

NIRS-R-14

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」報告書

(昭和57年度～61年度)

昭和62年12月

放射線医学総合研究所

NIRS — R — 14

**Final Report on “Biological Effects of Tritium as a Basis  
of Research and Development in Nuclear Fusion”**

**April 1981 — March 1986**

**December 1987**

**National Institute of Radiological Sciences**

**9—1, Anagawa 4—chome, Chiba 260, Japan**

# 目 次

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」総括	松平 寛通	1
I トリチウムの生体への取込みと生体内での動態研究		
1. 環境生態系におけるトリチウムの挙動解析	岩倉 哲男, 井上 義和, 宮本 霧子	4
Behavior of Tritium in the Terrestrial Environment	T.Iwakura Y.Inoue and K. Tanaka-Miyamoto	
2. 水棲生物への移行	渡部 輝久	16
Metabolism of Tritium Bound to Glutamic Acid in Carp	T. Watabe	
3. トリチウムの食物連鎖における動態研究	新井 清彦	21
Tritium Behavior in Food-Chain	K. Arai	
4. 生体内におけるトリチウムの動態	武田 洋	27
Tritium Behavior in Animal Tissues	H. Takeda	
II トリチウムの生物効果比を求めるための物理・化学的研究		
1. トリチウム $\beta$ 線の線量評価並びに線量効果のモデル系の開発に関する研究		
(1) 低LET放射線のマイクロドシメトリ	星野 一雄, 川島 勝弘, 平岡 武, 山口 寛	33
Microdosimetric Properties of Low LET Radiation	K.Hoshino, K.Kawashima, T.Hiraoka and H.Yamaguchi	
(2) トリチウム $\beta$ 線により水中に生じる遊離基の収量について	山口 寛, 川島 勝弘, 星野 一雄, 平岡 武	39
Yields of Free Radicals in Water Irradiated by Tritium $\beta$ Rays	H.Yamaguchi, K.Kawashima, K.Hoshino and T.Hiraoka	
2. トリチウムの生物効果比を求めるための化学的研究	柴田 貞夫, 河村 正一, 渡利 一夫, 松平 寛通	44
Synthesis of $^{63}\text{Ni}$ Cyclam Complex as a Model of Tritiated Water	S.Shibata, K.Watari, S.Kawamura and H.Matsudaira	
III 動物細胞を用いたトリチウムの生物効果の解析研究		
1. トリチウムによる動物細胞及びDNA分子の障害に関する研究	上野 昭子, 古野 育子, 松平 寛通	51
Tritium Effects on Cultured Mouse Leukemia Cells L5178Y	A.M.Ueno, I.Furuno-Fukushi and H.Matsudaira	
2. トリチウムによる哺乳動物細胞の放射線障害に関する研究	坪井 篤, 田中 薫, 山口 武雄	59

	Tritium Effects on Growing and Plateau Phase NRK Cells in Cultures A.Tsuboi, K.Tanaka and T.Yamaguchi	
3.	細胞増殖動態及び障害回復能に対する低線量率照射の効果 渡部 郁雄, 五日市ひろみ, 本郷 悦子, 上野 昭子, 松平 寛通	66
	Effects of Low Dose-Rate $\gamma$ -Irradiation on Cell Kinetics in Cultured Mammalian Cells (L5178Y) I.Watanabe, H.Itsukaichi, E.Hongou, A.M.Ueno and H.Matsudaira	
IV	トリチウムによる動物組織の障害, 発生異常並びに発がん効果の研究	
1.	魚類生殖腺に対するトリチウムの影響 江藤 久美, 田口 泰子	74
	Effects of Tritiated Water on Germ Cells in Medaka H.Etoh and Y.Hyodo-Taguchi	
2.	トリチウム内部被ばくによる実験動物の造血障害に関する研究	
(1)	マウス造血組織におけるトリチウムの残留 上島 久正, 福津久美子, 鹿島 正俊	80
	Retention of Tritium in the Femoral Bone Marrow and Spleen in Mice after a Single Intravenous Injection of Tritiated Water and Tritiated Thymidine H.Joshima, K.Fukutsu and M.Kashima	
(2)	マウス骨髄多染性赤血球の小核形成に対するトリチウム $\beta$ 線の効果 鹿島 正俊, 福津久美子, 上島 久正, 松平 寛通	88
	Induction of Micronuclei in Polychromatic Erythrocytes of Mice after Injection of Tritiated Thymidine and Tritiated Water M.Kashima, K.Fukutsu, H.Joshima and H.Matsudaira	
3.	トリチウムの被ばくによる哺乳類の初期発生の障害に関する研究 山田 武, 湯川 修身, 浅見 行一, 中沢 透	93
	Effects of Tritium $\beta$ , $^{60}\text{Co}$ $\gamma$ or X Radiation on Preimplantation Mouse Development <i>in Vitro</i> T.Yamada, O.Yukawa, K.Asami and T.Nakazawaa	
4.	培養系を用いたトリチウムによる発がんに関する研究 山口 武雄, 村磯 知採, 松平 寛通, 安川美恵子, 寺島東洋三, 坪井 篤	104
	<i>In Vitro</i> Cell Transformation by Tritium Beta-rays T.Yamaguchi, C.Muraiso, H.Matsudaira, M.Yasukawa, T.Terasima and A.Tsuboi	
V	トリチウムによるヒトの放射線障害, およびその診断・予防に関する 調査研究 中尾 憲, 今井 康文, 能勢 正子, 川瀬 淑子	111
	Changes in the Hemopoietic Stem Cells and Lymphocyte Subsets in Humans after Exposure to Some Internal Emitters I.Nakao, Y.Imai, M.Nose and Y.Kawase	



# 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」 総括

松平 寛 通  
(生物研究部)

## 1. 概要

トリチウム生物影響の研究が、放射線影響の重点項目の一つに加えられてから10年以上にもなる。直接の契機は、昭和50年7月31日原子力委員会が「核融合研究開発の推進について第二段階核融合研究開発計画」を策定し、さらに同年11月11日付で同委員会の中に核融合会議を設置したことによる。松平は同会議の委員に選ばれ、以来討議に参加している。同会議では当初からトリチウム問題が取り上げられ、昭和53年にはトリチウム生物影響分科会がつくられ、トリチウムの生物影響に関し長期的展望に立った研究計画が立案された。

トリチウム生物影響研究の課題は、最初作業者及び作業所内の安全を目的としたものが選ばれたが、核融合研究の進展に伴い、作業所周辺さらには一般環境を含めた生物学的安全を目途としたものに拡大された。

本研究所では、文部省関係の研究と相呼応して、昭和54年度に指定研究「トリチウムの生物効果解析のための基盤的研究」を発足させ、研究方針の樹立、研究体制や装置・施設の整備に着手した。次いで、昭和55、56年度には特別研究「低レベル放射線の人体に対する危険度の推定に関する調査研究」の一環として、予備的研究を進めた。トリチウム水は水蒸気として飛散し易いため、呼吸器及び皮膚を介しての摂取による研究者の被曝を防止する必要があった。従って、実験系としては代謝実験を除き細胞を始めとする密閉系を主とする一方、トリチウム汚染動物実験装置、トリチウム呼気モニター、トリチウム汚染実験ユニット等の整備を図った。

昭和57年度からは、以前の実績をもとに本特別研究を、生体への取込みと代謝、物理・化学、細胞への効果、組織障害、人体被曝の5課題について5ヶ年間行い、昭和61年度で終了した。

これらの研究は所内は勿論、所外との緊密な協力のもとに実行された。特に、昭和54年5月日米核融合研究協力協定が結ばれて以来、米国との研究協力が行われた。昭和55年1月に稲葉次郎（環境衛生研究部）、同56年9月に江藤久美（生物研究部）、同58年3月に山口武雄（生物研究部）58年10月及び59年6～9月に岩倉哲男（環境衛生研究部）、60年5～8月に上野昭子（生物研究部）がそれぞれ米国に出張し、施設訪問、討論、共同研究を行った。逆に昭和55年10月、56年10月、59年10月には米国の学者を迎えワークショップを行った。55年のものは核融合燃料に関するもので原研で行われ、松平が参加し放医研のトリチウム研究の計画と現状について発表を行った（1）。

56年10月には米国よりDobson, Carsten, Strand, Murphy, Jr., Easterly各博士の5人、59年10月には同じくCarsten, Lee, Travis, Dobson, Murphy, Jr., Duda各博士の6人を迎え、大学関係、原研、動燃の研究者も交え、各3日間にわたる討論を放医研で行った。ワークショップの記録はProceedings of the Workshop on Tritium Radiobiology & Health Physics, NIRS-M-41、及びNIRS-52としてそれぞれ1982、1984年に刊行した（2、3）。

一方、昭和57年11月モルで開催されたEuropean seminar on the risks from tritium exposureには松平が出席、放医研のトリチウム研究について講演した（4）。

同58年10月から1年間渡部輝久（環境放射生態研究部）がノイヘルベルク放射線衛生研究所にトリチウム研究のため留学した。同59年12月には山田武（生物研究部）が、EC諸国のトリチウム関連施設を訪問し、昭和60年9月、オックスフォードで行われたECワークショップで、山口武雄がトリチウムの発ガン効果についての研究成果を発表した。

また61年2月カールスルーエで行われたEC主催のワークショップ「Environmental and human risks of tritium」には組織委員となった松平と山田が出席し、放医研の特別研究を含め研究の成果を発表した(5)。

なお、昭和61年10月25日マウス造血組織に対するトリチウムの影響に関し、すぐれた業績をあげた鹿島正俊班員(障害基礎研究部)が病気のため急逝されたのは残念であった。改めて御冥福をお祈りする。

## 2. 主な研究成果

トリチウムの環境動態に関しては、トリチウム放出源からの距離に応じ、雨水や地下水中のトリチウム水の濃度が高まること、松葉等の植物が環境汚染のよい指標となることを明らかにした。また、米、麦等の食用植物は一年を通じ開花・結実の比較的短い時期にのみ、可食部分にトリチウムを取り込むことを明らかにした。

トリチウムの動物体内での代謝に関しては、幼若動物ほど体内水分含量が高くトリチウム水の取り込みが高いこと、トリチウム水に比べアミノ酸等の有機型トリチウムの方が体内残留が大きく、従って被曝線量もトリチウム水の数倍大きくなること、同様のことはトリチウム汚染麦等の食物の摂取についてあてはまることを明らかにした。

物理・化学関係ではトリチウム $\beta$ 線の微視的線量分布の解析等から、トリチウムの生物効果比は軟X線とはほぼ同じと考えられ、後述する生物実験の結果を支持した。

培養細胞に対する効果に関しては、細胞致死、突然変異等について、トリチウム $\beta$ 線は $\gamma$ 線に比べ、線量-効果関係が直線に近く、生物効果比が1.5から3に近く、また有機型トリチウムとくにDNAに取り込まれるサイミジンはトリチウム水に比べ、数倍効果が強いことを明らかにした。トリチウムの発ガン効果に関する結果もほぼ同様である。

メダカ生殖腺、マウス骨髄、マウス胚培養を用いた研究は、それぞれ独自の検出系を樹立したことが評価される。こゝでもトリチウム $\beta$ 線は $\gamma$ 線に比し効果が強く、生物効果比は1以上2の値となった。

人体障害との関係では、トリチウムの被曝例がないためトロトラスト投与例について、末梢血中

の血液幹細胞、Tリンパ球サブセットの定量法を確立し、内部被曝による潜在的な造血器障害の診断に寄与した。

なお、本特別研究の主な成果は、上記文献(1)-(5)の他、文献(6)、(7)にまとめた。ゼロに近い状態から出発したトリチウム研究の火は、核融合炉研究の進展と相まって、今後も絶えることなく燃え続けるであろう。

## 参考文献

- (1) Matsudaira, H.: Present status and program of radiological tritium research at NIRS. In Proceedings US/Japan Workshop on Fusion Fuel Handling. JAERI-M 9390, 211-229, 1981.
- (2) Matsudaira, H., Yamaguchi, T., Nakazawa, T., and Saito, C., Eds. Proceedings of the Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics, NIRS-M-41, 1982.
- (3) Matsudaira, H., Yamaguchi, T., and Etoh, H., Eds. Proceedings of the Second Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics, NIRS-M-52, 1985.
- (4) Matsudaira, H.: Current status and program of biomedical tritium research at NIRS, Chiba. In Radiation Protection, European seminar on the risks from tritium exposure. Eds. Gerber, G. and Myttenaere. Commission of the European Communities. Report EUR 9065 EN, 1984. pp. 337-339.
- (5) Matsudaira, H.: The Japanese tritium programme I. Biomedical research at NIRS, Chiba. Radiat. Prot. Dosimet., 16, 9-11, 1986.
- (6) 松平寛通: トリチウム被曝, 放射線の影響評価研究の現状と展望, 原子力安全研究協会, 1985. pp.255-266.
- (7) 松平寛通: トリチウムの生物影響。Isotope News, 7, 2-7, 1986.

## 3. 特別研究の分担者と研究課題

### 班構成員

班長 松平寛通

副班長 河村正一, 平嶋邦猛, 中尾恵

顧問 樫田義彦

- (1) トリチウムの生体への取込みと生体内での動態研究
  - 岩倉哲男, 井上和義, 宮本霧子, 渡部輝久, 新井清彦, 武田洋
- (2) トリチウムの生物効果比を求めるための物理・化学的研究
  - 川島勝弘, 星野一雄, 平岡武, 山口寛, 河村正一, 渡利一夫, 柴田貞夫, 松平寛通
- (3) 動物細胞を用いたトリチウムの生物効果の解析研究
  - 上野昭子, 古野育子, 松平寛通,
  - 坪井篤, 田中薫, 渡部郁雄, 五日市ひろみ
- (4) トリチウムによる動物組織の障害, 発生異常並びに発がん効果の研究
  - 江藤久美, 田口泰子, 鹿島正俊, 福津久美子, 上島久正, 山田武, 湯川修身, 浅見行一,
  - 山口武雄, 村磯知採, 松平寛通, 安川美恵子, 寺島東洋三
- (5) トリチウムによるヒトの放射線障害, およびその診断・予防に関する調査研究
  - 中尾恵, 杉山始, 今井康文, 川瀬淑子, 能勢正子, 陣内逸郎, 別所正美, 平嶋邦猛

# I トリチウムの生体への取込みと 生体内での動態研究

## 1. 環境生態系におけるトリチウムの挙動解析

岩倉哲男, 井上義和, 宮本霧子  
(環境衛生研究部)

## Behavior of Tritium in the Terrestrial Environment

Tetsuo Iwakura, Yoshikazu Inoue and Kiriko Tanaka-Miyamoto  
Division of Environmental Health

Behavior of tritium in the terrestrial environment was studied in the vicinity of nuclear facilities in Tokai-mura, Ibaraki Prefecture. A trend of fallout tritium concentration in Kujigawa and Nakagawa rivers in Naka Terrace was well simulated by a modified tank model, in which river water was considered to be supplied with a mixture of discharges of three layered aquifers in the underground of Kanto Plain whose residence time was estimated at about 4, 8 and over 30 years, respectively. A relationship between monthly washout deposition and a source distance was clearly observed along the southwest direction of two heavy-water moderated research reactors in JAERI and was

well simulated by a sector model in which a proportionality constant for a washout constant was estimated to be  $2.6 \times 10^{-8} \text{ amm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Two to three times higher tritium concentration was observed during three years in organically bound form than in tissue water form in pine needles collected near tritium facilities. Mean annual tritium concentrations of both forms were well correlated with mean annual tritium concentration of monthly precipitation, mean annual tritium deposition and annual tritium discharge rate. Soil was suggested to play an important role as a reservoir and source of tritium for plants, atmosphere and groundwater.

### 1. 諸言

原子力施設から大気中に放出されたトリチウム ( $^3\text{H}$ ) が、拡散移りし最終的に人間に至るまでには、種々の環境エコシステム (大気, 陸水, 土壌, 動植物など) を経ると考えられる。本研究では、野外での実測データを基にエコシステムを構成する各要素相互間の  $^3\text{H}$  の移行動態およびその支配因子を解明し、被曝線量評価に必要な各種のパラメータの現実に即した値を確定し、種々の被

曝経路の相対的な重要性を明確にすることを目的とする。本研究では、a) 地下水を含む陸水圏での挙動, b) 降雨洗浄沈着挙動, および c) 陸上植物中での挙動に関する成果を報告する。

### 2. 研究方法

この目的を遂行するため、茨城県東海村における主要な  $^3\text{H}$  放出源と考えられる日本原子力研究所 JAERI (重水炉 JRR-2, JRR-3, 廃棄物処理

棟) および動力炉核燃料開発事業団PNC(核燃料再処理施設)の周辺,特に両者の中間に当り,前者の施設境界から南~南西0.5~2.0km および後者の北北西~西0.5~1.5km に当たる村松および宿地区を中心とする対象地域を選定し,月間降水,地下水や河川水などの陸水,土壌および松などを必要に応じて年4回,毎月,毎日などの頻度で採取し,それらの<sup>3</sup>H濃度を分析した。測定方法は,原則的には科学技術庁分析法マニュアル「トリチウム分析法」に準拠したが,必要に応じて新しい方法を開発した。降水,陸水などの水試料は,<sup>3</sup>H濃度レベルと要求される感度と精度に応じて,蒸留後直接大容量低バックグラウンド液体シンチレーション計数器Aloka LB1で計測するか,計測前に電気分解濃縮法で約25倍に濃縮後,Aloka 600-LB で計測した。また,土壌や松葉の水分は,凍結乾燥法により回収した。乾燥松葉中の組織結合型<sup>3</sup>Hは,低温灰化装置を用いて燃焼すかことにより燃焼水として回収し,主としてPackard社のTRICARB 2000CA/LLで計測した。<sup>3</sup>H濃度の結果は,pCi/1水で表記するが,1pCi=0.037BqでBq/1に換算出来る。

### 3. 結果

#### a. 陸水中の<sup>3</sup>Hの挙動解析研究

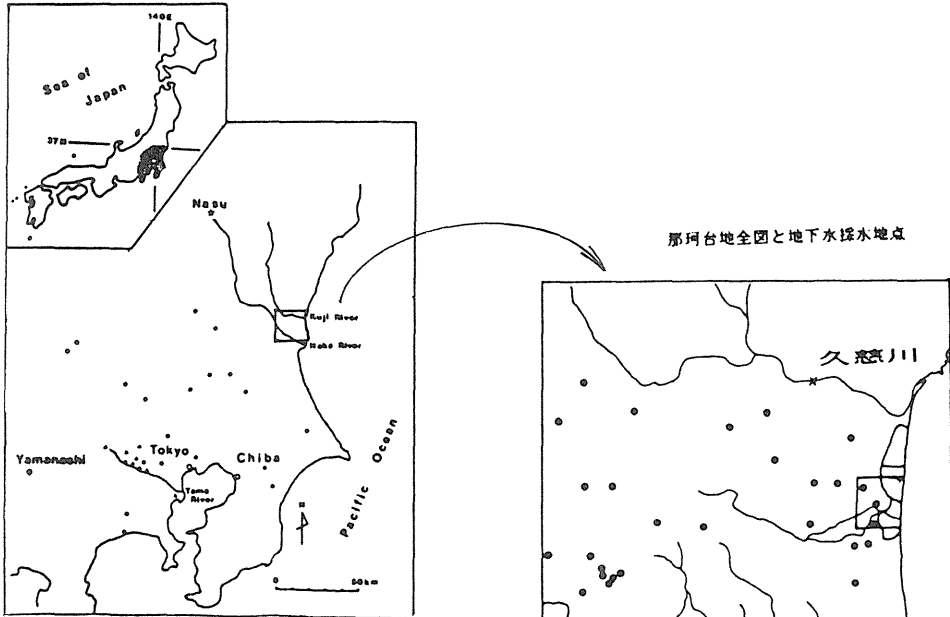
原子力施設の近隣のモニタリング結果を正しく評価するためには,広く後背地域の地下水や河川水などの住民の生活に密着した陸水の<sup>3</sup>Hに関するベースラインデータを求め,水文学的サイクルを考えた上での流域全体の水の挙動解析が重要である。本研究は東海村,那珂町を含む,那珂台地全域の水文学的情報を集め,フォールアウト起源の<sup>3</sup>Hと施設起源の<sup>3</sup>Hを弁別した上で,それぞれの挙動解析を行い,現実に即した線量評価モデルを確立することを目的とした。

まず原子力施設が多数稼働している東海村,那珂町等の属する那珂台地から,降水,地下水,河川水等の環境水を採取してその<sup>3</sup>H濃度を測定した。採水地点を図1に,測定結果の一部を表1に示した<sup>1-2)</sup>。那珂台地の地下水は40~90pCi/1で,降水30~50pCi/1の変化幅よりも高い濃度を示し,同時期に測定された河川水も50~110pCi/1と高く,1970年以前のフォールアウト<sup>3</sup>H濃度の高い降水が地下に貯留され,それが河川水へ流出していることがわかった。一方施設から2km以内の村松と照沼の地下水は100pCi/1

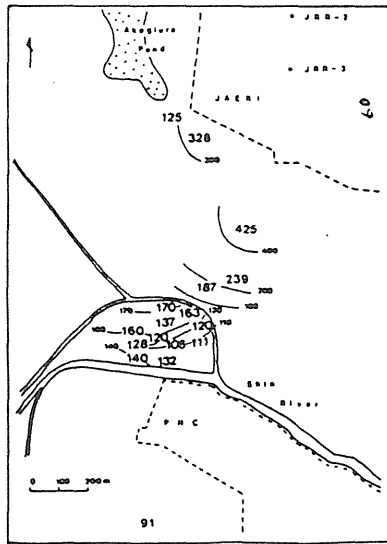
表1 那珂台地の地下水中トリチウム濃度 (pCi/1)

採水地	トリチウム濃度
昭和56年9月2日採水	
西木倉	0 ± 3
前本郷	68 ± 5
須和間	67 ± 4
南酒出	87 ± 5
岡	65 ± 5
村松-I	120 ± 6
照沼-I	122 ± 5
照沼-II	109 ± 6
昭和57年6月29日採水	
内里	77 ± 5
下国井	86 ± 5
飯田	48 ± 4
菅谷	50 ± 3
稲田	73 ± 4
舟石川	64 ± 4
押延	77 ± 4
長砂	67 ± 5
馬渡	69 ± 3
東中根	83 ± 4
瓜連	59 ± 4
向山	57 ± 5
村松-II	133 ± 5
村松-III	113 ± 4

以上で,施設寄与の<sup>3</sup>Hが付近に降下して地中へ浸透していることがわかった。より詳細な濃度分布は,図1右図に示すように村松の新川沿岸域に最高425pCi/1の地下水があり,<sup>3</sup>Hの放出源を示唆するように原研の南西方向の距離の増加とともに<sup>3</sup>H濃度が減少傾向を示した。このように,施設の極近隣の2km以内を除いてはフォールアウト<sup>3</sup>Hの寄与が支配的であることがわかった。そこで本研究では日本でフォールアウト<sup>3</sup>Hが測定され始めてから現在までに得られた測定データに対し,地下水中滞留時間を推定する概括的モデルを適用し30年間に亘る陸水中<sup>3</sup>H挙動の解析を試みた。



関東平野全図と文献2～9より引用した  
実測値の採水地点



東海村字村松の地下水中トリチウム濃度実測値と  
等濃度線（数字はpCi/l、59年11月採水）

図1 陸水採取地点地図

○：降水、●▲：地下水、×：河川水

(1) モデルの原理

図2に示すように、地下に三段に分割された貯留層を考える。モデルの原型としては菅原の<sup>3)</sup>河川流出解析法のタンクモデルを用いたが、本研究では、表2に定義されるように個々のコンパートメントに<sup>3</sup>H濃度の変数や、新しい定数などを導入した。まず最初の単位時間(i=1)に1段目

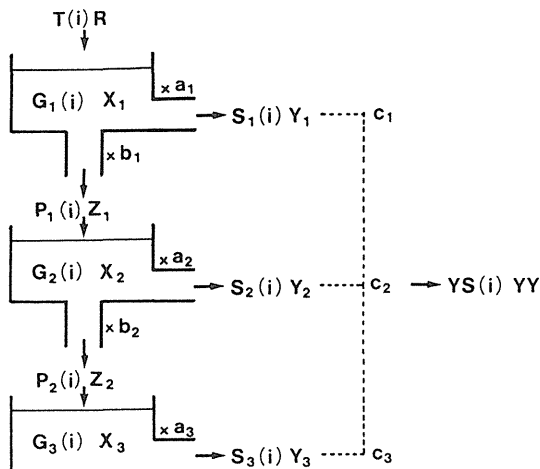


図2：モデルの構造  
文字の定義は表2を参照のこと

表2 モデルに使われる文字の定義  
(j=タンク段数, i=年)

	水量 (毎年一定)	<sup>3</sup> H濃度
降水	R	T(i)
貯留水	X <sub>j</sub>	G <sub>j</sub> (i)
流出水(地下水、温泉水)	Y <sub>j</sub>	S <sub>j</sub> (i)
浸透水	Z <sub>j</sub>	P <sub>j</sub> (i)
総流出水(河川水)	YY	YS(i)
降水平均滞留年数(X <sub>j</sub> /R)	x <sub>j</sub>	
地下水の河川水への流出寄与率	c <sub>j</sub>	
その他の定数	a <sub>j</sub> , b <sub>j</sub>	
1年分の <sup>3</sup> Hの壊変率	λ	

の貯留層に降水によりT(1)R(1)の<sup>3</sup>Hが注入され、貯留層に貯えられ、G<sub>1</sub>(1)X<sub>1</sub>(1)となる。そこからa<sub>1</sub>の割合で地下水として河川へ流出していく分(S<sub>1</sub>(1)Y<sub>1</sub>(1))と、b<sub>1</sub>の割合で更に下段の貯留層に浸透降下していく分(P<sub>1</sub>(1)Z<sub>1</sub>(1))を考えると次式が成り立つ。

$$G_1(1)X_1(1) = T(1)R(1) \quad \dots(1)$$

$$S_1(1)Y_1(1) = G_1(1)X_1(1)a_1 \quad \dots(2)$$

$$P_1(1)Z_1(1) = G_1(1)X_1(1)b_1 \quad \dots(3)$$

次の単位時間(i=2)の最初における<sup>3</sup>Hの残量は、G<sub>1</sub>(1)X<sub>1</sub>(1)-S<sub>1</sub>(1)Y<sub>1</sub>(1)-P<sub>1</sub>(1)Z<sub>1</sub>(1)となる。そこへ新たに降水によってT(2)R(2)が注入され、貯留層1の中の<sup>3</sup>Hは次式のごとくなる。

$$G_1(2)X_1(2) = \lambda \{ G_1(1)X_1(1) - S_1(1)Y_1(1) - P_1(1)Z_1(1) \} + T(2)R(2) \quad \dots(4)$$

いま、iの単位を1年にとれば、X<sub>1</sub>, Y<sub>1</sub>, Z<sub>1</sub>, Rなどの変数はiに対して不変とみなされ、また貯留層中の水の年間置換速度定数(turnover rate constant)を定義し、その逆数x<sub>1</sub>(x<sub>1</sub>=X<sub>1</sub>/R, (年))を代入して(1)~(4)式を整理すると次式が導き出される。

$$S_1(i) = \lambda \{ (1 - a_1 - b_1) S_1(i-1) + T(i)/x_1 \} \quad \dots(5)$$

2段目以降については注入された<sup>3</sup>Hは上段からの浸透降下分P<sub>j-1</sub>(i)Z<sub>j-1</sub>だけとする点を考慮して、前と同様にして次式が求められる。

$$S_2(i) = \lambda \{ (1 - a_2 - b_2) S_2(i-1) + S_1(i-1) b_1 x_2 / x_1 \} \quad \dots(6)$$

$$S_3(i) = \lambda \{ (1 - a_3) S_3(i-1) + S_2(i-1) b_2 x_3 / x_2 \} \quad \dots(7)$$

次に各段から流出する地下水が各々c<sub>j</sub>の混合比で河川へ流出寄与していると考えたと河川水については次式が得られる。

$$YS(i) = \sum S_j(i) c_j / \sum c_j \quad \dots(8)$$

得られた(5)~(8)式にあらかじめ定数a<sub>j</sub>, b<sub>j</sub>, c<sub>j</sub>, x<sub>j</sub>に適当な初期値を代入し、毎年の降水中平均<sup>3</sup>H濃度を逐次代入して計算し、得られた各段からの流出地下水S<sub>j</sub>(i)と河川水YS(i)の<sup>3</sup>H濃度の経年変化を、それぞれの実測による経年変化と合うようにa<sub>j</sub>, b<sub>j</sub>, c<sub>j</sub>, x<sub>j</sub>の修正を繰り返し、適合時の各定数を求める答えとする。

(2) モデル計算に利用した実測データ

降水の<sup>3</sup>H年平均濃度は1954~1960が山梨県のワインの値<sup>4)</sup>、1961~1979がIAEAによる東京の測定値<sup>5-6)</sup>、1980~1984が著者らによる千葉の測定値である。計算値修正のために利用した実測値は関東各地の地下水の値<sup>7-11)</sup>を引用し、河川水は東京水道水と多摩川を<sup>2)</sup>、また那珂台地の久慈川と那珂川について著者らによって測定されたものを用いた。これらのデータの地理的分布を図1に示す。

(3) モデル計算結果

流出地下水の計算値が最もよく実測値と適合した時の経年変化を図3に、河川水は図4に示した。また得られた定数を図5にまとめた。計算値と実測値が±10%以内で一致する時のパラメータの変動幅が相対百分率でカッコ内に示してある。計算の結果、関東平野の地下水は、約3.8年で河川へ

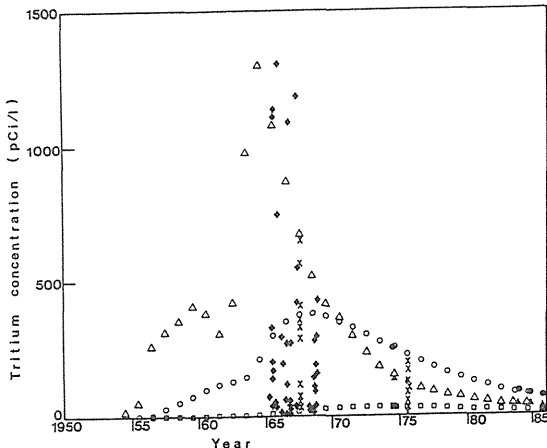


図3：流出地下水の計算値 ( $S_j(i)$ )と実測値の比較

- △:  $S_1(i)$ , ○:  $S_2(i)$ , □:  $S_3(i)$
- ◆: 文献6、7の地下水の実測値
- ×: 文献5、8の地下水の実測値
- ▲■: 文献9の地下水の実測値

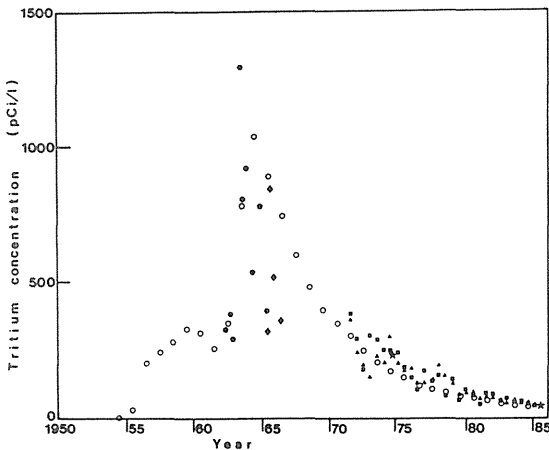


図4：河川水の計算値 ( $YS(i)$ )と実測値の比較

- :  $YS(i)$
- : 文献2の東京水道水の実測値
- ◆: 文献2の多摩川の実測値
- ★: 文献9の那珂川の実測値
- ▲: 本研究の那珂川の実測値
- : 本研究の久慈川の実測値

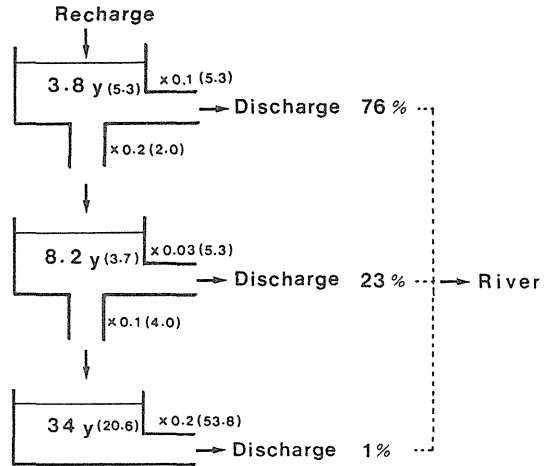


図5：関東平野について得られたパラメータのまとめ

流出する地下水、更に深部へ浸透して約8.2年の滞留時間で河川へ流出する地下水、それから30年以上長く地下に留まる地下水の3段の貯留層を考えると都合がよいことがわかった。図3、4中の計算値の経年変化を見ると、1970年以降2段目の貯留層の地下水が1段目の貯留層より<sup>3</sup>H濃度が上回るようになり、その流出寄与により、河川水が降水よりも高い濃度を保つようになった経過が一目でわかる。

(4) 討論

結果の不確かさの原因としては、計算に利用した<sup>3</sup>H濃度の実測データの数と信頼度が考えられるが、今回得られた各パラメータの感度は、モデル全体には影響の少ない $a_3$ と $x_3$ を除いて、非常に良い。河川への地下水流出寄与率 $c_j$ については、降雨直後の河川の増水を説明するための「直接流出」の解析など、数日～1ヶ月の時間スケールでのモデルでは、別の重要な意味をもつが、本モデルのように数十年の解析を目的とした場合には短い貯留層分はすべて第一段目に含まれてしまう。また年間降水量 $R$ は、地下へ浸透し貯留層に貯留され得る有効降水量を示すが、ごく短時間に流出してしまう表面流出分や大気中への再蒸発分は含まれない。定数 $a_j$ 、 $b_j$ と貯留層との地質学的属性の対応は今後の検討課題である。

本研究では施設後背景としての那珂台地のフォールアウトおよび施設寄与の<sup>3</sup>H濃度の分布を明らかにし、そのうちフォールアウト<sup>3</sup>Hをトレーサとして利用し、関東平野全体の地下水による流出挙動について概括的な数式モデルを提案した。



このモデルの意義は1970年以降関東地方で観測されている、降水の年平均濃度に近い地下水と、それより高い濃度の地下水と、ほとんど $^3\text{H}$ を含まない地下水、そして降水よりも高い濃度を保つ河川水などの、フォールアウト $^3\text{H}$ の流出機構に関し各コンパートメントの位置づけを行い、相互の関係を具体的な形で表現することにある。施設付近に降下した施設寄与の $^3\text{H}$ の短時間の貯留、流出挙動のモデル化については今後に残された問題である。

b.  $^3\text{H}$ の降雨洗浄沈着挙動

現地の気象統計によれば、同地域の年間風向頻度は主として春秋に吹く北東風が約33%を、冬に吹く北西風が約33%を占める。冬は降雨量が極小であることや、南風の頻度が8月以外には小さいことおよび再処理施設のスタック高が90mと高い故に風速も大であるため、大気拡散による希釈が大きいことなどを考慮すると、前記採取地域で観

測される $^3\text{H}$ は、PNCではなく主としてJAERIから大気放出されたものと予測される。この予測は、1982から1986年までの5年間に観測した月間降水量のデータ<sup>12)</sup>から裏づけられる。この前提に立ち、図6中のJAERIの南～南西0.5～2.0kmで観測された降水の $^3\text{H}$ 濃度または降下量のデータの中で放出源距離依存性が観測された月のデータを選び、次に示す降雨洗浄沈着に関するセクタモデルを適用して、 $^3\text{H}$ の降雨洗浄沈着に関する洗浄率定数 $s$ を評価した<sup>13)</sup>。

$$B_i = A \frac{N}{2\pi X} \sum_m q_{im} \frac{\lambda}{U_{im}} \quad \dots(1)$$

$$\lambda = s \delta \quad \dots(2)$$

ここで $B$ は単位面積当りの沈着量( $\text{Ci}/\text{m}^2$ )、 $N$ はセクタの数(=16)、 $A$ は放出率( $\text{Ci}/\text{s}$ )、 $X$ は放出源-観測点間距離(m)、 $q$ は降雨頻度( $i$ :風向、 $m$ :風速レベル)、 $\lambda$ は洗浄率定数( $\text{s}^{-1}$ )、 $s$ は比例定数( $\text{a mm}^{-1} \text{s}^{-1}$ )、 $\delta$ =降雨強度( $\text{m}^{-1} \text{a}^{-1}$ )である。

計算の際、以下の仮定をした。

- 1)  $^3\text{H}$ 放出源はJRR-2とJRR-3である。
- 2) 風下方向南～南西の時、JRR-2とJRR-3の実効スタック高は50mである。
- 3) 地上高50mの風速は、地上高10mのその2.6倍である。
- 4)  $^3\text{H}$ 放出率は1ヶ月の間一定で、一雨毎の降雨強度は観測地域内で一定である。
- 5) 比例定数 $s = 2.6 \times 10^{-8} \text{ a mm}^{-1} \text{ s}^{-1}$ とする。

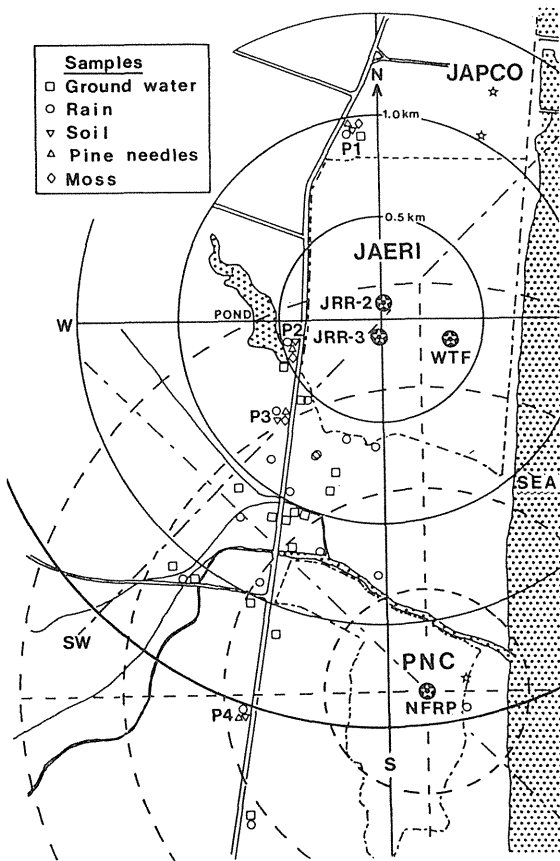


図6：茨城県東海村における試料採取地点

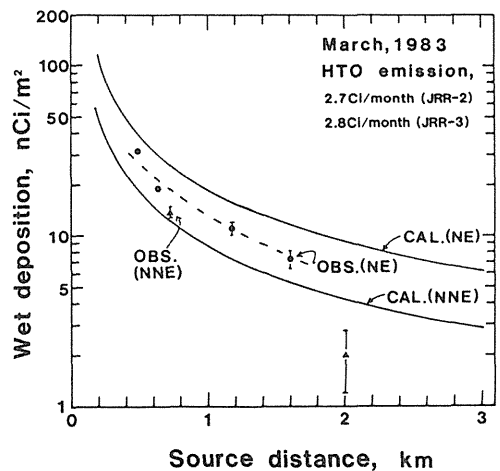


図7： $^3\text{H}$ 沈着量の放出源距離依存性に関する計算と観測との比較

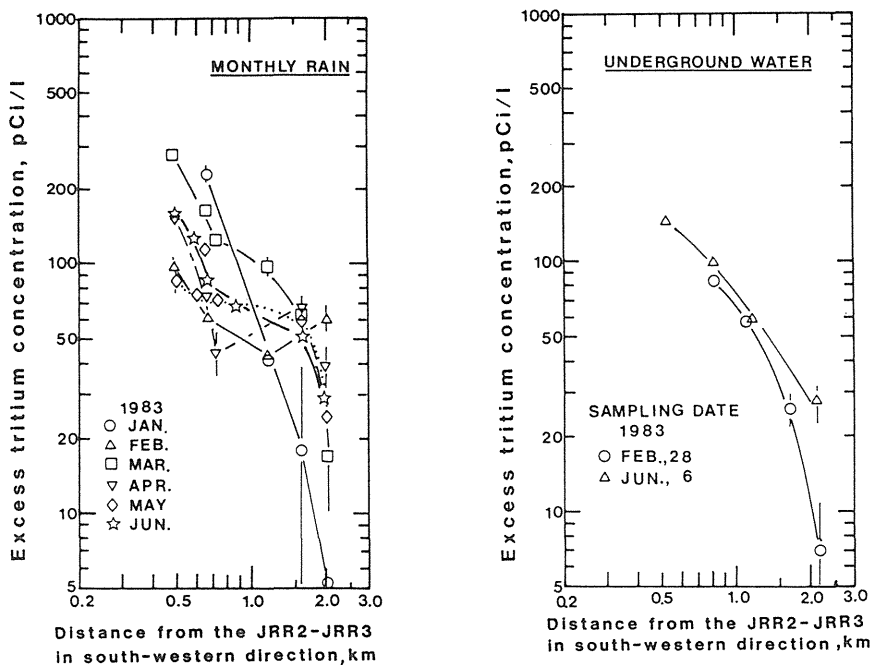


図8：月間降雨（左）および地下水（右）の過剰の<sup>3</sup>H濃度の放出源距離依存性の相互比較

表3 地点P3における<sup>3</sup>Hの月間沈着量に関する計算値と観測値との比較

		1982				1983	
		APR	MAY	JUL	SEP	JAN	MAR
Deposition	Obs.	6.4	32.1	67.5	11.2	3.9	17.9
	Cal.	11.8	72.5	41.1	8.0	2.4	29.9
RATIO (Obs/Cal)		0.54	0.44	1.6	1.4	1.7	0.60
Concentration	Obs.	74	234	540	82	233	163
	Cal.	114	566	325	41	127	259
RATIO (Obs/Cal)		0.65	0.41	1.7	2.0	1.8	0.63

放出率および気象データを式(1)と(2)に代入して計算した結果と、1982年4月から1983年3月の1年間JRR-2の南西約690mの地点P3において観測した降水の<sup>3</sup>H濃度から千葉での濃度を差し引いた後の測定値とを比較した。その結果、表3に示す様に信頼度の高い6ヶ月分のデータについては沈着量、濃度とも観測値と計算

値は互いに良く一致した。また、我々の推定値sを用いて計算した1983年3月の北東風と北北東風の場合の放出源距離と沈着量との関係の曲線を観測値とともに図7に示す。両者は、距離0.5～2.0kmの範囲で互いにFactor2で良く一致した。月間降雨の<sup>3</sup>H濃度と距離との関係は、図8に示したように同地域の浅層地下水中の<sup>3</sup>H濃度のそ

れと近似していた。このことは、地表に沈着した<sup>3</sup>Hが、地中を垂直浸透し地下水中に混入したことを強く示唆する。

比例定数  $s$  の我々の推定値を報告値 (表 4) と比べると Brenk, H. D. 等の  $3.4 \times 10^{-8}$  と極めて近いが、他の報告値と比べると 1 桁高い。この原因としては、雨滴の大きさの分布の相違や沈着した<sup>3</sup>Hの地表からの再蒸発に対する補正の有無等

が考えられる。以上の結果は、周辺に多数の放出源が存在する地域においても、化学形を考慮した放出強度、スタック高、風向、放出源距離等を考慮すれば、ある地点に対する主放出源の同定が可能であり、かつ計算により<sup>3</sup>H沈着量の推定が可能になったことを意味する。また、放出源管理や被曝線量評価の他、土壌や地下水中の<sup>3</sup>Hの挙動に関する研究に役立つと考えられる。

表 4 洗浄率定数の比例定数  $s$  の報告値

$s$ ( $\text{a mm}^{-1} \text{s}^{-1}$ )	References
$3.4 \times 10^{-8}$	Brenk, H.D., et al. (1976) (5)
$3 \times 10^{-9}$	Hübschmann, W., et al. (1978) (6)
$(1-2) \times 10^{-9}$	Papadopoulos, D. et al. (1982) (3)
$2.6 \times 10^{-8}$	This work (1984)

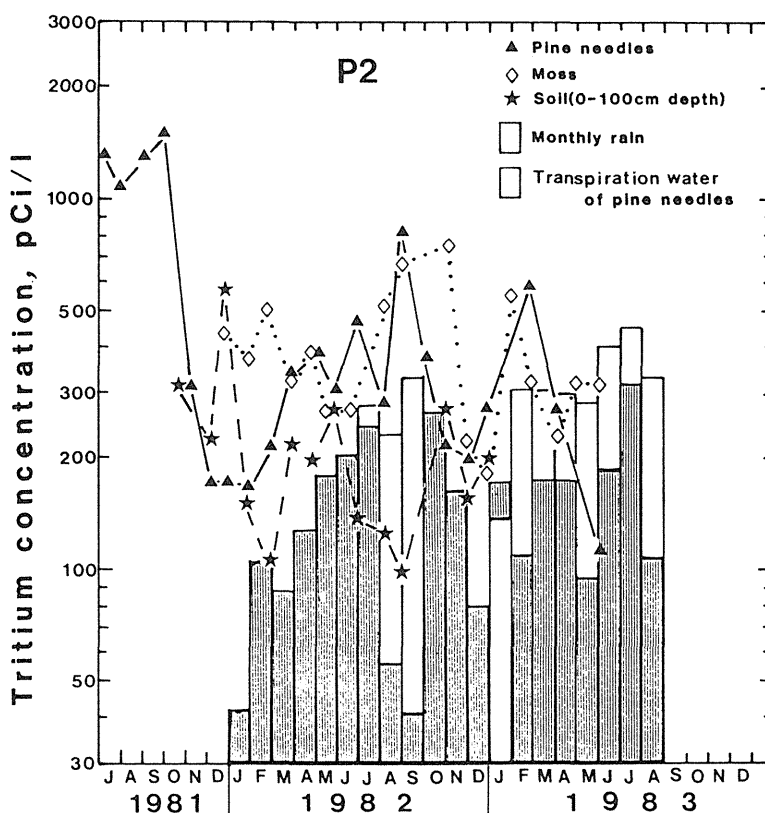


図 9 : 地点 P 2 で観測した苔、松葉水分、松葉蒸散水、土壌水分および月間降雨の<sup>3</sup>H濃度の経時変化。

c. 陸上植物中での挙動。<sup>14)</sup>

<sup>3</sup>H モニタリングの陸上植物の指標として松を選んだ。数多くの選定理由を列挙出来るが、第一には日本で地域、季節を問わず採取できることや外国でも同じ目的で使用されているので、データの相互比較が可能なことなどである。原則的に、1981年後半から1985年の間に図6に示すP1～P4の4定点で1～2ヶ月に1度採取した松葉中の<sup>3</sup>Hを組織水形TWT (Tissue Water Tritium) と組織結合形TBT (Tissue Bound Tritium) とに分離して測定した。

1) 松葉のTWT濃度については、南～西南西方向に高い地域分布を示し、距離に逆比例する傾向があった。この傾向は、降水の<sup>3</sup>H濃度や沈着量のそれらと同様であったので、松葉中の<sup>3</sup>Hの起源もJAERIの主としてJRR-2とJRR-3から大気放出された<sup>3</sup>Hであると推定された。

2) 同原子炉の西南西約500mの地点P2の狭い範囲で同時刻に採取した高さ4～5mの10本の松の葉および枝の<sup>3</sup>H濃度の平均値は、表5に示したようにそれぞれ約15%程度の標準偏差内にあり、局地的に極めて均一であった。また、葉と枝の濃度比の平均値は、 $1.29 \pm 0.14$  と葉の方が高かったが、これは大気中から葉への濃度勾配があったためと考えられる。

3) 同地点で採取した松葉、苔、土壌(深度0

-100cm)の含有水および、松葉蒸散水と月間降雨などの<sup>3</sup>H濃度を測定し、その経時変化を図9に示した。<sup>3</sup>H水の濃度は、月間降雨 $\leq$ 土壌=蒸散水 $\leq$ 松葉=苔の順に高かった。この現象の原因について考察する。植物の水分の<sup>3</sup>H濃度は、土壌の水分と大気水蒸気の両者の<sup>3</sup>H濃度の影響を受ける。JAERIの施設境界でのモニタリングデータ<sup>15)</sup>によれば、大気水蒸気の<sup>3</sup>H濃度は、月間降雨のその約2倍である。苔の<sup>3</sup>H濃度は、根が浅いので大気水分の影響を受け易く大気濃度に近くなり、一方、松葉は根が深いので根圏の水分、すなわち数カ月前の降雨の<sup>3</sup>H濃度と採取時の大気濃度の中間の値を示すと考えられる。蒸散水は、松葉にビニール被いをして採取するので、大気水分の影響を受けず、根圏の土壌水分の<sup>3</sup>H濃度を代表すると考えられる。土壌水の濃度が月間降雨の濃度より多少高いのは、土壌中では<sup>3</sup>Hの滞留時間が比較的長いので、過去に多量の<sup>3</sup>Hの沈着があったと仮定すれば説明がつく。

4) 1981年から1986年までの約5年間にJRR-2から南西の約750mの地点P3で観測した松葉のTWTおよびTBTの経時変化をJRR-2とJRR-3の月間大気<sup>3</sup>H放出率の合計および同地点で観測した降雨の<sup>3</sup>H濃度とともに図10に示す。TWTおよびTBT濃度は、共に一般環境レベルより10～20倍高く、かつ放出率や降水の<sup>3</sup>H濃度の

表5 松の葉と枝の水分の<sup>3</sup>H濃度の局地分布

松の番号	<sup>3</sup> H 濃度、 nCi/l ( $\pm 1SD$ )		
	葉	枝	濃度比(葉/枝)
1	1.94 $\pm$ 0.04	1.55 $\pm$ 0.04	1.25
2	1.46 $\pm$ 0.04	0.99 $\pm$ 0.03	1.48
3	1.79 $\pm$ 0.04	1.39 $\pm$ 0.03	1.29
4	1.56 $\pm$ 0.03	1.19 $\pm$ 0.03	1.32
5	1.51 $\pm$ 0.04	1.13 $\pm$ 0.03	1.33
6	1.33 $\pm$ 0.03		
7	1.47 $\pm$ 0.04	1.41 $\pm$ 0.03	1.04
8	1.94 $\pm$ 0.04		
9	1.97 $\pm$ 0.04		
10	1.75 $\pm$ 0.04		
平均値 (標準偏差)	1.67 $\pm$ 0.23 (14%)	1.28 $\pm$ 0.21 (16%)	1.29 $\pm$ 0.14 (11%)

\* 採取日 : 1981年10月1日  
採取地点: P2

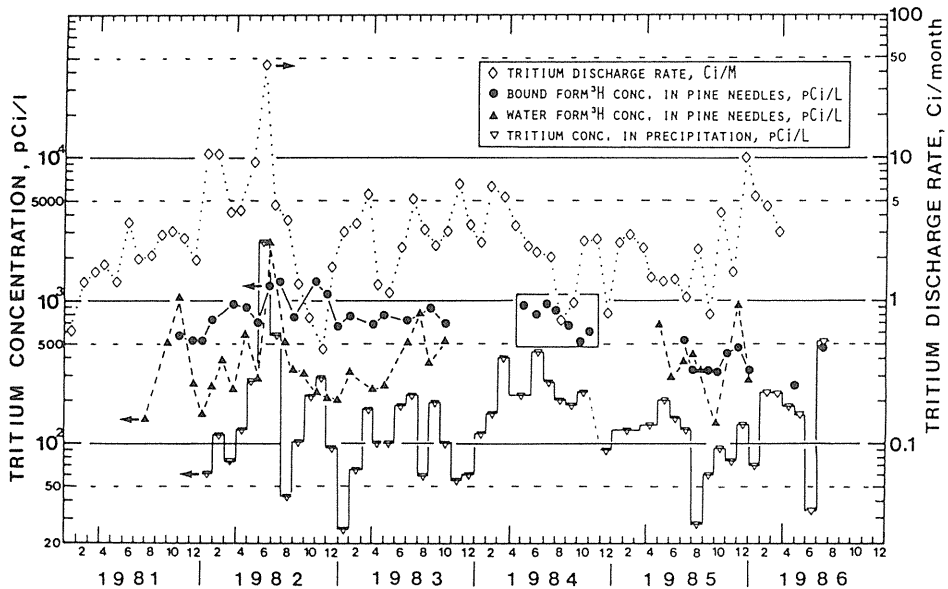


図10：地点P3で観測した松葉のTWT、TBTおよびJRR-2とJRR-3の<sup>3</sup>H月間放出率の経時変化間の相互比較。

経時変化にはほぼ対応して変化しているように見える。TWT濃度は大きな濃度幅を短時間で変動しているのに比べ、TBT濃度は、比較的小さな濃度幅で変動し、かつ1982年から1984年の約3年間は、TBT濃度はTWT濃度より2～3倍高かった。1985年には、両者は同じ濃度レベルで推移した。TWTがTBTより濃度変動が大きいのは、前者の松葉中での滞留時間が、後者よりも相当短いので、周辺環境の<sup>3</sup>H濃度の変動の影響を受け易いためと考えられる。他方、TBTの濃度が、TWTの濃度より約3年の長期間2～3倍高いレベルで推移した理由については不明である。この地域の大気中HT濃度は、我々やPNCの測定結果から一般環境の大気中レベルの1.0～1.2 pCi/m<sup>3</sup>と同じであり、一般環境の松葉のTBT濃度は100 pCi/l以下であったので、HTが原因ではあり得ない。過去に相当多量の<sup>3</sup>Hの沈着があり、土壌中に高濃度の<sup>3</sup>Hが腐蝕物やその分解生成物である低分子の有機物として存在し、松が根を通じて栄養として摂取した可能性も考えられ、今後の検討課題である。

5) 松葉のTWTおよびTBT濃度の年平均値と降水の濃度、沈着量、およびJRR-2とJRR-3の放出率の年平均値とのそれぞれの間の相関を調べた。図11および図12から明らかなように、相関係数0.75～0.99とかなり良い相関を示した。この結果は、TWTおよびTBTが、主として重水炉JRR-2とJRR-3に由来し、地上に沈着した後、根を通じて摂取され、松葉中に見いだされたことを示唆する。

6) 1986年には原研との共同研究の一環として、JRR-2の南南西750mの地点で大気水蒸気、降雨、松葉蒸散水の連続採取および2～3週毎に裸葉と深度0-100cmの土壌の採取を実施した。その結果、土壌が<sup>3</sup>Hの貯留槽になっており、その水分の<sup>3</sup>H濃度が、松葉のTWTや地表大気の水蒸気の<sup>3</sup>H濃度を支配していることが分かった。このことは、<sup>3</sup>Hの移行過程の中で、経根と蒸発散過程の重要性を示唆する。

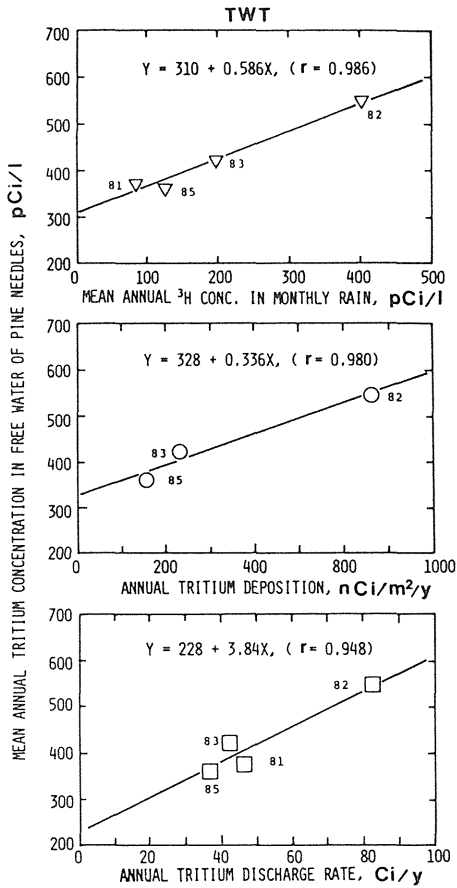


図 11：松葉のTWT濃度と<sup>3</sup>Hに関する月間降雨の濃度の年平均値（上）、年沈着量（中）および年放出率（下）間の相関。

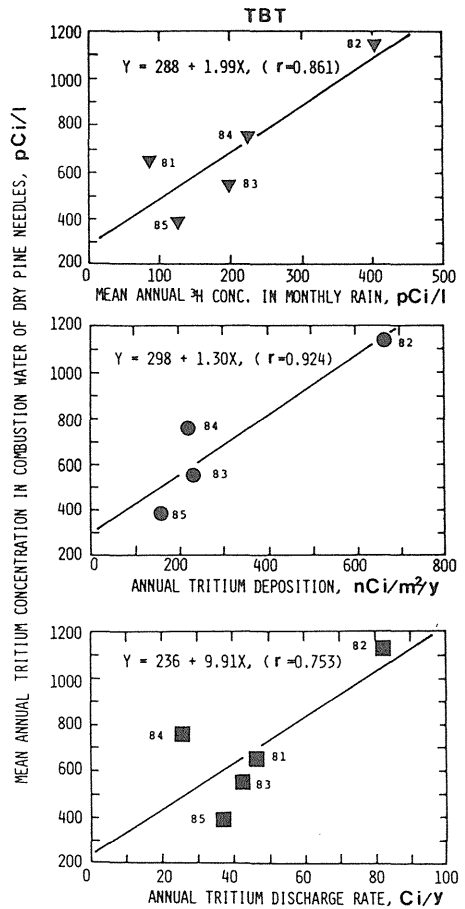


図 12：松葉のTBT濃度と<sup>3</sup>Hに関する月間降雨の濃度の年平均値（上）、年沈着量（中）および年放出率（下）間の相関

#### 4. 討論

結果の中で述べたので省略する。

#### 5. 結論

- 東海村を含む那珂台地を挟んで流れる久慈川と那珂川の河川水の過去20年間の<sup>3</sup>H濃度の変化を滞留時間の異なる3つの地下水層から成るタンクモデルにより説明出来た。
- <sup>3</sup>H放出源の風下で観測した沈着量と洗浄沈着モデルを適用した計算値と比較することにより、洗浄沈着定数の比例定数を決定した。この結果、計算により沈着量の評価が可能となった。
- <sup>3</sup>Hによる慢性的汚染環境での長期観測により、松葉の組織結合形<sup>3</sup>Hが、組織水の<sup>3</sup>Hより

りも高濃度の状態が長期間続く事実が明らかになった。また摂取経路については、土壌が<sup>3</sup>Hの貯留槽として作用している事実から、経葉よりも経根の方が相対的に重要であることが示唆された。

#### 参考文献

- 放射能調査報告書：NIRS-Rシリーズ，1979-1985。
- Tanaka-Miyamoto, K., Inoue, Y., Iwakura, T. and Takase, K.: Tritium concentrations of ground-water in Naka Terrace, Ibaraki Prefecture, Japan, *J. Environ. Radioactivity*, **5**, 219-227, 1987.
- 菅原正巳：流出解析法，水文学講座7，共立出版社，1978。

- 4) Takahashi, T., Nishida, M., Ohno, S. and Hamada, T.: Tritium concentration in wine, rain and groundwater. *Radioisotopes*, **18**, 560-563, 1969.
- 5) IAEA: Statistical treatment of environmental isotope data in precipitation. Technical report series No. 206, 78-79, 1981.
- 6) IAEA: Environmental isotope data No.7. World survey of isotope concentration in precipitation (1976-1979). Technical report series No.226, p.79, 1983.
- 7) 木越邦彦：大気中の<sup>14</sup>Cの長期変動および<sup>3</sup>Hの分布に関する研究，天然レベル気状放射性物質の放射能測定歩の研究，42年度文部省総合研究報告集録（課題番号956052），36-37，1968.
- 8) 落合敏郎：関東平野における地下水の年代測定とその水文地質学的研究，日本地下水学会会誌，第14号，11-23，1968.
- 9) 落合敏郎，川崎宏直：日本における地下水のトリチウム(11)，用水と廃水，**14**，1383-1388，1972.
- 10) 木越邦彦：地下水の古さを測る，自然，9月号，38-47，1976.
- 11) Tanaka, K., Koizumi, M., Seki, R. and Ikeda, N.: Hydrogen isotope (T, D) study of hot-spring waters from Nasu, Tochigi Prefecture. *Geochem. J.*, **19**, 289-299, 1985.
- 12) 昭和60年度放射能調査研究報告書，pp.54-69，NIRS-R-12，放医研，1986.
- 13) Inoue, Y., Iwakura, T. and Miyamoto, T. K.: Environmental aspects of tritium released into the atmosphere in the vicinity of nuclear facilities in Japan, *Proceedings of the Second Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics*, edited by Matsudaira, H. et al, NIRS-M-52, pp.296-315, 1985.
- 14) Inoue, Y., Tanaka, K. and Iwakura, T.: Ecological aspects of atmospheric discharged tritium in the vicinity of nuclear facilities in Japan, *Radiation-Risk-Protection*, edited by Kaul, A. et al, Fachverband fur Strahlenschutz e.V., Vol. 1, pp.180-183, 1984.
- 15) 東海研究所保健物理部他：保健物理部－管理と研究－No.27，JAERI-M85-134，pp.69-70，1985.

