

テーマ（２）

事故に係る心身への健康影響及びそのメカニズムに関する研究

- 2-1 放射線誘発小児甲状腺がんの特異性に関する実証研究
山田 裕（量子科学技術研究開発機構 量子・医療部分 高度被ばく医療センター
福島再生支援研究部 部長）
- 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
鈴木 啓司（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）
- 2-3 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
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）
- 2-4 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 原爆放射線医科学研究所 准教授）
- 2-5 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 放射線科学基盤機構 助教）
- 2-6 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
鈴木眞一（福島県立医科大学 医学部 甲状腺内分泌学講座 教授）
- 2-7 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
鈴木 正敏（東北大学 災害科学国際研究所 講師）
- 2-8 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
今岡達彦（量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 グループリーダー）

2-1 放射線誘発小児甲状腺がんの特異性に関する実証研究

主任研究者： 山田 裕（量子科学技術研究開発機構 量子医学・医療部門

高度被ばく医療センター 福島再生支援研究部・部長）

研究要旨

東京電力福島第一原子力発電所事故後に「県民健康調査」が実施されており、その甲状腺検査における甲状腺がん発見率は、我が国の地域がん登録で把握されている甲状腺がんの罹患統計などから推計される有病率に比べて高い数値が示されている¹⁾。このような状況については未だその原因が放射線によるものなのか、他の要因によるのか明らかにはなっていないことから、放射線誘発甲状腺がんの特異性を調べ、そのリスクや作用機序を明らかにすることは、今後、福島において発生している小児甲状腺がんの原因を理解する上で重要である。

そこで本研究では、小児期の放射線被ばく、特に低線量率連続被ばくによる甲状腺がん特異的な生物反応を明らかにし、小児期の放射線被ばくにより誘発される甲状腺がんのリスク評価、および診断のための基礎情報を得ることを目的として、実験動物を用いた放射線誘発甲状腺腫瘍の解析を行うこととした。

すなわち、実験では、まず B6C3F1 マウスを用いた動物実験試料のアーカイブを利用して、放射線照射により誘発した甲状腺がんの病理解析をおこない、その特異性を明らかにすること、ついでヒトの甲状腺がんで見られる遺伝子変異を持つマウスに低線量・低線量率放射線を照射し、その遺伝子変異により誘発される甲状腺がんと修飾要因としての被ばくとの関連性を調べることを計画した。

本年度は、動物実験病理アーカイブ（B6C3F1 雄雌マウス）よりガンマ線（高線量率一回、低線量率連続）照射マウス（1 週齢、及び 7 週齢照射）の病理診断を行い、その線量効果関係、線量率依存性、照射時年齢による違いを調べた。放射線誘発甲状腺腫瘍の相対リスクは 1 週齢照射で 4.6/Gy、7 週齢照射 1.4/Gy であり、1 週齢で 3.3 倍高く、照射時年齢依存性が見られた。1-5 週齢の連続照射では、リスクが 4.6/Gy から 1.3/Gy に低下し、線量率効果が見られたが、コントロール、および 7-11 週齢の連続照射と有意な差はなかった。

甲状腺腫瘍モデル動物である BRafCA; TPO-Cre-ERT2 マウスにおいて、生後 3 日齢にタモキシフェン投与により BRAF 変異を生じさせると、8-14 週齢において甲状腺腫瘍が発現した。このマウスに 1 週齢で放射線照射をおこない、甲状腺に形成された腫瘍組織の病理解析では、コントロールと照射群に大きな違いはなかった。

本研究により、小児期の放射線被ばくによる甲状腺がんの線量効果関係とその遺伝子変異の特異性に関わる情報、その発がん機序と修飾要因としての被ばくとの関連性に関する情報が得られることが期待される。これらの成果は、小児期に低線量率放射線に被ばくした時に見られる甲状腺がんに関する理解を深め、適確な放射線防護対策を行っていくために重要な科学的根拠を提供する。

キーワード

放射線発がん	甲状腺がん	小児被ばく
低線量率放射線	マウス	

研究参加者

柿沼 志津子（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・部長）,

森岡 孝満（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 長期低線量発がん病理研究グループ・研究統括）,

臺野 和広（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 発達期被ばく影響研究グループ・研究統括）,

金 小海（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 長期低線量発がん病理研究グループ・研究員）

I. 研究目的

東京電力福島第一原子力発電所事故後に「県民健康調査」が実施されており、その甲状腺検査結果における甲状腺がん発見率は、我が国の地域がん登録で把握されている甲状腺がんの罹患統計などから推計される有病率に比べて高い数値が示されている¹⁾。このような状況については未だその原因が放射線によるものなのか、他の要因によるのか明らかにはなっていないことから、放射線誘発甲状腺がんの特異性を調べ、そのリスクや作用機序を明らかにすることは、今後、福島において発生している小児甲状腺がんの原因を理解する上で重要である。

そこで本研究では、小児期の放射線被ばく、特に低線量率連続被ばくによる甲状腺がん特異的な生物反応を明らかにし、小児期の放射線被ばくにより誘発される甲状腺がんのリスク評価、および診断のための基礎情報を得ることを目的として、実験動物を用いた放射線誘発甲状腺腫瘍の解析を行うこととした。

すなわち、昨年度までは、動物実験病理アーカイブ（B6C3F1 雄雌マウス）よりガンマ線（高線量率一回、1 週齢、及び 7 週齢）照射マウスの甲状腺組織の病理診断を追加し、甲状腺病変の線量効果関係、照射時年齢による違いを調べた。その結果、放射線誘発甲状腺腫瘍の相対リスクは 1 週齢照射で 4.6/Gy、7 週齢照射で 1.4/Gy であり、1 週齢で 3.3 倍高いことがわかった。また、甲状腺腫瘍モデル動物である BRafCA; TPO-Cre-ERT2 マウスを長崎大学より導入して、SPF 施設への搬入のため微生物クリーン化を行い、照射実験のための準備を進めた。

本年度は、動物実験病理アーカイブ（B6C3F1 雄雌マウス）より低線量率連続照射マウス（1 週齢、及び 7 週齢より 4 週間照射）の病理診断を追加し、その線量効果関係、線量率依存性、照射時年齢による違いを調べた。また、甲状腺腫瘍モデルマウスにおいて、生後 3 日齢に BRAF 変異を発現させることによる甲状腺組織の変化について病理解析を行い、さらに 1 週齢における放射線照射（高線量率一回、低線量率連続）の影響を調べた。

II. 研究方法

1. 放射線誘発マウス甲状腺腫瘍の解析

これまでの動物実験データ、病理スライド標本、及び組織試料を蓄積整理した動物実験病理アーカイブ（B6C3F1 雄雌マウス）を利用して甲状腺組織の病理解析を行った。アーカイブシステムより、コントロールおよびガンマ線を高線量率一回（0.2, 1, 4Gy）で1週齢、あるいは7週齢で照射した群、および低線量率連続（総線量 1, 4Gy）で1週齢、あるいは7週齢から照射した群を生涯飼育したマウス(図 II-1)の試料を抜き出し、甲状腺がんの組織型（乳頭癌、濾胞癌等）を病理診断し、その線量効果関係、線量率、照射時年齢による違いを調べた。

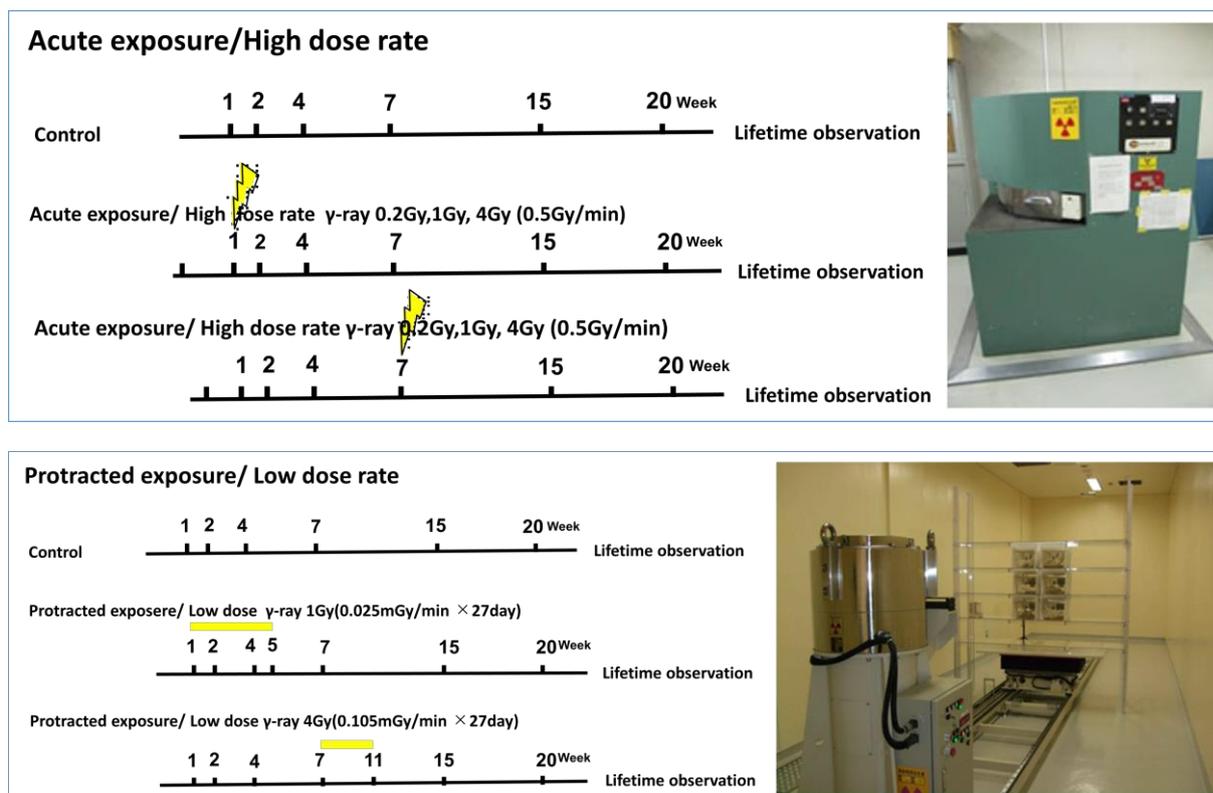


図 II-1 マウス放射線誘発甲状腺腫瘍実験プロトコル
(上：高線量率一回、下：低線量率連続)

2. 遺伝子改変動物照射実験

放射線による甲状腺腫瘍発生機構の仮説として、まず甲状腺上皮細胞そのものへの放射線が影響して、がん化が開始または促進される機構が考えられる。それとは別に、甲状腺上皮細胞の周りの（免疫・間質細胞等）への放射線影響として、それらの細胞が関与する免疫、炎症反応等を修飾することにより、上皮細胞の発がん過程を促進する機構も考えられる。

そこで、本研究では甲状腺がんにおいてよく見られる遺伝子変異をもった遺伝子改変動物を用いて、放射線照射による甲状腺がんが発生してくる過程に対する修飾効果について調べることにした。この遺伝子改変動物は、タモキシフェン投与により Cre リコンビナーゼが誘導され、Cre-loxP

部位特異的組み換えにより甲状腺ろ胞上皮細胞で点突然変異(V600E)を持つ変異 **Braf** 遺伝子が発現するマウスである。

通常のマウスの甲状腺がん解析では、1週齢照射で甲状腺腫瘍感受性が高かったため、遺伝子改変動物でも1週齢における照射を行うこととした。高線量率照射と低線量率照射の影響について、タモキシフェン投与後発生する甲状腺腫瘍の発生時期や線量、線量率効果、遺伝子解析、免疫・炎症系の関連を調べる予定であった。

本年度は、長崎大学より提供を受けた **BRAF** コンディショナルマウス(タモキシフェン誘導 **BRafCA;TPO-Cre-ERT2**)について、交配により雌雄マウスを増やして PCR による遺伝子型タイピングを行い、**Cre** 及び **BRaf** ホモの個体を作成し、その卵子及び精子を採取して体外受精卵移植をおこなうことにより、一度に出産時期をそろえた多匹数のマウスを実験に供する方法を確立した。

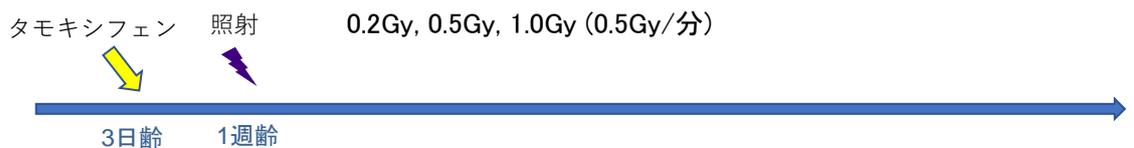
1) 生後 3 日齢の雌雄の仔マウスに、コーンオイルに溶解したタモキシフェン(10-20mg/ml)を 0.05mg/g 体重になるように胃内注射投与した。投与は安全キャビネット内で行い、投与後のマウスは、授乳母親マウスと共にディスプレイケージ内で1週間飼育した。

2) 生後 5 日目に達した時点で、母親 1 匹当たり仔マウス 5~6 匹になるように分配した。

3) 1 週齢において高線量率一回照射または低線量率連続照射を行った。高線量率一回照射は、アクリル製の照射容器に収容し、線量が 0.2, 0.5, 1.0Gy になるようにセシウム 137 (137Cs) 線源の γ セルを用いて照射した(線量率 0.5 Gy/min)。低線量率連続照射は、アクリル製の飼育ケージに母親マウスと仔マウスを収容し、 γ 線連続照射室において行った。137Cs 線源から照射対象物までの距離を調整し、積算線量を 1Gy (0.053mGy/min) になるように設定して 13 日間連続照射した。

4) 低線量率照射期間中、週一回の頻度でケージ交換と給餌を行い、週二回、観察と給水を行った。作業者の被ばくを避けるため、作業中の照射は行わないこととした。

高線量率一回照射



8~14週齢 解剖

低線量率連続照射

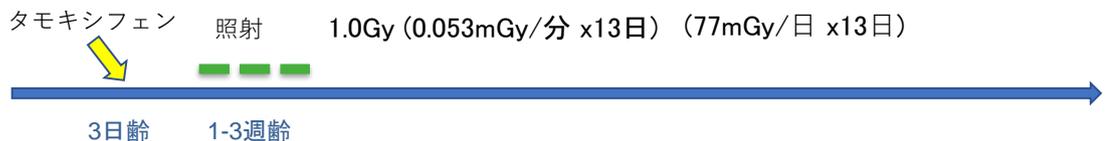


図 II-2 遺伝子改変動物照射プロトコール (上: 高線量率一回、下: 低線量率連続)

5) 照射終了後、マウスを通常のアクリル製飼育ケージに移して飼育室において飼育し、毎日目視にて一般状態を観察した。仔マウスは 4 週齢で離乳させ、性別ごとに飼育ケージに 3~5 匹ずつ収

容した。

6) 8～14 週齢において、イソフルラン吸入深麻酔後開腹し、後大静脈より採血して安楽死させて解剖し、病理解析のために舌、気管、食道、心臓、胸腺、肺を採取してひとまとめにホルマリン固定すると共に、血漿および腫瘍組織等を必要に応じて-80℃に保存した。固定臓器より組織切片を作製し病理組織型の診断を行った。イソフルランの使用はドラフト内で行ない、マスク・安全眼鏡などを着用することにより実験者が曝露されないようにした。

(倫理面への配慮)

動物実験については、「動物の愛護及び管理に関する法律」や「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(文部科学省告示第七十一号)に基づき、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おり、動物実験従事者には所内規程に基づいた教育訓練の受講が義務付けられている。

また、遺伝子組換え生物実験については、量子科学技術研究開発機構内の「遺伝子組換え生物等実験安全委員会」において実験内容の妥当性が審議され、機関承認を受けた上で遂行されており、実験従事者には所内規程に基づいた教育訓練の受講が義務付けられている。

III. 研究結果

1. 放射線誘発マウス甲状腺腫瘍の解析

1-1. 放射線による甲状腺腫瘍の病理組織像

図 III-1 に B6C3F1 雌マウスに高線量率一回照射、あるいは低線量率連続照射して生涯飼育した動物から得た甲状腺の組織像を示す(昨年度報告書より引用)。

老齢マウスの甲状腺は、萎縮性変化を伴う上皮により形成される、様々な大きさの濾胞より成っていた(A)。甲状腺における腺腫は、増殖し過染性を示す濾胞細胞と間質により形成される小塊で、コロイドを含む濾胞を伴い、濾胞型(B)あるいは乳頭型(C)に分けられた。

甲状腺における過形成は、一層以上の濾胞細胞の層によって内側を覆われた小胞によって形成されていた(D)。甲状腺における腺癌は腺腫よりも大きく、腺癌細胞の広範な増殖と多形態性および浸潤性を示し、濾胞型(E)あるいは乳頭型(F)に分けられた。

しかしながら、病理組織像において、特に照射や照射時年齢による明らかな違いは認められなかった。

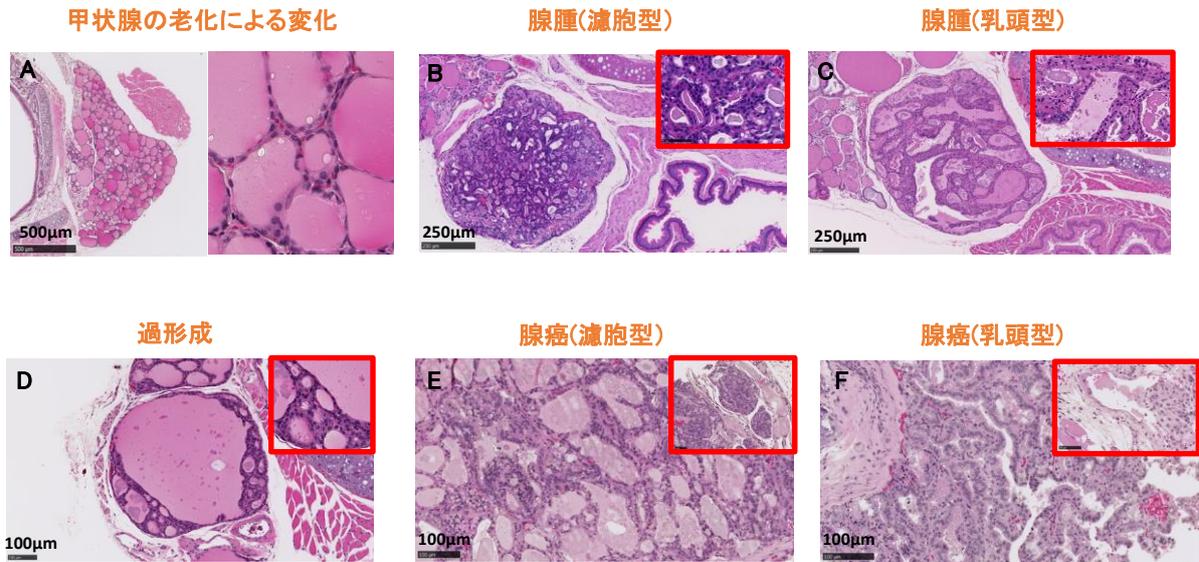


図 III-1 放射線による甲状腺腫瘍の病理組織像

1-2. 甲状腺病変の発生頻度

コントロール（非照射）群と照射群、約 1270 匹において、甲状腺組織の病理診断を行い病変について過形成、良性腫瘍、悪性腫瘍について解析結果をまとめた（表 III-1）。

表 III-1 放射線により生じる甲状腺病変の病理解析まとめ

実験群	照射週齢	照射線量(Gy)	動物数	過形成	%	腺腫	%	腺癌	%
コントロール		0	172	44	26	2	1	3	2
一回照射0.2Gy	1week	0.2	99	32	32	2	2	4	4
一回照射1Gy	1week	1	100	25	25	4	4	2	2
一回照射4Gy	1week	4	97	10	10	0	0	1	1
一回照射0.2Gy	7week	0.2	102	26	26	2	2	0	0
一回照射1Gy	7week	1	99	24	24	2	2	2	2
一回照射4Gy	7week	4	100	23	23	1	1	0	0
連続照射 コントロール		0	100	30	30	1	1	0	0
連続照射1G y	1--5	1	100	23	23	2	2	0	0
連続照射4G y	1--5	4	100	13	13	0	0	3	3
連続照射1G y	7--11	1	100	26	26	1	1	1	1
連続照射4G y	7--11	4	98	13	13	1	1	2	2

放射線による甲状腺上皮の腫瘍病変の発生頻度をまとめた(図 III-2)。一回照射において、甲状腺腫瘍(腺腫と腺癌を合わせたもの)の発生頻度は照射線量に依存性して増加し、1 週齢照射の 0.2, および 1Gy 照射群で腫瘍の頻度が増加した。なお、4Gy 照射群では甲状腺腫瘍の発生率が 4%に減少したのは、高線量の被ばくにより甲状腺以外のところに発生した腫瘍によりマウスの寿命が短縮し、甲状腺腫瘍が発生する前に死亡してしまった(リスクの競合)ためと考えられる。7 週齢照射においては甲状腺腫瘍はコントロールに比べてほとんど増加せず、1 週齢照射の方が 7 週齢照射にくらべて腫瘍誘発に関して感受性が高い事が分かった。また、連続照射では発生率が低下することが分かった。

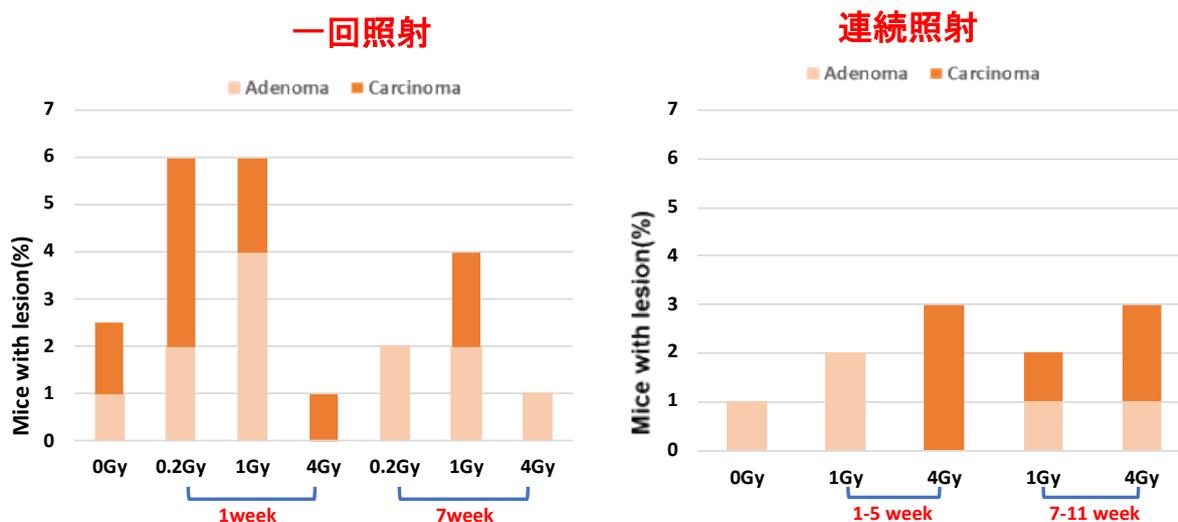


図 III-2 放射線による甲状腺腫瘍の発生頻度

1-3. 放射線による甲状腺腫瘍の発生時期

放射線の一回照射による甲状腺腫瘍の発生時期について、寿命を 100 日間で区切り、その期間に死亡した動物に存在した病変を調べ図に表示した。

コントロールでは腫瘍が 900 日以降に発生するのに対し、1 週齢照射、7 週齢照射共に、それよりも早い時期に腫瘍が観察された。この事より甲状腺腫瘍の発生時期は線量に依存して早まる傾向があることがわかった(図 III-3)。

連続照射による甲状腺腫瘍の発生時期について調べたところ、一回照射に比べ発生頻度は下がっていたが、連続照射でも甲状腺腫瘍の発生時期は線量に依存して早まる傾向があることがわかった(図 III-4)。

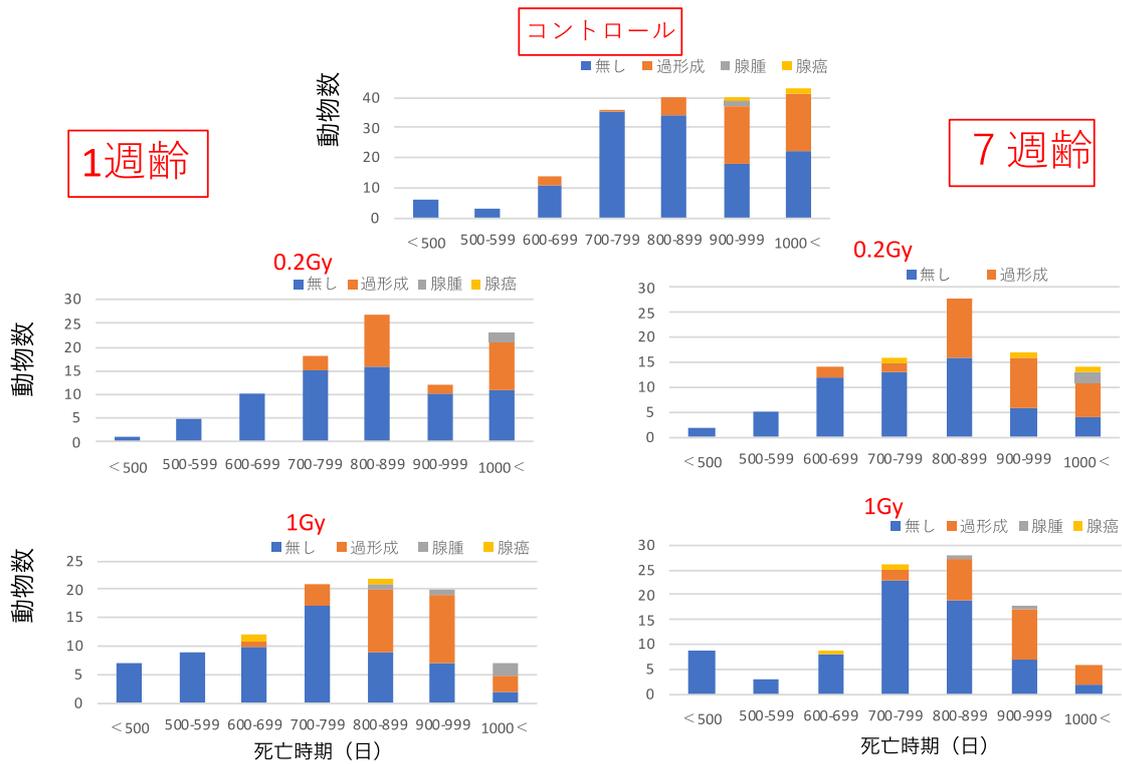


図 III-3 放射線による甲状腺腫瘍の発生時期 (一回照射)

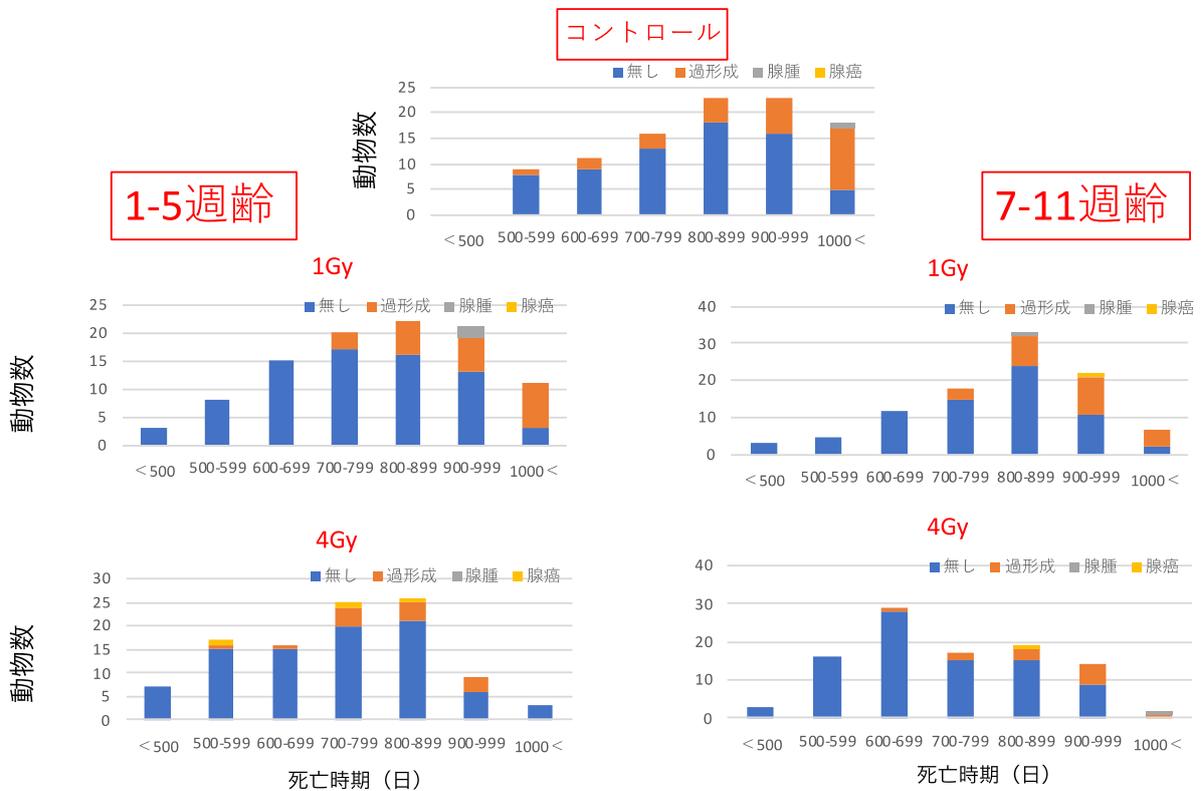


図 III-4 放射線による甲状腺腫瘍の発生時期 (連続照射)

1-4. 放射線による甲状腺腫瘍リスクと照射時年齢依存性および線量率依存性

放射線によるリスクを定量的に求めるため、甲状腺腫瘍リスクをハザード比として縦軸に取り、横軸を線量にして線量効果関係をプロットした(図 III-5)。甲状腺腫瘍の相対リスクは1週齢照射で4.6/Gy、7週齢照射で1.4/Gyであり、1週齢で3.3倍高い事が分かった。

また、1-5週齢の連続照射では、リスクが4.6/Gyから1.3/Gyに低下し、線量率効果が見られたが、コントロール、および7-11週齢の連続照射と有意な差はなかった。

一回照射

連続照射

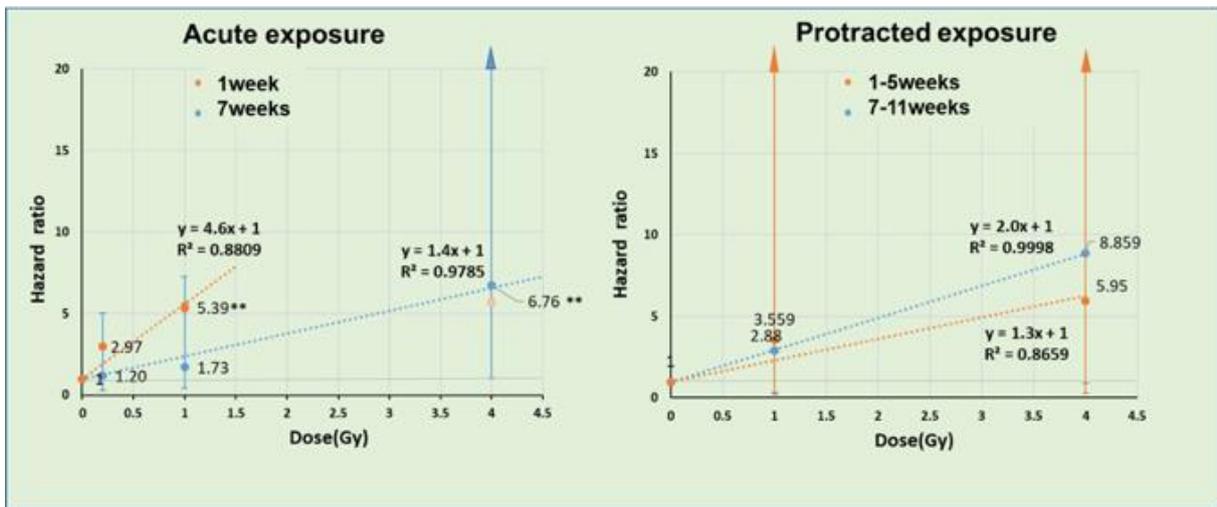


図 III-5 放射線による甲状腺腫瘍リスクと線量率効果

2. 遺伝子改変動物照射実験

2-1. 甲状腺腫瘍モデルマウスにおける病理解析

一週齢の甲状腺は未発達であり濾胞形成がなされていないが、7週齢では濾胞が形成された(図 III-6)。3日齢でタモキシフェン投与後、8-9週齢以降で甲状腺に結節が形成された(図 III-7)。

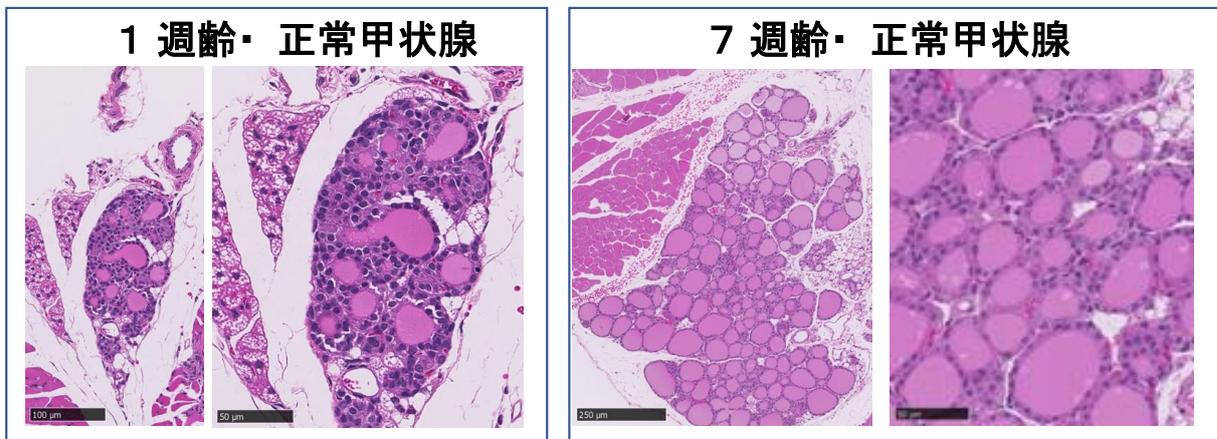


図 III-6 一週齢および7週齢における正常甲状腺

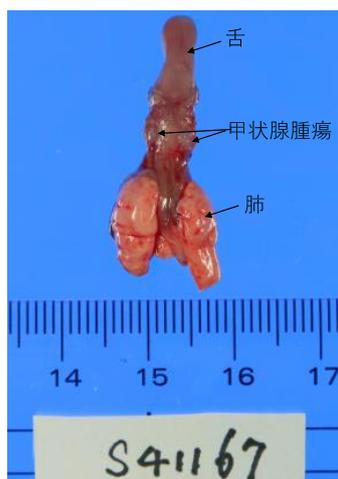
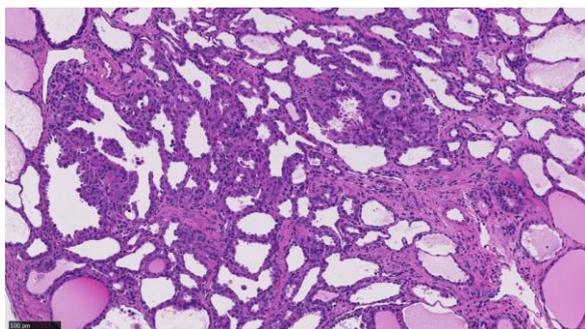
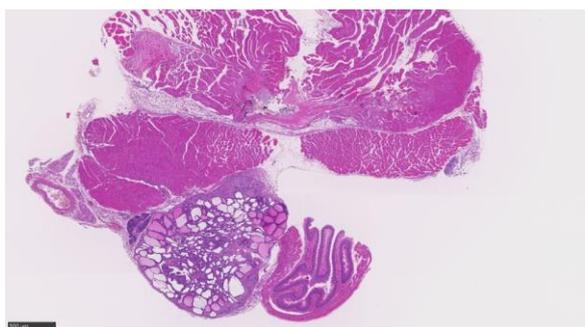


図 III-7 甲状腺腫瘍モデルマウスの甲状腺腫瘍マクロ像

9 週齢



13週齢

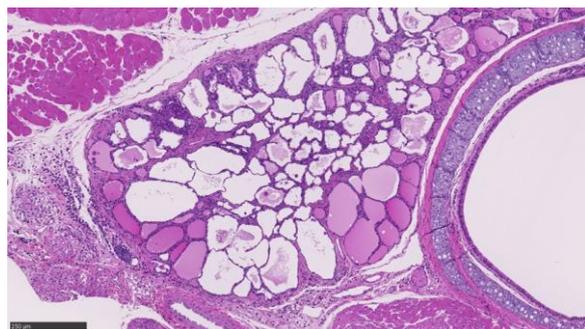
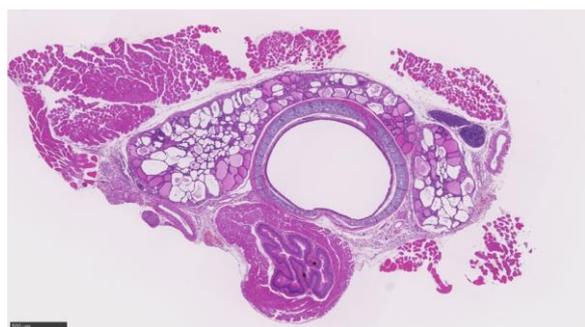


図 III-8 甲状腺腫瘍モデルマウスのタモキシフェン投与後の甲状腺病理組織像

甲状腺組織の中心部に上皮の増殖を示す腫瘍病変が観察され、リンパ球など炎症細胞浸潤、線維芽細胞の造因が見られた。辺縁部の濾胞は比較的正常でコロイドも作っていた。一方、中心の腫瘍病変部ではコロイドの形成が少量であった。濾胞の間は線維化が目立ち、リンパ球など炎症細胞浸潤、毛細血管の増生を認めた。また、病変の周辺部では部分的に線維化生じ、線維芽細胞の増生と比較的太い血管の増生が目立っていた（図 III-8）。

2-2. 甲状腺腫瘍モデルマウスにおける放射線影響

甲状腺腫瘍モデルマウスの3日齢時にタモキシフェンを投与し、非照射コントロールおよび、全身一回照射、あるいは全身連続照射を行った匹数と腫瘍が形成された匹数(割合)を表 III-2 にまとめた。コントロール群と 0.2Gy 一回照射群において、それぞれ一匹のみ腫瘍発生が見られなかったが、その他の群では全匹において腫瘍が発生し、それぞれの群間で発生割合に違いはなかった。

また、一回照射群および連続照射群における病理組織も、ほぼ図 III-8 と同様な上皮の増殖と線維化を示す病変像が観察され、照射群間やコントロールに比べて大きな差異はなかった。

表 III-2 甲状腺腫瘍モデルマウスに生じた甲状腺腫瘍まとめ

実験群	解剖時週齢	匹数(雌)	匹数(雄)	腫瘍が出来た割合	
				匹数(雌)	匹数(雄)
コントロール	8	4	4	3/4	4/4
0.2Gy一回照射	9	3	4	2/3	4/4
	14	2	4	2/2	4/4
0.5Gy一回照射	9	3	2	3/3	2/2
	14	3	3	3/3	3/3
1.0Gy一回照射	9	3	4	3/3	4/4
	14	3	4	3/3	4/4
1.0Gy連続照射	8	9	7	9/9	7/7
	13	12	9	12/12	9/9

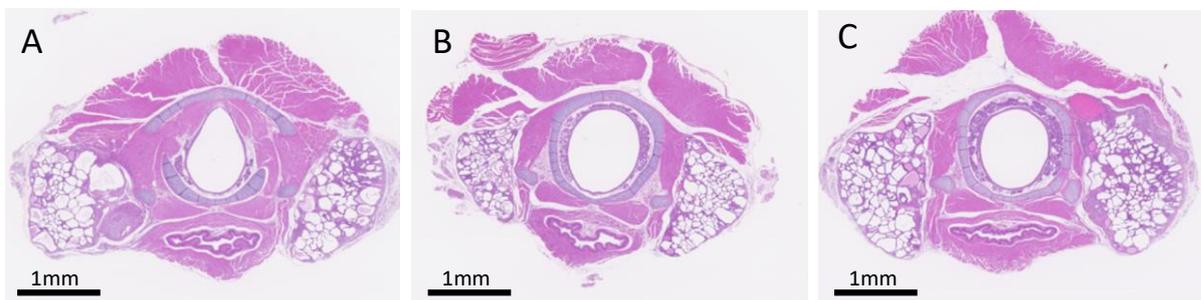


図 III-9 甲状腺腫瘍モデルマウスの甲状腺病理組織像 (A:コントロール 8週齢時解剖、B:1週齢に1Gy一回照射 9週齢時解剖、C:1-3週齢に1Gy連続照射 8週齢時解剖、いずれも3日齢時にタモキシフェン投与)

IV. 考察

動物実験は、ヒトにおける研究と細胞・分子研究の中間にあり、個体に生じる反応を各種の疾

患の発生率や寿命という物さしで観察することの出来る、きわめて貴重で重要な実験方法の一つである。種々の条件を制御して、放射線そのものの生体影響を実証することができ、放射線影響の発現機序が分かればヒトに応用することも可能である。

昨年度までは、実験動物に放射線を照射して発生する甲状腺がんについて、病理組織形態、線量効果関係、潜伏期間、照射時年齢依存性について明らかにしてきた。本年度は、低線量率放射線を連続照射した実験動物における甲状腺がんについて調べた。

その結果、まず、低線量率放射線の連続照射では、高線量率放射線照射に比べて甲状腺腫瘍の発生率が低くなり、高線量率放射線では7週齢より1週齢で高感受性であったのが、低線量率放射線ではそのような照射時年齢依存性による違いが小さくなった。また、高線量率放射線照射では、甲状腺腫瘍の発生時期が線量に依存して早まる傾向があったが、低線量率放射線でも同様に発生時期が早まっていることが分かった。さらに、甲状腺腫瘍リスク値で比較しても、一週齢一回照射で4.7/Gy、1-5週齢連続照射で1.3/Gyとなり低線量率効果が認められた。しかし1-5週齢連続照射のリスクの値は、コントロール(1.0/Gy)、や7-11週齢照射群(2.0/Gy)と有意差はなかったため、線量率効果係数を確かな数値として出すことは出来なかったが、仮に算出すると $4.7/1.3 = 3.3$ となるものと推定される。

総線量が同じであっても、線量率が低いほど生物影響が小さくなる「線量率効果」については、放射線影響の特徴的現象として古くから知られている。その作用機序として、一般に放射線照射により細胞核内のDNAが損傷を受けるが、線量率が低ければ放射線の飛跡が疎になり、損傷が少なくなる、と同時にあるいは損傷の修復が早く進むため、傷害を受けた細胞の割合が結果的に少なくなり最終的な効果、ここでは発がんが少なくなるということが定説として考えられてきた。

しかしながら、最近、放射線被ばくによりすべての細胞ががん化する可能性が高まると言うよりも、発がんに関与する幹細胞が組織中に存在し、放射線もこの幹細胞に傷害を与えることにより最終的にがん化に至るという機序が提案されている²⁾。この考え方によると、幹細胞は特定のニッチといわれる微小環境の中で生存し、幹細胞同士でそのニッチを競合的に取り合い、負ければ排除されるという。低線量率放射線照射では、傷ついた細胞と正常な細胞が混在して競合し、傷ついた細胞がニッチから排除されやすく、結果的に正常細胞が多く残るためにがんの発生率が下がると説明される。このような機序であれば、線量率を下げていくと、ある点で傷ついた細胞が完全に排除されて正常な幹細胞だけが残る、発がんにおける見かけ上のしきい値が存在することが考えられる。

このような放射線発がんに関与する幹細胞については、骨髄の造血幹細胞、腸管幹細胞、肺のTypeII細胞や分泌細胞が知られている。だが、放射線誘発甲状腺腫瘍(腺腫、腺癌)については濾胞上皮細胞由来とされているが、その幹細胞やニッチが甲状腺内のどこに存在しているのか、現在のところ不明である。「芽細胞発がん説」では、胎児期に甲状腺細胞に分化する前の3種類の未熟な細胞(甲状腺幹細胞、甲状腺芽細胞、前甲状腺細胞)が、分化せずに増殖して直接がん化し、それぞれ未分化がん、乳頭がん、および濾胞がんになるというモデルが提唱されている³⁾。今後、甲状腺における発がん幹細胞とその性質を調べ、線量率効果の機序を明らかにする研究が必要である。

放射線による固形がんの発生について、通常ヒトでは数年から十数年の潜伏期を持つが、チェ

ルノブイリでは事故後約4年後から甲状腺がんの増加が観察された。このように潜伏期が短いのは、その発がん過程を促進する何らかの修飾要因が存在する可能性が考えられるが、はっきりしたことは分かっていない。放射線の影響は、甲状腺の発がん標的細胞だけではなく、周囲の間質細胞や血管内皮細胞などにもおよび、周囲環境の変化が発がんに関与している可能性もある。作用機序の仮説として、放射線が細胞分裂中の腫瘍細胞に直接作用して増殖を抑制する、あるいは周囲の細胞死とそれに続く炎症反応により腫瘍細胞の増殖を促進することなどが考えられる。そこで本研究では、ヒトの甲状腺がんにおいてよく見られる遺伝子変異をもった遺伝子改変動物を用いて、甲状腺がんが発生してくる過程に対する放射線（一回あるいは連続）照射による修飾効果について調べることにした。

結果は、コントロール群と一回照射群および連続照射群において甲状腺腫瘍が発生し、それぞれの群間で発生割合に違いはなかった。また、病理組織も、ほぼ図 III-8 と同様な上皮の増殖と線維化を示す病変像が観察され、照射群間やコントロールに比べて大きな差異は認められなかった。これは、最大で1Gyの照射にしたため、腫瘍細胞の増殖抑制や細胞死が生じなかったためと考えられる。放射線が促進因子すなわちプロモーターとなるためには、相当量の細胞死を引き起こし、次いで代償性過形成を誘発するのに十分な線量の放射線を要するのかもしれない。今後、腫瘍組織に浸潤している炎症性細胞の有無や種類などについて詳しく調べ、放射線のプロモーターとしての性質についても調べていく必要があるだろう。

なお遺伝子改変動物を用いた実験については、甲状腺腫瘍モデルマウスその他臓器からの導入、SPF施設に搬入するためのクリーン化（受精卵移植と帝王切開）、タモキシフェン投与濃度設定（3日齢での投与例が論文的にも皆無）に日数を要したことから計画通りに実施できなかった部分が残った。

甲状腺における放射線発がんの特異性を調べ、その発がんメカニズムとそれを修飾する要因を明らかにすることは、ヒトでのリスク評価を行う上での根拠を提供することになるため、研究自体は事業終了後も継続したい。

V. 結論

動物実験病理アーカイブ（B6C3F1 雄雌マウス）よりガンマ線（高線量率一回、低線量率連続）全身照射マウス（1週齢、及び7週齢）の病理組織解析を行い、甲状腺腫瘍の組織型、腫瘍発生時期、線量効果関係、照射時年齢依存性、線量率効果を明らかにした。放射線照射により甲状腺に腫瘍病変が線量に依存して増加し、「過形成」、「腺腫」、「腺癌」を示す病理組織像を示すこと、発生時期は線量に依存して早まる（潜伏期が短縮する）ことが分かった。放射線誘発甲状腺腫瘍の相対リスクは、1週齢一回照射4.6/Gy、7週齢一回照射1.4/Gyであり、1週齢で3.3倍高く照射時年齢依存性が認められた。1-5週齢の連続照射では、リスクが4.6/Gyから1.3/Gyに低下し、線量率効果が見られたが、コントロール、および7-11週齢の連続照射と有意な差はなかった。

甲状腺腫瘍モデル動物であるBRafCA; TPO-Cre-ERT2マウスにおいて、生後3日齢にタモキシフェン投与によりBRAF変異を生じさせると、8-14週齢において甲状腺腫瘍が発現した。このマウスに1週齢で放射線照射をおこない、甲状腺に形成された腫瘍組織の病理解析では、コントロ

ールと照射群に大きな違いはなかった。

動物実験により、放射線誘発甲状腺腫瘍の病理組織型、線量効果関係、照射時年齢依存性、線量率効果を一括して調べた報告はこれまでになく、甲状腺がんの特異性を解明するうえで貴重なデータを提供する。

VI. 今後の展望

今回は動物実験により外部被ばくによる甲状腺がん誘発について調べたが、放射性核種の内部被ばく発がんの場合の線量評価、腫瘍病理型、線量効果関係、核種（ヨウ素とセシウム）、摂取様式（吸入か経口か）においてどの様な違いがあるかを調べる研究が、今後甲状腺がんの特異性を明らかにするために必要である。現在のところ、放射線による甲状腺がんの特異的なマーカーは見つかっていないが、甲状腺がんに関連する種々の細胞内情報伝達系遺伝子変異の研究が進展し、発がん過程における増殖因子シグナル伝達の役割が解明されると、それら分子を標的とする新しい診断方法や治療法、および予防方法の開発がもたらされ、新たな甲状腺がん医療の展開につながる事が期待される。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 論文：査読あり

1) なし

B. 論文：査読なし

1) なし

C. 学内学会発表

1) γ 線照射後のマウス甲状腺病変の被ばく時期年齢依存性について、第56回アイソトープ・放射線研究発表会（2019/7/4、東京）

D. 国際学会発表

1) Dose-rate effectiveness for incidence of thyroid lesions after γ -ray irradiation in mice. The 16th International Congress of Radiation Research (2019/8/26、英国)

2) Effects of low-dose-rate radiation on induction of thyroid tumors after γ -ray irradiation in mice. Asian Oncology Society 1st International Conference (2020/8/5 に延期、フィリピン)

VIII. 引用文献

- 1) 福島県県民健康調査検討委員会甲状腺検査評価部会. 甲状腺検査本格検査（検査2回目）結果に対する部会まとめ. 第13回甲状腺評価部会. 2019.
- 2) ICRP Publication 131. Stem Cell Biology with Respect to Carcinogenesis Aspects of Radiological Protection, 2015
- 3) Takano T. Fetal cell carcinogenesis of the thyroid: a hypothesis for better understanding of gene expression profile and genomic alternation in thyroid carcinoma, *Endocr J* 2004; 51: 509-515.

Study of carcinogenesis of radiation-induced thyroid cancer in childhood mice

Yutaka Yamada¹, Shizuko Kakinuma², Takamitsu Morioka², Kazuhiro Daino², Xiaohai Jin²

1: Department of Radioecology and Fukushima Project, Center for Advanced Radiation Emergency Medicine,

2: Department of Radiation Effect Research, National Institute of Radiological Sciences,

National Institutes for Quantum and Radiological Sciences and Technology.

Key word : Radiation carcinogenesis, thyroid cancer, childhood radiation exposure, low-dose-rate radiation, mice

Abstract

Since the nuclear accident in Fukushima Daiichi nuclear power plant, long-term low dose rate radiation exposure is concerned about health effects including cancer. There is an increasing interest in the radiation exposure effects of children with particularly high radiation susceptibility. Currently, thyroid cancer has been found by ultrasound thyroid screening. However, it is not clear whether thyroid carcinogenesis is associated with radiation exposure. A purpose of this study is to get clarifying carcinogenesis of thyroid cancer due to low-dose-rate radiation exposure at childhood period, and basics of thyroid cancer information for a risk estimation and a diagnosis.

By the experiment, pathological analysis of radiation-induced thyroid cancer is performed with the archive of the animal experiment sample. B6C3F1 male and female mice were acutely irradiated at 1 or 7 weeks of age with 0, 0.2Gy, 1Gy or 4Gy of γ - doses. The mice were also continuously irradiated for four weeks started at 1 or 7 weeks of age, up to the dose of 0 Gy, 1 Gy (0.026 mGy/min) or 4 Gy (0.105 mGy/min). After pathological examination, the incidences of thyroid lesion were calculated, and determined the effects of dose, dose-rate, and age at exposure.

The relative risk of radiation-induced thyroid tumor was 4.6 per 1Gy by 1 week of age and 1.4 per 1Gy by 7 weeks of age at exposure. The radiation risk of thyroid tumor was 3.3 times higher in a 1 week of age radiation exposure mouse than 7 weeks of age radiation exposure. On the other hand, the relative risk of continuously radiation-induced thyroid tumor decreased to 1.3 per 1Gy in 1-5 weeks of age, demonstrating that the existence of dose-rate effect in radiation-induced thyroid cancer. However, the difference of the risk was not significant among the control, 1-5 weeks of age and 7-11 weeks of age groups.

