

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550039

研究課題名(和文)セシウム137の多世代慢性的経口微量摂取による子孫マウスの心筋への影響

研究課題名(英文)Influences on structure and metabolism of the myocardium in descendant mice after the every generational low dose-rate internal 137Cs radiation exposure

研究代表者

中島 裕夫(Nakajima, Hiroo)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20237275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：137Csの長期低線量・低線量率内部被ばくによる心筋への影響を検討するために137CsCl水溶液(100Bq/ml)を12ヶ月自由摂取させた群と対照群でそれぞれ3匹ずつのマウスを12か月間飼育した。これらマウスの心臓の透過電顕による組織構造解析と代謝産物の解析を試みた結果、137Cs内部被曝群の心筋では、対照群に比してミトコンドリアの膨化像や巨大化像の頻度が高くなる傾向が認められたが、統計学的に有意な差はなかった。また、心筋の代謝系では、137Cs水摂取群で抗酸化ストレスに関わるグルタチオン(GSH)が有意($P=0.033$)に減少し、解糖系もグルコース6リン酸などが有意ではないが減退していた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the structural and metabolic effects on the myocardium in descendant mice after the every generational low dose-rate internal 137Cs radiation exposure, every generations of mice were maintained in the radioisotope facility with free access to drinking water containing 137CsCl (100 Bq/ml). Mice(12 months of age) of the seventeenth generation were assessed metabolic analysis in heart, and the structure abnormality of the myocardium with the electron microscope, and were compared the influence between the offspring exposed to continuous low-dose radiation and control mice of the same generation that started from a littermate mouse. Tendency to swelling of myocardium mitochondria and suppression of the glutathione level ($p=0.033$) and glycolytic pathway (nonsignificant) were observed in 137Cs drinking mice.

研究分野：放射線基礎医学

キーワード：福島原発事故 セシウム137 内部被ばく影響 心筋 チェルノブイリ原発事故 酸化ストレス 透過電顕解析

1. 研究開始当初の背景

東日本大震災の影響により福島において原発事故が引き起こされてしまった。チェルノブイリ原発事故より規模は小さいといえども人口密度は、チェルノブイリよりはるかに高い日本においての放射能汚染による被害は甚大である。低濃度汚染地域においても、ヒトを含めてそこに棲息する生物への長期にわたる外部被曝、内部被曝が懸念される。

チェルノブイリ事故においては、この30年ほどの間に放射能汚染地域に住む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者の高線量被曝による放射線急性障害と晩発障害、そして小児の放射性ヨウ素によ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、遺伝的影響、そして、奇形、循環器疾患など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いない。この確証が现阶段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、循環器系への影響などのように発生の検出までに長い時間を要するものであることと、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、放射能汚染を危惧した食生活の変化などが指標とする影響の要因や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、放射能汚染が原因となる低線量放射線被曝の生物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構築しなければならないと考えられた。これまでのチェルノブイリフィールドワークをもとにヒトより世代交代の速い近交系マウスを利用し、チェルノブイリ、福島近郊と同じような放射性セシウム(^{137}Cs)汚染環境を再現し、現在までに $^{137}\text{CsCl}$ 水溶液(100Bq/ml)を飲料水として自由摂取させながら同腹仔由来の対照群(0Bqの水を給水)とともに23世代以上の世代交代に成功した(ヒトでは、約450年の世代交代に相当する)。そして、10世代以上交配し続けた子孫マウスでの発がん性や突然変異などへの影響を検討し短期的なヒトへの影響の推測を試みてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、近年、ICRPなどで解明が急務とされる、低線量放射線の循環器系への影響の検討である。これまでに得られた、多世代慢性的低線量率内部被曝をした子孫マウスを利用して、発生初期より原発事故汚染地の環境濃度の ^{137}Cs に曝露され続けたマウスでの心臓への影響を生理的影響として酸化ストレスによる代謝活性への影響、細胞構造への影響として電顕による心筋ミトコンドリアなどへの影響を調べるものである。

