

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01937

研究課題名(和文)胎児期放射線被ばく：生涯の発がんリスクと発がんメカニズムの検討

研究課題名(英文)Fetal radiation exposure: an analysis of lifetime carcinogenic risk and underlying mechanisms

研究代表者

甘崎 佳子 (Amasaki, Yoshiko)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線影響研究部・研究員(任非)

研究者番号：80435700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胎児は放射線感受性が高いとされるが、生涯の発がんリスクについて統一した見解は得られていない。発がんは環境因子などに大きく影響されることから、胎児期放射線被ばくのリスクも生後の生育環境により変動する可能性がある。

本研究は胎児期放射線被ばくの生涯にわたる影響を動物実験で明らかにすることを目的とした。放射線と化学発がん物質の複合被ばく露によって得られたマウス肺腫瘍の解析から、対照群および放射線単独群と比較して、化学発がん物質単独群と複合被ばく露群で有意に発生率が高かった。しかし両群の間に有意差は無く、本実験においては生後の発がん物質被ばく露に対する胎児期放射線被ばくの影響は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、胎児期放射線被ばくと発がん性化学物質との複合影響について、生涯を通じた発がん影響を明らかにした。胎児期放射線被ばくによる発がんに関する報告は極めて少ないため、学術的な意義がある。

また、胎児期に放射線被ばくをしても、生後の生活様式を変えることでリスクを低減できる可能性が示唆されたことは、社会的に意義あるものとする。

研究成果の概要(英文)：The radiation sensitivity of fetus is considered high, but there is no consensus about the cancer risk following radiation exposure in fetal period. Because radiation carcinogenesis in humans is considered to result from the combined effect of radiation and environmental carcinogens, exposure to environmental carcinogens after birth may affect the cancer risk following irradiation.

This study was aimed to evaluate the carcinogenic risk following fetal irradiation and postnatal chemical carcinogens exposure. We analyzed the tumor spectrum of fetal radiation exposure in combination with postnatal administration of chemical carcinogen by histopathological examination. The incidence of lung tumor in the combined exposure group was equivalent to that of chemical carcinogen alone, and the effect of combined exposure was not observed. In this study, the effect of prenatal radiation exposure on the carcinogenesis of chemical carcinogens exposed after birth was not observed.

