

ISBN4-938987-07-4
NIRS-R-37



特別研究「放射線被ばくのデトリメントと
その修飾に関する生物学的調査研究」

(平成5年度～平成9年度)

最終報告書

平成11年3月

放射線医学総合研究所

Final Report on the Project Research
“Experimental Studies on the Radiation Health
Detriment and Its Modifying Factors”

(April 1993 ~ March 1998)

March 1999

National Institute of Radiological Sciences
9-1, Anagawa 4-chome, Inage-ku, Chiba-shi 263-8555, Japan

概 説

本特別研究は、平成5年度から5ヵ年計画で行われ、平成9年度で終了した。この特別研究では、ICRP等の動向に従い放射線の健康影響を従来の「リスク」から「デトリメント」として捉え直すこと、放射線による影響を定量的に明らかにし、影響発現機構の理解と影響の修飾因子の評価を通して、影響低減策につなげることを目的とした。

この特別研究では、放射線の生体への影響評価を目的としたため、動物実験を行い、そこから得られた材料を種々のレベルで解析することが特徴である。本特別研究では、放射線影響として最も重要な問題である次の3点に焦点を当てて研究が進められた。すなわち、(1) 低線量放射線被ばくにより最も影響があると考えられる「発がん」、(2) 確定的影響としては極めて感受性が高く、社会的関心が高い「胚・胎児への影響」、ならびに(3) 原子力利用において放射線安全上極めて重要な「プルトニウムの内部被ばくの影響」である。以下に各課題ごとの目標と成果の概要をまとめた。

「放射線による発がんとその修飾因子に関する研究」では下記の4小課題を設定して進められた。

「放射線感受性ミュータントマウスを用いた放射線発がんに関する研究」では、免疫関連遺伝子の再構成に欠陥があるため重症複合免疫不全の症状を呈するミュータント・マウスとして見つかり、後に、放射線誘発DNA二本鎖切断の修復機構の欠陥があるために放射線感受性が高いことが判明したscidマウスを用い、放射線感受性と発がん感受性の関連性を解析することを目的とした。急性障害実験の結果、scidマウスはF1 (scidヘテロ) マウスや野生型マウスに比べ、個体レベル・細胞レベル共に放射線感受性が高く、また、F1マウスは野生型マウスよりは感受性が高いことを明らかにした。また、放射線による発がん実験の結果、胸腺リンパ腫の発生率はscidマウスでは高く、野生型マウスやF1マウスでは低いことから、scid変異ホモマウスでは放射線誘発胸腺リンパ腫の発生感受性が高く、scid変異ヘテロマウスでは抑制されることが判った。

「放射線による乳腺腫瘍の発生機序とその調節因子に関する研究」に関しては、妊娠中や授乳中は、乳腺に作用する種々のホルモンの分泌様式が異なり、これらの各時期の乳腺細胞の放射線感受性は異なると予測されたため、ラットを用い放射線による乳腺細胞の腫瘍化と各種ホルモンの関係を解析すると共に、腫瘍化抑制因子の検索を進めることにした。この結果、妊娠中や授乳中のラットの乳腺組織は放射線発がん感受性が高く、エストラジオール処置は感受性を高めること、DES (卵胞ホルモン) はプロモーター作用を有するが、CMA (黄体ホルモン) はプロモーター作用を示さないこと、また、抗高脂血症薬 (ベザフィブラート、シンバスタチン、デヒドロエピアンドロステロン) は発がんのプロモーション過程を抑制することが判明した。

「マウス骨髄性白血病の発症とその修飾因子に関する研究」に関しては、動物に与える飼料のカロリーを制限することにより放射線誘発骨髄性白血病の発症が減少することを既に報告しており、今回は白血病の発症とその抑制機構の解析、特に、カロリー制限の効果が、白血病発症のイニ

シエーションとプロモーションのどちらに関与しているのかの解析を進めることを目標とした。この結果、カロリー制限による放射線誘発白血病発症の減少と、骨髄の骨髄系幹細胞・脾臓の多能性幹細胞と骨髄系幹細胞 (GM-CFU) の減少あるいは細胞周期の遅延との間には相関性が有り、また、照射前に制限食を投与しても白血病発生率があまり下がらないが、照射後にカロリー制限すると白血病発生率が下がることから、カロリー制限による白血病発生の抑制は、発がんイニシエーションにも関係はするが、発がんプロモーション期の関与が大きいことが判った。

「放射線の低線量照射による線量・線量率効果因子に関する実験的研究」では、高線量率または低線量率で放射線を照射したマウスの骨髄性白血病の発生率を比較することにより、線量・線量率効果係数 (dose dose-rate effectiveness factor: DDREF) を算出することを目標とした。8週齢雄C3Hマウスにガンマ線を低線量率ないし高線量率で照射後、終生飼育した結果、低線量域では線量率が低くても照射期間が長ければ白血病の発生率が高くなる傾向が見られ、白血病発生の線量・線量率効果係数 (DDREF) は2ないし3と算出された。

「放射線ならびに放射性物質の胎児影響に関する研究」は、以下の2小課題について進められた。

「放射性物質の摂取に伴う胎児の被ばく線量とその影響に関する研究」では、母胎に摂取された放射性物質の胚・胎児の各部位での代謝パラメーターを確定し、その器官における被ばく線量を求めること、胎児の内部被ばく影響を高感度で検知できる指標を明らかにし、放射性核種の胎児摂取量—線量効果関係を実験的に求めることを目標とした。プルトニウムを妊娠4日目の母胎に投与し、13日後に胎児肝臓の造血幹細胞数を算定した結果、C3Hマウスでは造血幹細胞数はプルトニウムの大量投与でも減少せず、BDF1マウスでは少量の投与で減少したが、両系統での受胎産物への移行量・分布には差が無く、感受性に系統差があることを明らかにした。また、肝臓における赤血球造血能の放射線感受性は胎齢により変動し、胎齢9日目に最も感受性が高いことが判った。

「発生過程における中枢神経系等の組織構築とその放射線損傷に関する研究」に関しては、これまでは、主に高線量・高線量率の照射による胚死・奇形の発生に基づいて放射線の胎児へのリスクが評価されていたため、低線量・低線量率放射線による中枢神経系発生分化への影響を解析することを目標とした。実験の結果、大脳皮質形成期 (胎齢14~16日) に0.1~1 Gyの比較的低線量を照射すると、発生過程の大脳皮質では神経細胞の移動の遅れと分布の乱れが生ずるが、0.1~0.3 Gy/日の線量率で胎齢14~16日の3日間連続照射 (総線量: 0.3~0.9 Gy) しても影響が無いこと、小脳では顆粒細胞層形成期 (生後6日) に被ばくとすると著明な細胞死が誘発されることが判明した。

「アルファ放射体による内部被ばくの生物学的影響とその修飾因子に関する研究」は次の3小課題のもとに行われた。

「吸入放射性物質の気道内沈着機構と体内動態に関する研究」では、呼吸気道のキャストモデルを用いた実験により、エアロゾルの呼吸気道内への沈着機構を明らかにするとともに、動物実験により、吸入エアロゾルの肺への沈着の様相とその後の体内動態や、それらに影響を及ぼす因子について明らかにすることを目標とした。呼吸気道模擬キャストを用いた単分散エアロゾルの沈着実験では、粒子径が小さくなるに従って沈着率が增大すること、また、プルトニウム吸入動物実験では、肺に沈着したプルトニウムの残留率は二相性で、高温焼結プルトニウムは、低温焼結プルトニウムや水酸化プルトニウムに比べ、排泄が遅いことを明らかにした。

「アルファ放射体による内部被ばくのバイオドシメトリに関する研究」に関しては、アルファ放射体の被ばく線量を、物理的手法によらず、細胞に生じた変化を測定し、生物学的指標から線量を直接評価するバイオドシメトリを開発し、細胞の被ばく線量を基準とした発がんデータの解析に用いることを目標とした。はじめにアルファ線in vitro照射装置を開発し、アルファ線照射後の培養細胞 (V79) の生存率を検討した結果、生存率は線量に対して肩のない直線が得られた。次に、小核誘発効果を検討した結果、線量効果関係は直線モデルに合い、誘発率 $=0.019+0.111\times$ 線量 (Gy) で、バイオドシメトリの指標として適することを見いだした。

「アルファ放射体による内部被ばく発がんとその生物学的修飾因子ならびに低減化に関する研究」では、プルトニウムの被ばく形式と臓器分布の特異性に基づく発がん効果と、それを修飾する生物学的要因について動物実験により実証すること、およびアルファ放射体の内部被ばくによる発がんの特異性・修飾因子・機構を明らかにすることを目標とした。酸化プルトニウムの吸入によるラットの肺腫瘍発生率には、4～6 Gyをピークとする線量効果関係が見られ、良性腫瘍と悪性腫瘍ではパターンに違いがあること、クエン酸プルトニウムの注射では骨腫瘍の発生に種差・性差があることを明らかにした。

「発がん」、「胚と胎児への影響」、「プルトニウムの内部被ばくの影響」、それぞれの成果を概評すると以下のようになる。

「発がん」に関しては、低線量影響評価に必要な線量・線量率効果係数が得られるとともに、DNA損傷修復能の不具合と放射線発がん感受性には相関があることが判った。また、乳腺腫瘍は妊娠期・授乳期の被ばくで発生しやすいが、抗高脂血症薬により抑制されること、白血病の発生は、食餌のカロリー制限によって抑制されること、これらの発がん抑制は、主に発がんプロモーション期への作用であることを明らかにした。これらの成果は、放射線による発がんリスクの評価と低減化のために重要な情報である。

「胚・胎児への影響」研究では、胎児造血幹細胞の放射性物質 (プルトニウム) に対する感受性には系統差があること、胎生期の時期により造血障害や大脳の組織構築障害の感受性時期が異なること、また、比較的低線量でも大脳の組織構築障害が発生することを明らかにした。造血障害は胎児の酸欠による奇形や発育障害の原因として重要であり、大脳の組織構築障害は精神遅滞の機構解明に重要である。これらの研究を通して胚・胎児への影響に関する重要な情報が得られた。

「プルトニウムの内部被ばくの影響」に関する研究成果としては、プルトニウムの焼結温度と呼吸気道への沈着率や排泄率との関係を明らかにしたこと、沈着したプルトニウムからのアルファ線による細胞単位の被ばく線量評価のための小核誘発試験法を開発したこと、実験動物へのプルトニウム吸入投与では肺腫瘍が、注射では骨腫瘍が線量依存性に発生することを明らかにしたこと等が挙げられる。これらの研究からプルトニウムの沈着・排泄に関わる要因や線量評価の生物学的指標が見つかり、発がんに関する基礎的な情報が得られている。

なお、成果の詳細は、それぞれの課題の報告を読んでいただきたい。

全体的に見て、各グループ共に研究の着実な進展が認められると共に、今後の研究で必要な課題が明らかになってきた。それぞれの研究の今後の発展が期待されるところである。

特別研究班長

(平成5～7年度) 稲葉 次郎

(平成8～9年度) 荻生 俊昭

目 次

概 説	稲葉 次郎、荻生 俊昭	
I. 放射線による発がんとその修飾因子に関する研究		1
1. 放射線感受性ミュータントマウスを用いた放射線発がんに関する研究	荻生 俊昭、石井 洋子、小林 森、島田 義也、西村まゆみ、 古野 育子、松本 恒弥、鈴木 文男、早尾 辰男、上野 渉	
Radiation Carcinogenesis in Radiosensitive Mutant Mice	Toshiaki Ogiu, Hiroko Ishii-Ohba, Shigeru Kobayashi, Yoshiya Shimada, Mayumi Nishimura, Ikuko Furuno, Tsuneya Matsumoto, Fumio Suzuki, Tatsuo Hayao, and Wataru Ueno	
2. 放射線による乳腺腫瘍の発生機構と調節因子に関する研究	稲野 宏志、小野田 眞、鈴木 桂子、石井 洋子、山内 洋	9
Mammary Tumorigenesis by Radiation and Its Regulatory Factors	Hiroshi Inano, Makoto Onoda, Keiko Suzuki, Hiroko Ishii, and Hiroshi Yamanouchi	
3. マウス骨髄性白血病の発症とその修飾因子に関する研究	吉田 和子、井上 達、野島久美恵、石原 弘、早田 勇	16
Modifying Factors of Radiation-induced Myeloid Leukemogenesis	Kazuko Yoshida, Tohru Inoue, Kumie Nojima, Hiroshi Ishihara, and Isamu Hayata	
4. 放射線の低線量率照射による線量・線量率効果因子に関する実験的研究	古瀬 健、野田 攸子、大津 裕司、白貝 彰宏、安田 徳一	21
Dose and Dose Rate Effectiveness Factors of Radiation Induced Myeloid Leukemia in C3H Male Mice	Takeshi Furuse, Yuko Noda, Hiroshi Otsu, Akihiro Shiragai, and Norikazu Yasuda	
II. 放射線ならびに放射性物質の胎児影響に関する研究		26
1. 放射性物質の摂取に伴う胎児の被ばく線量とその影響に関する研究	久保田善久、高橋千太郎、武田 洋、西村 義一、上島 久正	
Radiation Doses and Biological Effects in Rodent Embryos and Fetuses Following Maternal Contamination with Radioactive Materials	Yoshihisa Kubota, Sentaro Takahashi, Hiroshi Takeda, Yoshikazu Nishimura, and Hisamasa Joshima	
2. 発生過程における中枢神経系等の組織構築とその放射線損傷に関する研究	広部 知久、石川 裕二、田口 泰子、伏木信次	32
Effects of Radiations on the Histogenesis of Central Nervous Systems in Development	Tomohisa Hirobe, Yuji Ishikawa, Yasuko Yaguchi, and shinji Fushiki	
III. アルファ放射体による内部被ばくの生物学的影響とその修飾因子に関する研究		35
1. 吸入放射性物質の気道内沈着と体内動態に関する研究	佐藤 宏、山田 裕司、宮本 勝宏、小泉 彰、稲葉 次郎	
Deposition of Inhaled Radionuclides in the Respiratory Tract and Metabolism	Hiroshi Sato, Yuji Yamada, Katsuhiko Miyamoto, Akira Koizumi, and Jiro Inada	
2. アルファ放射体による内部被ばくのバイオドシメトリに関する研究	石樽 信人、仲野 高志、榎本 宏子、小木曾洋一、山田 裕、稲葉 次郎	40
Studies on Biodosimetry in the Internal Exposure by Alpha-particle Emitters	Nobuhito Ishigure, Takashi Nakano, Hiroko Enomoto, Yoichi Oghiso Yutaka Yamada, and Jiro Inaba	
3. アルファ放射体による内部被ばく発がんとその生物学的修飾因子に関する研究	小木曾洋一、山田 裕、飯田 治三、福津久美子、石樽 信人、仲野 高志、 榎本 宏子、佐藤 宏、山田 裕司、小泉 彰、稲葉 次郎	46
Studies on the Carcinogenesis Induced by Internal Alpha-emitters and Its Biological Modifiers	Yoichi Oghiso, Yutaka Yamada, Haruzo Iida, Kumiko Fukutsu, Nobuhito Ishigure, Takashi Nakano, Hiroko Enomoto, Hiroshi Sato, Yuji Yamada, Akira Koizumi, and Jiro Inaba	

I. 放射線による発がんとその修飾因子に関する研究

1. 放射線感受性ミュータントマウスを用いた 放射線発がんに関する研究

萩生俊昭¹、石井洋子¹、小林 森²、島田義也¹、西村まゆみ¹、古野育子³
松本恒弥⁴、鈴木文男⁵、(研究協力者) 早尾辰男⁴、上野 渉⁴

¹第5研究グループ、²客員協力研究員(元、生物影響研究部)、³生物影響研究部
⁴動植物開発管理室、⁵外来研究員(広島大学原爆放射能医学研究所)

Radiation Carcinogenesis in Radiosensitive Mutant Mice

Toshiaki Ogiu¹, Hiroko Ishii-Ohba¹, Shigeru Kobayashi², Yoshiya Shimada¹, Mayumi Nishimura¹, Ikuko Furuno³, Tsuneya Matsumoto⁴,
Fumio Suzuki⁵, Tatsuo Hayao⁴, and Wataru Ueno⁴

¹Fifth Research Group, ²Guest Research Associate, ³Division of
Biology and Oncology, ⁴Laboratory Animal and Plant Sciences, and
⁵Visiting Scientist (Hiroshima University)

Severe combined immunodeficient (scid) mice are known to be radiosensitive due to their heritable defects of repair of double strand breaks induced by ionizing radiation. We studied the effects of *scid* mutation on the acute as well as late effects of radiation. Acute 50% lethal doses of gamma-rays for scid, F1 and C.B-17 mice were 4.1, 6.5 and 7.2 Gy, respectively. When mice were irradiated with same dose, survival period of F1 mice was shorter than that of C.B-17 mice. The bone marrow cells of scid mice were also radiosensitive as compared to those from other 2 strains. Bone marrow cells from F1 mice were slightly but significantly more radiosensitive than that from C.B-17 mice. These results mean that *scid* heterozygotes are more resistant to ionizing radiation when compared with *scid* homozygotes, but more sensitive than wild-type. On the other hand, there were no differences in sensitivity to UV light and also in radiation-induced mutation as compared with wild type or scid heterozygous cell lines. In late effect studies,

groups of scid, F1 and C.B-17 mice were exposed to a single whole body dose of 1 - 3 Gy of gamma-rays. Results clearly indicated that scid mice were extremely susceptible for induction of thymic lymphomas as compared to other 2 strains. No difference for induction of thymic lymphomas was observed between F1 mice and C.B-17 mice. Ethylnitrosourea, a strong lymphomagen, was administered to scid mice. However, incidence of thymic lymphomas were not so high. These results indicate that close relationship between radiosensitivity and susceptibility for radiogenic development of thymic lymphomas was proved, but effect of *scid* heterozygosity was not demonstrated. Almost all thymic lymphomas of scid mice were CD4/CD8 double positive. In other organs, relationship between radiosensitivity and susceptibility for tumor development was not demonstrated in this system. Further studies are needed to analyze the effects of *scid* mutation on radiation-induced development of solid tumors.