低線量放射線の遺伝的影響や発がんに関する実験は、外部照射による低線量、低線量率照射実験として国内外でもいくつかの研究室で線量、線量率を変えて行われている。しかし、チェルノブイリや福島汚染を考慮した、 ^{137}Cs の慢性的低線量内部被曝による継世代的影響、特に、循環器系への影響についての毒性学的な観点からの検討はいまだどこでもなされておらず、本研究はこの点で独創的かつ世界初の試みである。この研究によって得られる結果は、今後のチェルノブイリ、福島におけるヒトの循環器系への影響の推測や除染などの行政措置を行うための判断における重要な情報の一つになるだけでなく、診断などの医療被曝における懸念に対しても情報を与えられるものと期待できる。

3. 研究の方法

チェルノブイリ事故後の長期にわたる汚染の主な生物体内蓄積放射性核種がセシウム137であることはこれまでの我々の調査でわかっている(国際学術研究、海外学術調査)(Nakajima, H., Saito, T. et al.; In Biological effects of low dose radiation (Eds. Sato, F., Yamada, Y., Onodera, J.) pp.199-205, 2000)。この調査で事故後10年目のベラルーシ中等度汚染地域(バブチン村)で捕獲された野生マウスの生体内 ^{137}Cs 含量が、単純平均で1g体重当たり26.01Bqであることもわかっており、この濃度が汚染地におけるマウスの繁殖可能な生体内での平衡的存在量と考えられたので、これを基にして本シミュレーション実験の給水用 ^{137}Cs 水の濃度を100Bq/mlに設定した。このセシウム水を常時自由摂取させると、個体あたり毎日約440Bq摂取され続け、おおよそ3週間後で筋組織1gあたり160Bq、肺、肝臓、腎臓など他のほとんどの臓器ではその約半量で平衡状態となる。この条件下で近交系マウス(A/J)を飼育し、交配させて子供を得た。その後、同環境下で兄妹交配を続けた。対照群は、実験群と同じ親から生まれた同腹仔を放射線管理区域外の飼育室にて同様に兄妹交配による飼育を続けた。

(1) 心筋組織の透過電顕解析

心筋への ^{137}Cs の低線量・低線量率内部被曝による心筋組織微細構造への影響を検討するために、 $^{137}\text{CsCl}$ 水溶液(100Bq/ml)を飲料水として給水開始後17世代目マウスの12ヶ月齢の群、 $^{137}\text{CsCl}$ 水溶液を2か月自由摂取させた後に対照群と同じ0Bq水を10か月自由摂取させた群(回復群)そして、対照群のそれぞれ3匹ずつの12か月齢マウスを得た。その後、マウスを安楽死させて、心臓を剔出し、それぞれ2分割して、2%グルタルアルデヒド固定と液体窒素による即時凍結保存を行った。固定サンプルからは、透過電顕用エポキシ切片を作製し、細胞構造、特に酸化ストレスの中心となるミトコンドリアの構造

異常について解析した。

(2) 心筋代謝産物の解析

心臓は、生理活動のために多くの酸素を必要とする臓器で、心筋細胞内のミトコンドリアでは、多くの酸素を電子伝達系により代謝しており、多くの過酸化物を生じている。そのために、ミトコンドリア自身に対して通常でも酸化ストレスが強くなる状況にある。そこへ、筋肉親和性の高い放射性セシウムがKイオンと共に取り込まれてくると心筋では放射線による酸化ストレスを相加的に受けることになる。さらに、Csは、放射性物質とは別に、Kイオンチャンネルブロッカーとしても知られるもので、放射性セシウムの壊変によってできるバリウムはさらに強力なKイオンチャンネルブロッカーである。CsはKイオンと同属のアルカリ金属であるので、生体内動態は、Kイオンと同じような動態を示す。

心筋収縮には、Kイオンが大きくかかわっているために、Csのチャンネルブロッカーとしての毒性、そして、酸化ストレスによるミトコンドリアへの傷害が予想されることである。そのために、電子伝達系の代謝がダウンすることで、酸素を必要としない、解糖系が亢進する可能性が考えられるので、この代謝系への影響を確認するために解糖系代謝産物(グルコース6リン酸、フルクトース6リン酸、フルクトース1,6リン酸)のレベルを対照群と比較検討した。

