

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和3年度～令和5年度実施総括報告書

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
研究期間	令和3年度 ～ 令和5年度（3年間）

	氏名	所属機関・職名
主任研究者	権藤 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		

1. 研究の概要

低線量放射線リスクを科学的に検証できないことを踏まえ 1950 年提唱の「LNT モデルを採用しリスクが明らかになるまで可能な限り被ばくしない」という基本方針が、70 年以上変わらず、最新の ICRP の放射線防護主勧告¹⁾でも明記されている。本研究では遺伝学、ゲノム学、情報学など分野融合研究班を組織し、低線量および低線量率放射線がもたらす超高速高精度リスク評価系を開発した。権藤班では明確な被ばく条件に基づくマウスモデル系を確立した。4000 を超える一塩基置換(SNV)を検出し、20mGy/日ガンマ線×300 日が次世代に SNV 誘発することを世界で初めて実証した。松本班はヒトへの橋渡しのためヒト培養細胞系と二段階クローン集団作製法を用いるリスク評価基盤を独自に確立した。角山班では「生じた変異が減少する項」を含む独自の WAM 数理モデル²⁾が、既報告の高線量被ばくデータから、権藤班が得た低線量/低線量率被ばくデータまで統一的に説明できることを初めて示した。すでに ICRP はじめ国際会議の招待講演依頼を受け、国際放射線防護基準の次回再検討に向け、とくに低線量および低線量率放射線がもたらすリスク評価に、初めて科学的データとエビデンスを与える解析系として着目されている。本研究で得られた結果の再現性を必要に応じて検証できる様、データや試料も保存アーカイブ化し、科学的議論や信頼性を担保できる基盤も整備した。この革新的なリスク評価系確立は最先端「全ゲノム解読 WGS」が鍵となった。ゲノム解析技術は 1 分子/1 細胞解析など精度と費用対効果が急速に高まりつつあり、新技術が利用可能となり次第、保存アーカイブしたデータや試料を用いることで、数年の時間を要する交配や実験をすることなく新たなデータを得ることができる。そのため、本研究では結果だけでなく、生データから試料まですべてオープンに公開することを提案している。
--

2. 研究期間内に実施した内容

年目／実施年度	実施した内容
1 年目	権藤班:環境科学技術研究所にて、非照射、0.05、1.0、20mGy/日低線量率の生涯長期被ばく 4 家系から G2 世代マウス群が得られた (IES 実験)。東海大学で先立
令和3年度	

	って進めていた非照射と 0.15mGy/日被ばく群からは、延べ 400 日ほど生涯被ばくした家系から G4 世代マウス群が得られ、全ゲノム解読(WGS)を完了した (TOKAI 実験)。国内³⁾ および国際会議⁴⁾にて、低線量率長期放射線被ばくリスク評価を可能にする「拡張トリオ法」を招待講演にて提唱した。松本班:培養細胞実験を通して、ヒトへの橋渡しを行うために、ヒト正常線維芽細胞株 NB1RGB の低線量放射線誘発変異解析を開始した。独自に着想した二段階クローン集団作製法を行い、第 1 段階クローン細胞群のゲノム DNA を抽出し WGS を完了した。角山班:長らく ICRP 防護基準の礎である「誘発変異は蓄積される一方とする閾値なし LNT/LQ モデル」に対し、「時間や世代とともに変異が減少する項を加えた WAM 数理モデル」を提唱し、放射線影響の包括的理解を進めてきた。新たにがんの放射線治療データに WAM モデルがよくあてはまることを示し⁵⁾、宇宙飛行士における染色体異常の実データにも応用を試み⁶⁾、ICRP 国際会議で招待講演した⁷⁾。LNT モデルと ALARA 原則に基づいて科学的エビデンスが欠落したまま 70 年以上提唱されている ICRP による国際放射線防護基準勧告の見直しに向け、新しいモデルとして期待が寄せられた。以上より、WAM 理論を、次年度以降に得られる権藤班、松本班の実験データに応用することで、これまでリスク検証方法や実データがなく、理論モデルの検証さえも不可能だった低線量率長期放射線被ばくによるリスク評価について、権藤班/松本班/角山班、異分野連携による 3 班共同で実データと科学的エビデンスを提供できる目処が立った。
2 年目	権藤班 :低線量率放射線リスク評価を可能とする拡張トリオ法を論文発表した ⁸⁾ 。
令和 4 年度	TOKAI 実験では、0.15mGy/日で生涯被ばくと非被ばくの G4 マウスからそれぞれ平均 95.2(±6.2SE)個と 100.4(±14.8SE)個の一塩基置換変異(SNV)を検出し提唱法の有効性を実証した。その結果、この低線量率長期被ばくでは有意な影響は検出されなかった。IES 実験では、非照射、0.05mGy/日、1mGy/日から G4 世代マウス(IES1)を、また、非照射、20mGy/日からは G3 世代マウス(IES2)の WGS を完了した。松本班:個体 vs 細胞、マウス vs ヒトの橋渡しのため、ヒトとマウスの細胞を用いて、WGS による変異解析を行った。まず、前年度非照射、1mGy/日、20mGy/日で 3 週間培養したヒト線維芽細胞の 1 細胞由来クローンのデータの変異抽出解析を行った。その結果、1 クローンあたり 750-1200 個の SNV、約 2500 個の小さな欠失挿入変異(small INDEL)を検出した。照射と非照射間での有意差は検出されなかった。また、権藤班の WGS 完了マウスから胎仔線維芽細胞を樹立し、非照射、1mGy/日、20mGy/日で 2 週間培養後、WGS を実施した。角山班:動植物への放射線照射実験における遺伝性影響に関する線量率応答数理モデル「WAM モデル」を基盤とし、種の違いや生殖細胞と体細胞の別をも説明し得る包括的モデルの構築を検討した。この過程において、線量率を変えて照射したマウスにおける脾臓中のリンパ球の染色体異常発生頻度に関する実験データに着目し、WAM モデルの拡張を試みた。結果、このデータに関しては単なるパラメータ調整のみでは適用不可能であり、新たなモデル構築が必要であることが判明した。新たな数理モデルの候補として、一定数の臓器細胞を異常細胞と正常細胞とが奪い合うモデルを提案した。