1. はじめに

Scidマウスは免疫機能不全動物として Philadelphia の Fox Chase Cancer CenterのBosmaらにより見いだされた¹⁾。このマウスの免疫機能不全は、免疫担当細胞であるT細胞とB細胞それぞれのT細胞受容体遺伝子および免疫グロブリン遺伝子の再構成が正常に行なわれないため、分化できないことが原因である²⁻⁴⁾。このscidマウスは放射線に対し高感受性であることが1990年にFulopとPhillips⁵⁾により報告されて以来、DNA損傷と修復の観点からも注目されてきた。即ちこのマウスの細胞は、放射線によって切断されたDNAの二本鎖の修復機構に異常をもっていた^{5,6)}。放射線により誘発されたDNA二本鎖切断の修復過

程でも、また免疫関連遺伝子再配列の再結合の過程でもscid遺伝子産物が共通の役割を担っていると考えられている^{7,8)}。このマウスは放射線高感受性で免疫不全があり、リンパ腫の自然発生が高いこと等、ヒトの末梢血管拡張性運動失調症(AT)に類似した症状を示す⁹⁻¹¹⁾。ヒトの末梢血管拡張性運動失調症の患者、すなわちATホモの患者はリンパ腫が発生しやすく、またその母親、即ちATヘテロの保因者は乳がんのリスクが正常人の約4倍高いことが報告されている^{12,13)}。scidマウスは、放射線感受性を示すヒト遺伝性疾患のモデル動物と考えられた。放射線によるDNA損傷修復能が低く、修復異常を起こしやすく、そのため腫瘍が発生しやすいことが予測されたが、現在ま

でのところ、文献的にも発がんに関する報告はほとんどない。このscid遺伝子のクローニングが幾つかの研究で行われ、DNA依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) の触媒サブユニットをコードする遺伝子の突然変異であることが近年判明した¹⁴⁻¹⁶⁾。しかし、この遺伝子産物がDNA修復過程においてどのような役割を演じているかは、まだ解明されていない。

今回の研究では、DNA二本鎖切断修復能に欠陥のあるscidマウスを使い、修復能の欠陥と発がん感受性の相関性を実証すること、即ち放射線による発がん標的組織を同定し、胸腺内のT細胞の分化と腫瘍化の観点から解析を行ない、組織および細胞レベルでDNA修復能の異常と発がん感受性の関連性を明らかにすることを目的とした。

そこでまず、scidマウスと対照系統 (C.B-17) マウスおよびそれらの交配子 (F1) マウスに、数段階の線量の中～高線量放射線を照射し、急性障害とscid変異との関連性を検討することにした。また、マウスから採取した骨髓細胞で放射線感受性を検討するとともに、線維芽細胞株を樹立し、放射線および紫外線に対する感受性と突然変異頻度を検討することとした。しかし実際には、線維芽細胞株は2倍体でなかったため、突然変異頻度の検定には胸腺リンパ腫細胞株を用いた。次に、scidマウス、C.B-17マウスおよびF1マウスに1～3 Gyの放射線を照射し、腫瘍発生の線量効果関係の検証と、発生した腫瘍については組織分類から、発がんの標的組織あるいは標的細胞を同定し、その組織・細胞におけるDNA損傷修復能と発がんの標的性との相関性を解析することを旨とした。また、予備実験からは、放射線では胸腺リンパ腫が高率に発生することが予測されたため、放射線のみならず化学物質によって発生した胸腺リンパ腫についても、病理学および細胞学的に解析し、細胞分化と胸腺リンパ腫発生の関連性を調べることにした。

2. 材料と方法

In vivo 実験:

マウス: 実験には、雌マウスのみ使用した。急性障害実験ではC.B-17/Icr-scidマウス (以下scidマウス) とC.B-17/Icrマウス (以下C.B-17マウス) を日本クレアから購入し、SPF動物施設で飼育した。(C.B-17×scid) F1マウス (以下F1マウス) はSPF動物施設内で交配して得た。また、長期発がん性の実験にはFox Chase Cancer Centerからの許可を得て、放医研のSPF動物施設内でscidマウスとC.B-17マウスの系統を維持、繁殖して実験に用いた。F1マウスはSPF動物施設内でC.B-17マウスとscidマウスを交配して得た。実験は研究所の実験指針に基づき遂行した。

放射線による急性障害実験: 8週齢の雌scidマウス、C.B-17マウス、F1マウスにセシウム-137ガンマ線を線量率1.1 Gy/分で照射した。scidマウスは、1群10匹以上からなる11群に分け0.5 Gy刻みに総線量1.0～6.0 Gyの照射を行った。C.B-17マウスとF1マウスには3.0～8.5 Gyを照射した。マウスは照射後、30日間観察し、50%致死線量 (LD₅₀₍₃₀₎) を求めた。また、3 Gy、5 Gy、8 Gy照射群については途中死亡および30日目屠殺マウス全例について病理組織学的検討を行った。

放射線による発がん実験: 8週齢の雌scidマウス、C.B-17マウス、F1マウスを各々4群に分け、セシウム-137線源

からのガンマ線で0、1、2、3 Gy照射した後、生涯飼育した。

化学物質による発がん実験: 雌scidマウスはSPF動物施設内で飼育・観察した。8週齢時にそれぞれ23～30匹からなる6群に分け、400 ppmのENU水溶液を飲料水として0、2、4、6、8ないし10週間連続投与した後、生涯飼育した。

病理学的検索および胸腺リンパ腫の細胞膜表面抗原の解析: マウスは衰弱激しく瀕死の状態にある時にエーテル麻酔により屠殺し、直ちに解剖を行った。全臓器を10%ホルマリン液で固定し、病理組織標本の作製を行った。胸腺リンパ腫が発生した場合には、解剖時に腫瘍細胞を分離し、PBSに浮遊した後、種々の蛍光色素ラベル抗体で細胞表面抗原を染色し、FACScan (BECTON DICKINSON) により解析を行った。

In vitro 実験

Scid線維芽細胞株の放射線感受性の検定: 胎生16日目のscidマウス、C.B-17マウス、F1マウスの胎児の細胞を培養系に移し、25回継代培養した後、クローニングにより各マウス系統毎に2～3株の細胞株を樹立した。これらの細胞株の性質をTable 1に記載した。各株の培養細胞は60 mm径のプラスチック・ディッシュに撒き、37℃の5%炭酸ガス培養器の中で5～10時間培養し、細胞がディッシュに付着した後、X線照射あるいは254 nmの紫外線照射を行った。照射10～14日後に出現したコロニーの数を数えた。

Table 1. Properties of immortal cell lines established from C.B-17, scid and F1 mouse embryos.

Mouse strain	Cell line	Chromosome mode (frequency)	Plating efficiency (%)	Doubling time (hr)
C.B-17	CB/CB-eA	30-40 (70%)	5.5	24
	CB/CB-eB	50-60 (46%)	12.4	33
	CB/CB-eC	55-65 (40%)	20.2	33
(C.B-17×scid)F1	SD/CB-eA	65-75 (47%)	8.5	39
	SD/CB-eB	60-70 (40%)	7.7	32
scid	SD/SD-eA	45-55 (37%)	7.5	27
	SD/SD-eB	84-94 (30%)	14.8	45
	SD/SD-eC	67-77 (33%)	44.7	18

Scid胸腺リンパ腫細胞株の放射線照射後の生残率と突然変異頻度の検定: scid細胞はMuto et al. により樹立されたscidマウス由来胸腺リンパ腫細胞株SCA1細胞¹⁷⁾で、37℃の5%炭酸ガス培養器の中で浮遊培養した。対照細胞としてはマウス白血病細胞株L5178Y細胞と放射線致死高感受性株LX830細胞 (L5178YからSato et al.¹⁸⁾ により単離された放射線致死高感受性株) を用い、⁶⁰Coガンマ線を照射した。照射直後、細胞を一部分取し、96穴マイクロプレートを用いたP(0)法¹⁹⁾により播種効率を測定し、非照射群の播種効率を1.0としたときの生残率を求めた。残りの細胞は発現期間として7日間の培養 (1サンプル当たり10⁸細胞以上を維持) を行った後、2×10⁴ cells/wellの割合で6-チオグアニン (1 μg/ml) を含む培地に播き、同時に一部を、薬剤を含まない培地に1 cell/wellの割合で播いて播種効率を求めた。6-チオグアニン耐性のコロニー数を播種効率で補正したものを突然変異頻度とした。

骨髓細胞の放射線感受性の検定：8～10週齢の雌scidマウス、C.B-17マウス、F1マウス各々3～4匹の大腿骨から骨髓細胞を分離し、ナイロンメッシュを通し、PBSで洗い、D-MEMに浮遊した後、40%メチルセルロース、20%ウシ胎児血清およびCFUの供給のため20%脾細胞培養上清を加え、35 mm直径のプラスチック・ディッシュに撒いた後、X線照射を行った。0.5～5.0 Gyの線量の範囲で一回照射後、37℃の5%炭酸ガス培養器に入れて培養し、7日後に出現したコロニーの数を顕微鏡下で数えた。

統計学的解析

50%致死線量を算定するために、プロビット法およびBehrensの検定法を用いた。また、マウスの生存日数および骨髓細胞の感受性の検定にはt検定を用い、さらに骨髓細胞の感受性の検定にはMann-Whitneyの検定法も用いた。

3. 実験結果

個体レベル (*in vivo*) の放射線感受性

致死線量：種々の線量の放射線をそれぞれの系統のマウス群に照射後、30日間観察を行った。その結果をFig. 1に示す。

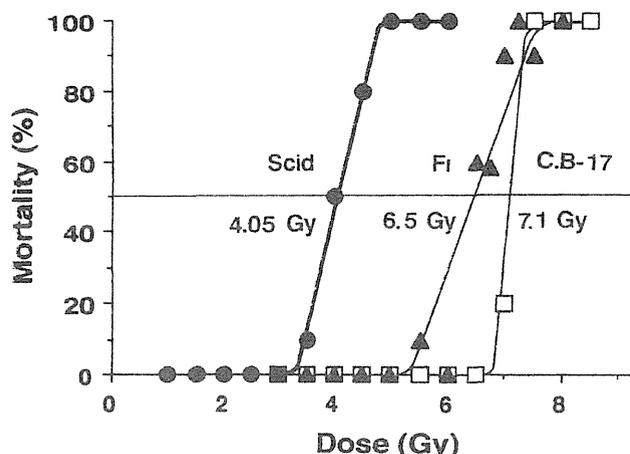


Fig. 1. Mortality of C.B-17 (□), scid (●) and their hybrid F1 (▲) mice after whole body γ -ray irradiation.

5 Gyの照射を受けたscidマウスは全例、30日目までに死亡したが、3 Gyの照射を受けたscidマウスは全例生存した。この結果、3 Gyが最大耐用線量と考えられた。C.B-17マウスでは7 Gyで死亡例が出現し、F1マウスでは、5.5 Gy照射群で死亡例が出現し始め、8 Gy照射群では全例死亡した。6.5 Gy照射の場合にはF1マウスでは60%が死亡しているが、C.B-17マウスでは死亡例は見られない。また、7 Gy照射ではF1マウスでは全例死亡しているが、C.B-17マウスでは20%が死亡しているのみである。

LD₅₀₍₃₀₎値は、scidマウスでは、プロビット法で4.06 Gy、Behrens法で4.05 Gyであった。F1マウスでは、各々6.45 Gyおよび6.55 Gyであった。また、C.B-17マウスでは、死亡率0%と100%の間には1つの線量群しかないためプロビット法では計算不可能であったが、Behrens法による計算値は7.2 Gyであった。これらの計算結果から、scidマウス、F1マウス、C.B-17マウス各々のLD₅₀₍₃₀₎値は、4.05 Gy、6.5 Gy、7.2 Gyと考えられた。この結果は、F1マウスとC.B-17マウスはscidマウスに比べて放射線感受性は低

いが、C.B-17マウスに比べて感受性であることを示すものである。

生存日数：同一の線量群同志で平均生存期間を検討した結果も、F1マウスがC.B-17マウスに比べて放射線感受性が高いことを示した。7.0 Gy、7.5 Gyおよび8.0 Gyの照射を受けたF1マウスとC.B-17マウスの生存曲線をFig. 2に示す。7.5 Gyの照射を受けたF1マウスの平均生存日数は12.1 ± 1.7日、C.B-17マウスの平均生存日数は17.2 ± 4.7日であった。また、8.0 Gy被ばくした場合には各々、10.1 ± 2.8日、15.2 ± 3.9日で、7.5 Gyおよび8.0 Gyを照射された場合には共に、両系統の間に有意差 (t 検定: 0.02) $p > 0.01$) が見られた。

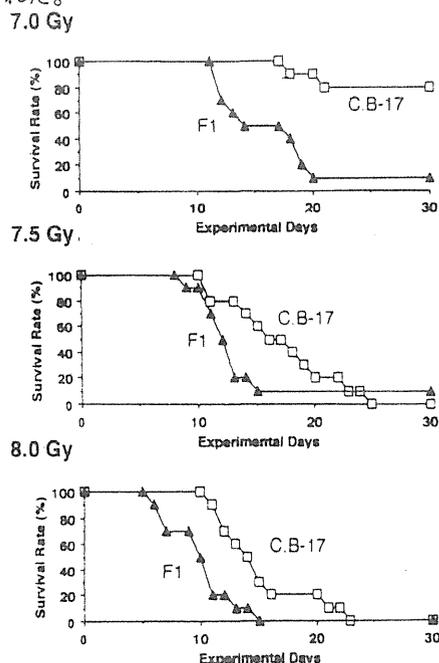


Fig. 2. Survival curves for C.B-17 (□) and F1 (▲) mice exposed to 7 Gy, 7.5 Gy and 8 Gy of γ -rays.

病理学的所見：実験30日目以前に死亡した動物では、どのマウスでも高度の貧血が見られた。これらの動物では組織学的に骨髓に高度の低形成と出血が見られた。また、肝臓に細菌のコロニーの出現がscidマウスでは4.5 Gy以上の線量で、C.B-17マウスとF1マウスでは7 Gy以上の線量で見られた。このコロニーを形成していた細菌は*Proteus mirabilis*で、腸内細菌叢の常在菌²⁰⁾であった。

3 Gy、5 Gy、7 Gyのガンマ線照射を受けたマウス全例については病理組織学的検査を行った。

3 Gyの照射を受けたscidマウスでは胸線は萎縮性で、脾臓は低形成から過形成までのばらつきがあり、骨髓はやや低形成を示した。5 Gy照射scidマウスでは、胸線と脾臓は高度ないし軽度に萎縮性であった。また、脾臓では赤脾髄よりも白脾髄の萎縮が強かった。

5 Gyの照射を受けたマウスでは、どの系統でも骨髓の出血と高度の低形成が見られた。一部のマウスの脳には出血と細菌のコロニーが、過半数のマウスの肝臓には細菌のコロニーが見られた。また、F1マウスとC.B-17マウスの胸腺では、萎縮性から正常レベル、過形成までのばらつきが見られた。また、赤脾髄は過形成を示した。ほとんどの臓器でC.B-17マウスとF1マウスの間に差は見られなかつ

たが、F1マウスの骨髄はC.B-17マウスの骨髄に比べてより高度の低形成状態であった。

7 Gyの照射を受けたF1マウスでは、胸線は低形成で、脾臓は高度ないし中等度の低形成、骨髄は高度の出血を伴う無形成状態であった。脳の出血と肝臓の出血・細菌コロニーがほとんどのマウスで見られた。また細菌のコロニーが脾臓、骨髄、肺にみられた。一方、7 Gy照射を受けたC.B-17マウスでは、F1マウスとは異なり、一般に片側の胸線は低形成のままであったが、他方の胸線には回復が見られた。また、脾臓は萎縮性、正常レベルまで回復、過形成とばらついていた。骨髄は約半数のマウスで低形成であったが、他の半数では正常レベルに回復していた。脳では約半数に出血が見られ、少数のマウスでは細菌のコロニーも見られたが、肝臓では約50%のマウスに細菌のコロニーと出血が見られた。

以上の*in vivo*の実験結果を総括的に考察すると、scidマウスはF1マウス、C.B-17マウスに比べ、放射線感受性が高かったことに加え、scidヘテロマウスは野生型マウスに比べ放射線に高感受性であると考えられた。

骨髄細胞 (*in vitro*) の放射線感受性

scid、C.B-17、F1マウスの骨髄細胞の感受性を*in vitro*の実験系で検討した。結果をFig.3に示す。scidマウスの骨髄細胞の生存曲線では肩が無く、 D_0 値は0.46 Gy、 n 値は0.91、 D_{10} 値は1.01であった。一方、C.B-17マウスとF1マウスでは、低線量領域では肩を持つ生存曲線を示し、X線の高線量域では線量に依存して対数的に低下する生存曲線を示した。

C.B-17マウスとF1マウスの D_0 値はほとんど同じであったが、 n 値は各々9.88と6.51、 D_{10} 値は3.13 Gyと2.84 Gyで、C.B-17マウスの方が抵抗性であった。この結果からscidマウスの骨髄細胞は感受性が高く、またF1マウスの骨髄細胞は野生型マウスの骨髄細胞に比べX線に対する感受性が高いことが示唆された。そこで、各線量でのデータをまとめ、さらに統計学的解析を行った。その結果、scidマウスとC.B-17マウスあるいはscidマウスとF1マウスの細胞間では全範囲にわたり*t*検定で有意差が見られた ($p < 0.01$)。また、C.B-17マウスとF1マウスの細胞間でも1~4 Gyの範囲で有意差が見られた (*t*検定: $p < 0.02$, Mann-Whitney検定: $p < 0.01$)。

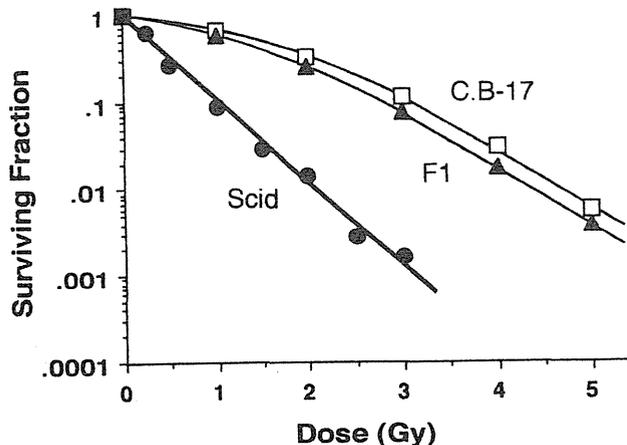


Fig.3. Survival curves of X-ray-irradiated bone marrow cells of C.B-17 (□), F1 (▲) and scid (●) mice.

線維芽細胞株の放射線感受性と紫外線感受性

8株のscidマウス、C.B-17マウス、F1マウスの胎児線維芽細胞の放射線感受性の検定は3回繰り返し、平均値をとった結果をTable 2に示す。X線に対する D_{10} 値はscid細胞では2.2~3.3 Gy、F1細胞では4.9~5.9 Gy、C.B-17細胞では4.3~7.1 Gyであり、紫外線に対する D_{10} 値はscid細胞では12.3~14.2 J/m^2 、F1細胞では11.3~14.0 J/m^2 、C.B-17細胞では5.2~14.2 J/m^2 であった。即ち、scid細胞は放射線に対する感受性は高かったが、紫外線に対する感受性はF1細胞、C.B-17細胞との間に違いがなかった。

Table 2. Sensitivity of various cell lines to X-rays and UV.

Mouse strain	Cell line	Parameters for X-rays			Parameters for UV		
		D_0 (Gy)	n	D_{10} (Gy)	D_0 (J/m^2)	n	D_{10} (J/m^2)
C.B-17	CB/CB-eA	1.08	5.18	4.25	2.27	1.00	5.23
	CB/CB-eB	2.50	1.68	7.05	4.63	2.13	14.16
	CB/CB-eC	2.00	2.01	5.88	3.10	3.67	11.17
(C.B-17×scid)F1	SD/CB-eA	1.41	3.23	4.92	3.52	2.47	11.29
	SD/CB-eB	1.91	2.24	5.94	4.00	3.33	14.02
scid	SD/SD-eA	0.63	7.73	2.72	3.90	3.80	14.19
	SD/SD-eB	0.88	4.09	3.28	4.75	1.80	13.73
	SD/SD-eC	0.79	1.65	2.22	3.75	2.67	12.31

Scid胸腺リンパ腫細胞株の放射線照射後の生残率と突然変異頻度

scidマウス由来のSCA1細胞ではDNA-PK活性はほとんど認められず、scid変異の性質を保持していることが確かめられている。このSCA1細胞のガンマ線致死感受性を調べた結果、線量・生残率曲線は肩がない直線で、 D_0 値は0.25 Gyであった。対照として用いた放射線致死高感受性株LX830細胞の D_0 値は0.40 Gyで、SCA1細胞はLX830細胞とはほぼ同等の非常に高い放射線感受性を示した (Fig.4)。SCA1細胞の6-チオグアニン耐性を指標とした自発突然変異頻度は約 10^{-6} と低く、ガンマ線誘発突然変異の頻度は対照細胞と同様に線量に比例して増加したが、その程度は非常に小さかった (Fig.5)。一方、LX830細胞は線量に比例して高い誘発突然変異頻度を示した。

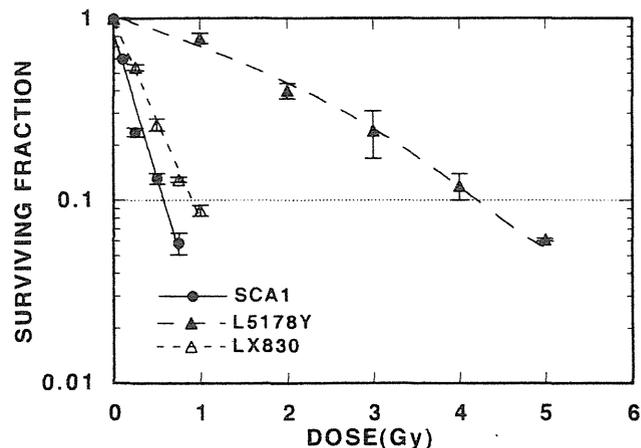


Fig.4. Survival curves for SCA1 (●), L5178Y (▲) and LX830 (△) cells irradiated with γ -rays. Vertical bars denote SEM.

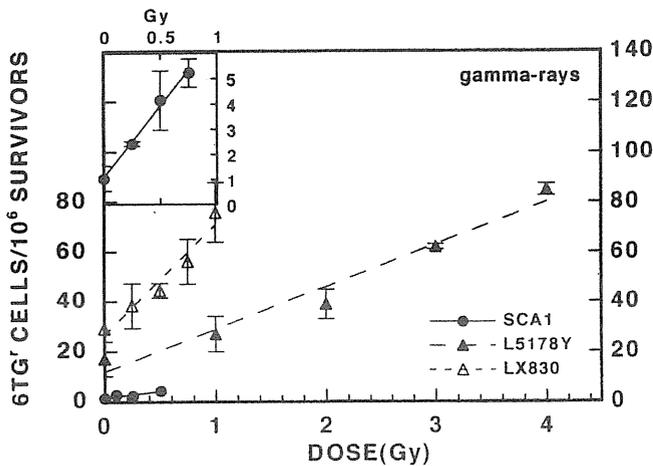


Fig.5. Mutant frequency of SCA1 (●), L5178Y (▲) and LX830 (△) cells as a function of dose of γ -rays. Vertical bars denote SEM.

