

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20510052

研究課題名 (和文) チェルノブイリ放射能汚染シミュレーションによる継世代的遺伝毒性と発癌のリスク推定

研究課題名 (英文) The tumorigenicity and transmissible genetic risk in mice under the Chernobyl simulation.

研究代表者

中島 裕夫 (NAKAJIMA HIROO)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20237275

研究成果の概要 (和文)：

チェルノブイリ原発事故以来、低レベル放射能汚染地域に生活するヒトへの遺伝的影響が懸念されている。ヒトへの影響研究の代替法として放射能汚染地のシミュレーション実験を行い、0、10、100Bq/ml の $^{137}\text{CsCl}$ 水を8カ月間給水し続ける低レベル放射能汚染環境下での内部、外部被曝マウスにおける腫瘍形成性とゲノムストレスへの影響を検討した。その結果、10、100 Bq/ml 各群で遺伝子切断頻度は有意に上昇したが、小核試験、ウレタン誘発による肺腫瘍発生頻度、増殖速度では、対照群との間に有意な差が認められなかった。

研究成果の概要 (英文)：

To simulate the radiocontamination in middle contaminated areas of Belarus (1997, 2005), mice were maintained for 8 months in the radioisotope facility with free access to drinking water containing $^{137}\text{CsCl}$ (0Bq/ml, 10Bq/ml and 100Bq/ml).

Mice were assessed the long term low dose rate and low dose internal and external radiation effect by the quantitative measurement of the contaminated radionuclides-induced DNA double-strand breaks by $\gamma\text{-H2AX}$ foci in the organs. The micro nuclei test and the tumorigenicity of mouse lung were also examined under the same condition.

The number of $\gamma\text{-H2AX}$ focus per hepatic cell was 1.4 (0Bq/ml), 9.5(10Bq/ml), 10.7(100Bq/ml), respectively. It was suggested that the genome damage caused internal low dose ^{137}Cs radiation were occurring chronically even in low dose contaminated area. But no significant difference was observed in the micro nuclei test. In addition, progress data (by 6 animals in each dose groups) is showing that the number of lung tumors per mouse induced by urethane under the same condition is 36.8(368/10) (0 Bq/ml), 44.1(441/10) (10Bq/ml), 44.1 (441/10)(100Bq/ml), and the average of tumor diameter (mm) is 1.64, 1.67, 1.68, respectively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響額

キーワード：生物影響、チェルノブイリ原発事故

1. 研究開始当初の背景

1986年4月26日に発生したチェルノブイリ原子力発電所爆発事故は事故発生後20年を越えた。しかし、未だに長半減期核種のセシウム137、ストロンチウム90の汚染が続いており（物理学的半減期はそれぞれ30.2年、28.8年）、ヒトを含めてそこに棲息する生物には外部被曝はもとより内部被曝が長期にわたって続いているのが現状である。

この20年の間に放射能汚染地域（ベラルーシ、ロシア、ウクライナ）における人々の健康影響が色々と研究されてきた。その中で事故発生直後の清浄作業に関与した人々の高線量被曝による放射線急性障害と晩発障害、そして放射性ヨウ素の小児被曝に関する甲状腺がんへの影響に関して明確な影響が報告されてきたが、それ以外のがん、奇形、遺伝的影響を含む放射能汚染地域住民の健康への影響については、色々な報告がなされているものの確固たる影響としては未だ確証が得られておらず、今後のデータの蓄積を待たねばならないのが現状である。この確証が現段階で得られていない原因には、指標とする影響が癌や継世代的影響などのように発生の検出までに時間を要するものであることもさることながら、被曝群の被曝線量が低いこと、被曝群の正確な被曝線量が把握できないこと、被曝線量にばらつきがあること、また、ソ連崩壊後の経済状況ならびに産業化学物質による公害などが指標とする影響の要因ならびに検出力に対して無視できない影響力を持っていることである。従って、チェルノブイリ事故による放射能汚染が原因となる低線量放射線被曝の生物影響、特にがん、遺伝的影響のリスクアセスメントを行うためには、新たに放射線影響のみを抽出する手法を考えなければならない。

また、広島・長崎の原爆放射線被曝データの基になった被曝線量よりさらに低い線量の被曝であるチェルノブイリ事故の詳細な疫学的データを得るまでには、かなりの年月を要することが予想される。20年を経過した中で、現在の汚染状況を把握し、今後の汚染地域における低線量放射線影響のリスクアセスメントを行うためには、ヒトにおける疫学に代わる短期代替法を考えなければならない状況である。

