

動物実験を用いた慢性的低線量内部被ばくによる突然変異と

発がんの非相関性のメカニズム解明

研究項目：未分化細胞に対する過酸化剤と放射線の損傷の量的相関関係解析およびセシウム線量推定と発がんの解析

分担研究者氏名（所属）石原 弘（量研機構、放医研、体内除染）

研究要旨

放射性セシウム内部被ばくによる生体影響評価を精細化するために活用可能な分子生物学実験による知見を公表することを目的として二つの研究を進めた。第一の研究は、DNA 損傷修復遺伝子に欠損を持つ Msh2(-/-)マウスの過酸化剤投与による小腸粘膜腫瘍モデルに適用可能とすることを目標として、マウス細胞における 2 種類の遺伝毒性指標を定量する技術を確立し、低線量の単発の外部被ばくと低線量率連続内部被ばくの線量と、過酸化剤濃度の関係を比較するために、本年度は、これまでに開発した被ばく線量依存性の遺伝毒性定量技術を、マウス個体から分離した細胞における定量分析に適用するための諸条件を決定した。第二の研究は、セシウムのドジメトリーに活用することを目標として、体内セシウムが循環する消化管経路において、腸粘膜組織におけるセシウムを滞留した細胞の存在確率および、細胞内-細胞外のセシウム濃度比を求めめるために、本年度は放射光解析による組織内セシウム分布解析のマイクロ定量技術開発に着手した。

キーワード：バイオドジメトリー、DNA 損傷応答 RNA、 γ H2ax、遺伝毒性、過酸化剤、微量金属分析

研究協力者

福津久美子（量研機構、放医研、線量評価）

I. 研究目的

東京電力福島第一原子力発電所事故で環境放出された放射性セシウムに対する食品および環境基準は科学的に安全性を十分に確保されたものである(注 1)。しかし実際は、これらが遵守されているにもかかわらず(注 2)、内部被ばくによる長期連続被ばく影響に関する曖昧さが過大に喧伝され、基準自体ならびにその遵守のための指導の正当性に齟齬が生じかねない。こうした状況に対して実験科学のできることは、実験事実を提示することにより放射線防護体系を補強することで、現行環境基準の合理性と正当性確保に寄与すること、そして放射線影響に関する茫漠とした不安の原因である、曖昧さを軽減する実験結果を提供することであろうと考えた。我々は原子力災害後

の不安の原因のうち、第一に低線量放射線の生体影響、第二に放射性セシウムの体内動態において、放射線感受性細胞への集中被ばくの原因となる特定細胞へのセシウム蓄積の無いことが証明されていないという曖昧さに注目し、それらの曖昧さ軽減を目的として、以下の研究計画 1 (過酸化剤用量と ^{137}Cs 内部被ばく線量の量的相関の解析)および研究計画 2 (腸管循環セシウムのドジメトリー精細化のためのセミマイクロ解析研究)を計画した。それぞれの研究目標は以下のとおりである。

1. 過酸化剤用量と ^{137}Cs 内部被ばく線量の量的相関の解析

原子力災害後に指摘されてきたことは、低線量・低線量率被ばく影響についての曖昧さである。疫学的に有意差のない現象を実験的に示すことは極めて難しい。総放射線線量が 10mSv 程度の極低線量被ばく、特に低線量率被ばくでは、ヒトなどの哺乳類細胞に実験的に観察可能かつ再現性の高い影響は限られる。その理由は、放射線の標的である DNA は生体に内在する過酸化剤や生体金属化合物などの内在性遺伝毒物によっても損傷を受け、これらの生理的変動や実験過程での混入による DNA 損傷の変動幅から、追加被ばくさせた放射線による DNA 損傷の有意な増加が判別し難いことによるものと予想される。この問題を解決するためには、複数の DNA 損傷指標を使用して、遺伝毒物のタイプごとに量的相関を求めることで、放射線影響を浮かび上がらせることが必要である。

筆者らは既にマウスの循環白血球細胞集団における $\text{Cdkn1a}/\text{Myc}$ RNA 比がマウスの被ばく線量に比例して増加すること、更に被ばく線量が 20mGy であっても有意に増加することを既に報告している(16, 17)。この比率は、循環白血球に含まれる微量な増殖能力を持つ白血球(Myc RNA+)あたりの DNA 損傷初期に誘導される RNA(Cdkn1a)の値であり、換言すれば DNA 損傷に対する細胞自身の応答の程度を測定していることになり、DNA 損傷の高感度指標のひとつである。本研究計画では、これに匹敵する感度を有するとともに、これとは異なる DNA 損傷プロセスを定量する指標を確立し、上述の方法と併用して、そして、 Cs137 内部被ばく量と、過酸化剤や生体金属などの内在性遺伝毒物用量の量的相関を示すことにより、低線量・低線量率放射線影響を定量化することを三年間の目標とした。

初年度はマイクロ分析に適した系列培養細胞である RAW264.7 細胞を使用して DNA 損傷量に比例して増加する gH2ax 指標の顕微定量技術を確立し、放射線・ β エミッター・過酸化剤の用量との相関を求めた。二年目にあたる本年度は、最終目標である放射線・ β エミッター・過酸化剤の比較分析のために、マウス個体から分離した細胞の RNA 指標および gH2ax 指標の同時定量技術を確立することを目的とした。

2. 腸管循環セシウムのドジメトリー精細化のためのセミマイクロ解析研究

放射性セシウムの体内動態は 1960 年代から研究が進められ、臓器レベルでの臓器被ばく線量評価の信頼性は高い(19)。ところが、その後の医学生物学研究はマイクロ化が進み、実際の発がんの原因となる標的細胞が臓器内に散在する半径数十マイクロメートルの幹細胞にあると信じられるようになった。そして、遷移金属が組織レベルで臓器内局在することが示されるようになると、アルカリ金属であるセシウムも臓器内に局在して幹細胞を被ばくさせるのではないかという想像が生ずるが、それを否定する実験結果が不在であり、曖昧さの要因となる。この曖昧さを軽減するためには、現代技術を使用してセシウムの臓器内における局在の程度を提示し、現在の臓器被ば

