

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月21日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21610029

研究課題名（和文）胎児・こどもの放射線被ばくによる健康影響

研究課題名（英文）Health effects from radiation exposure of the fetus and children

研究代表者

島田 義也（SHIMADA YOSHIYA）

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・プログラムリーダー

研究者番号：10201550

研究成果の概要（和文）：胎児・小児期における放射線被ばくの影響評価とその防護対策は、緊急の課題である。そこで本研究では、マウスを用いて寿命短縮に対する被ばく時年齢の影響や、被ばく後の変異蓄積および発生したがんにおける遺伝子変異頻度の違いを解析した。その結果、新生児は最も感受性が高く胎児後期は低いこと、被ばく時年齢時によって遺伝子の変異頻度が変化する可能性が示され、今後の解析の手がかりが得られた。

研究成果の概要（英文）：Assessing the impact of radiation exposure during fetal development and childhood, and identifying protective measures are matters of urgency. Using a mouse model, we analyzed the effect of the age-at-exposure on lifespan shortening, the accumulation of mutations in tissues, and the mutation frequency in induced cancers. The newborn period was found to be the most radiation-sensitive compared with fetal and adult stages, and the mutation frequency was altered in an age-dependent manner, providing an important opportunity for further analysis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：子ども学(子ども腫瘍学)

キーワード：健康影響 胎児 放射線被ばく

1. 研究開始当初の背景

(1) 世界的な胎児こどもの健康影響研究の流れ

21世紀の国民の大きな関心の一つは、次世代の健康、すなわち、胎児こどもの健やかな成長である。レイチェルカーソンの「沈黙の春」の発表以来、食品や環境中の化学物質の胎児こども期の摂取による内分泌系、脳神経系そして生殖系への影響に関する社会的関心が

高まった。この社会状況に応える形で、G8（1998年）で胎児・小児の健康と生活環境の健全性を守ることの重要性が認識され、WHO、アメリカ、ヨーロッパを中心に、こどもの健康に関する研究が精力的に進められてきた。米国環境省は、大幅なレビューを行い（EPA-SAB-04-003, 2004）、化学物質の安全基準を、年齢に応じて、大人に比べ2～10倍大きくすることを提案している。

(2) 医療被曝におけるこどもの健康調査の開始

一方、放射線については、胎児（妊婦）の診断X線の被ばくに関するオックスフォード調査は小児がんの増加を示しているが、原爆被ばく者や近年の医療被ばくの結果は必ずしも胎児のリスクが高いことを追試していない(Doll et al. Br J Radiol 70, 130-139, 1997)。また、こどもについては、米国や北欧の小児がんの放射線治療患者や小児性白血病の骨髄移植治療の長期生存者の大規模な疫学調査（Childhood Cancer Survivor Study）が始まり、慢性的な二次的健康障害である2次がん、心臓病、腎臓の病気などの症状が増えてきていると報告されている(Oeffinger et al. NEJM 355, 1572-82, 2006; Bassal M et al. J Clin Oncol 24, 476-483, 2006)。しかし、断片的な情報が多く、胎児、こどもが被ばくしたときの影響に関する正確な情報を提供できていない。その結果、医療における放射線検査や劣化ウラン弾に被ばくした小児に白血病が増加したなどという情報が、科学的な実証もないまま流布し、社会的な不安を引き起こしてきた。しかし、線量の高いCTの複数回の被ばくに関しては今年になって17万人規模の調査が行われ統計学的に有意に小児がんリスクが増加するという結果が初めて報告された。我が国では医療の分野でこどもがCTなどの診断による被ばくする機会が増えてきていること(Berrington de González A et al. Lancet 363, 345-51, 2004)や、小児がんの放射線治療をした患者がいることを考えると、胎児・小児期における放射線被ばくの影響評価とその防護対策は、緊急の課題である。

以上の状況を考えると、被爆国でもあり、医療被曝が多い我が国から、他国に先駆けて胎児・小児期の放射線被ばくによって発生する晩発障害についての科学的エビデンスを提供することが重要である。そこで、本研究では、マウスを用いて体系的に発がんの被ばく時年齢依存性の実証データと、それを裏打ちする分子生物学的なメカニズムを取得する。

2. 研究の目的

こどもの健康に影響を及ぼす環境・社会要因のうち、医療における利用拡大が顕著な放射線に着目し、被ばくによる晩期影響に関する定量的な科学的エビデンスを提示する。

具体的には①マウスを用いて、胎児期（胎生17日）、新生児期（生後1週）、思春期（3～4週）、成体期（7～8週）に被ばく（ γ 線および炭素線）した時の発がん率と寿命短縮率の実証的データを出す。②病理データのアーカイブを作成し公開を目指す。③被ばく時年齢による発がん率のデータの裏付けとして、分子

