

平成27年度  
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)  
報告書

平成28年3月

公益財団法人 原子力安全研究協会

本報告書は、環境省の平成 27 年度原子力災害影響調査等事業による委託業務として、公益財団法人原子力安全研究協会が実施した放射線の健康影響に係る研究調査事業の成果をとりまとめたものです。

## 目 次

1. 事業の背景及び目的	1
2. 事業の実施内容	1
2.1 新規研究課題に関する公募の事務	1
2.2 継続研究課題に関する事務	5
2.3 委員会等の開催	5
2.3.1 「第1回推進委員会」の開催	6
2.3.2 「第2回推進委員会」の開催	7
2.3.3 「第3回推進委員会」の開催	8
2.3.4 「研究成果発表会（平成28年度継続研究課題）」の開催	8
2.3.5 「評価委員会」の開催	9
2.3.6 「第4回推進委員会」の開催	9
2.3.7 「研究成果発表会（平成27年度終了研究課題）」の開催	9
2.4 研究計画書（案）の作成	9
2.5 研究報告書の作成	10
2.6 平成27年度の事務委任契約額案の作成	10
3. 平成27年度研究報告書	10
テーマ1：放射線被ばく線量の評価に関する研究	11
1-1 歯を用いた包括的被ばく線量評価 佐々木 啓一（東北大学大学院歯学研究科）	
テーマ2：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	30
2-1 低線量放射線は心血管疾患発症の原因と成りうるか？-動物実験による検証- 丹羽 保晴（公益財団法人放射線影響研究所副主任研究員）	
2-2 極低線量率放射線連続被ばくマウスを用いた健康影響解析 杉原 崇（環境科学技術研究所生物影響研究部主任研究員）	
2-3 小児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・准教授）	
2-4 小児・青年期の低線量率放射線被ばくによるがんリスクの評価——インドケ ララ州の高自然放射線地域住民の調査結果を中心として 秋葉 澄伯（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講 座疫学予防医学）	
2-5 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 中島 裕夫（大阪大学大学院医学系研究科放射線基礎医学助教）	
2-6 低線量率放射線長期連続照射によるマウス急性骨髄性白血病の起因となる PU.1 遺伝子変異の線量率依存性の解析～放射線発がんの線量率効果の仕組	

みを考える～

甲斐 倫明 (大分県立看護科学大学看護学部教授)

テーマ3 : 放射線による健康不安対策の推進に関する研究・・・・・・ 120

3-1 福島県川内村の帰村促進のための取り組み

浦田 秀子 (長崎大学原爆後障害医療研究所教授)

3-2 放射線測定と行動調査による子どもの線量低減化と健康不安の軽減に関する研究

細野 眞 (近畿大学医学部附属病院教授)

3-3 里山地域の生活・生産活動を支える放射線被ばくと里山資源汚染の実態調査と動向予測研究

原田 浩二 (京都大学大学院医学研究科環境衛生学分野准教授)

3-4 放射線による健康不安対策を実践する保健師・養護教諭のための教育プログラムの検討

川崎 裕美 (広島大学大学院医歯薬保健学研究院教授)

3-5 リスクの多元性を考慮したリスクコミュニケーションの実施とそのあり方に関する研究

中川 恵一 (東京大学医学部附属病院放射線科准教授)

3-6 福島の乳幼児を原発事故の影響から守るための統合的支援システムの開発

氏家 達夫 (名古屋大学大学院教育発達科学研究科教授)

3-7 原子力災害事故後の中長期的にわたる放射線ヘルスプロモーションの確立に向けて～なみえまちからはじめよう。～

西沢 義子 (弘前大学教育研究院医学系教授)

3-8 福島県における放射線健康不安の経年変化の把握と対策の促進に関する研究

川上 憲人 (東京大学大学院医学系研究科精神保健学分野教授)

3-9 イーラーニング (e-learning) を活用した、福島県、日本、アジアにおける包括的な放射線教育システムの確立

大野 和子 (京都医療科学大学医療科学部放射線技術学科教授)

3-10 放射線被ばく不安に関連した潜在的要因の解析によるオーダーメイドな放射線リスクコミュニケーションに向けて

長谷川 有史 (福島県立医科大学医学部放射線災害医療学講座教授)

テーマ4 (平成 26 年度) : 事故後の住民の被ばく線量の包括的な把握に関する研究・・・ 336

4-1 東京電力福島第一原子力発電事故における住民の線量評価に関する包括研究  
鈴木 元 (国際医療福祉大学クリニック院長)

テーマ4 (平成 27 年度) : 福島県内外での疾病罹患動向の把握に関する調査研究・・・ 418

4-1 福島県内外での疾病動向の把握に関する調査研究  
祖父江 友孝 (大阪大学大学院医学系研究科社会医学講座環境医学教室教授)

4-2 福島県内における原発事故後の健康状況の変化とその関連要因についての疫学研究  
大平 哲也 (福島県立医科大学医学部疫学講座教授)

4. 今後の事業への提言・・・・・・ 477

## 1. 事業の背景及び目的

原子力災害からの福島の復興及び再生に関する施策の総合的な推進を図るための基本的な方針として、平成 24 年 7 月に福島復興再生基本方針が閣議決定されたところであり、国内外の英知を結集した放射線の人体への影響等に関する調査の重要性等について指摘されている。また、平成 24 年 7 月に公表された東京電力福島原子力発電所事故調査委員会報告書や東京電力福島原子力発電所における事故調査・検証委員会報告書においても、継続的な健康影響に関する調査を行っていく必要がある旨の提言を行っているところである。

環境省は、このような状況を踏まえて、平成 24 年度から「放射線の健康影響に係る研究調査事業」を行っている。平成 27 年度放射線の健康影響に係る研究調査事業では、昨年度までの本事業において実施された研究内容及び「東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議」を踏まえつつ、放射線の健康影響に係る研究調査を推進することを目的としている。

## 2. 事業の実施内容

### 2.1 新規研究課題に関する公募の事務

環境省より公募された「平成 27 年度放射線の健康影響に係る研究調査事業」新規研究課題について、公募の事務を行った。また、推進委員会（「2.3.1 「推進委員会」の開催」を参照）において取り決められた研究の方向性等の方針に基づき、平成 28 年度から実施する新規研究課題に係る公募に関する事務作業等を行った。平成 27 年度、平成 28 年度は下記のテーマについて公募が行われ、公募時に提出された研究計画書を環境省から受領し、記載内容を確認した。公募テーマごとの応募件数を表 2.1-1、表 2.1-2 に示す。

#### 【平成 27 年度 公募課題の内容】

##### (1) 放射線被ばくの線量評価に関する研究

今般の事故における被ばく線量評価として、現在、個人線量計による外部被ばく線量の測定や、ホールボディカウンターによる内部被ばく線量の測定等が実施されている。これらの取組を補完し、一般住民の被ばく線量の評価に資する研究を行う。特に、下記の内容を満たす研究については優先的に採択する。

##### ① 線量評価に資するデータの収集及び評価に関する研究

「東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議」の「中間取りまとめ」では、「今後も、線量推計の基礎となる様々な測定データの収集と信頼性の評価を継続することが重要である」と記載されている。これを踏まえ、福島県内外における事故初期を含む被ばく線量の推計の精緻化を図ることを目的とし、線量評価に資する各種データを収集し評価する研究を行う。なお、当該研究については必要に応じ、研究成果となる計測データ等について、既存のデータとの比較・集計等ができる形での提出を求めることがある。

##### (2) 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

放射線による健康影響については、広島・長崎の原爆被爆者に関する調査を初めとする疫学調査、動物実験等による放射線生物学に係る研究等により、これまで様々な科学的知見の集積が行われてきており、これらの知見を踏まえて、一般住民の健康管理を行う必要性や健康管理の内容について検討が行われている。こうした取組に資するため、極低線量（10 mGy 未満）及び低線量（10～100 mGy）の放射線被ばくの影響に関する研究ならびに生活習慣等自然発がんの頻度を修飾することが明らかである要因について、その放射線の発がんへの影響と機序を解明する研究、さらに福島県民健康調査等の既存の取組で指摘されている課題の解決に資する研究を行う。特に、下記の内容を満たす研究については優先的に採択する。

① 避難等による生活習慣の変化に伴う健康影響に関する研究

「東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議」の「中間取りまとめ」では、「放射線に対する不安に加えて長期の避難生活による生活習慣の変化、生活設計が十分にできないことによる不安とストレス等が血圧、肥満度、血糖値といった健康指標の悪化をもたらしている、また、それらが十分に改善されておらず今後さらなる悪化も懸念される」との意見があった」と記載されている。これを踏まえ、今般の事故による生活習慣及び健康状態の変化について現況把握を行い、分析・検討を行う研究を行う。

(3) 放射線による健康不安対策の推進に関する研究

放射線による健康影響、特に低線量被ばくの影響に係る健康不安に対応するために、正確かつ迅速な情報提供を行うとともに、個々の住民が有する健康不安の内容を把握し、個々の健康不安の内容に適切に対応する必要があります。そこで放射線に対する健康不安の背景に対し、一定の妥当性を有するアプローチで対話を試みる研究や、健康に関する正確な情報に基づき、職種横断的に取り組む健康不安対策について、福島県内の自治体と連携し、住民の参加を促しながら、総合的かつ客観的に評価する研究を募集します。特に、下記の内容を満たす研究については優先的に採択する。

① 福島県内外での放射線不安等の現状把握に関する調査研究

「東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議」の「中間取りまとめ」を踏まえた当面の施策の方向性として、「福島県及び福島近隣県の各地域の状況や自治体としての方向性を尊重し、地域のニーズに合ったリスクコミュニケーション事業の推進に取り組む」ことが示されている。今般の事故に関して、現在、福島県内外の住民が抱えている放射線からの被ばくを含めた様々な不安やその心理的影響について包括的に調査し、その割合や要因等について分析した上で、系統的に整理する研究を行う。

② リスクコミュニケーションの効果の把握に関する研究

放射線による健康不安軽減に対して、効果的な方法の一つとしてリスクコミュニケーションがある。これまでに実施されてきた、住民向けのセミナーや車座集会、保健福祉関係者の人材育成を通じた不安対策等の様々なリスクコミュニケー

ション手法についての情報収集を行い、実際の結果を基に定量的に分析・評価し、効果を把握することを目的とした研究を行う。

(4) 福島県内外での疾病罹患動向の把握に関する調査研究

「東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議」の「中間取りまとめ」を踏まえた当面の施策の方向性として、「各種がんの罹患動向の把握及びがん以外の疾患においても同様に把握していく」ことが示されている。福島県およびその他の地域における死亡・死因、がん、循環器疾患、先天異常等の悉皆性の高い統計情報を収集し、地域ごとに経時的な疾病等の有病率、発症率および死亡率の変化を分析することで、福島県内外での疾病罹患動向の把握を行うことを目的とした研究を行う。採択に当たっては、日本国内において、がんや循環器疾患等に関する疫学研究の実績を十分に有する公衆衛生学や疫学の専門家を中心とした研究体制を構築していること、および、福島県の疾病罹患の動向を把握している専門家が参加している研究課題を優先的に採択する。

表 2.1-1 平成 27 年度新規研究課題応募件数

テーマ		件数
(1)	放射線被ばくの線量評価に関する研究	1
(2)	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	7
(3)	放射線による健康不安対策の推進に関する研究	7
(4)	福島県内外での疾病罹患動向の把握に関する調査研究	1
計		16

【平成 28 年度 公募課題の内容】

(1) 放射線被ばくの線量評価等に関する研究

今般の事故における被ばく線量評価として、現在、個人線量計による外部被ばく線量の測定や、ホールボディ・カウンタによる内部被ばく線量の算定等が実施されている。そこでこれらの取組を補完し、一般住民の被ばく線量の評価に資する研究を行う。

特に、①福島県内外における事故初期を含む被ばく線量評価の精緻化に資するデータ収集及びデータの評価に関する研究、②福島県における局所的に高い放射線量が観測される場所が存在する地域における詳細な被ばく線量の推計に関する研究、③被ばく線量測定や評価に係る新たなシステムの開発に関する研究、④避難指示解除区域における簡易かつ効果的な個人被ばく線量の測定・収集方法に関する研究、⑤疫学調査のための福島県の放射線被ばくに関する欠損データ分析 (missing data

analysis)に係る研究、については優先的に採択する。

※①については必要に応じ、研究成果となる計測データ等について、既存のデータとの比較・集計等ができる形での提出を求めていることがある。

(2) 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

放射線による健康影響については、広島・長崎の原爆被爆者等に関する調査を初めとする疫学調査、動物実験等による放射線生物学に係る研究等により、これまで様々な科学的知見の集積が行われてきており、これらの知見を踏まえて、一般住民の健康管理を行う必要性や健康管理の内容について検討が行われている。こうした取組に資するため、極低線量(10 mGy 未満)及び低線量(10~100 mGy)の放射線被ばくの影響に関する研究ならびに生活習慣等自然発がんの頻度を修飾することが明らかである要因について、その放射線の発がんへの影響と機序を解明する研究、さらに福島県民健康調査等の既存の取組で指摘されている課題の解決に資する研究を行う。

特に、①福島県における放射線に係る地域に根差した疫学的研究、については優先的に採択する。

(3) 放射線による健康不安対策の推進に関する研究

放射線による健康影響、特に低線量被ばくの影響に係る健康不安に対応するために、正確かつ迅速な情報提供を行うとともに、個々の住民が有する健康不安の内容を把握し、個々の健康不安の内容に適切に対応する必要がある。放射線に対する健康不安の背景に対し、一定の妥当性を有するアプローチで対話を試みる研究や、健康に関する正確な情報に基づき、職種横断的に取り組む健康不安対策について、福島県内の自治体と連携し、住民の参加を促しながら、総合的かつ客観的に評価する研究を行う。

特に、①避難している住民の健康不安軽減の方策に関する研究、②福島県近隣県住民に対するリスクコミュニケーション手法に関する研究、③今般の事故に伴うリスクコミュニケーション活動の効果測定に関する研究、④個人被ばく線量の測定を実施することによる健康不安軽減効果等に関する研究、については優先的に採択する。

表 2.1-2 平成 28 年度新規研究課題応募件数

テーマ		件数
(1)	放射線被ばくの線量評価等に関する研究	8
(2)	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	11



(3)	放射線による健康不安対策の推進に関する研究	9
	計	28

また、推進委員会（「2.3.1 「推進委員会」の開催」を参照）における審議の結果、平成 27 年度新規研究課題として採択された課題については、研究採択者と事務委任契約の締結等に関する事務を行った。なお、推進委員会での検討結果を踏まえ、環境省から研究課題応募者に送付される採用の可否と、研究計画への指摘事項等についての連絡文案を作成した。また、採択された研究計画については、推進委員会からの指摘事項反映した研究計画の提出を指示し、適切な修正がなされているか確認するとともに、契約締結に先立って、積算された経費の内訳が妥当なものであるかの確認を行った。

事務委任契約締結後は、研究の進捗及び経費執行状況について、年間スケジュールに基づき、確認を行った。進捗管理においては、研究計画の変更申請への対応、学会等外部発表に関する手続き等も実施した。

平成 28 年度新規研究課題として採択された課題については、推進委員会での検討結果を踏まえ、環境省から研究課題応募者に送付される採用の可否と、研究計画への指摘事項等についての連絡文案を作成した。採択された研究課題については、推進委員会からの指摘事項を反映した研究計画の提出を指示し、指摘事項が反映された修正が行われているか内容の確認等を行った。

## 2.2 継続研究課題に関する事務

「平成 24 年度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）（以下「平成 24 年度事業」という。）」で採択された 1 人の研究採択者、「平成 25 年度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）（以下「平成 25 年度事業」という。）」で採択された 3 人の研究採択者及び「平成 26 年度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）（以下「平成 26 年度事業」という。）」で採択された 7 人の研究採択者に対し、推進委員会等が指摘した事項、本年度契約額等を踏まえ修正された最終研究計画書の提出を指示するとともに、研究採択者と受託者間の事務委任契約の締結等に関する事務を行った。なお、契約締結に先立って、推進委員会等の指摘にきちんと回答しているか、積算された経費の内訳が妥当なものであるかの確認を行った。

なお、平成 26 年度までに採択された研究の実施にあたっては、仕様書別紙「再委任等に関する内容」により再委任した。

事務委任契約締結後は、研究の進捗及び経費執行状況について、年間スケジュールに基づき、確認を行った。進捗管理においては、研究計画の変更申請への対応、学会等外部発表に関する手続き等も実施した。

## 2.3 委員会等の開催

本事業を進めるため、外部の専門家 7 名で構成した「推進委員会」、外部の専門家 5 名で構成した「評価委員会」を設置した。推進委員会委員構成を表 2.3-1 に、評価委員会委員構成を表 2.3-2 に示す。

表 2.3-1 推進委員会委員構成（平成 28 年 3 月現在）

委員	所属・役職
稲葉 次郎	公益財団法人放射線影響協会研究参与
梅田 泉	国立研究開発法人国立がん研究センター 先端医療開発センター 機能診断開発分野 ユニット長
遠藤 啓吾	京都医療科学大学学長
木下 富雄	公益財団法人国際高等研究所フェロー (京都大学名誉教授)
酒井 一夫	東京医療保健大学教授
○佐々木康人	湘南鎌倉総合病院附属臨床研究センター 放射線治療研究センター長
柴田 義貞	長崎大学客員教授

○：委員長

表 2.3-2 評価委員会委員構成

委員	所属・役職
○遠藤 啓吾	京都医療科学大学学長
緒方 裕光	国立保健医療科学院 研究情報支援研究センター センター長
小田 啓二	神戸大学大学院海事科学研究科教授
木下 富雄	公益財団法人国際高等研究所フェロー (京都大学名誉教授)
百瀬 琢磨	日本原子力研究開発機構 福島研究開発部門核燃料サイクル工学研究所 副所長 (兼務 放射線管理部長)

○：委員長

### 2.3.1 「第1回推進委員会」の開催

「第1回推進委員会」を平成27年6月12日に（公財）原子力安全研究協会会議室にて開催した。上記「2.1 新規研究課題に関する公募の事務」で公募された平成27年度新規研究課題に関し、評価方法の特に研究者と推進委員との利害関係（利益相反）の範囲について検討し、範囲を確認した後に採択の可否等について審議を行った。なお、各研

研究課題の研究計画書については、推進委員に事前に送付し、事前確認の依頼を行った。審議の結果、以下の通り 9 件の研究を採択した。

<平成 27 年度新規研究課題として採択された研究課題及び主任研究者>

- (1) 放射線被ばくの線量評価に関する研究
  - ・該当なし
- (2) 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
  - ・小児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)
  - ・小児・青年期の低線量率放射線被ばくによるがんリスクの評価——インドケララ州の高自然放射線地域住民の調査結果を中心として  
秋葉 澄伯 (鹿児島大学)
  - ・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  
中島 裕夫 (大阪大学)
  - ・低線量率放射線長期連続照射によるマウス急性骨髄生白血病の起因となる PU.1 遺伝子変異の線量率依存性の解析～放射線発がんの線量率効果の仕組みを考える～  
甲斐 倫明 (大分県立看護科学大学)
- (3) 放射線による健康不安対策の推進に関する研究
  - ・福島県における放射線健康不安の経年変化の把握と対策の促進に関する研究  
川上 憲人 (東京大学)
  - ・イーラーニング (e-learning) を活用した、福島県、日本、アジアにおける包括的な放射線教育システムの確立  
大野 和子 (京都医療科学大学)
  - ・放射線被ばく不安に関連した潜在的要因の解析によるオーダーメイドな放射線リスクコミュニケーションに向けて  
長谷川 有史 (福島県立医科大学)
- (4) 福島県内外での疾病罹患動向の把握に関する調査研究
  - ・福島県内外での疾病動向の把握に関する調査研究  
祖父江 友孝 (大阪大学)
  - ・福島県内における原発事故後の健康状況の変化とその関連要因についての疫学研究  
大平 哲也 (福島県立医科大学)

### 2.3.2 「第 2 回推進委員会」の開催

平成 27 年 9 月 16 日、「第 2 回推進委員会」を(公財)原子力安全研究協会会議室にて開催し、平成 28 年度実施する研究課題について検討し、平成 28 年度公募テーマ及び

公募（案）を決定した。

### 2.3.3 「第3回推進委員会」の開催

平成27年12月11日、「第3回推進委員会」を（公財）原子力安全研究協会会議室にて開催した。上記「2.1 新規研究課題に関する公募の事務」で公募された平成28年度新規研究課題に関し、採択の可否等について審議を行った。なお、各研究課題の研究計画書については、推進委員に事前に送付し、事前確認の依頼を行った。審議の結果、以下の通り8件の研究を採択した。

<平成28年度新規研究課題として採択された研究課題及び主任研究者>

(1) 放射線被ばくの線量評価等に関する研究

- ・短半減期核種の寄与と合理的な線量係数を考慮した内部被ばく線量評価の高精度化に関する研究

高橋 千太郎（京都大学原子炉実験所）

- ・住家内汚染の包括的研究及びこれによる内部被ばく線量評価

吉田 浩子（東北大学）

- ・乳歯を用いた福島県在住小児の被曝線量評価

佐々木 啓一（東北大学）

(2) 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

- ・低線量放射線は循環器疾患のリスクを上げるか？低線量率放射線は？放射線関連循環器疾患の機序の解明

高橋 規郎（（公財）放射線影響研究所）

- ・DNA損傷・修復に基づく放射線・化学物質影響の統合と個人差の評価に関する研究

松本 義久（東京工業大学）

(3) 放射線による健康不安対策の推進に関する研究

- ・ビッグデータ解析による3.11以降の放射線影響に関する科学者の情報発信とその波及効果の検証：クライシス時に有効な科学者の情報発信法の開発を目指して

宇野 賀津子（（公財）ルイ・パストゥール医学研究センター）

- ・地域住民が主体となって取り組む放射線安全管理体制の整備と実践

角山 雄一（京都大学）

- ・インフォグラフィックスを活用した効果的なリスクコミュニケーション技術の開発

藤井 博史（国立がん研究センター）

### 2.3.4 「研究成果発表会（平成28年度継続研究課題）」の開催

平成27年12月14日、15日の2日間、平成28年度に実施の継続を希望している研究課題についての「研究成果発表会」を（公財）原子力安全研究協会会議室にて開催し、

平成 28 年度に継続を希望する各研究課題について、本年度途中までの研究成果の発表を行った。

評価委員は、この研究成果発表会に参加し、各研究成果を評価した。また、参加を希望した推進委員は、オブザーバとして参加した。

各日の発表終了後には、その日の研究成果発表についてまとめ及び評価を行った。得られたコメントについては、各研究課題の主任研究者に伝え、研究報告書及び平成 28 年度研究計画書を作成する際の参考としていただくとともに、評価結果については、評価委員会（「2.3.5 「評価委員会」の開催」を参照）において、平成 28 年度研究計画書（案）を評価する際の参考とした。

### 2.3.5 「評価委員会」の開催

「評価委員会」を平成 28 年 1 月 20 日に（公財）原子力安全研究協会会議室において開催し、平成 28 年度に継続を希望している研究課題の平成 28 年度研究計画書（案）（「2.4 研究計画書（案）の作成」を参照）の評価を行った。

各研究課題の平成 28 年度研究計画書（案）については、評価委員に事前に送付し、事前確認の依頼を行った。また、前述のとおり、「研究成果発表会」での評価結果についても、評価のための参考とした。なお、「評価委員会」での評価結果については、「第 4 回推進委員会」（「2.3.6 「第 4 回推進委員会」の開催」を参照。）において資料として配付し、審議の際に用いた。

### 2.3.6 「第 4 回推進委員会」の開催

「第 4 回推進委員会」を平成 28 年 2 月 5 日に（公財）原子力安全研究協会会議室において開催し、「評価委員会」での評価結果を踏まえ、来年度継続予定の研究課題についての継続の可否、経費の配分額について検討を行った。

経費の配分額については、評価委員会・推進委員会による評価結果、コメント内容、経費の内訳等を勘案し、研究費を適宜調整することとした。

### 2.3.7 「研究成果発表会（平成 27 年度終了研究課題）」の開催

平成 28 年 2 月 10 日に、平成 27 年度で終了予定となっている研究課題についての「研究成果発表会」を、（公財）原子力安全研究協会会議室にて開催し、本事業における研究成果について最終発表を行った。

評価委員は、この研究成果発表会に参加し、各研究成果を評価した。また、参加を希望した推進委員は、オブザーバとして参加した。

発表終了後には、各研究成果発表について、委員長による総括及び各研究の進捗状況について評価を行った。得られたコメントについては、各研究課題の主任研究者に伝え、研究報告書への反映を依頼した。

## 2.4 研究計画書（案）の作成

平成 28 年度に研究の継続を希望する研究課題の主任研究者に対して、平成 27 年 12 月 14 日、15 日に開催した「研究成果発表会」でのコメント等を取りまとめて研究者に

送付し、コメントを反映した平成 28 年度研究計画書（案）を作成するよう依頼した。平成 28 年度研究計画書（案）については、コメントの反映状況等を確認し、内容および経費について不明点等の取りまとめを行い、「評価委員会」、「第 4 回推進委員会」において、継続の可否等について審議を行った。

## 2.5 研究報告書の作成

「研究成果発表会」でのコメント等を取りまとめて各研究課題の主任研究者に送付し、平成 27 年度研究報告書への反映を依頼した。また、各研究課題の主任研究者に対し、平成 27 年度研究報告書の作成・提出を依頼し、全ての研究班から研究報告書を受領し、事務処理要領に沿って作成されたことを確認して本事業の報告書に取りまとめた。

## 2.6 平成 28 年度の事務委任契約額案の作成

「研究成果発表会」での評価及び提出された平成 28 年度の研究計画書（案）についての「評価委員会」、「推進委員会」による評価結果を踏まえ、平成 28 年度において研究採択者が事務委任契約に基づいて研究を継続する際の適正な契約額案を作成した。

## 3. 平成 27 年度研究報告書

各研究課題の平成 27 年度研究報告書を以下に示す。

**テーマ（１）**  
**放射線被ばく線量の評価に関する研究**

- 1-1 歯を用いた包括的被ばく線量評価  
佐々木 啓一（東北大学大学院歯学研究科）

# 歯を用いた包括的被ばく線量評価

佐々木 啓一（東北大学大学院歯学研究科長）

## 研究要旨

形成中の歯や骨には放射性ストロンチウム ( $^{90}\text{Sr}$ ) やセシウム ( $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{134}\text{Cs}$ ) が取り込まれ沈着する。本研究は歯の持つ非代謝性・記録性に着目し、歯に沈着した放射性物質を測定することにより個体の被ばく状況、特に、内部被ばく状況を把握しようとする試みである。本研究では、被災動物（ウシ、野ネズミ）を用いた研究から、歯に沈着する  $^{90}\text{Sr}$  や  $^{137}\text{Cs}$  は、歯の形成期に歯質中に取り込まれ、その濃度は放射性物質による環境の汚染度と比例すること、また、歯質中の放射性物質の濃度は、歯が形成される時期の内部被ばく状況を忠実に反映していると推定している。

また、本年度においては、前年度に引き続き福島県を中心に全国各地より乳歯を収集し、その中に蓄積している放射性物質量をイメージングプレートによりスクリーニングした。本年度までに収集した乳歯はいずれも福島原発事故が発生する以前に形成された乳歯で本年度以降に収集が可能となる乳歯（原発事故以降の環境下で形成された歯）のコントロールとなる歯である。現在まで、3,600本の乳歯のスクリーニングを終了している。乳歯中の放射性物質の量は、福島県と他県の間で現時点では差は認められない。また、福島県内の地方別にみても、地域差は認められないことを確認している。これまでの結果は、次年度以降に収集される乳歯を評価する際の基準値となるもので、その点で、重要な基礎データとなる。

キーワード 乳歯、内部被ばく、Sr-90、Cs-137、被災動物、福島第一原発事故

## [研究協力者]

大野 敬	奥羽大学歯学部 歯学部長
廣瀬 公治	奥羽大学歯学部 教授
木野 康志	東北大学大学院理学研究科 准教授
岡 壽崇	東北大学高度教養教育・学生支援機構 助教
関根 勉	東北大学高度教養教育・学生支援機構 教授
福本 学	東北大学加齢医学研究所 教授
高橋 温	東北大学病院 助教
細井 義夫	東北大学大学院医学系研究科 教授



## I.研究目的

本研究の最終目的は、原発事故被災地およびその周辺地域に居住する幼児を中心に、永久歯列への交換過程で脱落する乳歯や、歯科治療により抜去される歯を収集し、それらの歯に蓄積した放射性物質を物理化学的・生物学的に評価することにより、被ばく量や被ばく歴を個体ごとに推測し、原子力発電所災害による放射線の人体への影響を評価するための基礎資料を提供することにある。

一方、原発事故以後の環境下で形成された乳歯が永久歯との交換期に入り入手可能となるのは平成 28 年度以降となるため（乳歯の自然脱落は 5-6 歳時に始まる）、本年度までの研究は、原発事故の影響を受けていない乳歯（コントロール歯）について、次年度以降に収集されてくる歯（原発事故以降の環境下で形成された歯）を評価するための基礎データを確立することにある。具体的には、コントロール歯に含まれる放射性物質の量やそのバラツキについて、福島県と対照となる他県との間に、あるいは福島県内の各地方の間で差があるかどうかを確認することである。さらに、原発事故による警戒区域内で捕獲した被災動物（ウシ、野ネズミなど）の歯を用いて、ヒト乳歯を評価するための方法論や技術を確立することにある。

## II.研究方法

### [被災動物を用いた歯質中の放射性 Sr と Cs の測定—ヒト乳歯解析のための技術・方法論の確立]

#### (1) 放射性 Sr と放射性 Cs の測定

**<sup>90</sup>Sr の測定** 歯を機械的に粉末化したのち、450°C、12 時間の条件下で灰化した。灰化粉末中の Sr は発煙硝酸法により、共存する大量の Ca から化学分離し、さらに、歯質中に共存し <sup>90</sup>Sr の β 線測定の障害となる <sup>210</sup>Pb, <sup>226</sup>Ra, <sup>228</sup>Ra などの放射性核種を BaCrO<sub>4</sub> と共沈殿させて除去した。また、<sup>90</sup>Y を Fe (OH)<sub>3</sub> との共沈により除去した。試料中より分離した <sup>90</sup>Sr の平均回収率はおおよそ 70-95% の範囲にあった。分離した <sup>90</sup>Sr は低バックグラウンドガスフロー GM 管 (LBC-4201B, Hitachi-Aloka Medical 社) を用いて β 線の測定を行なった（詳細は平成 26 年度本研究報告書に詳述）。この低バックグラウンドガスフロー GM 管のバックグラウンドは 12 時間測定の場合 0.155 ± 0.015cpm (3 σ : 0.044cpm、σ は標準偏差)、また、線量 84.4Bq、厚さ 24 mg/cm<sup>2</sup> の <sup>90</sup>Sr 標準線源を使用した時の測定効率は 0.339 ± 0.001 であった。1g の灰化試料を用い、Sr の回収率を 70% と仮定したときの <sup>90</sup>Sr の検出限界値は 4.94 mBq/gCa であった。

**<sup>137</sup>Cs, <sup>134</sup>Cs の測定** 粉末化した歯質中の <sup>137</sup>Cs, <sup>134</sup>Cs などの γ 線放出核種の測定には高感度ゲルマニウム半導体検出器 (Ortec 社、米国) を用いた。放射性 Cs の測定に際しては環境からの γ 線を遮断して、測定バックグラウンドをできる限り下げて検出感度を上げる工夫を行い、カウントされるバックグラウンドの 3 σ (σ は標準偏差、すなわち計数誤差) 以上を有意のピークとして採用した。この場合、3 σ に実際の測定と同様に補正をかけた値が検出限界となる。われわれの測定環境で 24 時間測定での検出限界は <sup>137</sup>Cs で 0.5mBq/g tissue、<sup>134</sup>Cs で 0.7mBq/g tissue であった。

#### (2) 被災牛の歯の解析

原発事故避難区域内に放逐された牛 6 頭、コントロール牛 2 頭について、それら臼歯列中に含まれる歯、計 62 本の <sup>90</sup>Sr の濃度を測定した。被災牛 6 頭の内、2 頭 (H-young-1 および 2) は O

町（空間線量率 10-30  $\mu$  Gy/hr）で捕獲した若牛（震災時 8 か月齢で、臼歯列が形成中）、別の 2 頭（L-young-1 および 2）は K 村（空間線量率 0.8-1.2  $\mu$  Gy/hr）で捕獲した若牛、他の 2 頭（L-adult-1 および 2）は同じく K 村で捕獲した老牛（震災時 22 か月齢以上で、臼歯列はすでに完成済み）、対照牛として、岩手県 C 町（空間線量率 0.1  $\mu$  Gy/hr 以下）においてと畜された若牛 2 頭（control-1 および 2）を用いた。それらの歯の一部については、 $^{137}\text{Cs}$ 、および  $^{134}\text{Cs}$  を併せ測定した。さらに下顎骨の一部についても、 $^{90}\text{Sr}$ 、 $^{137}\text{Cs}$ 、および  $^{134}\text{Cs}$  の測定を行った。

### （3）野生アカネズミの歯の解析

原発事故避難区域内の A 町内に位置し、空間線量率が異なる 5 つの地区において野生アカネズミを採取した。また対照地区として青森県内の 2 地区から同様にアカネズミを採取し、上顎および下顎切歯 4 本を摘出、イメージングプレート（IP）を用いてオートラジオグラフを作成（1 ヶ月間の露光）した後（方法はヒト乳歯の解析の項に詳述）、歯質中の  $^{137}\text{Cs}$ 、および  $^{134}\text{Cs}$  の測定を行った。

### 〔ヒト乳歯・永久歯の収集とそのアーカイブ化〕

今年度も前年度において本格稼働させた歯の収集体制を引き続き維持し、福島県を中心に全国各地（北海道、新潟県、静岡県、鹿児島県、沖縄県が中心）より乳歯を収集し、そのアーカイブ化・バンク化を進めた。収集体制は、一昨年、昨年度と同様、福島県歯科医師会を中心に、倫理面についても、これまでと同様、東北大学、福島県歯科医師会、奥羽大学、各機関における倫理委員会承認のもとに実施した。

### 〔ヒト乳歯中に含まれる放射性物質の評価〕

#### （1）イメージングプレート（IP）による歯質中放射性物質含有量のスクリーニングとグレード化

厚さ 5cm の鉛ブロックで作成した鉛箱の内部を、さらに厚さ 1cm の鉄板で覆った遮蔽箱の中に、IP カセットに入れた IP を 1 か月にわたり静置し、環境放射線の影響を極力排除した低バックグラウンド環境下でオートラジオグラフを作成した。使用した IP は BAS-MS 2040（GE Healthcare 社製）、読み取り装置はフロオル・イメージアナライザー FLA-7000（富士フィルム社製）を使用した。IP の発光強度を IP 画像読み取りソフト Image Quant TL Ver.8.1（GE Healthcare 社製）を用いて QL 値（Quantum Level: IP 読み取り装置で読み取った発光量を 16 ビットの濃度階調（65536 階調）に変換した値）として測定した。また、 $^{40}\text{K}$  を 0~4000mBq/g 含む KCL 基準尺を作成し、 $^{40}\text{K}$  濃度と得られる QL 値に、直線的な比例関係があることを確認し、この KCL 基準尺を標準試料としてどの IP にも入れて、使用 IP や測定時期の違いによる測定値のバラツキを補正した。

IP による歯質中放射性物質含有量のスクリーニングとグレード化は、基本的には収集したすべての乳歯について実施予定で、今年度までに収集した乳歯 4,600 本のうち、3,800 本については既に解析を終了している。

#### （2）歯質中放射性 Sr と放射性 Cs の測定

3.11 以前に形成された以前に被災動物の歯で確立した測定技術を用いて、一部の乳歯について地域別に 3-4 本の乳歯をまとめて 1 サンプルとし、それらの中の  $^{90}\text{Sr}$ 、 $^{137}\text{Cs}$ 、および  $^{134}\text{Cs}$  の測定を

行った。

### (倫理面への配慮)

ヒト乳歯の収集に際しては、乳歯提供者の氏名、生年月日、住所等の基本的な個人情報が必要となる。また調査目的、社会的意義、調査結果の還元、開示方法等すべてについて、保護者からの書面によるインフォームド・コンセントが必用となるので、これらについてのインフォームド・コンセントが得られた検体のみを測定することとした。本調査研究で遂行する乳歯の収集方法から結果の開示に至るまでの一連の過程については、東北大学大学院歯学研究科研究倫理専門委員会による承認を得た。また、研究グループにおける乳歯収集・被ばく線量測定に関する倫理面での共通認識ならびに住民への配慮をより徹底させるために、福島県歯科医師会、奥羽大学においても当該倫理委員会での審議・承認を求め、承認を得た。乳歯収集の過程や研究結果から得られる個人情報は連結可能匿名化し、連結表は主任研究者及び疫学解析責任者（東北大学歯学研究科小坂教授）のみが鍵を持つ戸棚で厳重に保管した。また得られた測定値の被験者への伝達に当たっては、結果が適切に理解されるよう最大限の注意を払い、このため関係者の情報管理を徹底すると共に、研究機関、福島県歯科医師会が定期的に協議を行った。

## III. 研究結果

### 1. 被災牛歯質中の<sup>90</sup>Srおよび<sup>137</sup>Cs濃度

被災牛の臼歯中<sup>90</sup>Srの測定結果を図1に示した。臼歯(DM:乳臼歯、M:大臼歯、P:小臼歯)中の<sup>90</sup>Sr濃度は、比較的高度に汚染されていたO町において最も高く(図1(a))、低汚染地区のK村における値(図1(b),(c))は比較的低い値を示した。コントロール牛の歯質内にも、わずかではあるが<sup>90</sup>Srの存在が認められた(図1(d))。これらの事実から、歯質中の<sup>90</sup>Sr濃度は環境の汚染度(恐らくは、環境の汚染度に比例して汚染された草や水の摂取)を忠実に反映していることが示唆された。また、O町とK村で捕獲された若牛(事故当時DMは既に形成済み、Mは形成途中、Pは形成開始直後)についてみると、歯の大部分が事故後に形成された小臼歯(P)において最も高い値を示し、事故時において歯の大部分の形成が終了していた乳臼歯(DM)では低い値を示し、形成途上にあった大臼歯(M)はそれらの中間の値を示した。また、同じK村で捕捉された若牛と老牛(事故当時すべての臼歯は形成済み)の歯について比較すると、老牛の歯ではいずれの歯においても<sup>90</sup>Srの濃度は低い値を示した。これらの事実は、ウシが野において摂取した汚染された草や水を介して<sup>90</sup>Srを体内に取り込み、それらが歯の形成期に歯質中に取り込まれ、そのまま保持・蓄積されたものと考えられる。