## 2. 水棲生物への移行

渡部 輝久

(環境放射生態学研究部)

### Metabolism of Tritium Bound to Glutamic Acid in Carp

Teruhisa Watabe

Division of Radioecology

Excretion of tritium bound to glutamic acid was investigated in carp. Approximately 80 % of orally administered tritium was excreted with a half life of 1.4 hour and for the remainder slower excretion with that of 7 days was observed. Analysis with an ion exchange column chromatography suggested that tritium would be released in the form of tritiated water as a result of catabolism of glutamic acid in the fish. Tritium bound to glutamic acid was efficiently retained in the site of absorption, i.e. intestine, followed by liver, kidney, gill, blood and muscle in the decreasing order. A 10-fold

variation of tritium concentration was observed among these organs (tissues).

A dual marking experiment using tritiated glutamic acid and  $^{14}\text{C}$ -labeled glutamic acid showed higher excretion of tritium, by a factor of 2 to 5, than that of  $^{14}\text{C}$ . This could reasonably be explained by postulating a discrimination by the citric acid cycle between tritium and  $^{14}\text{C}$ , when glutamic acid entered into it. It was concluded that the energy producing process would greatly contribute to reducing the retention of organically bound tritium in the fish.

#### 1. 緒言

環境に放出されたトリチウム（トリチウム水）は生物により有機物中に固定される。この有機物中のトリチウムはトリチウム水に比較して生体中での滞留時間は長く、また、トリチウム水とは異なる生物効果を表わすものと考えられる。したがって、トリチウムの被曝線量評価では、環境中での有機態トリチウムの生成機構、人体に至る食物連鎖移行および生物体内における代謝について充分な知見を得ておくことが必要である。水圏においては第一次生産者である藻類はトリチウムを効果的に有機物中に固定する。水棲生物によるトリチウムの取込みを水素原子の取込みと比較した場合、差別係数（discrimination factor）は、

藻類で0.41から1.05、そしてそのほとんどが約1と報告されている。<sup>1)</sup> また、培地中のトリチウム濃度が漸減するような条件下においてもこの差別係数は、ほぼ1を維持することが示されている。<sup>2)</sup> トリチウムの生物固定の反応は鋭敏であり、事故時のような一過性の放出に対してもトリチウムの生物固定効果には十分に注意を払うことが必要である。一般に、定常放出時においてトリチウムの生物濃縮が起こるか否か、また、異常放出に対しトリチウムの生物固定・生物体内滞留がどの程度に及ぶかを明らかにすることが放射生態学的見地から重要な課題であるといえることができる。

藻類によるトリチウム（トリチウム水）の取込みに関して、淡水産緑藻類イカダモの一種を用い、トリチウムのアミノ酸中への取込みが調べられた



例が報告されている。この実験では培地中にトリチウム水、炭素14（二酸化炭素）が同時に添加され、アミノ酸に取込まれた炭素14放射能に対するトリチウム放射能の比較からアミノ酸中へのトリチウムの取込の易さについて検討が行われ、グルタミン酸に高いトリチウム移行が示されている。<sup>3)</sup> 本報告では、この知見に基づいて、グルタミン酸に取込まれたトリチウムが食物連鎖を経て従属栄養を営む魚類に移行した場合を想定し、魚体中におけるグルタミン酸に結合したトリチウムの挙動を調べるための実験を行ったのでその結果について述べる。

## 2. 研究方法

### a. 魚体中における有機態トリチウムの滞留に関するモデルの設定

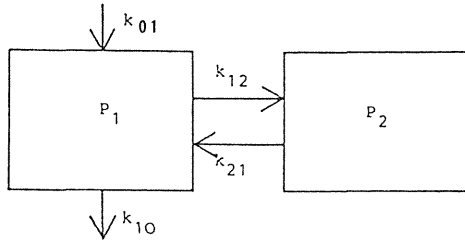


図1 生物体内における有機態トリチウムの概念的流れ図

生物体中での有機態トリチウムの代謝に関し、最も簡易なものとして図1のような概念的なモデルを考えることができる。魚類が餌料中の有機態トリチウムを摂取した場合、これらは生物体中で異化あるいは同化作用を受け易いコンパートメント、 $P_1$ に導されると考える。このコンパートメントの物質（水素分子）の流入・量は成長が無視される限り等しく、有機物中のトリチウムはここで異化作用を受けると無機態のトリチウムとして $P_1$ より排出される。このコンパートメントに導入された有機態トリチウムの一部分は同化作用を受け、生体中でより滞留時間の長いコンパートメント、 $P_2$ に移行する。また、 $P_1, P_2$ 間の物質（水素）交換の速度は、成長が無視される限り等しいものとする。これらの関係は次式のように表現することができる。

$$\begin{cases} S_1 \cdot dC_1/dt = k_{01}C_0 - (k_{10} + k_{12})C_1 + k_{21}C_2 \\ S_2 \cdot dC_2/dt = k_{12}C_1 - k_{21}C_2 \end{cases} \quad (1)$$

ここで、 $S_1, S_2$  はコンパートメント $P_1, P_2$ の大き

さ（M）、 $C_1, C_2$ はコンパートメント $P_1, P_2$ のトリチウム濃度（unit/M）、 $C_0$ は餌料のトリチウム濃度（unit/M）、また、 $k_{01}, k_{10}, k_{12}$  および  $k_{21}$  は移行係数（M/T）であり、 $k_{01} = k_{10} = k_i$ 、 $k_{12} = k_{21} = k_{ij}$  とする。これを解いてコンパートメント $P_1, P_2$ のトリチウム濃度は次式のように得ることができる。

$$\begin{aligned} C_1 &= C_0 + \frac{(r + k_{ij}/S_2)(rC_1^0 + k_iC_0/S_1)}{r(r-s)} e^{rt} \\ &\quad + \frac{(s + k_{ij}/S_2)(sC_1^0 + k_iC_0/S_1)}{s(s-r)} e^{st} \\ C_2 &= C_0 + \frac{-k_{ij}/S_2(rC_1^0 + k_iC_0/S_1)}{r(r-s)} e^{rt} \\ &\quad + \frac{-k_{ij}/S_2(sC_1^0 + k_iC_0/S_1)}{s(s-r)} e^{st} \end{aligned} \quad (2)$$

ここで、 $r, s$ は次式の根とする。また $C_1^0$ は $t=0$ における $P_1$ のトリチウム濃度であり、この時の $P_2$ のトリチウム濃度は0とする。

$$\begin{vmatrix} p + (k_i + k_{ij})/S_1 & -k_{ij}/S_1 \\ -k_{ij}/S_2 & p + k_{ij}/S_2 \end{vmatrix} = (p-r)(p-s) = 0 \quad (3)$$

魚体内に有機態トリチウムを一回投与した場合、これはコンパートメント、 $P_1$ に速やかに一様に分布するものと考え、この個体からのトリチウムの排出を観察し、2つの指数関数の合成によって排出曲線を表わしたときに上式の $r, s$ が実験的に求められることになるものと期待される。

### b. 実験方法

1) 実験材料 実験には重量44~178gの鯉（*Cyprinus carpio*）1年魚を用いた。孵化場より入手した魚は、実験室において市販餌料を用いて約1ヶ月間予備飼育を行った後に実験に供した。標識化合物はアマーシャム社より購入したL-[G-<sup>3</sup>H]グルタミン酸、およびL-[U-<sup>14</sup>C]グルタミン酸を用いた。前者については比放射能、39, 30 Ci/mmolの2バッチを、後者のそれは280 mCi/mmolのものを用いた。これらの標識化合物は、50 μCi/mlとなるよう蒸留水で稀釈し、投与実験に用いた。

2) トリチウムの排出、供試魚はMS 222を用い麻酔を施し、テフロンチューブを消化管に導入し、接続したツベルクリン注射筒で正確に0.2 mlを投与した。投与後供試個体は、それぞれ2000 mlの水を満たしたガラス水槽に移し、経時的にこの水中のトリチウム濃度を測定し、投与量より排出量を差し引くことによって、グルタミン酸に結合したトリチウムの魚体中の滞留を追跡した。また、

トリチウム標識グルタミン酸を腹腔内に投与したのものについても同様な方法を用いて魚体中のトリチウム滞留を調べた。消化管投与後、1, 3, 5, 8及び10日経過した個体について、血液、筋肉、鰓、腎臓、肝臓および消化管を採取・摘出し、トリチウムの器官・組織分布を調べた。

供試個体より排出されたトリチウムの性状（化学形）は、陽イオン交換樹脂に対する吸着性向を飼育水と投与液のトリチウムについて比較し検討を行った。即ち、Beckman M84陽イオン樹脂カラムにそれぞれの液体試料1 mlを填荷後、ErsserによるpH 3.25 クエン酸緩衝液<sup>4)</sup>を流下し、流出液を0.5 mlずつ連続的に採取し、その流出液中のトリチウム放射能を測定した。

他方、トリチウム標識グルタミン酸、炭素14標識グルタミン酸を同時に消化管投与し、トリチウム、炭素14の排出を調べ、これらの魚体中での挙動の相違について検討を行った。両核種を含むグルタミン酸を投与した個体は、2000 mlの水を満たした密閉水槽に投入した。この密閉水槽には空気の流れ・出管を接続しており、飼育水は流入管からの空気曝気し、一方、水槽内の空気は、1 Nの既知量の水酸化ナトリウム溶液を満した空気洗滌瓶に導き、空気中の二酸化炭素を捕捉できる構造としている。飼育水・アルカリ溶液を経時的に採取し、含まれるトリチウム、炭素14放射能を測定し、その排出量を24時間にわたって追跡した。

トリチウム及び炭素14放射能測定は、溶液試料については1 mlの試料に対し15 mlのInstagel (Packard)を加え測定試料とした。供試個体より摘出した器官・組織は自動試料燃焼装置 (Packard Tri-Carb 306) により処理し、液体シンチレーション用測定試料とした後放射能計測を行った。すべてのトリチウム、炭素14測定試料は液体シンチレーションカウンター (Packard Model 2660) で放射能計測を行った。

### 3. 結果

本実験系では、魚体中のトリチウムの滞留量は、投与量より排出量を差し引き間接的に求めているために結果には元より脆弱性が伴っている。魚体中のトリチウム保持量、Qは次のとおりである。

$$Q = C_0 V_0 - C_i V_i \quad (4)$$

ここで $C_0$ は投与液のトリチウム濃度、 $V_0$ は投与溶液量、 $C_i$ は経時的に測定した飼育水のトリチウム濃度、および $V_i$ は飼育水量である。この式から明

らかなように飼育水中のトリチウム濃度の増加に伴い推定値Qの不確かさは増大する。いま、この実験系で魚体中に滞留したトリチウムの推定可能な最小レベルをTLとすると、TLは投与量とほぼ等しい量が飼育水中に存在するときに有意に推定することができるQのレベルに帰結するから、投与量に対するTLの相対的な値は、

$$TL / (C_0 V_0) = f \sqrt{2 \{ (\sigma_1 / C_0)^2 + (\sigma_2 / V_0)^2 \}} \quad (5)$$

と表わすことができる。ここで、 $\sigma_1$ は $C_0$ の不確かさ、 $\sigma_2$ は $V_0$ の不確かさ、そして、 $f$ はこれらの不確かさに対しどの水準を有意に存在すると言えるかを決定する係数である。 $V_0$ と $C_0$ の値にはそれぞれ1%程度の誤差が内在していると見積ることができるので、魚体中のトリチウム滞留量を推定によって求めることのできる最小のレベルは、 $f$ を2とした場合には投与量の約4%までであるということができる。この最小レベルはトリチウムの滞留を追跡するためには充分であるとは言えぬことは明らかである。

魚体中のトリチウム滞留の例を図2に示す。投与直後よりトリチウムの速やかな排出が観察された。投与したものの大部分についてのこの速やかな排出と残余についての緩やかな排出は、消化管投与、腹腔内投与したものの両者に共通している。これらの測定値を前章で述べたように2つの指数関数の和の関数で最小自乗法によって近似すると

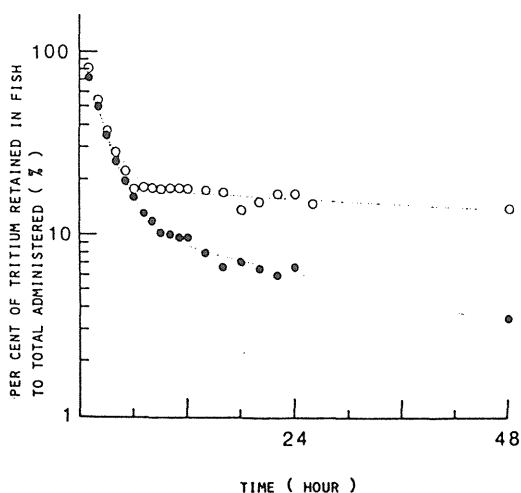


図2 グルタミン酸に結合したトリチウムの魚体内滞留

- : oral administration
- : intraperitoneal injection

図2の2例に対してそれぞれ次式を得ることができる。ただし、 $t$ は時間を単位とするものとする。

$$\begin{cases} Y_1 = 0.826 \exp(-0.494t) + 0.174 \exp(-0.004t) \\ Y_2 = 0.888 \exp(-0.443t) + 0.112 \exp(-0.025t) \end{cases} \quad (6)$$

投与直後に投与量の80~90%が急速に排出され、その半減期は、それぞれ、1.4、1.6時間である。また、残余について半減期約7、1日のより緩やかな排出がこれに引続く。トリチウムの器官(組織)分布を図3に示す。図中縦軸は器官(組織)のトリチウム濃度を個体1gあたりの投与量で規格化した値を示している。トリチウムの器官(組織)分布には明かに分別効果がみられ、吸収部位である消化管、肝臓でトリチウム濃度は高く、筋肉等で低く、その相違の幅は1桁以上に及んでいる。各器官のトリチウム濃度は時間経過とともに漸減し、その半減期は約3日と求められ、先に求めたトリチウム滞留曲線における緩やかな排出の速度と対応しているといえることができる。

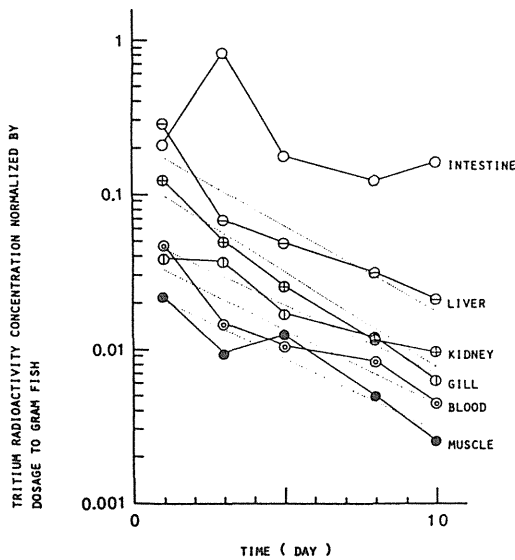


図3 グルタミン酸に結合したトリチウムの器官(組織)内分布

図4は飼育水を陽イオン交換樹脂カラムに填荷し、クエン酸緩衝液で溶離したときのトリチウムの流出パターンを投与原液のそれと比較して表わしたものである。飼育水中のトリチウムは緩衝液の流下とともに流下し、陽イオン交換樹脂への吸着性向を全く示さない。一方、投与原液のパター

ンでは、トリチウムの流出に明かな遅延がみられ、pH 3.25 緩衝液中で陽イオン交換樹脂に対する親和性があることを示しており、酸性アミノ酸であるグルタミン酸の性質と対応していると考えられる。したがって、生物体から排出されたトリチウムは、投与後に速やかな異化作を受け、グルタミン酸の炭素骨格より遊離した代謝生成物に由来していると考えられる。

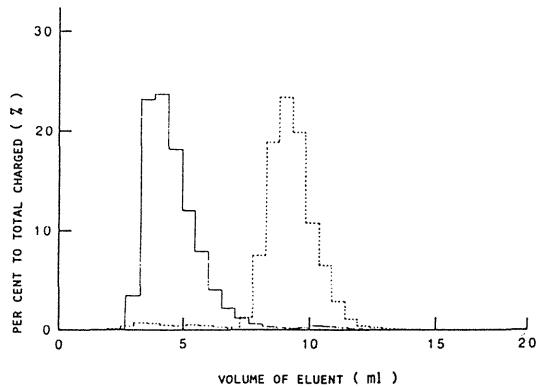


図4 飼育水および投与液中のトリチウムのイオン交換クロマトグラフィー  
—:  $^3\text{H}$  in ambient water  
.....:  $^3\text{H}$  in solution administered ( $^3\text{H}$ -glutamic acid)

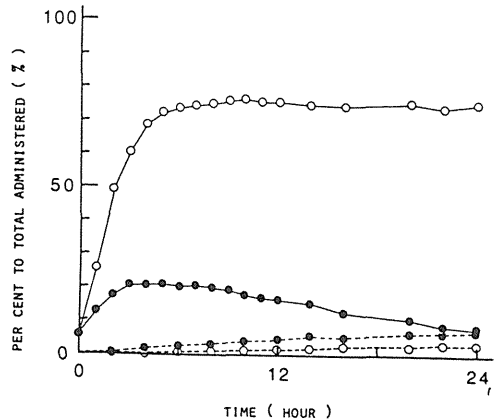


図5  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  標識グルタミン酸の同時投与実験における  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  の排出  
○:  $^3\text{H}$ , ●:  $^{14}\text{C}$   
—: fraction present in ambient water  
.....: fraction trapped in 1 N NaOH solution

トリチウムおよび炭素14で標識されたグルタミン酸の同時投与実験は、グルタミン酸の骨格を形成する炭素分子とそれに結合したトリチウムの生体内での挙動の相違を調べることを目的としている。図5には、両核種の排出量を飼育水とアルカリ溶液のそれぞれについて測定した値を示した。トリチウム、炭素14共に投与直後に急速な排出が観察されるが、トリチウムの排出は炭素14に比較し2~5倍大きく、投与量のそれぞれ約80、20%が急速に排出された後に緩やかな排出がこれに引き続くことが観察された。また、炭素14はアルカリ溶液に効果的に捕捉されることから二酸化炭素として排出されていることが示唆される。

#### 4. 討論

魚体中のトリチウム滞留モデル、式(2)において、トリチウムの排出量をEとするとEに関して次式が成立する。

$$dE/dt = k_i C_1 \quad (7)$$

また、これは生物体に保持されるトリチウムの減少量に相当する。投与直後の排出速度は式(7)より  $t = 0$  を代入し  $(dE/dt)_{t=0} = k_i C_1^0$  と求めることができる。投与量に対して  $k_i/S_1$  となり、コンパートメント、 $P_1$  の回転率に関する情報が得られることになる。また、式(3)からは次式を得、

$$\begin{cases} r+s = -(k_i + k_{ii})/S_1 - k_{ij}/S_2 \\ r s = k_i k_{ij} / (S_1 \cdot S_2) \end{cases} \quad (8)$$

排出曲線から2つのコンパートメントの回転率、あるいは、相対的な大きさについて示唆が得られることになる。式(6)で  $t = 0$  における微分係数からこの時の生物体内の減少率を求めると1時間あたり約40%という値が得られ、上述のコンパートメント、 $P_1$  の回転率に相当するものと見做すことができる。さらに式(8)より2つのコンパートメントの大きさの比較を試みると、コンパートメント、 $P_2$  は  $P_1$  に比較し、1.7~18倍大きい容量を持つことが推測される。これらのコンパートメントは概念的に設定されたものであり、必ずしも生物学的な対応関係に基づいて設定されたものではない。

グルタミン酸に関する生体内における反応としては、グルタチオン等のペプチドや蛋白合成が重要である。また、グルタミン酸は脱アミノ反応によって容易に  $\alpha$ -ケトグルタル酸を生成する。これは、トリカルボン酸サイクルの重要な中間体であり、中間体の添加によってサイクルの反応も促進されることがわかっている。グルタミン酸がト

リカルボン酸サイクルに導入された場合グルタミン酸の5分子の炭素分子は、回路を一巡する間に2分子が二酸化炭素として放出されることが考えられる。一方、炭素骨格に結合した水素分子はそのすべてが回路の一巡の間に放出される可能性がある。即ち、投与したグルタミン酸がエネルギー生成過程に導入されるとすると、投与量に対し回路より放出される割合は、水素分子と炭素分子で、1:2/5であることが想像される。相対的に水素分子は炭素分子の2.5倍だけ放出量が多いものと考えられる。この値は炭素14、トリチウム標識グルタミン酸を同時投与した実験で観察された両核種の排出の分別効果にはほぼ近いものであるということが出来る。即ち、概念上のコンパートメント  $P_1$  はエネルギー生成過程に対応しているということができよう。

#### 5. 結論

有機態トリチウムの体内滞留に関しエネルギー生成過程は非常に大きな関与を示していると考えられる。有機態トリチウムの食物連鎖移行は、生態系におけるエネルギーの流れの観点より動態的に眺望することが重要であろう。

#### 参考文献

- 1) G. Kistner, Behavior of tritium in aquatic system, in *European Seminar on the risk from tritium exposure*, EUR 9065 EN, pp. 55-90 (1984).
- 2) S. Strack, G. Kistner and C. C. Emeis, Incorporation of tritium into planctonic algae in a continuous culture under dynamic conditions, IAEA-SM-232/40, in *Behaviour of tritium in the environment*, pp.219-230, IAEA, Vienna (1979).
- 3) E. Nürnberger, E. Clausen and G. Kistner, Investigation on the distribution of tritium and  $^{14}\text{C}$  in the amino acids of labelled green algae (*Scenedesmus quadricauda* ssp.), *Annales de l'Association Belge de Radioprotection*, 7, 339-343 (1982).
- 4) R. S. Ersser, Ion-exchange chromatography of the more basic amino acids of protein hydrolysates using stepwise changes of buffers containing borate ions, *J. Chromatography*, 115, 612-625 (1975).

### 3. トリチウムの食物連鎖における動態研究

新井清彦

(環境衛生研究部)

## Tritium Behavior in Food-Chain

Kiyohiko Arai

Division of Environmental Health

Studies have been made on the metabolism of tritium in plants, in particular the incorporation into edible plants.

Samples of the edible plants including rice and wheat were given tritiated water by a single irrigation in the plant culture chamber. The distribution of tritium among plant tissues was subsequently determined. The results showed a definite but complex pattern of distribution according to the period of growth during which the tritium was given and the time of harvest of the plants.

The highest incorporation of tritium in the soybean was found in the bean, followed by the root. A similar distribution was found in other species of the plant examined.

Other experiments demonstrated the importance of the time of administration of tritium and the time of harvest on the distribution of tritium in the leaf, pod and seed. Similar findings were obtained in rice and wheat.

Marked changes were observed in the uptake and distribution of non-volatile tritium in wheat grains depending of the times after flowering and administration. Tritium concentration in wheat fruit was highest when tritiated water was administered at two weeks after flowering, a period where the growth of fruit was very rapid.

To examine the influence of cooking, tritium content of the grain was determined after 120 minutes' boiling. The tritium activity decreased to about 50 % of the original value and the decrease was about 25 % when milled samples (40 minutes' boiling) were examined.

After 30, 60, 90, 120 minutes' boiling, tritium concentration decreased to 84, 58, 53, 47 % in the rice and to 77, 65, 56, 54 % in the soybean. A decrease of about 30 % was observed in milled rice and soybean samples after 40 minutes' boiling.

#### 1. 緒言

トリチウムの環境汚染による被曝については、食物連鎖を経由するものが、重要な部分を占めるということが、これまでに知られている。<sup>1)~7)</sup>我々は、すでに各種の食用植物を用いて、植物体内におけるトリチウムの動向を追求し、取り込みの時期や、植物の部位により、トリチウムの植物

体内における濃度分布に、差異のあることを解明してきた。<sup>8)</sup> その結果、食物として植物を摂取するときに、どの部分を食品として利用するかにより、同一の植物体に由来するものであっても、被曝線量に差異の起こることが示された。さらに、人がこれらの植物を、食物として摂取するときに、多くは煮炊きなどの加工をおこなうので、その方法や程度により、食品中のトリチウム

濃度に、変化の起こることが推察される。そこで、これらの食品に加工を加え、植物の種類や、加工法などによる変化を調べ、トリチウム被曝線量推定に寄与する結果を得たので、得られた結果を報告する。

## 2. 研究方法

### a. 実験材料

1) 実験植物：水稻・小麦・大豆などを、 $\frac{1}{5000}$ アールポットには種後、自然条件下で開花期まで栽培した。品種は、水稻は越光、小麦は農林26号、大豆ははくちょうを主として用いた。栽培には水稻に対しては水耕を用い、他は砂耕を主として用い、一部に水耕を試用した。水耕用水や砂耕灌水には水道水を用い、施肥はボブピーターズ 20:20:20 (W. R. Grace Co. 製)の2000倍水溶液を主として用いた。

2) 標識食物試料：a.-1) で栽培された植物に、b.の方法で標識化した試料より、食品加工実験に必要な組織として、種子部分を採取し、濃度検定をして、使用に適するものを選別して原料とした。これらの原料は、完熟後に玄米、玄麦、大豆マメとして精製されたもので、粉末試料としては、さらにこれらを、平工製作所製粉碎機TI-100型を用いて微粉末としたものを用いた。また、餅状試料などには、これらの粉末試料に、蒸留水を加えて攪拌して餅状にしたものを用いた。

b. 植物試料の標識化：当所に設置されている植物栽培チェンバー内で、トリチウム、 $^{14}\text{C}$ の標識化をおこなった。この装置は、内容積2000ℓの大型チェンバーで、トリチウム、 $^{14}\text{C}$ 実験用に設計された、完全密閉できるガラス箱で、光源としては、自然の太陽光線を用い、約3~5万ルクスの照度が得られるもので、温度の設定は、平均気温とし、昼夜自動切換をしている。

上記のチェンバー内に、開花後10~15日目を中心とした、種子への取り込みの盛んな時期の植物を持ち込み、トリチウム水や $^{14}\text{CO}_2$ を投与して、光合成同化作用により、植物体内に吸収同化させて、標識植物を得た。投与量は、標準として、トリチウムで300mCi/300ml/ポット、 $^{14}\text{CO}_2$ では2000ℓのチェンバーに対して、2mCiを用いたが、実験の目的により、増減の調製をおこなった。

c. 食品加工：粒状試料の煮沸試験は、得られた玄米、玄麦を30粒、大豆では3粒を単位として、100mlビーカー中で蒸留水と共に加熱し、煮沸を

継続させて、一定時間毎に測定試料を採取した。これまでの研究結果により、同化時期や部位が異なると、トリチウムの取り込み量に差異が起こることが判明しているので、<sup>8),9)</sup>試料間のバラツキを少なくするため、米・麦では同一の穂から得られた種子を用い、大豆では同一の莢から得られた種子を1単位として用いた。

粉末試料とする場合は、完全に混合され、平均化するのので、得られた粉末ごとにトリチウム濃度、含水量を検定して使用した。このようにして得られた粉末に対して、蒸留水を加えて攪拌し、餅状又は溶液状にした後に、含水量を検定し、その後に煮、焼きなどの加工を加えた。加工の状態は、できるだけ一般家庭における炊事を想定しておこなった。なお、餅状試料の煮沸実験では、外部と中心部で溶出に対する差が大きいので、各部から測定試料を採取し、溶出状態を比較した。

d. 測定方法：トリチウムと $^{14}\text{C}$ の含有濃度測定には、溶液に対しては、親水性液体シンチレーターに溶解後、液体シンチレーション法を用い、不溶性成分に対しては、パッカー社製Tricarb B306型自動燃焼装置を用い、同様に液体シンチレーション法により、ベックマン社製LS-7000型液体シンチレーションカウンターで測定した。

e. 重水との比較：トリチウムを直接測定してその動態を解明すると同時に、トリチウムの安定同位体である重水素を用いて、比較検討することにより、さらにトリチウムの動向が、より良く理解されると思われるので、<sup>10)</sup>北光式全自動重水分析計HK-102型を導入して、比較試験をおこない、その有用性を示す結果を得た。植物試料の作成は、トリチウムと同様であるが、標識化のための投与実験と、その後の試料処理は、特別な規制がないので、一般の実験室でおこなわれ、効率化が計られた。

## 3. 結果

a. トリチウムの吸収と濃度分布：水稻、小麦、大豆のいずれにおいても、投与時期と組織によって、トリチウム吸収同化の程度が異なることが示された。表1に小麦の例を示し、表2に大豆の例を示した。

小麦では、トリチウム水投与日を、開花後1, 15, 25, 37日と変化させたときの、完熟種子中の濃度は、開花後15日目の区分に最も高い値が見られ、10mCi/300ml/potの投与量に対して912

pCi/mg に達した。これに対して、1日目と25日目の区分は、250pCi/mg と 195 pCi/mg で、15日目の値の約1/4にすぎなかった。さらに37日目の値は99pCi/mg で、1日目の約1割にすぎなかった。また、籾殻に相当する部分では、投与後1日目の区分に最も高い値 932pCi/mg が見られ、これは種子の15日目とほぼ同じ値を示した。そして、15日目以後は非常に低い値が示され、15日目で73pCi/mg、25日目13 pCi/mg、37日目は10 pCi/mg であった。

表1 小麦におけるトリチウム濃度分布  
(乾燥試料：pCi/mg)

開花より投与までの日数	種 子 類	
1	250	932
15	912	73
25	195	13
37	99	10

HTO 10 mCi/300 ml/pot

表2 大豆乾燥試料中のトリチウム濃度分布

時 間 (日)		トリチウム濃度 (pCi/mg)	
播種より投与までの日数	投与より採取までの日数	莢	豆
48	25	31.4	9.86
	47	29.1	7.73
74	1	10.9	10.5
	13	12.3	65.9
	21	9.32	60.5
96	1	2.50	1.82
	6	6.36	12.7

トリチウム水投与量：20 mCi/pot

同様に大豆の例では、採種後48, 74, 96日目にトリチウム水20mCi/300 ml/pot を投与したときに、投与後の日数に応じて、表2に示す値が得られた。それによると、種子中の濃度の最高値は、種後74日目に投与して、その後13日目に採取したもので、65.9pCi/mgを示した。それに次ぐものは、同じく74日目投与区で、投与後21日目に採取した区分であった。それ以外ではかなり低く、1/6前後の値またはそれ以下であった。これに対して、サヤに吸収同化されたトリチウム濃度は、種後48日目に投与した区分で、投与後25日目と47が最も高い31.4 pCi/mgの値と、ほぼ同水準の29.1 pCi/mg を示し、他の区分はこれより低い値であった。

b. 粒状試料からの溶出：粒状試料を蒸留水で煮沸したときの、トリチウム濃度の変化を表3に示す。表には、比較対照として、同様の植物に、<sup>14</sup>Cを標識化した試料の同一条件での<sup>14</sup>C変化も併記した。

トリチウムの濃度変化は、始めの60分に多く見られ、以後は変化の割合が少なく、120分で玄米47%、大豆54%に止まった。始めの30分では玄米84%、大豆77%で、各々16%と23%の減少で、玄米の方が変化が少なかったが、60分以後は、大豆の方が変化が少なくなり、逆転していることが示されている。

c. 粉末試料からの溶出：粉末試料に蒸留水を加え、餅状にしてから煮沸加工をおこなったときの、トリチウム濃度変化を表4に示す。20分煮沸後に、試料中に残存したトリチウム量は、玄米69%、大豆75%であった。また、小麦のC-14に対しては92%の値が得られた。さらに40分まで煮沸を続けると、玄米では溶解して、固化体として存在できないため、同じ状態の測定値が得られなかったが、大豆では餅状の固化体として残存し、そ

表3 煮沸加工によるトリチウム濃度の変化 (粒状試料)

	未煮沸	煮沸30分	煮沸60分	煮沸90分	煮沸120分
玄米 <sup>3</sup> H	100	84	58	53	47
大豆 <sup>3</sup> H	100	77	65	56	54
小麦 <sup>14</sup> C	100	82	55	42	37
玄米 <sup>14</sup> C	100	98	86	76	68
大豆 <sup>14</sup> C	100	86	81	79	79

未煮沸試料濃度を100とした割合で示す

表4 加工によるトリチウムの変化  
(餅状試料 煮沸加工)

	未加工 試料	加工後 試料20分 煮	加工後 試料40分 煮	餅状試料 含水率 %
玄米 <sup>3</sup> H	100	69	—	150
大豆 <sup>3</sup> H	100	75	74	63
小麦 <sup>14</sup> C	100	92	73	131

未加工を100とした割合で示す

表5 甘藷中位葉に於ける T (dpm/mg)  
T重水の取り込み濃度 重水 (ppm)

核種	葉身	葉柄	比(葉身/葉柄)
T (遊離水)	663	1460	0.45
重水 (1)	1000	2180	0.46
重水 (2)	946	2190	0.43
重水 (3)	936	2250	0.42

投与量 10ml 99.5% D<sub>2</sub>O/pot  
重水 投与期間 1日

れに含まれるトリチウム濃度の値は、74%が示された。小麦も同様に餅状固化体が維持され、その<sup>14</sup>C濃度は73%であった。

d. <sup>14</sup>Cとの比較：植物の有機結合性トリチウムは、その多くが光合成により固定されるものと考えられているが、<sup>11)</sup> <sup>12)</sup> <sup>13)</sup> この場合には、水と炭酸ガスから初期の炭水化物が合成されるので、トリチウムの取り込みと、<sup>14</sup>Cの取り込みには深い関係が見られる。<sup>10)</sup> そこで、トリチウムの動態解明に役立つ知見を得る目的で、<sup>14</sup>C標識試料について、トリチウムと同様の方法でその濃度変化を調べ、結果を表3に併記した。大体の傾向はトリチウムと似ているが、玄米、大豆のいずれにおいても、トリチウムより煮沸による減少率が小さく、特に大豆では、120分後においても79%が残存した。これに対して、小麦は120分煮沸後に37%に減少し、一番低い値を示している。

e. 重水との比較：トリチウムの動態研究の一部として、重水を用いて比較検討をおこなった。研究の結果の一部として、サツマイモの葉部への取り込みと分布の値が得られたので、表5にそれを示す。中位葉の葉身と葉柄において、遊離水中に取り込まれた濃度比は、トリチウムで0.45、重水では0.46~0.42の値が得られ、良い近似を示している。

#### 4. 討議

環境に放出されたトリチウムが、植物系食物連鎖に取り込まれ、人に摂取される場合、多くは降水中に含まれて、経根吸収により植物に同化される。農作物はその種類により、可食部と収穫期が定まっており、生育期間は水稻、小麦で6ヶ月、大豆で4ヶ月と見られている。そして、経根吸収されたトリチウムが、多量に可食部に蓄積されるのは、その内の約1ヶ月であることは、表1の小麦の結果や、表2の大豆の結果に示されている。特に小麦種子における乾燥試料中のトリチウム濃度が、開花後2週目に投与したものに最高値が見られるのは、この時期が、小麦種子に最も多く同化生産物の取り込みがあることを示しており、その前後では急速に低下している。その割合は、2週間の差が $\frac{1}{4}$ ~ $\frac{1}{5}$ の低下をもたらしている。このことは、事故などにより、一時的なトリチウムの接触が起った場合に、それを食物とするための被曝による危険性は、接触の時期が、生育のいかなる過程にあるかにより、大巾な差が生ずることを示している。大豆においても同様な傾向が示されているが、小麦のように可食部の生育が、植物体を通じて均一な種類は、取り込み盛期が短かいが、大豆のように可食部の生育に巾が見られる種類は取り込み盛期も長く、被曝の危険を想定する期間も長目となるものと推察される。<sup>14)</sup> <sup>15)</sup>

玄米・大豆の粒状試料の煮沸加工において、一般的に米飯を炊くときにおこなわれる、30分程度の煮沸では、トリチウムの溶出は16~23%、<sup>14</sup>Cで8~14%であった。さらに120分まで長時間煮沸を続けると、トリチウムで46~53%、<sup>14</sup>Cで20~32%と溶出量が増加した。これは、煮沸時間と溶出量との間には、関係があり、煮沸するにつれて、溶出が増加しているが、その関係は直線的でなく、120分程度で限界に達することが判明した。また、トリチウムと<sup>14</sup>Cを比較すると、いずれの時点においても、トリチウムの溶出が<sup>14</sup>Cよりも多いことが示されている。この原因として考えられることは、煮沸水中の水素との交換反応による、試料中トリチウムの減少や、有機物の骨核構造を構成している炭素は、末端に結合している水素より、変化しにくいことなどがあげられる。このことは、トリチウムの食品中における存在が、<sup>14</sup>Cに比べて不安定なことを示すもので、トリチウムの食物連鎖における動態を論ずるとき、注意



を要する点の一つであろう。

玄米と大豆からの溶出を比較すると、煮沸の初期には大豆からの溶出が多いが、煮沸時間が長くなると、玄米からの溶出が多くなる。これは、トリチウム、 $^{14}\text{C}$ ともに同様の傾向である。原因として考えられることは、玄米と大豆の成分の差で、蛋白質などの加熱により不溶性となる成分が、大豆に多く含まれている影響と考えられるものである。

餅状試料については、20分煮沸後のトリチウム濃度が玄米で69%、大豆で75%であり、大豆は粒状試料と近似の値を示しているが、玄米では減少率が大きいことが判明した。これは、両者の粘結性の差が大きく影響しているもので、澱粉や蛋白質などの性質の差によるものであろう。玄米は粘結性が弱く、長時間の煮沸をおこなうと、餅状試料は煮沸水中に溶解分散して、固化状態が保てず、20分が限界であった。小麦の $^{14}\text{C}$ については、20分煮沸で92%の残存が示され、溶出量が少ないことが特長であるが、その原因の一つは、粘結性が非常に強く、煮沸を加えることにより、不溶性となる性質が大きくなることによるものである。そのため、固化体の表面部分と中心部分では、溶出の割合に大きな差が見られ、直径2cmの固化体の40分煮沸後において、前者72%、後98%の残存が見られた。このような不均質さは、トリチウムについても起こるものと思われるので、餅状試料を構成する植物の種類や、塊の大きさなどの、食品の性状も、トリチウムの食物連鎖における動態解明に重要な因子となるものであることが示唆される。

トリチウムと重水素は共に水素の同位体で、生物体内における動向も、ほぼ同じものと考えられている。そして、トリチウムは放射性のために、被曝の危険性があるので、トリチウムを用いた実験は慎重におこなうことが要求される。そこで、重水素を用いた代替実験が考えられる。食物連鎖における動態研究に対して、どこまで重水素が代替できるかは、検討の過程にあるが、その一部として、トリチウム水投与の植物実験に対して、重水投与実験を比較して一部の結果が得られた。サツマイモの葉部に取り込まれた、遊離水における濃度分布において、葉身と葉柄の比が、トリチウムで0.45、重水で0.46~0.42の値が得られたことは、このような研究に対しては、トリチウム水の代りに、重水が使用できることを示しており、

さらに広い範囲に適用することが可能であれば、研究の推進に対して、有効な手法であることが示されたものといえる。

## 5. 結論

農作物へのトリチウム水投与による取り込みは、植物の部位と時期により、大きく変化する。小麦においては、開花後2週目が最も多く可食物に取り込まれ、それより前後では急激に減少し、2週間の差により、 $\frac{1}{4} \sim \frac{1}{5}$ となる。トリチウム標識化した米・麦・大豆などの、植物性食品の煮炊きなどの加工による、トリチウム濃度の変化は、食品の種類と加工法により異なるが、粒状試料の煮沸においては、30分で約20%、120分で約50%の減少を示した。粉末化試料を餅状にしたものにおいては、20分で約30%の減少で、粒状試料とは異なる値であった。さらに $^{14}\text{C}$ との比較においては、トリチウムの減少割合が大きいたことが示された。このような植物に対するトリチウム水投与実験に対して、重水投与実験で代替できるものがあることが示唆された。

## 参考文献

- 1) Kirchmann, R., Charles, P., Van Bruwaene, R., Remy, J., Koch, G. and Van den Hoek, J.: Distribution of tritium in the different organs of calves and pigs after ingestion of various tritiated feeds. *Curr. Top. Rad. Res. Quart.* 12, 291-321, 1977.
- 2) Van den Hoek, J., Ten Have, M. H. J. and Gerber, G. B. The metabolism of tritium and water in the lactating dairy cow. *Health Physics*, 44, 127-133, 1983.
- 3) Van Bruwaene, R., Gerber, G. B., Kirchmann, R., Van den Hoek, J. and Vankerkom, J.: Tritium metabolism in young pigs after exposure of the mothers to tritium oxide during pregnancy.: *Radiat. Res.*, 91, 124-134, 1982.
- 4) Pietrzak-Flis, Z., Radwan, I. and Indeka, L.: Tritium in rabbits after ingestion of freeze-dried tritiated food and tritiated water. *Radiat. Res.* 76, 420-428, 1978.
- 5) Pietrzak-Flis, Z., Radwan, I., Major, Z. and Kowalska, M.: Tritium incorporation in rats chronically exposed to tritiated food or tri-

- tiated water for three successive generations. *J. Radiat. Res.*, **22**, 434-442, 1981.
- 6) Rochalska, M. and Szot, Z.: The incorporation of organically-bound tritium of food into some organs of the rat. *Int. J. Radiat. Biol.*, **31**, 391-395, 1977.
  - 7) Strack, S., Kistner, G. and Emeis, C. C.: Incorporation of tritium into planctonic algae in a continuous culture under dynamic conditions.: *In, Proc. Symp. Behavior of tritium in the environment.* 219-230, San Francisco, CA. *IAEA SM-232/40*, 1979
  - 8) Arai, K., Takeda, H. and Iwakura, T.: Studies of the tritium uptake in some edible plants and transfer to the rat. *NIRS-M-52*, 35-49, 1985.
  - 9) Sionit, N. and Kramer, P. J.: Water potential and stomatal resistance of sunflower and soybean subjected to water stress during various growth stages. *Plant Physiol.*, **58**, 537-540, 1976.
  - 10) Shibabe, S. and Yoda, K.: Hydrogen isotope effect on transport of potassium ion in rice seedlings equilibrated with deuterium oxide. *Radioisotopes*, **33**, 675-679, 1984.
  - 11) Choi, I. C. and Aronoff, S.: Photosynthate transport using tritiated water. *Plant Physiol.*, **41**, 1119-1129, 1966.
  - 12) Smith, T. E. and Taylor, R. T.: Incorporation of tritium from tritiated water into carbohydrate, lipid and nucleic acid. *Report No. UCRL-50781*, 1969.
  - 13) Boyer, J. S.: Recovery of photosynthesis in sunflower after a period of low leaf-water potential. *Plant Physiol.*, **47**, 816-820, 1971.
  - 14) Quebedeaux, B. and Chollet, E.: Growth and development of soybean (*Glycine max L. Merr.*) pods. *Plant Physiol.*, **55**, 745-748, 1975.
  - 15) Cline, J. F.: Absorption and metabolism of tritium oxide and tritium gas by bean plants. *Plant Physiol.*, **28**, 717-723, 1953.

## 4. 生体内におけるトリチウムの動態

武 田 洋  
(環境衛生研究部)

### Tritium Behavior in Animal Tissues

Hiroshi Takeda  
Division of Environmental Health

Tritium released from nuclear facilities is converted ultimately to tritiated water (HTO) in the environment. Humans may be exposed, however, not only to HTO but also to tritiated organic compounds formed in the food chain. To obtain information necessary for dose estimation, incorporation and distribution of tritium in the cells and tissues were investigated in rats exposed chronically to HTO or tritiated organic compounds (various tritiated precursors and tritiated food). Different amounts of tritium were incorporated into the tissue organic constituents as organically bound tritium, OBT, depending on the chemical form of tritium. All of the tritiated precursors examined (tritiated leucine, lysine, glucose, glucosamine, thymidine, uridine) gave higher incorporation

into OBT than HTO. The highest incorporation was found in tritiated amino acids (leucine and lysine). Furthermore, tritiated wheat, examined as an example of tritiated food, showed higher incorporation into OBT than any other tritiated organic compounds tested. The results indicate importance of tritium uptake into OBT through the food chain in tritium exposure, thereby giving higher tissue dose than HTO.

The present study also revealed non-uniform distribution of OBT in the cell, the pattern of which was different with different chemical forms of administered tritium. This should be taken into account for risk estimation for each tritiated compound.

#### 1. 緒言

原子力施設から放出されるトリチウム ( $^3\text{H}$ ) の主たる化学形態は水の形すなわちトリチウム水 (HTO) である。この形で  $^3\text{H}$  は環境中での拡散も速やかであり、またあらゆる生物 (動物、植物) 体への侵入も容易である。生体内での  $^3\text{H}$  は体液あるいは組織水として存在する以外に、その一部が同位体である生体内有機成分中の水素と交換し同化・固定され、有機物として存在することが知られている<sup>1,2)</sup>。したがって、他の生物を糧

として生きている動物 (人を含む) は、 $^3\text{H}$  汚染した環境から水の形のみでなく有機物の形で  $^3\text{H}$  を摂取することとなる。本研究はこのような食物連鎖を介しての  $^3\text{H}$  被曝を考慮し、HTO および食物成分となる各種有機形  $^3\text{H}$  化合物、さらには  $^3\text{H}$  標識した食用植物の動物体内での動態を調べ、被曝線量評価に資する情報を得るとともに、 $^3\text{H}$  の化学形に依存する相対的危険度の評価を目指した。なお本特別研究開始以前に行った実験で、既に HTO および数種の有機形  $^3\text{H}$  化合物の単一被曝後の臓器および組織レベルの  $^3\text{H}$  動態に関する

知見<sup>3, 4)</sup>は得ているので、ここでは慢性被曝時における<sup>3</sup>Hの生体内動態についての情報を得ること、また低エネルギー、短飛程のβ線を放出する<sup>3</sup>Hの危険度評価に必要な細胞内での<sup>3</sup>Hの微視的分布の情報を得ることを中心に研究を行った。

## 2. 研究方法

### a. 慢性被曝時における<sup>3</sup>H生体内動態に関する研究

実験にはこれまでと同様3～4ヶ月令のウイスター系雄ラットを使用し、<sup>3</sup>H化合物としては、HTO、〔<sup>3</sup>H〕ロイシン、〔<sup>3</sup>H〕リジン、〔<sup>3</sup>H〕グルコース、〔<sup>3</sup>H〕グルコサミン、〔<sup>3</sup>H〕チミジン、〔<sup>3</sup>H〕ウリジンを、また<sup>3</sup>H標識食物として、生育中の小麦にHTOを与え成熟後収穫し、粉碎・乾燥したのち市販のラット用固形飼料（船橋農場、MB-1）と混合したものをを用いた。この実験には、摂取した飲料水および餌の量、また動物が排せつした尿とふんの量の測定が可能な新陳代謝研究用代謝ケージを使用した。この代謝ケージで約1週間馴し飼いしたのち各群3匹のラットに、<sup>3</sup>H化合物は約3.7 kBq/ml (0.1 μCi/ml) の濃度で、また<sup>3</sup>H標識小麦は0.37 kBq/g (0.01 μCi/g) の濃度で連続的に自由摂取させた。すべてのラットは投与開始後22日目に屠殺し各種の組織を摘出した。

これらの組織試料および<sup>3</sup>H投与期間中に各動物から毎日集められた尿とフンの各試料は、採取後直ちにその一部を取り放射能の測定を行った。組織試料の一部はさらに凍結乾燥処理を行い、乾組織中に残留する有機結合型<sup>3</sup>H (OBT) の放射能を測定した。測定は、すべて自動燃焼装置（パッカー社製）で試料調製後液体シンチレーション計測器で行った。

### b. <sup>3</sup>Hの細胞内分布に関する研究

#### ① 細胞内小器官への<sup>3</sup>Hの分布

HTOを単一投与したラットから経時的に摘出した肝臓、こう丸、脳の各臓器を0.25 M ショ糖液でホモジナイズ後、遠心法により核、ミトコンドリア（ライソゾーム 含む）、マイクロゾーム、細胞質の4画分に分離した。得られた各画分中の水分（HTOを含む）は凍結乾燥により除去し、各画分中のOBTのみを自動燃焼装置（パッカー社製）で試料調製後、液体シンチレーション計測器で測定した。

#### ② 細胞構成成分への<sup>3</sup>Hの分布

HTOおよび各種有機形<sup>3</sup>H化合物を単一投与または連続投与したラットから摘出した肝組織を凍結乾燥処理し、生理食塩水でホモジナイズ後、シュナイダー法（変法）にて、冷過塩素酸（PCA）溶性画分、エタノール・エーテル溶性画分、熱PCA溶性画分、およびアルカリ溶性画分に分離し、各画分中の<sup>3</sup>H放射能を液シンで測定した。なおこの場合の放射能測定用試料は、組織可溶化剤（プロトゾール；NEN社製）で溶解し、乳化シンチレーター（アクアゾール；NEN社製）を加えたのち0.5 N塩酸で中和したものを測定に供した。

## 3. 結果

### a. 慢性被曝時における<sup>3</sup>Hの生体内動態に関する研究

各種<sup>3</sup>H化合物投与期間中の尿とフン中の<sup>3</sup>H濃度の経時変化を調べると、<sup>3</sup>H HOの場合、尿（体液）中の<sup>3</sup>H濃度は投与開始から10日前後までは急速に上昇しその後はほぼ平衡に達した。この平衡時における体液中の<sup>3</sup>H濃度は、摂取した飲料水中<sup>3</sup>H濃度の約70%であった。これは体液の約30%が飼料（餌）中の水また飼料の消化・代謝によって作られる水（代謝水）に由来しているためと考えられた。一方有機形<sup>3</sup>Hの連続投与の場合にも、体液中の<sup>3</sup>H濃度は投与開始後10日から15日の範囲で平衡状態に達するが、そのレベルは化学形によって差がみられ、いずれもHTOの場合より低い値を示した。この実験期間（22日間）に尿およびフンとして排せつした<sup>3</sup>Hの量は摂取した全<sup>3</sup>Hに対して、HTOの場合に約50%、有機形<sup>3</sup>Hの場合に25～45%の範囲であった。

表1には各種<sup>3</sup>H化合物の22日間連続投与の間に体内各種臓器の有機成分中に取り込まれた<sup>3</sup>H (OBT) の濃度を乾組織重量g当りに投与した全放射能に対する百分率として示した。OBTの濃度は投与した<sup>3</sup>Hの化学形によりそれぞれ異なるが、HTOに比べ有機形<sup>3</sup>Hはいずれも高い濃度を示している。ここで調べられた<sup>3</sup>H化合物の中では、ロイシンとリジンの2つの<sup>3</sup>H標識アミノ酸の場合に最も高い取り込みが見られ、その量はHTOに比べ約4～8倍高い値を示した。また有機形<sup>3</sup>Hの場合、臓器間の濃度差も認められ、その分布は肝臓で高く、筋肉や脳で低いという様な傾向が見られた。

表1 各種  $^3\text{H}$ 化合物連続投与後の各臓器中OBT濃度

Tissue	percent of activity administered per gram freeze-dried tissue			
	HTO	$^3\text{H}$ -leucine	$^3\text{H}$ -glucose	$^3\text{H}$ -thymidine
Liver	5.6	31	15	19
Kidney	4.8	25	13	13
Testis	4.4	26	11	10
Spleen	3.8	19	11	11
S. intestine	4.3	17	11	15
Muscle	3.1	20	6.3	6.8
Brain	3.2	16	8.4	7.3

図1には、 $^3\text{H}$ 標識小麦を連続投与した場合のラットの尿とフン中の $^3\text{H}$ 濃度の経日変化をHTO投与の場合と比較して示した。HTOを投与した場合には前述したように尿中の $^3\text{H}$ 濃度は、投与開始後約10日目までにはほぼ平衡状態となったが、 $^3\text{H}$ 標識小麦を投与したラットの尿およびフン中 $^3\text{H}$ 濃度ではこのような平衡状態はこの実験期間内には見られなかった。

表2と3には、HTOあるいは $^3\text{H}$ 標識小麦を22日間連続投与した後のラットの湿および乾組織中の $^3\text{H}$ 濃度を示した。この濃度は湿あるいは乾組織 $g$ 当りに投与した全放射エネルギーに対する百分率で表している。 $^3\text{H}$ 標識小麦投与の場合の湿組織中の $^3\text{H}$ 濃度はHTO投与の場合より2~4倍程

度高い値が見られた(表2)。乾組織で見ると、両者の間の $^3\text{H}$ 濃度差はより顕著であり、HTOに対する $^3\text{H}$ 標識小麦の各組織での $^3\text{H}$ 濃度比は5.9から10.9の範囲であった(表3)。有機形 $^3\text{H}$ 化合物のなかで、組織有機成分への取り込みが最も高かった $^3\text{H}$ 標識アミノ酸の場合に、HTOに対する各臓器でのOBT濃度比は4~8であったが、 $^3\text{H}$ 標識小麦での結果はこれより更に高い値を示した。 $^3\text{H}$ 標識小麦投与の場合にはまた臓器間でのOBT濃度に有意な差が見られたが、その分布様式は他の有機形 $^3\text{H}$ 化合物での結果と類似していた。

表4には、投与した飲料水(HTO)あるいは飼料( $^3\text{H}$ 標識小麦)から動物組織有機成分への $^3\text{H}$ の取り込みの程度( $^3\text{H}$ 生物濃縮の有無)を示す指標となるR値、つまり飲料水あるいは飼料中 $^3\text{H}$ の比放射能( $^3\text{H}/\text{H}$ )に対する乾組織中 $^3\text{H}$ (OBT)の比放射能の比を示した。このR値を求めるために必要な各組織の水素含量はPietzak-Flis<sup>5)</sup>らの報告からとり、また飲料水の水素含量は11.1%とし、飼料中の水素含量はその構成成分から算出し7.0%とした。HTO投与の場合このR値はいずれの組織も0.20以下であった。一方、 $^3\text{H}$ 標識小麦の場合のR値は0.18から0.74の範囲であった。この結果は、いずれの

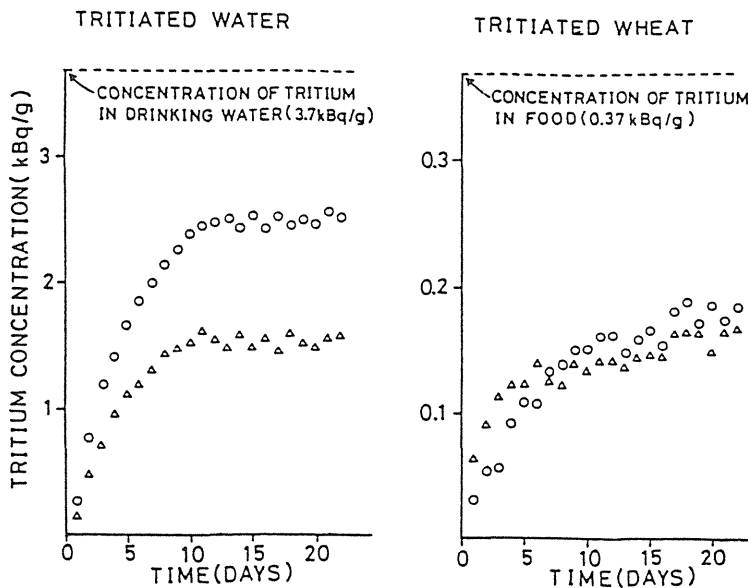


図1 HTOおよび $^3\text{H}$ 標識小麦の連続投与期間における尿(○)とフン(△)中 $^3\text{H}$ 濃度の経時変化

表2  $^3\text{H}$ 標識小麦および HTO 連続投与後の湿組織中  $^3\text{H}$ 濃度

Tissue	Percent of activity administered per gram of wet tissue	
	Tritiated water	Tritiated wheat
Liver	13	48
Kidney	15	41
Testis	15	38
Spleen	14	33
Lung	13	35
Heart	13	35
S.intestine	12	33
Muscle	15	31
Brain	15	35

表3  $^3\text{H}$ 標識小麦および HTO 連続投与後の乾組織中  $^3\text{H}$ 濃度

Tissue	Percent of activity administered per gram of freeze-dried tissue		Tritiated wheat
	Tritiated water	Tritiated wheat	Tritiated water
Liver	5.6	61	10.9
Kidney	4.8	40	8.3
Testis	4.4	27	6.1
Spleen	3.8	33	8.7
Lung	4.3	36	8.4
Heart	3.6	35	9.7
S.intestine	4.3	37	8.6
Muscle	3.1	23	7.4
Brain	3.2	19	5.9

