

特別研究「公衆被曝のリスク評価に 関する生物学的調査研究」

(昭和 63 年度～平成 4 年度)

最終報告書

平成 6 年 3 月

放射線医学総合研究所

Final Rrport on the Project Research “Biological Studies on the Risk Assessment of the Public Exposure to Radiation”

(April 1988 ~ March 1993)

March 1994

National Institute of Radiological Sciences, 9-1, Anagawa
4-chome, Inage-ku, Chiba-shi 263, Japan

概 況

本研究は昭和 63 年度に発足し、平成 4 年度に終了した。この 5 年間に各グループの努力によって当初の目標を達成することができたので、ここに報告します。

放射線リスク評価のための実験グループでは、放射線による発がん、発生・分化異常および遺伝的影響について個体、臓器、組織、細胞および分子レベルで研究を行った。

骨髓性白血病誘発における線量・線量率効果係数を求めるため、各種線量および線量率で照射したマウスの生涯飼育を行って、白血病発症を計測した。

動物における骨髓性白血病の自然発症率は 1 % であり、3 Gy の放射線による誘発率は 23 % になる。蛋白質、脂質、ビタミン、無機質は同量摂取して、カロリーだけを制限した群としない群の骨髓性白血病の放射線誘発率を比較すると、制限群では有意に低下しており、また、潜伏期も延長することを明らかにした。

妊娠動物にトリチウム水を投与して胎児への影響を調べると、脳重量と脳蛋白質含量は線量依存性に低下することを示し、トリチウム β 線の脳発育についての生物効果比 (RBE) は 1.7-2.0 であり、メラニン細胞分化及び脊椎奇形については 1.0 であることを明らかにした。

放射線感受性は後期精子細胞-精子期よりも前期精子細胞期のほうが顕著に高いことと、受精卵の放射線感受性は細胞周期によって大きく変動し、その変動が修復能と相関していることを示した。

近二倍体マウス細胞 (m5S) を用いて、ガンマ線誘発 6-チオグアニン抵抗性突然変異頻度を測定した。静止期細胞では線量率を下げると生存率は上昇し、突然変異頻度は低下した。トリチウム水による突然変異頻度を測定して、トリチウム β 線の RBE は 2.0 であることを示した。

放射線治療を受けた患者 28 名について、末梢血リンパ球の第 1 分裂中期染色体の異常を調べて、不安定型 (二動原体と環状) 染色体異常の線量当りの頻度は治療部位によって異なり、下腹部照射は頭部照射より 25 倍高いことを明らかにした。

新技術グループでは、放射線誘発胸腺リンパ腫は照射後、未成熟胸腺細胞から TL-2 抗原陽性細胞が出現し、それが変異して前リンパ腫細胞になること、リンパ腫細胞では特別な染色体転座が観察されること、および p53 遺伝子の変異はリンパ腫発症過程の後期に関与していることを明らかにした。

放射線による骨髓性白血病誘発の際に顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 投与は発症頻度を増加させず、しかも正常好中球の回復を促進することを示した。

間質細胞が産生する胸腺リンパ腫刺激因子 (TLSF) を分離・精製して、これは新しい因子であって既知のサイトカインとは異なることと、骨髓幹細胞の増殖を SCF とともに促進することを明らかにした。

動物における放射線誘発白血病細胞では c-myb の量的増加が観察され、顆粒球性白血病細胞では fos / jun の構成的発現が見られ、いくつかの白血病細胞では c-fms, c-myc, IL-3 遺伝子の再構成が見られることを示した。

哺乳類細胞の温度感受性変異株を 13 相補性群に分類し、そのうちの姉妹染色分体交換高頻度株は RNA ポリメラーゼ II の最大サブユニットに欠陥があることと、脆弱 X 症候群では Xq27.3 に位置する CCG 反復配列の増幅があることを示し、またヒト染色体 3 と 11 の詳細な細胞遺伝学的地図作成を行った。

マウス・リコンビナント近交系確立のために、1988 年に 53 ラインから始めたが、52 ラインは継代不能のため、1993 年までに 2-14 代で途絶した。1 ラインは継続している。また放射線誘発胸腺リンパ腫高発系と低発系のキメラマウスの作製に成功しており、これはリンパ腫発症機構解明に有用な動物である。マウス胚の凍結保存技術を開発し、既に 8 近交系の凍結保存に成功している。また胚移植法を用いた清浄化技術も開発して実施している。

内部被曝グループでは、原子力利用の保健物理上重要なプルトニウムの吸入毒性を中心課題に据え、エアロゾル

発生から生物影響まで広範な課題を対象に研究を行った。

肺に沈着する吸入粒子の滞留と代謝に重要な働きをしている肺胞マクロファージに取り込まれた放射性粒子の溶解性を新しい方法を開発して測定した。また肺胞マクロファージの放射線感受性は動物の系統によって異なることを示した。

小動物用および中動物用の酸化プルトニウム吸入実験装置を安全性を最優先して設計・製作した。また呼吸気道模擬キャストを用いてエアロゾル沈着様式を調べ、ICRPの沈着モデル改定に反映される成果を挙げた。さらに新しい人工呼吸器を開発した。

画像情報処理技術によって肺深部の立体構造を構築し、これを用いて粒子状 α 放射体の微視的線量評価を行った。これはICRP改定に寄与する。また体外計測法を確立して、酸化プルトニウム粒子の肺深部初期沈着量、沈着率および残留率を測定した。

プルトニウム吸入ラットには肺腫瘍が、また注射では骨肉腫、リンパ腫、白血病が誘発されることを示し、吸収線量との関連を明らかにした。

骨へのプルトニウム沈着量は骨量や骨塩基がピークとなる中年期に多く、雄よりも雌に多く、また骨梁骨へ最初沈着し、時間がたつと骨形成面に集まることを示した。

各種キレート剤のプルトニウム除去効果を比較検討して、骨への沈着阻止に有効であり、かつ毒性の低いものを見付けた。

放射性エアロゾルの粒子径分布評価法として多段フィルタ法を考案し、その妥当性を実験的に確認した。これは日常的モニタリング手法として採用でき、空気汚染の発生を検出し、警告を発するのに利用可能である。

特別研究班長 佐 藤 弘 毅

目 次

特別研究「公衆被曝のリスク評価に関する生物学的調査研究」概況

佐藤 弘毅

(1) 放射線リスク評価のための実験的研究

1. 発がんに関する研究

① 低線量率被曝による発がんに関する研究

大津 裕司, 古瀬 健, 野田 攸子, 小林 森 …… 1

崎山比早子, 白貝 彰宏, 安田 徳一

Influence of Dose Rate on Tumorigenesis in C3H/He Male Mice Irradiated at a High Dose Rate or Low Dose Rates, in Relation to Calculating the Dose and Dose-Rate Effectiveness Factor

H. Otsu, T. Furuse, Y. Noda, S. Kobayashi,

H. Sakiyama, A. Shiragai and N. Yasuda

② 放射線誘発骨髄性白血病の発症に及ぼすカロリー制限の効果

吉田 和子, 根本久美恵, 井上 達, 西村まゆみ ……11

荻生 俊昭, 佐渡 敏彦

The Effect of Calorie Restriction on Radiation-induced Myeloid leukemogenesis

K. Yoshida, K. Nemoto, T. Inoue,

M. Nishimura, T. Ogiu and T. Sado

2. 遺伝的影響等に関する研究

① 胎内トリチウム被曝による発生・分化異常に関する研究

山田 武, 広部 和久, 田口 泰子, 藤井 由布 ……16

栗原 靖之, 江藤 久美

Effects of Tritiated Water on the Development and Differentiation in Animals

T. Yamada, T. Hirobe, Y. Taguchi,

Y. Fujii, Y. Kurihara and H. Etoh

② 哺乳類生殖細胞における遺伝障害の発現とリスク推定に関する研究

戸張 徹夫, 松田 洋一, 宇津木豊子, 北爪 雅之 ……20

Studies on Estimation of Radiation-Induced Genetic Damage in Mammalian Germ Cells

I. Tobari, Y. Matsuda, T. Utsugi and

M. Kitazume

③ 低線量率照射による体細胞突然変異に関する研究

古野 育子, 村磯 知探, 松平 寛通 ……28

Mutation Induction by Low Dose Rate Gamma Rays and Tritiated Water in Near-Diploid Mouse Cells

I. Furuno, C. Muraiso and H. Matsudaira

④ ヒト集団の放射線被曝におけるリンパ球の細胞医学的研究

早田 勇, 南久松真子, 佐藤 弘毅, 中井きん子 ……34

久保田和美, 飯田 由美, 中野 隆史, 清水わか子

恒元 博, 青木 芳朗, 白貝 彰宏, 石原 隆昭

Cytogenetic Study on Peripheral Lymphocytes of Patients Treated by Radiation

I. Hayata, M. Minamihisamatsu, K. Sato,

K. Nakai, K. Kubota, Y. Iida, T. Nakano

W. Shimizu, H. Tsunemoto, Y. Aoki,

A. Shiragai and T. Ishihara

(2) 新技術の導入による放射線の影響とその修飾要因に関する分子・細胞生物学的研究

1. 発がんの機構と修飾に関する研究

① 放射線による胸腺リンパ腫の前リンパ腫細胞の発生と増殖に関する研究

武藤 正弘, 久保あい子, 神作 仁子, 佐渡 敏彦39

Characterization of Preliminary Cells and Analysis of Initial Events in Radiation-Induced Lymphomagenesis

M. Muto, E. Kubo, H. Kamisaku and T. Sado

② 放射線誘発白血病リスクの修飾と低減化に関する研究

川瀬 淑子, 明石 真言, 能勢 正子, 鈴木 元50

赤沼 篤夫, 大津 裕司, 青木 芳朗

Effect of hr-G-CSF on Induction of Myeloid Leukemias by X-Irradiation in Mice

Y. Kawase, M. Akashi, M. Nose, G. Suzuki,

A. Akanuma, H. Ohtsu and Y. Aoki

③ 胸腺リンホーマ細胞刺激因子 (T L S F) の精製

鈴木 元, 中田有紀子, 鶴澤 玲子, 能勢 正子54

川瀬 淑子, 稲盛 健

Purification of Thymic Lymphoma Cell Stimulating Factor (TLSF) from Stroma Cell-Supernatant

G. Suzuki, Y. Nakata, K. Inamori, M. Nose,

A. Uzawa and Y. Kawase

④ 放射線によるオンコジーン活性化に関する研究

石原 弘, 田中 泉, 常岡 和子, 武内 恒成56

浅見 行一, 東 知康, 村磯 知探, 宮本 忠昭

Studies on Oncogene Activation by Ionizing Radiation

H. Ishihara, I. Tanaka, K. Tsuneoka,

K. Takeuchi, K. Asami, T. Higashi

C. Muraio and T. Miyamoto

2. 遺伝的高リスク群の検出、モデル実験動物の開発に関する研究

① 遺伝的高リスク群の染色体不安定化関連ヒト遺伝子の研究

堀 雅明, 高橋 永一, 辻 秀雄, 辻 さつき66

山内 正剛

Molecular Cytogenetic Studies on Chromosomal Instability in Genetic High-Risk Groups

T. Hori, E. Takahashi, H. Tsuji,

S. Tsuji and M. Yamauchi

② モデル実験動物の開発に関する研究

小林 森, 松本 恒弥, 岡本 正則, 松下 悟77

松田 洋一, 広部 和久, 佐渡 敏彦

Studies on the Development of Model Experimental Animals

S. Kobayashi, T. Matsumoto, M. Okamoto,

S. Matsushita, Y. Matsuda, T. Hirobe and T. Sado

(3) 超ウラン元素による内部被曝のリスク評価に関する調査研究

1. 超ウラン元素の代謝に関する比較毒性学的研究

① 超ウラン元素の呼吸器への沈着、代謝に関する研究

高橋千太郎, 久保田善久, 佐藤 宏, 山田 裕司85
小木曾洋一, 稲葉 次郎

Deposition and Metabolism of Transuranic Radionuclides in the Respiratory Tract

S. Takahashi, Y. Kubota, H. Sato,
Y. Yamada, Y. Oghiso and J. Inaba

② 放射性エアロゾル粒子の肺沈着モデルに関する研究

山田 裕司, 久保田善久, 高橋千太郎, 福田 俊93
飯田 治三, 小泉 彰, 宮本 勝宏, 稲葉 次郎

Studies on Lung Deposition Model of Radioactive Aerosols

Y. Yamada, Y. Kubota, S. Takahashi, S. Fukuda,
H. Iida, A. Koizumi, K. Miyamoto and J. Inaba

2. 超ウラン元素の生物効果に関する比較毒性学的研究

① アルファ放射体による組織微細線量評価に関する研究

石樽 信人, 仲野 高志, 榎本 宏子, 小木曾洋一98
福田 俊

A Study on Microscopic Dose Distribution in Internal Exposure by α -Particle Emitters

N. Ishigure, T. Nakano, H. Enomoto,
Y. Oghiso and S. Fukuda

② 超ウラン元素の生物効果とその発現機構に関する比較毒性学的研究

小木曾洋一, 福田 俊, 山田 裕, 飯田 治三107
高橋千太郎, 佐藤 宏, 石樽 信人, 仲野 高志
榎本 宏子, 山田 裕司, 小泉 彰, 稲葉 次郎

Toxicological Studies on Biological Effects of Transuranium Elements

Y. Oghiso, S. Fukuda, Y. Yamada, H. Iida,
S. Takahashi, H. Sato, N. Ishigure, T. Nakano,
H. Enomoto, Y. Yamada, A. Koizumi and J. Inaba

③ 骨代謝ならびにプルトニウムの骨に対する効果に関する研究

福田 俊, 飯田 治三113

Bone Metabolism and Effects of Injected Plutonium in Rats and Beagle Dogs

S. Fukuda and H. Iida

3. 内部被曝リスクの低減化に関する研究

① キレート剤による生体除染とリスク低減に関する研究

佐藤 宏, 福田 俊, 飯田 治三, 稲葉 次郎120

Studies of the Removal of Plutonium and the Reduction of Biological Effects by Chelating Agents

H. Sato, S. Fukuda, H. Iida and J. Inaba

② キレート剤のプルトニウム除去効果と毒性

福田 俊, 飯田 治三, Hsieh Yuyuan126

Effects of Chelating Agents DTPA, CBMIDA, and Calcium Supplement on Removal of Plutonium, and the Assessments of Their Toxicities in Experimental Animals

S. Fukuda, H. Iida and H. Yuyuan

③ 内部被曝個人モニタリングの改善に関する研究

小泉 彰, 山田 裕司, 宮本 勝宏, 福田 俊130
飯田 治三

Studies on Improvements of Protection Techniques for Inhalation of Radioactive Aerosols

A. Koizumi, Y. Yamada, K. Miyamoto,
S. Fukuda and H. Iida

(1) 放射線リスク評価のための実験的研究

1. 発がんに関する研究

① 低線量率被曝による発がんに関する研究

大津裕司、古瀬健、野田攸子、小林森、崎山比早子（生理病理研究部）

白貝彰宏（物理研究部） 安田徳一（遺伝研究部）

Influence of Dose Rate on Tumorigenesis in C3H / He Male Mice Irradiated at a High Dose Rate or Low Dose Rates, in Relation to Calculating the Dose and Dose-Rate Effectiveness Factor.

Hiroshi Otsu, Takeshi Furuse, Yuko Noda, Shigeru Kobayashi, Hisako Sakiyama, Akihiro Shiragai*
and Norikazu Yasuda**

Division of Physiology and Pathology, * Division of Physics,

** Division of Genetics

This experiment was designed to assess the value of dose and dose rate effectiveness factor (DDREF) by using the linear regression coefficient at high dose rate and that at low dose rate. The above coefficients were derived by least square method from data on the incidence of myeloid leukemia and lung tumor and ratio of life shortening in mice irradiated with gamma-rays from Cs-137.

The irradiated groups consisted of 13 groups, of which 7 groups were irradiated in doses of 0.25 Gy, 0.5, 1, 2, 3, 4, and 5 at a dose rate of 0.882 Gy / min, and 3 groups in total doses of 1 Gy, 2 and 4 at a dose-rate of 0.39 Gy / day, a group in a total dose of 4 Gy at a dose rate of 0.089 Gy / day and 2 groups in total doses of 2 Gy and 4 at a dose rate of 0.021 Gy / day. Unirradiated groups served as control. Incidences of neoplasia were presented as both crude incidence (I) and incidence rate (Ir) by person year method.

The DDREF values were obtained by the regression linear coefficients of the line equations in the text derived from data on the incidence of leukemia, incidence of lung tumor and ratio of life shortening in both dose rate groups. The values showed 4.90 (9.46 / 1.93) for leukemia, 1.11 (1.13 / 1.01) for lung tumor and 2.53 (3.80 / 1.50) for ratio of life shortening. The difference of the DDREF values implied that there was difference in influence of dose rate on tumorigenesis among some irradiated tissues.

Lung tumor and myeloid leukemia were found

statistically significant among various types of neoplasias appearing in this experiment and their incidences showed acceptable fit for linear-quadratic model as a function of dose in the both dose rate groups. The equations for leukemia were $I_r = 0.78 + 14.95D - 2.29D^2$ ($r = 0.93$) in high dose rate group and $I_{Lr} = -0.68 + 2.67D - 0.18D^2$ ($r = 0.92$) in low dose rate group, and then equations for lung tumor were $I_r = 1.98 + 0.97D - 0.098D^2$ ($r = 0.80$) and $I_{Lr} = 2.05 + 0.67D - 0.045D^2$ ($r = 0.85$).

Although liver tumor spontaneously developed frequently (88%), there was no statistical difference in the incidences between in control groups and in irradiated groups (64%-87%).

More experiments should be continued to obtain the finer DDREF over wider range of dose rates in order to estimate more precisely radiation risk.

中線量以下の放射線に被曝した動物においては、一過性の急性組織障害を経た後に晩発性障害の一つである腫瘍の発生がみられることは広く認められている。しかも、その腫瘍の発生率は線量に比例して増加し、ある線量で最高値をとり次に漸次減少するという効果関係が成り立っている⁽¹⁾。被曝後の急性組織障害である細胞の増殖の抑制効果は、消化管上皮細胞、造血細胞、精子形成などを用いて詳細に観察されてきた。しかし、被曝の期間を長引かせる、すなわち、線量率を低下させると、その効果が減少し、ある線量率以下の被曝ではその抑制効果はほとんど認められなくなる^(2,3,4,5)。この線量率を減少させることによる急性組織障害の効果の低下と同様の現象が腫瘍発生にも予想され、

低線量率による放射線発がん実験が行われた。その結果、急性組織障害が観察されないような低い線量率で被曝をした生物にあっても腫瘍発生率の増加が認められた^(6,7,8)。このような低線量率による長期間の被曝は、近年職業人被曝や環境被曝のリスク推定のモデルとみなされるようになった。ヒトの低線量率長期被曝のリスク推定に当たっては、利用できるデータは中～高線量率の1回または数回の分割による中高線量被曝の結果であることが多く、これらのデータの低線量率・低線量への外挿に頼らざるを得ない。その場合、過大・過小推定を避けてより正確な推定には高線量率被曝効果に対する低線量率効果の効果係数（線量・線量率効果係数：dose and dose-rate effectiveness factor; DDREF）⁽⁹⁾を知っておくことが重要と思われる。この係数を算出するために、マウスを用いて高線量率と低線量率とを対比させた被曝実験を行い、腫瘍発生率を検索し、DDREFの算出を試みた。

実験方法

実験動物には放医研生産のC3H/Heマウスの雄を用いた。

照射実験では低線量率照射には放医研第一ガンマ線棟（ガンマ線棟）内の照射室のCs-137 0.374TBqの線源から、そして高線量率照射には放医研晩発障害実験棟（晩発棟）4階の照射室のCs-137 115TBqの線源からのγ線をそれぞれに用いた。低線量率照射での線量率は0.394Gy/日（0.000298Gy/min: A）、0.089Gy/日（0.000067Gy/min: B）、0.021Gy/日（0.000016Gy/min: C）で、蓄積線量はA群では1、2、4 Gyで、B群では4 Gy、C群では2と4 Gyとした。なお、照射は8週令から開始して1日22時間連続して規定の蓄積線量に達するまで行われた⁽¹⁰⁾。高線量率照射は線量率0.882Gy/min（H）で8週令マウスに1回で行われた。両照射は全身に行われ、その後は、それぞれの実験棟の飼育室で終生飼育された。

実験群は線量率と線量とによりA-1 Gy群、A-2 Gy群、A-4 Gy群、B-4 Gy群、C-2 Gy群、C-4 Gy群の6群とH-0.25 Gy群、H-0.5 Gy群、H-1 Gy群、H-2 Gy群、H-3 Gy群、H-4 Gy群、H-5 Gy群の7群と計13群で、無処置対照群の2群を加え15群とした。なお、無処置対照群の2群とは、晩発棟内飼育のU1群と第一ガンマ線棟内飼育のUg群であって、それぞれの実験棟内での被曝実験後のマウスと共に飼育された。実験マウス数は低線量率被曝群は1群250匹、高線量被曝群は1群150匹とした。なお、本年11月初旬の時点で各実験群全部が死亡しきっていないので実験群間の動物数にばらつきがみられる。

実験マウスは死後、解剖、主臓器を摘出、ホルマリン固定後、パラフィン包埋、薄切、光顕組織標本を作成、検鏡した。

次に腫瘍発生率の表現として以下の2通りの方法を用いた。一つは実験総数に対するある対象とした腫瘍発生を認めたマウス（担腫瘍マウス）数との比で表す crude incidenceである。もう一つは担腫瘍マウスの検索までの日数を考慮して、同一実験群マウスの寿命日数の総和（マウス・日）に対する担腫瘍マウス数の比で表した incidence rateである。

実験結果

1. 寿命

平均寿命：高線量率被曝実験群（H群）では、その平均寿命は無処置対照群（U1群）の711.3日（LSO）が最長で、以下被曝群ではH-0.25 Gy群の706.2日、H-0.5 Gy群の703.7日、H-1 Gy群671.3日とU1群の対照値とは有意差はなく、H-2 Gy群は654.0日とU1群値より有意に短縮が認められ、以下、H-3 Gy群よりH-5 Gy群まで漸次平均寿命の短縮が認められた（表1）。次に低線量率被曝群では、平均寿命は無処置対照群（Ug群）の722.3日が最長で、晩発棟4階で飼育された対照群（U1群）の711.3日より長い有意差は認められなかった。低線量率被曝群の平均寿命はA-1 Gy群は688.5日とUg群値と有意差は認められなかったが、蓄積線量2 Gy以上のA-2 Gy群（677.2日）、A-4 Gy群（674.0日）、B-4 Gy群（647.6日）、C-2 Gy群（677.2日）、C-4 Gy群（660.0日）いずれの群とも平均寿命はUg群値より有意に減少がみられた。

寿命短縮率：放射線被曝群の平均寿命の短縮の程度を対照群との比率で検討した。その比率は、無処置対照群の平均寿命（LSO）から被曝実験群の平均寿命（LSexp）を引き算した差を対照群の平均寿命で割算した商から求めた百分率を以て表した（式1）。

$$\text{ratio of life shortening} = \frac{\text{LSO} - \text{LSexp}}{\text{LSO}} \dots\dots\dots (1)$$

寿命の短縮は高線量率実験群でも低線量率実験群でも認められ、その割合を式(1)で求め、各実験群の値を表1に表わした。線量と寿命の短縮率（RL）との相関性を図1に線量（D）の函数として図示した。なお、H群とA群のRLは2次式によく合致した。H群のRL_Hは式(2)で、A群のRL_Aは式(3)で表された。

$$\text{RL}_H = -0.56 + 6.05D - 0.80D^2 \quad (r = 0.99) \dots\dots\dots (2)$$

$$\text{RL}_A = 0.19 + 4.78D - 0.79D^2 \quad (r = 0.99) \dots\dots\dots (3)$$

高線量率では被曝線量が3 Gy以上ではほぼ10%にその短縮が認められる。一方、低線量率被曝群ではB-4 Gyのみにほぼ10%の寿命短縮が認められた。各群とも被曝線量に比例して寿命の短縮率は増加傾向を示した。AやC群では各蓄積線量群で10%以下で、C-2、C-4群は対応するA群より各々、高値を示し、線量率減少により寿命の短縮が減少しなかったことを示している。

寿命による線量・線量率効果係数（DDREF）：寿命短縮率を高線量率、低線量率同一被曝線量群間で比率を比較するとH群対A群比は1 Gyでは1.2、2 Gyでは1.3、4 Gy群では1.5と線量とともに比率が多くなるが、対B群比4 Gyでは1.0、対C群比では2 Gyが1.2、3 Gyでも1.2とほぼ同じ値を示した。この比率がDDREFに相当するので、寿命短縮率から直接求めたDDREFは1.0～1.5とみなすことが出来る。しかし、直接的に相互を比較するのではなく、DDREFを求める方法の一つにNCRP-64で採られている方法がある⁽¹¹⁾。この方法では高低両線量率被曝実験データの数値から最小二乗法によりそれぞれの回帰直線を求めて、その式の一次の項 α_H と α_L との比 α_H/α_L から算出する方法である。この方法に従って、表1の各々の値からの回帰直線（図2）はH群は式

(4)、そして A 群は式(5)となり、これらの式の一次の係数の比からは $3.78 / 1.50 = 2.52$ となり、直接求めた値とは若干の差を認めた。

$$RL_H = 0.13 + 3.78D \quad (r = 0.98) \quad (4)$$

$$RL_A = 1.78 + 1.50D \quad (r = 0.84) \quad (5)$$

2. 腫瘍発生について

照射後 300 日を経過して死亡したマウスには諸臓器に腫瘍の発生が認められるようになった。そのなかで最も高頻度に認められるのは肝腫瘍であり、次いで、肺腫瘍そして骨髄性白血病であった。ここでは、線量と線量率との効果係数 (DDREF) を算出することを考慮し、肺腫瘍、骨髄性白血病と肝腫瘍の発生率、発生時期に関して高線量率被曝群と低線量率被曝群とにわけて詳記する。

①骨髄性白血病

骨髄性白血病の病像：マウスでは骨髄及び脾臓を中心として白血病細胞が他からの抑制を受けることなく（自律性）増殖をする造血系の腫瘍である。なお、白血病細胞は造血幹細胞が腫瘍化したと考えられており、腫瘍化した状態でも血球系としての全身を循環する性格を多少とも具えており、その結果として、全身諸臓器内に浸潤、発育する。よって病気の末期には、白血病細胞の浸潤発育の著しい肝・脾は腫大し、その重量の増加が招来される。造血機能をはたしている骨髄や脾臓が白血病細胞に占拠されると血小板系、赤血球系、白血球系などの各系の正常血球は減少をきたし、出血傾向、感染症に罹り易くなる、貧血に陥る、そして白血病細胞の浸潤を受けた諸臓器の機能が低下するなどの諸要因が相俟って、最後にはマウスを弊死させる。

発生率：骨髄性白血病の自然発生率は本実験の C 3 H / He 系のマウスでは低率で、UI 群には 1.1 %、Ug 群には 0 % であった。本実験の高線量率被曝群では表 2、図 3 にみられるように 1 Gy 被曝群から骨髄性白血病の発生率は 6 % と増加し、2 Gy 以上の被曝群ではその発生率は被曝線量に比例して増加し、被曝線量 3 Gy で最高値 18.3 % を示し、同 4 Gy では骨髄性白血病の発生率 (11.7 %) は減少の傾向を示し、同 5 Gy では更に発生率は減少 (11.3 %) した。この実験結果から骨髄性白血病における発生率と線量の相関性は被曝線量 3 Gy を頂点とした釣り鐘状に近い曲線関係が想定されたので、被曝線量を (D)、骨髄性白血病の発生率を (I) とする 2 次の近似式(6)を想定した。

$$I = \alpha_1 + \alpha_2 D + \alpha_3 D^2 \quad (6)$$

なお、同発生率を症例数と実験数の比からなる単純な発生率 (I) と、人年法を用いた incidence rate による発生率 (Ir) と 2 通りの方法によって、各々被曝群のデーターを用いて式(6)の係数を求め、次の式を得た (図 3)。

$$I = -0.23 + 9.3D - 1.4D^2 \quad (r = 0.93) \quad (7)$$

$$Ir = -0.78 + 15D - 2.3D^2 \quad (r = 0.93) \quad (8)$$

一方、低線量率で長期にわたった被曝を受けた群でも骨髄性白血病は認められた。0.394Gy/日の線量率で被曝した 1 Gy 被曝群 (A - 1 群) では未だ骨髄性白血病は認められないが、2 Gy 被曝群 (A - 2 群) では 3.6 %、4 Gy 被曝群 (A - 4 群) では 4.6 % とほぼ線量に比例して発生率が増加している。さらに、0.089Gy/日の線量で 4 Gy を被曝した群 (B - 4 群) や 0.021Gy/日の線量率で 2 Gy そして 4 Gy を被曝した群 (C - 2 群や C - 4 群) でも 2 ~ 5 % の発生が認められた。低線量率被曝群での骨

髄性白血病の発生率 (IL) について H 群と同様、近似式を求めると、A 群では

$$IL = -0.46 + 1.8D - 0.13D^2 \quad (r = 0.92) \quad (9)$$

$$ILr = -0.68 + 2.7D - 0.18D^2 \quad (r = 0.92) \quad (10)$$

と、上の式(9)(10)が得られた (図 3)

DDREF: 高線量率被曝群と低線量率被曝群からの骨髄性白血病の発生率のデーターを用いて、前記の方法に従って、0 から 3 Gy の線量の間の値を満足する回帰直線は高線量率群では式(11)と(12)、一方、低線量率被曝群では A 群の式(13)と(14)となった (図 4)。これらの 4 つの回帰直線の式の一次の項の係数の比を以て DDREF を求めると、incidence rate による式からは $9.46 / 1.93 = 4.90$ となり、crude incidence による式からは $5.89 / 1.29 = 4.57$ と両者はかなり近似した値を示した。

$$I = 0.57 + 5.89D \quad (r = 0.98) \quad (11)$$

$$Ir = 0.50 + 9.46D \quad (r = 0.98) \quad (12)$$

$$IL = -0.20 + 1.29D \quad (r = 0.91) \quad (13)$$

$$ILr = -0.32 + 1.93D \quad (r = 0.92) \quad (14)$$

発生時期：骨髄性白血病の発生時期を確かめるためには同一動物を経時的に血液学的検査をして、白血病細胞の確認をする必要があるが本実験ではその検査を行わなかったので正確な発生時期は確認できない。しかし、骨髄性白血病は前に記載したように致死性の疾病であり発生後一定期間後には死亡するので死亡日をもって発生時期とその後の発生率の増加傾向を実験群間で相対的に比較推定することにして、高低両線量率被曝各群の骨髄性白血病による累積死亡率を経時的に検索した (表 3 と図 5)。高線量率群のなかであって、大部分の被曝群では同死亡マウスは 300 日令代で認められたが、一部の H - 0.5Gy 群と対照 UI 群では 100 日遅れた。低線量率被曝群は A - 4 Gy 群は 100 日令代で同病死亡マウスが認められたが、A - 2 Gy 群は 300 日令代で、他の B - 4 Gy、C - 2 Gy、C - 4 Gy 群は 400 日令代に同病死亡マウスが認められ、線量率低下は同病の発生率の低下と同病による死亡マウスの高齢化を招来することが認められた。さらに、高線量率群でも低線量率群でも最も発生率の高い H - 3 Gy 群と A - 4 Gy 群には、白血病により死亡するマウスの日令がそれぞれ 800 日令代と 900 日令代と他群よりほぼ 100 日ほど高齢化しており、高い発生率を示す実験群は白血病死亡日令がより広い日令分布を示した (表 3 と図 5)。

②肺腫瘍

発生率：肺腫瘍の発生率 (表 4) は対照群値が UI 群 12.4 %、Ug 群が 16.4 % で、高線量率被曝群では H - 0.25Gy 群では急増し、次に一旦減少してから再び漸増があり、H - 3 Gy 群と H - 5 Gy 群では有意に増加している。一方、低線量率被曝群では A - 2 Gy 群、A - 4 Gy 群で 24.8 %、26.3 % と有意に肺腫瘍発生率が増加している。肺腫瘍発生率と被曝線量との相関性は H 群、A 群、C 群ともほぼ直線的に線量に比例して増加しているようにみえたので (図 6)、その相関性を直線で回帰して回帰直線式 (15 ~ 18) を求めた。一方、線形二次での回帰曲線を求めて比較をすると、近似式は特に incidence rate からのデーター値を用いた時には二次式の方が僅かながらよく適合する。各群の一次と二次の線量効果相関式は以下の式 (15 ~ 22) で表された。

H 群の一次式

$$I = 15.51 + 2.10D \quad (r = 0.78) \quad (15)$$

$$Ir = 2.22 + 0.32D \quad (r = 0.75) \quad (16)$$

A 群の一次式

$$IL = 14.92 + 3.05D \quad (r = 0.83) \quad (17)$$

$$ILr = 2.14 + 0.48D \quad (r = 0.84) \quad (18)$$

H 群の二次式

$$I = 15.35 + 2.42D - 0.067D^2 \quad (r = 0.78) \quad (19)$$

$$Ir = 4.17 + 1.49D - 0.19D^2 \quad (r = 0.80) \quad (20)$$

A 群の二次式

$$IL = 14.59 + 3.72D - 0.16D^2 \quad (r = 0.83) \quad (21)$$

$$ILr = 3.82 + 1.59D - 0.14D^2 \quad (r = 0.88) \quad (22)$$

DDREF: 線量・線量率効果係数を肺腫瘍発生率を用いて DDREF を算出するために UI 群から H - 3 Gy 群までの肺腫瘍発生率と Ug 群から A - 4 Gy 群までの肺腫瘍発生率の各々の数値を使用して回帰直線を求め、各々の数式の一次の係数の比を求めた (図 7)。即ち H 群の式(23)と(24)、そして A 群の式(25)と(27)の一次の係数から $3.02 / 3.05 = 1.0$ および $1.13 / 1.01 = 1.11$ の数値を得た。肺腫瘍発生では DDREF はほぼ 1 で、線量率を低減してもその発生率は大きく変化しないことを示した。

$$I = 14.86 + 3.02D \quad (r = 0.72) \quad (23)$$

$$Ir = 4.19 + 1.13D \quad (r = 0.82) \quad (24)$$

$$IL = 14.92 + 3.05D \quad (r = 0.83) \quad (25)$$

$$ILr = 4.10 + 1.01D \quad (r = 0.87) \quad (26)$$

発生時期: 肺腫瘍は骨髄性白血病と異なり致死性腫瘍となることは少なく、死亡マウスに偶然にその腫瘍が認められるにすぎないので、正確な発生時期は骨髄性白血病以上に検索が困難である。正確な発生時期の検索には経時的屠殺による検索が必須である。しかし、肺腫瘍発生率を経時的に累積して図示して外挿する事により大体の傾向としてその発生時期を推測できると考える。図 7 に両線量率群の肺腫瘍の発生率を経時的に累積した累積発生率を描画した。肺腫瘍は両線量率被曝群にあって大部分の群で 400 日令代にその発生が認められている。ただし、高線量率で最も発生率の高い H - 3 Gy 群だけは 200 日令代で、また低線量率被曝群にあって最も発生率の高い A - 4 Gy 群は 300 日令代とこの 2 群だけが他の群より早期に肺腫瘍の発生が認められた。この図から肺腫瘍の発生率は H - 3 Gy 群と A - 4 Gy 群の 26.3 % と UI 群の 12.4 % の間に各群は当嵌っており、H 群は低線量率群より急勾配をとっており、100 日令ほど早く発生することを示した。

③肝腫瘍

発生率: この腫瘍は自然発生率が UI 群で 87.6 % (rate incidence: $12.8 / \text{マウス} \cdot \text{日} \cdot 10^4$)、Ug 群で 88.9 % ($12.3 / \text{マウス} \cdot \text{日} \cdot 10^4$) と骨髄性白血病や肺腫瘍と比較して高率で、C 3 H / He 系の肝腫瘍好発系の特性を示した (表 5)。肝腫瘍発生率は高線量率被曝群と UI 群との間に有意差は認められず、また低線量率被曝群でも Ug 群より低率の傾向があるが発生率の増加は認められなかった。即ち、両被曝群とも放射線被曝による肝腫瘍誘発がほとんど認められなかった。また、発生時期は両線量率被曝群とも 200 日から 300 日令代で腫瘍の増加が認められており、大きく突出して早期に肝腫瘍誘発が認められず、その後もほぼ同じような増加傾向を示し、放射線被曝による発生時期促進も認められなかった (図 9)。

DDREF は肝腫瘍発生が両被曝群ともに増加がなく、相

違がみられなかったことから、この値はほぼ 1 に等しい結果となった。

考 察

低線量率連続照射実験により腫瘍発生率の検索を目的とした実験は Lorenz⁽¹²⁾による実験が最初で 1 日 8 時間 0.11rad ($0.0011\text{Gy} / 8 \text{時間/日}$) という肺線維症を起こさない低線量で終生照射で行われ、腫瘍発生率、なかでも肺腫瘍の検索に主眼がおかれ、radon による肺腫瘍発生との比較が試みられている。これ以後も他の研究者により、同種の実験が試みられているが表 6^(8,12,13,14,15,16)に示したように実験は照射期間により 2 つに分れる。その一つは照射期間を一定にして蓄積照射線量を一定にする方法^(8,12)と、もう一方は照射を終生継続する実験である。この方法によると個々の実験動物の寿命の日令差による被曝日数の相違によって被曝線量が実験動物個々によって異なることから、線量による発がん効果を検討するうえで不都合であった。低線量照射実験の多くは低線量率被曝により動物にどのような腫瘍が発生するかを確認することに重点がおかれ、次に腫瘍発生の線量効果関係に及ぼす線量率の影響を検索することが主眼となっていた。よって実験当初から高線量率と低線量率とを比較する目的で行われた実験は少なく、そのなかで Upton⁽³⁾と Ullrich⁽⁶⁾の実験が代表的なものである。なお、低線量率連続照射実験で用いられた線量率は、長期連続照射を行っても自己複製能のある骨髄 ($0.5\text{Gy} / \text{日}$)、精巣 ($0.02\text{Gy} / \text{日}$)、消化管上皮組織 ($4.0\text{Gy} / \text{日}$) に重篤な急性障害を惹起しない線量率であることが立証されている実験値以下で行われていることが多い⁽⁵⁾。また、国連科学委員会 (United Nations of Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: UNSCEAR) の 1986 年報告書⁽¹⁷⁾では、低線量と低線量率を 0.2Gy と $0.05\text{mGy} / \text{分}$ と規定している。この線量率域に本実験の C 群の線量率 $0.016\text{mGy} / \text{分}$ ($0.021\text{Gy} / \text{日}$) はほぼ当嵌っている。

これまでの報告では、実験の結果を統計処理に耐え得るために多数の症例が必要とされ、その条件が飼育など他の条件とうまく折り合ったマウスが用いられることが多く、米国の Argonne 研究所では実験途中でも血液検査が可能であるとして犬が使われたが、低線量率連続照射実験において数少ない実験の一つである⁽¹⁸⁾。

実験の検索標的腫瘍とされた腫瘍は広島・長崎などのヒト疫学データからも注目された骨髄性白血病がその第一に挙げられるが⁽¹⁹⁾、マウスにおいて骨髄性白血病が実験室において統計的処理可能な程度に発症する系統は CBA⁽²⁰⁾、RF⁽²¹⁾、SJL⁽²²⁾と本実験に用いられた放医研生産の C 3 H / He⁽²³⁾とかなりマウス系統が限られている。低線量率連続照射実験では RFM マウスが用いられているが、 $8.3\text{rad} / \text{日}$ ($0.0069\text{rad} / \text{min}$) で蓄積線量 $0 \sim 3 \text{Gy}$ の範囲では骨髄性白血病の有意発生がみられていない。しかし、Upton らの実験⁽¹³⁾では RF マウスで Co-60 の r 線を用い線量 $0 \sim 3 \text{Gy}$ の範囲で線量率 $80\text{rad} / \text{min}$ と $0.004 \sim 0.06\text{rad} / \text{min}$ では DDREF 6.7、また線量率 $7 \text{rad} / \text{min}$ と $0.0004 \sim 0.07\text{rad}$ では DDREF 2.3 と高低線量率被曝の効果を確実にしている。本実験においても DDREF が $4.5 \sim 5.0$ と算出され、Upton の実験結果に近い値を示した。本実験では骨髄性白血病で DDREF を算

出し得たので一応初期の実験目的を達することができた。しかし、低線量率照射実験間で線量率に $0.394\text{Gy}/\text{日} \sim 0.021\text{Gy}/\text{日}$ と差があるが、骨髓性白血病発生率には被曝線量率を反映した相違として認められなかった。

次に多くの実験で標的にされている腫瘍は肺⁽²⁴⁾、肝⁽²⁵⁾、雌では卵巣⁽¹³⁾、さらにヒトの放射線被曝疫学データでは腫瘍増加が現在まででは証明されてないがマウス実験では発生率の増加が認められる腫瘍として、胸腺リンパ腫⁽²⁶⁾と、またマウスに特有な腫瘍であり、その増加が放射線誘発腫瘍として知られている Harderian 腺腺腫⁽¹⁶⁾が挙げられているが、本実験では有意の発生率増加はみられなかった。本実験では他の実験報告と同様に肺、肝に腫瘍の発生率の増加が認められている。しかし、肺腫瘍と肝腫瘍とは発生の様式を異にしており、両腫瘍発生率は骨髓性白血病において認められるような高線量率照射群と低線量率照射群との間の有意の発生率の相違は認められず、線量率低減の効果が肺腫瘍発生には出現しないことが確かめられた。このように肺腫瘍は低線量被曝群にあって高線量被曝群に相当する発生率を認めたが、対照群より有意の発生率増加は A 群のみであって、かつ、B、C 群では肺腫瘍発生率は対照群と有意差はない。しかし、その発生率には増加傾向はあった。Ullrich の実験⁽¹⁶⁾では 2Gy の線量で、 $0.45\text{Gy}/\text{分}$ から $0.083\text{Gy}/\text{日}$ への線量率減少により肺腫瘍発生率が 36.8% から 21.4% へと減少を認めているが、その結果と本実験結果との相違はマウスの BALB/C と系統が異なることが一つの原因と考えられる。なお、低線量率実験では Lorenz (6) の $0.088\text{Gy}/8\text{時間/日}$ で 25Gy 照射でも 45% から 75% に増加すると低線量率被曝による肺腫瘍発生率の増加を LAF₁ マウスで報告しているが、高線量率被曝群の結果がなく高低線量率被曝群間相互比較が出来ない、また前記の Upton の実験⁽¹³⁾では肺腫瘍発生についての詳細な記載はない。一方、同じ LAF₁ マウスを用いた Lesher らの実験⁽⁸⁾では 1日 線量は 0.12Gy 、 0.24Gy で長期間照射の結果では肺腫瘍発生は対照群の 9.5% から減少しているとの結果を報告している。これらの研究結果からしても肺腫瘍発生における線量率効果については腫瘍発生の背景の異なった数種のマウス系統を用いた実験による結果を待たなくては結論は出ないと考ええる。

肝腫瘍の発生率は本実験では被曝群と対照群と相違は殆どなく、放射線の影響が発生率には殆ど認められなかった。また、発生時期についても発生の早期促進化などの放射線の効果は殆ど認められなかった。自然発生率の高い腫瘍については発生率を増加させる効果は少ないが発生時期を早める促進効果は認められることが知られているが、本実験ではそのいずれも認められなかった。

以上三種類の腫瘍発生における線量率効果について論じてきたが、これら誘発腫瘍が多少にかかわらず死因に影響を及ぼすので、その結果は寿命の長短として表れてくると考えられる。

本実験では寿命の短縮は高低両線量率被曝群とも 2Gy 以上の被曝群に同短縮率が 6% 以上と有意に短縮した。しかし、同一線量被曝群で線量率の高低による両被曝群相互間での有意差は $2 \sim 4\text{Gy}$ の範囲では認められていない。他の研究における寿命短縮について調べてみると、線量率 $0.083\text{Gy}/\text{日}$ で BALB/C を用いた Ullrich と Storer の研究^(16,27)では $0 \sim 2\text{Gy}$ の範囲で有意に差があるとし、

Lorenz の研究⁽⁶⁾では LAF₁ で線量率 $0.022 \sim 0.088\text{Gy}/8\text{時間/日}$ の被曝群の間では平均 $14 \sim 43\text{Gy}$ の蓄積線量の範囲では有意の寿命短縮が認められており、生理機能に急性または慢性障害を惹起しないとされる線量率の連続被曝であっても蓄積線量が大きくなると寿命短縮が生じることをこれらの研究は示している。この Lorenz の研究⁽⁶⁾での低線量率被曝の蓄積線量、 14Gy が高線量率でマウスに照射されたのであれば、間違いなく消化管死などの急性放射線障害による死が招来されたにちがいないが、低線量率であれば 703日 の平均寿命が 630日 に短縮したにすぎず、胸腺リンパ腫等の腫瘍発生率の増加はなく、ただその発生が早期に促進されたにすぎないとの線量率効果の所見が示された。

低線量率被曝実験では以上の結果のように、寿命や腫瘍発生に線量率による影響がみられるが、その影響を数量的に表現したのが線量・線量率効果係数⁽⁹⁾ (dose and dose-rate effectiveness factor: DDREF) である。本実験では骨髓性白血病では $4.5 \sim 5.0$ 、しかし寿命や肺、肝腫瘍では 2.0 以上の数値は認められなかった。米国の放射線防護測定会議 (National Council on Radiation Protection and Measurements: NCRP) の 64 報告書⁽¹¹⁾にこの係数の一覧表が記載されている。そこで、寿命は 2.0 、骨髓性白血病は 2.3 と 6.7 、肺腫瘍では 2.8 となっているが、肝腫瘍については値が出されていない。寿命をはじめとして卵巣腫瘍、肺腫瘍、乳腺腫瘍など腫瘍発生率により求められた DDREF はほぼ $2 \sim 1$ の範囲にある。しかし、線量率効果を比較するために対比させた高低両線量率は実験群によって比較した線量率にかなりの差があり、高低線量率の比をとって比較すると 33 倍から 2 万倍の範囲のひらきがみられる。さらに高線量率に限って各々の実験で較べると $0.07 \sim 1.5\text{Gy}/\text{分}$ の範囲であるが、低線量率域では各々の実験の間には 0.003Gy から $0.000004\text{Gy}/\text{分}$ と 750 倍のひらきがある。しかし、DDREF が諸実験結果で 10 倍程度であるのは、高線量率では大きな効果比はないとされているので低線量率のかなり広い範囲で腫瘍発生効果に差が出てこない、即ち、低線量率の変化と腫瘍発生率との対応は線量効果関係より、もっと粗大な対応関係であることを示唆している。

今後、高線量率照射実験による腫瘍発生率の線量効果関係に対して広い範囲の低線量率で照射実験による腫瘍発生率に対する線量効果と腫瘍発生率の相関関係に及ぼす線量率の影響を詳細に検討することが、DDREF 値の変動と腫瘍発生との相関性をより正確に導くことになると考える。また同時に系統差を検討する目的で腫瘍スペクトルを異なる系を用いて実験を行ない系統差の問題を取り上げることとも必要と考える。

結 論

誘発された腫瘍は高線量率群、低線量率群ともに

- ①肝腫瘍、肺腫瘍、骨髓性白血病の順で発生率が高かった。
- ②骨髓性白血病と肺腫瘍の発生率は線量の線形二次曲線の函数関係を示し、ほぼ 3Gy に頂点を示した。
- ③骨髓性白血病は高線量率群の発生率に対して、低線量率群の発生率は減少傾向を示し、それぞれの発生率による回帰直線の一次の項の比率による線量・線量率効果係数はほぼ $4.5 \sim 4.9$ の数値を示した。

- ④肺腫瘍発生率は高低両線量率で大きな差がなく DDREF はほぼ 1 を示した。
- ⑤腫瘍の種類により DDREF の相違することを認めた。
- ⑥低線量率群内では腫瘍発生率は相互間に有意差はなかった。
- ⑦平均寿命の短縮は高低両線量率群にあって、平均寿命は 2 Gy 以上の被曝群は無処置対照群の平均寿命より有意に短縮した。
- ⑧平均寿命の短縮率は高低両線量率群ともに線量と線形二次の函数関係を示した。
- ⑨直線回帰式の一次の項より求めた DDREF は 2.5 であった。

以上被曝線量率が低下すると、腫瘍発生率における線量効果および寿命短縮効果に減少が認められる。

しかし、その減少効果の出現しない腫瘍のあることも認めた。

謝 辞

本実験を行うにあたり、常にかたよりのない動物を供給し、飼育室の保守管理を担当して下さった放医研動植物管理課の皆様にご心から感謝いたします。

また、動物の飼育、観察、組織標本作成に尽力下さった樽見、東海林、尾崎、篠原、磯田さんに心より感謝いたします。

【参考文献】

1. Upton AC : The dose-response relation in radiation-induced cancer. *Cancer Res* 1961, 717-729, 1961.
2. Wimber DR and Lamerton LE: Cell population studies on the intestine of continuously irradiated rats. *Radiat Res* 18, 137-146, 1963.
3. Leshner S, Fry RJM and Sacher GA: Effects of chronic gamma irradiation on the generation cycle of the mouse duodenum. *Exptl Cell Res* 25, 398-404, 1961.
4. Lord BL : Cellular proliferation in normal and continuously irradiated rat bone marrow studied by repeated labelling with tritiated thymidine. *Brit J Haemat* 11, 130-143, 1965.
5. Lamerton LF : Cell proliferation under continuous irradiation. *Radiat Res* 28, 119-138, 1966.
6. Lorenz E : Some biologic effects of long continued irradiation. *Am J Roentgenol* 63, 176-185, 1950.
7. Otsu H, Kobayashi S, Furuse T, Noda Y, Shiragai A and Sato F : Age and sex dependence in tumorigenesis in mice by continuous low dose rate whole body irradiation. in *Proceedings of the International Conference on Radiation Effects and Protection*, pp. 211-216, Mito, 1992.
8. Leshner S, Sacher GA, Grahn D, Hamilton K and Salles A : Survival of mice under duration-of-life exposure to gamma rays, II. Pathologic effects. *Radiat Res* 24, 239-277, 1965.
9. ICRP : 1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection, B. 4. Stochastic Effects: Carcinogenesis. in *ICRP Publication 60, Annals of the ICRP* 26(1-3), pp. 106-114, New York, Pergamon Press, 1990.
10. Shiragai A, Sato F, Kawashima N, Kobayashi S, Otsu H, Seki M and Maruyama T : Absorbed dose estimates in a prolonged caesium-137 gamma irradiation facility for mice. *J Radiat Res* 21, 118-125, 1980.
11. NCRP : 9. Tumorigenesis in experimental laboratory animals. in *Influence of dose and its distribution in time on dose-response relationships for low-LET radiations*. NCRP Report NO. 64, National Council on Radiation Protection and Measurements, pp. 108-131, Washington, D. C. 1980.
12. Lorenz E, Heston WE and Eschenbrenner A : Biological studies in the tolerance range. *Radiology* 49, 274-285, 1947.
13. Upton AC, Randolph ML and Conklin JW : Late effects of fast neutrons and gamma-rays in mice as influenced by the dose rate of irradiation: Induction of neoplasia. *Radiat Res* 41, 467-491, 1970.
14. Yuhas JM : Recovery from radiation-carcinogenic injury to the mouse ovary. *Radiat Res* 60, 321-332, 1974.
15. Spalding JF, Prine JR and Tietjen GL : Late biological effects of ionizing radiation as influenced by dose, dose rate, age at exposure and genetic sensitivity to neoplastic transformation. in *Radiation Induced Cancer, IAEA-SM-224 / 201*. IAEA, pp. 3-11, Vienna, 1978.
16. Ullrich RL and Storer JB : Influence of gamma irradiation on the development of neoplastic disease in mice. 111. Dose-rate effects. *Radiat Res* 80, 325-342, 1979.
17. UNSCEAR : Term and units of radiation exposure. in *Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation*. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation 1988 Report to the General Assembly, with Annexes, pp. 407-408, New York, United Nations, 1988.
18. Fritz TE, Norris WP, Tolle DV, Seed TM, Poole CM, Lombard LS and Doyle DE : Relationship of dose rate and total dose to responses of continuously irradiated beagles. in *Late Biological Effects of Ionizing Radiation*. Vol. 11, IAEA-SM-224 / -206, pp. 71-82, Vienna, 1978.
19. Ichimaru M, Ohkita T and Ishimaru T : Leukemia, multiple myeloma and malignant lymphoma. in *GANN Monograph on Cancer Research* 32. Cancer in Atomic Bomb Survivors (Shigematsu I and Kagan A, ed.), pp. 113-127,

Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Plenum Press, New York, 1986.

20. Major IR and Mole FH : Myeloid leukemia in X-ray irradiated CBA mice. *Nature* 272, 455-456, 1978.
21. Upton AC, Furth RRW and Kimball AW : A comparison of the induction of myeloid and lymphoid leukemias in X-radiated RF mice. *Cancer Res* 18, 842-848, 1958.
22. Resnitzky P, Estrov Z and Haran-Ghera N : High incidence of acute myeloid leukemia in SJL / J mice after X-irradiation and corticosteroids. *Leukemia Res* 9, 1519-1528, 1985.
23. Seki M, Yoshida K, Nishimura M and Nemoto K : Radiation-induced myeloid leukemia in C3H / He mice and the effect of prednisolone acetate on leukemogenesis. *Radiat Res* 127, 146-149, 1991.
24. Coggle JE : Lung tumour induction in mice after X-rays and neutrons. *Int J Radiat Biol* 53, 585-598, 1988.
25. Nowell PC, Cole LJ : Hepatoma in mice: Incidence increased after gamma irradiation at low dose rates. *Science* 148, 96-97, 1965.
26. Kaplan HS and Brown MB : A quantitative dose-response study of lymphoid-tumor development in irradiated C57 Black mice. *J Nat Cancer Inst* 13, 185, 208, 1952.
27. Storer JB, Serrano LJ, Darden EB Jr, Jernigan MC and Ullrich RL : Life shortening in RFM and BALB / c mice as a function of radiation quality, dose, and dose rate. *Radiat Res* 78, 122-161, 1979.

〔研究発表〕

1. Hiroshi Otsu, Shigeru Kobayashi, Takeshi Furuse, Yuko Noda, Akihiro Shiragai and Fumiaki Sato : Age and sex dependence in tumorigenesis in mice by continuous low dose rate gamma-ray whole body irradiation. pp211-216, in the Proceeding of International Conference on Radiation Effects and Protection 1990. 3. (Mito)
2. Otsu H., Kobayashi S., Furuse T., Noda Y., Shiragai A. and Sato F : Influence of dose-rate on tumorigenesis in mice by continuous irradiation at low dose rates. 41st Annual Meeting of the Radiation Research Society. Poster presentation, 1993. 3. (Dallas, Texas)
3. 野田攸子, 大津裕司, 古瀬健, 吉田和子, 根本久美恵 : 腫瘍発生率と γ 線照射時年令との相関性。日本放射線影響学会第 36 回大会。口頭発表, 1993. 10. (広島)

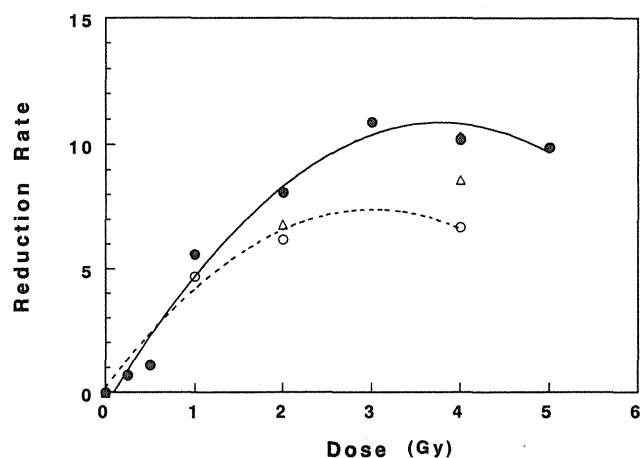


Figure 1. Ratio of life shortening of C3H mice.

The ratio is represented by a linear-quadratic equation as a function of dose, with which mice were irradiated at a dose rate of 0.882 Gy / min (●) in group H or 0.394 Gy / day (○) in group A or 0.089 Gy / day (◆) in group B or 0.021 Gy / day (▲) in group C. The equation for group H is $RLH = -0.56 + 6.05D - 0.80D^2$ ($r = 0.99$) and $RLA = 0.19 + 4.78D - 0.79D^2$ ($r = 0.99$) for group A.

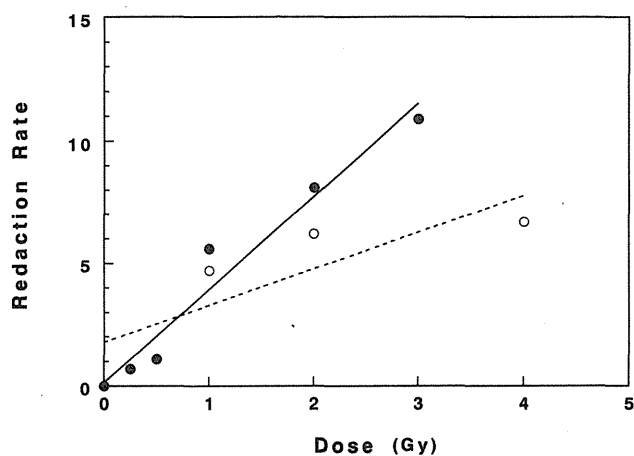


Figure 2. The regressive line for group H (●) is $RLH = 0.13 + 3.80D$ ($r = 0.98$) and $RLA = 1.78 + 1.50D$ ($r = 0.84$) for group A (○) by using least squares method. The DDREF value was equal to 3.80 / 1.50 (2.53).

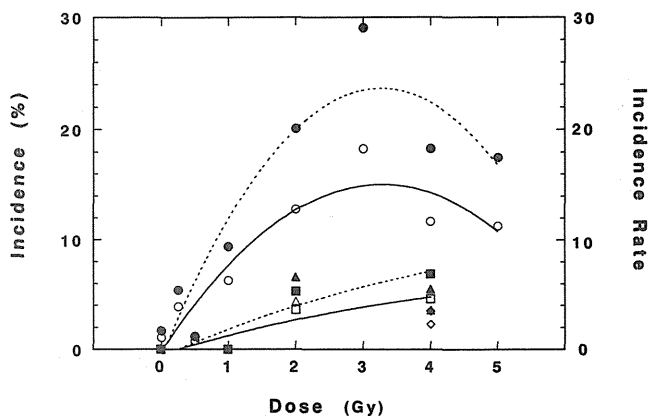


Figure 3. Incidence of myeloid leukemia in C3H mice. The incidence was described as crude incidence(I : —) or incidence rate(Ir : ...) by person year method. The incidences were drawn in the diagram as a function of dose, with which groups of mice were irradiated at a dose rate of 0.882 Gy / min (—○— : crude incidence, ...●... incidence rate) in group H or 0.394 Gy / day (—□—, ...■...) in group A, or 0.089 Gy / day (—△—, ...▲...) in group B or 0.021 Gy / day (—◇—, ...◆—) in group C. The incidence provided an adequate fit to the linear quadratic model equations, which were equal to equations(7),(8),(9)and(10)in the text.

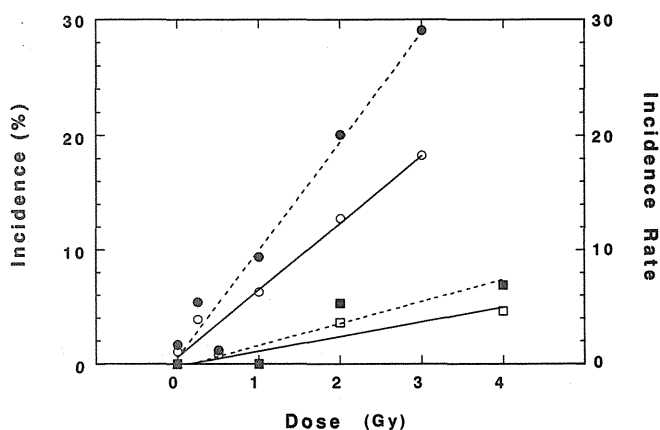


Figure 4. Regression lines of myeloid leukemia in C3H mice. The lines were depicted for group H (—○—, ...●...) and A (—□—, ...■...), Dotted line was derived from data of the incidence rates and solid line from that of the crude incidence.

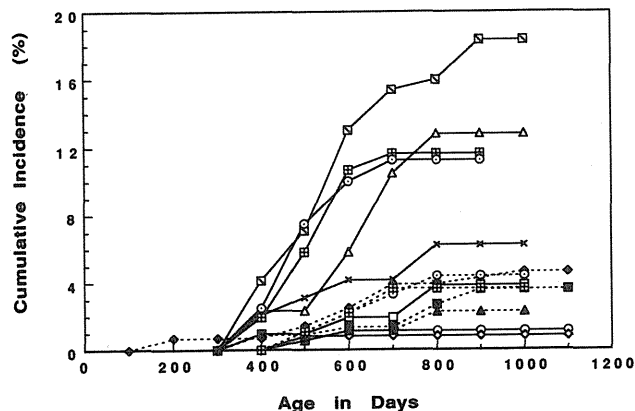


Figure 5. Cumulative incidence of myeloid leukemia in C3H mice. Solid lines indicated the cumulative incidences in groups of mice irradiated at a high dose rate (—○— : group U1, —□— : group H-0.25Gy, —◇— : group H-0.5Gy, × : group H-1Gy, —△— : group H-2Gy, ▤ : group H-3Gy, ▢ : group H-4Gy, —●— : group H-5Gy), and dotted lines those in groups of mice at low dose rates (...○... : group Ug, ...●... : group A-1Gy, ...■... : group A-2Gy, ...◆... : group A-4Gy, ...▲... : group B-4Gy, ...⊙... : group C-2Gy, ...▢... : group C-4Gy).

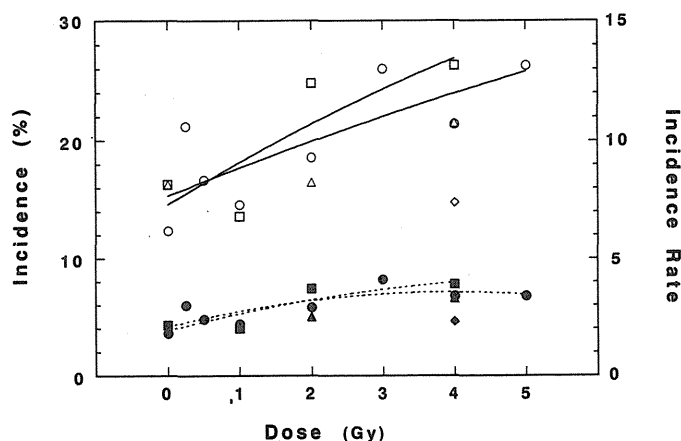


Figure 6. Incidence of lung tumor in C3H mice and regression curves for the incidence. The incidence was represented as a function of dose, with which groups of mice were irradiated at high dose rate (○ or ●) in group H or low dose rate (■ or □) in group A, (▲ or △) in group B, (◆ or ◇) in group C. Regression curves were derived from data of the crude incidences(dotted line) or incidence rates(solid line) and drawn from the equations(19),(20),(21)and(22)in the text.

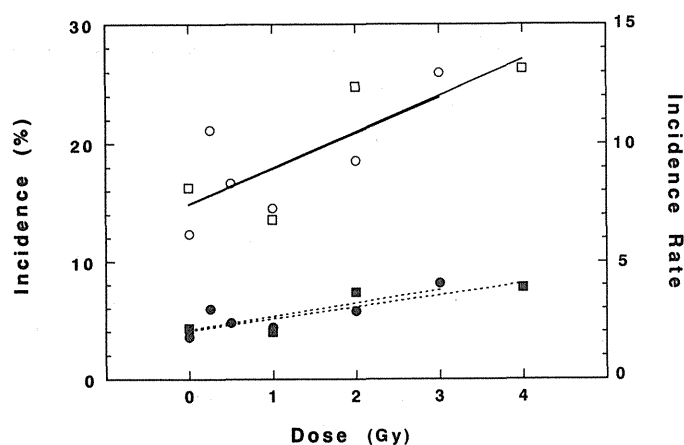


Figure 7. The regression line for the lung tumor incidence. The lines were drawn by the equations(23),(24),(25)and(26)in text. The lines and signs in this figure mean the same in figure 6.

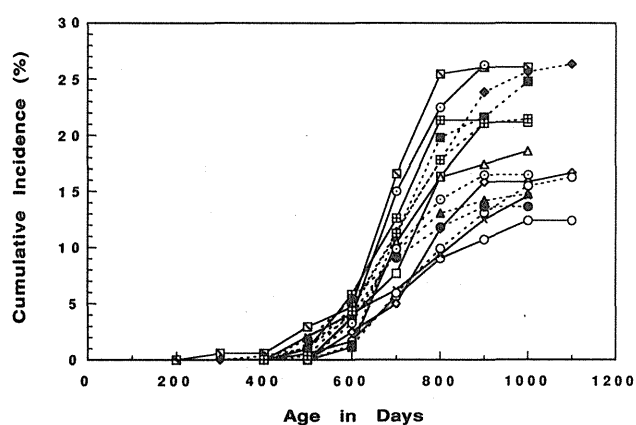


Figure 8. The cumulative incidence of lung tumor was represented as the curve in all groups. The lines and marks in this figure stand for the same in figure 5.

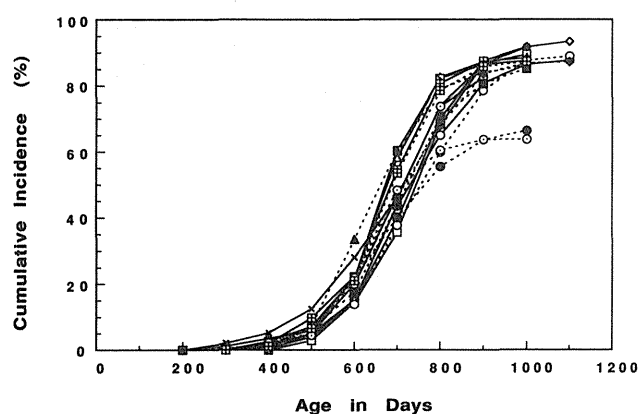


Figure 9. The cumulative incidence of liver tumor was shown as the curve in all groups. The lines and signs in this figure represent for the same in figure 5.

Table 1. Life Shortening of C3H/He Male Mice Exposed to Gamma-ray Irradiation

Dose Rate (Gy/min)	Dose (Gy)	No. of Mice	Average Life Span (days \pm SE) ^(h)	Ratio of Life Shortening ^(d)	DDREF ^(e)
0.882	0	281	711.3 \pm 8.3		
	0.25	139	706.2 \pm 11.2	0.7	
	0.5	132	703.7 \pm 12.7	1.1	
	1	116	671.3 \pm 13.6	5.6	
	2	118	654.0* \pm 11.9	8.1	
	3	183	634.1* \pm 9.2	10.9	
0.000298 ^(a)	4	122	638.5* \pm 12.4	10.2	
	5	103	641.2* \pm 13.6	9.9	
	0	252	722.3 \pm 9.2		
	1	87	688.5 \pm 16.5	4.7	1.2
	2	222	677.2* \pm 10.1	6.2	1.3
	4	281	674.0* \pm 9.6	6.7	1.5
0.000067 ^(b)	4	176	647.6* \pm 9.8	10.3	1.0
	2	92	673.0* \pm 13.2	6.8	1.2
0.000016 ^(c)	2	92	673.0* \pm 13.2	6.8	1.2
	4	275	660.0* \pm 7.1	8.6	1.2

a) The dose rate is equal to 0.394 Gy / 22hr / day

b) The dose rate is equal to 0.089 Gy / 22hr / day

c) The dose rate is equal to 0.021 Gy / 22hr / day

d) See equation (1) in the text.

e) DDREF = ratio of life shortening of high dose rate group exposed to a certain dose / ratio of life shortening of low dose rate group exposed to the same dose

f) Unirradiated control group was kept in the room on the 3rd floor of the late effects research laboratory

g) Unirradiated control group was kept in the first gamma-ray laboratory.

* Significant difference in average life span between the experimental group and control group(f)or(g)by t-student test($p < 0.005$)

h) Average life spans were calculated by Kaplan-Meier method

Table 2. Incidence of myeloid leukemia in irradiated C3H male mice

Dose (Gy)	High-dose-rate groups		Low-dose-rate groups				
			Group A		Group B		Group C
	Incidence (% \pm SE ^{a)})	Rate ^{b)} (% \pm SE ^{a)})	Incidence Rate (% \pm SE)		Incidence Rate (% \pm SE)		Incidence Rate (% \pm SE)
0	1.1 \pm 0.8	1.7	0 \pm 0				
0.25	3.9 \pm 1.9	5.4					
0.5	0.8 \pm 0.8	1.2					
1.0	6.3 \pm 2.5	9.4	0 \pm 0	0			
2.0	12.8 \pm 3.6	20.1	3.6 \pm 1.3	5.3			4.4 \pm 2.2 6.6
3.0	18.3 \pm 3.0	29.1					
4.0	11.7 \pm 3.2	18.3	4.6 \pm 1.3	6.9	2.3 \pm 1.1	3.5	3.6 \pm 1.1 5.5
5.0	11.3 \pm 3.5	17.5					

a) SE:standard error

b)Rate:number of mouse with tumor/mouse day 10^5

Table 3. Cumulative incidence of myeloid leukemia in C3H / He male mice

Age(days)	High dose-rate group									Low dose-rate group						
	Dose-rate (Gy/min)		0.882							0.000298		0.000067		0.000016		
	Dose (Gy)	0	0.25	0.5	1	2	3	4	5	0	1	2	4	4	2	4
0 - 100																
101 - 200													0.71			
201 - 300													0.71			
301 - 400	0	0.96	0	2.08	2.33	4.14	1.94	2.5	0	0	0.9	0.71	0	0	0	
401 - 500	0.56	0.96	0.83	3.13	2.33	7.10	5.83	7.5			0.9	1.42	0.57	1.1	1.09	
501 - 600	1.13	1.92		4.17	5.81	13.01	10.68	10.0			1.35	2.49	1.14	2.20	2.18	
601 - 701		1.92		4.17	10.47	15.38	11.65	11.25			1.35	3.91	1.14	3.30	3.64	
701 - 800		3.85		6.25	12.79	15.98					2.70	3.91	2.27	4.40		
801 - 900						18.34					3.60	4.27				
901 - 1000												4.63				
1001 - 1100																
1101 - 1200																

Table 4. Incidence of lung tumor in irradiated C3H male mice

Dose (Gy)	High-dose-rate groups		Low-dose-rate groups					
			Group A		Group B		Group C	
	Incidence (%±SE ^a)	Rate ^b	Incidence (%±SE)	Rate	Incidence (%±SE)	Rate	Incidence (%±SE)	Rate
0	12.4 ± 2.5	1.8	16.3 ± 2.3	2.3				
0.25	21.2 ± 4.0	3.0						
0.5	16.7 ± 3.4	2.4						
1.0	14.6 ± 3.6	2.2	13.6 ± 3.3	2.0				
2.0	18.6 ± 4.2	2.9	24.8 ± 2.9 [#]	3.7			16.5 ± 3.9	2.5
3.0	26.0 ± 3.4 [*]	4.1						
4.0	21.4 ± 4.0	3.4	26.3 ± 2.6 [#]	3.9	14.8 ± 2.7	2.3	21.5 ± 2.5	3.3
5.0	26.3 ± 4.9 [*]	3.4						

a) SE:standard error

b)Rate:number of mouse with tumor/mouseday10⁴

* and # indicated significantly more increase of lung tumor in the irradiated groups than in the control group.

Table 5. Incidence of liver tumor in irradiated C3H male mice

Dose (Gy)	High-dose-rate groups		Low-dose-rate groups					
			Group A		Group B		Group C	
	Incidence (%±SE ^a)	Rate ^b	Incidence (%±SE)	Rate	Incidence (%±SE)	Rate	Incidence (%±SE)	Rate
0	87.6 ± 2.5	12.8	88.9 ± 2.0	12.3				
0.25	89.4 ± 3.0	12.6						
0.5	93.3 ± 2.3	13.2						
1.0	91.7 ± 2.8	13.9	66.4 ± 4.5	9.8				
2.0	88.4 ± 3.5	13.9	85.1 ± 2.4	12.6			63.7 ± 5.0	9.5
3.0	87.6 ± 2.5	13.9						
4.0	87.4 ± 3.3	13.7	87.1 ± 2.0	13.0	85.8 ± 2.6	13.2	87.3 ± 2.0	13.2
5.0	82.5 ± 4.2	12.8						

a) SE:standard error

b)Rate:number of mouse with tumor/mouseday10⁴

Table 6. Low dose-rate irradiation experformed

Authors	Reported date	Low dose-rate (cGy/day)	High dose-rate (cGy/day)	Total dose (cGy)	Quality of radiation
Lorenz, E ¹²⁾	1947	0.11, 1.1, 2.2, 4.4, 8.8		life-time irradiation $\bar{d}_1 = 1400$ $\bar{d}_2 = 2600$ $\bar{d}_3 = 4300$	Ra γ
Leshner, S ⁸⁾	1965	12, 24, 32, 43, 56, 74, 125, 220		life-time irradiation	⁶⁰ Co γ
Upton, AC ¹³⁾	1970	0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100	9650(6.7cG/min)	25-9875	⁶⁰ Co γ
Yuhass, JM ¹⁴⁾	1974	1.75, 3.5, 7, 14, 18, 56, 112		49-392	¹³⁷ Cs γ
Spalding, JF ¹⁵⁾	1978	0.7, 2.1, 6.3, 18.4, 56.7		20-1620	⁶⁰ Co γ
Ullrich, RL ¹⁶⁾	1979	8.3,	48000(40 cGy/min)	10-300	¹³⁷ Cs γ

\bar{d}_1 indicates mean accumulated dose in group irradiated at a dose rate of 2.2cGy / day, \bar{d}_2 at a dose rate of 4.4cGy / day and \bar{d}_3 at a dose rate of 8.8cGy / day.

1. 発がんに関する研究

② 放射線誘発骨髄性白血病の発症に及ぼすカロリー制限の効果

吉田和子、根本久美恵、井上達**、西村まゆみ、荻生俊昭、佐渡敏彦*

放射線医学総合研究所 生理病理研究部

*放射線医学総合研究所 科学研究官

**外来研究員 (横浜市大医学部病理学教室)

The Effect of Calorie Restriction on Radiation-Induced Myeloid Leukemogenesis

* Kazuko Yoshida, * Kumie Nemoto, ** Tohru Inoue, * Mayumi Nishimura, * Toshiaki Ogiu, * Toshihiko Sado

* Div. Physiology and Pathology, . ** Yokohama City Univ.

The spontaneous incidence of myeloid leukemia was about 1% in C3H / He male mice, however it could be increased 23.3 % after 3 Gy whole body irradiation. Then, we examined whether or not the incidence of myeloid leukemia was decreased by calorie restriction. The diets were arranged so that the mice were from each experimental groups ingested similar amount of protein, lipid, vitamins and minerals. The mice of restricted A groups (RA) were fed of the same calorie (95Kcal) of control groups until radiation (10 weeks old). Then, they were controlled to keep a body weight

緒 言

発癌と食餌制限との関係については1940年代初頭より動物実験で種々検討されてきている。例えば、自然発症の乳がん、肺腫瘍、白血病、紫外線誘発皮膚がん、化学発癌剤によるSarcoma, Papillomaが食餌制限により有意に減少することが報告されている(1~7)。しかしながら、放射線誘発腫瘍と食餌制限に関する研究はまだ数編の報告しかなく(8~10)、骨髄性白血病の発症と食餌制限に関する報告はない。そのうえ、これらの報告の多くは極度の食餌制限を行なっているため、比較的初期に死亡するマウスが多く、食餌制限の方法に問題があると思われる。また、我々の研究室でC3H / Heマウスの骨髄性白血病の自然発症率は約1%であるが、放射線により全身1回照射を行なうと高率に発症することを発見した(11)。そして最も効果的な線量は約3 Gyであり、照射直後副腎皮質ホルモンであるプレドニン投与、あるいはマウスに慢性炎症反応を起こさせる事により照射単独より有意に骨髄性白血病の発症を増加させる事を報告している(11, 12)。そこで、マウスが正常に発育するに必要な程度のカロリーは与える条

件で放射線誘発骨髄性白血病について実験を行なった。of 25-27gm using 60 to 95 Kcal diet. The other groups (RB) were restricted from 6 weeks old. The incidence of myeloid leukemia in radiation plus control diet groups was $22.7 \pm 3.3\%$, however, in calorie restricted groups it is significantly decreased compared with control diet group. The incidences in 3RA and 3RB group are $10.7 \pm 2.7\%$ and $7.9 \pm 3.1\%$, respectively. Besides, the latent period of myeloid leukemia also is prolonged in the both calorie restricted groups compared to control diet group.

件で放射線誘発骨髄性白血病について実験を行なった。

実験方法

放医研で生産されたC3H / He雄マウスを使用し、4種類の給餌方法で実験を行なった (Table. 1)。

即ち、対照群としては、1つは従来の実験との比較の意味で、放医研で通常使用している飼料 (船橋農場製繁殖用飼料:MB-1) を自由に摂取させる通常食群 (N群) を置いた。この群のマウスは1週間に100から120Kcalの飼料を摂取する。この通常食群は制限食と飼料組成が異なるため正確なカロリー制限の対照群とするわけにはいかないので、制限食にたいするもう1つの対照群として、コントロール食群 (C群) を置いた。この群のマウスは1週間に95Kcal (カロリー制限の実験を行なう場合のコントロール食は一般的に通常食で飼育したマウスの100日から200日の間に摂取した平均カロリー数の80%制限がコントロール食群のカロリー数となる) 摂取する。制限食群は6週より照射時、即ち10週令までコントロール食で飼育し、その後60から95Kcalの飼料を用いて体重を25から27gmで飼育しコントロールするRA群と、6週から65

EXPERIMENTAL GROUPS AND PROCEDURES

EXP. GROUPS	DIET (Kcal / MOUSE / WEEK)	RADIATION	NO. OF MICE
C N	CONVENTIONAL DIET GROUPS 100~120Kcal	NO	113
3 N		YES	109
C C	CONTROL DIET GROUPS 95 Kcal	NO	165
3 C		YES	163
CRA	RESTRICTION DIET A GROUPS 95 Kcal (10 Weeks) → 60~95 Kcal	NO	135
3RA		YES	131
CRB	RESTRICTION DIET B GROUPS 65 Kcal (6 Weeks) → 60~95 Kcal	NO	70
3RB		YES	76

Mice in the restricted groups were controlled to keep a body weight of 25 to 27 gm using 60 to 95 Kcal diets.

Kcal の飼料で飼育し、その後体重が 25 ないし 27gm に達した後体重の増減により 60 から 95Kcal の飼料を用いて体重をコントロールする RB 群の 2 種類の制限方法を行なった。これらの実験群は更に 10 週令で 3 Gy 全身照射する群と非照射群を置き合計 8 群となった。各実験群は 6 回から 13 回に分けて実験を行なった。

カロリー制限の実験に使用した飼料の成分は Table. 2 に示すように何れの飼料を給餌しても 1 週間にマウス 1 匹当たり、蛋白、脂肪、ビタミン、ミネラルはほぼ同量摂取するように配合されており、炭水化物と糖でカロリーをコントロールするように作製した。制限食群即ち RA と RB の実験群のマウスは 1 週間に 1 回体重を測定し、体重が 25 から 27gm になるように 60 から 95Kcal の飼料を用いてコントロールした。マウスは原則的に終生飼育したが、貧血、脾腫等白血病の症状が出現したものは死亡寸前に屠殺し、血液学的検索を行なうとともに病理組織学的検索を行なった。他のマウスは死亡時に解剖し病理組織学的検索を行なった。

Composition of Diet(Gram/Mouse/Week)

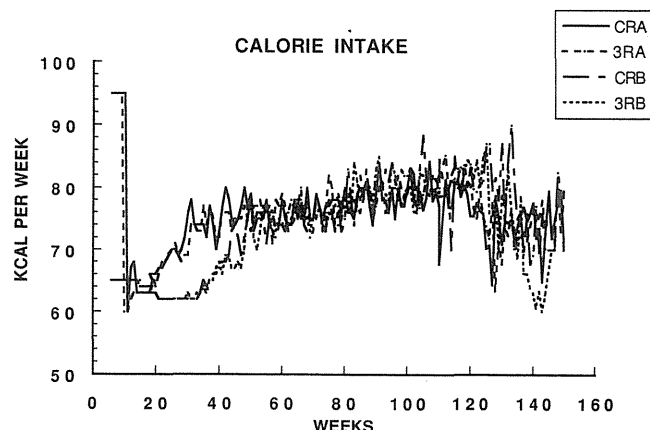
	Diet 1	Diet 2	Diet 3	Diet 4
Ingredient	95Kcal/Mouse/Wk.	70Kcal/Mouse/Wk.	65Kcal/Mouse/Wk.	60Kcal/Mouse/Wk.
Cornstarch	13.6	8.5	7.4	5.9
Milk Casein	6.3	6.0	6.0	6.3
Dextrose	2.7	1.6	1.4	1.2
Corn Oil	0.8	0.8	0.8	0.8
Fiber	1.4	1.3	1.3	1.4
Alpha Starch	0.3	0.3	0.3	0.3
Vitamin Mixture	0.3	0.3	0.3	0.3
Mineral Mixture	1.9	1.9	1.9	1.9

The diets were arranged so that the mice from each experimental groups ingested similar amounts of protein, lipids, vitamins and minerals.

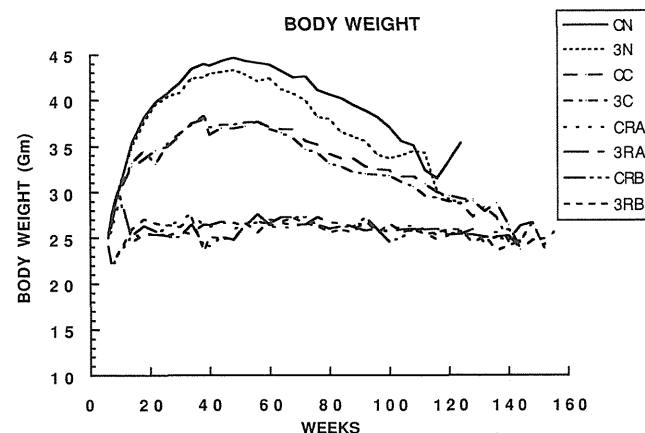
結 果

6 週より死亡時までの各制限食群について、マウス 1 匹が 1 週間に摂取した平均カロリー数は Fig. 1 に示す様に照射の有無で差は認められない。照射時即ち 10 週までコントロール食を給餌し照射後より制限食に代えた RA 群は 60Kcal の飼料より給餌しはじめ 20 週令までは 70Kcal 以下の摂取量となっているが、その後 70Kcal から 80Kcal の摂取量で変動し、終生の平均摂取量は CRA、

3 RA 群とも約 75Kcal であった。6 週より制限食を給餌した RB 群では約 40 週までの平均摂取量は 65Kcal で、その後徐々に摂取量は増加し、50 週を越えると RA 群と同様に摂取量は 70Kcal から 80Kcal の間を変動し、6 週から死亡時までの平均摂取量は照射群、非照射群とも約 72Kcal であった。



体重の変動は照射時までコントロール食を給餌していた RA 群は、照射群、非照射群ともに同様な体重の変動パターンを示した (Fig. 2)。照射時の体重は約 30gm で、その後急激なカロリー制限を行なった為に体重は急速に減少し 15 週令で我々が理想的な体重と考えている 25 から 27gm の範囲に入り死亡するまでほぼこの体重を維持した。一方、6 週より 65Kcal の制限食を給餌した RB 群は、RA 群と同様に照射群と非照射群との間で体重の変動パターンの差は認められず、6 週より通常食から 65Kcal の飼料に代えたため、体重はいったん減少したが 8 週より増加し続け 12 週で 25gm、14 週で 26gm となりその後 25 から 27gm の範囲を維持した。95Kcal のコントロール群は、照射、非照射群とも体重は 20 週まで増加し続け、その後 36 から 37gm の体重を 70 週まで維持し、その後徐々に減少した。通常食群も照射時の 10 週令では体重は約 30 gm で、その後も体重は増加し続け 30 週でプラトーに達した。その後は 3 Gy 照射群のマウスの体重のほうやや軽い傾向が続くのが認められた。



MEAN SURVIVAL DAYS

EXP. GROUPS	NO. OF MICE	MEAN SURVIVAL DAYS	G-W Test
C N	113	710.1 ± 11	
3 N	109	632 ± 12.3	1)
C C	165	778.6 ± 14.4	2)
3 C	163	670.0 ± 12.8	1)
CRA	135	834.1 ± 18.4	2),3)
3RA	131	772.4 ± 17.0	1),4)
CRB	70	810.0 ± 25.0	2)
3RB	76	716.4 ± 25.6	1),4)

G-W Test : Generalized Wilcoxon Test.

Significant Difference were observed as follows 1) $P < 0.01$ between unirradiated and irradiated groups, 2) $P < 0.01$ between CN and CC, CRA, CRB, 3) $P < 0.02$ between CRA and CC, 4) $P < 0.01$ between 3N, 3C and 3RA, 3RB.

± : Standard error.

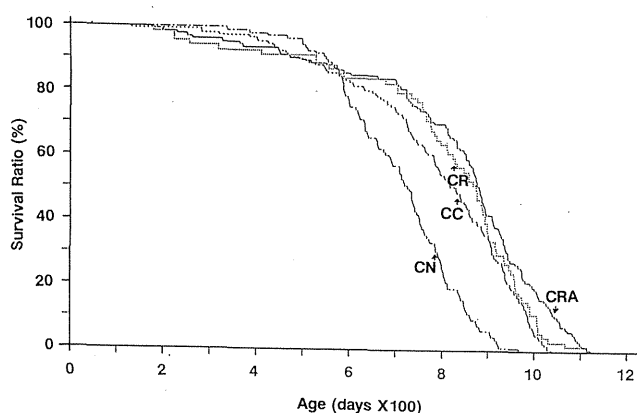


Fig. 3 Survival curve of unirradiated groups.

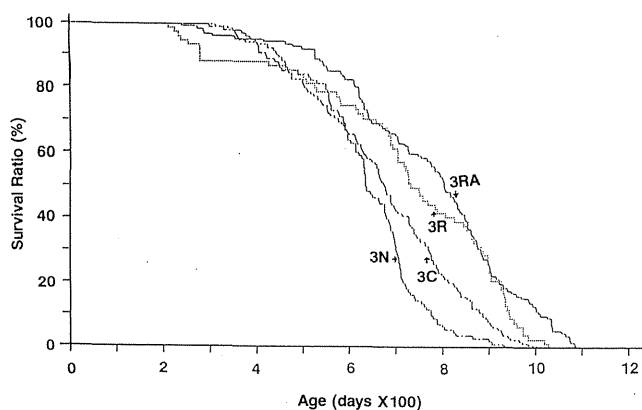


Fig. 4 Survival curve of irradiated groups.

平均生存日数及び生存曲線はそれぞれ Table-3 及び Fig. -3, 4 に示す。生存曲線について照射群と非照射群とを比較すると Generalized Wilcoxon 法で 1 % 以下の危険率で何れの実験群においても 3 Gy 照射群で寿命の短縮が認められた。非照射群で給餌方法による生存曲線の差異について検討すると約 600 日迄は何れの給餌法でも有意差は認められないが、通常食群で、600 日以降より急速に死亡するマウスが増加するがコントロール食群ではマウスは

徐々に死亡した。制限食群の RA と RB は 700 日までは徐々にマウスは死亡するが、その後はコントロール食と同様な傾きで死亡マウスは増加する。平均生存日数は CN: 710、CC: 779、CRA: 834、CRB: 810 日である。CC、CRA、および CRB は CN との間で Generalized Wilcoxon 法により 1 % 以下の危険率で寿命の延長が認められた。また、CRA は CC との間では 2 % 以下の危険率で寿命の延長が認められているが、CRB は CC より平均生存日数は長いが両者の間では統計学的に有意差は認められない。

3 Gy 照射群では通常食とコントロール食群は約 600 日までは両者ともほぼ同様な死亡曲線であるが、600 日以降ではコントロール食群で死亡曲線は緩慢になり、両者の間では 5 % 以下の危険率でコントロール食群で寿命の延長が認められる。6 週より制限食を給餌した 3 RB 群では 300 日迄の死亡数がやや多い傾向が認められるが、3 N、3 C と比較して 1 % 以下の危険率で有意な寿命の延長が認められる。また、照射後より制限食を給餌した 3 RA 群では、3 N 及び 3 C と比較して 1 % 以下の危険率で有意な寿命の延長が認められた。照射群間で、最も寿命の長い群は照射後より制限食にした 3 RA 群の 772 日、次は 6 週より制限食 (3 RB) の 716 日、コントロール食 (3 C) : 670 日、通常食 (3 N) の 632 日となった。

INCIDENCE OF MYELOID LEUKEMIA

EXP. GROUPS	NO. OF MICE	NO. OF MYELOID LEUKEMIC MICE	CRUDE INCIDENCE OF MYELOID LEUKEMIA (%)
C N	113	2	1.8 ± 1.3
3 N	109	25	22.9 ± 4.0
C C	165	3	1.8 ± 1.1
3 C	163	37	22.7 ± 3.3
CRA	135	0	0
3RA	131	14	10.7 ± 2.7 1),2)
CRB	70	0	0
3RB	76	6	7.9 ± 3.1 2),3)

1),2),3) : χ^2 tests for the incidence of myeloid leukemia. Statistically significant difference between 1) $P < 0.02$: 3RA, 3RB and 3N, $P < 0.02$: 3RA and 3C, $P < 0.01$: 3RB and 3C.

± : Standard error.

骨髄性白血病の発症率については Table 4 に示すように、非照射群では通常食、コントロール食とも発症率は 2 % 以下であったが、制限食群では 1 例も骨髄性白血病の発症は認められていない。3 Gy 照射群では通常食では 22.1 %、コントロール食では 22.7 % と、両者の間では差は認められなかった。照射までコントロール食と同様の飼料を給餌、その後制限食に代えた 3 RA では 10.7 % と通常食、コントロール食の発症率の約半分となり、これらの群との間に χ^2 テストで 2 % 以下の危険率で骨髄性白血病の有意な減少が認められた。照射前の 6 週より制限食を給餌した 3 RB 群では更に発症率は減少し、7.9 % となった。制限食群間すなわち、3 RB と 3 RA では有意差は認められないが、3 RB は 3 N との間では 2 % 以下、3 C との間では 1 % 以下の危険率で χ^2 テストにより有意差が認められた。以上の結果をまとめてみると、カロリー制限を行

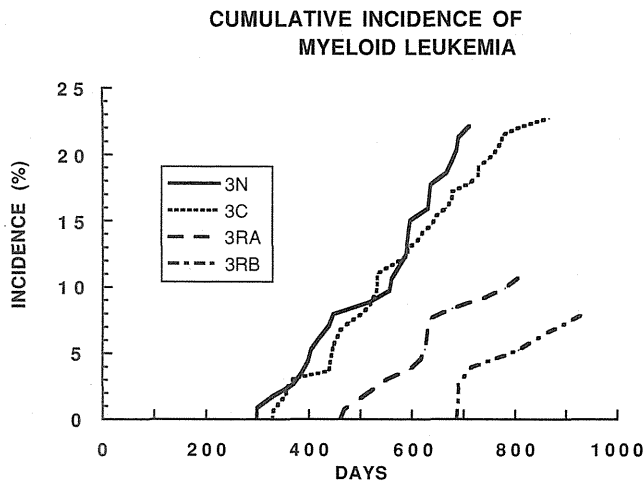


Fig. 5 CUMULATIVE INCIDENCE OF MYELOID LEUKEMIA

なう事により通常食及びコントロール食との間で放射線誘発骨髄性白血病の発症率は有意に減少し、その効果は照射前より制限食を給餌した群でより強く現れる。

3 Gy 照射群間での骨髄性白血病の Cumulative Incidence を Fig. 5 に示す。通常食群、コントロール食群ともに約 300 日令より骨髄性白血病が発症しはじめ、その後急速に増加し、両者で発症パターンに大きな差は認められなかった。これに対して、照射後制限食を給餌した 3 RA 群では、最初の 1 例の発症は 479 日と通常食、コントロール食群より大きく遅延し、発症率の増加もやや緩慢である。6 週より制限食を給餌した 3 RB 群では更に遅れて、690 日で始めての発症が観察された。以上の結果より、カロリー制限により骨髄性白血病の発症時期は有意に遅延すると考えられる。

考 察

マウスをカロリー制限することにより有意に寿命を延長し、放射線誘発骨髄性白血病の発症率を低下させることが明らかとなった。特に骨髄性白血病の発症率だけを考えれば、照射前よりカロリー制限を行なった方がその効果はより顕著に現れる。

放医研で通常使用している飼料を自由に与える群では、体重はコントロール食群よりも増加し平均生存日数はコントロール食よりも非照射群では有意に減少した。しかしながら、3 Gy 照射群での骨髄性白血病の発症率は全く同率であった。飼料の成分が通常食とコントロール食とは異なる為、単純には比較する事は出来ないが、20%程度のカロリー制限では体重は減少するが、少なくとも放射線で誘発される骨髄性白血病の発症率には影響を及ぼさないものと考えられる。

カロリー制限により放射線誘発骨髄性白血病の発症率を減少させる機構を説明するには、未だ十分なデータは得られていない。しかしながら、我々の予備実験では、カロリー制限を行なったマウスの脾臓での造血幹細胞数が著しく減少している結果が得られていることから、照射前よりカロリー制限を行なった群では、照射時の白血病発症における標的細胞である造血幹細胞の減少が反映している可能性が考えられる。しかしながら、照射時までコントロール食を給餌した群では、照射時の幹細胞数はコントロール食

と同一であるため、照射時の標的細胞の数の減少だけでは説明できない。白血病の発症過程をイニシエーションとプロモーション、プログレッションに分けると、特に 3 RA 群ではカロリー制限の効果はプロモーション、プログレッションの過程に関与している可能性が高い。特に、照射後の造血幹細胞の回復動態の差や、Cell Cycle に入っている幹細胞の比率や、活性酸素の問題が考えられる。また、栄養過剰や栄養不良も免疫異常をおこし発症率を増加させるという報告がある。低カロリー食を摂取したマウスは高カロリー群より T 細胞が産生するインターロイキン-2 (IL-2) の産生が高い事が報告されている (13)。IL-2 は B 細胞や T 細胞を活性化する事が知られているが、放射線誘発骨髄性白血病の場合も、プロモーションの過程で免疫能の違いが関与している可能性も考えられる。あるいはマウスの骨髄性白血病の発症に関連する遺伝子はまだ特定されていないが、その遺伝子発現等がカロリー制限により影響を受けている可能性も考えられる。カロリー制限により発症率が減少するこの機構については非常に興味のある問題であるが、今後の検討課題として残されている。

カロリー制限により有意な寿命の延長が認められたが、照射群では比較的早期に出現する骨髄性白血病の発症率が有意に減少する事で一応説明できる。しかしながら非照射群でもカロリー制限によりコントロール食と照射後制限食に代えた (CRA) との間で有意に寿命の延長が認められている。また、最も長寿命であったのも CRA 群であった。その上、コントロール食群でも通常食群と比較して有意な寿命の延長が認められている。C3H/He マウスは通常食で飼育した場合、肝癌が約 90% のマウスに自然発症するので通常食とコントロール食とは飼料の成分が異なる為、カロリーの差だけではなく通常食は肝癌が発症しやすい飼料である可能性も考えられる。従って、コントロール食群を含めて、制限食実験群での肝癌の発症率が減少するか否かも興味のあるところである。この報告書を書く時点で、やっと全マウスが死亡したところであるので、未だ全てのマウスについて組織学的検索が終了していないので、結論は未だだせないが、現在のところ制限食群での肝癌発症率が低下している傾向が認められている。他の固形癌を含めて発症時期が遅延するだけなのか、あるいは発症率も減少するのか興味深いところである。

今回の実験では 55 ~ 95Kcal の飼料でマウスの体重を 25 ~ 27gm にコントロールする方法をとったが、終生の平均摂取カロリー数は約 75Kcal / 週という結果が得られたので、コントロール食の約 20% 制限のカロリー摂取量で寿命の延長と白血病の発症率の有意な減少が認められたので、次期特研では照射後より 75Kcal / 週で今回と同様な結果が得られるか検討する事となった。また、照射時の骨髄性白血病の標的細胞数の差が白血病の誘発に影響を及ぼすか否か非常に興味のあるところなので、照射時まで 65Kcal / 週で飼育しその後コントロール食にかえる実験も行なう事となった。従ってこれらの実験結果が得られればカロリー制限はイニシエーションの過程、あるいはプロモーション、プログレッションの過程のどちらに多くに関与するのか明らかとなると考えられる。

結 論

放射線誘発骨髄性白血病はマウスの食餌中のカロリーを

制限して体重を 25 ～ 27gm にコントロールすることにより有意に発症率を低下させ、又発症時期も大はばに遅延させる事が出来る事が明らかとなった。発症率の低下及び発症時期の遅延は照射前よりカロリー制限を行なった方がより効果的であった。カロリー制限をする事によりマウスの寿命の延長も有意に認められた。マウスの体重を 25 ～ 27gm にコントロールするのに必要な平均カロリーは 1 週間にマウス 1 匹当たり 75kcal であった。

謝 辞

本研究に協力していただいた横浜市大・鈴木健一、放医研・朽木喜久代、佐々木恵子、堀越はる子、寺田南子、渡辺文子の各位に感謝致します。カロリー制限の方法について色々ご助言いただいた、東京都老人病研究所、藤田美明博士に感謝いたします。この研究は科学技術庁特別研究「公衆被曝のリスク評価に関する生物学的調査研究」によって行なわれた。

参考文献

1. Visscher, M. B., Ball, Z. B., Barnes, R. H. and Sivertsen, I. : The influence of calorie restriction upon the incidence of spontaneous mammary carcinoma in mice. *Surgery*, 11; 48-55, 1942.
2. White, F. R. and White, J. J. : Effect of a low lysine diet on mammary-tumor formation in strain C3H mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 5; 41-42, 1944.
3. Larsen, C. D. and Hestone W. E. : Effects of cystine and calorie restriction on the incidence of spontaneous pulmonary tumors in strain A mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 6; 31-40, 1945.
4. Saxton, J. A. Jr., Boon, M. C. and Furth, J. : Observations on the inhibition of development of spontaneous leukemia in mice by underfeeding. *Cancer Res.* 4; 401-409, 1944.
5. Rusch, H. P., Kline B. E. and Baumann, C. A. : The influence of calorie restriction and of dietary fat on tumor formation with ultraviolet radiation. *Cancer Res.* 5; 431-435, 1945.
6. Rusch, H. P., Johnson, R. O. and Kline, B. E. : The relationship of caloric intake of blood sugar to sarcogenesis in mice. *Cancer Res.* 5; 705-712, 1945.
7. Boutwell, P. K., Brush, M. K. and Rusch, H. P. : The stimulating effect of dietary fat on carcinogenesis. *Cancer Res.* 9; 741-746, 1949.
8. Gross, L. and Dreyfuss, Y. : Reduction in the incidence of radiation-induced tumors in rats after restriction of food intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81; 7596-7598, 1984.
9. Gross, L. and Dreyfuss, Y. : Inhibition of the development of radiation-induced leukemia in mice by reduction of food intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83; 7028-7931, 1986.
10. Gross, L. and Dreyfuss, Y. : Prevention of spontaneous and radiation-induced tumor in rats by reduction of food intake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87; 6795-6797, 1990.
11. Seki, M., Yoshida, K., Nishimura, M. and Nemoto, K. : Radiation-induced myeloid leukemia in C3H / He mice and the effect of prednisolone acetate on leukemogenesis. *Rad. Res.* 127; 146-149, 1991.
12. Yoshida, K., Nemoto, K., Nishimura, M. and Seki, M. : Exacerbating factors of radiation-induced myeloid leukemogenesis. *Leuk. Res.* 17:437-440, 1993.
13. Kubo, C., Johnson, B. C., Day N. K. and Good, R. A. : Calorie source, calorie restriction, immunity and aging of (NZB / NZW)F1 mice. *J. Nutr.* 114: 1884-1899, 1984.