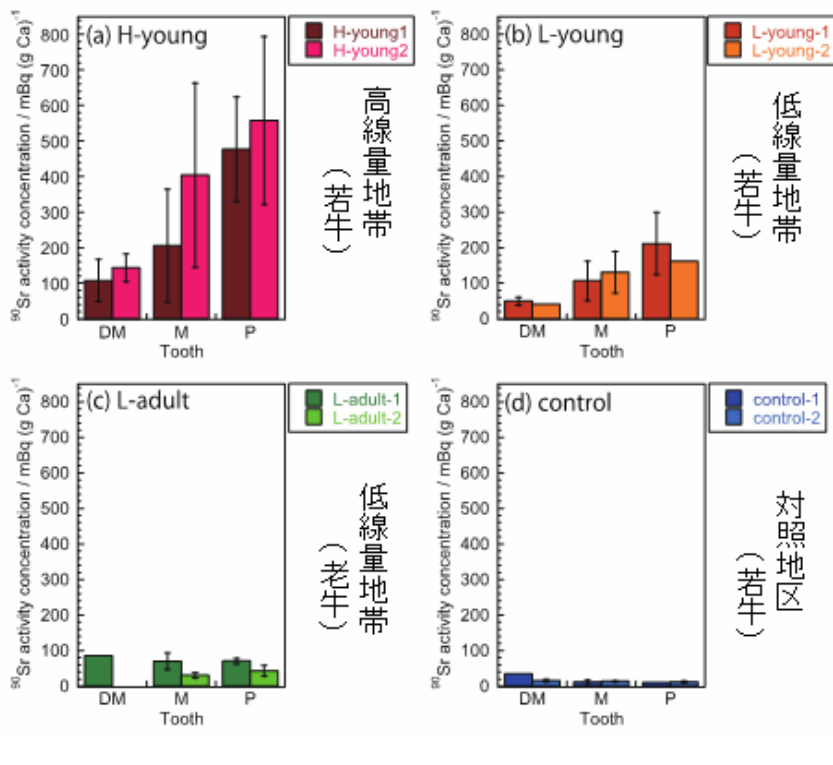


図 1

高線量地帯: O町  
(10-30 $\mu$ Gy/hr)  
低線量地帯: K村  
(0.8-1.2 $\mu$ Gy/hr)  
対照地区: 岩手県  
(>0.1 $\mu$ Gy/h)

岩手県においてと畜されたウシの歯にも少量 (6 -35 mBq/g Ca)の <sup>90</sup>Sr が検出された。原発事故以前においても、北海道のウシの骨に、これを超える濃度の <sup>90</sup>Sr が検出されており、これらは過去の大気中核実験に由来するものと考えられている。今回岩手のコントロール牛の歯に見られた <sup>90</sup>Sr 濃度も、これと同じく大気中核実験に由来していることが推測された。また、事故時に既に完成した歯だけを持つ K 村の老牛の歯の <sup>90</sup>Sr 濃度は、コントロール牛の歯の <sup>90</sup>Sr 濃度よりも高い値を示した。これは、歯が完成した後も、飲食物や水、唾液を介して、非特異的に歯表面へ <sup>90</sup>Sr の吸着が起こり得ること、また、歯髄内の血行を介して象牙質表面とのイオン交換が起こること、第二象牙質の形成等に伴う沈着等が起こることに依るものと考えられる。

表 1 には O 町で捕獲した原発事故発生時 8 ヶ月齢、と畜時 25 ヶ月齢のウシ (#7285) の歯と骨組織中の <sup>90</sup>Sr および <sup>137</sup>Cs 濃度を示したものである。<sup>90</sup>Sr についてみると、事故発生時に既に形成がほぼ終了していた乳臼歯 (DM1-DM3) および大臼歯 (M1, M2) の濃度は低く、事故発生後に歯質の大部分が形成された小臼歯 (P1-P3) や一部の臼歯 (M3) では著しく高い値を示していた。骨組織中の濃度はそれらの中間の値を示し、事故発生時まで形成され <sup>90</sup>Sr に汚染されていなかった骨が、と畜時まで一定の割合で残っており、事故発生後に形成された (汚染された) 骨に完全には置き換わっていないことに依るものと考えられた。一方、<sup>137</sup>Cs についてみると <sup>90</sup>Sr のような、歯や骨の形成段階に依存した濃度の違いは認められず、その濃度は <sup>90</sup>Sr に比べて比較的特異性の低い一様な濃度分布を示していた。言い換えれば <sup>90</sup>Sr の歯への取り込みはその形成期 (石灰化の過程) において行われ、それらは代謝されることなく蓄積性に歯質内に保持されるのに対して、<sup>137</sup>Cs は、歯や骨への特異的な結合様式を持たない緩やかな拡散に近い分布様式をとると考えられた。被災牛で得られたこれらの結果は、今後ヒトの歯で得られる <sup>90</sup>Sr や <sup>137</sup>Cs の測定結果の解釈にも重要な示唆を与えると考えられる。

表 1 O 町で捕獲した原発事故発生時 8 ヶ月齢のウシ (#7285) の歯と骨組織中の  $^{90}\text{Sr}$  および  $^{137}\text{Cs}$  濃度

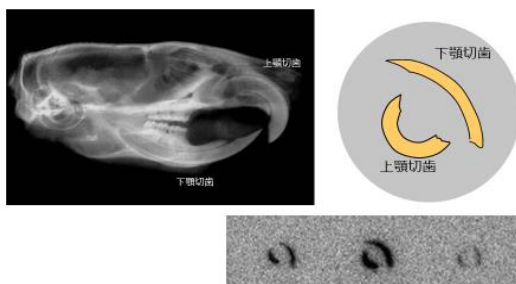
	Sr-90 (mBq/g-tissue)	Cs-137 (mBq/g-tissue)
DM1	47	220
DM2	23	261
DM3	15	276
M1	21	322
M2	40	206
M3	105	219
P1	176	297
P2	100	187
P3	113	265
海綿骨	92	151
舌側骨	66	197
頬側骨	65	180

## 2. 野生アカネズミの切歯中 $^{137}\text{Cs}$ 濃度

図 2 には野生アカネズミの上下顎切歯とその IP 像を示してある。アカネズミの切歯は常生歯で、根尖から先端までが入替わるのには 2-3 ヶ月を要すると考えられる。したがってその切歯中の放射性物質の量は歯を採取する前の 2-3 ヶ月間の飲食物を介しての個体の内部被ばく状況を反映していると考えられる。図 3 には福島県避難区域内の A 町で空間線量率が異なる 6 つの地域で捕獲したアカネズミの上下各 2 本ずつの切歯を地域ごとに並べた IP 像（露光期間 1 ヶ月）である。線量が高い地域に棲息していたアカネズミほど、切歯中に含まれる放射性物質の濃度が高いことが分かる。

また、図 4 には歯質中  $^{137}\text{Cs}$  濃度と環境の空間線量率との関係を定量的に示してある。動物が棲息する環境の空間線量率と歯の中の  $^{137}\text{Cs}$  濃度には高い相関が見られることがわかる。

図 2 アカネズミ切歯 IP 像



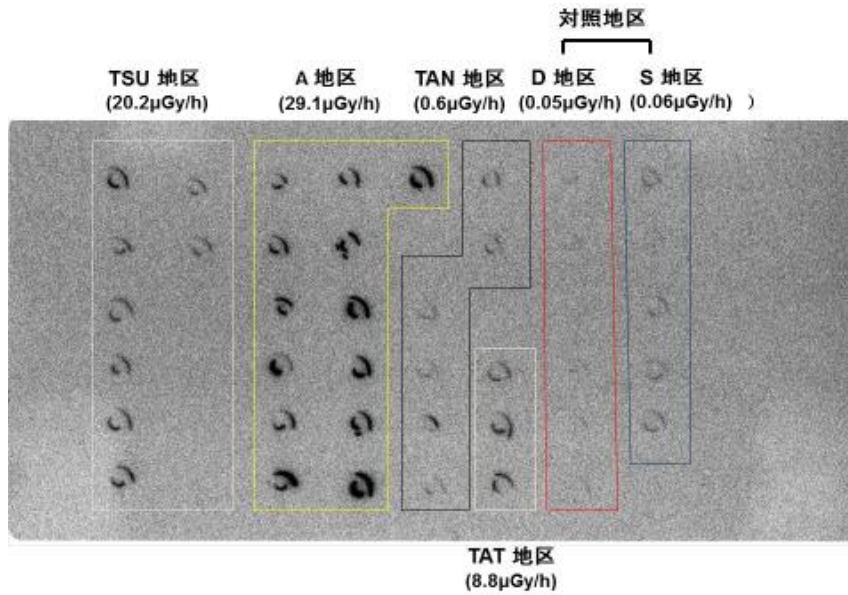


図 3

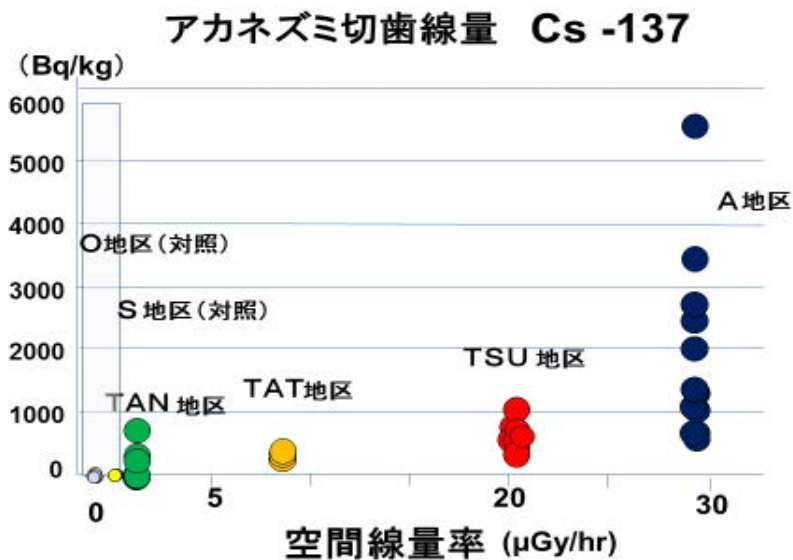


図 4

アカネズミ切歯  
歯質中 <sup>137</sup>Cs 濃度

### 3. ヒト乳歯の収集とバンク化

平成 27 年 12 月末の時点において、福島県を含め、全国より、4204 本の乳歯を収集している。そのうち福島県内より収集した乳歯数は 3348 本であった (図 5、6)。収集した乳歯については、表 2 の手順により、バンク化を行い、保管した。

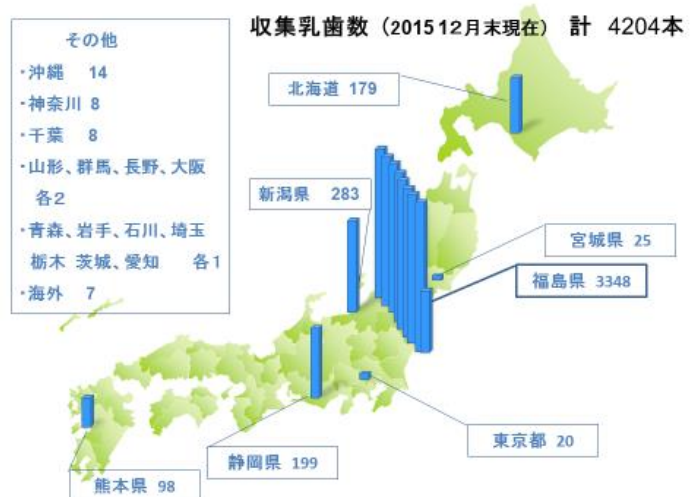


図 5



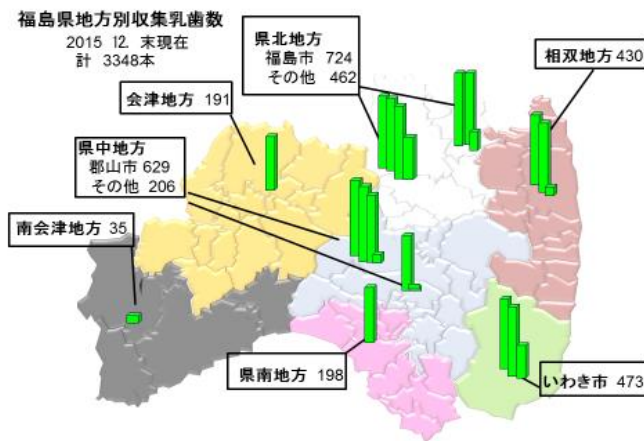


図 6

### 収集乳歯のバンク化

表 2

- (1) 基本情報の記録・管理  
(氏名、年齢、男女別、震災時住所、現住所・連絡先、関係歯科医院など)
- (2) 歯の鑑別(歯種の同定、部位の同定)
- (3) 歯の洗浄・ブラッシング、充填物・カリエスの有無、歯根の吸収程度の観察
- (4) 写真撮影(頬面、舌面、近心面、遠心面、咬合面)
- (5) 鍵付き保管庫に保管  
(記録ファイル、保管された乳歯には特定の管理者のみがアクセス可能)

#### 4. ヒト乳歯に含まれる放射性物質の評価

##### (1) IP による評価

図 7 にはヒト永久歯と野生ニホンザルの歯の IP 画像（露光 2 週間、強調画像）を示してある。上の 3 段がヒト永久歯、下段が原発事故後、南相馬山中で捕獲された被ばく野生ニホンザルの歯の画像である。ニホンザルの歯には高いレベルの放射性物質の存在がうかがえる。

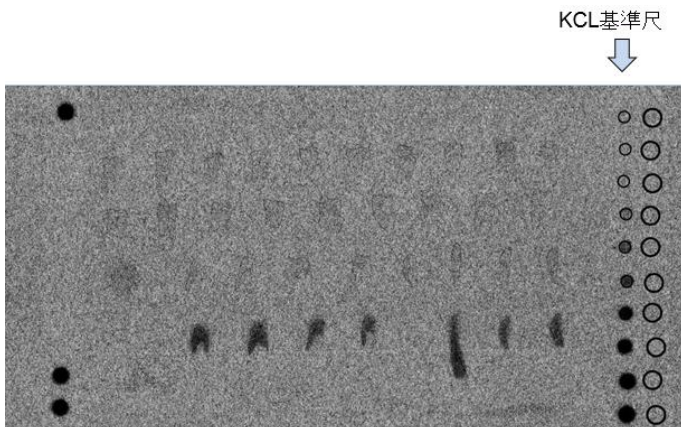


図 7

右側には KCL を用いた基準尺とバックグラウンド計測用の試が配置してある。

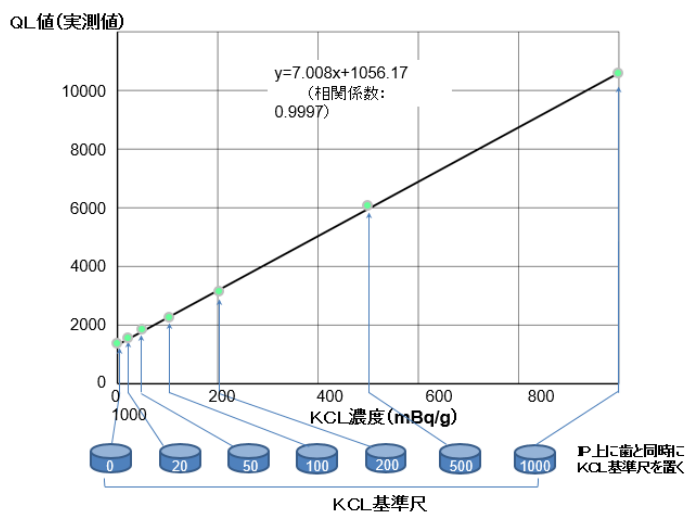


図 8

KCL 基準尺の  $^{40}\text{K}$  濃度と  
得られた QL 値の関係

図 8 は KCL 基準尺の  $^{40}\text{K}$  濃度と、得られた QL 値の関係を示したもので、両者には常に高い相関が認められる。歯質中には複数の放射性物質が存存するため ( $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{210}\text{Pb}$ ,  $^{226}\text{Ra}$ ,  $^{228}\text{Ra}$ ,  $^{40}\text{K}$  など)、歯から得られた QL 値を  $^{40}\text{K}$  の Bq 値に換算することは理論的には困難であるが、この KCL 基準尺を標準試料としてどの IP にも入れ、使用 IP や測定時期の違いによる測定値のバラツキを補正している。

図 9 には、ヒト乳歯 200 本を KCL 基準尺と共に IP 上に載せ、鉛の遮蔽箱に入れて 1 か月間露光させたときの IP 画像の例を示してある。本年度は、収集した乳歯のうち、3,600 本分について同様な IP 画像についての解析を行い、福島県と他県から収集した乳歯の放射線量に違いがあるか、また、福島県内において収集した乳歯について地域差があるか否かを中心に検討した。これまでに収集した乳歯は、いずれも原発事故以前に形成された歯で、コントロール歯に相当し、原発事故以後の環境下で形成された乳歯（永久歯との交換は 5-6 歳時から始まるので、次年度以降に入手可能となる）を評価するための基準値となる。

図 10 には福島県内からの乳歯の QL 値と福島県以外の各県からの乳歯の QL 値をすべてプロットした生データが示してある。福島県内と福島県外の乳歯の平均値とその分布様式については図 11 に示してある。QL 値の平均値と標準偏差は両群で差は認められない。また、福島県内からの乳歯について、その地域差について検討したのが図 12 である。統計的に見ても、県内の 6 つの地域について有意の地域差は認められない。



図 9

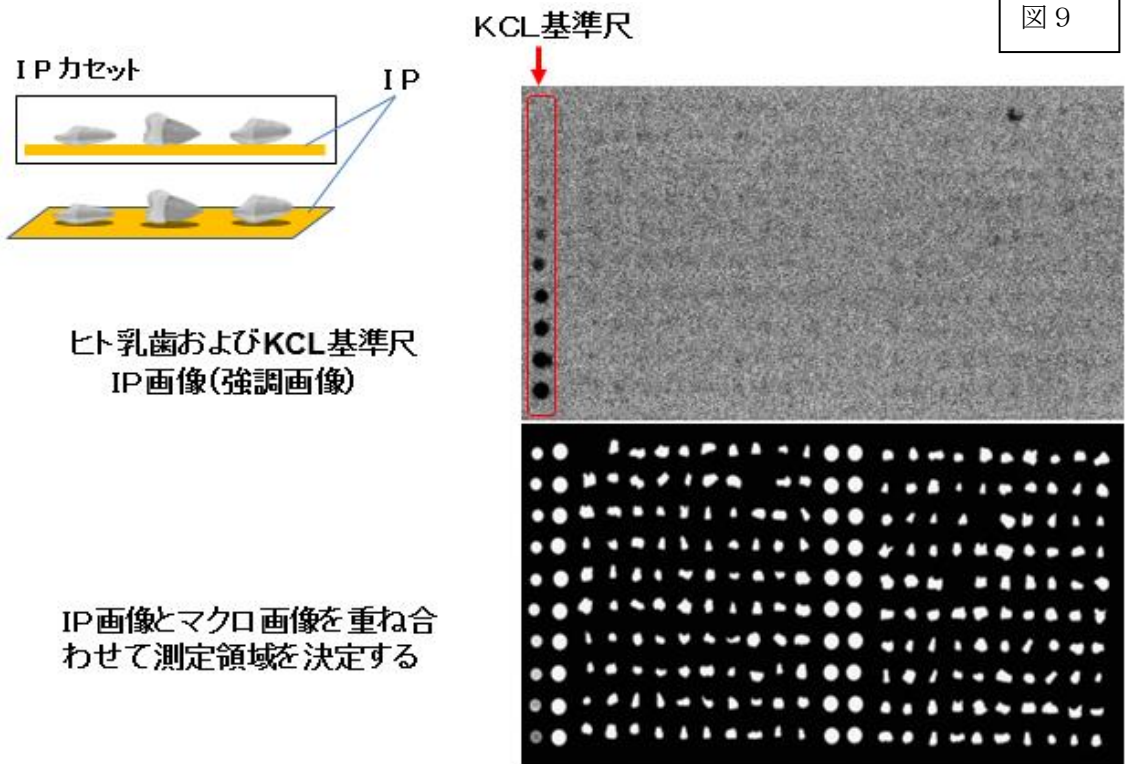


図 10

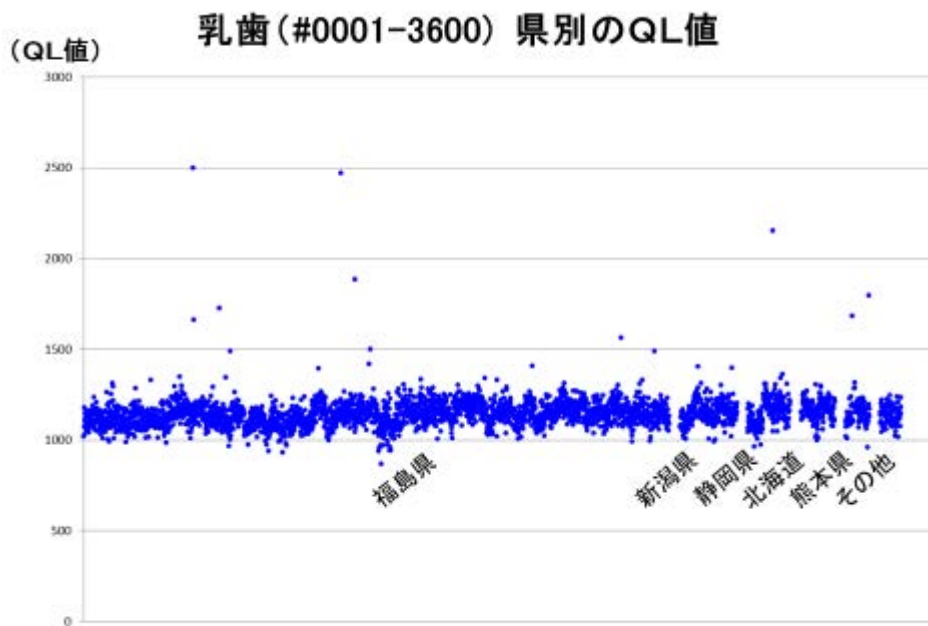
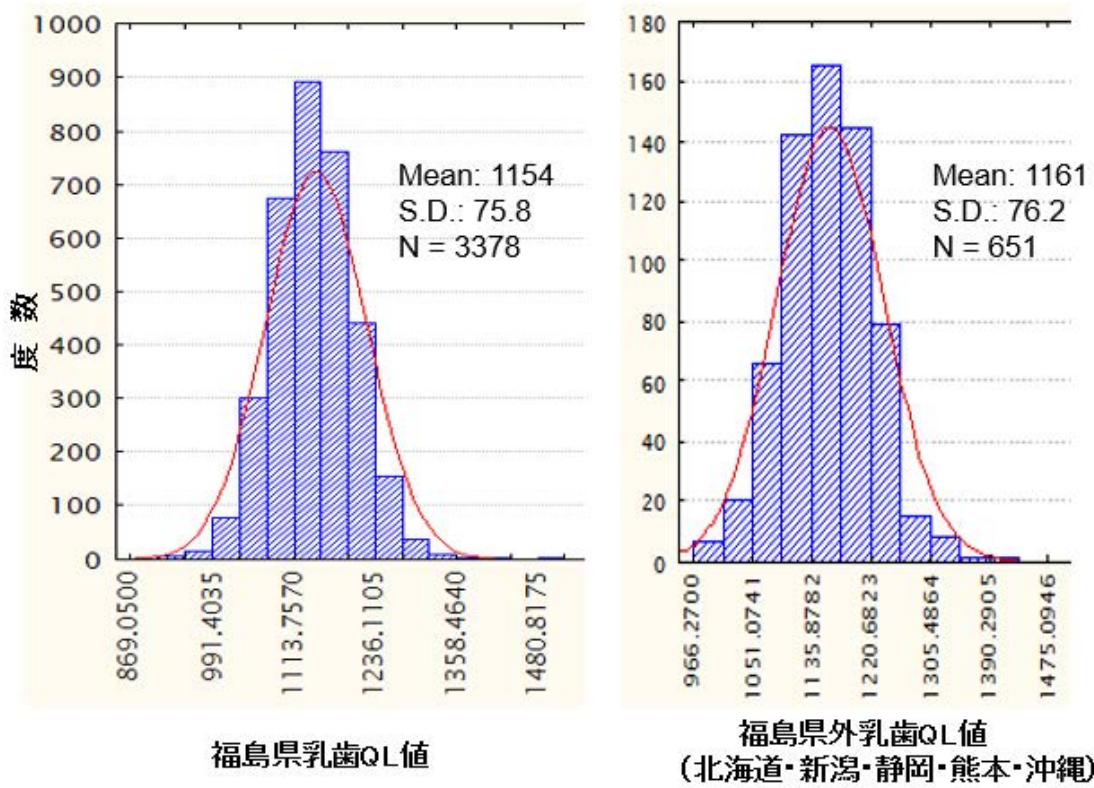


図 1 1



福島県内地方別 乳歯QL 値 (# 0001-3600)  
(QL値)

図 1 2

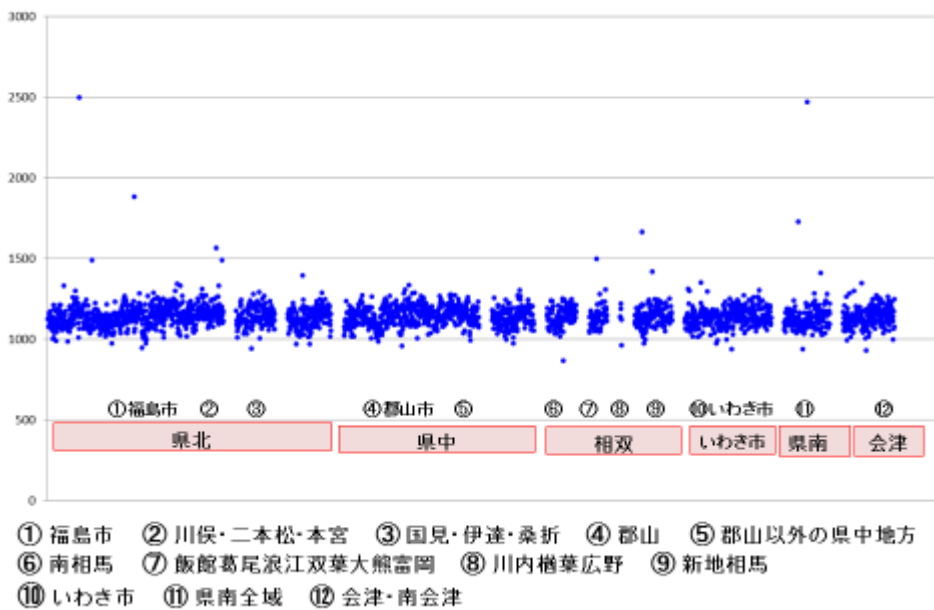


表3にはこれまでに解析した #0001 から#3,600 までの乳歯の中で、平均値+3 標準偏差以上の高値を示した 16 本の乳歯について、歯提供者の発災時住所を示したものである。福島県では、2,718 本の乳歯のうち 12 本 (0.44%) が、福島県外からの乳歯 882 本に関しても、4 本 (0.45%) に高値が見られた。地域的に見て、福島県の乳歯にその頻度が高いという傾向は認められていない。このような高い QL 値がどのような核種に由来するかについては、現在確認を行っているが、高い QL 値を示す乳歯中に  $^{137}\text{Cs}$ 、 $^{134}\text{Cs}$  は検出されず、 $\beta$ 線放出核種であることを示す結果が得られているので、現在その核種の同定を行っている。一方、高い QL 値を持つ歯は、その歯面にレジンを充填してあるものや、大きな齲蝕病巣を有するものが多い。レジン充填剤は親水性でその表面が粗造であるために歯石（主にリン酸カルシウム結晶よりなる）が付着しやすく、齲蝕病巣にも再石灰化の過程でミネラルが取り込まれ沈着する（図 13）。これらは、歯の形成途上に歯質内に取り込まれるものではなく、歯が形成された後に起こる非特異的な沈着で、内部被ばくの指標とはなりにくいと考えられる。真に内部被ばくの指標となり得るのは、あくまでも歯の形成途上に歯質内に取り込まれた放射性物質と考えられる。

0001-3600 までの高QL値 (mean+3 SD 以上)

表 3

発災時市町村	QL値
福島県福島市	2500
福島県西白河郡矢吹町	2473
福島県福島市	1885
熊本県人吉市	1798
福島県白河市	1727
熊本県水俣市	1684
福島県相馬市	1665
福島県福島市	1566
福島県双葉郡浪江町	1500
福島県福島市	1492
福島県福島市	1491
福島県相馬市	1419
福島県白河市	1411
新潟県見附市	1407
新潟県見附市	1400
福島県伊達郡国見町	1395

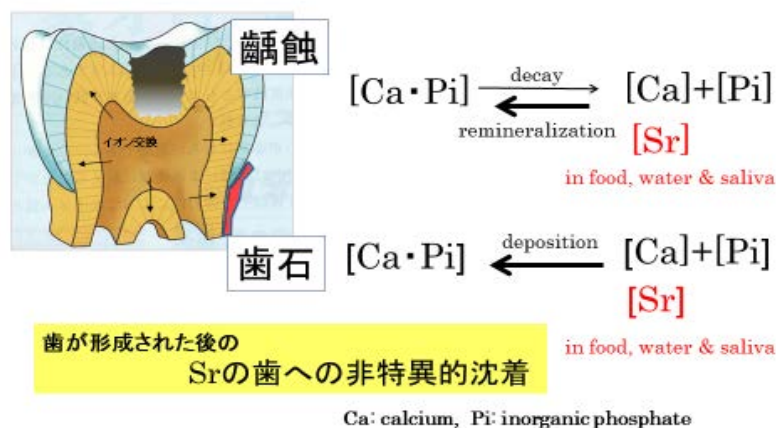
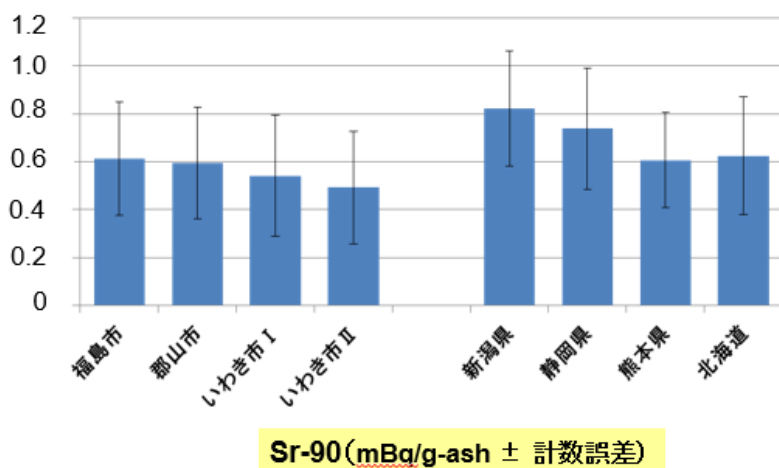


図 1 3

## (2) 乳歯中 $^{90}\text{Sr}$ 、 $^{137}\text{Cs}$ 、 $^{134}\text{Cs}$ の定量

図 14 には福島県内の主要都市、および福島県以外の対照県から得られた乳歯について、 $^{90}\text{Sr}$  濃度を測定した結果である。いずれの乳歯も同じ地区から得た乳歯 5 ないし 6 本をまとめて 1 検体として測定している。同一検体をそれぞれ 3 回測定している。平均値として見たとき、それらの濃度は、0.49-0.82 mBq/g-ash (g-Ca 当たりに換算するとおよそ 3 倍の数値) であった。福島県内の主要都市間、県間に特に違いは認められなかった。なお、2 g の歯粉末を用い、Sr の化学分離の回収率を 93% (乳歯測定時の平均回収率) としたとき、検出限界値は 24 時間測定の場合、0.460 mBq/g-ash であったので、乳歯で得られた値はすべてその測定限界値以上であった。また、ここで得られている歯質中の  $^{90}\text{Sr}$  濃度は、スイスの子供の乳歯についてチェルノブイリ原発事故直前に報告されている値 (およそ 40-50mBq/g-Ca) と比べ 20 倍以上低く健康への影響が懸念されレベルとは考え難い。一方、高感度ゲルマニウム半導体検出器を用いての 48 時間測定において、測定したすべての乳歯について  $^{137}\text{Cs}$ 、 $^{134}\text{Cs}$  は検出されなかった。今年度の研究から得られた上記、歯質中  $^{90}\text{Sr}$  や  $^{137}\text{Cs}$ 、 $^{134}\text{Cs}$  の値は、次年度以降に収集され、原発事故のあとに形成された歯を評価する際の基準値として重要な基礎データである。

図 1 4



都市別および県別  
乳歯 Sr-90 測定値

いずれの歯も3.11以前に形成された歯であり、都市間、県間に差は認められない。

\* Cs-134,137 については  
検出限界以下

## IV. 考察

本研究の目的は、歯の形成期 (放射線被ばくに対して最も感受性が高い時期でもある) に歯質中に取り込まれ蓄積する放射性物質を測定することにより、これを内部被ばくの指標として用いようとする新しい試みである。本年度の研究では、被災牛の歯に含まれる  $^{90}\text{Sr}$  の測定結果から、歯質中に見出される  $^{90}\text{Sr}$  は、体内に取り込まれた  $^{90}\text{Sr}$  が歯の形成期に歯質中に

取り込まれ、歯が形成される時期の環境中の<sup>90</sup>Sr濃度をよく反映していることが示された。人の乳歯中の<sup>90</sup>Sr濃度についても同様に考えることができるので、歯の中の<sup>90</sup>Sr濃度は個体の内部被ばく状態を推測するための重要な指標になり得ると考えられる。対象核種を<sup>90</sup>Srに限定すれば、ある歯が形成された時期に体内に存在していた<sup>90</sup>Srの総量は理論的には次のように推測することが可能と考えられる。

(1) 歯の比放射能値(<sup>90</sup>Sr/Sr)を測定する。(2) 動物(ウシ、ニホンザル等)試料から、歯質中Sr濃度(安定体濃度)と骨組織中Sr濃度(安定体濃度)の関係を実測値として求め、また、ヒトについても、文献値等により、歯質中Srと骨組織中Sr濃度の関係を得る。(3) 体重・身長等の情報から、個人の骨組織重量を概算する。(4) 骨組織重量にSr安定同位体濃度を掛け、骨中総Sr量を算出する。(5) 歯から得られた比放射能値を骨組織にあてはめ、歯の形成期中に体内に存在した総<sup>90</sup>Sr量を算出する。

個体ごとに上記の推定を行うためには、乳歯1本1本について比放射能値を得ることが必要となるが、収集した1本、1本の歯について数千本規模でこれを行うことは乳歯1本のサンプル量(0.2-0.5g)を考えたとき困難である。本研究では、収集したすべての乳歯について、まずIPによるスクリーニングを実施し、そのなかで、放射線量が高いと認められた歯についてのみ、<sup>90</sup>Srの測定を行う。乳歯は1人から最大20本まで提供を受けることも可能であるので、一人から、数本の歯を得ることができれば、その個人については、上記の推定を行うことが可能と考えられる。

我々は、今回の原発事故の影響は無視できるとされる他県からのウシの歯(岩手県からのウシ、図1(d)参照)やヒト乳歯(北海道、静岡県、新潟県、熊本県などからの乳歯、図14参照)からも微量の<sup>90</sup>Srを検出している。これらは1950年代から1980年代にかけて行われた大気中核実験により地球規模で拡散した<sup>90</sup>Srが現在も環境中に残っているためと解釈できる。北海道のウシの骨について1957年から2008年にかけて経年的に<sup>90</sup>Srを測定した結果が報告されているが、それによれば2008年の時点においても28mBq/g Caの値であったことが報告されている<sup>1,2)</sup>。その時点から考えても<sup>90</sup>Srの半減期である30年はまだ経過していない。また、原発事故以前の福島県の土壌中にも<sup>90</sup>Srが検出されている<sup>3)</sup>。さらに、北海道のウシの骨の中の<sup>90</sup>Sr濃度は、1960年代前半のピーク時から経年的に減少を続けているが、チェルノブイリ事故当時、その減少傾向に特に変化が見られなかった<sup>1,2)</sup>ことから、今回ウシの歯やヒト乳歯に見出された<sup>90</sup>Srはチェルノブイリ原発事故に由来するものではなく、少なくともその大部分は大気圏核実験に由来しているものと推測される。

今回測定した高感度ゲルマニウム半導体検出器を用いた48時間の測定においては、収集したヒト乳歯中に、<sup>137</sup>Csや<sup>134</sup>Csは検出することができなかった。大気中核実験に由来すると考えられる<sup>137</sup>Csは<sup>90</sup>Srと同じように現在も日本の土壌中に存在するが、今回測定した歯の中には<sup>137</sup>Csや<sup>134</sup>Csは検出されなかった。これは、Srが歯の主成分であるヒドロキシアパタイト $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 結晶の主要な構成元素であるCaと同族の元素であり、アパタイト結晶に組み込まれるかたちで歯質中に蓄積するのに対して、KやCsはアパタイト結晶の構成元素ではないことによると考えられる。被災動物(ウシやニホンザル、アカネズミなど)の歯には、高濃度の<sup>137</sup>Csや<sup>134</sup>Csが認められるが、これはアパタイト結晶の構成元素として組み込まれているものではなく、恐らくアパタイト結晶表面の水和水(hydration shell)中で結晶への吸着という形で存在していると推測される。

## V. 結論

- (1)  $^{90}\text{Sr}$  は、主に歯の形成途上に取り込まれ、歯質中に蓄積する。歯が形成された後も、歯石や齲蝕病巣への非特異的な沈着が起こり得る。
- (2) 被災動物の歯の中には、環境の汚染度に比例した  $^{90}\text{S}$  の沈着が認められ、歯が形成される時期の内部被ばく状況を忠実に反映しているものと考えられる。
- (3) 現在まで、福島県内を中心に全国より 4,200 本以上のヒト乳歯を収集、バンク化した。
- (4) これらの歯はいずれも原発事故以前に形成が完了していた歯で、次年度以降に入手可能となる原発事故以降に形成された歯のコントロール歯に相当する。これらコントロール歯の放射線量 (IP による QL 値の測定) は、福島県内から収集した乳歯と他県から収集した乳歯の間に差はなく、また福島県内の地方間でも差は認められなかった。
- (5) 原発事故以前に形成された乳歯 (コントロール歯) の中にも少量の  $^{90}\text{Sr}$  が検出された。その値は福島県と他県の間に差はなく、また、福島県内の主要都市間にも違いはなかった。
- (6) 今回の事故による内部被ばく状況を歯から推測するためには、次年度以降に自然脱落する乳歯 (原発事故以降に形成された歯) を継続して収集し、これまでに得たコントロール歯でのデータを基礎として評価を継続・実施していくことが必要である。

### この研究に関する現在までの研究状況、業績

Kazuma Koarai, Yasushi Kino, Atsushi Takahashi, Toshihiko Suzuki, Yoshinaka Shimizu, Mirei Chiba, Ken Osaka, Keiichi Sasaki, Tomokazu Fukuda, Emiko Isogai, Toshitaka Oka, Tsutomu Sekine, Manabu Fukumoto, Hisashi Shinoda.