研究分野：放射線生物学

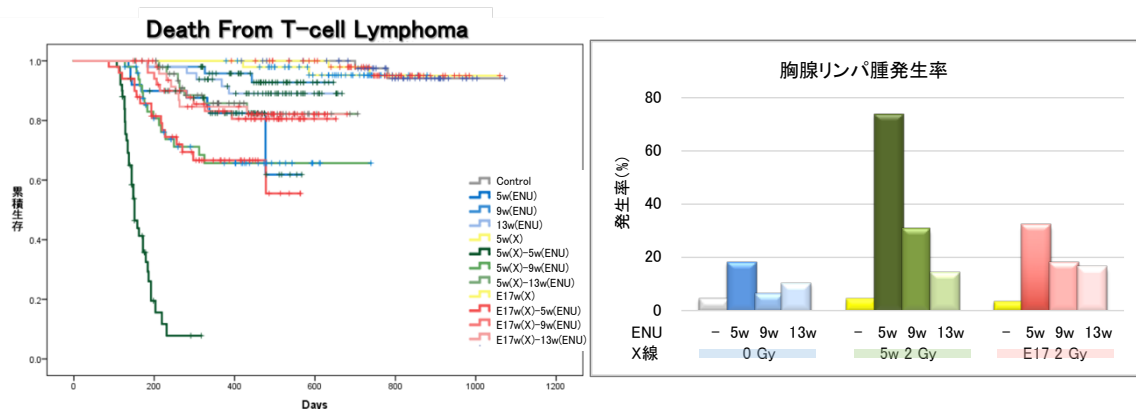
キーワード：放射線 胎児 発がん 複合影響

1. 研究開始当初の背景

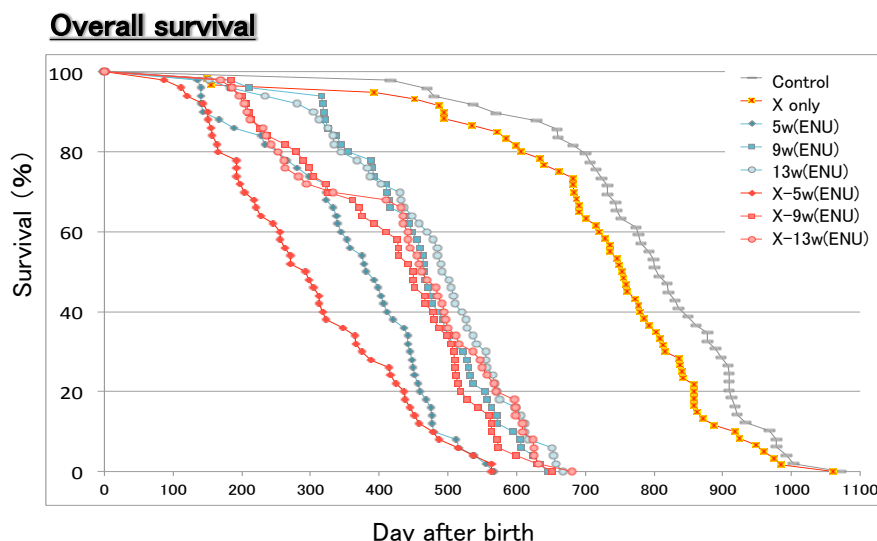
医療における放射線利用の増加や原発事故後の不安の中で、子どもや胎児への放射線の影響を心配する声は依然として多い。原爆やチェルノブイリ原発事故など様々な疫学調査から、胎児期は放射線感受性が高いと考えられている。1950年代から英国で行われた大規模な調査では、妊婦の X 線検査によって胎児期被ばくした子どもに小児白血病が増加したという結果が得られている (Stewart A, et al., Br Med J. 1958) (J. F. Bithell, et al., Br J Cancer. 1975)。しかし、1990 年代以降になると胎児期被ばくによるリスクの増加は見られないとの報告も多くなり (Wakeford R, Radiat Prot Dosimetry, 2008) (Nakano M, et al., Radiat Res, 2007) (Preston DL, et al., J Natl Cancer Inst 2008)、胎児期の放射線被ばくが生後いつまで、どのように影響するかについて統一した見解は得られていない。上述した原爆被爆者調査でも対象者が近年がん年齢に到達したところであり、全生涯にわたる発がんリスクを評価するには更なるフォローアップを待つ必要がある。

また、発がんは環境因子 (食事やたばこに含まれる化学発がん物質など) や遺伝的要因に大きく影響されることがわかっている (Doll, R. and R. Peto, J Natl Cancer Inst, 1981)。そのためヒトの放射線被ばくによる発がんリスクは、放射線単独ではなくそれら環境因子との複合影響の結果としてとらえる必要がある。胎児期被ばくにおいても、放射線単独では見えなかったリスクが出生後の生育環境によって変動している可能性がある。しかしヒトの生活環境は一律ではなく、生後の環境因子によるリスクは個人によって大きく異なる。そのため小児白血病のような早期のがんのみならず、「後年になってからの発がんまで考慮した胎児期被ばくのリスク」を疫学調査だけで推定することは困難である。これを補う手段として、飼育条件を統一できる動物実験が有効である。

当研究代表者はこれまでに、放射線 (X 線) と化学発がん物質 (ENU: エチルニトロソ尿素) の複合ばく露において、両者のばく露間隔が短いほど発がん率 (胸腺リンパ腫発生率) が高いこと (平成 22 年度科研費研究 (基盤 C))、さらに、胎児期被ばくでは小児期被ばくより複合効果が小さいこと (平成 25 年度科研費研究 (基盤 C)、下図参照) を明らかにした。



一方、下図に示すように胎児期放射線被ばくと 5 週齢 ENU の複合ばく露群 X-5w(ENU) では、5 週齢 ENU 単独投与群 5w(ENU) より寿命が短縮する傾向が見られたことから、早期に発症する胸腺リンパ腫以外の影響 (後年に発症するがんなど) を見過ごすことはできないと考えるに至った。



