

テーマ（2）事故に係る身体面・心理面の健康影響及び
そのメカニズムに関する研究

2-1 エンリッチメント環境による小児期連続放射線被ばくの健康影響に対する 低減化研究	
主任研究者：森岡 孝満（量子科学技術研究開発機構）	1
2-2 成体期の生活習慣等の低線量放射線発がんリスクにおよぼす影響と メカニズム解明	
主任研究者：鈴木 啓司（長崎大学）	14
分担研究者：柿沼 志津子（量子科学技術研究開発機構）	28
2-3 放射線による健康リスクと社会不安の低減化を目指した線量・線量率効果係数 DDREF=2 の妥当性の検討	
主任研究者：笹谷 めぐみ（広島大学）	35
分担研究者：河合 秀彦（広島大学）	54
分担研究者：志村 勉（国立保健医療科学院）	63
分担研究者：小林 純也（国際医療福祉大学）	72
2-4 セシウム 137 慢性的低線量内部被ばくマウスにおける突然変異と発がんの 非相関性の定量的検証とメカニズム解明	
主任研究者：中島 裕夫（大阪大学）	83
分担研究者：大野みずき（九州大学）、中津可道（九州大学）	103
分担研究者：石原 弘（量子科学技術研究開発機構）	119
2-5 動物モデルと数理モデルを用いた放射線発がん線量率効果が生じる メカニズムの解明	
主任研究者：今岡 達彦（量子科学技術研究開発機構）	135
分担研究者：服部 佑哉（東京工業大学）	153
2-6 不溶性セシウム粒子による生物影響の解明に向けた分野横断的共同研究	
主任研究者：鈴木 正敏（東北大学）	167

2-7 事故後に発見された小児若年者甲状腺疾患のメカニズムに関する研究 主任研究者：鈴木 眞一（福島県立医科大学）	201
2-8 ロングリード解析を用いた放射線刻印の同定と福島小児甲状腺癌への応用 主任研究者：光武 範吏（長崎大学）	224
2-9 原子力発電所事故後の避難住民・帰還住民における健康寿命に関わる 震災関連要因とそのメカニズムについての疫学研究 主任研究者：大平 哲也（福島県立医科大学）	229
2-10 原発事故後 10 年間に於ける地域住民の二次的健康影響の総括、 および今後の医療・介護ニーズの推定に関する研究 主任研究者：坪倉 正治（福島県立医科大学）	249

エンリッチメント環境による小児期連続放射線被ばくの影響に 対する低減化研究

主任研究者 森岡孝満（量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所・研究統括）

研究要旨

原発事故や地震、津波などの災害時における長期の避難生活や仮設住宅でのこもりきりの生活は心身ともに健康に悪影響を及ぼす。更に、東日本大震災に伴う福島第一原子力発電所事故を受けて、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱いている。特に、子どもは放射線被ばく後の発がんリスクが高いことより、子どもの健康影響が危惧されている。その為、被ばく後の健康影響に対するリスク低減化法の提唱が重要と考えられる。

本研究課題では、生活環境改善が小児期の低線量連続被ばくによる健康影響を低減するかを実験動物にエンリッチメント環境（Enriched Environment, EE; 豊で快適な良いストレス）を提供することで検証することを計画した。本年度は、EE の自然発症ならびに小児期放射線被ばく誘発の消化管腫瘍に対する予防効果を明らかにするため、ヒト家族性大腸腺腫瘍のモデルマウスである $Apc^{Min/+}$ マウスを用いて、生後 1 週齢から 2 週間 γ 線を連続照射（総線量 0.1、2 及び 4 Gy）する被ばく群と非照射群を設定し、生後 3 週齢から EE または通常飼育環境（Standard Environment, SE）で飼育を開始した群を継続して観察を行った。また、体重と摂餌量の測定を経時的に行った。昨年度は、20 週齢で解剖を行ったが本年度は 30 週齢での解剖を行い血液、小腸、大腸及び主要臓器を採取し血漿検査及び病理組織解析用に保存した。その結果、非照射と総線量 0.1 Gy 照射後に EE 飼育した群は、SE 群に比べて有意に体重増加の抑制効果が認められた。一方、総線量 2 と 4 Gy 照射後に SE 飼育した群は、24 週齢より体重減少を示し 30 週齢では EE 飼育群と同等の体重を示した。摂餌量は、非照射と総線量 0.1 Gy 照射後に EE 飼育した群は、SE 群に比べて有意に増加が認められた。総線量 2 と 4 Gy 照射後に EE 飼育した群は、18 週齢より徐々に摂餌量が減少を示し 30 週齢では SE 群との差は認められなかった。EE の体重増加抑制は、生殖器周囲の白色脂肪重量を有意に減少させたことに起因するものと考えられた。更に、血漿検査より EE 群は SE 群に比較し有意な脂質代謝の改善が認められた。EE による放射線誘発消化管腫瘍に対する効果として、小腸では 4 mm 以上の腫瘍数、大腸では 3 mm 以上の腫瘍数を有意に抑制することが分かった。

以上のことより、EE は放射線被ばく後の脂質代謝の改善作用と消化管腫瘍に対する抑制効果を有していることが示唆された。

キーワード：低線量、小児期被ばく、エンリッチメント環境、がん予防

I. 研究目的

原発事故や地震、津波などの災害時において長期の劣悪な避難生活や仮設住宅でのこもりきりの生活は心身ともに健康に悪影響を及ぼす。それに加え、十分な睡眠、運動（子どもの場合は好奇心のでの遊び）、そして社会的なつながりも十分ではなくなる。上記を予防するには適切な住環境や社会環境が必要なのは言うまでも無いが実際は長期避難を強いられるケースも多い。近年、動物実験において EE は動物が持つ本来の行動を刺激することから動物愛護の観点より重要であると指摘されている。さらに、EE は脳の機能を活性化しアルツハイマー病などの老化を予防し、肥満予防、がん予防にも寄与することが実験的に明らかとなってきた¹⁾。

子どもは放射線被ばく後の発がんリスクが、成人と比べて高い臓器もあることが、原爆被ばくやチェルノブイリ発電所の事故調査で明らかになっている^{2,3)}。我々も、マウスやラットを用いて、思春期以前の幼若期での被ばくは成体期に比べ発がんリスクが高くなり、寿命も短くなることを示してきた。東日本大震災に伴う福島原発事故を受けて、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱いている。そこで、本研究では放射線による晩発影響のひとつである発がんのリスクをエンリッチメント環境で低減可能ではないかと予測した。本研究では、EE 飼育が幼若期被ばくによる発がんリスクを低減することを期待し、被ばく後の EE によるホメオスタシス増進効果を幼若期（生後 3 週齢、離乳期）で定量的に比べることとした。発がん予防効果実験には、我々が構築したヒト家族性大腸腺腫症のモデルマウスである C3B6F1 *Apc*^{Min/+}マウスを用いる⁴⁾。構築したモデルマウスは、従来の C57BL/6J *Apc*^{Min/+}マウスに比べて自然発症の小腸腫瘍数が少ない特徴を有している。生後 1 週齢前後の被ばくで発がんリスクが最も高いことより、この時期に低線量率連続被ばく実験を設定する。EE の発がんリスク低減効果の評価と機序解明のため、経時的に実験動物を解剖し、消化管腫瘍数の抑制効果、病理組織学的解析による腫瘍の進展抑制効果及び血漿中の脂質成分、レプチンやアディポネクチンなどの脂肪細胞由来ホルモン、炎症性サイトカインなど、放射線被ばくによる発がんリスクを修飾する要因を多角的に調べる。本研究成果を通して、生活の環境改善により放射線の健康影響が低減できる可能性を示すことで、災害等による避難生活や仮設住宅で生活する子どもの健康回復（維持）の施策検討に資する基礎情報と成り得る。平成 30、31 年度は、EE と SE 環境で飼育を開始した全実験群の 10、20 週齢での解剖を行った。本年度は、30 週齢での解剖を行い、病理組織学的解析及び分子解析用に組織の保存を行う。また、採取した血漿を用いて生化学検査を行う。

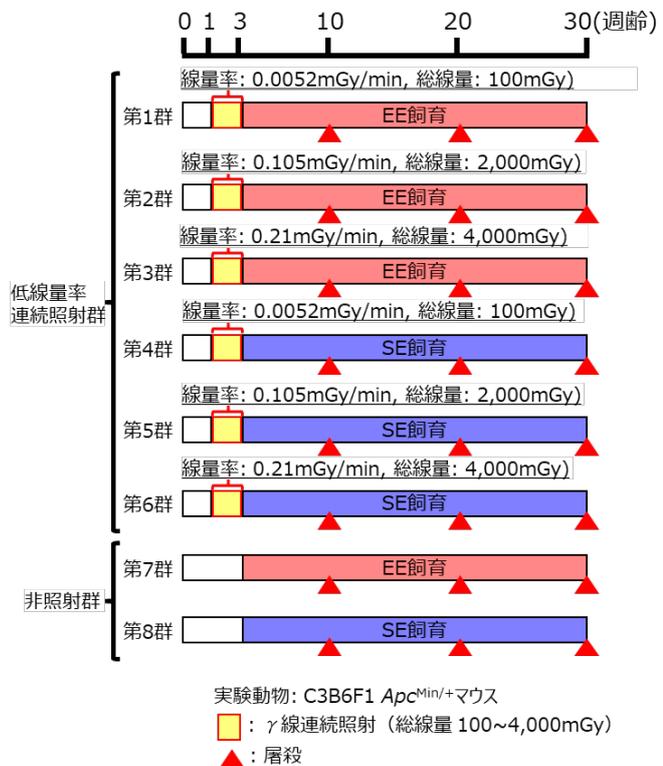


図 II-1 実験デザイン

II. 研究方法

1. C3B6F1 $Apc^{Min/+}$ マウスの作出と維持

平成 30、31 年度に量研放医研の SPF 実験動物飼育室にて系統維持されている雄 C57BL/6J $Apc^{Min/+}$ マウスと購入した雌 C3H マウスを交配させ、C3B6F1 $Apc^{Min/+}$ マウスを作製し実験群の設定を開始した。本年度は、設定した実験群の維持と体重及び摂餌量の測定を継続して行った。

2. EE による幼若期放射線被ばく誘発消化管腫瘍に対する予防効果の実証研究

① 低線量率連続 γ 線照射群の設定

図 II-1 に本実験のデザインを示す。平成 30、31 年度に作製した C3B6F1 $Apc^{Min/+}$ マウスを作出し、放射線高感受性の時期である 1 週齢から 2 週間、 γ 線を低線量率で連続照射し総線量が 0.1、2 及び 4 Gy の群を設定した（図 II-2）。その後、EE で飼育する群（第 1~3 群）と SE で飼育する群（第 4~6 群）に分けた。また、非照射群として、3 週齢から EE で飼育する群（第 7 群）と SE で飼育する群（第 8 群）も加え、合計 8 群を設定した。飼育条件は、室温 23 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度 45% \pm 5%、12 時間明暗照明サイクルで行った。EE 飼育は、通常ケージ（300 \times 170 \times 110mm）の約 8 倍程度のケージ（542 \times 426 \times 200mm）に遊具（回転盤や隠れ家、トンネル、ブロックなど）を設置し、ケージ当たり 5 匹（1 ケージ 5 匹）で飼育する環境、SE 飼育は、通常ケージに同様に飼育する環境（遊具なし）を設定した（図 II-3）。



図 II-2 γ 線連続照射装置

合計 8 群を設定した。飼育条件は、室温 23 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度 45% \pm 5%、12 時間明暗照明サイクルで行った。EE 飼育は、通常ケージ（300 \times 170 \times 110mm）の約 8 倍程度のケージ（542 \times 426 \times 200mm）に遊具（回転盤や隠れ家、トンネル、ブロックなど）を設置し、ケージ当たり 5 匹（1 ケージ 5 匹）で飼育する環境、SE 飼育は、通常ケージに同様に飼育する環境（遊具なし）を設定した（図 II-3）。



図 II-3 飼育環境

全群ともに、10、20、30 週齢で経時的に解剖を行い、採血、小腸及び大腸とその他の主要臓器（胸腺、脾臓、肝臓、肺、白色及び褐色脂肪組織など）の抽出分

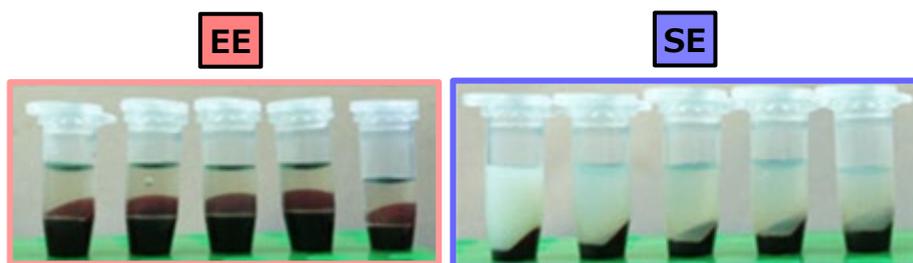


図 II-4 採取した血漿



図 II-5 ホルマリン固定された臓器

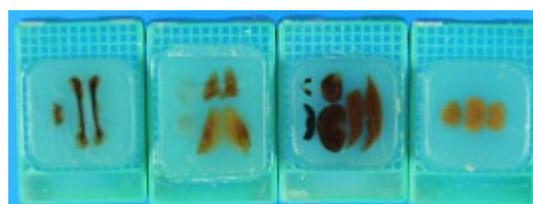


図 II-6 作製したパラフィンブロック

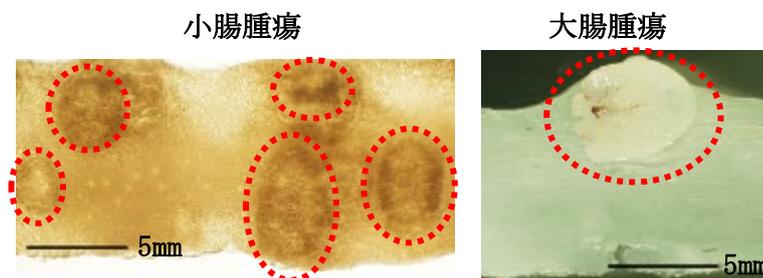
の実験動物を設定（全群とも各ポイント10～15匹）し飼育を開始した。昨年度までに、10、20週齢での解剖を終了した。本年度は、30週齢での解剖を行った。採取した血液は、血漿分離し脂質、糖質成分及びホルモン等の測定のために凍結保存を行った（図II-4）。摘出した主要臓器（胸腺、脾臓、肝臓、肺、白色及び褐色脂肪組織など）は、一部を病理組織学及び免疫組織学的解析用としてホルマリン固定し（図II-5）、パラフィンブロックを作製し（図II-6）、一部の組織について病理解析を行った。加えて、小腸及び大腸腫瘍を分子解析用に実体顕微鏡下で採取し凍結保存した（図II-7）。



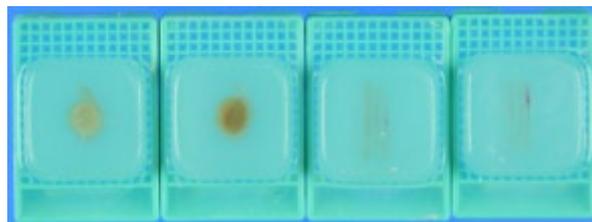
図II-7 採取した腫瘍の凍結サンプル

② 病理組織学及び免疫組織化学的解析

30週齢で解剖し、ホルマリン固定された小腸と大腸の腫瘍性病変は、実体顕微鏡下でカウントと長径の計測を行い、EEによる消化管腫瘍に対する抑制効果の評価に向けたデータの取得を行った（図II-8）。その後、腫瘍性病変は、病理組織学的検索（組織型と悪性度）と免疫組織化学的解析のためにパラフィン包埋し（図II-9）、一部の病変について病理解析を行った。



図II-8 小腸及び大腸腫瘍の実体顕微鏡像



図II-9 パラフィン包埋された腫瘍性病変

③ EEによるホメオスタシス増強効果の検討

30週齢で解剖し採取した血漿（凍結保存）を用いて、糖代謝の指標であるグルコースと脂質成分である総コレステロール、中性脂肪、LDL（悪玉コレステロール）及びHDL（善玉コレステロール）を測定し、EEの糖代謝と脂質代謝への修飾効果について評価を行った。

（倫理面への配慮）

本研究計画では、動物実験は、放医研において実施する。動物実験を行うにあたり、動物実験

委員会等の承認を受けた（動物実験計画書 16-1008-3）。動物愛護法ならびに放射線医学総合研究所「動物実験等実施に関する規程」「実験動物取扱者の健康管理等に関する基準」及び「実験動物の衛生管理等に関する基準」を遵守して実験を行った。

III. 研究結果

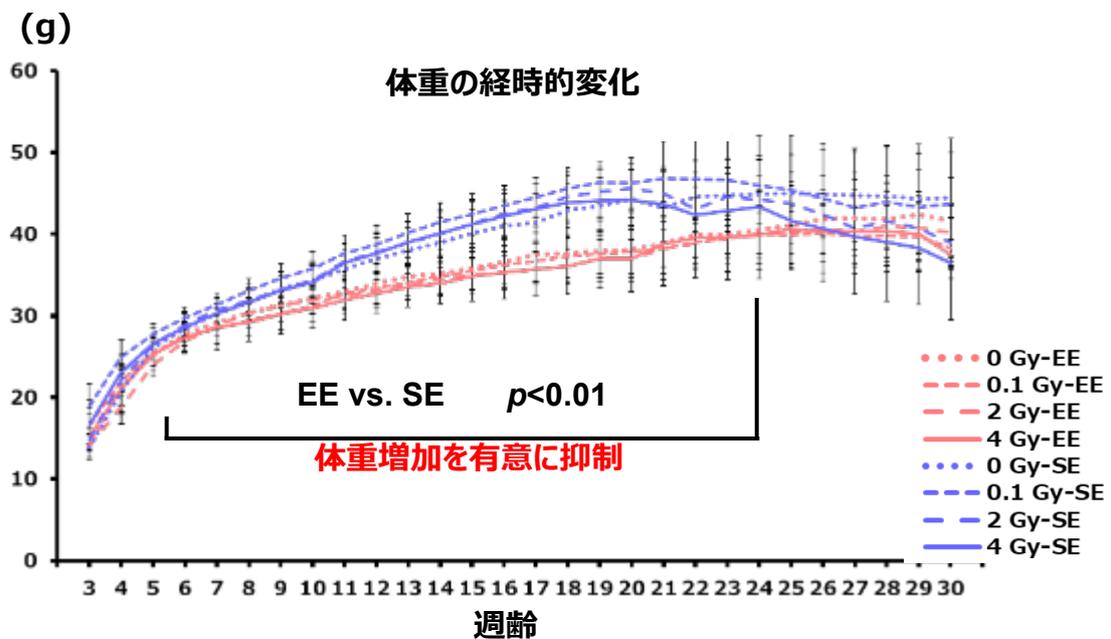
1. EE の健康増進効果の検討

① 体重への効果

3週齢からEE及びSEで27週間飼育した非照射群マウスの外表所見を図III-1に示す。EEで飼育したマウスは、SEに比較して小柄であった。3週齢から30週齢までの体重変化を図III-2に示す。非照射群と総線量0.1Gy照射後にEE飼育した群は、SE飼育群に比較して有意に体重の増加抑制効果が認められた。一方、総線量2及び4Gy照射後にSE飼育した群の体重は、24週齢から減少を示し30週齢ではEE飼育群と同等の体重を示した。



図III-1 EE及びSEで飼育した30週齢マウスの外表所見



図III-2 EE及びSEで飼育したマウスの体重の経時的変化データは、平均値±標準偏差で示す。

② 摂餌量への効果

4 週齢から 30 週齢までの摂餌量の変化を図 III-3 に示す。非照射群と総線量 0.1 Gy 照射群は、EE 飼育により SE 飼育群に比べて摂餌量が有意に増加した。一方、総線量 2 及び 4 Gy 照射後に EE 飼育した群では、摂餌量が 18 週齢より徐々に減少し始め、30 週齢では SE 飼育群との差は認められなかった。

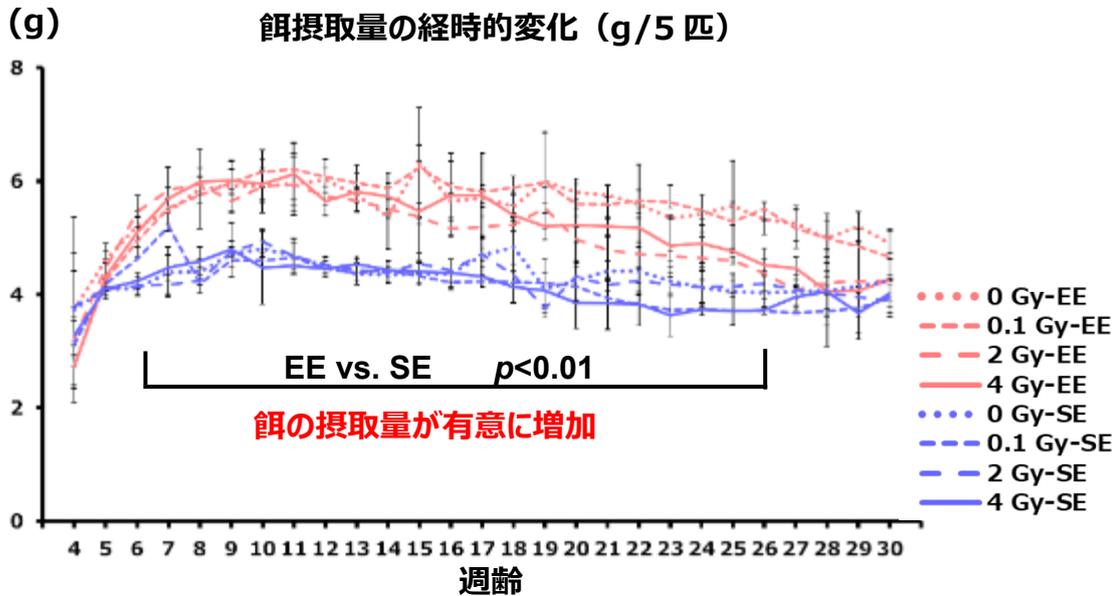


図 III-3 EE 及び SE で飼育による摂餌量の経時的変化

③ 白色脂肪及び褐色脂肪組織への効果

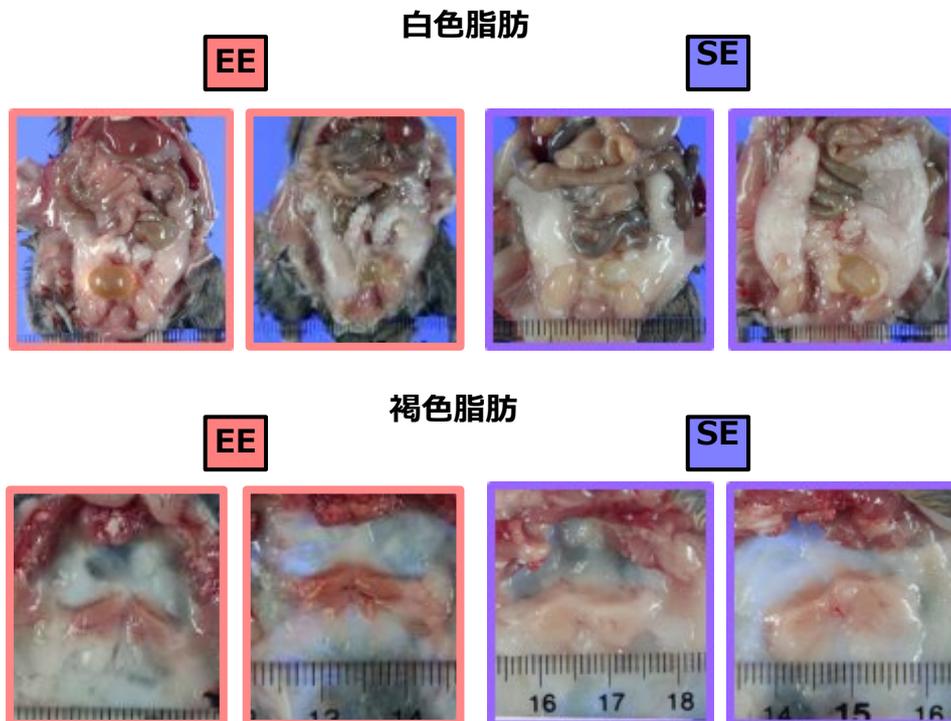
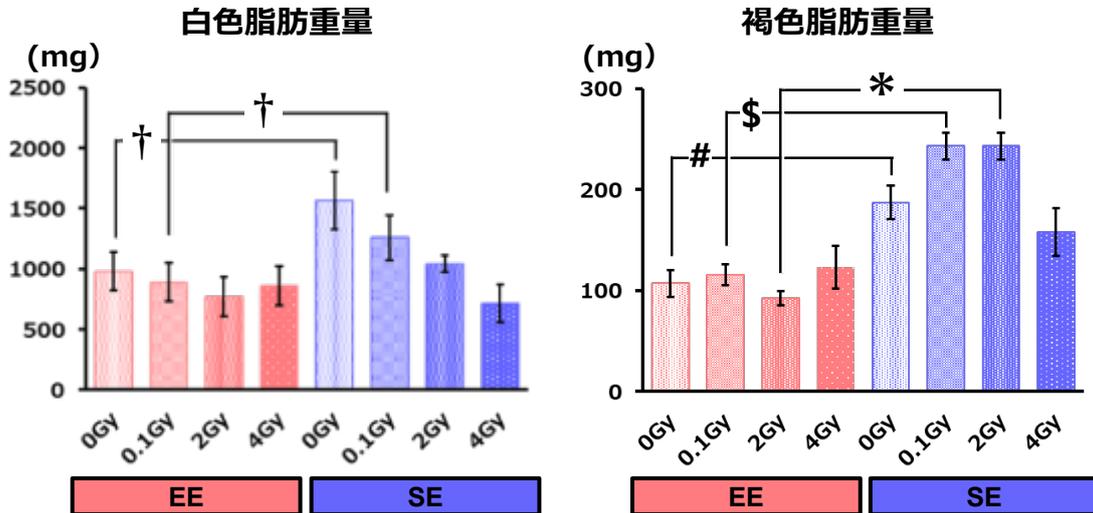


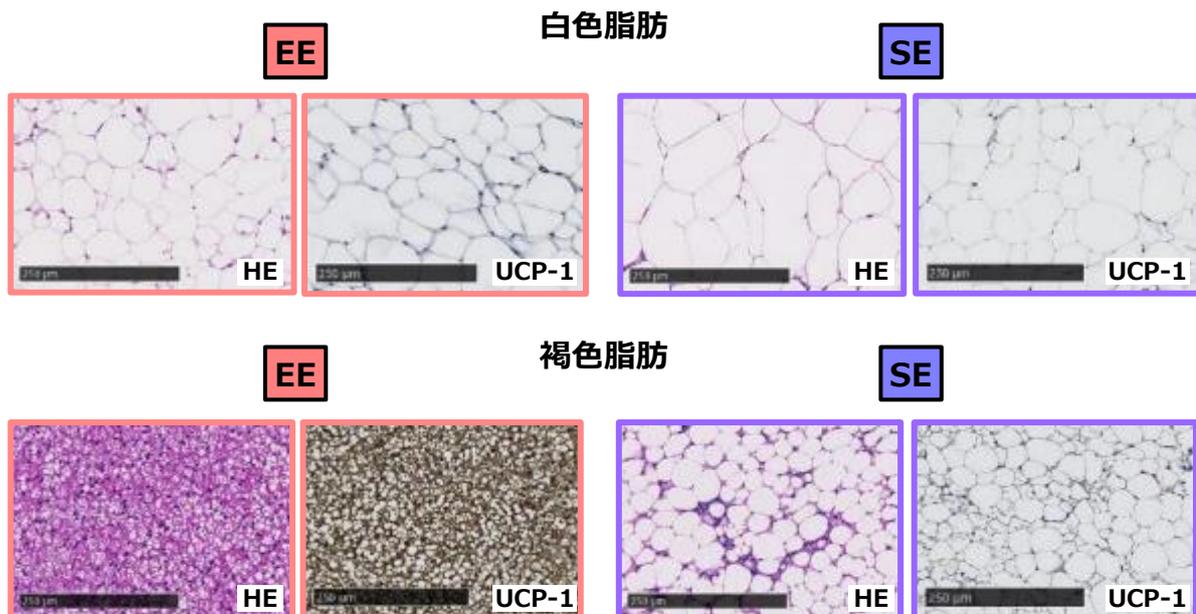
図 III-4 EE 及び SE で飼育した 30 週齢マウスの白色脂肪と褐色脂肪の肉眼像

EE 及び SE で 27 週間飼育したマウスの骨盤内白色脂肪と肩甲骨下褐色脂肪の肉眼像を図Ⅲ-4 に示す。EE 群は、SE 群に比べて白色脂肪の沈着が少なかった。褐色脂肪は、EE により褐色調が強かった。各群の白色脂肪と褐色脂肪重量を図Ⅲ-5 に示す。白色脂肪重量は、非照射群と総線量 0.1 Gy 照射群において EE により有意に減少を示した。褐色脂肪重量は、非照射群と総線量 0.1、2 Gy 照射群において EE により有意に減少した。



図Ⅲ-5 EE 及び SE で飼育した 30 週齢マウスの白色脂肪と褐色脂肪重量データは、平均値±標準偏差で示す。(* $p < 0.0001$, # $p < 0.005$, † $p < 0.01$, \$ $p < 0.05$)

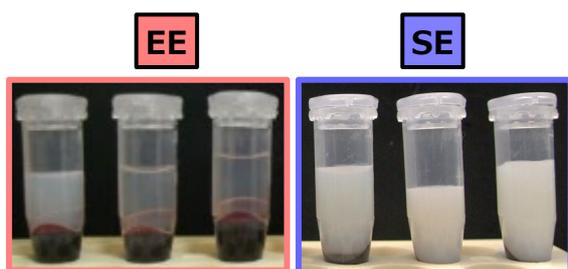
次に、白色脂肪及び褐色脂肪組織の病理組織学的解析を行った。図Ⅲ-6 に各脂肪組織のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した組織像と UCP-1 (uncoupling protein-1, 脱共役タンパク質 1) の免疫染色像を示す。白色脂肪及び褐色脂肪組織ともに、EE により細胞質内の油滴サイズの著明な減少を認めた。EE は、褐色脂肪組織での UCP-1 の発現を増加させた。



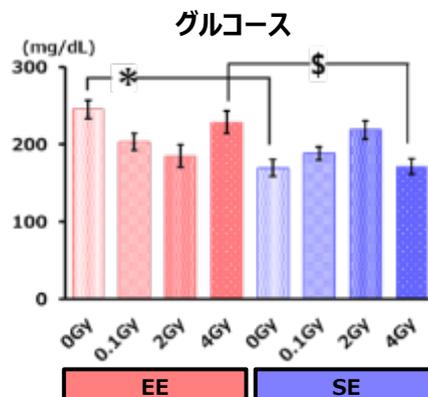
図Ⅲ-6 EE 及び SE で飼育した 30 週齢マウスの白色脂肪と褐色脂肪組織の組織像 (ヘマトキシリン・エオジン染色) と UCP-1 の免疫染色像

④ 糖代謝及び脂質代謝への効果

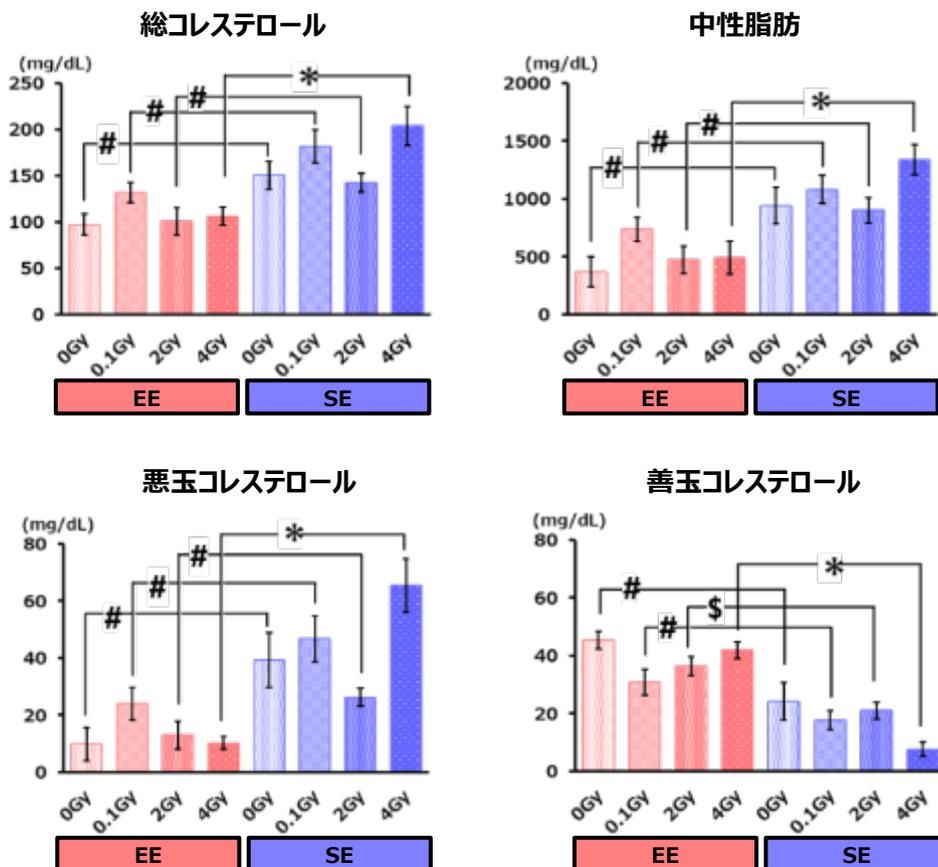
EE 及び SE で飼育した 30 週齢マウスから採取した血漿の肉眼像を図Ⅲ-7 に示す。SE 群は、乳び血漿であるのに対し EE 群では殆どが黄色透明であった。EE 群の一部の血漿において、軽度の白色混濁を示す血漿も認められた。次に凍結保存した血漿を用いて血中グルコース値を測定した結果、非照射群と総線量 4 Gy 照射群において EE により有意な増加が認められた（図Ⅲ-8）。



図Ⅲ-7 EE 及び SE で飼育した 30 週齢マウスから採取した血漿の肉眼所見



図Ⅲ-8 EE 及び SE で飼育した 30 週齢マウスの血中グルコース値データは、平均値±標準偏差で示す。（* $p < 0.001$, \$ $p < 0.005$ ）



図Ⅲ-9 EE 及び SE で飼育した 30 週齢マウスの生化学データデータは、平均値±標準偏差で示す。（* $p < 0.001$, \$ $p < 0.005$, # $p < 0.05$ ）

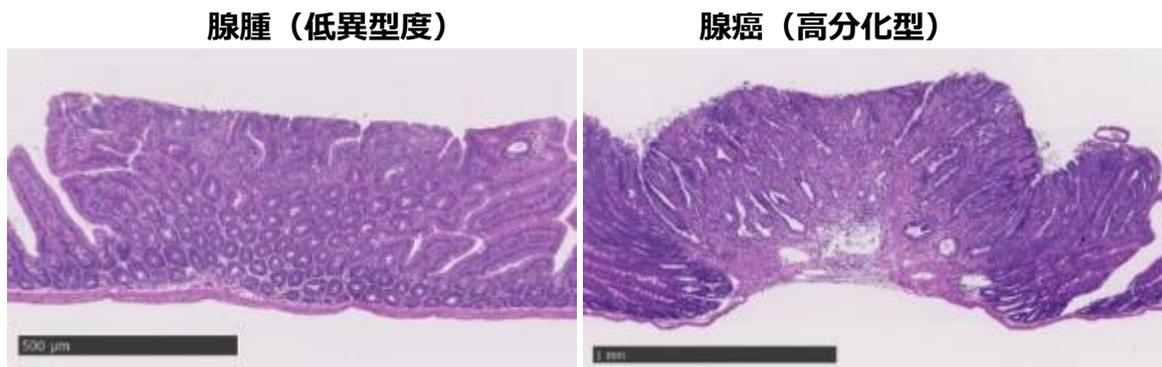
次に、血中脂質成分を測定した結果を図Ⅲ-9 に示す。EE 群は、SE 群に比較して、総コレステ

ロール、中性脂肪及び悪玉コレステロールの値が有意に減少を示した。一方、善玉コレステロールの値は、EE により有意に増加を示した。この効果は、被ばく総線量に関係無く認められた。

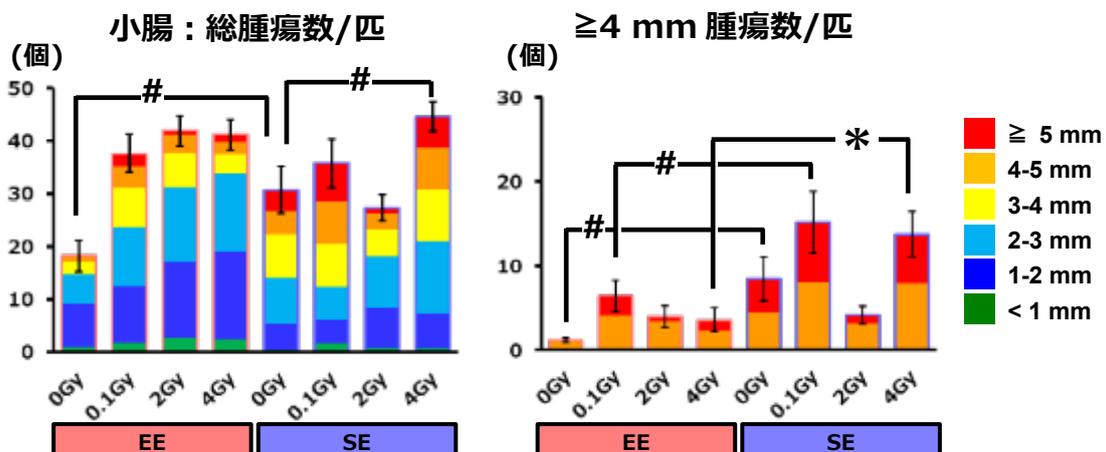
2. EE の放射線誘発消化管腫瘍抑制効果の検討

① 小腸腫瘍に対する効果

3 週齢から 27 週間、EE 及び SE で飼育した 30 週齢マウスの小腸に認められた腫瘍の病理組織像を図Ⅲ-10 に示す。腫瘍は、粘膜内に限局した腺腫と粘膜筋板や固有筋層へ浸潤を認める腺癌が観察された。次に、1 匹あたりの総腫瘍数と 4 mm 以上の腫瘍数を図Ⅲ-11 に示す。EE 群の小腸総腫瘍数は、被ばく総線量依存的な増加は認められなかった。SE 群においては、総線量 0.1 及び 2 Gy 照射群の総腫瘍数は非照射群（0 Gy）と比較して有意な増加がみられなかった。一方、総線量 4 Gy 照射群では、総腫瘍数の有意な増加を認めた。EE による総腫瘍数の抑制効果は、非照射群においてのみ認められた。腫瘍径が 4 mm 以上の腫瘍数は、非照射群、総線量 0.1 及び 4 Gy 照射群において EE により有意に抑制された。総線量 2 Gy 照射群における 4 mm 以上の腫瘍数は、EE と SE とともに同等の腫瘍数であった。



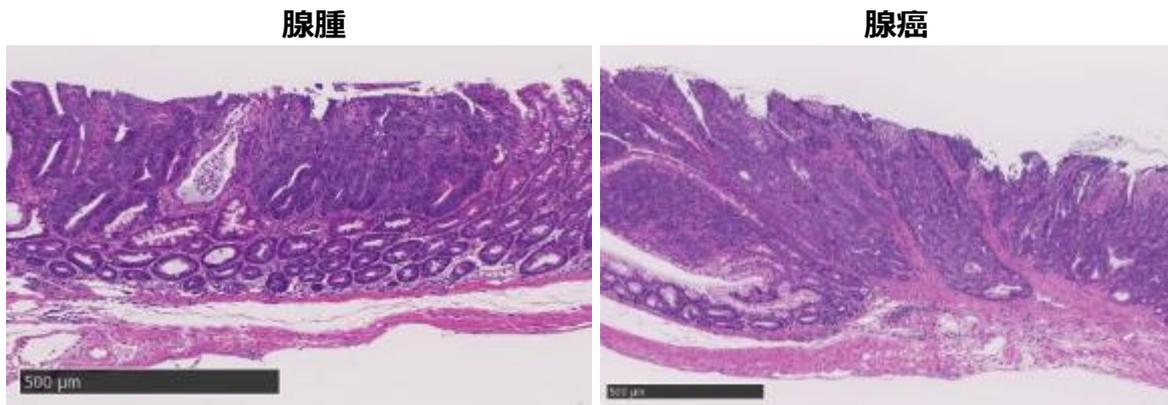
図Ⅲ-10 EE 及び SE で飼育した 30 週齢マウスの小腸に発生した腫瘍の病理組織像（ヘマトキシリン・エオジン染色）



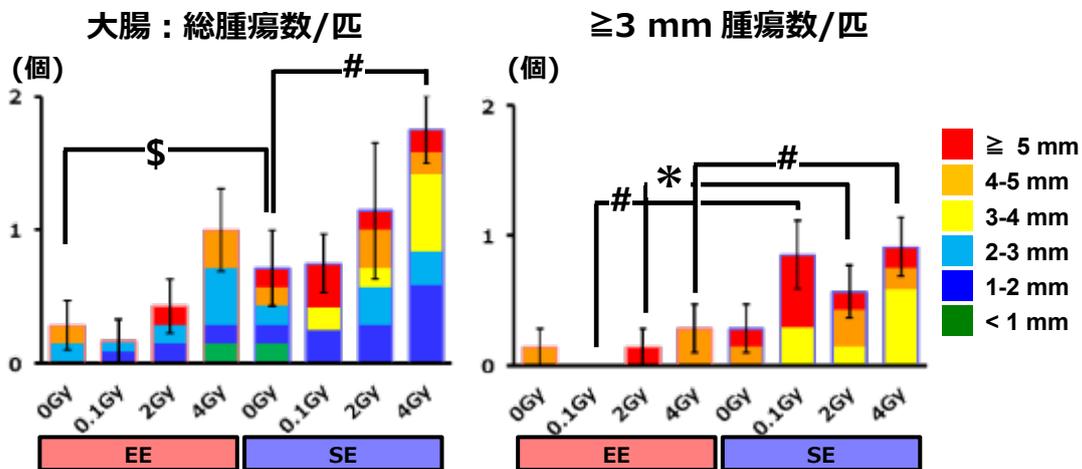
図Ⅲ-11 EE 及び SE で飼育した 30 週齢マウスの小腸腫瘍数データは、平均値±標準誤差で示す。（* $p < 0.005$, # $p < 0.05$ ）

② 大腸腫瘍に対する効果

図Ⅲ-12 に 3 週齢から 27 週間、EE 及び SE で飼育した 30 週齢マウスの大腸に認められた腫瘍の病理組織像を示す。腫瘍は、小腸腫瘍同様に粘膜内に限局した腺腫と筋層が線維性肥厚を示し粘膜筋板への浸潤を伴った腺癌が観察された。次に 1 匹あたりの総腫瘍数を図Ⅲ-13 に示す。SE 群では、総線量 2 及び 4 Gy 照射により総腫瘍数の増加傾向を認めた。総線量 0.1 Gy 照射群の総腫瘍数は、非照射群と同程度であった。SE 群では、腫瘍径が 3 mm 以上の腫瘍数の増加傾向が認められた。一方、EE 群は SE 群に比べて 3 mm 以上の腫瘍数が有意に減少した。



図Ⅲ-12 EE 及び SE で飼育した 30 週齢マウスの大腸に発生した腫瘍の病理組織像（ヘマトキシリン・エオジン染色）



図Ⅲ-13 EE 及び SE で飼育した 30 週齢マウスの大腸腫瘍数
データは、平均値±標準誤差で示す。（* $p < 0.001$, \$ $p < 0.005$, # $p < 0.05$ ）

IV. 考察

本研究の目的は、低線量率・低線量放射線を照射したヒト家族性大腸腺腫症のモデルマウスを用いて EE の健康増進（維持）効果と放射線誘発消化管腫瘍に対する予防効果を経時的に検証することにある。本研究成果は、生活の環境改善により放射線の健康影響や災害等による避難生活や仮設住宅で生活する子どもの健康回復の施策に資する情報となることが期待できる。

今年度は、3 年計画の最終年度であり、昨年度までに設定した図 II-1 に示す実験群のマウスの継続的な観察と体重と摂取餌の測定を経時的に行った。加えて、3 週齢から EE 及び SE で 27 週間飼育した 30 週齢のマウスの解剖を行い EE の効果を検証した。その結果、非照射群と総線量 0.1 Gy 照射群において、EE は SE に比べて摂取餌量が増加するにも関わらず体重の増加を有意に抑制することが分かった。一方、総線量 2 及び 4 Gy 照射後に SE で飼育した群の体重と摂取餌量は、小腸と大腸の腫瘍発生に伴い 20 週齢頃から減少傾向がみられ 30 週齢では EE 飼育群との顕著な差が認められなくなった。EE による体重増加の抑制効果の要因は、生殖器周囲の白色脂肪組織と肩甲骨下の褐色脂肪組織の病理組織学及び免疫組織化学的解析により脂肪滴サイズの減少と脂肪燃焼促進効果を有する UCP-1 の発現増加を認めたことより、脂肪組織への脂肪蓄積抑制と脂肪の消費亢進による脂肪組織重量の減少によるものと考えられた。

EE による糖及び脂質代謝への効果を評価するため、30 週齢で屠殺し凍結保存した血漿を用いて生化学検査を行った。昨年度と同様に、総線量 4 Gy 照射し SE 飼育した群では総コレステロール、中性脂肪及び悪玉コレステロールの値が非照射で SE 飼育した群に比較して増加を示した。逆に、善玉コレステロールは減少を示した。これらの所見は、総線量 4 Gy 照射群でのみ認められた。一方、総線量 4 Gy 照射後に EE 飼育した群では、上記の所見は認められず EE による脂質代謝改善効果が認められた。その他の群においても、EE により総コレステロール、中性脂肪及び悪玉コレステロール値の有意な減少と善玉コレステロール値の有意な増加がみられ、EE が脂質代謝改善作用を有していることが分かった。昨年度までに行った 10 及び 20 週齢の解析結果より、EE による顕著な脂質代謝改善効果が認められた。これらの効果は、EE による運動量やそれに伴うエネルギー消費の増加によるものと考えられた。

次に、EE による放射線誘発消化管腫瘍に対する抑制効果について、30 週齢で屠殺し摘出した小腸と大腸に発症した腫瘍数とサイズを計測し検証した。その結果、EE は、小腸においては総腫瘍数には統計学的有意差は認められなかったが、腫瘍径が 4 mm 以上の腫瘍数に関しては有意な抑制が認められた。大腸においても同様な抑制効果が認められた。以上のことより、EE は腫瘍の発生抑制効果ではなく腫瘍の進展を抑制する作用効果を有している可能性が示唆された。

V. 結論

ヒト家族性大腸腺腫症のモデルマウスに生後 1 週齢から 3 週齢までの 2 週間に総線量 0.1 Gy (0.0052 mGy/min)、2 Gy (0.105 mG/min)及び 4 Gy (0.21 mGy/min)の γ 線を照射後、EE 条件下で 27 週間飼育することで、体重の増加抑制、脂肪重量の増加抑制、脂質代謝の改善及び放射線誘発消化管腫瘍のサイズを有意に抑制することを確認した。以上のことより、生活環境改善は、身体の健康改善、維持及び増進に有用であることが示唆された。加えて、腫瘍の進展を抑制することでがんを予防する可能性が示唆された。

VI. 次年度以降の計画

本年度は、昨年度に設定した図 II-1 に示す実験群の EE 及び SE 環境での飼育の継続と体重、摂取餌の経時的測定を行った。また、EE 及び SE で 27 週間（3 週齢から 20 週齢まで）飼育した群

の解剖を行い EE の脂質代謝改善効果と消化管腫瘍に対する抑制効果を実証した。今年度で本課題の全ての計画を予定通り終了した。次年度は、本課題で得られた成果をまとめ学術雑誌に投稿予定である。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

ア) 学会発表等

- 1) Morioka T, Yanagihara H, Yokomizo S, Ogawa M, Fujita M, Nishimura M, Kakinuma S. Effects of enriched environment on health effects after continuous low-dose-rate irradiation in *Apc*^{Min/+} mice. 16th International Congress on Radiation Research (ICRR2019), Manchester, UK.

VIII. 引用文献

- 1) Cao L., *et al.* Environmental and Genetic Activation of a Brain-Adipocyte BDNF/Leptin Axis Causes Cancer Remission and Inhibition. *Cell*, 142(1), 52-64, 2010.
- 2) Ozasa K, Shimizu Y, Suyama A., *et al.* Studies of the mortality of atomic bomb survivors, Report 14, 1950–2003: an overview of cancer and noncancer diseases. *Radiat Res*, 177, 229-243, 2012.
- 3) Pearce MS, Salotti JA, Little MP., *et al.* Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. *Lancet*, 380, 499-505, 2012.
- 4) Morioka T., *et al.* Calorie restriction suppresses the progression of radiation-induced intestinal tumours in C3B6F1 *Apc*^{Min/+} Mice. *Anticancer Res.*, 41 (3), 1365-1375, 2021.

Study for risk reduction of childhood continuous radiation exposure-induced health effects by enriched environment

Takamitsu Morioka

Department of Radiation Effects Research, National Institute of Radiological Sciences

National Institutes for Quantum and Radiological Sciences and Technology

• Section manager

Key word: Low-dose radiation, Childhood exposure, Enriched environment, Cancer prevention

Abstract

Long-term evacuation life caused by disasters such as unclear accident, earthquake, and tsunami have an adverse effect on physical and mental health. After the accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant, many people are concerned about the health effects of low-dose radiation exposure. Low-dose radiation induced cancer risk is considered really small but many people worry about it, especially to children. It is important to establish a new prevention method for children's stress and radiation effects. Enriched environment (EE) provide positive physical and psychological stress. EE has been mainly reported to activate the central nervous, immune and endocrine systems. However, whether EE prevent the radiation associated tumor is unknown. In this study, we examined the modifying effects of EE on radiation-induced intestinal tumors using mouse model of human familial adenomatous polyposis.

Male C3B6F1 *Apc*^{Min/+} mice were irradiated γ -rays for 2 weeks from 1 week of age to the low-dose rate (0.0052-0.21 mGy/min), receiving 0, 0.1, 2 or 4 Gy total dose. After irradiation, mice were housed in EE or SE (Standard environment) cage from 3 weeks of age for 27 weeks. Mice were sacrificed under the anesthesia at 30 weeks of age. Blood, white and brown adipose tissues small intestine and colon were collected for biochemical and histopathological examinations.

EE significantly suppressed the body weight gain and promoted the feed consumption compared with SE. EE also significantly decreased the tissue weights of white and brown adipose tissues compared with SE. Histologically, EE reduced the lipid droplet size of both white and brown adipose tissues. In EE groups, plasma total cholesterol, triglyceride and low-density lipoprotein cholesterol were significantly lower than that of SE groups. EE suppressed the tumor growth in small intestine and colon. These results suggested that EE has possible improvement effect of lipid metabolism, and potent cancer preventive effect in this intestinal carcinogenesis bioassay system. The goal of the present study is to provide the scientific evidences that should contribute to the scientifically proven prevention against radiation exposure-induced health effects.

成体期の生活習慣等の低線量放射線発がんリスクにおよぼす影響と メカニズム解明

主任研究者：鈴木 啓司（国立大学法人長崎大学 原爆後障害医療研究所

放射線災害医療学研究分野 准教授）

分担研究者：柿沼 志津子（国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構

放射線医学総合研究所 放射線影響研究部 部長）

研究要旨

本研究は、成体期の生活習慣等変化が、小児期の低線量放射線被ばくによる発がんリスクにおよぼす影響とそのメカニズムの解明を目的として計画された。具体的には、『カロリー摂取バランス変調による肥満が局所の炎症を惹起し、炎症にともなう細胞死が組織微小環境を攪乱することにより小児期被ばくによる放射線発がんのリスクを修飾する』との仮説を提唱し、これを、動物発がんモデルと成体期の高脂肪食による肥満（Diet-induced obesity; DIO）モデルを組み合わせた実験系により証明することを目指した。低線量（100mGy）の放射線被ばくを含む小児期（1 週齢）での放射線被ばくによる発がんを、被ばく動物の経時的解析と終生飼育により追跡し、同時に、発がんのプロセスを、組織における DNA 障害、細胞死、細胞老化、炎症、を含む組織微小環境の変化から解析し、放射線照射直後から微小がんあるいはがん成立までの各プロセスでの DIO の影響を統合的に解析する。対象とするがんは、動物発がんモデルにおいて小児期被ばくにより発がんリスクの上昇する胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、および肺がんである。

本研究には、長崎大学および放射線医学総合研究所（放医研）の 2 機関が参画し、長崎大学では、組織微小環境の変化の解析を担当した。放医研では、DIO 動物の長期飼育、放射線照射（100 mGy および 4 Gy）、経時的標本採取、および発がん解析を担当した。放射線照射は B6C3F1 雄マウスの 1 週齢時に行い、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢まで、60%脂肪食を与えて飼育し、その後、通常食に戻して生涯飼育を行った。定期的に採取した組織標本は、作成した病理切片を長崎大に送付して、組織微小環境の解析に供した。組織微小環境の解析は、特異的抗体を用いた多重蛍光免疫染色法により実施した。

令和 2 年度は、1 週齢で照射したマウスを、累積の飼育日数で 1,000 日を超える期間、飼育および観察を継続した。このうち、高脂肪食は、20 週齢から 24 週齢まで与え、体重の一時的な増加を認めていたが、通常食に戻してから 4 週間には通常の体重に戻り、その後の観察期間でも通常食群との違いは認められなかった。一方、放射線照射群では、4 Gy 照射群で、生涯にわたる顕著な体重減少を認めたが、100 mGy 照射群の体重変化は、非照射群と同様であった。

生存率について検討したところ、4 Gy 照射群でコントロールと異なる有意な減少を認め、飼育開始 100~200 日頃から胸腺リンパ腫による生存率の減少が観察された。飼育日数が 500 日を超えると、再び生存率の低下が促進され、この時期には肝腫瘍の発生が確認された。4 Gy による発

がんによる生存率の低下は、成体期の高脂肪食の摂取によって変化する事はなかった。また、100 mGy 照射群は、コントロールと同様の生存率を示した。

組織微小環境の解析から、血清中の総コレステロールの一時的な増加に加え、高脂肪食の摂取による影響は肝臓において主に認められ、PLIN2 陽性脂肪滴の顕著な蓄積が確認された。その後、脂肪滴の蓄積は改善されたが、飼育日数が進むにつれ、コントロール群でも脂肪滴の蓄積が認められるようになり、放射線照射（4 Gy のみ）によって脂肪滴の蓄積が促進する事が明らかになった。さらに、脂肪滴の蓄積に連動して肝細胞の巨核化や増殖性の亢進が認められ、当初予想した炎症性反応の関与は認めなかったものの、放射線照射による脂肪性障害が、肝腫瘍発生の背景にある事が示唆された。

以上の結果から、1) 成体期の一時的な肥満は、小児期の放射線照射による発がんリスクを増加させない事、2) 100 mGy の低線量放射線には、過剰な発がんリスクは認められない事が明らかになり、3) 放射線発がんには組織老化の早期化が関わっている新モデルが提唱された。

キーワード：放射線、低線量、発がん、生活習慣、組織反応

I. 研究目的

東日本大震災にともなう東京電力福島第一原子力発電所の事故（以降は福島原発事故）を受けて、事故の被災者を始め、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱くことになった。事故から 10 年がたち、福島県内における県民健康調査において被ばく線量が把握されるに従い、専門家会議の中間取りまとめでも、また本年公開された UNSCEAR 報告書でも、福島県および福島近隣県において、発がんリスクの有意な増加はないと結論づけている。しかしながら、原発事故後の被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、事故当時に小児期を過ごした子供たちの生活習慣等の変化が、放射線発がんリスクを修飾する可能性が懸念される。中でも、学校生活環境の変化、戸外活動の制限、運動不足等に起因するカロリー摂取バランス変調に基づく一時的な肥満は、放射線の発がんリスクを修飾する要因として注視する必要がある、健康リスクの低減という観点からもその影響を明確にすることが望まれる。これまでの、小児期の肥満の影響を調査する研究により、小児期の肥満は、放射線発がんリスクに影響をおよぼさない可能性が示唆されている。今後、当時小児期にあった子どもたちは成長して、やがて青年~成人になっていくことを鑑みると、これまでの研究を補完する研究としても、小児期の被ばくの発がんリスクが、成体期の生活習慣等の変化で修飾されるか否かを明らかにする研究を実施する必要がある。福島県民、とりわけ、小児期に事故を経験した子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、子供たちの今後の生活習慣等が、小児期の低線量放射線被ばくによる健康影響におよぼす影響を対象とした研究は、極めて重要である。

このため本研究では、成体期の生活習慣等変化が、小児期の低線量放射線被ばくによる発がんリスクにおよぼす影響とそのメカニズムの解明を目的とした。具体的には、『カロリー摂取バランス変調による肥満が局所の炎症を惹起し、炎症にともなう細胞死が組織微小環境を攪乱することにより小児期被ばくによる放射線発がんのリスクを修飾する』との仮説を提唱し、これを、動物発がんモデルと成体期の高脂肪食による肥満（Diet-induced obesity; DIO）モデルを組み合わせた

実験系により証明することを目指した。研究項目としては、低線量（100mGy）の放射線被ばくを含む小児期（1 週齢）での放射線被ばくによる発がんを、被ばく動物の経時的解析と生涯飼育により追跡し、①DNA 障害の誘発と除去、②細胞死（細胞老化）を含む初期組織反応、③組織障害の回復と炎症性反応、④初期がんと発がん微小環境、および、⑤がんの成立と進展、の各プロセスにおいて、成体期の DIO の影響を組織微小環境の変化に着目して統合的に解析を行った。対象とするがんは、動物発がんモデルにおいて小児期被ばくにより発がんリスクの上昇する胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、および肺がんである。

本研究には、長崎大学および放射線医学総合研究所（放医研）の2機関が参画し、長崎大学では、組織微小環境の変化の解析を担当し、放医研では、DIO 動物の長期飼育、放射線照射（100mGy および 4Gy）、経時的標本採取、および発がん解析を担当した。放射線照射は B6C3F1 雄マウスの1 週齢時に行い、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢まで、60%脂肪食を与えて飼育し、その後通常食に戻して生涯飼育を行った。また定期的に採取した組織標本は、病理切片を長崎大に送付して、特異的抗体を用いた多重蛍光免疫染色法により組織微小環境の解析を実施した。

本研究では、動物発がんモデルを用いた高脂肪食による一時的な肥満の実験系を用い、小児期被ばくによる発がんリスクが変化するかどうかを明らかにするが、その結果、肥満などの生活習慣等による自然発がん要因が低線量放射線被ばくの健康影響にどのような影響をおよぼすか評価する際に不可欠な科学的知見が得られる。とりわけ、本研究では、低線量放射線として 100 mGy の影響を評価するが、これまでの研究成果から、100 mGy 単独照射群においては、本研究が解析対象とする発がんリスクの有意な増加は認められないと予想される。本研究の成果により、100 mGy による放射線被ばくと生体期の生活習慣等とが相互作用した場合でも、発がんリスクに有意な増加が認められなければ、100 mGy 以下の低線量放射線でも、放射線被ばく単独はもちろんのこと、生活習慣等の変化があった場合でも発がんリスクの増加は予想されないと結論できる。これらにより、生活習慣等の変化により懸念される放射線発がんリスクの低減に向け、機構論に基づいた対策を可能にする科学的基盤が提供できる。

令和2年度は、1 週齢で照射したマウスを、累積の飼育日数で 1,000 日を超える期間、飼育および観察を継続した。このうち、高脂肪食は、20 週齢から 24 週齢まで与え、体重の一時的な増加を認めていたが、通常食に戻してから 4 週間には通常の体重に戻り、その後の観察期間でも通常食群との違いは認められなかった。一方、放射線照射群では、4 Gy 照射群で、生涯にわたる顕著な体重減少を認めたが、100 mGy 照射群の体重変化は、非照射群と同様であった。

生存率について検討したところ、4 Gy 照射群でコントロールと異なる有意な減少を認め、飼育開始 100~200 日頃から胸腺リンパ種による生存率の減少が観察された。飼育日数が 500 日を超えると、再び生存率の低下が促進され、この時期には肝がんの発生が確認された。4 Gy による発がんによる生存率の低下は、成体期の高脂肪食の摂取によって変化する事はなかった。また、100 mGy 照射群は、コントロールと同様の生存率を示した。

組織微小環境の解析から、血清中の総コレステロールの一時的な増加に加え、高脂肪食の摂餌による影響は肝臓において主に認められ、PLIN2 陽性脂肪滴の顕著な蓄積が確認された。その後、脂肪滴の蓄積は改善されたが、飼育日数が進むにつれ、コントロール群でも脂肪滴の蓄積が認められるようになり、放射線照射（4 Gy のみ）によって脂肪滴の蓄積が促進する事が明らかになっ

た。さらに、脂肪滴の蓄積に連動して肝細胞の巨核化や増殖性の亢進が認められ、当初予想した炎症性反応の関与は認めなかったものの、放射線照射による脂肪性障害が、肝がん発生の背景にある事が示唆された。

以上の結果から、1) 成体期の一時的な肥満は、小児期の放射線照射による発がんリスクを増加させない事、2) 100 mGy の低線量放射線には、過剰な発がんリスクは認められない事が明らかになり、3) 放射線発がんには組織老化の早期化が関わっている新モデルが提唱された。

II. 研究方法

本研究では、福島原発事故を経験した子どもたちが成長してからの生活習慣等の変化を念頭に、小児期に放射線照射を行ったマウスに、成体期に相当する期間の間、高脂肪食（通常食が 10%脂肪含有であるのに対し 60%脂肪含有餌。おおよそ 36%のカロリー増になり、15~20 歳程度の青年で換算すると、1 日あたりの標準エネルギー量である 2,300~3,100kcal に対して、2,700~3,400kcal 相当になる）を給餌し、その後、生涯飼育をすることによってがんの発生を解析する実験プロトコルを採用した（図 II-1）。具体的には、放医研において、B6C3F1 雄マウスに、小児期である 1 週齢において放射線（ γ 線（0.5 Gy/分）、100 mGy および 4 Gy）を照射し、その後、成体期に相当する 20 週齢から 24 週齢までの期間に高脂肪餌を与えて DIO を誘導し、その後通常餌に戻してから長期飼育を実施した。本研究計画で使用している B6C3F1 マウスでは、年齢増加にともなう体重変化が収束するのがおおよそ 20 週齢付近であり、この週齢は、ヒトでは、生活習慣の大きな変化が想定される 20 歳代後半から 30 歳代に相当することから、20 週齢から 24 週齢の間の 4 週間の高脂肪食給餌を設定した。

放射線照射後は一定期間毎に組織標本を採取して、組織微小環境変化の継時観察を実施した。放射線発がんの対象とするがんのタイプは、小児期被ばくにより発がんリスクが上昇する、リンパ腫、肝がん、および肺がんであるため、これらの臓器・組織を採取し、その後薄切切片を作成し、抗原賦活化の後に蛍光免疫染色法による DNA 障害、細胞死、炎症反応や組織微小環境の解析に供した（図 II-2）。

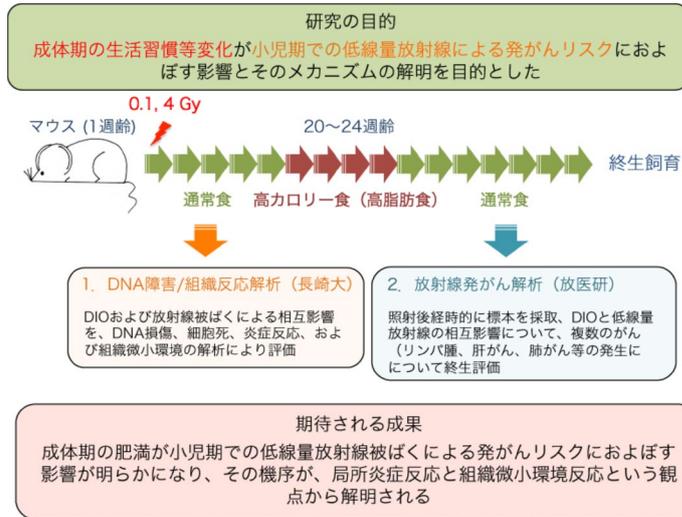


図 II-1. 研究概要図

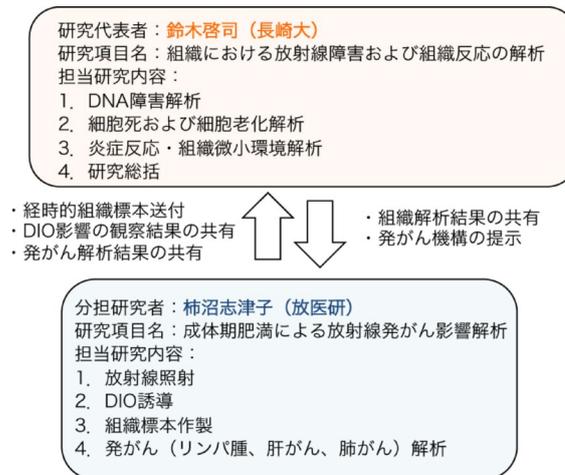


図 II-2. 研究組織間の連携図

DIOを誘導するための高脂肪餌としては、Research Diet社のD12492を用いた。D12492は、カロリーの60%が脂肪に由来し、残りの20%ずつが蛋白質と炭水化物の飼料である。単位重量あたりのカロリー量は、コントロール餌（D12450J、10%脂肪）にくらべおおよそ140%増加しており、多くのDIO研究の標準飼料として汎用されているものである。一方、通常餌には、脂肪含有率が10%以外は同じ組成の餌を用いた。

1. 組織における放射線障害および組織反応の解析

DIO あるいは放射線による組織障害あるいは組織微小環境変化を定量的に評価するため、採取された胸腺・脾臓、肝臓、肺および脂肪組織を、ホルマリン中で固定した後にパラフィン中に包埋し、薄切標本（厚さ $4\mu\text{m}$ ）を作成して解析に供した。発がんの対象となる組織は、胸腺・脾臓、肝臓および肺である。スライドガラス上に固定した薄切切片は、脱パラフィン処理を施した後に PBS 中に保管し、蛍光免疫染色を実施するまでは冷蔵庫中で保存した。

標本の染色を行う当日に、賦活化溶液中で 95°C のウォーターバスに 40 分間浸け、抗原の賦活化を行った。その後、5%skim milk を含む TBS-T（0.5%Tween-20 を含む TBS 緩衝液）に一次抗体を希釈して、標本切片と 37°C で 2 時間反応させた。反応終了後、PBS で十分に洗浄した後、二次抗体を 37°C で 1 時間反応させた。二次抗体には、Alexa 蛍光標識抗体を用いた。標本は、 $1\mu\text{g/ml}$ の DAPI を含む 10%グリセリン PBS 溶液中で封入して保存した。作成した標本は、蛍光顕微鏡下で観察し、デジタル画像を取得した後、画像解析システムにより一次抗体のシグナルを解析した。

一次抗体としては、DNA 損傷の検出には、抗 53BP1 抗体（Bethyl、A300-272）を、組織障害および回復の解析には、抗 Ki-67 抗体を検討した。炎症反応は、組織におけるマクロファージ、好中球および樹状細胞の浸潤を、これらの細胞に対する特異的抗体を用いた蛍光免疫染色法により検討した。細胞死は、アポトーシスの誘導および老化様細胞死の誘導を、また、組織微小環境は、上皮細胞および間葉系細胞を細胞骨格系蛋白質に対する特異的抗体によって、さらに微小血管やリンパ管は、血管内皮細胞あるいはリンパ管内皮細胞に対する特異的抗体によって可視化した。

2. 成体期肥満による放射線発がん影響解析

B6C3F1 雄マウスを用いて、小児期（1 週齢）に放射線照射（ γ 線、 100mGy および 4Gy 、線量率は 0.5Gy/min ）を行った。その後、通常餌で飼育を行い、成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢まで、高脂肪食（60%脂肪食）を与えて飼育し、その後、再び通常食に戻して生涯飼育を実施した。

生涯飼育を行う群は、 0Gy 、 100mGy 、および 4Gy 照射群の 3 群を、それぞれ通常脂肪食と高脂肪食で飼育し、合計 6 群を設定した。1 群は 60 匹で、発がんを観察する終生飼育用には計 360 匹を使用した。飼育観察および体重測定を継続し、がんの発生および病状の悪化が認められるマウスについては解剖し、病理サンプルの保存および解析を行った。成体期の肥満の影響は、リンパ腫、肝がん、および肺がんに着目して、各実験群における生存率の減少動態の違いを比較することにより評価した。

3. 統計解析

解析標本は、最低 3 匹の個体より採取したサンプルを用いた。群間差の有意差検定には、Student's *t*-test を用い、一方、マウスのグループ間の生存率の差は log-rank test により有意差を検定した。いずれも、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判断した。

（倫理面への配慮）

本研究計画では、動物実験は、放医研において実施する。このため、以下に記述するように、

動物実験を行うにあたり、動物実験委員会等の承認を受けた（承認番号 18-1003）。また、長崎大学では、各所において作成された組織切片を用いた解析のみを行うため、動物実験委員会等の承認は不要である。放医研においては、動物実験を行うにあたり、動物実験委員会等の承認を受けた上で、動物愛護法ならびに放射線医学総合研究所「動物実験等実施に関する規程」「実験動物取扱者の健康管理等に関する基準」および「実験動物の衛生管理等に関する基準」を遵守して実験を行った。

III. 研究結果

1. 組織における放射線障害および組織反応の解析

放射線による組織障害あるいは組織微小環境変化、およびこれらに対する DIO の影響を定量的に評価するため、採取された胸腺・脾臓、肝臓、および肺組織において、蛍光染色法による組織反応の解析を行った。

1-1. 成体期の一時的な肥満に対する組織反応

同一の個体から採取された胸腺・脾臓、肝臓、肺および脂肪組織において組織反応の検討を行ったところ、20 週齢から 4 週間の一時的な高脂肪食の給餌により、顕著な変化が認められたのは、肝臓における脂肪性障害であった。そこで、脂肪の蓄積により肝細胞内に生じる脂肪滴の構成蛋白質であるペリリピン 2 (PLIN2) を抗体を用いて可視化した。通常食で飼育した 20 週齢のマウス肝臓では、PLIN2 陽性の細胞は、類洞と肝細胞との間に存在するディッセ腔に位置する肝星細

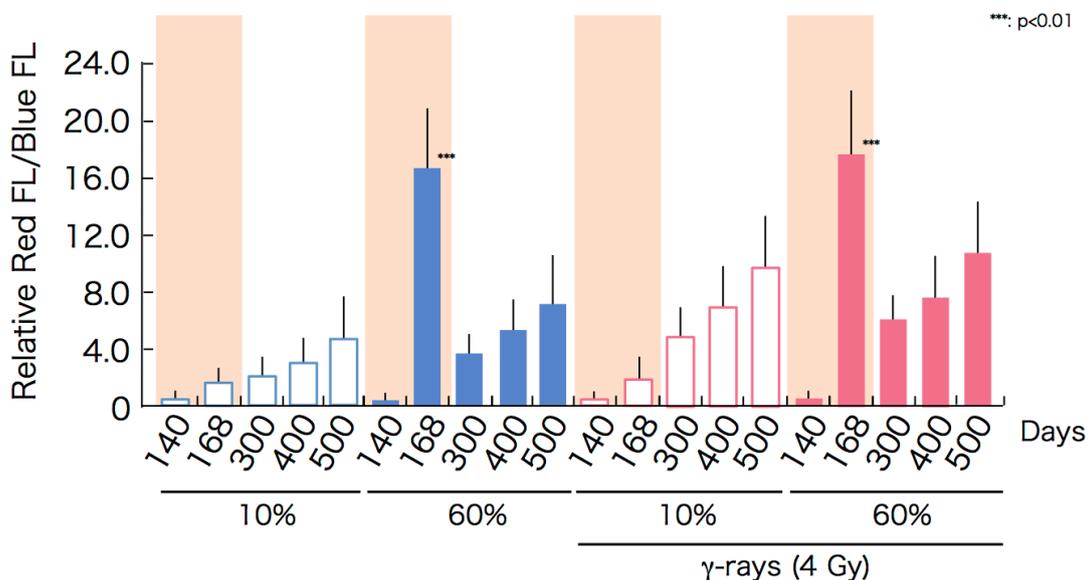


図 III-1 脂肪滴蓄積の経時変化

DAPI (Blue FL) あたりの PLIN2 蛍光値 (Red FL) を相対値として表した。横軸の数字は飼育日数を示している。白抜きバーは通常餌の結果を表し、青はコントロール、赤は 4 Gy 照射群で得られた結果を示す。また、橙色のエリアは、20 週齢から 24 週齢の高脂肪食を摂餌した期間である。

胞（Hepatic stellate cell : HSC）のみで検出された。一方、高脂肪食摂餌後は、肝細胞の細胞質に微細な脂肪滴の蓄積が観察された。そこで、細胞あたりの脂肪滴の蓄積を評価するために、任意のエリアの肝細胞数を DAPI で定量し、それに対する PLIN2 の蛍光値を測定した（図 III-1）。

その結果、20 週齢から 24 週齢の高脂肪食を給餌した 4 週間期間では、脂肪滴の蓄積が急激に進行し、極度の脂肪肝の状態になっている事が明らかになった。しかしながら、その 4 週間後には、コントロールとほぼ同程度の状態にまで改善し、その後は、500 日までの観察期間で、やや増加している傾向は認められるものの、一時的な高脂肪食の摂餌の影響は一時的である事が判明した（図 III-1）。

1-2. 放射線照射と一時的肥満との組織反応における相互作用

放射線による組織障害に対する組織反応と、一時的な高脂肪食給餌による影響との相互作用を検討するために、放射線照射群と非照射群との比較も行った（図 III-1）。非照射マウスの通常食給餌でも、飼育日数が増えるにつれて肝臓の一部に脂肪滴の蓄積を確認するようになるが、4 Gy の γ 線照射マウスでは、PLIN2 陽性の微小脂肪滴が充満した肝細胞がクラスター状に局在する状態が、肝臓の全体で無数に観察されるようになった。組織学上、これらのクラスターの分布は、主に中心静脈周辺に分布する事が明らかになり、放射線照射によって、脂肪滴の蓄積が明らかに促進されている事がわかった。高脂肪食摂餌群でも、放射線照射による脂肪滴蓄積の促進は認められたが、一時的な高脂肪食の影響は、長期的には認められなかった。図 III-1 に示す数値の比較から、コントロールの数値と同程度の数値は、照射群では、飼育日数で 100 日前と同等であるため、放射線照射によって、肝臓の脂肪性障害が 100 日程度早期化したと考える事ができる。

肝臓では、照射後 500 日を超える飼育日数あたりから肝腫瘍の発生が認められる。初期の肝腫瘍は Ki-67 陽性細胞による増殖性の微小クラスターとして組織中に検出されるが、興味深い事に、これら増殖性クラスターは、脂肪滴を蓄積した脂肪性障害が顕著な領域に局在し、当該領域には、巨核細胞や多核細胞が高頻度に混在する事も観察された。肝細胞における脂肪性障害は、アディポサイトカイン遺伝子等の発現制御に変調をもたらし、増殖性反応を惹起するのではないかと考えられ、その結果、多倍体の肝細胞が増加し、そのような細胞の中に倍数性を減少させる細胞が出現して肝腫瘍の細胞に変化していくのではないかと想定される。

肝臓の脂肪性障害は、ヒトでは非アルコール性脂肪性肝障害（NAFLD）として知られ、肝炎の前段階として位置づけられている。そこで、代表的な炎症性細胞であるマクロファージの局在をマクロファージのマーカーである F4-80 を指標に検討した。その結果、F4-80 陽性のマクロファージは、もともと肝臓内に常駐している事が確認できたが、その数は、高脂肪食の摂餌や放射線照射による脂肪性肝障害で増加する事はなかった。活性化マクロファージのマーカーである Iba-1 についても検討を行ったが、同様に、高脂肪食や放射線照射により一時的に脂肪滴を蓄積した肝組織において Iba-1 陽性細胞の増加は認められなかった。以上の結果から、マウスにおける肝腫瘍の発生に炎症性反応が関わっている可能性は低く、放射線発がんにおける炎症性反応の位置づけを再考する必要があるかもしれない。

2. 成体期肥満による放射線発がん影響解析

B6C3F1 雄マウスの小児期（1 週齢）において放射線照射（ γ 線、100 mGy および 4 Gy、線量率は 0.5 Gy/min）および成体期にあたる 20 週齢から 24 週齢の間に高脂肪食（60%脂肪食）を与えたマウスを累積の飼育日数で 1,000 日を超える期間、飼育および観察を継続した。その結果、小児期（1 週齢）に高線量放射線照射（ γ 線 4 Gy 全身照射）を受けた群は、照射後に有意な体重低下を示しただけでなく、その後も長期にわたり体重の減少傾向を示す事がわかった。一方、成体期（20 週齢から 24 週齢）の高脂肪餌摂取により顕著な体重増加は、24 週齢以降、通常餌に戻した飼育により改善したが、その後も高脂肪食摂取による影響は認められず、一時的な現象である事が明らかになった。低線量（100 mGy）照射群においては、一切の体重変化は認められずコントロールと同じ挙動を示した。

放射線によるがん発生の検討では、小児期（1 週齢）に高線量被ばく（ γ 線 4 Gy 全身照射）を受けた群では、照射後 100~200 日において早期に胸腺リンパ腫の発症を認めた。しかし、発症頻度は、高脂肪餌給餌群と通常餌給餌群との間に差はなく、同様の発症傾向が認められた。また、飼育日数が、500 日を超える付近から、再び生存率の低下が確認され、この時期には肝腫瘍の発生が認められた。4 Gy による発がんによる生存率の低下は、成体期の高脂肪食の摂取によって変化する事はなく、成体期の一時的な肥満は、生涯の発がんリスクを変化させない事が明らかになった。一方、100 mGy 照射群は、コントロールと同様の生存率の挙動を示し、飼育日数で 600 日を過ぎたあたりから両群で低下が観察されるようになってきた。コントロールおよび 100 mGy 照射群での生存率の低下は、肝腫瘍の発生によるものであるが、その発生率は両群間で違いは認められず、以上の結果から、100 mGy 照射は発がんリスクを増加させないと結論できる。

IV. 考察

放射線および一時的な肥満による発がんへの影響を、生涯飼育による観察と組織障害および組織微小環境の変化を定量的に評価する事により解析した。その結果、飼育日数で 1,000 日を超える期間の観察により、4 Gy 照射群では、生存率が 5%近くまで減少した。生存率の減少はがんの発生によるもので、照射後 100 日を超える飼育日数では胸腺リンパ腫が、飼育日数 500 日を超えるあたりからは肝腫瘍の発生が認められ、放射線による発がんの大半のケースを観察する事ができた。4 Gy 単独照射群と高脂肪食を摂取した群では、生存率の減少動態に明らかな差を認めず、成体期の一時的な肥満が、生涯の発がんリスクに影響をおよぼさない事が明らかになった。20 週齢から 24 週齢までの 4 週間の高脂肪食の摂取は、明らかな脂肪肝の状態をもたらしたが、その後 4 週間程度でその状態は解消し、その結果、長期間に渡るような影響にはならなかったと結論できる。したがって、福島原発事故後の生活環境や生活習慣の変化により、肥満の状態がもたらされたとしても、その後状態が改善される事によって発がんリスクを高める要因にはならないといえる。

高線量（4 Gy）照射により明らかながん誘発が認められるのに対し、低線量（100 mGy）照射群では、コントロール群との差は観察されなかった。コントロール群でも、飼育日数で 600 日を超える頃から生存率に低下が認められるが、これは、肝腫瘍の発生によるもので、その発生率は両

群間で同等であった。この結果から、100 mGy 照射は、自然の発がん率に影響をおよぼさないと結論する事ができる。また、一時的に高脂肪食を摂餌した 100 mGy 照射群でも検討したが、コントロール群との有意差は認められず、成体期の一時的な肥満が、低線量の発がんリスクを増加させる事実もないと結論できる。

発がんメカニズムの解明につながる組織反応の解析を行った結果、4 Gy の γ 線照射マウスでは、照射後 300 日において、PLIN2 陽性の微小脂肪滴が充満した肝細胞が局在するクラスターが、肝臓全体で無数に観察された。もともと、脂肪滴の構成蛋白質である PLIN2 を指標にした検討から、20 週齢から 24 週齢までの一時的な高脂肪食の給餌により、肝臓では、顕著な脂肪性障害が認められたが、肝細胞における脂肪滴の蓄積は、4 週間の高脂肪餌給餌終了時から通常餌の飼育に戻す課程で急激に解消されていき、通常食 4 週間後には通常食マウス由来の肝臓とほぼ同等の PLIN2 陽性細胞のパターンに戻った。この結果から、成体期であっても、一時的な肝脂肪性障害は、その後の生活習慣を見直す事で改善できることが示されたが、その後、再び肝脂肪性障害が見られたのである。血清中の総コレステロールの測定でも同様の傾向がみられ、全身性の脂肪代謝の変調と同調している事がわかる。

興味深い事に、同様の脂肪滴の蓄積はコントロール群でも飼育日数が増加するにつれ観察されるようになった。脂肪滴を蓄積した肝細胞クラスターの分布は、主に中心静脈周辺であり、放射線照射群とコントロール群の違いは認められなかった。つまり、マウス個体の年齢が上昇するにつれ脂肪性肝障害が発症する時期が、放射線照射によって、早められている可能性が示されたのである。近年、放射線が、個体の老化を促進する事によって発がんのリスクを上昇させる可能性が提唱されており (1)、本研究で得られた結果も、その可能性を支持している。また、発がんリスクの上昇が認められなかった 100 mGy 照射群では、脂肪性肝障害の見られる時期がコントロールと同等であった事も、放射線による老化の早期化と発がんリスクの増加が相関している事を示している。従来、放射線照射により発症したがんは、放射線により“誘発“されたものと解釈されているが、以上の事に鑑みると、“早期化”と解釈する方が適当であるかもしれない。事実、チェルノブイリ原発事故後の小児甲状腺がんのドライバー遺伝子変異パターンも、放射線起因のケースと散発性のケースとで顕著な差は認められず、放射線被ばくによる小児甲状腺がんは、自然発症のがんの早期化と考える事ができる (2, 3)。だとすると、過剰相対リスクなどの表現ではなく、発がんまでの潜伏期の短縮等の表現で、放射線の影響を説明する工夫が必要になる。現時点では、自然発生の肝腫瘍と、放射線誘発の肝腫瘍との違いは明らかではないが、今後両者のゲノム変異の違いなどを解析する事によって、この新仮説が正しいかどうかを検証していく事が重要であるといえる。

肝臓で観察された脂肪性障害は、ヒトで考えられる非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) と同等の状態である (4)。これは、マウスでもヒトでも、肝がんに至るプロセスが共通している事を示しているが、ヒトでは、NAFLD から脂肪性肝炎 (NASH) への変遷がよく知られている。NASH は、炎症性の病変であることから。炎症反応の主導役であるマクロファージについて検討した。マクロファージには、もともと組織内に常時在中する組織球と、炎症反応により組織外から浸潤してくるマクロファージとがあり、肝臓では、組織内に常駐しているマクロファージはクッパー細胞として知られている。そこで、脂肪滴を抗 PLIN2 抗体で評価し、抗 F4-80 抗体によりマクロ

ファージを可視化して解析を行ったところ、いずれのケースでも、マクロファージは肝臓全体に疎に分布し、従来知られているクッパー細胞の分布とその数は何ら変わる事はなかった。特に、脂肪的の蓄積が見られた肝細胞クラスター周辺においても詳細な観察を行ったが、マクロファージの分布に変化はなく、以上の結果から、一時的な肥満、並びに放射線照射による脂肪性肝障害は、炎症反応を惹起する状態ではない事が明らかになった。したがって、放射線による肝腫瘍の発生には、炎症反応が主体的に関わっている可能性は低く、放射線発がんによる発症プロセスの再考が必要になった。今後、経時的に採取された組織を用いて、多面的な解析を行う事によって、発がんプロセスに関わる分子変化が見出す研究の展開が必要である。

V. 結論

高線量の 4 Gy 照射群では、照射後 100 日程度で胸腺リンパ腫が、また、500 日程度で肝腫瘍の発生を認めたが、100 mGy 照射群では、コントロールと同様の生存率が観察され、低線量放射線照射による発がんリスクの増加は認められなかった。また、高脂肪食摂餌は、一時的な肥満をもたらしたが、その結果、がんの発生が観察された 4 Gy 照射群においても、発がんリスクに影響は見られなかった。

組織微小環境の解析から、飼育日数が進むにつれ、コントロール群で、脂肪滴の蓄積が認められるようになったが、放射線（4 Gy）照射群では、脂肪滴の蓄積が顕著に促進する事が明らかになり、放射線照射による脂肪性障害の早期化が、肝腫瘍発生に関わっている事が示唆された。さらに、脂肪滴の蓄積に連動して肝細胞の巨核化や増殖性の亢進が認められ、当初予想した炎症性反応の関与は認めなかったものの、放射線発がんの新メカニズムにつながる知見が得られた。

以上の結果より、1) 成体期の一時的な肥満は、小児期の放射線照射による発がんリスクを増加させない事、2) 100 mGy の低線量放射線には、過剰な発がんリスクは認められない事が判明し、さらに、3) 放射線発がんには組織老化の早期化に関わっている新たな放射線発がんモデルが提唱された。

VI. 今後の展望

今後の展望として、得られた成果を更に発展させる研究として、まず、放射線被ばく後の発がんリスク低減に向けた介入の実証的研究が望まれる。放射線誘発肝腫瘍では、生活習慣に密接に関連する肥満（脂肪性障害）が重要なステップとして関わっている事が判明したため、脂肪性障害の発生を抑制することにより、発がんリスクの低減に繋げる対策が可能である。肥満に関連する先行研究から、いくつかの有効な手段が開発されているため、これらを、放射線発がんリスクの修飾要因として応用して放射線発がんリスクの低減を図る事が可能である事を証明する研究が望まれる。

次に、老化早期化の視点からの放射線発がんの基盤メカニズムの解明研究が必要不可欠である。放射線被ばくによるがんの発生は、放射線による発がん突然変異の誘導により”誘発”さ

れる現象であるところまで解釈されてきた。そのため、放射線被ばくによる影響は、過剰相対リスクとして表現されてきたが、がんは、放射線を被ばくしていないヒト集団にも起こる疾患であり、更に、原爆被爆者において発症したがんやチェルノブイリ原発事故後の小児甲状腺がんでは、発がん突然変異に明らかな放射線起因性が認められない事から、未だに放射線発がんの真のメカニズムは解明されないままになっている。本研究の成果から、肝がんの発生に関わる肝臓の脂肪性障害が、コントロール群でも起こる事から、放射線照射は自然に起こるプロセスをより早期に発症する効果があるといえる。このため、放射線発がんの基盤メカニズムは、”誘発”ではなく、自然発がんの”早期化”であるとの仮説が提唱できる。この仮説が正しければ、放射線発がんのリスクは、過剰リスクとしてではなく、寿命短縮リスクとして議論するのが妥当であることになり、また、放射線による確率的な DNA 損傷の誘発は関係ない事になるため、発がんは確率的影響ではなく、発がんの線量依存性も、直線的ではない可能性が出てくる。これらは、放射線の健康影響の理解、および放射線防護の基盤を一新する可能性があるため、放射線影響のより正しい理解のためにも、この仮説の検証を最優先に進めるべきである。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

該当なし

VIII. 引用文献

1. Nakamura N. A hypothesis: radiation carcinogenesis may result from tissue injuries and subsequent recovery processes which can act as tumor promoters and lead to an earlier onset of cancer. *Br J Radiol.* 92, 20190843, 2020.
2. Suzuki K, Mitsutake N, Saenko V, Yamashita S. Radiation signatures in childhood thyroid cancers after the Chernobyl accident: possible roles of radiation in carcinogenesis. *Cancer Sci.* 106, 127-133, 2015.
3. Suzuki K, Saenko V, Yamashita S, Mitsutake N. Radiation-induced thyroid cancers: overview of molecular signatures. *Cancers* 11, 1290, 2019.
4. Hui ST, Kurt Z, Tuominen I, Norheim F., et al. The genetic architecture of diet-induced hepatic fibrosis in mice. *Hepatology.* 68, 2182-2196, 2018.

Analysis of the effects of life-style in adulthood on low-dose radiation carcinogenesis and its mechanism

Keiji Suzuki^{*1}, Shizuko Kakinuma^{*2}

**1Department of Radiation and Life Sciences, Nagasaki University Atomic Bomb Disease Institute*

**2Department of Radiation Effects Research, National Institute of Radiological Sciences, National Institute for Quantum and Radiological Science and Technology*

Key word : Radiation, low-dose, carcinogenesis, life-style, tissue response

Abstract

After the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident in Japan, much attention has been paid for the health risks associated with annual low-dose radiation exposure. The Health Management Survey governed by the Fukushima prefecture has reported that probable radiation dose delivered to children could be sufficiently low not to cause any noticeable delayed effects. However, enormous change in the life style and the school life of children might have affected the physical and psychological condition of those affected children. In addition, as children are growing up, changes in their life-style causes related complications, one of which is an excess calorie intake. Resulted obesity must be one of the health problem that should take into consideration in relation to the estimation of radiation-induced cancer risk.

Accumulating evidences so far have implicated notable relationship between obesity and the incidence of multiple types of cancer, including thyroid cancer. However, little is known about the effect of obesity on radiation-induced cancer. Therefore, the study has intended to determine whether a temporal excess calorie intake affects the cancer risks from low-dose ionizing radiation or not. A final goal is to define the mechanisms underlying the possible interaction between an excess calorie intake in adulthood and childhood radiation exposure.

Since an excess calorie intake could cause systemic inflammation, alteration of tissue microenvironments is expected to promote radiation carcinogenesis. Therefore, B6C3F1 mice were exposed to 100 mGy or 4 Gy of gamma-rays, and experienced high fat diets between 20 and 24 weeks. Tissues/organs, including thymus, spleen, liver, and lung, were obtained from the mice, and subjected to the analyses of tissue response, which was examined by immunofluorescence.

While significant liver steatosis was observed after high fat diet, it was apparently ameliorated during the subsequent normal diet feeding for 4 weeks. The fatty liver was brought about again 300 days after 4 Gy-irradiation, and the PLIN2-positive hepatocytes were significantly increased in irradiated cases. It should be noted that fatty liver was also observed in the control mice, although it took much longer days than the 4 Gy-irradiated group. It is suggested that radiation exposure accelerated steatosis.

Over 1000 days' observation exhibited excess liver tumors in 4 Gy-irradiated mice, which was

well correlated with decreased survival. Although liver tumors were detected in the control and 100 mGy-irradiated mice, the latency periods were much longer than the 4 Gy-irradiated mice, indicating that 100 mGy did not accelerate tumor incidence.

The study provided a fundamental scientific basis towards the possible countermeasures for mitigation of any possible risks from low-dose/low-dose-rate radiation exposure, together with the mechanisms underlying the late effects of low-dose ionizing radiation.