研究発表

1. 根本久美恵、吉田和子、西村まゆみ、井上達、佐渡敏彦 : 日本放射線影響学会第 34 回大会口頭発表、1991. 11 (東京)。
2. Yoshida, K., Nemoto, K., Nishimura, M. and Sado, T. : Modifying factors on development of myeloid leukemia with x-ray. : Proceedings of International Conference on Radiation Effects and Protection 206-210, 1992.
3. 吉田和子、根本久美恵、井上達、佐渡敏彦 : 第 24 回放医研シンポジウム口頭発表。1992. 12.
4. 吉田和子、根本久美恵、井上達、佐渡敏彦 : 日本放射線影響学会第 36 回大会口頭発表、1993. 10. (広島)

2. 遺伝的影響等に関する研究

①胎内トリチウム被曝による発生・分化異常に関する研究

山田武（東邦大学医学部、元生物研究部）、広部知久、田口泰子、藤井由布（生物研究部）、
栗原靖之（横浜国立大学工学部）、江藤久美（元生物研究部）

Effects of Tritiated Water on the Development and Differentiation in Animals

Takeshi Yamada*, Tomohisa Hirobe, Yasuko Hyodo-Taguchi, Yuh Fujii, Yasuyuki Kurihara** and
Hisami Etoh

Division of Biology, *Toho University of Medicine and **Yokohama National University of
Technology

The Present work was carried out as a research project with aims at comparing the effect of internal beta particles from tritiated water on the developmental system to those of external gamma rays.

Pregnant mice were irradiated with beta particles from tritiated water in total embryonic stages to investigate effects of tritiated water on brain development and melanocyte differentiation. Brain weights and protein contents of brains decreased in a dose-dependent manner. The abnormal differentiation of melanocytes (mid-ventral white spots) increased in a dose-dependent manner. Similar results were obtained in the animals continuously exposed to ^{137}Cs -gamma rays in total embryonic stages. The values of relative biological

effectiveness of tritium-beta particles on brain development and melanocyte differentiation were 1.7 to 2.0 and 1, respectively.

Embryos of medaka were exposed either to tritiated water (9.25-37 MBq / ml) or to ^{137}Cs gamma rays (dose rates of 0.44-1.89 Gy / day) continuously from morula to hatching. The newly hatched fry were bred under usual conditions for 1 month and young fish were fixed in buffered formalin. Vertebral malformations were observed on whole-mounted skeleton specimens. The incidence of vertebral malformations increased significantly in both groups irradiated with tritium beta particles and ^{137}Cs gamma rays. The RBE of beta particles relative to gamma rays was estimated to be 1 based on the dose-response relationships observed.

1. 緒言

トリチウムベータ線のリスク評価に当たっては、組織中で最も放射線感受性が高い胚あるいは胎児への影響を検討することが重要である。本研究では、発生障害リスクとして特に重要な哺乳類胎児の障害と、体外受精をして全発生過程が観察できて、取り扱いの容易なメダカ胚の障害を指標としてトリチウムベータ線の RBE を検討した。従来からトリチウム水の細胞増殖、細胞機能への効果は詳しく調べられてきたが、動物の発生・分化への効果についてはほとんど調べられてこなかった。そこで本研究では、特にこの点に着目し実験系を選んだ。マウスではトリチウム水の効果を脳の発生、特に脳重量、脳タンパク質量および細胞分化の系としてはメラノサイトの分化を指標に詳しく検討した。また、メダカにおいては発生過程中的環境要因により決定されることが知られていて、比較的定量化がしやすい脊椎骨の形成を指標とした。

2. 材料と方法

イ. マウス胎児組織へのトリチウムの吸収線量

BC3F1 系雌マウスを ICR 系雄マウスと交配させ、膣栓を確認した日よりトリチウム汚染動物飼育室の特殊ケージに雌マウスを移し、各濃度のトリチウム水を与えた。その後妊娠の全期間にわたり経時的に妊娠動物を殺し、血液内および胎内のトリチウム濃度をサンプルオキシダイザーで測定した。妊娠初期のマウス胚では母マウスの血液内濃度と胚内トリチウム濃度が同一と仮定して胚内濃度を推定した。また、胎児組織の含水量を 90 % と仮定して吸収線量を算定した。

ロ. マウス胎児へのガンマ線照射およびトリチウム水投与
光制御下（明期：7:00 - 19:00）で飼育した BC3F1 系雌マウスおよび ICR 系雄マウスを午前 6 時から 3 時間同居させた。膣栓を確認した雌マウス（妊娠 0 日目）について同日午前 11 時 30 分より ^{137}Cs ガンマ線の連続照射を

いて同日午前11時30分より¹³⁷Csガンマ線の連続照射を開始した。照射は線源の格納時間(9:30-11:30)を除いて1日22時間行われた。妊娠18日目に帝王切開によって胎児を取り出し、体重、脳重量、脳のタンパク質量、DNA量を測定した。

トリチウム水投与の実験の場合も同様に3時間雌雄マウスを同居させ膣栓を確認した雌マウスに50-500μCi/ml(1.85-18.5MBq/ml)の各濃度のトリチウム水を投与した。同様に妊娠18日目に帝王切開し、胎児の体重、脳重量、脳のタンパク質量、DNA量を測定した。

ハ、マウスメラノサイトへのガンマ線およびトリチウム水の効果

C57BL/10JHir-p/p系統の雌とC57BL/10JHir系統の雄を交配させ膣栓を確認した日の午前11:30分より¹³⁷Csガンマ線の連続照射を開始した(0.30-0.75Gy、線量率:0.5cGy/day-4.5cGy/day)。照射は線源の格納時間(9:30-11:30)を除いて1日22時間行われた。照射は妊娠18日目に停止した。生後25日目に毛色を確認し白斑個体の頻度を求めた。トリチウム水投与の実験の場合も同様に雌マウスに20-50μCi/ml(0.74-1.85MBq/ml)の各濃度のトリチウム水を投与した。

ニ、トリチウム水のベータ線によるメダカ胚の骨形成異常
近交系メダカのH04CおよびH05系統の胚を受精後4時間の桑実胚からふ化まで(25℃で約10日)、9.3-37MBq/ml(0.25-1mCi/ml)のHTO中または線量率0.4-1.9Gy/dayの¹³⁷Csガンマ線連続照射下で飼育し、ふ化後通常の水に戻して飼育した。ふ化約1ヵ月後、体長15-20mmの稚魚を10% buffered formalinで24時間固定した後、1% KOHで透明化し、alizerin red Sで骨を染色して、全身骨標本を作製し、実体顕微鏡で脊椎骨の異常とその数を調べた。また、しり鰭、背鰭、尾鰭と胸鰭の軟条数を数えた。

3. 結果および考察

イ、マウス胎児組織へのトリチウムの吸収線量

妊娠初日よりトリチウム水を与えた場合、胎内トリチウム濃度は妊娠後上昇し、7-10日で定常状態に達した。胎児組織の含水量を90%と仮定して吸収線量を算定したところ、蓄積吸収線量は飲料トリチウム水の濃度に比例して増大した(Fig. 1)。

ロ、トリチウム水のマウス胎児の脳重量、脳タンパク質量に対する効果

妊娠したマウスに¹³⁷Cs-ガンマ線を連続照射し(1.40-5.55Gy、線量率、0.11-0.42cGy/min)、胎児のリッター数、母マウス当たりの吸収数、胎児の体重、脳重量、脳タンパク質量およびDNA量を調べた。リッター数は各線量で有意差はみられなかったものの、母マウス当たりの胎児吸収数は線量依存的に増加し、体重は5.55Gy照射群、脳重量、脳タンパク質量およびDNA量は3.48Gy以上の照射群で対照と有意な差がみられた(Tables 1A、2A)。一方、トリチウム水を投与した場合には、吸収胚や死産の数は線量が高くなるにつれて増加し、リッター数は減少した。しかしながら、このリッター数の減少は吸収胚や死産などの着床後の死亡の増加よりも大きく、この減少は主に着床前の死亡に起因するものと考えられる。また、胎児の体重や脳重量、脳タンパク質量は

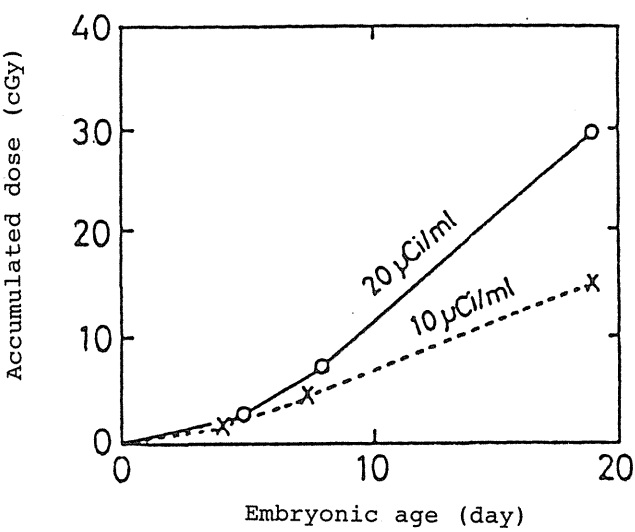


Fig. 1 Accumulated dose (cGy) in embryonic mice after exposure to tritiated water (HTO). 10μCi/ml(x), 20μCi/ml(O).

A. ¹³⁷Cs-gamma rays

Total dose(Gy)	Number of dam	Total			Average/Litter			
		Alive	Absorbed	Dead	Alive	Absorbed	Dead	Total
0	14	122	0	2	8.71	0	0.14	8.85
1.39	6	41	1	4	6.83	0.17	0.67	9.17
1.74	9	77	3	1	8.56	0.33	0.11	9.00
3.48	8	58	5	0	7.25	0.63	0	7.88
5.55	12	77	14	0	6.42	1.17	0	7.59

B. HTO

Conc. (μCi/ml)	Absorbed dose(Gy)	Number of dam	Total			Average/Litter			
			Alive	Absorbed	Dead	Alive	Absorbed	Dead	Total
0	0	6	57	0	0	9.5	0	0	9.5
50	0.64	7	60	2	0	8.6	0.3	0	8.9
100	1.19	8	67	0	1	8.4	0	0.1	8.5
200	3.41	7	49	1	5	7.0	0.1	0.7	7.8
400	6.45	3	24	3	3	8.0	1.0	1.0	10.0
500	7.53	1	5	1	2	5.0	1.0	2.0	8.0

Table 1. Effects of ¹³⁷Cs-gamma rays and tritiated water (HTO) on the development of mice

50μCi/ml(1.85MBq/ml)投与群では対照群と差はなかったが、それ以上の線量では有意に減少した(Tables 1B、2B)。したがって、ガンマ線の連続照射の結果と比較するとトリチウムベータ線のRBEは1.7-2.0と推定される。したがって、トリチウムベータ数はガンマ線よりマウスの胎児の脳の発生にやや強い抑制効果をもっていると考えられる。

A. ^{137}Cs -gamma rays

Total dose(Gy)	Body weight (g/fetus)	Brain weight (mg/fetus)	Protein content (mg/brain)	DNA content ($\mu\text{g}/\text{brain}$)
0	1.33 \pm 0.03	81.00 \pm 1.16	5.98 \pm 0.18	834.59 \pm 28.61
1.39	1.29 \pm 0.03	74.63 \pm 1.70	5.65 \pm 0.11	832.63 \pm 40.56
1.74	1.33 \pm 0.02	77.68 \pm 0.95	5.74 \pm 0.13	667.46 \pm 24.10
3.48	1.29 \pm 0.03	73.26 \pm 1.46	5.55 \pm 0.11	778.38 \pm 19.80
5.55	1.09 \pm 0.02	62.09 \pm 1.55	4.91 \pm 0.13	546.15 \pm 17.30

B. HTO

Concen. ($\mu\text{Ci}/\text{ml}$)	Absorbed dose(Gy)	Body weight (g/fetus)	Brain weight (mg/fetus)	Protein content (mg/brain)
0	0	1.26 \pm 0.03	81.63 \pm 0.71	3.40 \pm 0.09
50	0.64	1.28 \pm 0.03	84.06 \pm 1.20	3.45 \pm 0.06
100	1.19	1.17 \pm 0.02	75.06 \pm 0.67	3.10 \pm 0.09
200	3.41	0.99 \pm 0.02	62.88 \pm 0.92	2.35 \pm 0.05
400	6.45	0.58 \pm 0.03	35.56 \pm 1.00	1.47 \pm 0.08
500	7.53	0.44 \pm 0.03	23.16 \pm 1.14	0.90 \pm 0.09

Table 2. Effects of ^{137}Cs -gamma rays and tritiated water (HTO) on the development of mouse brains

ハ、マウスのメラノサイトの分化に対するトリチウム水の効果

C57BL/10JHir-p/p系統の雌マウスとC57BL/10JHir系統の雄マウスを交配し、妊娠期に ^{60}Co -ガンマ線を急照射すると子孫において腹部中央に白斑がみられ、その白斑の頻度はガンマ線の線量に応じて増加することが知られている。白斑部にはメラノblast、メラノサイトが欠損することからガンマ線はこれらの細胞の分化を抑制すると考えられる。マウスの胎児に妊娠期間を通じてトリチウム水を投与した場合にも、トリチウム水の濃度に応じて腹部白斑の頻度が高まった。トリチウムベータ線のRBEを求めするためにマウスの胎児に妊娠期間を通じて ^{137}Cs -ガンマ線を連続照射した。その結果、子孫にトリチウム水を投与した個体と同様な白斑がみられた。その頻度はガンマ線の線量に応じて増加した。両者の直線の傾きから算出したトリチウムベータ線のRBEは約1であった (Fig. 2)。

ニ、トリチウム水のベータ線によるメダカ胚の骨形成異常

(1) ふ化率と生存率：無照射対照群では、H04およびH05共に約90%の胚がふ化し、そのうち約70%が1カ月の稚魚になった。ガンマ線の連続照射群は、両系統共に対照群と差が無かったが、トリチウム群では濃度に依存したふ化率と1カ月後の生存率の低下が両系統でみられた。

(2) 脊椎骨の異常：ベータ線およびガンマ線の照射下で発生したメダカの脊椎骨には、2ヶ以上の椎骨の癒合、椎骨の形成不全、棘状突起の欠如等の骨形成異常がみられた (Fig. 3)。

これらの全異常の発生率はトリチウム水の濃度またはガンマ線の線量に比例して増加した。両者の線量-効果関係から、トリチウムベータ線とガンマ線のRBEはほぼ1に近い値が得られた (Fig. 4)。(3) 脊椎骨とひれ軟条数の変化：脊椎骨数はメダカの系統によっ

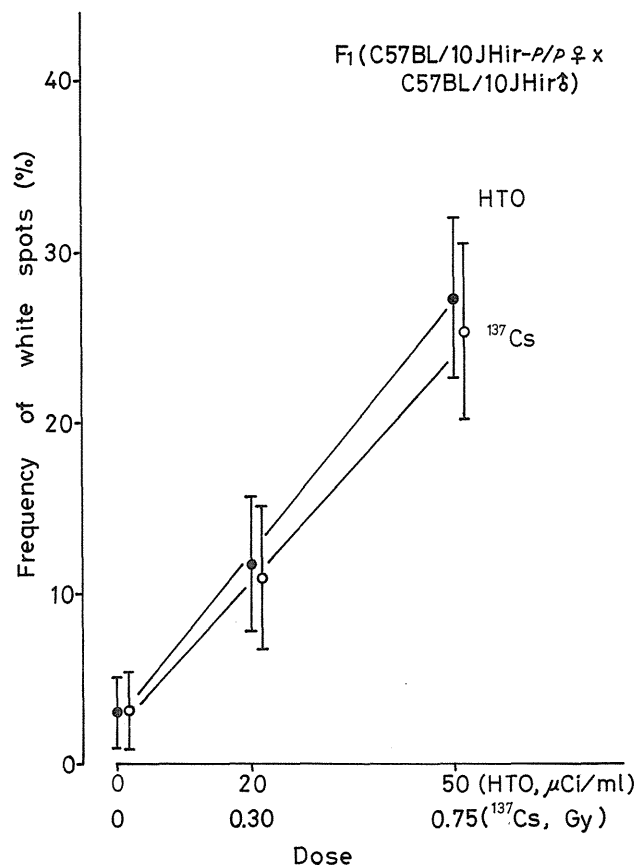


Fig. 2 Frequency of mid-ventral white spots after exposure to ^{137}Cs -gamma rays (○) or tritiated water (HTO, ●) in embryonic mice.

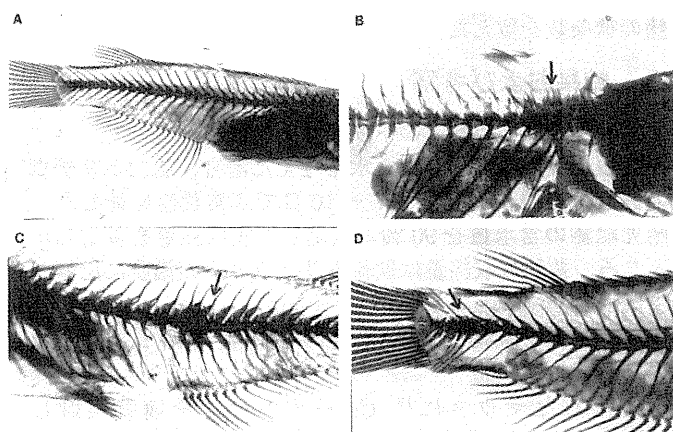


Fig. 3 Typical osteological malformation of vertebrae in medaka after exposure to tritiated water (HTO) during embryogenesis.(A)Normal vertebrae in control fish (H04) at 1 month after hatching. $\times 14$.(B)Fusion of three vertebrae of fish exposed to 37 MBq/ml HTO during embryogenesis. $\times 28$.(C)Incomplete formation of vertebrae of fish exposed to 9.25 MBq/ml HTO during embryogenesis. $\times 28$.(D)Lack of vertebral process of fish exposed to 9.25 MBq/ml HTO during embryogenesis. $\times 28$.

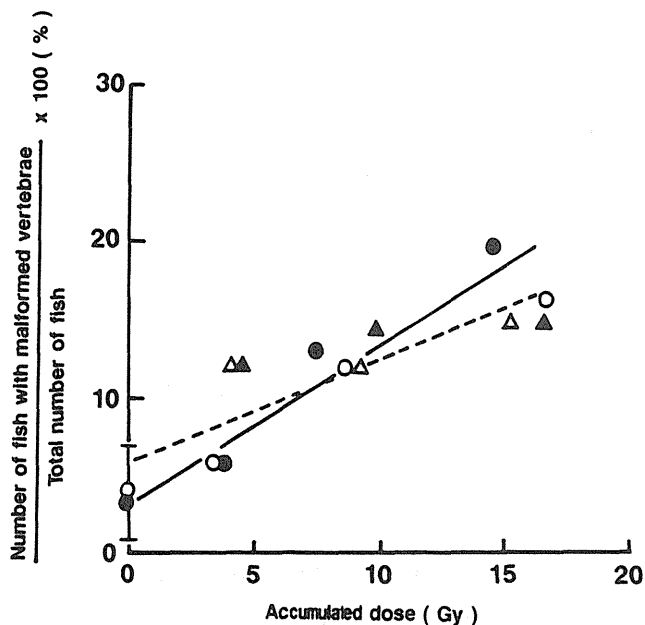


Fig. 4 Relationship between accumulated dose and incidence of vertebral malformation in medaka after exposure to chronic radiation during embryogenesis. The data are plotted as a function of accumulated dose. (○) HO4, β particles; (●) HO5, β particles; (△) HO4, γ rays; (▲) HO5, γ rays.

て異なり、H04Cで 30.42 ± 0.03 、H05で 31.14 ± 0.04 で、両系統でベータ線およびガンマ線の照射群とも減少するが線量に依存しなかった。また、各ひれ軟条数も両系統で減少の傾向がみられたがほとんど有意ではなかった。これらの結果は、メダカ胚の脊椎骨の異常は、放射線の胚発生に対する影響の指標として有用であるが、脊椎骨数やひれの軟条数は放射線影響の指標にはなりえないことを示している。

4. 結 論

ヒトの公衆被曝のリスクの推定の基礎資料としては、環境中に放出されるトリチウムが飲料水として体内に入り、その結果として生じる発生異常を研究することが妥当と考

えられる。本研究ではマウスの胎児の脳の発生、マウスのメラノサイトの皮膚内での分化およびメダカ胚の骨形成などの異常を指標にしてトリチウムベータ線のRBEを求めた。結果は1-2でほぼ近似の値が得られた。これらの結果は種を越えて、動物の発生過程へのトリチウムの効果は比較的穏やかであることを示唆している。このように、トリチウムベータ線のリスク評価にあたっては、脊椎動物組織中放射線感受性の高い胚あるいは胎児への影響をみることが重要である。発生・分化異常を指標にしたトリチウムベータ線のRBEに関するデータは比較的少ないので動物種を越えて生物効果の評価に役立つと思われる。

[研究発表]

- 1) 山田武、太田一正、藤井由布、中田理美、大山ハルミ：日本放射線影響学会第33回大会口頭発表、1990. 10. (仙台).
- 2) 広部知久、周湘★：日本放射線影響学会第34回大会口頭発表、1991. 11 (東京).
- 3) 藤井由布、宮地幸久、栗原靖之、幕田誉、大山ハルミ、山田武：日本放射線影響学会第34回大会口頭発表、1991. 11 (東京).
- 4) 栗原靖之、藤井由布、山田武：日本放射線影響学会第35回大会口頭発表、1992. 10. (大津).
- 5) 広部知久：日本放射線影響学会第35回大会口頭発表、1992. 10. (大津).
- 6) 田口泰子、江藤久美：日本放射線影響学会第32回大会口頭発表、1989. 8. (北九州市).
- 7) 江藤久美、田口泰子：日本放射線影響学会第32回大会口頭発表、1989. 8 (北九州市).
- 8) Hyodo-Taguchi, Y. and Etoh, H. : Int. Symp. on Radiation Protection, 1989, 11 (Beijing).
- 9) 田口泰子、江藤久美：日本放射線影響学会第33回大会口頭発表、1990. 10 (仙台).
- 10) 田口泰子、江藤久美：日本放射線影響学会第34回大会口頭発表、1991. 11. (東京).
- 11) Hyodo-Taguchi, Y. and Etoh, H. : Vertebral malformations in medaka (Teleost fish) after exposure to tritiated water in the embryonic stage, Radiat. Res. , 135, 400-404(1993).

2. 遺伝的影響等に関する研究

②哺乳類生殖細胞における遺伝障害の発現とリスク推定に関する研究

戸張巖夫、松田洋一、宇津木豊子（遺伝研究部）、北爪雅之（動植物管理課）

Studies on Estimation of Radiation-Induced Genetic Damage in Mammalian Germ Cells

Izuo Tobari, Yoichi Matsuda, Toyoko Utsugi-Takeuchi and Masayuki Kitazume
Division of Genetics and Division of Technical Services

Abstract

The analysis of chromosome aberrations in the eggs fertilized with sperm with exposure to X-rays at spermiogenic stage was performed to estimate radiosensitivity of mouse germ cells. The radiosensitivity was markedly higher in the early spermatid stage than the late spermatid-spermatozoa stage. The large amount of DNA lesions induced in spermiogenic cells persisted as reparable damage until sperm maturation and were effectively repaired in the fertilized eggs. The characteristic of X-ray damage induced in the spermiogenic stage and repair mechanism for the damage in the eggs was compared with the results with two chemicals, MMS and MMC.

I マウス精細胞および受精卵における放射線誘発染色体異常とマウス受精卵における染色体修復

緒言

電離放射線の遺伝的影響を研究する場合、生殖細胞に生じた遺伝損傷が、遺伝子突然変異または染色体突然変異として固定される機構を詳細に調べることは、重要なアプローチのひとつである。生殖細胞に放射線や化学物質によってDNA損傷が引き起こされた場合、それらは長期にわたる配偶子形成過程において様々な修復過程や淘汰を経た後、残存した遺伝損傷は受精を介して突然変異として後代に伝えられる。哺乳動物の雄生殖細胞における配偶子形成過程は大きく精原細胞期、精母細胞期、精細胞期の三つのステージに分けることができる。精原細胞に生じた染色体異常は体細胞分裂を経て安定型のものだけが減数分裂期まで残存するのに対し、精母細胞期に生じた放射線損傷は減数分裂中期で染色体異常として固定され、淘汰を受ける。一方、減数分裂後の精細胞に生じた損傷は、受精後の一細胞期胚においてはじめて染色体異常として固定される。この時期に生じた遺伝損傷はほとんど淘汰されることなく、受精を介して後代に伝えられるため、遺伝損傷を定量的に

The radiation-induced chromosome aberrations in the fertilized egg at pronuclear, S and G2 stages were examined to study a relationship between radiosensitivity and repair capacity. The radiosensitivity drastically changed with cell stage, and the change of radiosensitivity was correlated with repair capacity of the egg.

The genetic basis of male sterility in the interspecific hybrids of mice was studied cytogenetically as the model of radiation-induced damage in spermatogenesis, and it was clarified that the X-Y chromosomal pairing in early spermatocytes plays an important role in male fertility.

調べるには非常に好都合な時期である。

マウス生殖細胞に生じた放射線損傷が、受精卵中で様々な修復機構を経て染色体異常として固定される機構を解明する目的で、精細胞の様々な時期に放射線を照射した後、体外受精法を用いて一細胞期胚に生じる染色体異常を調べ、そして、いくつかの修復阻害剤処理によって誘発される染色体異常を調べることによって、誘発された損傷の種類とそれらの損傷に対する受精卵の修復機構を分析した。また化学物質を用いて得られた実験結果と比較し、生殖細胞に誘発される放射線損傷の特徴についても調べた。さらに、一細胞期胚の様々なステージにX線を照射し、生じる染色体異常を調べるとともに、放射線感受性の細胞周期特異性と受精卵の修復能の関係についても分析した。

1) 成熟精子および卵子の放射線感受性と受精卵の修復能

成熟精子および成熟卵子の放射線感受性を調べる目的で、精巢上体尾部より採取された成熟精子と過排卵処理によって輸卵管より集められた卵子にX線を照射し、体外受精法によって得られた一細胞期胚中期に生じる染色体異常を調べ、各々の放射線感受性を比較した。また、精子および卵子に生じたDNA損傷に対する受精卵の修復能の有無を検

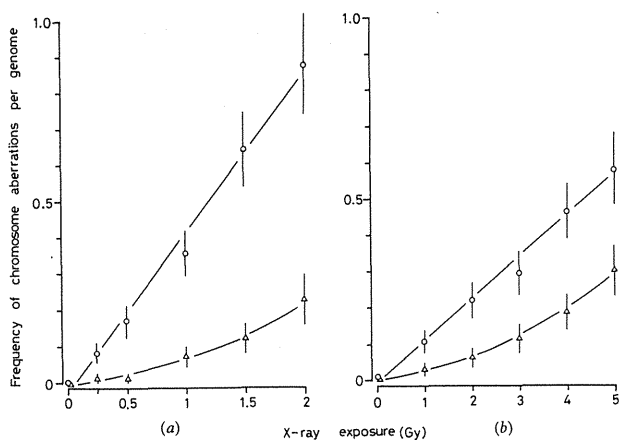


図1 Dose-response relationships of chromosome-type breaks (○) and exchanges (△) induced in oocytes (a) and sperm (b). Dose-response equations are follows;
 breaks: $Y = 0.33 \times 10^{-1} + 4.44 \times 10^{-1} D$ ($P < 0.001$)
 exchanges: $Y = 0.23 \times 10^{-2} + 0.95 \times 10^{-2} D + 5.14 \times 10^{-2} D^2$ ($P < 0.05$) in oocytes,
 breaks: $Y = -0.03 \times 10^{-1} + 1.14 \times 10^{-1} D$ ($P < 0.001$)
 exchanges: $Y = 0.64 \times 10^{-2} + 0.80 \times 10^{-2} D + 1.00 \times 10^{-2} D^2$ ($P < 0.01$) in sperm.
 Y is the yield of aberrations, and D the X-ray dose in Gy. Vertical lines indicate 95 percent confidence limits.

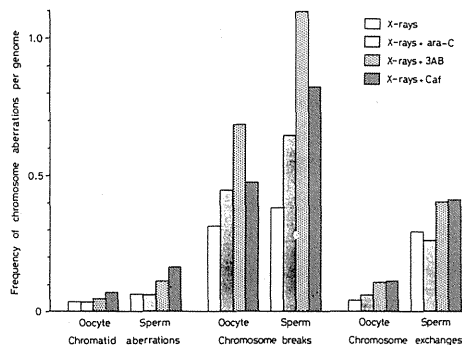


図2 The frequencies of chromosome aberrations induced in 1-cell mouse embryos with X-irradiation at the sperm or oocyte stage (□) and the frequencies induced by X-rays and post-treatments of 1 mM arabinofuranosyl cytosine (■), 20 mM 3-aminobenzamide (★) and 2 mM caffeine (☆). Each frequency per genome is demonstrated by deducting the frequency of spontaneous chromosome aberrations or the frequency of chromosome aberrations induced by the repair inhibitor alone. The chromosome aberrations are divided into 3 categories, chromatid aberrations (chromatid gaps and breaks, minutes and chromatid exchanges), chromosome breaks (chromosome gaps and breaks, chromosome fragments and non-terminal centric chromosomes) and chromosome exchanges (dicentric and ring chromosomes).

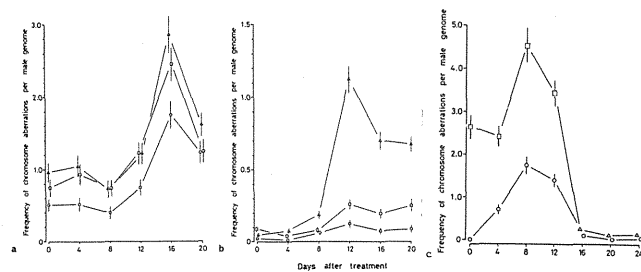


図3 The frequency pattern of chromosome aberrations induced in the first-cleavage metaphase of the eggs fertilized with sperm with X-irradiation of 4 Gy (a), i. p. injection of 5 mg MMC / kg (b) and 50 mg MMS / kg (c) in various spermiogenic stages (○), and enhancement of the frequencies by 2 mM caffeine (△) and 10 mM 3AB treatments (□).

定するため、三種の修復阻害剤、DNA polymerase の阻害剤である arabinofuranosyl cytosine (ara-C), poly (ADP-ribose) polymerase の阻害剤である 3-aminobenzamide (3AB) と複製後修復を阻害すると考えられるカフェインを処理し、生じる染色体異常を無処理群と比較した。その結果、精子、卵子ともにX線によって誘発される染色体異常のほとんどは染色体型であり、切断型異常はlinearな、交換型異常はlinear-quadraticな線量効果関係を示した(図1)。ここで注目すべき点は、精子に対し卵子の放射線感受性がきわめて高いことである。ara-Cを受精時から4時間、3ABとカフェインを全周期連続して処理した結果、両照射群とも全ての修復阻害剤で有為な修復阻害効果がみられ、精子および卵子に生じたX線損傷は様々な修復機構によって受精卵中で修復される可能性が示唆された(図2)。しかし、精子および卵子に生じたX線損傷に対する受精卵の修復効率には大差はみられなかった。照射時の卵子は第二減数分裂中期にあたり、精子DNAはプロタミンに取り巻かれた特殊な精子クロマチン構造をとっていること、また、今回用いた線量では放射線照射による精子の受精率の低下はみられないことから、精子と卵子の放射線感受性の差は、受精卵の修復効率の差ではなく、むしろ照射時のDNAを取り巻く分子構造の差に基づくDNA損傷量の差に由来すると考えられる。

2) 精細胞期における放射線および化学物質に対する感受性の時期特異性

減数分裂後の精細胞期に、異なったタイプの遺伝損傷を引き起こす三種の変異原、X線、マイトマイシンC (MMC) とメチルメタンスルホン酸 (MMS) を処理し、一細胞期胚に生じる染色体異常を調べた。さらに、精細胞期に生じたこれらの遺伝損傷がどの程度受精時まで残存し、受精後受精卵中でどの程度修復され得るかを調べるため、受精直後の一細胞期胚に二種の修復阻害剤、3-aminobenzamide (3AB) とカフェインを連続処理して生じる染色体異常を無処理群の結果と比較した。

減数分裂後の精細胞の放射線感受性は、処理後8日目(後期精細胞)を境にして、中期-前期精細胞(12-20日)では成熟精子期(0-4日)の約3~4倍高くなる(図3)。中期-前期精細胞期ではまだ細胞中に細胞質が残存し、不規則のDNA合成が起こる時期であることから、

この放射線感受性の時期特異性は興味深い。逆に MMS の場合は、前期成熟精子から中期精細胞（4－12 日）にかけて感受性が高く、不定期 DNA 合成がみられる前期精細胞（16－20 日）では染色体異常はほとんど見られず、放射線の結果と著しく対照的である。これらの結果は従来の優性致死突然変異の結果ときわめてよく一致する。一方、MMC では中期－前期精細胞で低頻度の染色体異常が観察されただけであった。

修復阻害効果としては、X 線損傷に対しては 3AB とカフェインで、MMS 損傷に対しては 3AB で、MMC 損傷に対してはカフェインで有意な染色体異常の増加がみられた。とりわけ化学物質 MMS と MMC 損傷に対する 3AB

表 1 Summary of the effects of repair inhibitors at various stages of cell cycle on the yield of chromosome aberrations at the first-cleavage metaphase in the egg fertilized with sperm exposed to 5Gy X-rays.

Treatment in fertilized eggs	Stage	Total aberrations	Chromatid-type		Chromosome-type	
			Break	Exchange	Break	Exchange
5 Gy+10 mM 3AB	G ₁ -M	+++	+	+	+++	-
5 Gy+10 mM 3AB	G ₁	+++	-	-	+++	-
5 Gy+10 mM 3AB	S-M	-	-	-	-	-
5 Gy+2 mM Caf	G ₁ -M	+++	+++	+	+++	-
5 Gy+2 mM Caf	G ₁	-	-	-	-	-
5 Gy+2 mM Caf	S-M	+++	+++	+	+++	-
5 Gy+2 mM Caf	early G ₂ -M	+++	+++	-	+++	-
5 Gy+2 mM Caf	late G ₂ -M	-	+	-	-	-
5 Gy+10 mM HU	G ₁	+++	+	-	+++	-
5 Gy+2 mM HU	early G ₂ -M	++	+++	-	-	-
5 Gy+2 mM HU	late G ₂ -M	-	-	-	-	-
5 Gy+1 mM ara-C	G ₁	+	+	-	+	-
5 Gy+0.2 mM ara-C	early G ₂ -M	-	++	-	-	-
5 Gy+0.2 mM ara-C	late G ₂ -M	-	-	-	-	-

+++ : P<0.001; ++ : 0.001<P<0.01; + : 0.01<P<0.05; - : P>0.1.

表 2 Summary of the effects of the repair inhibitows 3-Aminobenzamide (3AB), baffeine (Caf), arabinofutanosyl cytosine (ara-C) and hydroxyurea (HU) in vatious stages of the cell cycle on the yield of chromosome aberrations at the first-cleavage mataphase of eggs fertilized with mms-treated sperm at a dose of 40mg / kg

Time after injection and treatment	Stage	Chromatid-type		Chromosome-type	
		Break	Exchange	Break	Exchange
MMS 40 mg/kg 3 h +10 mM 3AB	G ₁	-	- ^a	- ^a	-
	S-M	-	+++ ^a	+++ ^a	-
	G ₂ -M	-	- ^a	- ^a	-
MMS 40 mg/kg 6 h +10 mM 3AB	G ₁ -M	-	+++	+++ ^a	-
	G ₁	-	-	- ^a	-
	S-M	+	+++	+++ ^a	-
MMS 40 mg/kg 24 h +2 mM Caf +1 mM ara-C +0.2 mM ara-C +10 mM HU +2 mM HU	G ₁ -M	-	-	-	-
	G ₁	-	-	-	-
	G ₂ -M	-	-	-	-
	G ₁	-	-	-	-
	G ₂ -M	-	-	-	-
+10 mM 3AB	G ₁ -M	+	+++	+++	-
	G ₁	-	-	+	-
	S-M	-	+++	+++	-
	G ₂ -M	-	-	-	-
+10 mM 3AB+2 mM Caf	G ₁	-	-	-	-
	S-M	-	-	-	-
MMS 40 mg/kg 12 days +10 mM 3AB	G ₁ -M	+++	+++	+++	-
	G ₁	++	-	+++	-
	S-M	-	+++	+	-
	G ₂ -M	-	-	-	-

+++ , P < 0.001; ++ , 0.001 < P < 0.01; + , 0.01 < P < 0.05; - , P > 0.05.

^a F value was calculated using the frequency of chromosome aberrations observed in the control group treated with 3AB since very few chromosome aberrations were observed with MMS treatment alone.

表 3 マウス精細胞に生じた X 線および MMS 損傷に対する受精卵の修復能と細胞周期の関係（指標：染色体異常）

変異原	処理時期	修復阻害剤	G ₁ 期		S期		G ₂ 期	
			切断	交換	切断	交換	切断	交換
X線	成熟精子	ara-C	+	-			+	-
		HU	++	-			++	-
		3AB	++	-	-	-	-	-
		Caf	-	-	-	-	++	-
MMS	成熟精子	3AB	-	-	+	+++	-	-
		Caf	-	-	-	-	-	-
	中期精細胞	3AB	++	-	+	+	-	-
		Caf	-	-	-	-	-	-

修復阻害剤処理による染色体異常の頻度増加の程度を－、＋、＋＋、＋＋＋で表す。

Caf：カフェイン

またはカフェインの修復阻害効果は著しく、ステージによっては 10 倍以上の染色体異常頻度が認められた。なかでも、成熟精子期に MMS を処理した場合、染色体異常は全くみられないのに対し、3AB 処理によって著しい染色体異常（2.64／雄ゲノム）の出現がみられた。また、MMS 処理群では、成熟精子－中期精細胞期に、MMC 処理群では中期－前期精細胞期に生じた遺伝損傷に対して顕著な修復阻害効果がみられたのに対し、放射線損傷においては、全てのステージに生じた損傷に対して同程度の修復阻害効果がみられた。

これらの結果は、精細胞に生じたかなりの量の修復可能な X 線、MMS および MMC 損傷が成熟精子まで残存し、受精後受精卵中で効率よく修復されることを示している。また、誘発される損傷に時期特異性が存在し、DNA 損傷に対する精細胞（前期－中期精細胞期）の修復能も損傷の種類によって大きく異なる可能性が示唆された。

3) 精細胞期における染色体異常誘発機構と受精卵の修復能との関係

精細胞期に生じた遺伝損傷が、受精卵において染色体異常として固定される機構と受精卵の修復機構との関連を詳細に調べる目的で、成熟精子に生じた X 線損傷と成熟精子と中期精細胞期に生じた MMS 損傷に対する受精卵の修復能と細胞周期の関係を調べた。

成熟精子に X 線 5 Gy を照射し、得られた受精卵の様々な細胞周期に四種の修復阻害剤、3AB、カフェイン、ヒドロキシウレア（HU）、ara-C を処理して生じる染色体異常を調べ、これらの阻害剤がどの細胞周期で修復を阻害するかを詳細に検討した（表 1、3）。その結果、3AB は G₁期において精子に生じた X 線損傷の修復を有意に阻害し、染色体型切断異常が多発した。一方、カフェイン処理群では G₂期において染色分体および染色体型切断異常を多発させた。また HU では G₁期、G₂期共に有意な修復阻害効果が見られた。ara-C でも顕著ではないが有意な染色体異常の増加がみられた。これらの結果は、精子に誘発される X 線損傷には、明らかに short-lived type と long-lived type の二種類の損傷が存在することを示している。前者は主として DNA 複製前に 3AB または ara-C、HU によって修復が阻害され、染色体型の切断異常の頻度が増加する。一方、交換型染色体異常は有意に増加せず、阻害剤処理によって G₁期に増幅された二重鎖切断の再結

合は、受精卵ではかなり低いことが推定される。一方、HU と ara-C では G₂期処理でも修復阻害効果がみられ染色体異常の増加がみられた。この結果は、精子に生じた一部の X 線損傷は、G₁期において修復されずに DNA 複製期まで持ち込まれ、複製期以降の修復合成によって修復を受けることを示している。また、G₁期以降にカフェインの顕著な効果がみられ、染色体異常の頻度は、無処理群の 1.9 倍であった。S 期と G₂期におけるカフェインの修復阻害効果を詳細に分析したところ、主に G₂期早期にその作用が認められたため、DNA 複製時に生じたギャップの穴埋め (filling-in) 修復の阻害とは考えにくい。また、受精卵の細胞周期の遅延は認められなかったため、カフェインによる G₂期遅延の抑制による修復阻害ではない。精子に生じた X 線損傷に対するカフェインによる修復阻害については何か別の機構を想定する必要があるであろう。

精細胞期での MMS 処理によって一細胞期胚中期に誘発された染色体異常の主なタイプは、染色体断片、二動原体染色体または環状染色体のような染色体型異常であり、この結果は、体細胞における MMS 誘発染色体異常 (ほとんどが染色分体型) と大きく異なる。また、精細胞期中一後期から成熟精子期にかけて MMS 損傷を受けた精子の染色体異常の頻度は、3AB 処理によって数倍に増加し (表 2、3)、成熟精子においては、0.05 / 細胞から 2.64 / 細胞に増加した。この結果は、この時期に生じた修復可能な MMS 損傷は受精時まで残存し、受精後、非常に効率よく修復されることを示している。そして、受精時まで残存する MMS 損傷は大きく二つに分けられる。一つは、受精卵の G₁期で特異的に修復を受ける損傷で、誘発される染色体異常はほとんどが染色体型切断および交換型異常であり、とりわけ染色体型切断の頻度が高く、そして、G₁期での 3AB 処理によって主に染色体型切断が増加する。この種の損傷は主として精細胞中期に誘発されるプロタミンのアルキル化によって二次的に形成された DNA 鎖切断と考えられ、このタイプの損傷は受精前 3 ~ 24 時間前の成熟精子期には誘発されず、この時期には染色体異常も生じない。もう一つの損傷は、受精卵の S 期において 3AB で特異的に修復が阻害されるアルキル化 DNA 損傷と考えられ、S 期の修復阻害によって二重鎖切断に変換され、染色分体型異常が誘発されることが考えられる。そして、染色分体型交換は、ほとんどの場合ヘテロクロマチン領域に特異的に生じる。成熟精子に誘発される MMC 損傷はほとんどがこの型であり、3AB 無処理群では染色体異常がほとんど観察されないことから、この型の損傷に対する受精卵の修復能力は著しく高いことがわかる。またそれ以外にも、前期精細胞が成熟精子に達するまでに十数日を要することから、この時期に受けた初期 DNA 損傷が成熟期間に何らかの修飾を受け、二重鎖切断に変換される可能性も考える必要がある。

4) マウス一細胞期胚の放射線感受性と修復能との関係
哺乳動物初期胚は致死に対して、放射線感受性が高いといわれているが、その感受性は細胞周期によって大きく変動する。我々は、異なる細胞周期の放射線感受性と修復能の関係を調べるため、受精直後の前核形成期 (媒精後 1 ~ 4 時間)、S 期中期 (7.5 時間) と G₂期中期 (12 時間) に X 線を照射した後、3AB とカフェインを処理し、生じる染色体異常を調べた。

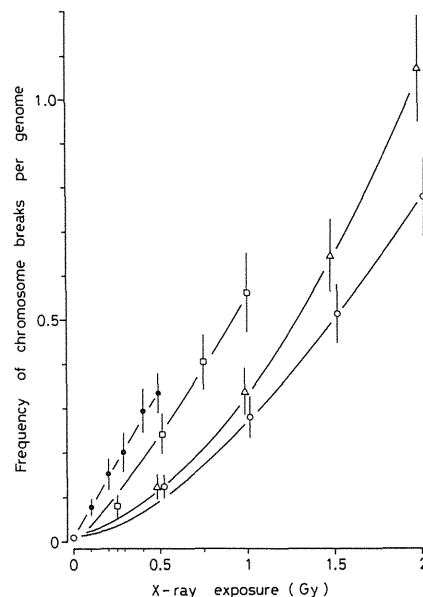


図4 Dose-response relationships of total chromosome breaks induced in the eggs following X-irradiations at 1h (○), 2h (△), 3h (□) and 4h (●) after insemination. Chromosome and chromatid-breaks are counted as one break, and chromosome and chromatid-exchanges were counted as two breaks. Vertical lines indicate 95 per cent confidence limits.

前核形成期受精卵においては、受精後時間の経過とともに放射線感受性は顕著に増大し、また、誘発される染色体異常の型も大きく変動した (図4)。前核形成が進むにつれて交換型異常の出現頻度が減少し、前核完成時 (媒精後 4 時間) では観察される染色体異常のほとんどは染色体型切断であった。この感受性の変化は、受精卵の X 線損傷に対する修復能と大きく関連している (図5)。

媒精後 1 ~ 4 時間にかけて、カフェイン処理群では修復阻害効率の低下はみられないが、3AB 処理群では受精卵の時間の経過とともに顕著な修復効率の低下がみられる (表4)。

この結果は、X 線損傷に対しては、3AB が G₁期に、カフェインが S 期以降に特異的に修復を阻害するこれまでの実験結果を考慮すれば、照射時間が DNA 合成期に近づくにつれて、3AB によって修復が阻害されるタイプの X 線損傷に対する受精卵の修復効率が低下し、高頻度の染色体異常が誘発されるものと考えられる。また、媒精後 4 時間後に X 線照射された受精卵で染色体型交換がほとんど出現しなかった原因としては、この時期が DNA 合成期にはいる直前であるため、二重鎖切断の再結合が充分行われないうちに DNA 合成期に入ったためと考えられる。

一細胞期胚中期では雌雄前核由来の染色体が別々に形成されるため、受精卵中の雄性前核と雌性前核の放射線感受性を比較することが可能である。前核形成期 (媒精後 1 ~ 3 時間) では雌雄前核間に著しい放射線感受性の差が認められた。

媒精後 1 時間の受精卵では、線量の増加とともに雄性前核に生じる染色体異常が占める割合は減少した。この時期はまだ受精直後であるため、この結果は精子および卵子の

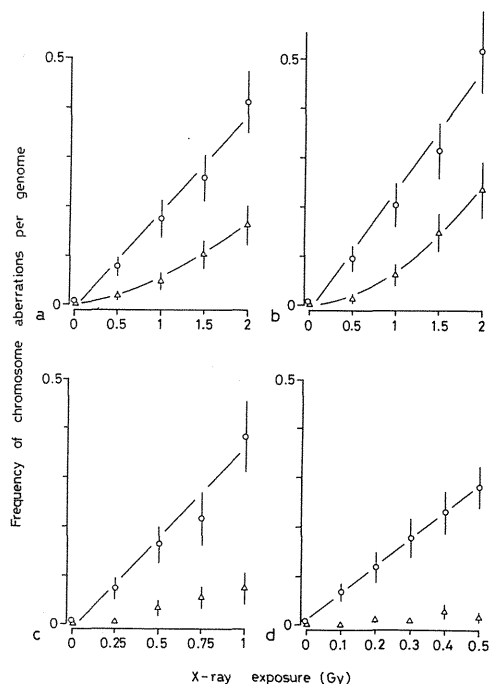


図5 Dose-response relationships of chromosome-type breaks (○) and exchanges (△) induced in the eggs following X-irradiations at 1h (a), 2h (b), 3h (c) and 4h (d) after insemination. Dose-response equations are as follows; breaks: $Y = -0.12 \times 10^{-1} + 1.97 \times 10^{-1} D$ ($P < 0.005$) exchanges: $Y = -0.03 \times 10^{-2} + 2.03 \times 10^{-2} D + 3.06 \times 10^{-2} D^2$ ($P < 0.025$) at 1h, breaks: $Y = -0.21 \times 10^{-1} + 2.48 \times 10^{-1} D$ ($P < 0.005$) exchanges: $Y = -0.28 \times 10^{-2} + 1.15 \times 10^{-2} D + 5.51 \times 10^{-2} D^2$ ($P < 0.05$) at 2h, breaks: $Y = -0.10 \times 10^{-1} + 3.75 \times 10^{-1} D$ ($P < 0.001$) at 3h, breaks: $Y = 0.10 \times 10^{-1} + 5.50 \times 10^{-1} D$ ($P < 0.001$) at 4h. The dose-response relationship of chromosome breaks at 5h, $Y = 0.11 \times 10^{-1} + 5.62 \times 10^{-1} D$ ($P < 0.001$), is not shown. Y is the yield of aberrations, and D the X-ray dose in Gy. Vertical lines indicate 95 per cent confidence limits.

表4 前核形成期に誘発されたX線損傷に対する修復阻害剤の効果

阻 害 剤 処 理	X線誘発染色体異常の増加率			
	受 精 後			
	1 時間	2 時間	3 時間	4 時間
X線+ 2 mM Caf	1.7	1.5	1.9	1.4
X線+ 10 mM 3 AB	1.9	1.7	1.3	1.1

照射線量：媒精後 1,2 時間：1 Gy；3,4 時間：0.5 Gy
Caf：カフェイン

放射線感受性が直接反映されていると考えられる。媒精後 2、3 時間後の前核形成時の受精卵では、雌性ゲノムに誘発される染色体異常の頻度は雄性ゲノムに比べて 2-4 倍高く、雌性ゲノムの放射線感受性が著しく高いことが判明

した。しかし、前核が完成される 4 時間後には両者の感受性差はほとんどなくなった。

一方、雌雄ゲノムに生じた X 線損傷に対する受精卵の修復能を調べたところ、全てのステージにおいて両者の間に修復能の差はほとんどみられなかった。今回用いた修復阻害剤ではとらえることのできない修復機構が関与している可能性もあるが、受精後 2-3 時間は卵子細胞に進入した精子頭部と第二減数分裂を終了した卵核から前核が形成される時期にあたり、この時期の雌雄ゲノムのクロマチン構造の差が放射線感受性の原因の一つと考えられる。

表5 S 期と G₂ 期の一細胞期胚に対する X 線照射によって引き起こされる分裂遅延とそれに対するカフェインの効果

照 射 時 期	照射線量と阻害剤処理	分裂遅延胚の頻度	ゲノムあたりの染色体異常の頻度
S 期 (媒精後 7.5 時間)	0.4 Gy	25.2 %	0.133 ± 0.018
	0.4 Gy + Caf 2 mM	0.8 %	0.423 ± 0.032
	0.6 Gy	48.4 %	0.203 ± 0.028
	0.6 Gy + Caf 2 mM	0.5 %	0.547 ± 0.049
G ₂ 期 (媒精後 12 時間)	2 Gy	17.5 %	0.106 ± 0.019
	2 Gy + Caf 2 mM	0.6 %	0.510 ± 0.041
	8 Gy	27.0 %	0.122 ± 0.025
	8 Gy + Caf 2 mM	0 %	0.767 ± 0.057

Caf：カフェイン

S 期中期 (7.5 時間) と G₂ 期中期 (12 時間) に X 線を照射し、修復阻害剤を処理した場合に誘発される染色体異常の頻度を表 5 に示した。S 期中期は、まだ感受性は高いが、G₂ 期中期は明らかに放射線抵抗性である。この時期に X 線を照射したときに観察される特徴は、著しい分裂遅延が引き起こされることである。S 期と G₂ 期に引き起こされた分裂遅延は、カフェイン処理によって完全に解除される。そして、その結果、著しい染色分体型の染色体異常の増加が観察された。一方、S 期前の前核形成期は放射線感受性が高いにもかかわらず、今回用いた X 線量では分裂遅延はまったく見られなかった。しかし、明らかにカフェインによる修復阻害効果が見られた。

以上の結果から、S 期と G₂ 期に生じた放射線損傷に対するカフェインの効果は、分裂遅延の解除によって染色体異常を誘発すると考えられ、S 期前に生じた放射線損傷に対するカフェインの効果とは異なると考えられる。

II マウス種間雑種にみられる雄性不妊現象の遺伝的解析 緒 言

実験用マウスの生殖細胞に放射線を照射すると、次世代の子孫に繁殖障害をもつ個体が出現する。その主たる原因は、相互転座や欠失などの染色体の構造異常によるものである。そして、それらの染色体異常をヘテロ接合体にもつ場合、配偶子形成の阻害は主として雄生殖細胞にみられ、雄が不妊であっても雌は妊性を有する場合が多くみられ、その原因はいまだに不明のままである。これと同様の現象が数多くのマウス種間雑種においてもみられる。我々は、実験用近交系マウスとヨーロッパ産野生マウス *Mus spretus* を用いて、マウス種間雑種にみられる雄性不妊現象の遺伝的支配機構の解析を試みた。その結果、精母細胞

の減数分裂過程における性染色体の対合異常がその主たる原因であることを見出し、その遺伝的要因が性染色体の偽常染色体部位に存在することが判明した。また、この種間雑種雌は妊性をもつにもかかわらず、やはり減数分裂過程は不安定であり、性染色体不分離が多発することを見出した。

1) マウス種間雑種雄の精母細胞における染色体対合の解析

実験用近交系マウス (*Mus musculus domesticus*) とヨーロッパ産野生マウス *Mus spretus* の F₁ 雑種雌は妊性を有するにもかかわらず、雄は不妊となることが知られている。この現象の遺伝的要因を調べる目的で、不妊雄の精巣を用いて生殖細胞の第一減数分裂中期 (MI 期) における染色体対合像を観察した結果、高頻度の X 染色体と Y 染色体の対合異常がみられ、精子形成は MI 期で停止していることが判明した (表 6)。妊性を有する F₁ 雑種雌を用いて戻し交雑を行った結果、戻し交雑第一世代で妊性を有する雄個体と不妊の雄個体が分離し、それらの染色体対合像を調べた結果、XY 染色体の対合異常と精子形成異常は高い相関関係を示した (図 6)。

そこで、性染色体対合と妊性を支配する遺伝的要因をマッピングする目的で、X 染色体上の DNA マーカーを用いて戻し交雑第一世代 123 個体についてサザン分析を行い、その結果を細胞学的分析の結果と比較した。その結果、偽常染色体の近傍に存在する *Amg* (アメロゲニン) 遺伝子の遺伝子型と Y 染色体のタイプがヘテロ接合型の個体では、MI 期で性染色体は高頻度に分離し、精子形成が阻害されるのに対し、ホモ接合型の場合は性染色体の分離はほとんどみられなかった。そして、5 個体の組換え型が出現したことから、この種間雑種にみられる高頻度の性染色体分離を伴う精子形成異常を支配する遺伝的要因は、*Amg* 遺伝子のさらに 4.1cM 遠部位に存在することが判明した。

次に、精母細胞の MI 期にみられる性染色体の分離が、パキテン期における不対合に基づくものか、あるいは対合後の早期分離に起因するものかを確認するために、パキテン期における染色体対合像を、シネプトネマ構造の抗体を用いた免疫細胞学的方法および透過型電子顕微鏡を用いて詳しく調べた。その結果、F₁ 雑種にみられる雄性不妊の原因は性染色体および常染色体の対合異常に基づくことが判明した (表 7、8)。常染色体の対合異常を有する細胞はパキテン後期からディプロテン期に退化するのに対し、性染色体の対合異常のみを有する個体は MI 期まで生存する。さらに、対合異常をもつ、または一価染色体となった常染色体のほとんどは X または Y 染色体と対合し、sex vesicle の形成を阻害することが判明した (表 9)。さらに、この sex vesicle の形成阻害によって精子形成に必須とされる X 染色体の不活性化が阻害される可能性を示す細胞学的証拠が得られた。

2) マウス種間雑種雌の減数分裂過程にみられる性染色体不分離現象

妊性を有する C57BL / 6 と *Mus spretus* の F₁ 雑種雌を用いて、C57BL / 6 および *Mus spretus* と戻し交雑を行い、得られた戻し交雑個体の染色体分析を行うことによって F₁ 雑種雌の減数分裂過程に生じる染色体の不分離の有無を検討した。200 個体について核型分析を行った結果、

4 個体の性染色体数異常 (XO 2 個体、XXX 1 個体、XX / XXX 1 個体) の個体が検出された。X 染色体上の遺伝子マーカーを用いて、これらの性染色体不分離の起源を調べた結果、これらの数的異常個体は、F₁ 雌の減数分裂過程に生じた性染色体の不分離に起因する可能性が強く示唆された。

表 6 Mean testis weights in groups of male mice 75-80 days of age (n = 10) and frequency of X-Y and frequency of X-Y and autosomal dissociation (n = 6) in BL / 6. *M. spretus*, and their F₁ hybrids

Mice	Body weight, g	Testis weight, mg	Relative testis weight*	Frequency of dissociation†	
				X-Y	Autosomes
BL/6	26.3 ± 2.3	203.0 ± 14.7	7.7 ± 0.6	3.0 ± 1.3	1.8 ± 0.9
<i>M. spretus</i>	14.9 ± 0.5	192.2 ± 33.2	12.9 ± 2.0	4.3 ± 1.6	1.7 ± 0.9
(BL/6 × <i>M. spretus</i>)F ₁	19.0 ± 1.6	92.0 ± 11.7	4.8 ± 0.5	95.0 ± 2.7	23.0 ± 7.1

*Values are given as mean ± SD.
†(Testis weight/body weight) × 10⁻³.
†Six hundred cells observed per male.

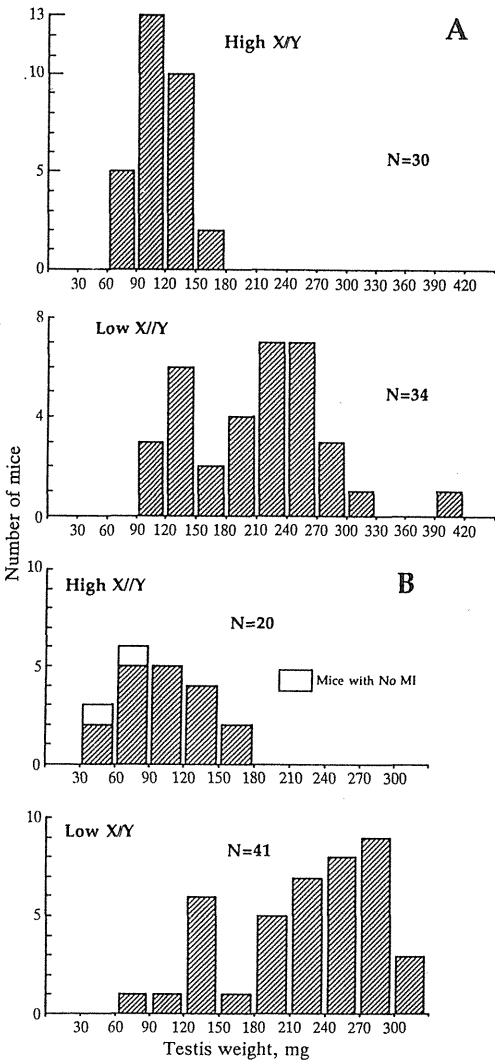


図 6 Distribution pattern of testis weight in backcross mice with high and low frequency of X-Y dissociation (High X // Y and Low X // Y, respectively). Vertical lines show number of mice, and horizontal lines show testis weight. (a) (BL / 6 × *M. spretus*) F₁ × BL / 6. (b) (BL / 6 × *M. spretus*) F₁ × *M. spretus*. High X // Y and Low X // Y show 80-100% and 0-29% X-Y dissociation, respectively.

表7 Immunological observation of X-Y chromosomal configuration at pachy-tene stage in spermatocytes of C57BL / 6 (B6) Mus spretus and their F₁ hybrids

Mice	No. of mice analyzed	No. of cells observed	X-Y		
			SC formation	Terminal association	X-Y dissociation
C57BL/6	1	100	80	20	0
<i>M. spretus</i>	1	100	97	2	1
(B6 × <i>spretus</i>) F ₁	2	200	24	17	159 ^a

^a In 143 out of 159 cells, dissociated X and Y chromosomes were located close to each other

表8 Electron microscopic observation of X-Y chromosomal configuration at pachytene stage in spermatocytes of C75BL / 6 (B6), Mus spretus and their F₁ hybrids

Mice	No. of mice	No. of cells observed	X-Y Association			No. of cells with abnormal X-Y configuration
			Association	Dissociation	Pseudo-association	
C57BL/6	2	77	77	0	0	2 ^a
<i>M. spretus</i>	2	78	78	0	0	0
(B6 × <i>spretus</i>) F ₁	3	100	17	81	2	55 ^b

^a One association at the proximal ends of X and Y chromosomes and one self-folding of Y chromosome

^b Frequency of cells with fold-back association within a sex chromosome or X-Y autosome association

表9 Frequency of abnormal X-Y chromosomal configuration at pachytene observed in 100 spermatocytes of F₁ hybrids between C57BL / 6 and Mus spretus

Type of abnormality	Number of the configuration	
1. Self folding		
Interstitial SC formation	X	9
	Y	0
Ring- or balloon-shape	X	12
	Y	10
2. Sex chromosome-autosome association		
Univalent autosomes near sex chromosome		21
Terminal association with univalent autosome		4
Terminal association with paired autosome		10
Terminal association with incompletely paired autosome		3
Pairing with incompletely paired autosome		2
Pairing with univalent autosome		3
3. Abnormal side-by-side association		1

研究発表

[総説]

- ・松田洋一，戸張巖夫，武内豊子，前盛まみ子，関直彦：マウス受精卵における染色体修復，放射線科学，31，363-370，1988.
- ・戸張巖夫：放射線による遺伝的影響のリスク，ESI-News，7(5)，1-171，1989.
- ・高橋永一，松田洋一，堀雅明：核型の同定（染色体標本の作製技術）「新生化学実験講座」第18巻「生化学領域における細胞培養技術」，57-67，東京化学同人，1990.
- ・松田洋一，武内豊子，前盛まみ子，関直彦，戸張巖夫：マウス生殖細胞の放射線感受性，（生島編）「放射線を利用した生命現象解明への展望－脳障害と遺伝性障害」，

京都大学原子炉研究所 Technical Report [KURRI-TR] 43-56，1991.

- ・松田洋一，武内豊子，前盛まみ子，関直彦，戸張巖夫：マウス精細胞および受精卵の放射線感受性と受精卵の修復能，放射線生物研究，26，53-67，1991.

[原著]

- ・Tobari, I., Matsuda, Y., Xiaohung, G., Yamagiwa, J., Utsugi, T., Kitazume, M. and Okamoto, M.: Dose-response relationship for translocation induction in spermatogonia of the crab-eating monkey (*Macaca fascicularis*) by chronic X-ray-irradiation, Mutation Res., 201, 81-87, 1988.
- ・Matsuda, Y. and Tobari, I.: Chromosomal analysis in mouse eggs fertilized in vitro with sperm exposed to ultraviolet light (UV) and methyl and ethyl methanesulfonate (MMS and EMS), Mutation Res., 198, 131-144, 1988.
- ・Matsuda, Y. and Tobari, I.: Repair capacity of fertilized mouse eggs for X-ray damage induced in sperm mature oocytes, Mutation Res., 210, 35-47, 1989.
- ・Matsuda Y., Seki, N., Utsugi-Takeuchi, T. and Tobari, I.: Changes in X-ray sensitivity of mouse eggs from fertilization to the early pronuclear stage, and their repair capacity, Int. J. Radiat. Biol., 55, 233-256, 1989.
- ・Matsuda, Y., Seki, N., Utsugi-Takeuchi, T. and Tobari, I.: X-ray- and mitomycin C (MMC)-induced chromosome aberrations in spermiogenic germ cells and the repair capacity of mouse eggs for the X-ray and MMC damage, Mutation Res., 211, 65-75, 1989.
- ・Matsuda, Y., Tobari, I., Maemori, M. and Seki, N.: Mechanism of chromosome aberration induction in the mouse egg fertilized with sperm recovered from postmeiotic germ cells treated with methyl methanesulfonate, Mutation Res., 214, 165-180, 1989.
- ・Matsuda, Y., Maemori, M. and Tobari, I.: Relationship between cell cycle in the fertilized egg of mice and repair capacity for X-ray-induced damage in sperm, Int. J. Radiat. Biol., 56, 301-314, 1989.
- ・Matsuda, Y. and Chapman, V. M.: In situ analysis of centromeric satellite DNA segregating in *Mus* species crosses, Mammalian Genome, 1, 71-77, 1991.
- ・Matsuda, Y., Hirobe, T. and Chapman, V. M.: Genetic basis of X-Y chromosome dissociation and male sterility in interspecific hybrids, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 4850-4854, 1991.
- ・Ratty, A. K., Matsuda, Y., Elliott, R. W., Chapman, V. M. and Gross, K. W.: Genetic mapping of two DNA markers, D16Ros1 and D16Ros2, flanking the mutation site in the *chakragati* mouse, a transgenic insertional mutant, Mammalian Genome, 3, 5-10, 1992.
- ・Matsuda, Y., and Chapman, V. M.: Analysis of

sex-chromosome aneuploidy in interspecific backcross progeny between the laboratory mouse strain C57BL/6 and *Mus spretus*, Cytogenet. Cell Genet., 60, 74-78, 1992.

・ Matsuda Y. Moens, P. B. and Chapman, V. M. : Deficiency of X and Y chromosomal pairing at meiotic prophase in spermatocytes of sterile interspecific hybrids between laboratory mice (*Mus domesticus*) and *Mus spretus*, Chromosoma, 101, 483-492, 1992.

・ Brannan C. I., Gilbert, D. J., Ceci, J. D., Matsuda, Y., Chapman V. M., Mercer, J. A., Eisen, H., Johnston, L. A., Copeland, N. G. and Jenkins, N. A. : An interspecific linkage map of mouse chromosome 15 positioned with respect to the centromere, Genomics, 13, 1075-1081, 1992.

・ Nonaka, M., Matsuda, Y., Shiroishi, T., Moriwaki, K., Nonaka, M. and Natsuume-Sekai, S. : Molecular cloning of mouse β_2 -glycoprotein I and mapping of the gene to chromosome 11, Genomics, 13, 1082-1087, 1992.

・ Justice, M. J., Gilbert, D. J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Buchberg, A. M., Ceci, J. D., Matsuda, Y., Chapman, V. M., Patriotis, C., Makris, A., Tsichlis, P. N., Jenkins, N. A. and Copeland, N. G. : A molecular genetic linkage map of mouse chromosome 18 reveals extensive linkage conservation with human chromosome 5 and 18, Genomics, 13, 1281-1288, 1992.

・ Miyazaki, T., Matsuda, Y., Toyonaga, T., Miyazaki, J., Yazaki, Y. and Yamamura, K. : Prevention of autoimmune insulinitis in nonobese diabetic mice by expression of major histocompatibility complex class I L^d molecules, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 9519-9523, 1992.

・ Matsuda, Y., Harada, Y. -N., Natsuume-Sakai, S., Lee, K., Shiomi, T. and Chapman, V. M. : Location of the mouse complement factor H gene (*cfh*) by FISH analysis and replication R-banding, Cytogenet. Cell Genet., 61, 282-285, 1992.

[口頭]

国内

・ 松田洋一, 戸張巖夫, 武内豊子, 前盛まみ子, 関直彦
* : マウス精細胞に生じたメチルメタンスルホン酸損傷に対する受精卵の修復機構, 第31回日本放射線影響学会, 1988. 10. (広島) (*千葉大・医).

・ 松田洋一, 戸張巖夫, 武内豊子, 前盛まみ子 : マウス精子に誘発されたメチルメタンスルホン酸およびX線損傷に対する受精卵の修復機構の解析, 第60回日本遺伝学会, 1988. 10. (京都).

・ 戸張巖夫 : カニクイザル生殖細胞での遺伝的障害, 日本環境変異学会主催公開シンポジウム「環境変異原による遺伝的障害を考えるーショウジョウバエからヒトまで」東大医科研, 1989, 5. (東京).

・ 戸張巖夫 : 国連科学委員会 (1988年) 報告についてー放射線による遺伝的影響のリスク, 日本保健物理学会勉強会, 1989. 8. (熊取).

・ 戸張巖夫, 高橋永一, 武内豊子 : γ 線長期全身照射によるカニクイザル末梢リンパ球における染色体異常, 日本放射線影響学会第32回大会, 1989. 8. (北九州市).

・ 松田洋一 : マウス生殖細胞の放射線感受性, 京都大学原子炉研究所研究集会「放射線のリスク評価に関する最近の話題」, 1992. 2. (大阪).

・ 松田洋一 : 精細胞の放射線感受性と受精卵の修復能, 第24回琵琶湖シンポジウム, 1991. 8. (近江八幡).

・ 松田洋一 : 雑種はなぜ不妊になるかーマウスを例としてー, 第4回ジェネセルワークショップ, 1991. 8. (志摩)

・ 松田洋一 : Moens, P. B., Chapman, V. M. : マウス種間雑種不妊雄の精母細胞における性染色体対合異常について, 第63回日本遺伝学会, 1991. 10. (福岡).

・ 松田洋一 : Moens, P. B., Chapman, V. M. : マウス種間雑種にみられる不妊現象の遺伝的支配機構の研究 I. 第39回日本実験動物学会, 1992. 5. (東京).

・ 松田洋一 : マウスにみられる種間雑種雄性不妊現象についてー性染色体対合を中心としてー, 第7回モロシヌス研究会, 1992. 6. (高崎).

・ 松田洋一 : FISH法を用いたマウス染色体マッピング技術の開発, ヒトゲノムワークショップ「日本におけるヒトゲノム研究ー新たな発展に向けてー」, 1992. 7. (東京).

・ 松田洋一 : 蛍光 in situ hybridization (FISH) 法を用いたマウス染色体マッピング技術の開発, 第64回日本遺伝学会, 1992. 10. (仙台).

国外

・ Matsuda, Y., Chapman, V. M. : Genetic basis of X-Y dissociation and male sterility in interspecific hybrids, 10th Annual Great Lakes Mammalian Development Meeting, 1990. 4. (Tront, Canada).

・ Matsuda, Y., Keitz, B. T., Miller, D. R., Chapman, V. M. : Genetical characterization of X-Y chromosome dissociation in primary spermatocytes of F1 hybrids between laboratory mice and *Mus spretus*. Joint Meeting of Genetics Society of America and Genetics Society of Canada, 1990. 7. (San Francisco, USA).

・ Matsuda, Y., Chapman, V. M. : Centromere mapping by in situ hybridization with mouse satellite DNA clone. 4th International Workshop on Mouse Genome Mapping, 1990. 11. (Anapolis, USA).

・ Lee, K. -H., Matsuda, Y. and Chapman, V. M. : Simultaneous visualization of nonisotopic in situ hybridization on thymidine-synchronized and banded chromosomes from various mouse cells. 4th International Workshop on Mouse Genome Mapping, 1990. 11. (Anapolis, USA).

2. 遺伝的影響等に関する研究

③低線量率照射による体細胞突然変異に関する研究

古野育子、村磯知採（生物研究部）、松平寛通（所長）

Mutation Induction by Low Dose Rate Gamma Rays and Tritiated Water in Near-Diploid Mouse Cells

Ikuko Furuno-Fukushi, Chidori Muraiso and Hiromichi Matsudaira*

Division of Biology, * Director-General

Induction of mutation to 6-thioguanine resistance was studied in cultured near-diploid mouse cells (m5S) in plateau and log phase after exposure to γ rays at dose rates of 30 Gy/h, 180 mGy/h or 13 mGy/h. In plateau-phase culture, lowering the dose rate from 30 Gy/h to 13 mGy/h resulted in an increase in cell survival and a marked decrease in mutation frequency. On the other hand, in the log-phase culture, the magnitude of the dose-rate effects was not as marked as in the plateau-phase culture, particularly within a dose range below 5 Gy. These results, together with those indicating the inverse dose-rate effects in growing mouse leukemia cells demonstrate the significant influence of cell growth that takes place during protracted irradiation, particularly for the induction of mutation.

1. 結 言

本研究はトリチウムなどの低線量率放射線による生物学的影響を培養細胞の体細胞突然変異を指標として調べることで、公衆被曝のリスク評価に対する基礎的知見を提供することを目的として行われた。

特別研究「核融合炉開発に伴うトリチウムの生物学的影響に関する調査研究」において、増殖中のマウス白血病培養細胞（L5178Y）を用いてトリチウムの影響を調べた結果、トリチウム水の RBE 値は 1.5～3 で、有機形トリチウムであるトリチウム標識アミノ酸はトリチウム濃度当りではトリチウム水より非常に大きくなるが、吸収線量当りで比べれば差がないことが明らかになった。またトリチウム標識チミジンは他の化合物よりも強い生物効果があり、トリチウム β 線以外の効果による可能性も残された¹⁻³⁾。以上の実験は 100～400 mGy/h の線量率での結果であり、さらに低い線量率で長期間照射の効果を検討するために、はじめに L5178Y 細胞を増殖期に保存しながら 6 mGy/h の線量率で γ 線を照射し、致死と突然変異を測定した。その結果、6 mGy/h 照射により生じる 6-チオグアニ

Effect of tritiated water (HTO) was also studied in m5S cells in plateau phase culture and compared to those following γ rays. Cell survival after exposure to HTO or γ rays at 6 mGy/h decreased linearly with increasing total dose up to 3 Gy, and RBE value of 2.0 was obtained for HTO β particles. Mutation frequency after exposure to HTO at the dose rates of 6 mGy/h and 150 mGy/h increased linearly with total dose. No significant differences were found in the slope between 6 mGy/h and 150 mGy/h exposure. Significant increase in mutation frequency was not observed after 6 mGy/h of γ rays, but the frequency after 13 mGy/h increased linearly with total dose. HTO was found to be more mutagenic than γ rays and dose rate effect was not marked in mutation induction.

ン（6TG）耐性突然変異頻度は総線量で比較すると急照射より低いが 200 mGy/h での照射より高くなり線量率の効果の逆転が見られた⁴⁾。同様のことがチャイニーズハムスター V79 の細胞でも報告されている⁵⁾。さらに、L5178Y から分離された放射線感受性株 LX830 についての実験では線量率による突然変異頻度の差がみられなかった⁶⁾。増殖中の細胞で X 線や γ 線による突然変異の誘発に、線量率効果が見られない例も報告されている⁷⁻⁹⁾。

一般に放射線の線量率が低下すると、致死や突然変異などの生物効果が減弱するが、これは障害が修復されるためと考えられている。しかし上に述べたように、必ずしも線量率の低下が生物効果の減弱を引き起こす場合ばかりでなく、また遺伝子座やそれらがホモ接合体かヘテロ接合体かによっても違ってくるとの報告もある¹⁰⁾。また低線量率の実験では照射時間が長くなるので、その間細胞を維持するために、細胞の希釈や植え継ぎが必要になり細胞増殖の影響を考慮しなければならない。

今回は L5178Y 細胞に見られた線量率効果の逆転が、照射中の細胞増殖と関連しているかどうかを検討するために、正常細胞としてマウス胎児皮膚由来の近二倍体細胞 m5S

を用い、細胞増殖がみられない定常状態の条件を調整し、前回と同様の線量率領域における線量効果関係を得て、さらにトリチウム水の RBE 値を求めた。

2. 実験

a. 培養細胞：マウス胎児皮膚由来の近二倍体 m5S 細胞（佐々木正夫博士より供与）¹¹⁾を用いた。細胞は同一の凍結保存サンプルから実験毎に解凍して 10 % 牛胎児血清（56 °C、30 分間非働化）を含む α MEM 培地、5 % CO₂-95 % 空気下で、37 °C で培養した。対数増殖期の細胞の倍加時間は約 15 時間であった。

b. γ 線照射：急照射（30Gy/h）は⁶⁰Co 照射装置を用い、プラスチックフラスコで培養した細胞を室温で照射した。低線量率照射（180mGy/h、13mGy/h、6 mGy/h）は¹³⁷Cs 線源を用いた低線量率細胞照射装置を用い 37 °C で照射した。線量測定は円筒形イオンチェンバーにより行った。

c. トリチウム水（HTO）処理：フード内で HTO を含む培地に交換してフラスコを密栓し、37 °C でインキュベートした。一定時間後直ちに HTO を含まない培地と交換して 4 回培地で洗った後、細胞をトリプシンでフラスコ壁からはがし、遠心して細胞を集めた。以上の操作はトリチウム専用のフードとクリーンベンチ内でおこなった。新しい培地に浮遊させ細胞数を算定し、生残率と突然変異頻度の測定に用いた。

d. HTO β 線の線量計算：細胞内外の水成分中に HTO は均一に分布しているとして、一定時間毎に培地の放射能を液体シンチレーションカウンターにより測定し、その値から β 線の線量を計算した。HTO 処理開始時と終了時とでは培地のトリチウム濃度に有意な差がなかったため、平均値をもちいた。計算は次式によった。線量率（Gy/h）= 培地の放射能（Bq/g） $\times 3.24 \times 10^{-9} \times 0.8$

0.8 は細胞内含水量、 3.24×10^{-9} は係数で下記の通りである。

$$3.24 \times 10^{-9} = 5.7 \times 10^{-3} \text{ (MeV/decay)} \times 1.6 \times 10^{-13} \text{ (J/MeV)} \times 3600 \times 10^3 \text{ (g/kg)}$$

e. 定常期の細胞： 2×10^6 の細胞を 18 個のフラスコ（25 cm³）にまき、壁面一杯に増えたところで、5 mM Hepes を含む培地に交換（一回目）して密栓し、培地交換の 48 時間後に照射を開始した。ここで 2 個のフラスコは自然突然変異頻度の測定に使用した。残りのフラスコは照射群と対照群に二分して上述の線量率で γ 線または HTO 処理をおこなった。96 時間以上の照射の場合（13mGy/h と 6 mGy/h）は一週間に二回、培地交換（トリチウム水の場合はトリチウム水を含む培地）を行い細胞を定常期に保持した。一定時間後に照射群と対照群、各々 2 個以上のフラスコを取り出して生残率と突然変異頻度の測定を行った。

f. 増殖期の細胞：細胞濃度を $2 \sim 10 \times 10^4$ /cm² の増殖状態に保ち γ 線または HTO を処理した。13mGy/h と 6 mGy/h の長期照射の場合は 4 個の 225 cm² フラスコを用い照射群と対照群に二分し、両群平行して培養を続けた。一週間に二回トリプシン処理により細胞を分散、希釈した。希釈時に細胞の一部を取り、生残率と突然変異の測定のためのサンプルとした。

g. 生残率と突然変異頻度：それぞれの線量率で一定時間 γ 線照射または HTO 処理後トリプシンにより細胞を分散し、直後に細胞の一部について生残率を測定した。100 mm 径のディッシュを使用し、14 日間培養後、固定染色してコロニーを数えた。残りの細胞は 10 日間の発現期間を対数増殖期に維持した後、5 μ g/ml の 6 TG を含む培地で培養し（細胞濃度は 100 mm 径ディッシュ当たり 1×10^5 細胞）6 TG 耐性細胞のコロニーを数えた。突然変異頻度は正常培地で得られたコロニー形成率で補正した。誘発突然変異頻度は得られた突然変異頻度から対照群の突然変異頻度を差し引いて表した。ただし、6 mGy/h の結果は例外とした（結果の項を参照）。

h. 標識率：定常期の細胞中に DNA 合成期にある細胞が含まれる割合を調べるため、³H-チミジンによる標識率をオートラジオグラフィーによって測定した。細胞を 25 cm³ のフラスコにまいてから時間を追ってフラスコを取り出し、フラスコ当たり 918kBq の ³H-チミジンを加え 37 °C、20 分間標識したのち放射能を含む培地を除いた。細胞を集めて、スライドガラス上に固定し、常法によりオートラジオグラフィーを行った。サンプル当たり 2000 個以上の細胞について検鏡し、5 個以上の銀粒子がのっている細胞核を標識細胞として数え標識率を算定した。

3. 結果

a. 定常期の細胞：図 1 は細胞をまいてから時間を追って細胞の標識率を調べた結果を示す。5 日後には、標識率は低下して DNA 合成期の細胞は数パーセント以下になったが、一回目の培地交換の一日後に再び標識率は上昇した。その後も培地交換毎に一時的な上昇が観察されたが、上昇の程度は小さく、7 日目のピークと比べると細胞核あたりの銀粒子数も 20 個以下で少なかった。9 日目から定常期の細胞として実験に使用し、長期照射は最長で 4 週間以内とした。4 週間以上の培養はトリプシンによる分散が困難になり実験には適さなかった。コロニー形成率および細胞数は 4 週間の培養で有意な変動は見られなかった。

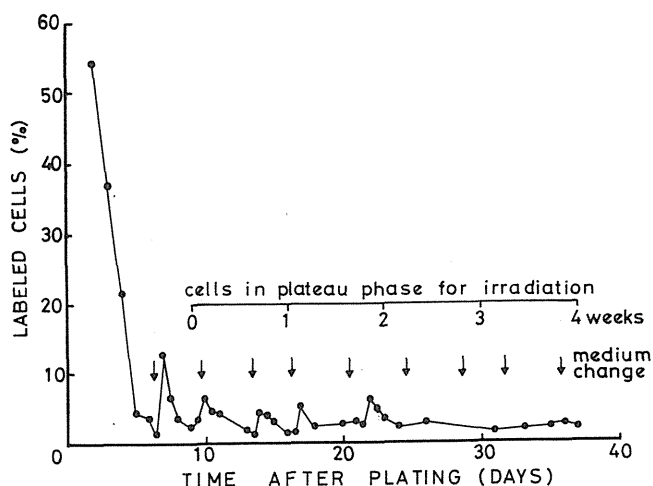


Fig. 1, Changes in the percentages of labeled cells as a function of time in days after plating near-diploid mouse m5S cells. Vertical arrows indicate the time of medium changes.

b. 定常期及び増殖期の生残率：図2は30Gy/h、180mGy/h、13mGy/hの線量率で γ 線を照射したときの総線量に対する生残率を示す。定常期（図2A）の細胞では、線量率が低くなると生残率は明らかに高くなった。また、13mGy/hの低い線量率でも2.2Gyで致死効果がみられた。増殖期（図2B）の細胞では、30Gy/hの急照射による線量効果は肩のない直線となり、180mGy/hの照射による生残率は急照射によるものより高くなった。しかし13mGy/hでは、1Gyから約80%の低下がみられ、総線量9Gyまでこの値は変わらなかった。以上の結果は $S = \exp - (\alpha D + \beta D^2)$ または $S = \exp - (\alpha D)$ の式に当てはめ最小二乗法により求めた値を表1にまとめている。

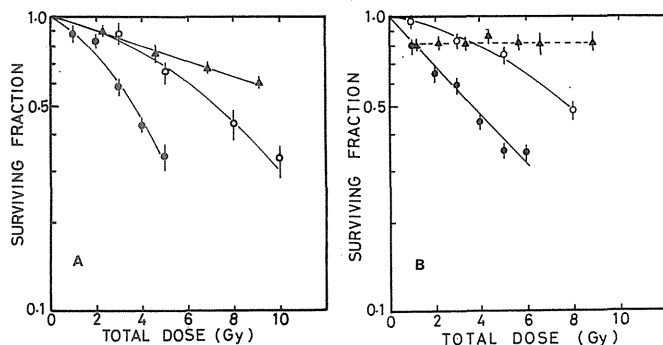


Fig. 2, Changes in the surviving fraction of plateau (panel A) and log (panel B) phase m5S cells as a function of total dose of γ rays administered at dose rates of 30 Gy/h (●), 180 mGy/h (○) and 13 mGy/h (▲). Vertical bars refer to SEM of at least four (A) and three (B) separate experiments.

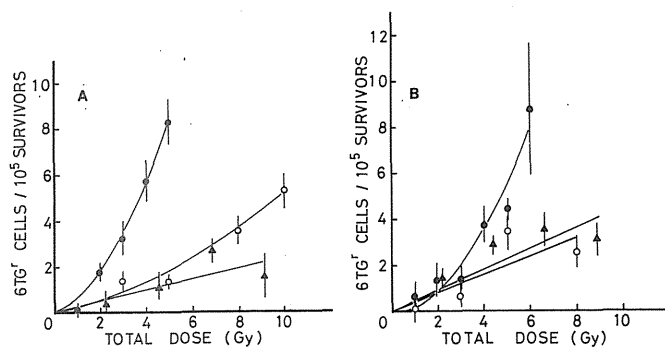


Fig. 3, Changes in the induced mutation frequency of plateau (panel A) and log (panel B) phase m5S cells as a function of total dose of γ rays administered at dose rates of 30 Gy/h (●), 180 mGy/h (○) and 13 mGy/h (▲). Vertical bars refer to SEM of at least four (A) and three (B) separate experiments

c. 定常期および増殖期の突然変異：図3は各線量率で γ 線を照射したときの総線量に対する誘発突然変異頻度を示す。定常期細胞（図3A）では、突然変異細胞は急照射により線量に対し直線二次的に増加した。

線量率が下がると突然変異細胞は明らかに減少した。しかし、180mGy/hと13mGy/hとのあいだに有意な差は認められなかった。9Gy付近では180mGy/hのほう

が有意に高かった。増殖期（図3B）の細胞では、いずれの結果にもばらつきが大きく、各線量率による違いが明らかにならなかった。このばらつきはトリプシン処理や培地交換、さらに照射中の細胞集団の細胞周期などによるものと考えられる。急照射は直線二次式、 $E = \alpha D + \beta D^2$ に、低線量率では一次式、 $E = \alpha D$ に当てはめた値を表1に示す。180mGy/h、13mGy/hともに線量との相関関係は有意であったが、両者の勾配には有意な差は認められなかった。急照射については増殖期の細胞より定常期の細胞の方が高い突然変異頻度を示したが、低線量率照射では増殖期の方が高かった。

d. 定常期細胞のトリチウム水処理による生残率と突然変異：図4はトリチウム水と γ 線の生残率に対する効果を示す。生残率は6 mGy/hでは γ 線もトリチウム β 線も3Gyまで線量に対し直線的に減少し、勾配の比より求めたRBEは2.0であった。130-150mGy/hのトリチウム β 線では4Gyまで直線的に減少し、 γ 線急照射による α の比でもとめたRBEは、2.0となった（180mGy/h、 γ 線（LQ型）の α の比では4.3）。

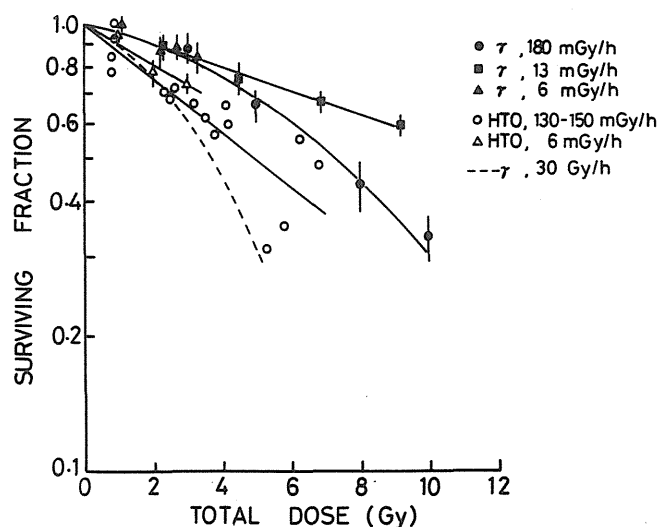


Fig. 4, Changes in the surviving fraction of plateau phase m5S cells as a function of total dose of γ rays and HTO. γ rays at 180 mGy/h (●); γ rays at 13 mGy/h (■); γ rays at 6 mGy/h (▲); HTO at 130-150 mGy/h (○); HTO at 6 mGy/h (△); acute γ rays (---).

トリチウム β 線130-150mGy/hと180mGy/h γ 線照射後の総線量に対する、それぞれの突然変異頻度（非照射対照群の値は差し引いていない）を図5に、6 mGy/hのトリチウム β 線と γ 線の突然変異頻度を図6に示す。また、6 mGy/hの長期照射と平行して培養した対照群の自然突然変異頻度の値も併せて示す。トリチウム β 線による突然変異頻度は130-150mGy/h、6 mGy/hともに線量にたいしてほぼ直線的に増加し、勾配は二つの線量率で差がなく、線量率の影響は認められなかった。 γ 線は13mGy/hでは線量に比例して増加したが（図3B）、6 mGy/hでは非照射と比べ有意な突然変異の増加は認められなかった（3Gy以下）。培養開始時の自然突然変異頻度95%信頼限界を斜線で示してあるが、自然突然変異頻度は長期培養によって、わずかであるが変動している

ことがわかった。トリチウム β 線の突然変異頻度は、 γ 線の急照射に相当する頻度となり、 γ 線急照射によって得られた α との比でしめす RBE は約 6 となった (表 1)。

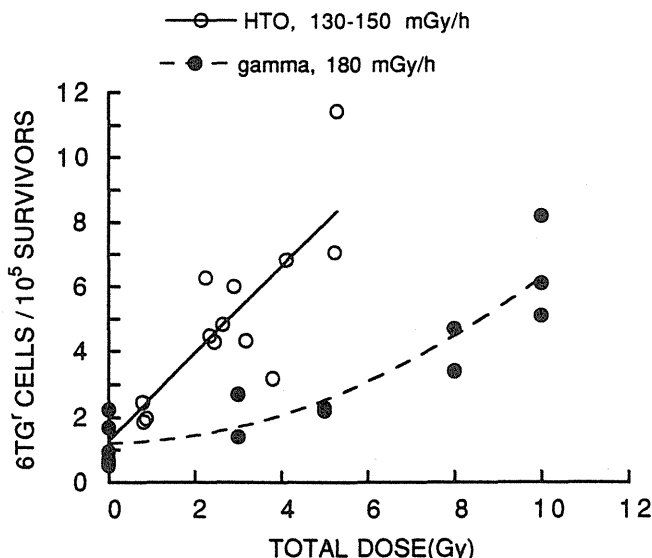


Fig. 5, Changes in the total mutation frequency of plateau phase m5S cells as a function of total dose of γ rays at dose rate of 180 mGy/h (●) and of HTO at dose rate of 130-150 mGy/h (○).

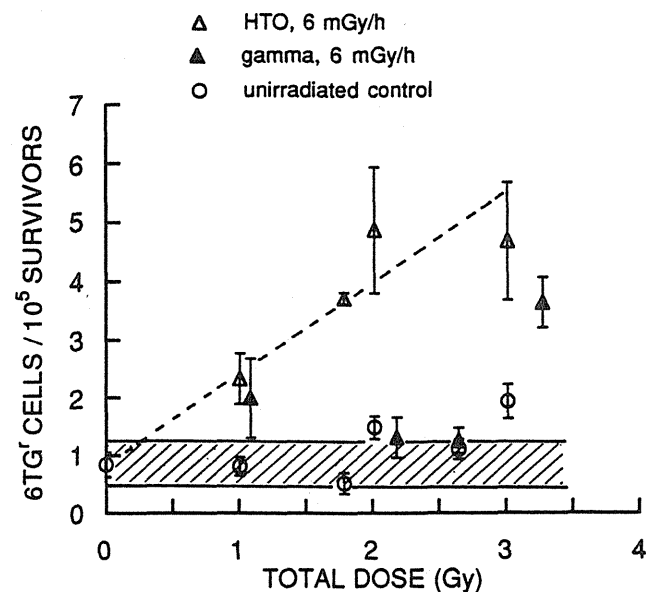


Fig. 6, Changes in the total mutation frequency of plateau phase m5S cells as a function of total dose of γ rays at dose rate of 6 mGy/h (▲) and of HTO at dose rate of 6 mGy/h (△).

The spontaneous mutation frequency was measured in parallel with unirradiated cells (○). The shaded area represents 95% confidence limit of spontaneous mutation frequency determined at the beginning of irradiation.

