

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：85401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24510080

研究課題名(和文)放射線被曝は循環器疾患のリスクを上昇させるか？動物実験による検証。

研究課題名(英文)Can radiation increase the risk of cardiovascular diseases? Evaluation by animal model studies.

研究代表者

高橋 規郎 (TAKAHASHI, Norio)

公益財団法人放射線影響研究所・顧問

研究者番号：40333546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：原爆被爆者等を対象とした疫学調査は循環器系疾患のリスクが放射線被曝線量に相関して上昇することを示している。本計画では、この事象を動物実験で検証し、循環器疾患リスクがどのようにして生じるかの作用機序を明らかにすることを目的とした。放射線を照射した脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット(SHRSP)を用いた実験では、寿命の有意な短縮、および、脳出血等の重篤度に顕著なる亢進が認められた。一方、高血圧自然発症ラット(SHR)では、収縮期血圧値は線量に比例して高値を示した。また、種々の血液マーカーにも線量に比例した増減が観察された。我々の実験が作用機序の解明に重要な役割を果たすことが示された。

研究成果の概要(英文)：Data from epidemiological studies for the atomic-bomb survivors indicate that risk for circulatory diseases (CDs) were associated with radiation exposure. In this study, we intend to assess the relationship between CDs and radiation exposure by animal model studies and to obtain information about biological mechanisms.

In the studies using stroke prone spontaneous hypertensive rat (SHRSP), the life span of irradiated rats was significantly shorter than unirradiated rats, and the damage, such as cerebral hemorrhage, in irradiated rats was more advanced than that observed in the organs of unirradiated rats. On the other hand, in the studies using spontaneous hypertensive rat (SHR), the systolic blood pressure level of irradiated rats increased with increasing of dose. Moreover, the amount of various blood biomarkers increased/decreased according to the radiation doses. The results revealed that our studies can play important roles to hypothesize on the mechanisms.

研究分野：放射線と循環器疾患リスクの相関。動物実験。生体分子の測定。

キーワード：循環器疾患 動物実験 放射線影響 リスク推定 作用機序

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線被曝が循環器疾患と関係するという疫学研究のデータは下記の3種類に大別される。①当研究所(放影研)の原爆被曝者集団を用いた研究は、原爆放射線被曝群で非被曝対照群に比べて、ガンと同様に、ガン以外(主に心血管系病変)による死亡数は増えている<sup>①</sup>(図1)。

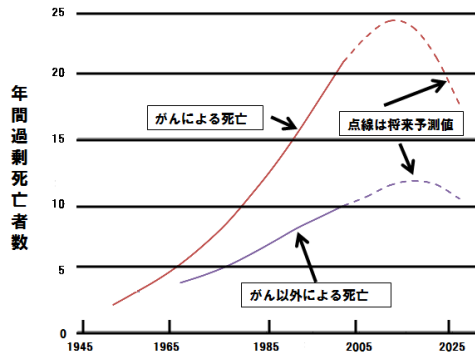


図1 放射線に相関した死亡

若年被曝者が高齢になるほど更に増加傾向は顕著になることを報告している。また、脳卒中、虚血性心疾患、循環器疾患の発症率は統計的に有意な線量との関連性が報告されている<sup>②、③</sup>。更に成人健康調査集団(AHS)を対象とした調査において、縦断的解析法による解析結果は、連続的の血圧値に小さいが統計的に有意な放射線による影響があることを報告している<sup>④</sup>。被曝者の寿命調査(LSS)から、放射線量が増加するに従って心疾患の死亡率が上昇したという興味ある結果が報告された<sup>⑤</sup>。②職業や環境中での低線量被曝後の循環器疾患のリスクに関するデータは議論の的になっている。虚血性心疾患や脳卒中の死亡率の増加がチェルノブイリ<sup>⑥</sup>の汚染除去作業で見つかった。また、英国核燃料施設の就業者<sup>⑦</sup>やカナダ原発職員<sup>⑧</sup>、他の職業被曝の集団調査から線量依存的に循環器疾患の死亡率が増加する傾向があるという報告がある。このように大規模な職業被曝の研究は、循環器疾患による死亡率が線量と共に増加するという幾つかの証拠を示している。これとは対照的に、放射線と循環器疾患の死亡率増加の相関には統計学的な有意性はないという他の報告もある<sup>⑨、⑩</sup>。このような矛盾を有する結果は、これらが単一な原因では解釈できないことを示している。そのような矛盾を説明するための更なる研究が必要である。③放射線治療後の患者で循環器疾患のリスクが上昇するという数多くの研究が報告されている。ガン罹患者でガン治療期間に放射線治療を受けた人たちにおいて、放射線治療が原因の疾病は主に血管障害である。例えば、放射線療法を受けた初期乳ガン患者の女性の解析から、後期血管疾患のような乳ガンに関連しない疾病による死亡率が増加することが報告されている<sup>⑪、⑫</sup>。ホジキン病に対する放射線治療もまた循環器疾患のリスクを増加させるという報告もある<sup>⑬</sup>。頭頸部ガン患者における後ろ向き調査では、血管狭