成体期の生活習慣等の低線量放射線発がんリスクにおよぼす影響と メカニズム解明

成体期肥満による放射線発がん影響解析

柿沼志津子（国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構

量子医学・医療部門放射線医学総合研究所放射線影響研究部）

研究要旨

本研究計画は、成体期の生活習慣等変化が、小児期の低線量放射線被ばくによる発がんリスクにおよぼす影響とそのメカニズムの解明を目的としたものである。具体的には、『カロリー摂取バランス変調による肥満が局所の炎症を惹起し、炎症にともなう細胞死が組織微小環境を攪乱することにより小児期被ばくによる放射線発がんのリスクを修飾する』との仮説を提唱し、これを、動物発がんモデルと成体期の高脂肪食による肥満（Diet-induced obesity; DIO）モデルを組み合わせた実験系により証明することを目指した。低線量（100 mGy）の放射線被ばくを含む小児期（8 日齢）での放射線被ばくによる発がんを、被ばく動物の経時的解析と終生飼育により追跡し、同時に、発がんのプロセスを、組織における DNA 障害、細胞死、細胞老化、炎症、を含む組織微小環境の変化から解析し、放射線照射直後から微小がんあるいはがん成立までの各プロセスでの DIO の影響を統合的に解析した。対象とするがんは、動物発がんモデルにおいて小児期被ばくにより発がんリスクの上昇する胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、および肺がんである。

本研究は、長崎大学および放射線医学総合研究所（放医研）の 2 機関による計画で、長崎大学では、組織微小環境の変化の解析を担当し、放医研では、DIO 動物の長期飼育、放射線照射（100 mGy および 4 Gy）、経時的標本採取、および発がん解析を担当した。令和 2 年度は初年度から実施した生涯飼育実験群の飼育、観察を完了した。また、前年度から実施している組織微小環境への影響を調べるための経時観察実験を継続し、300、400、500 日齢で予定した解剖、およびサンプル採取を完了し、全サンプルの病理標本の作製、および長崎大学への供与を終了した。また、採取した血漿サンプルを用いたバイオマーカーの発現量解析を行った。

キーワード：低線量、100 mGy、高カロリー食、肥満、成体期肥満

I. 研究目的

東日本大震災にともなう東京電力福島第一原子力発電所の事故（以降は福島原発事故）を受けて、事故の被災者を始め、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱くことになった。事故から 10 年がたち、福島県内における県民健康調査において被ばく線量が把握されるにしたいが、専門家会議の中間取りまとめでも、福島県および福島近隣県において、がん罹患率に統計的

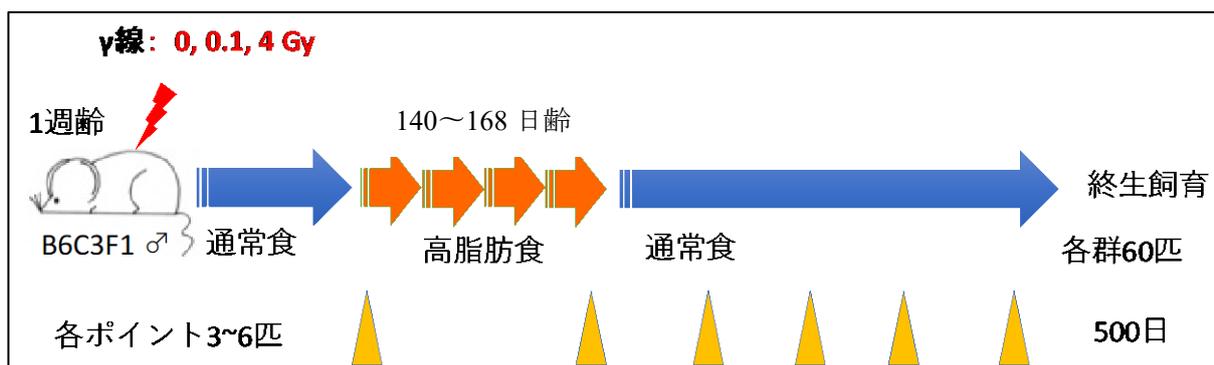
に有意な変化が検出される可能性は低いとされている。しかしながら、原発事故後の被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、事故当時に小児期を過ごした子供たちの生活習慣等の変化が、放射線発がんリスクを修飾する可能性が懸念される。中でも、学校生活環境の変化、戸外活動の制限、運動不足等に起因するカロリー摂取バランス変調に基づく肥満は、放射線の発がんリスクを修飾する要因として注視する必要があるとあり、健康リスクの低減という観点からもその影響を明確にすることが望まれる。そこで、平成27年度～29年度にかけて、小児期の肥満の影響を調査する研究に着手し、現時点までの結果から、小児期の肥満が、放射線発がんリスクに影響をおよぼす可能性について解析が進んでいる。今後、当時小児期にあった子どもたちは成長し、やがて青年～成人になっていくことを鑑みると、これまでの研究を補完する研究としても、小児期の被ばくの発がんリスクが、成体期の生活習慣等の変化で修飾されるか否かを明らかにする研究を実施する必要があると考えた。福島県民、とりわけ、小児期に事故を経験した子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、子供たちの今後の生活習慣等が、小児期の低線量放射線被ばくによる健康影響におよぼす影響を対象とした研究は、極めて重要である。

本研究では、動物発がんモデルを用いた高脂肪食による肥満の実験系を用い、小児期被ばくによる発がんリスクが変化するかどうかを明らかにする。その結果、肥満などの生活習慣等による自然発がん要因が低線量放射線被ばくの健康影響にどのような影響をおよぼすか評価する際に不可欠な科学的知見が得られる。これにより、生活習慣等の変化により懸念される放射線発がんリスクの低減に向け、機構論に基づいた対策を可能にする科学的基盤が提供できる。

年次計画としては、令和2年度は、初年度から開始した生涯飼育実験群の飼育、観察を継続する。また、組織微小環境への影響を調べるための経時観察実験を継続し、前年度に続けて300、400、500日齢に各群3～6匹を解剖し、病理標本作製して、長崎大学へ送付する計画である。同時に血清と凍結組織を採取し、バイオマーカーの発現量解析を継続した。

II. 研究方法

本研究では、福島原発事故を経験した子どもたちの生活習慣等の変化を念頭に、小児期に放射線照射を行ったマウスに、成体期に相当する期間から高脂肪食を給餌し、その後、終生飼育をすることによってがんの発生を解析する実験プロトコルを採用した。具体的には、放医研において、B6C3F1雄マウスに、8日齢で放射線（ γ 線（0.5 Gy/分）、100 mGy および 4 Gy）を照射し、その後、140日齢（20週例）から168日齢（24週例）まで高脂肪餌を与えてDIOを誘導し、その後通常餌に戻してから長期飼育を行った。放射線照射後は一定期間毎に組織標本を採取して、組織微小環境変化の経時観察を実施した。放射線発がんの対象とするがん種は、小児期被ばくにより発がんリスクが上昇するリンパ腫、肝がん、および肺がんである。また、採取した組織は、長崎大学に送付し、DNA障害、細胞死、炎症反応や組織微小環境の解析を行った。



放射線医学総合研究所は SPF レベルでのマウスの長期飼育およびガンマ線照射が可能な施設を有しており、本研究ではこの施設を使用した。分担者のグループでは、これまで長期飼育実験の実績が十分ある。また、マウスの発がん実験設定から終生飼育の終了までに 3 年半を要するが、これまでの経験から発がんに対する影響は約 2 年半で明らかになると予測できることから、中間段階での発がんリスク解析を取りまとめた。なお、研究期間終了後も終生飼育を継続し、本発がん実験の最終的なリスク解析としてまとめる計画である。

1. DIO による放射線発がん影響解析

前年度に設定した実験群の飼育観察を継続し、がんの発生等に伴う全身状態の悪化が認められるマウスについて解剖し、病理サンプルの保存および解析を行った。

2. DIO による組織微小環境への影響

① 実験群の設定

1 週齢 B6C3F1 マウスの作製は妊娠後期マウスを購入し、実験を行う SPF 環境下で出産させ、母マウスあたり子マウス 6 匹での飼育を行い体重のばらつきを最小限にした。妊娠後期マウスは平均 8 匹の F1 マウスを出産し、その半数が雄であることより 25 匹の妊娠後期マウスの購入で雄 100 匹の作製可能である。出産異常が一定の確率で生じるため、雄 F1 マウス 180 匹の作製に、妊娠後期マウス 55 匹を購入した。

実験群	線量 (Gy)	餌 (脂肪由来 カロリー)	匹数
1	0	10%	20
2	0	60%	20
3	0.1	10%	20
4	0.1	60%	20
5	4	10%	50
6	4	60%	50

表 II-1. 組織微小環境実験条件とマウスの匹数 (計 180)

②放射線照射

B6C3F1 雄マウスの 8 日齢時に 0、0.1、または 4 Gy の γ 線を全身照射した (線源 ¹³⁷Cs、線量率 0.5 Gy/min)。

③DIO 誘導

離乳後マウス群飼育し (5 匹/ケージ)、通常の実験マウス用餌で飼育した。成体期 B6C3F1 雄マウス (140~168 日齢) に標準餌 (摂取カロリーの 10%が脂肪由来) または高脂肪餌 (摂取カロリ

一の 60%が脂肪由来) を 28 日間摂取させて DIO を誘導した。28 日間後通常餌に戻し、定期的に体重を測定し (14 日間毎、140~168 日齢 7 日間毎)、毎日観察を継続し、がんの発生等に伴う全身状態の悪化が認められるマウスについて解剖し、病理サンプルの保存および解析を行った。組織微小環境への影響を調べるために、140、168、200、300、400、500 日齢に各群 3~6 匹を解剖し、病理標本と血漿、凍結組織サンプルを採取した。

(倫理面への配慮)

本研究計画では、動物実験は、放医研において実施する。放医研においては、動物実験を行うにあたり、動物実験委員会等の承認を受けた (動物実験計画書 18-1003、平成 30 年 6 月 26 日承認)。動物愛護法ならびに放射線医学総合研究所「動物実験等実施に関する規程」「実験動物取扱者の健康管理等に関する基準」および「実験動物の衛生管理等に関する基準」を遵守して実験を行っている。

III. 研究結果

1. DIO による放射線発がん影響解析

1-1. DIO 誘導による体重変化

図 III-1 に、体重変化についてのグラフを示した。

小児期 (8 日齢) 高線量放射線被ばく (γ 線 4 Gy 全身照射) によって有意な体重低下が認められた。成体期 (140 日齢から 168 日齢) の高脂肪餌摂取は、明らかな体重増加を示したが、通常餌に戻すことにより高脂肪餌の影響は改善される傾向が見られた。長期飼育で 4 Gy 照射によって体重の低下が高脂肪餌群と標準餌群両方に確認された。860 日齢以上まで観察しても、高脂肪餌の影響は認められず、また、低線量照射群の体重は非照射群との差が見られなかった。

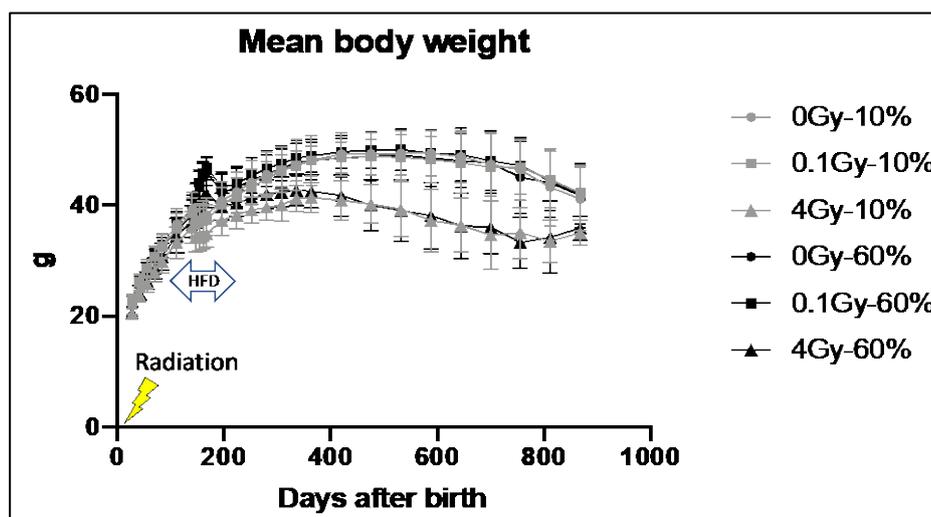


図 III-1 小児期放射線被ばくおよび成体期 DIO 誘導による体重変化

1-2.腫瘍の発生

小児期（8 日齢）高線量被ばく（ γ 線 4 Gy 全身照射）によって早期に胸腺リンパ腫が発症した。また、寿命 960 日まで観察した結果では、高脂肪餌群と標準餌群共に、400 日齢以後に肝腫瘍の発症が見られた。非照射群と低線量（0.1 Gy）照射群より顕著な寿命短縮が認められた。非照射群と低線量照射群では、500 日齢以後から肝腫瘍が主な原因と思われる死亡が観察され始めたが、低線量放射線照射や高脂肪餌による寿命への影響は見られなかった。

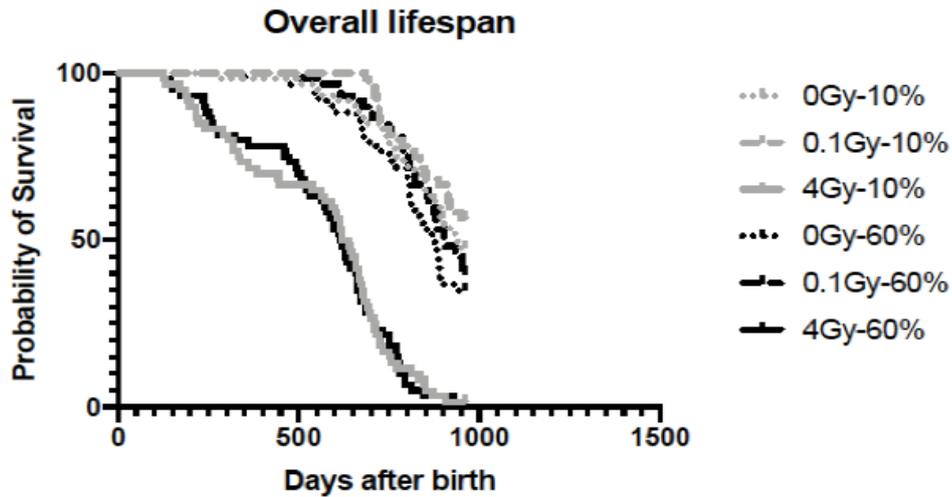


図 III-2 小児期放射線被ばくおよび成体期 DIO 誘導による寿命変化

2. DIO による放射線被ばく後の組織微小環境への影響研究

本年度に計画していた全ポイントのサンプル採取、病理標本の作製および長崎大学への供与を完了させた（解析結果については主任研究者の報告書を参照）。また、同時に採取した血清サンプルを用いた解析では、DIO 誘導直後に血中総コレステロール（T-CHO）の一時的上昇が見られたが、高脂肪餌摂取終了後に回復した。後期に 4 Gy 照射群の肝機能異常（AST、ALT 上昇）に伴う血中総コレステロールの上昇も確認された。

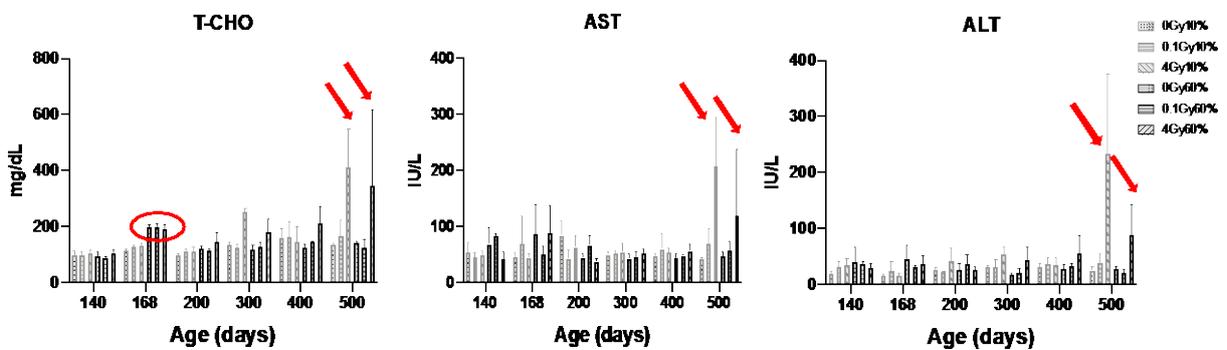


図 III-3 小児期放射線被ばくおよび成体期 DIO 誘導による脂質代謝および肝機能の変化

IV. 考察

成体期の高脂肪食摂取による肥満の実験系を用い、小児期被ばくによる発がんリスクへの成体期肥満の影響を検証するための発がん実験を継続して行った。まず、短期間の高脂肪食摂取による体重増加と通常餌に戻した後の体重回復傾向が観察されたが、長期的にも体重への影響は認められなかった。また、小児期高線量被ばくによる早期発症腫瘍である胸腺リンパ腫や、400 日齢以後に観察される肝腫瘍の発症には、成体期肥満の影響は認められなかった。さらに、960 日齢までの観察でも、高脂肪食摂取による寿命および腫瘍発生に対する影響が見られず、一時的な肥満は、発がんリスクに影響をおよぼさないと考えられる。また、低線量照射における寿命への影響も認められなかった。

V. 結論

前述のように、長期発がん実験および微小環境への影響研究の実験群の設定を実験計画とおりに実施し、成体期高脂肪食摂取による肥満の誘発に成功した。また、通常餌に戻した後の肥満解消も、先行した小児期の高脂肪食摂取実験系と類似した傾向が見られた。長期飼育に高線量被ばくに起因する体重低下も確認された。胸腺リンパ腫が早期発症腫瘍であり、被ばくの影響が大きく、DIO 実施する前に既に発症したため、摂取カロリーによる影響は受けていないと考えられる。後期に発生する肝腫瘍等に関して観察を継続している。また、組織微小環境への影響研究はすべてのサンプル採取が完了し、病理標本を主任研究者へ供与して解析を進めた。

VI. 今後の展望

終生飼育中の実験群は、研究期間終了後も飼育観察を継続し、瀕死マウスの解剖を進め臓器サンプルの保存と病理解析を行う。最終的には終生飼育を完了させて、被ばくおよび成体期 DIO によって寿命と腫瘍発生への影響を解析して、研究成果をまとめる。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

該当なし

VIII. 引用文献

該当なし

Uncovering the interaction of adulthood-lifestyle factors in children with low dose radiation-induced cancer risk and carcinogenic mechanisms

Shizuko Kakinuma

Department of Radiation Effects Research

National Institute of Radiological Sciences

National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

Keywords: Low dose, 100 mGy, high calorie diet, obesity, diet-induced obesity model

Abstract

The aim of this research is to identify the impact that lifestyle changes in adult have on the risk associated with childhood exposure to low dose radiation and the mechanisms underlying radiation-induced cancer. Specifically, the high calorie diet-induced obesity (DIO) mouse model will be used to test the hypothesis that ‘systemic inflammation associated with high calorie intake in adult will alter their risk of radiation-induced cancer.’ Following a low dose radiation exposure (100 mGy), the interaction of a high calorie diet on (1) DNA damage and repair; (2) initial tissue reactions including cell death; (3) subsequent tissue recovery; (4) the microenvironment for early cancer development; and, (5) the development of established tumors, will be examined by investigations at the molecular, cellular and tissue levels. The cancers of interest for induction by irradiation of young animals in this model will be thymic and splenic lymphomas, as well as lung and liver cancers.

As a part of this co-operative research, B6C3F1 mice are to be irradiated as infants (100 mGy or 4 Gy) before initiating diet-induced obesity (DIO) by rearing on a high-fat diet. In the annual plan for fiscal year 2020, the rearing of the DIO experimental animals was ongoing, with subsequent observation of body weight change and cancer induction. We confirmed the body weight gain in the mice reared on the adult high-fat diet, while the body weight gain was reversed to normal level soon after changing the normal diet. Thymic lymphoma was induced by 4Gy irradiation in the first 300 days. After 400 days of age, liver tumor was mainly detected. The influence of DIO on lifespan shortening and tumor development was not obvious.

放射線による健康リスクと社会不安の低減化を目指した

「線量・線量率効果係数」 $DDREF=2$ の妥当性の検討

笹谷 めぐみ（広島大学・准教授）

研究要旨

東京電力福島第一原子力発電所事故以降、低線量、低線量率放射線被ばくによる発がんリスクが問題となっており、科学的根拠にもとづく放射線リスク評価が求められている。現在、国際放射線防護委員会（ICRP）では、線量・線量率効果係数（ $DDREF$ ） $=2$ を用いて低線量（率）発がんリスクの推定が行われている。しかしながら、その数値の妥当性については、現在でも議論が続けられている。

放射線発がんリスクには、遺伝的背景、生活習慣や年齢のみならず、発がんに関わる多数の標的細胞とその個々の細胞内応答機構が修飾要因として多大な影響を与えることが示されている。これらの要因が、放射線発がんリスクを指標とした $DDREF$ 値を正確に算定することを困難にし、 $DDREF$ 値の多様化につながっていると考えられる。 $DDREF$ 値の妥当性を検討するためには、放射線被ばくによる個々の細胞におけるそれぞれの細胞内応答の線量率効果の有無、放射線発がんへの寄与といった生物学的影響解明が必要といえる。

そこで本申請研究では、放射線発がん高感受性モデルマウスを用いた動物実験、最先端技術を用いた細胞・分子学的解析を行うことにより、多角的視点から $DDREF$ 値の妥当性の検討を行った。その結果、放射線発がん高感受性モデルマウスを用いた動物実験結果により、低線量効果係数（ $LDEF$ ）と線量率効果係数（ $DREF$ ）は、個別に算定する必要があるという知見を得た。さらに、 $DREF$ は、遺伝的背景により多様性を示すことが明らかにされた。

さらに、細胞・分子学的な解析から、DNA 損傷修復関連因子、組み換え修復制御因子、ミトコンドリア分裂・誘導因子、細胞シグナル伝達因子等を $DREF$ 値の多様化に寄与する候補因子として同定することに成功した。

以上の結果より、 $DDREF$ は、 $LDEF$ 、 $DREF$ 個別に評価する必要があるといえる。また、 $LDEF$ 値は2よりも低く、 $DREF$ 値は多様性を示すことが明らかにされた。さらに、 $DREF$ 値の多様性に影響を与える候補因子、すなわち、低線量（率）放射線発がんハイリスクな集団を抽出するための候補因子を同定することに成功した。これらの研究成果は、 $DDREF$ 値の策定に寄与するための科学的知見を提供できると期待される。

キーワード：放射線発がん、線量・線量率効果係数（ $DDREF$ ）、低線量効果係数（ $LDEF$ ）、線量率効果係数（ $DREF$ ）、幹細胞、微小環境、DNA 損傷、がん関連繊維芽細胞

研究協力者

なし

I. 研究目的

ヒトにおける放射線発がんリスク評価は、広島・長崎原爆被ばく者の疫学調査から得られた知見がその基礎となっている^{1,2)}。しかしながら、低線量域での発がんリスク評価についての十分な情報が得られていないのが現状である。さらに、低線量率長期被ばくに関する高自然放射線地域住民を対象とした疫学調査では、がんの相対リスクの増加がみられないことが報告されているが、調査期間や信頼限界値などの点において最終的な結論には至っていない³⁾。現在、低線量・低線量率放射線発がんリスク評価において、ICRP では DDREF=2 を用いた低線量・低線量率放射線発がんのリスク推定が行われているが、DDREF の数値の妥当性については、現在でも議論が続いている。

そこで本研究では、独自に開発した放射線発がん高感受性モデルマウス系を発展させた放射線発がん実験から DDREF 値の算定を行い、遺伝的背景や被ばく時年齢に着目した DDREF=2 の妥当性を検討する。さらに、ヒト細胞を用いて DDREF 値の多様化に寄与する候補因子の探索を行う。将来的に、我々が明らかにした候補因子を指標とした、低線量（率）放射線発がんハイリスクな集団の抽出による低線量（率）放射線発がんリスクを個々で評価できる放射線防護体系の新規基盤確立に貢献することを目指す。

II. 研究方法

1. 遺伝子改変マウスを用いた放射線発がんにおける線量率効果

- 1-1. LDEF、DREF 値の検討：本研究により得られた放射線発がん実験に加え、これまで我々の研究室で得られた発がん実験結果をもとに、放射線発がんリスクにおける線量効果反応解析を行い、LDEF、DREF 値の検討を行った。更に、遺伝的背景が LDEF 値、DREF 値に及ぼす影響について検討を行った。
- 1-2. 放射線発がんにおける被ばく時年齢依存性の解析：昨年度開始した放射線発がんにおける被ばく時年齢依存性の解析を継続する。採取した小腸は、その後、ホルマリン固定、アルカリフォスファターゼ染色を行い、実体顕微鏡下観察することにより、マウス 1 匹あたりの腫瘍数の計測を行った。
- 1-3. ゲノム変異解析：昨年度の低線量・低線量率放射線発がん実験から得られた腫瘍を用いて、ゲノム変異の解析を行う。実際には、腫瘍から抽出した DNA を用いて、表 1 に示すように 18 番染色体上に存在するマイクロサテライト (Mit) マーカーと呼ばれる領域にプライマーを設計し、PCR を行った。その後、MultiNA を用いて、増幅された PCR 産物の定量を行い LOH の判定を行い、ゲノム変異の同定を行った。

表 1 ゲノム変異解析に用いた primer

Mit Marker	Position (cM)	Primer sequence
D18Mit64	4.46	Fw: TCAGATTCACTGCTAAGTCT Rv: AGCAAGAAAAGCAGGTGAGG
D18Mit64	5.84	Fw: AGCATTTTACTCCTGAACATATGTCC Rv: TTTGATTCCATTTTATACACAAAAGG
D18Mit64	18.21	Fw: ATCACAACCCCCCTACTTCC Rv: TCACGTGTTCTGTCTCCAGTG
D18Mit64	19.41	Fw: ACTGCACTGGTCCCATTTTC Rv: CAATAGTTGGAAATCAGACAGGC
D18Mit64	37.11	Fw: GGTAGGAGTCACTTCCGTCC Rv: TTTTGTGAGCATTTTATACCATT
D18Mit64	51.91	Fw: CTAGCATGCTTGAGGCTATGG Rv: GGAATGCCAGAGAACATGGT

2. 放射線発がんにおけるがん微小環境の役割

- 2-1. 細胞と培養条件：ヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞 MRC-5 と TIG-3 は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団と理研細胞バンクより購入した。細胞は、細胞培養用 T25 フラスコ内で、10%ウシ胎児血清と抗生物質を添加した α -minimum essential medium (α -MEM) 培養液を用いて、37°C、5%CO₂の条件で培養した。細胞は、飽和状態になる前に PBS (-) で洗浄した後に、トリプシンで処理してはがした。一部を新しいフラスコにまいて希釈して維持した。
- 2-2. 照射条件：X線照射装置（日立、MBR-1505R2）または、ガンマ線照射装置（ガンマセル 40 エグザクタ）を用いて、高線量率（0.7 Gy/min）の急性照射を行った。長期分割照射は、1 回当たり 0.01 Gy または、0.05 Gy の照射を一日 2 回、週に 5 日間行った。3 週間（21 日間）での累積線量は 1 回当たり 0.01 Gy の場合、 $0.01 \times 2 \times 5 \times 3 = 0.3$ Gy、1 回当たり 0.05 Gy の場合 $0.05 \times 2 \times 5 \times 3 = 1.5$ Gy になる。低線量率の慢性照射は広島大学原爆医科学研究所の放射性セシウム 137 を線源とするガンマ線照射装置を利用し、25 mGy、625、1250 mGy/day の線量率で 4 日間行い 累積線量 0.1、2.5、5 Gy の照射を行った。
- 2-3. 蛍光免疫染色法：細胞を照射から 24 時間後に固定して、 α -SMA の抗体（シグマ社）、Nrf2 の抗体（abcam 社）、parkin の抗体（Proteintech 社）、二次抗体 anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488、または、anti-mouse IgG Alexa Fluor 647（Invitrogen 社）を用いて蛍光免疫染色を行い、陽性細胞を定量した。蛍光免疫染色したスライドガラスは、キーエンス社 蛍光顕微鏡 Keyence BZ-X700 でランダムに 5~10 枚の画像を習得した。 α -SMA の解析では、100 個以上の細胞を観察し、陽性細胞を目視により判断してその頻度を求めた。Nrf2 の解析では、Hybrid Cell Count software の画像解析ソフトを用いて、しきい値を設定して染色される領域を選び、同じ解析条

件で全ての画像を自動で解析して蛍光量を定量した。

- 2-4. 統計処理：エラーバーは標準偏差を示す。全ての実験は、少なくとも 3 回以上の独立した試料を用いて繰り返し実験を行った。エクセル統計 2012 解析ソフトを用いて、一元配置 ANOVA 後に、Dunnett 法を用いて多重比較検定を行った。

3. 線量率効果を規定する因子のスクリーニング

- 3-1. ヒト iPSC 細胞株 ($p53^{+/+}$ 、 $p53^{\text{del}/+}$ 、 $p53^{\text{del}/\text{del}}$) と培養条件：本実験において iPSC 細胞は Human Episomal iPSC Line (hiPSC- $TP53^{+/+}$) (Thermo Fisher Scientific) を用いた。Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System (Takara Bio) で培養し、ガンマ線の持続照射中も含めて、37 °C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養維持した。継代培養には 35-mm dish (Thermo Fisher Scientific)、実験培養には 384-well imaging plate Cell Carrier Ultra (PerkinElmer) を用いた。2 種類の $TP53$ 遺伝子欠損細胞株、hiPSC- $TP53^{\text{del}/+}$ (hetero-deletion mutant) と hiPSC- $TP53^{\text{del}/\text{del}}$ (homo-deletion mutant) は、 $TP53$ 正常 hiPSC から CRISPR-Cas9 と Blasticidin 耐性遺伝子の一本鎖 DNA によって、前年度までの本分担研究課題で樹立したものをを用いた。

- 3-2. ガンマ線照射条件：ガンマ線の照射には広島大学原爆放射線医科学研究所放射線先端医学実験施設に設置されたガンマセル (¹³⁷Cs 線源、線量率：~0.9 Gy/min) および低線量率ガンマ線持続照射設備 (¹³⁷Cs 線源、線量率：~1.388 mGy/min) を用いた。

- 3-3. siRNA ライブラリーとその導入：DNA 損傷修復と DNA 損傷応答に関わる siRNA のカスタムライブラリー (Silencer Select、Thermo Fisher Scientific、315 遺伝子) を、核酸導入 (トランスフェクション) 試薬 RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて 384-well plate に播種された hiPSC 細胞 ($p53^{+/+}$ 、 $p53^{\text{del}/+}$ 、 $p53^{\text{del}/\text{del}}$) に導入した。照射を行う場合には、トランスフェクションから 24 時間培養後に、異なる条件でガンマ線の急照射あるいは持続照射を行い、それぞれの解析を行った。

- 3-4. $p53$ -LOH と細胞応答のイメージング解析：ガンマ線照射した細胞 4% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク) で固定し、0.2% Triton X-100 で処理した後、anti- $TP53$ -FL393 (SantaCruz、1:500) あるいは anti- $TP53$ -Ab-6 (Millipore、1:1000) と、anti-rabbit IgG-Alexa555 または anti-mouse IgG-Alexa488 蛍光標識抗体 (Thermo Fisher Scientific、1:2000) を用いて蛍光免疫染色を行った。細胞核を Hoechst33342 (Thermo Fisher Scientific、1 µg/ml) で蛍光標識し、全自動蛍光画像撮影装置 Opera Phenix (PerkinElmer) で蛍光画像データを取得した。データ画像は画像解析ソフト Harmony (PerkinElmer) を用いて、蛍光強度のデータから解析を行った。また、グラフ作成とデータ解析には TIBCO SpotFire (PerkinElmer) を用いた。

4. 放射線感受性の個人差の課題の検討

- 4-1. 細胞と培養条件：ヒト毛細血管拡張性運動失調症由来繊維芽細胞を SV40 ウイルスで不死化

した ATM 欠損細胞 (AT5VIBA)および ATM cDNA 導入相補した細胞 (AT5VIBA/ATM-wt)、ナイミーヘン症候群患者由来 NBS1 欠損細胞 (GM7166 : 同様に SV40 で不死化) と NBS1 cDNA 導入した相補細胞 (GM7166/NBS1-wt)、正常人由来繊維芽細胞 48BR (テロメラゼ導入して不死化した細胞)、及びヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞は、100 mm プラスティックディッシュ内で 10%ウシ胎児血清 (ギブコ) と抗生物質を添加した培養液 (DMEM:ギブコ) を用いて、37°C、5%CO₂の条件で培養した^{4,5)}。また、ヒト胎児臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUE-101) はコラーゲン I コート 60mm ディッシュ (イワキ) 内で、HuMedia-EG2 培地 (クラボウ) を用いて、37°C、5%CO₂の条件で培養した⁶⁾。分裂寿命があるため、40PDL (population doubling time) 未満の継代数の細胞のみを実験に用いた。

- 4-2. ガンマ線照射 : 細胞へのガンマ線の高線量率急照射は Gammacell 40Ex (MDS Nordion 社 : 線量率 0.9 Gy/min) を用いて室温で行った。低線量率緩照射は低線量長期放射線照射装置 (産業科学 : 線量率 1 Gy/day) を用いて、CO₂インキュベーター内に細胞を播種したディッシュを静置して行った。両方の装置とも照射線源は ¹³⁷Cs であり、累積線量は 2.5 Gy として行った。
- 4-3. ウェスタンブロット法 : ガンマ線照射を行った後、細胞はトリブシン処理で剥離して回収し、PBS で一度洗浄を行った。回収した細胞は RIPA 液 (10 mM Tri・HCl /pH7.5, 1% NP-40, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) でタンパク質成分を可溶化し、遠心して上清として回収した。回収した溶液はタンパク質濃度を定量し、各サンプルそれぞれ、50 μg を SDS-PAGE 電気泳動を行った。泳動分離されたタンパク質はセミドライ式エレクトロドブロット装置 (アトー) で PVDF 膜 (イモビロン : ミリポア) に転写した後、転写された PVDF 膜は、ブロッキング溶液 (5% Skim milk/TBS-T) 内で 1 時間浸透した。次に、TBS-T 適当な濃度に希釈した一次抗体液に一晩反応させ、その後、TBS-T 液で洗浄を行った。さらに、1%BSA/TBS-T で適当な濃度に希釈した horseradish peroxidase 標識した二次抗体 (GE ヘルスケア) に 1 時間反応させた後、TBS-T で洗浄した。その後、目的とするたんぱく質のバンドは、ECL-prime (GE ヘルスケア) を用いて発行させ、X 線フィルムに露光することによって検出した。ウェスタンブロット法に用いた抗体は、抗 MFN1 抗体 (Proteintech)、抗 MFN2 抗体 (Proteintech)、抗 OPA1 抗体 (Santa Cruz)、抗 MFF 抗体 (Proteintech)、抗 β actin 抗体 (シグマ) である
- 4-4. 活性酸素種の染色法 : 100 mm 培養ディッシュ内の MAS コートスライドガラス (マツナミ) 上に 1.0×10^5 個の細胞を播種し、インキュベーター内で一晩培養してから、ガンマ線照射を行った後に、ROS 総量染色には dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を、Superoxide 及び RNS 染色には ROS/RNS Detection Kit (Enzo Life Sciences) 内の特異的染色液を培地に添加し 15 分間後に PBS でスライドガラスを洗浄後、カバーガラスをかけて封入し、蛍光顕微鏡 (ライカ社) で観察し、画像データを取得した。
- 4-5. DIA プロテオーム解析 : 血管内皮細胞は高線量率あるいは低線量率ガンマ線照射終了 30 分後に回収し、PBS で洗浄した後、細胞のみ液体窒素で急速冷凍した。同様に凍結した非照射細胞とともに、株式会社かずさゲノムテクノロジーズに送付して、DIA プロテオーム解析を行った。解析結果については同定タンパク質名とその相対発現量のリストとして提供された。

（倫理面への配慮）

動物の取り扱いに関しては、広島大学実験動物取り扱い指針に従い、動物の苦痛を最小限に留めるよう処置を行う。また、本申請研究には放射性同位元素を使用する実験が含まれているため「放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律」に基づき広島大学原爆放射線医科学研究所放射線障害予防規程にしたがって承認を得て行った。

III. 研究結果

1. 遺伝子改変マウスを用いた放射線発がんにおける線量率効果

1-1. LDEF 値、DREF 値の検討：我々の本研究による、放射線発がん高感受性マウスを用いて得られた結果および、これまでに行った放射線発がん実験結果をもとに、高線量率照射による放射線発がんリスクの線量効果反応を解析した。その結果、線量依存的に腫瘍数の増加が観察された。また、500 mGy 以下の低線量域においても線量依存的な腫瘍数の増加が観察された。得られた線量効果反応は直線しきい値なしモデルが当てはまるといえ、すなわち、LDEF は 1 に近い数値であるという結果が得られた。遺伝的背景の異なる $Apc^{Min/+}$ マウスでの実験結果を比較した結果、LDEF 値は、遺伝的背景の影響をほとんど受けなかった。次に、高線量率放射線発がん実験、低線量率放射線発がん実験結果を基に、DREF 値の検討を行った。その結果、DREF 値は、B6/B6 系統; DREF=2.57, C3H/B6 系統; DREF=2.31, B6/B6-consomic 系統; DREF=1.24 を示し、DREF 値遺伝的背景の影響を受け、1~3 までの多様性を示した。

1-2. 放射線発がんにおける被ばく時年齢依存性の解析：原爆被ばく者の疫学研究から若年期の被ばくにおける発がんリスクは成人期のリスクよりも高いことが報告されている。そこで、昨年度は、 $Apc^{Min/+}$ マウスを用いた放射線発がんにおける被ばく時年齢依存性を解析するため、生後、1、11、21、41、61 日目にガンマ線照射を行い、19~24 週齢で屠殺しマウス 1 匹あたりの腫瘍数を計測し、生後 11、21 日に照射を行った群が最も放射線腫瘍数が多い結果が得られた。今年度は、各実験群で得られた腫瘍組織を用いて、ゲノム変異解析を行った。その結果、非照射では、主に分裂異常に由来するゲノム変異が主に検出された（図 1）。一方、放射線照射群では、分裂異常に加えて、欠失をもつゲノム変異が検出された（図 1）。放射線発がんにおける年齢依存性と、誘発欠失頻度には相関性が観察された。

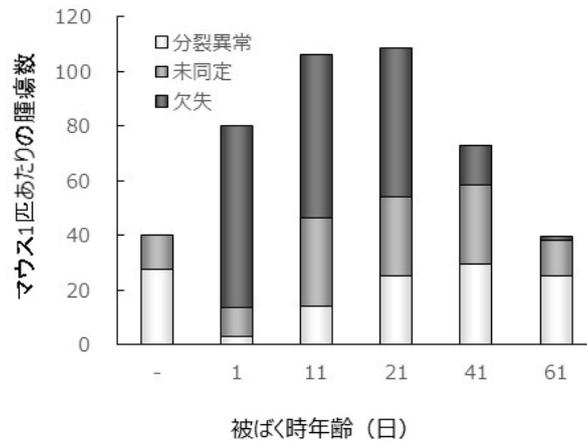
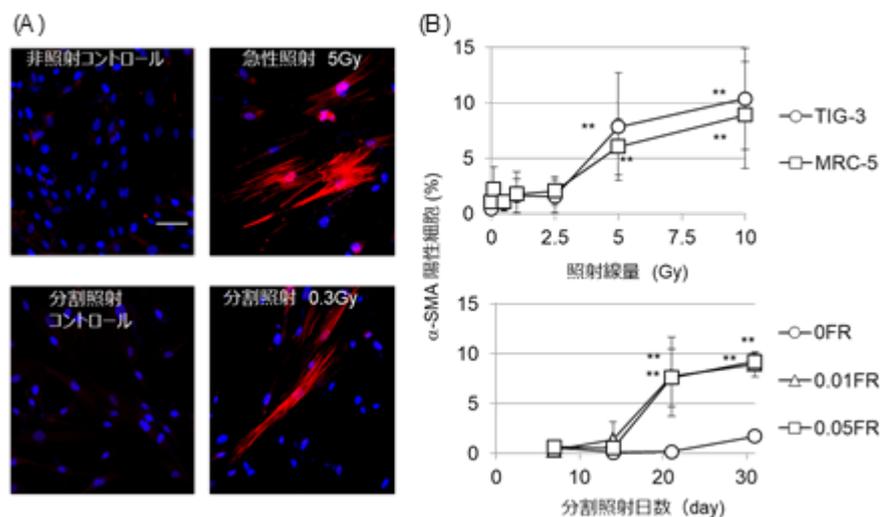


図 1 放射線発がんにおける年齢依存性とゲノム変異頻度

2. 放射線発がんにおけるがん微小環境の役割

がんの発達には、がん細胞だけでなく、免疫細胞や結合組織などの周辺部の細胞との相互作用（がんの微小環境）が関与している。がん組織に含まれる線維芽細胞は正常線維芽細胞とは異なりがん関連線維芽細胞（Cancer Associated Fibroblasts: CAF）と呼ばれる。CAF は、増殖因子の分泌をはじめとした様々なメカニズムによりがん細胞の増殖と浸潤を促進する、がん微小環境の重要な成分の 1 つとされている。放射線発がんにおいても、単にがん細胞の遺伝子変異の蓄積だけでなく、がん微小環境の形成が重要と考える。しかし、放射線発がんにおける CAF の役割は十分に解っていないのが現状である。これまでのヒト肺正常線維芽細胞 MRC-5, TIG-3 を用いた解析から、 α -SMA 発現陽性細胞を CAF と定義し、放射線が CAF を誘導することを報告した^{7,8)}。

放射線で誘発される CAF の照射条件について、急性照射と分割照射で違いがあるかどうかを検討した。ヒト正常線維芽細胞 MRC-5, TIG-3 を用いて、CAF の指標である α -SMA の発現を蛍光免疫染色法で検出した。図 2A の画像より α -SMA はファイバー状の染色パターンで、 α -SMA



陽図 2 急性照射と分割照射による CAF の誘導

性細胞は細胞質が大きく扁形の形態の特徴を示した（図 2 (A)）。この細胞を目視により計測して α -SMA 陽性細胞の割合を求めた。非照射細胞をコントロールとして統計解析により、2 つの細胞で α -SMA 陽性細胞の増加は 5 Gy 以上の急性照射で観察された（図 2 (B)）。一方の 31 日間の分割照射では、照射期間が 21 日を超えると α -SMA 陽性細胞が出現し、一回照射線量 0.01 Gy で 21 日間の総線量は 0.3 Gy になった（図 2 (B)）。同様に一回線量 0.05 Gy の分割照射においても照射量に関係なく同時期に α -SMA 陽性細胞が出現した。

3. 線量率効果を規定する因子のスクリーニング

放射線発がんの感受性は、個人レベル、あるいは、同一個体内でも細胞レベルで異なるが、その違いは遺伝的背景が寄与する部分も大きいと考えられる。放射線発がんの場合には、放射線ばくした細胞ががん抑制機能を有する遺伝子にヘテロ接合体で変異を有する場合において、変異アレルの存在に伴って生じる正常アレルの消失、すなわち LOH（loss of heterozygosity/ヘテロ接合性の消失）が、がん化に寄与することにより、がんの発生率が上昇するものも多いものと考えられる。事実、がん抑制遺伝子 *TP53* ヘテロノックアウトマウスでは、放射線照射による発がん頻度の顕著な上昇、および *TP53* 遺伝子正常アレルにおいての変異が検出される^{9,10}。

がんは各組織の幹細胞より生じることを考慮し、当分担研究課題では、放射線誘発 LOH のモデル細胞として、培養が安定に行うことが可能な多能性幹細胞である iPS 細胞（iPSC）を用いた。ヒト正常細胞由来 iPSC（hiPSC）による放射線誘発 LOH を解析するにあたり、ゲノム DNA 中の *TP53* 遺伝子の LOH を指標としてスクリーニングすることが可能な *in vitro* 実験系を構築した。まず、昨年度までに CRISPR-Cas9 を用いて hiPSC-*TP53*^{del/+}（hetero-deletion mutant）と hiPSC-*TP53*^{del/del}（homo-deletion mutant）を樹立した。正常 hiPSC、hiPSC-*TP53*^{del/+}、hiPSC-*TP53*^{del/del}を用いて、TP53 タンパク質の細胞の免疫蛍光染色を行い、細胞の蛍光画像を全自動蛍光画像撮影装置 Opera Phenix で取得し、画像解析ソフト Harmony で解析を行った。その結果、画像解析を行うことで、それぞれの細胞での TP53 の発現量の違いを識別できることが明らかとなった。

本年度は、放射線照射によって誘発される LOH について siRNA ライブラリーによる遺伝子スクリーニングを試みた。hiPSC-*TP53*^{del/+}に DNA 損傷修復と損傷応答に関連する遺伝子の siRNA カスタムライブラリーを導入した。24 時間後に、2 Gy/2.5 min（急照射）、または、2 Gy/days（持続照射）で、細胞にガンマ線を照射し、合計 5 日間培養した後、TP53 を蛍光免疫染色し全自動共焦点蛍光レーザー顕微鏡撮影装置で蛍光画像を取得し、画像解析を行った。

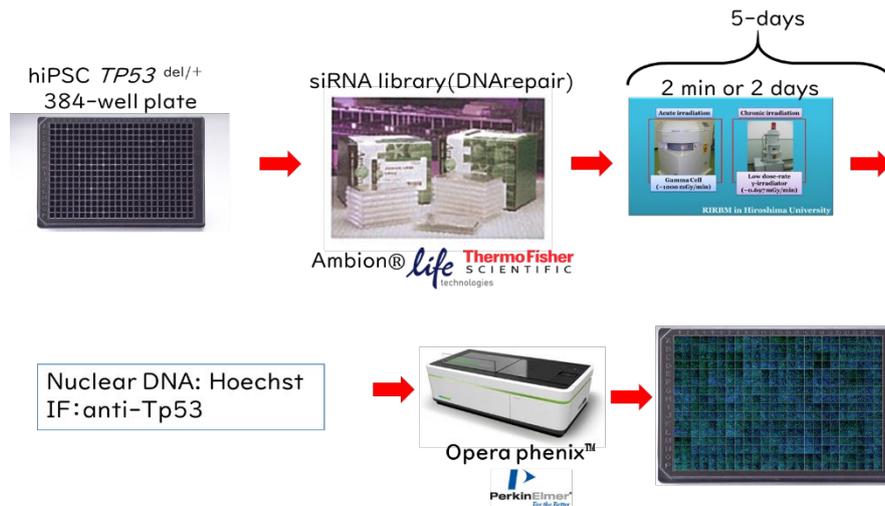


図 3 放射線誘発 LOH 関連因子の siRNA スクリーニングの概略図

hiPSC- $TP53^{\text{del/+}}$ を 384-well plate に播種し、翌日に DNA 損傷修復と損傷応答に関連する遺伝子の siRNA ライブラリーを導入した。翌日に急照射（2 Gy/2.5 min）または持続照射（2 Gy/2days）し、照射期間を含めてそれぞれ 5 日間培養を行い、固定後、Hoechst33342 で核染色（青）、TP53 タンパク質抗体（ab-6：mouse-monoclonal 抗体、FL393：rabbit-polyclonal 抗体）と、蛍光色素で標識された 2 種類の二次抗体（anti-mouse-IgG-Alexa488 抗体：緑色、anti-rabbit-IgG-Alexa555 抗体：橙色）で免疫蛍光染色し、全自動蛍光顕微鏡画像撮影装置で撮影し、それぞれの蛍光値を解析した。

siRNA ライブラリーを導入後に、ガンマ線未照射、急照射、持続照射の hiPSC- $TP53^{\text{del/+}}$ について、各 well（各 siRNA）の細胞数と TP53 の発現量を比較した（図 3）。それぞれの核について、DNA 量を横軸に TP53 の発現量を縦軸にボックスプロットとしたグラフを作成し、核サイズと DNA 量から G1 期と考えられる細胞のみのデータを抽出して、それぞれの DNA 量に対する TP53 の発現量が外れ値となる細胞を TP53 非発現細胞（LOH 細胞）として抽出した。

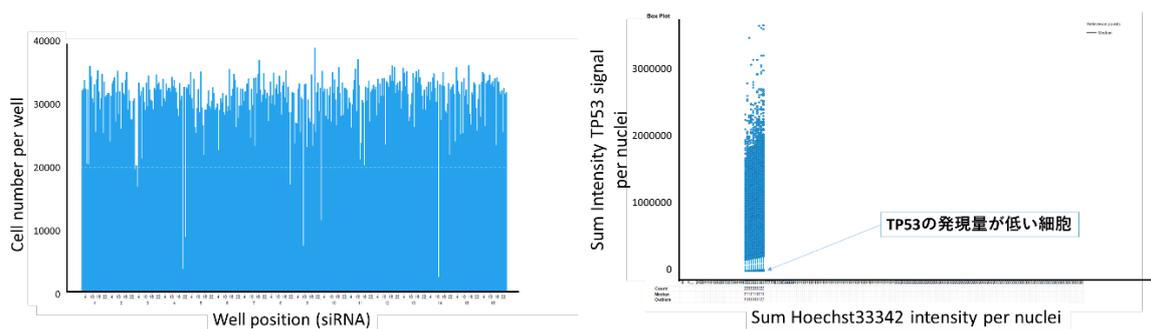


図 4 siRNA の導入による細胞数変化と照射による TP53 の発現量低下

【図左】図 3 の操作後の各 well（各 siRNA）を横軸に、それぞれの細胞数を縦軸にプロットしたグラフ例（未照射）。【図右】全て細胞について、DNA 量を横軸に TP53 の発現量を縦軸にボックスプロットを作成し、核サイズと DNA 量から G1 期と考えられる細胞のデータ例。DNA 量に対する TP53 の発現量が外れ値となる細胞を矢印で示した。

スクリーニングによって、急照射と持続照射にそれぞれにおいてのみ TP53 の発現量が減少した細胞が増加した siRNA の標的遺伝子が観察された（図 4）。その標的遺伝子とその機能を表 2 に示した。これらの遺伝子が無い場合には、TP53 の発現量が低下した細胞がそれぞれのガンマ線照射によって低下した。

表 2 照射によって TP53 の発現量が減少した細胞が増加した siRNA の標的遺伝子と機能

急照射	持続照射
<p>WDR48 : DNA 損傷応答に関わる USP1 結合因子 (DNA 複製にも関わる)</p> <p>CDC6 : DNA 複製開始に必要な因子</p> <p>C15orf42 : DNA 複製開始に必要な因子</p> <p>CKS2 : 細胞周期進行に必要な CDK 結合因子</p> <p>ERCC6 : 転写共役修復に必要な因子</p>	<p>EXO1 : DNA 損傷修復に関わる 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性と RNase 活性を持つ因子</p> <p>DNA2 : DNA 複製と DNS 損傷修復に関わるヘリカーゼ/ヌクレアーゼ</p> <p>KPNA2 : タンパク質の核内移行に必要な因子 V(D)J リコンビネーションに関わる可能性</p> <p>WDR77 : アルギニンメチルトランスフェラーゼ活性化因子</p> <p>CARM1 : アルギニンメチルトランスフェラーゼ</p>

4. 放射線感受性の個人差の課題の検討

放射線は DNA 損傷と活性酸素種 (ROS) 蓄積による酸化ストレスをともに誘発するが、低線量 (率) 放射線生体影響におけるこれらの寄与割合や相互作用はこれまで明らかとされていない。本研究では、放射線高感受性のヒト遺伝子欠損細胞を用いることにより放射線影響が蓄積される条件化で、低線量 (率) 放射線影響を高感度に検出する実験系を確立する。影響評価の指標としては、活性酸素の発生源であるミトコンドリアを対象とし、従来指標である微小核形成とも比較することにより、DDREF=2 の妥当性を再評価できる放射線影響評価法を確立する。さらに、酸化ストレスによるミトコンドリア機能異常の放射線発がんへの寄与についても明らかにすることを目的とする。

これまでの解析から、低線量率ガンマ線照射は細胞内酸化ストレスの蓄積、ミトコンドリア動態の変化が顕著に認められ、ヒト正常細胞では特に顕著であった。ミトコンドリアは細胞内で最大の ROS/酸化ストレス発生源であることから、低線量率照射ではミトコンドリアの機能不全が、酸化ストレスの蓄積につながっている可能性が示唆された。ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返しながら、損傷ミトコンドリアをマイトファジー (オートファジーの一種) で排除して機能維持をしており、融合・分裂サイクルの異常が機能不全につながると考えられている¹¹⁾。それゆえ、ヒト正常 48BR 細胞で融合・分裂サイクルに機能する因子への影響を検討した。

最初にヒト正常 48BR 細胞及びがん細胞 HeLa で ROS 総量 (total ROS)、ミトコンドリア性 ROS

(superoxide)、活性窒素種 (RNS) のガンマ線照射後の細胞内蓄積を特異的色素を用いて検討すると (図 5)、正常細胞では total ROS 及び superoxide が低線量率照射時で非照射時と比べて、有意に増加していたが、高線量率照射では増加していなかった。しかし、RNS は低線量率、高線量率の両方の照射で増加していた。一方、HeLa 細胞では高線量率、低線量率にかかわらず、照射後にこれらの増加は認められなかった。

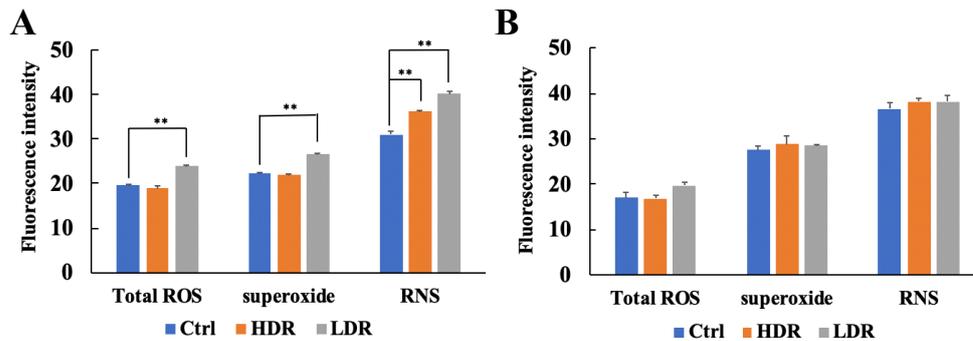


図 5 ガンマ線照射における ROS, RNS 蓄積

高線量率 (HDR) あるいは低線量率 (LDR) ガンマ線照射後、特異的色素で細胞染色して、ROS, superoxide, RNS の蓄積を検討した (A: 48BR 細胞 ; B: HeLa 細胞)。Ctrl : 非照射

** p<0.01

次に、ヒト正常 48BR 細胞で融合・分裂サイクルに機能する因子への影響をウェスタンブロット法で検討すると、ミトコンドリア融合制御因子である MFN1 および MFN2 は低線量率照射後では非照射細胞と比べて、有意な減少が見られ、その低下は照射 24 時間後でも認められたが (図 6)、高線量率照射時には見られなかった。また、別の融合制御因子 OPA1 も低線量率照射終了直後から顕著に低下し、その低下は 24 時間後まで持続していた (図 6)。一方、分裂制御因子 MFF は低線量率照射でも明確な差は認められなかった。

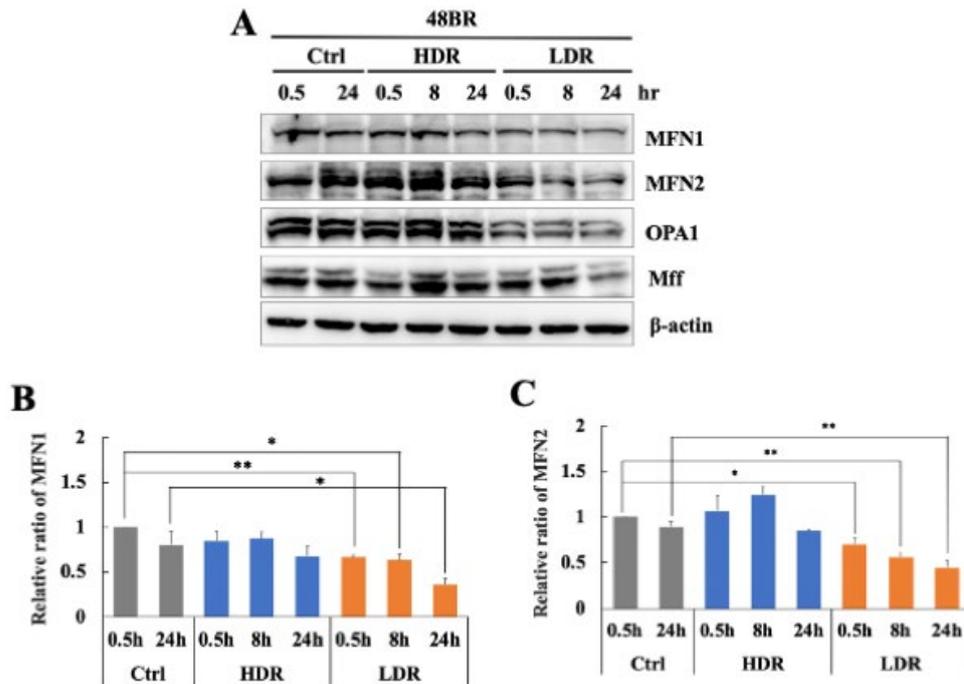


図 6 48BR 細胞におけるミトコンドリア融合・分裂因子の発現

高線量率（HDR）あるいは低線量率（LDR）ガンマ線照射後、図中に示される経過時間ごとに細胞を回収して、ウェスタンブロット法で解析を行った。MFN1（B）、MFN2（C）は（A）を含む 3 回の実験データで統計解析を行った結果である（* p<0.05; ** p<0.01）。

5. 血管内皮細胞における微小核形成誘導機構の検討

昨年度までの解析から、低線量率ガンマ線照射では γ H2AX 陽性微小核形成が誘導され、特に血管内皮細胞では顕著に認められた。 γ H2AX 陽性微小核は DNA 二本鎖切断損傷が含まれると考えられ、ゲノム DNA の損傷に起因して発生し、ゲノム不安定化による発がんや cGAS を介した炎症応答の活性化による細胞機能低下・細胞老化にもつながる可能性がある¹²⁾。それゆえ、血管内皮細胞での γ H2AX 陽性微小核の形成機構の解明を目的とし、発現タンパク質の網羅的解析を DIA（Data independent acquisition）プロテオーム法を用いて行い、非照射細胞と比べて発現量が顕著に変化するタンパク質の同定を試みた。従来の DDA（data-dependent acquisition）法によるプロテオーム解析では発現量の低いタンパク質を同定する検出感度は無く、原理上、定量解析が行えないが、今回 DIA 法で検討した結果、6500 種類あまりのタンパク質の同定に成功した(図 7)。それらの中で、131 種類のタンパク質は非照射と比べて低線量率照射時に 2 倍以上に増加し、増殖因子シグナル伝達、炎症応答、酸化ストレス応答、p53 関連のタンパク質が含まれていた。一方、低線量率照射で二分の一以下に低下するタンパク質は 145 種類同定し、DNA 複製、ヒストン・クロマチン、M 期制御にかかわる因子が含まれていた。さらにこの 145 種類のうち 85 種類のタンパク質は高線量率照射では変動せず、低線量率照射でのみ顕著な低下をしていたが、Cystoscape 3.8/string APP 解析を行うと、明白なクラスターを形成し、このクラスター内には KIFC1, KIF20A, KIF14, KIF15, KIAA0101 など、微小核形成制御への関与が示唆される因子が含まれていた。一方、

低線量率照射でのみ増加する因子は 32 個同定されたが、明確なクラスターの形成がみられなかった。

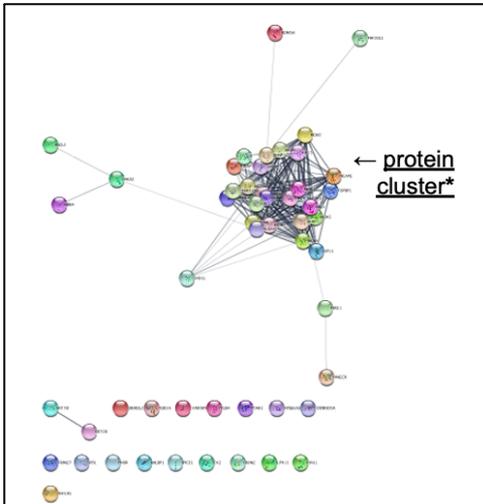


図 7 低線量率照射特異的に減少するタンパク質のクラスター形成

血管内皮細胞において低線量率照射特異的に減少するタンパク質 85 種類について、Cystoscape 3.8/string APP で解析を行った。

IV. 考察

現在、国際放射線防護委員会（ICRP）では、線量・線量率効果係数（DDREF）=2 を用いて低線量（率）発がんリスクの推定が行われている。DDREF 値の妥当性については、現在でも議論が続けられており、発がんを指標とした DDREF 値を検討することが重要である。そこで、本研究課題では、我々が独自に開発した放射線発がん高感受性モデルマウスを用いて低線量効果係数（LDEF）と線量率効果係数（DREF）を個別に算定し、遺伝的背景や被ばく時年齢に着目した DDREF=2 の妥当性の検討を行った。その結果、我々が用いたマウスにおける放射線発がん頻度の過剰相対リスクは、被ばく線量に対して、直線の線量効果関係を示し、直線閾値なし（LNT）モデルを支持する結果が得られた。放射線誘発 DNA 二重鎖切断量の線量反応関係結果からも、LDEF 値は 2 よりも小さいことが示唆された。

次に、放射線発がん高感受性モデルマウスを用いた異なる線量率被ばくによる発がん実験結果を解析した結果、DREF 値は、遺伝的背景の違いにより、 $1 < DREF < 3$ と多様性を示す結果が得られた。さらに、被ばく時年齢が、放射線発がん感受性に及ぼす影響について解析を行った結果、若年期が最も放射線発がん感受性が高い結果が得られた。このことは、被ばく時年齢と被ばく期間が DREF 値に多様性を与えることを示す結果といえる。我々の共同研究結果においても、マウスを用いたがん死亡率を指標にした DREF 値にも被ばく時年齢が影響を及ぼすことが明らかにされており、本研究結果を支持する知見が報告されている¹³⁾。

放射線発がんリスクには、遺伝的背景、生活習慣や年齢のみならず、発がんに関わる多数の細胞内応答機構が修飾要因として放射線発がんリスクに多大な影響を与えることが示されている¹⁴⁾。¹⁵⁾ これらの要因が、放射線発がんリスクを指標とした DDREF 値を正確に算定することを困難にし、DDREF 値の多様化につながっていると考えられる。そこで、DNA 損傷応答、ミトコンドリア損傷応答、がん関連繊維芽細胞誘導に着目し、DDREF 値の多様化に影響を与える候補因子の探

索を行った。がん関連繊維芽細胞の誘導解析では、放射線で誘発される CAF の照射条件と酸化ストレスの役割を検討した。これまでの我々の研究結果と本研究で得られた成果を表 1 にまとめた。分割照射では、急性照射に比べてより低い線量で活性酸素が増加する²⁾。ミトコンドリアで発生した活性酸素は、主にグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の働きで、細胞内の抗酸化物質還元型 (GSH) が活性酸素と反応して自身は酸化型 (GSSG) へと変化して除去される。我々は、急性照射と分割照射で活性酸素が増加するメカニズムが異なる原因として、GPx の発現抑制と不活性化が関与することを明らかにした (論文投稿中)。このため、急性照射では CAF の誘導に 5 Gy 以上の照射線量が必要であるが、分割照射や慢性照射ではより低い線量で活性酸素が増加し CAF が誘導される。また、分割照射や慢性照射では、急性照射よりも低い線量で parkin と Nrf2 の染色が観察され、酸化ストレス応答が誘導された。以上の結果から、放射線による活性酸素酸化ストレスが CAF の誘導に重要であることを明らかにした。

次に、DNA 損傷として、LOH に影響を与える因子を siRNA ライブラリーを用いることでスクリーニングすることが可能な実験モデルを確立した。実験には、がんの標的細胞である組織幹細胞のモデルとしてヒト由来の iPS 細胞を用いることとして、siRNA ライブラリーは DNA 損傷修復に対する細胞応答性と DNA 損傷修復に関わる遺伝子のカスタムライブラリーを用いた。TP53 遺伝子の片アレルが欠損した hiPSC-TP53^{del/+} と抗 TP53 抗体を用いて、急照射と持続照射のそれぞれで生じる LOH に関わる因子を siRNA ライブラリーによってスクリーニングした。その結果、表 1 に示したように、急照射では特に DNA 複製や細胞周期進行に関わる因子が候補因子として同定された。一方、持続照射では、DNA 損傷修復に関わるヌクレアーゼが 2 種類、及び、ヒストンのメチル化に関わる因子が 2 種類、候補因子として同定された。再現性を含めて確認実験および検証実験を行う必要があるが、それぞれの照射条件で、異なる同一経路の遺伝子群が候補因子として同定されたことは、興味深い。急照射については、iPS 細胞の複製機構が放射線誘発 LOH に影響を与える可能性、持続照射については、DNA 損傷修復機構とクロマチン構造の変化が LOH に影響を与える可能性が示唆された。また、未照射時に TP53 の発現量低下細胞の出現頻度増加する因子にもヒストンのメチル化に関わる因子がいくつか見出されていることから、更に検証は必要であるものの特にヒストン修飾によるクロマチン構造変化が LOH に影響している可能性があることも考えられる。

放射線誘発ミトコンドリア損傷解析を行った結果、ヒト正常繊維芽細胞では高線量率放射線被ばく時には損傷したミトコンドリアがマイトファジー機構で除去され、損傷ミトコンドリアからの ROS の漏えいには至らないが、低線量率放射線長期被ばくではミトコンドリア融合タンパク質の低下によりマイトファジーが誘導されず、損傷ミトコンドリアが残存して ROS を漏えいし続け、細胞内に過度な蓄積を引き起こし、微小核形成につながる可能性がある。血管内皮細胞では低線量率放射線照射により、 γ H2AX 陽性微小核形成制御にかかわる一群のタンパク質が低下して、微小核が誘発されると考えられる。それゆえ、 γ H2AX 陽性微小核、ミトコンドリア融合タンパク質、マイトファジー制御因子、さらに血管内皮細胞で低線量率照射特異的に上昇する 32 種類のタンパク質は、低線量率放射線長期被ばくの細胞影響の高感度検出、線量率効果の再検討において、有力な指標になり得ると考えられる。

以上の結果から、DNA 損傷修復関連因子、組み換え修復制御因子、ミトコンドリア分裂・誘導

因子等を DREF 値の多様化に寄与する候補因子として同定することに成功した。

V. 結論

DDREF は、LDEF、DREF 個別に評価する必要があるといえる。LDEF 値は 2 よりも低く、一方、DREF 値は多様性を示すことが明らかにされた。さらに、DREF 値の多様性に影響を与える候補因子、すなわち、低線量(率)放射線発がんハイリスクな集団を抽出するための候補因子を同定することに成功した。これらの研究成果は、DDREF 値の策定に寄与するための科学的知見を提供できると期待される。

VI. 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) Shimura T, Ando T, Narao M, Sasatani M, Kamiya K, Ushiyama A. Mechanism of turnover or persistence of radiation-induced myofibroblast in vitro. *Cell Cycle*. 2020 19; 3375-3385
- 2) Zaharieva E, Sasatani M, Matsumoto R, Kamiya K. Formation of DNA Damage Foci in Human and Mouse Primary Fibroblasts Chronically Exposed to Gamma Radiation at 0.1 mGy/min. *Radiation Res. in press*

イ) 学会発表等

- 1) 小林純也. 「低線量放射線の生体影響の解明」 日本歯科放射線学会第 1 回秋季学術大会・特別講演、2020 年 10 月 31 日、松本市（オンライン開催）
- 2) 小林純也. 低線量放射線影響研究と放射線生物学教育. 放射線生物学東京談話会（東京 RBC）、2021 年 2 月 13 日、東京（オンライン開催）

ウ) 書籍・総説

- 1) 「低線量リスクに関するコンセンサスと課題」(第 1 章 DNA・細胞レベルで起きること、執筆担当, p105-114) 日本保健物理学会・日本放射線影響学会 低線量リスク委員会 (甲斐 倫明、今岡 達彦、小笹 晃太郎、児玉 靖司、小林 純也、小村 潤一郎、酒井 一夫、佐々木 道也、島田 義也、田内 広、高原 省五、富田 雅典、吉永 信治). 放射線生物研究 55 巻第 2 号 (特別号), 2020.
- 2) Shimura T. Roles of fibroblasts in microenvironment formation associated with radiation-induced cancer. Birbrair, Alexander (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology. Tumor microenvironment: Novel Concepts 2020 in press*
- 3) Shimura T. The role of mitochondrial oxidative stress and the tumor microenvironment in radiation-related cancer. *Journal of Radiation Research*. 2020 *in press*

エ) 受賞

該当なし

オ) 特許

該当なし

カ) 環境行政への活用・貢献実績

1) 環境省・放射線健康管理・健康不安対策事業「長期的視点に立った放射線に関する科学リテラシー涵養とリスクコミュニケーション人材育成のための小中学校における「目で見る」放射線科学教育の実践研究」・放射線科学セミナー「放射線について」（小林純也講師）、郡山市立湖南小中学校（オンライン開催）、令和 3 年 2 月 16 日

VII. 引用文献

- 1) Grant EJ, Brenner A, Sugiyama H, et al. Solid Cancer Incidence among the Life Span Study of Atomic Bomb Survivors: 1958-2009. *Radiat Res.* 2017; 187(5):513-537.
- 2) Ozasa K, Shimizu Y, Suyama A, et al. Studies of the mortality of atomic bomb survivors, Report 14, 1950-2003: an overview of cancer and noncancer diseases. *Radiat Res.* 2012; 177(3):229-43.
- 3) Nair R R, Rajan B, Akiba S, Jayalekshmi P, et al. Background radiation and cancer incidence in Kerala, India-Karanagappally cohort study. *Health Phys.* 2009; 96:55-66.
- 4) Sakamoto S Iijima K Mochizuki D, et al. Homologous recombination repair is regulated by domains at the N- and C-terminus of NBS1 and is dissociated with ATM functions. *Oncogene*, 2007; 26: 6002-6009.
- 5) Zhou H Kawamura K Yanagihara H, et al. NBS1 is regulated by two kind of mechanisms; ATM-dependent complex formation with MRE11 and RAD50 and cell cycle dependent-degradation of protein. *J Radiat Res*, 2017; 58: 487-494.
- 6) 阿武久美子. 血管内皮細胞の培養. 広島大学技術センター報告集, 2004; 第 1 号:72-75.
- 7) Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. Radiation-Induced Myofibroblasts Promote Tumor Growth via Mitochondrial ROS-Activated TGFbeta Signaling. *Molecular cancer research*, 2018; 16:1676-86.
- 8) Shimura T, Sasatani M, Kamiya K, Kawai H, Inaba Y, Kunugita N. Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in low dose irradiated human fibroblasts. *Oncotarget*, 2016; 7:3559-70.
- 9) Miyazawa T, Sato H, Hatakeyama K, Kitagawa T, Kominami R. Allelic losses in mouse skin tumors induced by gamma-irradiation of p53 heterozygotes. *Jpn J Cancer Res.* 2002; 93(9):994-9.

- 10) Aizawa S, Tanaka K, Mori M, Tsuji S, Yoshida K. Direct detection of p53 $-/-$ thymocyte appearing at an early stage of radiation-induced thymic lymphomagenesis in p53 $+/-$ heterozygous B10 mice. *Int J Radiat Biol.* 2007; 83(4):259-67.
- 11) Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, et al. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol.* 2017; 11:637-645.
- 12) Harding SM, Benci JL, Irianto J, Discher DE, Minn AJ, Greenberg RA. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature.* 2017; 548:466-470.
- 13) Doi K, Kai M, Suzuki K, Imaoka T, Sasatani M, Tanaka S, Yamada Y, Kakinuma S. Estimation of Dose-Rate Effectiveness Factor for Malignant Tumor Mortality: Joint Analysis of Mouse Data Exposed to Chronic and Acute Radiation. *Radiat Res.* 2020; 194(5):500-510.
- 14) Nicolas F Catherine C, Michel B. 100 years of individual radiosensitivity: how we have forgotten the evidence. *Radiology.* 2012; 264(3):627-31.
- 15) Journy N, Rehel J-L, Le Pointe H Ducou, Lee C, Brisse H, Chateil J-F, Caer-Lorho S, Laurier D , Bernier M-O, *Br J Cancer*, 2015; 112(1):185-93.

Is applying a Dose and Dose Rate Effectiveness Factor = 2 a valid approach in radiation cancer risk estimation?

Megumi Sasatani¹, Tsutomu Shimura², Hidehiko Kawai³, Junya Kobayashi⁴

¹Departments of Experimental Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, Department of Environmental Health, National Institute of Public Health, ³Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, ⁴Radiation Biology Center, Graduate School of Biostudies, International University of Health and Welfare

Keywords: Dose and Dose rate effectiveness factor: DDREF, radiation-induced cancer risk, low dose/low dose rate, *Apc*^{Min/+} mice

Abstract

It is a well established fact that exposure to ionizing radiation (IR) may produce deleterious consequences in humans, including cancer induction. Our knowledge regarding the relationship between absorbed radiation dose and cancer risk is mainly based on epidemiological evidence from the Life Span Study of Japanese A-bomb survivors. The traditional approach to radiation-induced cancer risk estimation is to extrapolate the risk from high and moderate doses down to low doses and low dose rates which are relevant to contemporary radiological protection. The International Commission on Radiological Protection (ICRP) recommends using the so-called Dose and Dose Rate Effective Factor (DDREF =2) to estimate the cancer risk per unit dose at low doses/low dose-rates. However, with the accumulation of new epidemiological and radiobiological data, the validity of this extrapolation has been questioned, and the ICRP has re-opened the debate on whether the DDREF should be applied. There is also a growing appreciation for the need to elucidate the molecular events governing the dose rate effect.

In this project, we are planning to contribute to the reassessment of the DDREF value by addressing the issue of dose rate effects from multiple viewpoints at the molecular, cellular and organismal levels. Using a mouse model susceptible to tumor induction, we will conduct an *in vivo* study providing direct evidence for the carcinogenic potential of radiation at different doses and dose rates. In addition, our *in vitro* experiments will allow us to explore the relationship between radiation dose-rates and biological effects, such as genomic DNA damage, mitochondria damage and the induction of cancer associated fibroblasts (CAF), and to shed light on the molecular mechanisms underlying these phenomena. Single-dose of healthy human fibroblasts *in vitro* promotes myofibroblast induction at high doses (≥ 5 Gy). In contrast, repeated low-dose of fractionated radiation and chronic radiation is at least equivalent to high-dose single radiation regarding

myofibroblast induction. Low dose rate irradiation by gamma-ray decreased some regulatory factors for mitochondria fusion. Although high dose rate irradiation increased mitophagy regulatory factor, which leads to mitophagy activation, low dose rate irradiation did not.

Furthermore, in order to explore the potential relationship between radiation-induced carcinogenesis and radiation dose-rates, we are planning to conduct siRNA screening, which we expect will allow us to identify factors distinctively associated with gene mutations induced by different dose-rates of gamma-irradiation. We could identify several candidate genes that may be involved in the loss of heterozygosity induced by either acute or chronic radiation exposure. Thus, our study is expected to produce variable datasets and analysis of the biological effectiveness of different doses/dose rates of radiation, and we believe it may be a step towards developing a new scientifically based concept of radiation risk estimation.

放射線による健康リスクと社会不安の低減化を目指した

「線量・線量率効果係数」 DDREF=2 の妥当性の検討

線量率効果を規定する因子のスクリーニング

分担研究者 河合 秀彦 (広島大学大学院医系科学研究科)

研究要旨

低線量 (率) の放射線被曝による健康影響は、その実態を含めて明らかにすることは困難である。当分担研究者は、これまで低線量 (率) 放射線被曝の生物影響を明らかにすることを目的として、ガンマ線持続照射設備 (広島大学原爆放射線医科学研究所放射線先端施設、 ^{137}Cs 線源 培養細胞 : 0.001~1.4 mGy/min) を用いて、幅広い線量率のガンマ線を異なる種類の培養細胞に持続的に照射しながら培養し、照射線量率や照射期間に依存して現れる細胞応答や細胞運命の変化に注目して解析を行ってきた。これまでに、ヒトの初代培養細胞や様々な組織由来のがん細胞株、iPS 細胞など、異なる種類の細胞を用いた研究から、持続照射の放射線応答の決定に関与する因子やシグナル伝達経路を明らかとってきた。

当分担研究課題では、線量率効果を規定するいくつかの候補遺伝子を同定し、線量率と放射線発がんリスクに関する DDREF について、分子レベルでアプローチできる可能性を模索することを目的に研究を行った。放射線発がんの標的モデル細胞として、多能性幹細胞である iPS 細胞を用い、異なる線量率の放射線照射で誘発される LOH を規定する可能性のある因子を siRNA ライブラリーによってスクリーニングした。その結果、放射線誘発 LOH に関与する可能性がある遺伝子を複数種類同定することができた。LOH の頻度が上昇する因子は急照射と持続照射とでは明らかに異なっており、急照射では細胞周期進行、特に DNA 複製開始に関わる遺伝子が複数同定されたのに対し、持続照射では DNA 損傷修復とヒストンのメチル化に関与する因子が同定された。主任研究者の研究結果から、放射線誘発性の LOH に関わる因子が発がんリスクの線量率効果の決定因子の一つである可能性が示唆されている。この分担研究の結果からも、iPS 細胞では照射線量率に依存した放射線誘発性の変異を規定する遺伝子が異なっている可能性が示唆された。この結果は、主任研究者の結果を支持するものであると考える。組織や個体間での特定の因子の機能の差は、特定の線量率での照射による健康影響のみでその差が現れる可能性が示唆される。こうした研究結果は、将来的に、DDREF は個人差を考慮して決定する必要があることを意味する。今後、更に、線量率効果に関わる因子や分子機構などが同定され、放射線被曝による発がん機構の実態が明らかとなることで、人類にとってより有益性の高い DDREF を決定することができるものと期待する。

キーワード

放射線発がん、持続照射、細胞老化、siRNA スクリーニング

I. 研究目的

福島第一原発事故以降、低線量、そして、持続的な低線量率の放射線被曝の発がんへの影響は福島県民のみならず国際的にも最優先に解明すべき課題となっている。低線量率の放射線被曝による発がんリスクは、高線量率被曝よりも低いと言う多くの様々な研究結果から、放射線の防護基準を勧告する国際放射線防護委員会（ICRP）では、DDREF=“2”を用いた低線量率の放射線被曝による発がんのリスク推定を行っている。しかし、その数値の妥当性については、議論が必要とされている。

放射線被曝の線量・線量率効果に関する研究は、疫学解析、動物実験、細胞・分子生物学的な解析まで幅広く行われている。我々が行ってきた培養細胞を用いて放射線被曝の線量・線量率効果の解析を行う利点は、異なる組織由来の細胞を多くの異なる条件での放射線照射に対する応答や影響について、効率的にデータを得ることが可能となることであり、実験の再現性を確認しながら、ごくわずかな現象まで定量的に解析できるといった点にある。我々は低線量・低線量率被曝影響の一端を解明することを目的として、これまでに持続放射線被曝影響解析システムを構築し、持続照射が急照射よりも効果的に半永続的な細胞周期の進行停止である細胞老化を誘導すること、また、持続放射線誘発細胞老化に関わる分子を明らかにしてきた[1]。放射線発がんの感受性は、個人レベル、あるいは、同一個体内でも細胞レベルで異なるが、その違いは遺伝的背景が寄与する部分も大きいと考えられる。放射線発がんの場合には、放射線被曝した細胞ががん抑制機能を有する遺伝子にヘテロ接合体で変異を有する場合において、変異アレルの存在に伴って生じる正常アレルの消失、すなわち LOH（loss of heterozygosity/ヘテロ接合性の消失）が、がん化に寄与することにより、がんの発生率が上昇するものも多いものと考えられる。事実、がん抑制遺伝子 *TP53* ヘテロノックアウトマウスでは、放射線照射による発がん頻度の顕著な上昇、および *TP53* 遺伝子正常アレルにおいての変異が検出される[2,3]。放射線による正常アレルの遺伝子機能喪失には、放射線が直接的・間接的に誘発する点変異や欠失変異、あるいは転写の抑制などが関与することが明らかとなっている。本研究課題の主任研究者・笹谷による WNT Signaling Pathway Regulator *APC* の *min/+* ヘテロマウスを用いた放射線誘発性小腸腫瘍の発がん研究の結果からは、染色体組み換えを介した LOH では被曝線量率の影響が現れにくい可能性が示唆されており、DDREF の妥当性を検討するにあたっては、放射線による個別の生物学的影響への線量率効果の有無や寄与率と、それぞれに関与する分子機構を明らかにすることが重要であると考えられる。そこで、本研究項目では放射線被曝による LOH と染色体組み換えに関与する候補遺伝子を、多能性幹細胞である iPS 細胞を用いて、siRNA スクリーニングによる同定を試みることで、幹細胞において放射線誘発 LOH に関わる遺伝的背景の解明につながるデータを得ることを目的とした。

II. 研究方法

1. ヒト iPS 細胞株 ($p53^{+/+}$ 、 $p53^{\text{del}/+}$ 、 $p53^{\text{del}/\text{del}}$) と培養条件：本実験において iPS 細胞は Human Episomal iPSC Line (hiPSC-*TP553*^{+/+}) (Thermo Fisher Scientific) を用いた。Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System (Takara Bio) で培養し、ガンマ線の持続照射中も含めて、37 °C、5% CO₂ インキュベーター内で培養維持した。継代培養には 35-mm dish (Thermo Fisher Scientific)、実験培養には

384-well imaging plate Cell Carrier Ultra (PerkinElmer) を用いた。2 種類の *TP53* 遺伝子欠損細胞株、*hiPSC-TP53^{del/+}* (hetero-deletion mutant) と *hiPSC-TP53^{del/del}* (homo-deletion mutant) は、*TP53* 正常 *hiPSC* から CRISPR-Cas9 と Blasticidin 耐性遺伝子の一本鎖 DNA によって、前年度までの本分担研究課題で樹立したものをを用いた。

2. ガンマ線照射条件：ガンマ線の照射には広島大学原爆放射線医科学研究所放射線先端医学実験施設に設置されたガンマセル (^{137}Cs 線源、線量率： ~ 0.9 Gy/min) および低線量率ガンマ線持続照射設備 (^{137}Cs 線源、線量率： ~ 1.388 mGy/min) を用いた。

3. siRNA ライブラリーとその導入：DNA 損傷修復と DNA 損傷応答に関わる siRNA のカスタムライブラリー (Silencer Select, Thermo Fisher Scientific, 315 遺伝子) を、核酸導入 (トランスフェクション) 試薬 RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて 384-well plate に播種された *hiPS* 細胞 (*p53^{+/+}*、*p53^{del/+}*、*p53^{del/del}*) に導入した。照射を行う場合には、トランスフェクションから 24 時間培養後に、異なる条件でガンマ線の急照射あるいは持続照射を行い、それぞれの解析を行った。

4. *p53*-LOH と細胞応答のイメージング解析：ガンマ線照射した細胞 4% パラホルムアルデヒド (ナカライテスク) で固定し、0.2% Triton X-100 で処理した後、anti-*TP53*-FL393 (SantaCruz, 1:500) あるいは anti-*TP53*-Ab-6 (Millipore, 1:1000) と、anti-rabbit IgG-Alexa555 または anti-mouse IgG-Alexa488 蛍光標識抗体 (Thermo Fisher Scientific, 1:2000) を用いて蛍光免疫染色を行った。細胞核を Hoechst33342 (Thermo Fisher Scientific, 1 $\mu\text{g/ml}$) で蛍光標識し、全自動蛍光画像撮影装置 Opera Phenix (PerkinElmer) で蛍光画像データを取得した。データ画像は画像解析ソフト Harmony (PerkinElmer) を用いて、蛍光強度のデータから解析を行った。また、グラフ作成とデータ解析には TIBCO SpotFire (PerkinElmer) を用いた。

(倫理面への配慮)

本申請研究では市販のヒト培養細胞を用いた解析であり、倫理委員会の審査は必要としない。

III. 研究結果

iPS 細胞の照射線量率に依存した染色体組み換え LOH 検出

がんは各組織の幹細胞より生じることを考慮し、当分担研究課題では、放射線誘発 LOH のモデル細胞として、培養が安定に行うことが可能な多能性幹細胞である *iPS* 細胞 (*iPSC*) を用いた。ヒト正常細胞由来 *iPSC* (*hiPSC*) による放射線誘発 LOH を解析するにあたり、ゲノム DNA 中の *TP53* 遺伝子の LOH を指標としてスクリーニングすることが可能な *in vitro* 実験系を構築した。まず、昨年度までに CRISPR-Cas9 を用いて *hiPSC-TP53^{del/+}* (hetero-deletion mutant) と *hiPSC-TP53^{del/del}* (homo-deletion mutant) を樹立した。正常 *hiPSC*、*hiPSC-TP53^{del/+}*、*hiPSC-TP53^{del/del}* を用いて、*TP53* タンパク質の細胞の免疫蛍光染色を行い、細胞の蛍光画像を全自動蛍光画像撮影装置 Opera Phenix で取得し、画像解析ソフト Harmony で解析を行った。その結果、画像解析を行うことで、それぞれの細胞での *TP53* の発現量の違いを識別できることが明らかとなった (図 III-1)。

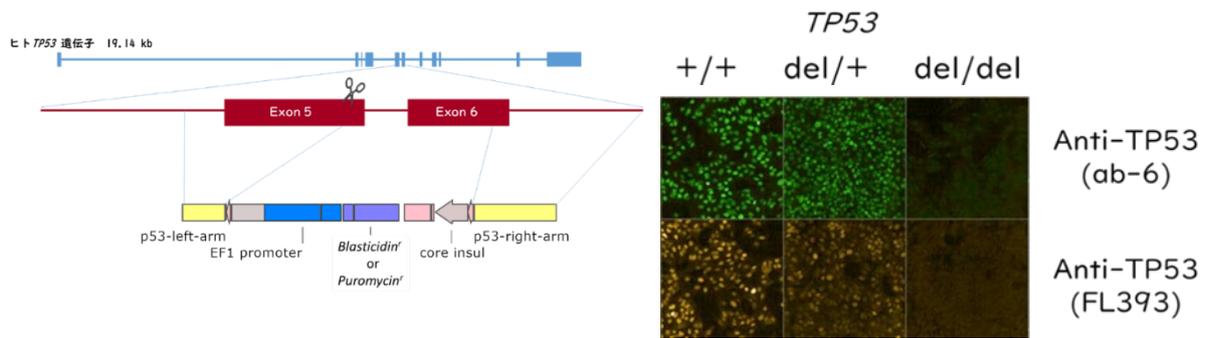


図 III-1. LOH 解析用 *TP53* 変異 hiPS 細胞株

【図左】 CRISPR-Cas9 と一本鎖 DNA による *TP53* の遺伝子のノックアウトの概略図。ゲノム DNA の *TP53* 遺伝子の Exon 5 の切断位置 (ハサミ) と薬剤耐性遺伝子 (*blastidicin^r* または *puromycin^r*) DNA フラグメント。【図右】 hiPSC-*TP53*^{del/+} と全自動蛍光画像撮影解析装置 Opera Phenix を用いた LOH 検出に用いる免疫蛍光染色画像。左から hiPSC-*TP53*^{+/+} (野生型、+/+)、hiPSC-*TP53*^{del/+} (欠失変異ヘテロ接合型、del/+)、hiPSC-*TP53*^{del/del} (欠失変異ホモ接合型、del/del)。Hoechst33342 での核染色 (青)、TP53 タンパク質を認識する一次抗体 (ab-6 : mouse-monoclonal 抗体、FL393 : rabbit-polyclonal 抗体) と蛍光色素で標識された 2 種類の二次抗体 (anti-mouse-IgG-Alexa488 抗体 : 緑色、anti-rabbit-IgG-Alexa555 抗体 : 橙色)。

本年度は、放射線照射によって誘発される LOH について siRNA ライブラリーによる遺伝子スクリーニングを行うにあり、siRNA の導入法の検討と同時に *TP53* の発現量検出の確認実験を行った。*TP53* 遺伝子に対する siRNA を用いて、異なる種類の siRNA 導入試薬を用いて確認を行なったところ、RNAiMax を用いた場合に、最も p53 遺伝子発現量の抑制が確認されることが明らかとなった (図 III-2)。そこで、siRNA ライブラリーの導入には RNAiMax を用いることとした。

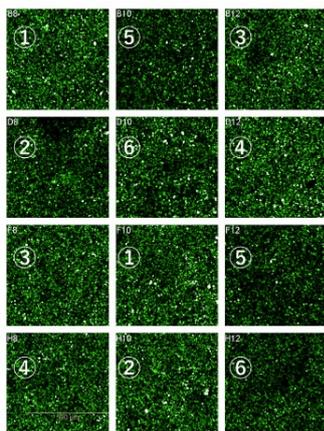


図 III-2. hiPSCs に対する siRNA 導入試薬の検討と *TP53* 遺伝子ノックダウンと *TP53* タンパク質発現量変化の確認

① 未処理、② MagBeads (Funakoshi)、③ Deremfect (Funakoshi)、④ MagBeads+Deremfect、⑤ RNAiMax、⑥ MagBeads+RNAiMax を用いて、p53 に対する siRNA (silencer select, Ambion) を導入。TP53 の発現量を蛍光免疫染色 (anti-TP53 : ab-6、anti-mouse IgG-Alexa488) 画像 (各 2 well)。遺伝子発現抑制が認められた siRNA 導入試薬のみの結果を示した。

次に、hiPSC-*TP53*^{del/+} に DNA 損傷修復と損傷応答に関連する遺伝子の siRNA カスタムライブラリーを導入した。24 時間後に、2 Gy/2.5 min (急照射)、または、2 Gy/days (持続照射) で、細胞にガンマ線を照射し、合計 5 日間培養した後、TP53 を蛍光免疫染色し全自動共焦点蛍光レーザー顕微鏡撮影装置で蛍光画像を取得し、画像解析を行った (図 III-3)。

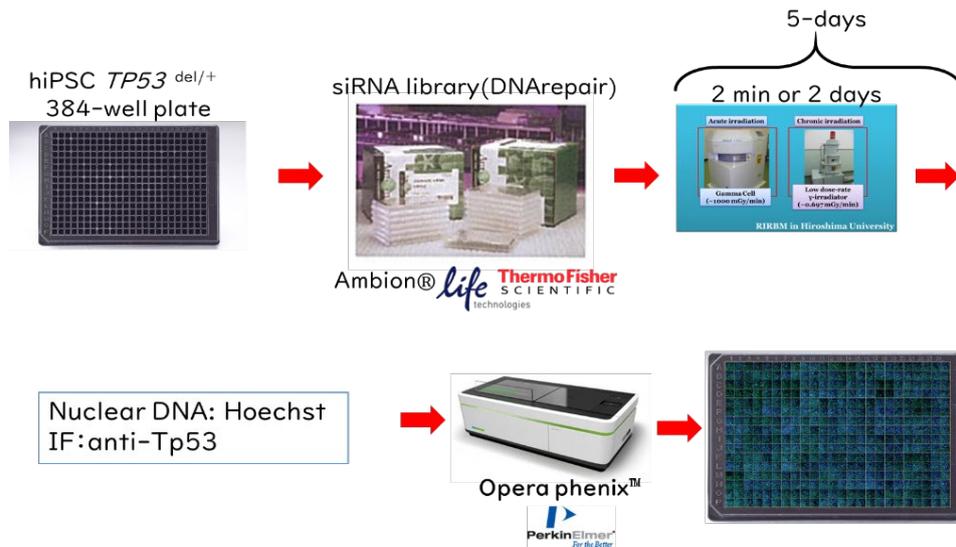


図 III-3. 放射線誘発 LOH 関連因子の siRNA スクリーニングの概略図

hiPSC-*TP53*^{del/+} を 384-well plate に播種し、翌日に DNA 損傷修復と損傷応答に関連する遺伝子の siRNA ライブラリーを導入した。翌日に急照射 (2 Gy/2.5 min) または持続照射 (2 Gy/2days) し、照射期間を含めてそれぞれ 5 日間培養を行い、固定後、Hoechst33342 で核染色 (青)、TP53 タンパク質抗体 (ab-6 : mouse-monoclonal 抗体、FL393 : rabbit-polyclonal 抗体) と、蛍光色素で標識された 2 種類の二次抗体 (anti-mouse-IgG-Alexa488 抗体 : 緑色、anti-rabbit-IgG-Alexa555 抗体 : 橙色) で免疫蛍光染色し、全自動蛍光顕微鏡画像撮影装置で撮影し、それぞれの蛍光値を解析した。

siRNA ライブラリーを導入後に、ガンマ線未照射、急照射、持続照射の hiPSC-*TP53*^{del/+} について、各 well (各 siRNA) の細胞数と TP53 の発現量を比較した (図 III-4)。それぞれの核について、DNA 量を横軸に TP53 の発現量を縦軸にボックスプロットとしたグラフを作成し、核サイズと DNA 量から G1 期と考えられる細胞のみのデータを抽出して、それぞれの DNA 量に対する TP53 の発現量が外れ値となる細胞を TP53 非発現細胞 (LOH 細胞) として抽出した。

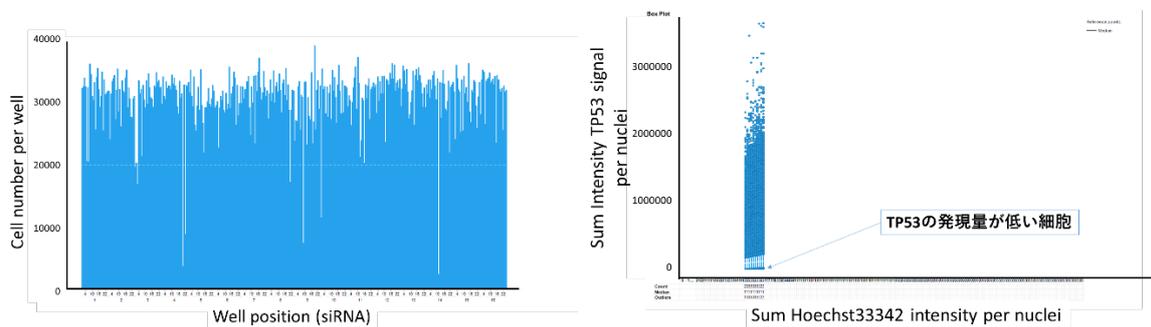


図 III-4. siRNA の導入による細胞数変化と照射による TP53 の発現量低下

【図左】図 III-3 の操作後の各 well (各 siRNA) を横軸に、それぞれの細胞数を縦軸にプロットしたグラフ例 (未照射)。【図右】全て細胞について、DNA 量を横軸に TP53 の発現量を縦軸にボックスプロットを作成し、核サイズと DNA 量から G1 期と考えられる細胞のみのデータ例。DNA 量に対する TP53 の発現量が外れ値となる細胞を矢印で示した。

スクリーニングによって、急照射と持続照射にそれぞれにおいてのみ TP53 の発現量が減少した細胞が増加した siRNA の標的遺伝子とその機能を、結果を表 1 に示した。これらの遺伝子が無い場合には、TP53 の発現量が低下した細胞がそれぞれのガンマ線照射によって低下したことから、LOH が生じた可能性も考えられる。

表 1：照射によって TP53 の発現量が減少した細胞が増加した siRNA の標的遺伝子と機能

急照射	持続照射
<p>WDR48 : DNA 損傷応答に関わる USP1 結合因子 (DNA 複製にも関わる)</p> <p>CDC6 : DNA 複製開始に必要な因子</p> <p>C15orf42 : DNA 複製開始に必要な因子</p> <p>CKS2 : 細胞周期進行に必要な CDK 結合因子</p> <p>ERCC6 : 転写共役修復に必要な因子</p>	<p>EXO1 : DNA 損傷修復に関わる 5'→3'エキソヌクレアーゼ活性と RNase 活性を持つ因子</p> <p>DNA2 : DNA 複製と DNS 損傷修復に関わるヘリカーゼ/ヌクレアーゼ</p> <p>KPNA2 : タンパク質の核内移行に必要な因子 V(D)J リコンビネーションに関わる可能性</p> <p>WDR77 : アルギニンメチルトランスフェラーゼ活性化因子</p> <p>CARM1 : アルギニンメチルトランスフェラーゼ</p>

IV. 考察

本分担研究課題では、主任研究者（笹谷）による *min/+* ヘテロマウスを用いた放射線誘発性小腸腫瘍の発がん実験の結果を踏まえて、異なる線量率での放射線照射によって誘発されるゲノム DNA の LOH に注目して実験を行った。まず、LOH に影響を与える因子を siRNA ライブラリーを用いることでスクリーニングすることが可能な実験モデルを確立した。実験には、がんの標的細胞である組織幹細胞のモデルとしてヒト由来の iPS 細胞を用いることとして、siRNA ライブラリーは DNA 損傷修復に対する細胞応答性と DNA 損傷修復に関わる遺伝子のカスタムライブラリーを用いた。TP53 遺伝子の片アレルが欠損した hiPSC-TP53^{del/+}と抗 TP53 抗体を用いて、急照射と持続照射のそれぞれで生じる LOH に関わる因子を siRNA ライブラリーによってスクリーニングした。その結果、表 1 に示したように、急照射では特に DNA 複製や細胞周期進行に関わる因子が候補因子として同定された。一方、持続照射では、DNA 損傷修復に関わるヌクレアーゼが 2 種類、及び、ヒストンのメチル化に関わる因子が 2 種類、候補因子として同定された。再現性を含めて確認実験および検証実験を行う必要があるが、それぞれの照射条件で、異なる同一経路の遺伝子群が候補因子として同定されたことは、興味深い。急照射については、iPS 細胞の複製機構が放射線誘発 LOH に影響を与える可能性、持続照射については、DNA 損傷修復機構とクロマチン構造の変化が LOH に影響を与える可能性が示唆された。また、未照射時に TP53 の発現量低下細胞の出現頻度増加する因子にもヒストンのメチル化に関わる因子がいくつか見出されていることから、

更に検証は必要であるものの特にヒストン修飾によるクロマチン構造変化が LOH に影響している可能性があることも考えられる。

V. 結論

これまでの様々な研究から、異なる線量率で放射線を持続照射した細胞では、細胞の種類や由来組織、状態などに依存して、損傷修復機構や細胞応答などが異なることが明らかとなっている。このことは、ヒトを構成する様々な細胞が持つ極めて多様な放射線応答性は、線量率が異なる放射線被曝の健康影響にも強く影響を与えている可能性を意味する。本研究課題の目的である DDREF の = 2 の妥当性を検討するためには、放射線被曝による一つ一つの生物学的影響への線量率効果の有無とその寄与率、そして、それらに関与する分子機構を明らかにすることが重要である。放射線被曝によって増加するゲノム DNA の変異は、直接、間接に関わらず、放射線発がんを含む様々な健康影響に寄与していることから、その変異の分子機構について線量率の影響の詳細を明らかにすることは重要であると考えられる。

これまでの我々のヒト由来の初代培養細胞などを用いた研究結果から、細胞の持続照射に対する放射線応答性は、急照射によるものとは異なる応答性が異なる分子機構で制御されていることが明らかとなっている。本研究課題の結果からも、幹細胞における LOH 変異と言った重要な生物学的影響の出現頻度が、異なる種類の遺伝子や分子機構の違いによって、線量率に依存して変化する可能性が示唆された。細胞や組織、個体間での特定の DNA 損傷修復遺伝子の機能の差は、高線量・高線量率被曝に対する放射線感受性だけではなく、低線量・低線量率被曝のみに対する健康影響に影響を与える可能性があることが明らかとなったものと考えられる。こうした結果は、将来的に、DDREF は個人差を考慮して決定する必要があることを意味するものである。今後、更に、線量率効果に関わる因子や経路などが同定され、低線量・低線量率放射線被曝による発がん機構の実態が明らかとなることで、人類にとってより有益性の高い DDREF を決定することができるものと期待する。

VI. この研究に関する現在までの研究状況、業績

論文発表

該当なし

VII. 引用文献

- 1) Cao L, Kawai H*, Sasatani M, Iizuka D, Masuda Y, Inaba T, Suzuki K, Ootsuyama A, Umata T, Kamiya K, Suzuki F. A novel ATM/TP53/p21-mediated checkpoint only activated by chronic γ -irradiation. PLoS One 9(8):e104279, 2014.
- 2) Miyazawa T, Sato H, Hatakeyama K, Kitagawa T, Kominami R. Allelic losses in mouse skin tumors induced by gamma-irradiation of p53 heterozygotes. Jpn J Cancer Res. 93(9):994-9, 2002.