Table 1 Dose-Response Parameters for Cell Survival and Mutation

α , β Obtained by the Least-Squares Analysis

		Survival (RBE)	Mutation* (RBE)
Plateau-phase cells			
γ rays acute	α	$0.071 \pm 0.029^{**}$	$0.221 \pm 0.120^{**}$
	β	0.031 ± 0.008	0.295 ± 0.028
180 mGy/h	α	0.033 ± 0.013	0.166 ± 0.103
	β	0.009 ± 0.002	0.035 ± 0.011
13 mGy/h	α	0.057 ± 0.010	0.245 ± 0.055
	β	0.054	not fitted
HTO 130-150 mGy/h	α	0.141	(2.0)* 1.30
	β	0.106	(2.0) 1.33
Log-phase cells			
γ rays acute	α	0.191 ± 0.024	-0.164 ± 0.234
	β		0.253 ± 0.047
180 mGy/h	α	0.026 ± 0.011	0.402 ± 0.102
	β	0.008 ± 0.002	
13 mGy/h	α	not fitted	0.450 ± 0.069

* $\times 10^{-5}$

^b Standard error

*,** ratio to α of γ rays acute

4. 考 察

線量率効果は放射線により生じた障害が照射中に修復されるためと考えられている。低い線量率の影響を調べるために照射時間が長くなると、細胞周期や細胞の増殖が複雑に影響し、結果の解析が困難になる。このためには均一な細胞集団で増殖が停止した状態の細胞による実験が望ましい。今回、マウス近二倍体細胞、m5S を、ほぼ接触阻止状態に保ち 4 週間の長期照射に供する系を確立し、突然変異に対する線量率効果を測定した。この間、一週間に二回の培地交換が必要で図 1 に示すように標識率は 1 ~ 5.5 % と変動した。マウス C3H 10T1 / 2 細胞の定常期は標識率 1 % 以下であるとの報告があるが、HGPRT の突然変異の測定には適さない¹²⁻¹³⁾。

図 2 A の生残率の結果は定常期の C3H 10T1 / 2 細胞の報告と類似している¹²⁾。線量率が低下すると、致死となるような障害が修復されて生残率が増加することを示している。しかし、今回使用した最低の線量率でも修復されずに残っている障害があることがわかる。増殖中の近二倍体細胞の低線量率照射による報告は少ない^{12,14)}。図 2 B に示した 13mGy/h、1 Gy での生残率の低下と急照射によって肩がなくなる理由はいまのところ不明である。増殖中の細胞集団では、細胞周期の変化、再増殖、希釈やトリプシン処理など多数のファクターが関係していると思われる。

図 3 A に示すように、定常期細胞の突然変異は線量率効果が大きい。13mGy/h の γ 線による突然変異頻度は 180mGy/h より高くなるはず、増殖中のマウス白血病由来 L5178Y で観察された逆転はみられなかった⁴⁾。急照射

による突然変異の誘発は増殖期より定常期細胞のほうが高く (図 3 A と 3 B)、 G_1 または G_0 期細胞の突然変異誘発率が高いとの報告と一致している¹⁵⁻¹⁷⁾。また、定常期細胞の急照射直後の突然変異頻度は照射後 6 時間保持したのちの分散によって、明かな低下がみられた (未発表データ)。定常期細胞の急照射直後の突然変異頻度は潜在性致死損傷に相当する突然変異の損傷も含まれていることを示している。

図 3 B に示すように、増殖期の m5S 細胞には明かな線量率効果がみられず、1-5 Gy の範囲では調べた三つの線量率に差がなかった。有意ではないが、L5178Y と同じように最も低い線量率のほうが中間より高い突然変異頻度を示す傾向があった。13mGy/h の照射後の突然変異頻度は線量に比例したが生残率は一定で、この傾向は増殖期の L5178Y 細胞でも放射線感受性変異株 LX830 でも同様であった^{4,6)}。

以上、定常期のマウス近二倍体 m5S 細胞は低線量率照射による HGPRT の突然変異誘発を調べる適当な系である。L5178Y 細胞で見られた逆線量率効果は定常期 m5S 細胞ではみられないので、照射中の細胞増殖に関連している可能性が示唆されたが、増殖期の結果からは確認できなかった。分子レベルでは突然変異体に線量率による違いがある可能性も否定できない。Waldren 等はヒトとハムスターのハイブリッド細胞を用い線量率の違いによって欠失の大きさに違いがあると報告している¹⁸⁾。

トリチウム β 線の効果を今までより低い線量率で調べた^{1,2)}。130-150mGy/h と 6 mGy/h では線量率による差がほとんどなく、とくに突然変異頻度は同じ勾配を得た。今回の RBE 値が L5178Y 細胞を用いた実験により得た値より高かったのは、HTO は線量率効果が小さいため、より低い線量率領域において、より高い RBE 値を示すためだと思われる。HTO 処理後の放射能の細胞への取り込みを図 7 に示すが、HTO 処理 24 時間で最大に達している。6 mGy/h では 3 週間まで変わらないことがわかる。取り

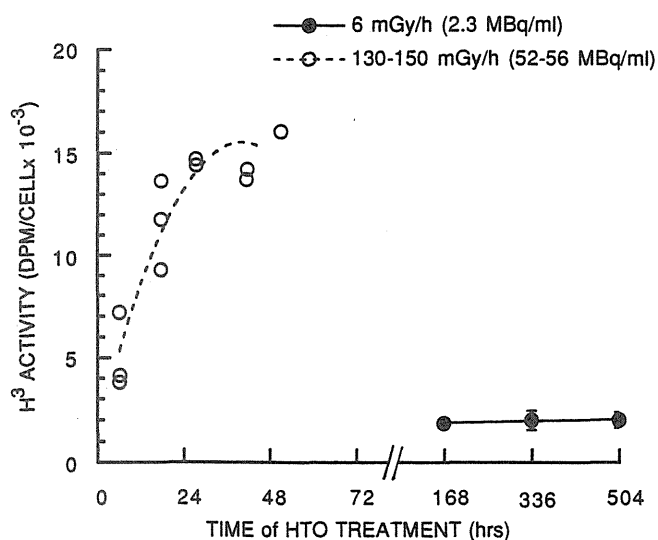


Fig. 7, Changes in tritium activity in the acid insoluble fraction of cells as a function of time after HTO treatment at dose rates of 130-150 mGy/h (○) and 6 mGy/h (●).

込みの最大値を培地中のトリチウム濃度の比で比較すると 130-150mGy/h より 6 mGy/h のほうが大きかった。トリチウムチミジンのように核内に取り込まれると効果が大きくなることから³⁾、低線量率による長期照射の影響が大きい可能性もある。ただし、いずれのトリチウム濃度でも HTO を培地より除いた後は 2 日間で未処理のレベルに低下する。トリチウムの効果は生残率より突然変異に対するほうが大きかった。

参考文献

- 1) Ueno, A. M., Furuno-Fukushi, I. and Matsudaira, H.: Induction of cell killing, micronuclei, and mutation to 6-thioguanine resistance after exposure to low-dose-rate γ rays and tritiated water in cultured mammalian cells (L5178Y). *Radiat. Res.* **91**, 447-456, 1982.
- 2) Furuno-Fukushi, I. and Matsudaira, H.: Mutation induction by tritiated water and effects of deuterium oxide in cultured mouse leukemia cells. *Radiat. Res.* **103**, 466-470, 1985.
- 3) Furuno-Fukushi, I., Ueno, A. M. and Matsudaira, H.: Cell killing and mutation to 6-thioguanine resistance after exposure to tritiated amino acids and tritiated thymidine in cultured mammalian cells (L5178Y). *Radiat. Res.* **110**, 428-438, 1987.
- 4) Furuno-Fukushi, I., Ueno, A. M. and Matsudaira, H.: Mutation induction by very low dose rate γ rays in cultured mouse leukemia cells L5178Y. *Radiat. Res.* **115**, 273-280, 1988.
- 5) Crompton, N. E. A., Zolzer, F., Schneider, E. and Kiefer, J.: Increased mutant induction by very low dose rate γ irradiation. *Naturwissenschaften*, **72**, 439-440, 1985.
- 6) Furuno-Fukushi, I. and Matsudaira, H.: Mutation induction by different dose rates of γ rays in radiation-sensitive mutants of mouse leukemia cells. *Radiat. Res.* **120**, 370-374, 1989.
- 7) Grososky, A. J. and Little, J. B.: Evidence for linear response for the induction of mutations in human cells by x-ray exposures below 10 rads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2092-2095, 1985.
- 8) Evans, H. H., Horng, M-F., Mencl, J., Glazier, K. G. and Beer, J. Z.: The influence of dose rate on the lethal and mutagenic effects of X-rays in proliferating L5178Y cells differing in radiation sensitivity. *Int. J. Radiat. Biol.*, **47**, 553-562, 1985.
- 9) Konig F. and Kiefer, J.: Lack of dose-rate effect for mutation induction by γ rays in human TK6 cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, **54**, 891-897, 1988.
- 10) Evans, H. H., Nielsen, M., Mencl, J., Horng, M-F. and Ricanati, M.: The effect of dose rate on X-radiation-induced mutant frequency and the nature of DNA lesions in mouse lymphoma L5178Y cells. *Radiat. Res.* **122**, 316-325, 1990.
- 11) Sasaki, M. S. and Kodama, S.: Establishment and some mutational characteristics of 3T3-like

- near-diploid mouse cell line. *J. Cell Physiol.*, **131**, 114-122, 1987.
- 12) Wells, R. L. and Bedford, J. S.: Dose-rate effects in mammalian cells IV. Repairable and nonrepairable damage in noncycling C3H 10T1 / 2 cells. *Radiat. Res.*, **94**, 105-134 1983.
 - 13) Terasima, T. , Yasukawa, M. and Kimura, M.: Neoplastic transformation of plateau-phase mouse 10T1/2 cells following single and fractionated doses of X-rays. *Radiat. Res.*, **102**, 367-377, 1985.
 - 14) Hall, E. J. et al: Response of cells of human origin, normal and malignant, to acute and low dose rate irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **12**, 655-659, 1986.
 - 15) Watanabe, M. and Horikawa. M. :Analyses of differential sensitivities of synchronized HeLa S3 cells to radiations and chemical carcinogens during the cell cycle. *Mutat. Res.*, **44**, 413-426, 1977.
 - 16) Jostes, R. F. et al : X-ray induction of 8-azaguanine-resistant mutants in synchronous Chinese hamster ovary cells. *Radiat. Res.*, **83**, 146-161, 1980.
 - 17) Watanabe, M. et al: Repair of lethal, mutagenic and transforming damage induced by X-rays in golden hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, **5**, 1293-1299, 1984.
 - 18) Waldren, C. et al: Molecular analysis of chromosomal mutations induced in mammalian cells by high and low dose rate ^{137}Cs γ rays. In *Low Dose Irradiation and Biological Defense Mechanisms* (Sugahara, T., Sagan, L. A. and Aoyama, T. , Eds.), 339-342. Elsevier, Amsterdam, 1992.

研究発表

- 1) Furuno-Fukushi, I. and Matsudaira, H. :Mutation induction by different dose rates of γ rays in radiation-sensitive mutants of mouse leukemia cells. *Radiat. Res.* , **120**, 370-374, 1989.
- 2) Yamaguchi, T. , Muraiso, C. , Furuno-Fukushi, I. and Tsuboi, A.: Water content in cultured mammalian cells for dosimetry of beta-rays from tritiated water. *J. Radiat. Res.* , **31**, 333-339, 1990.
- 3) Furuno-Fukushi, I. , Aoki, K. and Matsudaira, H. :Mutation induction by different dose rates of gamma rays in near-diploid mouse cells in plateau- and log-phase culture. *Radiat. Res.* , **136**, 97-102, 1993.

2. 遺伝的影響等に関する研究

④ ヒト集団の放射線被曝におけるリンパ球の細胞医学的研究

早田勇、南久松真子、佐藤弘毅、中井きん子、久保田和美、飯田由美（障害基礎研究部）、中野隆史、清水わか子、恒元博（病院部）、青木芳朗（障害臨床研究部）、白貝彰宏（物理研究部）、石原隆昭（特別研究員）

Cytogenetic Study on Peripheral Lymphocytes of Patients Treated by Radiation

Isamu Hayata, Masako Minamihisamatsu, Koki Sato, Kinko Nakai, Kazumi Kubota, and Yumi Iida (Division of Radiation Hazards); Takashi Nakano, Wakako Shimizu, and Hiroshi Tsunemoto (Hospital); Yosiro Aoki (Division of Radiation Health, University of Tokyo); Akihiro Shiragai (Division of Physics); Takaaki Ishihara (Special Researcher)

The present study cytogenetically examined the effect of the medical exposure on the normal tissues with the emphasis on its effect when different parts of the body were irradiated, and when patients' age groups were varied.

Peripheral lymphocytes of 28 patients (cervical cancers, 22; brain tumors, 5; and 1 patient irradiated at the hypophysis in order to control pituitary hormone) who received radiation therapy at the Hospital of National Institute of Radiological Sciences were examined. Each patient received about 55 Gy (mainly by 10 MeV X-rays) in total during one month period. The peripheral blood was obtained at three times: before irradiation; one day after the first or second irradiation; and within four weeks after the completion of the therapy. The fixed number of lymphocytes separated from each blood sample was cultured carefully for 49 hours. Chromosome aberrations of the metaphases that were in the first cell cycle were exclusively scored.

The frequency of unstable type chromosome aberrations (dicentrics and rings, D + Rs) per dose differed depending on the irradiated sites. After the therapy, the patient group whose lower abdomen had been irradiated showed about 25 times more abnormal chromosomes than the group whose head had been irradiated. Even if the difference in the volume of irradiated tissues had been considered, more D + Rs per dose were found in the cases irradiated at the lower abdomen than in those irradiated at the head. Before the therapy, the frequency of D + Rs was higher in the patients with cervical cancer than in the normal population and the patients with brain

tumors. After the therapy, among the patients with cervical cancer, the age group over 70 years old showed significantly lower frequency of D + Rs than the age group under 60 years old did. It is indicated that the age when the patients had medical exposure and the exposed part of the body should be taken into account when we apply radiation dosimetry analysing the chromosomes of the peripheral lymphocytes.

1. 緒言

放射線被曝した細胞は、DNA 鎖に障害を受けるが、その損傷部分のほとんどは修復され元通りの正常な鎖に戻る。希に誤って修復されたものが染色体異常となるものであり、その頻度は被曝線量に比例する。末梢血中のリンパ球は通常細胞分裂をしない Go 期にあるが、分裂誘起剤（PHA）を加えて培養すると DNA 合成を開始し分裂期に入り、染色体が観察できるようになる。染色体異常は化学物質などによっても誘発されるが、末梢血リンパ球を約 48 時間培養し、第一回目の分裂中期にあるものを観察すると、放射線によって誘発される染色体異常（2 動原体と環状染色体）は通常の化学物質によって誘発される染色体異常からその形状の特徴により区別することが出来る。

リンパ球は被曝の影響を保存したまま細胞分裂をせずに長期間末梢血中に存在するため、その放射線誘発染色体異常も長期間線量に相関し保存される。末梢血リンパ球中の 2 動原体と環状染色体を指標とする被曝線量推定法は、身体に現れる放射線障害の生物学的指標を用いる推定法の中で最も感度の高いものといわれ 6～8 Gy から数 cGy にわたる線量域において再現性の極めて高い線量効果関係が得られる。しかしながら、繰り返し被曝、身体の一部の被曝、低線量の慢性被曝の場合等における線量効果関係については、被曝リンパ球の死やリンパ球の末梢血中における

寿命などの複雑な要因が関与するため、さらに新しい推定技術の開発が必要である。

放射線によって誘発される染色体異常は個人個人の感受性の違いも含んだ被曝線量の生物学的影響（リスク）を推定する基礎資料として重要な意味を持っている。

高度に医療技術が進んでいる我国において公衆被曝の中で医療被曝の占める割合は年ごとに増加してきており、無視できない量になっている。また、放射線照射装置と照射技術の進歩により、照射線量の定量性は極めて良く、生体内における放射線と染色体異常の線量効果関係を解析する上で医療被曝者の末梢血は貴重な情報を提供するものである。本研究では、細胞遺伝学的手法を用いて医療被曝の正常組織細胞への障害の実態を明らかにすると共に、被曝線量が明確である放射線治療患者の末梢血リンパ球を解析し、被曝部位の違いや個人差等が末梢血リンパ球中の染色体異常の出現頻度にどのような影響を与えるか等につき新たな知見を得て公衆被曝のリスク評価の基礎資料に資することを試みた。

2. 研究方法

放医研病院部に来院し、治療のために放射線照射された5名の脳腫瘍患者、1名の下垂体照射患者、22名の子宮がん患者の末梢血リンパ球に出現する染色体異常を解析した。治療時における患者の年齢は、頭部照射治療患者では25～65才（平均43.5才）、子宮がん治療患者では49～84才（平均64.4才）であった。放射線治療は週5回の割合で、10MeV-X線または⁶⁰Coのγ線を各1.8Gyづつ照射し行った。頭部照射患者では、対向する2方向から照射を行い、平均照射野は表1に示すごとく84.5×84.5mm²であり、患部の平均照射線量は55.5Gyであった。子宮がん患者の場合、腹背2方向から中央（直腸、膀胱部）を遮蔽して骨盤リンパ節を十分含めた部分の外部照射と⁶⁰Co針の挿入（ラルストロン）による腔内照射を併用した。表2と表3に示すごとく照射線量の総計は子宮がん患者については骨盤リンパ節の線量として算定し、平均照射線量は55.3Gyであった。外部照射の平均照射野は158×158mm²であった。

表1. 頭部に放射線治療を受けた6名の患者の末梢血リンパ球に検出された二動原体と環状染色体の出現頻度（★100細胞中）

症例	年齢 (歳)	治療前 (★)	治療後 (★) (Gy)	照射野 (mm ²)
M I	41	0.5	1.5 56.3	160×130; 170×140; 60×60
I T*	28	0	1 54.5	50×50
N K	39	0.5	5 56.5	60×60; 60×70
U S	25	0	1 56.5	80×80; 70×70
T I	63	0	1 52.5	60×60; 40×40
O T	65	0	2.5 56.5	80×80; 70×60
平均	43.5	0.17	2.0 55.5	84.5×84.5

* 下垂体照射例

表2. 子宮腫瘍治療患者22名の放射線治療方法と線量と採血時の照射終了後日数

症例	⁶⁰ Co γ線照射 Gy/回/日	X線照射 Gy/回/日	ラルストロン照射 Gy/回(÷4)	骨盤リンパ節 線量 (Gy)	照射後 日数
W S		50.6/27/39	24/4 (6)	56.6	12
K T		59.6/33/55	18/3 (4.5)	64.1	0
S H		49.6/26/39	24/4 (6)	55.6	5
T M		50.6/27/40	6/1 (1.5)	52.1	5
S i T		50.4/27/39	0	50.4	4
M Y		47.9/26/41	6/1 (1.5)	49.4	1
I H		50.4/28/42	0	50.4	—
U S		49.6/27/42	18/3 (4.5)	54.1	—
H K		48.6/26/35	18/3 (4.5)	53.1	1
F K	16.2/9/11	34.4/18/24	24/4 (6)	56.6	5
H M	23.4/13/18	27.0/14/18	24/4 (6)	56.4	6
S K	9.0/5/5	41.6/22/31	24/4 (6)	56.6	5
M H		51.7/26/39	24/4 (6)	57.7	5
I T		50.6/27/37	25.1/4(6.3)	56.9	12
I N		50.6/27/37	23.9/4(6)	56.6	12
S M		49.6/27/37	22.8/4(5.7)	55.3	12
N H		50.4/28/38	18/5 (4.5)	54.9	5
N o M		50.6/28/45	18/4 (4.5)	55.1	5
T K		50.6/27/37	22/4 (5.5)	56.1	5
O T		50.6/27/37	25/4 (6.2)	56.8	6
S a T		50.6/27/37	17/4 (4.3)	54.9	26
N a M		50.4/27/38	26/4 (6.5)	56.9	19

表3. 下腹部に放射線治療を受けた22名の子宮腫瘍患者の末梢血リンパ球に検出された二動原体と環状染色体の出現頻度（★100細胞中）

症例	年齢 (歳)	治療前 (★)	治療初期 (★) (Gy)	治療後 (★) (Gy)	照射野 (mm ²)
W S	52	0	2.5 1.8	58 56.6	160×160
K T	55	0.5	— —	69 64.1	160×90
S H	62	×	— —	×	55.6 140×150
T M	49	0	— —	38 52.1	140×100
S i T	59	0	0.5 1.8	97 50.4	150×150
M Y	50	0.5	2.0 1.8	31 49.4	150×160
I H	58	0.5	10.5 3.6	— 50.4	150×150
U S	60	0	4.5 3.6	— 54.1	170×200
H K	54	0	0 1.8	73 53.1	175×150
F K	81	0	0.5 1.8	15.5 56.6	170×190
H M	74	0.5	1.0 1.8	24.5 56.4	150×180
S K	67	1.0	0 1.8	85 56.6	160×150
M H	75	0	0 1.8	55 57.7	160×150
I T	69	0.25	2.0 1.8	29 56.9	160×170
I N	70	0	0 1.8	35 56.6	170×160
S M	62	0	1.5 1.8	53 55.3	170×160
N H	84	0	0 1.8	33 54.9	170×160
N o M	69	1	2.5 1.8	27 55.1	170×160
T K	68	0.5	1.5 1.8	45 56.1	170×170
O T	74	0	1.0 1.8	48 56.8	165×143
S a T	62	0	0 1.8	42 54.9	170×160
N a M	67	0	3.0 1.8	110 56.9	160×160
平均	64.6	0.22	1.73 2.0	51 55.3	158×158

染色体分析はそれぞれの患者につき、治療前、治療初期（1.8または3.6Gy照射の翌日）および治療終了後（50～60Gy照射後4週間以内）の3時点で採血し行った。（治療の都合で3時点での採血が出来なかった例があった。）染色体標本は各10mlづつ採血し、リンパ球分離用リユーコプレップ管でリンパ球を分離し、子牛血清20%とPHAの入ったPRMI1640培養液中で、リンパ球の濃度が5,000,000個/mlとなるように調節し、炭酸ガス5%の存在下で培養し、24時間目にコルセミド0.05μg/mlを添加し、さらに25時間培養したのち、ハーベストし、温湿空気乾燥法でスライドを作り、ギムザ染色して作成した（Hayataら、1992）。染色体分析は原則として子宮がん治療終了後のサンプルは100細胞、それ以外は200細胞以上につき行った。染色体異常は第1回目分裂中期細胞に認められたもののみをスコアした。3動原

体、4動原体などは2動原体の2個、3個相当としてカウントした。統計処理はF検定によった。

3. 結果

表1に示すごとく頭部照射患者について、治療前、治療終了後における2動原体と環状染色体の100細胞中の頻度はそれぞれ0.17と2.0であった。

表4. 治療初期の至急腫瘍患者の末梢血リンパ球に検出された二動原体と環状染色体の分布

症例	線量 (Gy)	分析細胞	細胞中の二動原体と環状染色体の数			
			0	1	2	3
WS	1.8	200	195	5		
SiT	1.8	200	199	1		
MY	1.8	200	196	4		
IH	3.6	200	182	15	3	
US	3.6	200	194	4	1	1
HK	1.8	200	200			
FK	1.8	200	199	1		
HM	1.8	200	198	2		
SK	1.8	200	200			
MH	1.8	200	200			
IT	1.8	200	198	1	1	
IN	1.8	200	200			
SM	1.8	200	196	4		
NH	1.8	200	200			
NoM	1.8	200	197	2		1
TK	1.8	200	197	3		
OT	1.8	200	198	2		
SaT	1.8	200	200			
NaM	1.8	200	197	1	1	1

表5. 治療直後の子宮腫瘍患者の末梢血リンパ球に検出された二動原体と環状染色体の分布

症 例	線 量 (Gy)	分 析 細 胞	細胞中の二動原体と環状染色体の数									
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	
W S	56.6	100	70	13	10	4	2	1				
K T	64.1	68	38	20	5	3	2					
T M	52.1	100	76	15	6	1	2					
S i T	50.4	100	59	16	12	5	2	3	2	1		
M Y	49.4	100	82	11	3	2	2					
H K	53.1	100	71	12	3	5	6	2	1			
F K	56.6	100	88	6	4	2						
H M	56.4	100	89	4	3	1	2	1				
S K	56.6	100	49	18	17	12	1	3				
M H	57.7	100	82	7	6	2	2	2				
I T	56.9	100	85	7	4	1	3					
I N	56.6	100	85	2	7	3	3					
S M	55.3	100	77	9	6	5	1	1			1	
N H	54.9	100	82	8	5	5						
N M	55.1	100	85	8	4	2		1				
T K	56.1	100	80	6	9	3		1		1		
O T	56.8	100	77	8	6	8	1					
S a T	54.9	100	78	10	9		2		1			
N a M	56.9	100	56	15	9	7	11	1		1		

一方、表3に示すごとく子宮がん患者については、治療前、治療初期、治療終了後における2動原体と環状染色体の100細胞中の平均頻度はそれぞれ0.22、0.73、51であった。治療終了時における染色体異常の100細胞当たりの出現頻度には、最少値15.5から最大値110まで大きな差が認められたが、治療条件、投与剤などに原因になると考えられる要因は無かった。子宮がん治療患者のうち、年齢が70才以上の6名と60才以下の6名づつにつき、治療終了後の2動原体と環状染色体の100細胞中の平均頻度を

比較すると、前者では35.2後者では61.0であり統計的に有意（ $P < 0.01$ ）の差が認められた。子宮がん患者について治療初期と治療終了時におけるリンパ球中の2動原体と環状染色体の数の分布を表4と表5に示す。治療初期においてはこれらの異常染色体を持っていた54細胞中45細胞（83%）には異常染色体が1個のみ検出され（図1）、最も多く持っていたものでも3個、平均では1.2個であった。他方、治療終了時においては、2動原体と環状染色体を持った細胞の過半数（460細胞中265細胞、58%）が2個以上の異常染色体を持っており（図2）、最も多く持っていたものでは8個、平均では2.1個であった。

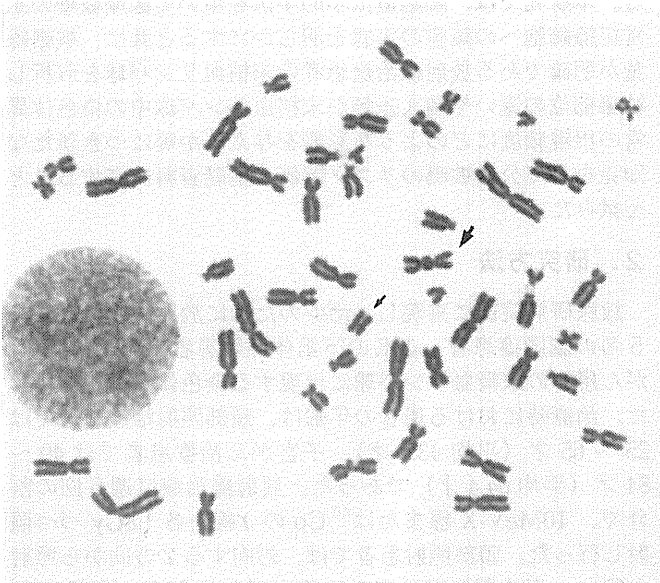


図1. 子宮がん放射線治療初期の患者の末梢血リンパ球に見られた染色体異常
太矢印：2動原体 細矢印：染色体断片

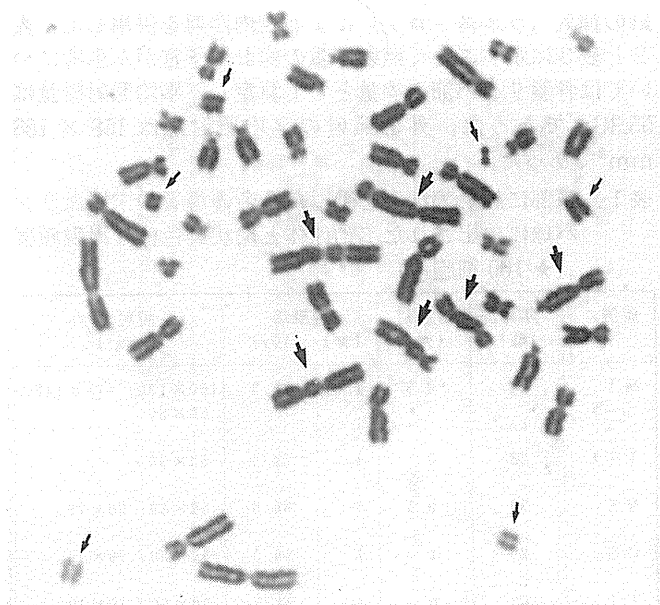


図2. 子宮がん放射線治療終了後の患者の末梢血リンパ球に見られた染色体異常
太矢印：2動原体 細矢印：染色体断片

4. 考察

従来の医療被曝者の血液の染色体研究では染色体標本が

全血培養法によるものであり、個人個人の血液細胞成分が異なるため細胞分裂頻度など染色体標本の質にバラツキが生じ、異常染色体の検出効率が必ずしも一定する状況ではなかった。本研究においてはリンパ球を分離し、一定数を培養することにより、従来より均質な標本を得て精度の高い染色体解析を試みている。

頭部照射患者の治療終了時点における2動原体と環状染色体の100細胞当たりの頻度は平均2.0であったが、この値は採血した末梢血にX線を照射して行ったin vitroの実験（未発表）の約0.5Gy照射時の値、つまり頭部の治療に要した平均照射線量の55.5Gyの約1%に相当する。一方、子宮がん患者の2動原体と環状染色体の100細胞当たりの頻度は1.8または3.6Gy照射を行った治療初期の時点で平均1.73であり、頭部照射治療の終了時の値に近い。治療終了時点では平均51であり、前記in vitroの実験の約3.2Gy、つまり平均被曝線量55.3Gyの5%強の線量照射時の値に相当する。この値はRigaudら（1990）の報告した4%よりはやや高い。頭部治療照射と子宮がんの下腹部治療照射では治療終了時点における平均照射線量はほぼ同じであり、照射野は後者は前者の約4倍であるが、染色体異常の出現頻度には約25倍の相違がある。これは、同じ線量と同じ体積に被曝した場合、頭部より下腹部の方が染色体異常が多く出現することを示し、その原因は被曝部位に存在するサイズの大きなリンパ節が下腹部に多く、リンパ節に集まり被曝したリンパ球が末梢血に多数流出したためと思われる。

子宮がん患者では治療前に2動原体と環状染色体の100細胞当たりの平均頻度はすでに0.22あり、Tonomuraら（1983）の報告にある健常女性についての2動原体と環状染色体のバックグランド値より高い。RameshとBhargava（1992）も我々と同じように子宮がん患者ではこれらの染色体異常が治療前にすでに高いことを報告している。

今回の解析により高齢者では同じ線量を被曝しても2動原体と環状染色体の検出頻度が低くなる事が明らかになったが、Tonomuraら（1983）のバックグランド値についての報告においても、これらの染色体異常の頻度は50才代までは年齢の増加とともに高くなるが60才代で低くなっている。

1細胞当たりの2動原体と環状染色体の数が1個であったものは治療初期では83%、治療終了時では42%と半減したが、これは同じ細胞が繰り返し照射された事を示す。

治療終了時に検出された染色体異常の頻度の大きな個人差を生じさせた主原因は、リンパ節内にあり繰り返し照射されたにもかかわらず生き残り末梢血流に放出されたリンパ球の割合の個人差、および年齢による影響であるように思われる。

5. 結 論

脳腫瘍などの頭部放射線治療患者と子宮がん放射線治療患者の末梢血リンパ球には、治療終了時点において治療に要した総線量のそれぞれ約1%と約5%に相当する線量で全身均一被曝した場合に相当する多数の染色体異常が検出される。頭部と下腹部の同じ体積に同じ線量が照射された場合、末梢血リンパ球に検出される染色体異常の頻度は下腹部照射の場合の方が高い。高齢者では放射線による染色

体異常の検出頻度が低くなる。従って、末梢血リンパ球の染色体分析で被曝線量の推定を行う場合には、被曝部分および被曝者の年齢を考慮し、被曝線量を算定する必要があることが明らかになった。また、繰り返し被曝の場合、同一被曝条件で末梢血リンパ球に検出される染色体異常の頻度には個人差が認められることが明らかになった。子宮がん患者では、治療前にすでに末梢血リンパ球中の染色体異常の頻度が健常人より高く、末梢血リンパ球の高頻度染色体異常ががんの高リスク者の指標となる可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Hayata, I., Tabuchi, H., Furukawa, A., Okabe, N., Yamamoto, M. and Sato, K.: Robot system for preparing lymphocyte chromosome. J. Radiat. Res. 33, Suppl., 231-241, 1992.
- 2) Ramesh, K. H. and Bhargava, M.K. : Cytogenetic damage in peripheral blood lymphocytes of cancer patients prior to radiotherapy. Cancer Genet. Cytogenet. 60, 86-88, 1992.
- 3) Rigaud, O., Guedeney, I. Duranton, A. Leroy, M. T. Doloy and H. Hagdelenat: Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on the circulating lymphocytes of breast cancer patients. II. chromosome aberrations induced in vivo. Mutat. Res. 242, 17-23, 1990.
- 4) Tonomura, A., K. Kishi and F. Saito: Types and frequencies of chromosome aberrations in peripheral lymphocytes of general populations. In "Radiation Induced Chromosome Damage in Man" eds. by T. Ishihara and M. S. Sasaki, Alan R. Liss, Inc., New York, pp. 605-616, 1983.

【研究発表】

- 1) Hayata, I., Minamihisamatsu, M., Aoki, Y., Nakano, T. and Shimizu, W.: Cytogenetic Study on Peripheral Lymphocytes of Patients Treated by Radiation. Proceedings of the China-Japan Medical Conference, Beijing, 1992.11.
- 2) Hayata, I., Removal of stainable cytoplasmic substances from cytogenetic slide preparations. Biotech. Histochem. 68, 150-152, 1993.
- 3) 早田勇、南久松真子、佐藤弘毅、武藤正弘、山本幹男：リユーコブレップで分離したリンパ球の2日間培養法による染色体標本改良、第40回染色体学会、吹田、1989. 11.
- 4) 早田勇、南久松真子、青木芳朗、中野隆史：放射線治療患者のリンパ球の不安定型染色体異常。第33回日本放射線影響学会大会、仙台、1990. 10.
- 5) 早田勇、賀嶋淳子、南久松真子、山本幹男、岡部信夫：サイトカラシンBによる倍数性の違いに基づく第一回目分裂中期細胞の簡単明瞭な識別。第41回染色体学会、東広島、1990. 10.
- 6) 早田勇、南久松真子、青木芳朗、中野隆史、清水わか子：頭部または下腹部に放射線治療を受けた患者のリンパ球の不安定型染色体異常。日本放射線影響学会、

第 34 回大会、東京、1991 . 11

- 7) 早田勇、松岡順子：末梢血リンパ球の小核標本の新作成法、第 42 回染色体学会、長崎、1991 . 10 .
- 8) 早田勇、南久松真子、青木芳朗、中野隆史、清水わか子：Cytogenetic study on peripheral lymphocytes of patients treated by radiation. 中日医学大会、北京、1992 . 11 .
- 9) Kanda, R., Tao, J., Hayata, I., Kobayashi, S. and Nakai, S.: Effects of Colcemide concentration on chromosome aberration analysis in human lymphocytes for low dose estimation. International Symposium on Biological Effects of Low Level Exposures to Radiation and Related Agents. Changchun, 1993. 10.
- 10) Jiang, T., Hayata, I., Chen, D., Wang, C., Li, S, and Nakai, S.: A renewed approach to evaluate chromosome aberrations regarding the subjects from big families in high background radiation area. International Symposium on Biological Effects of Low Level Exposures to Radiation and Related Agents. Changchun, 1993. 10.

(2) 新技術の導入による放射線の影響とその修飾要因に関する分子・細胞生物学的研究

1. 発がんの機構と修飾に関する研究

①放射線による胸腺リンパ腫の前リンパ腫細胞の発生と増殖に関する研究

武藤正弘、久保えい子、神作仁子、佐渡敏彦
(放射線医学総合研究所、生理病理研究部)

Characterization of Prelymphoma Cells and Analysis of Initial Events in Radiation-Induced Lymphomagenesis.

Masahiro Muto, Eiko Kubo, Hitoko Kamisaku and Toshihiko Sado. Division of Physiology and Pathology, National Institute of Radiological Sciences.

With the combined use of cell separation by cell sorter and intrathymic injection assay, we found that the main target cells for radiation-induced thymic lymphomagenesis are DN ($CD4^- CD8^+$), CD8SP ($CD4^- CD8^+$) and DP ($CD4^+ CD8^+$) cycling immature J11d⁺ thymocytes. After leukemogenic irradiation, thymocytes expressing TL-2 antigen, which is not expressed on normal thymocytes of B10 mice, develop from these immature cycling thymocytes, and prelymphoma cells develop, albeit infrequently, from these TL-2⁺ cells. To analyze the clonality of prelymphoma cells, limited numbers of TL-2⁺ thymocytes from individual irradiated mice were injected into thy 1 congenic mice intrathymically, and DNA from the donor type T cell lymphomas was examined by Southern blotting and the DNA sequences of the V-J junctional sites were investigated. Since the TCR rearrangement is a sequential process and unique to the progeny of each clone, a strategy for investigating the oncogenic process is to compare the oncogenic alterations with the pattern of TCR rearrangements of these lymphoma cells.

To investigate the contribution of chromosome aberrations in radiation-induced lymphomagenesis, we analyzed the chromosome G-banded karyotypes of the donor type T cell lymphomas from above experimental system. Many numeral and structural aberrations were observed in the donor-derived T cell lymphomas. Interestingly, common aberrations including translocations almost in the lymphomas of each group were found. The results indicated that chromosome aberrations including translocations might be important candidates of initiating events in radiation-induced lymphomagenesis. The PCR-SSCP

analysis of p53 gene suggested that the mutations of the p53 gene might be late-occurring events during oncogenesis.

(1) 諸言

放射線被爆によって最も誘発されやすい腫瘍（がん）は、白血病である。マウスでは多くの系統で放射線により胸腺原発のリンパ性白血病（胸腺リンパ腫）が誘発されることが知られている。1950年代のはじめ頃、H. S. KaplanはC57BL系のマウスに、生後約1ヶ月齢から1週間おきに、1.6GyのX線を4回全身照射すると、非常に高率に胸腺リンパ腫が発生することを報告した。

さらに彼らは、この系では、(1) 照射前あるいは照射直後に標的臓器の胸腺を摘出しておくとも胸腺リンパ腫は発生しないが、そのようなマウスに組織適合性の新生児の胸腺を皮下移植すると、放射線に照射されていない移植胸腺からリンパ腫が発生すること、および(2) 照射中に大腿部（骨髄）を鉛で遮蔽したり、照射後に正常なマウスからの骨髄細胞を大量に移植してやると、胸腺リンパ腫の発生が抑えられることをみいだした。これらの結果は、放射線によるリンパ腫の発生が、単に標的照射に突然変異や染色体異常が引き起こされるといった単純なメカニズムによるのではないことを強く示唆している。それ以来、多くの研究者がこのX線4分割照射の系を用いて胸腺リンパ腫発生のメカニズムを解明しようと試みてきた。多くの研究者はマウスがそのゲノムの中に潜在的にもっている（内在性）のがんウイルスが放射線によって活性化されて増殖を始め、未熟な胸腺細胞に感染して、それらの細胞をガン化させると考えている。しかし、今なおその十分な証拠は得られていない。

そこで、われわれは1981年頃からX線分割照射によって誘発される胸腺リンパ腫発生のメカニズムを明らかにするための研究を開始した。この研究の特徴は、我々の研究室で育成したB10. Thy 1コンジェニック系マウスの組み

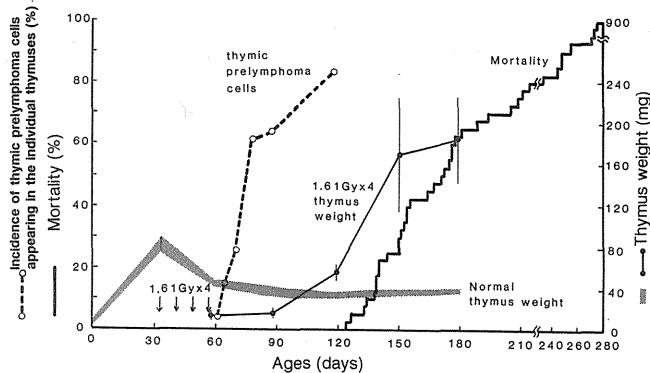


図1、放射線照射後に、胸腺内に生じた前リンパ腫細胞の発生頻度。

[.....] ; 照射個体の胸腺内に生じた前リンパ腫細胞の発生頻度。[—] ; 胸腺リンパ腫の発生による死亡頻度。[●] ; 照射個体の胸腺重量。[.....] ; 正常 B10.Thy 1.1 マウスの胸腺重量。

合せて、リンパ腫発生の標的となる胸腺あるいは骨髄細胞を適当な宿主に移植して、供与者及び宿主型の胸腺細胞の増殖分化あるいは腫瘍化を調べることを主要な実験手技として採用している点である。

本特別研究期間中に行なった研究成果の多くは、すでに原著論文あるいは国際会議のプロシーディングスに発表した^{1-4,6-8)}、われわれは先人の追試実験を含むいく種類もの注意深い実験の結果に基づいて、胸腺リンパ腫発生のメカニズムについてがんウイルスの関与を与えない新しいモデルを提唱した^{2,14)}。X 線分割照射されたマウスでは、胸腺細胞の大部分が死滅すると同時に骨髄におけるプレ T 前駆細胞 (T 細胞の前駆細胞) の数が著しく減少することが知られている^{2,4)}。さらに、われわれは別の実験で、

(1) X 線分割照射後に正常なマウスの骨髄細胞を移植すると、移植細胞数が増えるに従って胸腺リンパ腫の発生率が低下すること、及び (2) 致死量の X 線を照射したマウスに、X 線分割照射された Thy 1 コンジェニックマウスの骨髄細胞を移植すると、宿主の胸腺由来の胸腺リンパ腫が高率に発生するが、同様の処置を受けた宿主マウスに正常な Thy 1 コンジェニックマウスの骨髄細胞を移植しても胸腺リンパ腫は殆ど発生しないことを見いだした。¹⁾ これらの結果から、胸腺細胞と骨髄における T 前駆細胞の枯渇が同時に起こると、胸腺内に生き残った未熟な胸腺細胞に由来するリンパ腫が高率に発生することがわかる。そこで、われわれは、X 線分割照射により大量の胸腺細胞の消失と骨髄における前 T 細胞の枯渇が起こると、生き残った未熟な胸腺細胞の再生が始まっても、それらの細胞に残された分裂可能回数は限られている上に、骨髄からの前駆細胞の補給がないために、胸腺内では T 細胞の増殖/分化制御因子のアンバランスが起こり、再生してきた未熟な胸腺細胞が増殖も分化も出来ない状態におちいり、恐らくそういう状況の下で T 細胞の増殖/分化に関与する遺伝子の発現異常が起こり、それを契機として、我々が前リンパ腫細胞と呼んでいるところの「前がん」状態の細胞が生じ、さらにそれらの細胞から早晚悪性のリンパ腫細胞が発生するという「分化異常による発がんモデル」を考え²⁾。そこで問題になるのは、未熟な胸腺細胞の再生が始まってから前がん細胞への変化 (イニシエーションあるい

はトランスフォーメーション) がどのようにして起こり、そしてそれらがどのような過程を経て自律性を持ったリンパ腫細胞へ進展していくかということである。本報告ではこの問題に絞って最近の研究成果を要約する。

(2) 材料と研究方法

(a) マウス: マウスは、B10f / Sn ♀ (Thy 1.2, H-2^b, 以後 B10.Thy 1.2 と呼ぶ) と B10.NRH.Thy-1^a ♀ (Thy 1.1, H-2^b, 以後 B10.Thy 1.1 と呼ぶ) を使用した。B10.Thy 1.1 マウスは、佐渡等によって、NRH / Nrs マウスからの Thy 1.1 マーカーを B10 系マウスに反復戻し交配によって導入して育成されたマウスである。これらのマウスは、当研究所の動物生産施設で、コロニーから育成し、クリーンコンベンションの環境下で飼育した。

(b) X 線照射: 全身照射は、信愛 3 号 (島津製作所) を使用して、60R / min, (200KVp, 20mA, 0.5mmCu + 0.5mmAl フィルター、半価層 1.24mm, 照射距離 52 cm) の条件で行なった。マウスは 33 ± 3 日齢から、1.61Gy 8 日ごとに、4 回照射した。

(c) 抗体: ビオチン化抗 CD8 抗体、抗 Thy 1.2 抗体およびヒコエリスリン (PE) 標識ストレプトアビジンは、ベクトンディキンソン (Mountain View, CA) から購入した。FITC 標識された抗 Thy 1.1 抗体、抗 CD8 抗体および抗 TL-2 抗体は、明治乳業 (東京) から購入した。抗 CD4 (GK1.5)¹⁰⁾ と J11d 抗体⁹⁾ は、ハイブリドーマを移植したヌードマウスからの腹水から CM Affi Gel Blue (バイオラド、CA) クロマトグラフィで抗体を精製し、FITC 標識やビオチン標識して使用した⁸⁾。

(d) 蛍光標識による分析とソーティング: 胸腺細胞 (4X10⁶) に、FITC 標識抗 CD4 または抗 TL-2 抗体とビオチン標識抗 CD8 抗体、または J11d 抗体を反応させ、次に PE 標識ストレプトアビジンを反応させ、細胞を 3 回洗浄した後、FACStar (ベクトンディキンソン) で分析し、または必要に応じてソーティングも行なった。

(e) 胸腺内移植および Thy 1 タイピング: 胸腺内移植および Thy 1 タイピングは論文⁸⁾に記載した方法にしたがって、行なった。

(f) サーズン法による解析: 高分子 DNA を種々の細胞から抽出し、5 μg の DNA を 1 % Agarose gel で電気泳動し、ニトロセルローズフィルター上にトランスファした¹⁶⁾。プローブの標識やハイブリダイゼーションは、Molecular cloning¹¹⁾に記載された条件で行なった。

(g) PCR-SSCP: T 細胞リセプターの V_H4 と J_H1 遺伝子内の適当な primer および p53 の Exon 4 から Exon 9 までの両端の primer、さらに H-ras, K-ras, N-ras 遺伝子の codon 12 と codon 61 付近をはさむ 20-24 mer の primer を合成した。遺伝子増幅¹²⁾は [α³²P] dCTP 存在下で、94 °C 1 分、アニーリング温度を 55-57 °C 2 分、72 °C 2 分のサイクルを 30 回行い、その後増幅した DNA を、変性させた後、6 % ポリアクリルアミドゲルで泳動を行なった。

(h) 染色体標本の作成: リンパ腫細胞を PMA 10ng / ml, Ionomycine 250 ng / ml, 5X10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol, 10 % fetal calf serum を含む RPMI 1640 培養液で 48 時間培養し、その後、2 時間 TN-16 (30ng / ml) 処理を行なった。染色体標本の作成および G バンドの検

出は宮下¹³⁾等の方法に従って行なった。

(3) 結果

1. 前リンパ腫細胞の特性

これまでに B10.Thy 1 コンジェニックマウスを使用し放射線誘発胸腺リンパ腫の発生過程で、前がん細胞である前リンパ腫細胞が、照射後かなり早い時期（4－8日目）に胸腺内に生じ、照射後21－31日目には63%以上の個体の胸腺に検出されることを明らかにしてきた⁶⁻⁷⁾（図1）。ここで述べた前リンパ腫細胞は、胸腺環境下では増殖してやがてリンパ腫になるが、腹腔では増殖出来ない細胞として定義した。これに対して胸腺リンパ腫細胞は、胸腺内や腹腔内いずれにおいても、自律性増殖を示す。

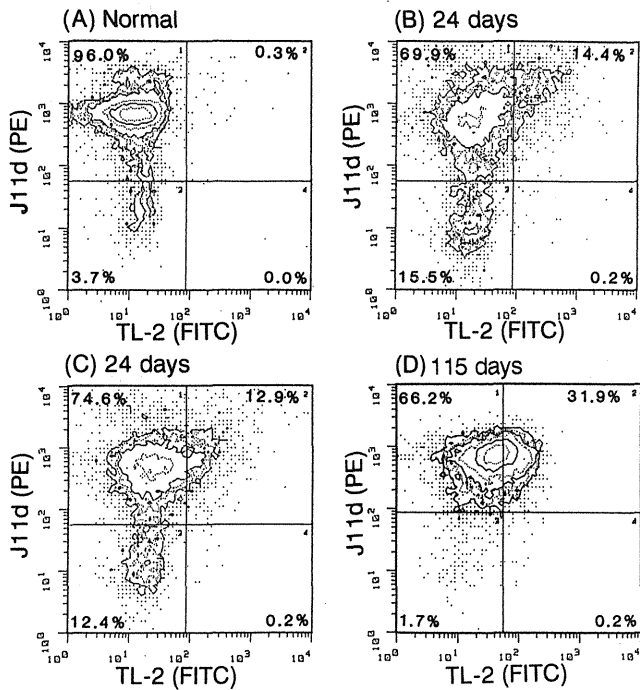


図2、放射線照射後、種々の日数後の胸腺における J11d 抗体と抗 TL-2 抗体による発現の解析。

照射後24日目(B, C)、115日目(D)のB10.Thy 1.1マウスの胸腺細胞を、J11d抗体と抗TL-2抗体で二重染色し、フローサイトメトリーで分析した。

X線照射後、種々の時間後に胸腺細胞を調整し、抗TL-2抗体⁸⁾とJ11d抗体⁹⁾で2重染色して、フローサイトメトリーで分析した(図2)。図2に示すように正常のB10.Thy 1.1マウスの胸腺細胞は、J11d⁺ TL-2⁻とJ11d⁻ TL-2⁻細胞集団から構成されているが、X線照射後24日目や115日目のマウスの胸腺細胞では、J11d⁺ TL-2⁻とJ11d⁻ TL-2⁻細胞以外にJ11d⁺ TL-2⁺細胞集団が出現していることが明らかになった⁸⁾。前リンパ腫細胞の表面抗原の特性を調べるために、照射後1ヵ月目のB10.Thy 1.1マウスの胸腺細胞を抗TL-2とJ11d抗体で染色し、セルソーターでJ11d⁺ TL-2⁺、J11d⁺ TL-2⁻、J11d⁻ TL-2⁻細胞亜集団に分離した。これらの細胞(10³または10⁴)を、3.78Gy照射したB10.Thy 1.2マウスの胸腺内に移植し、移植後5～6ヵ月後に発生してきたリンパ腫について、抗Thy 1.1または抗Thy 1.2抗体で染色して分析し、供与者由来のT細胞リンパ腫の発生頻度を決定した。これらの

結果から、前リンパ腫細胞はJ11d⁺ TL-2⁺胸腺細胞の中に存在していることが明らかになった(表1)。同様に抗CD4抗体⁹⁾と抗CD8抗体により照射個体の胸腺を染色し、セルソーターで4つの細胞亜集団に分離し、宿主の胸腺に移植し、発生してきた供与者由来T細胞リンパ腫の頻度を解析した⁸⁾。その結果、前リンパ腫細胞は、主にCD4⁻ CD8⁻とCD4⁻ CD8⁺細胞に存在し、また割合は小さいが、CD4⁺ CD8⁺細胞にも存在することが明らかになった。これらの結果から放射線誘発胸腺リンパ腫発生における主な標的細胞は、DN(CD4⁻ CD8⁻)、CD8SP(CD4⁻ CD8⁺)、およびDP(CD4⁺ CD8⁺)で、しかも分裂の盛んな未熟なJ11d陽性の胸腺細胞であることが示された。そして1.61Gy 4回照射後、TL-2陽性細胞は、これらの未熟な分裂の盛んな細胞から発生してくるものと考えられ、さらに前の実験結果から前リンパ腫細胞は、これらTL-2陽性細胞の中から発生してくることが明らかになった。これを模式的にまとめたのが図3である。

表1 Incidence of donor type T cell lymphomas after i. t. injection of fractionated thymocytes with regard to J11d marker and TL-2 antigen

Sorted Cells ^{a)}	10 ⁴	10 ³	Total
J11d ⁺ TL-2 ⁺	4/4 ^{b)}	3/4 ^{b)}	7/8
J11d ⁺ TL-2 ⁻	0/4	0/4	0/8
J11d ⁻ TL-2 ⁻	0/4	0/4	0/8

- a) 照射後、1ヵ月目のB10.Thy 1.1マウスの胸腺細胞を、抗J11d抗体と抗TL-2抗体で二重染色し、セルソーターでJ11d⁺ TL-2⁻、J11d⁻ TL-2⁻、J11d⁺ TL-2⁺の3群の細胞集団に分画した
- b) これらの分画した細胞(10³または10⁴)を、3.78Gy照射したB10.Thy 1.2マウスの胸腺内に移植して生じてきたdonor由来T細胞リンパ腫の頻度(donor由来T細胞リンパ腫の発生頻度/移植したマウス)を示す。

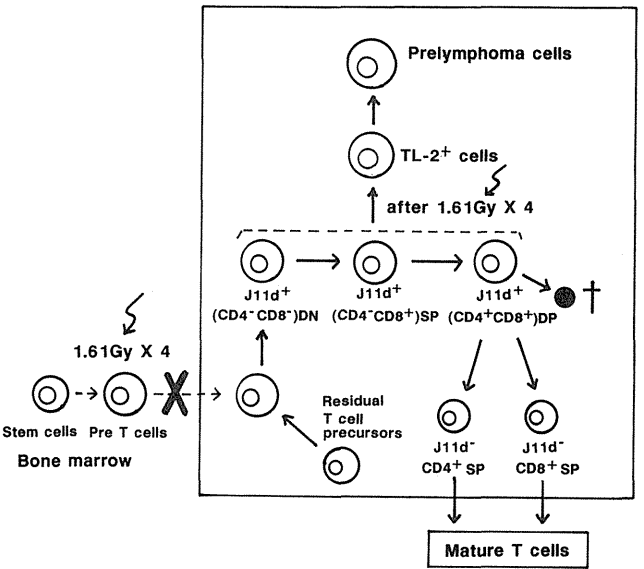


図3、放射線誘発胸腺リンパ腫の標的細胞と前リンパ腫細胞の発生様式。

表2 宿主の胸腺に発生した供与者由来T細胞リンパ腫の頻度

照射した個体 (B10Thy 1.1 マウス)	移植したTL-2 陽性細胞の数 ^{a)}				TL-2 陽性細胞 中の前リンパ腫 細胞の頻度
	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	
A	ND ^{c)}	ND	3/4	4/4 ^{b)}	1.4 X 10 ⁻⁴
D	0/4	2/4	4/4	ND	6.8 X 10 ⁻⁴
		(A5-A7)	(A1-A4)		
B	ND	ND	0/4	3/4	1.4 X 10 ⁻⁵
		(D5,D6)	(D1-D4)		
C	0/4	0/4	2/4	ND	6.8 X 10 ⁻⁵
		(C11,C12)			
E	ND	ND	3/4	4/4	1.4 X 10 ⁻⁴
		(E10,E11)	(E7-E9)		
F*	ND	ND	4/4	4/4	>6.8 X 10 ⁻⁴
		(F3,F4)	(F1,F2)		
G*	ND	ND	2/4	4/4	6.8 X 10 ⁻⁵
		(G9,G10)	(G5-G8)		
H*	ND	ND	0/4	2/4	6.8 X 10 ⁻⁶
		(H11,H12)			
No.9-No.15	ND	0/4	0/4	0/4	<6.8 X 10 ⁻⁷

a) 分割照射 (1.61Gy X 4) 後、28日目のB10.Thy 1.1マウスの胸腺細胞を抗TL-2抗体で染色し、個々(A-H)の胸腺細胞のTL-2陽性細胞 (10²-10⁵) を、宿主B10.Thy1.2マウス (F*-H*を胸腺内移植した時は、宿主は照射せず、A-Eを移植した時は、宿主は3.78Gy照射した) の胸腺内に移植し、3-4ヶ月後、リンパ腫が発生した個体について、供与者由来かどうかを抗Thy 1.1と抗Thy 1.2抗体で検定した。A1-A7,H11,H12は、供与者由来T細胞リンパ腫細胞。
b) 供与者由来T細胞リンパ腫の頻度。
c) ND; not determined.

2. 照射個体の TL-2 陽性胸腺細胞中の前リンパ腫細胞の頻度

これまでの結果から、照射個体の TL-2 陽性胸腺の中に前リンパ腫細胞が含まれていることが明らかになってきたが、次に問題となるのは TL-2 陽性細胞すべてが、がん化のイニシエーションを生じているのかどうかということである。この問題を解析するために個体別に、照射後 28 日目の B10.Thy 1.1 マウスの胸腺細胞を抗 TL-2 抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析して TL-2 陽性細胞の割合を算定した。この TL-2 陽性細胞を限界希釈して、宿主の胸腺に移植して、供与者由来 T 細胞リンパ腫の発生頻度を調べることににより、TL-2 陽性細胞中の前リンパ腫細胞の頻度を分析した (表2)。この結果 A-H の 8 個体では、TL-2 陽性細胞中に 1 / 10⁴ ~ 1 / 10⁵ の頻度で、前リンパ腫細胞が含まれていることがわかった。一方 No. 9 ~ No. 15 では、前リンパ腫細胞は非常に頻度が低いか、あるいはほとんど含まれていないことが示された。このことは、すべての TL-2 陽性細胞は、がん化のイニシエーションを起こしているのではなく、TL-2 陽性細胞の中から頻度の低い確率で、何らかのがん化への変化が生じて前リンパ腫細胞になることを示している¹⁴⁻¹⁵⁾。

3. 前リンパ腫細胞のクローナリティ

次に発がんの機構を考える上で重要な点は、このようながん化のイニシエーションの生じる細胞は、1つの細胞から由来するのか、またはいくつかの細胞にがん化のイニシエーションが生じ、悪性化の段階で選択が働いて単クローンとなるのかという点である。

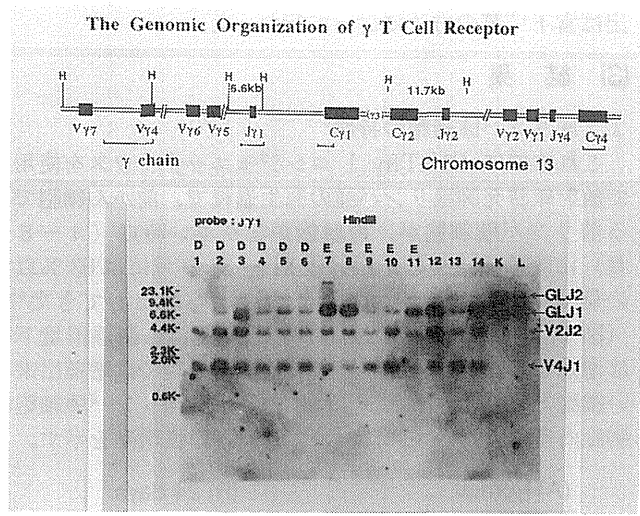


図4、 γ T 細胞リセプターの遺伝子構成と D, E 群リンパ腫 DNA のサーザンブロット解析。Hind III制限酵素で消化した D 群 (D1-D6) と E 群 (E7-E11) の DNA を電気泳動し、J_{r1}プローブでサーザンブロット解析を行なった。

このために 15 個体について、分割照射 (1.61Gy X 4) 後、個体別に、28 日目の B10.Thy 1.1 マウスの胸腺細胞を、抗 TL-2 抗体で染色し、個々の照射個体 A-H の胸腺細胞の TL-2 陽性細胞 (10²-10⁵) を、宿主 B10.Thy 1.2 マウスの胸腺内に移植し、3-4 ヶ月後、リンパ腫が発生した個体について、供与者由来かどうかを抗 Thy 1.1 と抗 Thy 1.2 抗体で検定した。この内 8 個体からの細胞から供与者由来の T 細胞リンパ腫が 36 例生じた。そこでこれらのリンパ腫から DNA を抽出分離し、DNA を種々の制限酵素で消化し、種々の T 細胞リセプターの probe を使用して、Southern 法で解析した。図4は、D および E マウス由来リンパ腫について、DNA を Hind III で消化後、J_{r1} を probe にして、サーザン法で解析したものである。J_{r1}

		No. of Frame Clones	
Germline V γ 4	TACTGTTCCTACGGCTAAAG cacagca.....		
sequences Jy1cactgtg ATAGCTCAGGT		
D1	-----TT-----	+	3
D2	-----CCACTA-----	-	3
D3	-----GGAT-----	-	3
D4	-----TT-----	+	4
D5	-----TT-----	+	3
D6	-----TT-----	+	1
Germline V γ 2	TACTGTGCAGTCTGGATGAG 7mer.....		
sequences Jy27mer ATAGCTCGGGCTT		
D1	-----GAT-----	-	3
D2	-----T-----	-	3
D3	-----G-----	+	4
D3	-----GT-----	-	2
D4	-----GAT-----	-	1
D5	-----GAT-----	-	3
D6	-----GAT-----	-	3

図5、D1-D6 T 細胞リンパ腫の V_{r4}-J_{r1}および V_{r2}-J_{r2}結合部位の DNA 塩基配列。

を probe にした場合、J_{r1}と J_{r2}ホモロジーが存在するため、Germ line バンドとしては 6.6kb と 11.7kb の 2 本が生じる。K は Kidney DNA であり、L は Liver DNA である。V_{r4}と J_{r1}あるいは V_{r2}と J_{r2}が遺伝子再配列を生じると、それぞれ 1.4kb と 3.6kb のバンドが生じる。同様の解析を他のリンパ腫について解析すると、すべて V_{r4} J

γ_1 の遺伝子が遺伝子再配列を生じていることがわかった。クローナリティについて、さらに詳しく調べるために、D 由来の D1-D6 の 6 例の供与者由来 T 細胞リンパ腫について、 r 遺伝子再配列結合領域の DNA シークエンシングを行なった。その結果、V γ_4 J γ_1 や V γ_2 J γ_1 の結合領域では、6 例の内 2 例 (D2, D3) の結合領域の DNA 配列が、他 (D1, D4-D6) の DNA 配列と異なっていた (図 5)。 β 鎖については、D2, D3 と D1, D4-D6 が異なった遺伝子再配列バンドを示していた。 α 遺伝子については、それぞれのリンパ腫から RNA を抽出し、cDNA を合成して、ライブラリーを作り、C α を probe にしてクローニングを行い、DNA 配列を決定した結果、それぞれのクローンは V α と J α の異なった組合わせの配列をしていた¹⁷⁾。以上の結果は、照射後初期において multiple に前リンパ腫細胞が生じるが、それが胸腺環境下で増殖していく過程で、1 つの前がん細胞が選ばれてそれが最終的に malignant T clone となることが示された。他の個体由来 T 細胞リンパ腫についても、J γ_1 を probe にして Southern 法で解析した結果、全てのリンパ腫において、V γ_4 J γ_1 遺伝子再配列が生じていることが示されたので、他のリンパ腫についてのクローナリティを調べるために、V γ_4 と J γ_1 の部分のプライマーを合成し、PCR-SSCP 法で解析し、遺伝子再配列結合部位の DNA 配列の違いを解析した (図 6、図 7)。その結果、A 由来の T 細胞リンパ腫 A1-A7 については同じバンドを示しているの、これらのリンパ腫は、単一細胞由来であることが推定される。また D 由来のリンパ腫については、D1, D4, D5, D6 は同じバンドを示しているの、1 つの細胞由来であることが推測されるが、D2, D3 については他の細胞由来であると推定され、3 ク

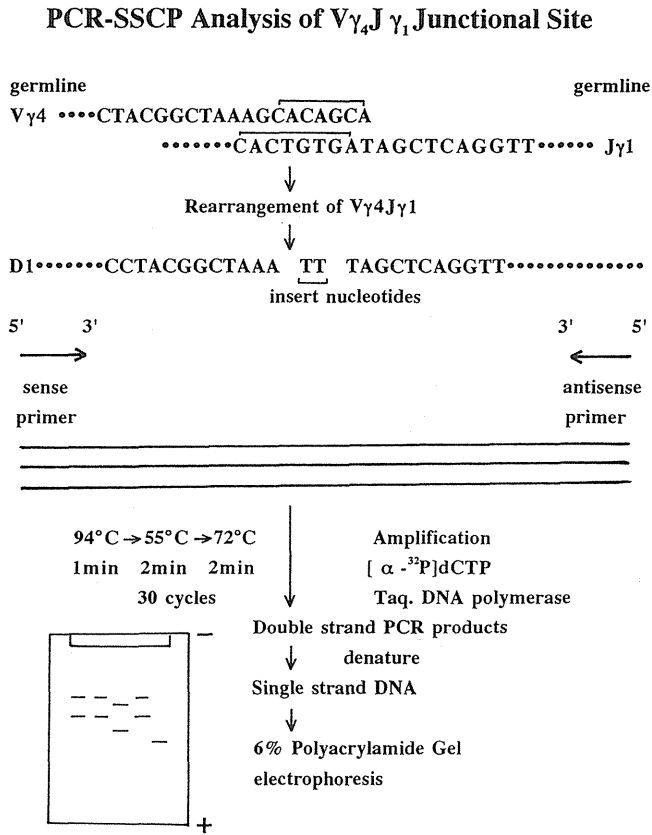


図 6、V γ_4 J γ_1 結合部位の PCR-SSCP 解析の説明図。

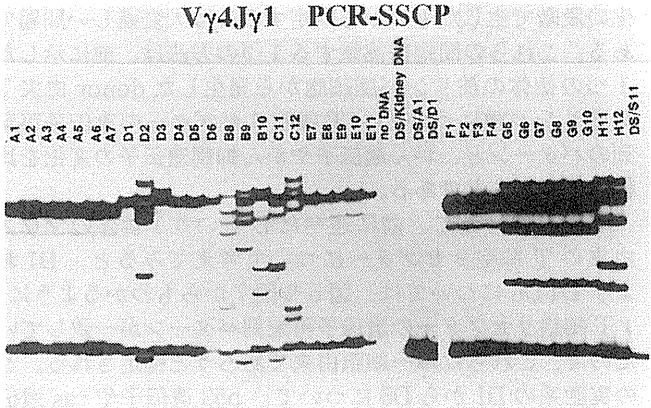


図 7、V γ_4 J γ_1 結合部位の PCR-SSCP 解析の結果。

ローン前リンパ腫細胞が存在していたことが示唆された。この結果は、上記の結合領域の DNA シークエンシングの結果にちょうど対応していることが示された (図 5)。また、E, F, G, H 由来リンパ腫もそれぞれの群で同じバンドパターンを示すので、単一細胞由来であることが示唆される。B, C についてはバンドが異なるので、それぞれ 3 クローン、2 クローン由来であることが示唆される。これらの結果を表 3 に示す。

表 3 Clonal Analysis of the Preliminary Cells by PCR-SSCP

	HindIII (J γ_1 probe)	Clonality of pre-neoplasia
A1	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	monoclonal origin
A2	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
A3	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
A4	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
A5	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
A6	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
A7	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
	(V γ_4 J γ_1)	
D1	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)TT.....	3 clones
D2	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)CCACTA.....	
D3	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)GGAT.....	
D4	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)TT.....	
D5	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)TT.....	
D6	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)TT.....	
B8	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	3 clones
B9	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
B10	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
C11	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	2 clones
C12	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
E7	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	monoclonal origin
E8	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
E9	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
E10	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
E11	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
F1	V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	monoclonal origin
F2	V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
F3	V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
F4	V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
G5	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	monoclonal origin
G6	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
G7	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
G8	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
G9	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
G10	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	
H11	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	monoclonal origin
H12	V γ_2 J γ_2 (3.6kb), V γ_4 J γ_1 (1.4kb)	

4. がん化の過程を解析する実験系の開発

これまでに数多くのがん関連遺伝子やがん抑制遺伝子が分離同定され、機能的な研究や、がん化によるそれらの遺伝子変化の研究が多くなされて来ている。しかしながら、これらの変化が、がん化の初期に生じたものか、後期の悪性

化の段階で生じたものかを同定するのは大変難しい問題である。これらの問題に挑戦する1つの方法は、前に示した1つの個体の前リンパ腫細胞から発生した donor 由来 T 細胞リンパ腫について、T 細胞リセプターの遺伝子再配列のパターンと、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変化を比較解析することである。

1つの例として、前に述べた D という1個体のマウス由来の T 細胞リセプターについて考えてみると、D1 および D4-D6 については、図5や図7からもわかるように、 γ T 細胞リセプターの遺伝子再配列パターンが一致していたので、これらは単一細胞由来であろうと推定される。この実験系の D1 から D6 について、p53 遺伝子や ras 遺伝子の変化および染色体の変化を調べた時に、もしそのがん化による変化が共通にあれば、がん化の初期に生じたものと推定されるし、D1, D4-D6 のリンパ腫で共通で、D2 や D3 では異なっていれば、その変化は γ T 細胞リセプター遺伝子再配列が生じた時期とかなり近い時期に生じた変化であると推定出来る。また D1-D6 の間で、その変化がそれぞれ異なっていた場合は、がん化の後期で生じたものであると推定出来る。

5. ras がん遺伝子および p53 がん抑制遺伝子変異の解析

最近がんの発生・進展の過程が遺伝子レベルで解明されつつあり、細胞の増殖・がん化に対して、促進的に働くがん遺伝子と抑制的に働くがん抑制遺伝子の異常が複雑に重なりあって、がん細胞の性状を規定していることがわかってきた。

例えば Ras 蛋白質は、細胞膜の内側に存在していて、GTP を GDP へと加水分解する活性を持っていることが示され、ras がん遺伝子の codon 12 と codon 61 に突然変異が生じると、これにより変異した Ras 蛋白質は、この活性が非常に弱くなっていて、GTP が結合した状態のままになっていることが見いだされた。Ras 蛋白質は、増殖因子のシグナル伝達に関与していると考えられていて、この GTP が結合したままの Ras 蛋白質の存在により、細胞を分裂に進ませ、がん化させると考えられている。

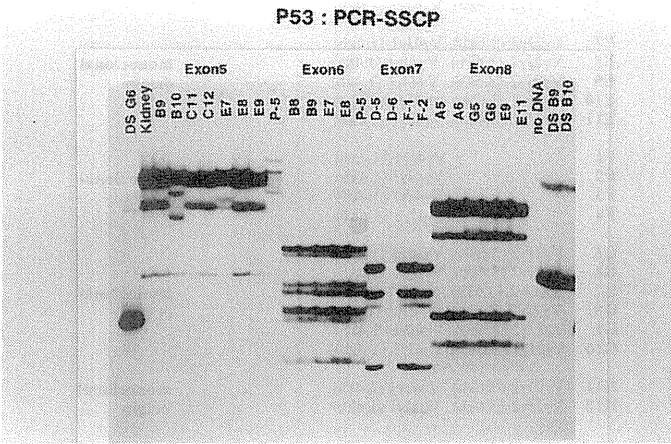


図8、p53 の Exon 5 - Exon 8 についての PCR-SSCP の代表的解析例。

p53 は細胞分裂の S 期へ入る直前の G1 期後期で、複製開始が起きないように抑制する働きをしていると考えられ

ていて、この遺伝子に変異が生じることにより、細胞のがん化が生じると考えられている。また p53 がん抑制遺伝子は、細胞周期やがん化にともなう遺伝子不安定性とも関係していることが最近解明されつつあり、がん化に関係する遺伝子として、p53 は大変重要な遺伝子の内の1つである。

そこで今回は上記に述べた実験系で、がん化にともなって、ras がん遺伝子の codon 12 と codon 61 付近の DNA 配列に突然変異が生じているかどうか、H-ras, N-ras, K-ras について、primer を合成し、PCR-SSCP 法で分析した。その結果、K-ras や H-ras については、はっきりした突然変異は見いだされなかった。いくつかのリンパ腫で欠失が見いだされたが、これについては、現在さらに詳しい解析を行っており、また N-ras についても現在解析中である。これらの結果から、ras については、それぞれの群で共通の突然変異は見いだされなかった。

表4 PCR-SSCP Analysis of p53 gene

Irradiated individual B10.Thy 1.1 mice (28 days after FX)	Donor type lymphomas (Thy 1.1 type)	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Exon 9
A	A1					
	A2					
	A3					
	A4					
	A5					
	A6					
	A7					
B	B8					
	B9					
	B10	+				
C	C11					
	C12					
D	D1					
	D2					
	D3					
	D4					
	D5					
	D6			+		
E	E7	+				
	E8					
	E9					
	E10					
	E11					
F	F1					
	F2					
	F3					
	F4					
G	G5				+	
	G6					
	G7					
	G8					
	G9					
	G10					

また p53 については、Exon 4 から Exon 9 までについて、各 Exon の両端において適当な primer を合成し、PCR-SSCP 法で、上記の実験系の donor 由来 T 細胞リンパ腫について変異が生じているかどうか解析した。図8は、その代表的な例を示したものであるが、Exon 5 では、B10 や E7 に突然変異が見いだされた。P-5 は Exon 5 に突然変異が存在することが知られているマウスのがん細胞の positive control である。表4は donor 由来 T 細胞リンパ腫について、PCR-SSCP で分析した結果をまとめたものである。この結果は p53 の突然変異は稀にしか生ぜず、一つの群の中で、共通に生じるような突然変異は生じていないことが示された。このことから、これらの

p53 の突然変異は、発がん過程の後期で生じたものでありと推定される。

6. 染色体異常の解析

白血病における染色体異常は、染色体の数の異常（トリソミー、モノソミー）と構造的異常（転座、切断、逆位、挿入など）の二つのタイプがある。染色体数の異常は遺伝子の量的恒常状態を乱し、また染色体の決失は他方のアレルの何らかの原因による不活性化に伴って、がん化に寄与すると考えられている。一方、染色体転座は染色体転座部位にある遺伝子の構造変化を引き起こし、新しいキメラ遺伝子を形成し、細胞増殖の促進へと作用したり、転座部位近傍にある遺伝子の異常発現に関与したりしている。

ここでは上記実験で得られた donor 由来 T 細胞リンパ腫について、PMA と Ionomycin で培養して、染色体異常を解析した。その結果、大変興味のあることであるが、各グループの donor 由来 T 細胞リンパ腫の T 細胞リセプターの分析から、前リンパ腫細胞のクローナリティを解析した結果と対応して、共通の染色体異常が観察されることが示された。

(a) A 群の A1-A7 については、第 15 番目染色体のトリソミーが、共通の染色体異常として、観察された。

(b) D 群の D1, D3, D4-D6 は、染色体 11 番目の A 領域と染色体 12 番目の E 領域との間に、共通の転座が生じており、その転座の頻度は 68 % であった。また D6 リンパ腫の 52 % は tetraploid であった。D2 は染色体 12 番目の E 領域と他の同定出来ない染色体との間の転座が生じていることが示された。 γ T 細胞リセプターの遺伝子再配列の分析では、D3 と D1, D4-D6 は異なっ

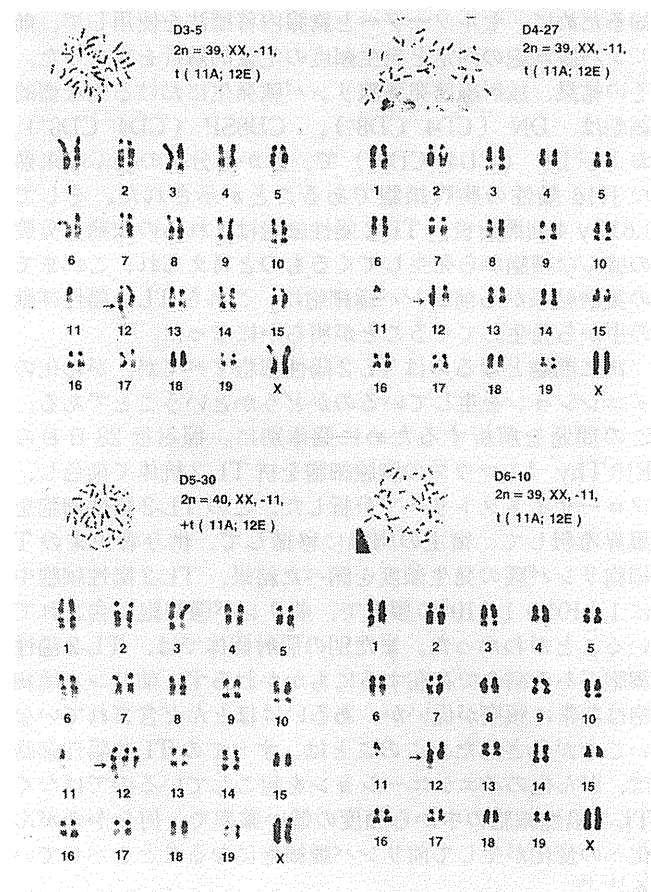


図 9、D3-D6 T 細胞リンパ腫の染色体異常の分析。

いたが、上記のような共通の染色体異常が存在していた。

この結果は、D1, D3, D4-D6 に生じた染色体 11A と 12E の転座は、 γ T 細胞リセプターの遺伝子再配列の少し前の時期で生じたことを示唆している（図 9）。

(c) E 群の E7-E10 は、染色体 12 番目の F 領域と染色体 15 番目の A 領域との間の共通の転座が観察された。この染色体異常の頻度は 88 % であった。しかし染色体の数は、このグループでは一様でなく、E7 のほとんどは tetraploid (64 %) である。E8 と E10 は、diploid と triploid の間の aneuploid であった (47-53 chromosomes)。E11 には、上記の染色体異常は見いだされず、正常核型を示していた。

(d) F 群の F1-F4 では、染色体 7 番目の F 領域と染色体 10 番目の C 領域との間に、共通の転座が存在し、また第 15 番染色体トリソミーと X 染色体モノソミーの共通の染色体異常が存在していた。これらの染色体異常の頻度は 82 % 位であった（図 10）。

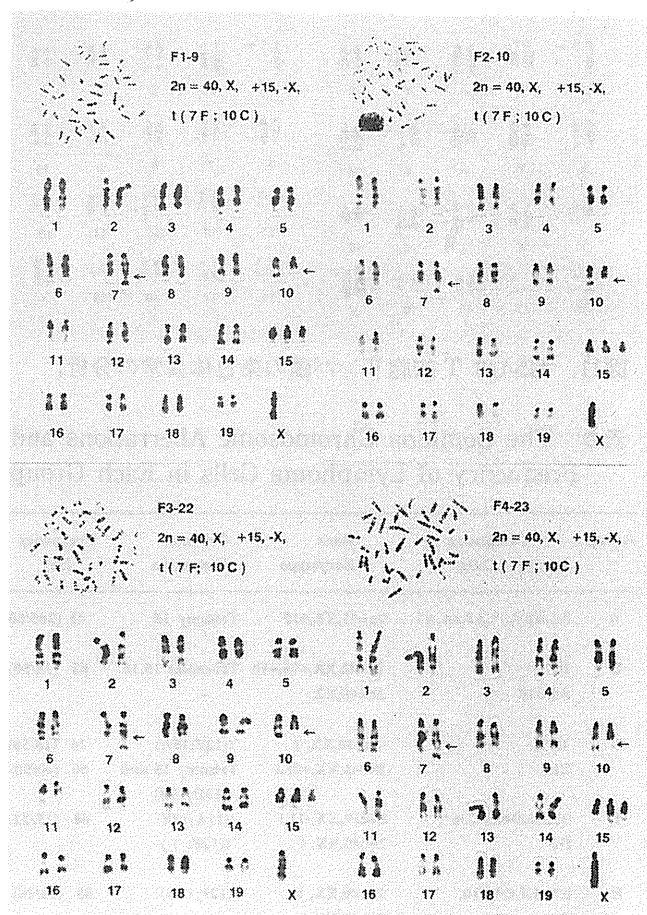


図 10、F1-F4 T 細胞リンパ腫の染色体異常の分析。

(e) G 群の G5-G10 は、染色体 1 番目の A 領域と染色体 13 番目の D 領域との間の共通の転座が認められ、その転座の頻度は 79 % であった（図 11）。

(f) H 群の H11, H12 は、染色体 6 番目の A 領域と X 染色体の B 領域の転座が共通に認められた。その転座の頻度は 87 % であった。

(g) B 群 (B8-B10) と C 群 (C11, C12) のリンパ腫については、それぞれ異なった染色体の核型を示し、共通な染色体異常は認められなかった。 γ T 細胞リセプターの V γ 4J γ 1 遺伝子再配列の結合部位の PCR-SSCP 法に

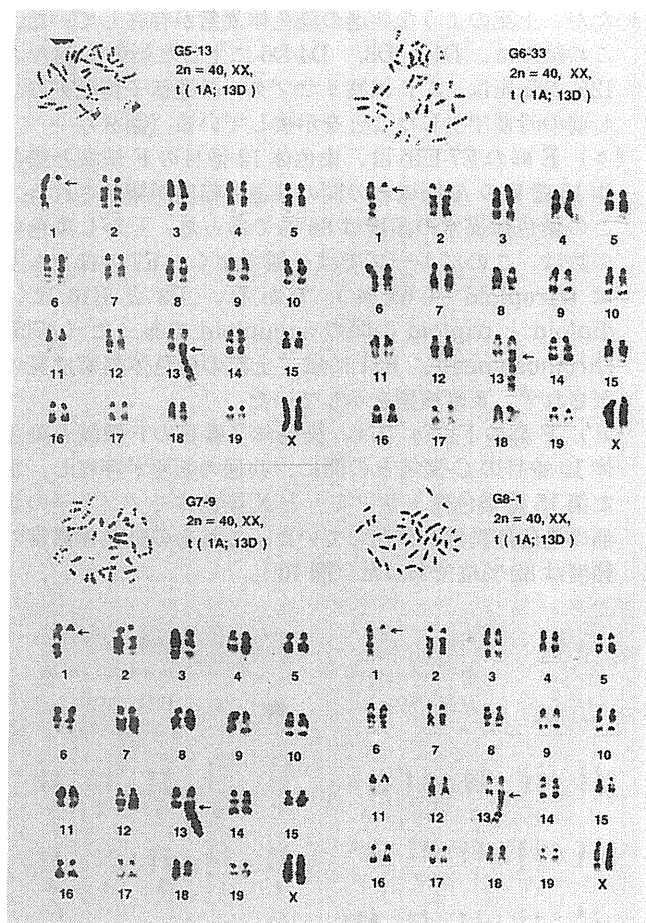


図11、G5-G8 T細胞リンパ腫の染色体異常の分析。

表5 The Common Chromosome Aberrations and Frequency of Lymphoma Cells in Each Group

Group	Lymphoma Cells	Basic Karyotype	Common Aberration	Frequency (%)
A	A1,A2,A3*,A5,A6,A7	2n=41,XX,+15	Trisomy 15	41 (245/600)
B	B9, B8,B10	2n=42,XX,+15,+18 2n=40,XX	Trisomies 15,18 -	68 (34/50)
C	C11, C12	2n=40,XX, t 2n=41,XX,+15,t	t(12F;15A) Trisomy 15 and t(13D;15B)	36 (18/50) 80 (40/50)
D	D1,D3,D4,D5,D6*, D2	2n=39,XX,-11,t 2n=40,XX, t	t(11A;12E) t(12E; ?)	68 (15/22)
E	E7*,E8,E9,E10, E11	2n=40,XX, t 2n=40,XX	t(12F;15A) -	88 (14/16)
F	F1,F2,F3,F4	2n=40,X, +15,-X,t	Trisomy15, Monosomy X, t(7F;10C)	82 (14/17)
G	G5,G6,G7,G8,G9,G10	2n=40,XX,t	t(1A;13D)	79 (237/300)
H	H11,H12	2n=40,XX,t	t(6A;XB)	87 (7/8)

*most of cells are tetraploids.

() aberration cells / total cells

よる解析では、これらそれぞれのリンパ腫で異なったバンドを示し、それぞれ異なった前リンパ腫細胞由来であることが示唆されているので、それぞれのリンパ腫が異

なった核型を示すことと対応していると考えられる。例えば B9 では、染色体 15 番目と 18 番目にトリソミーが 68 % 認められるが、B8 や B10 では認められない。また C11 では、染色体 12 番目の E 領域と 15 番目の A 領域に転座が生じていて、その頻度は 36 % であった。一方 C12 は染色体 13 番目の D 領域と 15 番目の B 領域との間で約 80 % に転座が認められ、また、15 番トリソミーが観察された。

これらの結果をまとめたのが表5である。これらの結果から、放射線誘発胸腺リンパ腫の場合、 γ T 細胞リセプターの遺伝子再配列の生じる前後の比較的初期において、ある特定の転座をも含めた染色体異常が生じることを示唆している。

(4) 考察

放射線によって誘発されるがんの場合、放射線は、ある特定の標的細胞が、直接的あるいは間接的に不可逆的な損傷を受ける initiator として作用していると考えられている。そしてその結果として、標的遺伝子に、特定の変異が生じることが、がん化の initiating events であることは、一般に認められていることである。しかしながら放射線によって、どのような標的遺伝子に、どのようなメカニズムで変異を生じさせるのかは、まだ解明されていない。

これまで我々は B10 系マウスを使用して、放射線によって高率に胸腺に T 細胞リンパ腫が生じる系を使用して、放射線によって生じる初期の細胞レベルでの変化や前がん細胞である前リンパ腫細胞の発生动態の解析を行なってきた。

本論文においては、より詳細に前リンパ腫細胞の特性を知るために、セルソーターと胸腺内移植法を使用して、前リンパ腫細胞の同定と発生頻度の定量的解析を行なった。その結果、放射線誘発胸腺リンパ腫発生における主な標的細胞は、DN ($CD4^-CD8^-$), $CD8SP$ ($CD4^-CD8^+$), および DP ($CD4^+CD8^+$) で、しかも分裂の盛んな未熟な J11d 陽性の胸腺細胞であることが示された。そして 1.61Gy 4 回照射後、TL-2 陽性細胞はこれらの未熟な分裂の盛んな細胞から発生してくるものと考えられ、これまでの実験結果から前リンパ腫細胞は、これら TL-2 陽性細胞の中から発生してくることが明らかになった。

次に問題となるのは TL-2 陽性細胞すべてが、がん化のイニシエーションを生じているのかどうかということである。この問題を解析するために個体別に、照射後 28 日目の B10.Thy 1.1 マウスの胸腺細胞を抗 TL-2 抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析した。この TL-2 陽性細胞を限界希釈して、宿主の胸腺に移植して、供与者由来の T 細胞リンパ腫の発生頻度を調べた結果、TL-2 陽性細胞中に $1/10^4 \sim 1/10^5$ の頻度で、前リンパ腫細胞が含まれていることがわかった。また別の照射個体では、TL-2 陽性細胞がある割合で存在するにもかかわらず、前リンパ腫細胞は非常に頻度が低いか、あるいはほとんど含まれていないことが示された。このことは、すべての TL-2 陽性細胞は、がん化のイニシエーションを起こしているのではなく、TL-2 陽性細胞の中から頻度の低い確率で、何らかのがん化への変化が生じて前リンパ腫細胞になることを示している¹⁴⁻¹⁶⁾。

次に発がんの機構を考える上で重要な点は、このような

がん化のイニシエーションの生じる細胞は、1つの細胞から由来するのか、またいくつかの細胞にがん化のイニシエーションが生じ、悪性化の段階で selection が働いて単一クローンとなるのかという点である。このために分割照射 (1.61Gy × 4) 後、個体別に、28日目の B10.Thy 1.1 マウスの胸腺細胞を、抗 TL-2 抗体で染色し、照射個体の胸腺細胞の TL-2 陽性細胞 (10^2 - 10^5) を、宿主 B10.Thy 1.2 マウスの胸腺内に移植し、3-4 ヶ月後、リンパ腫が発生した個体について、供与者由来かどうかを抗 Thy 1.1 と抗 Thy 1.2 抗体で検定した。この内8個体 (A-H) からの細胞から、供与者由来の T 細胞リンパ腫が 36 例生じた。そこでこれらのリンパ腫から DNA を抽出分離し、DNA を種々の制限酵素で消化し、種々の T 細胞リセプターの probe を使用して、southern 法で解析した。クローナリティについて、さらに詳しく調べるために、D 由来の D1-D6 の6例の供与者由来 T 細胞リンパ腫について、*r* 遺伝子再配列結合領域の DNA シークエンシングを行なった。その結果、*V_{r4}J_{r1}* や *V_{r2}J_{r2}* の結合領域では、6例の内2例 (D2, D3) の結合領域の DNA 配列が、他 (D1, D4-D6) の DNA 配列と異なっていた (図5)。他の個体由来 T 細胞リンパ腫についても、クローナリティを調べるために、*V_{r4}* と *J_{r4}* と *J_{r1}* の部分のプライマーを合成し、PCR-SSCP 法で解析し、遺伝子再配列結合部位の DNA 配列の違いを解析した (図7, 表3)。その結果、A 由来の T 細胞リンパ腫 A1-A7 については同じバンドを示しているの、これらのリンパ腫は、単一細胞由来であることが推定される。また、E, F, G, H 由来リンパ腫もそれぞれの群で同じバンドパターンを示すので、単一細胞由来であることが示唆された。B, C についてはバンドが異なるので、それぞれ3クローン、2クローン由来であることが示唆された。

この実験系を使用して、T 細胞リセプターの遺伝子再配列の分析と種々のがん化にともなう変化とを比較することにより、発がん過程においてそれらの変化が生じた時期を推定する方法を考え、*ras* がん遺伝子の突然変異や *p53* がん抑制遺伝子の変異、および染色体異常の生じる時期について解析した。その結果、*ras* については、それぞれの群で共通の突然変異は見いだされなかった。また *p53* については、Exon 4 から Exon 9 までについて、各 Exon の両端において適当な primer を合成し、PCR-SSCP 法で、上記の実験系の donor 由来の T 細胞リンパ腫について変異が生じているかどうか解析した。Exon 5 では、B10 や E7 に突然変異が見いだされ、また D6 は Exon 7 に、G 5 は Exon 8 に突然変異が見いだされた。この結果は *p53* の突然変異は稀にしか生ぜず、一つの群の中で、共通に生じるような突然変異は生じていないことが示された。このことから、これらの *p53* の突然変異は、発がん過程の後期で生じたものであろうと推定される。

一方、染色体異常については、これらリンパ腫において、数の異常や転座をも含めた染色体異常が頻度高く見いだされた。さらに大変重要なことは、各照射個体由来 T 細胞リンパ腫の T 細胞リセプターの分析から、前リンパ腫細胞のクローナリティを解析した結果と対応して、共通の染色体異常が観察されることが示された。例えば、A 由来のリンパ腫 A1-A7 については、第15番目染色体のトリソミーが、共通の染色体異常として、観察された。また D 由

来のリンパ腫 D1, D3, D4, D6 は、染色体11番目のA領域と染色体12番目のE領域との間に、共通の転座が生じており、その転座の頻度は68%であった。D2は染色体12番目のE領域と他の同定出来ない染色体との間の転座が生じていることが示された。*rT* 細胞リセプターの遺伝子再配列の分析では、D3とD1, D4, D6は異なっていたが、上記のような共通の染色体異常が存在していた。この結果は、D1, D3, D4, D6に生じた染色体11Aと12Eの転座は、*rT* 細胞リセプターの遺伝子再配列の少し前の時期で生じたことを示唆している。E由来のリンパ腫 E7-E10は、染色体12番目のF領域と染色体15番目のA領域との間の共通の転座が観察された。さらにF由来のリンパ腫 F1-F4では、染色体7番目のF領域と染色体10番目のC領域との間に、共通の転座が存在し、また第15番染色体トリソミーとX染色体モノソミーの共通の染色体異常が存在していた。またG由来のリンパ腫 G5 - G10は、染色体1番目のA領域と染色体13番目のD領域との間の共通の転座が認められ、その転座の頻度は79%であった。H由来のリンパ腫 H11, H12についても、染色体6番目のA領域とX染色体のB領域の転座が共通に認められた。その転座の頻度は87%であった。

これらの結果は、放射線誘発胸腺リンパ腫の場合、前リンパ腫細胞の生じる時期で、*r* T 細胞リセプターの遺伝子再配列の生じる前後の比較的初期において、ある特定の転座をも含めた染色体異常が生じることを示唆している。以上の結果を考え合わせると、放射線誘発胸腺リンパ腫の場合、転座をも含めた染色体異常が、initiating events として位置づけられ、*p53* や *ras* の突然変異は promotion あるいは progression の段階で生じたものであろうと推定される。

一般的に考えられている放射線発がんの機構では、1本の放射線の飛跡が、最初のがん化を生じさせる突然変異の原因となる標的DNAに交差する相対的確率を考えて、この値が大きい場合の変異が、発がんの初期過程に寄与していると考えられている。もしこのような考え方が正しいとすると、*ras* oncogene の mutation は、大きな遺伝子の中の codon 12 や codon 61 のみの変異によって活性化されるので、その mutation の確率は大変小さいと考えられる。また、*abl*, *bcl-2*, *c-myc* のようながん遺伝子と相対的に特異的活性化している遺伝子との間の転座によるものでも、これも2つの特異的 site を考えねばならぬので、それによって生じる確率は減少し、小さいと考えられる。これに対して、*p53* や *Rb* 等のがん抑制遺伝子は点突然変異、小さな欠失や大きな欠失によって、がん化に寄与していると考えられ、標的サイズの大きさから考えると、100倍位確率としては、大きくなると考えられ、がん抑制遺伝子の突然変異は、放射線発がんにおける initiating events として重要な寄与をしていることになる。

しかし我々の結果は、これとは矛盾する結果を得ているが、これらの点に関してどのように考えたら良いのだろうか。これに関していくつかの問題点をあげてみると、1つは、放射線によって引き起こされる細胞の反応と、その結果誘発される遺伝的不安定性の問題で、これに関しては、我々も実験事実を持っている。すなわち胸腺摘出し、照射したマウスに、照射していない新生児胸腺を胸部皮下に移植することにより、照射していない胸腺由来の T 細胞リ

ンパ腫が生じ、しかも染色体異常が観察されたことである²⁾。また最近注目されていることであるが、DNA 配列や構造が、放射線誘発突然変異や発がんに与える影響（たとえば Telomere-like DNA 配列が放射線誘発染色体損傷や、骨髄性白血病の発生に重要な関係があるとか、レトロウイルス様 DNA 配列やトランスポゾンのような DNA 配列が放射線によって活性化され、DNA 中に挿入されたりすること）である。このような現象は、低線量でも生じる可能性があり、DNA に直接交差して突然変異が生じることと比べて、どの程度遺伝的变化に寄与しているか解析していく必要があると思われる。

今後は上記の実験系で得られたリンパ腫について、共通に生じている染色体転座について、パルス電気泳動や分子生物学的手法を使用して、転座部位の同定や DNA 配列の解析を行なうとともに、p53 突然変異や発現について、さらに詳しい解析を行ない、さらに他のがん遺伝子やがん抑制遺伝子についても、解析を行なって行きたい。

5. 謝辞

ここに述べた研究は、Mrs. Chen Ying(中国輻射防護研究院)、山岸秀夫博士(京大、理)、清水建之博士(京大、理)との共同研究である。胸腺リンパ腫に関する我々の研究は、動植物管理課の協力のもとに放医研で育成、生産された B10.Thy 1 コンジェニックマウスを使用して行なったものである。本稿執筆の機会に、関係者の方々に心から謝意を表したい。

[研究発表]

- 1) Muto, M., Sado, T., Hayata, I., Nagasawa, F., Kamisaku, H., and Kubo, E. (1983) Reconfirmation of indirect induction of radiogenic lymphomas using thymectomized, irradiated B10 mice grafted with neonatal thymuses from Thy 1 congenic donors. *Cancer Res.* 43: 3822-3827.
- 2) Sado, T., H. Kamisaku and E. Kubo (1991) Bone marrow-thymus interactions during thymic lymphomagenesis induced by fractionated exposure in B10 mice: Analysis using bone marrow transplantation between Thy 1 congenic mice. *J. Radiat. Res.* 32, Suppl. 2, 168-180.
- 3) Sado, T. (1992) Experimental radiation carcinogenesis studies at NIRS. In, *Proceedings of the International Conference on Radiation Effects and Protection*, March 18-20, p36-42.
- 4) Muto, M., Kubo, E., and Sado, T. Cellular events during radiation-induced thymic leukemogenesis in mice: Abnormal T cell differentiation in the thymus and defect of thymocyte precursors in the bone marrow after split-dose irradiation. *J. Immunol.* 134, 2026-2031, 1985.
- 5) Boniver, J., Decleve, A., Lieberman, M., Honsik, C., Travis, M. and Kaplan, H. S. (1981) Marrow-thymus interactions during radiation leukemogenesis in C57BL / Ka mice. *Cancer Res.* 41: 390-392.
- 6) M. Muto, E. Kubo and T. Sado. (1987)

Development of prelymphoma cells committed to thymic lymphomas during radiation-induced thymic lymphomagenesis in B10 mice. *Cancer Res.* 47: 3469-3472.