When tamoxifen was administered at 3 days after birth in the thyroid tumor model mice (BRafCA; TPO-Cre-ERT2), a thyroid tumor developed in 8-14 weeks of age. Tumor tissue was formed in thyroid gland even if acute or chronic radiation exposure was performed at 1 week of age to this mouse, however, control and the irradiation group make no difference by the pathology analysis.

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（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ている。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する。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する。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経過観察を行う。採取した組織標本は、病理切片を長崎大に送付して、組織微小環境の解析に供する。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する計画である。

平成 31 年度は、前年度に設定した生涯飼育実験群の飼育、観察を継続し、組織微小環境への影響を調べるための経時観察実験を開始した。具体的には、1 週齢のマウスを照射後、20 週齢から 24 週齢まで高脂肪食（60%脂肪食）を与え、体重の変化を調べたところ、いずれも一時的な体重の増加を認めたが、通常色に戻してから 4 週間には、通常の体重に戻ることを確認した。また、20、24、28 週齢、300、400、500 日齢に各群 3～6 匹を解剖し、病理標本作製して組織微小環境の解析に供した。採取した組織標本は、前年度に最適化した蛍光免疫染色法による解析の実験条件を用いて、放射線被ばくの初期影響、および DIO の組織

微小環境への影響の解析を実施している。

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8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、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、事故当時に子ども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、当時子ども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、小児期の被ばくによる発がんリスクが、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ている。具体的には、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終生飼育により追跡し、同時に、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する。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する。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経過観察を行う。採取した組織標本は、病理切片を長崎大に送付して、組織微小環境の解析に供する。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。

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 100mGy の影響を評価するが、これまでの研究成果から、100mGy 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、100mGy 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、100mGy 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。

平成 31 年度は、前年度に設定した生涯飼育実験群の飼育、観察を継続し、組織微小環境への影響を調べるための経時観察実験を開始した。具体的には、1 週齢のマウスを照射後、20 週齢から 24 週齢まで高脂肪食(60%脂肪食)を与え、体重の変化を調べたところ、いずれも一時的な体重の増加を認めたが、通常食に戻してから 4 週間には、通常の体重にまで戻ることを確認した。また、20、24、28 週齢、300、400、500 日齢に各群 3~6 匹を解剖し、病理標本を作製して組織微小環境の解析に供した。採取した組織標本は、前年度に最適化した蛍光免疫染色法による解析の実験条件を用いて、放射線被ばくの初期影響、および DIO の組織微小環境への影響の解析を実施している。

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 2300~3100kcal に対して、2700~3400kcal 相当になる。)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(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(0.5Gy/分)、100mGy および 4Gy)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行っている。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 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する。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。採取した組織からは薄切切片を作成し、長崎大学において、抗原賦活化以降の処理を行い、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を行っている（図 II-2）。

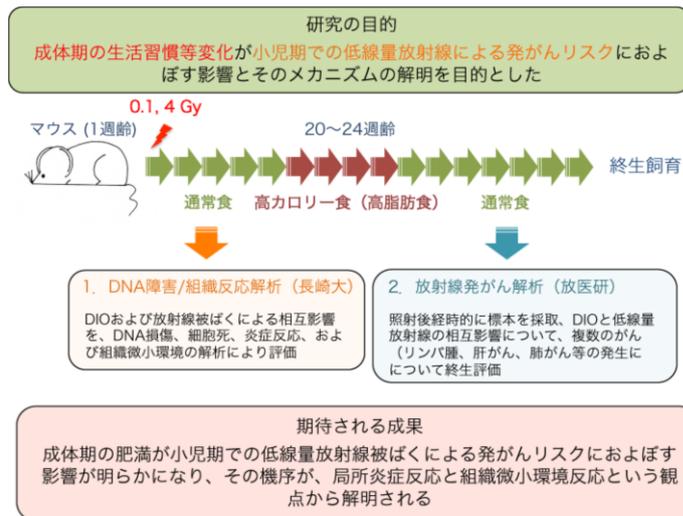


図 II-1. 研究概要図

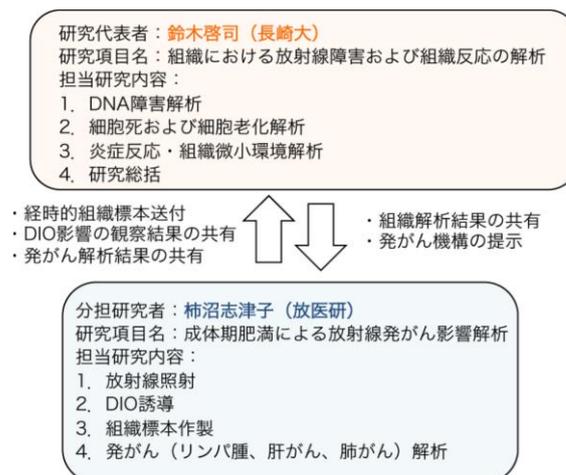


図 II-2. 研究組織間の連携図

DIO を誘導するための高カロリー餌としては、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。

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、放医研において採取された胸腺・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 μ 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が、高脂肪食による全身性の影響に関与する脂肪組織も解析の対象に含めた。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、蛍光免疫染色を行うまで、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、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 μ 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、複数の抗 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を検討した。

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終生飼育を実施した。

終生飼育を行う群は、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ている。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リスクの違いを比較することにより評価する。

(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」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ている。

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、放医研において採取される胸腺・脾臓、肝臓、肺および脂肪組織において、蛍光染色法による組織反応の解析を行った。組織標本は、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 μ m）を作成して解析に供した。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、蛍光免疫染色を行うまで冷蔵庫内で保存した。

1-1. 成体期の一時的な肥満に対する組織反応

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。標本の賦活化には、pH6.0 あるいは pH9.0 緩衝液を、抗体に応じて使い分ける事により、従来得られなかったシグナルが得られる事を新たに見い出した。

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る組織は、肝臓および脂肪組織のみであった。肝臓における代表的な組織反応である脂肪障害を評価するために、脂肪の蓄積により肝細胞内に生じる脂肪滴を可視化する抗ペリリピン 2 (PLIN2) 抗体を用いて、脂肪滴の蓄積を検討した。その結果、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胞 (Hepatic stellate cell : HSC) のみで検出され、HSC 内でビタミン A が蓄積する脂肪滴を染色している事が判明した。一方、高脂肪食摂餌群では、HSC の染色に加え、肝細胞でも微細な脂肪滴の分布が確認されるようになり、一時的な肥満であっても、肝臓の肝細胞において、脂肪の蓄積が促進されている事が明らかになった。興味深い事に、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急激に解消され、通常食で飼育された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。

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、一時的な高脂肪餌給餌による影響との相互作用を検討するために、放射線照射後 300 日齢の時点において、放射線照射群と非照射群との比較を行った。脂肪性障害は抗 PLIN2 抗体による染色により評価したが、組織微小環境の変化として炎症反応の検討も行った。炎症では、マクロファージ、好中球や樹状細胞の浸潤が予想されるため、これら炎症性細胞の先導役であるマクロファージについて検討した。肝臓内には、組織内に常駐しているクッパー細胞と呼ばれているマクロファージが分布する。そこで、マクロファージのマーカースとして、前年度染色条件を決定した抗 F4-80 抗体を用いて染色を行ったところ、図 III-1 に示すように、非照射マウスの通常食給餌でも、300 日間の飼育により、肝臓全体のごく一部ではあるが肝細胞における脂肪滴の蓄積を確認した（図 III-1. 左中央部分）。脂肪滴を蓄積した肝細胞は、細胞質に赤色の蛍光を貯え、その中央に、DAPI により染色された細胞核が青く抜ける像を示すことで区別が出来る。一方、緑色蛍光は、F4-80 陽性のマクロファージを示しているが、

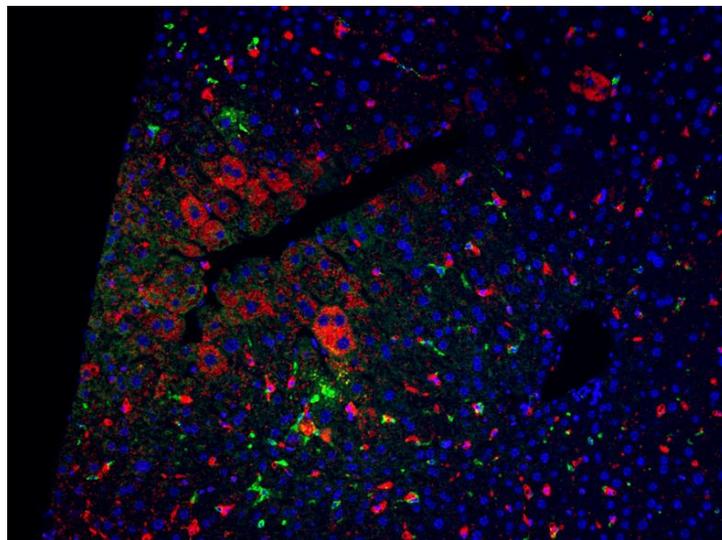


図 III-1. 非照射マウス由来肝臓における組織反応

非照射マウス（通常食）の給餌 300 日後の肝臓。PLIN2 抗体（赤色蛍光）のシグナルを有する微細な脂肪滴を含む肝細胞を認める（図左）。緑色の染色は、抗 F4-80 抗体により検出された肝臓に常在するマクロファージ（クッパー細胞）で、肝細胞間に散在するのが観察される

マクロファージは、肝臓全体に疎に分布し、特に、脂肪的の蓄積が見られた領域においても、明らかな集積は認められなかった。

一方、4Gy の γ 線照射マウスでは、照射後 300 日において、図 III-2 に示すように、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。興味深い事に、脂肪滴を蓄積した肝細胞のクラスターの周辺に、F4-80 陽性のマクロファージが集積する事は認められず、また、肝臓全体での評価においても、マクロファージが肝臓に浸潤している像は認める

ことはなかった。

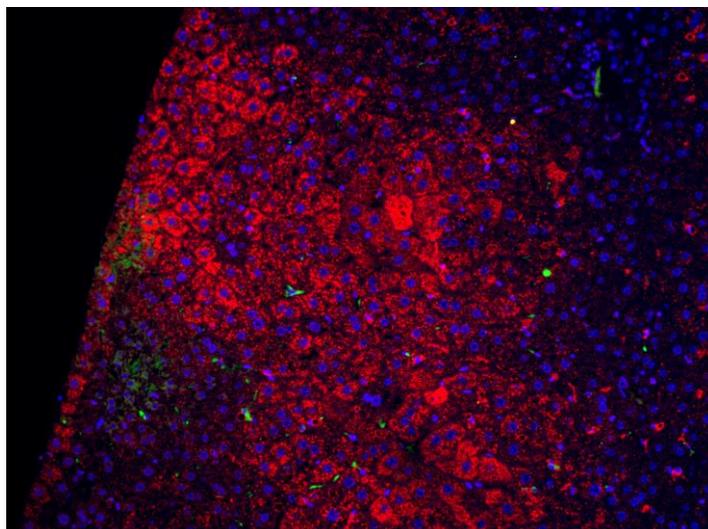


図 III-2. 照射マウス由来肝臓における組織反応

照射マウス（通常食）の給餌 300 日後の肝臓。PLIN2 抗体（赤色蛍光）のシグナルを有する微細な脂肪滴を含む肝細胞のクラスターを認める。緑色の染色は、抗 F4-80 抗体陽性のマクロファージ（クッパー細胞）であるが、その局在に明らかな傾向は認めなかった

組織微小環境は、上皮細胞とそれを取り巻く間質を構成する間葉系細胞からなる複合的組織野である。組織微小環境には、さらに微小血管やリンパ管等が分布して、複雑な環境を形成している。これまで、放射線の影響は、特定の細胞を標的にしてのみ評価されてきたが、放射線影響の統合的理解のためには、組織微小環境への影響を十分に理解する事が求められる。すでに、組織を構成する上皮細胞および間質細胞を、細胞骨格系蛋白質に対する特異的抗体を用いて可視化する蛍光染色法を最適化し、肝臓では、肝細胞を可視化する抗体として、抗サイトケラチン 8+18 抗体を選別して用いることとした。図 III-3. には、肝臓での解析の結果を示したが、肝臓組織を構築する主要な機能細胞である肝細胞が、サイトケラチン 8+18 で描出されて明確に把握できる。加えて、肝細胞の間隙を構成する類洞を確認する事もできる。

そこで、放射線照射による肝臓の脂肪性障害の促進に係わる組織反応を明らかにするために、照射後初期の組織反応の解析を行った。肝細胞は抗サイトケラチン 8+18 抗体を用いて検出したが、組織反応の解析は、抗 E-カドヘリン抗体を用いて実施した。E-カドヘリンは、上皮細胞どうしの細胞接着に係わるタンパク質であるため、肝臓においては、まず胆管上皮細胞が染色される。図 III-4 には、非照射マウス由来の肝臓の染色例を示したが、図中央に認められる門脈域には、数個の胆管が貫入しており、胆管を構成する胆管上皮細胞間に抗 E-カドヘリン抗体陽性のシグナルが認められる。また、肝細胞同士の接着面にも E-カドヘリンのシグナルが存在し、類洞に面した肝細胞の領域では、その間隙をなぞるように、E-カドヘリンのシグナルが観察される。

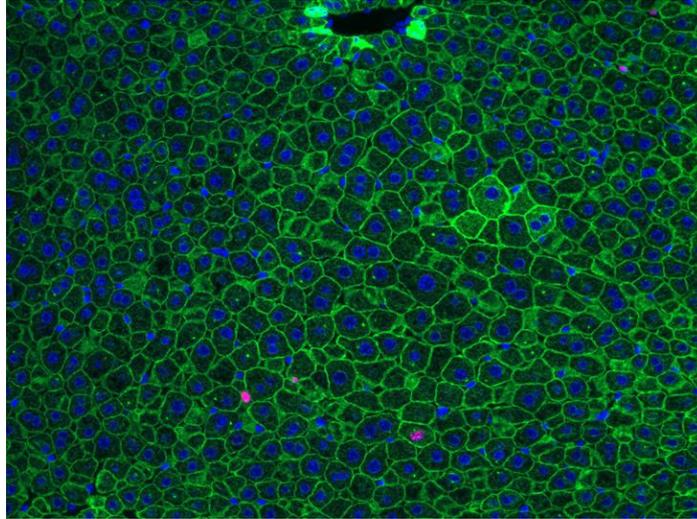


図 III-3. サイトケラチン 8+18 による肝細胞の描画
線状の緑色蛍光は肝細胞の細胞骨格が染色されたもので、細胞の輪郭に沿ってシグナルが検出される。赤色は Ki-67 陽性細胞。一部の肝細胞の核が染色されているのが観察される。

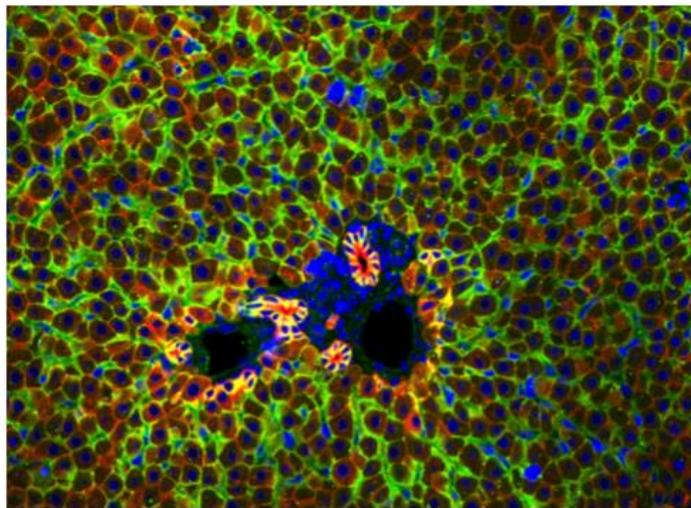


図 III-4. 抗 E-カドヘリン抗体による肝細胞の描画
非照射マウス（通常食）の肝臓。抗 E-カドヘリン抗体（緑色蛍光）のシグナルが肝細胞間に認められる。赤色蛍光は、抗サイトメラチン抗体陽性のシグナル。

図 III-4 では、抗サイトケラチン 8+18 抗体による染色も同時に行っているため、胆管に加え、肝細胞間もやや黄色の色に再構成されている。興味深い事に、非照射マウス由来の肝臓と比較す

ると、抗 E-カドヘリン抗体によって検出される E-カドヘリンの分布構造に変化が認められる事を見出した。図 III-4 でも観察されるように、E-カドヘリンのシグナルはメッシュワーク状の構造を示し、門脈を中心に放射状に分布している。しかしながら、このメッシュワーク構造は、放射線照射後に大きく変化する事が明らかになった。図 III-5 は、4Gy 照射 72 時間後のマウスより採取した肝臓での検討の結果であるが、図 III-4 と同様の条件によって染色を行っても、サイトケラチンの赤色蛍光が顕著に見られるパターンになることがわかった。これは、共存する緑色蛍光が減弱した結果で、このことから、放射線照射により E-カドヘリンのメッシュワーク構造が変化し、メッシュワークが部分的に減少している事が見出された。

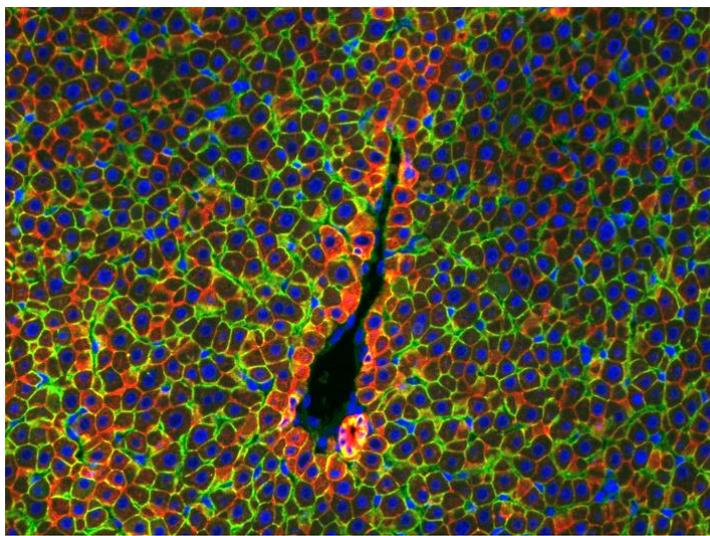


図 III-5. 抗 E-カドヘリン抗体による肝細胞の描画

照射マウス（通常食）の肝臓。4Gy 照射後 72 時間の組織標本。抗 E-カドヘリン抗体（緑色蛍光）のシグナルが肝細胞間に認められる。赤色蛍光は、抗サイトケラチン抗体陽性のシグナルで、図 III-4 と比較すると赤色蛍光が目立つ。

E-カドヘリンメッシュワークの減少に係わるメカニズムを解明する目的で、肝臓微小環境を構成するいくつかの因子について検討を始めたところ、毛細胆管を構成する CD26 の分布に変化が確認された。毛細胆管は、肝細胞間に形成され、肝細胞から排出される胆汁を胆管まで輸送する微細構造である。類洞とは異なり、肝細胞と肝細胞との接着面に沿って分布し、垂直方向で切片が形成された場合には、微細な管状の構造を肝細胞間に形成する。放射線照射前後で比較したところ、放射線照射後に、CD26 のシグナルに明らかな減弱が見られ、連続した毛細胆管の構造が顕著に減弱していた。

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）における放射線照射（ γ 線、100mGy および 4Gy、線量率は 0.5Gy/min）と、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）を与えることによる影響の解析を継続している。

まず、子ども期（1 週齢）に高線量放射線被ばく（ γ 線 4Gy 全身照射）による影響として、照射後数週間後で有意な体重低下が認められた。次に、成体期（20 週齢から 24 週齢）の高脂肪餌摂取により、明らかな体重増加が認められた。しかしながら、24 週齢以降、通常餌に戻して飼育を続ける事により、その後 4 週間程度で、高脂肪餌による影響は改善される傾向が見られた。また、長期飼育において、4Gy 照射群において体重の減少傾向が高脂肪餌群と通常餌群両方において確認された。低線量（100 mGy）照射群の体重は、非照射群と差が見られなかった。

放射線によるがん発生の検討では、子ども期（1 週齢）に高線量被ばく（ γ 線 4Gy 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、400 日齢以後では、肝腫瘍の発症が見られたが、高脂肪餌給餌群と通常餌給餌群との間に発症時期や発症頻度の差は認めなかった。低線量照射群（0.1Gy）においては、非照射群と同様に、がんの発症はほとんど観察しなかった（詳細は分担研究者の研究報告書を参照）。

IV. 考察

放射線および一時的な DIO による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ために、長期飼育を継続すると同時に、組織微小環境の解析に着手した。

まず、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組織反応が認められた肝臓について、脂肪滴を可視化できる抗ペリリピン 2 (PLIN2) 抗体を用いて、肝細胞内に蓄積する脂肪滴を評価する事により肝臓の脂肪障害を検討した。その結果、高脂肪食摂餌群では、通常食で飼育したマウス肝臓に見られる PLIN2 陽性の HSC に加え、微細な脂肪滴を包含する肝細胞が顕著に確認されるようになり、一時的な肥満であっても、肝細胞においては、顕著な脂肪蓄積が促進される事が明らかになった。興味深い事に、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急激に解消されていき、通常食での 4 週間の飼育のうちに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とから、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可能性が示された。

次に、放射線による組織障害に対する組織反応と、一時的な高脂肪餌給餌による影響との相互作用を検討するために、まず、放射線照射後 300 日齢の時点において、放射線照射群と非照射群との比較を行った。肝臓の脂肪性障害は抗 PLIN2 抗体による染色により評価できるが、組織微小環境変化の代表である炎症反応は、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、それぞれの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がある。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。

抗 PLIN2 抗体および抗 F4-80 抗体を用いて染色を行ったところ、通常食を給餌する非照射マウ

スでは、飼育開始後 300 日の段階で、肝臓全体のごく一部に脂肪滴を蓄積した肝細胞を確認した (図 III-1)。脂肪滴を蓄積する肝細胞は、クラスターとして集団で染色される事が多く、また、中心静脈周辺で確認される事が多い事から、通常の生理学的状態でも、マウスの年齢が上がると肝臓内に脂肪の蓄積がもたらされる事が確認された。この時点で、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何ら変わる事はなかった。また、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、分布の変化は認められなかった。

これに対し、4Gy 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クラスター上に局在する状態が、肝臓の全体で無数に観察された (図 III-2)。これらのクラスターの分布は、非照射マウスで見られたように、主に中心静脈周辺に分布する事から、放射線照射によって、脂肪滴の蓄積が促進されている可能性が示唆される。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、本研究で得られた結果も、その可能性を支持している。興味深い事に、放射線照射マウスで観察された顕著な脂肪性障害は、そのクラスターの周辺に、F4-80 陽性のマクロファージの集積をもたらす事はなく、また、肝臓全体での評価においても、マクロファージが顕著に肝臓に浸潤している像は認められなかった。以上の結果は、ヒトで考えられている脂肪性肝疾患 (NAFLD) から脂肪性肝炎 (NASH) への変遷の初期変化として捉える事ができ、さらに飼育を継続する事によって、炎症性の病変へと進展するかどうか明らかにする事が重要である。

放射線照射によって脂肪性肝障害が促進される原因を明らかにするためには、放射線照射初期に起こる組織反応を個々の細胞に着目して詳細に検討する必要がある。そこで、抗サイトケラチン 8+18 抗体による肝細胞を描画し、抗 E-カドヘリン抗体によって肝細胞同士の接着を検討したその結果、非照射マウス由来の肝臓と比較すると、放射線照射マウス由来の肝臓では、組織内に分布する E-カドヘリンのメッシュワーク構造に変化が認められる事を見出した (図 III-4)。放射線照射による E-カドヘリンのメッシュワーク構造の部分的な減少は、肝細胞間の接着や類洞の構造に影響を及ぼし、結果として肝臓の機能に障害をもたらす可能性がある事から、さらに、E-カドヘリンメッシュワークの減少に係わるメカニズムを解明する目的で、肝臓微小環境を構成するいくつかの因子についてさらに検討を始めたところ、毛細胆管を構成する CD26 の分布に変化が確認された。毛細胆管は、肝細胞間に形成され、肝細胞から排出される胆汁を胆管まで輸送する微細構造であり、肝細胞と肝細胞との接着面に沿って分布する微小構造である。放射線照射前後で比較したところ、放射線照射後に、CD26 のシグナルに明らかな減弱が見られ、連続した毛細胆管の構造が顕著に障害されていた。現時点では、CD26 の障害が、E-カドヘリンメッシュワークの減少の原因か結果かは不明であるが、今後、毛細胆管の構造変化の詳細を次年度明らかにする事により、放射線と一時的肥満との相互作用について更に明らかにしていく事が重要である。

V. 結論

平成 31 年度は、B6C3F1 雄マウスを用いて、小児期 (1 週齢) における放射線照射 (γ 線、100mGy および 4Gy、線量率は 0.5Gy/min) を実施し、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) を与えて飼育したマウスについて、再び通常食に戻してからの生涯飼育を継続している。放射線照射や一時的肥満による体重の変化を観察し、初期のがんの発症を観察し始め

た。また、組織微小環境の変化を蛍光免疫染色実験により検討し、放射線による肝臓の脂肪性障害の早期化を見出した。また、放射線照射による E-カドヘリンメッシュワークの構造変化や、CD26 の変化を見出し、平成 31 年度に予定したマイルストーンは全て達成した。

VI. 次年度以降の計画

平成 31 年度以降は、放射線照射および DIO 動物の終生飼育を継続し、発がんについての観察を継続する計画である。また、微小環境変化解析用の実験群の飼育を開始し、定期的に採取した組織標本において、組織微小環境変化の解析に着手している。特に、終生飼育中の実験群は、早期発症腫瘍（胸腺リンパ腫）の好発時期をへて、後期発症腫瘍（肝がんや肺がん）の好発時期に入るため、飼育観察を継続して行い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も行う。また、今年度新たに見出した E-カドヘリンや CD26 の構造変化についてもさらに解析を進め、放射線による影響と生活習慣の変化による影響の相互作用を、組織反応から統合的に行う解析を完了させる。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

学内学会発表

- 1) 鈴木啓司、がんにおける放射線被ばくと生活習慣との相互作用、第 60 回原子爆弾後障害研究会、広島、2019 年 6 月 2 日

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

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

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

^{*2}*Department 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 0.1 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.

The results showed that fatty liver disease was brought about 300 days after irradiation. The PLIN2-positive hepatocytes were significantly increased in irradiated cases, while they were not frequent in the control mice. It is suggested that radiation exposure accelerated steatosis. The study also identified that the E-cadherin meshwork was apparently compromised after irradiation, and CD26-positive signals were also abnormally distributed.

The study should provide 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.

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（成体期肥満による放射線発がん影響解析）

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

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す。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する。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する。平成 31 年度は前年度に設定した生涯飼育実験群の飼育、観察を継続している。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開始した。B6C3F1 雄マウスの 1 週齢時に 0 Gy、100mGy、4Gy 照射後、20 週齢から 24 週齢まで高脂肪食を与え、20、24、28 週齢に各群 3~6 匹を解剖し、病理標本を作製した。また、凍結組織から核酸とタンパク質を精製し、長崎大学へ送付した。同時に血漿を採取し、バイオマーカーの発現量解析に用いる。

キーワード

低線量	100mGy	高カロリー食
肥満（Diet-induced obesity; DIO）モデル	成体期肥満	

I. 研究目的

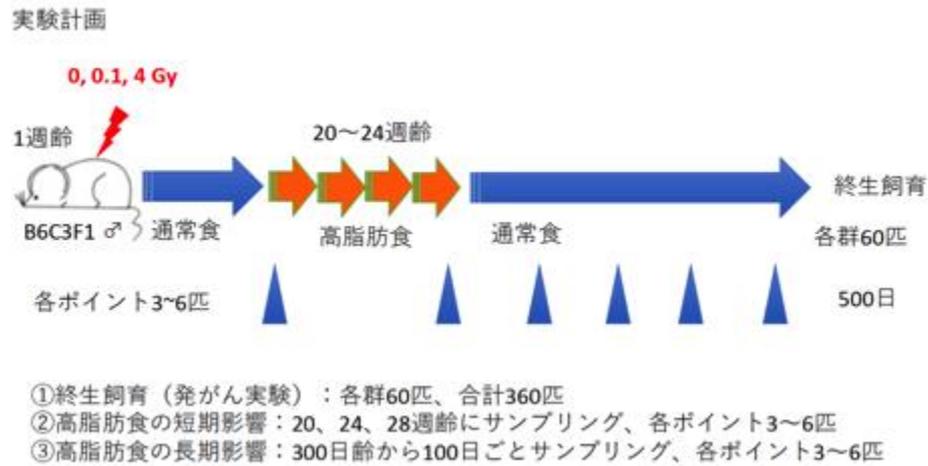
東日本大震災にともなう東京電力福島第一原子力発電所の事故（以降は福島原発事故）を受けて、事故の被災者を始め、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱くことになった。事故から数年がたち、福島県内における県民健康調査において被ばく線量が把握されるに従い、専門家会議の中間取りまとめでも、福島県および福島近隣県において、がん罹患率に統計的に有意な変化が検出される可能性は低いとされている。しかしながら、原発事故後の被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、事故当時に子ども期を過ごした子供たちの生活習慣等の変化が、放射線発がんリスクを修飾する可能性が懸念される。中でも、学校生活環境の変化、戸外活動の制限、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、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、当時子ども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、平成31年度は、前年度に設定した生涯飼育実験群の飼育、観察を継続した。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開始した。具体的に、前述通りマウスを照射後、20週齢から24週齢まで高脂肪食を与え、20、24、28週齢、300、400、500日齢に各群3~6匹を解剖し、病理標本を作製して、長崎大学へ送付する。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行った。

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、1週齢で放射線（ γ 線（0.5Gy/分）、100mGyおよび4Gy）を照射し、その後、20週齢から24週齢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う。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する。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、



図Ⅱ-1：実験計画

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う。

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る予定である。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。

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

表Ⅱ-1. 組織微小環境実験条件とマウスの匹数（計 180）

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

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。

②放射線照射

B6C3F1 雄マウスの 1 週齢時に 0、0.1、または 4Gy の γ 線を全身照射した（線源 ^{137}Cs 、線量率 0.5Gy/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（20～24 週齢）に標準餌（摂取カロリーの 10%が脂肪由来）または高脂肪餌（摂取カロリーの 60%が脂肪由来）を 4 週間摂取させて DIO を誘導した。4 週間後通常餌に戻し、定期的に体重を測定し（2 週間毎、20～24 週齢 1 週間毎）、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、20、24、28 週齢、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」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。

子ども期（1 週齢）高線量放射線被ばく（ γ 線 4Gy 全身照射）によって有意な体重低下が認められた。成体期（20 週齢から 24 週齢）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 4Gy 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。低線量照射群の体重は非照射群と差が見られなかった。

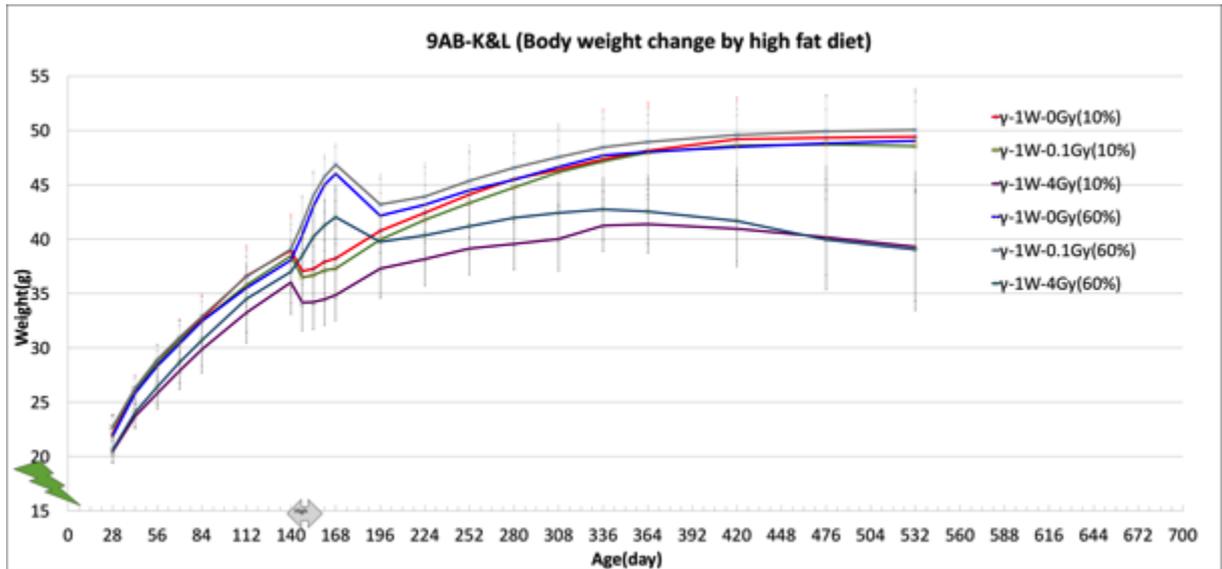


図 III-1 子ども期放射線被ばく及び成体期 DIO 誘導による体重変化

1-2.腫瘍の発生

子ども期（1 週齢）高線量被ばく（ γ 線 4Gy 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 580 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。腫瘍発生率は生存率と相関した。摂取餌による発症時期や発症頻度の差が認められなかった。非照射及び低線量照射群（0.1Gy）にマウスの死亡は少なかった。

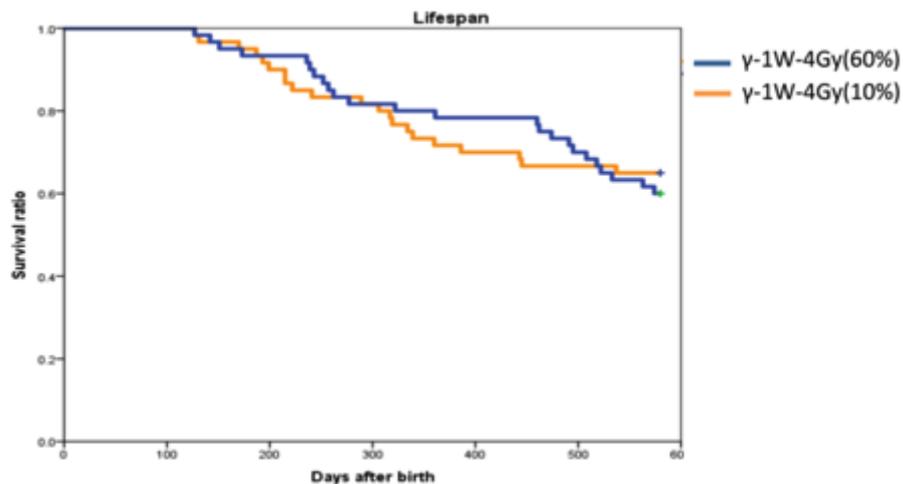


図 III-2 子ども期放射線被ばく及び成体期 DIO 誘導による腫瘍発生

2. DIO による放射線被ばく後組織微小環境への影響研究

本年度は実験群の設定を行って、計画通りマウスの照射、DIO 誘導を完了した。20、24、28 週

齡時のサンプル採取を実施し、病理及び核酸、タンパク質サンプルを順次長崎大学へ送付した。

IV. 考察

今年度には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がどう変化するかを検証するための発がん実験を継続している。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。また、小児期高線量被ばくによる早期発生腫瘍である胸腺リンパ腫、400日齢以後に肝腫瘍の発症も確認された。現時点で高脂肪食摂取による寿命及び腫瘍発生に対する影響が見られなかった。

V. 結論

前述長期発がん実験及び微小環境への影響研究実験群の設定が実験計画通り実施し、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子ども期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引き続き観察する必要がある。また、組織微小環境への影響研究は継続してサンプルを採取し、主任研究者へ供与する。

VI. 次年度以降の計画

終生飼育中の実験群は、飼育観察を継続して行い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。微小環境への影響研究実験は、継続してサンプルを採取すると共に、採取した血清サンプルを用いて、脂質代謝、内分泌関連因子の解析について検討する。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

なし。

VIII. 参考文献

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 2018, the rearing of the DIO experimental animals was to be started, 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. Thereafter, we also observed the weight was reversed to normal level after changing the normal diet. Thymic lymphoma was induced by 4Gy irradiation. The influence of DIO on lifespan shortening and tumor development was not obvious.

2-3 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。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。

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）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の放射線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、昨年度に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）で飼育を開始した全群を継続して飼育を行った。また、体重と餌摂取量の測定を経時的に行った。昨年度は、10 週齢で解剖を行ったが本年度は 20 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、EE 群は、SE 群に比べて体重増加の抑制傾向が認められた。逆に、餌摂取量は EE 群において有意に増加した。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、2mm 以上の腫瘍数に関しては有意な抑制が認められた。大腸においては腫瘍のサイズを抑制する可能性が示唆された。

今後、EE 及び SE での飼育を継続し、30 週齢時に解剖を行い 10、20 週齢と同様に血液と主要臓器を採取し保存する。また、保存した血漿と臓器を用いて血漿の生化学検査と病理組織解析を進め、EE による放射線誘発消化管腫瘍に対する予防効果についての科学的知見をまとめる。

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高いことが、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にした。発がん予防効果実験には、消化管腫瘍のモデルマウスである $Apc^{Min/+}$ マウスを用いる。 $Apc^{Min/+}$ マウスは、ヒト家族性大腸腺腫症のモデルマウスで、数ヶ月以内に多数の小腸・大腸ポリープを発症する。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、放射線の健康影響を、生活の環境改善で低減できることを示すことで、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）の施策の基礎情報に成り得る。平成 30 年度は、EE と SE 環境で飼育を開始した全実験群の 10 週齢での解剖を行った。本年度は、20 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。

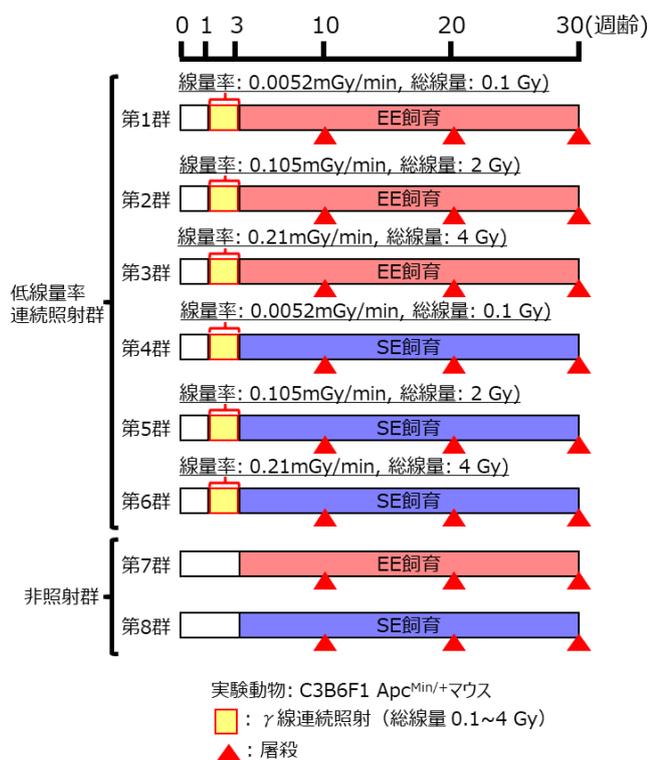


図 II-1 実験デザイン

II. 研究方法

1. C3B6F1 $Apc^{Min/+}$ マウスの作出

平成 30 年度から本年度にかけて量研放

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。

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 年度から本年度にかけて作製した C3B6F1 Apc^{Min/+}マウスを用いて、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、



図 II-2 γ 線連続照射装置

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)。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、



図 II-3 飼育環境

肝臓、肺、白色及び褐色脂肪組織など) の摘出分の実験動物を設定 (全群とも各ポイント 10~15 匹) し飼育を開始した。また、体重と摂

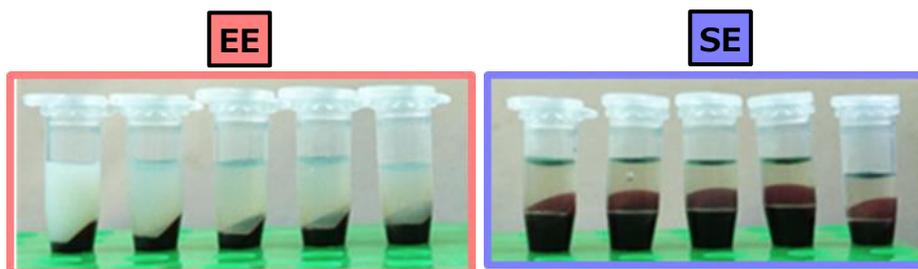


図 II-4 採取した血漿

餌量は、週 1 回の測定を開始した。本年度は、20 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



図 II-5 ホルマリン固定された臓器

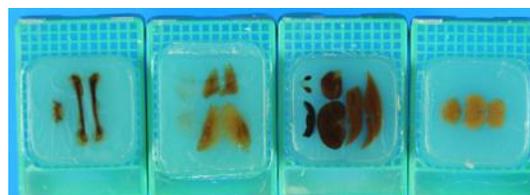


図 II-6 作製したパラフィンブロック

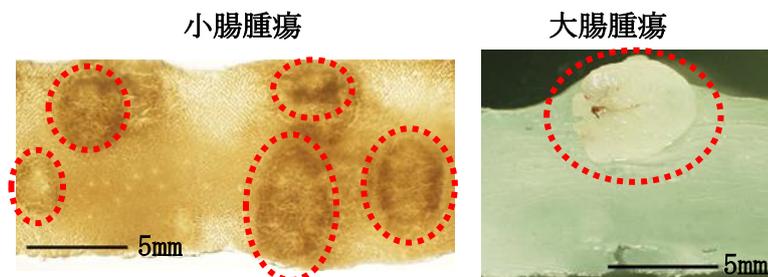
部の組織について病理解析を行った。加えて、小腸及び大腸腫瘍を分子解析用に実体顕微鏡下で採取し凍結保存した（図Ⅱ-7）。



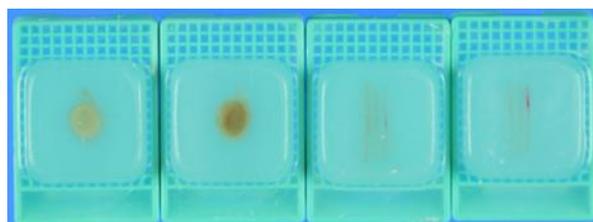
図Ⅱ-7 採取した腫瘍の凍結サンプル

② 病理組織学及び免疫組織化学的解析

20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

20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）、HDL（善玉コレステロール）及びNEFA（遊離脂肪酸）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ている。

III. 研究結果

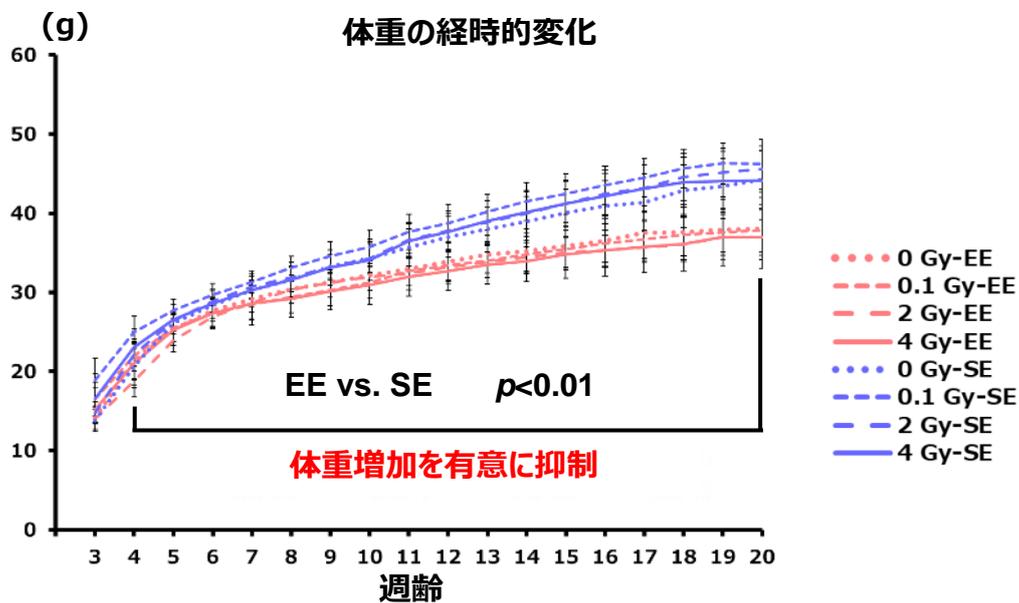
1. EE の健康増進効果の検討

① 体重への効果

3週齢からEE及びSEで17週間飼育した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20週齢までの体重変化を図III-2に示す。EE飼育群は、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。



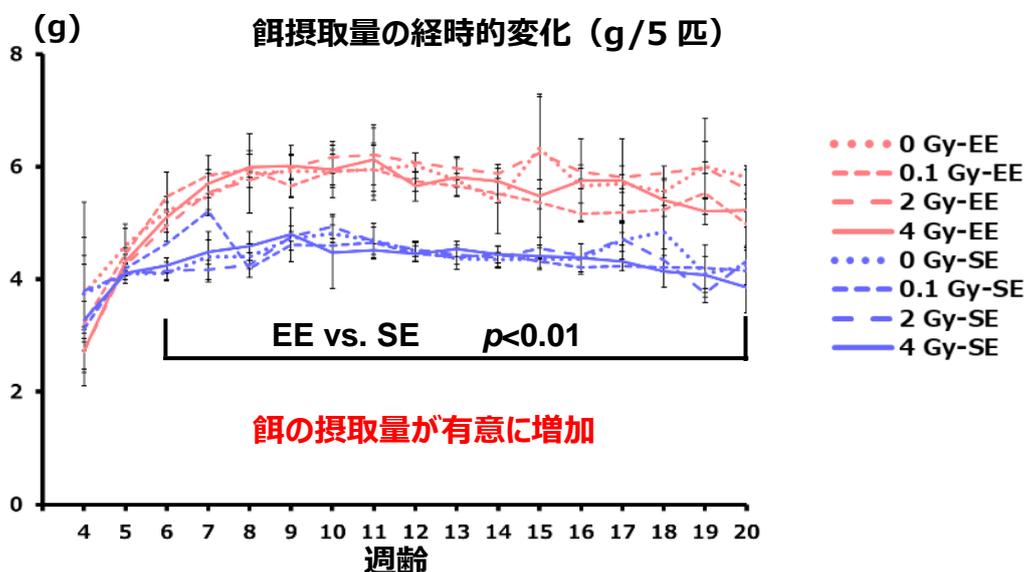
図III-1 EE及びSEで飼育した20週齢マウスの外表所見



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

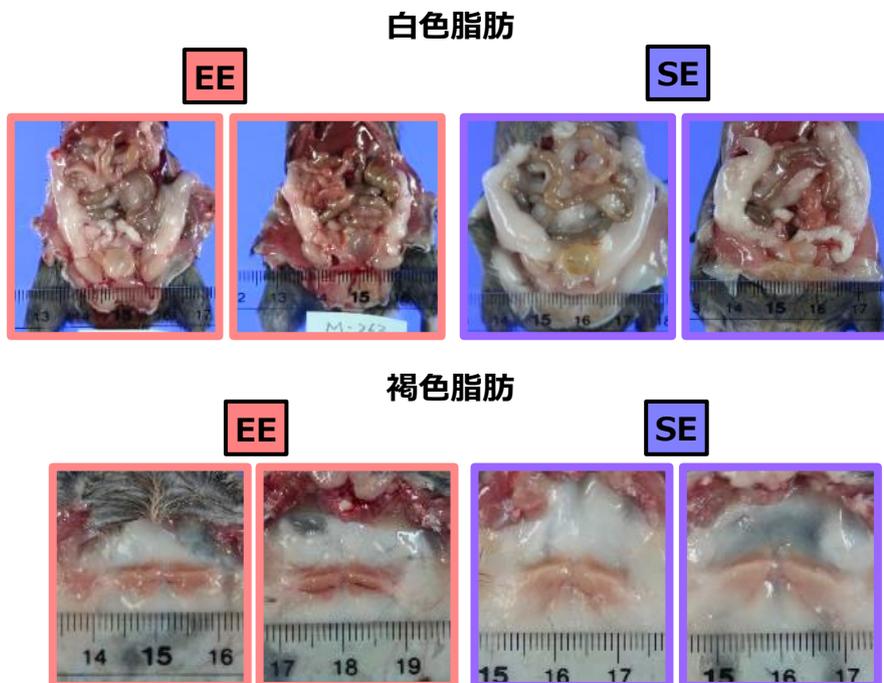
EE 飼育群は、SE 飼育群に比べて摂餌量が有意に増加した (図III-3)。



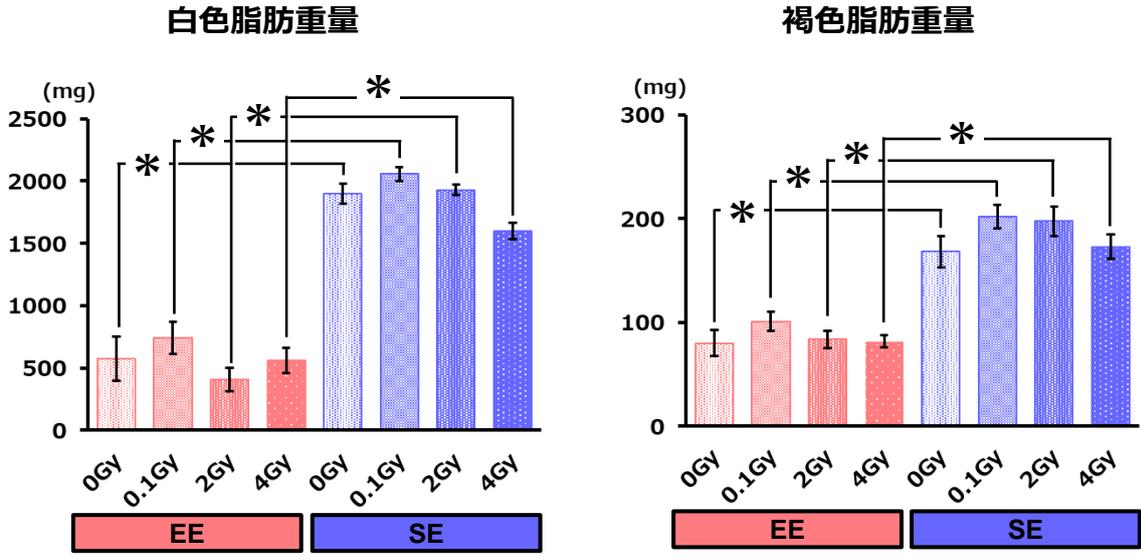
図III-3 EE 及び SE で飼育による摂餌量の経時的変化

③ 白色脂肪及び褐色脂肪組織への効果

EE 及び SE で 17 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 により褐色調が強くなるのが分かった。各群の白色脂肪と褐色脂肪重量を図III-5に示す。EE 群は、SE 群に比べて有意に白色脂肪重量と褐色脂肪重量が低かった。

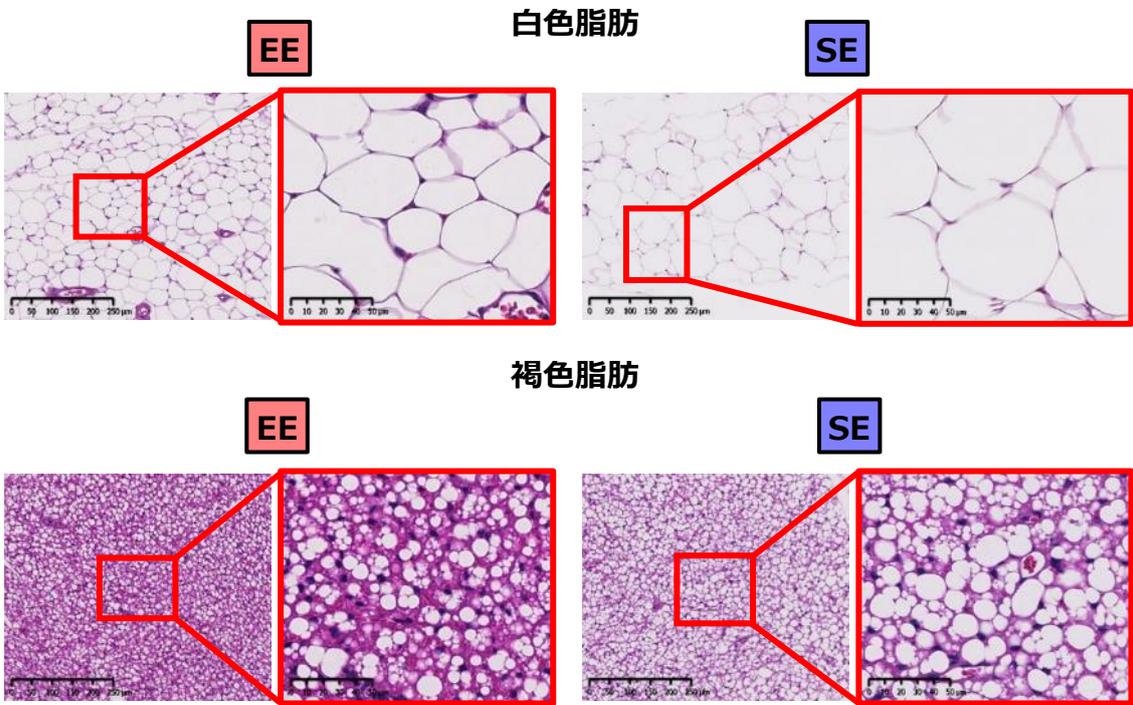


図III-4 EE 及び SE で飼育した 20 週齢マウスの白色脂肪と褐色脂肪の肉眼像



図III-5 EE 及び SE で飼育した 20 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。(* $p < 0.0001$)

