

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和 4 年度～令和 6 年度実施総括報告書

研究課題名	セシウム 137 による慢性的低線量内部被ばくマウスの体細胞・生殖細胞における DNA 塩基配列への影響－全ゲノム解析による継世代影響の統計解析－
研究期間	令和 4 年度～令和 6 年度（3 年間）

	氏名	所属機関・職名
主任研究者	中島 裕夫	大阪大学核物理研究センター・特任教授
分担研究者		
若手研究者		

1. 研究の概要

これまでの原爆^{1,2)}や医療被ばく^{3,4)}による疫学的調査においては、次世代への影響が認められていない。さらに、原爆被爆者⁵⁾やチェルノブイリ原発事故除染作業員⁶⁾の子供の全 DNA 塩基配列変異の調査においても次世代への影響は認められていない。しかし、それにもかかわらず、被爆 2 世への遺伝性影響の存否に関しては地方裁判所で係争した経緯があり、福島原発事故においても、遺伝性影響が憂慮されることとなっている。このようなことから福島原発事故での遺伝性影響の懸念が社会通念的に認められてしまうことは、遺伝差別への大きな流れにもなりかねず憂慮される事態である。このような憂慮をできる限り小さくすることが喫緊の課題と考えられる。

これまでの、放射線健康管理・健康不安対策事業で行った研究の報告は、当時、解析費用が高額であったため、多世代中の異なる 6 つの任意世代のそれぞれ 1 匹の全ゲノム解析データを各世代で比較して、セシウム投与群と対照群間で差がないことを示したものであったが、各世代における統計学的な脆弱性は否めない。しかし、昨今は、この解析費用が低額になったことで、1 世代 3 匹以上のマウスサンプルを使い、各世代で、さらに詳細な、また統計学的に充分耐えられる解析を行うことが可能となった。そこで、本研究の目的は、セシウム 137 水を飲ませながら世代交代を 40 世代以上行ったこれまでの受託研究で集積し、冷凍保存したマウスサンプルをもとに全ゲノム解析を行い、セシウム 137 の内部被ばくによる 1 世代あたりの無作用量の範囲を統計学的に耐えうる数値として示すことにある。

また、本研究の方法が確実に遺伝性変異をとらえることが可能である方法であることと、他系統のマウスでも再現性があるかを確認することにある。

研究協力者：大野みずき（九州大学）、日高京子（北九州市立大学）、鷹野典子（九州大学）、土岐博（大阪大学）、藤原智子（大阪大学）

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	セシウム 137 水（100,000 Bq/ℓ 飲水）を飲料水として飲み続け、慢性的に低線

令和4年度	量・低線量率内部被ばくを続けた A/J 系統マウス子孫への遺伝性影響を調べるために、同じ親由来のセシウム 137 群と対照群（セシウム 137 水を飲まずに世代交代した群）の全ゲノム解析を行ってきた。その結果、両群間の 1, 2, 5, 18 世代間では差が認められていない。しかし、20 億塩基対を超える塩基数を調べているとは言え、各群 1 匹のサンプル解析であるために統計学的脆弱性がある。そこで、令和 4 年度は、解析世代のサンプル数を増やし、より詳細な統計解析を行うことを目的として、凍結保存されていた第 25 代目の各群 3 匹ずつ（セシウム 137 群のマウス番号 1137, 1138, 1139 と対照群のマウス番号 907, 908, 909）の肝組織を用いて、理研ジェネシス株式会社に委託による全 DNA 配列解読を行った（Illumina 社 NovaSeq6000 を使用し、取得データ量：約 90 Gb(original fastq file にて)/検体、リード長：150 bp 以上のペアードエンドの条件）。 この解析によって、これまでの 1 匹 A/J マウスサンプルによる全ゲノム解析結果は大きなエラーバー（ポアソン誤差）であったが、3 匹による狭いエラーバーのグラフを完成させることができ、統計学的に精度の高い DNA 1 塩基変異率を示すことができた（図 1）。そして、25 世代目においても対照群とセシウム 137 群との間には、1 塩基変異率に有意な差がないことがわかった。 また、発がんの定量のために選ばれた A/J マウス系統とは、異なったマウス系統での影響を調べて比較するために、同時並行にて全ゲノム解析のリファレンス系統である C57BL/6J マウス（B6）での全ゲノム解析を開始した。
2 年目	令和 5 年度は、B6 マウス系統で DNA 修復系の欠損した放射線高感受性の <i>Msh2</i>
令和 5 年度	遺伝子改変マウスを用いて A/J マウスと同様の実験を試みた。 これまでの研究で、セシウム 137 水（2,500,000 Bq/ℓ）を 4 週間飲水させたとき（平均内部被ばく線量 76.7mGy）の体細胞突然変異率は、対照群に比べて有意（$p=0.038$）に高くなることがわかっている。そこで、体細胞突然変異が明らかに発生する同じ条件下での次世代影響を調べるため、同様に 4 週間セシウム 137 水を自由に飲ませた雄の <i>Msh2</i> 遺伝子改変マウス（<i>Msh2-KO</i>）と飲ませていない同系統のマウスそれぞれをセシウム 137 に曝露させていない雌の B6 マウスに交配してそれぞれの仔マウス 3 匹ずつを得た。また、<i>Msh2</i> 遺伝子が正常である雄の B6 マウスでもセシウム 137 水を飲ませたマウスと飲ませていないマウスを同様にセシウム 137 に曝露させていない雌の B6 マウスに交配して、それぞれの仔マウス 3 匹ずつを得た。これら 4 群の両親マウス、仔マウス 3 匹ずつのそれぞれについて、理研ジェネシス株式会社に委託し、全ゲノム解析を行った（Illumina 社 NovaSeq6000 を使用し、リード長：150 bp 以上のペアードエンドの条件）。