3) Aizawa S, Tanaka K, Mori M, Tsuji S, Yoshida K. Direct detection of p53 $-/-$ thymocyte appearing at an early stage of radiation-induced thymic lymphomagenesis in p53 $+/-$ heterozygous B10 mice. *Int J Radiat Biol.* 83(4):259-67, 2007.

用語説明

ヘテロ接合体：遺伝子において、染色体の一方のみに変異があり、異なった対立遺伝子を持つもの。

LOH (loss of heterozygosity/ヘテロ接合性の消失)：ヘテロ接合体における正常遺伝子座の欠失のこと。片方の遺伝子座に変異がある場合、残りの正常なアレルに変異が誘発されやすいことが知られており、放射線被曝によっても生じる。がん抑制遺伝子の不活性化にも寄与し、発がんメカニズムの1つでもある。

siRNA：21-23塩基対からなる二本鎖 RNA 断片であり、small interfering RNA と呼ばれる。細胞内に導入すると相補的な塩基配列を持つ mRNA を分解あるいは翻訳抑制することができ、特定の遺伝子の発現を抑制することができる。

siRNA ライブラリー：パスウェイの解析や創薬ターゲット分子の探索など、網羅的な遺伝子スクリーニングに用いられる。個別の遺伝子に対する siRNA が多数マルチウェルに分注されたものや、選択培養した後に同定できるように設計され全ての遺伝子に対する siRNA (shRNA) が混合されたものなどがあるが、本研究では前者を用いた。

DDREF：線量・線量率効果係数 (dose and dose rate effectiveness factor; DDREF)。国際放射線防護委員会 (ICRP) によって、2 が用いられている。低線量率被曝の単位線量当たりの放射線によるリスクが高線量率被曝の値の 2 分の 1 であることを示す。

トランスフェクション：動物細胞にプラスミドや siRNA などの核酸を導入する操作のこと。

TP53 遺伝子：転写因子 p53 の遺伝情報をコードする。遺伝子産物 TP53 は、細胞周期や DNA 修復、アポトーシスなどに関わる遺伝子を活性化することにより発がんを抑制する。ヒトにおいて最も重要ながん遺伝子の一つであり、半数のがんで変異や欠失が検出される。

点変異：1塩基が別のヌクレオチド塩基に置換されて生じる変異。

Screening for molecular factors that have determining role for the dose-rate effect

Hidehiko Kawai

Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University,

Key word: Radiation-induced carcinogenesis, Chronic irradiation, Cellular senescence, siRNA screening

Abstract

Low dose and low dose-rate radiation-induced health effects are still unclear, and the underlying biological mechanisms need to be better understood. In order to address this issue, we have established at the Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University, an experimental set-up where a Cs-137 source radiation facility can be operated at a wide range of dose rates (0.001~1.4 mGy/min for cell cultures). In our previous work, we have utilized this facility to conduct studies on the effects of chronic irradiation on various types of cultured cells, such as primary cells, tumor cell lines and iPS cells. Consequently, we have been able to single out several factors involved in cellular radiation responses and cell fate decisions triggered by low dose-rate gamma radiation.

In this study, in order to explore the potential relationship between radiation-induced carcinogenesis and radiation dose-rates, we have planned to conduct siRNA screening, which we expect would allow us to identify factors distinctively associated with gene mutations induced by different dose-rates of gamma-irradiation. In fact, we could identify several candidate genes that may be involved in the loss of heterozygosity induced by either acute or chronic radiation exposure. This study is expected to make a significant contribution to understanding the mechanisms of radiation-induced carcinogenesis and biological effects of low dose and low dose-rate radiation exposure.

放射線による健康リスクと社会不安の低減化を目指した

「線量・線量率効果係数」DDREF=2の妥当性の検討

(放射線発がんにおけるがん微小環境の役割)

志村 勉 (国立保健医療科学院・上席主任研究官)

研究要旨

東京電力福島第一原子力発電所事故以降、放射線被ばくによる将来の発がんリスク、子や孫への継世代影響など放射線健康不安が問題となっており、科学的根拠にもとづく放射線リスク評価が求められている。これまでの放射線発がん研究では、がん細胞に起こる特異的な遺伝子変異 (放射線シグナチャー) の同定を目的に進められているが機序解明に至っていない。がんは、がん細胞と様々な間質組織が相互に作用してがん微小環境を形成し、腫瘍の生着、増殖、浸潤などの発がん過程に深く関与している。間質細胞の主体は線維芽細胞で、その他に免疫細胞や内皮細胞が含まれる。本研究では、ヒト正常線維芽細胞を用いて放射線のばく露による間質細胞への影響を検討し、放射線発がんの発症機構の解明に挑戦した。放射線が、がんの微小環境を構成するがん関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblasts: CAF)を誘発するかどうかについて、CAFの指標である平滑筋用アクチン (α -SMA) の発現を指標に解析を行った。さらに、放射線発がんにおける酸化ストレスの役割について、ミトコンドリアの酸化損傷と酸化ストレス応答に重要な Nrf2 の活性化を測定した。急性照射、分割照射、慢性照射で放射線の照射条件を変え CAF の放射線応答と酸化ストレス応答を解析し、線量・線量率効果(DDREF)について検討した。放射線発がんにおけるがん微小環境の役割という新たな切り口で発がん解析を行うことで放射線影響を高感度に検出し、放射線誘発がんの機序の一端の解明に繋がることが期待される。

キーワード： 放射線発がん、微小環境、活性酸素、がん関連線維芽細胞、Parkin、Nrf2

I. 研究目的

世界保健機構や国連科学委員会などの国際機関による福島事故被災者の線量推計とリスク評価では、福島原発事故による被ばく線量は低く、健康被害は小さいと考えられている。しかし、事故後 10 年が経過した現在においても放射線健康リスクの不安は大きく、多くの課題が残されている。ヒトの放射線影響は、広島・長崎原爆被爆者の疫学データから、被ばく量に比例して固形がん、白血病の発症率が直線、または、直線-二次曲線で上昇することが報告されている。福島原発事故で問題となる 100 mSv 未満の低線量の放射線リスクについても、検出力を高めるために複数の研究の結果を統合した解析が進められている。しかし、人の疫学調査では、放射線量の推定、解析に用いる集団の偏りや交絡などリスク評価の不確実性が課題とされている。福島原発事故では、原爆被爆のような短時間の被ばくではなく、低線量率放射線の長期間の被ばくが想定されるため、同じ累積被ばく線量でも放射線の影響は小さいと考えられている。国際放射線防護委員会 (ICRP) では、広島・長崎原爆被爆者のヒト疫学調査や動物実験の結果から、線量・線量率効果 (DDREF)=2 として、低線量・低線量率の放射線影響は高線量、急性被ばくの半分と考え放射線防護に活用している。しかし、全ての放射線発がん影響に関するヒトの疫学結果が DDREF=2 の値を支持するわけではなく、ICRP では最新の知見を考慮して数値の妥当性が検討されている。

多くの放射線影響研究者によって放射線発がんの研究が進められている。発がんは、複数の段階を経て遺伝子の変異が蓄積し、臨床で診断されるようながんを形成する。がんの発達には、がん細胞だけでなく、免疫細胞や結合組織などの周辺部の細胞との相互作用 (がんの微小環境) が関与している。がん組織に含まれる線維芽細胞は正常線維芽細胞とは異なりがん関連線維芽細胞 (Cancer Associated Fibroblasts: CAF) と呼ばれる。CAF は、増殖因子の分泌をはじめとした様々なメカニズムによりがん細胞の増殖と浸潤を促進する、がん微小環境の重要な成分の 1 つとされている。放射線発がんにおいても、単にがん細胞の遺伝子変異の蓄積だけでなく、がん微小環境の形成が重要と考える。しかし、放射線発がんにおける CAF の役割は十分に解っていないのが現状である。これまでのヒト肺正常線維芽細胞 MRC-5, TIG-3 を用いた解析から、放射線が CAF を誘導することを報告した¹⁾。さらに、放射線による CAF の誘導には、ミトコンドリア由来の活性酸素によるトランスフォーミング増殖因子-ベータ (TGF β) シグナル経路の活性化と下流の平滑筋用アクチン (α -SMA) の発現が関与することを明らかにした¹⁾。

放射線の生物学的標的は DNA で、DNA 損傷は、放射線のエネルギーが直接吸収され生成される場合と放射線が生体中にある水の電離を引き起こして活性酸素を生成し、これが間接的に作用して生成される。活性酸素はミトコンドリアのエネルギー生産の過程でも副産物として発生する。細胞は活性酸素を除去する機構を備えているが、活性酸素制御機構の異常により細胞内に活性酸素が蓄積し、DNA、脂質、たんぱく質などの生体分子を酸化して酸化ストレスの原因となる。以上のことから、活性酸素の発生源であるミトコンドリアの放射線応答が注目されている。ミトコンドリアは 1 細胞当たり 1000 コピー存在し、機能不全のミトコンドリアは分解により排除することでミトコンドリアの質が維持されている。ユビキチン化酵素 Parkin はミトコンドリアの分解に関与することから、この抗体を用いて活性酸素によるミトコンドリア酸化損傷を検出することが可能である。Nrf2 は転写因子で、活性酸素によって安定化され細胞核に移行して酸化ストレス応答に必要な遺伝子の発現を制御している。

本研究では、放射線で誘発される CAF の照射条件や、間質細胞の酸化ストレス応答を解析し、放射線発がんの発症機構を明らかにすることを目的とする。本申請研究の成果により、放射線発がんリスク評価の根拠となる科学的知見の蓄積が期待される。

II. 研究方法

1. 細胞と培養条件：ヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞 MRC-5 と TIG-3 は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団と理研細胞バンクより購入した。細胞は、細胞培養用 T25 フラスコ内で、10%ウシ胎児血清と抗生物質を添加した α -minimum essential medium (α -MEM) 培養液を用いて、37°C、5%CO₂の条件で培養した。細胞は、飽和状態になる前に PBS(-)で洗浄した後に、トリプシンで処理してはがした。一部を新しいフラスコにまいて希釈して維持した。

2. 照射条件：X 線照射装置（日立、MBR-1505R2）または、ガンマ線照射装置（ガンマセル 40 エグザクタ）を用いて、高線量率（0.7 Gy/min）の急性照射を行った。長期分割照射は、1 回当たり 0.01 Gy または、0.05 Gy の照射を一日 2 回、週に 5 日間おこなった。3 週間（21 日間）での累積線量は 1 回当たり 0.01 Gy の場合、 $0.01 \times 2 \times 5 \times 3 = 0.3$ Gy、1 回当たり 0.05 Gy の場合 $0.05 \times 2 \times 5 \times 3 = 1.5$ Gy になる。低線量率の慢性照射は広島大学原爆医科学研究所の放射性セシウム 137 を線源とするガンマ線照射装置を利用し、25 mGy、625、1250 mGy/day の線量率で 4 日間行い累積線量 0.1、2.5、5 Gy の照射を行った。

3. 蛍光免疫染色法：細胞を照射から 24 時間後に固定して、 α -SMA の抗体(シグマ社)、Nrf2 の抗体 (abcam 社)、parkin の抗体 (Proteintech 社)、Tom20 (BD 社)、二次抗体 anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488、または、anti-mouse IgG Alexa Fluor 647 (Invitrogen 社)を用いて蛍光免疫染色を行い、陽性細胞を定量した。蛍光免疫染色したスライドガラスは、キーエンス社 蛍光顕微鏡 Keyence BZ-X700 でランダムに 5~10 枚の画像を習得した。 α -SMA の解析では、100 個以上の細胞を観察し、陽性細胞を目視により判断してその頻度を求めた。Parkin と Nrf2 の解析では、Hybrid Cell Count software の画像解析ソフトを用いて、しきい値を設定して染色される領域を選び、同じ解析条件で全ての画像を自動で解析して蛍光量を定量した。

4. 統計処理：エラーバーは標準偏差を示す。全ての実験は、少なくとも 3 回以上の独立した試料を用いて繰り返し実験を行った。エクセル統計 2012 解析ソフトを用いて、一元配置 ANOVA 後に、Dunnnett 法を用いて多重比較検定を行った。

（倫理面への配慮）

本申請研究では市販のヒト培養細胞を用いた解析のため、倫理委員会の審査は必要としない。

III. 研究結果

1. 放射線による CAF の誘導

放射線で誘発される CAF の照射条件について、急性照射と分割照射で違いがあるかどうかを検討した。本研究では、ヒト正常線維芽細胞 MRC-5, TIG-3 を用いて、 α -SMA の発現を蛍光免疫染色法で検出し、 α -SMA 陽性細胞と CAF 誘導細胞と定義した。図 III-1 の画像より α -SMA はファイバー状の染色パターンで、 α -SMA 陽性細胞は細胞質が大きく扁形の形態の特徴を示した。この細胞を目視により計測して α -SMA 陽性細胞の割合を求めた。非照射細胞をコントロールとして統計解析により、2 つの細胞で α -SMA 陽性細胞の増加は 5 Gy 以上の急性照射で観察された。一方の 31 日間の分割照射では、照射期間が 21 日を超えると α -SMA 陽性細胞が出現し、一回照射線量 0.01 Gy で 21 日間の総線量は 0.3 Gy になる。同様に一回線量 0.05 Gy の分割照射においても照射量に関係なく同時期に α -SMA 陽性細胞が出現した。

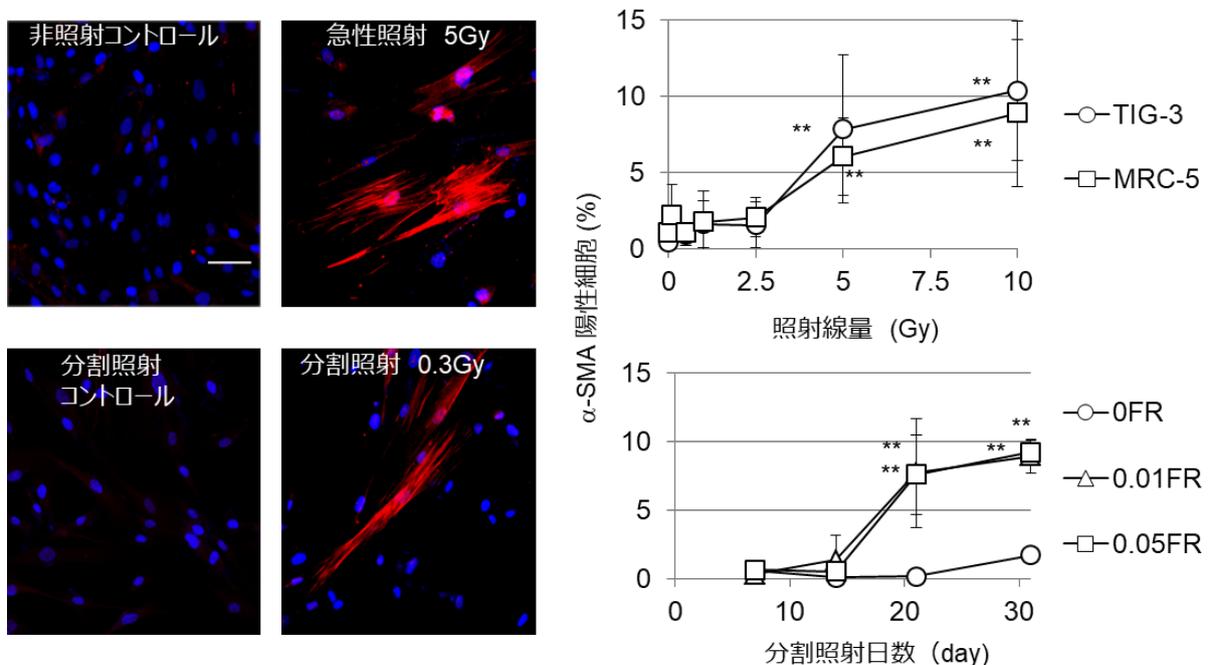


図 III-1 急性照射と分割照射による CAF の誘導

2. 急性照射と慢性照射による CAF の誘導

慢性照射と急性照射で CAF の誘導に違いがあるのかどうかを検討した。急性照射と比べて、慢性照射では α -SMA 陽性細胞の割合が高く、2.5 Gy の放射線照射でも誘導された。 α -SMA 陽性細胞は安定に存在するわけではなく、慢性照射を休止して 7 日目には、 α -SMA の染色は観察されなかった。

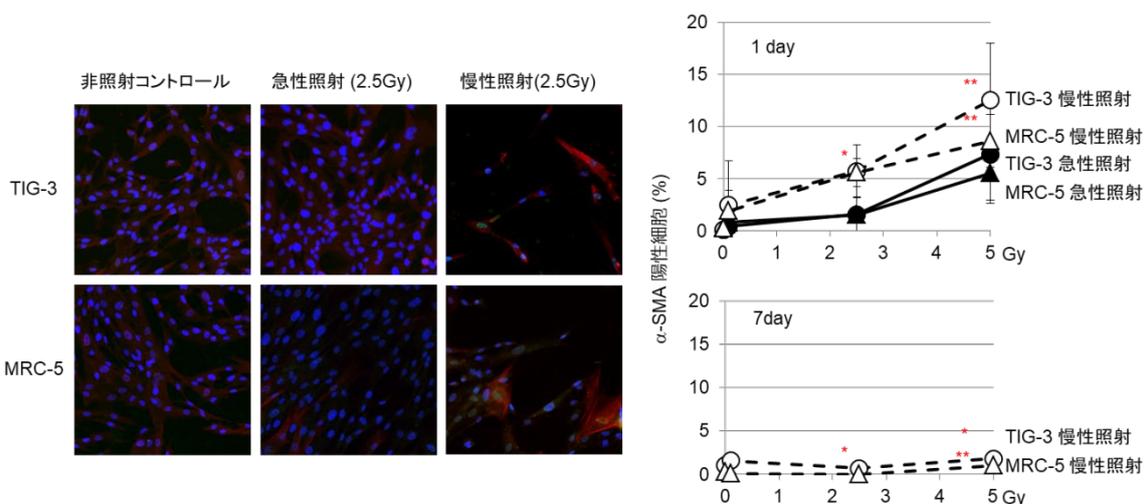


図 III-2 急性照射と慢性照射による CAF の誘導

3. ミトコンドリアの放射線応答

慢性照射の放射線応答について、活性酸素の発生源であるミトコンドリアの放射線影響を解析した。ミトコンドリアの分解に関わるユビキチン化酵素 Parkin の抗体を用いた蛍光免疫染色法によりミトコンドリア酸化損傷を検出した。また、細胞内のミトコンドリア量をミトコンドリアタンパク質 Tom20 の染色により検討し、慢性照射では、低線量の放射線でミトコンドリア量の増加とミトコンドリア損傷が誘導されることを明らかにした。

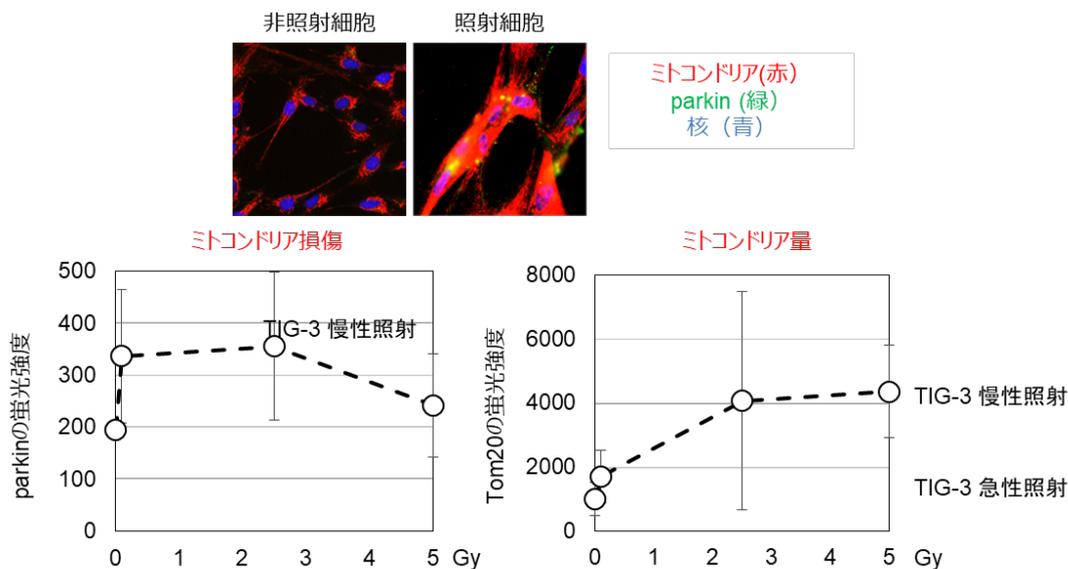


図 III-3 慢性照射によるミトコンドリアの放射線応答

4. 放射線による Nrf2 の活性化

転写因子 Nrf2 は酸化ストレス下で活性化され細胞核に移行し、酸化ストレス応答に必要な遺伝子の発現を誘導する。急性照射と比較して、慢性照射ではより低い線量で Nrf2 の酸化ストレス応答が活性化することを明らかにした。

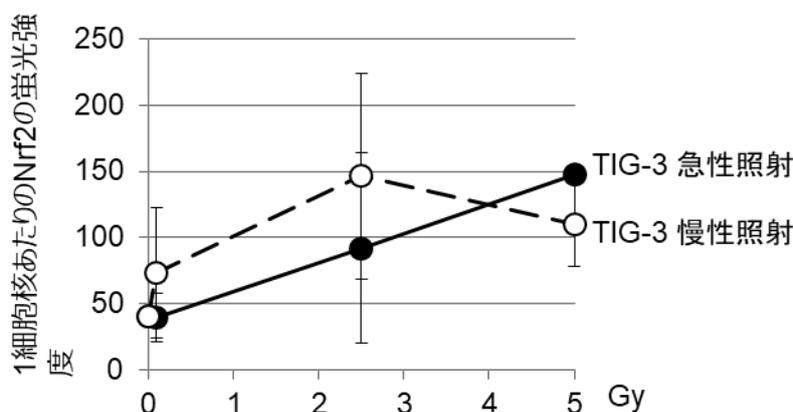


図 III-4 急性照射と慢性照射による Nrf2 の放射線応答

IV. 考察

これまでのヒト正常線維芽細胞やヌードマウスを用いたヒトがん移植片の解析から、放射線が CAF を誘導することを報告した。さらに、放射線誘発 CAF は、放射線がミトコンドリア由来の活性酸素を増加させ、TGFβシグナル経路の活性化を介することを明らかにした¹。本研究では、放射線で誘発される CAF の照射条件と酸化ストレスの役割を検討した。これまでの我々の研究結果と本研究で得られた成果を表 1 にまとめた。分割照射では、急性照射に比べてより低い線量で活性酸素が増加する²。ミトコンドリアで発生した活性酸素は、主にグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の働きで、細胞内の抗酸化物質還元型 (GSH) が活性酸素と反応して自身は酸化型 (GSSG) へと変化して除去される。我々は、急性照射と分割照射で活性酸素が増加するメカニズムが異なる原因として、GPx の発現抑制と不活性化が関与することを明らかにした (論文投稿中)。このため、急性照射では CAF の誘導に 5 Gy 以上の照射線量が必要であるが、分割照射や慢性照射ではより低い線量で活性酸素が増加し CAF が誘導される。また、分割照射や慢性照射では、急性照射よりも低い線量で parkin と Nrf2 の染色が観察され、酸化ストレス応答が誘導された。以上の結果から、放射線による活性酸素酸化ストレスが CAF の誘導に重要であることを明らかにした。抗酸化剤は活性酸素を除去して CAF の形成を抑制し、放射線発がんを抑制することが期待される。実際に、GSH を増加させる N-アセチルシステインや、その他の抗酸化剤である茶葉に含まれるエピカテキンやアスコルビン酸は、放射線による CAF の形成を抑制することを報告した^{1,3}。また、エピカテキンは、マウスに経口投与することで X 線全身照射による血液細胞のミトコンドリア損傷を抑制し、酸化ストレスを抑えることを報告している⁴。これらの抗酸化剤は、放射線発がんの抑制効果を持つことが期待される。

表 1 放射線の照射条件の違いによる活性酸素、CAF、ミトコンドリア酸化損傷、酸化ストレス
応答の誘導

	急性照射	分割照射	慢性照射
活性酸素の増加	$\uparrow \geq 5$ Gy	\uparrow FR ≥ 0.3 Gy (21day)	no data
α -SMA陽性細胞の割合	$\uparrow \geq 5$ Gy	\uparrow FR ≥ 0.3 Gy (21day)	\uparrow at ≥ 2.5 Gy
ミトコンドリアのparkin 蛍光強度	$\uparrow \geq 1$ Gy	\uparrow FR ≥ 0.3 Gy (21day)	\uparrow at ≥ 0.1 Gy
核内Nrf2の蛍光強度	$\uparrow \geq 2.5$ Gy	no data	\uparrow at ≥ 0.1 Gy

V. 結論

本研究の成果により、放射線による活性酸素が、がん微小環境の形成に重要であることを明らかにした。急性照射、分割照射、慢性照射で、活性酸素の発生とCAFの誘導が異なることを明らかにした。抗酸化剤は放射線による酸化ストレスを抑制し、放射線防護効果が期待される。

VI. 次年度以降の計画

発がん研究では、がん細胞だけでなく、がん微小環境の形成についての解析も重要である。ミトコンドリア酸化ストレスは、がんを含む様々な疾病に関与することから、加齢に伴う疾患の発症機構の解明にもつながると考える。今後は、がん微小環境の形成におけるミトコンドリア酸化ストレスの役割を解明することが必要である。

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) Shimura T, Ando T, Narao M, Sasatani M, Kamiya K, Ushiyama A. Mechanism of turnover or persistence of radiation-induced myofibroblast in vitro. *Cell Cycle*. 2020 19; 3375-3385

イ) 学会発表等

該当なし

ウ) 書籍・総説

- 1) Shimura T. Roles of fibroblasts in microenvironment formation associated with radiation-induced cancer. Birbrair, Alexander (Ed.), *Advances in Experimental Medicine and Biology. Tumor microenvironment: Novel Concepts 2020* in press
- 2) Shimura T. The role of mitochondrial oxidative stress and the tumor microenvironment in radiation-related cancer. *Journal of Radiation Research*. 2020 in press

エ) 受賞

該当なし

オ) 特許

該当なし

カ) 環境行政への活用・貢献実績

該当なし

VIII. 引用文献

- 1) Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. Radiation-Induced Myofibroblasts Promote Tumor Growth via Mitochondrial ROS-Activated TGFbeta Signaling. *Molecular cancer research : MCR* 2018; 16:1676-86.
- 2) Shimura T, Sasatani M, Kamiya K, Kawai H, Inaba Y, Kunugita N. Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in lowdose irradiated human fibroblasts. *Oncotarget* 2016; 7:3559-70.
- 3) Shimura T, Ando T, Narao M, Sasatani M, Kamiya K, Ushiyama A. Mechanism of turnover or persistence of radiation-induced myofibroblast in vitro. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2020; 19:3375-85.
- 4) Shimura T, Koyama M, Aono D, Kunugita N. Epicatechin as a promising agent to countermeasure radiation exposure by mitigating mitochondrial damage in human fibroblasts and mouse hematopoietic cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2019; 33:6867-76.

The role of cancer associated fibroblasts in radiation-induced cancer

Tsutomu Shimura

Department of Environmental Health; National Institute of Public Health • Chief Senior Researcher

Key word: radiation-induced cancer、microenvironment、ROS、Cancer Associated Fibroblasts, Parkin、Nrf2

Abstract

Stromal fibroblasts in tumor tissues, called cancer-associated fibroblasts (CAFs), are an activated form of fibroblast. CAF release various factors including growth factors, chemokines, and matrix-degrading proteases to neighboring tumor cells, and promote the development of tumors. However, the role of CAF in radiation-induced cancer is currently under investigation.

Mitochondria are a major radiation target because sites of ROS generation. The long-lasting effects of radiation are caused by persistent oxidative stress which is mediated due to delayed production of mitochondrial ROS. Deleterious ROS levels activate TGF- β signaling and induce expression of α -SMA characterizes fibroblast-to-myofibroblast differentiation. Interaction between activated fibroblast and malignant cancer cells contributes to form tumor microenvironment formation

Here, we investigated the threshold dose and the mechanisms of myofibroblast induction to assess adverse radiation effects on normal cells. Single-dose of healthy human fibroblasts in vitro promotes myofibroblast induction at high doses (≥ 5 Gy). In contrast, repeated low-dose of fractionated radiation and chronic radiation is at least equivalent to high-dose single radiation regarding myofibroblast induction. Alterations in stromal cells can contribute to radiation-related tumors. Thus, radiation affects malignant cancer cells directly and indirectly via the tumor stroma.

放射線による健康リスクと社会不安の低減化を目指した

「線量・線量率効果係数」DDREF=2 の妥当性の検討

放射線感受性の個人差の課題の検討

小林純也（国際医療福祉大学・教授）

研究要旨

放射線は DNA 損傷と活性酸素種（ROS）蓄積による酸化ストレスをともに誘発し、高線量照射ではゲノム DNA への DNA 損傷の誘発が放射線細胞影響の多くを占めると考えられる。一方、低線量（率）放射線ではこれらの寄与割合や相互作用はこれまで明らかでない。本研究では放射線障害・影響が蓄積されると考えられる放射線高感受性ヒト遺伝子欠損細胞を用いて、低線量（率）放射線影響を高感度に検出する実験系を確立することを目的としている。今年度の研究ではヒト正常繊維芽細胞における低線量率照射時の ROS 蓄積とミトコンドリア機能との関係を明らかにするとともに、ヒト血管内皮細胞において、昨年度までの研究で明らかとした指標候補である γ -H2AX 陽性微小核の形成機構について検討した。その結果、繊維芽細胞に対する低線量率ガンマ線照射がミトコンドリア融合制御因子の発現低下を介してマイトファジー不全とし、その結果 ROS の蓄積につながっていることを明らかにした。また、血管内皮細胞における発現タンパク質を DIA プロテオーム法で網羅的に解析した結果、低線量率ガンマ線照射により、微小核形成抑制に関与する複数種のタンパク質が減少していることを明らかにするとともに、低線量率照射特異的に増加する 32 種類のタンパク質を同定した。これらの結果から、昨年度までの研究で明らかとした γ -H2AX 陽性 H2AX とともに、繊維芽細胞において発現低下したミトコンドリア融合制御因子・マイトファジー制御因子、血管内皮細胞において低線量率照射特異的に増加する 32 種類のタンパク質は低線量率放射線影響の検出、線量率効果を検討する上で有力な指標候補となりうることを明らかとした。

キーワード：活性酸素、酸化ストレス、ミトコンドリア、放射線高感受性、ATM

研究協力者

なし

I. 研究目的

医療被ばく、職業被ばく、原発事故では、低線量放射線による放射線の晩発性の身体的影響である発がんが懸念されている。しかし、低線量・低線量率の放射線影響については未解明な部分

が多く、その評価の元となるデータ自体が乏しいのが現状である。放射線は DNA 損傷と活性酸素種（ROS）蓄積による酸化ストレスをともに誘発するが、低線量（率）放射線生体影響におけるこれらの寄与割合や相互作用はこれまで明らかとされていない。本研究では、放射線高感受性のヒト遺伝子欠損細胞を用いることにより放射線影響が蓄積される条件化で、低線量（率）放射線影響を高感度に検出する実験系を確立する。影響評価の指標としては、活性酸素の発生源であるミトコンドリアを対象とし、従来指標である微小核形成とも比較することにより、DDREF=2 の妥当性を再評価できる放射線影響評価法を確立する。さらに、酸化ストレスによるミトコンドリア機能異常の放射線発がんへの寄与についても明らかにすることを目的とする。

今年度の研究ではヒト正常繊維芽細胞における低線量率ガンマ線照射時の ROS 蓄積とミトコンドリア機能との関係を検討するとともに、ヒト繊維芽細胞よりも酸化ストレスに感受性と考えられるヒト血管内皮細胞において、昨年度までの研究で明らかとした指標候補である γ H2AX 陽性微小核の形成機構を DIA プロテオーム解析を用いて検討し、低線量率放射線影響における酸化ストレス応答の機構、及び線量率効果解析に適した材料・指標の候補を明らかにする。

II. 研究方法

1. 細胞と培養条件

ヒト毛細血管拡張性運動失調症由来繊維芽細胞を SV40 ウイルスで不死化した ATM 欠損細胞 (AT5VIBA) および ATM cDNA 導入相補した細胞 (AT5VIBA/ATM-wt)、ナイミーヘン症候群患者由来 NBS1 欠損細胞 (GM7166 : 同様に SV40 で不死化) と NBS1 cDNA 導入した相補細胞 (GM7166/NBS1-wt)、正常人由来繊維芽細胞 48BR (テロメラーゼ導入して不死化した細胞)、及びヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞は、100 mm プラスティックディッシュ内で 10%ウシ胎児血清 (ギブコ) と抗生物質を添加した培養液 (DMEM:ギブコ) を用いて、37°C、5%CO₂ の条件で培養した^{1,2)}。また、ヒト胎児臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUE-101) はコラーゲン I コート 60mm ディッシュ (イワキ) 内で、HuMedia-EG2 培地 (クラボウ) を用いて、37°C、5%CO₂ の条件で培養した³⁾。分裂寿命があるため、40PDL (population doubling time) 未満の継代数の細胞のみを実験に用いた。

2. ガンマ線照射

細胞へのガンマ線の高線量率急照射は Gammacell 40Ex (MDS Nordion 社 : 線量率 0.9 Gy/min) を用いて室温で行った。低線量率緩照射は低線量長期放射線照射装置 (産業科学 : 線量率 1 Gy/day) を用いて、CO₂ インキュベーター内に細胞を播種したディッシュを静置して行った。両方の装置とも照射線源は ¹³⁷Cs であり、累積線量は 2.5 Gy として行った。

3. ウェスタンブロット法

ガンマ線照射を行った後、細胞はトリプシン処理で剥離して回収し、PBS で一度洗浄を行った。回収した細胞は RIPA 液 (10 mM Tri-HCl /pH7.5, 1% NP-40, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM

EDTA) でタンパク質成分を可溶化し、遠心して上清として回収した。回収した溶液はタンパク質濃度を定量し、各サンプルそれぞれ、 $50 \mu\text{g}$ を SDS-PAGE 電気泳動を行った。泳動分離されたタンパク質はセミドライ式エレクトロブロット装置 (アトー) で PVDF 膜 (イモビロン: ミリポア) に転写した後、転写された PVDF 膜は、ブロッキング溶液 (5%Skim milk/TBS-T) 内で 1 時間浸透した。次に、TBS-T 適当な濃度に希釈した一次抗体液に一晩反応させ、その後、TBS-T 液で洗浄を行った。さらに、1%BSA/TBS-T で適当な濃度に希釈した horseradish peroxidase 標識した二次抗体 (GE ヘルスケア) に 1 時間反応させた後、TBS-T で洗浄した。その後、目的とするたんぱく質のバンドは、ECL-prime (GE ヘルスケア) を用いて発行させ、X 線フィルムに露光することによって検出した。

* ウェスタンブロット法に用いた抗体は以下の通りである。

抗 MFN1 抗体 (Proteintech)、抗 MFN2 抗体 (Proteintech)、抗 OPA1 抗体 (Santa Cruz)、抗 MFF 抗体 (Proteintech)、抗 LC3 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 β actin 抗体 (シグマ)、抗 PINK1 抗体 (Novus Biologicals)、抗 Parkin 抗体 (Proteintech)、抗 p62 抗体 (Proteintech)、抗 pKAP1 抗体 (Bethyl)、抗 KAP1 抗体 (GeneTex)

4. 免疫蛍光染色法

100 mm 培養ディッシュ内の MAS コートスライドガラス (マツナミ) 上に 1.0×10^5 個の細胞を播種し、インキュベーター内で一晩培養してから、ガンマ線照射を行った (ATM 阻害剤添加群は同時に阻害剤 [$10 \mu\text{M}$] を添加した)。細胞固定の 30 分前 (照射終了 6 時間後) に MitoTracker Red を $5 \mu\text{l}$ 添加して、インキュベーター内で静置した。スライドガラスは冷 PBS で洗浄し、冷メタノールに浸し氷温で 20 分間固定、さらに冷 PBS で洗浄後、0.5% Triton X-100/PBS に浸し氷上で 10 分処理を行い、冷 PBS で洗浄した。続いて、5%BSA/PBS に室温で 20 分間反応させ、PBS で一度洗浄後、PBS で 1000 倍に希釈した抗 γH2AX 抗体 (ミリポア) に 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、1.0% BSA/PBS で 1000 倍に希釈した二次抗体 (Alexa488 標識 mouse IgG 抗体: Molecular Probe) 溶液に 1 時間反応させた。PBS 洗浄後、DAPI 入りの封入剤を滴下し、カバーガラスをかけて封入し、蛍光顕微鏡 (ライカ社) で観察し、画像データを取得した。

5. 活性酸素種、活性窒素種の染色法

100 mm 培養ディッシュ内の MAS コートスライドガラス (マツナミ) 上に 1.0×10^5 個の細胞を播種し、インキュベーター内で一晩培養してから、ガンマ線照射を行った後に、ROS 総量染色には dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) を、Superoxide 及び RNS 染色には ROS/RNS Detection Kit (Enzo Life Sciences) 内の特異的染色液を培地に添加し 15 分間後に PBS でスライドガラスを洗浄後、カバーガラスをかけて封入し、蛍光顕微鏡 (ライカ社) で観察し、画像データを取得した。

6. DIA プロテオーム解析

血管内皮細胞は高線量率あるいは低線量率ガンマ線照射終了 30 分後に回収し、PBS で洗浄した後、細胞のみ液体窒素で急速冷凍した。同様に凍結した非照射細胞とともに、株式会社かずさゲノムテクノロジーズに送付して、DIA プロテオーム解析を行った。解析結果については同定タンパク質名とその相対発現量のリストとして提供された。

（倫理面への配慮）

本申請研究では基礎研究目的として樹立され、学術雑誌¹⁻³⁾に報告済みのヒト培養細胞のみを用いるため、倫理委員会の審査は必要としない。また、本分担研究では動物実験を行う予定は無い。

III. 研究結果

1. ミトコンドリア融合・分裂制御因子への影響の検討

これまでの解析から、低線量率ガンマ線照射は細胞内酸化ストレスの蓄積、ミトコンドリア動態の変化が顕著に認められ、ヒト正常細胞では特に顕著であった。ミトコンドリアは細胞内で最大の ROS/酸化ストレス発生器官であることから、低線量率照射ではミトコンドリアの機能不全が、酸化ストレスの蓄積につながっている可能性が示唆された。ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返しながら、損傷ミトコンドリアをマイトファジー（オートファジーの一種）で排除して機能維持をしており、融合・分裂サイクルの異常が機能不全につながると考えられている⁴⁾。それゆえ、ヒト正常 48BR 細胞で融合・分裂サイクルに機能する因子への影響を検討した。

最初にヒト正常 48BR 細胞及びがん細胞 HeLa で ROS 総量 (total ROS)、ミトコンドリア性 ROS (superoxide)、活性窒素種 (RNS) のガンマ線照射後の細胞内蓄積を特異的色素を用いて検討すると (図 III-1)、正常細胞では total ROS 及び superoxide が低線量率照射時で非照射時と比べて、有意に増加していたが、高線量率照射では増加していなかった。しかし、RNS は低線量率、高線量率の両方の照射で増加していた。一方、HeLa 細胞では高線量率、低線量率にかかわらず、照射後にこれらの増加は認められなかった。つまり、ヒト正常細胞では低線量率照射により損傷したミトコンドリアからミトコンドリア性 ROS である superoxide が漏えい、蓄積すると示唆される。

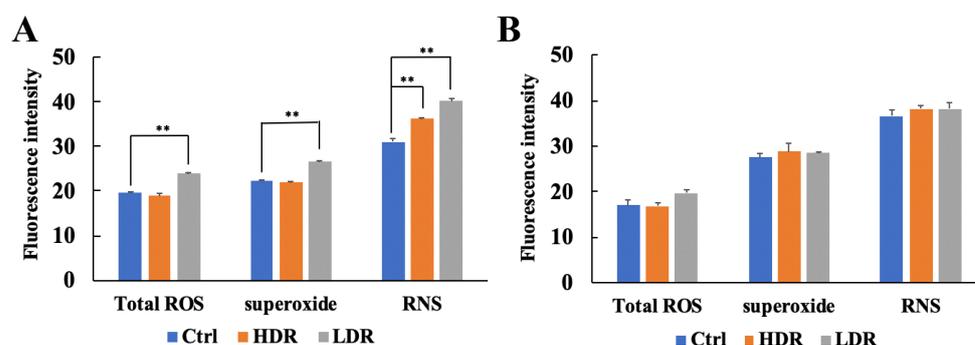


図 III-1 ガンマ線照射における ROS, RNS 蓄積

高線量率 (HDR) あるいは低線量率 (LDR) ガンマ線照射後、特異的色素で細胞染色して、ROS, superoxide, RNS の蓄積を検討した (A: 48BR 細胞 ; B: HeLa 細胞)。Ctrl : 非照射
 ** p<0.01

次に、ヒト正常 48BR 細胞で融合・分裂サイクルに機能する因子への影響をウェスタンブロット法で検討すると (図 III-2)、ミトコンドリア融合制御因子である MFN1 および MFN2 は低線量率照射後では非照射細胞と比べて、有意な減少が見られ、その低下は照射 24 時間後でも認められたが (図 III-2BC)、高線量率照射時には見られなかった。また、別の融合制御因子 OPA1 も低線量率照射終了直後から顕著に低下し、その低下は 24 時間後まで持続していた (図 III-2A)。一方、分裂制御因子 MFF は低線量率照射でも明確な差は認められなかった。これらの結果は、低線量率照射はミトコンドリア融合制御因子の発現に影響を及ぼすことにより、ミトコンドリアの機能維持に影響している可能性が示唆される。

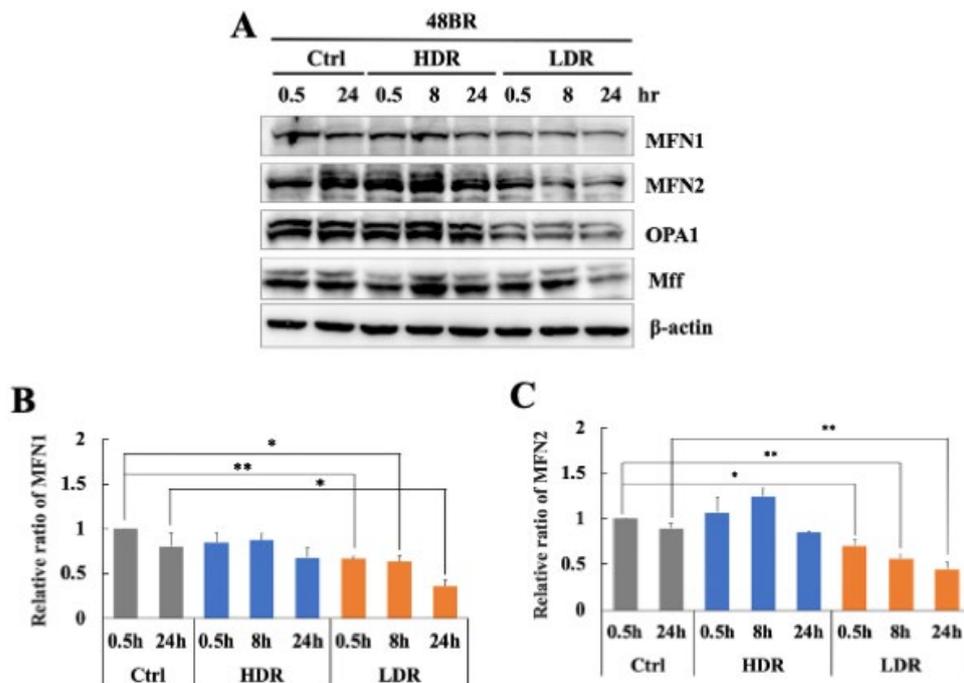


図 III-2 48BR 細胞におけるミトコンドリア融合・分裂因子の発現

高線量率 (HDR) あるいは低線量率 (LDR) ガンマ線照射後、図中に示される経過時間ごとに細胞を回収して、ウェスタンブロット法で解析を行った。MFN1 (B)、MFN2 (C)は(A)を含む 3 回の実験データで統計解析を行った結果である (* p<0.05; ** p<0.01)。

2. ミトファジーへの影響の検討

損傷ミトコンドリアから継続的に ROS 漏えいを防ぐために損傷ミトコンドリアの排除機構として細胞にはマイトファジー (オートファジーの一種) が備わっており、この制御にミトコンドリア分裂・融合因子がかかわっているが、図 III-2 で示したように低線量率照射後にはミトコンド

リア融合タンパク質が低下することが示された。このような低下はミトファジー制御に異常が生じていると考えられたことから、ミトファジー制御因子 (PINK1, Parkin) についてウェスタンブロット法で検討した (図III-3)。ミトファジー制御因子のうち PINK1 は高線量率照射後に有意に増加しており、ミトファジーが活性化していると考えられるが、低線量率照射後は非照射細胞とほぼ増減が無く、ミトファジーは誘導されていないと考えられる。

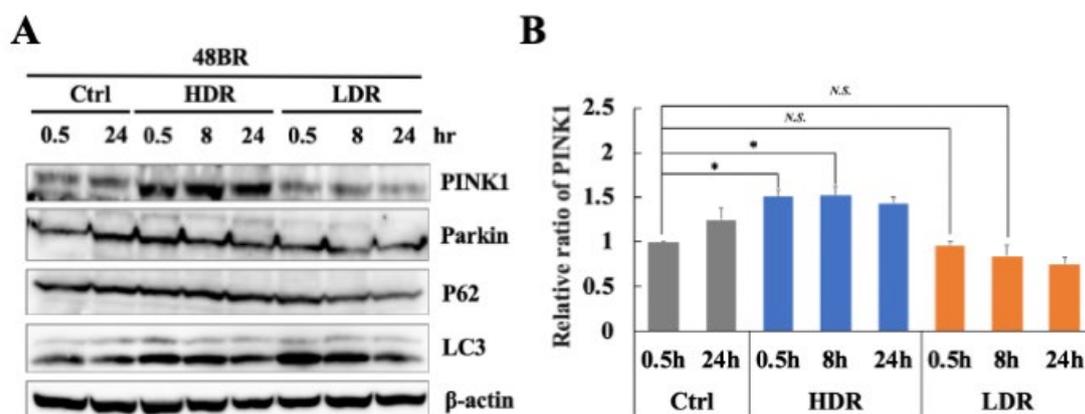


図 III-3 48BR 細胞におけるミトファジー因子の発現

高線量率 (HDR) あるいは低線量率 (LDR) ガンマ線照射後、図中に示される経過時間ごとに細胞を回収して、ウェスタンブロット法で解析を行った。(B) PINK1 について、(A) を含む 3 回の実験データで統計解析を行った結果である (* $p < 0.05$; N.S. 有意差無)。

毛細血管運動性失調症原因遺伝子 *ATM* の遺伝子産物 ATM はタンパク質リン酸化酵素として、DNA 二本鎖切断損傷で活性化されるとともに、ROS などで酸化ストレス蓄積時に活性化することが知られている⁵⁾。昨年までの検討から ATM の阻害は低線量率照射時に γ H2AX 微小核形成を顕著に誘導することを明らかにしており、ミトファジー機構を通して ATM が低線量率照射時に発生するミトコンドリア性 ROS の漏えい抑制に関与する可能性が考えられる。それゆえ、ATM 阻害剤添加によるミトファジー制御因子への影響を検討すると (図III-4)、高線量率照射時にみられる PINK1 の増加が、ATM 阻害剤添加で見られなくなった。この結果から、高線量率照射におけるミトファジー活性化には ATM が関与することが示唆される。

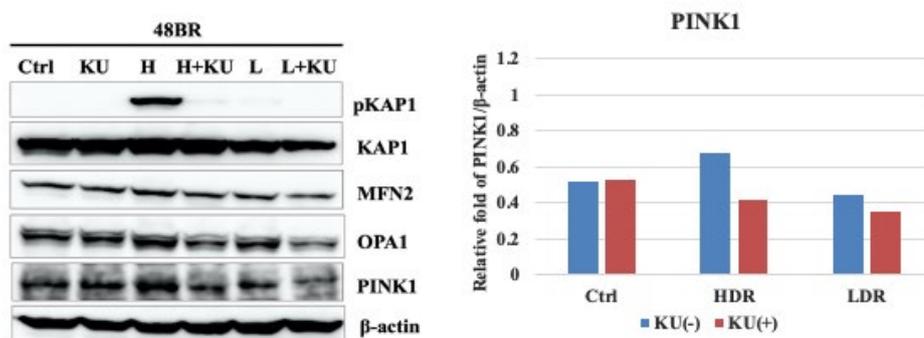


図 III-4 48BR 細胞における ATM 阻害時のミトファジー因子の影響

高線量率（H）あるいは低線量率（L）ガンマ線、図中に示される経過時間ごとに細胞を回収して、ウェスタンブロット法で解析を行った。KU: ATM 阻害剤 KU55937 添加

3. 血管内皮細胞における微小核形成誘導機構の検討

昨年度までの解析から、低線量率ガンマ線照射では γ H2AX 陽性微小核形成が誘導され、特に血管内皮細胞では顕著に認められた。 γ H2AX 陽性微小核は DNA 二本鎖切断損傷が含まれると考えられ、ゲノム DNA の損傷に起因して発生し、ゲノム不安定化による発がんや cGAS を介した炎症応答の活性化による細胞機能低下・細胞老化にもつながる可能性がある⁶⁾。それゆえ、血管内皮細胞での γ H2AX 陽性微小核の形成機構の解明を目的とし、発現タンパク質の網羅的解析を DIA (Data independent acquisition) プロテオーム法を用いて行い、非照射細胞と比べて発現量が顕著に変化するタンパク質の同定を試みた。従来の DDA (data-dependent acquisition) 法によるプロテオーム解析では発現量の低いタンパク質を同定する検出感度は無く、原理上、定量解析が行えないが、今回 DIA 法で検討した結果、6500 種類あまりのタンパク質の同定に成功した。それらの中で、131 種類のタンパク質は非照射と比べて低線量率照射時に 2 倍以上に増加し、増殖因子シグナル伝達、炎症応答、酸化ストレス応答、p53 関連のタンパク質が含まれていた。一方、低線量率照射で二分の一以下に低下するタンパク質は 145 種類同定し、DNA 複製、ヒストン・クロマチン、M 期制御にかかわる因子が含まれていた。さらにこの 145 種類のうち 85 種類のタンパク質は高線量率照射では変動せず、低線量率照射でのみ顕著な低下をしていたが、Cystoscape 3.8/string APP 解析を行うと、明白なクラスターを形成し、このクラスター内には KIFC1, KIF20A, KIF14, KIF15, KIAA0101 など、微小核形成制御への関与が示唆される因子が含まれていた (図 III-5)。一方、低線量率照射でのみ増加する因子は 32 個同定されたが、明確なクラスターの形成がみられなかった。

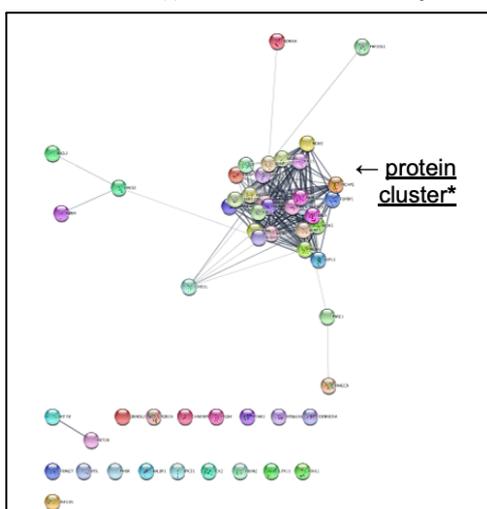


図 III-5 低線量率照射特異的に減少するタンパク質のクラスター形成

血管内皮細胞において低線量率照射特異的に減少するタンパク質 85 種類について、Cystoscape 3.8/string APP で解析を行った。

IV. 考察

本研究では、放射線高感受性を示すヒト遺伝子欠損細胞を用いることにより放射線障害が蓄積される条件化で、活性酸素の発生源であるミトコンドリアを主な指標対象として、DDREF=2 の妥

当性の再評価に利用できる低線量（率）放射線影響を高感度に検出する実験系の確立をめざし、本年度研究ではヒト正常繊維芽細胞における低線量率照射時の ROS 蓄積とミトコンドリア機能との関係を明らかにするとともに、ヒト繊維芽細胞よりも酸化ストレスに感受性と考えられるヒト血管内皮細胞において、 γ H2AX 陽性微小核形成機構の検討を行った。

細胞内の ROS の最大の発生器官はミトコンドリアであり、昨年度研究から低線量率放射線照射により ROS の蓄積と並行してミトコンドリアの動態変化が起こることを明らかとしてきた。ミトコンドリアは ROS 発生器官であるため、常に損傷が発生しており、損傷したミトコンドリアはミトコンドリア同士の融合と分離のサイクルを繰り返す過程でミトコンドリア特異的オートファジーであるマイトファジーを活性化して、損傷ミトコンドリアを除去していると考えられる⁴⁾。図III-2 が示すとおり、低線量率ガンマ線照射によりミトコンドリア融合制御因子の発現が顕著に低下するとともに、マイトファジー制御因子 PINK1 は誘導されなかった。一方、高線量率照射ではミトコンドリア融合制御因子は非照射時と同様に発現し、PINK1 が照射に伴い顕著に増加することからマイトファジーが活性化し、損傷ミトコンドリアが正常に排除されていると考えられる。図III-1 に示されるとおり、低線量率照射ではミトコンドリア性 ROS である superoxide の蓄積が増加するが、高線量率照射では増加していないことから、高線量率照射ではマイトファジーが活性化して損傷したミトコンドリアが除去されることにより ROS の蓄積が起らないが、低線量率照射ではミトコンドリア融合制御因子の減少でマイトファジー不全となって損傷ミトコンドリアが残存し、ROS の蓄積につながっていると考えられる。ATM は昨年度までの解析から微小核形成の抑制に機能すると考えられるが、今回マイトファジーの制御にかかわる可能性も示唆されており、低線量率放射線被ばく時の生体影響を考える上で、ATM のマイトファジーにおける機能を明らかにすることは重要と考えられる。

血管内皮細胞は生体内では酸素を多く含む血液に常に触れており、他の組織の細胞と比較して、酸化ストレス応答が亢進していることが考えられ、低線量率放射線影響を検出する上で、有望な生体材料と考えられる。昨年度までの解析で低線量率ガンマ線照射により γ H2AX 陽性微小核の形成が誘発され、低線量率放射線被ばくに対する有力な指標となると考えられた。本年度の研究では、その微小核形成機構を解明するために、DIA プロテオーム法を用いて発現タンパク質の網羅的解析を試み、低線量率照射時にのみ、顕著に減少する 85 種類のタンパク質を同定し、これらの中には微小核形成にかかわる複数のタンパク質が含まれていた。さらに、低線量率照射でのみ発現上昇する 32 種類のタンパク質も同定した。これらのタンパク質が低線量率放射線被ばくによる生体影響に関係するかは、これら個々の役割の解明が必要であるが、これら因子は血管内皮細胞において、低線量率放射線長期被ばくの細胞影響を高感度に検出するための指標となりうる可能性があり、線量率効果の検討への活用も考えられる。

V. 結論

ヒト正常繊維芽細胞では高線量率放射線被ばく時には損傷したミトコンドリアがマイトファジー機構で除去され、損傷ミトコンドリアからの ROS の漏えいには至らないが、低線量率放射線長期被ばくではミトコンドリア融合タンパク質の低下によりマイトファジーが誘導されず、損傷ミ

トコンドリアが残存して ROS を漏えいし続け、細胞内に過度な蓄積を引き起こし、微小核形成につながる可能性がある。血管内皮細胞では低線量率放射線照射により、 γ H2AX 陽性微小核形成制御にかかわる一群のタンパク質が低下して、微小核が誘発されると考えられる。それゆえ、 γ H2AX 陽性微小核、ミトコンドリア融合タンパク質、マイトファジー制御因子、さらに血管内皮細胞で低線量率照射特異的に上昇する 32 種類のタンパク質は、低線量率放射線長期被ばくの細胞影響の高感度に検出、線量率効果の再検討において、有力な指標になり得ると考えられる。

VI. 次年度以降の計画

これまでの研究で同定した指標候補について、異なる線量率を用いて、線量率の違いとの相関を検討する。血管内皮細胞で同定した 32 種類のタンパク質の低線量率放射線被ばくにおける細胞影響への関与を検討する。また、これまでの研究で個人差への作用因子である ATM を特異的に阻害した時のこれら指標候補への効果も検討し、これらが DDREF 算定に影響しうる個人差要因の指標となり得るかを検討する。

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

該当なし

イ) 学会発表等

- 1) 小林純也. 「低線量放射線の生体影響の解明」 日本歯科放射線学会第 1 回秋季学術大会・特別講演、2020 年 10 月 31 日、松本市（オンライン開催）
- 2) 小林純也. 低線量放射線影響研究と放射線生物学教育. 放射線生物学東京談話会（東京 RBC）、2021 年 2 月 13 日、東京（オンライン開催）

ウ) 書籍・総説

- 1) 「低線量リスクに関するコンセンサスと課題」（第 1 章 DNA・細胞レベルで起きること、執筆担当、p105-114）日本保健物理学会・日本放射線影響学会 低線量リスク委員会（甲斐 倫明、今岡 達彦、小笹 晃太郎、児玉 靖司、小林 純也、小村 潤一郎、酒井 一夫、佐々木 道也、島田 義也、田内 広、高原 省五、富田 雅典、吉永 信治）。放射線生物研究 55 巻第 2 号（特別号）、2020.

エ) 受賞

該当なし

オ) 特許

該当なし

カ) 環境行政への活用・貢献実績

1) 環境省・放射線健康管理・健康不安対策事業「長期的視点に立った放射線に関する科学リテラシー涵養とリスクコミュニケーション人材育成のための小中学校における「目で見る」放射線科学教育の実践研究」・放射線科学セミナー「放射線について」(小林純也講師)、郡山市立湖南小中学校 (オンライン開催)、令和 3 年 2 月 16 日

VIII. 引用文献

- 1) Sakamoto S Iijima K Mochizuki D, et al. Homologous recombination repair is regulated by domains at the N- and C-terminus of NBS1 and is dissociated with ATM functions. *Oncogene*2007; 26: 6002-6009.
- 2) Zhou H Kawamura K Yanagihara H, et al. NBS1 is regulated by two kind of mechanisms; ATM-dependent complex formation with MRE11 and RAD50 and cell cycle dependent-degradation of protein. *J Radiat Res* 2017; 58: 487-494.
- 3) 阿武久美子. 血管内皮細胞の培養. 広島大学技術センター報告集 2004; 第 1 号:72-75.
- 4) Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, et al. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: Pathophysiological implications. *Redox Biol.* 2017; 11:637-645.
- 5) Guo Z Kozlov S Lavin MF, et al. ATM activation by oxidative stress. *Science* 2010; 330: 517-521.
- 6) Harding SM, Benci JL, Irianto J, Discher DE, Minn AJ, Greenberg RA. Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei. *Nature* 2017;548:466-470.

Relationship between radiosensitivity and genetic individual difference

Junya Kobayashi

International University of Health and Welfare • Professor

Key word: ROS, oxidative Stress, mitochondria, radiosensitivity, ATM

Abstract

Exposure to ionizing radiation causes both DNA damage and oxidative stress induced by excess accumulation of ROS (reactive oxidative species). In the case of acute radiation, the biological effects of radiation are most induced by generation of genomic DNA damage, while it is unknown about the contribution between DNA damage and oxidative stress to the biological effects by low dose (rate) radiation. In this project, we attempt to develop hypersensitive detection system of the effect by low dose (rate) radiation using radiation hypersensitive genetic disorders. And, we investigated whether low dose rate irradiation to human normal fibroblast influences expression of mitochondria-related factors and amplifies oxidative stress. We also investigated the effect in human vascular endothelial cells. Mitochondria function is maintained by its fusion/fission cycle, related with mitophagy. Low dose rate irradiation by gamma-ray decreased some regulatory factors for mitochondria fusion. Although high dose rate irradiation increased mitophagy regulatory factor, which leads to mitophagy activation, low dose rate irradiation did not. Probably, the defect of mitophagy under low dose rate irradiation might lead to accumulate ROS from damaged mitochondria. We previously found that human vascular endothelial cells showed formation of gammaH2AX-positive micronuclei under low dose rate irradiation, and clarified several kinds of protein related with regulation of micronuclei formation with DIA proteome analysis in this year. DIA proteome analysis also identified 32 proteins which increased in response to low dose rate IR. Taken together, such our identifying factors might be useful marker to reconsider DDREF.

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

中島 裕夫（大阪大学・准教授）

大野 みずき（九州大学・助教）

石原 弘（量研機構放医研・専門業務員）

研究要旨

東日本大震災に伴って発生した福島原発事故直後よりクローズアップされ社会問題となった低線量放射線内部被ばくの懸念は究極的には、被ばくによる突然変異と発がんへの影響の存否とその度合いにある。

放射線は、遺伝子突然変異とがんの誘発に有力な因子であると考えられている。さらに、ICRPの放射線防護では、閾値なしの直線的作用仮説¹⁾が採択されていることから、微量の放射線でもこの突然変異を起こすことで致死のがんが誘発されると考えられている。しかし、我々の行った突然変異やがんを起こしやすい *Msh2* 遺伝子改変マウス系統を用いた先行研究²⁾では、誘発突然変異率が同じでも酸化ストレスを誘発する化学物質 (KBrO_3) の飲水投与では発がんするが、セシウム 137 放射線の慢性的低線量内部被ばくでは発がんが認められないことを観察している。

本研究では、先行研究で示唆された放射線の低線量内部被ばくでは、化学物質の作用とは異なり必ずしも突然変異と発がんが相関していないことを、より詳細な解析によって定量的に再確認するとともに、線量依存性、生理的反応性、免疫反応性を指標にしてマウスを用いた実験を行い、この突然変異と発がんが相関していない現象のメカニズムを解明する。そして、どの程度の内部被ばくまでは発がんの心配をしなくて良いのか等の判断材料を実験結果として提示して、これまでの我々の研究成果や多くの疫学研究によって示されている結果と合わせて総合的に評価することが目的である。

キーワード：低線量放射線、セシウム 137、内部被ばく、突然変異、発がん、福島原発事故

研究協力者

續 輝久（福岡歯科大学・客員教授、九州大学・学術研究員）、遠藤 暁（広島大学大学院・教授）、宇野 賀津子（公益財団法人ルイ・パストゥール医学研究センター・研究員）、中島 裕美子（九州大学・教授）、福津 久美子（量研機構放医研・主幹研究員）、中津 可道（九州大学・准教授）、武田 志乃（量研機構放医研・上席研究員）、上原 昭典（量研機構放医研・主任研究員）、田中 泉（量研機構放医研・研究員）、葉丸 晴子（量研機構放医研・研究員）、

山口 喜朗（大阪大学・技術専門員）

I. 研究目的

福島原発事故による低線量被ばくが人々の遺伝子や発がんへの影響の不安を招く要因のひとつになっている。これまでの我々のマウスを用いた研究では、20 世代以上にわたりセシウム 137 (^{137}Cs) 水 (100Bq/ml) を摂取し続けて慢性的低線量被ばく (マウス体内で 80~160Bq/g 体重、ヒトでは 100,000Bq/kg 体重で 400 年の世代交代に相当) した A/J マウス子孫において、同一祖先由来の同世代対照群に比べて有意な塩基配列変異が認められなかったこと、ウレタン誘発肺腫瘍の発がん率は ^{137}Cs 投与群と対照群で有意差は認められなかったが、腫瘍増殖は ^{137}Cs 投与群で線量依存的に抑制されたこと、*Msh2* 遺伝子改変マウス系統を用いた突然変異と発がん性を同時に高感度検出できる系³⁾ では、化学物質で認められる突然変異と発がんの相関性が低線量放射線では認められなかったことから、低線量放射線被ばくではこれまでの常識とされている次世代への影響や突然変異と発がんのメカニズムが異なっている可能性や、発がん作用が化学物質よりマイルドである可能性が示唆されている²⁾。 ^{137}Cs は放射性崩壊の過程で、その約 95%が β 線と γ 線を出して、また残りの約 5%が β 線を出してバリウム 137 に変化する。低 LET 放射線である γ 線の生物影響は、水の放射性分解による活性酸素種の生成によるものが約 2/3 と言われているが⁴⁾、酸化ストレスを誘発する化学物質 (KBrO_3) とは異なる酸化 DNA 損傷を誘発するのかもしれない。このことは遺伝子改変マウスに導入したレポーター遺伝子の変異スペクトラムの詳細な解析並びに全ゲノム解析を行うことで、明らかにすることが可能である。どのような変異スペクトラムが発がんに大きく寄与するのかを明らかにすることは低線量影響の中で重要な課題の一つである。

そこで、この現象の原因を解明することで、これまで、放射線と化学物質を同じ変異原として、その突然変異率で評価していた発がんリスクを、変異スペクトラムまでを含めた新たな観点からリスク評価し直すことが本申請研究の目的である。また、この実験系を使うことで、DNA 修復欠損の *Msh2* 遺伝子改変マウスを放射線高感受性の人と想定すれば、低線量内部被ばく影響が自然状態 (DNA 修復能がある野生型) である群では検出限界以下でも高感受性群では検出できる限界点を見つけることが期待できる。この感受性の幅を考慮し、突然変異と発がんの相関性を検討する本研究成果は、これまでのリスク評価にはなかった、ヒトでの放射線感受性の幅を考慮した世界でも初めての影響評価であり、放射線の基準値設定に際して安心の根拠として役立てられるのではないかと考えている。

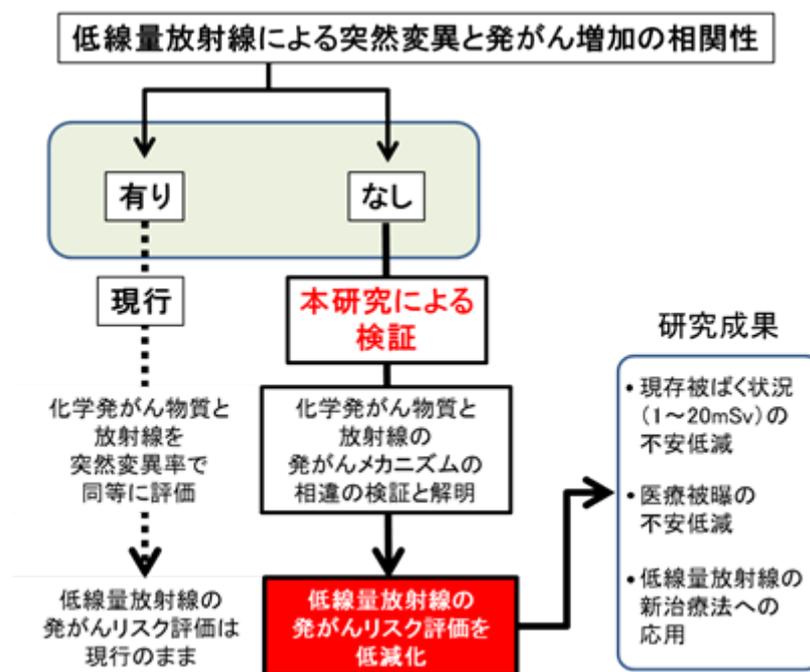
さらに、本研究で見出される放射線誘発による特異的な免疫反応や臓器の発現遺伝子の同定には、微量放射線による健康影響リスク評価のための根拠解明のみならず、被ばく線量の推定、さらには福島などでの環境からの低線量被ばくを利用した新たな疾病治療への応用の可能性も秘められている。

研究期間内に ^{137}Cs に対する低線量・低線量率内部被ばく影響を、酸化ストレス誘発消化管がんを高感度に検出できる DNA 修復系を欠損した *Msh2* 遺伝子改変マウス系統を用いて、被ばく世代における体細胞突然変異と消化管発がんの相関性並びに線量依存性を調べる(平成 31 年度~令

和2年度)。マウスの諸臓器における低線量被ばくに特異的な遺伝子の発現量の違い、免疫反応（サイトカイン量）のちがいを測定し、化学物質と放射線に対する生体反応の差異を定量的に調べる（令和2年度～令和3年度）。また、高感受性マウス系での継世代影響について全ゲノム解析法により変異スペクトラムについても調べ、既に結果が出ている修復系が正常である野生型のA/JやB6マウス系と塩基変異率にどのような違いがあるかを比較する（令和3年度）。

加えて、本研究で得られた結果を踏まえて、内部被ばく線量と同等の外部照射実験を行い、生体影響が同じであるか、あるいは、内部被ばくの特異性があるかを検討する比較実験を行う（令和2年度～3年度）

図I-1
成果の概要図



II. 研究方法

【令和2年度の計画】

大阪大学、九州大学、放医研それぞれの機関における施設の条件、これまでに確立している技術の特徴を生かして連携を密にして最も効率よく速やかに研究が遂行できる体制を取り、¹³⁷Csに対する低線量内部被ばくによる突然変異と発がんの非相関性について、また、そのメカニズムの解明に向けた研究を以下の方法で行った。

大阪大学には ¹³⁷Cs による内部被ばくと外部被ばくの動物実験を実施できる、国内でも数少ない施設を有しているので、その施設を利用して本課題の目的に沿った低線量・低線量率放射線をマウスに曝露させた。

マウス飼養については、大阪大学放射線科学基盤機構附属ラジオアイソトープ総合センター、医学系研究科附属未来医療イメージングセンターのマウス飼育室にて、室温 25°C (±1°C)、照明 14 時間明、10 時間暗 (4:00～18:00 点灯、18:00～4:00 消灯) の条件下で、ガンマ線滅菌 CRF-1 飼料 (オリエンタル酵母) にて、実験条件に即したマウスを選び出し、内部被ばくマウス、外部

被ばくマウスとして実験目的ごとのスケジュールで飼育した。その後に、血漿や臓器（肺、肝臓、腎臓、小腸、筋肉、脾臓、心臓、脳）、筋肉組織を剥出し、試料として解析用途ごとに適切な方法で調製・凍結保存した。

低線量被ばくと化学物質による突然変異と発がんの相関性の相違には、曝露後の適応応答による遺伝子発現や免疫能に差が生じている可能性が考えられた。そこで、曝露後の遺伝子発現量と免疫能の定量を行うためにマウスに対して内部被ばく、外部被ばく実験を行った。

II-1. 実験用マウス系統の選定と準備

低線量被ばく影響の主な要因を酸化ストレスと想定して、酸化ストレスに高感受性を示し、酸化剤（ KBrO_3 ）によって消化管がんを高発する、DNA のミスマッチ修復ができない *Msh2* 遺伝子をホモ欠損させた遺伝子改変マウスを用いることとした。変異検出用遺伝子（レポーター遺伝子）を導入した *Msh2* 遺伝子ホモ欠損マウス（*Msh2*^{-/-}・*rpsL*-*Tg*⁺）と野生型（*Msh2*^{+/+}・*rpsL*-*Tg*⁺）、およびそのコントロールとしてレポーター遺伝子を保持しない *Msh2* 遺伝子ホモ欠損マウス（*Msh2*^{-/-}・*rpsL*-*Tg*⁻）と野生型（*Msh2*^{+/+}・*rpsL*-*Tg*⁻）をそれぞれ九州大学で作成、繁殖させ、曝露実験を行う大阪大学へ輸送した（大野）。

II-2. 内部被ばく実験

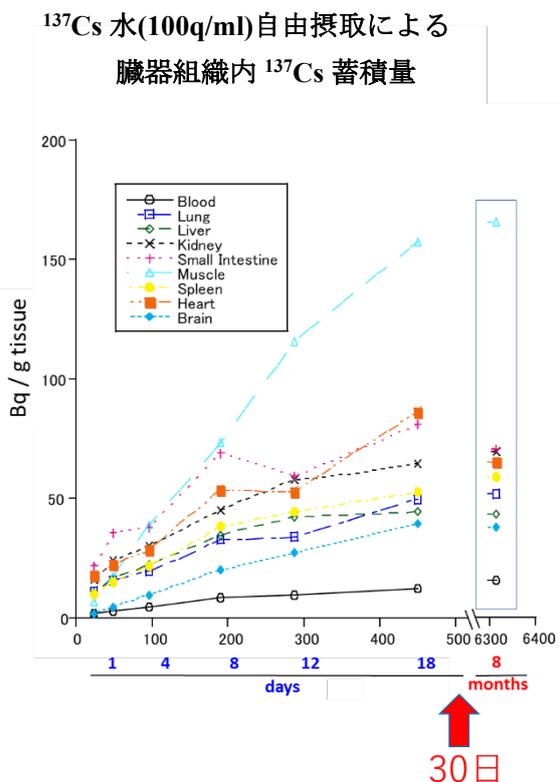
九州大学で準備された 3 週齢の *Msh2* 遺伝子改変マウスを大阪大学へ輸送し、1 週間の検疫飼育の後、内部被ばく実験を以下の条件で行った（中島）。

実験開始初日に経口投与用チューブ（胃ゾンデ）にて ^{137}Cs 水原液（ $^{137}\text{CsCl}$ 、4MBq/10ml 水：日本アイソトープ協会）を 4 週齢もしくは 8 週齢の *Msh2* 遺伝子改変マウスに体重 1g 当たり 0.01ml（4,000Bq/g 体重）の経口投与を行い、その後、2,500Bq/ml の ^{137}Cs 水（4MBq/10ml 水を滅菌水にて 160 倍希釈）を給水瓶にて飲料水として 4 週間（体細胞突然変異解析、免疫能解析、遺伝子発現量解析）、もしくは 16 週間（消化管発がん解析）の期間で自由摂取をさせた。

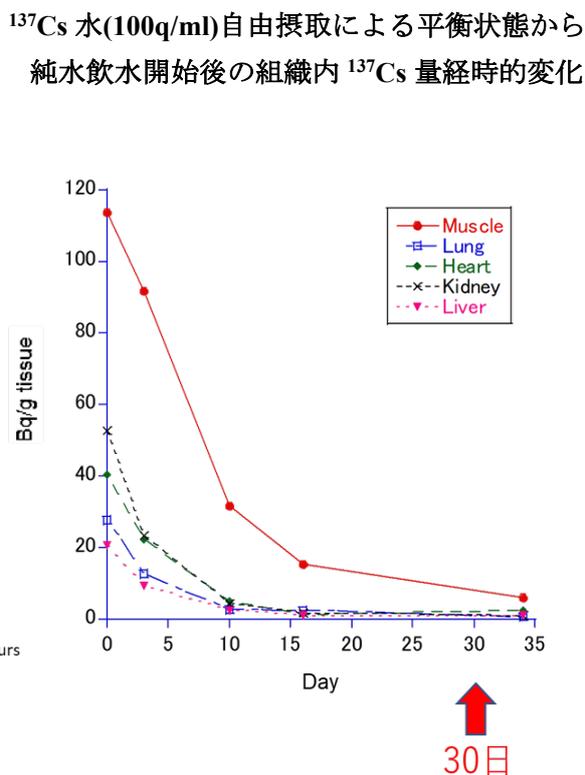
この初期処置は、ある濃度の ^{137}Cs 水を自由摂取した場合、筋肉内の ^{137}Cs 濃度が 4 週間で摂取濃度のおおよそ 1.6 倍で平衡状態となること（図II-1）、また、単回投与による筋肉内の ^{137}Cs 濃度の 4 週間の減衰状況（図II-2）の結果に基づき、 ^{137}Cs 水の給水開始日に、 ^{137}Cs 体内濃度がほぼ平衡状態の時と同じレベルになり、4 週間もしくは、16 週間の ^{137}Cs 水投与期間中の体内濃度を一定にするために行った。

図II-1 は、マウスに飲料水として ^{137}Cs 水の自由摂取を開始してから 8 か月目までの各組織（凡例上から血液、肺、肝臓、腎臓、小腸、筋肉、脾臓、心臓、脳）内の ^{137}Cs 蓄積量（Bq/g 組織）の変化を示しており、毎日の飲水によって一定量の ^{137}Cs が摂取されるにもかかわらず、体内蓄積量は永久に増え続けるのではなく、おおよそ 3 週から 1 か月で水平状態となり、8 か月まで平衡状態が維持される。また、 ^{137}Cs 水の給水を停止して、純水に変えた場合には、図II—2 のごとく、筋肉以外の組織（凡例 2 段目から肺、心臓、腎臓、肝臓）では、ほぼ 10 日で、筋肉（凡例最上段）においても、おおよそ 1 か月で減衰し、組織内の殆どの ^{137}Cs が体外へ排泄されることが分かっている^{5, 6)}。

図II-1



図II-2



4週間もしくは、16週間の¹³⁷Cs水給水の後、給水の水を純水に変えて2週の安定化（レポーター遺伝子の放射線や化学物質の刺激に対する変異ノイズを下げるための処置）を行った（図II-3、図II-4）。その後マウスを安楽死させ、血漿を含む主要臓器組織（脳、心臓、肺、腸管、脾臓、腎臓、精巣、精巣上部、卵巣、子宮、筋肉）を剥出して凍結、ホルマリン固定等の処置を行った。

なお、化学発がん物質であるKBrO₃（0.15%水溶液）のマウスへの自由摂取による飲水投与は、九大で行われた（大野）。

図II-3、
クリーン恒温飼育装置



図II-4
クリーン恒温飼育装置内部



II-3. 内部被ばく線量の推定

^{137}Cs 水 (2,500Bq/ml) を飲み続けて ^{137}Cs 量がマウス体内で平衡状態になった時の ^{137}Cs 臓器濃度 (Bq/g) をもとに、PHITS コードを用いて、内部被ばく線量率を求めた (遠藤)。

II-4. 外部被ばく実験

^{137}Cs による内部被ばくと外部被ばく影響の同等性、差異を検討するために内部被ばくと同様の条件で、産業科学株式会社製ガンマ線照射装置 (^{137}Cs 線源、2017.12.1 現在 53.45GBq) にて *Msh2* 遺伝子改変マウスへの ^{137}Cs ガンマ線外部照射実験を行った (図II-5、 図II-6)。

図II-5

^{137}Cs ガンマ線照射装置



図II-6

ガンマ線照射時のマウス飼育ケージ



マウスへの外部照射条件は、内部被ばく実験で推定された線量率 2.74 mGy/日になるように ^{137}Cs ガンマ線源から 2,359 mm の距離にマウスケージを設置して、4 週間の総線量 76.72 mGy を照射した。その後、2,659 mm (1 日後~5 日後)、3,500 mm (5 日後~10 日後)、4,000 mm (10 日後~13 日後) と、順次マウスケージを線源から遠ざけて照射を続けた。これは、 ^{137}Cs 水投与終了後から 2 週間の純水給水期間における体内 ^{137}Cs 量の減衰中の内部被ばく分を照射するために行った (図 II-7)。

図II-7 ^{137}Cs 体内残存率 (%) をもとにした減衰照射プラン照射線量 (枠内)

線源からの距離 (mm)、 ^{137}Cs 水摂取停止後の経時的マウス体内 ^{137}Cs の減衰 (青実線)



照射終了後にマウスを安楽死させ、内部被ばく実験時と同様に試料採取を行い、凍結、ホルマリン固定等の処理を行った。すべての試料を採取した後、まとめて、体細胞突然変異解析、免疫能解析、遺伝子発現量解析を行った。

II-5. 体細胞突然変異解析

前年度とII-2 で得られた *Msh2* 遺伝子改変マウスと野生型マウスへの 4 週間の ^{137}Cs 投与（中島）による低線量内部被ばく群、ならびに消化管発がんを発生させる用量の KBrO_3 曝露群での体細胞突然変異の検出を試みて、同等の体細胞突然変異率を示す線量と用量を調べた。（大野）。（詳細については、研究分担者大野による報告書に記載）

II-6. 免疫能解析

前年度ならびにII-2 で採取された血漿サンプルを用いて、血中サイトカインを指標とした 23 項目の免疫能（IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-12-2, IL-13, IL-17, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , KC, MCP-1, MIP-1 α , MCP-1 β , RANTES, TNF- α ）の変化を Bio-Plex Pro マウス サイトカイン GI 23-Plex（バイオラッド）にて測定し、放射線の内部被ばくもしくは化学発がん物質曝露後の免疫反応の差異について検討を行った（宇野・中島）。

II-7. 遺伝子発現量解析

Msh2 改変マウスとそれぞれの対照群マウスの消化管（小腸）より mRNA を抽出し、発現遺伝子の消長の解析を試みた（中島）。

II-8. 微細局所レベルの線量評価方法の確立

本課題における ^{137}Cs 水や化学発がん物質（ KBrO_3 ）による影響の用量依存性、放射線と化学物質の量的相関性を評価するためには、微細な局所レベルの線量や用量の評価方法確立が必要である。特に、経口摂取による ^{137}Cs 水や KBrO_3 が直接作用する消化管（小腸）での線量、用量の正確な評価を可能にするために、DNA 損傷比較実験により、未分化細胞に対する過酸化物質と放射線の損傷の量的相関関係解析（石原）、腸管循環セシウム量の測定により経口投与セシウムの消化管移動の経時変化を調べた（石原）（詳細については、研究分担者石原による報告書に記載）。

（倫理面への配慮）

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。

本実験の動物実験に関して、大阪大学においては、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いる（動物実験計画書：福島原発事故シミュレーションとしての多世代微量放射線内部被ばくによるマウス子孫での遺伝的、生理的影響の検討、承認番号：第 動医 02-005-000 号、有効期限：2025/03/31）（遺伝子組換え実験（動物使用実験）、承認番号：（遺）04165、有効期限 2022/3/31）。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ている（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害予防規定を遵守して行った。

九州大学における遺伝子組換え実験に関しては、「ゲノム安定性維持に関する分子制御機構の生態における機能解析」「DNA 傷害の防止並びに修復に関する分子機構の解明」（承認番号：1-57、有効期限：2024/08/31）で、また動物実験計画に関しては、「DNA 修復機構の破綻による突然変異と発がんの分子遺伝学的研究（A30-147-1） 有効期限：2020/0331）で機関の承認を得ている（2年毎の更新なので期限前に必要な手続きを行う予定である）」で機関の承認を得た。令和 2 年 4 月より新たに 「DNA 修復機構の破綻による突然変異と発がんの分子遺伝学的研究」が承認番号：A20-089-0（有効期限：令和 4 年 3 月 31 日）で承認されている。研究の遂行にあたっては学内規則を遵守すると共に、動物（マウス）については、規定に従った安楽死措置を施す等、動物愛護に配慮して適切に実験を行った。

本研究における動物実験は放射線医学総合研究所の計画承認[受付番号 15-1009-3 および 18-1010 実施期間 2018/3/16～2022/3/31 迄]を受け、実験動物委員会および技術安全部生物研究推進課による指導のもとに行った。遺伝子組換え動物実験として、*Msh2* 遺伝子欠損マウスを令和 2 年度から使用する予定であるが、令和 2 年度に施設の廃止がある予定であり、令和 3 年度から新規代替施設が使用可能になり次第再開手続きを行い、実験開始前に承認を得た。また本研究における外部被ばく・内部被ばく実験に関連する施設等は計画承認を受け[放射線発生装置[承認番号：X-実動-(31-7, 1-6, 2-6)・X-(31-9, 1-8, 2-8)・照-標-(31-1, 1-1, 2-1)・照-C1-(31-1, 1-1, 2-1)・照-低連(31-2, 1-2, 2-2)・照-低- γ (31-4, 1-4, 2-3)、ラジオアイソトープ[承認番号：非-被-(31-1, 1-1, 2-1)・非-E-(31-6, 1-5, 2-5)]、核燃料物質[承認番号：非核-被-(31-5-6, 31-20-21, 2-6-7)]はいずれも半年毎に更新し、技術安全部放射線安全課による確認と指導のもとに実施した。研究実施期間内に、核燃およびラジオアイソトープ使用動物施設の廃止および新設などがあったが、年度ごとに適切に使用許可を得た。本計画における化学物質を使用する実験室は、放射線医学総合研究所技術安全部保安管理課による確認のもと、承認を受けて実施した。

III. 研究結果

III-1. 内部被ばく実験

4 週齢もしくは 8 週齢の *Msh2* 遺伝子改変マウスならびに野生型マウスへの 4 週間の ^{137}Cs 、 KBrO_3 を投与したマウス匹数を表 III-1 に示す。

この実験は、消化管（小腸）における体細胞突然変異率が ^{137}Cs 投与群と KBrO_3 投与群で同じになる線量、用量を統計学的に耐えうるように定量し、ならびに低線量放射線と化学物質の免疫能への影響解析、遺伝子発現量解析を行うための実験である。

表III-1 4週間の内部被ばく、KBrO₃曝露実験マウス匹数

4週間 暴露実験 ¹³⁷ Cs KBrO ₃	Msh2 遺伝子	性別	総匹数	¹³⁷ Cs 投与群	対照群	KBrO ₃ 投与群
4週齢マウス群	-/-	♂	7	0	1	6
	-/-	♀	11	3	4	4
	+/+	♂	11	3	3	5
	+/+	♀	7	0	3	4
8週齢マウス群	-/-	♂	5	2	0	3
	-/-	♀	5	0	2	3
	+/+	♂	6	1	3	2
	+/+	♀	7	3	2	2

表III-1 において、野生型および *Msh2* 遺伝子欠損マウスのオスに 4 週間の ¹³⁷Cs の投与を行い、その後 2 週間の純水を飲ませる期間中において野生型メスと交配し複数の仔を得たので、全ての出生仔の個体、親の尾、心臓などの組織を凍結保存した。今後、*de novo* 生殖細胞変異を調べるためのエクソーム解析を行う予定である。

表III-2 に示すのは、4 週齢の *Msh2* 遺伝子改変マウスならびに野生型マウスへの 16 週間の ¹³⁷Cs を投与したマウス匹数の結果である。この実験は、KBrO₃ の体細胞突然変異率と同じ突然変異率を起こす ¹³⁷Cs の内部被ばく線量による *Msh2* 遺伝子改変マウスの消化管発がん率を KBrO₃ 群と比較するための実験である。

表III-2 16週間の内部被ばく実験マウス匹数

16週間 内部被ばく実験	Msh2 遺伝子	性別	¹³⁷ Cs 投与群
¹³⁷ Cs水 (2.5kBq/ml)	-/-	♂	6
	-/-	♀	7
	+/+	♂	2
	+/+	♀	6

III-2. 内部被ばく線量の推定

表III-1 で ¹³⁷Cs 水 (2500Bq/ml) を飲み続けて ¹³⁷Cs 量がマウス体内で平衡状態になった時の ¹³⁷Cs 臓器濃度 (Bq/g) をもとに、PHITS コードを用いて、内部被ばく線量率を求めた結果、マウス個体の中心部分に相当する肝臓での被ばく線量率は 2.74 mGy/日、そして 4 週間のマウス平均積算線量は 76.72 mGy、16 週間の平均積算線量は 306.88 mGy と推定された。この線量、線量率をもとに、外部被ばく実験 (¹³⁷Cs_γ 線照射実験) の条件を設定した。

III-3. 外部被ばく実験

表III-3 に示すのは、4 週齢の *Msh2* 遺伝子改変マウスならびに野生型マウスへの ¹³⁷Cs_γ 線照射 (線量率 2.74mGy/日、総線量 76.72mGy) した匹数である。この実験は、表III-1 の内部被ばく実

験で PHITS コードにより推定された同じ線量率、総線量になるように ^{137}Cs 線源の γ 線を外部から緩照射を行った、体細胞突然変異率を指標にして内部被ばく線量と外部被ばく線量の同等性を評価するための外部照射実験である。

なお、対照群については、表III-1 の対照群のサンプルを表III-3 の対照群のサンプルと同様に用いた。

表III-3 外部被ばく実験マウスの匹数

4週間 外部被ばく実験	Msh2			^{137}Cs 投与群	対照群
	遺伝子	性別	総匹数		
^{137}Cs γ 線 (2.74mGy/day) 総線量 76.72mGy	-/-	♂	3	3	0
	-/-	♀	4	4	0
	+/+	♂	6	5	1
	+/+	♀	7	5	2

III-4. 体細胞突然変異解析

今年度は、各群で統計処理（Wilcoxon 検定）を行えるように解析検体数を増やした。今年度のデータをまとめた消化管（小腸）における体細胞突然変異頻度解析結果を図III-1 に示す。

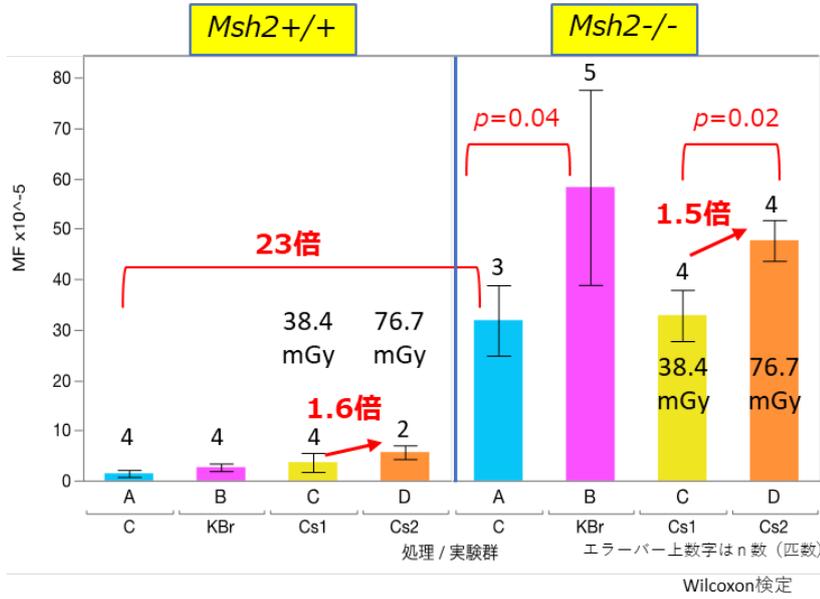
Msh2 遺伝子欠損マウス (*Msh2* -/-) は通常飼育時でも野生型マウス (*Msh2* +/+) の 23 倍高い自然突然変異頻度を示した (A:水色棒グラフ)。

