

NIRS-R-26

特別研究「低線量域における線量効果
関係の実証に関する予備的研究」

(平成2年度～平成4年度)

最終報告書

平成6年3月

放射線医学総合研究所

NIRS-R-26

Final Report on the Project Research
“Preliminary studies on the dose response
relationship at low dose level of radiation”

(April 1990 ~ March 1993)

March 1994

National Institute of Radiological Sciences

9-1, Anagawa 4-chome, Inage-ku, Chiba-shi 263, Japan

目 次

特別研究「低線量域における線量効果関係の実証に関する予備的研究」	序	堀 雅明
I. 放射線の生涯リスクとその発現の時間経過 — 被曝時年齢の影響についての解析 —		佐々木俊作 …………… 1
Lifetime Risk of Radiation and Temporal Pattern of Its Expression — Analysis on Influence of Age at Irradiation —		S. Sasaki
II. 遺伝的影響に関する予備的研究—放射線感受性（修復欠損）マウスの作製に向けて 塩見 忠博, 松田 洋一, 原田 良信, 斉藤 俊行 …………… 9		
Preliminary studies on genetic effects of low dose radiation—towards the establishment of radiation sensitive (repair-deficient) mice		T. Shiomi, Y. Matsuda, Y. Harada and T. Saito

序

本特別研究「低線量域における線量効果関係の実証に関する予備的研究」は平成2年度から4年度までの3年間に遂行されたものである。

低線量放射線によって生じる可能性のある生物影響としては発がん、遺伝障害および発生異常であるが、その中でも発癌のリスクが最も大きいと推定されている。低線量被曝による発がんのリスクをより高い精度で推定するためにはいくつかの問題が残されている。特に、リスク評価の基礎となる実験動物（マウス）を用いた実証的研究のデータが不十分であることと、評価に用いるリスク・モデルの妥当性が問題となっている。遺伝的障害については実験動物（マウス、サル）を用いた実証的研究のデータを基礎に直接法および間接法（倍加線量法）によって、リスク推定がなされてきたが、広島、長崎の大規模な疫学的研究においては遺伝障害の有意な増加は認められていない。より鋭敏な遺伝障害の検出系の開発が望まれている。

本研究ではこのような現状認識の下に、本格的な低線量放射線の生物影響研究の基礎作りを目標に予備的研究を実施した。第1班（3年間）は発がんを中心とする晩発効果について被曝時年齢を考慮した生涯リスクの定量的推定法について検討を行った。第2班（2年間）は、放射線の生物影響を個体レベルで鋭敏に検出することのできる実験系の開発を目指して、放射線感受性マウスの作製技術について予備的研究を行った。

短期間の実施期間ではあったが、以下の報告にみられるように、初期の目標はほぼ達成されたものと信じる。今後の低線量放射線の生物影響に関する本格的な研究においては、より鋭敏な実験系を用いての発がん、遺伝障害および発生異常を指標とした線量効果関係の実証的研究とその生成機構についての分子レベルでの解析的研究が総合的に実施され、両研究より得られたデータを基礎としてより精度の高いリスク・モデルが構築されることを期待する。

特別研究班長 堀 雅 明

I. 放射線の生涯リスクとその発現の時間経過： 被曝時年齢の影響についての解析

佐々木 俊 作 (放射線医学総合研究所生理病理研究部)

Lifetime Risk of Radiation and Its Expression : Analysis on Influence of Age at Irradiation

Shunsaku Sasaki

Division of Physiology and pathology, National Institute of Radiological Sciences

The present study was aimed to clarify influence of age at irradiation on the lifetime risk of radiation and its expression. Results of the experiment using female B6C3F₁ mice were made subject of analysis. In this experiment mice were irradiated at day 17 prenatal period or day 0, 7, 35, 105, 240 or 365 postnatal period with doses ranging from 0.95 to 5.7 Gy γ -rays from ¹³⁷Cs. They were allowed to live out their entire life spans under a specific pathogen free condition.

Radiation-induced lifetime risk which was expressed as fraction of the excess mortality (ECM) or the cumulative relative risk (CRR) was calculated using the cumulative hazard method for each experimental group. It was found that dose response relationship for lifetime

risk can be described by following equations:

$$\text{CRR}(D) = \exp(aD + bD^2)$$

$$\text{ECM}(D) = 1 - \exp(-aD - bD^2)$$

Parameters a and b were estimated by regression analysis. Present analysis revealed that mice of the early postnatal and juvenile periods are more susceptible than fetal and adult mice for induction of lifetime risk and that susceptibility decreases with increasing age during adult period. The relative risk decreased with advancing age in all groups examined. The decrease in relative risk after irradiation during the middle-age adult period was slower than that after irradiation during the younger period of life.

1. 緒言

この研究は放射線のリスク評価における諸問題を実験研究によって明らかにすることによりリスク評価の基礎に資することを目的とする。研究の対象は発癌を中心とする晩発効果である。現時点における最大の問題の一つは幼若期被曝による生涯リスクの推定を正確にはできないことである。その理由は被曝時年齢10歳未満の原爆被曝者の94%が生きており生涯リスクを求めるためには今後長期間の追跡調査を必要とするからである。現在の相対リスクがこのまま持続すれば生涯リスクは非常に大きいことになる。また、頭部真菌症の治療に伴い小児期にX線照射を受けた人々についてのイスラエルにおける追跡調査の結果も幼若期は発癌に関して感受性が高いことを示唆している。一方、相対リスクは年齢が進むにつれて低下するであろうから生涯リスクは成年期被曝の場合とほとんど等しいであろうという説が最近出されている。放射線の生涯リスクの大きさとその発現の時間経過に被曝時年齢がどのように影響するかを実験研究により明らかにすることは意義のあることである。これがこの報告書のテーマである。

放射線の生涯リスクをいかに把握し表現するかということは方法論上の重要問題なのでこの検討から始めた。従来実験研究においては晩発効果の包括的尺度として平均寿命

短縮率を用い、腫瘍発生率を列記するという方法が用いられているのであるが、これでは著しく不十分であると考えたからである。リスク評価においては最終的に過剰死亡を推定している。例えば10万人が0.1Sv被曝した場合過剰死亡がどの位誘発されるかをBEIR-Vにおいて推定している。実験研究においては過剰死亡を推定ではなく実測できるはずであるのでこれを求める方法を考案した。以下に述べるのはその解析方法による結果である。生涯リスク発現の時間経過については年齢別死亡率がどのように変化するかを解析した。これに加えて、相対リスクならびに累積相対リスクの時間的変化について検討した。

この特別研究の期間にこれまでよりも規模が大きくかつより低い線量のグループを含む実験を開始した。しかしこの実験はまだ飼育を続行しておりまだ完了していない。従ってここで報告する解析の対象となったのは既に得られているデータである。

2. 材料と方法

解析の対象としたデータはB6C3F₁雌マウスを用いて行なった実験の結果である。全てのマウスはSPF状態において終生飼育された。照射時年齢は胎生17日(出生の2日前)、出生後0日、7日、35日、105日、240日ならび

に365日である。 ^{137}Cs の γ 線を全身照射した。線量は0.95 Gyから5.7 Gyの範囲である。動物数は対照群332、照射群は大部分が80から100の間である。ただし0日齢0.95 Gy照射群は144である。自然死の後に剖検と組織学的検討を行なった。

放射線の生涯リスクの尺度として過剰死亡分率 (fraction of excess mortality, ECM) ならびに累積相対リスク (cumulative relative risk, CRR) を用いた。後で述べるようにこれらは互いに関連のある尺度である。この尺度を用いて全死因、リンパ腫と白血病を除く全死因、致死的な腫瘍のそれぞれについて解析した。致死的不是な腫瘍もしばしば発生するが、この場合には過剰発生分率 (fraction of excess incidence, ECI) と累積相対リスクを尺度とした。ここで注意してほしいのは過剰値ならびに相対値は観察値と期待値との差ならびに期待値に対する倍率であることである。具体的な方法については結果を述べる中で示すことにする。線量と生涯リスクの関係は直接ではなく曲線となったが、回帰は最小2乗法によって求めた。年齢別死亡率の時間的変化についてはいくつかのモデルに適合させることを試みた。適合度の指標として赤池の情報量基準を用いた。

3. 結果と考察

3.1. 生涯リスクに関する線量効果関係

全死因についての生涯リスクの解析から始める。まず最初に基本的な考え方について述べる。Fig. 1 は0日齢照

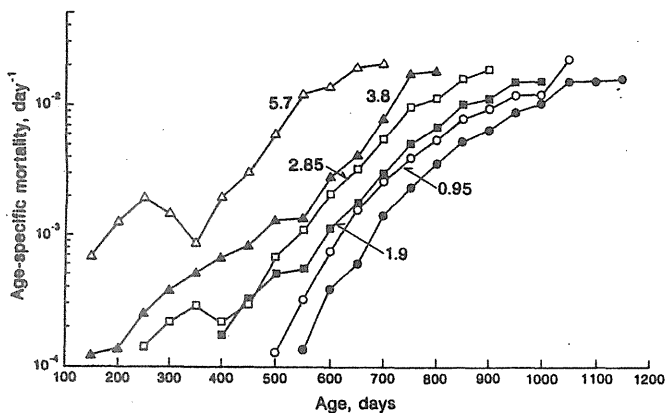


Fig. 1. Age-specific mortality as a function of age in female B6C3F₁ mice irradiated at day 0 with 0.95, 1.9, 2.85, 3.8 or 5.7 Gy γ rays in comparison with that in the control group.