く線量評価の正当性を示すことにあると考えた。

従来の動物臓器のオートラジオグラムでは、 β 線の飛程の長さから組織レベル解析は困難であった(20)。しかし、我々は Spring-8 を使用した放射光を利用して凍結組織切片中のウランのセシウム定量分析技術開発を進め、腎臓尿管組織におけるウランの局在を示してきた(21)。Spring-8 はエネルギー的にセシウムの同定と定量に至適であるので、ウラン分析に使用している解析プログラムを改変すればセシウム分析への適用が可能であり、分析解像度を一桁以上高めることが期待される。分析対象臓器としては、セシウムの体内動態で曖昧さが問題になりうる臓器と現象として、セシウムの体内循環における腸粘膜に注目した。体内に滞留したセシウムは排出量の 80% 相当量が唾液腺などの消化管から消化管腔に放出され、67%が腸管からカリウムとともに再吸収され、消化管循環することが知られている(19)。すなわち、腸粘膜は体内から放射性セシウムを排出する限り、 β 線に晒され続けることになる。カリウムは絨毛の粘膜上皮細胞で吸収されたのち、ただちに絨毛内の血管に移送されて肝臓に送られる。細胞内カリウムは細胞膜のポンプ蛋白とチャネル蛋白で細胞内外を往来するが、セシウムはイオン半径の相違により細胞内から外に移行しがたく、細胞内に滞留しやすいことが知られている(19)。そうすると、粘膜上皮細胞に吸収されたセシウムがカリウムと同等の移行経路をとるのか粘膜組織に滞留するのか予想は難しいため、局在可能性を要因とした曖昧さが生ずる。Msh2(-/-)マウスは過酸化物質により空腸の粘膜腫瘍を頻発するが放射線照射では容易に粘膜腫瘍を生じないことが、平成 27 年度～29 年度の本事業による研究で判明した。しかし、放射性セシウムの消化管循環にともなう空腸粘膜領域における局在や滞留に関する知見が不足していることが、影響評価に曖昧さを付与している。その軽減のために本研究計画では、消化管循環しているセシウムの粘膜組織における局在の程度と滞留比を、大型放射光 Spring-8 を使用してマイクロレベルで提示することを三年間の目標とした。

初年度は準備として天然セシウム投与マウスからの腸管切片、定量用標準系列を作成した。二年目にあたる本年度は、最終目標である空腸組織におけるセシウム分布定量分析のために、上記試料を Spring-8 で分析し、セシウム定量のための装置およびソフトウェアの適正化を行うことを目的とした。

注 1: 食品および環境基準の科学的な安全性の確保について

当該災害発災直後の平成 23 年 3 月 17 日、放射性セシウムによる内部被ばく線量の抑制のため、厚生労働省は食品衛生法（昭和 22 年法律第 233 号）に基づき放射性ヨウ素・セシウム・ウラン類の飲食物摂取制限に関する指標を通知した(1)。これが通称、暫定規制値であり、放射性セシウムについては、セシウム汚染飲食物の連続摂取による年間許容線量を 5mSv と設定して当時の原子力安全委員会が算出した値から逆算したものである。その年間許容線量の妥当性は食品安全委員会でも認められた(2)。この暫定規制値に基づく流通管理により(3)、食品等の検査ならびに出荷制限が関連省庁のみならず、東日本の各自治体により実施された。これらのデータならびに人体のホールボディカウンター検査による体内放射性セシウム量のデータは食品安全委員会でも精査・検証され(4)、放射性セシウム等の基準値の決定に至った(5)。その経緯、算出根拠ならびに検査と出荷制限についての一般向けの簡単な解説は環境省から公表された(6)。

注 2: 食品および環境基準の遵守

半減期の長い放射性セシウムの検査は事故 10 年を超えた現在でも実施されている。原子力災害対策本部は「検査計画、出荷制限等の品目・区域の設定・解除の考え方」の改正を現在も継続しており(7)、それに基づき中央省庁による食品(8)、水道(9)、農産物(10)、山菜類(11)、水産物(12)、酒(13)のみならず、都道府県産物については所掌の都道府県庁が現在も実施・公表を続けている。

放射性セシウムは環境中の土壌・微生物・生物残渣などからも容易に人体に侵入することが知られているので、放射性セシウム濃度の検査は、行楽地・海岸などは立地都道府県により、福島県の海水浴場は原子力災害対策本部(14)により、空港や港湾(15)は国土交通省により実施され公表されている。同様に、公営プールの水、ゴミ処理場、衛生処理場、終末処理場、土壌、河川等の放射能調査は市区町村が実施・公開している。測定値に基づいて適切な管理がなされているだけ、健康影響リスクの高まるほどの内部被ばくの発生は現在まで報告されていない。

II. 研究方法

第一の課題である過酸化物用量とセシウム 137 内部被ばく線量の量的相関の解析については、昨年度 RAW264.7 細胞ラインを使用して gH2ax および RNA 指標による定量技術を確認した。当該細胞は放射線に比較的耐性であり、既に形質転換した細胞であるために遺伝毒性影響比較には適用できない。最終目的である Msh2(-/-)マウスにおける消化管腫瘍モデルに適用可能な情報を得るためには、この技術をマウス個体細胞の分析に拡張する必要がある。マウス個体を構成する細胞の殆どが放射線耐性であり、低線量被ばく影響を反映する放射線感受性細胞は造血系細胞中のごく一部であること、臓器や組織には gH2ax や RNA の精密定量を妨害する赤血球や高分子成分が多量に含まれることから、複数の異なる方法を使用してそれぞれ適切な細胞分離、試料調製、定量方法を決定する必要がある。そこで本年度はマウスを使用として ex vivo モデル(下記 II-1)および in vivo モデル(下記 II-2)について検証を進めた。

第二の課題である腸管循環セシウムのドジメトリー精細化のためのセミマイクロ解析研究については、初年度に調製した試料を使用して Spring-8 によるセシウム定量を行った(方法は下記 II-3)。

II-1. ex vivo モデルの検討

昨年度は、放射線耐性の RAW264.7 細胞ラインを使用して放射性セシウムの内部被ばく影響と、過酸化物の遺伝毒性影響を比較する技術を確認した。腫瘍化した細胞ラインでは生体反応を議論できないので、正常細胞を使用して生体反応を定量することが必要である。また、低線量被ばく影響を分析するためには、体内の正常細胞のうち放射線感受性の高い細胞を選択する必要がある。そこで、我々はマウスから採取した組織に含まれる白血球を標的とした分析に着手した。マウスから分離した細胞は採取後の環境変化により一定率の細胞が自壊する。遺伝毒性評価値への自壊による影響が最小となる条件を探索するために、8 週齢マウスから無菌的に循環血液、骨片、骨髓片、小腸粘膜片、肝臓片、腎臓片を採取し、10%血清を含む RPMI 培地中に浮遊させて直後もし