放射線による発がん

雌scidマウスは4週齢時に採血し、血清中の免疫グロブリン(IgG + IgM)の量をELISA法により検定し、 $0.2 \mu\text{g/ml}$ 以上の値を示す個体は、leakyマウスとして実験群から除外した。また、実験に用いるF1マウスとC.B-17マウスについては同じ4週齢時に同じ程度の量の採血を行った。各系統のマウスをそれぞれ100匹以上からなる4群に分け、8週齢になった時にSPF動物施設内で0、1、2、3 Gyのガンマ線を一回照射した。その後、SPF動物施設内で生涯飼育・観察し、瀕死時に屠殺し解剖した。

Fig.6にそれぞれの系統のマウス毎に生存率曲線を示す。

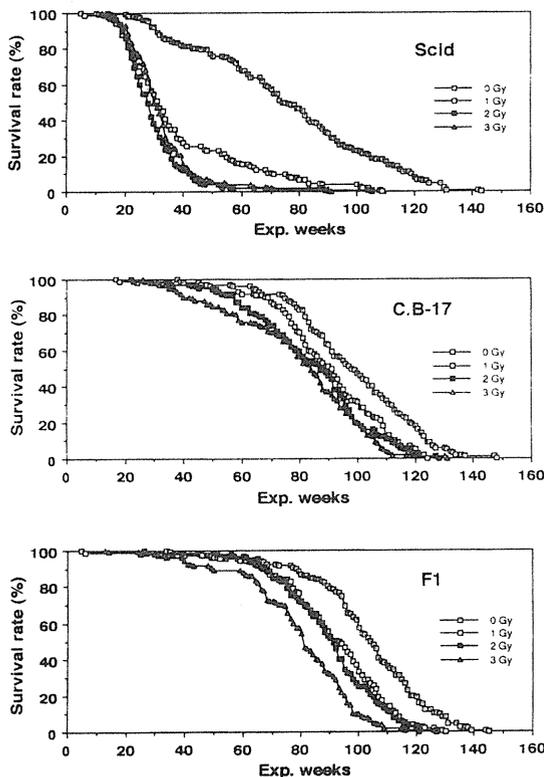


Fig.6. Survival rate of scid, C.B-17 and their hybrid F1 mice exposed to 0 (□), 1 (○), 2 (■) or 3 (▲) Gy of γ -rays.

1～3 Gyのガンマ線の照射を受けたscidマウスは実験15週頃から死に始め、2 Gyおよび3 Gy照射群では実験50週ころまでにほとんどが死亡した。また、1 Gy照射群では40週頃までに急速に死亡数が増えたが、その後、緩やかな曲線となり、実験80週頃までにほとんどが死亡した。1～3 Gyのガンマ線照射を受けたF1マウスおよびC.B-17マウスでは、実験30週頃から死に始め、実験110週ないし120週頃までにほとんどが死亡した。3 Gy照射を受けた場合には、F1マウスはC.B-17マウスに比べ生存期間は短縮する傾向が見られ、また非照射対照群の比較ではF1マウスの方が生存期間が長い傾向を示した。

早期に死亡したscidマウスの死因のほとんどが、胸腺リンパ腫の発生によるものであった。特に1～3 Gy照射群いずれでも80%ないし90%のマウスに胸腺リンパ腫が発生している。一方、非照射対照群では約45%のマウスに胸腺リンパ腫の自然発生が見られた。これに対し、F1マウスおよびC.B-17マウスでは照射群・非照射群共に胸腺リンパ腫の発生は少なく、8%以下であった。その他の臓器の腫瘍としては非照射scidマウスでは肺腫瘍が比較的多く見られた(約30%)。F1マウスとC.B-17マウスでは非胸腺型リンパ腫の発生が照射群・非照射群共に多く、また照射群では対照群に比べ、卵巣腫瘍、肺腫瘍、皮下腫瘍、肝腫瘍の発生が多かった。

化学物質による発がん

エチルニトロソ尿素(ENU)は多くの系統のマウスに胸腺リンパ腫を誘発する強力なリンパ腫誘発剤であることが知られている。8週齢雌scidマウスを6群に分け、ENUを0、2、4、6、8ないし10週間、連続投与した。その後、SPF動物施設内で生涯飼育・観察し、瀕死時に屠殺し解剖した。この結果、0、2、4、6、8ないし10週間ENU投与群での胸腺リンパ腫の発生率は、それぞれ12%、32%、21%、22%、46%、23%であり、8週間投与群で最も高い値を示したものの、ENU投与総量(あるいは投与期間)との間に比例関係(用量反応関係)は見られなかった。

胸腺リンパ腫の細胞表面抗原の解析

発生したガンマ線誘発リンパ腫42例、ENU誘発リンパ腫18例、自然発生リンパ腫11例について、種々のT細胞の細胞膜表面の分化抗原(Thy-1, CD3, CD4, CD8, TCR- $\alpha\beta$, TCR- $\gamma\delta$, HSA, IL-2R, TL-2)を蛍光色素をラベルした抗体により免疫学的に染色し、FACScanにより解析した。この結果、いずれの腫瘍でもTCR- $\alpha\beta$, TCR- $\gamma\delta$ は陰性であった。また、どの腫瘍もCD4とCD8は陽性でいわゆるdouble positive細胞からなっていた。CD3の発現はガンマ線誘発腫瘍、ENU誘発腫瘍各1例に見られただけであった。HSAは全例陽性、TL-2は大多数が陽性であったが、IL-2Rにはばらつきが見られた。誘発因子(ガンマ線、化学物質、自然発生)による差は見られなかった。

4. 考察

急性障害実験の結果、LD₅₀₍₃₀₎値はscidマウスでは4.05 Gy、F1マウスでは6.5 Gy、C.B-17マウスでは7.2 Gyであった。さらに、同じ線量を照射されても生存期間は、F1マウスではC.B-17マウスに比べ短縮していた。病理学的所見もF1マウスではC.B-17マウスに比べ、より高度の

変化をとまっていた。一方、骨髄細胞ではn値、D₀値、D₁₀値からも明らかなように、scidマウスの細胞は極めて放射線感受性が高かった。また、F1マウスではC.B-17マウスに比べ有意に感受性が高かった。これらの結果から、scidマウスは*in vivo*でも*in vitro*でも非常に感受性が高いことが確認されると共に、scidヘテロ(F1)マウスでは野生型マウスに比べ*in vivo*でも*in vitro*でも感受性が高いことが示された。即ち、これまでscid変異の遺伝様式は劣性と考えられていたが、今回の実験から、少なくとも急性障害実験の結果からは部分的優性 (partial dominance) を示すことが明らかとなった。

一方、細胞株を用いた実験では、scid細胞は放射線の細胞致死作用に極めて感受性が高く、紫外線照射に対しては特に異常は認められないことから、致死高感受性は電離放射線に特異的であることが示された。さらに、scid変異細胞は放射線による突然変異の誘発が非常に低いことが明らかになった。二重鎖切断の修復欠損が見られる放射線致死高感受性変異体のなかにはLX830やM10の様に突然変異誘発頻度の高いものとSCA1のように低いものがあり、scid変異細胞(XRCC7)とM10細胞(XRCC4)の両者では突然変異生成に関与する修復過程のうち、欠損しているものに違いのあることが示唆された。また、L5178Y細胞およびM10細胞では(恐らくLX830細胞でも)p53に変異のあることが明らかになっており²¹⁾、変異p53がこの違いに関与している可能性も考えられる。

長期発がん実験では、ガンマ線の1回照射によってscidマウスでは、胸腺リンパ腫が高率に、かつ極めて早期に発生した。これに対し、F1マウスおよびC.B-17マウスではガンマ線1回照射では胸腺リンパ腫は誘発されなかった。また、マウスのリンパ腫誘発剤であるENU処置によるscidマウスの胸腺リンパ腫の発生率はあまり高くなかった。即ち、scidマウスにおいては放射線により誘発される二本鎖切断の修復の欠陥と胸腺リンパ腫の発生には関連性があると考えられたが、アルキル化剤であるENUによるDNA損傷と胸腺リンパ腫の発生は関連性がなかった。このことから、今回の主な目的である放射線感受性と放射線発がん感受性の関連性については、胸腺に関しては関連性があると結論された。

発生したリンパ腫の細胞膜表面抗原の解析からは、未分化な細胞に出現する表面抗原と分化に伴って発現する抗原が同時に検出され、分化抗原の不均一性が見られた。このことは、マウスの胸腺リンパ腫一般に見られる現象である。非照射scidマウスではT細胞受容体(TCR- $\alpha\beta$ 、TCR- $\gamma\delta$)をコードする遺伝子の再構成ができないため、分化ができず、胸腺内に移住した直後の細胞分化段階で留まっている²²⁾。これに対してリンパ腫細胞ではCD4とCD8抗原は共に陽性を示し、分化傾向を示していた(Fig.7)。T細胞系における正常な分化の誘導は、T細胞受容体遺伝子の再配列が引き金になって起こると考えられている。正常に遺伝子再配列が進んだ場合にはTCR- $\alpha\beta$ あるいはTCR- $\gamma\delta$ の発現と共にCD3の発現が同時に見られるが、scidマウスの胸腺リンパ腫ではこれらの抗原の発現は見られなかった。T細胞受容体遺伝子が再配列する際には、RAG-1とRAG-2により選択的にコード領域とシグナル領域の間で切断され、シグナル同志は再結合し、輪状のDNA断片となってゲノム上から排出される。残ったコード領域は断端

が一度、ヘアピン構造を作り、暫時、結合できないで居るが、その後、ニックが入ることにより断端が解放され、TdTによるヌクレオチドの付加などの修飾を受けて再結合する²³⁾。scidマウスのT細胞では、ヘアピン構造を作る過程までは進むが、そのまま、しばらく生きていてやがて細胞死に至る²⁾。従って、ある程度の時間、コード領域が不安定な状態で存在することになる。このような時に放射線により他の部分のDNAが切断されると、T細胞受容体遺伝子の断端と放射線によりできたDNA断端同志が結合し、T細胞受容体が再配列を完了したようなシグナルを細胞に与え、CD4やCD8の発現を促進する可能性が考えられる。このことから、胸腺リンパ腫ではT細胞受容体遺伝子の関与する転座型の染色体異常が見られる可能性が有り、今後の検討課題である。scidマウスでは、放射線によって胸腺リンパ腫が高率にかつ早期に発生するため、遅くなって出現する他の腫瘍の発生率が低い。このため体細胞における放射線感受性と放射線発がん感受性の関連性はこの系では明確には解析できなかった。現在、放射線を照射されたscidマウスに正常系統マウスの骨髄細胞を移植し、胸腺リンパ腫を抑制する²⁴⁾ことにより、他の臓器への影響を検討している。一方、scid遺伝子の産物であるDNA-PKの活性は、胸腺には高く、脾臓、肝臓、腎臓では低い。このことは、免疫担当細胞においてはDNA-PKは重要な役割を担っているが、他の体細胞においてはあまり重要な役割は担っていない可能性を示唆するものではないかと考えられる。いずれにせよ、今後の体細胞における発がんデータの解析が重要である。

また、DNA二本鎖切断の後の再結合においてDNA-PKがどのような役割を演じているのかは解明されていない。この点を明らかにすることにより、さらに放射線感受性と発がん感受性の関連性が明らかになると考えられる。

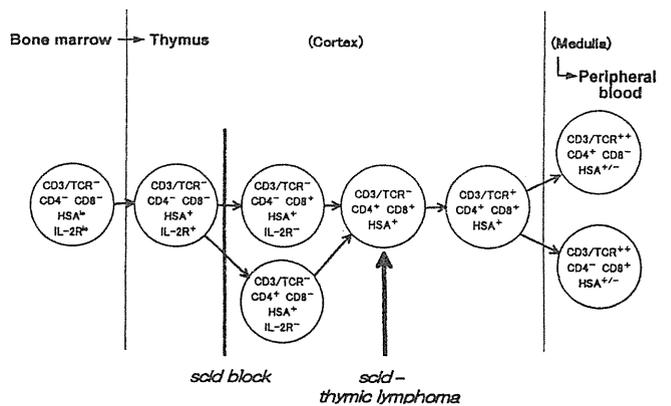


Fig.7. Scheme of T cell maturation and cell surface antigens. Maturation of scid cells arrested at early stage (CD4/CD8 double negative) but lymphoma cells generally represents CD4/CD8 double positive phenotype.

5. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、scidマウスの導入にご尽力頂き、また常に研究のご指導・ご支援を頂いた元科学研究所(現、特別研究員)、佐渡敏彦先生に感謝いたします。動物の系統の維持・供給は、実験動物開発管理室の松本恒弥室長、早尾辰男氏、上野 渉氏、はじめ多くの皆様によ

て遂行されました。また、動物実験には研究補助員の佐々木静江さん、長田春美さん、原千津子さん、近藤和子さん、卒業学生の向川原綾さんはじめ多くの方々の協力を得ました。その他、多くの研究所内外の皆様のご協力と励ましを受けました。ここに心から謝意を表します。

6. 参考文献

- 1) Bosma, G.C., Custer, R.P. and Bosma, M.J.: A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature*, 301, 527-530, 1983.
- 2) Roth, D.B., Menetski, J.P., Nakajima, P.B., Bosma, M.J. and Gellert, M.: V(D)J recombination: broken DNA molecules with covalently sealed (hairpin) coding ends in scid mouse thymocytes. *Cell*, 70, 983-991, 1992.
- 3) Harrington, J., Hsieh, C.-L., Gerton, J., Bosma, G. and Lieber, M.R.: Analysis of the defect in DNA end joining in the murine scid mutation. *Mol. Cell. Biol.*, 12, 4758-4768, 1992
- 4) Taccioli, G.E., Rathbun, G., Oltz, E., Stamato, T., Jeggo, P.A. and Alt, F.W.: Impairment of V(D)J recombination in double-strand break repair mutants. *Science*, 260, 207-210, 1993.
- 5) Fulop, G. M. and Phillips, R.A.: The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature*, 347, 479-482, 1990.
- 6) Biedermann, K.A., Sun, J., Giaccia, A.J., Tosco, L.M. and Brown, J.M.: Scid mutation in mice confers hypersensitivity to ionizing radiation and a deficiency in DNA double-strand break repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88, 1394-1397, 1991.
- 7) Henderickson, E.A., Qin, X.-Q., Bump, E.A., Schatz, D.G., Oettinger, M. and Weaver, D.T.: A link between double-strand break-related repair and V(D)J recombination: the scid mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88, 4061-4065, 1991.
- 8) Blunt, T., Finnie, N.J., Taccioli, G.E., Smith, G.C. M., Demengeot, J., Gottlieb, T.M., Mizuta, R., Varghese, A.J., Alt, F.W., Jeggo, P.A. and Jackson, S.P.: Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation. *Cell*, 80, 813-823, 1995.
- 9) Waldmann, T.A., Broder, S., Goldman, C.K., Frost, K., Korsmeyer, S.J. and Medici, M.A.: Disorders of B cells and helper T cells in the pathogenesis of the immunoglobulin deficiency of patients with ataxia telangiectasia. *J. Clin. Invest.*, 71, 282-295, 1983.
- 10) Taylor, A.M., Harnden, D.G., Arlett, C.F., Harcourt, S.A., Lehmann, A.R., Stevens, S. and Bridges, B.A.: Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature*, 258, 427-429, 1975.
- 11) Taylor, A.M., Metcalfe, J.A., Thick, J. and Mak, Y.F.: Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood*, 87, 423-438, 1996.
- 12) Swift, M., Peitnauer, P.J., Morrell, D. and Chase, C.L.: Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. *New Eng. J. Med.*, 316, 1289-1294, 1987.
- 13) Swift, M.: Ionizing radiation, breast cancer, and ataxia-telangiectasia. *J. Natl. Cancer Inst.*: 86, 1571-1573, 1994.
- 14) Kirchgessner, C.U., Patil, C.K., Evans, J.W., Cuomo, C.A., Fried, L.M., Carter, T., Oettinger, M.A. and Brown, J.M.: DNA-Dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science*, 267, 1178-1183, 1995.
- 15) Blunt, T., Gell, D., Fox, M., Tacciolo, G.E., Lehmann, A.R., Jackson, S.P. and Jeggo, P.A.: Identification of a nonsense mutation in the carboxyl-terminal region of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the scid mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93, 10285-10290, 1996.
- 16) Araki, R., Fujimori, A., Hamatani, K., Mita, K., Saito, T., Mori, M., Fukumura, R., Morimyo, M., Muto, M., Itoh, M., Tatsumi, K. and Abe, M.: Nonsense mutation at Tyr-4046 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 2438-2443, 1997.
- 17) Muto, M., Kubo, E., Kamisaku, H. and Sado, T.: Phenotypic characterization of thymic prelymphoma cells of B10 mice treated with split dose irradiation. *J. Immunol.*, 144, 849-853, 1990.
- 18) Sato, K., Hieda-Shiomi, N. and Hama-Inaba, H.: X-ray-sensitive mutant mouse cells with various sensitivities to chemical mutagens. *Mutat. Res.*, 121, 281-285, 1983.
- 19) Furuno-Fukushi, I., Tatsumi, K., Takahagi, M. and Tachibana, A.: Quantitative and qualitative effect of γ -ray dose-rate on mutagenesis in human lymphoblastoid cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 70, 209-217, 1996.
- 20) Matsumoto, T.: Influence of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus vulgaris* on the mortality pattern of mice after lethal irradiation with γ rays. *Lab. Anim.*, 16, 36-39, 1982.
- 21) Nakano, H., Kurihara, K., Okamoto, M., Tone, S. and Shinohara, K.: Heat-induced apoptosis and p53 in cultured mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 71, 519-529, 1997.
- 22) Rothenberg, E.V., Chen, D., Diamond, R.A.: Functional and phenotypic analysis of thymocytes in SCID mice. *J. Immunol.*, 151, 3530-3546, 1993.
- 23) Gellert, M.: Molecular analysis of V(D)J recombination. *Annu. Rev. Genet.*, 26, 425-446, 1992.
- 24) Lieberman, M., Hansteen, G.A., Waller, E.K., Weissman, I.L. and Sen-Majumdar, A.: Unexpected effects of the severe combined immunodeficiency.

ciency mutation on murine lymphomagenesis. *J. Exp. Med.*, 176, 399-405, 1992.

7. 研究発表

(1) 原著論文

- 1) Furuno-Fukushi, I., Tatsumi, K., Takahagi, M. and Tachibana, A.: *Int. J. Radiat. Biol.*, 70, 209-217, 1996.
- 2) Kobayashi, S., Nishimura, M., Shimada, Y., Suzuki, F., Matsuoka, A., Sakamoto, H., Hayashi, M., Sofuni, T., Sado, T., Ogiu, T.: *Int. J. Radiat. Res.*, 72, 537-545, 1997.
- 3) Nishimura, M., Wakana, S., Kakinuma, S., Mita, K., Ishii, H., Kobayashi, S., Ogiu, T., Sado, T., and Shimada, Y.: *Radiat. Res.* 151, 142-149, 1999.

(2) 口頭発表

- 1) 荻生、西村、島田、小林：日本癌学会第52回総会。1993.10.
- 2) 西村、小林、荻生：日本放射線影響学会第36回総会。1993.10.
- 3) 荻生、西村：第83回日本病理学会総会。1994.3.
- 4) 荻生、西村、小林、島田：日本癌学会第53回総会。1994.10.
- 5) 西村、島田、竹内、小林、荻生：日本放射線影響学会第37回総会。1994.10.
- 6) Ogiu, T., Kobayashi, S., Shimada, Y., Nishimura, M., Suzuki, F., Sado, T.: The 10th International Congress of Radiation Research (Wurzburg, Germany). 1995.8.
- 7) 荻生、小林、西村、島田：日本癌学会第54回総会。1995.10.
- 8) 小林、島田、西村、荻生：日本癌学会第54回総会。1995.10.
- 9) 小林、島田、西村、鈴木、荻生：日本放射線影響学会第38回総会、1995.11.
- 10) 西村、向川原、島田、小林、石井、荻生：日本放射線影響学会第38回総会、1995.11.
- 11) Ogiu, T.: The scid mutation and carcinogenesis, The First Japan-France Workshop on Radiology, Chiba, Japan, 1996.9.

- 12) 荻生、西村、石井、島田：第55回日本癌学会総会、1996.10.
- 13) 古野、巽、武藤、寺岡、渡邊、荻生：日本放射線影響学会第39回大会、1996.11.
- 14) 荻生、西村、向川原、石井、小林、島田：日本放射線影響学会第39回大会、大阪、1996.11.
- 15) 古野、巽、武藤、渡邊、荻生：日本放射線影響学会第40回大会、京都、1996.11.
- 16) 石井、西村、小林、島田、鈴木、祖父尼、佐渡、荻生：第14回放影研・原医研・放医研一研究交流セミナー、千葉、1997.6.
- 17) 西村、若菜、三田、石井、荻生、辻、佐渡、島田：日本放射線影響学会第40回大会、1997.11.
- 18) 古野、巽、武藤、渡邊、荻生：日本放射線影響学会第40回大会、1997.11.
- 19) Ogiu, T., Nishimura, M., Shimada, Y., Ishii-Ohba, H., Maekawa, A.: International Workshop on Comparative Evaluation of Health Effects of Environmental Toxicants derived from Advanced Technology, Chiba, 1998.1.
- 20) Nishimura, M., Wakana, S., Mita, K., Ishii, H., Kakinuma, S., Ogiu, T., Tsuji, H., Sado, T., Shimada, Y.: The 89th Annual Meeting of American Association of Cancer Research, 1998.3.
- 21) 石井、小林、西村、島田、荻生、鈴木、佐渡：第30回放医研シンポジウム、1998.11.
- 22) 辻、鶴飼、勝部、石井、島田、西村、三田、荻生：日本放射線影響学会第41回大会、1998.12.
- 23) 石井、西村、島田、辻、荻生：日本放射線影響学会第41回大会、1998.12.
- 24) 西村、柿沼、佐渡、荻生、島田：日本放射線影響学会第41回大会、1998.12.