射群ならびに対照群における年齢別死亡率を年齢に対してプロットしたものである。照射群の年齢別死亡率は対照群よりも全ての年齢において高く、その増加は線量に依存している。この増加が放射線被曝によることは自明であり、死亡率の差からそれぞれの期間における過剰死亡数を計算できる。年齢別死亡率の増加は致死疾患の誘発によるものであって加齢の促進によるものではないようであると考られている。次に具体的な例により過剰死亡分率と累積相対リスクを求める方法を示す。Fig. 2 は365日齢に3.8 Gy照射されたグループにおける累積死亡率の経時変化である。過剰累積死亡率(以下においては過剰値と略記する)

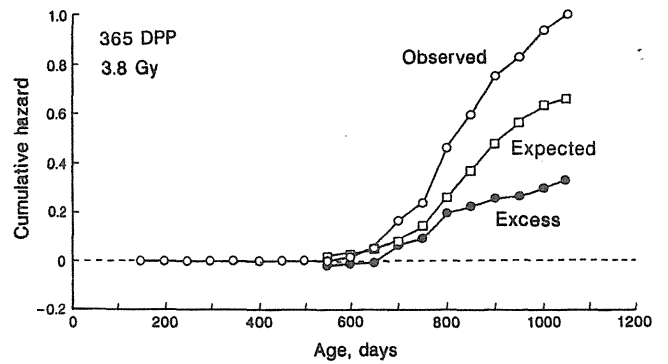


Fig. 2. Age-associated variations of the observed, expected and excess cumulative mortality in female B6C3F₁ mice irradiated at day 365 with 3.8 Gy γ rays.

は年齢別死亡率の増加から計算した累積死亡率である。期待値とは照射群において放射線被曝とは関係なく起こる死亡の累積値であり、対照群の年齢別死亡率を照射群に当てはめることにより求めた。それぞれの時点における過剰値と期待値の合計は当然観察値に等しい。もちろん観察値、過剰値、期待値のそれぞれには誤差が伴っている。過剰死亡分率 (ECM) は過剰値で割った数値、累積相対リスク (CRR) は観察値を期待値で割った数値と定義している。Fig. 2 の最右端のポイントは全個体が死亡した時点の数値なのでこれから生涯リスクを求めることができる。すなわち過剰死亡分率は0.335、累積相対リスクは1.503である。全個体が死亡した時点における観察値は当然1.0であるが、この数値も誤差を伴っていることは注意を要する。過剰死亡分率と累積相対リスクは全ての時点について求めることができる。過剰死亡分率と累積相対リスクは互いに関連のある尺度であり次のような関係が成り立つ。

$$\text{ECM} = 1 - 1/\text{CRR} \quad (1)$$

相対リスクは年齢別死亡率の比であり累積相対リスクとは異なる。両者の関係については後で述べる。

Fig. 3 においては0日齢に0.95 Gyから5.7 Gyまでの γ 線を照射した後の過剰累積死亡率の時間変化を相互に比較している。最右端のポイントは過剰死亡率で表した生涯リスクに等しい。0.95 Gy照射グループにおいては生涯リスクは過剰死亡率0.38である。生涯リスクを累積相対リスク

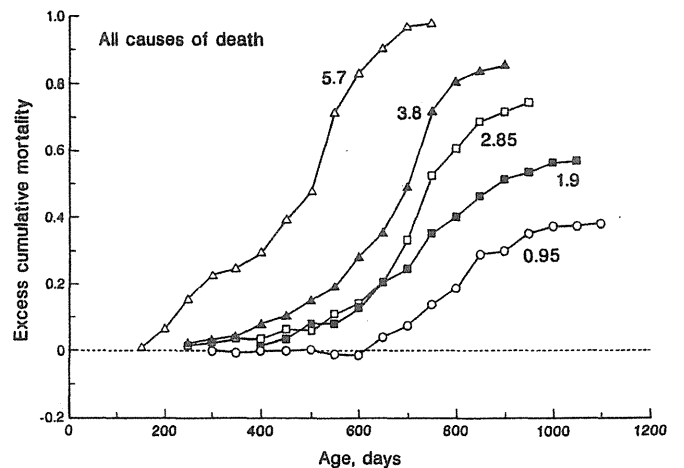


Fig. 3. Age-associated variations of the excess cumulative mortality after irradiation at day 0 with 0.95, 1.9, 2.85, 3.8 or 5.7 Gy γ -rays.

で表すと1.61という数値になる。線量5.7 Gy の場合の生涯リスクは過剰死亡率0.979、累積相対リスク47.1である。生涯リスクの大きさは線量に依存していることが明らかである。過剰累積死亡率が増加し始める年齢は0.95 Gy 照射群では600日を過ぎて後であり非常に遅いことが特徴である。過剰累積死亡率が増加し始める時期は線量が高くなるにつれて早くなっている。過剰累積死亡率の経時変化は放射線の生涯リスクの発現の時間経過を示しているものである。しかしながらこれらのデータを直接解析の対象とすることはできない。放射線が年齢別死亡率をどのように変化させているかを解析するのが常法であるからである。これについては後で述べる。

次に生涯リスクに関する線量効果関係とこれに及ぼす照射時年齢の影響について検討する。Fig. 4 に生涯にわた

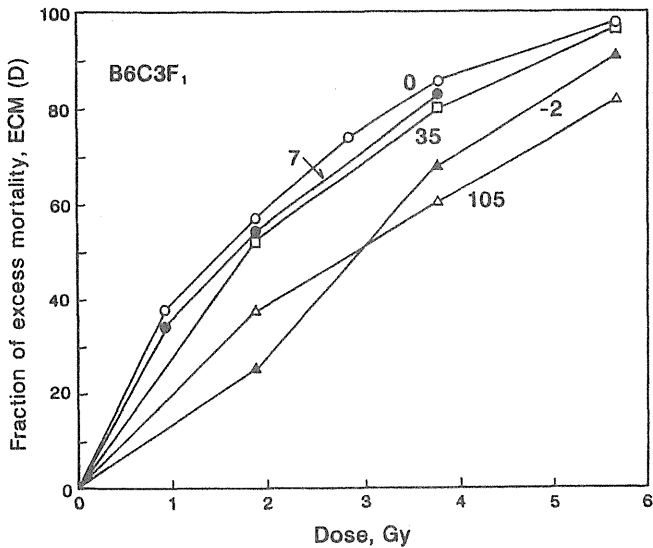


Fig. 4. Relationships between fraction of the excess mortality and dose of γ rays in mice irradiated at day 17 prenatal period (-2), day 0, 7, 35 or 105 postnatal period.

る過剰死亡率と線量の関係をまとめている。0日齢照射したグループにおける過剰死亡率が全ての線量において最も大きな数値であり、感受性が最も高いことを示している。7日齢および35日齢照射の過剰死亡率もかなり大きな数値であるが、105日齢ならびに胎生17日齢照射群の過剰死亡率は相対的に小さな数値である。線量効果関係の形は胎生17日齢の場合はシグモイドであるがその他は上に凸である。Fig. 5 は0日齢照射群における累積相対リスクに関する線量効果関係である。縦軸は対数目盛であるが、線量効果関係はやや下に凸である。線量Dにおける累積相対リスクをCRR(D)とすると次の関係が成り立つ。

$$CRR(D) = \exp(aD + bD^2) \quad (2)$$

累積相対リスクと過剰死亡率の間には関係式(1)が成り立つので、過剰死亡率と線量の関係は次のようになる。

$$ECM(D) = 1 - \exp(-aD - bD^2) \quad (3)$$

線量の一次の項の係数 a と二次の項の係数 b を回帰分析により求めた。その結果を誤差と共に Table 1 にまとめた。胎生17日齢の場合のみ二次の項の係数が一次の項のそれよりも大きいその他の時期の照射による生涯リスクについての線量効果関係においては線量の一次の項の係数

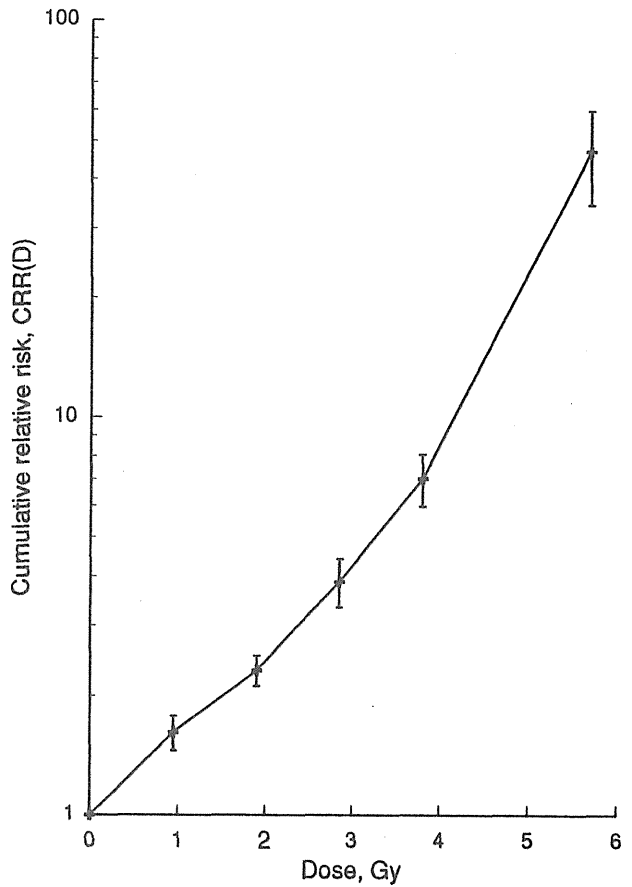


Fig. 5. Dose response relationship for the cumulative relative risk in mice irradiated at day 0 with γ -rays.