図 1 A/Jマウス25世代目の1塩基変異率

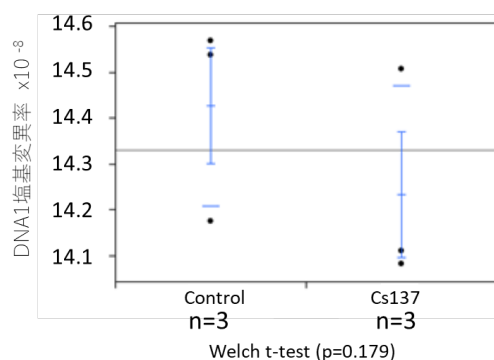


	図2 1塩基置換・挿入欠失数の比較 このことは、本実験系が、高線量・放射線高感受性マウスであれば、セシウム 137 水の内部被ばくによる DNA 塩基配列変異を十分に検出できる系であることを表しており、実験系として成り立っていることを示したことになる。	その結果、A/J マウスでは認められなかった 1 塩基置換数と挿入欠失数の有意な増加が高感度ミスマッチ修復欠損 <i>Msh2-KO</i> マウスにおいて認められた (図 2・左上)。しかし、A/J マウス実験の 25 倍量のセシウム 137 投与にもかかわらず B6 野生型のマウスでは、セシウム 137 群と対照群の間に 1 塩基置換、欠失挿入のいずれの変異も有意差が認められなかった (図 2・右上下)。
3 年目	令和 6 年度は、セシウム 137 水 (100,000 Bq / ℓ) を飲料水として飲ませ続け、慢性的に低線量・低線量率内部被ばく (1 世代平均 37mGy) させ続けた A/J 系統マウスの世代をさらに進めた 32 世代目の仔マウス各群 n=3 (セシウム 137 群のマウス番号 1384, 1385, 1430 と対照群のマウス番号 1112, 1113, 1114) による全ゲノム解析を行った。	
令和 6 年度	その結果、32 世代目においてもセシウム 137 曝露によって次世代で憂慮される対照群を上回る DNA 塩基配列変異の増加は認められなかった。しかし、セシウム 137 群の 1 塩基変異率が 32 世代目で、対照群に比べて有意に低くなっていることが認められた (図 3)。 次に DNA 修復系が正常な全ゲノム解析のリファレンスマウスである B6 系統での、A/J マウスと同じ実験を各群 n=2 で 10 世代目 (セシウム 137 群のマウス番号 205, 208 と対照群のマウス番号 660, 662) と 13 世代目 (セシウム 137 群のマウス番号 267, 270 と対照群のマウス番号 714, 716) と両群共通となる最初の両親 (雌 406, 雄 409) において行った。その結果、n=2 で統計学的には精度を欠くが、B6 マウス系統でも A/J マウス系統と同様な傾向を示すことがわかった。 令和 4 年度から令和 6 年度までの本研究では、共同研究するいずれの研究機関においてもヒトの個人情報、サンプル等を研究対象としていない。また、本実験の動物実験に関しては、大阪大学動物実験規程のもと、動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号: 第 動医 02-005-000 号、有効期限: 2025/03/31)。なお、放射性同位元素利用施設内での動物飼育については、大阪大学医学系研究科飼養保管施設等設置の承認を受け (承認番号 飼医 19-01-0 号)、放射性同位元素利用施設内での実験操作に関しては、大阪大学ラジオアイソトープ総合センター放射線障	図3 A/Jマウス32世代目の1塩基変異率 Welch t-test (p=0.006)