(3) 出版物

- 1) 荻生：放射線科学、37、287-293、1994.
- 2) Ogiu, T., Nishimura, M., Shimada, Y., Ishii-Ohba, H., Maekawa, A.: Proceedings of the International Workshop on Comparative Evaluation of Health Effects of Environmental Toxicants derived from Advanced Technology (ed. by J. Inaba and Y. Nakamura) Kodansha, Tokyo, 1998

I. 放射線による発がんとその修飾因子に関する研究

2. 放射線による乳腺腫瘍の発生機構とその調節因子に関する研究

稲野宏志、小野田 眞、鈴木桂子、石井洋子 (第一研究グループ)、
山内 洋 (科学技術特別研究員)

Mammary Tumorigenesis by Radiation and Its Regulatory Factors

Hiroshi Inano, Makoto Onoda, Keiko Suzuki, Hiroko Ishii,
and Hiroshi Yamanouchi (First Research Group)

Since the relationship of the γ -ray doses and of the developmental stages of the mammary gland to radiation-induced mammary tumorigenesis is not clearly understood, this study was designed to investigate the dose-response effect of radiation on the induction of mammary tumors in rats in various mammary developmental stages including the fetal, virgin, pregnant and lactating phases. Mammary tumors did not develop during the 1-year observation period in all of the mature rats that received less than 2.1 Gy intrauterine irradiation at fetal day-20. In the rats irradiated during virgin phase, mammary tumor incidence reached a maximum (approximately 30%) at the doses higher than 1.0 Gy. The total incidence of mammary tumors in the rats received whole-body irradiation with γ -rays during pregnant and lactating periods increased in a dose-dependent manner. A significantly higher incidence of adenocarcinoma (~83%) was induced in the lactating group at lower doses than 1.5 Gy of γ -rays, while much lower incidence of adenocarcinoma (~57%) was found in the pregnant group. The high susceptibility of the mammary glands during pregnancy and lactation to tumor induc-

tion by radiation may be a cause of the higher radiosensitivity of the differentiated stem cells than that of undeveloped stem cells in virgin rats.

Since it has been reported that the biosynthesis and metabolism of steroid hormones and hyperlipidemia may be associated with an increased risk of mammary carcinogenesis, we have undertaken investigations to evaluate the anti-carcinogenic activities of a precursor steroid, such as DHEA and anti-hyperlipidemic drugs, such as BEZF and SIMV against DES-dependent promotion/progression of radiation-induced mammary tumors. Incidence of mammary tumors that developed in the rats of the control group was approximately 87-96%. The administration of dietary 0.6% DHEA in rats irradiated in late pregnancy significantly decreased the total incidence of mammary tumors (35%). Next, we have studied the chemopreventive effects of anti-hyperlipidemic drugs, such as BEZF and SIMV, the tumor incidences were significantly decreased to 27% and 36% in the rats fed BEZF- and SIMV-diet, respectively. Precise mechanisms of those drugs against the radiation-induced mammary tumorigenesis still remain to be elucidated.

緒 言

乳腺の発達は脳下垂体、卵巣、副腎皮質などから分泌される様々なホルモンによって統御されている。そのため、異なるホルモン環境に応じて乳腺の発達は形態学的に、また機能的特徴としてとらえることができる。以前より、放射線被曝に伴う重大な障害の一つとして乳腺腫瘍が危惧されていることから、我々はこれまでに、放射線による乳腺腫瘍の発生をラットのモデル系を用いて報告してきた。特に、妊娠後期に被曝した親ラットに、出産、授乳を終了後にプロモーターとして合成エストロゲンのジエチルスチル

ベストロール(DES)を長期間投与すると高頻度に乳腺腫瘍が発生することなどを明らかにしてきた。本研究では、胎児期、処女期、授乳期の放射線感受性を明らかにして、既に報告してきた妊娠期乳腺の感受性と比較し、各時期の乳腺に対するホルモン支配と放射線による腫瘍発生の関係を明らかにすることを目的の一つとした。一方、放射線被曝以外にも乳腺腫瘍発生に関連していると思われる危険因子として、ステロイドホルモンの生合成や代謝過程が近年注目されている。デヒドロエピアンドロステロン(DHEA)は

副腎皮質由来のステロイドで、アンドロゲンやエストロゲンの前駆体として知られているが、ヒトの場合、DHEAの血中濃度の低下と乳癌発生率の増加との関連性が指摘されている。DHEAには、マウスの自然発生乳癌、やラットのN-ニトロソ-N-メチルウレア誘発乳癌、ジメチルベンツアントラセン(DMBA)誘発乳癌に対して抑制効果があることが報告されている。また、疫学研究や動物実験から、過度の脂肪摂取が乳癌の発生の危険要因となる可能性が示唆されていることから、高脂血症薬のベザフィブレート(BEZF)や高コレステロール血症薬のシンバスタチン(SIMV)による放射線誘発乳癌腫瘍に対する化学的予防効果を検討し、その予防機構の研究に着手した。

実験方法

1、動物とその処理

妊娠20日目のWistar-MS系ラットに⁶⁰Coを用いてγ線(0~2.6 Gy, 線量率17cGy/min)を全身照射した。親ラットには、出産、授乳終了後30日目から腫瘍発生のプロモーターとしてDESペレット(3 mg DESと27 mgコレステロール含有)の皮下投与を開始した。子宮内で胎齢20日目に被曝した雌の仔ラットには141日令に達した時からDESの投与を開始した。さらに、70日令の処女ラット及び授乳21日目のラットにγ線(0~2.6 Gy)を照射した後、DESを投与した。DESペレットは2ヶ月毎に新しいペレットと交換しながら一年間続けて乳癌腫瘍の発生を観察した。ペレットからのDESの溶出量は0.38±0.01 μg/日である。腫瘍発生の予防実験は、妊娠20日目のWistar-MS系ラットに⁶⁰Co(2.6 Gy)で全身照射を行い、出産、哺乳を終了した親ラットを対照群と試験群に分けた。対照群ラットには離乳後30日目からDESペレットを皮下に投与した。

一方、試験群では、離乳直後からFig. 1に示すような構造を有する0.6%DHEA含有餌(DHEA群)、0.15%ベザフィブレート含有餌(BEZF群)、0.03%シンバスタチン含有餌(SIMV群)を実験終了時まで与え続けた。試験群にもDESペレットを対照群と同様に投与し、一年間乳癌腫瘍の発生に対する各試験薬の影響を観察した。

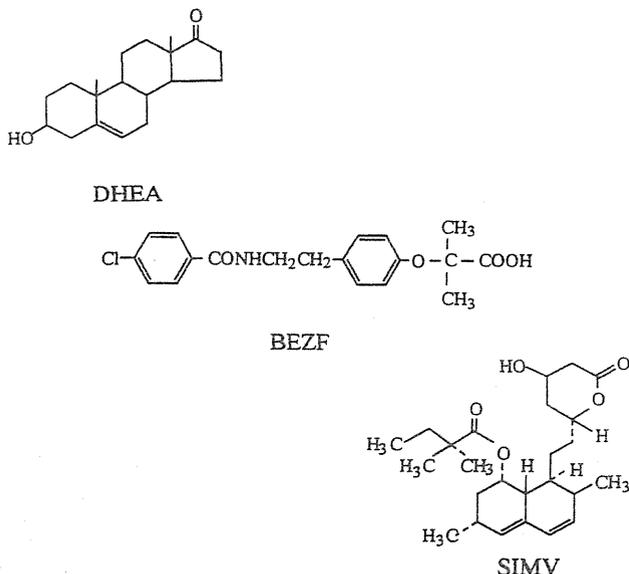


Fig.1. Chemical structures of dehydroepiandrosterone (DHEA), bezafibrate (BEZF) and simvastatin (SIMV).

2、血中ホルモンの定量

DESペレットの投与開始から一年後の観察終了時に、心採血して血清を調整した後、各種ホルモンの測定用として-80°Cで保存した。プロラクチン(PRL)、濾胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、はNIDDKラジオイムノアッセイキットを用い、プロゲステロン(Prog)、デオキシコルチコステロン(DOC)、DHEA、DHEA硫酸抱合体(DHEA-S)、コレステロール、トリグリセリドなどは市販のアッセイキットを用いて測定した。エストラジオール(E₂)はWatanabe等の方法を改良して測定した。

3、ステロイド受容体の測定

2g以上の全ての乳癌腫瘍から組織の一部(約1g)を切り出し、1.5 mM EDTA-1 mM ジチオスレート含有10 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)でホモゲナイズした後、遠心分離によって可溶性分画を調製し、ステロイド受容体の定量に供した。エストロゲン受容体(ER)とプロゲステロン受容体(PgR)は[2,4,6,7-³H]エストラジオール-17βと[17α-メチル-³H]R5020をそれぞれリガンドとして用いて定量した。最大結合部位(MBS)と解離定数(Kd)はスキッチャードプロットによって求めた。

4、乳癌組織の染色包埋

実験終了時の乳癌の発達状態を観察するため、鼠径部乳癌組織を10%中性ホルマリンで固定し、アセトンによる脱水後、明礬カルミン染色した。エタノールで脱色後、ツエーデル油中で保存して、組織像を実体顕微鏡下で観察した。

5、乳癌腫瘍の組織学的検査

発生した全ての乳癌腫瘍を10%中性ホルマリンで固定後、パラフィン包埋した。腫瘍組織の切片(4 μm)はヘマトキシリン/エオシン染色し、顕微鏡観察によって良性腫瘍(線腫)と悪性腫瘍(腺癌)に分類した。

6、Iball指標と統計学的解析

Iball指標は(腫瘍発生百分率/平均潜伏日数)×100の計算式から求めた。腫瘍発生率はχ²テストかフィッシャーの正確確立検定法により、血中ホルモン濃度などの2群間の比較はスチューデントt-テストにより、ステロイド受容体の解離定数と最大結合部位はマン-ホイットニー-U-テストによりそれぞれ有意性を求めた。すべての解析はスタットビュー-J4.5ソフトウェアを用いて計算した。

結果

1、胎児期、処女期、妊娠期、授乳期の乳癌の放射線感受性

胎児期(胎齢20日目)に0~2.1 Gyのγ線を被曝したラットは、性成熟後プロモーターが存在しても乳癌腫瘍は発生せず、2.6 Gyに線量を増やすと7.4%のラットに乳癌腫瘍が発生した(Fig. 2)。70日令の処女期に被曝したラットは、1.0 Gyの線量で乳癌腫瘍の最大発生率(30%)に達し、2.6 Gyまで線量を増やしても腫瘍の発生率は上昇しなかった。一方、妊娠20日目に被曝し、哺乳終了後にプロモーターを投与すると、照射線量に依存して乳癌腫瘍の発生率

が増加し、2.6 Gy で最大発生率(92%) に達した。授乳21日目に照射して30日後からプロモーターを投与した場合は、妊娠期乳腺と同じように乳腺腫瘍の発生は線量依存性を示し、2.6 Gyで最大発生率(92%) に達した。発生した乳腺腫瘍を組織学的に分類すると、授乳期被曝では腺癌の発生頻度が高く、妊娠期被曝では腺種の発生率の方が高ことから、両時期の被曝による乳腺腫瘍の発生過程に差があることが示唆された。

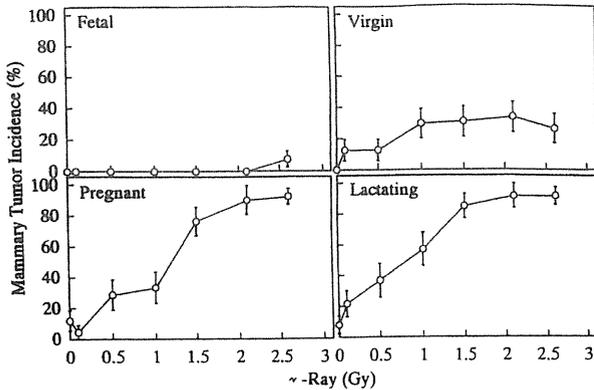


Fig.2. Cumulative incidence of total mammary tumors obtained after one year observation period in rats irradiated during various phases of development of the mammary glands. Values represent mean \pm S.D.

2、放射線誘発乳腺腫瘍に対するDHEAの化学的予防効果

放射線照射後、一年間のプロモーター投与により、対照群では96% のラットに乳腺腫瘍が発生したのに対して、DHEAを摂取した群では35% のラットに乳腺腫瘍の発生が認められた(Fig.3)。しかし、腫瘍発生までの平均潜伏期間は対照群、DHEA群でそれぞれ8.2ヶ月と9.1ヶ月で有意な差を認めることができなかった(Table 1)。DHEA群のIball指標は腫瘍発生率の低下に伴い、39.1 から12.8まで下がった。また、担腫瘍ラット当たりの乳腺腫瘍発生数は対照群で1.76個/ラットで、DHEA群の1.71個/ラットとの間に有意な差がなかった。

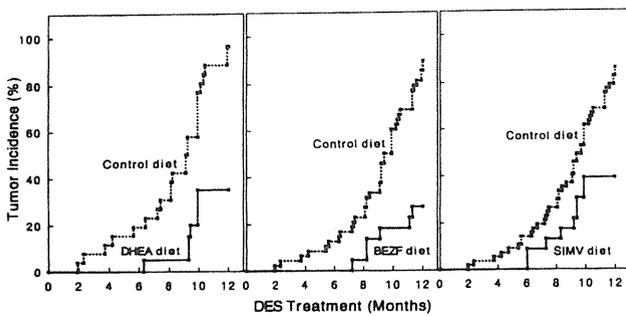


Fig.3. Cumulative incidence of the development of mammary tumors in irradiated rats treated with diethylstilbestrol (DES) and fed DHEA-, BEZF- or SIMV-diet.

Table 1. Chemoprevention by various drugs of mammary tumorigenesis induced by γ -ray

Treatment	No. of rats used	No. of rats w/ tumor	Incidence (%)	No. of tumors		No. of tumors/rat	Latency period (M)	Iball's ¹ index
				Fibro-adenoma	Adeno-carcinoma			
Control	26	25	96.2	28	16	1.76	8.2 \pm 0.6	39.1
DHEA ²	20	7	35.0 ⁵	7	5	1.71	9.1 \pm 0.5	12.8
Control	48	43	89.6	47	27	1.72	8.9 \pm 0.4	33.4
BEZF ³	22	6	27.3 ⁵	5	2	1.17	8.8 \pm 0.7	9.9
Control	57	50	87.7	56	29	1.70	8.7 \pm 0.4	33.1
SIMV ⁴	22	8	36.3 ⁵	13	2	1.88	8.7 \pm 0.4	13.9

*1: The ratio of incidence(%) to the average latency period in days was multiplied by 100.

*2: dehydroepiandrosterone

*3: bezafibrate

*4: simvastatin

*5: The significance of differences from control ($p < 0.01$).

発生した乳腺腫瘍を組織学的に分類すると、対照群では36% が腺癌であったのに対して、DHEA群の腺癌の占有率は42% とやや高くなっていった。

観察終了時に各種ホルモンの血中濃度を測定した結果、Table 2 に示すようにDHEA群ではDHEA濃度が対照群の100倍、DHEA-Sの濃度が570倍、E₂濃度は6倍も高い値を示した。しかし、Prog濃度は対照群の28%、PRL濃度は57%にまで減少していた。さらに、遊離型コレステロールとトリグリセリド濃度も有意な減少が認められた。

DHEA群のラットの血中PRL濃度が低下していたことから、両群の脳下垂体のPRL産生細胞を免疫組織化学的染色法により比較検討したところ、対照群ラットの脳下垂体ではPRL陽性細胞が非常に多く観察されたのに対し、DHEA群の脳下垂体では陽性細胞が点在する程度で明らかにPRL産生細胞数の減少が認められた。このことは血中PRL濃度低下の一因と考えられる。また、乳腺組織全体の染色像から、対照群のラットでは乳管に沿って小さな乳胞が未発達な状態で認められたのに対して、DHEA摂取ラットでは乳胞の発達が顕著で、腺葉形成も認められた。このような乳腺の発達は血中のE₂の濃度によるものと思われる。発生した腫瘍のステロイドホルモン受容体の発現を調べてみると、対照群では91%の腫瘍がER(+)型であったのに対して、DHEA群の腫瘍ではER(+)型は60%に減っていた(Table 3)。

3、放射線誘発乳腺腫瘍に対するベザフィブレードの化学的予防効果

妊娠20日目に照射したラットに、哺乳終了後プロモーターを一年間投与すると、BEZF摂取群では27%のラットに乳腺腫瘍が発生したが、この値は対照群の90%に比べて有意に減少していた(Fig. 3)。しかし、平均潜伏期間は対照群、BEZF群でそれぞれ8.9ヶ月と8.8ヶ月で差を認めることが出来なかった(Table 1)。

Iball指標は対照群で33.4を示し、BEZF群では腫瘍発生率の低下によって9.9まで下がった。BEZF群の担腫瘍ラット当たりの乳腺腫瘍の発生数は1.17個/ラットで、対照群の1.72 個/ラットに比べて減少傾向にあったが、統計学的には有意でなかった。対照群で発生した乳腺腫瘍の36%が腺癌であったのに対して、BEZF群に発生した腺癌は29%とやや低くなっていった。

Table 2. Effect of DHEA-, BEZF- and SIMV-treatment on hormones, cholesterol and triglyceride in rat serum

Substrate	Control diet		Drug treatment (% of control) ^{ab}		
	(Actual concentration) ^a		DHEA	BEZF	SIMV
Estradiol-17β	6.1±1.1	pg/ml	622±168*	381±123**	29±17*
Progesterone	44.0±9.9	ng/ml	28±5**	118±30	144±17
DHEA	0.9±0.1	ng/ml	10,000±3,510	40±8*	—
DHEA-S	32.2±2.9	ng/ml	57,143±4,348	84±13	—
DOC	103.5±8.4	ng/ml	109±61	91±13	—
PRL	349.6±105.7	ng/ml	57±9*	56±14	95±24
LH	0.3±0.1	ng/ml	171±39	76±9	150±15
FSH	5.4±0.4	ng/ml	107±8	145±20	106±13
TSH	2.3±0.3	ng/ml	280±42**	197±11**	135±15
Free-Cholesterol	20.8±0.4	mg/dl	41±4*	144±20	135±19
Cholesterol Ester	67.7±3.5	mg/dl	83±6	196±11**	86±10
Triglyceride	135.8±3.6	mg/dl	66±7*	63±12*	90±6

a): The value represent mean±S.E. obtained from 3 independent experiments. Each experiment contained 5 specimens.
 b): The value represent mean±S.E. obtained from 5 specimens in each experiments.
 **: Significant difference between control and others, $p < 0.01$.
 *: Significant difference between control and others, $p < 0.05$.