そして、*Msh2* -/-マウス (右図) での KBrO_3 投与 (B:ピンク色棒グラフ) による突然変異頻度は非投与群の *Msh2* -/-マウス (A:水色棒グラフ) に比べて約 2 倍の有意な上昇 ($p=0.04$) が認められた。また、低線量 ^{137}Cs 投与群 (総線量 38.4mGy) (C:黄色棒グラフ) の突然変異頻度は非投与群(A)と差がないが、高線量 ^{137}Cs 投与群 (総線量 76.7mGy) (D:橙色棒グラフ) では、低線量(C)群に比較して約 1.5 倍の有意な上昇が認められた ($p=0.02$)。野生型 *Msh2* +/+マウス (左図の C、D グラフ) でも同様に高線量 ^{137}Cs 投与群での変異率上昇が認められているが、ミスマッチ修復機構が正常に働く野生型マウスでは変異率が非常に低く抑えられて、統計学的有意性を認めることができないことより *Msh2* -/-マウスを使用することで ^{137}Cs の内部被ばくにおいて、線量依存的な突然変異頻度の変化を効率的かつ定量的に検出することが可能であることが示された (図III-1)。

表III-4 に図III-1 で検出された突然変異のスペクトルごとによる突然変異頻度($\times 10^{-5}$)を示す。

Msh2 -/- マウスでの突然変異の特徴は 1~2 塩基の挿入や欠失が変異の大半を占め、特に単一塩基の連続配列の領域で生じていた (表中ピンク色帯)。 *Msh2* +/+マウスでも ^{137}Cs 投与時に欠失の頻度が上昇しているが、これは単一塩基の連続配列の領域ではなかった (表中緑色帯)。このことから ^{137}Cs 内部被ばくにより、*Msh2* -/- マウスでは、挿入や欠失変異の原因となる DNA 損傷が多く認められたが、野生型細胞ではミスマッチ修復因子が働き突然変異率が低く抑えられていると考えられた (詳細については、研究分担者大野による報告書に記載)。

図III-1 突然変異頻度の比較



表III-4 突然変異スペクトルごとによる突然変異頻度(x10⁻⁵)

	Msh2 +/+				Msh2 -/-				
	A	B	C	D	A	B	C	D	
	cont.	0.15% KBrO ₃	¹³⁷ Cs-1	¹³⁷ Cs-2	cont.	0.15% KBrO ₃	¹³⁷ Cs-1	¹³⁷ Cs-2	
Base Substitutions	G:C→A:T	0.23	0.56	0.23	3.03	2.41	1.19	3.87	
	A:T→G:C		0.16		2.43	0.45	1.48	1.19	
	G:C→T:A	0.08	0.24	0.23		0.22	0.19	0.30	
	G:C→C:G					0.22		0.30	
	A:T→T:A	0.08		0.23	0.63	0.11		0.30	
	A:T→C:G				0.21	0.67		0.46	
Frameshift	1bp deletion	0.39	0.88	0.90	6.47	0.56	1.30	1.79	
	1bp deletion (A-run)			0.45		21.07	46.76	23.27	
	A塩基が続く配列での1塩基対欠失								
	1bp insertion		0.08			0.11		0.30	
	1bp insertion (A-run)					3.59	4.45	2.39	
	A塩基が続く配列での1塩基対挿入								
>2bps indel	0.63	0.72	1.58	2.52	1.79	1.48	1.79		
2塩基対以上の挿入・欠失									
Total	1.41	2.65	3.61	5.66	31.83	58.27	32.82	47.72	

III-5. 免疫能解析

表III-3 に血漿中サイトカイン（23項目）を測定した各群のマウス匹数と図III-2のグラフ中のコラム番号を示す。種々の血漿中サイトカイン量を測定した中で、放射線被ばくと化学発がん物質曝露による発がん率が相関しない原因にかかわる可能性の高いサイトカインとして抗腫瘍にかかわる Th1 サイトカイン（IL-2、IL-12、IFN-γ、TNF-α）と炎症にかかわる Th2 サイトカイン（IL-4、IL-5、IL-13）に焦点を当ててまとめたグラフが図III-2である。

表III-5 サイトカイン測定マウス匹数

カラムNO.	1	2	3
実験群	¹³⁷ Cs群	対照群	KBrO ₃ 群
4週齢	6	11	19
8週齢	6	7	10

図III-2 4週間の¹³⁷CsもしくはKBrO₃投与におけるTh1サイトカインとTh2サイトカインの血漿中量の比較



1 : ¹³⁷Cs 2.5kBq/ml 水投与群
 2 : Control
 3 : KBrO₃(酸化剤) 0.15%水投与群

図III-2 左側はマウスの4週齢から、右側は8週齢から4週間の¹³⁷CsもしくはKBrO₃の投与を行った結果である。これらは、週齢のちがいで曝露による影響に異なりが発生しないかを調べるために行ったものである。

Dunnett の検定を使い対照群（カラム番号2）との比較を行ったところ、¹³⁷Cs 群（カラム番号1）で KBrO₃ 群（カラム番号3）では認められない Th1 サイトカインの有意な増加（*）が認められた。一方、週齢のちがいによるサイトカイン増減の傾向には、両群で大きな差はなかった。

抗腫瘍作用（Th1）と炎症作用（Th2）のサイトカインバランスがどちら側に誘導されているかを確認するために、Th1 の主たるサイトカインとして IFN- γ 、Th2 の主たるサイトカインとして、IL-4、IL-5 を選んだ。そして、それぞれのサイトカインで、¹³⁷Cs 群もしくは KBrO₃ 群の対照群に対する増加比（増加倍率）を求めて、それぞれの Th1/Th2 の比を求めた。この比が1より大きいとサイトカインバランスは、Th1 側（抗腫瘍作用）に傾いており、1より小さいと Th2 側（炎症作用）に傾いていることを示す。その結果を表III-6（4週齢）、表III-7（8週齢）に示す。

抗腫瘍作用(Th1)と炎症作用(Th2)のバランス

表III-6

	Th1 / Th2	Th1 / Th2
4週齢	IFN- γ / IL-4	IFN- γ / IL-5
¹³⁷ Cs	2.0	5.5
KBrO ₃	0.7	1.3

表III-7

	Th1 / Th2	Th1 / Th2
8週齢	IFN- γ / IL-4	IFN- γ / IL-5
¹³⁷ Cs	1.8	5.8
KBrO ₃	1.2	1.2

この結果から、4週齢、8週齢のいずれでも ¹³⁷Cs 群では Th1 > Th2 を示しており、炎症作用よりも顕著な抗腫瘍作用へのサイトカインバランスの傾きが認められた。また、KBrO₃ 群では、サイトカインバランスに大きな偏りは認められていない。

さらに、¹³⁷Cs 群では、TNF- α （腫瘍壊死因子- α ）の有意な増加も認められた。

以上のことから、¹³⁷Cs 群では抗腫瘍免疫が惹起状態であると考えられた。

III-6. 遺伝子発現量解析

放射線被ばくと化学発がん物質曝露による発がん率が相関しない原因を調べるために、また、図III-2 で認められた抗腫瘍作用発現の遺伝子レベルでの動向も同時に調べる予定で、表III-1 の実験で得られたマウス消化管（小腸）の凍結試料を用いて遺伝子発現量の測定を行った。

現在、*Msh2* 遺伝子欠損マウス (*Msh2*^{-/-}) の対照（非投与）群、¹³⁷Cs 群、KBrO₃ 群、野生型マウス (*Msh2*^{+/+}) の対照（非投与）群、¹³⁷Cs 群、KBrO₃ 群、それぞれ3匹（合計18匹）から得られた遺伝子発現量測定データの解析中である。

III-7. 微細局所レベルの線量評価方法の確立

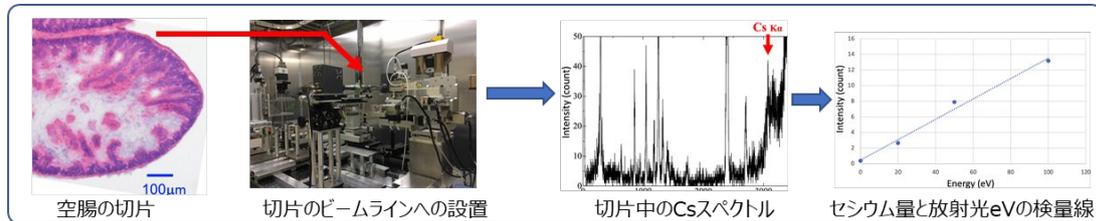
前年度、ライン化血液系細胞を利用して、動物実験に適用可能な定量技術を決定・確立した方法を応用して、マウスから分離した最終分化段階の造血細胞を指標細胞にできるようになった。

この細胞を利用して、DNA 損傷応答性の long non-coding RNAs (Q-PCR 極微量精密定量)、DNA 二本鎖切断量(γ H2ax)を測定して、放射線被ばくと KBrO₃ 曝露の量的影響を比較中である。

また、マウス消化管におけるセシウムの動態解析を精細化するべく、消化管部位ごとのセシウ

ム分布(mm レベル)、小腸組織内セシウムの Spring8 高解像度(mm-sq 内の定量)分析条件の確立を行った（図III-3）。（詳細については、研究分担者石原による報告書に記載）。

図III-3 小腸組織内セシウムの Spring8 高解像度分析



IV. 考察

本研究は、試験管内で行う *in vitro* 実験とは異なり、動物個体を用いた *in vivo* の実験研究であるために、動物の交配、出産、離乳、成長の時間も研究期間内に存在し、動物の営みに委ねられているので、目的の試料採取までに時間が多くかかっている。これまでは、目的達成のためのモデル動物を選定、作製し、必要匹数を確保するために、元マウスを交配し、その仔マウスを得て、そして、必要とする遺伝子を持った実験用マウスを得るために、その仔マウスの遺伝子型を解析した後に、目的にかなうマウス 10 ペア以上の仔マウスを親マウスとして交配し、実験目的を達成するために必要な条件を備えたマウスを得た。その後、実験計画にある、 ^{137}Cs 放射線や化学発がん物質としての KBrO_3 への曝露実験を行った。本年度までは、実験条件を整えて試料を採取することが主となったが、環境省「放射線の健康影響に係る研究調査事業」の理解あるサポートによりほぼ予定通り試料の採取が終了できた。最終年度は、この試料の解析を行い、総合的な結果を導き出せると考えている。

また、これまでに試料採取をしながら、並行して進められた実験解析から一部の結果が本年度までにも得られた。主な結果に対する考察を以下に示す。

IV-1. 化学物質と放射線による突然変異率と発がん率の比較検討

図III-1 に示した、体細胞突然変異解析では、統計に耐えうるマウスの匹数を用いて ^{137}Cs 放射線の内部被ばくと KBrO_3 の化学発がん物質で同じ突然変異率を示す条件（線量、曝露量）が決定できた（図III-1 右図、橙色棒グラフ (D) が ^{137}Cs 群、ピンク色棒グラフ (B) が KBrO_3 群）。

両群ともこの条件で 16 週間の曝露をすることで、同じ突然変異率を起こす条件での消化管がん（小腸）の発生率を比較することが可能となった。

なお、図III-1 結果は、自然突然変異率が高く、放射線や化学物質に対して高感受性を示す *Msh2* μ -マウスでも 1 リットルあたり 2,500,000 Bq の ^{137}Cs 水を 2 週間相当飲み続けた内部被ばく線量 (38.4mGy) では有意な突然変異を検出できなかった（図III-1 右図、黄色棒グラフ (C)）が、同様に 4 週間飲み続けた内部被ばく線量 (76.7mGy) では有意に体細胞突然変異を検出できたこと（図III-1 右図、橙色棒グラフ (D)）を示している。この結果は、ミスマッチ修復機構が正常に働く野生型マウス（正常な遺伝子修復系統）では、 ^{137}Cs の内部被ばくによる突然変異への影響が、非常

に低く抑えられるために変異の検出が困難であったことに対して、このような線量領域においても高感受性マウスでは、有意に検出できることを示し、また、その放射線高感受性マウスでも検出できない線量領域があることも示していると考えられる。

現在、同条件で16週間の投与を行った発がん実験の結果も出始めており、 KBrO_3 群ではマウス当たり20個を超える消化管がんフォーカス（病巣）を発症したが、同じ突然変異率を起こす ^{137}Cs の内部被ばく線量の場合には、目視において、顕著に消化管がんフォーカス（病巣）の発症率が低い状況である（現在、統計学的処理に耐えられるように匹数を増やすと同時に病理学的診断による解析を進めている）。このことから、放射線による発がんへの寄与率は、同等の突然変異率を示す化学発がん物質より低いことが示唆されている。

さらに、これまでの研究において1kg当たり100,000Bqの ^{137}Cs 水を20世代以上飲み続けた野生型マウスの全塩基配列解析においてもほとんど影響が認められていないことから、ヒトにおける水の規制値である1リットル当たり10Bq、食品としての1kg当たり100Bqは、高感受性マウスの検出できない線量よりさらに低い線量であるために、ヒトに対して、特にDNA修復系の障害がない健康人では、放射線影響を憂慮しなくてもよい線量領域であると考えられる。

IV-2. 免疫能解析

予備実験によって同じ突然変異率を示す低線量放射線、もしくは、化学物質への曝露でも、低線量放射線では化学物質に比べてはるかに低い発がん率を示すことが示唆された。この突然変異と発がんの非相関性が生じるメカニズムとして、曝露後の炎症の差が原因ではないかと考えられた。それは、高線量放射線では、強い作用において曝露部位に細胞死を起し炎症を生じ、炎症の修復過程で発がん作用が促進されていることが判っているが、低線量、低線量率放射線の場合には、総線量が同じでも細胞死が起らず炎症作用は少なくなることが分かっており、化学物質に比べて突然変異率が同じでも炎症作用が小さくなることで突然変異と発がんが相関しなくなるのではないかと予想されたからである。そこで、本実験では、同じ突然変異率を示す ^{137}Cs による内部被ばく後、もしくは、 KBrO_3 曝露後の血漿サイトカインの変化量を調べることで、炎症サイトカイン量のちがいを比較した。

その結果、予想に反してTh2サイトカイン（炎症作用）の有意な差は両群間では認められず、 ^{137}Cs 群においてTh1サイトカイン（抗腫瘍作用）の有意な増加が認められた。 ^{137}Cs 群のマウス体内では、Th1とTh2バランスが、Th1側に傾き抗腫瘍性優位の環境となっていることが分かった。これだけの結果から、突然変異と発がんの非相関性を説明することは早計であるが、この現象は、近年、免疫関与の可能性として話題となっているアブスコパル効果（放射線治療において、腫瘍病巣部への直接照射とは別の非照射部位にある転移腫瘍の同時縮小現象で古くから報告があるが現在でも原因不明）に関係している可能性が考えられた。

そこで、同状況における両群間の特定遺伝子の発現や遺伝子発現量の差を調べるための解析を開始している。

V. 結論

- 1) *Msh2* 遺伝子欠損マウス (*Msh2* $-/-$) を用いることで野生型マウスでは検出不可能な低線量放射線影響の定量的高感度検出を可能にする系を確立した。
- 2) *Msh2* $-/-$ マウスにおいて野生型マウスでは検出限界以下の曝露量で同じ体細胞突然変異率 (53×10^{-5}) を示す ^{137}Cs 低線量内部被ばく線量と化学発がん物質 KBrO_3 の曝露量が定量できた。
 ^{137}Cs : 1 リットルあたり 2,500,000 Bq の水の飲水による体内平衡状態量で 4 週間投与 :
線量率 2.74 mGy/日、総線量 76.7mGy
 KBrO_3 : 0.15%濃度水溶液を飲料水として 4 週間投与
- 3) 発がん率を調べるために 2) で確定した条件で 16 週間の、マウスへの曝露実験を行った。現在、腫瘍の発生頻度、病理学的解析を行っている。
- 4) 次年度に行う「発がん率解析」、「内部被ばくと外部被ばくの同等性評価」、「DNA 塩基変異スペクトル解析」、「遺伝子発現量解析」、「腸管組織における ^{137}Cs のマイクロ線量評価」のための試料の採取を予定通り終了できた。
- 5) 現在、採択されている ^{137}Cs の食品中基準値（食品：100q/kg、水：10Bq/kg）は、本研究の高感度 ^{137}Cs 低線量内部被ばくによる *in vivo* 体細胞突然変異検出系の検出限界値より、はるかに低いところに設定されていることが示された。

VI. 次年度以降の計画

これまでの進捗状況と令和 3 年度の研究計画

表VI-1 に示す令和 3 年度（2021 年度）達成目標は、酸化ストレス型発がん性化学物質と低線量放射線のゲノム損傷の質・量的相関性の有無、発がん性の評価である。

令和元年に開始した高感受性マウス系統での ^{137}Cs 水給水による継代飼育(阪大) で得られた子孫マウスを用いて DNA 塩基配列解析にて変異スペクトラムを調べ(九大)、既に結果が出ている修復系が正常である野生型の A/J や B6 マウス系統と塩基変異にどのような違いがあるかを比較検討する（放射線影響の爪痕を見つける試み）。

また、令和 2 年度に行った高感受性マウス系統への内部被ばく線量相当の外部照射した(阪大) マウス体細胞突然変異解析を行い(九大)、外部被ばくと内部被ばくにおける実効線量の整合性についてマウス *in vivo* 体細胞突然変異率を指標にして検討する（阪大）。

並行して腸管循環セシウムの腸管微細組織内量を定量するためのセミマイクロ解析を行う（放医研）。

総括として低線量放射線被ばくでは、発がん率と突然変異率が相関しないメカニズムを免疫能、放射線または化学物質による誘導発現遺伝子の差異を指標にして検討する。

また、DNA 修復欠損の *Msh2* 遺伝子改変マウスを放射線高感受性のヒトと想定して、低線量内部被ばく影響が自然状態（DNA 修復能がある野生型）の群では検出限界以下でも高感受性群では検出できる限界点を指標にして線量評価を試み、現在の許容線量の妥当性を確認する。そして、

一般社会での合意形成の一助とする。

表VI-1

進捗状況	平成31年度 (2019年度)				令和2年度 (2020年度)				令和3年度 (2021年度)			
	第1四 半期	第2四 半期	第3四 半期	第4四 半期	第1四 半期	第2四 半期	第3四 半期	第4四 半期	第1四 半期	第2四 半期	第3四 半期	第4四 半期
<p>中島裕夫 (大阪大学)</p> <p>セシウム137放射線に被ばくしたマウスにおける特異的発現タンパクと免疫能の解析</p>	Msh2遺伝子改変マウスに4週間のセシウム137投与、サンプルを九大へ輸送				16週間のセシウム137投与 4週間のセシウム137ガンマ線外部照射				内部被ばく条件 (Bq) から、内部被ばく線量 (Gy) への換算を試みて突然変異と発がんの線量評価			
	Msh2遺伝子ホモ欠損マウスでのセシウム137水 (100Bq/ml) 飲水による継世代飼育実験を開始				曝露後の遺伝子発現量と免疫能の定量				低線量影響評価と治療法への応用開拓			
									九大へサンプル送付 まとめ、総括			
<p>大野みずき (九州大学)</p> <p>セシウム137放射線に被ばくしたMsh2遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの突然変異の解析</p>	Msh2遺伝子改変マウス系統を準備、量産し、阪大へ輸送				阪大より輸送されたサンプルの体細胞突然変異の検出				突然変異のスペクトル解析			
					阪大より輸送されたサンプルの体細胞突然変異解析				腫瘍組織より抽出したゲノムDNAを用いて、次世代シーケンサーによる突然変異解析。 継世代突然変異の解析			
									まとめ			
<p>石原 弘 (放医研)</p> <p>未分化細胞に対する過酸化物質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</p>	株化細胞を使用して、種々の生体過酸化物質およびβエミッターについて、複数のゲノム損傷の質的な特徴を明らかにする				代表的ゲノム損傷指標の同時分析により質・量的相関を調べる。				空腸粘膜上皮組織におけるゲノム損傷指標の質・量的相関、発がん性を調べる。			
									腸管から腸管膜にかけての吸収線量を推定する。 まとめ			

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) なし

イ) 学会発表等

- 1) Nakajima H., Uno K., Yamaguchi Y. *et al.* Low dose-rate internal Cesium-137 radiation exposure may contribute little to carcinogenesis and transgenerational effects. The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (ACEK) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS), Nov 18-20, 2019, Tokyo. アジア環境変異原学会第6回大会/日本環境変異原学会第48回大会合同大会（東京）2019.11.18～11.20
- 2) Nakajima H, Uno K, Yamaguchi Y, Todo T, Shinohara A, Carcinogenicity and genome variation in descendant mice after the every generational low dose-rate internal Cesium-137 radiation exposure. 16th International Congress of Radiation Research (ICRR2019), (Manchester) , 2019.8.25～8.29.
- 3) Nakajima H. Carcinogenicity and genome variation in descendant mice after the every generational low dose-rate internal 137Cs radiation exposure. Oral presentation. The 9th Annual Meeting of the

International Society of Radiation Neurobiology (Nagashima), 2019.2.15~2.16 (招待講演)

- 4) Ohno M., Sakumi K., Takano N., *et al.* Toward understanding de novo germline mutations in mammals, 日本放射線影響学会第 62 回大会, 2019.11. 招待講演
- 5) Ohno M., Sakumi K., Takano N., *et al.* Detection of de novo germline mutations in DNA repair-deficient mice lines, The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens(ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society(JEMS), Tokyo. アジア環境変異原学会第 6 回大会/日本環境変異原学会第 48 回大会合同大会（東京）2019.11.18~11.20.

ウ) 書籍・総説

- 1) Nakajima H. Effects of Radioactive Cesium-containing Water on Mice. Low-Dose-Rate Radiation Effects on Animals and Ecosystem -Long-Term Study on the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident (Editors: Manabu Fukumoto), Springer Nature, 2019 ; 221-235, Print book ISBN: 978-981-13-8217-8 / eBook ISBN: 978-981-13-8218-5 (2020 : 電子版)
<https://doi.org/10.1007/978-981-13-8218-5>

エ) 受賞

- 1) なし

オ) 特許

- 1) なし

カ) 環境行政への活用・貢献実績

- 1) なし

VIII. 引用文献

- 1) ICRP (2005) Annals of the ICRP. ICRP Publication 99
- 2) 中島裕夫、大野みずき、石原弘、環境省マウスを用いたセシウム 137 の慢性的低線量内部被ばくによる成体と子孫への影響の定量的実験検証（Quantitative assessment for the effects of chronic low-dose internal Cesium-137 radiation exposure on genomic, carcinogenic and hereditary effects in mice.）環境省 原子力災害影響調査等事業（放射線の健康影響に係る研究調査事業）放射線による健康影響の解明及び放射線以外の要因による健康リスクの低減を含めた総合的な健康リスクに関する研究報告書、2018
- 3) Piao J., Nakatsu Y., Ohno M., *et al.* Mismatch repair deficient mice show susceptibility to oxidative stress-induced intestinal carcinogenesis. *Int J Biol Sci* 2013; 10: 73-79, doi:10.7150/ijbs.5750.
- 4) Hall EJ, Giaccia AJ *Radiobiology for the radiologist*, 8th edn. Wolters Kluwer, USA, Philadelphia 2019; pp10. (9781496335418)

- 5) Nakajima H., Yamaguchi Y., Yoshimura T., *et al.* Fukushima simulation experiment: Assessing the effects of chronic low-dose internal ^{137}Cs radiation exposure on litter size, sex ratio, and biokinetics in mice. *J Radiat Res.*, 2015; 56: i29-i35, doi: 10.1093/irr/rrv079, Special Issue – Fukushima
- 6) Nakajima, H. Effects of Radioactive Cesium-containing Water on Mice. *Low-Dose-Rate Radiation Effects on Animals and Ecosystem -Long-Term Study on the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident* (Editors: Manabu Fukumoto), Springer Nature 2019; 221-235, Print book ISBN: 978-981-13-8217-8 / eBook ISBN: 978-981-13-8218-5

Elucidation of the mechanism of non-correlation between mutation and carcinogenesis by chronic low-dose internal exposure using experimental animals

Hiroo Nakajima ¹, Mizuki Ohno ², and Hiroshi Ishihara ³

Institute for Radiation Sciences, Osaka University. Associate Professor ¹

Department of Medical Biophysics and Radiation Biology, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University.

Assistant Professor ²

Natl. Inst. Radiological Sciences, Natl. Inst. Quantum and Radiological Science and Technology.

Professional worker ³

Key word: Low-dose radiation, Cesium-137, Internal exposure, Hereditary effects, Carcinogenesis, Fukushima nuclear power plant accident

Abstract

Radiation is considered to be a powerful factor in the induction of gene mutations and cancer. Furthermore, since the Linear Non-Threshold hypothesis has been adopted in the radiation protection of ICRP, it is considered that even a small amount of radiation could induce lethal carcinogenesis. However, our previous studies suggest that low-dose internal radiation exposure does not correlate mutations with carcinogenesis, unlike the action of chemicals.

In this study, we elucidate the mechanism of the phenomenon in which this mutation and carcinogenesis are not correlated, and present as experimental results how much internal exposure does not need to worry about carcinogenesis. In addition, we will attempt a comprehensive evaluation of the research results and the results shown in many epidemiological studies.

This year, we increased the number of experimental mice (*Msh2* ^{-/-} rpsL-Tg +) and (*Msh2* ^{+/+} rpsL-Tg +) for detecting mutation rate and measuring immunocompetence. Then, the exposure experiments to cesium-137 and KBrO₃ were performed, and plasma and various organs were collected from each mice.

As a result, the internal exposure dose of cesium-137 and the exposure concentration of KBrO₃, which show the same mutation rate in the *Msh2* ^(-/-) mice, were confirmed. In addition, in the cesium-137 administration group under this condition, it was found that the amount of Th1 cytokine (antitumor effect) in plasma was predominant.

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

セシウム 137 放射線に被ばくした *Msh2* 遺伝子改変マウスを用いた

個体レベルの突然変異の解析

大野みずき (九州大学・医学研究院・基礎放射線医学分野・助教)

中津可道 (九州大学・医学研究院・基礎放射線医学分野・准教授)

研究要旨

放射線被ばくによる生物影響を考える際には生体内での様々な反応機構を踏まえ実験的データに基づき科学的に議論する必要がある。特に遺伝情報を担う DNA への影響を定量的に解析することは重要で、被ばく個体の健康だけでなくその子の健康をも守ることに繋がる重要な基礎データとなる。しかし、哺乳動物を用いた内部被ばくの実験的解析例は少なく基礎データも十分ではない。

そこで我々はセシウム 137 の経口摂取による内部被ばくの生体影響を効率的に評価するために、*rpsL* レポーター遺伝子をゲノムに導入した「高感度体細胞突然変異検出用マウス」を用いた解析系の検討を行なった。低 LET 放射線の生物作用では、細胞内成分と反応して発生する活性酸素種による間接作用の寄与が大きいことが予想されるため、本研究では酸化 DNA 損傷の修復にも関与する DNA ミスマッチ修復の機構を欠損させた遺伝子改変マウスを解析に用いた。

rpsL レポーター遺伝子を持つ野生型並びに *Msh2* 遺伝子欠損マウスに、生後 4 週齢から 8 週齢までセシウム 137 の飲水投与を 4 週間行い、その後 2 週間の通常飼育の後、臓器を摘出し保存した。内部被ばくの影響を直接受ける小腸組織を対象に変異解析を行った。当該年度はさらにマウスの匹数を増やして変異データの収集と変異スペクトルの解析を行った。野生型マウスでは酸化剤またはセシウム 137 投与による誘発突然変異は非投与コントロール群に比較してわずかに増加したものの有意差は認められなかったが、一方で *Msh2* 遺伝子欠損マウスでは高線量被ばくグループで突然変異頻度の有意な上昇が見られた。本実験系によりセシウム 137 の経口摂取により生体内で誘発された突然変異を高効率で定量的・定性的に検出することが可能であり、さらに実験に用いるマウスの個体数を、野生型マウスを用いる場合と比較して、大幅に減らすことが可能になると考えられた。ミスマッチ修復機構が正常に働く野生型マウスではセシウム 137 の内部被ばくによる誘発突然変異は非常に低く抑えられて

いることが示された。

研究協力者

中島裕美子 (九州大学アイソトープ総合センター・教授), 續輝久 (九州大学・名誉教授)

I. 研究目的

本研究はセシウム 137 の経口摂取による内部被ばくの生体影響を効率的に評価することが可能な実験系の検討を行うこと、また化学物質暴露後と放射線被ばく後の突然変異や生体反応の違いを明らかにすることを目的としている。

これまでに我々は、独自に樹立した DNA 修復系に関連する種々の遺伝子改変マウスを用いて、様々な環境ストレスによって生じる酸化 DNA 損傷が、がんを引き起こす原因になることを明らかにしてきた¹⁻⁶⁾。一般に「がん」は体細胞に生じた突然変異が原因で細胞増殖の制御機構が破綻し増殖を繰り返す状態であると考えられることから、体細胞突然変異頻度の上昇は発がん頻度の指標となる。我々はこれまでに大腸菌の *rpsL* 遺伝子を含むシャトルベクターをマウスゲノムに組み込むことで、マウス体内で起こった体細胞突然変異を効率的に検出する方法 (*rpsL* アッセイ) を確立しており^{3,8)}、定量的・定性的な解析が可能なが大きな利点である。

DNA ミスマッチ修復に関わる *Msh2/MSH2* 遺伝子はヒトの遺伝性非ポリポーシス大腸がんの原因遺伝子の一つで、この遺伝子のホモ欠損マウスは DNA ミスマッチ修復機構の不全により 6 ヶ月齢程度で胸腺リンパ腫や消化管がんを自然発症する。このマウスに酸化剤である臭素酸カリウム (KBrO_3) の 0.2% 水溶液を 16 週間与えると、小腸に十数個の腫瘍が発生する⁶⁾。一方 4 週間の投与期間ではまだ腫瘍は形成されていないが、すでに突然変異頻度が上昇していることを見出している (大野未発表、論文準備中)。酸化ストレスが DNA 損傷を誘発し、体細胞突然変異頻度を上昇させ、結果として発がん頻度の上昇につながるということが示唆されている。*Msh2* 遺伝子欠損マウスは通常飼育下でも野生型に比較して約 20 倍程度高い自然突然変異頻度を示すことから、野生型マウスでは検出感度以下の低線量・低線量率放射線被ばくによるゲノム変異が定量的に解析できるのではないかと期待された。実際に先行研究としてセシウム 137 水を 4 週間に渡り 2.5KBq/ml の自由飲水で投与 (初回投与時のみ 4KBq/g 体重を強制投与) した *Msh2* 遺伝子欠損マウスの小腸では、0.15% KBrO_3 (顕著に腫瘍が誘発される濃度) 投与時の変異頻度と同程度まで上昇していた。しかし予想に反して、等線量またはそれ以上の X 線を外部照射された *Msh2* 遺伝子欠損マウスの小腸では 16 週以降でも腫瘍の発生が認められなかった⁷⁾ (放医研 石原による実験より)。放射線被ばくと化学物質による酸化ストレス負荷では腫瘍発生に関して異なる経路をたどる可能性が示唆され、それらの分子メカニズムを明らかにする必要があると考えられた。

そこで本研究では、セシウム 137 の投与量による消化管の突然変異頻度の変化を検証し、より正確に解析するためにさらにマウス個体数を増やして突然変異解析実験を進める。また *Msh2* 遺伝子欠損マウスの放射線による腫瘍形成実験はこれまで外部照射でのみ行われたので、さらにセシウム 137 経口投与による発がんの解析を行う。中島 (大阪大学) は放射線被ばく後と化学物質暴露後に生じる発がん頻度の違いを明らかにするために、遺伝子発現解析を計画しており、そのため九州大学では通常飼育されたマウスおよび 0.15% KBrO_3 を投与した野生型および *Msh2* 遺

伝子欠損マウスの臓器サンプルを採取し保存、大阪大学に提供する。セシウム 137 の投与後のサンプルは大阪大学で採取する。

また、内部被ばくの継世代影響を解析する目的で、セシウム 137 を投与したオスの *Msh2* 遺伝子欠損マウスを野生型メスと交配し、得られた仔と親の DNA を用いて次世代シーケンサーによるゲノム解析を行い *de novo* 生殖細胞変異の検出を計画している。野生型マウスの世代あたりの突然変異率は非常に低いため、十分なデータ量を得るためには莫大な匹数を必要とするが、自然突然変異率が高い *Msh2* 遺伝子欠損マウスでは少ない匹数でセシウム 137 により誘発された生殖細胞変異が検出できる可能性があり、線量依存的な定量的結果が期待できる。

II. 研究方法

1. 研究の役割分担と年度の研究計画概要

本研究では、セシウム 137 の内部被ばくの生体影響についての解析を行うため、野生型マウスおよび *Msh2* 遺伝子欠損マウスを用いて、酸化剤である KBrO_3 投与群との比較を行いながら以下の項目の解析を行う。

解析ワークフローと役割分担を以下の図 II-1 に示す。目的の遺伝子マウスと交配計画の概要を図 II-2 に示す。

- ①体細胞突然変異解析 (*rpsL* アッセイ)：各実験群のマウスの正常小腸組織中の体細胞突然変異の頻度とスペクトルの解析を行う。(2019-2021 年度)
- ②腫瘍のゲノム解析：*Msh2* 遺伝子欠損マウスの KBrO_3 長期投与群で発生した小腸腫瘍と同一個体の正常組織を用いて次世代シーケンサーによるゲノム解析を行い、腫瘍特異的体細胞変異の検出を行う。(2019-2021 年度)
- ③遺伝子発現解析、生化学的解析：各実験群あたり 3 匹のマウスの正常小腸組織を用いてマイクロアレイまたは RNAseq 解析を行い遺伝子発現パターンの解析を行う。各実験群あたり複数匹のマウスの血漿を用いてサイトカインなどを含む生化学的解析を行う。(2019-2021 年度)
- ④生殖細胞変異解析：各実験群の雄マウスを野生型メスマウスと交配し生まれた仔の組織を用いて次世代シーケンサーによるゲノム解析を行い、親のゲノムとの比較により *de novo germline mutation* の検出を行う。(2020-2021 年度)

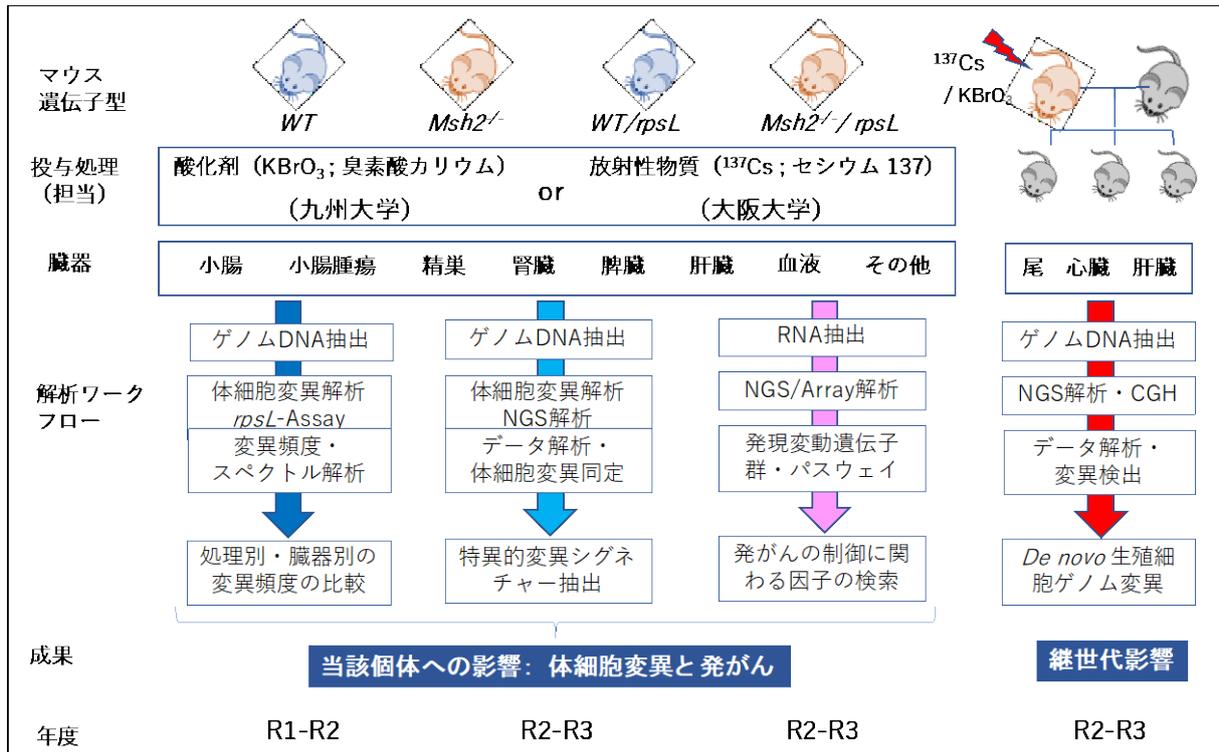


図 II-2 被ばく個体の生体影響と継世代影響の解析ワークフローと役割分担

2. 高感度変異検出用マウスの作出

九州大学の動物実験施設で既に樹立して系統維持している *Msh2* 遺伝子改変マウスと大腸菌の *rpsL* 遺伝子を含むシャトルベクターを遺伝子導入した変異解析用マウスを交配し、*rpsL* シャトルベクターを有し、*Msh2* 遺伝子欠損アレルをホモで持つ高感度変異検出用マウス (*Msh2*^{-/-}, *rpsL*-Tg⁺)、および、野生型マウス (*Msh2*^{+/+}, *rpsL*-Tg⁺) を交配により同時期に複数匹作出するための交配計画をたて目的のマウスの作出を行った。目的の遺伝子型マウスを大阪大学に輸送し、セシウム 137 投与や外部照射を行なった。

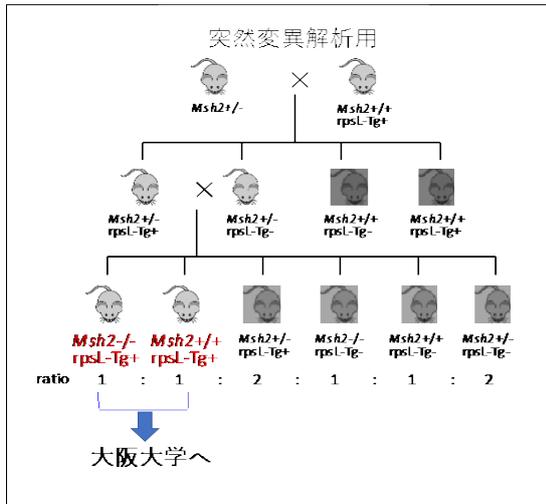


図 II-2 高感度変異検出用マウスの作出方法

3. セシウム 137 または KBrO_3 の投与および γ 線外部照射の短期照射プロトコールと臓器サンプリング

マウスは生後 3 週齢の時点で遺伝子型を決定し、生後 4 週齢で大阪大学に移送した。大阪大学では、RI 実験施設においてセシウム 137 の投与を行った。投与実験が終了した時点で全てのマウスを解剖し、臓器を摘出し凍結後、九州大学に返送した。九州大学では、同様の遺伝子型マウスを使用して、セシウム投与と同じタイムコースで対照実験としての KBrO_3 投与および非投与コントロール群として通常の水での飼育を行い、同様に臓器を摘出して保存した。投与プロトコールと実験群を以下の図 II-3 に示す。2020 年度は大阪大学にてセシウム 137 の飲水投与による内部被ばくとほぼ同じ線量になるように野生型および *Msh2* 遺伝子欠損マウスに γ 線の外部照射群を作成した (図 II-4, E 群)。また、図の投与プロトコールに加えて週齢の影響を確認するため、A, B, D 群と同様の方法で投与開始週齢を生後 8 週齢、投与終了 12 週齢、解剖 14 週齢にした実験群を準備した。

- A 群： コントロール（自由飲水、通常飼育）
- B 群： 0.15%臭素酸カリウム（酸化剤）投与群（自由飲水）
- C 群： 2.5KBq/ml セシウム 137 投与群（自由飲水）
- D 群： 初日に 4KBq/g 体重を強制飲水、2.5KBq/ml セシウム 137 投与群（自由飲水）、
（推定積算線量は C 群の約 2 倍）
- E 群： γ 線外部照射（（線量率 2.74mGy/日、総線量 76.72mGy, D 群とほぼ同程度）

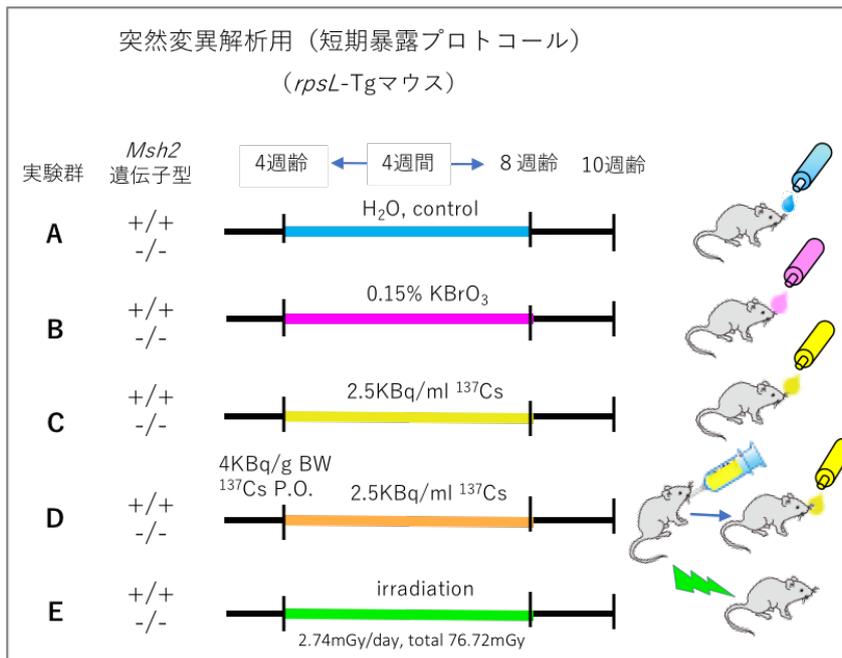


図 II-3 各実験群と突然変異解析用の投与プロトコール

4. 高感度体細胞変異検出用マウスを用いた突然変異解析

今回使用した野生型及び *Msh2* 遺伝子欠損マウスには、変異検出用シャトルベクター (大腸菌由来 *rpsL* 遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を含む) がゲノム中に組み込まれている。単一ベクターは約 3 kb でタンデムに約 100 コピー連結した状態で導入されている。この DNA 領域をマウスゲノム DNA から切り出して回収し、マウス体内で *rpsL* 遺伝子上に生じた変異を、大腸菌プレート上でストレプトマイシン耐性の表現型を指標にして検出する。カナマイシンとストレプトマイシンは抗生物質であり、それらに対する耐性遺伝子を獲得した大腸菌カナマイシン、ストレプトマイシン含有培地で増殖することが可能となる。本方法は変異頻度の算出だけでなく、塩基配列を解析することで変異部位での変化 (スペクトラム) を同定できる優れた実験系である。

凍結保存した臓器約 10mg からゲノム DNA を抽出し、制限酵素 Ban II で処理した後、3Kb 付近の DNA をさらに選択的に抽出し精製し、酵素処理により *rpsL* 遺伝子とカナマイシン耐性遺伝子を含むベクター領域の DNA を環状化する。精製し、濃度を調製した *rpsL* プラスミドベクターを用いて、大腸菌 DH10B6 (NEB) にエレクトロポレーションにより導入した。形質転換された大腸菌をカナマイシン含有 LB プレート、及びカナマイシンとストレプトマイシン含有 LB プレートに撒き 28°C で 40 時間培養した。大腸菌 DH10B6 はカナマイシン感受性、ストレプトマイシン耐性の性質を持つ。野生型 *rpsL* 遺伝子を含むプラスミドが導入されるとカナマイシン耐性、ストレプトマイシン感受性を示す。一方 *rpsL* 遺伝子の機能欠失型変異を持つプラスミドが導入されるとカナマイシン耐性、ストレプトマイシン耐性を示す。したがって、変異頻度についてカナマイシン/ストレプトマイシン耐性コロニー数をカナマイシン耐性コロニーで除した値として算出される。全てのカナマイシン/ストレプトマイシン耐性コロニーを新たにプレーティングし、単一コロニーを分離、特定領域を PCR で増幅し、ゲル電気泳動パターンの確認及びシーケンスま

で確認した上で、変異頻度の算出用データとして使用する。

5. 次世代シーケンスによる腫瘍のゲノム解析

腫瘍の解析には図 II-3 と同様の投与条件で、投与期間を 16 週間に延長し、その後小腸組織での解析を行う。腫瘍解析用長期暴露プロトコルを図 II-4 に示す。これまでに *Msh2* 遺伝子欠損マウスを用いて X 線の外部照射による解析を行っているので（放医研、石原）、2020～2021 年度は長期内部被ばくによる腫瘍形成の有無の解析用サンプルを作成する（阪大、中島）。

セシウム 137 または KBrO_3 の 16 週間の飲水投与により *Msh2* 遺伝子欠損マウスに発生した腫瘍の体細胞突然変異をゲノムワイドに検出するために、腫瘍組織および周辺の非腫瘍部に加え心臓、尾などを採取し、ゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーによるゲノム解析を行い腫瘍特異的に発生した体細胞変異の同定を行う。次世代シーケンス解析は受託で行う。解析ワークフローを図 II-5 に示す。

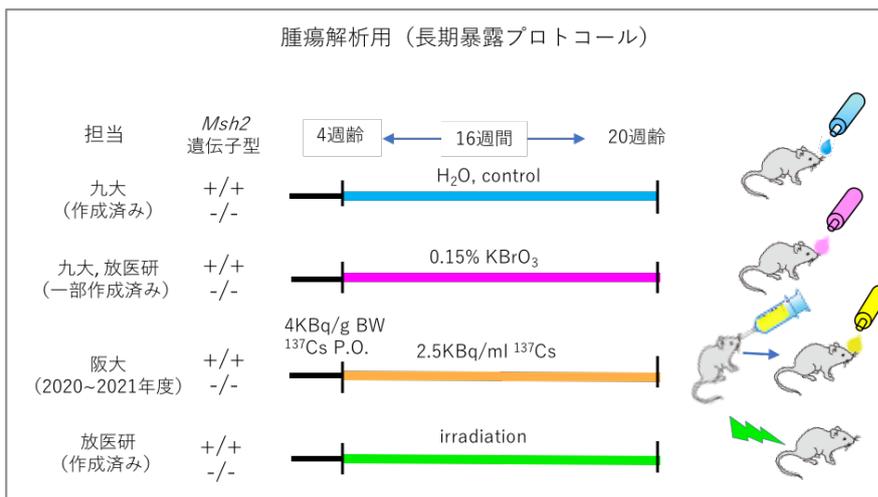


図 II-4. 腫瘍解析用 長期暴露プロトコール

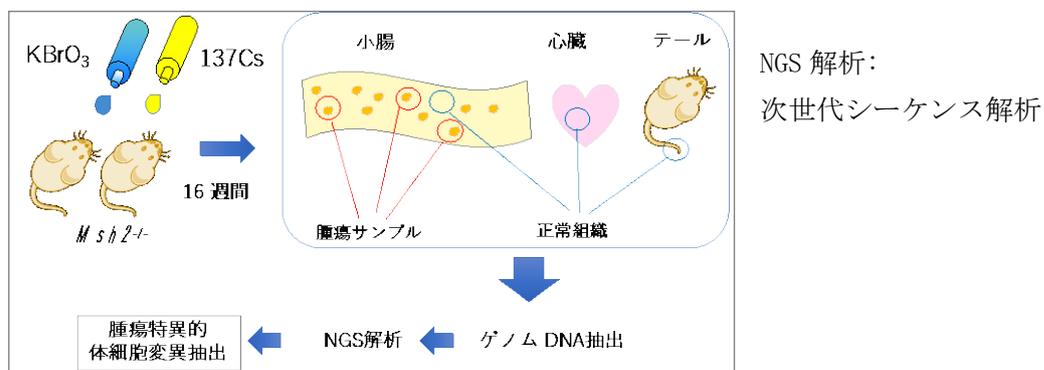


図 II-4 腫瘍特異的体細胞変異の解析ワークフロー

6. 次世代シーケンスによる *de novo* 生殖細胞変異の解析

図 II-3 に示したように、野生型および *Msh2* 遺伝子欠損マウスのオスにセシウム 137 を 4 週間投与し、野生型のメスと交配して得られた仔の尾をサンプルとして次世代シーケンス解析を行う。検出された変異データよりスペクトルや変異率を算出し、大阪大学の中島らがすでに行なっている野生型 A/J, C57BL/6 マウスにセシウム 137 を投与した際のデータとの比較解析を行う。

(倫理面への配慮)

本研究で行う遺伝子組換え実験 (カルタヘナ法) および動物実験計画に関して所定の審査を受け機関の承認を得ている。九州大学における遺伝子組換え実験については「ゲノム安定性維持に関する分子制御機構の生態における機能解析」(承認番号 1-57、有効期限令和 6 年 8 月 31 日まで)、動物実験については「DNA 修復機構の破綻による突然変異と発がんの分子遺伝学的研究」(承認番号 A20-089、有効期限令和 4 年 3 月 31 日まで) で承認を得ている。研究の遂行にあたっては、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」、「動物の愛護および管理に関する法律」などの法令及び関連する学内規則を遵守して行なっている。

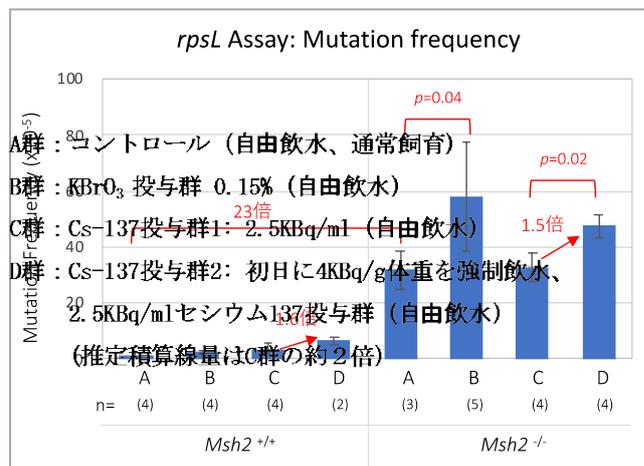
III. 研究結果

1. 高感度体細胞変異検出用マウスを用いた突然変異解析

Msh2^{-/-}, *rpsL*^{-Tg+} マウス及び *Msh2*^{+/+}, *rpsL*^{-Tg+} はそれぞれ A-E の 5 群に分け各処理を 4 週間行い (図 II-3 参照)、その後同じ週齢の時点で解剖し、主要な臓器を凍結保存した。セシウム 137 を可溶性水溶液の状態に飲水させた場合、消化管 (主に小腸) からそのほとんどが吸収され、その後迅速に血中に移行し全身に分布すると考えられる (ICRP publication 30)。そこで、セシウム 137 経口摂取による内部被ばくの影響を直接受ける小腸組織を用いてゲノム DNA を抽出し変異解析に用いた。 γ 線外部照射の E 群については本年度はサンプル保存まで行なったので解析を次年度に行う。これまでに行なった *rpsL* 解析のサンプル別の結果を表 III-1 に、各実験群別の平均値をグラフに表示した (図 III-1)。

表 III-1. *rpsL* 解析 サンプル別データ

Exp. Grop	Sample ID	Msh2 genotype	Km ^r clones (x 10 ⁵)	Km ^r Sm ^r clones	Mutation frequency (x 10 ⁻⁵)	MF(x 10 ⁻⁵) Average (SD)	Exp. Grop	Sample ID	Msh2 genotype	Km ^r clones (x 10 ⁵)	Km ^r Sm ^r clones	Mutation frequency (x 10 ⁻⁵)	MF(x 10 ⁻⁵) Average (SD)
A	RY1305	+/+	3.35	3	0.90	1.41 (0.71)	A	A2198	-/-	1.44	46	31.90	31.83 (7.00)
A	RY1411	+/+	1.28	1	0.78		A	A2198	-/-	0.57	22	38.80	
A	A1366	+/+	4.83	11	2.28		A	A2224	-/-	8.47	210	24.79	
A	A1364	+/+	1.79	3	1.68		B	A2214	-/-	0.96	51	53.18	58.27 (19.39)
B	RY1134	+/+	1.96	7	3.58	B	A2214	-/-	0.89	59	66.37		
B	RY1135	+/+	2.43	7	2.88	B	A2238	-/-	2.16	90	41.61		
B	RY1291	+/+	4.82	11	2.28	B	A2238	-/-	1.87	79	42.27		
B	RY1297	+/+	4.26	8	1.88	2.65 (0.74)	B	A2181	-/-	0.36	32	87.91	32.82 (5.11)
C	2212	+/+	1.11	2	1.81		C	2201	-/-	1.04	28	26.85	
C	2206	+/+	1.60	10	6.27		C	2184	-/-	1.07	33	30.81	
C	2163	+/+	0.63	2	3.17		C	2187	-/-	0.66	23	34.95	
C	2204	+/+	0.63	2	3.17	3.61 (1.89)	C	2222	-/-	0.60	23	38.66	47.72 (4.07)
D	2191	+/+	1.06	7	6.62		D	2183	-/-	1.46	67	45.80	
D	1387	+/+	4.25	20	4.71		D	2183_2	-/-	3.12	168	53.81	
							D	1390	-/-	2.46	113	45.86	
						6.62 (1.35)	D	1388	-/-	3.46	157	45.40	



図Ⅲ-1. *rpsL* 解析 Mutation Frequency

通常飼育コントロール群 (A 群) の結果から小腸組織における自然突然変異頻度が得られる。野生型マウスの自然突然変異頻度は 1.4×10^{-5} と非常に低い値であったのに対して *Msh2* 遺伝子欠損マウスでは 31.8×10^{-5} と野生型マウスの約 23 倍高い値を示した。

0.15% KBrO_3 の飲水投与 (B 群) は、A 群に比較して野生型マウスでは 1.9 倍、*Msh2* 欠損マウスでは 1.8 倍高い値を示した ($p=0.04$, Wilcoxon 検定)。一方 2.5kBq/ml セシウム 137 を 4 週間自由飲水により投与した C 群では、野生型マウスでは約 2.6 倍の上昇が見られたものの、*Msh2* 欠損マウスでは A 群とほぼ同等の変異頻度を示した。また初日に 4KBq/g 体重のセシウム 137 を強制飲水させた後に 2.5kBq/ml を自由飲水により投与した D 群 (推定積算線量は C 群の約 2 倍) の変異頻度は、A 群に比較して野生型マウスでは約 4.7 倍に、*Msh2* 欠損マウスでは約 1.5 倍に上昇していた。またこの値は C 群に比較して、野生型マウスでは約 1.6 倍に、*Msh2* 欠損マウス D 群では約 1.5 倍に上昇していた ($p=0.030$, Wilcoxon 検定) ことから、セシウム 137 の内部被ばく量による変異頻度の変化が検出されていると考えられた。*Msh2* 欠損マウス D 群の変異頻度は 0.15% KBrO_3 投与群 (B 群) とほぼ同程度の値まで上昇していることがわかった。

次に、カナマイシン/ストレプトマイシン耐性コロニー (表Ⅲ-1, Km^rSm^r カラム) の突然変異の種類とそのサイトを同定する目的で、ほぼ全てのコロニー (合計約 1200) について、単一コロニー分離を行なった後、*rpsL* 遺伝子領域を PCR で増幅し、ゲル電気泳動パターンを確認し、サンガーシーケンスを行なった。スペクトル別 Mutation Frequency を表Ⅲ-2 に示す。

表Ⅲ-2. *rpsL* スペクトル解析 変異別 Mutation Frequency

(× 10 ⁻⁵)		<i>Msh2</i> +/+				<i>Msh2</i> -/-			
		A	B	C	D	A	B	C	D
		cont.	0.15% KBrO ₃	¹³⁷ Cs-1	¹³⁷ Cs-2	cont.	0.15% KBrO ₃	¹³⁷ Cs-1	¹³⁷ Cs-2
Base Substitutions	G:C→A:T	0.23	0.56	0.23		3.03	2.41	1.19	3.87
	A:T→G:C		0.16		2.43	0.45	1.48	1.19	0.83
	G:C→T:A	0.08	0.24	0.23		0.22	0.19	0.30	0.18
	G:C→C:G					0.22		0.30	0.28
	A:T→T:A	0.08		0.23	0.63	0.11		0.30	0.18
	A:T→C:G				0.21	0.67			0.46
Frameshift	1bp deletion	0.39	0.88	0.90	6.47	0.56	1.30	1.79	1.66
	1bp deletion (A-run)			0.45		21.07	46.76	23.27	34.18
	1bp insertion		0.08			0.11		0.30	0.64
	1bp insertion (A-run)					3.59	4.45	2.39	1.66
	>2bps indel	0.63	0.72	1.58	2.52	1.79	1.48	1.79	3.78
	Total	1.41	2.65	3.61	5.66	31.83	58.27	32.82	47.72

Msh2 欠損マウスでは、塩基置換の中では G:C>A:T が多いこと、そして全変異の 60%以上がアデニン塩基の連続配列(A-run 配列)での 1~2 塩基の挿入/欠失変異であった。KBrO₃投与群 (B)、高線量セシウム 137 投与群 (D) では、コントロール群に比較して A-run 配列での 1 塩基欠失の増加が見られた。2 塩基以上の挿入/欠失変異は高線量セシウム 137 投与群 (D) でのみ増加が見られた。野生型マウスではセシウム 137 投与により 2 塩基以上の挿入/欠失変異の頻度が上昇していたが、これは A-run 配列ではなかった。

2. セシウム 137 長期飲水投与による腫瘍形成への影響の解析

九州大学で交配し目的の遺伝子型マウスを大阪大学へ輸送し、セシウム 137 の飲水投与を 16 週間行なった (図 III-4 参照)。表Ⅲ-3 に途中死亡などを除き解析可能となったマウスのリストを示す。投与終了後 1-2 週間程度通常飼育を行い、解剖して消化管とその他の臓器を保存し今後腫瘍解析に用いる。

表Ⅲ-3 セシウム 137 長期飲水投与による腫瘍解析用マウスリスト

mouse ID	Msh2 genotype	sex
1858	-/-	f
1845	-/-	f
1854	-/-	f
1858	-/-	f
2143	-/-	f
2144	-/-	f
2145	-/-	f
2146	-/-	f
1852	-/-	m
1855	-/-	m
1850	-/-	m
1863	-/-	m
2155	-/-	m
2159	-/-	m
1847	+/+	f
1848	+/+	f
2157	+/+	f
2158	+/+	f
2178	+/+	f
1844	+/+	m
1861	+/+	m

3. 次世代シーケンスによる腫瘍のゲノム解析

本年度は *Msh2* 遺伝子欠損マウスに KBrO_3 の 16 週間投与を行った後に解剖し、小腸に発生した腫瘍、小腸正常組織、心臓、尾を保存し、ゲノム解析用サンプルを調製し、一部次世代シーケンス解析を行った。今後データ解析を行い腫瘍組織特異的な体細胞変異を検出する予定である。セシウム 137 を 16 週間投与した場合に世代シーケンス解析が可能な大きさの腫瘍が発生した場合には、摘出して保存しゲノム解析に用いる。

4. 遺伝子発現解析 次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析

本年度はこれまでに突然変異解析または生化学解析用に作成し、凍結保存した小腸のサンプルの中から、次年度に大阪大学の中島が行う次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析用に各実験群 (図 III-3 参照) から 3 個体分、合計 18 サンプルを選択し受託解析用に調製した (表 III-4)。

表 III-4 RNA-seq 用 小腸の凍結サンプルのリスト

Exp. Group	treatment	Mouse ID	sex	Msh2 genotype
A	control	1768	female	-/-
A	control	1741	male	-/-
A	control	1799	male	-/-
B	KBrO3	1489	female	-/-
B	KBrO3	2214	male	-/-
B	KBrO3	1492	male	-/-
D	Cs-137 P.O.	1390	female	-/-
D	Cs-137 P.O.	1388	female	-/-
D	Cs-137 P.O.	2183	male	-/-
A	control	1810	female	+/+
A	control	1706	male	+/+
A	control	1801	male	+/+
B	KBrO3	645F	female	+/+
B	KBrO3	1478	male	+/+
B	KBrO3	1486	male	+/+
D	Cs-137 P.O.	2191	male	+/+
D	Cs-137 P.O.	1387	male	+/+
D	Cs-137 P.O.	1397	male	+/+

5. 次世代シーケンスによる *de novo* 生殖細胞変異の解析

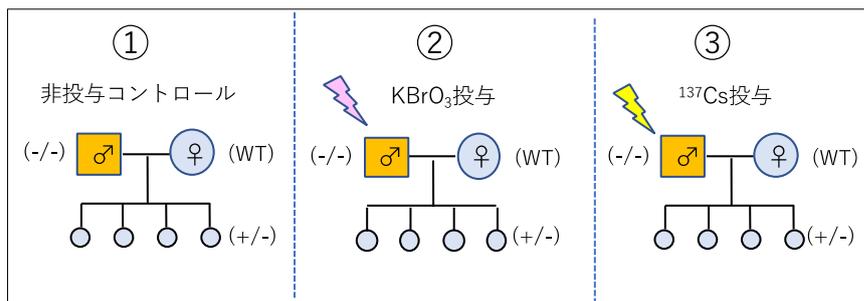


図 III-2 生殖細胞変異解析のための親仔サンプルの概略図

Msh2 遺伝子欠損マウスのオスを野生型のメスと交配しその仔を得て (図 III-2)、次世代シーケンサーによる親子解析を行い *de novo germline mutation* を検出する準備をした。未処理の *Msh2* 遺伝子欠損マウスの若いオスは生殖機能を持ち野生型メスとの交配での産仔数は 6-8 匹で C57BL6/J と変わらなかった。ただし生後 18 週齢程度から生殖能が低下する傾向が見られた。*Msh2* 遺伝子欠損オスと野生型メスとの交配での仔の遺伝子型は全てヘテロとなり、出生後も正常に育ち、生殖機能も正常であった。

非投与コントロール群についてはすでに親仔サンプル 1 家系分を用いて、尾組織からゲノム DNA を抽出し、その後受託業者によりエクソンキャピチュリング、ライブラリ合成、次世代シーケンサー (HiSeq2000) による全エクソン領域 (約 50Mb) のシーケンスを行った。*Msh2* 遺伝子欠損マウスのオスに 4 週間の KBrO₃ の投与を行いその後に野生型メスと交配し複数の仔を得たので、2 家系分のエクソームシーケンスを行った。

大阪大学にて、野生型および *Msh2* 遺伝子欠損マウスのオスに 4 週間のセシウム 137 の投与を行い、その直後に野生型メスと交配し複数の仔を得たので、全ての個体の尾などの組織を凍結保存した。今後エクソーム解析を行う予定である。今後これらのデータを用いて 1 世代で新たに生

じた *de novo* 変異を同定するために、親では検出されず、仔でのみ約 50% のアレル頻度で検出される変異（一塩基置換および小さな挿入／欠失）の抽出を行う。

KBrO₃ またはセシウム 137 の 4 週間投与により野生型および *Msh2* 遺伝子欠損マウスのオスの生殖能力が失われることはなく、また産仔に目視で判別できる形態異常などは見られなかった。

IV. 考察

これまでに生体内での誘発変異を検出する目的で種々のトランスジェニックマウスが作成され遺伝毒性試験に利用されている。生後約 12 週齢の C57BL/6 マウスの小腸の自然突然変異頻度は、*gpt delta* マウス⁹⁾で $(0.8 \pm 0.27) \times 10^{-5}$ 、*LacZ* plasmid マウス¹⁰⁾で $(11.0 \pm 2.7) \times 10^{-5}$ 、BigBlue^R マウス¹¹⁾で $(4.8 \pm 1.5) \times 10^{-5}$ 、MutaTM マウス¹²⁾で $(2.71 \pm 2.3) \times 10^{-5}$ と報告されている。今回の我々の *rpsL* 解析による野生型マウスのコントロール群の変異頻度は $(1.4 \pm 0.71) \times 10^{-5}$ で、他のトランスジェニックマウスの値とほぼ同程度であったことから実験系の有効性が確認できた。化学物質や放射線による誘発変異は自然突然変異頻度（バックグランド変異頻度）に対する相対比率の変化として考察するので自然突然変異を安定に検出できることが重要である。*Msh2* 欠損マウスでは野生型マウスに比較して 23 倍高い自然突然変異頻度を示し、セシウム 137 投与群のうち D 群（初日に 4KBq/g 体重を強制飲水 2.5KBq/ml セシウム 137 投与）ではコントロール群と比較して突然変異頻度の有意な上昇が確認された。野生型マウスでも線量依存的に突然変異頻度が上昇する傾向が認められたが、自然突然変異頻度が非常に低く、被ばくの影響は変異頻度のわずかな変化としてしか捉えられず、誘発変異の定量的・定性的解析と統計学的検定を行うにはさらに多くのマウス個体が必要であると考えられた。一方で *Msh2* 欠損マウスでは酸化剤や放射線被ばくにより誘発される突然変異を効率的に検出することが可能であった。これは変異原暴露により生体内では種々の DNA 損傷が誘発されるが、それらに起因して発生する突然変異はミスマッチ修復機構が効率的に抑制していること、ミスマッチ修復機構の不全により野生型マウスでは観察できない程度の変異原の影響が可視化されたことを示している。突然変異の抑制に関してミスマッチ修復機構以外にも重要な働きを担う種々の機構があるので、今後より効率的かつ定量的に内部被ばくの生体影響を解析できる遺伝子改変マウスを見つけることができるかもしれない。今回の結果はそのための重要な基礎データとなる。

rpsL レポーター遺伝子上に発生した変異のスペクトル解析から *Msh2* 欠損マウスの小腸における自然突然変異は塩基置換の中では G:C>A:T がもっとも高頻度であり、全体の変異の 60% 以上を A-run 配列での挿入／欠失変異が占めていた。KBrO₃ 投与、セシウム 137 投与（D 群のみ）により A-run 配列での挿入／欠失変異が増加したことから、両負荷に共通の原因（通常はミスマッチ修復機構が対処している DNA 損傷など）が生体内で発生していることが示唆された。また、コントロール群に比較して D 群でのみ 2 塩基以上の挿入／欠失変異が増加していた。野生型マウスでも D 群でのみ 2 塩基以上の挿入／欠失変異の頻度が上昇していた。このことから、2 塩基以上の挿入／欠失変異が、ある線量以上のセシウム 137 投与により誘発される変異の特徴である可能性が示唆された。今後さらに解析数を増やして今回の結果の検証を行う。

V. 結論

rpsL レポーター遺伝子を用いた解析法はマウスの個体レベルでのセシウム 137 内部被ばくにより誘発される体細胞突然変異の検出に有効であることが示された。本実験系を利用することで生体内で発生した突然変異を効率的に、定量性・定性性を持って検出することが可能であると考えられる。さらに *Msh2* 欠損マウスを用いることで、誘発変異を高感度に検出可能であり、野生型マウスを用いる場合に比較して解析に要するマウス匹数を大幅に減らすことができる。突然変異スペクトルの解析から、2塩基以上の挿入／欠失変異は KBrO_3 投与群では増加せず、セシウム 137 投与群（D 群、高濃度投与群）でのみ増加することがわかり、放射線被ばくの際の変異の特徴である可能性が示唆された。しかし、化学物質による発がん放射線による発がんの発生機序の違いや、セシウム 137 内部被ばくの生殖細胞への影響などの理解に向けて、今後も継続した基礎研究が重要であると考えられた。

VI. 次年度以降の計画

次年度では、解析サンプル数をさらに増やして突然変異データの定量的解析およびスペクトル解析を行う。セシウム 137 長期投与群の消化管腫瘍の解析、腫瘍が発生した場合にはゲノム解析を行う。また、継世代影響の実験のために必要なサンプルが揃った時点で次世代シーケンスによるゲノム解析を行う。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

ア) 学会発表等

- 1) Mizuki Ohno, Kunihoko Sakumi, Noriko Takano, Yoshimichi Nakatsu, Teruhisa Tsuzuki, Toward understanding de novo germline mutations in mammals, 日本放射線影響学会第 62 回大会, 2019.11. 招待講演
- 2) Mizuki OHNO, Kunihiko SAKUMI, Noriko TAKANO, Kosuke TESHIMA, Kyoko HIDAKA, Yoshimichi NAKATSU, Teruhisa TSUZUKI, Detection of de novo germline mutations in DNA repair-deficient mice lines, The Joint Meeting of The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens(ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society(JEMS), 2019.11.

VIII. 引用文献

- 1) Tsuzuki, T. *et al.* Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11456-11461, doi:10.1073/pnas.191086798 (2001).
- 2) Tsuzuki, T., Egashira, A. & Kura, S. Analysis of MTH1 gene function in mice with targeted mutagenesis. *Mutat Res* **477**, 71-78 (2001).
- 3) Egashira, A. *et al.* Mutational specificity of mice defective in the MTH1 and/or the MSH2 genes. *DNA Repair (Amst)* **1**, 881-893 (2002).
- 4) Sakamoto, K. *et al.* MUTYH-null mice are susceptible to spontaneous and oxidative stress induced intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* **67**, 6599-6604, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4802 (2007).
- 5) Isoda, T. *et al.* Abnormality in Wnt signaling is causatively associated with oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis in MUTYH-null mice. *Int J Biol Sci* **10**, 940-947, doi:10.7150/ijbs.9241 (2014).
- 6) Piao, J., Nakatsu, Y., Ohno, M., Taguchi, K. & Tsuzuki, T. Mismatch repair deficient mice show susceptibility to oxidative stress-induced intestinal carcinogenesis. *Int J Biol Sci* **10**, 73-79, doi:10.7150/ijbs.5750 (2013).
- 7) 環境省 原子力災害影響調査等事業（放射線の健康影響に係る研究調査事業）放射線による健康影響の解明及び放射線以外の要因による健康リスクの低減を含めた総合的な健康リスクに関する研究, 「マウスを用いたセシウム 137 の慢性的低線量内部被ばくによる成体と子孫への影響の定量的実験検証」代表中島裕夫（大阪大学）H30 年度報告書
- 8) Gondo, Y., Shioyama, Y., Nakao, K. & Katsuki, M. A novel positive detection system of in vivo mutations in rpsL (strA) transgenic mice. *Mutat Res* **360**, 1-14 (1996).
- 9) Aoki Y., Matsumoto M., Matsumoto M., Masumura K., Takehiko Nohmi T., Mutant frequency is not increased in mice orally exposed to sodium dichromate. *Food Safety* **7**, 2-10 (2019)
- 10) Dollé ME., Snyder WK., Gossen JA., Lohman PH., and Vijg J., Distinct spectra of somatic mutations accumulated with age in mouse heart and small intestine. *PNAS* **97**, 8403-8408 (2000)
- 11) Arrault X., Michel V., Quillardet P., Hofnung M., Touati E., Comparison of kinetics of induction of DNA adducts and gene mutations by a nitrofur compound, 7-methoxy-2-nitronaphtho[2,1-b]furan (R7000), in the caecum and small intestine of Big Blue™ mice. *Mutagenesis* **17**, 353-359 (2002)
- 12) Lynch M., Gooderham NJ and Boobis AR., Organ distinctive mutagenicity in Muta™ Mouse after short-term exposure to PhIP. *Mutagenesis* **11**, 505-509 (1996)

Analysis of mutations using *Msh2*-deficient mice internally exposed to Cesium-137 radiation

Mizuki Ohno and Yoshimichi Nakatsu

Department of Medical Biophysics and Radiation Biology, Faculty of Medical Science, Kyushu University

Key word: cesium-137, internal exposure, mutation, mismatch repair, oxidative stress, genetic effect,

Abstract

To evaluate the biological effects of internal exposure due to oral administration of cesium-137, we performed the experimental system using the *rpsL* reporter gene transgenic mice. Of the biological effects of chronic exposure to cesium-137 radiation, the contribution of the indirect effects caused by reactive oxygen species generated by low LET radiation reacting with intracellular components is expected to be large. Therefore, we used DNA mismatch repair-deficient mice addition with wild-type mice in this study. DNA mismatch repair system is known to be also involved in the repair of oxidative DNA damages.

Wild-type and *Msh2*-deficient mice possessing *rpsL* reporter genes were administered with cesium-137-containing water for 4 weeks. They were treated with regular water for additional 2 weeks. Subsequently, all the mice were sacrificed, and their organs were isolated and stored for further analysis. The small intestinal tissue, which was directly affected by the administration of cesium-137, was obtained for the mutation analysis. Mutation frequency in the wild-type mice, which received the same treatment, showed a slightly-increased mutation frequency, which was not statistically significant. We observed a 1.5-times increased mutation frequency in cesium-137 (77 mGy)-treated *Msh2*-deficient mice compared to the nontreated, matched control group, with statistical significance.

With this experimental result, we have successfully detected induced mutations *in vivo* with high efficiency by orally administering cesium-137, quantitatively and qualitatively. By using this system, it would be possible to reduce the number of mice used for the study compared to the study that uses wild-type mice. It has been suggested that DNA mismatch repair system play an important role in protecting intestinal tissues against the internal exposure of cesium-137.

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(過酸化物用量と¹³⁷Cs 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. 過酸化物用量と¹³⁷Cs 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物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Cdkn1a/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、過酸化物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・過酸化物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・過酸化物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ーカウンタ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立した。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立した。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、骨髄片、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。

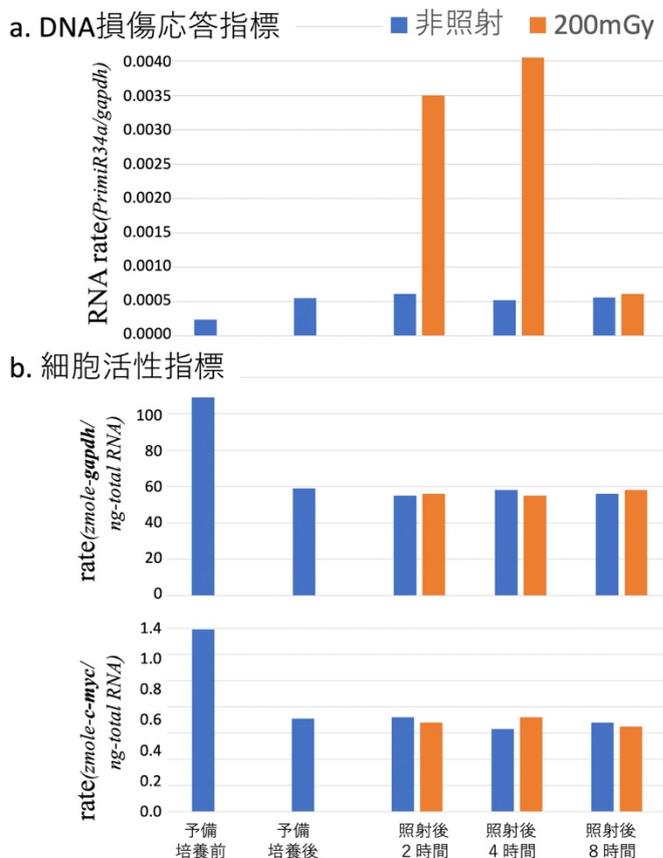
（倫理面への配慮）本研究における動物実験は放射線医学総合研究所で計画承認され、動物愛護

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

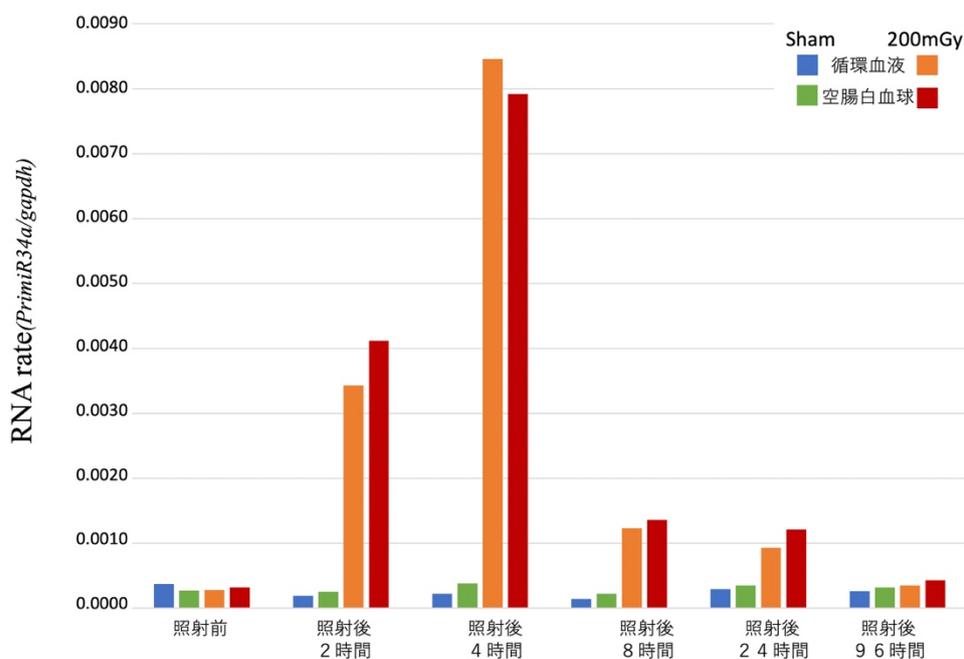
このモデルでは初年度に RAW264.7 細胞で確立した定量系のマウス ex vivo 培養組織細胞への適用であり、RNA と gH2ax 指標を基準にβエミッター用量と過酸化剤用量の関係を提示することを目的とする。高感度分析のためには、RNA 指標および gH2ax 指標を比較し、培養による変動が最少であり、200mGy 照射による影響が最大となる系である必要がある。種々の ex vivo 培養系を比較検討した結果、24 時間予備培養した骨髓細胞片が当該分析に適用可能であることがわかった(図 III-1a)。RNA 発現に関する細胞状態の指標となる総 RNA ng あたりの gapdh mRNA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

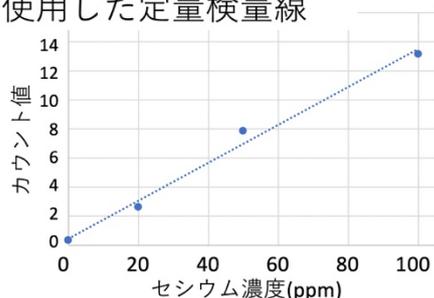


図III-2. 循環血液と空腸白血球におけるDNA損傷指標の経時変化

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



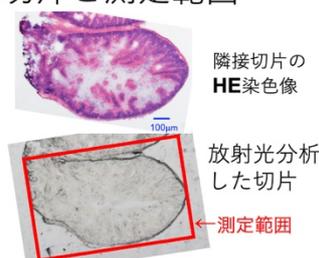
b. 照射室内の放射光測定装置



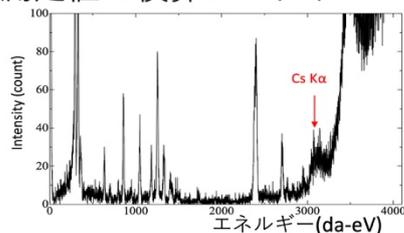
c. 大腸切片と測定範囲



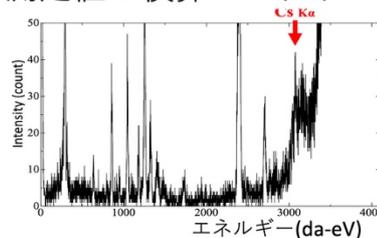
e. 空腸切片と測定範囲



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のマイクロ定量

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 RENEB 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 biosimetric 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 Yakumar 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 Yakumar 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).

動物モデルと数理モデルを用いた

放射線発がん線量率効果が生じるメカニズムの解明

主任研究者：今岡達彦（量子科学技術研究開発機構・グループリーダー）

分担研究者：服部佑哉（国立大学法人東京工業大学・助教）

研究要旨

東京電力福島第一原子力発電所事故の後に生活環境の放射線の線量率が増加したことは、健康不安の一因となっている。このような低線量率の放射線被ばくによるがんのリスクが、原爆被爆時のような高線量率のリスクと比べて低いのかどうか（これを「線量率効果」と呼ぶ。）については、両者を調査できるような適切な人間の集団がないため、十分な科学的知見がない。一方、実験動物の発がんでは、線量率効果がはっきりと見られる。動物実験で得られた知見を人間にあてはめられるかどうかを知るには、動物で線量率効果のメカニズムを理解し、それが人間でも起こりえる性質のことかどうかを検討する必要がある。そこで本研究は、ラットの実験で見られる乳腺の発がんの線量率効果がどのようなメカニズムで現れるかを解明する。本研究は、低線量率被ばくのリスクが不明確であるという課題の解決に貢献し、放射線不安に対応する情報を提供する。その目的のために、動物モデルを用いた実験を行い、実験で得られた数値を使って発がんリスクを数理的に予測するモデルを構築している。初年度である平成31（令和元）年度は、乳腺内に複数の種類の細胞があることから、放射線による細胞死の影響を細胞種ごとに求め、数理モデルの構築に必要な数値を得た。また、次年度に向けた実験条件の検討と、ラットの乳腺を模擬した数理モデルの基本型の構築を行った。令和2年度は、放射線被ばく後のラットの乳腺における損傷修復、細胞周期の変化を評価し、数理モデル化に必要な数値を得た。また、発がんがどの細胞から生じるかを解明するための実験と、放射線に被ばくした細胞が除去される「細胞競合」と呼ばれる過程を解明するための実験の設定を完了した。また、放射線による細胞死と線量率の関係を記述する数理モデル、発がんの過程を記述する数理モデルの基本型を構築した。数理モデルの挙動を解析したところ、低線量率でがんリスクが低くなる条件を整理できた。予定通りの成果が得られたことから、最終年度となる令和3年度は、引き続き幹細胞動態データを取得し、がん起源細胞の推定と細胞競合の評価を完了して、数理モデルにおいて線量率効果のメカニズムを特定する。

キーワード：放射線発がん、低線量率放射線、線量率効果、動物モデル、数理モデル、幹細胞

研究協力者

渡邊立子（量子科学技術研究開発機構・上席研究員）、横谷明徳（量子科学技術研究開発機構・統括グループリーダー）

若手研究者

永田健斗（量子科学技術研究開発機構・博士研究員）

I. 研究目的

1. 本研究課題の背景

東京電力福島第一原子力発電所事故では、放出された放射性物質により、生活環境において線量率が増加した時期があった。このことは、その後の住民の健康不安につながっている。現在も、線量率が増加した地域は帰還困難区域等に残っている。このような低線量率の放射線被ばくによるがんのリスクが、原爆被爆時のような十分解析された高線量率のリスクと比べてどれくらい低いと考えるべきか、国際機関の間でも見解が一致していない。低線量率における生体への影響が高線量率と比べて低くなることを「線量率効果」と呼ぶが、実際、同事故のリスク評価で線量率効果を考慮するかどうかは、機関によって異なっていた¹⁻³⁾。

低線量率被ばくした人間集団を対象とした疫学の精度は十分でない。そのため、人間集団においてがんのリスクに線量率効果があるのかどうかは、十分な証拠がない。一方、動物実験では、発がんの線量率効果が存在することがよく知られている。動物実験で得られた知見を人間にあてはめて良いかどうかを考えるには、動物で線量率効果のメカニズムを十分に理解し、それが人間でも起こりえる性質のことかどうかを検討し、そのメカニズムが人間に働いた場合にどれくらいリスクになるかを定量的に予測する必要がある。実際に国際機関等でもそのような研究を行う必要性が提言されている^{4,5)}。しかし、動物では、線量率効果のメカニズムが十分に定量的には理解されていないのが現状である。

放射線による発がんは、組織幹細胞やそれに近い細胞から発生すると推測されている。主任研究者らは、本事業が開始される前に、ラットを用いた発がん実験によって、低線量率(0.1 mGy/分)では高線量率(0.5 Gy/分)と比べて、乳がんの発生率が1/8倍程度と大幅に低くなることを見いだした⁶⁾。また、そのメカニズムを解析するため、ラットの乳腺にある各種細胞の増減や放射線への反応を定量的に評価する種々の実験系を確立した。さらに、東工大との共同研究で、ラットの乳腺幹細胞系の細胞数を定量的に記述する数理モデルのプロトタイプを開発した⁷⁾。

2. 研究期間全体を通じての目的

以上の背景に基づき、本事業では、動物実験で見られるような線量率効果が人間集団にも起こりえることかどうかの検証につなげるため、動物実験で見られる線量率効果のメカニズムを定量的に解明することを目的とする。

得られる成果は、冒頭に述べた原子力事故等による低線量率被ばくのリスク評価の課題解決に貢献する。さらに、同じ量の放射線であってもゆっくりと被ばくすればがんリスクがそれほど高まらない理由を解明することで、住民の放射線不安に対応する情報を提供する。また、その過程で若手研究者を育成し、国内で減少している放射線リスクの専門家を輩出する。以上を通して、本研究課題は環境行政の課題の解決に貢献する。

3. 前年度の実施内容の概略

本研究課題では、生物学的な機序を解明するための研究項目 1（「実験モデルにおける幹細胞解析」、担当：主任研究者）と、得られた結果を定量的に解釈して発がんリスクの予測につなげるための研究項目 2（「幹細胞動態数理モデルの構築」、担当：分担研究者）を実施している。

平成 31（令和元）年度は、乳腺の幹細胞動態の数理モデル化に必要な、乳腺の幹細胞系を構成する細胞種ごとの前駆細胞活性、細胞死、細胞増殖のデータを得た。また、がんの起源細胞を推定する実験系及び照射された細胞が非照射細胞の中に少数存在する場合の細胞間の競合を測定する実験系の改良を行った。さらに、数理モデルの一部である乳腺幹細胞系モデル（terminal end bud モデル、以下「TEB モデル」）を、開発済みのプロトタイプ（細胞集団の平均値を計算するモデル）から、個々の細胞の挙動を計算するモデルへと拡張させた。

4. 本年度の目的

令和 2 年度の研究項目 1 においては、放射線被ばく後の乳腺幹細胞系における損傷修復、細胞周期等の動態を解明することで、数理モデル化に必要なパラメータを前年度に続いて取得すること、また、発がんの起源細胞を解明するための実験と、放射線に被ばくした細胞が除去される細胞競合と呼ばれる過程の解明のための実験の設定を完了することを目的とする。特に、幹細胞系の動態の解明では若手研究者の専門的能力である病理組織学的技術を活用する。研究項目 2 においては、数理モデルの一部として、放射線による幹細胞系の細胞死と回復を記述するモデル（以下、「ダメージ修復モデル」）と、発がんの過程を記述するモデル（以下、「発がん過程モデル」）を構築し、その挙動を解析して、線量率が低いときにがんリスクが低くなる条件を検討する。

本報告では研究項目 1、分担研究者の報告において研究項目 2 について報告する。

II. 研究方法

1. 幹細胞動態の実験データ取得

① 放射線照射

発情期のラット（Jcl:SD 系統、日本クレア株式会社）を対象に、 γ セル照射装置（Nordion 社、線量率 30 Gy/時）による高線量率照射、あるいは連続 γ 線照射装置（ポニー工業株式会社。線量率 6 mGy/時となる条件を使用。）による低線量率照射を行った。照射の週齢と線量は研究結果の項目に記載した。

② 細胞周期標識物質の投与

細胞周期が S 期にある細胞を標識するため、生理食塩水（大塚生食注 10 mL、大塚製薬）に 5-エチニル-2'-デオキシウリジン（EdU、Thermo Fisher Scientific 社）あるいは 5-ブロモ-2'-デオキシウリジン（BrdU、Thermo Fisher）を溶解して 5 mg/mL とし、50 mg/kg 体重あたりとなる量を腹腔内投与した。発情期の動物を用いて、組織採取の 4 時間前に EdU を投与し、さらに 2 時間後に BrdU を投与して、解剖後に乳腺を 10%リン酸緩衝ホルマリン中で固定した。

③ 蛍光染色

ラットから採取してホルマリン固定パラフィン包埋を行った組織を 3 μ m 厚に薄切し、パラフィン除去後に 0.01 M トリス塩酸緩衝液（pH 9.0）中 95°C40 分で抗原賦活化処理を行い、10%ブロッ

キング液（Dako 社）を含む 0.5% Tween-20 含有トリス緩衝生理食塩水（TBS-T）に希釈した一次抗体（抗 53BP1 抗体、抗 BrdU 抗体、抗サイトケラチン 14 抗体、抗サイトケラチン 8+18 抗体を使用）と 37°C で 2 時間反応させ、TBS-T で洗浄後、同様に希釈した蛍光標識二次抗体を 37°C で 1 時間反応させ、TBS-T で洗浄した。EdU の染色には Click-iT EdU Cell Proliferation Kit (Thermo Fisher) を使用した。その後、4',6-ジアミジノ-2-フェニリンドール（DAPI）を含む封入剤（Vector 社）で封入した。

④ 画像データ取得及び解析

画像データ取得にはディスク走査型共焦点顕微鏡システム（DSU-IX81、オリンパス株式会社）及びオールインワン蛍光顕微鏡（BZ-X800、株式会社キーエンス）を、画像解析ソフトウェアとしては ImageJ（米国国立衛生研究所）を、それぞれ使用した。

2. 放射線誘発乳がんの起源細胞の推定

① 乳腺細胞の単離

野生型（LEW/CrlCrlj 系統、日本チャールスリバー株式会社）もしくはオワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子導入ラット（京都大学ナショナルバイオリソースプロジェクト・ラットより供与された系統を自家繁殖）より乳腺を摘出し細切した後、0.1% III 型コラゲナーゼ含有ハックス平衡食塩水（HBSS）で 37°C 3 時間消化し、2% ウシ胎仔血清（FBS）含有 HBSS、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄したのち、20 μ m 孔径メッシュを抜けなかった組織小片を回収、0.25% トリプシン含有エチレンジアミン四酢酸（EDTA）溶液、5mg/mL ディスパーゼ溶液で順に消化し、40 μ m 孔径及び 10 μ m 孔径メッシュを順次通して、通過した単離細胞を 1% FBS 含有 HBSS に懸濁し、細胞数を血球計算板で計測した。これを細胞凍結保存液セルバンカー（日本全薬工業株式会社）に懸濁して -80°C で保存した。使用時には 37°C 温浴によって解凍し、2% FBS 含有 HBSS で洗浄して、生存率と細胞数をトリパンブルー染色（死細胞を検出する。）及び血球計算板によって計測し、50% マトリゲル溶液（BD 社）を含む HBSS で目的の濃度（野生型と GFP ラット由来細胞が共に 5,000 個/ μ L）に調整し、細胞が沈殿しないように回転させながら 37°C でマトリゲルをゲル化させた。

② 細胞移植

野生型 Jcl:SD ラットと GFP ラットの自然交配によって雑種第一代を作製した。これらをレシピエントとする移植手術を以下のように実施した。3~4 週齢においてイソフルランで全身麻酔を行い、切開予定部位の周辺を動物用バリカンで剃毛したのち、手術部位にマジックによるマーキング及びヒビテン消毒液による消毒をして、保温しながら、乳腺組織を含む皮下脂肪組織を、電気メスを用いて摘出した。続けて、残存している、乳腺組織を含まない皮下脂肪組織に細胞懸濁ゲルを注入した。切開部を外科用クリップで閉創し、ヒビテン消毒液によって消毒したのち、保温しながら覚醒させ、飼育ケージで飼育した。

③ 放射線照射

一部の個体については 7 週齢時に「1.①」の方法で高線量率照射を行い、飼育を継続して、触診による腫瘍発生の観察を開始した。

④ 免疫染色

一部の個体については解剖を行い、移植した皮下脂肪組織を摘出して、「1.③」と同様に GFP 抗

体（MBL 社）による免疫染色を実施し、3,3'-ジシアミノベンジジン染色キット（Vector 社）により GFP 局在を可視化して、BX53-DP73（オリンパス社）により画像を取得した。

3. 放射線照射後の細胞競合の解明

① 放射線照射

「1.①」の方法で、雌の 7 週齢 GFP ラットを合計 4 Gy となるように高線量率ならびに低線量率で照射した。また、非照射の GFP ラットならびに造礁サンゴ由来赤色蛍光タンパク質（RFP）遺伝子導入ラットを用意した。

② 乳腺細胞の単離と移植

低線量率照射の終了から 3 ヶ月後に「2.①」の方法で、照射及び非照射の GFP ラット及び非照射の RFP ラットから乳腺細胞を単離し、凍結保存前の細胞を使って、GFP 細胞と RFP 細胞の比率が 1:99 かつ合計の細胞濃度が 10,000 個/ μ L となるように混合して、「2.②」の方法で、GFP ラットと RFP ラットの雑種第一代の雌ラットに移植し、3 ヶ月後の解剖に備えて長期の飼育を開始した。

（倫理面への配慮）

動物実験及び遺伝子組換え実験については、量子科学技術研究開発機構でのみ実施し、同機構の動物実験委員会及び遺伝子組換え実験委員会の承認を得て行った。人を対象とする研究には該当しない。

III. 研究結果

1. 幹細胞動態の実験データ取得

本項目は、若手研究者が主体となって実施した項目である。

① DNA 修復動態の解明

本項目は、構築しようとする数理モデルの一部である「ダメージ修復モデル」において、ラット乳腺の各種細胞の細胞死をモデル化するため、重篤な DNA 損傷修復速度を表すパラメータを取得するために実施した。修復過程を定量化するためには、検出可能な量の DNA 損傷を短時間に誘導する必要があるため、高線量率（30 Gy/時）1 Gy の照射を用いた。また、DNA 二重鎖切断マーカーである 53BP1 タンパク質の核内集合体（フォーカス）を、照射後 3, 6, 12, 24 時間後に採取した 7 週齢ラットの乳腺の標本上で、細胞種ごとに免疫染色によって可視化して定量した。この時、細胞種を判別するために、基底細胞マーカーであるサイトケラチン 14、全内腔細胞のマーカーであるサイトケラチン 8、成熟した内腔細胞のマーカーであるサイトケラチン 18 を同時に染色した。細胞マーカー解析結果を図 III-1 に示す。内腔成熟細胞の割合は TEB から離れるに従って増加し、それに伴って内腔前駆細胞の割合には減少傾向が見られた。