窄、血流減少、頸動脈の照射部の内膜肥厚の増加が同定されている<sup>⑭</sup>。放射線治療を受けた頭頸部ガン患者のコホート調査から動脈硬化症とは通常無関係な若年齢集団で、虚血性脳卒中のリスクが有意に増加することが報告されている<sup>⑮</sup>。しかし、放射線はヒト循環器疾患の進展には無関係なリスク因子であるという説得力のある報告もある。

(2) マウスやラットなどの動物モデルを用いた研究が、上記のように相対する二つの結論を有する疫学的情報を確認するためになされている<sup>⑯、⑰</sup>。しかし、従来の動物モデル実験では高線量が用いられていて、その結果は原爆被曝者集団、職業的被曝者、原発事故の修復のために働く職員、持続的低線量照射を受けている人たちにおける循環器疾患とは適合しないかもしれない。そこで、欧米では、Multidisciplinary European Low Dose Initiation (MELODI) に代表されるような国際的コンソーシアムを設立して低線量放射線が循環器疾患の発症に、本当に関与しているか否か、またその発症の機序についてマウスのプロテオームを中心にして調べているが、確固たる結論は未だ得られていない<sup>⑱</sup>。これに対して、我々は高血圧自然発症ラット(SHR)および脳卒中易発症性 SHR (SHRSP) に放射線照射を行い、どの程度の線量の放射線がどのような循環器疾患の原因と成りうるかを決め、続いてその過程で得られた血液バイオマーカー値および病理検査結果より放射線が如何なる機序で循環器疾患をもたらすかを決定するという方法論を策定した。この点はプロテオームの変化を主標的としている他の研究機関の戦略とは完全に異なることである。本研究では、これら2種の実験動物に実際の放射線被曝に近い形(0.5Gy-4Gy)で放射線照射を行い、放射線と循環器疾患に相関があるか否かを検証するとともに線量と疾患の重篤度の相関を求めたことを考えた。また、我々の研究組織には環境科学技術研究所(環境研)の病理診断専門家が研究協力者として加わっているため、臓器の形態的变化からも、放射線の影響の検索が可能である。結果の統計解析には当研究所の専門家の助力を得る。

2. 研究の目的

本研究において次の項目を明らかにする。

- (1) SHRSP ラットの脳卒中発症時期の亢進に放射線が確かに相関しているのか否かを観察する。
- (2) SHR ラットについて、血圧上昇曲線の形およびプラトーに達した血圧値に放射線量に相関した違いがあるかを見る。
- (3) 照射線量を段階的に変えたラット間で循環器疾患に関与する測定可能な表現型を比較検討するために、SHRSP ラットおよび SHR ラットの解剖組織の形態的、病理的調査および適切な血液中バイオマーカーの測定を行う。この結果より、循環器疾患がどのように

して放射線によりもたらされるかのメカニズムを検討する。更に、原爆被爆、放射線治療、原発事故、核施設作業等で想定される被曝線量とそれにより生じる循環器疾患についての関係を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 動物実験の概要；4週齢のオスラットを日本 SLC（浜松、日本）を通して疾患モデル研究センター（京都、日本）より購入した。実験（ $\gamma$ 線照射、飼育）は広島大学・原爆放射線医学研究所（原医研）の動物舎にて行い、血圧測定、死後解剖も同動物舎で行った。解剖試料は環境研に送付され、病理検索が行われた。結果の統計解析は当研究所の統計部研究員が実施した。