また、別の実験では、第10代目のマウス体内で酸化ストレスの指標となる8-Hydroxydeoxyguanosineが上昇していることがわかっているので、心筋内の抗酸化ストレス物質(グルタチオン)の増減についても検討した。

4. 研究成果

(1) 心筋組織の透過電顕解析

通常でも心筋内ミトコンドリアには呼吸代謝による酸化ストレスが強くと作用している。そこへ、さらなるストレスとして¹³⁷Cs内部被曝(70 Bq/g)による追加的な酸化ストレス作用が出生後1年間付加されることで、どれくらいミトコンドリアに影響を与えるか、透過電顕解析によって対照群や短期曝露群(2か月)との差異を調べるための比較を行った。

図-1の左に示すように正常なミトコンドリア像は内部にクリステによる縞模様を持った細長いワラジ状構造を呈しているが、¹³⁷Cs内部被曝群では、図-1中央に示すように円形状に膨化して内部の縞模様が歪になった構造を呈するものが認められた。さらに、図-1右に示すような強大化したミトコンドリアも観察された。これらの異常ミトコンドリアの出現頻度を定量するために、低倍率透過電顕像1視野あたりの正常ミトコンドリアと膨化ミトコンドリアの数をカウントし、1

群3匹で9視野におけるミトコンドリア膨化率を調べた。その結果を表したのが図-2である。

対照群の膨化ミトコンドリア率が0.145(1/690)に対して、¹³⁷Cs水を12か月摂取した群では、0.799(7/876)、¹³⁷Cs水溶液を2か月間自由摂取させた後、対照群と同じ0Bq水を10か月間自由摂取させた群(回復群)では、1.07(8/749)であった。

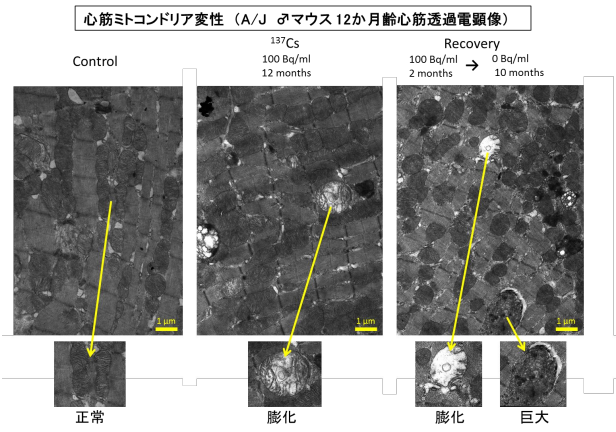


図 - 1

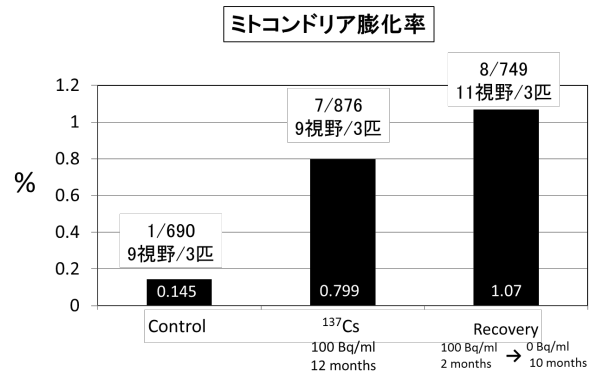


図 - 2

¹³⁷Cs内部被曝群では(短期曝露群を含めて)、対照群に比してミトコンドリアの膨化像や巨大化像の頻度が高くなる傾向は認められるものの、統計学的には有意な差を示すものではなかった。

(2) 心筋代謝産物の解析

解糖系代謝産物の量的変動を¹³⁷Cs水12ヶ月自由摂取群と対照群で比較検討した。

図-3がグルコース6リン酸(G6P)、図-4がフルクトース6リン酸(F6P)、図-5がフルクトース1,6リン酸(F1,6P)の心筋中濃度を表したグラフである。縦軸は濃度(nmol/g)を表し、青カラムが対照群、赤カラムが¹³⁷Cs水摂取群である。