“Determination of Sr-90 specific activity in the teeth of cattle in the evacuation zone of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident”

15th International Congress of Radiation Research,

Kyoto International Conference Center, 2015/5/25-5/29 Kyoto, Japan.

Toshitaka Oka, Atsushi Takahashi, Kazuma Koarai, Yasushi Kino, Tsutomu Sekine, Yoshinaka Shimizu, Mirei Chiba, Toshihiko Suzuki, Ken Osaka, Hisashi Shinoda

“Electron spin resonance study for dose assessment of milk teeth”

15th International Congress of Radiation Research,

Kyoto International Conference Center, 2015/5/25-5/29 Kyoto, Japan. ICRR2015, 2015/5/25-29, Kyoto, Japan.



Kazuma Koarai, Yasushi Kino, Atsushi Takahashi, Toshihiko Suzuki, Yoshinaka Shimizu, Mirei Chiba, Ken Osaka, Keiichi Sasaki, Tomokazu Fukuda, Emiko Isogai, Toshitaka Oka, Tsutomu Sekine, Manabu Fukumoto, Hisashi Shinoda.

“Incorporation of  $^{90}\text{Sr}$  into the teeth of abandoned cattle in the evacuation zone after the FDNPP accident”

Internal Symposium Future on Radiological Issues for Fukushima’s Revitalized Future, Paruse Iizaka, Fukushima city, 2015/5/30-31 Fukushima, Japan.

小荒井一真、木野康志、高橋温、鈴木敏彦、清水良央、千葉美麗、小坂健、佐々木啓一、福田智一、磯貝恵美子、岡壽崇、関根勉、福本学、篠田壽

「福島第一原発事故後の被災ウシ歯質中への Sr-90 と Cs-137 の取り込み」  
第 52 回アイソトープ・放射線研究発表会、2015/7/8-7/10 東京大学弥生講堂

小荒井一真、木野康志、西山純平、高橋温、鈴木敏彦、清水良央、千葉美麗、小坂健、佐々木啓一、福田智一、磯貝恵美子、岡壽崇、関根勉、福本学、篠田壽

「ウシの歯の Sr-90 と Cs-137 濃度を指標とした環境中の時間変化の解析」  
2015 日本放射化学会年会・第 59 回放射化学討論会 2015/9/25-9/27  
東北大学川内キャンパス

岡 壽崇、高橋 温、小荒井一真、木野康志、関根 勉、清水良央、千葉美麗、鈴木敏彦、小坂 健、佐々木啓一、篠田 壽

「ヒト乳歯の  $\text{CO}_2$  ラジカル測定による被ばく量推定」  
2015 放射化学会年会・第 59 回放射化学討論会、2015/9/25-27、東北大学川内キャンパス

Toshitaka Oka, Atsushi Takahashi, Kazuma Koarai, Yasushi Kino, Tsutomu Sekine, Yoshinaka Shimizu, Mirei Chiba, Toshihiko Suzuki, Ken Osaka, Hisashi Shinoda

“Electron spin resonance dosimetry using milk teeth of Japanese children”  
EPR BioDose 2015, 2015/10/4-8, New Hampshire, U.S.A.

小荒井一真、木野康志、西山純平、高橋温、鈴木敏彦、清水良央、千葉美麗、小坂健、佐々木啓一、福田智一、磯貝恵美子、岡壽崇、関根勉、福本学、篠田壽

「歯中放射能測定による体内 Sr-90 と Cs-137 推定」  
日本影響学会ワークショップ  
2015/10/16-10/17 富山大学五福キャンパス

## 引用文献

- (1) Chikayama Y. et al., Accumulation of  $^{90}\text{Sr}$  to cattle and horse bones in Hokkaido. *Radioisotopes* 1999; 48, 283-287.

(2) Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, and Technology (MEXT)., *51th bulletin of research results of environmental radioactivity* 2009.

Available at: [http://www.kankyo-hoshanou.go.jp/08/ers lib/ers51.pdf](http://www.kankyo-hoshanou.go.jp/08/ers_lib/ers51.pdf).

(3) Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, and Technology (MEXT), 2012.

Available at:[http://radioactivity.mext.go.jp/ja/contents/6000/5048/24/5600\\_0930\\_n.pdf](http://radioactivity.mext.go.jp/ja/contents/6000/5048/24/5600_0930_n.pdf)



# Assessment of internal exposure to radiation using teeth

Keiichi Sasaki

*Division of advanced prosthetic dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry*

*Key words:* Fukushima-Daiichi Nuclear Power Plant Accident, Exposure to Radiation, Milk Teeth,  $^{90}\text{Sr}$ ,  $^{137}\text{Cs}$

## Abstract

Radioactive strontium ( $^{90}\text{Sr}$ ) are known to be incorporated into teeth during the process of calcification.  $^{90}\text{Sr}$  incorporated in the tooth persists in it until the tooth is fallen out. We hypothesized that the levels of  $^{90}\text{Sr}$  in teeth can serve as an index of internal exposure to radiation. In order to assess the hypothesis, we examined the  $^{90}\text{Sr}$  concentrations in the teeth of cattle abandoned in the evacuation area of the Fukushima-Daiichi Nuclear Power Plant (FNPP) accident. We confirmed that  $^{90}\text{Sr}$  is incorporated into the teeth during tooth development and exhibited a positive relationship with the degree of radioactive contamination that the cattle experienced; thus, tooth  $^{90}\text{Sr}$  activity concentrations reflect environmental  $^{90}\text{Sr}$  levels during tooth formation. Assessment of  $^{90}\text{Sr}$  in teeth, therefore, could provide useful information about internal exposure to  $^{90}\text{Sr}$  radiation.

In order to assess the above hypothesis in humans, we have started collecting deciduous teeth from children in the Fukushima area and in the control area, where the effect of the FNPP accident was thought to be negligible. More than 4,200 milk teeth have been collected to date (at the end of December, 2015) and measurements of radioactivity in the teeth have been started using imaging plates and by the determination of  $^{90}\text{Sr}$  and radioactive Cs in the teeth. Since the teeth collected so far were formed before the FNPP accident (control teeth), there is no significant differences in the content of radioactive substances between Fukushima teeth and the teeth collected from control areas, and between the teeth collected from different cities in Fukushima Prefecture. Further collection of teeth that were formed after the FNPP is needed and further investigations are necessary for fully understanding the extent of environmental pollution by the FNPP accident.

**テーマ（２）**  
**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**

- 2-1 低線量放射線は心血管疾患発症の原因と成りうるか？—動物実験による検証—  
丹羽 保晴（公益財団法人放射線影響研究所副主任研究員）
- 2-2 極低線量率放射線連続被ばくマウスを用いた健康影響解析  
杉原 崇（環境科学技術研究所生物影響研究部主任研究員）
- 2-3 小児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・准教授）
- 2-4 小児・青年期の低線量率放射線被ばくによるがんリスクの評価——インドケララ州の高自然放射線地域住民の調査結果を中心として  
秋葉 澄伯（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科健康科学専攻人間環境学講座疫学予防医学）
- 2-5 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  
中島 裕夫（大阪大学大学院医学系研究科放射線基礎医学助教）
- 2-6 低線量率放射線長期連続照射によるマウス急性骨髄性白血病の起因となる PU.1 遺伝子変異の線量率依存性の解析～放射線発がんの線量率効果の仕組みを考える～  
甲斐 倫明（大分県立看護科学大学看護学部教授）

# 低線量放射線は心血管疾患発症の原因と成りうるか？ －動物実験による検証－に関する研究-

丹羽 保晴（公益財団法人 放射線影響研究所・副主任研究員）

## 研究要旨

原爆被爆者に代表される高線量放射線に被曝した集団では、放射線被曝が心血管病変の発症リスクの上昇と相関すると報告されている。本研究では、モデル動物(SHR；高血圧自然発症ラットおよびSHRSP；脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット)を用いた実験により上記エビデンスを検証するとともに、低線量放射線被曝でも同様な結果が見られるかを検証する。指標としては、SHRでは血圧値の上昇時期およびプラトーに達した際の血圧値を、一方、SHRSPを用いた実験では脳卒中様症状の発症時期および寿命を用いる。また、両系統のラットから得た検体を検索することにより、線量と病理形態学的、生理学的変化との相関を調べる。更に、原爆被爆者の調査の結果を基に選んだ血液バイオマーカーを測定する。これらのデータを総合して、放射線被曝と心血管病変との相関および放射線がいかんして心血管病変を起こすか、その機序について調べる。更に、心血管病変と有意に相関する最低線量(閾値)が存在するか否かも検証する。

キーワード：動物モデル、高血圧、脳卒中、心疾患、放射線影響、放射線被曝

研究協力者 高橋 規郎(公益財団法人 放射線影響研究所 顧問),大石 和佳(公益財団法人 放射線影響研究所 部長),三角 宗近(公益財団法人 放射線影響研究所 研究員),村上 秀子(公益財団法人 放射線影響研究所 来所研究員)

## I 研究目的

放射線の被曝線量の増加と心血管病変の発症リスクの増加が相関するか否かをモデル動物を用いた実験系で検証する。さらにモデル動物における線量効果のパターン、および発症に至る機序を解明する。

これらの結果は、福島原発事故にともない生じた環境汚染地区の住民、その除染作業員および核施設復旧作業員などの放射線防護に関して有用な情報を提供できるものと期待している。

## II 研究方法

1. SHR ラットを用い、放射線に相関する心血管病変の発生機序を推定する目的で実験は実施された。概要は次記の通りである。5週齢のオスのSHRラットに1.0 Gy、2.0 Gy、4.0 Gyのガンマ線を一括照射したものを照射群とし、非照射ラット(0 Gy)を対照群とした。照射後30週まで、体重および血圧値の測定を週一回行った。これらのラットの病理解析および血液バイオマーカーの測定を実施した。更に、各種血液細胞の細胞数を計測した。また、解剖時に計測した各種臓器の重量への放射線の影響を解析した。以上、得られたデータはDunnett test、線形回帰モデル、Linear mixed effects モデルなどを用いて統計解析を行い、放射線量と種々の指標との相関を推定した。
2. 低線量(0.1 Gy未滿)領域の放射線の心血管病変への影響を調査する前段階として下記の研究を実施した。SHRSPラットに関しては、0.25 Gy、0.5 Gy、0.75 Gy照射した照射群および対

照として非照射ラット群を用いて、脳卒中症状の発症時期、寿命調査を実施するとともに、傷害の重篤度を比較する目的で剖検試料の病理検査を行った。

3. 低線量率放射線と心血管疾患の相関に関して、今までの調査で集積された高線量率放射線を急照射した場合の影響と、低い線量率の放射線を緩照射して得られた影響の比較を行い、その違いを検証する。そのために、低線量率で緩照射した SHR および SHRSP を用いた実験を行う。手順は次記の通りである。①SHRSP を使用する。線量率(0.1 mGy/分)で集積線量は 0.25 Gy および 0.5 Gy とする。脳卒中様症状の発症時期の早期化、寿命の変化、死因および各臓器の病理学的変化を調べる。②①と同様の条件で照射し、8 週目で全例の病理検索と血液バイオマーカーの測定を行う。③SHR を用いる。線量率は①と同じ条件で、集積線量は 2Gy および 4 Gy とする。照射後 30 週間、血圧および体重の変遷を観察する。組織の病理形態学的検査およびバイオマーカーの測定を行う。①から③で得られた種々の指標と集積線量・線量率との関連を統計的に解析する。急照射して得られた結果と緩照射した場合の結果を比較してその違いを検証する。
4. 結果を総合して、放射線の影響が生じる生物学的機序、生じる心血管疾患の特徴につき、生命情報学的解析法による予測を試みる。結果は、福島の被災地のような低線量・低線量率の放射線と心血管疾患との相関を知るための重要なデータになると期待される。更に、より低線量・低線量率の放射線の影響を検出するための実験系および適切な指標などの確立に努力する。

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトを研究対象として行うものではない。動物実験に関しては、法令及び広島大学動物実験指針に従い、「動物の愛護及び管理に関する法律」並びに「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に則って実施した。行う動物実験等は通常の実験範囲のものであり、特段、倫理的に問題のあるものとは思われない。尚、本実験は広島大学動物実験委員会の承認を得て遂行した。

### III 研究結果

【平成 27 年度】

- ① SHR ラットによる実験では、昨年度報告したように対照ラット(0 Gy)に比べ、1 Gy 以上を照射したラットで放射線量に従って収縮期血圧値が上昇することを観察した。照射ラットに観察された肝臓に生じた脂肪滴、類洞拡張や炎症などの病変は匹数を増やした検証でも、線量の増加に従い、病変を有する個体数の増加が確認された(結果 1)。また、放射線量の増加にともなう、体重の増加の抑制が観察された。この体重増加の抑制の原因を明らかにするために単位時間当たりの餌の摂餌量、糞便数を測定したが、照射ラット、対照ラットの間有意な差異は認められなかった。解剖時に各臓器・組織の重量を測定した結果、臓器・組織の重量は放射線量の増加に従って減少していた(結果 2)。よって、この体重増加の抑制は組織・臓器の成長遅滞が原因ではないかと考えている。更に、放射線照射後 30 週目の血液細胞(白血球(WBC)、赤血球(RBC)、および血小板(PLT))数を計測した。2Gy および 4Gy を照射したラットで、血小板数が、対照群に比べ有意に減少することが、統計解析の結果より示された(結果 3)。血小板数の減少は病理検索で観察された肝臓の障害に起因するか、あるいは骨髄

で生じている脂肪化のような変化によりもたらされている可能性が示唆された。このように、SHR を用いた実験系は放射線被曝と血圧、体重との相関を観察するのに、最も適したものの一つと考えられた。更に、血液バイオマーカーの測定を行った。放射線影響研究所(放影研)の成人健康調査(AHS)の生化学検査で用いられる 11 種類の項目につき結果を得た。結果 4 に示すように、3 種類の指標で、放射線線量の増加にともなう上昇、もしくは減少が認められた。

- ② SHRSP の実験で、脳卒中様症状の発症時期が 0.25 Gy 照射群においても非照射対照群に比べて早期化していることを過去に報告した。それらの寿命の解析結果より、放射線量の増加にともなう寿命の短縮が観測された。主な死因は脳卒中であった。また病理検索の結果では、心筋の炎症、線維化を有する個体は非照射群に比べ照射群に高頻度で認められた。
- ③ 低線量率放射線に関しては、予備的実験を行い、実施計画の改訂を行った。本事業の成果を踏まえ、今後の低線量率放射線照射と循環器疾患の相関の検討を計画する。

#### 【本事業で実施した全期間の研究のまとめ】

##### ① SHR の研究で得られた結果。

- イ) 血圧値が放射線量の増加にともない高値を示した。放影研の AHS で観察された知見、即ち被爆者に観察された連続的血圧値の線量の増加に比例しての上昇が、この結果より確認された。このことは、血圧値の上昇は心理的ストレスによるものではないかと言う、過去に提示された疑念を打ち消すものかもしれない。
- ロ) 体重の増加が線量の増加にともない遅滞することが認められた。このことは AHS で認められた、高線量被爆者において低体重および低 BMI の頻度が高いという報告の機序解明に繋がるかもしれない。

##### ② SHRSP の研究で得られた結果

- イ) 脳卒中様症状の発症時期の早期化および寿命の短縮は 0.25 Gy のような低線量照射群においても観測された。その主死因は脳出血であった。この結果は、放影研の AHS で得た、被曝線量の増加にともない脳出血罹患率が上昇すると言う報告を支持している。
- ロ) 腎臓の血管に生じた線維化壊死などの障害の重篤度は線量に比例して増すことが病理検索の結果より示唆された。この結果は被爆者の慢性腎炎罹患率に線量効果が観察されることを支持しているのかもしれない。
- ハ) 心筋の壊死、線維化および炎症が照射群に高頻度で認められることが、剖検試料の病理検索より示唆された。この結果は、放影研の寿命調査(LSS)で高血圧性心疾患および心不全の死亡率が、また AHS において心筋梗塞の罹患率が被曝線量の増加にともない高くなることを支持している可能性も考えられる。

#### IV 考察

本研究を通じて、過去の疫学調査により示唆された心血管疾患と放射線との相関を支持する興味深いデータが得られつつある。モデル動物で得られた表現型は被爆者で観察される表現型と相関するものが多い。従って、この系を用いた研究を続けることにより、放射線が如何にして心血管疾患と相関するかの機序を検索することが可能になることが期待される。更に、この系を用いることにより、極めて低い線量(0.1 Gy 未満)の放射線影響の検討が可能であると考えられる。メ

タボロームやプロテオーム解析などにより、高感度で放射線の影響を観察できる新しい指標を得ることにより、現在福島被災地域で問題になっている極低線量の放射線と循環器疾患との相関に関しても重要な知見が得られることが期待される。

## V 結論

本研究調査から、我々の系を用いることにより、極めて高感度で放射線の心血管系への影響を調べることが可能であると考えられる。放射線による高血圧、脳卒中の発症メカニズムを解明した報告は現在まで存在しない。不確定な要素は含まれるものの、本研究を通して得られたデータから、脳卒中においては、放射線により脳を含む中小血管の炎症および線維化により発症が促進されると考えられる。放射線と高血圧症との相関調査に用いたモデル動物系では、血圧値に直接影響を及ぼすと考えられる病理変化が確認されなかったことより、脳卒中とは異なる経路と考えられた。今後、本研究で確立されたモデル動物系および得られた知見より、放射線被曝と心血管疾患とが、いかなる機序で相関するかが更に明らかになることが期待される。一方、本研究で使用したモデル動物は高血圧、脳卒中を発症するモデルであり、この成果が直ちに、ヒトにおける放射線による心血管疾患のリスク上昇に結び付くものではない。しかし、その過程で得られた情報は、ヒトのリスク低減に寄与するものと考えている。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

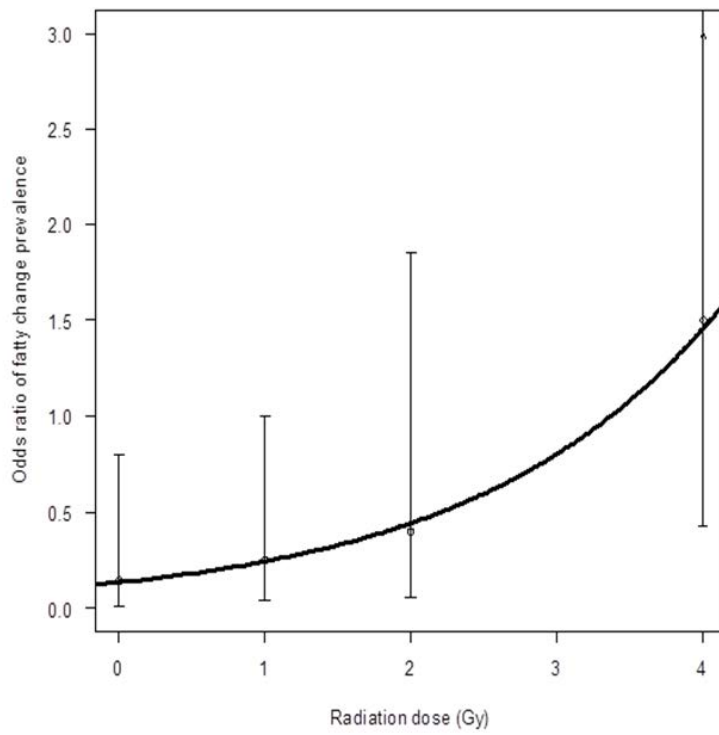
### ア) 雑誌の場合

- 1) Takahashi I, Ohishi W, Mettler Jr FA, et al. A Report from the 2013 International Workshop: Radiation and Cardiovascular Disease, Hiroshima, Japan. *J Radiol Prot.* 2013; 33(4); 869-80.
- 2) 高橋 規郎, 丹羽 保晴. 放射線が循環器疾患の発症リスクを上げているか-モデル動物としての SHRSP の適切性-. SHR 等疾患モデル共同研究会, News Letters, 2014: No.45; 1-2.

### イ) 単行本の場合

なし

結果 1. 病理検索の結果 (肝臓)

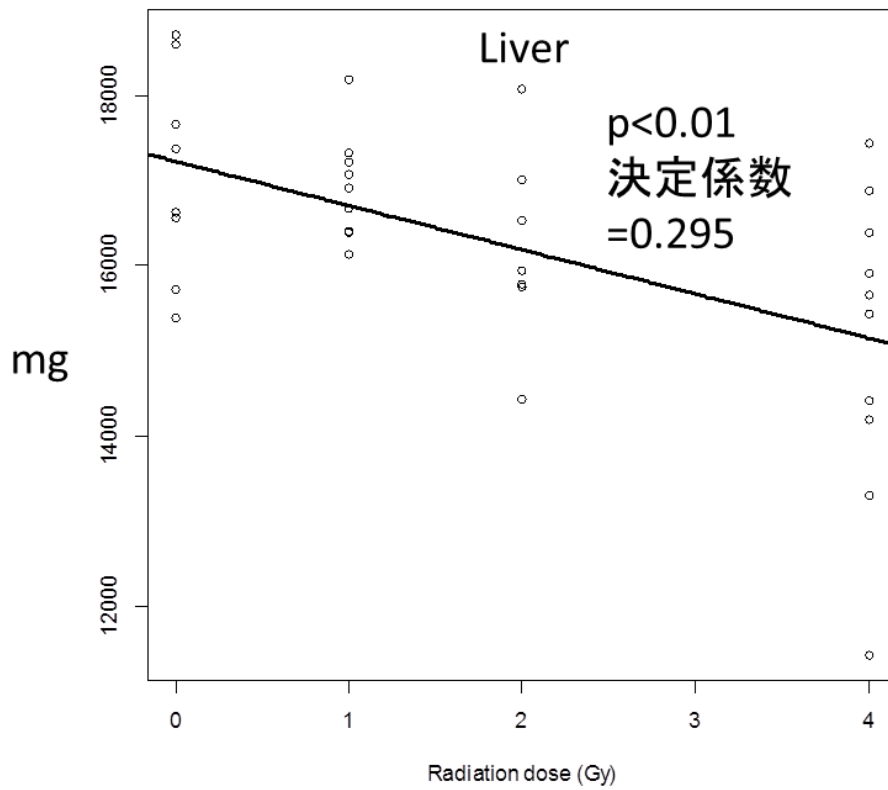
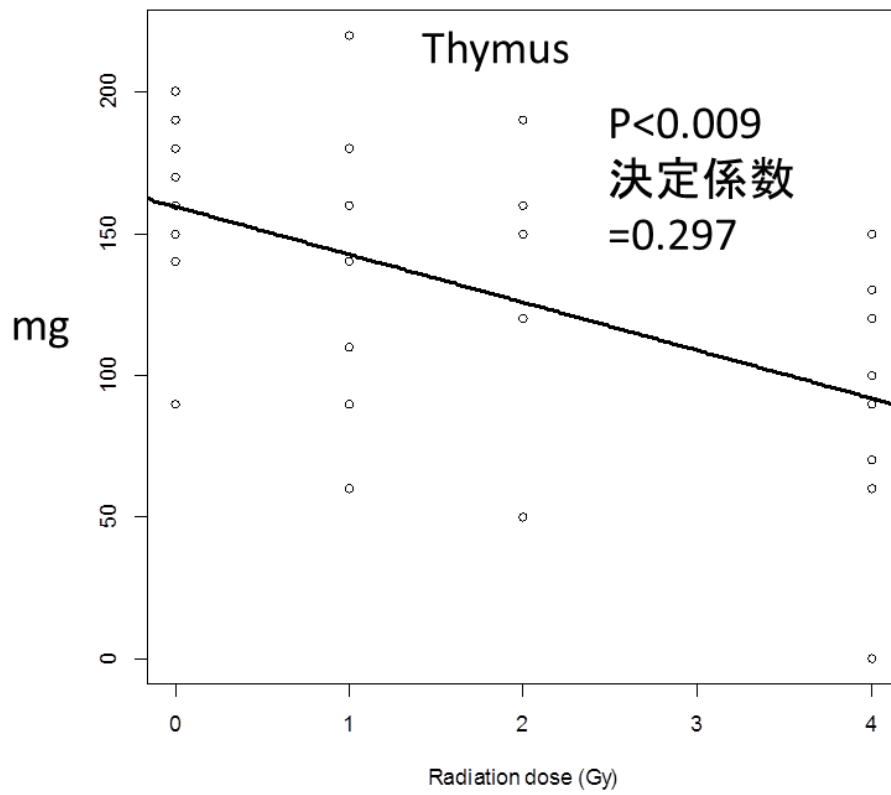


Fatty change (匹)/病理検索した匹数

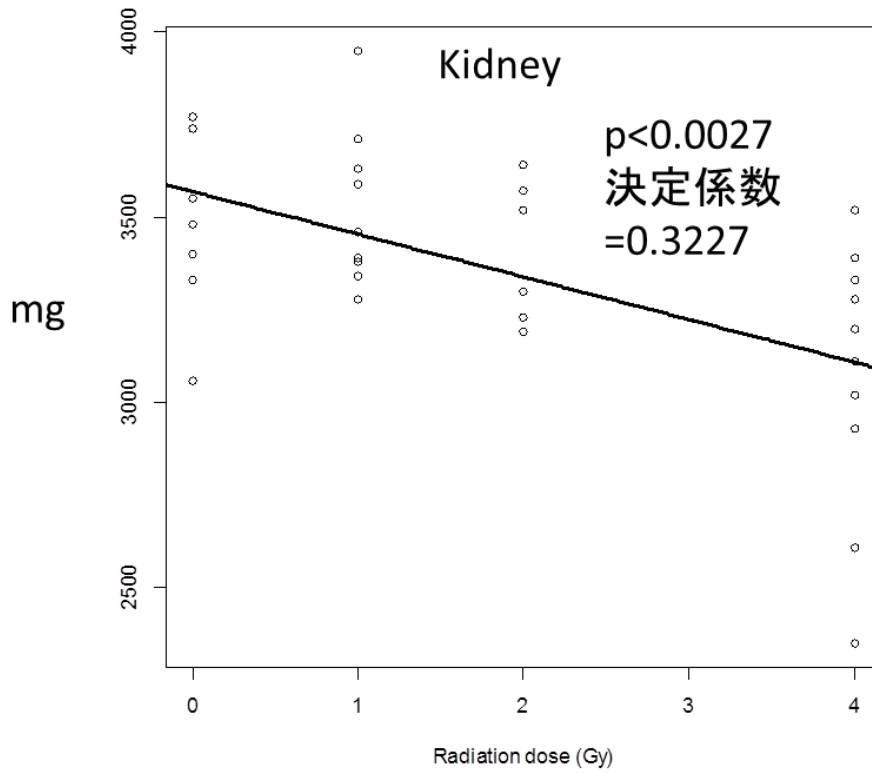
0Gy	1Gy	2Gy	4Gy
1/9	2/10	2/9	6/10

Logistic regression, p<0.024

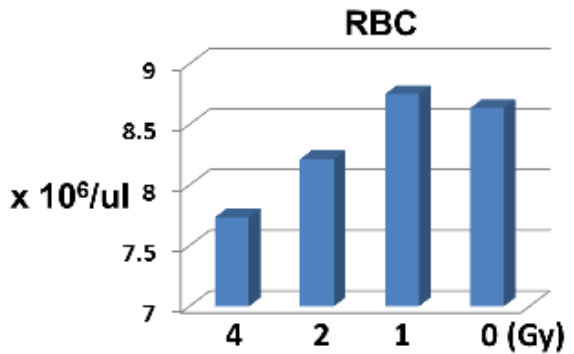
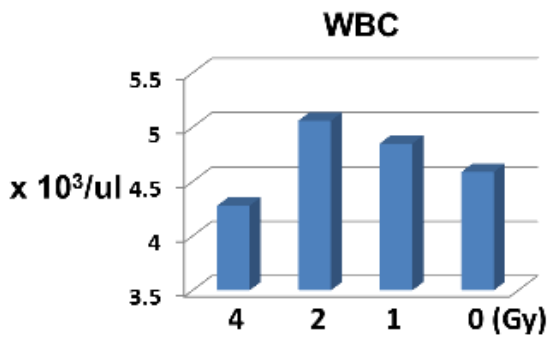
結果 2. 線量と臓器重量の相関



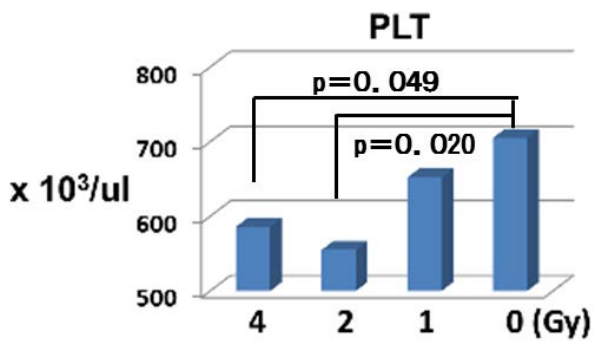




結果 3. 線量と各種血液細胞数の相関

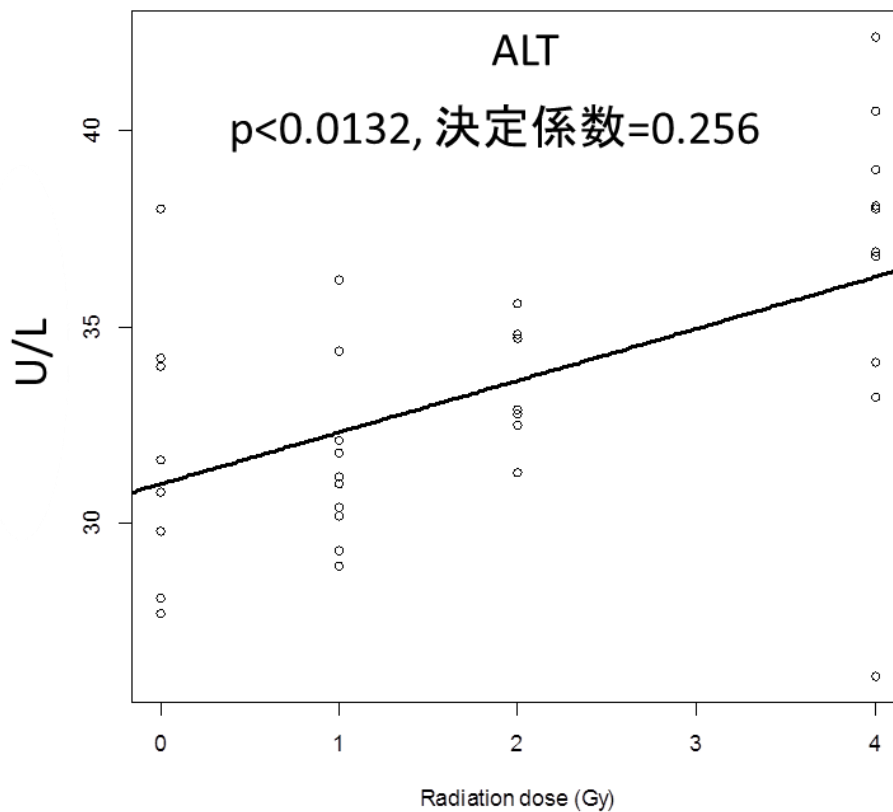
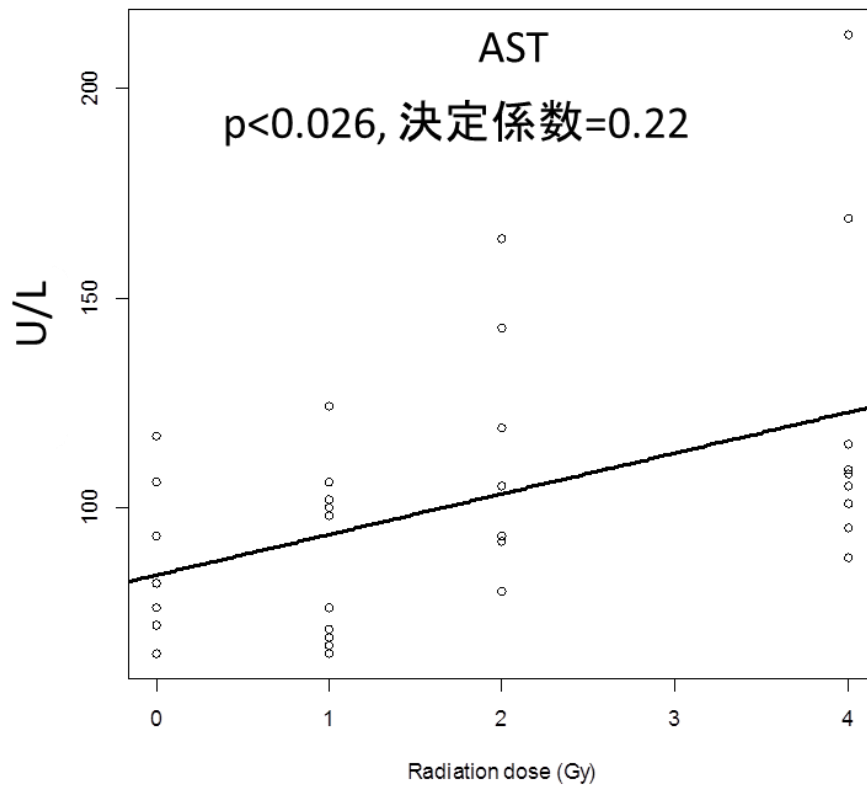


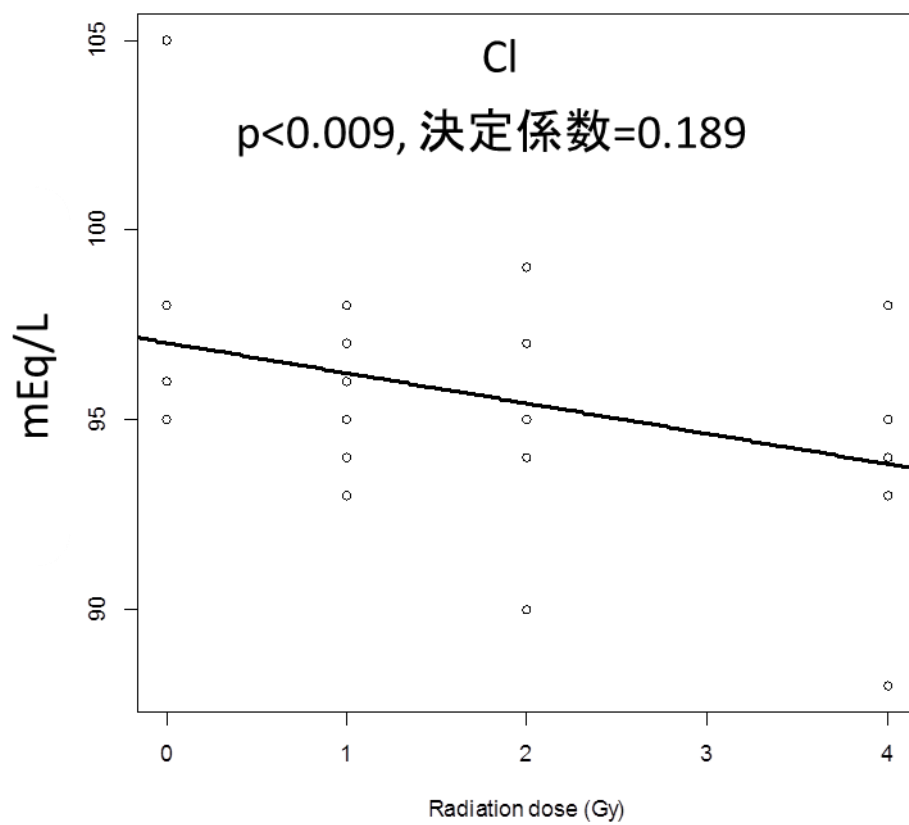
WBC と RBC には有意差は認められず



PLT では Dunnett test で有意差が認められた。

結果 4. 線量と血液バイオマーカーの相関





# Whether lower-dose radiation can induce circulatory disease?

## -Assessment using animal models-

Yasuharu Niwa

*Department of Molecular Biosciences ,  
Radiation Effects Research Foundation (RERF), Hiroshima*

*Keywords:* Model animal, Hypertension, Stroke, Circulatory disease, Radiation effects

### **Abstract**

#### [Introduction]

Previous epidemiological findings including the LSS and the AHS indicated that radiation may be associated with increased risk of circulatory diseases (CDs). These issues received keen attention from the research scientists in the field of radiation protection, radiation biology and cardiology. On the other hand, inconsistencies have been observed among various studies, especially low-dose occupational and environmental exposures. Given the uncertainties, a study using irradiated model animals is being conducted to assess whether or not risk of CD is elevated with increasing radiation dose.