実験は、①生存率を指標する SHRSP を用いた実験（SHRSP-1）。②照射後 8 週目の剖検試料を用いて病理検索を行う実験（SHRSP-2）。③放射線により生じる血圧上昇曲線の形の違いおよびプラトーに達した後の血圧値の高さを観察するための SHR を用いた実験（SHR）からなる。③においては照射後 30 週目で全血を採取したのち、剖検試料は病理検索を行った。それぞれの実験で用いられる照射線量、各群の匹数は次の通りである。

表1 実験の手順

実験番号	ストレイン	4Gy	2Gy	1Gy	0.5Gy	0Gy
SHRSP-1	SHRSP	0	5	5	5	5
SHRSP-2	SHRSP	4	4	4	0	4
SHR	SHR	10	10	10	10	10

(2) 全グループにおいて共通な実験条件；

ラットは一匹毎にプラスチックの容器内で 12 時間ごとの明暗サイクルの条件下で飼育した。体重と血圧は照射 1 週間前から各実験の終了時まで、1 週間当たり 1 回測定した。死（全血採取）後にできるだけ速やかに、標準的な方法に従って解剖した。解剖段階での体重、臓器重量、体内の著しい変異は全て記録した。脳、大腿骨と胸骨（骨髄を含む）、心臓、脾臓、胸腺、腎臓、肝臓、肺、脊髄（頸部や胸部を含む）、腎臓、消化管は組織病理診断のために収集した。全ての臓器や組織は 10% 中性緩衝化ホルマリン液で固定後、環境研へ常温にて郵送した。各標本は、環境研の方法に従い病理解析を実施した。2 人の動物病理の専門家が診断した。各線量群間で統計学的な解析を行った。

(3) 各グループにおいての実験方法

①SHRSP-1 実験は次記のようにして行った。各群 5 匹である。照射後 25 週目まで観察して線量と寿命の相関を見た。

②SHRSP-2 の目的は病理検索を行うための新鮮臓器を得ることである。SHRSP の示す表現型として脳での卒中がほぼ全てのラットで観察される。その他として血管炎、糸球体腎炎、骨髄中脂肪組織の割合の変化、心臓の大きさの変化や繊維化、肝臓中の脂肪細胞の割合の変化が頻繁にみられると報告されている。従って、病状に伴い観察される形態的変

化が、放射線により加速（減速）されるか否かをこれらの臓器・指標に関して検証した。特に、脳卒中の確認に必須である脳の病理検索を行った。これらのラット病理組織検査における組織化学的、組織形態学的分析は、放射線誘発循環器疾患の発症メカニズムの解明に重要な情報を提示できることが考えられる。

③照射した SHR ラットで血圧値の上昇曲線の形の違いが被曝線量に比例して起こるか否かを調べた。照射後 30 週目に、麻酔下で全血採取し、血液中バイオマーカーの測定を行うとともに、病理検索を行った。対象とする臓器、その理由は SHRSP-2 の項で述べた通りである。

(4) 統計解析方法

放射線量と発症時期、血圧値、バイオマーカーの測定値、組織形態学的変化といった指標との関連を統計的に解析する。

①基本統計量と線形回帰モデルで分析した。基本統計量分析法（中間値と標準偏差）は放射線量の区分、また実験回数により血圧値とバイオマーカー値を分析するために用いた。

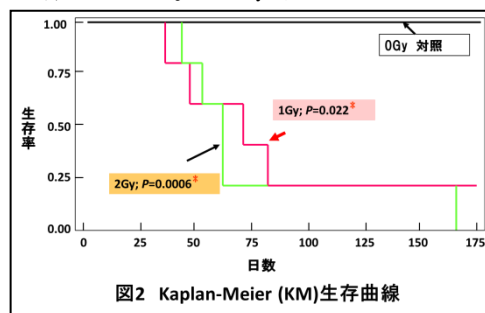
②実験期間中に繰り返し測定した血圧値に対する放射線の影響を見るためには線形混合モデルを用いた。線形混合モデルは個体間と個体内の経時的変動を評価できる。

③循環器疾患への放射線の影響を調べるため、異なった線量（0、0.5、1、2Gy）の区分間の Kaplan-Meier 生存曲線の推定値を比較した。循環器疾患の発生率における放射線被曝のリスクは Cox モデルを用いて解析した。時間依存的に見られる危険因子、すなわち血圧値、種々のバイオマーカーの測定値は、時間依存的共変動モデルによって調整した。