Table 1. Parameters of dose-response relationship for lifetime excess mortality and lifetime relative risk in mice irradiated at day 0, 7, 35, 105 or -2

Parameter	Day 0	Day 7	Day 35	Day 105	Day -2
a	0.425	0.407	0.341	0.207	0.018
(se)	(0.033)	(0.036)	(0.008)	(0.023)	(0.003)
b	0.024	0.009	0.024	0.014	0.074
(se)	(0.012)	(0.005)	(0.002)	(0.004)	(0.001)

の方が大きい。ただし線量効果関係は指数関数型である。ところでリスク評価における目標の一つは過剰死亡を推定することである。例えば BEIR-V は10万人が0.1 Sv 被曝するとがんによる過剰死亡が男性で770人、女性で810人起こると推定している。これらはそれぞれ0.77%、0.81%である。これらの数値はモデルを用いての外挿 (projection) によって推定されたものである。終生飼育法による動物実験においてはここに示したように過剰死亡率をより直接的に求めることができる。関係式 (3) を用いて0.1 Gy における過剰死亡を計算すると、0日齢照射では4.4%、105日齢照射の場合は2.2%となる。この数値は一見したところ BEIR-V の数値よりはるかに大きい。問題点は次の通りである。現在までのデータは0.95 Gy 以上についてなのでより低い線量のデータが必要である。BEIR-V などのリスク評価においては感受性の年齢依存性をリスクモデルの中に一応組み込んでいるが、不確実性が非常に大き

い。

放射線の生涯リスクに関する感受性の年齢依存性を Table 1 に示した結果が示している。感受性の年齢変化は線量効果関係の変化として表すのが正確な方法であるが、これができているのは胎生17日齢から出生後105日齢の間に限られている。240日齢と365日齢については3.8 Gyの実験群についてのデータが得られているのみであり、現在追加実験を行なっている。線量3.8 Gyにおける過剰累積相対リスク (excess cumulative relative risk) を照射時年齢に対してプロットしたのが Fig. 6 である。過剰累積相

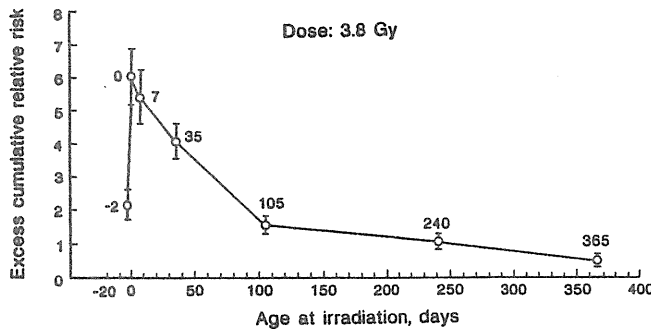


Fig. 6. Excess cumulative relative risk after irradiation with 3.8 Gy γ -rays at day 17 prenatal period, day 0, 7, 35, 105, 240 or 365 postnatal period.

対リスクとは累積相対リスクから1.0を差し引いた数値である。一つの線量における効果を比較しているわけであるが、感受性の変化の傾向は明らかに示されている。最も感受性が高いのは新生児期から思春期までの年齢である。胎生後期はこれより低いが若い成年期とほぼ同等である。成年期は常に等しい感受性ではなく、年齢が進むにつれて感受性が低下する。

放射線により誘発される致死的疾患の中でリンパ腫と白血病はきわだって早く発現する。Fig. 7 に0日齢に5.7 Gy照射した後の過剰累積死亡率の経時変化を示しているが、明らかに二相性である。このグループにおいてはリンパ腫を除く全死因についての過剰累積死亡率は単調増加している。リンパ腫と白血病を除く全死因についての累積相対リスクに関する線量効果関係をまとめたのが Fig. 8 である。

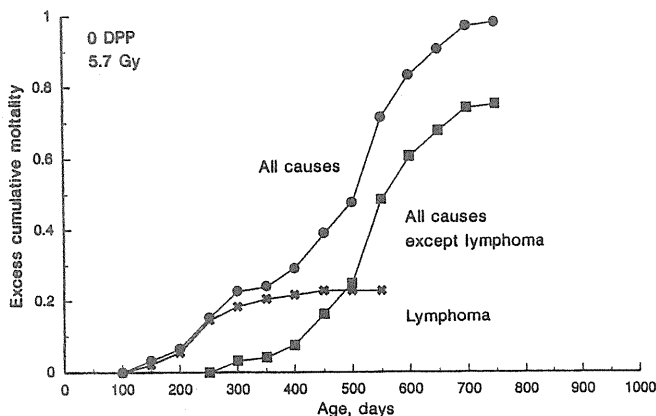


Fig. 7. Age-associated variations of excess cumulative mortality from all causes of death, lymphoma and all causes except lymphoma in mice irradiated at day 0 with 5.7 Gy γ -rays.

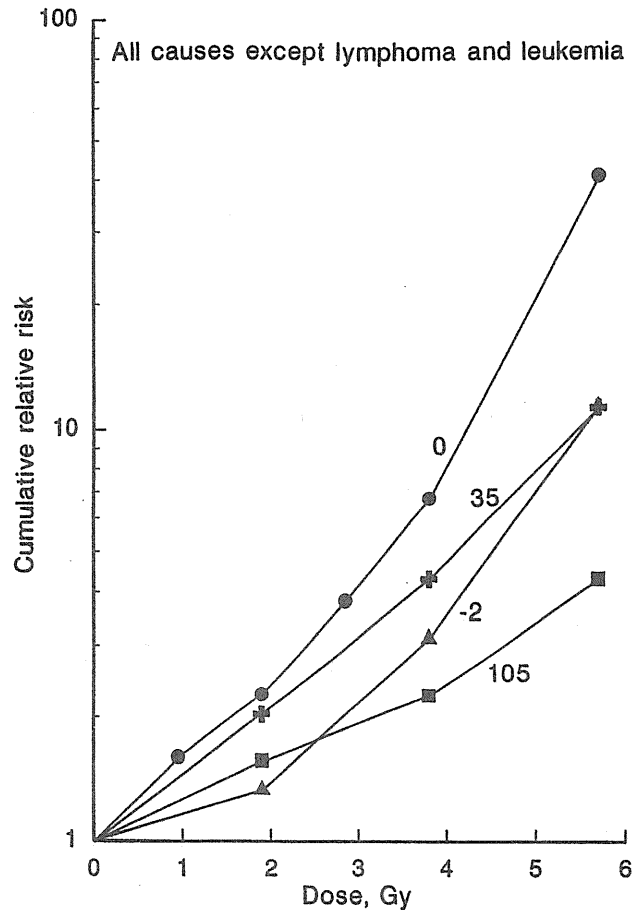


Fig. 8. Dose-response relationships on the cumulative relative risk for all causes of death except lymphoma and leukemia in mice irradiated at day 17 prenatal period (-2), day 0, 35 or 105 postnatal period.

全死因を対象とした場合と大きな傾向は同じであるが、0日齢と35日齢の感受性の差がより大きいといえる。

3.2. 生涯リスク発現の時間経過の解析

ここではリンパ腫と白血病を除く全死因について解析する。

3.2.1. 累積相対リスクの時間的变化

累積相対リスクとは累積死亡率の観察値の期待値に対する倍率である。Fig. 9 に0日齢に照射したグループにおける累積相対リスクの時間的变化をまとめた。累積相対リスクは年齢が高くなるにつれて次第に減少して行く傾向は全ての線量について見られる。もしも相対リスクが常に一定であれば累積相対リスクも一定であるはずであり、この結果は相対リスクは年齢と共に変化することを反映するものである。累積相対リスクの時間的变化を取り扱うことの利点は右端のポイントの数値は生涯リスクを意味しているということに関係があり、中間データから生涯リスクを予測する場合の確実性が高いということである。累積相対リスクの数値は時間が経過するほど信頼度が高くなるのが特徴である。この図においては累積相対リスクが1.0と有意差があるようになった時点からプロットしているが、累積相対リスクの最高値と最終値の倍率は2に近い数値である。0.95 Gyの倍率が最も小さい。

Fig. 10 は胎生17日齢、出生後0、35、105ならびに365

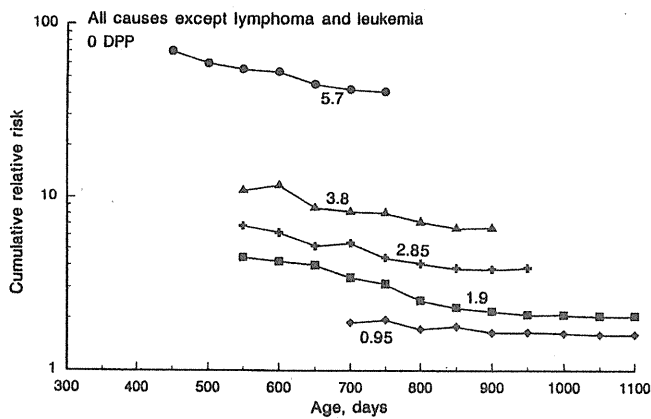


Fig. 9. Age-associated variations of the cumulative relative risk for all causes of death except lymphoma and leukemia after irradiation at day 0 with 0.95, 1.9, 2.85, 3.8 or 5.7 Gy γ -rays.

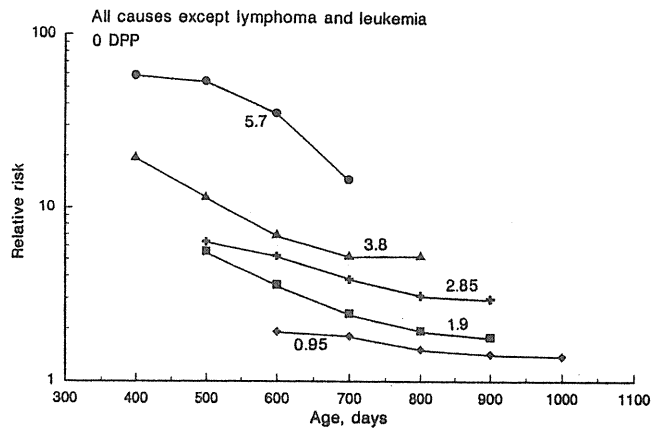


Fig. 11. Age-associated variations of the relative risk for all causes of death except lymphoma and leukemia after irradiation at day 0 with 0.95, 1.9, 2.85, 3.8 or 5.7 Gy γ -rays.