2. 研究の目的

ヒトにおいて経世代的影響が現れるには数世代の世代交代が必要であり、結果が明らかになるまでには百年以上の時間経過が必要である。そこで、世代交代の速いマウスに着目して、低レベル放射能汚染環境下で世代交代を重ねた野生マウスにおいて遺伝的影響の蓄積があるかどうかを検討することを

考えた。しかし、チェルノブイリ汚染地区では、汚染濃度の異なるところが斑状に存在しているために、それぞれのマウスの生涯被ばく線量の算定が困難なことや遺伝学的に雑種であること、また、放射能汚染のみならず、工業化、経済の低迷などの要因で化学物質などの環境汚染も進んでおり、現地野生マウスでの研究では、厳密な放射線影響のみを抽出することが困難であると考えられた。

本研究では、RI施設内で近交系マウスに放射能汚染地マウスの体内と同レベルになるように¹³⁷Csを長期間経口的に摂取させることでチェルノブイリ放射能汚染環境を実験室内で再現し、その被曝による遺伝的影響、生理的影響の検出を数世代にわたって試み、その結果をヒトにおける継世代的影響の短期的シミュレーション実験として外挿できるか検討することが目的である。

3. 研究の方法

(1) ¹³⁷Csの体内動態、世代交代実験

近交系マウス(A/J)をRI施設内で飼育し、¹³⁷Csの体内動態を調べることでベラルーシにおける野生マウスと同等量の¹³⁷Csが常に体内に存在するような飲み水の¹³⁷Cs濃度の設定を行った。そして、設定された¹³⁷Cs濃度0、10、100Bq/ml(3群)の給水条件下で、同じ親から生まれた(同腹子)近交系マウス

(A/J)をそれぞれの条件下で飼育、兄妹交配を続けた。また、各世代のマウスの尾部、肝臓組織をサンプルとして凍結保存した。

(2) 遺伝子損傷(DNA二本鎖切断)の検出

① 生体細胞内DNA二本鎖切断の定量

放射線被曝により最初に、そして全ての細胞で発生する二本鎖DNA切断を修復するための最初のプロセスであるDNA切断部位のH2AXヒストン蛋白リン酸化によって生じる γ H2AXをフォーカスとしてカウントするために、肝臓の凍結切片を作成し、免疫染色法により γ H2AXを特異的かつ線量依存的に検出した。

② 小核試験による遺伝子損傷の検出

赤血球形成過程での低線量被曝による染色体異常を検出するためにマウス大腿骨から採取した骨髓細胞をスライドグラスに塗沫後、アクリジンオレンジにて染色を施し蛍光顕微鏡下で赤血球中に生じる小核の頻度を測定した。

(3) 慢性的低線量放射線内部被曝の発がん過程への影響

低線量放射線被曝は環境物質による発がん過程を促進させるか抑制させるかを調べるために¹³⁷Cs濃度0、10、100Bq/mlの給水により飼育している3群のそれぞれのA/Jマウス(出生後8週目)に、肺腫瘍を誘発させるUrethane(1mg/g体重)を単回皮下投与し、

8ヶ月間飼育したマウスの個体あたりの腫瘍発生頻度と腫瘍増殖速度を定量した。ここで誘発される肺腫瘍は、初期の段階では、バクテリアコロニー様の病変を生ずるので、細菌コロニーカウントのように腫瘍の数を計数して腫瘍発生頻度、そして、腫瘍直径を測定することで、腫瘍増殖速度を定量することができる。

(4) 遺伝子発現量の変化

¹³⁷Cs 濃度 0、100Bq/ml の給水による飼育環境下で3世代経たマウスのそれぞれの肺組織より抽出した mRNA より cDNA を作成して GeneChip にて遺伝子発現量の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) ¹³⁷Cs の体内動態、世代交代実験