### 4. 研究成果

(1) SHRSP-1 の結果

図 2 は Kaplan-Meier の生存曲線である。このグラフでも明らかのように、1Gy、2Gy を照射したラットの寿命は、0Gy 対照群に比べ有意に短縮していた。0.5Gy 照射した SHRSP にお



いても同様な結果が得られた。死因は病理検索により、すべて脳出血と同定された。下記の『SHRSP-2 の結果』にも示したように、脳出血が 1Gy 照射のラットにおいても非照射に比べて重篤であることは病理検索の結果よりも明らかであった。これらのことは、AHS で認められた、脳卒中の罹患率が線量の増加に伴い上昇している事実<sup>®</sup>を支持しているの

かもしれない。

(2) SHRSP-2 の結果

照射群では非照射群に比べ、脳出血、心筋炎、心筋繊維症、腎動脈に周囲炎および線維化等の重篤度に顕著なる亢進が認められた。(表2) また、小腸の小血管に線維化を伴う壊死/血管炎が 4Gy 照射したラットにのみ認められた。心筋に認められた変異の重篤化は、LSS で高血圧性心疾患および心不全の死亡率が<sup>⑥</sup>、また AHS において心筋梗塞の罹患率が高い<sup>③</sup> ことに相関する可能性も考えられる。腎動脈に認められた障害の重篤度の線量に伴う亢進は、被爆者で報告されている慢性腎炎の頻度が被曝線量の増加に伴い上昇するという現象<sup>⑧</sup>に相関するものかもしれない。

表2 放射線照射したSHRSPの病理解析損傷の重篤度の非照射ラットとの比較

			Dose (Gy)		
			1	2	4
HEART	Cardiac Muscle	Inflammation	†	††	†††
		Fibrosis	ND	†††	†††
KIDNEYS	Arteries	Fibroid (Degeneration)	†	†††	†††
		Periarteritis	†	†††	†††
		Hemorrhage	†††	†††	†††
BRAIN	Cerebral				
INTESTINE	Small arteries	Fibroid necrosis and/or periarteritis	ND	ND	†††

ND: 0Gy対照と比べて違いなし  
 †:mid : ††:moderate: †††:severe

(3) SHR の結果

SHR ラットを用い、放射線に相関する循環器疾患の発生機序を推定するための実験を行った。指標としては、血圧値の変動、病理変化、血液バイオマーカーの測定値、各種血液細胞の細胞数の計測値である。以上、得られたデータは Steel test、線形回帰モデル、Linear mixed effects モデルなどを用いて統計解析を行い、放射線量と循環器疾患との相関について推定した。

① 照射後 30 週目(35 週齢)まで、血圧値の測定を行った。図 3 に示すように、非照射対照ラット(0 Gy)に比べ、1 Gy 以上を照射したラットでは、放射線量に従って収縮期血圧値が上昇することが観察された。この結果は佐々木らが AHS を基に報告した結果<sup>④</sup>を実験的に支持するものである。このことは、血圧値の上昇は心理的ストレスによるものではないかという、過去に提示された疑念を打ち消すものかもしれない。

② 照射後 30 週目(35 週齢)で得た剖検試料を

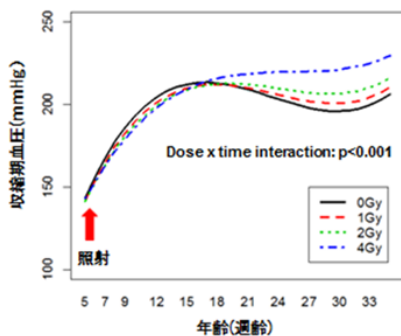


図3. SHRの収縮期血圧

病理検索したところ、照射ラットの肝臓に観察された脂肪滴、類洞拡張および炎症などの

病変を有する個体数は、線量の増加に従い、有意に増加することが観察された。

③ 放射線照射後 30 週目の血液細胞(白血球(WBC)、赤血球(RBC)、そして血小板(PLT))数を計測したデータを解析した。その結果は、血小板数が放射線量の増加に従い、減少することを示した。このデータは病理検索で観察された肝臓の障害に起因するものか、あるいは骨髄で脂肪化のような変化が起きていることを示唆している。

④ 血液バイオマーカーの測定を行った。当研究所の生化学検査に用いられる 11 種類の項目について結果が得られた。HDL-C や LDL-C などの 6 種類血液マーカーの値が放射線量の増加に従って上昇、もしくは減少することが認められた。