場合も、組織有機成分中  $^3\text{H}$ の比放射能が、摂取している飲料水あるいは飼料中  $^3\text{H}$ の比放射能より高くなかったことを示している。つまりHTOの場合はもちろん  $^3\text{H}$ 標識小麦の場合にも  $^3\text{H}$ の生物濃縮の現象はなかったことを示しているが、生物濃縮の有無について結論するにはなお長期にわたる連続被曝実験が必要であろう。

b.  $^3\text{H}$ の細胞内分布に関する研究

① 遠心法により分離した各細胞小器官への  $^3\text{H}$ の分布

HTO投与24時間後の細胞内小器官への  $^3\text{H}$ の取り込みは、3つの臓器のいずれでも細胞質画分で高く全OBTの50%を越えていた。こう丸と脳で、この細胞質画分に分布する  $^3\text{H}$ の割合は、時間の経過に従い減少し、100日後には、それぞれ全OBT量の13.5%と3.5%となった。肝臓においては、このような顕著な経時的変化は見られず、

表4  $^3\text{H}$ 標識小麦および HTO 連続投与後の各臓器におけるR値

Tissue	Hydrogen content (%)	R value $\ddagger$	
		Tritiated water	Tritiated wheat
Liver	7.11	0.20	0.74
Kidney	7.62	0.16	0.45
Testis	6.32	0.18	0.37
Spleen	6.12	0.16	0.47
Lung	5.61	0.20	0.56
Heart	8.15	0.11	0.37
S.intestine	7.95	0.14	0.41
Muscle	5.93	0.14	0.33
Brain	9.26	0.09	0.18

表5 各種  $^3\text{H}$ 化合物1回投与24時間後の肝細胞構成成分へのOBTの分布

$^3\text{H}$ -compound	Fraction (%)			
	Cold-PCA soluble	Ethanol-ether soluble	Hot-PCA soluble	Alkali soluble
HTO	65	13	3.1	19
( $^3\text{H}$ ) leucine	7.7	3.7	8.8	80
( $^3\text{H}$ ) glucose	27	37	3.3	33
( $^3\text{H}$ ) thymidine	48	21	17	14

100日後にも全OBT量の46%を占めた。

細胞質画分以外の3つの画分での  $^3\text{H}$ の分布は、肝臓ではほぼ均等であり、経時的変化も見られなかった。しかし、こう丸と脳ではそれぞれ、細胞核とミトコンドリア画分へ分布する  $^3\text{H}$ の割合が多く、またその量は経時的に増加し、100日後には両者とも全OBTのほぼ50%となった。

② シュナイダー法(変法)により分離した各細胞構成成分への  $^3\text{H}$ の分布

HTOおよび3種の有機形  $^3\text{H}$ 化合物の単一投与後色々な時点の肝臓細胞をシュナイダー法(変法)によって4つの成分に分画し、各画分中に占めるOBTの割合を求めた。表5には各  $^3\text{H}$ 化合物投与24時間後の結果を示した。HTOの場合、低分子化合物画分である冷PCA溶性画分が24時間後に65%と、かなり高い値を示した。しかしその後経時的にこの画分中に占めるOBTの割合は減少し50日後には23%となった。一方その他3つの画分(高分子化合物画分)では、経時的に増加する傾向が見られ、特に核酸画分である熱PCA溶性画分は、24時間後に3.1%であったものが50

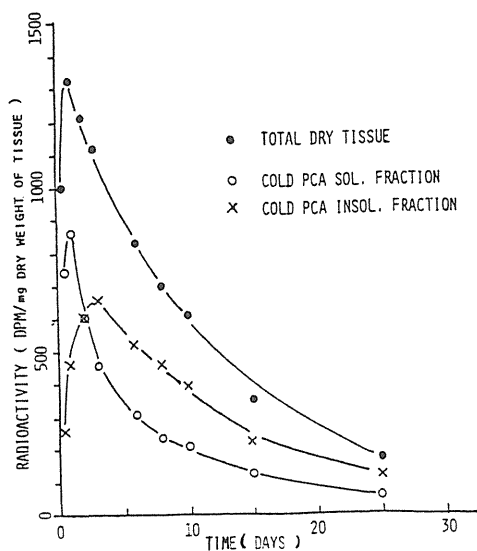


図2 肝細胞の低分子化合物画分と高分子化合物画分中<sup>3</sup>H濃度の経時変化

- TOTAL DRY TISSUE
- COLD PCA SOL, FRACTION
- × COLD PCA INSOL, FRACTION

日目には15%に増加した。図2には低分子化合物画分と高分子化合物画分中OBTの濃度変化を示した。これらの結果から、HTOのOBTへの移行が、まず低分子化合物で起こり、次にこの<sup>3</sup>H結合物質が高分子化するという可能性が示唆された。3種の有機形<sup>3</sup>H化合物投与24時間後のOBTの分布様式はHTOの場合とは異なっており、また3種の有機形<sup>3</sup>Hの間でもそれぞれ異なっていた。(表5)。<sup>3</sup>Hロイシンはタンパク質画分であるアルカリ溶性画分への分布が多く、<sup>3</sup>Hグルコースは熱PCA溶性画分を除く3つの画分へほぼ均等に分布し、また<sup>3</sup>Hチミジンは他の<sup>3</sup>H化合物と比べ熱PCA溶性画分への分布割合が相対的に多い等の特徴が見られた。なおこれらの分布様式は投与後の時間の経過とともにまた変化した。HTOと6種の有機形<sup>3</sup>H化合物を連続投与した場合の肝細胞成分へのOBTの分布を表6に示したが、この結果もまた<sup>3</sup>Hの細胞構成成分への分布様式が、投与した<sup>3</sup>Hの化学形により異なることを示している。

表6 各種<sup>3</sup>H化合物連続投与後の肝細胞構成成分へのOBTの分布

<sup>3</sup> H-compound	Fraction (%)			
	Cold-PCA soluble	Ehtanol-ether soluble	Hot-PCA soluble	Alkali soluble
HTO	34	22	4	40
[ <sup>3</sup> H] glucose	39	13	4	44
[ <sup>3</sup> H] glucosamine	15	27	8	50
[ <sup>3</sup> H] thymidine	45	17	9	29
[ <sup>3</sup> H] uridine	47	14	23	16
[ <sup>3</sup> H] leucine	8	6	4	82
[ <sup>3</sup> H] lysine	22	6	6	66

#### 4. 討論

ここで行った連続投与の実験は22日間という比較的短期間被曝の実験ではあるが、以前に行った単一投与の実験結果と同様HTOに比べ有機形<sup>3</sup>H化合物の組織有機成分への取り込みが相対的に高いことを明らかにした。我々が実験に供した炭水化物、タンパク質、核酸の前駆物質の中ではタンパク質の前駆物質である<sup>3</sup>H標識アミノ酸が最も高い取り込みを示した。この結果はアミノ酸の生体内での役割・機能を考える上で興味深い。しかしここで調べられたのは2種のアミノ酸のみであり代謝的性質が異なる他のアミノ酸でも同様な結果となるかは今後の課題である。

本研究では、食物連鎖による<sup>3</sup>H被曝の1つのモデルとして、HTO存在下で栽培し<sup>3</sup>H標識した小麦を飼料としてラットに与える実験を行った。この結果はラット組織有機成分への<sup>3</sup>Hの取り込みがHTO投与の場合に比べ各臓器で約6~11倍高いことを示した。またこの<sup>3</sup>H標識小麦投与から組織有機成分への<sup>3</sup>Hの取り込み率はここで調べられた単一化学形のいかなる<sup>3</sup>H化合物より高いことを明らかにした。これらの結果は<sup>3</sup>H被曝における食物連鎖を通じての<sup>3</sup>H摂取の重要性を示すとともに他の<sup>3</sup>H標識食物での実験の必要性が示唆された。これまでに報告された<sup>3</sup>H標識食物(飼料)の生体内動態に関する研究の数は多くないが、我々の実験結果と比較できる2つの報告がある<sup>5,6)</sup>。1つは<sup>3</sup>H標識したアルファルファ(牧草の一種)を、他の1つは<sup>3</sup>H標識したラット肉を使った実験で、両者とも動物組織有機成分への<sup>3</sup>Hの取り込み率をHTO投与の場合と比較したものである。参考のためこれらの実験結果を、本研究で得られた実験結果とともに表7に示

した。3つの実験結果の比較から、HTOの動物組織有機成分への<sup>3</sup>Hの取り込みには実験動物が異なった場合にもほとんど差が見られないが、

<sup>3</sup>H標識飼料からの<sup>3</sup>H取り込みには有意差のあることが判明した。この差は与えた<sup>3</sup>H標識飼料の違い、あるいは実験に供した動物種の違い、さらには連続投与期間の差などによるものと考えられる。このように3つの実験結果で、<sup>3</sup>H標識飼料から動物組織有機成分へ取り込まれたOBT量には差が見られるが、OBTの臓器間分布には類似点が認められた。つまり、いずれの実験結果においても相対的に高い取り込みを示したのは肝臓、

表7 <sup>3</sup>H標識食物(飼料)連続投与実験に関する他の報告との比較

Tissue	Percent of administered dose per g dried tissue					
	Tritiated water			Tritiated food		
	A	B	C	A	B	C
Liver	5.6	4.8	5	61	32	77
Kidney	4.8	4.7	5	40	32	43
S.intestine	4.3	4.1	4	37	26	68
Lung	4.3	3.8	3	36	22	41
Spleen	3.8	3.6	5	33	22	43
Heart	3.6	3.3	4	35	22	36
Muscle	3.1	2.7	2	23	12	13
Brain	3.2	7.2	4	19	12	11

A: Present report (experimental animal: rat, tritiated food: tritiated wheat, duration of exposure: 22 days)

B: Report by Pietrzak-Flis, Z. et al., (experimental animal: rabbit, tritiated food: tritiated alfalfa, duration of exposure: 29 days)

C: Report by Rochalska, M. et al., (experimental animal: rat, tritiated food: tritiated rat meat, duration of exposure: 5 days)

腎臓、小腸等の臓器であり、逆に低い取り込みを示したのは脳や筋肉であった。

本研究の<sup>3</sup>Hの細胞内分布に関する実験結果は、その分布様式が投与した<sup>3</sup>Hの化学形により異なり、かつ経時的に変化することを明らかにした。その分布様式はまた特定の<sup>3</sup>H化合物であっても臓器間で異なることが、HTOの実験結果から推測された。このような<sup>3</sup>Hの細胞内不均一分布の事実は、各種<sup>3</sup>H化合物のリスクを推定する上において考慮されなければならないであろう。なぜなら、短飛程のβ線放射核種である<sup>3</sup>Hの不均一分布はすなわち被曝線量の不均一性を意味してお

り、組織・細胞内での均一分布を仮定して算出される平均組織線量は、リスク推定のよい指標とはならないからである。したがって各<sup>3</sup>H化合物被曝に対するより正確なリスク推定を行うためには、<sup>3</sup>Hの細胞内不均一分布を考慮した微視的な線量評価が必要である。

そこで現在は、細胞内の放射線高感受性部位である細胞核を標的とした線量算定法について検討している。

## 5. 結論

単一投与の場合と同様、連続投与の場合にも<sup>3</sup>Hの取り込みと分布は、その化学形によって臓器レベルではもちろん細胞レベルにおいても異なることが明らかになった。これらの結果は<sup>3</sup>Hの潜在的危険度が、被曝時の化学形によって異なることを示している。またその危険度を表す指標となる被曝線量値を算定する場合に、細胞内の<sup>3</sup>Hの不均一分布を考慮する必要のあることを示唆した。

## 参考文献

- 1) Hatch, F. T. and Mazrimas, J. A.: Tritiation of animals from tritiated water. *Radiat. Res.*, **50**, 339-357, 1972.
- 2) Choi, I. C. and Aronoff, S.: Photosynthetic transport using tritiated water. *Plant. Physiol.* **41**, 1119-1129, 1966.
- 3) Takeda, H. and Kasida, Y.: Biological behavior of tritium after administration of tritiated water in the rat. *J. Radiat. Res.*, **20**, 174-185, 1979.
- 4) Takeda, H.: Comparative metabolism of tritium in rat after single ingestion of some tritiated organic compounds versus tritiated water. *J. Radiat. Res.*, **23**, 345-357, 1982.
- 5) Pietrzak-Flis, Z., Radwan, I. and Indeka, L.: Tritium in rabbits after ingestion of freeze-dried tritiated food and tritiated water. *Radiat. Res.*, **76**, 420-428, 1978.
- 6) Rochalska, M. and Szot, Z.: The incorporation of organically-bound tritium of food into some organs of the rat. *Int. J. Radiat. Biol.*, **31**, 391-395, 1977.



## II トリチウムの生物効果比を求めるための 物理・化学的研究

### 1. トリチウム $\beta$ 線の線量評価並びに線量 効果のモデル系の開発に関する研究

#### (1) 低LET放射線のマイクロドシメトリ

星野一雄, 川島勝弘, 平岡 武, 山口 寛  
(物理研究部)

## Microdosimetric Properties of Low LET Radiation

Kazuo Hoshino, Katsuhiko Kawashima, Takeshi Hiraoka and Hiroshi Yamaguchi  
Division of Physics

The microdosimetry system for tritium  $\beta$ -rays was constructed. It consists of a spherical wall-less proportional counter, a gas flow controller, electronics (including a logarithmic amplifier) and a multichannel pulse height analyzer. Microdosimetric event distributions for low energy X-rays and  $^{60}\text{Co}$ ,  $^{137}\text{Cs}$  and  $^{241}\text{Am}$   $\gamma$ -rays were measured using this system. Low energy X-rays were used as tritium  $\beta$ -ray substitute, and  $\gamma$ -rays sources were used to check the system.

The simulation of a microscopic volume of tissue of  $1\text{ g/cm}^3$  is achieved by replacing it by a much larger cavity ( $2.54\text{ cm } \phi$ ) filled with tissue equivalent (TE) gas of much lower density. The TE gas employed was the propane based gas mixture. The simulated cavity diameters ( $d$ ) chosen were  $0.5, 1, 2$  and  $3\text{ }\mu\text{m}$  for a  $^{60}\text{Co}$ , and  $1$  and  $2\text{ }\mu\text{m}$  for the other radiation sources.

Microdosimetric quantities such as the frequency-mean and dose-mean lineal energies

( $\bar{y}_F$  and  $\bar{y}_D$ ) were computed by personal computer from measured data of lineal energy distributions.

The results are compared with those of others who employed similar wall-less proportional counters. An agreement was found for  $^{60}\text{Co}$  and  $^{137}\text{Cs}$ ,  $\gamma$  rays, however, differences larger than experimental uncertainty were found for low energy X-rays.

The quantity  $\zeta$  which was derived from the dual radiation action theory by Kellerer and Rossi was calculated from experimental value of  $\bar{y}_D$ . In experiments where the dose is small compared to  $\zeta$ , RBE should be proportional to  $\zeta$ . Therefore, the RBE value can be estimated from  $\zeta$ 's. The estimated RBE values were relatively independent on the simulated cavity diameter. These results agreed with those of Ellett and Braby.

## 1. 緒言

トリチウム $\beta$ 線の線量評価の基礎資料を、マイクロドシメトリックな見地より集積する目的で、 $y$ 分布測定システムを完成させた。 $y$ は、マイクロドシメトリにおけるLETに代わる、単一のエネルギー付与事象に基づくところの、マイクロドシメトリックな物理量である。これより、生物効果比に関連の深い物理量 $\zeta$ を算定することが出来る。

施設上の制約から、実際にはトリチウムの測定は出来なかったが、代替線源とみられている低エネルギーX線を用いて $y$ 分布を測定した。また、他者との比較の意味も有り、 $^{60}\text{Co}$ 、 $^{137}\text{Cs}$ 、 $^{241}\text{Am}$ の $\gamma$ 線の測定も行った。これらのデータをもとに、 $\bar{y}_F$ 、 $\bar{y}_D$ 、 $\zeta$ 及びRBEを算定し、EllettとBraby<sup>1)</sup>やその他<sup>2,3,4)</sup>の結果と比較検討したので報告する。また、これらの結果をふまえて、トリチウム $\beta$ 線の代替線源選定上の注意事項の一つについて論じる。

## 2. 研究方法

### a. 測定システム

#### 1) LETカウンター（組織等価比例計数管）

主として直径 $2.54\text{cm}$ （1"）のwall-lessカウンター（One of kind社製）を用いたが、比較のため直径 $1.27\text{cm}$ （1/2"）のwalledカウンターも使用した。wall-lessカウンターは、球形籠状に形成された組織等価（TE）プラスチック電極（壁状になっていないのでwall-lessと呼ぶ）と、細いタングステンワイヤーで作られたヘリックスと中心線（電極）より成る。これらは外径約 $11.2\text{cm}$ 、厚さ約 $0.7\text{cm}$ のTEプラスチック製球形容器に納められている。容器内を低圧のTEガスで充し、球形電極の直径（ $d$ ）を密度1の組織に換算して、 $\mu\text{m}$ オーダーになるようシミュレートする。

walledカウンターは球形電極を完全なTEプラスチックの壁としたもので、これらは外径約 $2\text{cm}$ 、長さ約 $6\text{cm}$ の薄いアルミニウム容器に納められている。前者同様低圧のTEガス下で使用する。前者はガスフロー式で使用するのに対し、後者はガス充填密封式として使用する。

wall-lessカウンターが密封式として使用できない理由は、大型のTEプラスチック容器に吸着されているガスが、低圧下で漏出し、ガス圧の上昇及び純度の低下を来し、再現性及び分解能を低下させることにある。

$y$ 値の校正は、各カウンター内に取り付けられている $\alpha$ 線源で行う。校正用線源としては、wall-lessには $^{241}\text{Am}$ が、walledには $^{244}\text{Cm}$ が使用されている。

電離ガスは、プロパン形TEガスを使用した。その組成は $\text{C}_3\text{H}_8$ ：54.6%、 $\text{N}_2$ ：5.26%、 $\text{CO}_2$ ：40.16%（分圧）である。

#### 2) ガスフローコントローラ

低圧下（例えば、 $d=1\mu\text{m}$ にシミュレートするには $16.7\text{mmHg}$ ）で安定にガスフローするには、高価なフローコントローラが必要になる。トリチウムによる汚染廃棄を考慮すれば、高価なものは使い難い、そこで、安価かつ安定度の良い簡易式ガスフローコントローラを開発した。これは、減圧弁、層流エレメント（ポーターインスツルメント社製）、ニードルバルブ、回転真空ポンプよりなる流量コントロール部と、圧力測定用センサ（セトラシステムズ社製）より構成される。本器の特徴は、ガス流入側と流出側の差圧を常に一定に保つ機能を有する、層流エレメントの使用にある。差圧は手で任意に設定できる。

#### 3) 測定回路

$y$ 分布は低LET放射線と言えども、 $10\text{keV}/\mu\text{m}$ までの広範囲に及ぶ。校正用 $\alpha$ 線源の $y$ 値も考慮すると、 $y$ 分布に対応するパルス波高値分布のダイナミックレンジは $10^5$ に及ぶ。したがって、通常は全域を3部分程度に分割して測定する。この様な方法では、測定時間が分割回数倍かかることと、後のデータ処理が複雑になる欠点がある。そこでここでは、対数増幅器を使用して、パルスを対数変換し、一度に測定する方法を採用した。この方式には、大きなパルスを対数変換した時、本パルスに続き、疑似パルスを発生し易い欠点がある。この弊害を除くために、ここでは、同時計数方式を採用した。

### b. 測定及びデータ処理

#### 1) 測定

単一事象の観測のためには、複数の単一事象が測定システムの時間的分解能以内に発生しては困る。このような確率を極力減らすために、カウンターの計数率は $2000\text{cps}$ 以下に抑えた。そのため、線源強度に応じて十分な線源-検出器間距離をとった。

X線発生装置はKXO-12（東芝製）を使用した。実効エネルギーは、半価層の測定より求めた。 $^{60}\text{Co}$ 、 $^{137}\text{Cs}$ 、 $^{241}\text{Am}$ は、それぞれ標準線源室に

設置されている線源を使用した。

## 2) データ処理

以下に、マイクロシメトリックな諸量の定義と関連する式を示しておく。

$$y = \frac{\epsilon}{\bar{\ell}} \quad (1)$$

$$z = \frac{\epsilon}{m} \quad (2)$$

$$f(y) = \frac{dF(y)}{dy} \quad (3)$$

$$\bar{y}_F = \int_0^\infty y f(y) dy \quad (4)$$

$$d(y) = \frac{dD(y)}{dy} \quad (5)$$

$$\bar{y}_D = \int_0^\infty y d(y) dy \quad (6)$$

$$d(y) = \frac{y}{\bar{y}_F} f(y) \quad (7)$$

$$\bar{y}_D = \frac{1}{\bar{y}_F} \int_0^\infty y^2 f(y) dy \quad (8)$$

$$p(D) = K(\zeta D + D^2) \quad (9)$$

$$\zeta = 20.4 \frac{\bar{y}_D}{d^z} \quad (10)$$

ここで、 $y$  は lineal エネルギーと呼ばれ、単一（エネルギー付与）事象（single event）中に、ある容積要素中の媒質に付与させたエネルギー  $\epsilon$  を、その容器の平均の弦の長さ  $\bar{\ell}$  で除した商で、確率量である。 $z$  の平均値  $\bar{z}$  は吸収線量  $D$  である。 $F(y)$  は分布関数で lineal エネルギーが  $y$  より大きくない確率で、 $f(y)$  はこれより導かれる確率密度である。 $f(y)$  の分布は一個の一次粒子や、それによる二次粒子によるエネルギー付与に限られるので、吸収線量には無関係である。 $\bar{y}_F$  は頻度平均 lineal エネルギーと呼ばれ、非確率量である。 $D(y)$  は  $y$  以下の lineal エネルギーの事象による吸収線量の割合で、 $d(y)$  はこれより導かれる吸収線量の確率密度である。 $d(y)$  の分布は吸収線量には無関係である。 $\bar{y}_D$  は線量平均 lineal エネルギーと呼ばれ、非確率量である。

マイクロシメトリを生物効果に関連づけるモデルとして、Dual radiation action の理論が A. M. Kellerer と H. H. Rossi<sup>6)</sup> により提唱された。この理論では、細胞の損傷の収量  $p(D)$  は、吸収線量の一次及び二次の関数として (9)式のごとく与えられる。 $\zeta$  は容積要素中での単一事象による  $z$  の増分である。 $\zeta$  と  $\bar{y}_D$  と  $d$  は (10)

式の関係にある。

測定より得られたデータは、PC-8001パーソナルコンピュータ（NEC製）を用い処理した。上記諸量の計算用プログラムを開発使用した。

## 3. 結果

測定中のカウンター内のガス圧変動の代表例を図1に示す。 $d = 1 \mu m$ 、 $2 \mu m$  相当の場合、約3時間にわたる平均のガス圧と標準偏差（変動係数 CV）は、それぞれ  $16.69 \pm 0.013 \text{ mmHg}$  (0.077%)、 $33.31 \pm 0.018 \text{ mmHg}$  (0.054%)であった。

マイクロシメトリックスpektral ( $yd(y)$  vs  $y$ ) の代表例を図2に示す。また、図3には wall-less カウンターと walled カウンターの  $d = 2 \mu m$  における比較を示す。但し、これらの図の  $yd(y)$  は相対値として与えてある。

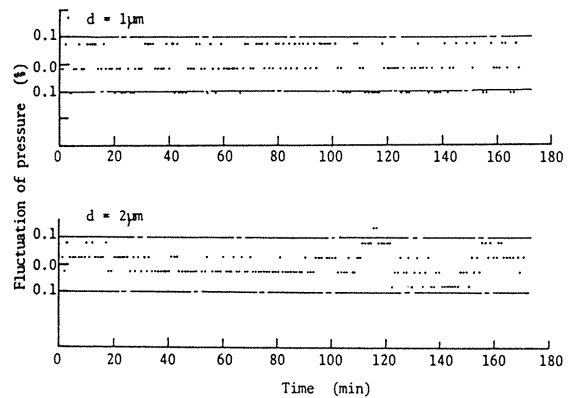


図1 wall-less LETカウンター中のガス圧変動

表1 wall-less LETカウンターによる  $\bar{y}_F$ 、 $\bar{y}_D$ 、 $\zeta$  及び RBE

Radiation	Effective Energy(keV)	Site Dia. d ( $\mu m$ )	$\bar{y}_F$ (keV/ $\mu m$ )	$\bar{y}_D$	$\zeta$	RBE
Co-60	1250	0.5	0.432	2.49	203.2	0.6
		1	0.371	1.75	35.7	0.5
		2	0.341	1.38	7.0	0.5
		3	0.302	1.28	2.9	0.5
Cs-137	660	1	0.461	1.97	40.1	0.6
		2	0.433	1.58	8.1	0.5
X-rays 100kV	37.0	1	1.37	3.54	72.2	1.0
		2	1.33	3.24	16.5	1.1
90kV	35.8	1	1.39	3.69	75.3	1.0
		2	1.40	3.22	16.4	1.1
80kV	34.0	1	1.41	3.69	75.3	1.1
		2	1.44	3.22	16.4	1.1
70kV	31.8	1	1.43	3.70	75.4	1.1
		2	1.43	3.25	16.6	1.1
60kV	29.9	1	1.50	3.74	76.2	1.1
		2	1.53	3.23	16.5	1.1
50kV	28.0	1	1.57	3.77	76.9	1.1
		2	1.62	3.34	17.1	1.1

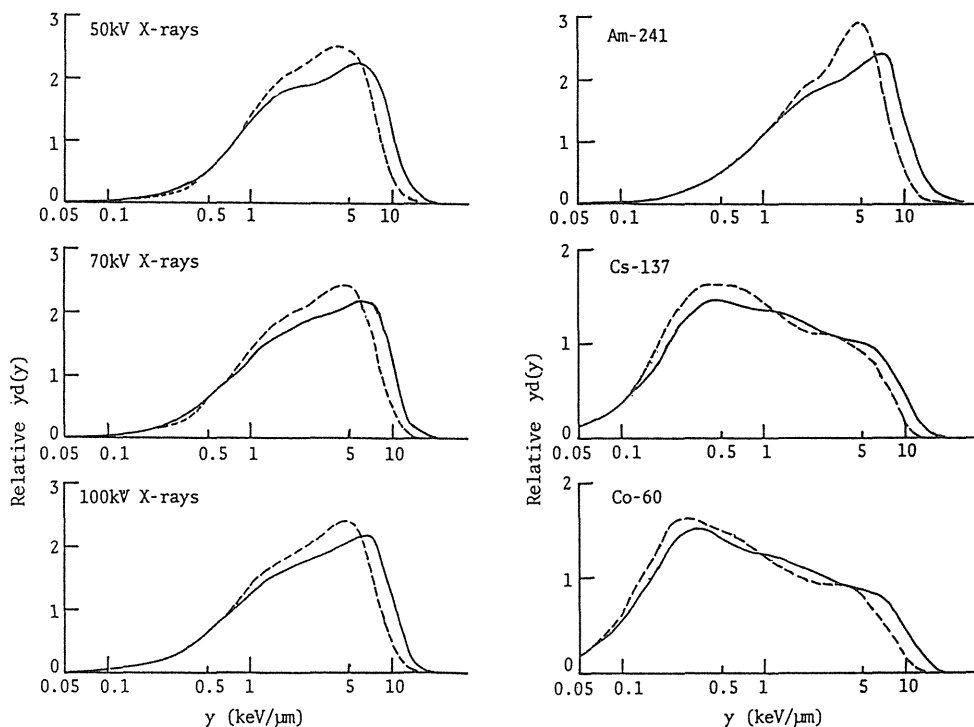


図2 wall-less LETカウンターによるマイクロシメトリックスpekトルの代表例  
 実線： $d = 1 \mu\text{m}$ ，破線： $d = 2 \mu\text{m}$

表1に wall-less カウンターから得られた  $\bar{y}_F$ ,  $\bar{y}_D$ ,  $\zeta$  及び RBE を与える。RBE は、各  $d$  における  $\zeta$  の、それぞれ 250kV X線に対する  $\zeta$  の比として計算した。250kV の  $\zeta$  は、Ellett と Brady のデータより彼我間の系統的相違を補正して求めた。

#### 4. 討論

試作したガスフローコントローラの圧力変動は CV で 0.1% 以下であった。これは、高級コントローラに優るとも劣らぬ結果である。高級器は、フィードバックループを有するので圧力の脈動を生じるが、本器ではその心配がない。欠点は、圧力切り替えの際、バランス点を見いだすのに少々時間を要することである。しかし、経験を積めば解決できるので問題はない。

本測定 of 成否の鍵はノイズをいかに抑えるかにある。本システムでは、回路構成における十分な検討と、調整の結果、ノイズレベルを  $45\text{eV}/\mu\text{m}$  相当に抑えることができた。

マイクロシメトリックスpekトルは、50~100 kV X線では余り変わらない。当然のことながら  $^{241}\text{Am}$   $\gamma$  線は X線 と類似している。 $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  線では、前者に比べて低  $y$  成分の著しい増加と、高  $y$  成分の減少がみられる。両者共  $d$  が増加すると高  $y$  成分の減少がみられる。(図2)

wall-less カウンターと walled カウンターの比較では、X線よりも、 $^{60}\text{Co}$  や  $^{137}\text{Cs}$  における相違が大きくみられた。この相違は、Rossi により提唱され、Kellerer により理論的に証明された wall-効果によるもので、Oldeburg と Booz や Kellerer による分類を、良く支持する結果となった。

$\bar{y}_F$  は(4)式から分かるように、 $y$  値の下限をどこまでとるか大きく変わる。理論的には積分範囲は 0 から無限大までとなっているが、実際には測定可能な範囲に制限されるからである。従って  $\bar{y}_F$  は他者との比較においては、余り重要視しない方がよい。これに対し、 $\bar{y}_D$  は(8)式にみられるごとく、 $y^2$  の項があるので、積分の下限に左右さ

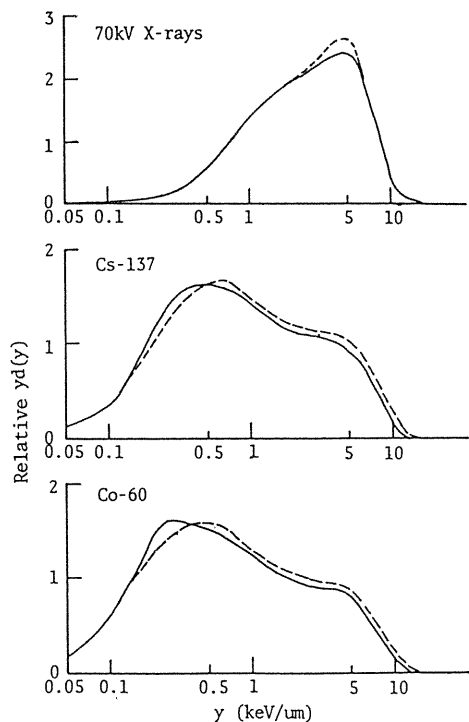


図3 wall-less と walled LETカウンターによるマイクロシメトリックスpekトルの比較 (d = 2 μm) 実線: wall-less, 破線: walled

表2 wall-less LETカウンターによる  $\bar{y}_F$ ,  $\bar{y}_D$ ,  $\zeta$  の比較

Radiation	$\bar{y}_F$ (keV/μm)	$\bar{y}_D$	$\zeta$	Author	
Co-60	0.371	1.75	35.7	Present work	
	0.280	1.59	32.5	P.Kliauga & R.Dvorak	
	0.380	1.65	33.7	L.A.Braby & V.H.Ellett	
	0.298	1.62	33.1	M.N.Varma et al	
	0.301	1.51	30.7	Y.Noda	
Cs-137	0.461	1.97	40.1	Present work	
	0.371	1.85	37.7	P.Kliauga & R.Dvorak	
	0.395	1.89	38.6	M.N.Varma et al	
X-rays					
	102keV(250kV)	3.73	76	V.H.Ellett & L.A.Braby	
	28keV (60kV)	1.57	37.7	Present work	
	27keV (65kV)	5.39	110	V.H.Ellett & L.A.Braby	
	25.3keV	1.88	4.09	83.4	P.Kliauga & R.Dvorak
Tritium		5.39	110	V.H.Ellett & L.A.Braby	

ることが少ない。 $\bar{y}_D$  は(9), (10)式のごとく、生物効果と関係づける $\zeta$ を導出できる量としても重要である。

表1にみられるごとく、このエネルギー範囲のX線では、 $\bar{y}_D$  の変化は少ない。従って $\zeta$ の変化も少ない(但し、dが同じ者同士の比較において)。

これに対し、 $^{137}\text{Cs}$ ,  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 線では前者と大きな違いがみられる。表2にはd = 1 μmで行った他者との比較を示す。 $\bar{y}_D$ をみるに、 $\gamma$ 線においては、測定誤差範囲で一致していると言えるが、X線では差が大きい。更に十分なデータの集積が必要であろう。

図4は生物効果を考える上で大変興味深い。即ち、着目する標的の大きさ(site size)により、 $\zeta$ は大きく変化することである。因みに $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 線の場合、dが3 μmから0.5 μmになると、 $\zeta$ は約70倍となる。同様のことは破線で示したEllettとBrabyの $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 線やトリチウム $\beta$ 線の結果からも言える。 $^{60}\text{Co}$ における我々の結果は、測定誤差範囲内で彼らの結果と一致している。

EllettとBrabyは、250 kV(実効エネルギー102 keV及び58 keV)、65 kV(27 keV) X線についても測定した。そして、 $\zeta$ がDよりも大

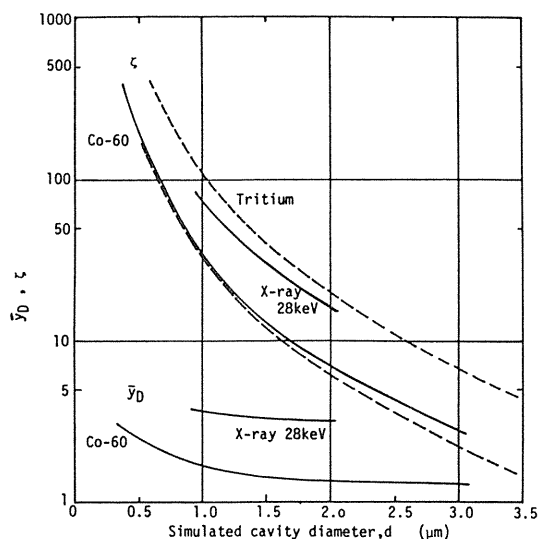


図4 wall-less LETカウンターによる  $\bar{y}_D$ ,  $\zeta$  の比較 実線: 本研究 破線: Ellett & Braby

きいときには、RBEが $\zeta$ に比例するものと仮定して、250 kV(102 keV) X線を基準としたRBEを $\zeta$ から計算した。その結果、d = 5, 3, 1, 0.6 μmにおける、トリチウムのRBEは1, 1.1, 1.3, 1.5, 1.6となるが、他の線質ではRBEはdに依存しないことを見いだした。我々のX・ $\gamma$ 線のRBEの結果(表1)も、彼らのX・ $\gamma$ 線における

結論を良く支持している。トリチウム $\beta$ 線のRBEがdに依存するとする彼らの結論が正しければ、トリチウム $\beta$ 線の代替線源を選択する際は、site size (d)を考慮する必要があるが、必ずしも低エネルギーX線が万能ではないように思われる。

低LET放射線に対するマイクロシメトリックな測定における不確定度として、ICRUレポート36では、系統誤差として $\bar{y}_F$ 、 $\bar{y}_D$ に対し、それぞれ $\pm 30\%$ 、 $\pm 10\%$ を、また、統計誤差として両者共、 $\pm 5\%$ を見積っている。

## 5. 結論

トリチウム $\beta$ 線の線量評価の基礎資料を、マイクロシメトリックな立場から集積する目的で、y分布測定システムを検討した。完成した測定システムは、十分満足できるものであった。

$^{60}\text{Co}$ 、 $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ 線の $\bar{y}_D$ は他者と実験誤差範囲内で一致したが、低エネルギーX線については、研究者間でかなりの差がみられた。更にデータの集積を進める必要がある。

$\zeta$ を指標とするRBEは、X・ $\gamma$ 線においてはdに依存しないことが確認され、EllettとBrabyの結果を支持した。トリチウム $\beta$ 線については、今後、確かめる必要がある。しかしながら、トリチウム $\beta$ 線のRBEがdに依存するとする彼らの結果が正しければ、トリチウム $\beta$ 線の代替線源の選択に際し、site sizeの考慮が必要であろう。

## 参考文献

- 1) Ellett W. H. and Braby L. A.: The microdosimetry of 250 kVp and 65 kVp X rays,  $^{60}\text{Co}$  gamma rays, and tritium beta particles. *Radiat. Res.*, **51**, 229-243, 1972.
- 2) Kliauga, P. and Dvorak R.: Microdosimetric measurements of ionization by monoenergetic photons. *Radiat. Res.*, **73**, 1-20, 1978.
- 3) Braby, L. A. and Ellett, W. H.: Ionization in solid- and grid-walled detector. *Radiat. Res.*, **51**, 569-580, 1972.
- 4) Varma, M. N., Baum, J. W., Kliauga, P. and Bond, V. P.: Microdosimetric parameter for photons as a function of depth in water using wall-less and walled counters. *Radiat. Res.*, **88**, 466-475, 1981.
- 5) 野田豊：球型LET計数管による付与エネルギー分布の測定，放射線，12,11-24，1985
- 6) Kellerer, A. M. and Rossi, H. H.: The theory of dual radiation action. *Curr. Top. Radiat. Res. Q.*, **8**, 85-158, 1972.

## (2) トリチウム $\beta$ 線により水中に 生じる遊離基の収量について

山口 寛, 川島勝弘, 星野一雄, 平岡 武  
(物理研究部)

### Yields of Free Radicals in Water Irradiated by Tritium $\beta$ Rays

Hiroshi Yamaguchi, Katsuhiko Kawashima, Kazuo Hoshino and Takeshi Hiraoka  
Division of Physics

A detailed track structure of electrons in water is considered in the prescribed diffusion calculation for a many-radical system. An interspur distance of an electron path in the primary electron and subsequent  $\delta$  rays is introduced by using the average energy to produce a spur and a restricted energy loss by an electron along the path, which is characterized by a cutoff energy. The resultant G-values of free radicals for each electron path are summed up to give the integral G-values from the whole paths by the electron

degradation spectrum. The concept of the interspur distance of an electron path segment and the use of the electron degradation spectrum improved the calculation. The yields of free radicals by tritium  $\beta$  rays are calculated and compared with those of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  rays. The result suggests that the indirect processes, determined by the whole yields of the free radicals, are less important than others with respect to higher RBE of the tritium  $\beta$  rays relative to  $\gamma$  rays.

#### 1. 緒言

トリチウム水が細胞核の中に取り込まれた場合、トリチウム  $\beta$  線が直接に DNA にヒットして障害を引き起こす直接過程と、トリチウム  $\beta$  線によって水中に生じた遊離基または free radicals が DNA にヒットして障害を引き起こす間接過程とが考えられる。直接過程と間接過程とがどのような比率で起こるのか、トリチウム  $\beta$  線の線質とどのような関係にあるのか、それ等を知ることは障害機構の解明にとって重要であるにもかかわらず、ほとんどが未知のままである。

この論文では、間接過程にとって基本的と思われる、トリチウム  $\beta$  線によって水中に生じる各種遊離基の収量を推定する理論的方法を検討した。

理論的解析に注目したのは、その時間変化の情報を与える、ピコ秒ラジオリシスの実験的方法がトリチウム  $\beta$  線に対しては適用できないからである。

理論的取り扱いとして Monte Carlo 法と解析的方法の二つがある。電子線の飛跡構造をシミュレートする Monte Carlo 計算は、電離や励起現象に引き続く free radicals 間の化学反応をもシミュレートするようになった<sup>1)</sup>。しかし、その種の計算はまだ初歩的段階にあり、radicals の初期値の設定、反応速度定数、拡散係数、の表現の仕方等に検討の余地を残している。他方、解析的な取り扱いの方は、free radicals の反応過程の記述には優れているものの、電子線の飛跡構造の反映のさせ方に問題があり、これまで種々の仕事になされてきた<sup>2-5)</sup>。

解析的取り扱いでは、ions や free radicals はある塊として飛跡のまわりに作られるとする。この塊は、物理分野では ion cluster, 化学分野では spur と呼ばれてきた。これ等塊の空間分布は飛跡構造に依存していること、free radical の化学反応は主に spur 内で起こるが、飛跡構造によって、または拡散の過程で近隣の spur 内にある free radicals とも反応する。ions や free radicals はまとめて species と呼ばれる。

Mozumder と Magee<sup>2)</sup> は、この塊をさらに blobs, short tracks そして isolated spurs に分け、それぞれ (entities と呼ぶ) に対する存在比を与えた。Magee と Chatterjee<sup>3)</sup> は、同様のエネルギー区分の entities に塊を分け、それぞれの entity における species の収量を与えた。spur 内の species の時間による拡散の部分を Gauss 分布であるとして予め解いてしまうことからそれ等の方法は prescribed diffusion model と呼ばれている。前者 (M. & M.) の計算は one-radical, 後者 (M. & C.) は two-radical system に対するものから many-radical system での収量が推定されている。これ等の計算方法を初めから many-radical system へ適用することは難しい。

Kuppermann<sup>4)</sup> と Schwarz<sup>5)</sup> は many-radical が関与する実際の反応式に従う計算式を出発点とした。この方法は、反応速度定数や拡散係数として実験値が使えるので reaction kinetics の部分についてはかなり現象に忠実なものになっている。しかし、飛跡構造の計算への反映のさせ方が粗く、飛跡平均の spur 間距離が使われ、その答えはすぐに積分収量を与えるものとされている。

Yamaguchi<sup>6)</sup> は、上記 (K. or S.) の prescribed diffusion model を一歩進め、飛跡切片ごとに spur 間距離を定義し、飛跡切片ごとの微分収量をまず求め、それ等を electron degradation spectrum で重み付けして積分収量を求めた。この取り扱いによってより現実に近い飛跡構造を計算に反映させられるようになった。

この論文では、その Yamaguchi の方法の概要を述べ、トリチウム  $\beta$  線への適用例とそれによる知見を述べる。

## 2. A prescribed diffusion model

### a. 飛跡構造

水中を走る電子のエネルギーが十分に高いと、数世代にわたる  $\delta$  線が発生する。図 1 にその概念の様子を 4 世代にわたって描いてある。高次の世代になるほど  $\delta$  線のエネルギーは平均として小さ

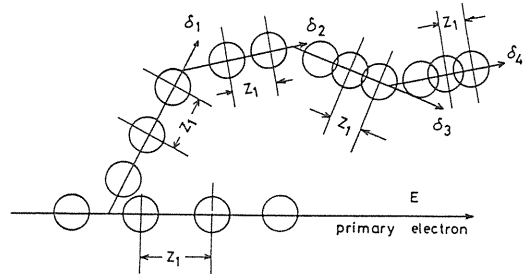


図 1 電子線飛跡構造の概念図。初期エネルギー  $E$  の一次電子線から 4 世代にわたる  $\delta$  線が出ている例を示す。一次電子線及び  $\delta$  線において次の  $\delta$  線 (エネルギーが cutoff energy  $c = 50\text{eV}$  より大きい) が出るまでの飛跡の部分を飛跡切片と呼び、その上に一定の大きさの spur ( $E_s = 50.5\text{eV}$ ) が飛跡切片のエネルギーに対応した距離  $Z_1$  に並ぶというモデルを示す。

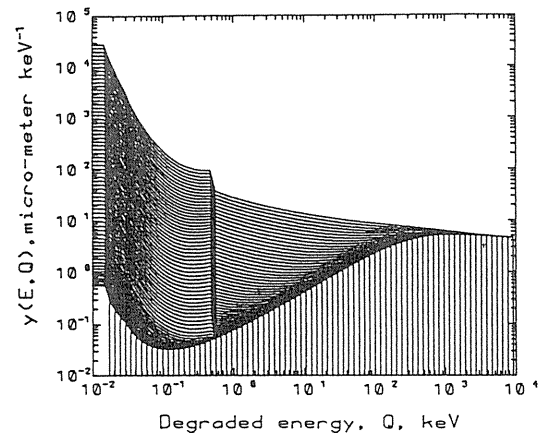


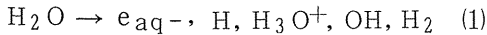
図 2 The electron degradation spectrum  $y(E, Q)$ 。  
4 世代にわたる  $\delta$  線を含む場合について Pagnamenta と Marshall<sup>7)</sup> の方法に従って求めた。各々の曲線は一次電子線  $E_i = 14.6 \zeta^i \text{eV}$  ( $i = 1, 2, \dots, 78$ ) ここで  $\zeta^4 = 2$  の  $y(E, Q)$  を示す。各曲線が重なる包絡線の部分は全阻止能の逆数に対応する。



く、各  $\delta$  線は飛跡に沿って水分子を電離したり励起したりしてエネルギーを失っていく。この  $\delta$  線が連続的にエネルギーを失っていく飛跡の部分ここでは飛跡切片と呼ぶ。飛跡切片はそのエネルギーで特徴付けられるので、大きさの一定な spur を考えると、飛跡切片ごとの spur 間距離  $Z_1$  がその飛跡切片を特徴付けるものとして導入できる。飛跡切片の飛跡全体にわたる分布は electron degradation spectrum  $y(E, Q)$  で評価できる。ここでは、Pagnamenta と Marshall<sup>7)</sup> の方法で計算し、図 2 に示した。

### b. 反応機構

電子線が通過後  $10^{-12} \sim 10^{-11}$  秒における水の放射線分解は次のごとくである。



これ等 species 間に引き続いて起こる化学反応及び反応速度定数を表 1 に示す。

表 1 反応式と反応速度定数<sup>5)</sup>

Reactions	$k \times 10^{-10}, \text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$
(1) $e_{aq}^{\cdot-} + e_{aq}^{\cdot-} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^{\cdot-}$	0.55
(2) $e_{aq}^{\cdot-} + \text{H} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + \text{OH}^{\cdot-}$	2.5
(3) $e_{aq}^{\cdot-} + \text{H}^{\cdot} \rightarrow \text{H}$	1.7
(4) $e_{aq}^{\cdot-} + \text{OH} \rightarrow \text{OH}^{\cdot-}$	2.5
(5) $e_{aq}^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^{\cdot-} + \text{OH}$	1.3
(6) $\text{H} + \text{H} \rightarrow \text{H}_2$	1.0
(7) $\text{H} + \text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	2
(8) $\text{H} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{OH}$	0.01
(9) $\text{H}^{\cdot} + \text{OH}^{\cdot-} \rightarrow \text{H}_2\text{O}$	10
(10) $\text{OH} + \text{OH} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2$	0.6

### c. 拡散反応機構

ある飛跡切片上にある spur 内の species  $i$  の濃度  $C_i$  は、次の連立微分方程式に従う<sup>5)</sup>、  

$$dC_i/dt = D_i \nabla^2 C_i - \sum_j K_{ij} C_i C_j + \sum_{j, k \neq i} K_{jk} C_j C_k - K_S C_i C_S \quad (2)$$
 ここで、 $D_i$  は拡散係数を示し、 $K_{ij}$  は species  $i$  と species  $j$  との間の反応速度定数であり、 $K_S C_i C_S$  は species  $i$  と溶質（その濃度  $C_S$ ）との単位時間当たりの反応数を示す。濃度の空間分布が Gaussian 形であると仮定し、(2)式を全空間にわたって積分すると、(2)式は spur 中の species  $i$  の数  $N_i$  に対する方程式に帰着する、  

$$dN_i/dt = - \sum_j K_{ij} N_i N_j f_{ij} + \sum_{j, k \neq i} K_{jk} N_j f_{jk} - K_S C_S N_i, \quad (3)$$

$$f_{jk} = \left[ 1 + \left\{ \pi (b_j^2 + b_k^2) \right\}^{(1/2)} / Z_1 \right] / \int_0^E \left\{ \pi (b_j^2 + b_k^2) \right\}^{(3/2)}, \quad (4)$$

ここで、 $Z_1$  はある特定の飛跡切片上での spur 間距離を示す<sup>8)</sup>。また  $b_j^2$  は、spur の広がりを示す量で初期値として Gaussian の半径  $r_j^0$  の 2 倍がとられ、拡散により時間と共に大きくなっていく。

### d. 飛跡切片 spur 間距離

ここに一次電子線に対する制限阻止能  $L_{1,c}$  を導入する、

$$L_{1,c} = \int_0^c N_1(E, Q) (Q+B) dQ + B_e \sigma_e(E), \quad (5)$$

ここで、 $N_1(E, Q) dQ$  はエネルギー  $E$  の一次電子線の単位長さ当たりの飛跡から、 $(Q, Q+dQ)$  のエネルギーを持って出てくる第一世代  $\delta$  線の数を示す。 $B = 12.6 \text{ eV}$  は ionization potential であり、 $c$  は cutoff energy,  $B_e = 13 \text{ eV}$ <sup>9)</sup> は the mean excitation energy transfer, そして  $\sigma_e(E)$  は一次電子線の励起に対する断面積<sup>9)</sup>を示す。

我々は(5)式から、飛跡切片の spur 間距離を次のごとく定義する<sup>6)</sup>。

$$Z_1 = E_s / L_{1,c}, \quad (6)$$

ここで、 $E_s$  は spur 一個を作るのに必要なエネルギーであり、飛跡全体にわたって一定であるとする。

### e. 電子線の積分 G 値

エネルギーが  $Q$  の飛跡切片上での微分 G 値  $G_i'(Q)$  は 100 eV 当たりの species  $i$  の数であるが、(3)と(5)式の解から求められる。

初期エネルギー  $E$  の電子の、積分 G 値は electron degradation spectrum  $y(E, Q)$  を使って、

$$G_i(E) = \int_0^E G_i'(Q) y(E, Q) L(Q) dQ / \int_0^E y(E, Q) L(Q) dQ \quad (7)$$

と求められる。ここで、 $L(Q)$  は全阻止能を示す。

放射線が  $\beta$  線及び電子線に対してエネルギー分布  $P(E)$  を持つ場合、その積分 G 値  $G_i$  は、

$$G_i = \int_0^\infty P(E) G_i(E) dE. \quad (8)$$

となる。

## 3. 結果と討論

連立微分方程式(3)は時刻  $t = 10^{-12} \sim 3 \times 10^{-7}$  秒にわたり、拡散係数として Schwarz<sup>5)</sup> の値、

species の初期半径は Burns<sup>10)</sup>の値を使い数值的に解かれる。

<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 線と $\beta$ 線源4種類に対する Fricke dosimeter の実験値<sup>11)</sup>と計算値を比べた。それ等の放射線に対する電子のエネルギー分布 P(E) は文献<sup>12, 13, 14)</sup>に与えてある。

spur 内の species の初期値は実験値<sup>15)</sup> や Schwarz<sup>5)</sup> の値を参照して決めた。

これ等を固定したうえで、Fricke dosimeter の実験値を最も再現するようなパラメーター Es と c とが決められ Es = 50.5ev, c = 50ev となった。表2に Fricke dosimeter のG値の計算値と実験値との比較を示した。図3に各species の積分G値のエネルギー依存性を示した。

表2 Fricke 線量計G (Fe<sup>3+</sup>)の計算値と実測値<sup>11)</sup>との比較

	radiation	calculation	experiment
<b><math>\beta</math> rays</b>			
1.	<sup>3</sup> H	12.91	12.9 $\pm$ 0.2
2.	<sup>35</sup> S	14.80	14.3 $\pm$ 0.4
3.	<sup>90</sup> Y	15.72	15.4 $\pm$ 0.4
4.	<sup>32</sup> P	15.64	15.3 $\pm$ 0.5
<b><math>\gamma</math> rays</b>			
	<sup>60</sup> Co	15.55	15.5 $\pm$ 0.3

表3 <sup>60</sup>Co  $\gamma$ 線により水中に生じた各種遊離基の収量についての計算値と実測値<sup>17)</sup>との比較

Species	Calculations			Experiment
	Burns	Trumbore	Present work	
e <sub>aq</sub> <sup>-</sup>	2.85	2.97	3.04	2.70
OH	3.06	3.67	2.86	2.86
H	0.712	0.804	0.647	0.61
H <sub>2</sub>	0.407	0.452	0.402	0.43
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.659	0.503	0.82	0.61
G(Fe <sup>3+</sup> )	15.06	16.0	15.55	14.01
Es in eV	62.5	60	50.5	

\* Data in the presence of scavenger.

表4 <sup>3</sup>H  $\beta$ 線及び<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 線により水中に生じた各種遊離基の収量

Species	Tritium $\beta$ rays		<sup>60</sup> Co $\gamma$ rays	
	Calculation	Experiment	Calculation	Experiment
e <sub>aq</sub> <sup>-</sup>	2.318		3.04	2.70
OH	2.140		2.86	2.86
H	0.641		0.647	0.61
H <sub>2</sub>	0.503		0.402	0.43
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.914		0.82	0.61
G(Fe <sup>3+</sup> )	12.91	12.9 $\pm$ 0.2*	15.55	15.5 $\pm$ 0.3**

\* Data in the presence of scavenger from

A. Appleby and H.A. Schwarz, J. Phys. Chem., **73**, 1937, (1969).

\*\* A.O. Frege, Radiat. Res., **31**, 256, (1967).

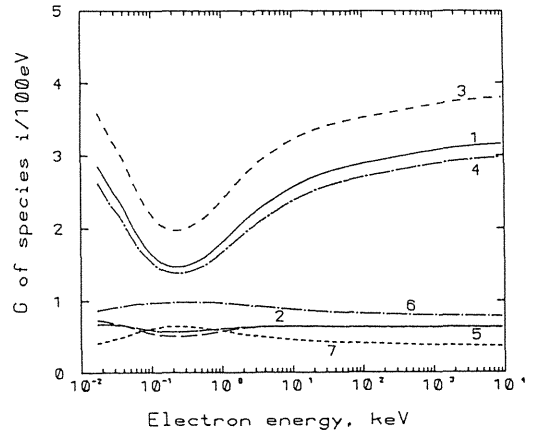


図3 電子線により水中に生じた各種遊離基の積分収量。曲線に付けた数字はそれぞれ 1 = e<sub>aq</sub><sup>-</sup>, 2 = H, 3 = H<sup>+</sup>, 4 = OH, 5 = OH<sup>-</sup>, 6 = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 7 = H<sub>2</sub>を示す。

表3に<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 線に対する実験値との比較及びこれまでの計算値との比較を示す。我々の計算は飛跡平均 spur 間距離を使う Burns や Trumbore<sup>16)</sup>等の結果と同程度の一致であるが、これまでの Es = 60 ~ 62.5 ev であるといわれていたものが、実はもうすこし小さく Es = 50.5 ev となった点が新しい知見だと思われる。

表4にトリチウム $\beta$ 線による各種 species のG値を<sup>60</sup>Co  $\gamma$ 線の結果<sup>17)</sup>との対比で示した。トリチウムについての実験値はない。収量を<sup>60</sup>Co

$\gamma$ 線との比で示すと,  $e_{aq}^- = 0.76$ ,  $OH = 0.75$ ,  $H = 0.99$ ,  $H_2 = 1.25$ ,  $H_2O_2 = 1.11$ と推定された。収量比で1を越えたのは $H_2$ と $H_2O_2$ だけであった。しかし, 図3に示されているようにこれ等の分子のG値のエネルギー依存性はそれほど有意とは思われないので, トリチウムのRBEは水中に生成された水ラジカルの総収量に係わるような間接過程に起因しているのではなさそうだと暗示を受ける。

#### 参考文献

- 1) Turner J. E., Magee J. L., Wright H. A., Chatterjee A. and Ritchie R. N.: Physical and chemical development of electron tracks in liquid water. *Radiat. Res.*, **96**, 437, 1983.
- 2) a) Mozumder A. and Magee J. L.: Model of tracks of ionizing radiations for radical reaction. *Radiat. Res.*, **28**, 203 and 215, 1966.  
b) Mozumder A. and Magee J. L.: Theory of radiation chemistry. VII. Structure and reactions in low LET tracks. *J. Chem. Phys.*, **45**, 3332, 1966.
- 3) Magee J. L. and Chatterjee A.: Theory of the chemical effects of high-energy electron. *J. Phys. Chem.*, **82**, 2219, 1976.
- 4) a) Kuppermann A.: Diffusion model of the radiation chemistry of aqueous solution. In *Radiation Research 1966*, pp.212. North Holland, Amsterdam, 1967.  
b) Kuppermann A.: Diffusion kinetics in radiation chemistry. In *Physical mechanism in radiation biology*, pp.155, CONF-721001, 1974.
- 5) Schwarz H. A.: Application of the spur diffusion model to the radiation chemistry of aqueous solutions. *J. Phys. Chem.*, **73**, 1928, 1969.
- 6) Yamaguchi H.: A prescribed diffusion model of a many-radical system with considering electron track structure in water. *Radiat. Phys. Chem.*, **30**, 279, 1987.
- 7) Pagnamenta A. and Marshall J. H.: The track structure of electron in water. *Radiat. Res.*, **106**, 1, 1986.
- 8) a) Magee J. L. and Chatterjee A.: Radiation chemistry of heavy-particle track. 1. General considerations. *J. Phys. Chem.*, **84**, 3529, 1980.  
b) Chatterjee A. and Magee J. L.: Radiation chemistry of heavy-particle track. 2. Fricke dosimeter system. *J. Phys. Chem.*, **84**, 3537, 1980.
- 9) Paretzke H. G. and Berger M. J.: Stopping power and energy degradation for electrons in water vapor. *Proc. Vth Symp. Microdos.*, p.749, Haewood, London, 1978.
- 10) Burns W. G., Sims H. E. and Goodall J. A. B.: Radiation chemical diffusion kinetic calculations with prescribed and non-prescribed diffusion-1. *Radiat. Phys. Chem.*, **23**, 143, 1984.
- 11) Fregene A. O.: Calibration of the ferrous sulfate dosimeter by ionometric and calorimetric methods for radiations of a wide range of energy. *Radiat. Res.*, **31**, 256, 1987.
- 12) Saigusa T.: Energy deposition of a  $^3H$ -beta Particle in water. *Ryukokukiyo*, **2**, 123, 1981.
- 13) *Table of Radiation Isotopes*, Eds., Browne, E., Firestone R. B. and Shirley V. S., John Wiley and Sons, 1986.
- 14) Cormack D. V. and Johns H. E.: Electron energies and ion densities in water irradiated with 200 KeV, 1MeV and 25MeV radiation. *Brit. J. Radiol.*, **25**, 369, 1952.
- 15) Samuel A. H. and Magee J. L.: Theory of radiation chemistry. II. track effects in radiolysis of water. *J. Chem. Phys.*, **21**, 1080, 1953.
- 16) Trumbore C. N., Short D. R., Fanning J. E. and Olsen J. H.: Effects of pulse dose on hydrated electron decay kinetics in the pulse radiolysis of water. A computer modeling study. *J. Phys. Chem.*, **82**, 2762, 1978.
- 17) Appleby A. and Schwarz H. A.: Radical and molecular yields in water irradiated by  $\gamma$  rays and heavy ions. *J. Phys. Chem.*, **73**, 1937, 1969.