We have been assessing the issues as above, and obtaining information about biological mechanisms through the animal model studies. Irradiated stroke-prone spontaneous hypertensive rats (SHRSP), even at 0.25 Gy, showed stroke symptom significantly earlier than unirradiated rats. In the course of SHRSP studies, we learned that the system using SHR rats is more suitable for assessing evidence of radiation-associated risks for hypertension, because measurement of blood pressure is difficult after SHRSP showed stroke symptoms. Thus, we used SHR rats. We are conducting the study using SHRSP and SHR rats for assessing the association between radiation and CDs, such as stroke and hypertension.

#### [Methods]

In the study of male SHR rats irradiated by gamma ray with 0, 1, 2 and 4 Gy, blood pressure and their body weight were measured once a week until 30 weeks after irradiation. In this study, we examined blood cell compositions and blood biomarkers. In the study for SHRSP, male rats are irradiated with 0.25, 0.5, 0.75 and 1 Gy, as well as a 0 Gy control. The life span was examined and pathological examinations were conducted by autopsy samples.

#### [Results]

1) Regarding to SHR's peripheral blood cell composition at 30 weeks after irradiation, platelet number was statistically significant decreased with increasing radiation dose. 2) Several blood biomarkers in SHR rats altered with increasing radiation dose. 3) The life span among irradiated SHRSP rats was significantly

shorter than that of non-irradiated SHRSP rats. 4) Pathological analyses demonstrated the number of rats showing fibrosis and inflammation in cardiac muscle increased in irradiated rats.

[Discussions]

Our animal model studies using SHR and SHRSP rats demonstrated that we expect to obtain somewhat clear evidence indicating radiation truly related to CDs, such as hypertension and stroke. The approach may provide novel ways to seek possible mechanisms of CDs at lower-dose radiation exposure and long-term effects after irradiation.

Finally, the results obtained through our studies might be able to provide important information for the association between CDs and low dose and low dose rate exposures of ionizing radiation from Fukushima Power Plant Accident.

# 極低線量率放射線連続被ばくマウスを用いた健康影響解析

杉原崇（環境科学技術研究所生物影響研究部主任研究員）

## 研究要旨

従来行われてきた低線量放射線影響研究は、高線量の放射線を短時間照射することにより得られる低線量域での研究であったが、高線量率放射線の単回照射により惹起された影響の研究は、放射線治療などのリスクに関する研究には有用であるが、低線量率の長期間被ばくによる健康影響リスク推定には単純に応用できない。特に、福島第一原子力発電所事故（以下「今般の事故」という）などにより大きな関心が寄せられている低線量率放射線長期被ばくの健康影響を明らかにするためには、低線量率放射線を照射できる施設での研究が重要となる。2007年に発表した低線量率長期連続放射線照射がB6C3F1マウスの健康にどのような影響を及ぼすかに関するデータの中で、0.05、1.0および21 mGy/22時間/日の低線量率 $\gamma$ 線を400日間連続で照射したマウスの肝臓において、雄では有意な肝腫瘍発生率増加がみられることが、雌では0.05および1.0 mGy/日照射群では肝腫瘍の発生率が増加しないことが示され、低線量率放射線照射による肝腫瘍発生には性ホルモンが関与している可能性が示唆された。そこで、雄B6C3F1マウスに0.05 mGy/日の連続照射を行い、経時的に解剖すると共に肝腫瘍発生についての影響を解析する実験計画を立てた。昨年度は、実験条件等の検討及び雄B6C3F1マウス及び去勢処置を行ったマウスに低線量率（0.05 mGy/22時間/日、及び20 mGy/22時間/日）放射線照射を開始したことを報告した。本年度は、マウスの照射を開始してから100日目、200日目、及び300日目に解剖し、マウスの健康状況（体重、肝腫瘍発生割合、臓器相対重量、血球数解析、血清成分の解析、病理標本の解析、遺伝子発現解析）についてモニターした。さらに、男性ホルモンの影響を明らかにするために、去勢したマウスの体重についても検討した。これまでの途中経過の結果、極低線量率放射線照射（0.05 mGy/22時間/日）した100-300日目のマウスにおいて、極低線量率照射群は非照射群より体重が重く、血糖値、総コレステロール値が上昇する傾向にあった。また、極低線量率（0.05 mGy/22時間/日）照射による体重増加は去勢処置によって見られなくなった。また、肝臓中の脂肪肝の原因遺伝子であるPPAR $\gamma$ 遺伝子の発現上昇が極低線量率照射群で見られた。一方、当初予想していた極低線量率照射群での性ホルモン（テストステロン）量の有意な変化は見られなかった。マウスへの極低線量率（0.05 mGy/22時間/日）放射線照射による健康影響に関しては、当初予想していたよりも多く、代謝系への影響が見られることから、どのような原因で変化が見られるかを検討する必要がある。一方、今回見られた代謝系への影響は通常的生活習慣の乱れでも起こりうる現象であるため、高線量率照射を用いた実験では考慮する必要がなかったような飼育環境などの環境要因が実験結果に影響している可能性も否定できない。今後、非常に微弱な影響である低線量率放射線照射影響を検出するためには、より厳密な同一の飼育環境でかつ、大規模な繰り返し実験を行い証明する必要があることを提言する。これらの放射線による代謝系への影響及びその機構を明らかにできれば、今後、福島県民の健康不安解消にとって重要な研究成果となると考える。

キーワード：低線量率放射線、雄マウス、肝腫瘍、体重、血清成分の解析、去勢、

研究協力者 田中 聡（環境科学技術研究所生物影響研究部主任研究員）、  
田中 イグナシヤ（環境科学技術研究所生物影響研究部副主任研究員）

## I 研究目的

現在まで、低線量率高線量(8 Gy)放射線照射による生物への影響研究データは蓄積されつつあるものの、今般の事故で健康影響が懸念される低線量低線量率(200 mGy 以下あるいは 0.1 mGy/日以下)被ばくによる病理・分子レベルでの影響は、未だによくわかっていない。環境研ではマウスに 0.05, 1.0 および 21 mGy/22 時間/日の低線量率放射線を照射した実験(寿命試験)を実施し、その結果の中で、最も低い線量率である 0.05 mGy/22 時間/日の 400 日間照射(総線量 20 mGy)によって有意に肝腫瘍発生率が增加することを報告した。この結果は、極低線量率(0.05 mGy/日)放射線の連続被ばくがヒトになんらかの健康影響を及ぼす可能性を示唆している。そこで、本研究では、極低線量率低線量(0.05 mGy/22 時間/日の 400 日間連続照射、総線量 20 mGy)を照射した雄 B6C3F1 マウスの経時的な剖検を行い、放射線照射及び去勢による肝機能、血清中因子、遺伝子発現等の生理学的変化を調べることで、肝腫瘍発生率の増加に関する極低線量率低線量放射線ひばく影響の科学的根拠を明らかにすること、さらには、今般の事故による低線量率放射線長期被ばくの健康影響の有無を明らかにすることを目的とする。

## II 研究方法

本年度は低線量照射施設での B6C3F1 雄マウスへの放射線照射を開始し、照射開始後 100-300 日目のマウスそれぞれにおいて(非照射群を 16 匹、0.05 mGy/22 時間/日の照射群を 16 匹、20 mGy/22 時間/日の照射群を 8 匹)を解剖し、マウスの健康状況(体重、肝腫瘍発生割合、臓器相対重量、血球数解析、血清成分の解析、病理標本の解析、遺伝子発現解析)についてモニターした。また、去勢したマウスに関しては、解剖せずに体重のみを測定した。継時的に解剖したマウスは事前の摂食による影響を排除するために、解剖前日より絶食処置を行った。解剖直前に眼窩採血した血液中の血球数は CellTac $\alpha$  (日本光電)により測定した。解剖時に心臓採血を行い、採取した血液から血清を分離し、スポットケム(アークレイ社)により生化学的成分量を測定した。また、血清中のテストステロン量は ELISA 法(CAY 社)により測定した。また、解剖時に採取した肝臓から mRNA を抽出し、cDNA に変換後、脂肪肝に関与する遺伝子 PPAR $\gamma$  の発現について解析した。病理標本解析用サンプルとして、肝臓、脾臓、肺、精巣、ハーダー腺の病理切片を作成した。また、解剖後マウスの腎臓、心臓、精巣上体、膵臓、病変部をホルマリン保存した。

(倫理面の配慮)

環境研内の動物実験委員会規程に基づき、申請書を提出し、動物実験委員会による審査、所内承認を経て研究を行った。

### III 研究結果

#### 1. 体重

27年度の解剖予定日である低線量率放射線照射後100, 200, 300日目に、解剖を行わないすべてのマウス（今後解剖する予定のマウス）について、体重を測定した。その結果、100日目では両照射群（0.05 mGy/22時間/日、及び20 mGy/22時間/日）（図1）、200日目以降は極低線量率（0.05 mGy/22時間/日）照射群において有意な体重増加が見られた（図2、図3）。一方、100、200日目の去勢マウスにおける体重を測定したところ、去勢マウスでは去勢した影響による体重増加が見られるものの、極低線量率（0.05 mGy/22時間/日）照射による体重増加の効果は見られなくなった（図4：100日目の結果のみ図示）。

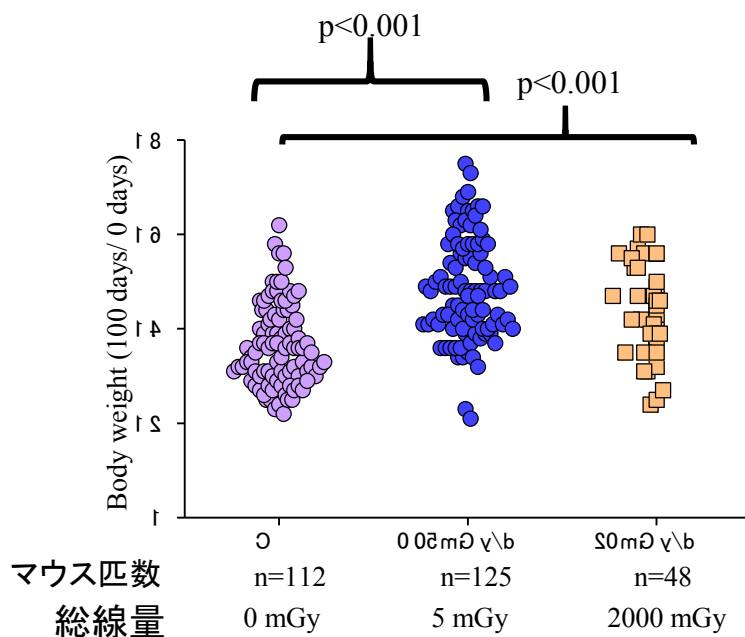


図1 100日目の体重（200-700日目に解剖予定の全マウス：100日目解剖マウス含まず）。 C：非照射群、0.05 mGy/d：0.05mGy/d照射群、20 mGy/d：20 mGy/d照射群



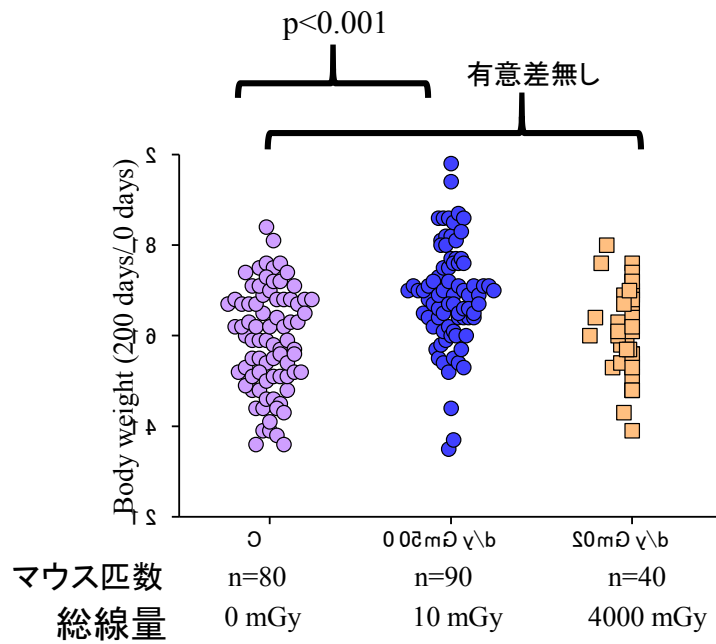


図2 200日目の体重（300-700日目に解剖予定の全マウス：200日目解剖マウス含まず。）C：非照射群、0.05 mGy/d：0.05mGy/d照射群、20 mGy/d：20 mGy/d照射群

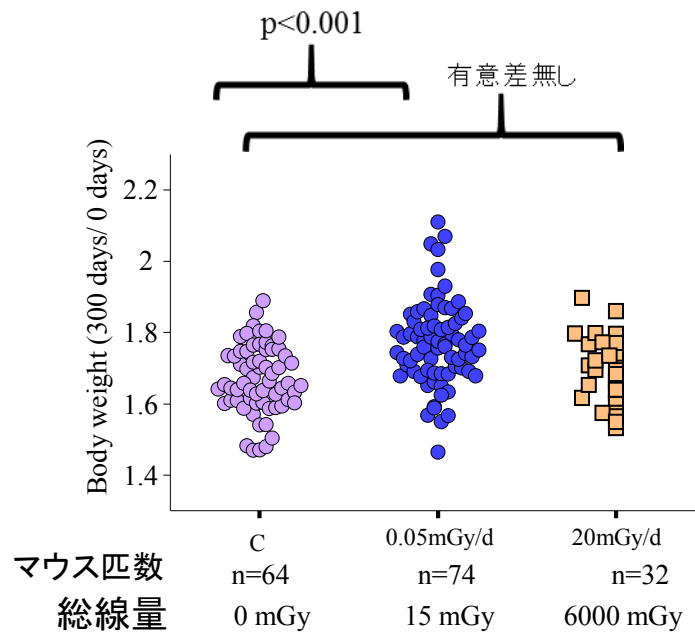


図3 300日目の体重（400-700日目に解剖予定の全マウス：200日目解剖マウス含まず。）C：非照射群、0.05 mGy/d：0.05mGy/d照射群、20 mGy/d：20 mGy/d照射群

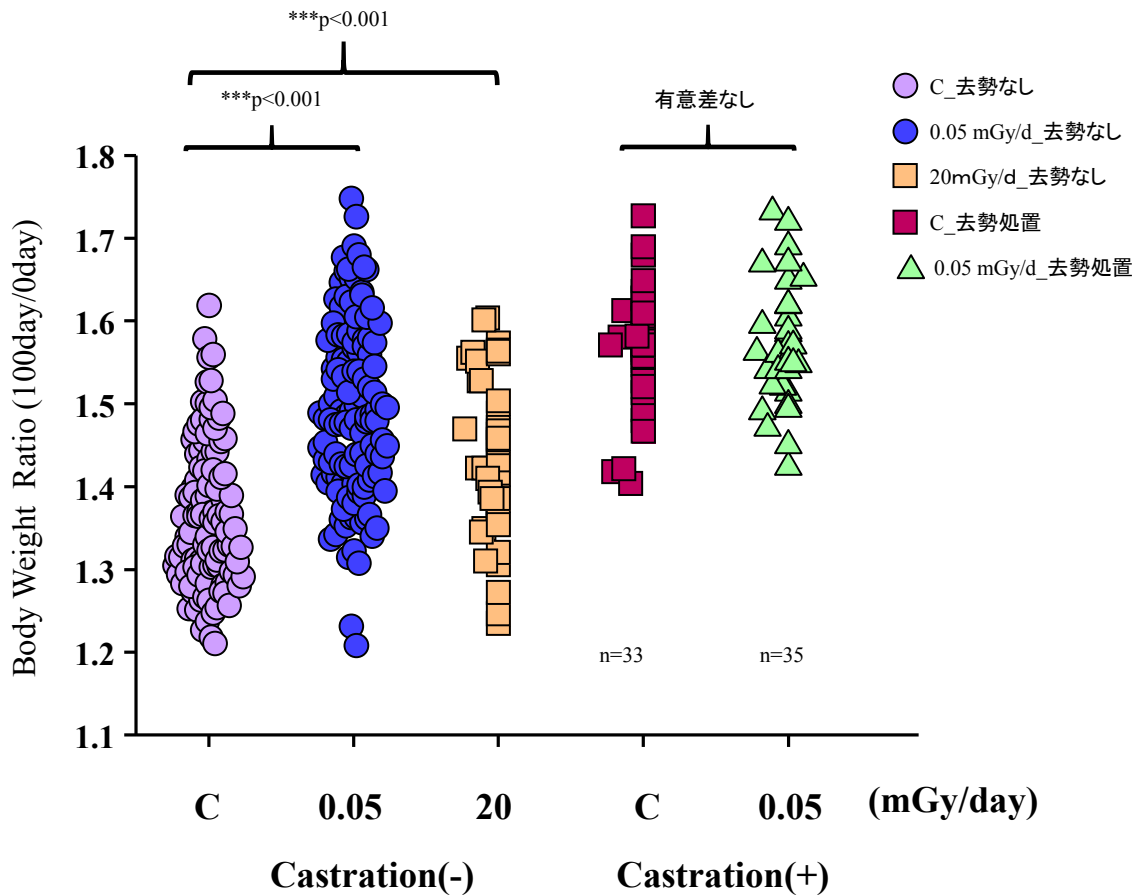


図4 100日目の去勢マウスの体重 C: 非照射群、0.05 mGy/d: 0.05mGy/d 照射群、20 mGy/d: 20 mGy/d 照射群

## 2. 肝腫瘍発生率

低線量率放射線照射後 100-300 日目に解剖を行ったマウスについての肝腫瘍の発生数について病理学的所見から解析を行った。その結果、100、200 日目で、肝腫瘍は発生していなかった（表 1）。一方、300 日目のマウスでは非照射群で 16 匹中 1 例の肝腫瘍が発生していた。一方、極低線量率（0.05 mGy/22 時間/日）照射群においては、16 匹中 3 例の肝腫瘍発生が観察された。そのため、300 日時点では、過去の寿命試験の結果と同様に極低線量率（0.05 mGy/22 時間/日）照射群において、肝腫瘍発生割合が高い結果となった（表 1）。しかしながら、現時点では、解析数が少ないため、有意差は見られなかった。その他に観察された腫瘍として、非照射群で 1 例の肺腫瘍、また、極低線量率（0.05 mGy/22 時間/日）照射群においても 1 例の肺腫瘍が観察された。

現在までの肝腫瘍発生数（率）（解剖時病理観察による）						
解剖日		0 mGy/日	0.05 mGy/日		20 mGy/日	
2015年	照射日数	肝腫瘍発生率	肝腫瘍発生率	総線量 (nGy)	肝腫瘍発生率	総線量 (nGy)
5/8~5/20	100日	0/16 (0%)	0/16 (0%)	5	0/8 (0%)	2000
8/31~9/2	200日	0/16 (0%)	0/16 (0%)	10	0/8 (0%)	4000
12/7~12/9	300日	<b>1/16</b> <b>(6.3%)</b> 参考：肺腫瘍 1/16 (6.3%)	<b>3/16</b> <b>(18.8%)</b> 参考：肺腫瘍 1/16 (6.3%)	15	0/8 (0%)	6000

表 1  
100

-300日目までの解剖時の肝腫瘍発生率

### 3. 臓器相対重量

低線量率放射線照射後 100-200 日目に解剖を行ったマウスについての臓器相対重量（肝臓、心臓、精巣）について記載する。肝臓では照射後 100 日目のみにおいて、重量比の減少が見られた（図 5）。一方、心臓では 100、200 日目とも、両照射群（0.05 mGy/22 時間/日、及び 20 mGy/22 時間/日）において相対重量の減少が見られた（図 6）。精巣においては、100 日目は 20 mGy/22 時間/日の照射群のみ、200 日目は両照射群（0.05 mGy/22 時間/日、及び 20 mGy/22 時間/日）において相対重量の減少が見られた（図 7）。

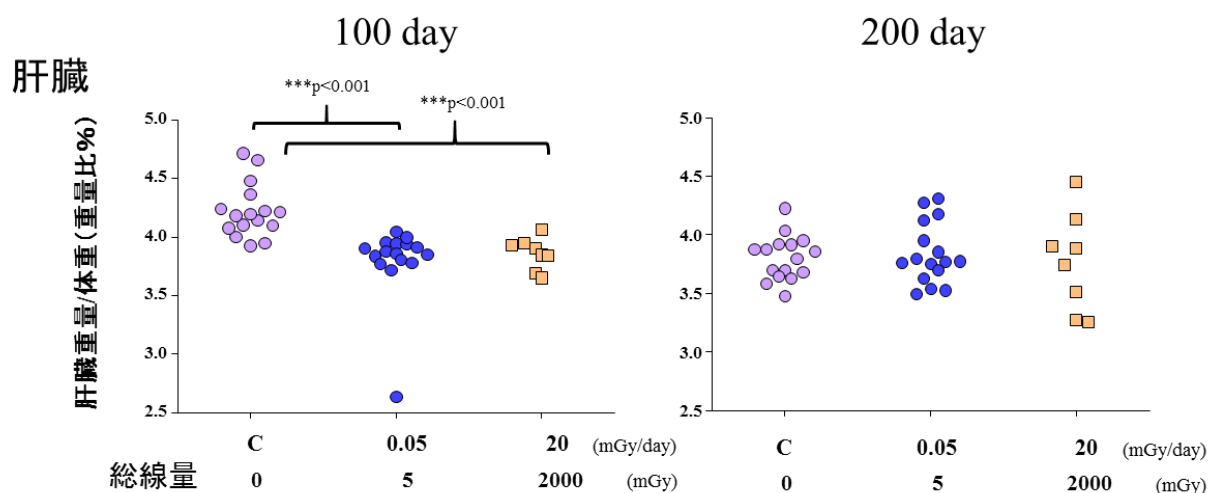


図 5 100-200 日目の肝臓での相対重量（C：非照射群、0.05 mGy/d：0.05mGy/d 照射群、20 mGy/d：20 mGy/d 照射群）

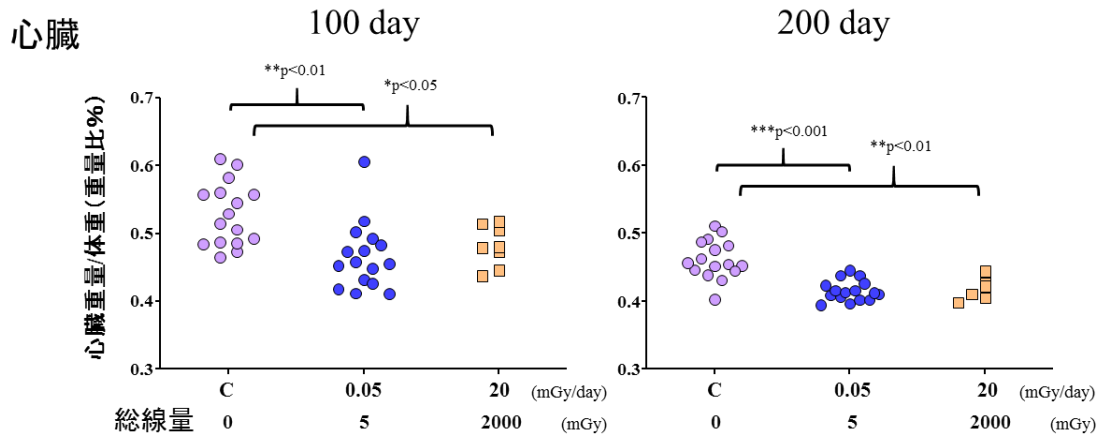


図 6 100-200 日目の心臓での相対重量 (C : 非照射群、0.05 mGy/d : 0.05mGy/d 照射群、20 mGy/d : 20 mGy/d 照射群)

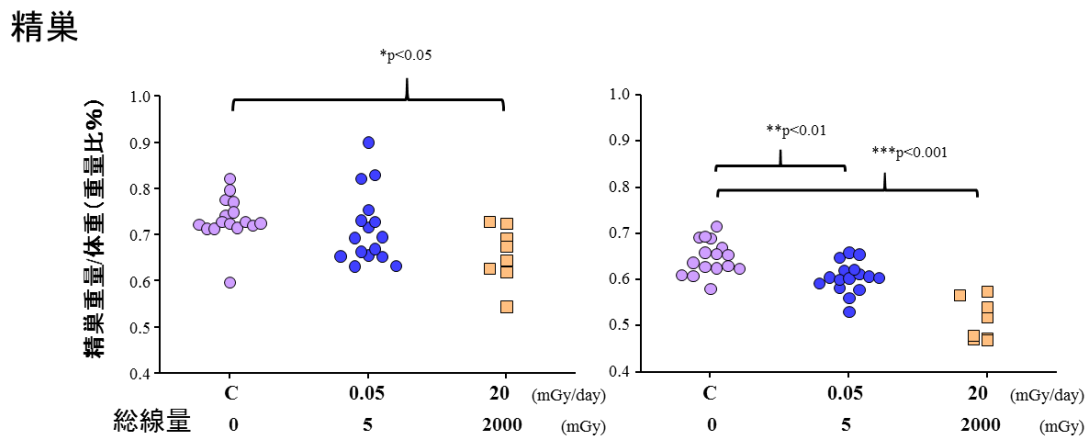


図 7 100-200 日目の精巣での相対重量 (C : 非照射群、0.05 mGy/d : 0.05mGy/d 照射群、20 mGy/d : 20 mGy/d 照射群) : 左図 100 日, 右図 200 日

#### 4. 血球数

低線量率放射線照射後 100-200 日目に解剖を行ったマウスについての眼窩採血した血液中の血球数 (白血球、赤血球、血小板) についての結果を記載する。低線量率放射線照射によって白血球数に変化は見られなかった (図 8)。赤血球数は (0.05 mGy/22 時間/日) 照射群において 200 日目に有意に増加していた (図 9)。血小板数は 100 日目では両照射群 (0.05 mGy/22 時間/日、及び 20 mGy/22 時間/日) において減少が見られた (図 10) が、200 日目に極低線量率 (0.05 mGy/22 時間/日) 照射群ではその有意差がなくなった。

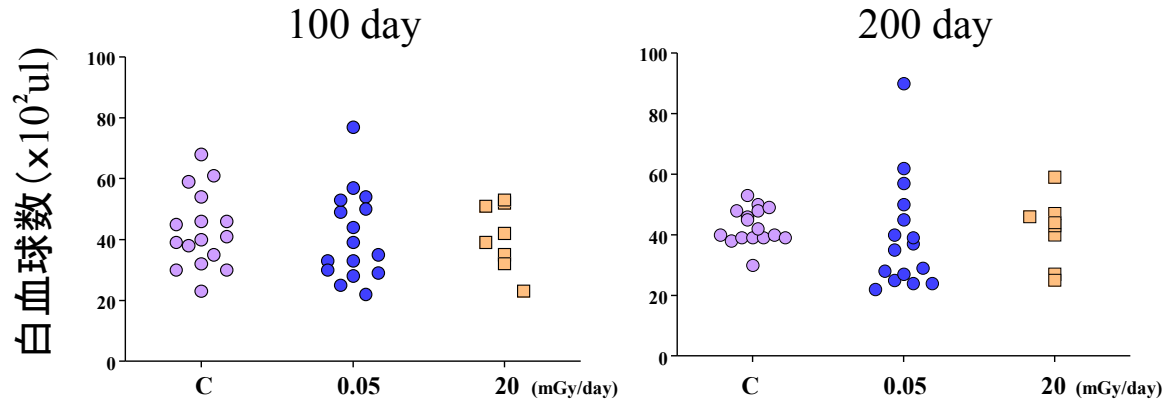


図8 100-200日目の白血球数 (C : 非照射群、0.05 mGy/d : 0.05mGy/d 照射群、20 mGy/d : 20 mGy/d 照射群)

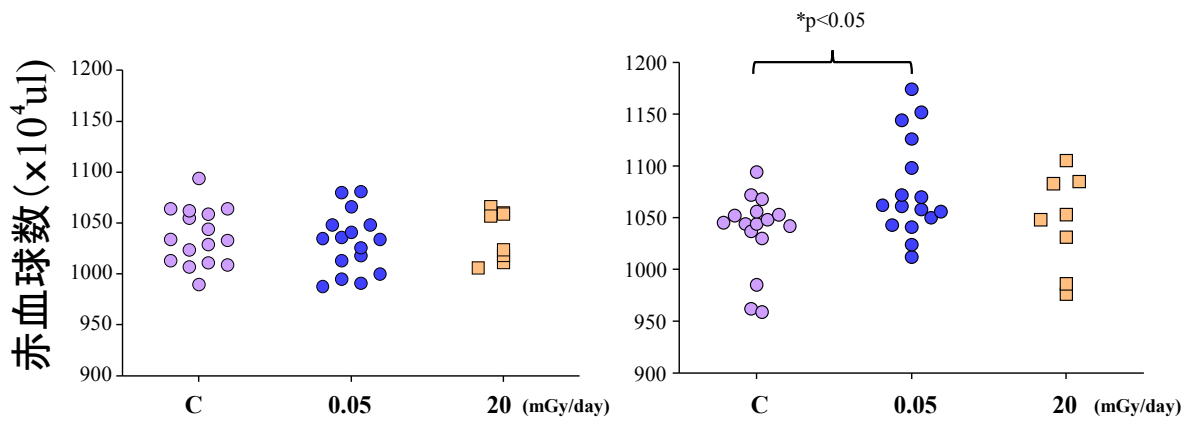


図9 100-200日目の赤血球数 (C : 非照射群、0.05 mGy/d : 0.05mGy/d 照射群、20 mGy/d : 20 mGy/d 照射群) : 左図 100 日, 右図 200 日

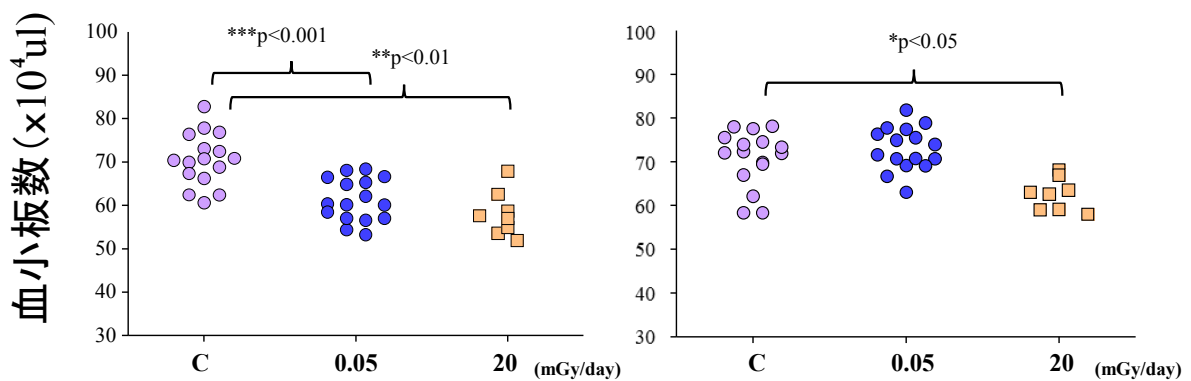


図10 100-200日目の血小板数 (C : 非照射群、0.05 mGy/d : 0.05mGy/d 照射群、20 mGy/d : 20 mGy/d 照射群) : 左図 100 日, 右図 200 日

#### 血清解析

低線量率放射線照射後 100-200 日目に解剖を行ったマウスについての心臓採血した血液中の生

化学成分（血糖値、総コレステロール、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ「GOT」、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ「GPT」、テストステロン量）についての結果を記載する。血糖値は100日目では両照射群（0.05 mGy/22 時間/日、及び20 mGy/22 時間/日）において増加し、200日目では極低線量率（0.05 mGy/22 時間/日）照射群でのみ増加した（図11）。総コレステロールは100、200日目とも（0.05 mGy/22 時間/日）照射群においてのみ有意に増加していた（図12）。肝障害の指標であるGOT、GPT共に極低線量率（0.05 mGy/22 時間/日）照射群では有意な変化は見られなかった（図13、図14）。血中のテストステロン量もまた、予想に反して極低線量率（0.05 mGy/22 時間/日）照射群では有意な変化は見られなかった（図15）。

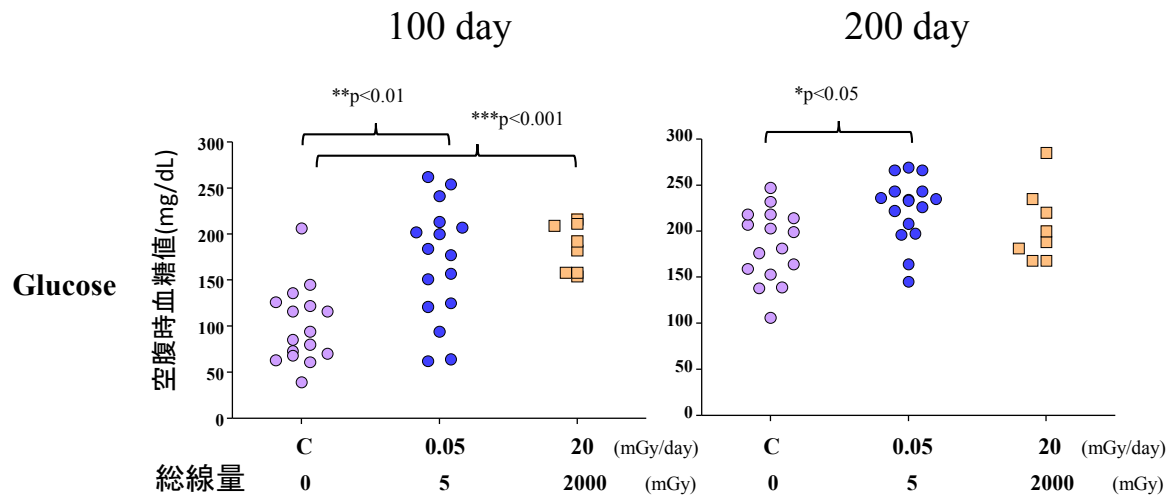


図11 100-200日目の血糖値(C:非照射群、0.05 mGy/d:0.05mGy/d照射群、20 mGy/d:20 mGy/d照射群)

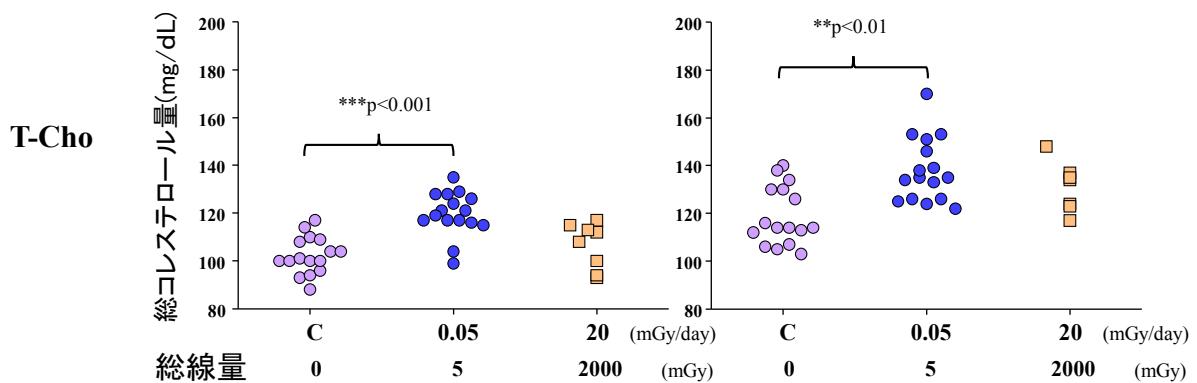


図12 100-200日目の総コレステロール（C：非照射群、0.05 mGy/d：0.05mGy/d照射群、20 mGy/d：20 mGy/d照射群）：左図100日、右図200日

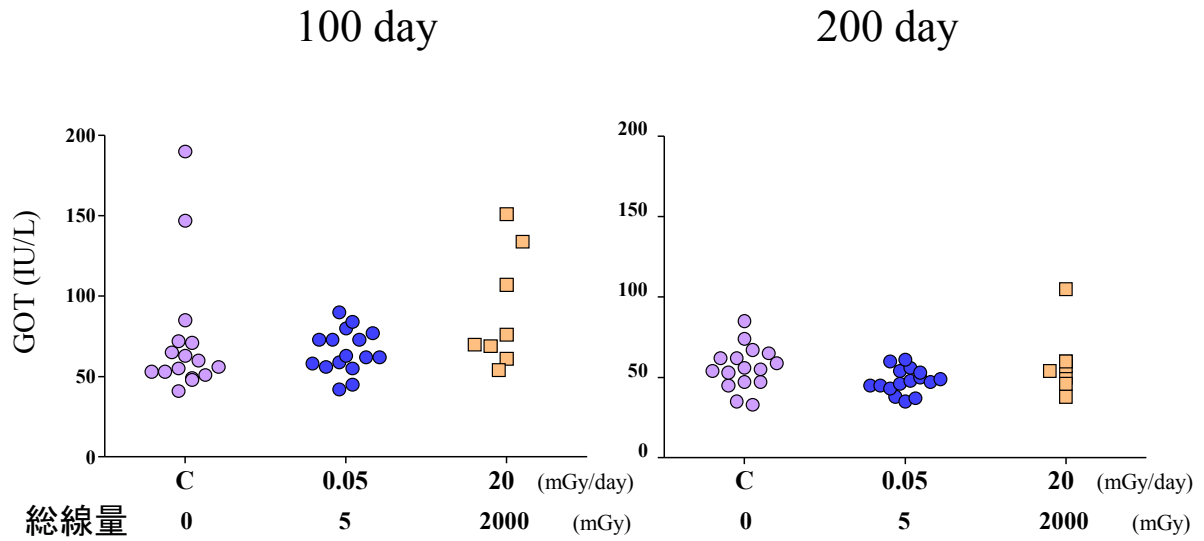


図 13 100-200 日目のグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (C : 非照射群、0.05 mGy/d : 0.05mGy/d 照射群、20 mGy/d : 20 mGy/d 照射群) : 左図 100 日, 右図 200 日