くは予備培養後に、0mGy または 200mGy の X 線を *ex vivo* 照射した後に培養を開始した。照射後 0.5, 2, 4, 8, 24 時間後に経時的に *ex vivo* 培養液から白血球を分離して分析に使用した。

RNA 調製用試料については計数版および核染色により生細胞数を観察・計測しつつ、Qiagen RNeasy カラムで RNA を調製し、総 RNA 量を電気泳動ゲルのレーザースキャンニング法で精密に定量した。総 RNA 中の mRNA と lncRNA は *in vitro* 逆転写処理後に定量 real-time PCR により種々の RNA 群を精密定量した。生育細胞の指標として *gapdh* mRNA、増殖細胞の指標として *c-myc* mRNA、増殖停止信号の指標として *cdkn1a* mRNA および Primary miR34a lncRNA、細胞死トリガーの指標として *bbc3* mRNA および *bax* mRNA を使用した。

組織分析用試料についてはサイトスピンを使用して塗抹標本を調製した。標本は gH2ax 抗体で二本鎖切断-修復部位を、Hoechst33342 で細胞核を蛍光染色し、顕微鏡で同一視野について蛍光画像と微分干渉画像からなる一群の画像ファイルを作成し、少なくとも 5 視野以上の部位を撮影した。画像ファイルセットについては、gH2ax-focus「陽性」細胞と「陰性」細胞を判別するための種々のファイル操作方法を比較し、測定偏差が少なくかつ再現性の最も高い顕微定量法を模索した。

II-2. *in vivo* モデル

Msh2(-/-)マウスに空腸粘膜腫瘍を誘発する臭素酸の経口摂取では消化器粘膜が常時遺伝毒物に暴露されていることを示している。腸粘膜上皮の未分化細胞に比べて未分化白血球は 2 倍以上の放射線感受性を示すことから、臭素酸投与マウスや放射線照射マウスの空腸粘膜上皮に滞留する白血球が遺伝毒性指標となることが予想されたので、本年度は放射線照射影響を指標として空腸粘膜白血球の採取方法および、遺伝毒性指標である RNA ならびに gH2ax の定量方法を検討した。

8 週齢の C3H/He マウス群に 200mGy の X 線を全身照射して、2, 4, 6, 24 または 96 時間後に被ばく影響指標となる循環血液を採取した。また、種々の方法で空腸粘膜滞留白血球を採取して、RNA 調製用試料および組織分析用試料とした。上記 II-1 と同様の方法で RNA 分析と gH2ax 分析を行った。

II-3. SPring-8 による組織標本内セシウムの定量技術開発

マウスに kg 体重あたり 0, 2.5, 5.0, 10mg の天然セシウムを皮下投与し、投与後 2, 87, 187 時間後に各種臓器を採取し、マイクロウェーブ湿性灰化処理後、ICP-MS でセシウム量を定量した。臓器のうち一部は凍結包埋した。充分量のセシウムを含む骨格筋、大腿骨、脾臓、小腸包埋試料について、10 μ m 厚の凍結切片をポリマーフィルム上にマウントして SPring-8 用試料とした。また、定量検量線作成のために、0, 20, 50, または 100 ppm の天然セシウムを溶解した包埋ゲルからセシウム標準凍結切片を調製した。

各種組織切片およびセシウム標準凍結切片を使用して、SPring-8 のビームを照射し、セシウムから放出される 31keV 付近の $K\alpha$ 放射光を適正に分析するために、照射室内の切片設置装置や計測機器の配置、ソフトウェアの適正化を進めつつ、検量線を作成した。

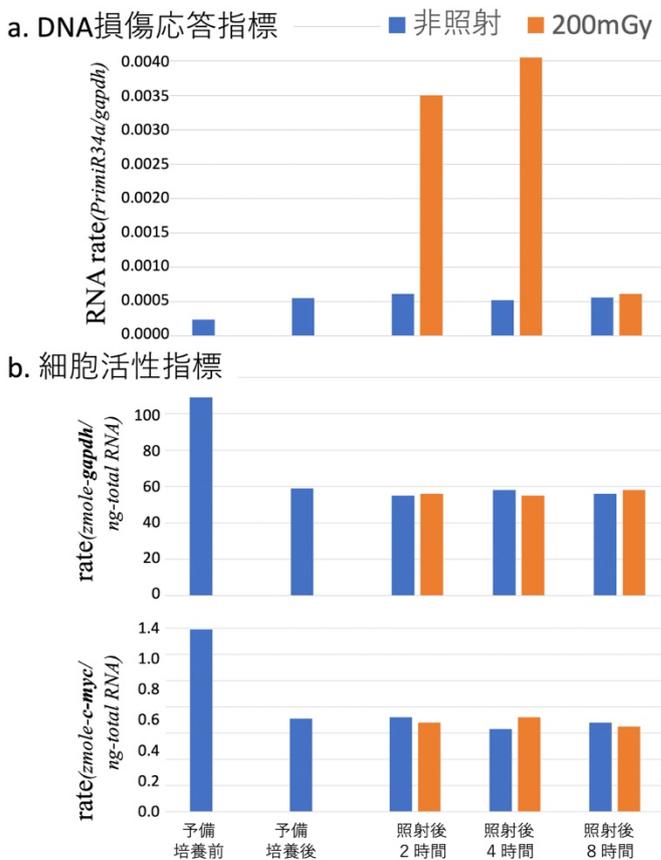
（倫理面への配慮）本研究における動物実験は放射線医学総合研究所で計画承認され、動物愛護

の観点から適切な方法で行った。また、放射線照射実験についても事前に計画書を放射線医学総合研究所技術安全部放射線安全課に提出するとともにその確認と指導のもとに適法に実施した。SPRING-8 大型放射光施設の使用に先だって適正な安全管理教育の受講のうえ使用許可を得た。

