

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25350956

研究課題名(和文) 胎児期の放射線被曝は将来の発がんに関与するのか？

研究課題名(英文) May the effects of in utero irradiation be involved in future carcinogenesis?

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期放射線被曝の影響を明らかにするため、放射線と化学発がん物質との複合曝露の系を用いて動物実験を行った。胎生17日齢または生後5週齢のマウスにX線照射後、5週齢、9週齢、13週齢からN-エチル-N-ニトロソウレア(ENU)を4週間投与して胸腺リンパ腫を誘発した。その結果、胎児期照射および5週齢照射ともに複合曝露のタイミング(インターバル)が短いほど胸腺リンパ腫発生率が高く、胎児期被曝の影響は生後も残ることが示された。

研究成果の概要(英文)：We studied the combined effect of radiation exposure in utero, with ENU treatment at various times after birth, on T-cell lymphoma development using B6C3F1 mice. Combined radiation exposure with ENU treatment increased the T-cell lymphomas incidence significantly compared to irradiation at either 5 weeks old or E17. ENU was more efficient at inducing T-cell lymphomas with shorter intervals following irradiation, at either age. These results suggest the effects of in utero irradiation may persist, and that sub-carcinogenic doses may still pose a risk with additional environmental exposures in later life.

研究分野：放射線分子生物学

キーワード：胎児期 放射線 複合曝露 胸腺リンパ腫

## 1. 研究開始当初の背景

福島原子力発電所の事故以降、胎児や子どもの被曝影響について不安の声が絶えない。その要因の一つとして「判断基準の不確かさ」が考えられる。

原爆被爆者や放射線治療患者の調査では、胎児期における中・高線量放射線被曝によって発達異常や重度精神遅滞など確定的影響が現れることが報告されている<sup>1) 2)</sup>。しかしそこには閾値が存在し、被曝線量 100mSv 未満では影響は観察されないという見解で一致している (ICRP Publ. 90, 2003)。

一方、確率的影響である発がんのリスクに関しては、1950 年代に英国で行われた大規模疫学調査において、X 線検査を受けた妊婦から生まれた子どもは小児白血病のリスクが上昇したとされ<sup>3) 4)</sup>、その後も同様の報告がなされている<sup>5)</sup>。

しかし 1990 年以降になると、リスクの増加は観察されないという報告が増えてきた<sup>5)</sup>。マウスを用いた我々の研究においても、放射線誘発胸腺リンパ腫の発生率は生後 1 週齢で最も高く、7 週齢や胎生 17 日齢では低いという結果が得られている (図 1)。

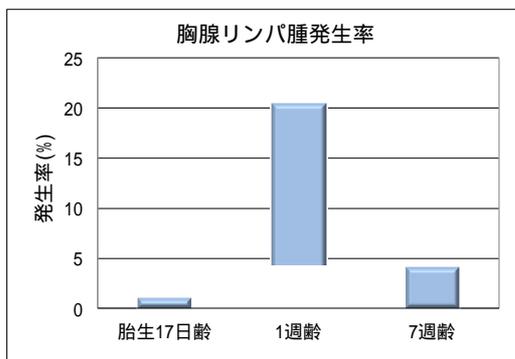


図 1 線 4Gy 1 回照射によるマウス胸腺リンパ腫発生率

さらに、胎児期被曝したマウスのリンパ球や骨髄細胞に染色体異常は生後残存しないとの報告もあり<sup>6)</sup>、胎児期被曝の発がんリスクについて未だ結論は出ていない。

矛盾の原因として、この 60 年間に放射線診断時の線量が低くなったことに加え、放射線以外の様々な要因 (喫煙・飲酒等の生活習慣や妊婦及び胎児の体重調節に対する意識の変化など) の関与が考えられる。

さらに私たちの生活環境中には、タバコや食事成分、大気汚染物質など様々な発がん要因が混在している<sup>7)</sup>ため、放射線被曝によるヒトの発がんリスクも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なくてはならない。これまで我々が行ってきたマウス胸腺リンパ腫 (ヒト T 細胞白血病のモデル) をエンドポイントとした研究から、放射線 (X 線) と化学発がん物質との複合曝露では胸腺リンパ腫が相乗的に増加

