

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和5年度研究報告書

研究課題名	低線量長期被ばくマウスおよび細胞の超高感度変異検出に基づく放射線影響と変異誘発機構の解析
令和5年度研究期間	令和5年4月3日～令和6年2月29日
研究期間	令和3年度 ～ 令和5年度（3年目）

	氏名	所属機関・職名
主任研究者	榎藤 洋一	東海大学医学部・客員教授
分担研究者	松本 義久	東京工業大学科学技術創成研究院・教授
分担研究者	角山 雄一	京都大学環境安全保健機構・准教授
若手研究者		

キーワード	低線量率被ばく、遺伝的影響、次世代リスク評価、ゲノム解析、モデル構築
-------	------------------------------------

本年度研究成果
I 研究背景 高線量放射線被ばくによって変異が誘発され様々な健康被害が生じる。一方、100mSv 程度の低線量被ばくでは発がんは認められず、さらに、世代を越えて低線量率長期被ばくした場合のリスクについては、いまだに評価法もデータもない。そこで LNT モデルに基づき高線量データを低線量域にまで外挿して間接的に推測され、リスクが明らかになるまではなるべく被ばくしないという 1950 年に提唱された国際防護基準が、21 世紀の今日でも ALARA の原則として最新の ICRP 主勧告¹⁾でも提唱されている。すなわち、低線量率長期被ばくの次世代影響を、直接、高精度に検出できるリスク評価法の確立と、科学的エビデンスに基づく防護基準の見直しが喫緊の課題となっている^{2,3)}。 II 目的 福島地域における残留放射線と同程度の低線量率において長期生涯被ばくしたマウスモデルに誘発される変異を非被ばくコントロール群の変異(=自然変異)と比較解析し、低線量率放射線の長期被ばくによる高精度リスク評価系確立を目的とする(榎藤班)。また、マウス実験結果のヒトへの橋渡しのため、ヒト培養細胞およびマウス培養細胞にも同様の低線量率長期被ばくを実施し、誘発変異を比較解析する(松本班)。得られる実験データを用いて、ヒト vs マウス、個体 vs 培養細胞、生殖系列細胞 vs 体細胞など包括的に応用できる数理モデルを開発する(角山班)。3 班からなる異分野間連携により、低線量率長期被ばくのリスクの超高感度実験検証とモデル化が世界ではじめて可能となり、次世代への影響について科学的エビデンスを得る。本研究から得られるデータから解析結果まで全て公開し、放射線被ばくの安全基準や汚染廃棄物の安全性評価など、国際的な科学的議論に貢献する。

III 研究方法

榎藤班：独自に提唱した多世代にわたる変異蓄積と最新ゲノム解読法を駆使する拡張トリオ解析法⁴⁾を用いる。すでに、環境科学技術研究所(IES)被ばくマウス飼育施設において、福島の主たる残留放射線源でもある ^{137}Cs ガンマ線照射により、0.05mGy/日、1mGy/日、20mGy/日および非照射群の4家系マウス群の全ゲノム解読を2022年度に完了したので2023年度にはパイオインフォーマティクス解析を駆使して誘発変異検出を行った。東海大(TOKAI)では、 ^{22}Na ガンマ線 0.15mGy/日の線量率で被ばくしたマウスの全ゲノム解読から誘発変異を非照射コントロール群との比較により2022年度にすでに検出しているので、IESおよびTOKAI実験結果を2023年度には総合的に比較解析し、低線量率長期被ばくの影響を明らかにする。なお、動物実験を実施した東海大学および環境科学技術研究所では、それぞれ、実施にあたってそれぞれの研究機関において、動物実験従事者登録及び動物実験課題承認を得て行なった。

松本班：実験できないヒトへの影響を明らかにするため、2023年度はヒト培養細胞と二段階クローン集団作製法を用いて、低線量率被ばくしたヒト培養細胞を、WGS法を用いて解析し、ヒトへの橋わたしとなる解析法確立を進めるとともに変異を検出する。低線量率(0~20mGy/日)連続照射条件下での解析に加え、高い線量・線量率での照射(X線1Gy/min、1分照射、原子炉での γ 線0.2Gy/h、中性子0.2Gy/hで2.5時間照射)も行い、結果を比較検討する。