III. 研究結果

III-1. ex vivo モデル

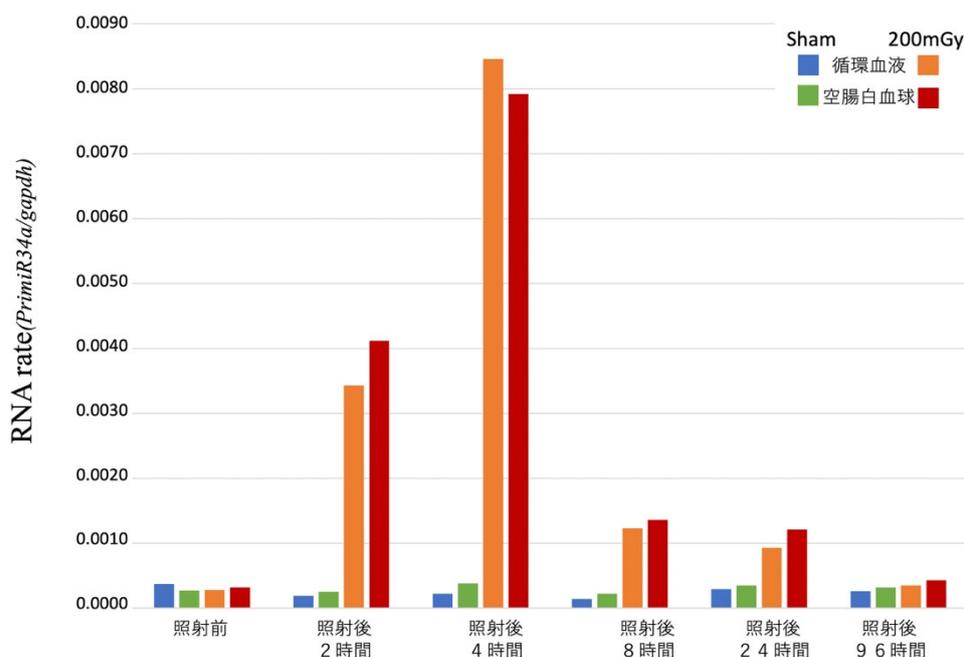
このモデルでは初年度に RAW264.7 細胞で確立した定量系のマウス ex vivo 培養組織細胞への適用であり、RNA と gH2ax 指標を基準にβエミッター用量と過酸化剤用量の関係を提示することを目的とする。高感度分析のためには、RNA 指標および gH2ax 指標を比較し、培養による変動が最少であり、200mGy 照射による影響が最大となる系である必要がある。種々の ex vivo 培養系を比較検討した結果、24 時間予備培養した骨髓細胞片が当該分析に適用可能であることがわかった(図 III-1a)。RNA 発現に関する細胞状態の指標となる総 RNA ng あたりの gapdh mRNA mole 比ならびに c-myc mRNA の mole 数は、照射後 8 時間までは変動せず(図 III-1b)、gH2ax 陽性細胞は照射後 8 時間でも消失しなかった。



図III-1. マウス骨髓片のex vivo培養時のRNA指標の変動

III-2. in vivo モデル

200mGy 全身照射後のマウスでは循環白血球と空腸白血球は同等の挙動を示した。被ばく指標である 34a/gapdh RNA 比は照射後 4 時間後にピークの 22 倍に到達したのちに緩やかに減少して 24 時間後には 3 倍まで低下して 96 時間後にベースレベルに戻った(図 III-2)。gH2ax 分析では、照射後 30 分後の白血球集団で gH2ax 陽性細胞が明瞭に増加し、RNA 指標ピークの 4 時間後において gH2ax foci の染色像の形状変化はあるものの、蛍光強度減少は認められなかった。

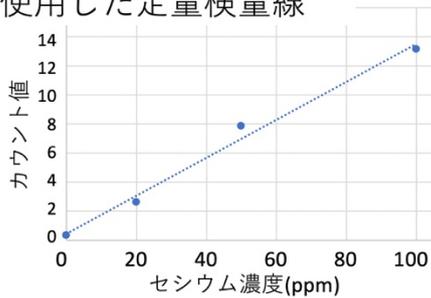


図III-2. 循環血液と空腸白血球におけるDNA損傷指標の経時変化

III-3. SPring-8 による組織標本内セシウムの定量技術開発

SPring-8 の入射エネルギーを 45 keV とすることで、31keV の K 殻 α 吸収を利用したセシウム定量を試みた。20~100ppm のセシウム濃度標準となる切片試料を用いた検量線(図 III-3a)から、ミクロ定量時の切片中のセシウム濃度の下限が 13.9 ppm 程度であることが算出された。今回の SPring-8 に搬入した腸管試料の平均セシウム濃度は 2ppm であり、正確な定量は困難であったが、測定室内(III-b)の機器条件を調製しつつ、切片試料測定を試みた。大腸切片の赤粋内(III-3c)を $1\mu\text{m}$ 平方のビームサイズでランダムに 14,400 箇所を測定した積算スペクトル(III-3d)から Cs ピークが同定できた。同様に上部空腸(図 III-3e)の分析でもピークが同定できた(図 III-3f)。

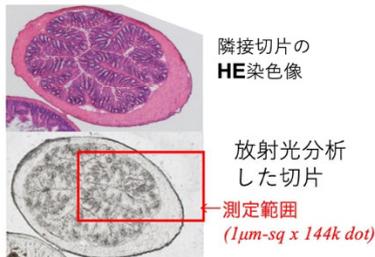
a. セシウム量標準切片を使用した定量検量線



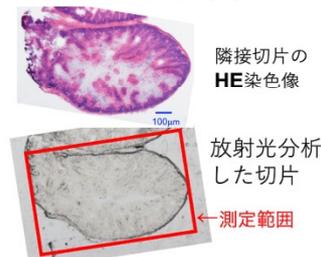
b. 照射室内の放射光測定装置



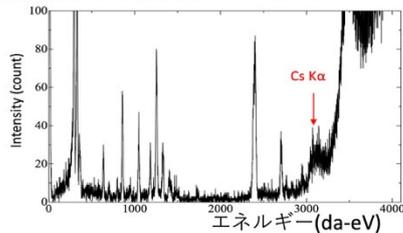
c. 大腸切片と測定範囲



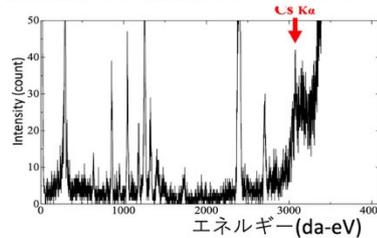
e. 空腸切片と測定範囲



d. 測定値の積算スペクトル



f. 測定値の積算スペクトル



図III-3. SPring-8による切片内セシウムマイクロ定量

IV. 考察

IV-1. ex vivo モデル

上記のように予備培養後の骨髓片組織が遺伝毒性試験に最も適していることが判明したが、放射性セシウムと臭素酸の影響を分析するためにはある程度の時間、細胞を処理する必要がある。図 III-b に示したように照射 8 時間までの細胞の遺伝子発現状態に異常のなかったことから、放射能または遺伝毒物との 8 時間までの共培養による分析が可能であることが示された。