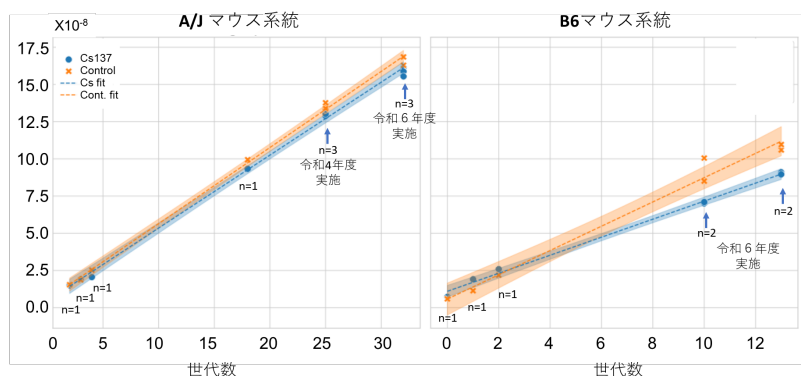
害予防規定を遵守して行った。

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

【結果①】セシウム 137 水を飲料水として飲ませ続け、慢性的に低線量・低線量率内部被ばくさせ続けた A/J 系統マウスの 25、32 世代目における対照群との全ゲノム解析の比較では、対照群を超えるような遺伝性影響は認められなかった。これまでの 1, 2, 5, 18 世代目と共に 25、32 世代目の共通ゲノム範囲 (2,142,886,829 塩基) の

図4 1塩基変異率 (SNV)



1 塩基変異率を図 4 に示す。A/J における回帰直線では、世代ごとに一定の割合で 1 塩基変異が蓄積しているが、セシウム 137 群が対照群を上回ることにはなかった。

世代の影響を考慮しながら、セシウム 137 群と対照群の差を検定する最も一般的な方法とされている線形混合効果モデル (LME) を使用して解析を試みた結果、A/J、B6 マウス共に世代が進むにつれてセシウム 137 群の 1 塩基変異率が対照群より有意に低くなっていることがわかった ($p < 0.05$) (図 4: 青帯線)。この結果については、今後を確認すべき課題と考えられた (後述)。

【結果②】DNA 修復系が欠損した放射線高感受性の *Msh2* 遺伝子欠損マウスの雄に、A/J マウス実験の 25 倍濃度のセシウム水を 4 週間飲水させた後、セシウム 137 に曝露させていない B6 系統の雌マウスと交配させて得た仔の全ゲノム解析を行った。

その結果、セシウム 137 水を飲水した *Msh2* 欠損雄マウス由来の仔では、対照群と比較して 1 塩基変異および挿入欠失変異の頻度が統計学的に有意に増加していることが確認された。一方、DNA 修復系が正常な B6 マウスの雄を用いた同様の実験では、対照群との間に有意差は認められなかった。

このことから、本研究における実験系は、DNA 塩基配列の変異を確実に検出できる系であると同時に、DNA 修復系が正常のマウスでは、本実験のセシウム 137 水濃度では、仔マウスに影響を与えないことがわかった。

【結論】本研究において A/J マウスに摂取させたセシウム 137 の濃度は、国際食品基準 (CODEX)⁷⁾ の 100 倍、日本の食品基準⁸⁾ の 1,000 倍、水の基準の 10,000 倍である。放射線による遺伝性影響があるとされている自然突然変異率がヒトとほぼ同じマウスですら、本実験におけるセシウム 137 水濃度では、多世代に渡って飲水しても遺伝性影響が認められなかった。このことから、日本におけるセシウム 137 の現行規制値以下の食品や水の摂取において、遺伝性影響に対する安心度は十二分に担保されていると言え、リスクコミュニケーションでの安心説明の一助に資せる。