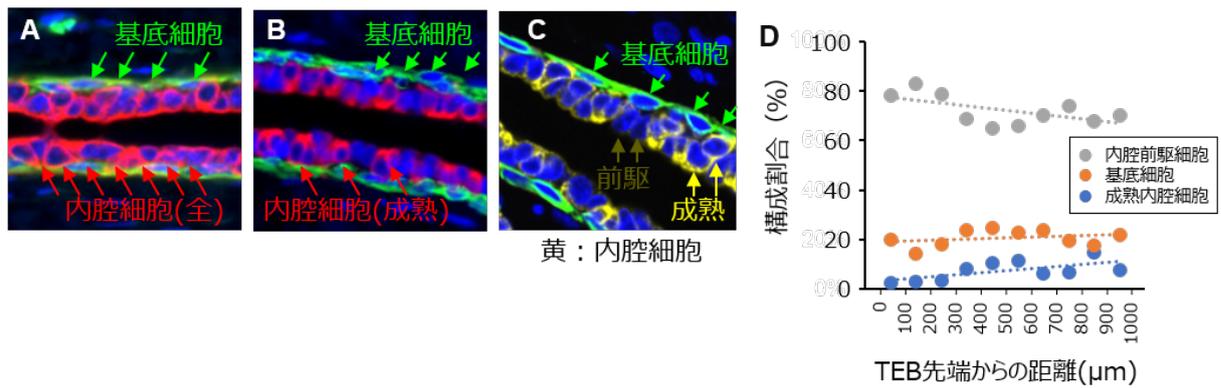


図 III-1 乳腺上皮の各種細胞。A. 基底細胞のマーカであるサイトケラチン 14 (緑) とすべての内腔細胞のマーカであるサイトケラチン 8 (赤) の局在。B. 基底細胞のマーカであるサイトケラチン 14 (緑) と成熟した内腔細胞のマーカであるサイトケラチン 18 (赤) の局在。C. 基底細胞のマーカであるサイトケラチン 14 (緑) とサイトケラチン 8 及び 18 の両者を認識する抗体によるシグナル (黄) の局在。後者に関して、内腔成熟細胞は強陽性、内腔前駆細胞は弱陽性となる。D. 非照射群乳腺の 100 μm ごとの基底細胞、内腔細胞の構成割合。

DNA 二重鎖切断マーカの定量の結果が図 III-2 である。DNA 二重鎖切断マーカのフォーカスは基底細胞及び内腔細胞に見られた (図 III-2A)。内腔細胞はさらに前駆細胞と成熟細胞に分けられた (図 III-2B)。TEB 先端から計 1 mm の領域に含まれる各種細胞の 53BP1 フォーカス数を放射線照射の 3 時間後に比較すると、内腔前駆細胞におけるフォーカス数が他の細胞種よりも有意に多いことが判明した (図 III-2C)。また、照射 3~24 時間後のフォーカス数の減少の動態は、細胞種によって顕著に異ならなかった (図 III-2D)。

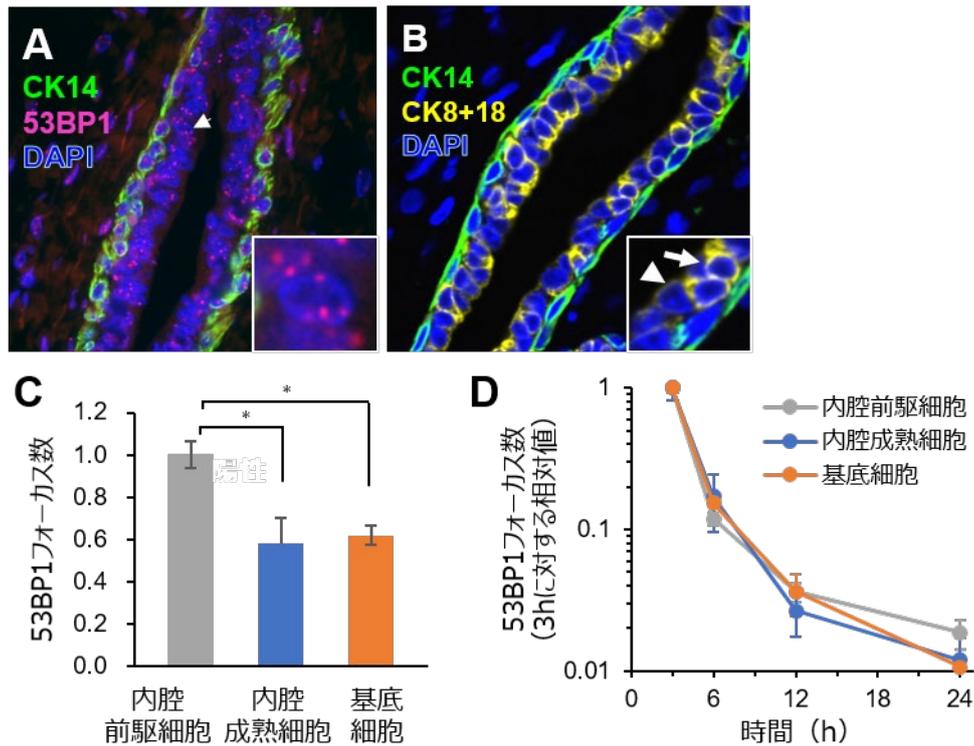


図 III-2 放射線照射後の乳腺上皮の各種細胞における DNA 二重鎖切断マーカ (53BP1 フォーカス)。A. 代表的な基底細胞マーカー (サイトケラチン 14、CK14) 及び 53BP1 の染色像。枠内は 53BP1 フォーカスの拡大図。B. 代表的な基底細胞マーカー (CK14)、内腔細胞マーカー (サイトケラチン 8 及び 18、CK8+18) の染色像。枠内は CK8+18 弱陽性の内腔前駆細胞 (▲) と CK8+18 強陽性の内腔成熟細胞 (↑) の拡大図。C. 各種細胞における 53BP1 フォーカス数の比較。照射 3 時間後、TEB 先端から 1 mm までの領域を解析。D. 各種細胞における 53BP1 フォーカスの減少曲線 (照射 3 時間後を基準とした相対値)。TEB 先端から 1 mm の領域を解析。

② 細胞周期動態の解明

本項目は、構築しようとする数理モデルの一部である「TEB モデル」において、高線量率及び低線量率で照射後の乳腺組織における各細胞の細胞周期の変化の情報を用いるため、実施した。細胞周期長の測定法としては、S 期 (DNA 合成期) を標識する EdU 及び BrdU を、時間差を設けて投与する時間差二重標識法⁸⁾を用いた。本法では、EdU と BrdU の投与時刻の差 (T_i) と、EdU 陽性細胞割合 (P_{E+})、EdU 陽性/BrdU 陰性細胞割合 (P_{E+B-})、細胞周期が回転している細胞 (増殖マーカー Ki67 に陽性の細胞) の割合 (P_{Ki67}) の情報から、S 期の長さ (T_s) と細胞周期長 (T_c) を求めることができる (図 III-3)。

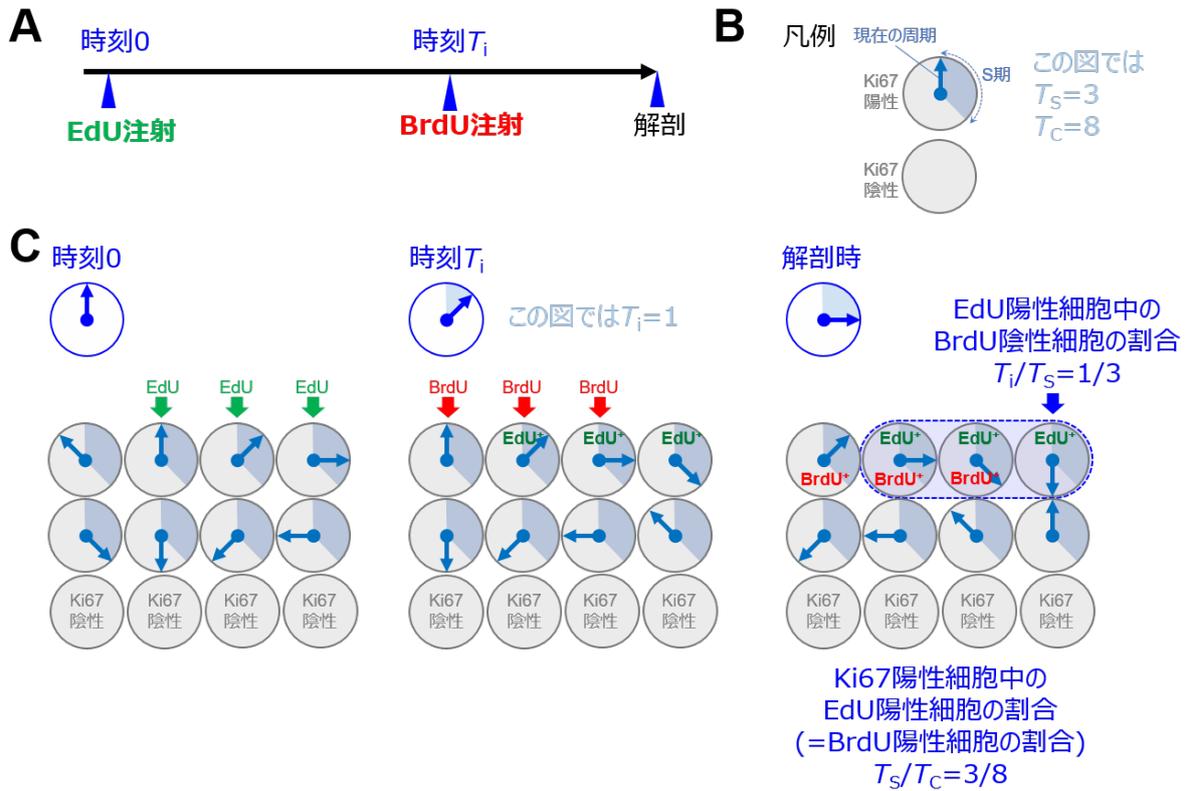


図 III-3 時間差二重標識法による細胞周期長の測定の原理。A. 投与計画。時刻0でEdUを投与し、時刻 T_i でBrdUを投与する。B. 凡例。S期の長さを T_S 、細胞周期が1周する時間を T_C とする（ただし $T_C > T_S \geq T_i$ ）。C. 解剖時に、EdUを持つ細胞集団の中でBrdUを持たない細胞の割合は T_i に比例し、 T_i/T_S で表される（ $T_i=0$ の場合0%で、 $T_i=T_S$ の場合100%）。つまり、EdUを持つ細胞の割合を P_{E+} 、EdUを持ちBrdUを持たない細胞の割合を P_{E+B-} とすると、 $T_i/T_S = P_{E+B-}/P_{E+}$ である。細胞周期が回転している細胞（Ki67陽性細胞）においてEdUを持つ細胞の割合は T_S に比例し、 T_S/T_C で表される（ $T_S=0$ の場合0%で、 $T_S=T_C$ の場合100%）。つまり、Ki67陽性細胞の割合を P_{Ki67+} とすると、 $T_S/T_C = P_{E+}/P_{Ki67+}$ である。

本実験における代表的な染色像と、非照射、高線量率2 Gy 照射（5週齢時）、低線量率2 Gy 照射（3～5週齢時）の処置を行ったラットの乳腺の各種細胞で細胞周期S期の長さを試算した結果を次の図に示す。染色像の観察の結果、時間差二重標識法により、EdU単独陽性細胞、BrdU単独陽性細胞、両者に陽性の細胞、両者に陰性の細胞が確認された。各細胞の陽性率を元に、図III-3に示した方法によって、各群の内腔前駆細胞と基底細胞の細胞周期の長さを試算した（図III-4）。その結果、非照射群においてS期はそれぞれ約3.1時間、約6.4時間であった。細胞周期全体の長さは、内腔細胞では約9.4時間であった。文献¹¹⁾において、同じ7週齢Sprague-Dawley系統雌ラットのTEBでのS期は7.2時間、細胞周期全体は11.7時間との報告があるが、本研究のように細胞の種類を分けておらず、主に内腔細胞（前駆細胞及び成熟細胞）のものと思われるため、今回の結果にはやや小さめの数値があり検討の余地はあるが、大きな乖離はないと考えられた。また、

内腔前駆細胞の S 期は基底細胞よりも短い傾向が一貫して見られた。さらに、いずれの線量率の放射線照射によっても S 期の長さは著明には変化しない傾向が確認された。

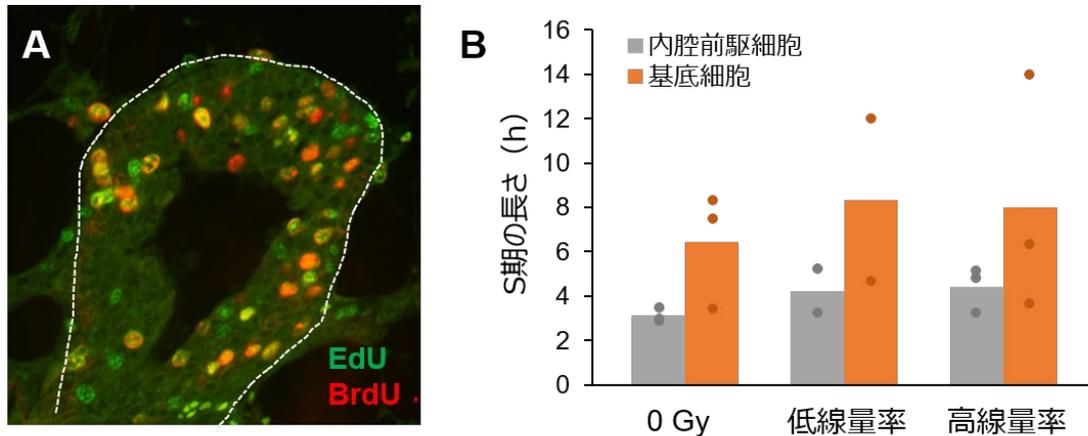


図 III-4 時間差二重標識法による S 期長及び細胞周期長の測定結果。A. EdU 及び BrdU の二重染色像の代表例。7 週齢ラットの TEB 領域。B. 無処理 (0Gy) 及び低線量率・高線量率で 2 Gy 照射後の S 期長の測定結果。

2. 放射線誘発乳がんの起源細胞の推定

発がんの初期には内腔細胞が多層化し、基底細胞は単層のままであるため、内腔細胞ががんの起源細胞であると予想されるが、直接的な証明はない。そこで、放射線発がんの起源は内腔細胞であり、基底細胞は追隨的に増殖しているという仮説を検証する。そのため、蛍光タンパク質によって識別可能な 2 種の細胞からなるモザイク組織を移植実験によって作製し、これを照射して乳がんを発生させ、できた乳がんの基底細胞、内腔細胞が単クローンとなるかどうかを評価する計画である。令和 2 年度は実験群の設定、モザイク組織の確認を実施した。

① 実験群の設定の完了

令和 2 年度は、GFP ラット及び野生型ラットから採取した乳腺細胞を同数ずつ混合し、51 匹のレシピエントに移植した。そのうち 31 匹に発がん線量である γ 線 4 Gy を照射し、16 匹を非照射群とした。これらの個体は、週 1 回の触診によって腫瘍発生を確認し、移植部位以外の腫瘍を外科的に除去しながら長期飼育しており、令和 3 年度に解析する予定である (図 III-5A, B)。

② 正常組織におけるモザイクの存在の確認

照射時点の乳腺の状態を確認するために、レシピエント 4 匹を解剖し、GFP 陽性細胞の局在パターンを免疫染色によって確認した (図 III-5C)。なお、予備的検討において凍結切片を作製して GFP の蛍光を直接的に画像化した。GFP 蛍光量が少ない細胞が見られたことから、免疫染色によって GFP の局在を示すシグナルを増強して画像化する方法を採用した。その結果、移植された正常組織には GFP 陽性細胞と陰性細胞のモザイクから成る部分が存在していることを確認した。非モザイクの部分も存在していたが、マウス乳腺を用いた過去の文献⁹⁾の報告内容から予想され

る範囲内であった。

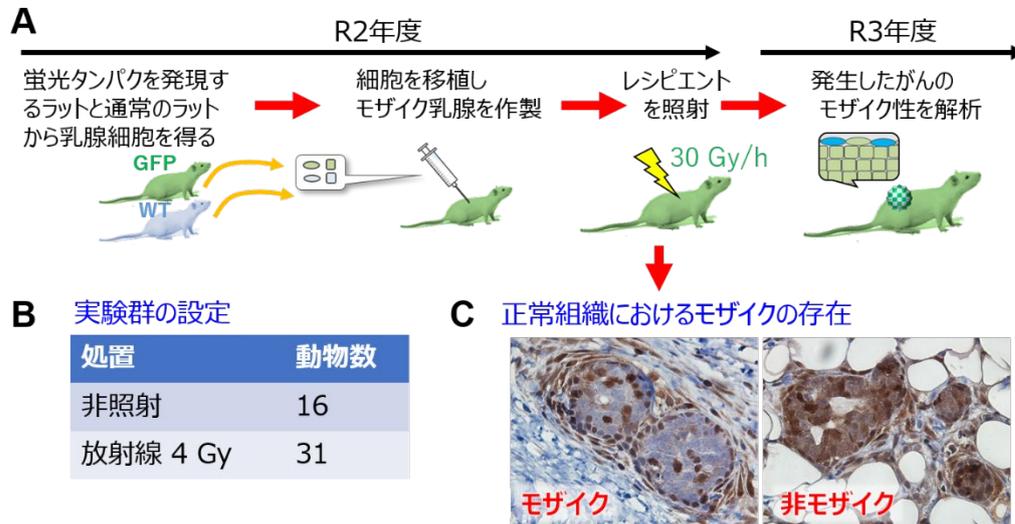


図 III-5 放射線誘発乳がんの起源細胞推定に関する実験経過。A. 令和（R）2年度における実験の進捗と令和3年度の予定の全体を示す模式図。B. 設定した実験群の動物数。C. 正常組織におけるモザイク性（左）及び非モザイク性（右）を示す部位の顕微鏡写真（抗GFP抗体を用いた免疫染色）。茶色はGFPラット由来の細胞であり、茶色に染まらない（青色の）細胞は野生型ラット由来の細胞である。

3. 放射線照射後の細胞競合の解明

本実験は、「DNA修復履歴のある細胞は履歴のない細胞よりも組織内での細胞競合により排除されやすく、低線量率ではこのような細胞競合が起こりやすい」という仮説を検証するためのものである。実際には、高線量率あるいは低線量率で照射した、もしくは非照射のラットから採取した細胞（GFPを有する）と、非照射のラットから採った細胞（RFPを有する）を混合して、自身の乳腺をあらかじめ除去した第三のラットに移植し、乳腺組織を形成させる。仮説の通りであれば、高線量率では一度すべての緑色細胞にDNA損傷が生じるため、混合後は非照射細胞（RFPを有する）との競合によって排除されるが、低線量率では損傷細胞が細胞競合によってすでに除去されているため、GFP細胞は排除されないと予想される。細胞競合の程度は、GFP細胞が全体に占める割合を対照群と比較して評価する。令和2年度は、照射・非照射のラットから細胞を採取し、第三のラットに移植する工程までを実施した（図III-6）。

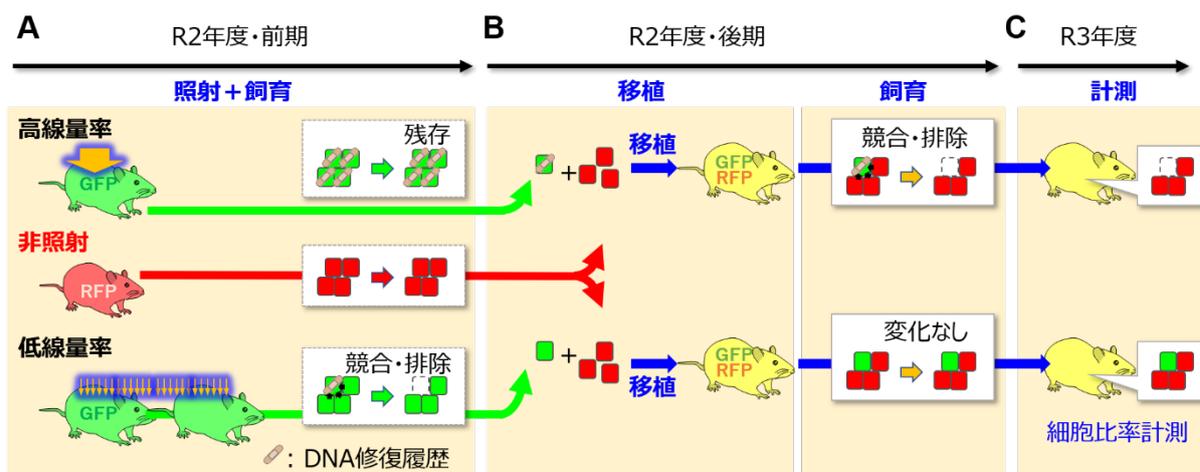


図 III-6 放射線照射された細胞と非照射の細胞の間の細胞競合と線量率の関係を示すための実験概要及びその経過。A. 令和（R）2年度前期にはラットを照射し、3ヶ月飼育した。高線量率群では全細胞が一度に照射される。低線量率では一度に照射される細胞はごく一部であるため、この照射・飼育の間に細胞競合が起こる可能性を考えている。B. 令和2年度後期には、照射したラットから採取した細胞と非照射の細胞を混合して、第三のラットに移植し、引き続き3ヶ月飼育した。この間に、C. 令和3年度には、ラットから細胞を採取して、混合比を測定する予定である。

① 高線量率および低線量率照射の実施

7週齢時において高線量率（30 Gy/分）で4 Gy照射した GFP ラット、7～11 週齢において低線量率（6 mGy/時）で4 Gy照射した GFP ラット、非照射の GFP ラット及び RFP ラットを用意し、これらを3ヶ月間飼育した。

② 移植実験

上記処置の3ヶ月後のラットから乳腺細胞を採取し、同時に第三のラット（19 個体）の乳腺組織を郭清した乳腺のない脂肪組織を作製しておいて、ここに競合を評価したい細胞を混合して移植した。個体差があることを考慮し、すべての個体において、右半身の脂肪組織には非照射 RFP 細胞と非照射 GFP 細胞（混合比 99:1）を移植し、左半身の脂肪組織には非照射 RFP 細胞と各種処理を行った GFP 細胞（混合比 99:1）を移植して、右半身の結果を基準として左半身を評価できるようにした。用意した実験群の匹数は以下の通りである。

表 III-1 設定した実験群

番号	左半身		右半身		匹数
	GFP 細胞 (割合 1%)	RFP 細胞 (割合 99%)	GFP 細胞 (割合 1%)	RFP 細胞 (割合 99%)	
1	高線量率	非照射	非照射	非照射	12
2	低線量率	非照射	非照射	非照射	7

IV. 考察

1. 幹細胞動態の実験データ取得

本研究課題で構築しようとする数理モデルはいくつかの部分で構成される。令和 2 年度の本項目の成果は、これらの数理モデルで用いるパラメータの決定に寄与するものである。以下に、その成果の意義と今後の利用法を説明する。

① DNA 修復動態の解明

1) 成果の概要とその意義

「ダメージ修復モデル」は、数理モデル全体のうちで、被ばく直後の細胞死をモデル化する部分である。令和 2 年度の本項目の成果は、放射線による DNA 損傷のうち最も中心的な役割を果たす DNA 二重鎖切断の修復過程をモデル化するパラメータを取得したことである。このパラメータは、線量率が細胞死に及ぼす影響を予測するために必要である。すなわち、高線量率では細胞の生存に関わる複数の重要遺伝子が DNA 二重鎖切断によって同時にダメージを受けることで細胞死が効率よく起こるが、低線量率ではダメージが修復されながら照射を受けるため複数の遺伝子が一度にダメージを受けることは比較的まれである。この違いは修復過程に起因するため、修復の速度を表すパラメータが必要である。乳腺を構成する複数種の細胞における DNA 二重鎖切断修復速度の知見はこれまでになく、本項目では若手研究者の力により、それを求めることができた。

2) 成果の利用法

高線量率（30 Gy/時）における細胞死誘導の線量効果関係の実験データは、平成 31（令和元）年度にコロニー形成解析によって、基底細胞・内腔細胞それぞれの前駆細胞についてすでに取得してある。コロニー形成解析実験では細胞を体外で照射するが、本研究で扱う低線量率（6 mGy/時）で意味のある線量を照射するには数週間を要し、細胞を体外で維持できない。また、体内で照射すると、失われた細胞が他の細胞によって補われることから、細胞死を評価できない。そこで、ダメージ修復モデル、今回得られたパラメータ、すでに得ている高線量率での線量効果関係の 3 つを組み合わせることで、低線量率における細胞死を予測するモデルを完成する。

② 細胞周期動態の解明

1) 成果の概要とその意義

「TEB モデル」は、数理モデル全体のうちで、被ばく後の中長期における細胞の動態をモデル化する部分である。令和 2 年度の本項目では、高線量率及び低線量率の放射線に被ばくしたラット個体の乳腺組織における細胞周期の測定系を、若手研究者が主体となって提案・構築し、実際に測定を行った。さらなるデータの蓄積が必要ではあるが、非照射群において内腔前駆細胞の S 期長が基底細胞よりも短いことは合理的であり、内腔細胞の細胞数を効率よく増やす手段であると考えられる。実際、TEB においては内腔細胞の数が基底細胞よりも多い。細胞周期長が過去の文献¹¹⁾よりもやや小さい数値となっている原因として、データ数の不足のほか、EdU と BrdU が体内で同等に速やかに消失するという仮定の再考の余地も挙げられる。EdU 単独陽性細胞数と

BrdU 単独陽性細胞数の比を用いて補正する方法が考えられ、次年度の課題とする。

2) 成果の利用法

平成 31（令和元）年度に構築した TEB モデルは、細胞ひとつひとつに増殖、移動、分化、死に関する定数を与え、実際の乳腺幹細胞系（TEB）の細胞数、増殖率、形態、伸長速度を再現したモデルである。放射線照射直後の細胞死の誘導については、前項で説明したダメージ修復モデルで記述する。このほかに、放射線照射後の中長期の細胞動態に現れる影響については、今回得られた検討課題を解決した後に、求める細胞周期長の変化に関する定数を使って、モデル化する。

2. 放射線誘発乳がんの起源細胞の推定

平成 31（令和元）年度の検討により、移植実験において GFP が外来抗原として移植組織の拒絶の原因となり得ることが確認された。そこで GFP を発現する系統をレシピエントとし、GFP を発現する LEW 系統の乳腺細胞及び GFP を発現しない LEW 系統の乳腺細胞を用いてモザイク組織を作製するのが適切であると考えられた。乳がん発生の可能性を高めるために、レシピエントには乳がん高感受性系統である Jcl:SD 系統と GFP ラットの F1 ラットを用いることとした。

引き続き令和 2 年度は、実際にこのレシピエントを用意して、移植によりモザイク組織を作製し、放射線照射による発がん刺激を与えて、長期飼育を開始した。照射時のタイミングで解剖した個体では、免疫的な拒絶の証拠は確認されず、GFP 細胞と野生型細胞のモザイクからなる乳腺組織が観察され、予定した実験系が成立していることが確認できた。

今後は、照射した個体において、移植部位以外に発生した腫瘍を摘出しつつ、移植部位の腫瘍における GFP 細胞と野生型細胞のモザイク性を解析する予定である。基底細胞と内腔細胞のどちらにおいてモザイク性が保持され、どちらにおいてそれが失われているかを判断することで、腫瘍の起源の推定を行う。

3. 放射線照射後の細胞競合の解明

平成 31（令和元）年度は GFP 細胞と RFP 細胞の計測法を検討した。引き続き令和 2 年度は、ラットの照射及び細胞移植を行い、細胞競合を示すための実験群の設定を完了した。照射から移植までには 3 ヶ月の期間において、細胞競合が生じることを期待した。ここで期間を 3 ヶ月とした理由は 2 つある。1 つは、11 週齢から 3 ヶ月後（すなわち 23 週齢）は、過去の実験⁹⁾の高線量率照射群で発がんが見られ始める時期であり、両線量率群の間で発がんを起こしうる細胞の数にすでに違いが生じていると考えられる時期であることによる。もう 1 つは、主任研究者らが以前行った実験¹⁰⁾において、ラット乳腺内の増殖細胞を標識して追跡すると 10 週間程度で大部分が排出されたことから、この程度の期間をおくことで組織内の細胞が入れ替わると予想されることによる。

今後は、移植から 3 ヶ月後に移植した細胞から形成された乳腺組織を摘出し、GFP 細胞数と RFP 細胞数の比率を計測する。非照射群、高線量率照射群、低線量率照射群の比較を行って、図 III-6 の概念図において予想される結果が得られるかどうかを評価する。

4. 数理モデル解析で考察すべき線量率について

図 IV-1 は、福島第一原発事故を始め、様々な疫学やラット乳がん実験に関する線量・線量率をまとめたものである。この図を元に、乳がん実験の線量率から原発事故に関わる線量率までをカバーする解析を行うべきと考えられる。

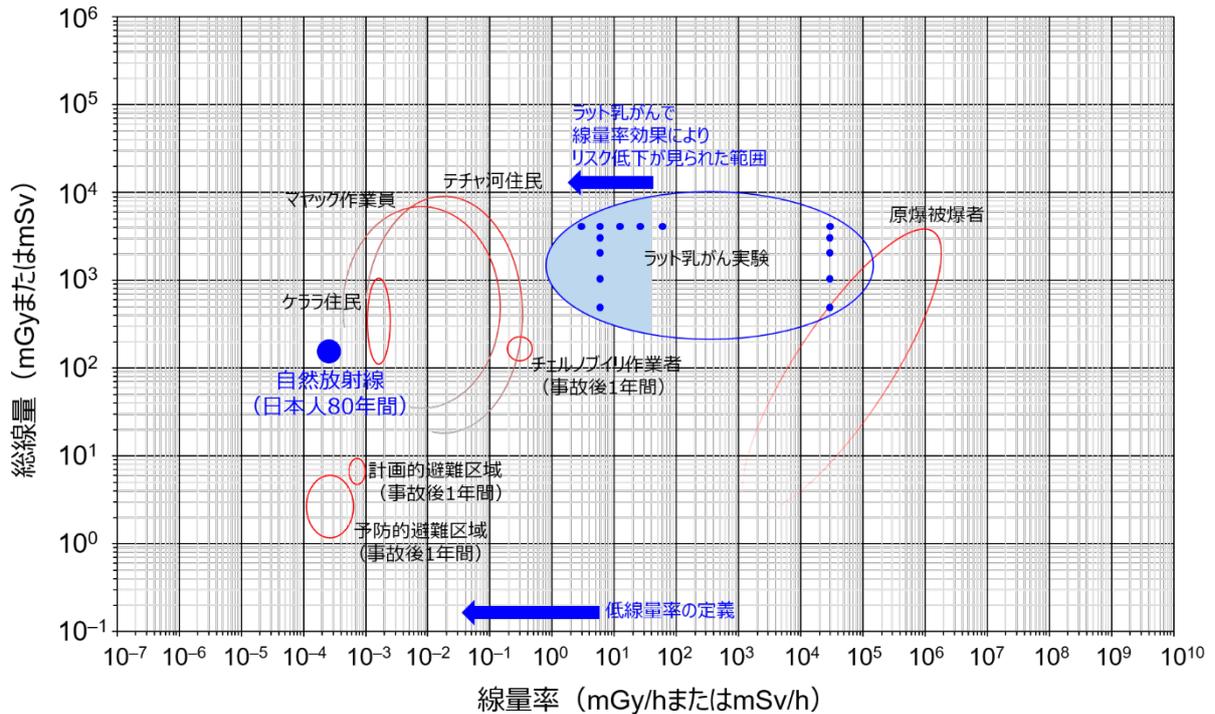


図 IV-1 様々な線量率と線量。自然放射線と福島第一原発事故由来の線量については文献^{4,12)}、ケララ住民については文献¹³⁾、その他は文献¹⁴⁾を参照した。

V. 結論

ラット乳腺において放射線による細胞動態変化から発がんまでを記述する数理モデルの構築に必要な幹細胞動態の情報として、乳腺における基底細胞と内腔細胞の DNA 二重鎖切断修復及び細胞周期の動態データを得た。また、次年度以降に解析するための、乳がん起源細胞を解明する実験及び細胞競合を評価する実験の設定を完了した。これらは、数理モデルの構築を通して、ラットの乳腺における発がんの線量率効果のメカニズムを解明することに寄与する成果である。

VI. 次年度以降の計画

令和2年度の計画は順調に進行し、計画書に示したマイルストーンを達成した。これを受けて、最終年度となる令和3年度も計画通りに実施する。すなわち、乳腺幹細胞系の動態のデータをさらに追加するとともに、がんの起源細胞、細胞競合の実験的エビデンスを確定するとともに、実験で得られた知見を取り入れたシミュレーションを行って、線量率効果が発生する要因を推定す

る。また、若手研究者の成長に資するために、研究内容の論文化を行う。さらには、環境行政への貢献に資するため、研究内容を大学等の講義に活用して、放射線影響の理解の普及に努める。

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) Kudo KI, Takabatake M, Nagata K, Nishimura Y, Daino K, Iizuka D, Nishimura M, Suzuki K, Kakinuma S, Imaoka T. Flow Cytometry Definition of Rat Mammary Epithelial Cell Populations and Their Distinct Radiation Responses, *Radiat Res* 2020; 194: 22-37.

イ) 学会発表等

- 1) 工藤健一,高島賢,西村由希子,臺野和広,飯塚大輔,西村まゆみ,鈴木啓司,柿沼志津子,今岡達彦. Distinct difference of radiation response between luminal and basal cells in rat mammary glands. 第 19 回日本再生医療学会総会, 2020 年 5 月, オンライン (国内), ポスター発表.
- 2) Kudo KI, Takabatake M, Nishimura Y, Daino K, Nishimura M, Iizuka D, Kakinuma S, Imaoka T. Distinct difference of radiation response between luminal and basal cells in rat mammary glands. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 2020 Virtual Annual Meeting, 2020 年 6 月, オンライン (海外), ポスター発表.
- 3) Imaoka T, Kudo KI, Suzuki K, Nishimura M, Daino K, Kakinuma S. Effect of radiation on the balance of normal epithelial cell populations in the rat model of mammary carcinogenesis. 第 79 回日本癌学会学術総会, 2020 年 10 月, オンライン (国内), 口頭発表
- 4) Kudo KI, Nishimura Y, Suzuki K, Nagata K, Nishimura M, Daino K, Kakinuma S, Imaoka T. Imbalance between cell populations in normal mammary epithelium after radiation exposure in a rat model of breast cancer. 日本放射線影響学会第 63 回大会, 2020 年 10 月, オンライン (国内), ポスター発表.
- 5) Nagata K, Nishimura Y, Hattori Y, Watanabe R, Suzuki K, Kakinuma S, Imaoka T. Dynamics of DNA double-strand break repair in progenitor and mature cells of the rat mammary gland. 日本放射線影響学会第 63 回大会, 2020 年 10 月, オンライン (国内), ポスター発表
- 6) Kudo KI, Takabatake M, Nagata K, Nishimura Y, Daino K, Nishimura M, Iizuka D, Suzuki K, Kakinuma S, Imaoka T. Distinct Difference of radiation response between luminal and basal cells in rat mammary glands. 日本放射線影響学会第 63 回大会, 2020 年 10 月, オンライン (国内), ポスター発表.

ウ) 書籍・総説

該当なし。

エ) 受賞

該当なし。

オ) 特許
該当なし。

カ) 環境行政への活用・貢献実績
該当なし。

VIII. 引用文献

- 1) 世界保健機関（World Health Organization）. Health risk assessment from the nuclear accident after the 2011 Great East Japan earthquake and tsunami, based on a preliminary dose estimation, WHO Press, Geneva, 2013.
- 2) 原子放射線の影響に関する国際連合科学委員会（United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation）. Sources, effects and risks of ionizing radiation, UNSCEAR 2013 Report to the General Assembly with Scientific Annexes, United Nations, New York, 2014.
- 3) 国際原子力機関（International Atomic Energy Agency）. The Fukushima Daiichi Accident. Technical Volume 4/5, Radiological Consequences, IAEA, Vienna, 2015.
- 4) 経済協力開発機構・原子力機関（Organization for Economic Co-operation and Development, Nuclear Energy Agency）. 2019 NEA Annual Report. OECD/NEA Publishing, Paris, 2019.
- 5) 米国放射線防護測定審議会（National Council on Radiation Protection and Measurements）. Approaches for Integrating Information from Radiation Biology and Epidemiology to Enhance Low-Dose Health Risk Assessment. National Council on Radiation Protection and Measurements, Bethesda, 2020.
- 6) Imaoka T, Nishimura M, Daino K, Hosoki A, Takabatake M, Nishimura Y, Kokubo T, Morioka T, Doi K, Shimada Y, Kakinuma S. Prominent dose-rate effect and its age dependence of rat mammary carcinogenesis induced by continuous gamma-ray exposure. *Radiat Res* 2019; 191: 245–254.
- 7) 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構. 「平成 30 年度文部科学省国家課題対応型研究開発推進事業英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業 幹細胞のキネテイクスから発がんの線量率効果を紐解く 成果報告書」, 2019.
- 8) Martynoga B, Morrison H, Price DJ, Mason JO. Foxg1 is required for specification of ventral telencephalon and region-specific regulation of dorsal telencephalic precursor proliferation and apoptosis. *Dev Biol* 2005; 283: 113–127.
- 9) Kisseberth WC, Sandgren EP. Polyclonal development of mouse mammary preneoplastic nodules. *Cancer Res* 2004; 64: 857–863.
- 10) Imaoka T, Hisatsune H, Sakanishi Y, Nishimura Y, Nishimura M, Shimada Y. Progesterone stimulates proliferation of a long-lived epithelial cell population in rat mammary gland. *J Endocrinol Invest* 2012; 35: 828–834.
- 11) Russo J, Russo IH. Influence of differentiation and cell kinetics on the susceptibility of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Cancer Res* 1980; 40: 2677–2687.

- 12) 環境省. 「放射線による健康影響等に関する統一的な基礎資料（令和元年度版）」, 2019.
- 13) 量子科学技術研究開発機構. 「放射線リスク・防護研究基盤準備委員会報告書」, 2017.
(<https://www.qst.go.jp/uploaded/attachment/2910.pdf>)
- 14) Rühm W, Azizova T, Bouffler S, Cullings HM, Grosche B, Little MP, Shore RS, Walsh L, Woloschak GE. Typical doses and dose rates in studies pertinent to radiation risk inference at low doses and low dose rates. *J Radiat Res* 2018; 59: ii1–ii10.

Deciphering the mechanism underlying the dose rate effect of radiation carcinogenesis using animal and mathematical models

Tatsuhiko Imaoka¹, Yuya Hattori²

¹ *National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology*

² *Tokyo Institute of Technology*

Key word: radiation carcinogenesis, low dose rate radiation, dose rate effect, animal model, mathematical model, stem cell

Abstract

The persisting health concerns after the TEPCO Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident result from the temporal increase in the environmental radiation dose rate. There have been only insufficient insights from human studies into the dose rate effect of radiation-associated cancer risk (i.e., whether or not the effect at low dose rates is reduced from that of high dose rates as in the atomic bomb survivor study). On the other hand, the dose rate effect has been eminent in animal carcinogenesis experiments. The purpose of this project is to elucidate the mechanism underlying the dose rate effect of breast cancer risk in rat experiments. The goal is to address the issue of risk assessment of low-dose-rate radiation and to produce information as a potential countermeasure for health anxiety. To this end, this project conducts joint biological and mathematical researches to obtain new experimental data, quantitatively interpret them and elucidate the mechanism underlying the dose rate effect. In the first year of 2019, the inactivating effect of radiation for individual breast cell type was investigated, the experimental details for the following years were determined, and a mathematical model simulating the breast was constructed. In this second year of 2020, we clarified the damage repair and cell cycle changes in the breast after radiation exposure, and acquired related parameters necessary for mathematical modeling. We have also completed the setup of an experiment to elucidate the cell type from which radiation-induced breast carcinogenesis originates and another experiment to elucidate a process called cell competition in which radiation-affected cells are removed from the tissue. We also constructed a mathematical model that describes the relationship between radiation-induced cell inactivation and dose rate, and another model that describes the process of carcinogenesis, and analyzed their behavior. As a result, we clarified the conditions under which the dose rate effect appears. Since all of the results were as planned, in the final year of 2021, we will continue to acquire tissue dynamics data, completed estimation of the cellular origin of radiogenic cancer and evaluation of cell competition, and identify the mechanism of the dose rate effect on the finalized mathematical model. We will further use the research information for lectures of universities to facilitate understanding on radiation health effects.

動物モデルと数理モデルを用いた

放射線発がん線量率効果が生じるメカニズムの解明

幹細胞動態数理モデルの構築

服部佑哉（国立大学法人東京工業大学・助教）

研究要旨

低線量率放射線によるがんリスク評価のためには、生物学的メカニズムの知見に基づいてモデル化することで数理的に評価するアプローチが必要である。本研究では、幹細胞の動態を元に発がんを記述する数理モデルを構築し、実験的知見を加味して、線量率効果を説明する要因を示すことを目的とする。発がん過程のモデル化の対象には、発がんの線量率効果が明確なラット乳がんモデルを使用する。初年度である平成 31 年度（令和元年度）は、数理モデルに必要なパラメータの推定に資するラット乳腺の幹細胞動態データの一部を実験によって取得した。数理モデルについては、1 細胞の状態変化追跡の仕様を満たすモデルとするために、乳腺と対象とした組織モデルの拡張と、発がん過程モデルと線量率モデルの構築を実施した。令和 2 年度は、ラットの乳腺における損傷修復動態、細胞周期の変化を評価し、数理モデルに反映させた。これにより、放射線による細胞死と線量率の関係を記述する数理モデル、発がんの過程を記述する数理モデルにエビデンスを追加することができた。さらに、数理モデルの線量率依存性の挙動を解析し、条件検討を行った結果、低線量率でがんリスクが低くなる線量率効果を説明し得ることが示せた。最終年度である令和 3 年度は、数理モデルを用いて発がんの線量率効果のメカニズムの特定を目指す。

キーワード：末梢芽状突起、数理モデル、線量率効果、発がん、幹細胞

研究協力者

渡辺立子（量子科学技術研究開発機構・上席研究員）、
横谷明徳（量子科学技術研究開発機構・統括グループリーダー）

I. 研究目的

低線量率被ばくのがんリスクが高線量率のリスクより低いかどうかは、放射線リスク評価を大きく左右する。現状では低線量率被ばくの疫学データの精度が高くないことから、低線量率放射線によるがんリスク評価には、作用機序の生物学的メカニズムの知見に基づいてモデル化することで数理的に評価するアプローチが必要である。

我々は、これまでの研究でラット乳腺の細胞動態を解析するために、プロトタイプモデルを構築してきた。本研究の目的は、ラットの乳腺を対象として、数理モデルの構築と実験データの解

析を行うことで、線量率効果の因子を明らかにすることである。

ラット乳腺の幹細胞系（末梢芽状突起、TEB）の細胞動態数理モデルのプロトタイプ（状態遷移モデル）を作成した実績の上、初年度である平成 31 年度（令和元年度）は、このプロトタイプのモデルを、空間構造を持つモデルや発がんの過程を表現する数理モデルに関連づけること、主任研究者の実験で得られた情報を取り込むことによって精緻化し、モデルを構成する様々な要素のうち線量率効果を説明するために重要なものを見つけ出すことを目的とした。本研究が考える解析・予測モデルは、TEB モデル、ダメージ修復モデル、発がん過程モデル、線量率モデルの 4 つのモデルから構成される。昨年度は、数理モデルについては、TEB モデルの拡張と、発がん過程モデルと線量率モデルの構築を実施した。これにより、解析に必要な 1 細胞の状態変化追跡の仕様を満たすモデルが構築できた。そこで、本年度は、本数理モデルの主軸となる、放射線による幹細胞系の細胞死と回復を記述するモデル（ダメージ修復モデル）と、発がんの過程を記述するモデル（発がん過程モデル）に実験的エビデンスを追加することによって発展させ、その挙動を解析して、線量率が低いときにがんリスクが低くなる線量率効果があらわれる条件を具体的に検討する。

II. 研究方法

本年度は、昨年度までに構築した TEB における発がん過程を記述する数理モデルについて、パラメータの決定と挙動解析を実施した。図 II-1 には、モデルの概要を示す。

1. ダメージ修復モデルのパラメータ値の決定と挙動解析

① 修復率の推定

図 II-1 で示した放射線発がん過程の一連のモデルのうち、まず、細胞の増殖・分化・細胞死に関するパラメータ値を決定した。TEB を構成する個々の細胞の状態は、ダメージ修復モデルによって決定される。ダメージ修復モデルは、細胞における放射線により生じるダメージの蓄積レベルと修復過程・細胞死を計算するモデルである。このモデルでは、細胞の運命を決定づけるダメージは、その実態を限定しなくても成立するように汎用性をもたせてデザインした。しかし、本研究プロジェクトでは、ダメージの実態として DNA 二重鎖切断マーカーで検出できる DNA 二本鎖切断を想定し、ラットの TEB 細胞実験データから損傷の修復率を決定することとした。

② 線量率による生存率への影響解析

上記の DNA 損傷の修復動態の実験データを用いて決定した、ダメージ修復モデルの修復率等のパラメータを用いて線量率を変えて細胞生存率を計算し、ダメージ修復モデルの細胞生存率の線量率依存性を解析した。

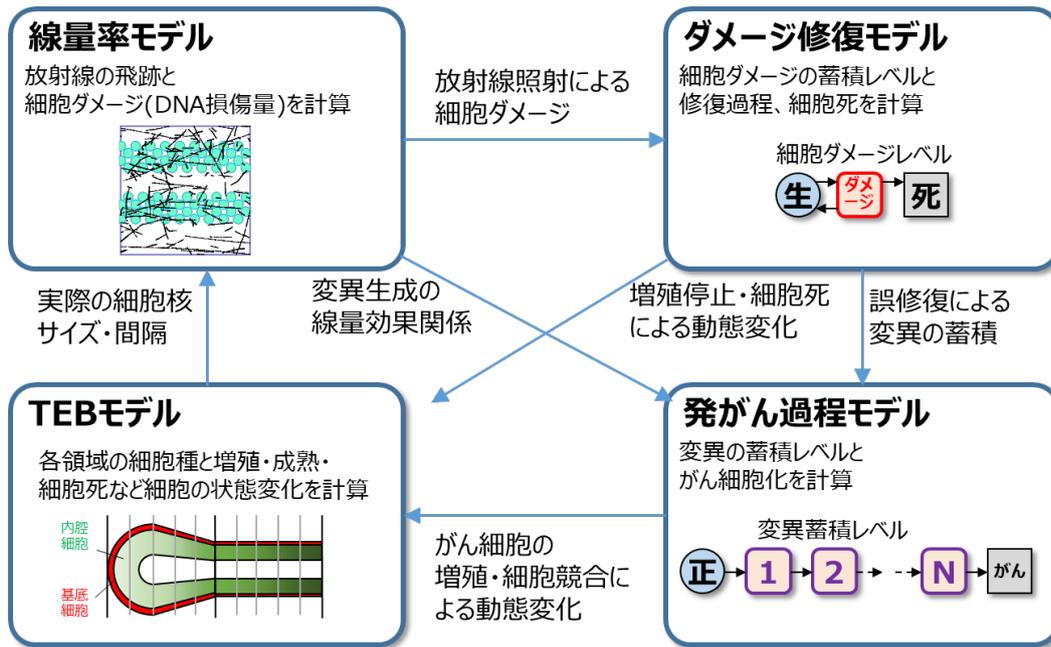


図 II-1 構築した TEB における発がん過程を記述する数理モデルの構成

2. 発がん過程モデルのパラメータ値の決定と挙動解析

① 発がん過程モデルのパラメータ値の決定

主任研究者らによって実施された乳がんデータの解析によって決定したパラメータである変異蓄積の段階数に加え、今年度は細胞の変異の蓄積による発がん過程のモデルを用いて非照射の乳がんの発生率の時間経過の実験データを再現することにより、非照射の細胞における変異率を求めた。

② 発がん過程モデル（単独モデル）による線量率依存性の解析

発がん過程モデルに重要なパラメータである変異率に着目し、放射線照射によって生じる変異率と線量率の関係により、線量率の違いががんリスクに与える影響を解析した。

③ ダメージ修復モデルを取り込んだ発がん過程モデル（複合モデル）の挙動解析

次に、発がん過程モデルにおいてダメージ修復モデルを取り込む複合モデルを作成した。これを用いて、線量依存性の挙動解析を行った。

この複合モデルは、発がん過程の各変異レベルで、独立した生存率モデルを用いて放射線照射による生死の判定を行う。この結果、各段階において一定数の致死が生じる。一方、組織が維持されることを前提に系全体の細胞数は一定であるとしたため、放射線による致死によって減少した分の細胞数は、生細胞が分裂して補充されると仮定した。この仮定の下で、修復率、変異率と線量率の関係、死細胞を補う細胞腫の種類を変数として、②と同様の解析を行った。

（倫理面への配慮）

人を対象とした研究は行わない。動物実験、遺伝子組換え実験は行わない。研究に参加する者は、研究機関が実施する、研究倫理に関する教育訓練を受講する。

III. 研究結果

1. ダメージ修復モデルのパラメータ値の決定と挙動解析

① 修復率の推定

本研究で構築・使用する、細胞の状態を判定するためのダメージ修復モデルの概要を図 III-1 に示す。このモデルは、放射線により生じるダメージの蓄積レベルと修復動態を考慮して細胞生存率を計算することができる¹⁾。

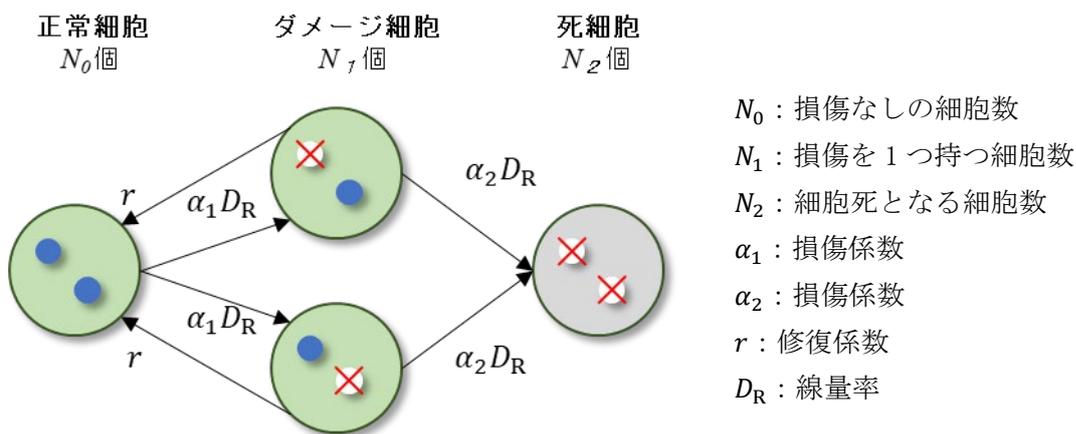


図 III-1 ダメージ修復モデルの概要とパラメータ

正常細胞、ダメージ細胞、死細胞それぞれの細胞数は、上図に示したパラメータを用いて下記のような微分方程式で表すことができる。

$$\frac{dN_0(t)}{dt} = -2\alpha_1 D_R N_0(t) + 2r N_1(t)$$

$$\frac{dN_1(t)}{dt} = 2\alpha_1 D_R N_0(t) - (2\alpha_2 D_R + 2r) N_1(t)$$

$$\frac{dN_2(t)}{dt} = 2\alpha_2 D_R N_1(t)$$

また、時間 t における細胞生存率 $S(t)$ は、上記の各状態の細胞数から、下記の式で求めることがで

きる。

$$S(t) = \frac{N_0(t) + N_1(t)}{N_0(t) + N_1(t) + N_2(t)}$$

モデルのパラメータのうち、損傷係数と修復率を決定する必要がある。まず、損傷係数、 α_1 、 α_2 は、主任研究者らのグループが取得した高線量域（0.5 Gy/min）での生存率曲線¹⁾を再現する条件により決定した。さらに、主任研究者らのグループが取得した、ラット乳腺における 53BP1 の免疫染色による foci の係数による DNA 二本鎖切断収率の修復動態の結果をもとに、修復率 r を決定した。具体的には、内腔前駆細胞 DNA 損傷修復動態のデータ（本報告書研究項目 I の研究結果：図 III-2-D 参照）に対して、この修復動態は、早い修復と遅い修復の二成分から成ると仮定し、さらに、細胞の致死にかかわる重篤な損傷に対応するのが遅い修復という仮定のもとに、遅い成分への近似式： $y = Ae^{-rt}$ により、修復率 r を決定した。図 III-2 には、内腔前駆細胞の修復動態の実験データと遅い修復成分への近似曲線を示した。この解析の結果、得られたパラメータの値は、 $\alpha_1 = 0.3846$ (1/Gy)、 $\alpha_2 = 0.1923$ (1/Gy)、 $r = 0.001302$ (1/min)となった。

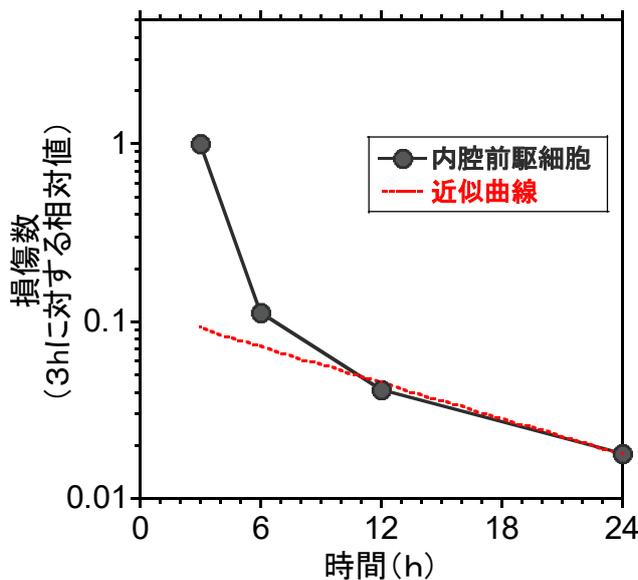


図 III-2 内腔前駆細胞の修復動態の実験データと近似曲線

② 線量率による生存率への影響解析

次に、上記のように決定したパラメータを用いて、線量率のみを変えて生存率を計算した結果を、図 III-3 に示す。計算条件は、累積線量が 0~4 Gy のときの、高線量率（0.5 Gy/min）、低線量率 1（0.01 Gy/min）、低線量率 2（0.001 Gy/min）とした。

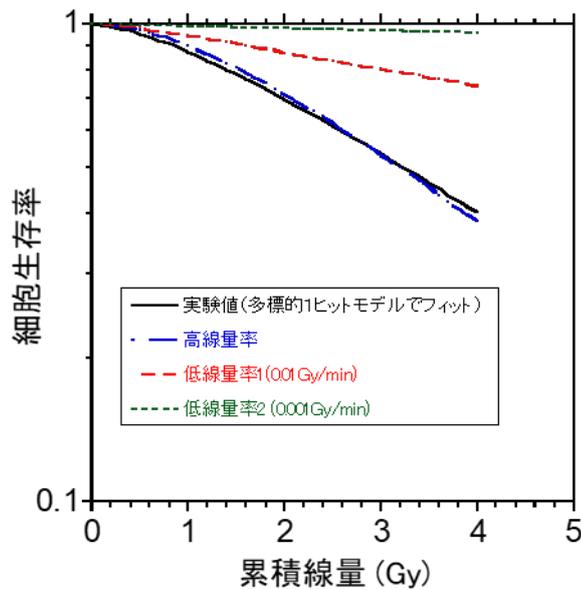


図 III-3 ダメージ修復モデルを用いて計算した細胞生存率の線量率依存性
 計算に用いたパラメータの値は、 $\alpha_1 = 0.3846$, $\alpha_2 = 0.1923$, $r = 0.001302$
 図中の多標的 1 ヒットモデルは、実験データ¹⁾への回帰曲線に相当

この結果、主任研究者らの実験値である高線量率（0.5 Gy/min）の生存率データ¹⁾をよく再現した多標的 1 ヒットモデル（黒実線）と同程度の再現性を得られた。さらに、線量・線量率が低くなるほど生存率が高くなるという挙動を示した。以上から、本研究で構築したダメージ修復モデルは実験値を表現できており、さらに線量率の影響を反映していることを示すことができた。

2. 発がん過程モデルのパラメータ値の決定と挙動解析

発がん過程モデルの概要とパラメータを図 III-4 に示す。発がん過程は、正常細胞に、誤修復による変異イベントが起きて、変異レベルの状態が段階的に蓄積状態に変化し、最終的にがん化の状態を示す、いわゆる多段階変異モデル（Armitage-Doll モデル）²⁾で記述した。

本プロジェクトの研究対象であるラットの乳がんの発がんに至るまでの変異蓄積の段階数は、昨年度、ラット乳がんの罹患率のデータ³⁾を、この発がん過程モデルにより解析した結果、約 3 段階であると決定されている。

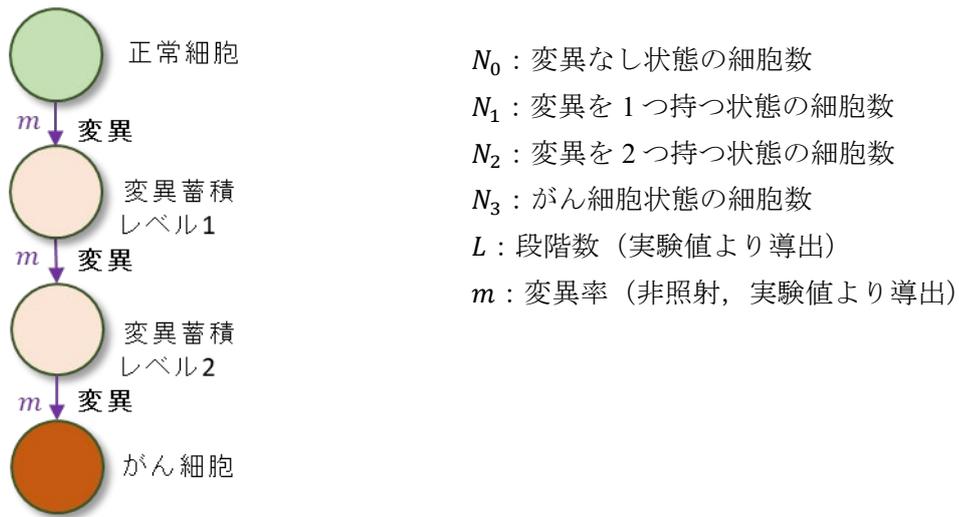


図 III-4 発がん過程モデルの概要

図 III-4 で示した各変異レベルの状態の細胞数は、下記のような微分方程式で表すことができる。

$$\begin{aligned} \frac{dN_0(t)}{dt} &= 0 \\ \frac{dN_1(t)}{dt} &= mN_0(t) - mN_1(t) \\ \frac{dN_2(t)}{dt} &= mN_1(t) - mN_2(t) \\ \frac{dN_3(t)}{dt} &= mN_2(t) \end{aligned}$$

また、時間 t におけるがん細胞数の割合 $S(t)$ は、上記の各変異レベルの状態の細胞数から、下記の式で求めることができる。

$$S(t) = \frac{N_3(t)}{N_0(t) + N_1(t) + N_2(t) + N_3(t)}$$

① パラメータ値の決定

先に述べたように、がんに至るまでの変異蓄積の段階数 $L \sim 3$ は、昨年度に実施された解析によって決定済みである。今年度は、図 III-5 に示すように、発がん過程のモデルを用いて、さらに高い精度で非照射の乳がんの実験データを再現することにより、非照射の細胞における変異率を、 $m_0 = 9.92 \times 10^{-7}$ と決定した。

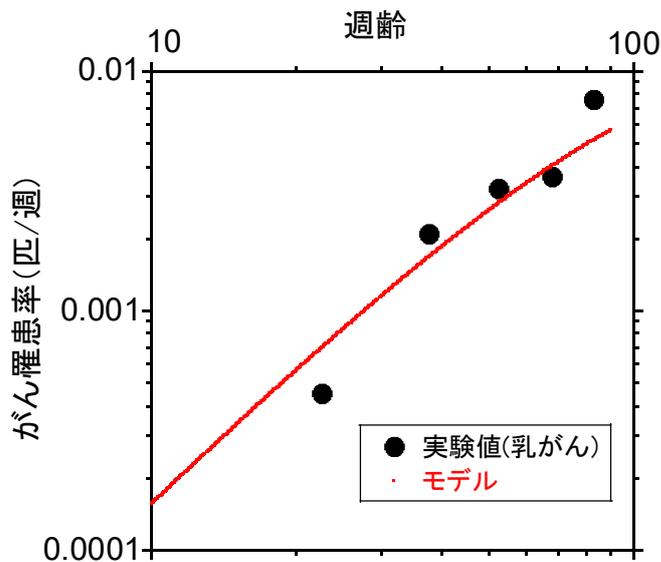


図 III-5 非照射細胞の乳がん罹患率データ³⁾と発がん過程モデル

② 発がん過程モデル（単独）による線量率依存性の解析

まず、図 III-4 に示した、発がん過程モデルを単独で用いて、変異率を変数とする解析を行った。具体的には、放射線照射によって生じる変異率が、線量率に対してどのような関係で増加するかに着目して、線量率の違いががんリスクに与える影響を解析した。このために、放射線照射による変異率 m を、次のように、線量率 D_R に対する二次関数であらわした。

$$m = m_2 D_R^2 + m_1 D_R + m_0$$

$$m_0 = 9.92 \times 10^{-7}$$

上の式において、線量率 D_R の一次の項、二次の項、それぞれの係数であるパラメータ m_1 と m_2 について、それぞれ0~0.5の間の0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5の5点の数値を選んで、25通りの組み合わせを作り、それぞれの条件下で、がんリスクに対する線量率の影響の現れ方を調べた。

図 III-6 には、この25通りの組み合わせの中で代表的な変異率の線量に対する関係式、累積線量に対するがんリスクの相対値を、線量率を変えて計算した結果を示す。

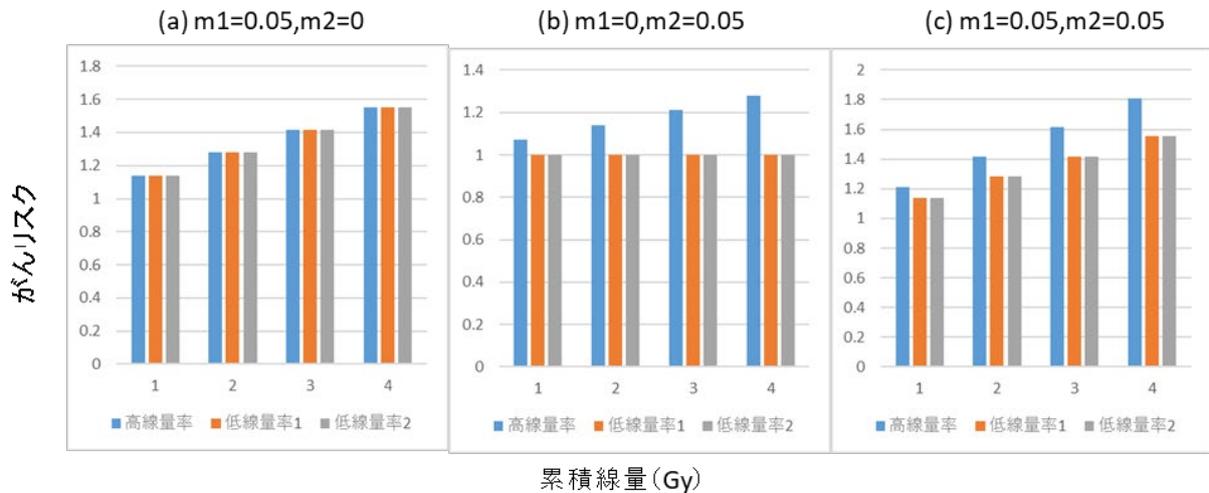


図 III-6 発がん過程モデル単独による線量率依存性の解析

■ 高線量率(0.5 Gy/min) ■ 低線量率1 (0.01 Gy/min) ■ 低線量率2 (0.001 Gy/min)

図 III-6 の3つのグラフは、それぞれ、変異率が線量率に対して、(a)線形、(b)二次、(c)線形二次の関係で増加する場合に対応している。図からわかるように、(a)の線形の関係式の場合には、いずれの線量率の場合も、がんリスクは累積線量とともに増加するのみで線量率による違いが全くみられなかった。(b)の二次式の場合には、高線量のがんリスクが高く、低線量率では累積線量の増加に対してもがんリスクは増加しないという結果になった。(c)の場合には、高線量でがんリスクは高くなるが、低線量でも累積線量とともにがんリスクは増加するという結果を示した。この結果から、変異率と線量率の関係が、線量率効果の現れ方に大きく影響する重要な因子であることがわかった。

③ ダメージ修復モデルを取り込んだ発がん過程モデル（複合）の挙動解析

次に、発がん過程モデルにおいてダメージ修復モデルを取り込んだ複合モデルを作成した。この複合モデルは、発がん過程の各変異レベル内に、独立した生存率モデルを抱合したものになり、各変異レベルの細胞の放射線照射によるダメージのレベルと生死の判定を行うことができる。これにより、放射線照射に伴う各変異段階における致死細胞の数を計算することができる。一方、組織が維持されることを前提に系全体の細胞数は一定であるとしたため、放射線による致死によって減少した分の細胞数は補充されなければならない。そこで、生細胞が分裂して補充されると仮定した。この仮定の下で、②と同様の変異率と線量率の関係の条件を変え、さらに、放射線による致死によって減少した分の細胞数を補う細胞の種類によって、次の3つのパターンに分けた。

- 1) 致死細胞が正常細胞によって補われると仮定した場合（図III-7）
- 2) 致死細胞が同じ変異段階の細胞によって補われると仮定した場合（図III-8）

3) 致死細胞が、一段階変異の進んだ細胞によって補われると仮定した場合 (図III-9)

1)~3)のそれぞれのモデルの概要と、解析の結果を、図III-7~9 に示した。モデル概要の図の中の緑の線は、死細胞に対する補充の経路を示した。補充細胞の種類が異なる3つのモデルの計算結果のいずれも、(a)のグラフは、 $m_1=0, m_2=0$ の条件であり、細胞の変異率 $m=m_0$ という条件を示している。この場合、放射線による変異は起こらず、細胞死のみ起こるので、その分の生細胞による補充によって、線量率効果が現れるということになる。なお、現時点では、ダメージ修復モデルで考えるヒット数や損傷数は細胞死の決定に使われるが、細胞の変異率には関係しないとしている。他は、変異率と線量率の関係が、(b)は線形 (c)は二次、(d)は線形二次である。

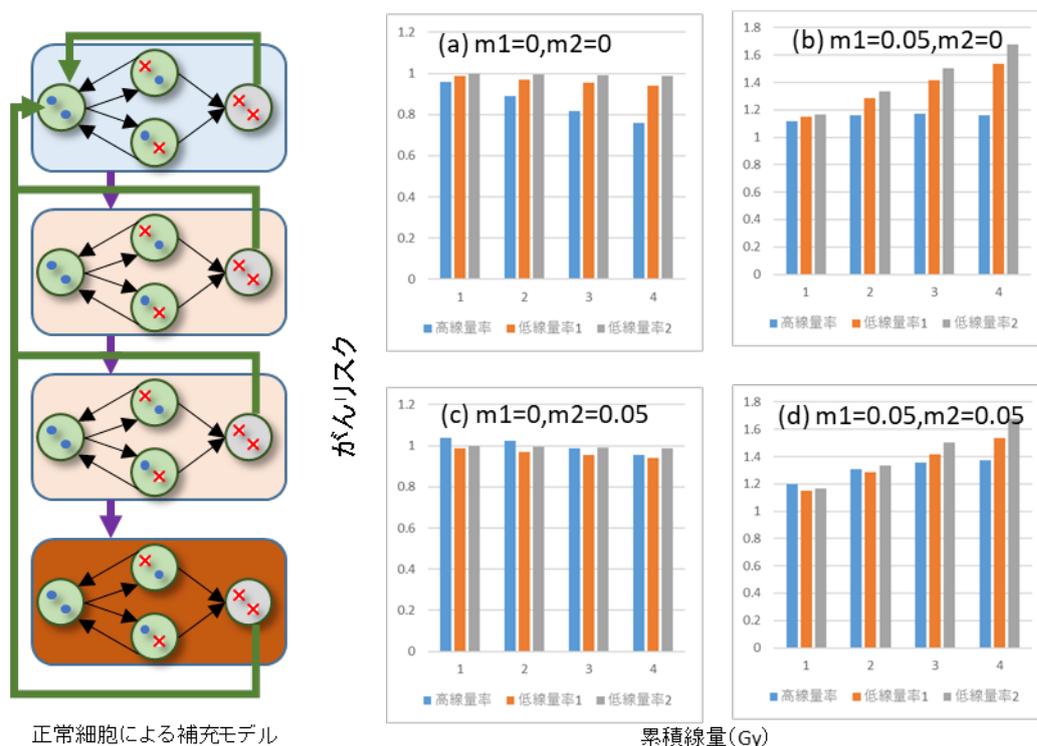


図 III-7 致死細胞が正常細胞に補われる場合の線量率依存性の解析

■ 高線量率(0.5 Gy/min) ■ 低線量率 1 (0.01 Gy/min) ■ 低線量率 2 (0.001 Gy/min)

1)の場合 (図III-7) には、(a)の照射による変異がない場合も、(c)の場合も、高線量率照射ではがんリスクの低下がみられた。これは、細胞死が増えるほど、組織内は正常な細胞が増殖するためである。(b)(d)の場合、低線量率は線量とともにリスクは増加し、高線量率は増加後に減少した。この結果から、致死細胞が正常細胞に置き換わるモデルでは、照射による細胞死よりも、照射による変異が早い条件を設定しない限り、線量率効果はあらわれないことがわかった。

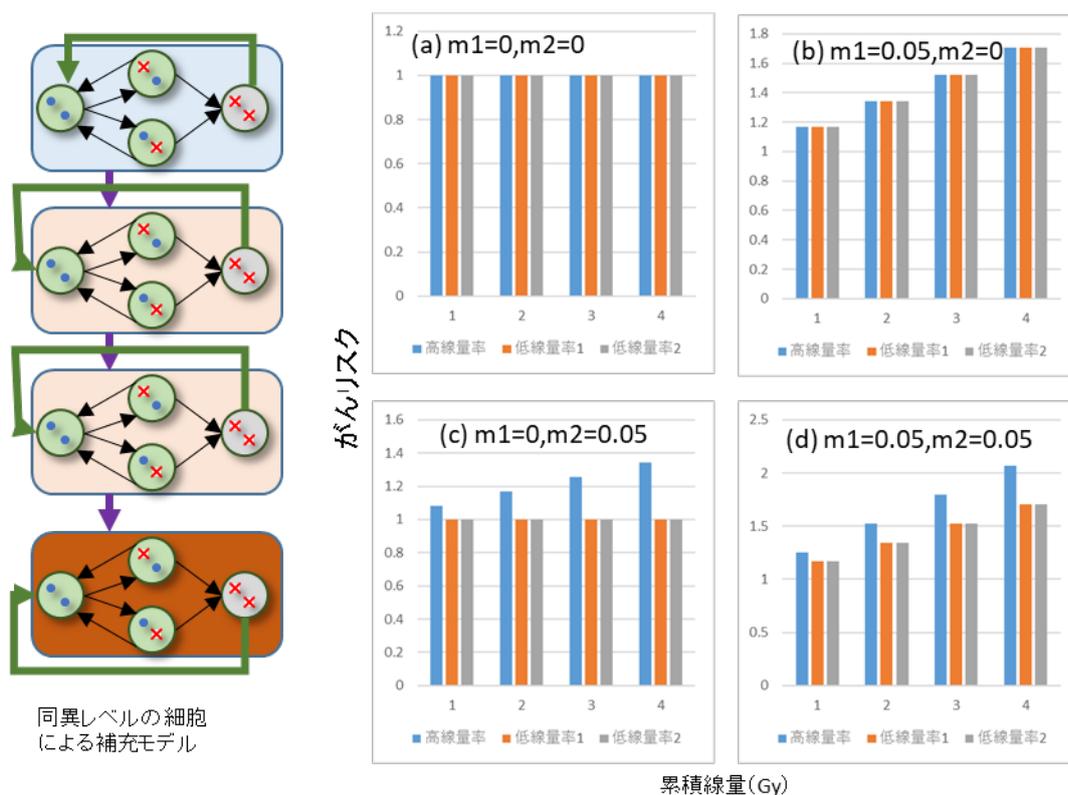


図 III-8 致死細胞が同変異レベルの細胞に補われる場合の線量率依存性の解析

■ 高線量率(0.5 Gy/min) ■ 低線量率1 (0.01 Gy/min) ■ 低線量率2 (0.001 Gy/min)

2)の場合(図III-8)には、(a)の照射による変異がない場合は、すべての線量率でがんリスクは変化しなかった。このモデルでは、同レベルの細胞内で細胞の補充が行われるだけなので、細胞死が起きて、またもとの状態に戻るといった現象が起きるため、照射による細胞死は変異の進み方に影響を与えない。結果的に、ダメージ修復モデルの効果があられず、②で解析を行った、発がん過程モデルの単独モデルの場合と同じ結果となることがわかった。

最後に、3)の場合(図III-9)には、すべての変異率で、どの線量率でも線量とともにリスクが増加した。致死細胞数は線量率が大きいほど増加するため、線量率が大きいほどがんリスクは大きく増加という線量率効果はみられるが、低線量率のがんリスクも、累積線量に対して増加するという傾向を示すことがわかった。

以上の解析を通して、変異の蓄積に基づく発がん過程モデルでは、変異率と線量率の関係が一次式、あるいは線形二次式であらわされるという仮定の下では、低線量率でがんリスクが低くなる線量率効果を説明するのは難しく、変異率が線量に対して二次式の関係で増加すると考えると、線量率効果が現れ得ることが分かった。さらに、細胞死が起きた場合に、変異の進んだ細胞が増殖して補うと仮定すると、線量率効果が現れることも示された。

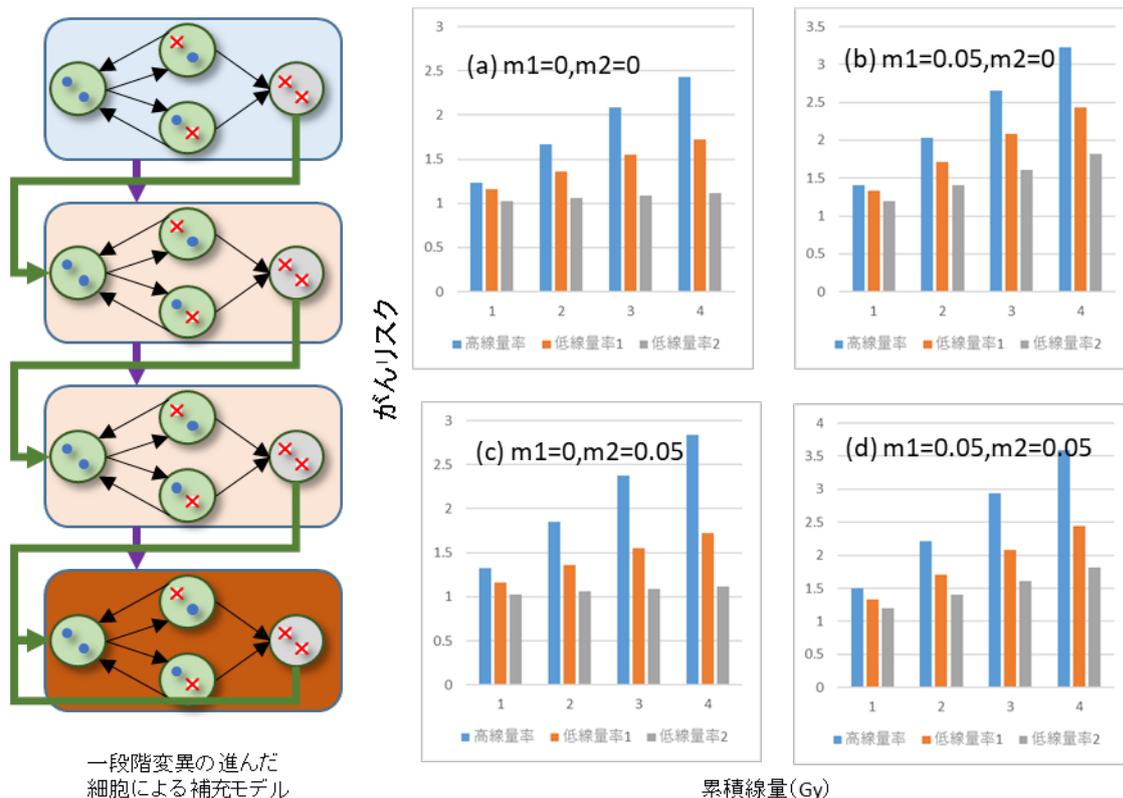


図 III-9 致死細胞が一段階変異が進んだ細胞に補われる場合の線量率依存性の解析

■ 高線量率(0.5 Gy/min) ■ 低線量率 1 (0.01 Gy/min) ■ 低線量率 2 (0.001 Gy/min)

IV. 考察

本分担研究では、ラットの TEB を対象とし、がんリスクの線量率効果の因子を明らかにするために、細胞の照射影響の時間変化を追跡可能な数理モデルを構築する。本年度は、解析・予測の数理モデルを構成する昨年度までに構築した数理モデルについて、主任研究者らのグループによる実験データを反映してパラメータを決定し、これをもとにモデルの挙動解析を行った。この中で、ダメージ修復と変異と細胞死の各々の挙動から、がんリスクに関する線量率効果の条件についての手がかりを得ることができた。特に、変異率と線量率の関係、組織内での細胞動態の重要性が示されたことにより、今後の研究の方向性と発展性が明確になった。次年度は、さらに具体的にラットの TEB における細胞動態を通して発がん過程に対する線量率効果の要因に迫る。

V. 結論

放射線による細胞死と線量率の関係を記述する数理モデル、発がんの過程を記述する数理モデルの基本型を構築した。数理モデルの挙動を解析したところ、低線量率でがんリスクが低くなる条件を整理できた。

VI. 次年度以降の計画

今年度は、実験とモデルとの連携を通して、数理モデルにエビデンスに基づいたパラメータを導入することができた。また、発がん過程と線量率との関係を具体的に検討するための予備計算を行うことができ、本研究の目的に大きく前進することができた。今後、構築・精緻化した数理モデルを用いて、線量率効果への影響が大きいパラメータや状態を調べる。個々のパラメータ値や個々の状態内の細胞数を変えた時の線量率効果を網羅的に解析し、線量率効果に大きく寄与する要因を特定する。そして、LNT モデルに追加すべき要因として提案する。

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

該当なし

イ) 学会発表等

- 1) 渡辺立子、服部佑哉、横谷明德. Simulation of dose-rate effect on DNA damage and cellular responses. 日本放射線影響学会第 63 回大会（オンライン）2020 年 10 月

ウ) 書籍・総説

該当なし

エ) 受賞

該当なし

オ) 特許

該当なし

カ) 環境行政への活用・貢献実績

該当なし

VIII. 引用文献

- 1) Kudo KI, Takabatake M, Nagata K, Nishimura Y, Daino K, Iizuka D, Nishimura M, Suzuki K, Kakinuma S, Imaoka T. Flow Cytometry Definition of Rat Mammary Epithelial Cell Populations and Their Distinct Radiation Responses, *Radiat Res* 2020; 194: 22–37.
- 2) Armitage P, Doll R. The Age Distribution of Cancer and a Multi-stage Theory of Carcinogenesis. *Br J Cancer* 1954; 8: 1–12.
- 3) Imaoka T, Nishimura M, Daino K, Hosoki A, Takabatake M, Kokubo T, Doi K, Showler K, Nishimura Y, Moriyama H, Morioka T, Shimada Y, Kakinuma S. Age Modifies the Effect of 2-MeV Fast Neutrons on Rat Mammary Carcinogenesis. *Radiat Res* 2017; 188: 419–425.

Deciphering the mechanism underlying the dose rate effect of radiation carcinogenesis using animal and mathematical models.

Development of a stem cell dynamics model

Yuya Hattori

Tokyo Institute of Technology

Key words: terminal end bud, mathematical model, dose rate effect, carcinogenesis, stem cell

Abstract

A mechanism-based approach is needed to clarify whether the cancer risk of low dose rate exposure is lower than the risk of high dose rate exposure. The purpose of this study is to elucidate the factors contributing to the dose rate effect by using a mathematical model. We have previously built a prototype of a mathematical model describing the dynamics of the rat mammary gland structure containing the stem cells (i.e., terminal end bud; TEB). In this project, we developed the model to deal with the carcinogenesis process of rat mammary gland. Our analytical and prediction models to be constructed consist of four models: a TEB model, a damage repair model, a carcinogenic process model, and a dose rate model. In the first year of the project, the TEB model was refined to include the spatial structure based on the observed data. Also, the carcinogenesis process model and the dose rate model were constructed. For each model, the single-cell state-change tracking was made available. In this year, we introduced some lines of experimental evidence into the mathematical models. The DNA damage repair kinetics in the mammary gland after irradiation were experimentally clarified and introduced as the parameters of the damage repair model. The mutation probability of carcinogenesis process was determined from the data of rat mammary cancer. Using these mathematical models with the determined parameters, the dose-rate effect on the carcinogenesis was simulated. The simulation showed that the dose-rate effect could be reproduced under some conditions. In the next year, we aim to identify the critical factors in the dose rate effect on the carcinogenesis by using the developed mathematical model.