- 7) 武藤正弘、久保えい子、佐渡敏彦 (1988) 放射線誘発胸腺リンパ腫の研究、放射線科学、Vol. 31, No. 6, 178-186.
- 8) M. Muto, E. Kubo, H. Kamisaku and T. Sado. (1990) Phenotypic characterization of thymic prelymphoma cells of B10 mice treated with split-dose irradiation. *J. Immunol.* 144, 849-853.
- 9) Crispe, I. N. and Bevan, M. J. (1987) Expression and functional significance of the J11d marker on mouse thymocytes. *J. Immunol.* 138: 2013-2018.
- 10) Dialynas, D. P., Quan, Z. S., Wall, K. A., Pierres, A., Quintans, J., Loken, M. R. Pierres, M., and Fitch, F. W. (1983). Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK1.5: similarity of L3T4 to the human Leu-3 / T4 molecule. *J. Immunol.* 131: 2445-2451.
- 11) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. In: Cold Spring Harbor Laboratory Press., p324-389.
- 12) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: p487.
- 13) 宮下信泉、鈴木恭子、栗原端之、森脇和郎、マウス免疫遺伝学—技法と展開、森脇和郎、D. W. Bailey 編、p217、ソフトサイエンス社 (1988)。
- 14) M. Muto, E. Kubo, T. Sado, H. Yamagishi. (1991) Characterization of thymic prelymphoma cells that develop during radiation-induced lymphomagenesis in B10 Mice, *J. Radiat. Res.*, Supplement 2, 156-167.
- 15) M. Muto, E. Kubo, T. Shimizu and H. Yamagishi. (1992) Characterization and clonality of prelymphoma cells of B10 mice treated with fractionated X-irradiation (FX). *Proc. Int. Conf. Radiat. Effects and Protection*, 1992, 198-205.
- 16) E. Kubo, M. Muto, T. Sado, S. Takeshita, T. Shimizu and H. Yamagishi. (1992) Novel TCR gene rearrangements and expression in radiation-induced thymic lymphomas. *J. Radiat. Res.*, 33, 227-242.
- 17) Shimizu, T., Muto, M., Kubo, E., Sado, T. and Yamagishi, H. Multiple pre-neoplastic events and clonal selection of radiation induced mouse thymic lymphomas shown by TCR gene rearrangements. (1993) *Leukemia Research*, 17, No. 11, 959-965.
- 18) M. Muto, Y. Chen, E. Kubo, T. Sado, T. Shimizu and H. Yamagishi. Analysis of Initial Events by

comparing T cell receptor (TCR) rearrangement patterns with oncogenic alterations in radiation-induced lymphomagenesis. In *Molecular mechanisms in radiation mutagenesis and carcinogenesis*. Eds. K. H. Chadwick, R. Cox, H. P. Leenhouts, J. Thacker. 1994. Published by the European Commission. Rue de la Loi 200, B-1049, Brussels. p269-275.

1. 発がんの機構と修飾に関する研究

②放射線誘発白血病リスクの修飾と低減化に関する研究

川瀬淑子、明石真言、能勢正子、鈴木元、赤沼篤夫（障害・臨床研究部）、大津裕司（生理病理研究部）、
青木芳朗（東京大学医学部、放射線健康管理学教室）

Effect of hr-G-CSF on Induction of Myeloid Leukemias by X-Irradiation in Mice

Yoshiko Kawase, Makoto Akashi, Masako Nose, Gen Suzuki, Atsuo Akanuma,
Hiroshi Ohtsu*, and Yoshiro Aoki**.

Division of Radiation Health, *Division of Physiology and Pathology,

**Division of Radiological Health, Faculty of Medicine, University of Tokyo.

Hematopoietic suppression is one of the serious problems induced by whole body irradiation. Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) stimulates the progenitors of granulocytes and accelerates their recovery from bone marrow suppression induced by cytotoxic chemotherapy or radiation. On the other hand, G-CSF stimulates proliferation of myeloid leukemia cells as well as normal granulocytes in vitro. We designed a method to determine if G-CSF affects the incidence of myeloid leukemias induced by irradiation and the types of leukemias induced according to the FAB classification in RFM / MsNrs mice. Administration of G-CSF (2 μ g/day for 7 days) after a single 3 Gy irradiation significantly increased the number of peripheral blood neutrophils as compared with those in control mice. Even after discontinuation of G-CSF, both the total leukocyte and neutrophil counts increased to day 10, and their levels remained elevated until day 14. The incidence of myeloid leukemia in mice exposed to a single 3 Gy irradiation was 18.6% (38/204) and treatment with G-CSF did not increase the incidence [15.7% (32/204)]. In the mice with radiation-induced leukemia, the ones administered G-CSF had a mean survival time of 349 days, while those not given the factor survived for 357 days. There was no significant difference of survivals between the two groups. Most of the radiation-induced leukemias in the two groups were M1 or M2, according to the FAB classification; no characteristic difference was observed among the types of leukemias. Although G-CSF stimulated the leukemia cells in vitro, G-CSF

administration after irradiation did not increase the occurrence of radiation-induced myeloid leukemias. Our results demonstrate that administration of G-CSF effectively accelerates neutrophil recovery from irradiation-induced hematopoietic injury and does not enhance the induction of myeloid leukemia in RFM / MsNrs mice by irradiation.

1. 緒 言

G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor) は血液幹細胞を成熟した顆粒球へと分化させ、また、その増殖を増進させたり機能を増大させることが報告されている。最近その遺伝子がクローニングされ、細胞工学的に産生された G-CSF は、臨床的にも抗癌剤、化学療法剤等による骨髄抑制や骨髄移植、造血能障害に対して、また骨髄移植後に好中球回復を早める効果が報告されている。一方、G-CSF は、正常な顆粒球のみならず、骨髄性白血病細胞の増殖を刺激すること、骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome, preleukemia) 患者への長期連続投与により急性骨髄性白血病 (Acute Myeloblastic Leukemia) へ転化する事も報告されている。

急性放射線障害に対しても、G-CSF は、防護剤として有用であることが指摘されている。しかしながら、放射線により誘発された白血病発生初期過程に対する G-CSF の影響に関する報告はない。我々は、これまでに X 線照射により、骨髄性白血病が高頻度に発生する系 RFM / MsNrs 雄マウスを見出した。この系を用い、照射後 G-CSF を連続投与し、骨髄性白血病の発生頻度とその型、また寿命に及ぼす影響を調べ、急性放射線被曝による骨髄症の治療薬としての安全性を異なった角度から検討した。

2. 実験方法

実験材料と動物

用いた G-CSF は遺伝子組み換えにより産生された human recombinant G-CSF (hrG-CSF, specific activity:10⁸ Unit / mg protein, 0.25mg / ml) で (株) キリンビールにより供与された。マウスは、放医研自繁の RFM / MsNrs マウス (9-13 週齢の雄) を使用し、固形飼料 (MB-1: 船橋農場製)、塩酸水 (pH2. 8-3.0) により清浄 CV 下で終生飼育した。

照射と G-CSF 投与方法

X 線照射は、信愛 3 型 6 号ユニット (島津製作所、200kV、20mA、Filter:0.5mmAl + 0.5mmCu、FSD:56 cm) により、線量率は、60cGy / min で行なった。9-13 週齢の雄マウスは 3Gy X 線全身 1 回照射後、2 μg / shot / day (0.2ml) の G-CSF を、7 日間連続腹腔注射 (i.p.) した。対照として 0.2ml / shot / day の生理的食塩水 (saline) を i.p. 投与したものを用いた。採血は腋窩より行い、照射直後から day14 までの白血球数、絶対好中球数の回復状態を調べた。

白血病の診断

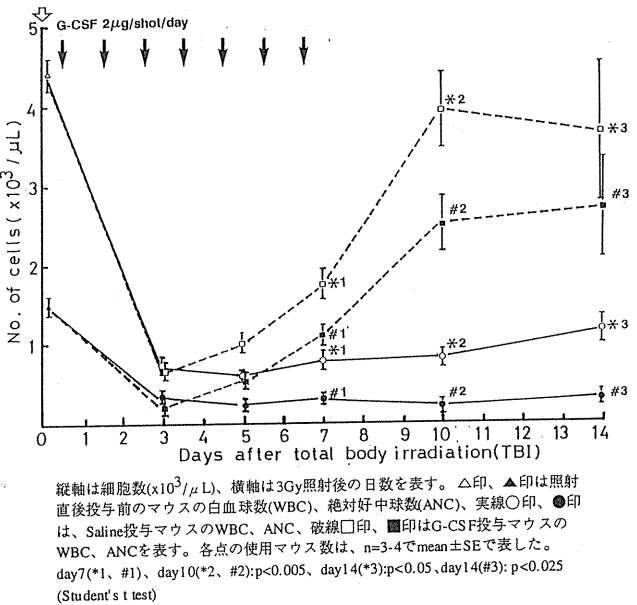
体毛の逆立ち、貧血、脾腫等の白血病特有の兆候が認められたマウスは、頸椎脱臼により屠殺解剖し、病理学的、血液学的検索を行った。診断は、末梢血塗抹標本と大腿骨の骨髓細胞、脾細胞のサイトスピン標本 (Shandon 社製) をライト・ギムザ及びペルオキシダーゼ (P. O.) により染色した。骨髄性白血病と診断したマウスの脾細胞 (1x10⁶個) を同系雌マウスの尾静脈より注入移植し、生着を確認することにより、類白血病反応の除外を行った。

G-CSF の in vitro での白血病細胞の増殖への影響は、移植マウスの脾臓由来の白血病細胞 (1x10⁶個) に G-CSF (100U / ml) を添加後、³H-TdR (37kBq) にて、30 時間パルスラベルし検討した。

3. 結果

(1) G-CSF の照射マウスの白血病の回復に与える影響：

図 1. G-CSF 投与マウスの照射後の白血球数と絶対好中球数の回復動態



無処置マウス RFM / MsNrs 雄マウス (n = 13) の白血球数、絶対好中球数は、各々 3600 ± 320、1400 ± 140 (μL:mean ± SE) であった。図 1 に示した通り、X 線全身 1 回照射直後、G-CSF の、i. p. 前のマウスの白血球数、絶対好中球数は、やや増加した (4370 ± 190、1420 ± 60)。対照マウスでは、照射後、白血球数、絶対好中球数、ともに著明に減少し、day14 で、白血球数にやや回復傾向が認められるものの、絶対好中球数は、依然として低値であった (290 ± 30)。一方、G-CSF 投与マウスはこれとは対照的に day5 で白血球数、絶対好中球数ともに増加傾向を示し、day7 では絶対好中球数は照射直後 (i. p. 前) のマウスの 80 % まで回復し、統計学的に有意差が認められた (Student's t test)。また、G-CSF 投与群では白血球数と絶対好中球数はその後も増加し、day10 では照射前の値より増加した。

(2) G-CSF の照射マウスの寿命に与える影響：

無処置マウス、照射 saline 投与マウス、照射 G-CSF 投与マウスの寿命を検討した。図 2、表 1 に示した通り、無処置マウス (n = 98) の平均寿命は 666 ± 97 日 (days:mean ± SD) (440-1042 日) であった。これに対して照射 saline 投与マウス (n = 204) の平均寿命は 484 ± 144 日 (184-775 日)、照射 G-CSF 投与マウス (n = 204) では 467 ± 161 日 (128-800 日) であった。統計学的には、無処置マウスと照射マウス 2 群の間で有意差が認められたが、照射マウス、即ち G-CSF 投与マウスと saline 投与マウスの間に有意差は認められなかった (generalized Wilcoxon test)。

図 2. 3Gy 照射 RFM / MsNrs マウスの生存曲線

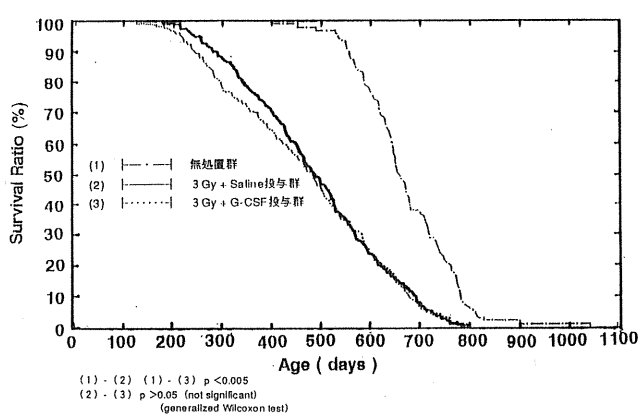


表 1. G-CSF の骨髄性白血病マウスの平均寿命と発生率に与える影響

実験群	マウス数	平均寿命(days:mean±SD)			発生率 (%)
		全マウス	骨髄性白血病マウス		
無処置群	98	666.3 ± 96.9 ⁽¹⁾	-		0 (0)
3Gy + Saline群	204	484.2 ± 143.9 ⁽²⁾ (411.5 ± 142.9)*	430.4 ± 115.2 ⁽⁴⁾ (356.9 ± 115.1)**		38 (18.6) ⁽⁶⁾
3Gy + G-CSF群	204	467.2 ± 160.9 ⁽³⁾ (397.1 ± 161.2)*	419.3 ± 118.2 ⁽⁵⁾ (348.7 ± 118.0)**		32 (15.7) ⁽⁷⁾

(1)-(2), (1)-(3) p<0.005, (2)-(3), (4)-(5)p>0.05(generalized Wilcoxon test).

(6)-(7)p>0.05(χ² test).

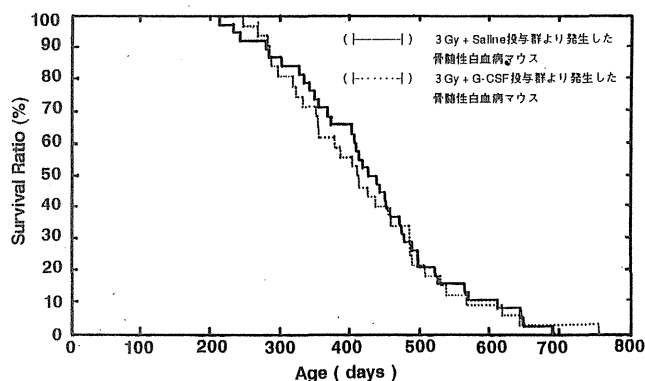
下段()内は照射後の平均生存日数(mean±SD)を表す。

*,**p>0.05(generalized Wilcoxon test).

(3) G-CSF の放射線誘発骨髄性白血病の発生率と白血病マウスの寿命に与える影響：

図3、及び表1に示した通り、無処置マウスでは骨髄性白血病の発生は認められなかったが、その他の造血器腫瘍は77.5% (76例/98) にみられた。その内訳は、胸腺リンパ腫1.9% (2例)、非胸腺リンパ腫75.5% (74例)であった。これに対して、照射 saline 投与マウスでは18.6% (38例/204)、照射 G-CSF 投与マウスでは15.7% (32/204例)の骨髄性白血病の発生が認められたが、2群の間に有意差は認められなかった (χ^2 test)。両群の骨髄性白血病マウスの寿命は、照射 saline 投与マウスでは430 ± 115 日 (212-691 日) (days:mean ± SD)、照射 G-CSF 投与マウスでは419 ± 118 日 (241-753 日)、両群間に有意差はなかった (generalized Wilcoxon test)。

図3. 照射により発生した骨髄性白血病マウスの生存曲線



(4) G-CSF の放射線誘発骨髄性白血病型に与える影響：

照射 saline 投与マウスと照射 G-CSF 投与マウスに発生した骨髄性白血病をヒトの French-American-British (FAB) 分類に準じて分類した (表2)。照射 saline マウスに発生した骨髄性白血病は、M1, 11例、M2, 12例で発生数 (N = 38) の61%を占めた。照射 G-CSF 投与マウスでは、M1, 8例、M2, 15例で発生数 (n = 32) の72%を占めた。両群の白血病で大半を占めた M1, M2 に罹患したマウスの寿命及び寿命範囲は、saline 投与マウスでは、M1 は436 ± 114 日 (days:mean ± SD) (212-649 日)、G-CSF 投与マウスでは、483 ± 154 日、(313-753 日)、saline 投与マウスで M2 は394 ± 101 日 (241-569 日)、G-CSF 投与マウスでは、400 ± 87 日 (277-535 日) であった。両群の M1, M2 をもつマウスの寿命に有意差はなかった (generalized Wilcoxon test)。照射 saline 投与マウスに発生した骨髄異形成症候群と診断したマウスでは、末梢白血球数は約4万あり、骨髄細胞の PO 陽性率は8%であった。両群に発生した4例に末梢白血球数の著明増加 ($12.8-38.4 \times 10^3 / \mu\text{L}$)、巨大脾腫、また塗末標本で各分化段階の細胞が見られることから慢性骨髄性白血病 (Chronic Myeloid Leukemia) と診断した。照射 saline 投与マウスから発生した3例の CML の寿命は446 ± 38 日 (days:mean ± SD) であり、照射 G-CSF 投与マウスから発生した1例の寿命は263 日であった。FAB 分類が急性骨髄性白血病の分類法であることから、その他の項にはその範疇に入らない白血病、即ち

慢性骨髄性白血病様の4例、MDS1例と、生細胞の標本不良による判定不能例及びマウスの死亡により PO 陽性率が調べられず、病理組織学的検索により診断した骨髄性白血病例は、その他に分類した。両群の各々の病型別の白血病の発生率、寿命に有意差はなかった (χ^2 test, generalized Wilcoxon test)。

表2. RFM / MsNrs マウスにおいて放射線により誘導された骨髄性白血病

白血病情型	M1	M2	M3	M4	M5	Others	Total
実験群							
3Gy+Saline群	11 ⁽¹⁾	12 ⁽²⁾	1	1	2	11*	38
3Gy+G-CSF群	8 ⁽¹⁾	15 ⁽²⁾	0	1	1	7**	32

*11例の内訳：骨髄異形成症候群(1)、慢性骨髄性白血病(3)、剖検により病理学的に診断した骨髄性白血病(7)、**7例の内訳：慢性骨髄性白血病(1)、剖検により病理学的に診断した骨髄性白血病(6)
(1), (2) p>0.05, M1+M2 p>0.05 (χ^2 test)

(5) G-CSF の放射線誘発骨髄性白血病細胞の増殖に与える影響：

発生した骨髄性白血病マウスの脾細胞を同系雌マウスに移植し、移植マウスで増殖した白血病細胞を用い、in vitro で G-CSF に対する反応性を³H-TdR の摂取率により調べた (表3)。M1 に分類された2例を除き、いずれも G-CSF により、³H-TdR の取り込みは有意に増加した (Student's t test)。

表3. G-CSF に対する放射線誘発白血病細胞の in vitro 反応

白血病情型	case	³ H-TdR Uptake (mean ± SE cpm)		S.I.	P-Value
		medium	hr-G-CSF		
M1	1	16070 ± 330	25180 ± 340	1.6	p<0.005
	2	39290 ± 840	38170 ± 770	1.0	-
	3	25200 ± 1200	30700 ± 1890	1.2	-
	4	28430 ± 650	50640 ± 2160	1.8	p<0.005
M2	1	1610 ± 220	5540 ± 390	3.4	p<0.005
	2	8180 ± 300	17100 ± 210	2.0	p<0.005
	3	6080 ± 170	12660 ± 640	2.1	p<0.005
	4	85340 ± 3400	100680 ± 1390	1.2	p<0.05
	5	19430 ± 630	72670 ± 1850	3.7	p<0.005
	6	17040 ± 710	46940 ± 1090	2.8	p<0.005
M3	1	22580 ± 600	69040 ± 1410	3.1	p<0.005
CML	1	2370 ± 30	3550 ± 50	1.5	p<0.005
	2	13050 ± 240	203880 ± 2780	15.6	p<0.005
normal control (n=5)		1630 ± 90	2290 ± 110	1.4 ± 0.05	p<0.005

移植マウスの脾臓由来の白血病細胞 1×10^6 個に G-CSF (100U/ml) 添加、³H-TdR (37kBq) で30時間パルスラベルしその増殖を見た。Stimulation Index (S.I.) = ³H-TdR Uptake with G-CSF / ³H-TdR Uptake without G-CSF. 統計分析は Student's t test により行った。

4. 討 論

放射線は生体に様々な障害をもたらす。胸腺リンパ腫、骨髄性白血病、骨肉腫も放射線で誘導される悪性腫瘍のひとつである。骨髄性白血病は RF / Un、CBA / H、及び

SJL / J 系のマウスで放射線により高頻度に発生し、特に雄に高い発生がみられる。これまでに我々は RFM / MsNrs 系マウスでは全身照射により骨髄性白血病が高率に発生することを報告しているが、この系を用い G-CSF の放射線による骨髄性白血病誘導に及ぼす効果を調べた。

放射線による骨髄性白血病誘導には一般に 2-3Gy の照射が最適であると言われており、それ以上の線量では照射により細胞を殺す効果のみが高く、骨髄性白血病誘導を増加させることはない。今回の実験では RFM / MsNrs 系マウスに 3Gy、1 回照射した。これらのマウスでは、この線量により重篤な骨髄抑制が起こり、骨髄性白血病が高頻度に発生した。この照射したマウスに G-CSF を投与後 7 日目には、好中球数はほぼ回復し、その後照射前に比べて 3 倍にも増加した。このことは G-CSF は、骨髄の骨髄前駆細胞に働き造血細胞の回復を効果的に促進することを示している。

放射線によりどのような機序で骨髄性白血病が発生するかはいまだ不明である。マウスでは、2 番目の染色体に deletion / rearrangement がみられる事が放射線による骨髄性白血病の遺伝学的特徴である。一方、Silver らは、この放射線による 2 番目の染色体の deletion / rearrangement は造血幹細胞に誘導されることを報告しており、2 番目の染色体による deletion / rearrangement は放射線による骨髄性白血病の引き金にはなっているが、明らかな白血病を発生させるにはそれだけでは不十分ではないかと報告している。更に in vitro の研究では、造血幹細胞を照射した骨髄ストローマ細胞と培養すると悪性転換するとの報告もあり、放射線により白血病が発生するのは様々な段階が必要である。放射線誘発による骨髄性白血病発生モデルには 2 つの段階が提唱されている。すなわち 2 番目の染色体の deletion / rearrangement などのように、潜在的に白血病細胞になり得る幹細胞を作り出す段階とストローマ細胞の異常のため幹細胞の環境に変化をもたらし段階的效果とがある。最近の報告では、副腎皮質ホルモンを照射直後に投与すると、著しく放射線による骨髄性白血病の発生が増加し、発生までの期間が短縮される、とされている。このことから、骨髄性白血病の発生には、放射線により白血病へのきっかけをつくられた細胞が、腫瘍細胞への形質転換を促進させる第 3 の影響を必要とすることがわかる。

今回、我々は in vitro の系で放射線による骨髄性白血病発生に与える G-CSF の効果を調べた。in vitro で G-CSF は白血病細胞の増殖を刺激したにもかかわらず、照射後の G-CSF 投与は白血病の発生率に影響を及ぼさなかった。また、G-CSF 投与の有無で白血病罹患マウスの生存日数においても有意差は認められなかった。すなわち、G-CSF は少なくとも放射線により白血病発生過程に方向づけられた細胞を悪性転換したり悪性異常クローンの増殖を高めることはなかった。

放射線照射後の骨髄性白血病の発生率の高いマウスの系として SJL / J、CBA / H、RFM / Ms 等があげられる。放射線と副腎皮質ホルモンにより骨髄性白血病の発生が増加する系の SJL / J マウスでは、M-CSF や GM-CSF により骨髄性白血病の発生がさらに上昇することが報告されている。今回の実験では、G-CSF により RFM / MsNrs マウスにおいて放射線による骨髄性白血病の発生の上昇は

見られなかった。このマウスの系統による差に関しては明らかでないが、サイトカインに対する反応は、マウスの系統により変化することがあり、系統差、実験システムでちがった結果を生むこともあり、今後の検討が必要と思われる。

照射マウスにおいては G-CSF 投与、非投与によりマウス間の生存日数に差は認められなかった。3Gy の照射は骨髄性白血病を誘発するには至適線量であるが致死の線量ではない。3Gy 照射により骨髄抑制がおこるが、これは一過性のものであり、2 週間後には G-CSF の投与がなくても十分な回復が認められている。3Gy の照射は好中球減少による死亡に至る程の感染症は余り起こらないのかも知れない。

最後にまとめて、全身照射によりマウスに骨髄性白血病が発生しやすい状態にある時の G-CSF 投与の効果を調べた。G-CSF の致死線量被曝マウスの生存率を高める報告は多数見られる。今回の研究で骨髄性白血病の発生リスクを上げることなく放射線被曝者、放射線による治療患者に安全に G-CSF を投与できる結果を得た。

5. 結 論

以上のことから、以下の結論が得られた。

- (1) RFM / MsNrs マウスで放射線により骨髄性白血病が高頻度に発生する。
- (2) これらの骨髄性白血病では、FAB 分類の M1、M2、が大半を占める。
- (3) G-CSF は、これら骨髄性白血病の発生率とそのタイプ、これらマウスの寿命に影響を与えない。
- (4) G-CSF は、放射線被曝による急性骨髄症候群の治療薬として、安全に投与できる。

(謝辞)

本実験の遂行にあたって優れた実験動物の供給と維持に努力された放医研動植物管理課諸氏、実験動物の飼育補助に献身的な努力を払われた篠原澄子氏に、感謝致します。

(研究発表)

1. Kawase Y, Akashi M, Ohtsu H, Aoki Y, Akanuma A and Suzuki G. :Effect of human recombinant granulocyte colony-stimulating factor on induction of myeloid leukemias by X-irradiation in mice. Blood. 82:2163, 1993.
2. 川瀬淑子、明石真言、鈴木元、能勢正子、青木芳朗、大津裕司、稲盛健：hr-G-CSF の白血病誘発リスクの検討、日本血液学会第 53 回総会口頭発表 1991. 4. (京都)。
3. 川瀬淑子、今井康文、能勢正子、中尾勇：低線量域に於ける放射線誘発骨髄性白血病の潜伏期の差異、日本放射線影響学会第 30 回大会口頭発表 1987. 11. (東京)。

1. 発がんの機構と修飾に関する研究

③胸腺リンホーマ細胞刺激因子 (T L S F) の精製

鈴木元、中田有紀子、鵜沢玲子、能勢正子、川瀬淑子 (障害臨床研究部)
稲盛健* (東大、医、3内)

Purification of Thymic Lymphoma Cell Stimulating Factor (T L S F) from Stroma Cell-Supernatant

Gen Suzuki, Yukiko Nakata, Ken Inamori*, Masako Nose, Akiko Uzawa, and Yoshiko Kawase
Division of Radiation Health,* 3rd Department of Medicine, Faculty of Medicine, Tokyo University

In attempting to establish thymic lymphoma cell lines in vitro from irradiated RFM / Ms mice, we noticed that the thymic lymphoma cells were highly dependent on stroma cells to propagate in vitro. Without stroma cells, the lymphoma cells grew poorly in vitro. The lymphoma cells attached on the surface of stroma cells or crept beneath the stroma cell layer. Supernatant of the stroma cells contained an activity that stimulated the lymphoma cell growth. The activity was susceptible to a trypsin treatment but rather resistant to heat treatment. We tentatively named the activity as a thymic lymphoma cell stimulation factor (T L S F). T L S F activity was not replaced by cytokines such as IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, EGF, acidic FGF and basic FGF. T L S F was purified by serial chromatography using Heparin Sepharose CL4B, Green A agarose, Heparin-5PW HPLC, SP-NPR HPLC and C18-NPR HPLC. Purified T L S F is a monomer of 8 kD species in SDS-PAGE. N-terminal amino acid sequences of T L S F were determined up to the 22nd residue. There are no homologous nor related sequences in the protein data base (SWISS-PROT Rel. 24, NBRF-PDB Rel. 36, 1993, July). Purified T L S F has a growth promoting activity on bone marrow stem cells in conjunction with stem cell factor but not with GM-CSF.

1. 緒言

発癌という過程では、細胞死を抑制するような遺伝子や細胞増殖に関連した遺伝子の変異が重層的に起きていると考えられている。癌細胞に特有な増殖機構が発現する場合もあるが、正常細胞に発現している増殖機構が抑制されずに発現する場合もある。後者の場合には、癌細胞を用いた増殖機構の研究が正常細胞の増殖機構の解明に利用できる。私たちはプライマリーの放射線誘発胸腺リンホーマ細胞が

高度にストローマ細胞依存性に増殖することを観察した。そこでリンホーマ細胞とストローマ細胞の細胞間相互作用を解析する中から、新たな細胞増殖機構の解明を試みた。

2. 新しいサイトカインの精製

3 Gy X線急照射した RFM / Ms マウスは、高率に胸腺リンホーマ細胞を発生する。このリンホーマ細胞を試験管内で培養してみると、胸腺のストローマ細胞と複合体を形成して増殖する。ストローマ細胞を除くと、プライマリーの胸腺リンホーマ細胞は試験管内で維持されない。そこで AKR マウス胎仔胸腺から胸腺ストローマ細胞株を樹立しておいて、このストローマ細胞株とプライマリー胸腺リンホーマ細胞の共培養を行った。こうして複数の RFM / MS 由来の胸腺リンホーマ培養株を樹立した。胸腺リンホーマ細胞のストローマ細胞依存性は、ストローマ細胞との共培養を行うことにより維持される。

胸腺リンホーマ細胞株 TL-9 は、 $CD3^+ 4^- 8^+$ 、 $TCR\alpha\beta^+$ 、 HSA^+ のリンホーマ細胞で、ストローマ細胞培養上清液および IL-4 に反応して増殖する。しかし IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-10, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, aFGF, bFGF 等のサイトカインに反応しない。ストローマ細胞に IL-4 mRNA は検出されないことより、培養上清中の活性は IL-4 以外のものである。また、この活性はトリプシン消化 (1mg / ml トリプシン, 37 °C 30 分) され、熱処理 (56 °C 30 分あるいは 100 °C 2 分) で半減する。そこでこの活性を胸腺リンホーマ細胞刺激因子 (T L S F) と名付け、精製を試みた。

AKR 胎仔胸腺由来のストローマ細胞あるいは胎仔頭冠皮膚由来のストローマ細胞 PA-6 を IL-1 添加無血清培地で培養すると、ストローマ細胞は T L S F を IL-1 の濃度依存性に産生する。T L S F はヘパリンセファロースカラムやグリーン A アガロースカラムおよびレッド A アガロースカラムなどのアフィニティーカラムに吸着する。T L S F の分子量は 10kd 前後であり、ポアサイズ 10kd の半透膜を用いた濃縮操作で濃縮することは出来ない。T L S F は 40 % の飽和硫酸アンモニウム、pH7.5 では塩析されない

が 50 % の飽和硫酸アンモニウムで塩析される。そこで、精製の工程を考案するに当たり、初期の粗精製の段階で物理的な濃縮操作を加えない事、アフィニティーカラムを用いて効率良く精製することにした。その後の精製は HPLC にて行うこととした。

4.6L の PA-6 培養液上清 (1 % FCS、1U / ml rIL-1, ASF301 培地) をベッドボリューム 100 ml のヘパリンセファロース CL4B カラムに通し TLSF を吸着させた。塩濃度が 0.35M、0.7M、1.4M NaCl と異なるトリス HCl, pH7.5 バッファーで順次カラムに吸着した蛋白質を溶出させた。TLSF 活性は 0.7M 溶出分画に回収された。次いで、0.7M 溶出分画をバッファーで希釈し、グリーン A アガロースカラムに通した。カラムに吸着した TLSF を NaCl の塩濃度勾配をかけて溶出した。グリーン A アガロースカラムから回収した TLSF をバッファーで希釈して、ヘパリン 5PW-HPLC カラムに吸着させ、塩濃度勾配により活性分画を回収した。次いで活性分画を希釈後、SP-NPR 強陽イオン交換樹脂 HPLC カラムにかけ、塩濃度勾配により活性分画を回収した。回収したサンプルを C18-NPR 逆相 HPLC カラムにかけ、最終段階の精製を行った。精製 TLSF の分子量は 8KD であった。逆相カラムで再度精製した標品のアミノ末端のアミノ酸配列を 22 番まで決定したところ、TLSF は 1993 年 7 月の段階でデータベースに登録されていない新しいサイトカインであることが判明した。

3. TLSF の生物活性

TLSF は複数の胸腺リンホーマ細胞の増殖を促進させる他、放射線誘発骨髄性白血病細胞の増殖をも促進させる。しかし、成熟型 T 細胞リンホーマ、プレ B 細胞ライン、プレ B 細胞リンホーマ、B 細胞リンホーマ、マクロファージ腫瘍の増殖を促進させなかった。また成熟 T 細胞や胸腺細胞の増殖を誘導しない。しかし、胎齢 14.5 日のマウス胎

仔胸腺細胞を SCF (c-kit リガンド) で刺激して増殖を誘導する際に TLSF を加えると、弱いながら増殖が促進した。次いで骨髄幹細胞に対する影響を調べるために、5 FU 投与 BDF1 マウスの骨髄細胞を TLSF の存在下あるいは非存在下に SCF あるいは GM-CSF とともにメチルセルロースゲルに浮遊させ、コロニーを形成させた。TLSF は単独でコロニー形成能を持たないが、SCF と共に作用させると骨髄幹細胞の分化を促進し、幹細胞のマクロファージ、ミエロモノブラスト、巨核球への分化を促進した。

4. 今後の課題

TLSF の生物活性の全貌を解析するためには、TLSF をコードする cDNA を単離してリコンビナント TLSF を大量に準備する必要がある。TLSF の生物活性を知るためには、TLSF ゲノム遺伝子の染色体での遺伝子座を決定して何等かの遺伝子疾患に関連しているか否かを検討する必要がある。TLSF を中和する抗体を作製し、in vivo 投与して影響を調べたり、TLSF を過剰に発現するトランスジェニックマウスや逆に TLSF を欠損するマウスを作製して生体内の機能を検討する必要がある。

胸腺細胞では消失している TLSF にたいする応答性が胸腺リンホーマ細胞で残っていた事実は、発癌の過程で TLSF 反応性の調節機構が異常になったことを示唆している。TLSF レセプターの発現調節と発癌の関連を研究する必要がある。

研究報告

1. 稲盛*, 鈴木、川瀬、北村*, 高久* (*東大 3 内) 第 18 回日本免疫学会、1988, 12, 京都
2. 野村、中田、鶴沢、能勢、明石、鈴木 第 23 回日本免疫学会、1993, 11, 仙台

1. 発がんの機構と修飾に関する研究

④放射線によるオンコジーン活性化に関する研究

石原弘、田中泉、常岡和子、武内恒成** (薬理化学研究部)、浅見行一*、東智康、村磯知採 (生物研究部)、
宮本忠昭 (病院部)

Studies on Oncogene Activation by Ionizing Radiation

Hiroshi Ishihara, Izumi Tanaka, Kazuko Tsuneoka, Kosei Takeuchi, Kouichi Asami*, Tomoyasu Higashi*, Chidori Muraio*, Tadaaki Miyamoto**

Division of Chemical Pharmacology, *Division of Biology, **Hospital

Molecular mechanisms of the process for the radiation-induced tumorigenesis are still unclear. To analyze the mechanisms, it is necessary to select an appropriate experimental model system for the tumorigenesis and to isolate molecular indicator such as oncogene.

After establishment of quantitative and rapid method for blot hybridization analysis, we screened several model systems to analyze radiation-induced tumor. Finally, radiation-induced murine acute myeloid leukemia system was selected. Function and structure of oncogenes in the system were analyzed. An increased amount of protooncogene *c-myc* and *c-myb* was observed in all the types of the leukemia cells. Similarly, granulocytic leukemia cells constitutively expressed protooncogenes *fos* / *jun* families.

Furthermore, gene rearrangements in related genes with protooncogenes *c-fms* and *c-myc* and in interleukin-3 gene were observed in several leukemia cells. Quantitative Southern blot hybridization probed interleukin-3 gene showed the deletion and the rearrangement in leukemia cells in only half of the genome, and restriction enzyme fragment length polymorphisms in the region. To clarify these molecular structures, cloning of DNAs containing interleukin-3 gene was performed after construction of genomic DNA library in several mouse strains and the leukemia cells. Structural analysis of the cloned interleukin-3 gene showed that the occurrence of insertion of some DNA fragment at the regulative site of the gene. We discussed the usage of the cloned gene to analyze the molecular processes in the radiation-induced leukemogenesis.

*浅見行一 現、札幌医科大学、**武内恒成 現、都老人研

緒 言

近年の分子生物学的解析の結果、ヒト癌のプロモーションや悪性化に寄与する様々なオンコジーンなどの遺伝子異常が発見され、これらの関与する分子機構が次第に明らかにされつつある。しかし、これらの研究は培養細胞や分離異常組織を使用さざるを得ないという実験の制約上、主に癌の後期過程や遺伝的要因の分析が主体となり、後天的要因により発生した腫瘍の初期から中期過程の分析は困難である。放射線障害により骨髄性白血病などの発生率の増加することは以前から知られてきたものの、放射線障害という確率的現象がいかに腫瘍発生に結びつくかという疑問に対する解答を見出すためには特定の腫瘍細胞におけるゲノム異常を同定し、これをマーカーとして同一の系に対して放射線照射を行い、放射線障害との関連を見出すという研究方向が必要である。このためには実験動物を用いた発癌系を使用することが必要である。もし、適当な系を選定した後にその系でゲノム構造・機能の異常を同定し、それを分離することができれば、放射線から白血病発生に至る過程の分子機構を研究することが可能になる。しかしながら、多くの実験誘発腫瘍発生系では分子レベルの基礎的な知見にすら乏しいのが現状である。

我々は放射線障害から腫瘍発生に至る過程の分子機構を解析することを目的として、実験誘発腫瘍発生系の分子レベル分析に着手した。そして、これに必要な技術的改良ならびに目的に適した系の選定および分子インジケータの検索を行った。その結果、放射線誘発マウス骨髄性白血病の実験誘発系を選択し、さらにいくつかの腫瘍発生過程分析のための分子インジケータおよびその候補を同定・分離することができた。

本稿ではその経過にしたがい、オンコジーン等の構造および機能異常を迅速かつ定量的に研究するための、プロットハイブリダイゼーション技術の改良 (I 章)、遺伝子上の構造異常や突然変異を検出および分離するための、シャトルベクター系の検討 (II)、オンコジーン活性化を検索するための、in vitro 放射線誘発形質転換系における検討 (III 章)、オンコジーン類の構造機能異常の検討に適した

放射線 in vivo 発癌系の検索 (IV章)、放射線誘発マウス骨髄性白血病系を使用したオンコジーン類の機能異常の同定 (V章)、放射線誘発マウス骨髄性白血病系における分子インジケータとなり得る遺伝子構造異常の同定および分離 (VI章) の順で得られた結果を述べるとともにこれを総括 (VII章) する。

I. プロットハイブリダイゼーション技術の改良

一般的なプロットハイブリダイゼーションによるオンコジーンなどの遺伝子構造機能の検索法は時間を要し、かつその定量性には問題がある。また、パルスフィールドゲル電気泳動法で巨大 DNA 断片を分離した後に、分析するためにはナイロン膜担体に巨大 DNA を転写する必要があるが、通常のプロット法ではその転写効率は著しく低いため、ゲノムサイズの大きい哺乳類細胞の単一コピー遺伝子进行分析することが困難である。そこでこれらの点を改良するためにプロット法に検討を加え、極低塩下における電気転写法である LSE 法を開発した^{1,2,3)}。

原理および方法

ゲル電気泳動法は一定の低イオン強度下、アガロースやアクリルアミドゲルの分子ふるい効果を利用して巨大荷電分子を分子量分画するものである。分画した核酸はナイロン膜などの担体に電気的もしくは毛管現象を利用していったん転写してからはじめてハイブリダイゼーションなどの分析が可能になる。しかし、ゲル内の分子を担体に転写する際にもこの分子ふるい効果は影響を与え、低分子量のものに比べ高分子量のものでは転写の速度低下または転写不能になることがある。特にパルスフィールドゲル電気泳動などで分画した 100kbp 以上の巨大 DNA などではその転写が一般に困難である。それを改善するためにゲルを予め塩酸などで処理して核酸のアプリン酸分解で DNA を切断することで分子サイズを低下せしめる方法が用いられることもあるが、この場合、核酸のゲル内からの消失や拡散をまねくことがある。この分子量による転写効率の低下はその後のハイブリダイゼーション後の定量性にも影響を与える。

しかし、高電圧で電氣的転写を行った場合および極低イオン下で転写を行った場合には分子ふるい効果が低下する。本方法はこれを利用したものであり、電気泳動分画後ゲルを予め極低イオン状態としてから高電圧で電氣的に転写させるものである。このときジュール熱が発生するので熱によるゲルの溶解やパターンの乱れを避けるために緩衝液の冷却および電極間を広くした電気転写装置の作製 (図 1)²⁾によりこの問題を解決した。緩衝液が低温かつ低イオンそして電極間距離増大により緩衝液の抵抗は増大し、高電圧にもかかわらず低電流となり、熱発生は抑えられる。

電気泳動分離した後、ゲルを 20 倍以上の極低イオン緩衝液 (2mM トリス・0.2mMEDTA) にて 30 分以上振盪する。ゲルおよび Optiblot™ もしくは Genescreen Plus™ などの陽電荷ナイロン膜を多孔質パッドでサンドイッチし、氷冷した極低イオン緩衝液を満たした専用電気転写装置に組み込み、ナイロン膜を陽極側として 600V (100-200mA) 5-10 分の電氣的転写を行う。DNA 転写後はナイロン膜を沸騰水に 1 分浸して DNA を 1 本鎖に変性させたのちに乾燥して DNA をナイロン膜に結合させる。また、RNA 転写の際はそのままナイロン膜を乾燥す

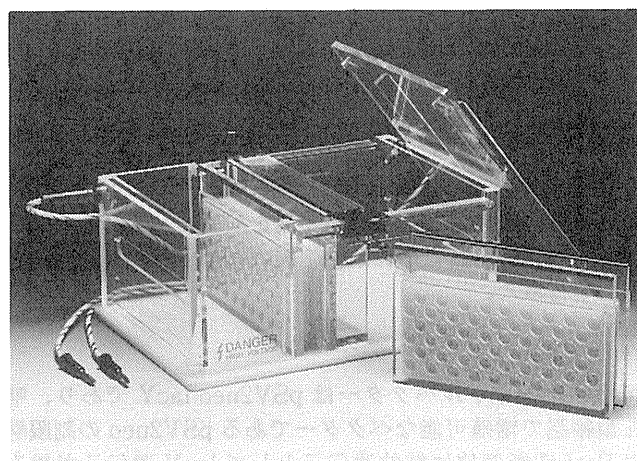


Fig1 A “Low-Salt Electroblotting” apparatus specially designed for rapid and efficient transfer of DNA or RNA from the electrophoresis gel to a plastic membrane.

る。これらのナイロン膜はそのままハイブリダイゼーション実験に供した。

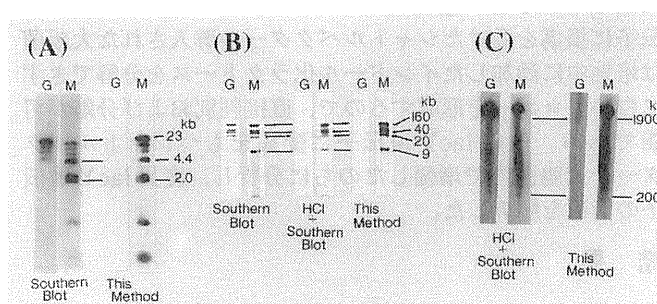


Fig2 Comparison of Southern blotting and the LSE method for the efficiency of DNA transfer. Radioactive DNA was electrophoresed and transferred onto the nylon membrane. After the transfer, the blot membrane(M) and the gel(G) were dried and autoradiographed. (A) Blotting after 1% agarose gel electrophoresis of radioactive λ DNA / Hind III. (B) A radioactive T4dC DNA (mixture of Bgl I -digest and full length) was electrophoresed in a 0.3% agarose gel. The DNA was transferred by capillary blotting (right pair) or by the LSE method (right pair). The middle pair shows the data after capillary blotting of DNA which is depurinated by treatment of the gel in HCl. (C) Radioactive large DNA of HL-60 DNA / Not I was electrophoresed in 0.3% agarose by pulsed-field gel electrophoresis. DNA was transferred by capillary blotting with depurination or by the LSE method.

結 果

³²P 標識した種々のサイズの DNA を分子量に応じてパルスフィールドゲル電気泳動、アガロースゲル電気泳動およびポリアクリルアミドゲル電気泳動で分画し、LSE 法でナイロン膜に転写しオートラジオグラムを行うと、分子

量に関わらず同時高速転写が完了した(図2)。このことで従来16-40時間を要した転写が5-10分程度になり、巨大DNA転写および定量的転写が可能になった。

II. シャトルベクター系の検討

放射線損傷後に修復を受けた哺乳類細胞DNA分子上に存在する構造異常および突然変異を検出し、それを分離するために、大腸菌と哺乳類細胞間のシャトルベクター系の検討を行った。

方 法

用いたシャトルベクターはpSV2neo-lacYであり、哺乳類細胞で増殖可能なベクターであるpSV2neoの制限酵素PstI切断部位に標的遺伝子としてlacY遺伝子が組み込まれている。lacY遺伝子は損傷を受けると容易に不活性化されるので検出系として優れている。このプラスミドをin vitroで γ 線照射した後に、エレクトロポレーションを用いてサル腎臓由来の細胞株であるCOS-1もしくはCV-1に導入した。このシャトルベクタープラスミドはCOS-1細胞内でのみ複製される配列を所有する。この細胞からDNAを抽出した後、再びエレクトロポレーションによりDNAを大腸菌株HB101に移入させた。lacY遺伝子に損傷を受けたシャトルベクターの導入された大腸菌は培地中に添加したインドール化ラクトースを分解できずに白いコロニーを形成するので、直接判別および分離が可能である。このlacY遺伝子に変異をもつシャトルベクターを大腸菌内で増幅したのちに分析し、変異lacY遺伝子の構造を解析した。

結 果

γ 線のin vitro照射線量に比例して、プラスミドの残存率が減少するとともに、lacY遺伝子に損傷を持つものが増加していた。5 Gyの γ 線照射で出現したlacY変異株のlacY遺伝子は、60%が欠失変異であり40%が点突然変異を伴っていた。10Gyから40Gyの照射群では線量とともに欠失変異の割合が増加し、40Gyではほぼ100%が欠失変異であった。また、この割合は一次宿主であるCOS-1細胞とCV-1細胞間に相違が見られなかった。

III. in vitro 放射線誘発形質転換系における検討

オンコジーンの分離は化学物質や自然発生した種々のライン化細胞を用いてなされている。そこで放射線で誘発したライン化細胞における既知のオンコジーン構造異常を検討した。

方法および結果

本研究所で樹立したTfシリーズ細胞ラインはマウスC3H10T1/2細胞をX線により形質転換したものであり、この細胞で活性化されていることの予想されるオンコジーンの検索を行った。C3Hマウスに対する腫瘍形成能および3型フォーカスを形成する当該ライン化細胞としてTf13、Tf21およびTf6からDNAを抽出し、燐酸カルシウム法で正常な10T1/2細胞に導入した。30日培養後に判定したところ、Tf13由来のDNAは3型のフォーカス形成能があり、その形質転換細胞は腫瘍形成能が認められた。また、Tf13由来のDNAは3型とは異なる型の

フォーカスを形成し、Tf21由来のDNAにはフォーカス形成能が認められなかった。このTf13DNAで形質転換した10T1/2細胞における既知のオンコジーン構造異常は同定されなかった。このことからin vitroでライン化細胞を腫瘍化させるDNAがTf6に存在し、それは既知のオンコジーンではないことが示された。

IV. オンコジーン類の構造機能異常の検討に適した放射線in vivo 発癌系の検索

放射線発癌の分子機構を解析するためには放射線誘発腫瘍細胞内の遺伝子異常を同定・分離して分子インジケータを単離することが必要である。放射線障害から腫瘍発生にいたる過程には多数の要因が寄与していることが予想されており、これらの同定のためにはin vitro系よりもin vivo腫瘍発生系の使用が優れている。そこで、本目的への適合性の検討を行うために、実験腫瘍発生系としてC3H/Heマウスにおける放射線誘発骨髄性白血病の系⁴⁾、C57BL/10マウスにおける放射線誘発リンパ性白血病の系⁵⁾およびWister系ラットにおける放射線誘発乳腺腫瘍の系⁶⁾を使用して、既知のオンコジーンやサイトカイン構造機能異常の検討を行った。

方 法

放射線誘発骨髄性白血病は8週齢のC3H/Heオスマウスに3 GyのX線を全身照射した後、1-2年後に発生する⁴⁾。白血病マウスの脾臓では白血病細胞が大多数を占めているので、脾臓から白血病細胞を分離し、原発白血病細胞とする。この細胞をメスC3H/Heマウスに注射すると、約1か月後、マウスは白血病になり、脾臓に白血病細胞が集中する。このin vivo passageを5回以上繰り返すと白血病細胞は集団として安定化するので、これを株化白血病と称した。また、一部の白血病細胞は既に樹立しており、これをライン化白血病細胞と呼称した。白血病細胞としての材料として、これらの原発白血病、株化白血病およびライン化白血病を使用した。これら細胞材料の調製は放医研生理病理研究部の吉田和子博士および根本久美恵が担当した。

放射線誘発マウスリンパ腫細胞はC57BL/10マウスにX線を4回照射することで胸腺に発生する⁵⁾。腫瘍細胞は放医研生理病理研究部の武藤正弘博士および久保い子の協力を得て当該胸腺から分離した。

放射線誘発ラット乳腺腫瘍は授乳期のWisterメスラットに放射線照射することで得られる⁶⁾。この腫瘍細胞は放医研薬理化学研究部の稲野宏志博士、鈴木桂子博士および石井洋子博士の調製したものを使用した。

各腫瘍細胞から常法⁷⁾に従ってDNAおよびRNAを抽出して電気泳動にかけ、I章に示したLSE法^{1,2,3)}でナイロン担体に転写した後に既知のオンコジーンおよびサイトカインプローブを用いてハイブリダイゼーション分析を行った。RNAに関しては発現量の増強の有無、DNAに関しては大規模な遺伝子再編もしくはコピー数の増加の有無について検討した。ハイブリダイゼーション後、X線フィルムへのオートラジオグラフィによってバンドパターンおよび β 線強度を測定したが、定量的実験には一部、イメージングプレートTMへのオートラジオグラフィおよびフジフィルムBAS2000システムにより測定

表1 放射線誘発マウス骨髄性白血病におけるオンコジーンおよびサイトカイン類遺伝子の機能および構造異常。
機能は定量的ノザンハイブリダイゼーション（上段）、構造は定量的サザンハイブリダイゼーション（下段）で検討した。

遺伝子発現 ¹														
株名	myc	myb	fos	jun	Hras	fms	raf	IL-1	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	G-CSF	GM-CSF
L-8313 ³	+	+	±	±	+	—	+	—	—	+	—	—	—	++
L-8704 ⁴	+	+	±	±	++	+	+	+	—	—	+	—	—	—
L-8065 ⁵	++	++	—	—	++	+	++	—	+	—	±	—	—	—
L-8069 ⁵	+	+	—	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
L-8072 ⁶	++	++	++	++	++	±	+	++	—	—	+	+	+	—
L-8720 ⁶	++	+	++	++	+	±	+	—	—	—	±	—	—	—
L-8726 ⁶	+	+	+	++	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—
L-8718 ⁷	+	+	—	—	++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
L-8929 ⁷	++	++	—	—	+	—	—	—	—	—	±	—	—	—
L-8738 ⁷	+	+	—	—	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—

遺伝子構造 ²						
株名	IL-1β	abl	IL-3	fms	myc	
L-8313	—	—	—	nd	nd	
L-7926	—	M	D	—	R	
L-8002	—	—	—	R	R	
L-8028	—	—	I	R	—	
L-8032	M	—	—	R	R	
L-8065	M	M	D	R	R	
L-8072	M	M	—	R	R	
L-8704	—	—	D	R	R	
L-9209 ⁸	M	—	—	—	—	
L-9210 ⁸	—	—	—	R	R	

- ¹ 遺伝子発現は通常のノザンプロットハイブリダイゼーションで行なった。
RNA量に応じて—, ±, +, ++であらわした。
- ² M=メチル化等の影響を受けている可能性の高いもの。D=欠失を受けているもの
I=挿入のあるもの。R=類縁遺伝子異常の発生している可能性の高いもの。
- ³ T細胞系白血病細胞株（このタイプの発生率は著しく低い）
- ⁴ マクロファージ様白血病細胞株
- ⁵ 単球様白血病細胞株
- ⁶ 顆粒球様白血病細胞株
- ⁷ 単球顆粒球様白血病細胞株（このタイプの発生率が高い。）
- ⁸ 原発白血病細胞株

した。

プローブとして使用したオンコジーンのうち、v-fos、v-abl、v-Ha-ras、v-rafはJapan Cancer Research Resources Bank (JCRB)、マウス c-fmsはFred Hutchinson Cancer Research CenterのDr. R. Rohrschneider、マウス c-mybはMelbourne Tumour Biology BranchのDr. T. J. Gonda、マウス c-mycは理研の戸所一雄博士から供給を受けた。マウス jun 遺伝子族はATCC由来のものを使用した。また、サイトカイン cDNAのうち、マウス G-CSF cDNAは大阪バイオ研の長田重一博士、マウス IL-1αおよびβ cDNAはヤクルト中研の大脇眞博士、マウス IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6およびIL-7のcDNAは日本免疫学会などから放医研生理病理研究部の武藤正弘博士および障害・臨床研究部の鈴木元博士を介して供給を受けた。また、マウス M-CSFおよびGM-CSFのcDNAは公表された配列データを利用してクローニングした。コントロールに利用したβアクトチンDNAは和光純薬工業の製品を使用した。これらは200-500bpのDNA断片としてランダムプライマー法で³²P標識し、10⁸ cpm / μgDNA程度のDNAプローブとした。

結 果

1. マウス骨髄性白血病細胞

RNAの分析の結果、他の多くの腫瘍細胞と同様にmyc, myb, Ha-rasのRNA発現が全ての白血病細胞株に共通して観察された（表1）⁸⁾。また、顆粒球様白血病として分類される細胞株では共通してfos, jun等の転写因子遺伝子をコードするオンコジーンの持続性発現が観察された。また、プロトオンコジーンrafやサイトカイン類の遺伝子は白血病細胞株によって発現しているものもあったが、組織化学的形質との関連性や共通性などは見出されなかった。

DNA分析の結果、コピー数に関しては2倍程度にオンコジーンを増幅している株もあったが、著しい増幅は検出されなかった。しかし、この程度のオンコジーン増幅では腫瘍の寄与は低いと考えられ、また、このことは白血病細胞の細胞集団内多様性を反映しているものと考えられる。一方、M-CSF受容体をコードするオンコジーンであるfmsのキナーゼドメイン領域に相当するcDNA断片をプローブとしたところ、fms以外にも弱くハイブリダイズするfms類縁遺伝子が多数検出され、その内に構造異常が認められた。このような類縁遺伝子構造異常はオンコ

表2 放射線誘発マウスリンパ腫瘍細胞および放射線誘発ラット乳腺腫瘍における遺伝子発現および機能異常の検索。

遺伝子発現 ¹										遺伝子構造 ²
コードNo	myb	myc	Hras	fms	IL2R α	IL2R β	IL-2	IL-1 α	IL-3	
リンパ腫										
LL-01	++	±	±	—	±	+	+	+	—	c-myc c-myb c-fos c-jun c-raf c-mos c-fms IL-2R α IL-2R β IL-2
LL-02	++	+	+	—	+	—	+	—	—	
LL-03	++	+	+	—	+	+	+	+	—	
LL-04	++	++	+	±	++	+	+	+	—	
LL-05	++	+	±	±	±	+	+	—	—	
LL-06	++	±	—	—	—	—	+	—	—	
LL-07	++	±	+	—	—	—	+	—	—	
LL-08	++	±	+	—	—	—	+	±	—	
LL-09	++	—	—	—	—	—	+	++	—	
LL-10	++	—	—	—	—	—	+	+	—	
LL-11	++	++	+	—	++	+	+	+	—	
LL-12	++	++	+	—	++	+	+	+	—	
乳腺腫瘍 ³										
rmt01	—	—	—	—	—	—	—	—	—	

¹ 遺伝子発現は通常のノザンブロットハイブリダイゼーションで行なった。RNA量に応じて—, ±, +, ++であらわした。

² 当該リストの遺伝子に構造異常は検出されなかった。

³ 6種類の独立腫瘍を検討したが、いずれも同様であったのでrmt02-rmt06を省略する。

ジーン myc を用いた際にも検出された。

また、IL-3 遺伝子について検討したところ、ライン化白血病細胞 L-8704 では IL-3 遺伝子のコピー数の半減、白血病細胞株 L-8028 では上流領域の遺伝子再編が認められた。

2. マウス胸腺リンパ腫

RNA 分析ではすべての腫瘍に共通して myb、IL-2 遺伝子などが、一部の腫瘍に myc、IL-2 受容体遺伝子などの発現亢進が検出された (表2)。前者は胸腺細胞の特徴を示しており、後者はリンパ腫細胞の集団多様性を反映しているものと思われる。また、DNA 分析でリンパ腫細胞の T 細胞受容体遺伝子の再編が報告されている⁵⁾が、オンコジーンやサイトカイン遺伝子にコピー数の著しい増幅や再編などは検出されなかった。

3. ラット乳腺腫瘍

RNA 分析でも DNA 分析でも異常な発現、コピー数増加、再編などは全く観察されなかった (表2)。myc や fos 発現亢進すら認められなかったことは、この腫瘍の増殖自体が緩やかであることを示している。

結 論

本研究の目標は分子インジケーターとなり得る遺伝子構造異常を同定することである。3種類の in vivo 放射線誘発実験腫瘍発生系を検討して最も顕著な相違の見出されたものは放射線誘発マウス骨髄性白血病の系であった。そこで、この系が最も遺伝子異常構造の分離同定に適すると判断し、この系について更に検討を進め、遺伝子発現異常 (V章) および遺伝子構造異常 (VI章) を分析した。

V. 放射線誘発マウス骨髄性白血病を使用したオンコジーン類の機能異常

放射線誘発マウス骨髄性白血病細胞はその多くが組織化学的性質からおもに単球様白血病、顆粒球様白血病および

単球顆粒球様白血病として分類されている⁴⁾。そこで各種の白血病細胞株の RNA を分析し、オンコジーンやサイトカイン関連遺伝子に関する共通発現異常および組織学的形質との関連性の有無について検討を加えた。

方 法

III章の方法に準じて行い、また必要に応じて in situ ハイブリダイゼーションで細胞集団の分析を行った⁸⁾。

結果および考察

いずれの放射線誘発マウス骨髄性白血病細胞株でも myc、myb、ras の発現が亢進していた (表1)。これは白血病細胞集団に増殖過程にある細胞の多数含まれることを示しているものと考えられる。in situ ハイブリダイゼーションによる集団分析の結果⁸⁾でも多数の細胞で myc 遺伝子は発現していた。一方、fos、jun 等の転写因子遺伝子をコードするオンコジーンの場合は、これらを発現していない株および持続的に発現している株の2種類の白血病細胞株があった。fos を発現していない細胞に血清やホルボルエステルを添加すると、他の多くの細胞と同様に、一過性の fos 発現が全ての細胞で増加していることが in situ ハイブリダイゼーションで観察された。一方、fos を持続的に発現している株はいずれも組織化学的に顆粒球様白血病として分類されている白血病細胞株であり、この場合 fos 発現細胞は細胞集団の約半数であった。一般に fos の細胞内 RNA 量は主に転写量および細胞内 RNA 分解で調節されており、プロテインキナーゼ C などの活性化により転写の促進することが知られている。しかし、この細胞にプロテインキナーゼ C の活性化剤であるホルボルエステルやその阻害剤である H7 (生化学工業) およびアクチノマイシン D 等の転写阻害剤を添加しても RNA 減少速度の低下が少なかった。また、fosRNA 分解阻害効果をもつシクロヘキシミドを投与しても RNA 増加速度の増加は少なかった。これらのことから、顆粒球様白血病細胞の

fosRNA の持続的発現は fosRNA の細胞内プールの分解調節が十分に機能していないという、転写後調節の異常に起因することが示された。この細胞集団の約半数がこの状態にあるという *in situ* ハイブリダイゼーションの結果は、顆粒球様白血細胞集団の内に分化状態の異なる細胞が混在していることを示唆している。また、独立に発生した顆粒球様白血細胞株に共通してこの性質がみられることから、持続性 fos 発現細胞集団の存在が白血細胞の顆粒球様形質に寄与していること、または顆粒球様白血細胞に共通した遺伝子機能異常のあることが示唆された⁸⁾。これらの遺伝子発現亢進は細胞の白血病化の一因とも結果とも考えられる。

また、raf やサイトカイン類の遺伝子発現に上記のような共通性は見られなかった。このことは、上記の核内で機能する蛋白質をコードするものとは異なり、サイトカイン類などの細胞機能的形質に携わる蛋白質の遺伝子発現は白血病の多様性を反映しているものと思われる。

VI. 放射線誘発マウス骨髓性白血病系における遺伝子構造異常

放射線で誘発された腫瘍細胞では初期の放射線によるゲノム損傷から中後期における細胞のプログレッションなどによるゲノム異常まで多数の遺伝子構造異常が蓄積しているものと考えられる。腫瘍発生の分子機構を分析するためにはある程度腫瘍発生過程を分割し、それぞれ異なる方法論で研究を進めることが有効である。しかし、当該実験腫瘍発生系ではその過程を示すマーカーが存在しないため、その分析はさらに困難になっている。この実験系でも他種の腫瘍のように、それぞれ独立に発生した白血細胞相互で共通性のある遺伝子構造異常が見出されれば、その過程の分割のみならず放射線誘発腫瘍の発生過程を直接解析するということが期待できる。

そこですでに腫瘍化した細胞から共通性の高い遺伝子構造異常の検索を行った。検索対象遺伝子としては腫瘍共通性質という意味でオンコジンを、さらに骨髓性白血細胞では細胞自身の分化異常を伴い、正常機能を呈さないということからサイトカインおよびその受容体の遺伝子を選択した。分析は遺伝子の再編およびコピー数に注目して行った。既に分離されている遺伝子をプローブとしたサザンブロットハイブリダイゼーションにより構造異常の同定・分析を行い、必要に応じて当該遺伝子のクローニングを行った。

方 法

IV 章の方法で放射線誘発骨髓性白血細胞の DNA のサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。正常マウスとして C3H / He、C57BL / B10、Balb / c、A / J および STS / A を使用し、これらの肝臓および脾臓由来の DNA を対照とした。

ゲノム DNA ライブラリーは、C3H / He マウス肝臓、STS / A マウス肝臓、C57BL / B10 マウスの肝臓、ライン化白血細胞 L-8704 および株化白血細胞 L-8028 由来のゲノム DNA 由来のものを常法⁸⁾により調製した。50-200kbp のゲノム DNA を制限酵素 MboI による部分切断、ショ糖密度勾配遠心法による分子量分画の後、 λ EMBL3 ベクターに連結し、GIGAPACK GOLDTM

(Stratagene) を用いてインビトロパッケージングを行い、大腸菌 P2-392 株で増幅した。その結果、それぞれから 10^6 - 10^7 独立クローンを含むライブラリーを得た。また、Balb / c マウスゲノム DNA ライブラリーは JCRB および Stratagene から 2 種類入手した。クローニングは通常のブランクハイブリダイゼーションにより行った。また、サブクローニングにはプラスミドベクター pBluescript II KS + TM (Stratagene) を使用した。

ゲノムコピー数の決定は以下の方法で行った。制限酵素切断した正常細胞および白血細胞由来のゲノム DNA 10 μ g ずつを電気泳動分離し、アルカリブロットティングもしくは LSE 法でそれぞれ HybondN + TM (Amersham) もしくは OptiblotTM (IBI) 陽電荷ナイロン膜に転写し、乾燥により結合させた。まず、 β アクチン DNA プローブを用いて通常のハイブリダイゼーションを行い、正常細胞 DNA にハイブリダイズした β アクチン DNA 量を測定し、これを内部標準としてナイロン膜上の白血細胞 DNA の相対比を求めた。この場合、分子量増加に従ってナイロン膜へのトランスファー効率の低下することがあるので、 β アクチン DNA プローブで生じた複数のバンド相互の放射能強度比を求め、分子量によるトランスファー効率の変動を測定するとともに有効分子量範囲を決定した。次に、ナイロン膜上の β アクチン DNA プローブを除去した後、目的とする DNA プローブを用いてリハイブリダイゼーションを行い、対象バンドの放射能を測定した。更に当該プローブを除去して再び β アクチン DNA プローブでリハイブリダイゼーションを行って放射能測定を行い、ナイロン膜からの DNA の脱落による試料相互の相対比低下のないことを確認した。 β アクチン DNA プローブによる放射能あたりの目的プローブによる放射能を求め、正常マウスゲノム DNA の値を 1 コピー/半数体としてコピー数を算出した。Balb / c および C3H / He マウスのゲノムコピー数を比較し、精度が 10 % 以下であることを確認した。

結果および考察

種々の遺伝子を検索したところ fms 類縁遺伝子および myc 類縁遺伝子に構造異常が認められた。また、IL-1 β 遺伝子および abl 遺伝子にメチル化部位の相違を示唆する結果を得た。さらに IL-3 遺伝子構造異常を同定した。そこで特に fms 類縁遺伝子および IL-3 遺伝子についてその構造異常を検討した。

1. fms 類縁遺伝子の構造異常

fms ゲノム DNA のサイズは約 40kbp にもおよびその 22 のエクソンから約 5 kb の mRNA が合成される。fms 自身に関してはその全長に異常は見出されなかったが、fms のキナーゼドメイン領域に相当する cDNA 断片をプローブとして弱厳密度でハイブリダイゼーションを行ったところ、fms 以外にも弱くハイブリダイズするバンドが多数検出され、約半数の白血細胞 DNA では正常 DNA とは異なるパターンを呈していた。そこでこの弱くハイブリダイズするバンドを明らかにするとともに異常パターンの原因遺伝子を検索するために、マウスゲノム DNA ライブラリーから当該 DNA を持つクローンを 50 クローン選択してその制限酵素地図を比較したところ、8 種類のゲノ

— T C T T T G A C T G C G T C A T C A C A G T T C A G A G T G A T G T G T G G	— c - f m s
— T t T T T G A t a G a G T t t a C A C t c a T C A G A G c G A T G T c T G G	— K G F R
— T g T T T G A C c G g a T C t a C A C A c a c C A G A G c G A T G T G T G G	— b F G F R
— T C T T c a A C a G C c T C t a C A C c a c T t t G A G T G A T G T c T G G	— P D G F R
— c t T T T G A C c G a G T C t a C A C c c a c C A G A G T G A T G T G T G G	— ?
— c c T T T G A t T a C G T t t a C A C c a c c C A G A G T C A T G T c T G G	— ?
— t t T T T a A C T G C G T C A T C A C c c a T g A G A G T t G T G T G T G G	— ?
— T C T T T G g C a G C G T C A a C A C c a c a g A G A G a G g T G T G c G c	— ?
— c C T T T t A C a G a G T C t T C A C c c a c C A G A G T G A T G T c T G G	— ?

図3 クローン化 fms 類縁遺伝子の配列。

各キナーゼドメイン相当配列の一部を示した。大文字は fms と完全に一致する配列でそれ以外は小文字で表示。
(KGFR = keratinocyte growth factor receptor; bFGFR = basic fibroblast growth factor receptor; PDGFR = platelet derived growth factor receptor)

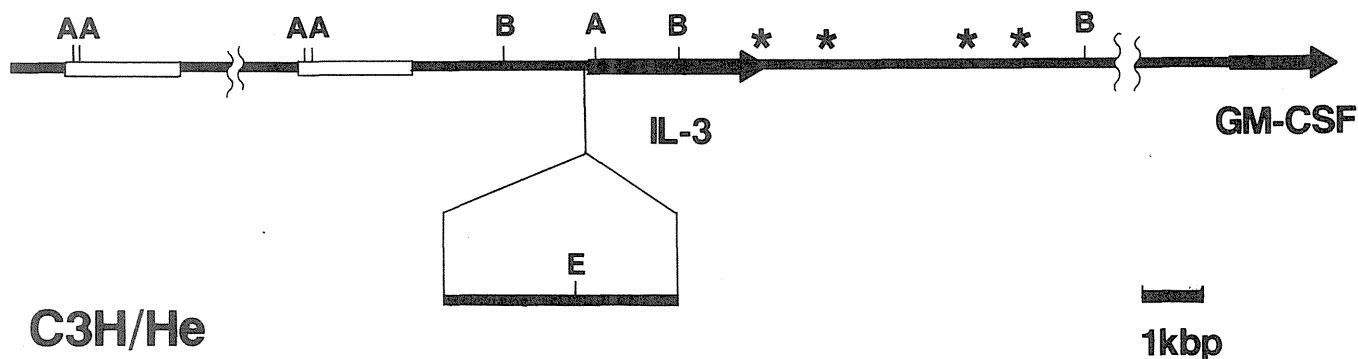


Fig4 Restriction enzyme mapping of IL-3 gene. Genes of IL-3 and GM-CSF (arrow) are positioned closely. Main reason of the polymorphism in C3H / He IL-3 genome is an insertion of a large DNA fragment between direct repeat(open box)at the upstream region. The other reason is small scale insertion, deletion and substitution of DNA at the downstream region. Genome of several leukemia cells contains insertion of DNA (lower line) at the transcriptional regulation site of IL-3.

ム断片に分類された (図3)。これらの内には遺伝子構造異常の原因ゲノムDNAが存在しておらず、また白血病細胞における機能異常なども見られなかったが、サザンハイブリダイゼーションの際の弱バンドの位置と一致していたので、その本態を明らかにするためにさらなる分析を行った。まずこれらの断片のうち、キナーゼドメインに相当する領域を同定・分離した後、その領域の塩基配列を決定して塩基配列データベースの検索を行った。8種類の内、3種は既知の血小板由来増殖因子受容体遺伝子、繊維芽細胞増殖因子受容体遺伝子およびケラチノサイト増殖因子受容体遺伝子であったが、5種類は新規遺伝子であった (図3)。さらに周辺構造解析から、検出した弱バンドはいずれも繊維芽細胞成長因子受容体遺伝子族に属する膜貫通型のチロシンキナーゼ受容体の遺伝子であることが示唆された。このグループに属する遺伝子はゲノム内に多数存在することが知られており、その内のいずれかに白血病化に伴う遺伝子再編の原因遺伝子のあることが示唆された。その原因遺伝子は現在まだ分離されていないが、使用した fms キナーゼ領域は3つのエクソンにまたがっているのでさらにこれを分割すれば、より効率の良い同定・分離が可能になるものと思われる。

2. IL-3 遺伝子の構造異常

半コピーの IL-3 遺伝子領域が消失していたり、構造異常を起こしている白血病細胞株が存在していた。IL-3cDNA 塩基配列⁹⁾は他のサイトカインのヒトとマウス間の相同性に比べ、著しく低いことから系統発生レベルで変化し易いものであることが示される。さらに IL-3 遺伝子周辺も変化に富んでおり、実験動物マウスである *Mus musculus musculus* 内でも制限酵素多型が存在する¹⁰⁾。そこでこの領域の分析を進めるために、STS / A、C3H / He、Balb / c および骨髓性白血病細胞のゲノムDNAライブラリーをそれぞれ構築し、その IL-3 領域をクローニングしてその構造解析を行った。

マウス系統相互の制限酵素多型の最大の原因は IL-3 遺伝子上流約 3kbp に約 2kbp の同方向反復配列が存在し、そこに 10kbp 以上の DNA 挿入の起きていることが示唆された (図4)。また、下流にも数箇所の小規模な挿入、脱落および塩基置換が起りやすく (図4)、これにより同一近交系内でも多型が発生していた。IL-3 遺伝子下流には GM-CSF 遺伝子があり¹¹⁾、両者の組織特異発現の調節領域やエンハンサーなどの領域は構造遺伝子からかなり離れている¹²⁾。これらの発現調節機構にはまだ不明な点も多いが、この多型が全身レベルでの造血組織調節や白血病化細胞の特質にも影響を与え得る。また、造血系組織の分

化増殖に重大な寄与をする IL-3 と GM-CSF は放射線急性障害後の造血系の回復にも影響を与えるので、骨髄性白血病の原因細胞出現が確率的事象ならばこの出現率の増減に IL-3 と GM-CSF が関与するとも考えられる。実際、放射線により骨髄性白血病の発生は一部の近交系マウスに限られており、この系統差に当該多型の関与する可能性がある。

また、半コピーの IL-3 ゲノムの消失している白血病細胞株では大規模な脱落の発生していることがわかったが消失の境界点を同定することはできなかった。染色体研究などから染色体の半コピーにのみ消失や転座の見られること^{13,14)}にこの知見は一致する。これらの染色体異常は放射線障害初期に発生するものもあり、消失の境界点を同定し、その構造を同定することで異常の分子インジケータとすることが可能であると思われる。消失の境界点同定のための巨大 DNA 分析、分離のためのゲノムウォーキングが今後の課題である。

一方、半コピーの IL-3 ゲノムに構造異常の発生している白血病細胞株の当該領域をクローニングして構造を分析したところ、IL-3 転写調節部位近傍に DNA の挿入が認められた (図 4)。現在まだその塩基配列分析は完了していないが、WEHI-3B などの IL-3 高発現ライン化細胞などではレトロポゾンである intracisternal A particle が IL-3 遺伝子転写調節領域に挿入されており¹⁵⁾、これに相当する現象がこの *in vivo* で発生した骨髄性白血病細胞でも発生していることを示唆している。このようなレトロポゾンの挙動やその生物学的影響などについては現在ほとんど解析がなされていないが、今回分離したクローン化断片の特異的領域を決定してこれをインジケータとして正常細胞や腫瘍細胞における構造・コピー数をモニターすることでも腫瘍の程度を解析できると考えられる。

VII. 考察および結論

放射線障害としての腫瘍研究は一般に確率的事象であるとされている初期の損傷から前腫瘍状態、そして腫瘍発生に至る過程をある程度分割して研究を進めて行く必要があるが、現在までのところそれを判定するためのインジケータすら存在しない。この過程で体細胞レベルでの遺伝的多様性の発生などゲノムの構造・機能が深く関与することが予想されてはいるものの、実際に関与する遺伝子そのものや、修飾を受けたゲノム分子の例などの実例がないのが現状である。これを打開するためには既存のインジケータや知見を利用するだけでなく、新たなインジケータの同定・分離が必要であろう。たとえば、放射線から腫瘍に至る過程の分子分析は特定のモデル系を設定し、その系において共通性の高いゲノム異常を同定・分離することができれば、これらをインジケータとして過程を分割するとともにそれぞれの過程分析に適した方法を導入・開発し、分子機構の解析を進めることができる。我々は良好なモデル系の選択という点に関して遺伝子構造機能の迅速検索法を開発するとともに (図 1、図 2)^{1,2,3)}、複数の実験腫瘍発生系を検討し (表 1、表 2)、放射線誘発マウス骨髄性白血病の系⁵⁾を選定した。

この系における骨髄性白血病発生過程を推定すると、まず、3 Gy 程の電離放射線により放射線に感受性の高い、造血系細胞集団が大規模な損傷を受け、大多数の未分化造

血幹細胞が死滅する。この程度の線量では障害の主体は核酸であり、ゲノム構造に多数の損傷の発生することが知られている。次いで、失われた造血組織を再生するために生じた造血系細胞が急激に増加するが、この細胞集団の内には放射線障害を確率的に受けなかった細胞や放射線障害を修復した細胞の他に、一定数の異常細胞が含まれると考えられる。実際、見かけ上の造血細胞総数は照射一日後で激減し、3-4 週後には回復しているものの、その後数年間、白血病の発生の有無にかかわらず、一定数の細胞に染色体異常が見られる。このことはヒトの放射線障害でもしばしば観察される現象であることから、種を越えた染色体維持機能に由来すると考えられる。染色体異常の発生した細胞に限らず、多数の細胞でゲノム異常の発生していることが予想されるが、その中で骨髄性白血病になり得る『前骨髄性白血病』細胞がプロモーション・プログレッションすなわちゲノム異常の蓄積、集団内多様性の獲得、不死性の獲得、転移能の獲得等を経て、1-2 年後白血病細胞と化すものと考えられる (図 5)。

腫瘍発生の分子機構をさらに効果的に解析するためには、インジケータとなる遺伝子異常を同定・分離することが必要である。我々は骨髄性白血病の発生過程を模式的に図 5 のようにみなした。すなわち、正常 C3H/He マウスの造血細胞集団は 3 Gy 程の電離放射線でその一定集団が損傷を受ける。その時、いくつかのゲノム異常が発生しているはずである。損傷を受けた細胞は、損傷を修復するか細胞死することで照射後消失してしまう。しかし、20-30 % の個体では損傷細胞が持ち越され、これは前白血病細胞としてその後のプロモーション・プログレッションを経て異常ゲノムの総量はさらに増加すると考えられる。そして、1-2 年後、白血病細胞として増加し始める。その段階では白血病細胞自身がクローン内多様性を獲得しているので異常ゲノムの総量はさらに増加し、これが腫瘍の悪性化に寄与するものと考えられる。

我々はこの放射線誘発マウス骨髄性白血病をモデルとして放射線障害から白血病発生に至る過程の分子機構を解析することを目的として、独立に発生した白血病細胞に共通性の高い遺伝子機能および構造異常を同定するという試みを行った。その結果、当該白血病細胞ではいずれも *myc*、*myb*、*ras* などの発現亢進がみられ、顆粒球様白血病細胞では *fos/jun* 類の持続性亢進が認められ (表 1)⁸⁾、これらの形質が抗体などのように発現レベルでのインジケータになると考えられた。また、白血病細胞における *fms* キナーゼドメインに類似した遺伝子に異常の発生していることが示唆されたので、その原因を確認するためにこれらの遺伝子のクローニングを行った。現在までにその原因遺伝子の分離には成功していないが、少なくとも検出した遺伝子の異常構造は *fms* 類縁遺伝子である繊維芽細胞増殖因子受容体遺伝子族の一員であることが示唆された (図 3)。これと同様な類縁遺伝子構造異常は *myc* でも認められた (表 1)。さらに複数の白血病細胞株で IL-3 遺伝子近傍に制限酵素多型とともに構造異常の発生していることを見出し、当該白血病細胞や系統の異なるマウスからゲノム DNA ライブラリーを構築し、その領域をクローニングするとともに構造を決定した (図 4)。そしてこれらの白血病細胞では遺伝子挿入や脱落がこの領域に発生していることを示した。

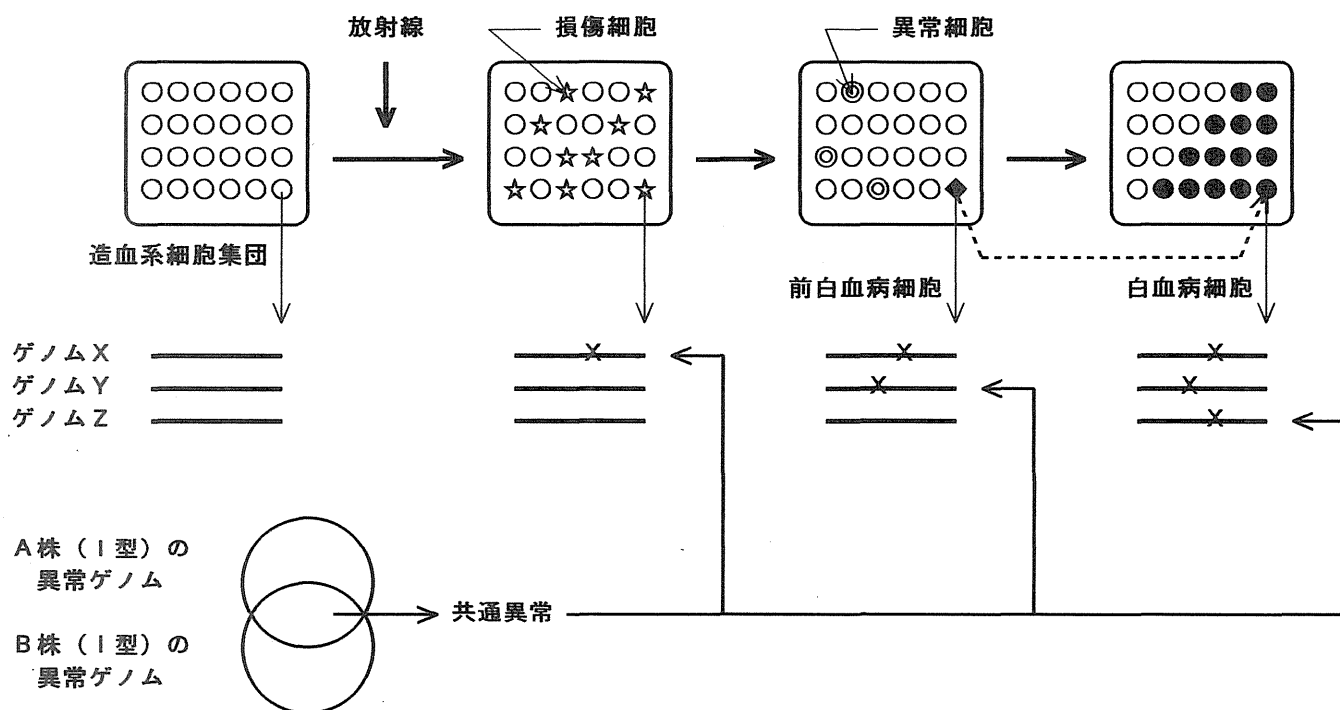


図5 放射線誘発マウス骨髄性白血病発生過程におけるゲノム異常の蓄積。

3 Gy 程の電離放射線によりマウス造血組織の正常細胞 (○) は損傷を受け、ゲノム構造異常を伴う損傷細胞が生ずる (☆)。その多くは死滅もしくは損傷を回復するが、修復が不完全な異常細胞 (◎) の集団が残る。そのいずれかが前骨髄性白血病細胞 (◆) であり、その後プロモーション・プログレッションおよびゲノム異常を蓄積し、20 - 30 % の個体で1 - 2年後白血病細胞 (●) とし増殖する。

類似した染色体異常を持つそれぞれ独立に分離した白血病細胞株のゲノム異常の内、共通性の高い異常を分子として分離することができれば、その発生過程のインジケーター分子として過程の分析が可能になるであろう。

このように、複数の独立発生白血病細胞に共通した発現異常や構造異常が複数同定され、さらにその一部は分子クローニングに成功したことは、これらを分子インジケーターとして放射線誘発マウス骨髄性白血病という *in vivo* 系を用いて放射線初期障害から腫瘍化の過程を分子解析するための道が開かれつつあることを意味している。

参考文献

- 1) Ishihara, H. and Shikita, M. : Electroblothing of double-stranded DNA for hybridization experiments: DNA transfer is complete within 10 minutes after pulsed-field gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* , 184, 207-212, 1990.
- 2) Ishihara, H. and Shikita, M. : Ultrarapid Northern blotting by the low salt concentration electroblothing (LSE) method. *Meth. Mol. Cell. Biol.* , 2, 37-40, 1990.
- 3) 石原弘、色田幹雄：実験講座 巨大DNAの超高速サザンブロット法 蛋白質核酸酵素 35, 2037-2041, 1990.
- 4) Seki, M. , Yoshida, K. , Nishimura, M and Nemoto, K. : Radiation-induced myeloid leukemia in C3H/He mice and the effect of prednisolone acetate on leukemogenesis. *Radiat. Res.* , 127, 146-149, 1991.
- 5) Muto, M. , Kubo, E. , Kamisaku, H. and Sado, T. : Phenotypic characterization of thymic prelymphoma cells of B10 mice treated with split-dose irradiation. *J. Immunol.* , 144, 849-853, 1990.
- 6) Inano, H. , Suzuki, K. , Ishii-Ohba, H. and Wakabayashi, K. : Pregnancy-dependent initiation in tumorigenesis of Wister rat mammary glands by ^{60}Co -irradiation. *Carcinogenesis*, 12, 1085-1090, 1991.
- 7) Maniatis, T. , Sambrook, J. and Fritsch, E. F. : "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold spring Harbor Laboratory Press, New York, 1982.
- 8) Ishihara, H. , Yoshida, K. , Nemoto, K. , Tsuneoka, K. and Shikita, M. : Constitutive overexpression of the c-fos gene in radiation-induced granulocytic leukemia in mice. *Radiat. Res.* , 135, 394-399, 1993.
- 9) Yang, Y. C. , Ciarietta, A. B. , Temple, P. A. , Chung, M. P. , Kovacic, S. , Witek, G. J. S. , Leary, A. C. , Kriz, R. , Donhue, R. E. , Wong, G. G. and Clark, S. C. : Human IL-3 (multi-CSF): Identification by expression cloning of a novel hematopoietic growth factor related to murine

IL-3. Cell, 47, 3-10, 1986.

- 10) Campbell, H. D. , Ymer, S. , Fung, M. C. and Young, I. G. : Cloning and nucleotide sequence of the murine interleukin-3 gene. Eur. J. Biochem. , 150, 297-304, 1985.
- 11) Barlow, D. P. , Bucan, M. , Lehrach, H. , Hogan, B. L. M. and Gough, N. M. : Close genetic and physical linkage between the murine haematopoietic growth factor genes GM-CSF and Multi-CSF(IL-3). EMBO J. 6, 617-623, 1987.
- 12) Nishida, T. , Yoshida, M. , Arai, K. and Yokota, T. : Definition of GC-rich motif as regulatory sequence of the human IL-3 gene : Coordinate regulation of the IL-3 gene by CLE / GC box of the GM-CSF gene in T cell activation. Int. Immunol. , 3, 245-254, 1991.
- 13) Hayata, I. , Seki, M. , Yoshida, K. , Hirashima, K. , Sado, T. , Yamagiwa, J. and Ishihara, T. : Chromosomal aberrations observed in 52 mouse myeloid leukemias. Cancer Res. , 43, 367-373, 1983.
- 14) Breckon, G. , Papworth, D. and Cox, R. : Murine radiation myeloid leukemogenesis : A possible role for radiation-sensitive sites on chromosome 2. Genes, Chromosomes & Cancer, 3, 367-375, 1991.
- 15) Ymer, S. , Tucker, W. Q. J. , Sanderson, C. J. , Hapel, A. J. , Campbell, H. D. and Young, I. G. : Constitutive synthesis of interleukin-3 by leukemia cell line WEHI-3B is due to retroviral insertion near the gene. Nature, 317, 255-258, 1985.

研究発表

原著論文

- 1) Ishihara, H. and Shikita, M. : Electroblotting of double-stranded DNA for hybridization experiments: DNA transfer is complete within 10 minutes after pulsed-field gel electrophoresis. Anal. Biochem. , 184, 207-212, 1990.
- 2) Ishihara, H. and Shikita, M. : Ultrarapid Northern blotting by the low salt concentration electroblotting (LSE) method. Meth. Mol. Cell. Biol. , 2, 37-40, 1990 .
- 3) Takeuchi, K. , Ishihara, H. , Tsuneoka, K. and Shikita, M. : Barbiturate enhance retinoic acid or 1, 25-dihydroxyvitamin D3-induced differentiation

of leukemia HL-60 cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. , 178, 263-268, 1991.

- 4) Ishihara, H. , Tsuneoka, K. , Dimchev, A. B. and Shikita, M. : Induction of the expression of the interleukin-1 β gene in mouse spleen by ionizing radiation. Radiat. Res. , 133, 321-326, 1993.
- 5) Ogiso, Y. , Yamada, Y. , Ando, K. , Ishihara, H. and Shibata, Y. : Differential induction of prostaglandin E2-dependent and -independent immune suppressor cells by tumor-derived GM-CSF and M-CSF. J. Leukoc. Biol. 53, 86-92, 1993.
- 6) Ishihara, H. , Yoshida, K. , Nemoto, K. , Tsuneoka, K. and Shikita, M. : Constitutive overexpression of the c-fos gene in radiation-induced granulocytic leukemia in mice. Radiat. Res. , 135, 394-399, 1993.

総説・解説

- 1) 石原弘、色田幹雄：実験講座 巨大 DNA の超高速サザンブロット法 蛋白質核酸酵素 35 , 2037-2041, 1990.
- 2) 石原弘：電離放射線に対する細胞の遺伝子発現応答 医学のあゆみ 166,792, 1993.

口頭発表

- 1) 色田幹雄、常岡和子、石原弘 :International Symp. on Mol. Biol. of Hematopoiesis、インスブルック 1989 .7.
- 2) 石原弘、常岡和子、色田幹雄：第 52 回日本血液学会総会、東京 1990.3.
- 3) 石原弘、常岡和子、吉田和子、根本久美恵、武藤正弘、色田幹雄：日本放射線影響学会第 33 回大会、仙台 1990. 10.
- 4) 東智康：第 13 回日本分子生物学会年会、京都 1990. 11.
- 5) 色田幹雄、常岡和子、石原弘 :9th International Congress of Radiat. Res. トロント 1991. 7.
- 6) 石原弘、Dimchev A. B. 、常岡和子、色田幹雄：第 64 回日本生化学会大会、東京 1991. 10.
- 7) 石原弘、田中泉、常岡和子、色田幹雄：第 15 回日本分子生物学会年会、京都 1992. 12.
- 8) 石原弘、田中泉：第 16 回日本分子生物学会年会、千葉 1993. 12.

2. 遺伝的高リスク群の検出、モデル実験動物の開発に関する研究

①遺伝的高リスク群の染色体不安定化関連ヒト遺伝子の研究

堀雅明、高橋永一、辻秀雄、辻さつき（遺伝研究部）

山内正剛（科学技術特別研究員）

Molecular Cytogenetic Studies on Chromosomal Instability in Genetic High-Risk Groups

Tada-aki Hori, Ei-ichi Takahashi, Hideo Tsuji

Satsuki Tsuji and Masatake Yamauchi*

Division of Genetics, *Special Researcher for Science and Technology

Chromosome instability associated with genetic diseases and cancers is one of the current topics in radiation biology. Many genes appear to be involved in the chromosome instability and they act as cis- or trans-acting predisposing factors in genetically high-risk group of individuals. In the present study, the following three researches were undertaken: 1) Molecular cytogenetics on chromosome instability in temperature-sensitive mutants of Chinese hamster cells, 2) Population cytogenetics and molecular genetics on chromosomal fragile sites, and 3) Human genome mapping of chromosomes 3 and 11.

Thirteen genetic complementation groups were identified among temperature-sensitive mutants defective in DNA synthesis and/or chromosome stability at non-permissive temperature. By molecular cloning of responsible human gene, a mutant exhibiting high sister chromatid exchanges was found to be defective in a gene function of RNA polymerase II largest subunit. Chromosomal fragile sites appeared to be hot-spots of chromosomal instability and might act as predisposing factors in cancer development. The fragile X syndrome, one of the most common human genetic diseases, was characterised by a unique genetic mechanism which involves dynamic mutations due to a heritable unstable DNA sequence, CCG repeats, located on a fragile site at Xq27.3. High-resolution cytogenetic maps of human chromosomes 3 and 11 were constructed by using chromosome-specific cosmid clones and direct R-banding fluorescence in situ hybridization method. These maps cover entire chromosomes with average physical distance of 0.6 Mb and 0.8 Mb for

chromosomes 3 and 11, respectively. These maps will provide many useful landmarks for positional cloning of genes associated with cancer and genetic diseases on these chromosomes. Further characterizations of other temperature-sensitive mutants and fragile sites are needed for understanding the chromosomal instability and radiation-sensitivity of the human genome.