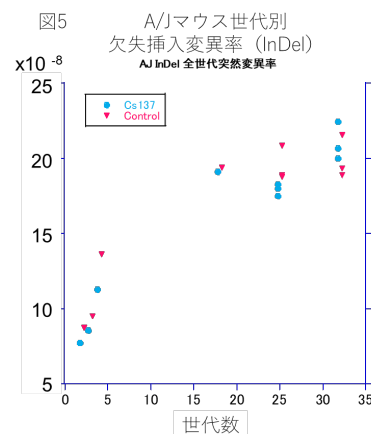
【成果】これまでの結果については、International Journal of Radiation Biology, 2024, Vol. 100, no. 11, 1560-1578 にて論文発表した (<https://doi.org/10.1080/09553002.2024.2400521>)⁹⁾。

② 計画・目標通り実施できなかった事項とその理由

当初の計画では、全ゲノム解析を 3 匹以上のマウスで行う予定であった。これまで 17 年間に渡ってセシウム 137 水を飲ませながら世代交代させてきた A/J (12 サンプル) を中心に、放射線高感受性の *Msh2* 遺伝子欠損マウスを用いて行った実験系の検証実験 (4 群のそれぞれの両親、各群の 3 匹の仔マウス計 20 サンプル) の全ゲノム解析については、計画通り $n=3$ の目標を達成できた。しかし、マウス全ゲノム解析のリファレンス系統である C57BL/6 の A/J と同様の実験では、系統維持の途中で 10 ペアでも子供を産まなくなる系統の断絶があり、新たに開始した世代交代にも時間がかかったために、0~13 世代までしか世代交代を進められなかった。また、C57BL/6 マウスの全ゲノム解析においては、できる限り多くの世代 (0, 10, 13 世代目) で解析を試みたために、各世代で 2 匹ずつ (合計 10 サンプル) の解析となった。

各世代の解析サンプル数を増やす必要があるかどうかの問題が残るが、解析した DNA の塩基数は、一匹のマウスでも約 22 億塩基対である。3 匹では約 66 億塩基対ほどになり、この数が変異率の分母になっているので、かなり信頼性が高いと考えており、費用対効果を考えると 3 匹でも十分と考えられる。

全ゲノム解析において、1 塩基変異率 (SNV) の結果とともに挿入欠失変異率 (InDel) についても統計処理を考えていたが、図 5 に見られるように各世代のプロットにかなりのばらつきが認められ、精度に欠けた。これは、解析におけるフィルター設定の問題か、以前から言われている短いペアエンドによる方法による検出能の低さからかの検証が必要である。高精度の InDel の検出には、長いペアエンドを用いた解析 (短いペアエンドの解析より高額) を行う必要があり、今後の新たな実験計画に期待したい。



③ 当初の計画で予定した成果以外 (以上) に得られた事項

セシウム 137 群と対照群の差を検定する最も一般的な方法とされている線形混合効果モデル (Linear Mixed-Effects Model, LME) を使用して得られた世代別 1 塩基変異率の推移の解析では、A/J、B6 マウスともに世代が進むにつれてセシウム 137 群の 1 塩基変異率が対照群より有意に下がることが認められた ($p < 0.05$)。このことは予想外であった。

低線量放射線影響として 1 塩基置換は、酸化ストレスによる寄与が大きい¹⁰⁾と考えられているので、慢性的低線量被ばくにより抗酸化ストレス、DNA 修復酵素などの代謝系の亢進などによる適応応答の可能性が考えられる。これまでの我々の研究で、低線量放射線により、腫瘍増殖抑制効果があること、抗腫瘍性免疫能が賦活されることがわかっていることから、発がん、突然変異などのような生体にとって害となる影響だけではなく、益となる未知の放射線防護機構 (酵素活性、異常細胞排除、放射線による何らかの防御機構のスイッチオン) が存在している可能性も期待できる。毒性の強い酸素を呼吸という代謝方法で解毒とともに、より効率的なエネルギー獲得を可能にした生物であることから考えると、太古から低線量放射線に曝露され続けている生物にとって、放射線に対する益的な生体反応が存在することは不自然ではなく、この仮説の検証の必要性が顕在化した。

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

本研究に用いた、放射線高感受性系統の結果から隠れた放射線高感受性のヒトへの影響が憂慮されるかもしれない。しかし、この実験のセシウム 137 水は 2,500,000Bq/l と到底ヒトが口にすることのない線量であることを付記したい。また、放射線感受性を示す多くの AT、XP、ナイミーヘン患者は、他の症状も併発していることから放射線高感受性者であることの判別は可能である。しかし、他の症状を呈しない隠れた放射線高感受性のヒトがどれくらい存在するかの調査は、今後の課題として必要と考えられる。