不溶性セシウム粒子による生物影響の解明に向けた

分野横断的共同研究

主任研究者	鈴木 正敏（東北大学災害科学国際研究所・講師）
分担研究者	二宮 和彦（大阪大学大学院理学研究科・助教）
分担研究者	遠藤 暁（広島大学大学院工学研究科・教授）
分担研究者	山田 裕（量子科学技術研究開発機構 量子医学・医療部門・部長）

研究要旨

東京電力（株）福島第一原子力発電所の事故（福島第一原発事故）によって、水に不溶な粒子状の形態で放射性セシウムが放出（不溶性セシウム粒子）されたことが知られている。福島第一原発事故以前に環境中に放出された放射性微粒子は核燃料断片であるために高い放射能を有し、不溶性セシウム粒子とは生成過程や性状が異なる。本研究課題では不溶性セシウム粒子の性状解析とその結果を取り入れた局所被ばく線量評価、生物影響解析を包括的に実施する分野横断的共同研究を実施し、福島第一原発事故で放出された不溶性セシウム粒子が環境リスクとなるか否かの検討を通じて環境保健行政に資する基礎的な知見を集約する課題である。

土壌から分離した不溶性セシウム粒子の中でも粒径が大きく、高い放射能を有するタイプ B 粒子について性状解析を行い、これまで報告されてきたように二酸化ケイ素を主成分として Cs-137 を含むことに加えて、Sr-90 と Pu-239+240 が Cs-137 に対して 10^{-4} 、 10^{-8} オーダーで含まれていることを明らかにした。被ばく線量評価では肺胞モデルを作成し、肺胞上皮細胞における線量評価体系を確立した。不溶性セシウム粒子の沈着場所周辺では β 線由来の線量率が高くなる領域が生じる。肺全体で平均化する線量評価モデルでは、不溶性セシウム粒子による β 線が到達する高い線量領域では過小評価となり、粒子から離れて放射性セシウムの γ 線の寄与が高くなる領域でも線量率が大きく異なることが確認された。このため、局所被ばくによる線量を肺全体で平均化するモデルによって評価することは困難であることが示唆された。また、タイプ B の不溶性セシウム粒子を用いた細胞影響解析では、特に粒子から離れて β 線の寄与が少ない領域にあるヒト正常細胞に生じる DNA 二重鎖切断数が、短時間・均等照射時に誘発される DNA 二重鎖切断数よりも多くなること、また粒子との共培養時間に依存して DNA 二重鎖切断が蓄積していくことを明らかにした。このように、被ばく線量評価や細胞生物実験結果では、従来知見が蓄積されてきた均等被ばくのモデル・結果から局所被ばくについて単純に推定することは難しく、局所被ばくについて独自の線量評価系の確立や、細胞影響メカニズムを構築することが過大あるいは過小評価のない局所被ばく影響の解明に重要となることが明らかとなった。

また、ラットに非放射性的の不溶性粒子を気管内投与し、肺の組織標本作製して病理診断を行い、低容量の不溶性粒子投与によって明確な組織形態の変化がみられない場合における肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージの免疫組織染色評価法を検討した。

キーワード：不溶性放射性微粒子、局所被ばく影響、微量元素分析、
モンテカルロシミュレーション、被ばく線量評価、病理診断

研究協力者

五十嵐康人（京都大学複合原子力科学研究所・教授）、小嶋光明（大分県立看護科学大学看護学部・准教授）、甲斐倫明（大分県立看護科学大学看護学部・教授）、佐藤志彦（日本原子力研究開発機構廃炉環境国際共同研究センター・研究員）、末木啓介（筑波大学アイソトープ動態研究センター・教授）、福本学（理化学研究所革新知能統合研究センター・客員主幹研究員）、三浦富智（弘前大学被ばく医療総合研究所・教授）、森口祐一（東京大学大学院工学研究科・教授）

I. 研究目的

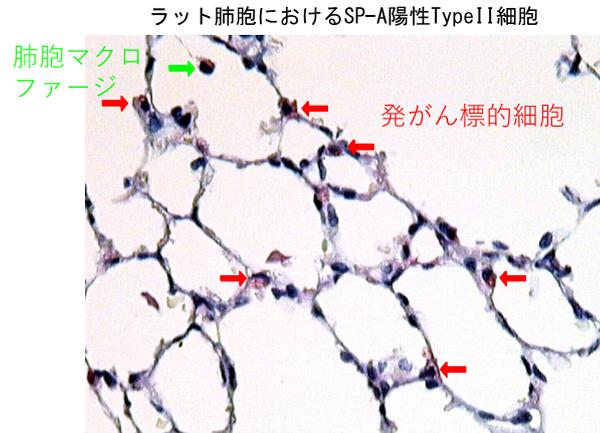
福島第一原発事故では放射性セシウムが複数の形態で環境中に放出されたことが明らかになっている。主要な放出形態である水溶性放射性セシウムについては、過去の原子力災害事故の教訓として環境および体内での分布・動態に関する知見が収集されている¹⁾。他方、水溶性以外の形態として水に不溶な微粒子（不溶性セシウム粒子）として放出された後に、エアロゾルに含まれて関東地方などの広範囲に放散していたことや、福島県内の旧警戒区域の土壤に沈着していることが確認されている^{2,3)}。福島第一原発事故から5年以上が経過した後に採取した土壤からも不溶性セシウム粒子が見つかることから、環境中で比較的安定して存在すると考えられている。福島第一原発事故以前にも核実験やチェルノブイリ原発事故の際に放出された不溶性の放射性微粒子（ホットパーティクル）が環境中で確認されていた。このときに放出された粒子は核燃料断片に由来していたので、生物作用が大きい α 線を含む様々な放射線を放出し、 10^6 Bq オーダーの高い放射能を有する粒子も含まれていた。不溶性粒子は水溶性の形態と比べて体外に排出されにくくなるので、放射性微粒子を体内に吸引摂取すると呼吸気道内、特に肺内に長期間沈着するために局所的で長期の内部被ばく要因となる（表I-1）。

表I-1 吸入された不溶性粒子の体内動態

	大部分	1%未満
呼吸気道から除去される機序	線毛運動クリアランス	肺胞マクロファージにより貪食され長期間滞留（一部溶解）
呼吸気道から除去された後の挙動	嚥下により消化管に入り糞便排泄	マクロファージごとリンパ節を通じて各組織へ移行し長期間滞留（溶解後の核種は血中に入り排泄）
体内滞留時間	短い	長い

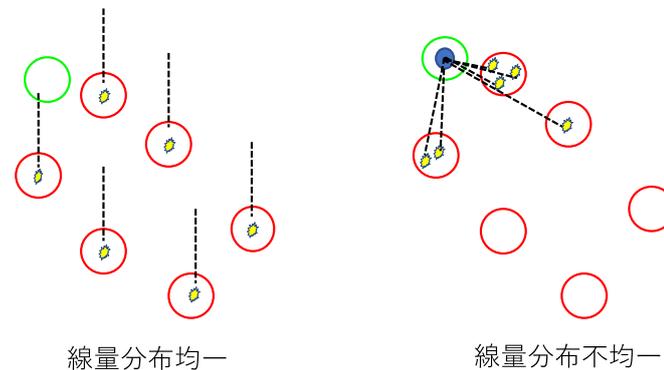
粒子近傍の細胞が持続的に放射線に暴露することによって、ホットパーティクルのように高い

放射能を有する粒子の場合には急性障害やがんなどの晩発影響を起こすことが懸念される（図I-1）。



図I-1. 肺胞において粒子を貪食するマクロファージと発がん標的細胞であるII型肺胞上皮細胞

このため、高い放射能を有する不溶性粒子は、原子力災害時の環境リスクとして考慮することが必要となる。一方で、福島第一原発事故の際に形成された不溶性セシウム粒子は核燃料断片とは異なり、ガス状の放射性セシウムが原子炉外に放出される過程で二酸化ケイ素（ SiO_2 ）を主成分とする材質に凝集して形成したメカニズムが仮説の一つとして考えられている。不溶性セシウム粒子に含まれる主な γ 線放出核種は放射性セシウムのみであり、環境中に放出された不溶性セシウム粒子の中でこれまでに報告された高い放射能は数千 Bq であった。以上のように不溶性セシウム粒子は放射性微粒子ではあるが、福島第一原発事故以外で放出された核燃料断片由来の放射性微粒子と比べて放射能が低く、粒子に含まれる放射性物質の種類が異なる。このため、不溶性セシウム粒子が環境リスクとして考慮すべきか否かの判断には不溶性セシウム粒子を用いる独自の科学的検証が必要である。また、不溶性セシウム粒子は粒径や放射能によって2あるいは3種類に区分されており、このような特徴の違いによる生物影響に着目した知見も必要である。さらに、放射性粒子による局所被ばくが、従来得られてきたような可溶性の放射性セシウムが全身に広く分布する均等被ばく影響と等しいのか否かについて十分な知見は得られておらず（図I-2）、理解を深めることは重要である。このため、福島原発事故特有の不溶性セシウム粒子を用いて環境動態や健康影響に結びつく科学的知見を収集することは、環境保健行政での不溶性セシウム粒子に対する判断材料として重要な資料となる。



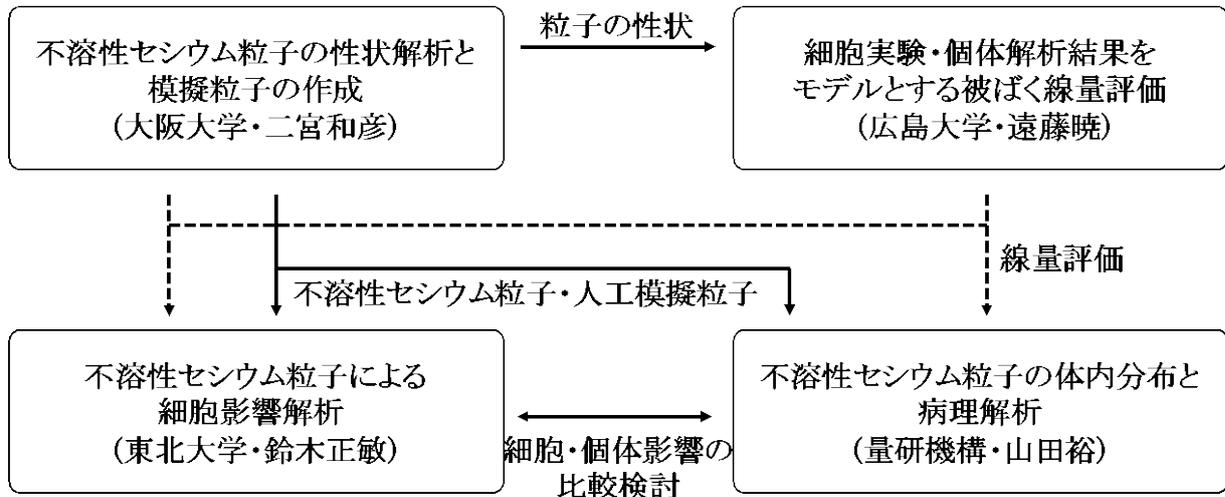
図I-2. 不溶性放射性粒子がマクロファージに貪食されたときの線量分布の不均一性

本課題では、不溶性セシウム粒子による生物影響を明らかにすることを目的に環境試料からの不溶性セシウム粒子の分離、放射化学的手法に基づいて粒子の性状を解析するとともに生成過程の知見を人工模擬粒子の作成にフィードバックさせることで、実物に近い粒子を生物実験に提供する研究体制を構築している。土壌から回収する不溶性セシウム粒子や人工模擬粒子を細胞実験や動物実験に用いることで、不溶性セシウム粒子の分子レベルの影響から肺内分布、動態、および病理組織変化について検討する。また、放射線被ばくと生物影響を関連付けるためには被ばく線量評価が必須である。放射性微粒子は一般的に比放射能が非常に高いため、不溶性セシウム粒子の検討においてもホットパーティクルと同様に体内に取り込んだ場合の被ばくによって与える線量は空間的な分布をもつことが予想される。不溶性セシウム粒子に含まれる主な放射性核種はCs-134、Cs-137であるため、不溶性セシウム粒子近傍の細胞に与えられる線量は β 線に起因する。ICRPが推奨する臓器・組織単位で平均化した線量は実際に体内に取り込んだ不溶性セシウム粒子が周囲に与える線量と異なる値になることが予想される。そこで、本研究では体内に取り込んだ不溶性セシウム粒子が周囲の細胞に与える線量分布について、PHITSモンテカルロコードを用いて計算する。

以上のように、本課題では粒子の性状と生物実験体系をシミュレーションで再現して推定される被ばく線量と生物影響との相関を調べるための分野横断かつフィールドワークとベンチワークを融合する学際共同研究を立ち上げ、不溶性セシウム粒子によるリスク推定に寄与する基礎的知見を収集することを目指す。特に、非放射性模擬粒子の影響と比較することで、不溶性セシウム粒子による影響の特異性についても明らかにする。

II. 研究方法

本課題では不溶性セシウム粒子の生物影響の解明を目的として、各担当者が粒子の分離と性状解析、被ばく線量評価、細胞レベルと個体レベルの影響解析を担当し、得られた知見や試料を共有することによって課題全体の目的達成を目指す（図II-1）。



図II-1. 本課題の実施体制

1. 不溶性セシウム粒子の性状解析と模擬粒子の作成

本項目では以下の3つのテーマに基づいて、不溶性セシウム粒子の生成過程の検討と、生物影響を明らかにするための人工模擬粒子の生成実験を行う。

- (1) 環境試料からの不溶性セシウム粒子の探索
- (2) 不溶性セシウム粒子の微量元素分析
- (3) 不溶性セシウム粒子の人工模擬粒子生成

(1) 環境試料からの不溶性セシウム粒子の探索

不溶性セシウム粒子を土壌試料から分離するために、土壌試料を薄く分散させ、イメージングプレートを用いるオートラジオグラフィにより放射能を可視化した。得られた放射能の濃集点の土壌の小さなフラクションを分離し、同様の操作を繰り返すことによりスケールダウンを行い、粒子の単離を行った。また必要に応じて、放射性粒子を水中に分散させることで、大量に存在するマトリクス成分である土壌からの分離を行った。

得られた不溶性セシウム粒子については、カーボンテープ上に展開し、電子顕微鏡を用いてその性状観察を行った。またEDS分析により、主要元素の分析を行い、さらに放射性セシウムはゲルマニウム半導体検出器を用いて定量した。そして、放射性セシウムの同位体比（Cs-134 および Cs-137）から、粒子を放出した原子炉（～0.9：1号機、～1.0：2、3号機のどちらか）の特定をおこなった。これらの粒子がどの土壌から分離されたかの情報を収集保存することで、環境中の不溶性粒子の分布についても情報を得た。

(2) 不溶性セシウム粒子の微量元素分析

不溶性セシウム粒子の元素分析研究は多く行われているが、そのほとんどは電子顕微鏡や放射

光を用いた非破壊的な分析である。この分析法は、微小な空間での元素の濃集点を特定することは可能であるが、低い濃度で微量に含まれている元素の定量はできない。不溶性セシウム粒子は原子炉建屋内で生成したと考えられており、これらに含まれる微量元素、特に燃料に由来する微量放射性核種の定量は粒子の生成過程、具体的には放射性核種の揮発の様子を明らかにするうえで重要な意味がある。

本項目では、初年度に不溶性セシウム粒子中の微量な放射性核種（ストロンチウムおよびプルトニウム）の定量に成功した。両核種は、クロマトグラフィーの技術を用いて化学的に分離し、それぞれ β 線測定、質量分析により定量した。これにより不溶性粒子中の微量放射性元素定量法の妥当性については示すことができた。今年度は、より多くの粒子の分析を行い、合計 6 個の粒子について分析を行い、それぞれについて定量値を得た。

（3）不溶性セシウム粒子の模擬粒子生成

不溶性セシウム粒子による詳細な生物影響を検討するためには、大量の不溶性セシウム粒子を準備する必要がある。しかしながら環境試料から大量の粒子を分離することは現実的ではなく、また粒子自身の性質のばらつきからも環境試料を使つての評価は難しい。そこで本研究では、放射性セシウムを導入した人工模擬粒子の作成を行うことにした。本項目の初年度の成果として、シリカゲルに対して非放射性的のセシウムを吸着させることで、不溶性粒子と同じ SiO_2 を主成分としてセシウムを含んだ非放射性的人工模擬粒子を製作することができた。同様の方法で非放射性的のセシウム試薬を Cs-137 に置き換えることで放射性的の人工模擬粒子の生成を行った。

2. 細胞実験・個体解析結果をモデルとする被ばく線量評価

PHITS コードを用いたモンテカルロシミュレーションによって、吸入摂取した不溶性セシウム粒子が肺胞内に沈着することを仮定した線量評価を行なうための計算を行なった。計算で使用した条件などについては、研究結果の項目で後述する。

3. 不溶性セシウム粒子による細胞影響解析

ヒトテロメア逆転写酵素（hTERT）遺伝子の導入で無限増殖能を獲得した不死化正常ヒト網膜色素細胞(RPE1-hTERT)を用いた。10 %ウシ胎児血清(FBS)を添加した DMEM あるいはライボビッツ培地で対数増殖期を維持するように継代操作を行った。不溶性セシウム粒子との共培養実験では、ガラスボトムディッシュ上に RPE1-hTERT 細胞が隙間なく接着する密度になるまで細胞を培養し、細胞層の直上に不溶性セシウム粒子を置いた。共培養中は生細胞イメージングシステム（BioZero、キーエンス）により作成した動画を用いて、粒子が細胞上を動かずに静置していることを確認した。X 線照射は 0.1 または 0.3 mm 銅フィルターを搭載した X 線発生装置 (M-150WE、ソフテックス) を用いて管電圧 150kVp、管電流 6mA の条件で行った。Cs-137 暴露実験は、4 MBq の Cs-137 放射能標準溶液（日本アイソトープ協会）を用いて終濃度 10、100、1,000 Bq/ml となるように希釈した培地を RPE1-hTERT 細胞に処理した。非放射性的シリカ粒子への暴露には粒径 100 nm、1 μm 、3 μm の sicastar (micromod、50 mg/ml)を終濃度 10-50 $\mu\text{g/ml}$ になるように希釈した培地

を処理した。各種処理を行なった細胞に対して DNA 二重鎖切断の検出には蛍光免疫染色法を行なった。処理後の細胞を PBS で 1 回洗浄し、4%ホルムアルデヒド溶液を室温で 10 分間の処理を行い、細胞を固定した。固定後に PBS で 1 回洗浄した後に、0.5%トライトン X-100 溶液を氷上で 5 分間処理し、膜透過処理を行った。DNA 二重鎖切断の指標として用いた 53BP1 の検出では、1 次抗体にラビットポリクローナル抗 53BP1 抗体 (Novus Biologicals) を 37°C で 2 時間処理した後、2 次抗体に Alexa594 標識抗ラビット IgG 抗体 (Invitrogen) を 37°C で 1 時間処理した。4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) による対比染色を行った後、粒子近傍の細胞と粒子から 1 cm 離れた領域の細胞における 53BP1 のフォーカス形成を蛍光顕微鏡 (BioZero、キーエンス) で撮影した画像で評価した。ミトコンドリア由来 ROS は MitoSOXRed (ThermoFisher Scientific) を用いて常法により検出した。

4. 不溶性セシウム粒子の体内分布と病理解析

(1) 肺の組織標本の免疫組織染色

不溶性セシウム粒子によるリスクを推定するための手段の一つとして、不溶性セシウム粒子の肺における分布、動態、線量評価、および病理組織変化について実験動物を用いて調べることが有効である。本項目では、人工的に作成された不溶性セシウム模擬粒子を実験動物の呼吸気道内に投与し、呼吸気道内での分布と動態を調べ、局所での内部被ばく線量を評価するためのデータ取得とともに、投与初期の生物影響を病理組織学的方法により解析することを目的とする。また非放射性模擬粒子投与と胸部外部照射の比較群を作成し、粒子の吸入摂取そのものによる影響、および放射線均等被ばくによる影響と比較することで、不溶性放射性セシウム粒子による影響の特異性を明らかにする検討を行なう。

令和 2 年度は、実験動物（ラット）に非放射性的の不溶性粒子を気管内投与し、肺の組織標本を作製して病理診断を行い、病変に関わる肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージの免疫組織染色方法を検討した。

コロナ禍により、動物実験を行うことが出来ず、非放射性的の不溶性粒子(0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0 mg/kg 体重 (bw))を気管内投与した投与 7 日目の肺の組織標本の免疫組織染色方法を検討した。

実験動物を 4 %イソフルラン麻酔下において両腋窩動静脈切開により放血し、気管を露出してカニューレを挿入し、10 ml シリンジで 10 %ホルマリン固定液 2-3 ml を肺内に注入した。その後、開胸して気管および肺を採取し、10 %ホルマリン固定液に浸漬した。

一日後、50 %エタノール固定液に置換し、全肺葉（左葉、右前葉、右中葉、右後葉、中間葉）について、主要な気管支を含む面で切り出し、常法によりパラフィン包埋後、3-5 ミクロン厚で薄切し、組織切片標本を作製した。

各パラフィンブロック標本より ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本および免疫染色標本 (SFTPC、CD11b および CD68) を作製した (表II-1)。

表II-1 抗体と陽性細胞

抗体	細胞
SFTPC	II型肺胞上皮細胞で陽性
CD68	肺胞マクロファージで高発現 単球、血中好中球、および組 織マクロファージで陽性
CD11b	炎症性樹状細胞、単球、NK細 胞、顆粒球、好中球で陽性

免疫染色については、各抗原について条件検討を実施し、最適化されたプロトコールを以下に示す。

【1 日目作業手順】

1) 脱パラフィン

キシレン 1 回目 10 分
 キシレン 2 回目 10 分
 100%エタノール 3 分
 80%エタノール 3 分
 70%エタノール 3 分
 流水洗浄 15 分

2) 抗原賦活（流水洗浄後）

蒸留水（DW）にて軽く洗浄 1 回

0.01 M クエン酸緩衝液（pH6.0）に浸して、オートクレーブ 105°C 10 分

（スライドが完全に浸かっている状態で）→自然に冷えるのを待つ

トリス緩衝液（TBS）にて洗浄 10 分 1 回

3)免疫染色（ポリマー法：酵素と二次抗体が標識されたポリマー試薬を使用）

3% H₂O₂/DW 5 分室温 《内因性ペルオキシターゼの阻止》

TBS 洗浄 10 分+5 分+5 分

《ブロッキング》 20% 正常ヤギ血清 リン酸緩衝液(PBS) 20 分室温

TBS にて軽く洗浄1回

一次抗体 (20% 正常ヤギ血清 + 0.1% Triton X-100/PBS)4°C 一昼夜

・ウサギ抗 SFTPC 抗体 (GTX54694、 1.82 mg/mL) 希釈倍率:X 1200

- ・ウサギ抗 CD11b 抗体(NB 110-89474、 1 mg/mL) 希釈率:X 1200
- ・ウサギ抗 CD68 抗体 (bs-0649、 1 mg/mL) 希釈倍率:X 400
- ・正常ウサギ IgG 抗体(PM035、 MBL、 5 mg/mL) 希釈倍率:X 2000 陰性コントロール用

【2 日目作業手順】

TBS 洗浄 10 分+5 分+5 分

ポリマー試薬 30 分室温

(MACH4 Universal HRP-Polymer Detection System, BIOCARE MEDICAL,B RR4012H)

TBS 洗浄 10 分+5 分+5 分

ジアミノベンジジン (DAB) 発色 : いずれも 3 分

DAB 試薬 (DAB 四塩酸塩 10 mg+30 % H₂O₂ 10 μL) / (0.05 M Tris-HCL 緩衝液(pH7.6) 50 mL)

流水洗浄5 分

DW にて軽く 洗浄 1回

核染色 ; ヘマトキシリン染色(3 倍希釈、10 秒)

流水洗浄10 分

70~100 % エタノール系列にて脱水

キシレン透徹

カバーガラスをかけて封入

顕微鏡下で肺の組織像を観察し、各染色群で比較した。

(倫理面への配慮)

不溶性セシウム粒子の性状解析と模擬粒子の作成の項目では、福島県内において不溶性セシウム粒子を分離するための土壌採取を行った。フィールド実験実施に当たっては、地権者、地元自治体との連絡を密に取り、試料採取の許可を得た上で実施した。

動物実験については、量子科学技術研究開発機構内の「動物実験委員会」において実験内容の妥当性が審議され、理事長の承認を受けた上で遂行されている。

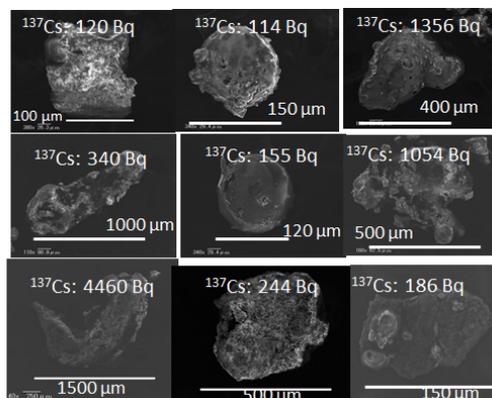
III. 研究結果

1. 不溶性セシウム粒子の性状解析と模擬粒子の作成

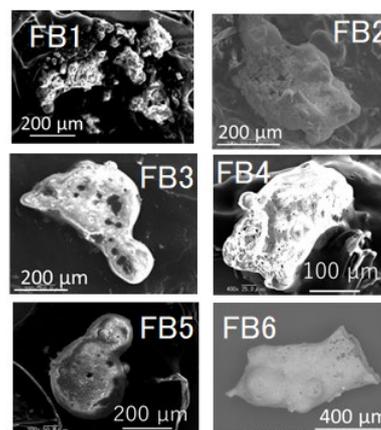
本研究では、20程度の不溶性粒子を福島県双葉町で採取した土壌試料から分離した（図III-1）。分離した不溶性粒子について、電子顕微鏡による観察、X線による元素分析、Ge検出器による γ 線測定を行った結果、今回見つけた粒子の大きさは120～1,500 μm 程度の大きさがあり、全て SiO_2 を主成分としていることがわかった。Cs-134/Cs-137は、事故時換算で0.92であった。放射能分析の結果、得られた不溶性粒子に含まれるCs-137は、100～4,500 Bqであった。

これらのうち、今年度は3つの粒子に対して、ストロンチウムとプルトニウムの分析を実施した。Sr-90に関しては、 β 線測定の結果0.2～1.3 Bqであり、Sr-90/Cs-137は 10^{-4} のオーダーであることが明らかとなった（図III-2、表III-1）。さらにPu-239+240の分析では、化学分離後の質量分析測定により、全て 10^{-5} Bqオーダーの放射能しか含まれていないことが明らかとなった。このような微量なプルトニウムの分析は、本研究グループの一連の研究により初めて明らかとなったものである。Cs-137に対する放射能比は、 10^{-8} オーダーであることが分かった。

不溶性粒子の模擬試料を生成するために、100 kBqオーダーのCs-137を使い、直径数 μm のシリカゲル粒子に対する吸着実験を実施した。シリカゲル粒子に、Cs-137が吸着していることを示唆する結果が得られた。



図III-1. 本研究課題で分離した不溶性粒子の一部の電子顕微鏡像とCs-137放射能



図III-2. 化学分析を行った不溶性粒子の電子顕微鏡像

表Ⅲ-1 不溶性粒子の放射能の分析結果。FB1-3 は昨年度報告済み⁴⁾である

粒子ID	¹³⁷ Cs activity (Bq)	⁹⁰ Sr activity (Bq)	²³⁹⁺²⁴⁰ Pu activity (Bq)
FB1	214	0.17±0.01	(1.7±0.2) × 10 ⁻⁵
FB2	794	0.59±0.03	(3.5±0.5) × 10 ⁻⁵
FB3	679	-	(7.1±0.6) × 10 ⁻⁵
FB4	225	-	(4.1±0.4) × 10 ⁻⁵
FB5	1010	1.32±0.03	(3.3±0.5) × 10 ⁻⁵
FB6	625	0.83±0.07	(6.0±0.9) × 10 ⁻⁵

2. 細胞実験・個体解析結果をモデルとする被ばく線量評価

2-1 被ばく線量計算モデル

放射性核種を体内に取り込む経路は経口摂取と吸入摂取の2種類が考えられる。放射性微粒子が不溶性であることから、経口摂取によって取り込んだ放射性微粒子は食道を通り、速やかに体外に排泄されると考えられる。従って、本研究では吸入摂取によって体内に取り込んだ放射性微粒子を取り扱う。不溶性セシウム粒子はタイプ A(直径 1-10 μm)とタイプ B(直径 70-400 μm)が存在する。一般に、鼻呼吸で 1-5 μm の粒子を吸入するとおよそ半分が気管気管支領域に沈着し、残りの半分は肺泡領域に到達するとされている⁵⁾。また、ICRP が提唱する呼吸軌道モデルにおいても、タイプ A のような粒径の小さい粒子は吸入すると肺泡まで到達する可能性があることが示唆されている⁶⁾。気管支領域に沈着した不溶性粒子は線毛細胞による線毛運動により咽頭まで運ばれるか、咳反射によって取り除かれる。一方、肺泡に沈着した不溶性粒子は主に肺泡マクロファージによって取り除かれるが、一般に粘膜線毛輸送で排出される気道に沈着した粒子より保持期間が長い⁵⁾。Bailey(1982)らが直径 1.2 μm と 3.9 μm の粒子を ⁸⁵Sr または ⁸⁸Y でラベルし、7 名のボランティアに吸入させて不溶性粒子のクリアランスについての実験を行っている⁵⁾。その結果、1.2 μm の粒子は約 8%、3.9 μm の粒子は約 40%が 6 日以内に初期沈着場所からの移動が確認されたが、肺から除去される半減期はどちらの粒子も約 600 日といった結果を報告している⁵⁾。従って肺泡まで到達した放射性微粒子は気管気管支領域に沈着した放射性微粒子と比較して長期にわたって肺の内部に留まり、内部被ばくをもたらす。そこで肺泡に沈着した不溶性セシウム粒子が周囲に与える線量を計算する。

生物体が放射線によって受ける影響はどの組織が照射されたかで異なる。一般的に細胞分裂が盛んな造血組織、上皮細胞、生殖腺、皮膚などは放射線感受性が高く、筋組織、神経組織、脂肪組織などは細胞分裂が停止しているために放射線感受性が低いとされる⁷⁾。組織ごとに放射線に対する応答が異なるため、線量は組織毎に計算する必要がある。本研究では最も肺泡の表層側に存在する組織である呼吸上皮細胞の線量を計算する。

生体組織の大きさは個人差があり、肺泡については形も様々である。一般的に肺泡は直径 100-300 μm 程度とされるため、本研究では直径 200 μm の球と仮定し、その表層部分に厚さ 0.1 μm

の上皮細胞が存在するとした⁷⁾。不溶性セシウム粒子は直径 1 μm の球とし、 SiO_2 とした。計算を行った核種は Sr-90、Cs-134 及び Cs-137 の 3 つであり、それらからの γ 線、及び β 線について実施した。 β 線スペクトルは平成 31 年度の報告と同じ、フェルミ関数で与えた。Cs-134 及び Cs-137 が放出する γ 線は表III-2 に示したもののみを考慮し、線源に入力した。

また、細胞の組成は人体組織等価物質(O: 76.2 %, C: 11.1 %, H: 10.1 %, N: 2.6 %)、密度は 1 g/cm^3 とした。線量の計算モデルは以下に示す 3 種類を設定した。

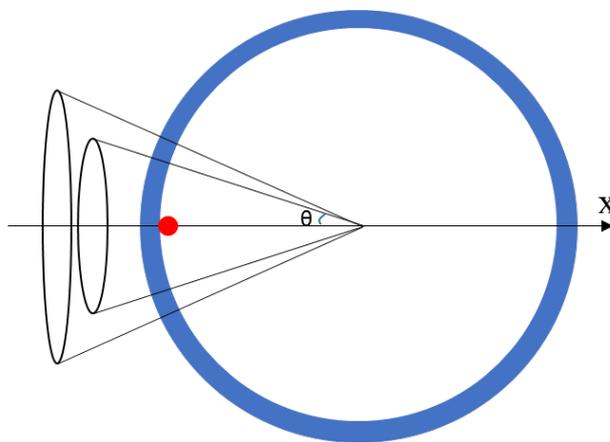
表III-2 線量の計算に考慮した γ 線

核種	エネルギー (MeV)	放出率
^{134}Cs	0.5632	0.083
	0.5693	0.153
	0.6047	0.976
	0.7958	0.855
	0.8019	0.086
^{137}Cs	0.66165	0.851

a) 1 肺胞モデル

不溶性セシウム粒子が沈着した肺胞の上皮細胞の線量を計算するためのモデルである。図III-3 に計算体系の二次元での概略図を示す。

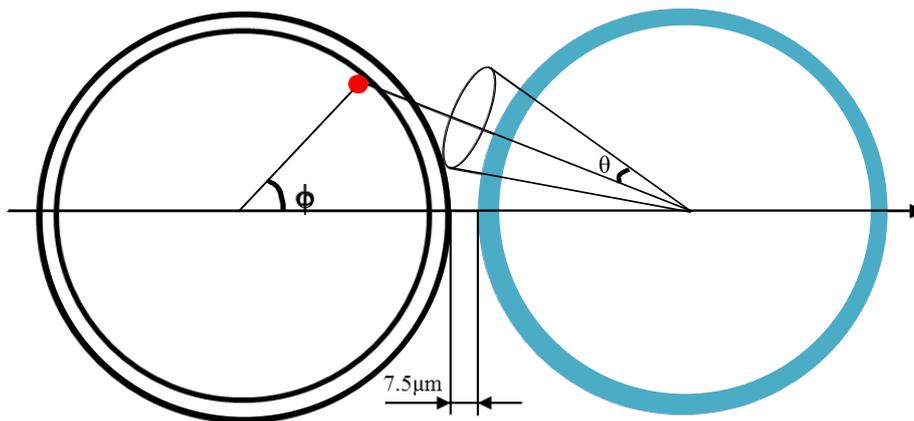
図III-3 中の青色で示されているのが上皮細胞、赤丸で示したのが不溶性セシウム粒子を示す。不溶性セシウム粒子の大きさは肺胞と比較して非常に小さく、同一肺胞の呼吸上皮細胞においてもその位置に応じて不溶性セシウム粒子との立体角が大きく異なるため、線量には分布が生まれることが予想される。そこで、図III-3 中に示したように x 軸からの角度 θ を 1° ステップで変化させた円錐を用いて、上皮細胞を 180 個の円環に切り分けた。線量の計算は切り分けた呼吸上皮細胞毎に行った。



図III-3. 1 肺胞モデル概略図

b) 2 肺胞モデル

肺胞はヒトにおいては 3-5 億個存在し、不溶性セシウム粒子が沈着した肺胞の周囲には無数の肺胞が存在する。そのため、肺胞に沈着した不溶性セシウム粒子が周囲の呼吸上皮細胞に与える線量の分布を知るためには、放射性微粒子が沈着した肺胞のみではなく、その周囲に与える線量も計算する必要がある。このモデルは不溶性セシウム粒子が沈着した肺胞の隣に存在する肺胞の呼吸上皮細胞の線量を計算するモデルである。2 肺胞モデルの二次元での概略図を図III-4 に示す。線量を計算する呼吸上皮細胞は図III-3 と同様に青色で示した。1 肺胞モデルと同様に 180 個の円環に切り分け、それぞれの線量を計算した。肺胞間の距離は $7.5\mu\text{m}$ とした。これは毛細血管の厚みを参考にした値である。不溶性セシウム粒子が図III-4 中左側の肺胞のどこに沈着したかに依存して線量の計算結果は変化する。従って、不溶性セシウム粒子の沈着場所を図III-4 中の角度 ϕ を 0° - 180° の範囲で 30° ステップで二次元的に変化させ、6 通り計算を行った。位置関係を二次元的に考えているが、三次元に拡張した場合にも、 x 軸上で回転させることによって図III-4 と同じ位置関係となる。

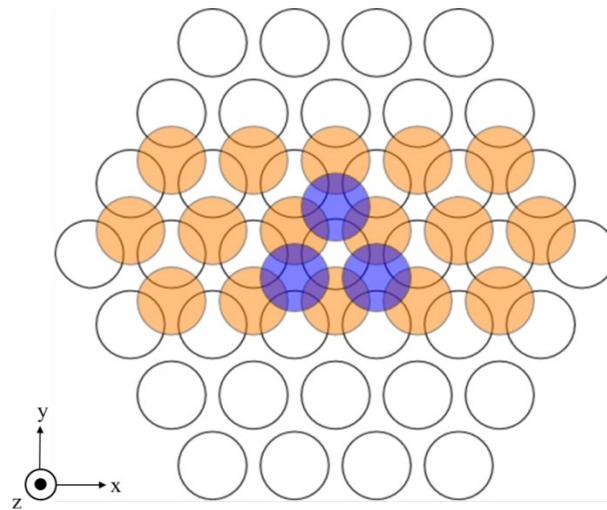


図III-4. 2 肺胞モデル概略図

c) 多肺胞モデル

さらに遠くに位置する呼吸上皮細胞の線量を計算するには、より多くの肺胞細胞を考慮する必要がある。ここでは、肺胞が六方細密で整列していると仮定した。図III-5 に六方細密で整列させた肺胞の概略図を示す。

同じ色で示した肺胞は同じ xy 平面上に配置されることを意味する。一番下の層に位置する肺胞を白、その上の層に位置する肺胞はオレンジ、さらにその上の層に位置する肺胞は青で着色した。視認しやすいよう、2 層目と 3 層目の肺胞は一部のみ示してある。なお、4 層目の肺胞の x 座標及び y 座標は 1 層目と一致する。また、肺胞の間は全て細胞で満たされているとした。本来、六方細密構造は平面上では球の中心が正三角形となるように接して配置し、その正三角形の重心と同じ x 座標及び y 座標を持つ球を 3 つの球と接するように配置していく構造であり、その 4 つの球が基本単位となる。しかし、今回は肺胞を接触させず、毛細血管の厚みを考慮した $7.5\mu\text{m}$ だけ間



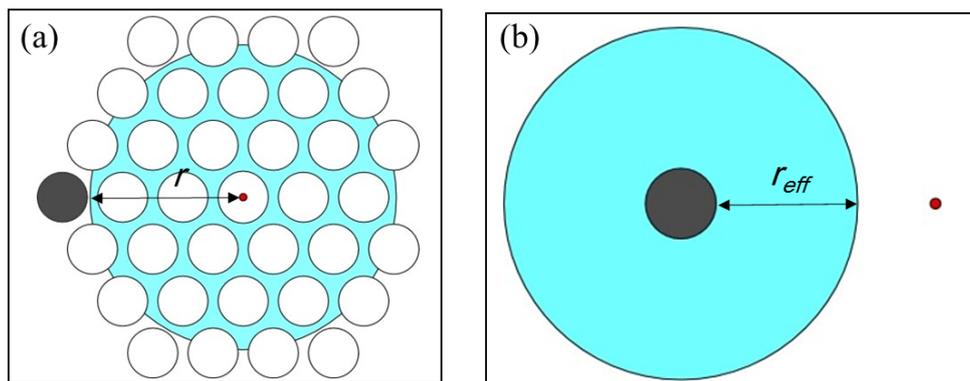
図III-5. 六方細密での肺胞の配置

隔をあけて配置した。何層にもわたって実際に肺胞を配置することは非常に手間がかかる。ある程度不溶性セシウム粒子から離れた呼吸上皮細胞の線量は、 β 線及び γ 線の他の細胞による減衰を考慮することで求めることとした。そのため、不溶性セシウム粒子から発生した放射線が線量を計算する呼吸上皮細胞に到達するまでに通過する細胞の厚み(細胞の実効厚)を推定し、実効厚を用いて六方細密構造を単純化した。その詳細を以下に述べる。

線量を計算する呼吸上皮細胞の周りに球殻の形で細胞を配置して六方細密構造を単純化して計算モデルとした。単純化する前と後の計算モデルの例を図III-6 に示す。図III-6 中に灰色で示したのが線量を計算する呼吸上皮細胞、赤色で示したのが不溶性セシウム粒子、水色で示したのが細胞である。図III-6 (b)における細胞の実効厚 r_{eff} は、図III-6 (a)の r を半径とする球中の細胞の体積と等しい体積となる肺胞の周りを覆った球殻の厚みになるよう決定した。この半径 r の球の内側で定義される空間を便宜上、ここでは体積近似空間と呼ぶ。細胞の実効厚 r_{eff} を決定するためには体積近似空間中の細胞の体積の値が必要となるが、幾何学的に求めることはできない。そこで PHITS の体積自動計算機能を用いて計算することとした。これは PHITS 上で定義した任意のセルの体積をモンテカルロ積分によって計算する機能である。この機能を利用するためには PHITS 上で実際に肺胞を定義しなければならないため、大きさが小さい体積近似空間中の細胞の充填率を計算し、細胞の体積はこの充填率を利用して計算することとした。肺胞の配置は六方細密構造を参考にしているため、同じ配列の繰り返しで構成される。従って、細胞の充填率は体積近似領域の大きさに依存しないと考えられる。ある一定の値で細胞の充填率を定義することができれば任意の体積近似領域中の細胞の体積 v を計算することができる。細胞の充填率 P は次式により計算される。

$$P = \frac{v}{\frac{4}{3}\pi r^3}$$

1



図III-6．多肺胞モデル概略図 (a)簡単化前、(b)簡単化後

200-600 μm の範囲で r を 0.01 ステップで変化させ、5 通りの大きさの体積近似領域について充填率を計算した。計算結果を表III-3 にまとめる。

表III-3 半径 r の球における充填率

$r(\mu\text{m})$	P
200	0.34
300	0.34
400	0.33
500	0.34
600	0.33

表III-3 の計算結果より細胞の充填率 P は 0.34 でほぼ一定となることが確認されたため、あらゆる r に対して P を 0.34 で一定とした。細胞の実効厚 r_{eff} はその定義から次式で決定される。

$$r_{eff}^3 = P \cdot r^3 + 0.01^3 \quad 2$$

γ 線による線量は不溶性セシウム粒子から 5 cm 離れた肺胞の呼吸上皮細胞まで計算を行った。 β 線の飛程はその最大エネルギーに依存し、(Sr-90)-(Y-90)、Cs-134 及び Cs-137 の水中での最大飛程はそれぞれ約 1.1 cm、0.2 cm、0.5 cm となる。従って、 β 線による線量の計算は核種毎にそれぞれ 1.2 cm、0.3 cm、0.5 cm までとした。1 肺胞モデル及び 2 肺胞モデルでは同一肺胞における呼吸上皮細胞の線量分布を計算したが、多肺胞モデルでは付与される線量は呼吸上皮細胞全体での平均線量とした。また不溶性セシウム粒子は肺胞の中心に配置した。これらの妥当性は 2 肺胞モデルの結果の章で述べる。

2-2 内部被ばく線量

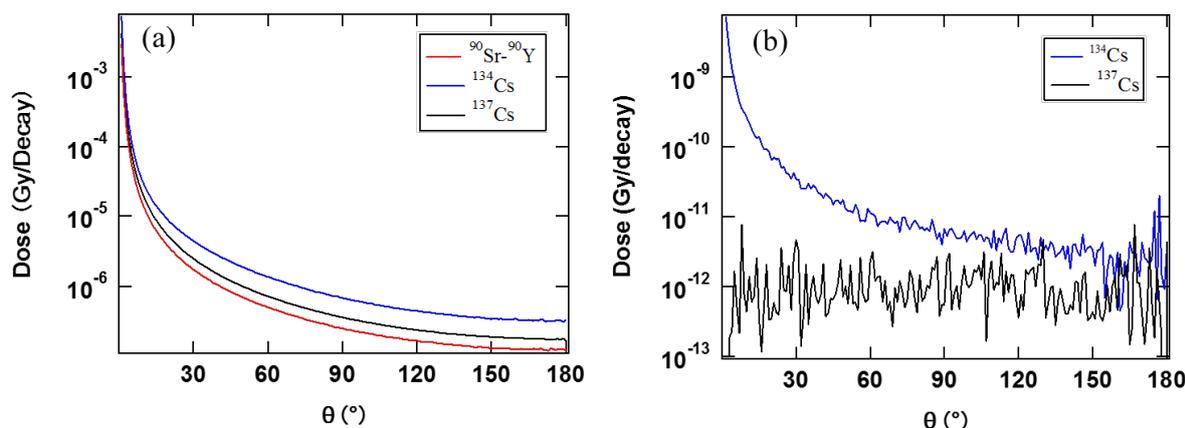
PHITS 計算ではそれぞれの核種からの β 線及び γ 線 1 粒子当たりで規格化された結果が得られる。考慮した Cs-134 の γ 線の放出率から、本研究における PHITS 計算で模擬した Cs-134 が放出する γ 線は 1 崩壊につき 2.153 本、Cs-137 は 1 崩壊につき 0.851 本である。後に比較しやすいよう、これらの値を PHITS 計算の結果得られた線量分布に乗じることで、それぞれの核種 1 崩壊当たりの線量分布に規格化した。

a) 1 肺胞モデル

得られた β 線及び γ 線についての核種毎の線量分布を図III-7 に示す。

不溶性セシウム粒子が沈着した近傍においては β 線によって付与される線量は γ 線と比較して 10^6 倍ほど高く、 β 線が吸収線量を決定することが確認できる。また、不溶性セシウム粒子が沈着した周辺では 1 崩壊当たり 10^{-3} Gy 以上の非常に高い線量となる。これは不溶性セシウム粒子にそれぞれの核種が 1 Bq 含まれていた場合には、3.6 Gy/h の線量率となることを意味する。ただし、不溶性セシウム粒子が沈着した場所と最も遠い反対側の呼吸上皮細胞の線量はその 1 万分の 1 となる。1 つの肺胞の呼吸上皮細胞中であっても場所に依存して線量は最大 4 桁異なるため、不溶性セシウム粒子から極めて近い場所の線量を取り扱う際には注意が必要である。

γ 線の付与する線量は低いが、線量の最大値と最小値の比は β 線と同程度である。不溶性セシウム粒子が与える線量に空間依存性が表れる原因は放射線の減衰または減弱と線源からの立体角の 2 つが考えられる。 γ 線と β 線は透過力が大きく異なるため、放射線の減衰または減弱が原因で同じ形の分布が得られることはない。不溶性セシウム粒子は等方線源であるため、放射性微粒子からの立体角が大きい細胞であれば、放射線がその細胞に入射する確率は高くなる。逆に、立体角が小さい細胞に放射線が入射する確率は小さい。この事象は放射線の種類に無関係である。 β 線と γ 線で似た形の線量分布が得られたことから 1 肺胞モデルにおける線量分布は不溶性セシウム粒子に対する細胞の立体角の違いによるものと推察される。



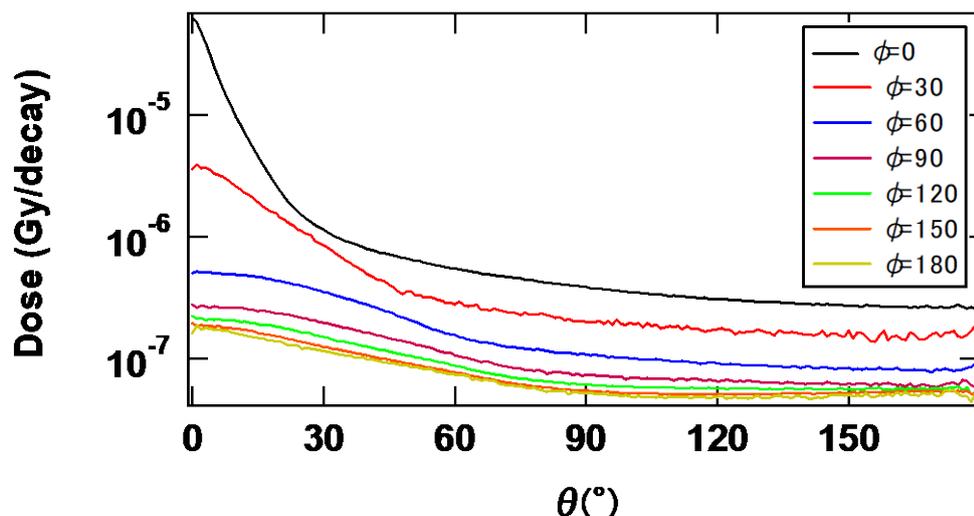
図III-7. 1 肺胞モデルにおける線量分布 (a) β 線による付与線量 (b) γ 線による付与線量

b) 2 肺胞モデル

得られた線量分布を図III-8 に示す。

図III-8 は放射性微粒子の沈着場所に応じた Cs-137 の β 線による線量分布の変化をまとめた図である。より近くに不溶性セシウム粒子が沈着した場合には、呼吸上皮細胞全体にわたって高い線量となり、遠くなるに従って、線量は減少していく。また線量の分布についても同様、より近くに不溶性セシウム粒子が沈着した場合には勾配の強い分布となり、遠くなるにしたがってその分布は緩やかになる。

隣の肺胞よりもさらに遠い肺胞に放射性微粒子が沈着した場合の線量分布は $\phi=180$ の場合の線量分布より緩やかな分布になる。 $\phi=180$ の場合の線量分布と $\phi=150$ の場合の線量分布がほぼ同じであることから、多肺胞モデルにおいて不溶性セシウム粒子の沈着場所は線量の計算結果に無関係と考えられる。従って、多肺胞モデルにおける不溶性セシウム粒子は肺胞の中心に配置することとした。 $\phi=180$ の場合には最大線量は最小線量の 2 倍程度となり、呼吸上皮細胞における線量分布は 1 肺胞モデルと比較して非常に緩やかになる。従って、多肺胞モデルにおいて計算する線量は呼吸上皮細胞全体の平均線量とした。

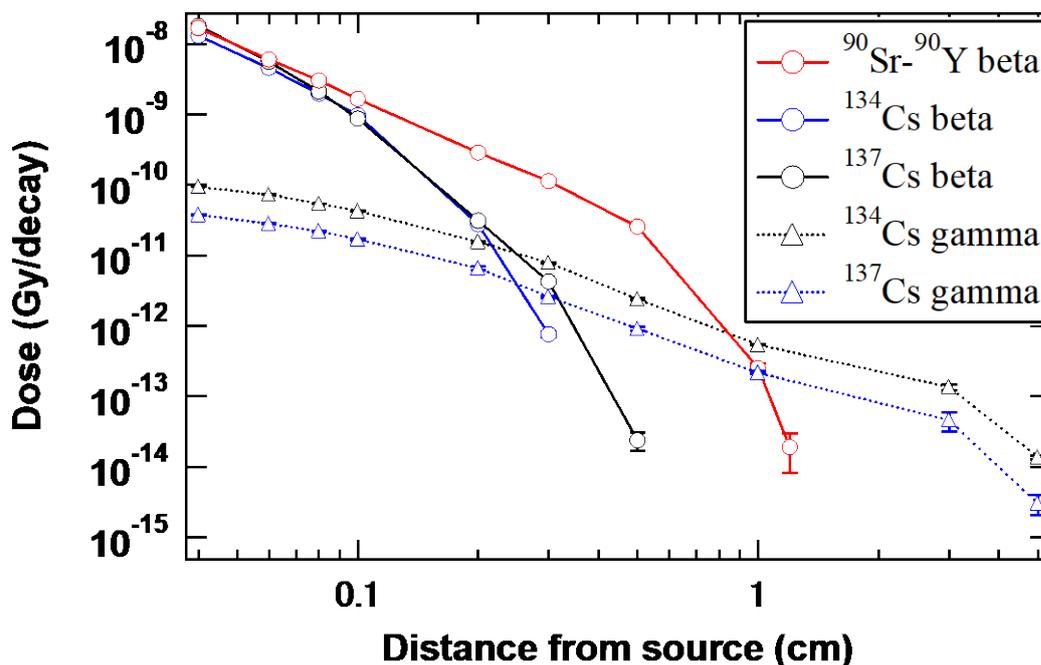


図III-8. 2 肺胞モデルにおける線量分布

c) 多肺胞モデル

得られた線量と不溶性セシウム粒子と呼吸上皮細胞の距離の関係を図III-9 に示す。

ある程度離れた場所においても不溶性セシウム粒子が与える線量には空間分布が存在することが確認できる。特に、不溶性セシウム粒子付近の細胞には β 線により高い線量が付与されるが、放射性微粒子から離れるにつれて β 線の寄与は急激に低下する。Cs-134 及び Cs-137 が与える線量は不溶性セシウム粒子から数 mm までは β 線による線量が支配的であり、それより離れると γ 線による線量が支配的となる。Sr-90 は娘核種の Y-90 が最大エネルギー 2.2MeV の高いエネルギーの β 線を放出するため、Cs-137 と比較してより遠くまで高い線量を与える。

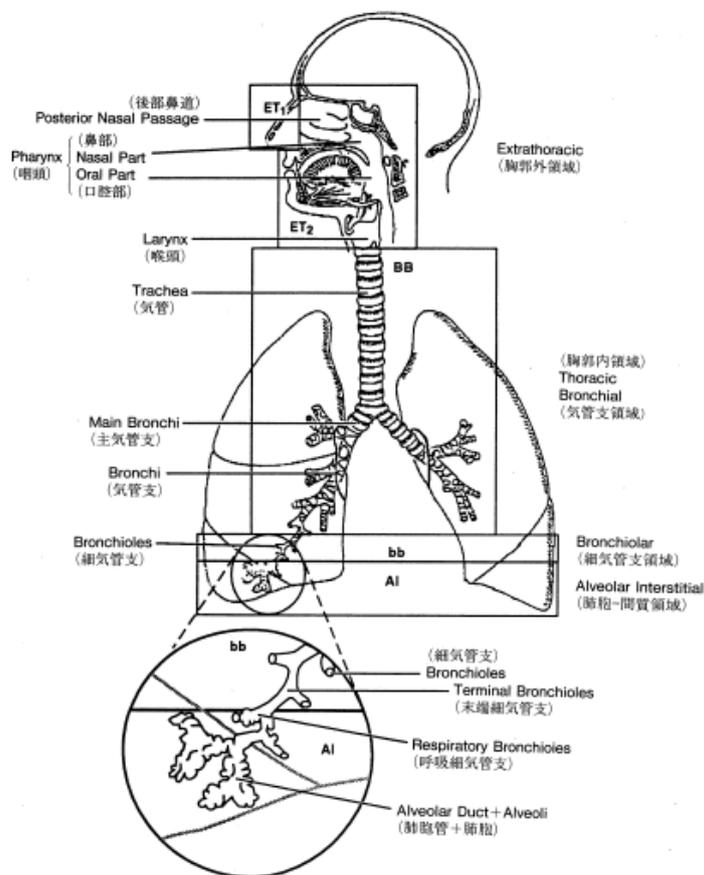


図III-9. 放射性微粒子からの距離による線量の変化

不溶性セシウム粒子に含まれる Sr-90 の放射能は Cs-137 の 0.0028 倍という結果が得られている。実際に体内に取り込んだ不溶性セシウム粒子が与える線量は放射能に比例することから、放射能比を考慮した Sr-90 による線量は Cs-137 の 0.0028 倍となり、 γ 線とほぼ等しい線量となる。従って、 β 線が高い線量をもたらす領域は不溶性セシウム粒子の周囲数 mm 程度であると考えられる。なお、Cs-134 及び Cs-137 の γ 線の平均エネルギーがほぼ等しい(Cs-137:0.662 MeV、Cs-134:0.684 MeV)ため、PHITS 計算で得られた線量分布はほぼ等しい。1 崩壊当たりの線量に換算するため、それぞれの放出率を乗じ線量分布を導出した。得られた線量分布を図III-9 に示す。

2-1-4 ICRP モデルとの比較

内部被ばく線量の算出には ICRP が勧告する預託実効線量係数が広く用いられる。しかし、得られる線量は組織単位での平均化線量であるため、実際に不溶性セシウム粒子が与える線量とは大きく異なることは既に述べた。ここでは ICRP が推奨する組織単位での平均化線量と実際の線量の差異がどの程度であるかを明確にするため、ICRP モデルを用いて肺胞に沈着した不溶性セシウム粒子が与える線量を計算し、本研究で得られた線量分布と比較する。吸入または経口摂取した 1 Bq の放射性核種がその後のある期間にわたって臓器に与える預託等価線量が ICRP レポート 72 にまとめられている⁹⁾。本研究で取り扱った 3 つの核種(Sr-90、Cs-134、Cs-137)について、直径 1 μm のこれらの粒子を 1 Bq 吸引した場合の肺の預託等価線量を調べた。この預託等価線量は体内に取り込んだ放射性核種の体内挙動に基づいて導かれている。呼吸軌道の体内動態モデルの概要を以下に述べる。呼吸気道は 5 つの領域によって表される。図III-10 に呼吸気道モデルの概要を示す。ICRP は AI 領域、bb 領域及び BB 領域を肺として扱っている⁶⁾。



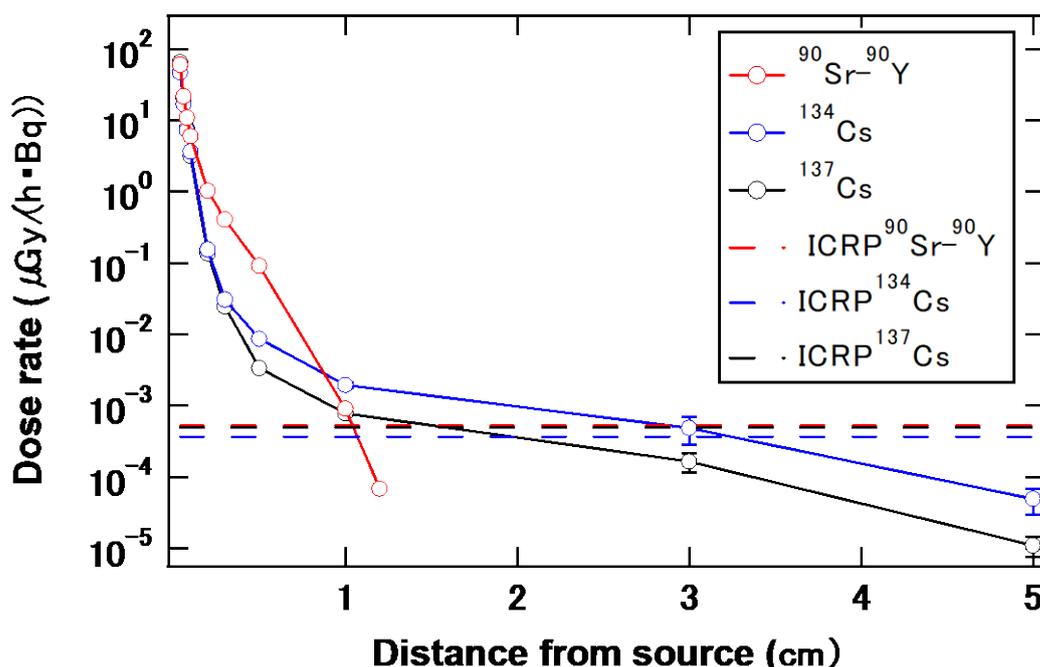
図III-10. ICRP 呼吸気道モデル⁶⁾

吸引したエアロゾルの各領域における沈着割合は、粒子径により決定される。その後の呼吸気道からのクリアランスとして胃腸管及びリンパ節への粒子輸送と血液への吸収を想定している。クリアランスの速度は吸引したエアロゾルの化学形態に依存する。ICRP はクリアランスの速度を3種類想定し、それぞれのクリアランスの速度毎に預託線量を計算している⁶⁾。3種類のクリアランス速度は近似的半減期で表すと以下ようになる。

- ・タイプ F : 10分 (100%)
- ・タイプ M : 10分 (10%) ; 140日(90%)
- ・タイプ S : 10分 (0.1%) ; 7000日(99.9%)

預託線量ではクリアランスにより放射性核種が移動していることを考慮しているため、比較ができない。そこで、記載されていたクリアランスタイプ S の場合の1日間の預託線量を1時間当たりの線量率に換算した。タイプ S のクリアランスの場合、1日経過しても放射性核種はほとんど

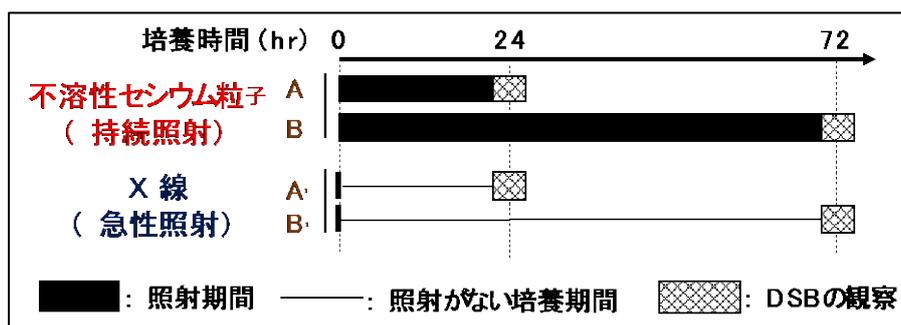
どクリアランスされない。そのため、線量率に換算する際、クリアランスは無視した。ただし、得られた線量率は 1 Bq の放射性核種を吸入した場合の値となる。本研究において計算されたのは 1 Bq の放射性核種が肺胞に存在した場合の線量分布のため、ICRP の線量率を肺に 1 Bq 存在した場合の値に補正する必要がある。本研究において肺胞に沈着した不溶性セシウム粒子の大きさは直径 1 μm と仮定した。直径 1 μm の粒子を吸入した場合、肺の沈着割合は 13.5%とされているため⁶⁾、この沈着割合で線量率を除することで、肺に 1 Bq 存在した場合の線量率に規格化した。比較を行った図を図III-11 に示す。



図III-11. 多肺胞モデルと ICRP モデルの比較

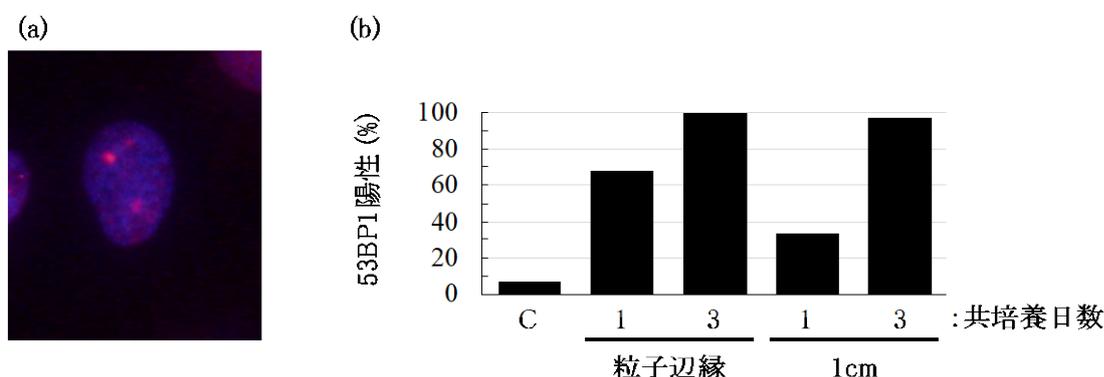
3. 不溶性セシウム粒子による細胞影響解析

土壌から分離した不溶性セシウム粒子を用いた平成 31 年度の結果より、1 粒子あたりの放射能が 100 Bq 以上になると粒子の周辺にある細胞で DNA 二重鎖切断が生じることを示した。DNA 二重鎖切断は高い細胞致死性を有する損傷である。組織反応が線量に応じて重篤度を増すときに細胞死の増加が関連すると考えられていることから、不溶性セシウム粒子による持続的・局所的な被ばくとこれまでに知見が蓄積している短時間・均等照射による DNA 二重鎖切断の誘発状況を比較した(図III-12)。DNA 二重鎖切断が生じると 53BP1 タンパク質が DNA 二重鎖切断周辺部位に集積する特徴を利用し、53BP1 を特異的に認識する抗体を用いた蛍光免疫染色法を行なうと 53BP1 の凝集斑（フォーカス）として検出されることが知られている。このような手法を利用すると個々の細胞で DNA 二重鎖切断を定量することができるため、不溶性セシウム粒子のように局所被ばくによる DNA 二重鎖切断の時空間的な誘発について解析することが可能となる。実験



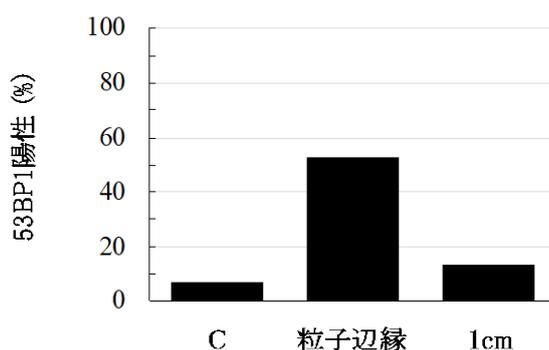
図III-12. 不溶性セシウム共培養と X 線急照射実験の概要
DSB: DNA 二重鎖切断

日に補正した Cs-137 が 1,677 Bq のタイプ B に分類される土壌から分離した不溶性セシウム粒子 (PB-1) を RPE1-hTERT 細胞と 1 日および 3 日共培養した後に、粒子辺縁領域と粒子から 1 cm 離れた場所に位置する細胞で DNA 二重鎖切断の指標となる 53BP1 フォーカスに陽性を示す細胞の割合を調べた(図III-13)。未処理時に 1 割弱程度が 53BP1 フォーカスに陽性を示す細胞上に PB-1 をのせて共培養すると、1 日後には粒子辺縁領域にある 69 % の細胞で 53BP1 フォーカスが形成され、共培養を 3 日間継続すると同じ領域のすべての細胞でフォーカスの形成が確認された(図III-13)。粒子から 1 cm 離れた領域にある細胞では、共培養開始から 1 日後に約 34 %、3 日後に 97 % の細胞で 53BP1 のフォーカス形成が確認された。次に、90 Bq の Cs-137 を有する土壌から分離した不溶性セシウム粒子(PB-2)を細胞と 1 日共培養したときの DNA 二重鎖切断の誘発について検討した(図III-14)。粒子辺縁領域では 53 %、粒子から 1 cm 離れた領域では 14 % の細胞が 53BP1 フォーカス陽性を示した。以上の結果より、100 Bq 以上の Cs-137 を有するタイプ B の不溶性セシウム粒子は少なくとも粒子から 1 cm 離れた領域にある細胞に対して DNA 二重鎖切断を誘発するが、誘発される細胞数は粒子に含まれる Cs-137 放射エネルギーや共培養する時間とともに増加し、線源粒子から離れると誘発率が低下することが明らかとなった。



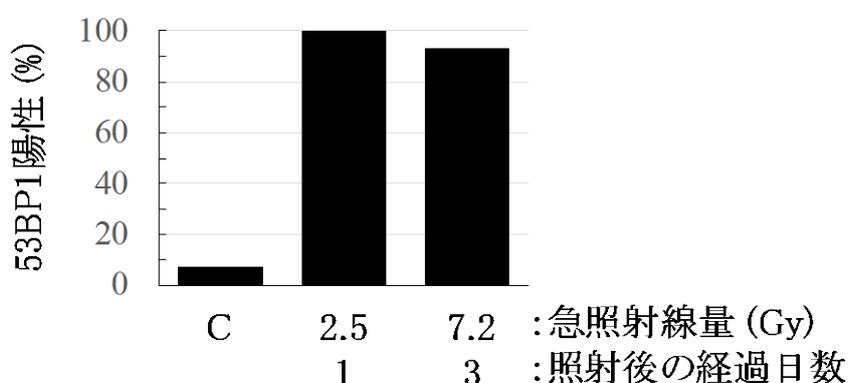
図III-13. 不溶性セシウム粒子 PB-1 共培養による 53BP1 フォーカスの形成

(a) 53BP1 フォーカス (赤) の検出例。細胞核は青の領域。(b) 不溶性セシウム粒子 PB-1 との共培養による 53BP1 フォーカスの誘発。粒子辺縁と 1cm では、共培養時間 1 日と 3 日の結果はそれぞれ左右の棒グラフで示されている。C は非照射時の結果を示す。

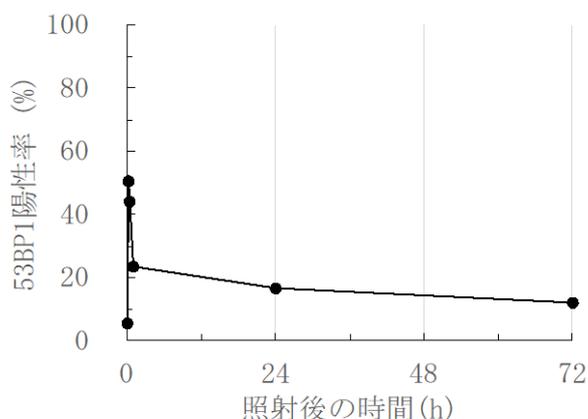


図III-14. 不溶性セシウム粒子 PB-2 と 1 日共培養による 53BP1 フォーカスの形成
C は非照射時の結果を示す。

不溶性セシウム粒子の持続的な被ばくによる DNA 二重鎖切断の誘発状況を、X 線発生装置による急性均等被ばくによる誘発状況と比較・検討した(図III-12、III-15)。不溶性セシウム粒子周辺細胞に付与される線量評価は、分担研究者の遠藤が本課題の平成 31 年度研究報告書に記載した方法を用いた。その結果、PB-1 辺縁の線量は共培養 1 日、3 日の条件でそれぞれ 2.5 Gy、7.2 Gy となった。本年度実施した急照射実験では、それぞれの線量を照射した後に、該当する線量に達するまで不溶性セシウム粒子を共培養した時間と同じ日数が経過した時点で 53BP1 の検出を行なった。急照射実験では照射 30 分後に最も多く観察されるフォーカス数が照射 12-24 時間にいたるまでの時間帯で急激に減少し、24 時間以降になるとフォーカスの減少速度が緩やかになることが報告されている。本年度実施した急照射実験では、両方の線量でほぼすべての細胞が照射 24 時間後に 53BP1 フォーカスを形成しており、7.2 Gy 照射群で照射後 72 時間が経過すると陽性細胞が 93% となり、照射 24 時間後から陽性細胞の割合が若干減少した。急照射 3 日後の 53BP1 フォーカス陽性細胞の割合が、不溶性セシウム粒子と 3 日間共培養したときの陽性率と類似していたが、その時間帯に至るまでの陽性率の変動は異なっていた。不溶性セシウム粒子と共培養すると時間経過とともに陽性率が増加したことに對し、急照射では直後にほぼすべての細胞が陽性細胞となった後、照射 24 時間以降にフォーカスを完全に消失する細胞が若干ながら 1 割弱ほど観察された。



図III-15. 短時間均等照射による 53BP1 フォーカス陽性細胞
C は非照射時の結果を示す。



図III-16. 4.3 mGy の短時間均等照射後の 53BP1 フォーカス陽性細胞の時間変化

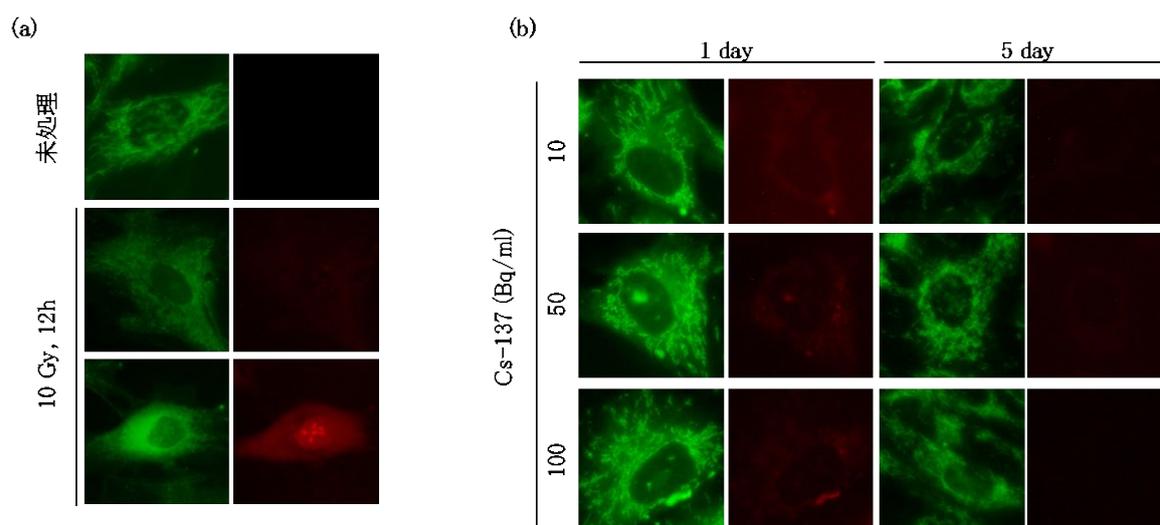
次に、不溶性セシウム粒子 PB-1 から 1 cm 離れた領域における線量を急照射したときの 53BP1 陽性率の変動に関する検討を計画した。PB-1 から 1 cm 離れた場所の線量評価は、共培養 1 日および 3 日間でそれぞれ 0.05 mGy および 0.14 mGy であった。今回使用した X 線発生装置で照射可能な最低線量は 4.3 mGy であり、その線量の急照射 1 日後と 3 日後の 53BP1 フォーカス陽性細胞について定量した(図III-16)。照射後 15-30 分で 40-50 %の細胞に細胞あたり 4 個以内の 53BP1 フォーカスが形成され、照射 1 時間後には 53BP1 陽性率が 20 %に減少した。照射 1 日後、3 日後の陽性率は 16 %、10 %と緩やかに減少していき、照射 3 日後の陽性細胞の 9 割以上が細胞あたり 1 個の 53BP1 フォーカスが検出された。一方、PB-1 と共培養して 1 cm 離れた部位の領域では急照射に使用した 4.3 mGy よりもはるかに低い線量が付与されていたにもかかわらず、53BP1 陽性率は 34 %、97 %といずれの共培養日数でも高く、時間経過とともに増えていった。

本課題では 9 Bq、90 Bq、1,677 Bq の Cs-137 が含まれる不溶性セシウム粒子を用いて検討を行ってきた。そこで類似の放射エネルギーを均等に暴露させた細胞における 53BP1 フォーカスの誘発について検討した。このため、培地中の濃度が 10 Bq/ml、100 Bq/ml、1,000 Bq/ml となるように Cs-137 を加えて、細胞に 24 時間処理したときの 53BP1 フォーカス形成能を調べた。その結果、いずれの濃度で処理を行っても 53BP1 フォーカス陽性率や細胞あたりのフォーカス数は未処理細胞と同等であった。分担研究者の遠藤によって培地に Cs-137 が均等に分布するときの細胞の線量を評価した結果を表III-4 まとめた。1,000 Bq/ml の均等被ばくで 0.09 mGy と評価されたことから、今回得られた結果は従来報告されてきた短時間均等照射実験による 53BP1 フォーカス誘発能の知見と矛盾はない。しかしながら、1,000 Bq/ml で 24 時間処理による線量は PB-1 から 1 cm 離れた距離で 1 日間粒子と共培養したときよりも 1.8 倍高い線量となるが、不溶性セシウム粒子と共培養した局所被ばくで圧倒的に 53BP1 の誘発能が高い。この結果は、局所被ばくと均等被ばくでは DNA 二重鎖切断の誘導メカニズムが異なることを示唆している。

表III-4. Cs-137 含有培地を 1 日処理された細胞の被ばく線量評価

培地中の Cs-137濃度 (Bq/ml)	線量 (mGy)		
	β 線	γ 線	$\beta + \gamma$ 線
10	8.81×10^{-4}	6.45×10^{-5}	9.46×10^{-4}
100	8.81×10^{-3}	6.45×10^{-4}	9.46×10^{-3}
1,000	8.81×10^{-2}	6.45×10^{-2}	9.46×10^{-2}

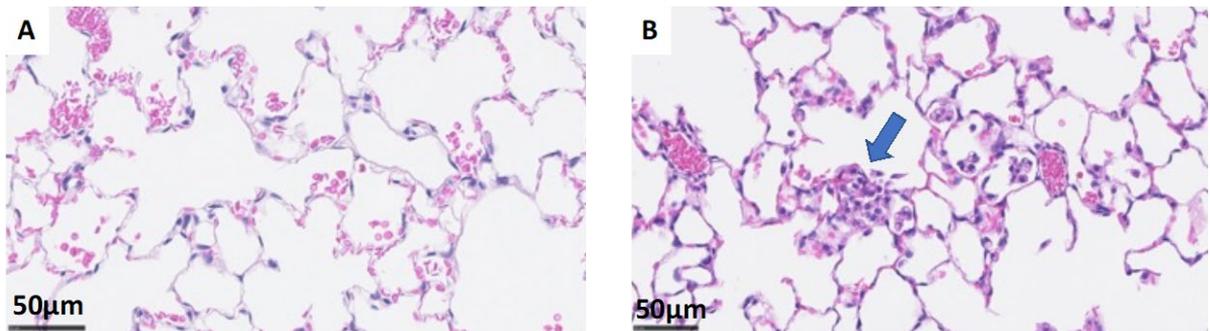
次に、DNA 二重鎖切断を誘発しない Cs-137 処理による酸化ストレスの誘発の有無について検討を行なった。低線量率放射線被ばくによってミトコンドリアに由来する活性酸素種が生じることによって細胞応答反応が活性化することが知られている。このため、100 Bq/ml までの濃度で Cs-137 を処理した細胞でミトコンドリアの形態とミトコンドリア由来の活性酸素種の検出を行なった(図III-17)。陽性コントロールとして、RPE1-hTERT 細胞に 10 Gy を照射して 12 時間後には細胞質でミトコンドリアの断片化が観察され、活性酸素種が誘発される状況が確認された。一方、10、50、100 Bq/ml の濃度で Cs-137 含有培地を 1 日あるいは 5 日処理を行なったところ、ミトコンドリア形態に関しては 5 日で断片化様の変化が見られたが、軽度な変化にとどまっていた。ミトコンドリア由来活性酸素種については 1 日処理で若干誘発される状況が確認されたが、5 日後には未処理時と同じレベルに戻っていた。このため、不溶性セシウム粒子と同等の放射能を持つ Cs-137 均等被ばくではミトコンドリア由来の活性酸素種や DNA 二重鎖切断の誘発が見られなかった一方で、不溶性セシウム粒子による DNA 二重鎖切断能は短時間照射や均等照射とは異なる時空間的变化が見られたことから、放射能が低いタイプ A に分類される不溶性セシウム粒子による酸化ストレスの影響について、不溶性セシウム粒子を用いた検討が必要になることが示唆された。



図III-17. Cs-137 処理によるミトコンドリアに及ぼす影響解析
 緑：ミトコンドリア形状、赤：ミトコンドリア由来活性酸素種
 (a)未照射および陽性コントロール、(b)Cs-137 含有培地処理細胞の結果

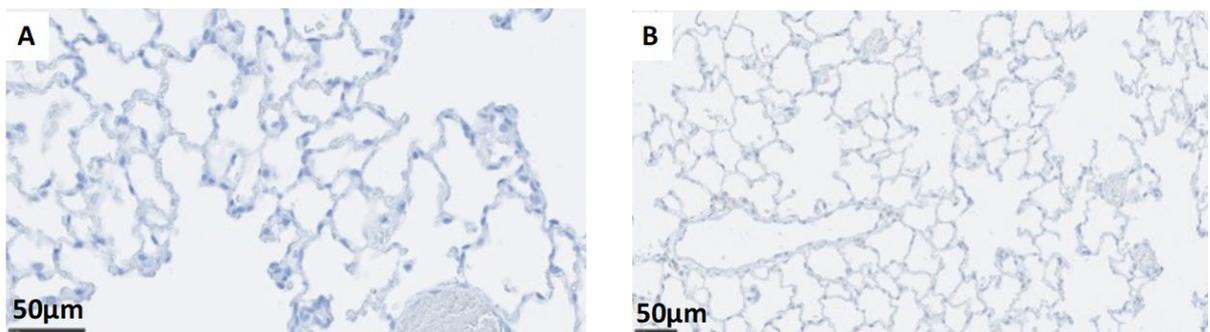
4. 不溶性セシウム粒子の体内分布と病理解析

非放射性のシリカ粒子投与後 7 日目において、HE 染色による病理診断では、非投与コントロール群および低用量(2.5mg/kg bw)では組織反応が見られないが(図III-18A)、それ以上の投与群では、肺胞内のマクロファージの浸潤、増加が観察され、肺胞マクロファージの集簇が出現した(図III-18B、矢印)。

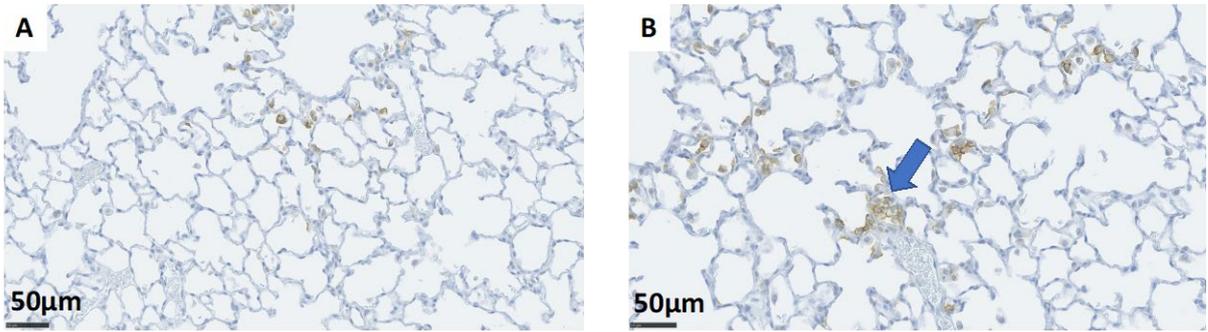


図III-18. 肺胞部位の組織像 (HE 染色、A:非投与コントロール、B: 15.0 mg/kg bw 投与)

炎症性マクロファージの免疫組織染色(図III-19A,B)では、非投与コントロール群では炎症性マクロファージがわずかに見られるだけだが(図III-19B)、粒子を投与(10.0mg/kg bw)すると炎症性マクロファージが滲出し(図III-20A)、高用量(15.0mg/kg bw)では、粒子を取り込んだ肺胞マクロファージの周囲に集簇を形成した(図III-20B、矢印)。一方、常在性マクロファージの免疫組織染色では、投与量に関わらずその数は一定であった(図省略)。

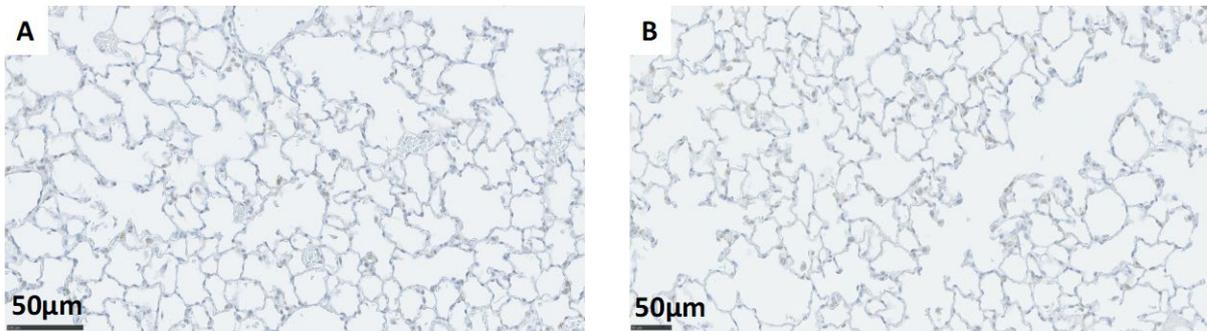


図III-19. 肺胞部位の組織像 (CD11b 染色、A:染色陰性コントロール、B: 非投与コントロール)



図III-20. 肺胞部位の組織像（CD11b染色、A: 10.0 mg/kg bw 投与、B: 15.0 mg/kg bw 投与）

肺腫瘍（腺腫、腺癌）の標的細胞である肺胞II型上皮細胞の数は、非投与コントロールでも投与群でも大きな違いは見られなかった（図III-21A,B）。



図III-21. 肺胞部位の組織像（SFTPC染色、A:非投与コントロール、B: 10.0 mg/kg bw 投与）

以上の所見を表III-5にまとめた。不溶性シリカ粒子は肺胞マクロファージに貪食され、集簇を形成することが、炎症性反応を調べる免疫染色により裏付けられた。

表III-5 不溶性粒子投与肺の組織変化まとめ

投与粒子量 (mg/kg bw)	肺胞 MΦ 集簇像	炎症性 MΦ (CD 11b)	常在性 MΦ (CD 68)	肺胞II型細胞 (SFTPC)
0	—	+	+	+
2.5	—	+	+	+
5.0	+	++	+	+
10.0	+	++	+	+
15.0	++	+++	+	+

IV. 考察

粒子の分離実験により、土壌試料中には多くの不溶性セシウム粒子が比較的安定に存在していることが分かった。粒子の土壌中での濃度を出すためには、土壌の採取面積当たりの粒子数を導出する必要があり、より多くの粒子の分析が必要となる。本研究で見つけた不溶性セシウム粒子は、その大きさ、形状、放射能、セシウム同位体の放射能比から、すべてタイプ B と呼ばれるものであると考えられる¹⁰⁾。このように不溶性セシウム粒子には、地域によって粒子のタイプに明確な特徴があることが分かった。得られた粒子はすべて数 100 μm の大きさを持ち、100 Bq 以上の大きな放射能を持っていた。主成分についても、既報のタイプ B 粒子の特徴をよく再現することが分かった。また、不溶性セシウム粒子に含まれるストロンチウムとプルトニウムの分析に成功し、セシウムに対してストロンチウムはかなり少なく、プルトニウムに至ってはさらに少ないことが分かった。セシウム、ストロンチウム、プルトニウムはそれぞれ揮発性の異なる元素であり、セシウムが最も揮発性が高く、プルトニウムはほとんど揮発しない。これらの元素の含有量にこれほど大きな差があるということは、仮に揮発過程により粒子にこれらの元素が取り込まれたと考えた場合、炉内温度はせいぜい 2,000 K 程度であると考えられる。これらの不溶性セシウム粒子に含まれるセシウム、ストロンチウム、プルトニウムの放射能の絶対値には大きな差があるが、比をとった場合粒子間での差は小さく、これらの不溶性セシウム粒子は、温度などが比較的似た条件、過程で生成したと考えられる。

被ばく線量評価では、肺胞上皮細胞における線量評価体系を確立した。計算された線量は β 線と γ 線の放出率を用いて、それぞれの核種 1 崩壊当たりの線量率とした。ICRP が勧告する線量を元に計算した線量率は肺全体で同じ値を適用するので細胞の位置に依存せず一定の値となるため、図III-11において直線で示した。本研究において、不溶性セシウム粒子の沈着場所周辺の線量率は非常に高くなるという結果が得られているが、ICRP モデルで線量率を評価した場合には線量は肺全体で平均化されるため、線量の値は過小評価となる。不溶性セシウム粒子近傍の高線量は β 線に由来するものであるが、この β 線が局所的に高い線量を与える効果を ICRP モデルでは考慮できないといえる。 γ 線を放出する Cs-134 及び Cs-137 は数 cm 以上不溶性セシウム粒子から離れると多肺胞モデルで計算された線量率が ICRP モデルを下回る。さらに遠い場所では ICRP モデルは線量を過大評価する。 γ 線を放出せず、 β 線のみを放出する Sr-90 は不溶性セシウム粒子から 1cm 離れた時点で多肺胞モデルと ICRP モデルの線量率が逆転し、 β 線が届かない細胞の線量は制動放射線のみとなるため、非常に小さい。しかし、ICRP モデルでは全ての場所で同じ線量が付与されるものとして扱われる。どの核種においても、ICRP モデルによって算出される線量率は実際に不溶性セシウム粒子が与える線量率とは大きく異なることが確認された。ICRP モデルと多肺胞モデルでは得られる線量率に最大 5 桁、1 肺胞モデルとは最大 10 桁の差がある。これらの結果は、不溶性セシウム粒子による被ばくの特徴である空間分布を持った線量は、ICRP 計算モデルでは再現されず、局所的な生物応答を過小評価する可能性が示唆された。

細胞影響解析では、不溶性セシウム粒子による持続的かつ局所照射による細胞影響と急照射や均等照射による細胞影響の違いについて検討を行なった。100 Bq 以上の Cs-137 を有するタイプ B の不溶性セシウム粒子が周辺の細胞に対して高い細胞致死性を有する DNA 二重鎖切断を誘発するため、DNA 二重鎖切断を各種照射による影響を比較する指標として用いた。急照射では線量に

依存する数の DNA 二重鎖切断が一度に生じるために、DNA 二重鎖切断マーカーとして用いた 53BP1 フォーカスは照射 30 分後に最も多く検出されて、その後は DNA 二重鎖切断が修復されるために時間経過とともにフォーカス数は減少していく。本課題で実施した検討においても、細胞実験系に適した線量評価体系によって評価された不溶性セシウム粒子と同等の線量を急照射した結果においても同様のフォーカス陽性細胞の変動が確認された。一方で、不溶性セシウム粒子によって生じる DNA 二重鎖切断は共培養時間とともに増加することを確認している。誘発された DNA 二重鎖切断は修復されていくことが急照射の実験結果より示されていることから、不溶性セシウム粒子の共培養期間中には DNA 二重鎖切断の誘発と修復が同時に進行していると考えられる。このため、不溶性セシウム粒子の共培養時間とともに 53BP1 フォーカスが増加する理由として、(1) DNA 二重鎖切断修復能を上回る頻度で不溶性セシウム粒子による DNA 二重鎖切断が生じている、(2) 不溶性セシウム粒子によって誘発される DNA 二重鎖切断には修復できないあるいは修復に時間がかかるものが含まれる、ことが理由として考えられた。ただ、不溶性セシウム粒子から 1 cm 離れて線量が 1 mGy 以下と評価された領域においても急照射、均等照射に比べて多い DNA 二重鎖切断が検出されたことから、局所被ばくでは均等被ばくとは異なるメカニズムが DNA 二重鎖切断の誘発に関与する可能性が考えられる。このメカニズムとしてバイスタンダー効果が考えられる。低線量率被ばく時のように被ばく細胞と被ばくをしてしない細胞が混在する環境において、被ばくをしていない細胞の一部で被ばく細胞と同じように DNA 二重鎖切断が生じることが報告されている。被ばく細胞と非被ばく細胞間の情報伝達を介して、非被ばく細胞に DNA 二重鎖切断が誘発されるメカニズムが考えられており、このような非被ばく細胞で被ばく細胞様の事象が誘発されることをバイスタンダー効果と呼ばれている。不溶性セシウム粒子から 1 cm 離れた場所に相当する線量の 1.8 倍高い線量で急性均等照射を行なうと、約半数の細胞でのみ 53BP1 フォーカスが検出されたことから、不溶性セシウム粒子による照射でも DNA 二重鎖切断を誘発された細胞とその損傷を有しない細胞が混在する環境が予想されるために、バイスタンダー効果が関与する可能性がある。また、バイスタンダー効果のメカニズムとして分泌因子を介する経路が考えられている。放射線に被ばくした細胞から分泌因子の放出が促進されていること、また、不溶性セシウム粒子辺縁には高い線量で照射された細胞領域があるので、高線量照射細胞から放出される分泌因子を受け取ることによって粒子から離れた領域でも均等照射より多くの DNA 二重鎖切断が検出された可能性がある。いずれのメカニズムにおいても、不溶性セシウム粒子による局所被ばくと均等照射による細胞影響は異なることから、不溶性セシウム粒子を使用した局所被ばくの基礎的な知見を収集していくことが重要である。

粒子状物質を吸入摂取したときの影響を実験動物により調べる方法として、気管内投与は有効な方法の一つである¹¹⁾。シリカ粒子の投与量が 100 mg/kg bw 程度であれば、投与後 3 日でも、肺全体に粒子を貪食した肺胞マクロファージや白血球の出現、肺胞上皮の増生などが HE 染色標本でも観察可能である¹²⁾。しかしながら、今回は最大投与量でも 15 mg/kg bw であり、HE 染色で病理変化を明確に捉えることが難しかったが、炎症性マクロファージに対する免疫染色により炎症反応とその分布を見ることが出来ることが分かった。このことは、不溶性粒子投与初期において、HE 染色での病理変化が明らかでなくても、炎症性マクロファージの免疫染色は炎症反応を捉えられる鋭敏なマーカーの一つとなることを示している。また粒子が高用量であれば、炎症性マ

クロファージの集簇像が観察され、これも炎症反応マーカーとして利用できることがわかった。一方、肺胞上皮細胞のうち、発がん（腺腫瘍）の標的細胞であるII型肺胞上皮細胞についても免疫染色することができ、不溶性粒子投与の初期においては特に変化を現さないことがわかった。今回の研究結果の意義は、低用量の不溶性粒子の肺胞内取り込みでも炎症反応が生ずることを明らかにし、また、肺胞内に取り込まれた粒子と、それを取り込んだマクロファージ、及び標的細胞の分布と位置関係がわかり、細胞レベルでの線量評価をする上での基本的なパラメータが得られたことである。今後、実際に放射性物質を含む不溶性粒子を投与し、肺中の放射線量を経時的に測定し、その活性のリテンションを求めることにより、最終的に内部被ばく線量を算出することに結び付けられる。不溶性セシウム粒子の生物影響については、粒子そのものの影響とそこから放出される放射線による影響の複合影響になる。粒子そのものによる炎症反応が、放射線による急性の炎症反応や、晩発の発がん過程にどのように影響を及ぼすのかは不明である。これまでの研究で、甲状腺がんなど腫瘍組織中に腫瘍に付随したマクロファージ(Tumor associated macrophage)が混在していることがわかっており、それらが腫瘍の形成・進展に促進的に関与（腫瘍形成性の支持：pro-tumorigenic)していることが示されている¹³⁾。今後、標的細胞レベルでの内部被ばく線量評価の推定を行い、同程度の線量の外部被ばくによる影響を比較することにより、不溶性粒子投与による炎症反応と、放射線そのものの影響に対する修飾効果を明らかにすることが出来るだろう。

V. 結論

環境中の不溶性セシウム粒子の一部で、放射性セシウム以外の放射性元素としてストロンチウム、プルトニウムが含まれており、Cs-137に対してそれぞれ 10^{-4} 、 10^{-8} オーダーと含有量が少ないことを明らかにした。Cs-137に対する比がほとんど一定であることから、粒子の生成過程が比較的均一な環境で起こっていたことを示唆している。

複数の肺胞モデルを作成して肺胞上皮細胞における不溶性セシウム粒子の被ばく線量を評価する体制を確立した。肺全体を平均化する被ばく線量評価では、粒子周辺の β 線が寄与する範囲は過小評価となり、 β 線がとどかない範囲でも大きく異なることを確認した。不溶性セシウム粒子による被ばくの特徴である空間分布を持った線量は、ICRP計算モデルでは再現されず、局所的な生物応答を過小評価する可能性が示唆された。

細胞生物学的評価でも、不溶性セシウム粒子による持続的局所被ばくによる影響が、これまでにデータが収集されている急性均等照射と異なることを示唆した。不溶性セシウム粒子では暴露時間とともにDNA二重鎖切断数が増加すること、同一の線量でも均等被ばくで得られた結果よりも多くのDNA二重鎖切断が誘発され、特に β 線が届かない低線量領域でその影響が顕著に出ることが明らかになった。このため、均等照射で得られた結果から不溶性セシウム粒子の影響を推定することは難しく、粒子を用いる基礎的な知見を収集することが重要であることを示唆した。

動物実験では、低用量の不溶性粒子の気管内投与により炎症性マクロファージの肺胞内の滲出が生じ、反応が濃度依存性に起きることが免疫染色により明らかになった。一方、発がん（腺腫瘍）の標的細胞であるII型肺胞上皮細胞についても免疫染色することができ、不溶性粒子投与の初

期においては特に変化を現さないことがわかった。

VI. 次年度以降の計画

これまで分析した不溶性粒子中のストロンチウム、プルトニウムについてさらに検体数を増やし、粒子の生成プロセスが比較的似ていると考えられる現在の仮説の検証を行う。また不溶性粒子の模擬粒子の生成を進め、放射性セシウムを含んだ粒子の提供から生物影響実験を展開する。細胞影響では、DNA 二重鎖切断を生じないタイプ A に相当する Cs-137 を有する粒子によって酸化ストレス状態の誘発について検討するとともに、肺胞内で上皮細胞とともに被ばく影響を受ける標的であるマクロファージへの影響を解析する。動物実験では、放射性模擬粒子を投与し、その分布・動態と経時的な変化を調べる。評価委員会からのコメントをうけて、肺腫瘍の発がん性試験に用いられるモデル動物として A/J マウスを導入し、放射性セシウム不溶性粒子投与による肺の病理変化を調べて晩発影響に関する知見を得る。以上のような粒子の性状や生物学的情報を、これまでに確立してきた線量評価体系に組み込み、被ばく線量と生物影響の相関についても引き続き情報を収集する。

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) Martin PG, Jones CP, Bartlett S, Ignatyev K, Megson-Smith D, Satou Y, Cipiccia S, Batey DJ, Rau C, Sueki K, Ishii T, Igarashi J, Ninomiya K, Shinohara A, Rust A, Scott TB. Structural and compositional characteristics of Fukushima release particulate material from Units 1 and 3 elucidates release mechanisms, accident chronology and future decommissioning strategy, Scientific Reports 2020; 10: 22056.
- 2) Igarashi J, Zheng J, Zhang Z, Ninomiya K, Satou Y, Fukuda M, Ni Y, Aono T, Sueki K, Shinohara A. Identification of Sr and Pu in different type of insoluble particles released by the accident of Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant, KEK-Proceedings: Proceedings of the 21th Workshop on environmental Radioactivity 2020; 2020-4: 24-29.
- 3) Kajiwara T, Ninomiya K, Shinohara A, Yamaguchi Y. Distribution of ^{90}Sr near the FDNPP released from the accident of FDNPP, KEK-Proceedings: Proceedings of the 21th Workshop on environmental Radioactivity 2020; 2020-4: 51-56.

イ) 学会発表等

- 1) 五十嵐淳哉、鄭建、張子見、二宮和彦、佐藤志彦、福田美保、倪有意、青野辰雄、末木啓介、篠原厚、福島原発事故により放出された不溶性粒子のプルトニウム同位体比、日本放射化学会第 64 回討論会、大阪、2020 年 9 月
- 2) 梶原知啓、二宮和彦、篠原厚、山口喜朗、原発周辺土壌中における ^{90}Sr と ^{137}Cs の分布と

その比の方角依存、日本放射化学会第 64 回討論会、大阪、2020 年 9 月

- 3) 鈴木正敏、遠藤暁、松谷祐輝、岡壽崇、小野拓実、光安優典、木野康志、高橋温、篠田壽、漆原佑介、中島裕夫、二宮和彦、三浦富智、稲葉洋平、千田浩一、福本学、福島原発事故による動物・環境試料を用いた放射線被ばく影響解析、日本放射線影響学会第 63 回大会、福島、2020 年 10 月
- 4) 鈴木正敏、遠藤暁、松谷祐輝、二宮和彦、稲葉洋平、千田浩一、福本学、不溶性セシウム粒子による細胞影響解析、京都大学複合原子力科学研究所専門研究会、大阪、2020 年 12 月

ウ) 書籍・総説

なし

エ) 受賞

なし

オ) 特許

なし

カ) 環境行政への活用・貢献実績

なし

引用文献

- 1) Leggett RW, Williams LR, Melo DR, Lipsztein IL. A physiologically based biokinetic model for cesium in the human body, *Science of the Total Environment* 2003; 317: 235-255.
- 2) Adachi K, Kajino M, Zaizen Y, Igarashi Y. Emission of spherical cesium-bearing particles from an early stage of the Fukushima nuclear accident, *Scientific Reports* 2013; 3: 2554
- 3) Igarashi Y, Kogure T, Kurihara Y, Miura H, Okumura T, Satou Y, Takahashi N, Yamaguchi A. A review of Cs-bearing microparticles in the environment emitted by the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident. *Journal of Environmental Radioactivity* 2019; 205-206:101-18.
- 4) Igarashi J, Zheng J, Zhang Z, Ninomiya K, Satou Y, Fukuda M, Ni Y, Aono T, Shinohara A. First determination of Pu isotopes (^{239}Pu , ^{240}Pu and ^{241}Pu) in radioactive particles derived from Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident, *Scientific Reports* 2019; 9: 11807.
- 5) 第 5 回微小粒子状物質健康影響評価検討会 資料 1-3、
http://www.env.go.jp/air/info/mpmhea_kentou/05/
- 6) ICRP, 1994. Dose Coefficients for Intakes of Radionuclides by Workers. ICRP Publication 68. Ann. ICRP 24 (4).
- 7) 山口彦之, 放射線生物学, 株式会社裳華房, 1995.

- 8) 高野幹久, 湯元良子. 肺胞上皮細胞におけるタンパク質・ペプチドの輸送とその制御. 膜. 2011; 36: 145-153.
- 9) ICRP, 1995. Age-dependent Doses to the Members of the Public from Intake of Radionuclides - Part 5 Compilation of Ingestion and Inhalation Coefficients. ICRP Publication 72. Ann. ICRP 26 (1).
- 10) Satou Y, Sueki K, Sasa K, Yoshikawa H, Nakama S, Minowa H, Abe Y, Nakai I, Ono T, Adachi K, Igarashi Y. Analysis of two forms of radioactive particles emitted during the early stages of the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Station accident, *Geochemical Journal* 2018; 52: 137-143.
- 11) Driscoll KE, Costa DL, Hatch G, Henderson R, Oberdorster G, Salem H, Schlesinger RB. Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations, *Toxicological Sciences* 2000; 55:24-35.
- 12) Chen Y, Chen J, Dong J, Jin Y. Comparing study of the effect of nanosized silicon dioxide and microsized silicon dioxide on fibrogenesis in rats, *Toxicology and Industrial Health* 2004; 20:21-7.
- 13) Ryder M, Gild M, Hohl TM, Pamer E, Knauf J, Ghossein R, Joyce JA, Fagin JA. Inhibits Tumor-Associated Macrophages and Impairs BRAF-Induced Thyroid Cancer Progression, *PLoS ONE* 2013; 8: e54302.

Interdisciplinary joint research for elucidation of biological effects of radiocesium-bearing insoluble particle

Masatoshi Suzuki¹, Kazuhiko Ninomiya², Satoru Endo³, Yutaka Yamada⁴

1 International Research Institute of Disaster Science, Tohoku University, Lecturer

2 Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, Assistant Professor

3 Quantum Energy Applications, Graduate School of Advanced Science and Engineering, Hiroshima University, Professor

4 Department of Radioecology and Fukushima Project, Center for Advanced Radiation Emergency Medicine, National Institutes for Quantum and Radiological Sciences and Technology, Research Director

Key word: radiocesium-bearing insoluble particle, the effect of local radiation exposure, physicochemical property analysis, Monte Carlo simulation, dose evaluation, pathological analysis

Abstract

Radiocesium-bearing insoluble particles were released into the environment after the accident of Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. Many points remain to be elucidated regarding the characteristics of the particles and the scientific evidences regarding biological effects are particularly insufficient. In this research project, we promote interdisciplinary joint research that crosses research fields and integrates fieldwork and benchwork, and accumulates the evidences of biological effects based on property analysis of the particle and dose evaluation, resulting in the contribution to risk estimation by radiocesium-bearing insoluble particle. Chemical analysis was performed using type B particle isolated from the soil, and ⁹⁰Sr and ²³⁹⁺²⁴⁰Pu were detected in addition to radiocesium, but the radioactivity ratio with ¹³⁷Cs were 10⁻⁴ and 10⁻⁸, respectively.

In order to evaluate radiation dose of lung by inhalation of radiocesium-bearing insoluble particle, the alveolar models were established. Comparing with the exposure dose averaged over the entire lung, the estimated dose of the area around the particle in which β-rays contributes was underestimated, and that of the area in which β-rays did not reach was also significantly different. Therefore, our simulation suggested that the dose estimation with the spatial distribution characteristic of exposure to insoluble particles may not be reproduced by the ICRP model and may underestimate the local biological response.

DNA double-strand break was induced by local irradiation of insoluble particle in which more than 100 Bq of Cs-137 was detected. The DNA lesion accumulated over the time of co-culture with the particle within 1 cm apart from the particle. The number of DNA double-strand breaks induced by the radiocesium-bearing insoluble particle was higher than that induced by the uniform irradiation with the equivalent dose to the particle, indicating that the additional mechanism may be involved in the induction of DNA double-strand breaks by the local irradiation of radiocesium-bearing insoluble particle.

Non-radioactive insoluble particles were administered to laboratory animals (rats) intratracheally. The histological tissue preparations of the lungs were made, and pathologically diagnosed. Immunohistochemical staining method of the alveolus epithelium cell and macrophage were examined, and it was shown that infiltration and aggregation of the inflammatory macrophages to the alveolus occurred in dose-dependent manner. On the other hand, the type II alveolus epithelium cell which was a target cell for tumor was found not to show a change in early phase. These results provide the information that is useful for microdosimetry and risk evaluation with the radiocesium-bearing insoluble particle.