## 2. トリチウムの生物効果比を求めるための化学的研究

柴田 貞夫、河村 正一、渡利 一夫 (化学研究部)  
松平 寛通 (生物研究部)

### Synthesis of $^{63}\text{Ni}$ Cyclam Complex as a Model of Tritiated Water

Sadao Shibata, Kazuo Watari, Shoichi Kawamura and Hiromichi Matsudaira\*  
Division of Chemistry, \*Division of Biology

Attempts have been made to use  $^{63}\text{Ni}$  as an alternative of tritiated water, a low energy  $\beta$ -ray emitter, sometimes inconvenient to handle due to its volatility.  $^{63}\text{Ni}$  cyclam (cyclam = 1, 4, 8, 11-tetraazacyclotetradecane) was expected to be a model compound of tritiated water applicable in biologic experiments, because of its high solubility and stability in water, nonvolatility, and low toxicity.

In the present experiments were studied, method of preparation, optical absorption spectra, adsorption or extraction behavior, isotopic exchange of central metal ion, and metabolism in rat of the cyclam complex.

Preliminary experiments were made using  $^{60}\text{Co}$  instead of  $^{63}\text{Ni}$ , because chemical proper-

ties of Co (III)-cyclam are similar to Ni-complex and  $\gamma$ -rays of  $^{60}\text{Co}$  are suitable to rapid and easy radiation measurement. Carrier free  $^{60}\text{Co}$  cyclam solution ( $2 \mu\text{Ci/ml}$ ) was prepared by mixing cyclam and  $^{60}\text{Co}$  chloride in methyl alcohol.

The  $^{60}\text{Co}$  complex prepared was injected i.v. to rats and the biological half-lives estimated: they were 6.5 hours (90 %) and 5.0 days (10 %). Those values were not influenced by the presence of EDTA in contrast to inorganic  $^{60}\text{Co}$  compound.

These results suggest that  $^{63}\text{Ni}$  cyclam complex is very stable and can be used as an alternative compound of tritiated water. Its preparation is now being under way.

#### 1. 緒言

環境中に放出されたトリチウムはそのほとんどがトリチウム水として存在すると考えられ、また実験研究でもトリチウム水を対象とすることが多い。このトリチウム水は空気中の水蒸気と交換して作業空間に揮散して、吸入・経口はもちろん経皮的にも体内に取り込まれ易いので実験者ならびに実験環境の汚染が起りやすく取扱いが困難である。

このような背景から

(1) トリチウム水代替化合物を開発することで、作業環境の汚染防止に役立つ。

(2) トリチウムの生物効果比に与える軟ベータ線以外の要素を除く。

の2点が解決すべき問題としてあきらかとなった。

トリチウムのモデル核種としては、長寿命の純ベータ放出体で、ベータ線の最大エネルギーがトリチウムのそれに近いものが望ましいことはいうまでもない。この点からは $^3\text{H}$ の最大エネルギー18.6keVに最も近く、容易に購入できる純 $\beta$ -放出体 $^{63}\text{Ni}$  (67 keV) が最適である。しかしながら、無機態のニッケルには発癌性があるとされているため、応用にあたっては適当な化学形に変えることが必要である。

また、市販の $^{63}\text{Ni}$ には、少量のニッケル担体が含まれており、液体シンチレーション・カウンターの測定の際、色クエンチングを起こし計数効率が著しく低下しそのままでは計測できない。

これまでに着色を消し色クエンチングを無くす方法を種々検討し、 $^{63}\text{Ni}$  水溶液 1ml に 20% アスコルビン酸 2 滴を添加したのち、InstaGel (Packard 社) 10ml を混和することにより、色クエンチングが認められない高い計数効率で計測できることを確認している。

本研究では、トリチウム水モデル化合物の選定条件を明確にし、その合成と適用の可否について検討したので報告する。

## 2. 研究方法

### a. トリチウム水モデル化合物の選定条件

トリチウム水のモデル化合物としての条件は以下の 5 点を満足するものと考えた。

- (1) 水に溶け易い。
- (2) 反応性が低く、生体中で変化を受けずに安定に存在し得る。
- (3) 生体構成物質中への取り込みや吸着が起こらない。
- (4) 揮発しない。
- (5) 毒性が低い。

これらの条件を考慮しながらニッケル化合物の安定度定数を調べた。その結果アミノポリカルボン酸および大環状化合物を配位子とする錯体が適当と考えられた。前者はエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) をはじめとして古くから調べられているものである。後者は最近、金属イオン選択性などの特異な化学的特性が注目され、分離分析にも広く応用され出したものである。<sup>1-4)</sup>

我々は比較的合成がし易く非常に安定な錯体をつくる 1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン (cyclam) およびそのアナログに着目し、上記の条件にあうか検討した。

また、 $^{63}\text{Ni}$  化合物を目的とするものの、測定の便から予備的な研究ではガンマ線放出体が望ましい。しかしながらガンマ線を放出する適当な放射性ニッケル核種が存在しないため、類似した挙動をとると思われる  $^{60}\text{Co}$  の上記錯体を用いることにした。<sup>5)</sup>

### b. 錯体の合成

1) 過塩素酸 (1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン) ニッケル (II):  $[\text{Ni}(\text{cyclam})](\text{ClO}_4)_2$

合成は文献にしたがって行った。すなわち、1, 3-ジアミノプロパンと 1, 2-ジプロモエタンを

縮合し、4, 7-ジアザデカン-1, 10-ジアミンを得る。これをニッケルイオンを鋳型としてグリオキサルと縮合環化し、水素化ホウ素ナトリウムで還元したのち橙赤色針状の過塩素酸塩として結晶化する。

2) 1, 4, 8, 10-テトラアザシクロテトラデカン:  $\text{C}_{10}\text{H}_{24}\text{N}_4 = \text{cyclam}$

$[\text{Ni}(\text{cyclam})](\text{ClO}_4)_2$  水溶液をシアン化物イオンで処理し、クロロホルムに抽出したのち溶媒を除き、ベンゼンから再結晶する。最近、市販品が出されているが精製して用いる必要がある。

3) ジクロロ (1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン) ニッケル (II):  $[\text{NiCl}_2(\text{cyclam})]$  エチルアルコール中で cyclam と塩化ニッケルを反応させ、エーテルを加えると淡紫色の沈澱を得る。メチルアルコールに溶かしエーテルを加えることにより再結晶できる。水に溶かすと塩化物イオンを解離し淡褐色を呈する。

4) trans-ジクロロ (1, 4, 8, 11-テトラアザシクロテトラデカン) コバルト (III):  $[\text{CoCl}_2(\text{cyclam})]\text{Cl}$

メチルアルコール中で cyclam と塩化コバルト (II) を混合し、空気を通じて酸化する。塩酸を加えると溶液の色は褐色から濃緑色に変わる。さらに空気を通じてから、ろ過後ろ液を蒸発乾固する。残留物を熱水にとかし冷却すると緑色針状の結晶を得る。これをろ過しアセトン、エーテルで洗い風乾する。

5) 高比放射能  $^{60}\text{Co}$ -cyclam 溶液: CF- $^{60}\text{Co}$ -cyclam

cyclam 2mg をメチルアルコール 40 ml に溶かし、キャリアなし  $^{60}\text{CoCl}_2$  を加え、空気を 1 時間通ずる。濃塩酸 3ml を加えてさらに 1 時間空気を通じたのち 100 ml ビーカーに移して気流下で溶媒を除去する。残渣を水 20ml に溶かし、クロロホルム 5ml と振り混ぜ未反応の配位子を除く。水相をアンモニア水で pH 8 とし、オキシニクロロホルム溶液 5ml で処理してフリーの  $^{60}\text{Co}$  を除く。溶液を赤外ランプで濃縮し、冷却後 0.45nm のミリポアフィルターでろ過する。水で全量を 25 ml としたのち 5ml ずつに小分けしてバイアルびんに入れて保管した。

### c. 可視部吸収スペクトル

$[\text{CoCl}_2(\text{cyclam})]\text{Cl}$  の  $10^{-2}\text{ML}^{-1}$  溶液を調製し、NaCl,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{AgNO}_3$  の添加による 500~700nm のスペクトル変化を調べ溶液

中に存在する化学種を推定した。

d.  $^{60}\text{Co}$ -cyclam 錯体のイオン性および非イオン性巨大網状樹脂への吸着挙動

CF- $^{60}\text{Co}$ -cyclam 0.5ml をとり水を加えて 100mlにする。これを二分し一方に NaCl 1400mg を溶かす。各々 10ml と樹脂 0.1g 一定時間振りまぜ水溶液中の放射能を測定して吸着率を求めた。

e. 中心金属の同位体交換

1) 酸性条件

錯体  $[\text{CoCl}_2(\text{cyclam})]\text{Cl}$  250mg を  $10^{-1}\text{M}$   $\text{L}^{-1}$   $^{60}\text{CoCl}_2$  7.5ml, 濃塩酸 0.1ml 中で加熱溶解し, 冷却後に析出した結晶をトローろ紙 No. 5 A でろ過し, アセトン, エーテルで洗う。これを, 1:100 塩酸に加熱溶解して再結晶し, 一定の比放射能になるまで繰り返す。

2) 弱塩基性条件

錯体 250mg,  $^{60}\text{Co}-\text{CoCl}_2$  ( $10^{-1}\text{ML}^{-1}$ ) 6ml,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  166mg に 5ml の水, 濃アンモニア水 3 滴を加えて加熱溶解し, 冷却後に析出した結晶をトローろ紙 No. 5 A でろ過し, アセトン, エーテルで洗い風乾する。Co のアンミン錯体を除くために 1:2 硝酸に加熱溶解し再結晶する。さらに 1:100 塩酸に加熱溶解して再結晶し, 一定の放射能になるまで繰り返す。

f. 代謝実験

雄成熟ウイスターラットに尾静脈から CF- $^{60}\text{Co}$ -cyclam 錯体を注射し, 全身放射能計測により排泄速度を調べた。比較のため, CF- $^{60}\text{CoCl}_2$  の排泄速度および EDTA を同時に投与したときの影響も検討した。

排出経過は 2 つの指数関数で近似できるものとし, 柴田が開発した非線形最小 2 乗法プログラム EDCAL1 を用いて解析した。<sup>6-7)</sup>

### 3. 結果

a. トリチウム水モデル化合物の選定条件

表 1 にアミノポリカルボン酸類および本研究でとりあげた cyclam の酸解離定数とニッケル錯体生成定数を示す。これからわかるように, 核医学でしばしば用いられている ジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) に比べて cyclam は 100 倍も安定な錯体をつくる。

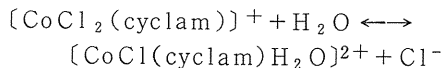
また, 分子模型によって cyclam 錯体の構造が水の結晶構造の一部と類似していることが確かめられ, このことからこの化合物が水のモデルとして適当なものと考えられることができる。

b. 錯体の合成

配位子および錯体の合成は図 1 にしたがいが比較的容易に行うことが出来た。高比放射能  $^{60}\text{Co}$ -cyclam 溶液の比放射能は  $2\mu\text{Ci/ml}$  であった。また, オキシソークロホルムに抽出されるフリーの  $\text{Co}^{2+}$  イオンは調製後 4 年経っても認められなかった。

c. 可視部吸収スペクトル

図 2 に種々の条件におけるコバルト錯体のスペクトルを示す。615nm と 605nm 付近に等吸収点を持ち, それぞれが最初の塩化物イオン, 第二の塩化物イオンの解離平衡に対応している。最初のアコ化反応の解離平衡



の平衡定数は  $6 \times 10^{-3}\text{ML}^{-1}$  と見積もられており, 0.8% 食塩水中ではほとんどが  $[\text{CoCl}_2(\text{cyclam})]^+$  として存在することが計算から知れる。

表 1 配位子のプロトンおよびニッケル錯体生成反応の平衡定数

	配位子	cyclam	$\text{CN}^-$	EDTA	CDTA	DTPA
H	$\log K_1$	11.59	9.21	10.24	12.4	10.55
	$\log K_2$	10.62		6.16	6.15	8.59
	$\log K_3$	1.61		2.66	3.53	4.30
	$\log K_4$	2.42		2.0	2.42	2.66
	$\log K_5$					1.82
Ni	$\log K_{HL}$	22.2	30.22*	18.62	20.3	20.32

\*)  $\log \beta_{HL4}$

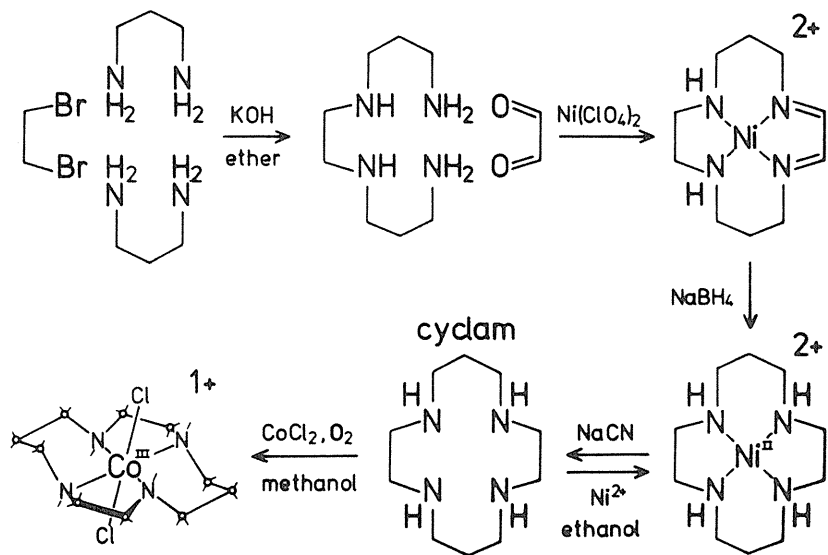


図1 配位子および金属錯体の合成経路

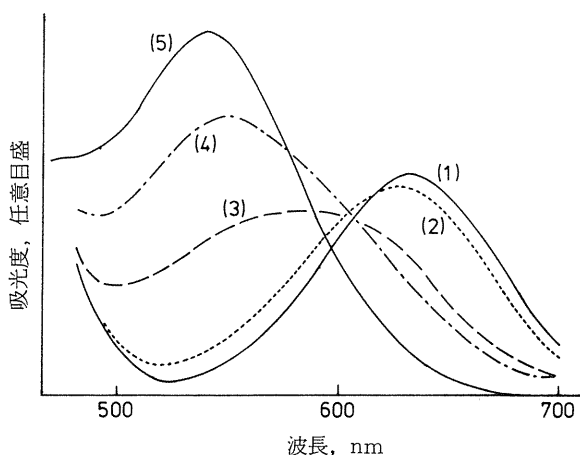


図2 Co-cyclam 錯体の可視部吸収スペクトル

- (1) 0.8%食塩水中： $[\text{CoCl}_2(\text{cyclam})]^+$
- (2) 蒸留水中 (pH 4)
- (3) 1当量の硝酸銀を添加後の上澄液：  
 $[\text{CoCl}(\text{OH}_2)(\text{cyclam})]^{2+}$
- (4) 2当量の硝酸銀を添加後の上澄液：  
 $[\text{Co}(\text{OH}_2)_2(\text{cyclam})]^{3+}$
- (5) 弱塩基性溶液 (pH 8)：  
 $[\text{Co}(\text{OH})(\text{OH}_2)(\text{cyclam})]^{2+}$

d. <sup>60</sup>Co-cyclam 錯体の樹脂への吸着挙動  
表2にCF-<sup>60</sup>Co-cyclam 錯体の各種樹脂への吸着率を示す。

e. 中心金属の同位体交換

表3に加熱溶解した非放射性錯体の水溶液に<sup>60</sup>Coを添加し、再結晶を繰り返して比放射能を調べた結果を示す。これより同位体交換はほとんど起こらないと考えられる。

f. 代謝実験

図3に雄成熟ウイスターラットの全身放射能計測による排泄経過を示す。表4にEDCAL1を用いて計算された排泄速度パラメータを武田らが報告したトリチウムの値とともに示す。

#### 4. 討論

a. 多量のトリチウムを取り扱う機会が増大するにしたがって、その被曝による影響を明かにすることは緊急性を要している。しかしながら、トリチウムは軟ベータ放出体であり、トリチウム水として使用した場合には揮発して実験環境の汚染を起こし易く、測定や取扱いに困難なことが多い。低エネルギー放射線の全身的な影響を見るだけであれば、<sup>241</sup>Amや<sup>144</sup>Ceのガンマ線外部照射を用いることが出来る。

表2 CF-<sup>60</sup>Co-cyclam 錯体の吸着率(%)<sup>a</sup>

吸着体	溶媒	24時間振盪	48時間振盪
陽イオン 交換樹脂 <sup>b</sup>	蒸留水	82.1 ± 1.3	82.7 ± 1.3
	0.8%食塩水	66.0 ± 1.9	67.5 ± 1.8
陰イオン 交換樹脂 <sup>c</sup>	蒸留水	3.5 ± 3.7	7.0 ± 3.6
	0.8%食塩水	0.0 ± 3.9	0.0 ± 3.8
非イオン性 MR樹脂 <sup>d</sup>	蒸留水	34.8 ± 2.8	40.2 ± 2.6
	0.8%食塩水	4.6 ± 3.7	0.1 ± 3.8

- a) 吸着体0.1g/溶媒10ml    b) アンバーライト200C  
 c) アンバーライト1RA-904    d) アンバーライトXAD-7

表3 コバルトイオンの同位体交換率\*

溶媒	担体なし	担体あり
0.5N塩酸	$2.82 \times 10^{-6}$	$1.85 \times 10^{-6}$
0.2Nアンモニア水	$1.33 \times 10^{-4}$	$4.42 \times 10^{-7}$



表4 <sup>60</sup>Co化合物およびトリチウム水のラット中での生物学的半減期

	短半減期部分	長半減期部分
<sup>60</sup> Co-cyclam	6.5時間 (90%)	4.6日 (10%)
<sup>60</sup> Co-cyclam + EDTA	5.0時間 (92%)	4.0日 (8%)
<sup>60</sup> CoCl <sub>2</sub>	6.9時間 (79%)	3.6日 (21%)
<sup>60</sup> CoCl <sub>2</sub> + EDTA	3.3時間 (98%)	2.9日 (2%)
HTO (ラット)		3.5日
HTO (ヒト)		9.5日



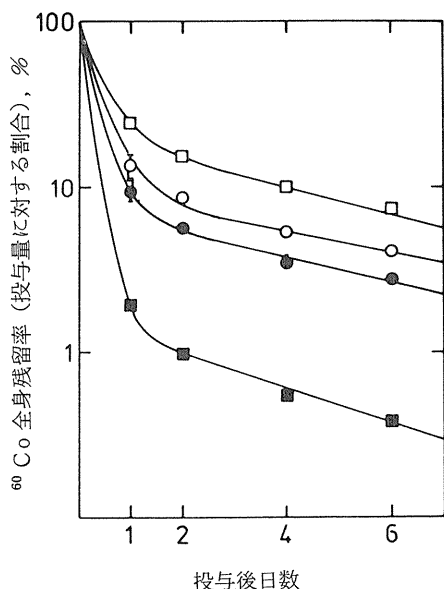


図3 ラットに静脈内投与した  $^{60}\text{CoCl}_2$  の全身残留曲線

- :  $^{60}\text{Co}$ -cyclam 錯体
- :  $^{60}\text{Co}$ -cyclam 錯体 + EDTA
- :  $^{60}\text{CoCl}_2$
- :  $^{60}\text{CoCl}_2$  + EDTA

内部被曝を問題とするときは、軟ベータ放出体によるトリチウム水代替化合物が望まれるわけであるが、核種としては  $^{63}\text{Ni}$  以外に適当なものは見あたらない。無機態の  $^{63}\text{NiCl}_2$  を用いたデータではそのほとんどがアルブミンと結合もしくはヒスチジル基をもつ低分子が配位した状態で存在するとされており、水分子と挙動を共にするとは考えられない。

そこで、ニッケル錯塩の中で先に上げた条件の化合物を検索した。配位子の候補としては、表1にとりあげたアミノポリカルボン酸類すなわち EDTA、シクロヘキサンジアミン五酢酸(CDTA)、および核医学でしばしば用いられている DTPA がまず考えられたが、いずれの錯体もほぼ全量が短時間のうちに尿として排泄されてしまうことがわかっている。<sup>8-10)</sup>

我々は、金属イオン選択性などの特異な化学的特性をもつ大環状化合物に着目し、これまでに放

射性ストロンチウムの分離分析法の開発を行ってきた。ここでは、N 4 配位子である cyclam が DTPA の 100 倍も安定な Ni 錯体を形成すること、その構造が水分子中に無理なく入り込めるものであるということから最も有望なものとして実験を計画した。

b. 配位子 cyclam および錯塩の合成は比較的容易である。また、市販品が出回るようになってきたので今後の研究に活用し易い条件が整ってきた。

高比放射能  $^{60}\text{Co}$  錯体溶液の調製には未反応の配位子と  $^{60}\text{Co}$  を除くことが必要であるが、クロロホルムおよびオキシソクロロホルムで抽出することによって達成できた。また、非放射性錯体と挙動を共にすることから正しく標識されていることを確認した。

c.  $[\text{CoCl}_2(\text{cyclam})]\text{Cl}$  の  $10^{-2}\text{ML}^{-1}$  溶液は緑色であるが、 $\text{AgNO}_3$  を添加していくとピンク色になり、 $\text{NH}_4\text{OH}$  でアルカリ性になると赤紫になる。これは、錯体のアコ化とそれに続くヒドロキソ化によるものである。 $\text{NaCl}$  を含む溶液中ではほとんどが  $[\text{CoCl}_2(\text{cyclam})]^+$  となっている。

d.  $\text{CF}^{-60}\text{Co}$ -cyclam 錯体の各種樹脂への吸着率は 0.8% 食塩水中では陽イオン交換樹脂にのみ吸着していることを示しており吸収スペクトルの結果と一致する。蒸留水における吸着挙動は、 $\text{FeCl}_4^-$  型錯陰イオンの XAD-7 への吸着と同様に錯イオンの疎水性吸着現象として解釈できる。<sup>11)</sup>

e. 中心金属の同位体交換は再結晶法で見るとほとんど起こらないといえる。アルカリ性、 $\text{CoCl}_2$  担体なしでの値が高いのは  $^{60}\text{Co}^{2+}$  イオンの保持剤として加えた  $\text{NH}_4\text{Cl}$  によるアンミン錯体が除ききれなかったためであろう。

また、自己放射線分解によるフリーの  $^{60}\text{Co}$  が検出されなかったことは、cyclam が酸化に対しプロトン放出して二重結合を生成するなどにより環構造を維持できることも一因であろう。

f. 以上の結果からこの錯体が充分安定なものであることが確認できたので、生体中での代謝実験を試みた。雄成熟ウイスターラットの全身放射能計測による排泄経過は  $^{60}\text{CoCl}_2$  のものとは明かに異なるといえる。無機金属イオンでは長半減期の部分が 20% もあるのに対し錯体では 10% 弱である。また、EDTA を同時に投与した場合無機金属イオンはただちに EDTA と結合し 98.5% が速

やかに排泄されてしまうのに対し錯体の挙動はほとんど影響を受けていない。

したがって、本錯体は生体内においても充分安定に存在し、その生物学的半減期（4.65日）も武田らの報告にあるトリチウム水の3.53日に近いといえる。

毒性についても培養細胞を用いた予備的な実験で、かなりの濃度までほとんど影響がないことが示され、充分低いものと考えられる。

## 5. 結論

以上のことを先の条件に照らしてみると、(1)水に溶解易く、(2)反応性が低く、生体中で変化を受けずに安定に存在し、(3)取り込みや吸着が起こらず、(4)揮発しないで、(5)毒性が低いということであり、cyclam錯体はトリチウム水のモデルとして使用できることがわかった。

今後、 $^{63}\text{Ni}$ 錯体を実際に生体実験等に適用すると共に、各種のcyclam錯体の濃縮係数、体内分布、線量効果関係などを調べることが必要である。

なお、これまでにcyclamおよびそのアナログを用いるこの種の報告は、わずかにテクネチウム(V)錯体の核医学診断薬とマンガン(III)錯体を核磁気共鳴イメージング用造影剤とする試みがみられるにすぎない。この点でも、これらの錯体に関する研究の発展が望まれる。

## 6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり代謝実験をしていた環境衛生研究部の稲葉次郎室長および毒性試験をしていただいた生物研究部の福土育子主任研究官に感謝いたします。

## 参考文献

1) 河村正一, 黒滝克己, 柴田貞夫, 竹下洋: クラウンエーテル溶液中のRIの吸着挙動, 第21回放射能化学討論会, 石川県辰口町, 1977.10

2) 河村正一, 柴田貞夫, 黒滝克己, 竹下洋: クラウンエーテルによるSrの吸着, 第22回放射化学討論会, 東京, 1978.10

3) 河村正一, 竹下洋, 柴田貞夫, 黒滝克己: *Artemisiae folium*をRI吸着・保持体に使用する試み, 第23回放射化学討論会, 大阪, 1979.10

4) 河村正一, 竹下洋, 黒滝克己, 柴田貞夫, 島野哲也: クリプタンドによる放射性核種捕集の試み, 第29回放射化学討論会, 船橋, 1985.10

5) 柴田貞夫, 河村正一, 渡利一夫, 松平寛通, 稲葉次郎:  $^{60}\text{Co}$ -サイクロム錯体の合成, 第21回理工学における同位元素研究発表会, 東京, 1984.7

6) 柴田貞夫: EDCAL利用者サブシステムの開発—TSSで使える最小2乗法によるパラメータ推定(1), 放射線科学, 25, 172-175, 1982

7) 柴田貞夫: EDCAL利用者サブシステムの開発—TSSで使える最小2乗法によるパラメータ推定(2), 放射線科学, 25, 193-198, 1982

8) 池平博夫, 山根昭子, 福田信男, 鳥居伸一郎, 柴田貞夫, 松本徹, 飯沼武, 館野之男: ガドリニウムDTPAによるNMR-CT腎動態機能検査法の試み, 核医学, 22, 219-224, 1985

9) 池平博夫, 鳥居伸一郎, 山根昭子, 福田信男, 柴田貞夫, 遠藤真広, 松本徹, 篠藤仁, 飯沼武, 館野之男: ガドリニウムDTPAによるNMR-CT腎動態機能検査(第2報)—局所レノグラムと非観血的GFR測定法について, 核医学, 22, 1615-1624, 1985

10) 柴田貞夫: Gd-DTPA: NMRイメージング造影剤, 化学と工業, 38, 381, 1985

11) 渡利一夫, 今井靖子, 柴田貞夫, 三浦正敏: 放射性核種吸着体としてのMR樹脂とポリウレタンフォームの利用, 日本原子力学会誌, 26, 384-391, 1984

### Ⅲ 動物細胞を用いたトリチウムの 生物効果の解析研究

#### 1. トリチウムによる動物細胞およびそのDNA分子の 障害に関する研究

上野昭子, 古野育子, 松平寛通 (生物研究部)

#### Tritium Effects on Cultured Mouse Leukemia Cells L5178Y

Akiko M. Ueno, Ikuko Furuno-Fukushi and Hiromichi Matsudaira  
Division of Biology

Effects of tritium, tritiated water and tritiated organic compounds, were studied in cultured mouse leukemia cells L5178Y, with cell killing and induced mutation as end points, by using acute and low dose-rate  $\gamma$  rays as reference. Effects of  $D_2O$  were also examined.

Beta-rays from HTO had an RBE from 1.3 to 2.9 relative to low dose-rate  $\gamma$  rays, the values being higher for induced mutation than for cell killing.

$D_2O$  at 45 % enhanced the cell killing and mutation induced by  $\gamma$  rays and HTO. It abolished totally the dose-rate effects of  $\gamma$  rays for cell killing. The results with  $D_2O$  precluded the contribution of isotope effects in the action of HTO.

The effects of tritiated organic compounds were examined in detail. Tremendous differences were found in their effects when compared

on the basis of their concentration in the medium (for example, tritiated thymidine was about 1000 times more radiotoxic than HTO). These differences disappeared when compared on the basis of the absorbed dose. HTO and tritiated amino acids examined have given similar dose-response relationship each other for both cell killing and induced mutation. Tritiated thymidine, however, was found to be about two times more effective than HTO and tritiated amino acids even on the basis of the absorbed dose. Therefore, tritium incorporated into DNA of the cells may have actions other than  $\beta$  ray-irradiation.

These results indicate the importance of measurement of the absorbed dose in the estimation of risks from tritium.

#### 1. 緒言

トリチウム水は揮発性なので、実験には適当な設備と細心な取り扱いが必要であり、通常の実験よりも困難が伴う。そこで、我々は比較的処理の容易な哺乳動物培養細胞を用いてトリチウムの

生物学的効果を調べるとともに解析的研究も行い、トリチウムの生物影響に関する基礎的知見を早めに提供することにより研究の推進を計った。培養細胞に対するトリチウムの効果についてはこれまでにもいくつかの研究があるので、それらの結果と比較・再検討しつつ、更に新しい知見も加える

ことができたのでここに報告する。この実験では主に細胞死と突然変異を指標としてトリチウム水および有機形トリチウムのRBEを求めた。

## 2. 研究方法

a. 実験材料：対数増殖期のマウス白血病培養細胞L5178 Yを用いた。細胞は10%ウマ血清を含むフィッシャー培地で密栓浮遊培養した。

b. 細胞のトリチウム水処理：トリチウム水(HTO)除去装置付きのフード内でHTOを稀釈し、HTOを含む培地を作製した。 $1 \times 10^4$  cells/ml (長時間培養のとき)又は $1 \times 10^5$  cells/ml (20時間培養のとき)の細胞を種々の濃度のHTOを含む培地に浮遊させ、密栓ガラス試験管内で37°Cでインキュベートした。一定時間後直ちに遠心して細胞を集め、非放射能の培地と交換、これを5回繰り返した。この手順により $^3\text{H}$ の放射能は最初の10万分の1以下に減少した。以上の操作もトリチウム専用のフード及びクリーンベンチ内で行った。

c. HTO  $\beta$ 線の線量計算：細胞内水成分と外液中に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測定し、その値から $\beta$ 線の線量を計算した。最終的には実験開始時に測定した培地のトリチウム濃度 (mCi/ml)に実験中の減少率0.9 (器壁への附着その他のため)をかけた値を用いることにした。計算は次式によった。

線量率 (rad/h) = 培地の放射能 (mCi/ml)  $\times 12.14 \times 0.8 \times 0.9$

0.8 は細胞内含水量, 0.9 は実験中におこる $^3\text{H}$ の減少率。12.14 は変換係数で下記の通りである。

$12.14 = 5.7 \times 10^{-3} (\text{MeV}) \times 1.6 \times 10^{-6} (\text{erg}/\text{M-eV}) \times 3.7 \times 10^7 \times 3,600 / 100$

d.  $\gamma$ 線照射：急照射は3,000Ciの $^{60}\text{Co}$ 照射装置を用い、 $1 \times 10^5$ 又は $1 \times 10^6$  cells/mlの細胞をプラスチックフラスコに入れ、回転させながら室温で照射した。線量率は0.5Gy/minである。低線量率照射には50 Ciの $^{60}\text{Co}$ 線源を用い、37°Cの水浴中で照射した。水浴の中で線源からフラスコまでの距離を変え、0.1, 0.2, 0.4 Gy/hの線量率を得た。一部は300 Ciの $^{137}\text{Cs}$ を線源にした低線量率細胞照射装置を用いた。照射時間は4.5~100時間位なので、長時間にわたる時は毎日又は1日おきに細胞濃度を測定して適当に稀釈した。線量測定にはTLDを用いた。

e. 生残率の測定：トリチウム処理又は照射後、前述の様に遠心で洗滌してから適当な数の細胞を0.14%軟寒天培地に播き、37°Cで約10日間培養した。生成したコロニー数を播いた細胞数で割ってコロニー形成率とし、無照射細胞のコロニー形成率を1として生残率を算出した。

f. 小核形成率の測定：トリチウム処理又は照射後24時間培養してから細胞を洗滌し、低張塩溶液処理、アルコール・酢酸 (3:1, v/v) 固定後スライド上でギムザ染色をした。顕微鏡で細胞2,000個以上を数え、そのうち小核をもつ細胞の数で形成率を算出した。

g. 突然変異誘発率の測定：KnaapとSimons<sup>1)</sup>の方法に従った。処理又は照射した $1 \sim 3 \times 10^7$ 個の細胞を $6 \times 10^5$  cells/ml以下の濃度に保つよう適当に稀釈しながら6~7日間培養した (Mutation expression)。生き残った細胞 $10^6$ 個を $10^{-4}$  M 6-チオグアニンを含む軟寒天培地に $4 \times 10^4$  cells/mlの濃度で播き、一方、6-チオグアニンを含まない軟寒天培地にも細胞を播いて、10日間培養した。6-チオグアニンを含む培地に生じたコロニー数を6-チオグアニン抵抗性細胞数とし、これを生き残った細胞 $10^5$ 個当たりに換算して、突然変異誘発率とした。

h. 細胞の [ $^3\text{H}$ ] 化合物処理と吸収線量計算：種々の濃度の [ $^3\text{H}$ ] アミノ酸又は [ $^3\text{H}$ ] -チミジン (それぞれのキャリアを含む、チミジンの場合はチミジンとデオキシチミジンを含む) を含む培地で $1 \sim 3 \times 10^4$  cells/mlの細胞を50時間浮遊培養した後、細胞をキャリア化合物を含む培地で洗滌した。細胞は途中で稀釈しなかった。トリチウムの線量計算を行うため一定の時間間隔で細胞を採取し、取り込まれた放射能を測定した。

[ $^3\text{H}$ ]アミノ酸処理細胞はグラスファイバーフィルターの上にのせ、生理食塩水でよく洗い、一晚乾燥後、トルエン-トリトンX-100シンチレータで溶かし、液体シンチレーションカウンタで放射能を測定した。 [ $^3\text{H}$ ]チミジンの場合は磷酸緩衝液を含む生理食塩水と0.1%トリトンX-100の混合液で細胞核を分離してからフィルター上5%の三塩化酢酸で洗い、DNAに取り込まれた放射能を液体シンチレーションカウンタで測定した。一方、細胞をアセトカーミン処理後、顕微鏡写真により細胞と細胞核の平均直径を測定した。細胞の直径は $10.9 \pm 0.95$ 、核の直径は $7.6 \pm 0.7 \mu\text{m}$ であった。標識化合物の50時間処理により細胞1個がう

けた全放射能 (total decays/cell) は各処理時間における取り込み量 (dpm/cell) をプロットした曲線内の面積から計算した。この値と細胞又は核の容積を用い、 $[^3\text{H}]$  アミノ酸は細胞内に均一に分布しており、細胞は密度 1 の球と仮定して、次の式<sup>2)</sup> から吸収線量 (Gy) を計算した。

細胞 ( $[^3\text{H}]$  アミノ酸) の場合

$$\text{Gy} = \frac{5.7 \times 10^{-3} \text{ MeV/decay}}{6.78 \times 10^{-16} \text{ m}^3/\text{cell}} \times \frac{1.602 \times 10^{-13} \text{ J/MeV}}{1 \text{ J/kg/Gy}} \times \frac{10^{-3} \text{ m}^3}{1 \text{ kg}} \times \text{total decays/cell}$$

細胞核 ( $[^3\text{H}]$  チミジン) の場合

$$\text{Gy} = \frac{5.7 \times 10^{-3} \text{ MeV/decay}}{2.30 \times 10^{-16} \text{ m}^3/\text{nucleus}} \times \frac{1.602 \times 10^{-13} \text{ J/MeV}}{1 \text{ J/kg/Gy}} \times \frac{10^{-3} \text{ m}^3}{1 \text{ kg}} \times \text{total decays/nucleus} \times 0.8$$

(0.8 は edge effect 補正值)

### 3. 結果

a. トリチウム水の RBE<sup>3,4)</sup>: 細胞死を指標とした RBE 値を求めるため、二種類の実験を行った。トリチウムの線量率 (濃度) を一定にして処理時間を変えた場合と、処理時間を一定にして線量率を変えた場合である。HTO と  $\gamma$  線の両者について線量率を一定にして時間を変える実験を 0.1, 0.2, 0.4 Gy/h の三種の線量率について行い、生残率曲線を描いた。 $\gamma$  線の場合は顕著な線量率効果が見られたが、HTO の場合はその効果が低線量域ではっきりせず、5 Gy 以上で明らかになった。使用した最も低い線量率の曲線を  $S = \exp(-\alpha D + \beta D^2)$  の式に適合させると  $\alpha$  値は  $\gamma$  線で 0.277, HTO で 0.356 となり、RBE 値は 1.3 となった。一方、処理時間を 20 時間に固定し、線量率を変えて生残率曲線を描くと、線量率効果の有無が反映されて、低線量域では  $\gamma$  線は肩のある曲線になったが、HTO はほぼ直線になった。5 Gy 以上では二本の曲線が接近した (図 3 参照)。そこで 5 Gy 以下の線量のデータを用いて曲線を描き、LD<sub>50</sub> で比較すると RBE は 1.6 となったが、5 ~ 8 Gy までのデータも含めて比較すると RBE は 1.4 となり、低線量域のデータで得られた RBE の方が高くなることがわかった。小核形成率を指標とした場合も 1,000 個の細胞当たり 50 又は 25 の小核を持つ細胞が出現する時の線量から RBE を計算すると、50 の時は 1.8 25 の時は 2.3 となり、同じく、低線量域で比較した

時の方が RBE は大きくなった。突然変異の場合も低線量域のデータで得られた RBE は 2.9 で、高線量域のデータまで含めた場合は 1.8 となり、低線量域のデータによるものの方が大きくなった (表 1 参照)。

b. 同位体効果について<sup>3,5,6)</sup>: HTO の RBE が 1 より大きくなる理由はよくわかっていないが、いくつかの事が考えられる。その一つに同位体効果が考えられるので、水素の非放射性同位体である二重水素 (重水素) を用いて同位体効果を調べた。種々の濃度の重水を含む培地で細胞を処理してから通常の培地に移し、生残率を測定した結果、重水の致死効果は 20% 以上の濃度でないと見られないことがわかった。20% 重水には水素 4 個に二重水素 1 個が存在している。そこで致死効果を表すのに必要なトリチウム (三重水素) の原子数を計算したところ HTO 37 MBq (1 mCi) では水素  $3 \times 10^6$  個にトリチウム原子 1 個が存在しているにすぎなかった。このように二重水素より極端に少ない原子数でトリチウムが生物効果を表すので、トリチウムの致死作用には同位体効果は関与していないと思われる。トリチウムの生物影響は大部分が  $\beta$  線の効果によるものと考えてよいであろう。

c. 重水の増感作用<sup>3), 5-8)</sup>: 低濃度の重水は無害であるが、ある濃度以上では放射線作用を増大させる。45% 重水を含む培地で細胞を  $\gamma$  線照射又は HTO 処理すると致死効果は約 2 倍増大した。低線量率照射の方が重水の増感作用は大きい、それは重水が修復阻害のほかに細胞の増殖を抑制するためと考えられる。45% 重水によって放射線誘発突然変異も増加するが、生残率当たりの突然変異誘発率は変らなかった。

d. 有機形トリチウムの影響<sup>9-11)</sup>: トリチウムの取り込みと代謝の実験から、有機形トリチウムの摂取は HTO の摂取に比べて組織の吸収線量が高くなることがわかった<sup>12,13)</sup>。また、培養細胞では HTO より有機形トリチウムの方が高い毒性又は変異原性を示すことが報告されているが、これらは処理時の培地のトリチウム濃度にもとづいて効果が表わされている。一方、標識部位によって  $[^3\text{H}]$  核酸関連物質の突然変異誘発効果が異なることがいくつか報告されている。我々は 4 種類の  $[^3\text{H}]$  アミノ酸と 2 種類の標識部位の異なる  $[^3\text{H}]$  チミジンを用いて、有機形トリチウムのマウス培養細胞への効果をトリチウムの吸収線量当たりで調べた。まず、吸収線量を明らかにするた

め,  $[^3\text{H}]$ アルギニン,  $[^3\text{H}]$ リジン,  $[^3\text{H}]$ ロイシン,  $[^3\text{H}]$ アスパラギン酸などの  $[^3\text{H}]$ アミノ酸又は  $[\text{メチル-}^3\text{H}]$ チミジンや  $[6-^3\text{H}]$ チミジンを含む培地で細胞を処理し, 適当な時間間隔で細胞を採取し放射能を測定した。50時間の処理後細胞を洗ったあと放射能を含まない培地で培養を継続し細胞の放射能が無くなるまで測定を行った。細胞に取り込まれた放射能を細胞試料を採取した時間に対してプロットし, その曲線内の面積から細胞が処理後の培養をふくめた総時間中にうけた全放射能を計算した。

取り込みによる細胞当たりの全放射能は  $[^3\text{H}]$ 化合物の種類によって大きく異なり,  $[^3\text{H}]$ アミノ酸の中では  $[^3\text{H}]$ アルギニンが最も多く, 次いで  $[^3\text{H}]$ リジン,  $[^3\text{H}]$ ロイシン,  $[^3\text{H}]$ アスパラギン酸の順になった。  $[^3\text{H}]$ アスパラギン酸の取り込み量は非常に少ない。  $[^3\text{H}]$ チミジンは  $[^3\text{H}]$ アミノ酸に比べて取り込み量が多いが,  $[\text{メチル-}^3\text{H}]$ と  $[6-^3\text{H}]$ の間には殆んど差がなかった (図1)。

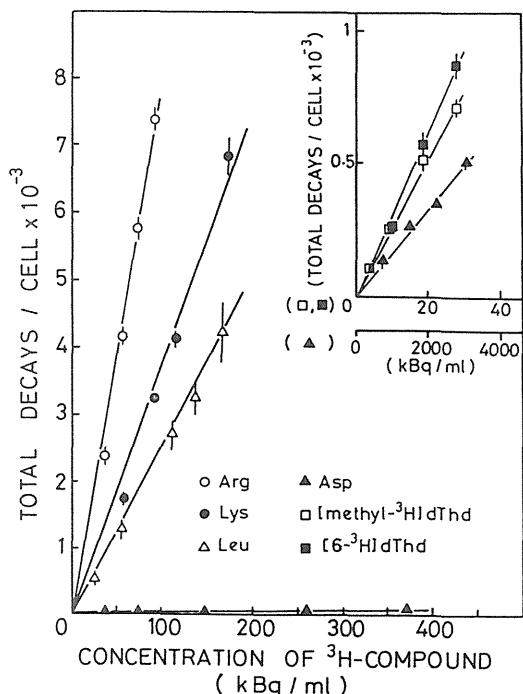


図1 マウス白血病細胞へのトリチウム標識アミノ酸とトリチウム標識チミジンの取り込み。縦軸は50時間のインキュベーションの間に細胞1個に与えられた総壊変数を示す。

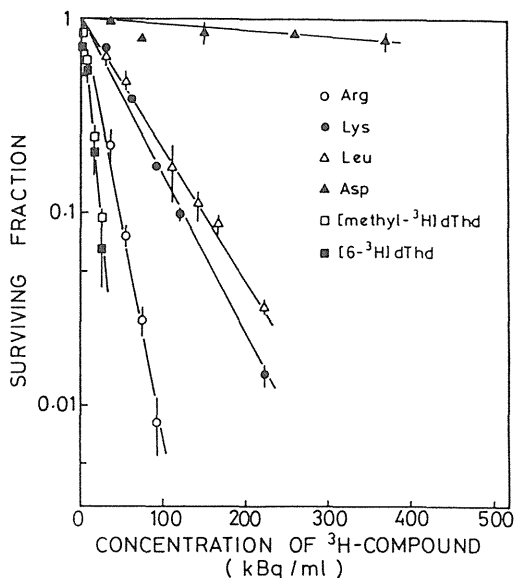


図2 トリチウム標識アミノ酸とトリチウム標識チミジンのマウス白血病細胞に対する致死効果。培地のトリチウム濃度当たりで表した場合。

種々の濃度の  $[^3\text{H}]$ 化合物で細胞を50時間処理したのちの培地中の  $^3\text{H}$  濃度と生残率の変化を図2に示した。致死効果は化合物の種類によって非常に異なるが, 毒性の強さの順序は取り込んだ放射能の多さの順と一致している。生残率曲線はいづれも直線となった。

図3は全放射能から吸収線量を計算し, 吸収線量 ( $[^3\text{H}]$ チミジンでは細胞核の吸収線量) 当たりで生残率を示した結果である。先に述べたHTOと低線量率  $r$  線の影響も比較のため一括して示してある。この結果から, 用いたすべての  $[^3\text{H}]$ アミノ酸の致死効果は吸収線量当たりで表すと一致することがわかる。HTOや  $r$  線との間にもあまり大きな差は見られない。曲線は  $S = \exp(-\alpha D)$  に適合し,  $\alpha$  値は0.46 となった。  $[^3\text{H}]$ チミジンの場合,  $[^3\text{H}]$ アミノ酸より効果は約2倍強いが,  $[\text{メチル-}^3\text{H}]$ と  $[6-^3\text{H}]$ の間に差はなく, 直線の  $\alpha$  値は0.98 であった。

突然変異の場合も同じ方法で細胞および細胞核のDNAに取り込まれた放射能を測定した。  $[^3\text{H}]$ 化合物の培地中の処理濃度当たりの突然変異誘発率は  $[6-^3\text{H}]$ チミジンが最も高く,  $[\text{メチル-}^3\text{H}]$ チミジンはこれよりわずかに低かった。次いで  $[^3\text{H}]$ アルギニン,  $[^3\text{H}]$ リジンの順となった。こ

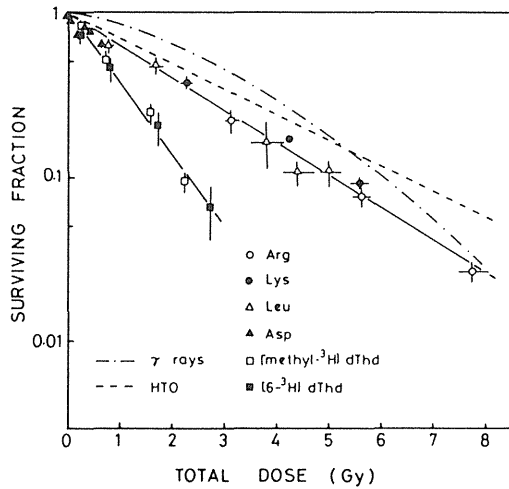


図3 低線量率 $\gamma$ 線，トリチウム水，トリチウム標識アミノ酸，トリチウム標識チミジンのマウス白血病細胞に対する致死効果。吸収線量当たりで表した場合。

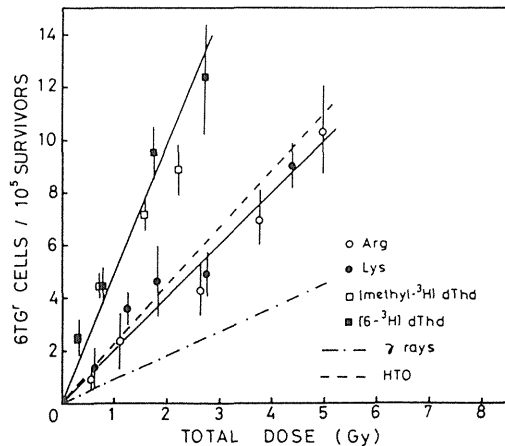


図4 吸収線量当たりで表した低線量率 $\gamma$ 線，トリチウム水，トリチウム標識アミノ酸，トリチウム標識チミジンによるマウス白血病細胞の突然変異。

の結果を吸収線量当たりで表したのが図4である。比較のため HTO と低線量率 $\gamma$ 線の結果も示してある。 $[^3\text{H}]$ アルギニンと $[^3\text{H}]$ リジンによる誘発率は一致し、 $[\text{メチル-}^3\text{H}]$ と $[\text{6-}^3\text{H}]$ の結果もほぼ一致したが、 $[^3\text{H}]$ アミノ酸よりも $[^3\text{H}]$ チミジンは高い変異原性を示した。これらの曲線は Y

$= \alpha D + \beta D^2$  の式に適合するが $\beta$ の項は除外できるほど小さい。それぞれの $\alpha$ 値は $[^3\text{H}]$ アルギニンと $[^3\text{H}]$ リジンが $19.9 \times 10^{-6}$ 、 $[\text{メチル-}^3\text{H}]$ と $[\text{6-}^3\text{H}]$ チミジンが $45.8 \times 10^{-6}$ であった。因みに HTO は $22.2 \times 10^{-6}$ 、低線量率 $\gamma$ 線は $7.7 \times 10^{-6}$ である。

図5は今までのデータをまとめ、生残率に対する突然変異誘発率をプロットしたものである。 $[^3\text{H}]$ チミジンとHTOは最も高い変異原性を示した。 $[^3\text{H}]$ アミノ酸は $\gamma$ 線とHTOの間になった。

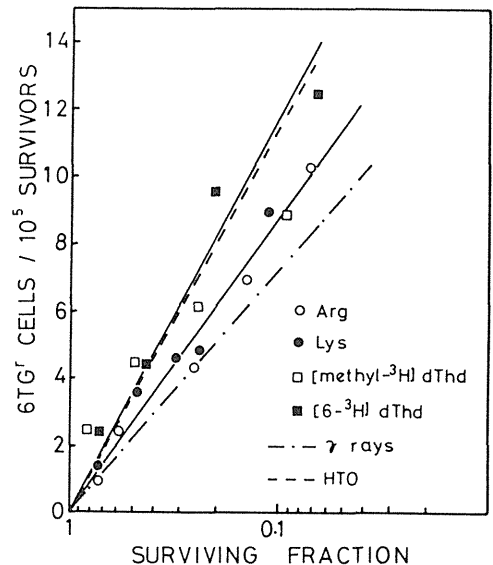


図5 低線量率 $\gamma$ 線，トリチウム水，トリチウム標識アミノ酸，トリチウム標識チミジンによるマウス白血病細胞の生残率と突然変異誘発率との関係

#### 4. 討論

この実験でトリチウム水の RBE 値は 1.5 ~ 3 であることを報告した。この算出の根拠となった線量効果曲線のパラメーターをまとめて表1に示した。RBE 値は基準放射線の種類，指標，線量範囲，線量率，実験条件，線量の計算法などに依存して変化した，いずれも上記の範囲内に入った。マイクロドシメトリーの理論から $\gamma$ 線に対するトリチウムの $\beta$ 線の RBE 値は少なくとも1以

表1 細胞死と突然変異の線量-効果曲線のパラメーター。細胞死は  $S = \exp(-(\alpha D + \beta D^2))$  ,  
突然変異は  $Y = \alpha D + \beta D^2$  にフィットさせた。

Cell killing

	Range of dose tested	$\alpha$	$\beta$	RBE**
$\gamma$ -rays acute	0.5 - 6	0.277 $\pm$ 0.01	(1.12 $\pm$ 0.086) $\times 10^{-2}$	
$\gamma$ -rays chronic	0.5 - 6	0.279 $\pm$ 0.028	-	
HTO	0.5 - 4	0.356 $\pm$ 0.024	-	1.3
$^3\text{H}$ -amino acid	0.2 - 7.5	0.461 $\pm$ 0.029	-	1.7
$^3\text{H}$ -thymidine	0.2 - 2.5	0.980 $\pm$ 0.074	-	3.5

Mutation

$\gamma$ -rays acute	1.0 - 5.0	6.9 $\pm$ 2.63*	3.03 $\pm$ 0.75*	
	0.5 - 3.0	9.0 $\pm$ 2.6	1.80 $\pm$ 0.65	
$\gamma$ -rays chronic	1.5 - 5.0	8.1 $\pm$ 1.25	-	
	0.5 - 3.0	7.7 $\pm$ 1.3	0.25 $\pm$ 0.14	
HTO	1.5 - 5.0	14.8 $\pm$ 3.7	-	1.8
	0.5 - 3.0	22.2 $\pm$ 1.6	-	2.9
$^3\text{H}$ -amino acid	0.5 - 5.0	19.9 $\pm$ 0.43	-	2.6
$^3\text{H}$ -thymidine	0.3 - 2.5	45.8 $\pm$ 0.67	-	5.9

\*  $\times 10^{-6}$  in Gy.

\*\* relative to  $\gamma$ -rays, chronic.

上4と予言されている。また、他の研究者によって報告された値（本報告II-1-1、文献3参照）も1から4の範囲にある。我々の値もそれらとよく一致した。

トリチウムの生物効果の研究のために生残率、小核形成、突然変異の三つの指標を選んだが小核形成は急照射ではよい指標であるが、低線量率照射ではどの時点でサンプルを採るべきかに難点があった。

トリチウムの効果には $\beta$ 線の作用の他に同位体効果、壊変による効果、 $\beta$ 線の平均飛程が非常に短い（0.6  $\mu\text{m}$ ）ことによる線量の不均等分布の影響などが考えられる。重水を用いた実験は同位体効果の寄与の可能性を一応否定した。

重水は急照射、低線量率 $\gamma$ 線、HTOのいずれにおいても、また、致死、小核形成、突然変異のどの指標でも、つねに増感作用を示した。重水の生物作用については細胞の分列阻害、修復阻害、活性酸素移動速度の抑制、生体高分子の合成阻害、酵素活性の抑制、その他多くの報告があり、増感作用に関与している要因を決定することは困難である。修復阻害が含まれていることは確かであろうが、何故修復が阻害されるかはよくわかっていない。

[ $^3\text{H}$ ]化合物の線量計算のため、細胞と細胞核の平均直径を測定したが、この値は無照射の細胞のものである。 $\gamma$ 線やHTOの長時間処理によって細胞の分裂が阻害され、照射の後期には直径がや $\times$ 大きくなる可能性もあるが、それは計算に入れてない。

用いた [ $^3\text{H}$ ]アミノ酸は塩基性のもの、酸性のものなど、種類の違うものを選んだ。培地に含まれるトリチウム濃度（Bq/ml）当たりの効果はアミノ酸の種類により非常に大きなひらきがあるが、取り込み量にも効果と平行した大きな差があり、吸収線量当たりに換算すれば、化学形の異なるアミノ酸の間には差がない。従って、ある [ $^3\text{H}$ ]化合物の吸収線量さえわかれば、他のものリスクも推定することができる。突然変異の場合には多少差があるが、致死効果に関してはHTO、低線量率 $\gamma$ 線、と [ $^3\text{H}$ ]アミノ酸の間にもあまり大きな差はない。参考のため、調べた [ $^3\text{H}$ ]化合物が0.1 Gy/hの線量率（ $\beta$ 線）を細胞に与える培地中のおよその濃度を表2に示した。 [ $^3\text{H}$ ]化合物はHTOよりもはるかによく細胞に取り込まれるから、低濃度でHTOと同じ吸収線量を与えることができる。 [ $^3\text{H}$ ]アスパラギン酸は例外的に取り込みが低い、これは細胞膜を通過し難いた



表2 各種トリチウム標識化合物がマウス白血病細胞  
に0.1 Gy/hの線量率を与える培地中の濃度

HTO	37	MBq/ml	( 1	mCi/ml )
<sup>3</sup> H-Arg	74	kBq/ml	( 2	μCi/ml )
<sup>3</sup> H-Lys	111	kBq/ml	( 3	μCi/ml )
<sup>3</sup> H-Leu	148	kBq/ml	( 4	μCi/ml )
<sup>3</sup> H-dThd	55	kBq/ml	( 1.5	μCi/ml )
<sup>3</sup> H-Asp	4.4	MBq/ml	( 120	μCi/ml )

めかもしれない。生体内ではもっと取り込まれる可能性がある。

[<sup>3</sup>H]チミジンの致死効果および突然変異誘発効果は吸収線量当たりでみても [<sup>3</sup>H]アミノ酸, HTO, γ線などよりも高い。この結果はLiberら<sup>14)</sup>の結果と少し違っている。彼等はヒトリンパ芽球細胞を用い, [<sup>3</sup>H]チミジンの致死効果はHTOより高いが, 突然変異はHTOと同じであることを報告した。これはヒトとマウスの細胞の違いによるか, 又は実験条件に差があり推定した吸収線量が異なったためかもしれない。 [<sup>3</sup>H]チミジンの効果が例外的に大きい理由は今のところ明らかではないが, β線以外のDNAに取り込まれたトリチウムの(壊変)効果が関与していると思われる。[メチル-<sup>3</sup>H]と[6-<sup>3</sup>H]チミジンの突然変異誘発効果に差があるということはショウジョウバエやバクテリアだけでなく, 哺乳動物培養細胞でもClever<sup>15)</sup>によって報告された。しかし, 我々の実験では両者間に差がみられなかった。理由は明らかでないが, Cleaverは凍結状態の細胞を用い, 我々よりかなり高い線量で実験しているので, そのような違い, 特に線量の違いが反映されているのかもしれない。 [<sup>3</sup>H]チミジンは放射線生物学的興味はともかく, 現実の環境から直接体内に取り込まれることは殆んどないと思われるので, リスク推定の観点からはあまり問題にする必要はないであろう。

生残率当たりの突然変異誘発率でみると, HTOは [<sup>3</sup>H]チミジンに匹敵するほど高い。このように高い変異原性が何によるものかは今後の研究課題であろう。

## 5. 結論

増殖中のマウス培養細胞で調べたトリチウム水のRBE値は実験条件によって変わるが, すべて

1.5から3の間であり, 2を超える場合がある。トリチウム標識アミノ酸の効果は培地のトリチウム濃度当たりで調べるとトリチウム水より非常に大きく, アミノ酸の種類によっても差があるが, 吸収線量当たりで比べれば殆んど差がなくなる。トリチウム標識化合物の効果は吸収線量当たりで調べることが重要である。トリチウムの効果の大部分はβ線によるものであるが, トリチウム標識チミジンは他のトリチウム化合物よりも強い細胞致死効果や変異原性をもち, それにはβ線以外の効果も関与していると思われる。

## 参考文献

- 1) Knaap, A. G. A. C. and Simons, J. W. I. M.: A mutational assay system for L5178Y mouse lymphoma cells, using hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transferase(HGPRT)-deficiency as marker. The occurrence of a long expression time for mutations induced by X-rays and EMS. *Mutat. Res.*, **30**, 97-110, 1975.
- 2) NCRP, Tritium and Other Radionuclide Labeled Organic Compounds Incorporated in Genetic Material. Report No. 63, National Council on Radiation Protection and Measurements. Bethesda, 1979.
- 3) 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, and their potentiation by deuterium oxide in cultured mammalian cells L5178Y. *Proc. of the Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics*, NIRS-M-41,; 19-34, 1982.
- 4) 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.
- 5) Ueno, A. M. and Matsudaira, H.: Deuterium oxide inhibition of gamma ray dose-rate effects in growing mouse leukemia cells. *Proc. of the Second Workshop on Tritium*

- Radiobiology and Health Physics, NIRS-M-52*, pp 110-126, 1985.
- 6) Ueno, A. M., Tanaka, O. and Matsudaira, H.: Inhibition of gamma-ray dose-rate effects by D<sub>2</sub>O and inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase in cultured mammalian 15178Y cells. *Radiat. Res.*, **98**, 574-582, 1984.
  - 7) Furuno-Fukushi, I. and Matsudaira, H.: Mutation induction by tritiated water and effects of some agents in mouse leukemia cells. *Proc. of the Second Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics, NIRS-M-52*, pp. 101-109, 1985.
  - 8) 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.
  - 9) Matsudaira, H., Ueno, A. M., Furuno-Fukushi, I. and Yamaguchi, T.: Induction of cell killing, mutation and oncogenic transformation following exposure to tritiated water in cultured mammalian cells. *Radiat. Prot. Dosimet.*, **16**, 145-150, 1986.
  - 10) 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.
  - 11) Matsudaira, H., Ueno, A. M., Furuno-Fukushi, I. and Sato, K.: Dose-rate effects in cultured mammalian cells, their mechanisms and implications. *Proc. Intern. Symp. on Biological Effects of Low Level Radiation*. Nanjing, China, 23-26 Nov. 1986, Society of Radiological Medicine and Protection, Chinese Medical Association.
  - 12) Takeda, H.: Comparative metabolism of tritium in rat after single ingestion of some tritiated organic compounds versus tritiated water. *J. Radiat. Res.*, (Tokyo), **23**, 345-357, 1982.
  - 13) Takeda, H., Iwakura, T. and Mabuchi, Y.: Radiation doses to the tissues of rat from tritiated thymidine administered by three different routes. *J. Radiat. Res.* (Tokyo), **25**, 194-202, 1984.
  - 14) Liber, H. L., Lemotte, P. K. and Little, J. B.: Toxicity and mutagenicity of X-rays and [<sup>125</sup>I]dUrd or [<sup>3</sup>H]TdR incorporated in the DNA of human lymphoblast cells. *Mutat. Res.*, **111**, 387-404, 1983.
  - 15) Cleaver, J. E.: Induction of thioguanine- and ouabain-resistant mutants and single-strand breaks in the DNA of Chinese hamster ovary cells by <sup>3</sup>H-thymidine. *Genetics*, **87**, 129-138, 1977.