こうした ex vivo 照射細胞を使用したバイオドジメトリー技術は 2012 年の北大西洋条約機構のプロジェクト(22)を端緒に Realising The European Network of Biodosimetry (RENEB) プロジェクトにより、二動原体染色体(DC)、小核、gH2ax、mRNA、ラマン、白血球濃度の同時平行分析が欧州各国を中心として(23)我が国を含む関連諸国を含めて(24) 同一の健常ヒト血液を使用した模擬訓練が実施された。特に DC によるバイオドジメトリーは完成域に到達して所謂"Gold Standard"と見做されている。mRNA は細胞自体の生物学的影響を受けやすいため偏差が大きいという問題がある(25)が、試料調製から定量操作技術影響を抑えるための努力がなされている(26)。gH2ax は多様な測定方法があり、目的に応じて様々な方法が採用されている(27)。こうしたバイオドジメトリーにおいて目的とする線量範囲は、確定的影響の現れる数 Gy クラスである。また、DC によるバイオ

ドジメトリーの定量下限線量は 0.1Gy であり、0.1~10Gy という広い範囲の線量評価が同時に行われることが、実際に大規模放射線災害が発生したときのトリアージや治療情報提供に望ましいという国際的コンセンサスが主流である。

ところが、実際に個体や *ex vivo* 培養細胞が 0.1Gy を超える線量で被ばくすると、細胞増殖の停止機構が起動するだけでなく、細胞自壊機構の誘導されることが知られている(17, 26)。我が国の現状で問題となる極低線量の放射線影響の分析のために 0.1Gy を超えれば超えるほど、細胞への影響は放射線のみならず、細胞機能障害により誘導される二次的三次的生体反応が相乗的に値に影響することが予想される。また、こうした線量に匹敵する過酸化物の濃度で細胞を処理すると、化学的な細胞膜破壊による大規模細胞消失が分析値に著しく影響するので、放射線と化学物質影響の客観的に比較は困難であることが容易に予想される。

我々は低線量影響の分析の精密化のために、国際的な主流とは反する 0.1Gy 以下の影響の定量化を試みている。上記 RENE B プロジェクトにおいて、盲検試料を使用した各種のバイオドジメトリーの比較からは、gH2ax と RNA の指標による線量推定は、実際の被ばく線量や DC による推定線量よりも大きな値が得られることが知られている(22)。このことは RNA と gH2ax の指標の感受性の高さを示しており、0.1Gy 以下の線量の影響分析にこれらが適するという我々のこれまでの結果と矛盾しない。よって、0.1Gy 以下の線量における gH2ax と RNA 分析により、放射性セシウム放射能と過酸化物濃度が量的に比較可能になるものと予想される。

IV-2. *in vivo* モデル

生体のあらゆる臓器と同様にマウス空腸の粘膜下組織にもリンパ管が複雑に侵入して消化器免疫に寄与していることが予想されており、十分に脱血した後のマウスであっても、その消化器粘膜組織分析の際に相当量の白血球が観察されることは古くから知られている。上記のように、照射 4 時間後に空腸に滞留した白血球を分離して RNA および gH2ax の同時分析に供することが可能であることが示された。組織に滞留する白血球は臓器研究の邪魔者とされ、白血球自体に注目した研究は殆ど行われていない。血液学分野では採血部位や臓器毎に含まれる白血球細胞の種類や分化段階の異なることが古くから知られてきた。また我々は、概日リズムによる白血球集団の変遷(15)や小腸粘膜組織における RNA 発現様式解析(28, 29)や極微量 RNA の定量(18, 30)を行ってきた。これらの動物-組織-細胞-RNA の調製技術の統合により、極微量の空腸粘膜内白血球の分析は可能であると考えている。

臭素酸は組織浸透性の極めて大きな負電荷過酸化物であるために、マウス経口ゾンデで胃粘膜に投与すれば速やかに空腸粘膜に浸透し、粘膜下組織の白血球に作用することが予想される。この *in vivo* モデルで得られることの予想される臭素酸濃度影響結果と、上記の *ex vivo* モデルで得られる臭素酸影響結果との対比により、消化管組織の独自性の有無に関する情報の得られることが期待される。

IV-3. SPring-8 による組織標本内セシウムの定量技術開発

放射性セシウムの臓器内における偏在はオートラジオグラムを使用して古くから研究されて

きた(20)が、 β 線飛程の長さから解像度は低く、組織中の細胞レベルでの偏在の有無の検討は不可能であったが、SPring-8の組織切片解析用のビームライン(21)を使用すれば可能であることが予想された。ただし、年間に予約可能なSPring-8ビームラインの時間が限られており、本年度予約できた3日間を利用してビームラインで初めてのセシウム分析に着手した。近年のビームライン改修により、セシウムのK殻由来の放射光である31keV付近は、極めてバックグラウンドの高い領域であったことが判明し(図3c, e)、組織中の平均セシウム濃度が100ppmクラスでないと定量が困難であることが判った。本年度搬入した組織切片はその1/50濃度であるために定量には使用できなかったが、次年度の実験に向けて照射-測定装置のセッティングやソフトウェアの検討を行いつつ、本番に備えた種々の疑似測定を行った。来年度も予約時間が限られる可能性が高いが、50倍濃度のセシウムを含む消化管組織を使用すればマイクロレベルでの定量解析が可能であることが予想される。