Table 3. Effect of DHEA-, BEZF- and SIMV-treatment on expression of estrogen receptor and progesterone receptor in mammary tumors

Treatment	No. of tumors analyzed	Receptors ^a			
		ER+PrgR+	ER+PrgR-	ER-PrgR+	ER-PrgR-
Control	11	8	2	1	0
DHEA ^b	5	3	0	2	0
Control	33	22	5	5	1
BEZF ^c	7	5	2	0	0
Control	40	30	3	6	1
SIMV ^d	13	5	2	2	4

a: ER; estrogen receptor, PrgR; progesterone receptor
 b; dehydrocpiandrosterone
 c; bezafibrate
 d; simvastatin

実験終了時の血中E₂濃度はBEZF群では対照群の4倍まで上昇したが、PRL濃度とトリグリセリド濃度はそれぞれ対照群の56%, 63% にまで低下していた。これに対して、血中コレステロール値は幾分増加傾向にあった (Table 2)。

BEZF群ラットの血中PRL濃度が低下したので、両群の脳下垂体のPRL産生細胞を免疫組織化学的に調べたところ、対照群ラットに多発した脳下垂体の血腫では、非常に多くのPRL産生細胞が存在していたが、BEZF群ラットの脳下垂体ではPRL産生細胞数は著しく減少していた。このPRL産生細胞数の減少が血中PRL濃度の減少の原因と思われる。また、実験終了時の乳腺組織を観察すると、BEZF摂取ラットの乳腺は対照群に比べて乳管に沿った乳胞が良く発達していることから、血中E₂濃度の上昇との関連性が考えられる。BEZF群で発生した腫瘍の全てがER(+)型であった (Table 3)。

4、放射線誘発乳腺腫瘍に対するシンバスタチンの化学的予防効果

一年間の観察期間中に対照群のラットの88%に乳腺腫瘍が発生したが、SIMV摂取群では36%のラットに乳腺腫瘍が発生し、有意に減少した (Fig. 3)。しかし、腫瘍が発生するまでの平均潜伏期間是对照群、SIMV群共に8.7ヶ月で全く同じであった (Table 1)。Iball指標では、対照群の33.1に対してSIMV群では13.9にまで低下した。また、担腫瘍ラット当たりの乳腺腫瘍発生数は対照群、SIMV群でそれぞれ1.70個/ラット、1.88個/ラットで両群の間には差が認められなかった。対照群では発生した乳腺腫瘍の34%が腺癌であったのに対して、SIMV群の腺癌の占有率は13%と低下して、良性腫瘍の割合が高まっていた。

SIMV群ラットの血中ホルモン濃度を測定した結果、E₂濃度が対照群の29%にまで有意に低下したが、PRLや他のホルモン濃度に有為な差は認められなかった (Table 2)。両群ラットの脳下垂体のPRL産生細胞を免疫組織化学的染色により比較検討したが、対照群とSIMV群との間に顕著な差は認められず、血中PRL濃度の結果と一致していた。また、乳腺組織染色像から、乳管に沿って未発達小さな乳胞が両群ラットで観察された。

発生した腫瘍のステロイドホルモン受容体の発現を測定すると、対照群では75%の腫瘍がER(+)PgR(+)型であっ

たのに対して、SIMV群の腫瘍のER(+)PgR(+)型は38%まで減少していた (Table 3)。また、SIMV群ではER(-)PgR(-)型腫瘍が31%も出現していた。さらに、SIMV群ラットに発生した腺腫のERとPgRの最大結合数(MBS)は、それぞれ、4.1±1.6 fmol/mg蛋白質、25.4±9.2 fmol/mg蛋白質で、対照群に発生した腺腫のMBSの10.9±1.9fmol/mg蛋白質、99.3±24.4fmol/mg蛋白質より有意に低値を示した。腺癌においても腺腫と同じようにSIMVの摂取によりMBSの減少傾向がみられた。

考 察

胎児期、処女期、妊娠期、授乳期の各時期の乳腺の放射線被曝による腫瘍発生から、放射線感受性は被曝時の乳腺の分化度や発達度と強い相関を示した。しかし、組織学的には妊娠期被曝では線腫が多発し、授乳期被曝では腺癌の割合が多いことが示された。妊娠期乳腺は低PRL状態で卵胞ホルモン(エストラジオール)と黄体ホルモン(プロゲステロン)の作用で発達し、一方、授乳期乳腺は低卵胞ホルモン/低黄体ホルモン状態で、PRLの作用で分化しているため、妊娠期と異なる内分泌環境であることが知られている。この事実から、授乳期乳腺組織内の放射線により腫瘍化すると考えられている幹細胞はPRLの影響を強く受けているため、放射線被曝によって腺癌へのイニシエーションを受けやすくなっていると思われる。

本研究から、DHEAは放射線被曝によって誘発される乳腺腫瘍発生のプロモーション/プログレッション過程に対して化学的予防効果を有することが明らかになった。DHEAがDMBA誘発乳腺腫瘍の増殖やエストロゲン刺激による乳癌細胞(MCF-7)の増殖を抑制することやDHEAの代謝物がERに強い親和性を持っていることが知られている。すなわち、DHEAの予防作用の機序にステロイドの持つ特徴が関与していると思われ、DHEAの代謝物がE₂やDESとERとの結合を競り合う事により乳腺腫瘍の増殖に対する予防効果もたらされるものと考えられる。一方、DHEAを摂取したラットでは肝のペルオキシゾーム増殖が促進され、脂肪酸のβ-酸化が活性化して過剰のH₂O₂が発生し、これがHMG-CoA還元酵素を不活性化する可能性も指摘されている。ファルネシル-ピロリン酸とコレステロール生合成の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素の不活性化

により癌遺伝子ras蛋白質のp21^{ras}のイソプレニル化の低下が起こり細胞形質転換が損なわれることも考えられる。また、DHEAはグルコース-6-リン酸脱水素酵素を阻害してHMG-CoA還元酵素の反応に必要なNADPHを枯渇させることも知られている。放射線誘発乳腺腫瘍に対するDHEAの化学的予防効果はこのような複雑なプロセスを介している可能性が高い(Fig. 4)。

さらに、BEZFも放射線誘発乳腺腫瘍のDES依存性プロモーション/プログレッション過程を抑制することが示されたが、BEZFによる放射線誘発乳腺腫瘍の化学的予防効果が証明されたことは本報告が初めてである。BEZFによる乳腺腫瘍の発生抑制は、本剤の長期間投与によるPRLレベルやトリグリセリドレベルの低下が一因と考えられるが、さらにBEZF投与による脂肪酸伸張の刺激や不飽和化酵素活性の刺激が、血中トリグリセリドの減少や腫瘍細胞の増殖を促進するリノール酸の低下をもたらし、放射線誘発乳腺腫瘍の発生を抑制した可能性もある。また、BEZF摂取ラットではHMG-CoA還元酵素が有意に減少することも知られており、前記のDHEAと同じようにp21^{ras}蛋白質の活性化抑制による腫瘍化抑制の可能性も考慮されるべきである。しかし、今回の我々の実験では血中コレステロール値が減少せず、BEZFによる放射線誘発乳腺腫瘍の予防効果がHMG-CoA還元酵素の抑制を介しているのか否かについては今後の課題である。

SIMVも前記のDHEAやBEZFと同様に放射線誘発乳腺腫瘍に於けるDES依存性プロモーションやプログレッション過程に対して有効な化学的予防効果を有することが証明された。SIMVはHMG-CoA還元酵素阻害薬であるが、今回の我々のラットを用いた実験ではBEZF摂取と同じようにSIMV摂取群の血中コレステロール値に有意な減少がみられず、SIMVのHMG-CoA還元酵素阻害作用に疑問が生じた。SIMVをラットに一回投与したときは、HMG-CoA還元酵素の活性が著しく阻害されるが、SIMVを継続的に投与したときはHMG-CoA還元酵素のmRNAレベルが増加して酵素誘導が起こることが報告されていることから、SIMV含有餌を長期間摂取したラットではHMG-CoA還元酵素の活性

が阻害されずに上昇したと思われる。これらの事実から、SIMVの継続的摂取による放射線/DES誘発乳腺腫瘍の抑制作用が、HMG-CoA還元酵素阻害を介したp21^{ras}蛋白質のファルネシル化の阻害に起因している可能性は低い。

一方、今回の我々の実験で、SIMV摂取群のラットに発生した乳腺腫瘍ではERとPgRが低値を示したことやER(-)PgR(-)型の乳腺腫瘍の割合が増加したことから、SIMVがホルモン依存性腫瘍の増殖に対して抑制的に作用していると考えられる。SIMVの長期間摂取による放射線/DES誘発乳腺腫瘍の抑制作用は、本来のHMG-CoA還元酵素阻害作用よりも、腫瘍細胞のホルモン依存性の変調を介したホルモン依存性腫瘍の増殖抑制作用によるものと考えられる。

結論

放射線被曝による乳腺腫瘍の発生頻度は、被曝時の乳腺の分化や発達度に依存していることが示された。すなわち、卵胞ホルモンと黄体ホルモンの作用で発達している妊娠期乳腺や、PRLの作用で分化している授乳期乳腺は放射線感受性が高く、容易に放射線により腫瘍化イニシエーションを受けることが証明された。特に、授乳期に被曝すると悪性腫瘍発生の頻度が高くなることから、PRLが作用した乳腺幹細胞は放射線により癌化へのイニシエーションを受けやすくなり、合成女性ホルモンのようなプロモーターが存在するとイニシエートされた細胞が増殖を開始して癌組織を形成していくと思われる。また、疫学研究や動物実験から、過度の脂肪摂取が乳癌発生の危険要因の一つであることが示唆されていることから、高脂血症治療薬のBEZFや高コレステロール血症治療薬のSIMVによる放射線誘発乳腺腫瘍の予防効果を検討した。その結果、これらの薬物の長期間投与によりプロモーターが存在しても放射線でイニシエートされた癌初期化細胞は増殖が抑制され、癌組織形成が阻害された。一方、DHEAも放射線でイニシエートされた乳腺の癌初期化細胞のDES依存性増殖を抑制することから、HMG-CoA還元酵素の不活性化によるp21^{ras}蛋白質のイソプレニル化の低下も予防機構の一つとして示唆された。

研究発表

- 1) Inano H., Suzuki K., Ishii-Ohba H., Yamanouchi H., Takahashi M. and Wakabayashi K.: Promotive effects of diethylstilbestrol, its metabolite (Z,Z-dienestrol), and a stereoisomer of the metabolite (E,E-dienestrol) in tumorigenesis of rat mammary glands pregnancy-dependently initiated with radiation, *Carcinogenesis*, 14, 2157-2163, 1993.
- 2) 山内 洋、小野田 眞、石井洋子、鈴木桂子、稲野宏志、若林克己、高橋正一：乳腺をとりまく内分泌環境と放射線により誘発される乳腺腫瘍発生との関係、第18回日本比較内分泌学会総会、東京、1993.8.
- 3) 石井洋子、稲野宏志、千葉史子、松島美一：ペルオキシソーム増殖剤DHEAのラットへの影響の年齢依存性と胎児期被曝による影響減少、第66回日本生化学会大会、東京、1993.10.
- 4) 稲野宏志、鈴木桂子、石井洋子、山内 洋：授乳期の放射線被曝による乳腺腫瘍の発生、日本放射線影響学

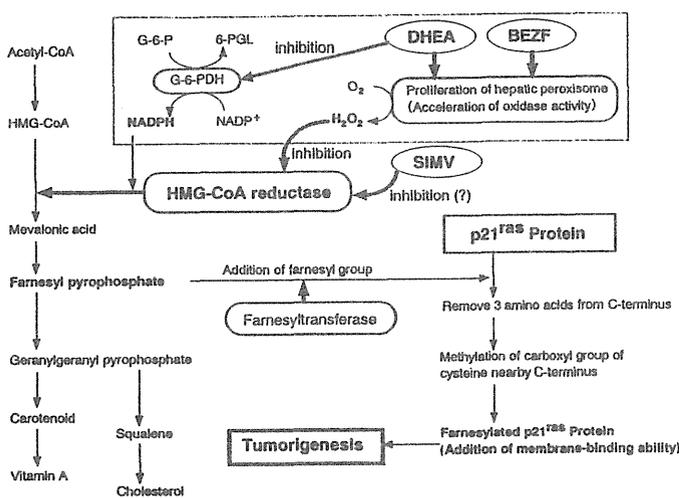


Fig 4. Mechanism of chemoprevention by DHEA, BEZF and SIMV against radiation-induced mammary tumorigenesis in rats.

会第36回大会、広島、1993.10

- 5) Suzuki K., Ishii-Ohba H., Yamanouchi H., Wakabayashi K., Takahashi M. and Inano H.: Susceptibility of lactating rat mammary glands to γ -ray irradiation in tumorigenesis, *Int. J. Cancer*, 56, 413-417, 1994.
- 6) Onoda M., Suzuki K., Ishii H., Yamanouchi H. and Inano H.: Relationship between radiation-induced mammary tumorigenesis and developmental stages of mammary glands at irradiation, 11th NIRS-REF-Gen-iken Research Exchange Seminar, Hiroshima, 1994.6.
- 7) 稲野宏志、鈴木桂子、石井洋子：妊娠時に放射線被曝したラットの乳腺腫瘍発生に対するDESとその代謝物の効果、第53回日本癌学会総会、名古屋、1994.10.
- 8) 鈴木桂子、石井洋子、稲野宏志、高橋正一：放射線に対するラット乳腺の発癌イニシエーションの感受性、第53回日本癌学会総会、名古屋、1994.10.
- 9) 石井洋子、鈴木桂子、稲野宏志： γ 線によるラット乳腺悪性腫瘍のイニシエーションに対する内分泌的影響とRas, Neu産物の免疫的検出、第53回日本癌学会総会、名古屋、1994.10.
- 10) 山内 洋、小野田 眞、石井洋子、鈴木桂子、稲野宏志、椎野昌隆：放射線誘発乳腺腫瘍の発生と被曝時の内分泌環境の関係、日本解剖学会、第70回近畿地方部会、大阪、1994.12.
- 11) 稲野宏志：内分泌環境と放射線誘発乳腺腫瘍について、第10回アイソトープ/放射線利用研究特別講演会、静岡、1994.12.
- 12) Yamanouchi H., Ishii-Ohba H., Suzuki K., Onoda M., Wakabayashi K. and Inano H.: Relationship between stages of mammary development and sensitivity to γ -ray irradiation in mammary tumorigenesis in rats, *Int. J. Cancer*, 60, 230-234, 1995.
- 13) Inano H., Ishii-Ohba H., Suzuki K., Yamanouchi H., Onoda M. and Wakabayashi K.: Chemoprevention by dietary dehydroepiandrosterone against promotion/progression phase of radiation-induced mammary tumorigenesis in rats, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 54, 47-53, 1995.
- 14) Inano H., Yamanouchi H., Suzuki K. and Onoda M. and Wakabayashi K.: Estradiol-17 β as an initiation modifier for radiation-induced mammary tumorigenesis of rats ovariectomized before prepuberty, *Carcinogenesis*, 16, 1871-1877, 1995.
- 15) Inano H.: Androgen production in testes of adult rats fetally irradiated with ^{60}Co and response to hCG and PMSG, *Life Sci. Adv., Steroid Biochem.*, 14, 7-11, 1995.
- 16) 稲野宏志、鈴木桂子、石井洋子、小野田 眞、若林克己、山内 洋：乳腺の腫瘍化に対するホルモンと放射線の関係、日本薬学会第115年会、仙台、1995.3.
- 17) 稲野宏志：ステロイドホルモン生合成のダイナミクス、第10回下垂体研究会学術集会シンポジウム、広島、1995.7.
- 18) 稲野宏志、石井洋子、鈴木桂子：放射線誘発乳腺腫瘍発生のプロモーション過程に対するdehydroepiandrosteroneの抑制作用、第54回日本癌学会総会、京都、1995.10.
- 19) 鈴木桂子、石井洋子、山内 洋、稲野宏志：卵巣のホルモン分泌能と γ 線照射による乳腺腫瘍の誘発、第20回日本比較内分泌学会総会、静岡、1995.10.
- 20) 稲野宏志、山内 洋、鈴木桂子、小野田 眞、若林克己、放射線誘発乳腺腫瘍のイニシエーション修飾因子、日本放射線影響学会第38回大会、千葉、1995.11.
- 21) 鈴木桂子、石井洋子、山内 洋、稲野宏志：性周期の各時期に γ 線照射を受けたメスラットにおける乳腺腫瘍の発生、日本放射線影響学会第38回大会、千葉、1995.11.
- 22) Inano H., Suzuki K., Onoda M. and Yamanouchi H.: Susceptibility of fetal, virgin, pregnant and lactating rats for the induction of mammary tumors by gamma rays, *Radiat. Res.*, 145, 708-713, 1996.
- 23) Inano H., Suzuki K., Onoda M. and Wakabayashi K.: Relationship between induction of mammary tumors and change of testicular functions in male rats following gamma-ray irradiation and/or diethylstilbestrol, *Carcinogenesis*, 17, 355-360, 1996.
- 24) Inano H., Suzuki K. and Wakabayashi K.: Chemoprevention of radiation-induced mammary tumors in rats by bezafibrate administered together with diethylstilbestrol as a promoter, *Carcinogenesis*, 17, 2641-2646, 1996.
- 25) 小野田 眞、稲野宏志：ラットカゼイン様物質の体内分布、日本薬学会第116年会、金沢、1996.3
- 26) 稲野宏志、鈴木桂子：雄性ラットの放射線誘発乳腺腫瘍発生と精巣機能、第55回日本癌学会総会、横浜、1996.10.
- 27) 鈴木桂子、稲野宏志： γ 線照射とDES (diethylstilbestrol) 処理によって誘発されるラット乳腺腫瘍の発生は、腎皮膜下へ他の脳下垂体を移植することにより促進される、第55回日本癌学会総会、横浜、1996.10.
- 28) 稲野宏志、鈴木桂子、小野田 眞、山内 洋：ラット乳腺腫瘍発生に対する胎児期、処女期、妊娠期、授乳期の放射線感受性、日本放射線影響学会第39回大会、豊中、1996.11.
- 29) 鈴木桂子、稲野宏志、若林克己、高橋正一：プロラクチン分泌亢進ラットにおける放射線誘発乳腺腫瘍の発生、日本放射線影響学会第39回大会、豊中、1996.11.
- 30) Inano H., and Suzuki K.: Radiation-induced mammary tumorigenesis in pseudopregnant rats mated with vasectomized partners, *Cancer Lett.*, 116, 241-245, 1997.
- 31) Onoda M. and Inano H.: Distribution of casein-like proteins in various organs of rat, *J. Histochem. Cytochem.*, 45, 663-674, 1997.
- 32) Inano H., Suzuki K., Onoda M. and Wakabayashi K.: Anti-carcinogenic activity of simvastatin during the promotion phase of radiation-induced mammary tumorigenesis of rats, *Carcinogenesis*, 18, 1723-1727, 1997.

- 33) 小野田 眞、稲野宏志：培養ラット乳腺細胞による一酸化窒素(NO)産生、日本薬学会第117年会、東京、1997.3.
- 34) 稲野宏志、鈴木桂子：高脂血症薬(ベザフィブレート)による乳腺腫瘍の予防、第56回日本癌学会総会、京都、1997.9.
- 35) Suzuki K., Inano H. and Wakabayashi K.: Grafted pituitaries before γ -irradiation enhance induction of mammary tumors in the rat, XIII International Congress of Comparative Endocrinology, Yokohama, 1997.11.
- 36) Onoda M. and Inano H.: Localization of nitric oxide synthases and nitric oxide production in rat mammary gland. *J. Histochem. Cytochem.*, 46, 1269-1278, 1998.
- 37) Inano H., Suzuki K., Onoda M., Kobayashi H. and Wakabayashi K.: Comparative effect of chlor-madinone acetate and diethylstilbestrol as promoters in mammary tumorigenesis of rats irradiated with gamma-rays during lactation. *Breast Cancer Res. Treat.*, in press, 1998.
- 38) Inano H., Suzuki K., Onoda M., Kobayashi H. and Wakabayashi K.: Radiation-induced tumorigenesis of mammary glands in pituitary transplanted rats ovariectomized before onset of estrous cycle. *Cancer Lett.* in press, 1998.
- 39) Onoda M., Suzuki K. and Inano H.: Relationship between radiation-induced mammary tumorigenesis and developmental stages of mammary gland at irradiation, The 2nd Japan-France Workshop on Radiobiology and Isotopic Imaging, Fontenay-aux-Roses, 1998.2.
- 40) 稲野宏志、鈴木桂子、小野田 眞、若林克己：乳腺腫瘍発生のプロモーション過程に対するトリグリセリド低下薬の作用、日本薬学会第118年会、京都、1998.3.
- 41) 小野田 眞、稲野宏志：ラット乳腺組織における一酸化窒素合成酵素(NOS)の分布、日本薬学会第118年会、京都、1998.3.
- 42) 稲野宏志、鈴木桂子：乳腺腫瘍のプロモーション過程に於けるシンバスタチンの抗腫瘍活性、第57回日本癌学会総会、横浜、1998.9.
- 43) 小野田 眞、稲野宏志：乳腺組織における一酸化窒素合成酵素(NOS)アイソザイムの免疫化学的検出、第71回日本生化学会大会、名古屋、1998.10.
- 44) 小野田 眞、鈴木桂子、稲野宏志：放射線による乳腺腫瘍の発生と予防、第30回放医研シンポジウム、千葉、1998.11.
- 45) 稲野宏志、小野田 眞、鈴木桂子：WR-2721およびシステアミンによる放射線誘発乳腺腫瘍の予防、日本放射線影響学会第41回大会、長崎、1998.12.
- 46) Inano H., Onoda M., Inafuku N., Kubota M., Kamada Y., Osawa T., Kobayashi H. and Wakabayashi K.: Chemoprevention by curcumin during promotion stage of tumorigenesis of mammary gland in rats irradiated with gamma-rays. in press, 1998.
- 47) 小野田 眞、稲野宏志：培養ラット乳腺組織における一酸化窒素(NO)産生に対するクルクミンの影響、日本薬学会第119年会、徳島、1999.3.