## 2. トリチウムによる哺乳動物細胞の放射線障害に関する研究

坪井 篤, 田中 薫 (障害基礎研究部)  
山口 武雄 (生物研究部)

### Tritium Effects on Growing and Plateau Phase NRK Cells in Cultures

Atsushi Tsuboi, Kaoru Tanaka and Takeo Yamaguchi\*  
Division of Radiation Hazards  
\*Division of Biology

Relative biological effectiveness (RBE) of  $\beta$ -rays from tritiated water relative of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays was examined in NRK cells, using cell division delay and cell killing as end points. Based on a prolonged doubling time of NRK cell populations following irradiation at dose rates of 9.2-9.8 rads/hr and of 13-14 rads/hr, RBEs of  $\beta$ -rays from HTO relative to  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -rays were estimated to be 1.8 and 1.36 respectively. From the iso-effect curves of cell growth, an RBE of 1.5 was estimated for HTO. The division of NRK cells ceased almost totally during continuous irradiation above dose rates of 1.5 mCi/ml (13 rads/hr) for HTO and 19 rads/hr for  $\gamma$ -rays. Then, efficiencies of cell killing were compared in the exponential phase cells at dose rates of

19-37 rads/hr of  $\gamma$ -rays and 2-4 mCi/ml (18.3-36.6 rads/hr) of HTO. From cell survival responses the values of  $D_0$  were estimated to be 380 rads and 300 rads for  $\gamma$ -irradiation and HTO, respectively. Then, an RBE of 1.26 could be calculated for HTO. Similarly, the RBE values of HTO were estimated for killing of the stationary phase cells following irradiation at dose rates of 8-11 rads/hr and 17-44 rads/hr. They were 1.88 at dose rates of 8-11 rads/hr and 1.53 at the dose rates of 17-44 rads/hr, respectively.

These results indicate that the values of tritium RBE relative to  $\gamma$ -rays were more than unity, and high for lower dose rates, and decreased with increasing doses of  $\beta$ -rays from HTO.

#### 1. 緒言

本研究は核融合炉開発に伴うトリチウムの生物学的影響研究と云うプロジェクトの一環として行われたものである。それはトリチウムによる生体の障害を評価するために、多くの実験データが必要とされているにほかならない。トリチウムによる生体障害を評価するためにはその生物効果比(RBE)を求めることが主な課題となる。

過去に報告されたトリチウムのRBEに関する主なデータをひろって見ると、E.J.Hall等(1967)はその値を1.6と記載している。<sup>1)</sup>しかし、

ICRP(1969)はRBE値はX線を基準とすると1よりそう大きくないとして、QFを1とすると記載している。<sup>2)</sup>また、最近報告されたものでは、トリチウムのRBE値は1より大きい。<sup>3~5)</sup>これらトリチウムのRBE値が変動する理由は基準とすべき放射線の種類や放射線の線量率のほか、被検体としての生物の種類、用いたend-pointや実験条件により変動しやすい要因を持っているからである。<sup>6)</sup>したがって、トリチウムのRBE値を基礎として放射線防護を考察する場合、そのRBEを単一な値とする事は難しいかもしれない。そのためにはより多くの実験条件におけるトリチ

ウムのRBEに関するデータが必要となって来るだろう。

本報告ではラットの正常腎組織由来のNRK細胞を用いて、 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 線による細胞の分裂障害および致死障害を基準としてHTOによる細胞分裂障害と致死障害のRBEが低線量率の照射条件で推定された。しかし、線量率の低い照射条件においてRBEを求めるためには多くの難しい問題が提起される。例えば、低線量率放射線による生物効果を短時間の照射により捕えることは出来ないし、それを検出するためには放射線の照射が長時間にならざるを得ない。したがって、長期照射の間に生物自体の回復等の因子により損傷の不均一な生物集団が形成する可能性は存在する。本研究ではこの点に関して比較的配慮したつもりである。その1例として、15rad/時以下の低線量率 $\gamma$ 線の照射条件下では、6日間の照射期間中に約3回の細胞分裂が行われるため、その細胞集団は放射線損傷と云う点で不均一なものとなるであろう。それ故、この照射条件における細胞致死に関するRBE値は本報告に記載しない。

## 2. 材料と方法

細胞：用いた細胞は正常ラットの腎臓由来のNRK細胞である。この細胞は通常我々の実験室において10～20%の仔牛胎児血清を含むMEM-ハンクスバッファーで維持されている。しかし、トリチウム水を使用する実験では培養フラスコを密封する必要があるため、その培地はMEM-ヘスバッファーとした。pHは7.4であった。

細胞分裂：照射または非照射細胞の分裂速度はwindow counting法により行われた。<sup>7)</sup> すなわち、25cm<sup>3</sup>の培養プラスチックフラスコ（コーニング社製）に10<sup>3</sup>のNRK細胞がプレートされ、2時間37°C 5%CO<sub>2</sub>条件下で培養された。個々の細胞がフラスコの底に付着後、付着した細胞の底に記を付けた。この記を付けられた細胞は24時間間隔で、その分裂状態が顕微鏡下で6日間追跡され、記録された。

$^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 線の照射：対数増殖期または増殖定常期にあるNRK細胞を含む培養フラスコはMEM完全培地に充填され、完全に密封された後、 $\gamma$ 線の照射に供された。照射中の培養細胞は37°Cに維持された。各線量が投与された後、細胞はトリプシナイズされ、細胞生存率の検定に供された。

トリチウムによる照射：対数増殖期または増殖

定常期の細胞を含む培養フラスコ（25cm<sup>3</sup>）は5mlの20%仔牛胎児血清を含むMEM-ヘスバッファーにより充填されダブルキャップのゴム栓により密封された。トリチウム水は注射器により1, 1.5, 2, 3, 4, 4.8mCi/mlになるようにゴム栓上より注入した。これらの培養フラスコは所定の時間まで37°Cにて培養された。トリチウム水にて処理された細胞は新鮮培地を用い3回洗浄によりトリチウム水を除去し、トリプシナイズされ、細胞生存率の検定に供された。用いたトリチウム水(1Ci/ml)はNew England Nuclear製のものであった。

線量測定：低線量率 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 線の吸収線量はTLDにより、高線量率 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 線の吸収線量はビクトリンのイオンチャンバーにより測定された。トリチウム水の放射能はトライトン-POP-POPOPのシンチレータを用い、ベックマン社製の液体シンチレーションカウンターにより測定された。トリチウムの放射能からの吸収線量(rad)への換算はDeweyの式<sup>8)</sup>にしたがった。しかし、NRK細胞の水分含量測定において84%と云う値が得られているので、細胞水分量の補正には0.84を用いた。

## 3. 結果

a. 低線量率 $\gamma$ 線およびHTOによる細胞分裂の阻害効果

図1は線量率9.8 rad/時の $\gamma$ 線および1mCi/ml (9.17 rad/時)のHTOによる細胞分裂の抑制効果を示したものである。点線で表した曲線は非照射細胞の増殖曲線であり、その増加時間は18時間であった。9.8 rad/時の $\gamma$ 線照射において第1回の分裂は殆んど影響を受けない。しかし、その後照射中の細胞の倍加時間は約30時間に延長され、照射90時間後に細胞の分裂が停止する。これに対しほぼ同一の線量率である1mCi/mlのHTO (9.17 rad/時)を用いた場合、細胞分裂の速度はHTO投与後ただちに低下し、その倍加時間が40時間となり、HTO投与70時間後に細胞分裂が停止した。したがって、9.8 rad/時の $\gamma$ 線の照射は非照射細胞の倍加時間を12時間延長させたことになり、1mCi/mlのHTOは22時間延長させたことになる。これら2つの延長時間からトリチウムのRBE値を算出するとその値は1.83となった。

次に、線量率14 rad/時の $\gamma$ 線照射および1.5 mCi/ml (13.7 rad/時)のHTO投与による細胞分裂の阻害効果が調べられた(図2)。この図

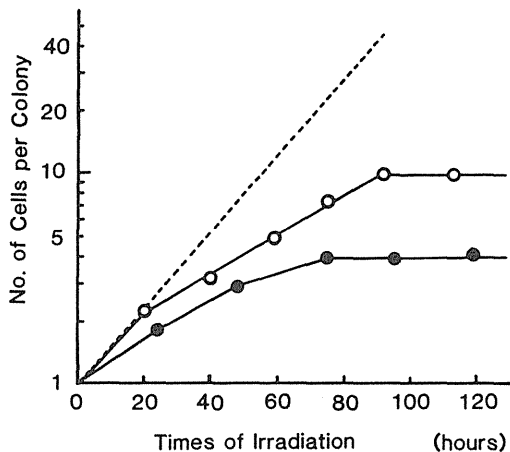


図1 低線量率 $\gamma$ 線およびHTOによる細胞分裂の阻害

- ：コバルト60 $\gamma$ 線（9.8 rad/時）
- ：HTO 1mCi/ml（9.17 rad/時）
- …：非照射細胞の増加曲線

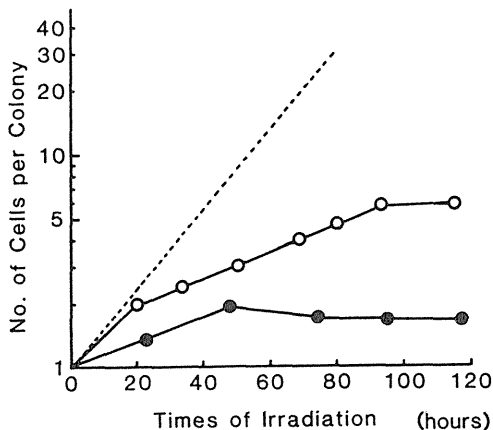


図2 低線量率 $\gamma$ 線およびHTOによる細胞分裂の阻害

- ：コバルト60 $\gamma$ 線（14 rad/時）
- ：HTO 1.5 mCi/ml（13.7 rad/時）
- …：非照射細胞の増加曲線

から明らかなように、14rad/時の $\gamma$ 線による照射は細胞の増加時間を40時間に延長させ、HTOでは54.4時間の延長となった。この延長増加時間から同様にトリチウムのRBEを求めると、その値は1.36となった。次に、Hall等<sup>1)</sup>が示した方法にしたがって、 $\gamma$ 線およびHTOによる細胞分

裂の阻害効果について、その同一効果を与える線量率を図1および図2からそれぞれ求め、この2つの値からRBEが算出された。それぞれの値は $\gamma$ 線の14rad/時と1mCi/ml(9.17rad/時)であった。したがって、トリチウムのRBEは1.52となった。

b. 低線量率 $\gamma$ 線およびHTOによる対数増殖期細胞の致死効果

すでに示したように2mCi/ml以上のHTOの存在では細胞の分裂がほぼ停止する。また、線量率20rad/時以上の $\gamma$ 線の照射条件でも、細胞は殆んど分裂し得ない<sup>9)</sup>すなわち、これはこれらの照射条件下で細胞分裂の要因に左右されずに対数増殖期の細胞生存率が検定出来ることを示して

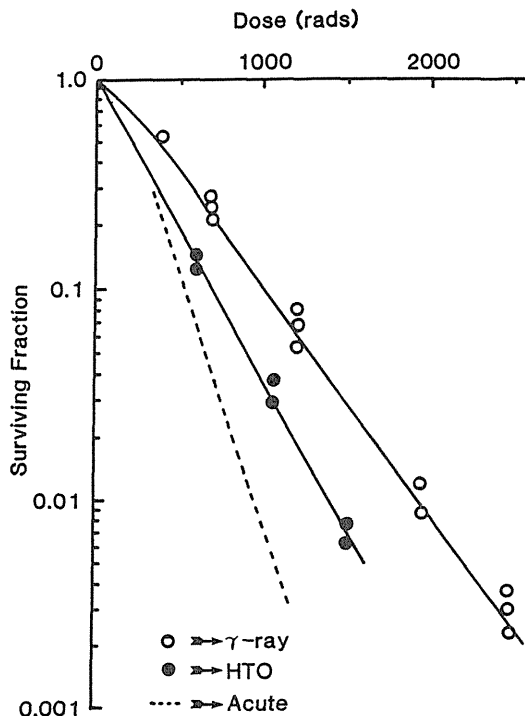


図3 低線量率 $\gamma$ 線およびHTOによる対数増殖期NRK細胞の致死。

- ：コバルト60 $\gamma$ 線（20～44 rad/時）
- ：HTO 2～4 mCi/ml（18.3～36.7 rad/時）
- …：コバルト60 $\gamma$ 線 88 rad/分の細胞生存率

いる。そこで、 $2 \sim 4 \text{ mCi/ml}$ のHTO ( $18.3 \sim 36.7 \text{ rad/時}$ ) および線量率 $20 \sim 44 \text{ rad/時}$ の $\gamma$ 線照射による対数増殖期細胞の線量-生存率曲線が求められた(図3)。これら2本の曲線から平均致死線量( $D_0$ )を求めると、 $\gamma$ 線照射においてその値は $380 \text{ rad}$ となり、HTO処理においては $300 \text{ rad}$ となった。これら2つの値からトリチウムのRBEを算出すると、その値は $1.26$ となった。

c. 低線量率 $\gamma$ 線およびHTOによる増殖定常細胞の致死効果

前項において明らかにしたように、 $14 \text{ rad/時}$ 以下の線量率の $\gamma$ 線照射の条件において、細胞は遅延をともなって分裂する。そのような低線量率放射線のもとで細胞分裂要因をともなわずに細胞生存率を検定するためには、細胞実験系の確立が必要である。一般に培養細胞の増殖定常期は培地を交換することなく3日以上維持することが困難である。また、 $14 \text{ rad/時}$ 以下の低線量率 $\gamma$ 線による細胞の線量-生存率曲線を求めるためには5日間以上の照射が必要である。この点に関し幾つかの細胞をテストした結果、我々はそれをNRK細胞に求めた。すなわち、NRK細胞の増殖定常

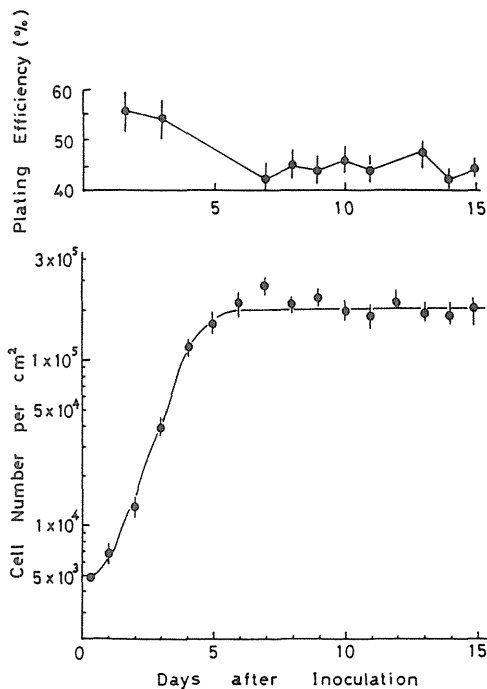


図4 NRK細胞の増殖曲線と細胞生存率

期が培地交換なしに何日間維持出来るかを検討した(図4)。この図に示すように、 $5 \times 10^3 / \text{cm}^2$ の濃度にプレートしたNRK細胞は5日目まで対数増殖を行い、その後、培養15日まで一定の細胞数を示す、いわゆる増殖定常期を示す。また、この期間の細胞生存率の平均値は対数増殖期において約50%、増殖定常期において40%を示している。すなわち、NRK細胞の増殖定常期は培養6日以後細胞分裂を停止し、安定な細胞集団であることが明らかとなった。

そこで、線量率 $8 \sim 11 \text{ rad/時}$ の $\gamma$ 線および $1 \text{ mCi/ml}$ HTOによる増殖定常期NRK細胞の線量-生存率曲線が求められた(図5)。これら2つの線量効果曲線はいずれも原点を通り、対数的直線性を示した。 $1 \text{ mCi/ml}$ のHTOによる線量-生存率曲線の $D_0$ は $450 \text{ rad}$ であり、 $8 \sim 11 \text{ rad/時}$ の $\gamma$ 線照射の線量-生存率曲線における $D_0$ は $850$

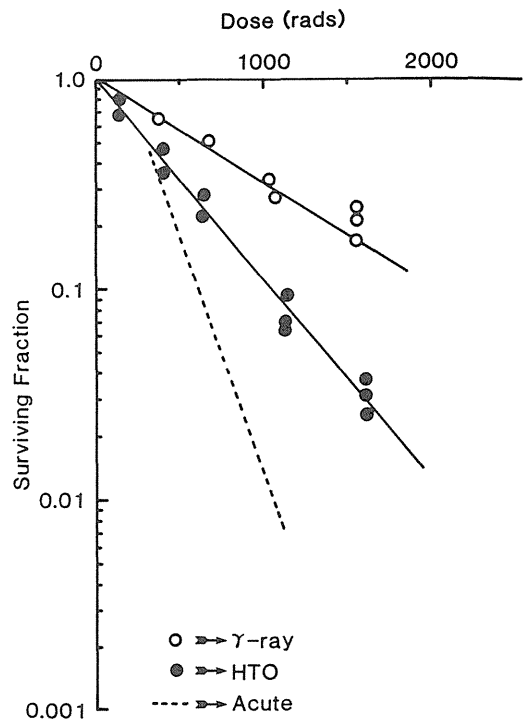


図5 低線量率 $\gamma$ 線およびHTOによる増殖定常期NRK細胞の致死  
○:コバルト60 $\gamma$ 線 ( $8 \sim 11 \text{ rad/時}$ )  
●:HTO  $1 \text{ mCi/ml}$  ( $9.17 \text{ rad/時}$ )  
---:  $88 \text{ rad/分}$ のコバルト60 $\gamma$ 線を照射したときの細胞生存率

radであった。これら2つのD<sub>0</sub>からトリチウムのRBEを算出すると、その値は1.88となった。第5図の点線で示した生存率曲線は88rad/分の高線量率<sup>60</sup>Coγ線によるものであった。次に、線量率を若干上昇させ2~4.8mCi/mlのHTOおよび23~44rad/時のγ線照射によるNRK増殖定常期細胞の線量-生存率曲線が求められた(図6)。HTOおよびγ線による生存率曲線は第6図の黒マルと白マルでそれぞれ表した。このような照射条件下でも、明らかな線量率効果が認められた。HTOによる線量-生存率曲線から算定されるD<sub>0</sub>は325radでありγ線の照射によるそれから算定されるD<sub>0</sub>は500radとなった。この2つの値からトリチウムのRBEを算出すると、その値は1.56となった。

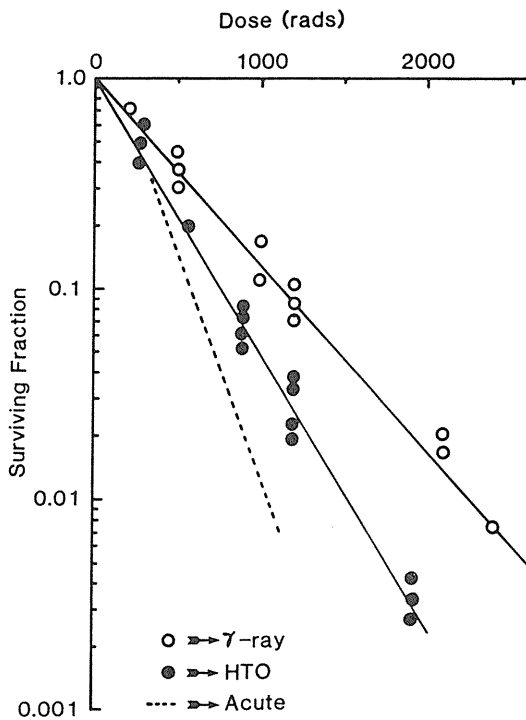


図6 低線量率γ線およびHTOによる増殖定常期NRK細胞の致死効果  
 ○: コバルト60γ線(23~44rad/時)  
 ●: HTO 2~4.8mCi/ml(18.3~44rad/時)  
 ---: コバルト60γ線(88rad/分)照射したときの細胞生存率

以上は低線量率<sup>60</sup>Coγ線やHTOによる細胞致死効果に関するトリチウムのRBE値をNRK細胞の増殖定常期を用いて調べられたものである。この細胞致死効果が認められるまでの照射期間は長いもので6日間を要している。それ故、細胞は長期間照射される間、放射線による損傷とその回復の繰り返しを継続しているものと考えられる。その結果として表現されるこれら低線量率放射線による細胞の致死障害がさらに回復しうるものかどうか吟味するべきであろう。そこで、9~44rad/時のγ線を照射した細胞を照射後24~30時間まで37°Cで培養し、その線量-細胞生存率曲線を求め、それを照射直後の線量-細胞生存率曲線と比較検討した。その結果は図7に示した。この図から明かなように、照射後24時間37°Cで培養した細胞の生存率は照射直後の細胞生存率と全く同一であった。これは照射中に回復がすべて完了していることを示している。一方、急照射した細胞を照射後5時間37°Cで培養すると細胞の生存率は照射直後の生存率にくらべて明らかに上昇している。

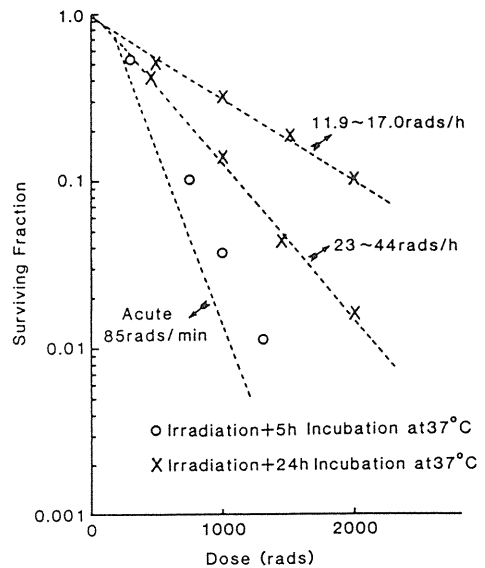


図7 低線量率γ線による細胞の致死障害の回復

#### 4. 討論

細胞分裂障害を指標としたRBEについて他に報告された値との相違点、低線量率放射線による対数増殖期細胞のD<sub>0</sub>と増殖定常期細胞のD<sub>0</sub>の相

違点およびHTOのRBE値が1より大きい点の3つの問題に焦点をしばり討論を進めたい。

培養細胞の分裂を指標としてトリチウムのRBE値を調べた報告は極めて少い。1967年、J. H. Hall等はHeLa細胞の分裂を指標としてトリチウムのRBEを算出し、その値を2と報告している。我々がここに求めた8.7~9.8 rad/時と13~14 rad/時の2つの線量率の $\gamma$ 線の照射条件における増加時間の延長に関するトリチウムのRBEは1.8と1.36を示し、細胞分裂動態の同一阻害効果に関するトリチウムのRBEは1.5であり、いずれのRBE値もHall等の値よりも低い値を示した。しかし、我々が得た細胞分裂に関するトリチウムのRBE値とHall等が得たそれとを直接比較することは出来ない。何故ならば、彼らの報告によれば、使用した線量率が1~3 rad/時であり、我々の使用したものより低い。したがって、彼らの照射条件では細胞分裂が7日間放射線の影響を受けない。照射10日後になって、細胞分裂の低下が若干観察される程度である。これに対し我々の結果は照射6日以内に観察されたものであり、基本的に彼らの結果とは異っている。我々の結果が示すように、線量率が低下するとトリチウムのRBEは高い値を示す。この点から云えば、Hall等が使用した線量率が我々のものより低いので、そのRBE値が高いことは当然かもしれない。

NRK対数増殖期細胞の $D_0$ が線量率24~44 rad/時の $\gamma$ 線の照射条件において380 radであったのに対し増殖定常期細胞の $D_0$ がほぼ同じ照射条件において500 radであった。また、2~4 mCi/mlのHTOの処理条件下において、対数増殖期細胞の $D_0$ が300 radであったのに対し増殖定常期細胞の $D_0$ が320 radであった。これらの結果は増殖定常期NRK細胞の $D_0$ が対数増殖期細胞の $D_0$ よりいずれも高いことを示している。

増殖定常期の細胞集団の大部分は放射線抵抗性細胞である $G_1$ 期細胞から成り立っている。<sup>10, 11)</sup>しかし、 $D_0$ 線量の100 radの差異を $G_1$ 期細胞の集積の要因によって完全に説明する事は出来ないだろう。その他の要因としては増殖定常期細胞は放射線による潜在性損傷(PLD)の回復が大きいと云われている。<sup>12~14)</sup>しかし、低線量率 $\gamma$ 線の照射後にはPLDの回復が認められないので(図7)、恐らく、低線量率 $\gamma$ 線の照射中におこなわれるであろうPLDの大きさの相違が $D_0$ の差に反映したのかもしれない。

トリチウムのRBE値が細胞分裂であれ致死効果であれ1より大きい値を示したが、その理由を明確に提示する事は困難である。このトリチウムのRBEを求めるにあたり、HTOの分布を均一と仮定し、トリチウムの $\beta$ 崩壊による効果の無視等の不確定要素が含まれていることも事実である。強いてトリチウムのRBEが1より大きいことを考察するならば、それはLETの相違に求めざるを得ない。すなわち、 $\gamma$ 線のLETは平均で0.7 keV/ $\mu m$ であり、トリチウム $\beta$ 線のLETは平均で5 keV/ $\mu m$ である。

## 5. 結論

ラット腎臓由来のNRK細胞の細胞分裂障害および致死障害を指標として、低線量率 $^{60}Co$  $\gamma$ 線を基準としてHTOのRBEが調べられた。

細胞の増加時間の延長に関するトリチウムのRBEは1.3~1.8となった。また、細胞増殖動態の同一阻害効果に関するトリチウムのRBEは1.53となった。

対数増殖期NRK細胞の致死効果に関するトリチウムのRBEは1.3であり、増殖定常期NRK細胞の致死効果に関するトリチウムのRBEは1.53~1.88となった。

## 参考文献

- (1) Hall, E. J., Oliver, R. and Bedford, J. S.: The relative biological effectiveness of tritium beta particles compared to gamma radiation—its dependence on dose-rate. *Br. J. Radiol.*, **40**, 704-710, 1967.
- (2) Dunster, H. J.: Progress report from ICRP. *Health Phys.*, **17**, 389, 1969.
- (3) Dobson, R. L. and Kwan, T. C.: The RBE of toxicity of tritium radiation measured in mouse oocytes: Increase at low exposure levels. *Radiat. Res.*, **66**, 615-625, 1976.
- (4) Ellett, W. H. and Braby, L. A.: The microdosimetry of 250 kVp and 65 kVp X rays,  $^{60}Co$  gamma rays, and tritium beta particles. *Radiat. Res.*, **51**, 229-243, 1972.
- (5) Bedford, J. S., Mitchel, J. B., Griggs, H. G. and Bendor, M. A.: Cell killing by gamma rays and beta particles from tritiated water and incorporated tritiated thymidine. *Radiat. Res.*, **63**, 531-543, 1975.



- (6) 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  $\gamma$ -rays and tritiated water in cultured mammalian cells (L5178Y). *Radiat. Res.*, **91**, 447-456, 1982.
- (7) Marcus, P. I. and Puck, T. T.: Host-cell-interaction of animal viruses. I. Titration of cell-killing by viruses. *Virology*, **6**, 405-423, 1958.
- (8) Dewey, W. C., Hunphrey, M. M. and Joues, B. A.: Comparisons of tritiated thymidine, tritiated water, and cobalt-60 gamma rays in inducing chromosomal aberrations. *Radiat. Res.*, **24**, 214-238, 1965.
- (9) Tsuboi, A.: Effect of low dose rate  $\gamma$ -rays on cell proliferation and survival in exponentially growing and plateau phase cultures of normal rat kidney cells. Proceeding of the Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics, NIRS-M-41, pp.9-18, 1982.
- (10) Wiebel, F. and Baserga, R.: Early alterations in amino acid pools and protein synthesis of diploid fibroblasts stimulated to synthesize DNA by addition of serum. *J. Cell. Physiol.*, **74**, 191-202, 1969.
- (11) Okamoto, M., Tsuboi, A. and Tsuchiya, T.: In vivo and in vitro radiosensitivities of newly established mouse ascites tumors. *Radiat. Res.*, **85**, 567-603, 1981.
- (12) Hahn, G. M., Little, J. B.: Plateau cultures of mammalian cells. An in vitro model of human cancer. *Curr. Top. Radiat. Q.*, **8**, 39-83, 1972.
- (13) Douple, E. B.: Recovery following potentially lethal damage in Chinese hamster cells (V79) in plateau-phase culture and in mouse mammary adenocarcinoma cells (MTG-S) in vivo and in vitro. *Radiat. Res.*, **62**, 552-553, 1975 (Abstract).
- (14) Iliakis, G.: Repair of potential lethal damage in unfed plateau phase cultures of Ehrlich ascites tumor cells. II. Monolayer cultures. *Int. J. Radiat. Biol.*, **37**, 591-600, 1980.

### 3. 細胞増殖動態及び障害回復能に対する低線量率照射の効果

渡部 郁雄, 五日市 ひろみ, 本郷 悦子 (生理病理研究部)  
上野 昭子, 松平 寛通 (生物研究部)

## Effects of Low Dose-Rate $\gamma$ -Irradiation on Cell Kinetics in Cultured Mammalian Cells (L5178Y)

Ikuo Watanabe, Hiromi Itsukaichi, Etsuko Hongo  
(Division of Physiology and Pathology)  
Akiko M. Ueno, Hiromichi Matsudaira  
(Division of Biology)

Effects of protracted low dose rate irradiation with or without repair inhibitors ( $D_2O$  and 3-AB) on cell kinetics were analyzed in mouse leukemic L5178Y cells. The cells in exponential growth phase were irradiated with  $^{60}Co$   $\gamma$ -rays at dose rates of approximately 0.1, 0.2 and 0.4 Gy/h as reported by Ueno *et al*<sup>15)</sup>. When total absorbed dose reached 4.4 or 8.5 Gy, the cells were removed, stained with propidium iodide, and subjected to flow cytometric analysis. The results indicated a significant accumulation of cells in the  $G_2 + M$  phase and a slight decrease in the other phases of cell cycle. There was no significant difference in the kinetics among three levels of dose rate used in this experiment. Furthermore, the results suggested that there are no direct correlation between cell's radiosensitivity and cell's kinetic change.

Deuterium oxide ( $D_2O$ ), an inhibitor of radiation-induced potentially lethal damage, caused a slight change in cell cycle distribution. Since cell growth was reported to be inhibited by 45 %  $D_2O$  in the same cell line<sup>15)</sup>, it may be concluded that  $D_2O$  inhibits cell progression at

any phase in the cell cycle. When the cells were irradiated in  $D_2O$  medium, a significant accumulation of cells in the  $G_2 + M$  phase was observed. Fraction of cells in the  $G_1$  and S phases was reduced in parallel with  $G_2 + M$  phase accumulation.

Administration of 3-aminobenzamide (3-AB), an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase, at 10 mM did not accumulate cells in the S phase but resulted in a slight accumulation of cells in the  $G_2 + M$  phase. Since cell growth was not inhibited until 30 to 40 h even in the presence of 3-AB<sup>15)</sup>, inhibition of poly (ADP-ribose) synthetase may not interfere with cell progression through the cell cycle. A drastic change in the cell kinetics was observed when the cells were irradiated with low dose-rates of  $\gamma$ -rays in the medium containing 10 mM of 3-AB. That is, approximately a half of cells accumulated in the  $G_2 + M$  phase at a total dose of 8.2 Gy and the cells in  $G_1$  and S reduced significantly. The mechanisms and the role of synergistic accumulation of  $G_2 + M$  phase cells in the presence of  $D_2O$  or 3-AB are not known at present.

## 1. 緒言

増殖中の細胞が電離放射線の照射を受けると、その増殖が一時的に遅くなったり（増殖遅延）、あるいは照射された集団において一時的に分裂像がみられなくなる（分裂阻害）現象は古くから知られている。これらの現象は細胞周期の概念とその解析法が確立された現在ではDNA合成率の低下によるS保留と分裂装置形成阻害によるG<sub>2</sub>阻害がその原因として特定されている。<sup>1,2)</sup>しかしながら、これらの実験のほとんどが1分間当たり1ないし2 Gyという高い線量率で行なわれたものであり、低線量率連続照射による細胞動態については、HeLa S<sub>3</sub><sup>8-9)</sup>, V79<sup>4,7-9)</sup>, CHL-F<sub>4</sub>, LP597,<sup>9)</sup> CHO<sup>11)</sup>, 10T<sub>1/2</sub><sup>12)</sup>, Pig Kidney<sup>7,9)</sup>, (PK-15) CCL337), Indian muntiac (CCL157)<sup>7,9)</sup>, rat Kangaroo (CCL56)<sup>7,9)</sup>, L5178 Ys<sup>9)</sup>などの報告例があるにすぎない。

報告例があるにすぎない。  
本研究は、マウス白血病性L5178Y細胞を用い、トリチウムによる被曝を考え、細胞動態に及ぼす低線量率連続照射の効果を調べることに、および細胞動態における変化が細胞生存率においてみられる線量率効果と何らかの相関性を有するか否かを検討するために行なわれた。また低線量率照射を受けている細胞の障害回復能を調べる目的の一環として亜致死性障害あるいは潜在性致死障害に対して修復阻害効果を有する重水(D<sub>2</sub>O)<sup>13-15)</sup>及び3-アミノベンザマイド(3-AB)<sup>15-19)</sup>存在下における動態の変化についても予備的な実験を行なった。

## 2. 研究方法

a. 細胞及び培養法：マウス白血病性L5178Y細胞を用いた。フィッシャー培地（10%馬血清、100単位/mlペニシリン、及び100 µg/mlストレプトマイシン添加）に細胞を浮遊させた状態で37°Cで培養した。この条件下で、本細胞の世代時間とその95%信頼限界は8.2 ± 0.3時間であり、またG<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, 及びM期を通過するに要する時間はそれぞれ、1.3 ± 0.1, 5.5 ± 0.3, 0.9 ± 0.3及び0.6 ± 0.3時間であった。またG<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>及びM期に分布する細胞の割合とその標準偏差は、それぞれ24.2 ± 0.8%, 62.7 ± 1.3%, 7.8 ± 0.1%, 5.3 ± 0.0%であった。

b. 薬剤：3-アミノベンザマイド(3-AB)は最組濃度10mMの割合でフィッシャー培地に加えた。また重水はフィッシャー培地調整の段階で45%の割合で加えた。

C. 照射条件：照射は細胞浮遊液を25ml培養フラスコに入れ、37 ± 0.5°Cの水浴中に固定し、<sup>60</sup>Co-γ線で行なった。線量率はγ線単独照射及び重水含有培地中では0.1 Gy/h (0.102-0.106), 0.2 Gy/h (0.197-0.211), 及び0.4 Gy/h (0.405-0.426)であった。これらの実験においては総線量を4.4 Gy及び8.5 Gyとしたので、その照射時間はそれぞれ、44, 22, 11時間(4.4 Gyの時)及び85, 42.5, 21.3時間(8.5 Gyの時)となる。また3-AB含有培地中での照射では線量率0.12 Gy/h, 0.24 Gy/h, 0.34 Gy/hを用い、総線量は4.4 Gy及び8.2 Gyとした。従ってその照射時間はそれぞれ、37, 18.3, 13時間(4.4 Gyの時)及び68, 34, 24時間(8.2 Gyの時)となる。

なお本実験は上野ら<sup>15)</sup>の実験と平行して行なわれたものである。

d. 細胞動態解析：各線量率で予定線量に達した細胞浮遊液5ml当りに下記の染色液1mlを加え、1分間37°Cに保って単鎖及び二重鎖RNAを分解した後、4°Cで2時間以上染色を行なった。染色液の組成は次の通りである。

プロピディウム・ヨウダイド(P I)	30 mg
10%トリトンX-100溶液	3 ml
蒸溜水	97 ml

使用前に6 mg/mlの割合でRNA分解酵素を加える。

染色された細胞はサイトフルオログラフ4800 A (オルソー社)を用い、流速約200細胞/秒、X軸を長波長蛍光光度、Y軸を細胞数として分析を行なった。得られたDNAヒストグラムデータはACOS S700又はS650電算機を用いFriedの方法<sup>20,21)</sup>で解析した。特に正確を期さなければならない対照区についてはHP-85マイクロコンピュータを用いDeamの方法<sup>22)</sup>でダブルチェックを行なった。実験は照射のみ、及び重水存在下での照射については各線量率、各総線量について3回行ない、3-AB存在下での照射については2回の繰返しを行なった。

## 3. 結果

a. 低線量率照射の効果：非照射対照区細胞集団のDNAヒストグラムを図1左側に示す。ヒス

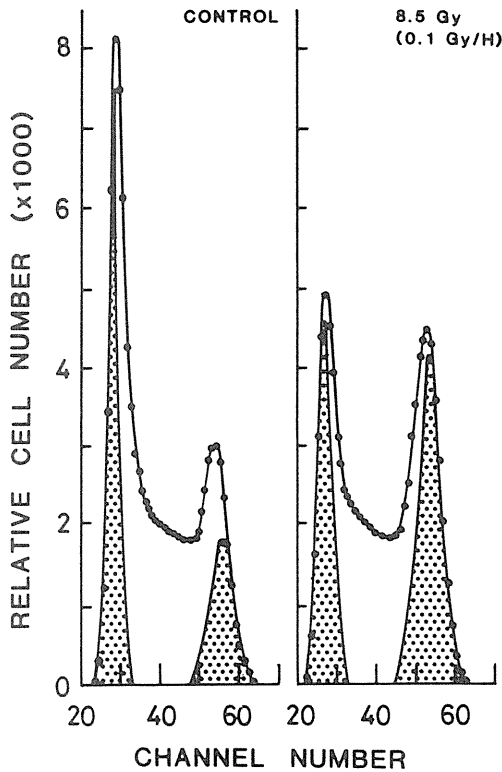


図1 非照射及び低線量率連続照射を受けた細胞集団の DNA ヒストグラム。左：非照射対照区，右：0.1 Gy/h の  $\gamma$  線を 85 時間照射された細胞集団。

トグラムは  $G_1$  期細胞を主とする第 1 ピーク (ヒストグラム左側) と  $G_1+M$  期細胞を主とする第 2 ピーク (ヒストグラム右側) の二峰性を示し、その中間が S 期の細胞で占められる。通常  $G_1$  期細胞の割合は  $G_2+M$  期細胞のそれに対して十分に多く、また S 期細胞は第 1 ピークから第 2 ピークにわたって広く分布するので、指数増殖をしている細胞集団の DNA ヒストグラムはほとんどの場合図 1 左側に示すような形になる。低線量率連続照射を受けると、図 1 右側に示すように、第 1 ピークの低下すなわち  $G_1$  期細胞の減少が起り、同時に第 2 ピークの上昇すなわち  $G_2+M$  期細胞の増加が起きる。このような変化は次のように解釈される。すなわち、照射によって  $G_2+M$  期に細胞の移行障害が生じ、 $G_1$  期に移行する細胞の割合が少なくなった。しかし  $G_1$  期から S 期にかけての移行はそれ程阻害されないで、結果において、 $G_1$  期細胞は減少し  $G_2+M$

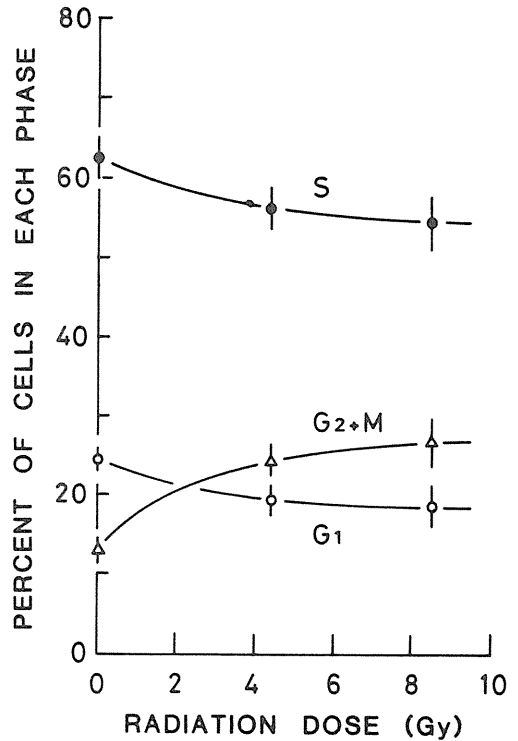


図 2 正常培地中で低線量率連続照射を受けた細胞集団における動態変化。線量率による動態変化の違いは認められなかったので平均値及び標準偏差は全データの合算によって求めた。白丸，黒丸，白三角はそれぞれ  $G_1$ ，S， $G_2+M$  期にある細胞の割合を示す。

期細胞は増加する。このような細胞周期上の変化を照射線量に対してプロットしたものが図 2 である。ここに得られたような動態変化が線量率によって異なる可能性については、0.1~0.4 Gy/h の範囲内ではほぼ否定された。

b. 重水培地中での低線量率照射の効果：重水の細胞動態に及ぼす効果についてはほとんど知られていない。そこで、低線量率照射に先行して重水の効果について調べた。低濃度の重水 (22.5%) では 24 時間後に到るも DNA ヒストグラムの変化は軽微であり、また引き続いて低線量率照射を行うことを配慮して、本実験では上野ら<sup>15)</sup>の場合と同じく 45% の濃度を用いた。結果は図 3 左側に示すヒストグラム及び図 4 に示すように、約 20 時間位の間にならぬ  $G_1$  及び S 期細胞の減少と  $G_1+M$  期細胞の増加が認められるが、それ以後

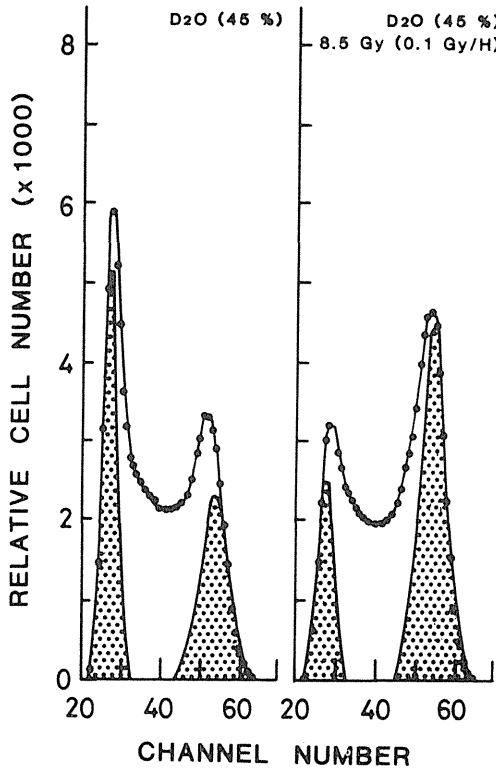


図3 重水培地中及び重水培地中で低線量率照射を受けた細胞集団のDNAヒストグラム。左：45%重水培地中で85時間培養，右：45%重水培地中で線量率0.1 Gy/hで85時間照射された細胞集団。

は安定的に推移した。しかしこの事実は後で述べるように、必ずしも重水の生物学的効果が少ないことを意味するものではない。

次に重水培地中で低線量率照射を行なった。その結果は、図3右側ヒストグラム及び図5に示すように、本質的には低線量率照射のみの場合と同じ傾向を示すが、 $G_1$ 期細胞の減少は照射のみの場合より顕著で、S期の細胞の割合もわずかに減少の傾向をます。これらに対し、 $G_2+M$ 期の細胞の増加は最も顕著で、 $G_2$ 期において相当きつ細胞移行率の低下が起きていることをうかがわせる。

c. 3-AB存在下での低線量率照射の結果：3-ABはポリ(ADP-リボース)合成の阻害剤で最終的にDNAのライゲーションを阻害することが知られており、また放射線によるDNA損

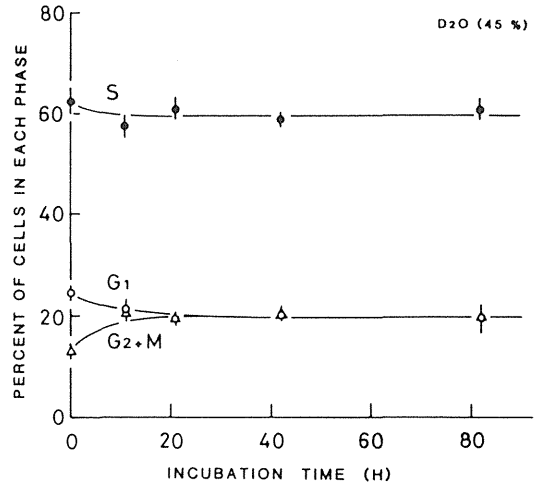


図4 45%重水培地中で培養された細胞の経時的動態変化。白丸，黒丸，白三角はそれぞれ $G_1$ ，S， $G_2+M$ 期細胞の割合を示す。

傷の修復を阻害する効果がある。3-ABのこのような薬理作用から、当然のこととして細胞周期上のS期において大きな変化が起ることが予想される。そこでまず3-AB単独の細胞動態に対する効果を調べた。結果は図6左側ヒストグラム及び図7に示すように、わずかな $G_1$ 及びS期細胞の減少と $G_2+M$ 期細胞の増加にとどまるが、その変化は40時間前後で定常化する。一方、3-AB含有培地中で低線量率照射を受けた場合には、図6右側ヒストグラム及び図8に示すように、 $G_1$ 及びS期細胞の著しい減少と $G_2+M$ 期細胞の顕著な増加が認められた。

#### 4. 討論

同一系統の細胞を用い、ほぼ平行して行なわれた上野ら<sup>15)</sup>の実験結果によれば、L5178Y細胞を0.1ないし0.4 Gy/hの線量率で連続照射すると照射開始まもなくから細胞の増殖率はわずかながら低下しており、更に総線量3ないし4 Gy(線量率0.1及び0.2 Gy/h)及び約10 Gy(線量率0.4 Gy/h)で顕著な増殖率の低下が認められる。本実験では各線量率(0.1, 0.2, 及び0.4 Gy/h)について照射開始後4.4 Gy及び8.5 Gyの各時点で細胞の周期分布を解析した。その結果、総線量

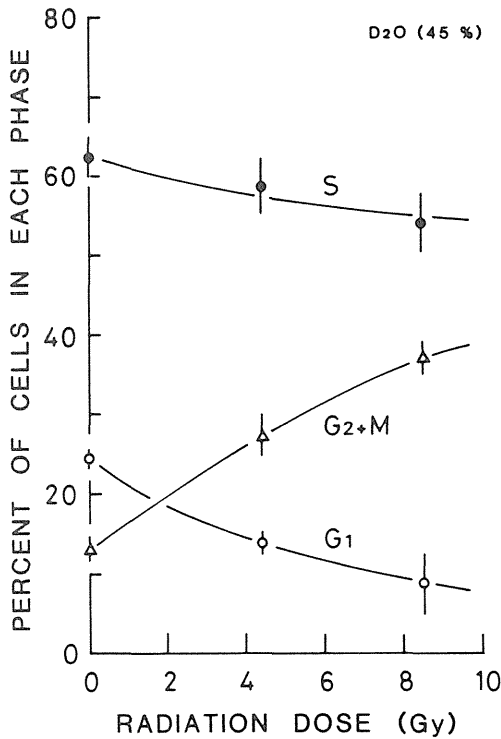


図5 45%重水培地中で低線量率連続照射を受けた細胞集団における動態変化。線量率による動態変化の違いは認められなかったので全データの合算によって平均及び標準偏差を求めた。白丸、黒丸、白三角はそれぞれG<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>+M期にある細胞の割合を示す。

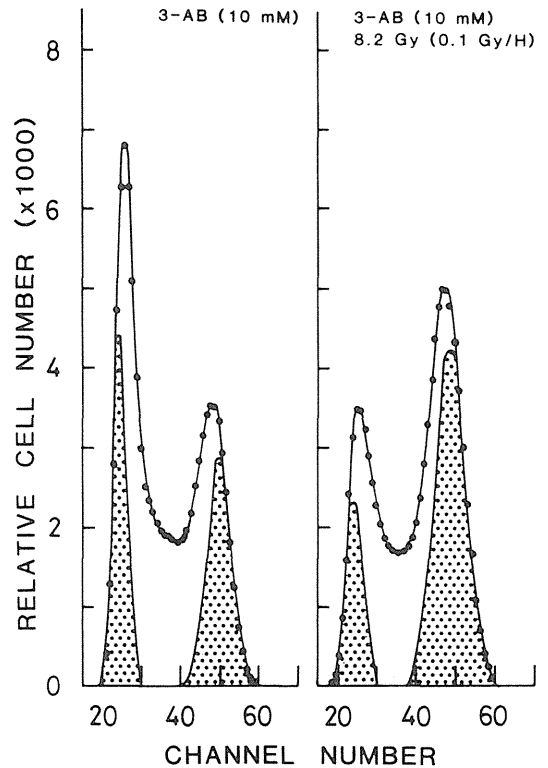


図6 3-AB (10mM) 含有培地で82時間培養された細胞集団(左)及びその条件で低線量率連続照射を受けた細胞集団(右)のDNAヒストグラム。照射条件は0.1 Gy/h, 8.2 Gy (82時間)である。

の増加に比例してG<sub>2</sub>+M期の細胞の増加が認められ、それだけ細胞の増殖率が低下していることが明らかになった。一方、線量率0.1ないし0.4 Gy/hの範囲では線量率依存性は認めることはできなかった。上野ら<sup>15)</sup>の増殖曲線には線量率と線量の二つの因子が含まれているが、もし本実験の結果をこれに当てはまるならば、増殖率低下の主たる要因は線量依存性ではないかと推定される。

照射によるG<sub>2</sub>+M期細胞の周期移行率の低下について、PuckとSteffen<sup>23)</sup>は0.09 Gyというわずかな吸収線量で、短時間ではあるが、ほぼ完全なG<sub>2</sub>阻止を認めている。これに対し、本実験のように低線量率で長時間にわたって照射が続けられた場合、明らかに細胞の増殖は続いているので完全なG<sub>2</sub>阻止は起きていないと考えられる。また

BedfordとMitchell<sup>5)</sup>はHeLa S3細胞を0.37ないし0.38 Gy/hの<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 線で照射し位相差顕微鏡写真及び固定染色材料の観察を行なった結果、多くの細胞がM期に蓄積しているかあるいは分裂しようとしていたと報告している。しかも連続照射中60時間にもわたって、ごくわずかの細胞しか分裂できなかったと報告している。このような場合、細胞の増殖はほとんど起こらないと考えられるが、上野ら<sup>15)</sup>の実験においても本実験においてもL5178Y細胞は明らかに増殖していたのでHeLa S3細胞の反応とL5178Y細胞の反応は異なるのかも知れない。この点についてはMitchellら<sup>7,9)</sup>も細胞間に相当大きな違いが存在することを認めている。

本実験では0.092 Gy/h及び0.26 Gy/hの線量

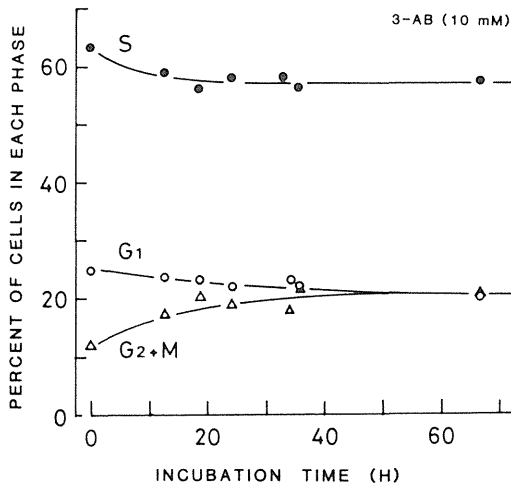


図7 3-AB (10 mM) 含有培養で培養された細胞集団における経時的動態変化。白丸, 黒丸, 白三角はそれぞれG<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> + 期にある細胞の割合を示す。

率で総線量11Gy照射後のDNA ヒストグラムの分析及び解析も試みたが、得られたヒストグラムの変動係数 (CV) が異常に大きく周期分布を解析することができなかった。この事実は、このような大線量が蓄積する過程においてDNA分子あるいはクロマチンのレベルでプロピディウム・ヨウダイドのキレート作用を阻害するような変化が生じたか、あるいは染色体異常などによって細胞当りのDNA含量が不均一になったためと考えられる。このような現象があらわれるのは照射開始30~40時間後であり、上野ら<sup>15)</sup>の観察した増殖率の急激な低下と時間的に対応している。またこのような変化が更に進行するとShipleyら<sup>11)</sup>の観察したような急激な増殖停止と生存率の低下が起こるのではないかと考えられる。

上野ら<sup>15)</sup>はほぼ同一条件で行なわれた細胞生存率検定において明らかな線量率依存性を認めているが、細胞動態の面からは線量依存性しか認めることはできなかった。この事は細胞の増殖阻害と細胞の不活化との間に直接的な相関性がないことを示すものと考えられる。

重水45%含有培地中でL5178Y細胞を培養した時の細胞動態の変化は表面的にはごくわずかで、20時間位までに一定となり、その後80時間に及ぶまで変化していないように見える。しかし上野ら

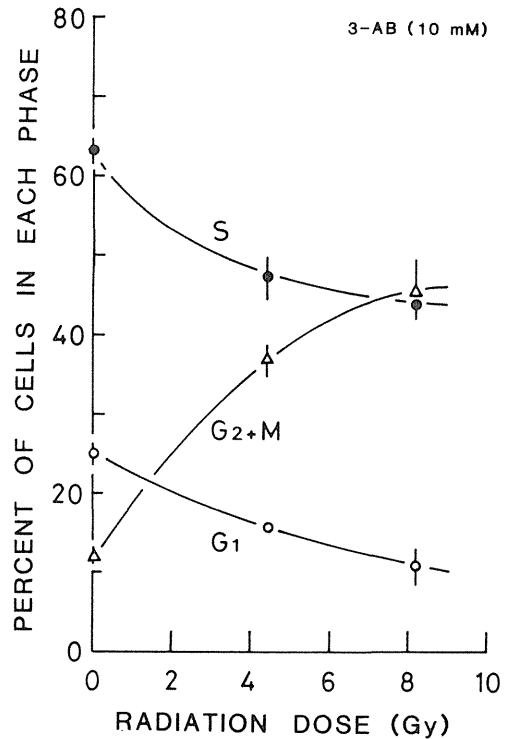


図8 3-AB (10 mM) 含有培地中で低線量率連続照射を受けた細胞集団における動態変化。線量率は0.1 Gy/h, 総線量は8.2 Gy。線量率依存性は認められないので全データの合算から平均及び標準偏差を求めた。白丸, 黒丸, 白三角はそれぞれG<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> + M 期の細胞の割合を示す。

<sup>15)</sup>の増殖曲線では培養開始まもなくからその増殖率は大巾に低下している。これらの実験結果を対比してみると、重水は細胞周期上の特定の期の細胞に作用するというよりも全ての期に作用して全体として増殖率を低下させているものと考えられる。重水は安定同位元素化合物であり、生体に対してこのような激しい結果を及ぼすことは予想外であった。細胞動態における変化が少ないことから重水の効果は細胞周期上の全ての期に対して普遍的なものといえる。重水培地中で低線量率照射を行なった場合、各線量率間で細胞動態上の有意な差は認められず、むしろ動態変化は総線量に依存していた。この総線量に対する依存性は高く8.5 Gyにおいて40%近い細胞がG<sub>2</sub>+M期に蓄積していたが、その間に線量率効果は認められない。

また $G_2+M$ への蓄積は重水単独の効果及び照射単独の効果の何れよりも多く相乗的であった。細胞生存曲線<sup>15)</sup>についてみると45%重水存在下で線量率効果は著しく低下しているが、これらは重水の傷害修復阻害効果<sup>13, 14)</sup>によるものであって増殖率の低下又は細胞動態の変化との相関性は低いものと考えられる。

ポリ (ADP-リボース) 合成酵素の阻害剤である3-AB<sup>15-19)</sup>を単独でL 5178 Y細胞に作用させた場合の動態変化も重水の場合と同様にそれほど顕著な変化ではなかったが、定常化するまでの時間は約40時間であった。増殖曲線<sup>15)</sup>と対比してみると、30ないし40時間の間に $G_2+M$ 期細胞のゆるやかな蓄積とS期細胞の減少がみられるが、それ以後は細胞周期の全般にわたって移行率の低下が起り増殖率が低下するようである。3-ABはポリ (ADP-リボース) の合成を阻害し、最終的にDNA鎖の伸長を抑制<sup>23)</sup>することから、3-AB処理によって細胞がS期に蓄積するのではないかという予測は完全に否定された。Okazaki fragmentを含むDNA分子の複製と、それをリガーゼによって結合して行くことはDNA合成の過程において必ずしも連鎖していなくてもよいのかもしれない。3-AB含有培地中における低線量率照射の効果は重水と同様、3-AB単独あるいは低線量率照射のみの効果からの予測を大巾に上回る $G_2+M$ 期細胞の蓄積という結果をもたらした。このような相乗的な効果の発現機構については現在のところ不明である。

## 5. 結論

指数増殖期に維持されているマウス白血病性L 5178 Y細胞を材料として、低線量率 (0.1, 0.2及び0.4 Gy/h) での<sup>60</sup>Co- $\gamma$ 線連続照射 (11ないし85時間) が細胞動態に及ぼす影響について調べた。被曝線量の増加について細胞周期上の $G_1$ 及びS期細胞はわずかに減少し、 $G_2+M$ 期が増加した。しかし、この $G_2+M$ 期細胞の蓄積は通常の線量率での急性照射にみられるような $G_2$ 期の移行率の低下によるものと考えられる。なを用いられた線量率の範囲内では生存曲線においてみられるような線量率効果はほとんど認められず、その変化は主として被曝線量に依存している。

重水は予想に反して激しい増殖抑制効果を示すが、その影響は特定の期に対してではなく細胞周期の全ての期に対するものであった。重水培地中

での低線量率照射の効果は照射単独の場合と同質であるが、その効果は重大の存在によって増強される。同じような傾向は3-AB含有培地においてもみられ、3-AB単独では特に $G_2+M$ 期に対して高い特異性を示さないにもかかわらず低線量率照射との間に強い相乗効果がみられた。その理由については今後の研究に待たねばならない。

なを、低線量率照射中における細胞の障害回復能が生存曲線にみられる線量率効果に果す役割を調べる目的でDNAポリメラーゼ阻害剤を中心に探索を行なったが、いずれも長期処理に適しておらず、この点も今後の研究に待たなければならない。

## 参考文献

1. Elkind, M. M. and Whitmore, G. F.: Effects of radiation on cell division and growth. In "The Radiobiology of Cultured Mammalian Cells", Eds. M. M. Elkind and G. F. Whitmore. Chapter 7, pp 303-382, Gordon and Breach, N. Y., London, Paris, 1967.
2. Okada, S.: Radiation effects on cell progress through the life cycle. In "Radiation Biochemistry", Eds. K. I. Altman, G. B. Gerber, and S. Okada, Vol.1, Chapter VI, pp 190-239, Academic Press, N. Y. & London, 1970.
3. Nias, A. H. W. and Lajtha, L. G.: Continuous irradiation with tritiated water of mammalian cells in a monolayer, *Nature*, **202**, 613-614, 1964.
4. Bedford, J. S. and Mitchell, J. B.: Dose-rate effects in synchronous mammalian cells in culture. *Radiat. Res.*, **54**, 316-327, 1973.
5. Bedford, J. S. and Mitchell, J. B.: Mitotic accumulation of HeLa cells during continuous irradiation. Observations using time-lapse cinematography. *Radiat. Res.*, **70**, 173-186, 1977.
6. Mitchell, J. B. and Bedford, J. S.: Dose-rate effects in synchronous mammalian cells in culture. II. A comparison of the life cycle of HeLa cells during continuous irradiation or multiple-dose fractionation. *Radiat. Res.*, **71**, 547-560, 1977.