解糖系は、初期産物のグルコース6リン酸(G6P)からフルクトース6リン酸(F6P)を経てフルクトース1,6リン酸(F1,6P)へと代謝が進むが、予想に反していずれの代謝産物においても¹³⁷Cs水摂取群の方が対照群より少なくなっていた。原因は不明だが、代

謝亢進後の疲弊による減退の可能性も考えられる。

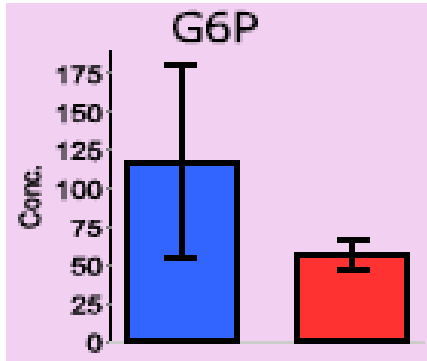


図 - 3

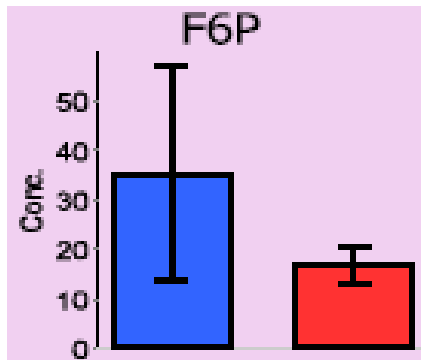


図 - 4

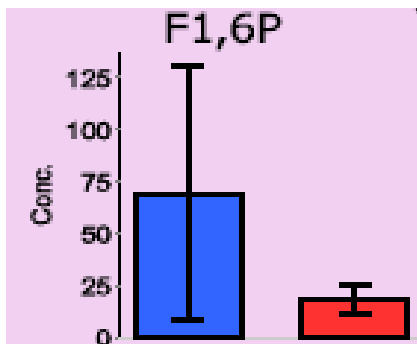


図 - 5

細胞内酸化ストレス状態を調べるべくグルタチオン酸化還元比と総グルタチオン量を測定した結果が図 - 6 である。縦軸は nmol/g で、青カラムが対照群、赤カラムが¹³⁷Cs 水摂取群である。

図 6 - 左上の GSH が還元型グルタチオン量を、図 6 右上の GSSG が酸化型グルタチオン量を示している。図 6 左下のグルタチオン酸化還元比 (GSH/GSSG) を見ると¹³⁷Cs により余剰的に酸化ストレスの負荷がかかっている¹³⁷Cs 水摂取群でも対照群との間で差はなく、両群とも酸化ストレスからの保護が想定内でなされているようであった。しかし、図 - 6 右下の総グルタチオン量を比較すると¹³⁷Cs 水摂取群の方が有意 (P=0.033) に減退していることがわかる。このことは、長期にわたる¹³⁷Cs の内部被ばくによる酸化ストレスが影響しているのかもしれない。

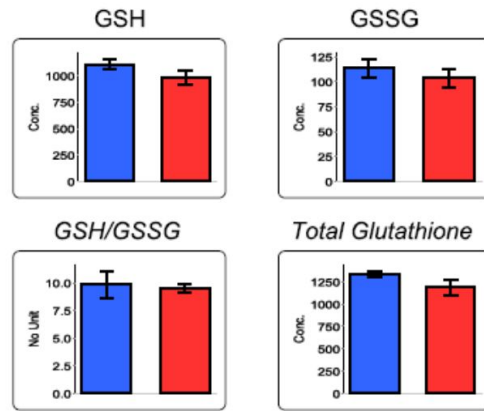


図 - 6

(3) まとめ

これまでの研究[チェルノブイリシミュレーション実験による多世代低線量率慢性内部被曝の子孫への影響(基盤研究 B: 課題番号 23310037)など]から¹³⁷Cs 水摂取群には対照群より過剰の酸化ストレスが負荷されていることがわかっている。しかし、本研究条件下では、ミトコンドリア膨化の増加傾向、解糖系における代謝産物量やグルタチオン量の減衰傾向が¹³⁷Cs 水摂取群で認められたものの、本研究の条件である¹³⁷Cs 水摂取群(心筋¹³⁷Cs 量は 70Bq/g = 70000Bq/kg)の多世代、長期内部被曝において、これまでの結果からは心筋組織構造や心筋代謝への劇的な影響や有意水準を上回るような影響は認められなかった。介在配列をほとんど持たないミトコンドリア DNA は母系遺伝していることを考えると 17 世代の間の長期にわたる¹³⁷Cs の被曝によって形態に関わるような変異などを起こす可能性も考えられるが、本実験条件下では検知できなかった。

