

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310037

研究課題名(和文)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

研究課題名(英文)The transgenerational effects in descendant mice after the every generational low dose-rate internal <sup>137</sup>Cs radiation exposure as a Chernobyl simulation

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) 12,300,000円、(間接経費) 3,690,000円

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の継世代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マウスに0または100Bq/mlのセシウム137水を自由摂取させて世代交代させた子孫マウスでの発がん性、遺伝的影響を調べた。その結果、セシウム137摂取群で腫瘍増殖抑制ならびにDNA切断頻度の有意な上昇が認められたが、肺腫瘍発生頻度、小核頻度、染色体異常に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 investigate the transgenerational effects of chronic low dose-rate internal radiation exposure after the Chernobyl nuclear power plant accident, every generations of mice were maintained in the radioisotope facility with free access to drinking water containing <sup>137</sup>CsCl (0 and 100 Bq/ml). Mice of the tenth generation (F10) were assessed gamma-H2AX foci in hepatic cell, micronuclei test, chromosome aberration analysis, gene mutation in noncoding region (total 6000bps in 8 introns) and tumorigenicity of lung.

Suppression of the tumor growth and increasing of the gamma-H2AX focus number were observed in <sup>137</sup>Cs drinking mice, however, no significant difference was observed in the analyses of micronuclei test, chromosome aberration, tumor incidence and gene mutation.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：チェルノブイリ原発事故 福島原発事故 低線量・低線量率放射線影響 セシウム137 内部被ばく影響 遺伝的影響 継世代的影響 メタボローム

## 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後20余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状況であった。この確証が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ていないこと、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がん、遺伝的影響に対して無視できない影響力を持っていたことによる。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かった。また、住民の被曝線量は広島・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ために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、まだ数百倍の年月を要することが予想された。事実、我々の行ったベラルーシや広島原爆被曝者における次世代遺伝的影響の調査(Mut. Res., 581, 69-82, 2005)では、被曝群と非被曝群との間には遺伝的変異の有意な差は認められなかった。しかし、被ばく線量に対しての標本数が少ないことと、まだ1世代しか検討できていない事から蓄積する遺伝的影響の有無は不明確であった。

## 2. 研究の目的

チェルノブイリ原発事故による汚染地では、長半減期核種の汚染が続いており、立ち入り制限区域外の低濃度汚染地域には多くの住人が生活を営んでいる。このような環境下で暮らし続ける住人においては低線量内部被曝による人体への影響、特に継世代的影響が懸念される。低線量被曝に加えて、ヒトでは世代交代の年月が長いために、これらの影響が判明するには数百年の経過が必要である。そこで、世代交代の速い近交系マウスに飲料水として100 Bq/mlのセシウム137水を給水して多世代にわたり飼育することで、チェルノブイリ近郊と同じようなセシウム137汚染環境を実験室内で再現し、10世代以上交配し続けた子孫マウス(ヒトでは、

約300年の世代交代に相当)での発がん性や遺伝的影響の蓄積性を検討してヒトへの影響を推測することとした。

また、この研究は奇しくも研究開始後に発生してしまった東日本大震災による福島第1原発事故の今後の生物への影響予測にも資することができる。

## 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であることは前回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(バプチン村)で捕獲された野生マウスの生体内セシウム137含量が、単純平均で1g体重当たり26.01 Bqであることもわかっており、この濃度が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セシウム137水の濃度を0, 100 Bq/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440 Bq摂取され続け、おおよそ3週間で筋組織1gあたり160 Bq、肺、肝臓、腎臓など他のほとんどの臓器ではその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子を放射線管理区域外の飼育室にて飼育した。

### (1) 遺伝子損傷の検出

#### 生体細胞内二本鎖DNA切断の定量

放射線被曝により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H2AXヒストン蛋白のリン酸化(H2AX)を免疫染色によって検出する方法を用いて、8カ月間セシウム137水を飲み続けた第0世代(親マウス)と対照群の間に二本鎖DNA切断量の差があるかを調べた。

#### 小核試験、染色体異常解析

8カ月間セシウム137水を飲み続けた第0世代(親マウス)と第10世代目のマウスの骨髓細胞における小核の出現頻度をしらべた。また、第10世代目のマウスの骨髓細胞より作製した染色体標本にChromosome painting(マルチカラーFISH法)による染色を行い、すべての細胞に共通した転座型の染色体異常の検出を試みた。ここでのすべての細胞に共通した転座型の染色体異常とは、骨髓組織細胞だけの変異ではなく、生涯被曝の中で生じた生殖細胞での変異であり、次世代に受け継がれる全身の細胞に見られる染色体異常のことである。