生物学的解析を行い、メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) γ 線、粒子線による発がん実験、寿命短縮実験

寿命解析のための動物実験群は、受精後3日（着床前期）、13日（器官形成期）、17日（胎児期後期）、生後1週（新生児期）、3-4週（思春期前）、7-8週（性成熟期）のマウス（B6C3F1、♂♀各40匹）に0.2Gyと2Gyの γ 線（ ^{137}Cs ）または、粒子（炭素）線（290keV/u, LET=13keV/um）を照射して設定した。これらの動物実験群の観察を継続し、瀕死の状態になった時点でマウスの解剖、病理標本作製（主に、パラフィン切片、HE染色）を行い、病理検索を進めた。全てのマウスについて、終生飼育を行い各実験群の平均寿命を解析し放射線照射における寿命短縮について解析した。

(2) 病理データのアーカイブの作成

寿命実験で得られた病理標本を、デジタル画像として保存および外部からもデータを閲覧できるシステムの構築を行った。

(3) Tリンパ腫発生における被ばく時年齢依存性のメカニズム解析

①Tリンパ腫の発生率

生後1、4、および8週齢のB6C3F1マウスにTリンパ腫を最も効率的に誘発させることのできるKaplanの方法（1週間間隔で4回照射）で、X線で全身照射し（1.2Gy x4）、Tリンパ腫の発生率を求め、被ばく時年齢依存性を調べた。

②染色体解析

発生したTリンパ腫については、染色体解析を行った。通常のギムザ染色に加え、FISH法を用いた。FISHは、4週齢被ばくTリンパ腫で転座の多い、第12番、第15番染色体を2色で染め分けた（Yoshida et al., Cancer Genet Cytogenet. 179:1-10, 2007）。

③アレイCGH解析

生後1、4、8週齢被ばくの群から発生した32サンプルについて、DNAを抽出し、アジレントのCGHアレイ（8 x 60K）でゲノムのコピー数の変化を比較した。第11番、第12番、第19番染色体に着目し、アレイCGHを行った（Takabatake et al. Rad Res 169:426-36, 2008）。

④遺伝子変異解析 *Ikaros* 解析

Kaplanの方法で誘発したTリンパ腫のがん抑制遺伝子のひとつである *Ikaros* 遺伝子についてDNA、RNA、タンパクレベルで変異解析を行い、被ばく時年齢によって *Ikaros* 変異の頻度やスペクトルの違いを調べた（Kakinuma et al. Oncogene 26, 2945-49, 2007）。

(4) 肝がん発生における被ばく時年齢依存性のメカニズム解析

寿命短縮実験の結果から、1週齢の1回照射では肝がんが高頻度に誘発されることが確認されたので、照射後肝臓に生じる変異について変異解析用 *gpt* マウスを用いて解析した。

① *gpt* マウスを用いた突然変異誘発実験

gpt ホモ (C57/BL6) マウスと C3H マウスと交配し、発がん実験と同じ遺伝的背景を持つ B6C3F1 ヘテロの *gpt* マウスを作成した。これらのマウスに、生後1週、10週に X 線 3.8Gy を全身照射後、がんが発症する以前の生後40週齢と72週齢の肝臓を採取し、解析まで -80°C で凍結保存した。各臓器から DNA を抽出し、ラムダ EG10 ファージに組み込み、大腸菌に感染させ、クロラムフェニコールと 6-TG で突然変異を選択し、定法に従い、突然変異率を求めた (Yamauchi et al. Mut Res 640:27-37, 2008)。同時に、塩基配列を決定し、突然変異スペクトルを解析した。

② アレイ CGH 解析

1週齢と10週齢に照射 (2Gy) ②より発生した肝がん (各8サンプル、合計32サンプル) から、DNA を抽出し、アジレントの CGH アレイ (4 x 180K) でゲノムのコピー数を比較した。

