

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510075

研究課題名(和文)核分裂中性子の胎児期変異原性と関連毒性に関する研究

研究課題名(英文)Studies on mutagenicity and related toxicity of fission neutrons in fetal mice

研究代表者

藤川 和男 (FUJIKAWA, Kazuo)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：90247958

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：実験動物の胎児における核分裂中性子の変異原性効果を明らかにするため、D1b-1座のヘテロ接合マウスの器官形成期胎児に対する核分裂中性子、高線量率X線および低線量率ガンマ線の照射実験を行った。比較のため、ICR系統の胎児を用いて、外表奇形と未熟赤血球における小核形成を指標として催奇形性と染色体損傷性も調べた。調べたいずれの指標についても、誘発効率は核分裂中性子>X線>ガンマ線であった。奇形のX線誘発でみられた顕著な照射時期依存性と対照的に、いずれの放射線についても、器官形成期の2時点で求めた突然変異誘発率は有意差を示さず、器官形成期の間、ほぼ一定の突然変異感受性をもっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Little is still known about mutagenic effect in fetal animals of fission neutrons. The present study was conducted in which fetal mice heterozygous at the D1b-1 locus were irradiated at the organogenic stage with fission neutrons, X-rays at a high dose rate or gamma-rays at a low dose rate. Teratogenic and clastogenic effects of these radiations in fetal ICR mice were also investigated. Irrespective of the kind of endpoints used, fission neutrons were the most effective, followed by X-rays and gamma-rays in this sequence. Induced rates of mutations by fission neutrons determined at two time points during the organogenic stage do not differ significantly from each other. The same was true for the induction by other radiations. These results suggest fairly uniform sensitivity of fetal somatic cells to ionizing radiation for mutation induction during the organogenic stage in contrast to a marked shift in X-ray sensitivity seen for the induction of malformation.

研究分野：放射線生物学，環境変異原学

キーワード：核分裂中性子 マウス胎児 器官形成期 突然変異 奇形 小核 誘発率 生物学的効果比

1. 研究開始当初の背景

(1) 原爆放射線の体内被ばく者の疫学調査と動物実験から、形の放射線誘発には危険期とこれ以下だと無効である線量(閾値)があることが明らかにされている。Norimura 他(1996)は閾値の存在はアポトーシスと DNA 修復の協働作用による奇形を導く損傷を被った細胞の組織からの完全除去によるという実験的証拠を報告していたが、この協働作用説は突然変異や染色体異常などの他の放射線効果について検討されていなかった。

(2) マウス胎児における奇形の放射線誘発の危険期における X 線による体細胞突然変異の誘発実験はすでに行われており、奇形誘発に最感受期においても突然変異が誘発され、その誘発効率は線量率を下げると低下することが知られていた(Nomura 他, 1990)。しかし、高 LET 放射線によって危険感受期およびその最感受期において突然変異が誘発されるかどうかは定かではなかった。

2. 研究の目的

(1) 奇形誘発の危険期に相当する器官形成期において、初期、中期、後期で感受性は大きく異なる。放射線奇形を防御するしくみが突然変異防御に関わっておれば、奇形誘発の閾値以下の線量では突然変異が誘発されない可能性がある。また、突然変異感受性も最感受期と比較的低感受期で異なるはずである。これらの可能性を検討することを主目的の1つとした。

(2) 奇形誘発の危険期のみならず安全期の胎児における高 LET 放射線の変異原性効果と染色体損傷効果は全く知られていなかった。本研究の主目的は、高 LET 放射線として核分裂中性子を用いて、この点を明らかにすることにあった。

3. 研究の方法

(1) ICR マウス胎児の妊娠 6~13 日(器官形成期)に対する X 線照射実験を行い、奇形誘発に関して最感受期と最も低い感受性を示す(抵抗期)を決め、最感受期における奇形と胎児死亡の誘発に関して、X 線、ガンマ線および核分裂中性子の線量と効果の関係から、突然変異誘発実験における各放射線の線量域を決定した。

(2) X 線照射は日立メディコ社製 X 線発生装置 MBR-1505R を 140 kV、4 mA で作動させ、1mm Al フィルターをかけて、線量率 0.5 Gy/min で行った。ガンマ線照射が産業医科大学の Cs-137 線源を用いて線量率 1 mGy/min で行った。核分裂中性子の照射は、近畿大学原子炉 UTR-Kinki を用いて、線量率 0.2 Gy/hr で行った。その際、混在するガンマ線の線量率も 0.2 Gy/hr であった。