角山班：線量率と被ばく時間を変数として含めたリスク評価する数理モデルWAM⁵⁾をすでに開発し、中線量率から高線量率では様々な生物種で有効に被ばくリスクが推定できることを示した。2023年度には榎藤班および松本班から得られるマウス個体および培養細胞における低線量率長期被ばくデータを数理モデルWAMに応用し、モデルの一般性・有効性の検証を低線量域で進める。

IV 研究結果、考察及び今後の研究方針

榎藤班：TOKAIおよびIES実験あわせ4000を超える一塩基置換変異(SNV)を検出した。4世代自然変異を蓄積したTOKAIとIESの非照射群ではそれぞれ24.58($\pm 1.20\text{SE}$)SNV/マウス/世代および24.77($\pm 0.53\text{SE}$)SNV/マウス/世代と再現性の高い結果が得られ、既報告のマウスの自然変異率⁶⁾とも合致した。またTOKAIの0.15mGy/日およびIESの0.05mGy/日、1mGy/日被ばく群では非照射群と全く有意差がなかった。一方、20mGy/日ではメスが不妊となりオスのみ長期生涯被ばくさせたにも関わらず3世代の変異蓄積によって、コントロール群24.61($\pm 0.78\text{SE}$)SNV/マウス/世代に対し、32.89($\pm 1.91\text{SE}$)SNV/マウス/世代と顕著な有意差($p=0.005$)が検出された。SNVが有意に誘発された実験データとしては、これまででもっとも低い線量率である。

松本班：ヒトNB1RGB細胞株の分裂回数および平均倍加時間を得て、一次クローン形成時の分裂回数を計画の10~13回から8回程度に減らし、二次クローンを 10^6 細胞程度に増殖しただけでも変異抽出が可能であることを示し、当初計画より高速な二段階サブクローニング解析手順を確立した。さらに、WGS解読データから変異を抽出し、既報告の培養細胞変異率⁷⁾と同等の結果を得た。また、ヒトTK6培養細胞を用いたX線および γ 線・中性子照射による結果も含め統計的有意差は検出されず、マウス実験と比べ被ばく期間が短いことが要因の一つと考えられた。

角山班：放射線防護目的で採用されているLNTモデルでは生じた変異は時間及び被ばく量に比例して増加するモデルである。一方、角山班が提唱するWAMモデルは、生体の変異細胞除去能など考慮し、変異が時間軸と増加した変異に依存して減少する項を含む点で大きく異なる。榎藤班において本研究で得た低線量域の変異データと、Russellらによって得られていた高線量域のSLTデータ⁸⁾の、両

方のデータを統一的に説明し、WAM モデルの有効性ととも、閾値なしを仮定する LNT と異なり、閾値存在の可能性を示した。3 班の成果はすでに国際誌^{9,10)}および国際会議^{2,3,11~20)}で発表した。今後、低線量率長期放射線被ばくのリスク評価データと解析法として原著論文として公開するとともに ALARA の原則に代わる放射線防護基準を検討するための、実データに基づく科学的議論を国際的に開始することを提唱する。

V 結論

大規模かつ高精度な次世代リスク評価を 3 年という短期間で実施できた。放射線の低線量・低線量率曝露による遺伝子変異に閾値が無い LNT モデルが定説となっているが、これを見直すことを示唆する実験的・理論的基盤を確立した。実験試料から、解析方法、オリジナルデータまで全て公開することから、エビデンスに基づく科学的議論が期待できる。