## 2. 研究の目的

本研究は、放射線と化学発がん物質との複合ばく露の系を用いて胎児期の放射線被ばくによる生涯にわたるリスクを動物実験で明らかにするとともに、胎児期被ばくの発がんメカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本実験では、平成 25 年度科研費研究（基盤 C）にて終了した動物実験から得られた試料を用いて解析を行った。胎生 17 日齢（E17）の B6C3F1 マウス（雌）に X 線 2 Gy を 1 回全身照射した後、以下に示すスケジュールで ENU（*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, 125 ppm）を投与し飼育観察を行った。瀕死または死亡時に解剖し、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存した試料について病理解析を行い、胎児期複合ばく露の発がんリスクおよびそれぞれの発がんスペクトルを求める。さらに、次世代シーケンス法による全エクソーム解析から胎児期被ばくに特異的な遺伝子変異（胎児期被ばくの傷跡）を網羅的に検索する。本研究では、特に寿命短縮効果が大きかった複合ばく露群（胎児期照射と 5 週齢 ENU 投与）を中心に解析を進めた。

### 【発がん実験（すでに終了）】

動物：B6C3F1 マウス（雌）

Control 群：49 匹

X only 群：60 匹

他は各群：50 匹

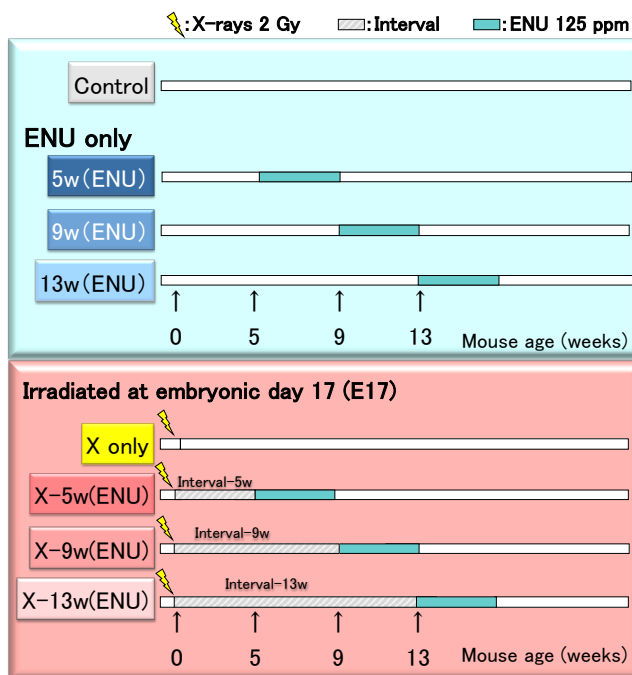
X 線：2 Gy (0.6 Gy/min)

(PANTAK X-ray generator)

ENU：*N*-ethyl-*N*-nitrosourea

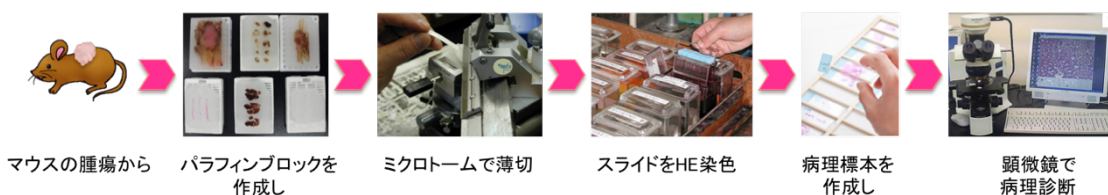
Sigma N8509 125 ppm 飲水投与

※ マウス発がん実験は平成 25 年度科研費実験にてすでに終了している。



### 腫瘍の病理解析

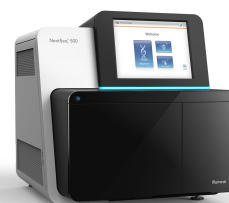
Control 群の終生飼育でも観察される肝がんや肺がんの他、ENU を投与した群では子宮や卵巣、消化器系など多くの臓器に腫瘍が形成される。保存済みの腫瘍から下記の要領で病理標本を作製し、病理診断を行う。