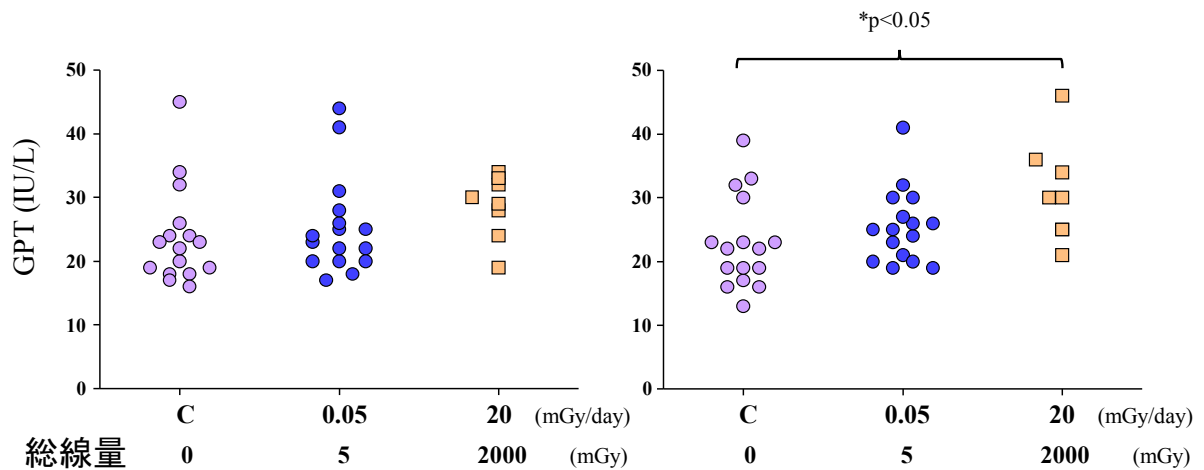


図 14 100-200 日目のグルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (C : 非照射群、0.05 mGy/d : 0.05mGy/d 照射群、20 mGy/d : 20 mGy/d 照射群) : 左図 100 日, 右図 200 日)

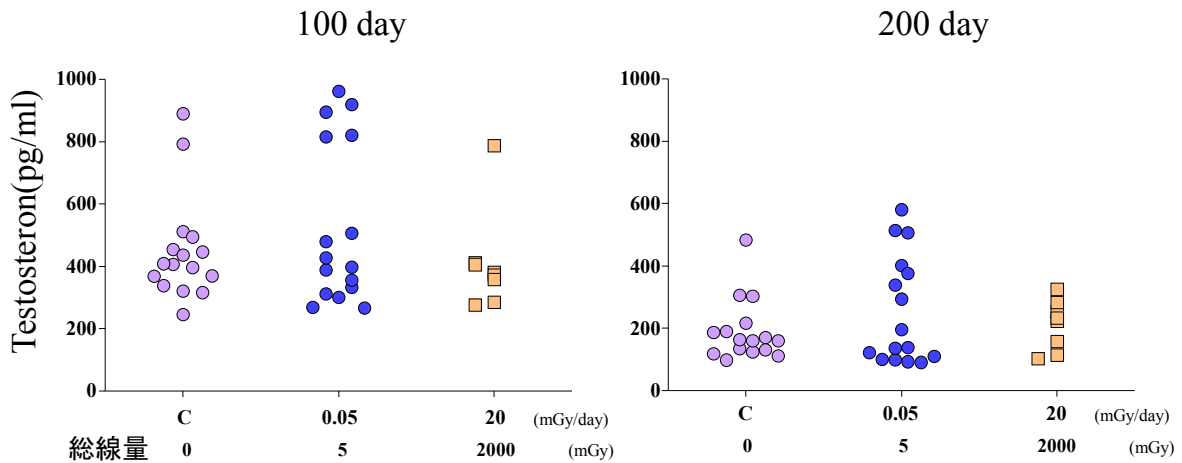


図 15 100-200 日目のテストステロン量 (C : 非照射群、0.05 mGy/d : 0.05mGy/d 照射群、20 mGy/d : 20 mGy/d 照射群)

## 5. 病理標本解析

低線量率放射線照射後 100-200 日目に解剖を行ったマウスの精巣組織標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行い、形態変化を解析した。その結果、極低線量率照射群 (0.05 mGy/22 時間/日) において形態の異常は観察されなかった。一方、20 mGy/22 時間/日の照射群は 25%のマウスで精細管萎縮の傾向が見られた。その他の臓器部位 (肝臓、脾臓、肺、ハーダー腺) の病理解析は、現在、病理標本作成中であり、今後観察する予定である。

## 6. 肝臓での遺伝子発現解析

これまでの、脂肪細胞の分子生物学的解析によって、脂肪幹細胞の脂肪分化に働く重要な遺伝子として PPAR $\gamma$  が知られている。また、肝臓病変である脂肪肝でも PPAR $\gamma$  の活性化が重要であることが報告されている。そこで、採取した 100、200 日目の肝臓組織を用いて、PPAR $\gamma$  の遺伝子発現を解析した。その結果、100 日目では極低線量率照射群 (0.05 mGy/22 時間/日) において発現増加し、200 日目では両照射群 (0.05 mGy/22 時間/日、及び 20 mGy/22 時間/日) において発現増加することが分かった (図 16)。この結果は、照射群の肝臓において、PPAR $\gamma$  遺伝子の発現が亢進することにより、肝臓が脂肪化する可能性を示唆している。



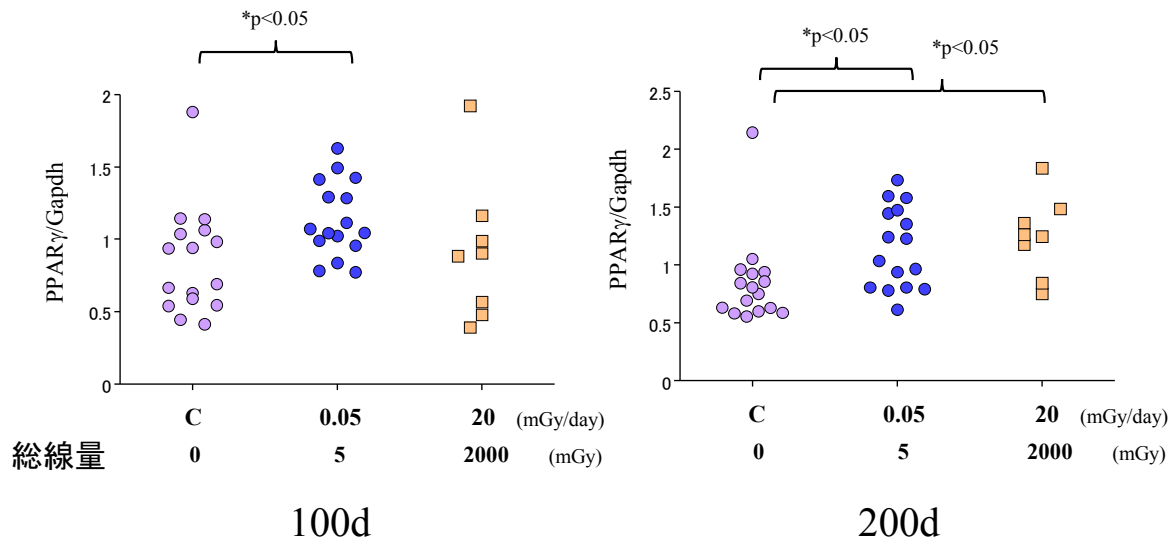


図 16 100-200 日目の肝臓における PPAR $\gamma$  遺伝子の発現量 (C : 非照射群、0.05 mGy/d : 0.05 mGy/d 照射群、20 mGy/d : 20 mGy/d 照射群)

#### IV 考察

現在までの結果、極低線量率 (0.05mGy/d)照射群のマウスは非照射群より体重が重く、血糖値、総コレステロール値の上昇が見られた。これらの結果は、極低線量率 (0.05mGy/d)照射群のマウスは非照射群より体重その他の生化学的検査で肥満傾向にあることを示す。さらに、去勢処置を行ったマウス実験の体重測定の結果、去勢処置がマウスの体重増加を引き起こすことが分かった。去勢したマウスの体重が増加することは過去に報告されており、この原因は、去勢により皮下および内臓の白色脂肪組織重量が増加することで体重が増加するとされている。一方、極低線量率 (0.05 mGy/22 時間/日) 放射線照射マウスでは、去勢による肥満影響のほうが強いためか、極低線量率照射した去勢マウス群と去勢した非照射群の間に体重の有意な差は見られなかった。去勢による肥満が耐糖能への影響によるものと報告されている知見から考えて、去勢処置が極低線量率放射線照射群で見られる体重増加を打ち消す効果は、極低線量率放射線照射も去勢処置による効果と同様の解糖系や脂質代謝系に影響を及ぼしている可能性を示唆する。また、過去に低線量率放射線照射が糖尿病の改善や肥満を引き起こす等の知見が報告されていることから、本実験結果もまた、極低線量率放射線照射がマウスの糖代謝系になんらかの影響を及ぼす可能性を示唆しているのかもしれない。一方、100-200 日目までの血清解析の結果、当初予想していた極低線量率照射による性ホルモン (テストステロン) 量の有意な変化は見られなかった。また、100 日目の時点では、極低線量率照射したマウス精巣の病理学的所見にも異常は見られなかった。一方、200 日目の時点で、極低線量率照射群で精巣相対重量の減少が見られる結果から、200 日間の極低線量率照射が精巣になんらかの影響をあたえている可能性も考えられる。肝腫瘍発生については、700 日目までの全マウスを観察して、解剖総数での肝腫瘍発生率を最終結果としたい。一方、肝臓の遺伝子発現解析の結果、極低線量率 (0.05 mGy/d) 照射群で初期の脂肪肝生成にとって重要な肝臓中の PPAR $\gamma$ 遺伝子の発現上昇が見られた。近年、脂肪肝が肝腫瘍を惹起することが報告されていることから、極低線量率 (0.05 mGy/d) 照射群で見られる体重増加が肝腫瘍発生に影響を及ぼしている可能性が考えられる。今後、採取した肝臓標本の病理解析等によって、脂肪肝発

生割合についても解析していきたい。現在までの結果から考察しうる結果をまとめると、「極低線量率 (0.05 mGy/d) 照射→体重増加→肝臓での脂肪蓄積」という代謝への影響が起こっている可能性が考えられる。

## V 結論

マウスへの極低線量率 (0.05 mGy/22 時間/日) 放射線照射による健康影響に関しては、当初予想していたよりも代謝系などの多くの項目で変化が見られたため、今後どのような原因で代謝変化が見られるかを検討する必要がある。しかしながら、従来の放射線影響の原因因子となる DNA 損傷量などの結果から考慮した際、極低線量率放射線照射がこれほどまで検出可能な影響を与えることは、想定を超える結果であった。そのため、今回見られた代謝系への影響は通常的生活習慣の乱れでも起こりうる現象であるため、高線量率照射を用いた実験では考慮する必要がなかったような飼育環境などの環境要因が実験結果に影響している可能性も否定できない。そのため、本実験で得られた結果に関しては、照射による影響以外の可能性も十分に考慮し、慎重に極低線量率 (0.05 mGy/22 時間/日) 放射線照射による影響の有無に関して結論を出さなければいけないと考える。今後、非常に微弱な影響である極低線量率低線量放射線照射影響を詳細に論ずるためには、厳密に飼育環境を同一にし (飼育部屋の構造等の考慮)、かつ、マウスの生産ロットによる差をなくすような繰り返しの大規模実験を行い証明する必要があることを提言する。

## VI 次年度以降の計画

現在まで遅滞なくマウスの照射実験が行われていることから、次年度の計画では 400 日目以降の極低線量率照射マウスの組織サンプリング及びデータ取得が可能であると考えられる。また、今後、加齢に伴い肝腫瘍発生頻度が増えることが予測されることから、より詳細な極低線量率照射群における肝腫瘍発生割合が解析できると考える。また、去勢したマウスの解剖は照射開始から 600 日後に行われる予定で、次年度は去勢による肝腫瘍発生割合についても明らかにできる。最終年度はこれら 3 年間の実験結果をまとめ、最終的な極低線量率放射線照射影響についての知見を報告できると考える。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Sugihara T., Murano H, Nakamura M, Tanaka K. In vivo partial bystander study in a mouse model by chronic medium-dose-rate  $\gamma$ -ray irradiation. *Radiat Res.* (2013), 179(2), 221-31.
- 2) Sugihara T., Murano H, Tanaka K. Increased  $\gamma$ -H2A.X Intensity in Response to Chronic Medium-Dose-Rate  $\gamma$ -Ray Irradiation. *PLoS One.* (2012), 7(9), e45320.
- 3) Sugihara T., Murano H., Nakamura M., Ichinohe K., Tanaka K., Activation of interferon-stimulated genes by  $\gamma$ -ray irradiation independently of the ataxia telangiectasia mutated-p53 pathway. *Mol Cancer Res.* (2011), 9(4), 476-484.
- 4) Sugihara T., Murano H., Nakamura M., Ichinohe K., Tanaka K., p53-mediated gene activation in mice at high doses of chronic low-dose-rate  $\gamma$  radiation. *Radiat Res.*, (2011), 175, 328–335.
- 5) Sugihara T., Murano H., Tanaka K., Oghiso Y., Inverse dose-rate-effects on the expressions of extra-cellular matrix-related genes in low-dose-rate  $\gamma$ -ray irradiated murine cells *J Radiat Res*

(Tokyo). (2008), 49(3), 231-40.

- 6) Tsuruga, M., Taki, K., Ishii, G., Sasaki, Y., Furukawa, C., Sugihara, T., Nomura, T., Ochiai, A., and Magae, J. Amelioration of Type II Diabetes in db/db Mice by Continuous Low Dose-Rate  $\gamma$ -Irradiation, *Radiat Res.* (2007) 167, 592–599.
- 7) Sugihara T., Magae J, Wadhwa R, Kaul SC , Kawakami Y, Matsumoto T, Tanaka K. Dose and dose-rate effects of low-dose ionizing radiation on activation of Trp53 in immortalized murine cells. *Radiat Res.*, (2004) 162(3):296-307

#### 総説 (和文)

- 1) 杉原 崇、田中公夫 低線量率放射線によるマウス培養細胞への影響 放射線科学 (2005) 48, 118-122
- 2) 杉原 崇 低線量率放射線照射された培養細胞の細胞応答とその分子機構 放射線生物 (2005) 40,(2) 156-167
- 3) 杉原 崇 血清成分にみられる低線量率放射線の影響 放射線生物 (2014) 49,(1) 85-97

#### 引用文献

1. K. Taki, B. Wang, T. Nakajima, J. Wu, T. Ono, Y. Uehara, T. Matsumoto, Y. Oghiso, K. Tanaka and M. Neno, Microarray analysis of differentially expressed genes in the kidneys and testes of mice after long-term irradiation with low-dose-rate gamma-rays. *J. Radiat. Res.* (Tokyo) (2009) 50(3), 241–52.
2. Y. Uehara, Y. Ito, K. Taki, M. Neno, K. Ichinohe, S. Nakamura, S. Tanaka, Y. Oghiso, K. Tanaka, and T. Ono, Gene expression profile in mouse liver after long term low dose-rate irradiation with gamma-rays. *Radiat. Res.* (2010) 174(5), 611-617.
3. S. Nakamura, I. B. Tanaka 3rd, S. Tanaka, K. Nakaya, N. Sakata and Y. Oghiso, Adiposity in female B6C3F1 mice continuously irradiated with low-dose-rate gamma rays. *Radiat. Res.* (2010) 173(3), 333–41.
4. N. Okudaira, Y. Uehara, K. Fujikawa, N. Kagawa, A. Ootsuyama, T. Norimura, K. Saeki, T. Nohmi, K. Masumura and T. Ono, Radiation dose-rate effect on mutation induction in the spleen and liver of gpt delta mice. *Radiat. Res.* (2010) 173(2), 138–47.
5. K. Tanaka, A. Kohda, K. Satoh, T. Toyokawa, K. Ichinohe, M. Ohtaki and Y. Oghiso, Dose-rate effectiveness for unstable-type chromosome aberrations detected in mice after continuous irradiation with low-dose-rate gamma rays. *Radiat. Res.* (2009) 171(3), 290–301.
6. K. Tanaka, A. Kohda, T. Toyokawa, K. Ichinohe and Y. Oghiso, Chromosome aberration frequencies and chromosome instability in mice after long-term exposure to low-dose-rate gamma-irradiation. (2008) *Mutat. Res.* 657(1), 19–25.
7. T. Takabatake, K. Fujikawa, S. Tanaka, T. Hirouchi, M. Nakamura, S. Nakamura, I. Braga-Tanaka, K. Ichinohe, M. Saitou and K. Tanaka, Array-CGH analyses of murine malignant lymphomas: genomic clues to understanding the effects of chronic exposure to low-dose-rate gamma rays on lymphomagenesis. *Radiat. Res.* (2006) 166(1 Pt 1), 61–72.
8. T. Nakajima, K. Taki, B. Wang, T. Ono, T. Matsumoto, Y. Oghiso, K. Tanaka, K. Ichinohe, S.

- Nakamura and M. Neno, Induction of rhodanese, a detoxification enzyme, in livers from mice after long-term irradiation with low-dose-rate gamma-rays. *J. Radiat. Res. (Tokyo)*. (2008) 49(6), 661–6.
9. S. Tanaka, I. B. Tanaka 3rd, S. Sasagawa, K. Ichinohe, T. Takabatake, S. Matsushita, T. Matsumoto, H. Otsu and F. Sato, No lengthening of life span in mice continuously exposed to gamma rays at very low dose rates. *Radiat. Res.* (2003) 160(3), 376–9.
10. I. B. Tanaka 3rd, S. Tanaka, K. Ichinohe, S. Matsushita, T. Matsumoto, H. Otsu, Y. Oghiso and F. Sato, Cause of death and neoplasia in mice continuously exposed to very low dose rates of gamma rays. (2007) *Radiat. Res.* 167(4), 417–37.
11. S. Nakamura, I. B. Tanaka 3rd, S. Tanaka, K. Nakaya, N. Sakata, Y. Oghiso, Adiposity in female B6C3F1 mice continuously irradiated with low-dose-rate gamma rays. *Radiat Res.* (2010) 173(3):333-41.
12. T. Sugihara, H. Murano, M. Nakamura, K. Ichinohe, K. Tanaka, p53-Mediated gene activation in mice at high doses of chronic low-dose-rate  $\gamma$  radiation. *Radiat Res.* (2011) 175(3):328-35.
13. A. Ito, T. Takahashi, H. Watanabe, P.O. Ogundigie, T. Okamoto. Significance of strain and sex differences in the development of <sup>252</sup>Cf neutron-induced liver tumors in mice. *Jpn J Cancer Res.* (1992) 83(10):1052-6.
14. T. Nakatani, G. Roy, N. Fujimoto, T. Asahara, A. Ito, Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin. *Jpn J Cancer Res.* (2001) 92(3):249-56.
15. A. Marshall A, M. Lukk, C. Kutter, S. Davies, G. Alexander, D.T. Odom, Global gene expression profiling reveals SPINK1 as a potential hepatocellular carcinoma marker. *PLoS One.* (2013) 8(3):e59459.

# Health effects of continuously very low-dose rate irradiation exposure in male B6C3F1 mice.

Takashi Sugihara, Ignacia III Braga Tanaka, Satoshi Tanaka,

*Department of radiobiology, Institute for Environmental Sciences*

*Keywords:* Low-dose-rate irradiation, male mouse. Liver tumor, Castration, Testis

## **Abstract**

Currently, the effects of chronic Low Dose-Rate (LDR) irradiation are estimated using the data obtained from HDR radiation studies, due to the limited data on LDR radiation effects. To elucidate the health effects of LDR radiation, especially on metabolism and tumor development in the liver, male in-house specific-pathogen-free (SPF) B6C3F1 mice will be exposed to LDR gamma-rays (0.05 mGy/22hrs/day or 20 mGy/22hrs/day) for 400 days and a batch of mice will be sacrificed every 100 days until 700 days from the start of irradiation. Body weights, incidence of liver tumor, tissue weights, blood counts, and serum components will be scored, and pathological analysis and gene expression analysis will be performed. Up to the present time, mice have been sacrificed at day 100, 200, and 300 from the start of irradiation. Increased body weights, increased levels of glucose and total cholesterol in the sera of LDR (0.05 mGy/ 22hrs/ day)-irradiated mice were observed. Increased gene expression of PPAR $\gamma$ , a differentiation-initiation factor of lipid cells, was also detected in the liver of LDR-irradiated mice. These results suggest a possibility that continuous LDR irradiation may have effects on the metabolism in the liver of B6C3F1 mice.

## 小児期の生活習慣等の低線量放射線発がんリスクに及ぼす影響と 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・准教授）

柿沼志津子（国立研究開発法人放射線医学総合研究所放射線防護研究センター・チームリーダー）

大塚健介（一般財団法人電力中央研究所原子力技術研究所放射線安全研究センター・主任研究員）

### 研究要旨

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、事故の被災者をはじめ、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱いている。事故以来4年以上がたち、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ともない、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、原発事故後に置かれている被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、子ども達の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過多が、放射線の発がんリスクを修飾する要因となる可能性が指摘されており、健康リスクの低減という観点からも、その影響を明確にすることが望まれる。カロリー摂取過多の自然発がんリスクに対する影響は広く研究されているにも係わらず、カロリー摂取過多が、放射線発がんリスクにおよぼす影響は、体系的に調べられている例は極めて乏しい。このため、福島県民、とりわけ子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、生活習慣等が低線量放射線被ばくの健康影響におよぼす影響を、メカニズム論を基盤とした科学的に実証された事実を提示する研究が強く求められている。

このような背景から、本研究では、動物発がんモデルを用いた高カロリー食による肥満（Diet-induced obesity; DIO）の実験系を用い、『カロリー摂取過多により惹起される全身性の炎症性細胞の活性化が、臓器・組織の炎症反応を引き起こすことにより、放射線被ばくによる発がんリスクを上昇させる』との仮説を提唱し、これを証明する研究計画を立案した。特に、低線量（100mGy）の放射線被ばくを含む、放射線被ばくによる発がんの各プロセスでのDIOの影響を、分子・細胞・組織・個体レベルで統合的に解析する計画を立てた。対象とするがんは、動物発がんモデルにおいて小児期被ばくにより発がんリスクの増加する胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、肺がん、および消化管がんである。これらの解析に加え、放射線発がんの標的が組織幹細胞であることに留意し、カロリー摂取過多が消化管幹細胞ターンオーバーにおよぼす影響も解明する。

本研究では、長崎大学、放射線医学総合研究所（放医研）および電力中央研究所（電中研）の3機関が連携した共同研究を推進し、長崎大学では、組織におけるDNA障害、細胞死、細胞老化、および炎症反応の解析を担当、放医研では、DIO動物の長期飼育、放射線照射（100mGyおよび4Gy）、経時的標本採取、および発がん解析を担当している。一方、電中研では、DIO動物における消化管がん解析、およびDIOの消化管幹細胞影響の解析を担当している。

平成27年度は、B6C3F1マウスの飼育を開始し、4週齢から8週齢までの高カロリー餌の投与を始め、高カロリー餌摂取による体重増加を確認した。また、DIOによる全身性の炎症反応を検討するために、組織において炎症反応の主体となるマクロファージを認識する抗体を用

いた、蛍光免疫染色技術の確立に成功した。さらに、遺伝子改変により消化管幹細胞系譜追跡を可能にしたマウス (LRZ マウス) においても、高カロリー餌の投与を開始し、解析のための標本作製に着手した。

本研究課題を推進することにより、カロリー摂取過多が、低線量放射線被ばくによる健康影響にどのような影響をおよぼすかが明らかになる。また、カロリー摂取過多による放射線発がんへの影響のメカニズムが解明され、とりわけ小児期の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を低減するための、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と期待される。

キーワード: 放射線、カロリー、低線量、炎症、組織幹細胞

## 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、事故の被災者をはじめ、多くの国民が放射線被ばくによる健康影響に不安を抱いている。事故以来4年以上がたち、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ともない、「東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議」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、原発事故後に置かれている被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、子ども達における生活習慣等の変化が、放射線発がんの頻度を修飾する要因とな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過多は、放射線の発がんリスクを修飾する要因として注視する必要があると、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。カロリー摂取過多の自然発がんリスクに対する影響は広く研究されているにも係わらず、カロリー摂取過多が、放射線発がんリスクにおよぼす影響は、体系的に調べられている例は極めて乏しく、特に、低線量放射線被ばくによる発がんに限れば、カロリー摂取過多の影響を評価する科学的知見は皆無である。このため、福島県民、とりわけ子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、生活習慣等が低線量放射線被ばくの健康影響におよぼす影響を、メカニズム論を基盤とした科学的に実証された事実を提示する研究が強く求められている。

そこで本研究では、動物発がんモデルを用いた高カロリー食による肥満 (Diet-induced obesity; DIO) の実験系を用い、『カロリー摂取過多により惹起される全身性の炎症性細胞の活性化が、臓器・組織の炎症反応を引き起こすことにより、放射線被ばくによる発がんリスクを上昇させる』との仮説を提唱し、これを証明する研究計画を立案した。特に、低線量 (100mGy) の放射線被ばくを含む放射線被ばくによる発がんのプロセスを、①DNA 障害の誘発と除去、②細胞死を含む初期組織反応、③組織障害の回復、④初期がん発がん微小環境、および、⑤がんの成立と進展、とに分け、各プロセスでの DIO の影響を、分子・細胞・組織・個体レベルで統合的に解析する事を目的としている。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増加する、胸腺・脾臓リンパ腫、肝がん、肺がん、および消化管がんである。これらの解析に加え、放射線発がんの標的が組織幹細胞であることに留意し、消化管幹細胞の動態を追跡できるように工夫した遺伝子改変マウスを用いて、カロリー摂取過多が消化管幹細胞ターンオ

ーバーにおよぼす影響も解明する事を目標にしている。

## II. 研究方法

本研究は、3 研究機関の連携による共同研究として計画されたもので、研究全体の概要は以下のとおりである。まず、発がん実験においては、放医研において放射線照射を行ったマウスに、小児期に相当する期間に高カロリー餌を与え、その後、長期飼育をすることによってがんの発生を解析する。具体的には、放医研において、B6C3F1 雄マウス（1 群 60 匹）に、1 週齢で放射線（ $\gamma$ 線（0.5Gy/分）、100mGy および 4Gy）を照射し、その後、4 週齢から 8 週齢まで高カロリー餌を与えて DIO を誘導し、その後通常餌にもどしてから 700 日目までの長期飼育を行う。放射線照射後は一定期間（100 日）ごとに組織標本を採取して、発がんの継時観察を実施する。対象とするがん種は、小児期被ばくにより発がんリスクが上昇する、リンパ腫、肝がん、および肺がんである。また、採取した組織は、長崎大学において、DNA 損傷、細胞死、組織反応、および炎症反応の解析を行う。電中研では、幹細胞系譜追跡系導入（LRZ）マウスにおいて、同様のプロトコルにより DIO を誘導し、消化管幹細胞におよぼす影響を評価すると同時に、消化管がんの発生におよぼす影響を解析する。また、採取した組織は、長崎大学に送付し、DNA 損傷や細胞死、炎症反応の解析を行った。

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試料である。単位重量あたりのカロリー量は、コントロール餌（D12450B、10%脂肪）にくらべおおよそ 140%増加しており、多くの DIO 研究の標準試料として汎用されているものである。

### 1. 組織における DNA 障害および組織反応の解析

DIO あるいは放射線による DNA 障害あるいは組織反応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、肝臓および肺を、ホルマリン中で固定後にパラフィン包埋し、薄切標本（厚さ 4  $\mu$ m）を作成して解析に用いた。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、賦活化液中で 95°C のウォーターバスに 30 分浸け、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、Alexa546 標識の抗ウサギ IgG 抗体及び Alexa647 標識の抗ラット IgG 抗体を用いた。標本は、1  $\mu$ 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) を用いた。組織障害および回復の解析には、抗 Ki-67 抗体 (DAKO, TEC-3 もしくは Biologend, 16A8) を用いた。炎症反応は、組織におけるマクロファージの浸潤を、マクロファージに対する特異的抗体を用いた蛍光免疫染色法により解析した。

### 2. DIO による放射線発がん影響解析（詳細は分担研究者の報告書を参照）

B6C3F1 マウスを用いて、DIO の誘導、放射線照射および発がん解析を実施する。DIO の誘導



は、4 週齢から 8 週齢まで高カロリー餌を与えることにより行う。また、放射線照射との組み合わせを行う場合には、1 週齢で放射線（γ線（0.5Gy/分）、100mGy および 4Gy）を照射し、4 週齢から DIO を誘導する。その後、通常餌にもどしてから 700 日の長期飼育を行う。放射線照射後には、一定期間（100 日）ごとに対象とする臓器・組織における発がんの継時観察を平成 29 年度にかけて実施する。解析するがんは、リンパ腫、肺がんおよび肝がんである。合わせて、解析のための組織標本を作成し、主任研究者と協働により研究項目 1 の解析を実施する。対象とする組織は、胸腺、脾臓、骨髄、肺および肝臓である。

### 3. 消化管幹細胞の組織動態変化（詳細は分担研究者の報告書を参照）

遺伝子改変により消化管幹細胞系譜追跡法を可能にしたマウス（LRZ マウス）（1 群 5～10 匹）において、幹細胞のターンオーバーに与える DIO の影響を解析する。DIO の誘導は、LRZ マウスに高カロリー餌を与えることにより行う。放射線照射との組み合わせの場合には、1～2 週齢で放射線（X線、0.5Gy/分、0.1～4Gy）を照射し、3～4 週齢から DIO を誘導する。幹細胞ターンオーバーへの影響は、Lgr5 プロモーターに制御される LacZ の発現の有無により評価する。

また、大腸炎症関連がんモデルを用いて、放射線による大腸がんの誘発に対する DIO の効果（1 群 5～10 匹）を 18～20 週齢後までの期間において検証し、放射線発がんにおける組織幹細胞に対する DIO の影響を解明する。

（倫理面への配慮）

本研究は、動物実験を行うにあたっては、国内の動物実験指針を遵守し、照射実験を行う環境科学技術研究所の動物実験委員会等の承認を受けた上で、同所の動物実験ガイドラインを遵守して実験を行った。

### III. 研究結果

平成 27 年度は、DIO による全身性の炎症反応を検討するために、組織において炎症反応の主体となるマクロファージを認識する抗体を用いた、蛍光免疫染色技術の確立を目指して以下の研究を実施した。

まず、組織標本は、95℃の温浴で抗原賦活化処理を行い、一次抗体と反応させることとした。組織における、DNA 損傷の検出には抗 53BP1 抗体（Bethyl、A300-272）を用いた。また、組織障害および回復の解析には、抗 Ki-67 抗体（BioLegend、16A8）を用いた。これらの一次抗体は、前年度まで実施していた事業において使用していたもので、既に蛍光免疫染色の条件設定を済ませている。

次に、組織炎症反応を検出するために、炎症反応に関わる炎症性細胞に対するマーカーを検討した。最も代表的な炎症性細胞はマクロファージであるが、マクロファージを可視化する抗体として、F4/80 および CD11b（MAC1）に対する抗体の有用性を検討した。その結果、5 種類の抗 F4/80 抗体を選択し入手した。このうち 4 種類はウサギ由来の抗体で、1 種類がラット由来の抗体である。また、2 種類がマウス由来の抗原を用いて作成され、残りの 3 種類はヒト由来の抗原を用いて樹立された抗体である。マクロファージの存在が確認されている肝臓の標本を用いて、5 種類の抗体を評価した。その結果、3 種類の抗体では一切のシグナルが検出できなかった。残りの 2 種類の抗体は、マクロファージと思われる特徴的な形態を持つ細胞を認識しているのがわか

った。これらの抗体は、異なる動物種由来の抗体であったので、この2種類の抗体を同時に反応

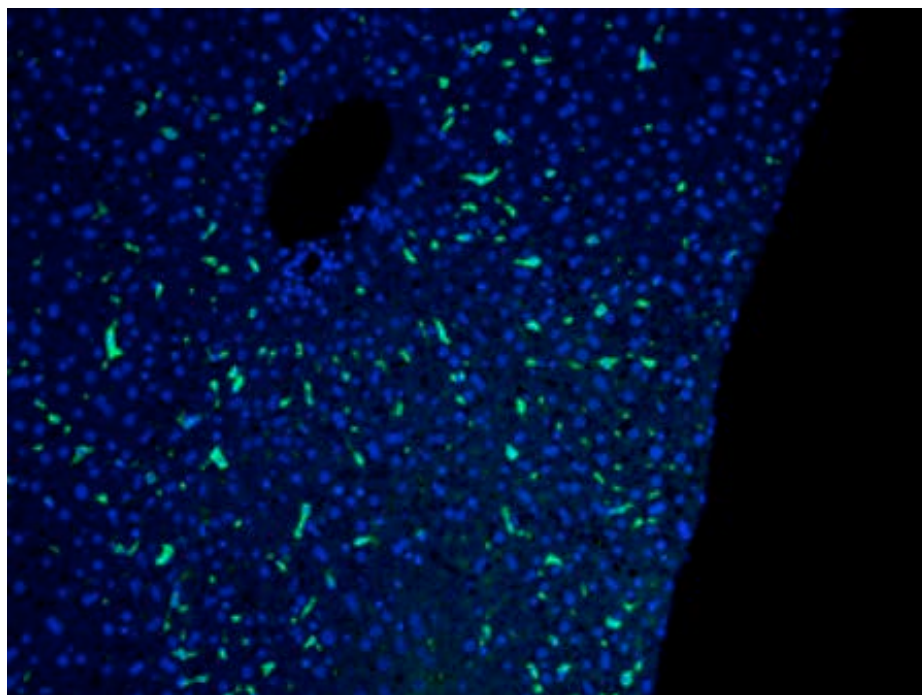


図1 肝臓における F4/80 陽性マクロファージの検出

させて、シグナルの比較を行った。その結果、両者のシグナルは一致することがわかり、共にマクロファージを可視化する有用な抗体であることを明らかにした。

一方、抗 CD11b 抗体については、組織染色に適当なものが少なく、唯一利用可能であったラット由来の抗体を入手したが、マクロファージのシグナルは得られなかった。

組織における炎症性反応に関わる細胞として、F4/80 陽性のマクロファージとは別に、NKT 細胞の検出も試みた。NKT 細胞は、T 細胞の特徴と NK 細胞の特徴を合わせ持つ細胞で、サイトカインの分泌を介して炎症反応を仲介する。そこで、NK 細胞も含む NKT 細胞の特異的マーカーとして知られる NK-1.1 に対する抗体を探した。その結果、組織標本に適用可能であるとされる3種類の抗体を入手し、NKT 細胞が存在するとされる胸腺および肝臓でシグナルの有無を検討した。その結果、いずれの抗体も特異的なシグナルを示すことはなく、利用できる抗体は見つけれなかった。

#### 4. 分担研究者の研究成果概要

##### 【柿沼志津子】

##### 1. 高カロリー餌の投与による DIO 誘導

B6C3F1 雄マウスの1週齢時に0、0.1、または4 Gy を照射後、4週齢からカロリーの異なる餌で4週間飼育し、その後通常餌で生涯飼育を行う6群を設定した。飼育観察および体重測定を継続しながら、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解剖に供し、病理サンプルの保存および解析を行う準備を完了した。

これまでに、カロリー餌投与後の4週齢から8週齢までの体重の測定を終了した。その結果、まず、カロリー餌の投与前は、4 Gy 照射群で20%弱の体重抑制を認めた。一方、0 Gy および

0.01 Gy 照射群では、体重の変化は認められなかった。また、4 週齢からの、カロリー餌投与後は、高カロリー食の 60%脂肪食では、10%脂肪食に比べて有意な体重の増加を認めた。

#### 【大塚健介】

### 2. 小児期の生活習慣等による消化管幹細胞の組織動態変化と放射線発がんリスクに及ぼす影響評価

消化管幹細胞 (Lgr5 幹細胞) で、タモキシフェン (4OHT) の投与に依存して時期特異的に組織換えを誘導し、その子孫細胞をレポーター遺伝子 (LacZ) で標識させるマウス (Lgr5-EGFP-CreERT2 / ROSA26-LSL-LacZ マウス、以下 LRZ マウス) の飼育を開始した。平成 27 年度は、肥満個体と非肥満個体において幹細胞維持能にどれだけの違いがあるのかを相互比較し、高脂肪食を摂取した場合に消化管幹細胞のターンオーバーにおよぼす影響を明らかにするために、LRZ マウスに離乳直後(約 3~4 週齢)から 1 か月間、60kcal%ラードを含む高脂肪食 (Research Diet 社、型番 D12492) を与えた。高脂肪食を与えている期間は、週に 2 回、餌を交換し、体重および摂餌量の測定を行った。比較のため、同じカロリーで低脂肪 (10kcal%脂肪, 35kcal%スクロース) の対照食 (Research Diet 社、型番 D12450B) を与えたマウスの体重および摂餌量の測定を行った。1 か月間の高脂肪食および対照食を与えた後、すべてのマウスの餌を通常食に切り替えた。その結果、高脂肪食を与えた群で、週あたりの顕著な体重増加が認められた。また、成体マウス (10~15 週齢) になった時点で解剖し、幹細胞系譜追跡法 (Lineage tracing) により標識された組織単位 (LacZ<sup>+</sup>クリプト) の割合を測定したところ、対象食群との違いは観察されなかった。

## IV. 考察

### 1. 組織における炎症反応検出技術の確立

組織炎症反応を検出するためには、炎症性細胞の特定をはじめ、炎症性サイトカインの測定、や DAMPs の測定等の方法がある。炎症性細胞も多岐にわたり、マクロファージ以外にも樹状細胞や好中球、NKT 細胞などが炎症の惹起に関与している。本研究では、これらの指標の中で、マクロファージを選び、細胞の組織内での分布を特定することで、炎症性反応の時空間的解析を実施することとした。その理由は、例えば、発がんの初期変化が組織内に合った場合、まず炎症性サイトカインや DAMPs の測定は無意味だからである。また、炎症細胞の中でも、炎症反応の惹起から持続までの全てのプロセスに関わる細胞として、マクロファージの測定が最も適切だからである。

つぎに、マクロファージを特定する方法として、蛍光免疫染色法を選択した。これまでも、フローサイトメトリーによるマクロファージの解析が一般的に行われてきたが、本事業では、組織内での位置情報が最も重要な要因であるため、組織における免疫染色法を選択した。マクロファージを可視化する抗体として、一般的に、F4/80 および CD11b (MAC1) 抗原に対する抗体が用いられている。しかしながら、その多くは、フローサイトメトリー用であるため、まずこれら抗体の組織染色における有用性を検討した。数多くの抗体が販売されている中でパラフィン固定の組織染色に応用できるものをまず選別した。通常、組織の固定にはホルマリンが用いられ、その後パラフィン中に包埋されるが、別の方法として、凍結標本を作製する必要があるが、同じ組織標本でも、パラフィン包埋標本と凍結標本では、適用できる抗体が異なる場合があるので、ホルマリン固定-パラフィン包埋標本に適用のある抗体を選んだ。さらに、標本における蛍光二

重染色を可能にするために、ウサギあるいはラットに由来する抗体を探した。一般的には、マウス由来のモノクローナル抗体が汎用されるが、本研究で用いている実験動物がマウスであるために、マウス由来の一次抗体を用いると、一次抗体を検出するために用いる抗マウス免疫グロブリンに対する蛍光標識二次抗体が、本来マウスの組織中に存在する免疫グロブリンを産生する B 細胞に反応して、内在性の蛍光シグナルの原因になってしまう。とりわけ、免疫系の細胞の多い脾臓などでは、二次抗体に由来するシグナルが多数検出され、目的とする細胞由来のシグナルと区別がつかなくなる。このような理由から、可能な限り、マウス以外の動物種に由来する一次抗体を探した。

さらに、抗体を作成する時に、抗原をどの動物種から入手したかにも注意を払った。一般的には、ヒト由来の蛋白質やペプチドが抗原としてよく用いられるため、ヒト細胞に対する特異性が高い抗体が多いが、その抗原のアミノ酸配列が種を超えて保存されている部分を選んでいる場合には、他の動物種にも反応する可能性が出てくる。最近では、抗原を選ぶ時に、多種にもホモロジーのある配列を選ぶことが多いので、抗原がヒト由来であっても、他の動物種に交差することも多い。しかしながら、逆に、共通したアミノ酸配列を選んでいても、他種には交差しない場合や、あるいは特異性が低い場合も多く、実際には利用できないことも多く経験している。そのため、最初から、マウス由来の抗原を元に作成された抗体を積極的に検索した。

その結果、5 種類の抗 F4/80 抗体を選択し入手した。このうち 4 種類はウサギ由来の抗体で、1 種類がラット由来の抗体であった。また、2 種類がマウス由来の抗原を用いて作成され、残りの 3 種類はヒト由来の抗原を用いて樹立された抗体である。マクロファージの存在が確認されている肝臓の標本を用いて、5 種類の抗体を評価したところ、2 種類の抗体は、共にマクロファージを可視化する有用な抗体であることが明らかになった。これらの抗体は、幸いなことに 1 つがラット由来の抗体、もう 1 つはウサギ由来の抗体であるため、DNA 損傷や細胞死、あるいは組織反応を検討する抗体との二重染色の選択肢が広がった。

組織における炎症性反応に関わる細胞として、F4/80 陽性のマクロファージとは別に、NKT 細胞の検出も試みた。NKT 細胞は、T 細胞の特徴と NK 細胞の特徴を合わせ持つ細胞で、サイトカインの分泌を介して炎症反応を仲介する。そこで、NK 細胞も含む NKT 細胞の特異的マーカーとして知られる NK-1.1 に対する抗体を探した。その結果、組織標本に適用可能であるとされる 3 種類の抗体を入手し、NKT 細胞が存在するとされる胸腺および肝臓でシグナルの有無を検討したが、いずれの抗体も特異的なシグナルを示すことはなく、利用できる抗体は見つけられなかった。

以上の結果から、平成 27 年度に確立したマクロファージの蛍光免疫染色による検出法は、組織における DIO による炎症性反応を時空間的に解析する有用な手法であると結論できる。

## V. 結論

平成 27 年度は、B6C3F1 マウスの飼育を開始し、4 週齢から 8 週齢までの高カロリー餌の投与を終了し、DIO による体重増加を確認した。また、DIO による全身性の炎症反応を検討するために、組織において炎症反応の主体となるマクロファージを認識する抗体を用いた、蛍光免疫染色技術の確立に成功した。さらに、遺伝子改変により消化管幹細胞系譜追跡を可能にしたマウス (LRZ マウス) においても、高カロリー餌の投与を開始し、標本の作成に着手した。

## VI. 次年度以降の計画

平成 28～29 年度は、DIO 動物の飼育を継続し、100 日毎に、対象とする臓器・組織における発がんの継時観察を行う。特に、平成 28 年度からは、当初の研究計画書では予定していなかった 1 Gy 照射群を加えて、発がん実験ならびに組織解析に着手する。発がん実験に合わせて、組織標本作製し、DIO による DNA 損傷および細胞死の誘導、組織反応および炎症反応の解析を行う。また、放射線照射による DNA 損傷や細胞死、初期組織反応に対する DIO の影響も解析する。さらに、DIO 動物の長期飼育を継続し、照射後 700 日程度までの組織反応を解析すると共に、微小がん誘発の解析と発がん微小環境の解析を行う。加えて、DIO の消化管幹細胞ターンオーバーへの影響を、放射線照射による影響と合わせて解析し、大腸炎症関連発がん実験にも着手する。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

該当なし

引用文献

- 1) Wolf MJ, Adili A, Piotrowitz K, et al. Metabolic activation of intrahepatic CD8+ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer Cell*, 2014; 26, 549-564.