#### DNA の塩基配列変異の検出

本来、DNA のコーディング領域に突然変異が生じると多くの場合では次世代が得られない。しかし、非コーディング領域での変異は保存され次世代へ遺伝し、世代ごとに蓄積していくことが期待される。そこで第 5、11 世代目のセシウム水摂取群と第 11 世代目の対照群それぞれのマウスの凍結肝臓組織より DNA を抽出し、Wwox (第 8 番染色体) の任意 3 か所でそれぞれ 500bp ずつ、Fhit (第 14 番染色体) の任意 3 か所でそれぞれ 500bp ずつ、Uty (Y 染色体)、Zfy-1 (Y 染色体)、Zfy-2 (Y 染色体)、mt-Rnr1 (ミトコンドリア)、mt-Ts1 (ミトコンドリア)、mt-Ts2 (ミトコンドリア) の任意の場所 500bp ずつを PCR にて増幅、精製後、Dye Terminator 法により DNA シーケンスを行い、解析ソフト SEQUENCHER (Gene Code 社) にて、アセンブルし参照配列と比較して非コーディング領域内 (DNA 配列上の蛋白に翻訳されない部位) の DNA 配列を中心に塩基配列変異が起こっているかどうかを調べた。

#### (2) 慢性的低線量放射線内部被曝と化学発がん物質との発がん過程における相互作用

慢性的低線量放射線内部被曝が化学物質誘発発がんを相乗的もしくは相加的に促進するか、あるいは抑制するかを検討する。これは、通常ヒトが置かれている生活環境での発がん物質への暴露を考慮したもので、慢性的低線量放射線内部被曝が発がん性に影響を与えるかどうかを調べる実験である。

セシウム 137 水を飲み続けた第 10 世代目のマウスの出生後 4 週目に、Urethane (A/J マウス系統において肺腫瘍を高頻度に誘発する発がん物質) を単回皮下投与した。ここで誘発される肺腫瘍の初期段階では、バクテリアコロニー様の病変部を生ずるので、腫瘍の数を細菌コロニーカウントのように計数することができる。また、腫瘍直径を測ることで腫瘍の増殖速度も比較することもできる。この我々が確立した方法 (Nakajima, H. et al. Enhancement of tumor growth under short light/dark cycle in mouse lung. Cancer Letters, 78, 127-131, 1994) を用いて、Urethane 投与後 4 か月と 8 か月後に安楽死させたマウス個体あたりの肺腫瘍発生頻度ならびに肺腫瘍増殖速度を定量して対照群と比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 遺伝子損傷の検出

##### 生体細胞内二本鎖 DNA 切断の定量

8 か月間セシウム 137 水 (100 Bq/ml) を飲み続けた第 0 世代 (親マウス) では、対照群に比しておよそ 5 倍の DNA 二本鎖切断を示す H2AX フォーカスが検出された。図 1, 2 は、セシウム 137 水を摂取したマウスと外部から 1 Gy の線を照射されたマウスの肝臓

細胞での H2AX フォーカス数の比較である。セシウム 137 水摂取による低線量率被曝においても DNA 切断の指標である H2AX の増加が認められ、慢性的な DNA へのストレスが認められた。

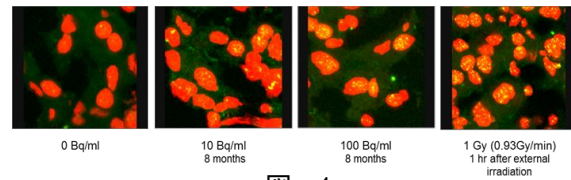


図 - 1

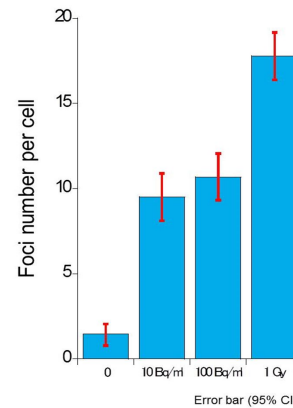


図 - 2

##### 小核試験、染色体異常解析

8 か月間のセシウム 137 水溶液給水群では、対照群に比して有意に二本鎖 DNA 切断の指標である H2AX フォーカスが検出されたにもかかわらず第 0 世代の小核の出現頻度には有意な差が認められなかった。これは、赤血球分化過程での被曝線量が小核を有意に増加させる線量ではなかった可能性が考えられる。また、第 10 世代ではセシウム 137 水溶液給水群の方が対照群より小核の出現頻度が有意に減少しており、小核形成抑制の可能性が示唆された (図 - 3)。