I. 放射線による発がんとその修飾因子に関する研究

3. マウス骨髄性白血病の発症とその修飾因子に関する研究

吉田 和子、井上 達*、野島久美恵** (生物影響研究部、*現国立医薬品食品研究所、**現第3研究グループ)
石原 弘 (第1グループ)、早田 勇 (障害基盤研究部)
(研究協力者) 渡辺文子、和田幸子 (生物影響研究部)

Modifying Factors of Radiation-induced Myeloid Leukemogenesis

Kazuko Yoshida, Tohru Inoue*, Kumie Nojima** (Division of Biology and Oncology,
*National Institute of Health Sciences, **Space and Particle Radiation Science Research Group),
Hiroshi Ishihara (Bioregulation Research Group),
and Isamu Hayata (Division of Radiobiology and Biodosimetry)

The host-defense mechanisms against cancers are known to be modulated by changing the environmental factor(s). The spontaneous incidence of myeloid leukemia is about 1% in C3H/He mice, and the incidence increases up to 23.3% when a single dose of radiation, 3 Gy X-ray, is exposed to a whole-body. Since caloric restriction was known to reduce the incidence of spontaneous tumors, a question as to whether such radiation induced-increase of myeloid leukemia would be also decreased by caloric restriction, was aimed to answer to elucidate possible mechanism of radiation-induced myeloid leukemia. By the caloric restriction, the incidence of myeloid leukemia was significantly decreased; it was reduced to 7.9% and 10.7% when restriction was started before (6 weeks old) and after (10 weeks old) irradiation, respectively. In addition, the latent period of the myeloid leukemia in the groups for caloric restriction was significantly extended at a greater extent as compared with the control diet groups.

Number of hematopoietic stem cells, the possible target cells for radiation-induced leukemias, in the groups for the caloric restriction demonstrated a significant decrease, especially in the spleen, as compared

with that in the control, when the evaluation was made at the time of radiation exposure. Then, we examined whether the decreased number of target cells at the time of exposure is caused by the reduction of radiation-induced myeloid leukemia with caloric restriction. The third restricted groups were fed 65 kcal diet (restricted diet) for the first 4 weeks i.e. from 6 weeks to 10 weeks old, then, the mice were fed with control diet after radiation. The incidence of myeloid leukemia in this group was slightly decreased but did not show statistically significance. Therefore, the caloric restriction seems to be more effective in the promotion stage than the initiation stage on radiation-induced leukemogenesis.

It is well known that C3H/He mice develop hepatoma spontaneously with high incidence. However, the incidence of hepatoma in all groups for caloric restriction significantly decreased. The caloric restriction not only reduced the incidence but also reduced the latent period of the hepatoma. Interestingly, the incidence of hepatoma was not changed with radiation, however, the onset of hepatoma in all diet groups was promoted by radiation.

緒言

C3H/He雄マウスに10週齢で3Gyの放射線を全身に1回照射を行うと骨髄性白血病は約24%発症する。これはマウスに自由に飼料を与えた場合であり、種々の修飾因子により発症率は変動する。たとえば、照射直後の副腎皮質ホルモンの投与やマウスの腹腔内へセルロースアセテート膜を挿入し慢性炎症をおこさせると、放射線誘発骨髄性白血病の発症率は約40%に増加する。一方、脾臓を摘出し

た後に放射線を照射すると発症率を約12%に減少する。古くから、特に化学発がんの実験系で、カロリー制限により腫瘍の発症率が減少することが、報告されている。しかしながら、放射線の晩発障害のなかで、最も重要な疾患である骨髄性白血病についての報告は無いことから、前特研で、カロリー制限により骨髄性白血病の発症率が減少するか検討した。カロリー制限は照射前の6週齢より終生制限

する群と照射直後より制限を開始する2種類の制限方法を行った。カロリー制限の方法としては、4種類の異なったカロリー（60、65、70、95 kcal）の飼料で、マウスの体重を25～27gにコントロールする方法を用いた。又、何れの飼料を摂取しても、蛋白、脂肪、ビタミン、ミネラル等は同量摂取し、糖と炭水化物で、カロリーをコントロールする様に飼料は配合した。対照食群（95 kcal）の骨髄性白血病の発症率は約2.2%であるが、照射後より制限した群では約11%と有意に減少した。又、照射前の6週齢より制限した群は更に減少し約7%となった。前者のカロリー制限の効果は白血病発症過程における、主としてプロモーションの過程に、後者はイニシエーションからプロモーションの全過程の関与を調べる実験系である。そこで、カロリー制限による白血病の減少機構がイニシエーションとプロモーション・プログレッションの何処に関与するか、6週齢から10週齢（照射まで）まで制限食・その後対照食で飼育する実験を行った。又、前特研では毎週体重を測定し、異なったカロリーの飼料でマウスの体重をコントロールしたが、生涯の平均摂取カロリー数は75kcal/週であったので、このカロリー数での白血病の発症効果についても検討した。

実験方法

放医研で繁殖したC3H/He 雄マウスを用い、1) 6週齢より終生コントロール食（95kcal）、2) 6週から10週まで、コントロール食（95kcal）・その後制限食（約75kcal）、3) 6週より10週まで制限食（65Kcal）・その後コントロール食（95kcal）の3種類の給餌方法について、10週齢で、更にX線により全身3Gyの照射群と非照射群に分け計6群設定した（Fig.1）。マウスは終生飼育し、貧血・脾腫等の白血病の兆候を示したものは、死亡直前に屠殺し、血液学的病理学的検索を行った。他のマウスは死亡時に病理学的解析を行った。又、一部屠殺群も設定し、造血幹細胞数及び、細胞周期についての検索を行った。造血幹細胞数は多分化能幹細胞はTill and MuCullochの脾コロニー法（CFU-S）で、顆粒球・単球系にコミットした幹細胞であるGM-CFUは脾臓細胞の培養上清を造血因子として使用しメチルセルローソで培養した。

Exp. Groups	Diet (kcal/Mouse/Week)		Radiation
Control			
CC	6 Week	10 Week	No
3C	95 Kcal		Yes
Restriction			
CRD	95 Kcal	75 kcal	No
3RD	95 Kcal	75 kcal	Yes
CRC	65 Kcal	95 Kcal	No
3RC	65 Kcal	95 Kcal	Yes

Fig.1 Experimental groups and procedures
CC; nonirradiated mice on the control diet; 3C; mice on the control diet irradiated with 3 Gy; CRD (the restricted diet D groups), CRC and 3RC (the restricted diet D groups) with and without irradiation at 3 Gy, respectively. The control diet groups were given 95 kcal diet for 6 weeks over their entire lifespan. The restricted D groups were given 95 kcal for the first 4 weeks then 75 kcal of diet. The restricted groups were given 65 kcal for the first 4 weeks then 95 kcal of diet

細胞周期の解析はin vivoでの持続ラベルが可能な平林等により開発されたBUUV法を用いた。即ちS期の細胞はプロモデオキシウリジン（BrdU）を選択的に取り込む、近紫外線照射を行うとこれを取り込んだ細胞のみが選択的に殺される。そこでプロモデオキシウリジンを充填した浸透圧ポンプをマウスの皮下に埋め込み経時的にマウスを屠殺し骨髄及び脾臓をとり、細胞浮遊液を調整する。この細胞浮遊液を2等分し、一方に360nmをピークとするトランスイルミネーターで、20000J/m²照射する。近紫外線照射と非照射の細胞をそれぞれ、CFU-SおよびGM-CFUのアッセイをおこない、両者の比より細胞周期にある比率を求める。横軸にBrdUを取り込ませた時間を、縦軸にBrdUを取り込んで近紫外線によって殺された幹細胞の比率をlogで取ると、percent killは経時的に増加し、3～7日間の持続ラベルでプラトーに達する（Fig.2）。このプラトー値は、定常状態における細胞周期内分画の大きさないし細胞回転に入っていないdomantな分画の大きさを求めることが出来る。そこで、カロリー制限群および対照食群のマウスに5日間BrdUの持続ラベルを行い、定常状態における細胞周期内分画の大きさを検討した。

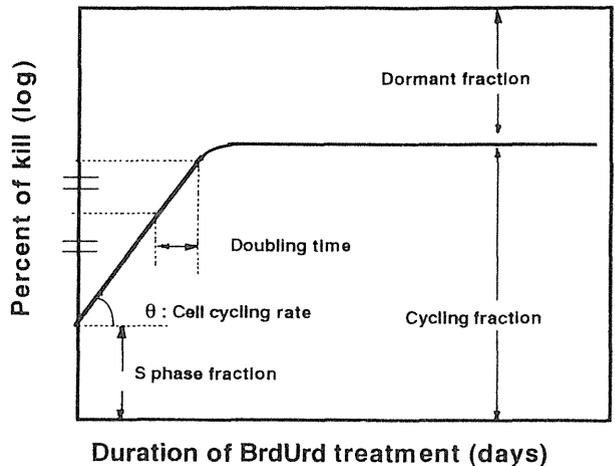


Fig.2 Sequential labeling profile based on the BUUV method.

Hirabayashi Y. et al. Mechanism of Aging and Development. 101, 202-231, 1998

結果および考察

1) 骨髄性白血病

非照射群では、対照食群（CC）と照射後制限食群（CRD）では、骨髄性白血病は全く発症しなかったが、照射後対照食に替えた群（CRC）の発症率は2.1%であった。これは制限食マウスの脾臓は対照食群のそれより小さく、造血幹細胞数も対照食群の約10%しかなく、それが対照食に替えることにより急に増加するため、増殖刺激が起きた結果の可能性も考えられるが、一回10匹程度の動物数の実験では、確定的なことは言えない。3Gy照射群では、対照食（3C）の骨髄性白血病の発症率は20.2%であるが、照射後制限食（3RD）は8.1%と統計学的に有意に減少した。照射前制限・その後対照食（3RC）の骨髄性白血病は16.2%と対照食に比べて発症率は減少したが、統計学的に有意ではなかった（Table.1）。終生対照食群（3C）の前回の実験での発症率は2.2%であり、今回の結果はやや低値であった。照射後制限食群（3RD）も基本的には前回と同じ実験群であるが、これも今回白血病の発症

Table 1 Incidence of myeloid leukemia, hepatoma and tumor free mice and survival in experimental mice

Experimental groups	No of mice	No of leukemic mice	Incidence of leukemia, %±SE	No of hepatoma mice	Incidence of hepatoma, %±SE	Tumor free mice	Incidence of tumor free mice, %±SE	Mean survival days ±SE
CC	97	0	0	80	82.5±3.9	8	8.2±2.8	798.7±21.1
3C	109	22	20.2±3.8	78	71.6±4.3	5	4.6±2.0	724.0±16.7
CRD	139	0	0	68	48.9±4.2 ²⁾	42	30.2±3.9 ⁴⁾	866.7±15.8 ⁶⁾
3RD	149	12	8.1±2.2 ¹⁾	87	58.4±4.0 ³⁾	27	18.1±3.2 ⁵⁾	767.8±18.5 ⁷⁾
CRC	95	2	2.1±1.5	71	74.7±4.5	10	10.5±3.1	853.2±17.0
3RC	99	16	16.2±3.7	75	75.8±4.3	7	7.0±2.6	717.0±18.9

^{1),2),3),4),5)} X² tests for the incidence of myeloid leukemia, hepatoma and tumor free mice were performed.

Significant difference were found between ¹⁾ 3C and 3RD(p<0.01), ²⁾CC and CRD(p<0.0001), ³⁾3C and 3RD(p<0.05),

⁴⁾ CC and CRD(p<0.0001), ⁵⁾3C and 3RD(p<0.005). Generalized Wilcoxon tests were performed.

Significant difference were found between ⁶⁾CC-CRD, P<0.005, ⁷⁾ 3C-3RD, p<0.05.

率は低値であった。この様なC3H/Heマウスにおける発症率の低傾向は最近の放医研で繁殖されたC3H/He 雄マウスは全体的に低体重である結果が反映されている可能性も考えられる (Fig.3)。また、前回の結果より、制限食群の終生摂取カロリー数は75kcal /週であったことより、今回照射後制限食群について75kcal /週と一定のカロリー数での実験を行ったが、矢張り1年経過後より、個体による体重のばらつきがあり、飼料を替えざるを得ないマウスもあった。従って、長期間のカロリー制限食を行う実験では、体重をコントロールする方法が最も良い方法であると考えられる。

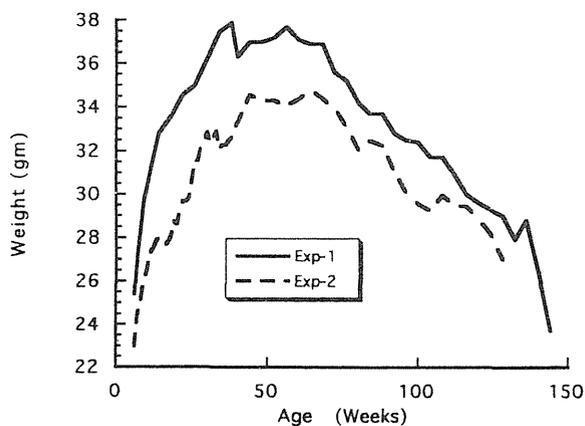


Fig.3 Mean body weight vs. sge in weeks in control diet groups of experiment 1 and 2

2) 平均生存日数

最も平均生存日数の長い群は非照射・照射後制限食 (CRD) で867日であり、非照射・対照食群 (798日) と比較して、generalized wilcoxon testで有意の寿命の延長が認められた (Table.1)。照射前制限食・その後対照食群の平均生存日数は853日と対照食群より2ヶ月近く延長したが、統計学的に有意差はなかった。3 Gy照射群は照射後制限食群 (3RD) の平均生存日数は768日で、対照食及び照射後対照食群がそれぞれ724、718日と比較してgeneralized wilcoxon testで有意の寿命の延長が認められた。従って、照射後制限食に替えた群は非照射、照射群とも有意な寿命の延長が認められた。

3) 肝腫瘍と他の疾患

C3H/He マウスは肝腫瘍が高率に自然発症する事が、知られているが、カロリー制限食により自然発症の肝腫瘍も有意に減少した (Table.1)。3 Gyの照射は発症率には影響を及ぼさなかった。対照食、照射後対照食群の肝腫瘍の発症率は72~82%であるのに対して、照射後制限食群は50~59%と有意に減少した。C3H/Heマウスはその他に肺腫瘍、副腎腫瘍、ハーダー氏腺腫瘍等が発症するが、例数が少ないため、統計学的処理が不可能なため、死亡時に腫瘍を持たないマウスの頻度を制限食と対照食群で比較した (Table.1)。非照射群では、対照食群 (CC)、照射後対照食群 (CRC) の腫瘍の無いマウスは8~10%であるのに対して、照射後制限食 (CRD) は30%と有意に増加した。3 Gy照射群も非照射群と同様に制限食群で腫瘍の無いマウスの頻度が増加しているが、非照射群程は高くなく照射後制限食群 (3RD) で18%であった。これらの死亡時に腫瘍を持たないマウスの死因は、腎盂腎炎や水腎症などの腎疾患、心筋の石灰化や繊維化と心耳血栓等の心疾患で死亡するマウスが制限食群で増加した。

4) カロリー制限食による骨髄性白血病の減少機構

カロリー制限をおこなと脾重量が減少し、末梢血の有核細胞数も減少することから、骨髄性白血病の標的細胞でもある造血幹細胞数を照射時の10週齢と白血病が発症しはじめる時期である54週齢で解析した。照射時の10週齢で制限食と対照食群マウスの骨髄のCFU-S及びGM-CFUの数はカロリー制限食群で、減少傾向は認められたが、統計学的に有意差は認められなかった (Figs.3、4)。一方、脾臓におけるCFU-S及びGM-CFUの数はカロリー制限食群では対照食群の約10%に減少した (Figs.4,5)。54週齢でもほぼ同様の結果であった。従って、カロリー制限食群で多能性幹細胞と顆粒球・単球系へコミットした幹細胞が減少している事が明らかとなった。カロリー制限による照射時の標的細胞の減少は、骨髄性白血病の発症率の減少に何らかの影響を及ぼしている可能性はあると考えられる。しかしながら、照射後よりカロリー制限を行っても、有意な減少が認められることから、放射線誘発骨髄性白血病の発症過程のなかで、カロリー制限はイニシエーションよりもプロモーション過程により多く関与

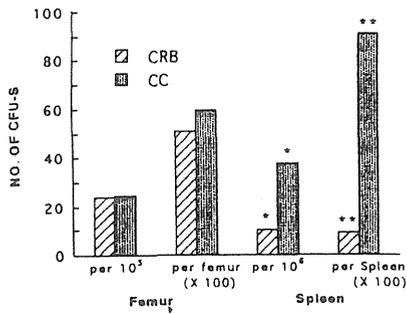


Fig.4 Number of CFU-S of the femur and spleen from 10 weeks old mice. Day12-CFU-S in the spleen cells was significantly lower in number in the group for caloric restriction than in the control.

(T-test;*, $p < 0.001$, ** $p < 0.002$)

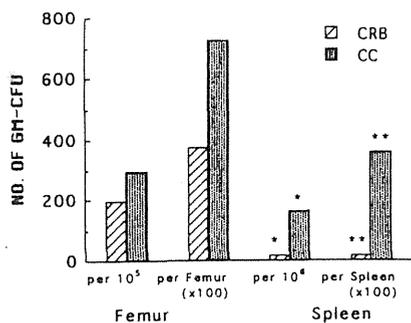


Fig.5 Number of GM-CFU of the femur and spleen from 10 weeks old mice. Number of GM-CFU of the spleen cells was significantly lower in the restricted diet group than in the control diet group. (T-test;*, $p < 0.05$, ** $p < 0.02$)

している可能性が示唆される。

カロリー制限をすると、骨髄性白血病の発症時期も遅延することが、前回の実験で明らかとなったので、カロリー制限と対照食群とで、骨髄性白血病の標的細胞である造血幹細胞の細胞周期について検討した。制限食、対照食両群のマウスにBrdUを5日間持続ラベルし、BUUV法で解析した。対照食群の骨髄及び脾臓のCFU-Sのそれぞれ46%、31.4%は細胞周期入っている。一方、制限食群では骨髄26%、脾臓17.7%と細胞周期内分画が減少していることが明らかとなった (Fig.6)。又、C3Hマウスへ放射線で誘発した骨髄性白血病であるL-8057を、制限食群と対照食群のマウスに同数移植し白血病でマウスが死亡する期間を見ると、死亡し始める時期及び最後のマウスの死亡時期も制限食群で遅れる (Fig.7)。従って、カロリー制限食群では、正常の造血幹細胞と白血病性幹細胞の細胞周期は緩慢であると考えられる。

以上の結果と前回の実験結果を合わせて、考えると、対照食群は照射時の標的細胞数、プロモーションの時期の修飾因子も十分であるので骨髄性白血病の発症率は約22%である。それに対して照射後制限食に替えた群は、標的細胞は十分あるが、修飾因子は減少しているため、発症率は

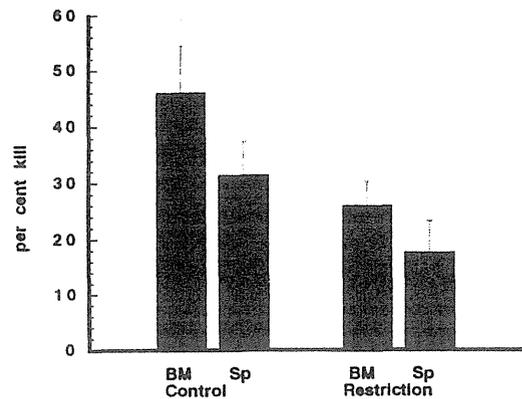


Fig.6 Cycling fraction of hematopoietic colony-forming unit in spleen(CFU-S) in control and restricted mice.

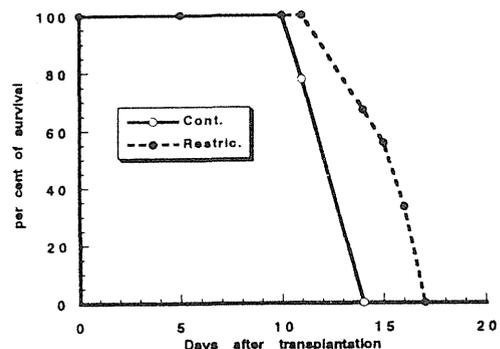


Fig.7 Survival ratio of control and restricted diet mice after L-8057 transplantation.