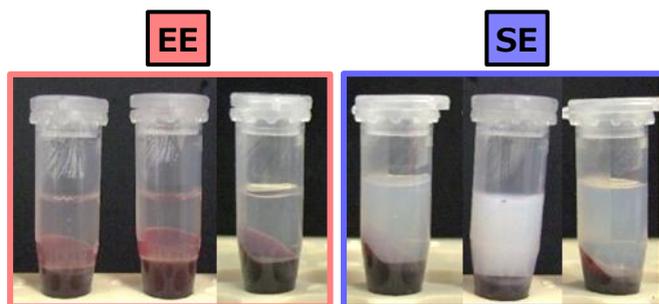
次に、白色脂肪及び褐色脂肪組織の病理組織学的解析を行った。図III-6 に各脂肪組織のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した組織像を示す。白色脂肪及び褐色脂肪組織ともに、EE により細胞質内の油滴サイズの著明な減少を認めた。



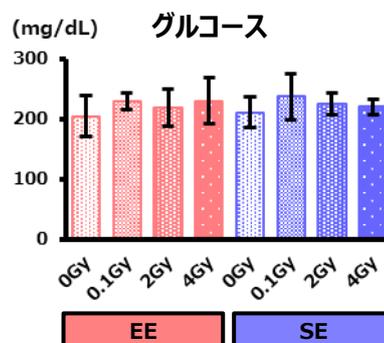
図III-6 EE 及び SE で飼育した 20 週齢マウスの白色脂肪と褐色脂肪組織の組織像 (ヘマトキシリン・エオジン染色)

④ 糖代謝及び脂質代謝への効果

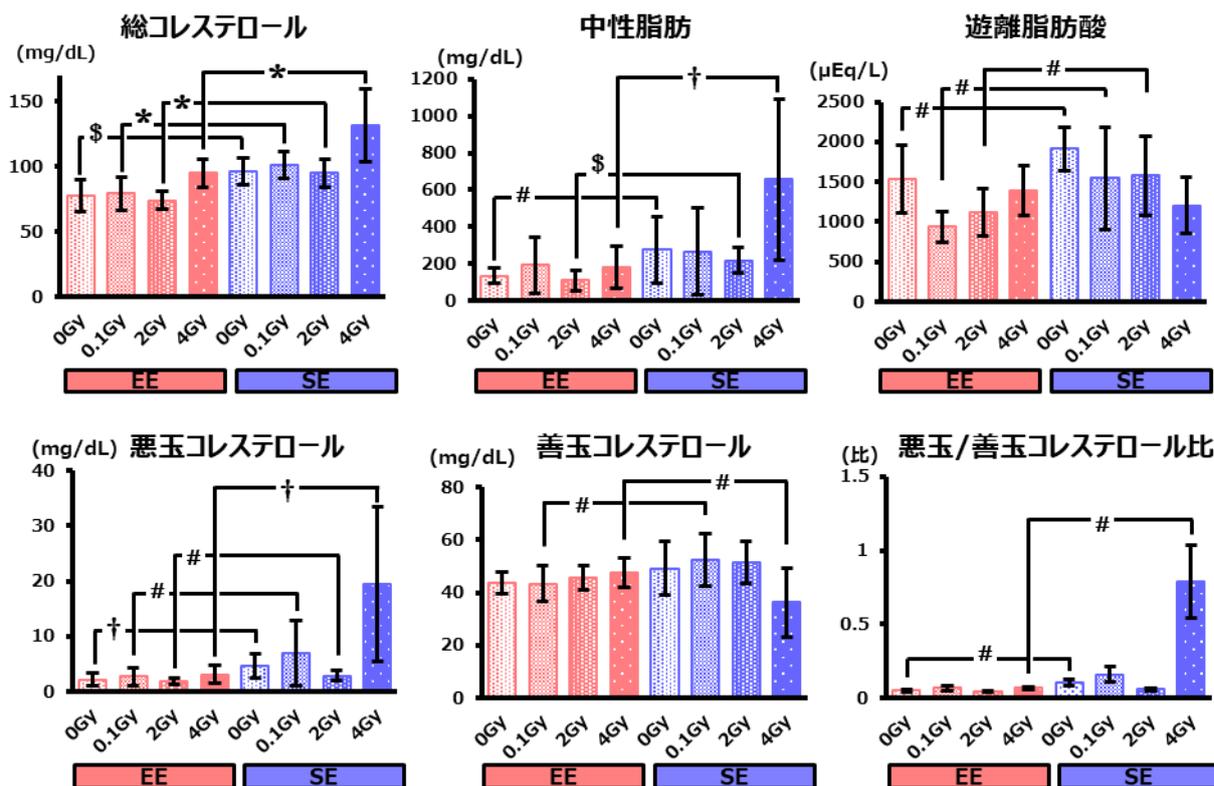
EE 及び SE で飼育した 20 週齢マウスから採取した血漿の肉眼像を図III-7に示す。SE 群は、乳び血漿であるのに対し EE は黄色透明の血漿であった。次に凍結保存した血漿を用いて血中グルコース値を測定した結果、EE 群と SE 育群との間に有意な差は認められなかった (図III-8)。



図III-7 EE 及び SE で飼育した 20 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 20 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。



図III-9 EE 及び SE で飼育した 20 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。 (# $p < 0.05$, † $p < 0.01$, \$ $p < 0.005$, * $p < 0.001$)

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、総コレステロール値と悪玉コレステロール値が有意に減少を示した。この効果は、被ばく総線量に関係無く認められた。中性脂肪、遊離脂肪酸、善玉コレステロールは、EE により一部の群においてのみ有

意に減少することが分かった。総線量 4 Gy を照射した SE 群においては、総コレステロール、中性脂肪、悪玉コレステロール及び悪玉/善玉コレステロール比の上昇と善玉コレステロールの減少が顕著に認められた。

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 17 週間、EE 及び SE で飼育した 20 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

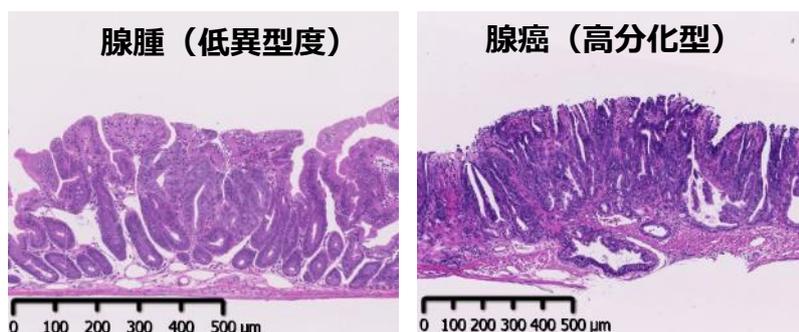


図 III-10 EE 及び SE で飼育した 20 週齢マウスの小腸に発生した腫瘍の病理組織像 (ヘマトキシリン・エオジン染色)

観察された。次に、1 匹あたりの総腫瘍数と 2mm 以上の腫瘍数を図 III-11 に示す。EE 群の小腸総腫瘍数は、有意な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 Gy 照射群の総腫瘍数は非照射群 (0 Gy) と同等であり、腫瘍数の増加がみられなかった。一方、総線量 2 Gy と 4 Gy 照射群では、腫瘍数の増加傾向を認め、総線量 4 Gy 照射群では有意な増加を示した。腫瘍径が 2mm 以上の腫瘍数は、EE 群では有意な被ばく総線量依存的な増加は認められなかった。SE 群では、総線量 4 Gy 照射群で有意な増加を示した。EE の小腸腫瘍抑制効果は、総腫瘍数に関しては有意な抑制効果は認められなかったが腫瘍径 2mm 以上の腫瘍数においては総線量 2 Gy と 4 Gy 照射群において有意な抑制効果が認められた。

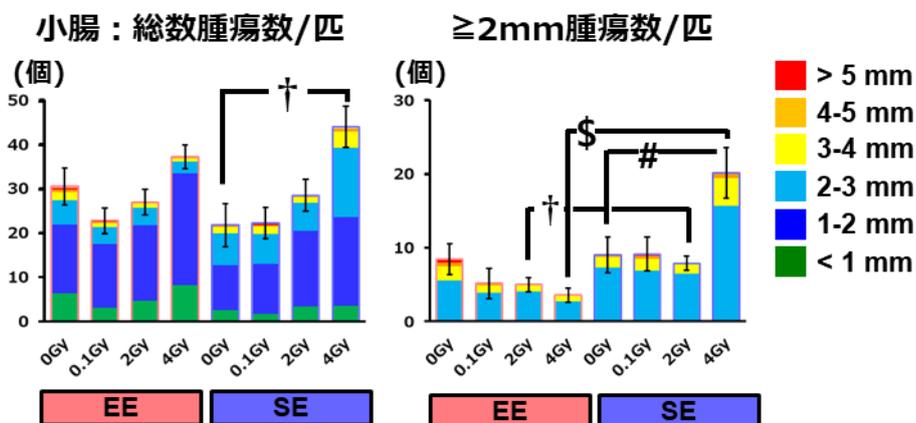
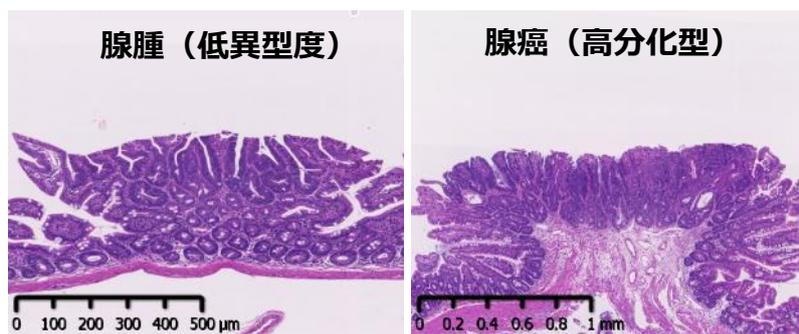


図 III-11 EE 及び SE で飼育した 20 週齢マウスの小腸腫瘍数データは、平均値±標準誤差で示す。
 (# $p < 0.05$, † $p < 0.01$, \$ $p < 0.005$, * $p < 0.001$)

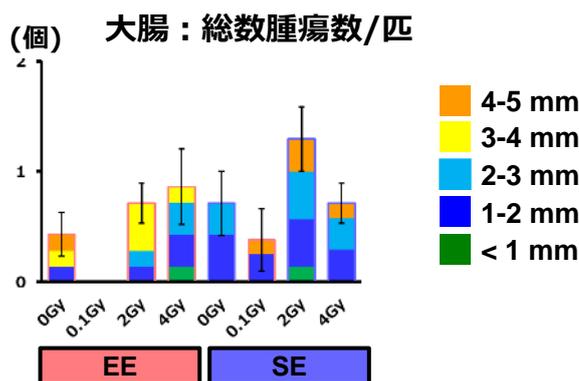
② 大腸腫瘍に対する効果

図Ⅲ-12 に 3 週齢から 17 週間、EE 及び SE で飼育した 20 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浸潤した腺癌が観察された。



図Ⅲ-12 EE 及び SE で飼育した 20 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)

次に 1 匹あたりの総腫瘍数を図Ⅲ-13 に示す。EE 及び SE 群共に、被ばく総線量による腫瘍の発生数には有意な違いはみられなかった。SE 群において、照射により腫瘍径が 2-3mm と 4-5mm の腫瘍が増加する傾向が認められた。EE 群は、SE 群に比べて腫瘍径の大きい腫瘍の発生数が低い傾向が認められた。



図Ⅲ-13 EE 及び SE で飼育した 20 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。

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。本研究成果を通して、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繋げることを最終目標としている。

今年度は、3 年計画の 2 年目であり、昨年度に設定した図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 17 週間飼育した 20 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、EE は SE に比べて摂取餌量が有意に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。EE による体重増加の抑制効果の要因は、病理組織学的解析により生殖器周囲の白色脂肪組織と肩甲骨下の褐色脂肪組織への脂肪滴の蓄積抑制あるいは脂肪滴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、20 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。その結果、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、悪玉コレステロール及び悪玉/善玉コレステロール比が非照射で SE 飼育した群に比較して有意に増加を示した。一方で、善玉コレステロールは、有意に減少を示した。これらの所見は、総線量 4 Gy 照射群でのみ認められたことより、照射により脂質代謝に異常を生じさせる可能性が考えられた。総線量 4 Gy 照射し EE 飼育した群では、上記の所見は認められず EE により脂質代謝が改善したと考えられた。その他の群においても、EE により総コレステロールと悪玉コレステロールは有意に減少することが分かった。また、一部の EE 群において中性脂肪、遊離脂肪酸が有意に減少した。これらの減少効果は、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。加えて、動脈硬化の指標として用いられる悪玉/善玉コレステロール比は、EE 群において低い傾向を示し、将来の動脈硬化予防にも効果的である可能性が示唆された。

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、20 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、2mm 以上の腫瘍数に関しては有意な抑制が認められた。大腸においては腫瘍のサイズを抑制する可能性が示唆された。

今年度は、EE 条件下で 17 週間飼育したマウスを用いて EE の効果を検証したことより、EE の効果に統計学的な有意差が得られない項目も存在した。来年度以降、3 週齢から EE 条件下で 27 週間飼育したマウスを用いて EE の効果を検証する予定である。

V. 結論

EE 条件下で 17 週間飼育したマウスにおいて、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。

今年度は、17 週間の EE 飼育での評価を行ったことより、放射線誘発消化管腫瘍に対する EE の効果が軽微であったと考えられた。来年度以降の長期の EE で飼育（27 週間）したマウスを用いた評価が重要と考えている。

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、摂食量の経時的測定を行った。EE で 17 週間（3 週齢から 20 週齢まで）飼育する群を解剖し EE の効果を検証した結果、体重増加の抑制、有意な脂肪重量増加の抑制、脂質代謝の改善及び消化管腫瘍サイズの有意な抑制傾向が認められた。次年度は、EE での飼育期間を延長することによる効果を検証すべく、実験群の飼育を継続して行い全身状態の観察と体重測定（1 回/週）を行う。EE 及び SE 環境で飼育した 30 週齢マウスの解剖を行い血液採取、小腸と大腸の腫瘍性病変のカウント及び採取を行い保存する。また、主要臓器も採取しホルマリン固定後、パラフィンブロックを作製する。凍結保存した血漿に関しては、脂質代謝、脂肪細胞由来ホルモン、炎症性サイトカイ

ン及びマイオカインの測定を行う。特に近年がん予防効果が報告されている筋肉由来のホルモンであるマイオカインに着目し、アイシリン、IL-6 (Interleukin-6)、FGF-21 (Fibroblast growth factor-21)、イノシン、SPARC (Secreted protein acidic rich in cysteine)等について測定を行いEEのがん予防効果に關与する要因を明らかにする。加えて、EEによる放射線誘発消化管腫瘍の予防効果については、腫瘍性病變の病理組織標本を作製し病理組織学的に解析を行い、腫瘍の進展度の観点から評価を行う。また、凍結保存した腫瘍性病變を用いて網羅的遺伝子発現解析を進め、EEのがん予防メカニズム解明を進める。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

- 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.

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.

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

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

Abstract

Long-term evacuation life caused by disasters such as nuclear 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 against radiation-induced intestinal tumors in mice.

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 17 weeks. Mice were sacrificed under the anesthesia at 20 weeks of age. Blood, 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, low-density lipoprotein cholesterol and triglyceride were significantly lower than that of SE groups. EE reduced the tumor size 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.

2-4 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)

分担研究者： 志村 勉(国立保健医療科学院)

河合 秀彦 (広島大学)

小林 純也 (京都大学)

研究要旨

現在、100 mSv 以下の低線量放射線被ばくや低線量率の長期間被ばくに対する発がんリスクは未解明である。その為、低線量や低線量率被ばくにおけるリスクを推定するために線量・線量率効果係数(Dose and Dose Rate Effectiveness Factor: DDREF)が用いられている。現在、国際放射線防護基準では、DDREFを2と定めており、低線量・低線量率放射線のリスクは、高線量での値の半分であると推定されている。放射線の健康リスクに対し、防護と社会が向き合う上では、このDDREFの定義が極めて重要である。しかしながら、DDREFの妥当性については、現在議論が行われており、より正確な科学的知見の提供が求められている。

我々は、これまでの研究から放射線発がん高感受性マウス(*Apc^{Min/+}*マウス)を用いて、100 mGyの高線量率ガンマ線被ばくで、有意ながんの増加を検出することに成功した。また、放射線照射に特有の遺伝子変異(放射線の爪痕)をより高感度に検出できる *Apc^{Min/+}*マウスを作成し、遺伝的背景が線量率効果に影響を与えることを明らかにした。このことは、これまで明らかとされていなかった線量・線量率効果の分子機構解明に極めて重要な知見といえる。

本申請研究では、これまでとは異なる、放射線発がん高感受性であり、かつ染色体組み換えを検出可能な遺伝的背景を有する *Apc^{Min/+}*マウスを用いて線量率の変化による腫瘍発生頻度への影響を解析する。得られた結果とこれまでの我々の放射線発がん研究結果を基に、DDREF値の策定とその数値の妥当性および、多様性の検討を行う。また、DDREF値の多様性に寄与する因子の同定を試みる。

得られたマウス個体レベルの結果をヒト発がんリスクへ外挿するためには、ヒト放射線発がんの分子機構解明が重要といえる。そのため、ヒト正常細胞を用いて、発がん過程に関与すると考えられる、ゲノム 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(Cancer Associated Fibroblasts: CAF)誘発等に着眼した放射線応答の分子機構を解析する。また、我々のこれまでの *Apc^{Min/+}*マウスを用いた放射線発がん研究から、染色体組み換えによる LOH (loss of heterozygosity/ヘテロ接合性の消失) が線量率効果に関与することが明らかにされている。そこで、ヒト幹細胞モデル細胞として iPS 細胞株(hiPSC)を用いて、染色体組み換えによる LOH を検出

できるシステムの構築と線量率効果を規定する因子のスクリーニングを行う。これらの結果から、DDREF 値の多様化に寄与する候補因子の同定を試みる。得られた DDREF 値の多様化に寄与する候補因子は、将来的に低線量(率)放射線発がんハイリスクの可能性のある集団を抽出し、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へ貢献することが期待される。

キーワード

線量・線量率効果係数(Dose and Dose Rate Effectiveness Factor: DDREF)	<i>Apc</i> ^{Min/+} マウス	活性酸素
がん関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblasts: CAF)	DNA 損傷	ミトコンドリア

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。

我々は、遺伝的背景の異なる *Apc*^{Min/+}マウスを用いて低線量・低線量率放射線発がんリスク評価を行い、遺伝的背景が線量率効果に影響を及ぼす知見を得ている。そこで、本研究では、放射線発がん高感受性であり、かつ染色体組み換えを検出可能な遺伝的背景を有する *Apc*^{Min/+}マウスを用いて線量率の変化による腫瘍発生頻度への影響を解析する。得られた結果と我々のこれまでの放射線発がん結果を基に、DDREF 値の算定とその数値の妥当性の検討を行う。さらに、得られたマウス個体レベルの結果をヒト発がんリスクへ外挿するため、ヒト放射線発がんに関与すると考えられる放射線細胞応答の分子機構解明により、DDREF 値の多様化に寄与する候補因子の同定を目指す。

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マウスの飼育:マウスの飼育は、原爆放射線医科学研究所放射線先端医学実験施設内の動物飼育スペースにて行った。飼料は、MF(オリエンタル酵母工業(株))を用い、餌、水を自由摂取させて飼育し

た。マウスは、基本的に 1 ケージあたり 4、5 匹で飼育し、週 1 回のケージ交換ならびに、週 2 回の給水瓶の交換を行った。

②異なる線量率の放射線発がん実験:昨年度に引き続き、放射線発がん実験を継続した。マウスを 19～24 週齢まで飼育後、屠殺、解剖を行い、末梢血および小腸を採取した。*Apc^{Min/+}*マウスでは、小腸腫瘍の肥大に伴う出血による貧血症状がみられることが報告されている。貧血に伴い末梢血中のヘモグロビン(Hgb) 値が低下することから、全自動血球計数装置 PCE-310 (ERMA)を用いて、末梢血中 Hgb 値の測定を行った。また、採取した小腸は、腸の長軸方向に水平方向に開きティッシュピンを用いて固定した。その後、アルカリフオスファターゼ染色を行った。また、腫瘍は、実体顕微鏡下でピンセットを用い、1 つずつ採取を行い、凍結保存した。

③放射線発がんにおける被ばく時年齢依存性の解析:繁殖に適した 8 週齢以上の *Apc^{+/+}*マウスのメスと *Apc^{Min/+}*マウスのオスを準備し交配を行った。妊娠したメスマウスが確認されたら、別ケージに移動させ個別飼育を行い、毎日観察することにより、出産日を記録した。得られた仔マウスは生後 1、11、21、41、61 日目に高線量率放射線照射を行った。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 Gammacell® 40 Exactor (Best™ Theratronics 社(¹³⁷Cs 線源、線量率: ~0.9 Gy/min))を用いた。約 4 週齢時に、マウスの尻尾から DNA を抽出し、遺伝子型決定により *Apc^{Min/+}*マウス、*Apc^{+/+}*マウスの判定を行った。定期的にマウスの様子を確認し、衰弱していないか観察を行った。マウスを 19～24 週齢まで飼育後、屠殺、解剖を行い、小腸を採取した。採取した小腸は、その後、アルカリフオスファターゼ染色を行った。また、腫瘍は、実体顕微鏡下でピンセットを用い、1 つずつ採取を行い、凍結保存した。

2. 放射線発がんにおけるがん微小環境の役割

①培養細胞株と培養条件:ヒト由来正常線維芽細胞株 (MRC-5、TIG-3) は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団より購入した。細胞は、MEM (ナカライ社) に 10%ウシ胎児血清と抗生物質を添加した培養液を用いて、37℃、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、維持した。

②照射条件:照射には、国立保健医療科学院に設置されたエックス線照射装置(日立、MBR-1505R2)または、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 Gammacell® 40 Exactor(Best™ Theratronics 社(¹³⁷Cs 線源、線量率:~0.9 Gy/min))を用いて、高線量率(0.7 Gy/min)の急性照射と長期分割照射(1回当たり0.01 Gy または、0.05 Gy の照射を週に5日間 1か月間:累積線量 0.46 Gy または、2.3 Gy)を行った。低線量率の慢性照射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低線量率ガンマ線照射装置を利用し、20 mGy または、500 mGy/day の線量率で5日間行い 累積線量 0.1 Gy または、2.5 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)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100個以上の細胞を観察し、 α -SMA で染色される陽性細胞を目視により判断してその頻度を求めた。

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、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

①ヒト iPS 細胞と培養条件:本実験には正常ヒト iPS 細胞株 Human Episomal iPSC Line (hiPSC) (ThermoFisher Scientific)を用いた。hiPSC の培養には Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System(タカラバイオ)を用い、ガンマ線の持続照射中を含めて 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で維持した。

②hiPSC のゲノム編集:CRISPR-Cas9 システムと遺伝子導入装置 NEPA21 (Nepagene) によるエレクトロポレーション法を用いて、hiPSC の *apc* 遺伝子および *p53* 遺伝子のゲノム DNA の編集を行った。エレクトロポレーションでは、Poring Pulse 条件は、電圧 125 V、パルス幅 5 ms、パルス間隔 5 ms、回数 ± 2 回、減衰率 10%、極性+/-を、Transfer Pulse 条件は、電圧 20 V、パルス幅 50 ms、パルス間隔 50 ms、回数 ± 5 回、減衰率 40%、極性+/-を用いた。CRISPR-Cas9 システムのリコンビナント Cas9 には、Alt-R® S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3 (Integrated DNA Technologies)を用い、それぞれの遺伝子に対する guide RNA として、*apc* 遺伝子に対しては Alt-R® CRISPR-Cas9 sgRNA (Integrated DNA Technologies)、*p53* 遺伝子に対しては TrueGuide gRNA (ThermoFisher Scientific)を購入して用いた。標的部位の一塩基置換細胞の作製には、それぞれの遺伝子配列に対する 90 mer の一本鎖 DNA(ssDNA) (Integrated DNA Technologies)を合成し、Cas9 とそれぞれの guideRNA と共に hiPSC に導入した。TP53 遺伝子欠失 hiPSC は、TP53 遺伝子のゲノム配列の exon 5-6 に抗生物質耐性遺伝子の挿入を行うことによって作製した。部分的ゲノム DNA 配列で挟まれた

Blasticidin あるいは Puromycin に対する耐性遺伝子をコードするプラスミドから精製した一本鎖 DNA を CRISPR-Cas9 と共に hiPSC に導入し、それぞれの薬剤に対する耐性の獲得を指標に *TP53* 遺伝子を欠失した hiPSC の樹立を行った。

③イメージング解析:ガンマ線照射した細胞を 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 (ThermoFisher Scientific、1:2000)を用いて蛍光免疫染色を行った。細胞核を Hoechst33342 (ThermoFisher Scientific)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。データ画像を画像解析ソフト Harmony (PerkinElmer)を用いて、蛍光強度のデータから各解析を行った。また、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

①培養細胞株と培養条件: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)、及び正常人由来繊維芽細胞 48BR (テロメララーゼ導入して不死化した細胞)は、37°C、5% CO₂ の条件で培養した。

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)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。

(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したがい、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異なる線量率の放射線発がん実験:DDREF=2 の妥当性の検討を行うため、*Apc^{Min/+}*マウスに総線量 100 mGy (線量率 50 mGy/day (低線量率低線量)、262 Gy/day (高線量率低線量)) のガンマ線

照射を行った。マウスを屠殺し、解剖を行い、末梢血および小腸を採取した。貧血の程度を測定するため、末梢血を用いて、全自動血球計数装置 PCE-310 (ERMA)にて Hgb 値を計測した。その結果、非照射群における Hgb 値の平均は、 13.5 ± 2.3 g/dL であったが、低線量率低線量照射群では、 11.7 ± 2.3 g/dL、100 mGy 高線量率低線量照射群では 10.8 ± 2.1 g/dL といずれも非照射群と比較して有意に Hgb 値が低下した (表 III-1)。

次に、採取した小腸を用いて、アルカリフォスファターゼ染色を行い、実体顕微鏡下で観察を行った。非照射群では、マウス 1 匹あたりの腫瘍数の平均が 10.3 ± 4.0 であったのに対し、低線量率低線量照射群では、 12.6 ± 3.9 、高線量率低線量照射群では 14.5 ± 7.2 といずれも非照射群と比較して有意にマウス 1 匹あたりの腫瘍数が増加した (表 III-1)。また、低線量率低線量照射群と比較して、高線量率低線量照射群の方が、マウス 1 匹あたりの腫瘍数が多い結果が得られた。

表 III-1 異なる線量率の放射線発がん実験結果

Dose	Dose rate	No. of Mice	Hgb (g/dL)	No. of tumors/ mouse
0 mGy	-	30	13.5 ± 2.3	10.3 ± 4.0
100 mGy	50 mGy/day	24	11.7 ± 2.3 **	12.6 ± 3.9 *
100 mGy	262 Gy/day	18	10.8 ± 2.1 **	14.5 ± 7.2 **

* $p < 0.05$ vs 0 mGy, ** $p < 0.01$ vs 0 mGy

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。被ばく時年齢が発がんリスクに影響を及ぼすのであれば、線量率効果を議論する上で照射時期、照射期間を共に考慮する必要があるといえる。そこで、*Apc^{Min/+}*マウスを用いて被ばく時年齢が発がんリスクに及ぼす影響を調べた。*Apc^{Min/+}*マウスの生後、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た。その結果、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。一方、生後 61 日目にガンマ線照射を行った群では、非照射群と比較して、有意な腫瘍数の増加は観察されなかった。

2. 放射線発がんにおけるがん微小環境の役割

発がんには、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であると考えられている。がん微小環境の構成因子である線維芽細胞は正常線維芽細胞とは異なり CAF と呼ばれ、液性因子を放出してがん細胞の増殖を促進する^{4,5)}。しかし、放射線発がんにおける CAF の役割は、十分にわかっていないのが現状である。そこで、ヒト正常線維芽細胞を用いて、放射線感受性と CAF 誘導との関係について調べた。放射線照射前に ATM 阻害剤 (KU55933)、DNA-PK 阻害剤 (NU7026)、AKT 阻害剤 (API-2) を処理し、蛍光免疫染色法により α -SMA 陽性細胞を測定し、放射線照射による CAF 発生頻度を計測した(図 III-1)。その結果、ATM 阻害剤処理では、放射線による CAF の誘導が抑制された一方、DNA-PK 阻害剤と AKT 阻害剤では、2.5Gy の照射で活性酸素の増加と CAF の誘導が観察された(図 III-1)。以上より、DNA-PK 阻害剤と AKT 阻害剤は、放射線感受性を増加するだけでなく、放射線誘発 CAF のしきい線量を低くすることを明らかにした。また、ウェスタンブロッティング法を用いたタンパク質発現解析においても、同様の結果が得られた。

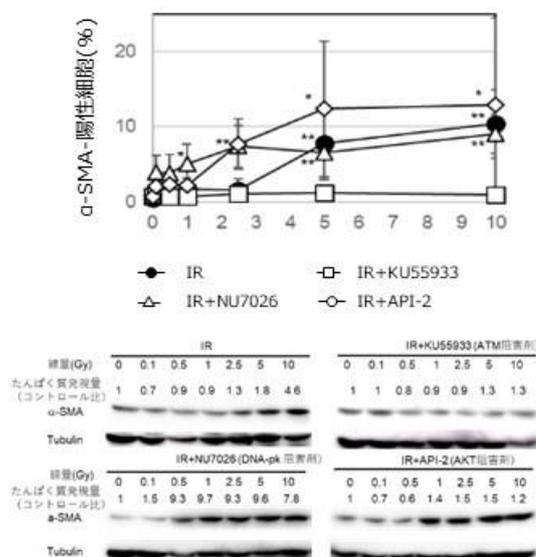


図 III-1 放射線感受性と CAF の誘導 ATM 阻害剤(KU55933)、DNA-PK 阻害剤(NU7026)、AKT 阻害剤(API-2)存在下、放射線照射による CAF 発生頻度を α -SMA を指標に検出した (上: 蛍光免疫染色法、下: ウェスタンブロッティング法)

3. 線量率効果を規定する因子のスクリーニング

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、変異アレルの存在に伴って正常アレルの消失すること、すなわち LOH が、がん化に寄与すると考えられる。我々は、*Apc*^{Min/+} マウスを用いた解析から、染色体組み換えによる LOH が線量率効果に関与する知見を得ている。そこで、ヒト幹細胞において染色体組み換えによる LOH を検出するシステムの構築を行った。

- ① 染色体組み換え LOH 検出系の構築:がんは、ヒトを構成する各組織の幹細胞から生じる。そこで、

本研究では、幹細胞のモデル細胞として、細胞の培養が比較的容易であるヒト正常細胞由来の iPS 細胞株 (hiPSC) を用いて、放射線照射によって生じる LOH 検出することが可能な実験系の構築を行った。まず、がん抑制遺伝子である *APC* 遺伝子、*TP53* 遺伝子に着目し、hiPSC から CRISPR-Cas9 システムを用いて、*APC* 遺伝子、*TP53* 遺伝子の片側アレルに変異を持つ hiPSC-*APC*^{del/+} (codon 852/Leu TTG>TAG nonsense mutation STOP codon mutant) あるいは、hiPSC-*TP53*^{del/+} (codon 176/Cys TGC>TGA nonsense mutation STOP codon mutant 又は deletion mutant) の作製を試みた (図 III-2)。その結果、*APC* 遺伝子と *TP53* 遺伝子の片アレルにのみ点変異を誘発した hiPSC を樹立することは困難であったが、*TP53* 遺伝子欠失のヘテロ接合体 TP53hiPSC-*TP53*^{del/+} (hetero-deletion mutant) と実験のコントロールとして用いるホモ接合体 hiPSC-*TP53*^{del/del} (homo-deletion mutant) を得ることに成功した。

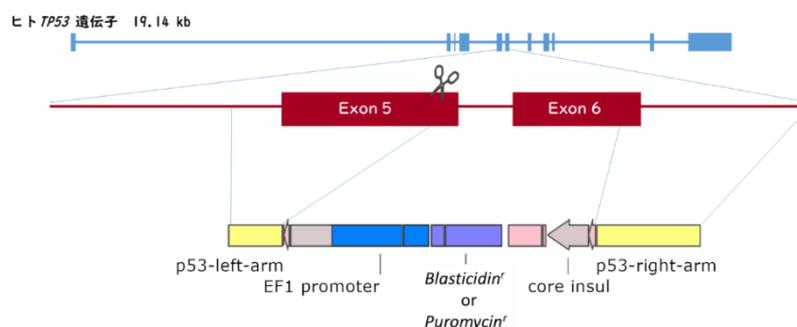


図 III-2. CRISPR-Cas9 を用いた hiPSC-*TP53*^{del/+} (deletion mutant) のゲノム編集の設計図 ヒト *TP53* 遺伝子のゲノムの exon-intron map (青線) に対する Cas9 と guideRNA による *TP53* の Exon 5 内 (茶色) の切断位置 (ハサミの絵) と薬剤耐性遺伝子 (*blastidicin^R* または *puromycin^R*) を含む挿入 DNA フラグメントの構造を示す。

②LOH 解析法の構築: ①の実験によってヘテロ接合体の hiPSC-*TP53*^{del/+} が得られたことから、引き続き、hiPSC-*TP53*^{del/+} に生じる *TP53* 遺伝子の LOH を検出する方法の構築を行った。まず、両アレルに正常 *TP53* 遺伝子を持つ hiPSC と、hiPSC-*TP53*^{del/+}、hiPSC-*TP53*^{del/del} について、TP53 タンパク質の細胞の免疫蛍光染色を行った。その後、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、画像解析により、野生型、欠失変異ヘテロ接合体、欠失変異ホモ接合体それぞれを識別できることが明らかとなった (図 III-3)。

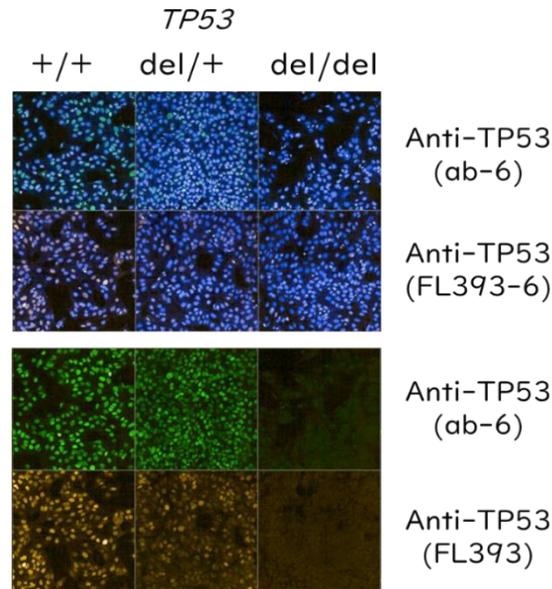


図 III-3. hiPSC-*TP53*^{del/+}と全自動蛍光画像撮影解析装置 OperaPhenix を用いた LOH 検出に用いる免疫蛍光染色画像 hiPSC-*TP53*^{+/+} (野生型、+/+), hiPSC-*TP53*^{del/+} (欠失変異ヘテロ接合型、del/+), hiPSC-*TP53*^{del/del} (欠失変異ホモ接合型、del/del) の二重免疫蛍光染色画像。Hoechst33342 での核染色 (青)、TP53 タンパク質を認識する一次抗体 (ab-6: mouse-monoclonal 抗体、FL393: rabbit-polyclonal 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) で免疫蛍光染色を行った。

4. 放射線感受性の個人差の課題の検討

昨年度の解析から、ATM 阻害剤 (KU55933) を照射開始前に処理した場合、低線量率ガンマ線照射した細胞のみで有意な微小核頻度の増加が検出された。ATM は DNA 損傷誘導時だけでなく、H₂O₂ 処理など酸化ストレス誘導処理時にも活性化することが知られている⁶⁾。昨年度の研究から低線量率照射時には酸化ストレス応答が活性化されることが示唆されたことから、ATM は低線量率照射時の酸化ストレス応答にも役割を果たすことが考えられた。それゆえ、ATM 阻害剤処理による酸化ストレスの増強の有無について、48BR 細胞を用いてウェスタンブロット法で検討を行った (図 III-4)。

ATM 阻害剤処理を行うと、低線量率照射では酸化ストレス応答活性化のマーカである p38MAPK と AMPK α のリン酸化がともに増加していた。また、TP53 は放射線誘発 DNA 損傷発生時に活性化される ATM によりリン酸化されて増加する報告にあるとおり、高線量率照射では ATM 阻害で著しく TP53 は減少するが、低線量率照射では減少しなかった。このことは TP53 が低線量率照射時には ATM のリン酸化にはあまり依存せず、酸化ストレスに応答して増加することを示唆している。DNA 二本鎖切断損傷のマーカである γ -H2AX は主に ATM のリン酸化に依存しており、高線量率照射では阻害剤添加で減少したが、低線量率照射では阻害剤添加により増加しており、これは昨年度の研究から見いだした γ -H2AX 陽性微小核が増加することと一致している。これらの結果から、ATM キナーゼの阻害は低線量率照射時に酸化ストレス応答を増強し、 γ -H2AX も増加させることが明らかとなった。

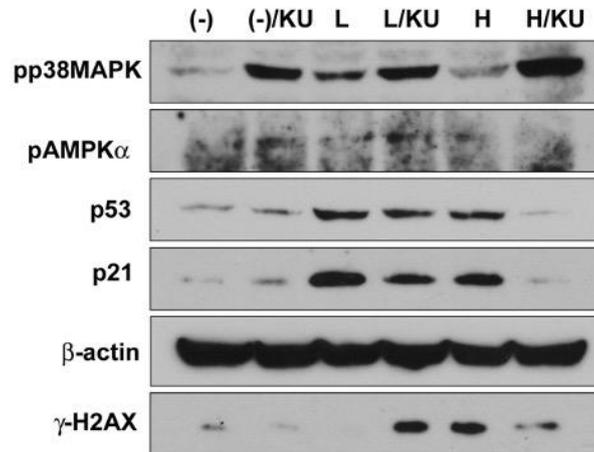


図 III-4 48BR 細胞における ATM 阻害時のウェスタンブロット解析 低線量率(L)あるいは高線量率(H)ガンマ線照射終了 30 分後に細胞を回収して、ウェスタンブロット法で解析を行った。KU は ATM キナーゼ阻害剤 KU55933 添加を示す。

IV. 考察

本研究では、放射線発がん高感受性モデルマウスを用いて、線量率の異なる条件下で放射線発がん実験を行い、DDREF 値の算定とその数値の妥当性、多様性の検討を行う。さらに、ヒト正常細胞を用いて、放射線発がんに関与すると考えられる細胞応答に着目し、DDREF 値の多様化に寄与する候補因子の同定を目指す。

まず、線量率の違いによる放射線発がんリスクへの影響を調べるため、ヒト大腸がんモデルマウスとして知られている *Apc^{Min/+}*マウスに着目した。我々はこれまでの研究により、*Apc^{Min/+}*マウスが放射線に高発がん性であるという知見を得ている。また、遺伝的背景の異なる *Apc^{Min/+}*マウスを用いて線量率の異なる放射線発がん実験を行った結果、遺伝的背景が *Apc^{Min/+}*マウス小腸腫瘍における線量率効果に影響を与えるという知見を得ている。そこで本研究では、線量率効果が検出でき、かつ、遺伝子変異解析を行うことのできる *Apc^{Min/+}*マウスを用いて、総線量を 100 mGy とし、高線量率および低線量率放射線発がん実験を開始した。その結果、高線量率および低線量率群どちらも、非照射と比較して有意な腫瘍の増加が観察された。また、有意差は検出されなかったものの、低線量率照射群と比較して高線量率照射群の方が、マウス 1 匹あたりの腫瘍数が多い結果が得られた。すなわち、放射線高感受性 *Apc^{Min/+}*マウスを用いることにより、100 mGy という低線量域においても、線量率効果が検出できた。得られた腫瘍は凍結保存を行っているため、来年度は、得られた腫瘍を用いた遺伝子変異解析を行っていきたいと考えている。更に、これまでに得られた遺伝的背景の異なる *Apc^{Min/+}*マウスを用いた放射線発がん研究結果を基に、DDREF 値の算定とその数値の妥当性、多様性の検討を行う予定である。

また、原爆被ばく者の疫学研究結果から、若年期の発がんリスクが高いことが報告されている。このことは、被ばく時年齢が DDREF 値に影響を及ぼすことを示唆する。そこで、本年度は、*Apc^{Min/+}*マウスを用いて、異なる週齢のマウスにガンマ線照射を行い、腫瘍数の計測を行った。その結果、生後 2~3 週齢と

いった若年期マウスにおける被ばくは、成人期と比較して放射線発がんリスクが高い結果が得られた。このことは、被ばく時期とその照射期間が、DDREF 値の多様化に影響を及ぼす重要な知見といえる。

得られたマウス個体レベルの結果をヒト発がんリスクへ外挿するためには、ヒト放射線発がんの分子機構解明や、DDREF 値の多様化に寄与する候補因子の同定が必要といえる。そこで、ゲノム DNA 損傷応答、ミトコンドリア損傷応答、CAF 誘発等に着目した放射線応答解析を行った。その結果、DNA-PK や AKT を抑制することにより、より低い線量域で放射線照射による CAF が誘導されることを明らかにした。DNA-PK や AKT 阻害により、DNA 損傷シグナルが持続し、その損傷シグナルがミトコンドリアに伝わり、CAF の誘導を促進すると考えられる。また、ATM を抑制することにより、放射線照射時により酸化ストレスが増大することが明らかにされた。昨年の結果とあわせることにより、ATM は、低線量率放射線照射により誘導される酸化ストレスを抑制することにより、ゲノムの安定化に関与すると考えられる。これらの結果から、DNA-PK、AKT、ATM が、DDREF 値の多様化に寄与する候補因子であると考えられる。すなわち、DNA-PK、AKT、ATM に変異があるヒト集団は、低線量・低線量率放射線発がんにはハイリスクを示す可能性がある集団であることが示唆される。この点については、来年度以降、詳細な解析を行う必要があると考える。線量率効果を規定する因子のスクリーニングでは、hiPSC を用いて、染色体組み換えによる LOH を検出するための *TP53* 遺伝子欠失 hiPSC のヘテロ接合型、ホモ接合型を作成することに成功した。また、抗 *TP53* 抗体を用いた LOH 検出のためのイメージング解析法が確立できたことから、令和 2 年度、最終年度には、持続放射線照射による LOH に関わる因子のスクリーニングが可能であると考えている。

V. 結論

現在、低線量・低線量率放射線被ばくの影響は未解明の部分が多く残されている。そのため、低線量・低線量率放射線発がんのリスク評価には、DDREF を用いたリスク推定が行われている。この 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。

そこで本年度は、放射線発がんを高感受性を示す *Apc^{Min/+}*モデルマウスを用いて、高線量率放射線被ばく及び、低線量率放射線被ばくによる発がん実験を行い、線量率の違いによる発がんリスクへの影響について解析を行うための発がん実験を行った。その結果、低線量域においても線量率効果が観察された。また、*Apc^{Min/+}*マウスを用いて、被ばく時年齢が放射線発がんリスクに影響を及ぼすことを明らかにした。このことは、被ばく時期、その被ばく期間が、DDREF 値の多様性に寄与する重要な知見といえる。

ヒト正常細胞を用いて、DNA 損傷、ミトコンドリア損傷、CAF 誘導に着目した放射線応答解析から、DNA-PK、AKT、ATM が DDREF 値の多様化に寄与する因子である事を示唆する結果が得られた。また、また、hiPSC を用いて、染色体組み換えによる LOH を検出するための *TP53* 遺伝子欠失のヘテロ接合型とホモ接合型を作成し、LOH 検出のイメージング解析法を確立した。

VI. 次年度以降の計画

今年度の放射線発がん実験により腫瘍の凍結保存を行った。次年度は、その得られた腫瘍を用いて遺伝子変異解析を行う。また、これまでの遺伝的背景の異なる *Apc^{Min/+}*マウスを用いた放射線発がん実

験結果をまとめ、DDREF 値の策定とその数値の妥当性を検討するとともに、DDREF 値に影響を及ぼす因子について検討する。

放射線発がんにおけるがん微小環境の役割については、酸化ストレスが放射線発がんにどのように寄与するのかを、がんの微小環境の役割に注目して解析を行う。特に、放射線が活性酸素を増加するメカニズムに着目し、放射線による活性酸素の除去機構への影響を解析する。

線量率効果を規定する因子のスクリーニングについては、今年度構築した検出系を用いて、MDM2-P53 結合阻害剤 Nutlin-3 やプロテアソーム阻害剤 MG132 の低濃度処理を行うことによって、片アリルに TP53 を持つ細胞において TP53 タンパク質の蓄積を誘導し、両アリル欠失した細胞との発現量の差を明確にすることで、より高感度な検出系として改良を試みる。また、siRNA ライブラリを用いて異なる線量率のガンマ線照射によって生じる(染色体)組み換え頻度を規定する遺伝子(LOH の頻度が上がる遺伝子)のスクリーニングを行う。

放射線感受性の個人差の課題の検討については、放射線感受性の個人差の DDREF の影響の微小核形成を指標とした検討として、①ATM キナーゼを特異的阻害剤で抑制した条件下で、様々な線量率で γ H2AX 陽性微小核の形成率を測定し線量率効果を明らかにする、②ATM 阻害剤の添加濃度を複数設定して部分的に活性抑制した場合、キナーゼ活性レベルと微小核形成頻度の関係を検討することによって、DDREF 算定に影響しうる個人差要因の解明を目指す。さらに、ATM キナーゼ抑制下における低線量率放射線のミトコンドリア応答への影響を MitoTracker を用いたミトコンドリア動態・分布の解析、マイトファジー関連因子を指標としたウエスタンブロット解析を行い、DDREF 算定に影響しうる個人差要因の指標となり得るか、検討する。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 論文:査読あり

- 1) Elena Zaharieva, Megumi Sasatani, Kenji Kamiya, DNA damage and oxidative stress in primary murine fibroblasts subjected to acute or chronic gamma radiation, 広島医学, *in press*

B. 論文:査読なし

なし

C. 国内学会発表

- 1) Elena Zaharieva, Megumi Sasatani, Kenji Kamiya, DNA damage and oxidative stress in primary murine fibroblasts subjected to acute or chronic gamma radiation, 第 60 回原子爆弾後障害研究会, 2019.6.1
- 2) 笹谷めぐみ, 土居主尚, 飯塚大輔, 神谷研二, Elucidation of radiation-induced tumor risk at low doses and low dose rates by using *Apc^{Min/+}* mice, 日本放射線影響学会第 62 回大会, 2019.11.16
- 3) 笹谷めぐみ, 飯塚大輔, 河合秀彦, Zaharieva Elena, 神谷研二 *Apc^{Min/+}*マウスを用いた

放射線誘発小腸腫瘍形成の機構解明, 日本環境変異原学会第 48 回大会, 2019.11.18

D. 国際学会発表

- 1) Elena Zaharieva, Megumi Sasatani and Kenji Kamiya, Effects of dose rate on the radiation response of primary fibroblasts, 16th International Congress of Radiation Research (ICRR2019), 2019.8.25-29
- 2) Tsutomu Shimura, Megumi Sasatani, Hidehiko Kawai, Kenji Kamiya and Akira Ushiyama, The role of cancer-associated fibroblasts on radiation-induced cancer. The 4th international symposium of the network-type joint usage/research center for radiation disaster medical science, 2020.2.12.
- 3) Kobayashi J, Meng Q, Komatsu K. Relationship between endogenous ROS accumulation and mitochondria responses under low dose rate irradiation. The 4th International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science, 2020.2.12
- 4) Megumi Sasatani, Elena Zaharieva, Kenji, Kamiya, The effect of dose rate on intestinal adenoma development in *Apc^{Min/+}* mice, 4th International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science, 2020.2.12
- 5) Elena Zaharieva, Megumi Sasatani, Kenji Kamiya, Response of primary murine fibroblasts to low-dose-rate versus acute gamma radiation exposure, The Joint Workshop of QST-NIRS, CEA and IRSN, 2019.10.28-29
- 6) Meng Q, Kobayashi J. The relationship between oxidative stress and mitochondria change under low-dose rate irradiation. The Joint Workshop of QST-NIRS, CEA and IRSN. 2019.10.28-29

E. 著書

なし

F. 講演

- 1) 笹谷めぐみ, *Apc^{Min/+}*マウスを用いた低線量・低線量率放射線発がんリスク評価, 第 56 回アイソトープ・放射線研究発表会, 2019.7.4
- 2) 小林純也, 低線量率放射線生物影響における酸化ストレス・ミトコンドリア応答の役割. 基研研究会「放射線の生体影響解明への分野横断による挑戦」, 2019.5.23-25

G. 主催した研究集会

- 1) 日本放射線影響学会にて「integration of multiple, trans-disciplinary approaches for the elucidation of the effects of low dose/low dose rate radiation」というタイトルで

international symposium を主宰

H. 特許出願・取得

1)

I. その他

1)

VIII. 参考文献

- 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) Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2016; 16(9): 582-98.
- 5) Kalluri, R, Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer.* 2006; 6(5): 392-401.
- 6) Guo Z Kozlov S Lavin MF, et al. ATM activation by oxidative stress. *Science* 2010; 330: 517-521.
- 7) Shimura, T, Sasatani, M, Kawai, H, et al. ATM-mediated mitochondrial damage response triggered by nuclear DNA damage in normal human lung fibroblasts. *Cell Cycle.* 2017.

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

Departments of Experimental Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University¹, Department of Environmental Health, National Institute of Public Health², Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University³, Radiation Biology Center, Graduate School of Biostudies, Kyoto University⁴

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. 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. 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.