V. 結論

第一の課題において、過酸化物質である臭素酸と ^{137}Cs 放射能の正常細胞に対する影響を指標とする実験は以下の2方法で比較解析のことが示された。第一の方法は、マウス *ex vivo* 培養骨髄組織片を使用して、 ^{137}Cs または臭素酸を投与した8時間後の白血球のRNA比(34a/gapdh)値およびgH2ax陽性率を定量するものであり、これにより ^{137}Cs と臭素酸の濃度の関連を比較するものである。第二の方法は、マウス個体にX線照射または臭素酸を強制経口投与し、4時間後の循環血液白血球と空腸粘膜白血球を採取し、RNA比(34a/gapdh)値およびgH2ax陽性率を定量するものであり、これによりX線吸収線量と臭素酸濃度の関連を比較するものである。

第二の課題である、消化管内ルーメンと粘膜組織におけるセシウム濃度の分布測定は、前回の50倍濃度のセシウムを含む消化管切片を使用することでSPring-8マイクロ定量の可能であることが示された。

VI. 次年度以降の計画

次年度は本計画の最終年度であり、第一の課題としては、マウス個体中の放射線感受性の細胞におけるバイオドジメトリー指標を基準として、 ^{137}Cs 放射エネルギーと、臭素酸濃度の関係を求めることが目的である。そのために上記結論に記述した2種類の方法で検討を行う。第一は *ex vivo* 実験による8時間積算影響比較であり、第二はマウス個体を使用した単回照射/投与の4時間後における影響比較である。これにより生体細胞指標を用いた過酸化物質と放射性セシウムの影響の比較に関するデータの提供が期待される。

第二の課題としては平均セシウム濃度 100ppm の消化管切片を調製し、SPring-8 の 1 μ m 平方のビームで空腸ルーメン領域、空腸粘膜領域、大腸平滑筋領域について、それぞれ約 1000 箇所 Cs 濃度を測定し、ヒストグラムを比較することによりセシウム局在のないこと、すなわち従来のセシウム預託線量の修正の不要であることを提示することが期待される。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

ア) 論文・雑誌等

- 1) Takeda S Fujishiro A Tanaka I Yakumaru H Kyoko A Uehara A Oikawa M Himeno S Ishihara H. Single-Cell Imaging for Studies of Renal Uranium Transport and Intracellular Behavior, Minerals, 2021; 11; 191.
- 2) Uehara Akihiro, Oikawa Masakazu, Tanaka Izumi, Ishihara Hiroshi, Takeda Shino. Quantitative Analyses of Urinary Uranium by μ -PIXE, Minerals 2021; 11; 196.
- 3) 上原章寛,及川将一,田中泉,石原弘,武田志乃. マイクロ PIXE を用いた生体液中の元素定量のための迅速・簡便な試料作製法の検討. X線分析の進歩 2020; 51; 81-90.
- 4) 武田志乃,吉田峻規,沼子千弥,及川将一,上原章寛,田中泉,石原弘. 元素イメージングのための組織試料作製手法の検討: 自家蛍光を利用した組織構造および元素局在部の抽出. X線分析の進歩 2020; 51, 91-96.
- 5) 吉田峻規,武田志乃,及川将一,上原章寛,沼子千弥,石原弘. 骨の 2 次元元素分析に適する粘着膜の検討. X線分析の進歩 2019; 50; 313-319.
- 6) Nagayasu A Kakinuma S Nishimura M Shang Yi Sunaoshi M Tsuruoka C Ishihara H Shimada Y Kobayashi Y. Kinetics of cytokine mRNA and protein expression by plastic adherent cells in the thymus after split-dose irradiation. Cytokine 2018; 114; 92-97.
- 7) 武田志乃,吉田峻規,沼子千弥,及川将一,上原章寛,佐藤修彰,寺田靖子,石原弘. 腎臓におけるウラン濃集部の形成と組織影響. J Toxicol Sci 2019; 44; S285.
- 8) 上原章寛,薬丸晴子,田中泉,城鮎美,松村大樹,辻卓也,齋藤寛之,安田良,石原弘,武田志乃. 生体成分と結合したアクチノイドイオンの除染用キレート剤による配位子置換反応. SPring-8 利用課題実験報告書 2020; .
- 9) 薬丸晴子,武田志乃,田中泉,阿山香子,上原章寛,石原弘,沼子千弥,関澤央輝,新田清文,藤代瞳. 細胞内ウラン分布解析の基礎的検討. SPring-8 User Experiment Report 2021; Oct.
- 10) 薬丸晴子,武田志乃,田中泉,阿山香子,上原章寛,石原弘,沼子千弥,関澤央輝,新田清文. 内部被ばく核種の組織局在解析. SPring-8 User Experiment Report 2020; Oct.
- 11) 上原章寛,武田志乃,松村大樹,齋藤寛之,城鮎美,辻卓也,安田良,吉田峻規,田中泉,石原弘. アクチノイドイオンと生体内関連物質との局所構造解析. SPring-8 利用課題実験報告書, 2020; Mar.
- 12) 武田志乃,吉田峻規,上原章寛,沼子千弥,佐藤修彰,関澤央輝,新田清文,石原弘. 2 次元マイクロ XAFS によるウラン投与ラット腎尿管におけるウラン化学形解析. Spring-8 User Experiment Report 2018; Oct.