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

Keiji Suzuki<sup>\*1</sup>, Shizuko Kakinuma<sup>\*2</sup>, Kensuke Otsuka<sup>\*3</sup>

<sup>\*1</sup>*Department of Radiation and Life Sciences, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences*

<sup>\*2</sup>*National Institute of Radiological Sciences*

<sup>\*3</sup>*Radiation Safety Research Center, Nuclear Technology Research Laboratory, Central Research Institute of Electric Power Industry*

*Keywords:* Radiation, Calorie, low-dose, inflammation, tissue stem cells

## **Abstract**

After the accident at the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant 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 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 particular, physical inertia may cause life-style-related complications, one of which is an excess calorie intake. Resulted obesity must be one of the health problem that should take into consideration.

Accumulating evidences so far have implicated notable relationship between obesity and multiple types of cancer. However, little is known about the effect of obesity on radiation-induced cancer. Therefore, we have intended to determine whether an excess calorie intake affects the cancer risks from low-dose ionizing radiation. Our final goal is to define the mechanisms underlying the possible interaction between an excess calorie intake and radiation exposure.

Current study has applied the diet-induced obesity (DIO) mouse model, which is widely used to study the effects of obesity. Our hypothesis is that an excess calorie intake could cause systemic inflammation, resulting in alteration of tissue microenvironments to promote radiation carcinogenesis. To prove the hypothesis several tissues and organs, which are the target of radiation-induced cancer, are obtained from DIO mouse, and DNA damage, cell death, tissue recovery, as well as local inflammation are investigated. Also, sequential analyses for up to 700 days is carrying out to find out microcarcinomas and cancers. Considering that tissue stem cells are the origin of cancer, effects of an excess calorie intake on the turnover of tissue stem cells is examining in the small and large intestines. Our results should provide a fundamental scientific basis towards the possible countermeasures for mitigation of any possible risks from low-dose/low-dose-rate radiation exposure.

# DIO による放射線発がん影響解析

柿沼志津子

(国立研究開発法人放射線医学総合研究所放射線防護研究センター・チームリーダー)

## 研究要旨

本研究計画は、小児期の生活習慣等の変化が低線量放射線の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、『カロリー摂取過多が全身性の炎症を惹起することにより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小児期の高カロリー食による肥満 (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放射線被ばくによる発がんのプロセスを、①DNA 障害の誘発と除去、②細胞死を含む初期組織反応、③組織障害の回復、④初期がん発がん微小環境、および、⑤がんの成立と進展、とに分け、各プロセスでの DIO の影響を、分子・細胞・組織・個体レベルで統合的に解析する。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。

本分担研究では、B6C3F1 マウスを用い、幼若期での放射線照射 (100mGy および 4Gy) とその後の高脂肪食による DIO の誘導、および終生飼育による発がん解析を実施する。年次計画としては、平成 27 年度は、DIO 動物の飼育を開始し、DIO による DNA 損傷、細胞死、炎症の誘導解析のための標本作製を行った。これまでに、年度内に研究計画書に記載した実験群を設定し、終生飼育を開始した。また、標本作製のための実験群も設定し、サンプル保存を開始した。4 週齢からの高カロリー食の投与開始後に、明らかな体重増加が認められ、本実験の設定は計画したとおりに進行している。

キーワード：低線量、100mGy、高カロリー食、肥満 (Diet-induced obesity; DIO) モデル

## 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いている。事故後 4 年以上がたち、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、「東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議」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、原発事故後に置かれている被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、子どもにおける生活習慣等の変化が、放射線発がんの頻度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過多は、放射線の発がんリスクを修飾する要因として注視する必要があると、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。カロリー摂取過多の自然発がんリスクに対する影響は広く研究されているにも係わらず、カロリー摂取過多が放射線発がんリスクにおよぼす影響

が体系的に調べられている例は極めて乏しく、特に、低線量放射線被ばくによる発がんに限れば、カロリー摂取過多の影響を評価する科学的知見は皆無である。このため、福島県民、とりわけ子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、生活習慣等が低線量放射線被ばくの健康影響におよぼす影響を、メカニズム論を基盤とした科学的に実証された真実を提示する研究が強く求められている。

そこで本研究では、動物発がんモデルを用いた高カロリー食による肥満 (Diet-induced obesity; DIO) の実験系を用い、『カロリー摂取過多により惹起される全身性の炎症性細胞の活性化と炎症性サイトカインの分泌が、臓器・組織の炎症反応を引き起こすことにより放射線発がんリスクを上昇させる』との仮説を提唱し、これを証明することを目的とした。

本研究課題の実施により、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期待される。また、カロリー摂取過多による放射線発がんへの影響のメカニズムが世界で初めて解明され、とりわけ小児期の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を提供できる。

## II. 研究方法

当研究所では、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。当グループでは、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を行うため、全てのマウス飼育が終了するためには3年半が必要であるが、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され、中間段階での発がんリスク解析を取りまとめる。なお、研究期間が終了後も、本発がん実験は、最後まで飼育を継続し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

B6C3F1 雄マウスの1週齢時に0、0.1、または4 Gyを照射後、4週齢からカロリーの異なる餌(10%食と60%食)で4週間飼育し、その後通常餌で生涯飼育を行う6群(1群60匹、計360匹)を設定した。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解剖し、病理サンプルの保存および解析を始めた。寿命短縮や特にリンパ腫、肝がん、肺がんに着目して各実験群におけるリスクの違いの解析に着手した。

1週齢マウスは、妊娠後期マウスを購入し実験を行う環境で出産させ、母マウスあたり6匹を付けて体重のばらつきが小さくなるようにした。B6C3F1 妊娠後期マウスは、平均8匹のマウスを出産するので、25腹購入すると雄100匹を準備できる。従って、680匹を準備するためには、妊娠後期マウス170腹を必要とした。

各実験群の条件とマウスの匹数 (計 680)

実験群	線量 (Gy)	餌 (カロリー)	終生飼育 (匹)	サンプリング (匹)
1	0	10%	60	40
2	0	60%	60	40
3	0.1	10%	60	50
4	0.1	60%	60	50
5	4	10%	60	70
6	4	60%	60	70



飼育餌について：

10%食：D12492 と 60%食：D12450J Research Diet 社を使用した。これらの餌は Sucrose 7% で統一されており脂肪分のみが各々10%と 60%に調整されている。SPF 環境での飼育のため、10kGy 照射滅菌餌を当研究所の動物管理室であらかじめ無菌試験検査を行い使用可能なことを確認した。通常餌は、MBR-1、30kGy 照射滅菌餌、船橋ファームを使用した。

## 2) DIO による放射線発がん影響のメカニズムの解析のためのサンプル供与

上記と同様に実験群を設定し、高カロリー食による臓器の変化（4, 5, 8 週齢）、通常餌に戻してから臓器の変化（9, 12 週齢）、および発がん過程の変化を 100 日目から 700 日目まで 100 日毎に各群 3 匹を解剖し、病理標本を作成する実験に着手した（計 12 ポイント）。また、同サンプルの一部を長崎大学で免疫染色解析するために供与を開始した。長期的には照射群や高カロリー群で発がん率が上昇し、サンプル採取予定時にマウスの匹数が減少することが予想される。これまでの経験から予定解剖ポイントでのマウス数の減少を考慮して、実験設定時のマウスの匹数を多めにした。非照射群で 40 匹、0.1Gy 照射群で 50 匹、4Gy 照射群で 70 匹を順次設定した。設定したマウス数は、上記表に示すように計 680 匹である。

### 研究方法の概要



解剖時は、胸腺、脾臓、骨髄、肺、肝臓、白色脂肪、赤色脂肪、血清を採取し、臓器は、ホルマリン中で固定後にパラフィン包埋し、または、臓器と血清は凍結保存した。その後、4 ミクロンの厚さで薄切標本を作成して、脱パラフィン処理後に、PBS 中に凍結保存した。

### (倫理面への配慮)

本研究は、動物実験を行うにあたっては、国内の動物実験指針を遵守し、照射実験を行う環境科学技術研究所の動物実験委員会等の承認を受けた上で、同所の動物実験ガイドラインを遵守して実験を行った。放射線医学総合研究所における動物実験計画の承認番号は 15-1016、研究課題名は「小児期の生活習慣などの低線量放射線発がんリスクのメカニズム解明」として実験実施期間は 2015 年 8 月 25 日開始として承認された。

### III. 研究結果

#### 1. DIO による放射線発がん影響解析

B6C3F1 雄マウスの 1 週齢時に 0、0.1、または 4Gy を照射後、4 週齢からカロリーの異なる餌（10%食、60%食）で 4 週間飼育し、その後通常餌で生涯飼育を行う 6 群（1 群 60 匹、計 360 匹）を順次設定中で、隔週で 120 匹ずつが搬入予定である。設定した実験群については、飼育観察および体重測定を継続している。

カロリー餌投与後の 4 週齢から 12 週齢までの体重を下図に示した。カロリー餌の投与前の 4 週齢では、0Gy および 0.1Gy では差は認められないが、4 Gy 照射群で明らかな体重抑制が認められた。カロリーの体重に対する影響は、高脂肪食の投与直後から観察され 60%脂肪食で 10%脂肪食に比べて有意に増加し、高脂肪食の 4 週間は継続して体重が増加した。また、8 週齢から

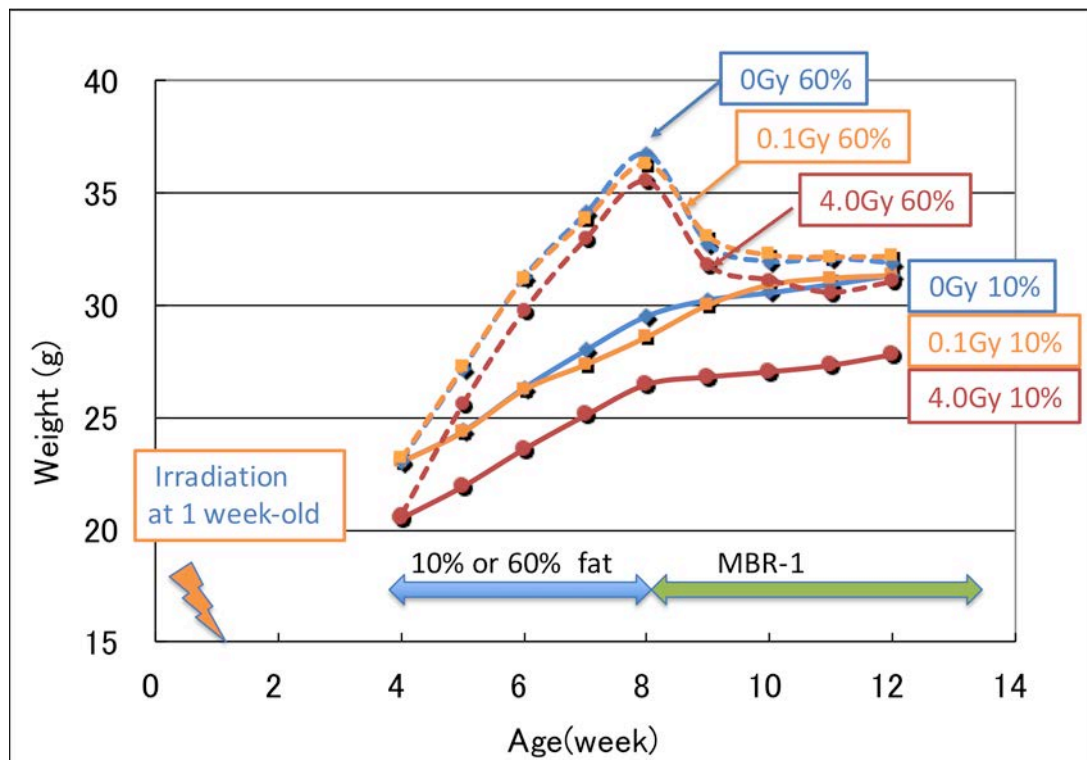


図 1，カロリー餌による体重への影響

通常餌（MBR-1）に切り替えたところ、60%食のグループの体重は減少し 2 週間後の 10 週齢で 0Gy10%または 0.1Gy10%の群と同等の体重に減少した。

#### 2. DIO による放射線発がん影響のメカニズムの解析のためのサンプル供与

実験群の設定は、サンプル供与するための実験群を優先に設定し終了した。（0Gy60 匹、0.1Gy 60 匹、4 Gy 60 匹）現時点で、各群の 4 週齢、5 週齢、8 週齢での解剖を行った。各臓器・組織は 10%中性緩衝ホルマリン中で 1 日振盪し、流水洗浄の後に臓器の切り出しを行い、その後、カセ

ットに入れて自動包埋装置によりパラフィン包埋した。採取した臓器は、胸腺、脾臓、骨髄、肺、肝臓、白色脂肪、赤色脂肪、および血清で、薄切切片はスライドグラス上に固定した。

#### IV. 考察

平成 27 年度中に計画した発がん実験群は順次設定を進めており、現時点まで、研究計画の進行を妨げる何らの障害を認めておらず、今年度中に全ての発がん実験群の設定が終了できる。個別の実験群については、組織解析に供する標本の作成も始めており、次年度に向けた解析の準備も予定どおりに進行している。10%カロリー群では、4Gy 照射により強い体重減少が認められたが、60%カロリー群ではその影響は小さいことが分かった。すなわち、高脂肪食摂取では、高線量照射による体重減少効果を小さくする作用がある可能性が示唆された。

#### V. 結論

平成 27 年度に予定している実験群の設定を予定どおり行い、高脂肪食の効果を体重増加として確認した。また、高脂肪食から通常食へ移行後は 2 週間で体重が減少して低脂肪食群と同等の体重になったことから、本実験が子ども期に一定期間高脂肪摂取量した後、通常食に戻した場合の実験系として予定通り設定できていることが分かった。

#### VI. 次年度以降の計画

平成 27 年度末には、実験群の設定が終了するため、平成 28 年度以降は、飼育観察の継続および継時的な解剖を継続し、初期がんの検出を進める。また、免疫染色用のスライドを作成し、長崎大学との協働により組織応答の解析を進める。さらに、次年度からは、1.0Gy 照射群を新たに追加設定する。必要匹数は、4.0Gy 群と同様に、10%カロリー、40%カロリーの終生飼育実験群各 60 匹、サンプリング群各 70 匹、計 260 匹を設定する。飼育観察および継時的な解剖および免疫染色用スライドの作成等は、今年度設定の実験群と同様に行い、カロリー摂取過多が放射線発がんリスクにどのような影響をおよぼすかを明らかにする。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

なし

引用文献

なし

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

Shizuko Kakinuma

*Radiobiology of Children's Health Program, Research Center for Radiation Protection, National Institute of Radiological Sciences*

*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 children have on the risk associated with 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 children 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 2015, the rearing of the DIO experimental animals was to be started, with subsequent preparation of tissue samples to study the effects of DIO on DNA damage, cell death and inflammatory responses. We have already finished the rearing of half of the total DIO animals, with collection of the requisite samples, which are now ongoing. We also observed the predicted body weight gain in the mice reared on the high-fat diet confirming that the project is progressing as anticipated and remains on schedule.

# 小児期の生活習慣等による消化管幹細胞の組織動態変化と 放射線発がんリスクに及ぼす影響評価

大塚 健介

(一般財団法人電力中央研究所 原子力技術研究所 放射線安全研究センター・  
主任研究員)

## 研究要旨

本研究では、『カロリー摂取過多により惹起される全身性の炎症性細胞の活性化と炎症性サイトカインの分泌が、消化管クリプトの炎症反応を引き起こすことにより誘導される組織幹細胞の過増殖が発がん変異の蓄積に寄与する』との仮説を立てた。これを検証するために高カロリー食による肥満 (Diet-induced obesity; DIO) の実験系によって、生活習慣の変化に伴って生じる消化管幹細胞ターンオーバーの変化を明らかにすることで、小児期の放射線被ばくのリスクの大きさを定量的に明らかにするための研究計画を立案した。あわせて、放射線による大腸がんの誘発に DIO が及ぼす影響と消化管幹細胞の関与を解明する研究を実施し、発がんまでのプロセスを包含する研究計画とした。まず全体計画の基礎となるデータを取得するため、小児期に高脂肪食を摂取することで、対照食 (低脂肪・高スクロース) を摂取させたマウスと比較したところ、高脂肪食群で体重の有意な増加が認められた。一方で、高脂肪食と対照食を摂取させたマウスの消化管幹細胞のターンオーバーには差が認められないことが明らかになった。

キーワード: 生活習慣、小児期、高脂肪食、消化管、組織幹細胞

## 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いている。「東京電力福島第一原子力発電所事故に伴う住民の健康管理のあり方に関する専門家会議」の中間取りまとめでは、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たが、原発事故後に置かれている被災住民の生活環境を鑑みると、とりわけ、子どもにおける生活習慣等の変化、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過多は、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。カロリー制限による自然発がんリスクに対する影響は広く研究されているにも係わらず、カロリー摂取過多が組織幹細胞におよぼす影響は十分に解明されているとは言い難く、このため、福島県民、とりわけ子供たちの安心・安全のための健康管理に資する研究として、生活習慣等が組織幹細胞におよぼす影響を、機構論に基づいて解明する研究が強く求められている。

そこで本研究では、消化管幹細胞系追跡法を用いて、高脂肪食による肥満 (Diet-induced obesity; DIO) の実験系を用い、『カロリー摂取過多により惹起される全身性の炎症性細胞の活性化と炎症性サイトカインの分泌が、消化管クリプトの炎症反応を引き起こすことにより誘導される組織幹細胞の過増殖が発がん変異の蓄積に寄与する』との仮説を立て、放射線影響によって蓄積する同様の発がん変異と、生活習慣の変化に伴って生じる発がん変異の頻度を相対的に比較することで、

小児期の放射線被ばくのリスクの大きさを定量的に明らかにするための研究計画を立案した。あわせて、放射線による大腸がんの誘発に DIO が及ぼす影響と消化管幹細胞の関与を解明する研究を実施し、発がんまでのプロセスを包含する研究計画とした。

## II. 研究方法

消化管幹細胞 (*Lgr5* 幹細胞) で、タモキシフェン (4OHT) の投与に依存して時期特異的に組織換えを誘導し、その子孫細胞をレポーター遺伝子 (*LacZ*) で標識させるマウス (*Lgr5-EGFP-Cre<sup>ERT2</sup>/ROSA26-LSL-LacZ* マウス、以下 LRZ マウス) を用いて、小児肥満の実験的誘導と *Lgr5* 幹細胞ターンオーバー攪乱への影響評価を行った。これまでの研究では、小児期において高脂肪食摂取が組織幹細胞のターンオーバーに影響を及ぼすかどうかについては明らかになっていなかった。そこで本年度は、肥満と放射線照射の相乗効果を確認する前段階として、高脂肪食により小児期肥満が誘導できるのか、そして肥満個体と非肥満個体において幹細胞維持能にどれだけの違いがあるのかを相互比較し、高脂肪食を摂取した場合の消化管幹細胞のターンオーバーにおよぼす影響を明らかにした。LRZ マウス (出生後 10~17 日齢時) に 10 mg/m の濃度でヒマワリオイルに溶解した 4-hydroxytamoxifen (Sigma-Aldrich 社, #H6278) を 3 mg/40 g 体重ずつ単一腹腔内投与を行った。マウスは 22~25 日齢で離乳させ、その際に同腹仔を 2 群に分けて片方の群には離乳直後から 1 か月間、摂取カロリーの 6 割が脂肪由来である高ラード含有の高脂肪食 (Research Diet 社, 型番 D12492) を自由摂取させた。高脂肪食を与えている期間は、週に 2 回、餌の交換と体重測定を行った。比較のため、もう片方の群には摂取カロリーの 7 割が炭水化物 (35 kcal%スクロース) である低ラード含有の対照食 (Research Diet 社, 型番 D12450B) を自由摂取させ、高脂肪食群と同様に餌交換とマウスの体重測定を行った。1 か月間に高脂肪食および対照食投与を終了し、すべての餌を通常食に切り替えた。表 1 には実験に用いた高脂肪食、対照食、通常食の餌の組成のうち、摂取カロリーに関係する成分を抜粋したものを示す。成体マウス (10~15 週齢) になった時点で解剖した。実験には遺伝子型タイピングの結果、*Lgr5-EGFP-CreERT2* アリルを発現するマウスのみを用いた。大腸組織は固定後に *LacZ* 染色して、パラフィン包埋ブロックとし、クリプト断面が円形になるような切断方向で切片を作製した。エオジン染色によるカウンター染色を行った後、*LacZ* 陰性クリプト (エオジン染色のみ) および *LacZ* 陽性クリプト (クリプト断面が *LacZ* で染色された細胞で埋め尽くされたもの) 高脂肪食群と対照食群とで比較した。

(倫理面への配慮)

本研究は、当所が開催した動物実験委員会で定める「動物実験および実験動物取扱規則」に基づき動物愛護の観点から審査が行われ、研究計画の承認をもって実施した。

## III. 研究結果

### 1. 小児期の高脂肪食摂取による体重変化

図 1 は、3~7 週齢時に高脂肪食もしくは対照食を与えた雄マウスの日齢と体重変化の個体別推移を示す。図 1 上段は対照食群として設定した 14 匹のデータ、下段は高脂肪食群として設定した 16 匹について、体重測定 (週 2 回) ごとのデータをプロットした。同様に、図 2 は 3~7 週齢時に高脂肪食もしくは対照食を与えた雌マウスの日齢と体重変化の個体別推移を示す。図 2 上段は対照食群として設定した 9 匹の、下段は高脂肪食群として設定した 13 匹について、体重測定 (週

2 回) ごとのデータをプロットした結果を示す。雄マウスおよび雌マウスの両方で、対照食群に比べて高脂肪食群で高脂肪食摂取期間開始から顕著な体重増加を示す個体が観察された。しかしながら、個体によって離乳時(すなわち摂取制限開始日)の日齢および体重が異なることから、日齢で推移を観察しても高脂肪食と対照食群の違いが明確に区別できなかった。そこで、高脂肪食もしくは対照食を与えたマウスの体重について、週齢ごとにまとめて平均値で表した結果を図 3 に示す。図 3 上段は雄マウス、下段は雌マウスの結果である。対照食群と高脂肪食群について、週齢ごとに体重の平均値を両側 t 検定 ( $\alpha = 0.05$ ) による統計学的処理を行ったところ、雄マウスにおいては、6 週齢および 7 週齢時に、雌マウスにおいては 7 週齢および 8 週齢時に高脂肪食群で有意に体重が多い結果を示した。次に、高脂肪食もしくは対照食を与え始めた日を起点に、それ以降、週当たりどれくらい体重が増加したかを表した(図 4)。図 4 上段は雄マウス、下段は雌マウスの結果である。摂取開始から 6 日目を 0 週とし、それ以降は 7 日ずつ 1~6 週とし、摂取開始からの体重増分の平均値を両側 t 検定 ( $\alpha = 0.05$ ) による統計学的処理を行ったところ、雄マウスでは 1 週間以降、高脂肪食を与えた群で有意に体重増加を示した。雌マウスの場合、2 週間目は統計学的有意な差は認められなかったが、0 週から 5 週にかけて高脂肪食群で有意に体重増加が認められた。これらの結果から、離乳時から高脂肪食を 4 週間摂取し続けることで、低脂肪・高スクロース食を続けたマウスと比較して体重が増加することが明らかとなった。

## 2. 高脂肪食を摂取した場合の大腸幹細胞ターンオーバー

3~7 週齢時に高脂肪食もしくは対照食を与えて経時的に体重測定を行ってきた LRZ マウスについて、大腸における LacZ 陽性クリプトの割合を比較した。表 2 は個体ごと(対照食群 7 匹、高脂肪食群 9 匹)について、それぞれ測定したクリプトの数と、そのうちの LacZ 陽性クリプトの割合を示したものである。対照食群の LacZ 陽性クリプトの割合は、 $1.39 \pm 0.43\%$  であり、対する高脂肪食群の LacZ 陽性クリプトの割合は、 $1.34 \pm 0.65\%$  であった。両側 t 検定により統計学的処理を行ったところ、有意差は認められなかった ( $p = 0.87$ )。また、それぞれの群において雄と雌の性差についても検討したところ、両群とも雌マウスの方が雄マウスに比べて LacZ 陽性クリプト割合の低下傾向が認められたが、統計学的な有意差は認められなかった。

## IV. 考察

本課題は小児期肥満における放射線の影響を解明するものであり、そのためにはまず小児期や肥満についての理解が必要である。マウスの寿命は飼育環境にもよるが 2~3 年であり、そのうち、哺乳期は出生から約 19 日で、幼若期は 20~100 日齢(ヒトでは 0.75~17 歳)に該当する(1)。ヒトにおける「小児」という言葉の定義は、解釈や関係法令によってその幅が様々であるが、医学的に狭義の小児とは幼児と学童を合わせた生後 1 年~12 年くらいを指している(2)。本研究では、離乳を 22~25 日齢で行い、その後 4 週間の高脂肪もしくは対照食を与えたことで、ヒトにおいては、幼児期に食事コントロールしたことに相当する。

肥満は、摂食、基礎代謝、エネルギー消費バランスの崩れによってもたらされ、その原因様々であるが、主な原因は過剰なカロリー摂取である(3, 4)。高脂肪食を与えた様々な系統のげっ歯類で体重増加や糖尿病が増加することが知られている(5)。このような DIO の感受性は系統によって異なり、マウスであれば A 系統は抵抗性であるが、C57BL/6J 系統は肥満になりやすくヒトの肥満

モデルとして用いられている(6)。本研究で用いたマウスは遺伝子組換え動物であるが、バックグラウンドは C57BL/6J であることから、高脂肪食によって誘導される肥満を検出するには最適な系統であると考えられた。実際、本研究の結果、雄マウスでも雌マウスでも、離乳直後の体重増分は、低脂肪・高スクロースの対照食と比較して有意な増加が認められた。しかしながら、体重の平均値の差は当初の予想と比べて大きな違いがなく、投与期間終了時期に近づいて初めて差が認められるようになった。高脂肪食と放射線との関係をより明確にしていくためには、ヒトの学童期にあたる時期まで高脂肪食の摂餌期間を延ばすことで、さらに肥満を誘導することが必要かもしれない。筆者が本研究とは別にこれまでにに行った普通食のみを与えた動物実験の結果から、1~2週齢でタモキシフェンを投与した LRZ 雄マウスの平均体重は、7週齢で  $19.83 \pm 1.51$  g, 8週齢で  $22.56 \pm 1.96$  g であることが分かっていた。そこで、その普通食のみの群と本試験の対照食群(7週齢で  $21.67 \pm 1.48$  g, 8週齢で  $23.24 \pm 1.21$  g) を比較したところ、対照食群の体重の方が統計学的に有意に高いことも判明した。このことから、通常食群に比べて高脂肪食群も対照食群も多くのカロリーを摂取していたことが推察されたため、通常食のみを与えたマウスとの比較や、対照食に含まれるスクロースの量を高脂肪食と揃えたものを使用するなどの改善も必要であろう。

近年、肥満と発がんの関係についての研究が進み、高い BMI を持つヒトで多くのがんでリスクが高いことなどから、肥満が発がんの大きな要因となっていることが分かってきた(7)。また、腸管のがんは組織幹細胞に変異が生じることで誘導されると考えられている(8)。腸管幹細胞プールが失われると、その補充によって変異が蓄積すると考えられるため、幹細胞プールが維持されるかが発がんリスクを理解するのに重要である。これまでに、筆者らは幹細胞プールの健全性を評価する Lineage tracing 法により、大腸の LacZ 陽性クリプトの割合が幹細胞性を評価する指標になることを報告しており、通常食のみを与えた場合のバックグラウンドレベルの LacZ 陽性割合は、およそ 2%程度であることが分かっている(9, 10) (表 2 参考データ)。本研究では、通常食のみ与えた場合の対照群を設定していなかったため、週二回の体重測定の有無やタモキシフェン投与の日齢などの違いもあって直接比較して議論することは出来ないが、通常食のバックグラウンドレベルに対して、高脂肪食および対照食群のいずれも LacZ 陽性クリプトが減少していた。この結果も体重変化の結果と同様に、両方の群とも通常食に比べて高カロリーを摂取していたため、バックグラウンドレベルで LacZ 陽性細胞の入れ替わり、すなわち大腸幹細胞の補充が顕著に誘導されていた可能性がある。高カロリー摂取による腸管幹細胞への影響については、高脂肪食を与えたマウスで腸管幹細胞の増殖活性が高まることが報告されている(11)。興味深いことに、幹細胞を維持するニッチ細胞として知られているパネート細胞(12)は、高カロリー食でその数が減少していた(11)。逆にカロリー制限をすることで、パネート細胞は幹細胞の維持能が高まり、分化よりも幹細胞プールを維持する力が働く(13)。これらのことを総合的に捉えると、高脂肪食環境下では、ニッチが幹細胞を維持できなくなり、幹細胞の増殖が誘導されて分化に働き、幹細胞プールの減少をもたらすことで、上位幹細胞の補充が誘導されるという仮説が成り立つ。ヒトの小児期にあたる時期では、マウスの腸管では成長に伴って幹細胞の数を増やす時期にあり(14)、この時期に幹細胞のプールを維持する能力が保たれていなければ、増殖の激しい細胞が幹細胞として機能することで、必然的に変異が蓄積しやすいことになる。放射線が小児期肥満に陥った個体に対して、発がんのリスクを相乗的に高めるのかどうかは、今後の課題であるが、その解明には、カロリーコントロールの時期や、幹細胞とニッチとの関係を明らかにすることも重要なアプローチであろう。



## V. 結論

小児期に高脂肪食を摂取することで、体重増加が認められたことから、本実験系でも小児期肥満を検出することが可能であることが分かった。高脂肪食による幹細胞ターンオーバーへの影響は観察されなかったが、通常食のみで起こる現象と比較しつつ、放射線との相互作用を理解する必要がある。

## VI. 次年度以降の計画

放射線照射することで、高脂肪食群で幹細胞ターンオーバーの攪乱が観察されるかどうかを確かめる。その結果から、高脂肪食摂取と放射線が複合的に作用することで発がんリスクを高めるかを検証する実験を進める。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

1. Otsuka K Iwasaki T. Effects of dose rates on radiation-induced replenishment of intestinal stem cells determined by Lgr5 lineage tracing. *J Radiat Res* 2015; 56:615-622.

## 引用文献

1. 前島一淑・笠井憲雪 「最新実験動物学」 朝倉書店
2. 志馬 伸朗 「小児 ICU マニュアル 第6版」永井書店
3. J. S. Flier, Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* (2004) 116, 337-350.
4. B. E. Wisse, F. Kim and M. W. Schwartz, Physiology. An integrative view of obesity. *Science* (2007)318, 928-929.
5. A. Scalfani, Animal models of obesity: classification and characterization. *International journal of obesity* (1984)8, 491-508.
6. M. Rossmeisl, J. S. Rim, R. A. Koza and L. P. Kozak, Variation in type 2 diabetes--related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. *Diabetes* (2003)52, 1958-1966.
7. E. E. Calle, C. Rodriguez, K. Walker-Thurmond and M. J. Thun, Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine* (2003)348, 1625-1638.
8. N. Barker, R. A. Ridgway, J. H. van Es, M. van de Wetering, H. Begthel, M. van den Born, E. Danenberg, A. R. Clarke, O. J. Sansom and H. Clevers, Crypt stem cells as the cells-of-origin of intestinal cancer. *Nature* (2009)457, 608-611.
9. K. Otsuka, N. Hamada, J. Magae, H. Matsumoto, Y. Hoshi and T. Iwasaki, Ionizing Radiation Leads to the Replacement and de novo Production of Colonic Lgr5 Stem Cells. *Radiation research* (2013).
10. K. Otsuka and T. Iwasaki, Effects of dose rates on radiation-induced replenishment of intestinal stem cells determined by Lgr5 lineage tracing. *Journal of radiation research* (2015)56, 615-622.
11. A. T. Mah, L. Van Landeghem, H. E. Gavin, S. T. Magness and P. K. Lund, Impact of diet-induced obesity on intestinal stem cells: hyperproliferation but impaired intrinsic function that requires insulin/IGF1. *Endocrinology* (2014)155, 3302-3314.

12. T. Sato, J. H. van Es, H. J. Snippert, D. E. Stange, R. G. Vries, M. van den Born, N. Barker, N. F. Shroyer, M. van de Wetering and H. Clevers, Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* (2011)469, 415-418.
13. O. H. Yilmaz, P. Katajisto, D. W. Lamming, Y. Gultekin, K. E. Bauer-Rowe, S. Sengupta, K. Birsoy, A. Dursun, V. O. Yilmaz, et al., mTORC1 in the Paneth cell niche couples intestinal stem-cell function to calorie intake. *Nature* (2012)486, 490-495.
14. J. J. Dehmer, A. P. Garrison, K. E. Speck, C. M. Dekaney, L. Van Landeghem, X. Sun, S. J. Henning and M. A. Helmrath, Expansion of intestinal epithelial stem cells during murine development. *PloS one* (2011)6, e27070.