病理診断の結果をもとに Control 群、X only 群、5w(ENU) 群、X-5w(ENU) 群の 4 群から次世代シーケンス法で解析するサンプルを選定する。

### 腫瘍の遺伝子変異解析

病理診断の結果がんと確定した腫瘍について、凍結試料からクリオスタットを用いて凍結切片を作成し、レーザーマイクロダイセクション法によりがん細胞を収集する。QIAamp DNA Micro Kit を用いてゲノム DNA を抽出し、Illumina 社製 NextSeq500 (右図) にて全エクソーム解析を行う。



NextSeq500 (Illumina)

#### 4. 研究成果

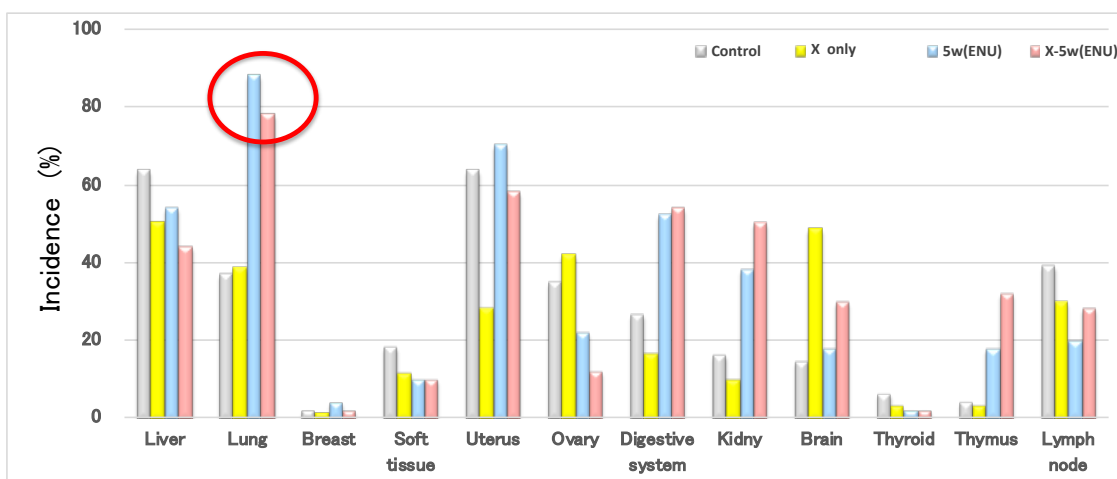
##### (1) 各臓器に観察された病変の割合（解剖所見より）

胸腺リンパ腫発生時期以降も飼育を継続し、瀕死または死亡時に解剖した。解剖所見のまとめを以下に示す（表1）。本研究では、赤枠で囲った Control 群、X only 群、5w(ENU) 群、X-5w(ENU) 群について解析を進めることとした。

(%)	Liver	Lung	Breast	Soft tissue	Uterus	Ovary	Digestive system	Kidny	Brain	Thyroid	Thymus	Lymph node
Control	63	37	2	18	63	35	27	16	14	6	4	39
X only	50	38	2	12	28	42	17	10	48	3	3	30
5w(ENU)	54	88	4	10	70	22	52	38	18	2	18	20
9w(ENU)	60	96	6	16	84	36	78	44	12	0	6	22
13w(ENU)	50	84	0	24	70	32	72	36	18	0	10	34
X-5w(ENU)	44	78	2	10	58	12	54	50	30	2	32	28
X-9w(ENU)	44	84	0	12	58	38	66	40	16	2	18	18
X-13w(ENU)	42	66	0	16	44	34	60	22	8	2	16	20

表1 臓器ごとの病変の頻度

Control 群、X only 群、5w(ENU) 群、X-5w(ENU) 群についてグラフ1に表す。赤丸で示すように、肺の異常は5w(ENU) 群で88%、X-5w(ENU) 群では78%と、他の臓器と比べて高頻度であった。