イ) 学会発表等

- 1) 武田志乃,吉田峻規,沼子千弥,及川将一,上原章寛,寺田靖子,関澤央輝,新田清文,田中泉,石原弘. ウラン腎尿細管細胞内動態解析に向けた基礎検討. 第 55 回 X 線分析討論会, X 線分析討論会, 2019-10-31.
- 2) 武田志乃,沼子千弥,上原章寛,板倉雄一,関澤央輝,新田清文,石原弘. Two-dimensional μ XAFS for uranium in kidney of rats exposed to uranyl acetate. XAFS 分析に関する国際会議 (XAFS2018), 2018-07-25.
- 3) 武田志乃,吉田峻規,沼子千弥,上原章寛,佐藤修彰,寺田靖子,小久保年章,石原弘. 幼若ラット腎臓におけるウラン動態と化学形解析. 第 45 回日本毒性学会学術年会, 2018-07-19.
- 4) 上原章寛,松村大樹,薬丸晴子,城鮎美,田中泉,辻卓也,齋藤寛之,石原弘,武田志乃. X線吸収分光法を用いた血清内アクチニドのキレート剤による除染評価. 生命金属に関する合同年会,日本毒性学会生命金属部会,メタロミクス研究フォーラム,日本セレン研究会, 2020-11-06.
- 5) Ishihara H Tanaka I Yakumaru H Tanaka M Yokochi K Uehara A Takeda S. Quantitative comparison of DNA damage by radiation and genotoxic metal compounds using biodosimetric indicators of DNA-damage-induced RNAs and double-strand break in RAW264.7 cells. 日本放射線影響学会第 63 回大会, 2020-10-15.
- 6) Tanaka I Ishihara H Uehara A Tanaka M Yokochi K Takeda S. Comparison of substitution velocity of multivalent metallic radionuclide coordinated with serum protein mixture by chelates using in vitro Fe(III) model. 日本放射線影響学会第 63 回大会, 2020-10-15.
- 7) 上原章寛,武田志乃,田中泉,石原弘,齋藤寛之,城鮎美,安田良,松村大樹,辻卓也. アクチニドと除染剤が共存する生体内反応場での化学形解析. 日本放射線影響学会第 63 回大会, 2020-10-15.
- 8) Takeda S Yakumaru H Ayama K Uehara A Tanaka I Ishihara H. Formation of uranium concentrated areas and the surrounded tissue characteristics in kidney. 日本放射線影響学会第 62 回大会, 2020-10-15.
- 9) Takeda S Uehara A Oikawa M, Numako C Terada Y Tanaka I Ishihara H. Uranium localization and tissue alteration in developing kidney. 第 47 回日本毒性学会学術年会, 2020-06-29.
- 10) 上原章寛,田中泉,石原弘,武田志乃. 除染剤存在下における体液中のアクチノイドの溶存状態. 日本放射線影響学会第 62 回大会, 2019-11-15.
- 11) 武田志乃,吉田峻規,上原章寛,田中泉,石原弘. 酢酸ウランを投与した新生ラットにおけるウラン体内動態. 日本放射線影響学会第 62 回大会, 2019-11-15.
- 12) 田中泉,石原弘,薬丸晴子,田中美香,横地和子,上原章寛,武田志乃. 皮下組織に侵入した多価金属カチオンと細胞外液成分配位物のマウスにおける体内動態研究、Fe(III)モデル系. 日本放射線影響学会第 62 回大会, 2019-11-15.
- 13) 上原章寛,及川将一,田中泉,石原弘,武田志乃. micro PIXE を用いた体液内元素の簡易定量法の検討. 第 55 回 X 線分析討論会, 2019-10-31.

- 14) 上原章寛,松村大樹,齊藤寛之,田中泉,石原弘,武田志乃. X 線吸収分光法による体液内アクチニドの溶存状態の研究. メタルバイオサイエンス研究会, 2019-10-30.
- 15) Takeda S Yoshida T Oikawa M Uehara A Numako C Terada Y Tanaka I Ishihara H. Dynamics of uranium localization and tissue alteration in kidney of rats exposed to uranyl acetate. 16th International Congress of Radiation Research (ICRR2019), 2019-08-26.
- 16) 武田志乃,吉田峻規,沼子千弥,及川将一,上原章寛,佐藤修彰,寺田靖子,石原弘. 腎臓におけるウラン濃集部の形成と組織影響. 第 46 回日本毒性学会学術年会, 2019-06-27.
- 17) 上原章寛,及川将一,田中泉,石原弘,武田志乃. マイクロビーム分析を利用した体液中元素動態簡易モニタリング法の開発. 量子生命科学研究会第 3 回研究集会・量子生命科学会第 1 回大会, QST, 2019-05-23.
- 18) 武田志乃,小平聡,及川将一,吉田峻規,寺田靖子,上原章寛,田中泉,石原弘,小西輝昭. マイクロビーム分析を利用した *in situ* 解析技術の組み合わせ手法によるウラン動態解析. 量子生命科学研究会第 3 回研究集会・量子生命科学会第 1 回大会, QST, 2019-05-23.

ウ) 書籍・総説

特になし

エ) 受賞

特になし

オ) 特許

1) 田口 光正, 大山 智子, 木村 敦, 大山 廣太郎, 石原 弘, 下川 卓志. 細胞培養用ハイドロゲル、ゲルキット、細胞培養物の製造方法、及び細胞培養用ハイドロゲルの製造方法

カ) 環境行政への活用・貢献実績

特になし

VIII. 引用文献

- 1) 厚生労働省医薬食品局食品安全部長通知、放射能汚染された食品の取り扱いについて、食安発 0 3 1 7 第 3 号、平成 2 3 年 3 月 1 7 日
- 2) 食品安全委員会、放射性物質に関する緊急とりまとめ、2 0 1 1 年 3 月
- 3) 原子力災害対策本部、検査計画、出荷制限等の品目・区域の設定・解除の考え方(初版)、平成 2 3 年 4 月 4 日
- 4) 食品安全委員会、評価書、食品中に含まれる放射性物質、2 0 1 1 年 1 0 月
- 5) 厚生労働省、食品衛生法第 11 条第 1 項の規格基準、食品中の放射性物質の新たな基準