することが明らかとなっている<sup>8)</sup>。

また、4 週齢 (思春期に相当) マウスを用いた当研究代表者による平成 22 年度科研費研究では、X 線被曝後、次の発がん要因に曝露するまでの間隔 (インターバル) が短いほど発がん率が高いことが観察されている。しかし胎児期被曝の複合影響に関する情報は少ない。

1. Nakashima E, Relationship of five anthropometric measurements at age 18 to radiation dose among atomic-bomb survivors exposed in utero, *Radiat Res*, 1994. 138:121-6
2. Otake M, et al., Brain Damage among the Prenatally Exposed, *J Radiat Res*, 1991. 32(suppl): 249 -264
3. Stewart A, et al., A survey of childhood malignancies, *Br Med J*. 1958 Jun 28, 1(5086): 1495-1508.
4. J. F. Bithell, et al., Pre-natal irradiation and childhood malignancy: a review of British data from the Oxford Survey, *Br J Cancer*. 1975 March, 31(3): 271-287.
5. Wakeford R, Childhood leukaemia following medical diagnostic exposure to ionizing radiation in utero or after birth, *Radiat Prot Dosimetry*, 2008. 132 (2): 166-174
6. Nakano M, et al., Chromosome Aberrations do not Persist in the Lymphocytes or Bone Marrow Cells of Mice Irradiated In Utero or Soon after Birth, *Radiat Res*, 2007. 167, 693-702.
7. Doll, R. and R. Peto, The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, 1981. 66(6): p. 1191-308.
8. Kakinuma S, et al., Combined exposure to X-irradiation followed by N-ethyl-N-nitrosourea treatment alters the frequency and spectrum of Ikaros point mutations in murine T-cell lymphoma, *Mut. Res*, 2012. 737:43-50

## 2. 研究の目的

本研究は、胎児期放射線被曝のより明確なリスク評価に役立つ科学的根拠を得ることを目的とする。

研究を開始するにあたり、我々は胎児期被曝した子どもが出生後に環境発がん物質に曝露されることで、放射線単独では観察されなかったリスクが顕在化したという仮説を立てた。

本研究では、放射線と化学発がん物質との複合曝露の系を用いて、胎児期被曝の影響はなくなるのか否かを動物実験で明らかにす

る。さらに、得られた胸腺リンパ腫についてがん関連遺伝子の変異解析を行い、「胎児期被曝による放射線の傷痕」の特徴を分子生物学的見地から検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 胸腺リンパ腫の誘発

本実験では、放射線は X 線を、化学発がん物質は食事やたばこに含まれるアルキル化剤であり環境中の発がん物質としてデータが蓄積されている *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) を用いた。胎生 17 日齢 (E17) および 5 週齢 (5w) の B6C3F1 マウス(雌)に X 線 2Gy(PANTAK X-ray generator)を 1 回全身照射した後、図 2 に示すスケジュールで ENU(125ppm)を 4 週間飲水投与し胸腺リンパ腫を誘発した。



図 2 発がん実験プロトコル

マウスは、Control 群 49 匹、E17 X 線単独群 60 匹、その他の群は全て 50 匹を使用した。

発がん処理後のマウスは毎日健康状態をチェックし、発がんの兆候を示したとき麻酔下ですみやかに解剖した。サンプルは DNA、RNA、タンパクなどの分子解析用に処理した後、凍結保存した。全てのマウスは生涯飼育し、寿命解析を行った。