2-4 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

分担研究者： 志村 勉（国立保健医療科学院）

研究要旨

酸化ストレスは、加齢に伴う様々な疾患（老化、がん、生活習慣病など）の原因である。放射線が誘発するがんにおいても、活性酸素による酸化ストレスが深く関与することが考えられる。内在性の活性酸素はミトコンドリアが発生源で、スーパーオキシドディスムターゼや細胞内の抗酸化物質グルタチオンなどの活性酸素除去機構により無毒化され、細胞内の酸化還元状態（レドックス）の恒常性が維持されている。しかし、長期放射線照射による慢性のストレス刺激では、過剰な活性酸素が発生し、発生源のミトコンドリアに酸化損傷を誘導する。がん組織に存在する線維芽細胞は、正常線維芽細胞とは性質が異なりがん関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblasts:CAF)と呼ばれ、がん細胞の増殖や浸潤に関わる。これまでの我々の解析から、放射線はヒト正常線維芽細胞から CAF を誘導すること。放射線誘発 CAF は、ミトコンドリアから発生する活性酸素が主な原因であり、がんの微小環境を形成して放射線発がんに関与することを明らかにした (Shimura et.al., Molecular cancer research 2018; 16(11), 1676-1686)。以上より、放射線発がんにはがん細胞の遺伝子変異だけでなく、ミトコンドリア酸化ストレスが重要で、がん細胞と周りの細胞との相互作用によるがん微小環境の形成が深く関与していると考えられる。昨年度までに、CAF の指標である平滑筋用アクチン (alpha-SMA)の発現解析により、放射線の照射条件（急性照射、長期分割照射と慢性照射）で CAF の誘導のしきい線量が異なることを明らかにした。長期分割照射では、急性照射に比べてより低い線量で活性酸素が発生し、CAF を誘導することを明らかにした。今年度は、特に、放射線誘発 CAF の寿命に着目し、放射線誘発 CAF の除去機構を解析した。本研究のがんの微小環境の解析により、従来の方法では解析困難であった放射線によるがんの発症メカニズムの解明が期待される。以上より、放射線発がんの機序を理解し、線量・線量率効果 (DDREF)について検討する。

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

I. 研究目的

国際機関（世界保健機構（WHO）や国連科学委員会（UNSCEAR））の被ばく線量推計及び健康リスク評価では、一般公衆の福島原発事故に関する被ばく線量は限定的で、放射線に関連する疾患の過剰発症は検出されないと報告されている。しかし、一般に放射線被ばくによる発がんの不

安は大きく、二字的な健康被害が問題となっている。このため放射線の不安対策として、科学的根拠に基づく放射線リスク評価が求められている。ヒトの放射線影響は、広島・長崎原爆被爆者の疫学調査から、被ばく線量の増加とともにがんの罹患率が増加することが報告されている。しかし、100mSv以下の低線量放射線では、疫学調査でがんのリスクの有無の判断は困難である。福島原発事故では、原爆被爆のような高線量率の急性被ばくではなく、低線量率の慢性被ばくが想定されるため、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。DDREF を考慮する上で、がんの発症機構の理解は不可欠である。

我々は、放射線発がんには、単にがん細胞の遺伝子変異の蓄積だけでなく、がん細胞と周辺部の細胞の相互作用（がん微小環境）の形成も重要であると考え。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、液性因子を放出してがん細胞の増殖を促進する(1,2)。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。これまでのヒト正常線維芽細胞 MRC-5, TIG-3 を用いたヒトがん移植片の解析から、一か月間の長期分割照射により CAF を誘導することを報告した。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-beta (TGFbeta) シグナル経路の活性化が関与することを明らかにした(3)。本研究では、放射線で誘発される CAF の照射条件や、CAF 形成の分子機構を明らかにし、放射線発がんの原因となる標的分子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 alpha-minimum essential medium (alpha-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（0.7Gy/min）の急性照射と長期分割照射（1回当たり 0.01Gy または、0.05Gy の照射を週に 5 日間 1 か月間：累積線量 0.46Gy または、2.3Gy）を行った。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、25mGy または、625mGy/day の線量率で 4 日間行い 累積線量 0.1Gy または、2.5Gy の照射を行った。

3. 無血清培地・低血清培地を用いた細胞増殖の抑制： 2×10^5 個の細胞を、60mm 細胞培養器に準備し、24 時間後に 10%血清の通常培地から、0%または、0.5%FBS 入りの培地に置換し、さらに 24 時間培養した。X 線を急性照射し、24 時間の細胞数を血球計算板で計測した。

4. 蛍光免疫染色法：細胞を照射から 24 時間後に固定して、alpha-SMA の抗体(シグマ社)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 100 個以上の細胞を観察し、alpha-SMA で染色される陽性細胞を目視により判断してその頻度を求めた。

5. ウェスタンブロッティング法：放射線照射 24 時間後に細胞の抽出液を回収した。alpha-SMA (A2547, Sigma) と beta-tubulin (10068-1-AP, Proteintech) に対する一次抗体と horseradish peroxidase を標識した二次抗体 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いて目的のたんぱく質の検出を行った。たんぱく質のバンドは Chemi-Lumi One L Western blotting substrate (Nacalai Tesque) で発色し、バンドの強度を Image Lab software (Bio-Rad)を用いて検出した。alpha-SMA の発現レベルは beta-tubulin の発現量で補正し、数値は、コントロールを 1 とした比で示した。

6. MTT assay：細胞増殖は Cell Counting Kit-8 assay (Dojindo, Kumamoto Japan) を用いて、メーカーのプロトコールに従い実施した。

7. 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)

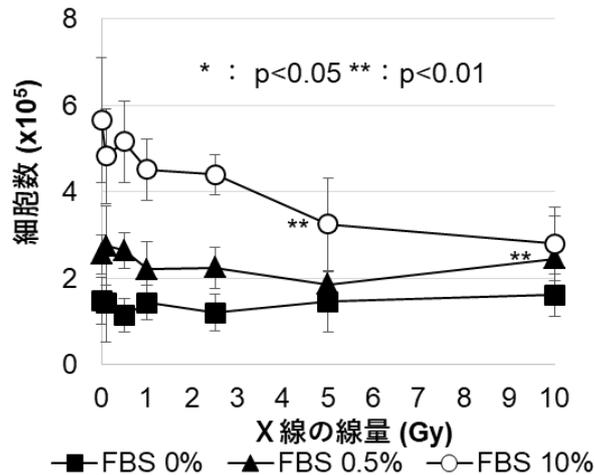
本申請研究では市販のヒト培養細胞を用いての解析であり、倫理委員会の審査は必要としない。

III. 研究結果

1. 無血清、低血清培地を用いた細胞増殖抑制による放射線誘発がん関連線維芽細胞への影響解析
昨年度までの CAF の指標である alpha-SMA の発現解析から、ヒト正常線維芽細胞 MRC-5, TIG-3 では、放射線照射により CAF が誘導されることを明らかにした。陽性細胞は細胞質が大きく扁形の形態を持ち、ファイバー状の alpha-SMA 染色パターンを示した。線維芽細胞は、生体内では増殖が活発でないことから、より生体内を反映した条件で放射線影響を検討するため、無血清培地または、低血清培地 (0%、または、0.5%FBS) を利用して、細胞増殖を抑制した。培地交換 24

時間後に細胞数を計測して、血清除去による細胞増殖への影響を検討した。通常の培養条件である 10%FBS では、5Gy 以上の高線量の放射線で、非照射コントロール細胞と比べて細胞増殖の抑制が観察された (図 III-1)。一方、無血清、低血清培地では、放射線照射の有無に関わらず細胞増殖が抑制された。

図 III-1 無血清、低血清培地を用いた細胞増殖の抑制



無血清、低血清培地で細胞増殖を抑制した状態で、放射線が CAF を誘導するかどうかを検討した。X 線の急性照射 24 時間後に細胞を固定して被ばく線量と alpha-SMA 発現誘導の相関関係を検討した。図 III-2 に示すように、TIG 細胞では、10%血清の培養条件、5Gy 以上の照射で非照射コントロールと比べ統計的に優位に alpha-SMA 陽性細胞が増加することを明らかにした。一方、無血清、低血清培地の培養条件では、0.1Gy の低線量放射線照射においても、alpha-SMA 陽性細胞が観察されることを明らかにした。

図 III-2 X 線照射による CAF の誘導

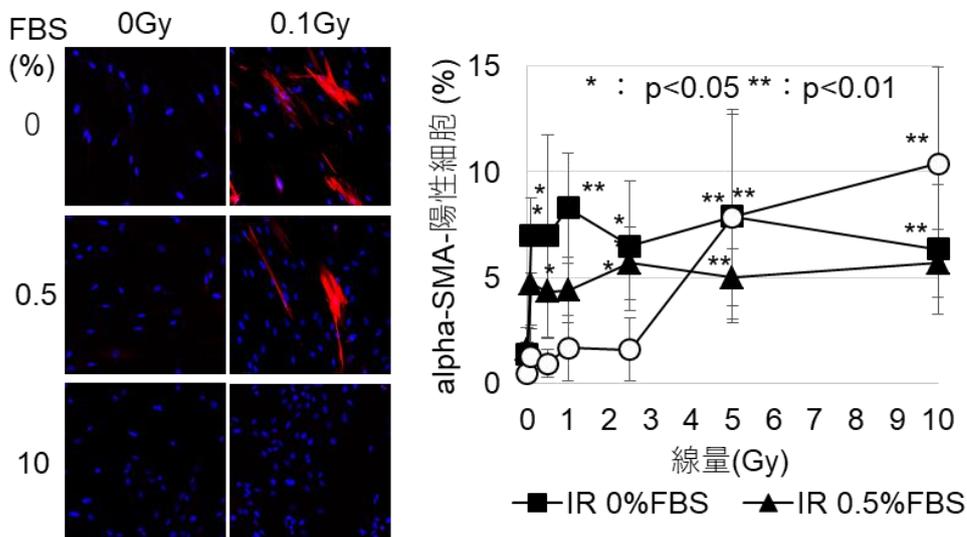
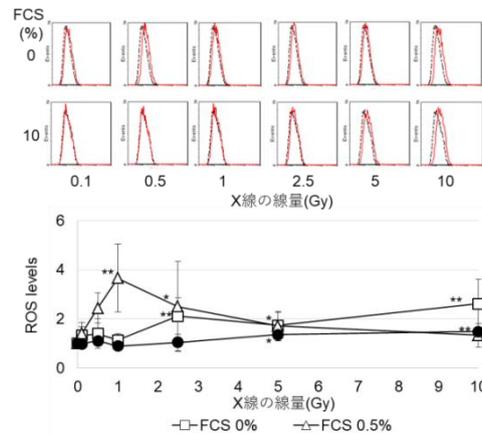


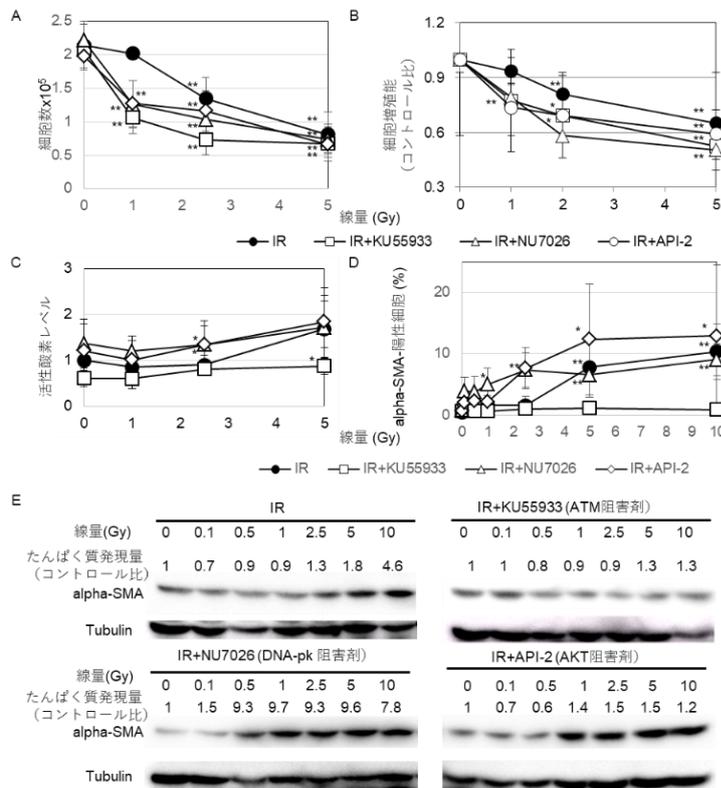
図 III 3 慢性照射による CAF の誘導



2. 活性酸素の発生

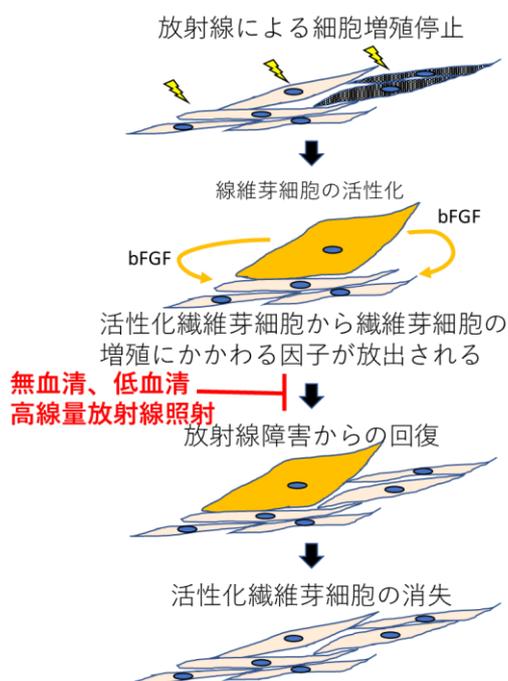
我々は、CAF の誘導にはミトコンドリアから発生する活性酸素が重要な役割を持ち、活性酸素が TGFbeta シグナル経路を活性化して下流の alpha-SMA の発現誘導を行っていることを明らかにしている(3)。このため、放射線による活性酸素の発生に、細胞増殖の抑制がどのように影響するのかを検討した。活性酸素 (ROS) レベルは、活性酸素を検出する DCFDA で染色し、FACSscan (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)で定量した。急性照射では、通常の 10%血清の培養条件、5Gy 以上の高線量照射で活性酸素量が増加する。一方、無血清、低血清培地で細胞増殖が制限されている場合は、低線量の放射線照射においても活性酸素量が増加する (図 III-3)。

図 III-4 放射線感受性と CAF の誘導



我々はさらに、細胞の放射線感受性と CAF 誘導との関係について調べた。放射線照射前に ATM 阻害剤 (KU55933)、DNA-PK 阻害剤 (NU7026)、AKT 阻害剤 (API-2) を処理して DNA 損傷応答を阻害することで、放射線単独処理よりも細胞増殖の抑制効果が増大することを明らかにした (III-4A, -4B)。ATM 阻害剤処理では、放射線による活性酸素の発生、CAF の誘導が抑制された (III-4C, -4D)。一方、DNA-PK 阻害剤と AKT 阻害剤では、2.5Gy の照射で活性酸素の増加と CAF の誘導が観察された (III-4C, -4D)。以上より、DNA-PK 阻害剤と AKT 阻害剤は、放射線感受性を増加するだけでなく、放射線誘発 CAF のしきい線量を低くすることを明らかにした。また、ウェスタンブロッティング法を用いたたんぱく質発現解析においても、放射線照射のみでは、alpha-SMA 発現増加は、5Gy 以上の高線量で観察され、DNA-PK 阻害剤または、AKT 阻害剤と放射線の併用では、より低い線量で観察された。しかし、ATM 阻害剤と放射線の併用の場合では、alpha-SMA 発現増加は観察されないことを明らかにした (III-4E)。

図 III-5 放射線誘発 CAF の除去機構



IV. 考察

国際機関の報告では、福島原発事故に関する一般の放射線被ばく量は少なく、放射線に関連する疾患の過剰発症は検出されないと報告されている。しかし、放射線被ばくに対する不安から、精神ストレスなどの二次的な健康被害が懸念されており、科学的根拠に基づく放射線リスクの評価と、放射線の健康影響に関する知識の普及など放射線不安対策が求められている。本研究では、放射線発がんの発症機構を理解するために、放射線発がんに関わる CAF の形成機構について詳細な解析を行った。筋線維芽細胞は活性化した線維芽細胞であり、組織の修復や再生に重要な働きを持っている。図 III-5 では、放射線照射後の線維芽細胞の活性化と回復を示す。放射線照射により誘導される活性化した線維芽細胞は、細胞外マトリックスの再構築や組織の線維化に関与して

いる。修復が完了すると、活性化された線維芽細胞は組織から除外され消失する。しかし、高線量の放射線照射では、不可逆的に細胞の増殖停止により回復が阻害され、活性化した線維芽細胞が少なくとも照射 24 時間後も残っている。無血清または、低血清の培養液を用いた培養条件で放射線傷害からの回復が阻害された場合でも同様に、活性化した線維芽細胞の除去が阻害されるため、低線量照射においても残存することが考えられる。この細胞はがん微小環境の形成に関与し、その場でがん細胞が増殖する場合には、CAF になると考えられる。

我々は、放射線感受性と放射線誘発 CAF の関係について調べた。ATM 阻害剤は、DNA 損傷応答を阻害し、放射線の増感効果を持つ。しかし、活性酸素の増加や CAF の誘導は観察されない。これまでの解析から、ATM は DNA 損傷応答だけでなく、ミトコンドリアの放射線応答においても重要であることを明らかにしている。ATM の欠失により、放射線によるミトコンドリアの活性化、活性酸素の発生、ミトコンドリア機能低下などのミトコンドリアの放射線応答が起こらない(4)。一方で、DNA-PK 阻害剤 (NU7026) と AKT 阻害剤 (API-2) は、放射線の増感効果だけでなく、CAF の誘導を促進する。DNA 修復や生存シグナルの阻害により DNA 損傷シグナルは持続し、損傷シグナルがミトコンドリアに伝わり、放射線応答を誘導する。ミトコンドリアの活性化により活性酸素が増加し、CAF の誘導を促進することが考えられる。

間質細胞 (線維芽細胞) の変化が、放射線発がんのカギとなることが考えられる。放射線誘発 CAF を標的とした放射線発がんの抑制が考えられる。我々はこれまで、抗酸化剤として N アセチルシステイン、エピカテキン、アスコルビン酸 は放射線が誘導する活性酸素の除去に有効であることを示している(5)。これらの阻害剤は、ミトコンドリアを酸化ストレスから防護し、CAF の誘導、微小環境の形成を抑え、放射線発がんの抑制効果が期待される

V. 結論

本研究の成果により、放射線照射後の増殖回復は活性化した線維芽細胞の除去に必要であることを明らかにした。活性酸素は放射線誘発 CAF の原因であるため、抗酸化剤は放射線発がんを抑制し、放射線防護効果が期待される。

VI. 次年度以降の計画

本研究の最終年度では、酸化ストレスが放射線発がんにどのように寄与するのかを、がんの微小環境の役割に注目して解析を行う。特に、放射線が活性酸素を増加するメカニズムに着目し、放射線による活性酸素の除去機構への影響を解析する。以上より、放射線発がんの機序を理解し、線量・線量率効果(DDREF)について検討する。

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

C 学会発表

1) Tsutomu Shimura, Megumi Sasatani, Hidehiko Kawai, Kenji Kamiya and Akira Ushiyama The role of cancer-associated fibroblasts on radiation-induced cancer. The 4th international symposium of the network-type joint usage/research center for radiation disaster medical science.: 2020;.2. P.59.

VII. 参考文献

- 1) Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2016; 16(9): 582-98.
- 2) Kalluri, R, Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2006; 6(5): 392-401.
- 3) Shimura, T, Sasatani, M, Kawai, H, et al. Radiation-Induced Myofibroblasts Promote Tumor Growth via Mitochondrial ROS-Activated TGFbeta Signaling. *Molecular cancer research : MCR*. 2018; 16(11): 1676-86.
- 4) Shimura, T, Sasatani, M, Kawai, H, et al. ATM-mediated mitochondrial damage response triggered by nuclear DNA damage in normal human lung fibroblasts. *Cell Cycle*. 2017; (24):2345-2354
- 5) Shimura, T, Koyama, M, Aono, D, et al. Epicatechin as a promising agent to countermeasure radiation exposure by mitigating mitochondrial damage in human fibroblasts and mouse hematopoietic cells. *FASEB journal*. 2019; 33 (6), 6867–6876

Analysis of the role of the tumor microenvironment on radiation-induced carcinogenesis

Tsutomu Shimura

1 Department of Environmental Health; National Institute of Public Health 2-3-6 Minami; Wako, Saitama,
351-0197, Japan

Key word: Radiation-induced carcinogenesis, tumor microenvironment, ROS, Cancer-associated fibroblasts

Abstract

Fibroblasts are cells in connective tissue that contribute to the synthesis and deposition of extracellular matrix (ECM) to induce changes in the tissue microenvironment. Cancer-associated fibroblasts (CAFs), which are related to myofibroblasts, are an activated form of fibroblasts in tumor tissues, are distinguishable from their normal counterparts. CAF control the release of paracrine signals that promote tumor growth and cancer cell aggressiveness, such as tumor angiogenesis, extracellular matrix remodeling, tumor proliferation, invasion, and metastasis. Expression of alpha-SMA characterizes fibroblast-to-myofibroblast differentiation. However, the role of tumor microenvironments in radiation-induced carcinogenesis is not well understood.

Oxidative stress is associated with increased risk of various diseases, including vascular disease, neurodegeneration, aging, and cancer. While low reactive oxygen species (ROS) levels of non-transformed cells originate from cytosolic membrane nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate reduced form (NADPH) oxidase, elevated ROS levels in transformed cells have mitochondrial origin. ROS play a pivotal role in the process of myofibroblast induction in normal tissue injury. We here investigated the threshold dose and the mechanisms of myofibroblast induction to assess adverse radiation effects on normal cells.

Upon acute single radiation to human normal fibroblasts, myofibroblast induced by irradiation with high doses (>5 Gy). In contrast, fractionated radiation, which is used for radiotherapy in cancer treatment, lowered the threshold for myofibroblast induction compared with single radiation. ROS play a pivotal role in the process of myofibroblast induction in normal tissue injury. Antioxidants, such as epicatechin and ascorbic acid can prevent myofibroblast induction by scavenging ROS. We further investigated the role of DNA damage responses (DDR) on myofibroblast induction. Blocking the DDR using DNA-PK or AKT inhibitors enhanced radiation sensitivity of irradiated cells and led to facilitated myofibroblast induction, whereas an ATM inhibitor enhanced radiation sensitivity of irradiated cells but abrogated ROS accumulation and myofibroblast induction. In contrast to standard culture conditions, myofibroblast remained after low or moderate doses irradiation (below 2.5 Gy) under the growth-restricted conditions by removal of or a decrease in fetal calf serum (FCS). In conclusion, recovery of damaged cells from radiation

is essential for myofibroblast clearance, which restores stromal cell dormancy and prevents tumor microenvironment formation. However, remaining ROS maintained myofibroblasts persistence which led to facilitated tumor microenvironment formation. Targeting ROS using antioxidants is effective in the mitigation of radiation-related adverse effects, such as growth retardation and myofibroblast induction, and helps protect normal tissues.

2-4 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・低線量率の放射線被曝による健康影響の実態とその発現機構はそのほとんどが不明である。本分担研究者は、これまで低線量・低線量率放射線被曝の生物影響を解明することを目的に、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照射施設、 ^{137}Cs 線源 培養細胞：0.001～1.4 mGy/min、実験動物：0.001～2.8 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照射することで、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を解析してきた。これまでに、ヒトの初代培養細胞やがん細胞、iPS細胞などのさまざまな種類の細胞を用いた研究によって、持続照射の放射線応答の決定に関与する因子を明らかにしている。

本研究では、放射線被曝発がんと線量率効果の関係を分子レベルで明らかにすることを目的として、異なる線量率の放射線被曝で誘発される変異の違いに関与する遺伝子のsiRNAスクリーニングを行う。放射線誘発変異と線量率効果に関わる因子を同定することにより、低線量・低線量率放射線被曝による発がんリスクの解明に貢献する。

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ものと考えられ、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、 $DDREF=2$ を用いた低線量率放射線による発がんのリスク推定が行われている。しかし、その数値の妥当性については、現在も議論が続いている。

放射線被曝の線量・線量率効果に関する研究は、疫学研究から実験動物、分子生物学的な研究まで幅広い領域で行われている。培養細胞を用いて放射線被曝の線量・線量率効果の検証を行う利点は、各種ヒト由来細胞を用いて放射線の生物学的影響データを効率的に得ることにより、質、量ともに多くのデータを得ることが可能で、実験結果の再現性を確認しながら、ごくわずかな生物学的影響を定量的に解析できる点にある。われわれは低線量・低線量率被曝影響の全容解明を

目的に、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が多い。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、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 スクリーニングを行い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する。

II. 研究方法

1. ヒト iPS 細胞と培養条件：本実験には正常ヒト iPS 細胞株 Human Episomal iPSC Line (hiPSC) (ThermoFisher Scientific) を用いた hiPSC の培養には Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System (タカラバイオ) を用い、ガンマ線の持続照射中を含めて 37 °C, 5% CO₂ インキュベーター内で維持した。継代のための培養には、35-mm の培養 dish (ThermoFisher Scientific)、6-well dish (ThermoFisher Scientific)、画像解析を目的とした培養には 384-well imaging plate Cell Carrier Ultra (PerkinElmer) を用いた。
2. hiPSC のゲノム編集：CRISPR-Cas9 システムと遺伝子導入装置 NEPA21 (Nepagene) によるエレクトロポレーション法を用いて、hiPSC の *apc* 遺伝子および *p53* 遺伝子のゲノム DNA の編集を行った。エレクトロポレーションでは、Poring Pulse 条件は、電圧 125 V、パルス幅 5 ms、パルス間隔 5 ms、回数 ±2 回、減衰率 10 %、極性+/-を、Transfer Pulse 条件は、電圧 20 V、パルス幅 50 ms、パルス間隔 50 ms、回数 ±5 回、減衰率 40 %、極性+/-を用いた。CRISPR-Cas9 システムのリコンビナント Cas9 には、Alt-R® S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3 (Integrated DNA Technologies) を用い、それぞれの遺伝子に対する guide RNA として、*apc* 遺伝子に対しては Alt-R® CRISPR-Cas9 sgRNA (Integrated DNA Technologies)、*p53* 遺伝子に対しては TrueGuide gRNA (ThermoFisher Scientific) を購入して用いた。標的部位の一塩基置換細胞の作製には、それぞれの遺伝子配列に対する 90 mer の一本鎖 DNA (ssDNA) (Integrated DNA Technologies) を合成し、Cas9 とそれぞれの guideRNA

と共に hiPSC に導入した。その後、hiPSC を 96-well plate (Integrated DNA Technologies) に、2 well あたり 1 細胞の細胞数で播種を行う限界希釈法を用いてクローニングを行った。TP53 遺伝子欠失 hiPSC は、TP53 遺伝子のゲノム配列の exon 5-6 に抗生物質耐性遺伝子の挿入を行うことによって作製した。部分的ゲノム DNA 配列で挟まれた Blasticidin あるいは Puromycin に対する耐性遺伝子をコードするプラスミドから精製した一本鎖 DNA を CRISPR-Cas9 と共に hiPSC に導入し、それぞれの薬剤に対する耐性の獲得を指標に TP53 遺伝子を欠失した hiPSC の樹立を行った。

3. 照射条件：ガンマ線の持続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照射装置 (^{137}Cs 線源、線量率： ~ 1.388 mGy/min) を用いた。

4. イメージング解析：ガンマ線照射した細胞を 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 (ThermoFisher Scientific、1:2000) を用いて蛍光免疫染色を行った。細胞核を Hoechst33342 (ThermoFisher Scientific) 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。データ画像を画像解析ソフト Harmony (PerkinElmer) を用いて、蛍光強度のデータから各解析を行った。また、データ解析には TIBCO SpotFire (PerkinElmer) を用いた。

5. siRNA の遺伝子導入：TP53 に対する siRNA (Silencer Select、ThermoFisher Scientific) を、核酸導入 (トランスフェクション) 試薬 RNAiMAX (ThermoFisher Scientific) を用いて 384-well plate に播種された細胞に導入し、24 時間培養した後、異なる条件でガンマ線持続照射処理と解析を行った。

(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ての解析であり、倫理委員会の審査は必要としない。

III. 研究結果

染色体組み換え LOH 検出系の構築

放射線持続照射によって生じる LOH をヒト培養細胞系でスクリーニングすることが可能な *in vitro* での実験系を構築することとした。がんは、ヒトを構成する各組織の幹細胞から生じる。そこで、本研究では幹細胞での LOH の解明を目的とし、幹細胞のモデル細胞として、細胞の培養が比較的容易であるヒト正常細胞由来の iPS 細胞株 (hiPSC) を用いることとした。

①LOH 解析用 hiPSC の作製

LOH によるスクリーニング用の培養細胞株を得ることを目的に、hiPSC から CRISPR-Cas9 システムを用いて、hiPSC-APC^{del/+} (codon 852/Leu TTG>TAG nonsense mutation STOP codon mutant) あるいは、hiPSC-TP53^{del/+} (codon 176/Cys TGC>TGA nonsense mutation STOP codon mutant) を用いた。

mutant 又は deletion mutant) の作製を試みた (図 III-1、III-2)。

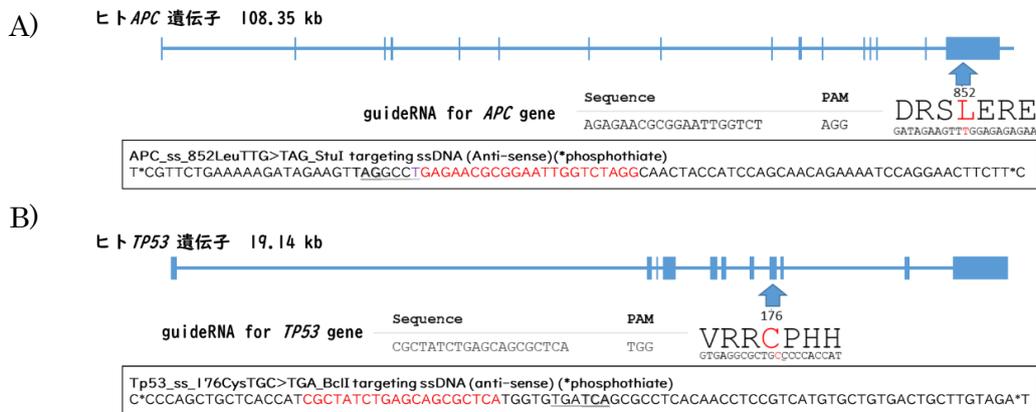


図 III-1. A) hiPSC-*APC*^{del/+} (codon 852/Leu TTG>TAG) および B) hiPSC-*TP53*^{del/+} (codon 176/Cys TGC>TGA) のゲノム編集の設計図 *APC* と *TP53* 遺伝子のゲノムの exon-intron map (青線) とその下に guideRNA と PAM の塩基配列およびゲノム編集によって終止コドンに変換するアミノ酸の周辺配列とその塩基配列 (赤字: 標的アミノ酸と置換塩基) の情報。黒線の枠内は Cas9 と guideRNA と共に細胞に導入した ssDNA の編基配列情報。赤字は guideRNA の標的配列、下線部はゲノム編集によって生じる制限酵素切断部位。

APC 遺伝子に関しては、主任研究者が本研究課題で用いている *Mouse APC*^{min/+} 850 T>A の遺伝子配列に相当するヒトゲノム配列の編集を目標とし、*TP53* 遺伝子についてはアミノ酸置換によって *TP53* タンパク質の転写機能が喪失するように、その DNA 結合領域への終止コドンの挿入を目標として、それぞれ guide RNA と ssDNA を設計した (図 III-1)。hiPSC に Cas9 と共に guideRNA と ssDNA をエレクトロポレーション法により導入した後、限界希釈法にて分離培養した。増殖した細胞のゲノム DNA を抽出して PCR 増幅し、制限酵素処理による選別を行ったが、目的の hiPSC を得ることはできなかった。そこで、CRISPR-Cas9 と Blasticidin と Puromycin の抗生物質に対する耐性遺伝子を含む DNA フラグメントを用いることで、hiPSC-*TP53*^{del/+} (deletion mutant) の樹立を試みた (図 III-2)。

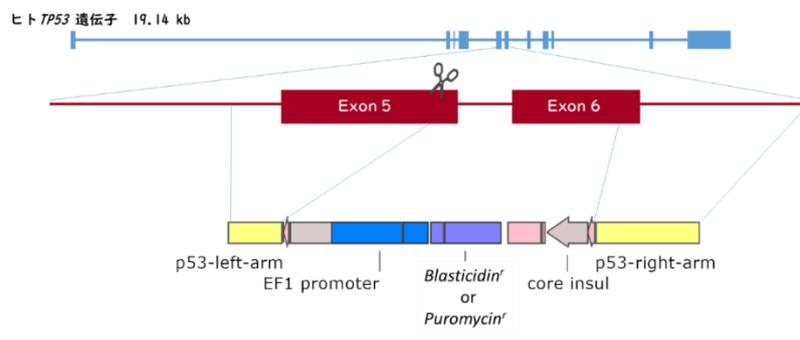


図 III-2. CRISPR-Cas9 を用いた hiPSC-*TP53*^{del/+} (deletion mutant) のゲノム編集の設計図 ヒト *TP53* 遺伝子のゲノムの exon-intron map (青線) に対する Cas9 と guideRNA による *TP53* の Exon 5 内 (茶色) の切断位置 (ハサミの絵) と薬剤耐性遺伝子 (*blasticidin^r* または *puromycin^r*) を含む挿入 DNA フラグメントの構造を示す。

hiPSC に、リコンビナント Cas9 と guideRNA、および、図 III-2 に示した抗生物質耐性遺伝子 (*Blasticidin^r* または *Puromycin^r*) と *TP53* のゲノム配列を部分的に含んだ DNA フラグメントをエレクトロポレーション法によって導入した。細胞が付着した後、*Blasticidin* または *Puromycin* それぞれの薬剤を含む培地を用いて培養することで、DNA フラグメントがゲノム DNA に安定的に挿入され、抗生物質耐性を獲得した hiPSC を選択した。選択した hiPSC の中から、*p53* ゲノム領域の標的部位の両方あるいは片方のアレルに抗生物質耐性遺伝子が挿入されている hiPSC を PCR スクリーニングによって選別して 2 回クローン化する作業を行い、LOH スクリーニングに用いる hiPSC-*TP53*^{del/+} (hetero-deletion mutant) と実験のコントロールとして用いる hiPSC-*TP53*^{del/del} (homo-deletion mutant) を得た。

②LOH 解析法の構築

①の実験によってヘテロ接合体の hiPSC-*TP53*^{del/+} が得られたことから、引き続き、hiPSC-*TP53*^{del/+} に生じる *TP53* 遺伝子の LOH を検出する方法の構築を行った。

まず、両アレルに正常 *TP53* 遺伝子を持つ hiPSC と、hiPSC-*TP53*^{del/+}、hiPSC-*TP53*^{del/del} について、*TP53* タンパク質の細胞の免疫蛍光染色を行った。その後、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。*TP53* タンパク質を特異的に認識する 2 種類の一次抗体と、それぞれの一次抗体を特異的に認識する 2 種類の蛍光標識二次抗体を用いて解析を行ったところ、野生型、欠失変異ヘテロ接合体、欠失変異ホモ接合体を、画像解析から、それぞれを識別できることが明らかとなった (図 III-3)。

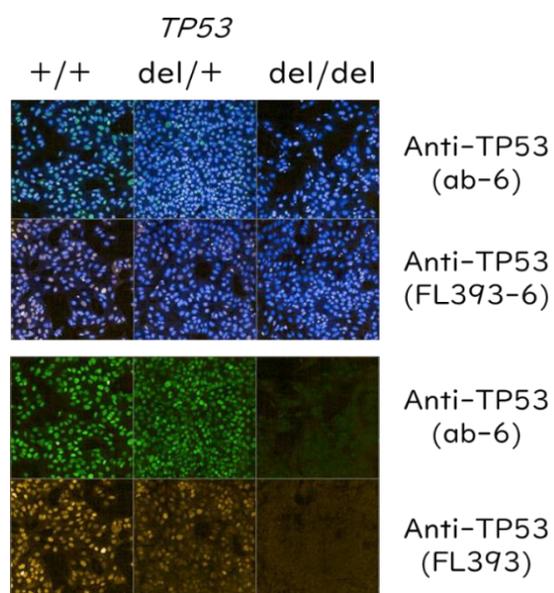


図 III-3. hiPSC-*TP53*^{del/+} と全自動蛍光画像撮影解析装置 OperaPhenix を用いた LOH 検出に用いる免疫蛍光染色画像 hiPSC-*TP53*^{+/+} (野生型、+/+)、hiPSC-*TP53*^{del/+} (欠失変異ヘテロ接合体、del/+)、hiPSC-*TP53*^{del/del} (欠失変異ホモ接合体、del/del) の二重免疫蛍光染色画像。Hoechst33342 での核染色 (青)、*TP53* タンパク質を認識する一次抗体 (ab-6 : mouse-monoclonal 抗体、FL393 : rabbit-polyclonal 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) で免疫蛍光染色を行った。

IV. 考察

本研究項目の初年度の実験結果から、異なる線量率で放射線を持続照射された細胞では、細胞の種類や状態などに依存して、損傷修復因子やストレス応答因子の応答性や経時的な挙動の変化が異なることが明らかとなった。このことは放射線被曝の健康影響に対する線量-線量率効果に関しては、ヒト細胞が持つ多様な因子が深く関係する可能性を示唆している。そのため、本研究課題である DDREF の妥当性=2 を検討する上では、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さまざまな放射線被曝による健康影響に寄与している。そこで、本分担研究課題では、異なる線量率の放射線持続照射によって誘発されるゲノム DNA の変異に注目した。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、特に LOH 変異に対する線量-線量率効果に関わる因子の同定を試みることにした。平成 31 年度は、*APC* 遺伝子と *TP53* 遺伝子の片アレルにのみ点変異を誘発した hiPSC を作製することを試みたが、点変異を片アレルにのみ導入されたものを樹立することが困難であった。ゲノム編集の効率を踏まえて、点変異のみが誘発された細胞株をスクリーニングによって樹立することが、ある程度困難であることは計画段階において想定されていたことから、同時に抗生物質耐性遺伝子を用いた *TP53* 遺伝子の欠失変異 hiPSC の作製を行なった。その結果、*TP53* 遺伝子欠失 hiPSC のヘテロ接合型、ホモ接合型を得ることができた。また、それらを用いた 2 種類の抗 *TP53* 抗体を用いた LOH 変異のイメージング解析法が確立できたことから、令和 2 年度、最終年度には、持続放射線照射による LOH に関わる因子のスクリーニングが可能であると考えている。

V. 結論

TP53 遺伝子の欠失変異 hiPSC の作製を行い、ヘテロ接合型とともにホモ接合型を得た。2 種類の抗 *TP53* 抗体を用いた LOH 変異のイメージング解析法を確立した。次年度には、DDREF=2 の妥当性を検討する上で、放射線誘発 LOH に関わる因子の同定作業を行うことが可能である。

VI. 次年度以降の計画

平成 31 年度には、CRISPR-Cas9 システムを用いて LOH 解析用細胞として、hiPSC から hiPSC-*TP53*^{del/+} を樹立した。また、同時に *TP53* 遺伝子に LOH が生じた場合のコントロール細胞として hiPSC-*TP53*^{del/del} の樹立を行った。また、それらの細胞株と 384-well の imaging plate 及び *TP53* 抗体および変異体認識抗体を用いた蛍光免疫染色による LOH 検出系を構築した。令和 2 年度は、構築した検出系を用いて、MDM2-P53 結合阻害剤 Nutlin-3 やプロテアソーム阻害剤 MG132 の低濃度処理を行うことによって、片アレルに *TP53* を持つ細胞において *TP53* タンパク質の蓄積を誘導し、両アレル欠失した細胞との発現量の差を明確にすることで、より高感度な検出系として改良を試みる。また、siRNA ライブラリを用いて異なる線量率のガンマ線照射によって生じる（染色体）組み換え頻度を規定する遺伝子（LOH の頻度が上がる遺伝子）のスクリーニングを行う。

VII. 業績

論文発表

該当なし

学会発表

1) Tsutomu Shimura, Megumi Sasatani, Hidehiko Kawai, Kenji Kamiya and Akira Ushiyama The role of cancer-associated fibroblasts on radiation-induced cancer. The 4th international symposium of the network-type joint usage/research center for radiation disaster medical science.: 2020;.2. P.59.

VIII. 参考文献

- 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. 2002 Sep;93(9):994-9.
- 3) Aizawa S1, Tanaka K, Mori M, Tsuji S, Yoshida K. Int J Radiat Biol. 2007 Apr;83(4):259-67. Direct detection of p53 $-/-$ thymocyte appearing at an early stage of radiation-induced thymic lymphomagenesis in p53 $+/-$ heterozygous B10 mice.

用語説明

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。

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。

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。

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 their 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, and 0.001~2.8 mGy/min for experimental animals). 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 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. 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.

2-4 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

分担研究者： 小林純也（京都大学大学院生命科学研究科）

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、ヒト放射線高感受性遺伝病原因遺伝子 ATM と ROS 蓄積による酸化ストレス応答との関係を検討した。さらに、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、昨年度研究で明らかとした指標である γ H2AX 陽性微小核および酸化ストレス応答について検討した。その結果、繊維芽細胞における ROS 蓄積はミトコンドリア融合・分裂制御因子への影響を介して起きていることを明らかにした。また、繊維芽細胞では ATM の活性化阻害が低線量率照射時の酸化ストレスを増大させることを明らかとし、これが微小核誘発の要因であると考えられる。また、血管内皮細胞では ATM の機能が細胞外酸化ストレスと対抗して生存していく上で必須であり、低線量率照射は血管内皮細胞にも酸化ストレスの増大、ATM 阻害下でなくても γ H2AX 陽性微小核形成を増加させることを明らかにした。これらの結果から、 γ H2AX 陽性 H2AX 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であること、血管内皮細胞はその評価に適する材料であ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でない。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。

本年度研究では、ヒト正常繊維芽細胞における低線量率放射線照射時の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、ヒト放射線高感受性遺伝病原因遺伝子ATMと酸化ストレス応答との関係を検討した。さらに、ヒト血管内皮細胞において、昨年度研究で明らかとした指標、 γ H2AX陽性微小核および酸化ストレス応答について検討し、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)、及び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)は、100 mmプラスチ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。

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。

ウエスタンブロット法

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 μ 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) を用いて発光させ、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 Mfn2 抗体 (Proteintech)、抗 Opa1 抗体 (Santa Cruz)、抗 Mff 抗体 (Proteintech)、抗 LC3 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 pp38MAPK 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 pAMPK1 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 p53 抗体 (Santa Cruz)、抗 p21 抗体 (BD)、抗 β actin 抗体 (シグマ)、抗 γ H2AX 抗体 (ミリポア)、抗 pKAP1 抗体 (Bethyl)、抗 KAP1 抗体 (GeneTex)、抗 CyclinA 抗体 (Santa Cruz)、抗 pSTAT1 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 H2B 抗体 (ミリポア)

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 μ 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 μ 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 γ H2AX 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。

(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

昨年度の解析から、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動態変化につながる機能不全が、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ウェスタンブロット法で検討した（図 III-1）。

ミトコンドリア融合制御因子である Mfn2 は低線量率照射、高線量率照射、非照射で発現量の変化はみられなかったが、別の融合制御因子 Opa1 は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。また、分裂制御因子 Mff も同様に低線量率照射では低下がみられた。これらの結果は、低線量率照射ではミトコンドリア融合・分裂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異常を誘発している可能性が示唆される。

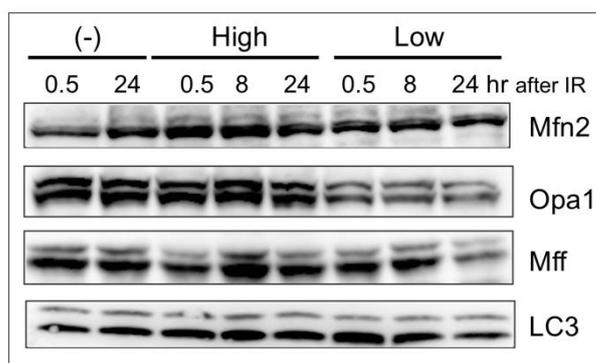


図 III-1 48BR 細胞におけるミトコンドリア融合・分裂因子の発現

低線量率（Low）あるいは高線量率（High）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。LC3 はオートファジーのマーカである。

2. ATM キナーゼ阻害による酸化ストレス応答への影響の検討

昨年度の解析から、ATM 阻害剤（KU55933：シグマ）を照射開始前に添加した場合、低線量率ガンマ線照射した細胞のみで γ H2AX 陽性の微小核形成が 40%以上で観察された。一方、高線量率照射では約 12%、非照射では約 5%であり、阻害剤処理を行わなかった場合は、 γ H2AX 陽性微小核はほとんど観察されなかった。ATM キナーゼは放射線誘発 DNA 損傷誘導時だけでなく、 H_2O_2 処理など酸化ストレス誘導処理時にも活性化することが知られている⁵⁾。昨年度の研究から低線量率照射時には酸化ストレス応答が活性化されることが示唆されたことから、ATM は低線量

率照射時の酸化ストレス応答にも役割を果たし、それゆえ、ATM キナーゼを阻害すると酸化ストレスが増強することが考えられた。それゆえ、ATM 阻害剤処理による酸化ストレスの増強の有無について、48BR 細胞を用いてウェスタンブロット法で検討を行った (図III-2)。

ATM 阻害剤処理を行うと、低線量率照射では酸化ストレス応答活性化のマーカである p38MAPK と AMPK α のリン酸化がともに増加していた。また、p53 は放射線誘発 DNA 損傷発生時に活性化される ATM によりリン酸化されて増加する報告にあるとおり、高線量率照射では ATM 阻害で著しく p53 は減少するが、低線量率照射では減少しなかった。このことは p53 が低線量率照射時には ATM のリン酸化にはあまり依存せず、酸化ストレスに応答して増加することを示唆している。DNA 二本鎖切断損傷のマーカである γ H2AX は主に ATM のリン酸化に依存しており、高線量率照射では阻害剤添加で減少したが、低線量率照射では阻害剤添加により増加しており、これは昨年度の研究から見いだした γ H2AX 陽性微小核が増加することと一致している。これらの結果から、ATM キナーゼの阻害は低線量率照射時に酸化ストレス応答を増強し、 γ H2AX も増加させることが明らかとなった。

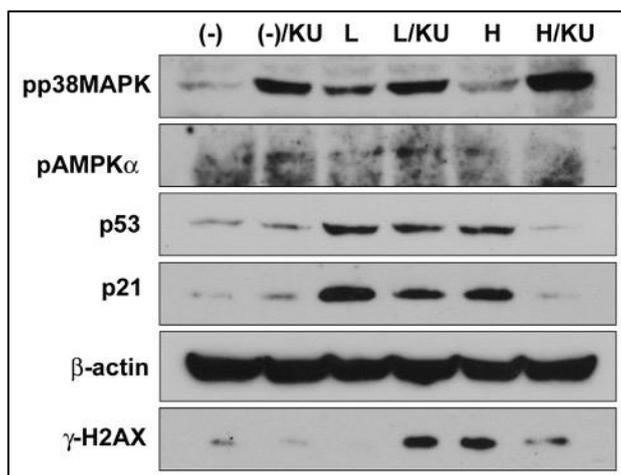


図 III-2 48BR 細胞における ATM 阻害時のウェスタンブロット解析

低線量率 (L) あるいは高線量率 (H) ガンマ線照射終了 30 分後に細胞を回収して、ウェスタンブロット法で解析を行った。KU は ATM キナーゼ阻害剤 KU55933 添加を示す。

3. 血管内皮細胞における微小核形成の検討

低線量率照射時にはヒト正常繊維芽細胞では、ミトコンドリア機能異常により細胞内 ROS の蓄積、その結果として酸化ストレスの増大が引き起こされていると考えられるが、次に生体内で酸素に触れやすい環境にあり、繊維芽細胞よりも酸化ストレス応答が高い頻度で誘導されていると考えられるヒト正常血管内皮細胞について⁶⁾、低線量率ガンマ線照射における微小核形成について検討を行った (図III-3)。

血管内皮細胞では ATM キナーゼの活性阻害を行わなくても、非照射細胞で約 12%の γ H2AX 陽性微小核の形成がみられた。さらに低線量率照射を行った場合には約 21%と明白な微小核形成の増加が観察されたが、高線量率照射では形成率は約 11%と増加は見られなかった。さらに ATM

キナーゼ阻害による微小核形成率の増強について検討を行うことを試みた。しかし、血管内皮細胞では ATM 阻害剤を添加しただけで、ガンマ線照射を行わなかった場合でも 50%異常細胞がディッシュから剥離しており、細胞死の誘導が示唆された。このような細胞死の顕著な誘導から、ATM キナーゼ阻害による微小核形成への影響は観察することができなかった。一方、ヒト繊維芽細胞では ATM キナーゼ阻害剤の添加は、照射の有無にかかわらず、細胞死を誘導しないことは昨年度研究から明らかとなっていた。γ線非照射時には血管内皮細胞でも ATM の活性化を誘発するような DNA 二本鎖切断損傷が顕著に蓄積するとは考えがたいことから、このような状況下では ATM は細胞外酸化ストレスに反応して活性化していると考えられ、その活性は酸化ストレスに対抗して生存していく上で必須であると考えられる。このような細胞外酸化ストレスに対する感受性から、血管内皮細胞は ATM キナーゼ非阻害下でも、高頻度でγH2AX 陽性微小核が誘導されるのかもしれない。

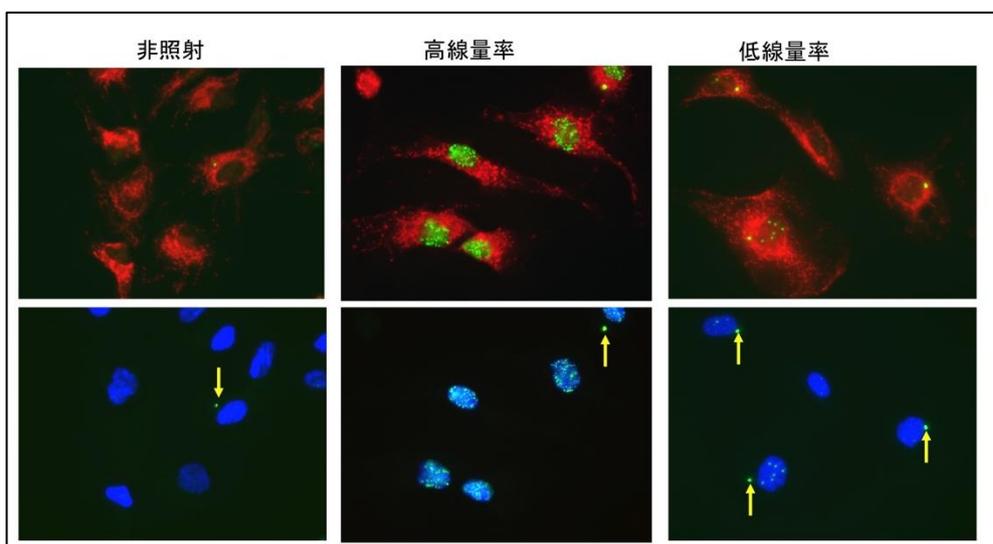


図 III-3 ヒト血管内皮細胞における微小核形成

低線量率あるいは高線量率ガンマ線照射終了 30 分後に細胞を固定して、γH2AX 抗体(緑色)を用いて免疫蛍光染色を行った。赤色 : MitoTracker Red 染色、青色 : DAPI 染色。矢印はγH2AX 陽性微小核を示す。

4. 血管内皮細胞における酸化ストレス応答の活性化

図 III-3 が示すように、血管内皮細胞への低線量率照射はγH2AX 陽性微小核を増加させたが、このような増加から血管内皮細胞でも酸化ストレスが誘発されている可能性が考えられる。それゆえ、低線量率照射による酸化ストレス応答の活性化の有無について、ウェスタンブロット法で検討することとした(図III-4)。

高線量率ガンマ線照射では、放射線誘発 DNA 損傷発生で活性化する ATM に依存した KAP1 のリン酸化 (pKAP1)、γH2AX の増加が見られるが、低線量率照射ではこれらのリン酸化の明らかな増加は観察されなかった。一方で、酸化ストレスにともなってリン酸化される p38MAPK は

低線量率照射時に顕著に増加しており、AMPK1 の増加も認められた。これらの結果から、低線量率ガンマ線照射では血管内皮細胞に酸化ストレスを増加させていることが示唆される。

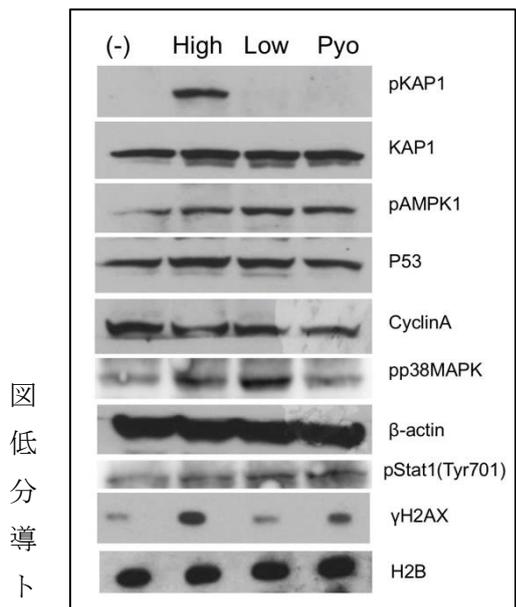


図
低
分
導
ト

III-4 血管内皮におけるウェスタンブロット解析
線量率 (Low)、高線量率 (High) ガンマ線照射終了 30 後あるいは pyocyanin 処理 (ミトコンドリア性 ROS 誘剤) で 2 時間後に細胞を回収して、ウェスタンブロット法で解析を行った。

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、ヒト放射線高感受性遺伝病原因遺伝子 ATM と酸化ストレス応答との関係を検討した。さらに、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 陽性微小核および酸化ストレス応答についても検討を行った。

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ミトコンドリア形態への影響が明らかとなっていた。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⁶⁾。図 III-1 が示すとおり、低線量率ガンマ線照射はミトコンドリア分裂・融合制御因子の発現に影響を及ぼしており、このような影響がマイトファジー機構を阻害して、低線量率ガンマ線被ばくで損傷したミトコンドリアが細胞内に異常蓄積し、ROS を細胞質内へ漏れいさせている可能性がある。また、ATM キナーゼ阻害により、図 III-2 が示すように、酸化ストレス応答因子 p38MAPK のリン酸化が増大しており、ヒト繊維芽細胞では低線量率ガンマ線照射時に ATM が阻害されることによって酸化ストレスが増大して微小核形成が増加したと考えられた。つまり、酸化ストレスに対する ATM の対抗機構が微小核誘導の抑制に重要と考えられる。ただし、ATM の活性阻害による酸化ストレスの増大がミトコ

ンドリアへの影響を経て引き起こされるのかは不明であり、今後、ミトコンドリア機能維持における ATM の役割を解明することが重要であると考えられる。

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することが考えられ、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。実際に、微小核形成について検討すると、ATM キナーゼ阻害を行わない場合でも低線量率ガンマ線照射により γ H2AX 陽性微小核の増加が確認された (図 III-3)。また、この時に酸化ストレスによる p38MAPK のリン酸化が顕著に増加しており (図 III-4)、血管内皮細胞では低線量率ガンマ線照射時には酸化ストレスに呼応して微小核形成が誘発されていると考えられる。さらに ATM キナーゼ阻害剤の添加により非照射でも細胞死が顕著に誘導されることから、血管内皮細胞では ATM が有する酸化ストレスへの対抗機構が、通常の増殖における細胞生存にも重要であると考えられ、血管内皮細胞での ATM の役割を詳細に解明する必要がある。このように、血管内皮細胞を用いた γ H2AX 陽性微小核の検出は、低線量率放射線の細胞影響の高感度に検出できる可能性があり、線量率効果の検討にも活用できることが考えられる。

次年度以降の計画

本研究の最終年度では、放射線感受性の個人差の DDREF の影響の微小核形成を指標とした検討として、①ATM キナーゼを特異的阻害剤で抑制した条件下で、様々な線量率で γ H2AX 陽性微小核の形成率を測定し線量率効果を明らかにする、②ATM 阻害剤の添加濃度を複数設定して部分的に活性抑制した場合、キナーゼ活性レベルと微小核形成頻度の関係を検討することによって、DDREF 算定に影響しうる個人差要因の解明を目指す。さらに、ATM キナーゼ抑制下における低線量率放射線のミトコンドリア応答への影響を MitoTracker を用いたミトコンドリア動態・分布の解析、マイトファジー関連因子を指標としたウエスタンブロット解析を行い、DDREF 算定に影響しうる個人差要因の指標となり得るか、検討する。

V. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 論文：査読あり 該当なし

B. 論文：査読なし 該当なし

C. 学内学会発表

1) Kobayashi J, Meng Q, Komatsu K. Relationship between endogenous ROS accumulation and mitochondria responses under low dose rate irradiation. The 4th International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science. Hiroshima. Feb. 12-13, 2020

2) Meng Q, Kobayashi J. The relationship between oxidative stress and mitochondria change under low-dose rate irradiation. The Joint Workshop of QST-NIRS, CEA and IRSN. Chiba. Oct. 28-29. 2019.