7. Mitchell, J. B., Bedford, J. S. and Bailey, S. M.: Doserate effects in mammalian cells in culture III. Comparison of cell killing and cell proliferation during continuous irradiation for six different cell lines. *Radiat. Res.*, **79**, 537-551, 1979.
8. Mitchell, J. B., Bedford, J. S. and Bailey, S. M.: Doserate effects on the cell cycle and survival of S3 HeLa and V79 cells. *Radiat. Res.*, **79**, 520-536, 1979.
9. Bedford, J. S., Mitchell, J. B. and Fox, M. H.: Variations in response of several mammalian cell lines to low dose-rate irradiation. In "Radiation Biology in Cancer Research", Eds. R. E. Meyn and R. Withers, pp 251-262, Raven Press, N. Y., 1980.
10. Ehmann, U. K., Williams, J. R., Nagle, W. A., Brown, J. A., Belli, J. A., and Lett, J. T.: Perturbations in cell cycle progression from radioactive DNA precursors. *Nature*, **258**, 633-636, 1975.
11. Shipley, W. U., Jennings, M., Gerweck, L. E., and Ling, C. C.: Prolonged "ultra" low-dose-rate irradiation: Effects on Chinese hamster cell population growth, survival, and radiation sensitivity. *Radiat. Res.*, **85**, 150-160, 1981.
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. Sideris, E. G., Mukherjee, R. and Vomvovanni, V.: Effect of deuterium water on the mitotic cycle, the deoxyribonucleic acid stability, and the frequency of radiation-induced chromosome aberration in Barley. *Radiat. Res.*, **61**, 457-467, 1975.
14. Ben-Hur, E., Utsumi, H. and Elkind, M. M.: Potentially lethal and DNA radiation damage: Similarities in inhibition of repair by medium containing D<sub>2</sub>O and by hypertonic buffer. *Radiat. Res.*, **84**, 25-34, 1980.
15. Ueno, A. M., Tanaka, O. and Matsudaira, H.: Inhibition of gamma-ray dose-rate effects by D<sub>2</sub>O and inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase in cultured mammalian L5178Y cells. *Radiat. Res.*, **98**, 574-582, 1984.
16. Creissen, D. and Shall, S.: Regulation of DNA ligase activity by poly (ADP-ribose). *Nature*, **296**, 271-272, 1982.
17. Kumar, A., Kiefer, J., Schneider, E. and Crompton, N, E, A.: Enhanced cell killing, inhibition of recovery from potentially lethal damage and increased mutation frequency by 3-aminobenzamide in Chinese hamster V79 cells exposed to X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, **47**, 103-112, 1985.
18. Kelland, L. R., Burgess, L. and Steel, G. G.: Radiation damage repair capacity of a human germ-cell tumor cell line: inhibition by 3-aminobenzamide. *Int. J. Radiat. Biol.*, **51**, 227-241, 1987.
19. Thraves, P. J., Mossman, K. L., Brennan, T. and Dritschilo, A.: Differential radiosensitization of human tumor cells by 3-aminobenzamide and benzamide: inhibitors of poly (ADP-ribosylation). *Int. J. Radiat. Biol.*, **50**, 961-972, 1986.
20. Fried, J.: Method for the quantitative evaluation of data from flow microfluorometry. *Comput. Biomed. Res.*, **9**, 263-276, 1976.
21. Fried, J. and Mandel, M.: Multi-user system for analysis of data from flow cytometry. *Comput. Prog. Biomed.*, **10**, 218-230, 1979.
22. Dean, P. N.: A simplified method of DNA distribution analysis. *Cell Tissue Kinet.*, **13**, 299-308, 1980.
23. Puck, T. T. and Steffen, J.: Life cycle analysis of mammalian cells I. A method for localizing metabolic events with the life cycle, and its application to the action of Colcemid and sublethal dose of X-irradiation. *Biophys. J.*, **3**, 379-397, 1963.

## IV トリチウムによる動物組織の障害、 発生異常並びに発がん効果の研究

### 1. 魚類生殖腺に対するトリチウムの影響

江 藤 久 美, 田 口 泰 子 (生物研究部)

## Effects of Tritiated Water on Germ Cells in Medaka

Hisami Etoh and Yasuko Hyodo-Taguchi  
Division of Biology

Embryos of the medaka (*Oryzias latipes*; strain of d-rR) were exposed to tritiated water continuously from the morula stage until hatching (10 days at 26°C). Tritium concentrations of 0.05 to 0.2 mCi/ml were applied to the eggs. To compare with the tritium, the eggs were continuously irradiated for the same period of time with  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -rays at dose-rates of 11.4 to 47.6 rad/day. The dose for 50 % survival of female primordial germ cells were 140 rad for  $\beta$ -rays and 305 rad for  $\gamma$ -rays, and an RBE of 2.2 could be calculated for  $^3\text{H}$   $\beta$ -rays relative to  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -rays. From the dose-survival relationship curves, no significant differences were found between  $\beta$ - and  $\gamma$ -rays for killing of male primordial germ cells.

The newly hatched fry were irradiated for 7 days with  $\beta$ - and  $\gamma$ -rays under the conditions mentioned above. The doses for 50 % survival of female primordial germ cells were 200 rad for  $\beta$ -rays and 460 rad for  $\gamma$ -rays and RBE of  $^3\text{H}$   $\beta$ -rays was calculated as 2.3. On the other hand, RBE was estimated at 1 when survivals of male primordial germ cells treated with tritiated water were compared to those irradiated with  $\gamma$ -rays.

To determine effects of early radiation in-

duced germ cell loss on life-time reproduction, the fecundity and fertility of the fish given chronic irradiation in their embryonic stages were also investigated. Embryos were exposed to tritiated water and  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -rays. Newly hatched fry were removed from radioactive environment. At 4-8 months after hatching, pairs consisting of irradiated males and nonirradiated females or the reverse were mated. Tritium  $\beta$ -rays were more effective than  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -rays in reducing the fecundity of irradiated females. In the irradiated male pair groups, the total number of oviposition hardly decreased, but the number of fertilized eggs per fish decreased depending on the dose-rate. There was little difference of effectiveness found between  $\beta$ -rays and  $\gamma$ -rays in decreasing the fertility of the irradiated males.

These results indicate that RBEs of  $^3\text{H}$   $\beta$ -rays relative to  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -rays are approximately 2 in the tissues consisting of dividing cells and 1 in those consisting of non-dividing cells, and that the recovery by germ cell repopulation is dominant in females, although the primordial germ cells at embryonic stages are more sensitive to radiation in female than in male.

## 1. 緒言

原子力施設の増加に伴ない、トリチウムの排出が増大しつつある。トリチウムは他の核種と異なって、大部分が環境中に放出される。排出されたトリチウムは最終的にはトリチウム水 (HTO) となって水圏に入るので、水中に生息する魚類を用いて HTO の影響を調べることは生物学的に重要であるばかりでなく、ヒトに対する影響を推定する基礎的資料を提供すると考えられる。

こゝではメダカ (胚, 稚魚, 成魚) を用い、生殖腺の障害を指標としてトリチウム  $\beta$  線と  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  線の連続照射の効果を比較し、低線量域でのトリチウムの RBE に関する知見を得ることを目的として研究を行なった。

## 2. 研究方法

### a. 実験材料

d-rR系のメダカ (*Oryzias latipes*) を用いた。孵化直後のメダカ稚魚では雌雄の判別が困難であり、雌雄それぞれの始原生殖細胞に対する HTO の影響を調べるため、山本の性転換法<sup>1)</sup> によって雌のみ、あるいは雄のみを産出する親魚を育てた。その方法を図 1, 2 に示す。

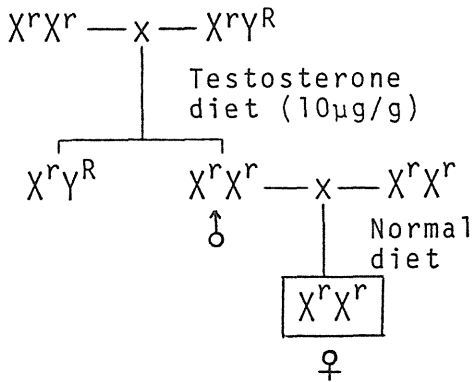


図 1. 雌のみを産出する親魚の作出法。d-rR系メダカの孵化直後の稚魚にテストステロン添加餌料を与えると  $X^r X^r$  の雄が生ずる。この雄は体色が白で、正常雄 ( $X^r Y^R$ ) のオレンジ色と区別がつく。この白色の ( $X^r X^r$ ) の雄と正常雌 ( $X^r X^r$ ) の交配で全て  $X^r X^r$  の雌が産出される。

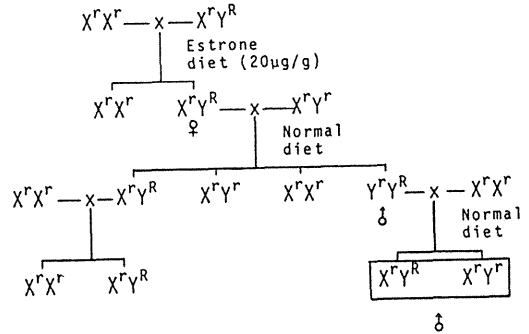


図 2. 雄のみを産出する親魚の作出法。孵化直後の稚魚にエストロン添加餌料を与えると  $X^r Y^R$  の雌が生ずる。この雌と正常雄 ( $X^r Y^R$ ) を交配すると、 $X^r Y^R$ ,  $Y^r Y^R$  の 2 種の雄が生ずる。これらは体色では区別できないので、それぞれ正常雌と交配させてその子供の出現状態を調べる。白色雌が混入していれば、そのペアは捨て、雄 (白色, オレンジ色) のみを生ずるペアから卵を採取し実験に供する。

胚発生の各時期に胚を Bouin 氏液で固定し、連続切片を作製して、発生中の始原生殖細胞数の変化を調べた。

実験は全て  $26^\circ\text{C}$  の恒温で行なった。

### b. HTO 処理及び $\gamma$ 線照射

#### 1) 始原生殖細胞に対する影響

a) 受精直後 (morula 期) から孵化まで (約 10 日) 卵を HTO ( $0.05 \sim 0.2 \text{ mCi/ml}$ ) 中で飼育した。また  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  線の連続照射 (線量率:  $11.4 \sim 47.6 \text{ rad/日}$ ) を行なった。孵化直後の稚魚は Bonin 氏液で固定した (図 3, Exp. 1)。

b) 胚発生の前半 (4 日間), あるいは後半 (6 日間) を HTO 処理あるいは  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$  線を照射し、孵化直後に固定した (図 3, Exp 2 および 3)。

c) 孵化直後の雌雄の稚魚を 7 日間, HTO 中で飼育した後、固定した (図 3, Exp. 4)。

d) 固定された稚魚から常法に従って  $6 \mu\text{m}$  の連続切片を作製し、始原生殖細胞数を数えた。

#### 2) 繁殖率に対する影響

##### a) 胚期に照射された場合

受精直後から孵化まで HTO ( $0.05 \sim 2 \text{ mCi/ml}$ ) 中で飼育し、孵化直後の稚魚は通常水に戻し

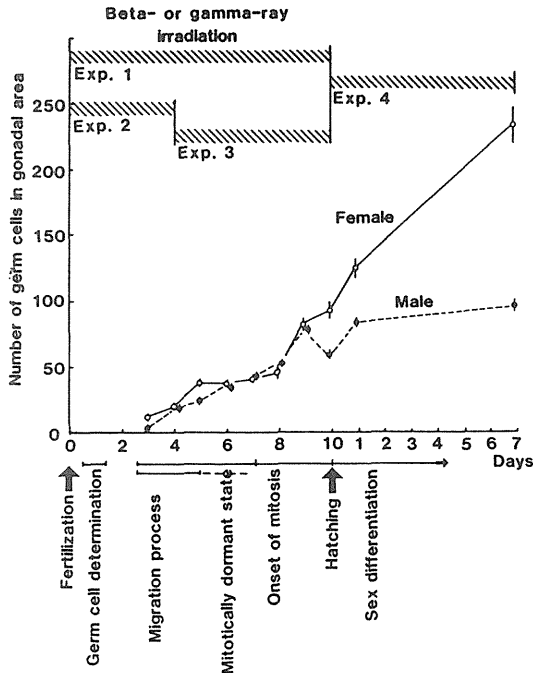


図3. 胚発生中の雌および雄始原生殖細胞数の変化。HTO 処理,  $\gamma$  線照射の時期を同時に示した。

て成熟するまで(4~6ヶ月)飼育した。処理された雌雄魚はそれぞれ非処理の雄雌と1:1で交配させ、生殖能力を調べ、 $\gamma$ 線照射(線量率:6.1~254rad/日)と比較した。

b) 成魚の幹精原細胞に対する影響

3~6ヶ月令の雄メダカをHTO(0.1~0.5mCi/ml)中で10日間飼育、あるいは $\gamma$ 線(線量率:50~200rad/日)で10日間連続照射した後、約2ヶ月間通常の条件下で飼育した。産卵中の非処理雌メダカと1:1で交配し、生殖能力を調べた。

c) 生殖腺重量-体重比(GSI)

生殖能力を調べた後、全ての魚をBouin氏液で固定し、体重及び生殖腺重量を測定して、GSIを求めた。その後、生殖腺から6 $\mu$ mの切片を作製し組織像を観察した。

c. 線量計算

トリチウム $\beta$ 線の吸収線量は次式により求めた。

$$D = \frac{A \cdot E \cdot K}{100W}$$

D: 線量率 (rad/分)

A: 毎分当りの崩壊数(卵内のトリチウム量は上野<sup>2)</sup>の報告により、0.60の濃縮係数を用いた)

E:  $\beta$ 線の平均エネルギー(5.69 keV)

K: 変換係数,  $1.602 \times 10^{-9}$  erg/keV

W: 卵1ケの重量(g)

100: erg/gからradへの変換係数

<sup>137</sup>Cs(10Ci)線源からの距離を変えることにより(34~290cm)線量率を変えた。各線量率はVictoreen R-meterで測定し、0.95の係数を乗じてradを求めた。線源は毎朝2時間格納され、その間に卵の調査を行なった。22時間の線量をrad/日と表わした。

3. 結果

a. 始原生殖細胞に対する影響

1) 胚発生中の始原生殖細胞数の変化を図3に示す。始原生殖細胞は受精後3日頃に腸管背部に集合しはじめ、8日頃には約60細胞となった。しかし、この間に分裂像は全く見られなかった。孵化時には分裂により約90細胞となる。雌では引き続き増殖がおり、孵化後7日目には約270細胞となった。雄ではその後分裂はおこらず孵化後7日目でも、約90細胞のまゝであった。

2) 全胚期にわたり照射されたメダカ始原生殖細胞数の変動を図4に示す。雌性生殖細胞の50%生残線量は $\beta$ 線で140rad, $\gamma$ 線で305radであった。この値から推定したトリチウム $\beta$ 線のRBEは2.2となった。雄性生殖細胞の線量-生残率関係曲線は $\beta$ , $\gamma$ 線の間で有意の差はなく、RBEは1であった<sup>3,4)</sup>

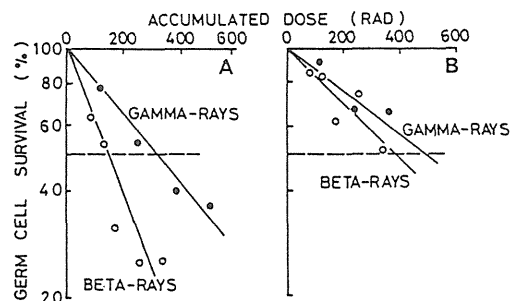


図4. 胚期に照射された雌(A)および雄(B)始原生殖細胞数の変化。

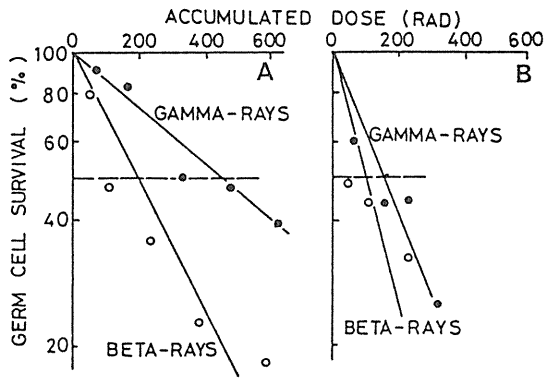


図5. 稚魚期に照射された雌(A) および雄(B) 生殖細胞数の変化。

3) 分裂細胞を含まない胚発生前半(4日間)を照射した場合、生殖細胞数は線量の増加とともに指数函数的に減少した。雄性生殖腺の方が感受性は低かったが、 $\beta$ 、 $\gamma$ 両放射線の影響に差がなく、RBEは1となった。これに反し、分裂細胞を含む胚発生の後半(6日間)を照射した場合には、雌雄いずれの生殖細胞に対しても $\beta$ 線の方が $\gamma$ 線よりも効果が大きく、トリチウム $\beta$ 線のRBEは1.6~1.9となった。

4) 孵化直後の稚魚を7日間、照射した場合、細胞分裂の盛んな雌性生殖細胞の50%生残線量は $\beta$ 線で200rad、 $\gamma$ 線で460radとなり、RBEは2.3

であった。一方、分裂細胞を含まない雄性生殖細胞では、両放射線の間で差がなく、RBEは1となった(図5)。<sup>5)</sup>

b. 生殖能力に対する影響

1) 胚期にHTO処理をうけたメダカの生殖能力を表1, 2に示す。受精卵を産む回数と産卵された受精卵数で比較すると、雌が照射をうけた場合、HTOでは生殖能力は線量に依存して急速に減少し、約400radで半減した。 $\gamma$ 線照射では産卵数の低下はゆるやかで、半減する線量は1500rad以上となり、 $\beta$ 線の方が効果が大きい。雄が照射をうけた場合には受精卵数は $\beta$ 線、 $\gamma$ 線の連続照射ともに低線量域で急速に減少し、約500radで受精卵数が対照の $1/2$ となった。<sup>6-8)</sup>

2) 雄成魚を $\beta$ 線あるいは $\gamma$ 線で10日間照射し、2ヶ月後の生殖能力を調べた。調べた期間中の産卵回数と全産卵数は用いた線量範囲( $\beta$ 線で170~425rad、 $\gamma$ 線で500~2000rad)では殆んど影響されなかった。しかし、受精卵を産む回数と全受精卵数は線量に依存して減少し、また、孵化率も低下した。受精卵を産む回数および受精率が対照の $1/2$ になる線量はそれぞれ $\beta$ 線で450, 500rad、 $\gamma$ 線で670, 850radであった。<sup>9)</sup>

3) 胚期に $\beta$ 線で照射され、成熟後に測定したGSIは低濃度範囲では対照と殆んど差がなかったが、雌では1mCi/ml以上(1700rad)で、雄では2mCi/mlで $1/10$ 以下となった。 $\gamma$ 線照射では雌雄とも2500radで対照の $1/3$ 位に低下したにと

表1. 胚期に $^3\text{H}$   $\beta$ 線および $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ 線を照射された雌メダカの生殖能力。

Irradiation group	accumulated dose (rad)	Number of ovipositions tested <sup>a</sup>	Total number of oviposition	Total oviposition frequency <sup>b</sup>	Number of ovipositions with fertilized eggs	Normal oviposition frequency <sup>c</sup>	Completely infertile fish
Control	0	1176	1100	0.94 ± 0.01	1048	0.89 ± 0.02	0/84
HTO $\beta$ rays	85	229	182	0.81 ± 0.06	150	0.68 ± 0.08	1/17
	170	420	346	0.82 ± 0.04	275	0.66 ± 0.06	0/30
	255	182	131	0.72 ± 0.08	95	0.52 ± 0.10	2/13
	340	434	259	0.60 ± 0.08	228	0.55 ± 0.08	10/31
	850	280	129	0.43 ± 0.11	112	0.40 ± 0.11	11/21
	1700	294	13	0.04 ± 0.05	5	0.02 ± 0.02	20/21
	3400	126	0	0	0	0	9/9
$^{137}\text{Cs}$ $\gamma$ rays	61	280	225	0.80 ± 0.04	184	0.70 ± 0.06	0/20
	105	294	242	0.82 ± 0.05	213	0.73 ± 0.07	0/21
	240	588	482	0.80 ± 0.05	420	0.72 ± 0.06	5/42
	910	431	339	0.79 ± 0.06	293	0.68 ± 0.07	5/31
	1400	378	248	0.66 ± 0.08	225	0.60 ± 0.08	7/27
	2540	746	208	0.28 ± 0.06	199	0.27 ± 0.06	34/54

a. (検査した魚の数) × (検査期間, 14日)

b. (産卵回数) / (産卵を検査した回数)

c. (受精卵を産出した回数) / (産卵を検査した回数)

表2. 胚期に<sup>3</sup>H β線および<sup>137</sup>Cs γ線を照射された雄メダカの生殖能力(検査期間は14日)。

	Irradiation group accumulated dose (rad)	Number of ovipositions tested	Total number of ovipositions	Total oviposition frequency	Number of ovipositions with fertilized eggs	Normal oviposition frequency	Completely infertile fish
Control	0	1176	1100	0.94 ± 0.01	1048	0.89 ± 0.02	0/84
HTO β rays	85	308	275	0.89 ± 0.03	263	0.85 ± 0.05	0/22
	170	210	197	0.94 ± 0.02	187	0.89 ± 0.02	0/15
	255	168	161	0.96 ± 0.02	139	0.83 ± 0.08	1/12
	340	434	362	0.83 ± 0.04	198	0.46 ± 0.08	6/21
	850	266	201	0.76 ± 0.04	119	0.45 ± 0.09	5/19
	1700	434	275	0.63 ± 0.04	55	0.13 ± 0.03	8/13
	3400	126	86	0.68 ± 0.07	24	0.19 ± 0.07	4/9
<sup>137</sup> Cs γ rays	61	294	264	0.90 ± 0.04	254	0.86 ± 0.04	0/21
	105	224	202	0.90 ± 0.03	183	0.82 ± 0.04	0/16
	240	812	634	0.88 ± 0.02	566	0.75 ± 0.04	2/58
	910	350	314	0.90 ± 0.04	246	0.70 ± 0.08	3/25
	1400	560	400	0.71 ± 0.04	131	0.23 ± 0.05	14/40
	2540	913	692	0.76 ± 0.03	344	0.38 ± 0.04	12/66

表3. 生殖細胞の50%生残線量及びトリチウムのRBE値(カッコ内)。

STAGE AT IRRADIATION	FEMALE		MALE	
	<sup>3</sup> H β-RAYS	<sup>137</sup> Cs γ-RAYS	<sup>3</sup> H β-RAYS	<sup>137</sup> Cs γ-RAYS
EMBRYO	140 RAD (2.2)	305 RAD	390 RAD (1.3)	520 RAD
FRY	200 (2.3)	460	110 (1.5)	160

まいった。組織学的検査によると、高線量を照射された群の生殖腺は生殖細胞の発達はみられず、極く少数の始原生殖細胞様細胞を含むのみであった。また、被曝した精巣中には精巣卵がみられ、高線量被曝群の方が精巣卵の出現頻度が高かった<sup>10)</sup>

#### 4. 討論

胚発生中の始原生殖細胞数の変化は Ijiri and Egami<sup>11)</sup> によって報告されているが、今回、雌雄別々の胚によって検査し、同様な変化が確認された。

始原生殖細胞及び精原細胞の50%生残線量とそれらから推定したRBEを表3に示す。胚期に照射された場合、雌性始原生殖細胞の方が感受性が高く、また、RBEはほぼ2となった。雄では雌に比べ50%生残線量が約2倍大きく、RBEはほぼ1であった。稚魚期に照射された場合には、雄性始原生殖細胞の方が感受性が高かった。雄生殖腺には分裂細胞はないが、雄性生殖腺への分化が

おこっており、活発な代謝が行なわれているためと考えられる。

雌性始原生殖細胞の50%生残線量(β線で140rad, γ線で305rad)と生殖能力が50%に低下する線量(β線で400rad, γ線で1500rad以上)と比較すると、雌の生殖細胞は成魚になるまで著しく回復したことが示された。雄が照射された場合には、受精卵数は約500radで対照の1/2となり、雄始原生殖細胞の50%生残線量(β線で390rad, γ線で520rad)と比較すると大体同じ程度で、孵化時の生殖細胞数が精子の形成に反映されていることがわかった。このことは各個体毎に得られた受精率と精巣重量の相関から、個体の受精能力の低下は形成される精子数の減少によることが確認された。また、高濃度で処理された雄メダカのペアから産まれた卵の孵化率が低下することから、形成された精子の性質そのものもβ線の影響をうけることが明らかとなった。

また雄成魚の感受性を胚や稚魚と比較すると、精原細胞の生残率は、始原生殖細胞より高感受性を示したが、生殖能力の回復のみで幹精原細胞の感受性は、始原生殖細胞のそれと同じ程度であった。<sup>12,13)</sup>

#### 5. 結論

メダカ生殖腺の障害を指標として、HTOの影響を調べ、<sup>137</sup>Cs γ線連続照射の結果と比較した。

a. 胚期においては分裂細胞を含む雌生殖腺の方が、分裂細胞を含まない雄生殖腺よりも感受性が高い。稚魚期においては雄性生殖腺への分化が

活発におこっている雄生殖腺の方が感受性が高い。

b. 分裂細胞を含む雌性生殖腺の方が $\beta$ 線の効果が大きく、RBEは2と考えられる。分裂細胞を含まない雄性生殖腺では両放射線の間に効果の差はなく、RBEは1と考えられる。

c. 雌性生殖腺においては成魚になるまでに著しく回復がみられたが、雄性生殖腺では回復がみられず、成魚の生殖能力は、雄性始原生殖細胞数の減少を反映していると考えられる。

#### 参考文献

- 1) Yamamoto T.: Control of Sex Differentiation. In "Medaka (Killifish), Biology and Strains" (T. Yamamoto, ed.) pp. 192-213, 1975.
- 2) Ueno A. M.: Incorporation of tritium from tritiated water into nucleic acids of *Oryzias latipes* eggs. *Radiat. Res.*, **59**, 629-636, 1974.
- 3) Etoh, H. and Hyodo-Taguchi, Y.: Effects of tritiated water on germ cells in medaka embryos. In "Proc. 1st Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics" (NIRS-M-41). (Matsudaira, H., Yamaguchi, T., Nakazawa, T. and Saito, C. eds.) pp. 156-170, 1982.
- 4) Etoh, H. and Hyodo-Taguchi, Y.: Effects of tritiated water on germ cells in medaka embryos. *Radiat. Res.*, **93**, 332-339, 1983.
- 5) Etoh, H. and Hyodo-Taguchi, Y.: Effects of  $\beta$ -rays from tritiated water on germ cells in medaka embryos and fry. In "Proceedings of the Seventh International Congress of Radiation Research" (Broerse J. J. et al., eds) p. C3-05, 1983.
- 6) Hyodo-Taguchi, Y. and Etoh, H.: The fecundity and fertility of medaka exposed to chronic  $\gamma$ -radiation in their embryonic stages. *J. Radiat. Res.*, **24**, 270-277, 1983.
- 7) Hyodo-Taguchi, Y. and Etoh, H.: Tritium effects on the gonads of the aquarium fish, *Oryzias latipes*. 1. Fecundity and fertility. In "Proc. 2nd Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics" (NIRS-M-52). (Matsudaira, H., Yamaguchi, T. and Etoh, H. eds.) pp. 207-220, 1985.
- 8) Hyodo-Taguchi, Y. and Etoh, H.: Effects of tritiated water on germ cells in medaka. II. Diminished reproductive capacity following embryonic exposure. *Radiat. Res.*, **106**, 321-330, 1986.
- 9) Hyodo-Taguchi, Y. and Etoh, H.: Effects of tritiated water on germ cells in medaka V. Diminished reproductive capacity following embryonic exposure. *J. Radiat. Res.*, **26**, 38, 1985. (Abstract).
- 10) Etoh, H. and Hyodo-Taguchi, Y.: Tritium effects on the gonads of the aquarium fish, *Oryzias latipes*. 2. Histological changes. In "Proc. 2nd Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics" (NIRS-M-52). pp. 221-230, 1985.
- 11) Ijiri, K. and Egami, N.: Effects of  $\gamma$ -ray irradiation on primordial germ cells in embryos of *Oryzias latipes*. *Radiat. Res.*, **72**, 164-173, 1977.
- 12) Hyodo-Taguchi, Y. and Egami, N.: Damage to spermatogenic cells in fish kept in tritiated water. *Radiat. Res.*, **71**, 641-652, 1977.
- 13) Hyodo-Taguchi, Y., Aoki, K. and Matsudaira, H.: Use of medaka as a tool in studies of radiation effects and chemical carcinogenesis. In "Proc. 1st Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics" (NIRS-M-41). (Matsudaira, H., Yamaguchi, T., Nakazawa, T. and Saito, C. eds) pp 135-155, 1982.

## 2. トリチウム内部被ばくによる実験動物の造血障害に関する研究

### (1) マウス造血組織におけるトリチウムの残留

上 島 久 正 (養成訓練部)

福 津 久美子, 鹿 島 正 俊 (障害基礎研究部)

## Retention of Tritium in the Femoral Bone Marrow and Spleen in Mice after a Single Intravenous Injection of Tritiated Water and Tritiated Thymidine

Hisamasa Joshima, Kumiko Fukutsu\* and Masatoshi Kashima\*  
Training School

\*Division of Radiation Hazards

To derive parameters necessary for evaluation of the absorbed dose of tritium, retention of tritium in femoral marrow and spleen was observed in mice after a single intravenous injection of tritiated water and tritiated thymidine. Retention curves of  $^3\text{H}$  in TCA insoluble and soluble fractions of the femoral marrow and spleen were resolved fairly well into two exponential components.

After injection of [ $^3\text{H}$ ] thymidine,  $^3\text{H}$  activity in the femoral marrow and spleen attained the maximum value of 0.1361 and 1.0361 % of the administered radioactivity, respectively, at the time of its initial localization. About two-third of this  $^3\text{H}$  was incorporated rapidly into the TCA insoluble fraction. Tritium in this fraction decreased with half-times of 2.2 days in the femoral marrow and 3.6 days in the spleen as the first component, and 23.9 days and 30.5 days, respectively, as the second component. About one-third of initially localized tritium in the marrow and spleen was observed in TCA soluble fraction. Most of tritium in this fraction decreased with half-times of 2.8 and 2.6 days in

the marrow and spleen as the first component, respectively, suggesting breakdown of [ $^3\text{H}$ ] thymidine into HTO.

After injection of HTO,  $^3\text{H}$  activity in the femoral marrow and spleen attained the maximum value of 0.0492 and 0.2296 % of the administered radioactivity, respectively, at the time of its initial localization. Only 0.0009 and 0.0087 % of the administered activity was incorporated into TCA insoluble fraction of the femoral marrow and spleen, respectively. Then, most of  $^3\text{H}$  was considered to be in TCA soluble fraction. Tritium in this fraction was estimated to decrease with half-times of 2.6 days in the femoral marrow and 2.3 days in the spleen as the first component, and 8.0 days and 8.2 days, respectively, as the second component.

It is concluded that the retention of  $^3\text{H}$  in marrow is similar to that in spleen for HTO but not for [ $^3\text{H}$ ] thymidine. Radiation dose to the bone marrow and spleen after intravenous injection of HTO may be estimated from  $^3\text{H}$  only in body water.



## 1. 緒言

体内のDNA合成細胞のうち約15%は骨髄に存在し<sup>1)</sup>、造血系は放射線感受性の高い組織として知られている。原子力施設から放出されるトリチウム水(HTO)や、研究室で細胞動態の解析に用いられるトリチウムサイミジン( $[^3\text{H}]$ TdR)の造血組織における残留状況を観察することは、トリチウム $\beta$ 線の内部被ばくによる造血機能障害を評価する上での重要な基礎データを提供する。 $[^3\text{H}]$ TdRの造血組織における残留については、細胞動態解析の立場から $[^3\text{H}]$ TdR投与後比較的短時間について観察されているが、保健物理的立場から長期間にわたって観察されたものは少ない<sup>2-8)</sup>。また、HTOの造血組織における長期間の残留についても十分な観察がなされているとは言えない<sup>9,10)</sup>。さらに保健物理的な立場から細胞内におけるトリチウム $\beta$ 線の分布を考えると、DNAや蛋白質などの高分子に取り込まれたトリチウムの存在が特に注目される<sup>10-13)</sup>。本研究では、HTOや $[^3\text{H}]$ TdRをマウスの静脈内に投与し、骨髄・脾臓における総トリチウム活性、ならびにTCA難溶性分画・TCA可溶性分画へのトリチウムの取り込みを、投与後56日間にわたって計測し、それぞれの残留曲線を得ることとした。さらに得られた残留曲線を回帰分析することにより、トリチウム $\beta$ 線の線量評価に必要な各種のパラメーターを得ることとした。

## 2. 研究方法

a. 実験動物へのトリチウムの投与：9週令のICR/JCL雄マウスを1群5~8匹として使用した。 $[^3\text{H}]$ TdRは、 $[\text{メチル-}^3\text{H}]$ TdR(比放射能5 Ci/mmol)を生理食塩水に希釈して、マウスの体重1g当り0.5  $\mu$ Ciずつ静脈内投与した。また、HTO(比放射能25 mCi/ml)は生理食塩水にて希釈した後、マウスの体重1g当り5~10  $\mu$ Ciずつ静脈内投与した。

b. TCA難溶性分画の分離：トリチウム投与1時間、4時間、1日、3日、7日、14日、28日、42日、および56日後にマウスを殺処分し、ハンクス液にて大腿骨骨髄(1本/2 ml)と脾臓(1個/8 ml)の細胞浮遊液を作製した。分画する前に骨髄および脾臓の総トリチウム活性を測定するため、細胞浮遊液を0.2 mlずつ採取した。残りの細胞浮遊液を用いて、Bollumらのメンブランフィルタ

ーを用いた吸引濾過法に準じて<sup>14-15)</sup>、TCA難溶性分画測定用の試料を作製した。すなわち、Whatman社製のGF/Cメンブランフィルター(直径24mm)を着装した吸引濾過装置に氷冷5%TCA溶液15 mlを取り、そこへ骨髄または脾臓の細胞浮遊液1 mlを添加し、ゆっくりと吸引濾過した。さらに氷冷5%TCA溶液でフィルターを3回洗浄した後、残余のTCAと水分をアルコールで除去し、TCA難溶性分画をフィルター上にトラップした。フィルターは空气中で自然乾燥させ測定に供した。

c. 液体シンチレーションカウンターによる測定：分画する前の総トリチウム活性を含む細胞浮遊液や、TCA難溶性分画をトラップしたフィルターを液体シンチレーション用バイアルにとり、組織溶解剤ソルエン350にて溶解した後、トルエン系シンチレーターを用いて常法により放射能を測定した。TCA可溶性分画は、それぞれの試料の総トリチウム活性からTCA難溶性分画をさし引くことにより、計算上で求めることとした。

## 3. 結果

$[^3\text{H}]$ TdRまたはHTO投与後56日間にわたるトリチウムの骨髄(大腿骨1本)・脾臓における残留曲線を、分画する前の総トリチウム活性・TCA難溶性分画・TCA可溶性分画にわけて図1と図2に示した。縦軸は、マウス1匹に投与したトリチウムの量を100%とした時の各時点・各分画に存在するトリチウムの量をパーセントで示してある。

a. 総トリチウム活性の変化： $[^3\text{H}]$ TdR投与群では、投与1時間後で骨髄・脾臓の総トリチウム活性は最大値を示し、それぞれ投与量の0.1361%、1.0361%であった。以後の総トリチウム活性の経時的変化は、脾臓に比べて骨髄の方が若干速い速度で減少する傾向にあった。一方、HTO投与群でも投与1時間後に骨髄および脾臓の総トリチウム活性は最大値を示し、それぞれ投与量の0.0492%、0.2296%であった。以後の総トリチウム活性の経時的変化は、骨髄と脾臓とでほぼ同じ速度で減少する傾向にあった。

b. TCA難溶性分画の変化： $[^3\text{H}]$ TdR投与群では、初期に比較的急速に多量のトリチウムがTCA難溶性分画に取り込まれた。すなわち、骨髄では投与1日後に、脾臓では投与1時間後にTCA難溶性分画に取り込まれたトリチウムが最

大値を示し、それぞれ投与量の 0.0904%, 0.7240% であった。最大値に達した後は投与14日後まで比較的速く減少し、それ以降はゆっくりと減少した。各時点で存在する総トリチウム活性に対する

TCA難溶性分画の寄与を図3に示した。投与1時間後では骨髄の58%, 脾臓の71%をTCA難溶性分画が占めており、投与初期において総トリチウム活性の約  $\frac{2}{3}$  がTCA難溶性分画に取り込

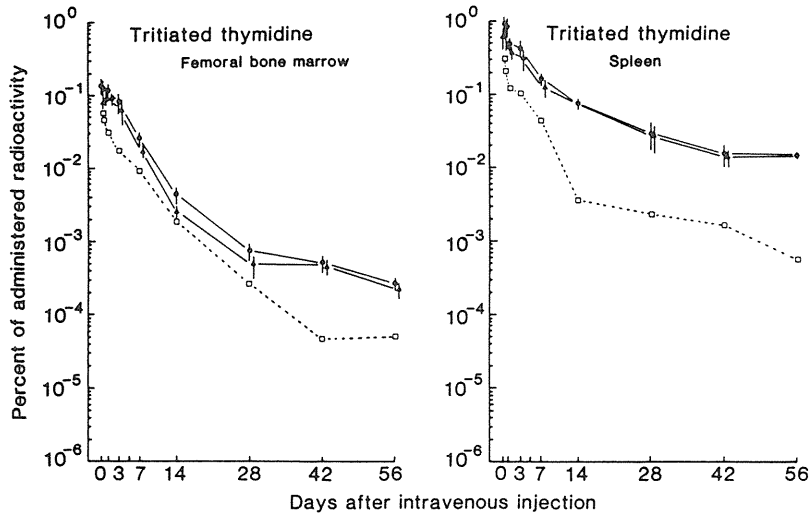


図1.  $[^3\text{H}]$  サイミジン静脈内投与後のマウス骨髄・脾臓におけるトリチウムの残留曲線 (●—●: 総トリチウム活性, ▲—▲: TCA 難溶性分画, □··□: TCA 可溶性分画)

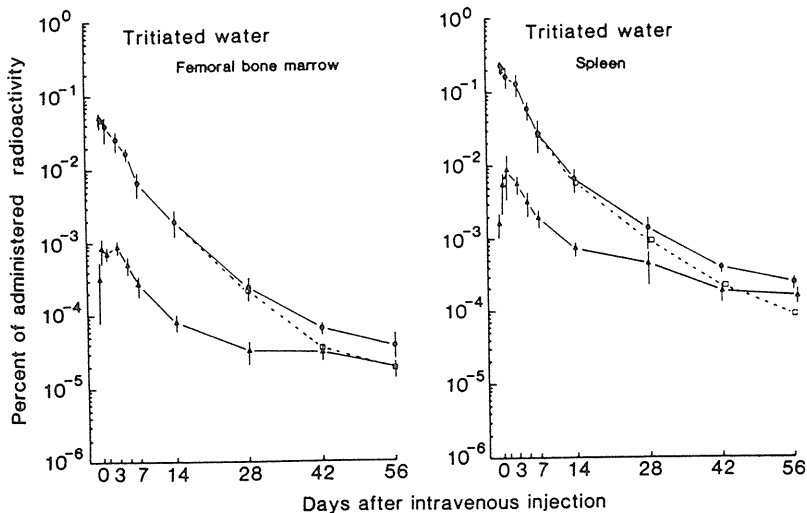


図2.  $\text{HTO}$  静脈内投与後のマウス骨髄・脾臓におけるトリチウムの残留曲線 (●—●: 総トリチウム活性, ▲—▲: TCA 難溶性分画, □··□: TCA 可溶性分画)

まれている事が明らかとなった。それ以降は多少の変動はあるものの、骨髄・脾臓に存在するトリチウムの大半はTCA難溶性分画に存在しているものであった。一方、HTO投与後にTCA難溶

性分画に取り込まれるトリチウムの量は、当初時間の経過とともに増加し、骨髄では投与3日後、脾臓では投与1日後に最大値に達し、以後は2相性の指数関数で減少するようであった。しかしそ

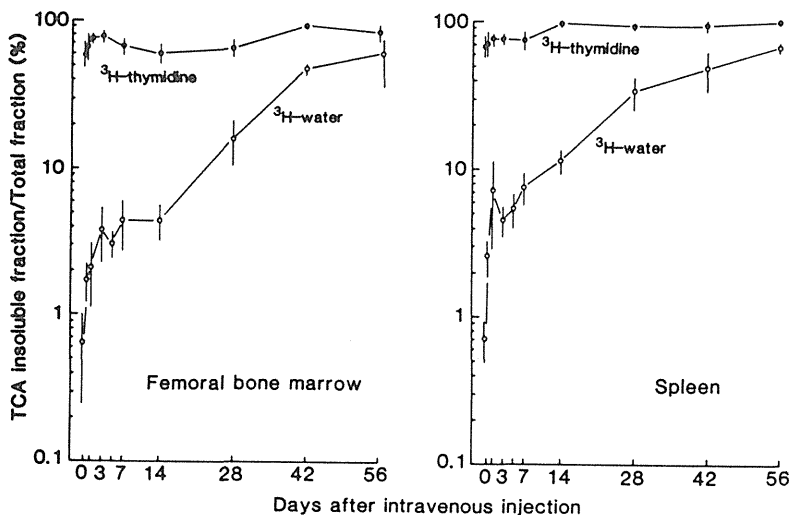


図3. [ $^3\text{H}$ ]サイミジンまたはHTO静脈内投与後の骨髄および脾臓における総トリチウム活性に対するTCA難溶性分画の割合(%)

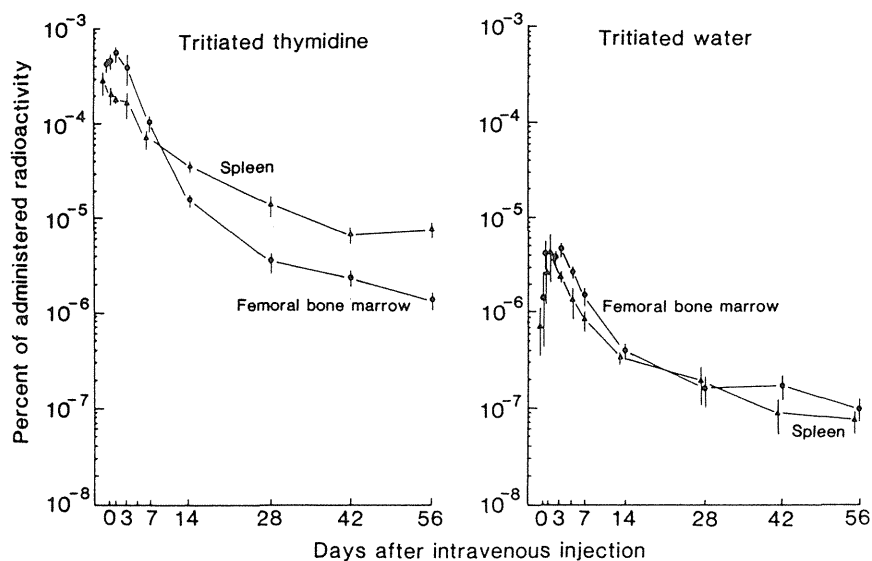


図4. [ $^3\text{H}$ ]サイミジンまたはHTO静脈内投与後の骨髄および脾臓の $10^5$ 個の有核細胞当りのTCA難溶性分画に存在するトリチウム量の変化

の最大の取り込みが認められた時点においてさえも、骨髄では投与量の0.0009%が、脾臓では0.0087%がTCA難溶性分画に存在するにすぎなかった。HTO投与1時間後においては、骨髄と脾臓のTCA難溶性分画に取り込まれるトリチウムは、それぞれの総トリチウム活性の1%以下であった。しかし時間の経過とともに総トリチウム活性が減少していくと、総トリチウム活性に占めるTCA難溶性分画の割合は増加し、投与56日後においては骨髄の58%、脾臓の64%がTCA難溶性分画に存在していた。

c. TCA可溶性分画の変化：総トリチウム活性からTCA難溶性分画をさし引いて計算上で得られた部分をTCA可溶性分画として、図1と図2に点線で示した。〔<sup>3</sup>H〕TdR投与1時間後では総トリチウム活性の約1/3はTCA可溶性分画に存在した。この時点で骨髄と脾臓のTCA可溶性分画に存在するトリチウムは最大値を示し、それぞれ投与量の0.0571%と0.3121%であった。一方、HTO投与1時間後では、骨髄・脾臓ともに総トリチウム活性の99%以上がTCA可溶性分画に存在した。この時点で骨髄と脾臓のTCA可溶性分画に存在するトリチウムはそれぞれ投与量の

0.0488%、0.2280%で最大値を示した。TCA可溶性分画に存在するトリチウムも2相性の指数関数に従って減少する傾向を示した。

d. 残留曲線の回帰分析：〔<sup>3</sup>H〕TdR投与群・HTO投与群の骨髄・脾臓のいずれにおいても、TCA難溶性分画・TCA可溶性分画に存在するトリチウムは、その最大値に達した後、投与14日後までの間は比較的急速に減少し、それ以降はゆっくりと減少する傾向を示した。そこで、トリチウムの減少は最大値から2相性の指数関数に従って減少するものとして残留曲線の回帰分析を行なった<sup>16)</sup>。表1には、各成分へのトリチウムの取り込みの最大値、最大値に達するまでの投与後の時間、および回帰分析の結果得られた各成分における生物学的半減期が示してある。例えば、〔<sup>3</sup>H〕TdR投与群の骨髄中TCA難溶性分画に存在するトリチウムの残留は次のごとくである。すなわち、TCA難溶性分画に存在するトリチウムは〔<sup>3</sup>H〕TdR投与1日後に最大値に達し投与量の0.0904%となり、それ以降は、 $R(t) = 0.1394e^{-0.3110t} + 0.0012e^{-0.0290t}$ なる2相性の指数関数に従って減少する。したがって、0.0904%のTCA難溶性分画の99.1%が2.2日の生物学

表1. 〔<sup>3</sup>H〕サイミジンまたはHTO静脈内投与後のマウス骨髄・脾臓におけるトリチウムの残留関数

Fraction	Organ	Peak value (%)*	Peak time	Retention function
<b>Tritiated thymidine</b>				
Total	Femoral marrow	0.1361	1 hr.**	$0.985e^{-0.693t}/2.56 + 0.015e^{-0.693t}/18.79$
	Spleen	1.0361	1 hr.**	$0.931e^{-0.693t}/3.22 + 0.069e^{-0.693t}/28.48$
TCA insoluble	Femoral marrow	0.0904	1 day	$0.991e^{-0.693t}/2.23 + 0.009e^{-0.693t}/23.90$
	Spleen	0.7240	1 hr.**	$0.913e^{-0.693t}/3.64 + 0.087e^{-0.693t}/30.46$
TCA soluble***	Femoral marrow	0.0571	1 hr.**	$0.978e^{-0.693t}/2.81 + 0.022e^{-0.693t}/11.80$
	Spleen	0.3121	1 hr.**	$0.968e^{-0.693t}/2.63 + 0.032e^{-0.693t}/16.47$
<b>Tritiated water</b>				
Total	Femoral marrow	0.0492	1 hr.**	$0.972e^{-0.693t}/2.66 + 0.028e^{-0.693t}/10.34$
	Spleen	0.2296	1 hr.**	$0.971e^{-0.693t}/2.33 + 0.029e^{-0.693t}/11.21$
TCA insoluble	Femoral marrow	0.0009	3 day	$0.960e^{-0.693t}/1.89 + 0.040e^{-0.693t}/22.43$
	Spleen	0.0087	1 day	$0.924e^{-0.693t}/1.78 + 0.076e^{-0.693t}/18.52$
TCA soluble***	Femoral marrow	0.0488	1 hr.**	$0.961e^{-0.693t}/2.62 + 0.039e^{-0.693t}/7.98$
	Spleen	0.2280	1 hr.**	$0.960e^{-0.693t}/2.25 + 0.040e^{-0.693t}/8.19$

\* 投与量を100%とした時のパーセント

\*\* 投与後、最初の測定値

\*\*\* 総トリチウム活性からTCA難溶性分画をさし引いて求めた値

の半減期で、残りの 0.9% が 23.9 日の生物学的半減期で減少することとなる。

図 4 には、骨髄および脾臓の  $10^5$  個の有核細胞当りの TCA 難溶性分画に存在するトリチウムの量が示してある。〔 $^3\text{H}$ 〕TdR 投与群においては、骨髄・脾臓ともに投与初期には投与量の  $10^{-4}$  % のレベルであったものが時間の経過とともに  $10^{-6}$  % のレベルへと減少している。一方、HTO 投与群では、有核細胞  $10^5$  個当りの TCA 難溶性分画に存在するトリチウム量は少なく、〔 $^3\text{H}$ 〕TdR 群よりも 1~2 桁程度おちていた。

#### 4. 考察

HTO や 〔 $^3\text{H}$ 〕TdR として体内に侵入したトリチウムの一部は、蛋白質・DNA・RNA・脂質などといった高分子に取り込まれることが知られている<sup>10~13)</sup>。本研究では放射線高感受性組織である造血系に注目して、分画する前の総トリチウム活性・TCA 難溶性分画・TCA 可溶性分画に存在するトリチウムの量を、HTO や 〔 $^3\text{H}$ 〕TdR 投与後 56 日間にわたり測定しそれぞれの残留曲線を求め、線量評価に必要な各種パラメーターを得ることとした。

本研究で用いた吸引濾過法によると<sup>15)</sup>、氷冷 TCA で洗滌しヌクレオチドやアミノ酸などの低分子物質を濾過した後にメンブランフィルター上にトラップされる TCA 難溶性分画には、核酸・蛋白質・脂肪といった高分子物質に取り込まれたトリチウムが存在しているものと考えられる。特に 〔 $^3\text{H}$ 〕TdR 投与後に急速に減少する TCA 難溶性分画の第一成分は、DNA に取り込まれた 〔 $^3\text{H}$ 〕TdR の動きを反映しているものと思われる。また、TCA 難溶性分画のうちゆっくりと減少する第二成分は、DNA 以外の高分子物質や、長寿命の DNA 合成細胞<sup>17)</sup> に取り込まれたトリチウムの存在を示している。さらに TCA 可溶性分画には、HTO として存在するトリチウム・低分子物質に取り込まれたトリチウム・サイミジンそのものとして存在するトリチウムなどが含まれているものと考えられる。

〔 $^3\text{H}$ 〕TdR 投与直後の 1 時間後においては、骨髄および脾臓に存在するトリチウムのうち約 2/3 は TCA 難溶性分画に取り込まれていた。この TCA 難溶性分画のうち骨髄では 99% が、脾臓では 91% がそれぞれ 2.2 日と 3.6 日の半減期で減少した。これらの半減期の値は、Blackwell<sup>8)</sup> や

Feinendegen ら<sup>7)</sup> が測定した DNA 分画中に存在するトリチウムの半減期の値と類似しており、〔 $^3\text{H}$ 〕TdR 投与後に TCA 難溶性分画に存在するトリチウムは DNA に取り込まれたトリチウムを反映しているものとの考えを支持する結果となった。〔 $^3\text{H}$ 〕TdR 投与後の脾臓においては、TCA 難溶性分画のゆっくりと減少する第二成分に取り込まれるトリチウムが多少存在することが注目された。〔 $^3\text{H}$ 〕TdR 投与当初においては、骨髄・脾臓に存在するトリチウムの約 1/3 は TCA 可溶性分画に認められた。この TCA 可溶性分画に存在するトリチウムの約 97% は骨髄では 2.8 日、脾臓では 2.6 日の半減期で減少した。この半減期は水の半減期に近く、多くの研究者が指摘しているように<sup>4, 18~20)</sup>、〔 $^3\text{H}$ 〕TdR 投与直後に生体内で 〔 $^3\text{H}$ 〕TdR が加水分解された結果生じた HTO の動きを反映しているものと考えられた。

HTO 投与 1 時間後においては、骨髄と脾臓に存在するトリチウムの 99% は TCA 可溶性分画に認められた。この可溶性分画の 96% は、骨髄では 2.6 日、脾臓では 2.3 日の半減期で減少した。この半減期は Lambert らの報告した値<sup>9)</sup> とほぼ一致しており、水そのものの動きを示すものと考えられた。HTO 投与後にも TCA 難溶性分画に存在するトリチウムが認められた。HTO 投与後の時間の経過とともに、総トリチウム活性に占める TCA 難溶性分画の割合は増加していったが、HTO 投与後に TCA 難溶性分画に取り込まれたトリチウムの量は最大の時点においてさえも骨髄で投与量の 0.0009%、脾臓では 0.0087% と極めて低いものであった。そこで、HTO 投与後の造血組織における吸収線量の推定に際しては、水の動きそのものを考えさえすればよいものと思われる。

#### 5. 結論

トリチウムの内部被ばくによる造血器障害について、線量評価に必要な基礎データを得る目的で、マウスに HTO または 〔メチル- $^3\text{H}$ 〕TdR を静脈内投与した。投与後 56 日間にわたって骨髄および脾臓におけるトリチウムの取り込みを、総トリチウム活性・TCA 難溶性分画・TCA 可溶性分画にわけて計測した。得られた残留曲線について、2 成分の指数関数モデルをあてはめて回帰分析を行い、線量評価に必要なパラメーターを得た。

a. [メチル-<sup>3</sup>H] TdR 投与群においては、分画する前の総トリチウム活性は骨髄・脾臓ともに投与直後（1時間後）に最大値を示し、投与量の0.1361%が大腿骨（1本）骨髄に、1.0361%が脾臓に分布していた。当初（投与1時間後）、骨髄と脾臓ともに総トリチウム活性の約 $\frac{2}{3}$ はTCA難溶性分画に存在した。骨髄でのTCA難溶性分画は投与1日後に投与量の0.0904%と最大値を示した後、その99.1%が2.2日、0.9%が23.9日の半減期で減少した。一方、脾臓でのTCA難溶性分画は投与1時間後に投与量の0.7240%と最大値を示した後、その91.3%が3.6日、8.7%が30.5日の半減期で減少した。投与1時間後の総トリチウム活性の約 $\frac{1}{3}$ はTCA可溶性分画に存在し、骨髄ではその97.8%が2.8日、2.2%が11.8日の半減期で、脾臓ではその96.8%が2.6日、3.2%が16.5日の半減期で減少した。TCA可溶性分画に存在したトリチウムは、[メチル-<sup>3</sup>H] TdR投与直後に体内で加水分解により生じたHTOに由来するものであらうと考えられた。

b. HTO投与群の骨髄（大腿骨1本）と脾臓における総トリチウム活性も投与直後（1時間後）に最大値を示し、それぞれ投与量の0.0492%、0.2296%が存在した。当初（投与1時間後）、骨髄と脾臓ともに総トリチウム活性の99%はTCA可溶性分画に存在し、骨髄ではその96.1%が2.6日、3.9%が8.0日の半減期で減少し、脾臓ではその96%が2.3日、4%が8.2日の半減期で減少した。HTO投与後に骨髄と脾臓のTCA難溶性分画に取り込まれたトリチウムは、最大でそれぞれ投与量の0.0009%、0.0087%と極めて少量でしかなかった。

以上の実験結果から次の結論を得た。

1) 静脈内投与された[メチル-<sup>3</sup>H] TdRの約 $\frac{1}{3}$ は投与直後に加水分解されHTOとなる。残りの約 $\frac{2}{3}$ は高分子化合物に取り込まれるが、骨髄と脾臓とでは若干異なった半減期で減少する。

2) 静脈内投与されたHTOのほとんどはTCA可溶性分画に存在して水としての行動をとり、骨髄と脾臓ではほぼ同じ半減期に従って減少する。したがって、HTOの摂取に由来する造血組織の線量は、HTOの水としての残留のみを考慮して推定してよいものと考えられた。

## 参考文献

- 1) Hughes, W. L., Commerford, S. L., Gitlin, D., Krueger, R. C., Schultze, B., Shah, V. and Reilly, P.: Studies on deoxyribonucleic acid metabolism in vivo. I. Cell proliferation and death as measured by incorporation and elimination of iododeoxyuridine. *Fed. Proc.*, **23**, 640-648, 1964.
- 2) Feinendegen, L. E.: General factors influencing the incorporation of exogenous precursors in intact organisms, exemplified mainly for the case of nucleic acids. in *Tritium-Labeled Molecules in Biology and Medicine*, pp.237-307, Academic Press, New York, 1967.
- 3) Bond, V. P., Feinendegen, L. E. and Cronkite, E. P.: Stability of RNA and DNA in bone marrow cells demonstrated with tritiated cytidine and thymidine. in *Tritium in Physical and Biological Sciences*, pp.277-289, IAEA, Vienna, 1961.
- 4) Steel, G. G.: The use of direct tritium assay techniques in studies with tritiated thymidine. in *Tritium in Physical and Biological Sciences*, pp.349-359, IAEA, Vienna, 1961.
- 5) Steel, G. G. and Lamerton, L. F.: The turnover of tritium from thymidine in tissues of the rat. *Exp. Cell. Res.*, **37**, 117-131, 1965.
- 6) Feinendegen, L. E., Bond, V. P. and Hughes, W. L.: Physiological thymidine reutilization in rat bone marrow. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **122**, 448-454, 1966.
- 7) Feinendegen, L. E., Heiniger, H. J., Friedrich, G. and Cronkite, E. P.: Differences in reutilization of thymidine in hemopoietic and lymphopoietic tissues of the normal mouse. *Cell. Tissue. Kinet.*, **6**, 573-585, 1973.
- 8) Blackwell, L. H. and Ledney, G. D.: Bone marrow cellularity in normal and polycythemic mice estimated by DNA incorporation of <sup>3</sup>H-TdR. *Exp. Hematol.*, **10**, 514-523, 1982.