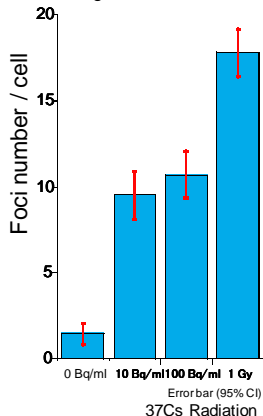
経口的に単回投与された 1 kBq/g (平均 28kBq / マウス(平均体重 28g)) の ¹³⁷Cs は、消化管、肝臓、腎臓で 1 時間後、心臓、肺、脾臓で 4 時間後、筋肉、脳でおおよそ 3 日後に組織内濃度が最高に達し、筋肉、脳以外の臓器では急速に排泄されて、ほぼ 2 日で半分以下になった。また、筋肉組織でのピーク濃度が 1.15kBq/g とほぼ摂取濃度と同濃度であった。また、100Bq/ml 濃度の ¹³⁷CsCl 水溶液を常時飲ませた場合では、平均的なマウス 1 日当たりの摂水量が 4.4ml で 1 日当たりの ¹³⁷Cs 摂取量は 16Bq/g 体重 (440Bq/day / mouse) となった。諸臓器への蓄積量は飲水開始後から緩やかに上昇し、おおよそ 3 週間で筋肉では 1 日摂取量の約 10 倍量、他臓器では 2~5 倍量で平衡に達した。この濃度はチェルノブイリ中等度汚染地の動物体内濃度 (1997 年) と同じであり、本実験の給水条件とした。

現在までに 0、10Bq/ml 群では 8 世代、100Bq/ml 群では 9 世代まで世代を進めることに成功した。引き続き世代交代飼育を行っている。全ての群の 10 世代目において、遺伝子変異、染色体異常、遺伝子発現量、生理学的な差異の有無を解析する予定である。

(2) 遺伝子損傷 (DNA 二本鎖切断) の検出

① 生体細胞内 DNA 二本鎖切断の定量

Quantitative detection of γ -radiation-induced DNA double-strand breaks using γ -H2AX foci in mouse liver

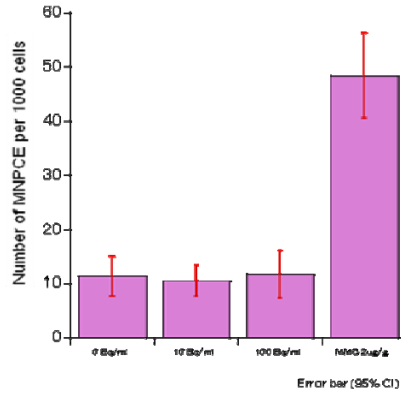


8 カ月間の ¹³⁷Cs 水給水実験では、10、100 Bq/ml それぞれの群で対照群に比しておおよそ 5 倍の γ H2AX フォーカス数が検出された (左図)。このような

10Bq/ml 群の低線量率被曝においても DNA 切断の指標である γ H2AX の増加が認められる慢性的な遺伝子ストレスの存在が示唆された。

② 小核試験による遺伝子損傷の検出

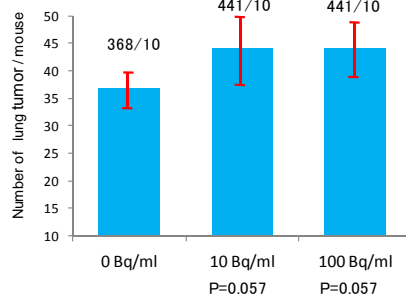
γ H2AX フォーカスが検出されたにもかかわらず骨髄細胞における小核の出現頻度は、



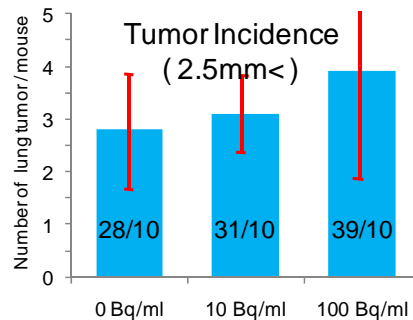
陽性対照群以外の全ての群間で差が認められなかった (左図)。これは、骨髄幹細胞から赤血球分化までの期間内での被曝線量が小核検出限界以下であった可能性が考えられた。

(3) 慢性的低線量放射線内部被曝の発がん過程への影響

Lung Tumor Incidence



¹³⁷Cs 水給水で 8 ヶ月間飼育した第一世代親マウスの個体あたりのウレタン誘発による腫瘍発生頻度、腫瘍増殖速度を定量した結果、個体あたりの肺腫瘍発生数は、0、10、100 Bq/ml 群 (各群 10 匹) それぞれで 36.8 (368/10)、44.1 (441/10)、44.1 (441/10)、平均腫瘍直径 (mm) は 1.64、1.69、1.68 であった (上図)。