D. 国際学会発表 該当なし

E. 著書： 該当なし

F. 講演

- 1) 小林純也. 低線量率放射線生物影響における酸化ストレス・ミトコンドリア応答の役割. 基研研究会「放射線の生体影響解明への分野横断による挑戦」. 京都. May 23-25. 2018.

VI. 参考文献

- 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) Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Miyagawa K, Nagai R. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. *J Biol Chem* 2010; 285: 29662-29670.

Relationship between radiosensitivity and genetic individual difference

Junya Kobayashi¹

Radiation Biology Center, Graduate School of Biostudies, Kyoto University¹

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 with ATM inhibition in this year. And, 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/fusion cycle. Previous research clarified that ATM inhibition by the specific inhibitor remarkably increased gammaH2AX-positive micronuclei under low dose rate irradiation. The ATM inhibition also increased phosphorylation of p38MAPK, which is the marker for activation of oxidative stress responses. These results suggest that the inhibition of ATM induces gammaH2AX-positive micronuclei via accumulation of oxidative stress under low dose rate irradiation. Probably, ATM might have a role to repress micronucleus formation against oxidative stress by low dose rate irradiation. Human vascular endothelial cells could be sensitive with oxidative stress. Low dose rate irradiation induced gammaH2AX-positive micronuclei markedly and also increased phosphorylation of p38MAPK in the absence of ATM inhibitor, suggesting that detection of gammaH2AX-positive micronuclei in human vascular endothelial cells may be useful marker to reconsider DDREF.

2-5 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

主任研究者： 中島 裕夫（大阪大学）

分担研究者： 大野 みずき（九州大学）

石原 弘（量研機構放医研）

研究要旨

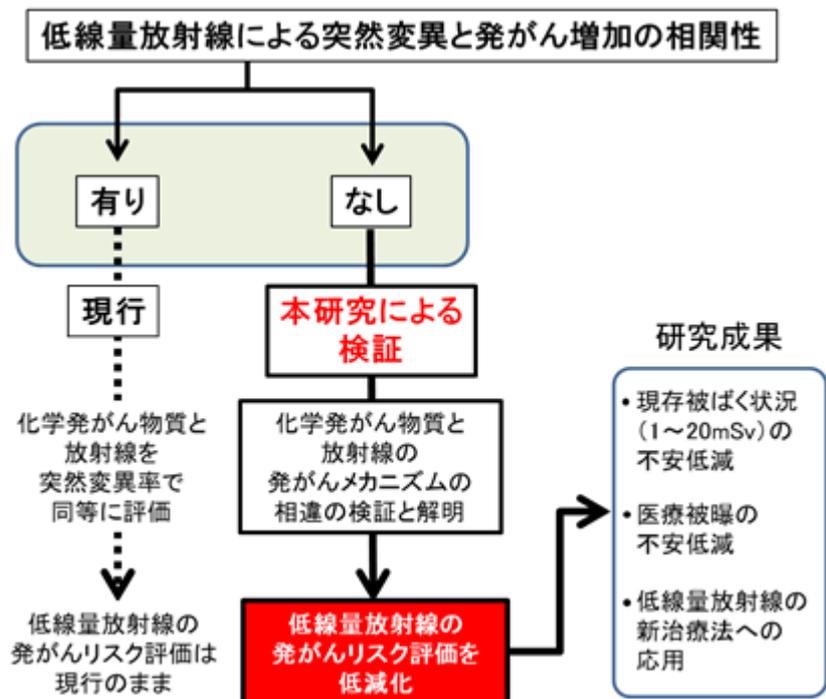
東日本大震災に伴って発生した福島原発事故直後よりクローズアップされ社会問題となった低線量放射線内部被ばくの懸念は究極的には、被ばくによる突然変異と発がんへの影響の存否とその度合いにある。

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（福岡歯科大学分子遺伝学、放射線生物学、九州大学アイソトープ総合センター）
遠藤 暁（広島大学大学院工学研究科 環境解析学、放射線・化学物質影響科学）
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）
中島 裕美子（九州大学アイソトープ総合センタ）
福津 久美子（量研機構放医研 計測・線量評価部生物線量評価チーム）
中津 可道（九州大学分子生物学）
武田 志乃（量研機構放医研放射線障害治療研究部体内除染研究チーム金属化学）
上原 昭典（量研機構放医研放射線障害治療研究部体内除染研究チーム金属化学）
田中 泉（量研機構放医研放射線障害治療研究部体内除染研究チーム分子生物学）
薬丸 晴子（量研機構放医研放射線障害治療研究部体内除染研究チーム細胞生物学）
山口 喜朗（大阪大学放射線科学基盤機構ラジオアイソトープ総合センター）

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 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 100000Bq/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セシウム 137 投与群と対照群で有意差は認められなかったが、腫瘍増殖はセシウム 137 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⁾。セシウム 137 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。

研究期間内にセシウム 137 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)。

II. 研究方法

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、セシウム 137 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、その解明に向けた研究を以下の方法で開始した。

【平成 31 年度の計画】

低線量被ばくと化学物質 (KBrO_3) による突然変異と発がんの非相関性確認のための実験準備

1. 高感度変異検出用マウスの繁殖と輸送

低線量放射線被ばく影響の主たる作用として考えられる酸化ストレスによる DNA 損傷修復系の欠損した *Msh2* 遺伝子改変マウスは、酸化ストレス誘発による消化管がんや DNA 突然変異を高感度に検出できる。 KBrO_3 投与群とセシウム 137 水給水群との突然変異率を比較するために体細胞突然変異解析用レポーター遺伝子を導入したミスマッチ修復欠損マウス (*Msh2* $^{-/-}$ /rpsL-Tg $^{+}$)、および野生型マウス (*Msh2* $^{+/-}$ /rpsL-Tg $^{+}$) を準備して、大阪大学の R I 施設に

輸送した（大野・續）。

2. セシウム 137 または KBrO_3 の投与および臓器サンプリング

九大から阪大に輸送された 4 週齢のマウスを投与開始が 4 週齢からの群と 8 週齢からの群（週齢差による影響のちがいを検出できるようにするため）の 2 群に分け、対照群には真水、セシウム 137 投与群にはセシウム 137 水（2500 Bq/ml）を飲料水として 4 週間与えた。セシウム 137 水の給水開始から終了までのマウス体内セシウム 137 量を一定濃度にさせるために、給水開始当日に経口ゾンデを使って各マウスに 4000Bq/g 体重のセシウム 137 水を強制的に単回経口投与した。また、セシウム 137 水給水終了直後の組織内残留セシウム 137 による突然変異率測定への影響を少なくするために、給水 4 週後にヘパリン採血（20～50 μl の血漿採取）を行った後、セシウム 137 水を真水に変えて 2 週間の休養期間を設けた。休養期間の後、ヘパリン採血（20～50 μl の血漿採取）を行い、マウスを安楽死させて小腸管 3 部位（十二指腸側 3 分の 1、小腸中間部 3 分の 1、盲腸側 3 分の 1 をそれぞれミンチして別々に分けた）、精巣、精巣上体、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、尾部のそれぞれを剥出し、凍結用プラスチックチューブに分配して採取した血漿とともに -80 $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。凍結保存した血漿を免疫能の測定用、そして、諸臓器を突然変異率測定用のサンプルとした（中島）。

3. DNA 損傷の定量指標の確立

DNA 損傷の新たな定量指標を確立するために、マイクロ分析に適した系列培養細胞である RAW264.7 細胞を使用して定量技術開発を進めるとともに、放射線・ β エミッター・過酸化物の DNA 損傷指標との量的相関を求めた（石原）。

4. 高感度変異検出用マウスへのセシウム 137 投与

Msh2 遺伝子のホモ欠損マウスでのセシウム 137 水（2500Bq/ml）飲水による継世代的影響を調べるための飼育実験を開始した（中島）。

5. セミマイクロ定量を行うための基礎実験

Spring-8 セミマイクロ定量に向けて必須なデータを得るために、臓器試料調製方法を検討しつつ、極微量（体重 1g あたり 2 pmole 程度）投与した放射性セシウムと、微量（体重 1g あたり 100nmole 程度）投与した天然セシウムの臓器分布の同等性を示すことを試みた（石原）。

（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 26-067-000 号、有効期限：2020/03/31）。なお、放射性同位元素利用施設内での動物飼育については、大阪大学医学系研究科飼養保管施設等設置の承認を受けている（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、「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:26-53、有効期限:2019/08/31)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)」で機関の承認を得ている。

放射線医学総合研究所の動物実験においては温度湿度および微生物環境の適正化された専用の飼育室および実験室を使用し、マウスに処置する際はストレス軽減のためのトランキライザー軽麻酔またはセボフルラン吸入麻酔下で行った。当該設備ならびに作業手順は所内実験動物委員会により事前審査および承認により、その適正化が確保されている。また、実験室使用者の安全確保ならびに施設周囲の環境保護のため、放射線発生装置、ラジオアイソトープおよび化学物質の使用に先立って、所内担当部署による確認および承認を受けた作業手順および施設使用要領に従って実施した。

III. 研究結果

1. 高感度変異検出用マウスの繁殖と輸送

実験に供する4週齢のマウスを得るために、目的遺伝子がヘテロ(*Msh2* ^{-/+}と *rpsL-Tg* ^{+/+}) 同士10ペアの親マウスを交配し、交尾確認後に母マウスを隔離し、3週後の出産時に出生匹数を確認、それから3週間の離乳までに出生個体の遺伝子型を検査した。離乳後ただちに遺伝子型が判明したマウスを阪大へ輸送した。また一部を酸化剤投与群として KBrO_3 (0.15%) 水を飲料水として4週間給水し、実験方法2. のセシウム137水給水群と同じように実験を行った(表III-1~表 III-6)。詳細は、分担研究者(大野みずき)の報告書に記載。

2. セシウム137または KBrO_3 の投与および臓器サンプリング

4週齢および8週齢マウスのそれぞれにセシウム137水(2500Bq/ml)を4週間給水し、ヘパリン採血(20~50 μ lの血漿採取)を行い、2週間の休養期間の後、再採血、臓器の剥出をしたマウスの番号、1回目の採血日、2回目の採血・解剖日を表IIIに示す。

今年度計画で得られた、表中動物番号の凍結臓器サンプルは突然変異率測定用(大野)、そして、凍結血漿サンプルは免疫能を調べるためのサイトカイン(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-10、IL-12、IL-12、IL-13、IL-17、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、KC、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、TNF- α)量の測定用として、次年度研究計画に従って測定を行う(宇野・中島)。

なお、表中 Genotype での WT は、野生型マウス(*Msh2* ^{+/+}/*rpsL-Tg* ^{+/+})、KO は、酸化ストレス高感受性マウス(*Msh2* ^{-/-}/*rpsL-Tg* ^{+/+})を示している。いずれも突然変異率検出のためのレポーター遺伝子を保持しているマウスである(表III-1~表III-6)。また、「-」は、死亡等により血漿の採取ができなかったマウスを示している。

表III-1 セシウム 137 水 (2500Bq/ml) 給水群 (4 週齢から開始の群)

放射線群	Cs ₁₃₇ 照射 開始週齢	Mouse ID	Sex	Genotype	直後 採血日	2週後の採 血・解剖日
	4	1386	♂	WT	2019/11/18	2019/12/2
	4	1387	♂	WT	2019/11/18	2019/12/2
	4	1397	♂	WT	2019/11/18	2019/12/2
	4	1388	♀	KO	2019/11/18	2019/12/2
	4	1390	♀	KO	2019/11/18	2019/12/2
	4	1408	♀	KO	2019/11/18	2019/12/2

表III-2 KBrO₃ 水 (0.15%) 給水群 (4 週齢から開始の群)

KBrO ₃ 群	投与 開始週齢	Mouse ID	Sex	Genotype	直後 採血	2週後 採血
	4	1478	♂	WT	2019/12/12	2019/12/25
	4	1486	♂	WT	2019/12/12	2019/12/25
	4	1551	♂	WT	2020/1/23	2020/2/6
	4	1557	♂	WT	2020/1/23	—
	4	1558	♂	WT	2020/1/23	2020/2/6
	4	1540	♀	WT	2020/1/23	2020/2/6
	4	1545	♀	WT	2020/1/23	2020/2/6
	4	1559	♀	WT	2020/1/23	2020/2/6
	4	1560	♀	He	2020/1/23	2020/2/6
	4	1474	♂	KO	2019/12/12	2019/12/25
	4	1479	♂	KO	2019/12/12	2019/12/25
	4	1561	♂	KO	2020/1/23	2020/2/6
	4	1562	♂	KO	2020/1/23	2020/2/6
	4	1491	♂	KO	2019/12/19	2020/1/7
	4	1492	♂	KO	2019/12/19	2020/1/7
	4	1477	♀	KO	2019/12/12	2019/12/25
	4	1483	♀	KO	2019/12/12	2019/12/25
	4	1448	♀	KO	2019/12/19	—
	4	1489	♀	KO	2019/12/19	2020/1/7

表III-3 対照群（真水給水）（4週齢から開始の群）

対照群	投与 開始週齢	Mouse ID	Sex	Genotype	直後 採血	2週後 採血
	4	1470	♂	WT	2019/11/14	2019/11/28
	4	1499	♂	WT	2019/12/19	—
	4	1501	♂	WT	2019/12/19	2020/1/7
	4	1496	♀	WT	2019/12/19	2020/1/7
	4	1497	♀	WT	2019/12/19	2020/1/7
	4	1498	♀	WT	2019/12/19	—
	4	1500	♂	KO	2019/12/19	—
	4	1459	♀	KO	2019/11/21	2019/12/5
	4	1464	♀	KO	2019/11/14	2019/11/28
	4	1465	♀	KO	2019/11/14	2019/11/28
	4	1466	♀	KO	2019/11/14	2019/11/28

表III-4 セシウム 137 水（2500Bq/ml）給水群（8週齢から開始の群）

放射線群	Cs ¹³⁷ 照射 開始週齢	Mouse ID	Sex	Genotype	直後 採血	2週後 採血
	8	1270	♂	WT	2019/9/20	2019/10/4
	8	1259	♀	WT	2019/9/20	2019/10/4
	8	1263	♀	WT	2019/9/20	2019/10/4
	8	1267	♀	WT	2019/9/20	2019/10/4
	8	1268	♂	KO	2019/9/20	2019/10/4
	8	1269	♂	KO	2019/9/20	2019/10/4

表III-5 KBrO₃水 (0.15%) 給水群 (8週齢から開始の群)

KBrO ₃ 群	投与開始週齢	Mouse ID	Sex	Genotype	直後採血	2週後採血
	8	1348	♂	WT	2019/10/24	2019/11/7
	8	1349	♂	WT	2019/10/24	2019/11/7
	8	1345	♀	WT	2019/10/24	2019/11/7
	8	1446	♀	WT	2019/12/12	2019/12/25
	8	1448	♂	KO	2019/12/12	2019/12/25
	8	1507	♂	KO	2020/1/23	2020/2/6
	8	1556	♂	KO	2020/2/13	2020/2/27
	8	1346	♀	KO	2019/10/24	2019/11/7
	8	1548	♀	KO	2020/2/13	2020/2/27
	8	1552	♀	KO	2020/2/13	2020/2/27

表III-6 対照群 (真水給水) (8週齢から開始の群)

対照群	投与開始週齢	Mouse ID	Sex	Genotype	直後採血	2週後採血
	8	1254	♂	WT	2019/10/17	—
	8	1257	♂	WT	2019/10/17	—
	8	1393	♂	WT	2019/11/28	2019/12/12
	8	1395	♀	WT	2019/11/28	2019/12/12
	8	1409	♀	WT	2019/12/5	2019/12/19
	8	1258	♀	KO	2019/10/17	—

3. DNA 損傷の定量指標の確立

株化細胞の Raw264.7 細胞 (破骨細胞系) モデルで各種被ばく指標の定量性を比較しつつ技術確立を進めた。そして、定量性・感度・再現性の観点から、指標を γ H2ax 分析と DNA 損傷応答発現 RNA とする同時分析を試みた。詳細は、分担研究者 (石原弘) の報告書に記載。

4. 高感度変異検出用マウスへのセシウム 137 投与

Msh2 遺伝子欠損マウスでのセシウム 137 水 (2500Bq/ml) 飲水による継世代的な遺伝性影響を調べるために、研究結果 2. で示したセシウム 137 給水群の動物番号 1269 雄 (*Msh2* $-/-$ /rpsL-Tg+) の休養期間中に母親である 1047 雌 (*Msh2* $+/-$ /rpsL-Tg+) と交配を行い、セシウム 137 の放射線に内部被ばくした雄の遺伝子を引き継いだ仔マウス 6 匹 (雄 3 匹、雌 3 匹) を得た (出生日 2019/10/20)。これらの仔マウスにセシウム 137 水を飲んでいない非被ばく C57BL/6J マウス (同じ遺伝的バックグランド系統) を交配し、被ばく雄から 2 代目の孫マウ

スを4匹(雄2匹、雌2匹)を得たので、被ばくによる次世代へ伝わるDNA突然変異率、塩基突然変異の特徴を調べるためにマウス組織を凍結保存した。これまで行ってきたA/Jマウス系統(DNA修復能がある野生型)での次世代影響との比較が可能となった。

5. セミマイクロ定量を行うための基礎実験

消化管循環の発生するセシウム摂取後期の安定期において、食道から直腸までの消化管等の細分化領域ごとのセシウム量比を求めるために¹³³Cs投与至適量決定、ICP-MS装置のCs定量設定、そして、Spring-8解析の準備を行った。詳細は、分担研究者(石原弘)の報告書に記載。

IV. 考察

1. 今年度成果

本研究に供された酸化ストレス高感受性*Msh2*遺伝子改変マウス系統は、*Msh2*欠損ホモでは子が育たないために、常に*Msh2* +/-のヘテロ状態で維持しなければならない。従って、実験を行うにあたって、ヘテロマウス同士の交配によって出生仔マウスの4分の1しか得られない*Msh2*遺伝子欠損(-/-)マウスを各群で統計的に扱える匹数以上得なければならない。今年度は、実験に供すマウスの生産に費やされた。非常に厳しい出産状況の中、今年度予定した*Msh2*欠損ホモマウスでレポーター遺伝子(rpsL-Tg+)を持っている雌雄マウス、*Msh2*遺伝子が野生型マウスでレポーター遺伝子(rpsL-Tg+)、持っている雌雄マウスをおおむね得ることができ、それぞれのマウスに放射線曝露(セシウム137水)と化学物質曝露(KBrO₃)を行い、それぞれから血漿サンプル、臓器サンプルを得ることができ、次年度予定している突然変異率の検出、免疫能測定の準備が整った。

今年度に採取したサンプルで突然変異率の検出、免疫能測定を行うことで、化学物質と放射線の発がん作用の相関関係がどれくらいあるのか、突然変異率を指標にして定量的に解明し、それに関係する免疫能(炎症など)の関与の度合いを解析することが可能となった。

また、各臓器におけるセミマイクロ線量解析の準備が整ったので、この線量解析を進めることで今後得られるデータをもとにして過酸化化合物用量とセシウム137被ばく線量の量的相関の詳細な定量的解析が期待できる。

2. 環境保健行政に対してどのような観点で貢献できるか

これまで、放射線と化学物質を同じ変異原として発がんリスクを評価してきたが、低線量では突然変異と発がんを独立的に評価できるようにすることで発がんへの懸念を低減化でき、このことは低線量放射線被ばくの安心の根拠として役立てられると考えている。また、この研究では、ヒトでの放射線感受性の幅も考慮しているので世界でも初めての影響評価法として期待できる。

【根拠】

本研究の実験系である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すれば、低線量内部被ばく影響が自然状態であるA/Jマウス群(DNA修復能がある野生型)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からである。もし、高感受性群でも検出できなければ、そのレベルはかなり安心できるレベル

と考えられることになる。

3. 研究成果の社会的意義

低線量内部被ばくでも突然変異を起こすことで致死的発がんが誘発されると考えられているが、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などの判断材料を実験結果として提示し、福島原発事故による低線量被ばくへの不安を科学的見地で軽減することができることは、社会的に意義があると考えられる。

V. 結論

平成31年度（2019年度）達成目標：「*Msh2* 遺伝子改変マウスの量産とセシウム137投与を開始する」ことをほぼ予定通りに行うことができた。以下に計画全体における進捗状況を赤ラインで示す。

進捗状況	平成31年度 (2019年度)				平成32年度 (2020年度)				平成33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セシウム137投与とサンプリング。九大へ輸送				曝露後の遺伝子発現量と免疫能の定量を行う				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を行う			
	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								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 <i>Msh2</i> 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に関する解析を行う 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			

VI. 次年度以降の計画

令和2年度

今年度（令和元年）において *Msh2* 遺伝子欠損マウスに突然変異率が同等となる用量のセシウム 137 水もしくは KBrO_3 を4週間投与して、採血、解剖、臓器の凍結を行った。この得られたサンプルを使って、令和2年度は、突然変異率(大野)、免疫能（宇野・中島）、臓器別放射線誘導遺伝子の同定（中島）を行い、セシウム 137 群と KBrO_3 群の差異を検出することで、放射線と化学物質に対する生体反応の差異を定量的に調べる。

同時に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ために、投与期間を16週間に伸ばして同様にサンプル採取を行う(阪大)。

また、培養細胞を用いた過酸化剤用量とセシウム 137 内部被ばく線量の量的相関の解析結果から詳細な臓器線量を求めて、酸化剤と放射線の線量同等性を確定して、本事業の信頼性を確保する(放医研)。

加えて、本年度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令和2年度～3年度にかけて行う。

令和3年度

令和元年に開始した高感受性マウス系統でのセシウム 137 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（塩基突然変異の特徴）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。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）。

総括として内部被ばくと外部被ばくでの Gy 換算の相同性の確認と突然変異と発がんの線量評価を試みる。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 論文：査読あり

1) なし

B. 論文：査読なし

1) 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**, 2020-03

2) 上原章寛, 武田志乃, 松村大樹、アクチノイドイオンを模擬した金属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**, 2020-03

C. 学内学会発表

1) 中島 裕夫、宇野 賀津子、山口 喜朗、藤堂 剛、米倉 義晴、篠原 厚、低線量率のセシウム 137 放射線内部被曝は発がんや継世代影響にほとんど寄与しない可能性が

ある Hiroo NAKAJIMA、Katsuko UNO、Yoshiaki YAMAGUCHI、Takeshi TODO、Yoshiharu YONEKURA、Atsushi SHINOHARA, 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 年 11 月 18~20 日

- 2) 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、10/30-11/1 第 55 回 X 線分析討論会
- 3) 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, 日本毒性学会, 2019-06-2
- 4) 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、11/14-11/16 日本放射線影響学会第 62 回大会, 日本放射線影響学会, 2019-11-157
- 5) 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、11/14-11/16「日本放射線影響学会第 62 回大会」, 日本放射線影響学会, 2019-11-15
- 6) 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
- 7) 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
- 8) Mizuki Ohno, Kunioko 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
- 9) Mizuki OHNO, Kunihiro 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.

D. 国際学会発表

- 1) 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), Aug 25-29, 2019 (Manchester).

- 2) Shino Takeda, Takanori Yoshida, Masakazu Oikawa, Akihiro Uehara, Chiya Numako, Yasuko Terada, Izumi Tanaka, Hiroshi Ishihara, Dynamics of uranium localization and tissue alteration in kidney of rats exposed to uranyl acetate. 16th International Congress of Radiation Research (ICRR2019), Association for Radiation Research (ARR), 2019-08-26
- 3) Mizuki Ohno, Toward understanding de novo germline mutations in mammals, 16th International Congress of Radiation Research (ICRR) 2019.8, 招待講演

E. 著書

- 1) Hiroo Nakajima, 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, p221-235, 2019, Print book ISBN: 978-981-13-8217-8 / eBook ISBN: 978-981-13-8218-5

F. 講演

- 1) なし

G. 主催した研究集会

- 1) なし

H. 特許出願・取得

- 1) なし

I. その他

- 1) なし

VIII. 参考文献

- 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., 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).
- 4) Hall EJ, Giaccia AJ (2019) Radiobiology for the radiologist, 8th edn. Wolters Kluwer, USA, Philadelphia, p p10. (9781496335418)

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 1

Department of Medical Biophysics and Radiation Biology, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University 2

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

2-5 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

分担研究者： 大野みずき（九州大学・医学研究院・基礎放射線医学分野）

中津可道（九州大学・医学研究院・基礎放射線医学分野）

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^{注1)}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ところ、*Msh2* 遺伝子欠損マウスでは野生型に比較して約 10~20 倍の突然変異頻度を示した。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性・定性性を持って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。現在変異スペクトルの詳細な解析を進めている。

注 1) 低 LET 放射線：

電離性放射線が物質中を通過する際、飛程の単位長さ当りに平均して失うエネルギーを線エネルギー付与 (LET : Linear Energy Transfer) といい、放射線の種類 (線質) の違いを表す指標としても用いられる。LET が低い放射線を低 LET 放射線という。例としては X 線、ガンマ線、ベータ線等がある。また高 LET 放射線の例としてはアルファ線、中性子線、粒子線等がある。

キーワード

セシウム 137	内部被ばく	突然変異
DNA ミスマッチ修復	酸化ストレス	継世代影響

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）

續 輝久（九州大学アイソトープ総合センター、産業医科大学・産業生態科学研究所）

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、定量的・定性的な解析が可能なこと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 ヶ月齢で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 0.15% 水溶液を 16 週間与えると、小腸に数十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、2017 年環境変異原学会、論文準備中)。このように酸化ストレスが 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明らかとなった。*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る。実際にセシウム 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には 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暴露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より正確に解析するためにさらに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、本研究ではさらに経口投

与による検証を行う。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には免疫能や炎症反応が関係している可能性を検証するためサイトカインの測定を計画している。そのため九州大学では野生型および *Msh2* 遺伝子欠損マウスに 0.15% KBrO_3 を投与した際の血液を採取し測定用サンプルを調整し、大阪大学に提供する。セシウム 137 の投与後の血液サンプルは大阪大学で採取する。

また、次年度以降には、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ス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予定している。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 の内部被ばくの影響について、①体細胞突然変異解析 (*rpsL* アッセイ)、②腫瘍のゲノム解析、③生化学的解析、④生殖細胞変異解析を行う。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-1 に示す。

2019 年度は、*Msh2* 遺伝子改変マウスの量産とセシウム 137 投与開始、①体細胞突然変異解析 (*rpsL* アッセイ) を開始する。

2020 年度は、①体細胞突然変異解析 (*rpsL* アッセイ) の継続、③生化学的解析 (免疫能の定量) を開始する。④生殖細胞変異解析のためのセシウム 137 投与と交配の開始。②腫瘍のゲノム解析用のサンプル作成のためにセシウム 137 または KBrO_3 の 16 週間の飲水投与を開始する。

2021 年度は、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、発がん性を評価するために、②腫瘍のゲノム解析を行う。

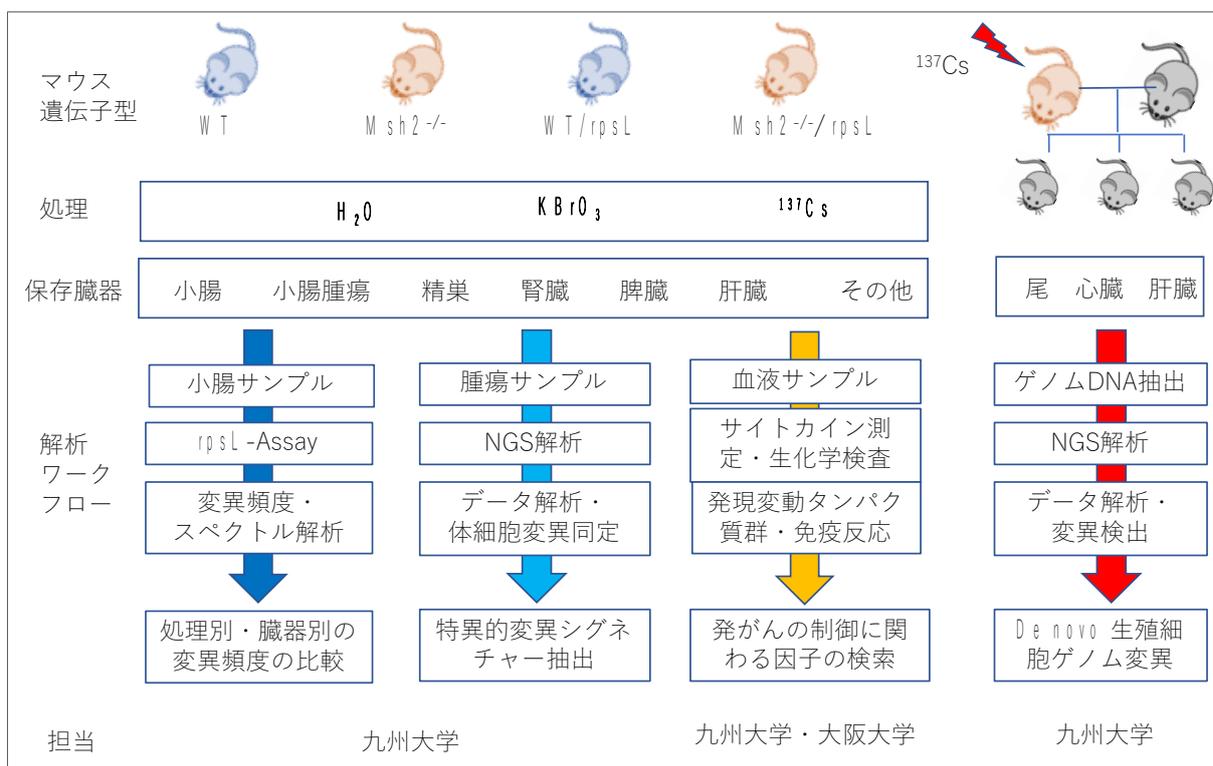
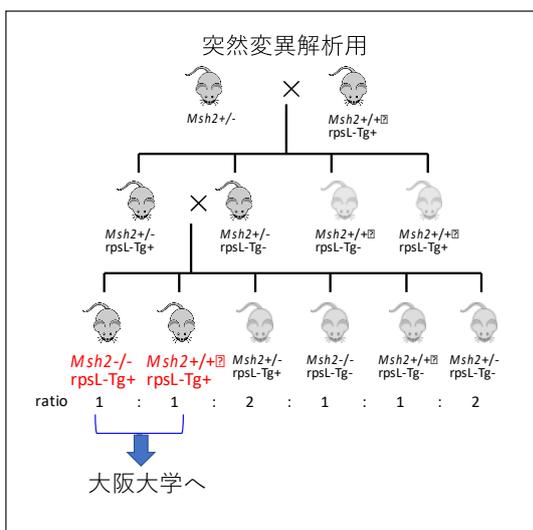


図 II-1 解析ワークフローと役割分担

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。



継世代影響の解析には、セシウム 137 を摂取したオスの *Msh2* 遺伝子欠損マウスを野生型メスと交配して得られた子の DNA サンプルを全ゲノム解析する [受託]。

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。

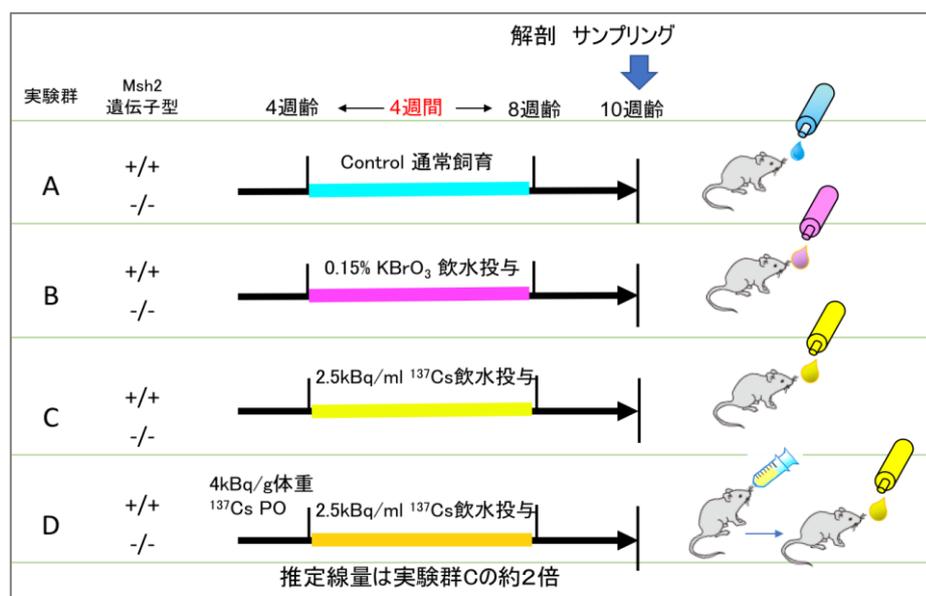


図 II-3 各実験群と突然変異解析用の投与プロトコール

大阪大学では、今年度は上記の投与プロトコールに加えて、D 群の投与と同様の方法で投与開始週齢のみ生後 8 週齢に変更した実験群も作成した。

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、濃度を調整した *rpsL* プラスミドベクターを用いて、大腸菌 DH10B β (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 DH10B β 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。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、今回は内部被ばくの影響を解析する。

セシウム 137 または KBrO₃ 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-4 に示す。

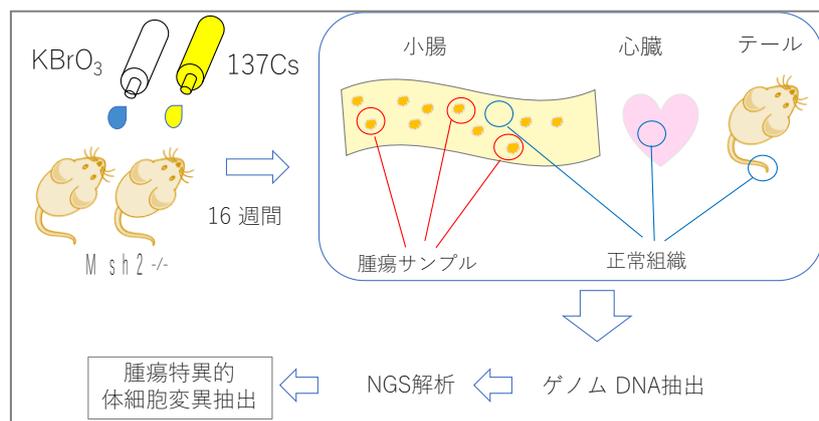


図 II-4 腫瘍特異的体細胞変異の解析ワークフロー

NGS 解析:次世代シーケンス解析

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-2 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。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⁺ はそれぞれ以下の4群に分け、4週間の投与処理を行い、その後同じ週齢時点で解剖し、凍結保存した臓器サンプルを用いて変異解析を行った。本年度は、H29年度の事業にて行われた解析結果に加え、解析マウス数が少なかった高濃度処理群であるD群として、*Msh2*^{-/-}, *rpsL*-Tg⁺ マウス5匹、*Msh2*^{+/+}, *rpsL*-Tg⁺ 7匹を大阪大学に輸送しセシウム137の追加投与を行い解析用サンプルを保存した。

- 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)

セシウム137を可溶性水溶液の状態での飲水させた場合、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。

本年度は保存したサンプルの一部、*Msh2*^{-/-}, *rpsL*-Tg⁺ マウス2匹、*Msh2*^{+/+}, *rpsL*-Tg⁺ 1匹からの小腸サンプルでの変異頻度の解析を行った。スペクトル解析および残りのサンプルの変異解析は次年度に行う。今回の解析分を追加した変異頻度のデータを以下の表 III-1 に示す。また各実験群の平均突然変異頻度と標準偏差を棒グラフで表記した(図 III-1)。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%KBrO₃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($p=0.037$, 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倍に、*Msh2*欠損マウスD群では約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% KBrO₃ 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。

表 III-1 小腸組織における突然変異頻度と解析サンプル数

<i>Msh2</i> Genotype	+/+				-/-				
	Experimental group	A	B	C	D	A	B	C	D
Mutation frequency ($\times 10^{-5}$)									
Average		1.41	2.65	3.61	5.66	31.83	58.27	32.82	48.47
SD		0.71	0.74	1.89	1.35	7.00	19.39	5.11	4.65
No. of sample analyzed		4	4	4	2	3	5	4	4

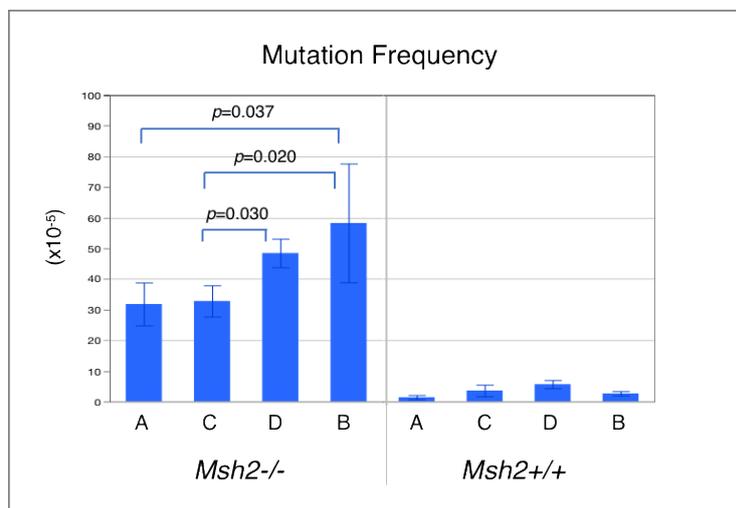


図 III-1 各実験群における平均変異頻度と標準偏差

Msh2 +/+は野生型マウスを、*Msh2* -/-は *Msh2* 遺伝子欠損マウスを示す。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）。Wilcoxon 検定（ペアごとのノンパラメトリックな多重比較）による p 値を示す。

2. 次世代シーケンスによる *de novo* 生殖細胞変異の解析

本年度は図 III-2 に示すように、*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これまでに保存されていた親仔サンプル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 (表 III-2)。5 サンプル全てで対象領域の 10X カバレッジは 94%以上、mean depth は 60 以上であり、エクソンキャプチャーおよびシーケンスの工程が変異解析に使用可能な精度で行われたことがわかる。今後このデータを用いて1世代で新たに生じた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。

また、本年度は *Msh2* 遺伝子欠損マウスのオスに 4 週間の KBrO_3 またはセシウム 137 の投与を行いその後野生型メスと交配したところ、 KBrO_3 投与、セシウム 137 投与の実験群でそれぞれ 1 ペアのみ仔が生まれたので尾サンプルを保存した。次年度以降に次世代シーケンサーによるゲノム解析を行う予定である。 KBrO_3 またはセシウム 137 の 4 週間投与により *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いことがわかった。

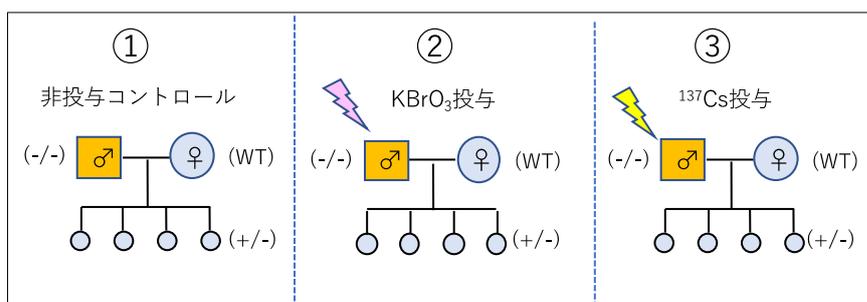


図 III-2 生殖細胞変異解析のための親仔サンプル

表 III-2 親仔サンプルのエクソーム解析レポート

Mouse ID	genotype	Sample	Average read length (bp)	Target regions (bp)	Average throughput depth of target regions (X)	Initial mappable reads (mapped to human genome)	% Initial mappable reads (out of total reads)	Non-redundant reads (deduplicated by Picard tools)	% Non-redundant reads (out of initial mappable reads)
Ms-Father	Msh2 -/-	tail	101	51,619,095	121.5	61,873,316	99.70%	54,110,286	87.50%
B6-Mother	Msh2 +/+	tail	101	51,619,095	136.7	69,634,576	99.70%	60,152,163	86.40%
pup-1	Msh2 +/-	tail	101	51,619,095	133.5	67,999,014	99.70%	59,152,228	87.00%
pup-2	Msh2 +/-	tail	101	51,619,095	133.3	67,910,102	99.70%	59,018,713	86.90%
pup-3	Msh2 +/-	tail	101	51,619,095	134.9	68,615,876	99.60%	59,596,441	86.90%

Mouse ID	Non-redundant unique reads (uniquely mapped to human genome)	% Non-redundant unique reads (out of non-redundant reads)	On-target reads (=reads mapped to target regions)	% On-target reads (out of non-redundant unique reads)	% Coverage of target regions (more than 1X)	Number of on-target genotypes (more than 1X)	% Coverage of target regions (more than 10X)	Number of on-target genotypes (more than 10X)	Mean depth of target regions (X)
Ms-Father	50,255,815	92.90%	37,881,532	75.40%	97.80%	50,477,961	94.10%	48,566,107	61.9
B6-Mother	55,773,519	92.70%	42,401,825	76.00%	97.70%	50,435,834	94.70%	48,882,819	69.5
pup-1	54,747,479	92.60%	42,182,143	77.00%	97.70%	50,440,245	95.00%	49,037,609	69.3
pup-2	54,820,582	92.90%	42,716,240	77.90%	97.80%	50,463,502	94.60%	48,853,832	69.9
pup-3	55,365,891	92.90%	40,369,927	72.90%	97.80%	50,468,168	94.20%	48,642,473	66

3. 次世代シーケンスによる腫瘍のゲノム解析

本年度はゲノム解析用サンプルを採取するために *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、尾を保存した。次年度以降にこれらのサンプルを用いて次世代シーケンスによる全エクソーム解析を行い、腫瘍組織特異的な体細胞変異を検出する予定である。

4. サイトカイン測定用血液サンプルの採取

表 III-3 に今年度血液サンプルの採取に用いたマウスの匹数を示す。生後 4 週齢または 8 週齢から、通常飼育または KBrO_3 の 4 週間投与を行った野生型マウスと *Msh2* 遺伝子欠損マウスから血液を採取し大阪大学に送った。セシウム 137 投与および採血は大阪大学で行った。

表 III-3 血液サンプル採取用マウスと採血済みサンプルの数

投与開始週齢	<i>Msh2</i> 遺伝子型	処理	マウス匹数	採血サンプル数	
				採血日 1	採血日 2
4w	+/+	A (非処理)	6	6	4
4w	+/+	D (^{137}Cs)	3	3	3
4w	+/+	B (0.15% KBrO_3)	9	9	7
4w	-/-	A (非処理)	5	5	4
4w	-/-	D (^{137}Cs)	3	3	3
4w	-/-	B (0.15% KBrO_3)	10	10	8
8w	+/+	A (非処理)	5	5	3
8w	+/+	D (^{137}Cs)	4	4	4
8w	+/+	B (0.15% KBrO_3)	4	4	4
8w	-/-	A (非処理)	2	2	1
8w	-/-	D (^{137}Cs)	2	2	2
8w	-/-	B (0.15% KBrO_3)	6	6	6

IV. 考察

高感度体細胞変異検出用マウスを用いた突然変異解の結果から、*Msh2* 欠損マウスでは、野生型マウスに比較して、通常飼育の状態での自然突然変異頻度が約 20 倍高いことが明らかとなった。*Msh2* 欠損マウスのセシウム 137 投与群のうち、C 群 (2.5KBq/ml セシウム 137 投与) では変異頻度の上昇は認められなかったが、高線量の D 群 (初日に 4KBq/g 体重を強制飲水 2.5KBq/ml セシウム 137 投与) では今年度解析したデータを追加して検定したところ有意な上昇が確認された。詳細な変異スペクトルの解析は今後行う予定であり、その結果から誘発変異の特徴を明らかにすることができると考えている。一方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いいため誘発変異の定量的・定性的解析にはさらに

多くのサンプルを必要とする。野生型マウスでは被ばくの影響が変異頻度のわずかな変化としてしか捉えられないが、*Msh2* 欠損マウスでは効率的に検出することが可能であると考えられた。また、DNA ミスマッチ修復機構が正常に機能する個体では、 KBrO_3 やセシウム 137 の飲水投与によって小腸に組織に誘発されるゲノム変異は効率的に抑制されていることが示された。

放射線被ばくにより体細胞に生じた変異は被ばく個体の発がんや様々な病態の誘発要因になる可能性があるが、生殖細胞に変異が生じた場合には子またはそれ以降の世代にまで影響が及ぶ可能性がある。そこで本研究では被ばくしたオスを親として作出した家系を用いて次世代シーケンスによる *de novo* 生殖細胞変異の解析も行う計画である。B 群および D 群の *Msh2* 欠損オスマウスを用いた交配で仔が得られたことから、投与期間中に生殖細胞に生じた影響が仔のゲノムに現れる可能性が考えられた。詳細な解析は今後行う予定である。

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た。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。一方で、化学物質による発がんや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

次年度以降もセシウム 137 投与サンプル数をさらに増やして突然変異解析を行う。腫瘍解析、継世代影響の実験のために必要なマウスの量産体制を整える。今年度すでに保存したサンプルを用いた解析を継続して行う。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 学内学会発表

- 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.

B. 国際学会発表

- 1) Mizuki Ohno, Toward understanding de novo germline mutations in mammals, 16th International Congress of Radiation Research (ICRR) 2019.8, 招待講演

VIII. 参考文献

- 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).

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 : ^{137}Cs , internal exposure, mutation, mismatch repair, oxidative stress, genetic effect

Abstract

A quantitative analysis of radiation effects on DNA is very important, and this data is valuable in understanding the effect of radiation on the health of exposed individuals and their children. To evaluate the biological effects of internal exposure due to oral administration of cesium-137, we examined the experimental system using the *rpsL* reporter gene transgenic mice. Of the biological effects of chronic exposure of cesium-137 radiation, the contribution of the indirect action 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 in this study. DNA mismatch repair 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, after which they were treated with regular drinking water for 2 weeks. Subsequently, all the mice were sacrificed, and their organs were isolated and stored for further analysis. When the small intestinal tissue, which was directly affected by the administration of cesium-137, was examined, mutation analysis revealed that the mutation frequency in the *Msh2*-deficient mice was approximately 10-20 times higher than that in the wild-type mice. With this experimental result, we have successfully detected induced mutations *in vivo* with high efficiency by orally administering cesium-137, quantitatively and qualitatively. It would be possible to reduce the number of mice used for the study compared to the study that uses wild-type mice. A detailed analysis of the mutation spectrum is currently underway.