- 9) Lambert, B. E. and Clifton, R. J.: Radiation doses resulting from the administration of tritiated folic acid and tritiated water to the rat. *Br. J. Radiol.*, **40**, 56-61, 1967.
- 10) Commerford, S. L., Carsten, A. L. and Cronkite, E. P.: The turnover of tritium in cell nuclei, chromatin, DNA and histone. *Radiat. Res.*, **92**, 521-529, 1982.
- 11) Commerford, S. L., Carsten, A. L. and Cronkite, E. P.: The distribution of tritium in the glycogen, hemoglobin and chromatin of mice receiving tritium in their drinking water. *Radiat. Res.*, **72**, 333-342, 1977.
- 12) Major, Z.: Incorporation of tritium into organic compounds of brain. *Int. J. Radiat. Biol.*, **37**, 455-458, 1980.
- 13) Saito, M., Streffer, C. and Molls, M.: Tritium distribution in newborn mice after providing mothermice with drinking water containing tritiated thymidine. *Radiat. Res.*, **95**, 273-297, 1983.
- 14) Bollum, F. J.: Thermal conversion of non-priming deoxyribonucleic acid to primer. *J. Biol. Chem.*, **234**, 2733-2734, 1959.
- 15) Mizuno, S.: Preparation of nucleic acids. in *Separation and Measurement of Nucleic Acids*, pp.60-67, Tohdai Press, Japan, 1973.
- 16) ICRP Report 30: Metabolic data for hydrogen. in *Limits for Intakes of Radionuclides by Workers*, pp.65-68, Pergamon Press, England, 1978.
- 17) Cronkite, E. P., Robertson, J. S. and Feinendegen, L. E.: Somatic and teratogenic effects of tritium. in *Tritium*, eds. Moghissi, A. A. and Carter, M. W., Messenger Graphics Publ., U. S. A., 1973.
- 18) Rubini, J. R., Cronkite, E. P., Bond, V. P. and Fliedner, T. M.: The metabolism and fate of tritiated thymidine in man. *J. Clin. Invest.*, **39**, 909-918, 1960.
- 19) Lambert, B. E. and Clifton, R. J.: Radiation doses resulting from the injection of tritiated thymidine by the rat. *Health Physics*, **15**, 3-9, 1968.
- 20) Hughes, W. L., Bond, V. P., Brecher, G., Cronkite, E. P., Painter, R. B., Quastler, H. and Sherman, F. G.: Cellular proliferation in the mouse as revealed by autoradiography with tritiated thymidine. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **44**, 476, 1958.

(2) マウス骨髓多染性赤血球の小核形成に対する  
トリチウムβ線の効果

鹿島正俊, 福津久美子 (障害基礎研究部)  
上島久正 (養成訓練部)  
松平寛通 (生物研究部)

**Induction of Micronuclei in Polychromatic  
Erythrocytes of Mice after Injection  
of Tritiated Thymidine and Tritiated Water**

Masatoshi Kashima, Kumiko Fukutsu, Hisamasa Joshima\* and Hiromichi Matsudaira\*\*  
Division of Radiation Hazards  
\*Training School, \*\*Division of Biology

The cytogenetic effects of tritium  $\beta$ -rays were studied by micronucleus test with polychromatic erythrocytes in the femoral marrow. RFM/Nrs male mice, aged 7-13 weeks, were injected intravenously with methyl- $^3\text{H}$ -thymidine (methyl-TdR),  $6\text{-}^3\text{H}$ -thymidine ( $6\text{-}^3\text{H}$ -TdR) or tritiated water (HTO). To estimate RBE of tritium  $\beta$ -rays, mice were given continuous  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -radiation with a decreasing dose rate. Animals were sacrificed 2 or 3 days after exposure to tritium  $\beta$ -rays or  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -rays for the micronucleus test. The absorbed dose to bone marrow from  $^3\text{H}$ -thymidine was calculated from the number of nucleated cells in the femoral marrow, tritium labeling index, specific activity, biological half time, disintegration per nucleus per unit time and mass of nucleus.

When mice were injected with 0.025 mCi/g of HTO, significant increase in micronucleus

was observed. The dose-effect curves of micronuclei induction were found to be almost linear both for  $^3\text{H}$ -TdR  $\beta$ -rays and  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -rays. However, curves for HTO were bending continuously upward with an initial slope higher than that of  $\gamma$ -rays. RBE values of tritium  $\beta$ -rays relative to  $\gamma$ -rays for micronucleus induction were found to be approximately 1.4-1.6 for methyl- $^3\text{H}$ -TdR and 1.1-1.6 for  $6\text{-}^3\text{H}$ -TdR, respectively, at 2 days after injection. Those of HTO  $\beta$ -rays were estimated to be 2.2-2.7 for 2-day- and 3-day- exposure. The values obtained in this study were in good agreement with those of other investigators. Therefore, the micronucleus test with polychromatic erythrocytes in the femoral marrow was found to be one of the sensitive indicators to evaluate the hazard from exposure to tritium  $\beta$ -rays.



## 1. 緒言

本研究の目的は、トリチウムの内部被曝による造血器障害について実験動物を用いて *in vivo* の立場から検討を加え、ヒトのトリチウム内部被曝障害評価に有用な基礎的データを得ることにある。このために、放射線による造血器障害の定量的指標としてすぐれている骨髄の多染性赤血球小核形成率を指標として、トリチウムβ線の効果を観察した。さらに、トリチウムの内部被曝と類似した外部連続被曝実験を行い、トリチウムβ線の生物学的効果比 (RBE) を得ることとした。

## 2. 研究方法

a. 実験動物へのトリチウムの投与：7～13週令のRFM雄マウスを1群5～7匹として使用した。用いたトリチウム線源は、〔メチル-<sup>3</sup>H〕サイミジン (〔メチル-<sup>3</sup>H〕TdR)、〔6-<sup>3</sup>H〕サイミジン (〔6-<sup>3</sup>H〕TdR) およびトリチウム水 (HTO) の3種類である。〔メチル-<sup>3</sup>H〕TdR (比放射能 20 Ci/mmol) 又は〔6-<sup>3</sup>H〕TdR (比放射能 19.3 Ci/mmol) は生理食塩水にて希釈し、マウスの体重 1 g 当り 0.85 μCi から 4.5 μCi ずつ静脈内投与した。HTO (比放射能 100 mCi/ml) は生理食塩水にて希釈し、マウスの体重 1 g 当り 0.025 から 0.2 mCi ずつを静脈内投与した。

b. 内部被曝線量の推定：〔メチル-<sup>3</sup>H〕TdR、〔6-<sup>3</sup>H〕TdR、HTO 投与 2 日後ないし 3 日後にマウスを殺処分し、大腿骨骨髄・脾臓・血清・尿を採取し、液体シンチレーションカウンターにてトリチウム放射能を測定した。骨髄の内部被曝線量の推定は、骨髄での放射能・比放射能と、骨髄有核細胞数とそのトリチウム標識率、および骨髄の揮発性トリチウム分画の値 (前報 IV-2-1 参照) などから NCRP, No. 63 を参考にして行われた。

c. 骨髄の多染性赤血球小核形成率の観察：〔メチル-<sup>3</sup>H〕TdR、〔6-<sup>3</sup>H〕TdR、HTO 投与 2 日ないし 3 日後に大腿骨骨髄の細胞浮遊液を作製し、Schmidらの方法<sup>1)</sup>を改良して観察試料を作製した。すなわち、骨髄細胞浮遊液から浮遊細胞遠心法により smear 標本を作製し、Wright・Giemsa 染色により染色した。予備的検討として大腿骨骨髄と脾臓の多染性赤血球と正染性赤血球を観察した結果、骨髄の多染性赤血球の小核形成

率で再現性のよい線量効果関係が得られたので<sup>2,3)</sup>、以後は骨髄の多染性赤血球小核形成率の変化を中心に観察することとした。

d. 生物学的効果比 (RBE) の推定：トリチウムβ線の RBE を推定するために、<sup>137</sup>Cs (10Ci) の外部線源を用いて r 線連続照射を行い、骨髄の多染性赤血球小核形成率の変化をトリチウム投与群のそれと比較検討した。この際、〔メチル-<sup>3</sup>H〕TdR、〔6-<sup>3</sup>H〕TdR、HTO の骨髄での生物学的半減期 (IV-2-1 参照) に対応させて、外部連続照射の線量率を 1 日ごとに変化させることとした。

## 3. 結果

a. 骨髄における内部被曝線量の推定：液体シンチレーションカウンターによる放射能測定の結果、大腿骨骨髄におけるトリチウムの半減期は、〔メチル-<sup>3</sup>H〕TdR で 70 時間、〔6-<sup>3</sup>H〕TdR で 55 時間、HTO では 42 時間と推定された。〔メチル-<sup>3</sup>H〕TdR 静脈内投与 2 日後での大腿骨骨髄での吸収線量を推定した結果は、2 μCi/g 群が 30 rad、3 μCi/g 群が 37 rad、4 μCi/g 群が 52 rad となった。〔6-<sup>3</sup>H〕TdR 投与群の大腿骨骨髄における吸収線量は、〔メチル-<sup>3</sup>H〕TdR の場合と大差がなかった。一方、HTO 投与 2 日後では、0.05 mCi/g 群で 27 rad、0.1 mCi/g 群で 58 rad、0.2 mCi/g 群では 98 rad であった。さらに、HTO 投与 3 日後の 0.025 mCi/g、0.05 mCi/g、0.1 mCi/g、0.2 mCi/g 群における骨髄の吸収線量はそれぞれ 16、31、68、129 rad となっていた。

b. トリチウム内部被曝による骨髄多染性赤血球の小核形成率の変化：非照射群における大腿骨骨髄の多染性赤血球小核形成率は 0.177～0.218 % 程度であった。〔メチル-<sup>3</sup>H〕TdR 投与 2 日後においては、2 μCi/g 群で 0.923%、3 μCi/g 群で 1.041%、4 μCi/g 群で 1.293% と、投与量の増加に伴い、小核形成率の増加をみた。また〔6-<sup>3</sup>H〕TdR 投与 2 日後の小核形成率は、2 μCi/g、3 μCi/g、4 μCi/g 投与群においてそれぞれ、0.584%、0.820%、1.030% と、〔メチル-<sup>3</sup>H〕TdR 投与群に比べ若干低めの小核形成率が認められた。一方 HTO 投与 2 日後では、0.05 mCi/g 群、0.1 mCi/g 群、0.2 mCi/g 群でそれぞれ 0.895%、1.367%、1.642% の小核形成率が認められた。さらに、HTO 投与 3 日後での小核形成

率は、0.025 mCi/g 群で 0.591%，0.05 mCi/g 群で 0.831%，0.1 mCi/g 群で 1.094%，0.2 mCi/g 群で 1.431%であった。

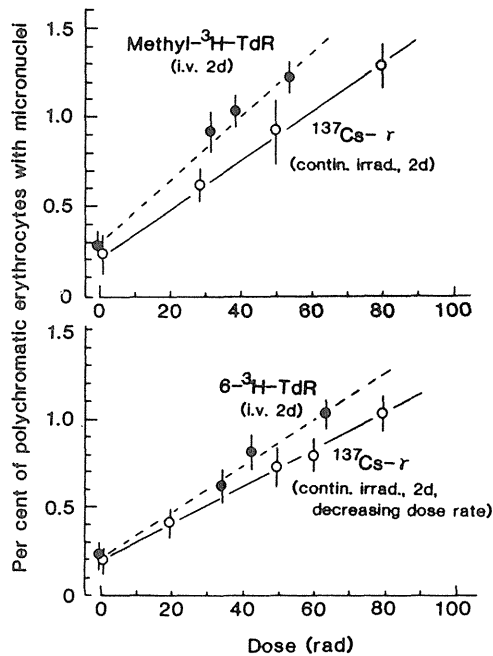


図1. トリチウムサイミジン投与およびγ線連続照射2日後の、多染性赤血球小核形成率と吸収線量との関係

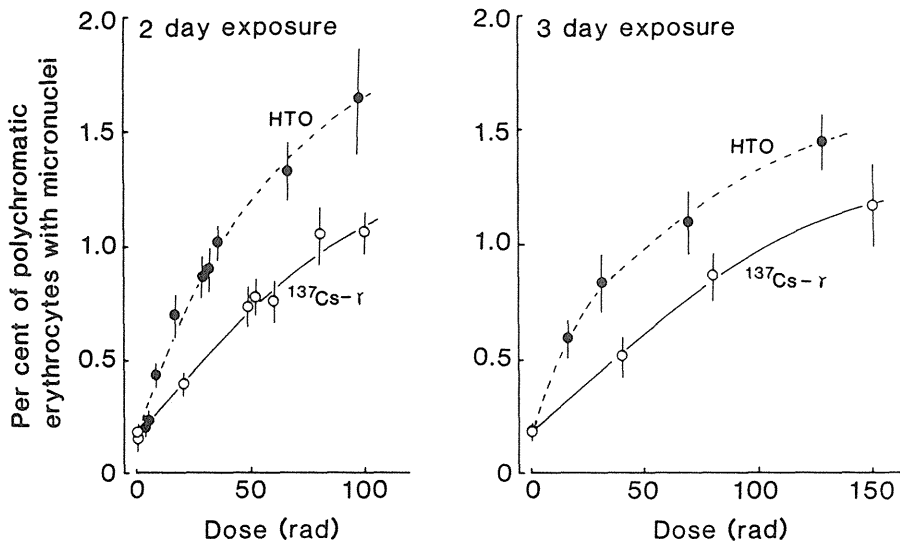


図2. トリチウム水投与およびγ線連続照射2日後および3日後における多染性赤血球小核形成率と吸収線量との関係

c. トリチウムβ線の生物学的効果比 (RBE) の推定：図1には、〔メチル-<sup>3</sup>H〕TdRまたは〔6-<sup>3</sup>H〕TdR投与2日後における小核形成率の変化を、<sup>137</sup>Csの外部連続照射の結果と対比しながら示してある。rad当りの効果比を<sup>137</sup>Csγ線照射を1とすると、〔メチル-<sup>3</sup>H〕TdRのβ線のRBEは2 μCi/g, 3 μCi/g, 4 μCi/g 群でそれぞれ1.61, 1.55, および1.39となり、低い線量域ほど高いRBE値となる傾向を認めた。また〔6-<sup>3</sup>H〕TdRのβ線のRBEも1.06~1.59の範囲となり、〔メチル-<sup>3</sup>H〕TdRの場合とほぼ同等であった。図2には、HTO投与2日後および3日後における小核形成率の変化を示してある。HTOのβ線のRBEは2.2~2.7の範囲にあったが、特に50 rad以下の低線量域では高いRBE値が得られた。ただ、図2の曲線はカーブ・フィッティングしたものではない。

#### 4. 考察

小核試験は、化学物質のin vivoにおける変異原性を容易に検出する方法としてSchmidらにより発表された。我々はX線を全身照射したマウスを用いて、造血組織の吸収線量と相関する指

標を検索した結果、比較的低線量域における生物効果として、赤芽球段階の被曝による染色体切断数を反映する多染性赤血球の小核形成率の変化がすぐれた指標となりうることを確認し、その再現性のよい測定法を確立した<sup>2,3)</sup>。

多染性赤血球の小核形成率の変化から得られたトリチウム $\beta$ 線のRBEは、[メチル- $^3\text{H}$ ]TdRで1.39～1.61、[6- $^3\text{H}$ ]TdRで1.06～1.59、HTOで2.2～2.7の範囲であった。一方、StorerらはHTOの $\beta$ 線のRBEを、脾臓の萎縮を指標にした場合に1.4、胸腺の萎縮を指標にした場合に1.6、 $^{59}\text{Fe}$ の赤血球への取り込みを指標にした場合には1.7と報告している<sup>4)</sup>。またDobsonは、マウスの卵細胞に対する致死作用の実験から、低線量域においてはHTOの $\beta$ 線のRBEが最大3にまでなることを示唆している<sup>5,6)</sup>。さらにRussellらは、マウスの精祖細胞および精母細胞の遺伝子突然変異を観察した結果、HTOの $\beta$ 線のRBEをそれぞれ0.7と2.2と報告している<sup>7)</sup>。これらの実験と我々の実験とは、指標として用いた生物効果はもとより、HTOの投与量および投与後の観察時期も異なっている。しかしながら、小核形成を指標にした我々の実験結果はこれらの他研究者の結果の範囲内におさまっており、骨髄の多染性赤血球の小核形成率の変化が放射線の線量効果関係を精度よく示し、トリチウムによる内部被曝の障害評価に有用な指標になりうる事が明らかとなった。結果の一部は文献8に詳述している<sup>8)</sup>。

[ $^3\text{H}$ ]サイミジンのRBEがHTOにくらべ低くなった理由は、前者での吸収線量の計算が複雑で、得られた値が実際よりも過大評価されているためと考えられる。小核の形成には、骨髄の幹細胞のうちかなり分化した細胞か、赤芽球の障害が関係すると思われる。これらの細胞の吸収線量の推定は、とくに[ $^3\text{H}$ ]サイミジンの場合難しく、今後に残されている。

## 5. 結論

トリチウム水やトリチウム標識化合物の内部被曝による障害評価のための基礎データを得る目的で、マウスの骨髄多染性赤血球における小核形成率の変化を観察し、以下の結果を得た。

a. HTO投与群においては、0.025 mCi/g群において小核形成率の有意の上昇を認めた。[メチル- $^3\text{H}$ ]TdR投与群、[6- $^3\text{H}$ ]TdR投与群、

HTO投与群のいずれにおいても、骨髄での線量と小核形成率との間に正なる線量効果関係が認められた。

b.  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ 線に対するトリチウム $\beta$ 線のRBEは、[メチル- $^3\text{H}$ ]TdRで1.39～1.61、[6- $^3\text{H}$ ]TdRで1.06～1.59、HTOでは2.2～2.7となった。これらのRBEは、これまでに報告されている他の研究者の結果と類似していた。

c. 以上の結果から、骨髄の多染性赤血球における小核形成率の変化は、トリチウムの内部被曝による障害評価を行なう上で有用な指標となりうる事が判明した。

## 参考文献

- 1) Schmid, W.: The micronucleus test. *Mutat. Res.* **31**, 9-15 (1975).
- 2) 鹿島正俊, 上島久正: 放射線による小核試験法の吟味 I. 試料調整法および染色法について, 第93回日本獣医学会, 東京, 1982, 4.
- 3) 鹿島正俊, 上島久正: 放射線による小核試験法の吟味 II. 試験動物および組織について, 第94回日本獣医学会, 東京, 1982, 10.
- 4) Storer, J. B., Harris, P. S., Furchner, J. E. and Langham, W. H.: The relative biological effectiveness of various ionizing radiation in mammalian systems. *Radiat. Res.* **6**, 188-288, 1957.
- 5) Dobson, R. L. and Cooper, M. F.: Tritium toxicity; Effect of low-level  $^3\text{HOH}$  exposure on developing female germ cells in the mouse. *Radiat. Res.* **58**, 91-100, 1974.
- 6) Dobson, R. L.: Low-level chronic exposure to tritium, an improved basis for hazard evaluation. in *Biological and Environmental Effects of Low-Level Radiation*, Vol. II, pp. 57-63, IAEA, Vienna, 1976.
- 7) Russell, W. L., Cumming, R. B., Kelly, E. M. and Phipps, E. L.: Induction of specific-locus mutations in the mouse by tritiated water. in *Behaviour of Tritium in the Environment*, pp.489-497, IAEA, Vienna, 1979.
- 8) Kashima, M., Joshima, H. and Fukutsu, K.: Induction of micronuclei and some other abnormalities in mouse bone marrow following tritium exposure. *Proc. of the Second*

*Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics.* eds. Matsudaira, H., Yamaguchi, T. and Etoh, H., NIRS-M-52, pp.246-257, 1985.

y

### 3. トリチウムの被ばくによる哺乳類 の初期発生の障害に関する研究

山田 武, 湯川修身, 浅見行一, 中沢 透\*

(生物研究部, \*現東邦大学理学部)

## Effects of Tritium $\beta$ , $^{60}\text{Co}$ $\gamma$ or X Radiation on Preimplantation Mouse Development *in Vitro*

Takeshi Yamada, Osami Yukawa, Kouichi Asami and Tohru Nakazawa\*  
Division of Biology, \*Faculty of Science, Toho University

Pre-implantation mammalian embryos are highly radiosensitive. Comparing the effects on mammalian embryos of tritium radiation with those from other radiations at low dose, therefore, is of special importance from the view point of radiation protection. To this end, we have established a highly efficient culture system of mouse zygotes fertilized *in vitro* which allow them to develop to the expanded blastocyst stage, using BC3F<sub>1</sub> mouse strain.

Sensitivity of mouse zygotes to X-rays or to UV was found to vary markedly depending on the time of irradiation. Zygotes at early pronuclear stage show the highest sensitivity (LD<sub>50</sub>: 40 R). RBE values for tritium  $\beta$  radiation relative to  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  rays were examined by using damage to blastocyst formation (LD<sub>50</sub>) and chromosome aberrations at the 1st cleavage metaphase as endpoints. The values obtained were within the range of 1 to 2.

#### 1. 緒言

哺乳類胚および胎児は放射線感受性が高く、低線量の放射線の照射により胚の死や奇形が生じる。中でも着床前期の胚は、死を指標とした場合とくに感受性が高く、極低線量の放射線被ばくにより胚が死に至る。したがって、哺乳類初期胚に対する放射線影響の定量的研究は、低線量放射線のリスク推定にとって不可欠な研究分野である。

着床前期の中でも、受精直後から卵割期の胚がもっとも感受性が高いことが、1960年代から報告されていた。だが胚の直接観察が困難なこの時期については、リスク推定に必須な放射線影響の定量的な実験が少なかった。1970年代から実用

化され始めた胚の試験管内培養技術は、着床前期胚の直接観察を可能とし、さらに母胎の影響を介せず胚への放射線の直接影響を見る道を開いた。

本研究は、発生障害の定量的解析を可能とするマウス初期胚の培養法を確立し、トリチウムの哺乳類初期胚への低線量放射線の影響の線量効果関係を測定し、核融合開発にともなって大量に発生することが予想されるトリチウムのリスク評価に資することを目的とする。

#### 2. 研究方法

1970年代以前の研究において、哺乳類胚はその発生の初期ほど放射線感受性が高いことが知られていた<sup>1)</sup>。さらに試験管内培養法が導入されて、

放射線感受性が胚発生のステージによって異なるのみならず、同一ステージ内においても細胞周期の進行にともなって大きく変動することが判明した<sup>2)</sup>。この変動の大きさは、ステージ間の差よりもむしろ大きく、哺乳類初期胚の放射線感受性を論じる場合、発生のステージのみならずステージ内のいかなる時期に照射を行ったかを確定しておかねばならない。

ところが、放射線感受性がもっとも高いとされている1-細胞期胚、すなわち受精卵では、母胎内での自然発生の場合、正確な受精の時刻は不明である上、排卵も数時間の幅を持って生じる。したがって、1-細胞期内の放射線感受性の変動を測定することは、交配直後の雌マウスを照射する従来の方法では不可能であった。

そこで受精の時刻を制御でき、かつ受精後正確な時間に照射を行うことが出来る体外受精法すな

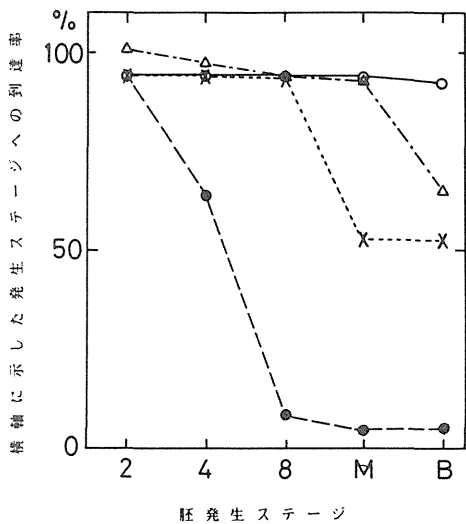


図1. 試験管内受精卵の胚盤胞形成率・マウス系統差による差異。

精子はICR系雄より採取した。テキストに詳述した方法により試験管内受精・培養し、横軸に示した発生ステージ(2:2-細胞期;4:4-細胞期;8:8-細胞期;M:桑実期;B:胚盤胞期)までの形成率を測定した。○-○:BC3F<sub>1</sub>;

×-×:C3H;△-△:RFM;---:ICR

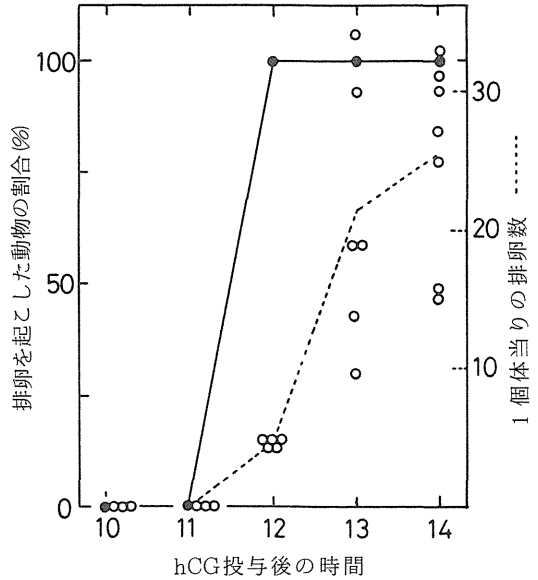


図2. 放医研BC3F<sub>1</sub>系マウスの誘導排卵。

PMSの投与後48時間にhCGを、いずれも7IU投与し、横軸に示した時間に排卵を起したマウスの割合(左縦軸%)と、その排卵数(右縦軸、1個体当りの卵の数)を調べた。

わち試験管内受精法を用いることにした。しかし、1-細胞期胚の培養は、2-細胞後期以降の胚に比べて格段に難しく、その上試験管内受精胚の培養の成功率は極めて低かった。そのため、放射線影響の定量的解析に用いることができる、成功率の高い安定した試験管内受精法・培養法の確立から実験を開始した。

a. 試験管内受精法・培養法: 試験管内受精卵の培養は、せまい至適条件下、ある限られた系統のマウスでしか成功していない。排卵を実験に合わせて集中させ、かつ多数の卵を得るため、人為的に脳下垂体ホルモンを投与して排卵を起こさせる誘導排卵法により、通常卵を採取する。受精法・培養法は豊田らの方法<sup>3)</sup>を用い、その培養液に10μMのEDTAを加えたところ、安定して高率の培養成績を得ることができた<sup>4)</sup>

マウスの系統については放医研にて入手できる数種について調査したところ、C3HとC57BLの一代雑種である、BC3F<sub>1</sub>がもっとも良い結果であった(図1)。誘導排卵に対する反応は系統

により大きく異なることが知られている。用いたBC3F<sub>1</sub>では、図2に示すごとく、ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン投与後15時間で1個当り20個以上の排卵を得ることを確認したので、実験には総てこの方法を用いた。

このように試験管内受精法・培養法として豊田らの方法の改良法、卵子供与系統としてBC3F<sub>1</sub>、精子をICR系より採取する方法により、試験管内受精卵を胚盤胞期まで90%以上の高率にて培養できる系を確立した。

《方法の概要》 12週令以上のBC3F<sub>1</sub>系雌マウスに馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG, 三共臓器製)、ついで48時間後ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン(hCG, 三共臓器製)をそれぞれ個体当り5-10 IUを投与する。hCG投与より15時間後(通常実験日の朝9時)卵管膨大部より卵子塊を採取し、培養液内に移す。動物の屠殺から卵の培養液への投入までの時間は短時間で行う。

培養液の組成を表1に示す。水の純度が最も重要で組織培養用高純度水を使用直前コールツガラス器で再度蒸留した超高純度水を用いる。

受精及び培養は35mmプラスチックシャーレ内で、パラフィンオイルに覆われた培養液内で行う(Brinsterの微小滴培養法)<sup>5)</sup>。受精には0.4, 培養には0.1mlの液を用い、実験前日より炭酸ガス培養器内に静置して温度(37℃)、気相(5%CO<sub>2</sub>, 95%空気)を平衡させておく。

精子は12週令以上のICR系雄マウスの精巢上

体尾部より採取し、1時間の培養により受精能獲得(capacitation)を起こさせ直ちに受精に用いる。卵子塊の入っている培養液中に受精能獲得の終わった精子液を加えることにより(精子濃度100-150/ml)受精を行う。

約5時間後第二極体の放出を観察して受精を確認する。健康な卵の受精率は98%以上である。混在する卵丘細胞や精子を分離するため、解剖顕微鏡下微小ガラスキャピラリーピペットで受精卵のみを培養用小滴に移す。

以後の培養は2-細胞期以降のマウス初期胚の培養法と同じである。培養液微小滴として0.05-0.1mlの量を用い、1小滴当り20-30の胚を入れて胚盤胞まで培養する。37℃で培養された受精卵は、受精後15時間で雌雄それぞれの前核から別々に染色体が形成され(雌雄前核の融合はない)、17時間で最初の卵割となる。2-細胞期は20時間と長い、以後11-12時間の細胞周期で卵割を繰り返す、3日目に桑実期、4-5日で正常胚の90%以上が胚盤胞に達する(図3)。

b. 放射線照射: 照射はすべてin vitro すなわち培養液中にて行った。X線急照射は島津信愛5号深部治療用装置を用い、20mA, 200kVp, Cu 0.5mm + Al 0.5mm フィルターの条件にて、線量率150-200 R/minで照射した。

トリチウムβ線のRBE測定のために、<sup>60</sup>Co-γ線の緩照射を行った。線量計校正用50Ci <sup>60</sup>Co線源からの距離可変の台の上に炭酸ガス培養器設置し、マウス胚の培養を続けながらトリチウムβ線の線量率に合致させた線量率にて、トリチウムβ線照射と同一期間、<sup>60</sup>Co-γ線の緩照射を行った。マウス胚吸収線量は、胚培養用と全く同一な条件の培養液小滴内に、放医研物理研究部にて校正済みのTLD(LiF熱ルミネッセンス線量計)を置き、同一条件で5個のTLDを測定して、その平均値をもって吸収線量とした。

トリチウム水による胚の吸収線量は、胚の含水率を70%と仮定して、Dobsonの式<sup>6)</sup>、すなわち1μCi/ml 当たり0.7×0.291=0.204 rad/dayの吸収があるものとした。

c. LD<sub>50</sub>の測定: 前核期あるいは卵割期に照射を受けても大線量ではないかぎり桑実期までは達する。照射を受けた胚では、胚盤胞期に至って、図4に見られるような異常が観察される。正常異常の胚盤胞は顕微鏡観察により容易に視認できるから、正常胚盤胞への発生の可非をもって胚

表1. 試験管内受精, 受精能獲得ならびに胚盤胞期までの培養のための培養液

受精能獲得と試験管内受精		胚盤胞期までの培養
NaCl	119.4	72.1
KCl	4.78	4.78
CaCl <sub>2</sub>	1.71	—
Ca lactate	—	1.71
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19	1.19
MgSO <sub>4</sub>	1.19	1.19
NaHCO <sub>3</sub>	25.07	25.07
Glucose	5.56	5.56
Na pyruvate	1.0	0.30
Na lactate	—	30.0
EDTA <sup>a</sup>	0.01	0.01mM
BSA <sup>b</sup>	4	4 mg/ml
Penicillin	100	100
Streptomycin	50	50 U

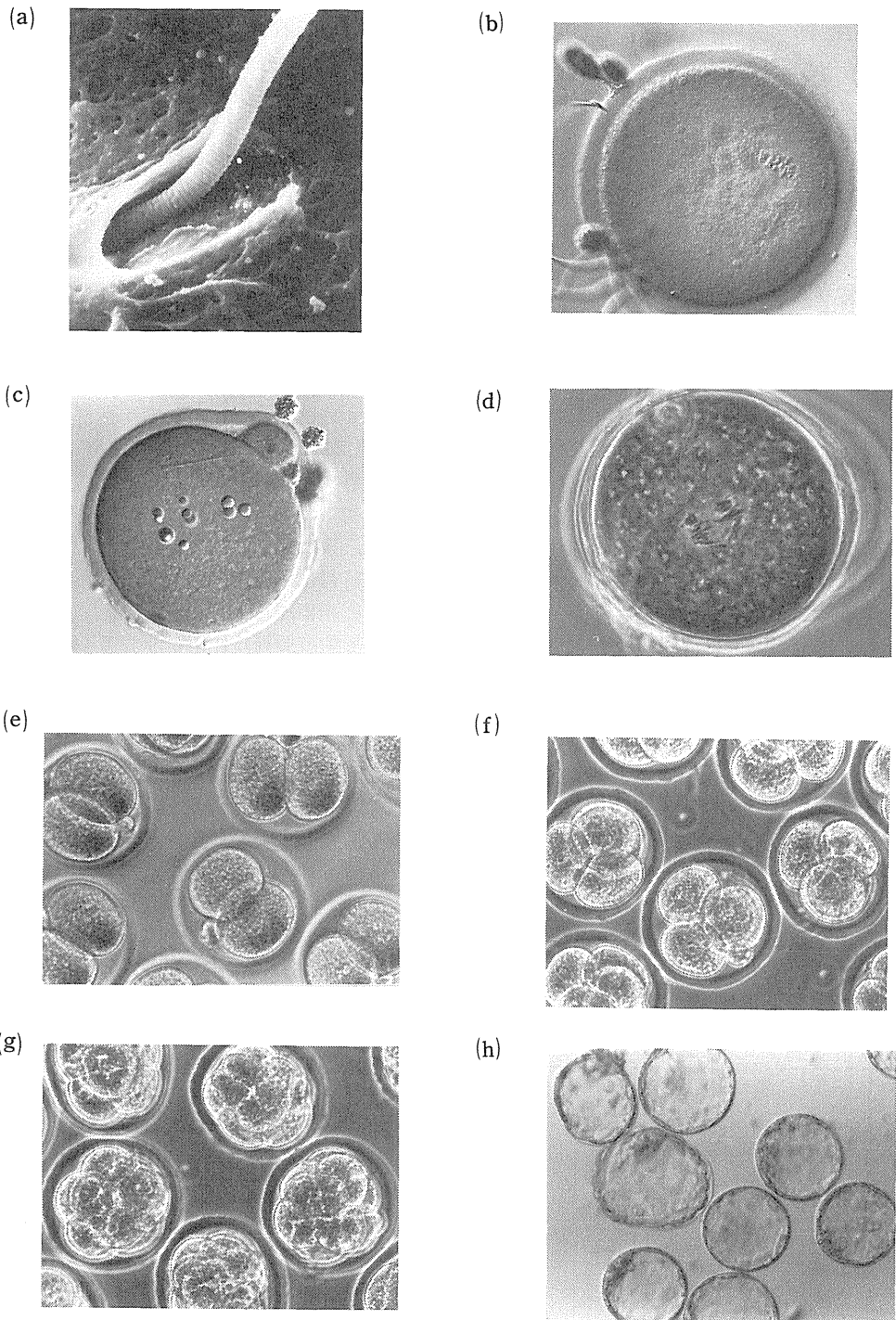


図3. 試験管内受精胚の発生。a. 受精の瞬間の走査電顕写真。b. 受精の瞬間のノマルスキー顕微鏡写真。第2減数分裂をしつつある卵子染色体が見える。c. 前核期受精卵。d. 第1卵割の終期。e. 2-細胞期。f. 4-細胞期。g. 8-細胞期。h. 胚盤胞期。



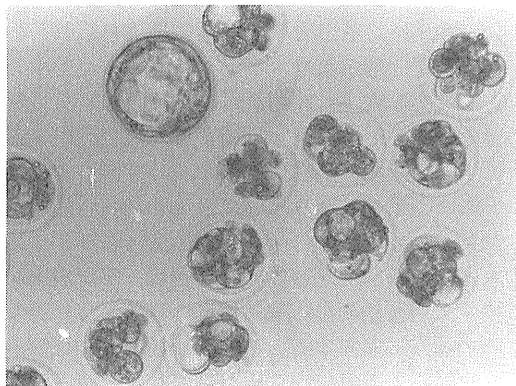


図4. 異常胚盤胞。

の生死を判定した。

胚盤胞発生率(%)をプロビット変換後、コンピュータ(NEC PC 8001)・プログラム(自作)によりLD<sub>50</sub>を求めた。

### 3. 結果

a. 前核期胚の放射線感受性：マウス試験管内受精卵を受精から第1卵割の間、任意の時刻にX線急照射を行い、胚盤胞期まで培養してLD<sub>50</sub>を求め、1-細胞期内の放射線感受性の変動を測定した<sup>7)</sup>。

受精の時刻を正確に制御でき、受精後、細胞周期の進行、胚発生の時間的経過が明確に観察することが可能であり、その上任意の時間に照射ができる試験管内受精胚を用いて初めて、受精卵(1-細胞期胚)の受精直後から第1卵割まで(受精直前の卵子、精子を含む)の放射線感受性の変動を測定することができた(図5)。

受精後4-5時間の前核形成初期にLD<sub>50</sub>は40Rとなり、1-細胞期胚は最も高い放射線感受性を示す。その後発生の進行に伴い感受性は次第に低下し、受精後12時間の前核形成終期(S期末)にLD<sub>50</sub>は400Rとなる。以後第1卵割に向かって感受性は再び上昇する。このパターンは、よく知られた培養細胞の場合と本質的に同じであり、2-細胞期胚について観察された結果<sup>2)</sup>とよく一致した。

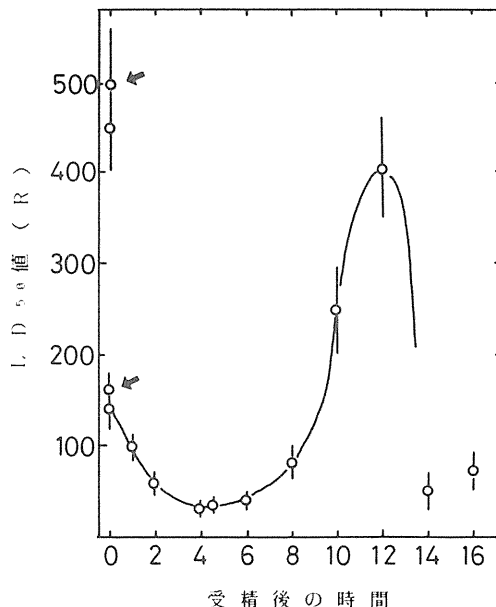


図5. マウス試験管内受精卵の放射線感受性。

横軸に示した受精後の時間に各種線量のX線を照射し、胚盤胞期まで培養して胚盤胞形成率を測定し縦軸に示したLD<sub>50</sub>を求めた。矢印上は受精直前照射した精子と正常卵子を受精させた結果。矢印下は受精直前の卵子と正常精子を受精させた結果。

b. 前核期胚の紫外線感受性：同様に紫外線に対する感受性の変動を測定したところ<sup>8)</sup>、放射線の場合と全く同じ感受性変動パターンが得られた。すなわち、S期初期の前核形成開始期(受精後4時間)に感受性が最も高く、S期終期の受精後12時間に感受性は最低となり、その後また上昇するというパターンである(図6)。

培養細胞の紫外線感受性はS期初期は低く<sup>9)</sup>、この点受精卵は特異的である。この事実は、受精卵における受精後4時間目の高感受性が通常の体細胞(培養細胞)の場合のようにDNA合成周期の進行に関連したのみのものではなく、前核形成という受精卵特有の現象と密接に関連しているものであることを強く示唆する。

前核は卵子核ならびに卵子内に侵入した精子頭部より形成される。とくに精子頭部より形成される雄性前核は、形態・容積の変化はきわめて激し

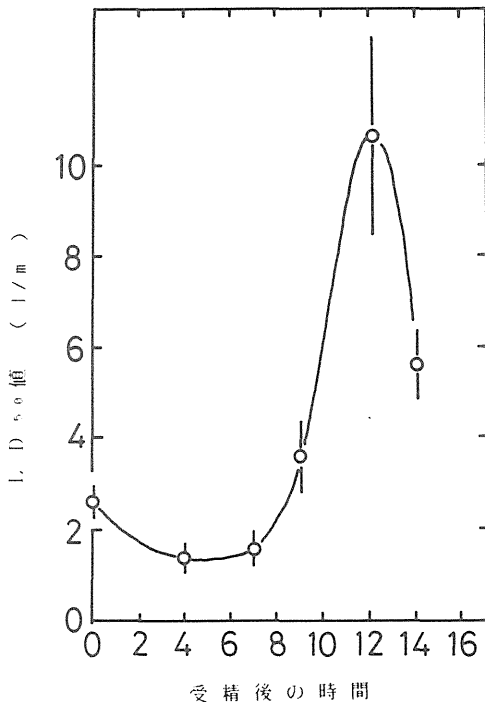


図6. マウス試験管内受精卵の紫外線感受性。横軸に示した受精後の時間に各種線量の紫外線を照射し、胚盤胞期まで培養して胚盤胞形成率を測定し縦軸に示したLD<sub>50</sub>を求めた。

く、受精直後より4時間に至る間に容積は百倍以上に膨大化する。また、核タンパクの組成もこの時大きく変化し、精子内ではなかったヌクレオソーム構造をとるようになる。したがって、受精後4時間の放射線、紫外線高感受性は、このような核構造の特異性と関連していると推定される。

c. 哺乳類受精過程の走査電子顕微鏡観察：試験管内受精系の確立により、これまで困難であった哺乳類受精過程とくに受精に伴う卵子精子の表層構造の経時的微細変化の観察が可能となった。

卵表層構造の観察を妨害する卵丘細胞は hyaluronidase 処理により、卵黄膜観察の際には pronase 処理により透明層を除去した。受精後経時的に受精卵を glutaraldehyde により固定、さらに osmium tetroxide により後固定した。リジン処理したカバーガラスに固定した卵を付着安定させ、ethanol, isoamylacetate シ

リーズにより脱水、臨界点乾燥の後イオンスパッターリング装置により金蒸着を行い、JOEL-LSM-F7型走査電子顕微鏡により観察した<sup>10)</sup>。

未受精卵透明層はスポンジ状網状構造を示し、尖体反応を終了した精子頭部の接着により接着部分が一部溶解するように精子侵入口が開く。精子頭部先端の湾曲部背部から必ず侵入する。精子尾部の激しい遊泳運動によって透明層を通過した精子は、まず困卵腔内に尾部を含む精子全体が入る。困卵腔内を移動する精子は、卵黄膜上に密生する粘着性の微絨毛に捕えられるように徐々に卵黄膜内に陥入する。この際、精子は頭部のみならず尾部も卵黄膜内に取り込まれる。精子頭部を取り込んだ卵黄膜部は盛り上がり、受精丘を形成する(図7)。

d. 前核期照射による第1卵割の遅延：照射受精卵の観察において最初に気付かれたことは、第1卵割の明瞭な遅延現象であった。そこで、前核期中最も放射線感受性の高い受精後4時間の時点に、12-100RのX線を急照射して第1卵割遅延の線量効果関係を調べた<sup>11)</sup>。

全受精卵を受精後16時間より30分おきに観察し、第1卵割を終了している胚の割合をプロビット変換し、受精後の時間に対してプロットした(図8)。LD<sub>50</sub>解析に使用したと同じコンピュータ・プログラムにより、50%の胚が第1卵割を終了する時間(受精よりの)を求め、その実験群の第1卵割時間とした。それを照射線量に対してプロットしたのが図9である。

12Rの照射により有意な遅延が生じ、第1卵割時間は線量に依存して直線的に増加する。その回帰式は

$$T = 17.75 + 0.06 D \quad (T: \text{第1卵割時間}; D: \text{線量}, R)$$

で表され、1R当たり3.6分の遅延が生じることが明らかとなった。

e. マウス初期胚発生障害を指標としたトリチウム水β線のRBE：トリチウム水の胚への影響を観るには通常妊娠動物を用いるが、この場合には多量の動物と大量のトリチウム水が必要となり、設備の整った専用施設が要求される。

培養胚を用いると1単位の培養液は先述のように数十μlであり、トリチウム水の必要量は妊娠動物を用いる場合の10<sup>-4</sup>~10<sup>-5</sup>でよい。また、動物の必要数も1/20以下に低減できる。マウス

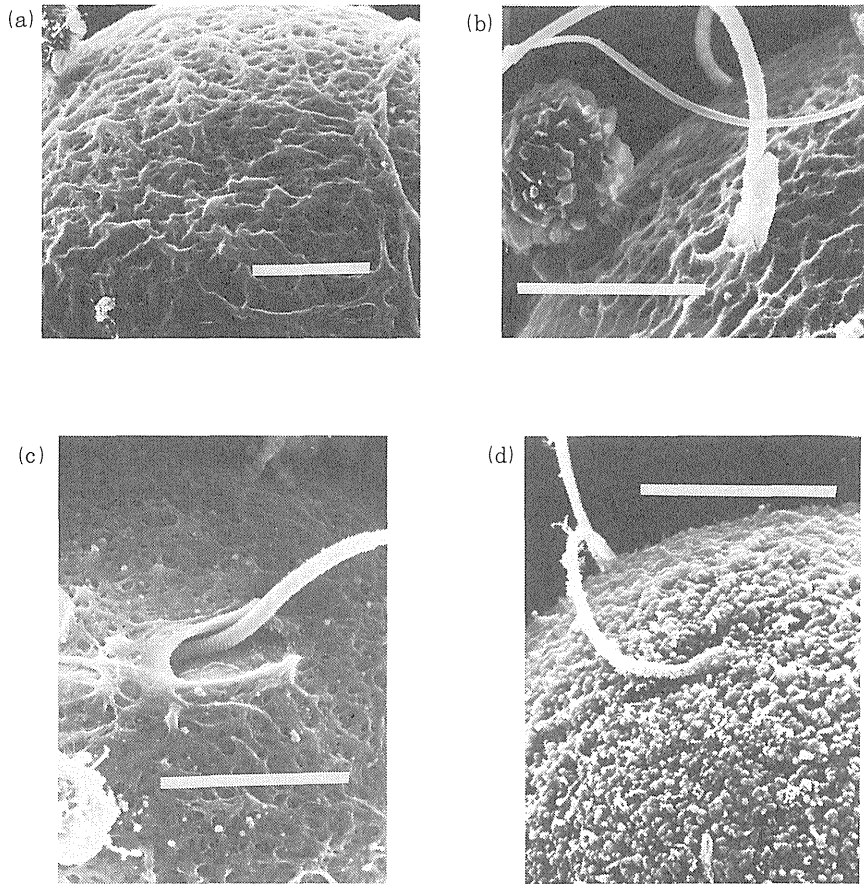


図7. マウス試験内受精の走査電子顕微鏡による観察。

- a. 未受精卵透明層。b. 精子頭部が透明層に接着。
  - c. 精子頭部が卵卵腔に侵入。
  - d. 卵黄膜微絨毛内に取り込まれた精子。
- マーカーは10 $\mu$ mを示す。

試験管内受精・培養系を開発しなければならなかった理由の一つはここにある。

胚のトリチウム水 $\beta$ 線照射は各種濃度のトリチウム水を含む培養液中にて培養することによって行った。その培養の開始時間を①前核形成初期、②2-細胞期初期、③2-細胞期後期との3つに変えて3シリーズの実験を行った。RBE測定のための $^{60}\text{Co}-\gamma$ 線照射も照射開始時期をこれに合せて3シリーズに行った<sup>12-14</sup>。

やはり①の前核期からトリチウム処理を行った胚が最も感受性が高く、吸収線量に換算して約80ラドのLD50値を示した。2-細胞初期②、2

-細胞後期③とトリチウム処理が遅くなるにつれ感受性は次第に低下した。

$^{60}\text{Co}-\gamma$ 線に対するRBEは1から1.7の間であった(図10)。第1卵割期の染色体異常を指標とした場合もRBEは2以下であった<sup>14 15</sup>。

f. 有機型トリチウムのマウス初期胚発生への影響：原子力施設より放出されたトリチウムガス(HT)やトリチウム水(HTO)は、環境中の植物、微生物の代謝により有機結合型トリチウム(OBT)に変化した後人体内に取り込まれる可能性がある。そこで上述した実験系を用いてOBTのマウス初期胚への影響を調べた。

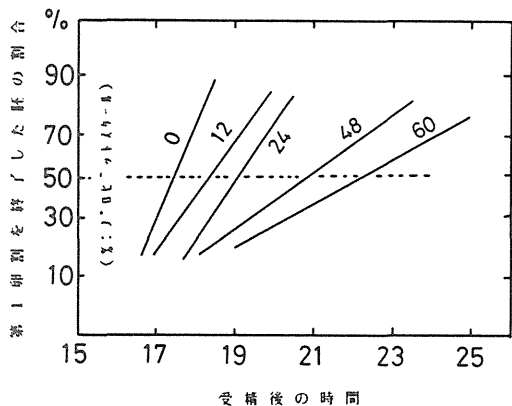


図 8. 前核期初期 X 線照射による第 1 卵割の遅延。第 1 卵割を終了した胚の割合 (%) (縦軸: プロビット・スケール) を観測時間 (受精からの) に対してプロットした。50% の胚が第 1 卵割を終了する時間を求めて、各実験群の第 1 卵割時間とした。各斜線横の数値は照射線量 (R)。

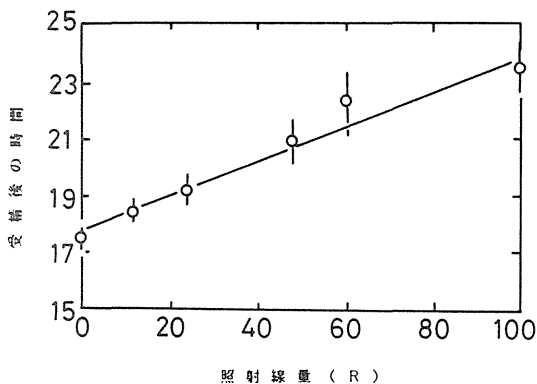


図 9. 前核期照射 X 線線量と第 1 卵割遅延との関係。

図 8. で求めた第 1 卵割時間を前核期照射線量に対してプロットした。卵割遅延時間は線量に依存して増大する。

OB T としてタンパク合成前駆体 (アミノ酸) として  $[^3\text{H}]$  lysine,  $[^3\text{H}]$  arginine, 核酸合成前駆体 (チミジン) として  $[6-^3\text{H}]$  thymidine,  $[\text{methyl}-^3\text{H}]$  thymidine を用い, 10-250 nCi/ml の各種濃度の OB T を含

トリチウム水処理を始めた時期	LD <sub>50</sub> (μCi/ml)	RBE (対 <sup>60</sup> Co-γ線)
受精前前核期①	118	1.1
2-細胞初期②	230	1.7
2-細胞後期③	426	1.3

① S期      ② S期      ③ LD<sub>50</sub>測定  
 -1-細胞期-    -2-細胞期-    胚盤胞

図 10. トリチウム水β線のRBE 培養マウス初期胚の死を指標として

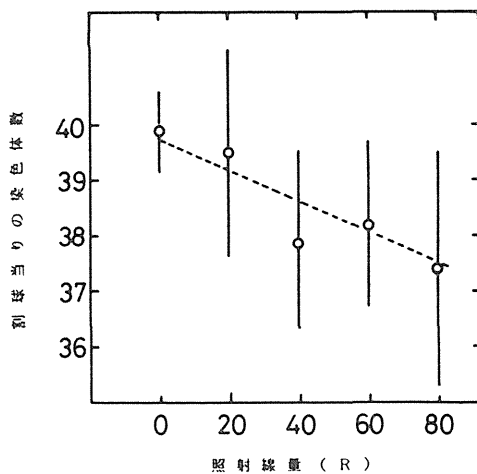


図 11. 第 3 卵割における割球当りの平均染色体数 前核期照射線量との関係。

前核期に X 線照射を受けた胚は、第 3 卵割期に低二倍体性の割球が線量に応じて増加する。

各図において、縦方向の線は S. E. M. を表す。

む培養液にて、前核形成初期より培養して、胚盤胞形成率を求めて LD 50 を測定した<sup>16,17)</sup>。

表 2 に示すように、有機結合型トリチウムはトリチウム水に比較して一般に高率に胚盤胞形成障害を起すが、特に  $[6-^3\text{H}]$  thymidine と  $[^3\text{H}]$  arginine は極めて毒性が強いことがわかった。ただし有機型トリチウムによる吸収線量

表 2. 有機型トリチウムのLD<sub>50</sub>

有機型トリチウム	LD <sub>50</sub>	HTOとの比
[Methyl- <sup>3</sup> H] thymidine	33.0	2.3
[6- <sup>3</sup> H] thymidine	10.7	7.1
[ <sup>3</sup> H] lysine	115	0.66
[ <sup>3</sup> H] arginine	23.4	3.2
HTO	76.0 (rad)	

の計算は、大まかな仮定に基づいており、なお、詳細な研究を現在続行中である。

g. 前核期照射による低二倍体性割球の増加：このマウス試験管内受精・培養系を用いて、前核期照射を受けた胚の第1卵割期における染色体異常が、松田らにより詳しく調べられている<sup>18,19)</sup>。第1卵割期の染色体異常は、全て構造異常であり、胚の死が染色体異常に起因することが推定されていた。

これをさらに確認するために、試験管内受精胚を前核期に照射し、4-細胞期から8-細胞期になる第3卵割における染色体異常を調べたところ、この時期では染色体構造異常は見られなくなり、染色体数が正常の40より少ない低二倍体性の割球が線量に依存して増加していることがわかった<sup>20)</sup> (図11)。

このことから、前核期照射により第1卵割期に染色体構造異常が頻発するが、第2卵割以降構造異常を持った染色体はしだいに細胞より欠落し、低二倍体性割球がしだいに増加すると推定される。低二倍体性の異常な割球の増加は最終的に胚盤胞形成不能な異常胚として発現するものと考えられる。

#### 4. 討論

マウス胚試験管内受精・培養系の確立：本研究の当初の目的であった放射線影響の定量的解析に耐え得る安定したマウス試験管内受精法・培養法は、確立し得たと自負している。成功の要因はこれまでに高率の成功率を持っていた豊田の方法を採用し、卵子供与体としてBC3F1を選んだこと、培養液にEDTAを加えたこと、ならびに実験手技の高速化等にあると考えられる。

この実験系は当研究室のみで可能という極端に高度の熟練を要するものではなく、数日の練習の

後誰でも可能な実験法であり、国内においては大阪大学医学部、三菱化成生命科学研究所、国立遺伝学研究所等において、国外では西ドイツ・Essen大学放射線生物学教室、ベルギー核エネルギー研究所・放射線生物学研究所等において実験に用いられている。

試験管内受精卵を安定に培養し得る系の確立は、放射線生物学領域の研究のみにとどまらず、哺乳類卵子の受精過程、初期発生の研究にも多大の進展をもたらすことが期待される。上述の研究cはその一例であり、現在この試験管内受精卵を用いた発生工学技法の開発が当研究室においても行われつつある。既に試験管内受精胚を仮親子宮内に移植し60%以上の高率で新生仔を得ることに成功している。

前核期胚の放射線感受性：妊娠動物を照射することによって受精卵の放射線感受性をRussell<sup>21)</sup>らは調べている。妊娠日の午前11時が前核期初期に相当するとして最も感受性であり、LD<sub>50</sub>は100Rであった。ところが午後3時半には感受性は低下したことを報告している。

しかし、胚培養法による実験ではこれまで1-細胞期内の放射線感受性の変動を確認した研究は無かった。先述のように受精の時点から培養できる系はこれまで実際上無かったからである。したがって、本研究が培養系において受精卵の放射線感受性を正確に求めた最初のものである。最も感受性の高い受精後4時間の点では、僅か10Rの照射で有意な胚死の増加があることが明らかとなった。

この受精後4時間の点は、S期直前から初期に当るが通常の培養(体)細胞と全く異なり、紫外線に対しても高感受性期である(図6)。結果の項で述べたように受精卵の核構造の特異性の基づくものであろうが、今後の研究による解明を要する興味ある問題である。

トリチウムβ線のRBE：本研究の主目的であったトリチウムの哺乳類胚への影響の定量的評価は、胚の死(胚盤胞形成不能)と第1卵割期の染色体異常という2つの指標を用いて行われた。トリチウム水の場合、いずれの指標をとってもRBEは1よりも大きい2よりも小さいという結論が得られた。マウス初期胚、特に受精卵の発生障害をトリチウムで観たものは他に例が無く、1-細胞期の放射線感受性の報告と合せて1986年の国連報告に引用されている。

本研究により哺乳類着床前期胚の発生障害に着目したトリチウム水の影響については一応の結論は得たものと確信している。有機型トリチウムの影響については研究を続行中である。

## 5. 結論

卵子供与体としてBC 3 F<sub>1</sub>系マウスを用い、培養液に10 μMのEDTAを添加することにより、これまで困難とされていた試験管内受精マウス胚の安定した培養系を確立した。これにより常に90%以上の高率の胚盤胞形成率が得られるようになり、胚盤胞系成立を指標としてマウス初期胚発生に対する放射線の影響の定量的評価が可能となった。その結果、もっとも感受性が高いとされていた受精卵も照射時期によって感受性は大きく変動し、感受性が最も高い前核形成初期では40RのLD<sub>50</sub>値を示した。<sup>60</sup>Co-γ線を対照としたトリチウム水β線のRBEは、1から2の間にあることがわかった。

### 〈謝 辞〉

試験管内受精法ならびに培養法については、東京大学医科研・豊田教授(当時北里大学)、明治学院大学・笠井講師(当時北里大学)に全面的なご指導を頂いた。染色体異常に関する研究は、放医研遺伝研究部松井博士、走査電子顕微鏡観察その他については同障害臨床研究部大山博士にご協力を頂いた。TLDによる線量測定は同物理研究部丸山博士らによって行われた。また、東邦大学学生(当時)の奥山、滝内、奥田、有家の各氏が卒業研究として、上記研究の一部に参加された。実験は、大川、鈴木、中村、犬井、(故)樽松、磯田、森氏らの多大の協力によって行われた。ここに謝意を表します。

## 参考文献

- 1) Russell, L. B. and Russell, W. L.: Analysis of the changing radiation response of the developing mouse embryos. *J. Cell Comp. Physiol. Suppl. 1.* 43, 103-149, 1954.
- 2) Domon, M.: Cell cycle-dependent radiosensitivity in two-cell mouse embryos in culture. *Radiat. Res.*, 81, 236-245, 1980.
- 3) Kasai, K., Minato, Y. and Toyoda, Y.: Fertilization and development *in vitro* of mouse eggs from inbred strains and F<sub>1</sub>

hybrids. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 24, 19-22, 1978.