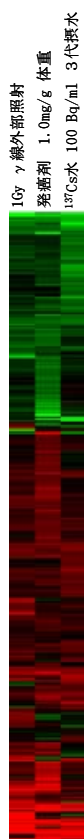
また、腫瘍直径が 2.5 mm 以上の腫瘍の各群

における頻度はそれぞれ 2.8、3.1、3.9 であり、上図に示すごとく 100Bq/ml 給水群では対照群に比して若干の肺腫瘍増殖促進の傾向 (P=0.057) は認められるものの肺腫瘍発生頻度ともに有意な差は認められなかった。

今後さらに世代を重ね 10 世代目において再度詳細な遺伝子と腫瘍発生への影響を調べる予定である。

(3) 遺伝子発現量の変化

左図 dendrogram は、第 3 代目マウス肺の GeneChip Arrays 解析で、対照群に対して遺伝子の発現が増加(赤色)、減少(緑色)した遺伝子を γ 線外部照射群、発がん物質投与群と同時に比較したものである。100Bq/ml ^{137}Cs 水給水マウスでは、発がん物質投与群とは異なるパターンを示すことが予想されるが、外部からの γ 線急照射群とも明らかに異なる遺伝子発現パターンを示していることがわかった(矢印、赤は増加、緑は減少したバンドを示す)。これらが、第 10 世代目でも認められるか、また、この発現パターンが何を意味しているかの検討が今後の課題である。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

① Nakajima, H., Ozaki, K., Hongyo, T., Narama, I., Todo, T., A rapid and easy method for the qualitative detection of intracellular deposition of inhaled nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* (2011), doi:10.1016/j.nano.2011.02.004、In press.

② Adachi, S., Ryo, H., Hongyo, T., Nakajima, H., Tsuboi-Kikuya, R., Tokita Y., Matsuzuka, F., Hiramatsu, K., Fujikawa, K., Itoh, T., Nomura, T., Effects of fission neutrons on human thyroid tissues maintained in SCID mice, *Mutation Research*, 696, 107-113, 2010.

③ Kodaira, M., Roy, H., Kamata, N., Furukawa, K., Takahashi N., Nakajima H., Nomura, T., Nakamura, N. No evidence of

increased mutation rates at microsatellite loci in offspring of A-bomb survivors. *Radiation Research*, 173, 205-213, 2010.

④ Nakamura, S., Morimoto, S., Saito, T. and Tsunoda, Y. Mössbauer Study on the Polar Ferrimagnet GaFeO₃. *J. Phys.*, C200, 012140-1-4, 2010.

⑤ 野村大成、梁 治子、足立成基、時田偉子、堀家なな緒、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介、宇宙環境の人体影響評価、Evaluation of Human Risk in Space Environment、*Space Utiliz Res.*, 26, 249-251, 2010.

⑥ 野村大成、梁 治子、足立成基、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、松塚文夫、ヒト臓器・組織置換マウス等を用いた宇宙放射線の人体および継世代リスクの基礎評価、Risk of Cosmic Radiation on Human Organs and Tissues Maintained in SCID Mice and Transgenerational Effects、*Space Utiliz Res.*, 25, 42-45, 2009

⑦ Kawase, M., Saito, T., Ogawa, M., Uejima H., Hatsuda, Y., Kawanishi, S. Y. Hirotani, M. Myotoku, K. Ikeda, K. Takano, M. Hangyo, K. Yamamoto, and M. Tani, Terahertz Absorption Spectra of Original and Generic Ceftazidime. *Anal. Sci.*, 25, 1483-1485, 2009.

⑧ 小平美江子、梁 治子、高橋規郎、鎌田直子、古川恭治、中島裕夫、野村大成、中村典、原爆被爆者の子供におけるマイクロサテライト突然変異のスクリーニング長崎医学会雑誌 83(特集号) :345-8, 2008.

⑨ Taisei Nomura, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Li Ya Li, Mukh Syaifudin, Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Rajamanickam Baskar, Kazuyasu Fukuda, Yoshihiro Oka, Haruo Sugiyama, Fumio Matsuzuka. Differential radiation sensitivity to morphological, functional and molecular changes of human thyroid tissues and bone marrow cells maintained in SCID mice. *Mutation Research* 657, 68-76, 2008.

⑩ 中島裕夫 : チェルノブイリシミュレーション実験—放射能汚染地域における低線量放射線内部被曝による生物影響—、大阪大学 R I センターニュース、No. 21, 2-4, Feb. 2008.