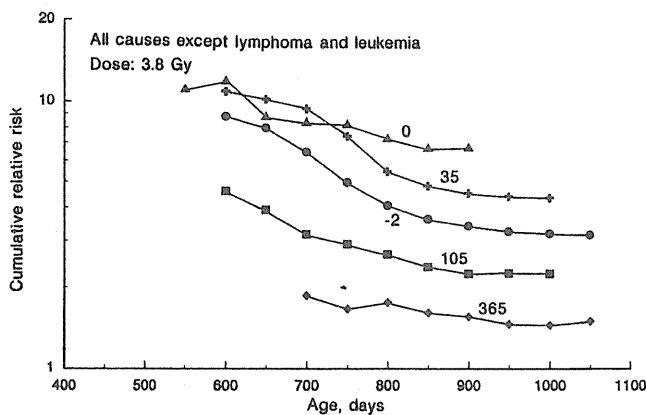


Fig. 10. Age-associated variations of the cumulative relative risk for all causes of death except lymphoma and leukemia after irradiation with 3.8 Gy γ -rays at day 17 prenatal period, day 0, 35, 105 or 365 postnatal period.

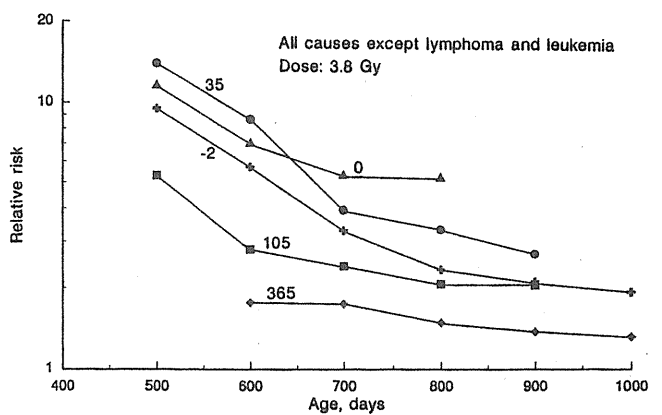


Fig. 12. Age-associated variations of the relative risk for all causes of death except lymphoma and leukemia after irradiation with 3.8 Gy γ -rays at day 17 prenatal period, day 0, 35, 105 or 365 postnatal period.

日齢に3.8 Gyを照射した後の累積相対リスクの時間的変化を相互に比較したものである。累積相対リスクの時間的変化は365日齢に照射した場合が最も小さい。より若い時期の照射の場合は減少はより大きい、若ければ若いほど減少幅が大きいというわけではない。0日齢照射群の累積相対リスクの減少は35日齢や105日齢照射群におけるよりもゆるやかである。最高値と最終値（生涯リスク）の倍率は2を超える場合もあるが3を超えるものはない。

3.2.2. 相対リスクと年齢別死亡率の時間的変化

累積相対リスクの最終値はまさに生涯リスクである。累積相対リスクの時間の経過による減少は相対リスクの減少反映するものである。相対リスクモデルや発癌の多段階モデルは相対リスクならびに年齢別死亡率の時間的変化を数式の中で取り扱っている。放射線は年齢別死亡率を増加させるように作用するのであるからこれは当然なことである。ここでは実験により得られたデータを示して検討を加える。Fig. 11は0日齢に照射した後の相対リスクの時間的変化である。またFig. 12は3.8 Gyを異なる年齢において照射した後の相対リスクの変化である。最も重要なこと

は相対リスクは一定ではないことである。また、相対リスクの大きさと減少速度は照射時年齢と線量に依存していることも重要である。これらの性質は累積相対リスクの時間的変化の場合と共通であるが、減少の速度はより急速である。

次に、年齢別死亡率の時間的変化について検討する。Fig. 13に0日齢照射後の年齢別死亡率を示す。片対数グラフにおいてどこまでも直線ではなく上限値があるかに見える時間的変化をしていることが第一の特徴である。上限値に近づくにつれて勾配は次第にゆるやかになっている。立上り部分の勾配はほぼ平行に見える。勾配がゆるやかになるという現象が相対リスクが次第に減少して行くことの原因となっているようである。年齢別死亡率に上限値があるという事実は決して稀なものではない。後述の肝腫瘍や下垂体腫瘍の場合も同様である。ヒトにおける多種類の悪性腫瘍についても認められている。Gompertz関数はこの上限と勾配がゆるやかになる部分には適合しない。また多段階モデルの場合にも年齢別死亡率は単調に増加するはずであり、上限値の存在はこのモデルからは出てこない。現在検討を進めている一つのモデルを紹介する。線量Dを照射された集団の年齢Tにおける年齢別死亡率を $\lambda(D, T)$

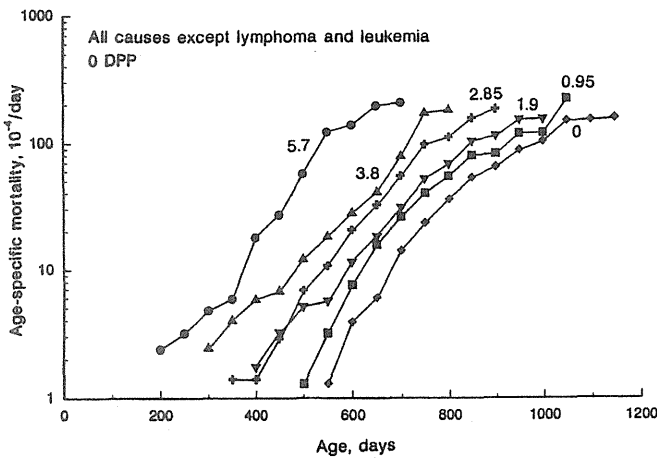


Fig. 13. Age-associated variations of the age-specific mortality for all causes of death other than lymphoma and leukemia after irradiation at day 0 with 0.95, 1.9, 2.85, 3.8 or 5.7 Gy γ -rays in comparison with that in control group.

とすると

$$\lambda(D, T) = \frac{\lambda_{\max}}{1 + \exp[a - \ln RR_1(D) - bT]} \quad (4)$$

ここで λ_{\max} は年齢別死亡率の上限値、 a は癌などの致死的疾患の発生を抑制する力に関する係数、 $RR_1(D)$ は線量 D を照射した場合の初期相対リスク (initial relative risk)、 b は抑制力を解除する速度に関する係数である。要するにこのモデルは抑制する力とこれを解除する力のバランスによって年齢別死亡率が決まっているというものである。放射線は照射後短期間に抑制力を解除すると考えている。初期相対リスクの意味は次の通りである。例えば初期相対リスクが10であるということは初期抑制力を1/10にしていると考えているわけである。上限値から遠い範囲においては次の近似式が成り立つ。

$$\lambda(D, T) = c \times RR_1(D) \times \exp(bT - a) \quad (5)$$

この関係式は実質的に Gompertz の式と同じである。このモデルを抑制力モデル (suppressive activity model) とよんでいる。

このモデルにおける初期相対リスクを0日齢照射の場合について推定した。Fig. 14 にその結果を示す。生涯リスクであるところの累積相対リスクと比較してあるが、当然のことながら初期相対リスクの方が大きい数値として推定された。初期相対リスクは指数関数的に増加するという結果になった。すなわち放射線は抑制力を指数関数的に減少させるという結果である。

3.2.3. 致死的腫瘍についての生涯リスクとその発現

これまでリンパ腫と白血病を除く全死因についての解析を行ってきた。このカテゴリーにおける生涯リスクの増加の大部分は多種類の固形腫瘍の誘発によると考えられる。生涯リスクの増加を問題とする場合には多種類の疾患を含んでいてもさしつかえない。全死因であっても特定の

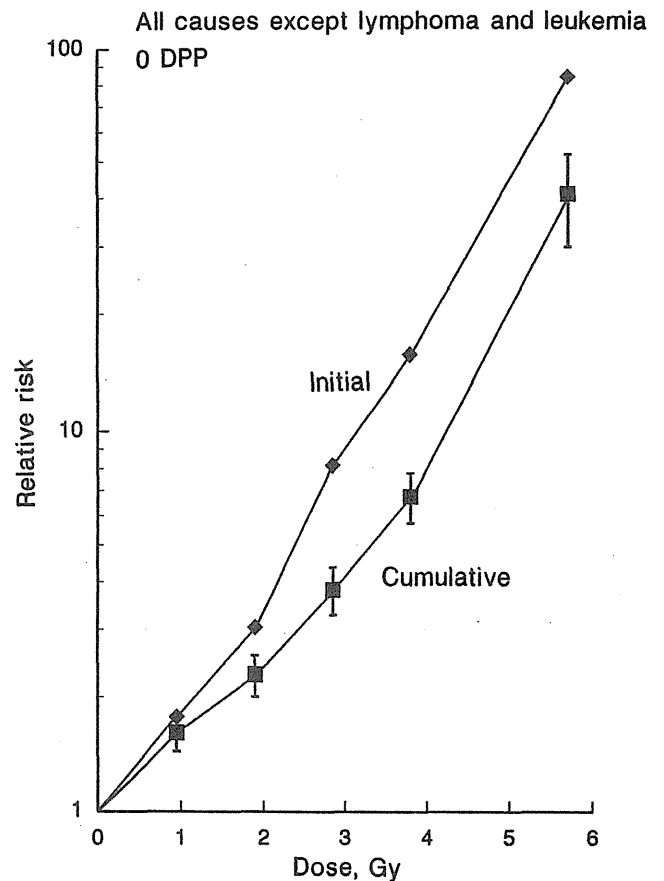


Fig. 14. Dose-response relationships on the initial relative risk for all causes of death except lymphoma and leukemia in mice irradiated at day 0 in comparison with that on the cumulative relative risk. The initial relative risk was estimated with the suppressive activity model.