#### (2) 胸腺リンパ腫のゲノム解析

得られた胸腺リンパ腫サンプルから DNA を抽出し、11 番、12 番、19 番染色体について LOH (ヘテロ接合性の消失) 解析を行った。

これまでの我々の研究から、X 線誘発の胸腺リンパ腫では 11 番、12 番、19 番染色体に高頻度に LOH が観察されることがわかっている (図 3)。

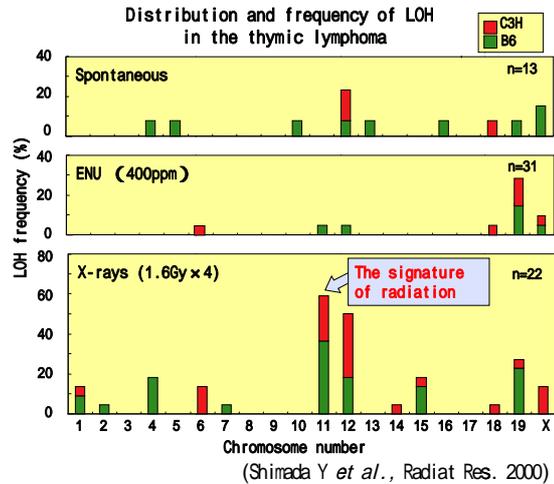


図 3 マウス胸腺リンパ腫における LOH 頻度

12 番染色体は自然誘発、19 番染色体は ENU 誘発でも高頻度であったのに対し、11 番染色体は放射線に特有であった。本研究では図 4 に示す Mit マーカーを用いて 11、12、19 番染色体について LOH 解析を行った。

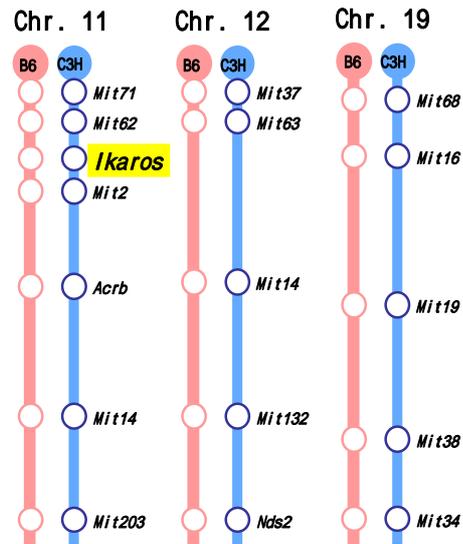


図 4 LOH 解析用 Mit マーカー

### 4. 研究成果

#### (1) 生存率

生存曲線 (図 5) で示したように、5w 照射および E17 照射ともに複合曝露群では ENU 単独群より短縮した。また X 線照射と ENU 投与の間隔 (インターバル) がほぼ同じ 5w-9w (インターバル 4w) 群と E17-5w (インターバル 5w) 群では類似する生存カーブを示した。

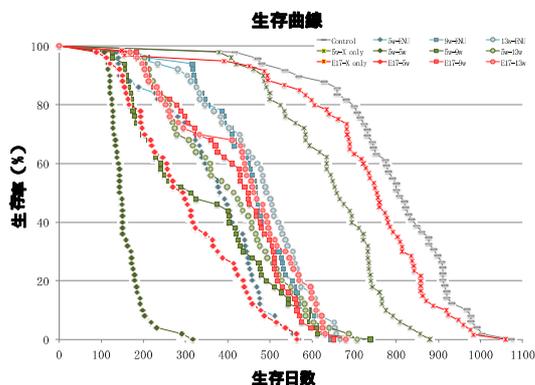


図5 生存曲線

(2) 胸腺リンパ腫発生率

胸腺リンパ腫発生率を表1に示す。X線2Gy単独照射の胸腺リンパ腫発生率は5w照射群4%、E17照射群3%で、コントロール群4%と同レベルであった。ENU単独投与では、5w投与群のみコントロールより有意に高かった。複合曝露群について同時期のENU単独投与群と比較すると、5w照射の複合曝露では、5w-5w群(インターバル0w)および5w-9w群(インターバル4w)で有意な増加が見られたが、5w-13w(インターバル8w)では有意差は得られなかった。さらに、E17照射の複合曝露においては全ての群で有意な増加は認められなかった。

	X線単独 (ENU Oppm)	5w-ENU	9w-ENU	13w-ENU
ENU単独 (X線 0Gy)	4	24	6	10
5w X-rays	4	74	36	16
E17 X-rays	3	32	18	16

表1 胸腺リンパ腫発生率(%)

また、同じ週齢でのENU単独投与と比較したときのハザード比を図6に示す。

		ENU		
		5w	9w	13w
X線	5w	15.2 [6.3-36.5]	8.4 [2.5-28.6]	2.0 [0.7-6.1]
	E17	1.6 [0.8-3.4]	3.3 [0.9-12.3]	1.8 [0.6-5.5]