7~11%となる。照射前より終生制限食は標的細胞、修飾因子とも減少しているので、骨髄性白血病の発症率は一番低く約6%となる。それに対して、照射前制限食・その後対照食は、標的細胞は減少しているが、照射後直ぐに対照食に替える為、造血幹細胞数も対照食と同レベルまで回復し修飾因子も十分あるので、発症率はそれ程減少しなく17%となると考えられる。

結論

カロリー制限により放射線誘発骨髄性白血病と自然発症肝腫瘍の発症率が減少し、生存日数も延長することが明らかとなった。放射線誘発骨髄性白血病の場合は特に、照射後より制限しても効果が認められる事は被ばく後のリスクの軽減化を行う上でも意義深い結果である。

カロリー制限による骨髄性白血病の減少機構について造血幹細胞から考察すると、照射時のみの標的細胞数の減少(6~10週まで制限食・その後対照食)だけでは1群約100匹のマウスでの実験では、発症率は減少するが、統計学的有意差は認められなかった事から、照射時のイネシエーションを受けた標的細胞のプールの減少よりも、その後のカロリー制限による造血微小環境変化がより重要であ

ると考えられる。即ち、細胞回転に入っている造血幹細胞の分画がカロリー制限では低下していることから、プロモーションの過程により大きい影響を及ぼしていると考えられる。

C3Hマウスは自然発症肝腫瘍高発系であり、Ha-rasの変異をもっているが、低発系であるC57BLも同様にこの変異があることから、このマウスの肝腫瘍発生には"hepatocarcinogen sensitivity gene(s)"の修飾が関与していると考えられる。肝腫瘍の場合は自然発症のためにイニシエーションの時期が特定出来ないが、この遺伝子が活性化され前癌細胞、腫瘍へと移行するはずである。カロリー制限によりアポトーシスの頻度が肝臓で亢進し前癌細胞はアポトーシスの影響を受けやすい事が報告されている。従って、肝腫瘍のカロリー制限による減少の一つはアポトーシスの亢進が関与していると考えられる。

最近、daf-2に変異がある線虫は寿命が2倍も長くなり、酸化ストレスに強くなること、daf-2はひとのインスリン受容体のホモログであることが報告された。従って、カロリー制限による腫瘍発生の減少にはエネルギー代謝系が大きく関わっているものと推測される。減少機構の解明には今後これらについての検討が必要であると考えられる。

研究発表

- 1) Yoshida, K., Nemoto, K., Nishimura, M. and Seki M.: *Leuk. Res.*, 17, 437-440, 1993.
- 2) 吉田、根本、井上、佐渡：日本放射線影響学会第36回大会、1993.10.
- 3) 吉田、根本、井上、佐渡：日本血液学会総会、1994.5.
- 4) 吉田、根本、井上、佐渡：日本癌学会第53回総会、1994.10.
- 5) 吉田、根本、佐渡：基礎老化研究、18、24-29、1994.
- 6) Yoshida, K., Inoue, T., Nojima, K., and Sado, T.: 10th International Congress of Radiation Research (Wurzburg, Germany), 1995.8.
- 7) 吉田、井上、平林、松村、根本、佐渡：日本放射線影響学会第38回大会、1995.11.
- 8) Yoshida, K., Inoue, T., Hirabayashi, Y., Matsumura, T., Nojima, K., and Sado, T.: The XVIII Symposium of International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Disease (Kyoto, Japan), 1995.11.
- 9) Yoshida, K.: The 2nd Italy-Japan Workshop on Radiation Effects and Biomedical Applications (Rome, Italy), 1995.12.
- 10) Yoshida, K., Inoue, T., Nojima, K., Hirabayashi, Y. and Sado, T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 2615-2619, 1997.
- 11) Hirabayashi, Y., Yoshida, K., Kanno, J. and Inoue, T.: *Am. Soc. Hematol. (San Diego, USA)* 1997, 12.
- 12) Yoshida, K., Inoue, T., Hirabayashi, Y., Matsumura, T., Nojima, K., and Sado, T. *Leukemia* 11, Suppl. 410-412, 1997.
- 13) Yoshida, K., Inoue, T., Nojima, K., Hirabayashi, Y., and Sado, T.: The second Japan-France Workshop on Radiobiology and Isotopic Imaging, 1998.2
- 14) Hirabayashi, Y., Matsumura, T., Matsuda, M., Kuramoto, K., Motoyoshi, K., Yoshida, K., Sasaki, H. and Inoue, T.: *Mech. Ageing Dev.*, 101, 221-231, 1998.
- 15) 吉田：第30回放射医研シンポジウム、1998.11.
- 16) 吉田、井上、平林、野島、佐渡：日本放射線影響学会第41回大会、1998.12.

I. 放射線による発がんとその修飾因子に関する研究

4 放射線の低線量率照射による 線量・線量率効果因子に関する実験的研究

古瀬 健、野田攸子、大津裕司 (生物影響研究部)、
白貝彰宏 (放射線科学研究部)、安田徳一 (特別研究員)

Dose and Dose Rate Effectiveness Factors of Radiation Induced Myeloid Leukemia in C3H Male Mice

Takeshi Furuse, Yuko Noda, Hiroshi Otsu (Division of Radiation Biology and Oncology),
Akihiro Shiragai (Division of Radiation Research), and Norikazu Yasuda (Senior Reserch Counselor)

We investigated the induction of myeloid leukemia and other kinds of neoplasias in C3H male mice irradiated at several levels of dose and dose rate to compare the incidence of neoplasias among these groups, and then to obtain dose and dose rate effectiveness factors (DDREF) for myeloid leukemia.

C3H/He male mice were exposed to whole body γ ray irradiation at 8 weeks of age. All mice were maintained for their life span and then pathologically examined after thier death. Radiation at a high dose rate of 882 mGy/min (group H), a medium dose rate of 95.6mGy/min (group M), and low dose rate of 0.298mGy/min (group L-A), 0.067mGy/min (group L-B), 0.016mGy/min (group L-C) were delivered from ^{137}Cs sources. The mice in group L were irradiated continuously for 22 hours daily up to total doses of 1, 2,3,4, and 10Gy over a period of 3 days to 200 days. As for the induction of neoplasias, it was significant that myeloid leukemias developed more frequently in irradiated

groups than in unirradiated groups. The time distribution of mice dying from myeloid leukemia did not show a difference between group H and L.

The incidence of myeloid leukemia showed a greater increase in the high dose rate groups than in the low and medium dose rate groups in the dose range over 2Gy, it also showed significant increase in the groups irradiated with 1Gy of various dose rate, but the difference between these groups was not clear. These dose effect curves had their highest values on each curve at about 3Gy. We obtained DDREF values of 2-3 by linear fittings for their dose response curves of dose ranges in which leukemia incidences were increasing.

key words: radiation carcinogenesis, myeloid leukemia, low dose and low dose rate exposure, dose and dose rate effectiveness factor (DDREF)

緒言

放射線の急性障害についての線量率の影響については、消化管上皮細胞、造血細胞、生殖細胞等を用いて詳細に研究されてきた。そこでは線量率を下げると、増殖抑制の効果は減少し、ある線量率以下ではその効果が認められなくなる¹⁻⁴。一方、放射線発がんに関しても同様の効果が予想され、実験が行われた。その結果急性障害が認められない低い線量率で照射した動物に腫瘍発生の増加が観察された⁵⁻⁷。このような低線量率放射線による発がんはヒトにおける環境放射線リスクのモデルみなされるようになった。ヒトの環境放射線によるリスクを推定する際に、高線量・高線量率被ばく群からの外挿によって推定する以外に方法はなく、それには、推定の対象となる疾病等に関して、動物実験によって得られた線量効果関係のモデルを用いて線量・線量率効果係数 (DDREF) を得る必要がある。

そのためには線量効果関係を広い線量率範囲にわたって、可能な限り低い線量での確度の高いデータを得る必要があることは国連科学委員会 (UNSCEAR) 米国放射線防護審議会 (NCRP) 等の報告でも強調されている⁸⁻⁹。原爆被ばく者における白血病についての線量反応関係は線形二次に最もよく適合し、相当するDDREFは約2であるとしている¹⁰。これまでの研究では線量効果関係が必ずしも十分な確度で得られておらず、推定に困難がある。この研究はマウスにおける骨髄性白血病の発生に関するDDREFを、広い線量率範囲にわたって、より確度の高い線量効果関係から得ようとするものである。ちなみに、国連科学委員会の1986年報告書では低線量と低線量率をそれぞれ0.2Gyと0.05mGy/minと規定して¹¹、本研究では最低線量率の0.016mGy/minはこの低線量率の範囲にある。

実験方法

ウスを用いた。高線量率ガンマ線照射は882mGy/min (H群)、中線量率照射は95.6mGy/min (M群) でそれぞれ115TBqと185TBqの¹³⁷Cs線源 (SPF環境)により、また低線量率照射は0.298mGy/min (L-A群)、0.067mGy/min (L-B群)、0.016mGy/min (L-C群) の3レベルを0.374TBqの線源 (CV環境)からの距離を変えることによって得た¹²。L-A,B,C群は1~10Gy (L-C群は4Gyまで)を3日から200日にわたって、1日2時間連続照射を行った。生後8週令から照射を開始し、照射終了後、終生飼育した。死後の解剖所見と病理組織所見から骨髄性白血病を同定した。その発生率はUllrichら¹³の用いたAge Adjusted Incidence法により対照群の年齢分布に標準化する補正を行った。

結果と考察

ガンマ線を被ばくしたC3Hマウスに発生した主な腫瘍は肝腫瘍、肺腫瘍、骨髄性白血病である。肝腫瘍は照射、非照射を問わず死亡したマウスの90%以上に見られ線量依存性は認められなかった。また肺腫瘍は10~20%に見られたが線量依存性は低い。リンパ腫、甲状腺腫瘍についても、この実験では線量依存性があるとは言えない。副腎腫瘍と

その他の軟部組織腫瘍では高線量率の高線量域で増加を認めた (表1)。この系統での骨髄性白血病の自然発生率は0.4%と低く、それに対して放射線照射による発生は顕著であり、発生時期に特徴がある。図1に示すように生後100日から1000日におよび、高線量、高線量率では400日から800日に発生が集中する傾向を示すが、低線量・低線量率では長期間に分散した。骨髄性白血病の発生率は高線量率の0.25Gyを被ばくした群で有意に増加し、さらに1Gyから増加を続け、関ら14も示しているごとく3Gyでピークに達した。中間線量率のM群 (高線量率の100分の1) では高線量率での2分の1にピークの発生率は減少し、この線量域での線量率効果の大きいことを示した。2Gy以下の線量域では白血病発生を反映して平均生存日数の減少が認められる。M群 (95.8mGy/min) の1/300から1/5000の低線量率域で白血病の発生率は2/3に減少した (表2、図2)。低線量率の3つのレベルについて1Gyから4Gyまでの線量効果関係が得られ、それぞれの間有意な差は認められなかったが、2Gy以下の曲線にフィットした直線の傾斜は低線量率ほど大きかった。しかし一方で3Gy以上での発生率が低線量率ほど強く頭打ちになっていた。高線量率から中線量率にかけての線量率減少に伴う発生率の減少が明らかである。

Table 1. Tumors observed in irradiated and unirradiated groups of mice and its incidences.

High Dose Rate(882mGy/min)

Dose (Gy)	No. of Mice	ML	HCA	HAD	LuCA	LuAD	Lymphoma	Adrenal	Thyroid	Others
0.000	272	0.4%	18.0%	74.6%	2.2%	14.7%	10.7%	0.0%	6.3%	3.3%
0.125	205	1.0%	19.5%	75.6%	2.9%	7.3%	5.9%	0.5%	7.8%	3.4%
0.250	189	5.3%	16.9%	76.2%	4.2%	13.8%	4.2%	0.5%	11.1%	2.1%
0.500	225	1.8%	14.7%	79.1%	3.1%	11.1%	6.7%	0.0%	7.6%	3.1%
1.000	200	4.5%	15.5%	76.5%	3.0%	13.5%	4.0%	0.0%	6.0%	3.0%
2.000	196	12.8%	21.9%	66.8%	2.6%	17.9%	4.6%	2.0%	6.6%	2.6%
3.000	299	16.7%	17.7%	69.9%	5.4%	18.4%	3.3%	1.0%	11.0%	5.7%
4.000	183	12.6%	17.5%	68.3%	4.9%	16.4%	7.1%	1.1%	6.0%	6.0%
5.000	169	8.3%	19.5%	65.1%	3.6%	16.0%	9.5%	4.7%	10.7%	11.2%

Medium Dose Rate(95.8mGy/min)

Dose (Gy)	No. of Mice	ML	HCA	HAD	LuCA	LuAD	Lymphoma	Adrenal	Thyroid	Others
1.000	259	6.6%	18.9%	69.9%	2.7%	13.5%	4.2%	1.5%	10.4%	6.9%
3.000	264	8.7%	20.5%	64.0%	5.3%	16.3%	4.5%	1.1%	14.8%	4.9%
5.000	158	9.5%	19.6%	70.3%	1.9%	18.4%	7.6%	1.9%	12.0%	10.1%

Low Dose Rate

(0.298mGy/min)

Dose (Gy)	No. of Mice	ML	HCA	HAD	LuCA	LuAD	Lymphoma	Adrenal	Thyroid	Others
0.000	272	0.4%	18.0%	74.6%	2.2%	14.7%	10.7%	0.0%	6.3%	3.3%
1.000	319	2.2%	17.6%	73.7%	3.1%	11.3%	5.6%	0.0%	5.3%	3.8%
2.000	258	3.9%	19.0%	70.2%	3.9%	17.4%	5.4%	0.8%	7.8%	1.9%
3.000	225	4.4%	24.9%	69.8%	2.7%	9.3%	3.6%	0.4%	5.3%	1.3%
4.000	279	5.0%	20.8%	67.7%	3.9%	17.6%	2.5%	0.4%	5.4%	3.9%
10.000	180	2.8%	21.7%	67.2%	5.0%	19.4%	3.9%	2.8%	10.0%	1.7%

(0.067mGy/min)

Dose (Gy)	No. of Mice	ML	HCA	HAD	LuCA	LuAD	Lymphoma	Adrenal	Thyroid	Others
1.000	228	3.5%	25.9%	68.0%	7.5%	14.0%	6.1%	1.3%	11.0%	3.5%
3.000	279	6.8%	21.5%	71.7%	2.2%	15.1%	5.7%	0.4%	6.5%	2.2%
4.000	298	4.0%	21.5%	71.5%	5.4%	18.1%	3.7%	1.0%	9.1%	4.0%
10.000	151	4.6%	19.9%	67.5%	7.3%	21.9%	9.3%	0.0%	5.3%	2.6%

(0.016mGy/min)

Dose (Gy)	No. of Mice	ML	HCA	HAD	LuCA	LuAD	Lymphoma	Adrenal	Thyroid	Others
1.000	269	3.3%	11.2%	82.2%	3.3%	14.1%	3.7%	0.7%	4.1%	2.2%
2.000	300	5.0%	20.7%	72.7%	2.3%	16.3%	3.3%	0.7%	3.3%	3.3%
3.000	253	3.2%	24.1%	70.4%	3.2%	15.8%	3.6%	1.2%	8.3%	4.0%
4.000	367	3.8%	19.9%	74.7%	4.1%	21.5%	3.8%	0.5%	3.5%	3.8%

ML: myeloid leukemia, HCA: hepatocellular carcinoma, HAD: hepatocellular adenoma, LuCA: lung carcinoma, LuAD: lung adenoma, Adrenal: adrenal gland tumor, Thyroid: thyroid gland tumor

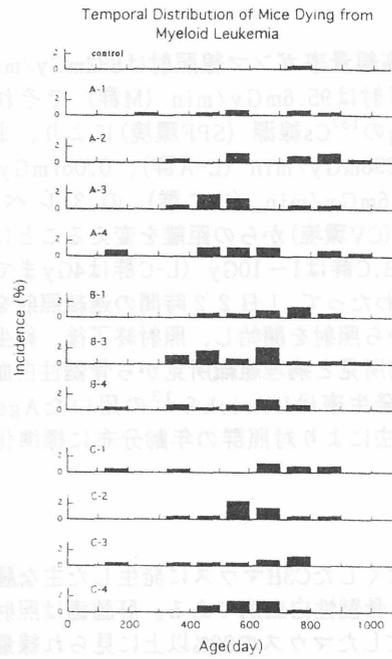
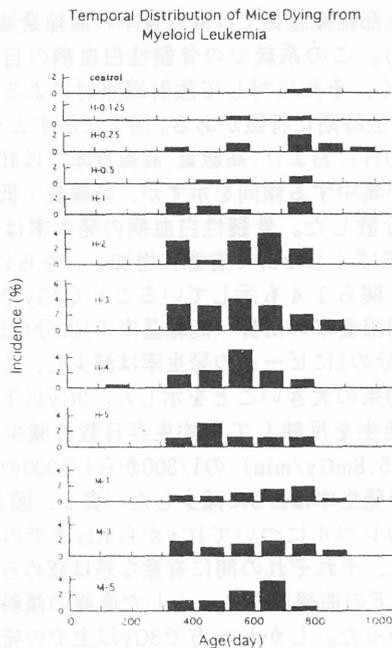


Fig.1 Incidences of myeloid leukemia at intervals of 100 days indicate latent periods of the disease in irradiated and unirradiated groups of mice.

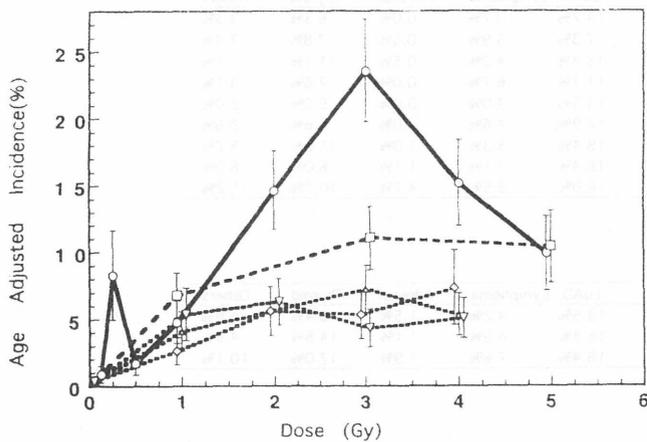


Fig.2 The relationship between radiation dose and incidence of myeloid leukemia.

NCRPが採用しているDDREFの算出方式DDREF = α_L / α_{EXP} を(高線量率での線量効果関係の勾配/低線量率実験での線量効果関係の勾配)⁹を用いるためには得られた線量効果曲線に回帰直線を設定する必要があるが、先に述べたごとく、3Gy以上の高線量域では発生率が低線量率でつよく頭打ちになっているので、高線量率と中線量率および低線量率の一部では、3Gyまでの全ての値についての回帰直線を用いたが、最低線量率については発生率の上昇部分の0Gyから2Gyまでの発生率についての回帰直線を求めた。直線の式は図3に示すごとく

高線量率 (882mGyin)
 $Y=0.067+7.202X \quad R=0.939$
 中線量率 (95.8mGyin)
 $Y=1.598+3.355X \quad R=0.953$

Table 2. Average life span and myeloid leukemia incidences in irradiated and unirradiated groups of mice.