しかし、対照群に比してある程度の影響らしき傾向がみられることから、低線量・低線量率放射線内部被曝による心筋への影響の存否については、今後さらにサンプル数を増やすとともに更なる高線量域における実験の必要性があると考えられた。

また、ヒトへの影響の考察には至れないが、本実験における¹³⁷Cs レベルは、1 個体あたりの¹³⁷Cs 量が 2313Bq/個体で、体重あたりに換算すると 95.5Bq/g=95500Bq/kg である。この条件下での 17 世代にわたる世代交代において、性比や産仔数への影響は認められていない (Nakajima H, *et al.* J Radiat Res. 2015、主要な論文 より)。

ヒトでの¹³⁷Cs の慢性的摂取による体内平衡量としては、Bandazhevskaya らの報告 (Swiss Med Wkly. 2004;134(49):725) のチェルノブイリ事故後の子供(ベラルーシ)で 122 ± 18.5Bq/kg、また、1963 年の日本人の平均的¹³⁷Cs 体内量が 680Bq/個体(体重 50kg とした換算で 13.6Bq/kg) (Uchiyama M, *et al.* Health Physics 1996;71:320) であったことから考えると本研究の結果はヒトの 700 ~ 7000 倍量の¹³⁷Cs を多世代連続被曝し続けた

第 17 世代目の 12 か月齢におけるものである。
このことから、これまで認知されているヒトの ^{137}Cs 内部被曝量は、本実験条件よりはるかに低い線量であるので、このようなレベルのヒトにおける被曝影響を検知することは非常に難しいのではないかと推測できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Hiroo Nakajima, Yoshiaki Yamaguchi, Takashi Yoshimura, Manabu Fukumoto and Takeshi Todo, Fukushima simulation experiment: Assessing the effects of chronic low-dose internal ^{137}Cs radiation exposure on litter size, sex ratio, and biokinetics in mice. *J Radiat Res.*, 56, i29-i35 (2015), doi: 10.1093/irr/rrv079, Special Issue - Fukushima.

中島裕夫, 藤堂 剛, セシウム 137 の慢性的経口摂取で多世代にわたり低線量・低線量率内部被ばくを続けた子孫マウスでの生理的、遺伝的影響, 「福島原発事故による周辺生物への影響に関する専門研究会」報告書(今中哲二、福本学 編), 京大原子炉研究所, KURRI-KR-209, 16-22, (2016), ISSN 1342-0852

真鍋勇一郎, 和田隆宏, 中村一成, 角山雄一, 中島裕夫, 坂東昌子「放射線誘発突然変異頻度の線量・線量率応答への数理モデル Whack-A-Mole モデルの適用」『放射線生物研究』50(3) (2015): 211-225.

Yuichiro Manabe, Takahiro Wada, Yuichi Tsunoyama, Hiroo Nakajima, Issei Nakamura, and Masako Bando, Whack-A-Mole Model: Towards a Unified Description of Biological Effects Caused by Radiation Exposure. *J. Phys. Soc. Jpn.* 84, 044002 (2015)

Hiroo Nakajima, Chapter 11, Comparative Analyses of Leaves Contaminated with ^{137}Cs Collected in Chernobyl and Fukushima. In: Fukushima Nuclear Accident: Global Implications, Long-Term Health Effects and Ecological Consequences (Editors: Shizuyo Sutou), Nova Science Publishers, AN, USA. p185-202, 2015, ISBN: 978-1-63463-820-3

Hiroo Nakajima, Chapter 13, Biokinetics of ^{137}Cs and Estimation of Internal Radiation Dose; Physiological effects in Descendant Mice after the Every Generational Low Dose-Rate Internal ^{137}Cs Radiation Exposure, as the Fukushima Simulation