表 1 本実験で使用した餌の主成分

単位：重量%

摂餌種別	高脂肪食	対照食	通常食
販売元	Research Diet社	Research Diet社	株) フナバシファーム
型番	D12492	D12450B	MBR-1
タンパク質	26 (20 kcal%)	19.2 (20 kcal%)	24.2
脂質	35 (60 kcal%)	4.3 (10 kcal%)	4.4
内 ラード	31.7	1.9	データなし
炭水化物	26 (20 kcal%)	67.3 (70 kcal%)	54.4 (可溶無窒素物)
内 スクロース	8.9	33.2	データなし

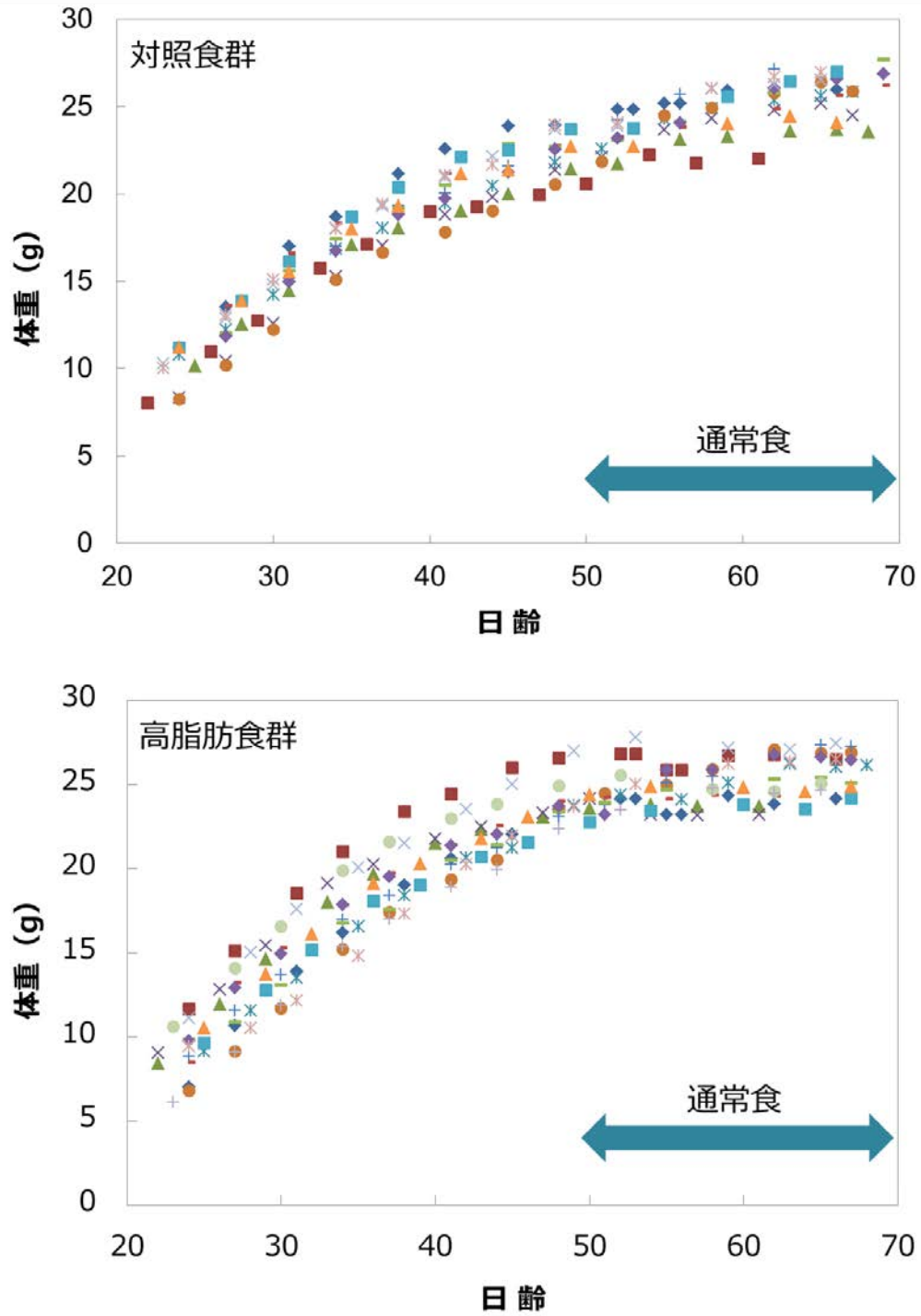


図1 離乳直後から高脂肪食および対照食を1カ月間与えた雄マウスの個別体重推移

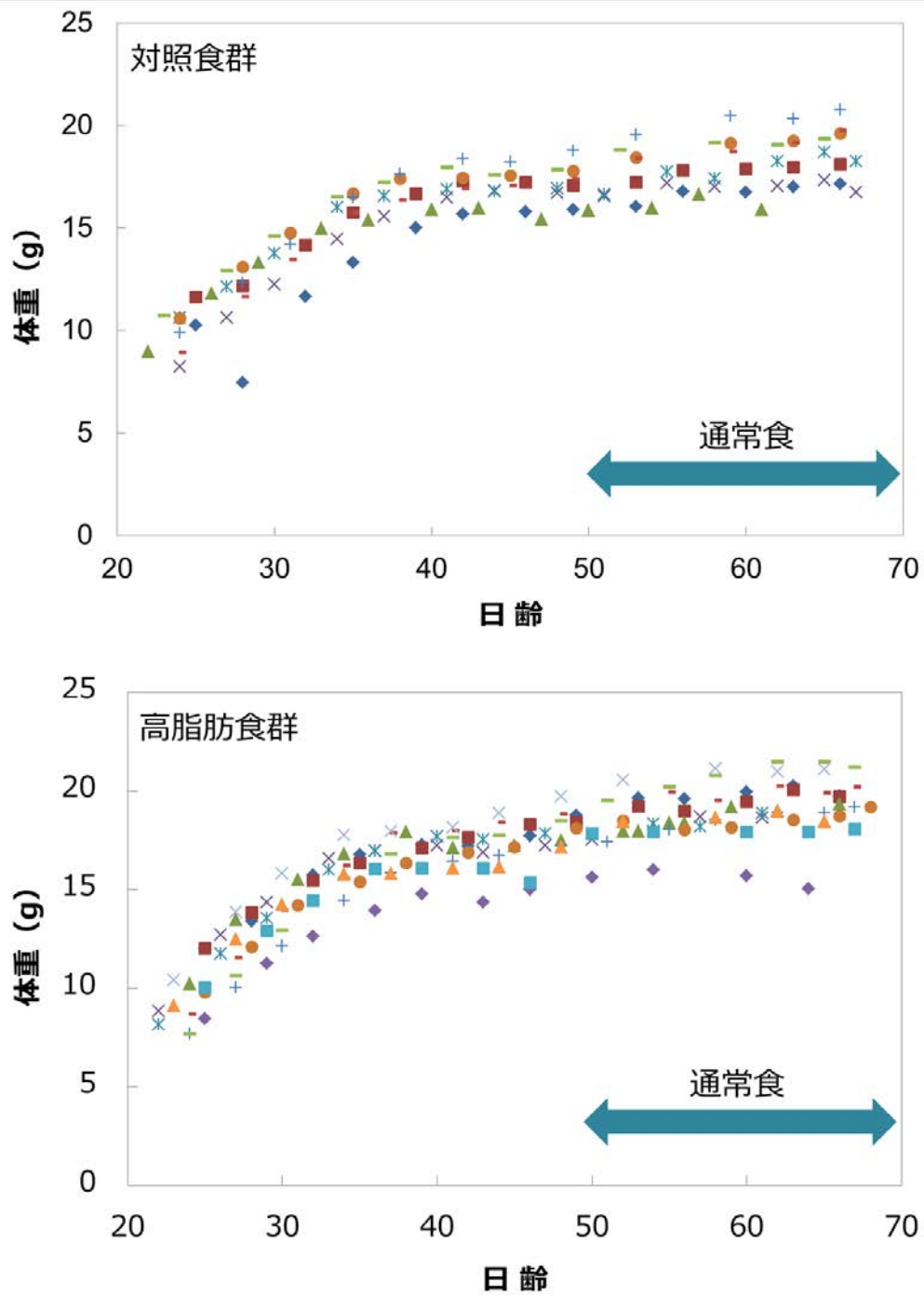


図2 離乳直後から高脂肪食および対照食を1カ月間与えた雌マウスの個別体重推移  
高脂肪食群の◆は、66日齢で死亡した個体。

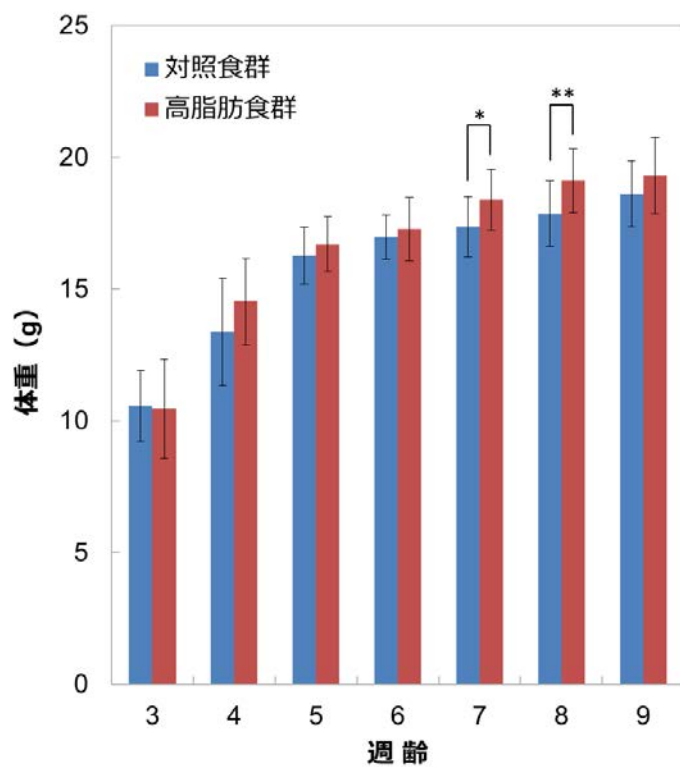
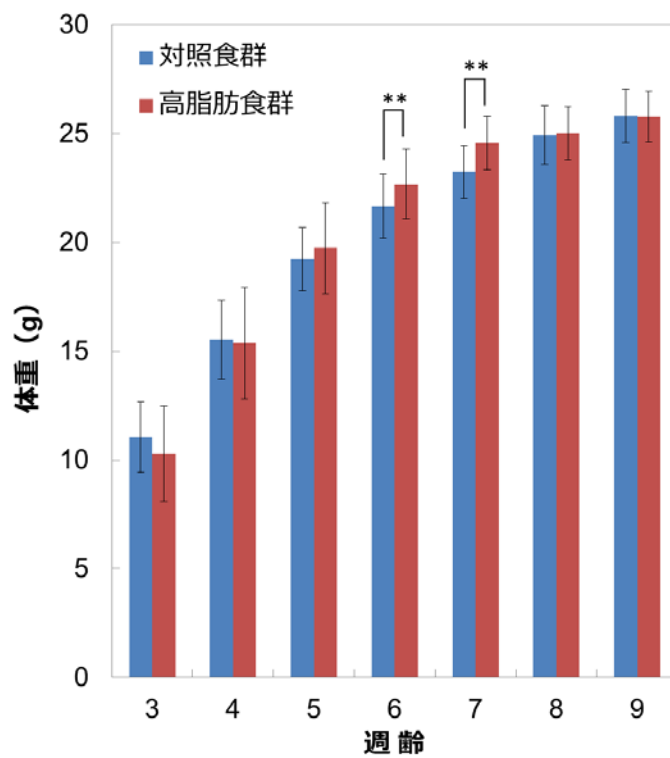


図3 離乳直後から高脂肪食および対照食を1カ月間与えたマウスの週齢あたりの平均体重  
 上段：雄マウス、下段：雌マウス。両側t検定 \*：P<0.05, \*\*：p<0.01

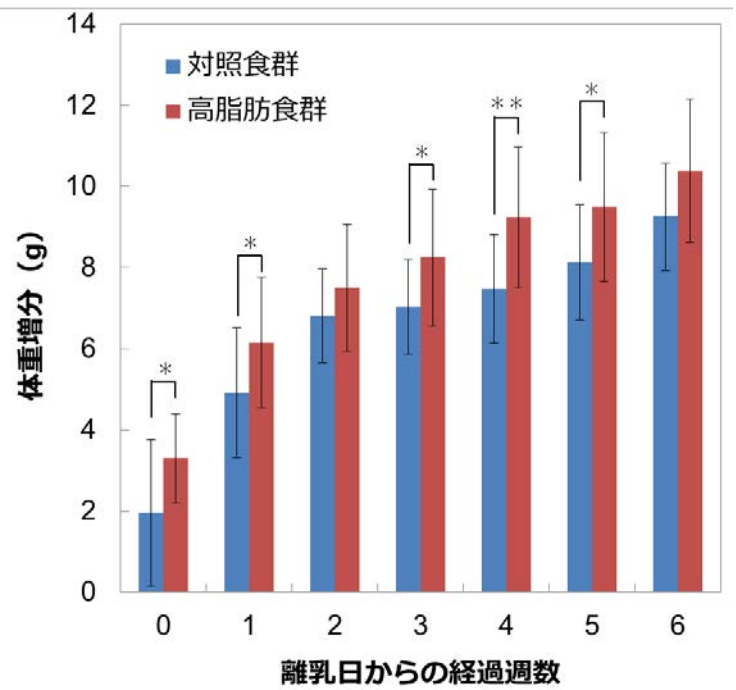
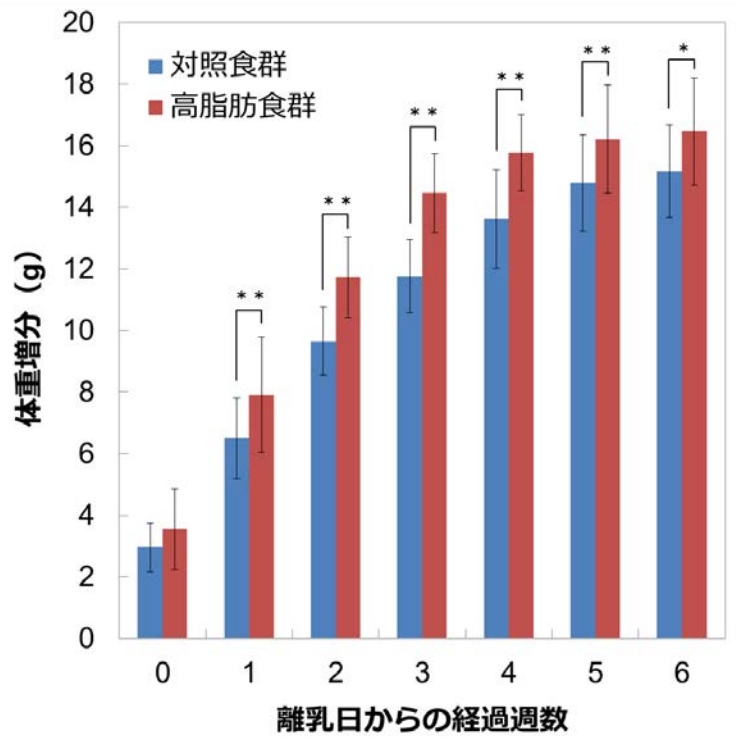


図4 離乳直後から高脂肪食および対照食を1カ月間与えたマウスの週当たりの体重増分  
 上段：雄マウス、下段：雌マウス。両側t検定 \*：P<0.05, \*\*：p<0.01

表 2 小児期に高脂肪食を与えた後の大腸幹細胞ターンオーバーへの影響

摂餌群	性別	カウントした大腸クリプトの数			平均値 ± 標準偏差
		LacZ陰性	LacZ陽性	%LacZ陽性	
対照食群 (n = 7)	オス	1,392	25	1.76	1.39 ± 0.43
		833	12	1.42	
	メス	1,393	22	1.55	
		285	5	1.72	
		907	11	1.19	
		749	12	1.58	
	756	4	0.53		
高脂肪食群 (n = 9)	オス	1,726	13	0.75	1.34 ± 0.65
		253	4	1.56	
		2,842	23	0.80	
		320	9	2.74	
		1,023	14	1.35	
		647	9	1.37	
	メス	368	7	1.85	
		431	4	0.92	
	257	2	0.77		
参考：通常食群 (Otsuka and Iwasaki, 2015)					1.98 ± 0.55



# Effects of life-style in childhood on radiation-induced carcinogenesis and cellular turnover of intestinal stem cells

Kensuke Otsuka

*Radiation Safety Research Center, Nuclear Technology Research Laboratory, Central Research Institute of  
Electric Power Industry*

*Keywords:* Life-style; Childhood; High fat diet; Intestine; Tissue stem cells

## **Abstract**

In this study, we established a hypothesis that an excess calorie intake could cause systemic inflammation, resulting in alteration of tissue microenvironments in intestinal crypts to promote radiation carcinogenesis. To this end, we applied the diet-induced obesity (DIO) mouse model, which is widely used to study the effects of obesity, and evaluated the effects of life-style in childhood by feeding a high-fat diet (HFD) or a low-fat diet (LFD) as control.

First of all, we fed the HFD or LFD to *Lgr5-EGFP-Cre<sup>ERT2</sup>/ROSA26-LSL-LacZ* (LRZ) mice during childhood (from 3 to 7 week-old) and measured increase in body-weight to evaluate the validity of the diet. We confirmed that the body-weight in HFD group significantly increased their body-weight compared to LFD group.

Then we quantified the rate of LacZ-positive colonic crypts to detect the effects on cellular turnover of intestinal stem cells by lineage tracing. We found that the rate of LacZ-positive crypts did not show significant difference between HFD and LFD group.

These results indicated that HFD did not affect cellular turnover rate in colonic crypts. However, the LFD may increase body-weight compared to normal diet, which contains lower carbohydrate. We had to consider total calorie intake to understand the consequences.

# 小児・青年期の低線量率放射線被ばくによるがんリスクの評価— —インドケララ州の高自然放射線地域住民の調査結果を中心として

秋葉澄伯（鹿児島大学大学院医歯学総合研究科・教授）

## 研究要旨

福島の原子力事故で被ばくした住民における健康影響が懸念されている。特に懸念されるのが悪性腫瘍リスクであるが、小児期に被ばくした場合、悪性腫瘍の線量あたりの過剰相対リスクは、成人と比べ2-3倍高い場合もあると考えられており、福島事故でも、小児・青年期の被ばくによるがんリスク増加を懸念する住民が少なくないようである。

本研究では、ケララ州カルナガパリ地域（高自然放射線地域）のがん罹患データを用いて、小児・青年期の放射線被ばくによるがんリスクを推定し、原爆被爆者など高線量被ばくを受けた集団の疫学調査結果などと比較するなどする。

1990-97年にインドのケララ州カルナガパリ地域住民全体を対象にベースライン調査が行われ、コホートが設立された（カルナガパリコホート）。現在、2010年までのがん罹患調査データが収集され、データベース化されている。これまで主任研究者は、インド側の研究者と連携して、この調査で得られたデータを用いて自然放射線への累積被ばく線量と悪性腫瘍などのリスクにかんして、検討を行ってきた。

本年度は、すでに主任研究者が行っていた検討結果をインド側の研究者に依頼して、予備的ではあるが、より詳細な検討を行った。そのような検討において、甲状腺がんと白血病に関しては、累積線量に統計学的に有意な関連は認められなかった（予備的な結果であるので、本報告書に具体的な結果を記載していない）。しかし、診断の精度が必ずしも明確ではないため、この調査で蓄積された地域がん登録データなどを見直すなどして、臨床・病理・血液のデータなどを詳細に検討する必要があると考え、インド側の調査担当者と意見交換を行ったうえで、検討のために必要な資料の整理を依頼した。

キーワード：高自然放射線、ケララ、小児、青年、がんリスク

## I 研究目的

### 研究の背景

福島の原子力事故で被ばくした住民における健康影響が懸念されている。最近の国連の原子力放射線の影響に関する科学委員会(UNSCEAR)報告書によると、悪性腫瘍の線量あたりの過剰相対リスクは、小児期に被ばくした場合に成人と比べ2-3倍高い場合もあると考えられており、福島事故でも、小児・青年期の被ばくによるがんリスク増加を懸念する住民が少なくないようである<sup>1)</sup>。

放射線被ばくによるがんリスクの定量的評価において、最も重要な役割を果たしているのは広島・長崎の原爆被爆生存者の追跡調査の結果である。しかし、これは高線量率の放射線被ばくである。一方、福島の原子力事故による放射線被ばくは低線量率の被ばくである。低線量率

の被ばくによる健康影響は不明確な点が多く、定量的なリスク評価に関するデータは不十分である。低線量率のがんリスクを検討することは、福島事故で被ばくした住民などの健康管理を実施する上で、また、放射線リスクに関する国民の理解を深めるうえでも重要と考える。

小児期の放射線被ばくによるがんリスクに関して、最近、幾つかの重要な研究結果が報告された。例えば、イギリス、オーストラリア、台湾などから報告された研究では、小児のCT検査による放射線被ばくが白血病や固形がんを増加させる可能性が示唆された<sup>2-5)</sup>。しかし、これは比較的高線量率での被ばくと考えられる。低線量率の放射線被ばくとしては注目されているのは自然放射線への被ばくである。最近のイギリスでの調査では、自然放射線被ばくにより小児の白血病が増加し、その線量あたりの過剰相対リスクが高線量率被ばくでの推定値と変わらないことが報告されている<sup>6)</sup>。この研究では、ラドン被ばくと小児がんとの関連も検討されたが、明確な関連は認められなかった。なお、この研究では、個人線量が推定されているが、地域ごとの平均線量を基に得られた値であり、線量推定は正確とは言えない。同様の研究がスイスでも行われ、自然放射線の累積被ばく線量と小児の白血病や脳腫瘍などのリスクが関連していることが示された<sup>7)</sup>。

インド・中国などの高自然放射線地域住民の放射線被ばくは低線量率での被ばくである。これまでのインド・中国の疫学調査から、成人の固形がんに関しては、低線量率での放射線被ばくが高線量率での被ばくに比べ、線量あたりの過剰相対リスクが低くなることが強く示唆されている<sup>8,9)</sup>。しかし、小児・青年期の被ばくによる白血病や固形がんに関しては、不明確な点が多い。

目的：本研究の目的は、ケララ州カルナガパリ地域（高自然放射線地域）のがん罹患データの正確性などを検討したうえで、がんリスクとの関連が特に強いと考えられている小児・青年期の放射線被ばくによるがんリスクを推定するとともに、その線量あたりのリスクを成人期の被ばくによるものと比較する。仮に、小児期・青年期の被ばくでリスクが増加しているがんの部位があれば、成人期の被ばくの場合と比べて、リスクの大きさがどの程度異なりうるかを検討する。さらに、本研究で得られた低線量率被ばくによる線量あたりのリスクが、他の研究で得られた中・高線量率の被ばくを含む、様々な線量率で得られたリスク推定値と異なるか（どの程度異なるか）を検討する。この目的を達成するには、がん登録で得られたがん症例の診断の信頼性の確認、症例の把握漏れなどの検討、小児期の被ばく線量に焦点を当てたリスク解析など総合的な検討が必要である。

## II 研究方法

### 対象と方法

主任研究者秋葉澄伯は、公益財団法人（以下、公財と略）体質研究会がインド・中国の研究者と共同で行ってきた高自然放射線地域の住民の疫学調査に協力してきている。調査方法の詳細は、平成 23-25 年度に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）として実施された「低線量率放射線被ばくの健康影響——インド・中国の高自然放射線被ばく地域住民の調査結果を中心として（主任研究者：秋葉澄伯）の報告書でも記述したので、以下には簡単に記述する。



1990-97年にインドのケララ州カルナガパリ地域住民全体を対象にベースライン調査が行われ、コホートが設立された。この調査には、それ以降にカルナガパリ地域で生まれた住民、または移住してきた住民は含まれていない。このコホートをカルナガパリオコホートと呼ぶこととする。2009年のNairらの報告では、このコホートの半分（放射線コホート）を対象に2005年までの成人のがん罹患率が検討された<sup>8)</sup>。その後、カルナガパリオコホート全体のデータベースが完成し、また、追跡期間は5年間延長され2010年までとなった（平成28年度内に、追跡期間は2013年末までとなる予定である）。

これまで主任研究者は、インド側の研究者と連携して、この調査で得られたデータを用いて自然放射線への累積被ばく線量と悪性腫瘍などのリスクにかんして、検討を行ってきた。本年度は、すでに主任研究者が行っていた予備的な結果を検討する。なお、統計解析では、データを性、年齢、観察期間、累積線量などで層別し、層別データを用いてポアソン回帰分析を行った。

#### （倫理面への配慮）

本研究で得られるがん罹患率、死亡率のデータは、インドの研究者が（公財）体質研究会との共同研究で得たものであり、調査の実施に当たっては倫理委員会の承認を得ている。データの供与に関しては、（公財）体質研究会の許可、インドの研究者の同意を既に得ている。また、平成24年2月に鹿児島大学医歯学総合研究科疫学研究等倫理委員会から疫学調査で得られたデータの使用に関する承認を得た。なお、本年度に行われたデータの解析・検討は、平成26年度までに主任研究者が行っていた予備的な解析で作表されていた結果を用いて、統計学的な検討を行うとともに、インド側の研究者がデータベースなどを用いて、さらに詳細な検討を行ったものである。

### III 研究結果

本年度は、すでに主任研究者が行っていた予備的な検討結果を、インドの共同研究者に依頼して、より詳細に検討した。統計解析では、データを性、年齢、観察期間、累積線量などで層別し、層別データを用いてポアソン回帰分析を行った。2010年までのカルナガパリオコホートの追跡調査で、到達年齢が30歳未満の対象者は約10万人であり、追跡期間中に200人弱のがん症例が確認されており、そのうち、白血病が約30例、甲状腺がんが約20例であった。この検討では、14歳までの累積線量を屋内外線量と居住係数などから推定し、この累積線量と30歳までのがんリスクの関連を検討した。予備的検討において甲状腺がんと白血病に関しては、累積線量に統計学的に有意な関連は認められなかった（予備的な結果であるので、本報告書に具体的な結果を記載していない）。しかし、診断の精度が必ずしも明確ではないため、この調査で蓄積された地域がん登録データなどを見直すなどして、白血病の具体的な診断名、類縁疾患の把握、診断方法などを含む臨床・病理・血液のデータなどを詳細に検討する必要があると考えた。現地で、インド側の調査担当者と意見交換を行ったうえで、実際にどのような検討を行えるかを判断し、そのうえで、検討のために必要な資料の整理を依頼した。また、2月下旬に米国で南カロライナ医科大学教授ホーエル博士と面談し、低線量放射線被ばくの健康影響の研究の現状に関して意見交換を行うとともに、データ解析の詳細について、助言を受けた。



#### IV 考察

本研究では予備的検討を行い、小児がんリスクと自然放射線被ばくの関連を検討した。小児がんのなかで甲状腺がんと白血病は放射線との関連が強いと考えられるが、これらのがんを含め、小児がんと累積線量に統計学的に有意な関連は認められなかった。統計学的検出力は計算していないが、線量当たりの過剰相対リスク推定値の95%信頼区間は非常に広く、この研究単独で線量当たりのリスクを十分に評価できる可能性は低い。

小児期・青年期の放射線被ばくは、成人期での被ばくに比べて、線量あたりのがんリスクが高くなる可能性が高い。また、被ばく線量が同じでも、線量率が異なると健康影響は異なる可能性がある。in vitro や動物実験では、線量当たりの生物影響は、低線量・低線量率のほうが高線量・高線量率より小さい可能性が示されているが、ヒトでは十分な証拠は得られていない。広島・長崎の原爆被爆より低い線量率の放射線被ばくの疫学調査で重要なものは、高自然放射線地域・Techa 川流域・台湾のコバルト 60 で汚染された鋼材を用いたビルなどの住民や原子力作業者を対象とした調査である。この中でもインドの高自然放射線地域住民のコホート調査は、がん罹患の情報が得られていること、線量が対象者全員について推定されていること、生活習慣などの情報が得られていることなどから、特に重要であり<sup>10)</sup>、近年、国際的な注目を集めつつある。本研究は、我々がインドで行ってきた高自然放射線地域住民の疫学調査の中で<sup>8)</sup>、これまで検討が不十分であった小児・青年期の被ばくによるがんリスクを検討するものである。

小児期の自然放射線被ばくと小児がん、特に白血病のリスクについては注目されており、今後、他の地域で行われた研究のメタ分析などが行われる可能性が高い。なお、2009年のNairらの報告<sup>8)</sup>に示された白血病リスク推定値はDanielsらの行ったメタ分析<sup>11)</sup>に含まれていることを指摘しておきたい。本研究の統計学的検出力は小さく、この研究単独で線量当たりのリスクを評価できる可能性は低い。本研究で可能な限り正確な推定値を得ることで、国際的なリスク評価に貢献できるものとする。そのためにも、まず、がん診断の精度を確認する必要があると考え、本年度は、それに必要な準備を行った。

#### V 結論

本年度は、予備的な検討結果を詳細に検討し、その結果などから、がん診断の精度を確認する必要があると判断し、必要な準備を行った。次年度以降、研究計画に沿って研究を行い、データの正確性などを確認したうえで、リスク解析を行うとともに、他の研究との比較を行う。

#### VI 次年度以降の計画

平成28年度には、小児・青年期だけでなく、念のために成人期の白血病や甲状腺がんなどの悪性腫瘍症例に関しても、地域がん登録で収集された症例の診断の正確性を検討するとともに、白血病症例の把握漏れを検討する。症例の把握漏れを評価するのは容易ではないが、がん登録の症例把握の完全性の指標である死亡診断書のみの症例の割合を検討したり、白血病類縁疾患の把握の状況や調査地域で多くの白血病・悪性リンパ腫の診断・治療を行っている医療施設の症例が把握されているかなどを、腫瘍登録担当者と話し合うなどして、検討を行う。また、他の研究との比較の準備として、近年報告されている幾つかの自然放射線と白血病リスクに関する報告のレビューを行う。そのうえで、昨年度に引き続き、米国で南カロライナ医科大学教授

ホーエル博士と面談し、データの国際比較などに関して意見交換を行うとともに、データ解析の詳細について、助言を受けたい。また、弘前大学、福島県立医科大学などを訪問し、インドでの調査に関して助言などを得るとともに、研究成果の福島県などの住民にどのように還元するのが良いか探る。また、鹿児島大学は弘前大学と合同で放射線看護の専門看護師の養成に取り組んでいる。平成28年度は、この活動に協力し、インドなどでの調査結果をもとに低線量率放射線被ばく者の健康影響に関する知識の普及に努めたい。

平成29年度には、小児・青年期の自然放射線被ばくと白血病や甲状腺がんなどの悪性腫瘍リスクに関する総合的な検討を行い、線量あたりのリスクの大きさを評価する。また、その線量あたりのリスクをすでに検討・報告した成人期の被ばくによるものと比較する(必要に応じて、新たにリスクを推定する)。さらに、カルナガパリの近隣の地域のデータを利用したり、原爆被ばく者の追跡調査結果や、他の調査結果も参照しながら、線量当たりの悪性腫瘍リスクが線量率で異なるか否かを明らかにする。

弘前大学、福島県立医科大学、鹿児島大学保健学科などの研究者と協力し、福島をはじめとするいろいろな地域で、低線量率放射線被ばく者の健康影響に関する知識の普及に貢献したい。

本研究に関する現在までの研究状況、業績  
なし

#### 引用文献

- 1) UNSCEAR. UNSCEAR 2013 Report to the General Assembly, with Scientific Annexes. Sources and Effects of Ionizing Radiation. Volume II, Scientific Annex B: Effects of radiation exposure of children. United Nations, New York: United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation; 2003.
- 2) Pearce MS, Salotti J, Little M et al. Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study. *Lancet* 2012; 6736(12):1-7
- 3) Mathews JD, Forsythe AV, Brady Z et al. Cancer risk in 680 000 people exposed to computed tomography scans in childhood or adolescence: data linkage study of 11 million Australians. *BMJ* 2013; 346:f2360
- 4) Huang WY, Muo CH, Lin CY et al. Paediatric head CT scan and subsequent risk of malignancy and benign brain tumour: a nation-wide population based cohort study. *BJC* 2014;110(9):2354-2360
- 5) Krille L, Dreger S, Schindel R et al. Risk of cancer incidence before the age of 15 years after exposure to ionising radiation from computed tomography: results from a German cohort study. *Radiation Environment and Biophysics*. 2015;54(1):1-12.
- 6) Kendall GM, Little MP, Wakeford R et al. A record-based case-control study of natural background radiation and the incidence of childhood leukaemia and other cancers in Great Britain during 1980-2006. *Leukemia*. 2013;27(1):3-9.



- 7) Spycher BD, Lupatsch JE, Zwahlen M et al. Swiss Pediatric Oncology Group; Swiss National Cohort Study Group. Background ionizing radiation and the risk of childhood cancer: a census-based nationwide cohort study. *Environmental Health Perspectives*. 2015;123(6):622-8.
- 8) Nair RR, Rajan B, Akiba S et al. Background radiation and cancer incidence in Kerala, India-Karanagappally cohort study. *Health Physics*. 2009;96(1):55-66.
- 9) Tao Z, Akiba S, Zha Y et al. Cancer and non-cancer mortality among Inhabitants in the high background radiation area of Yangjiang, China (1979-1998). *Health Physics*. 2012;102(2):173-81.
- 10) Boice JD Jr, Hendry JH, Nakamura N et al. Low-dose-rate epidemiology of high background radiation areas. *Radiation Research*. 2010;173(6):849-54.
- 11) Daniels RD, Bertke S, Waters KM, Schubauer-Berigan MK Risk of leukaemia mortality from exposure to ionising radiation in US nuclear workers: a pooled case-control study. *Occupational and Environmental Medicine* 2013;70: 41-48.

Cancer risk associated with childhood exposure to  
low-dose-rate ionizing radiation – risk evaluation mainly based on  
epidemiological studies of residents in high natural background  
radiation areas in Kerala, India

Suminori Akiba

*Department of Epidemiology and Preventive Medicine, Kagoshima University graduate School of  
Medical and Dental Sciences.*

*Keywords:* high natural background radiation; Kerala; children, young people, cancer risk

**Abstract**

Health effects of Fukushima residents after the nuclear accident in March 2011 is of concern. Particularly concerned is cancer risk after exposure among children and young people since the excess relative risk of cancer risk is considered to be a few times higher when compared to adulthood exposure. In Fukushima, residents are concerned about the childhood exposure and its cancer risk.

In this study, cancer risk associated with radiation exposure in the childhood and in young adulthood will be estimated, using the Karunagappally cohort data, and the estimates will be compared to those obtained from other studies, including the LSS of atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki.

The Karunagappally cohort was established after the baseline survey conducted in Karunagappally in Kerala, India during the period 1990-97, when the baseline survey was conducted. To date, the follow-up was completed until the end of 2010. Akiba, the principle investigator of the present study, has been helping Indian scientists to analyze cancer and other disease risks in relation to cumulative radiation dose.

In this fiscal year, the results of statistical analysis already conducted by the principle investigator were more closely examined with the collaboration of Indian investigators. In preliminary analyses, leukemia risk and thyroid cancer risk was not significantly related to cumulative dose (since the analysis was preliminary, the results were not shown in the report). However, the accuracy of diagnosis of those malignancies was unclear. Therefore, it was concluded that closer examinations of the clinical/pathological /hematological data were necessary. After discussions with Indian investigators, it was decided to examine the relevant data, and some preparatory work was conducted.