2-5 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

分担研究者：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の精細化に活用可能な知見を公表することを目的として二つの研究を進めた。第一に、DNA 損傷修復遺伝子に欠損を持つ Msh2(-/-)マウスおよび野生型マウスの生細胞において、低線量・低線量率の単発および連続的な外部および内部被ばくと過酸化物質の影響を DNA 損傷バイオドジメトリー指標により定量的に比較することを目標として、本年度は RAW264.7 培養細胞を用いて γ H2ax 指標の線量依存性を示す定量技術を開発した。第二に、放射光解析により臓器内滞留セシウムの高解像度な組織内分布の知見を得ることを目標として、本年度は基盤整備を進めた。

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	過酸化物質	微量金属分析

研究協力者

研究協力者名 1 福津久美子（量研機構、放医研、線量評価）

I. 研究目的

東電 F1 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。しかし実際は、これらが遵守されているにも関わらず、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ける曖昧さに注目し、それらの曖昧さ軽減を目的として、以下の研究計画 I(過酸化物用量と ^{137}Cs 内部被ばく線量の量的相関の解析)および研究計画 II(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 ^{137}Cs 内部被ばく線量の量的相関の解析、

原子力災害後に指摘されてきたことは、低線量・低線量率被ばく影響についての曖昧さである。疫学的に有意差のない現象を実験的に示すことは極めて難しい。総放射線線量が 10mSv 程度の極低線量被ばく、特に低線量率被ばくでは、ヒトなどの哺乳類細胞に実験的に観察可能かつ再現性の高い影響は限られる。その理由は、放射線の標的である DNA は生体に内在する過酸化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 $\text{Cdkn1a}/\text{Myc RNA}$ 比がマウスの被ばく線量に比例して増加すること、更に被ばく線量が 20mGy であっても有意に増加することを既に報告している。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すること、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。

本年度は DNA 損傷の新たな定量指標を確立するために、マイクロ分析に適した系列培養細胞である RAW264.7 細胞を使用して定量技術開発を進めるとともに、放射線・ β エミッター・過酸化物の DNA 損傷指標との量的相関を求め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。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。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ミミ

クロ定量分析技術開発を進め、腎臓尿細管組織におけるウランの局在を示してきた。Spring-8 はエネルギー的にセシウムと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。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。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セミマイクロレベルで提示することを三年間の目標とした。

本年度は Spring-8 セミマイクロ定量に向けて必須なデータを得るために、臓器試料調製方法を検討しつつ、極微量(体重 1g あたり 2 pmole 程度)投与した放射性セシウムと、微量(体重 1g あたり 100nmole 程度)投与した天然セシウムの臓器分布の同等性を示すことを目的とした。

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は分子細胞生物学的実験(方法は下記 1, 2, 3)、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は主に動物実験(方法は下記 4, 5)により、今後の研究に活用する技術開発を含む研究を行った。

II-1. 系列培養細胞 RAW264.7 細胞への照射および β エミッター、過酸化物、金属処理

培養細胞はマウス破骨細胞系ライン化細胞である RAW264.7 細胞の高速増殖サブクローン(倍加速度 18 時間)を選択した。10%FCS を含む RPMI-1640 培地で培養した細胞を 20°C で X 線(200V, 200mA, Al-Cu-0.5mm-filter)照射した。照射装置の線量率はそれぞれ AirKerma から水吸収線量率 Gy/min として求め、0.5~1.0Gy/min の範囲で照射した。RNA 分析は直径 3.5cm 培養皿を使用して細胞の底面占有率 80%、 γ H2ax 分析の際には底面占有率 50% の細胞を使用した。 β エミッターとしてはセシウム 137 を使用し、Ge 半導体検出器で放射能測定した $^{137}\text{CsCl}$ を 0.1mL 培地に 488kBq を投入した。セシウム 137 の β 線平均エネルギーが 188.4keV であることから、488kBq/0.1mL/1hr では 500mGy 相当と見積もられた。過酸化物としては過酸化水素(H_2O_2)と臭素酸ナトリウム

(NaBrO₃)、遺伝毒性金属はクロム酸カリウム[K₂Cr(VI)O₄]を使用した。これらは pH7 付近の水溶液として調製したのちに培地に投入し、20°Cで 1 時間培養した。物質実験の際には毎回線量既知の X 線を照射した細胞を調製して、DNA-damage 定量標準とした。

II-2. RAW264.7 細胞の γ H2ax 分析および小核分析

γ H2ax 定量分析は以下の方法で行った。薄ガラス底培養皿上で付着培養して上記処理した RAW264.7 細胞を新鮮な培地で 37°C30 分培養した後にホルムアルデヒド蒸気固定した。常法に基づいて DNA 損傷を γ H2ax 蛍光抗体染色した後に、染色率指標としてヘキスト 33342 核染色して蛍光顕微鏡撮影した。最高線量の X 線を照射した細胞試料と Sham 照射細胞試料から、 γ H2ax 蛍光定量に至適な励起光強度と露光時間を決定した後に、中間線量の X 線照射細胞試料を検量線として、試験物質処理試料とともに撮影した。蛍光減衰が 10%を超えない励起時間内に 10 倍対物レンズによる位相差- γ H2ax-ヘキスト画像セットの画像ファイルを 5 視野ずつ記録した。 γ H2ax レベルの解析としては、細胞核面積の 40%以上が γ H2ax 蛍光染色された細胞を陽性として、試料あたり約 500 細胞をカウントした。事前に、Sham 照射対照でカットオフ Threshold レベルを決定した上で最高線量の外部被ばく試料が 100%付近を示すようにダイナミックレンジを設定した。

小核分析は常法により、以下の方法で行った。チャンバースライドガラス上に付着培養した RAW264.7 細胞をサイトカラシンとともに 20 時間培養し、50mM KCl で細胞を膨潤処理した後に固定し、ギムザ染色で核染色して撮影した。二核細胞および小核を伴う二核細胞の数を測定した。

II-3. RAW264.7 細胞の DNA 損傷誘発 RNA の定量分析

低線量放射線影響を分析するための RNA 指標としては Cdkn1a を使用した。基準 RNA としては Gapdh を使用した。上記処理した細胞は 2 時間培養したのちに総 RNA を調製し、200~600ng あたり 10unit の AMV 逆転写酵素で cDNA を合成し、上記 RNA に相当する primer を使用して real-time PCR で定量した。real-time PCR 反応の際、毎回到 10zmole の標準 DNA を増幅して増幅速度のずれを補正しつつ、Gapdh RNA あたりの Cdkn1a または RNA の量比を求めた。

II-4. マウスに対するセシウム 137 の投与と臓器分離

代謝ケージで順化済みの C3H/He マウスに 1kBq の ¹³⁷CsCl 溶液を皮下投与した。規定時間飼育後、マウスはトランクリライザー軽麻酔下に放血安楽死させて臓器を採取した。放射エネルギーは Ge 半導体検出器を使用して、および臓器放射能は臓器溶解浮遊物をセシウム 137 を含む標準線源、安楽死前のマウス体内総セシウム 137 量は放射エネルギー既知のマウスファントムを使用して測定した。

II-5. マウスの安定セシウム投与と臓器内セシウムの ICP-MS 定量、放射光解析用組織試料調製

順化済みの C3H/He マウスの皮下に 0.5~5mg/kg の CsCl を投与した。マウスのトランクリライザー軽麻酔下に放血安楽死させて臓器を採取した。分離臓器はマイクロウェーブ湿性灰化装置で硝酸分解した後に希釈液を調製し、ICP-MS 装置を使用してセシウムを定量した。また、放射光解析用に凍結臓器の連続切片(10 μ m 厚)を調製した。連続切片シリーズのうち一部を組織染色のためにスライドガラスに固着させ、一部をセシウムの Spring-8 放射光解析のため、一部をカリウム

の Pixe 放射光解析のためにポリプロピレンフィルムに固着させた。骨を含む組織試料は切断面にポリプロピレンフィルムテープを貼り付けることで破砕物の移動を防止した連続切片シリーズを調製した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては温度湿度および微生物環境の適正化された専用の飼育室および実験室を使用し、マウスに処置する際はストレス軽減のためのトランクライザー軽麻酔またはセボフルラン吸入麻酔下で行った。当該設備ならびに作業手順は所内実験動物委員会により事前審査および承認により、その適正化が確保されている。また、実験室使用者の安全確保ならびに施設周囲の環境保護のため、放射線発生装置、ラジオアイソトープおよび化学物質の使用に先立って、所内担当部署による確認および承認を受けた作業手順および施設使用要領に従って実施した。

III. 研究結果

III-1. 過酸化物用量と ^{137}Cs 内部被ばく線量の量的相関の解析

低線量被ばく影響指標としては血液細胞における DNA 損傷誘導性 RNA のひとつである *Cdkn1a* mRNA (p21) および long non-coding (lnc) RNA である micro RNA34a 前駆体(34ae)の発現量が 50mGy 以上の放射線の線量依存性定量指標となることを我々は既に見出していた。この生物学的原理は、生細胞内で生じた DNA 損傷の程度に応じて活性化する生体機構の端緒を RNA 量増加として測定することであり、real-time PCR による高精度極微量 RNA 定量技術の確立に基づいている。

放射線とは DNA 損傷プロセスの異なる過酸化物等の対比には、別の生物学的原理に基づく低線量被ばく指標の定量技術確立が必要である。しかしながら、低線量被ばく指標となりうる細胞生物学的指標は限られている。たとえば放射線による DNA 複製の低下を EdU アッセイ、RNA 合成抑制を EU アッセイ、ミトコンドリア過酸化レベルを JC1 アッセイ、小胞体活動低下を ER-tracker、細胞膜流動の劣化を Cell-Mask、細胞死を TUNEL で、染色体切断を M 期核染色で検討したが、これらの変化はいずれも 3Gy を超える高線量被ばくでのみ観察され、低線量被ばく指標とはなり得なかった(data not shown)。定量性比較検討の結果、低線量放射線定量指標としては、放射線で生細胞核内に発生した二本鎖 DNA 切断部位を認識して結合する特異蛋白量を抗体で定量するという生物学的原理に基づく γH2ax 分析を選択した。

顕微鏡観察画像の定量化は容易ではない。そこで、今年度は系列化細胞を使用して γH2ax 蛍光染色による定量方法の確立に主眼を置いた。マウス RAW264.7 細胞は破骨細胞系の食細胞として広く使用されてきたライン化細胞である。やや分化した細胞であるために、放射線感受性はマウス血液細胞に比べて低く、低線量影響分析には適合しないが、小核分析結果からは、非処理の小核頻度が極めて低く、100mGy 程度の線量でも有意な小核増加が観察される。本年度は当該細胞ラインを使用して、外部被ばく線量依存性を示す検量線を作成できる γH2ax 定量方法を決定し

(1-1)、 β エミッターと過酸化物質等物質性遺伝毒物の影響の程度を γ H2ax ならびに RNA 指標で比較した(1-2)。

III-1-1. RAW264.7 細胞における放射線線量依存性の γ H2ax 陽性蛍光強度と活性化

線量依存性の γ H2ax 増加の検量線を得るために、100m から 1000mGy の範囲で X 線照射した RAW264.7 細胞の γ H2ax 染色を行い、低倍率で蛍光顕微鏡撮影の後に細胞単位で γ H2ax 染色レベルを測定した。図 III-1 は 100m から 1000mGy の範囲の外部被ばくの放射線量ごとの、検出細胞数を示した図である。当該線量範囲において高度な直線性を示した。なお縦軸に示す細胞比 (γ H2ax-focus-rich) とは II 研究方法の 2 に記述した条件で「陽性」と見なされた細胞であり、実際の γ H2ax-focus 発生率よりも著しく感度を落とした定量方法である。感度を落として定量した理由は IV 考察の 1 に記述した。この定量方法で 100mGy 以上の線量で有意な増加が認められた。

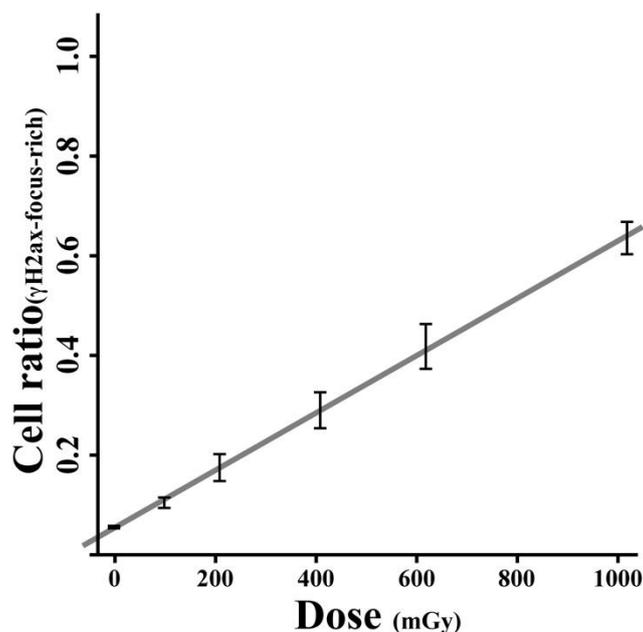


図 III-1. RAW264.7 細胞における X 線量依存性の γ H2ax 強陽性細胞の頻度増加

III-1-2. RAW264.7 細胞における DNA 損傷応答 RNA 量の放射線依存性増加

RAW264.7 細胞の継代選択により、細胞倍加速度が 22 時間から 18 時間に加速したサブクローンを選択した。増殖加速により放射線感受性の高まることを期待したが、DNA 損傷応答 RNA の増加を指標とした放射線感受性は更に低下し、血液細胞の高感度指標である PrimiR34a lncRNA の応答性は消失し、Cdkn1a mRNA のみが 500 から 1500mGy の範囲の線量で直線性を示した(図 III-2)。

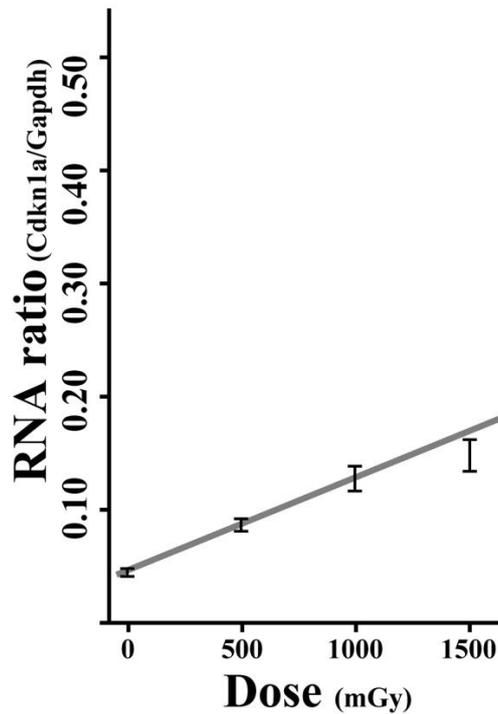


図 III-2. RAW264.7 細胞における X 線量依存性の Cdkn1a mRNA 量の増加

III-1-3. RAW264.7 細胞における遺伝毒物の二種類の指標による定量比較。

上記の γ H2ax-rich 細胞検出率および Cdkn1a RNA 比を定量指標として、DNA 損傷作用を持つ遺伝毒物の影響を比較した。過酸化剤として過酸化水素と臭素酸ナトリウムのほか、オキシ酸金属であるクロム(VI)酸を使用し、 β エミッターは ^{137}Cs を使用した。これらの遺伝毒物に細胞を 20°C で 1 時間接触させたが、その理由は IV 考察 3 に記述した。 γ H2ax を指標とした結果を図 III-3、Cdkn1a RNA を指標とした結果を図 III-4 に示すが、 γ H2ax 陽性率および Cdkn1a RNA 量による相当線量は、 $25\mu\text{M}$ の過酸化水素では約 200mGy 相当量(eq)と約 1000mGy -eq、 $100\mu\text{M}$ の臭素酸ナトリウムは 0mGy -eq と 1000mGy -eq、 $50\mu\text{M}$ のクロム酸は約 800mGy -eq と 1500 を大幅に超える mGy -eq をであった。また、今回の実験では ^{137}Cs による細胞の被ばく線量は 500mGy に相当することが予想されたが、 γ H2ax および Cdkn1a RNA とも有意な増加は認められなかった。

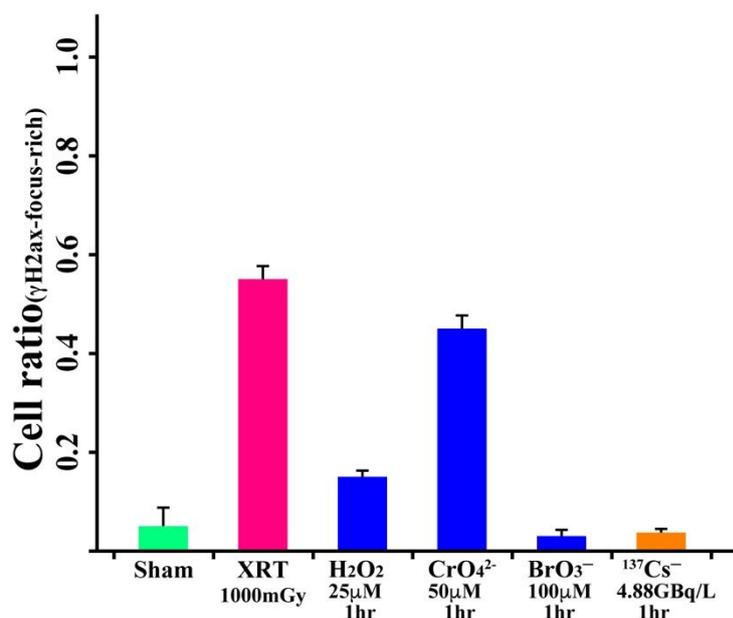


図 III-3. RAW264.7 細胞に対する種々の遺伝毒性物質処理による γ H2ax 強陽性細胞の頻度増加

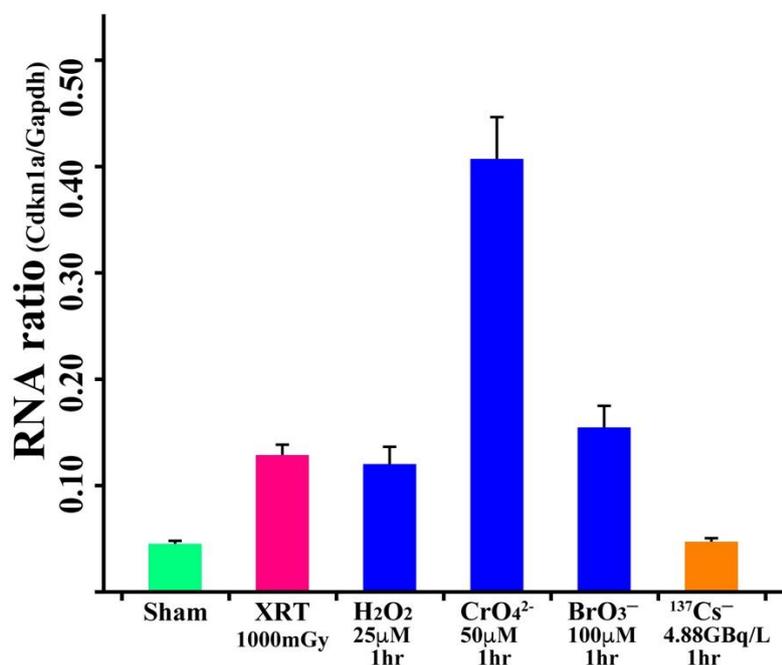


図 III-4 RAW264.7 細胞に対する種々の遺伝毒性物質処理による Cdkn1a mRNA 量増加

III-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

国内共同利用施設である Spring-8 ではマシンタイム使用の審査があり、年間数日しか使用できない。最終年度までにセシウム保持組織の放射光分析結果を得ることに向け、本年度は実験基

盤整備を進めた。具体的には ICP-MS スペクトル分析装置のセシウム定量のための整備、安定セシウム至適投与量の検討、臓器試料調製などであり、提示できるに十分な実験結果は得られていない。

IV. 考察

IV-1. RAW264.7 細胞の低倍率撮影による放射線量依存性 γ H2ax 活性化レベルの定量法

放射線影響指標として γ H2ax-focus の観察は汎用され、その定量方法についても多くの報告がある。しかしながら、顕微鏡分析を使用した定量は原理的に容易ならざることに加え、関連機器や手技の寄与が極めて大きく、500mGy 以下の線量については再現性の高い方法は確立されていない。特異性ならびに定量性が優れ汎用される蛍光抗体法では顕微鏡観察の際、通常光・励起光・ならびに自然酸化による蛍光強度の低下の定量結果に与える影響が問題になる。低線量に至適とされる 100 倍対物レンズ下の細胞核内観察による γ H2ax-focus の測定法では、実際に厚みのある細胞核中に立体的に散在するドット状の γ H2ax focus を観察するために 1 視野あたり焦点深度を 20 分割して蛍光顕微鏡画像を得ないと検出できないドットが増大する。励起光照射範囲を狭めた細胞核内分析専用の蛍光顕微鏡を使用して自動焦点分割撮影すると、1 視野 20 分割焦点撮影を 1 回を終えると蛍光強度が 60~80%に減弱してしまう。また、蛍光観察前に通常光照射下で微分干渉画像観察により適切な視野の決定と焦点範囲設定を行う必要がある。倍率が大きいためこれに数分を要するが、5 分間の通常光による蛍光強度は 70%に低下する。蛍光強度に依存する低線量定量の目的に、 γ H2ax focus の核内観察による分析は当面不可能であると結論した。励起光ならびに通常光照射による蛍光強度低下を 10%以内に抑える条件を確保するため、焦点深度が大きく必要励起光量の少ない 10 倍または 20 倍の対物レンズで細胞核全体の γ H2ax 蛍光量を記録し、明らかに陽性の細胞の数と頻度を測定するという定量方法を採用した。その結果、線量範囲が 100 から 1000mGy の線量範囲で線量依存性が示された(図 III-1)。

RAW264.7 細胞に比べてマウスから採取した血液系細胞は放射線感受性が高いので、本年度採用した方法で低線量被ばく指標となることが予想されるが、技術的改善の余地のあることがわかった。

IV-2. RAW264.7 細胞における低線量被ばく影響の異なる指標による定量下限

Cdkn1a RNA が DNA 損傷による増殖抑制の際の遺伝子発現レベルを指標としていることに対し、 γ H2ax は生細胞の核内に発生する DNA 二本鎖切断部位に結合するリン酸化ヒストンの量を示している。この他にも放射線により発生する現象は数多いが、高再現性かつ線量依存性の増減が期待でき、かつ低線量分析に使用できる指標には限界がある。我々は他にも幾つかの候補を検討したが、満足できる定量方法を発見できなかった。染色体分析に類似した小核分析は上記の感度を下げた γ H2ax 定量と同等の感度であり、100mGy 以上の外部被ばくでしか有意な頻度増加が検出できなかった(data not shown)。小核頻度の生物学的測定標的は DNA 二本鎖切断による染色体切断である。被ばく後の細胞は細胞核分離阻害剤であるサイトカラシン B の存在下、1 細胞周

期時間培養することで細胞増殖させると、核複製後に細胞分離できない二核細胞が出現する。切断した染色体は微細なサイズの小核として二核細胞内に含まれるので、小核を所持する二核細胞の出現頻度は、染色体切断の発生頻度に比例する。しかしながら、照射から測定までの培養時間の長さ、毒性薬剤処理は再現性を大幅に低下させる要因である。よって、次年度以降は γ H2ax と RNA 分析を指標とすることにした。なお、次年度以降に計画しているマウス由来の血液系細胞は、RAW264.7 細胞よりも放射線や遺伝毒物に感受性が高いので、測定線量範囲の下がることが予想される。

IV-3. RAW264.7 細胞における遺伝毒物の影響

今回は、遺伝毒物として過酸化水素と臭素酸ナトリウム、クロム酸カリウムを使用した。過酸化水素用量は類似研究での下限濃度であるが、37°Cで1時間処理すると細胞は急速に致死過程に至るため、血液系細胞において細胞増殖や細胞呼吸を低下させる20°Cで1時間処理した。血液系細胞を4°C処理すると自然過酸化が促進して自壊の進むことが古くから知られているので、次年度以降は温度影響の確認が必要になる。

過酸化水素や臭素酸はともに過酸化物であり、DNA 損傷応答 RNA を強く誘導したが、 γ H2ax への誘導量は低かった。過酸化物の遺伝毒性作用は主に一本鎖切断とされ、局所集中した一本鎖切断部位にのみ γ H2ax が結合するが、一本鎖切断でも細胞は DNA 損傷応答することから、この結果に問題はなさそうである。

クロム酸は多量の γ H2ax-focus-rich 細胞を生ずるのみならず、DNA 損傷応答 RNA を著しく誘導したことから過酸化よりも多価金属毒性としての寄与の大きい可能性がある。今回セシウム 137 投与では誘導が観察されなかったが、放射線感受性の高い細胞を使用する次年度以降から、内部被ばくモデルとして解析する意義が示された。

4. 腸管循環セシウムの放射光分析に向けた整備

放射光分析試料や分析前定量データを得るための ICP-MS スペクトル分析ために、動物に投与する安定セシウム量は微量ではあるものの、一般的なセシウム 137 を使用した動物実験で投与されるセシウムのモル量は桁外れに少なく、前者は後者の 50,000 倍のモル用量となる。このモル量の相違による、臓器間や臓器内セシウム分布の相違の程度を把握するために、セシウム 137 と安定セシウムを使用した実験を開始している。

V. 結論

本年度は当初計画に基づき、生細胞における線量依存性の放射線影響の定量のために、DNA 損傷指標である γ H2ax を導入するために、RAW264.7 系列化細胞を使用してマイクロ定量方法を決定した。そして γ H2ax と DNA 損傷応答 RNA という異なる生物学的過程を反映する指標を用いて過酸化物の細胞影響を量的に比較し、本年度確立した方法を基盤として次年度以降のマウス血液系細胞を使用した低線量放射線影響の測定に利用できることが示された。また、セシウムの臓器内

分布をセミマイクロレベルに精細化する放射光分析に向けた基盤整備を進めた。

VI. 次年度以降の計画

VI-1. 過酸化剤用量と ^{137}Cs 内部被ばく線量の量的相関の解析

令和2年度は、本年度に確立した γH2ax 定量技術を改良してマウスの初代細胞の放射線量依存性を測定可能な方法を確立する。また、本年度と同様に、処理温度と濃度の相関を含め遺伝毒性過酸化剤と β エミッターによる内部被ばく影響を、 γH2ax と DNA 損傷応答 RNA を同時に定量し、作用の相違と類似性を明瞭化する。令和3年度はその技術開発を更に進め、DNA 損傷修復機構に欠損のある $\text{Msh2}(-/-)$ マウス細胞を使用して、外部被ばく・内部被ばく・遺伝毒性影響を比較する。

VI-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

令和3年度に Spring-8 放射光による組織切片のセミマイクロ分析が可能となるように、令和2年度は本年度に引き続き放射光分析に向けて基盤整備を進める。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

B. 論文：査読なし

- 1) 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, 2020-03
- 2) 上原章寛, 武田志乃, 松村大樹、アクチノイドイオンを模擬した金属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, 2020-03

C. 学内学会発表

- 1) 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、10/30-11/1 第55回 X線分析討論会
- 2) 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, 日本毒性学会, 2019-06-27
- 3) 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、11/14-11/16 日本放射線影響学会第62回大会, 日本放射線影響学会, 2019-11-15
- 4) 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、11/14-11/16 「日本放射線影響学会第62回大会」, 日本放射線影響学会, 2019-11-15
- 5) 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・量子生命科学学会 第1回大会, QST, 2019-05-23

- 6) 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／量子生命科学学会 第1回大会, QST, 2019-05-23

D. 国際学会発表

- 1) Shino Takeda, Takanori Yoshida, Masakazu Oikawa, Akihiro Uehara, Chiya Numako, Yasuko Terada, Izumi Tanaka, Hiroshi Ishihara, Dynamics of uranium localization and tissue alteration in kidney of rats exposed to uranyl acetate. 16th International Congress of Radiation Research (ICRR2019), Association for Radiation Research (ARR), 2019-08-26

Studies on the quantitative comparison of immature cell-damages by radiation and superoxide, toward the dose estimation of internal radiocesium prior to tumorigenesis.

Hiroshi Ishihara

Internal Decorporation Research Group , Department of Basic Medical Sciences for Radiation Damages , 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 set two 3-year projects, aimed to publish data that can be utilized for dose estimation of internal exposure of radiocesium. In the first project, the object is quantitative comparison of the action of DNA-damaging agents including reactive oxygen species and low-dose ionizing radiation in external-single and internal-continuous exposure at low dose-rate, using two different biodosimetric indicators, in the cell from wild-type and *msh2(-/-)* DNA-repair defective mice. In the first year, we established quantitative microscopic methodology of γ H2ax in RAW264.7 cell line. In the second, the purpose is high resolutional observation of the location of cesium in the tissue by X-ray fluorescence imaging using high-energy synchrotron radiation. This year, we set about instruments and procedures for quantitative and histological analysis of cesium ion.

2-6 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（福島県立医科大学医学部 甲状腺内分泌学講座 教授）

研究要旨

福島第一原子力発電所事故時 0-18 歳を対象に甲状腺超音波検査をおこなっており、甲状腺がんがみついている。癌のメカニズムを解明するために病理組織学的解析と遺伝子変異解析をおこなった。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。手術時年齢は 9 歳から 23 歳で中央値は 18 歳であった。震災時年齢は 5 歳から 18 歳までで中央値は 14.5 歳であった。手術症例の腫瘍径は平均 15.3mm であった。病理組織型の検討では 138 例中甲状腺乳頭癌 (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(Cribiform-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。遺伝子変異解析では *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の甲状腺癌とは異なっていた。

キーワード：小児若年者、甲状腺がん、遺伝子変異、福島第一原子力発電所事故

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)，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 甲状腺検査部門)，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 甲状腺検査部門)，山下俊一(福島県立医科大学)，光武範史(長崎大学原爆後障害医療研究所)，石川徹夫(福島県立医科大学放射線物理学)，大平哲也(福島県立医科大学疫学)，山谷幸恵(福島県立医科大学甲状腺内分泌学)，関野瑞希(福島県立医科大学甲状腺内分泌学)，岩館学(福島県立医科大学甲状腺内分泌学)，鈴木聡(福島県立医科大学甲状腺内分泌学)，松本佳子(福島県立医科大学甲状腺内分泌学)

I 研究目的

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。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)。

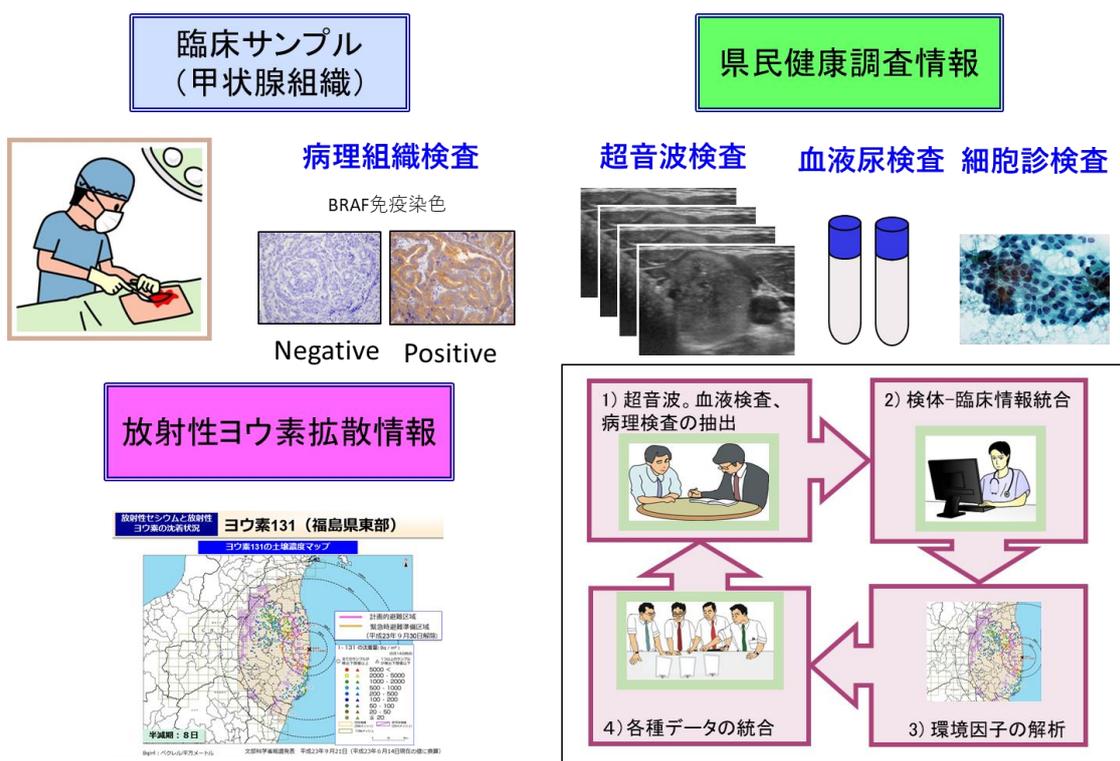


図1 本研究の概略

II 研究方法

(方法) 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。遺伝子変異解析は手術時に採取した凍結標本を用いDNAおよびRNAを抽出した。*BRAF*^{V600E} 遺伝子変異はダイレクトシーケンシング法で解析し、*RET/PTC1*, *RET/PTC3*, *ETV6(ex4)/NTRK3*などの融合遺伝子はreal time RT-PCR法およびダイレクトシーケンシング法で解析した³⁾。

(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

(対象)

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例に対して遺伝子変異解析をおこなった。手術時年齢は9歳から23歳で中央値は18歳であった。震災時年齢は5歳から18歳までで中央値は14.5歳であった。男性は52例(36.6%)、女性は86例(63.4%)であり、男女比(女性/男性)は1.65であった(表1)。

	All (n=138)
Age (at surgery) Median (range)	18 (9-23)
Age (at disaster: March 11, 2011) Median (range)	14.5 (5-18)
Sex	
Male	52 (36.6%)
Female	86 (63.4%)
Female/Male	1.65

表1 手術時年齢、震災時年齢、男女比

(臨床病理学的特徴)

手術症例の腫瘍径は平均 15.3mm であった。腫瘍径は 72.5% で 10mm を超えていた。被膜外浸潤は 45.7% に認められた。リンパ節転移は 78.6% に認められた。肺などの遠隔転移は 2.2% に認められた (表 2)。

	All (n=138)
腫瘍径 (mm)	15.3 ± 8.9
≤10.0	38例 (27.5%)
>10.0, ≤20.0	79例 (57.2%)
>20.0, ≤40.0	18例 (13.0%)
>40.0	3例 (2.2%)
pEx factor (被膜外浸潤)	
pEx0	74例 (53.6%)
pEx1	63例 (45.7%)
pExX	1例 (0.7%)
pN factor (リンパ節転移)	
pN0	29例 (21.4%)
pN1	109例 (78.6%)
M factor (遠隔転移)	
M0	135例 (97.8%)
M1	3例 (2.2%)

表2 臨床病理学的特徴

pEx (pathological extrathyroidal extension), pN (pathological lymph node metastasis), M (distant metastasis)

(小児甲状腺癌の病理組織診断)

病理組織型の検討では 138 例中甲状腺乳頭癌(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)

小児甲状腺癌の病理組織診断 (n=138)
Papillary thyroid cancer(n=136) Classical (n=125)
Cribiform-morular variant (n=4)
Follicular variant (n=3)
Diffuse sclerosing variant(n=2)
Solid variant (n=2)
Poorly differentiated carcinoma(n=1)
Others (n=1)

表3 小児甲状腺癌の病理組織診断

(遺伝子変異解析)

遺伝子変異解析では *BRAF*^{V600E} 変異が 96 例(69.6%)であった。*RAS* の変異はみとめず、チェルノブイリで多くみられた *RET/PTC3* 遺伝子異常はわずか 1 例のみに認めた(表 4)。

Mutation analysis (n=138)	Mutation of gene	No of Cases (%)
Papillary thyroid cancer(n=136)	<i>BRAF</i> ^{V600E}	96 (69.6)
	<i>RET/PTC1</i>	8(5.8)
	<i>RET/PTC3</i>	1 (0.7)
	<i>ETV6(ex4)/NTRK3</i>	6 (4.3)
	Others	8(5.8)
	Unknown	17 (12.3)
Poorly differentiated carcinoma(n=1)	Unknown	1 (0.7)
Others (n=1)	Unknown	1 (0.7)

表4 遺伝子変異解析

IV 考察

本年度は 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。遺伝子変異解析では *BRAF*^{V600E} 変異が 96 例(69.6%)にみられ、チェルノブイリ事故後の小児若年者甲状腺癌で多くみられた *RET/PTC* 遺伝子異常は 6.5%と少ないことが明らかとなった⁴⁾(表 5)。一

方で成人における散発性甲状腺癌では *BRAF*^{V600E} 変異が 40-50%の頻度で見られており⁵⁾、福島県県民健康調査で発見治療された甲状腺癌の遺伝子異常の割合と類似する傾向であった。

mutation	散発性、成人	散発性、小児	Post-Chernobyl、小児	福島小児 (n=138)
<i>BRAF</i>	40-50%	3-6%	0* 4-16%**	69.6%
<i>RAS</i>	10-15%	0	0	0
<i>RET/PTC</i>	20-30%	50-60%	64-86%* 50-60%**	6.5%
<i>AKAP9/BRAF</i>	1%		11%* 0**	0
<i>TRK fusion</i>	0-10%		3-7%	5.8%

*In tumors developed after a short latency (< 7-10 yr)

**In tumors developed after a long latency (> 9-10 yr)

Nikiforov YE, et al. Endocr Pathol (2006)
Mitsutake N, Suzuki S, et al. Sci Rep (2015)

表5 海外データとの比較

V 結論

福島第一原子力発電所事故後の小児若年者甲状腺がんの遺伝子異常は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。

VI 次年度以降の計画

次年度以降は小児甲状腺がん患者における放射線環境（外部被ばく；震災後の低線量被ばくや小児期の医療被ばく、内部被ばく）、性ホルモン環境（初経の有無、成長曲線、肥満等の生活習慣）、免疫環境（過去の病歴、甲状腺自己抗体の有無、自己免疫疾患との関連性、ヨード摂取環境）などを検討し、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を解明する予定である。

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. 2019; 47-1-8.
2. Ohira T, Ohtsuru A, Midorikawa S, Takahashi H, Yasumura S, Suzuki S, Matsuzuka T, Shimura H, Ishikawa T, Sakai A, Suzuki S, Yamashita S, Yokoya S, Tanigawa K, Ohto H, Kamiya K; Fukushima

- Health Management Survey group. 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; 30:853-860.
3. Sugitani I, Ito Y, Miyauchi A, Imai T, Suzuki S. Active Surveillance Versus Immediate Surgery: Questionnaire Survey on the Current Treatment Strategy for Adult Patients with Low-Risk Papillary Thyroid Microcarcinoma in Japan. *Thyroid*. 2019; 29:1563-1571.
 4. Yokoya S, Iwadata M, Shimura H, Suzuki S, Matsuzuka T, Suzuki S, Murono 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; 65:122-127.
 5. Ohira T, Shimura H, Hayashi F, Nagao M, Yasumura S, Takahashi H, Suzuki S, Matsuzuka T, Suzuki S, Iwadata 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; 61:243-248.
 6. Ishikawa T, Yasumura S, Akahane K, Yonai S, Ohtsuru A, Sakai A, Sakata R, Ohira T, Kamiya K. The latest update of individual external doses in an early stage after the Fukushima accident. *Radiat. Prot. Dosim*. 2019; ncz274.
 7. 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 accident. *Radiat. Prot. Dosim*. 2019; ncz281.
 8. Matsuo M, Taira Y, Orita M, Yamada Y, Ide J, Yamashita S, Takamura N: Evaluation of Environmental Contamination and Estimated Radiation Exposure Dose Rates among Residents Immediately after Returning Home to Tomioka Town, Fukushima Prefecture. *Int J Environ Res Public Health*. 2019; 16: E1481.
 9. Shimura K, Shibata H, Mizuno Y, Amano N, Hoshino K, Kuroda T, Kameyama K, Matsuse M, Mitsutake N, Sugino K, Yoshimura Noh J, Hasegawa T, Ishii T: Rapid Growth and Early Metastasis of Papillary Thyroid Carcinoma in an Adolescent Girl with Graves' Disease. *Horm Res Paediatr*. 2019; 91: 210-215.
 10. Suzuki K, Saenko V, Yamashita S, Mitsutake N: Radiation-Induced Thyroid Cancers: Overview of Molecular Signatures. *Cancers (Basel)*. 2019; 11: E1290.

口頭発表

1. Shinichi Suzuki. Surgical treatment of childhood, adolescent and young adult thyroid cancers detected by the ultrasound screening after the Fukushima's power plant accident. *World Congress of Surgery*

- WCS 2019. Krakow, Poland. 2019
2. Shinichi Suzuki. Is Childhood, Adolescent and Young Adult Thyroid Cancer in Fukushima after Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident different from Chernobyl's Thyroid Cancer after the accident? The 13th Congress of AOTA (Asia and Oceania Thyroid Association). Sydney, Australia. 2019
 3. Shinichi Suzuki. Ultrasound Diagnosis of Thyroid lesions Using Ultrasound to distinguish between benign and malignant. 2019年度中日中青年甲状腺フォーラム. Beijing. 2019
 4. Shinichi Suzuki. "Surgical treatment of pediatric thyroid cancer in Japan" (Keynote Lecture). The 2nd International Symposium of the Radiation Medical Science Center for the Fukushima Health Management Survey. Fukushima. 2020
 5. Shinichi Suzuki. Is Fukushima's thyroid cancer occurred due to the radiation effect or screening effect?. AsAES 2020 Congress. Melbourne. 2020
 6. Manabu Iwadate. The Clinicopathological results of the thyroid cancer with BRAF mutation in the young population in Fukushima. 89th Annual Meeting of the American Thyroid Association, Chicago, U.S.A, 2019
 7. Manabu Iwadate. BRAF(V600E) mutation is highly prevalent in the young population in Fukushima. The 13th Congress of AOTA, Sydney, Australia, 2019
 8. Shunichi Yamashita. 『Radiation and Thyroid Cancers after Nuclear Accidents – lessons learned』 International Symposium in Minsk, Belarus, 2019
 9. Shunichi Yamashita. "Social and Medical Preparedness and Response against Nuclear Accident in Japan" Key session I, Conference on Radiation Topics/ 23rd Nuclear Medical Defense Conference , Germany, 2019
 10. Shunichi Yamashita. "Post-Crisis Recovery from the Fukushima NPP Accident - Different Risk of Thyroid Cancer in comparison with Chernobyl", Plenary Lecture, The 18th International Conference of the Pacific Basin Consortium for Environment and Health, Kyoto, 2019
 11. Norisato Mitsutake. Genetic alterations in thyroid cancers in Fukushima. The 3rd Joint Symposium between Nagasaki University and Würzburg University, Nagasaki, 2019
 12. Norisato Mitsutake. Genetic changes associated with the aggressiveness of thyroid cancer. MMCOD 85th Anniversary Symposium, Minsk, 2019.
 13. 鈴木眞一. 福島第一原発事故後の福島甲状腺超音波検診による小児若年者甲状腺癌について (特別講演). 第92回日本内分泌学会学術総会. 仙台市. 2019年5月
 14. 鈴木眞一. 福島原発における甲状腺疾患(特別講演). 第1回昭和大学甲状腺フォーラム学術集会. 横浜. 2019年5月
 15. 鈴木眞一. 本邦の甲状腺結節診断基準について(国際シンポジウム). 日本超音波医学会第92回学術集会. 東京. 2019年5月
 16. 鈴木眞一. 甲状腺結節の鑑別診断対する超音波組織弾性評価の歴史的変遷とその有用性について(ワークショップ). 日本超音波医学会第92回学術集会. 東京. 2019年5月
 17. 鈴木眞一. 福島における超音波スクリーニングによって発見された甲状腺乳頭癌の病理組織

- 学的検討(厳選演題). 第31回日本内分泌外科学会総会. 東京. 2019年6月
18. 鈴木眞一. 福島第一原発事故の甲状腺の影響と甲状腺癌の治療～新ガイドラインのポイント～. Meet The Expert in いわき. いわき市. 2019年9月
 19. 鈴木眞一. 福島第一原発事故の甲状腺の影響と甲状腺癌の治療～新ガイドラインのポイント～. Meet The Expert in 会津. 会津若松市. 2019年9月
 20. 鈴木眞一. 福島における小児甲状腺癌の臨床像(国際シンポジウム). 第43回日本乳腺甲状腺超音波医学会学術集会. 福島市. 2019年10月
 21. 鈴木眞一. 東日本大震災8年を経た福島における小児若年者甲状腺癌について(特別講演). 第27回特定非営利活動法人東北内分泌研究会/第39回日本内分泌学会東北地方会. 福島市. 2019年10月
 22. 鈴木眞一. US screening of children in Fukushima(講義). IAEA 小児核医学 workshop. 金沢市. 2019年12月
 23. 岩館学. 甲状腺結節に対する血流評価とエラストグラフィを組み合わせた鑑別診断 第42回日本乳腺甲状腺超音波医学会学術集会 東京 2019年5月
 24. 岩館学. 小児における良性結節の超音波所見 日本超音波医学会第92回学術集会 東京2019年5月
 25. 岩館学. 福島第一原発事故後の小児若年者甲状腺癌について 第78回日本癌学会学術総会 京都 2019年9月
 26. 山下俊一. 甲状腺がんの基礎研究から臨床・社会問題の解決に向けて 第92回日本内分泌学会学術集会 仙台 2019年5月
 27. 山下俊一. 原発事故と医療人 放射線災害シンポジウム in Kagoshima. 鹿児島 2019年5月
 28. 山下俊一. 原発事故と医療人—チェルノブイリと福島の経験から 第42回国立大学アイソトープ総合センター長会議 長崎 2019年6月
 29. 山下俊一. 我が国の被ばく医療の中心的・先導的役割を果たすセンター; 高度被ばく医療センター 第7回日本放射線事故・災害医学会年次総会 仙台 2019年9月
 30. 山下俊一. 原子力災害医療 第43回日本乳腺甲状腺超音波医学会学術集会 福島 2019年10月
 31. 光武範吏. 甲状腺癌の遺伝子変異 第92回 日本内分泌学会学術総会 仙台 2019年5月
 32. 光武範吏. 福島県の若年者甲状腺癌に見られる遺伝子変異 第92回 日本内分泌学会学術総会 仙台 2019年5月
 33. 光武範吏. 分化型甲状腺癌の悪性度と関連する遺伝子異常 第31回 日本内分泌外科学会総会 東京 2019年6月
 34. 光武範吏. 甲状腺乳頭癌の幅広い悪性度と関連する遺伝子異常 第23回 日本臨床内分泌病理学会学術総会 東京 2019年10月
 35. 光武範吏. 甲状腺癌の悪性度と関連する遺伝子異常 第62回 日本甲状腺学会学術集会 2019年10月

引用文献

1. Suzuki S, Yamashita S, Fukushima T, Nakano K, Midorikawa S, Ohtsuru A, Yasumura S, Ho soya M, Kamiya K, Shimura H, Suzuki S, Nakamura I, Abe M. The protocol and preliminary baseline survey results of the thyroid ultrasound examination in Fukushima [Rapid Communication]. *Endocr J.* 2016;63: 315-21.
2. Suzuki S. Childhood and Adolescent Thyroid Cancer in Fukushima after the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident: 5 Years On. *Clin Oncol.* 2016;28: 263-71.
3. Mitsutake N, Fukushima T, Matsuse M, Rogounovitch T, Saenko V, Uchino S, Ito M, Suzuki K, Suzuki S, Yamashita S. BRAF(V600E) mutation is highly prevalent in thyroid carcinomas in the young population in Fukushima: a different oncogenic profile from Chernobyl. *Sci Rep.* 2015;20: 16976.
4. Nikiforov YE. Radiation-induced thyroid cancer: what we have learned from chernobyl. *Endocr Pathol.* 2006;17: 307-17.
5. Fukushima T, Suzuki S, Mashiko M, Ohtake T, Endo Y, Takebayashi Y, Sekikawa K, Hagiwara K, Takenoshita S. BRAF mutations in papillary carcinomas of the thyroid. *Oncogene.* 2003;22: 6455-7.

The mechanism of the thyroid cancer in the young population after the accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant

Shinichi Suzuki

Department of Thyroid and Endocrinology, Fukushima Medical University, Fukushima, Japan

Key word: young population, thyroid cancer, gene mutation, Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident

Abstract

Thyroid ultrasound screening for children aged 0–18 years was performed in Fukushima following the accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. As a result, many thyroid cancer cases were detected. To explore the carcinogenic mechanisms of these cancers, we analyzed their clinicopathological and genetic features. We analyzed 138 patients who had undergone surgery between 2013 and 2016 at Fukushima Medical University. Median age at surgery was 18 (range 9–23) years. Median age at disaster was 14.5 (range 5–18) years. Average size of the tumor was 15.3mm. Postoperative pathological diagnosis revealed 136 cases of papillary thyroid cancer, one case of poorly differentiated thyroid cancer, and one ‘other’. This ‘other’ case was reported in our original paper as chromophobe renal cell carcinoma-like thyroid carcinoma with tuberous sclerosis complex. The PTCs included 125 cases of classical type, four cases of the cribriform-morular variant, three cases of the follicular variant, two cases of the diffuse sclerosing variant, and two cases of the solid variant. 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*.