1. 緒言

最近、ヒトゲノムを構成している全染色体をDNAレベルに解剖して染色体の分子構築様式、染色体機能および染色体変異性を解析しようとする気運が高まっている。ヒトゲノムの遺伝的安定性は正確な細胞複製機構（DNA代謝と染色体分配）によって維持されているが、このゲノム安定維持機構は必ずしも安定ではなく、自然界の種々の内的（生理的）あるいは外的（放射線や化学物質などの変異原）ストレス要因によるゲノム損傷によって乱れ、遺伝子突然変異や染色体異常などの原因となっている。

遺伝性疾患や癌の原因となるヒトゲノムの遺伝的変異性（染色体不安定性）を理解するためには細胞複製機構が関与するDNA代謝関連遺伝子群のトランス効果要因と染色体の分子構築に関与するシス効果要因との両面からの研究が必要である。これらの遺伝的要因に欠損のある個人は遺伝的高リスク群と考えられる。本研究は遺伝的高リスク群の検出系の開発を目標として、DNA代謝欠損および染色体不安定性を示す温度感受性変異株を用いたトランス効果に働く遺伝子群の研究とヒト染色体脆弱部位（fragile site、以下FSと略す）に着目したシス効果に働く要因の構造解析を行った。また、遺伝性疾患や癌に関連する遺伝子群、染色体再配列切断点、放射線高感受性遺伝子（AT）、脆弱部位などが座位しているヒト3番染色体と11番染色体について、コスミド・クローンの詳細な染色

体地図を作製し、これらの疾病原因遺伝子のポジショナル・クローニングによる解析研究に備えた。

2-1. 染色体不安定性突然変異株の分子細胞遺伝学的研究

哺乳類の染色体はヒトを含めて細胞分裂周期において動的変化を繰り返しているが、その構造は常に安定に保たれている。従って、染色体の構造を安定に保持する機構を細胞はそなえていると考えられる。その構造が不安定になれば、染色体異常の発生によってゲノムの変異を生じ、それは発癌や遺伝性疾患の原因となる。また、ヒト遺伝性疾患のうち、染色体不安定性症候群と呼ばれる染色体異常を誘発しやすい疾患があり、これらの疾患では放射線によるDNA損傷の修復欠損、高発癌性、免疫不全などの多面的な異常が認められている。従って、染色体不安定化に関与する遺伝子の分析は、放射線による遺伝的リスクの研究の基礎となると期待される。

染色体の安定保持には、テロメアやセントロメアなどのDNA配列と、DNA代謝およびクロマチンの動的変化に関与する遺伝子群とが重要な役割を担っていると推定される。その遺伝子群の遺伝学的解析にとって、一連の染色体不安定性突然変異株（ts株）を分離することは有効な方法である。染色体不安定性を示す構成的突然変異株を分離することは、安定保持に働く遺伝子が細胞の生存にとって必須な場合困難である。我々はあらゆる遺伝子の変異株の分離が原理的に可能な温度感受性変異を利用して、チャイニーズハムスターの培養細胞から細胞分裂周期に関するts株を分離し、それらのts株のうち非許容温度で姉妹染色分体交換（SCE）や染色体異常を高発する染色体不安定性ts株を選択して、その性状を分子細胞遺伝学的に解析した。

1. 実験材料と研究方法

(1) 染色体不安定性細胞周期変異株の分離と解析

染色体不安定性変異株は、細胞分裂周期に関するts株の中から、非許容温度（39℃）で染色体異常あるいはSCEを高発する変異株として分離された。ts株を得るために、チャイニーズハムスター培養細胞CHO-K1を変異原MNNGで突然変異処理を行い、突然変異の発現の後、軟寒天培地に植え、細胞クローンを得た。個々のクローンを2枚の軟寒天培地に植え、それぞれ許容温度（33.5℃）と非許容温度（39℃）で培養した。非許容温度で致死となる細胞クローンを許容温度で培養したプレートより分離し、再び非許容温度におけるts性を確認した後、ts株として分離した。ts株の欠損遺伝子の異同および優劣表現型は、ts株どうし、あるいはts株と野生株との細胞融合により雑種細胞を作成し、非許容温度での細胞増殖の回復を指標にした相補性試験により決定した。個々の相補性群に属するts株を非許容温度で10時間処理し、分裂期中期の染色体を用いて染色体不安定性の有無を検討した。細胞分裂周期におけるts株の停止点およびDNA合成率の異常を以下の方法により調べた。ts株を非許容温度で培養し、30分間ブロモデオキシウリジン（BrdU）でDNAを標識した。細胞を固定し、抗BrdU抗体/FITC 2次抗体およびプロピジウムイオダイドで2重染色し、2次元フローサイトメトリーにより解析した。

(2) 高SCEts株tsTM4を相補するヒト遺伝子の分離

SCE高発ts株、tsTM4に約50kbpに切断されたヒトゲノムDNAをリン酸カルシウム法により導入した。導入後、非許容温度で増殖する細胞クローン（一次形質転換細胞）を分離し、ヒトゲノムDNAの存在をヒト特異的反復配列Alu配列をプローブとしてサザン法により検出した。一次形質転換細胞のDNAをtsTM4にリン酸カルシウム法により再度導入し、形質が回復した二次形質転換細胞を分離した。二次形質転換細胞のDNAをEcoRIで切断し、ショ糖密度勾配遠心によりヒトDNAを含むDNAを分画した。このDNAをλgt10に連結し、ライブラリーを作成した。ファージライブラリーより、Alu配列をプローブとしてプラークハイブリダイゼーション法により、ヒト短鎖DNAを回収した。得られたヒトDNA断片に含まれるユニーク配列を用いて、HeLaゲノムライブラリーより長鎖DNA（12-19kb）を分離した。さらに、長鎖DNAと重複する両側のヒトDNA断片を分離した。分離したヒトゲノムDNAに存在するユニーク配列をプローブとして、プラークハイブリダイゼーション法によりヒトcDNAライブラリーよりヒト遺伝子を単離した。

(3) 染色体分配欠損ts株tsTM13の細胞生物学的解析

tsTM13の細胞分裂周期における停止点を、非許容温度で培養した細胞のフローサイトメトリーおよび分裂指数の測定により決定した。分裂期における染色体動態の異常を、非許容温度で培養した細胞の染色体スライドを用いて解析した。M期の紡錘体構築の異常は、チャンバースライドで培養した細胞を直接固定し、抗αチューブリン抗体/FITC 2次抗体を用いた蛍光抗体法により調べた。染色体の凝縮に関与するヒストンH1およびH3のリン酸化を次のように調べた。非許容温度下で³²P正リン酸で標識した細胞よりヒストンを抽出し、尿素ポリアクリルアミドゲルでヒストンを分離後、各ヒストンバンドの³²P取り込み量をオートラジオグラフィーおよび液体シンチレーションカウンターにより測定した。染色体凝縮とヒストンH1キナーゼの関係を調べるために、非許容温度で培養した細胞より核粗抽出液を調整し、H1キナーゼの特異的リン酸化部位を含むS1ペプチドを基質としてH1キナーゼ活性を測定した。

3. 実験結果と考察

(1) 染色体不安定性変異株

MNNGで突然変異処理した3万余りの細胞より25株のts株を分離した。相補性試験の結果、これらのts株はすべて劣性形質を示し、13の相補性群に分類された（表1）。そのうち、9相補性群が染色体不安定性を示した。染色体不安定性ts株はSCEおよび染色体異常の誘発性から3群に分けられた。すなわち、1群のts株は非許容温度で主にSCEを誘発した。2群のts株はSCEと染色体異常を、3群のts株は主に染色体異常を誘発した。1群と2群のts株は、tsTM13を除いて非許容温度ではS期で細胞分裂周期を停止し、停止したS期細胞のDNA合成率は低下した。染色体異常を高発する3群はS-G₂期で細胞周期を停止し、S期細胞のDNA合成率が低下するts株と低下しないts株が認められた。これらの結果より、細胞分裂周期における染色体の安定保持に細胞分裂周期に働く多くの遺伝子が関与し、これらの遺伝子の欠損により

表1 ts 変異株の染色体不安定性、DNA 合成の低下、細胞周期停止点

クラス	相補性群	細胞株	SCE 誘発 ^a	染色体異常誘発 ^b	DNA 合成 ^b	停止点
		CHO-K1	-	-	+	
1	D	tsTM4	++	±	-	S
	K	tsTM19	++	±	-	S
2	H	tsTM13	+	+	+	M
	J	tsTM18	+++	+++	-	S, G2
	I	tsTM20	++	+++	-	S
	H	tsTM26	+++	++	-	G1, S, G2
3	C	tsTM3	±	++	-	S-G2
	F	tsTM8	±	+	+	S-G2
	L	tsTM24	+	++	+	S-G2
4	A	tsTM1	±	±	+	S-G2
	B	tsTM2	±	±	-	G1
	E	tsTM7	-	-	+	G1, S, G2
	G	tsTM11	±	-	±	G1, S, G2

a, - : 誘発性なし, ± : わずか, + : 少し, ++ : かなり, +++ : 著しく
b, + : DNA 合成率変化なし, ± : 少し低下, - : かなり低下
SCE : 姉妹染色分体交換

SCE あるいは染色体異常が誘発されると考えられる。染色体不安定化は、DNA 損傷を誘起する突然変異原や DNA 複製の阻害剤により誘発されることが既に知られている。この事実より、染色体不安定性 ts 株の場合も、DNA 組み換えや DNA 切断を誘発する DNA 構造の変異が非許容温度で誘起されると考えられる。

SCE を多発する 1 群と 2 群の ts 株では S 期停止と DNA 合成率の低下が認められる。この結果は、DNA 複製に関与する遺伝子の異常により SCE が誘発されることを示唆する。すでに、SCE は S 期において DNA 複製と連動して形成されることが知られている。今回分離された ts 株における SCE も、S 期に誘発される結果を得ている。従って、SCE 変異株を用いた我々の結果は、単一遺伝子の異常が S 期機能、おそらく DNA 複製の異常を介して SCE を誘発することを強く支持する。

SCE の誘発に対して染色体異常の誘発は、表 1 に示されるように、S 期の DNA 合成の異常に起因するものと、DNA 合成にはほとんど関与せず、本来 S 期から G₂ 期に作用する遺伝子の欠損によるものとがある。後者の遺伝子機能は不明であるが、G₂ 期はクロマチンから高次の染色体構造に変化する移行時期であることから、染色体の凝縮に関与する遺伝子あるいはパッケージングのためのクロマチンの修飾に関与する遺伝子である可能性がある。

SCE の形成と DNA 代謝とは密接な関係があり、SCE の誘発因子として DNA ポリメラーゼ α 、チミジル酸合成酵素、ポリ ADP リボシル化酵素、XRCC1、DNA リガーゼ I 遺伝子が分離されている。分離した ts 株が既知の遺伝子か否かを明らかにするために、チミジル酸合成酵素遺伝子の変異株、および DNA ポリメラーゼ α の変異株との相補性試験を行ったところ、ts 株の変異遺伝子はいずれの遺伝子とも異なっていた。他方、ユビキチン活性化酵素 E1 遺伝子の ts 株との相補性試験から、tsTM3 は E1 遺伝子の変異株であることがわかった。E1 遺伝子の欠損は DNA 複製の開始および伸長速度を抑えることが知られていることから、tsTM3 では DNA 複製の遅延により染色体異常が誘発されると考えられる。以上の結果より ts 株の染色体不安定性の誘発は、DNA 複製など細胞分裂周期に必須な未知の遺伝子の欠損によると推定される。

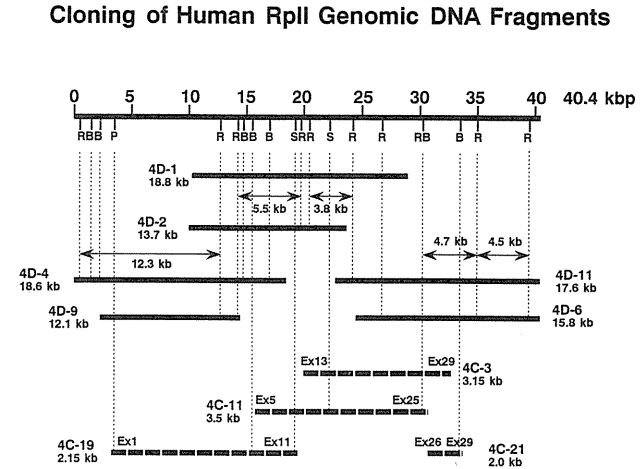
(2) SCE 高発 ts 株 tsTM4 の欠損を相補するヒト遺伝子の分離

染色体不安定性を遺伝学的に解析するためには、不安定性に関与する遺伝子を同定することが必須である。SCE 高発 ts 株の tsTM4 にヒトゲノム DNA をリン酸カルシウム法により導入し、2 株の一次形質転換細胞を 10⁻⁸ の頻度で分離した。さらに 1 株の一次形質転換細胞の DNA を tsTM4 に導入し、10⁻⁸ の頻度で 2 株の二次形質転換細胞を分離した。これらの形質転換株がヒト DNA を含むか否かをヒト特異的反復配列である Alu 配列をプローブとしたサザン法により決定した。その結果、一次形質転換株では多くのヒト DNA が含まれるのに対して、二次形質転換株ではわずかのヒト DNA が認められた。さらに、2 株の二次形質転換株に共通した Alu 配列を含む 4 個の EcoRI 切断 DNA 断片が検出された。この結果から、これらのヒト DNA 断片、あるいはその隣接 DNA に tsTM4 の欠損を相補するヒト遺伝子が存在すると推定される。

二次形質転換株の EcoRI 切断 DNA を用いてファージライブラリーを作成した。このライブラリーより、3.8kb の Alu 配列を含むヒト DNA を回収した。さらに、3.8kb に含まれるユニーク配列をプローブとして、HeLa ゲノムライブラリーより長鎖 DNA (4D-1, 4D-2) を分離した (図 1)。4D-1 の両端のユニーク配列をプローブに用いて、4D-1 と重複する DNA 断片 (4D-4, 4D-9, 4D-11, 4D-6) を分離した (図 1)。これらの DNA 断片には二次形質転換株で認められた 4 個の EcoRI DNA 断片 (12.3kb, 5.5kb, 3.8kb, 4.5kb) が存在した。ゲノム DNA 断片に存在するユニーク配列をプローブに、ヒト cDNA ライブラリーより cDNA を分離した。分離されたゲノム DNA および cDNA の塩基配列を決定したところ、得られた遺伝子は mRNA 転写の触媒酵素である RNA ポリメラーゼ II largest subunit (RPIILS) であった。現在、これ以外の遺伝子は、分離されたゲノム DNA に認められていない。

図 1 ヒト RPIILS 遺伝子の分離

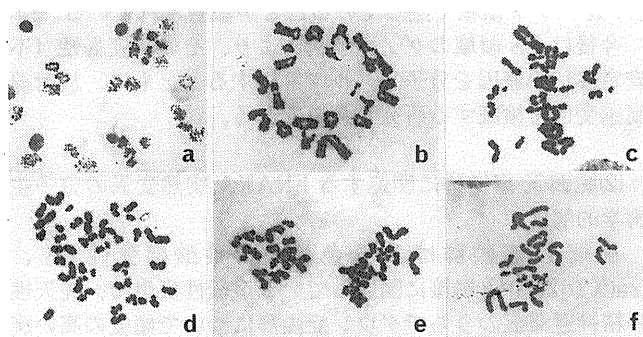
実線は、HeLa ゲノムライブラリーより回収したヒトゲノム DNA 断片を示す。破線は、ゲノム DNA のユニーク配列をプローブとして分離したヒト RPIILScDNA 断片を示す。上段実線のアルファベットは制限酵素切断部位を表す。R, EcoRI; B, BamHI; P, Sph I; S, Sal I; Ex, exon.



RPIILS が tsTM4 の変異遺伝子であるか否かは、ヒト RPIILS 遺伝子の導入による相補性の検討、および tsTM4 の RPIILS 遺伝子の突然変異の検出によって確認されなければならない。仮に RPIILS が tsTM4 の変異遺伝子だとすると、mRNA 転写を介した DNA 複製の異常によって DNA 構造の異常が誘起され、それが SCE の誘発要因になっていると考えられる。その過程の分析はこれからの課題であるが、RPIILS の分離は、染色体不安定性 ts 株を用いて DNA 代謝に関連した重要な遺伝子を分離できることを示唆する。

(3)染色体分配欠損 ts 株の解析

図2 tsTM13 の M 期染色体の動態異常。tsTM13 を非許容温度で 25 時間培養した。a, M 期中期から後期の細胞が蓄積する。b, 後期のはじめ。セントロメア領域のみ分離している。c, 遅延型後期。染色体の分離が非同調的に起こる。d, 後期の中頃。分離した染色体は細胞全体に分散する。e, 終期のはじめ。f, 終期のおわり。細胞質分裂を完了した後も染色体は脱凝縮しない。



tsTM13 は非許容温度で主に M 期後期で細胞分裂を停止する。そのため、非許容温度における分裂指数は 70 % に達する (図 2 a)。M 期で停止した細胞の染色体の挙動を観察したところ、染色体は過凝縮をおこし (図 2 b-f)、後期において染色体は非同調的に分配される (図 2 c)。約 10 % の細胞は細胞質分裂を完了した終期まで到達するが、これらの細胞においても本来生じる染色体の脱凝縮がおこらない (図 2 f)。これらの結果より、tsTM13 では M 期から G₁ 期への移行に必須な遺伝子に変異しており、この変異によって染色体過凝縮、染色体分配遅延、および染色体脱凝縮欠損が起こると推定される。

M 期後期における染色体分配遅延が紡錘体の構造異常によるか否かを、抗 α チューブリン抗体を用いた蛍光抗体法により調べた。その結果、M 期後期の紡錘体の伸長に異常は認められなかったが、本来、紡錘体の消失する終期においても tsTM13 の紡錘体の脱構築は認められなかった。すなわち、tsTM13 は染色体の脱凝縮欠損とともに、紡錘体の脱構築欠損を示す。

染色体の脱凝縮欠損が、ヒストン H1 および H3 の過度のリン酸化によるか否かを調べるために、非許容温度において M 期後半に細胞分裂を停止している細胞 [³²P] 正リン酸で標識した。その結果、tsTM13 のヒストン H1 および H3 のリン酸化は、非許容温度において M 期細胞の増加に伴って上昇した。さらに、リン酸化は M 期後半の細胞が多い処理時間においても増加していた。この結果は、

正常細胞において M 期後半で H1 および H3 のリン酸化は減少するという知見に反する。ヒストン H1 をリン酸化する cdc2 キナーゼの活性も、M 期後半の細胞が多数を占める細胞集団で顕著に増加していた。これらの結果より、tsTM13 では M 期後半においても、正常細胞と異なり cdc2 キナーゼの活性が高レベルに保たれ、ヒストンリン酸化は高レベルで維持され、そのため染色体の脱凝縮がおきないと考えられる。

cdc2 キナーゼの活性化には、おもに cdc2 蛋白質の 15 番目のチロシン (Tyr-15) 残基の脱リン酸化とサイクリン B との結合が必要であることが知られている。また、M 期後半におけるその不活化は、ユビキチン経路によるサイクリン B の分解によると考えられている。tsTM13 で両者を調べたところ、M 期後半においても cdc2 蛋白質は脱リン酸化された活性型として維持されており、またサイクリン B の分解も認められなかった。以上の結果より、tsTM13 の染色体脱凝縮の欠損は、cdc2 キナーゼの活性が M 期後半においても維持されているため、即ち、本来 M 期後半に活性型 cdc2 に作用し、不活化する制御因子が遺伝的に変異しているためと考えられる。

上述の推定が正しいならば、M 期停止細胞の活性型 cdc2 キナーゼを人為的に不活化すれば、細胞分裂は正常化すると思われる。そこで、非許容温度で M 期に停止した細胞をチロシンホスファターゼである cdc25 の活性阻害剤バナジン酸や、プロテインキナーゼの活性阻害剤スタウロsporin で処理したところ、凝縮染色体は脱凝縮し、細胞分裂は M 期から G₁ 期へと進行した。これらの処理により、tsTM13 のもう 1 つの異常形質である紡錘体の脱構築の異常も正常化した。この時、cdc2 キナーゼ活性は顕著に低下していた。この結果は、tsTM13 では活性型 cdc2 キナーゼの不活化因子が遺伝的に変異していることを裏づけるとともに、染色体脱凝縮や紡錘体脱構築に cdc2 キナーゼの不活化が関与していることを示している。cdc2 キナーゼの不活化因子は未だ同定されておらず、tsTM13 を相補する遺伝子の分離は cdc2 の不活化の機構を知る上で重要である。

2-Ⅱ. ヒト染色体脆弱部位の遺伝的不安定性とその分子遺伝学的研究

ヒト染色体上の脆弱部位 (FS) はヒトゲノムの遺伝的変異性に関与するホット・スポットとして注目されている。本研究では、FS の遺伝的不安定性を分子細胞遺伝学的に検討するとともに、脆弱 X 症候群 (fragile X syndrome) に密接に関連する X 染色体上の FS について分子遺伝学的解析を行った。

1. 実験材料の研究手法

(1) FS の検出法：一般健常人、癌患者および無精子症患者の末梢血リンパ球を特定の培養条件下で培養して染色体標本作製し、G バンドおよび R バンド法を用いて FS の座位を決定した (Takahashi et al, 1988 参照)。

(2) FS での染色体不安定性の検定：FS 保因者由来のリンパ芽球細胞株を用いて染色体異常と姉妹染色分体交換 (SCE) の頻度を調査した (Tsuji et al, 1991 参照)、また、子宮癌患者由来の癌細胞株を用いて、ヒトパピローマウィルス (HPV16) の染色体挿入部位を FISH 法で検定

した (Hori et al, 1992 参照)。

(3)脆弱 X 症候群の DNA 診断用プローブの調製：Kremer らの報告した DNA 塩基配列を参考にして、(CCG)_nの上流と下流側でそれぞれ 127bp と 451bp のゲノム DNA 断片を増幅させてクローン化し 451bp のプローブを pPCRfx1 と命名した (図 3、Yamauchi et al, 1992 参照)。簡便かつ再現性良くゲノム DNA から目的の領域を十分量増幅するため、まず、外側に設定したプライマーを用いてゲノム DNA を増幅してから、さらにその増幅産物を 1 回目の PCR で用いたプライマーのすぐ内側に設定したプライマーを用いて増幅するという 2 段階 PCR 法を用いることにより、きわめて特異的に PCR 産物を増幅することができた。次いで、PCR 産物をプラスミドベクターにクローン化し、その塩基配列を決定したところ、得られた増幅産物は間違いなく目的の領域に由来するものであることが確認された。

pPCRfx1 をプローブとしてヒトゲノム DNA ライブラリーより脆弱 X 部位を含む約 20kb をカバーする二つの λ ファージクローンを得た。両クローンともに脆弱 X 染色体の発現部位にマップされることが蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法で確かめられた。

(4)脆弱 X 症候群患者および家系調査：患者及びその家系員の末梢血リンパ球あるいはリンパ芽球細胞株より通常の方法でゲノム DNA を抽出し、制限酵素 (EcoRI, EagI, EcoRI-EagI) 処理後、アガロースゲル電気泳動法により DNA 断片を分離した。³²P-標識 pPCRfx1 を DNA 診断用プローブとしてサザンブロット法で脆弱 X 突然変異による制限酵素断片長の変異を検定した。

2. 実験結果と考察

(1) FS の遺伝的不安定性についての分子細胞遺伝学的解析

日本人集団 (一般健常人 1022 人、癌患者 693 人、および無精子症患者 35 人) を対象に FS の集団調査を行い、3 群 9 種類の遺伝性 FS 保因者を 94 人 (5.4 %) 検出した。検出された FS のほとんどは染色体 R バンドと G バンドの境界領域に位置しており、癌関連遺伝子や腫瘍特異的染色体再配列の切断点近傍に存在する。また、特定の癌患者に FS 保因者が多い傾向がみられ、FS と腫瘍発生の関係を示唆する知見が得られた。3 種類の遺伝性 FS [fra (8) (q24.1), fra (16) (p12) および fra (16) (q22)] について FS の発現条件 (ディスタマイシン A、ヘキスト 33258、ペレニール処理) を FS 保因者由来のリンパ芽球細胞株 (LCL) を用いて検討した結果、LCL が FS 発現に関して末梢リンパ球での性質を保持していることが確認された。また、BrdU 存在下で FS 誘発剤処理を行うと 3 種類の FS とともに FS 発現頻度の上昇が認められた。さらに、fra (16) (q22) と別種の fra (10) (q25.2) については FS 領域で姉妹染色分体交換 (SCE) の有意な増加が見られ、これらの変異領域が DNA 組み換えのホットスポットであることを示唆する結果が得られた。これらは SCE がレプリコン群の連結部位 (すなわち、G/R 境界領域) で生じやすいという Painter の複製モデルを支持する結果である。

また、ヒトパピローマウイルスに感染した子宮癌患者の腫瘍細胞株を用いてそのウイルス DNA の染色体上の挿入

部位を FISH 法で解析したところ、パピローマ 16 型の遺伝子 DNA が遺伝性 FS, fra (8) (q24.1) と MYC 癌遺伝子 (8q24.12-q24.13) の近傍 (8q24.1) に挿入され、その部位で約 1000 コピーに増幅されていることが明らかとなった。FS の存在する 8q24 領域は他のウイルス遺伝子の挿入/欠失部位でもあり、本結果はこの領域が外来遺伝子の挿入と増幅のホットスポットであることを示唆している。

多くの FS が存在する G/R バンド境界領域は DNA 複製のタイミングとともにゲノムの変異性に関しても興味ある領域である。ヒト 2 番染色体上の遺伝性 FS については FRA2A(2q11.2) と FRA2B(2q13) の中間領域に介在型のテロメア類似配列の存在が報告されている。この領域は霊長類の 2 番染色体の核型進化にも関連している。最近、この領域に相同性をもつマウスの 2 番染色体 FS にもテロメア類似配列が検出され、しかも、この FS が放射線によって誘発されるマウス急性白血病 (AML) の染色体変異のホットスポットであることが報告されている。また、放射線によって誘発されるヒト染色体異常の切断点も G-バンド/R-バンド法併用解析によって、そのほとんどが G/R バンド領域で生じていることが報告されている。

今後は FS 領域のゲノム解析により、その高変異性 (不安定性) の原因を分子レベルで解析するとともに、放射線高感受性を検証する研究が必要である。

(2)脆弱 X 症候群に関連する FRAXA 突然変異の分子生物学的解析

脆弱 X 症候群は X 染色体上の葉酸感受性 FS、fra(X)(q27.3) と密接に関連している遺伝性疾患で、先天性の精神遅滞症のうちダウン症候群について頻度の高い疾患である。最近、FRAXA 領域の DNA 断片がクローン化され、その構造解析が進みつつある。我々も FRAXA 領域の一部分を PCR 法で増幅し、クローン化することに成功した。(図 3 参照、実験方法の項参照)

図 3 脆弱 X 領域 (FRAXA) の CCG 反復配列近傍の物理的地図

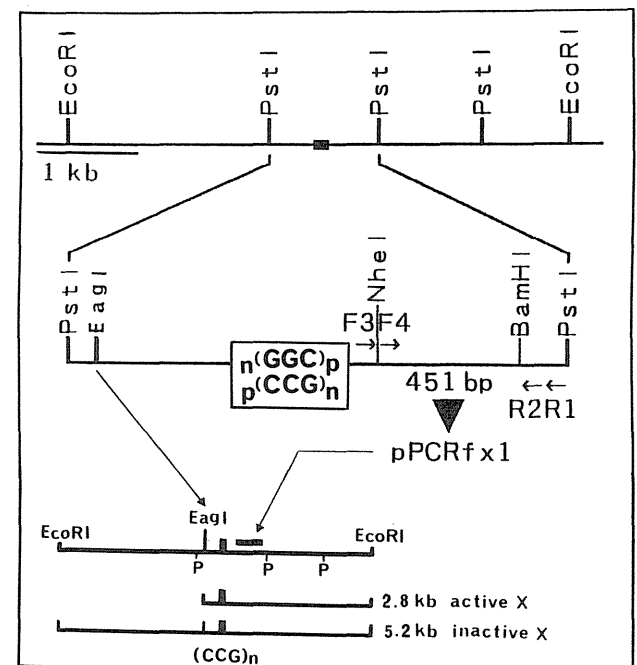


図4 脆弱 X 症候群患者 [fra (x)], 体細胞雑種 (脆弱 X ヒト細胞-マウス細胞, S. c. h.) および正常人 (Control) 由来の DNA サンプルを用いたサザンブロット解析結果

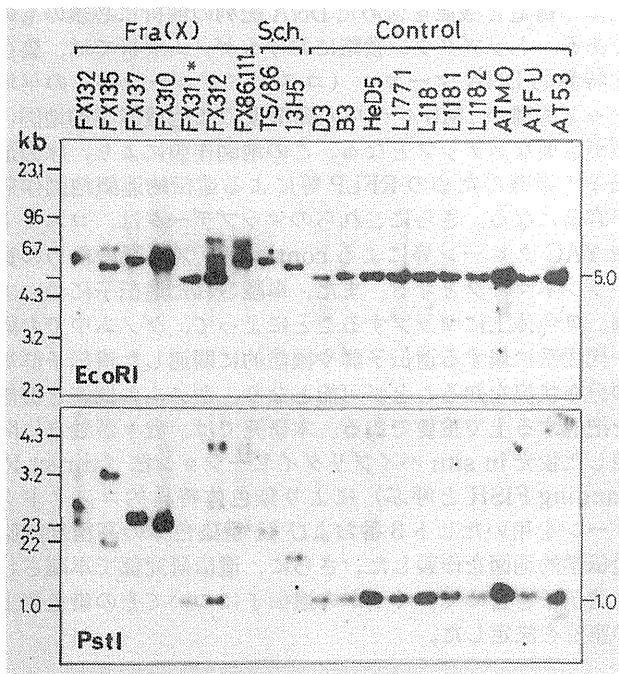


図5 脆弱 X 症候群家系 (A, B, C) の DNA 診断結果 PstI 消化物 (a, b, c) を用いた遺伝子型同定と EcoRI + EagI 二重消化物 (d, e, f) を用いたメチル化パターン解析

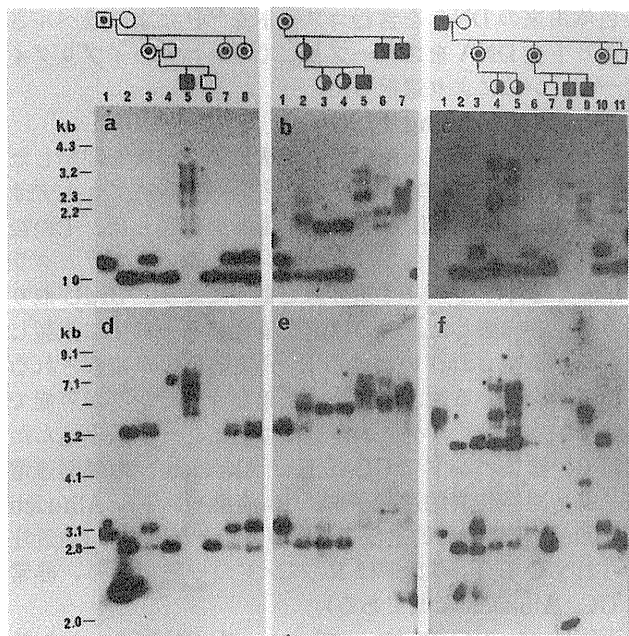


図4は図3の pPCRfx1 をプローブとして行ったサザンハイブリダイゼーションの結果である。供試材料は、脆弱 X 症候群患者6人、正常人10人および脆弱 X 染色体を保持しているヒト X マウス雑種細胞2系統由来の DNA サンプルを制限酵素 EcoRI と PstI で処理したものである。正常人由来の DNA ではすべて EcoRI 処理で 5.2kb, PstI 処理で 1kb の DNA 断片が検出される。しかし、脆弱 X 症候群患者 (FX311 は後で正常人と判明) と雑種細胞では

いずれも正常人に比較して検出される DNA 断片長が長くなっている。FX312 は女性の保因者で正常 X 染色体と変異 X 染色体の両方が検出されている。他の患者はすべて男性患者で変異 X 染色体のみ検出されている。PstI 処理サンプルは EcoRI 処理サンプルと同様の変異を示し、前者は後者の変異をより詳細に示したパターンとなっている。このことは、変異の原因が図3に示す 1kb の PstI 断片中のおそらく (CCG)n の増幅にあることを示唆している。変異のパターンは患者によって異なり、複数の変異バンドが検出される例などがある。この複数バンドあるいはスミアの原因は体細胞における (CCG)n 反復配列の不安定性によるものと考えられる。われわれがクローン化した pPCRfx1 は、従来の X 染色体脆弱部位に近接する DNA マーカーでは脆弱 X 症候群かどうか判別できなかった患者に対して、有効な遺伝子診断用プローブとして利用することができる。

図5は脆弱 X 症候群家系の代表的な3例について DNA 診断を行った結果を示している。

家系 A (a, d) では lane 5 の男性が精神遅滞を発症していた。家系分析は家族構成員の血液資料から DNA を抽出し、PstI 消化物 (a) と EcoRI + EagI 2 重消化物 (d) をサザンブロット解析して行った。Lane 1 の男性は約 1.6kb の断片が検出され premutation の保因者と診断された。精神遅滞等の臨床症状は見られなかった。lane 3, 7, 8 の3人の女性も正常な 1kb に加えて 1.6kb の断片が検出され、premutation の保因者と診断された。精神遅滞を発症している lane 5 の男性では、母親の premutation が遺伝子として full mutation への変換が起こり、CCG 反復配列を含む脆弱 X 領域はさまざまな大きさの制限酵素切断断片の集積またはスミアとして検出されている。これは患者個人を構成する体細胞において脆弱 X 領域の CCG 反復配列数がモザイクになっていることを示唆するものであり、CCG 反復配列の脆弱 X 領域における遺伝的不安定性を如実に示すものである。

また、この結果は脆弱 X 症候群は母親から遺伝した場合にのみ発症し、父親から遺伝した場合にはその直接の子供においては発症しないという従来の観察データを分子レベルで支持するものである。premutation を保因している lane 1 の男性から3人の女性へ脆弱 X 染色体が遺伝しているが、いずれの場合においても premutation として遺伝しており、full mutation への変換は行っていない。これらの3人の女性保因者の表現型は正常であった。

家系 B (b, e) は premutation の女性保因者 (lane 1) から脆弱 X 染色体が伝達された場合、3人の子供 (lane 2, 6, 7) ですべて full mutation への変換がみられた例である。また、C (c, f) は精神遅滞を発症している男性患者 (lane 1, 家系 B の lane 7 と同一人) が正常な女性 (lane 2) と結婚して子供をもうけた大変まれな例である。この男性患者からは異常にサイズが増大した断片が検出されたが、これは男性精神遅滞患者に典型的なサザンブロットの結果である。しかし、驚くべきことにこの男性患者から脆弱 X 染色体を遺伝した3人の女性 (lane 3, 6, 10) からは premutation しか検出されなかった。この結果はたとえ精神遅滞を発症している患者からであっても、男性から遺伝した場合にはその直接の子供においては発症しないという観察事実を分子レベルで具体的に示すも

のである。これは脆弱 X 症候群男性患者の体細胞と生殖細胞とでは脆弱 X 領域における動的変異の程度が大きく異なっている可能性を示唆するものである。最近、full mutation をもった男性患者から得た生殖細胞をサザンブロット法で解析して男性患者の精子細胞では premutation レベルの変異しか検出されないことが報告された。

CCG 反復配列を含む FRAXA 領域の 5' 上流には CpG 島の存在が知られており、full mutation 領域の変異をもった脆弱 X 染色体ではこの CpG 島に異常なメチルが生じることが報告されている。図 5 の下段 d, e, f は CpG 島の EagI 部位に着目してメチル化のパターンを調べた結果である。図 3 に示した制限酵素 EagI 認識切断部位がメチル化を受けている場合、EagI はその認識配列を切断できなくなる。DNA を EagI と EcoRI で消化すると、EagI 部位がメチル化を受けていなければ 5.2kb の EcoRI 断片は切断され、診断用 DNA プローブ (pPCRfx1) で検出される断片の長さは 2.8kb となるが、メチル化を受けている場合には 5.2kb の EcoRI 断片が検出される。正常な男性の X 染色体はメチル化されていないので 2.8kb の断片だけが検出される (図 5 d, e の lane 2)。表現型が正常な premutation の男性においては約 3kb の断片だけが検出され、脆弱 X 領域がメチル化をのがれていることが分かる。full mutation を持った男性患者 (図 5 d の lane 5; 図 3 e の lane 5, 6, 7; 図 3 f の lane 8, 9) では、いずれの場合も完全なメチル化のパターンが検出されている。しかし、女性保因者のメチル化のパターンは複雑で、正常 X 染色体も脆弱 X 染色体もメチル化をうけているものといないものが入り交じったいわゆるモザイクの状態として検出される。

以上の結果は脆弱 X 症候群の原因が Xq27.3 に存在する FRAXA 領域の CCG 反復配列の増幅によることを強く示唆している。この遺伝性疾患はその原因が X 染色体上の遺伝子突然変異による伴性劣性遺伝性疾患と考えられていたが、遺伝学的にそれと矛盾する不可解な遺伝様式が家系内で観察されている。その 1 つは約 30 % の女性保因者に精神遅滞の発症がみられること、次に脆弱 X 染色体を受け継いだと思われる男性のうち 20 % が精神遅滞を発症せず、見かけ上正常であるが、脆弱 X 突然変異を子孫伝達するいわゆる normal transmitting male の存在である。そして、この疾患では世代を経るごとに家系内での患者数が増加するいわゆる表現促進 (anticipation) の現象がみられることである。これらの現象は FRAXA 領域に存在する CCG 反復配列の正常多型変異から premutation への変異と premutation から full mutation への変異とからなる 2 段階の動的突然変異 (dynamic mutation) によって説明することが可能となった。同様の三塩基反復配列の異常な増幅による動的突然変異が筋緊張性ジストロフィー、球脊髄性筋萎縮症、ハンチントン病、脊髄小脳失調性などの遺伝性疾患においても同定されてきており、ヒトゲノム中には同様の変異性に富んだ領域が多数存在するものと思われる。動的突然変異の発生機構の解明は染色体不安定性とゲノムのダイナミズムを分子レベルで理解するうえでも重要な課題である。

2-III. FISH 法によるヒトゲノムマッピング

ゲノムマップ (細胞遺伝学的地図および遺伝的連鎖地図、本報告では前者を指す) の作製は生命現象の遺伝学的解析研究に欠くことのできない手段であり、遺伝子の単離や染色体の構造と機能を含めた DNA 配列の解析に必須のものである。トップダウン戦略におけるゲノム解析では、染色体特異的 DNA マーカー (コスミドクローン等) の平均マップ距離が 1Mb レベルの高精度の細胞遺伝学的地図作製が重要なステップとなる。この地図作製により、原因遺伝子の単離のための RFLP 等による遺伝的連鎖地図作製が容易になる。さらにこれらのマップデータは、コスミドや YAC クローン等による contig マップ作製のための良いランドマークとなる。また、単離された遺伝子については、染色体上にマップすることによって、ゲノム中での同一代謝系に属する遺伝子群や機能的に関連した遺伝子群等の分布状況を知ることが可能となり、ゲノムの構造と機能を把握する上で重要である。本研究では、我々が独自に開発した蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法 (direct R-banding FISH と呼ぶ) により染色体特異的コスミドクローンをを用いたヒト 3 番および 11 番染色体の高精度細胞遺伝学的地図を作製した。さらに、遺伝研究部で単離された遺伝子を含めていくつかの遺伝子についてその染色体上の座位を決定した。

1. 実験材料と研究方法

(1) ヒト 3 番及び 11 番染色体特異的コスミドクローンの分離

ヒト 3 番あるいは 11 番染色体のみを持つヒトゲッ歯類体細胞雑種よりコスミドライブラリーを作製した。ヒト染色体由来の DNA を含むコスミドを ^{32}P によりラベルされたヒト全 DNA をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーション法により選択した。

(2) Direct R-banding FISH

ヒト末梢リンパ球を用いて、常法により培養を開始した後、細胞周期 S 期の前半にチミジン、後半にブロモデオキシウリジン (BrdU) で処理して標本作製した。その後、ヘキスト 33258 で染色し、水銀ランプあるいはブラックライト + ホットプレート (紫外線と熱) により、BrdU 取り込み部位を崩壊した。この標本を染色すると前半に複製した部分が染色され、いわゆる R- 分染染色体が観察される。この標本を用いることにより、正確なマッピングが可能であるばかりでなく、ゲノム構造について、一歩踏み込んだ解析 (R- 濃染バンド: GC-rich、Alu-rich、増殖関連遺伝子群、組織特異的遺伝子群、R- 淡染バンド: Alu-rich、L1-rich、組織特異的遺伝子群) が可能となった。(最近注目されている T- バンドは R- バンドの一種であり、非常に GC、Alu-rich 領域である)。

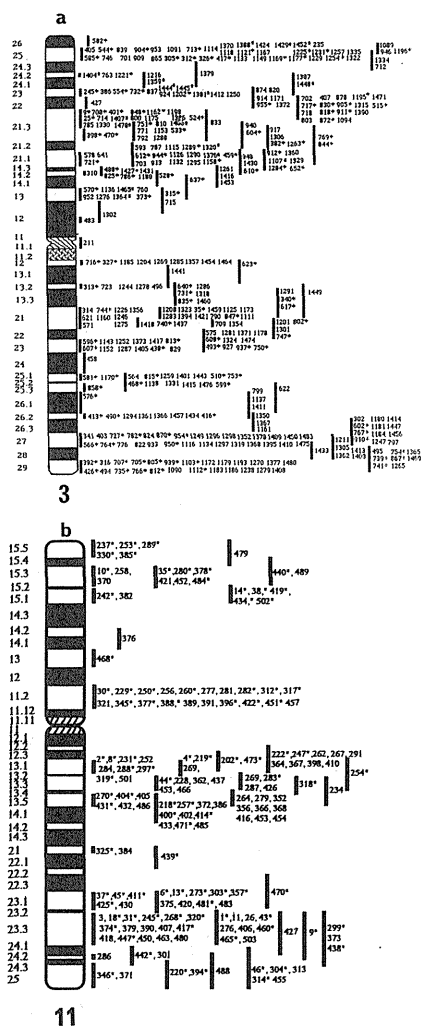
FISH については、プローブ DNA をビオチン-16dUTP でニックトランスレーションによりラベルし、エタノール沈殿、熱変性を行った。染色体は熱変性して、1 本鎖にした後、プローブ DNA とハイブリダイズさせ、常法に従って検出した。反復配列の抑制にはヒト全 DNA あるいはヒト Cot-1 DNA を用いた。またシグナルの増幅についてはヤギ抗ビオチン抗体-FITC 抗体ヤギ IgG 法により行った。

2. 結果と考察

(1) FISH 法の改良

最近の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法は、従来の体細胞雑種法やアイソトープ標識 *in situ* ハイブリダイゼーション法の難点を克服した方法で、短時間で高精度の結果が得られる利点がある。この方法は、プローブ DNA をビオチンで標識し、染色体にハイブリダイズさせ、ビオチンに親和性の高いアビジン-FITC (fluorescein isothiocyanate) で処理して、アビジンに結合した FITC をある特定の蛍光波長で発色させて、光のスポットとして蛍光顕微鏡で検出する方法である。しかし、この方法にも解決すべきいくつかの問題点、1) 染色体分染核型上での直接的マッピング、2) インサートサイズが 5kb 以下の単一コピー遺伝子の検出、3) ゲノミククローンに含まれる反復配列の除去、が残されていた。本研究により、1) 複製前中期 R-バンドを用いた直接的マッピング (direct R-banding FISH)、2) 二次抗体を用いたシグナル増幅 (amplification)、3) ヒト全 DNA あるいは Cot-1DNA による抑制 (suppression) によって解決することができた。

図6 ヒト3番染色体 (366 クローン、a) 及びヒト11番染色体 (186 クローン、b) のコスミドによる染色体地図。バーはクローンのマップされた領域を示す。☆印は多型性 (RFLP および VNTR) のクローンを示す。



(2) ヒト染色体特異的コスミドクローンによる3番及び11番染色体の細胞遺伝学的地図

コスミドクローンに含まれている反復配列を除去するために、ヒト全 DNA あるいは Cot-1 の DNA による抑制 FISH 法を用いた。シグナルの検出効率及びサイズはクローン毎に異なっていたが、タブレットのシグナルが最低5つ観察された染色体像についてその局在部位を決定した。3番染色体については366クローンをマップした (図6a)。3番染色体の物理的 DNA 長は 214Mb と推定されているので、この染色体地図の平均マップ距離は 0.6Mb (214/366) となる。11番染色体については168クローンをマップした (図6b)。11番染色体の物理的 DNA 長は 130Mb であるから、その平均マップ距離は 0.8Mb (130/168) である。

各染色体におけるクローンの局在部位は染色体全体に位置するが、R-濃染バンドに集中する傾向がみられた。これはコロニーを選択する際にヒト全 DNA を用いており、Alu を含んだ DNA を選択的に回収しているためであり、R-分染標本作製上の技術的問題ではないと考えられる〔注〕。このマップでは R-淡染バンドでのマップが欠けており、この領域でのマップを別の系 (例えば、L1 配列でコロニーを選択するか、染色体顕微切断法でその領域をクローン化するかあるいはレーザーによる染色体ソーティングでライブラリーを作製する) で行う必要がある。また、3Mb レベルでのオーダリング (配列順次決定) は可能であったが、それ以下の距離のものについては不可能であり、それには休止核を用いた多色 FISH 法による解析や染色体 fragile site をランドマークとしての解析が必要である。〕

ヒト3番染色体短腕 (p14-p21 領域) には肺がん、腎がん等の数多くのがん抑制遺伝子の存在が知られている。また、p14.2 には染色体脆弱部位が報告され、さらにこの3番染色体には数多くのがん特異的染色体再配列に観察される切断点 (cancer-breakpoint) が記載されている。ヒト11番染色体については、ataxia telangiectasia の原因遺伝子が q23.1 領域にマップされており、さらに種々の遺伝性疾患の原因遺伝子や cancer-breakpoint が報告されている。これらの遺伝子の単離にはこの高精度細胞遺伝学的地図は重要な資料となり、さらに YAC やコスミドによる contig マップ作製のための有用ランドマークを提供する。

〔注〕 R-淡染バンド領域ではハイブリダイゼーションが行われないという可能性が考えられるが、次の実験結果からそれは支持されない; 1) ヒト全 DNA を R-分染染色体に FISH を行った場合、セントロメアと Y 染色体のヘテロクロマチン領域を除いて R-濃染、淡染バンド共にハイブリダイズする、2) セントロメアプローブはセントロメア領域 (後期複製で AT-rich) にハイブリダイズする、3) チミジンと BrdU の処理を逆に行うと R-濃染バンドは G-淡染バンドとなる標本 (複製 G-分染) が得られるが、この標本にヒトコラーゲン II 型遺伝子 (COL2A1, GC-rich, R-濃染バンドにマップされている) をハイブリダイズした場合、そのシグナルの検出頻度は両ホモログでのダブルットシグナルが 20% 程度低下したが、全体の検出頻度は 90% であり、R-分染標本を用いた頻度と同じであった。これらのことから、R-淡染バンドでは多少検

出頻度は低下するという可能性は残されるものの、あきらかに淡染バンドにハイブリダイズする。これらの問題を解決するには、G- 分染標本を用いて、Alu および L1 選択クローンを R- と G- 分染核型上に相互にハイブリダイズし、解析する必要がある。]

(3) 遺伝子マッピング

DNA 修復遺伝子、がん遺伝子あるいは DNA 複製に関連する遺伝子を中心にそのヒト染色体上の詳細な座位を決定した。その代表例として、遺伝研究部で単離された DNA 修復 ERCC5 遺伝子を 13q32.3-q33.1 に、ヒトシジン三リン酸合成酵素遺伝子 CTPS を 1p34.1-p34.3 にマップした。また他機関との共同研究によりチミジル酸合成酵素遺伝子 (TS) を 18p11.32 に、そして脆弱部位マーカーを併用して、MYC 遺伝子を (8q24.12-q24.13) にマップした。その他の一連の研究から、技術的には cDNA では 1.1kb、ゲノミック DNA では、2.1kb までの遺伝子がサブバンドレベルでマップが可能となった。これらの遺伝子の局在部位はすべて R- 濃染バンドであった。哺乳類では、前期複製の R- 濃染バンドには増殖関連遺伝子が座乗していると言われており、これらの遺伝子は増殖に関連した遺伝子であることからこの知見と矛盾しない。

3. 結論

本研究では、遺伝的高リスク群の検出系の開発を目標として、(I) 染色体不安定性突然変異株の分子細胞遺伝学的研究、(II) ヒト染色体脆弱部位の遺伝的不安定性とその分子遺伝学的研究および (III) FISH 法によるヒトゲノムマッピングを実施し、染色体不安定化関連ヒト遺伝子の研究を行った。研究 (I) においては、温度感受性変異 (ts) 株の体細胞遺伝学的解析によって、染色体不安定性に關与する遺伝子の多くは、細胞分裂周期の S 期に機能する遺伝子であることがわかった。SCE 高発 ts 株を相補するヒト遺伝子を分離したところ、その遺伝子は、ヒト RNA ポリメラーゼ II largest subunit 遺伝子であった。また、染色体分配欠損 ts 株の解析から、染色体分配にヒストン H1 キナーゼである cdc2 の不活性化が關与する知見を得た。研究 (II) においては、ヒト染色体脆弱部位が染色体不安定化のホットスポットで、腫瘍発生にも関連している知見がえられた。また、脆弱 X 症候群に関連する X 染色体上の脆弱部位 (FRAXA) の分子遺伝学的解析によって、その突然変異の原因が FRAXA 領域に存在する CCG の三塩基反復配列の増幅による動的突然変異にあることが明らかとなった。研究 (III) においては、AT 遺伝子、脆弱部位、染色体再配列切断点あるいは癌抑制遺伝子の欠失等が存在するヒト 3 番および 11 番染色体について当研究部で開発した Direct R-banding FISH を用いて高精度の染色体地図を作製した。

これらの一連の研究成果は、遺伝的高リスク群での染色体不安定化にトランス効果あるいはシス効果を与える遺伝的要因の理解に寄与するばかりでなく、今後の放射線感受性および放射線発癌の機構解明に向けてのゲノム解析研究にも展望を与えるものである。

4. 研究発表

I.

- 1) Tsuji, H., Heartlein, M. W. and Latt, S. A. :

Disparate effects of 5-bromodeoxyuridine on sister-chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Bloom syndrome fibroblasts. *Mutat. Res.*, 198, 241-253, 1988.

- 2) Tsuji, H., Matsudo, Y., Tsuji, S., Hanaoka, F., Hyodo, M. and Hori, T. : Isolation of temperature-sensitive CHO-K1 cell mutants exhibiting chromosomal instability and reduced DNA synthesis at nonpermissive temperature. *Somat. Cell Mol. Genet.*, 16, 461-476, 1990.
- 3) Tsuji, H., Matsudo, Y., Ajiro, K., Yasuda, H., Hanaoka, F., Hayashi, A., Utsumi, S., Ohba, Y. and Hori, T. : A temperature-sensitive CHO-K1 cell mutant (tsTM13) defective in chromosome decondensation and spindle deconstruction in M phase. *Exp. Cell Res.*, 198, 201-213, 1992 .

II.

- 1) Takahashi, E., Hori, T. and Murata, M. : Population cytogenetics of rare fragile sites in Japan. *Human Genet.* 78, 121-126, 1988.
- 2) Murata, M., Takahashi, E., Minamihisamatsu, M., Ishihara, T., Wong, P., Bessho, M., Hirashima, K. and Hori, T. : Heritable rare fragile sites in patients with leukemia and other hematologic disorders. *Cancer Genet. Cytogenet.* 31, 95-103, 1988.
- 3) Takahashi, E., Hori, T. and Murata, M. : A new rare fragile site at 8q24.1 found in a Japanese population. *Clin. Genet.* 33, 91-94, 1988.
- 4) Hori, T., Takahashi, E., Tsuji, H., Tsuji, S. and Murata, M. : Fragile X expression in thymidine-prototrophic and -auxotrophic human-mouse cell hybrids under the conditions of low and high thymidylate stress. *Cytogenet. Cell Genet.* 47, 177-180, 1988.
- 5) Hori, T., Takahashi, E., Murata, M. : Distamycin A-inducible fragile sites and cancer-proness. *Cancer Genet. Cytogenet.* 34, 177-187, 1988.
- 6) Hori, T., Takahashi, E., Murata, M. : Nature of distamycin A-inducible fragile sites. *Cancer Genet. Cytogenet.* 34, 189-194, 1988.
- 7) Takahashi, E., Kaneko, Y., Ishihara, T., Minamihisamatsu, M., Murata, M. and Hori, T. : A new rare distamycin A-inducible fragile site, fra(11)(p15.1), found in two acute non-lymphocytic leukemia (ANLL) patients with t(7;11) (p15-p13;p15). *Human Genet.* 80, 124-126, 1988.
- 8) Murata, M., Ohtsuka, M., Hayakawa, Y., Takahashi, E., Tsuji, H. and Hori, T. : A population cytogenetic study of a common fragile site, fra(3)(p14), in healthy population. *Jpn. J. Hum. Genet.*, 35, 291-302, 1990.
- 9) Hori, T., Ichimura, H., Minamihisamatsu, M., Takahashi, E., Yamauchi, M., Hama, Y., Kurimura, O., Yamasaki, M. and Kurimura, T. : Chromosomal insertion and amplification of

- human papillomavirus 16 DNA sequences in a cell line on argyrophil small cell carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 371-375, 1991.
- 10) Tsuji, H., Hitomi, A., Takahashi, E., Murata, M., Ikeuchi, T., Tsuji, S. and Hori, T. : Induction of distamycin A-inducible rare fragile sites and increased sister chromatid exchanges at the fragile site. *Human Genet.* 87, 254-260, 1991.
 - 11) Seki, N., Tsuji, H., Takahashi, E., Yamauchi, M., Saito, T., Hashimoto, T., Yamamoto, K. and Hori, T. : Induction of BrdU-enhanceable fragile site lesion and sister chromatid exchange at 11q23.1 in EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *Cytogenet. Cell Genet.*, 61:95-98, 1992.
 - 12) Seki, N., Sumiya, H., Shimazaki, J., Toyama, Y., Takahashi, E., Murata, M., and Hori, T. : Chromosome abnormalities and rare fragile sites detected in azoospermia patients. *Jpn J. Hum. Genet.*, 37, 215-222, 1992.
 - 13) Hori, T., Takahashi, E., Tsuji, H., Yamauchi, M. and Murata, M. : Research for genetic instability of human genome. *Proceedings of International Conference Radiation Effects and Protection*, Mito, Japan, 1992.
 - 14) Murata, M., Otsuka, M., Hayakawa, Y., Takahashi, E. Tsuji, H. and Hori, T. : Expressivity of a common fragile site, fra(3)(p14), in patients with cancer and other diseases. *Jpn J. Hum. Genet.*, 37, 205-213, 1992.
 - 15) Yamauchi, M., Seki, N. and Hori, T. : Rapid preparation of diagnostic probes for fragile X syndrome by direct PCR amplification of human chromosomal DNA. *Jpn. J. Hum. Genet.*, 37, 95-203, 1992.
 - 16) Hori, T., Yamauchi, M., Seki, N. and Kondo, I. : Heritable unstable DNA sequences and hypermethylation associated with fragile X syndrome in Japanese families. *Clin. Genet.*, 43, 34-38, 1993.
- III.
- 1) Takahashi, E., Hori, T., Lawrence, J. B., McNeil, J., Singer, R. H., O'Connell, P., Leppert, M. and White, R. : Human type II collagen gene (COL2A1) assigned to chromosome 12q13.1-q13.2 by in situ hybridization with biotinylated DNA probe. *Jpn. J. Human Genet.*, 34:307-311, 1989 .
 - 2) Takahashi, E., Hori, T., O'Connell, P., Leppert, M. and White, R. : R-banding and non-isotopic in situ hybridization: Precise localization of the human type II collagen gene (COL2A1). *Hum. Genet.* 86, 14-16, 1990.
 - 3) Takahashi, E., Hori, T. and Sutherland, G. R. : Mapping of the human type II collagen gene (COL2A1) proximal to fra(12)(q13.1) by nonisotopic in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 54, 84-85, 1990.
 - 4) Hori, T., Takahashi, E., Ayusawa, D., Takeishi, K., Kaneda, S. and Seno, T. : Regional assignment of the human thymidylate synthase(TS)gene to chromosome band 18p11.32 by nonisotopic in situ hybridization. *Hum. Genet.* 85, 576-580, 1990.
 - 5) Tokino, T., Takahashi, E., Mori, M., Tanigami, A., Claser, T., Park, J. W., Jones, C., Hori, T. and Nakamura, Y. : Isolation and mapping of 62 new RFLP markers on human chromosome 11. *Am. J. Hum. Genet.*, 48, 258-268, 1991.
 - 6) Takahashi, E., Hori, T., O'Connell, P., Leppert, M. and White, R. : Mapping of the MYC gene to band 8q24.12-q24.13 by R-banding and distal to fra(8)(q24.11), FRA8E, by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.*, 57, 109-111, 1991.
 - 7) Takahashi, E., Yamauchi, M., Tsuji, H., Hitomi, A., Meuth, M. and Hori, T. : Chromosome mapping of the human cytidine-5'-triphosphate synthetase (CTPS) gene to band 1p34.1-p34.3 by fluorescence in situ hybridization. *Hum. Genet.* 88, 119-121, 1991.
 - 8) Yamakawa, K., Morita, R., Takahashi, E., Hori, T., Lathrop, M. and Nakamura, Y. : A detailed deletion mapping of the short arm of chromosome 3 in sporadic renal cell carcinoma. *Cancer Res.*, 51, 4707-4711, 1991.
 - 9) Takahashi, E., Ayusawa, D., Kaneda, S., Itoh, Y., Seno, T. and Hori, T. : The human ubiquitin-activating enzyme E1 gene (UBE1) mapped to band Xp11.23-p11.3 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 59, 268-269, 1992.
 - 10) Takahashi, E., Yamakawa, K., Nakamura, Y. and Hori, T. : A high-resolution cytogenetic map of human chromosome 3: localization of 291 new cosmid markers by direct R-banding fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 13, 1047-1055, 1992.
 - 11) Yoshimoto, T., Arakawa, T., Hada, T., Yamamoto, S. and Takahashi, E. : Structure and chromosomal localization of human arachidonate 12-lipoxygenase gene. *J. Biol. Chem.*, 267, 24805-24809, 1992.
 - 12) Takahashi, E., Takeda, O., Himoro, M., Nanao, K., Takeda, G. and Hayasaka, K. : Localization of PMP-22 (candidate gene for the Charcot Marie-disease 1A) to band 17p11.2 by direct R-banding fluorescence in situ hybridization. *Jpn. J. Hum. Genet.* 37, 303-306, 1992.
 - 13) Takahashi, E., Shiomi, N. and Shiomi, T. : Precise localization of the excision repair gene, ERCC5, to human chromosome 13q32.3-q33.1 by direct R-banding fluorescence in situ hybridization. *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 1117-1119, 1992.
 - 14) Masuno, M., Kano, M., Fukao, T., Yamaguchi, S., Osumi, T., Hashimoto, T., Takahashi, E., Hori,

- T., and Orii, T. : Chromosome mapping of the human mitochondrial acetoacetyl-coenzyme A thiolase gene to 11q22.3-q23.1 by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* 60, 121-122, 1992.
- 15) Ichinose, C. S., Ichinose, H., Takahashi, E., Hori, T., and Nagatsu, T. : Molecular cloning of genomic DNA and chromosomal assignment of the human aromatic L-amino acid decarboxylase, the enzyme for catecholamine and serotonin biosynthesis. *Biochemistry*, 31, 2229-2238, 1992.
- 16) Hori, T., Takahashi, E., Tanigami, A., Tokino, T. and Nakamura, Y. : A high-resolution cytogenetic map of 168 cosmid DNA markers for human chromosome 11. *Genomics*, 13, 129-133, 1992.

2. 遺伝的高リスク群の検出、モデル実験動物の開発に関する研究

②モデル実験動物の開発に関する研究

小林森（生理病理研究部）、松本恒弥、岡本正則、松下悟（動植物管理課）、
松田洋一（遺伝研究部）、広部知久（生物研究部）、佐渡敏彦（科学研究官）

Studies on the Development of Model Experimental Animals

Shigeru Kobayashi, Tsuneya Matsumoto*,
Masanori Okamoto*, Satoru Matsushita*, Yoichi Matsuda**,
Tomohisa Hirobe***, Toshihiko Sado****

Division of Physiology and Pathology; *Section of Laboratory Animals; **Division of Genetics;
*** Division of Biology; ****Deputy Director-General

1) An attempt to produce a set of mouse recombinant inbred strains between C3H/He and MOM

Fifty three pairs (lines) of $F_2 \times F_2$ mice based on a cross between a C3H/He female and a MOM male were set up in 1988. All of the lines consisted of brother \times sister mated 2nd to 14th filial generations.

Of the 53 lines, 52 have died out due to infertility as of 1993. Two causative factors responsible for this onset of infertility are suggested. It is very difficult to obtain inbred strains derived from a cross between two mice of subspecies.

2) Production of mouse aggregation chimera

B10.Thy1.1 and BALB/c strain mice are predisposed to the radiation induced thymic lymphoma, but this is not true for STS/A and C3H/He strains of mice. These mice express differing cell surface markers. Aggregation chimera, B10.Thy1.1 — STS/A and BALB/c — C3H/He, were created with the purpose of producing suitable model animals for studying the mechanism of lymphomagenesis. These B10.Thy1 — STS/A and BALB/c — C3H/He chimeras consisted of 26 and 97 weanlings respectively. They should be useful in investigating the origin and dynamics of lymphoma cells.

3) Technological improvements in embryo cryopreservation and the elimination of pathogenic micro-organisms of mice

Based on results obtained from examinations of optimum conditions for freezing, thawing and transplanting embryos, the storage of 8 inbred strains was completed with the use of cryopreservation methods. In addition, we developed a novel method

for producing germ-free offspring from embryos taken from conventional mothers.

1. 緒言

各種のモデル実験動物が医・生物学研究の進展に大きく貢献している。しかし、放射線被曝による発がんや放射線感受性に関する遺伝機構の研究推進のために適切なモデル実験動物は現在までのところ得られておらず、その開発が期待されるところである。Bailey ら（1981）により開発・理論化されたマウスリコンビナント近交系（mouse recombinant inbred strains、以下、マウス RIS と略す）は、形質発現に関する遺伝子（座）の連鎖分析や遺伝子（座）の数の推定等のために有効な実験モデルであるとされている。そこで我々は、放射線発がんや放射線感受性を規定する遺伝的背景を解明するために有効と考えられる 1 セットのマウス RIS の育成を試みることにした。

マウス RIS 育成の他に、新モデル実験動物開発の一環として、発がん機構（がん細胞の起源や動態）解明に有効な集合キメラマウスの開発についても検討を行った。ここでは、放射線誘発胸腺腫高発系マウスと低発系マウスよりなる集合キメラマウスを作出するとともに量産システムを確立し、これを発がん研究グループに供給することを目標とした。

マウス RIS は通常多数の近交系で構成されるので、それらの維持や不測の病原微生物による汚染に備えて、信頼性が高くコンパクトな系統保存技術や汚染系統清浄化の技術の確立が必要となる。これらの技術の確立やデータの集積は、一般に多くのマウス系統を維持している機関において共通の課題となっている。このような事情に基づき、上記 RIS 育成と平行して、近年急速に発展してきた発生工学的手法による、既存の各種系統マウスの胚の凍結による系統保存を行うとともに胚移植法による汚染マウスの清浄化および無菌マウスの作出方法の確立を図ることとした。

また、キメラマウス作出も含めマウス発生工学にとって最も重要なデータの一つである、様々な近交系の初期発生に関する調査を行うこととした。

2. C 3 H × MOM マウス RIS 育成の試み

1) 材料と方法

マウス：RIS とは、2つの近交系間の F から多くの交雑ライン（以下、ライン）を作り、各々のラインで近親交配を行って近交系群としたものである。マウス RIS に用いられる親系統間の遺伝的な差が大きいほど、作出される RIS は遺伝学的分析に有効に利用される。従来型の近交系マウスの祖先であるヨーロッパ野生マウスと日本産野生マウスは亜種の関係にあり、約 100 万年前に共通の祖先より枝分かれして、各々が様々な変異を蓄積して現在に至ったとされている。これらマウス亜種間の遺伝的な差は、従来型の近交系間の差よりもはるかに大きいはずである。そこで我々は、RIS の親系統として従来型近交系であり放射線による晩発障害等に関する多くのデータが得られている C 3 H / He 系を一方に選び、他方に日本産野生マウス由来で最も近交化が進んでおり様々な特性が明らかにされている MOM 系を選んだ。用いたマウスは当初動植物管理課で近交系として維持されていた C 3 H / He 系の雌と MOM 系の雄である。

近交系マウス（Laboratory mouse）と亜種マウスの組み合わせによるマウス RIS 確立の報告は、現在までのところない。この組み合わせによる試験的 RIS 確立の試みが不首尾に終わったという記録（近藤、1985）や個人情報があり、彼らはこの組み合わせが成功しない主な理由として近交退化現象を上げている。今回の我々の場合にも、RIS 育成途中で幾つものラインが途絶える可能性があり、また、妊性保有ラインの経代的推移等の定量解析を容易にするために、当初から出来るだけ多くのラインを用意し、育成することとした。すなわち、C 3 H と MOM の F₂ より 53 組のラインを作り、本特別研究実施期間中を通じて各々のラインの兄妹交配による継代を可能な限り進めた。

繁殖・飼育管理と疾患の検索：マウスの飼育は、室温 23 ± 2℃、湿度 50 ± 10 %、7 時 - 19 時点灯の SPF 環境下で行った。マウス 5 匹用アルミケースに杉床敷を入れ滅菌・乾燥したものを繁殖・育成に用いた。MOM 系は、昼間隠れている場所があると繁殖良好との記述（近藤、1985）があるので、飼育棚 5 段のうち上から 3 段までケージの蓋の上に、その面積の約 2 / 3 を被う厚紙を置き、天井蛍光灯からのケージ内への光量を制限した。飲料水（塩素 10ppm、塩酸 pH3.0 添加）と高圧蒸気滅菌した固形飼料（船橋農場、MB-1）を自由に摂取させた。仔マウスは 4 週間後離乳し、雌雄別々に育成した。8 週齢時に同腹の雌雄 1 : 1 を同居させ交配を開始した。次世代を短期間でより多く得るために、妊娠個体の隔離は行わなかった。数ペア分の次世代が離乳した時点で、親世代を安楽死させた。同居開始後 6 ヶ月以上経ても分娩が確認されないペアは殺処分した。なお、繁殖力低下等の状況に応じて、3 または 2 : 1 交配や同腹内交配相手の交換を試みた。死亡または殺処分した個体の一部は剖検するとともに生殖系組織や病変組織を採取し、ホルマリンまたはブアンで固定し、H.E. 染色による顕微鏡標本作製して鏡検した。

2) 経過と結果

雌 C 3 H / He マウス 1 匹と雄 MOM マウス 1 匹を 1988 年 1 月に交配し、同年 2 月に 3 : 3 の F を得た。3 ペアの F₁ × F₁ から F₂ を生産した。これら 3 ペアの F は繁殖力が強く、同年 5 月より 10 月までの間に合計、雌 62 匹、雄 84 匹の F₂ を得た。性比は 1 : 1.35、平均産仔数は 8.1 匹であった。続いて同腹 F₂ の 1 : 1 のペアを 53 セット用意した。この数は飼育スペースと管理労力を勘案して決めた。

本特別研究初年度（1988）は、F₂ × F₂ のセットアップを行うとともに、各々のライン内での兄妹交配による継代を進めた。最も継代の進んだラインは F₅ に達した。しかし、53 ライン中 10 ラインは初年度中に不妊のため絶えた。F₃ や F₄ に達したラインの繁殖力は、出産率（出産雌数 / ペア数）で比較すると F₁ の大凡 60 % に低下していた。次年度（1989）には 2 ラインが F₇ に、12 ラインが F₆ に達した。出産率、産仔数の低下が多くラインで次第に認められるようになり、特に F₂ の段階でこの傾向が顕著であった。この年度末までに合計 23 ラインが途絶した。平成 2 年度（1990）には近交 10 代（F₁₀）に 4 ライン、F₉ に 4 ライン、F₇ - F₈ に 13 ラインが到達した。一方、継代不能となったラインは 32 に増加した。平成 3 年度（1991）は 1 ラインが F₁₂ に、5 ラインが F₁₀ に、6 ラインが F₈ - F₉ に各々到達したが、9 ラインが絶えて途絶ラインは合計 41 となった。この年度から不妊または繁殖力低下の原因を明らかにするための病理組織学的検討を開始した。本特研最終年度にあたる平成 4 年度（1992）は、病理組織学的検討を続けるとともに、前年度まで生存し、F₈ - F₁₂ に達していた 12 ラインの継代進行に努めたが、11 ラインが絶えて、F₁₄ に達した 1 ラインのみが残った。このラインは未だ弱いながらも繁殖力がある。

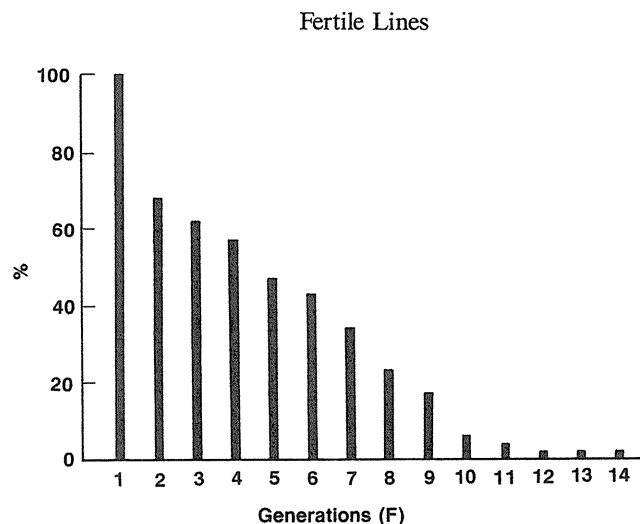


図 1. 継代可能な妊性を保有するラインの割合の経代的推移。

F₂ - F₁₄ の各々の値は、総ライン数 53 に対する割合を示す。F₁ は 3 ペアでの値。

C 3 H × MOM RIS 育成の試みの、この時点における結果をまとめて図 1、2 および 3 に示した。繁殖力を維持しているラインの数は世代の進行とともに減少した（図 1）。F₂ × F₂ の 53 ライン（ペア）のうち 36 ライン（68 %）は次世代を残したが、以降は F₁₀ に至るまで

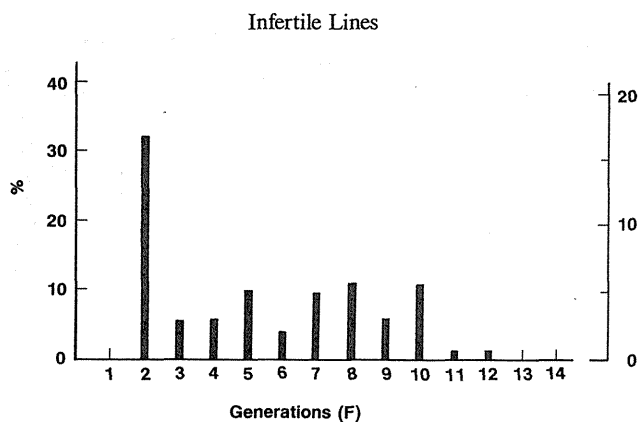


図2. 不妊ラインの割合(数)の経代的推移。

F₂ - F₁₄の各々の値は、総ライン数53に対する割合または実数を示す。F₁は3ペアでの値。

各々の世代においてはほぼ同じ割合で繁殖能力のあるライン数は減少した。わずかに1ラインのみがF₁₂を過ぎても繁殖力を保っていた。各世代に現れた不妊ラインの数(割合)を図2に示した。53のF₂ラインのうち17ラインが不妊で、この値は他の世代に比べて最も高かった。F₃からF₁₀に至る世代では1世代を経る毎に平均4ラインが途絶した。各々の世代に達したラインの数に対して、そこで次世代を残したライン数の割合を図3に示した。F₂でやや低いがF₃ - F₉までは67 - 92%のレベルを保った。しかし、F₁₀では33%に低下した。

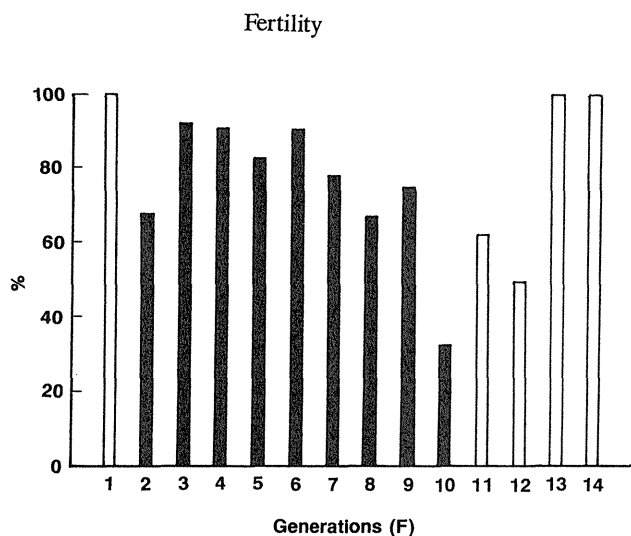


図3. 各世代における妊性を保有するラインの割合。

F₁は3ペアでの値。F₁₁、F₁₂、F₁₃およびF₁₄でのライン数は各々3、2、1および1での値。

このRIS育成中のマウスには、12ヵ月齢以下の個体を対象とした観察にもかかわらず、様々な異常・疾患が見られた。最も多かったのは不妊症個体で、これは全てのラインに見られた。不妊個体においては生殖器官系、特に精巣の萎縮が著しかった。萎縮精巣には白膜萎縮、精子形成各段階の細胞中の多数の空胞、ならびに間質細胞の退行変性など、上位中枢的欠陥の存在を示唆する異常が見られた。次いで多く見られたのは水の多飲・多尿の症状を示す個体で、10ライン中に高い頻度で見られ、それら個体の多くに水

腎症や嚢胞腎があった。また、肝腫瘍個体が5ライン中に多数見られた。その他、皮膚の広い範囲に炎症が起こる個体が4ラインに、皮下腫瘍個体が4ラインに、胸腺腫個体が2ラインに、非胸腺型リンパ腺が1ラインに各々見られた。

3) 考察

一般に、マウス近交系を新たに育成する場合には、継代がF₇₋₈付近まで達すると近交退化のリスクは少なくなり、それより先の世代は比較的安定した繁殖力が保たれると言われている。しかし、亜種間であるC3H × MOMのRISを確立する目的で多くのラインの近交化を試みた結果では、F₈の段階を過ぎても不妊ライン数の増加傾向は続いた。この現象は従来の近交系と亜種近交系との交雑に由来する新たな近交系を育成する場合の大きな障害となる。

F₂では17 / 53ライン(32%)が不妊であった。一方、F₃ - F₁₀までの各世代では4 - 11%の範囲で不妊ラインが見られた。不妊ライン発現率の世代的推移に2相性が認められることに関しては、不妊の原因がF₂の場合とその他の場合とで異なる性質のものである可能性が考えられる。しかし、共通の要因があって、それがF₂で特に強い影響を与えるという可能性も否定できない。このRISの育成はSPF条件下で行われたが、多数の不妊ラインが現れた。従って病原微生物と不妊とは直接的な関係がないことは明らかである。

従来の近交系と日本産野生マウス由来近交系との組み合わせによるRIS確立の試みとしてC57BL × MOMの例が報告されている(近藤恭司, 1985)。この例では12ラインで育成を開始したがF₁₁の段階までで全ラインが絶えてしまった。我々の場合も1993年3月現在53ライン中1ライン(繁殖力あり)を残して他は全て不妊のため途絶してしまった。今後、この不妊の機構を明らかにするための、臓器・細胞レベル、下垂体ホルモン等の内分泌学分野、分子遺伝学レベルでの研究の進展が望まれる。

3. 発がん機構解明のためのキメラマウスの開発・作出と実験への応用

集合キメラマウスは2つ以上の遺伝的に異なる個体由来する複合個体であり、発生・組織形成過程や細胞分化の解析に有効である。本研究の目的は、放射線誘発胸腺リンパ腫の発生機構について、腫瘍細胞の起源や動態を解明するためのキメラマウスを開発・作出することにある。すなわち、胚の発生工学的技術を利用して、リンパ腫高発系統および低発系統の2系統から得た胚に由来する集合キメラについて、その作出方法を検討しつつ多数のキメラ個体を作り出し、発がん研究グループに供給することである。

1) 材料および方法

放射線誘発リンパ腫高発系のB10.NRH-Thy1^a(以下B10.Thy1¹) - STS / A(低発系)およびBALB / c - C3H / Heの2つの組み合わせによるキメラマウスを作成することとした。

各々の系統の雌はPMSG - hCG投与による過排卵処理後、同系の雄と同居させた。翌日膣栓を確認し、同居3日目に雌の卵管・子宮からキメラ作出用の8細胞 - 桑実期胚を回収した。各々の胚は透明帯をプロナーゼにより除去、フィトヘマグルチニン(PHA-P)を用いた集合法により胚を集合・接着した。集合胚はその後24時間培養し、単

一の集合胚を形成した正常な胚盤胞を予め偽妊娠させたレシピエント (Jcl:MCH (ICR)) 雌の子宮内に移植した。移植後、分娩に至ったレシピエントから得られた産仔は、毛色に有色、アルビノあるいはキメラと異なったタイプを示した。これら産仔の内、キメラタイプの毛色を示した個体を予備的にキメラ個体として識別し、以後の実験に使用した。キメラ個体に胸腺リンパ腫を誘発させるために、4週齢時からX線1.7Gyを4回照射し、6カ月以降に認められるリンパ腫特有の症状を示した個体について、免疫組織学的方法によりキメラであることの確認と腫瘍細胞のタイプングを行った。

2) 結果および考察

① B10.Thy1¹において、266匹の雌マウスを過排卵処理し、交尾を認めた雌は197匹 (交尾率74.1%)であった。回収胚は333個得られ、雌1匹あたりの平均胚回収率は1.7個であった。一方、STSは54匹の雌を過排卵処理して30匹 (55.6%)に交尾を認め、383個の胚が得られ、平均胚回収率は12.8個であった。胚の平均回収率がB10.Thy1¹はSTSに比較して著しく低く、この組み合わせでは胚の集合効率がきわめて悪いことがわかった。胚数のバランスをとり、効率的にキメラ胚を作出するために各々の系統の胚を一時凍結保存し、胚を集積することとした。すなわち、本系統の組み合わせでは凍結保存-融解胚を用いて集合胚の作出とその移植を行った。

その成績は、179個の集合胚 (図4) を作製し、レシピエントに移植 (12-15個/マウス) した結果、39匹の産仔 (21.8%)、26匹の離乳仔 (14.5%) を得た。離乳仔の毛色の内訳は有色が12匹 (♀5:♂7)、アルビノが2匹 (2:0)、キメラタイプが12匹 (5:7) であった。

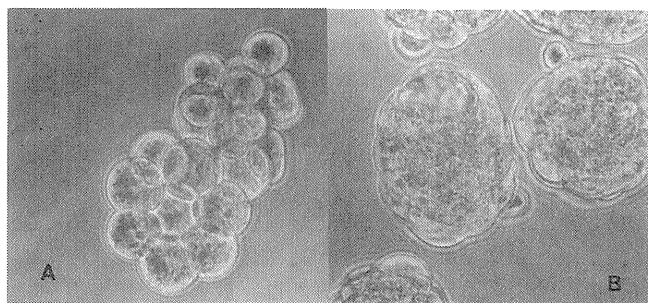


図4. 出来上がった集合キメラ胚の一部

A: 接着・集合したBALB/c (上) とC3H (下) の8細胞期胚

B: 培養後20時間に初期胚盤胞期へと発生したBALB/cとC3Hの単一集合胚

② BALB/cは109匹を過排卵処理し、78匹に交尾 (71.6%) を認めた。また、C3Hは77匹の雌を過排卵処理し、55匹に交尾 (71.4%) を認めた。これらから胚を回収し、合計581個の集合胚を作製してレシピエントに移植した。その結果、239匹の産仔 (41.1%)、222匹の離乳仔 (38.2%) を得た。離乳仔の毛色の内訳は、有色が90匹 (♀54:♂36)、アルビノが35匹 (19:16)、キメラタイプが97匹 (32:65) であった (図5)。

以上の結果から、胚回収率には著しい系統差があり、胚の凍結処理の有無による相違はあるものの、キメラ作製系統の組み合わせによって産仔への発生率に差があることが

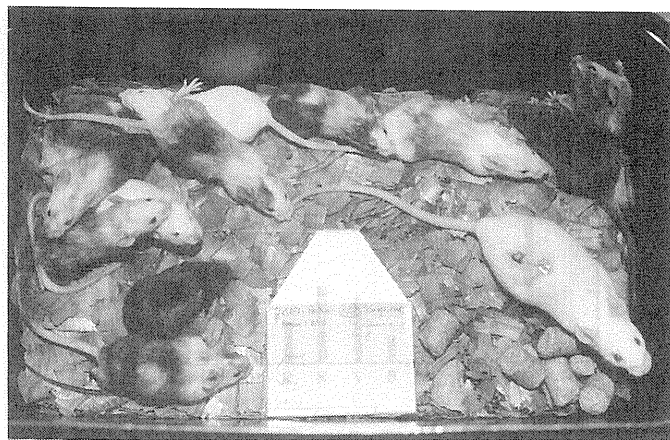


図5. 集合胚によって作出されたBALB/cとC3H/Heとのキメラマウスの一例。

毛色、皮膚・目の色からBALBタイプ、C3Hタイプおよびキメラタイプの3群に分類される。図中、アルビノで大きな個体はレシピエントのMCHである。

示唆された。また、キメラマウスの性比を、例数の多いBALB/c-C3Hで検討したところ、雄の比率が67%と明らかに多くなっていた。胚の性染色体はXX (♀) とXY (♂) とがある。キメラ作製時これらの胚は無作為に選ばれ集合胚となるので、集合胚の性染色体の組み合わせはXX-XXとXY-XYが各25%、XX-XYが50%の確立となる。この内、XX-XYの集合胚から得られるキメラはH-Y抗原の精巢誘導作用により表現型が雄として発生するとの報告がある。本結果も同様の現象により雄が多くなったものと推察される。

当初、我々はキメラマウスを使用する実験計画からキメラ作出目標最低数を50匹においていたが、目標数をはるかに上回る109匹が作出された。作出されたキメラマウスは、現在、放射線誘発胸腺リンパ腫の発生機構を解明するための実験に使用されており、本研究・開発の目的は達成された。

4. 胚移植法を用いたマウスの清浄化技術の開発と胚凍結保存ならびに排卵数調査について

我々が計画した新モデル動物 (マウス RIS および集合キメラマウス) 開発には以下のような特徴と問題があった。すなわち、リコンビナント近交系については、①一度に多数の系統が作出され、系統群として実験に使用される。このため、一度リコンビナント近交系が作出されると、その維持・生産に多大な飼育スペースと労力が必要となる。②開発に長い期間 (4-5年) が必要であり、病原体による汚染の可能性が増大するため、病原体に汚染された場合の対策が必要となる。③開発は清浄 (SPF) な環境下で行わなければならない。また、キメラマウスの作出には、①一度に多数の受精卵を2系統同時に必要とし、②キメラ卵を移植するレシピエントを多数必要とする。しかし、様々な近交系について発生工学に必要な基礎データ (特に排卵の初期発生について) は圧倒的に不足している。

これらの問題点を解決し、リコンビナント近交系およびキメラマウスの開発を支援するため①当面使用予定のない近交系の維持を胚凍結保存によって行い、②清浄なマウス

を用いた系統別排卵数（特に誘起排卵について）および初期発生の調査を行う。③系統育成途上で動物が病原体に汚染された場合、系統育成を進めながら汚染された動物の清浄化を行うため、胚移植法による汚染マウスの清浄化を検討するとともに、④胚移植による無菌マウス作出の技術開発を行うこととした。

1) 胚凍結保存

放医研動植物管理課で維持している系統の内 13 系統（ B10.A 、 B10.LP 、 B10.129 、 B10.Thy1¹、 B10.BR.Thy1¹、 C3H / He 、 C57BL / 6J 、 C57L 、 CBA / J 、 GAM 、 HTI 、 HTH 、 STS ）の基礎ストックについて実施した。すなわち、8 週齢以上の雌に PMSG を、そしてその 2 日後に hCG を各々 5 IU 腹腔投与し同腹の雄マウスと 1 夜同居交配した。膣栓が確認された雌を同居 3 日後に安楽死させ、卵管および子宮より 8 細胞－桑実期胚を回収し、凍害保護剤（DMSO）を含む培地内に浮遊させ、それを凍結用チューブに入れプログラムフリーザーを用いて凍結処理を行った。室温から－70℃まで緩慢冷却（0.5－1.0℃/分）を行い、その後、液体窒素に浸漬し、保存した。本法の有効性（凍結・融解・移植による正常新生仔の誕生）は、以前に行った C3H と C57BL を用いた研究により明らかとなっている。

また、1 系統あたりの凍結保存胚数は、国際実験動物科学委員会の胚バンクマニュアルでは 500 個とすることが提唱されているが、我々はこれまでのデータから 200 個以上を目標とすることにした。

凍結保存胚は、胚保存台帳を作成し、それに凍結チューブ番号、系統名、世代数、発生ステージ、収容胚数、日付、容器番号、キャニスター番号、ケーン番号等を記録・保管した。

平成 4 年度末までに凍結保存した胚の総数は 2314 個となり、その内訳は以下の通りである。

B10.A ;222	B10.LP;212
B10.Thy1 ¹ ;135	B10. BR. Thy1 ¹ ;220
B10.129 ;245	CBA / J ;221
C57L / Ms ;164	C3H / He ;259
C57BL / 6J ;225	GAM / Nga ;51
HTI ;259	HTH :4
STS / A ;97	

この結果、B10.Thy1¹、C57L、GAM、HTH、STS を除いた 8 系統が保存胚 200 個以上に達したので凍結を終了した。これにより初期の目的は達成された。

2) 近交系マウスの排卵数および初期発生調査

放医研で維持・生産している系統のマウスについて、交尾率、排卵（過排卵、自然排卵）数、初期発生等について調査を行った。すなわち、15 系統の雌に PMSG－hCG を各 5 単位腹腔投与（過剰誘起排卵処理）し、16－17 時間後に卵管－子宮より卵を採取・観察した。また、13 系統の雌について過排卵処理後、同系の雄と同居させ翌日に膣栓の形成を確認することにより交尾の有無を確認し、同居 3 日目に卵管－子宮より胚を採取、顕微鏡下で形態を観察し凍結適格胚と不適格卵・胚とを区別することにより交配成績、胚回収成績の比較を行った。（この作業は凍結保存およびキメラ作成作業の一環として行った）。さらに、B10. Thy1¹、B10.129、CBA、C57L、HTI の 5 系統では過排卵処理を行わずに雄と同居・交配を行い 3 日目に、

過排卵処理マウスと同様に胚（自然排卵由来）を採取・観察することにより過排卵処理胚と自然排卵胚の回収率の比較を行った。

表 1. 過剰排卵誘起した雌マウスの系統別排卵数調査成績

系統	動物数	排 卵 数 (M±S.E.)	
		正 常 卵	異 常 卵
AKR-A1d	3	29.6±11.4	0.3±0.4
BALB/c	10	11.3±5.2	4.4±5.9
B10	4	16.5±6.6	1.2±1.0
B10. BR	2	24.0	0
B10. D2	5	18.4±9.8	2.4±3.0
BC3F ₁	10	31.9±5.8	5.5±4.5
BDF ₁	5	53.0±7.1	5.2±4.7
C3H/He	10	18.8±7.3	3.5±3.2
C57BL/6J	10	17.2±9.4	2.2±1.7
C57BL/6J-W ^v /+	3	14.6±7.3	7.6±2.0
CBA/T6	4	35.7±6.1	3.5±1.1
CBA/J	2	28.0	3.0±2.0
ICR	10	23.3±9.8	0.2±0.4
RFM/Ms	8	53.2±10.7	3.0±5.0
WB	4	38.7±11.9	2.5±2.0

- 1) マウスは 9～10 週齢の当所生産の供給用(Production colony)由来
2) 過剰排卵は雌に PMSG-hCG を各 5IU 投与、投与後 16～17 時間に排卵数測定

表 2. 近交系マウスにおける過排卵処理後の交配成績および胚の回収成績

系 統	動物数	交尾率 ¹ (%)	正常胚 ² (4～16細胞期)	異常 卵・胚 ³	雌 1 匹当りの 平均回収胚数 ²
B10. A/Sn	32	18(56.1)	222	79	12.3
B10. LP/Sn	35	15(42.9)	212	130	14.1
B10-Thy-1.1	92	56(60.9)	233	491	4.2
B10. BR-Thy-1.1	35	13(37.1)	219	-	16.8
B10. 129(5M)/Sn	156	79(50.6)	191	1020	2.4
CBA/J	106	37(34.9)	137	236	3.8
C57L/Ms	104	21(20.2)	193	215	9.2
C3H/HeMs	27	24(88.9)	259	-	10.8
C57BL/6J	28	17(60.7)	225	-	13.2
GAM/Nga	-	9(-)	132	-	14.7
HTI	56	25(44.6)	251	101	10.0
HTH	7	4(57.1)	4	18	1.0
STS/A	54	30(55.6)	383	-	12.8

¹ 雌は PMSG-hCG を各 5 1u 投与、同系の雄と交配、膣栓を確認
² 膣栓確認後(Day 1)、Day 3 に雌の子宮、卵管より回収した正常な形態を有する 4～16 細胞期胚
³ 異常卵および胚（1～3 細胞期・未受精・退行・異常分割）
- No data

15 系統の過排卵数は表 1 に示した。また、過排卵処理後の交配率、胚の回収成績は表 2 に示した。

これらの結果から、過排卵処理後の排卵数、交尾率、胚回収率には系統差が著しいことが明らかとなった。B10. Thy1¹、B10.129、CBA 及び HTH の胚回収率が極端に低い理由は、他の系統では胚回収時における発生ステージが 8－16 細胞期に同調していたのに対し、これらの系統では 2－4 細胞期と発生速度が遅かったり（CBA）、未受精卵や異常分割が著しく多かった（B10.129）ためである。過排卵処理により胚回収率が低い 5 系統について、自然排卵させた場合の胚の回収率を調べたところ、過排卵処理の場合と著しい差を認めることはできなかった。

我々は、当初集合キメラマウス作出のため B10. Thy1¹ と STS の胚を使用する予定であったが、上記調査で B10. Thy1¹ の胚回収率が極端に少ないことが明らかとなったた

め、これに加え C 3 H と BALB / c の組み合わせによるキメラの作出も行うこととした。

3) 胚移植法を用いた汚染マウスの清浄化

放医研では、病原体に汚染された動物は子宮切断術の実施と清浄里親哺育による清浄化処置を実施している。しかし、この方法は効率が悪い。そこで、実験用マウス管理に取っても最も恐ろしい病原体の一つであるセンダイウイルスに汚染されたマウスをモデルに、胚移植法を用いた病原体汚染マウスの清浄化について検討した。

動物：ドナーマウスとして SPF の Jcl:MCH (ICR) (日本クレア、アルビノ) の雌雄を使用し、精管結紮マウスにも本系統を使用した。胚を移植されるレシピエントマウスには当所生産 B6C3F₁ (野生色) の SPF を用いた。

感染：ドナーマウスに TCID₅₀ のセンダイウイルス浮遊液を経鼻接種し、スナッフ、体重減少を示した個体を感染が成立したものと判定し、胚採取用に供した。

胚採取と移植：雌にセンダイウイルスを接種し、5-7 週目に PMSG と hCG を各 5 単位を 2 日間隔で i.p. 投与し、同系の雄と 1 夜同居し、膣栓が確認された個体から同居 3 日目に卵管-子宮灌流により胚を採取した。正常胚を 26-28 時間体外培養した。その後、予め精管結紮雄と不妊交尾させた偽妊娠 3 日目のレシピエントの子宮に培養胚を移植した。産仔は生後 10 週齢時まで育成した。

微生物検査：ドナーは胚採取時に、レシピエントとその産仔は生後 10 週齢時に、剖検と CF および ELISA 法により血清抗体価を測定した。

飼育管理：感染前はブートロンで、感染後は感染動物飼育装置で、胚移植後のレシピエントは滅菌済みの感染動物飼育装置内 (SPF 状態が保持されている) で飼育した。

表 3. Development of embryos collected from Sendai virus (SV)-infected mice after transfer to pseudopregnant recipients

Exp. no.	No. of embryos transferred	No. of pregnant recipients/No. of recipients	No. of live young			No. of young weaned (♀:♂)	No. of SV positive/No. of young tested****
			Total (%)*	born	caesarean-derived**		
I	5	1/1	5 (100)	5	0	5 (3:2)***	0/4
II	71	7/8	42 (59.2)	40	2	42 (24:18)	0/42
Total	76	8/9	47 (61.8)	45	2	47 (27:20)	0/46

*: Based on a total number of embryos transferred into the recipients. **: The recipients were performed caesareotomy on day 20. The young were fostered by mother of the same group. ***: One mouse died after weaning. ****: Sera from young were tested for the presence of anti-SV antibody by CF test or ELISA at 10th weeks of age.

表 4. Number of embryos collected from Sendai virus-infected mice and development of embryos after culture for 26-28 hr

Exp. no.	No. of animals inoculated	No. of animals survived after infection (%)	No. of animals treated with PMSG-hCG	No. of animals having embryos* (%)	No. of morphologically normal embryos collected**	No. of embryos developed to morula or blastocyst*** (%)
I	10	5 ^a (50.0)	5 ^a	5 (100)	32	28 (87.5)
II	31	29 ^a (93.5)	16 ^a	12 (75.0)	254	231 (90.9)
Total	41	34 (82.9)	21	17 (81.0)	286	259 (90.6)

a: At 5 weeks after inoculation b: At 7 weeks after inoculation *: Animals with vaginal plug after mating **: 8-16 cell stages on day 3 (discovery of vaginal plug is taken as day 1) ***: Morphologically normal embryos after culture for 26-28 hr in vitro

感染マウスより採取した正常胚の数と体外培養後の成績は表 3 に示した。なお、胚採取したドナーの全てが高い抗体価を示し、感染の成立が確認された。胚の移植成績は表 4 に示した。76 個の胚が 9 匹のレシピエントに移植され、8 匹が妊娠し、47 匹 (2 匹は子宮切断により摘出) の仔

を得た。46 匹が 10 週齢まで育成された。分娩後のレシピエントおよび 10 週齢時の移植仔の血清中からセンダイウイルス抗体は検出されなかった。剖検でも病変は認められなかった。なお、育成中に死亡した 1 例の剖検でも感染性の病変は認められなかった。

以上の結果から、十分に抗体価が上昇したセンダイウイルス感染マウスから採取した胚を、SPF マウスに移植することにより、清浄マウスを作出できることが明らかとなった。胚移植法は病原体汚染マウスの清浄化の有効な手段となることが本研究によって示された。

4) 胚移植法による無菌マウスの作出

マウス清浄化の究極は無菌化にある。無菌マウスの作出は、分娩直前のマウスから子宮を無菌的に摘出し、無菌条件下で胎仔を取り出し、無菌里親に哺乳させる方法が一般的に行われている。この方法は最適子宮摘出時期の見極めがむずかしく、また里親哺育が成功しないことも多いなどの問題がある。無菌動物作出および維持の効率化を図るため、普通マウス胚を無菌マウスに移植し、無菌新生仔を得る新しい無菌動物作出技術の開発を行った。

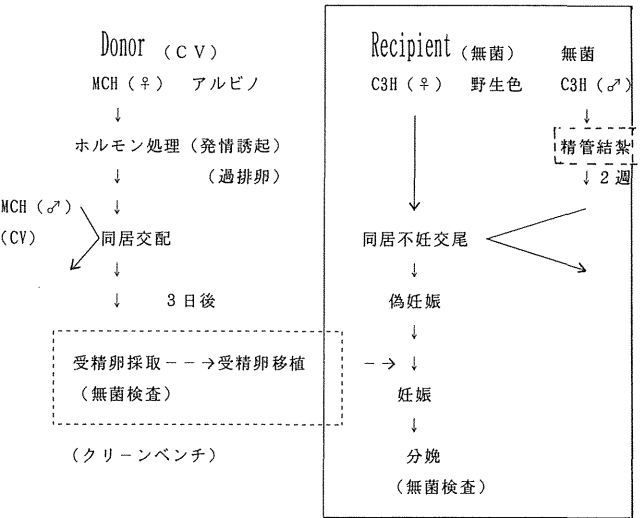


図 6. 胚移植法による無菌マウス作出の概略 (アイソレータ)

方法の概略：図 6 に示した。すなわち、①無菌 C3H マウス雄 (野生色) を滅菌したクリーンベンチ内に搬入し、無菌的に精管結紮を行い無菌アイソレータ内に戻す。この雄を 2 週後に無菌 C3H 雌マウスと不妊交尾させ、無菌偽妊娠マウス (レシピエント) を作る。②普通 MCH 雌マウス (アルビノ) を過排卵処理後、同系雄と同居・交配させ、3 日後に、安楽死させ、殺菌してクリーンベンチ内に搬入、無菌的に胚を採取する。③同時にクリーンベンチ内に無菌偽妊娠マウスを搬入し、無菌環境下で胚の移植を行い、再度アイソレータ内に戻し、妊娠・分娩させる。また、無菌検査を行う。

無菌精管結紮マウスの作出：①予め、手術用具を滅菌専用紙袋 (滅菌パック) に入れ高圧蒸気滅菌しておく。また、ハンダごても滅菌パックに入れガス滅菌しておく。②アイソレータとクリーンベンチをステリルロックで繋ぎ、ステリルロック内を過酢酸で滅菌するとともにクリーンベンチ内もこれで滅菌する。同時に予め滅菌していた器材入り滅菌パックや滅菌スピッツ管、滅菌シリンジ等も表面を過酢

酸噴霧してクリーンベンチ内に入れる。③クリーンベンチを作動させ十分に排気した後、術者は滅菌白衣・帽子・マスクと手術用ゴム手袋を着用、ゴム手袋表面を過酢酸で滅菌後、クリーンベンチ内に手を入れる。④助手が、術者が持っているスピッツ管にマイレクスミリポアフィルターを装着したシリンジでネンブータル液を注入する。⑤アイソレータから無菌雄マウスをクリーンベンチ内に搬入し、ネンブータル液で麻酔する。⑥開腹し、精管を取り出し、ハンドゴテで精管を焼き切る（精管結紮）。⑦縫合後、マウスをアイソレータに戻し、4～5日後に無菌検査を行う。⑧術後2週間経過したものを無菌精管結紮（切断）マウスとして使用する。

マウスの準備：①雌 MCH に PMSG と hCG を2日間隔で投与後、同系雄と1夜同居させ、翌朝膣栓を確認し、その2日後のマウスを胚採取用ドナーとした。②無菌 C 3 H 雌マウスを精管結紮 C 3 H マウスと移植4日前に同居させ、同居開始1～2日目に膣栓が確認されたものをレシピエントとした。

無菌胚採取：①実体顕微鏡をアイソレータ用滅菌缶に入れガス滅菌する。ホットプレートはビニル袋の中に入れ、コード部分をきつく縛ってシールする。手術器具や採卵・移植器具は滅菌バックに入れ蒸気またはガス滅菌する。②クリーンベンチ前面を透明ビニル膜に換える。③ガス滅菌した実体顕微鏡の入っている滅菌缶をクリーンベンチと繋ぎ、スリーブ内及びクリーンベチ内を過酢酸で噴霧滅菌する。この時、器材入り滅菌バック、ホットプレート、滅菌済みディスポ製品表面を過酢酸で噴霧滅菌してクリーンベンチ内に入れる。④術者は精管結紮時と同様の準備をして、クリーンベンチ内に手を入れ、実体顕微鏡を取り入れ組み立てる。⑤顕微鏡をのぞくため接眼部の位置で、助手が消毒した鉗でビニル膜を円く切る。⑥滅菌缶をはずし、レシピエントの入っているアイソレータとクリーンベンチを繋ぐ。⑦10%ネンブータル液を精管結紮時と同様にマイレクスフィルタ濾過してクリーンベンチ内に搬入、同様にウイッテン培地も濾過滅菌して搬入する。⑧ドナーマウスを安楽死させ、過酢酸もしくはマイクロクリン液に浸漬・殺菌した後、マウスをクリーンベンチ内に入れる。⑨マウスを開腹し、卵管・子宮を無菌的に取り出し、小シャーレに入れる。⑩培地を入れた灌流針付きシリンジの針を子宮体部に刺し、子宮内を洗い流し、培地入りシャーレに胚を採取する。⑪顕微鏡下で胚を観察し、正常分割胚を選択して胚ストック用シャーレに取りまとめておく。なお、培地及び培地入りシャーレはホットプレート上で温めておく。

無菌胚移植：①胚採取に引き続き、レシピエントをクリーンベンチ内に搬入し、ネンブータルで麻酔する。②背側の毛を刈り、皮膚、筋肉を切開して子宮を取り出し、子宮両側の卵管端に26Gの針で穴を開け、予め移植用の胚を吸い上げていたマイクロピペットをその穴に刺し、胚を子宮内に注入する。③子宮を腹腔内に戻し、筋肉・皮膚を縫合して、マウスをアイソレータ内に戻す。④4～5日後にレシピエントの糞便の無菌検査を行う。⑤移植17日前後に新生仔の誕生を確認する。その後、再度無菌検査を行う。

予備的な検討を含め、精管結紮雄の作出を4回（8～9匹／回）実施した。前記の方法で無菌精管結紮雄作出に成

功した。次に、無菌胚採取を試みた。膣栓により交尾が確認された雌マウス3匹から胚を採取し、1匹分づつ無菌検査を行い、全てが無菌であることを確認した。手技の習熟や器材の配置の検討のため予備テストを実施した後、無菌胚採取とその移植を行った。すなわち、2匹から19個の胚を採取し、2匹のレシピエント（内1匹は膣栓が確認されていない）に移植した。膣栓が確認されていた（確実に偽妊娠していた）1匹からアルビノマウス6匹（図7）が誕生し、その後の無菌検査において無菌であることが確認された。



図7. 胚移植によって作出された無菌マウス。

アルビノが作出された無菌 MCH、有色マウスはレシピエントの C 3 H。写真が不鮮明なのはアイソレータ越しに写したためである。

以上の結果から、我々が開発した胚移植法によっても無菌マウスが得られる事が証明された。

5. 結論

1) 亜種の関係にある2系統のマウスからリコンビナント近交系を確立することを目的として、SPF条件下でC3H/He × MOM のRISの育成を試みた。1988年に53ライン（F₂ × F₂）をセットし、各々による兄妹交配による継代を進めてきた。1993年3月までに52ラインが途絶え、F₁₄に達した1ラインのみが残った。この組み合わせに由来する近交系を多数育成することは極めて困難であった。ライン途絶の主な原因は、育成途中に繁殖力が失われることにあった。不妊となったラインの数の経代的推移のパターンが二相性を示していたことから、不妊の原因は単一でない可能性も示唆された。マウス亜種間の組み合わせによるRISの育成を成功させるには、育成途中に現れる不妊現象の機構・原因を明らかにし、それに基づく不妊防止方法を確立する必要がある。

2) 発がん機構を解明するために、放射線誘発胸腺腫高発系統と低発系統からなるキメラマウスの開発・作出を行い、これを発がん研究グループに供給することを目的として、B10.Thy1¹とSTS、BALB/cとC3Hの2つの組み合わせによるキメラを作出することとした。過排卵処理後の胚の平均回収率はSTSが12.8個であったのに対しB10.Thy1¹は1.7個と極端に少なかったため、胚数のバランスをとり効率的にキメラ胚を作出するため、この組み合わせでは各々の系統の胚を一時冷凍保存し、胚を集積し、融解後キメラ胚の作出を行った。179個の集合胚を作製・

移植し、26匹の離乳仔を得た。そのうち、12匹がキメラタイプであった。BALB/cとC3Hの組み合わせでは、胚の凍結保存はせず、581個の集合胚を作製して、レシピエントに移植、222匹の離乳仔を得た。そのうち、キメラタイプは97（32：65）匹であった。キメラは雄の比率が多く、これはH-Y抗原の精巣誘導作用に起因すると推察された。作出された109匹のキメラマウスは、放射線誘発胸腺腫の発生機構研究グループに提供され、発がん実験に使用された。

3) RISおよびキメラマウスの開発を支援するため放医研で維持している近交系の胚の凍結保存の実施、各種近交系の胚卵数・初期発生に関する調査を行うとともに胚移植法による病原体汚染マウスの清浄化と無菌マウスの作出についての技術開発を行った。凍結保存は13系統の基礎ストックについて実施し、8系統が保存胚200個以上に達したので凍結を終了するとともに使用予定のない7系統のin vivoによる系統維持を中止した。排卵数・初期発生調査を13-15系統について実施し、過排卵処理後の排卵数、交尾率、胚回収率には著しい系統差があることを明らかにした。胚回収率の低い系統では初期発生速度が遅かったり、未受精卵や異常分割が多く認められた。これらのデータから、キメラマウス作出の組み合わせとして、当初予定のSTS-B10.Thy1¹の他にBALB/c-C3Hの組み合わせも加えることとした。胚移植による汚染マウスの清浄化は、センダイウイルス人工感染マウスをモデルとして行い、十分に抗体価が上昇したセンダイウイルス感染マウスから過排卵処理によって採取した胚を、SPF偽妊娠マウスに移植することにより、病原体に汚染されていない清浄なマウスを効率的に作出できることを明らかにした。また、無菌雄マウスの精管結紮術の開発、無菌環境下での胚採取および移植技術を開発した。これにより、普通マウスから無菌的に採取した胚を無菌偽妊娠マウスに移植することにより無菌新生仔を得ることに成功した。胚移植法はマウス清浄化の有効な手段となることが本実験によって証明された。

謝辞

本研究の遂行に当たって、研究協力者として動植物管理課の長沢文男、富田静雄、山田能政、桜田雅一の各氏のご尽力を得た。また、病理組織標本の検索に際しては大津裕司先生のご指導を頂いた。さらに、マウス飼育管理に際して佐藤義子、溝越豊子、土田君子、長田晴美、松村ミツの皆さんのご協力を得た。これらの方々に心よりの謝意を表す。

〔研究発表〕

- 1) 岡本正則、松本恒弥、長沢文男、富田静男、山田能政、桜田雅一：胚凍結保存法による近交系マウスの系統維持に関する2-3の問題、1989年第3回実験動物研究者集談会、東京、1989.12.
- 2) 岡本正則、松下悟、松本恒弥：胚移植法を用いたセンダイウイルス感染マウスの清浄化、Experimental Animals, 39, 601-603, 1990.
- 3) Sado, T., Kubo, W., Kamisaku, H., : Internat'l. Sympo., "Radiation Carcinogenesis in the Whole-Body System", Tokyo, 1990. 12.
- 4) 岡本正則、松下悟、松本恒弥：受精卵移植法を用いたセンダイウイルス汚染マウスの清浄化、第37回日本実験動物学会総会、京都、1990.5.
- 5) 岡本正則、松本恒弥、山田能政、富田静雄：マウスの系統維持を目的とした胚の凍結保存、第3回哺乳動物生殖工学会シンポジウム-精子・卵子・胚の凍結保存-、東京、1991.12.
- 6) 松本恒弥、岡本正則：胚移植法による無菌マウスの作出、第27回日本無菌生物ノートバイオロジー学会総会、名古屋、1994.1.
- 7) 岡本正則、中瀉直己、松田洋一、他：野生マウス精子の凍結保存、第41回日本実験動物学会総会、筑波、1994.5.