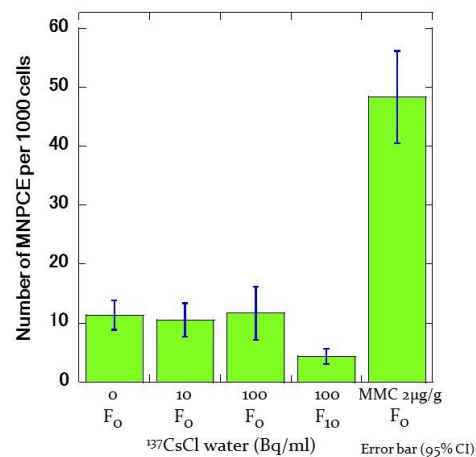


図 - 3

小核試験では 2 群間で差異が認められなかったため、より長期間被曝し続けている細胞を対象として、セシウム 137 水を飲み続けた第 10 世代目のマウスの骨髓細胞から作成し

た細胞分裂中期の全染色体を同時に異なった色で識別できるマルチカラー-FISH 法で染色し染色体異常の解析を行った。しかし、すべての細胞に共通した転座型の染色体異常は認められなかった(図-4)。

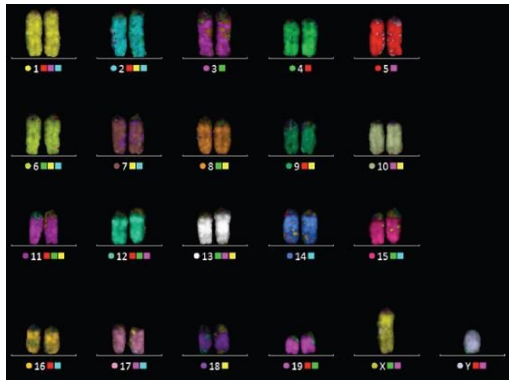


図 - 4

DNA の塩基配列変異の検出

解析を行った DNA 配列は、DNA の複製ミスを起こしやすい部位とされる Wwox、Fhit 遺伝子と雄のみに受け継がれる Y 染色体上の Uty、Zfy-1、Zfy-2 遺伝子(すべての世代で精子形成期を通る)そして、雌に受け継がれるミトコンドリア DNA 上の mt-Rnr1、mt-Ts1、mt-Ts2 遺伝子(すべての世代で卵子形成期を通る)の非コーディング領域(ミトコンドリアには非コーディング領域がほとんどないのでコーディング領域)である。現在までに合計 6000bp 塩基の解析を終了した。その結果 Uty ならびに Wwox 遺伝子においてリファレンス(NCBI: C57BL/6J 系統マウス)との相違は認められたが、給水群(F5 と F11)と対照群(F11)の群間では、塩基の違いは認められなかった(表-1)。リファレンスとの相違は、本実験のマウス系統がリファレンス系統の C57BL/6J ではなく A/J によるための系統差であると考えられた。マウスの DNA 全塩基数に対する変異発生頻度を考慮すると解析した塩基配列数が 6000 塩基対では非常に少ないと考えられ、セシウム 137 水摂取群における DNA 配列変異を検出するには、全ゲノム解析を行う必要があると考えられた。なお、この全ゲノム解析の結果からは、放射線影響のみではなく DNA 変異の自然蓄積とその速度についても検討でき、進化に関する研究の糸口となる可能性も期待できる。

<sup>137</sup>Cs 100 Bq/ml 水群(F<sub>5</sub>、F<sub>11</sub>)と 0 Bq/ml 対照群(F<sub>11</sub>)の Intron における塩基配列変異

遺伝子	染色体	解析塩基数	群間差異
Wwox	Intron (第8番染色体)	1500bp	—
Fhit	Intron (第14番染色体)	1500bp	—
Uty	Intron (Y染色体)	500bp	—
Zfy-1	Intron (Y染色体)	500bp	—
Zfy-2	Intron (Y染色体)	500bp	—
mt-Rnr1	Exson (ミトコンドリア)	500bp	—
mt-Ts1	Exson (ミトコンドリア)	500bp	—
mt-Ts2	Exson (ミトコンドリア)	500bp	—
合計		6000bp	

表 - 1

(2) 慢性的低線量放射線内部被曝と化学発がん物質との発がん過程における相互作用

第 10 世代目におけるセシウム 137 水給水群と対照群の発がん物質(Urethane)投与後 4 ヶ月と 8 ヶ月後の肺腫瘍発生頻度、増殖速度の比較を行った結果、肺腫瘍発生頻度では両群間で差が認められなかった(図-5)。