3 年目	権藤班: WGS 解読した個体の性差の影響がなく直接比較可能な常染色体 SNV に
令和 5 年度	焦点をあて、初代 G0 ペアと末代 42 マウスから検出した総数 3,927 個の SNV の詳細な解析結果を国際会議にて招待講演として発表した^{9,10}。1mGy/日の線量率までは全く統計的有意差は検出されなかった。一方、20mGy/日被ばくではコントロールと比較して顕著な有意差($p<0.005$)が検出され、世界で初めて低線量率長期被ばくによる誘発 SNV の発見となった。WGS 解析を行ったゲノム DNA サンプルとともに生涯長期交配被ばくによって得られたマウスもバイオリソースとして凍結保存アーカイブ化した。松本班:ヒト線維芽細胞株とヒトリンパ球細胞株を用いて二段階クローン集団作製法による放射線誘発変異検出系を確立し国際会議にて発表した¹¹⁻¹⁴。マウス個体では有意差が得られた 20mGy/日でも培養細胞系では有意な放射線影響は検出されず、被ばく期間が短いことがその理由として示唆された。また、精子や卵形成時の変異率/細胞分裂に比べ、両細胞株では変異率が 10 倍ほど高く、生殖細胞と体細胞では大きく異なることが示唆された。角山班:様々な生物種、放射線がん治療、宇宙飛行士における被ばく影響を WAM モデルを用いて解析を進めるとともに、権藤班が WGS で検出した変異データを数理モデル化することに成功し国際誌^{15,16}および国際会議¹⁷⁻²¹)で発表した。1980 年までに得られていたメガマウスプロジェクトのデータと権藤班 WGS データを統一的にモデル化できた上、WAM 数理モデルから、1mGy/日以下に閾値があることを示唆するデータが得られ、LNT モデルが 1mGy/日以下の低線量率では当てはまらないことを示唆した。また、国際会議を開催し、3 年間で得られた結果を広く公開するとともに海外からの参加者も含め実データに基づく科学的議論を深めた。 なお、全研究機関を通して、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。

3. 研究終了時に得られた結果・結論

① 研究結果・結論（総括）・成果など

独自に提唱した拡張トリオ法を用いることで、これまで全く解析法もデータもなかった低線量率放射線長期被ばく影響を実験実証できる超高速高精度な放射線リスク評価法を確立した。Russell らの SLT 法では 30 年で 531,500 匹のマウスの観察から 28 個のコントロール変異検出をバックグランド値として初めて大規模に次世代へのリスク評価を示した²²⁾のに対し、権藤班の拡張トリオ解析では 3 年と 19 匹のマウスから 1,781 個のバックグランド変異をリスク評価の基準として検出した。単純計算で、SLT 法と比較して、WGS 法では 1780 万倍(= 30 年/3 年×531,500 匹/19 匹×1781 変異/28 変異)の高効率を達成した。この計算には、要した人手、解析費用、解析施設設備などは加味されていないので費用対効果を含めると少なくともさらに 100 倍は効率が高まる。また、計画段階で、バックグランド変異検出数はそれまでの実績から個体当たり世代あたり 14.2 個と想定し、その実験誤差(SE)を最小限にすることがわずかな誘発変異を検出する鍵となることを明記していた。本研究では非照射 19 匹の WGS データから世代あたり個体あたり平均 25.43(±0.65SE)の SNV 変異を検出し、当初計画の 1.79 倍の SNV 変異を検出した上に、異なる研究機関で独立に実施しても極めて再現性の高い超高精度なリスク評価系であることを明らかにした。この結果、1mGy/日×400 日の被ばくでは全く有意な誘発