(3) 超ウラン元素による内部被曝のリスク評価に関する調査研究

1. 超ウラン元素の代謝に関する比較毒性学的研究

① 超ウラン元素の呼吸器への沈着、代謝に関する研究

高橋千太郎、久保田善久、佐藤宏、山田裕司、小木曾洋一、稲葉次郎（内部被ばく研究部）

Deposition and Metabolism of Transuranic Radionuclides in the Respiratory Tract

Sentaro Takahashi, Yoshihisa Kubota, Hiroshi Sato, Yuuji Yamada, Youichi Oghiso, and Jiro Inaba
Division of Radiotoxicology

Alveolar macrophages play important roles on the retention and metabolism of inhaled radioactive particles deposited in the lung. In the present study, a new method was developed in order to evaluate the solubility of radioactive particles having phagocytosed by alveolar macrophages. By using this newly developed method, radiosensitivity of alveolar macrophages was investigated to estimate the effect of radiation emitted by radioactive particles on the functions of alveolar macrophages. This method was demonstrated to be a simple but useful method for the evaluation of the solubility of various particles in alveolar macrophages, compensating the disadvantages of the previous particle solubility tests performed in vivo and in vitro. The experiments on the radiosensitivity of alveolar macrophages showed that the alveolar macrophages of C3H mice were much more radiosensitive than those of the several other strains of mice and rats, with respect to the induction of apoptosis (a mode of interphase cell death). This suggests that the radiosensitivity of alveolar macrophages varies among animal species and / or strains, and that it is necessary to consider the species and strain differences in the radiosensitivity of alveolar macrophages for estimating the retention and metabolism of inhaled radioactive particles.

1. 緒言

放射性物質の生体内摂取に起因する内部被ばくの影響を評価するためには、1) 対象とする放射性物質の生体内での挙動（沈着、滞留、代謝および排泄）を明確にし、2) これをもとに、生体の各臓器が受ける放射線の線量を計算し、3) 誘発された生体影響を線量との関係から明らかにすることが必要である。

この点から、対象とする放射性物質の生体内における挙動、代謝に関する知見は、内部被ばく影響評価の基礎をなすものである。過去、種々の放射性物質を対象として、その生体内挙動、代謝に関する研究が行われてきたが、それらの研究はイオン状の放射性核種を対象としたものが多く、生体内において粒子もしくはコロイドの状態で存在するいわゆる粒子状放射性物質の生体内挙動、代謝に関しては不明な点が多い。

生体内で粒子状物質として挙動する放射性核種の代表的なものは超ウラン元素である。原子力施設での使用量が増大し、放射線防護の観点から関心のもたれているプルトニウムなどの超ウラン元素は、空气中浮遊微粒子（エアロゾル）として呼吸にともなって生体に吸入され、呼吸器に沈着するという摂取経路がもっとも主要な経路と考えられている。さらに、これらの核種では、生体の体液中においては水酸化物重合体のような粒子状で挙動することが知られている。したがって、プルトニウムなどの超ウラン元素の生体内での挙動を明らかにするには、粒子状で吸入された物質の呼吸器での挙動、代謝に関する知見と、血液やリンパに吸収された後のコロイド粒子の生体内処理に関する知見が必要となってくる。このような外因性異物粒子の処理を担当している細胞は、マクロファージ（食食細胞）とよばれる血液細胞の一種である。たとえば、吸入によって呼吸器に沈着した粒子は、外来性の異物を排除し生体防御に重要な役割を担っている肺胞マクロファージにすみやかに食食される。可溶性粒子は肺胞マクロファージ内で可溶化され、血液あるいはリンパ液を介して生体の他臓器に移行し、または糞尿中に排泄されるが、不溶性粒子の場合は肺胞マクロファージに食食されたまま長期間肺深部に滞留し、肺組織を連続的に照射することになる。すなわち、放射線防護上重要な放射性核種「超ウラン元素」の内部被ばく影響評価においては、吸入後の体内挙動、代謝に深く関わっている肺胞マクロファージの異物粒子処理能に関する生理学的特性を明らかにし、さらに食食した粒子から放出される

放射線に対する肺胞マクロファージの反応等の粒子との相互作用に関する知見を得ることが極めて重要である。

本研究では、吸入摂取された粒子状超ウラン元素の肺胞マクロファージによる貪食および可溶化、放射性粒子状物質が放出する放射線によって生ずる肺胞マクロファージの機能的変化に関する基礎的な知見を得ることを目的として、1) 粒子状物質の肺胞マクロファージによる貪食、溶解能を評価するための新手法の開発、2) 肺胞マクロファージによる粒子状物質溶解能に及ぼす放射線の影響、3) 肺胞マクロファージの放射線感受性の種差、系統差、および4) 放射線によって誘発される肺胞マクロファージの細胞死の形態について研究を実施し、以下の成果を得た。

2. 研究方法

2-1. 粒子状物質の肺胞マクロファージによる貪食、細胞内消化にともなう溶解を評価するための新しい手法の開発：

ウィスター系ラットをハロセンガス麻酔下で気管切開し、微細ナイロンカニューレを、先端が気管支第1分岐部に保持される状態で気管内挿管した。麻酔から覚醒した後、⁵⁹Fe-水酸化鉄コロイド溶解 (Priest らの方法によって作製)、あるいは²³⁹Pu-水酸化プルトニウムコロイド溶液 (Lindenbaum の方法によって作製) 0.5 ml を、カニューレを介して肺内に投与した。投与後1日目、3日目、7日目に動物を麻酔下で放血死させ、リン酸緩衝生理食塩水 (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free PBS) で肺洗浄を行った。得られた肺洗浄細胞を2~3回ハンクス緩衝液で洗浄した後、3時間培養した。培養終了後、培養液を遠心分離し、上清中に放出された放射活性をオートγカウンターおよび液体シンチレーションカウンターで測定した。培養開始時の全放射能に対する上清中放射能の割合から放出率を求めた。すなわち、この場合の放出率とは、肺胞マクロファージが粒子を貪食してから1、3、7日目において、細胞内消化され、短時間 (3時間) で細胞から培養液中に放出される状態まで可溶化された粒子の量を意味している。

2-2. 肺胞マクロファージによる粒子状物質溶解能に及ぼす放射線の影響：

⁵⁹Fe-水酸化鉄コロイド粒子を1) で述べた気管支挿管法でウィスター系ラット及びC3H系マウスの肺内に投与した。C3Hマウスの場合、ラットの1/10量、0.05 ml を投与した。投与後24時間目に動物を放血と殺し、肺洗浄によって得られた細胞浮遊液を¹³⁷Cs線源 (線量率12.5Gy/min) で照射した後、10%のウシ胎児血清を含むイーグルMEM培養液で培養した。2時間後、プラスチックプレート非付着細胞を培養液で洗って除去した後、さらに同じ培養液で6-70時間培養した。培養後、細胞を遠心分離し、培養上清中に放出された⁵⁹Fe活性をオートγカウンターで測定した。また、一部の細胞では、0.5%トリパンブルーによる生存率の測定を行った。

2-3. 肺胞マクロファージの生存率に及ぼす放射線照射の影響：

i) ウィスター系、SD系、フィシャー系、ルイス系ラット、およびC3H系、BALB系、C57Black系マウスから、上記の肺洗浄法を用いて肺胞マクロファージを採取した。非照射あるいは照射後一定期間培養した後、PBSで2回洗浄し、次に0.1%のクリスタルバイオレットで

15~20分間染色した。染色が完了したプレートは水道水でよく洗浄したのち、乾燥させ、さらに0.5%ドデシル硫酸ナトリウム溶液を添加して染色細胞を溶解した。この染色細胞溶解液を一定倍率で希釈した後、分光光度計 (波長540nm) で吸光度を測定した。非照射肺胞マクロファージの吸光度を100とした時の照射肺胞マクロファージの吸光度をその生存率とした。

ii) トリパンブルー色素排除能：非照射および照射肺胞マクロファージを24時間培養した後、PBSで洗浄して付着細胞と非付着細胞に分けた。非付着細胞数は直接コールターカウンターで測定し、付着細胞数は、5%のザッポグロビン (コールター社) で細胞壁を溶解した後、浮遊させた細胞核数をコールターカウンターで測定することにより求めた。非付着細胞のトリパンブルー色素排除能は、血球計算盤を使用して常法通り行い、付着細胞の色素排除能は、プレートに直接トリパンブルー色素液を滴下し、倒立顕微鏡下で観察することにより算定した。

2-4. 放射線によって誘発される肺胞マクロファージの細胞死の形態：

i) マウス肺胞マクロファージのコロニー形成能：肺洗浄によって採取したマウスの肺胞マクロファージをX線照射後、10%の馬血清、300ユニット/mlのリコンビナントGM-CSFを含むイーグルαMEM培地中で、7日間培養し、50個以上の細胞からなるコロニーの数を算定した。照射肺胞マクロファージのコロニー形成率は非照射肺胞マクロファージのコロニー数を100として表現した。

ii) 照射肺胞マクロファージの形態：上記の方法で採取した肺胞マクロファージをγ線照射した後、さらに6時間培養した。培養後、細胞を酢酸メタノールで固定し、ギムサ染色した。光学顕微鏡を用いて観察し、核濃縮 (ピクノーシス) あるいは核のフラグメンテーションをおこしている細胞の割合を算定した。

iii) 照射肺胞マクロファージから抽出したDNAのアガロースゲル電気泳動：照射肺胞マクロファージを6時間培養したのち、ラウリル硫酸ナトリウムを含む細胞溶解液で溶解し、引き続きプロテナーゼKおよびRNAaseで処理した。さらに、フェノール/クロロホルム混合液を用いてDNAの抽出を2回行った後、0.2M NaCl、70%エタノールで沈降させ、最終的にトリス-EDTA溶液に溶解した。調製されたDNAサンプルは0.5μg/mlのエチジウムブロマイドを含む1.2%アガロースに負荷し、15時間TBE (Tris borate EDTA buffer) 溶液中で電気泳動を行った。泳動終了後、紫外線照射下でポラロイドカメラで写真を撮り、DNAのフラグメンテーションの有無を観察した。

3. 結果および考察：

3-1. 粒子状物質の肺胞マクロファージによる貪食および溶解能を評価するための新手法の開発：

表1は、⁵⁹Fe-水酸化鉄コロイドあるいは²³⁹Pu-水酸化プルトニウムコロイドを気管挿管法によって肺内に投与されたウィスターラットから、投与後1日目、3日目、7日目に肺洗浄を行って得た肺胞マクロファージを3時間培養し、培養上清中に放出される放射活性を培養開始時の全放射活性のパーセンテージで表現したものである。投与後1日目の肺胞マクロファージでは3時間の培養で7.8%

Table 1 Release of ^{239}Pu or ^{59}Fe from alveolar macrophages having ingested ^{239}Pu - or ^{59}Fe -iron hydroxide colloids.

Radionuclides	Time after loading (h)		
	24	72	168
^{239}Pu	$0.6 \pm 0.4^*$ (100)**	1.2 ± 0.3 (210)	2.5 ± 0.8 (434)
^{59}Fe	7.8 ± 5.3 (100)	5.4 ± 2.1 (69)	3.9 ± 2.8 (50)

* Values are mean \pm s.d. of triplicated assays in at least two experiments, and expressed as percentage of the initial activity in macrophages at the start of *in vitro* culture.

** Values in parentheses are percentages of the release rates to those at 24 h after loading of the colloids.

の ^{59}Fe を放出するが、投与後3日目では5.4%、7日目では3.9%と放出率の低下が認められる。一方 ^{239}Pu 水酸化プルトニウムコロイドの場合は1日目0.6%、3日目1.2%、7日目2.5%と放出率が上昇した。 ^{59}Fe -水酸化鉄コロイドと ^{239}Pu -水酸化プルトニウムコロイドの間で、コロイド貪食肺胞マクロファージから放出される割合が粒子投与後の時間経過で全く逆の傾向を示す機序については明らかでないが、個々の放射性核種およびその物理、化学的形態によって、生体内で肺胞マクロファージによる可溶化、細胞外への放出割合ならびにその時間的経過が大きく異なることを本実験は示唆している。従来、呼吸器に沈着した放射性粒子状物質の肺における可溶化を調べるためには、可溶化した放射性核種が他臓器へ再沈着し、また糞尿を介して体外に排出されるなど複雑な経路があるため、連続的な糞尿採取と動物の定期的な解剖、各臓器の採取、それらのサンプルの放射活性の測定が必要であり、多大な労力、動物数およびコストを要した。一方、*in vitro*で、培養肺胞マクロファージによる可溶化を定量化する実験が多くの研究者によって行われてきたが、この実験系の問題点は、長期にわたって肺胞マクロファージを培養することが不可能なため、長くても1週間程度の期間に限られること、また培養期間を延長すればするほど培養肺胞マクロファージの形態、機能が本来肺胞マクロファージが生体内で有しているものと異なってしまう可能性があることである。そのため、肺胞マクロファージの培養期間を延長できたとしても、それを使用した粒子状物質の可溶化試験の結果が、生体内での肺胞マクロファージによる粒子の可溶化及びその時間的変動を正確に反映するとは言い難いものであった。我々が考案した実験系でも肺から採取して培養することにより、肺胞マクロファージの生体内での本来の性質が変化する可能性を完全には否定できない。しかしながら、わずか3時間の培養であること、また図1の結果で、水酸化コロイドの溶解率が、コロイド投与後の時間経過によって変化する事実は、その時点での肺胞マクロファージの生体内における特性を正確に反映していることを示唆している。もし、肺胞マクロファージが、均一な培養条件によってその性質が固定化されるのならば、水酸化コロイドの投与後

の時間経過によって肺胞マクロファージからの放出率の変動は認められないはずである。以上のことから、本実験系は、*in vivo*および*in vitro*の実験系の短所を補完し、肺胞マクロファージによる放射性粒子状物質の可溶化およびその時間的変動を比較的容易にスクリーニングしうる優れた方法であると思われる。

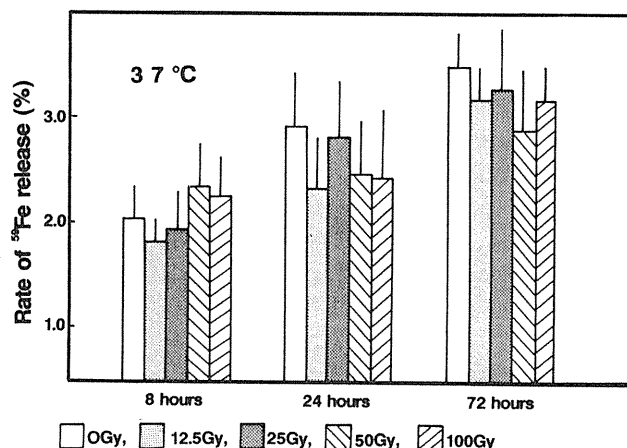


図1 The rate of ^{59}Fe release from AM which were loaded with ^{59}Fe -iron hydroxide colloid. Cell culture was carried out for 8-72 hrs after irradiation at 37°C . Values are expressed as percentages of initial activity of ^{59}Fe in AM, and the vertical bar in each column shows the standard deviation.

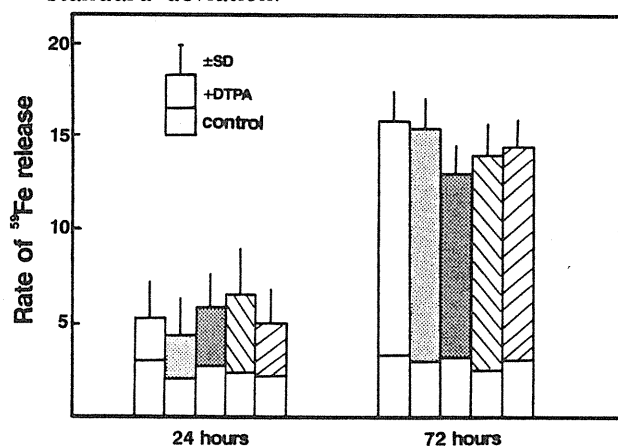


図2 The rate of ^{59}Fe release, expressed as percentages of initial activity of ^{59}Fe in AM, in AM cultured with 10 mM Ca-DTPA for 24 and 72 hrs after irradiation. The total length of each column denotes the ^{59}Fe release in AM cultured with Ca-DTPA and that of the blank column shows the release in control AM which were incubated in normal medium without Ca-DTPA.

3-2. 肺胞マクロファージによる粒子状物質溶解能に及ぼす放射線の影響：

粒子状物質が吸入され、呼吸器に沈着すると粒子状物質の代謝に重要な役割を担っている肺胞マクロファージに貪食されるが、貪食された粒子が放射性粒子の場合、自身が放出する放射線によって肺胞マクロファージが機能的に変化し、非放射性粒子状物質と異なる挙動・代謝を示す可能

表2 Effect of γ irradiation on ^{59}Fe release from AMs that had ingested ^{59}Fe -iron hydroxide colloid*¹⁾

Animal	Time after irradiation (hr)	Radiation dose (Gy)				
		0	12.5	25	50	100
Mice	24	2.2 \pm 0.1* ²⁾	2.9 \pm 0.3	4.3 \pm 0.6	16.8 \pm 3.9	23.4 \pm 4.9
	72	3.1 \pm 0.2	3.4 \pm 0.2	6.6 \pm 0.4	22.0 \pm 2.4	32.9 \pm 5.2
Rats	24	2.8 \pm 0.5	2.3 \pm 0.5	2.8 \pm 0.5	2.5 \pm 0.5	2.9 \pm 0.6
	72	3.2 \pm 0.3	3.4 \pm 0.3	3.3 \pm 0.6	2.9 \pm 0.6	3.8 \pm 0.3

*1) The rate of ^{59}Fe release is expressed as the percentage of the initial ^{59}Fe activity in AMs at the start of culture.
*2) Values are means \pm s.d. of 6 to 9 culture dishes from 3 experiments.

表3 Effect of γ irradiation on AM survival rate of C3H mice and Wistar rats*¹⁾

Animal	Time after irradiation (hr)	Radiation dose (Gy)			
		12.5	25	50	100
Mice	24	76.2 \pm 15.8* ²⁾	60.9 \pm 17.2	23.5 \pm 12.1	5.9 \pm 6.0
	72	55.0 \pm 10.9	37.1 \pm 18.4	11.2 \pm 13.0	1.6 \pm 1.5
Rats	24	101.1 \pm 9.4	98.6 \pm 18.9	93.9 \pm 21.1	92.9 \pm 10.5
	72	78.6 \pm 9.5	73.2 \pm 12.2	71.5 \pm 14.8	73.3 \pm 10.6

*1) The survival rate is defined as the ratio (%) of the optical density of crystal violet in the irradiated group to that in the non-irradiated controls.
*2) Values are means \pm s.d. of 6 to 9 culture dishes from 3 experiments.

性がある。しかしながら、肺胞マクロファージの放射線に対する反応性、特に細胞内消化などの機能に対する放射線の影響についてはほとんど知られていない。そこで、 ^{59}Fe -水酸化鉄コロイドを気管内投与したウィスターラットから採取した肺胞マクロファージの ^{59}Fe 放出能に及ぼす放射線の影響を調べた(図1)。培養時間が8時間から72時間に長くなるにしたがい肺胞マクロファージから培養液中に放出される ^{59}Fe は増加したが、いずれの培養時間においても100Gyまでの γ 線照射は ^{59}Fe の放出に全く影響を及ぼさなかった。肺胞マクロファージによって貪食された水酸化鉄コロイドは、ライソゾーム内に入りライソゾーム酵素によって加水分解され、鉄イオンとして細胞質内に移行し、さらに細胞内外の鉄イオン濃度差による受動的なトランスポートによって細胞外に放出されることが知られている。100Gyまでの γ 線照射が、ラット肺胞マクロファージからの ^{59}Fe の放出に全く影響しないという事実は水酸化鉄コロイドの可溶化から鉄イオンの細胞膜透過までの過程がすべて非常に放射線抵抗性である可能性あるいは各過程が放射線によって影響をうけても、エンドポイントとしての ^{59}Fe の放出量は変化しない様に各過程が相互に補完している可能性を提起する。図2は培養液中に ^{59}Fe のキレート効果を有するカルシウム-DTPA10mM添加した実験の結果である。 ^{59}Fe の肺胞マクロファージからの放出率はキレート剤によって顕著に増加し、特に培養72時間目で顕著であったが、100Gyまでの γ 線照射を行っても、 ^{59}Fe の放出率は非照射群と比較して有意な差を生じなかった。培地中にCa-DTPAを添加した場合細胞外に存在する鉄イオンはすみやかにCa-DTPAにキレートされるために、鉄イオンの細胞内外濃度平衡化のための細胞膜における受動的トランスポートは、一方的に鉄イオンの細胞外への放出を生じ、 ^{59}Fe の肺胞マクロファージからの放出がこう進する状態にある。このような状態においても、 γ 線照射の影響が認められないことから、 γ 線照射が、細胞のライソゾーム中での水酸化鉄コロイドの可溶化を促進又は抑制している可能性は考えにくい。そこでウィスターラットの肺胞マクロ

ファージによる ^{59}Fe -水酸化鉄コロイドの可溶化、細胞外放出の過程は極めて放射線抵抗性であると結論された。同様の実験をC3Hマウスの肺胞マクロファージを使用して行い、ウィスターラット肺胞マクロファージの結果と比較したのが表2である。非照射の肺胞マクロファージからの ^{59}Fe の放出量は、培養24時間で、ウィスターラット2.8%、C3Hマウス2.2%であり、培養72時間になると ^{59}Fe 放出率は両者共増加するがほぼ同レベルであった。ウィスターラットの肺胞マクロファージからの ^{59}Fe 放出は、100Gyまでの γ 線照射によって全く影響を受けなかったのに対し、C3Hマウスの肺胞マクロファージからの ^{59}Fe 放出は、線量依存性に増加した。この結果から、C3Hマウスの肺胞マクロファージは γ 線照射によって細胞死、特に細胞膜の障害を誘発されやすく、細胞死によって貪食した ^{59}Fe -水酸化鉄コロイドが漏出した可能性あるいは水酸化鉄コロイドのライソゾーム酵素による加水分解、それに続く ^{59}Fe の細胞外への放出という一連の過程のいずれかが γ 線照射によってこう進した可能性が考えられた。そこでこれらの可能性を検討するために肺胞マクロファージの生存率に及ぼす放射線の影響を調べた(表3)。クリスタルバイオレットによる細胞の生体染色は、機能的に生存している細胞のみがこの色素を細胞内に取り込むことから、細胞の生存率を調べる簡単な方法として使用されてきた。本法によって肺胞マクロファージの生存率を評価した時、照射後24時間目で、ウィスターラットの肺胞マクロファージは100Gy照射されても92.9%の生存率を示すが、C3Hマウスの肺胞マクロファージでは5.9%と極端に減少していた。また72時間ではウィスターラットの100Gy照射された肺胞マクロファージの生存率は非照射コントロールの約70%であり、一方、C3Hマウスの肺胞マクロファージの生存率は、25Gyで37.1%、50Gyで11.2%、100Gyで1.6%と線量依存性に顕著に減少することが分かった。この結果は、C3Hマウスの肺胞マクロファージはウィスターラットの肺胞マクロファージと比べて放射線によって細胞死(膜障害)を生じ易いことを明確に示した。表2と表3を比較すると肺胞マクロファージに対する放射線の影響は、 ^{59}Fe -水酸化鉄コロイドを貪食した肺胞マクロファージからの ^{59}Fe の放出率より、クリスタルバイオレットによる細胞生存率試験の方が感度良く検出できることが分かる。例えばC3Hマウスの肺胞マクロファージを12.5Gy照射し72時間培養した時、クリスタルバイオレットによる細胞生存率は非照射コントロールの55%に低下するのに対し、 ^{59}Fe の放出率は非照射コントロールと比べて有意な差が認められない。この傾向はウィスターラットの肺胞マクロファージにおいても、また使用したすべての線量で認められた。放射線によって重篤な膜障害を生じ、クリスタルバイオレットを取り込むことができなくなった肺胞マクロファージでも、照射以前に細胞内に取り込んだ水酸化鉄コロイドを放出せずに細胞内に蓄積し続けることが考えられるし、また ^{59}Fe -水酸化鉄コロイド粒子が死滅した細胞から放出されても、まだ生残している肺胞マクロファージに再度取り込まれる可能性もある。いずれにせよ、この結果から ^{59}Fe -水酸化鉄コロイドを貪食したC3Hマウスの肺胞マクロファージからの ^{59}Fe の放出に及ぼす放射線の影響は一義的に放射線による肺胞マクロファージの細胞死の誘発によって説明できる。

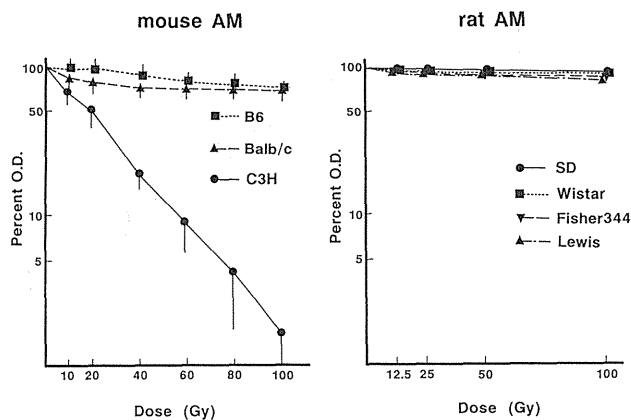


図3 The effect of r -irradiation on the viability of mouse and rat alveolar macrophages determined by vital staining with crystal violet. Vertical bars indicate standard deviation of the means. There was no significant difference among rat alveolar macrophages of 4 strains at each dose-point.

表4 The viability of mouse and rat AM 24hrs after irradiation

Strain/ Species	Dose (Gy)	Percentage of initial cell number ^a		
		Adherent fraction ^b	Nonadherent fraction ^c	Total cell viability ^d
Wistar rat	0	89.3±4.7 ^a (98.7±0.8)*	9.7±1.4 (85.9±3.3)	95.9±4.5
	50	86.6±5.7 (96.1±5.7)	8.6±1.5 (80.2±4.6)	90.1±4.8
	100	80.3±7.6 (95.2±5.5)	12.9±2.5 ^a (81.9±6.6)	87.2±5.7
SD rat	0	45.5±4.8 (97.1±5.3)	50.6±5.1 (93.4±5.8)	91.3±0.9
	50	46.5±6.3 (95.2±1.1)	48.7±2.9 (89.6±3.8)	87.8±5.5
	100	50.3±6.7 (94.7±1.5)	41.5±3.7 (95.6±1.2)	87.4±5.6
Fisher rat	0	66.5±6.7 (95.1±4.3)	31.9±3.2 (92.4±1.5)	92.9±4.6
	50	65.3±9.3 (98.4±5.7)	28.6±3.7 (89.7±7.2)	90.5±5.9
	100	56.2±5.8 (96.2±6.8)	35.4±6.8 (91.2±5.4)	86.4±5.7
Lewis rat	0	59.5±4.1 (97.9±6.1)	38.5±4.7 (87.9±7.2)	92.1±4.5
	50	65.5±8.3 (98.6±8.8)	33.2±7.2 (88.3±6.7)	93.4±8.5
	100	53.9±6.1 (97.6±7.4)	42.9±7.9 (86.4±9.9)	88.7±8.1
B6 mouse	0	74.6±9.4 (99.3±2.6)	2.9±0.4 (77.6±3.9)	99.4±5.5
	50	77.1±8.9 (86.2±3.4)	21.9±8.5 (55.8±6.6)	79.1±9.0
	100	66.2±7.5 (88.7±7.6)	18.4±3.6 (51.3±5.1)	68.2±8.1
C3H mouse	0	97.7±8.3 (99.3±2.6)	2.9±0.4 (77.6±3.9)	99.4±5.5
	50	48.0±5.2 (44.4±4.5)	26.7±6.2 (14.1±2.1)	25.1±3.6
	100	24.6±2.0 (13.1±3.1)	30.9±3.8 (5.2±3.0)	4.7±0.7
Balb mouse	0	89.1±5.2 (98.3±4.1)	8.9±1.1 (75.0±4.3)	93.5±5.3
	50	85.0±5.4 (89.5±5.0)	12.3±2.1 (57.3±4.0)	83.0±5.2
	100	82.2±3.5 (84.4±4.4)	12.0±1.5 (50.8±1.9)	75.6±3.1

^a Initial cell number was that of AM adherent to dishes after 2hr of culture and was taken as 100%.

^b Adherent fraction: AM still adherent to dishes after washing with PBS after 24hr in culture. The cell number in the adherent fraction was expressed as a percentage of the initial cell number.

^c Nonadherent fraction: AM washed out with PBS after 24hr in culture and the cell number in the nonadherent fraction was expressed as a percentage of the initial cell number.

^d The values are means of percent cell numbers and the standard deviations of the means in three separate experiments.

^e The values in parentheses are the percent cell viabilities determined by trypan blue exclusion.

^f Total cell viability expressed as a percentage of the initial cell number, was calculated from the percent cell number and the percent cell viability of both adherent and nonadherent fractions.

3-3. 肺泡マクロファージの放射線感受性の種差、系統差および放射線によって誘発される肺泡マクロファージの細胞死の様態：

肺泡マクロファージの生存率に及ぼす放射線の影響がC3Hマウスとウィスターラットで異なることが明らかになったので、他の系統のマウスおよびラットの肺泡マクロファージについてもその放射線感受性を検討した（図3および表4）。図3はクリスタルバイオレットの生体染色に

よる測定時においてプレートに付着している肺泡マクロファージの生存率を非照射コントロールを100%として表したものである。使用した4系統のラット、すなわち、ウィスター系、フィッシャー系、ルイス系およびSD系のラットの肺泡マクロファージはすべて放射線抵抗性であり、100Gyの r 線を照射されても、照射後24時間で非照射コントロールの90%以上の生存率を維持していた。またC57BlackおよびBalb系マウスの肺泡マクロファージも比較的放射線抵抗性であり、100Gyの照射でコントロールの70-80%の生存率であった。一方、調べたマウス、ラットの系統の中で、唯一C3Hマウスの肺泡マクロファージが顕著な放射線感受性を示し、100Gyの照射で生存率は非照射群の1-2%に低下していた。表4では測定時（照射後24時間）にプレート付着肺泡マクロファージと非付着マクロファージに分け、それぞれの細胞数とトリパンブルー色素排除能試験による生存率から全生存細胞数を計算し、培養開始時の生存細胞数に対するパーセンテージで表現した（表中のtotal cell viability）。その結果はクリスタルバイオレットの生体染色によるプレート付着肺泡マクロファージの生存率試験の結果と非常に良く一致した。すなわち4系統のラットの肺泡マクロファージおよびC57Black、Balb系マウスの肺泡マクロファージは放射線抵抗性であるのに対し、C3Hマウスの肺泡マクロファージのみが特異的に顕著な放射線感受性を示した。インターロイキン-3やGM-CSF、M-CSFなどのマクロファージを増殖させる因子を添加しない通常の培養条件下においては、肺泡マクロファージは全く増殖しないことが知られている。したがって、クリスタルバイオレットの生体染色およびトリパンブルー色素排除能試験によって明らかにされたC3Hマウスの肺泡マクロファージの放射線照射による生存率の低下は間期死（interphase cell death）によるものと考えられた。細胞の間期死には形態的にまた生化学的に全く異なる2つの様式すなわちネクロシスとアポトーシスが存在する。一般にネクロシスは細胞に激しい障害を与えることによって生じ、一方アポトーシスは生理的条件や非常にマイルドな刺激によって誘発されると言われている。放射線が胸腺細胞や腸管のクリプト細胞に比較的低線量で顕著なアポトーシスを誘発することはよく知られた事実である。アポトーシスは形態的には細胞核の濃縮、核の断片化、アポトーティックボディの出現等の特徴によって、また生化学的にはDNAのアガロースゲル電気泳動によって明らかにされるヌクレオゾームを単位とするDNAの断片化を指標として定義されてきた。C3Hマウスの肺泡マクロファージが放射線によって顕著な間期死を生ずることが明らかになったので、この間期死がいずれの様式によるものかを検討した。図4は50Gy照射後6時間目のC3Hマウスの肺泡マクロファージの光学顕微鏡写真である。濃縮して小さくなった細胞核や断片化した核が多くの肺泡マクロファージで認められる。また、図5は50Gy照射後6時間目の肺泡マクロファージから抽出したDNAのアガロースゲル電気泳動像である。50Gy照射されたC3Hマウスの肺泡マクロファージのみに顕著なDNAの梯子状の断片化が見られる。これらの結果から放射線照射によって誘発されるC3Hマウスの肺泡マクロファージの間期死はアポトーシスであると断定される。またデータには示さないが、アポトーシスにおいてDNAの

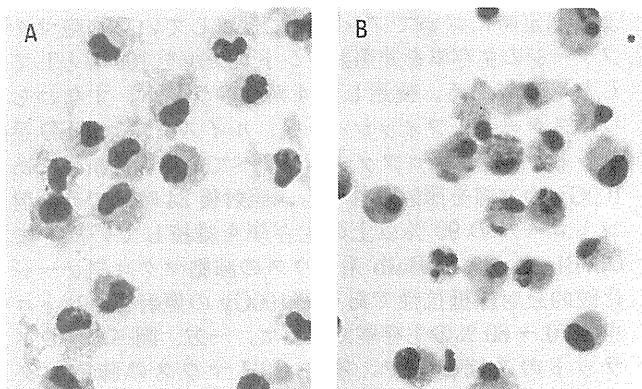


図4 Light microscopic photographs of C3H mouse alveolar macrophages 6hr after irradiation. A, non-irradiated; B, 50Gy irradiated.

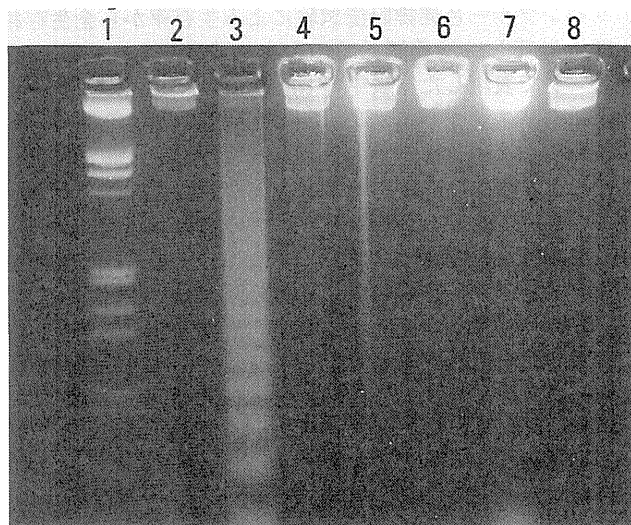


図5 DNA fragmentation of irradiated C3H mouse alveolar macrophages (AM). Lane 1, molecular size markers, Hind III and Eco RI digests of lambda phage DNA; lane 2, non-irradiated C3H mouse AM; lane 3, 50Gy irradiated C3H mouse AM; lane 4, non-irradiated C57Black mouse AM; lane 5, 50Gy irradiated C57Black mouse AM; lane 8, C3H mouse AM treated with 0.33mM ZnSO₄ immediately after irradiation with 50Gy.

断片化に関与している Ca、Mg 依存性 DNA エンドヌクレアーゼの活性を阻害すると考えられている亜鉛イオンの照射直後の添加によって C3H マウスの肺胞マクロファージの照射による細胞死は完全に抑制された。

放射線による肺胞マクロファージの間期死誘発にマウス、ラットの系統によって差があるので、放射線による増殖死 (reproductive or proliferative cell death) にも系統差が存在するのか否かを調べた。ラットの肺胞マクロファージのコロニー形成能試験は、リコンビナントのインターロイキン-3、GM-CSF、M-CSF や優れたコンディショニングメディウムが入手できないので行えず、マウスリコンビナント GM-CSF を使用して C3H、C57Black、Balb 系マウスの肺胞マクロファージでコロニー形成能に及ぼす放射線の影響を調べた (図6)。平均のクローニング効率は3系統のマウスとも同レベルで約10%であった。肺胞

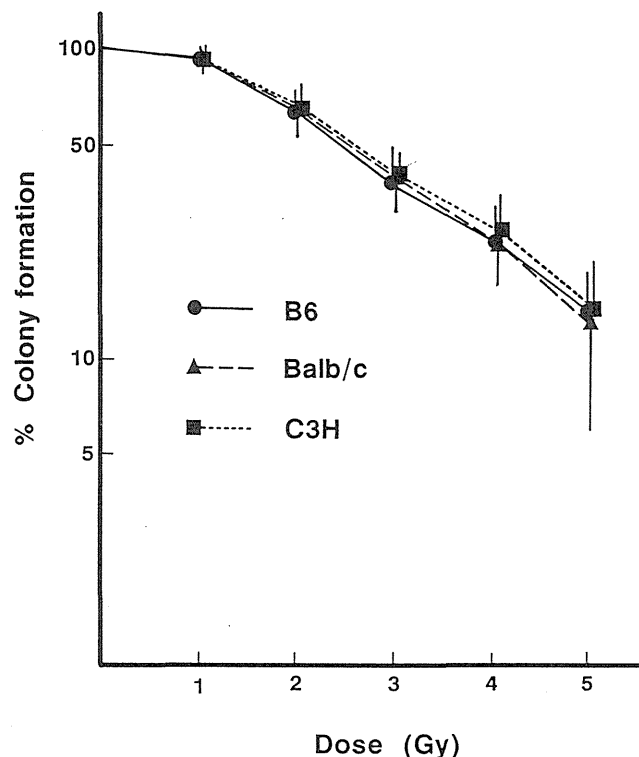


図6 The effect of X-irradiation on the colony forming ability of alveolar macrophages from 3 strains of mice. Vertical bars indicate the standard deviations of the means.

マクロファージのコロニー形成能の放射線感受性は図6に示すように比較的大きな肩をもつ直線になったが、3系統のマウス間で全く差は認められなかった。マウスの肺胞マクロファージの放射線感受性に関して、増殖死では系統差が認められないのになぜ間期死の1様式であるアポトーシスの誘発では C3H マウスの肺胞マクロファージが特異的に高感受性なのだろうか。現在この問題に対する明確な答えはない。放射線による細胞の増殖死誘発の主たる原因は修復しえない DNA の2重鎖切断であることが培養株化細胞を使用して明らかにされてきている。マウスの肺胞マクロファージの放射線による増殖死も修復不能な DNA の2重鎖切断に依存していると考えれば図6の結果から3系統のマウスの肺胞マクロファージでは照射によって同レベルの DNA 鎖切断が生じているはずである。放射線による肺胞マクロファージのアポトーシス誘発も DNA 鎖切断に依存しているのならば、増殖死を誘発する線量 (~5 Gy) に対してアポトーシスを誘発する線量 (数10 Gy) によって生ずる DNA 鎖切断の質や量にマウス系統差が存在するのかもしれない。また増殖因子存在下でコロニーを形成しえる肺胞マクロファージは全細胞の10%であり、他の肺胞マクロファージは増殖能を失い、より成熟した細胞と考えられるため、10%のコロニー形成可能な肺胞マクロファージの放射線感受性が3系統のマウス間で同一であっても肺胞マクロファージ全体としてアポトーシス誘発に関する放射線感受性が異なることも考えられる。さらに放射線による DNA 鎖切断の質や量が同じであっても最終的にアポトーシスを誘発するまでの細胞内で生ずる生化学的反応 (例えば放射線によって胸腺細胞に誘導され、胸腺細胞のアポトーシスに必須であることが証明されている

p53 蛋白) に系統差が認められるかもしれない。一方、放射線照射によって C3H マウスの肺胞マクロファージに顕著に誘発されるアプトーシスは DNA 鎖切断に関係していない可能性もある。これらの可能性を検討することは今後の課題であるが、パルスフィールド電気泳動等を駆使した放射線による肺胞マクロファージの DNA 鎖切断の定量化が解明の手がかりになると思われ、現在検討をすすめている。

4. 結論

吸入によって呼吸器に沈着した放射線粒子状物質の生体内挙動、代謝に肺胞マクロファージが重要な役割を担っていることが知られている。本研究では肺胞マクロファージによって食食された放射性粒子状物質の溶解性を評価するための新手法の開発および放射性粒子状物質の放出する放射線が肺胞マクロファージの機能に及ぼす影響を評価するために、数系統のマウス、ラットの肺胞マクロファージの放射線感受性に関して検討を行った。放射性粒子状物質の肺胞マクロファージによる溶解性を評価するために新しく開発された方法は、粒子の投与を *in vivo* で行い、その後の溶解性の評価を *in vitro* で行うものである。この方法は、今までに行われてきた *in vivo* および *in vitro* の粒子溶解性試験のそれぞれの短所を補完し、粒子状物質の呼吸器における溶解性を容易にスクリーニングすることを可能にする方法であり、今後、放射性物質を含め種々の粒子状物質の溶解性試験に広く利用できるものと期待される。

肺胞マクロファージの放射線感受性を調べた実験においては、検討した数系統のマウス、ラットのなかで、C3H マウスの肺胞マクロファージが特異的に放射線感受性で、他の動物の肺胞マクロファージと比較して、放射線照射により間期死の一様式であるアプトーシスを生じ易いことが証明された。この結果は動物の種、系統によって肺胞マクロファージの放射線感受性がそれぞれ異なることを示唆しており、実際吸入によって肺に沈着した放射性粒子状物質の生体内挙動、代謝を評価する際には、肺胞マクロファージの放射線感受性の相違を考慮する必要のあることを示している。

[研究発表]

- 1) Kubota, Y., Sato, H. and Takahashi, S. : The effect of γ irradiation on the function and viability of alveolar macrophages of mice and rats. *Int. J. Radiat. Biol.* 65, 335-344, 1994.
- 2) Takahashi, S., Esaka, F., Sato, K., Kikuchi, T., and Furuya, K. : Concentrations of metal elements in mouse lung after intratracheal administration of coal fly ash. *Inhalation Toxicol.*, 6, 67-77, 1994.
- 3) Takahashi, S., Sato, H., Kubota, Y. and Matsuoka, O. : Retention of $^{133}\text{BaSO}_4$ in the trachea of rabbits, dogs, and monkeys following local administration as $^{133}\text{BaSO}_4$ particles. *Inhalation Toxicol.*, 5, 265-272, 1993.
- 4) Kondo, T., Takahashi, S., Sato, H., Yamada, M., Kikuchi, T. and Furuya, K. : Cytotoxicity of size-density fractionated coal fly ash in rat alveolar macrophages cultured in vitro. *Toxicol.*

In Vitro, 7, 61-67, 1993.

- 5) Yamada, M., Takahashi, S., Sato, H., Kondo, T., Kikuchi, T., Furuya, K. and Tanaka, I.: Solubility of nickel oxide particles in various solutions and rat alveolar macrophages. *Biological Trace Element Research*, 36,189-98, 1993.
- 6) Bulman, R. A., Sato, H., Takahashi, S. and Kubota, Y. : ^{59}Fe release from alveolar macrophages by macromolecular forms of chelating agents. *J. Radiol. Prot.*, 13, 127-133, 1993.
- 7) 高橋千太郎、「呼吸器における大気中微粒子の挙動とその生体影響」、志賀健ら編「環境と健康」、HBJ 出版、東京、1992.
- 8) Takahashi, S., Yamada, M., Kondo, T., Sato, H., Furuya, K. and Tanaka, I. : Cytotoxicity of nickel oxide particles in rat alveolar macrophages cultured in vitro. *J. Toxicol. Sci.*, 17, 243-251, 1992.
- 9) Takahashi, S., Kubota, Y., and Sato, H. : Effect of size on the movement of latex particles in the respiratory tract following local administration. *Inhalation Toxicol.* 4, 113-123, 1992.
- 10) Kubota, Y., Sato, H. and Takahashi, S. : The effect of γ irradiation on the adherent capacity and iron metabolism of alveolar macrophages in mice and rats. *Environ. Health Perspect.*, 97, 163-165, 1992.
- 11) 高橋千太郎、生体における環境中微粒子の溶解性の評価、*in vivo* から *in vitro* まで。環境科学シンポジウム報文集、pp.178-179, 1991.
- 12) Takahashi, S., Kubota, Y. and Sato, H. : Difference between C3H mice and Wistar rats in ^{59}Fe release from alveolar macrophage ingested as colloidal form. *J. Radiat. Res.* 32, 262-269, 1991.
- 13) Takahashi, S. and Sato, H. : A new method to estimate the solubility of radioactive particles in the respiratory tract : Comparison of solubility between ^{59}Fe and ^{239}Pu -hydroxide colloid particles. *Hoken Butsuri*, 26, 351-353, 1991.
- 14) 高橋千太郎：「吸入粒子の呼吸器内挙動と代謝」、松岡ら編「粒子状物質の吸入とその生物作用の発現機構」、NIRS-M-78、実業公報社、1990.
- 15) Takahashi, S., Kubota, Y. and Sato, H. : The effect of external γ irradiation on ^{59}Fe release in vitro from alveolar macrophages previously having ingested ^{59}Fe -iron hydroxide colloid. *J. Radiat. Res.*, 31, 263-269, 1990.
- 16) Takahashi, S., Moriguchi, K. Kubota, Y. Sato, H. and Matsuoka, O.: The Deposition pattern of insoluble particles with different sizes in the rat trachea. *Hoken Butsuri*, 24, 19-24, 1989.
- 17) Kubota, Y., Takahashi, S., Sato, H. and Matsuoka, O.: Pulmonary deposition and clearance of inhaled or instilled ^{198}Au -colloid in the rat after the induction of pulmonary delayed type hypersensitivity reactions. *Hoken Butsuri*, 23, 295-302, 1988.

- 18) 高橋千太郎、久保田善久、佐藤宏： $^{133}\text{BaSO}_4$ 粒子のウサギ、イヌ、及びサル気管壁への沈着、第27回日本保健物理学会口頭発表、1992.5.（秋田）。
- 20) 高橋千太郎、久保田善久、佐藤宏：水酸化プルトニウムおよび水酸化鉄コロイドのラット肺胞マクロファージによる可溶化、第26回日本保健物理学会口頭発表、1991.5.（東京）。
- 21) 高橋千太郎、久保田善久、佐藤宏：呼吸気道に沈着した不溶性粒子の上行性クリアランスおよびリンパ節への移行における粒子径の影響、環境科学会1990年会口頭発表、1990.11.（東京）。
- 22) 高橋千太郎、久保田善久、佐藤宏： ^{59}Fe -コロイド鉄食ラットマクロファージの鉄代謝に及ぼす γ 線の影響、第32回日本放射線影響学会口頭発表、1989.9.（北九州）。
- 23) 高橋千太郎、久保田善久、佐藤宏：気道に沈着した不溶性粒子の上行性クリアランスにおよぼす粒子径の影響、第24回日本保健物理学会口頭発表、1989.5.（仙台）。
- 24) 高橋千太郎、久保田善久、佐藤宏：げっ歯類の気管壁への微細粒子の沈着と滞留、第23回日本保健物理学会、1988.5.（千葉）。
- 25) 佐藤宏、高橋千太郎、久保田善久： ^{59}Fe -水酸化コロイドを気管に投与したラットに対するCa-DTPAの吸入の効果、第27回日本保健物理学会口頭発表、1992.5.（東京）。
- 26) 佐藤宏、高橋千太郎、久保田善久：酸化プルトニウム吸入ラットにおけるプルトニウムの糞尿中排泄、第26回日本保健物理学会口頭発表、1991.5.（大阪）。
- 27) 佐藤宏、高橋千太郎、久保田善久：培養肺マクロファージによる金属粒子の可溶化におよぼすキレート剤の効果、第26回日本保健物理学会口頭発表、1991.5.（大阪）。
- 28) 久保田善久、佐藤宏、高橋千太郎：マクロファージの腫瘍障害能に及ぼす γ 線照射の影響、第32回日本放射線影響学会口頭発表、1988.10.（北九州）。
- 29) 久保田善久、佐藤宏、高橋千太郎：呼吸気道に沈着した径の異なるラテックス粒子の領域リンパ節への移行量、第24回日本保健物理学会口頭発表、1989.5.（名古屋）。
- 30) 佐藤宏、久保田善久、高橋千太郎： $^{239}\text{Pu} \cdot ^{59}\text{Fe}$ -水酸化コロイドを取り込んだラット肺マクロファージからの ^{239}Pu および ^{59}Fe 放出に対するキレート剤の効果、第24回日本保健物理学会口頭発表、1989.5.（名古屋）。

1. 超ウラン元素の代謝に関する比較毒性学的研究

②放射性エアロゾル粒子の肺沈着モデルに関する研究

山田裕司、久保田善久、高橋千太郎、福田俊、飯田治三、
小泉彰、宮本勝宏、稲葉次郎、(内部被ばく研究部)

Studies on Lung Deposition Model of Radioactive Aerosols

Yuji Yamada, Yoshihisa Kubota, Sentaro Takahashi, Satoshi Fukuda, Haruzo Iida,
Akira Koizumi, Katsuhiko Miyamoto and Jiro Inaba
Division of Radiotoxicology

In this study, we tried to develop a system for plutonium aerosol exposure and to clear aerosol deposition mechanism in a respiratory tract.

Our exposure system was specially designed for inhalation study of plutonium oxide, $^{239}\text{PuO}_2$, and two systems were developed for small rodents and dogs, respectively. Twenty rats or mice are exposed simultaneously in a nose-only exposure chamber, and for dog exposure a rubber death mask is used. Plutonium oxide aerosols were obtained by nebulizing of plutonium hydrate solution and calcinating the droplets in a high temperature furnace. Particle size of the generated aerosols was proportional to a cubic root of the plutonium concentration of the nebulizing solution. When the concentration was in the order of 10^6 Bq/cm^3 , AMAD(Activity Median Aerodynamic Diameter) was $0.4\text{--}0.5 \mu\text{m}$ and σ_g was approximately 2.0.

The activity size distribution was almost the same as the mass size distribution. It means that the specific activity of the plutonium aerosols is independent of the particle size. The ratio of americium to plutonium in aerosol particle, $^{241}\text{Am} / ^{239}\text{Pu}$, was also found to be independent the particle size from the radiation analysis. And from electron microscopy the aerosols were observed to be spherical and non-coagulated particles.

Total depositions in human nasal and tracheobronchial casts were measured for ultrafine monodisperse aerosols below $0.2 \mu\text{m}$ in diameter. At 20 l/min of constant flow, inspiratory nasal deposition efficiency reached approximately 40 % for $0.005 \mu\text{m}$. The efficiency increased with decreasing particle size and respiratory flow rate. Expiratory deposition was slightly higher than for inspiratory deposition. Inspiratory and expiratory deposition

efficiencies were expressed as functions of the particle diffusion coefficient and respiratory flow rate derived from the turbulent diffusion theory for simple straight tube. Tracheobronchial deposition also increased with decreasing particle size and respiratory flow rate.

Deposition efficiencies under cyclic flow were found to be almost the same as those under constant flow having equivalent mean flow rate. It was also observed that varying the tidal volume, but keeping the minute volume constant (i.e., having the same mean flow rate), has little effect on deposition of ultrafine aerosols.

[はじめに]

放射性エアロゾルの呼吸気道内沈着様式を調べるためには、生体における粒子沈着解明のための実験動物を用いた *in vivo* 実験と沈着機構解明のための気道模型を用いた工学実験という両方向のアプローチが必要である。このため本研究課題では、つぎの2つのテーマ、A：放射性エアロゾル吸入実験装置の開発、B：呼吸気道模擬キャストを用いたエアロゾル沈着様式の解明、に分けて実験的研究を実施した。

A：放射性エアロゾル吸入実験装置の開発

I 緒言

プルトニウムなどのアルファ放射体を取り扱う施設においては、吸入摂取による内部被曝影響が大きな問題である。吸入摂取の場合、吸入エアロゾルの化学形、粒度分布、粒子形状などの粒子性状が呼吸気道沈着部位、沈着率からの初期排泄、さらには、その後の生体影響に大きく作用する。つまり、吸入による生体影響を評価するためには、吸入摂取した放射エネルギーのみならず粒子性状を知ることがこれに劣らず重要である。

本研究課題では、酸化プルトニウムエアロゾル吸入に係わる代謝・影響研究に必要な曝露動物を供給するための吸入実験装置の開発を行うとともに、吸入エアロゾルの性状

を明らかにするための諸計測を実施した。

II 研究方法

吸入実験装置は、ラット・マウスなどの小動物用とイヌを対象とした中型動物用の2基を開発した。プルトニウムエアロゾルの吸入投与を可能とするため、運転制御部を除く装置本体は全てグローブボックスと呼ばれる密閉容器内に設置した。曝露方式としては、小動物用装置には20匹同時の鼻部曝露方式、中型動物用には1頭単独の頭部マスク曝露方式を採用した。エアロゾル発生方法など曝露方式以外の部分については、2基の吸入実験装置は基本的に同一である。Fig. 1には中型動物用の吸入実験装置の概略を、Photo. 1には曝露中のビーグル犬を示す。酸化プルトニウムエアロゾルの作成は、以下の方法で行った。硝酸塩の形の保存原液をエアロゾル化直前に水酸化物に転換した上で発生原液とした。これをシリンジポンプで一定量ずつネブライザに送り、ミスト化した。この水酸化プルトニウムミストを、300℃のプレヒータおよび1150℃の高温ヒータに通し2段階加熱を行うことにより、気相にて酸化プルトニウムエアロゾルを得た。

発生させた酸化プルトニウムエアロゾルの空气中放射能濃度、粒度分布、粒子形状などを調べるために用いた方法をつぎに示す。空气中放射能濃度測定については、エアロゾル発生実験中の濃度変動を監視するための光散乱方式のフォトメータを除いては、エアフィルタサンプリングを基本的とした。粒度分布測定にはカスケードインパクタを利用したが、ここでは、特に、QCM (Quartz Crystal Microbalance) 型と呼ばれるインパクタを採用し、実時間で重量濃度データも得た。これにより粒子径別の濃度変動情報ばかりではなく、比放射能に関する情報も得ることができた。粒子状であることの確認およびその形状については走査型電子顕微鏡による観察の他、乾板法によるマイクロレベル、イメージインテンシファイアによるマクロレベルのアルファ線飛跡観察などを実施した。

III 結果および考察

開発した2基の吸入実験装置は基本的に同型であるので、発生エアロゾルの粒子性状については小動物用装置のデータを中心に示す。 $10^5 \sim 10^6 \text{ Bq/cm}^3$ のプルトニウム発生原液を用いた場合、吸入チャンバ部における空气中放射能濃度はおよそ $0.1 \sim 1 \text{ Bq/cm}^3$ となり、最大1時間この濃度を持続することが可能であった。このときの発生原液使用量に対する吸入可能なエアロゾル量、つまり、有効エアロゾル化率は $0.3 \sim 0.5 \%$ であった。ただし、ここには再利用する発生廃液(補: 廃液回収率=90~95%)の分が含まれていないので、この点を考慮すると実質的な有効エアロゾル化率は10%近くに達する。

プルトニウムエアロゾルの粒度分布は、例えば、 10^6 Bq/cm^3 のプルトニウム発生原液を用いた場合、空気力学的放射能中央径AMAD (Activity Median Aerodynamic Diameter) が $0.4 \sim 0.5 \mu\text{m}$ 、幾何標準偏差 σ_g (Geometric Standard Deviation) が ~ 2.0 であった。ただし、AMADは発生原液中のプルトニウム濃度に依存し、原液濃度が例えば10倍濃くなると粒子径は約 $3\sqrt{10} \approx 2.2$ 倍というように増大した。つぎに、粒度分布を放射能基準で評価した場合と重量基準で評価した場合とを比較し

てみると、Fig. 2に示すように、両者の分布曲線はかなり部分で重なり、エアロゾルの比放射能が粒子径に依らず一定であることが示された。また、プルトニウムエアロゾルに不純物として混入しているアメリシウムの割合を粒子径別に求めたところ、Am/Pu比は0.04前後でほぼ一定であることも示された。これらの結果から、発生させたプルトニウムエアロゾルはほぼ均質な粒子であることが示唆された。

プルトニウムエアロゾルが粒子状であることの確認はつぎのようにして行った。捕集放射能が約400Bqのフィルタサンプルに対して、まず、そのマクロの捕集沈着面分布をアルファイメージングシステムで観察した。イメージインテンシファイアを通してアルファ線によるスポット像を

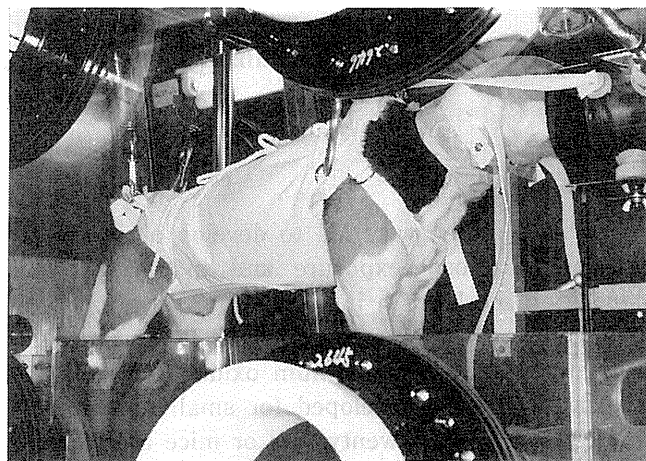


Photo.1 Beagle dog exposed to plutonium aerosols.

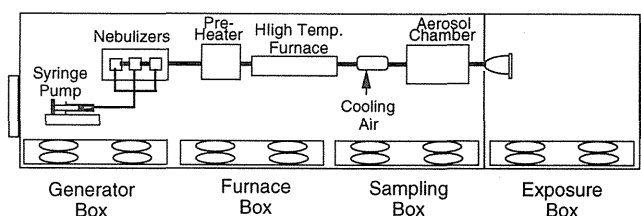


Fig.1 Schematic diagram of a radioactive aerosol exposure system for dogs.

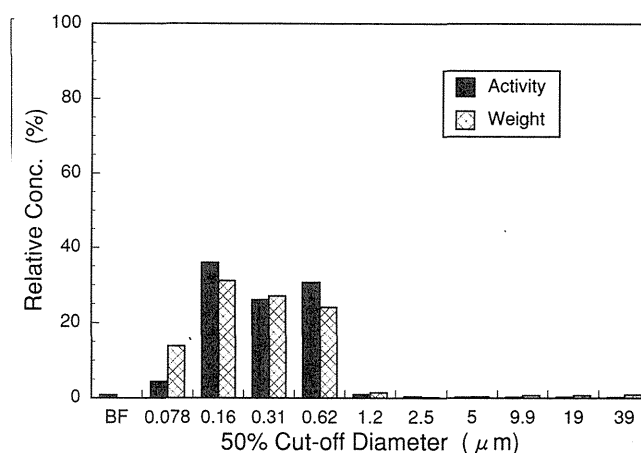


Fig.2 Activity and mass size distributions of plutonium aerosols.

強調しているため、短時間の露光にもかかわらず、有効直径 37 mm のフィルタの全面から多数の像が得られた。このことは、大量の放射能をもった少数のプルトニウムエアロゾルが発生したのではなく、相当多数の微小エアロゾルであったことを推測させる。つぎに、ミクロレベルでの観察を行うため ZnS シンチレータを介さずに、プルトニウムエアロゾルのアルファ線を飛跡の形で直接観察した結果を Photo. 2 に示す。飛跡の方向から判断して、この写真の中には少なくとも飛跡源が 2 点存在する。つまり、プルトニウムが粒子状で 2 粒存在することになる。この写真で見られる 2 つのスター状の飛跡は、偶然にも同一規模であったが、この他にもこれらとは大きさが異なるスター状の飛跡が別の観察場所で多数観察された。また、走査型電子顕微鏡では、ほぼ球形の粒子が凝集することなく、それぞれ単離して存在していたことが観察されている。

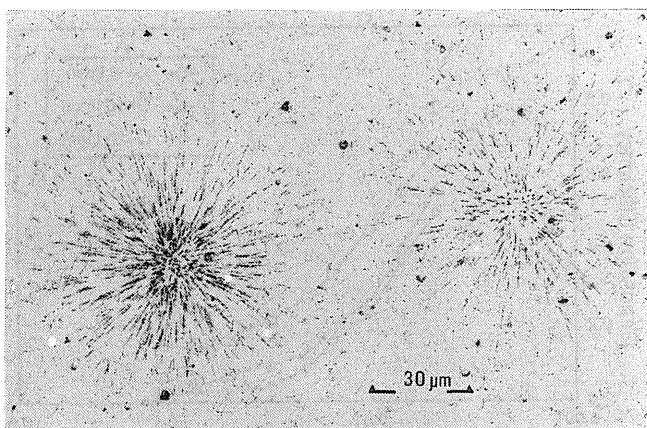


Photo.2 Star-like α tracks from plutonium aerosols.

IV 結論

プルトニウムをエアロゾル化し、これを実験動物に吸入投与するための実験装置を開発した。プルトニウムが主たる吸入対象物質ということで、装置の設計にかなりの制約を受け、また、装置の安全性を最優先したため、吸入装置としては必ずしも満足できるものにはならなかった。装置がグローブボックス内設置のため、実験条件の自由度、操作性などに問題があるものの、当初の目標であったラットの発ガンレベルの吸入投与がルーチンとして可能となったことは本研究課題の 1 つの大きな成果であると考えられる。

B：呼吸気道模擬キャストを用いたエアロゾル沈着様式の解明

I 緒言

近年、ラドンの吸入被曝の問題、チェルノブイリ原発事故などから、原子力関係者のみならず、一般人の間にもエアロゾル吸入に対する関心が高まっている。また、ICRP の肺沈着モデルについても、現在、Pub.30 モデルの改定作業が進められており、まもなく新しいモデルが公表されるようである。

現行の肺沈着モデルは、 $0.2\mu\text{m}$ 以上の比較的大きなエアロゾルを対象としており、火災事故で発生するような微細なエアロゾル、あるいは、ラドン娘核種のフリー成分などに対してはその適用が難しかった。そこで本研究では、従来、あまり検討されてこなかった $0.2\mu\text{m}$ 以下のエアロ

ゾルを中心にその呼吸気道内沈着様式を調べた。ただし、生体による沈着実験は制約が多く、また、沈着機構の解明に耐えられるデータが得難いので、ここでは呼吸気道を模擬した工学的模型（キャスト）による模擬沈着実験を試みた。

II 研究方法

呼吸気道は大きく分けると、鼻咽頭（NP）部、気管—気管支（TB）部、肺泡（P）部の 3 つの部位に区分できる。本研究では、この中から、まず、鼻咽頭部および気管—気管支部についてそれぞれヒトの呼吸気道を模擬したキャストを作成した。鼻咽頭部キャストは、Fig. 3 に示すように鼻孔から口腔を含め気管入口までである。一方、気管—気管支部キャストは気管から始まるが、気管支分岐次数は Fig. 4 に示すように一律ではなく 4 から 10 分岐ある。分岐から次の分岐までを 1 つの気道と数えると、気道総数は 111 本（気管を含む）あり、また、終端の気管支断面口は全部で 56 箇所ある。呼吸気道模擬キャスト内の空気の流れについては、一定速流で流れる定速呼吸と実際の呼吸のように吸気と呼気とが交互に現れ、しかも、流速がサインカーブのように刻々と変化する往復呼吸を模擬した。

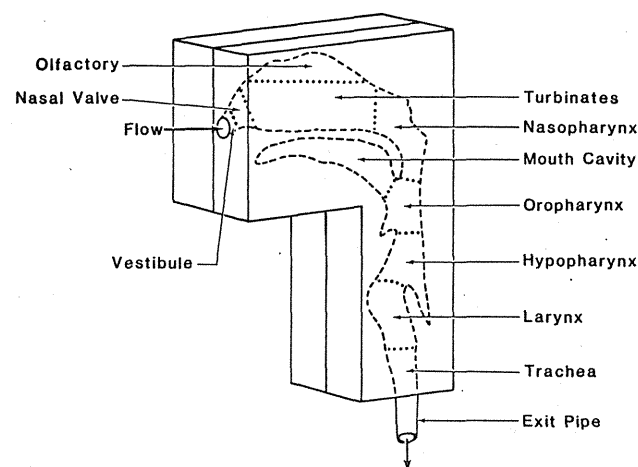


Fig.3 Human nasal cast

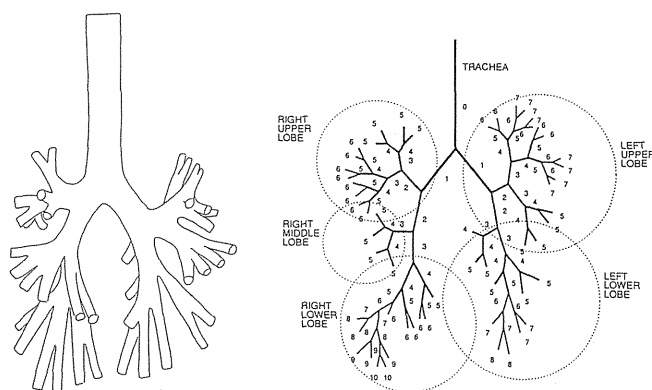


Fig.4 Branching pattern of a human tracheobronchial cast

沈着実験に用いる試験エアロゾルの作成は、まず、蒸発凝縮法により多分散の NaCl エアロゾルを発生させ、これを静電分級法で単分散化することにより得た。エアロゾル粒子径は $0.005\mu\text{m}$ から $0.2\mu\text{m}$ までの間で変化させた。模

擬気道内でのエアロゾル沈着率は、それぞれのキャストの上流および下流におけるエアロゾル濃度を凝縮核測定器CNCで計測することにより求めた。

III 結果および考察

鼻咽頭部キャスト内でのエアロゾル沈着率を低速呼吸で調べたところ、4～50 ℓ/minの何れの呼吸流量においても沈着率は0ではなく、かなりの沈着が認められた。特に、0.01 μm以下の超微小粒子径領域においてそれは顕著であった。結果の1例をFig. 5に示す。一般的傾向として、粒子径が小さいほど、また、呼吸流量が小さいほど沈着率は高かったが、呼吸流量への依存性は弱かった。低速呼吸ながら空気の流れが全く逆方向である吸気と呼気を比べてみると、呼気時の方がわずかに沈着率が高かった。このような沈着傾向を示す鼻咽頭部沈着に対しその沈着機構を調べたところ、以下に示すような直円管に対する乱流拡散モデルでうまく説明できることが分かった。

$$\eta = 1 - \exp(a \cdot Q^{-1/8} \cdot D^{2/3})$$

ここで、 η = エアロゾル沈着率 (—)、 Q : 呼吸流量 (ℓ/min)、 D : エアロゾル拡散係数 (cm²/sec)、 a : 装置定数 (吸気時 $a = -40.3$ 、呼気時 $a = -48.7$) である。

さらに、気管—気管支部キャスト内でのエアロゾル沈着も、鼻咽頭部と同様に超微小粒子径領域にて高い沈着が認められた (Fig. 6)。粒子径が小さいほど、また、呼吸流量が小さいほど沈着率が高くなるという傾向も認められた。例えば、呼吸流量が20 ℓ/minの低速呼吸の場合、粒子径が0.1 μmでは2～3%に過ぎなかった沈着率が、0.005 μmでは50%まで上昇している。つぎに、エアロゾル沈着性能がほぼ同一であることが確かめられた2体のキャストを人工胸郭中に吊し、さらに、特殊人工呼吸器を用いて往復呼吸時のエアロゾル沈着を調べたところ、呼吸流量が4 ℓ/minのときFig. 7に示すような結果を得た。往復呼吸の場合、流速は絶えず変化しているので、呼吸流量は1回換気量と呼吸数との積で与えられる平均呼吸流量で表現されている。Fig. 7の例では、同一の平均呼吸流量となる3種類の呼吸パターンについてエアロゾル沈着を調べたが、3者の沈着率曲線には明確な差は認められなかった。また、このときの沈着率曲線はちょうど呼吸流量が同じ定速呼吸時の曲線とほぼ重なった。この4 ℓ/minという呼吸流量はヒトの活動状態でいえば、安静時に相当する状態でかなり穏やかな呼吸といえる。図には示されていないが、呼吸流量がこれより多い10、20 ℓ/minの場合においても、往復呼吸と定速呼吸との間には沈着率に明確な差は認められなかった。

IV 結論

ヒトの呼吸気道を模擬する鼻咽頭部キャスト、気管—気管支部キャストを用いて0.2 μm以下の微小エアロゾルの沈着様式を調べた。その結果、慣性あるいは重力による沈着だけで、0.1 μm以下のエアロゾルは通過してしまうと云われていた鼻咽頭部において、乱流拡散による微小粒子の多大な沈着を認めた。このことは、微小粒子の沈着はほとんど考えていなかったICRPの沈着モデルにも大きな影響を与え、現在改訂作業中の新沈着モデルに反映されることが見込まれている。また、キャストのような工学的模

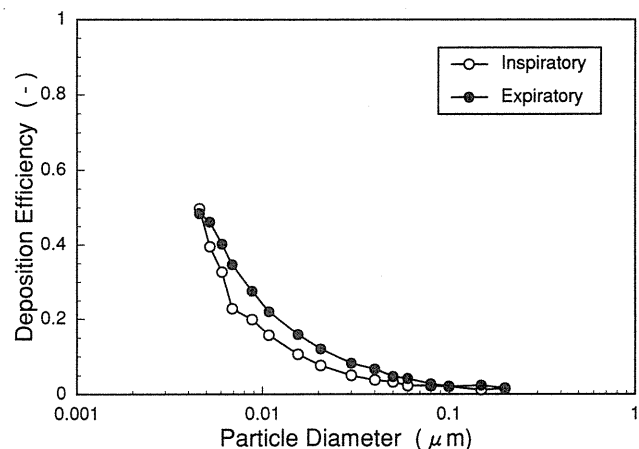


Fig.5 Aerosol deposition in a human nasal cast at 20 ℓ/min of constant flow.

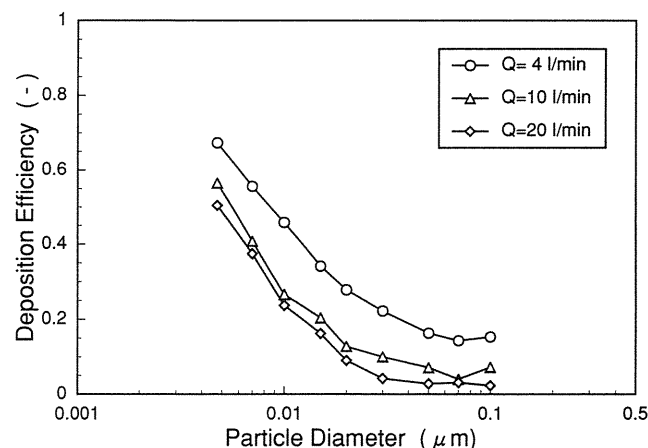


Fig.6 Expiratory deposition in a tracheobronchial cast under constant flow.

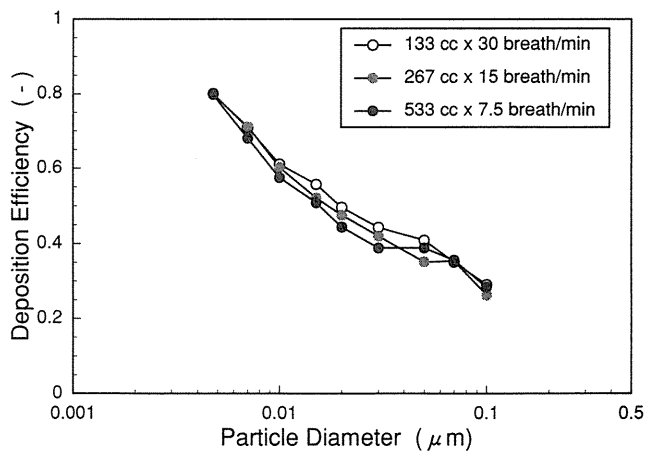


Fig.7 Effects of respiratory patterns on the tracheobronchial deposition.

型実験では、往復呼吸時の沈着を調べることが容易ではなかったが、新たな特殊人工呼吸器の開発によりこの方面の実験の可能性が広がった。今回、実験を行った安静時から軽作業時の範囲では、1回換気量あるいは呼吸数で個別に評価するよりも、これらの積である呼吸流量で評価した方がエアロゾル沈着をうまく説明できることが分かった。ただし、呼吸流量がこれより大きい重作業あるいは中作業時には、呼吸気道内の流れの乱流度が高まり、エアロゾル沈

着に影響が現れる可能性がある。また、今回のキャストは何れも鋳型キャストであり、実際に近いという非常に大きな利点がある半面、形状が複雑すぎて理論的な解析が難しいという欠点もある。今後はこうした方面からのアプローチも考慮していく必要がある。

〔研究発表〕

- 1) 山田裕司、Cheng, Y. S., Yeh, H. C., Swift, D. L. and McClellan, R. O. : 人体鼻咽頭部キャストへの微小エアロゾル粒子沈着、第23回日本保健物理学会、千葉、1988.
- 2) 山田裕司、福田俊、飯田治三、宮本勝宏、小泉彰、鵜田和美、澤地邦宏：肺沈着モデルのためのビーグル犬肺の動的変移の解析、第23回日本保健物理学会、千葉、1988.
- 3) 福田俊、山田裕司、飯田治三、宮本勝宏、小泉彰、鵜田和美、倉橋英治：犬気管支分岐に関する解剖学的特徴、第23回日本保健物理学会、千葉、1988.
- 4) 山田裕司、Cheng, Y. S., Yeh, H. C., Swift, D. L. and McClellan, R. O. : 人体鼻咽頭部キャストへの微小エアロゾル粒子沈着、第6回エアロゾル科学・技術討論会、大阪、1988.
- 5) 小泉彰、山田裕司、福田俊、飯田治三、宮本勝宏、倉橋英治、松下裕二：粒子沈着モデルのための犬気管支分岐の解剖学的解析、第6回エアロゾル科学・技術討論会、大阪、1988.
- 6) Yeh, H. C., Cheng, Y. S., Yamada, Y. and Swift, D. L. : Deposition of ultrafine particles in human nose and mouth, DOE contractors meeting on interactions of chemicals with living systems, Albuquerque (USA), 1988.
- 7) Yamada, Y., Cheng, Y. S. and Yeh, H. C. : Inspiratory and expiratory deposition of ultrafine particles in a human nasal cast, Inhalation Toxicol., Premier issue, 1-11, 1988.
- 8) Cheng, Y. S., Yamada, Y., Yeh, H. C. and Swift, D. L. : Diffusional deposition of ultrafine aerosols in a human nasal cast, J. Aerosol Sci., 19, 741-751, 1988.
- 9) 山田裕司、久保田善久、松岡理：小動物用放射性エアロゾル吸入実験装置の開発とその基礎特性、第24回日本保健物理学会、名古屋、1989.
- 10) 福田俊、山田裕司、小泉彰、澤地邦宏、圓谷誠司、松下裕二：肺沈着モデルを目的としたビーグル犬の呼吸生理学的機能に関する基礎的検討、第24回日本保健物理学会、名古屋、1989.
- 11) 山田裕司、小泉彰、宮本勝宏、松岡理：小動物用放射性エアロゾル吸入実験装置の特性、第7回エアロゾル科学・技術討論会、横浜、1989.
- 12) 山田裕司、久保田善久、小泉彰、松岡理：小動物用放射性エアロゾル吸入実験装置の開発とその基礎特性、保健物理、24, 331-336, 1989.
- 13) 山田裕司、小泉彰、福田俊、稲葉次郎：ヒトの気管－気管支キャストへの微小エアロゾル粒子沈着、第25回保健物理学会、つくば、1990.
- 14) 藤田道郎、織間博光、清水幹子、本好茂一、福田俊、山田裕司、小泉彰、稲葉次郎：肺沈着モデルを目的としたビーグル犬の呼吸生理学的機能に関する基礎的検討(2)呼吸生理値の個体差、第25回日本保健物理学会、つくば、1990.
- 15) 小泉彰、山田裕司、宮本勝宏、福田俊、飯田治三、石樽信人、佐藤宏、稲葉次郎：酸化Puエアロゾルの発生とラット気道への初期沈着、第33回日本放射線影響学会、仙台、1990.
- 16) 串田尚隆、吉村竜一、藤田道郎、清水幹子、織間博光、本好茂一、友田勇、福田俊、山田裕司、小泉彰、稲葉次郎：犬の呼吸生理学的機能に関する基礎的研究、第110回日本獣医学会、宮崎、1990.
- 17) Cheng, Y. S., Yamada, Y. and Yeh, H. C. : Deposition of ultrafine aerosols in a human oral cast, Aerosol Sci. Technol., 12, 1075-1081, 1990.
- 18) 山田裕司、小泉彰、宮本勝宏、佐藤宏、石樽信人、仲野高志、榎本宏子、稲葉次郎：ネブライザで発生させたPuエアロゾルの粒子性状、第26回日本保健物理学会、堺、1991.
- 19) 福田俊、飯田治三、山田裕司、小泉彰、宮本勝宏、佐藤宏、吉田浩樹：無麻酔ラットにおける酸化プルトニウムの沈着量と初期体内挙動、第26回日本保健物理学会、堺、1991.
- 20) 小泉彰、山田裕司、宮本勝宏、稲葉次郎：ラットへのプルトニウムエアロゾル吸入投与実験、第8回エアロゾル科学・技術討論会、東京、1991.
- 21) Yamada, Y., Koizumi, A., Fukuda, S., Inaba, J., Cheng, Y. S. and Yeh, H. C. : Deposition of ultrafine monodisperse particles in a human tracheobronchial cast, 7th Int. Symp. on Inhaled Particles, Edinburgh (UK), 1991.
- 22) 山田裕司、小泉彰、福田俊、稲葉次郎：気管－気管支部エアロゾル粒子沈着に対する呼吸様式の影響、第27回日本保健物理学会、秋田、1992.
- 23) 山田裕司、小泉彰、福田俊：気管－気管支部粒子沈着に対する呼吸様式の影響、第9回エアロゾル科学・技術討論会、太田、1992.
- 24) 山田裕司、小泉彰、宮本勝宏、佐藤宏、石樽信人、仲野高志、榎本宏子、稲葉次郎：ネブライザで発生させた酸化プルトニウムエアロゾルの粒子性状、保健物理、27, 197-204, 1992.
- 25) Yamada, Y., Koizumi, A., Fukuda, S., Inaba, J., Cheng, Y. S. and Yeh, H. C. : Deposition of ultrafine aerosol particles in a human tracheobronchial cast, Hoken Butsuri (in press).

2. 超ウラン元素の生物効果に関する比較毒性学的研究

①アルファ放射体による組織微細線量評価に関する研究

石樽信人、仲野高志、榎本宏子、小木曾洋一、

福田俊（内部被ばく研究部）

A Study on Microscopic Dose Distribution in Internal Exposure by α -Particle Emitters

Nobuhito Ishigure, Takashi Nakano, Hiroko Enomoto, Yoich Oghiso and Satoshi Fukuda

Division of Radiotoxicology

(A) Microscopic Dose Distribution in Parenchymal Lung Inhaled with Particulate Plutonium

The macroscopic quantity “absorbed dose” loses its validity to interpret the radiation-induced biological effects in the lung inhaled with particulate α -emitters like transuranic elements, because the doses to individual cells differ more widely than the range of doses over which the dose-response relationship can be regarded as linear. We intended to make up a three-dimensional model of parenchymal lung structure using a stack of actual histological sections in order to compute microscopic dose distribution around a particulate α -emitters instead of dose calculations given so far in which a mathematical model or two-dimensional models were employed. This theoretical dosimetric approach will provide a scientific basis to the extrapolation of results of animal experiments utilizing high doses to man exposed to relatively low level radioactivity and to the understanding of biological effects associated with “hot spots”.

(B) *In Vivo* Counting of Pu in Experimental Animals and Its Application to Dosimetry

We have developed a method for *in vivo* counting of low energy LX-rays emitted from Pu. The minimum detectable activity was 90 Bq for 10% relative uncertainty. By this method, in contrast with serial-sacrifice study, a long term follow-up can be performed upon a specific exposed rat, which can reduce the number of animals required. This *in vivo* counting was applied to our dosimetric study: 1) the evaluation of initial lung burden of rats inhaled with PuO₂ particles, 2) the determination of our lung retention function of PuO₂ particles in rat lungs and 3) the examination of the behavior of ²⁴¹Am contained as a trace contaminant in PuO₂ particles.

(A) 粒子状 Pu による肺深部の微視的線量評価

I. 緒言

諸外国で行われた培養細胞の実験によれば、 α 粒子は細胞に致死損傷を高い率で誘発し、その平均致死線量は α 粒子1個の細胞通過に相当する場合もある。体内においてもこのような致死効果が事実であるならば、 α 粒子による細胞ヒットの回数分布は障害の発生確率を推定する上で重要な意味を持つ。

中課題「超ウラン元素・・・」では、Puの吸入被曝の生物影響が主要ターゲットであり、本小課題においても肺深部に沈着・滞留する α 放射体の影響に強い関心を抱いている。

肺深部の構造を媒質と α 粒子との相互作用という観点から区分した場合、空気で満たされた肺胞腔とそれを構築している肺胞壁等軟組織との2成分系と見なすことができる。従来の線量評価では、肺深部を、密度が一定の均質の無構造な媒質と仮定し、吸入されたPu粒子の回りの細胞の α 粒子によるヒット数分布等を計算している。しかしながら肺胞のサイズや肺胞壁の厚みは α 粒子の軟組織中の飛程と比べ充分小さいとは言えず、こうした均質無構造のモデルは良い近似を与えないと推察される。一方より複雑な数学モデルとして、肺胞の形状に偏五角十二面体を仮定するという構造モデルで線量評価が行われたこともある。

本小課題では、これら数学モデルではなく、可能な限り現実に近いモデルを作成すべく、最終的には、実験動物の肺の組織切片標本の2値化イメージと画像情報処理技術とによって肺深部のイマジナリーな立体構造を構築し、これを用いてヒット数分布、比吸収エネルギー分布等マイクロドシメトリの諸量を求めようとするものである。

II. 基本的な計算方法

1. フローチャート

計算のプロセスをFig.1のフローチャートに示す。実験動物の肺深部の多数枚の連続切片を作成し、その顕微鏡イメージをビデオカメラにより画像解析装置へ入力する。画

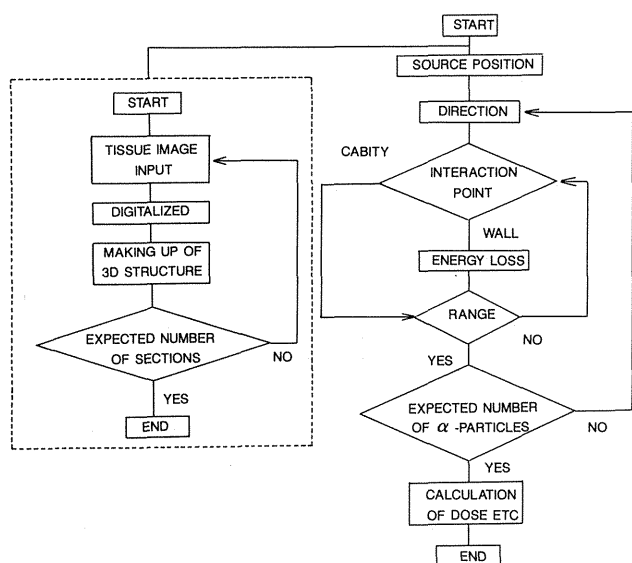


Fig.1 Flow chart of the procedures to calculate microscopic dose distribution using real lung tissues.

像の2値化等各種処理を施した後、画像記憶装置へ保存して肺深部の立体的な微細構造に関するファイルを作成する。これを利用して肺の中の線源粒子の位置や α 粒子の放出方向を乱数により選定し、その α 粒子が組織の無い空洞部を通過する時は何も相互作用を起こさず、組織部を通過する時はその部位にエネルギーを与え自身は減速してゆく、こうしたプロセスをその α 粒子が静止するまで追跡するというシミュレーションにより、 α 線の飛跡長さの分布や線源近傍の線量分布を求めようとするものである。

2. ハードウェア

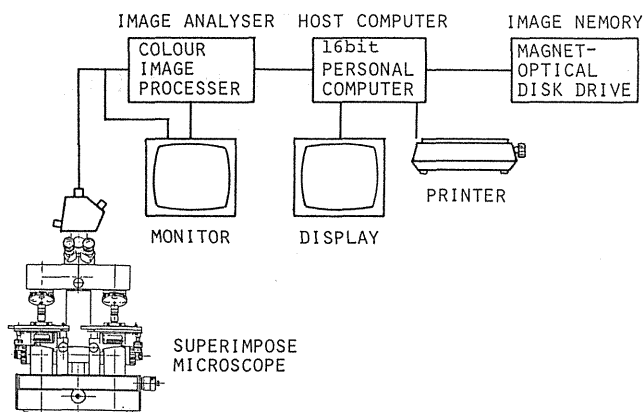


Fig.2 Block diagram of the image analyzing system used for the present dose calculation.

計算のために構成した装置を Fig.2 に示す。これは次の部品により構成されている。①組織切片の顕微鏡画像を入力するスーパーインポーズ顕微鏡、②画像の2値化や種々の補正を行う画像解析装置、③装置全体の制御や線量分布の計算を行うマイクロコンピュータ、④3次元の画像データや線量の計算結果を記憶する画像記憶装置。なお図の中

のスーパーインポーズ顕微鏡は本研究において試作したものである。この装置は二つの独立したステージの各々に、隣合う切片を1枚づつ載せ両者からの合成像を観察しながら画像が一致するまで両方のステージの位置を独立に操作する顕微鏡である。

3. 仮定

次の仮定を設けて計算を実行した。

- ①エネルギー損失の計算には Bethe-Bloch の理論式が解析的に与えられたものとして計算に使いやすい。しかし、この式は静止電子と高速荷電粒子とのクーロン相互作用のみを考えており、低エネルギー領域では荷電粒子の中性化の効果のため、エネルギー損失は過大評価となる。そこで、低エネルギー領域でより正しいと考えられる、実験経験に基づいた Benton-Henke の式を使うこととした。
- ②肺を構成する組織の元素組成は次に示す Walsh のものを用いた。水素 63 %、炭素 9.5 %、窒素 1.4 %、そして酸素 26 %。なお、組織部分の密度を 1 とした。
- ③組織の無い空気の部分のエネルギー損失は組織中に比べ無視し得るものとした。
- ④線源や細胞は静止しているとした。

III・計算結果

1. 飛程分布

飛程計算時の CRT 画面の写真を Fig.3 に示す。図中、色の薄い部分が組織部、濃い部分が空洞部である。放射状の直線は模擬的に発生させた α 線の飛跡を表し、その長さは、各 α 線の飛程に対応している。

種々エネルギーの α 線について飛程分布を計算した。結果を Fig.4 に示す。これは、線源位置を 10 か所とり各線源位置に関しては等角に 360 個（合計で 3600 個）の α 線を飛ばした結果である。

肺深部での実際の飛程は、均質無構造モデルに比べ大きく広がっており、遠くの組織を照射し得ることが示された。また、飛程の平均値と α 線の初期エネルギーとの間にはほぼ比例関係の成り立つことが示された。

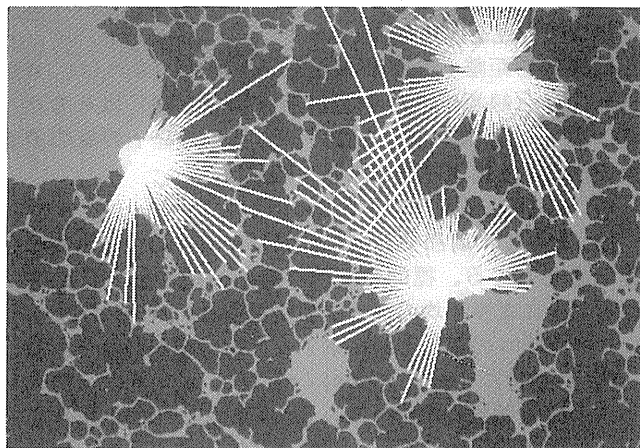


Fig.3 Digitized image of a lung section during the calculation of track length of α particles in a parenchymal lung.

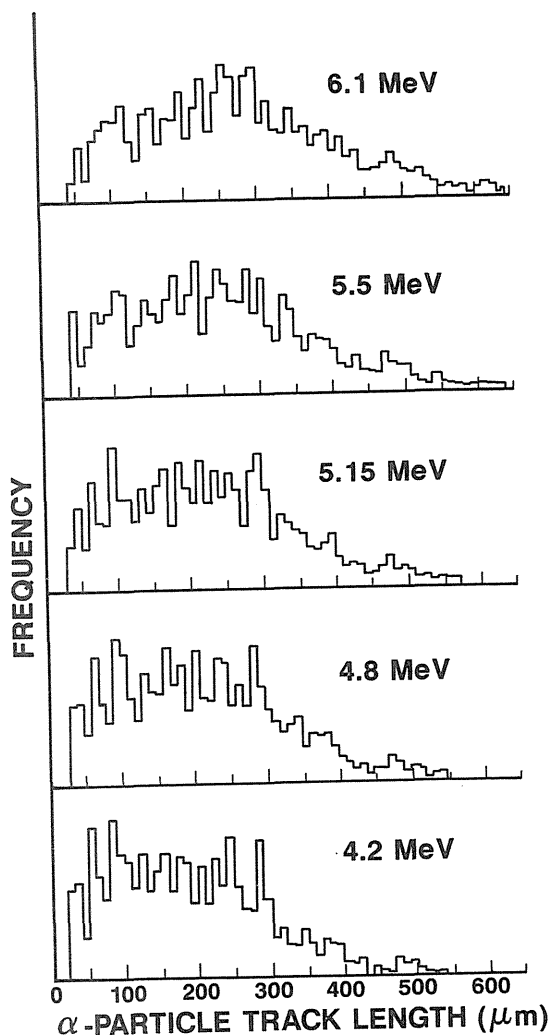


Fig.4 Calculated track length in a parenchymal lung for different α -particle energies.