2-7 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）

遠藤 暁（広島大学大学院工学研究科・教授）

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

福島第一原子力発電所（福島原発）事故では、放射性セシウムが濃集する不溶性粒子（不溶性セシウム粒子）が環境中に放出された。福島原発事故特有の不溶性セシウム粒子について解明すべき点が多く残されているが、生物影響に関する知見が特に不足している。本研究では分野横断、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推進し、不溶性セシウム粒子の性状解析と被ばく線量評価に基づく生物影響の知見を集積し、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。加えて、非放射性模擬粒子による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検討する。

土壌から単離した比較的大きい不溶性セシウム粒子を用いて化学分析を行い、放射性セシウム以外に ^{90}Sr と $^{239,240}\text{Pu}$ が検出されたが、 ^{137}Cs との放射能比はそれぞれ 10^{-4} と 10^{-8} のオーダーであった。また、安定セシウムを用いて非放射性模擬粒子の作成方法を検討し、不溶性セシウム粒子のセシウム濃度とよく一致する非放射性模擬粒子を作成した。この粒子を実験動物への投与方法の検討に用い、投与後短期間において非放射性粒子による組織変化は観察されなかった。

不溶性セシウム粒子を用いた細胞影響実験では、PHITS コードを用いるモンテカルロシミュレーションによって線量推定の体制を整えた。粒子近傍にある細胞は放射性セシウムによる β 線の影響が大きく、粒子から 1cm 離れた部位では γ 線のみ影響となることを明らかにした。また、分子マーカーを用いた検討により、粒子から 1 cm 以内の範囲で DNA 二重鎖切断が誘発されること、粒子と共存する時間に依存して損傷が蓄積すること、7 Bq の粒子では DNA 二重鎖切断が誘発されないことを明らかにした。

キーワード

不溶性放射性微粒子	局所被ばく影響	物理化学性状解析
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・客員主管研究員），三浦富智（弘前大学被ばく医療総合研究所・准教授），森口祐一（東京大学大学院工学研究科・教授）

I. 研究目的

福島第一原子力発電所（福島原発）事故では、核分裂生成物である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可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。可溶性以外には不溶性微粒子（不溶性セシウム粒子）として放出されたことが報告されており、原子炉外に放出される過程でガス状の放射性セシウムが二酸化ケイ素を主成分とする材質に濃集したと考えられている。過去の原子力災害事故や核実験では核燃料断片などに起因するホットパーティクルが不溶性の放射性微粒子として知られているが、その特徴は福島原発事故で放出された不溶性セシウム粒子と明確に異なっている。ホットパーティクルは核燃料を含むので放射能は極めて高く、生物作用が大きい α 線を放出する。これに対して、福島原発事故による不溶性セシウム粒子の放射能は低く、 γ 線放射核種として放射性セシウムのみが不溶性粒子から検出されている。粒径や放射能によってタイプA(粒径が1-10 μm 、放射能が数Bq)とタイプB(粒径が70-400 μm 、放射能が数十Bq以上)に分類される。水に溶けない粒子を吸入摂取すると呼吸気道内、特に肺内に長期間沈着することによる健康リスクの可能性が懸念されるが、ホットパーティクルによる健康影響の知見を外挿して不溶性セシウム粒子の健康影響を推定することは合理的ではない。また、放射性粒子による局所被ばくが、従来得られてきた均等被ばく影響と等しいのか否かについての理解を深めることも重要である。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た生物影響の知見を集積し、健康リスクに結びつく科学的知見が必要とされていた。

本課題では、環境中に放出された放射性セシウム粒子を土壌から回収し、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、解析結果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する。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、放射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、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、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

ることを目指す。

II. 研究方法

1. 不溶性セシウム粒子の性状解析と模擬粒子の作成

福島県の浜通り地域におけるフィールド実験で採取した土壌試料から、不溶性セシウム粒子を単離した。具体的には土壌試料をイメージングプレートに暴露させ、オートラジオグラフィーによって試料中の放射能分布を二次元に可視化した。画像上で強く放射能が濃集した場所にある土壌を取り出し、これを繰り返してスケールダウンしていくことによって、不溶性セシウム粒子を単離した。単離した不溶性セシウム粒子は、まずゲルマニウム半導体検出器により放射性セシウムの定量を行った。その後、光学顕微鏡、電子顕微鏡を用いてその性状を観察し、さらにエネルギー分散型 X 線分析で主要元素の分析を行った。これにより、3つの不溶性セシウム粒子を分離し、化学分析に利用した。不溶性セシウム粒子を水酸化ナトリウムとともに 400°C に加熱し、アルカリ溶融によって不溶性粒子を溶液化した。溶液調整を行った後、Sr-rad-disk を用いてストロンチウム (Sr) を固相抽出した。Sr と化学的挙動が似ており、同時に Sr-rad-disk に抽出される鉛 (Pb) については、陽イオン交換によって取り除いた。得られた Sr フラクシオンについて、低バックグラウンドの液体シンチレーションカウンターを用いて、チェレンコフ光の測定を行った。2 週間の連続測定を行うことにより、 ^{90}Sr の娘核種である ^{90}Y の成長を観察した。化学収率は誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) によりキャリアーに加えた ^{84}Sr を定量することで決定した¹⁾。Sr-rad-disk を通過した溶液について、プルトニウム (Pu) の分析を行った。沈殿法と TEVA、U-TEVA、DGA の 3 種類のイオン交換樹脂を用いた方法²⁾により Pu フラクシオンを得た。この溶液を SF-ICP-MS で分析し、質量数 239 および 240 のカウントから、 ^{239}Pu 、 ^{240}Pu を定量した。

不溶性セシウム粒子は、数 μm の直径をもつ球形粒子で、 SiO_2 を母材にしていることが分かっている。本研究では、不溶性セシウム粒子の模擬粒子作成のために、直径 3 μm の多孔質シリカゲル粒子を母材として利用した。シリカゲル粒子を塩化セシウム溶液に浸潤し、振盪後の遠心分離によってシリカゲル粒子を分離した。得られた粒子をイオン交換水で洗浄後、乾燥させてエネルギー分散型 X 線分析により主要元素の分析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、福島県大熊町や双葉町など、立ち入りに制限のある区域での環境試料の採取を行っている。この際、自治体、関係省庁の許可を得たうえで立ち入りを行っている。

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

東北大学で実施した不溶性セシウム粒子を用いた細胞実験について、被ばく影響を議論するためには線量を評価する必要がある。この細胞実験ではヒト上皮細胞を $\phi 10\text{cm}$ のディッシュに蒔き、不溶性セシウム粒子をディッシュ表面に配置し、照射を行った。この細胞実験体系をシミュレーションで再現し、ディッシュ上に不溶性セシウム粒子を配置した条件で細胞照射する場合の線量

評価を実施した。

計算には PHITS コードを利用した。計算体系を図 II-1 に示す。直径 10 cm のディッシュ内に、細胞を模擬した高さ 10 μm の細胞領域を配置し、その上に培地を模擬する高さ 2 mm の水を配置した。また、ディッシュの底を SiO_2 1 mm、インキュベータの SUS 1 mm を考慮した。細胞領域に接するようにディッシュ中心に線源を配置し、細胞領域へのエネルギー付与を動径の関数 (R-Z 座標系) として計算した。1 Bq の ^{134}Cs 、 ^{137}Cs 、 ^{90}Sr の 3 種類の放射性微粒子線源に対して、直径 1、10、50、75、100、150、200、500 μm の SiO_2 で 8 つの大きさに対して計算を行った。線源 ^{134}Cs 、 ^{137}Cs 及び ^{90}Sr から放出される γ ・X 線を考慮した光子および β 線・内部転換電子・オージェ電子を発生させ、細胞層への付与エネルギーを微粒子からの距離の関数として計算した。

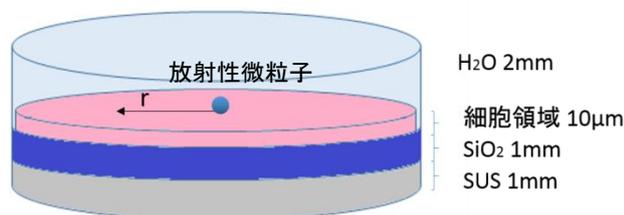


図 II-1. PHITS の計算体系

^{134}Cs 、 ^{137}Cs が放出する光子は、National Nuclear Data Center (NNDC)³⁾および Japan Atomic Energy Agency (JAEA)⁴⁾の核データサイトから γ 線・X 線データを利用した。更に、 ^{134}Cs 、 ^{137}Cs が放出する電子として β 線・内部転換電子・オージェ電子を考慮した。 ^{90}Sr - ^{90}Y については ^{90}Sr からの β 線と、娘核種 ^{90}Y の β 線・内部転換電子・オージェ電子を考慮した。

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)を入手し、以下の検討に用いた。10% ウシ胎児血清(FBS)を添加した DMEM 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。共培養実験終了後に細胞を PBS で 1 回洗浄し、4%ホルムアルデヒド溶液を室温で 10 分間処理して細胞を固定した。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 分間処理することで膜透過処理を行った。53BP1 の蛍光免疫染色では、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。その後、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。SRB1 タン

パク質発現の確認には、1次抗体にラビットポリクローナル抗SRB1抗体(Novus Biologicals)、2次抗体にAlexa594標識抗ラビットIgG抗体(Invitrogen)を用いる蛍光免疫染色を行った。X線照射は0.1mm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、線量率0.2mGy/分の条件で行った。また、ヒト急性単球性白血病細胞(THP-1)は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターより購入した。10%FBSを添加したRPMI-1640培地でTHP-1を培養した。

(倫理面への配慮)

細胞実験では遺伝子組換え実験計画を申請し、東北大学遺伝子組換え実験安全専門委員会によって承認された。また、本課題で提供される野生動物試料の採取にかかる作業手順は、提供元の課題において東北大学、および弘前大学の動物実験委員会の確認あるいは承認を得た。

不溶性セシウム粒子の体内分布と病理解析

7週齢の雌Wistarラットを導入し、コントロール群(4匹)、不溶性非放射性シリカ粒子投与群(0.5, 1.0, 2.0, 3.0mg/匹、各群3匹)に分ける。1週間順化後(8週齢、体重150~200g)三種混合麻酔薬を腹腔内注射投与する。(投与方法:メドトミジン0.15mg/0.15ml/kg体重、ミダゾラム2mg/0.5ml/kg体重、ブトルファノール2.5mg/0.5ml/kg体重、生理食塩水1.45ml/kg体重を混合して調製する。最終調製液量として2.5ml/kg体重を投与する。麻酔時間約60分。)

ラットを保定板に仰臥位に固定し、頸部を剃毛後、皮膚を正中切開して気管を露出する。生理食塩水に懸濁した不溶性粒子を高圧蒸気滅菌した後、1mlシリンジに取り、気管内投与器具を取り付けて気管内に噴霧する(図II-2)。コントロール群は生理食塩水のみを投与する。皮膚をクリップで縫合し、頸部皮膚に消毒薬(イソジン)を塗布する。

なお、気管を露出せず口腔からの挿管による投与方法の方が動物に負担がかからないが、左右肺葉になるべく均一に、また個体間でばらつきを少なく投与するためには、気管内投与器具の先端を気管一気管支分岐の直前に正確に挿管する必要があり、気管を露出する方法を採用した。

不溶性粒子の投与用量は2.5-15mg/kg体重、投与液中濃度は2.5-15mg/ml、投与液量は1.0ml/kg体重とする。

肺の病理組織解析では、実験動物への気管内投与7日後、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する。気管を露出してカニューレを挿入し、10mlシリンジで10%ホルマリン固定液2-3mlを肺内に注入する。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する。

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を行う(図II-3)。常法によりパラフィン包埋後、3-5μm厚で薄切し、組織切片標本を作製して、ヘマトキシリン(HE)染色をする。

HE染色標本について顕微鏡下で肺の病理組織像を観察し、出血、気腫、炎症、線維化、増殖像、細胞分裂像等をスコア化し、各群で比較する。

(倫理面への配慮)

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、理事長の承認を得た上で遂行されている。

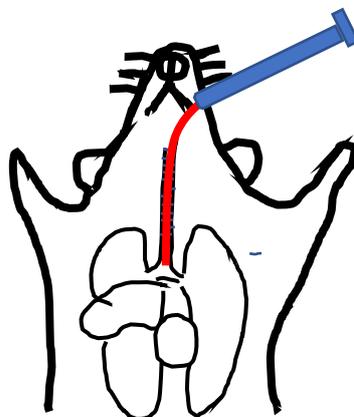


図 II-2. 気管内投与法：

麻酔下で頸部皮膚を切開し、気管を露出して気管内投与器具を挿入し、肺に粒子懸濁液を直接噴霧して投与する。

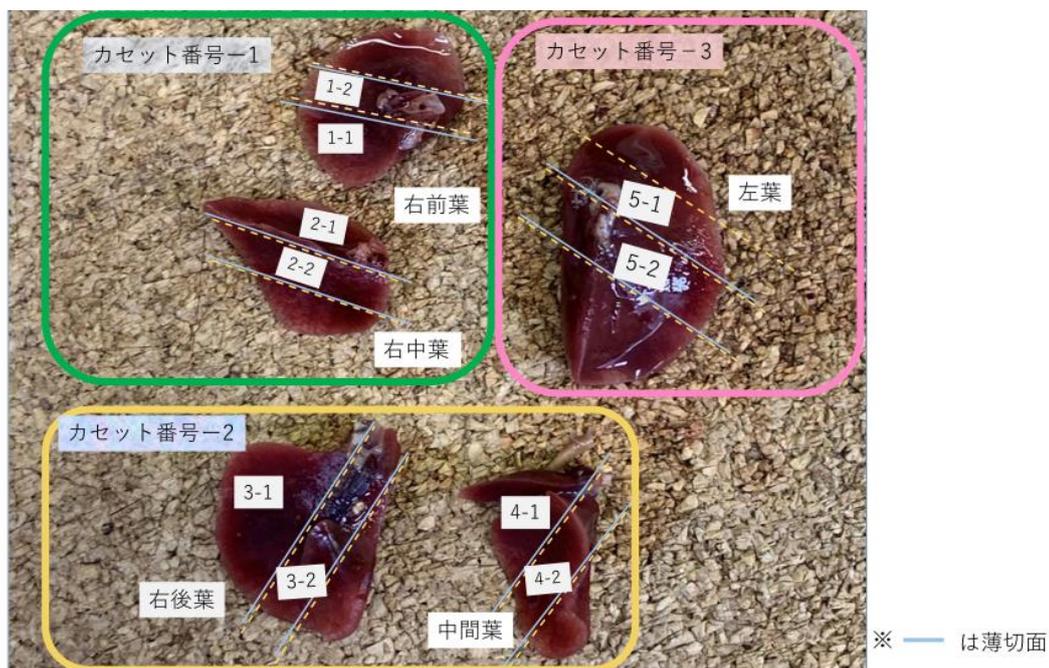


図 II-3. 病理組織学的検査における肺の切り出し方法：

全肺葉（左葉、右前葉、右中葉、右後葉、中間葉、それぞれ主要な気管支を含む面で組織切片標本を作製する。

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

① 不溶性セシウム粒子の性状解析実験

本研究では、3つの不溶性セシウム粒子を単離した。そのうちの1試料について、図 III-1 に電子顕微鏡像を示す。不溶性粒子は直径が数百 μm の大きさがあることが分かった。この粒子についてゲルマニウム半導体検出器を用いて放射性セシウムを定量したところ、事故時に半減期を補正した場合 ^{137}Cs で 234 Bq、 ^{134}Cs で 214 Bq であった。これより放射性セシウムの放射能比 $^{134}\text{Cs}/^{137}\text{Cs}$ を求めたところ、0.92 となった。また、エネルギー分散型 X 線分析により、この不溶性セシウム粒子は SiO_2 を主成分にしていることが分かった。ほかの2つの不溶性セシウム粒子の ^{137}Cs 放射能はそれぞれ 890 Bq、740 Bq であり、それぞれ同様の性質があることが分かった。粒子が有する放射能から、解析した全ての粒子はタイプ B に分類される。

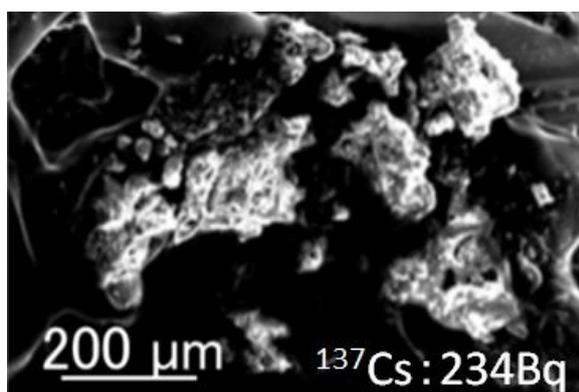


図 III-1. 本研究で分析した不溶性セシウム粒子の電子顕微鏡像の一例

これらの粒子のうち2つについて ^{90}Sr の分析を行ったところ、それぞれの不溶性セシウム粒子に由来する ^{90}Sr の定量ができた。結果を表 III-1 に示す。 $^{90}\text{Sr}/^{137}\text{Cs}$ の放射能比は、 10^{-4} のオーダーであった。

表 III-1. 本研究で分析した不溶性セシウム粒子の放射能 [Bq]

	粒子 1	粒子 2	粒子 3
^{137}Cs	234 \pm 1	887 \pm 4	736 \pm 4
^{134}Cs	214 \pm 2	794 \pm 4	679 \pm 4
^{90}Sr	0.171 \pm 0.010	0.589 \pm 0.034	
$^{239+240}\text{Pu}$	(1.70 \pm 0.20) $\times 10^{-5}$	(3.48 \pm 0.45) $\times 10^{-5}$	(7.06 \pm 0.57) $\times 10^{-5}$

今回単離した3つの粒子について、プルトニウム同位体の分析を行ったところ、表 III-1 に示す分析値が得られた。これまで不溶性セシウム粒子のプルトニウムは確認されていなかったが、本研究により初めてその存在が明らかとなった。 $^{239+240}\text{Pu}$ の放射能は 10^{-5} オーダーであり、 $^{239+240}\text{Pu}/^{137}\text{Cs}$ の放射能比は 10^{-8} であった。

② 不溶性セシウム粒子の模擬粒子の作成

図 III-2 に生成した不溶性セシウム粒子の模擬粒子の電子顕微鏡像と、エネルギー分散型 X 線分析により得られたスペクトルを示す。本研究で、セシウム溶液によりシリカゲル粒子を処理した結果、その形状には変化が見られなかった。一方で図 III-2 のスペクトルに示すように、この模擬粒子には非放射性的のセシウムが吸着しており、定性分析の結果からセシウム量は3%程度であることが分かった。この値は、これまで見つかっている不溶性セシウム粒子のセシウム濃度とよく一致していた。

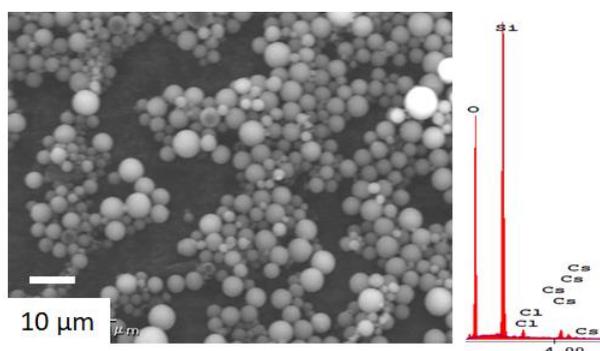


図 III-2. 本研究で作成した不溶性セシウム粒子の模擬粒子と、それをエネルギー分散型 X 線分析することにより得られたスペクトル

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

① 不溶性セシウム粒子を用いた細胞照射実験条件における照射線量率推定

計算結果のうち、細胞実験の線量評価に使用した $500\ \mu\text{m}$ の放射性微粒子の場合について、線量率と距離の関係を図 III-3 に示す。 ^{134}Cs 、 ^{137}Cs とも同様の傾向を示し、放射性微粒子から $1.5\text{--}2\ \text{mm}$ 離れた距離で、電子と光子の寄与が入れ換わることが示された。粒子近傍では $100\ \mu\text{Gy}/(\text{h}/\text{Bq})$ 程度と高く電子の寄与が支配的な線量率であるのに対し、 $2\ \text{mm}$ 離れると光子の寄与が高くなり $5\ \text{mm}$ では光子の線量率に比べ電子は無視できるようになる。また、 ^{90}Sr では、 β 線のエネルギーが高いため、 $1\ \text{cm}$ 近傍まで β 線が到達している。

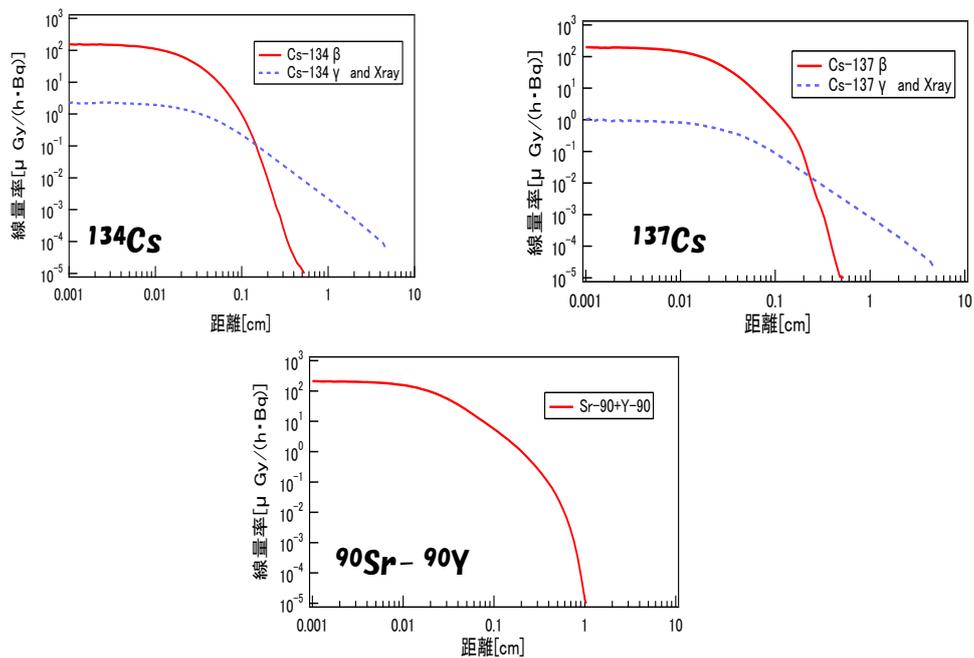


図 III-3. 500 μm- 1 Bq の ^{134}Cs 、 ^{137}Cs 、 ^{90}Sr - ^{90}Y 線源の線量率の動径依存性

② 細胞実験の線量評価

計算で得られた γ 線・ β 線の 1 粒子あたりのエネルギー付与から、 γ 線・ β 線の放出比を考慮し、1 Bq 当たりの細胞層の吸収線量率を算出した。東北大学で実施した不溶性セシウム粒子の細胞照射実験の結果と検討を行った。細胞実験では、1677Bq の不溶性セシウム粒子から 250μm と 1 cm の位置で、1 日照射と 3 日照射の細胞について 53BP1 フォーカス数を観察している。したがって、2011 年 3 月で $^{134}\text{Cs}/^{137}\text{Cs}=1$ を仮定し実験日に半減期補正することで、 ^{134}Cs と ^{137}Cs の放射能（それぞれ 310Bq と 1677Bq）を決定した。この放射能値と照射時間を 1 Bq 線量率に乗じることで積算照射線量距離依存性を導出した。積算線量の距離依存性を図 III-4 に示す。

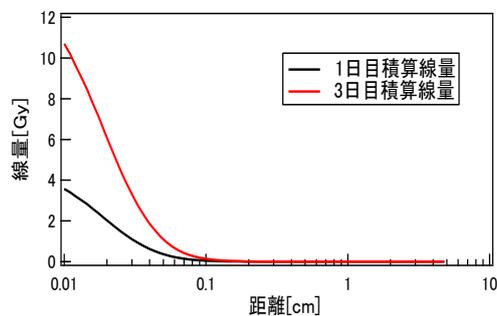


図 III-4. 積算照射線量距離依存性

③ 細胞実験データの解析

東北大学より提供された 53BP1 の観測データを用いて解析を行った。表 III-2 に 53BP1 の各照射条件のフォーカス発生率を示す。非照射では、93%がフォーカス発生率 0 で、5%が 1、3%が 2

であることから、フォーカス発生率がポアソン分布で表現できると考え、各照射条件について n 個のフォーカス数の発生率 R_n について、次式の χ^2 の最小値を与える平均値 m を推定した。

$$\chi^2 = \sum_{n=1}^{16} \left(R_n - \frac{m^n \exp(-m)}{n!} \right)^2 \quad 2-1-1$$

表 III-2. 53BP1 の各照射条件のフォーカス発生数

# of Foci	Fraction																
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
非照射	0.93	0.05	0.03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
250 μ m, 1 day	0.31	0.2	0.08	0.14	0.14	0.02	0.02	0.05	0.01	0	0	0	0.01	0	0	0	0.01
250 μ m, 3 days	0	0	0	0.05	0.08	0.03	0.08	0.18	0.13	0.13	0.15	0.03	0.03	0	0.03	0.08	0.03
1cm, 1 day	0.66	0.16	0.08	0.02	0.02	0.02	0.01	0	0.02	0	0	0	0	0.01	0.01	0	0
1cm, 3 days	0.03	0.05	0.1	0.14	0.14	0.1	0.12	0.11	0.07	0.09	0.02	0	0	0.02	0	0	0.01

照射条件 3 日 1 cm 距離の場合における平均値 m の推定例を図 III-5 に示す。フォーカス発生プロファイルは、ポアソン分布で良く再現できていることが確認できる。同様に、非照射を含む 5 つの場合について、フォーカス発生数の平均値とその標準偏差を導出した。非照射の自然発生率のバックグラウンドとして補正した照射時のフォーカス発生数の平均値とその標準偏差を表 III-3 に示す。

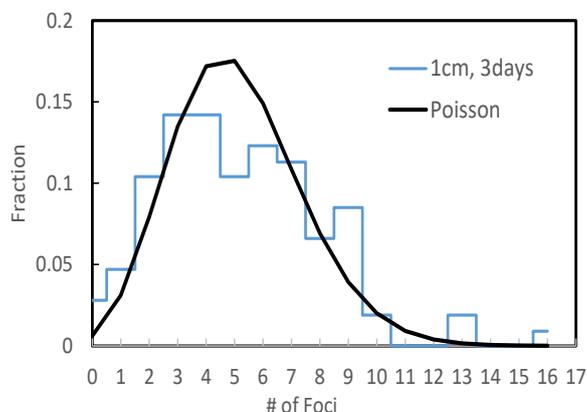


図 III-5. 照射条件 3 日 1 cm 距離の平均値 m の推定例

表 III-3 フォーカス発生数の平均値とその標準偏差

距離 (cm)	1day		3days	
	mean	SD	mean	SD
0.025	1.2	1.1	8.3	2.88
1	0.3	0.55	5.1	2.25

距離 0.025 cm および 1 cm の 1 日照射と 3 日照射時のフォーカス発生数の平均値 4 点 (表 III-3) を用いて、フォーカス形成率 $a(1/\text{Gy})$ をパラメータに次式の χ^2 を最小にする a を決定した。

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^4 \frac{(F_i - aD_i)^2}{\sigma_i^2}$$

2-1-2

ここで、 F_i はフォーカス発生数の平均値、それに σ_i は対応した標準偏差、 D_i は照射条件に対応した線量を示す。

結果を図 III-6 に示す。フォーカス形成率 a は $1.6 \pm 0.7(1/\text{Gy})$ と推定された。細胞実験の結果と計算結果を比較したところ、最小二乗法で得た関数と細胞実験のデータは、1日照射の2点と3日照射の250 μm での53BP1フォーカス数は矛盾がなかったが、3日照射の1 cm離れた位置では生成フォーカス数は、優位に生物応答が高い結果であった。

Markova 等は、正常ヒト線維芽細胞 VH-10 に γ 線を 3 Gy の 1 回照射したときのフォーカス形成頻度を、照射終了後 12 時間後で $1.9(1/\text{Gy})$ 、24 時間後で $0.8(1/\text{Gy})$ と報告している⁵⁾。不溶性セシウム粒子照射のフォーカス形成率 $a=1.6 \pm 0.7(1/\text{Gy})$ は、Markova 等のデータと近い値であった。放射性微粒子照射の1日間または3日間の連続照射で Markova 等のデータは、1回の急照射であるため、直接比較できる条件ではないものの、 γ 線 3 Gy 照射時のフォーカス形成頻度と同程度で、 γ 線と同程度の生物効果である可能性がある。

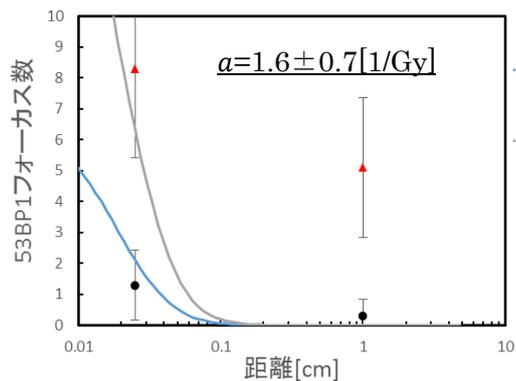


図 III-6. χ^2 の最小値を与えるフォーカス形成率

3. 不溶性セシウム粒子による細胞影響解析

① 不溶性セシウム粒子と X 線発生装置を用いた急照射で誘発される DNA 二重鎖切断の消長

不溶性セシウム粒子による持続的な照射と、X 線発生装置を用いる急照射によって生じる DNA 二重鎖切断数を分子マーカーである 53BP1 を指標として比較した。¹³⁷Cs が $1,677\text{Bq}$ の不溶性セシウム粒子と RPE1-hTERT を 24 時間、あるいは 72 時間共培養し、粒子辺縁部位と粒子から 1 cm 離れた部位の細胞で誘発される DNA 二重鎖切断を定量した (図 III-7)。PHITS シミュレーションの結果より、粒子辺縁部位では、24 時間の共培養で 2.5 Gy が照射されたと評価した。そこで、2.5 Gy の照射を約 12 分で完了する急照射を行い、照射完了から 24 時間後に検出される 53BP1 フォーカス数と粒子との共培養で検出されるフォーカスを比較した。不溶性セシウム粒子との共培養

で、ほぼ全てのフォーカス陽性細胞では、1細胞あたり1-5個の範囲でフォーカスが検出された。X線発生装置を使った急照射では1細胞あたり6個以上の53BP1フォーカスが検出され、不溶性セシウム粒子との共培養よりもはるかに多い53BP1フォーカスが検出された。3日間の共培養に相当する線量で急照射を行った場合も同様で、急照射細胞で共培養細胞よりも多い53BP1フォーカスが検出された。急照射では短時間に多くのDNA二重鎖切断が誘発され、その数は20-40 DNA二重鎖切断/Gy・細胞と考えられている。短時間で生じたDNA二重鎖切断は照射後の時間経過によって修復されるために53BP1フォーカス数が減少する。急照射後のDNA二重鎖切断修復速度は、照射後2-4時間のうちに生成したDNA二重鎖切断の半数以上が修復される早い修復と、その後の時間帯は修復速度が緩やかになる二相性が知られている。特に照射後数日が経過するとDNA二重鎖切断の残存数にほとんど変化が見られない。このため、急照射3日後よりも、不溶性セシウム粒子と3日間共培養したときの53BP1フォーカスの誘導数が少ないことは、1,000Bq以上の高い放射能をもつ粒子であっても同じ線量の急照射と比べてDNA二重鎖切断の誘導能は低いことが示された。DNA二重鎖切断は致死性の高い損傷であるから、同じ線量の急照射に比べて細胞致死効果も低くなると考えられる。しかしながら、粒子と接触する時間が長いと53BP1フォーカスが増えることから、DNA二重鎖切断誘導能は急照射より低いものの、接触時間(=線量)に応じて徐々にDNA二重鎖切断が蓄積することが示された。以上の結果より、高い放射能をもつ不溶性セシウム粒子は少なくとも粒子から1cm離れた範囲までDNA二重鎖切断を誘発する能力を有するが、誘導速度は急照射よりも遅いために粒子との接触時間を短くすることで被ばく影響を抑制できることが予想された。

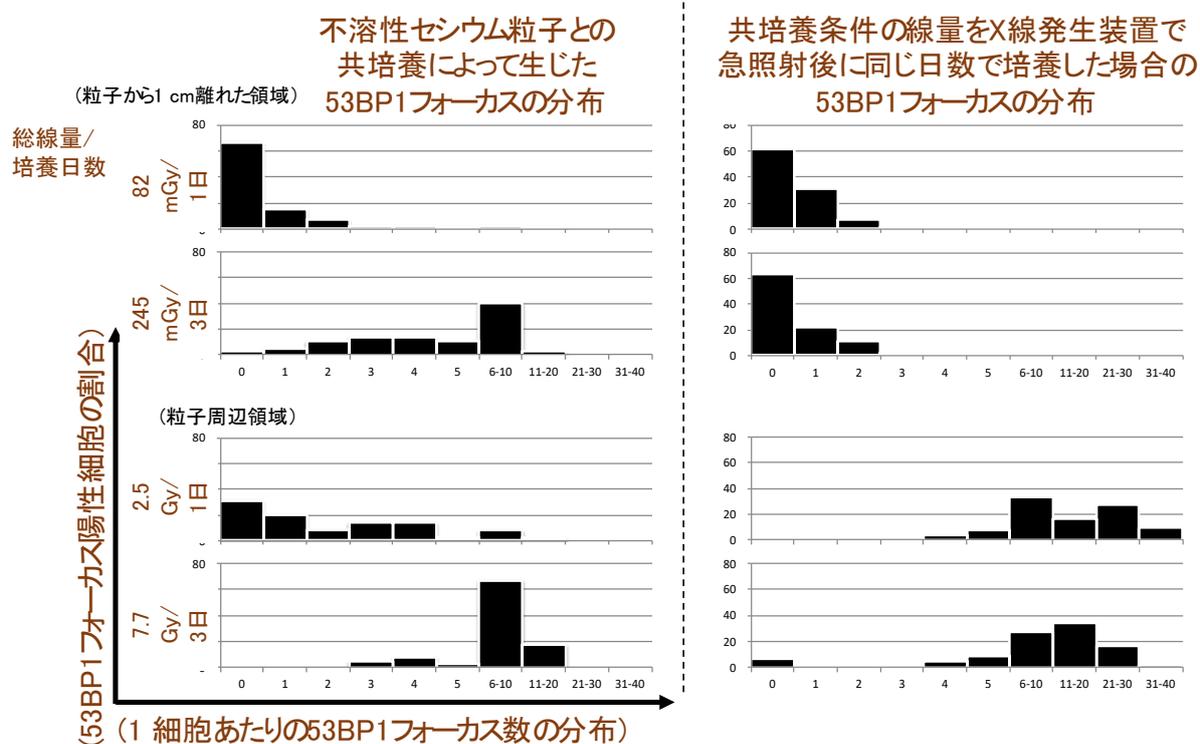


図 III-7. 不溶性セシウム粒子共培養（左）と同じ線量の X 線を急照射したとき（右）の
1 細胞あたりの 53BP1 フォーカス数の分布

左端には、不溶性セシウム粒子との共培養による推定線量と共培養時間を記載した。
左のグラフは共培養終了直後の 53BP1 数の分布、右のグラフは左端に記載されている
線量を急照射した後、記載されている時間が経過した後に検出された 53BP1 数の分布

② 不溶性セシウム粒子の放射能と DNA 二重鎖切断の誘発

異なる放射能 (^{137}Cs で 7 Bq、90 Bq、1,677 Bq)をもつ不溶性セシウム粒子と RPE1-hTERT 細胞を 24 時間共培養し、粒子辺縁部位と 1cm 離れた領域の細胞に誘発される DNA 二重鎖切断を 53BP1 を指標に検討した (図 III-8)。53BP1 陽性細胞頻度で比較すると、90 Bq の放射能をもつ不溶性セシウム粒子による DNA 二重鎖切断の誘発を確認したが、7 Bq の粒子では未処理細胞の 53BP1 陽性細胞頻度と同等で、損傷誘発は見られなかった。不溶性セシウム粒子は大きさと放射能によって 2 群に大別されている。粒径が数 μm で数 Bq 程度の粒子はタイプ A に分類され、肺の深部まで到達する可能性があるために長期の影響を考慮する必要がある粒子である。今回使用した 7 Bq の粒子は A タイプに分類されると考えられるが、DNA 二重鎖切断を誘発しなかったことから、少なくとも短期間に致死性の作用を及ぼす可能性は低いと考えられる。一方で、DNA 二重鎖切断の誘発が確認された粒子は粒径が大きいタイプ B に分類できる。(今回使用した 90 Bq の粒子はタイプ A とタイプ B の中間の形態的特徴を示すことから、粒子の分類基準を改訂する必要性が示唆された)。粒径が大きいと体内の異物を排除するクリアランス機構が働くために体内深部に到達するリスクは低いと考えられる。このため、鼻腔や咽頭部に B タイプの粒子が留まる期間を動物実験で検証し、組織反応についても確認する必要がある。

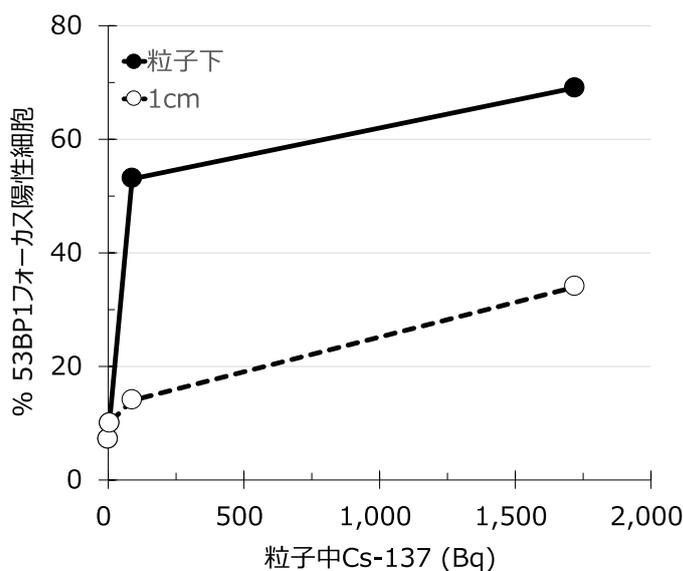


図 III-8. 粒子中 ^{137}Cs と DNA 二重鎖切断の誘発

③ シリカ粒子を認識する受容体タンパク質の発現

次年度以降に検討する不溶性粒子の細胞内取り込みに関する予備的検討を行った。シリカ粒子を認識して細胞内取り込みに関与する受容体タンパク質 **SRB1** の発現を蛍光免疫染色法で検出し、全ての細胞で均一に **SRB1** が発現していることを確認した (図 III-9)。赤色蛍光で標識したシリカ粒子と **THP1** を共培養したところ、低頻度ながら粒径 $1\mu\text{m}$ のシリカ粒子が細胞内に取り込まれることを確認した (図 III-9)。効率的にシリカ粒子を細胞内に取り込み、その細胞影響を検討するために **SRB1** 高発現細胞の樹立を試みた。**SRB1** 発現プラスミドを **THP1** 細胞に導入し、薬剤耐性細胞を回収したが、**SRB1** を安定的に高発現する細胞は樹立できなかった。レンチウイルスベクターを用いる導入効率の高い方法に切り換えて、**SRB1** 高発現細胞の樹立を行っている。

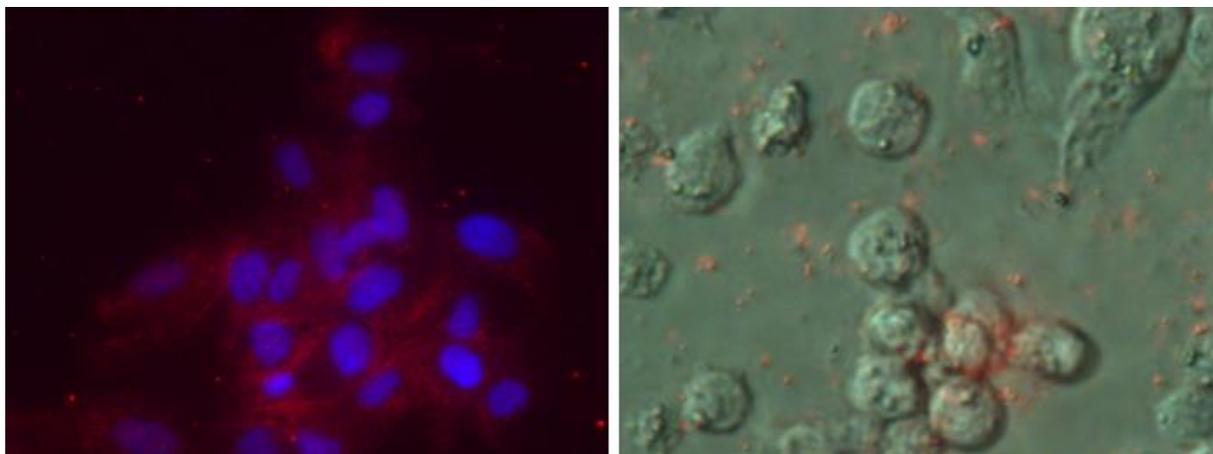


図 III-9. **SRB1** の細胞内発現とシリカ粒子の取り込み

(左) RPE1-hTERT における **SRB1** の検出。赤 : **SRB1**、青 : 細胞核

(右) **THP1** による非放射性シリカ粒子 (赤) の細胞内取り込みの確認

④ 野生動物の肺を用いたイメージングプレート像

旧警戒区域の野生動物の肺を用いて、不溶性セシウム粒子が肺に取り込まれる可能性について検討した。本年度は、土壌試料を用いてイメージングプレートへの曝露条件の検討を行った。3 Bq の不溶性セシウム粒子を含む土壌をイメージングプレートに 3 時間密着させたオートラジオグラフィによって粒子が検出できることを確認した (図 III-10)。そこで、1 mm 厚の肺を最大 24 時間イメージングプレートに密着させ、オートラジオグラフィによる肺内の不溶性セシウムの検出を試みた。ニホンザルとアライグマそれぞれ 2 個体ずつ検討したが、粒子状のシグナルは検出されなかった。次年度以降も引き続き検討し、測定個体数を増やした上で肺の放射性セシウム濃度測定結果との比較を行う。

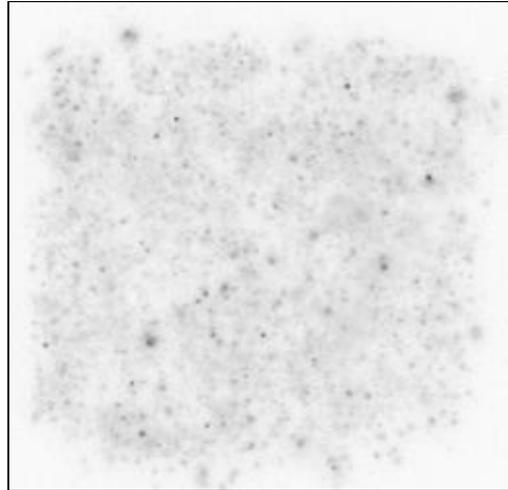


図 III-10. イメージングプレートを用いたオートラジオグラフィによる粒子検出の条件設定

4. 不溶性セシウム粒子の体内分布と病理解析

① 動物への不溶性粒子投与方法

雌 Wistar ラットに対し、今回使用した 3 種混合麻酔薬の量（メドトミジン、ミダゾラム、ブトルファノール）では、1 匹当たりの手術時間（15–20 分間）において十分な筋弛緩と昏睡が得られた。今回採用した、皮膚を正中切開して気管を露出する方法では、投与すべき全量を正確に気管支分岐部に噴霧することができた。動物の容体も変化なく、数時間後に全匹覚醒して、感染症を発症することなく正常に飼育を継続することができた。

② 肺の病理組織解析

各動物の肺全葉から 10 枚の組織切片標本を観察したところ、いずれの投与群においても、気管支、細気管支、肺胞内腔表面にほとんど不溶性粒子は認められなかった。ただし、最も高用量群（3.0mg/ 匹）においては、不溶性粒子を貪食した肺胞マクロファージがわずかに（1 切片に一箇所程度）観察された（図 III-11）。

組織像としては、好中球の浸潤等の炎症性反応は認められず、肺胞 I 型や II 型上皮細胞の変化も無かった。出血、気腫、炎症、線維化、増殖像、細胞分裂像いずれもコントロールと同じであった。また、不溶性粒子を貪食したマクロファージの集簇像、肺間質の線維化、肉芽腫形成も認められなかった（図 III-12）。

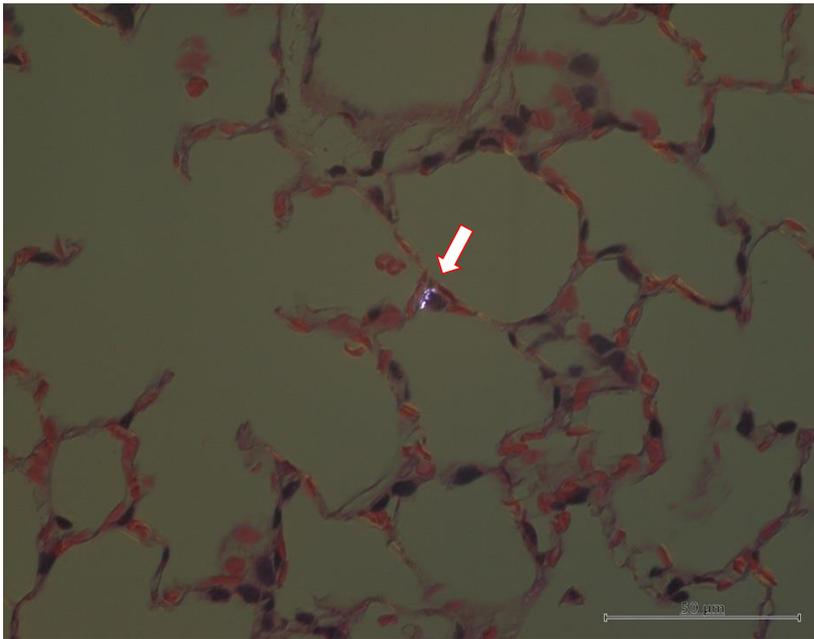


図 III-11. 不溶性粒子を貪食した肺胞マクロファージ
(中央の光沢物を含む細胞：偏光顕微鏡写真)

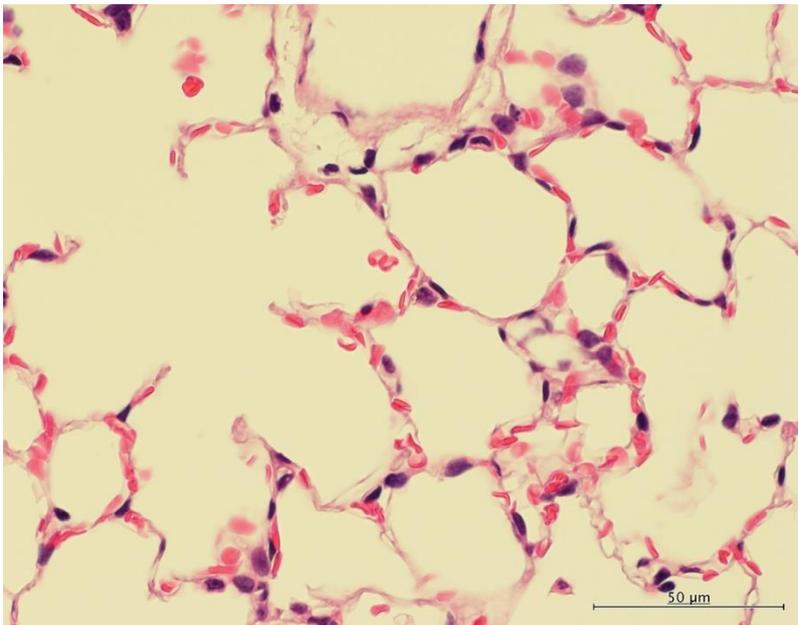


図 III-12 不溶性粒子を投与したラット肺の組織像 (肺胞領域：HE 染色)
コントロールと差異はみとめられず

IV. 考察

土壌から採取した不溶性セシウム粒子は、数百 μm の大きさを持っており、エネルギー分散型 X 線分析からはセシウムの存在を確認することができなかった。またゲルマニウム半導体検出器

による分析から、放射性セシウムの放射能比 $^{134}\text{Cs}/^{137}\text{Cs}$ はすべて 0.9 程度であることが分かった。これらの性状から、この不溶性セシウム粒子は先行研究のタイプ B に分類された⁶⁾。

不溶性セシウム粒子に含まれている ^{90}Sr の放射能自体にはばらつきがあるが、 $^{90}\text{Sr}/^{137}\text{Cs}$ の放射能比は、 10^{-4} のオーダーであった。これは過去に報告されていた不溶性セシウム粒子の分析値とも整合した¹⁾。さらにこれらの不溶性セシウム粒子に対してプルトニウムの分析を行った結果、これらの粒子にプルトニウム同位体が含まれていることを初めて明らかにした⁷⁾。プルトニウム同位体の存在量は、 ^{137}Cs の存在量に対して 10^{-8} のオーダーであり、極めて少ないことが分かった。このプルトニウム量は、過去に土壌で報告されている放射能比とも比較的よく整合した⁸⁾。放射性セシウム、ストロンチウム、プルトニウムという、化学的性質の異なる3つの元素の特性を考えることで、不溶性粒子の生成した温度について推定することが可能である。現時点では分析の精度が十分ではないが、これらの元素の蒸気圧の違いを考えると不溶性粒子生成時の炉内温度は 2500 K 程度であると推定された。

またプルトニウムの同位体比を詳細に調べたところ、 $^{240}\text{Pu}/^{239}\text{Pu}$ は 0.35 程度、 $^{241}\text{Pu}/^{239}\text{Pu}$ は 0.17 程度であることが分かった。これは福島原子力発電所の核燃料のプルトニウムインベントリーの計算値から求めた同位体比⁹⁾ともよく整合していた。つまり不溶性セシウム粒子に含まれるプルトニウムは、福島原発事故に由来していることが確かめられた。現時点では精度が低いものの、今後検体数を増やしていくことで、福島事故に由来するプルトニウムの同位体比を実験的に決定できる可能性がある。

細胞実験では、線量評価結果に基づいて不溶性セシウム粒子と同じ線量を急照射したときの DNA 二重鎖切断の誘発を検討した。急照射と比べて不溶性セシウム粒子による DNA 二重鎖切断数が少ないことを示した。不溶性セシウム粒子による線量率は本研究での急照射時の線量率よりも低く、さらに不溶性粒子では持続照射となっている。線量率が低いために、不溶性セシウム粒子が誘発する単位時間あたりの DNA 二重鎖切断数が少ないこと、持続照射期間に DNA 二重鎖切断の誘発と修復が並行して行われていることが、急照射よりも不溶性セシウム粒子による損傷数が少なかった理由として挙げられる。一方で、粒子処理時間とともに損傷数が増加したことから、DNA 損傷が徐々に蓄積する、すなわち修復されない損傷が出現する可能性が示唆された。この現象は粒径の大きいタイプ B でのみ確認されたことから、肺の深部まで到達することが予想される粒径の小さいタイプ A が致命的損傷を誘発する可能性は低いことが予想された。

今回の動物実験により、三種混合麻酔を用いた頸部切開術による気管内投与方法が適応可能ということが分かった。今回はまず投与方法の確立が目的だったので不溶性粒子の量を最大で 3mg/kg 体重にしたが、3-5 μm 厚の薄切標本ではほとんどシリカ粒子を検出することができなかった。よって、線量評価のために不溶性粒子の肺内分布を調べるためには今回投与した量の 10 倍以上の量の不溶性粒子を投与する必要があると考えられる。

病理組織変化については、今回の投与量、および観察日（投与一週間後）では炎症や線維化反応が見られなかった。これは、投与量が少ないことと、HE 染色のみで観察しているためと考えられる。一匹当たり 20 mg のシリカ粒子の気管内投与で、投与 1 ヶ月後よりも 2 ヶ月後において進行した線維化所見が認められた報告があり¹⁰⁾、さらに 1~2 か月経過後に観察する必要がある。

V. 結論

タイプ B の不溶性セシウム粒子には、放射性セシウム以外に、放射性ストロンチウムとプルトニウムが含まれることを明らかにしたが、放射性セシウムに対する放射能比はそれぞれ 10^4 と 10^8 オーダーであった。粒子近傍では放射性セシウムから生じる β 線の寄与が大きく、1 cm 離れると γ 線のみが影響することをシミュレーションによって明らかにした。また、タイプ B 粒子から 1 cm 以内の範囲にある細胞に対して DNA 二重鎖切断を誘発し、粒子の処理時間とともに損傷が蓄積するが、タイプ A では短時間で DNA 二重鎖切断の誘発は見られなかった。また、病理診断の結果、今回投与した非放射性不溶性粒子量と観察時期（投与後一週間）では、肺に有意な炎症反応や繊維化反応は認められなかった。

VI. 次年度以降の計画

不溶性セシウム粒子にプルトニウム同位体が含まれていたが、一部の不溶性セシウム粒子ではプルトニウムが検出されなかったことから、不溶性粒子間でプルトニウムの含有量にばらつきがあることが示唆される。また放射性ストロンチウムに関しても、含有量にばらつきがあると考えられる。今後検体数を増やすことで、これらのばらつきについて評価を行う。また、模擬粒子の作成では、放射性セシウムの導入を試みる。

動物実験の進捗に併せて、タイプ A 粒子が肺に取り込まれた場合の被ばく線量評価体系を構築する。

細胞実験では、本年度の上皮細胞に対する影響に加えて、肺内で粒子が影響をおよぼす可能性が高いマクロファージに対する影響解析を実施する。また、低線量率放射線発生装置を用いる照射実験により、不溶性セシウム粒子による局所被ばくと、均一被ばくによる影響の差異について検証する。

動物実験では、本年度確立した粒子の投与方法を用いて、不溶性粒子 30mg/kg 体重の量をラット気管内に投与し、14、28、56 日後に、各群のラットを麻酔下で解剖して肺の組織標本を作成する。不溶性粒子の分布を計測し、経時的な変化、炎症性反応などについて検討する。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 論文：査読あり

- 1) Igarashi J, Zheng J, Zhang Z *et al.*, 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.
- 2) 梶原知啓, 二宮和彦, 篠原厚, 他. 福島原発周辺における土壌中放射性ストロンチウム濃度の分布測定. *KEK-Proceedings*. 2019; 2019-2: 44-48.

3) 五十嵐淳哉, 張子見, 二宮和彦, 他. 福島県大熊町及び双葉町にて採取した放射性セシウムを含む不溶性粒子の分類. KEK-Proceedings. 2019; 2019-2: 54-59..

B. 論文：査読なし

1) 鈴木正敏. 放射性粒子による生物影響解明に向けた異分野融合研究の必要性. 素粒子論研究 2019; 29: 39-43.

C. 学内学会発表

- 1) 鈴木正敏、遠藤暁、松谷祐輝、二宮和彦、佐藤志彦、末木啓介、福本学、基礎物理学研究所研究会、(京都、2019年5月)
- 2) 梶原知啓、二宮和彦、篠原厚、山口喜朗、日本放射化学会第63回討論会(2019) (いわき、2019年9月)
- 3) 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、篠原厚、日本放射化学会第63回討論会(2019) (いわき、2019年9月)
- 4) 鈴木正敏、遠藤暁、松谷祐輝、二宮和彦、佐藤志彦、末木啓介、福本学、京都大学複合原子力科学研究所専門研究会 (熊取、2019年12月)
- 5) 梶原知啓、二宮和彦、篠原厚、山口喜朗、第21回環境放射能研究会 (つくば、2020年3月)
- 6) 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、第21回環境放射能研究会 (つくば、2020年3月)
- 7) 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、日本原子力学会2020年春の年会 (福島、2020年3月)

D. 国際学会発表

- 1) J. Igarashi, J. Zheng, Z. Zhang, K. Ninomiya, Y. Satou, M. Fukuda, Y. Ni, T. Aono, A. Shinohara, 5th International Conference on Environmental Radioactivity (Prague, Czech Republic, 2019年9月)
- 2) T. Kajiwara, K. Ninomiya, A. Shinohara, Y. Yamaguchi, Migration 2019 (Kyoto, 2019年9月)

E. 著書

1) Ninomiya K. Properties of Radioactive Cs-Bearing Particles Released by the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident and Trace Element Analysis, Fukumoto M. Low-Dose-Rate Radiation Effects on Animals and Ecosystem -Long-Term Study on the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident, Singapore: Springer Nature, 2020; 195-204.

1) Suzuki M, Ninomiya K, Satou Y, *et al.* Perspective on the Biological Impact of Exposure to Radioactive Cesium-Bearing Insoluble Particles, Fukumoto M. Low-Dose-Rate Radiation Effects on Animals and Ecosystem -Long-Term Study on the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident, Singapore: Springer Nature, 2020; Low-Dose-Rate Radiation Effects on Animals and Ecosystem -Long-Term Study on the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant Accident, Singapore: Springer Nature, 2020; 205-213.

- F. 講演
 - 1)
- G. 主催した研究集会
 - 1)
- H. 特許出願・取得
 - 1)
- I. その他
 - 1)

VIII. 参考文献

- 1) Zhang Z, Igarashi J, Satou Y, *et al.*, Activity of ^{90}Sr in fallout particles collected in the difficult-to-return zone around the Fukushima Daiichi nuclear power plant, *Environmental Science Technology* 2019; 53: 5868-5876.
- 2) Wang Z, Zheng J, Ni Y, *et al.* High-Performance Method for Determination of Pu Isotopes in Soil and Sediment Samples by Sector Field-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry* 2017; 89: 2221-2226.
- 3) National Nuclear Data Center (NNDC). NNDC data base: Interactive Chart of Nuclides. <http://www.nndc.bnl.gov/chart/> (last update: 1 February 2017)
- 4) Japan Atomic Energy Agency (JAEA), WWW Chart of the Nuclides 2014, <https://www.nndc.jaea.go.jp/CN14/index.html> (last update: 8 May 2015)
- 5) Marková E, Schultz N, BelyaevMarkova IY, Kinetics and dose-response of residual 53BP1/ γ -H2AX foci: Co-localization, relationship with DSB repair and clonogenic survival, *International Journal of Radiation Biology* 2007; 83: 319 – 329.
- 6) Satou Y, Sueki K, Sasa K, *et al.*, 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.
- 7) Igarashi J, Zheng J, Zhang Z *et al.*, 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.
- 8) Zheng, J, Tagami K, Watanabe Y, *et al.*, Isotopic evidence of plutonium release into the environment from the Fukushima DNPP accident, *Scientific Reports* 2012; 2: 0304.
- 9) Nishihara K, Iwamoto H, Suyama K. Estimation of Fuel Compositions in Fukushima-Daiichi Nuclear Power Plant JAEA-Data/Code 2012-018. Ibaraki:JAEA, 2012; 65-117.
- 10) Chen Y, Chen J, Dong J, *et al.*, 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.

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, 2 Department of Chemistry, Graduate School of Science, Osaka University, 3 Quantum Energy Applications, Graduate School of Engineering, Hiroshima University, 4 Department of Radioecology and Fukushima Project, Center for Advanced Radiation Emergency Medicine, National Institutes for Quantum and Radiological Sciences and Technology

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 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 relatively larger particles isolated from the soil, and Strontium-90 and Plutonium-239/240 were detected in addition to radiocesium, but the radioactivity ratio with Cesium-137 were 10^{-4} and 10^{-8} , respectively. In addition, we established the protocol to form insoluble silica particles using stable cesium. The concentration of cesium in non-radioactive particles we made was in good agreement with that of radiocesium-bearing insoluble particles. These particles were used to examine an intratracheal instillation method in animal experiment. As a result of pathological diagnosis, as for the excessive fibrosis and inflammatory reaction, it was not admitted to the lungs with the present quantity of insoluble particle and the observation time.