死因であってもよいのである。それぞれのカテゴリーに特有の性質が解析の結果として得られるはずである。ここでは下垂体腫瘍と肝腫瘍についての結果を簡単に述べる。

下垂体腫瘍はマウスの胎生後期や新生児期の照射により誘発されやすい腫瘍であり、この腫瘍の発生は致死的であると考えられる。Fig. 15 は下垂体腫瘍の生涯リスクに関する線量効果関係である。0日齢照射と105日齢照射の効果を相互に比較している。生涯リスクは累積相対リスクにより表しており、これは下垂体腫瘍による死亡についての観察値の期待値に対する倍率である。0日齢は105日齢と比べてはるかに感受性が高いことが明らかである。線量 0.95 Gy における累積相対リスクは4.46であり、全死因についての累積相対リスク1.61より大きな数値である。より低い線量における影響を検討してみたい。Fig. 16 は0日齢照射群における下垂体腫瘍による年齢別死亡率である。対照群においては700日齢を過ぎてから死亡率が高くなるが、線量に応じて顕著に早くなっている。5.7 Gy 照射群は700日齢までに大部分が死亡するので累積死亡率の期待値を計算できない。Fig. 15 において5.7 Gy のポイントがないのはこのためである。上に述べたモデルを用いて初期相対リスクを推定して140という数値を得た。上限値はそれぞれ異なるので解析がやや複雑になるが上述の抑制モデルがよく合う。詳細は省略する。

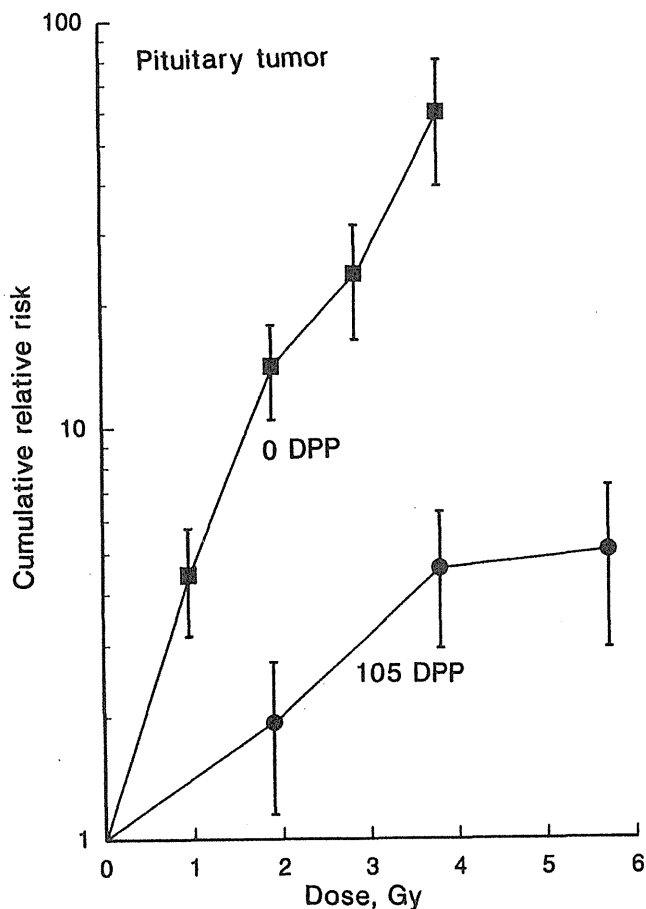


Fig. 15. Dose-response relationships on the cumulative relative risk for induction of pituitary tumor after irradiation at day 0 or 105.

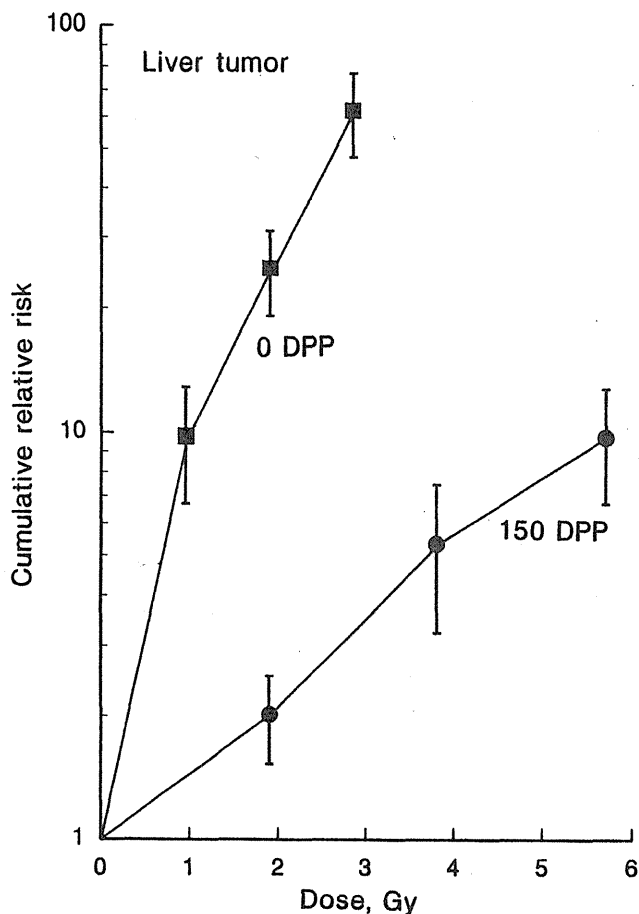


Fig. 17. Dose-response relationships on the cumulative relative risk for induction of liver tumor after irradiation at day 0 or 105.

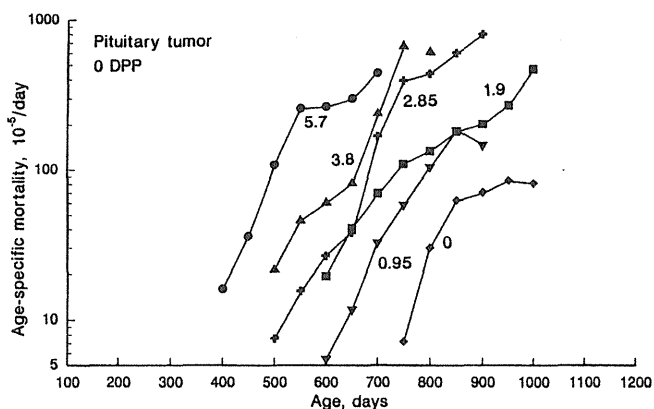


Fig. 16. Age-associated variations of the age-specific mortality for pituitary tumor after irradiation at day 0 with 0.95, 1.9, 2.85, 3.8 or 5.7 Gy γ -rays in comparison with that in control group.

Fig. 17 は肝腫瘍による死亡についての累積相対リスクに関する線量効果関係である。新生児期は非常に感受性が高い。この図にはプロットしていないが3.8 Gy 照射群の累積相対リスクは189である。5.7 Gy 照射群については期待値を計算できないが、抑制力モデルにより推定した初期相対リスクは720であった。これは抑制力が1/720に減少

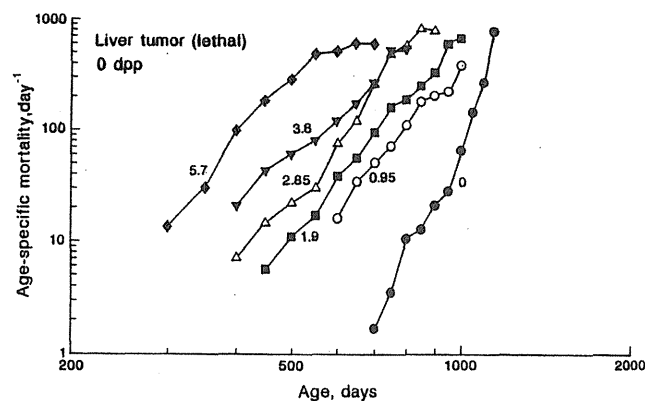


Fig. 18. Age-associated variations of the age-specific mortality for liver tumor after irradiation at day 0 with 0.95, 1.9, 2.85, 3.8 or 5.7 Gy γ -rays in comparison with that in control group.

したと推定されることを意味する。0.95 Gy 照射群の累積相対リスクは9.73である。より低線量における発癌の検討は肝腫瘍についてはさほど困難ではないと思われる。Fig. 18 は肝腫瘍による年齢別死亡率である。死亡率が増加する年齢は線量が高くなるにつれて若い時期に移行している。この図においては横軸も対数目盛である。これは多段

階モデルを意識したものである。確かに線量が高くなるにつれて勾配がゆるやかになる傾向が認められる。この現象は多段階モデルによって解釈しようとする場合には都合のよいことではある。しかし年齢別死亡率の増加率が次第にゆるやかになるという事実は多段階モデルにとっては都合が悪いことである。むしろこの逆でなければならないからである。抑制力モデルによって年齢別死亡率の時間的変化は十分に記述できるし、矛盾点が少ない。

4. 結論

要点と問題点を箇条書きにまとめてみる。

- (1) 放射線の生涯リスクを累積相対リスクまたは過剰死亡率として表現する解析方法を確立した。この方法は全死因、個別の腫瘍などあらゆるカテゴリーに適用できる。
- (2) 全死因についての生涯リスクに関する線量効果関係を胎生後期、新生児期、思春期ならびに若い成年期について得た。線量効果関係は線量の一次と二次の項を持つ指数関数型であった。新生児期から思春期までの年齢において最も感受性が高いことが明らかとなった。中年成年期については実験群が少ないので線量効果関係としては表現できないが、より若い時期よりも感受性は低いといえる。
- (3) 累積相対リスクならびに相対リスクは全ての照射群において年齢と共に減少した。この現象は線量と照射時年齢に依存しており、線量が低い場合に小さく中年成年期の照射の後では小さかった。
- (4) 年齢別死亡率の時間的変化には上限値が存在することが多かった。抑制力モデル (suppressive activity model) と呼んでいるモデルを考案しこれを適用した。抑制力とこれを解除する力とのバランスにより年齢別死亡率が決まっているというモデルであり。放射線は線量に応じて抑制力を解除すると考えるものである。年齢の進行に伴う抑制力解除の速度は対照群と照射群において同じであると仮定しているが、この点はさらに検討しなければならない。
- (5) 下垂体腫瘍と肝腫瘍についてその生涯リスクに関する線量効果関係とその発現の時間経過について検討した。発生率よりは累積相対リスクで表す方が正確に発癌効果を把握できる。その理由は潜伏期の長い腫瘍の場合には死因の

競合の影響を受けるので発生率の観察値は発癌効果を直接的には反映していないからである。発癌効果を反映しているのは年齢別死亡率または年齢別有病率でありこれに基づく解析方法を示した。

(6) ここに述べた研究結果はリスク評価の基礎に資することができる。さらに研究を深めるためにはグループ当りの個体数を多くした実験のデータならびにより低線量についての実験データが必要である。

[研究発表]

- 1) Sasaki, S. : Influence of the age of mice at exposure to radiation on life-shortening and carcinogenesis. *J. Radiat. Res.*, 32, Suppl. 2. 73-85, 1991.
- 2) Sasaki, S. : Age-dependence of susceptibility to carcinogenesis by ionizing radiation in mice. *Radiat. Environ. Biophys.*, 30, 205-207, 1991.
- 3) Sasaki, S. : Influence of age at radiation exposure on attributable risk in mice. Proceedings of International Congress on Radiation Effects and Protection, pp. 223-228, Japan Atomic Energy Research Institute, 1992.
- 4) Mori, H., Iwata, H., Morishita, Y., Mori, Y., Ohno, T., Tanaka, T. and Sasaki, S. : Synergistic effect of radiation on N-2-fluorenylacetylamide-induced hepatocarcinogenesis in male ACI rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 81, 975-978, 1990.
- 5) Morishita, Y., Tanaka, t., Mori, H. and Sasaki, S. : Effects of X-rays on N-methyl-N-nitrosourea-induced multicarcinogenesis in rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 26-33, 1993.
- 6) Minamisawa, T., K. Hirokaga, S. Sasaki and Y. Noda. Effects of fetal exposure to gamma-rays on aggressive behavior in aduol male mice. *J. Radiat. Res.* 33: 243-249 (1992).
- 7) 春日孟, 佐々木俊作: 放射線障害. 現代病理学大系 (飯島宗一編), 第10巻B, 101-114, 中村書店, 東京, 1990.