本研究を通じて、過去の疫学調査により示唆された循環器疾患と放射線との相関を支持する興味深いデータが得られつつある。モデル動物で得られた表現型は被爆者で観察される表現型と相関するものが多い。従って、この系を用いた研究を続けることにより、放射線が如何にして心血管疾患をもたらすかの機序を検索することが可能になると期待される。更に、この系を用いることにより極めて低い線量(0.1 Gy 未満)の放射線影響の検討が可能であることが考えられる。現在福島被災地域で問題になっている極低線量の放射線と循環器疾患との相関に関しても重要な知見が得られることが期待される。

<引用文献>

- ① Furukawa K. et. al. Risk Anal 29(6): 885-99, 2009
- ② Preston DL. et. al. Radiat Res 160(4):381-407, 2003
- ③ Yamada M. et. al. Radiat Res 161(6):622-32, 2004
- ④ Sasaki H. et. al. J Clin Epidemiology 55:974-81, 2002
- ⑤ Shimizu Y. et. al. BMJ 340:b5349, 2010
- ⑥ Ivanov VK. et. al. Health Phys 90(3):199-207, 2006
- ⑦ McGeoghegan D. et. al. Int J Epidemiol 37(3):506-18, 2008
- ⑧ Ashmore JP. et. al. Am J Epidemiol 148(6):564-74, 1998
- ⑨ Muirhead CR. et. al. Radiat Biol Radioecol 48(2):212-7, 2008
- ⑩ Kreuzer M. et. al. Radiat Environ Biophys 45(3):159-66, 2006
- ⑪ Darby SC. et. al. Lancet Oncol 6:557-65, 2005
- ⑫ Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (EBCTCG): Lancet 366:2087-106, 2005
- ⑬ Swerdlow AJ. et. al. J Natl Cancer Inst 99:206-14, 2007
- ⑭ Smith GL. et. al. J Clin Oncol 26:5119-25, 2008
- ⑮ Little MP. et. al. Radiat Res 169:99-109,

2008.

- ⑫ Lauk S. et. al. Int J Radiat Biol 57:1017-30, 1990
- ⑬ Lauk S. et. al. Radiother Oncol 8:363-7, 1987
- ⑭ Zhang C. et. al. Am J Physiol Endocrinol Metab 297(6):E1366-77, 2009
- ⑮ Takahashi I. et. al. BMJ Open;2:e000654, 2012.
- ⑯ Sera N. et. al. Radiat Res 179, 46-52, 2013

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 高橋 規郎, 丹羽 保晴. 放射線が循環器疾患の発症リスクを上げているか-モデル動物としての SHRSP の適切性-. SHR 等疾患モデル共同研究会, News Letters, 2014: No. 45; 1-2.  
[http://www.dmcra.com/newsletter/Newsletter\\_No\\_045.pdf](http://www.dmcra.com/newsletter/Newsletter_No_045.pdf) (査読あり)
- ② Takahashi I, Ohishi W, Mettler FA Jr, Ozasa K, Jacob P, Ban N, Lipshultz SE, Stewart FA, Nabika T, Niwa Y, Takahashi N, Akahoshi M, Kodama K, Shore R. A Report from the 2013 International Workshop: Radiation and Cardiovascular Disease, Hiroshima, Japan. J Radiol Prot. 2013; 33(4); 869-80. doi: 10.1088/0952-4746/33/4/869. (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

- ① Niwa Y, Murakami H, Ohishi W, Misumi M, Kusunoki Y, Nagamachi A, Inaba T, Tanaka S, Tanaka I, Takahashi N. Study of radiation-related circulatory diseases using animal models - Evaluating the feasibility of spontaneous hypertensive rat (SHR) as an animal mode ; 17th International MELODI (Multidisciplinary European Low Dose Initiative) Workshop ; 2015 年 11 月 10 日、ミュンヘン、ドイツ
- ② Takahashi N, Murakami H, Ohishi W, Misumi M, Nagamachi A, Inaba T, Tanaka S, Tanaka I, Niwa Y ; Study of the association between radiation exposure and circulatory diseases using stroke prone spontaneous hypertensive rat (SHRSP) as an animal model ; 61st Annual Meeting of the Radiation Research Society ; 2015 年 9 月 22 日、ウェストン、米国
- ③ Niwa Y, Murakami H, Ohishi W, Misumi M, Kusunoki Y, Nagamachi A, Inaba T, Tanaka S, Tanaka I, Takahashi N ; Study of radiation-related circulatory diseases using animal models to evaluate the feasibility of spontaneous

hypertensive rat (SHR) as an animal model ; 15th International Congress of Radiation Research ; 2015 年 5 月 26 日、国立京都国際会館、京都府、京都市