2. ヒット数分布

(1) 計算法

2次元の画像データを3次元へ敷衍するために肺深部の構造に等方性を仮定した。

線源から距離 r の点の α 粒子フルエンス $\Phi(r)$ は、 α 粒子放出数（線源粒子の α 放射能 \times 積分期間）にその点への α 粒子到達確率 $f(r)$ を掛け、これを半径 r の球の表面積で割ることにより得られる。即ち、

$$\Phi(r) = (\alpha \text{ 粒子放出数}) \times f(r) / (4 \pi r^2)$$

$f(r)$ として、前節で述べた肺深部における飛程分布の計算結果を充てる。標的の幾何学的断面積 σ を上記 Φ に掛けることにより平均のヒット数が得られ、次式に示すようにヒット数 n の関数としてポアソン分布が計算できる。

$$P_n = (\phi \sigma)^n \cdot \exp(-\phi \sigma) / n!$$

この確率関数に半径 r 厚み dr の球殻内の細胞 $N(r)$ を掛け、全空間に亘って積分すれば次式に示すように1個の線源粒子について、ヒット数を確率変数とする細胞の個数分布 n_n が得られる。

$$n_n = \int P_n \cdot N(r) dr$$

更に、個々の線源粒子の影響が独立と見なせる低レベル被曝の場合は、肺深部への沈着放射能 A を線源1個の放射能 a で割ったもの、即ち線源の個数をこの n_n に掛ける

ことにより、肺全体で任意の回数ヒットを受ける細胞数 N_n を求めることができる。即ち、

$$N_n = n_n \cdot (A / a)$$

が得られる。

(2) 1回ヒットされる細胞数

まず、1個の線源粒子の回りで1回だけヒットされる細胞の数を計算した。Fig.5に計算結果を示す。これから分かるように、組織切片の2値化画像による場合と蜂の巣格子モデルによる場合とでは、粒子径依存性は比較的近い。一方、均質無構造モデルでは、 $0.8 \mu\text{m}$ をピークとしそれより大きい粒子では減少してゆき、 $2 \mu\text{m}$ 以上で殆ど0となるという他の二つのモデルとは著しく異なる粒子径依存性を示した。この結果は、均質無構造モデルを適用できる場合が限られていることを示唆している。

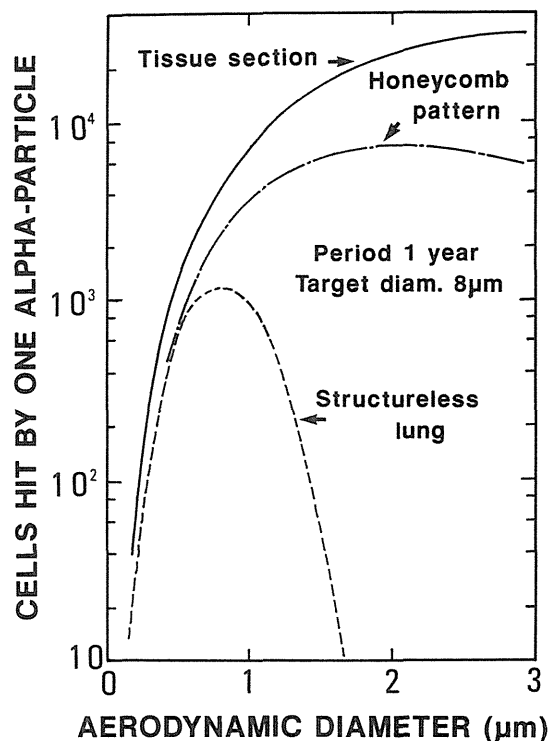


Fig.5 Number of cells hit by only one α -particle: dependence on particle diameter.

(3) ヒット後生存細胞数

冒頭で述べたように細胞は α 線にヒットされると高い確率で死ぬというデータがある。ここで、ヒットされてもなお生き残った細胞が障害の発生に深く関わっていると仮定する。また、細胞個々の悪性化への可能性はヒット回数に比例すると仮定する。すると、ヒット後生存細胞数 S （ヒット数による重み付け後）は1ヒット後の生存確率 P の n 乗にヒット回数を掛けさらに n 回ヒットされる細胞数 N_n を掛けて合計すれば得られる。即ち、

$$S = \sum (N_n \cdot p^n \cdot n)$$

$p = 1/3$ の場合の S の計算結果を Fig.6 に示す。3種のモデルとも粒子径 $1 \mu\text{m}$ に規格化した相対値である。この図より、いずれのモデルにおいても粒子径の増加に伴い S が減少した。そして減少の型はほぼ指数関数で近似できた。しかし、各々の傾きはモデルによって異なり、均質無構造モデルが最も大きい傾きを示し、このパラメータ

Sにおいても他の2種類のモデルとは大きく異なることが示された。

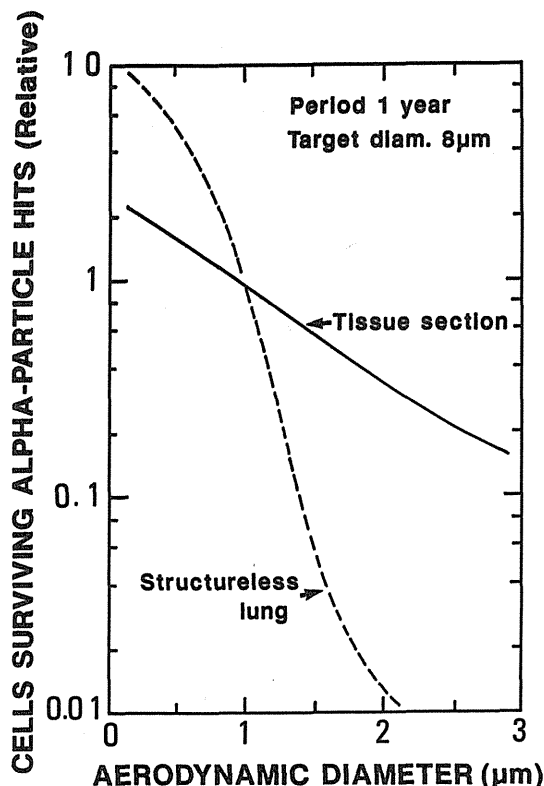


Fig.6 Number of cells surviving α -particle hits: dependence on particle diameter.

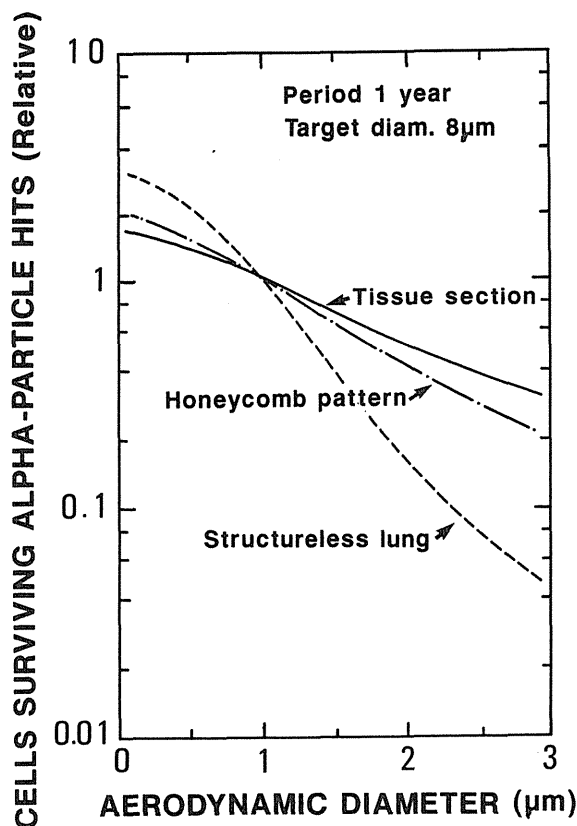


Fig.7 Number of cells surviving α -particle hits in the case that the space of the cells killed is occupied with reproduced cells.

(4)致死細胞の空間の取り扱い

次に、細胞が α 線のヒットによって死に、処理された後その空間が、別の細胞の分裂の結果生まれた新たな細胞により短時間の内に補填されると仮定し計算した。紙面の制約上詳細は省くが、この場合 S は次式で表わされる。

$$S = N_1 \cdot p + \sum (N_n \cdot S_n)$$

なお、 $S_n = \sum \{ {}_{n-1}C_i \cdot p^i \cdot (1-p)^{n-1-i} \cdot p \cdot (i+1) \}$ である。

計算結果を Fig.7 に示す。粒子径依存性の傾きは Fig.6 に比べゆるやかとなった。このように致死細胞の空間のターンオーバーの実態はリスク推定の信頼性に強く影響すると推察され、この問題に関する知見の現在の到達段階を踏まえた上で、今後の計算に慎重に反映させる必要がある。

(5)標的サイズ及び積分期間の影響

ここまでの計算では、標的サイズと積分期間という2つのパラメータが使われていた。これらの値は、S（ヒット後生存細胞数）の線源粒子径依存性にどのように影響するのであろうか。粒子径依存性の指標として、Fig.6の傾き、即ち縦軸の値 S が $1 \mu\text{m}$ 粒子の場合の $1/2$ に低下する粒子径をとることとした。結果を Fig.8 に示す。大きな標的では、また長い積分期間をとった場合には、線源粒子径依存性が若干弱くなることが示された。

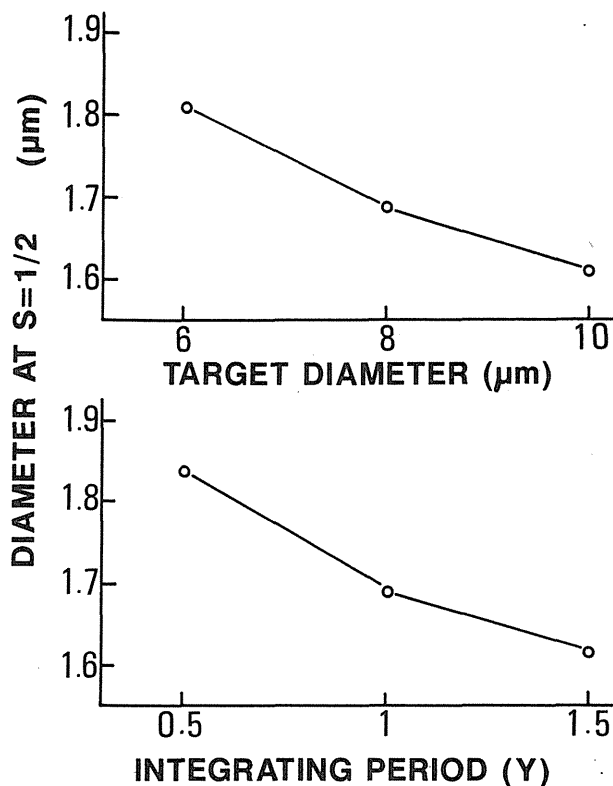


Fig.8 Effects of target size and integrating period on the size dependence of the calculated number of surviving cells.

IV. 結論

本研究で示唆された重要なポイントは次の通りである。

一定の α 放射能が沈着した肺について線源の粒子径を変えて α 線によるヒット数の分布を計算したところ、分布の型は、粒子径により大きく変化した。冒頭に述べた様に細胞は1回ヒットされると何割かは死に到る。従って

ヒットされなお生残する細胞は障害の発生に深い関わりがあると考えられる。この値を試算したところ、粒子径が大きい程減少する傾向が示された。ICRP の立場では、粒子のサイズをとりあえずは考慮しないとしている。今後、現在進めている計算の信頼性を高めることによって、粒子状 α 放射体の影響評価に関わるこうした重要課題に答える根拠を見つけることが期待される。

(B) 体外計測法による動物体内 Pu の測定と線量評価への応用

1. 緒言

中課題「超ウラン元素・・・」は、プルトニウム (Pu) による内部被曝の生物影響の解明を固有の目的としている。この生物影響は原因量としての Pu 体内量との関連で評価されて初めて量的見積りとして意味をなす。

諸外国では、実験動物 5 匹程度を一つの群とし、一群ごとに定期的に屠殺しながら体内 Pu の変化を見積ってきた。この方法では、同量の Pu を吸入した動物を、群の数 \times 5 匹と多数用意しなければならず、この実施には大規模な設備と多大の労力を要する。本小課題では、こうした定期屠殺法に代わるものとして動物を生存状態で体外から計測する方法を開発した。本法によれば、個体別に長期間連続的に追跡できるため、少ない数の動物で目的とするデータが取得できる。また、動物の個体差に起因する誤差も除くことができ信頼性の高いデータが得られるといった長所があり、線量評価だけではなく Pu の代謝や影響、その他内部被曝の多くの研究課題で共通に使われる基盤となる技術である。

この方法ではアルファ壊変の 4 % という低い放出率のしかも動物の組織自身による吸収減弱を強く受ける低エネルギーの微弱な X 線を検出する必要がある。このため低バックグラウンドでかつ高い計数効率をもつ特殊な計測システムを構築する必要がある。さらに、試料が複雑な幾何学的形状のしかも生きた動物であることに起因する誤差の評価や作業者の安全を確保しながら実施するための技術的な困難も多い。

本研究では、試作した装置について、①種々計数ジオメトリに対する計数効率の依存性、②体表面汚染や肺以外の臓器に残留する Pu の計数への影響、③放射能/計数率の校正係数の測定等を検討し、ラットの体内 Pu を正確に測定する具体的な実施手順を確立することを目的とした。ついで、線量評価に必要な初期沈着量の測定、及び残留特性の測定へ本方法を応用した。

II. 結果と考察

1. 体外計測法の確立

(1) 体外計測装置

Fig.9 に試作した小動物用体外計測装置の概略図を示す。鉛製遮蔽箱は、厚さが 5 cm、外寸法は 129 cm (L) \times 74 cm (W) \times 59 cm (H) である。バックグラウンドの低エネルギー成分を低減するために、箱の内側に銅板とアクリル板とを内張りした。検出器は直径 5 cm、厚さ 1 mm の薄型 NaI(Tl) シンチレーション検出器で、窓材は、0.025 mm の Al 薄膜である。このような検出器を動物の左右と腹側に各一本ずつ合計 3 本配置し、動物体外へ透過してくる低エネルギー X 線を検出した。

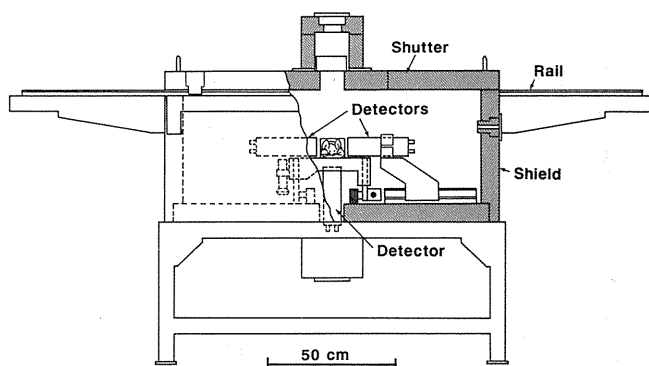


Fig.9 Schematic diagram of the whole body counter designed in the present study.

(2) 体外計測の実施操作

グローブボックス (GB) やフードの外で Pu を取り扱う場合、内部被曝の防止と作業環境の保全のために、原則として試料を密封することが要求される。しかし、この目的のために、生きた動物を生存に充分な容積をもつがっしりとした箱に密封することは許されない。検出する微弱な低エネルギー X 線がその箱の構成材で著しく吸収減弱されたり、動物と検出器とが離れることによって幾何学的計数効率が低下するからである。

そこで本研究では、薄いアクリルの板 (2 mm 厚) によりラットがようやく入る大きさの箱を作り、その中にラットを保定して、ついでその箱ごとラットを、呼吸用に空気をいれたファスナー付きのポリエチレン袋に密封するという方法によりこの問題の解決を図った。

Fig.10 に体外計測の実施操作のフロー図を示す。

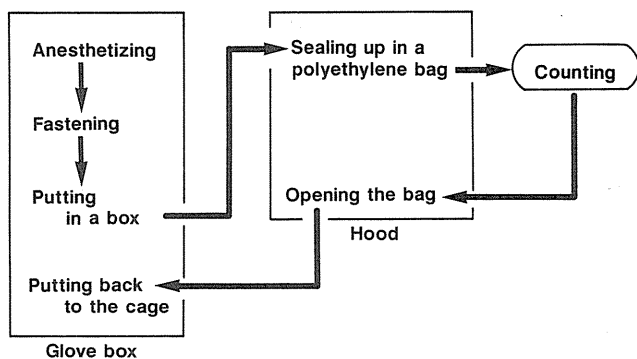


Fig.10 Flow chart of the whole body counting procedures.

- 1) GB 内でラットを麻酔、
- 2) アクリル製保定板 (2 mm 厚) の上に腹ばいにして載せ、前肢を伸ばした状態で保定、
- 3) 保定箱に入れる、
- 4) この保定箱を GB からダブルカバーシステムによって取り出し、フードへ運搬、
- 5) フード内で保定箱をファスナー付きポリエチレン袋へ入れ、低流量のポンプにより空気を入れる、
- 6) 袋の口を閉じ、別の袋で包む、
- 7) 体外計測を実施、
- 8) 逆のルートでケージへ戻す。

なお、麻酔持続時間、袋の中の空気量、LX 線計数率等を考慮し計測時間を 1000 秒とした。

(2)ジオメトリ

検出する放射線が微弱なため、検出器をラットの体に可能な限り近付けて測定する必要がある。このため計数効率にはジオメトリに強く依存することとなった。そこで計数効率のラットの位置依存性を検討し、再現性のよい計数効率の得られる最適なラットの位置の決定と、位置の不確かさがもたらす誤差の評価を行った。

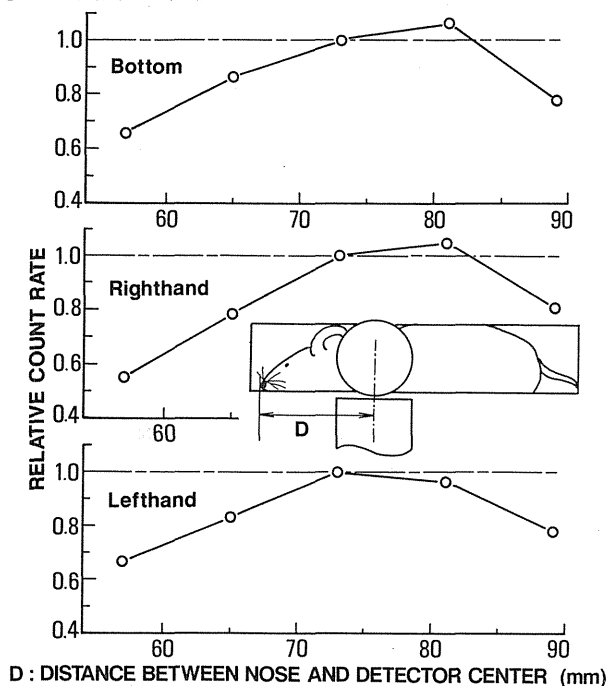


Fig.11 Dependence of count rate on the rat-detector geometry with different locations of the rat along its longitudinal axis.

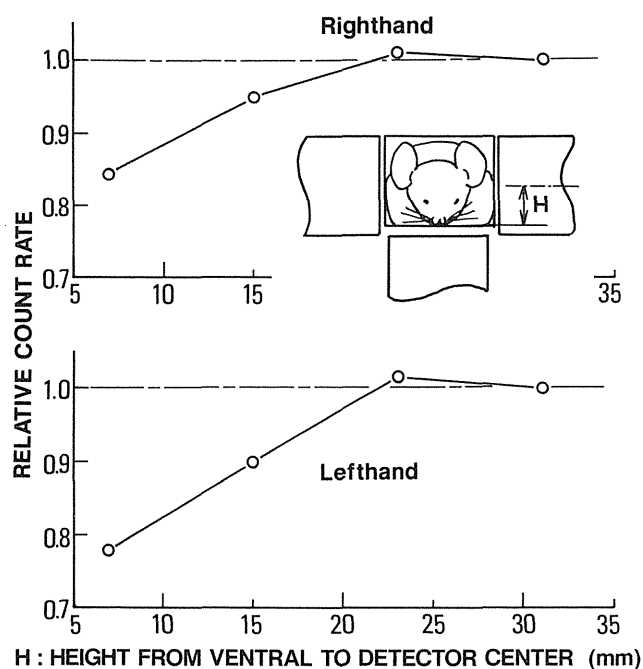


Fig.12 Dependence of count rate on the rat-detector geometry with different locations of the rat in the up / down direction.

Fig.11 にラットの位置を前後方向に動かした時の計数効率の変化を、Fig.12 には、上下方向に動かした時の変化を示す。

Fig.11 から、計数効率は前後方向の位置に応じてかなり敏感に変化し、5 mmの違いが計数効率に 10 %近い変動をもたらした。また、鼻先と検出器の中心が 70 ~ 80 mmの時に最も高い計数効率を得られた。

Fig.12 から、保定箱の底板が左右検出器の中心から 23 ~ 30 mm低い位置の時に最も高い計数効率を得られた。なお上下方向の場合は前後方向と異なり、設定の再現性が良好なので、計数効率の変動に注意する必要がない。

(4)肺以外の Pu の計数への影響

この体外計測法では、肺の中の Pu のみを評価したい。そこで体表面汚染や、肺以外の臓器に移行沈着した Pu がどの程度計数されるかを、次の方法により定量的に評価した。

まずラットを体外計測した。その後、ラットの肺のみを取り出し、残った死体を最初の体外計測と同じジオメトリで体外計測し、両者の計数率の比を求めた。

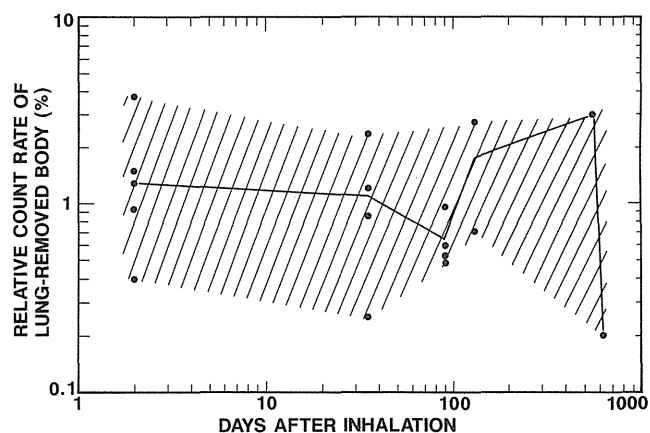


Fig.13 Effect of possible Pu content of the parts other than the lung on the count rate of the whole body counter.

結果を Fig.13 に示す。体表面汚染や胃腸管内 Pu の影響が懸念された吸入 2 日後に始まり、おもに骨と肝臓に沈着する Pu の影響が懸念された 600 日後に至る長期間、肺以外の部位の Pu は、体外計測値の 4 %以下であり、実際上は、無視しても構わないという結論が得られた。

(5)校正係数

体外計測の通常法では、体内放射能の定量は標準ファントムの計数率との比から求められる。しかし、Pu の場合は、検出する放射線が相互作用断面積の大きい低エネルギーの光子であるため、動物の体格のわずかの差が計数効率に強く影響する。このため、ファントム法を採用すると、体格の異なる非常に多くの標準ファントムを用意しなければならず、著者らは、これは現実的ではないと判断した。これに代わる校正方法として、次の方法を検討した。①まず、種々の体重のラットについて、体外計測の計数率と摘出した肺の放射能とから LX 線の計数効率を求める、②これを体重に関してプロットすることによって体重対計数効率の相関曲線を得る、③放射能を測定したいラットの体重

を体外計測時に測定し、相関曲線上で計数効率を読み取る。なお、摘出肺の Pu 放射能の測定には、筆者らが開発したフォスウィッチ検出器による LX 線計数法を用いた。

Fig.14 に、このようにして得られた計数効率をラットの体重に対してプロットした結果を示す。体重増加に伴い LX 線の吸収減弱がはなはだしくなり、計数効率が減少していることが示された。以上のように、両者の間にはきわめて強い相関関係が認められ、本方法により体内の Pu の放射能を決定できることが明らかとなった。

以上の計数効率の検討とバックグラウンドの評価結果から、本装置の最小検出放射能を評価したところ、相対誤差 10 % を仮定した時 90Bq が得られ、放医研における吸入放射能の範囲 (100Bq ~ 数 1000Bq) をクリアしていた。

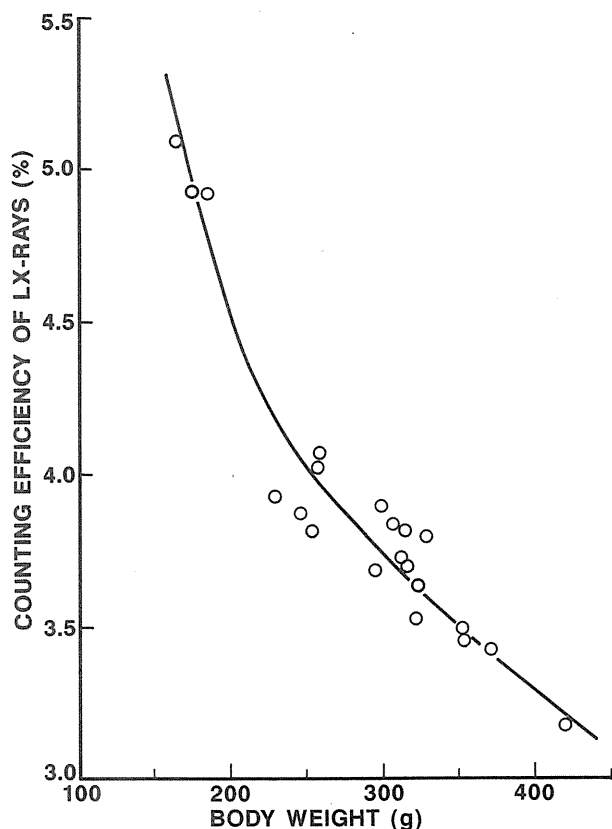


Fig.14 Counting efficiency of LX-rays for the rats of various body weights, which was used for the calibration of the whole body counter.

2. 体外計測法の線量評価への応用

(1) 肺深部初期沈着量の測定

肺への初期沈着量を決定することは内部被曝の影響の全ての研究の出発点となる。諸外国では、一緒に吸入投与した一群の動物から数匹をその群の代表として抽出し、屠殺後の肺の放射能分析結果をもってその群全体の初期沈着量としている。しかし、一緒に吸入させても実際に沈着する放射能は一般的に個体間で大きくばらつく。このため、屠殺した動物がその投与群を真に代表していたかどうかは不明である。本研究では、長期間飼育観察する動物そのものを全て一匹ごとに体外計測し Pu の肺への初期沈着量を求めた。

放医研の吸入実験装置は 20 匹を同時吸入する装置であるが、例として、Fig.15 に酸化 Pu の吸入実験 5 回分の

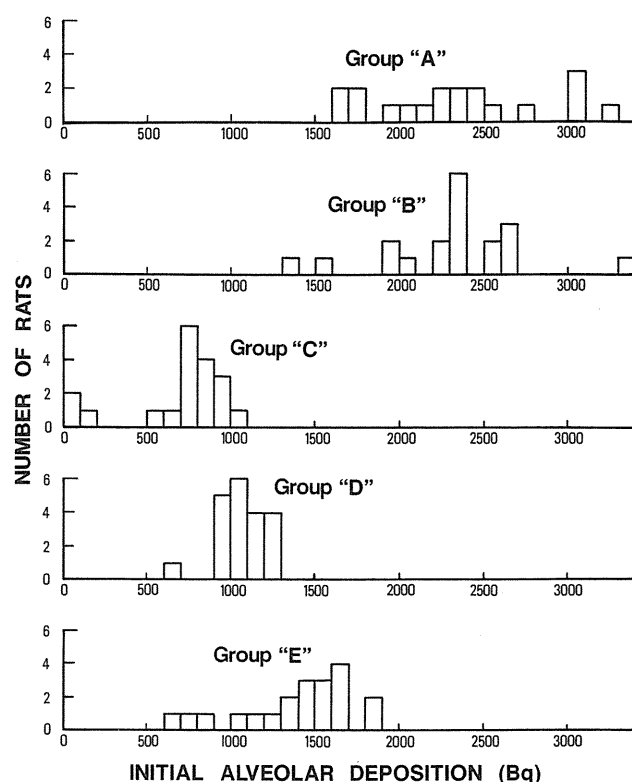


Fig.15 Distributions of initial lung burdens of PuO_2 particles for the five different batches of exposure.

Table 1 Deposition fractions of inhaled plutonium aerosols in alveolar region of rats

Batch	AMAD* ¹ (μm)	GSD	Exposure* ² (min·Bq/cc)	IAD (Bq)	Resp. Vol.* ³ (cc/min)	Depos. Frac. (%)
A	0.48	2.0	69	2350	124	27
B	0.49	1.9	60	2310	128	30
C	0.42	2.1	38~45	800* ⁴	99	18~21
D	0.39	1.9	46	1060	99	23
E	0.43	2.1	86	1390	97	17

*1 Activity median aerodynamic diameter.

*2 Time integral of air concentration of plutonium during exposure.

*3 Calculated values using the Guyton formula.

*4 Rejecting the three lowest IAD.

沈着量の頻度分布を示す。

このように測定した初期沈着量から初期沈着率を評価した。なお、ラットの呼吸量は吸入時にモニタできないので、Guyton が提唱している計算式により推定した。

得られた結果を Table 1 に示す。これらを、珪酸塩粒子を用いて米国で測定された沈着率や密度が 1 の標準粒子に対する理論的計算値と比べたところ、酸化 Pu では沈着率が高くなる傾向が観察された。この理由として、酸化 Pu は粒子の密度が大きいと、拡散機構による沈着率が高くなり、その結果、同じ空気力学径の標準粒子の場合よりも全体としての沈着率が高くなったものと推察された。

(2) 酸化 Pu の肺残留特性

次に、酸化 Pu を吸入投与したラットについて、肺にお

ける残留率特性を本研究で開発した体外計測法により約500日間追跡した。こうしたデータは、ラットを用いた発がん実験において、吸収線量を正確に評価するために使われる。また、酸化Puの肺における挙動の理解に基礎的データを提供する。

吸入した酸化Pu粒子は、空気力学的放射能中央径 $0.47\text{ }\mu\text{m}$ 、幾何標準偏差2.1の多分散エアロゾルである。肺深部初期沈着量は最も少ないラットが1990Bq、最も多いものが2960Bqであった。

この実験には、放医研で維持しているWistar系の雌ラット5匹を用いた。吸入時12週齢で、体重は平均230gであった。

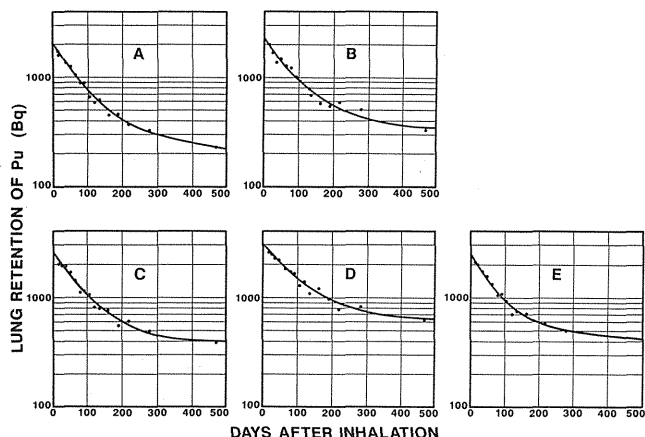


Fig.16 Lung retention of Pu of five rats following inhalation of PuO_2 particles.

Fig.16に5匹のラットの残留特性の測定結果を示す。残留率はいずれのラットにおいても2成分の指数関数でよく近似された。相互によく似た残留特性を示しているように思われる。

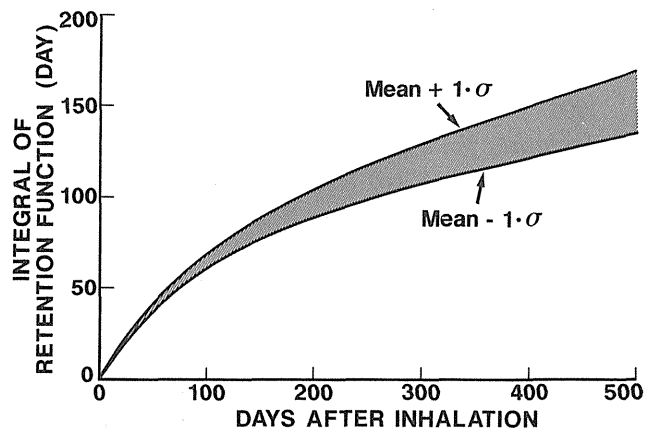


Fig.17 Time integral of retention function; the shadowed area indicates the range of the integral between [the mean] + [the standard deviation] and [the mean] - [the standard deviation] of the four rats.

残留率の時間積分は、蓄積線量のよい指標である。残留特性におけるこれら5匹の間の個体差を評価するために、この時間積分を計算した。5匹の平均値と標準偏差をFig.17に示す。この図が示すように標準偏差は小さく、個体差は比較的小さいことが明らかとなった。

これら5匹の残留率を平均し、母集団の残留率を推定した。結果を次式に示す。

$$Y(t) = 0.77\exp(-0.0136t) + 0.23\exp(-0.00084t)$$

ここで $Y(t)$ は、吸入後 t 日目における肺内Pu残留率である。これは、初期沈着量の77%は半減期51日で、一方残りの23%は長期間肺内に残留し、半減期825日でクリアランスされることを示している。

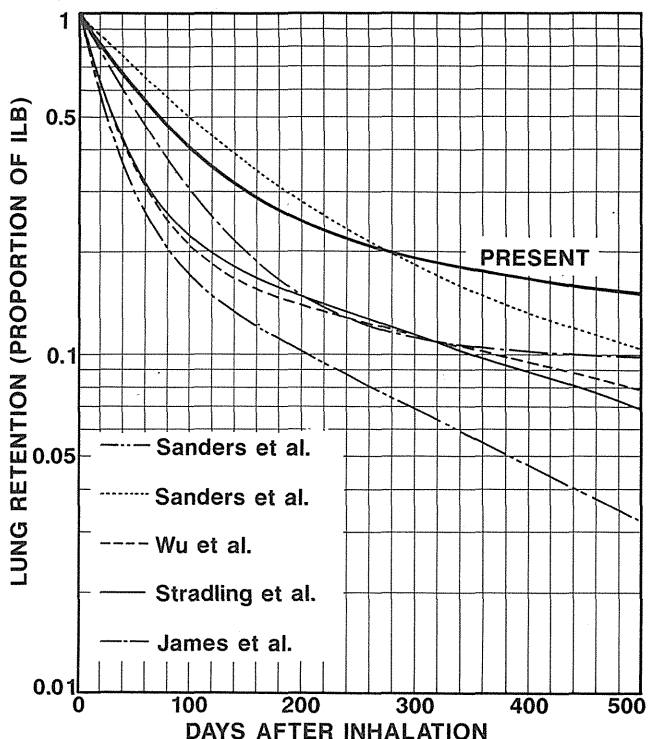


Fig.18 Comparison of the retention function with the other retention functions in a few literatures.

Fig.18に今回著者らが得た残留率曲線を諸外国のものと比較した。ここで注目されるのは、今回の結果が、バツテル研究所(USA)のSandersらの最近の結果とともに長い肺内残留を示している点である。

酸化Puのクリアランスを修飾する要因については従来いろいろな報告がなされてきた。その中のひとつに、沈着したPuの α 線による肺の組織の照射効果が粒子の肺からのクリアランスを遅らせるという報告がある。

Sandersらの最近の方の実験も著者らのものも初期沈着量は比較的多い。このため照射効果がクリアランスを阻害した可能性も否定はできない。しかし、著者らは現在、より低い初期沈着量で残留特性を測定中であり、その途中経過を観察すると、必ずしも照射効果が今回の遅いクリアランスの主原因とは言えないことを示唆する結果が得られつつある。

放医研のエアロゾル発生法では、まず、水酸化Puの微小ミストを発生させ、これをエアロゾル状態のまま $1150\text{ }^\circ\text{C}$ という高温で酸化することにより、酸化Puのエアロゾルを得ている。このため、Pu粒子は芯まで十分に酸化された球状の欠陥の少ない単結晶を形成しているものと推定される。一方、バツテル研等では、蔞酸Puの沈澱物を空气中で熱して酸化し、これを水に懸濁し、エアロゾル化している。このため、粒子は不整形であり、結晶として不完全である可能性が高い。このような粒子は表面積が

大きく、また結晶欠陥に起因する粒子の破碎も受け易いと思われる。これらは、クリアランスを早める原因となり得る。

以上のように、本研究においては、Puの防護を考える上で、酸化Puということだけではなく、粒子の詳細な物理化学的性状にも留意しなければならないことが示唆された。また、Puの発がん研究における線量の評価に諸外国の残留率は適用できず、放医研の実験条件で実測された残留率をこそ使わなければならないことが実証されたことは、プロジェクト全体の成果の信頼性に少なからず寄与するものと考えられる。

(3) アメリシウム (Am) と Pu との随伴挙動

通常、Puには ^{241}Pu から β 壊変した ^{241}Am が含まれている。現行のICRPの立場では、酸化PuはクラスY、つまり肺から年のオーダーで、AmはクラスW、つまり週のオーダーでクリアランスされるとしている。それでは、酸化Pu中で生成した ^{241}Am はどのようなクリアランス特性を示すであろうか。本研究では ^{241}Am を放射能比で4%含む酸化Puを吸入したラットの肺について、Am/Pu比を体外計測法で測定することによりこれら両元素のラットの肺における随伴性を検討した。

実験方法や材料は、前節と同じである。なお、 ^{241}Am の測定は、この核種から放出される60keVの γ 線を計測することにより行った。

Am/Pu比を吸入後約500日間追跡した。その結果をFig.19に示す。これよりAm/Pu比は吸入後の時間経過によらず一定値を示すことが明らかとなった。つまり、Pu中に生成したAmは、ICRPのいうクラスWではなく、Puと随伴してクラスYとして挙動することが明らかとなった。この結果は酸化Puは大部分が肺の中で粒子状態のまま残留・クリアランスされることを示唆している。さらに本結果は、人体のように体が大きくてLX線の吸収を受け易くPuのモニタが困難な場合でも、測定の容易な ^{241}Am を追跡することにより、Puの肺負荷量を推定できる可能性を示唆している。

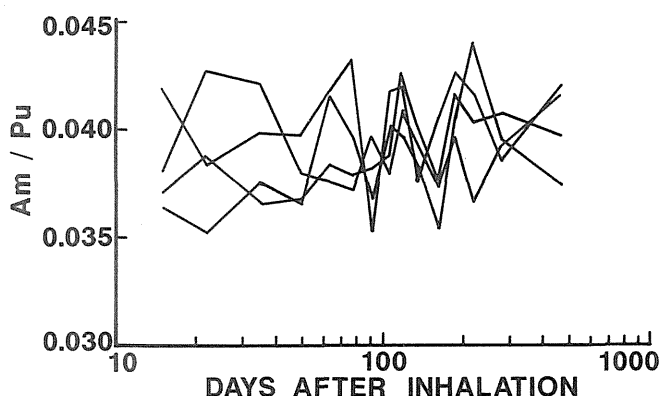


Fig.19 Ratio of Am / Pu in rat lung for long term follow-up.

III. 結論

本研究では、次のことが明らかにされた。

①開発した体外計測法の最小検出放射能は、相対誤差10%を仮定した時、90Bqであり、放医研における吸入放射能の範囲(100Bq～数1000Bq)をクリアした。

②本方法を用いて、線量評価の基本情報であるPuO₂粒子の肺深部初期沈着量及び沈着率を評価した。

③本方法を用いて、PuO₂の肺深部残留特性を測定した。このデータは、発がん研究において吸収線量の正確な評価に使われている。初期沈着量の77%は半減期51日で、23%は825日でクリアランスされることが明らかとなった。これは、吸入毒性研究で有名なパッテル研の結果等と比較し、遅いクリアランスであった。この理由として、粒子の物理化学的性状の差異が示唆された。正確な理由を明らかにするためにはこの点に焦点を絞り、さらに検討を進める必要がある。

④ ^{241}Pu の β 壊変により生じた ^{241}Am は肺内でPuに随伴して挙動することが明らかにされ、ICRPの ^{241}Am はクラスWであるという仮定はこのようなAmには適用できないことが示された。

[研究発表]

- 1) 石樽信人, 他: アルファ線測定用線源の固体飛跡検出器によるオートラジオグラフィ, RADIOISOTOPES, 38, 282-285, 1989.
- 2) Ishigure, N., Nakano, T. and Matsuoka, O.: An Investigation to Assess Which Component in the Air Is Concerned with the Vacuum Effect on Plastic Track Detector Sensitivity, Nucl. Tracks Radiat. Meas.(Int. J. Radiat. Appl. Instrum. Part D), 16, 57-59, 1989.
- 3) 仲野高志: 肺深部における α 粒子の飛程分布, 第21回放医研シンポジウム報文集, 142-149, 1990.
- 4) 石樽信人: 肺深部における細胞のヒット数分布と粒子性, 第21回放医研シンポジウム報文集, 150-157, 1990.
- 5) Ishigure, N., Nakano, T., and Enomoto, H.: A Device for In Vitro Irradiation with α -Particles Using an α -Emitting Radioactive Source, J. Radiat. Res., 32, 404-416, 1991.
- 6) 石樽信人: 固体飛跡検出器のプルトニウム内部被曝への応用, 放射線, 18, 8-15, 1992.
- 7) Ishigure, N. et al.: Assessment of Initial Alveolar Deposition on Rats Exposed to Plutonium Aerosols Using a Whole Body Counter, 保健物理, 27, 135-142, 1992.
- 8) Ishigure, N., Nakano, T. and Enomoto, H.: Activity Measurement of Plutonium in Solid Samples by LX-ray Counting with a Phoswich Detector, 保健物理, 28, 195-201, 1993.
- 9) Ishigure, N. et al.: Lung Retention of Pu Following Inhalation of PuO₂ in Rats Measured Using a Whole Body Counter, J. Radiat. Res., 35, 16-25 1994.

2. 超ウラン元素の生物効果に関する比較毒性学的研究

②超ウラン元素の生物効果とその発現機構に関する比較毒性学的研究

小木曾洋一、福田俊、山田裕、飯田治三、高橋千太郎、佐藤宏、石樽信人、
仲野高志、榎本宏子、山田裕司、小泉彰、稲葉次郎（内部被曝研究部）

Toxicological Studies on Biological Effects of Transuranium Elements

Yoichi Oghiso, Satoshi Fukuda, Yutaka Yamada, Haruzo Iida, Sentaro Takahashi, Hiroshi Sato,
Nobuhito Ishigure, Takashi Nakano, Hiroko Enomoto, Yuji Yamada, Akira Koizumi and Jiro Inaba
Division of Comparative Radiotoxicology

For risk estimation of internal exposures of transuranium elements, especially plutonium, biologic parameters such as microdosimetry at tissue or cellular levels and factors modulating sensitivities of target cells remain to be elucidated. In this study, we focused on carcinogenic effects of plutonium either in inhalation exposures or the subsequent translocation to the liver, skeleton and hematopoietic organs. To investigate carcinogenesis of inhaled plutonium dioxide particles, approximately 120 rats were exposed to aerosols with 0.3 to 0.4 μm of AMAD, and were kept for life span periods. The results have shown that 97% of animals inhaled 1000 Bq or more died with lung tumors (mainly adenocarcinomas) within 600 days after inhalation, and that almost 60% of rats inhaled 500-1000Bq died with lung tumors from 500 to 700 days after inhalation, although the remaining animals are still survived. Estimated absorbed lung doses in these lung tumor-bearers were ranged from 3 to 8 Gy, depending on initial alveolar deposition and survival time. Carcinogenic effects of injected plutonium citrate were also examined in total 120 mice for life-span periods. Osteosarcomas were observed in approximately 60% of animals injected 1000 to 5000 Bq and 35% of animals injected 500 Bq, respectively, but only 17% of animals injected 10000 Bq had bone tumors, while no incidence of bone tumors has been noted in untreated control animals. Additionally, relatively higher incidence of lymphomas and lymphatic leukemias was observed in 17% of animals injected 5000-10000 Bq, as compared to 8% of control animals. Finally, to clarify biological parameters of α -ray exposures at cellular levels, preliminary assays for survival of colony-forming cells were performed by using *in vitro* exposure system of α -ray emitted from the source of ^{241}Am . As expected, both of

pulmonary alveolar macrophages and bone marrow cells after α -ray exposures were more sensitive than those by γ -ray emitted from the source of ^{137}Cs , and the estimated RBE was approximately 1.5-2.1.

1. 緒言

プルトニウム等超ウラン元素による内部被曝の生物効果で最も重要なものは、その発癌性であり、とくに骨肉腫については低 LET 放射線はもちろん、 β 線放出核種に比べてもきわめて誘発性が強く、プルトニウムはその最たるものとされている。一方、プルトニウムについてはその存在形態から、溶解度の極めて低い酸化プルトニウムエアロゾルの吸入被曝が最も危険度の高い被曝形式であり、その発癌性、すなわち肺腫瘍誘発性がリスクの対象となっている。プルトニウムによって誘発される骨肉腫あるいは肺腫瘍いずれにおいても、一定の線量効果関係がすでに米国等での大規模な動物実験で得られているが、低レベルでの発癌率やヒトでのリスク推定に必要なとされる種々の生物学的パラメータ、すなわち標的細胞レベルの微細線量分布、標的細胞の感受性を決定する要因や微小環境要因などについてはまだ明らかにされていない。本研究では、以上のことを明らかにするために、まず酸化物エアロゾル吸入による肺腫瘍発生と吸収線量推定および体内移行して血液に侵入したプルトニウムが誘発する腫瘍のスペクトルについてそれぞれラットおよびマウスによる生涯飼育実験で病理学的に検索するとともに、 α 線を *in vitro* で標的細胞に照射したときの生物効果を検出して、生物学的パラメータのひとつである RBE を推定する試みを行った。

2. 方法

(1)酸化プルトニウムエアロゾルの吸入による肺腫瘍誘発と線量効果関係

すでに我々により開発されたエアロゾル吸入曝露装置を用い、硝酸塩から水酸化物に変換し、ジェネレータで発生させたミストを約 1000 $^{\circ}\text{C}$ で加熱・焼結により生じた酸化物 ($^{239}\text{PuO}_2$) エアロゾル (AMAD : 0.3-0.4 μm , $\sigma =$

2.0) を、雌の Wistar 系ラット (体重 200-250g) に吸入した。吸入直後および一定期間毎に、LX 線を検出する体外計測法により肺組織内沈着量を測定し、得られた滞留率曲線から初期沈着量 (Initial alveolar deposition; IAD) を、また吸入後の時間 (日数) までの肺組織全体に与えられた吸収線量を、滞留率と肺重量変化の関数の積分値と IAD および諸係数によりそれぞれ計算した (アルファ放射体による組織微細線量評価に関する研究の項参照)。吸入動物は、同年齢の無処置対照群とともに終生飼育し、死亡個体について解剖と肺組織等の病理組織学的検索により、肺腫瘍誘発率を検討した。

(2) プルトニウム注射投与マウスにおける腫瘍誘発とそのスペクトル

硝酸塩からクエン酸塩に変換、pH 6-7 に調整後、250nm pore サイズのミリポアフィルターを通過させ、生理食塩水で一定濃度に希釈した可溶性プルトニウム (^{239}Pu) を C3H/He 系雌マウスの腹腔内に注射投与した。マウスは、同年齢の無処置対照マウスとともに終生飼育し、死亡個体について解剖と腫瘍組織等の病理組織学的検索により、腫瘍誘発率とスペクトルの違いを比較検討した。

(3) in vitro α 線照射細胞による生物効果検出系の予備的検討

^{241}Am 密封線源を用いてその α 線 (3.2MeV、138KeV / μm 、線量率 0.1Gy / min) を薄膜 (ダイヤホイル) 上に付着・培養した細胞に照射し、生物効果を検出するシステム (アルファ放射体による組織微細線量評価に関する研究の項参照) を用い、予備的検討のため、マウス骨髄細胞および肺泡マクロファージによるコロニー形成能を生物学的パラメータとして、線量-生存率効果を検討し、 ^{137}Cs の γ 線 (線量率 1.0Gy / min) 照射細胞のそれと比較した。コロニー形成能は照射直後の細胞をそれぞれ一定数、コロニー刺激因子 (M-CSF) を含む 0.5% アガロース培地を加えた径 35 mm のプラスチックプレート上で 7-21 日培養し、固定・染色後生じたコロニー数を算定、比較した。

3. 結果

(1) 酸化プルトニウム吸入ラットにおける肺腫瘍誘発と線量効果関係

研究期間内に行った酸化プルトニウム吸入実験は、計 8 回、それぞれ 20 匹ずつ計 160 匹のラットに吸入させた。このうち約 30 匹は初期沈着量と滞留率測定のために定期的に処分され、残りを吸入量 (Bq) の違いにより、次の 4 群および対照群に分けて終生飼育し、肺腫瘍誘発効果の検索に用いた。

グループ	吸入量 (Bq)	動物数
対照	0	60
Level 1	< 740	18
Level 2	740 - 925	30
Level 3	925 - 1295	32
Level 4	1295 <	34

このうち、対照群の約 70 % と吸入量 1000Bq 以下 (Level 1 および 2) の動物の一部は現在 (1993 年 10

月) でも生存しているが、吸入量 1000Bq 以上 (Level 3 および 4) の動物は全て吸入後約 600 日までに死亡した。それぞれの生存率の推移を図 1 に示すが、高レベル吸入群 (Level 3 および 4 群) は、250-300 日より死亡が観察され、以後急速に死亡率が増加し、平均生存日数はそれぞれ 454 日 (Level 4) および 524 日 (Level 3) であった。これに対し低レベル吸入群 (Level 1 および 2) は、500 日以降より死亡が観察され、700-800 日までに約 40 % および 26 % がそれぞれ死亡し、平均生存日数 696 日および 593 日であった。このように対照群の平均生存日数 775 日、生存率約 70 % と比較し、吸入群ではより早期の死亡が明らかではあるが、吸入レベルの低いものでは、死亡時期の遅延が明らかである。

Survival of Pu-Inhaled Rats

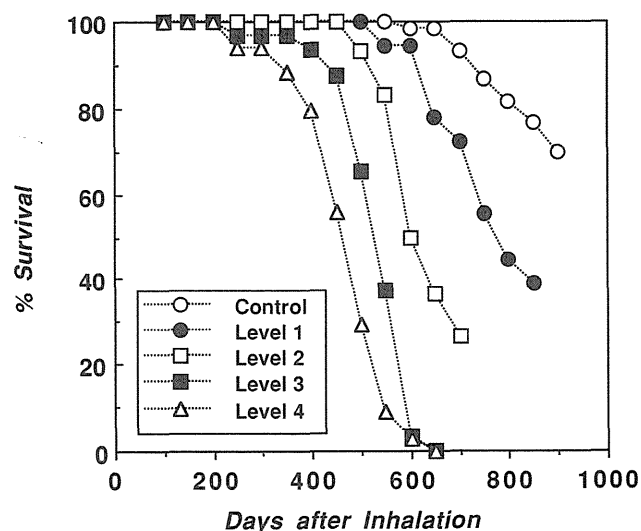


図1 酸化プルトニウム吸入ラットの生存率

この死亡の主要因は、肺腫瘍であるが、対照群においては、乳腺腫瘍、腎障害等他の原因が多く、肺腫瘍は現在のところ全くみられていない。プルトニウム吸入群の肺腫瘍発生率は、対照群と明らかに異なり、レベルに応じた累積増加率を示している (図 2)。すなわち、高レベル (Level 3 および 4) 群では、250 日より増加し、最終的な肺腫瘍発生率は、それぞれ約 97 % であったが、低レベル (Level 1 および 2) 群では、一部未だ生存中ではあるが、遅れて 500 日より増加し、現在それぞれ約 55 % および 73 % の発生率を示しており、今後さらに発生率が累積されるものと考えられる。肺腫瘍の病理組織型としては、これらの約 80 % 以上が、深部細気管支-肺胞部より発生した腺癌 (adenocarcinoma) で、一部化生して類表皮癌 (epidermoid carcinoma) あるいは扁平上皮癌 (squamous carcinoma) の形態を示した。なお肺腫瘍の組織型には吸入レベルによる大きな違いはないものの、低レベル吸入群では、腫瘍病巣が比較的限局されている傾向が強く、また、とくに高レベル吸入群では、線維化病変が顕著で、その周囲に腫瘍病巣がみられる場合が多かった。

次に、肺腫瘍により死亡した個体ごとに、肺吸収線量を計算し、その分布を吸入レベルごとに分類すると、図 3 に示すように Level 1 では 3-5Gy、Level 2 では 5-7Gy、Level 3 では 6-8Gy、Level 4 では 8Gy 以上と吸入レベル

Incidence of Lung Tumors in Pu-Inhaled Rats

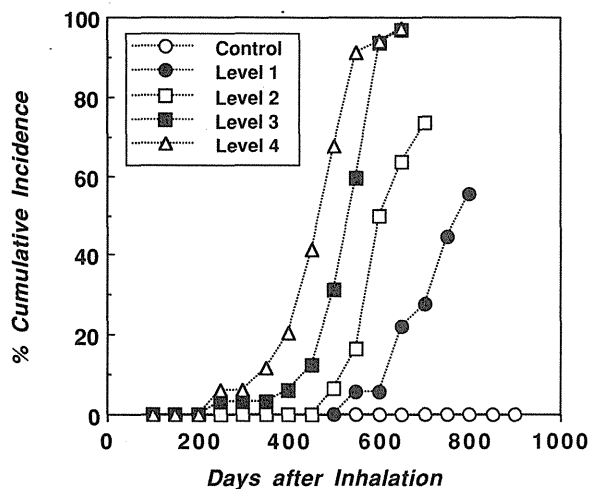


図2 酸化プルトニウム吸入ラットの肺腫瘍累積発生率

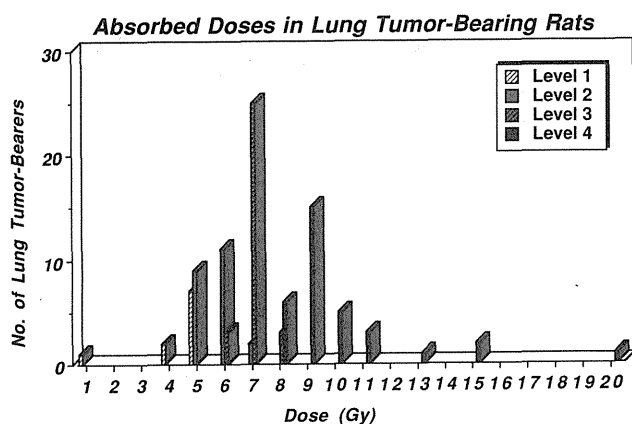


図3 酸化プルトニウム吸入ラット肺腫瘍例の肺吸収線量分布

Relationships between IAD, Dose and Time after Pu-Inhalation in Lung Tumor-Bearers

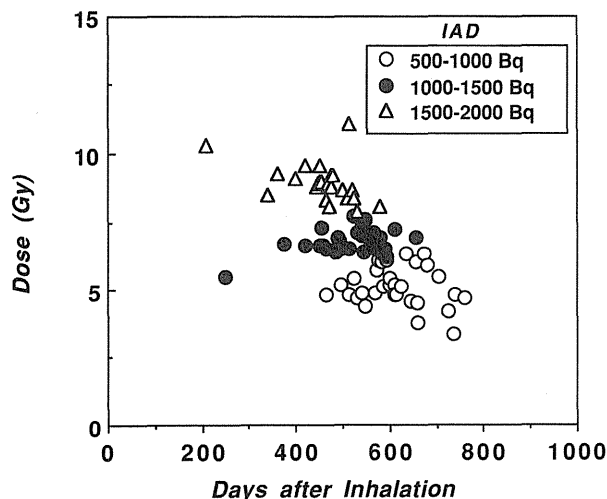


図4 酸化プルトニウム吸入ラット肺腫瘍例の肺吸収線量と初期沈着量（IAD）ならびに吸入後の時間との関係

の高低による差がみとめられ、高レベルほど大きかった。さらに、初期沈着量（IAD）、吸収線量および生存時間（日数）との関係をみたところ、IAD 500-1000Bq の個体の線量は、平均 5Gy で 600-800 日に、1000-1500Bq では平均 7Gy で 400-700 日に、また 1500-2000Bq では平均 8Gy で 300-600 日にそれぞれ最も多く分布し、初期沈着量レベルにより異なるが、肺腫瘍により死亡するまでの時間と吸収線量との間には一定の関係があることが推察される（図4）。しかしながら低レベル群の一部個体の検索では、1Gy 以下でも肺腫瘍が発生しており、今後肺腫瘍誘発の線量効果関係が詳細化されると思われる。

(2)プルトニウム注射マウスにおける腫瘍誘発とそのスペクトル

可溶性プルトニウムを、投与レベルの異なる次の4群のマウスに分けて注射投与し、無処置対照群とともに、終生飼育して腫瘍誘発率およびそのスペクトルを比較・検討した。

グループ	投与量 (Bq)	動物数
対照	0	60
Level 1	500-600	30
Level 2	1000-1500	30
Level 3	5000-6000	30
Level 4	10000-11000	30

このうち対照群の動物は現在約 60 % が生存中であるが、プルトニウム投与群の動物のほとんど全てが 700 日までに死亡した。生存率の推移は図5に示すとおりで、高レベル（Level 3 および 4）群は、約 200 日から死亡が観察され、500 日までにほぼ全例が死亡し、平均生存日数は 350-360 日であったのに対し、中レベル（Level 2）群はやや遅れて 300 日から 600 日に全てが死亡、平均生存日数は 430 日であった。低レベル（Level 1）群は、さらに時期が遅れて 400 日から 700 日までに 95 % が死亡し、平均生存日数 530 日であった。いずれのプルトニウム投与群もレベルによる差が明らかであるが、対照群の平均生存日数 750 日と比較して、早期の死亡が特徴であった。この早期の死亡の主要因としては腫瘍発生以外に、高レベル群（とくに Level 4）においては急性造血器障害によるものが多かった。腫瘍による累積死亡率の推移を図6に示すが、対照群では 600 日以降に腫瘍死が観察され、現在（1993 年 10 月）までに約 30 % に達しているのに比べて、Level 1 では 400 日から約 45 %、Level 2 では 300 日から約 67 % に、また Level 3 では 200 日から 63 % に、それぞれ腫瘍死がみられた。しかし最もレベルの高い Level 4 群では 200 日よりみられるものの最終的な累積腫瘍死は約 34 % にしか達しなかった。これは急性死によるためと考えられる。

発生した腫瘍を病理組織学的に分類すると、対照群では肝癌（hepatocellular carcinoma）、リンパ腫（lymphoma）、卵巣腫瘍（granulosa cell tumorあるいはadenocarcinoma）および肺腫瘍（adenomaあるいはadenocarcinoma）がほとんどであったが、プルトニウム投与群では、骨肉腫（osteosarcoma）、リンパ腫ならびにリンパ性白血病（lymphoma / lymphatic leukemia）が大部分を占めていた。各群におけるこれら腫瘍の発生率を骨肉腫、リンパ腫・白血病およびその他の腫瘍（肝癌等）に分けて比べ

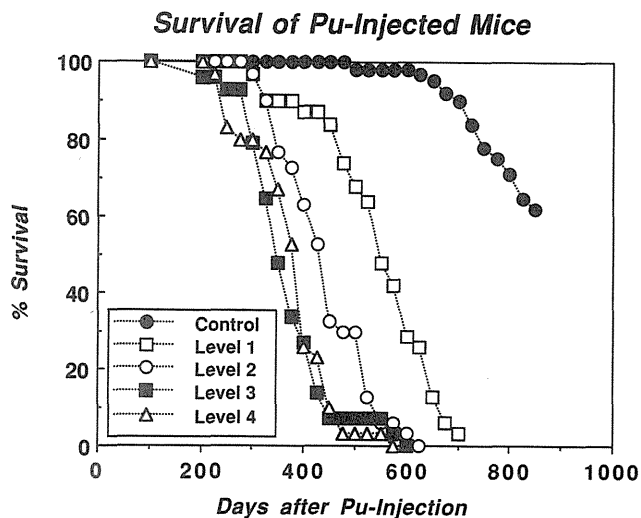


図5 プルトニウム注射投与マウスの生存率

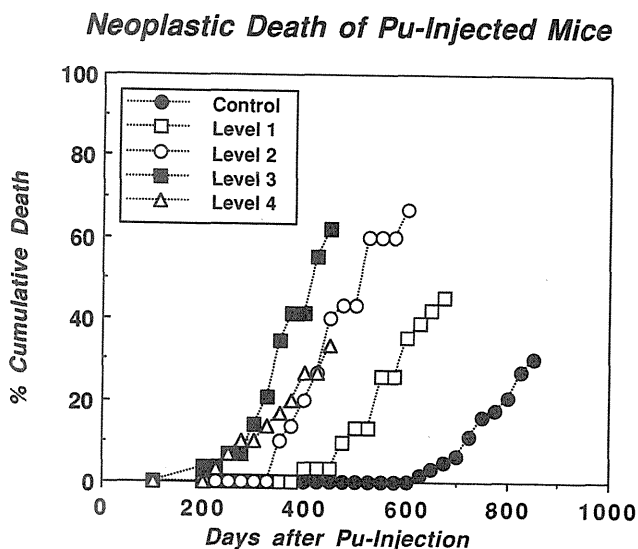


図6 プルトニウム注射投与マウスの腫瘍による累積死亡率

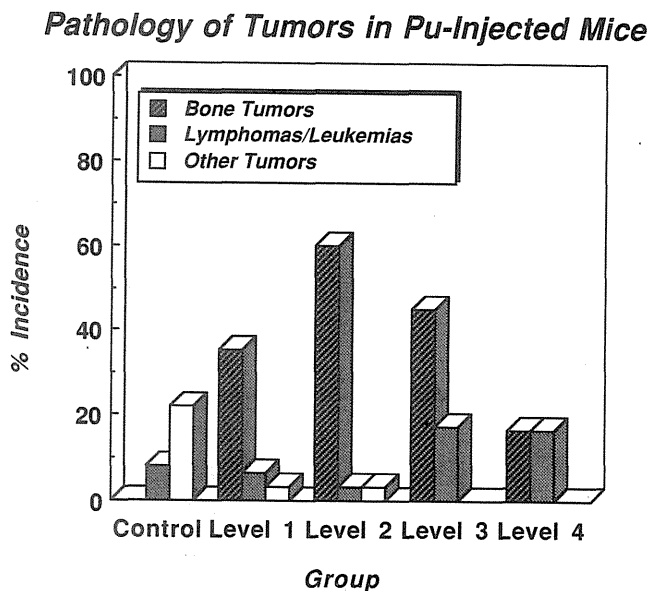


図7 プルトニウム注射投与マウスに誘発された腫瘍の発生率

ると、図7に示すように、骨肉腫は対照群で全くみられないのに対し、投与群ではLevel 1で35%、Level 2で60%、Level 3で45%、Level 4で17%と投与レベルに依存した増減を示した。リンパ腫・白血病は、高レベルのLevel 3および4で約17%であり、対照群の約8%と比べて有意に高いが、低レベル群（Level 1および2）では6%以下であり、有意差はみられなかった。その他の腫瘍については高レベル投与群では全くみられず、低レベル群で約3%であり、対照群の24%に比べて低かった。これは対照群の腫瘍（とくに肝癌）が700日以降にみられるのに対し、プルトニウム投与群ではそれより早期に骨肉腫あるいはリンパ腫・白血病等で死亡してしまうためと考えられた。このことは、実際に腫瘍の発生時期を比較してみると、プルトニウム投与群での骨肉腫は300-400日より、またリンパ腫・白血病は200-300日よりそれぞれ出現することからも明らかである。

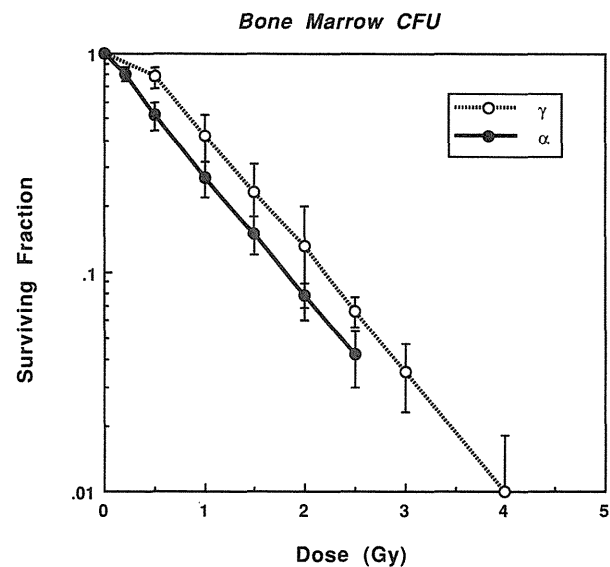
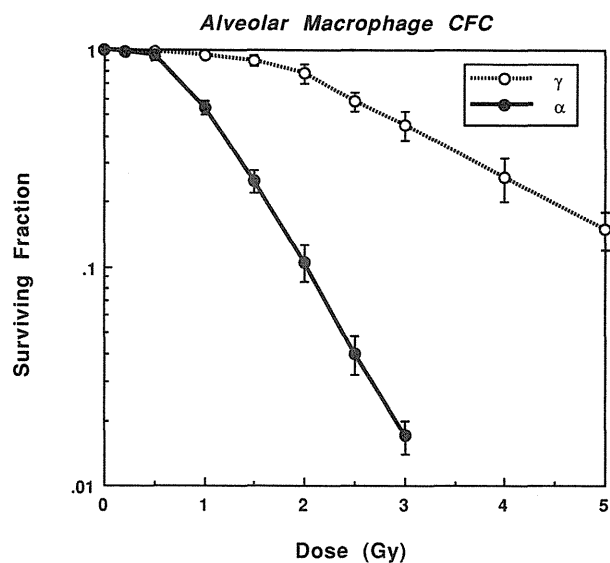


図8 α 線および γ 線照射肺マクロファージ・コロニー形成細胞（上）および骨髄CFU（下）の生存率曲線

(3)肺胞マクロファージおよび骨髄細胞のコロニー形成に対する α 線照射の効果

コロニー形成能を指標とした α 線および γ 線照射肺胞マクロファージの生存率曲線はきわめて異なり、線質による放射線感受性の違いが明らかであった(図8)。この場合の D_0 値は、それぞれ0.5および2.0となり、 D_{37} 値で比べた生物学的効果比(RBE)は約2.1と推定された。一方、造血コロニー形成能を指標とした α 線照射骨髄細胞の生存率曲線は、肩のほとんどない直線となり、 γ 線照射の場合と比べると、 D_0 値は0.8と同じであるが、 D_{37} 値で比較したRBEは約1.5となり、肺胞細胞との放射線感受性の違い(骨髄細胞の方が高い)が明らかであった(図8)。

4. 考察

プルトニウムは、超ウラン元素のうち最も毒性の強い α 放射性核種に位置付けられているが、人体障害例についての報告は未だなく、従って人体でのリスク評価は、動物実験による詳細な線量-効果関係によって導き出さざるを得ない。プルトニウムの発癌性に関する動物実験データは、米国等でのイヌを用いての大規模実験がすでに行われ、とくに注射投与等により、血液に移行したプルトニウムが閾値のない直線的線量効果関係で骨肉腫を誘発することが知られているものの、これをヒトに外挿するために必要な動物種差、標的細胞レベルでの線量分布や感受性の差等様々な生物学的パラメータは十分明らかにされていない。さらに骨肉腫以外の腫瘍、例えば白血病などがプルトニウムの内部被曝により誘発されるとされているが、その線量効果関係やスペクトルについての情報は乏しい。一方、特異的ではあるが重要な被曝形式である吸入被曝に関しても、イヌを用いた大規模実験により、化学形やエアロゾル粒子径等による発癌(肺腫瘍誘発)の線量効果関係がある程度明らかにされているが、低レベル酸化物エアロゾルの吸入による発癌率等についてのデータはほとんどないのが現状である。このような観点から、我々はラット、マウスのような小動物におけるプルトニウムの発癌性について、注射投与による腫瘍誘発のスペクトルおよび吸入投与による肺腫瘍誘発の低線量域での発癌率にそれぞれ焦点を絞り、研究を行った。また同時に、プルトニウムの生物学的効果比を推定するために、 α 線による標的細胞レベルでの生物学的効果とその線量効果関係を検出する実験系の確立を試みた。

不溶性酸化物プルトニウム・エアロゾルのラットへの吸入実験は、全て submicron サイズの粒子径(AMAD: 0.3-0.4 μ m)で行われたが、これは大部分肺深部に沈着し得る大きさのエアロゾルであり、実際にデータには示さなかったがマイクロオトラジオグラフィーにより肺胞部への沈着を確認しており、誘発された肺腫瘍も全て細気管支-肺胞部の上皮細胞より生じた腺癌、類表皮癌あるいは扁平上皮癌であり、上部気道粘膜等より生じた腫瘍はなかった。さらに今回の実験では、大部分の動物の吸入量(初期沈着量)が1000-2000Bqで、これまでにラットで報告されている吸入レベルの内でも比較的低い範囲にあったが、発癌率(肺腫瘍誘発率)はきわめて高く、1000Bq以上の2群では、97%にも達した。また、1000Bq以下の群ではこれより死亡時期が遅れ、一部生存中ではあるが、約60%

以上で比較的高く、死亡個体の90%以上は肺腫瘍であるため、今後さらに発生率の累積増加が期待される。従って、肺腫瘍発生率と吸入量との関係を明らかにするためには、これら比較的低レベル吸入群での最終的な結果に加えて、さらに極低レベル、例えば100-500Bqあるいは100Bq以下の群における発生率に関する検討が必要と思われる。現在この極低レベル群の吸入実験を施行中である。

吸入による肺腫瘍発生についての線量効果関係の確立のためには、肺全体および組織微細部分における線量評価が不可欠である。これまでに報告されているプルトニウム吸入動物での肺吸収線量は、比較的大きく8Gy以上と推定されるものが多いが、今回我々が体外計測法により推定した吸収線量は、3Gyから8Gyのものが多かった。これは粒子径の違い、肺深部における分布の均等性等様々な物理的要因を考慮する必要があるが、1Gy以下のものでも肺腫瘍誘発がみとめられているので、肺腫瘍誘発に必要な線量は、おそらくさらに低いと推定される。そのためには、低レベルあるいは極低レベル群についての十分なデータが必要であろう。しかしながら、今回推定された肺腫瘍例での吸収線量は、初期沈着量にもよるが、平均ほぼ5-8Gyのものが最も多く分布しており、死亡するまでの時間と吸収線量の大きさとの間には一定の関係があり、単に線量の蓄積だけでなく、それに達するまでの時間が腫瘍誘発に必要であることも考えられる。

次に血液移行したプルトニウムによる腫瘍誘発のスペクトル検討のため行った注射投与マウスでは、予想したとおり骨肉腫が多発し、しかも投与レベルにより発生率に差がみられた。この場合、高レベル(5000-10000Bq)投与群においては、骨肉腫の出現する以前に急性造血障害あるいは早期のリンパ腫・白血病により死亡する割合が高いため、みかけ上の発生率が低くなると考えられる。また、肝癌や卵巣腫瘍など対照群で600日以降出現するその他の腫瘍についてもプルトニウム投与群ではきわめて低かったが、これも同様であると考えられる。骨肉腫以外の腫瘍として、高レベルのプルトニウム投与動物ではリンパ腫・白血病が対照群に比べて有意に高く、かつ早期に出現したが、低レベル群では対照群よりも低かった。マウスにおけるリンパ腫発生はプルトニウム投与動物でもこれまで報告されているが、いずれもかなり高レベル投与においてのみ対照レベルより高い値を示している。我々の場合、すべてのリンパ節・リンパ組織を侵襲するタイプのものがほとんどであり、プルトニウムの沈着は胸部以外みとめられなかったので、このリンパ腫の誘発にプルトニウム(の α 線)が直接関わっているとは考えにくい。このメカニズムについては、外部照射によるリンパ腫発生と比較したとき興味深いものがあるが、現在のところ不明である。なお、骨に沈着したプルトニウムが、骨細胞のみならず骨髄細胞にもその α 線の効果を及ぼすことは、よく知られているものの、今回の実験では、いずれの群(対照群も含めて)でも骨髄性白血病は観察されていない。他報告にもあるように、骨髄性白血病はきわめて低い線量でしか起こり得ず、今回の投与量ではむしろ細胞死のほうが先行してしまうためと考えられるが、標的細胞によっては放射線感受性の差が腫瘍誘発の違いを決定するひとつの要因であると思われ、極低レベル、例えば100Bq以下のような投与量による実験を現在遂行中である。

α 線を直接標的細胞に in vitro 照射し、その生物効果を検出し、線量効果あるいは RBE 等を明らかにすることは、プルトニウムの生物影響評価を補完するうえで重要である。このため、我々は²⁴¹Am 線源を用いた照射・培養装置を開発して、実験を開始した。今回は、コロニー形成を指標とした生存率に関する実験のみ行っただけであるが、肺および骨髄細胞における線量効果の違い、およびこれら標的細胞の放射線感受性と α 線による致死効果が γ 線による反応とかなり異なることが明らかにされた。今後は、このシステムを用いて、例えば突然変異の出現率など生物学的パラメータと線量評価の検討を行ってゆく予定である。

5. まとめ

プルトニウムによる内部被曝のリスク評価において重要な生物学的パラメータを明らかにするため、重要な被曝形式である酸化エアロゾルの吸入によって誘発される肺腫瘍、血液移行したプルトニウムによる腫瘍誘発、および標的細胞レベルでの α 線照射による生物効果をそれぞれ検討した。プルトニウム吸入ラットにおける肺腫瘍誘発率は、きわめて高く 1000Bq 以上で 97 %、1000Bq 以下で 60-70 % に達した。また、吸収線量は初期沈着量により異なるが、平均で 5-8Gy のものが多く、死亡するまでの時間との間には一定の関係がみとめられた。プルトニウム注射マウスにおいて誘発された腫瘍のうち、骨肉腫は最も多く、投与レベルにより 17-60 % の発生率を示したが、このほかリンパ腫・白血病が高レベル投与群において 17 % と

有意に高い発生率で、かつ早期に出現した。 α 線を照射した肺胞細胞および骨髄細胞のコロニー形成能を指標とした生存率はいずれも γ 線と比較して低く、線質による違いおよび細胞の放射線感受性の違いが明らかとなった。

6. 研究発表

- 1) Oghiso, Y., Yamada, Y., and Shibata, Y. : Radiosensitivity of macrophage colony-forming cells. Implications for their heterogeneity. J. Radiat. Res., 31, 324-332, 1990.
- 2) Ishigure, N., Nakano, T., Enomoto, H., Fukuda, S., Iida, H., Oghiso, Y., Yamada, Y., and Inaba, J. : Assessment of initial alveolar deposition on rats exposed to plutonium aerosols using a whole body counter. Hoken Butsuri, 27, 135-142, 1992.
- 3) Inaba, J., Takahashi, S., Sato, H., Ishigure, H., Nakano, T., Enomoto, H., Oghiso, Y., Fukuda, S., Yamada, Y., Iida, H., Koizumi, A., Yamada, Y., and Miyamoto, K. : Biokinetics and biological effects of inhaled plutonium in rat. Proceedings of International Conference on Radiation Protection, 247-249, 1992.
- 4) Oghiso, Y. and Yamada, Y. : Heterogeneity of the radiosensitivity and origins of tissue macrophage colony-forming cells. J. Radiat. Res., 33, 334-341, 1992.

2. 超ウラン元素の生物効果に関する比較毒性学的研究

③ 骨代謝ならびにプルトニウムの骨に対する効果に関する研究

福田俊、飯田治三（内部被ばく研究部）

Bone Metabolism and Effects of Injected Plutonium in Rats and Beagle Dogs

Satoshi Fukuda and Haruzo Iida

Division of Comparative Radiotoxicology

Bone metabolism and some regulation factors related to bone were examined in rats and beagle dogs in order to be useful of carrying out the experiments on the effects of injected plutonium-nitrate to bone and other organs, and evaluating the results obtained from experiments for human damages.

The results examined on the age-related changes in bone metabolism of Wistar-Mishima (WM) rats by histomorphometry and analyses of bone strength, mineral contents, serum biochemical constituents related to bone showed that bone mass and surface area, strength and mineral contents in bone increased with development and reached to the peak at the age of 12 months both sexes, thereafter these parameters decreased with age, indicated that the age of 12 months in rats would correspond to the age of 30-40 years in human and the age of 2-4 years in beagle dogs when the bone mass and bone mineral density were highest. Some factors occurring the reductions of bone mass and fragility of bone such as the loss of sex hormone by ovariectomy and orchidectomy, decrease of stimulation to bone by reductions of body burden and exercise in fixed of hind limb with the body, x-ray irradiation to whole body, locally to hind limb or neck including parathyroid and thyroid in WM rats, osteoporosis and decrease of intestinal calcium absorption in the stroke-prone spontaneously hypertensive rats, and some beneficial factors of preventing loss of bone mass such as exercise by swimming, calcium supplement were examined.

Plutonium contents (Bq / kg) in bone, liver, spleen, kidney in rats were highest at the age of 12 months compared to those at the age of 3 or 24 months both sexes, and were higher in female than male, and higher in ovary than in testes. These results suggested that the contents of plutonium deposited in bone and

other organs were highest at the middle age (30-40 years) in human that might correspond to the age of 12 months in rats. Plutonium nitrate of $0.185-3.7 \times 10^5$ Bq / kg was injected peritoneally to rats in order to examine the long term effects, up to now the shortening of average of life span and decrease of body weight, bone tumor were found out. In dogs injected intravenously plutonium nitrate, about 18 % of administered dose was excreted in urine and feces 4 weeks later, and remaining 82 % including 20 % in liver retained in the body. Plutonium content was highest in trabecular bone, subsequently cortical bone and bone marrow, tended to increase in the trabecular bone but decrease in cortical bone and bone marrow. The observation of plutonium-oxide inhaled beagle dogs was initiated.

X-ray irradiation to whole body (1.25-5.0Gy), hind limb (1.25-15.0Gy), and neck (1.25-15.0Gy), and neck (1.25-15 Gy) of 4 week-old rats caused not only the shortening of length of bones in hind limb induced by damage of growth plate, but also decrease of bone mass, mineral density and fragility, and the magnitudes of these bone damages were strongly in whole body > hind limb > neck irradiated groups in order. The damages of bone by neck irradiation were induced by loss or decrease of calcium regulating hormone such as parathyroid hormone and calcitonin.

Plutonium nitrate was injected immediately or 7 days after whole body (2.5 and 5.0 Gy), hind limb (15Gy) or neck (15Gy) irradiation to examine the effects of combinations of x-ray external and Pu internal irradiation. Plutonium contents (Bq / kg) of bone immediately after x-ray irradiation did not change but decreased 7 days post-plutonium injection in whole body irradiated group, while those decreased both immediately and 7 days after plutonium injection in

hind limb or neck irradiated group. All results on plutonium deposition and bone metabolism obtained in this study can be available to assess the risk by plutonium intake in human. In this study, the anatomical and physiological analyses of the trachea-bronchi and respiratory exercise in beagle dogs, and pathological examinations of rats and beagle dogs were also done.

1. 緒言

骨親和性核種であるプルトニウム (Pu) の人の、とりわけ骨に対する影響を評価するために、これまでに進めているビーグル犬に加えてラットの骨代謝に関する基礎的およびその修飾因子に関する検索を先行させながら、これらの結果に基づいて注射投与した硝酸 Pu の初期沈着および効果について検討を進めた。とくに、Pu の沈着や効果に対する年齢、雌雄差、骨代謝に影響を及ぼす生理的な種々の要因について、また放射線感受性や線量評価を行うために外部被曝の影響、外部被曝との複合被曝の影響について検索した。さらに犬に関しては、Pu の吸入実験における実験条件の設定および影響評価のために、気管一気管支の解剖学的な特徴および呼吸の生理的運動について、またビーグル犬およびラットにおける Pu の効果を評価するために自然発がん注目した病理学的な基礎データの集積も実施した。

2. 方法

1) 骨代謝の検索方法

骨の形態および代謝の検索は、骨標識した非脱灰組織標本による骨形態動態計測法、骨強度試験法、骨含ミネラル分析法、骨代謝に関連した血清生化学成分の分析法、走査電子顕微鏡観察法などを用いて行った。

(1) 骨形態動態計測法：ビーグル犬およびラットの骨組織の動態を解析するために、骨標識剤であるテトラサイクリンとカルセインを一定間隔で投与して骨二重標識を行った。犬の生検採取した腸骨やラットの脛骨を Villanueva's bone stain で染色、アルコール脱水、メチルメタクリレート樹脂包埋、薄切、研磨して非脱灰骨組織標本を作製した。また、必要に応じて Toluidine blue 染色を行った。犬の腸骨の海綿骨部分、ラットの脛骨の近位骨幹端の海綿骨 (secondary spongiosa) 部分を対象に、蛍光顕微鏡で観察しながら骨組織形態計測用の半自動画像解析装置を用いて、形態および動態の計測を行った。

(2) 骨強度試験：ラットの大腿骨の強度 (破断力および変位) は骨強度試験装置によって測定した。測定部分の下方の2点の支柱に大腿骨を置き、上方から1点の支柱が下方の2点の中央に位置するように加重を加え、骨が破断した時の加重力と変位 (しなりの距離) を測定した。

(3) 骨含有ミネラル量の測定：ラット大腿骨の生重量、乾燥重量 (24 時間、100 °C)、灰化重量 (24 時間、600 °C) を測定した。灰化した骨は硝酸で溶解した後、カルシウム量は Cresolphthalein complexone 法で、リン量は Molybdenum blue 法でそれぞれ測定した。これらの結果から、生骨重量に対する水分含有量 (生骨重量 - 乾燥重量)、有機成分重量 (乾燥骨重量 - 灰化重量)、灰分量、カルシウム量、リン量の比率を求めた。

(4) 骨代謝関連血清生化学成分の測定：血清中の Parathyroid hormone, Calcitonin, Vitamin D metabolites, Alkaline phosphatase activity, Total and ionized calcium, Phosphorus など測定した。

2) 硝酸 Pu の注射投与および濃度測定

硝酸 Pu 原液をクエン酸で pH および濃度調整後、(1) ラットを用いた長期 (終生) 飼育による発がんおよび障害の検索 (Pu 投与群: $0.37\text{--}3.7 \times 10^5$ Bq / kg の4段階、合計 255 頭)、(2) ラットにおける Pu 沈着量の年齢差、雌雄差および初期挙動の検索、(3) ラットにおける外部照射と組み合わせた場合の骨への Pu 沈着量に及ぼす影響、(4) ビーグル犬 (6 頭) における初期の臓器沈着量と体内挙動の検索を目的として、静脈あるいは腹腔内投与した。また、成犬 (6 頭) に酸化 Pu を吸入させ、肺への初期沈着と糞尿中への排泄の経時変化の測定を開始した (一部は長期実験中)。

各実験で採取した臓器や糞尿中の Pu 濃度は、灰化処理後、液体シンチレーションカウンターで測定した。

3) 外部照射

成長および成熟ラットの全身あるいは局所 (後肢、頸部) に X 線照射を1回行った。線量は、全身照射群では 0-15Gy, 局所照射群では 0-25Gy とした。

4) 犬の気管一気管支の解剖生理学および呼吸機能の生理学的検討

成犬から摘出した肺にシリコン樹脂を流し込んだ後、肺組織を苛性ソーダで溶解して気管一気管支キャストを作製した。麻酔した成犬の肺に造影剤を注入し、生理的な呼吸運動と判断される範囲における最大呼気と吸気時、および強制的に拡大した時 (最大拡張) の気管一気管支の X 線造影写真を撮影した。気管一気管支キャストおよび X 線造影写真から、犬の気管一気管支の分岐図の作製と呼吸運動に伴う気管支の伸縮率 (長さおよび直径) や動態を計測した。さらに、麻酔した犬に気管カテーテルを挿入しポリグラフを用いて呼吸曲線を測定した。

5) ビーグル犬およびラットの病理学的検索

ビーグル犬およびラットを長期飼育しながら、生存年齢や発生腫瘍など臨床病理学的検索を行った。

3. 結果

1) ラットおよび犬の骨代謝とその修飾因子

雌雄 Wistar-Mishima (WM) ラットの海綿骨の骨量や骨表面積は成長に伴って増加し、12 カ月齢でピークに達した後、加齢が進むにつれて減少した。(Fig.1)。石灰化速度や骨形成速度は成長に伴って急速に減少し、12 カ月齢以降ほぼ一定になった。骨強度やカルシウム、リン含有量は 12 カ月齢まで増加し、6-12 カ月齢まで水分含有率は減少、灰分含有率は増加した後それぞれ一定になったが、24-27 カ月齢以降に雄の水分含有率の増加、灰分含有率の減少がみられた。すなわち、WM ラットにおける骨の形態および代謝の年齢変化は、生後から 12 カ月齢までの骨組織量、骨塩量、強度が増加し続けてピークに達する急速な成長およびそれに続く成熟過程と、12 カ月齢から老齢に至るまでの全身的な加齢の進行に伴った骨組織や代謝活性の減少過程に分かれることが認められた。

骨代謝に及ぼす修飾要因である性ホルモンの消失の影響を卵巣あるいは精巣摘出して検索した結果、骨代謝は

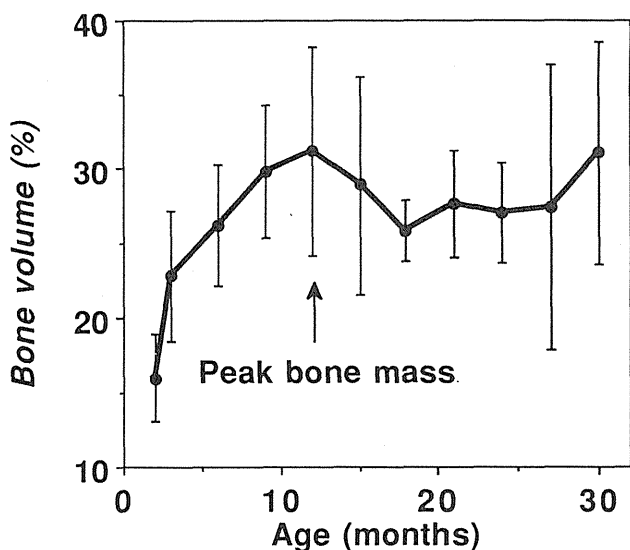


Fig.1 Age-related changes in bone volume in female Wistar-Mishima rats. There is the peak bone mass at the age of 12 months.

high turnover になり、骨量が減少したが、その減少速度は12カ月齢以降の方が3ヶ月齢よりも著しかった。すなわち、性ホルモンが消失すると若い年齢では骨成長や形成障害による骨の組織量や骨塩量の減少および脆弱化が起こり、成熟および老齢期では骨代謝の維持機能の消失、減少が全身的な加齢変化も加わって著しく起こることが示唆された。高血圧自然発症ラット（spontaneously hypertensive rat; SHR）および脳卒中易発症 SHR（stroke-prone SHR; SHRSP）の骨の形態および代謝の年齢変化を、正常血圧の Wistar Kyoto（WKY）および WM ラットと比較した結果、とりわけ SHRSP の骨代謝は Low turnover を示し、5 ヶ月齢以降から骨量の減少や脆弱化（骨粗鬆症化）が著しく進むことを初めて確認し、その原因が従来報告されている腎臓からのカルシウム多量排泄だけでなく、Vitamin D の低代謝、高血圧および腸管からのカルシウム吸収機能の低下にもあることを認めた。WM ラットにおける片側の後肢を体躯に固定して体重や運動の骨に対する負荷重による刺激を除いた結果、骨粗鬆症化がみられた。このような骨粗鬆症化に対して、水泳運動による骨刺激やカルシウム補給を行うと予防および回復効果が認められた。

2) 骨代謝の加齢性変化と Pu の初期沈着量の関係

(1) Pu 注射投与ラットの長期観察実験は現在も継続中であるが、これまでに得られた結果では、平均寿命は対照群では雄：687 ± 166 日（n = 201）、雌：806 ± 222 日（n = 248）であったが、0.37Bq×10⁵ Bq / kg 投与群では436 ± 65 日（n = 11）、0.925×10⁵ Bq / kg 投与群では498 ± 145 日（n = 26）、1.85×10⁵ Bq / kg 投与群では466 ± 147 日（n = 24）、3.7×10⁵ Bq / kg 投与群では345 ± 175 日（n = 6）であった。骨腫瘍の発生は後肢骨、腰椎に認められている。

(2) 3, 12, 24 カ月齢に硝酸 Pu を腹腔内投与した2週間後の雌雄ラットの骨、肝臓、脾臓、腎臓の1g当りのPu濃度は、骨量および骨表面積が最大になる12カ月齢で最

も高く、各臓器のPuの濃度は雌の方が雄よりも、また卵巣の方が精巣よりも高かった（Fig.2）。4週間後の各臓器濃度は、2週間後の結果と大きな差はみられなかった。

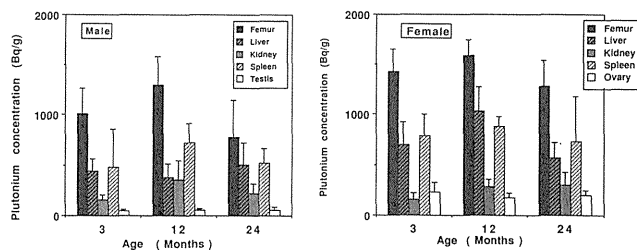


Fig.2 Plutonium contents in bone and other organs 2 weeks after X-ray irradiation and Pu injection on various ages of male and female rats.

(3) 2歳齢の雌ビーグル犬に投与した硝酸Puの4週間後までの糞尿排泄は、投与4日後までは急速に、続く9日までは緩徐になり、その後一定となった。糞と尿への排泄割合は投与1日後では尿>糞、2-15日後では糞>尿、16日以降は尿>糞であった。投与14日および28日後の糞尿中へ総排泄率はほとんど差がなく投与量の約18%で、体内に残った82%のうち約20%が肝臓に、その残りは骨やその他の臓器に沈着した。すなわち、Pu投与14日以降では体内からの排泄率は変化がみられないことを示した。各臓器のPu濃度（Bq/g）は、骨と肝臓が最も高く、続いて腎、脾、リンパ節、腸管、脾、血清の順に低かった。骨の各部分の濃度は、骨梁骨が最も高く、次に皮質骨、骨髓の順であった。骨梁骨への沈着を骨標識を用いて観察した結果、骨形成面への沈着が著しかった。2週間後と4週間後の濃度を比較すると、骨梁骨、肝臓、骨髓で増加がみられ、その他の臓器では減少傾向にあった（Table 1）。

Table 1 Plutonium contents in various organs 2 and 4 weeks after plutonium injection in beagle dogs

Organs	2 weeks after Pu injection	4 weeks after Pu injection
Liver	128.96±14.81 Bq/g	175.45±49.50 Bq/kg
Spleen	31.33±20.47	23.43±6.90
Kidney	37.97±15.73	24.94±3.86
Lung	8.74±2.57	6.45±2.87
Small intestine	5.39±0.92	2.76±0.36
Lymph node	18.84±4.37	15.49±5.35
Pancreas	4.63±2.25	2.15±0.24
Bone (Femur)		
Trabecular bone	159.00±45.00	301.00±93.00
Cortical bone	39.28±7.60	31.90±8.50
Bone marrow	14.13±4.30	16.36±10.81
Serum	2.17±0.42	0.88±0.36

3) X線による外部照射の骨代謝に及ぼす影響

骨の成長が最も激しい4週齢に1.25, 2.5, 5.0GyのX線を1回全身照射すると、照射線量の増加に対応して、増体重の減少、骨端軟骨の形成障害による骨長の短縮、骨形成量の減少、脆弱化の重度化が認められた。1.25-25.0Gyを後肢骨のみに照射した時にも同様な障害が線量の増加に応じて認められたが、同一の線量における障害の程度は全身照射よりも軽度であり、また同一個体の非照射側の骨では、ほとんど障害はみられなかった。1.25-25.0Gyを頸部のみに照射した時の後肢骨にも同様な骨障害がみられたが、その障害の程度は全身照射および後肢の局所照射に比べて軽度であった。すなわち、外部照射による骨障害は少なくとも1.25Gy以上で起こり、その障害の重度は同一線量では

全身照射が最も大きく、次に骨、頸部の順であった (Fig.3)。

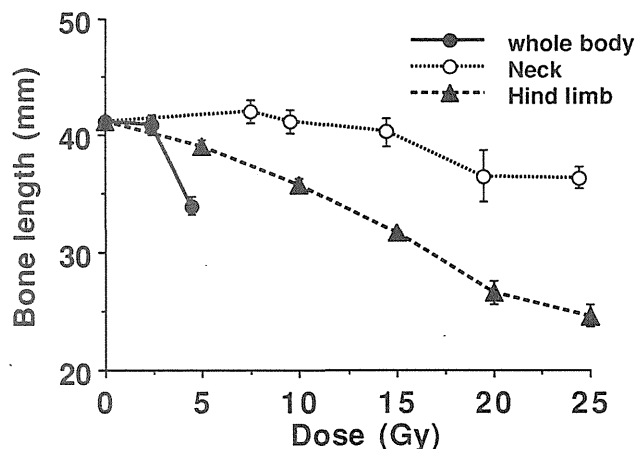


Fig.3 Longitudinal lengths of tibia 18 weeks after single irradiation to whole body, neck and hind limb at the age of 4 weeks in rats.

4) 外部照射と Pu の内部被曝の複合被曝

全身 (2.5, 5.0 Gy)、片側の後肢 (15 Gy)、頸部 (15Gy) に X 線を照射した直後および 7 日後に硝酸 Pu を投与して、それぞれ 7 日後の骨の Pu 濃度 (Bq / g) を測定した結果、照射直後に Pu を投与した場合の全身照射群では対照群に比べて変化はみられなかった。頸部照射では対照群に比べて Pu 濃度の減少が、後肢照射した骨では非照射側の骨および対照群に比べて減少がみられた。照射 7 日後の Pu 濃度は、全身照射では線量の増加に反して減少がみられた。局所照射では頸部、後肢の照射側と非照射側のいずれも対照群に比べていずれも同程度の減少を示した。(Fig.4)。

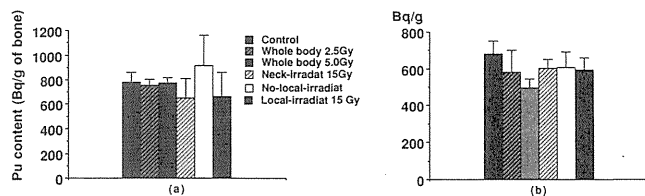


Fig.4 Plutonium contents in tibia 7 days (a) after x-ray irradiation and plutonium injection and (b) after plutonium injection 7 days post irradiation in rats.