グラフ1 Control 群、X only 群、5w(ENU) 群、X-5w(ENU) 群についての病変の頻度

##### (2) 肺腫瘍の病理解析：肺腺がん（AC）発生率

結果(1)より、最も高頻度に異常が観察された肺について良性腫瘍（肺腺腫：AD）であるか悪性腫瘍（肺腺がん：AC）であるかを病理切片の顕微鏡観察によって確認した（図1参照）。

その結果、AC発生率は① Control 群と X only 群で有意差は無く、② 5w(ENU) 群および X-5w(ENU) 群はいずれも control 群および X only 群より有意に高頻度であった。

一方、③ 5w(ENU) 群と X-5w(ENU) 群の間に有意な差は認められなかった（グラフ2）。

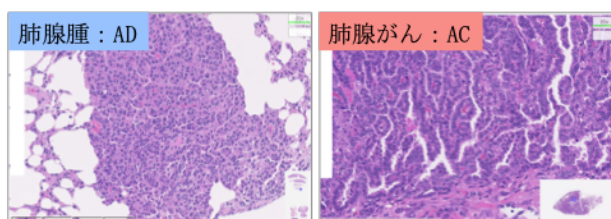
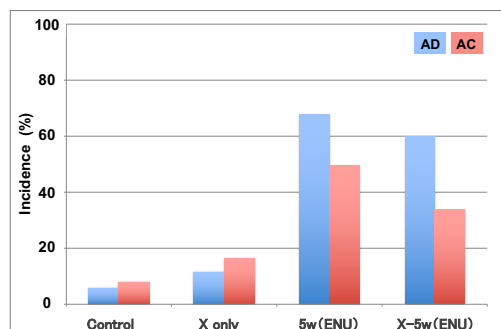
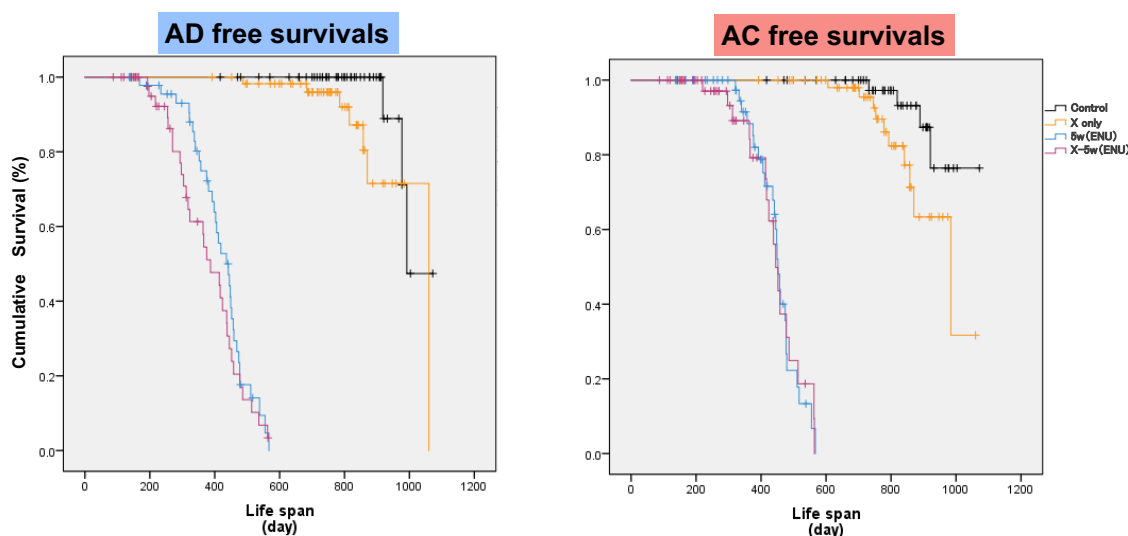