⑩中島裕夫、齋藤直、梁治子、野村大成：チェルノブイリ高度、中度放射能汚染地域における動植物体内の¹³⁷Csの分布と含量の時間的推、Ecological decrease and biological concentration of radionuclides in plants and animals after Chernobyl catastrophe, Proceedings of the Eight Workshop on Environmental Radioactivity (TaichiMiura and Norikazu Kinoshita eds.), KEK Proceedings 2007-16, 113-118, 2008.

[学会発表] (計9件)

①中島裕夫、菊谷理絵、野村大成、藤堂剛、scidマウスと野生型マウス系統における γ -H2AXフォーカス消長の比較 日本放射線影響学会 第53回大会 要旨集、2010. (2010.10.20~22、京都)
 γ -H2AX foci formation in white blood cells of wild type and scid mouse strains after high or low dose rate γ -rays irradiation.

②野村大成、梁治子、足立成基、大平充宣、本行忠志、中島裕夫、伊藤哲夫、藤川和男、落合俊昌、行徳淳一郎、桂洋介、時田偉子、堀家なな緒、宇宙環境の人体影響評価、宇宙利用シンポジウム(第26回)、宇宙航空研究開発機構・相模原キャンパス(相模原)、2010.1.25(月) - 26(火)

③H Nakajima, T Saito, KG Yeliseeva, H Ryo, T Hongyo, Y Yamaguchi, NA Kartel, EV Krupnova, V Trusova, AM Voitovich, VS Piskunov, TP Smirnova, EI Anisimova, V Afonin, T Todo, T Nomura; Ecological decrease, biological concentration and genome stress of radionuclides in plants and animals after Chernobyl catastrophe. 10th International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), pp221, Firenze - Italy, 20-25 August 2009

④中島裕夫、本行忠志、齋藤直、藤堂剛、チェルノブイリ放射能汚染シミュレーションにおけるマウス腫瘍形成性とゲノムストレス 日本放射線影響学会 第52回大会 要旨集 82, 2009.11.11-13、広島) The tumorigenicity and genome stress in mice under the Chernobyl simulation. pp82.

⑤野村大成、梁治子、足立成基、中島裕夫、本行忠志、藤川和男、伊藤哲夫、松塚文夫、ヒト臓器・組織置換マウス等を用いた宇宙放射線の人体および継世代リスクの基礎評価、宇宙利用シンポジウム2009.1.14-15、宇宙航空研究開発機構・相模原キャンパス(相模原)

⑥H. Nakajima, T. Saito, T. Hongyo, and T. Todo: Mice genome stress in the Chernobyl simulation experiment. 22nd International Mammalian Genome Conference. Nov.2 - 5, 2008, Institute of Molecular Genetics, Prague, Czech Republic, pp 129, 2008

⑦足立成基、野村大成、梁治子、本行忠志、中島裕夫、猪原秀典、藤川和男、伊藤哲夫、SCIDマウスに維持されたヒト甲状腺組織への核分裂放射線の影響、日本放射線影響学会大会、講演要旨集 pp.259- (小倉2008)

⑧小平美江子、梁治子、高橋規郎、鎌田直子、古川恭治、中島裕夫、野村大成、中村典、マイクロサテライトでの突然変異率に対する原爆放射線の遺伝的影響は検出されなかった、日本放射線影響学会大会、講演要旨集, pp.264- (小倉2008)

⑨中島裕夫、梁治子、野村大成、齋藤直、本行忠志、藤堂剛、チェルノブイリ放射能汚染地域に棲息する生物の体内核種動態と遺伝子へのストレス 日本環境変異原学会(第37回大会)、International Symposium on Genotoxicity Assesment (併催)、2008,12,4 (12.4-12.6)、沖縄コンベンションセンター(沖縄) 要旨集pp171.
Genome Stress, Ecological Decrease and Biological Concentration of Radionuclides in Organisms after Chernobyl Catastrophe.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 裕夫 (NAKAJIMA HIROO)
大阪大学・大学院・医学系研究科・助教
研究者番号：20237275

(2) 研究分担者

齋藤 直 (SAITO TADASHI)
大阪大学・ラジオアイソトープ総合センター・教授
研究者番号：50153812

(3) 研究分担者

本行 忠志 (HONGYO TADASHI)
大阪大学・大学院・医学系研究科・准教授
研究者番号：90271569