II. 遺伝的影響に関する予備的研究—放射線感受性（修復欠損）マウスの作製に向けて

塩見 忠博、松田 洋一、原田 良信、斉藤 俊行
放射線医学総合研究所 遺伝研究部

Preliminary studies on genetic effects of low dose radiation – towards the establishment of radiation sensitive (repair – deficient) mice.

Tadahiro Shiomi, Yoichi Matsuda, Yoshinobu Harada and Toshiyuki Saito.

Division of Genetics, National Institute of Radiological sciences, 4-9-1, Anagawa, Inage-ku, Chiba, 260 Japan.

Abstract

The intricate network of biochemical repair systems has evolved to counteract the deleterious consequences of DNA injury and permanent mutations. One of the major repair processes is the nucleotide excision repair pathway. This system removes a broad category of DNA lesions caused by very dissimilar agents such as UV-in-

duced cyclobutane pyrimidine dimers and photoproducts, as well as bulky chemical adducts and DNA cross-links. An UV-sensitive repair deficient mouse strain, if established, would be very useful for studying the nucleotide excision repair mechanism in vivo. For the first step to establish such a mouse strain, we isolated a mouse counterpart of human DNA repair gene ERCC5.

緒言

低線量の遺伝的影響をマウス等の実験動物を用いて行なうためには、膨大な数の動物を必要とする。このような研究を本格的に実施するためには、放射線影響を鋭敏に検出できる実験系の確立が不可欠であると思われる。放射線に高感受性となったマウス系統を樹立することができれば、これらのマウスは放射線の生物影響を個体レベルで鋭敏に検出し研究するのに最適の材料になると期待される。

近年、多分化能を有するマウス胚幹 (ES) 細胞に遺伝子ターゲティング法を用い特定の遺伝子にのみ突然変異を導入した変異 ES 細胞をマウス受精卵 (胚盤胞胚) に微量注入し、それから変異マウス個体を作製する方法が開発されてきた。理論的には、この方法を用いると、マウスの遺伝子をクローン化すれば、その遺伝子を欠損したマウスを作製することが可能になってきた。我々の研究グループでは、これまでにヒト紫外線型 DNA 損傷修復に関与する遺伝子 (ERCC5) のクローニング及び対応するヒト cDNA の分離に成功してきた。そこで放射線感受性マウス作製のモデルケースとして ERCC5 遺伝子を欠いた修復欠損マウス作製を目指し研究を進めた。

放射線感受性（修復欠損）マウス個体作製の原理

DNA 損傷修復機能の個体維持における役割、即ちがん化、老化、分化にどのように関与しているかを明らかにするためには、修復欠損の実験動物が開発されることが必須である。最近の発生工学、遺伝子工学の進歩により、クローン化されたマウス遺伝子と多分化能を有するマウス胚幹細胞を組み合わせ用いることにより、その遺伝子を欠損した

突然変異マウスを作製することが可能になってきた。

胚幹 (Embryonic Stem, ES) 細胞とは、マウス受精卵を培養してえられた多分化能を保持した細胞株をさす。ES 細胞を胎胚期のマウス受精卵に注入してやると受精卵由来の細胞と共に分化して個体形成にあずかり、卵由来と ES 細胞由来の細胞の混ざった個体 (キメラ) が生まれる。したがって ES 細胞は卵に匹敵するぐらいの能力を持っているといえる。このような ES 細胞に、試験管内で突然変異を導入したマウスの修復遺伝子 (ERCC のマウス相同遺伝子) を移入すると低い頻度ではあるが、相同組換えにより、正常遺伝子が突然変異遺伝子と置きかわり修復遺伝子座がヘテロ (正常: + / 変異: -) になった ES 細胞が出現する。このような ES 細胞を胚盤胞期のマウス受精卵に戻すと、修復遺伝子がホモ (+ / +、卵由来) とヘテロ (+ / -, ES 由来) の細胞からなるキメラマウスが誕生する (このとき、毛色の異なったマウス由来の卵と ES 細胞を組み合わせ用いると、キメラの見分けが簡単にできる。) これらのうち ES 細胞が生殖細胞に分化したマウス個体を選び掛け合わせを進めることにより修復欠損のホモ (- / -) 個体を得ることが出来る (図 1)。

結果と結論

1. マウス修復欠損紫外線高感受性変異株細胞の欠損を補うヒト遺伝子のクローニング。

マウス紫外線高感受性変異株 XL216 は、げっ歯類の紫外線高感受性変異株の相補性群の第 5 群に属する。XL216 の欠損を補うヒト遺伝子のクローニングを以下のようにして行なった。制限酵素 EcoRI で部分分解したヒ

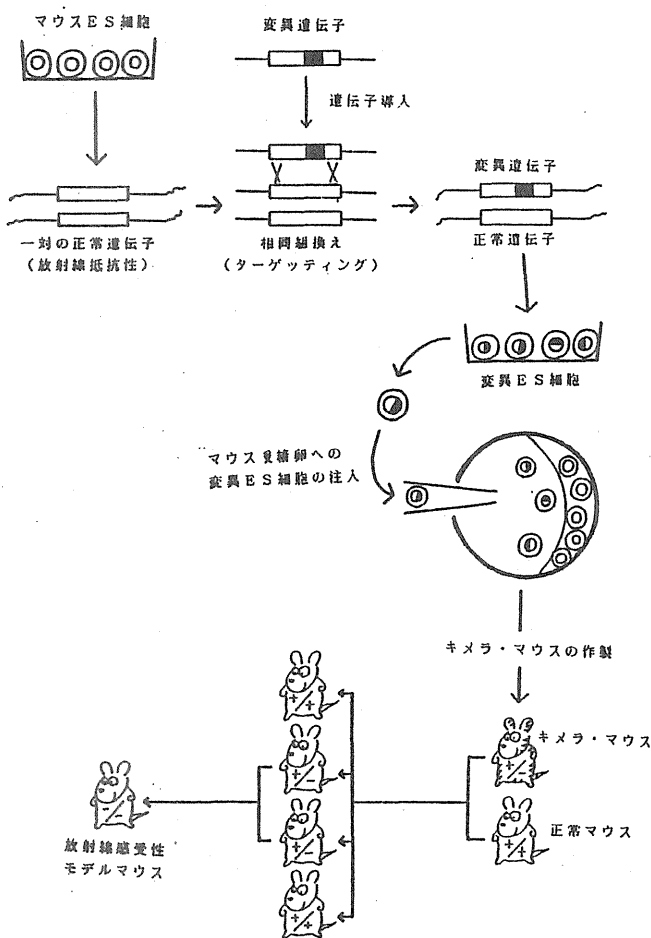


図1 放射線感受性モデルマウスの作製

ト HaLa 細胞 DNA (平均60Kb) と EcoRI で切断したプラスミド pSV2neo をリガーゼで連結した後、リン酸カルシウム法で XL216 細胞に導入し、薬剤 G418 と紫外線の両方に抵抗性になった第一次形質転換細胞 (TSR1) を得た。さらに第一次形質転換細胞 DNA を XL216 細胞に導入し、G418 と紫外線で選択し、第二次形質転換細胞 (TS2R1) を得た。ヒト細胞 DNA には neo 遺伝子が連結されているから、第二次形質転換細胞中に保持されているヒト修復遺伝子 (第5群の欠損を補うから ERCC5 と名付ける) の近傍には neo 遺伝子が連結され存在するはずである。TS2R1 DNA からコスミドライブラリーとラムダファージライブラリーを構築し、この neo 遺伝子を目印にしてコスミドライブラリーからヒト DNA を含むクローンを得た。ところがこれらのコスミドクローンは性質が不安定であったためコスミド DNA の一部断片をプローブにしてさらにファージライブラリーをスクリーニングし、ヒト由来の DNA 30kb を回収し、制限酵素地図を製作した (図2)。回収した DNA 断片は独立に分離した紫外線抵抗性形質転換細胞すべてに保持されていたことから、これが目的のヒト遺伝子 ERCC5 と考えられた。

2. ERCC5 遺伝子 cDNA の分離。

ヒト ERCC5 遺伝子のエクソンを含む断片をプローブにして、pCD2 に構築した二つのヒト cDNA ライブラリーをスクリーニングし、30個の陽性クローンを得た。これらの cDNA クローンを XL216 細胞に導入したがいずれの