令和 2 年度放射線健康管理・健康不安対策事業

（放射線の健康影響に係る研究調査事業）

研究成果報告

事故後に発見された小児若年者甲状腺疾患のメカニズムに関する研究

主任研究者 鈴木真一（福島県立医科大学医学部甲状腺内分泌学講座・主任教授）

研究要旨

2011 年 3 月の東日本大震災に連動して、東京電力福島第一原子力発電所事故が発生した。この事故により、ヨウ素 131 を含む種々の放射線物質が周辺に拡散した。直後に福島県は福島県民健康調査をスタートさせ、福島県民の長期にわたる健康管理のシステムを整えた。この調査では震災時に 18 歳以下であった福島県民全員に甲状腺超音波検査が計画された。先行検査（2011 年～2014 年 3 月）の対象者は約 37 万人であった。第 1 回本格検査（検査 2 回目）（2014 年 4 月～2016 年 3 月）では、約 38 万人がその対象となった。いずれの検査においても第一次検査（スクリーニング検査）では甲状腺超音波検査が行われた。2017 年 6 月の結果では、FNAC が施行された被験者中 187 名が「“悪性”ないし“悪性疑い”」と診断された。

2013 年から 2016 年の間に福島県立医科大学で手術施行された 138 例を解析した。98.6%が甲状腺乳頭がんの診断であった。*BRAF*^{V600E} 遺伝子変異は 69.6%に認められた。一方、*RET/PTC3* 遺伝子異常は 0.7%であった。*BRAF*^{V600E} 遺伝子変異が福島で多く認められ、*RET/PTC3* 遺伝子異常が多いチェルノブイリ事故後に発見された甲状腺がんとは異なっていた。

内部被ばくを含めた被ばく線量と甲状腺がんとの関連を検討するために、原子放射線の影響に関する国連科学委員会（The United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: UNSCEAR）2013 年報告書によって評価された甲状腺吸収線量のデータを用いて解析を行った。放射線被ばく線量を複数の評価方法を用いて甲状腺がんとの関連を検討した結果、本格検査 1 回目（検査 2 回目）までに発見された甲状腺がん（疑い含む）と放射線被ばくとの明らかな関連はみられなかった。

キーワード：甲状腺がん 福島第一原子力発電所事故 福島県民健康調査 甲状腺超音波検査
研究協力者

志村浩己（福島県立医科大学放射線医学県民健康管理センター 甲状腺検査部門長），鈴木悟（福島県立医科大学放射線医学県民健康管理センター 甲状腺検査副部門長），松塚崇（福島県立医科大学放射線医学県民健康管理センター 甲状腺検査副部門長），山下俊一（福島県立医科大学），光武範吏（長崎大学原爆後障害医療研究所 主任教授），石川徹夫（福島県立医科大学放射線物理学講座 主任教授），大平哲也（福島県立医科大学疫学講座 主任教授），山谷幸恵（福島県立医科大学甲状腺内分泌学講座），関野瑞希（福島県立医科大学甲状腺内分泌学講座）

研究参加者

岩館学（福島県立医科大学甲状腺内分泌学講座 講師），鈴木聡（福島県立医科大学甲状腺内分泌学講座 講師），松本佳子（福島県立医科大学甲状腺内分泌学講座 助教）

I 研究の目的

福島県では東京電力福島第一原子力発電所事故による放射性物質の拡散を踏まえ、平成23年3月11日時点で概ね18歳以下の福島県民を対象に平成23年10月から甲状腺超音波検査を実施している^{1,2)}。福島県県民健康調査で発見治療された甲状腺癌の症例は150例を超え、その病態解明を明らかにしつつある。一方、県民健康調査の甲状腺超音波検査で要精査となった症例の中には悪性所見だけでなく良性と判断された症例も存在する³⁾。甲状腺疾患の要因として放射線環境だけでなく、ヨード摂取環境、居住環境、性ホルモン環境、免疫環境など様々な環境因子が関連している可能性があるが、現在まで詳細な研究報告はされていない。本研究の目的は、平成23年3月11日以降に発見された小児若年者の甲状腺結節について手術で得られた病理組織や血液生化学検査などの臨床情報と県民健康調査で得られた放射線環境、ヨード摂取環境、居住環境、性ホルモン環境、免疫環境などを統合し、事故後に発見された小児若年者甲状腺結節のメカニズムを解明することにある（図1、図2）。前年度は福島県立医科大学で手術施行した138例についての遺伝子変異解析をおこなったが、本年度は穿刺吸引細胞診の検討、手術症例の詳細な臨床病理学的解析、甲状腺吸収線量と甲状腺がんとの関連を検討することとした。

II 研究方法

1. 福島県県民健康調査における福島原子力発電所事故後の小児・若年者の甲状腺細胞検査をおこなった。対象は先行検査（2011年～2014年3月）と第1回本格検査（検査2回目）（2014年4月～2016年3月）でおこなわれた穿刺吸引細胞診について検討した。
2. 先行検査2011年3月震災時に18歳以下で2012年から2016年までに福島県立医科大学で手術施行された138例に対して臨床病理組織学検査の解析および遺伝子変異解析をおこなった。臨床病理組織学検査は震災時年齢、手術時年齢、性別、腫瘍径、リンパ節転移、遠隔転移について検討した。遺伝子変異解析は *BRAF^{V600E}*, *RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *ETV6(ex4)/NTRK3* などを解析した。
3. 東日本大震災後のUNDCEARにより評価された甲状腺吸収線量と小児甲状腺がんとの関連を

検討した。本格検査1回目（検査2回目）までの結果をまとめ、内部被ばく線量を含めた放射線被ばく線量と甲状腺がんとの関連を検討した。

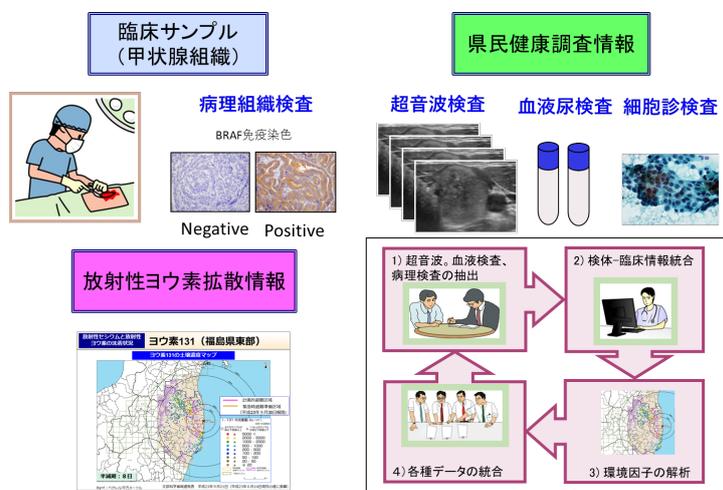


図1 研究方法の概略

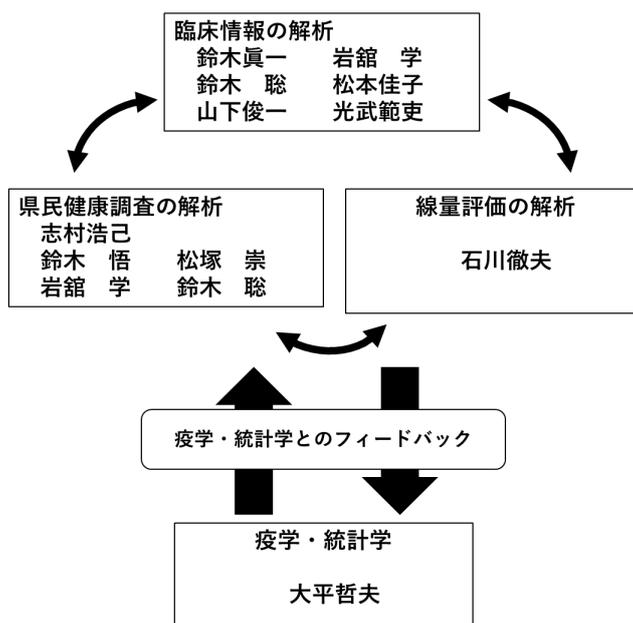


図2 研究体制

（倫理面への配慮）

本研究では福島医大で手術施行された症例および福島県県民健康調査で得られた症例の情報を収集するため、個人情報の保護には最大限の配慮をする。本研究における手術症例についてはすでに福島県立医科大学倫理審査委員会による審査を受け、すでに承認を得ている。また、県民健康調査の症例についてもすでに福島県立医科大学倫理審査委員会による審査を受け、すでに承認

を得ている。さらに、臨床情報と県民健康調査の情報を統合するための倫理審査を付加する予定である。本研究の参加者全員にはヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、人を対象とする医学研究に関する倫理指針をはじめ、各種指針・規範を遵守し、研究対象者の人権擁護と個人情報保護に十分に配慮した上で研究を実施する必要があることを再確認しており、本研究の開始時にも再度確認をおこなう。

III 研究結果

1. 福島県県民健康調査における福島原子力発電所事故後の小児・若年者の甲状腺細胞検査

2011年3月の東日本大震災に連動して、東京電力福島第一原子力発電所事故が発生した。この事故により、ヨウ素131を含む種々の放射線物質が周辺に拡散した。直後に福島県は福島県民健康調査をスタートさせ、福島県民の長期にわたる健康管理のシステムを整えた。この調査では震災時に18歳以下であった福島県民全員に甲状腺超音波検査が計画された。先行検査（2011年～2014年3月）の対象者は約37万人であった。第1回本格検査（検査2回目）（2014年4月～2016年3月）では、約38万人がその対象となった。いずれの検査においても第一次検査（スクリーニング検査）では甲状腺超音波検査が行われた。

この検査で甲状腺に病変が見つかり、その状態によって穿刺吸引細胞診（FNAC）が施行される。FNACの対象となる基準は、充実性の結節では直径5.1mm、嚢胞が形成されている場合は直径が20.1mm以上とされている。2017年6月の結果では、FNACが施行された被験者中187名が「悪性」ないし「悪性疑い」と診断された。

細胞診判定の基準は“甲状腺細胞診ベセスダシステム”に準拠している。この判定基準は国際的にも最も広く流布しているもので、我が国で決められている「甲状腺癌取り扱い規約」もこれを参考にして作られている。先行検査と第1回本格検査（検査2回目）で「悪性」ないし「悪性疑い」と判定された被験者はそれぞれ116名、71名であった（表1）。

表 1 Suspected for Malignancy and Malignant cases in the preliminary baseline survey (PBLs) and the first full-scale survey (1st FSS) diagnosed by fine needle aspiration cytology

	PBLs	1st FSS
No. of Suspected for Malignancy and Malignant cases	116	71
Male/ Female	39/ 77	32/ 39
Mean age \pm SD at the secondary examination (minimum – maximum)	17.3 \pm 2.7 years (8-22 years)	16.9 \pm 3.2 years (9-23 years)
Mean age \pm SD at the time of disaster (minimum – maximum)	14.9 \pm 2.6 years (6-18 years)	12.6 \pm 3.2 years (5-18 years)
Mean tumor size \pm SD (minimum – maximum)	13.9 \pm 7.8 mm (5.1-45.0 mm)	11.1 \pm 5.6 mm (5.3-35.6 mm)

PBLs, the Preliminary Baseline Survey; 1st FSS, the first Full - scale Survey.

細胞診の判定区分は”良性“は先行検査で 310 名（56.2%）、第 1 回本格検査で 94 名（45.2%）、”意義不明“は先行検査で 21 名（3.8%）、第 1 回本格検査（検査 2 回目）で 16 名（7.7%）であった。一方、”悪性疑い“は先行検査で 10 名（1.8%）、第 1 回本格検査（検査 2 回目）で 6 名（2.9%）、”悪性“は先行検査で 106 名（19.2%）、第 1 回本格検査（検査 2 回目）で 65 名（31.3%）であった（表 2）⁴⁾。

表 2 Fine cytologic interpretation by the Bethesda System

Categories	PBLs	1st FSS
I ND/ UNS	23 (4.2%)	14 (6.7%)
II Benign	310 (56.2%)	94 (45.2%)
III AUS/ FLUS	21 (3.8%)	16 (7.7%)
IV FN/ SFN	82 (14.9%)	13 (6.3%)
V SFM	10 (1.8%)	6 (2.9%)
VI Malignant	106 (19.2%)	65 (31.3%)
Total	552	208

PBLs, the Preliminary Baseline Survey; 1st FSS, the first Full-scale Survey; ND, Nondiagnostic; UNS, Unsatisfactory; AUS, Atypia of Undetermined Significance; FLUS, Follicular Lesion of Undetermined Significance; FN, Follicular Neoplasm; SFN, Suspicious for a Follicular Neoplasm; SFM, Suspicious for Malignancy.

2. 福島県における *BRAF*^{V600E}変異を伴う若年者甲状腺がんの臨床病理学的解析

震災時 18 歳以下の福島県民を対象に、県民健康調査「甲状腺検査」が行われている。「甲状腺検査」で発見された小児・若年者甲状腺がんのうち 2013 年から 2016 年にかけて福島県立医科大学附属病院で手術施行されたうちの 138 例の病理組織所見と遺伝子異常を解析した。この研究では、68 例を対象とする同様の研究⁵⁾に本格検査での発見が加わっている。

138 例の遺伝子変異解析では、*BRAF*^{V600E}変異が 96 例（69.6%）と最も多く、*RET*、*NTRK*、*ALK* 等の遺伝子の再構成を認めたのは 23 例（16.7%）、*BRAF*^{V600E}変異や遺伝子再構成のいずれも認めなかったのは 19 例（13.8%）であった。また、チェルノブイリ事故後に多くみられた *RET/PTC3* 遺伝子再構成はわずか 1 例であった（図 3）⁶⁾。

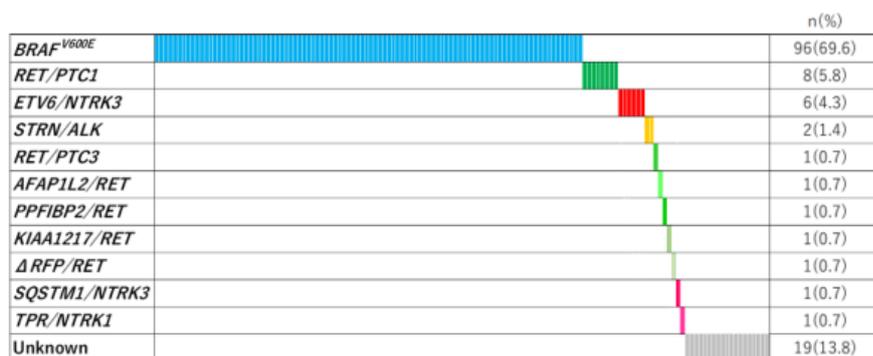


図 3 The plot of genomic alterations in 138 cases

病理組織型の検討では 138 例のうち甲状腺乳頭癌（Papillary thyroid cancer）が 136 例、低分化癌（Poorly differentiated carcinoma）が 1 例、Others（Chromophobe renal cell carcinoma-like thyroid carcinoma）が 1 例であった。甲状腺乳頭癌は古典型（Classical）が 125 例、篩型乳頭癌

（Cribriform-morular variant）が 4 例、濾胞型乳頭癌（Follicular variant）が 3 例、びまん性硬化型乳頭癌（Diffuse sclerosing variant）が 2 例、充実型乳頭癌（Solid variant）が 2 例であった。チェルノブイリで多くみられた充実型乳頭癌は少なかった（表 3）

表 3 Histopathology and Genome Alteration in 138 Cases

Mutation analysis (n=138)	Mutation of gene	No of Cases (%)	
Papillary thyroid cancer(n=136) Classic (n=125)	<i>BRAF</i> ^{V600E}	96 (69.6)	
	<i>RET/PTC1</i>	7 (5.1)	
	<i>RET/PTC3</i>	1 (0.7)	
	<i>AFAP1L2/RET</i>	1 (0.7)	
	<i>PPF1BP2/RET</i>	1 (0.7)	
	<i>ETV6(ex4)/NTRK3</i>	6 (4.3)	
	<i>SQSTM1/NTRK3</i>	1 (0.7)	
	<i>TPR/NTRK1</i>	1 (0.7)	
	<i>STRN/ALK</i>	1 (0.7)	
	Unknown	10 (7.2)	
	Cribiform -molecular variant (n=4)	Unknown	4 (2.9)
	Follicular variant (n=3)	<i>RET/PTC1</i>	1 (0.7)
		<i>STRN/ALK</i>	1 (0.7)
	<i>KIAA1217/RET</i>	1 (0.7)	
Diffuse sclerosing variant(n=2)	<i>Delta RFP/RET</i>	1 (0.7)	
	Unknown	1 (0.7)	
Solid variant (n=2)	Unknown	2 (1.5)	
Poorly differentiated carcinoma(n=1)	Unknown	1 (0.7)	
Others (n=1)	Unknown	1 (0.7)	

BRAF^{V600E}変異を有した 96 例と *BRAF* 野生型 42 例の比較検討においては、先行検査と本格検査（検査 2 回目および 3 回目）の間には *BRAF*^{V600E}変異の発見率に有意差を認めなかった (p=0.3344) (表 4)。

表 4 Association of the *BRAF*^{V600E} Mutation with the Period of Survey of 138 Cases

	All (n=138)	<i>BRAF</i> ^{V600E} (n=96)	Wild-type <i>BRAF</i> (n=42)	P value
First-round survey	89	59(66.3)	30(33.7)	^a 0.3344
Second- and third-round surveys	49	37(75.5)	12(24.5)	

^aChi-square test

また、*BRAF*^{V600E}変異を認めた甲状腺がんは野生型のがんよりも有意に腫瘍径が小さく (p<0.0001), リンパ節転移が多い (p=0.0026) ことが明らかになった (表 5)。

表5 Association of the *BRAF*^{V600E} Mutation With Clinicopathological Features of 138 Cases

	All (n=138)	<i>BRAF</i> ^{V600E} (n=96)	Wild type <i>BRAF</i> (n=42)	p value
Age (at surgery) Median (range)	18 (9-23)	18.5 (13-23)	17 (9-22)	0.0043
Age (at disaster: March 11, 2011) Median (range)	14.5 (5-18)	14.5 (8-18)	14 (5-18)	0.0776
Sex Male Female Female/Male	52 (36.6) 86 (63.4) 1.65	41 (42.7) 55 (57.3) 1.34	11 (26.2) 31 (73.8) 2.81	0.0654
Size (mm) ≤10.0 >10.0, ≤20.0 >20.0, ≤40.0 >40.0	15.3 ± 8.9 38 (27.5) 79 (57.2) 18 (13.0) 3 (2.2)	12.8 ± 6.8 36 (37.5) 54 (56.3) 4 (4.2) 2 (2.1)	20.9 ± 10.5 2 (4.8) 25 (59.5) 14 (33.3) 1 (2.4)	<0.0001
pEx factor pEx0 pEx1 pExX	74 (53.6) 63 (45.7) 1 (0.7)	56 (58.3) 39 (40.6) 1 (1.0)	18 (42.9) 24 (57.1) 0 (0)	0.1748
pT factor pT1a pT1b pT2 pT3 pT4	22 (15.9) 47 (34.1) 5 (3.6) 64 (46.4) 0 (0)	21 (21.9) 35 (36.5) 0 (0) 40 (41.7) 0 (0)	1 (2.4) 12 (28.6) 5 (11.9) 24 (57.1) 0 (0)	0.0001
pN factor pN0 pN1	29 (21.4) 109 (78.6)	13(13.5) 83 (86.5)	16 (38.1) 26 (61.9)	0.0026 (pN0 vs pN1)
pN1a pN1b	91 (65.5) 18 (13.1)	75 (78.1) 8 (8.3)	16 (38.1) 10 (23.8)	0.0015 (pN1a vs pN1b)
M factor M0 M1	135 (97.8) 3 (2.2)	96 (100) 0 (0)	39 (92.9) 3 (7.1)	0.0268

3. 東日本大震災後の UNSCEAR により評価された甲状腺吸収線量と小児甲状腺がんとの関連

チェルノブイリ原発事故後に明らかになった放射線による健康被害として、放射性ヨウ素の内部被ばくによる小児の甲状腺がんが報告されている。福島県においては、チェルノブイリに比べて放射性ヨウ素の被ばく線量が低く、放射線の影響は考えにくいとされているが、子どもたちの甲状腺の状態を把握し、健康を長期に見守ることを目的に平成 23 年 10 月から甲状腺検査を実施している。先行検査（検査 1 回目）の結果では、放射線被ばく線量と甲状腺がん（疑い含む）との明らかな関連はみられなかった。また、平成 26 年度以降は、本格検査として、2 回目以降の検査を行っているが、本格検査 1 回目（検査 2 回目）の結果と外部被ばく線量との統計学的に意味のある関連はみられなかった⁷⁾。しかしながら、内部被ばく線量との関連は未だ明らかではない。そこで今回、本格検査 1 回目（検査 2 回目）までの結果をまとめ、内部被ばく線量を含めた放射線被ばく線量と甲状腺がんとの関連を検討した。震災当時 18 歳以下であり福島県「県民健康調査」甲状腺検査の先行検査（検査 1 回目）を受けた 300,473 人の内、本格検査 1 回目（検査 2 回目）を受けた 245,530 人を対象とした。内部被ばくを含めた被ばく線量と甲状腺がんとの関連を検討するために、原子放射線の影響に関する国連科学委員会（The United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: UNSCEAR）2013 年報告書によって評価された甲状腺吸収線量のデータを用いて解析を行った。UNSCEAR では、甲状腺吸収線量を 1 歳、10 歳、成人に分けて評価を行っている。今回の解析では、震災時 5 歳以下の人からみつかった甲状腺がんは 1 人のみであったため、6 歳以上の人のみを 6 歳以上 15 歳未満

および 15 歳以上に分けて、甲状腺吸収線量と甲状腺がんとの関連を検討した。164,299 人の解析対象者を甲状腺吸収線量別、年齢別に 59 市町村を 4 つの地域に分けて解析した結果（図 4）、甲状腺吸収線量が低い地域から高い地域に行くにしたがって、甲状腺がんの発見率が高くなるというような関連はいずれの年齢でもみられず（いずれの年齢も $P>0.1$ ）、甲状腺吸収線量と甲状腺がんとの関連は明らかではなかった⁸⁾。

性、年齢、検査年度調整オッズ比

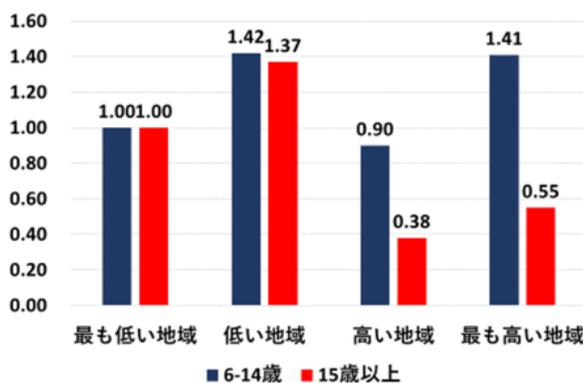


図 4 UNSCEARによる甲状腺吸収線量別にみた甲状腺がん及びその疑いの発見のオッズ比

IV 考察

本年度は 1) 福島県県民健康調査における福島原子力発電所事故後の小児・若年者の甲状腺細胞検査、2) 福島県における $BRAF^{V600E}$ 変異を伴う若年者甲状腺がんの臨床病理学的解析、3) 東日本大震災後の UNSCEAR により評価された甲状腺吸収線量と小児甲状腺がんとの関連を検討した。

$BRAF^{V600E}$ 変異は成人の甲状腺乳頭がんによく発見される⁹⁾。一方、 RET/PTC 遺伝子再構成はチェルノブイリ事故後に多くみられるだけでなく、小児甲状腺がんでも多くみられる遺伝子異常である^{10,11)}。 $BRAF^{V600E}$ 変異を有す甲状腺がんは腫瘍径が小さくとも浸潤が強いことが知られている。「甲状腺検査」では日本乳癌甲状腺超音波学会のガイドラインや日本超音波学会の診断基準に基づいた検査が行われており、結節径が小さい場合、超音波所見上にて浸潤性を示唆する結節に対し穿刺吸引細胞診が実施されている。そのため、 $BRAF^{V600E}$ 変異を有す甲状腺がんを選択的に発見している可能性があると考えられる。

東日本大震災後の UNSCEAR により評価された甲状腺吸収線量と小児甲状腺がんとの関連ではこれまで放射線被ばく線量を複数の評価方法を用いて甲状腺がんとの関連を検討した結果、本格検査 1 回目（検査 2 回目）までに発見された甲状腺がん（疑い含む）と放射線被ばくとの明らかな関連はみられなかった。しかしながら、UNSCEAR による被ばく線量評価に不確定要素が多いこと、放射線事故よりそれほど年数が経っていないこと（最大で 6 年間）及び甲状腺がんの発見

数が統計学的評価を行うにあたり十分でないことが影響している可能性もあり、より精度の高い被ばく線量を用いて関連を検討する必要があることや本格検査2回目（検査3回目）以降のデータを用いて引き続き評価していく必要があると考えられる。

V 結果

福島県県民健康調査における小児・若年者の甲状腺細胞検査では日本乳腺甲状腺超音波学会のガイドラインや日本超音波学会の診断基準に基づいておこなわれ、有用であると考えられた。さらに、震災後の超音波検査で発見された小児若年者甲状腺がんの病理組織像や *BRAF*^{V600E} 変異は、チェルノブイリ事故後にみられた小児甲状腺がんの特徴とは大きく異なり、本邦の放射線被ばくに関係のない成人で発見される甲状腺がんの特徴に類似していることが明らかにした。また、東日本大震災後の UNSCEAR により評価された甲状腺吸収線量と小児甲状腺がんとの関連では、本格検査1回目（検査2回目）までに発見された甲状腺がん（疑い含む）と放射線被ばくとの明らかな関連はみられなかった。

VI 次年度以降の計画

前年度までの解析により、チェルノブイリ事故後にみられた小児甲状腺がんの特徴とは大きく異なることを明らかにし、UNSCEAR により評価された甲状腺吸収線量の解析でも甲状腺癌と放射線被ばくとの明らかな関連はみられていない。しかし、震災後の低線量被ばくや小児期の医療被ばくとの関連についてはまだ明らかになっていないため、放射線環境と甲状腺癌の遺伝子変異との関連について重点的に解析する予定である。

引用文献

1. Suzuki S. Childhood and Adolescent Thyroid Cancer in Fukushima after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident: 5 Years On. *Clinical Oncology*. 2016; 28(4):263-271.
2. Suzuki S Yamashita S Fukushima et al. The protocol and preliminary baseline survey results of the thyroid ultrasound examination in Fukushima. *Endocrine Journal*. 2016; 63(3):315-321.
3. Yamashita S Suzuki S Suzuki S et al. Lessons from Fukushima: Latest Findings of Thyroid Cancer After the Fukushima Nuclear Power Plant Accident. *Thyroid*. 2018; 28(1):11-22.
4. Sakamoto A Matsuzuka T Yamaya Y et al. Cytological examination of the thyroid in children and adolescents after the Fukushima Nuclear Power Plant accident: the Fukushima Health Management Survey, *Endocr J* 2020; 67(12):1233-1238.
5. Mitsutake N Fukushima T Matsuse et al. *BRAF*^{V600E} mutation is highly prevalent in thyroid carcinomas in the young population in Fukushima: a different oncogenic profile from Chernobyl. *Scientific Reports*. 2015 11; 5:16976.

6. Iwate M Mitsutake N Matsuse M et al. The Clinicopathological Results of Thyroid Cancer With BRAFV600E Mutation in the Young Population of Fukushima, *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105(12):dgga573
7. Ohira T Ohtsuru A Midorikawa S et al. External Radiation Dose, Obesity, and Risk of Childhood Thyroid Cancer After the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident: The Fukushima Health Management Survey. *Epidemiology* 2019; 30(6):853-860.
8. Ohira T Shimura H Hayashi F et al. Fukushima Health Management Survey Group. Absorbed radiation doses in the thyroid as estimated by UNSCEAR and subsequent risk of childhood thyroid cancer following the Great East Japan Earthquake, *J Radiat Res* 2020; 62(2):243-248.
9. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of papillary thyroid carcinoma. *Cell* 2014;159:676-90.
10. Nikiforov YE. Radiation-induced thyroid cancer: what we have learned from chernobyl. *Endocr Pathol.* 2006;17: 307-17.
11. Yamashita S, Saenko V. Mechanisms of Disease: molecular genetics of childhood thyroid cancers. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007;3: 422-9.

本研究に関する現在までの研究状況、業績

論文

1. Takahashi K Takahashi H Nakaya T Yasumura S Ohira T Ohto H Ohtsuru A Midorikawa S Suzuki S Shimura H Yamashita S Tanigawa K Kamiya K. Factors Influencing the Proportion of Non-examinees in the Fukushima Health Management Survey for Childhood and Adolescent Thyroid Cancer: Results From the Baseline Survey, *J Epidemiol* 2020; 30(7):301-308.
2. Iwate M Mitsutake N Matsuse M Fukushima T Suzuki S Matsumoto Y Oukouchi C Mizunuma H Nakamura I Nakano K Sakamoto A Hirokawa M Ito M Naganuma H Hashimoto Y Shimura H Yamashita S Suzuki S. The Clinicopathological Results of Thyroid Cancer With BRAFV600E Mutation in the Young Population of Fukushima, *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105(12):dgga573.
3. Ito Y Suzuki S Matsumoto Y Oukouchi C Suzuki S Iwate M Midorikawa S Yokoya S Suzuki S Shimura H. Time-dependent changes in FT4 and FT3 levels measured using mass spectrometry after an acute ingestion of excess levothyroxine in a case with hypothyroidism, *Thyroid Res* 2020; 13:1-6.
4. Sakamoto A Matsuzuka T Yamaya Y Suzuki S Iwate M Suzuki S Hashimoto Y Suzuki O Suzuki S Yokoya S Ohira T Yasumura S Ohto H Kamiya K Shimura H. Cytological examination of the thyroid in children and adolescents after the Fukushima Nuclear Power Plant accident: the Fukushima Health Management Survey, *Endocr J* 2020; 67(12):1233-1238.

5. Ito Y Kaneko H Sasaki Y Ohana N Ichijo M Furuya F Suzuki S Suzuki S Shimura H. Calcitonin levels by ECLIA correlate well with RIA values in higher range but are affected by sex, TgAb, and renal function in lower range, *Endocr J* 2020; 67(7):759-770.
6. Onoda N Sugitani I Ito KI Suzuki A Higashiyama T Fukumori T Suganuma N Masudo K Nakayama H Uno A Yane K Yoshimoto S Ebina A Kawasaki Y Maeda S Iwadate M Suzuki S. Evaluation of the 8th Edition TNM Classification for Anaplastic Thyroid Carcinoma, *Cancers (Basel)* 2020; 12(3):552.
7. Yokouchi Y Suzuki S, Ohtsuki N Yamamoto K Noguchi S Soejima Y Goto M Ishioka K Nakamura I Suzuki S Takenoshita S Era T. Rapid repair of human disease-specific single-nucleotide variants by One-SHOT genome editing, *Sci Rep* 2020; 10(1):13927.
8. Takahashi H Yasumura S Takahashi K Ohira T Ohtsuru A Midorikawa S Suzuki S Shimura H Ishikawa T Sakai A Suzuki S Yokoya S Tanigawa K Ohto H Kamiya K. Nested matched case control study for the Japan Fukushima Health Management Survey's first full-scale (second-round) thyroid examination, *Medicine (Baltimore)* 2020; 99(27): e20440.
9. Ohira T Shimura H Hayashi F Nagao M Yasumura S Takahashi H Suzuki S Matsuzuka T Suzuki S Iwadate M Ishikawa T Sakai A Suzuki S Nollet KE Yokoya S Ohto H Kamiya K. Fukushima Health Management Survey Group. Absorbed radiation doses in the thyroid as estimated by UNSCEAR and subsequent risk of childhood thyroid cancer following the Great East Japan Earthquake, *J Radiat Res* 2020; 62(2):243-248.
10. Yokoya S Iwadate M Shimura H Suzuki S Matsuzuka T Suzuki S Muro S Yasumura S Kamiya K Hashimoto Y Suzuki SI, Investigation of thyroid cancer cases that were not detected in the Thyroid Ultrasound Examination program of the Fukushima Health Management Survey but diagnosed at Fukushima Medical University Hospital, *Fukushima J Med Sci* 2020; 65(3):122-127.
11. Bogdanova TI Saenko VA Hashimoto Y Hirokawa M Zurnadzhy LY Hayashi T Ito M Iwadate M Mitsutake N Rogounovitch T Sakamoto A Naganuma H Miyauchi A Tronko MD Thomas G Yamashita S Suzuki S. Papillary thyroid carcinoma in Ukraine after Chernobyl and in Japan after Fukushima: different histopathological scenarios, *Thyroid* 2020; 0308.
12. Horiguchi K Yoshida Y Iwaku K Emoto N Kasahara T Sato J Shimura H Shindo H Suzuki S Nagano H Furuya F Makita N Matsumoto F Manaka K Mitsutake N Miyakawa M Yokoya S Sugitani I. Position paper from the Japan Thyroid Association task force on the management of low-risk papillary thyroid microcarcinoma (T1aN0M0) in adults, *Endocr J* 2021; EJ20-0692.
13. Miura S Yoshida A Misaka T, Yamaki T Kojima T Toyokawa M Ogawa K Shimura H, Yamamoto N Kasahara K, Takeishi Y, Kitazume S. Amyloid precursor protein 770 is specifically expressed and released from platelets, *J Biol Chem* 2020; 295 (38): 13194-13201.

14. Imai M Kimura Y, Tanno D Saito K Honda M Takano Y Ohashi K Toyokawa M Ohana N Yamadera Shimura H. Validation of MALDI-TOF MS devices in reanalysis of unidentified pathogenic bacteria detected in blood cultures, *Fukushima J Med Sci* 2020; 66(2): 193-112
15. Shimura H Yokoya S Kamiya K. An Accurate Picture of Fukushima's Thyroid Ultrasound Examination Program, *Arch Pathol Lab Med* 2020; 144 (7): 797.
16. Matsuzuka T Uemura H Yoshimoto S Miura K Shiotani A Sugasawa M Homma A Yokoyama J Tsukahara K Yoshizaki T Yatabe Y Kobari T Kosuda S Murono S Hasegawa Y. Investigation of thyroid cancer cases that were not detected in the Thyroid Ultrasound Examination program of the Fukushima Health Management Survey but diagnosed at Fukushima Medical University Hospital, *Fukushima J Med Sci* 2020; 65(3): 122-127.
17. Imaizumi M Suzuki T Ikeda M Matsuzuka T Goto A Omori K. Implementing a flexible endoscopic evaluation of swallowing at elderly care facilities to reveal characteristics of elderly subjects who screened positive for a swallowing disorder, *Auris Nasus Larynx* 2020; 47(4): 602-608.
18. Oka Y Hamada M Nakazawa Y Muramatsu H Okuno Y Higasa K Shimada M Takeshima H Hanada K Hirano T Kawakita T Sakaguchi H Ichimura T Ozono S Yuge K Watanabe Y Kotani Y Yamane M Kasugai Y Tanaka M Suganami T Nakada S Mitsutake N Hara Y Kato K Mizuno S Miyake N Kawai Y Tokunaga K Nagasaki M Kito S Isoyama K Onodera M Kaneko H Matsumoto N Matsuda F Matsuo K Takahashi Y Mashimo T Kojima S Ogi T. Digenic mutations in ALDH2 and ADH5 impair formaldehyde clearance and cause a multisystem disorder, AMeD syndrome, *Science Advances* 2020; 6(51): eabd7197.
19. Ishikawa T Yasumura S Akahane K Yonai S Ohtsuru A Sakai A Ohira T Kamiya K. Age dependence of individual external doses in an early stage after the Fukushima nuclear accident, *Radiation Protection Dosimetry* 2020; 188(2): 238-245.
20. Igarashi Y Kim E Hashimoto S Tani K Yajima K Iimoto T Ishikawa T Akashi M Kurihara O. Difference in the Cesium Body Contents of Affected Area Residents Depending on the Evacuation Timepoint Following the 2011 Fukushima Nuclear Disaster, *Health Physics* 2020; 119(6): 733-745.
21. Ebihara K Yamagishi K Umesawa M Muraki I Cui R Imano H Kubota Y Hayama-Terada M Shimizu Y Ohira T Sankai T Okada T Kitamura A Kiyama M Iso H for the CIRCS Investigators. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and risk of incident stroke among Japanese: The Circulatory Risk in Communities Study, *Journal Atheroscler Thromb* 2020; 27(8):751-760.
22. Takahashi A Ohira T Okazaki K Yasumura S Sakai A Maeda M Yabe H Hosoya M Ohtsuru A Kawasaki Y Shimabukuro M Kazama J Hashimoto S Watanabe K Nakano H Hayashi H Ohto H Kamiya K Ohira H. Effects of psychological and lifestyle factors on metabolic syndrome following the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident: The Fukushima Health Management Survey, *Journal Atheroscler Thromb* 2020; 27(9):1010-1018.

23. Li J Muraki I Imano H Cui R Yamagishi K Umesawa M Hayama-Terada M Ohira T Kiyama M Okada T Sankai T Tanigawa T Kitamura A Iso H and for CIRCS investigators. Serum uric acid and risk of stroke and its types: the Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). *Hypertens Res* 2020; 43(4):313-321.
24. Zhang W Ohira T Maeda M Nakano H Iwasa H Yasumura S Ohtsuru A Harigane M Suzuki Y Horikoshi N Takase K Takahashi A Yabe H Kamiya K for the Fukushima Health Management Survey Group. The association between self-reported sleep dissatisfaction after the Great East Japan Earthquake and a deteriorated socioeconomic status in the evacuation area: the Fukushima Health Management Survey. *Sleep Med* 2020; 68:63-70.
25. Ma E Ohira T Sakai A Yasumura S Takahashi A Kazama J Shimabukuro M Nakano H Okazaki K Maeda M Yabe H Suzuki Y Kamiya K. Dietary patterns associated with cardiometabolic risks in Japan: the Fukushima Health Management Survey, 2011–2015, *Nutrients* 2020; 12(1):129.
26. Kawasaki Y Hosoya M Nakano H Yasumura S Ohira T Satoh H Sakai A Ohtsuru A Takahashi A Kobashi G Kamiya K Suzuki H. Influence of post-disaster evacuation on childhood obesity and hyperlipidemia, *Pediatr Int* 2020;62(6):669-676.
27. Nagao M Kobashi G Umesawa M Cui R Yamagishi K Imano H Okada T Kiyama M Kitamura A Sairenchi T Haruyama Y Ohira T Iso H. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine levels and cardiovascular disease incidence in Japan, *Journal Atheroscler Thromb* 2020; 27(10):1086-1096.
28. Ikeda S Ikeda A Yamagishi K Hori M Kubo S Sata M Okada C Umesawa M Sankai T Kitamura A Kiyama M Ohira T Tanigawa T Iso H. Longitudinal Trends in Blood Pressure Associated with the Frequency of Laughter: Longitudinal Study of Japanese General Population: the Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS), *J Epidemiol* 2021; 31(2):125-131.
29. Hirokawa K Ohira T Kajiura M Imano H Kitamura A Kiyama M Okada T Iso H. Cardiovascular reactivity to acute stress associated with sickness absence among Japanese men and women: A prospective study, *Brain and Behavior* 2020; 10(4):e01541.
30. Yasuoka M Muraki I Imano H Jinnouchi H Kubota Y Hayama-Terada M Umesawa M Yamagishi K Ohira T Kitamura A Okada T Kiyama A Iso H. Joint impact of muscle mass and waist circumference on Type 2 Diabetes in Japanese middle-aged adults: the Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS), *J Diabete* 2020; 12(9):677-685.
31. Tanaka M Imano H Kubota Y Yamagishi K Umesawa M Muraki I Cui R Hayama-Terada M Shimizu Y Okada T Ohira T Sankai T Tanigawa T Sato S Kitamura A Kiyama M Iso H; and the CIRCS Investigators. Serum high-sensitivity C-reactive protein levels and the risk of atrial fibrillation in Japanese population: the Circulatory Risk in Communities Study. *J Atheroscler Thromb* 2020; 28(2):194-202.
32. Jinnouchi H Ohira T Kakihana H Matsudaira K Maeda M Yabe H Suzuki Y Harigane M Iso H Kawada T Yasumura S Kamiya K and on behalf of the Mental Health Group of the F

- ukushima Health Management Survey. Lifestyle factors associated with prevalent and exacerbated musculoskeletal pain after the Great East Japan Earthquake: A cross-sectional study from the Fukushima Health Management Survey, *BMC Public Health* 2020; 20(1):677.
33. Hashimoto S Nagai N Ohira T Fukuma S Hosoya M Yasumura S Satoh H Suzuki H Sakai A Ohtsuru A Kawasaki Y Takahashi A Okazaki K Kobashi G Kamiya K Yamashita Fukuhara S Ohto H, the Fukushima Health Management Survey Group. Influence of post-disaster evacuation on incidence of hyperuricemia in residents of Fukushima prefecture; the Fukushima Health Management Survey, *Clin Exp Nephrol* 2020;24(11):1025-1032.
 34. Kudo A Kitamura A Imano H Cui R Umesawa M Yamagishi K Ohira T Muraki I Hayama-Terada M Kiyama M Iso H, CIRCS Investigators. Salt taste perception and blood pressure levels in population-based samples: The Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS), *Br J Nut* 2021; 85(4):385-392.
 35. Yagi A Maeda M Suzuki Y Yabe H Yasumura S Niwa S Ohira T Ohtsuru A Mashiko H Harigane M Nakano H Abe M; Fukushima Health Survey. Changes in drinking behavior among evacuees after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident: the Fukushima Health Management Survey, *Fukushima J Med Sci* 2020; 66(3):133-142.
 36. Yamaguchi S Otaki Y Tamarappoo BK Ohira T Ikenaga H Yoshida J Chakravarty T Friedman J Berman D Rader F Siegel RJ Makkar R Shiota T. The Impact of Valvuloarterial Impedance on Left Ventricular Geometrical Change after Transcatheter Aortic Valve Replacement: A Comparison between Valvuloarterial Impedance and Mean Pressure Gradient, *J Clin Med* 2020; 9(10):E3143.
 37. Ohba T Goto A Nakano H Nollet KE Murakami M Yoshida K Yumiya Y Honda K Kuroda Y Kumagai A Ohira T Tanigawa K. Implementing eHealth with radiation records: a new support package for evacuees returning to areas around the Fukushima Daiichi nuclear power station, *Radioprotection* 2020; 55(4), 291–295.
 38. Li J Imano H Yamagishi K Cui R Muraki I Umesawa M Hayama-Terada M Ohira T Kiyama M Okada T Sankai T Tanigawa T Kitamura A Iso H; CIRCS Investigators. Serum albumin and risks of stroke and its subtypes - The Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS), *Circ J* 2021; 85(4):385-392.
 39. Sanoh T Eguchi E Ohira T Hayashi F Maeda M Yasumura S Suzuki Y Yabe H Takahashi A Takase K Harigane M Hisamitsu T Ogino K Kanda H Kamiya K. Association Between Psychological Factors and Evacuation Status and the Incidence of Cardiovascular Diseases after the Great East Japan Earthquake: A Prospective Study of the Fukushima Health Management Survey, *Int J Environ Res Public Health* 2020; 17(21):7832.
 40. Murakami M Takebayashi Y Harigane M Mizuki R Suzuki Y Ohira T Maeda M Yasumura S. Analysis of direction of association between radiation risk perception and relocation using a random-intercept and cross lagged panel model: The Fukushima Health Management Survey, *SSM - Population Health* 2021; 12:100706.

41. Hirokawa K Ohira T Kajiura M Imano H Kitamura A Kiyama M Okada T Iso H. Job stress factors measured by Brief Job Stress Questionnaire and sickness absence among Japanese workers: A longitudinal study, *Fukushima J Med Sci* 2021; 66(2):88-96.
42. Harigane M Takebayashi Y Murakami M Maeda M Mizuki R Oikawa Y Goto S Momoi M Itagaki S Najima S Ohira T Yabe H Yasumura S Kamiya K. Higher psychological distress experienced by evacuees relocating outside Fukushima after the nuclear accident: The Fukushima Health Management Survey, *Int J Disaster Risk Reduct* 2021;52: (101962).
43. Suzuki H Ohira T Takeishi Y Sakai A Hosoya M Yasumura S Kawasaki Y Takahashi A Nakano H Kamiya K for the Fukushima Health Management Survey Group. Association between atrial fibrillation and white blood cell count after the Great East Japan Earthquake: An observational study from the Fukushima Health Management Survey, *Medicine* 2021; 100(6):e24177.
44. Nagai M Ohira T Shirai K Kondo K. Does variety of social interactions associate with frequency of laughter among older people? The JAGES cross-sectional study, *BMJ Open* 2021; 11(1):e039363.
45. Yazawa Y Ohira T Itabashi R Uchida K Sakai N Yamagami H Morimoto T Yoshimura S; RESCUE-Japan Registry 2 Investigators. Association of admission hyperglycemia with clinical outcomes in Japanese patients with acute large vessel occlusion stroke: A post hoc analysis of the Recovery by Endovascular Salvage for Cerebral Ultra-Acute Embolism Japan Registry 2, *Cerebrovasc Dis* 2021; 50(1):12-19.
46. Ma E Ohira T Yasumura S Nakano H Eguchi E Miyazaki M Hosoya M Sakai A Takahashi A Ohira H Kazama JJ Shimabukuro M Yabe H Maeda M Ohto H Kamiya K. Dietary Patterns and Progression of Impaired Kidney Function in Japanese Adults: A Longitudinal Analysis for the Fukushima Health Management Survey, 2011–2015, *Nutrients* 2021; 13(1):E168.
47. Hayashi F Ohira T Okazaki K Nakano H Nagao M Harigane M Yasumura S Maeda M Takahashi A Yabe H Suzuki Y Kamiya K the Fukushima Health Management Survey Group. Association between post-traumatic stress disorder symptoms and bone fractures after the Great East Japan Earthquake in older adults: a prospective cohort study from the Fukushima Health Management Survey. *BMC Geriatrics* 2021; 21(1):18.
48. Yoshida T Eguchi E Mashiko H Ohira T. Social factors associated with life satisfaction and psychological distress among Residents with Developmental Disorders in Fukushima Prefecture, *Tohoku J Exp Med* 2021; 253(2):113-123.
49. Nagai M Ohira T Maeda M, Yasumura S, Miura I, Itagaki S Harigane Takese K Yabe H Sakai A Kamiya K. The Association between body mass index and recovery from post-traumatic stress disorder after the nuclear accident in Fukushima, *Sci Rep* 2021 11(1):5330.
50. 鈴木眞一【内分泌腺腫瘍(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート】序文 *日本臨床* 2020; 78(増刊4):1-2.

51. 山下俊一【内分泌腺腫瘍(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート】総論 内分泌腫瘍の基礎研究の現状と今後の展望 日本臨床 2020; 78(増刊4):11-18.
52. 鈴木眞一【内分泌腺腫瘍(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート】I 総論 内分泌外科：最近の進歩 日本臨床 2020; 78(増刊4):23-29.
53. 鈴木悟【内分泌腺腫瘍(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート】内分泌腺の解剖学と生理学 内分泌生理学的調節機構 甲状腺 日本臨床 2020; 78(増刊4):76-81
54. 横内裕二, 鈴木眞一【内分泌腺腫瘍(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート】IV 甲状腺腫瘍 甲状腺細胞の分化と腫瘍発生機構 iPSC細胞も含め 日本臨床 2020;78(増刊4):247-253.
55. 鈴木眞一【内分泌腺腫瘍(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート】IV 甲状腺腫瘍 甲状腺腫瘍の治療 甲状腺腫瘍の治療戦略；概論 日本臨床 2020; 78(増刊4):372-378.
56. 松本佳子, 塩功貴, 鈴木聡, 岩館学, 鈴木眞一【内分泌腺腫瘍(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート-】IV 甲状腺腫瘍 甲状腺腫瘍の治療 甲状腺腫瘍の組織型別治療方針 甲状腺リンパ腫 日本臨床 2020; 78(増刊4):406-411.
57. 岩館学, 鈴木眞一【内分泌腺腫瘍(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート】IV 甲状腺腫瘍 甲状腺腫瘍その他 甲状腺腫瘍の予後と予後因子 日本臨床 2020; 78(増刊4):433-438.
58. 松本佳子, 塩功貴, 鈴木聡, 岩館学, 鈴木眞一【内分泌腺腫瘍(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート-】副甲状腺腫瘍 副甲状腺腫瘍の検査・診断 画像診断 日本臨床 2020; 78(増刊4):516-522.
59. 横内裕二, 鈴木眞一【内分泌腺腫瘍(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート】X 多発性内分泌腫瘍症(MEN) 多発性内分泌腫瘍症の分化と腫瘍発生機構 日本臨床 2020; 78(増刊4):823-828.
60. 鈴木眞一【内分泌腺腫瘍(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート】X 多発性内分泌腫瘍症(MEN) 多発性内分泌腫瘍症の検査・診断と治療 MEN 1 日本臨床 2020; 78(増刊4):848-855.
61. 鈴木眞一【内分泌腺腫瘍(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート】XII 特論 内分泌外科 専門医 日本臨床 2020; 78(増刊4):916-928.
62. 岩館学, 松本佳子, 長谷川翔, 鈴木聡, 水沼廣, 中野恵一, 中村泉, 福島俊彦, 志村浩己, 鈴木眞一 日常よく遭遇する甲状腺疾患シリーズ『甲状腺嚢胞性病変』甲状腺嚢胞性病変の超音波画像 乳腺甲状腺超音波医 2020; 9(3): 19-23.
63. 鈴木眞一, 松本佳子, 塩功貴, 長谷川翔, 岩館学, 鈴木聡, 中野恵一, 水沼廣【甲状腺・副甲状腺外科における術中神経モニタリングの実際】術中神経モニタリングのセットアップ 日内分泌・甲状腺外会誌 2020; 37(3): 171-175.
64. 鈴木眞一 将来検討ワーキンググループ(W/G)について 本企画によせて 乳腺甲状腺超音波医 2020; 9(3):31.
65. 松塚崇 その他の頸部腫瘍—正中頸嚢胞, 側頸嚢胞, 下咽頭梨状窩瘻. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 2020; 92(3): 252-256.
66. 松塚崇, 鈴木政博, 垣野内景, 室野重之 梨状陥凹瘻 2例の超音波所見. 頭頸部外科 2020; 30(3): 379-384.

書籍

67. Ishikawa T. Individual Doses to the Public after the Fukushima Nuclear Accident. Journal of Radiation Protection and Research.
68. 鈴木眞一 4章-8 放射線被ばくと甲状腺超音波検査 甲状腺疾患診療マニュアル（改定第3版）、診断と治療社
69. 鈴木眞一 第5章 病態に応じた周術期での注意点 7 甲状腺機能障害 周術期の薬の使い方 パーフェクトガイド、株式会社じほう
70. 鈴木眞一 甲状腺がん手術 いい病院2021 朝日新聞出版

学会発表

71. 鈴木眞一 甲状腺用語診断基準委員会企画シンポジウム「超低リスク微小乳頭癌のアクティブサーベイランス」内分泌外科学会アンケート 第44回日本乳腺甲状腺超音波医学会学術集会 2020年4月
72. 松本佳子, 岩館学, 鈴木聡, 中野恵一, 中村泉, 福島俊彦, 水沼廣, 伊藤祐子, 志村浩己, 鈴木眞一 CNBの適応と実際 第44回日本乳腺甲状腺超音波医学会学術集会 2020年4月
73. 志村浩己 オーバービューと甲状腺嚢胞による疼痛 第44回日本乳腺甲状腺超音波医学会学術集会 2020年4月
74. 岩館学, 志村浩己, 鈴木眞一 甲状腺結節血流評価の多施設研究 第44回日本乳腺甲状腺超音波医学会学術集会 2020年4月
75. 鈴木眞一 甲状腺分化癌に対する分子標的治療の適応と治療の実際 第93回 日本内分泌学会学術総会 2020年6月
76. 岩館学, 松本佳子, 鈴木聡, 水沼廣, 光武範吏, 山下俊一, 鈴木眞一 第93回 日本内分泌学会学術総会 2020年6月
77. 光武 範吏, 松瀬 美智子, 岩館 学, サエンコ ウラジミール, 鈴木 眞一, 山下 俊一 小児・若年者甲状腺がんと成人甲状腺がんの遺伝子変異の相違 第93回 日本内分泌学会学術総会 2020年6月
78. 松本佳子, 塩功貴, 長谷川翔, 鈴木聡, 岩館学, 角田ますみ, 赤間孝典, 鈴木眞一 内分泌外科領域における遺伝性腫瘍に対するチーム医療 第26回日本遺伝性腫瘍学会学術集会 2020年8月
79. 岩館学, 松本佳子, 長谷川翔, 塩功貴, 鈴木聡, 水沼廣, 中野恵一, 中村泉, 鈴木眞一 網羅的遺伝子発現プロファイルを用いた甲状腺濾胞癌マーカーの解析 第120回日本外科学会定期学術集会 2020年8月
80. 鈴木 眞一 甲状腺穿刺吸引細胞診精査基準と穿刺における臨床検査技師との連携 第69回日本医学検査学会 2020年9月
81. 松本佳子, 岩館学, 鈴木聡, 中野恵一, 中村泉, 福島俊彦, 水沼廣, 伊藤祐子, 志村浩己, 鈴木眞一 CNBの適応と実際 第45回日本乳腺甲状腺超音波医学会学術集会 2020年9月

82. 志村浩己 甲状腺超音波ガイド下穿刺専門資格の概要 第45回日本乳腺甲状腺超音波医学会学術集会 2020年9月
83. 小野田尚佳, 杉谷巖, 伊藤研一, 鈴木眞一 UICC TNM 分類第8版による甲状腺未分化癌の予後 第32回日本内分泌外科学会総会 2020年9月
84. 松本佳子, 塩功貴, 長谷川翔, 鈴木聡, 中野恵一, 岩館学, 水沼廣, 鈴木眞一 当科における甲状腺良性結節の手術適応についての検討 第32回日本内分泌外科学会総会 2020年9月
85. 塩功貴, 岩館学, 松本佳子, 長谷川翔, 鈴木聡, 水沼廣, 中野恵一, 鈴木眞一 血漿交換療法が奏功した甲状腺クリーゼの1例 第32回日本内分泌外科学会総会 2020年9月
86. 岩館学, 松本佳子, 長谷川翔, 塩功貴, 鈴木聡, 水沼廣, 中野恵一, 鈴木眞一 RET遺伝子変異部位からみたMEN2手術の検討 第32回日本内分泌外科学会総会 2020年9月
87. 光武 範吏 乳頭癌の遺伝子異常 第32回日本内分泌外科学会総会 2020年9月
88. 松本佳子, 岩館学, 鈴木聡, 中野恵一, 中村泉, 福島俊彦, 水沼廣, 伊藤祐子, 志村浩己, 鈴木眞一 CNB の適応と実際 第45回日本乳腺甲状腺超音波医学会学術集会 2020年9月
89. 中野恵一, 佐々木英司 特別講演 「原点から飛躍へ」-甲状腺超音波ガイド下甲状腺細胞診練習のためのファントムの作り方と練習方法について 第45回日本乳腺甲状腺超音波医学会学術集会 2020年9月
90. 志村浩己 Current status of Thyroid Ultrasound Examination program: The Fukushima Health Management Survey 日本放射線影響学会第63回大会 2020年10月
91. 志村浩己 Management of thyroid nodules in Thyroid Ultrasound Examination program: The Fukushima Health Survey 日本放射線影響学会第63回大会 2020年10月
92. 松本佳子, 塩功貴, 中野恵一, 鈴木聡, 岩館学, 武藤淳, 鈴木眞一 甲状腺クリーゼを繰り返し、ドクターヘリにて2度搬送されたバセドウ病の2例 第63回日本甲状腺学会学術集会 2020年11月
93. 岩館学, 光武範吏, 松本佳子, 鈴木聡, 水沼廣, 中野恵一, 中村泉, 福島俊彦, 山谷幸恵, 斎藤勝治, 鈴木眞一 甲状腺癌におけるBRAFV600E変異検出のための免疫組織学染色の有効性について 第63回日本甲状腺学会学術集会 2020年11月
94. 塩功貴, 松本佳子, 尾崎章彦, 鈴木聡, 岩館学, 鈴木眞一 乳頭癌と髄様癌を偶発的に認めた甲状腺癌の1手術症例 第63回日本甲状腺学会学術集会 2020年11月
95. 鈴木眞一 小児甲状腺腫瘍に関する治療経験 第62回日本小児血液・がん学会学術集会 2020年11月
96. 志村浩己 震災後10年を迎える福島県県民健康調査「甲状腺検査」の歩みと明らかになりつつある小児甲状腺がんの実像 第62回日本小児血液・がん学会学術集会 2020年11月
97. 松瀬美智子, Vladimir Saenko, 中尾 朋恵, 山下 俊一, 光武 範吏 増悪する甲状腺乳頭癌を予測できる分子マーカー：さらなる高精度化と細胞診への応用 第63回日本甲状腺学会学術集会 2020年11月
98. 光武範吏 遺伝子変異からみた甲状腺がんの診断：穿刺吸引細胞診におけるTERTプロモーター変異の検出 第30回 臨床内分泌代謝Update 2020年11月

99. 志村浩己 超音波検査に基づく甲状腺腫瘍の診断 第30回 臨床内分泌代謝Update 2020年11月
100. 志村浩己 福島県県民健康調査「甲状腺検査」から見えてきた小児・若年者甲状腺結節性疾患の実像 第13回静岡東部内分泌・代謝疾患治療研究会 2020年11月
101. 松本佳子, 長谷川翔, 中野恵一, 鈴木聡, 岩館学, 鈴木眞一 転移性甲状腺腫瘍の2例 日本超音波医学会第93回学術集会 2020年12月
102. 岩館学, 松本佳子, 長谷川翔, 塩功貴, 鈴木聡, 中野恵一, 鈴木眞一 Bモード、血流、硬さの指標を用いたスコア化解析による甲状腺濾胞性腫瘍の鑑別 日本超音波医学会第93回学術集会 2020年12月
103. Shimura Hiroki Diagnosis of pediatric thyroid cancer. 16th International Thyroid Congress. 2020年12月
104. 志村浩己 震災後10年を迎える福島県県民健康調査「甲状腺検査」の現在と得られたエビデンス. 第25回日本生殖内分泌学会学術集会 2020年12月
105. Shimura Hiroki, Kamiya Kenji. Current progress and future challenges of Thyroid Ultrasound Examination Program in Fukushima: The Fukushima Health Management Survey. 15th International Congress of the International Radiation Protection Association. 2021年1月
106. 志村浩己 甲状腺検査の現状と検査3回目までの結果 2021年福島県立医科大学「県民健康調査」国際シンポジウム 2021年2月
107. 鈴木 眞一, 志村 浩己 日本乳腺甲状腺超音波医学会 甲状腺超音波ガイド下穿刺専門資格の概要 第22回うつくしま甲状腺フォーラム 2021年2月
108. 鈴木 眞一, 貴田岡 正史 甲状腺疾患の超音波診断 第22回うつくしま甲状腺フォーラム 2021年2月
109. 鈴木 眞一 甲状腺がんの診断と治療 がん医療のスキルアップ講演会 2021年2月
110. 松本佳子, 二見徹, 塩功貴, 鈴木聡, 中野恵一, 岩館学, 水沼廣, 鈴木眞一. 甲状腺ワルチン腫瘍様乳頭癌の1例 日本超音波医学会 第61回東北地方会学術集会 2021年3月
111. 二見徹, 岩館学, 松本佳子, 中野恵一, 鈴木聡, 水沼廣, 鈴木眞一 甲状腺未分化癌との鑑別に超音波所見が有用であった甲状腺びまん性大細胞型B細胞リンパ腫の1例 2021年3月
112. 岩館学, 松本佳子, 長谷川翔, 塩功貴, 鈴木聡, 水沼廣, 鈴木眞一 網羅的遺伝子発現解析を用いた甲状腺濾胞癌の鑑別 第32回 東北甲状腺談話会 2021年3月

講演

113. 鈴木眞一 超音波の基礎と超音波画像診断 令和 2 年度甲状腺検査者育成事業講習会 2020年7月
114. 岩館学 県民健康調査「甲状腺検査」、甲状腺結節に対する外科治療について 令和 2 年度甲状腺検査者育成事業講習会 2020年7月
115. 鈴木眞一「甲状腺疾患の治療と最近の話題 2020」令和 2 年度 甲状腺検査者育成事業 更新講習会 2020年7月

116. 鈴木眞一 甲状腺結節に対する外科治療について－甲状腺の手術について－ 令和 2 年度
甲状腺検査者育成事業講習会 2020 年 8 月
117. 鈴木眞一 「甲状腺疾患の治療と最近の話題 2020」 令和 2 年度 甲状腺検査者育成事業 更
新講習会 2020 年 9 月
118. 鈴木眞一 超音波の基礎と超音波画像診断 令和 2 年度甲状腺検査者育成事業講習会
2020 年 10 月
119. 鈴木眞一 「甲状腺疾患の治療と最近の話題 2020」 令和 2 年度 甲状腺検査者育成事業 更
新講習会 2020 年 11 月

The mechanism of the thyroid cancer in the young population after the accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident

Shinichi Suzuki (*Professor and Chairman, Department of Thyroid and Endocrinology, Fukushima Medical University*), Hiroki Shimura (*Director, Department of Thyroid Ultrasound Examination, FMU Radiation Medical Science Center for the Fukushima Health Management Survey*), Satoru Suzuki (*Assistant Director, Department of Thyroid Ultrasound Examination, FMU Radiation Medical Science Center for the Fukushima Health Management Survey*), Takashi Matsuzuka (*Assistant Director, Department of Thyroid Ultrasound Examination, FMU Radiation Medical Science Center for the Fukushima Health Management Survey*),

Shunichi Yamashita (*Fukushima Medical University*), Norisato Mitsutake (*Professor and Chairman, Department of Radiation Medical Science, Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University*), Tetsuo Ishikawa (*Professor and Chairman, Department of Radiation Physics and Chemistry, Fukushima Medical University*), Tetsuya Ohira (*Professor and Chairman, Department of Epidemiology, Fukushima Medical University*), Yukie Yamaya (*Department of Thyroid and Endocrinology, Fukushima Medical University*), Mizuki Sekino (*Department of Thyroid and Endocrinology, Fukushima Medical University*), Manabu Iwadate (*Associate Professor, Department of Thyroid and Endocrinology, Fukushima Medical University*), Satoshi Suzuki (*Associate Professor, Department of Thyroid and Endocrinology, Fukushima Medical University*), Yoshiko Matsumoto (*Assistant Professor, Department of Thyroid and Endocrinology, Fukushima Medical University*)

Key word: Thyroid cancer, Fukushima Daiichi Nuclear Power Accident, Fukushima Health Management Survey, Thyroid Ultrasound Examination (TUE)

Abstract

The Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident occurred on March 11 2011, following the Great East Japan Earthquake and tsunami. Radioactive materials, including I-131, were released into the environment after the accident. Shortly after, the prefectural government initiated the Fukushima Health Management Survey for monitoring the long-term health conditions of the residents of Fukushima Prefecture. In the survey, thyroid ultrasonography was scheduled for all people aged 18 years or younger who were living in Fukushima Prefecture at the time of disaster. The total number of examinees was approximately 370,000 in the Preliminary Baseline Survey (PBLs), and 380,000 in the first Full-scale Survey (FSS). First, thyroid ultrasonography was performed as the Primary Examination. When a thyroid nodule that meets the fine needle aspiration cytology (FNAC) guideline is detected, thyroid FNAC is performed. By the end of June 2017, the cytological specimens of 187 examinees had been interpreted as Malignant or Suspicious for Malignancy (SFM). In this article, the cytological results of whole categories are presented using the criteria of The Bethesda System for Reporting Thyroid Cytopathology. The total numbers of examinees with SFM or Malignant in PBLs and at the first FSS were 106 (62.0%) and 71 (38.0%), respectively.

We analyzed 138 patients who had undergone surgery between 2013 and 2016 at Fukushima Medical University. Postoperative pathological diagnosis revealed 136 (98.6%) cases of papillary thyroid cancer (PTC). The *BRAF*^{V600E} mutation was detected using direct DNA sequencing in 96 (69.6%) of the thyroid cancer cases. However, *RET/PTC3* rearrangement was only observed in one (0.7%) case. The *BRAF*^{V600E} mutation was mainly detected in residents of Fukushima, which was different from post-Chernobyl PTC with *RET/PTC3*.

We grouped participants according to estimated absorbed doses in each of 59 municipalities in Fukushima Prefecture, based on The United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (UNSCEAR) 2013 report. No dose-dependent pattern emerged from the geographical distribution of absorbed doses by municipality, as estimated by UNSCEAR, and the detection of thyroid cancer among participants within 4–6 years after the accident. Ongoing surveillance might further clarify the effects of low-dose radiation exposure on thyroid cancer in Fukushima.

ロングリード解析を用いた放射線刻印の同定と福島小児甲状腺癌への応用

光武 範吏（長崎大学・教授）

研究要旨

正常ヒト線維芽細胞にヒトテロメラーゼ (*hTERT*) 遺伝子を導入して不死化した BJ1-hTERT 細胞において、コントロール（無処理）、 γ 線（1, 3, 6 Gy）あるいは N-ethyl-N-nitrosourea (ENU, 1mM, 1 hr) による処理を行い、6-thioguanine (6-TG, 40 μ M) 培養下でそれぞれ複数の耐性クローンを樹立した。各クローンの *HPRT* 遺伝子における各エクソンの欠失状態を定量 PCR 法にて確認した。高い線量を照射後に得られたクローンほど、欠失の頻度が高かった。各クローンより 5 クローンずつを選択し、そのうち 16 について、ショートリード法、ロングリード法の 2 種類の次世代シーケンシング法にて全ゲノム解析を行い、配列データを得た。

キーワード：放射線、ロングリード次世代シーケンス解析、甲状腺癌

研究協力者

吉浦 孝一郎（長崎大学・教授），三嶋 博之（長崎大学・助教），サエンコ ウラジミール（長崎大学・准教授），鈴木 眞一（福島県立医科大学・教授），岩館 学（福島県立医科大学・講師），山下 俊一（福島県立医科大学・副学長）

I. 研究目的

研究の背景・目的：人体への放射線被ばくの晩発影響として最も重要なものは発癌である。しかし、癌は一般集団によく見られる疾患であり、あるひとつの癌が放射線によって引き起こされたものか、その他の原因で起きたものかを区別する方法は今のところない。福島第一原発事故の後、多くの小児・若年者甲状腺癌が発見された。これらの被ばく線量は極めて低いと思われ、事故により放出された放射性ヨウ素との関連はないと考えられているものの、個々の症例における明確な分子エビデンスはない。そこで本研究の目的は、最新のゲノム解析技術を駆使して、放射線ゲノム刻印の存在を明らかにし、同様の技術を用いて福島県小児・若年者甲状腺癌のゲノム解析を行い、これらの刻印が存在するかを検証すること、さらには本研究の学術成果によって、福島県民の健康管理や不安への対応策の有効性をさらに向上させることである。本年度の目的は、培養細胞系を用い、放射線被ばくによるゲノム変化が確実な細胞クローンを樹立し、ショートリードとロングリード次世代シーケンス解析を実施することである。

II. 研究方法

正常ヒト線維芽細胞にヒトテロメラーゼ (*hTERT*) 遺伝子を安定導入して不死化させた BJ1-hTERT 細胞を用いた。¹³⁷Cs- γ 線（線量率：1 Gy/min）1, 3, 6 Gy、もしくは N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)（1 mM で 1 hr 処理）によって突然変異を導入、6-thioguanine 存在下で培養し、細胞クローンを樹立した。

クローンよりゲノム DNA を抽出し、各エクソンの有無を定量 PCR にて解析した。

全ゲノム解析を行った。使用したのは、ショートリード解析は MGI 社 DNBSEQ-T7 にて、ロングリード解析は Oxford Nanopore Technologies 社の PromethION を用いて行った。

（倫理面への配慮）

本年度の研究内容に関しては、培養細胞を用いた実験のみで、倫理面への配慮は必要なかった。

III. 研究結果

放射線や ENU 処理なしに樹立したクローンをコントロールとし、すべての処理（ γ 線 1, 3, 6 Gy, ENU 1mM）より複数のクローンを樹立することが出来た。それぞれの樹立したクローン数とエクソンの欠失状態を以下に示す。被ばく線量の増加によって、明らかに欠失を持つクローンの割合が増加した。

実験群	樹立クローン数	全エクソン欠失	エクソン部分欠失
コントロール	16	0/16 (0%)	0/16 (0%)
γ 線 - 1 Gy	27	0/27 (0%)	1/27 (3.7%)
γ 線 - 3 Gy	27	1/27 (3.7%)	3/27 (11.1%)
γ 線 - 6 Gy	33	10/33 (30.3%)	6/33 (18.2%)
ENU	24	0/24 (0%)	2/24 (8.3%)

このうち、コントロール、1 Gy、3 Gy、6 Gy から 5 クローンずつ、ENU から 4 クローン、合計 24 クローンを選択し、コントロール、1 Gy、3 Gy のクローン全てと 6 Gy のクローン 1 つ（計 16 クローン）についてショートリードとロングリード法による全ゲノムシーケンスを施行し、配列データを得た。

IV. 考察

BJ1-hTERT 細胞を用いたクローンを樹立できたことで、癌細胞株と比較し、正常に近いゲノムを用いた解析が可能となり、より放射線による変異を正確に検出できるものと考えられる。また、これらのクローンは、放射線照射によってクローン化したことがほぼ確実であり、さらに *HPRT* 遺伝子ローカスを狙って詳細な検討が可能である。さらに、本年度の PCR によるエクソン欠失デ

ータは、次年度の次世代シーケンサーより得られたデータ解析の検証に用いることができる。高線量照射後のクローンにおける欠失数の増加は放射線被ばくによるものと考えられ、実験が適切に行われたことを意味する。

V. 結論

詳細なゲノム解析に供することのできる放射線被ばくによる *HPRT* 変異クローンを樹立が完了し、一部の全ゲノムシーケンシングまで施行した。

VI. 次年度以降の計画

HPRT 変異クローンの全ゲノムシーケンシングを、ショートリード、ロングリード法の両方にて完了させ、放射線特異的なゲノム変異の同定を行う。また、福島県において発見された小児・若年者甲状腺癌症例を、年齢や遺伝子変異別にグループ分けを行い、クローンに用いた同じ手法にて全ゲノム解析を開始する。

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

Iwadate M, Mitsutake N, Matsuse M, Fukushima T, Suzuki S, Matsumoto Y, Ookouchi C, Mizunuma H, Nakamura I, Nakano K, Sakamoto A, Hirokawa M, Ito M, Naganuma H, Hashimoto Y, Shimura H, Yamashita S, Suzuki S. The Clinicopathological Results of Thyroid Cancer with BRAFV600E Mutation in the Young Population of Fukushima. *J Clin Endocrinol Metab* 2020; 105: dgaa573.

イ) 学会発表等

なし

ウ) 書籍・総説

なし

エ) 受賞

なし

オ) 特許

なし

カ) 環境行政への活用・貢献実績

なし

VIII. 引用文献

なし

Identification of genomic radiation signatures using long-read sequencing and its application to pediatric thyroid cancers in Fukushima.

Norisato Mitsutake

Professor, Nagasaki University

Key words: radiation, long-read next generation sequencing, thyroid cancers

Abstract

The aim of this study is to identify genomic radiation signatures using latest technologies of genome analysis, to verify the existence of these signatures in childhood and adolescent thyroid cancers found in Fukushima, and to further improve the effectiveness of measures to the health management and anxiety of the people living in Fukushima. The purpose of this academic year's was to establish cell clones that are certain to carry genomic changes induced by ionizing radiation and to perform short-read and long-read next-generation sequencing.

BJ1-hTERT cells, which had been established by introducing the human telomerase reverse transcriptase (*hTERT*) gene into normal human fibroblasts to immortalize, were treated with three different doses of gamma-rays (1, 3, 6 Gy) or N-ethyl-N-nitrosourea (ENU, 1 mM, 1 hr). Then, the cells were cultured in the presence of 6-thioguanine (6-TG, 40 μ M), and clones were isolated and propagated. Next, a quantitative PCR-based method was developed to confirm the genomic structure of the *HPRT* gene locus, and the status of deletion of each exon was confirmed. Clones established with no treatment and low doses of radiation had almost no exon deletions; however, the number of exon deletions was increased with dose, and many of the clones with 6 Gy were found to lose all exons. We selected 5 clones from each dose and performed Nanopore long-read whole genome sequencing (WGS) and also conventional short-read WGS on 16 of them during this academic year, and their fastq files were successfully obtained, which will be subjected to detailed analysis in the next year.

原子力発電所事故後の避難住民・帰還住民における健康寿命に関わる

震災関連要因とそのメカニズムについての疫学研究

大平 哲也（福島県立医科大学 医学部疫学講座 主任教授）

研究要旨

本研究では、福島県内における避難区域住民の脳卒中と放射線を含む要因との関連を検討することで、健康寿命を阻害する要因を疫学的に明らかにすることを目的とした。最初に、脳卒中発症に対して震災や避難の影響を検討するため、今年度はコントロール群として福島県の中通り地域の9医療機関における2018年の採録を行った。その結果、2013年2,388例と比較して2018年では2,347例の脳卒中発症が登録され、発症数に変化はみられなかった。また、初発再発の比較では、全体では再発の減少がみられたが有意な変化ではなかった。さらに脳梗塞の病型の比較では、心原性脳塞栓の増加、アテローム血栓性脳梗塞とラクナ梗塞の減少がみられた。引き続き、浜通り、会津地域でも採録を継続することで、原発事故による避難の直接的、間接的な脳卒中発症への影響について明らかにしていく予定である。

次に、会津地方と比較して避難区域住民の震災後5年間の健診成績を比較した結果、避難区域住民では、肥満の割合が有意に増加し、高血圧の割合が増加したが、降圧剤服用の割合も増加したため、血圧のコントロールはできていた。また、避難気区域住民の約6割が脂質異常であり、その割合も増加しているが、服薬によりHDLコレステロールは上昇、LDLコレステロールは低下していた。一方、糖尿病型の割合と糖尿病治療中の割合も有意に増加したが、HbA1cの平均値は上昇しており、血糖のコントロールは十分でないことが明らかになった。したがって、避難という環境の変化が継続的に脳卒中発症リスクが高い状態と関連していることが明らかになった。今後は、これらの循環器リスクと環境要因を含む心理社会的要因・生活習慣との関連を検討するとともに、脳卒中発症と要介護認定との関連を明らかにしていく。

キーワード：福島第一原発事故、健康寿命、脳血管疾患、生活習慣病、避難

研究協力者

磯 博康（大阪大学大学院医学系研究科公衆衛生学）

安村 誠司（福島県立医科大学医学部公衆衛生学）

木山 昌彦（大阪府がん循環器病予防センター）

佐久間 潤（福島県立医科大学脳神経外科学講座）

石川 徹夫（福島県立医科大学 医学部放射線物理化学講座）

前田 正治（福島県立医科大学 医学部災害こころの医学講座）

坂井 晃（福島県立医科大学 医学部放射線生命科学講座）

小橋 元（獨協医科大学公衆衛生学講座）

梅澤 光政（獨協医科大学公衆衛生学講座）

神谷 研二（福島県立医科大学放射線医学県民健康管理センター）

研究参加者

林 史和（福島県立医科大学放射線医学県民健康管理センター）

中野 裕紀（福島県立医科大学放射線医学県民健康管理センター）

岡崎 可奈子（福島県立医科大学放射線医学県民健康管理センター）

長尾 匡則（福島県立医科大学放射線医学県民健康管理センター）

舟久保 徳美（福島県立医科大学 医学部疫学講座）

坪井 聡（福島県立医科大学 医学部疫学講座）

江口 依里（福島県立医科大学 医学部疫学講座）

宮崎 真（福島県立医科大学 健康増進センター）

馬 恩博（福島県立医科大学 健康増進センター）

I. 研究目的

放射線被ばくは循環器疾患に影響することが報告されており、広島・長崎原爆被ばく者コホートでは、放射線被ばくが量反応的に脳卒中、心臓病による死亡リスクを高めることが報告されている^{1,2)}。一方、東日本大震災後の福島の避難住民においては、放射線被ばくによる直接的な循環器疾患発症への影響は考えにくいものの、避難生活に伴う環境の変化、社会心理的ストレスの増大、生活習慣の変化が起こっており、循環器疾患、認知症、身体機能低下の発症リスクが高い状態であると考えられる。しかしながら、我々が福島県内の平成 25 年までに心筋梗塞発症・死亡の地域差を比較した結果、避難区域住民における心筋梗塞、急性死発症率の増加はみられなかった³⁾。一方、福島県内の避難区域避難住民において、震災前後の健診成績を比較した結果、特に避難住民において震災後に肥満、高血圧、糖異常、脂質異常、肝機能異常等の発症が増加していた⁴⁾。また、避難区域住民では要介護者の急増が指摘されており、さらに福島県内の市町村における健康寿命を比較した結果、避難区域市町村では健康寿命が短い傾向がみられた (<https://www.pref.fukushima.lg.jp/sec/21045a/otasshado.html>)。したがって、避難区域住民は、今後さらに脳卒中等の循環器疾患、認知症、身体機能低下等の出現による要介護者の増加が予測される。しかしながら、震災関連因子が要介護にどの程度寄与するかについては明らかになっていない。また、今後避難区域住民において脳卒中の発症・死亡の増加がみられ、単純に地域差を比較した場合、放射線被ばく線量との量反応関係がみられる可能性があり、放射線被ばくの影響が過大評価される可能性が懸念される。

そこで本研究では、①平成 30 年の脳卒中発症登録を実施し、既に実施した平成 25 年の脳卒中発症率の推移及びその地域差を比較すること、②発症登録結果と福島県「県民健康調査」による個別の外部被ばく線量、避難状況、健診成績、放射線不安・うつ症状等のこころの健康度の結果を紐づけすることにより、避難区域における脳卒中の発症における震災関連因子の寄与率を明らかにすること、及び③避難区域内外の市町村の介護データと健診及びこころのアンケート調査の結果を紐づけし、避難区域住民の要介護の要因を明らかにすることを目的とした。本研究により、放射線事故に伴う放射線の直接的な健康リスク及び避難及びそれ以外の間接的な健康リスクが脳卒中発症及び要介護に及ぼす影響を明らかにし、避難区域住民の健康寿命の延伸に寄与することを成果とする（図 1）。

II. 研究方法

I. 避難区域住民における脳卒中発症率の推移と地域差に関する研究

【対象】対象者は、震災後に避難区域に指定された 13 市町村住民及び震災後に避難の有無に関わらず福島県内に住んでいた者及び福島県内に住民票がある者である。

【方法】平成 28（2016）年～29（2017）年にかけて、福島県内の医療機関を対象とした脳卒中発症登録を開始した。脳卒中発症による入院した症例について、各病院に出向して採録調査を実施した結果、採録には非常に多数の調査者と時間がかかることが判明した。最終的には脳卒中発

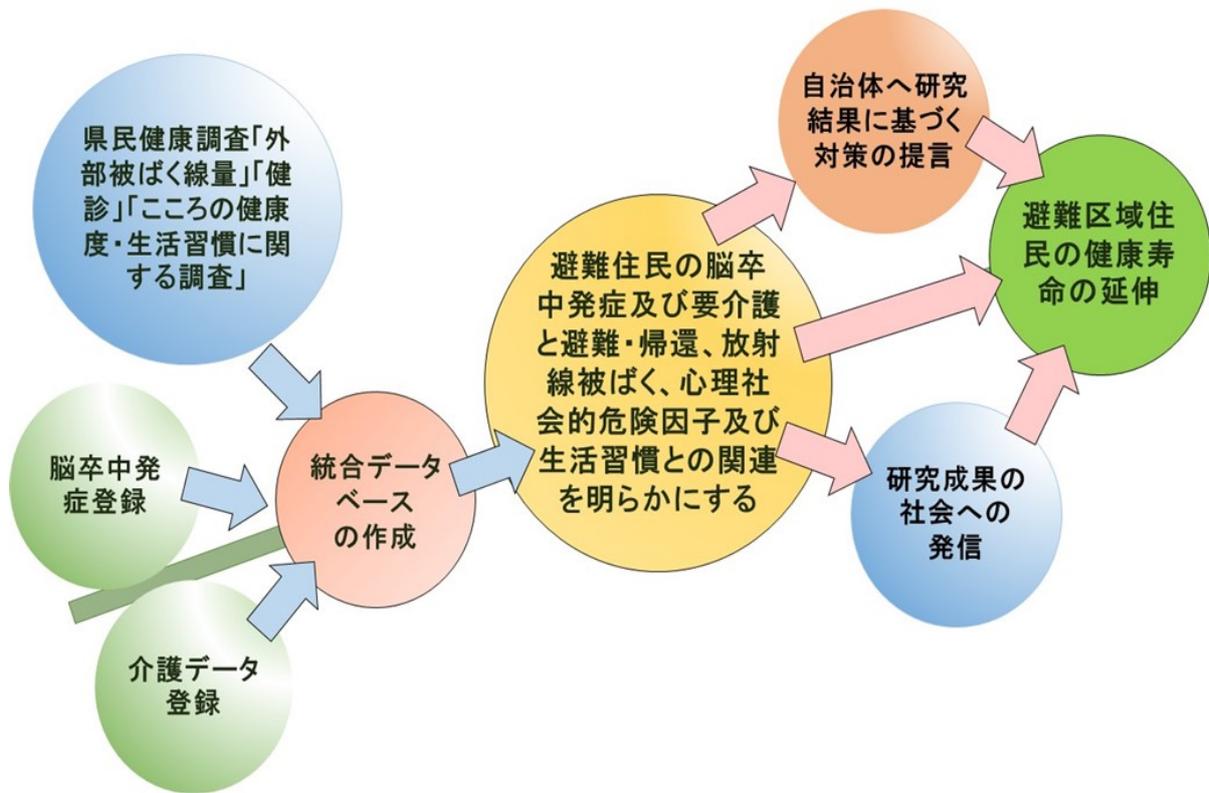


図1. 研究の目的、方法、期待される成果を示した概要図

症登録に関する簡易版を作成し、それを用いて平成25年（2013年）1月～12月末日までの県内の脳卒中を採録・登録を行った結果、計9,447件の採録を行い、脳卒中診断基準によって、計5,455件の登録を行った。本研究では、平成25年（2013年）1月～12月末日までの調査と全く同じ方法で平成30（2018年）年1月～12月の脳卒中の発症登録を行い（図2）、平成25年の結果と比較検討する。尚、本研究の主な対象者は避難区域12市町村住民であるが、未だに県内各地に避難している者が多いこと及び他の地域と比較する必要があることから県内医療機関全体の採録が必須である。

令和2年度は福島県内の震災や避難の影響を検討するため、コントロール群として福島県の中通り地域の9医療機関での採録を行った。この内、脳卒中除外例を除いて脳卒中及びその下位分類（脳内出血、くも膜下出血、ラクナ梗塞、血栓性梗塞、塞栓性梗塞）を登録し、これまで調査した平成25年（2013年）の発症状況からの推移を下位分類別に比較検討した。

解析方法

- ・解析は、平成25年調査結果と平成30年調査結果の発症数の違いについてはポアソン回帰分析を、それぞれの調査結果の初発、再発の割合の違い、脳卒中の下位分類の割合の違いについては、 χ^2 乗検定によって有意差検定を行った。
- ・解析ソフトはSAS, version 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)を用いた。有意差検定は両側検定を行い、5%未満の有意水準（ $P < 0.05$ ）をもって有意と判定した。

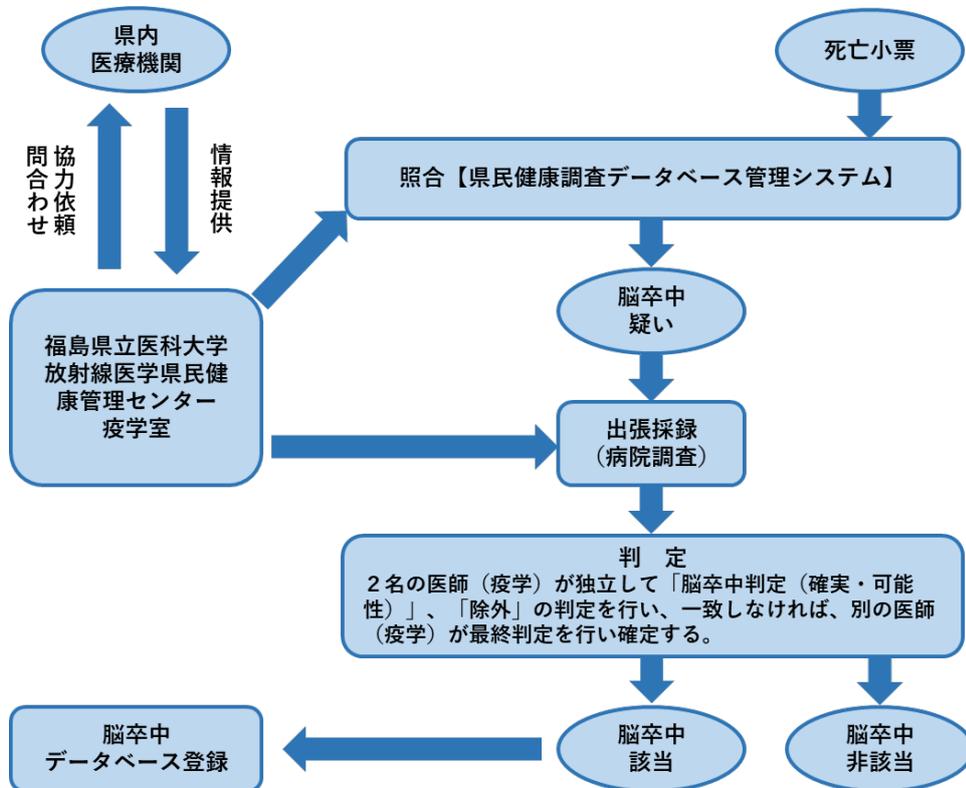


図2. 脳卒中登録のフロー図

II. 避難区域住民における要介護認定とその要因に及ぼす因子についての前向き研究

【対象】対象者は、震災後に避難勧告を受けた地域及び地域を含む県民健康調査「健康診査」対象13市町村住民（人口約21万人）、会津地方の3市町（人口約7万人）の内、20歳以上の住民である。

- ・県民健康調査「健康診査」対象13市町村

広野町、檜葉町、富岡町、川内村、大熊町、双葉町、浪江町、葛尾村、飯館村、南相馬市、田村市、川俣町、伊達市の一部（特定避難勧奨地点の属する区域）このうち、下記の2地域に分けて解析を行った。

- ・13市町村（一部避難区域）：南相馬市、田村市、川俣町、伊達市
- ・13市町村（避難区域）：広野町、檜葉町、富岡町、川内村、大熊町、双葉町、浪江町、葛尾村、飯館村
- ・他地域：会津地方（喜多方市、南会津町、只見町）

【方法】上記の3つの地域の健診（特定健診および後期高齢者健診・県民健康調査による健診のいずれか）を受診された方のうち、平成23年（2011年）～24年（2012年）度において少なくとも1回以上受診した方を分析対象とした。この間、2回以上受診した方については、最も震災に近い年度に受診した健診結果をベースラインとし、平成26年（2014年）～27年（2015年）度に実

施した健診との間で健診データを比較検討した。平成26～27年度に2回以上健診を受診した方については、震災から最も遠い年度に受診した健診結果を解析に用いた。

尚、解析対象者は、13市町村（避難区域）は10,768人（男性4,652人、女性6,116人、平均年齢63.9歳）、13市町村（一部避難区域）は21,744人（男性9,431人、女性12,313人、平均年齢63.5歳）、会津地方は、6,216人（男性2,710人、女性3,506人、平均年齢67.4歳）であり、各地域の追跡期間はそれぞれ3.5年、3.4年、3.6年であった。

解析方法

・連続変量（肥満度、血圧値、HbA1c値、コレステロール値）については、対応のあるt検定を用い、割合（肥満、やせ、高血圧、糖尿病型、脂質異常、肝機能異常、eGFR低値、高尿酸血症の頻度、および服薬等治療中の頻度）の推移についてはMcNemar検定を用いて有意差検定を行った。尚、グラフ中の各カラムの数値は四捨五入して表示しているため、全体として100%にならない場合がある。

・解析ソフトはSAS, version 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)を用いた。有意差検定は両側検定を行い、5%未満の有意水準（ $P < 0.05$ ）をもって有意と判定した。

（倫理面への配慮）

本研究は人を対象とする医学系研究に関する倫理指針ならびに個人情報保護法に則り、福島県立医大の倫理委員会に申請を行った上で実施した。「倫理指針」に照らし合わせて、今回の研究は、①研究対象者に対して最小限の危険を超える危険を含まないこと、②当該方法によることが、研究対象者の不利益とならないこと、③悉皆性の重要性、④研究後の社会還元、⑤社会的意義・重要性の観点から、被験者個人からの同意文書を得ることは免除できる。得られた情報、各種検査データは、福島県立医科大学内において、厳重な個人情報管理のもとに保管される。

2. 個人情報の取扱い

個人情報はインターネットに接続していないセキュリティ管理されたコンピューターにのみ入力し、磁気ディスク等の媒体には複製しない。調査票などの紙資料については、研究代表者が疫学講座の鍵のかかるロッカーにて保管する。入力内容などの電子データについては、記憶媒体に記録した上で、疫学講座の鍵のかかるロッカーにて保管する。10年経過後に、データベースの記憶媒体は、物理的、電磁的に破壊したのちに破棄する。

集計・解析は、放射線医学県民健康管理センター及び医学部疫学講座において本人同定可能な情報を削除した上で、解析用データベースを構築し、集計・解析を行う。研究参加者が集計・解析を行なう場合も同様に連結不能匿名化した解析用データを用いる。結果の公表の範囲は、統計学的解析結果のみであり、個人の情報に関する内容は一切公表しない。

上記のとおりデータの取り扱いについて、福島県立医科大学の規定を順守する。

III. 研究結果

I. 避難区域住民における脳卒中発症率の推移と地域差に関する研究

令和 2 年度は平成 30 年（2018 年）の福島県の中通り地域の 9 医療機関での採録を行った結果、2,347 例の脳卒中発症が登録された。平成 25 年（2013 年）における同医療機関での発症登録数 2,388 例と比較すると、若干の減少がみられたが、統計学的有意差はみられなかった。次に、各年の調査結果における脳卒中の初発、再発の割合を図 3 に示す。平成 30 年調査においては、平成 25 年調査と比較して、初発が若干多く、再発が少ない傾向がみられたが、統計学的有意差はみられなかった。



図 3. 2013 年と 2018 年の発症調査における初発、再発割合の比較

図 4 に、医師による判定結果に基づいて、脳卒中の下位分類（脳梗塞、脳内出血、くも膜下出血）を平成 25 年調査と平成 30 年調査で比較した結果を示す。平成 25 年（2013 年）に比べて、平成 30 年（2018 年）調査では、脳梗塞が若干増加し、脳内出血、くも膜下出血は若干減少傾向であったが、統計学的有意差はみられなかった。

図 5 に、脳梗塞の病型別（アテローム血栓性脳梗塞、心原性脳梗塞、ラクナ脳梗塞）に平成 25 年調査と平成 30 年調査で比較した結果を示す。平成 25 年（2013 年）に比べて、平成 30 年（2018 年）調査では、アテローム血栓性脳梗塞及びラクナ脳梗塞が有意に減少し($p < 0.05$)、心原性脳梗塞が有意に増加する傾向がみられた($p < 0.05$)。

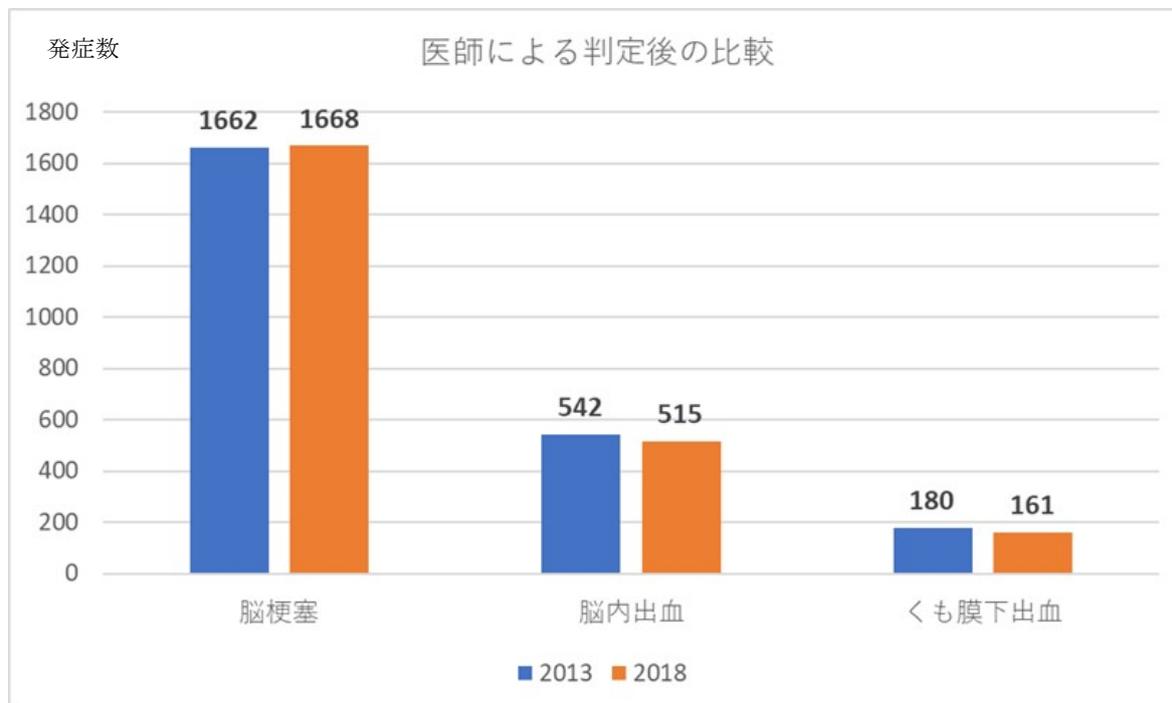


図 4. 2013 年と 2018 年の発症調査における脳梗塞、脳内出血、くも膜下出血の割合の比較

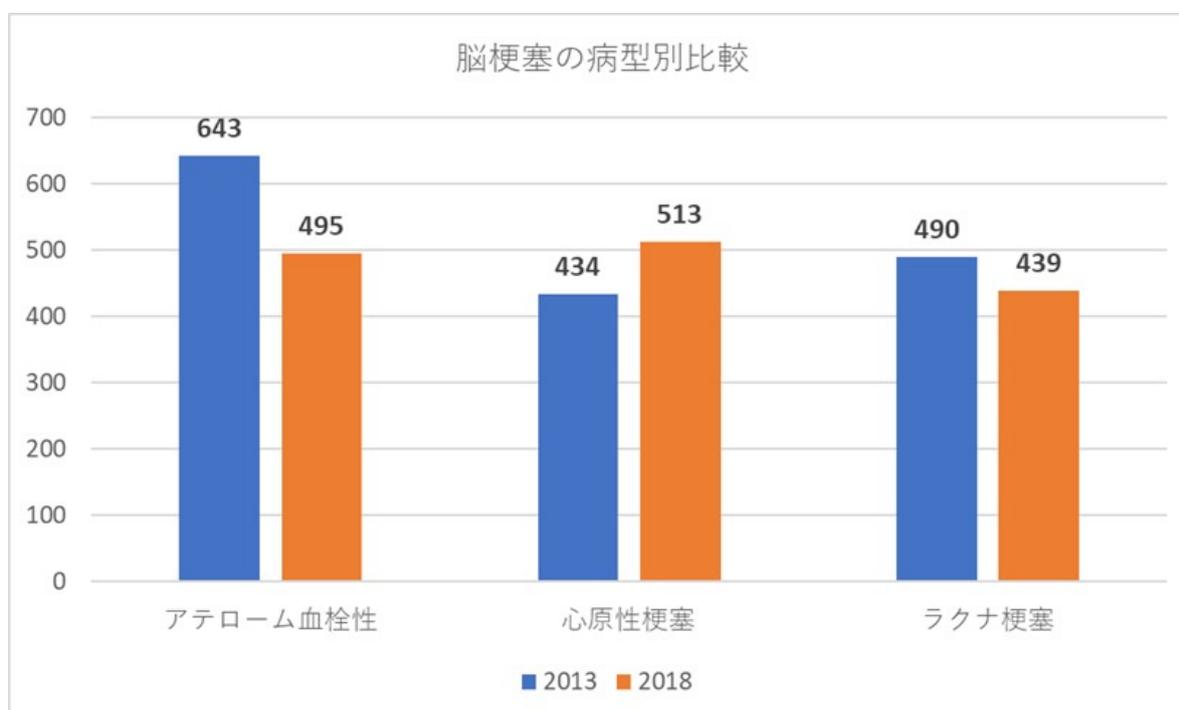


図 5. 2013 年と 2018 年の発症調査における脳梗塞の病型別割合の比較

II. 避難区域住民における要介護認定とその要因に及ぼす因子についての前向き研究

会津地方（非避難区域の 3 市町）、13 市町村（一部避難区域）、13 市町村（避難区域）のそれぞれにおいて平成 23 年—24 年度と平成 26 年—27 年度とを比較した結果、肥満（BMI 25.0 以上）の割合は、会津地方（3 市町）、13 市町村（一部避難区域）において、平成 23 年—24 年度と比べて平成 26 年—27 年度では有意に減少した($p<0.05$)が、13 市町村（避難区域）では、有意に増加した($p<0.05$)（図 6）。