図6 複合曝露のハザード比 [95% CI]

(3) 胸腺リンパ腫のLOH解析

図7に示したように、各染色体ともに5w-5w群のLOH頻度が高い傾向にあり、特に12番染色体で高頻度であった。E17複合曝露群では全体にLOH頻度が低い傾向が見られた。

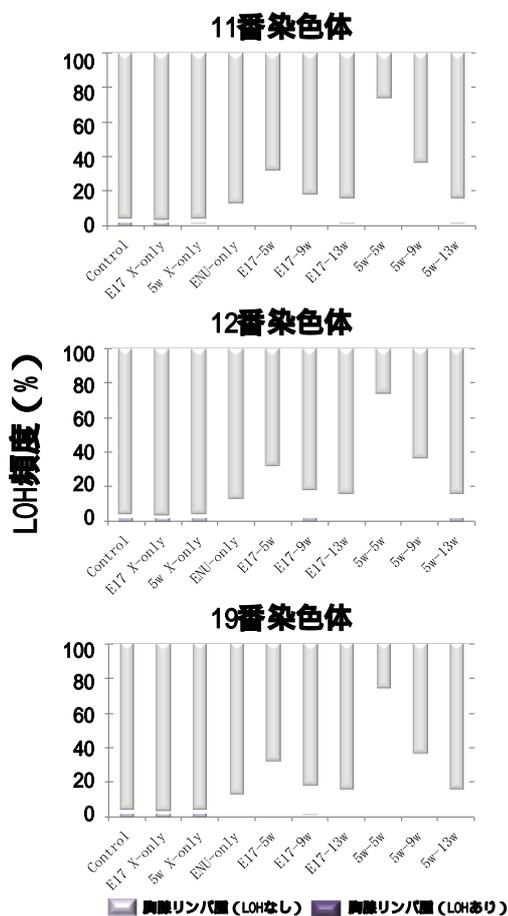


図7 胸腺リンパ腫のLOH頻度

(4) 結論

胎児期放射線被曝による発がんへの影響は、思春期前後の被曝より小さい傾向が見られた。しかし、有意差はないが胎児期複合曝露でも胸腺リンパ腫発生率はENU単独より増加傾向にあったこと、生存日数が短縮したことから、胎児期放射線被曝の影響は生後も残ることが示唆された。ただし複合曝露においては後から曝露する発がん物質との曝露の間隔(インターバル)に依存するところが大きく、曝露間隔が8週以上開くと有意な増加が認められないことが分かった。

また、胎児期複合曝露で生じた胸腺リンパ腫のゲノム変異には、放射線特有のLOH変異は確認できなかった。胎児期被曝による発がん機構を解明するためには、今後さらなる検討が必要である。

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)

[学会発表](計 3件)

甘崎 佳子, 尚 奕, 鶴岡 千鶴, 島田 義也, 柿沼 志津子: 胎児期の放射線被ばく・生後の化学物質ばく露との複合影

響を検討する、ダイバーシティ CHIBA 研究環境促進コンソーシアム共同シンポジウム 共同研究促進のための合同研究発表会、2016.12.03、東邦大学、千葉県船橋市

甘崎 佳子、尚 奕、鶴岡 千鶴、島田 義也、柿沼 志津子：胎児期放射線被ばくと生後の化学物質ばく露との複合影響・胎児期被ばくで生じたゲノム変異の関与、第 39 回日本分子生物学会、2016.12.01、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

Yoshiko Amasaki, Yi Shang, Chizuru Tsuruoka, Shusuke Tani, Mayumi Nishimura, Yoshiya Shimada<sup>1</sup> Shizuko Kakinuma : Prenatal irradiation increases T-cell lymphoma risk when mice are exposed to a chemical carcinogen in early life, but not after radiation alone, EACR-AACR-SIC 2015 Special Conference, 2015.06.21, Florence, Italy

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

甘崎 佳子 (AMASAKI YOSHIKO)

国立研究開発法人量子化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

研究者番号：80435700

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

柿沼 志津子 (KAKINUMA SHIZUKO)

国立研究開発法人 量子化学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 放射線影響研究部・部長

研究者番号：20322219