値、交付平成24年3月15日、施行平成24年4月1日

- 6) 環境省、放射線、統一的な基礎資料、第4章 食品中の放射性物質、2013年8月 s1-s64.
- 7) 原子力災害対策本部、検査計画、出荷制限等の品目・区域の設定・解除の考え、改正令和3年3月26日
- 8) 厚労省、医薬・生活衛生局食品監視安全課、食品中の放射性物質の検査結果について（1224報）令和3年2月24日
- 9) 厚労省、医薬・生活衛生局水道課 水道水質管理室、水道水中の放射性物質の調査結果について（第422報）令和3年3月12日
- 10) 農水省、生産局総務課、農産物に含まれる放射性セシウム濃度の検査結果
- 11) 林野庁、経営課特用林産対策室、きのこや山菜の出荷制限等の状況
- 12) 水産庁、増殖推進部 研究指導課、水産物の放射性物質調査の結果・出荷制限・自粛
- 13) 国税庁、酒類等安全確認調査、
- 14) 原子力災害現地対策本部(放射線班)、福島県、海水浴場の環境放射線モニタリング調査結果
- 15) 国土交通省港湾局海岸・防災課危機管理室、空港・港湾近辺の放射線測定状況、
- 16) Ishihara H Tanaka I Yakumar H et al. Circadian transitions in radiation dose-dependent augmentation of mRNA levels for DNA damage-induced genes elicited by accurate real-time RT-PCR quantification. *J Radiat Res* 2010; 51; 265-275.
- 17) Ishihara H Tanaka I Yakumar H Tanaka M Yokochi K Fukutsu K Tajima K Nishimura M Shimada Y Akashi M. Quantification of damage due to low-dose radiation exposure in mice: construction and application of a biodosimetric model using mRNA indicators in circulating white blood cells. *J Radiat Res*, 2016; 57; 25-34.
- 18) 石原弘. 低線量被ばくによる生体影響を利用したバイオドジメトリー. *放射線生物研究* 2016; 51; 241-254.
- 19) Leggett RW, Williams LR, Melo DR, Lipsztein JL. A physiologically based biokinetic model for cesium in the human body. *Sci Total Environ*, 2003; 317; 235-255.
- 20) Matsusaka N Yamakawa Y Sato I Tsuda S Kobayashi H Nishimura Y. Organ Distribution of ¹³⁷Cs in Mouse Fetuses and Their Dams. *Radioisotopes*, 1997; 46; 214-218.
- 21) Takeda HS Numako C Kitahara K, Yoshida T, Oikawa M, Terada Y Kokubo T, Shimada Y. Phosphorous localization and its involvement in the formation of concentrated uranium in the renal proximal tubules of rats exposed to uranyl acetate. *Int J Mol Sci* 2019; 20; 4577.
- 22) Rothkamm K Beinke C Romm H Badie C Balagurunathan Y Barnard S Bernard N Boulay-Greene H Brengues M De Amicis A De Sanctis S Greither R Herodin F Jones A Kabacik S Knie T Kulka U Lista F Martigne P Missel A Moquet J Oestreicher U Peinnequin A Poyot T Roessler U Scherthan H Terbrueggen B Thierens H Valente M Vral A Zenhausern F Meineke V Braselmann H Abend M. NATO Biodosimetry Study:

- Comparison of established and emerging biodosimetry assays. *Radiat Res.* 2013; 180; 111-119.
- 23) Kulka U Ainsbury L Atkinson M Barquinero JF Barrios L Beinke C Bogner G Cucu A Darroudi F Fattibene P Gil O Gregoire E Hadjidekova V Haghdoost S Herranz R Jaworska A Lindholm C Mkacher R Mörtl S Montoro A Moquet J Moreno M Ogbazghi A Oestreicher U Palitti F Pantelias G Popescu I Prieto MJ Romm H Rothkamm K Sabatier L Sommer S Terzoudi G Testa A Thierens H Trompier F Turai I Vandersickel V Vaz P Voisin P Vral A Ugletveit F Woda C Wojcik A. Realising the European Network of Biodosimetry (RENEB). *Radiat Prot Dosimetry.* 151(4):621-5.
- 24) Kulka U Wojcik A. Special issue: Networking in biological and EPR/OSL dosimetry: the European RENEB platform for emergency preparedness and research. *Int J Radiat Biol.* 2017; 93; 1.
- 25) Manning G Macaeva E Majewski M Kriehuber R Brzóška K Abend M Doucha-Senf S Oskamp D Strunz S Quintens R Port M Badie C. Comparable dose estimates of blinded whole blood samples are obtained independently of culture conditions and analytical approaches. Second RENEB gene expression study. *Int J Radiat Biol.* 2017; 93; 87-98.
- 26) Abend M Amundson SA Badie C Brzoska K Hargitai R Kriehuber R Schüle S Kis E Ghandhi SA Lumniczky K Morton SR O'Brien G Oskamp D Ostheim P Siebenwirth C Shuryak I Szatmári T Unverricht-Yeboah M Ainsbury E Bassinet C Kulka U Oestreicher U Ristic Y Trompier F Wojcik A Waldner L Port M. Inter-laboratory comparison of gene expression biodosimetry for protracted radiation exposures as part of the RENEB and EURADOS WG10 2019 exercise. *Sci Rep.* 2021; 11; 9756.
- 27) Raavi V Perumal VFD Paul S. Potential application of γ -H2AX as a biodosimetry tool for radiation triage. *Mutat Res.* 2021; 787; 108350.
- 28) Ishihara H Tanaka I Yakumaru H Tanaka M Satoh A Ishiwata A Yokochi K Kurematsu A Ueda J Shibata T Hachiya M Akashi M. Acceleration of Regeneration of Mucosa in Small Intestine Damaged by Ionizing Radiation Using Anabolic Steroids. *Radiat Res* 2011; 175; 367–374.
- 29) Ishihara H Tanaka I Yakumaru H Tanaka M Yokochi K Akashi M. Pharmaceutical drugs supporting regeneration of small-intestinal mucosa severely damaged by ionizing radiation in mice. *J Radiat Res* 2013; 54; 1057-1064.
- 30) Ishihara H Tanaka I Ishihara F Suzuki K Yoshino C Cheeramakara C Wan H Akashi M. Transient reporter RNA assay: quantification of reporter gene mRNA during immediate early response in mammalian cells based on real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 2005; 34; 369-371.

Studies on the quantitative comparison of immature cell-damages by radiation and superoxides, for dose estimation of internal radiocesium and their effects on tumorigenesis.

Hiroshi Ishihara

Internal Decorporation Research Group , Department of Sciences for Regulation on Radiation, National Institute of Radiological Sciences , National Institute for Quantum and Radiological Science and Technology

Key word: , biodosimetry, gamma-H2ax, DNA damage-induced RNA, genotoxicity, trace biometal

Abstract

In this part, we designed two 3-year-projects, aimed to publish data that can be utilized for dose estimation of internal exposure of radiocesium. In the first project, we planned to establish biodosimetric model for the quantitative comparison through radiation and reactive oxygen species (ROS) on the genotoxic effect in the mouse cells, aiming to utilize the tumorigenic mechanisms by ROS in *msh2(-/-)* DNA-repair defective mice model. In the second year, genotoxicities were quantified in hematocytes of irradiated mouse, based on the established methodology in RAW264.7 cell line in the first year. In the second project, high resolution quantification of cesium in the tissue for the microdosimetry, with X-ray fluorescence imaging by high-energy synchrotron radiation was scheduled. This year, we established methods for microquantification of cesium in the tissue-section including construction of the instruments for in a beam-line of Super Photon ring-8 GeV (SPring-8).