図1 肺腫瘍の病理組織像



グラフ2 肺腺腫および肺腺がん発生率

ADまたはACが確認された日齢をグラフ3に表す。発生率（グラフ2）と同様に、ADおよびACの発生時期について、5w(ENU)群とX-5w(ENU)群の間に差は認められなかった。また、必ずしも肺腫瘍が死因ではないため、リスク解析は行わないこととした。



グラフ3 ADまたはACを確認した日齢

### (3) 全エクソーム解析

次世代シーケンスによる全エクソーム解析を行うため、クリオスタットを用いて凍結腫瘍組織から凍結切片を作成した後、レーザーマイクロダイセクション法によりがん細胞を収集しQIAamp DNA Micro Kitを用いてゲノムDNAを抽出した。リファレンスゲノムとしては、それぞれの肺の正常部位からQIAamp DNA Micro Kitを用いてDNAを抽出した。Control群および5w(ENU)群についてはそれぞれ1検体、X only群およびX-5w(ENU)群はそれぞれ3検体（リファレンスを合わせて計16検体）について解析を進めている。

### (4) 重複腫瘍

発がん処理の方法に関わらず、多発性の腫瘍や重複腫瘍（卵巣悪性顆粒膜細胞腫、骨肉腫、肝細胞腺腫、肺腺腫など多種の臓器に腫瘍を持つ個体もあった）が多く観察された。発がん物質のばく露条件による多発・多重腫瘍の発生頻度について現在解析を進めている。

### 結論

本研究の条件では、胎児期の放射線被ばくにおける発がんは、生後にばく露する化学発がん物質の作用に影響しないことが示唆された。この結果から、胎児期に放射線被ばくをしても、生後の生活様式を変えることによってリスクが低減されることが期待できる。今後は、化学発がん物質単独で生じた腫瘍と複合ばく露で生じた腫瘍について、悪性度などの病理学的特徴や、遺伝子変異に違いがあるのかさらなる検討を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoshiko Amasaki, Atsuko Ishikawa, Kazuhiro Daino, Takamitsu Morioka, Yi Shang, Chizuru Tsuruoka, Yoshiya Shimada, Shizuko Kakinuma
2. 発表標題 Mutation profiling of mouse T-cell lymphomas induced by exposure to X-rays and/or N-ethyl-N-nitrosourea using whole-exome sequencing
3. 学会等名 The 16th International Congress of Radiation Research (ICRR 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 甘崎 佳子、石川 敦子、臺野 和広、森岡 孝満、尚 奕、島田 義也、柿沼 志津子
2. 発表標題 放射線と化学発がん物質に起因する変異パターンの違い：マウス胸腺リンパ腫の全エクソンシーケンス解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiko Amasaki, Takamitsu Morioka, Kazuhiro Daino, Yi Shang, Chizuru Tsuruoka, Mayumi Nishimura, Yoshiya Shimada, Shizuko Kakinuma
2. 発表標題 Increased risk of in utero X-ray exposure to mice treated with N-ethyl-N-nitrosourea postnatally
3. 学会等名 25TH BIENNIAL CONGRESS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH (EACR25) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 甘崎 佳子、石川 敦子、臺野 和広、森岡 孝満、尚 奕、島田 義也、柿沼 志津子
2. 発表標題 放射線と発がん性化学物質により誘発されたマウス胸腺リンパ腫のゲノム変異パターン：全エクソーム解析による探索
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 甘崎 佳子、森岡 孝満、臺野 和広、石川 敦子、尚 奕、鶴岡 千鶴、島田 義也、柿沼 志津子
2. 発表標題 胎児期被ばくの発がんリスク；化学発がん物質との複合影響について
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第60回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	柿沼 志津子  (Kakinuma Shizuko)  (20392219)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・放射線影響研究部・部長   (82502)	
連携研究者	森岡 孝満  (Morioka Takamitsu)  (70253961)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・放射線影響研究部・研究統括   (82502)	
連携研究者	臺野 和広  (Daino kazuhiko)  (90543299)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・放射線影響研究部・研究統括   (82502)	
連携研究者	石川 敦子  (Ishikawa Atsuko)  (30443063)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所・放射線影響研究部・主任技術員   (82502)	