5) 犬の気管一気管支の解剖および動態ならびに呼吸機能の解析

ビーグル犬の気管一気管支の分岐マップを作製した。その結果、気管支の分岐は気管分岐部から非対称分岐を繰り返しながら細くなり、気管終末に近い部分から対称分岐が増加した。気管の分岐回数も部位によって著しい差が認められた。呼吸運動による胸腔内における呼気時の位置から最大拡張時の尾部方向および腹側方向への移動距離は、それぞれ気管分岐部が 11.5, 13.5 mm, 後葉の終末に近い部分が 15.5, 19.0 mm, また呼気時に対する最大拡張時の気管支の断面積は気管分岐部では 1.31 倍, 後葉の終末に近い部分では 1.59 倍であった。すなわち、気管支が終末に向かって細くなるにつれて、伸縮率は大きくなり、呼気時に対する

最大拡張期の増加割合は 50 % 以下であった。

呼吸曲線から分析した呼吸運動の特徴として、各呼吸間には長い静止期がある、吸気より呼気の時間の方が長い、最大流速は吸気より呼気時の方が大きい、呼吸数や一回換気量は年齢により異なるが分時換気量は一定であることが認められた。このような、呼吸の特徴は腹臥位および横臥位では一定であるが、背臥位では変化した。

6) 犬およびラットの病理学的な検索

犬における悪性腫瘍の発生は 8-12 歳で高く、乳腺、肺、腎、脾、消化管 (胃、小腸) の腫瘍、リンパ腫、血管肉腫などが観察されたが、骨腫瘍はみられていない。悪性腫瘍を発生しなかった個体の寿命はおおよそ 15 歳であった。詳細な病理学的な検索は検討中である。ラットでは、乳腺、肺、骨に腫瘍が認められた。

4. 考察

ラットの骨量、骨強度、ミネラル含有量が雌雄ともに成長に伴って増加して 12 カ月齢にピークを示す様相は、人の骨量あるいは骨塩量のピークが 30-40 歳代にみられる様相と一致しており、骨形態や代謝を基準に比較するとラットの 12 カ月齢と人の 30-40 歳代が年齢対応し、それぞれの年齢とこれまでに検索した犬の 2-4 歳代が対応していることが認められた。この成果は異なる年齢のラットに硝酸 Pu を投与した結果において骨の最大沈着量が 12 カ月齢に認められたのと一致した。すなわち、人が Pu を摂取した場合、骨における Pu の初期沈着量はいわゆる骨梁骨の表面積や量、骨塩量が最大になる middle age が最も多いことを示唆した。骨内における Pu 沈着量は、犬の骨の検索から海綿骨が皮質や骨髄に比べてはるかに多く、骨梁骨の石灰化面に集中することが確認された。さらに、ラットにおいて観察された骨以外の肝臓、脾臓、腎臓への Pu の沈着量が 12 カ月齢で最も多かった結果は、これらの臓器においても加齢に伴って Pu の沈着量が増加するような新陳代謝速度や含有成分の変化が起こっていると推定された。本結果とビーグルの juvenile、young adult、adult の各年齢に硝酸 Pu を投与すると、young adult や adult の方が juvenile よりも寿命が短い研究報告と合わせると、Pu 摂取による内部被曝の影響評価では幼若期の方が細胞の放射線感受性が高いために骨肉腫や重要な障害が発生すると説明されているが、Pu の臓器沈着量の年齢による相違および沈着後の挙動も、重要な要因であることが示唆された。

Pu を注射投与したラットの長期観察実験において得られた結果からは、対照群の平均寿命に比べて、Pu 投与群では投与量が増加するにしたがって短くなり、多くの例で消瘦が顕著である。ラットの骨腫瘍発生率に関しては人やビーグル犬に比べて低いとの報告があるが、この点については本実験で得られたラットの骨代謝と犬あるいは人との詳細な比較、あるいは平均寿命の短縮や骨以外の臓器にみられる障害を含めて、臓器中の Pu 濃度と病理組織検索を進めながら現在観察中の動物の最終的な検査結果が得られた時点でまとめた。

外部被曝を全身に受けた場合の骨代謝の影響が骨へ直接被曝を受けた場合よりも重度であった結果は、骨代謝に関連した臓器だけでなくその他の全身の臓器の機能障害の影響が加わったためと推察された。とりわけ、骨およびカル

シウム代謝調節ホルモンである Parathyroid hormone を分泌する副甲状腺および calcitonin を分泌する甲状腺のある頸部の局所照射によって、全身の骨代謝障害が生じることは、チェルノブイリ事故において問題とされる甲状腺がんの発生だけでなく、外部被曝や甲状腺に沈着した放射性ヨードによる副甲状腺や甲状腺の被曝による副甲状腺ホルモンやカルシトニン分泌の機能低下、および治療処置として副甲状腺を含めた甲状腺摘出に起因したこれらのホルモンの消失は、骨の発育障害や形成障害を起こす可能性が十分にあることを示唆している。

本実験において全身被曝と同時に Pu を摂取した場合には骨への Pu 沈着量は非被曝群と変わらないが外部被曝 7 日後に Pu を摂取すると減少した結果は、上述した外部被曝の骨代謝への影響が遅れて現れたことを示した。後肢骨や頸部へ外部被曝を受けた場合には直後から骨の Pu 沈着濃度が減少した結果は、全身照射よりも照射線量が大きいため早期に重度な障害が発現したためであるが、少なくとも 1.25Gy 以上の局所照射を受けると全身照射群と同様な骨障害が認められることから、骨への Pu 沈着量は減少すると推定された。しかし、外部被曝と Pu 摂取を同時に受けた場合の骨への Pu 沈着量の減少は総合的な放射線障害の発生の軽減を示すものではない。したがって、放射線事故における外部被曝と内部被曝の複合被曝の影響に関する研究が今後も必要と考えられた。

Pu の内部被曝の評価を行う場合、年齢によって臓器の沈着量に著しい相違が認められ、とくに骨に注目すれば成長期、成熟期、老年期の影響は、骨代謝を修飾する性ホルモン、運動、高血圧、腸管のカルシウム吸収機能などによって大きな影響を受けることが示唆される一方、障害リスクの軽減にもこれらの修飾要因の関与が重要であると判断された。

ビーグル犬の気管一気管支の解剖学特徴や動態および呼吸の波形や運動生理学的な検討によって得られた結果は、犬への酸化 Pu の吸入実験の条件設定だけでなく、Pu 吸入量の算定、吸器系への吸入粒子状物質の沈着分布やその後の挙動の評価に有用であった。とくに、放射性物質の吸入被曝に用いられている人工モデルにおける呼吸の波形は連続運動する台形波や正弦波であったが、実験によって実測したこれらとは異なる波形や呼吸運動の成果は、シミュレートによるより精度の高い評価を得るために重要な成果であった。

ビーグル犬やラットに関する腫瘍に注目した病理学的な検索や種々の臓器や血液成分などに関する加齢性変化などの基礎研究の成果は、本研究において実施している Pu の代謝や影響実験の結果およびこれまでに外国で発表された研究論文の内容を評価するために有用であると判断された。

5. 結論

本研究の結果から、人における骨や肝臓などの主要臓器の Pu の沈着量は若年および老年に比べて、骨量や骨塩量がピークとなる中年期（30-40 歳代）に、また男性よりも女性の方が多いことが認められた。骨では骨梁骨への沈着が最も多く、時間の経過につれてさらに骨梁骨の骨形成面に集まること、外部被曝を同時に受けた場合には全身被曝あるいは骨への局所被曝だけでなく、骨代謝やカルシウム代謝ホルモンの調節臓器である副甲状腺や甲状腺被曝の影

響が重要であること、Pu 摂取に伴う影響は寿命の短縮だけでなく、骨代謝を大きく修飾する年齢、性別、生活様式などの種々の要因を、人における Pu の障害リスクを評価する場合に考慮しなければならないことが示唆された。

〔研究発表〕

- 1) Fukuda, S., Kawashima, N., Iida, H., Aoki, J. and Tokita, K.: Age dependency of hematological values and concentrations of serum biochemical constituents in normal beagle from 1 to 14 years of age. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 51, 636-641, 1989.
- 2) Fukuda, S.: Circadian rhythm of serum testosterone levels in male beagle dogs. -Effects of lighting zone-. *Exp. Anim.*, 39, 65-68, 1990.
- 3) 飯田治三、福田俊、川島直行、山崎友吉、青木純二、鳩田和実、森岡一憲、宝田奈美、添田照子：ビーグル仔犬の犬パルボウイルス、犬ジステンパーウイルスおよび犬伝染性肝炎ウイルスに対する移行抗体価の推移とワクチン摂取に対する応答について、*実験動物*、39, 9-19, 1990.
- 4) Fukuda, S. and Iida, H. : Effects of swimming in ovariectomized rats. *Bone Morphometry*. 157-160. Nishimura, Smith-Gordon, 1990.
- 5) 福田 俊、飯田治三：ビーグル犬の成長に伴う骨代謝の変化、骨の代謝と形態。86-91, 西村書店、1990.
- 6) 家森幸男、堀江良一、奈良安雄、池田克巳、福田 俊、飯田治三、土倉 覚、織間博光：骨粗鬆症自然発症ラットの確立とそれを用いた微小重力による骨量減少メカニズムおよび予防法に関する提案。第 7 回宇宙利用シンポジウムプロシーディング。286-290, 1990.
- 7) Fukuda, S. and Iida, H.: Preventive effects of swimming on the reduction of bone mass in ovariectomized rats. *JBMM*, 8, 61-62, 1990.
- 8) 百武衆一、後藤澄雄、山県正庸、神山知典、小林康正、福田 俊：運動負荷に対する骨変化に関する研究、*日整会誌*、7, 65, 1991.
- 9) Yamori, Y., Fukuda, S., Tsuchikura, S., Ikeda, K., Nara, Y. and Horie, R.: Stroke-prone SHR(SHRSP) as a model for osteoporosis. *Clinical and Experimental Hypertension*, 13, 755-762, 1991.
- 10) Fukuda, S., Iida, H., Miyamoto, T., Tanabe, M. and Takahashi, H. : Quantitative analysis of radiation damage in growth cartilage of rat using histomorphometric measurements. *Radiation Research*, Vol.1, 163, 1991.
- 11) 福田 俊、飯田治三：加齢に伴う雌雄ラットの骨代謝と卵巣、精巣摘出年齢による影響の差、*日骨形態誌*、1, 89-94, 1991.
- 12) Fukuda, S., Tsuchikura, S., Ikeda, K., Nara, Y., Horie, R. and Yamori, Y.: Bone metabolism of SHRSP and its characteristics as a model for spontaneous osteoporosis. *Jpn. Heart J.* 32, 586, 1991.
- 13) Tsuchikura, S., Fukuda, S., Nara, Y., Ikeda, K. and Yamori, Y.: Effect of dietary NaCl and calcium balance on bone mass in SHRSP as a

- model for spontaneous osteoporosis. Jpn. Heart J., 32, 606, 1991.
- 14) Fukuda, S. and Iida, H.: Comparison of histomorphometric values in iliac trabecular bone of beagle dogs raised different breeding system. Exp. Anim., 41, 131-137, 1992.
 - 15) Fukuda, S., Tsuchikura, S., Iida, H., Ikeda, K., Nara, Y. and Yamori, Y.: Further study on osteoporosis in SHRSP: Quantitative analyses by bone histomorphometry and serum biochemical constituents related to bone. Genetic Hypertension. 218, 421-423, 1992.
 - 16) Tsuchikura, S., Fukuda, S., Iida, H., Ikeda, K., Nara, Y. and Yamori, Y.: Effects of antihypertensive agents on osteoporosis in SHRSP. Genetic Hypertension. 218, 417-419, 1992.
 - 17) 福田 俊、土倉 覚、飯田治三、池田克巳、奈良安雄、堀江良一、家森幸男：脳卒中易発症高血圧自然発症ラットにおける加齢に伴う骨梁骨の形態変化、日骨形態誌、2, 93-98, 1992.
 - 18) 福田 俊、飯田治三：ビーグル犬における体重負荷が異なる部位の骨形態計測値の比較、日骨形態誌、2, 227-231, 1992.
 - 19) 飯田治三、福田 俊：ラットの加齢に伴う骨重量および含有成分量の変化、実験動物、42, 349-356, 1992.
 - 20) Fukuda, S. and Iida, H.: Histomorphometric changes in iliac trabecular bone during pregnancy and lactation in beagle dogs. J. Vet. Med. Sci, 55, 565-569, 1993.
 - 21) 福田 俊：実験動物における形態計測法とその応用—ラットおよびイヌの骨代謝の年齢変化を中心に—。骨代謝学会誌、11, 194-198, 1992.
 - 22) 福田 俊、飯田治三：第105回日本獣医学会、東京、1988, 4.
 - 23) 福田 俊、山田裕司、飯田治三ら：日本保健物理学会第23回研究発表会、千葉、1998, 5.
 - 24) 倉橋英治、松下裕二、福田 俊ら：日本実験動物技術者協会第22回総会、東京、1988, 7.
 - 25) 永島 博、森岡一憲、福田 俊ら：日本実験動物技術者協会第22回総会、東京、1988, 7.
 - 26) 宝田奈美、斎藤紀子、福田 俊ら：日本実験動物技術者協会第22回総会、東京、1988, 7.
 - 27) Fukuda, S. and Iida, H.: The Fifth International Congress on Bone Morphometry. Niigata, 1988, 7.
 - 28) Haba, T., Takahashi, H. and Fukuda, S.: The Fifth International Congress on Bone Morphometry. Niigata, 1988, 7.
 - 29) 福田 俊、飯田治三：第107回日本獣医学会、東京、1989, 4.
 - 30) Yamori, Y., Fukuda, S., Tsuchikura, S., et al.: Sixth International Symposium on SHR and Related Studies. Michigan. 1989, 5.
 - 31) 福田 俊、澤地邦宏、永島 博ら：日本保健理学会第23回研究発表会、名古屋、1989, 5.
 - 32) 福田 俊、山田裕司、小泉 彰ら：日本保健理学会第23回研究発表会、名古屋、1989, 5.
 - 33) 飯田治三、福田 俊：日本実験動物技術者協会第23回総会、鹿児島、1989, 7.
 - 34) 福田 俊、飯田治三：第7回日本骨代謝学会、東京、1989, 7.
 - 35) 土倉 覚、福田 俊、池田克巳ら：第25回高血圧自然発症ラット学会総会、東京、1989, 9.
 - 36) 福田 俊、飯田治三：第5回日本獣医畜産大学学会、東京、1989, 11.
 - 37) 福田 俊、土倉 覚、池田克巳ら：第9回骨粗鬆症研究会、静岡、1989, 11.
 - 38) 福田 俊、飯田治三：第109回日本獣医学会、東京、1990, 4.
 - 39) 福田 俊、家森幸男：第44回日本栄養食糧学会、仙台、1990, 5.
 - 40) 福田 俊、飯田治三：第10回日本骨形態計測学会、大阪、1990, 6.
 - 41) 福田 俊、土倉 覚、池田克巳ら：第8回日本骨代謝学会、東京、1990, 7.
 - 42) 福田 俊、土倉 覚、池田克巳ら：第6回ビタミンDワークショップ、横浜、1990, 9.
 - 43) 福田 俊、土倉 覚、池田克巳ら：第26回高血圧自然発症ラット学会総会、大阪、1990, 9.
 - 44) 土倉 覚、福田 俊、池田克巳ら：第26回高血圧自然発症ラット学会総会、大阪、1990, 9.
 - 45) 福田 俊、飯田治三、山田裕司ら：第33回日本放射線影響学会、仙台、1990, 10.
 - 46) 福田 俊、飯田治三、宮本忠昭ら：第33回日本放射線影響学会、仙台、1990, 10.
 - 47) 福田 俊、飯田治三：第10回骨粗鬆症研究会、浜松、1990, 11.
 - 48) 飯田治三、福田 俊：日本実験動物技術者協会第24回総会、東京、1991, 2.
 - 49) 土倉 覚、福田 俊、池田克巳ら：第80回日本病理学会総会、大阪、1991, 4.
 - 50) 福田 俊、飯田治三：日本保健物理学会第26回研究発表会、大阪、1991, 5.
 - 51) 福田 俊、飯田治三、山田裕司ら：日本保健物理学会第26回研究発表会、大阪、1991, 5.
 - 52) 福田 俊、飯田治三、土倉 覚ら：第11回日本骨形態計測学会、つくば、1991, 6.
 - 53) 土倉 覚、福田 俊、飯田治三ら：第27回高血圧自然発症ラット学会総会、札幌、1991, 6.
 - 54) Fukuda, S., Iida, H., Miyamoto, M., et al.: Ninth ICRR, Tronto, 1991, 7.
 - 55) Fukuda, S., Tsuchikura, S., Iida, H., et al: Seventh International Symposium on SHR and Related Studies. Lyon, 1991, 10.
 - 56) Tsuchikura, S., Fukuda, S., Iida, H., et al: Seventh International Symposium on SHR and Related Studies. Lyon, 1991, 10.
 - 57) Fukuda, S.: International Conference on Osteoporosis. Kobe, 1991, 11.
 - 58) Fukuda, S., Tsuchikura, S., Iida, H., et al.: International Conference on Osteoporosis. Kobe, 1991, 11.
 - 59) Fukuda, S. and Iida, H.: International Conference

- on Osteoporosis. Kobe, 1991, 11.
- 60) 福田 俊、飯田治三：第 113 回日本獣医学会、東京、1992, 4.
 - 61) Hori, M., Fukuda, S., Uzawa, T., et al.: ICCRH, Italy, 1992, 4.
 - 62) 飯田治三、福田 俊：第 39 回日本実験動物学会、東京、1992, 5.
 - 63) 福田 俊、飯田治三：日本保健物理学会第 27 回研究発表会、秋田、1992, 5.
 - 64) 福田 俊、飯田治三：第 12 回日本骨形態計測学会、京都、1992, 7.
 - 65) 福田 俊：第 10 回日本骨代謝学会、東京、1992, 7.
 - 66) 福田 俊、飯田治三：第 10 回日本骨代謝学会、東京、1992, 7.
 - 67) 福田 俊、飯田治三：第 1 回日本骨粗鬆症研究会、大阪、1992, 10.

3. 内部被曝リスクの低減化に関する研究

① キレート剤による生体除染とリスク低減に関する研究

佐藤宏、福田俊、飯田治三、稲葉次郎（内部被ばく研究部）

Studies of the Removal of Plutonium and the Reduction of Biological Effects by Chelating Agents

Hiroshi Sato, Satoshi Fukuda, Haruzou Iida and Jiro Inaba
Division of Comparative Radiotoxicology

(A) 肺胞マクロファージからの ^{59}Fe および ^{239}Pu 放出
に対する高分子キレート剤の効果

Effect of Macromolecular Chelating Agents on the Release of ^{239}Pu and ^{59}Fe from Rat Alveolar Macrophages

The effect of macromolecular chelating agents (MCAs) on the release of ^{59}Fe from rat alveolar macrophages (AMs) ingested ^{59}Fe -iron hydroxide colloid was studied. Six MCAs were tested. Each MCA and Ca-DTPA were added into the culture medium at the concentration which is not toxic for AMs. The activity of ^{59}Fe released into culture medium was determined 8 hr after the addition of MCA or Ca-DTPA. The most increase of ^{59}Fe release was shown by Si-DTPA. It was about 15 times of Ca-DTPA. Amyl-DTPA is effective more than 10 times of Ca-DTPA. The intensive effect was also shown by AEC- and O-AEC-DTPA. The extracellular release of ^{239}Pu and ^{59}Fe from AMs after ingestion of ^{239}Pu - ^{59}Fe -hydroxide colloid is determined by the degree of aggregation of colloids. It is assumed that the dissolution of and redistribution of ^{239}Pu and ^{59}Fe from the lung after instillation of hydroxide colloid of these radionuclides are affected by the degree of their aggregation. The efficacy of chelating agents differed between Fe and Pu, suggesting a significant difference in the dissolution of the colloids and subsequent metabolism of these radionuclides in AMs. Except for Si-DTPA, the chelating agents at removing intracellular ^{59}Fe also showed a significant effectiveness for ^{239}Pu . On the release of ^{239}Pu from AMs ingested ^{239}Pu hydroxide, the effect of chelating agents was tested in AMs obtained 24, 72 and 144 or 168 hr after the instillation of Pu. Ca-DTPA was the most effective in each experiment.

1. 緒言

吸入された Pu 粒子は気道内に沈着するが、肺深部に達した粒子は肺胞に存在するマクロファージ（alveolar macrophage、AM）の貪食により細胞内に取り込まれる。これらの粒子は lysosome により消化、可溶化されたものは血液中へ移行し全身へ分布する。しかし、未消化のものは細胞内に残留する。生体内へ取り込まれた Pu の除去にはキレート剤の投与が考えられているが、すでに臨床に応用された Ca-DTPA は水溶性であるために細胞内の Pu には効果がないかまたは弱い。この点を改良して効力増強するために、疎水基を結合させて膜透過性を良くする方法や、liposome として投与する方法、また、AM を活性化する物質との併用等、種々の方法が報告されている。本研究ではその1つとして英国 NRPB の Dr. Bulman との共同で AM に貪食されうる物質に DTPA を結合させた高分子 DTPA について ^{59}Fe -水酸化コロイド、 ^{239}Pu - ^{59}Fe -水酸化鉄コロイド、水酸化 Pu の3種類の粒子を使用して Ca-DTPA との効力比較を検討した。

2. 実験方法

a. キレート剤

高分子 DTPA は aminoethylcellulose-DTPA (AEC-DTPA)、AEC-DTPA oxidized with periodic acid (O-AEC-DTPA)、amino-propyl silica-DTPA (Si-DTPA)、dextran hexylamio-DTPA (Dx-DTPA)、amylose-NH. PEG.NH-DTPA (amyl-DTPA)、alginic trien-DTPA (alg-DTPA)、polyvinyl alcohol-DTPA (PVA-DTPA)、polyethylene glycol-DTPA (PEG-DTPA) の8種、さらに高分子 DTPA の効果比較の対照として Ca-DTPA を使用した。濃度は、Si-DTPA 0.12mg/ml、PVA-DTPA 3.9、PEG-DTPA 13、Ca-DTPA 1.8、他はすべて 1.2mg/ml とした。

b. ^{59}Fe -水酸化鉄コロイド溶液（Fe-コロイド）の調製

Priest らの方法に若干の変更を加え以下の通り調製し

た。⁵⁹Fe-塩化鉄（NEN製）の0.5M塩酸溶液に2%（W/V）塩化鉄水溶液0.5mlを加えた後、沸騰水浴中で加温しながら蒸留水を加えて水酸化鉄コロイドを生成させた。冷却後、2%（W/V）デキストランでコロイドを安定化させて蒸留水に対する透析を行って鉄イオンを除去した。グルコースを添加して等張とし、投与液とした。

c. ²³⁹Pu-⁵⁹Fe-水酸化鉄コロイド溶液（PuFe-コロイド）の調製

⁵⁹Fe-水酸化鉄コロイドの調製法とほぼ同様にして調製した。硝酸Pu（11kBq）および⁵⁹Fe-塩化鉄（348kBq）を含む溶液に塩化鉄溶液を加え、加温しながら蒸留水3mlを加えて生成させたコロイドに、安定化剤としてデキストランを加え、グルコースにより等張とした。

d. 水酸化Pu溶液の調製

硝酸Puの8NHNO₃溶液（54MBq/ml）を0.1NHNO₃溶液に希釈しNaOH溶液でpH7.4に調製して水酸化Puを生成させた。ゼラチンで安定化しグルコースで等張とした。凝集度の違うコロイドを調製し、コロイド1およびコロイド2とした。

e. AMの回収

ウィスター系雌性ラット（3～5か月齢）にハロセン麻酔下でFe-コロイド、PuFe-コロイド、水酸化Puを気管内挿管法により肺へ投与し、24時間後、水酸化Puについてはさらに72、144時間後に肺洗浄を行いAMを回収した。

f. ²³⁹Pu、⁵⁹Fe放出率の算定

回収したAMをイーグルのMEM（EMEM）無血清培地で洗浄して細胞表面に吸着した²³⁹Pu、⁵⁹Feを除去した後10%牛胎児血清を含むEMEM培地に懸濁し96穴マイクロプレートに5X10⁴/0.2ml/穴の割合でまいた。5%CO₂気相下37℃でインキュベーションした。Fe-コロイドの場合は8時間、PuFe-コロイド、水酸化Puの場合は3時間後に0.22μmφのフィルター付き遠心チューブ（ウルトラフリーC3）を使用して遠沈し培養液上清を得た。上清中の²³⁹Puの放射能は液体シンチレーションカウンター（1219RACKBETA）、⁵⁹Feはオートウェルγ-カウンター（Gamma 5500）でそれぞれ計測した。一方細胞は0.2%SDS溶液で溶解し、同様に放射能を計測し、以下の式より放出率を算定した。

$$\text{放出率 (\%)} = \frac{\text{培養液上清中の放射能}}{\text{プレートの各穴に含まれる総放射能}} \times 100$$

3. 結果

a. 細胞毒性

キレート剤の濃度はAMに対する細胞毒性を色素排除法により検討した。表1に示したようにCa-DTPA 1.8mg/ml、AEC-DTPA、O-AEC-DTPA、Dx-DTPA、alg-DTPA、amyl-DTPAはそれぞれ1.2～1.3mg/ml、PVA-DTPA 3.9mg/ml、PEGDTPA 13mg/ml、Si-DTPA 0.12mg/mlいずれにおいても生残率は81～96%で、細胞に対する毒性はほとんど見られなかった。

b. Fe-コロイドを取り込んだAMからのFe放出

表2に示したようにFe-コロイドを取り込んだAMから8時間の培養で2.95%の⁵⁹Feが放出された。Ca-DTPA1.8mg/ml存在下では3.6%の放出が見られ続

表1 AM生残率に対するキレート剤の影響

キレート剤	生残率(%)
対 照	91.9±3.3
Ca-DTPA	93.3±0.8
AEC-DTPA	86.5±1.3
O-AEC-DTPA	87.5±2.2
Si-DTPA	93.3±0.8
Dx-DTPA	96.0±1.2
amyl-DTPA	81.3±3.5
PVA-DTPA	86.3±3.1
PEG-DTPA	90.9±3.4

計的に有意差はなかったが、約20%の放出増加傾向がみられた。これに対し高分子キレート剤を添加した群でCa-DTPA以上の効果が認められた。AEC-DTPA、O-AEC-DTPAではそれぞれ対照の6.5、5.3倍に放出率が増加し、alg-DTPA存在下では10.3倍、Si-DTPAでは約15倍の放出促進が認められた。これらの効果はCa-DTPAと比較しても4～12倍に相当する。Dx-DTPA、alg-DTPAについては放出促進はみられなかった。

表2 Fe-コロイドを取り込んだAMからの⁵⁹Fe放出に対するキレート剤の効果

キレート剤	放出率(%)
対 照	2.95±0.52 (100)
Ca-DTPA	3.60±0.05 (122)
AEC-DTPA	19.2 ±0.23* (651)
O-AEC-DTPA	15.7 ±1.4* (532)
Si-DTPA	43.6 ±2.4* (1478)
Dx-DTPA	2.16±0.68 (73)
amyl-DTPA	30.3 ±0.44* (1027)
alg-DTPA	2.21±0.41 (75)

()対照を100とした場合の値. * P<0.005

c. PuFe-コロイドを取り込んだAMからのPu、Fe放出

1) コロイド1とコロイド2の違い：コロイド1とコロイド2の投与液中の10kDa以下の割合を見ると、コロイド1が47%に対しコロイド2が3.3%でコロイド2の凝集度が高いのは明らかであり、コロイド2を投与したラットの肺洗浄液中の細胞画分に含まれる²³⁹Puの割合はコロイド1の2.1倍高く、細胞画分と洗浄液上清画分に含まれる²³⁹Puの割合はコロイド1の2.1倍高く、細胞画分と洗浄液上清への分布の比率では6.2倍で凝集度の高いコロイドがAMに取り込まれやすい（表3）。

表3 PuFe- コロイドを投与したラット肺洗浄液中のPu 分布

	投与液に含まれる 10kDa以下の割合	肺洗浄液		
		細胞画分	上清	細胞画分/上清
コロイド1	47.2	3.4	16.0	0.21
コロイド2	3.3	7.3	5.7	1.3

数値は投与したPu量に対する割合を百分率で表した。

2) コロイド1に対する効果：結果は表4にまとめた。コロイド1を取り込んだAMからの²³⁹Puおよび⁵⁹Feの培養3時間の放出率は対照ではそれぞれ1.15、1.13%で同程度であった。しかし、キレート剤の効力には大きな違いが見られた。Si-DTPA以外のキレート剤について、いずれも²³⁹Puと⁵⁹Feの放出率を比較するとCa-DTPAで²³⁹Puの方が4.1倍高い放出促進を示し、高分子キレート剤で1.7-3.8倍高い効果を示した。²³⁹Puについて見るとCa-DTPA、O-AEC-DTPA、PVA-DTPAでそれぞれ11.3、11.7、28.3%でPVA-DTPAはCa-DTPAより高い放出促進を示し、O-AEC-DTPAでCa-DTPAと同程度の効果が認められた。他のキレート剤も対照の4倍以上の促進効果を示した。⁵⁹FeではPEG-DTPAの1.5倍からPVA-DTPAの13倍までの範囲で放出促進がみられた。一方、Si-DTPAは⁵⁹Feの放出に対してのみ効果がみられた。

表4 PuFe- コロイドを取り込んだAMからの²³⁹Pu、⁵⁹Fe放出に対するキレート剤の効果（コロイド1）

キレート剤	²³⁹ Pu放出率(%)	⁵⁹ Fe放出率(%)
対 照	1.15±0.62 (100)	1.13±0.26 (100)
Ca-DTPA	11.3 ±0.71** (983)	2.68±0.18** (237)
AEC-DTPA	4.54±0.41** (395)	2.59±0.37* (229)
O-AEC-DTPA	11.7 ±1.0** (1017)	5.07±0.24** (449)
Si-DTPA	1.17±0.41 (102)	4.29±0.37** (380)
PVA-DTPA	28.3 ±0.35** (2457)	14.9 ±0.72** (1319)
PEG-DTPA	6.97±1.0** (606)	1.78±0.16 (158)

()対照を100とした場合の値。* P<0.01, ** P<0.005

表5 PuFe- コロイドを取り込んだAMからの²³⁹Pu、⁵⁹Fe放出に対するキレート剤の効果（コロイド2）

キレート剤	²³⁹ Pu放出率(%)	⁵⁹ Fe放出率(%)
対 照	0.24±0.07 (100)	0.03±0.02 (100)
Ca-DTPA	0.44±0.05* (183)	0.09±0.02* (300)
AEC-DTPA	0.24±0.03 (100)	0.09±0.01* (300)
O-AEC-DTPA	0.52±0.03** (217)	0.20±0.04** (667)
Si-DTPA	0.16±0.01 (67)	0.07±0.01 (233)
PVA-DTPA	3.66±0.50** (1525)	0.42±0.02** (1400)
PEG-DTPA	0.36±0.04 (150)	0.03±0.01 (100)

()対照を100とした場合の値。* P<0.01, ** P<0.005

3) コロイド2に対する効果：表5に示したように凝集度の高いコロイド2の場合は、コロイド1の場合と比較して大きく異なった点は対照の²³⁹Pu放出が⁵⁹Feより高かったこと、キレート剤による放出促進が⁵⁹Feの方が大きかったことである。すなわち、²³⁹Puに対する放出促進はCa-DTPA、O-AEC-DTPAがそれぞれ対照の1.8、2.2倍であったのに比較して⁵⁹Feでは3.0、6.7倍であっ

た。Si-DTPAは⁵⁹Feに対してのみ効果がありPVA-DTPAでは²³⁹Puと⁵⁹Feに対して同程度の効果を示した。

d. 水酸化Puを取り込んだAMからの²³⁹Pu放出

1) 凝集度の低い水酸化Puに対する効果：水酸化Puを投与して24、72、144時間後に回収したAM(AM24、AM72、AM144)の3時間培養で放出される²³⁹Puは対照でそれぞれ1.2、2.9、5.6%で、Pu投与後の時間経過にともない増加した(表6)。AM24ではCa-DTPAで4.2%に放出が増加し、試験した高分子キレート剤全てが有意な放出促進を示し、放出率は1.6-3.6%であった。AM72の場合はSi-DTPA以外の放出率は3.6-7.1%の範囲で放出促進効果が見られ、AM144ではAEC-DTPA、Si-DTPAを除きいずれも効果が認められた。放出率は7.7-13%であった。AM24、AM72、AM144いずれもCa-DTPAが最も効果が強かった。

表6 凝集度の低い水酸化Puを取り込んだAMからのPu放出に対するキレート剤の効果

キレート剤	Pu投与後の時間		
	24時間	72時間	144時間
対 照	1.22±0.06 (100)	2.87±0.14 (100)	5.56±0.34 (100)
Ca-DTPA	4.16±0.10** (341)	7.13±0.30** (248)	13.2 ±0.40** (237)
AEC-DTPA	1.60±0.16* (131)	3.58±0.12* (125)	5.73±0.25 (103)
O-AEC-DTPA	3.39±0.13** (278)	4.09±0.05** (143)	8.52±0.13** (153)
Si-DTPA	1.56±0.07* (128)	2.53±0.07 (88)	5.70±0.32 (103)
Dx-DTPA	3.21±0.22** (263)	5.48±0.61** (191)	13.0 ±1.51** (234)
alg-DTPA	2.58±0.15** (211)	4.69±0.60** (163)	8.95±0.51** (161)
amyl-DTPA	3.59±0.10** (294)	4.83±0.12** (168)	7.74±0.45* (139)

()対照を100とした場合の値。\$ P<0.05, # P<0.025, * P<0.01, ** P<0.005

2) 凝集度の高い水酸化Puに対する効果：AM24、AM72、AM144の放出率は対照でそれぞれ0.31、1.2、1.6%で凝集度の高い水酸化PuでもPu投与後の時間経過にともない増加した(表7)。amyl-DTPAが最も効果が高く、ついでO-AEC-DTPA、次に効果の高かったのは、Si-DTPAであった。

表7 凝集度の低い水酸化Puを取り込んだAMからのPu放出に対するキレート剤の効果

キレート剤	Pu投与後の時間		
	24時間	72時間	168時間
対 照	0.31±0.04 (100)	1.22±0.07 (100)	1.64±0.09 (100)
Ca-DTPA	0.53±0.02* (171)	1.65±0.01* (136)	2.36±0.17** (144)
AEC-DTPA	0.45±0.05 (146)	1.84±0.11** (151)	1.58±0.06 (96)
O-AEC-DTPA	0.65±0.01** (208)	2.29±0.09** (188)	2.36±0.09** (144)
Si-DTPA	0.59±0.09* (191)	1.75±0.09** (144)	2.46±0.14 (150)
Dx-DTPA	0.60±0.06* (195)	1.59±0.18 (131)	1.61±0.11 (98)
alg-DTPA	0.55±0.05* (177)	1.37±0.06 (112)	1.49±0.05 (90)
amyl-DTPA	0.83±0.07** (268)	2.43±0.03** (199)	3.20±0.25** (195)

()対照を100とした場合の値。# P<0.025, * P<0.01, ** P<0.005.

4. 考察

Fe-コロイドが取り込んだAMをキレート剤存在下で8時間培養するとAEC-DTPA、O-AEC-DTPA、Si-DTPA、amyl-DTPAで高い放出率が認められたが、いずれもAMの生存率は81~93%で毒性は認められない濃度であり細胞死による放出ではなく、膜を介した放出が促進された結果と推測される。使用した高分子キレート剤には、Si-DTPA、amyl-DTPA、O-AEC-DTPA、AEC-DTPAでそれぞれ0.13、25、30、124μg/mlの

DTPA が含まれ、Si-DTPA が他の 3 種と比較して 1 / 200 以下であること、また、Si-DTPA のみは不溶性で粒子として存在していること等から他のキレート剤とは作用機序が異なることが推測される。Si-DTPA では Si により AM が活性化されることにより細胞内での可溶化が促進されたために、他に比べ促進効果が高くあらわれたものと考えられる。

次に PuFe-コロイドの場合の Pu と Fe に対する効力の違いについて。コロイド 1 とコロイド 2 それぞれの粒子径は測定していないが、コロイド 1 が水溶液中で長時間安定であるのに対しコロイド 2 は 2、3 時間内に一部が沈降してくる。これからみても粒子径の違いは明らかであり、コロイド 2 は正確にはコロイドとは言えないがここではコロイド 2 としてコロイド 1 と区別した。肺洗浄液において細胞画分に存在する Pu の洗浄液上清中の Pu に対する比率がコロイド 2 で約 6 倍高いことから、コロイド 2 が AM に取り込まれやすいことを示している。(表 3) また、3 時間培養で培養液中に放出される Pu の割合はコロイド 1 が約 5 倍高く、コロイド 1 が可溶化されやすいことを示唆している。Fe ではさらに違いが大きくコロイド 2 ではコロイド 1 に比して著しく可溶化されにくい。Pu と Fe の違いの原因は不明であるが、Fe が必須元素であることのほかに PuFe-コロイドにはキャリアーとして Fe の安定同位体が多く含まれていることが考えられる。キレート剤の効力の点からみて大きな違いは、Pu について Si-DTPA 以外のキレート剤でコロイド 1 が 395 ~ 2457 %、コロイド 2 が 100 ~ 1525 % と、凝集度が高いと効果が弱くなること、Fe では Pu と異なり凝集度の違いは効果にあまり影響しないこと、Si-DTPA は Fe の放出に対してのみ促進効果がみられた点である。Si-DTPA が Pu に対して効果がない点についてその原因は不明であるが、Pu と Fe に対するキレート剤の効果の違いは、細胞内で可溶化された後の細胞内での存在形態の違いによるのかも知れない。Fe はフェリチンと結合して細胞内に貯蔵され、Pu もフェリチンと結合すると考えられるが、フェリチン-Pu の解離には Fe にみられるような価数の変化は必要ないことが報告されており、これが内因性キレート剤であるフェリチンと DTPA との間で Pu、Fe に対する競合的結合する際に差が生じキレート剤の効力の違いとして現れたと考えられる。一方、水酸化 Pu については、Pu 投与後 AM 回収までの時間が長くなるにしたがって AM の 3 時間培養で放出される Pu の割合は、凝集度の高い水酸化 Pu、凝集度の低い Pu のいずれにおいても高くなり時間と共に細胞内可溶化が進行していることを示唆するものである。各種キレート剤の効果については、AM24、AM72、AM144 いずれにおいても Ca-DTPA が最も効果が強く、凝集度の低い水酸化 Pu では amy1-DTPA が Ca-DTPA 以上の効果を示したが、全体としては時間経過と共にキレート剤の効果は弱くなる傾向がみられた。これは、Pu 摂取後初期の段階でのキレート剤治療が効果的であるとする従来の in vivo 実験の結果を支持するものである。

5. 結論

DTPA の効力増強を目指して開発した種々の高分子 DTPA について、Fe と Pu に対する効果を in vitro 系で

Ca-DTPA と比較検討してきた。Fe に対しては Ca-DTPA 以上の効果が認められた高分子 DTPA が 2、3 あったが Pu に対しては Ca-DTPA 以上に効果的なものはほとんど見つからず、本研究においては、Pu に対し Ca-DTPA が最も有効であるとの結論に達した。

(B) Ca-DTPA 吸入投与による生体除染

Decorporation of ^{59}Fe and ^{239}Pu by the Inhalation of Ca-DTPA

The inhalation of Ca-DTPA is effective on the removal of ^{59}Fe and ^{239}Pu . On the other hand, it was not shown by the intraperitoneal injection. The urinary exclusion of ^{239}Pu was 100 times of ^{59}Fe in content. This may be due to the difference of characteristics of two elements, but it was increased about 3 times of the control in both ^{239}Pu and ^{59}Fe . The inhalation was carried out by the neblizer on the market, which is very convenient, and it confirmed that the inhalative Ca-DTPA is effective on the removal of accidental inhalation.

1. 緒言

実際に吸入により生体内に取り込まれた粒子状放射性金属の除去方法としては、肺洗浄の他にキレート剤による除去が考えられる。前特研ではキレート剤を気管内挿管法により肺へ投与することにより除去効果が得られることを報告した。しかし、臨床応用を考慮すると気管内挿管法は非現実的であり、実用性を考慮した場合の吸入摂取金属粒子の除去には以下の点で吸入法が適している。1) 摂取者自身による投与が可能、2) 摂取後迅速な処置が可能、3) 効果の持続性が期待できる。本研究では市販されている簡便かつ安価な吸入装置を使用して吸入投与法の効果を調べ、臨床面での応用の可能性について検討した。in vitro 系の結果との比較も考慮して対象金属粒子として水酸化鉄コロイドを選択したが、実際に原発で事故が発生した場合に想定される摂取金属である Pu は必須金属である鉄とは体内動態が異なることから粒子状水酸化 Pu に対するキレート剤吸入投与の効果についても検討し、効力比較を行った。

2. 実験方法

a. ^{59}Fe 水酸化鉄コロイドおよび水酸化 Pu の投与

(A) 2. b. および d. により調製した ^{59}Fe -水酸化鉄コロイドおよび水酸化 Pu をハロセン麻酔下で気管内挿管法によりラット肺に投与した。

b. Ca-DTPA の吸入投与

^{59}Fe -水酸化鉄コロイドおよび水酸化 Pu を投与し、粘液纖毛運動による上部気道沈着分の初期排泄が終了する 2 日目から Ca-DTPA を吸入投与した。発生原液の 10 % (W / V) 水溶液とし、超音波式ネブライザー (オムロン NE-U12 型) でエアロゾル化し 1 回 15 分、週 2 回全身曝露した (図 1)。Ca-DTPA の投与の比較対照として 7 mg / kg を腹腔内投与した。

c. 試料中の放射能計測

Ca-DTPA 吸入投与開始後、糞尿は週 3 - 4 回分別採取し、 ^{59}Fe 投与群は 30 日目、 ^{239}Pu 投与群は 38 日目に放血屠殺後、臓器を摘出した。得られた試料中の放射活性は

^{59}Fe についてはオートウェル γ -カウンターにより ^{239}Pu については尿は未処理のまま、糞、臓器は灰化後硝酸とフッ化水素酸の混合酸に溶解し液体シンチレーションカウンターによりそれぞれ計測を実施した。

曝露条件

Ca-DTPA溶液の濃度：10% (w/v)
 流量：17 L/m l
 エアロゾル化率：0.7 m l/分
 粒子径：1~5 μm
 曝露時間：15分

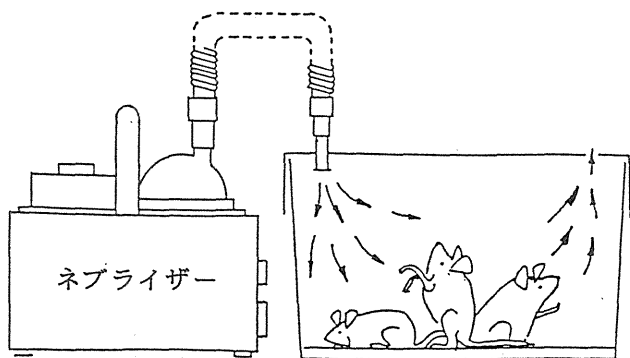


図1 DTPA吸入投与の概略

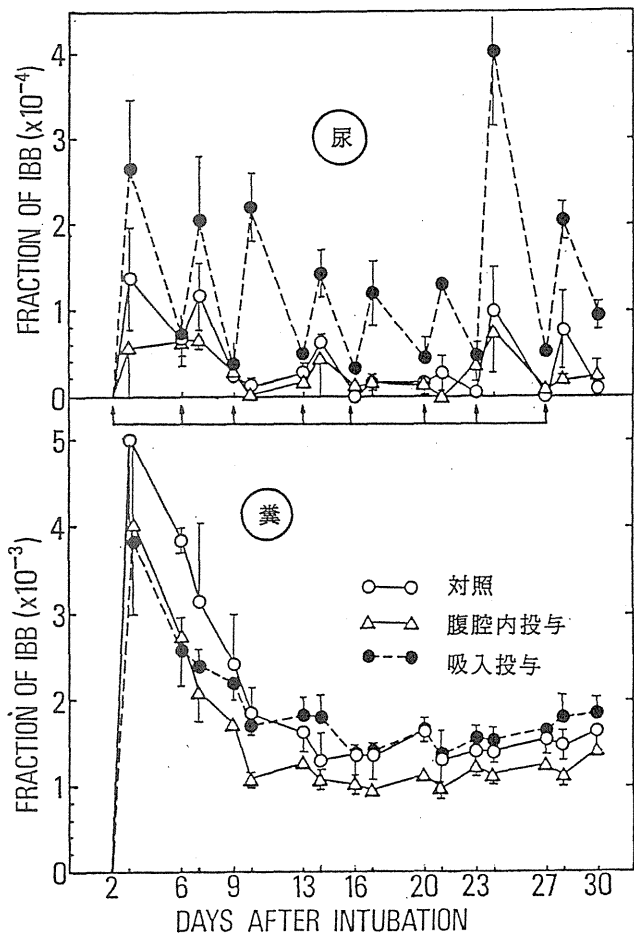


図2 ^{59}Fe 投与ラットにおける糞尿排泄の経日変化

表8 Fe -コロイドを投与したラットの臓器分布に対するCa-DTPAの効果

処置方法	肺	肝	脾	腎	大腿骨
対 照	87.1 \pm 1.71	2.60 \pm 0.29	0.04 \pm 0.01	0.09 \pm 0.03	0.04 \pm 0.03
腹腔内投与	89.2 \pm 0.76	2.32 \pm 0.13	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
吸入投与	88.6 \pm 1.21	2.31 \pm 0.16	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00

表9 Fe -コロイドを投与したラットの排泄に対するCa-DTPAの効果

処置方法	尿		糞	
	総排泄率	排泄率/日	総排泄率	排泄率/日
対 照	0.10 \pm 0.04	0.005 \pm 0.001	5.59 \pm 0.79	0.20 \pm 0.03
腹腔内投与	0.08 \pm 0.02	0.003 \pm 0.001	4.25 \pm 0.21	0.15 \pm 0.02
吸入投与	0.28 \pm 0.05 [*]	0.013 \pm 0.003	5.28 \pm 0.49	0.19 \pm 0.02

$\$ P < 0.05$

3. 結果

a. ^{59}Fe の体内分布、排泄への効果

未処置対照群の各臓器への残留率は ^{59}Fe 投与2日目の体内残留量を100%とした場合肺87%、肝2.6%、脾0.04%、腎0.09%、大腿骨0.04%で、大部分が肺に残っていた。肺、肝、脾についてはCa-DTPA投与による影響は見られず、腎、大腿骨では有意差は認められなかったが、残留率が低下する傾向が認められた(表8)。排泄への影響についてみると表9に示されたように糞への排泄にはCa-DTPA投与による影響はなかった。また、腹腔内投与による尿中排泄増加も見られなかった。しかし、Ca-DTPA吸入投与により尿中への排泄は約3倍に増加した。すなわち、吸入投与により1日当りの尿中排泄率が対照の0.0045%が0.013%に、吸入投与開始後28日間の総排泄量でも対照の0.10%から0.28%に増加した。Ca-DTPA吸入投与による尿中排泄の変化を図2に示したが、吸入投与後24時間の排泄率が高くなっているのがわかる。

b. ^{239}Pu の体内分布、排泄への効果

表10に示したように ^{239}Pu を投与したラットでは投与38日後の肺への残留量は投与2日目の体内残留量の21%に減少した。Ca-DTPA吸入投与では20%で対照と差はなかった。しかし、肺から全身への移行、排泄に差が見られた。Ca-DTPA投与群の肝への残留は15%に低下し、脾では有意差はなかったが40%に低下した。腎、大腿骨ではそれぞれ対照の37、22%が残っていた。糞中への排泄には影響はほとんど認められなかったが、尿への総排泄量は2.8倍に増加し、1日当りの平均で比較しても2.7倍高い排泄率を示した(表11)。図3には糞尿中への排泄の変化を示した。

表10 水酸化Puを投与したラットの臓器分布に対するCa-DTPA吸入投与の効果

処置方法	肺	肝	脾	腎	大腿骨
対 照	21.4 \pm 2.53	1.19 \pm 0.32	0.040 \pm 0.022	0.15 \pm 0.024	0.45 \pm 0.10
Ca-DTPA	20.0 \pm 4.35	0.18 \pm 0.011 [*]	0.016 \pm 0.010	0.056 \pm 0.003 [*]	0.098 \pm 0.012 [*]

$\$ P < 0.05$, $* P < 0.025$

表11 水酸化 Pu を投与したラットからの排泄に対する
Ca-DTPA 吸入投与

処置方法	尿		糞	
	総排泄率	排泄率/日	総排泄率	排泄率 /日
対 照	10.0±1.14	0.28±0.032	58.1±3.09	1.62±0.086
Ca-DTPA	27.5±3.15*	0.76±0.087*	50.3±2.48	1.40±0.069

\$ P<0.05, * P<0.01

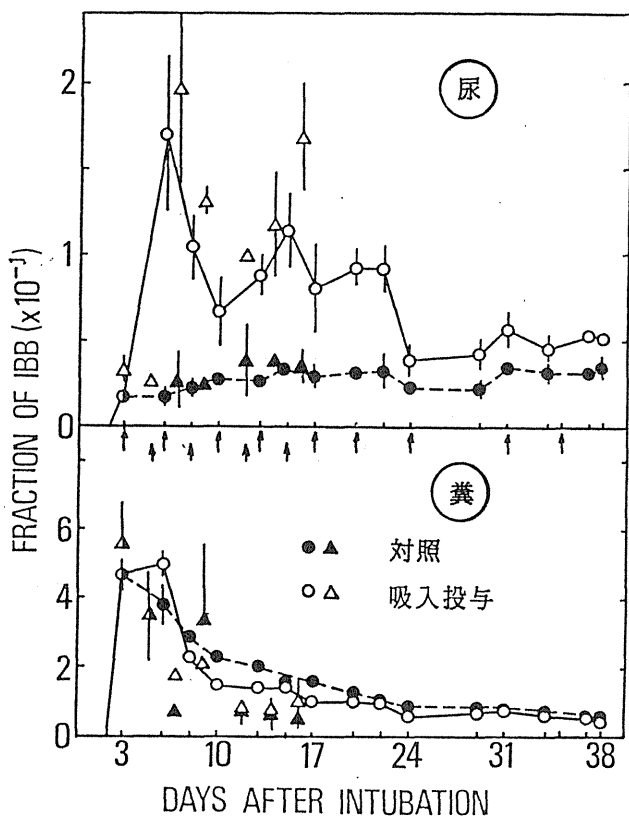


図3 ^{239}Pu 投与ラットにおける糞尿排泄の経日変化

4. 考察

^{59}Fe の体内分布についてみると、Ca-DTPA による影響はほとんど見られない。1 カ月後においても肺への残留率は 87 % と依然高い残留率を示しており、全身への移行が少ない。鉄は必須元素であるため、投与した ^{59}Fe が肺組織内に貯蔵され全身へ移行しにくいと考えられる。移行した ^{59}Fe の分布を見ると肝への移行率が高いがこれは肺から移行した ^{59}Fe はすべてイオン状ではなく微細粒子状の ^{59}Fe も移行系に含まれそれらが肝へ沈着したためと考えられる。一方、排泄については尿に比べ糞への排泄率が高いが糞への排泄は胆汁を介する経路のほかに 2 日目以降も気道から上行性にクリアランスされる経路があり、それらが消化管を経て排泄されたものが含まれたためと考えられる。DTPA 投与群の尿中排泄を比較すると腹腔内投与では効果がないのに対し吸入投与で約 3 倍の排泄増加が見られたが、DTPA の投与方法による効果の違いが如実に現れた。すなわち、Stather らの報告に示されたように、吸入投与では ^{59}Fe の存在する肺局所に一時的に滞留し、徐々に血液中に移行するために静脈内投与（腹腔内投与もほとんど同程度の血中保持時間）の様に投与後急速に血液中濃度が低下することなく一定のレベルが比較的長く保た

れる。この違いが尿中排泄率の増加として反映されたと考えられる。図 2 に糞尿排泄の経日変化を示したが、吸入投与 24 時間の排泄が強く促進され、さらに 72 時間までの排泄も促進される傾向がみられ、腹腔内投与ではほとんどが体外へ排泄されてしまう 24 時間以降も効果が持続していることが示唆された。

Pu の体内分布については 38 日後の肺への残留率は 21 %、データは示さなかったが 16 日目では 31 % であった。硝酸 Pu の気管内投与では 7 日目で 31 % との報告があり、硝酸 Pu が生体内で水酸化 Pu に変化することを考慮すると本研究での結果はその報告にほぼ合致する。Fe の 30 日目の肺への残留率が 87 % であるのに対し Pu は 21 % と低い。化学形態が同一でないことが大きな原因と考えられるが、Pu が Fe と異なり必須元素でないために組織的へ貯蔵されにくく、全身へ移行しやすいためとも考えられる。移行した Pu の臓器分布を見ると、Fe との大きな違いがあるが、大腿骨への残留率が Fe で 0.04 %、Pu が 0.45 % で 10 倍の差がある。これは Pu が bone seeker といわれるように骨に沈着しやすいことを示唆している。糞尿排泄については Pu、Fe が対照でそれぞれ 68 %、5.7 % と大きな差があり、DTPA 投与で 78、5.6 % と Fe では差がなく Pu で 10 % の排泄増加がみられたように DTPA は Pu に対しては有効性が示唆された。また、in vitro で Pu に対しての効果が強いことが示されたが、in vivo でもそれが裏付けられた。

5. 結論

Ca-DTPA の吸入は市販のネブライザーを使用し、15 分間ラットに全身曝露することにより行ったが、水酸化 Pu のように酸化 Pu と比較して比較的可溶性の粒子状 Pu に対しては効果が認められた。事故による被曝においては被曝者自身がマウスピースによる吸入もしくは鼻部曝露による吸入となり、全身曝露より効果的な投与が可能と考えられるので効果はさらに高いと考えられる。しかも携帯が可能なので被曝直後の投与ができ操作も非常に簡便であることから、臨床応用の面からも十分に価値があると思われる。

[研究発表]

- 1) 佐藤：キレート剤による体内摂取金属の除去。放射線科学、33, 386-387, 1990.
- 2) 佐藤：重金属のキレート剤による追い出し。第 21 回放医研シンポジウム「粒子状物質の吸入とその生物作用の発現機構」報文集 (NIRS-M-78) : pp.222-228, 1991.
- 3) Bulman, R. A., Sato, H., Takahashi, S. and Kubota, Y.: ^{59}Fe release from alveolar macrophages by macromolecular forms of chelating agents. J. Radiol. Prot., 13, 127-133, 1993.
- 4) Sato, H., Bulman, R.A., Takahashi, S. and Kubota, Y.: Effects of macromolecular chelating agents on the release of ^{239}Pu and ^{59}Fe from rat alveolar macrophages after phagocytic uptake of ^{239}Pu - ^{59}Fe -iron hydroxide colloid. Health Phys., 66, 545-549, 1994.

3. 内部被曝リスクの低減化に関する研究

②キレート剤のプルトニウム除去効果と毒性

福田 俊、飯田治三（内部被ばく研究部）

Hsieh Yuyuan（中国科学院上海葯物研究所）

Effects of Chelating Agents DTPA, CBMIDA, and Calcium supplement on Removal of Plutonium, and the Assessments of Their Toxicities in Experimental Animals

Satoshi Fukuda, Haruzo Iida and Hsieh Yuyuan*

Division of Comparative Radiotoxicology, *Shanghai Institute of Materia Medica

In this study, the overall assessments on toxicity of DTPA (Diethylenetriaminopentaacetic acid) were summarized, and the effects of new chelating agent CBMIDA [Catechol-3,6-bis (methyleiminodiacetic acid)] on removal of plutonium and its toxicity, and calcium supplement to help the Ca-DTPA effect were examined.

The overall results obtained from our many toxicological studies on DTPA concluded that the recommended human dose (30 μ mol / kg) of DTPA has very low toxicities but the devised administration routes, such as intravenous injection of Ca-DTPA at early period after accident and the following oral administration of Zn-DTPA for a long term treatment could lower the toxicities, in addition to raise the effect on removal of plutonium from body.

The effects of new chelating agent CBMIDA on removal of plutonium were higher than those of Ca-DTPA and Zn-DTPA in bones, and almost the same as those of DTPAs in liver of rats. The toxicity of CBMIDA was almost the same as those of DTPA, rather lower than the intravenous injection of Zn-DTPA. Therefore, CBMIDA can be regarded as a most beneficial chelating agent to remove plutonium from human body.

Pre- and post-supplement of calcium-oxide, showing high calcium absorption from small intestine, against plutonium intake, had beneficial effects to decrease plutonium deposition and help to enlarge the effect of Ca-DTPA on removal of plutonium.

1. 緒言

プルトニウムの体内摂取に伴う内部被曝の障害リスクを低減する方法として、除去効果が高いとされる合成キレート剤 DTPA (diethylenetriaminopentaacetic acid) の使用が推奨されている。しかし、その毒性に関しては十分

な安全性の評価が得られておらず、除去効果も十分とはいえないことから、さらに高い除去効果かつ低毒性のキレート剤の開発が望まれている。

本研究では緊急医療および保健物理学的な観点から、前特研において得られた成果を合わせた DTPA の総合的な毒性評価、および新しいキレート剤 CBMIDA [Catechol-3,6-bis (methyleiminodiacetic acid)] の Pu の除去効果と毒性の検索、および DTPA の除去効果の向上と低毒性化について検討した。

2. 研究方法

(1) キレート剤の毒性

① Ca-DTPA、Ca-EDTA および CBMIDA の静脈注射による一般急性毒性および骨毒性を検索するために、ビーグルの成犬 9 頭を 3 群に分け、Ca-DTPA、Ca-EDTA および CBMIDA (150 μ mol / kg) を 0.06-0.08ml / s の速度で静脈注射した 15、30、45、60 分後に採血して、血清中のカルシウム濃度を測定した。その後、同量の各キレート剤を 1 日 1 回、1 カ月間連続して静脈注射した。投与 0、1、2、3、4 週後に採血を行い、GOT、GPT、ALP、BUN、Creatinine の測定を行った。また、骨代謝への影響を検索するために、テトラサイクリンとカルセインを投与して骨二重標識を行った。実験終了時に解剖して、主要臓器および腸骨を採取した。各臓器の検索はパラフィン包埋した病理組織標本を作製して行った。骨の検索は非脱灰組織標本を用いた形態計測法によって行った。

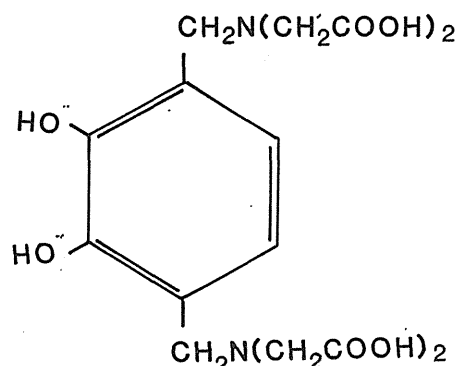
CBMIDA は中国科学院上海葯物研究所の Hsieh Yuyuan 博士によって、合成されたキレート剤である (図 1)。

② Zn-DTPA の経口投与による骨毒性を検索するために、ビーグル成犬 8 頭に 30 μ mol / kg、3 頭に 150 μ mol / kg、5 頭に 300 μ mol / kg を 1 日 1 回、1 カ月間連続投与した。実験①と同一の方法で骨標識を行い、骨形態計測法を用いて検索した。

(2) CBMIDA と DTPA の Pu 除去効果の比較

Fig.1 Catechol-3,6-bis(methyleimino diacetic acid)

CBMIDA



ラット（3カ月齢、雄）の20頭に硝酸Pu(1.85×10^4 Bq/kg)を静脈投与した後に4群（5頭/群）に分け、3群にはCBMIDA、Ca-DTPA、Zn-DTPAのそれぞれ150 μ mol/kgを2週間連続して腹腔内注射した。残りの1群はPu対照群とした。動物は糞尿分離ケージで飼育し、24時間置きに糞尿を採取した。大腿骨、肝臓、糞尿中のPu濃度は、灰化した後、硝酸で溶解して液体シンチレーションカウンターで測定した。

（3）酸化カルシウムによる除去効果とCa-DTPAとの併用投与の効果

ラット（3カ月齢、雄）の25頭を、①Pu投与1週間前からカルシウム飼料を投与した群、②Pu投与直後からカルシウム飼料を投与した群、③Pu投与後にカルシウム飼料と腹腔内にCa-DTPA（150 μ mol/kg）を投与した群、④Ca-DTPA（150 μ mol/kg）と通常の飼料を投与した群、⑤Pu対照（通常の飼料を投与）群に分けた。投与した硝酸Puの量は 1.85×10^4 Bq/kgであった。カルシウム飼料は、貝がらを焼成して得た酸化カルシウム（1%）を通常の飼料に加える炭酸カルシウムと入れ換えて作製した。動物の飼育および大腿骨、肝臓、糞尿中のPu濃度は、実験（2）と同様な方法を用いた。

3. 結果

（1）キレート剤の毒性

ビーグル犬にCa-DTPA、Ca-EDTA、CBMIDAを点滴の速度で静脈投与した後は、血清カルシウム濃度の変化は認められなかった。1カ月間連続静脈注射投与した結果、骨毒性以外の観察においてCa-DTPA投与群では、平均体重の有意な減少、GOT、GPT、BUN、Creatinineの上昇がみられた。Ca-EDTA投与群では、有意な変化はみられなかった。CBMIDA投与群では、GPT、ALP、Creatinineの上昇がみられた。すべての群で、軽度の小腸粘膜の充血とリンパ球の浸潤、腎臓の近位尿細管のリンパ球の浸潤、肝臓の変性がみられた。

骨毒性を検索した結果、Ca-DTPA、Ca-EDTA、CBMIDA静脈投与群およびZn-DTPAの経口投与群のいずれにおいても、骨量や骨梁幅に変化はみられなかった。CBMIDA投与群では類骨量や類骨幅の有意な増加がみられたが、石灰化速度や骨形成速度は骨標識の不全のため計測できなかった。Zn-DTPA150 μ mol/kg投与群で類骨量や類骨幅の有意な減少、石灰化速度や骨形成速度の増加

が、300 μ mol/kg投与群では類骨量の増加がみられた。血清成分については、Zn-DTPA30 μ mol/kg投与群ではリン濃度の低下、Parathyroid hormone濃度の上昇、150 μ mol/kg投与群ではParathyroid hormone濃度の低下がみられた。

前特研および本特研において検索したDTPAの毒性をまとめ、結果を表1および図2に示した。また、人への安全な投与方法を図3に示した。

Table 1 Damages in various organs and clinical signs induced by DTPA

Blood or organs (Intestine, Kidney, Liver)	RBC↓, Ht↓, GOT↑, GPT↑, ALP↑, BUN↑ Zn-deficiency, Inhibition of DNA, RNA synthesis Ca-deficiency, Hemorrhage, Congestion,
Clinical signs	Loss of appetite, Dehydration, Sore mouth and throat, Decrease of body weight, Abdominal tenderness Nausea, Vomiting, Hematemesis, Melena, Diarrhea, Hemafecia, Hematuria, Hair loss,

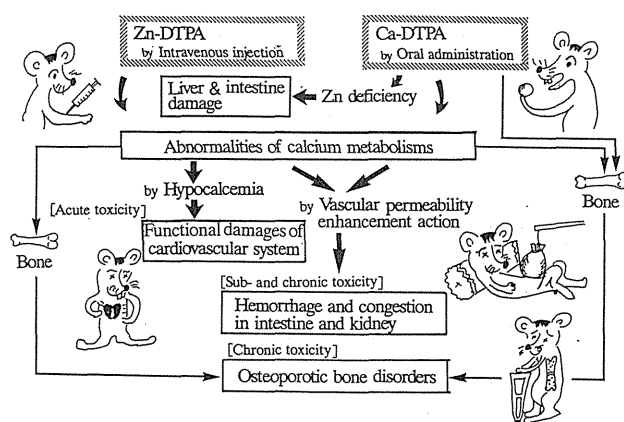


Fig.2 Summary of DTPA toxicity

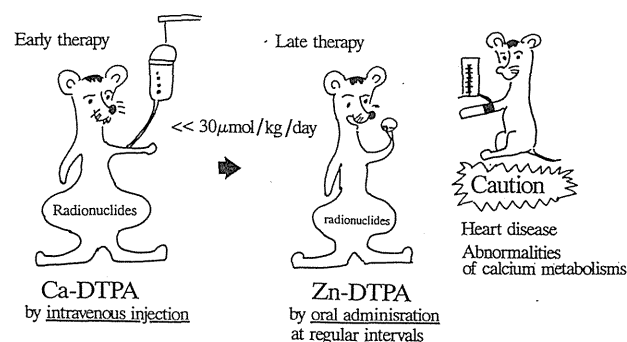


Fig.3 Administration routes for use in safety

（2）CBMIDAとDTPAのPu除去効果の比較

Pu投与量に対する骨および肝臓含有率の測定結果を図4に示した。骨に対するCBMIDAの効果は、Ca-DTPAとZn-DTPAに比べて高く、とりわけZn-DTPAとは有意な差がみられた。肝臓に対する効果は、いずれも同程度で投与量の0.35-0.62%であった。尿中へのPu排泄は、すべてのキレート剤とも対照群よりも高かった。糞中への排泄は、Pu投与5日後までは対照群よりも高かったが、

それ以降低くなった。

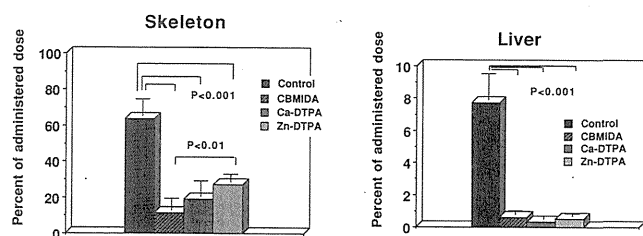


Fig.4 Plutonium content of skeleton and liver (percent. of administered dose) in the CBMIDA, Ca-DTPA, Zn-DTPA and control groups on day 14 after plutonium injection.

(3) 酸化カルシウムによる除去効果と Ca-DTPA との併用投与の効果

酸化カルシウムの経口投与および Ca-DTPA の注射投与との併用効果の結果を図5に示した。骨および肝臓ともに Pu の沈着率は、Pu 投与前および後のいずれの場合にも酸化カルシウム投与の効果がみられ、Pu 投与前の場合の方が効果的であった。これらの効果は、Ca-DTPA 注射投与と併用すると著しく高まり、Ca-DTPA のみの投与より効果的であった。

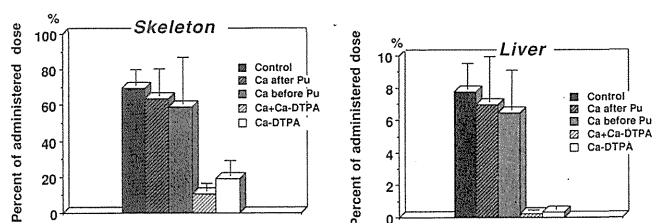


Fig.5 Plutonium contents of skeleton and liver in the pre- and post-calcium supplement groups, calcium supplement and Ca-DTPA injected group, Ca-DTPA injected group and control group on day 14 after plutonium injection.

4. 考察

前特研および本特研において実施した DTPA の毒性研究は、催奇形性試験、長期毒性試験、急性毒性、薬理試験である。催奇形性試験では、妊娠ラットに Ca-DTPA を投与すると $460 \mu\text{mol}/\text{kg}$ 以上の投与量で無眼球症、小眼球症、脳露出症、肋骨融合などの胎児の奇形が発現したが、Zn-DTPA は $1,080 \mu\text{mol}/\text{kg}$ まで奇形はみられなかった。すなわち、Ca-DTPA の毒性は Zn-DTPA よりも強いことが認められた。Taylor, GN ら (1978) の研究では $30 \mu\text{mol}/\text{kg}$ の Ca-DTPA を妊娠ビーグル犬に投与すると、重度な奇形や毒性が認められることから、人体推奨量である $30 \mu\text{mol}/\text{kg}$ であっても妊婦あるいはその可能性のある女性への DTPA の投与はできないと結論している。Ca-DTPA および Zn-DTPA を長期間投与すると、表1に示すような種々の毒性が臨床的あるいは病理学的にみられる。この一連の研究において、Ca-DTPA よりも安全であるとされた Zn-DTPA を静脈注射すると、血液中のカルシウム濃度が低下し、その結果血圧の上昇や心機能の

亢進などの循環器系の異常が認められることから、とくに静脈注射による Zn-DTPA の投与は慎重に行うべきであること、さらに被曝者が高血圧などの循環器系の疾患を有する場合にはこの副作用が増大すること、DTPA の薬理作用として血管の拡張作用があり、Pu 等の物質の透過性亢進によって組織への沈着が増加すること、骨における石灰化障害による骨の脆弱化やカルシウム代謝異常が起こることを新たに指摘した。CBMIDA および高投与量の DTPA によって見られた類骨や石灰化速度、骨形成度の変化は、同時に Pu の骨沈着阻止作用が強いことを表している」と判断された。

DTPA の毒性に関する結論として、人の推奨量である $30 \mu\text{mol}/\text{kg}$ の毒性は非常に低いが、とくに長期投与を行う場合には十分に安全な量とはいえない。事故直後には Ca-DTPA の点滴投与、その後は Zn-DTPA の経口投与によって、副作用を軽減できることが確認された。この DTPA の適用方法は、これまでの報告によって同時に Pu の除去効果が高めることができることが知られている。

中国科学院上海葯物研究所と共同研究した CBMIDA の Pu 除去効果は、Ca-DTPA および Zn-DTPA のいずれに比べても、Pu が親和性を持つ骨の沈着を有意に減少でき、また肝臓の沈着も DTPA と同等の効果を有することから、さらに副作用も DTPA と同等あるいは注射投与では低い結果を合わせて判断すると、現時点では最も Pu 摂取事故において除去効果が高く、かつ安全な合成キレート剤であるといえる。

Pu の除去効果は天然キレート剤に比べて合成キレート剤の方が高いが、その使用は副作用の発現によって大きく制限される。また、被曝者の状態によっても使用制限が生じる。この詳細な内容については、放医研シンポジウムシリーズ No. 23, 129-137, 1992. に述べた。事故直後の被曝者自身による Pu の体内沈着量の減少および長期治療における除去対策、さらに Ca-DTPA の効果の上昇と副作用低減化（低投与量化）を目的として検討した、酸化カルシウムの摂取は単独投与ではわずかであるが骨や肝臓への沈着阻止の効果がみられた。Pu 投与前から酸化カルシウムを摂取しておくことより高い効果がみられた結果は、酸化カルシウムには毒性がないので Pu 取り扱い作業前の服用による実用性がある。また酸化カルシウムの投与は Ca-DTPA との併用によって、Ca-DTPA 単味の投与よりも骨や肝臓への Pu 沈着阻止効果を高めた。酸化カルシウムによる Pu の骨沈着阻止の増加率は、骨梁骨の形成割合とほぼ同等であった。したがって、酸化カルシウムの効果は、酸化カルシウムの腸管吸収率が高いため、急速に血液中へ入ったカルシウムが骨の石灰化表面に結合し、Pu の沈着を阻止するためと推察された。しかし、酸化カルシウムの使用は、合成キレート剤のあくまでも補助手段であり、本質的には合成キレート剤の使用が重要である。現在人体への使用が推奨されている DTPA は、その除去効果と毒性を総合判断すると必ずしも満足できるキレート剤ではなく、さらに高い除去効果と低毒性のキレート剤の検討が必要である。

5. 結論

本研究において、現在人体への使用が推奨されている DTPA の毒性の総合評価、新しい合成キレート剤である

CBMIDA の Pu の除去効果と毒性、酸化カルシウムの補助効果について検討した。その結果、次のような成果が得られた。

1) Ca-DTPA および Zn-DTPA とともに、人体投与推奨量である 30 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ は毒性は非常に低い。事故直後に Ca-DTPA を点滴投与、その後に Zn-DTPA を経口投与することによって、除去効果だけでなく、毒性を低減できることが認められた。しかし、とくに循環器系の疾患あるいはその恐れのある被曝者に対しては、投与に際して慎重な対策が必要である。

2) 新合成キレート剤 CBMIDA の Pu 除去効果は、DTPA に比べてとりわけ骨への Pu 沈着阻止に有意な効果があり、毒性も同等あるいはやや低いことから、最も有用な薬物であると判断された。

3) 酸化カルシウムの経口投与は Pu の体内沈着阻止効果、とくに Ca-DTPA との併用適用によって除去効果の増大が認められ、被曝直後あるいは長期摂取における合成キレート剤の効果が期待された。

〔謝辞〕

本研究の遂行にあたり、CBMIDA の合成および使用に関して技術的な協力および指導を頂きました中国科学院上海葯物研究所長 Hsieh, Yuyuan 博士に深謝いたします。また、III International Chelation Conference (Georgetown University, Washington, DC, 1989) の講演への招待および有意義な指導を頂きました International Chelation Research Foundation 理事長、Martin Rubin 博士に深謝いたします。

〔研究発表〕

- 1) Fukuda, S.: Toxicity of DTPA administered intravenously or orally in rats and beagles. Chelating Agents in Pharmacology, Toxicity and Therapeutics. Suppl., 56, 41-43, 1988.
- 2) 福田 俊：キレート剤 DTPA の毒性評価、保健物理、24, 201-210, 1989.
- 3) Fukuda, S., Iida, H., Hsieh, Y. and Chen, W.: Toxicological study of DTPA as a drug(V). Toxicities of Ca-DTPA, Ca-EDTA and CBMIDA after intravenous injection in beagle dogs. Hoken Butsuri, 25, 115-119, 1990.

- 4) 福田 俊：キレート剤の生体機能への影響と人における DTPA の安全性評価、NIRS-M-78(放医研シンポジウムシリーズ No.21), 229-236, 1991.
- 5) Fukuda, S., Iida, H., Hsieh, Y. and Chen, W.: Toxicological study of DTPA as a drug(VI). Effects of intravenously injected Ca-DTPA, Ca-EDTA, CBMIDA and orally administered Zn-DTPA to bone metabolism in beagle dogs. Hoken Butsuri, 26, 101-107, 1991.
- 6) Fukuda, S., Iida, H., Hsieh, Y. and Chen, W.: Effects of CBMIDA [Catechol-3,6-bis(methyleiminodiacetic acid)] on removal of plutonium in rats. Hoken Butsuri, 27, 11-15, 1992.
- 7) 福田 俊：プルトニウムの沈着阻止と体外除去、NIRS-M-86 (放医研シンポジウムシリーズ No.23), 129-137, 1992.
- 8) Fukuda, S. and Iida, H.: Removal of plutonium by a new type calcium and combination of the calcium and Ca-DTPA in rats. Hoken Butsuri, 28, 167-172, 1993.
- 9) 福田 俊、飯田治三：日本保健物理学会第 23 回研究発表会、千葉、1988, 5.
- 10) 福田 俊、飯田治三：日本保健物理学会第 24 回研究発表会、名古屋、1989, 5.
- 11) Fukuda, S.: IIIrd International Chelation Conference. Washington D.C., 1989, 7.
- 12) Fukuda, S., Ikeda, K., Tsuchikura, S., et al.: IIIrd International Chelation Conference. Washington D.C., 1989, 7.
- 13) 福田 俊：第 21 回放医研シンポジウム、千葉、1989, 12.
- 14) 福田 俊、土倉 覚、池田克巳ら：日本保健物理学会第 25 回研究発表会、つくば、1990, 5.
- 15) 福田 俊、飯田治三、稲葉次郎：日本保健物理学会第 25 回研究発表会、つくば、1990, 5.
- 16) 福田 俊、飯田治三：日本保健物理学会第 26 回研究発表会、大阪、1991, 5.
- 17) 福田 俊：第 23 回放医研シンポジウム、千葉、1991, 12.

3. 内部被曝リスクの低減化に関する研究

③内部被曝個人モニタリングの改善に関する研究

小泉 彰、山田裕司、宮本勝宏、福田 俊、飯田治三（内部被ばく研究部）

Studies on Improvements of Protection Techniques for Inhalation of Radioactive Aerosols

Akira Koizumi, Yuji Yamada, Katsuhiko Miyamoto, Satoshi Fukuda and Haruzo Iida
Division of Radiotoxicology

In this series of study, three investigations were carried out independently as follows;

- 1) Estimation of dispersal rates for non-volatile radioactive nuclides under some operations with experimental animals

The dispersal rates of non-volatile radioactive nuclides were determined with a view to obtaining a basic information, which will be applicable to safety handling of experimental animals administered radioactive nuclides like as Pu. Under injection of RI to rats, the dispersal rates detected during the injection operation, housing in cages, anatomical operation were the order of 10^{-7} /h. But the dispersal rates from contaminated surface of animals were very high values, the order of 10^{-7} per one operation. Air contamination dispersed from 20 rats administered Pu by inhalation and animal surface contamination decreased rapidly, and were not detectable after 2 weeks from administration.

- 2) Calibration method for alpha counting of Pu on an air filter paper

It is important to know the over-all counting efficiency of alpha measurements of air filter in radiation protection. In this study, the counting efficiencies of ZnS(Ag) scintillation counting were measured for three types of sample as follows;

sample A: filter paper collected Pu aerosols.

sample B: plate source which Pu solution was dropped on and dried.

sample C: filter paper which Pu solution was dropped on and dried.

Pu activities on each sample were decided by characteristic X-rays counting. Each counting efficiency for sample A,B,C were 6.6%, 35%, 6.8%. Alpha spectrum of sample A was quite different

from that of sample C, it was clear that sample C was not pertinent as a standard source. These results show that using sample B as a standard source causes a large under-estimation of air concentration.

- 3) Size estimation method of radioactive aerosols in air monitoring

New simplified method for particle size estimation of radioactive aerosols was proposed for air monitoring. It does not need any new instruments but a traditional aerosol sampling device with a multistage filter system. The method is based on the particle size dependency of penetration for air filter. Decontamination factor data measured in each filter stage is inverted to a size distribution of aerosols. When air filter for a dust sampler such as Toyo HE-40T is used, the method can be applied for a size estimation of aerosols ranging from 0.2 to 10 μm in which ICRP is interested for lung deposition model. In a size measurement of ^{198}Au aerosols, it was shown that the size distribution estimated by the present method was in a good agreement with the distribution by the existent method using a cascade impactor.

緒言

放射性物質の吸入による内部被曝の問題は核燃料再処理事業の民営化などの推移もあり、年々その重要性を増している。特にプルトニウムに代表されるアルファ核種による内部被曝においては、摂取量に比して被曝線量（預託線量当量）が大きく、そのため各種のモニタリング技術の精度、感度、迅速性などはベータ核種、ガンマ核種よりも高度なものが要求される。しかし、プルトニウムのようなアルファ核種のエアロゾルの吸入摂取に伴う内部被曝を想定すると様々な問題が残されている。まず第1の問題はアル

表3 Pu 吸入ラットの体表面汚染測定結果

吸入 2 時間後(cpm)					
ラットNo.	背面	腹面	咽—鼻先	頭部—鼻先	合計
B-1	10.5	23.0	17.0	120	170.5
B-2	3.5	1.5	9.2	32	45.2
B-3	6.0	1.3	33.8	89	130.1
B-4	8.0	4.0	21.0	58.2	91.2
B-5	1.0	4.5	4.5	33	43.0
			平均		77.8
吸入後 2 日(cpm)					
B-6	2.0	1.0	0	10.0	13.0
B-7	2.0	1.0	4.0	7.0	13.0
B-8	3.0	0	1.0	0	4.0
B-9	0	0	1.0	17.0	18.0
B-9	0	0	1.0	17.0	18.0
B-10	0	0	0	7.0	7.0
			平均		77.8
吸入後 36 日(cpm)					
B-11	0	0	0	0	0
B-12	0	0	0	0	0
B-13	1.0	0	0	0	1.0
B-14	1.0	0	0	0	1.0
			平均		0.5
吸入後 3 カ月(cpm)					
B-11	1.0	0	0	0	1.0
B-12	1.0	0	0	0	1.0
B-13	0	0	0	0	0
B-14	0	0	0	0	0
			平均		0.5

表4 吸入ホルダとラット鼻先のスメアガーゼのPu量 (Bq)

試料No.	吸入ホルダ	鼻先
HSF-1	2250±200	17±2
HSF-2	2630±250	12±1
HSF-3	3590±390	47±3
HSF-4	4110±410	62±5
HSF-5	3340±290	47±3
HSF-6	2050±370	22±2
HSF-7	3280±410	43±3
HSF-8	2420±260	11±1
HSF-9	5020±630	37±3
HSF-10	5250±450	22±2
HSF-11	5490±540	49±4
HSF-12	5570±550	109±8
HSF-13	5330±660	59±4
HSF-14	6930±600	11±1
HSF-15	4360±540	-----
HSF-16	6710±720	25±2
HSF-17	6510±1100	123±9
HSF-18	7400±500	5±1
HSF-19	3760±470	10±1
HSF-20	4550±90	14±1
平均	4528 Bq	38 Bq
合計	90550 Bq	725 Bq

表2にプルトニウム吸入投与ラット飼育時の空気汚染濃度の経時的な測定結果を示す。表3にプルトニウム吸入ラットの体表面汚染の経時的な測定結果を示す。また表4

に吸入投与直後のラットの鼻先と吸入ホルダのスメア想定結果を示す。

考察

動物実験の代表的な実験操作での非揮発性核種 (^{99m}Tc) の飛散率は比較的高く、プルトニウムのようなアルファ核種の使用の際には注意を要することがわかった。この飛散率が高くなる理由は表1の結果が示す通り、体毛が密生している動物体表面が汚染し、そこに実験者の手等による接触・摩擦が加わったとき飛散し易くなることであった。このときの飛散率は約 10^{-4} であり、RIの注射器への分取・注射投与の操作での飛散率はほぼ無視し得るレベルであった。測定された飛散率から注射投与時の動物体毛を汚染させた RI 溶液の量は 1×10^{-3} ml 程度と計算される。注射時にこの程度の量が動物体毛を汚染させることは十分に考えられる。これらのことは空気汚染を可能な限り低く抑えるためには動物体毛を可能な限り汚染させないようにする、という安全対策に結び付く。

表2、表3に示したプルトニウムの空気汚染濃度、動物体毛の汚染の経時的変化の結果は両者とも約2週間後にはほぼ無視できるレベルまで時間と共に低下することを示す。このことは発ガン性研究のような長期間飼育において、グローブボックスより開放的な飼育方法が可能であることを意味する。

プルトニウムを吸入投与されたラットの飼育時の空気汚染レベルは投与直後でも約 10×10^{-10} Bq / cc と極めて低く、このレベルでも法規制値の $1 / 100$ 以下であった。空気汚染を低レベルに保つことができた理由には、吸入投与方法に鼻部曝露方式を採用し、体表面の汚染部を鼻先のみ限定したこと、および吸入投与直後に鼻先の汚染を拭き取ったことが大きく働いていると考えられる。

結論

プルトニウムを投与し、その安全性を研究する実験を念頭に置き、動物実験の際の非揮発性核種の空气中飛散率を検討した。その結果、次のことがわかった。

- ①動物体毛が汚染すると空气中への飛散率が大きくなり、その飛散率は約 10^{-4} であった。
- ②動物体毛、および飼育時の空気汚染レベルは時間と共に低下し、約2週間後にはほぼ無視できるレベルまで低下した。

本研究で得られた上記の知見は現在内部被曝実験棟におけるプルトニウム投与動物および各種試料の取り扱いに対する安全管理に反映され、利用されている。しかし、種々のケースでの飛散率のデータはまだ少なく、今後とも多くの事例で飛散率データを積み重ねていく必要があると思われる。

研究2. プルトニウム粒子を捕集したフィルタ試料の校正方法

実験の概要と結果

放射性エアロゾルによる空気汚染は通常エアスニッフア設備でフィルタに粒子を捕集し、そのフィルタの放射能の測定から求められる。このときアルファ核種については ZnS シンチレーションカウンタの用いられることが多い。この ZnS シンチレーションカウンタの計数効率とは適当な

標準線源が無い場合、アルファ核種の電着試料あるいは既知濃度溶液をフィルタに滴下した試料から求められる。これらの標準試料での計数効率と実サンプル（プルトニウム粒子を捕集したフィルタ試料）での計数効率にどの程度の差異があるかを次の方法で測定した。

プルトニウムエアロゾルを捕集した HE-40T フィルタ試料（実サンプル）、プルトニウム溶液をステンレス板に滴下し、蒸発乾固した試料（標準乾固試料）、およびプルトニウム溶液を HE-40T フィルタに滴下し、蒸発乾固した試料（標準含浸試料）の 3 種類の試料を作製し、それぞれのプルトニウム量を特性 X 線計測によって求めた。3 種類の試料を日常モニタリングに用いられる ZnS シンチレーションカウンタでアルファ線を計測した。さらに 3 種類の試料のアルファ線スペクトルをシリコン半導体検出器で測定した。

3 種類の試料のアルファ線スペクトルを図 2～図 4 に示す。このスペクトルから標準乾固試料ではプルトニウムアルファ線スペクトルのみが観察されるが、実サンプルおよび標準含浸試料ではフィルタ内部への潜り込みに起因する低エネルギー成分が見られ、その割合は多かった。3 種類の試料の ZnS シンチレーションカウンタでの計数効率は実サンプルが 6.6 %、標準乾固試料が 35 %、標準含浸試料が 6.8 %であった。

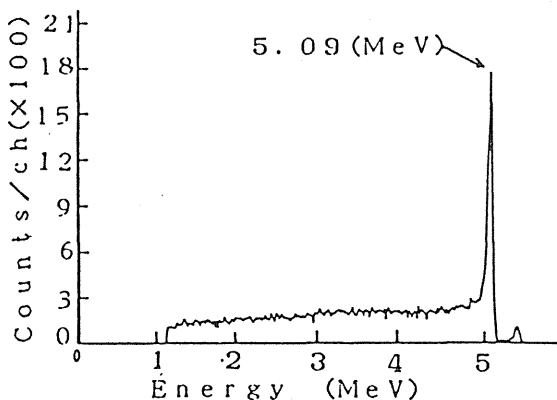


図 2 サンプルの α 線スペクトル

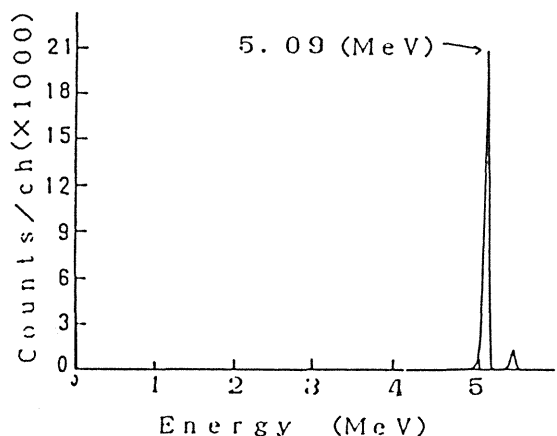


図 3 標準乾固試材の α 線スペクトル

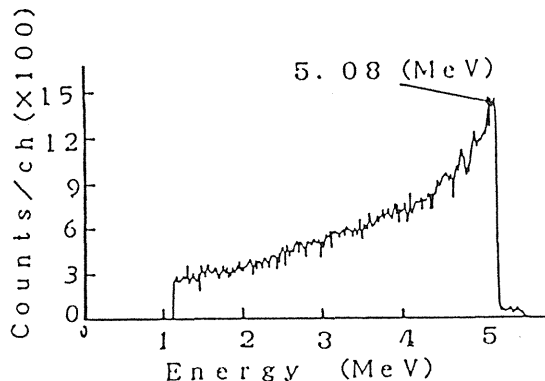


図 4 標準含浸試材の α 線スペクトル

考察

実サンプルと標準含浸試料の計数効率は近い値を示したが、アルファ線スペクトルを比べると全く異なっており、ZnS シンチレーションカウンタのディスクリレベルが不明な点を考慮すると標準含浸試料が標準線源としては不適当なことは明らかである。一方、実サンプルと標準乾固試料とでは計数効率に約 5 倍の差があり、またこの差は空気汚染濃度を $1/5$ に過少評価することを意味する。安全管理上かなりの注意を要すると考えられる。しかし、今回得られた実サンプルの計数効率は、汚染空気のサンプリング流量すなわち面風速が異なるとフィルタの捕集効率、フィルタ内部への潜り込みの程度が変わってくるため変化すると考えられる。さらに放射性エアロゾルの粒子径分布が異なると同様に計数効率は変化すると考えられる。

結論

- ①アルファ核種のエアロゾルを捕集したフィルタのアルファ線計測における標準線源として、電着線源、蒸発乾固試料、あるいはフィルタへ溶液を滴下し、蒸発乾固した試料はそれぞれが不適当である。
- ②電着線源、蒸発乾固試料から求めた計数効率を用いると、空気汚染濃度を $1/5$ 程度に過少評価する可能性がある。
- ③アルファ核種のエアロゾルを捕集したフィルタのアルファ線計測における計数効率は、既知量のエアロゾルを捕集したフィルタを用いて求める必要がある。

研究 3. 放射性エアロゾルの粒子径分布評価法の開発 実験の概要と結果

プルトニウム等のアルファ核種を取り扱う事業所では通常エアスニッフなどによって常時空気中の放射性エアロゾルをフィルタに採取し、空气中放射能濃度を監視している。しかし、この方法では空气中濃度の情報は得られるが、内部被曝線量評価の際有用なエアロゾル粒子の中央径、分散の情報は得られない。そこで事後的な吸入摂取時の内部被曝における線量評価の精度向上を目的とし、通常 1 段フィルタのエアスニッフを多段にする多段フィルタサンプリングによって得られる各段のフィルタの放射能値から空気汚染濃度のみならず、粒子径分布も評価する方法を考案した。

多段フィルタ法の原理は次のとおりである。フィルタの上流側と下流側のエアロゾル分布を測定した例を図 5 に示す。上流側と下流側ではエアロゾル分布の形が変化している。このデータから粒子径ごとに透過率 = 下流側濃度 \div 上

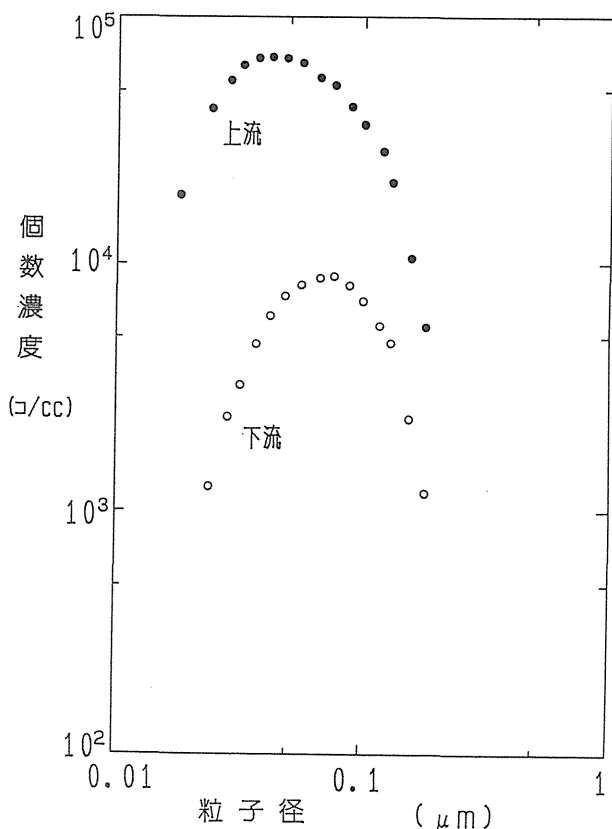


図5 フィルタ上流・下流の粒子径分布

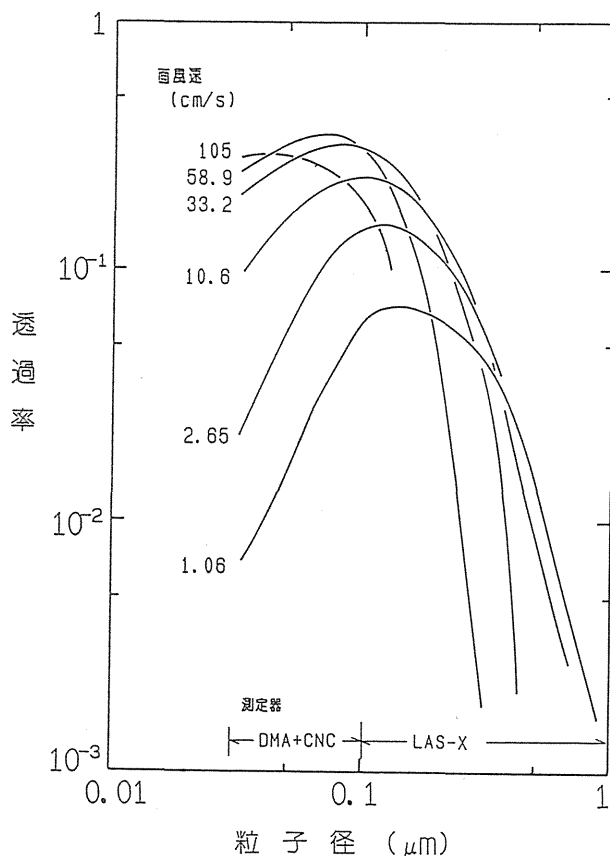


図6 HE-40T フィルタの透過率曲線（面風速依存性）

流側濃度、を計算すると一つの曲線となり、これを透過率曲線という。図6に空気汚染サンプリング用フィルタの透

過率曲線の測定例を示す。フィルタのエアロゾル透過率曲線はフィルタ繊維および粒子の帯電が無い場合1つの曲線となる。すなわち透過率曲線はそのフィルタ固有の性能であり、2段、3段に用いても変化せず、またエアロゾル粒子の種類が異なっても変化しない。一定の面風速での透過率曲線が得られれば1段目フィルタの上流側の粒子径別濃度分布から下流側の粒子径別濃度分布が計算できる。1段目フィルタの下流側の粒子径別濃度分布は2段目フィルタの上流側の粒子径別濃度分布であるから2段目フィルタの下流側の粒子径別濃度分布も計算できる。同様に3段目フィルタの下流側の粒子径別濃度分布も計算できる。この計算結果から各段のフィルタの除染計数（DF）が求められる。この計算を様々な粒子径分布（中央径と分散）について行い、粒子径分布ごとに各段のDFの組み合わせを予め計算しておく。多段フィルタ各段の放射能実測値から各段のDFを計算し、このDFに最も近い組み合わせとなる粒子径分布を選び出す。この粒子径分布が汚染空気のエアロゾルの粒子径分布である。

ダストサンプリング用紙（東洋、HE-40T）について面風速 1.33 cm/sec での透過率曲線を測定し、数値計算に用いる関数として次の近似関数を得た。

$$\log P = -2.25 \{ \log dp \}^2 - 4.12 \{ \log dp \} - 2.71$$

ただし、Pは透過率、dpは粒子径（μm）である。この近似関数を用い、中央径（MD）が0.1から10μmの範囲、および幾何標準偏差（GSD）が1～5の範囲の、812通りの粒子径分布における各段のDFを計算機で予め計算した。次にカスケードインパクトで粒子径分布が測定されている¹⁸⁹Auの放射性エアロゾルをHE-40Tフィルタの3段フィルタでサンプリングし、各段の放射能実測値から各段のDFを算出した。算出されたDFの組み合わせに近い組み合わせを812通りの粒子径分布から計算機によって選出させた。その結果を表5に示す。選出された粒子径分布はどれもカスケードインパクトによる実測値と極めて良い一致を見た。

表5. 多段フィルタ各段のDFの実測値と計算値の比較

Filter	Decontamination Factor (DF)			
	Experiment*		Calculation	
	MD = 1.2 GSD = 2.0		MD = 0.9 GSD = 1.8	MD = 1.0 GSD = 1.9
First Stage	94.1 ± 3.9		89.6	99.3
Second Stage	20.7 ± 1.1		21.4	20.2
Third Stage	13.9 ± 3.1		13.1	12.4

*; Size distribution determined by a cascade impactor and DFs measured in the three stage filter.

考察

今回の実験結果は考案した多段フィルタ法が放射性エアロゾルの粒子径分布評価法として妥当であることを示している。またその評価精度は内部被曝線量の評価には充分であった。多段フィルタ法によって得られる粒子径は内部被曝線量計算で必要となる放射能基準中央径（AMAD）であり、エアロゾル粒子の種類の違いにおける粒子密度の差を考慮する必要が無い利点がある。また最大の利点は事故時のような通常粒子径分布の情報が得られないケースに対しても、エアスニッファの1段フィルタを3段フィルタシステムに替えることのみで対応でき、カスケードインパクト

タのような特別な装置を必要としないことである。ただし、フィルタを多段に用いるため通気抵抗（圧量損失）が高くなるので、従来のエアシニッファにそのまま適用するには問題があると考えられる。

今回の実験では粒子の体積に放射エネルギーが比例するケースを検討した。しかし、ラドン、トリンの娘核種の吸入摂取の場合のように非放射性粒子の表面に RI が付着している、すなわち放射能が粒子表面積に比例するケースも考えられる。このようなケースでも種々の粒子径分布について予め DF を計算する段階で粒子表面積に比例する計算をしておけば対応できると考えられる。

結論

放射性エアロゾルの粒子径分布評価法として多段フィルタ法を考案し、その妥当性を実験的に確認できた。多段フィルタ法は特別な装置を必要とせず、日常的なモニタリング手法として採用でき、予め予測できない事故的な空気汚染の発生にも対応できる。

〔参考文献〕

- 1) ICRP, Publication 30 Part 1. (日本アイソトープ協会), p55. 1980.
- 2) 高田 茂、他 RADIOISOTOPES、32、260-269、1983.

〔研究発表〕

- 1) 山田裕司、宮本勝宏、小泉 彰：HEPA フィルタの捕集効率と除染係数、保健物理、21、237-244、1986.
- 2) 宮本勝宏、山田裕司、福田 俊、飯田治三、小泉 彰：第 23 回日本保健物理研究発表会口頭発表、1988.5. (千葉) .
- 3) 小泉 彰、宮本勝宏、山田裕司：第 24 回日本保健物理研究発表会口頭発表、1989.5. (千葉) .
- 4) 山田裕司、福田 俊、小泉勝三、飯田治三、小泉 彰：第 24 回日本保健物理研究発表会口頭発表、1989.5. (愛知) .
- 5) 小泉 彰、山田裕司、宮本勝宏：集塵用フィルタの粒子捕集効率の面風速依存性、保健物理、24、123-127、1989.
- 6) 小泉 彰、山田裕司：第 25 回日本保健物理研究発表会口頭発表、1990.5. (つくば) .
- 7) 福田 俊、飯田治三、山田裕司、小泉 彰、宮本勝宏、佐藤 宏、吉田浩樹：第 26 回日本保健物理研究発表会口頭発表、1991.5. (大阪) .
- 8) Yamada, Y. and Koizumi, A. : Simple method of size estimation of radioactive aerosols in air monitoring, J. Jpn. Health Phys. Soc., 26, 17-21, 1991.
- 9) 吉田浩樹、津浦伸次、小泉 彰、山田裕司：第 27 回日本保健物理研究発表会口頭発表、1992.6. (秋田) .
- 10) 小泉 彰、山田裕司、宮本勝宏、陳 淑恵：第 28 回日本保健物理研究発表会口頭発表、1993.5. (福岡) .