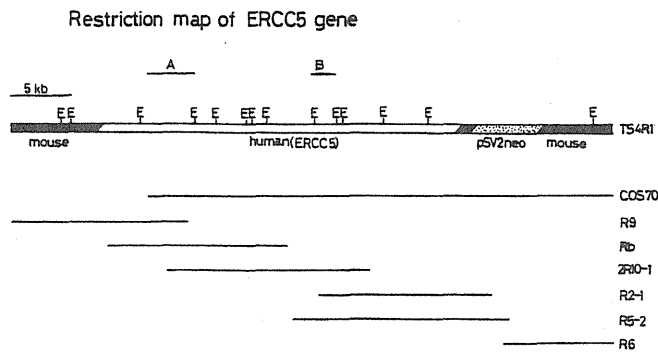


図2 ERCC5 遺伝子の制限酵素地図

クローンも XL216 細胞の紫外線高感受性の性質を直すことができなかった。最長の cDNA は 3.2kb であったが、ノーザンブロット法で調べた ERCC5 の mRNA のサイズ (-3.8kb) に比べやや短く、制限酵素地図から判断すると、5' 側に欠損があると思われる。そこで未回収の 5' 側 cDNA 断片を RACE (Rapid Amplification of Complementary DNA End) 法により合成し、回収した。ヒト ERCC5 cDNA をプローブにして五種類のマウス cDNA ライブラリーをスクリーニングし 9 個の陽性クローンを得た。一つのクローンは 2.8kb の長さで 5' 側は完全であるが 3' 側に欠損があった。4つのクローンは 5' 側と 3' 側の両方に欠損があった。残りの 4つのクローンは 5' 側に欠損が見られるが 3' 側は完全であることがわかった。5' 側が完全なクローンと 3' 側が完全なクローンから得た cDNA を酵素的に連結して完全長の cDNA (少なくともオープンリーディングフレームは完全) を作成した。この cDNA を pSV2 の発現ベクターに挿入し pSVMER5 と名付けた (図3)。

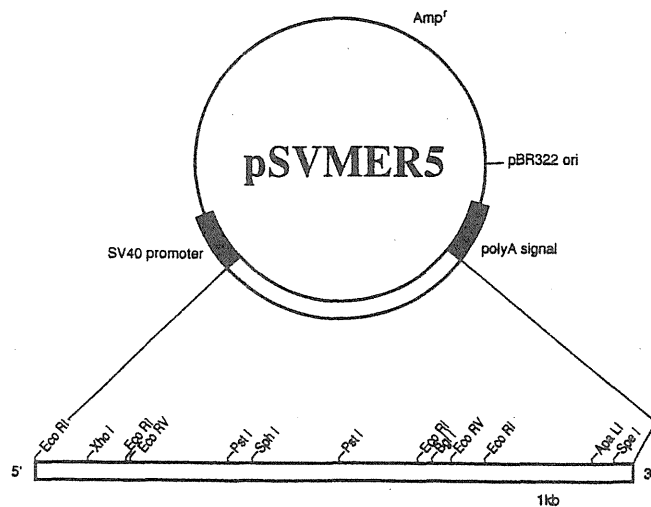


図3 pSVMER5 の構造

pSVMER5 を取り込んだ XL216 細胞は紫外線に抵抗性になる (図4) ことから連結した cDNA は完全な ERCC5 蛋白質をコードすると考えられた。

3. ERCC5 cDNA の塩基およびアミノ酸配列。

ERCC5 cDNA の塩基配列を決定した (図5)。ERCC5 cDNA はポリ A 部位の19塩基上流に典型的なポリ A シグナル (AATAAA) を有していた。ERCC5 cDNA

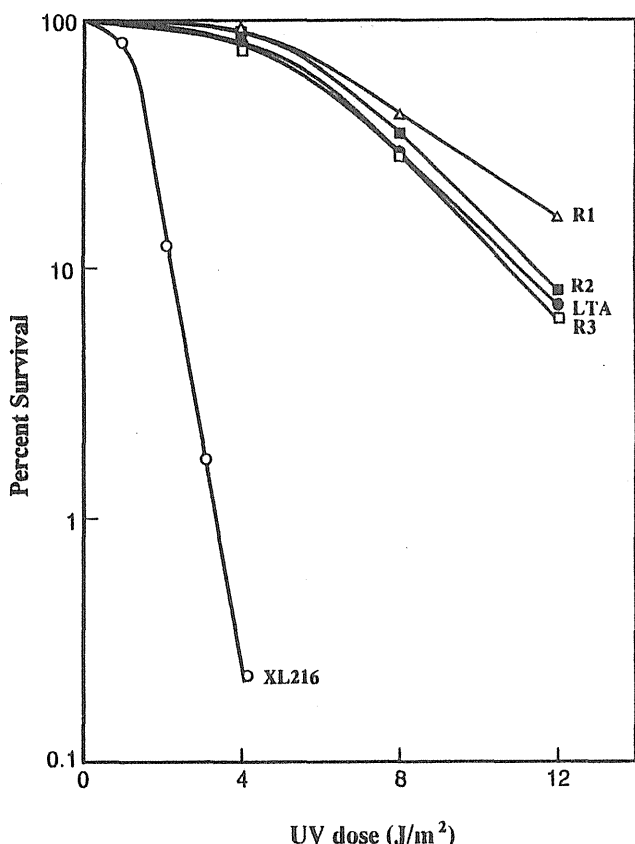


図4 ERCC5 遺伝子で形質転換した細胞の紫外線に対する生存曲線

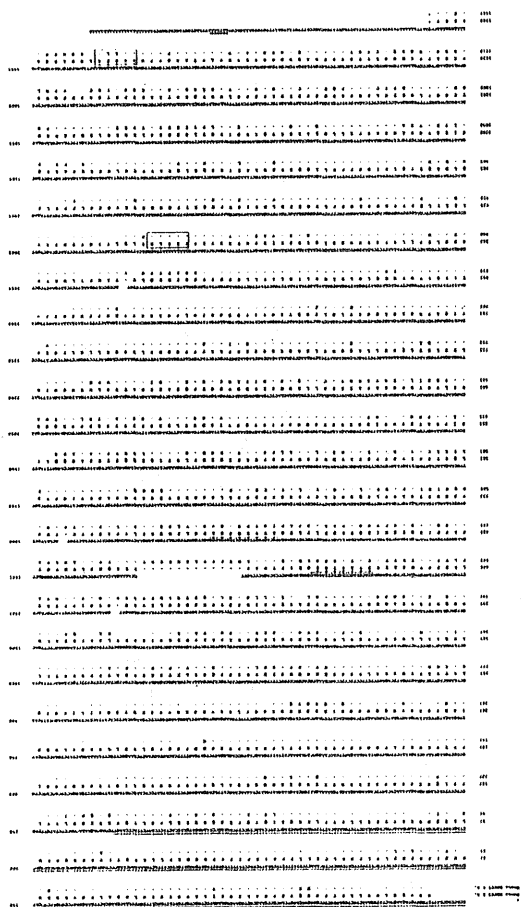


図5 ERCC5 の塩基配列

は、塩基配列から類推して、1185アミノ酸からなる分子量132519の蛋白質をコードしている。データベースをホモロジーサーチして、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の除去修復関連遺伝子 RAD2 のコードする蛋白質と ERCC5 蛋白質が有意に相同性が高いことがわかった。特に RAD2 の1-110番目と、767-866番目のアミノ酸配列と ERCC5 の1-110番目と764-863番目のアミノ酸配列が特に相同性が高く、51%のアミノ酸残基が同一であった(図6)。さらに86%のアミノ酸残基が相同であった。ERCC5 蛋白質には二つの核移行シグナルらしいアミノ酸配列が認められるから、核内において働く蛋白質と考えられる。

ERCC5	1	MGVQGLWKLLECSGRQVSPLEAGKILAVDISIWLNQALKGVDRRHGNSIENPHP
		::: : : ::: : :: : :: :: :: :: :: :: :: :
RAD2	1	MGVHSFWDIAGPTARPVRLSLEDKRMVAVDASIIWIIYQFLKAVRDQEGNAVKNSHI
ERCC5	56	LTLFHLRCLKLLFFRIRPIVFDG6DAPLLKQTLVKKRQRKDLASSDSRKTTEKLL
		::: : :: :: :: :: :: : :: : : : : : : : : : : : : : : : :
RAD2	56	TGFFRRIKLLYF6IRPVFVFDGGVPLKRETIKRRKERRDGRKRESAKSTARKLL
ERCC5	764	VTGQMFLESQELLRLFGIPYIQAPMEAEQAQAVLDLTDQTSGTITDSDIWLFGA
		: : :: : :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
RAD2	767	VTMDMIKEVQELLSRF6IPYITAPMEAEQAQAEALLQLNLVDGIITDSDVFLFGG
ERCC5	829	RHYVRNFFNKKNKFEYYQYVDFHNLGLDRNKLINLAYLLGSDYT
		::: :
RAD2	832	TKIYKMFHEKNYVEFYDAESIKLLGLDRKNMIELAQLLGSDYT

図6 ERCC5 と酵母 RAD2 のアミノ酸配列の相同性

4. ERCC5 cDNA は XPあるいは CS の欠損を相補するか。

げっ歯類の第5群の変異株細胞の形質は紫外線高感受性ヒト遺伝病色素性乾皮症 XP やコケイン症候群 CS の形質に似ている。そこでクローン化した ERCC5 cDNA を用いて、7群 (A-G) の XP と2群 (A-B) の CS との相補性試験を行なった。各相補性群の遺伝病細胞の核内に ERCC5 の cDNA を導入後、XP 細胞では紫外線誘発不定期 DNA 合成 (UDS) の回復の有無、CS 細胞では紫外線照射後の RNA 合成抑制の回復の有無を指標にして相補性の有無を判定した。ERCC5 cDNA は XP の G 群細胞の修復欠損を特異的に相補した(表1)。XP の他の群や CS の欠損は相補しなかった。ERCC5 cDNA を微量注入した XP-G 細胞の UDS はほぼ正常細胞レベルまで回復していた(図7)。XP-G 細胞 (XP3BRSV) に ERCC5 cDNA (pSVMER5) を導入し、紫外線抵抗性になった形質転換細胞を得た。このうち2つのクローン (XP3BRSVR1, 2) について紫外線に対する生存曲線を作成した(図8)。2クローンとも紫外線に対してはほぼ正常レベル近くまで抵抗性になっていた。ERCC5 遺伝子は XP-G 群の紫外線高感受性ならびに修復欠損を特異的に相補することから、XP-G 群で欠損している原因遺伝子であると考えられる。