The cellular effect was examined with radiocesium-bearing insoluble particles isolated from the soil. Radiation dose from the particle was evaluated by Monte Carlo simulation using PHITS code. It was clarified that β -rays caused by radiocesium had a great effect on cells in the vicinity of the particles, and that only γ -rays had an effect at a site 1 cm away from the particles. In addition, studies using 53BP1 molecular marker showed that DNA double-strand breaks were induced within 1 cm of the particles, and the damage were accumulated depending on the time of coculture with the particles. We also revealed that 7 Bq of radiocesium in the particles was insufficient to introduce DNA double-strand breaks into the surrounding cells.

2-8 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

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。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て、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。動物モデルとしては、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幹細胞動態データの一部を実験によって取得した。具体的には、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。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。さらに、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。いずれも予定通りの成果が得られたことから、次年度は幹細胞動態データの取得、がん起源細胞の推定と細胞競合の評価を行う実験の開始、数理モデルのパラメータ解析及び実験的知見の取り込みを実施する。

キーワード

放射線発がん	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）

横谷明德（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、環境行政、特に放射線健康影響に関する主要な課題である。低線量率放射線の影響評価に関しては、疫学の精度が高く

ないことから、作用機序の生物学的メカニズムに基づいてモデル化するアプローチが必要であることが、国際的な議論によって指摘されている^{1~3)}。

動物発がん実験では、低線量率では高線量率と比べて、放射線誘発がんの発生率が明らかに低くなる（すなわち線量率効果が明らかである）ことがわかっている。主任研究者は、ヒト乳がんに近い放射線発がんモデルであるラットを使用した動物発がん実験を行ってきた⁴⁾。また、分担研究者は、放射線被ばくした細胞の挙動を数理モデル化することで、実際の実験結果を説明し、分析することに成功してきた⁵⁾。

本研究では、ヒトでは研究の難しい、放射線被ばく後の細胞の動態を解析できる動物発がんモデル、特にラット乳がんをモデルケースとして取り上げる。そして、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、実験で得られる情報を加味して、線量率効果を説明する重要な要因を見つけ出すことを目的とする。初年度である平成31年度（令和元年度）は、研究項目1（主任研究者）では数理モデルに必要なパラメータの推定に資する幹細胞動態データの一部の取得を、研究項目2（分担研究者）では数理モデルに空間構造と発がんを取り入れるデザイン拡張を、それぞれ目的とする。また、若手研究者を活用した加速化事業により、研究項目1で2年目以降に行う予定の、がん起源細胞推定実験及び細胞競合実験の実験系の高度化に資する改良を行う。

主任研究者の報告では研究項目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. コロニー形成能解析

① 乳腺細胞の単離

ラット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ンクス平衡食塩水(HBSS)で37°C3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。

② コロニー形成実験

調製した生細胞を染色し、セルソーター(Beckman Coulter社 MoFlo-XDP)で分取した。これを2mg/mLラット尾由来I型コラーゲン(Corning社)及び5mM HEPESを含むEpiCult-B培地(Stem Cell Technologies社)中に氷上で懸濁し、超低接着プレート(Corning社)に播種して37°Cで1時間ゲル化した後、EpiCult-B培地(5%FBS、ラット上皮成長因子及び塩基性線維芽細胞成長因子、3 μ M Y-27632、10 μ M フォルスコリン、0.5 μ g/mL コルチコステロンを含む)に浸漬し、ウェル壁から剥離して培養した。3~4日に1回、新鮮な培地に交換し、11~14日培養した。

③ 細胞照射

細胞の照射は、 γ セル照射装置(Nordion社、¹³⁷Cs、線量率30Gy/時)を用いて行った。

④ モデルフィッティング

多標的 1 ヒットモデル⁶⁾ の以下の式に、Microsoft Excel のソルバー機能を用いて、最小二乗法によるフィッティングを行った。

$$S(D) = 1 - (1 - e^{-\frac{D}{D_0}})^n$$

但し、 S はコロニー形成能の生存率、 D は線量、 D_0 及び n はそれぞれヒット効率と標的数を表すパラメータ。

2. 細胞死・細胞増殖解析

① 照射

ラット個体（日本クレア社、日本チャールスリバー株式会社）の照射は、 γ セル照射装置を用いて行った。

② EdU 投与

生理食塩水（大塚生食注 10mL、大塚製薬）に 5-エチニル-2'-デオキシウリジン（EdU、Thermo Fisher Scientific 社）を溶解して 5mg/mL とし、50mg/kg 体重あたりとなる量を腹腔内投与した。

③ フローサイトメトリー

乳腺細胞を、「1. コロニー形成実験」の「①乳腺細胞の単離」と同様の方法で調整し、最終濃度 2.5~5.0%のホルマリンで固定して-80℃で保存した。使用時に、融解した細胞を 1%FBS 含有 PBS に混ぜ、V 底 96 ウェルプレート of the ウェルに約 150,000 個となるように入れ、遠心して上清を除いたのち、抗体溶液を滴下して、氷上で 30 分間放置、200 μ L の 1%FBS 含有 PBS で洗浄、遠心して、250 μ L の 1%FBS 含有 PBS に懸濁した。これを簡易型フローサイトメーター（Guava easyCyte、メルクミリポア社）で解析した。EdU 陽性細胞の検出には、Click-iT Plus EdU Flow Cytometry Assay Kits（Thermo Fisher Scientific 社）を使用した。

④ 蛍光染色

ホルマリン固定パラフィン包埋した組織を 4 μ m 厚に薄切し、脱パラフィン処理後に 0.01M クエン酸緩衝液（pH6）中 121℃10 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と 4℃で一晩反応させ、TBS-T で洗浄後、同様に希釈した蛍光標識二次抗体を 37℃で 1 時間反応させ、TBS-T で洗浄し、4',6-ジアミジノ-2-フェニリンドール（DAPI）を含む市販封入剤で封入した。

3. 移植実験

① 乳腺細胞の単離

オワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質（EGFP）、造礁サンゴ由来赤色蛍光タンパク質（DsRed）遺伝子を導入したラットは、京都大学ナショナルバイオリソースプロジェクト・ラットより導入したものを自家繁殖した。これらのラットより乳腺を摘出し、「1. コロニー形成実験」の「①乳

腺細胞の単離」と同じ方法で細胞を調製した。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℃で保存した。使用時には37℃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（死細胞では細胞膜の崩壊によって取り込まれるが生細胞にはとりこまれない。）及び血球計算板によって計測し、2%FBSを含むHBSSで目的の濃度に調整した。

② 細胞移植

細胞懸濁液は手術まで氷上で保管した。レシピエントラットにイソフルラン麻酔を行い、下半身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、ハミルトンシリンジを用いて細胞を注入した。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、飼育ケージ内で覚醒させ、通常飼育した。解剖後、移植した皮下脂肪組織を摘出した。

③ 移植部位の解析

摘出した組織は、実験の目的により、以下のいずれかの方法で解析した。

a) 組織学的解析

摘出した組織を10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、定法によりパラフィン包埋切片（約3μm）を作製して、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製した。

b) フローサイトメトリー

「2. 細胞死・細胞増殖解析」の「③フローサイトメトリー」と同様の方法で実施した。

c) 組織透明化及び画像解析

組織をゲル化し電気泳動することによって脂質を除去し透明化する方法（CLARITY法）を用いた。摘出した乳腺組織をスライドガラスに貼付して、50mLプラスチック遠心管内で4℃においてアクリルアミドヒドロゲルモノマーに1~2日浸漬した。これをヒドロゲル重合システム（EasyGel、LifeCanvas Technologies社）に設置して、陰圧下でモノマー溶液の浸透を行った後、洗浄して、電気泳動システム（SmartClear II、LifeCanvas Technologies社）で脂質を除去した。その後、屈折率調整透明化試薬（EasyIndex、LifeCanvas Technologies社）に浸漬した。写真撮影にはディスク型共焦点顕微鏡システム（オリンパス株式会社）を使用し、画像解析システムImaris（Carl Zeiss Meditec社）で解析した。

（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. 幹細胞動態解析

① コロニー形成能解析

ラットの乳腺細胞を CD49f 及び CD24 の発現量を指標としてソーティングして、内腔前駆細胞と基底細胞に分画した。それぞれをコラーゲンゲル培養条件下で 0~4Gy の γ 線を照射し、14 日後のコロニー形成能を指標とした生存率曲線を作成した。その結果、内腔前駆細胞は、基底細胞よりも、高線量での生存率が高いことがわかった (図 III-1)。多標的 1 ヒットモデルに当てはめた際のパラメータは表 III-1 の通り。

② 細胞死 (アポトーシス) 解析

ラットを照射後、DNA 断片化を指標として、各細胞のアポトーシスを調べた。その結果、照射後のアポトーシスの頻度は高くないこと、内腔細胞で、基底細胞より、顕著であることがわかった (図 III-2)。

③ 細胞増殖解析

ラットを照射後、新規合成 DNA を EdU で標識し、各細胞での取り込みを調べた。その結果、照射後の細胞増殖停止 (EdU 取り込みの減少) は内腔細胞で基底細胞より顕著であった (図 III-3)。基底細胞は増殖停止をせず、増殖死に至ると考えられた。

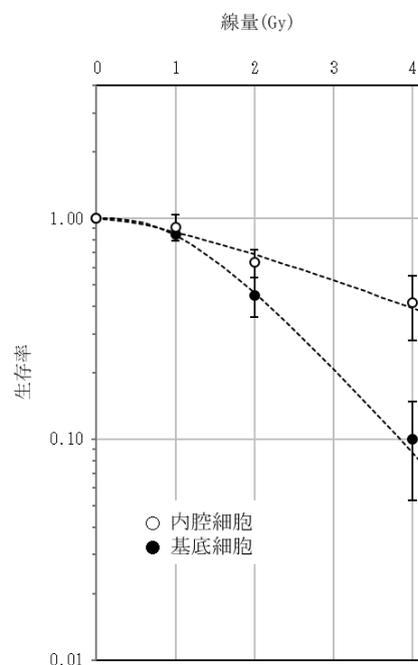


図 III-1 ラット乳腺の基底細胞及び内腔前駆細胞のコロニー形成能に対する放射線の影響。誤差棒は標準誤差。点線は、多標的 1 ヒットモデルへのフィッティング結果。

表 III-1 多標的1ヒットモデルへのフィッティング結果

パラメータ	内腔細胞	基底細胞
D_0	3.1	1.1
n	1.6	3.5

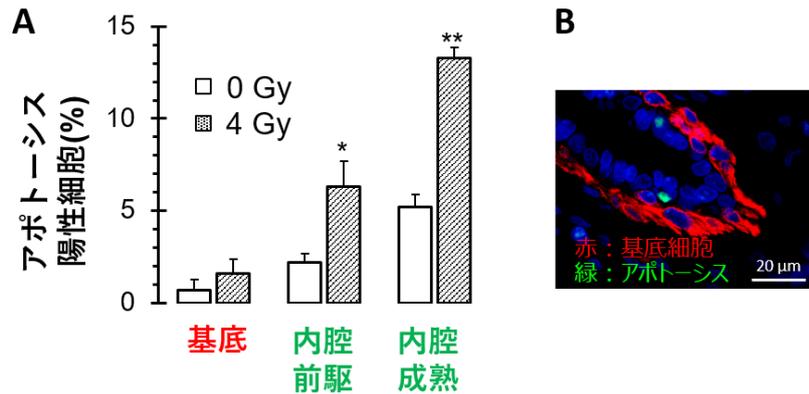


図 III-2 ラット乳腺の基底細胞、内腔前駆細胞及び内腔成熟細胞の細胞死（アポトーシス）に対する放射線の影響。A：フローサイトメトリー解析。グラフの誤差棒は標準誤差。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (vs. 0 Gy)。B：組織切片上におけるアポトーシス（緑）の検出。基底細胞をサイトケラチン 14（赤）で染色。青は細胞核（DAPI 染色）。

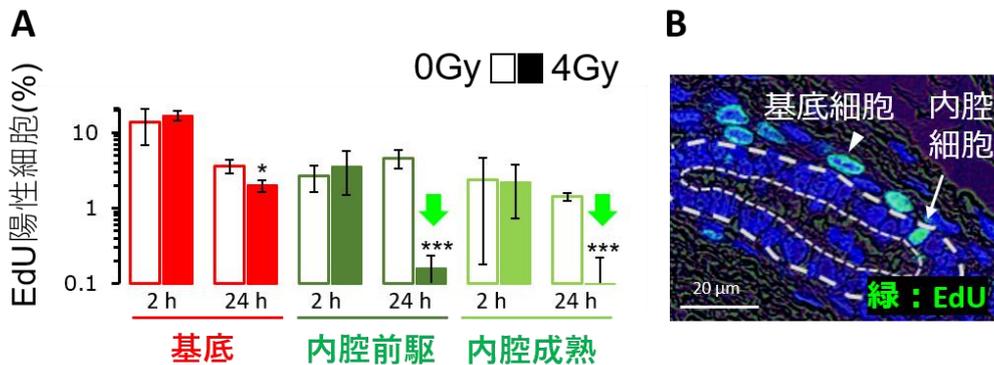


図 III-3 ラット乳腺の基底細胞、内腔前駆細胞及び内腔成熟細胞の細胞増殖停止（EdU 取り込みの減少）に対する放射線の影響。A：フローサイトメトリー解析。グラフの誤差棒は標準誤差。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ (vs. 0 Gy)。B：組織切片上における EdU（緑）の検出。青は細胞核（DAPI 染色）。EdU は緑と青の重なりによってシアン色に見える。

2. がん起源細胞推定実験の高度化

本項目は、若手研究者を活用した加速化事業により、令和二年度に予定している実験の高度化

を試みるものである。数理モデルの構築において、発がんの起源細胞としての基底細胞、内腔細胞の扱い方を決める上で、がん起源細胞に関する情報があるのが望ましい。ここで高度化を試みるのは、その情報を得るための実験である。

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、内腔細胞が発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る。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。

本実験の効率を高めるため、当初予定していたラット系統（LEW 系統）よりも乳がん発生率が高い Jcl:SD ラット系統と LEW 系統の交雑系（F1 系統）を使用することを検討した。実験では、LEW ラット（GFP を発現）より乳腺細胞を単離し、LEW 系統、F1 系統（GFP を発現する系統、しない系統）に移植して、3~4 週間後の生着を評価した。その結果、GFP を発現しない LEW もしくは F1 系統に移植した場合、移植片の周囲や内部に炎症が観察され、正常な乳腺組織に近い環境が構築できていないことが確認された（図 III-4 左）。これは GFP が非自己と認識され移植細胞の拒絶反応が起こっていることを強く示唆している。GFP を発現する LEW もしくは F1 系統に移植した場合、そのような炎症は観察されなかった（図 III-4 右）。そこで、次年度以降の実験では、GFP を発現する F1 系統を使用することに決定した。

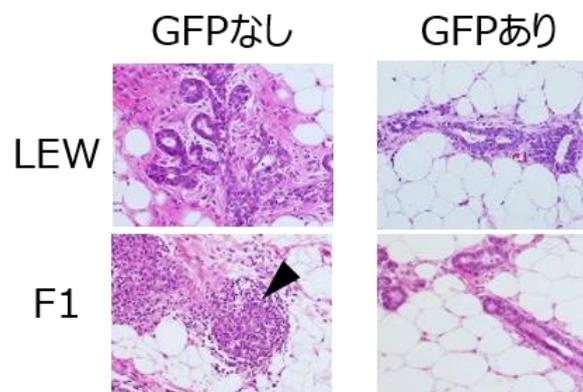


図 III-4 レシピエントの系統（LEW、F1）と GFP 発現の有無の組み合わせにおける、移植部位の組織像。矢印は炎症細胞の浸潤巣。

3. 細胞競合実験の高度化

本項目は、若手研究者を活用した加速化事業により、令和二年度に予定している実験の高度化を試みるものである。この実験は、「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。そのため、高線量率、低線量率で照射した、もしくは非照射のラットから採った細胞（緑色の蛍光タンパク質を有する）と、非照射のラットから採った細胞（赤色）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（赤色）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、緑色の細胞は排除されないと予想される。細胞競合の程度は、緑色の細胞が全体に占める割合を対照群と比較して評価する。

本実験の効率を高めるため、当初予定した組織透明化標本の蛍光画像解析に加え、フローサイトメトリーによる多数細胞の解析が可能であるかを検討した。その結果、数分間で約2万個の細胞を解析することができた。ただし、GFP の蛍光が強いため、DsRed の蛍光を検出する赤色用の検出器にも GFP 由来のシグナルが現れ、そのままでは GFP を発現する細胞と DsRed を発現する細胞を区別できないことがわかった。そこで、赤色用の検出器のシグナルから緑色用の検出器のシグナルに比例した量を差し引くことでこれを補正した。これにより GFP と DsRed を区別することに成功した（図 III-5）。GFP 細胞のみあるいは DsRed 細胞のみを計測した場合、GFP 細胞でありながら DsRed 細胞として、あるいは DsRed 細胞でありながら GFP 細胞として検出されるような外れ値を示す細胞は、非常に少数であった。蛍光画像解析については、3D 画像解析ソフトウェア Imaris による空間的細胞認識アルゴリズムが適用可能であることを確認した。

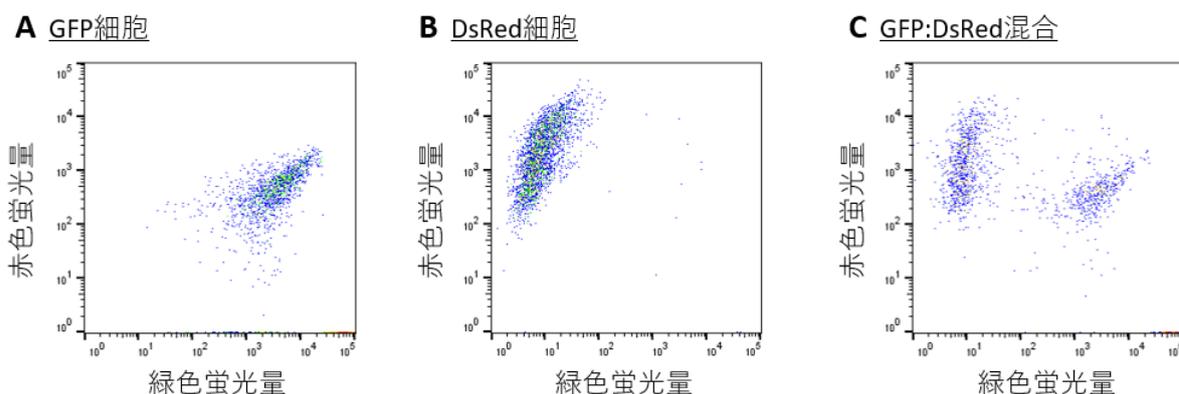


図 III-5 フローサイトメトリーによる GFP 及び DsRed 発現細胞の弁別可能性の検証。各点は各細胞の緑色及び赤色蛍光量を表す。A. GFP 発現細胞は緑色蛍光の高い右側にプロットされている。B. DsRed 発現細胞は緑色蛍光が低い左側で、赤色蛍光が高い上側にプロットされている。C. 両者を 1:1 で混合した場合も、2つの細胞集団を区別することが可能であった。

IV. 考察

1. 幹細胞動態解析

数理モデル構築に必要な、基底細胞及び内腔細胞のコロニー形成能、細胞死（アポトーシス）誘導、細胞増殖に対する放射線（急性照射）の影響のデータを得た。コロニー形成能は、前駆細胞活性を表すと解釈され、その放射線影響は多標的 1 ヒットモデルによく適合した。1Gy 程度以

下では基底細胞と内腔細胞への影響に大きな違いはなく、2Gy 程度以上では両者に大きな差が見られた。この結果を標的理論に基づいて解釈すると、基底細胞には放射線高感受性 ($D_0 = 1.1$ Gy で生存率が $1/e$ となる) の標的が多数 ($n = 3.5$ 程度) 存在し、内腔細胞には放射線低感受性 ($D_0 = 3.1$ Gy で生存率が $1/e$ となる) の標的が少数 ($n = 1.6$ 程度) 存在することを示唆している。今回のデータに他のモデルを適用しても感受性の指標を定量的に取得できる可能性があり、数理モデルの構築に応用可能である。

アポトーシスについては、上記で基底細胞と内腔細胞の間で差が見られた 4Gy において、基底細胞ではほとんど誘発されず、内腔細胞では顕著に誘発されるという結果を得た。これはコロニー形成能の結果とは異なることから、コロニー形成能実験における照射に伴う前駆細胞活性の喪失は、アポトーシスとは異なる機序で生じると考えられる。細胞増殖のデータを見ると、同じ線量の照射による増殖抑制は、基底細胞ではわずかであるが内腔細胞では顕著であった。照射後の増殖抑制は、DNA 損傷修復の時間を稼いで細胞が生存するためのメカニズムである。増殖抑制が起こりにくく DNA 損傷修復が適切に行われな可能性のある基底細胞は、細胞の生存には不利な状況にあると考えられる。そこで、内腔細胞中の標的が放射線低感受性であるのは、増殖抑制等を介して適切に損傷を修復できるためであり、基底細胞中の標的が放射線高感受性であるのは、増殖抑制等を介した損傷修復がうまく行えないためであると考えられる。

以上より、基底細胞と内腔細胞の前駆細胞における放射線応答を数理モデル化するには、標的数は内腔細胞よりも基底細胞で多く設定し、損傷修復については基底細胞よりも内腔細胞により効率的に行われるように設定するのがよいと考えられる。

2. がん起源細胞推定実験の高度化

本年度の検討により、がん起源細胞推定実験では GFP を発現する F1 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。SD ラットは放射線誘発乳がんを高感受性の系統であり、その遺伝的背景を持つ F1 ラットも LEW ラットより高感受性の体内環境を持っていることが期待できる。

GFP を発現しないレシピエントに GFP 発現細胞を移植することによって炎症が生じるメカニズムについては、GFP を非自己と認識することによる拒絶反応である可能性が高い。過去に皮膚移植について、類似した知見が報告されている⁷⁾。仮に GFP を発現しないレシピエントを実験に使用できるとすれば、レシピエント動物は購入した SD 及び LEW 系統ラットを交配させることで生産できるために効率的となると考えられた。しかし移植後に拒絶反応が生じるというデメリットが明らかとなったため、今後は GFP を発現する LEW 系統ラットを効率的に自家繁殖し、SD 系統と交配する必要がある。

3. 細胞競合実験の高度化

本年度は、多数の GFP 発現細胞と DsRed 細胞が混合された試料から、それぞれの細胞を区別して計測するフローサイトメトリーの手法を検討し、約 2 万個の細胞を短時間で解析できるという利点が明らかになった。欠点としては、GFP 蛍光の長波長成分が赤色用検出器で検出される、いわゆる「漏れ込み」が問題となった。漏れ込みは、シグナル間の演算によって補正可能であっ

た。補正後も少数の細胞が外れ値となるシグナルを示したが、問題となるほどではないと考えられた。細胞競合実験では、多数の DsRed 細胞内に少数の GFP 細胞を混ぜ入れ、前者を非照射、後者を照射あるいは非照射とする等の組み合わせを用いることにより、フローサイトメトリーが強力なツールとなることが示唆された。一方、本法では細胞を単離して解析するため、空間的情報が失われるという欠点があり、これは 3D 画像解析のような方法で補完できると考えられた。

V. 結論

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動態データを得た。また、次年度以降に実施する実験の効率を高めるための実験手法の高度化に成功した。

VI. 次年度以降の計画

初年度である平成 31 年度（令和元年度）の計画は順調に進み、マイルストーンを達成する見込みである。これを受けて、次年度以降も計画通りに実施する。すなわち、2 年度目である令和 2 年度は、幹細胞動態の追加データを取得するとともに、がんの起源細胞推定実験、細胞競合評価実験を開始する。また、数理モデルに、実験で得られたデータ、エビデンスを反映する。3 年度目である令和 3 年度は、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、若手活用加速化で雇用した若手研究者が、研究の進め方を自身で考え進めるように配慮し、指導していく。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 論文：査読あり

該当なし

B. 論文：査読なし

該当なし

C. 国内学会発表

1) 工藤健一、高島賢、西村由希子、臺野和広、西村まゆみ、飯塚大輔、柿沼志津子、今岡達彦. ラット乳腺における幹細胞と前駆細胞の放射線応答の違いについて. 日本放射線影響学会第 62 回大会, 2019 年 11 月

2) 今岡達彦、工藤健一、細木彩夏、西村由希子、高島賢、服部佑哉、渡辺立子、鈴木啓司、西村まゆみ、臺野和広、飯塚大輔、永田健斗、島田義也、柿沼志津子. 放射線誘発乳がんモデルにおける乳腺幹細胞系の放射線応答. 日本放射線影響学会第 62 回大会, 2019 年 11 月

D. 国際学会発表

1) Ken-ichi Kudo, Masaru Takabatake, Yukiko Nishimura, Kazuhiro Daino, Mayumi Nishimura, Daisuke Iizuka, Shizuko Kakinuma, Tatsuhiko Imaoka. Radiation response of mammary stem

and progenitor cells in the radiation carcinogenesis model of female Sprague-Dawley rats. 16th International Congress on Radiation Research, 2019-08-26

2) Tatsuhiko Imaoka, Mayumi Nishimura, Kazuhiro Daino, Ayaka Hosoki, Masaru Takabatake, Toshiaki Kokubo, Takamitsu Morioka, Kazutaka Doi, Yoshiya Shimada, Shizuko Kakinuma. Age modifies rat mammary carcinogenesis after continuous γ -ray irradiation. 16th International Congress on Radiation Research 2019, 2019-08-26

E. 著書

該当なし

F. 講演

該当なし

G. 主催した研究集会

該当なし

H. 特許出願・取得

該当なし

I. その他

該当なし

VIII. 参考文献

1) UNSCEAR. Biological mechanisms of radiation actions at low doses. A 2012 white paper to guide the Scientific Committee's future programme of work. United Nations. New York, 2012.

2) NCRP. Commentary No. 24 – Health Effects of Low Doses of Radiation: Perspectives on Integrating Radiation Biology and Epidemiology. National Council on Radiation Protection and Measurements. Bethesda, 2015.

3) Cool. International coordination of research: EPRI International Dose Effect Alliance. International Journal of Radiation Biology 2019; 95: 1358–1360.

4) Applegate KE, Rühm W, Wojcik A, et al. Individual response of humans to ionising radiation: governing factors and importance for radiological protection. Radiation and Environmental Biophysics 2020; 59: 185-209.

5) Hattori Y, Suzuki M, Funayama T, et al. A mathematical model of radiation-induced responses in a cellular population including cell-to-cell communications. Radiation Protection Dosimetry 2015; 166: 142-147.

6) Little JB. Cellular effects of ionizing radiation. New England Journal of Medicine 1968; 278: 369-376.

7) Inoue H, Ohsawa I, Murakami T, et al. Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. Biochemical and Biophysical Research Communication 2005; 329: 288-295.

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, dose rate effect, animal model, mathematical model, stem cell

Abstract

Assessment of cancer risk from low-dose-rate radiation requires a mathematical modeling approach based on knowledge of the biological mechanisms of radiation action. The purpose of this study is to show factor(s) that explain the dose rate effect of carcinogenesis, by using a mathematical model that describes carcinogenesis based on the experimental findings on dynamics of stem cells. As an animal model, a rat breast cancer model is used because of its well-described dose rate effect. In the first fiscal year (FY2019), experiments were conducted to obtain a part of stem cell kinetics data contributing to estimation of parameters required for the mathematical model. Specifically, data were obtained on progenitor cell activity, cell death, and cell proliferation for each cell type constituting the stem cell system of the mammary gland. In addition, the mathematical model was designed to incorporate the spatial structure and carcinogenesis, making it possible to describe the dynamics and carcinogenesis of individual cells. A separate model was constructed that simulate the dynamics of generation and repair of DNA damages under different dose rates. Furthermore, improvement was made to an experimental system for estimating the origin cells of cancer and another experimental system for measuring competition between a small number of irradiated cells present in a large number of non-irradiated cells. In the next fiscal year, we will acquire additional stem cell dynamics data, start experiments to estimate the cell of origin of cancer and evaluate cell competition, analyze mathematical model parameters, and incorporate experimental findings into the model.

2-8 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

(研究項目 2) 幹細胞動態数理モデルの構築

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

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、疫学データの精度が高くないことから、メカニズムに基づいたアプローチが必要とされている。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。我々は、これまでに、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を構築した。本研究では、構築した数理モデルに、空間構造、発がんまでの過程、マイクロドジメトリによる線量分布を追加するとともに、主任研究者の実験研究で得られた情報を数理モデルに取り込むことで、プロトタイプ数理モデルを精緻化する。そして、実験データを解析する。本研究で構築を目指す解析・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。本年度では、これらのモデルを揃えるために、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、それぞれのモデルについて、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。

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

渡邊立子（量子科学技術研究開発機構・上席研究員）

横谷明德（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、発がんのメカニズムを元にこの問題にアプローチすべきことが提言されている。

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。本研究では、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する。

II. 研究方法

本年度では、解析と予測に用いるための数理モデルを構築した。本研究で構築を目指す数理モデルは、TEB モデル、ダメージ修復モデル、発がん過程モデル、線量率モデルから構成される（図 II-1）。TEB モデルと放射線ダメージモデルは、従来研究によってプロトタイプを作成したものの、（1）空間構造が反映されていない、（2）1 細胞の状態変化を計算できないといった課題が残されていた。そこで、これらを解決するために、TEB モデルを拡張した。さらに、本年度では、新たに発がん過程モデルの構築と、線量率モデルの構築を実施した。

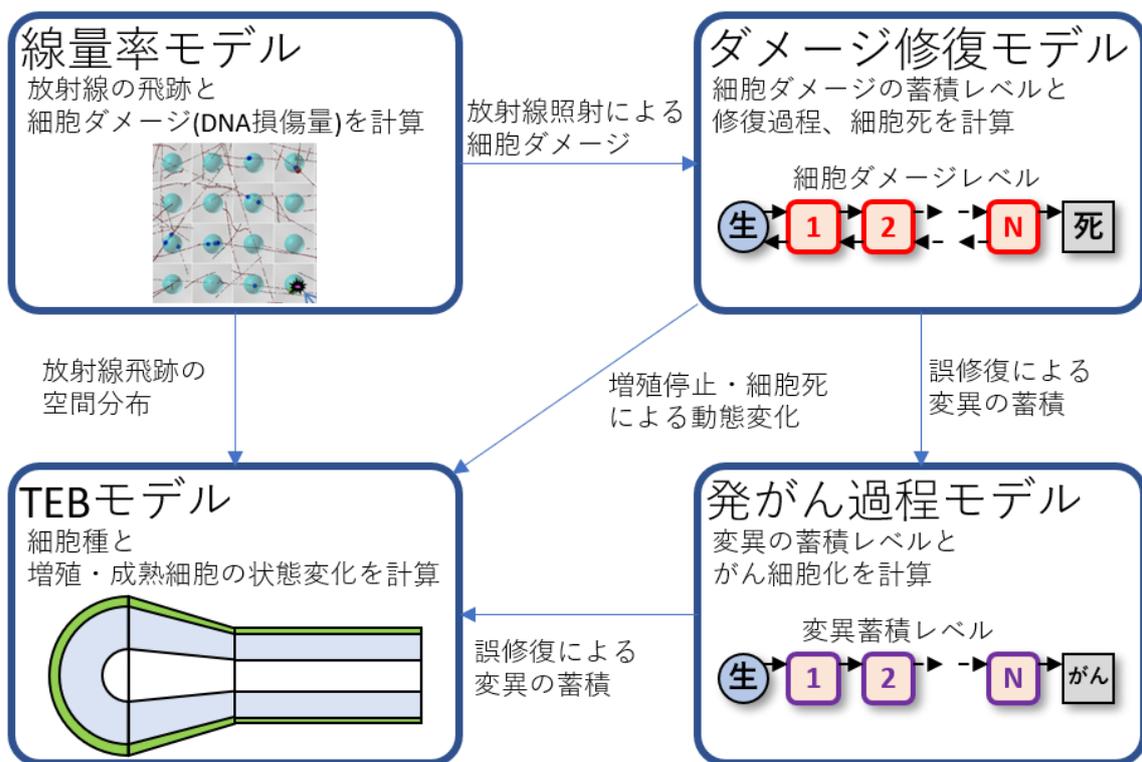


図 II-1 解析・予測モデルを構成する 4 つのモデル

1. TEB モデルの拡張

① 空間構造の追加

従来研究で構築した TEB モデルでは、TEB 内を 1 つの空間として扱っていた。しかしながら、（1）TEB では増殖細胞と成熟細胞の配置が均一ではないこと、（2）放射線による影響が増殖細胞と成熟細胞で異なることから、空間構造を考慮する必要がある。そこで、TEB の先端から 0.1mm ごとに区画し、TEB 内を 10 個の空間に分割する。

② 1 細胞追跡型への変更

従来研究で構築した **TEB** モデルでは、例えば、**TEB** 内の増殖細胞の数や成熟細胞の数といった、ある状態における細胞の数を計算していた。しかしながら、細胞への放射線照射後から発がんに至る過程を追跡するには、1 細胞レベルで細胞の状態変化を追跡する必要がある。そこで、1 細胞のオブジェクトを作成し、オブジェクトに状態とイベントを与える。

2. 発がん過程モデルの構築

放射線照射後に、増殖細胞が発がん細胞化するまでの過程を解析・予測するために、発がん過程モデルを構築する。増殖細胞が発がん細胞化するまでの過程は、増殖細胞のダメージ修復時に、修復ミスによって変異が蓄積されることで表現する。変異は、程度の異なる複数段階に分割する。

3. 線量率モデルの構築

放射線照射による細胞の状態変化の起点を計算するために必要な線量率モデルについて、空間的な放射線照射の影響を計算可能なマイクロジメトリのモデルを用いる。そこで、マイクロジメトリのモデルと、ダメージ修復モデルを関連付けるために、それぞれのモデルを用いて、DNA 二本鎖切断 (DSB) 数を調べる。

(倫理面への配慮)

本研究は、主任研究者が取得した実験データに対し、数理モデルを使って解析するものである。したがって、研究実施者が所属する大学・研究所では、倫理面に配慮が必要な実験及び人を対象とする研究は行わない。

III. 研究結果

1. **TEB** モデル

空間構造の追加と 1 細胞追跡型への変更を実施した **TEB** モデルの概要図を図 III-1 に示す。拡張した **TEB** モデルでは、**TEB** の空間を 10 分割して、各空間を領域 1～領域 10 と番号付けした。また、**TEB** の形は、細胞間の接着力によって一定を保つように振る舞う、つまり、領域内の細胞数の割合は一定値を保とうとすると仮定した。この仮定から、領域間の移動は、各領域内における細胞数と領域の格納限界細胞数を基に、細胞数の多い領域から少ない領域へ拡散的に移動するとした。また、各領域に、1 細胞のオブジェクトを作成し、細胞の属性を示す状態と、状態変化を引き起こすイベントを与えた。状態は、**TEB** モデル単体では、細胞種、増殖/成熟、領域番号、生存/死の 4 状態を持つ。さらに、ダメージ修復モデルや発がん過程モデルを組み合わせた場合では、それぞれのモデルで表現されるダメージ蓄積レベルや変異蓄積レベルなどの状態が追加される。イベントは、**TEB** モデル単体では、増殖、分化、細胞死、領域移動があり、状態と同様に、ダメージ修復モデルや発がん過程モデルを組み合わせた場合では、それぞれのモデルで表現されるイベントが追加される。これらのイベントは、一定の時間経過や確率によって引き起こされる。

このような表現方法を用いることで、TEB 内の空間を時間の経過とともに状態変化しながら移動する 1 細胞の追跡が可能となった。

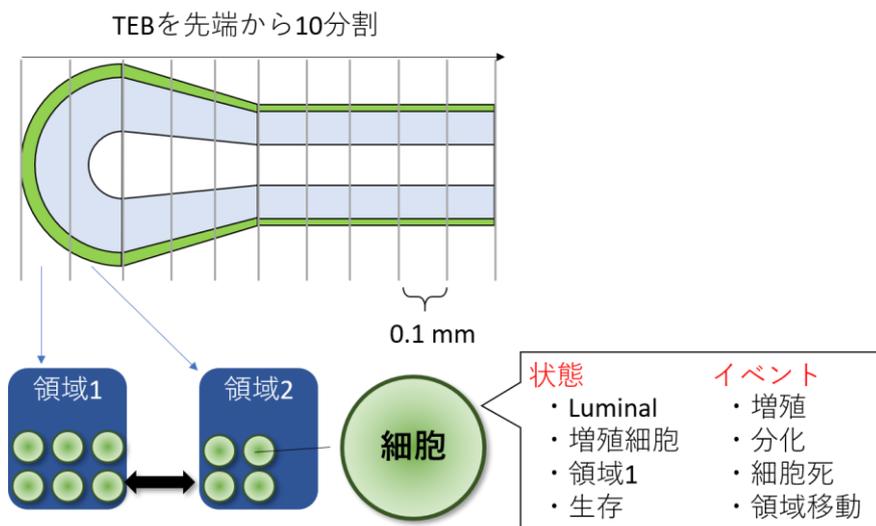


図 III-1 拡張した TEB モデルの概要

次に、拡張した TEB モデルを用いて、非照射時における内腔 (Luminal) 細胞の各領域の細胞数の時間変化を計算した各領域の細胞数の初期値は、実験データから得られた値を設定した。この TEB モデルでは、計算ステップを 10min としており、10min ごとに、増殖、分化、細胞死、領域移動のイベントの判定と、状態変化が実施される。増殖、分化、細胞死のイベントが起こる確率は、表 III-2 に示すように設定した。

表 III-2 拡張した TEB モデルに用いたパラメータ値

領域番号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
増殖細胞数	51	32	21	14	10	10	9	7	6	6
成熟細胞数	63	52	41	33	28	35	32	30	29	28
増殖率	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013
増殖細胞の細胞死率	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003	0.003
成熟細胞の細胞死率	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
分化率	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009

計算した増殖細胞数と成熟細胞数の時間変化を図 III-3 に示す。両方の細胞とも、時間経過とともに各領域の細胞数が変化しており、特に、増殖細胞数の変化は大きいことが分かる。この計算では、各イベントに関連するパラメータ値は、各領域で同じ値を設定しているにも関わらず、各領域の初期細胞数が異なるため、空間的に細胞数が変化している。また、1 細胞に起こるイベントは確率分布に従うため、細胞数も小さく変化していることが分かる。したがって、この計算結果から、空間的な細胞数の違いが、空間依存的な細胞数の増減を引き起こすことが示された。

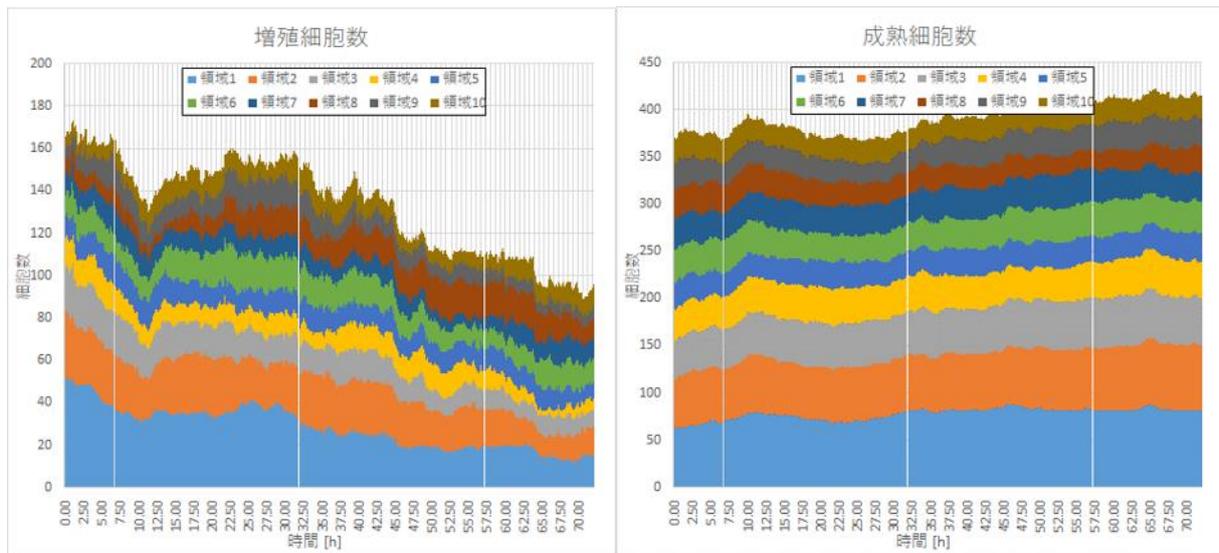


図 III-3 拡張した TEB モデルによる細胞数の時間変化の計算結果

2. 発がん過程モデル

構築した発がん過程モデルの概要を図 III-4 に示す。本モデルも、拡張した TEB モデルと同様に、1 細胞の状態を追跡可能なオブジェクトで表現した。発がん過程は、正常細胞が、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ことで表現した。

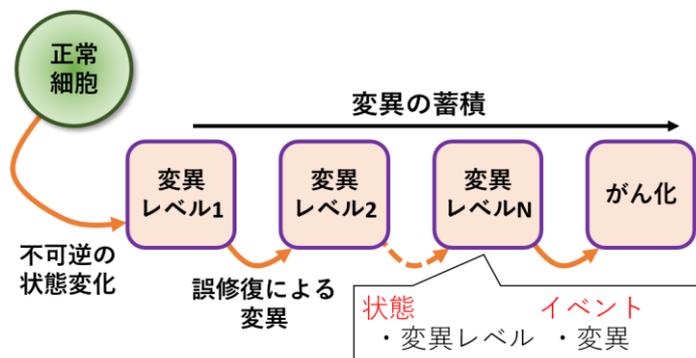


図 III-4 発がん過程モデルの概要

発がん過程モデル単体では、各状態における細胞数の時間変化は、下記の微分方程式で表現される。

$$\frac{dX_0(t)}{dt} = -m_0X_0(t)$$

$$\frac{dX_1(t)}{dt} = m_0X_0(t) - m_1X_1(t)$$

$$\frac{dX_i(t)}{dt} = m_{i-1}X_{i-1}(t) - m_iX_i(t)$$

$$\frac{dX_{N+1}(t)}{dt} = m_NX_N(t)$$

ここで、 $X_i(t)$ は、時刻 t における変異レベル i の状態の細胞数を表す。 m は、変異イベントが起きる確率を表す。この微分方程式において、1) 正常細胞は十分に多いため一定とし、2) がん細胞数の減少が無視できると仮定すると、下記の式が得られる。

$$\frac{dN_1(t)}{dt} = mN_0$$

$$\frac{dN_i(t)}{dt} = mN_{i-1}(t)$$

$$N_i(t) = m^i \frac{N_0}{i!} t^i$$

$$\log\left(\frac{N_i(t)}{N_0}\right) = \log\left(\frac{m^i}{i!}\right) + i\log(t)$$

この式は、罹患率 $N_i(t)/N_0$ の対数が、経過時間 t の対数に比例する Armitage-Doll モデル¹⁾ を示している。そこで、本研究の主任研究者が取得した実験データ (図 III-5)²⁾ から、Armitage-Doll モデルに基づいて発がんに必要な変異レベル数 i を推定したところ、がん化までの状態数 $N+1=2.988$ を得た。

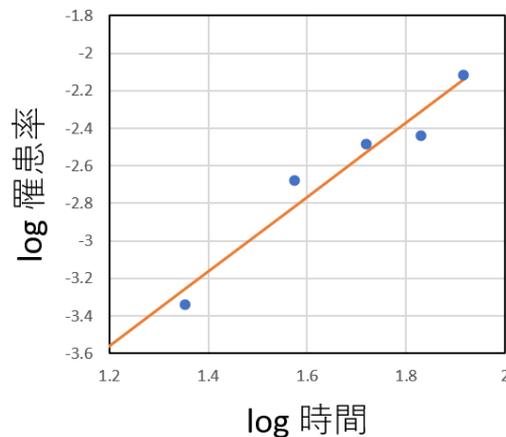


図 III-5 ラット乳がんの罹患率の時間変化²⁾

3. 線量率モデル

マイクロドジメトリモデルを使って計算した DSB を、DSB 修復を考慮したダメージ修復モデルと関連付ける。まず、マイクロドジメトリモデルを用いて、簡易的な細胞集団において、細胞ごとに 1 トラック通過あたりに付与される最少線量分布と DSB 生成数の分布を計算した。計算し

た結果について、生成された初期 DSB 数の線量依存性を図 III-6 に示す。この図から、初期 DSB 数は、線量に比例して増加することと、複雑な損傷を持つ複雑な DSB も線量依存的に生成されることが分かる。

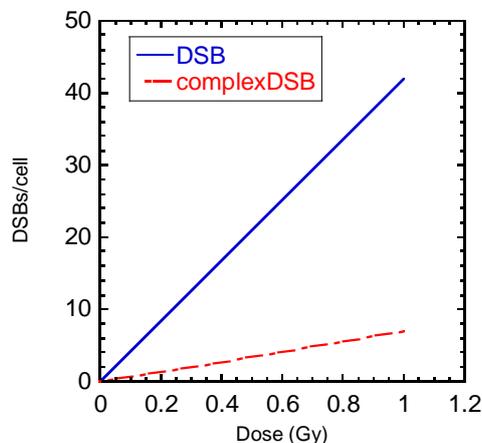


図 III-6 マイクロドジメトリのシミュレーションによる初期 DSB 数の線量依存性

次に、DSB 生成数と修復 DSB 数を、従来研究で構築したダメージ修復モデルを用いて、高線量率 (1.8Gy/min) と低線量率 (0.3mGy/min) のそれぞれの条件で DSB 数の時間変化を計算した。細胞ダメージ修復モデルは、下記の微分方程式で表される。

$$\frac{dZ_1(t)}{dt} = a_1 D_R - r_1 Z_1(t)$$

$$\frac{dZ_i(t)}{dt} = a_i D_R - r_i Z_i(t)$$

ここで、 $Z_i(t)$ は、特定の質を持つ DSB の数の時間変化を表し、 D_R は線量率、 a_i と r_i は DSB 生成と修復のパラメータを表す。DSB 生成と修復のパラメータに適当な値を与え、線量は変えずに線量率を変えた計算結果を、図 III-7 に示す。この図では、1 細胞当たりの DSB 数の時間変化で表している。この図から、高線量率では DSB 数が短い照射時間中に急激に増えており、修復の効果がほとんど表れていないが、低線量率では緩やかに増加した後、少ない DSB 数で一定値を保っており、修復の効果によって DSB 数の増加が抑えられていることが分かる。

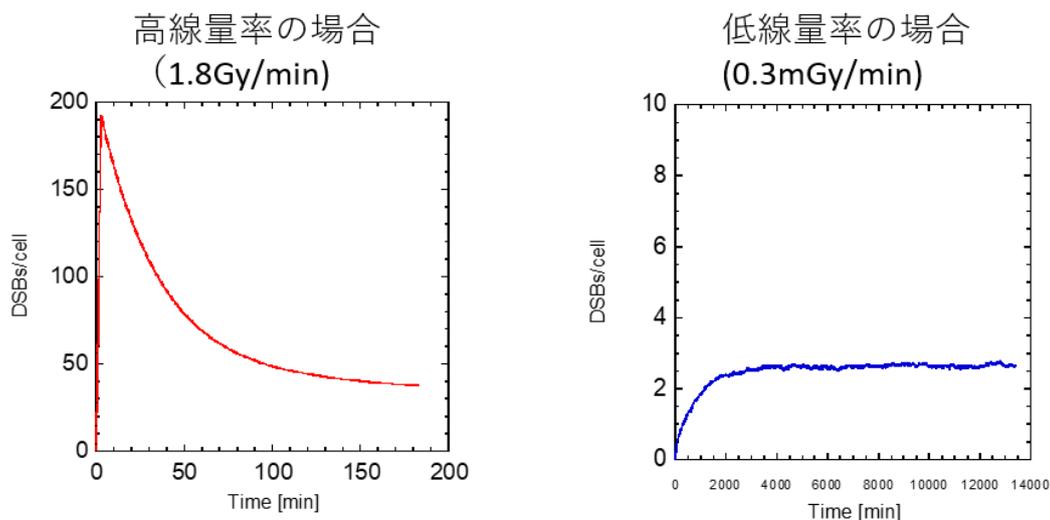


図 III-7 ダメージ修復モデルのシミュレーションによる照射後の DSB 数の時間変化

最後に、生成された DSB 数について、ダメージ修復モデルを用いて、線量率が異なる場合の線量依存性を調べた。この計算時における修復パラメータの値は、DSB 数の線量依存性の実験データを基に決定した。計算結果を図 III-8 に示す。この結果から、ダメージ修復モデルで計算した結果は、実験値と同じ傾向を示すことと、高線量率と低線量率では、異なる線量依存性が現れることが分かる。

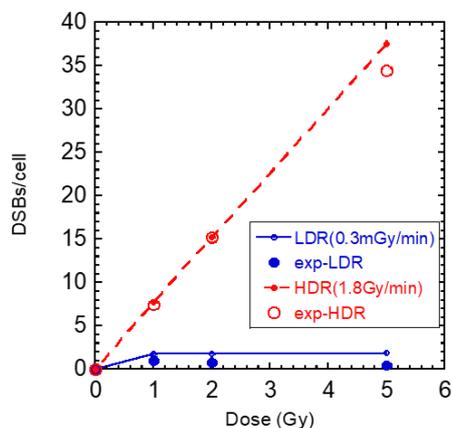


図 III-8 高線量率と低線量率照射による DSB 数の線量依存性 (実験値：文献³⁾)

また、図 III-6 の DSB の変化と、図 III-8 の HDR の変化を比較すると、同じ傾向が得られていることが分かる。これらの結果から、マイクロジメトリで計算した詳細な DSB 生成過程から、ダメージ修復モデルの係数を求めることで、マイクロジメトリモデルの DSB 数とダメージ修復モデルで表現する DSB 数が十分に関連付できることが分かった。これにより、マイクロジメトリで計算可能な TEB 全体の領域における DSB 数の分布を起点に、細胞の変異蓄積とがん化まで追跡可能である。

IV. 考察

本分担研究では、ラットの **TEB** を対象とし、発がん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 4 つのモデルについて、**TEB** モデルの拡張、発がん過程モデルの構築、線量率モデルの構築を実施した。それぞれのモデルについて、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。

V. 結論

本年度の成果によって、本研究計画の解析・予測に必要な数理モデルを構成する 4 つのモデルが揃った。次の課題は、各モデルで実験データと比較し、パラメータ値やモデルの検証を実施することと、各モデルを連結し、モデルの挙動を確認・検証することが挙げられる。

VI. 次年度以降の計画

各モデルに含まれるパラメータ値を実験データに基づいて決定する。一方、実験データからは導出不可能なパラメータ値については、感度解析を実施し、網羅的にシミュレーションに有効なパラメータ値を探る。また、各モデルが実験データを再現可能か検証し、再現が出来ない場合は、主任研究者との議論を通して、細胞競合の影響の追加など、数理モデルの修正を実施する。

VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

A. 論文：査読あり

該当なし

B. 論文：査読なし

該当なし

C. 国内学会発表

1) Yuya Hattori, Ritsuko Watanabe, Akinari Yokoya, Daisuke Kurabayashi, A mathematical model of low-dose / low-dose-rate radiation effect: One-target multi-hit model with damage repair function, 日本放射線影響学会第 62 回大会, 京都府京都市, 2019 年 11 月 14-16 日.

2) 服部 佑哉, 渡辺 立子, 横谷 明德, 倉林 大輔, DNA 損傷修復の時間変化を考慮した放射線誘発の標的論モデル, 日本数理生物学会年会 2019, 東京都目黒区, 2019 年 9 月 14-16 日, ポスター発表.

D. 国際学会発表

該当なし

E. 著書

該当なし

F. 講演

該当なし

G. 主催した研究集会

該当なし

H. 特許出願・取得

該当なし

I. その他

該当なし

VIII. 参考文献

- 1) Armitage P, Doll R. The Age Distribution of Cancer and a Multi-stage Theory of Carcinogenesis. 1954; British Journal of Cancer 8(1): 1–12.
- 2) Imaoka T, Nishimura M, Daino K, et al. Age Modifies the Effect of 2-MeV Fast Neutrons on Rat Mammary Carcinogenesis. Radiat Res 2019; 188(4): 419–425.
- 3) Ishizaki K, Hayashi Y, Nakamura H, et al. No induction of p53 phosphorylation and few focus formation of phosphorylated H2AX suggest efficient repair of DNA damage during chronic low-dose-rate irradiation in human cells. J Radiat Res 2004; 45(4): 521–525.

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 study, the prototype mathematical model is refined by adding the spatial structure, the process of carcinogenesis, and the dose distribution estimated by microdosimetry simulation. 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 this fiscal year, we extended the TEB model and constructed a carcinogenic process model and a dose rate model in order to bring these models together. For each model, we were able to construct one that met the specification for single-cell state-change tracking required for the analysis.