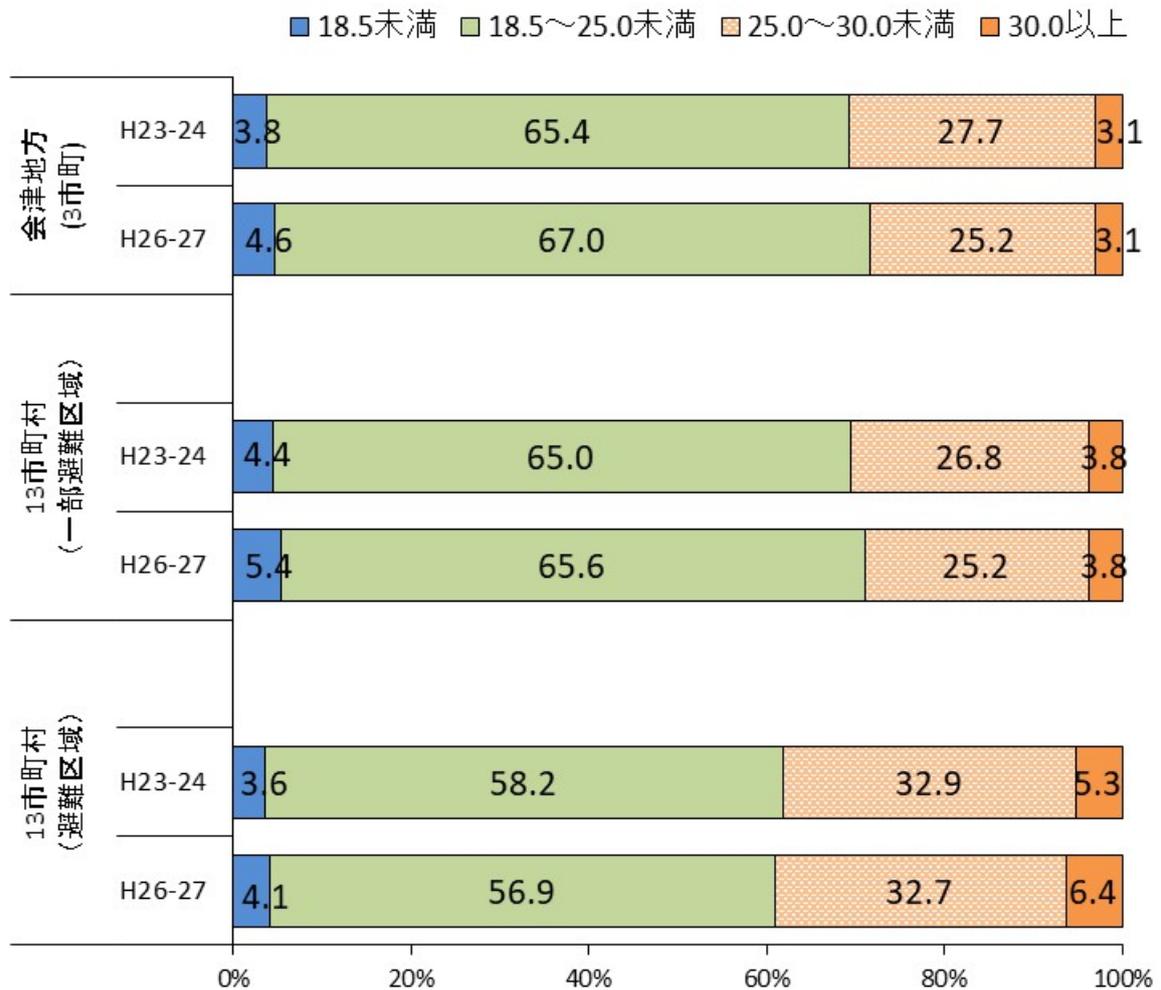


図 6. 避難区域、一部避難区域、非避難区域別にみた肥満割合の推移

高血圧（収縮期血圧 140 mmHg 以上、もしくは拡張期血圧 90 mmHg 以上、もしくは降圧剤服用中）の割合は、会津地方（3 市町）、13 市町村（一部避難区域）、13 市町村（避難区域）のいずれにおいても、平成 23 年—24 年度と比べて平成 26 年—27 年度で有意に増加していた（図 6）。3 地域の中では、13 市町村（避難区域）における増加が最も大きかった。また、高血圧未治療の割合は、3 地域のいずれにおいても減少したが、減少量は 13 市町村（避難区域）で最も小さかった。

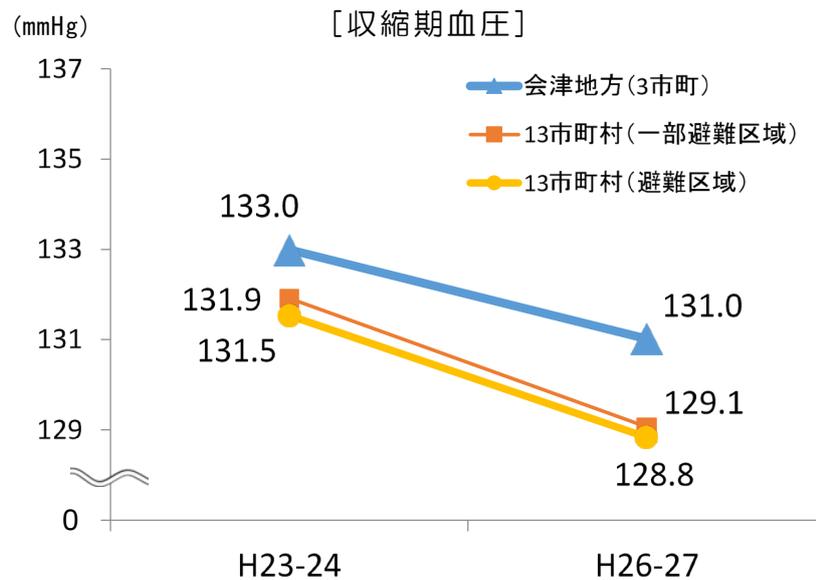


図7. 避難区域、一部避難区域、非避難区域別にみた収縮期血圧（平均値）の推移

収縮期血圧の平均値は、会津地方（3市町）、13市町村（一部避難区域）、13市町村（避難区域）のいずれにおいても、平成23年—24年度と比べて平成26年—27年度で有意に低下した（図7）。また、拡張期血圧の平均値も、収縮期血圧と同様の傾向がみられ、3地域すべてにおいて有意に低下した。

糖尿病型（空腹時血糖 126 mg/dL 以上、もしくは随時血糖 200 mg/dL 以上、もしくは HbA1c 6.5% 以上、もしくは血糖降下剤等治療中）の割合は、会津地方（3市町）、13市町村（一部避難区域）、13市町村（避難区域）のいずれにおいても、平成23年—24年度と比べて平成26年—27年度で有意に増加した（図8）。3地域の中では、13市町村（避難区域）における増加が最も大きく、糖尿病型にあてはまる者の割合が最も多かった。一方、糖尿病未治療の割合は、会津地方（3市町）、13市町村（一部避難区域）で増加したが、13市町村（避難区域）においては変化がなかった。一方、血糖コントロールの指標である HbA1c の平均値は、会津地方（3市町）、13市町村（一部避難区域）、13市町村（避難区域）のいずれにおいても、平成23年—24年度と比べて平成26年—27年度で有意に上昇したが、変化量は、3地域のいずれにおいても同程度であった（図9）。

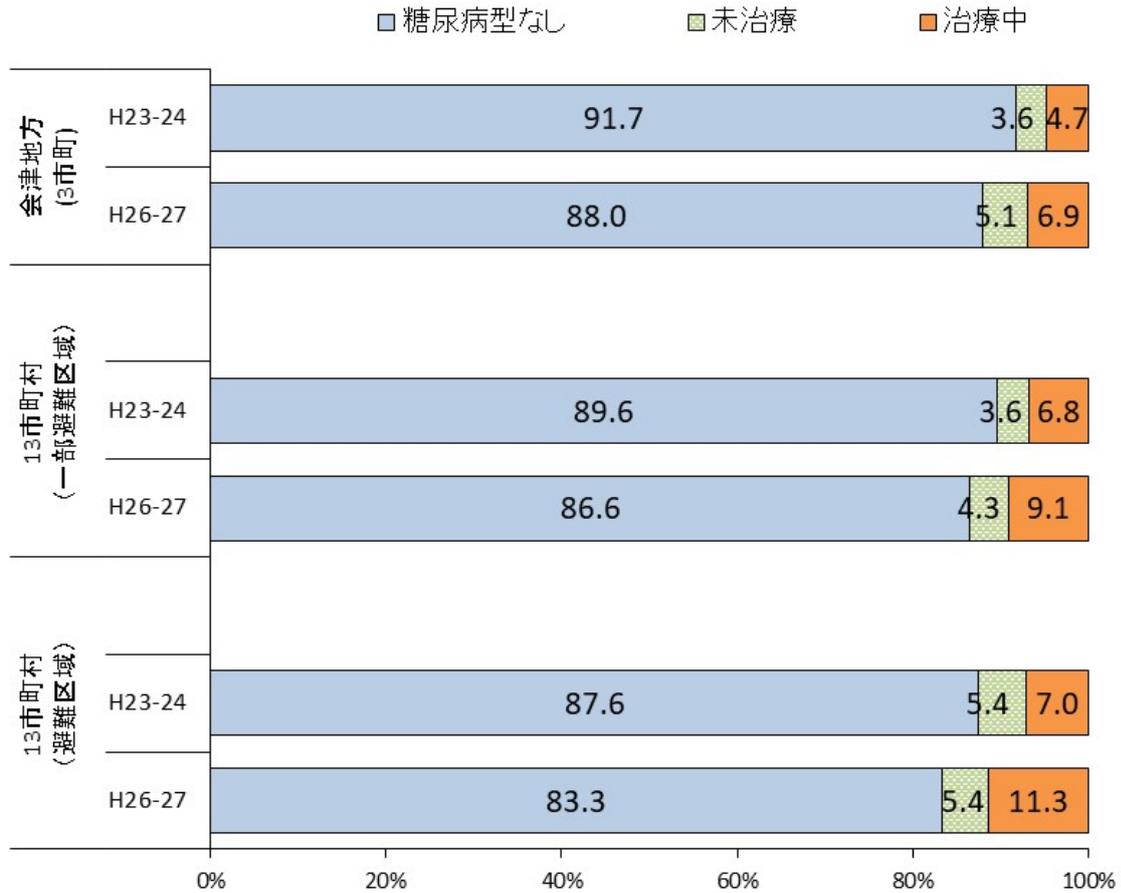


図8. 避難区域、一部避難区域、非避難区域別にみた糖尿病型の割合の推移

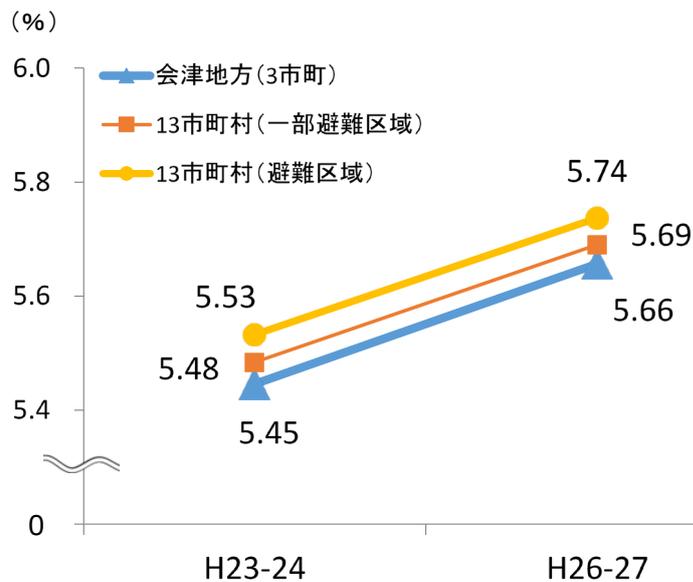


図9. 避難区域、一部避難区域、非避難区域別にみた HbA1c (平均値) の推移

脂質異常（HDL コレステロール 40 mg/dL 未満、もしくは LDL コレステロール 140 mg/dL 以上、もしくは空腹時トリグリセライド 150 mg/dL 以上、もしくは脂質異常治療中）の割合は、会津地方（3市町）、13市町村（一部避難区域）、13市町村（避難区域）のいずれにおいても、平成23年―24年度と比べて平成26年―27年度で有意に増加した。また、3地域の中では、13市町村（避難区域）で脂質異常にあてはまる者の割合が多かった。

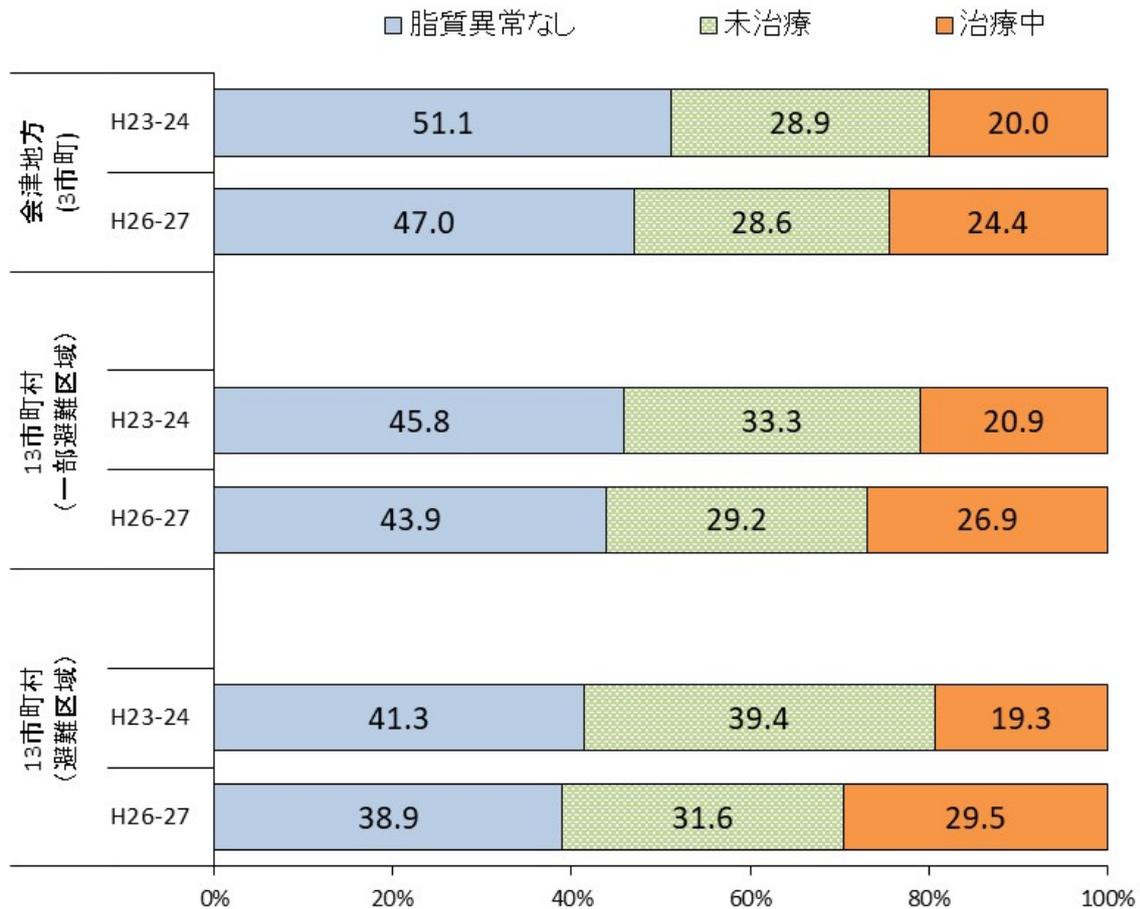


図10. 避難区域、一部避難区域、非避難区域別にみた脂質異常の割合の推移

HDL コレステロールの平均値は、会津地方（3市町）、13市町村（避難区域）において平成23年―24年度と比べて平成26年―27年度で有意に上昇したが、13市町村（一部避難区域）では有意な変化がなかった。また、平均値が最も低かったのは13市町村（避難区域）であった。LDL コレステロールの平均値は、会津地方（3市町）では平成23年―24年度と比べて平成26年―27年度で有意に上昇したが、13市町村（一部避難区域・避難区域）においては、いずれも有意に低下した。また、低下量が最も大きかったのは、13市町村（避難区域）であった。

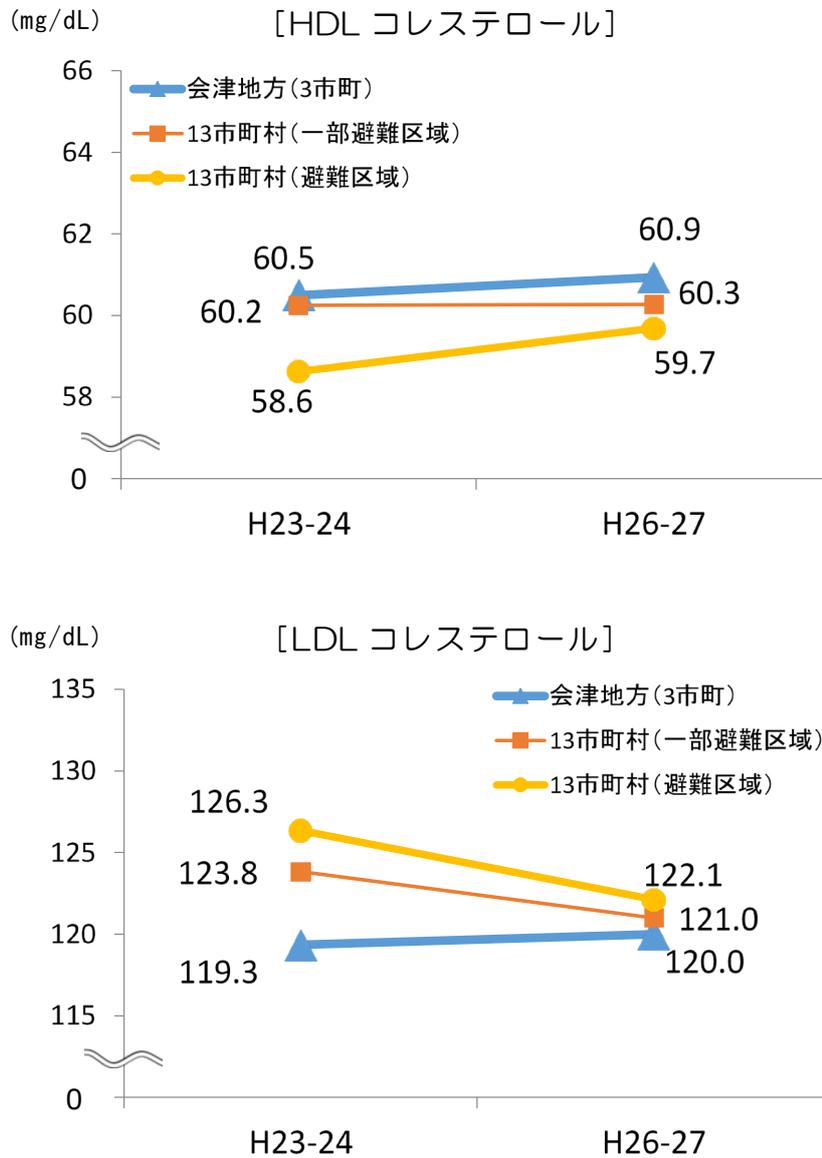


図11. 避難区域、一部避難区域、非避難区域別にみた HDL コレステロール（平均値）及び LDL コレステロールの推移

肝機能異常（AST 31 U/L 以上、もしくは ALT 31 U/L 以上、もしくは γ -GT 51 U/L 以上）の割合は、会津地方（3市町）では平成23年～24年度と比べて平成26年～27年度で有意な変化はみられなかったが、13市町村（一部避難区域・避難区域）ではいずれも有意に減少した（図12）。また、肝機能異常の割合が最も多かったのは、13市町村（避難区域）であったが、減少量は、13市町村（一部避難区域）で最も大きかった。

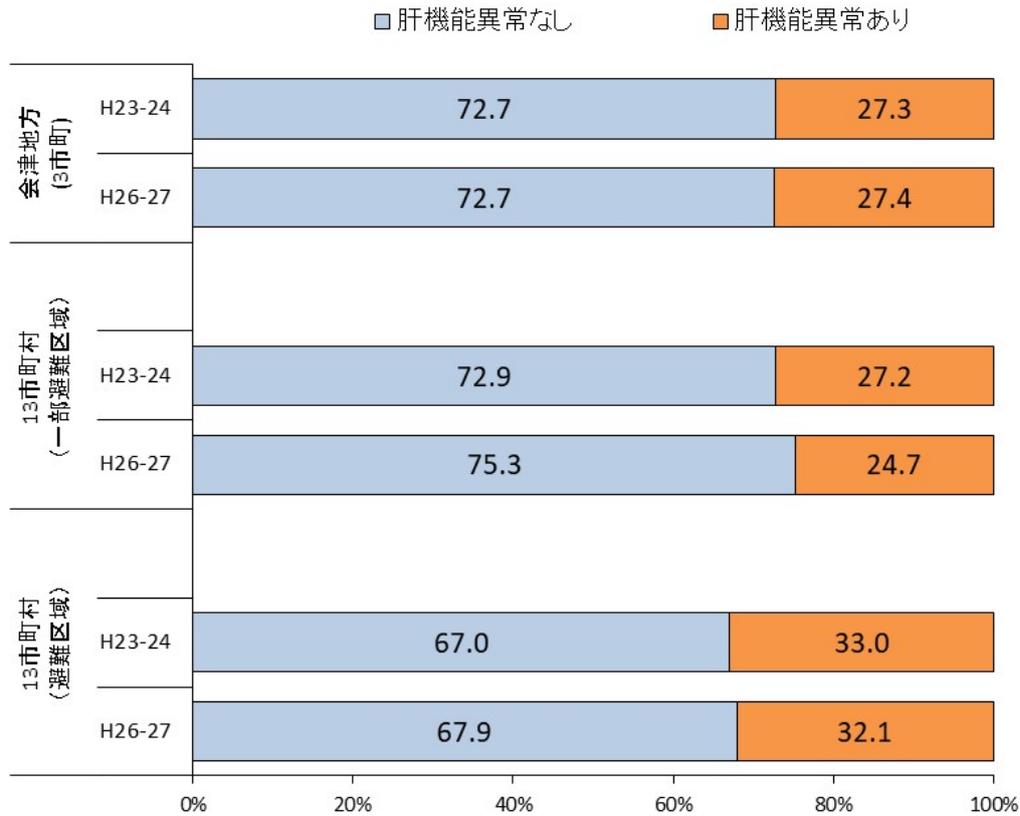


図 1 2. 避難区域、一部避難区域、非避難区域別にみた肝機能異常の割合の推移

腎機能異常 (eGFR(推算糸球体濾過量)が 60 mL/min/1.73m²未満) の割合は、会津地方 (3 市町)、13 市町村 (一部避難区域)、13 市町村 (避難区域) のいずれにおいても、平成 23 年—24 年度と比べて平成 26 年—27 年度で有意に増加した (図 13)。また、腎機能異常 (eGFR 低値) の割合が最も多かったのは、会津地方 (3 市町) であった。

尿酸高値 (尿酸 7.1 mg/dL 以上) の割合は、会津地方 (3 市町)、13 市町村 (避難区域) において、平成 23 年—24 年度と比べて平成 26 年—27 年度で有意に増加したが、13 市町村 (一部避難区域) においては有意な変化がなかった (図 14)。尿酸高値の割合が最も多かったのは、13 市町村 (避難区域) で、変化量が最も大きかったのは会津地方 (3 市町) であった。

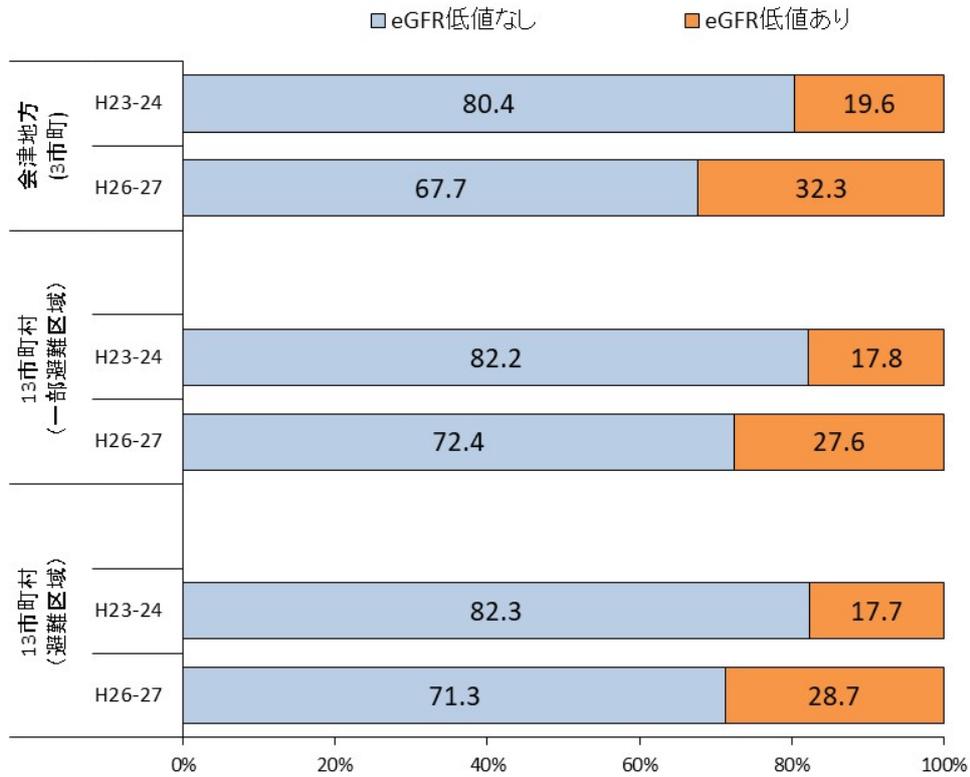


図13. 避難区域、一部避難区域、非避難区域別にみた腎機能異常の割合の推移

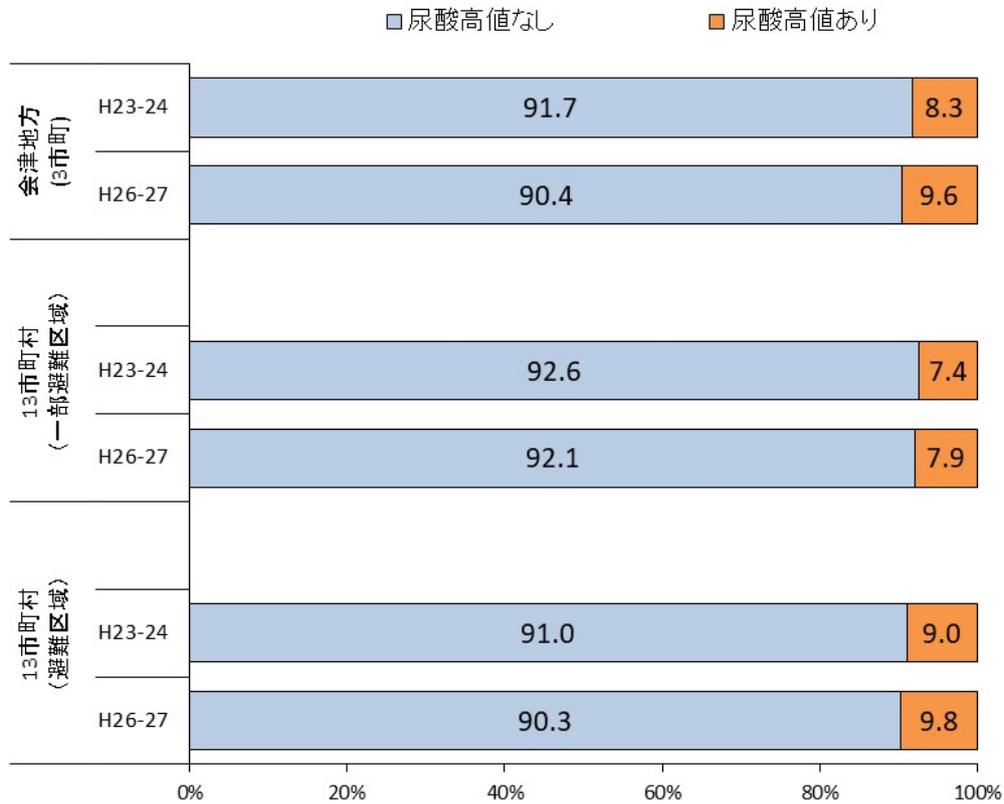


図14. 避難区域、一部避難区域、非避難区域別にみた尿酸高値の割合の推移

IV. 考察

本年度は、福島県の 2018 年における脳卒中発症状況について中通りを中心として調査した結果、2,347 例の脳卒中発症が登録された。同じ医療機関において 2013 年に調査を行った結果と比較すると、2013 年の 2,388 例とほぼ同じ発症数であった。また、初発再発別、及び脳内出血、脳梗塞、くも膜下出血で分けて比較した結果においても、2013 年と 2018 年の間に有意差はみられなかった。一方、脳梗塞の病型別では、2018 年では脳塞栓が有意に増加していた。今回調査した中通りは、震災の直接的な影響や放射線事故による避難等の影響はほとんど受けておらず、脳卒中発症数に大きな変化がなかったことは妥当な結果と考えられる。一方、病型別の分析において脳塞栓が増加したことについては、今後、他の地域を含めて解析した上で検討することが必要と考える。これまで脳塞栓は心房細動が重要な危険因子であることが報告されているが、心房細動の危険因子として年齢に加えて、多量飲酒、肥満、心理的ストレス等の存在が報告されており、今回の結果は、住民の高齢化以外に生活習慣や心理的ストレスの影響を示している可能性がある。後述するように、特に避難区域では肥満者が震災後に増加し、その傾向が今もなお継続している。一方、避難区域住民においては、精神的苦痛を感じる人の割合が震災後に急増した。これらの影響については、次年度以降に避難区域住民の調査を行うこと、及び避難区域住民を対象として実施している県民健康調査の結果を紐づけることによって明らかになっていくと考える。

次に、会津地方と比較して避難区域住民の震災後 5 年間の健診成績を比較した結果、避難区域住民では、肥満の割合が有意に増加し、高血圧の割合が増加したが、血圧のコントロールは良好であった。また、避難区域住民の約 6 割が脂質異常であり、その割合も増加していたが、測定値である HDL コレステロール値は上昇し、LDL コレステロール値は低下していた。既に、避難区域住民では、震災前後において肥満⁵⁾、高血圧⁶⁾、糖異常⁷⁾、脂質異常⁸⁾、肝機能異常⁹⁾、メタボリックシンドローム⁹⁾、高尿酸血症¹¹⁾、心房細動¹²⁾が増加したことが明らかになっている。本研究の結果、震災後 5 年が経過した後も、肥満者の割合は特に避難区域で増加傾向であり、高血圧、脂質異常を有する者の割合がさらに増加していることが明らかになった。一方、測定値をみると、血圧及び脂質の値は改善傾向がみられた。これは、避難区域では、保健医療従事者における受診勧奨が積極的に行われていること、及び医療費の無料化が行われたことにより、受診率が向上した結果、血圧、脂質のコントロールがよくなったものと考えられる。

一方、糖尿病型の割合と糖尿病治療中の割合も有意に増加したが、HbA1c の平均値は上昇しており、血糖のコントロールは十分でないことが明らかになった。糖尿病は、治療そのものに加え、食事療法、運動療法等の生活習慣の改善が重要である。そのため、治療中であっても受診者本人の意識を高めないとコントロールが難しいと考えられる。肥満、高血圧、脂質異常、糖異常はいずれも脳卒中をはじめとする循環器疾患の重要な危険因子である。したがって、避難という環境の変化が継続的に脳卒中発症リスクが高い状態と関連していることが示唆された。今後は、これらの循環器リスクと環境要因を含む心理社会的要因・生活習慣との関連を検討する必要がある。

VI. 次年度以降の計画

I. 避難区域住民における脳卒中発症率の推移と地域差に関する研究

令和 3 年度は会津、いわき、県南、相双地区の発症登録を実施する。これらにより約 10,000 件の採録を行い、この内、脳卒中除外例を除いて約 5,500～6,000 件の新規脳卒中を登録する。脳卒中及びその下位分類（脳内出血、くも膜下出血、ラクナ梗塞、血栓性梗塞、塞栓性梗塞）を登録し、これまで調査した平成 25 年の発症状況からの推移を地域別に比較検討する。

II. 避難区域住民における要介護認定とその要因に及ぼす因子についての前向き研究

本研究で解析に用いた、震災後の平成 23 年～25 年のデータをベースラインとして、その間における、避難状況（避難の有無、避難継続・帰還の有無）、健診における生活習慣、肥満、高血圧、糖尿病、脂質異常等の身体的指標、及び不安、うつ症状、トラウマ反応等の心理的指標とその後の平成 25 年～令和元年における健診データ及び要介護の認定との関連を前向きに検討する。また、これらの解析は福島県住民の震災前後の NDB データ（特定健診、レセプト）を用いても同様の解析を実施し、解析したデータが一般化できるかどうかについても検討する。さらに、医療受療状況と健康寿命との関連についても避難区域・区域外で分析する。これらにより、福島県内の避難区域住民の要介護の震災関連要因を総合的に明らかにし、同定された危険因子に対しての介入方法を検討したうえで、避難区域の自治体に対してエビデンスに基づいた対策を提言する。

III. 避難区域住民における脳卒中発症の震災関連要因についての検討

避難区域住民においては、県民健康調査により個別の外部被ばく線量、避難状況（避難、帰還の有無）、健診成績、こころの健康度・生活習慣に関する調査による心理社会的ストレス、及び生活習慣の把握が可能である。そのため、平成 30 年の脳卒中発症登録例と、平成 30 年に健診等を受診し、脳卒中発症していないことが明らかな対照者との間で、Nested Case-control の手法を用いて脳卒中発症と震災に関連した要因とを比較検討する。具体的には、平成 30 年に発症した約 5,500～6,000 件のデータの内、約 500～550 件が 12 市町村住民であり、その内 200～250 件で震災後に外部被ばく線量、健康診査、こころの健康度・生活習慣に関する調査を受けていることが予想される。そのため 200～250 件と性・年齢を一致させた対照群（1：3 で抽出）400～750 件との間で、避難及び帰還の有無、外部被ばく線量、健診における生活習慣、肥満、高血圧、糖尿病、脂質異常等の身体的指標、及び放射線に関する認知、不安、うつ症状、トラウマ反応等の心理的指標、失業、住居、転居等の社会的指標との関連を比較検討する。さらに、放射線の影響がほとんどないとされる会津地域を対照地域として脳卒中の発症率の推移を比較するとともに、会津地域の内、既に健診及び心理社会的指標を測定している地域を対照として、避難区域と同様の検討を行い結果を比較する。これにより震災後 7 年後の新規脳卒中発症と放射線及び放射線事故に伴う心理社会的要因との関連を明らかにする。

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

該当なし。

イ) 学会発表等

- 1) 岡崎加奈子、大平哲也, 他. 東日本大震災後 5 年間における生活習慣病発症に及ぼす避難の影響, 第 79 回日本公衆衛生学会総会, (京都, 2020 年 10 月 20 日-22 日) [ポスター発表].

ウ) 書籍・総説

該当なし。

エ) 受賞

該当なし。

オ) 特許

該当なし。

カ) 環境行政への活用・貢献実績

該当なし。

VIII. 引用文献

1. Shimizu Y, Kodama K, Nishi N, et al. Radiation exposure and circulatory disease risk: Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivor data, 1950-2003. *BMJ*, 340:b5349, 2010.
2. Schöllnberger H, Eidemüller M, Cullings HM, et al. Dose-responses for mortality from cerebrovascular and heart diseases in atomic bomb survivors: 1950-2003. *Radiat Environ Biophys*, 57:17-29, 2018.
3. Takiguchi M, Ohira T, Nakano H, et al. Trends in the incidence of sudden deaths and heart diseases in Fukushima after the Great East Japan Earthquake. *Int Heart J*, 60:1253-1258. 2019.
4. Ohira T, Nakano H, Nagai M, et al. Changes in cardiovascular risk factors after the Great East Japan Earthquake: A review of the Comprehensive Health Check in the Fukushima Health Management Survey. *Asia Pac J Public Health*. 29(2_suppl):47S-55S, 2017.
5. Ohira T, Hosoya M, Yasumura S, et al. Effect of evacuation on body weight after the Great East Japan Earthquake. *Am J Prev Med*. 50:553-560. 2016.
6. Ohira T, Hosoya M, Yasumura S, et al. Evacuation and risk of hypertension after the Great East Japan Earthquake: The Fukushima Health Management Survey. *Hypertension*. 68:558-564, 2016.

7. Satoh H, Ohira T, Hosoya M, et al. Evacuation after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident is a cause of diabetes: Results from the Fukushima Health Management Survey. *J Diabetes Res.* 2015:415253, 2015.
8. Satoh H, Ohira T, Nagai M, et al. A hypo- high-density lipoprotein cholesterolemia is caused by evacuation after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident: Results from the Fukushima Health Management Survey. *Intern Med*, 55:1967-1976, 2016.
9. Takahashi A, Ohira T, Hosoya M, et al. Effect of evacuation on liver function after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident: The Fukushima Health Management Survey. *J Epidemiol.* 27:180-185, 2017.
10. Hashimoto S, Nagai M, Fukuma S, et al. Influence of post-disaster evacuation on incidence of metabolic syndrome: The Fukushima Health Management Survey. *J Atheroscler Thromb*, 24:327-337, 2017.
11. Hashimoto S, Nagai N, Ohira T, et al. Influence of post-disaster evacuation on incidence of hyperuricemia in residents of Fukushima prefecture; the Fukushima Health Management Survey. *Clin Exp Nephrol.* 24(11):1025-1032., 2020.
12. Suzuki H, Ohira T, Takeishi Y, et al. Increased prevalence of atrial fibrillation after the Great East Japan Earthquake: Results from the Fukushima Health Management Survey. *Int J Cardiol.* 198:102-5, 2015.

Epidemiological study on earthquake-related factors and their mechanisms related to healthy life expectancy in evacuated and returned residents after the nuclear power plant accident

Tetsuya Ohira

Department of Epidemiology, Fukushima Medical University School of Medicine

Key words: Fukushima Daiichi nuclear power plant accident, healthy life expectancy, cerebrovascular disease, lifestyle related disease, evacuation

Abstract

The aim of this study was to epidemiologically identify factors that interfere with healthy life expectancy by examining the association between stroke and its risk factors including radiation in residents of the evacuation area in Fukushima Prefecture. First, to examine the effects of the earthquake and evacuation on the incidence of stroke, we took the 2018 data at 9 medical institutions in the *Nakadori* area of Fukushima Prefecture as a control group this year. As a result, 2,347 stroke cases were registered in 2018 compared with 2,388 cases in 2013, and there was no change in the number of cases. In addition, a comparison of recurrence rate showed an overall decrease from 2013 to 2018, but not a significant change. In addition, a comparison of stroke subtypes showed an increase in cardiogenic cerebral embolisms and a decrease in atherothrombotic and lacunar infarctions. We will continue to collect data in the *Hamadori* and *Aizu* regions to clarify the direct and indirect effects of evacuation due to the nuclear accident on stroke incidence.

Next, we compared the health examination results of the residents of the evacuation area with those of the *Aizu* area for 5 years after the disaster. The results showed that the proportion of obesity increased significantly and the proportion of hypertension increased in the residents of the evacuation area, but the percentage of those taking antihypertensive medications also increased, indicating that the blood pressure was well controlled. In addition, about 60% of the residents in the evacuation area had dyslipidemia, and the proportion of this group also increased, but HDL cholesterol increased and LDL cholesterol decreased with medication. On the other hand, the proportion of diabetic type and the proportion of those on diabetes treatment also increased significantly, but the mean levels of HbA1c increased, indicating that blood glucose was not well controlled. Therefore, it is clear that the environmental change of evacuation is continuously associated with a higher risk of stroke. In the future, we need to examine the associations between these cardiovascular risks and psychosocial factors and lifestyles, including environmental factors, as well as clarify the relationship between stroke onset and certification as requiring nursing care.

原発事故後10年間における地域住民の二次的健康影響の 総括、および今後の医療・介護ニーズの推定に関する研究

坪倉正治（福島県立医科大学医学部放射線健康管理学講座 主任教授）

研究要旨

原発事故は周辺地域の放射能汚染を引き起こし、周辺地域住民へ放射線被ばくに伴う健康影響を及ぼしうる。福島原発事故に伴う健康影響の実態を明らかにし、福島県への放射線に伴う無用な偏見や差別を払拭する助けとすることを目的として、①介護・高齢化問題 ②生活習慣病をはじめとする疾患調査 ③医療ニーズ（病院への入院や救急搬送）の分析の3点において重点的に調査・研究を行った。本年度は、原発事故後の健康影響について主に浜通り地区の生活習慣病健診およびがん検診、介護サービス、救急搬送に関するデータのデータベース化を行い、浜通り北側の相馬地方のデータベースが完了した。パイロット的に行った解析では、①介護問題では避難指示解除後の地域では、より介護を使用しない方が帰還している傾向にあり、家族の離散を経験しているとより介護サービスの使用を行う傾向にあった。②生活習慣病については、糖尿病は原発事故後継続的に悪化傾向にあるものの、避難パターンによってその悪化に変化はなかった。がん検診は原発事故後2年間は受診率の低下が見られたが、その後回復傾向にあった。しかしながら、長期的には原発事故前のレベルまでの回復は見られなかった。③医療ニーズの分析では、避難指示解除後の地域においては、高齢者による一般診療に関係する受診が増えていることが分かった。このような結果から、被災地域の今後の対策と方法、優先順位、原発事故後の健康影響の本体が明らかとなった。

キーワード：二次的健康影響、介護、高齢化、生活習慣病、医療ニーズ

研究協力者

村上道夫（福島県立医科大学・准教授）、小野恭子（産業技術総合研究所・主任研究員）、野村周平（慶應義塾大学医学部・特任准教授）、尾崎章彦（ときわ会常磐病院・医員）、西川佳孝（ひらた中央病院・医員）、森田知宏（相馬中央病院・医員）、山本知佳（南相馬市立総合病院・看護師）、野中沙織（南相馬市立総合病院・研修医）、三浦訓子（特定非営利活動法人医療ガバナンス研究所・事務員）、関家一樹（特定非営利活動法人医療ガバナンス研究所・事務員）、原田恭子（特定非営利活動法人医療ガバナンス研究所・事務員）、朱旭瑾（特定非営利活動法人医療ガバナンス研究所・事務員）、澤野豊明（福島県立医科大学医学部・大学院生）、齋藤宏章（福島県立医科大学医学部・大学院生）、樋口朝霞（福島県立医科大学医学部・大学院生）、小橋友理江（福島県立医科大学医学部・大学院生）、伊東尚美（福島県立医科大学医学部・大学院生）、園田有紀（福島県立医科大学医学部・大学院生）、西村有代（福島県立医科大学医学部・事務員）、原田由佳（福島県立医科大学医学部・事務員）、趙天辰（福島県立医科大学医学部・事務員）

I. 研究目的

原発事故は周辺地域の放射能汚染を引き起こし、周辺地域住民へ放射線被ばくに伴う健康影響を及ぼしうる。そのため、事故早期からの線量計測・環境モニタリング、避難や除染、汚染管理などの被ばく低減対策は必須となる。しかしながら、放射線災害の地域住民への影響は放射線被ばくによるものだけに留まらず、多面的な健康影響、経済・社会的影響を長期的に持つ。¹原発事故後における、そのような放射線の直接的な被ばく以外の健康課題を明らかにすることは、今後の地域の復興および、放射線に伴う無用な偏見や差別を払拭するためにも重要である。

それに加え、原発事故の影響を受けた被災地福島県浜通り地域では、人的・物的なリソースが限られる中で、避難指示解除や様々な施策の導入など、急激な社会状況の変化が続き、多くの健康課題の中で重要性や効果の観点からどれに注力すべきか知りたいというニーズがある。また福島県外では、社会環境変化によって起こりうる多くの放射線被ばく以外の健康課題が、直接的な放射線被ばくによる影響と混同されやすい側面がある。

本研究では、以下の 3 点を目的として研究を行う。①福島原発事故に伴う健康影響（特に直接的な放射線被ばくによるものではなく、社会環境変化によって起こるもの）の実態を明らかにし、福島県への放射線に伴う無用な偏見や差別を払拭する助けとすること。②帰還の徐々に進む旧避難指示区域での医療や介護のニーズおよび方向性をより具体的に検討するために必要な情報を提供すること。③今後原発事故によって影響を受けた地域の自治体や医療者が、地域の少ないリソースをどの健康課題に対して集中的に注力するかを知るために必要な情報を提供すること。

本年度は、その目的の達成のために福島県浜通り地区での健診・検診データ、個人被ばく線量データ、医療機関や介護施設の受診・利用データ、死亡統計・人口動態統計をはじめとする行政がもつ統計データのデータベース化を行い、パイロット的にデータの解析を行うことを目的とする。本研究の成果を国内外に積極的に発信し、より開かれた透明性の高い議論を行うことで、地域の復興に向けたエビデンス形成のための基盤を強化できると考えられる。

II. 研究方法

地域の健康課題の中で、本研究では特に①介護・高齢化問題 ②生活習慣病をはじめとする疾患調査 ③医療ニーズ（病院への入院や救急搬送）の分析の 3 点において重点的に調査・研究を行った。市町村からのデータの提供を受けて、そのデータベースのクリーニング、整備および紐付け、倫理委員会の承認を受けた上で、それぞれのパラメータの経年変化および、悪化させる因子を統計解析にて特定した。

- 介護・高齢化問題については、介護申請に関する主治医意見書、認定調査票および市町村データベースから、介護認定状況および介護サービス使用状況をデータベース化した。加えて地域の介護データとカルテ情報等から、被介護者の生活情報や家族情報を収集し、それらを突合する。具体的には市町村に存在する、介護意見書と紙媒体となっている家族情報をまとめた。
- 生活習慣病をはじめとする疾患調査については、市町村の特定健診に加え、地域の骨粗鬆症や歯科検診、がん検診、予防事業など、様々な既に行われている取り組みに関してデータベ

ス化が可能なものを取り扱った。また、死亡統計の取得については厚生労働省審査解析室に依頼した。

- 医療ニーズの分析としては、各病院及びクリニックに協力を要請し、入院データ（入院日数、診断名、居住地や生活の状況）をデータベース化した。また、各消防署に要請し、救急搬送データ（救急覚知日時、搬送時間、搬送先、診断名）をデータベース化した。これらの情報の多くは紙データで存在するため、病院での入力事務作業と医療者がデータベース化する部分を分けて処理を行った。

上記の大課題の中でデータベースのアクセスの可否から、2020年度は以下の小課題が構成された。

<小課題一覧>

① 介護・高齢化問題

- ①-1 南相馬市在住高齢者における避難指示区域居住と新規介護認定の関連：5年間の追跡調査
- ①-2 福島原発事故後の避難区域に帰還した高齢者の介護利用率の調査
- ①-3 相馬市における高齢者介護対策 井戸端長屋の効果検証に関する調査
- ①-4 県全体の介護需要変化に関する調査

② 生活習慣病をはじめとする疾患調査

- ②-1 避難シナリオ別の慢性疾患リスク評価 福島原発事故後7年間の後向きコホート研究
- ②-2 相馬地方の大腸癌検診 震災前後10年間の参加率の推移と参加に関わる因子の検討
- ②-3 原発事故後の浜通り地区の乳がん診療への影響と進行期がん患者の推移に関する調査
- ②-4 福島原発事故後の福島県内での死亡理由の変動に関する調査

③ 医療ニーズ（病院への入院や救急搬送）の分析

- ③-1 震災および福島原発事故後の双葉地方の救急搬送状況に関する調査
- ③-2 原発事故が福島県の医師の配置に与えた長期的な影響に関する調査
- ③-3 除染作業員の健康に関する研究
- ③-4 避難指示解除後の病院受診理由に関する研究
- ③-5 帰還後の保健課題に関する聞き取り調査
- ③-6 帰還後の救急搬送の種類に関する研究

各々の小課題に対して、下記の3つのステップを段階的にすすめた。

ステップ1：福島県浜通り地区での健診・検診データ、個人被ばく線量データ、医療機関や介護施設の受診・利用データ、死亡統計・人口動態統計をはじめとする行政がもつ統計データのうち、利用可能なものを特定し、データベース化した。

ステップ2：データベース化完了したものから順次、データをまとめた形の観察研究および、地域・バックグラウンドによる差の解析を行い、それぞれ論文化を行った。結果は、地域の医療者および行政に速やかに返却した。

ステップ3：それぞれ観察されたものをリスト化し、影響の大きさを損失余命のパラメータを用いて比較した。得られた情報に基づき、将来ニーズと費用、およびその対応のために必要な人員についてシミュレーションを行った。

小課題ごとの方法は以下の通りである。

① 介護・高齢化問題

①-1 南相馬市在住高齢者における避難指示区域居住と新規介護認定の関連：5年間の追跡調査

原発事故後の南相馬市在住の高齢者の新規要介護認定に、震災時避難区域居住（強制避難）が関連するかどうかを検証することを目的に、2011年3月11日時点で要介護認定を受けていない65歳以上の南相馬市市民を対象に、2016年12月までの介護認定データを解析する。アウトカムは震災後の新規要介護の発生として、新規要介護認定の関連要因は震災時避難区域居住、震災時の同居家族の有無、年齢、性別としてロジスティック回帰分析を行った。

①-2 福島原発事故後の避難区域に帰還した高齢者の介護利用率の調査

原発事故後の2011年3月11日の時点で南相馬市小高区に住民登録されていた住民の、2019年1月1日現在の年齢、地区単位の居住地情報と、2019年1月1日における介護の利用の有無についての情報を抽出し、介護利用率を調べ、帰還された高齢者と帰還されていない高齢者について比較した。

①-3 相馬市における高齢者介護対策 井戸端長屋の効果検証に関する調査

相馬市に震災後に作られた高齢者共同住宅である井戸端長屋の入所者および行政関係者を対象に、インタビューを行い、どのような利点があるか、どのような健康影響を井戸端長屋使用によって避けることが出来るかをまとめた。症例報告の形で問題点と利点を明らかにした。

①-4 県全体の介護需要変化に関する調査

原発事故による影響を強く受けた福島県双葉地方の介護保険料が高騰した市町村（葛尾村を含む）での介護問題に対する取り組みを調査し、それらを症例報告の形でまとめた。例えばいくつかの市町村が震災後に行った施策を例にして、その効果と影響について明らかにした。

② 生活習慣病をはじめとする疾患調査

②-1 避難シナリオ別の慢性疾患リスク評価 福島原発事故後7年間の後向きコホート研究

南相馬市が2010年から2017年にかけて実施した特定健診における健康診断結果データを使用し、7年間（2017年まで）の避難シナリオ（いつ帰還したか：避難継続、避難せずを含む）ごとにおける、糖尿病・高血圧・脂質異常症のリスクの違いを評価した。検査結果から糖尿病、高血圧、脂質異常症を定義し、2つの分析を実施した。（1）年齢標準化有病率の年次トレンドを避難シナリオ別に推定する（2）2010年のベースライン共変量を調整し、2017年の健診時の有病率に避難シナリオ間で差があったかを評価した。

②-2 相馬地方の大腸癌検診 震災前後 10 年間の参加率の推移と参加に関わる因子の検討

南相馬市のがん検診の一つである大腸癌検診（便潜血）に関して、住民基本台帳（年齢、性別、居住区、世帯人数、避難種別を使用）登録の人口（40-74 歳）を母数として、大腸癌検診受診率を解析した。がん検診の受診率の低下の程度と期間を明らかにすることに加えて、地域別およびバックグラウンド別の受診率の変化を明らかにした。

②-3 原発事故後の浜通り地区の乳がん診療への影響と進行期がん患者の推移に関する調査

南相馬市では、家族社会環境の変化から、乳がんに関係する症状を自覚してから医療機関を実際に受診するまでの期間が延長したことが知られている（患者側の因子が影響を受けていた）。²一方で、医療機関を受診してから乳がんの治療開始までの期間は震災前後で変化していなかった（病院側の因子は影響を受けていなかった）。³原発事故後の 2011 年 3 月から 2016 年 3 月において、地域で唯一の乳がん診療を行っている南相馬市立総合病院に来院した乳がん患者のカルテ情報を使用し、新たに病理学的に乳がんと診断された女性のデータを後方視的に解析した。受診までの日数と、乳がんの Stage（I～IV）の関係について、<3 か月、3～12 か月、および 12 か月以上で比較した。

②-4 福島原発事故後の福島県内での死亡理由の変動に関する調査

統計法第 33 条に基づき、厚生労働省から震災前後における福島県内での死亡統計を取得し、市町村における震災前後の寿命の変化および、損失余命の原因となる疾患の変化を調べた。

③ 医療ニーズ（病院への入院や救急搬送）の分析

③-1 震災および福島原発事故後の双葉地方の救急搬送状況に関する調査

2009 年～2015 年までの双葉地方の全ての救急搬送データの搬送の時間に関する情報・疾患情報を整理し、経年的に状況をまとめた。

③-2 原発事故が福島県の医師の配置に与えた長期的な影響に関する調査

公開データから医師数と既存人口を抽出し、2010 年から 2018 年までの福島県の人口に対する医師数の変化率を調べ、同じく被災したが原発事故の直接の影響を受けていない近隣の 2 県（宮城県および岩手県）を合わせたものをコントロールとして比較した。さらに、属性別に層別化した医師の記述的サブ分析を行った。これにより、福島第一原発事故後の被災地における医師数の長期的変化を検討した。

③-3 除染作業員の健康に関する研究

除染作業員におけるこれまでの健康に関する報告を review し、まとめた。^{4,5}特に放射性物質を扱うことによる職業的な被ばくに関するものに留まらず、除染作業員の方々の生活環境や社会環境に注目し、病院へのアクセスの問題や、基礎疾患の管理に関することに焦点を置いた。

③-4 避難指示解除後の病院受診理由に関する研究

放射線災害からの復興期には、住民に対する内部・外部被ばくの評価に加え、特に避難によって生じる健康影響、例えば高齢者、障害者などの健康脆弱層における慢性疾患・精神疾患の悪化への対応、精神的な影響のフォロー、介護・福祉対応などに対して限られた医療供給体制で適切に対応していく必要があることが明らかとなっている。

特に避難指示地域においては、避難指示の解除が決定されると、住民の帰還準備および帰還が開始され、彼らのもつ医療需要に応える必要が生じる。しかし、東日本大震災以前に生じた放射線災害では、避難指示の解除や住民の帰還は実施されておらず、避難解除地域での医療需要に関する具体的な情報は限られている。

避難指示区域となった南相馬市小高区において、最も早期に診療を再開した南相馬市立小高病院（現：市立総合病院附属小高診療）の受診者に関して、2014～2019年度の診療録を利用して医療需要に関して調べ、将来起こりうる放射線災害からの復興加速に役立てる。2014/4～2020/3に小高診療所に来院した全患者を対象に年齢、性別、来院年月、居住区、診断名（診断名はICD-10に準拠してCodingする）を解析対象として、後ろ向き観察研究を行った。

③-5 帰還後の保健課題に関する聞き取り調査

長期避難後に帰還が開始された地域での生活再建は健康課題が多い一方でその情報は少ない。避難指示解除地域における健康・医療・福祉の問題を明らかにしまとめるために、調査の実施に承諾頂けた福島県内の被災地自治体に所属する保健師（3自治体、6名の保健師）に対して半構造化聞き取り調査を用いた個人面接もしくはフォーカスグループインタビューを行った。

③-6 帰還後の救急搬送の種類に関する研究

相馬消防本部救急搬送データを用いて、南相馬市小高区の避難指示解除後の2016年7月12日～2018年7月30日の2年間における、南相馬市小高区を中心とする避難解除地域の病院搬送データをまとめる。時期による搬送先の変化についてはカイ二乗検定を、搬送時間の変化はt検定を行う。

（倫理面への配慮）

各課題に対して、福島県立医科大学倫理委員会および、南相馬市立総合病院倫理委員会に審議を依頼し通過した。課題特性によって書面による同意書の取得や、研究情報の公開（オプトアウト）を行った。

III. 研究結果

各課題に関して、今年度解析・論文化が終了したものの結果は以下の通りである。（データベースのみの構築完了したものや、解析途中であるものについては除き、説明を加えている。）

① 介護・高齢化問題

①-1 南相馬市在住高齢者における避難指示区域居住と新規介護認定の関連：5年間の追跡調査

2011年3月11日時点で南相馬市に住民登録のある65歳以上の介護認定を受けていない18,178人の住民のうち、2016年6月1日時点で住民票がない（転居あるいは死亡）者を除き、13,934名が解析対象となった。（図1）

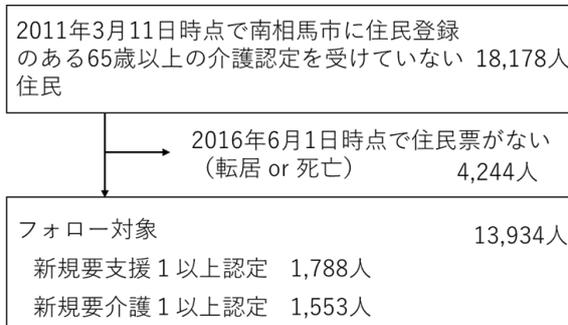


図1：解析フロー

アウトカムは震災後の新規要介護の発生、新規要介護認定の関連要因は震災時避難区域居住、震災時の同居家族の有無、年齢、性別としてロジスティック回帰分析を行い、オッズ比は以下の通りであった。（表1）

	オッズ比 (95%CI)
震災時避難区域居住	1.378 (1.038-1.829)
同居家族なし	1.523 (1.320-1.757)
年齢（中央化）	1.182 (1.170-1.194)
性別（ref. 男性）	1.599 (1.367-1.871)
避難区域居住×同居家族なし	0.705 (0.505-0.984)

表1：新規要介護認定の関連要因（ロジスティック回帰分析）

解析より、震災時避難区域居住は要介護認定と関連し、同居家族がいることでよりその関連が強くなった。同居家族がいないことは、避難区域に居住していたか否かに関わらず要介護と関連していた。これらより、避難により家族が離散する者、独居者、高齢な者には、特に介護予防支援が必要といえる。2021年度は論文の出版及び課題①-4とあわせて、データベースの拡張と現場へのフィードバックについて検討を行う予定である。

①-2 福島原発事故後の避難区域に帰還した高齢者の介護利用率の調査

南相馬市小高区の住民において、すべての年齢層で介護の利用率は避難者よりも帰還者の方が低かった。各年齢層の帰還者の介護利用率は65～69歳で0.78%（ $p=0.194$ ）、70～74歳で0.69%（ $p=0.003$ ）、75歳から79歳で3.23%（ $p=0.007$ ）、80歳から84歳で6.79%（ $p<0.001$ ）、85歳から89歳で22.84%（ $p=0.011$ ）、90歳以上で44.09%（ $p=0.089$ ）であった。今後帰還す

る高齢者の高齢化が進む為、介護の利用率は増加することが予想された。（図 2）

本研究は、Disaster Medicine and Public Health Preparedness 誌に掲載された。

Long-term Care Utilization Discrepancy Among the Elderly in Former Evacuation Areas, Fukushima.

Disaster Med Public Health Prep. 2021 Mar 24;1-3. doi: 10.1017/dmp.2020.481. Online ahead of print.

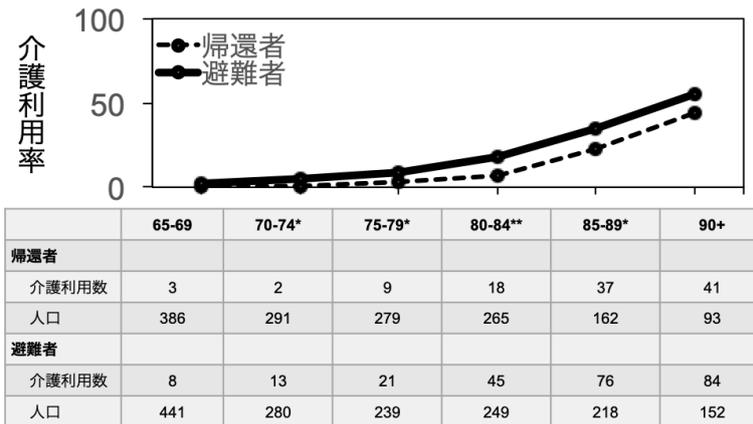


図 2：小高区における帰還者および避難者別の介護利用率とその人数（Long-term Care Utilization Discrepancy Among the Elderly in Former Evacuation Areas, Fukushima. Disaster Med Public Health Prep. 2021 Mar 24;1-3 から引用筆者改変）

①-3 相馬市における高齢者介護対策 井戸端長屋の効果検証に関する調査

相馬市の井戸端長屋を使用していた入所者で、認知症の予防に効果があった例や、孤独死を防いだ例があり、それらの症例報告をまとめるために、当該入所者とその関係者にインタビューを行った。

①-4 県全体の介護需要変化に関する調査

現在、福島県川内村の老人介護施設における入所者の震災後の変化を見ることで、地域の介護需要がどのように変化しているかをまとめるため、既存資料の検討を行った。

② 生活習慣病をはじめとする疾患調査

②-1 避難シナリオ別の慢性疾患リスク評価 福島原発事故後 7 年間の後向きコホート研究

計 1,837 人の 40-74 歳を分析した。避難シナリオと関係なく、糖尿病と高血圧において、2010 年から 2017 年にかけてそれぞれ上昇と下降傾向を示唆する推定結果であった。脂質異常症は期間中に顕著な変化はなかった。また 2017 年の有病率は、異なる避難シナリオ間で差があるとは言えない結果であった。（表 2）

	オッズ比	95% 信頼区間	P値
糖尿病			
2012年に帰還	0.98	0.96-1.01	0.29
2013-15年に帰還	1.00	0.95-1.04	0.90
2016-17年に帰還	1.01	0.96-1.07	0.71
帰還せず(避難継続)	1.04	0.99-1.09	0.16
脂質異常症			
2012年に帰還	1.02	0.95-1.10	0.58
2013-15年に帰還	0.97	0.87-1.09	0.64
2016-17年に帰還	1.07	0.94-1.23	0.28
帰還せず(避難継続)	0.98	0.89-1.06	0.59
高血圧			
2012年に帰還	1.01	0.96-1.07	0.73
2013-15年に帰還	0.99	0.90-1.08	0.78
2016-17年に帰還	0.94	0.87-1.01	0.07
帰還せず(避難継続)	0.94	0.89-1.00	<0.05

表 2：避難シナリオごとによる、糖尿病、脂質異常症、高血圧の発症リスク

表 2 の結果は、南相馬市の地域特有の要因が避難による健康影響に重要な役割を果たした可能性を示していると考えられる。例えば、南相馬市における糖尿病、高血圧、高脂血症などの生活習慣病対策に対する震災後の一般市民の意識の高さを反映しているのかもしれない。避難による健康リスクを強調するのではなく、地域の医療システムの災害対応力を強化することで、避難による住民の健康への影響を軽減する余地が大いにある。

②-2 相馬地方の大腸癌検診 震災前後 10 年間の参加率の推移と参加に関わる因子の検討

震災前後 10 年間における、南相馬市の大腸がん検診の対象者となる住民の方々を対象に合計 44,766 名の解析を行った。表 3 は各年度における受診者とそのバックグラウンド情報についての結果である。

年度	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
対象者 (人)	33,103	32,851	31,996	31,634	31,641	31,742	31,709	31,633	31,074	30,544
男性 (%)	16,487 (49.8)	16,386 (49.9)	15,968 (49.9)	15,851 (50.1)	15,908 (50.3)	16,062 (50.6)	16,188 (51.1)	16,239 (51.3)	15,939 (51.3)	15,707 (51.4)
女性 (%)	16,616 (50.2)	16,465 (50.1)	16,028 (50.1)	15,783 (49.9)	15,733 (49.7)	15,680 (49.4)	15,521 (49.0)	15,394 (48.7)	15,135 (48.7)	14,837 (48.6)
平均年齢 (標準偏 差)	57.4 (9.5)	57.5 (9.5)	57.59 (9.5)	57.7 (9.5)	57.8 (9.7)	57.9 (9.8)	57.9 (9.9)	57.9 (9.9)	58.1 (10.0)	58.2 (10.0)
自宅外避難 者数 (%)	-	-	16,858 (52.7)	12,692 (40.1)	11,966 (37.8)	11,529 (36.3)	11,227 (35.4)	10,892 (34.4)	10,315 (33.2)	10,282 (33.7)
世帯構成										
独居	2,886 (8.7)	2,871 (8.7)	2,978 (9.3)	3,094 (9.8)	3,211 (10.2)	3,438 (10.8)	3,753 (11.8)	4,090 (12.9)	4,058 (13.1)	4,102 (13.4)
2名以上	30,217 (91.3)	29,980 (91.3)	29,018 (90.7)	28,540 (90.2)	28,430 (89.9)	28,304 (89.2)	27,956 (88.2)	27,543 (87.1)	27,016 (86.9)	26,442 (86.6)
居住区										
鹿島区	5,454 (16.5)	5,361 (16.3)	5,209 (16.3)	5,160 (16.3)	5,165 (16.3)	5,250 (16.5)	5,301 (16.7)	5,312 (16.8)	5,239 (16.9)	5,184 (17.0)
原町区	21,680 (65.5)	21,596 (65.7)	21,131 (66.0)	20,930 (66.2)	20,998 (66.4)	21,100 (66.5)	21,217 (66.9)	21,407 (67.7)	21,306 (68.6)	21,108 (69.1)
小高区	5,969 (18.0)	5,894 (17.9)	5,656 (17.7)	5,544 (17.5)	5,478 (17.3)	5,392 (17.0)	5,191 (16.4)	4,914 (15.5)	4,529 (14.6)	4,252 (13.9)

表 3：南相馬市における大腸がん検診受診者数の推移

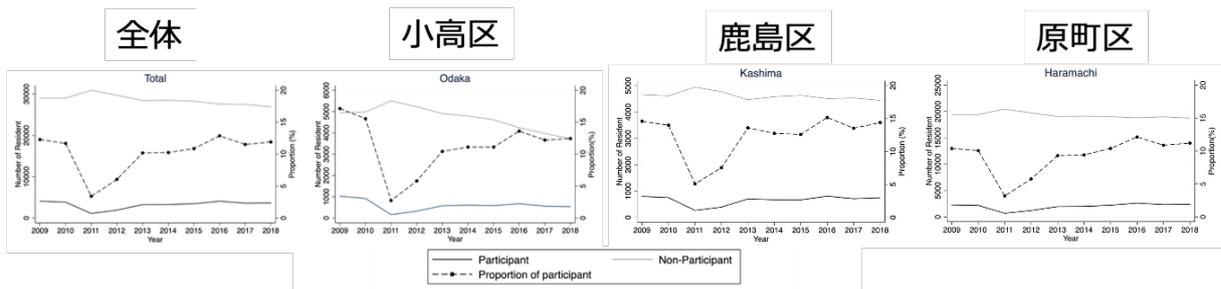


図 3：南相馬市における大腸がん検診受診率の推移 各地域別

大腸がん検診の受診率は、全体では 2013 年に 10.2% とほぼ震災前の水準に回復した。南相馬市内の 3 つの地区別（小高区・鹿島区・原町区）でも同様の傾向だが、小高区のみ、震災以降、2011 年以前の参加率を回復していなかった。不参加の因子としては、震災以前から男性、65 歳未満、原町区（鹿島区を参照値）、独居が挙げられた。震災以降は上記に加えて小高区、避難していることが不参加の因子となり、2018 年でも継続していた。震災以前の受診動向別から分析を行うと、毎年検診を受けていた層は 2 年で 50% 台の受診率に戻ったが、以前から受けていない層は低調（9% 台）であった。特に以前から検診を受けていない層では、2015 年以降は独居が不参加の有意な因子となり、震災後の回復期により受診しにくい状況となっていた。

②-3 原発事故後の浜通り地区の乳がん診療への影響と進行期がん患者の推移に関する調査

相馬地方（浜通り地区の原発の北側地域）の乳がん患者において、乳がんに関する症状を自覚して医療機関を受診するまでの期間が延長するほど、進行期（ステージⅢ・Ⅳ）で診断される割合が増加していた。（図 4）

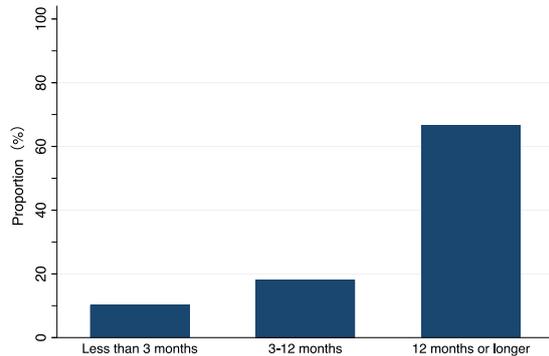


図 4：医療機関を受診するまでの期間と進行癌（ステージⅢ・Ⅳ）で診断される割合

これらの受診の遅れは、この地域のがん患者の治療に大きな影響を与えており、今後、医療機関を受診後乳がん患者がスタンダードな診療を受けることができていたか、震災後に医療機関を受診し、診断された乳がん患者の困難やニーズが何なのか継続的に調査が必要である。

②-4 福島原発事故後の福島県内での死亡理由の変動に関する調査

厚生労働省から震災前後における、福島県内での死亡統計を取得した。現在市町村における震災前後の寿命の変化および、損失余命の原因となる疾患の変化を調査中である。

③ 医療ニーズ（病院への入院や救急搬送）の分析

③-1 震災および福島原発事故後の双葉地方の救急搬送状況に関する調査

双葉地方における月あたりの救急搬送件数は震災前（2011年2月終わりまで）174件（範囲141～231）であったが、震災後（2011年4月以降）は27件（範囲5～59）にまで減少した。

（図5）搬送時間について、震災前は47分 SD 25分 <T1:9分（SD 5分）、T2:15分（SD 10分）、T3:22分（SD 20分）>だったのが、震災後は73分（SD 31分）<T1:12分（SD 9分）、T2:22分（SD 14分）、T3:39分（SD 24分）>と約1.57倍になっていた。（T1からT3はそれぞれ、T1:覚知～現場到着まで T2:現場到着から病院選定 現場出発まで T3:現場～病院到着までの時間を指す）T1やT2に比べて、T3の震災前後の平均値の変化が17分と最も大きかった。2011年4月以降トータルで120分以上かかっているのは100件（6.8%）だった。

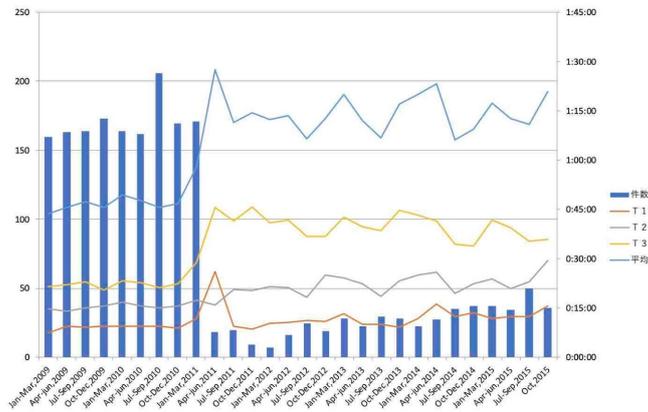


図 5：双葉郡における救急搬送件数と搬送時間の推移

T1：覚知～現場到着まで T2：現場到着から病院選定 現場出発まで T3：現場～病院到着まで

③-2 原発事故が福島県の医師の配置に与えた長期的な影響に関する調査

東日本大震災後、福島県の人口 10 万人当たりの医師数は 2010 年の 183.3 人から 2012 年には 184.1 人と 0.4%増加した。(表 4 と図 6) 医師の属性別では、コントロールと比較して福島県では顕著な差が見られた。2010 年から 2012 年の間に、福島県の女性医師数はコントロールと比較して 19.0%減少し、40 歳未満の医師数は 14.5%減少し、研修医数は 9.3%減少した。その一方、研修医は 40.9%、60 歳以上の医師は 6.1%と顕著に増加していた。

Variables	2012 compared to 2010			2018 compared to 2010		
	Fukushima Prefecture - %*	Control - %*	Differences - %‡	Fukushima Prefecture - %*	Control - %*	Differences - %‡
Number of Physicians	-5.4	2.6	-8.0	3.1	9.1	-6.0
Population of Preference†	-5.7	-1.4	-4.3	-8.9	-3.2	-5.7
Number of Physicians per 100,000 Population	0.4	4.0	-3.6	13.1	12.6	0.5
Sex - no. (%)*						
Female	-10.2	8.8	-19.0	12.6	25.4	-12.8
Age - no. (%)*						
Under < 40 yr	-14.3	0.2	-14.5	0.6	4.5	-3.9
40-59 yr	-5.4	2.6	-8.0	-13.2	1.1	-14.3
≥ 60 yr	3.7	5.7	-2.0	36.6	30.5	6.1
Main Specialty - no. (%)*						
Internal Medicines	-6.1	3.8	-9.9	0.2	9.9	-9.7
Surgery	-2.5	2.4	-4.9	0.5	5.2	-4.7
Pediatrics	-4.4	4.3	-8.7	-3.1	7.8	-10.9
Obstetrics and Gynecology	-3.1	4.0	-7.1	-1.3	12.2	-13.5
Interns	-16.3	-7.0	-9.3	49.0	8.1	40.9
Other Specialties	-5.9	2.5	-8.4	5.1	11.6	-6.5

表 4：福島県とコントロールの医師数 2010 年と比較した 2012 年と 2018 年

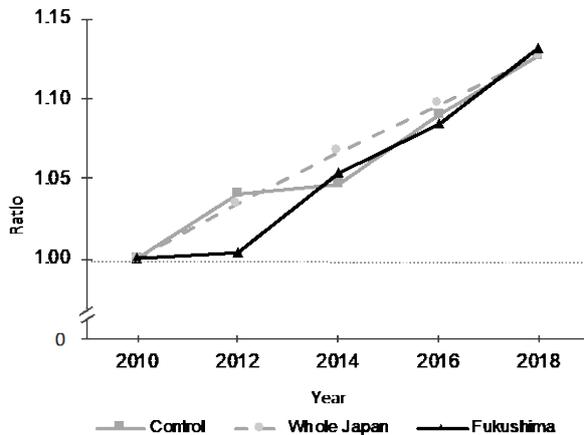


図 6： 人口 10 万人当たりの医師数の 2010 年と比較した福島県、コントロール（宮城県と岩手県）、全国の連続的な変化

③-3 除染作業員の健康に関する研究

福島原発事故後の除染作業員が直面している既存の健康リスクを包括的にレビューした。作業に伴う放射線被ばくだけでなく、仕事関連の感染症、工作中的の外傷などの職業上のリスクが多く報告されていた。加えて、飲酒や喫煙、肥満、生活習慣病などの職業とは直接には関係の無い疾患のリスクも多く報告された。ライフスタイルの管理は、将来の除染労働者に対するサポートの上で重要であることが示唆された。

本研究は、Radioprotection 誌に掲載された。 Review of health risks among decontamination workers after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident. Radioprotection 2020, 55(4), 277–282

③-4 避難指示解除後の病院受診理由に関する研究

2014/4～2020/3 に南相馬市に存在する小高診療所に来院した全受診者数は 12,430 人（女性 6,210 人：54.9%）、20 歳以下 1.8%、21–60 歳 25.5%、61 歳以上 72.8%であった。受診者数および全受診者中の小高区民の割合、高齢者の割合は年々上昇していた。救急症例は 33 例（0.3%）であった。（図 7 および図 8）



図 7： 居住地別受診数

受診理由件数を避難指示解除前後に分けて順位付けすると、解除前は外傷、蜂刺症、熱中症がより高い順位、解除後は高血圧、脂質異常症、予防接種、睡眠障害がより高い順位となった。復興早期には、南相馬市外からの作業員がより多く受診しており、復興作業に伴う外傷や蜂刺症、熱中症がより高い順位を占めていた可能性がある。また、復興慢性期においては、生活習慣病やヘルスマネジメント、精神疾患がより多く受診しており、帰還した高齢者の受診が多かったことが関係している可能性がある。放射線災害後は、復興フェーズと受診者層の医療ニーズに合わせたプライマリケアを提供する必要があることが明らかとなった。

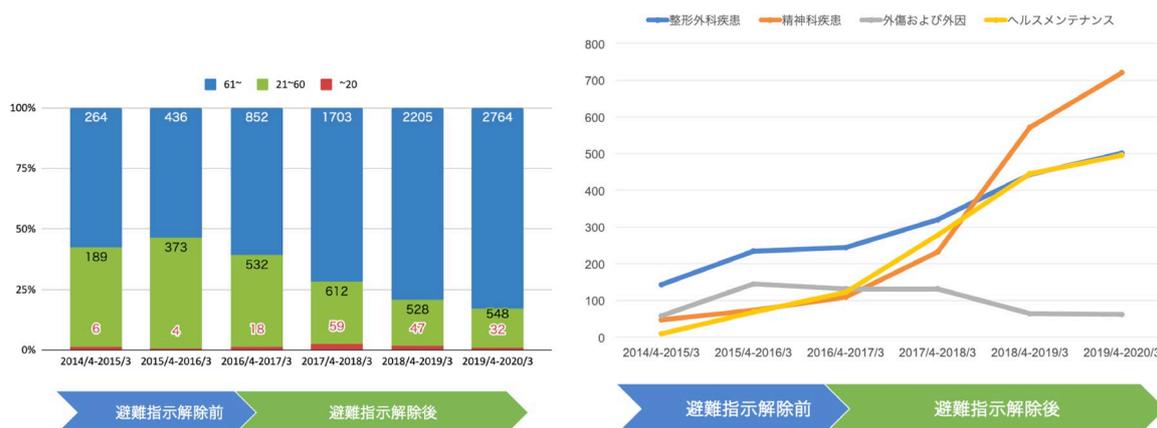


図8：受診者の世代割合と実数と受診理由の内訳

③-5 帰還後の保健課題に関する聞き取り調査

調査から、主要な課題として【放射線に関する問題】と【高齢者に関する問題】の2つカテゴリーが導かれた。放射線被ばく量の管理は重要であるが、時期によって住民の健康ニーズ、またそれに対応する主要な支援者と役割が大きく変化することが示された。事故初期では住民ニーズに対し支援体制が十分に構築されていない点が課題となるが、災害から1年以上は住民との双方向のリスクコミュニケーションを行い、風化対策とともに顕在化されない住民の不安に対して、様々な事業を通じてアプローチしていく必要性が示された。高齢者に関する問題について、原発事故及びそれに続く長期の避難生活によって、高齢者個人の健康的な生活を営む習慣が著しく阻害され、糖尿病はじめ生活習慣病を引き起こしていたが、家族や地域活動、医療や介護サービスなど高齢者が健康的な生活を営む上で土台となる環境自体も影響を受けており、帰村率の低下や高齢化に伴う医療介護ニーズが増大し、事業者や自治体への負担が増していた。

現在、世界規模で都市化や高齢化が進む一方で災害が多発している。今回の知見は、高齢化が進行する都市で災害が発生する際起こりうる課題として参考となる可能性がある。しかし現時点においてこれらの課題は、原因と結果が入り乱れ相互に影響しあっており、どの課題が重要かつボトルネックになっているかを示すには至っていない。公共サービスの限りある資源を効果的かつ効率的に再分配するため、それぞれの課題を個別具体的に観察し、関係を調べるなど更なる調査が必要である。

③-6 帰還後の救急搬送の種類に関する研究

南相馬市小高区における 2016 年 7 月 12 日～2018 年 7 月 30 日の 2 年間の全救急搬送件数は 325 件であった。（図 9）救急要請入電から病院到着まで要した時間の中央値は 46 分、平均値は 48 分であり、救急要請年齢は 65 歳以上が 197 件（60.6%）、75 歳以上が 141 件（43.4%）と半数以上が高齢者であった。救急要請時間帯が 6 時から 17 時の日中の要請が 220 件（67.7%）であった。

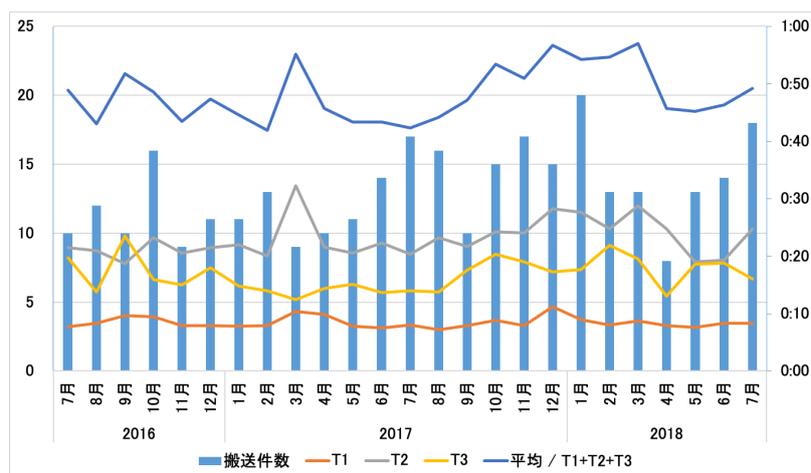


図 9：小高区における避難指示解除後の救急搬送件数と搬送時間の推移

T1：覚知～現場到着まで T2：現場到着から病院選定 現場出発まで T3：現場～病院到着まで

救急要請された患者の傷病程度は、軽症が 163 件（50.2%）、中等度が 132 件（40.6%）であり全体の 90%を占めていた。搬送先病院は南相馬市立総合病院が 196 件（60.3%）、南相馬市内病院は 112 件（34.5%）小高病院収容は 1 件（0.3%）と半数以上が南相馬市立総合病院で受け入れを行っていた。病院選定が 1 度で可能であったのは 245 件（75.4%）、6 回以上要したものは 6 件（1.8%）であった。その 6 件は病院が開院していない夜間帯での要請であり、意識レベル低下や循環器疾患症状の訴えであった。

IV. 考察

本研究は、初年度（2020 年度）はデータベースの構築、2 年目は解析と論文化、3 年目はニーズの推計を行うことが目標であった。当初目標設定していた、多くのデータベースの作成とその突合に関しては概ね予定通り作成と取得が完了した。いくつかの追加のデータベースの作成は次年度も継続しておこなう予定ではあるものの、重要な部分のデータベース化は完了している。

①介護・高齢化問題、②生活習慣病をはじめとする疾患調査、③医療ニーズの 3 点それぞれにおいて、行政が持つデータとカルテ情報や避難先情報といった、統合した解析が難しいデータのデータベース化の多くが完了し、（一部完了見込みのものも含む）データの解析および論文化を開始している。特に介護利用と家族情報や避難情報、生活習慣病・がん検診と避難時期に関する情報

は、他のチームでは実行不可能な本研究班固有の解析結果となると考えられる。例えば、解析も進んだ②-1は、南相馬市からの避難者の長期的な健康状態を理解し、避難と健康状態の関係の評価を試みたものである。このような研究が南相馬市のみならず広く地域で行われることで、将来、避難を必要とする災害が発生した場合に、避難による健康リスクを可能な限り低減するための世界、国、地域の取り組みを促進するためのエビデンスの向上に役立つと考えられる。今後、他の各課題についても学術論文化していく予定である。

介護・高齢化問題については、より介護の必要が無い高齢者が帰還している傾向にあり、今後介護需要の増加が見込まれる。生活習慣病をはじめとする疾患調査については、原発事故から長期の時間経過後、避難行動による生活習慣病の変化は見られず、市町村全体としての対策を継続的に行っていく必要性が明らかになった。医療ニーズ分析については、避難指示解除地域の医療ニーズが救急搬送や病院受診データから徐々に明らかとなってきている。今後このようなニーズを定量化し、必要な医療について議論を深める必要がある。

研究成果の社会的意義と、環境保健行政への貢献について

- 浜通り地区は介護ニーズが全国でもトップクラスに増大した地域であり、その対策と現状の評価に関する情報は、今後の地方行政運営のために必須である。
- 生活習慣病やがん検診、がんの受診に関する情報は、長期的には県外でのデマ情報の抑止やリスクコミュニケーションにとって有益な情報となると考えられる。
- 本事業の結果は県民健康調査と相互補完的な関係にある。
- 市町村によって避難指示解除時期は異なる。そのため復興の速度は異なり、今後避難指示を解除していく自治体にとって、先に解除した地域の情報は重要である。
- 今後自治体や医療者が、浜通り地域の少ないリソースをどの健康課題に対して集中的に注力するかを知るために必要な情報となる。

V. 結論

原発事故後の健康影響は多岐にわたる。その一つ一つを明らかにし、詳細なデータをまとめることで、今後の対策と方法、優先順位を議論し、原発事故後の健康影響の本体を明らかにすることは重要である。パイロット的に行った解析では、①介護問題では避難指示解除後の地域では、より介護を使用しない方が帰還している傾向にあり、家族の離散を経験しているとより介護サービスの使用を行う傾向にあった。②生活習慣病については、糖尿病は原発事故後継続的に悪化傾向にあるものの、避難パターンによってその悪化に変化はなかった。がん検診は原発事故後2年間は受診率の低下が見られたが、その後回復傾向にあった。しかしながら、長期的には原発事故前のレベルまでの回復は見られなかった。③医療ニーズの分析では、避難指示解除後の地域においては、高齢者による一般診療に関係する受診が増えていることが分かった。今年度はデータベースの構築が主であり、結論までは到達していないが、今後各種結果を報告していきたい。

VI. 次年度以降の計画

現状は、原発事故後に地域で起こった様々な健康課題を、①介護・高齢化問題、②生活習慣病をはじめとする疾患調査、③医療ニーズについて、重点的に調べ、その結果を数値化している状況である。

追加データベースの取得および構築に関して

- 各病院や診療所、老人ホームにおける受診に関するデータベースの構築を行う。
- 一地域での詳細なデータベースから様々な知見が得られており、それを浜通り全域や避難区域全域に広げた同様の解析を行うようにデータベースを取得する。（具体的には県担当課との調整を行い、介護、検診、病院利用、救急利用に関するデータベースの提供について相談する。）
- 将来的な医療ニーズの推定のため、交流人口を含む、人口情報や帰還者の年齢分布に関するデータを取得する。（Yahoo との DS insight を使用予定）

健康課題のリスト化および論文化について

- これらの課題が多く健康課題の中でどの位置にあるか（他に見逃している大きな健康課題は無い）かを知ること。地域保健担当者のインタビュー調査により、聞き取りを行う。
- これらの健康課題のうち、それぞれの健康へのインパクトは異なるのか？どの程度、余命を損失するのか計算を行う（健康への影響の程度の比較を行う）
- 今後の人口変化、更なる高齢化によって、現状の課題がどのように変化するか推計を行う。
- 発表した結果に関しては、市町村および県担当者と密に連絡を取る。地域での報告を重点的に行う。

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) Kobashi Y, Morita T, Ozaki A, et al. Long-term Care Utilization Discrepancy Among the Elderly in Former Evacuation Areas, Fukushima. *Disaster Med Public Health Prep* 2021: 1-3.
- 2) Sawano T, Ozaki A, Tsubokura M. Review of health risks among decontamination workers after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident. *Radioprotection* 2020; 55(4): 277-82.

イ) 学会発表等

- 1) 2020年4月 題名：Health Issues after Fukushima Daiichi nuclear accident and its management
発表者：坪倉正治 会議名：Balancing action and longer-term outcomes during a time of crisis
- 2) 2020年7月 題名：Health Issues after Fukushima Daiichi nuclear accident and its management
発表者：坪倉正治 会議名：Turkey Workshop programme for rad-nuc hazard
- 3) 2020年10月 題名：原子力災害時の避難とそれに伴うリスクについてー福島県浜通りでの現場のデータからー 発表者：坪倉正治 会議名：2020年度福島災害医療セミナー
- 4) 2020年10月 題名：Overviews of Secondary Health Issues After the Fukushima Incident 発

表者：坪倉正治 会議名：FMU-IAEA Virtual Consultancy Meeting

5) 2020年10月 題名：原子力災害時の避難とそれに伴うリスクについて－福島県浜通りでの現場のデータから－ 発表者：坪倉正治 会議名：令和2年度防災・日本再生シンポジウム

6) 2020年11月 題名：放射線防護措置・避難に伴う健康リスクを最小化するために 発表者：坪倉正治 会議名：リスク学会

7) 2020年12月 題名：Overviews of Secondary Health Issues After the Fukushima Incident 発表者：坪倉正治 会議名：ICRP Fukushima Symposium

8) 2020年12月 題名：Overviews of Secondary Health Issues After the Fukushima Incident 発表者：坪倉正治 会議名：IAEA Technical meeting on Living and Working in Long-term Contaminated Environments

ウ) 書籍・総説

特に無し

エ) 受賞

特に無し

オ) 特許

特に無し

カ) 環境行政への活用・貢献実績

1) 2020年11月 相馬市役所 相馬市役所での市役所職員の勉強会資料として活用

2) 2020年11月 南相馬市 南相馬市の放射線教育を担当する先生方対象の勉強会資料として活用

3) 2020年12月 飯舘村 飯舘村での車座意見交換会の勉強会資料として活用

4) 2021年1月 郡山市 安積高校高校生対象の医療ゼミの勉強会資料として活用

5) 2021年3月 東京都 次世代と考える放射線に関する情報発信資料として活用

VIII. 引用文献

1. Tsubokura M. Secondary health issues associated with the Fukushima Daiichi nuclear accident, based on the experiences of Soma and Minamisoma Cities. *Journal of the National Institute of Public Health* 2018; **67**(1): 71-83.

2. Ozaki A, Nomura S, Leppold C, et al. Breast cancer patient delay in Fukushima, Japan following the 2011 triple disaster: a long-term retrospective study. *BMC Cancer* 2017; **17**(1): 423.

3. Ozaki A, Nomura S, Leppold C, et al. Breast Cancer Provider Interval Length in Fukushima, Japan, After the 2011 Triple Disaster: A Long-Term Retrospective Study. *Clin Breast Cancer* 2020; **20**(2): e127-e50.

4. Sawano T, Tsubokura M, Ozaki A, et al. Non-communicable diseases in decontamination workers in areas affected by the Fukushima nuclear disaster: a retrospective observational study. *BMJ Open* 2016; **6**(12):

e013885.

5. Ozaki A, Yokota T, Nomura S, et al. Decontamination Work and the Long-term Increase in Hospital Visits for Hymenoptera Stings Following the Fukushima Nuclear Disaster. *Disaster medicine and public health preparedness* 2017; **11**(5): 545-51.

A Study on the Summary of Secondary Health Issues Among Affected Residents After the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident and its Estimation of Future Medical and Nursing Care Needs

Masaharu Tsubokura

Fukushima Medical University School of Medicine, Department of Radiation Health Management

Key word: secondary health effects, nursing care, aging population, lifestyle-related diseases, medical needs

Abstract

A nuclear power plant accident causes radioactive contamination of the surrounding area, which may have health effects on the residents of the surrounding area due to radiation exposure. In order to clarify the actual situation of the health effects caused by the Fukushima nuclear power plant accident and to help dispel unnecessary prejudice and discrimination associated with radiation in Fukushima Prefecture, we focused our research on the following three areas: (1) nursing care and aging of the population, (2) survey of lifestyle-related diseases, and (3) analysis of medical needs (hospitalization and emergency transport). In this year, we compiled a database of data on health checkups for lifestyle-related diseases and cancer screening, nursing care services, and emergency transportation in the north of Hamadori area. In the pilot analyses, we have found that (1) for the nursing care issue, those who did not use nursing care tended to return more in areas after the evacuation order was lifted, and those who experienced family separation tended to use nursing care services more. As for lifestyle-related diseases, diabetes tended to worsen continuously after the nuclear accident; however the worsening did not change according to the evacuation pattern. As for cancer screening, there was a decline in the screening rate for two years after the nuclear accident, but the rate has been recovering since then. However, in the long term, there was no recovery to the level before the nuclear accident. In the analysis of medical needs, it was found that the number of consultations related to general medical care by the elderly increased in the areas after the evacuation order was lifted. From these results, future measures and methods, priorities, and the main topic of health issues after the nuclear accident in the affected areas were clarified.