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

多世代低線量内部被ばくした A/J、C57BL/6J マウス系統の子孫における  
ゲノム変異検出とそのスペクトル解析

中島裕夫（大阪大学大学院医学系研究科放射線基礎医学・助教）

*Msh2* 遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの突然変異・発がん  
並びに継世代影響の解析

續 輝久（九州大学大学院医学研究院生体制御学講座基礎放射線医学分野・教授）

*Msh2* 遺伝子改変マウスの発がん率を有意に増加させる内部被ばく線量の検証

石原 弘（放射線医学総合研究所緊急被ばく医療研究センター被ばく医療研究プログラム  
体内除染研究チーム・研究チームリーダー）

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世代における発がんや次世代への遺伝的影響の存否に集約される。

本研究では、低線量の内部被ばくによる発がんやゲノム突然変異への影響についてマウス個体を用いて実験的に、そして、定量的に検証するものである。

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 *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発がん影響を調べ、また、継世代影響についても調べる。さらに、多世代(15世代以上)にわたりセシウム 137 を飲み続けたマウスの塩基配列変異を全ゲノム解析法により同腹仔由来の対照群と比較して、子孫でのゲノムにおける塩基変異の特徴について調べる。最終的に内部被ばく線量と外部被ばく線量の同等性について検証する。さらに、統計学的手法に活路を見出しにくい低線量影響のような領域に対して、新たな視点から長期低線量被ばく影響を予測するための革新的な数理モデル構築が可能か試みる。

キーワード: 低線量放射線、セシウム 137、内部被ばく、遺伝性影響、発がん、福島原発事故  
研究協力者: 鬼頭靖司（放射線医学総合研究所・主任研究員）、山内一己（環境科学技術研究所・研究員）、坂東昌子（大阪大学核物理研究センター・共同研究員、NPO 知的人材ネットワークあいにしゅたいん・理事長）、和田隆宏（関西大学システム理工学部・教授）、真鍋勇一郎（大阪大学大学院工学（系）研究科・助教）

I 研究目的

福島原発事故による低線量被ばくが人々への発がんや遺伝的影響の不安を招く要因のひとつになっている。そこでどの程度の内部被ばくまではそれほど心配しなくて良いのか等の判断材料を実験研究結果としてこれまでの疫学研究結果に加えて提供することが本研究の目的である。

本研究は、実験動物を用いた研究ではあるが、低線量・低線量率放射線被ばくの影響を定量的に評価する新たな実験システムを開発しようとするものであり、3年間で高感度検出系として *Msh2* 遺伝子改変マウスを用いて、また、野生型マウスでは、被ばくさせる世代数を多くして全ゲノムの中から変異の検出を試みる。この研究成果は、ICRP 勧告や国内法の設定した線量の妥当性を検証する実験結果を与えるだけでなく、放射性セシウムによる内部被ばく影響の視点から検証することにもなるため、現在の設定された預託線量に基づく規制値の是非を実験的に検証・認知することを可能にし、今後の規準値の安心度を担保するための参考資料として福島復興に資することが期待できると考えている。

また、欧米の MELODI などのような低線量被ばくに関する長期におよぶ基礎研究体制を福島原発事故に直面している日本においても構築する必要があると考えられ、得られた成果がその体制づくりの礎となるよう期待したい。

## II 研究方法

### 【平成 27 年度の計画】

大阪大学、九州大学、放医研それぞれの機関における施設の条件、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 に対する慢性的低線量内部被ばく影響を調べるための準備と実験を開始した。

### 1. 多世代低線量内部被ばくした A/J、C57BL/6J マウス系統の子孫におけるゲノム変異検出とそのスペクトル解析

近交系マウス A/J 系統の同腹子から 2 組のつがいを交配させ、1 つがいを原発事故後の放射性物質高濃度飛散地域調査結果を基に濃度設定した 100 Bq/ml の  $^{137}\text{CsCl}$  水溶液を自由に摂取させて、もう 1 つがいを対照群としてそれぞれ兄妹交配を行い、すでに 15 世代以上の交配に成功しているので、そのまま同じ条件で兄妹交配を継続した。そして、それぞれの群のそれぞれの代における動物から尾部、肝臓を剥出して凍結保存をした。

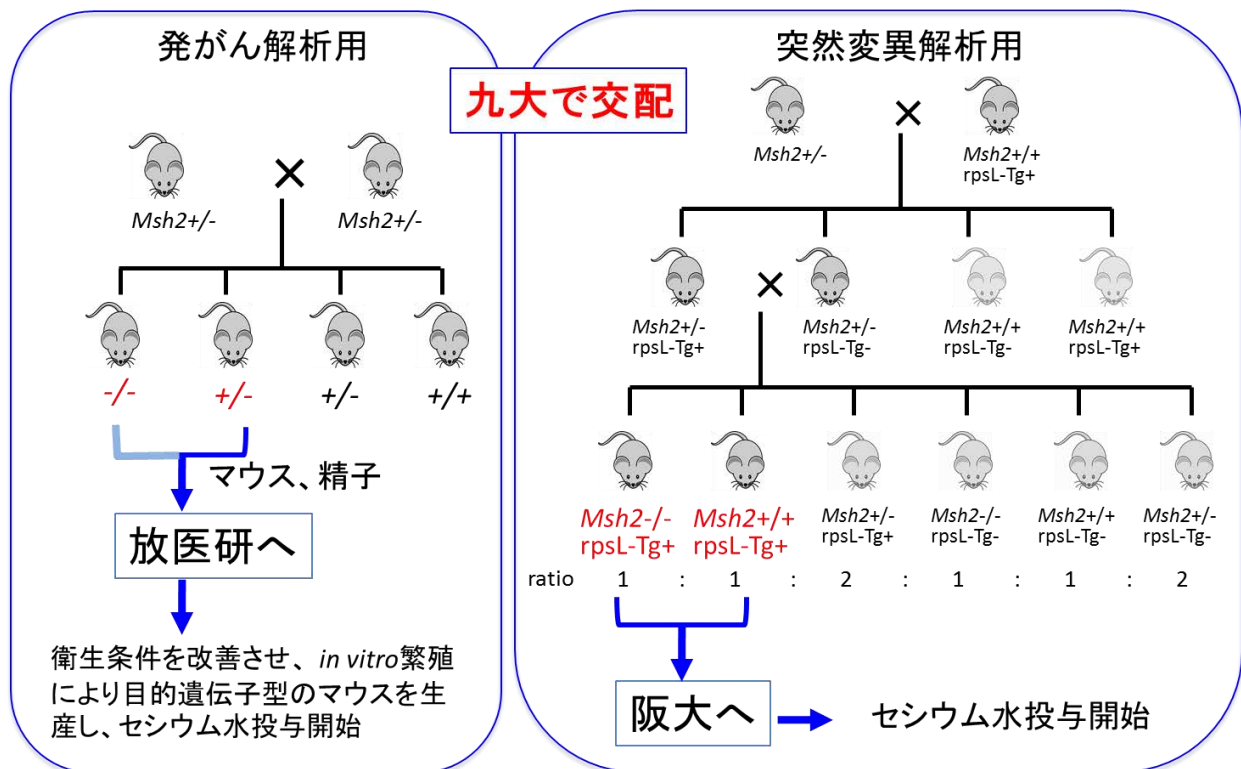
15 代目のマウスにおける凍結肝臓組織より DNA を抽出し、特に非コーディング領域に蓄積すると考えられる変異の検出を試みるために次世代 DNA シーケンサー (HiSeq2000) にてイルミナ社のプロトコールに準じて Illumina V3 kit を使用し全ゲノムシーケンス解析を行った。さらに得られたリード配列を用いてパイオインフォマティクス解析を行いコーディング領域 (Exon) ならびに非コーディング領域 (Intron、Intergenic) の塩基配列変異を調べて、2 群間での塩基変異率の差、変異座位の特徴を各群で比較した。また、同時に各群における解析対象領域の塩基変異発生率をもとめ低線量放射線の変異率促進効果を調べて低線量影響の存在性とその定量化を試みた (中島)。

### 2. *Msh2* 遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの突然変異・発がん並びに継世代影響の解析

これまでの研究でミスマッチ修復系の構成要素の一つである *Msh2* の遺伝子をホモで欠損したマウスを解析し、野生型マウスに比べて自然突然変異頻度の上昇とともに消化管腫瘍を自然発生すること、さらに酸化剤の飲水投与で酸化ストレスを付加することによりこれらの頻度が上昇することが明らかとなっている。*Msh2* 遺伝子ホモ欠損マウスにセシウム 137 を一定期間投与し、投与期間終了後、動物実験のガイドラインに従い適切な方法で対象マウスを安楽死させ、胃から大腸までの消化管を摘出し、内

容物を洗浄により除去した後に固定し、顕微鏡下で腫瘍の数や形態、発生部位などを記録して消化管での腫瘍形成頻度を非投与群と比較することで、内部被ばくの影響を解析するための *Msh2* 遺伝子ホモ欠損マウスの準備を行った。

放射線医学研究所で行う被ばくによる発がん解析実験のためには *Msh2* 遺伝子改変マウスの衛生条件を改善させる必要があるため、下左図のように遺伝子欠損マウスの受精卵と精子を搬入して代理母に妊娠させて帝王切開後に里親に飼育させ、衛生基準に適合したヘテロ欠損およびホモ欠損マウスの作成を行い、それらの生殖細胞を使用して *in vitro* 繁殖を開始した。



また、セシウム 137 投与後の突然変異解析の方法を順に以下に示す。突然変異解析用のレポーター遺伝子 *rpsL* を持った *Msh2* 遺伝子ホモ欠損マウス、およびレポーター遺伝子を持った野生型マウスにセシウム 137 を 4 週間投与し、各臓器別にサンプリングして直ちに凍結保存する。消化管を含む各臓器からゲノム DNA を抽出する。精製したゲノム DNA から回収したレポーター遺伝子を用いて、大腸菌を形質転換する。このレポーター遺伝子が持つカナマイシン耐性遺伝子の発現の結果、カナマイシン存在下で育成してきた耐性コロニー数を指標に形質転換効率を算出し、同時に、変異解析用のレポーター遺伝子領域に生じた変異に起因するストレプトマイシン耐性コロニーをカウントすることで体細胞突然変異頻度を算出する。この実験のため、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および野生型マウスの作出を開始した。レポーター遺伝子 *rpsL* を有する *Msh2* 遺伝子欠損マウスを準備する手順を上右図に示す。3 週齢の時点で遺伝子型を決定し、準備した遺伝子改変マウスを 4 週齢の時に大阪大学に輸送し、セシウム 137 投与を行う予定である(續)。

### 3. *Msh2* 遺伝子改変マウスの発がん率を有意に増加させる内部被ばく線量の検証

放射線医学総合研究所の動物飼育施設は、放射線影響の長期観察が可能なように、独自の実験動物衛生基準を設定しているため、九動株式会社に依頼して自然交配の困難な *Msh2* 遺伝子欠損マウスの生殖細胞を分取し、放射線医学総合研究所内に搬送後に胚操作を開始し、人工授精・代

理母への移植・帝王切開・里親による飼育を進めつつ、*in vitro* 繁殖による *Msh2(-/-)* マウスの多数生産を目指すための準備を行った。また、内部被ばく実験施設で飼育したマウスにおける放射性セシウムの減衰速度の測定および制御に関する技術開発を進めた<sup>1)</sup>。

また同時に、すでに確立しているバイオドジメトリー技術のさらなる高感度化を試みた。このバイオドジメトリー技術は、今後行う予定のセシウム 137 投与による積算 500mGy, 100mGy, 20mGy および対照における発がん実験のための内部被ばく線量と外部照射による被ばく線量の同等性を確認するために非常に有効である。概日リズム影響<sup>2,3)</sup>を回避する測定技術<sup>4)</sup>に基づき、予備実験として野生型マウス系統 (C57BL/6) においてセシウム 137 ガンマ線、X線、リン 32 の投与などの方法で 500mGy(水吸収線量)以下の低線量放射線で単回被ばくさせた際、ならびに 3 時間累積水吸収線量を約 100mGy となる低線量率放射線で連続照射をした際の吸収線量の判定を行うべく末梢白血球細胞の損傷応答 RNA (*Bax*, *Cdkn1a*) の精密定量を行い、線量・用量と計測値の関係を調べた(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た(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曝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た(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、「突然変異と発がんの抑制に関する分子遺伝学的研究」(承認番号：A26-121-0、有効期限：2016/03/31)で機関の承認を得た。

放射線医学総合研究所においては、マウスへのセシウム 137 投与による内部被ばく実験に関して、非密封放射性同位元素使用計画(非-被-26-8)および動物実験計画(10-1026-1)として、また、カルタヘナ法に基づく拡散防止については遺伝子組換え生物等実験計画(H25-6)として、いずれも実験計画および使用施設に関して機関内で承認を得た。

### III 研究結果

#### 1. 多世代低線量内部被ばくした A/J、C57BL/6J マウス系統の子孫におけるゲノム変異検出とそのスペクトル解析

DNA の Exon 領域、Intron 領域、Intergenic 領域での 1 塩基多型 (SNV) と挿入欠失変異 (InDel) の継代的な蓄積を調べるためにセシウム 137 投与群と対照群の 15 代目の A/J 雄マウスの全ゲノム解析を行った結果、セシウム 137 投与群で 2,633,045,179 塩基対、対照群で 2,632,851,805 塩基対の DNA 配列解析を行うことができた。セシウム 137 投与群と対照群での Exon 領域、Intron 領域、Intergenic 領域で Annotation が付与されている SNV と InDel の頻度を比較した結果が下表で

ある。表に示すようにセシウム 137 投与群の SNV の数が Exon では 2、Intron では 6,095、Intergenic では 19,539 と対照群より多く認められた。また、InDel においても同様に、Exon では 0、Intron では 802、Intergenic では 1,833 と Exon 以外の領域でセシウム 137 投与群の方が対照群より多く認められた。Exon 領域では 15 代の世代交代後も両群間で殆ど差がなかったが、生存に影響を与えない Intron と Intergenic 領域での DNA 塩基配列変異は明らかに対照群よりセシウム 137 投与群の方が多く認められた。

### F<sub>15</sub> A/J ♂マウスにおける全ゲノム塩基配列解析

HiSeq2000 (イルミナ社)	<sup>137</sup> Cs F <sub>15</sub>	Control F <sub>15</sub>
Initial Bases whole genome	2,647,537,787	2,647,537,787
Bases covered whole genome	2,633,045,179	2,632,851,805
Bases covered all exon	64,332,589	64,330,842
Fraction of whole genome covered with >= 8X	98.55%	98.41%

Annotation有		<sup>137</sup> Cs F <sub>15</sub>	Control F <sub>15</sub>	<sup>137</sup> Cs F <sub>15</sub> Mutation	15 世代の間に蓄積した対照群より多く
SNV 一塩基多型	Exon	113	111	2	
	Intron	1,944,232	1,938,137	6,095	
	Intergenic	3,922,697	3,903,158	19,539	
InDel 挿入欠失	Exon	5	5	0	
	Intron	444,742	443,940	802	
	Intergenic	776,367	774,534	1833	

## 2. Msh2 遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの突然変異・発がん並びに継世代影響の解析

### Msh2 遺伝子欠損マウスおよび突然変異解析用遺伝子改変マウスの作出

研究プロジェクト開始初年度である平成 27 年度は、実験に使用するマウスの繁殖計画に従い、目的の遺伝子型マウスの作出に向けて量産体制を整えた。放射線医学研究所のマウス飼育施設に導入するためには胚移植を行う必要があり、生殖細胞を採取するために必要な遺伝子型のマウスを複数匹準備し、精子と卵子を分離して凍結保存し、一部は受精させ受精卵を凍結した上でサンプルを放射線医学研究所へ移送した。大阪大学で行う短期内部被ばくと体細胞突然変異の解析用の Msh2 遺伝子ホモ欠損/rpsL-Tg マウスの作出準備を行った。交配によってレポーター遺伝子である rpsL 遺伝子を有する Msh2 遺伝子欠損マウスを前述の図に示したように準備した。これまでに Msh2 遺伝子ヘテロ欠損/rpsL-Tg マウスを数匹得ているが、目的の遺伝子型を得るには不十分であるため引き続き交配を行っている。

### セシウム 137 投与及び酸化剤投与の実験

セシウム投与実験に必要な遺伝子型のマウスの匹数が調達できるのが二年度目にあたる平成 28 年度以降であるため、現時点で *Msh2* 遺伝子改変マウスへのセシウム 137 投与は開始できていない。突然変異解析用に臭素酸カリウムを 4 週間投与した *Msh2* 遺伝子ホモ欠損及び野生型マウスと、非投与群のそれぞれのマウスについて、数匹を安楽死後解剖し、臓器をサンプリングし、凍結保存した。

#### 体細胞突然変異の解析

これまでに実験計画 2 で保存したサンプルの一部を用いて *rpsL* レポーター遺伝子を利用した変異解析を行うために、ゲノム DNA の抽出を行い保存した。解析条件を等しくするために、各実験群の目的とする遺伝子型マウスのサンプルが揃った時点で変異解析を行うが、これまでに予備実験として一部のサンプルを用いて変異解析を行った結果、臭素酸カリウムを 4 週間飲水投与した *Msh2* 遺伝子ホモ欠損マウスの小腸では、同様の処理をした野生型マウスの小腸に比較して突然変異頻度が約 20 倍に上昇していることを確認した。

#### 生殖細胞突然変異の解析

これまでに *Msh2* 遺伝子ホモ欠損マウスの雌雄を交配し得られた仔マウスで、世代間で新たに生じた突然変異を検出するために、両親と仔マウスの尾部よりゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いてシーケンス解析を行った（受託）。全エクソームの対象配列約 50Mb に対して、エクソンキャプチャー及び HiSeq2000 によるシーケンス（100bp、ペアエンド）を行い、マウスゲノムリファレンス配列（mm10）を用いてマッピングを行った。今回解析したサンプルではマップ可能リードは 99%以上、non-redundant unique reads は 92%以上であった。リファレンス配列に対して異なる塩基が読まれたサイト（SNV）の解析により、各サンプルで 2000 カ所以上の変異候補サイトがコールされた。これらのサイトより、解析エラーの可能性を除くためのフィルターをかけ、さらに仔マウスでのみ検出され、親マウスで検出されない *de novo* 変異候補を抽出したところ、60 サイト程度が残った。ここからさらにこれらの *de novo* 変異候補の確定のためにキャピラリーシーケンスを行って、次世代シーケンサーによる結果の確認を行い、現在詳細に解析中である。これまでに得られた結果では、変異候補の約 30%を占める一塩基置換では、ほとんどの変異サイトで *de novo* 生殖細胞変異である事が確認された。変異候補サイトの 60%以上が繰り返し配列近傍または繰り返し配列中に存在していたため、キャピラリーシーケンスによるエラーとして検出される事が多く、現在解析法について検討中である。

### 3. *Msh2* 遺伝子改変マウスの発がん率を有意に増加させる内部被ばく線量の検証

九州大学において *Msh2* ヘテロ欠損マウスの精子および卵細胞を使用して 140 個の受精卵を得たのでそれらを凍結し、20 個を使用して解凍テストにより生存率が 95%であることを確認した後、残りの 120 個の受精卵を放射線医学総合研究所に移送した。放医研では 100 個の受精卵を解凍し、生存していた 94 個の受精卵を代理母に移植して妊娠させた。その帝王切開の結果 35 匹の新生仔が得られたので里母に飼養させたが、予想外に育児放棄が多く、離乳時には 18 匹に減少していた。これらはいずれも衛生基準を満たすことが検査で判明し、*Msh2* ホモ欠損個体はメス 1 匹とオス 2 匹であり、*Msh2* ヘテロ欠損個体はメス 3 匹とオス 8 匹が得られた。これらの個体は生殖細胞を得るために飼育中であり、今年度内に *in vitro* 受精以降のプロセスを開始する予定である。

循環血液白血球中の RNA 分析による線量評価システムを更に改善し、内部被ばくのような連続

被ばくの際に適した RNA 指標を決定するために、低線量被ばくさせた C57BL/6 マウスから分離した循環白血球 RNA を使用してマイクロアレイ分析を進めた。指標の候補として、100 種を超える RNA 種が同定されたが、mRNA よりも lncRNA が多く、その誘導発現量は極微量であった。現在は最適指標の絞り込みと精密定量システムの確立を進めている。

#### IV 考察

##### 1. 多世代低線量内部被ばくした A/J、C57BL/6J マウス系統の子孫におけるゲノム変異検出とそのスペクトル解析

同腹仔から開始した 15 世代目のセシウム 137 投与群の方が同じ 15 代目の対照群に比べて明らかに DNA 塩基変異が多く認められたことから、セシウム 137 による各世代での内部被ばくの影響は生存に必要な非コード領域で継代的に蓄積されていることがわかり、全ゲノム解析による非コード領域における DNA 塩基変異を低線量影響の指標として十分に使える可能性が示唆された。

また、Exon 領域、Intron 領域、Intergenic 領域のそれぞれの塩基配列数当たりの SNV 発生率を求めるとそれぞれ  $3.10 \times 10^{-8}$ 、 $6.53 \times 10^{-6}$ 、 $1.16 \times 10^{-6}$  であった。このことから、全 DNA 塩基配列上で均等な確率で塩基変異が発生しているのではなく、生存に必要なコード領域では非コード領域より変異率が 2 桁ほど低く、次世代影響の検出効率が領域によって異なることがわかった。このことは DNA 塩基変異が次世代へ受け継がれるのを防御する選択圧が存在していることを示唆するもので生物学的知見として興味深い。

ただ、DNA の非コード領域における SNV の蓄積が認められることから発がん性が懸念される場所であるが、本研究とは別に行っている第 10 世代目マウスにおける自然発生がんおよび化学物質（ウレタン）誘発発がん実験において、セシウム 137 投与群と対照群との間で肺腫瘍の発生率に有意差は認められていない。また、肺腫瘍増殖速度の比較では、セシウム 137 投与群の方が対照群に比べて有意に増殖抑制されていることから、本実験条件下でのセシウム 137 の放射線が、発がん促進に働いているということは考え難く、DNA の非コード領域における SNV の蓄積が、そのまま発がんにつながるものではないと考えている（論文作成中）。さらに第 1 世代目から第 18 世代目までにおける 1 回の平均出産仔数、性比においても両群間で差は認められていない（Nakajima et al., J. Radiat. Res., 2015）。

今後、さらに非コード領域の変異率を詳細に調べ、全塩基配列当たり世代あたりの一塩基変異の自然発生率と比較することで定量性の精度をどれくらいまで高められるかを検討する。さらに、DNA 損傷に起因する発がんを抑制する多重の防御システムによる低線量放射線の次世代への影響の効率的な低減化についても検討していきたい。

##### 2. *Msh2* 遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの突然変異・発がん並びに継世代影響の解析

予備実験の結果で *Msh2* 遺伝子ホモ欠損マウスでは、酸化剤である臭素酸カリウムの飲水投与により小腸での突然変異頻度が野生型の約 20 倍程度となっていた。大阪大学で実施予定の同マウスへのセシウム 137 は、投与開始週齢と投与期間を臭素酸カリウムと同様に定めて行うため、突然変異頻度やスペクトルの結果の相互比較が可能であると期待される。また、*Msh2* 遺伝子ホモ欠損マウス同士の通常飼育下での自然交配により生まれた仔マウスでは、約 50Mb の全エクソーム解析でも検出可能な程度の新規生殖細胞突然変異が発生していることが示された。これに対して、



野生型マウスの自然突然変異率は  $5.4 \times 10^{-9}$ /bp/世代と報告されており (Uchimura et al., Genome Res. 2015)、今回と同様の全エクソーム解析を行った場合、通常飼育下での自然交配により得られる親と仔のトリオサンプルでは、新規生殖細胞突然変異のカウント数は1以下になることから、検出限界以下と推定される。従って今回の突然変異解析の結果より、Msh2 遺伝子ホモ欠損マウスを使用する本実験系の有効性が示唆された。今回の変異頻度や変異スペクトルの結果を基準として、今後実施する酸化剤投与群、セシウム 137 投与群における新規生殖細胞突然変異の結果を比較検討可能であると考えられた。

### 3. Msh2 遺伝子改変マウスの発がん率を有意に増加させる内部被ばく線量の検証

当初目的どおり、放医研の衛生基準を満たした Msh2 ホモ欠損およびヘテロ欠損マウスが得られた。受精卵の子宮定着および出産率は 35%程度であったが、過去に放医研に凍結胚として移入した種々の放射線損傷関連遺伝子の欠損したマウス系統と同程度であり、雄雌仔およびホモヘテロ仔の生成率はメンデル則に一致していたことから、Msh2 遺伝子的欠損による胚発生の影響のないことが示唆された。よって、当初予定していた *in vitro* 繁殖系の樹立を進めるにあたって、発生学的な支障はないものと予想された。

低線量放射線被ばくに応答する RNA 種としては lncRNA が優勢であった。約 20mGy 以上で被ばくしたマウスから採取した血液細胞では、放射線応答性 mRNA 量および細胞増殖抑制の有意な増加が認められる<sup>4)</sup>が、これより低い線量では両者の有意な増加は認め難い。ところが、放射線応答性 lncRNA は 5mGy 程度の被ばくマウス由来の血液細胞中でも有意かつ線量依存性に増加していた。細胞内におけるこの lncRNA 量は放射線応答性 mRNA 量の 0.1%程度と極微量であり、lncRNA 増加による細胞への影響は殆どないことが予想される。しかし、細胞に影響の現れない程度の低被ばく線量であっても、この lncRNA を被ばく線量の指標とすることにより、様々な被ばく様態の量的解析が可能であることを示唆している。

## V 結論

平成 27 年度の研究において「DNA 修復系の欠損動物を用いた微量変異の蓄積性を高めたがん遺伝影響の高感度検出系」、そして、「全 DNA 塩基配列解析による継世代的に蓄積された塩基変異の高感度検出系」で十分に低線量放射線被ばく影響を定量できることが確認された。また、同時に「低線量内部被ばく量を検証するためのバイオドジメトリーシステム」の確立ができた。

このことから、当初計画したマウス動物個体 (*in vivo*) を用いることによるセシウム 137 の慢性的低線量内部被ばくの成体と子孫への影響の定量的実験検証の今後の研究計画の実現性を担保することができた。

## VI 次年度以降の計画

### 1. 多世代低線量内部被ばくした A/J、C57BL/6J マウス系統の子孫におけるゲノム変異検出とそのスペクトル解析

次世代影響の検出実験：生殖細胞突然変異

- ・他系統マウス (C57BL/6J) による再現性実験
- ・A/J でさらに 10 世代実験を進めた F<sub>25</sub> における再現性実験
- ・A/J の F<sub>15</sub> でセシウム 137 水給水停止後真水にて世代交代させた 10 世代後 (F<sub>15</sub>→F<sub>25</sub>) で



の塩基変異の蓄積速度が対照群 (F<sub>15</sub>→F<sub>25</sub>) と同じになるかを調べる

数理モデル構築

・統計学的手法に代わる数理モデルにより低線量影響の予測が可能かを調べる

平成 27 年度の全ゲノムシーケンス解析を行って得られたコーディング領域 (Exon) ならびに非コーディング領域 (Intron、Intergenic) の DNA 塩基配列変異データを基に雄のみに継承される Y 染色体上の塩基配列変異、雌のみに継承されるミトコンドリア DNA 上の塩基配列変異数の差についてもセシウム 137 投与群と対照群の間で比較を行う。

また、別系統マウスでの再現性を調べるために C57BL/6J 系統マウスを用いて A/J マウス系統と同様の世代交代実験を行い、セシウム 137 を多世代低線量内部被ばくした子孫を得て全ゲノムシーケンスによる DNA 塩基配列変異データの比較検討を行う。また、平成 29 年度において *Msh2* 遺伝子のホモ欠損マウスでの継世代影響についても同様に調べる。

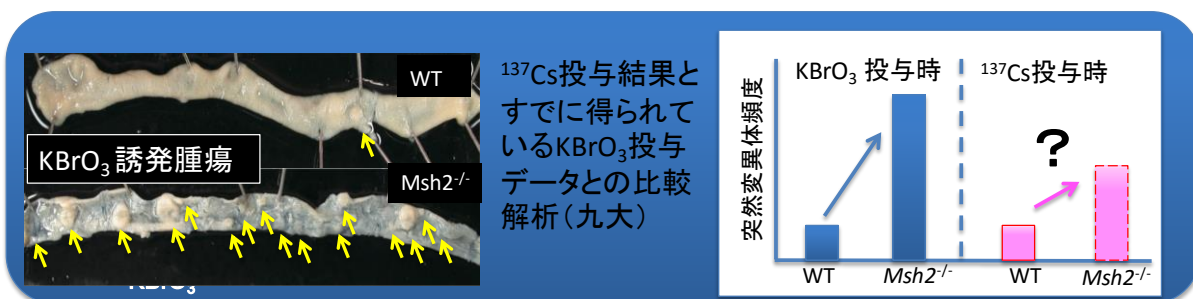
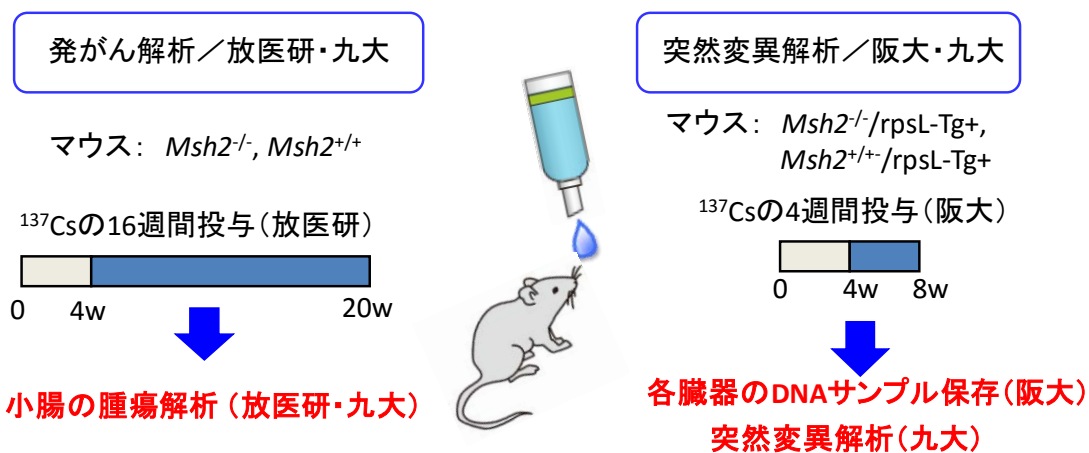
最終的には、外部照射によるデータと本研究における内部被ばくのデータとの比較検討が行えるように実験計画を立てる。

さらに、平成 28 年度において予備的に検討されつつある低線量放射線影響の数理モデル (Wak-Mol モデル)<sup>5,6)</sup>を構築するための準備を行う。そして、平成 29 年度においてそれまでの実験によって得られたデータをもとに低線量率長期被ばくによる突然変異や発がんの新たな数理モデルの構築が可能か検討し、統計学的手法の代替法として低線量放射線影響の閾値や低線量率放射線の長期被ばくによる線量依存的影響について予測することが可能かを試みる。

## 2. *Msh2* 遺伝子改変マウスを用いた個体レベルの突然変異・発がん並びに継世代影響の解析

現在までに、セシウム投与を行うための遺伝子改変マウスの繁殖を行っており、目的の遺伝子型を得るための交配に用いる親の準備はほぼ計画どおりに進んでいる。今年度後半から来年度平成 28 年度早々には大阪大学でのセシウム 137 投与マウス実験のための各遺伝子型のマウスの供給を開始する予定である。放射線医学総合研究所での *Msh2* 遺伝子欠損マウスの効率的生産とセシウム 137 による発がんへの影響の研究のための精子・卵子については、既に採取し移送済みである。マウスの維持・繁殖・供給を引き続き行う。突然変異解析・生殖細胞のゲノム解析についても引き続きサンプル調製を行い、順次解析を行う。

# Msh2 遺伝子欠損マウスにおける消化管発がん及び突然変異の解析 ----- 今後の実験の分担と解析の流れ



## 1 世代影響の検出実験：体細胞突然変異・発がん

- ・内部被ばくによる個体あたりの発がん率、体細胞突然変異率の実測
- ・外部被曝と内部被曝の同等性の検証

### 1) 体細胞突然変異率の実測

平成 27 年度に準備した突然変異解析用のレポーター遺伝子 *rpsL* を持った *Msh2* 遺伝子ホモ欠損マウスを 4 週齢の時点で内部被ばく実験が可能な大阪大学の R I 施設に輸送し、異なる線量・線量率となるようにセシウム 137 投与を行う (平成 28 年度)。

### 2) *Msh2* 遺伝子改変マウスを利用した 1 世代低線量内部被ばくによる発がんと体細胞突然変異検出 (平成 28 年度～平成 29 年度)

実験の対象群としてセシウム 137 非投与マウス (レポーター遺伝子が導入されている野生型 ( $Msh2^{+/+} \cdot rpsL\text{-Tg}$ ) と *Msh2* 遺伝子ホモ欠損マウス ( $Msh2^{-/-} \cdot rpsL\text{-Tg}$ ) から DNA を調製して、突然変異の解析を行う。異なる内部被ばくを受けたマウス臓器からゲノム DNA を抽出して同様の解析を行い、結果については、酸化剤  $\text{KBrO}_3$  の投与によって誘発される変異解析の結果と比較して考察する。

### 3. *Msh2* 遺伝子改変マウスの発がん率を有意に増加させる内部被ばく線量の検証

- ・内部被ばくによる個体あたりの発がん率、体細胞突然変異率の実測
- ・外部被ばくと内部被ばくの同等性の検証

平成 27 年度に行った C57BL/6 マウス系統での定量系を  $Msh2^{-/-}$  マウスに適用可能とするために、放射線単回照射した際の線量-影響直線を修正する。そして、低線量率被ばくモデルとして、

γ線連続照射マウスおよびRI投与による連続被ばくマウスを用いて、至適採血時間を決定することでバイオドジメトリー系として確立する。また対照として、臭素酸カリウム投与モデルでの消化器粘膜組織滞留白血球を用いた分析を行う。

さらに、週齢-体重ごとのセシウム137の体内半減期を測定することで、適切なセシウム137投与量を決定する。同時にKBrO<sub>3</sub>を使用して、指標となる小腸粘膜腫瘍発生率の増加率および偏差を測定することにより、統計学的評価のために必要な個体数を算出する。そして、4~20週齢の間の積算線量が20mGyから500mGyの範囲となるように、セシウム137を投与して非投与群との対照で有意差の有無を評価する。

#### 1) Msh2 遺伝子欠損マウスを用いた放射線発がんの予備実験(平成 28~29 年度)

実証試験における統計処理を最小限のマウス個体数で可能とするために遂行の時、少数のMsh2 遺伝子欠損マウスを使用した予備検討を行う。統計処理に適した条件を決定する。代表的な処理条件として、Msh2 遺伝子欠損マウスに異なる濃度のKBrO<sub>3</sub>の連続投与、リン32の投与、セシウム137の等の投与、またはおおよびγ線連続照射を行い、上記バイオドジメトリーにより吸収線量を予測する。これらのマウスを用いて小腸の腫瘍形成頻度、発がん率を測定し、両者の量的の相関関係の概要を把握することで、実証研究のための実験計画の基盤とするデザインを作成する。また、発生したがん細胞クローンの一部は、将来的なゲノム分析のために凍結保存しておく。

#### 2) Msh2 遺伝子欠損マウスを用いた連続被ばく線量と放射線発がん率の相関の実証(平成 29 年度)

最後に実証研究の仕上げとして、上記予備実験により絞り込まれた条件で、統計処理に必要な個体数のMsh2 遺伝子欠損マウスを用いて、セシウム137を投与することにより内部被ばくさせて小腸の発がん率を測定する。そして発がん率を有意に増加させる線量を決定する。

この研究に関する現在までの研究状況・業績

- 1) Tanaka I Ishihara H Yakumar H et al. Comparison of absorbents and drugs for internal decorporation of radiocesium: Advances of polyvinyl alcohol hydrogel microsphere preparations containing magnetite and Prussian Blue, Biological and Pharmaceutical Bulletin 2016; 39(3): in press.
- 2) Ishihara H Tanaka I Yakumar H et al. Quantification of damage due to low-dose radiation exposure in mice: construction and application of a biodosimetric model using mRNA indicators in circulating white blood cells, Journal of Radiation Research 2016; 57: 25-34.

引用文献

- 1) Tanaka I Ishihara H Yakumar H et al. Comparison of absorbents and drugs for internal decorporation of radiocesium: Advances of polyvinyl alcohol hydrogel microsphere preparations containing magnetite and Prussian Blue, Biological and Pharmaceutical Bulletin 2016; 39(3): in press.
- 2) Ishihara H Tanaka I Yakumar H et al. Circadian transitions in radiation dose-dependent augmentation of mRNA levels for dna damage-induced genes elicited by accurate real-time RT-PCR quantification, Journal of Radiation Research 2010; 51: 265-274.
- 3) 石原弘. 概日リズムと放射線感受性. ファルマシア. 2011; 47: 648-653.
- 4) Ishihara H Tanaka I Yakumar H et al. Quantification of damage due to low-dose radiation exposure in mice: construction and application of a biodosimetric model using mRNA indicators in circulating white

blood cells, *Journal of Radiation Research* 2016; 57: 25-34.

- 5) Manabe Y Wada T Tsunoyama Y et al. Whack-A-Mole Model: Towards a Unified Description of Biological Effects Caused by Radiation Exposure. *J. Phys. Soc. Jpn.* 2015; 84: 044002.
- 6) 真鍋勇一郎, 中村一成, 中島裕夫, 他. LNT 再考 放射線の生体影響を考える. *日本原子力学会誌*. 2014; 56(11): 705-708.

# Quantitative assessment for the effects of chronic low-dose internal Cesium-137 radiation exposure on genomic, carcinogenic and hereditary effects in mice.

Hiroo Nakajima<sup>\*1</sup>, Teruhisa Tsuzuki<sup>\*2</sup>, Hiroshi Ishihara<sup>\*3</sup>

<sup>\*1</sup>*Department of Radiation Biology and Medical Genetics, Graduate School of Medicine Osaka University*

<sup>\*2</sup>*Department of Medical Biophysics and Radiation Biology, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University*

<sup>\*3</sup>*Research Center for Radiation Emergency Medicine, National Institute of Radiological Sciences*

**Key words:** Low-dose radiation; Cesium-137; Internal exposure; Hereditary effects; Carcinogenesis; Fukushima nuclear power plant accident

## **Abstract**

Even 30 years after the Chernobyl catastrophe of 1986, people have been suffering from the concern that the southern districts of Belarus and Chernobyl are still highly radiocontaminated. Similarly, the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident, caused by the tsunami of the Great East Japan Earthquake of 2011, has led to environmental changes. It is predicted that radionuclides in the contaminated areas are taken into living organisms, and they irradiate organisms for long periods externally and internally. The health effects of radiation exposure, especially low dose and low dose-rates irradiation, on residents of contaminated areas, such as Chernobyl and Fukushima, have to be estimated based on the scientific data..

To investigate the genomic, carcinogenic and hereditary effects of chronic low dose-rate internal radiation exposure after the nuclear power plant accident, we are trying to develop new systems for quantitative assessment for the low-dose radiation effects.

1. Every generations of A/J mice were maintained in the radioisotope facility with free access to drinking water containing Cesium-137 (100 Bq/ml). And then, we performed all mouse genome sequences of the mouse (15th generation) to detect accumulated genomic mutations. Because small genomic mutations could occur, be inherited, and accumulate in each successive generation in non-coding genomic regions and have no effect on survival, we compared levels of accumulated base mutations between the offspring exposed to continuous low-dose radiation and control mice of the same generation that started from a littermate mouse.
2. Since the indirect effect of low LET radiation, such as gamma ray, is known to result from oxidative stress. We attempt to evaluate the effect of internal exposure of Cesium-137 and the treatment of oxidizing agent on the somatic mutations, tumor incidence and germline mutations by using DNA repair-deficient mice.
3. To quantify the damage due to low-dose radiation exposure in mice, we constructed a biodosimetric

model using mRNA indicators (the relative levels of RNA for DNA damage-induced (DDI) genes, such as *Bax*, *Bbc3* and *Cdkn1a*) in circulating white blood cells. And we quantified RNA from a small amount of blood isolated from mice following low-dose body irradiation (<0.5 Gy) aimed at developing biodosimetric tools for situations that are difficult to compare of external and internal radiation exposure.