変異が検出されない一方で、20mGy/日×300 日において世界で初めて低線量率長期被ばくによる有意な SNV 検出につながった。ヒトへの橋渡しとなるヒト培養細胞系においても松本班が独自の二段階クローン集団作製法を確立し、既報のヒトやマウスのバックグランド体細胞変異と同等の結果を得るとともに有意な放射線影響は検出されなかった。角山班では、生じた変異が減少する項を含む独自に開発した数理 WAM モデルを用いると、権藤班によって低線量/低線量率変異実測データと、高線量域における Russell らの SLT 実測データを統一的に説明できることを示し、LNT モデルの棄却と閾値の存在を示唆した。生データや試料までアーカイブ化公開し、実験結果の再検証はもとより、新解析技術が利用可能となり次第、即座に実験データを得ることができるゲノム解析基盤も整備した。総合的に、今回の研究から一塩基置換を指標とした研究がリスク評価に有用であることが明らかとなった。

② 計画・目標通り実施できなかった事項とその理由

マウスや培養細胞を用いた実験研究のため、マウスが生まれない、また、細胞が予定通りに分裂しないなどのトラブルに初年度から対応を迫られた。予め、必要な予備実験やバックアップを用意し計画立案したものの、人手、スペース、予算の制限を超えた準備は難しかった。また、マウスを必要以上に増やすことは、動物実験の「使用数の削減 reduction」の原則にも相反する。幸い、申請以前に、低線量放射線被ばくでは、高線量急照射被ばくでみられる「一時的不妊」現象がなく、生涯被ばくさせても交配出産できることを示し、計画の根幹をなす多世代に渡って長期常時被ばくさせ得る証明するための予備実験を別途事前に進めていたため、その予備実験マウスから得られたマウス群を用いて初年度の WGS が可能となり、問題を回避できた。また、2 年目に入り、20mGy/日被ばくで生まれた G2 メスが全て不妊となり G3 マウスが得られないことが判明した。幸い G2 オスには問題なく、非照射家系の G2 メスと変則的に交配することでこの問題を回避し、IES2 マウスが得られた。さらには、サンプルの取り違いといった単純なトラブルから、松本班でもマウス初代培養細胞株が予定通りに分裂しない問題や、角山班でも他のデータセットでは WAM モデルの調整が必要なデータがあるなど、当初計画のタイムテーブルの変更を度々迫られた。また、産出した全てのマウスを凍結保存アーカイブする予定であったが、超低温フリーザーのスペースが不足し処分せざるを得ないマウスが生じた点も計画通りに進まなかった。こういった問題も、これから低線量率長期放射線被ばく影響を多くの研究機関や研究室で広く大規模に進めていくうえでは貴重かつ有用なトラブルシューティングとなる。データや試料の公開に加え、3 班が 3 年間の研究期間に遭遇したトラブルとその解決過程も広く公開する。

③ 当初の計画で予定した成果以外（以上）に得られた事項

バックグランド変異を極めて再現性よく検出したため、顕著な統計的有意差まで得た。要因は、1) ゲノムの 40%強から SNV 検出する情報解析法を当初計画していたが、内村研究協力員独自のインフォーマティクスパイプライン²³⁾導入により、同じ WGS データから平均 80%の SNV 検出が可能となり検出 SNV 数がほぼ倍増した。2) 従来の変異解析ではサンプルごとの実験誤差が大きいためなかなか統計的有意差が検出されなかったが、本研究では TOKAI と IES の全く異なる実験施設で独立に実施した解析にも関わらず、各施設内でも両施設間でも非照射群の実験誤差が極めて小さいことがわかり、統計的に超高感度な放射線リスク検出系を確立できた。この 2 点が当初計画を大きく上回る成果につながった。また、TOKAI および IES のバックグランド変異率は、内村が 2015 年に発表した自然