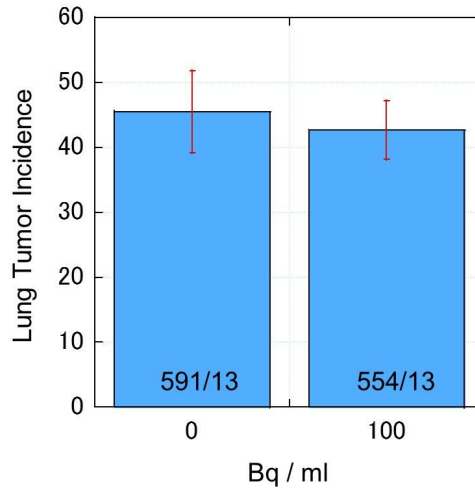


図 - 5 肺腫瘍発生頻度  
グラフ内の数字  
(肺腫瘍数 / マウス個体数)

しかし 10 か月齢の Urethane 誘発平均肺腫瘍体積では、セシウム 137 水給水群(3.6 mm<sup>3</sup>)の方が対照群(5.5 mm<sup>3</sup>)に比して有意(p=0.0056)に小さいことが認められ、セシウム 137 による腫瘍増殖抑制効果が示唆された(図-6)。

この結果から少なくとも、セシウム 137 の低線量慢性内部被ばくによる放射線の作用が、発がん物質誘発肺腫瘍発生過程に対して、相加的、相乘的には作用していないことが示された。

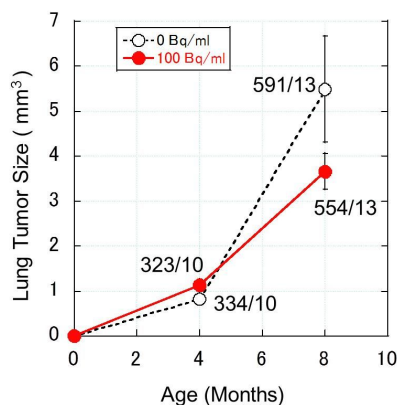


図 - 6 平均肺腫瘍体積  
グラフ内の数字  
(肺腫瘍数 / マウス個体数)

以上のことから、A/J マウス系統では 100Bq/ml 濃度のセシウム 137 水を生涯、多世

代(11世代)にわたって摂取した場合、DNA二本鎖切断は対照群に比して有意に多く発生するものの、小核の増加や染色体異常は検出されなかったことがわかった。このことは、本実験条件において放射線による物理的、生化学的影響は、生体内で明らかに起こっているが、生体に備えられている修復機構などにより、発生した放射線影響が次世代への影響とはなっていないと考えられる。そして、セシウム137水摂取群で腫瘍体積が有意に小さいことから腫瘍増殖が抑制される可能性も示唆された。このことから、長期間のセシウム137水摂取により生体内の放射線適応応答や腫瘍増殖にかかる免疫能などが亢進している可能性が考えられた。なお、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が上昇しているが抗酸化ストレス物質の減少は認められず、体内産生量の増加傾向が示されている。

また、ヒトへの影響の考察には至れないが、本シミュレーション実験におけるセシウム137レベル(160Bq/g、160000Bq/kg体重量)での内部被ばくによる生体へのリスクは、現在考えられているリスクレベルよりも低いところに落ち着く可能性が感じられる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Hiroyuki 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, 査読有, Vol.106, No.5, 2014, 565-570

DOI: 10.1097/HP.0000000000000020.

中島裕夫、今後、放射線影響を正確に伝えるには、放射線生物研究、査読有46(2), 120-126, 2011

<http://rbrbc.kenkyukai.jp/special/index.asp?id=6130>

[学会発表](計13件)

中島裕夫、本行忠志、花本敦、福角隆仁、武本憲彦、岡幸子、藤堂剛、福島シミュレーション実験としての137Csのマウス多世代低線量率内部被曝による子孫での生理的影響、日本環境変異原学会第42回大会(岡山) pp97 (2013,11,30)

中島裕夫、本行忠志、岡幸子、藤堂剛、福島シミュレーション実験としての137Csのマウス多世代低線量率内部被曝による10世代目での遺伝子、生理、発がんへの影響、日本放射線影響学会第56回大会(青森)、pp143 (2013,10,19)

中島裕夫、藤堂剛、生体放射能画像解析による汚染状況、除染効果の効率的評価と今後の汚染動態予測、日本環境除染学会、pp (2013年6月6日、東京)

中島裕夫、福島原発事故による137Csの生体内動態と生態学的半減期の推測、A speculation of the ecological half-life of 137Cs by the Fukushima nuclear power plant disaster、日本放射線影響学会第54回大会 要旨集、pp125、2011(2011.11.17~18、18発表、神戸)

Nakajima H, Saito T, Hongyo T, Ryo H, Todo T, Nomura T: In vivo distribution of radionuclides, tumorigenicity and genome stress in mice after Chernobyl catastrophe. 14<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research, Warsaw, Poland, pp231 (Aug. 31), August 28 - September 1, 2011.

#### 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

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

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