遺伝子への影響のない線量では、次世代影響として残る課題はエピジェネティックな影響の存否である。これまでの我々の報告では、低線量被ばくにより抗腫瘍免疫の活性化、遺伝子発現の消長に影響を与えていることから次世代へのエピジェネティックな影響の可能性が考えられ、今後の研究が望まれる。

微量放射線は体に影響がないとすることに対して懐疑的になるのが現在の一般市民の状況である。しかし、害である発ガンも、益であるがん治療も DNA が切断されなければ始まらない。どちらもミクロ的には、同じ反応経路の上にある。微量放射線の益害を考える上で重要なのは、生体内での効果を受ける部位と線量と影響の度合いの関係をj知ることである。

人々の放射線に対する懸念は、生後に与えられた情報によるものである。従って、放射線の健康影響にかかる新たな調査研究としては、低線量放射線のヒトへの影響が極めて低い点においても懐疑的となる根拠や、懐疑心の強さを決めている原因は何かを調べる大々的な事業が考えられる。

また、非日常的な放射線をいかに日常的なものにするかにおいては、一例として、放射線診断を行うときには、診断結果と共に被ばく線量も知らせることが挙げられる。このような制度設計は、今後の行政の課題と考えられ、その時、低線量の憂慮を取り除くための一助として本研究結果が利用されることを期待したい。

引用文献

- 1) Neel JV, Schull WJ, Awa AA, *et al.* The children of parents exposed to atomic bombs: estimates of the genetic doubling dose of radiation for humans. *Am J Hum Genet.*, 1990; 46(6):1053–1072.
- 2) Izumi S, Suyama A, Koyama K. Radiation-related mortality among offspring of atomic bomb survivors: a half-century of follow-up. *Int J Cancer.* 2003; 107(2):292–297. doi:10.1002/ijc.11400
- 3) Green DM, Kawashima T, Stovall M, *et al.* 2009. Fertility of female survivors of childhood cancer: a report from the childhood cancer survivor study. *J Clin Oncol.* 27(16):2677–2685. doi:10.1200/JCO.2008.20.1541
- 4) Winther JF, Olsen JH, Wu H, *et al.* Genetic disease in the children of Danish survivors of childhood and adolescent cancer. *J Clin Oncol.*, 2012;30(1):27–33. doi:10.1200/JCO.2011.35.0504
- 5) Horai M, Mishima H, Hayashida C, *et al.* Detection of de novo single nucleotide variants in offspring of atomic-bomb survivors close to the hypocenter by whole-genome sequencing. *J Hum Genet.* 2018;63(3):357–363. doi:10.1038/s10038-017-0392-9
- 6) Yeager M, Machiela MJ, Kothiyal P, *et al.* Lack of transgenerational effects of ionizing radiation exposure from the Chernobyl accident. *Science.* 2021;372(6543):725–729. doi:10.1126/science.abg2365
- 7) GENERAL STANDARD FOR CONTAMINANTS AND TOXINS IN FOOD AND FEED CXS 193-1995 Adopted in 1995 Revised in 1997, 2006, 2008, 2009 Amended in 2010, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2021, 2022, 2023. chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/fr/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS_193e.pdf
- 8) 食品中の放射性物質の対策と現状について、厚生労働省健康・生活衛生局 chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.mhlw.go.jp/content/001336143.pdf
(厚生労働省薬事・食品衛生審議会、食品安全委員会、放射線審議会平成 24 年 4 月に設定、令和 6 年 4 月 1 日以降；食品衛生基準行政は消費者庁に移管)。
- 9) Nakajima H, Ohno M, Uno K, *et al.* Effects of generational low dose-rate ¹³⁷Cs internal exposure in descendant mice. *Int. J. Radiat. Biol.*, 2024; 100(11): 1560–1578. <https://doi.org/10.1080/09553002.2024.2400521>
- 10) Meng, Q. M., Zaharieva, E. K., Sasatani, M. & Kobayashi, J. Possible relationship between mitochondrial changes and oxidative stress under low dose-rate irradiation. *Redox Rep* 26, 160–169 (2021). <https://doi.org/10.1080/13510002.2021.1971363>