4. 研究成果

(1) γ 線、粒子線による発がん実験、寿命短縮実験

寿命解析のための動物実験群の観察を継続し、瀕死の状態になったマウスの解剖、病理標本作製 (主に、パラフィン切片、HE 染色) を行い、病理検索を進め終生飼育が終了した。1週齢 (新生児; 1W)、7週齢 (性成熟期; 7W)、受精後17日 (胎児期後期; E17) の雄に γ 線 2Gy 照射後の寿命曲線を図1に示した。新生児期の照射による寿命短縮が最も大きかった (21%短縮)。胎児期後期被ばくによる寿命短縮 (6%) は、新生児期の被ばくに比べて少なく、性成熟期被ばくによる寿命短縮 (6%) と同程度であった。また、新生児期被ばくでは、非照射群に比べて肝がんの発生率が有意に高いことが明らかとなり被ばく時年齢依存性が認められた。また、寿命短縮に関し、ゴンペルツ関数による解析を行ったが、マウスの匹数が少ないためばらつきが大きく解析方法の再検討が必要であることが分かった。病理標本については、将来的な「がん以外の慢性的疾病」解析のために、心臓、血管、脳を中心として病理標本用に保存した。

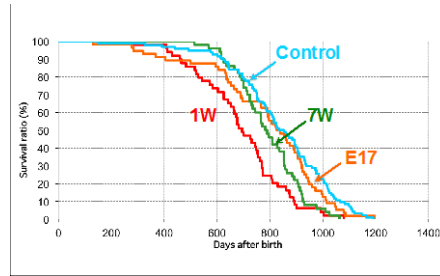


図1. 被ばく時年齢の異なる B6C3F1 マウスの寿命曲線: 受精後17日 (E17) 1週齢 (1W)、7週齢 (7W)。

(2) アーカイブの作成

被ばく時年齢依存性実験により得られたサンプルのゲノムや病理標本を広く提供するため、病理標本をデジタル画像化するシステムを用いて、これまでにデジタル画像で約5000スライド分のデータを保存した。また、研究所内のみならず、外部からもデータを閲覧できるシステムを構築した。将来的には、炭素線のサンプルを含むデータを当研究所のホームページに掲載し、国際的なアーカイブコンソーシアムと連携する予定である。



図2. 病理標本のデジタル画像と公開システムの構築

(3) Tリンパ腫 (TL) 発生における被ばく時年齢依存性のメカニズム解析

① Tリンパ腫の発生率

B6C3F1 マウスに1週齢、4週齢及び8週齢から1週間間隔で計4回照射 (1.2Gy x 4) して (Kaplan 法) 誘発した Tリンパ腫の発生率に有意な差は認められなかった (図3)。

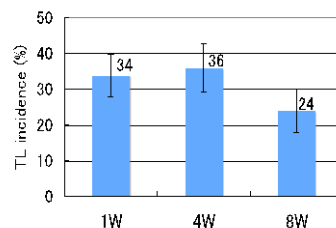


図3. 被ばく時年齢の異なるマウスに発生した Tリンパ腫の発生率

②染色体解析

Tリンパ腫について、通常のギムザ染色に加え、FISH法を用いる染色体解析の結果、1週齢からの照射では12番染色体の介在欠失が、4週齢からの照射では11番染色体の動原体領域の欠失が特徴的で被ばく時年齢依存性が認められた。

③アレイ CGH 解析

アジレントのCGHアレイ (8 x 60K) を用いて、ゲノムのコピー数を比較した結果、11番染色体におけるゲノムコピー数の変化が認められたTリンパ腫の割合は、乳児期 (1-4週齢) 被ばくで33%、幼児期 (4-7週齢) 被ばくで40%、成体期 (8-11週齢) 被ばくで50%であり、週齢が高くなると、ゲノムコピー数変化が大きくなる傾向が認められた。現在、変化領域のゲノム解析を進めている。

④遺伝子変異解析 *Ikaros* 解析

Tリンパ腫のがん抑制遺伝子のひとつである *Ikaros* 遺伝子についてDNA、RNA、タンパクレベルで変異解析を行い、*Ikaros* の変異頻度は乳児期 (1-4週齢) に低く、成体期 (8-12週齢) 高く年齢依存的に変化することが明らかとなった (論文投稿準備中) (図4)。

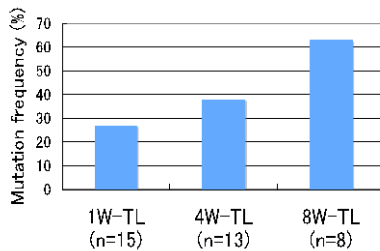


図4. 被ばく時年齢の異なるマウスに発生したTリンパ腫における *Ikaros* の変異頻度

(4) 肝がん発生における被ばく時年齢依存性のメカニズム解析

① *gpt* マウスを用いた突然変異誘発実験

1週齢と10週齢でX線を3.8Gy照射後の、突然変異の蓄積について *gpt* マウスを用いて解析した。非照射群では、加齢と共に突然変異頻度が上昇したが有意差は認められなかった。また、1週齢照射群では10週齢および40週齢で変異頻度がやや上昇し、72週齢では減少した。続いて、得られた変異コロニーの遺伝子変異解析を行い、1週齢で照射したマウスでは、10週齢になって調べたところ1ベース欠失が特徴的であったが、40週齢、72週齢ではこの変異タイプの割合は減少し逆に点突然変異の割合が増加した。10週齢で照射した群については、現在解析中である。