変異率²³⁾とも合致し、統計解析の精度の高さに加え、確立した方法の再現性の高さも実証した。この大規模高精度な実験データを角山班の WAM 数理モデルに応用したところ、Russell らの高線量データから、従来の LNT モデルでは説明不可能だった低線量/低線量率データまで広く統一的に説明できることも当初計画を越えて示した。マウス実験データセットから 1mGy/日×400 日長期生涯被ばく交配を続けても顕著な誘発変異は検出されず、20mG/日×300 日長期生涯被ばく交配において顕著な有意差($p<0.005$)が得られた結果に、WAM 数理モデルを応用したことで、LNT モデルは低線量/低線量率域では当てはまらず、閾値が存在する可能性まで当初計画を越えて示唆することができた。さらに、本研究成果を基盤として、若手である角山分担班代表を主任研究者として 2024 年度から本研究を発展させる新規課題が採択され今後継続的に進めていく体制と研究資金も当初計画を越えて得られた。

4. 研究成果の活用方策の提案

本研究をさらに発展させる新たな研究や事業化の提案

確立した超高速高感度な放射線リスク評価法を用いて、閾値が存在するか、データポイントと精度を上げて精査し、科学的裏付けなしに長く放射線防護の基盤とされてきた「LNT モデルと ALARA の原則」の実験検証を提案する。とくに、低線量/低線量率域で実測データがなく LNT モデルを外挿して推定されてきた線量・線量率効果係数(DDREF)や生物学的効果比(RBE)も、LNT モデルを用いることなく実測可能となった。WGS 法では、バックグラウンド変異率が高い再現性で得られたことから、その値を倍増させる倍加線量率 doubling dose (DD)の高精度な推定も可能となり、異なる放射線被ばく条件の比較に留まらず、様々な化学変異原についても、LNT モデルを仮定することなく直接 DD 値を実測して比較することが可能となった。放射線を含め様々な環境変異原について「正しく恐れる」ための実測データに基づく科学的議論が可能となる。また、本研究では、SNV を指標として放射線影響を検証したが、データや試料は保存アーカイブ化しており、高線量放射線で誘発されるとされる欠失、転座、逆位などの大きな構造変異を含め、最先端ゲノム解析系で検出可能となり次第、すぐに着手できる基盤が整えており、公的資金に基づく生データから研究資料までバイオバンク化と公開を提案する。本邦において得られた成果を基盤として放射線被ばくリスク評価の国際標準プロトコルを確立し、UNSCEAR の科学的検証や ICRP 次回勧告における放射線防護基準の見直しに向け国際貢献できる。それぞれの解析機関や研究室において、国際標準プロトコルが着実に実現されているか評価するための標準サンプル試料も、再現性と信頼性の高いデータ取得には必須であり、アーカイブ化したサンプルの保存と公開はこの点でも国際的に大きく貢献する。ヒトを含む種間比較や野生生物への影響解明も提案したい。

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. 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
3. 権藤洋一. 特定座位テストから見える変異、WGS から見える変異、未だ見えない変異. 日本遺伝学会第 93 回大会ワークショップ WS5, 9 Sept 2021; Online invited presentation.
4. Gondo Y. Detection of transgenerational genetic effects based on whole genome sequencing in the mouse model. International Symposium on Environmental Dynamics of Radionuclides and Biological Effects of Low Dose-Rate Radiation, 28 Sept. 2021; Aomori, Japan
5. Bando M, Tsunoyama Y, Suzuki K, et al. WAM to SeeSaw model for cancer therapy – overcoming LQM difficulties, *Int. J. Radiat. Biol.*, 2021; 97, 228-239
6. 角山雄一, 土岐博, 坂東昌子. 宇宙飛行士の染色体異常と WAM モデル, 第 3 回日本放射線安全管理学会・日本保健物理学会合同大会, 2 Dec. 2021; オンライン口頭発表
7. Tsunoyama Y, Toki H, Bando M. A proposal for the application of mathematical models that accurately approximate measured data to radiation protection, ICRP Digital Workshop: the Future of Radiological Protection, 9 Dec. 2021; online invited oral presentation
8. Gondo Y. Detection of transgenerational genetic effects based on whole genome sequencing in the mouse model, *Radiat. Protec. Dos.*, 2022; 198, 1137-1142
9. Gondo Y, Arikuni U, 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, 8 Nov. 2023; Tokyo, Japan
10. 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
11. 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
12. 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.
13. 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.
14. 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
15. 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.

16. 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.
17. 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
18. 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
19. 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.
20. 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
21. 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
22. Russell WB, Kelly M. Specific-locus mutation frequencies in mouse stem-cell spermatogonia at very low radiation dose rates, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982; 79, 539-541
23. 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