(3) 突然変異の検出には、小腸絨毛上皮組織の幹細胞における突然変異が絨毛表面において認められるドリコス豆レクチン受容体非発現細胞のクローンとして検出できる、D1b-1 座のヘテロ接合マウスを用いた。染色体損傷性の指標として、未熟赤血球における小核を選んだ。検出にはアクリジンオレンジ染色法を用いた。

4. 研究成果

(1) 放射線の変異原性効果の研究に適した胎児の発育時期と線量を明らかにする目的で、ICR マウスの妊娠 6~13 日までの各時期に高線量率 X 線 2Gy の照射を行って、妊娠 18 日に奇形頻度を測定した。その結果、妊娠 9 日と 10 日の照射で最も高頻度で奇形が誘発され、妊娠 13 日の胎児が最も抵抗性であることが確認できた。この結果は従来からの知見と一致する。妊娠 10 日のマウスに原子炉放射線、高線量率 X 線および低線量率 X 線の照射実験を行い、得られた線量効果関係から、それぞれの放射線の 0.4 Gy、1 Gy、2 Gy が奇形誘発に関して閾値であることを明らかにし、原子炉放射線に含まれる核分裂中性子の生物核的効果比(RBE)は 4 前後であることがわかった。この値は奇形誘発に関する速中性子の RBE の既報値の範囲内にある。奇形誘発実験では、胎児死亡率のデータも得られた、50%死亡率の誘発に関しても RBE 値は約 4 となった。

(2) 奇形誘発に関する X 線の閾値以下の線量 0.5 Gy を用いて、妊娠 6~9 日、妊娠 6~12 日、妊娠 13~16 日の各期間で 4 回反復照射実験を行い、いずれの照射群においても、対照頻度以上の有意な変異クローン頻度の増加が認められ、閾値以下の線量の変異原性効果が確認できた(表1)。これは、突然変異損傷を被った細胞のアポトーシスと DNA 修復の協働作用による完全除去の可能性を否定する結果である。

表1. X線 0.5 Gy の 4 回反復照射後の変異クローン頻度

照射時期(妊娠日齢)	観察絨毛総数(使用マウス数)	クローン頻度中央値(／10000 絨毛)
対照	221015 (22)	1.0
6-9 日	100000 (10)	3.0**
9-12 日	112941 (11)	2.9**
13-16 日	91378 (9)	4.0**

\*\*、Man-Whitney U 検定で有意 (p<0.01)

(3) 突然変異検出用マウス胎児の予備的照射実験を行い、(1)の成果と生存マウスの出生数から、使用可能な X 線の線量は妊娠 10 日では 1 Gy 以下、妊娠 13 日では 3 Gy 以下、核分裂中性子を一回照射する場合の使用可能な線量域を妊娠 10 日では 0.2 Gy 以下、妊娠 13 日では 0.4 Gy 以下に定めた。こうして決めた線量域の範囲内で線量効果関係を求

める照射実験を行った。得られたデータを直線式  $f=C+D$  ( $C$  = 定数、 $f$  = 突然変異誘発率、 $D$  = 線量) に回帰させ、下表の突然変異誘発率 ( / 細胞 / Gy ) を推定した。比較のため実施した成体 ( 出生後 8 ~ 11 週 ) に対する照射実験において得られた誘発率も表中に示している。

表 2. 奇形誘発の最高感受期と最低感受期および成体期における突然変異誘発率

照射時期	照射	突然変異誘発率
妊娠 10 日	高線量率 X 線	0.54 ± 0.19
妊娠 9 - 12 日	低線量率ガンマ線	0.25 ± 0.06
妊娠 10 日	原子炉放射線	1.60 ± 1.08
妊娠 13 日	高線量率 X 線	0.52 ± 0.06
妊娠 12-14 日	低線量率ガンマ線	0.26 ± 0.05
妊娠 13 日	原子炉放射線	2.84 ± 0.43
成体	高線量率 X 線	0.35 ± 0.04
	低線量率ガンマ線	0.20 ± 0.03
	原子炉放射線	1.28 ± 0.17