②アレイ CGH 解析

1週齢照射と10週齢照射によって発生した

肝がんについてのアレイ CGH 解析の結果、コピー数の変化は認められたが被ばく時年齢に特徴的なコピー数の減少や増幅は認められなかった。

(5) 考察

マウスを用いて、被ばく時年齢の寿命短縮に対する影響は、新生児が最も感受性で、胎児期被ばくは成体期と同等であることが明らかになった。また、新生児期被ばくで発がん率の高くなる肝がんについて、被ばく後の変異の蓄積は変異スペクトルが経時的に毛変化していること、また、発生した肝がんのゲノムコピー数の変化に被ばく時年齢にと悔い的な変化は認められないことが明らかになった。またTリンパ腫発がんモデルを用いた場合は、幼児期被ばくから成体期被ばくまでリンパ腫の発生率に差は認められなかったが、発生したがんの *Ikaros* 遺伝子の変異頻度は、成体期の方が幼児期に比べて高いことが明らかになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計10件)

- ① D. He, Y. Uehara, S. Kakinuma, Y. Shimada, (13人中7番目、9番目): Effects of calorie restriction on the age-dependent accumulation of mutations in the small intestine of lacZ-transgenic mice, Mechanisms of Ageing and Development, 132(3), 117-122, 2011, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21300080>
- ② Y. Shimada, M. Nishimura, S. Kakinuma (13人中1番目、2番目、9番目): Interactions of low dose radiation with other factors in carcinogenesis in vivo, Health Physics, 100(3), 278-279, 2011, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21595068>
- ③ T. Kokubo, S. Kakinuma, M. Nishimura, Y. Shimada, et.al (10人中2番目、8番目、10番目): Age dependence of radiation-induced renal cell carcinomas in an Eker rat model, Cancer Science, 101(3), 616-623, 2010, doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01456.x (2010-02-08)
- ④ T. Imamura, S. Kakinuma, M. Nishimura, Y. Shimada (10人中2番目、6番目、10番目): Unique characteristics of radiation-induced apoptosis in the postnatally developing small intestine and colon of mice, Radiation Research, 173(3),

310-318, 2010, URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
20199216

〔学会発表〕(計 35 件) (10)

- ① S. Kakinuma: Lifespan shortening after exposure of mice at fetal, childhood and adulthood periods to gamma-rays and carbon ions, 14th International Congress of Radiation Research, ワルシャワ, 2011.08
- ② 島田 義也: 放射線の健康影響について「大人と子どもと胎児の違いは?」、日本放射線技術学会主催市民公開講座、東京都、2011.06
- ③ Yi Shang: Age dependence of radiation-induced liver tumor of mice, The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference, Chiba, 2011.03
- ④ Y. Sawa: Age dependency of hepatic response to gamma-rays in B6C3F1 mice., The 3rd JCA-AACR Special Joint Conference, 千葉, 2011.03
- ⑤ Y. Shimada: Experimental research on radiation health effects on children, Bond symposium: Biological consequences and health risks of low level exposure to ionizing radiation, Richland, 2010.05
- ⑥ 島田 義也: 放射線発がん-胎児・こどもの被ばく、次世代の環境発がんを考える会創立シンポジウム、東京、2010.05
- ⑦ Y. Shimada: Experimental research on radiation health effects on children, Third Conference on Children's Environmental Health, Busan, 2009.06

〔図書〕(計 1 件)

島田 義也、福士 政広*、その他: 放射線生物学 (診療放射線技師スリム・ベシク ; 1)、1-173、2009

〔その他〕

福島原子力発電事故後の「胎児。こどもの放射線影響」に関する講演多数。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 義也 (SHIMADA YOSHIYA)
独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・プログラムリーダー
研究者番号 : 10201550

(2) 研究分担者

西村 まゆみ (NISHIMURA MAYUMI)
独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・主任研究員

研究者番号 : 70218204

(3) 連携研究者

柿沼 志津子 (KAKINUMA SHIZUKO)
独立行政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
研究者番号 : 20392219