5. XP 細胞における ERCC5 遺伝子の発現。

各相補性群に属する XP 細胞ならびにヒト HeLa 細胞からポリAプラスの RNA を抽出し、ERCC5 cDNA をブロー

表1 ERCC5 遺伝子による各種 XP や CS 細胞の相補性試験

Cell (Complementation group)	Grains/Nucleus		Correction
	Non-injected	Injected	
Kps4 (XP-A)	4±1	4±1	-
CRL1199 (XP-B)	6±1	6±1	-
GM3176 (XP-C)	31±2	30±3	-
Kps1 (XP-G)	35±2	33±3	-
GM2415B (XP-E)	72±5	74±5	-
Nps1 (XP-F)	25±2	25±3	-
Sps1 (XP-G)	6±2	93±7	+
GM3021A (XP-G)	7±2	90±7	+
Mps1 (CS-A)	122±11	127±13	-
CS1MO (CS-B)	115±11	111±13	-

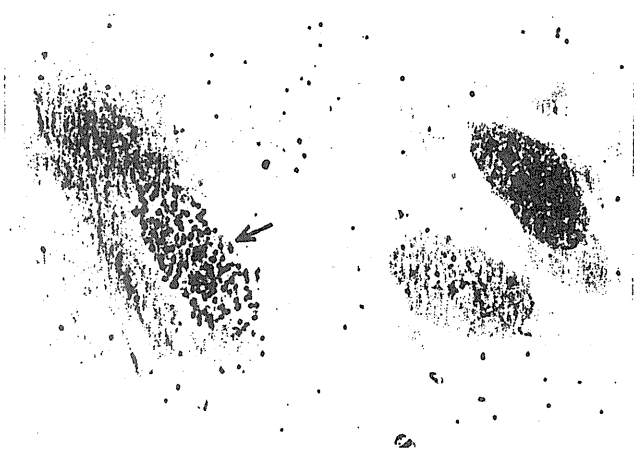


図7 XP-G 群細胞の UDS
矢印の細胞核には ERCC5 cDNA を微量注入した

ブとしてノーザンブロットングを行なった (図9)。その結果、XP-G 細胞 (二種類) においても正常と変わらない大きさの mRNA を正常とほぼ同量合成していることがわかった。このことから調べた XP-G 細胞の ERCC5 遺伝子に生じた突然変異は、その発現量や mRNA の長さに影響を及ぼすような大きなものではなく、恐らく点突然変異か、あるいは非常に小さな欠失のようなものであろうと推定される。XP-G 群患者細胞における ERCC5 遺伝子座での突然変異を同定することは今後に残された問題である。

6. ターゲッティング ベクターの作製

遺伝子ターゲッティング法で目的とする遺伝子に突然変異を導入したマウス胚幹 (ES) 細胞を分離し、それから変異マウス個体を作製する方法が開発され、ある遺伝子の個体での働きや役割に関する知見を得ることが可能になってきた。この方法を ERCC5 遺伝子に適用するため、遺伝子ターゲッティング用ベクターの作製を試みた。まず、ERCC5 のマウス相同遺伝子の単離を目指した。マウスの肝臓 RNA から cDNA ライブラリーを作製し、ヒト

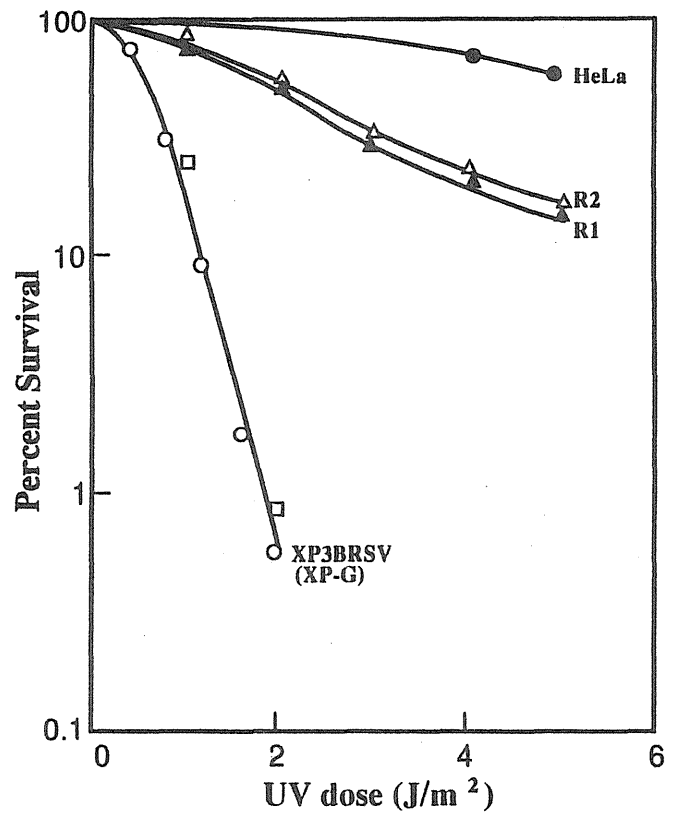


図8 ERCC5 cDNA で形質転換した XP-G 細胞の紫外線に対する生存曲線

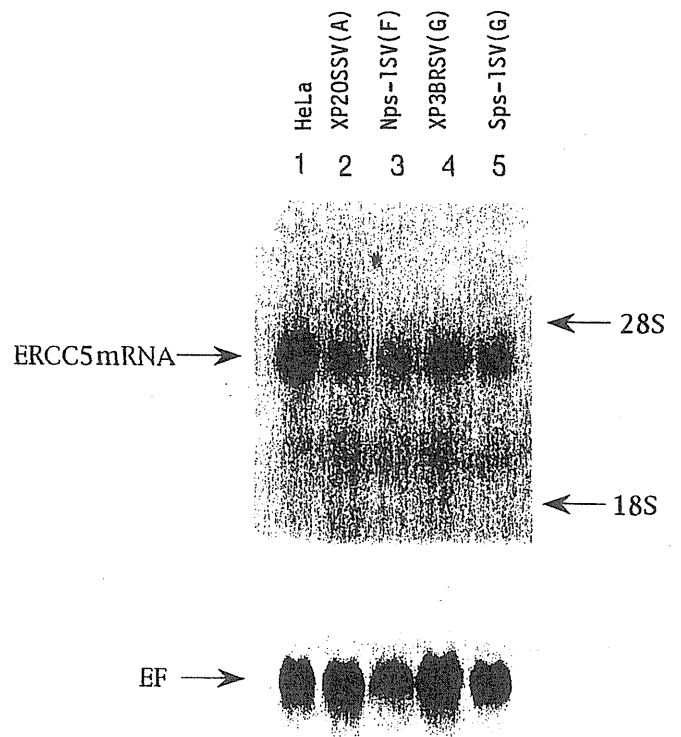


図9 各種 XP 細胞の ERCC5 mRNA のノーザンブロット

ERCC5 の cDNA をプローブとして約150万クローンのスクリーニングを行ない、9 個の陽性 cDNA クローンを得た。このうち最長の cDNA は2.8kb であった。このクロー

ンの塩基配列を決定し、ヒト ERCC5 の cDNA 塩基配列と比較すると全長にわたって相同性が保たれていることがわかった。このことは、分離したマウス cDNA が ERCC5 のマウス相同遺伝子の cDNA であることを強く示唆している。このマウス ERCC5 cDNA をプローブにして C57BL/6 マウス胎児由来細胞 DNA から作製したゲノムライブラリーをスクリーニングしてマウス ERCC5 遺伝子断片 (約20kb) を回収できた。さらにこの断片を HindIII と EcoRI で切断して得た7.5kb断片中には、ERCC5の比較的大きな約0.7kbのエクソンを含むことがわかった。そこで、このH-E断片をpUC119にクローン化し、0.7kbのエクソン中の SphI site に polyA シグナルを欠く MCneo を挿入し、挿入型の変異を導入した (コントロールベクター)。さらに neo から下流約1.1kb の BglIII site より下流部位を取り除いたターゲティング用ベクターを作製した (ターゲティングベクター) (図10)。

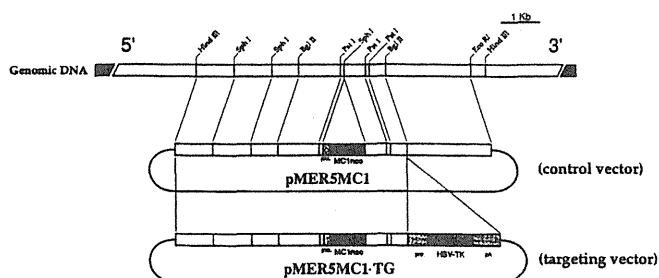


図10 ターゲティングベクターの作製

研究発表

1. Precise Localization of the Excision Repair Gene, ERCC5, to Human Chromosome 13q32.3-q33.1 by Direct R-Banding Fluorescence in situ Hybridization. E. Takahashi, N. Shiomi and T. Shiomi. Jpn. J. Cancer Res. 83, 1117-1119, 1992.
2. Location of the mouse complement factor H gene (cfh) by FISH analysis and replication R-banding. Y. Matsuda, Y.-N. Harada, S. Natsuume-Sakai, K. Lee, T. Shiomi and V. M. Chapman. Cytogenet Cell Genet 61, 282-285, 1992.
3. Identification of Cellular Defect in UVSI, a UV-sensitive Chinese Hamster Ovary Mutant Cell Line. M. Numata, H. Hata, T. Shiomi, T. Matsunaga, T. Mori, O. Nikaido, A. Yasui and A. Oikawa. Cancer Research 53, 495-499, 1993.
4. An ERCC5 gene with homology to yeast RAD 2 is involved in group G xeroderma pigmentosum. T. Shiomi, Y. Harada, T. Saito, N. Shiomi, Y. Okuno and M. Yamaizumi. Mutation Research, in press.