- ④ Takahashi N, Murakami H, Ohishi W, Misumi M, Kusunoki Y, Nagamachi A, Inaba T, Tanaka S, Tanaka I, Niwa Y ; Study of radiation related circulatory diseases using stroke prone spontaneous hypertensive rat (SHRSP) strain as animal models ; 15th International Congress of Radiation Research ; 2015 年 5 月 26 日、国立京都国際会館、京都府、京都市
- ⑤ Niwa Y, Murakami H, Ohishi W, Misumi M, Kusunoki Y, Inaba T, Nagamachi A, Tanaka S, Tanaka I, Takahashi N ; Study of radiation related circulatory diseases using animal models, Part II: Evaluating feasibility of spontaneous hypertensive rat (SHR) as an animal mode ; 16th MELODI (Multidisciplinary European Low Dose Initiative) International Workshop ; 2014 年 10 月 9 日、バルセロナ、スペイン
- ⑥ 高橋規郎、村上秀子、大石和佳、三角宗近、楠 洋一郎、長町安希子、稲葉俊哉、小木曾洋一、田中 聡、田中イグナシヤ、丹羽保晴 ; 放射線に関する循環器疾患の研究 : 高血圧自然発症ラット (SHR) 系統のモデル動物としての有効性 ; 第 57 回 日本放射線影響学会、2014 年 10 月 2 日、かごしま県民交流センター、鹿児島県、鹿児島市
- ⑦ Takahashi N, Murakami H, Ohishi W, Misumi M, Kusunoki Y, Nagamachi A, Inaba T, Oghiso Y, Tanaka S, Tanaka I, Niwa Y ; Study of radiation related circulatory diseases using an animal model : Introducing spontaneous hypertensive rat (SHR) and stroke prone SHR (SHRSP) as animal models ; 60th Annual Meeting of the Radiation Research Society ; 2014 年 9 月 24 日、ラスベガス、米国
- ⑧ 高橋規郎、村上秀子、大石和佳、三角宗近、楠 洋一郎、長町安希子、稲葉俊哉、小木曾洋一、田中 聡、丹羽保晴 ; モデル動物を用いた放射線に関する循環器疾患の研究 - 高血圧自然発症ラット (SHR) を導入についての予備的検証 - ; 第 56 回 日本放射線影響学会、2013 年 10 月 20 日、ホテルクラウンパレス青森、青森県、青森市
- ⑨ Niwa Y, Murakami H, Kusunoki Y, Ohishi W, Misumi M, Nagamachi A, Inaba T, Oghiso Y, Tanaka S, Takahashi N ; Study of radiation related cardiovascular diseases (CVD) using animal models ; 5th MELODI (Multidisciplinary European Low Dose Initiative) International Workshop ; 2013 年 10 月 9 日、ブリュッセル、ベルギー

- ⑩ 高橋規郎、丹羽保晴、村上秀子、大石和佳、Hsu WL、長町安希子、稲葉俊哉、小木曾洋一、田中 聡、小久保年章、楠 洋一郎；動物モデルを使った放射線により誘発される循環器疾患の研究 55 回 日本放射線影響学会、2012 年 9 月 7 日、東北大学川内北キャンパス、宮城県、仙台

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

高橋 規郎 (TAKAHASHI, Norio)

放射線影響研究所・顧問

研究者番号： 4 0 3 3 5 4 6

##### (2) 研究分担者

大石 和佳 (OHISHI, Waka)

放射線影響研究所・臨床研究部(広島)・部長

研究者番号： 2 0 3 9 3 4 2 3

丹羽 保晴 (NIWA, Yasuharu)

放射線影響研究所・分子生物科学部・副主任  
研究員

研究者番号： 4 0 2 8 4 2 8 6

##### (4) 連携研究者

並河 徹 (NABIKI, Tohru)

島根大学・医学部・病態病理学・教授

研究者番号： 5 0 1 8 0 5 3 4

稲葉 俊哉 (INABA, Toshiya)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・がん分子病態研究分野・教授

研究者番号： 6 0 2 8 1 2 9 2