Experiment. In: Fukushima Nuclear Accident: Global Implications, Long-Term Health Effects and Ecological Consequences (Editors: Shizuyo Sutou), Nova Science Publishers, AN, USA. p217-223, 2015, ISBN: 978-1-63463-820-3

伊勢川裕二, 中島裕夫, 大島淳、安居輝人、渡辺倫子、華山力成、井上寛一、加藤友久、山本拓也、渡辺亮、河原敦雄, 命を守る生体の機構と科学, 2015 年初版, 武庫川女子大学出版部, ISBN:978-4-907594-01-5,(2015)

本行忠志、那波伸敏、中島裕夫、パリダディリップ、インドにおける噛みタバコによる口腔がんの分子生物学的解析と予後予測、日本臨床内科医会誌 30(3): 401 -401 2015

真鍋勇一郎、中村 成、中島裕夫、角山雄一、坂東昌子、LNT 再考 放射線の生体影響を考える、日本原子力学会誌, 56(11), 705-708, 2014

Hiroo Nakajima, Mamoru Fujiwara, Isao Tanihata, Tadashi Saito, Norihiro Matsuda and Takeshi Todo, Imaging plant leaves to determine changes in radioactive contamination status in Fukushima, Japan. *Health Physics Journal*, May 2014 - Volume 106 - Issue 5 - p 565-570, 2014. doi: 10.1097/HP.0000000000000020

〔学会発表〕(計 8 件)

中島裕夫、福本 学、藤堂剛、セシウム 137 の慢性的経口摂取で多世代にわたり低線量・低線量率内部被ばくを続けた子孫マウスのゲノムへの影響、日本環境変異原学会 第 44 回大会(福岡) p125,(2015,11,27 ~ 28) Best Presentation prize Elsevier.

Hiroo Nakajima, Yoshiaki Yamaguchi, Takashi Yoshimura, Manabu Fukumoto, Takeshi Todo. Physiological, genomic effects in descendant mice after the every generational low dose-rate internal ^{137}Cs radiation exposure. ICRR2015 15th International Congress of Radiation Research Congress. 2-PSF-11, May 25-29, 2015, Kyoto Japan. Excellent Poster Award

Yuichiro Manabe¹, Takahiro Wada, Yuichi Tsunoyama, Hiroo Nakajima, Issei Nakamura, Masako Bando. Whack-a-mole (WAM) model which we can estimate the biological effect caused by radiation-exposure. 2-PS1C-02, May 25-29, 2015, Kyoto Japan

Taisei Nomura, Li Ya Li, Tadashi

Hongyo, Hiroo Nakajima, Shigeki Adachi, Haruko Ryo. Combined effects of radiation and chemicals; radiation-induced germ-line alteration causes cancer by postnatally-given chemicals. 3-PS4A-01, May 25-29, 2015, Kyoto Japan

真鍋勇一郎、和田隆弘、角山雄一、中島裕夫、坂東昌子、放射線誘発突然変異頻度を定量評価可能な線量率をあらわに取り入れた数理モデル、日本遺伝学会第 87 回大会（仙台）、2015.9.26

中島裕夫、山口喜朗、吉村 崇、福本 学、藤堂剛、福島シミュレーション実験としての ^{137}Cs のマウス多世代低線量率内部被曝による子孫での突然変異の蓄積性、日本環境変異原学会 第 43 回大会（東京）、p83, (2014,12,4~5)

中島裕夫、尾崎清和、岡幸子、福本学、藤堂剛、福島シミュレーション実験としての ^{137}Cs 多世代慢性的経口摂取による低線量率内部被曝の子孫マウスへの影響、日本放射線影響学会第 57 回大会(鹿児島)、p127 (2014,10,1~3)

真鍋勇一郎、中村一成、中島裕夫、角山雄一、坂東昌子、数理モデルによる突然変異発生頻度の統一的理解、日本放射線影響学会第 57 回大会(鹿児島)、p128 (2014,10,1~3)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

吉村 崇 (YOSHIMURA, Takashi)
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：90323336