引用文献

1. ICRP. The 2007 recommendation of the International Commission on Radiation Protection. Annals of the ICRP, ICRP Publication 103, 2007; Vol. 37.
2. Gondo Y, Uchimura A, Yoneya M, et al. A multidisciplinary challenge to assess the next-generation risks of low-dose-rate long-term gamma-ray exposure by whole-genome sequencing in the mouse model, ICRP2023: 7th International Symposium on the System of Radiological Protection, 8 Nov 2023; Tokyo, Japan
3. Gondo Y, Uchimura A, Yoneya M, et al. Toward a new risk assessment system for low-dose/low-dose-rate long exposure to radiation, BEAR2024: Biological Effects & Application of Radiation, 15 March 2024; Tokyo, Japan.
4. Gondo, Y. Detection of transgenerational genetic effects based on whole-genome sequencing in the mouse model. Radat. Prot. Dosimetry 2022; 198, 1137-1142
5. Tsunoyama Y, Suzuki K, Masugi-Tokita M, et al. Verification of a dose rate-response dynamic equilibrium model on radiation-induced mutation frequencies in mice, Int. J. Radiat. Biol., 2019; 95, 1414-1420
6. Uchimura A, Higuchi M, Minakuchi Y, et al. Germline mutation rates and the long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice. Genome Res. 2015; 25, 1125-1134
7. Millholland B, Dong X, Zhang L, et al. Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice, Nat. Commun., 2017; 9, 15183
8. Russell WL, Kelly EM. Mutation frequencies in male mice and the estimation of genetic hazards of radiation in men, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982; 79, 542-544
9. Bando M, Onoue Y, Tsunoyama Y, et al. Example of the misleading results caused by LQ model in calculating the fractionation effect in radiation therapy, Ann. ICRP, 2023; 52(1-2), Annex, 17-21.
10. Bando M, Tsunoyama Y, Suzuki K, et al. Proposal of See-Saw model - overcoming LQM difficulty, Ann. ICRP, 2023; 52(1-2) Annex, 276-282.
11. Bando M, Tsunoyama Y, Yonekura Y, et al. MRG data that revolutionizes the fundamentals of radiation protection over 100 years and the theoretical reproduction and interpretation by the WAM model, ICRP2023: 7th International Symposium on the System of Radiological Protection, 6 – 9 Nov 2023; Tokyo, Japan
12. Toki H, Gondo Y, Uchimura A, et al. Statistical analysis of low dose mouse experiments with WGS technology and quantitative reproduction of mutation frequency using Whack-a-Mole model, ICRP2023: 7th International Symposium on the System of Radiological Protection, 6 – 9 Nov 2023; Tokyo, Japan
13. Milai E, Tsumbuukhuu D, Sugihara T, et al. Whole genome sequencing-based analysis of low dose rate radiation-induced mutations in normal human fibroblast NB1RGB in culture, ICRP2023: 7th International Symposium on the System of Radiological Protection, 6 – 9 Nov 2023; Tokyo, Japan
14. Matsumoto Y, Enkhbaatar M, Tsumbuukhuu D, et al. Mutation analysis of human cells in culture through whole genome sequencing, BEAR2024: Biological Effects & Application of Radiation, 15 March 2024; Tokyo, Japan.
15. Tsunoyama Y, Bando M, Gondo Y, et al. Exploring the range of “background radiation dose-rates” based on the WAM model estimation and the results of the base substitution analysis in long-term irradiation experiments on mice, BEAR2024: Biological Effects & Application of Radiation, 15 March 2024; Tokyo, Japan.
16. Gondo Y and Kimura M. Simple and effective gamma-ray exposure system for low-dose-rate long exposure to mice, BEAR2024: Biological Effects & Application of Radiation, 15 - 17 March 2024; Tokyo, Japan.

17. Milai E, Tsumbuukhuu D, Matsuda T, et al. Whole genome sequencing analysis of X-ray and nuclear reactor irradiation-induced mutations in human lymphocyte TK6 in culture, BEAR2024: Biological Effects & Application of Radiation, 15 - 17 March 2024; Tokyo, Japan.
18. Milai E, Tsumbuukhuu D, Sugihara T, et al. Whole genome sequencing analysis of spontaneous and low dose rate radiation-induced mutations in human fibroblast NB1RGB in culture, BEAR2024: Biological Effects & Application of Radiation, 15 - 17 March 2024; Tokyo, Japan
19. Tsunoyama Y, Bando M, Gondo Y, et al. Fit values by the WAM model to SNV analysis results in low-dose - rate irradiated mice, BEAR2024: Biological Effects & Application of Radiation, 15 - 17 March 2024; Tokyo, Japan
20. Bando M, Tsunoyama Y, Gondo Y, et al. Suggestions of the latest data on genomic mutations induced by low-dose radiation – the steady state, BEAR2024: Biological Effects & Application of Radiation, 15 - 17 March 2024; Tokyo, Japan