( 4 ) 表 2 のデータに基づいて、核分裂中性子の X 線に対する生物学的効果比 ( RBE ) を求めて、表 3 にまとめている。なお、RBE 値の推定のために必要な核分裂中性子による突然変異誘発率  $n$  を、原子炉放射線と低線量率ガンマ線による誘発率をそれぞれ  $r$  と  $g$  とする次式から求めた： $r = 0.5g + 0.5n$ 。ここで 0.5 は原子炉放射線における核分裂中性子とガンマ線の線量率配分比 1 : 1 に由来すそれぞれの線量率割合である。

表 3. 照射時期と核分裂中性子の生物学的効果比

照射時期	核分裂放射線による誘発率	RBE
妊娠 10 日	2.95 ± 1.08	5.4 ± 2.9
妊娠 13 日	5.55 ± 0.45	10.8 ± 1.5
成体	2.36 ± 0.03	6.7 ± 0.3

( 5 ) 小核を指標とする染色体損傷性を調べるための照射実験は ICR 系統のマウスの妊娠 15 日に行い、末梢血のアクリジンオレンジ染色標本の作製は照射後 1 日あるいは 2 日に行った。全照射実験で使用した妊娠マウスの総数は 16 個体、各妊娠マウスから任意に選んだ 4 個体の胎児を小核試験に供した。胎児 1 個体あたり 2000 個以上の未熟赤血球を観察して、小核を検出し、同胞 4 個体の小核頻度の平均値を各妊娠マウスの代表値とし、各サンプリング時期のそれぞれの線量で 2 つの小核頻度を決定した。対照以上の小核の任意誘発は、照射 1 日後でも 2 日後でも原子炉放射線を使用した染料 ( 0.2、0.4、0.8Gy ) のすべてで認められた。一方、0.25 ~ 1Gy の 4 線量で行った X 線照射の有意な効果が 2 つのサンプリング時点でも認められた線量は、0.75Gy と 1Gy に限られた。原子炉放射線照射実験においても X 線照射実験においても、小核頻度のサンプリング時期依存性を示す証

拠は認められなかったため、サンプリング時期を無視して、線量ごとに 4 つの小核頻度の平均値を求め、その値に基づいて、回帰分析を行った。その結果、X 線量と小核頻度の関係は、二次モデルに従うことが明らかになった。一方、原子炉放射線の線量効果関係は非閾値直線モデルによくフィットした。原子炉放射線に混在している低線量率 ( 3mGy/min ) 線の小核誘発への寄与を無視すると、核分裂中性子の X 線に対する生物学的効果比は、誘発頻度 2% では 3.9、頻度 1% では 5.4 となった。

#### < 引用文献 >

Nomura, T. et al. (1990) Embryonic mutation as a possible cause of in utero carcinogenesis in mice revealed by postnatal treatment with 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Cancer Res.*, 50, 2135-2138.  
Norimura, T., et al (1996) p53-dependent apoptosis suppresses radiation-induced teratogenesis, *Nature Med.*, 2, 577-580.

#### 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

尾崎依里奈、川崎裕也、河井一明、藤川和男、器官形成期マウス胎児体細胞の突然変異誘発に関する核分裂中性子の生物学的効果比、日本人類遺伝学会第 59 回大会、2014 年 11 月 19 日 ~ 22 日、タワーホール船堀 ( 東京都江戸川区 )

尾崎依里奈、川崎裕也、河井一明、藤川和男、マウス胎児の器官形成期における電離放射線による体細胞突然変異の誘発率、第 38 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会、2014 年 6 月 26 日 ~ 29 日、近畿大学 ( 大阪府東大阪市 )

川崎裕也、尾崎依里奈、河井一明、藤川和男、放射線に対する胎児と成体マウスの突然変異応答の比較、日本環境変異原学会第 42 回大会、2013 年 11 月 29 日 ~ 30 日、岡山コンベンションセンター ( 岡山県岡山市 )

川崎裕也、尾崎依里奈、河井一明、藤川和男、放射線に対する胎児マウスの突然変異応答、日本人類遺伝学会第 58 回大会、2013 年 11 月 20 日 ~ 23 日、江陽グランドホテル ( 宮城県仙台市 )

川崎裕也、河井一明、藤川和男、核分裂  
中性子に対する胎児期マウス体細胞の突  
然変異応答、原子力学会 2013 年春の年会、  
2013 年 3 月 28 日、近畿大学（大阪府東  
大阪市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤川 和男 (FUJIKAWA, Kazuo)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：90247958

### (2) 研究分担者

長尾 哲二 (NAGAO, Tetsuji)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：30351563

加川 尚 (KAGAWA, Nao)

近畿大学・理工学部・教授

研究者番号：803515668