- 4) 山田武: マウス卵子の試験管内受精と発生, 細胞, 17, 240-244, 1985.
- 5) Brinster, R. L.: A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exptl. Cell Res.*, 32, 205-208, 1963.
- 6) Dobson, R. L. and Kwan, T. C.: The RBE of tritium radiation measured in mouse oocytes: Increase at low exposure levels. *Radiat. Res.*, 66, 615-625, 1976.
- 7) Yamada, T., Yukawa, O., Matsuda, Y. and Ohkawa, A.: Changes in radiosensitivity of the *in vitro* fertilized mouse ova during zygotic stage from fertilization to the first cleavage. *J. Radiat. Res.*, 23, 450-456, 1982.
- 8) Yamada, T., Matsuda, Y., Ohyama, H. and Ohkawa, A.: UV-Sensitivity of the mouse sperm and zygotes fertilized *in vitro*. *Proc. 2nd Workshop on Tritium Radiobiol. and Health Physics. NIRS-M-52* (Eds. Matusdaira, H. et al.) 182-192, 1985.
- 9) Eddington, A.: Implications of cell division cycle studies. in "The cell division cycle temporal organization and control of cellular growth and reproduction." (Eds. Lloyd, D., Poole, R. K. & Edwards, S. W.), pp.419-442, Academic Press, New York, 1982.
- 10) Yamada, T. and Ohyama, H.: Scanning electron microscopic observations of the *in vitro* fertilization of mouse ova. *Proc. XIth Cong. on Electron Microscopy*, Kyoto, 3007-3008, 1986.
- 11) 山田武, 滝内晴美, 奥山幸司, 大山ハルミ: マウス試験管内受精卵のX線照射による卵割遅延. 日本放射線影響学会第28回大会, 講演要旨集, 247, 1985.
- 12) Yamada, T., Yukawa, O., Asami, K. and Nakazawa, T.: Effect of chronic HTO β or <sup>60</sup>Co γ radiation on preimplantation mouse development *in vitro*. *Radiat. Res.*, 92, 359-369, 1982.
- 13) Yamada, T. and Yukawa, O.: Changes in sensitivity of mouse embryos during the

- pronuclear and 2-cell stage. *Proc. EULEP Symp. "Effects of prenatal irradiation with special emphasis on late effects"* (Eds. Streffer, C. & Patrick, G.), Commission of the European Communities, Brussell, pp.5-17, 1984.
- 14) Matsuda, Y., Yamada, T. and Tobari, I.: Chromosomal effects of tritium in mouse zygotes fertilized *in vitro*. *Proc. 2nd Workshop on "Tritium radiobiology and Health Physics" (NIRS-M-52)* (Eds. Matsudaira, H. et al.), 193-206, 1985.
- 15) Yamada, T., Matsuda, Y. Ohyama, H., Takiuchi, H. and Okuyama, K.: RBE of HTO radiation measured by its effects on cultured mouse embryos at preimplantation stage. *Radiat. Protection Dosimetry*, **16**, 151-154, 1986.
- 16) 山田武, 有家則子, 奥田香代, 大山ハルミ: マウス初期胚に対する有機型トリチウムの影響, 日本放射線影響学会第29回大会, 講演要旨集, p.43, 1986.
- 17) Yamada, T., Ohyama, H., Uke, N. and Okuda, K.: Effect of the organically-bound tritium on the preimplantation mouse development. *Proc. 8th Int. Cong. Radiat. Res.*, Vol. 1, p.195, 1987.
- 18) Matsuda, Y., Yamada, T. and Tobari, I.: Studies on chromosome aberrations in the eggs of mice fertilized *in vitro* after X-irradiation. *Mutation Res.*, **148**, 113-117, 1985.
- 19) Matsuda, Y., Tobari, I. and Yamada, T.: Studies on chromosome aberrations in the eggs of mice fertilized *in vitro* after irradiation II. Chromosome aberrations induced in mature oocytes and fertilized eggs at the pronuclear stage following X-irradiation. *Mutation Res.*, **151**, 275-280, 1985.
- 20) 山田武, 有家則子, 奥田香代: 試験管内受精マウス初期胚のX線による染色体異常, 日本動物学会第57回大会予稿集, p.68, 1986.
- 21) Russell, L. B. and Montgomery, C. S.: Radiation sensitivity differences within cell-division cycles during mouse cleavage. *Int. J. Radiat. Biol.*, **10**, 151-164, 1965.

## 4. 培養系を用いたトリチウムによる発がんに関する研究

山口 武雄, 村 磯 知 採, 松 平 寛 通 (生物研究部)  
安 川 美恵子 (生理病理研究部)  
寺 島 東洋三 (所 長)  
坪 井 篤 (障害基礎研究部)

### *In Vitro* Cell Transformation by Tritium Beta-rays

Takeo Yamaguchi, Chidori Muraiso, Hiromichi Matsudaira, Mieko Yasukawa\*,  
Toyozo Terasima\*\* and Atsushi Tsuboi\*\*\*

Division of Biology

\*Division of Physiology and Pathology, \*\*Director General, \*\*\*Division of Radiation Hazards

Cultured mouse C3H 10T1/2 cells in confluency were irradiated with either beta-rays from tritiated water (HTO) or  $^{60}\text{Co}$  gamma-rays. The duration of exposure was 20 h at either 4°C or 37°C, and the total dose was varied by changing the dose rate. HTO-exposure was carried out by adding a required amount of HTO into culture medium and the absorbed dose was calculated using a water content value of 0.84. The value of 0.84 was determined in a mass culture of the cells by using [carboxyl- $^{14}\text{C}$ ]inulin to measure the amount of extracellular water.

The dose-survival and dose-transformation curves for gamma-irradiation at 4°C were nearly the same as those obtained after a single acute X-ray dose (0.5 Gy/min). When gamma-irradiation was administered at 37°C, both the lethality and transformation-induction were lower than

those after the corresponding doses at 4°C, indicating the existence of repair from lethal and transformational damage during irradiation at 37°C. The same effect of temperature was observed in the case of HTO-exposure. The recovery ratios as expressed by the ratio of slopes in the dose-response curve were 2.25 for cell-killing by gamma-rays, 2.31 for cell-killing by beta-rays, 1.65 for transformation by gamma-rays and 1.51 for transformation by beta-rays. The effect per Gy, however, was higher for beta-rays than for gamma-rays in both the responses. Resulting relative biological effectiveness (RBE) values of tritium beta-rays were  $\approx 1.4$  at  $D_0$  for cell-killing and 1.6-1.7 for cell transformation within the dose range examined (1 to 6 Gy of beta-rays), irrespective of the temperature during irradiation.

#### 1. 緒言

国際放射線防護委員会 (ICRP) 勧告における線量当量 (Sv または rem) は, 晩発性の確率的影響と良く結びつく量として定義されている<sup>1)</sup>。従って, 吸収線量 (Gy または rad) から線量当

量への換算係数すなわち線量係数  $\bar{Q}$  の決定には, 発がんを指標とした生物効果比 (RBE) が重視される。近い将来に取扱い量の飛躍的増大が見込まれているトリチウムについて, 発がんの RBE に関する報告が皆無であったのは, 極めて不都合であった。そこで, マウス 10 T 1/2 培養細胞のト



ランスフォーメーション（悪性転換，以下Tf と略す）を指標として，トリチウム水（HTO）の効果を調べ，これと同じ線量率の $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 線の効果とを比較してRBEを求めることにした。

なお，研究開始後の1984年にカナダのグループがラットを用いて，HTOによる乳腺腫瘍の発症率をX線と比較して，1.1-1.3というRBEを得た<sup>2)</sup>。これが我々の予備的発表<sup>3)-5)</sup>以前における，トリチウム発がんを同一線量率の基準放射線と比較してRBEを求めた唯一の報告例である。

さらに，HTOによる線量計算には，細胞の含水量を知らねばならない。ところが，細胞含水量の測定は困難であり<sup>6)</sup>，従来，近似的な値を使用してきた。例えば，広く引用されるDeweyの式<sup>7)</sup>で用いる0.80という値は，Gieseのテキスト<sup>8)</sup>の一文「Water makes 80 per cent of protoplasm」を唯一の根拠としているが，この数値に関する直接の実験的データがあるわけではない。RBE値が，含水量として用いる値に反比例することを考慮すると，培養細胞の含水量を正確に測定しておく必要がある。含水量測定の最大の困難点は，細胞塊中に混入する外液量の補正である。そこで， $^{14}\text{C}$  イヌリンを用いて外液量を測定する方法により細胞含水量の精密測定を行い，HTOによる細胞の吸収線量の計算に用いた。

## 2. 研究方法

a. 細胞培養：Reznikoffら<sup>9)</sup>により開発され，Dr. C. Heidelbergerより贈られたC3H 10T1/2 (clone 8)を用いた。Eagleの基本培地（BME；GIBCO）10%の熱非動化ウシ胎児血清ならびに $1 \times 10^{-8}$  Mの3,3', 5-トリヨードチロニン， $100 \mu\text{IU}/\text{ml}$ のインシュリン（いずれもSigma）， $100 \text{U}/\text{ml}$ のペニシリンおよび $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシン（いずれも明治製薬）を添加して培養液とし<sup>10)</sup>， $37^\circ\text{C}$ で5%  $\text{CO}_2$ +95% 空气中で培養した。

b. 照射：照射は常に培養11日の完全に接触阻害のかかった状態にあるプラトー期の細胞に対して行った。

低線量率 $\gamma$ 線照射は， $1.85 \text{TBq}$  ( $50 \text{Ci}$ )の $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 線源の照射野におかれた温度調節水槽内に密封培養フラスコをおいて行った。水中での線源からの距離を変えて所用の線量率を得た<sup>11)</sup>。照射終了後に，細胞をトリプシン処理し，生存率

およびTf頻度の検定を行った。

HTO処理は，密封培養フラスコ中に所用線量率に応じた比活性になるようにHTO（Radiochemical Centre, Amersham）を加えて行った。照射終了後，新鮮な培養液で充分洗浄した後，生存率およびTf頻度の検定を行った。HTO処理により細胞の受ける線量率は次式により算出した。

$$c \text{ Gy}/\text{h} = (\text{MBq}/\text{ml}) \times 0.329 \times W$$

但し，0.329は換算係数（ $1 \times 10^6$ 崩壊/s/MBq  $\times$   $60 \times 60$  s/h  $\times$   $5.7 \times 10^3$  eV/崩壊  $\times$   $1.62 \times 10^{-19}$  J/eV  $\times 10^5$  cGy/J/g）で，比放射能をmCi/mlで表せば12.16となる。Wは細胞の含水量（ml/g）である。

照射の時間は常に20時間とし，線量率を変えることにより総線量を変えた。照射中の温度は $4^\circ\text{C}$ （照射中に放射線障害の回復がないと予想）または $37^\circ\text{C}$ （照射中に回復が行われると予想）とした。

c. 細胞含水量の測定：HTOによる線量の計算に必要なWを求める。大量培養してプラトー期にある $10 \text{T} 1/2$ 細胞を，トリプシン処理した後（以下水冷状態で操作を行う），馴化培地に再懸濁し，遠沈（ $1,000 \text{rpm}$ ，5分間）により濃密懸濁液（ $2-3 \times 10^7$ 細胞/ml）とし，その $5.0 \text{ml}$ に非放射性イヌリン $5.0 \text{mg}$ を加えてから，[carboxyl- $^{14}\text{C}$ ] inulin（無菌，Dupont/NEN）を $0.50 \mu\text{Ci}$ 加える。再遠沈して細胞ペレットと上清とに分ける（ここまで水冷）。上清のアリコットについて $^{14}\text{C}$ を液シンで計測する。細胞ペレットを秤量管に移し湿量を測定した後，定温乾燥（ $110^\circ\text{C}$ ）する。2時間毎に秤量し，最低到達値を乾量とする。乾燥ペレット中のイヌリンを温水抽出して $^{14}\text{C}$ を計測する。この値と，前述の上清中 $^{14}\text{C}$ 量とから，ペレット中の外液混入量を求める。混入外液の乾量（一定量の馴化培地についての実測値より算出）を補正した細胞正味乾量と，細胞正味湿量とから，細胞含水量を算出した<sup>12)</sup>。

d. 生存率およびTf頻度の検定：詳細は別報<sup>10,13,14)</sup>に記述してある。但し，照射前培養は， $25 \text{cm}^2$ 底面の培養フラスコ（Falcon No. 3013）に $6.5 \times 10^4$ 細胞を播種して行った。

血清の質が放射線誘発Tf頻度を左右することが知られている<sup>13)</sup>ので，前培養と，検定培養の最初の10日間は全実験を通じて同一バッチのウシ胎児血清（GranitロットNo. 100293）を使用した。それ以降はウシ胎児血清の代わりに新生仔ウシ血清

(Flow ロットNo.29122824)用い、毎週培養液を更新して8週間培養を続けた<sup>16)</sup>。

Tf フォーカスのタイピングは Reznikoffら<sup>15)</sup>に従って行った。軟寒天培養ではタイプⅢでないコロニーを作らない<sup>16)</sup>ので、タイプⅢのフォーカスを Tf として数えた。タイプⅢ由来のクローンは免疫抑制条件下の C3H マウスに植込むと悪性腫瘍を作ること確認されている<sup>16)</sup>。

検定培養時の播種細胞の密度による Tf 頻度の変動を避けるために、10cm径の検定シャーレ当たり 200-400 個の範囲内の細胞を播種した。Tf 頻度が  $1 \times 10^{-3}$ /生存細胞より高い場合で約 10,000 コロニーについて、また Tf 頻度が  $2 \times 10^{-4}$ /生存細胞より低い場合で約 50,000 コロニーについて Tf 検定を行った。培養シャーレの数にすると、前者で 25-50 枚、後方で 120-200 枚、中間の Tf 頻度を求めた。

Tf 頻度の算出は、実験結果に Poisson 分布則を適用して行い<sup>13, 17)</sup>、生存細胞コロニー数に対するトランスフォームしたフォーカスの数の比で表した。

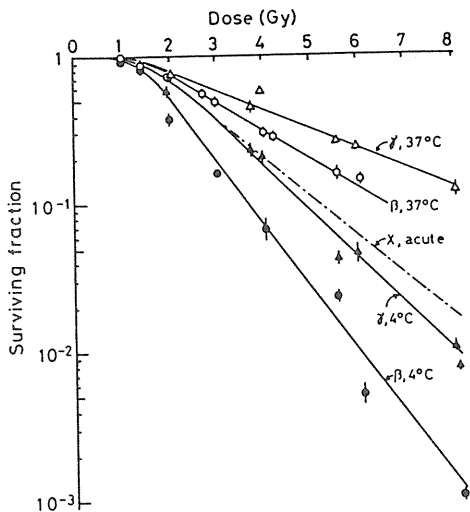


図1. 線量-生存率関係(照射時間はすべて20時間とし、線量率を変えて線量を変化させた。▲:4°Cにおける $\gamma$ 線照射, △:37°Cにおける $\gamma$ 線照射, ●:4°CにおけるHTO- $\beta$ 線照射, ○:37°CにおけるHTO- $\beta$ 線照射。各点は少なくとも3例の平均値, 垂直の短い線はSEM。破線は比較のためにX線急性1回照射の結果を示す)。

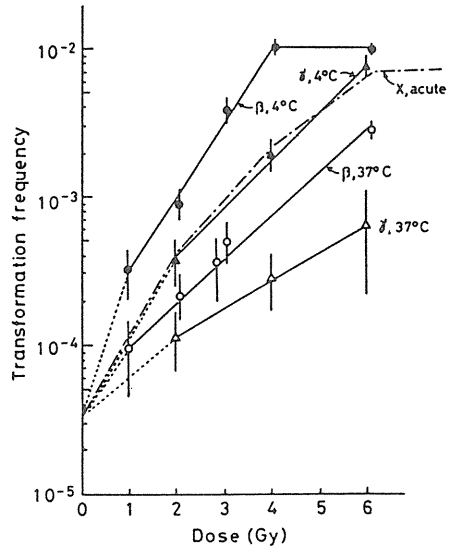


図2. 線量-トランスフォーメーション頻度関係(記号の説明は、図1と同じ。線量0の頻度は、同一条件下での自然発生頻度)。

線量-生存率曲線(図1)および線量-Tf 頻度曲線(図2)とも、片対数グラフの上で一定線量範囲内では直線にフィットするから、最小二乗法を適用して勾配を求め、4°Cと37°Cの勾配の比から回復比を、 $\beta$ 線と $\gamma$ 線の勾配の比から生物効果比(RBE)を求めた。

### 3. 結果

a. 細胞の含水量: 10T1/2細胞の含水量の測定値は  $0.841 \pm 0.014$  (ml/g, 3例の平均値  $\pm$  SEM) となった。同様にして測定した他の培養細胞の含水量もこれと非常に近い値となった。すなわち、HeLa(ヒト子宮頸癌由来):  $0.857 \pm 0.006$ ; JTC12P3(サル腎由来):  $0.832 \pm 0.004$ ; NRK(ラット腎由来):  $0.838 \pm 0.008$ ; L5178Y(マウス白血球リンパ球由来):  $0.844 \pm 0.006$  で、これら5種類の培養細胞の平均含水量は  $0.842 \pm 0.004$  となった。従って、HTOによる線量の計算には、 $W = 0.84$  を用いることにした。

b. 線量-生存率関係: 図1に示すように、生存率Sの対数は線量D(Gy)に対し、始め肩の部分を持ち、以後直線となった。この直線部分に最小二乗法を適用して次式が得られた。

4°Cでの $\gamma$ 線照射： $\ln S = 1.0003 - 0.6988 D$   
 37°Cでの $\gamma$ 線照射： $\ln S = 0.4168 - 0.3092 D$   
 4°Cでの $\gamma$ 線照射： $\ln S = 1.4096 - 0.9971 D$   
 37°Cでの $\gamma$ 線照射： $\ln S = 0.6092 - 0.4318 D$   
 これから、 $D_0$ 値は、 $\gamma$ 線に対しては、4°Cで1.43 Gy, 37°Cで3.23 Gyとなり、 $\beta$ 線に対しては、4°Cで1.00 Gy, 37°Cで231 Gyとなった。

c. 細胞致死に対する照射中の温度の影響：37°Cの低線量率照射では、照射中に放射線損傷が修復され、いっぽう、4°Cでは修復されないであろうと予想して実験を行った。この予想は妥当であったと思われる。すなわち、4°Cでの $\gamma$ 線照射は、X線（50 cGy/h）の急性1回照射とほぼ等しい線量-生存率曲線を生じ、37°Cの $\gamma$ 線照射では、同じ線量の4°C照射に比し生存率がずっと高くなった（図1）からである。37°Cでの $D_0$ 値と4°C $D_0$ 値との比で回復比を表すと、 $3.23/1.45 = 2.25$ となった。

同様な温度効果は、HTOによる $\beta$ 線照射でもみられ、この場合の回復比は、 $2.31/1.00 = 2.31$ となり、 $\gamma$ 線の場合と同様な値となった。このことは、 $^3\text{H}$ の $\beta$ 線でも37°Cでの照射中に放射線損傷の修復が行われることを示している。

d. 細胞致死におけるトリチウム $\beta$ 線のRBE： $\beta$ 線と $\gamma$ 線とにおける $D_0$ の比から求めたRBEは、4°C照射では1.43, 37°C照射では1.39となり、照射中の温度によらず、ほぼ1.4となった。

e. 線量-Tf頻度関係：Tf頻度（TF）の対数は、線量D（Gy）に対し、始め急激に上昇した後、一定の線量域で直線となった（図2）。この直線部分に最小二乗法を適用して次式が得られた。

4°Cでの $\gamma$ 線照射： $\ln TF = -9.2891 + 0.7384 D$

37°Cでの $\gamma$ 線照射： $\ln TF = -9.9580 + 0.4455 D$

4°Cでの $\beta$ 線照射： $\ln TF = -9.2045 + 1.1538 D$

37°Cでの $\beta$ 線照射： $\ln TF = -9.9862 + 0.7623 D$

f. Tf頻度（TF）に対する照射中の温度の影響：放射線誘発Tfに対する照射中の温度の影響は、細胞致死に対するそれと非常によく似ていた。すなわち、4°Cにおける $\gamma$ 線照射の線量-TF曲線は、同一のウシ胎児血清を用いてX線急性1回照射で得られた線量-TF曲線<sup>13)</sup>とほぼ一致し、また、37°Cでの $\gamma$ 線照射によるTFは、4°Cでの同一線量の $\gamma$ 線照射によるTFより顕著に低くなった（図2）。細胞致死の場合と同様に求めた回復比は、 $0.7384/0.4455 = 1.65$ となった。

同様な温度効果は、HTOによる $\beta$ 線照射でも

みられ、この場合の回復比は  $1.1538/0.7623 = 1.51$ となった。

このことは、37°Cにおける低線量率照射では、 $\gamma$ 線でも $\beta$ 線でも照射中にTF損傷の修復が行われることを示している。

g. Tf誘発におけるトリチウム $\beta$ 線のRBE： $\gamma$ 線照射と $\beta$ 線照射による線量-TF曲線の直線部分の勾配の比から、トリチウムのRBEは、4°C照射では1.56, 37°C照射では1.71となった。

#### 4. 討論

ICRP, Publication 9<sup>18)</sup>では、最大エネルギー0.03 MeVまでの $\beta^-$ ,  $\beta^+$ および $e^-$ 放射線に対し、線質係数を1.7とすることが勧告されている。この1.7という値は、CF1マウスのLD<sub>50(30)</sub>に対するトリチウム $\beta$ 線のRBE<sup>19)</sup>に基づいている。LD<sub>50(30)</sub>は非確率の影響の感受性の指標である。従って、この後、ICRPは、確率的晩発性影響に対するRBEが不明で線質係数 $\bar{Q}$ が不確実であることを理由に、これらの放射線に対する $\bar{Q}$ の値を1にするよう修正した<sup>20,21)</sup>。

近年になって、放射線防護の分野でのトリチウムの生物学的影響の重要性が増すに従い、種々の指標についてトリチウム $\beta$ 線のRBEが調べられ、多くの場合1を越すことが報じられた<sup>11,22)</sup>。とくに、確率的晩発性影響の一つである突然変異誘発効果に関し、バクテリア<sup>23)</sup>、イースト<sup>24)</sup>、カイコ<sup>25)</sup>、マウス<sup>26)</sup>、培養細胞<sup>11,27)</sup>で、X線と $\gamma$ 線と比較したトリチウム $\beta$ 線のRBEが1から2の間になるという報告が相次いだ。これに対し、もう一つの代表的な晩発性の確率的影響である発がんについてRBEの値が知られていなかったことは誠に不都合であった。そこで、培養細胞のトランスフォーメーションを指標として、トリチウム水による $\beta$ 線の効果を同様な線量率の $\gamma$ 線の効果と比較してRBEを求めることにしたわけである。

トリチウム水による $\beta$ 線照射の線量を知るためには、培養細胞の含水量を知る必要がある。ところが、NCRP<sup>6)</sup>も強調しているように、細胞含水量の測定は困難であって、正確な実測値はなかった。主な困難点は、細胞湿量中に混入する外液量の正確な値が求め難いということである。多糖類のイヌリンは、細胞外水相に自由に拡散するが、細胞内には入らずまた代謝もされない。そこで、<sup>14</sup>Cイヌリンを利用して、細胞の湿量中に混入する外液量を放射能として定量し、目的を果た

した。調べた5種の細胞で、すべて約84%という値がえられた。教科書に記載してある約80%という値<sup>8)</sup>よりは、幾分高めである。精密を要する場合には、 $W=0.84$  とすべきであろう。

本実験で得られたトリチウムのRBE値は、照射中の温度、従って、放射線損傷の修復の有無に、あまり左右されず、細胞死に対しては、約1.4、トランスフォーメーションに対しては、1.6 - 1.7となった。細胞致死に対する値は、従来の多くの報告値<sup>11,22)</sup>と近く、またTfに対する値は、突然変異に関する諸報告値<sup>11,23~27)</sup>に近い。さらに、本実験でのTfに対するRBE値1.6 - 1.7は、トリチウム $\beta$ 線のLET(5.5 - 8.25 keV/ $\mu$ m)<sup>28)</sup>をICRP勧告<sup>1)</sup>のLET-Q曲線に適用して得られる値1.6 - 2.3の範囲内に入る。妥当な値と考えられる。

増殖期の10T1/2細胞では、X線分割照射によりTf損傷の修復が証明されたが、中性子線照射では修復が殆どみられなかった<sup>17)</sup>。本実験では、プラトー期の10T1/2細胞のトリチウム $\beta$ 線によるTf損傷が、 $\gamma$ 線の場合と同様、修復されることが示された。

線量率を小さくすると、トリチウムのRBEが大きくなるのが、種々の生物学的効果について報じられている<sup>22,29~31)</sup>。本実験では、線量率を0.05 Gy/hから0.3 Gy/hまで変えてもTfに対するトリチウムのRBE値は変らなかった。線量0のTf自然発生率を考慮に入れると初期の立上がり急になるが、この低線量域でのRBEはもっと小さくなって、決して大きくはならない。カナダのグループが報じたラット乳腺腫瘍誘発におけるトリチウムのRBE値も、0.008 Gy/hから0.001 Gy/hへの線量率の低下によって、1.3から1.1へと減少している<sup>2)</sup>。従って、線量率低下によるトリチウム発がんRBEの減少は本質的なものである可能性が高い。この点は、防護の上からも、放射線発がん損傷の本体解明の上からも重要であり、さらに低線量率での検討が必要である。

#### 参考文献

1) ICRP: *Recommendation of the International Commission on Radiological Protection*. ICRP Publication 26, Pergamon Press, Oxford, 1977.

- 2) Gragtmans, N. J., Myers, D. K., Johnson, J. R., Jones, A. R. and Johnson, L. D.: Occurrence of mammary tumors in rats after exposure to tritium beta rays and 250-kVp X rays. *Radiat. Res.*, 99, 636-650, 1984.
- 3) Yamaguchi, T., Yasukawa, M., Terasima, T. and Matsudaira, H.: Malignant cell transformation induced by tritiated water in mouse 10T1/2 cells. in *Proceedings of the Second Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics*. Matsudaira, H., Yamaguchi, T. and Etoh, H. eds., NIRS-M-52, pp. 136-145, 1985.
- 4) Yamaguchi, T., Yasukawa, M., Terasima, T. and Matsudaira, H.: Cell transformation induced by tritiated water in mouse 10T1/2 cells. *J. Radiat. Res.*, 26, 58 (abstract), 1985.
- 5) Yamaguchi, T., Yasukawa, M., Terasima, T. and Matsudaira, H.: Cell transformation induced by tritiated water in mouse 10T1/2 cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 49, 525 (abstract), 1985.
- 6) NCRP. Tritium dose. in *Tritium and Other Radionuclide Labeled Organic Compounds Incorporated in Genetic Material*. NCRP Report 63, pp.58-60, National Council on Radiation Protection and Measurements, Washington, D. C., 1979.
- 7) Dewey, W. C., Humphrey, R. M. and Jones, B. A.: Comparisons of tritiated thymidine, tritiated water and cobalt-60 gamma rays in inducing chromosomal aberrations. *Radiat. Res.*, 24, 214-238, 1965.
- 8) Giese, A. C.: Water, gases and pressure in cellular environments. in *Cell Physiology*, Chapter 3, p.24, W. B. Saunders Co., Philadelphia, 1957.
- 9) Reznikoff, C. A., Brankow, D. W. and Heidelberger, C.: Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to post-confluence inhibition of division. *Cancer Res.*, 33, 3231-3238, 1973.
- 10) 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.
- 11) Ueno, A. M., Furuno-Fukushi, I. and Mutsudaira, H.: Induction of cell killing, micronuclei, and mutation to 6-thioguanine resistance after exposure to low-dose-rate  $\gamma$ -rays and tritiated water in cultured mammalian cells (L5178Y). *Radiat. Res.*, 91, 447-456, 1982.
  - 12) Yamaguchi, T., Muraiso, C. and Tsuboi, A.: Determination of the water content within cultured cells for the calculation of RBE values of tritium beta rays. *J. Radiat. Res.*, 28, 11 (abstract), 1987.
  - 13) Terasima, T., Yasukawa, M. and Kimura, M.: Radiation-induced transformation of 10T1/2 mouse cells in the plateau phase: Post-irradiation changes and serum dependence. *Jap. J. Cancer Res. (Gann)*, 72, 762-768, 1981.
  - 14) Terasima, T., Yasukawa, M. and Kimura, M.: Development of insusceptivity to serum factor during the radiation transformation process. *Brit. J. Cancer*, 47, 439-442, 1983.
  - 15) Reznikoff, C. A., Betram, J. C., Brankow, D. W. and Heidelberger, C.: Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division. *Cancer Res.*, 33, 3239-3249, 1973.
  - 16) Otsu, H., Yasukawa, M. and Terasima, T.: In vitro properties and tumorigenicity of radiation-transformed clones of mouse 10T1/2 cells. *J. Radiat. Res.*, 24, 118-130, 1983.
  - 17) Han, A. and Elkind, M. M.: Transformation of mouse C3H/10T1/2 cells by single and fractionated doses of X-rays and fission neutrons. *Cancer Res.*, 39, 123-130, 1979.
  - 18) ICRP: *Recommendation of the International Commission on Radiological Protection*. (ICRP Publication 9, Pergamon Press, Oxford, 1966.
  - 19) Furchner, J. E.: Relative biological effectiveness of tritium beta-particles and  $\text{Co}^{60}$  gamma -rays measured by lethality in CF1 mice. *Radiat. Res.*, 6, 483-490, 1957.
  - 20) Dunster, H. J.: News and comments. *Health Phys.*, 17, 389-396, 1969.
  - 21) NCRP: A review of RBE experiments in mammals. in *Organic Compounds Incorporated in Genetic Material*. NCRP Report 63, pp.56-63, National Council on Radiation Protection and Measurement, Washington, D. C., 1979.
  - 22) Ujeno, Y.: Relative biological effectiveness (RBE) of tritium  $\beta$ -rays in relation to dose rate. *Health Phys.*, 45, 789-791, 1983.
  - 23) Tanooka, H. and Munakata, N.: Mutagenic effect of tritiated water on spores of *Bacillus subtilis*. *Radiat. Res.*, 73, 581-584, 1980.
  - 24) Ito, T. and Kobayashi, K.: Mutagenesis in yeast cells by storage in tritiated water. *Radiat. Res.*, 76, 139-144, 1978.
  - 25) Tazima, Y. and Onimaru, K.: Mutagenic effectiveness of an internal  $\beta$ -emitter, tritium. (5) RBE of tritiated water estimated by specific loci method in the silkworm. *J. Radiat. Res.*, 21, 45 (abstract), 1980.
  - 26) Russel, W. L., Cumming, R. B., Kelly, E. M. and Phipps, E. L.: Induction of specific locus mutation in the mouse by tritiated water. in *Behaviour of Tritium in the Environment. Proceedings of a Symposium. San Francisco, 16-20 October 1978*, pp.489-497, International Atomic Energy Agency, Vienna, 1979.
  - 27) Okada, S. and Nakamura, N.: RBE of tritiated water for three radiobiological effects in cultured mammalian cells. *J. Radiat. Res.*, 21, 44 (abstract), 1980.
  - 28) Johnson, H. A.: The quality factor for tritium radiation. in *Tritium*. Moghissi, A. A. and Carter, M. W. eds., pp.231-239, Messenger Graphics, Phenix, 1973.
  - 29) Hall, E. J., Oliver, R. and Bedford, J. S.: The relative biological effectiveness of tritium beta particles compared to gamma — Its dependence on dose rate. *Brit. J. Radiol.*, 40, 704-710, 1967.

- 30) Dobson, R. L.: Low-exposure tritium radio-toxicity in mammals. *in Proceedings of Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics*. Matsudaira, H., Yamaguchi, T., Nakazawa, T. and Saito, C. eds., NIRS-M-41, pp.120-134, 1982.
- 31) Dobson, R. L. and Kwan, T. C.: The RBE of tritium radiation measured in mouse oocyte: Increase at low exposure levels. *Radiat. Res.*, 55, 615-625, 1976.

# V トリチウムによるヒトの放射線障害、 およびその診断・予防に関する調査研究

中尾 憲, 今井康文, 能勢正子, 川瀬淑子  
(障害臨床研究部)

## Changes in the Hemopoietic Stem Cells and Lymphocyte Subsets in Humans after Exposure to Some Internal Emitters

Isamu Nakao, Yasufumi Imai, Masako Nose and Yoshiko Kawase  
Division of Radiation Health

An attempt was made to evaluate the effect of long term internal exposure on hemopoietic stem cells and cellular immunity in Thorotrast ( $^{232}\text{ThO}_2$ ) administered patients as a model human exposure to some internal emitters.

Marrow cells from Thorotrast cases have shown significantly decreased numbers of CFU-F (fibroblastoid colony forming unit) and CFU-Mix (mixed colony forming unit) as compared with normal controls.

The values of BFU-E (erythropoietic burst forming unit), CFU-E (erythrocytic colony forming unit) and CFU-c (colony forming unit in culture) in this CFU-F depleted marrow did not show significant differences from the controls, albeit slight decreases in the mean values of these stem cell lines.

The results of Thorotrast cases are regarded to represent the injuries of the stromal progenitor cells and multipotential precursors following the life long exposure to alpha emitters.

Concerning the relationship between CFU-F

and CFU-Mix in controls and Thorotrast cases (n=30), CFU-F values correlated well with those of CFU-Mix ( $r=0.623$ ,  $p < 0.01$ ) but not with the others. CFU-F was considered to play a more important role in pluripotent hemopoiesis than in stem cell hierarchy. Therefore, the examination of stem cells including CFU-F and pluripotent hemopoietic precursors appears important for the evaluation of radiation hazard, because it is informative to the detection of the injuries in hemopoiesis.

Secondly, lymphocyte subpopulations in Thorotrast cases were analyzed. There is a decrease in the percentages of OKT 4<sup>+</sup> cells and in the OKT 4/OKT 8 ratio. The results may be regarded as a slight immunodeficiency state. Moreover, there is an increase in the total number and percentages of OKT 11<sup>+</sup>, OKT 17<sup>+</sup>, OKT 10<sup>+</sup>, OKM1<sup>+</sup> and HNK-1<sup>+</sup> (Human Natural Killer-1) lymphocytes compared to age matched controls. It was thought that an increased number of these cells reflects an increased number of null cells. Further, a negative

balance in the number of OKT 3<sup>+</sup> cells minus the sum of OKT 4<sup>+</sup> and OKT 8<sup>+</sup> cells is consistent with an increased number of less differentiated T cells in the blood. It seems likely that an increase of such cells reflects an increase in the number of NK cells. In addition, the Leu 11<sup>+</sup>, Leu 7<sup>-</sup> cells which have been thought to be NK cells having a potent function showed an marked-

## 1. 緒言

トリチウム被曝による再生不良性貧血類似の病像は、病態生理上、血液幹細胞の障害が主として関与すると想定される。そこで、人における造血幹細胞の定量的アッセイ法を確立したうえで、各系列の造血幹細胞の相互関係の解析を行い、さらに、核種は異なるが、トリチウム被曝様式に類似する、持続的で長期にわたる内部被曝例として、二酸化トリウム、<sup>232</sup>ThO<sub>2</sub> (トロトラスト) 注入患者群の造血幹細胞量を検討した。これら内部被曝例の平均骨髄線量は、4.4 rad/年である。

造血幹細胞の一元的始祖と目される多分化能幹細胞の実態はなお十分に明らかではない。しかし、マウスの多分化能幹細胞である脾コロニー、CFU-Sの一部か、もしくはCFU-Sと近接した分化段階にあると考えられる人の混合コロニー、CFU-Mixの定量法を確立したので、CFU-Mixとともに、造血間質系幹細胞、CFU-F、赤血球系幹細胞、BFU-F、CFU-E、および顆粒球系幹細胞、CFU-cをあわせて測定して検討した。

次に、同じくトロトラスト投与例の細胞性免疫能をリンパ球サブセットの測定により検索した。すなわち、長期内部被曝の免疫系に及ぼす影響について、末梢リンパ球を単クローン抗体で標識し、フローサイトメトリーによって、サブセットの比率と総数を求めて解析した。

## 2. 研究方法

### a. 造血幹細胞の定量

CFU-Mixアッセイ<sup>1)</sup>は、骨髄のbuffy coat cell, 2×10<sup>5</sup>個, FCS 30%, BSA 1%, エリスロポリエチン 2 U/ml, メチルセルロース 0.88%, PHA LCCM 10%をαメジウム 1 ml に調整し、3プレート、計6×10<sup>5</sup>細胞当りのコロニーアッセイを行った。BFU-E, CFU-

ly low value, contrary to Leu 11<sup>-</sup>, Leu 7<sup>+</sup> cells having minimal function.

These results apparently indicate an increase in the number of NK cells and their heterogeneity, the NK cells with minimal function predominating in Thorotrast patients due to the long term internal exposure.

Eは、Iscoe法<sup>2)</sup>により、それぞれ、7日および14日後にスコアをとり、CFU-cは、Pike & Robinson法<sup>3)</sup>を改良して行い、10% GCT CMをCSF (colony stimulating factor) として用いた。CFU~F<sup>4~6)</sup>は、同時に、5×10<sup>5</sup>個細胞を、20%牛胎仔血清を加えたMcCoy 5 Aメジウムで14日間培養し、線維芽様細胞50個以上よりなるAggregateをコロニーとして算定した。

### b. リンパ球 Subpopulation の解析

標識に用いた単クローン抗体は、OKT11, OKT17, OKT3, OKT4, OKT8, OKT10, OKM1, OKIa-1およびOKB7は、Ortho社製を用い、NK (natural killer) 細胞に関与する単クローン抗体として、Leu 11, Leu 15は、Bekton-Dickinson社製を用いた。なお、Leu11, Leu 15, OKT3は、Phycoerythrin標識抗体として、リンパ球の2重標識蛍光体法を用い、Cytofluorograph II Sとモデル2151で表面抗原を解析した。

## 3. 結果

### a. 低線量持続被曝による骨髄造血幹細胞の定量的検索

1) 18例の<sup>232</sup>ThO<sub>2</sub>群の患者では、CFU-Mixは、平均値21.2±12.4、対照群13例は、44.5±14.4で、有意(P<0.001)に患者群に減少がみられた。また、患者群のCFU-Fは、平均値50.7±21.9、対照群は、85.4±24.7で、有意(P<0.001)に患者群に減少がみられた。BFU-Eは、患者群113.1±83.1、対照群153.3±70.4、CFU-Eは、患者群159.4±88.2、対照群195.0±82.4であり、両群に有意差はない。CFU-cは、患者群54.9±25.4、対照群73.1±42.0で、平均値からは、患者群に減少がみられるが、検定上は有意とはいえない(表1)。以上から、低線量持続内部被曝例においては、多分化能



**Comparison of Control and Thorotrast Patients in Colony Formation of Hematopoietic Stem Cells**

Case	Control	Thorotrast Pts
No. of Case	13	18
CFU-Mix No./ $6 \times 10^5$ cells	44.5 ± 14.4	21.2 ± 12.4 **
CFU-F No./ $5 \times 10^5$ cells	85.4 ± 24.7	50.7 ± 21.9 **
BFU-E No./ $2 \times 10^5$ cells	153.3 ± 70.4	113.1 ± 83.1
CFU-E No./ $5 \times 10^5$ cells	195.0 ± 82.4	159.4 ± 88.2
CFU-c No./ $1 \times 10^5$ cells	73.1 ± 42.0	54.9 ± 25.4

\*\* P < 0.001

表 1.

**Relationship between CFU-F and CFU-MIX**

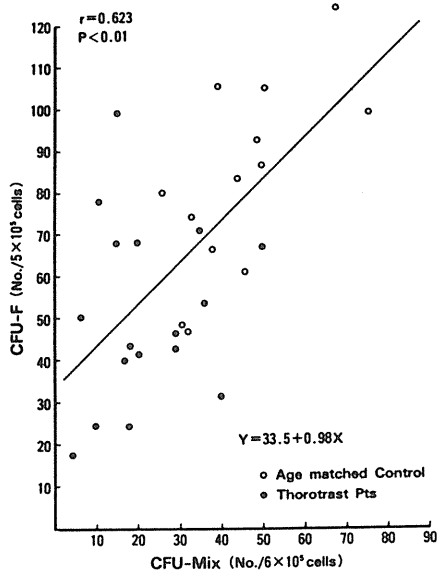


図 1.

幹細胞CFU-Mixと、間質系幹細胞CFU-Fが有意の減少を示す事実が明かとなった。赤血球系幹細胞と顆粒球系幹細胞は、平均値では患者群が低値を示すが、検定上有意ではない。

2) 次に、CFU-MixとCFU-Fの相関<sup>7)</sup>を検討した。患者群17例および対照群13例の計30例において両者の相関を検討すると、相関係数 $r = 0.62$ 、 $P < 0.001$ で相関を示し、直線回帰式は、 $Y = 33.5 + 0.98X$ となる(図1)。

b. 低線量持続内部被曝例の細胞性免疫能の検索

1) リンパ球抗原によるサブセットの比率

$^{232}\text{ThO}_2$ 患者群ではOKT4<sup>+</sup>細胞比率の減少、OKT8<sup>+</sup>細胞比率の増加があり、従って両者の比、OKT4/OKT8陽性細胞比は低値を示し、同年令対照群2.1に対し1.4と低値であった<sup>8)</sup>。一方、OKT11<sup>+</sup>、OKT17<sup>+</sup>、OKM1<sup>+</sup>、HNK-1<sup>+</sup>(Human Natural Killer-1)リンパ球比率の増加( $P < 0.05$ )がみられた(図2)。さらに、OKT3<sup>+</sup>リンパ球総数からOKT4<sup>+</sup>およびOKT8<sup>+</sup>リンパ球数の和を差し引いた値、すなわち、 $OKT3^+ - (OKT4^+ + OKT8^+)$ 値、 $[3 - (4+8)]$ は、対照に比し、よりnegative balanceを示した<sup>9)</sup>(表2)。

2) NK細胞サブセットの比率<sup>10)</sup>

癌発症のリスクが高いとされる $^{232}\text{ThO}_2$ 例において、NK細胞比率の増加がみられたので、20例のNK細胞比率とNK細胞表面形質のheterogeneityを解析した。ヒトNK細胞に反応するモノクローナル抗体は幾つか数えられるが、ここでは、NK細胞に反応する抗体として、Leu7(HNK-1)、Leu11(B73-1)、Leu15、およびOKT11を用いた。FITC標識抗体のOKT11、Leu2a、Leu7に対し、Phycoerythrin標識抗体のLeu11、およびLeu15のいずれかを組合せた蛍光抗体法でリンパ球の2重標識を行い、Flowcytometryにより、表面抗原を解析した。OKT11<sup>+</sup>、Leu11<sup>+</sup>細胞は、 $\bar{x} = 18.6 \pm 9.0\%$ 、Leu11<sup>+</sup>細胞は、 $\bar{x} = 24.0 \pm 9.0\%$ であり、Eロゼットを形成する全T細胞抗原をco-expressしたLeu11細胞比率が、Leu11<sup>+</sup>細胞の約80%を占めた。T細胞抗原をco-expressしたNK細胞は、未成熟NK細胞とみなされ、NK細胞活性は低いとされているので、患者群のLeu11<sup>+</sup>細胞の大部分は、弱いNK活性しかもたないことが推測された。さらに、Leu11<sup>+</sup>、Leu<sup>-</sup>細胞比率は、 $\bar{x} = 8.7 \pm 3.4$ と低値を示し、Leu11<sup>+</sup>細胞の36%に過ぎないが、これに対し、Leu11<sup>-</sup>、Leu7<sup>+</sup>細胞は、 $\bar{x} = 21.5 \pm 10.5\%$ と高値を示し、Leu7<sup>+</sup>細胞の61%を占めた。Leu11<sup>+</sup>、Leu7<sup>-</sup>細胞は、強いNK活性をもつが、これに属する細胞比率は

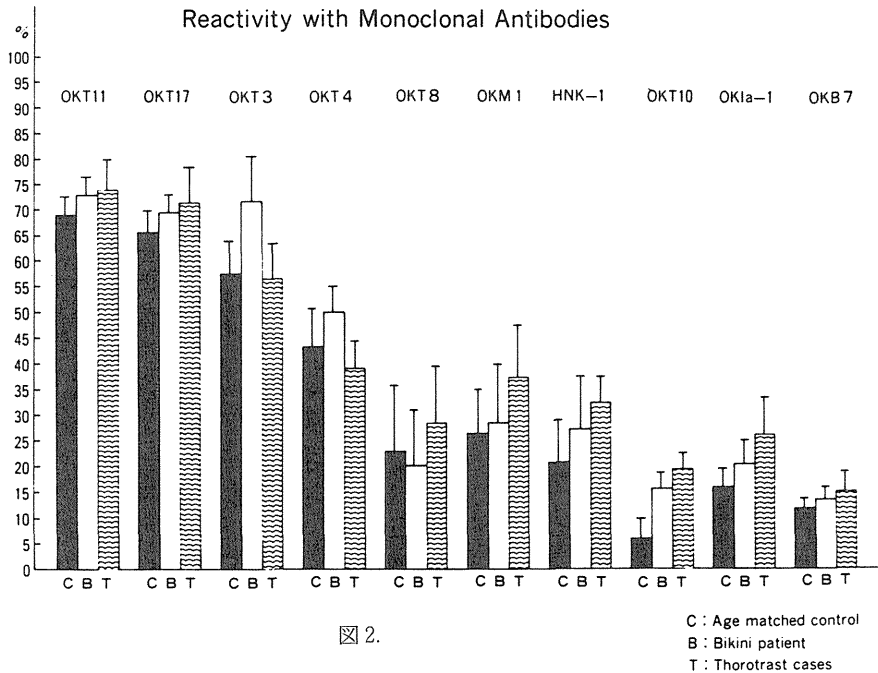


図 2.

	Age matched controls	Bikini patients	Thorotrast cases
$\frac{4}{8}$ Ratio	2.1	2.5	1.4
OKT 11		↑	↑
OKT 3		↑	—
OKT 4		↑	↓
OKT 8		↓	↑
OKM 1		— (2 groups)	↑↑
HNK-1		↑ (2 groups)	↑↑
OKT 10		↑	↑↑
OKIa-1		—	↑
3-(4-8)	negative balance -5.0	negative balance -9.0	negative balance -21.0

表 2.

低く、弱いNK活性を保有する Leu11<sup>-</sup>, Leu7<sup>+</sup> 細胞比率は高く、以上の解析から、<sup>232</sup>ThO<sub>2</sub> 患者群では、弱いNK活性をもつNK細胞比率が優位にあることが明らかとなった(表3)。一方、サプレッサー機能をもつ Leu2a<sup>+</sup>, Leu15<sup>+</sup> 細胞の比率、細胞傷害性T細胞の前駆細胞ないし effector である Leu2a<sup>+</sup>, Leu15<sup>-</sup> 細胞の比率は、いずれも健常対照群に対し、有意差はなかった。

#### 4. 討論

放射性トリウムによる持続性の低線量内部被曝では、CFU-Fと、CFU-Mixのそれぞれ有

Subsets of NK Cells in Blood from <sup>232</sup>ThO<sub>2</sub> Patients

	Control Subjects n=12	Patients n=20
Leu 7 <sup>+</sup>	2 2.4 ± 6.4	3 5.1 ± 5.1 *
Leu 11 <sup>+</sup>	2 9.0 ± 4.9	2 4.2 ± 8.8
OKT 11 <sup>+</sup> , Leu 11 <sup>+</sup>	1 7.1 ± 8.6	2 1.4 ± 9.1
Leu 7 <sup>+</sup> , Leu 11 <sup>-</sup>	9.4 ± 4.0	2 1.6 ± 8.2 **
Leu 7 <sup>+</sup> , Leu 11 <sup>+</sup>	1 8.4 ± 3.5	1 5.5 ± 5.4
Leu 7 <sup>-</sup> , Leu 11 <sup>+</sup>	1 7.2 ± 5.0	8.6 ± 3.6 **
Leu 2a <sup>+</sup> , Leu 15 <sup>-</sup>	1 7.0 ± 6.2	2 3.2 ± 9.2
Leu 2a <sup>+</sup> , Leu 15 <sup>+</sup>	9.4 ± 5.8	8.9 ± 3.8
Leu 2a <sup>-</sup> , Leu 15 <sup>+</sup>	1 8.6 ± 5.6	1 6.0 ± 7.8

\* p<0.05, \*\* p<0.001

表 3.

意の減少がみられ、造血間質系幹細胞と、多分化能幹細胞に障害をきたしていることが明らかとなった。この成績は、トリチウムの慢性被曝で発症した過去にみられた再生不良性貧血様病態の成因に関して、示唆を与えるようにおもわれる。

実験的に、マウスで造血幹細胞の放射線感受性をコロニー形成能から D<sub>0</sub> 値を求めると<sup>12)</sup>, CFU-Fは、270 rad, CFU-Mixは140 rad

で、両者は比較的近接しており、また 1.5 Gy 照射マウスの CFU-F と CFU-Mix の回復は、他の幹細胞系列よりも遷延するので<sup>12)</sup>、人の持続性被曝にみられた CFU-F と CFU-Mix の減少は、外部照射と内部照射の違いはあるが、動物実験からも考えられるところであり、さらに、マウスの連続全身照射実験では、造血幹細胞のうち、CFU-S が最も著明な減少を示し、多能性幹細胞障害が最も顕著であった。<sup>7)</sup>

以上から持続性内部被曝例では、ことに CFU-F と CFU-Mix の障害をきたすことが考えられるので、この両者の測定が臨床上重要とおもわれる。

次に、持続的内部被曝の免疫能に与える影響を、同じく <sup>232</sup>Th O<sub>2</sub> 投与例を対象として検討した。リンパ球サブセットの変化では、ヘルパー T 細胞比率の減少と suppressor T 細胞比率の増加、すなわち、同年令層に較べて 4/8 比の低下があり、軽度の免疫不全状態にあると考えられた。また、OKT11<sup>+</sup>、OKT17<sup>+</sup> 細胞数の増加があるが、OKT3<sup>+</sup> 細胞数には変化がなく、OKT11<sup>+</sup> 細胞数と OKT3<sup>+</sup> 細胞数の差が大で、未熟 T 細胞 (T8<sup>+</sup>、T3<sup>-</sup>、T4<sup>-</sup>) が含まれる。また、OKM1<sup>+</sup>、OKT10<sup>+</sup>、HNK-1<sup>+</sup> 細胞数<sup>13,14)</sup> の増加が顕著で、null 細胞増加が示唆された。さらに、T 細胞が OKT3 形質の獲得以前に、OKT4、OKT8 を保有することから、3-(4+8) 細胞数<sup>15)</sup> の negative balance は、OKT10<sup>+</sup> 細胞増加とあわせ、未成熟 T 細胞増加の反映と解される。老年対照者に対し症例群においては、negative balance に有意差が認められた。これらの所見は、持続性内部被曝による免疫系の homeostatic response と解され、null 細胞の増加は、未だ T 形質をもたない未成熟 T 細胞と、OKM1<sup>+</sup>、および NK 細胞の末梢血中への早期放出機序が推定される。

NK 細胞比率の増加に関しては、健常人では、HNK-1<sup>+</sup> (Leu7<sup>+</sup>) 細胞比率は、加齢とともに増加するとされ、症例群は 60 才以上であるから、NK 細胞比率の増加は、年令の影響は否定できない。しかし、症例群の NK 細胞サブセットは、弱い活性をもつ NK 細胞 (Leu11<sup>-</sup>、Leu7<sup>+</sup> 細胞<sup>16)</sup>) が優位にあり、強い活性をもつ NK (Leu11<sup>+</sup>、Leu7<sup>-</sup> 細胞<sup>16)</sup>) が少ない不均質性を示した。健常人では、Leu7<sup>+</sup> 細胞レベルと NK 機能は、高い相関があるが、癌患者などでは、Leu7<sup>+</sup> 細胞の増加がありながら

NK 機能は低い<sup>17)</sup>。今回の症例群も、サブセットの検索からは類似の免疫病態にあると考えられた。

かゝる弱い機能をもつ NK 細胞の優位は、NK 細胞が未熟な分化段階にあるのか、もしくは、細胞障害機能を発現する他の NK 様細胞、例えば anomalous K 細胞や、マクロファージなどの代償変化が考えられるが、Leu2a と Leu15 (≡OKTM1) の 2 重標識で見た限りでは、少くともマクロファージの代償性変化は有意ではないように推測された。

## 5. 結論

トリチウム被曝様式に類似する <sup>232</sup>Th O<sub>2</sub> 注入患者群を対象として、人の造血幹細胞障害と、免疫能への影響を検索し、もってトリチウムによる障害の診断と予防に資するべく研究を行った。

- 1) 人の CFU-Mix の定量法を確立し、CFU-F、BFU-E、CFU-E、CFU-c をあわせて測定した。
- 2) 造血間質系幹細胞と、多分化能幹細胞に障害を認めた。この成績は、過去にみられたトリチウムの慢性被曝による再生不良性貧血様病態の成因に示唆を与える。
- 3) CFU-F と CFU-Mix は、相関係数  $r = 0.62$ 、 $P < 0.01$ 、で相関を示し、直線回帰式は、 $Y = 33.5 + 0.98x$  であった。
- 4) リンパ球サブセットは、OKT4/OKT8 比の低下があり、軽度の免疫不全状態にあると考えられた。
- 5) null 細胞ないし未成熟 T 細胞比率の増加があり、血中への早期放出機序が想定された。
- 6) NK 細胞比率の増加と、弱い機能をもつ NK 細胞を優位とする NK 細胞の不均質性が明らかとなった。

## 参考文献

1. 原宏, 多分化能幹細胞 B: CFU-Mix 日本血液学全書, 87-105, 丸善, 197.
2. Iscove, N. N., Sieber, F., Winterhalter, K. H.: Erythroid colony formation in culture of mouse and human bone marrow analysis of the requirement for erythropoetin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin. *A. J. Cell physiol.*, 83, 309-320, 1974.
3. Pike, B. L., Robinson, W. A.: Human bone

- marrow colony growth in agar-gel. *J. Cell Physiol.*, 76, 77-84, 1970.
4. Friedenstein, A. J., Deringlasova, U. F., Kulaguna, N. N., Panasuk, A. K., Rudakova, S. F., Luria, E. A., Rudakowa, I. A.: Precursors for fibroblasts in different population of hemopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.*, 2, 83-92, 1974.
  5. Friedenstein, A. J., Chajakhjan, R. K., Latsnik, N. V., Panasyuk, A. F., Keiliss-Borok, I. V.: Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. *Transplantation.* 17, 331-340, 1974.
  6. Friedenstein, A. J., Gorskaya, U. F., Kulagina, N. N.: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hemopoietic organs. *Exp. Hematol.*, 4, 267-274, 1974.
  7. 今井康文, 能勢正子, 川瀬淑子, 中尾恵, 低線量持続照射による骨髓造血幹細胞の定量的検索, 第29回日本臨床血液学会総会抄録集 P.203, 1987.
  8. 中尾恵, 西尾美乃里, 鈴木美和子, 放射線被照射例と被曝者のFCMによる細胞性免疫能について, 第12回日本臨床免疫学会抄録集, p.143, 1984.
  9. 中尾恵, 川瀬淑子, 大谷正子, 別所正美, 被曝様式の差異によるリンパ球サブセットの変化, 日血誌, 48, 477, 1985.
  10. 中尾恵, 杉山始, 川瀬淑子, 大谷正子, 今井康文, 蜂谷みさを, 木村玲子, 放射線の持続的内部照射例におけるNK細胞サブセットの解析, 日血誌, 49, 337, 1986.
  11. Nakao, I., Jinnai, I., Bessho, M., Kawase, Y., Ohtani, M., Sugiyama, H., and Hirashima, K.: Changes in the hemopoietic stem cells and lymphocyte subsets in humans after exposure to some internal emitters. Proc. 2nd workshop on tritium radiobiology and health physics. Matsudaira, H. et al. eds. *NIRS-M-52*, 276-286, 1985.
  12. Imai, Y. and Nakao, I.: In vivo radiosensitivity and recovery pattern of the hemopoietic precursors and stem cells in mouse bone marrow. *Exp. Hematol.* 15, 890-895, 1987.
  13. Talle, M. A., Allegar, N., Makowski, M., Rao, P. E., Mittler, R. S., Goldstein, G.: Classification of human lymphocytes and monocytes with the OKT series of monoclonal antibodies. *Diagnostic Immunol.* 1, 129-135, 1983.
  14. Shwab, R., Staiano-Coico, L., Weksler, M. E.: Immunological studies of aging. IX. Quantitative differences in T lymphocyte subsets in young and old individuals. *ibid*, 1, 195-198, 1983
  15. Hallgren, H. M., Jackola, D. R., O'Leary, J. J.: Unusual patterns of surface marker expression on peripheral lymphocytes from aged humans suggestive of a population of less differentiated cells. *J. Immunol.* 131, 191-194, 1983
  16. Lanier, L. L., Le, A. M., Phillips, J. H., Warner, N. L., Babcock, G. F.: Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) Antigens. *ibid*, 131, 1789-1796, 1983.
  17. Abo, T., Balch, C. M.: The use of monoclonal antibodies to characterize human natural killer cell ontogeny and function. Monoclonal antibodies, probes for the study of autoimmunity and immunodeficiency, Haynes, B. F. ed. 98 ~ 112, Academic press, Inc. New York. 1983.

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」報告書

千葉県穴川4-9-1  
放射線医学総合研究所  
Tel. 0427-51-2111(代)

---

小薬印刷(株)