Dose Rate (mGy/min)	Dose (Gy)	No. of Mice	Average of Life Span (day)	No. of ML	Incidence of ML (%)	Age Adjusted Incidence of ML (%)
0	0	272	719.7 ± 9.1	1	0.37	0.368 ± 0.368
882.0	0.125	205	741.4 ± 9.7	2	0.98	0.874 ± 0.619
	0.25	189	708.5 ± 9.8	10	5.29	8.295 ± 3.335
	0.5	225	732.0 ± 9.9	4	1.78	1.667 ± 0.834
	1.0	200	692.5 ± 11.1	9	4.50	4.774 ± 1.593
	2.0	196	679.8 ± 10.7	25	12.76	14.631 ± 2.946
	3.0	299	650.6 ± 8.0	50	16.72	23.572 ± 3.827
	4.0	183	637.4 ± 11.1	23	12.57	15.161 ± 3.215
95.8	5.0	169	641.1 ± 11.4	14	8.28	9.902 ± 2.772
	1.0	259	708.4 ± 9.5	17	6.56	6.795 ± 1.653
	3.0	264	659.0 ± 9.7	23	8.71	11.048 ± 2.376
0.298	5.0	159	670.2 ± 12.0	15	9.43	10.412 ± 2.694
	1.0	319	681.0 ± 8.3	7	2.19	2.615 ± 1.018
	2.0	258	682.9 ± 9.2	10	3.88	5.598 ± 1.804
0.067	3.0	225	655.6 ± 9.5	10	4.44	5.355 ± 1.807
	4.0	279	671.0 ± 9.8	14	5.02	7.345 ± 2.775
	10.0	180	612.9 ± 11.0	5	2.78	5.017 ± 2.37
0.016	1.0	228	695.2 ± 9.9	8	3.51	4.086 ± 1.479
	3.0	279	682.8 ± 8.3	19	6.81	7.246 ± 1.742
	4.0	298	643.1 ± 8.1	12	4.03	5.325 ± 1.574
	10.0	151	591.3 ± 9.9	7	4.64	5.781 ± 2.275
0.016	1.0	269	654.1 ± 9.8	9	3.35	5.382 ± 1.976
	2.0	300	665.1 ± 7.7	15	5.00	6.302 ± 1.731
	3.0	253	671.9 ± 8.4	8	3.16	4.333 ± 1.414
4.0	367	653.4 ± 6.2	14	3.81	5.075 ± 1.506	

低線量率 (0.298mGyin)
 $Y=0.245+2.615X \quad R=0.997$
 (0.067mGyin)
 $Y=0.979+2.191X \quad R=0.972$
 (0.016mGyin)
 $Y=1.050+2.967X \quad R=0.929$

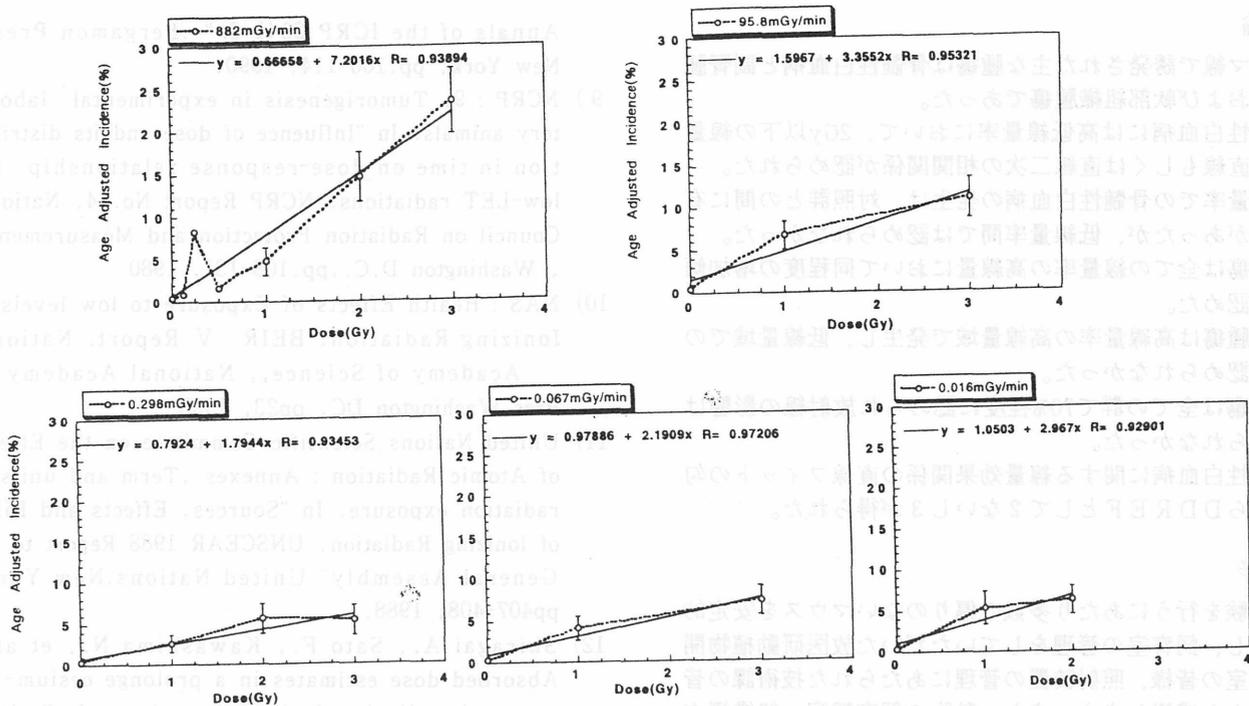


Fig.3 Linear regression to dose response curves of myeloid leukemia incidences for 5 dose rate groups.

となった。 α_L として高線量率の勾配を、 α_{EXP} として中、低線量率の勾配をあてるとDDREFの値として2.2から3.3が得られた。これまで骨髄性白血病の発生における線量効果関係についてはいくつかの系統のマウスで調べられている。Uptonら¹⁵はRFマウスを用い0.25Gyから10Gyの線量範囲で効果を比較した。800mGy/minでは0.25Gyで有意に増加し、2Gyまで直線にフィットし、低線量率の0.04から0.6mGy/minでは3Gyではじめて有意な増加を観た。高線量率のデータは我々のものとよく一致しているが、低線量率では低い値となっているため、DDREFとして5.6を示している。Ullrichら¹⁶はRFM雌マウスを用いて同様の実験を行ったが高線量率の3Gyでの骨髄性白血病の発生率が5.2%と低く、低線量率では2Gyでも発生が有意に増加しなかったためDDREFを無限大としている。雄マウスでは発生率が高かったため5という係数を求めている。また、Majorら¹⁷はCBAMマウス（非照射マウスでは1400匹中に骨髄性白血病の発症を一例も観ない）を用いて同様の実験を行ったところ、高線量率では明らかな線量依存性を認めたと、低線量率（0.04-0.11mGy/min）では発生率の増加はみたものの用いた線量範囲では線量依存性がなかったとしている。勾配の比をとる代わりに線量レベル毎の発生率の比較で係数を求め、1.5Gyから4.5Gyの範囲で2.2から5の値を得ている。いずれにしても、線量率毎の線量効果関係が得られていない。本研究においても線量レベル毎の効果の比較では3Gyでは2.1から5.4、2Gyでは2.6から2.9、1Gyでは0.7から1.2となる（図4）。この結果が示すように線量レベル毎の比較では線量が異なると値が大きく異なる。このような関係について放射線誘発突然変異率のデータから同様な指摘をラッセルがしている¹⁸。

本研究での最低線量率（0.016mGy/min）においては2Gyの照射に95日を要し、4Gyでは190日におよぶ。照射時間の長さによる生体の多様な因子の関与を考慮する必要が生じてくる。イニシエーションを主とした発がんの初期段階にたいして高線量率から中線量率の範囲での線量率変化

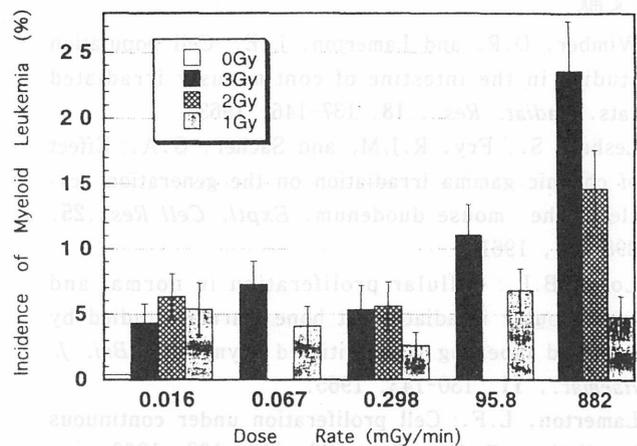


Fig.4 Comparison of incidences of myeloid leukemia between different dose levels at 5 dose rate levels.

がDNA損傷の程度とその回復に大きな影響を及ぼす一方、細胞の標的あたり平均1個以下の事象しか起こらないような低線量域でのイニシエーションには線量率は影響せず、線量に比例すると考えられる。長期の遷延照射は、増殖サイクルの繰り返しに対しての継続的な照射となりプロモーションの局面に作用する可能性から、線量率低下に対して、発生率の上げ止まりもしくは上昇傾向をもたらしたとも考えられる。そうとすれば、より照射期間が長期にわたった3Gy以上において発生率の上昇がみられないのはなぜであろうか。低線量率群で発生時期が大きくばらつきしかも頻度が低いことから解析は容易ではないと思われるが、このデータを元により一層の解析を進めることが重要であると考えられる。

結 論

- ①ガンマ線で誘発された主な腫瘍は骨髄性白血病と副腎腫瘍、および軟部組織腫瘍であった。
- ②骨髄性白血病には高低線量率において、2Gy以下の線量域で直線もしくは直線二次の相関関係が認められた。
- ③低線量率での骨髄性白血病の発生は、対照群との間に有意差があったが、低線量率間では認められなかった。
- ④肺腫瘍は全ての線量率の高線量において同程度の増加傾向を認めた。
- ⑤副腎腫瘍は高線量率の高線量域で発生し、低線量域での差は認められなかった。
- ⑥肝腫瘍は全ての群で70%程度に認められ放射線の影響は認められなかった。
- ⑦骨髄性白血病に関する線量効果関係の直線フィットの勾配からDDREFとして2ないし3が得られた。

謝 辞

本実験を行うにあたり多数の偏りのないマウスを安定的に供給し、飼育室の管理をしていただいた放医研動植物開発管理室の皆様、照射装置の管理にあられた技術課の皆様、心から感謝します。また、動物の飼育観察、組織標本の作製に尽力下さった樽見邦代、東海林千恵子、篠原時子、尾崎幸恵、磯田初江の各氏に感謝します。また、この研究を始めるにあたって、貴重なる示唆を頂いた佐渡敏彦氏に感謝します。

参考文献

- 1) Wimber, D.R. and Lamerton, L.E.: Cell population studies in the intestine of continuously irradiated rats. *Radiat. Res.*, **18**, 137-146, 1963.
- 2) Leshner, S., Fry, R.J.M. and Sacher, G.A.: Effect of chronic gamma irradiation on the generation cycle of the mouse duodenum. *Exptl. Cell Res.*, **25**, 398-404, 1961.
- 3) Lord, B.L.: Cellular proliferation in normal and continuously irradiated rat bone marrow studied by repeated labelling with tritiated thymidine. *Br. J. Haemat.*, **11**, 130-143, 1965.
- 4) Lamerton, L.F.: Cell proliferation under continuous irradiation. *Radiat. Res.*, **28**, 119-138, 1966.
- 5) Lorenz, E.: Some biologic effects of long continued irradiation. *Am. J. Roentgenol.*, **63**, 176-185, 1950.
- 6) Otsu, H., Kobayashi, S., Furuse, T., et al.: Age and sex dependence in tumorigenesis in mice by continuous low dose rate whole body irradiation. In Proceedings of the International Conference on Radiation Effects and Protection, Mito, pp.211-216, 1992
- 7) Leshner, S., Sacher, G.A., Grahn, D., et al.: Survival of mice under duration-of-life exposure to gamma rays, II. Pathologic effects. *Radiat. Res.*, **24**, 239-277, 1965.
- 8) International Commission on Radiological Protection: Recommendations of the ICRP, B. 4. Stochastic Effects: Carcinogenesis. In "ICRP Publication 60, Annals of the ICRP 26 (1-3)", Pergamon Press, New York, pp.106-114, 1990.
- 9) NCRP: 9. Tumorigenesis in experimental laboratory animals. In "Influence of dose and its distribution in time on dose-response relationship for low-LET radiations. NCRP Report No.64, National Council on Radiation Protection and Measurements", Washington D.C., pp.108-131, 1980
- 10) NAS: Health Effects of Exposure to low levels of Ionizing Radiation, BEIR V Report. National Academy of Science, National Academy Press, Washington DC, pp.23, 1990
- 11) United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: Annexes, Term and units of radiation exposure. In "Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation, UNSCEAR 1988 Report to the General Assembly" United Nations, New York, pp.407-408, 1988.
- 12) Shiragai A., Sato F., Kawashima N., et al., Absorbed dose estimates in a prolonged cesium-137 gamma irradiation facility for mice. *J. Radiat. Res.* **21**, 118-125, 1980
- 13) Ullrich R.L., and Storer, J.B.: Influence of γ irradiation on the development of neoplastic disease in mice. I. Reticular tissue tumours. *Radiat. Res.* **80**, 303-316, 1979
- 14) Seki M., Yoshida K., Nishimura M., et al.: Radiation-Induced myeloid Leukemia in C3H/He mice and the effect of prednisolone acetate on leukemogenesis. *Radiat. Res.* **127**, 146-149, 1991
- 15) Upton, A.C., Randolph, M.L. and Conklin, J.W.: Late effects of fast neutrons and gamma-rays in mice as influenced by the dose rate of irradiation: Induction of neoplasia. *Radiat. Res.*, **41**, 467-491, 1970.
- 16) Ullrich, R.L. and Storer, J.B.: Influence of gamma irradiation on the development of neoplastic disease in mice. III. Dose-rate effects. *Radiat. Res.*, **80**, 325-342, 1979.
- 17) Major, I.R. and Mole, R.H.: Myeloid leukemia in X-ray irradiated CBA mice. *Nature*, **272**, 455-456, 1978
- 18) Russel W.L., Kelly E.M., Mutation frequencies in male mice and the estimation of genetic hazards of radiation in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **79**, 542-544, 1982

Ⅱ. 放射線ならびに放射性物質の胎児影響に関する研究

1. 放射性物質の摂取に伴う

胎児の被ばく線量とその影響に関する研究

久保田善久*、高橋千太郎*、武田 洋*、西村義一**、上島久正***

(*第4研究グループ、**人間環境研究部、***人材・研究基盤部)

Radiation Doses and Biological Effects in Rodent Embryos and Fetuses Following Maternal Contamination with Radioactive Materials

Yoshihisa Kubota*, Sentaro Takahashi*, Hiroshi Takeda*,
Yoshikazu Nishimura**, and Hisamasa Joshima***

(*Fourth Research Group, **Division of Human Radiation Environment,
and ***Division of Education and Scientific Services)

The aims of this study were, 1) to evaluate the radiation doses in rodent embryos and fetuses after maternal contamination with major radioactive matters, 2) to elucidate possible mechanisms of radiation damages of fetal hematopoietic function by plutonium, and 3) to clarify the relationship between severe mental retardation caused by in utero radiation exposure and impaired oxygen transport to fetal brain. In the dose estimation study, transfer of ^3H (THO and organic bound tritium), ^{137}Cs , ^{54}Mn and ^{65}Zn to the fetus as well as the deposition of these radionuclide in the fetoplacental units including fetus, placenta, fetal membrane and fluid were investigated. The amount and rate of transfer were different between the nuclides as well as their chemical states. In the study on the effects of plutonium on fetal hematopoietic systems, very interesting findings were obtained. First, the rodent placenta play as effective barrier for the transportation of plutonium from maternal circulation to fetal tissues and accumulate the plutonium at concentrations 30-50 times higher than fetal tissues.

胎児は、その組織や臓器が活発に分化増殖していることから放射線に対する感受性が一般に高く、また、独立した個人でありながらその生存は母体に依存していることから、放射線影響や放射線防護において特異な存在である。近年、いくつかの状況から放射性物質による胎児の被曝とその影響に強い関心が持たれている。第1に、従来放射線防護の対象は主として職業人であったが、一般公衆の放射線防護の必要性が認知され、国際放射線防護委員会等で胎児における線量評価や影響評価、胎児線量評価モデルの策定が進んでいること、第2に英国の核関連施設周辺において小児白血病の発生率増加を示す疫学調査研究を契機に、放射性核種の胎児移行や胎児影響を再検討する必要性が叫ばれたこと、第3に放射線の胎児影響として精神遅滞の発生が原爆被爆者調査等で明らかにされてきたが、その発生機序には不明な点が多く、近年の脳科学の進展に伴って種々のアプローチがなされていること、などである。この

The second important finding was that the decrease in fetal hematopoietic functions (determined by the number of spleen colony forming unit in the fetal liver) was more pronounced in BDF1 mice than C3H mice. The colony forming unit numbers (CFU-S) in the fetal liver were decreased significantly by ^{239}Pu at doses more than 30kBq/kg body weight in BDF1 mice, but were not changed by up to 900kBq/kg in the C3H strain mice. In the study on the relationship between severe mental retardation caused by in utero radiation exposure and a possible involvement of impaired oxygen transport to fetal brain following the prenatal irradiation, the effect of X-ray irradiation on erythropoietic activity in fetal liver of C57Bl/6 mice was studied in vivo and in vitro. The erythropoietic activity in fetal liver determined by ^{59}Fe incorporation was markedly reduced by irradiation in vivo and in vitro, suggesting that the necessary amount of oxygen may not be supplied to the fetal brain at the time required, and this may be one possible cause of brain damage after fetal irradiation.

ような状況を受け、本研究では放射線のデトリメントという観点から、胎児への放射性物質の移行と線量評価、超ウラン元素等による胎児期被曝の胎児造血器系への影響、ならびに胎児期放射線照射の胎児赤血球造血能に及ぼす影響に関する研究を進めた。以下にその概要を報告する。

1) 放射性核種の胎児への移行と線量評価

放射性核種の胎児移行に関しては、すでに多くの研究が行われてきているが、線量評価に必要な種々のパラメータ、たとえば、妊娠日齢による変動、胎児の臓器別の沈着量、化学形による影響などについては不明な点が多い。特に、臓器別の沈着量は各臓器の線量を算定する際に必要であるが、現時点では母体における各臓器間の濃度比が胎児においても成り立つとの考え (ICRPの胎児モデルにいうところの濃度比モデル) が支持されているが、それを実証するデータは不足している。そこで、核分裂生成物でありチェ

ルノブイル原発事故の際にも問題になった¹³⁷Csについて胎児各臓器への沈着率を中心として検討した。また、原発の冷却水中に生成され、放射線防護上の重要な核種であるが、代謝データについて不明な点が多い⁵⁴Mn、⁶⁵Znについて、胎児への移行率を中心として検討した(1, 2)。また、放射性核種の中でも代謝や影響が特異的な³Hは、核分裂炉からの放出だけでなく、核融合炉の開発が進むに連れて、今後、益々重要となってくる核種と予測されているが、³Hの胎児移行や胎児中での臓器濃度など、胎児における線量評価に必要なデータは、著しく不足している。さらに、³Hでは化学形が代謝データに影響することは良く知られており、化学形の異なる³H化合物の胎児における代謝データの蓄積が求められている。このことから、本研究では、THO(トリチウム水)や³H標識アミノ酸の胎児移行や受胎産物中での濃度をラットで明らかにするとともに、胎児が受ける線量について検討を加えた(3)。また、DNAの前駆体であるチミジンは、種々の用途に広く用いられているが、特定の部位に沈着して高い局所線量を与える危険性が指摘されている。そこで、このようなチミジンに結合した³Hや¹⁴Cの胎児局所線量を明らかにすることを目的に、最近開発されたバイオイメージングアナライザーを活用して胎児の脳と肝臓への沈着様式と局所線量について検討した(4)。

[材料および方法]

実験に使用した動物はラットならびにマウスである。これらの動物は、胎児への移行経路がヒトに類似した1層の栄養膜細胞をもつ尿膜絨毛胎盤であり、ヒトでの胎児への物質移行のモデル動物として多用されていることから使用した。また、これらの動物では発生分化の時期とヒトとの対応が明確であるという長所を有している。

⁵⁴Mn、⁶⁵Znの胎児移行に関する実験はマウスを用いて行われた。すなわち、妊娠17日目のICR系マウスに⁵⁴Mn、⁶⁵Zn溶液を静脈内投与し、その後、3, 6, 24および48時間目に各放射性核種の胎児胎盤系への移行をガンマ線計測により求めた。また、一部の実験では、母体(胎児と付属器官を含む)のオートラジオグラフィーを作成し、オートラジオグラムから、胎児と母体の各対応臓器の相対放射能濃度を求めた。なお、本研究は岩手大学との共同研究として実施された。

一方、トリチウムの移行に関する実験では、ウイスター系のラットを用いた。常法に従い作成した妊娠ラットに、THO(トリチウム水)、³H標識アミノ酸(リジン)および³Hチミジンを妊娠13および17日目に母体に静脈内注射により投与した。動物は投与後24時間目に殺し、胎児、胎膜、胎盤等の受胎産物中の³H量を液体シンチレーション計測により求めた。また、チミジンとしての移行の特異性と胎児組織への局所沈着の様相を明確にするため、¹⁴Cチミジンを妊娠17日目のC3H系マウスに投与し、投与48時間までの胎児の各組織における沈着状態と濃度をBAS2000(フジ写真フィルム製)にて検討した。

[結果]

¹³⁷Csを母体に投与後、24時間における胎児1匹当たりの取り込み量は投与量の0.8%であり、1腹に換算すると投与量の11%であった。また、⁵⁴Mnでは、投与量の19%が

胎児に移行した(1腹当たり)。これに対して、⁶⁵Znの胎児移行割合は高く、投与48時間までに投与量の50%が胎児に移行した(1腹当たり)。このため、¹³⁷Csおよび⁵⁴Mnでは、観察期間中に胎児の放射能濃度が母体の放射能濃度を上回ることにはなかったが、⁶⁵Znでは投与後24-48時間において胎児の放射能濃度が有意に母体の放射能濃度より高かった。

トリチウムにおいては、使用した3種類の化合物(THO(トリチウム水)、³H標識リジンおよび³Hチミジン)の胎児平均濃度は母体の主要臓器における平均濃度より低い傾向が認められた(Table1)。この傾向は妊娠13日および17日のいずれの妊娠日齢に投与された時にも認められ、

Table1. Relative tissue concentration of tritium 24hr after ingestion in different chemical forms

Tissue or organ	Relative concentration of tritium*					
	After ingestion on the 13th day of gestation			After ingestion on the 17th day of gestation		
	HTO	³ H-thymidine	³ H-lysine	HTO	³ H-thymidine	³ H-lysine
Maternal liver	73±4	78±5	136±8	74±4	76±6	130±11
Maternal kidney	72±2	77±6	125±8	70±3	81±5	120±10
Fetus whole	102±6	73±6	78±6	87±7	85±4	95±7
Placenta	87±7	79±7	100±7	71±3	68±6	105±6
Fetal membrane	86±3	71±4	76±4	72±5	65±6	84±5

* Relative concentration was expressed as the per cent of radioactivity administered per g body weight of mother rat. Each value is the mean ± s.d. for the three pregnant rats.

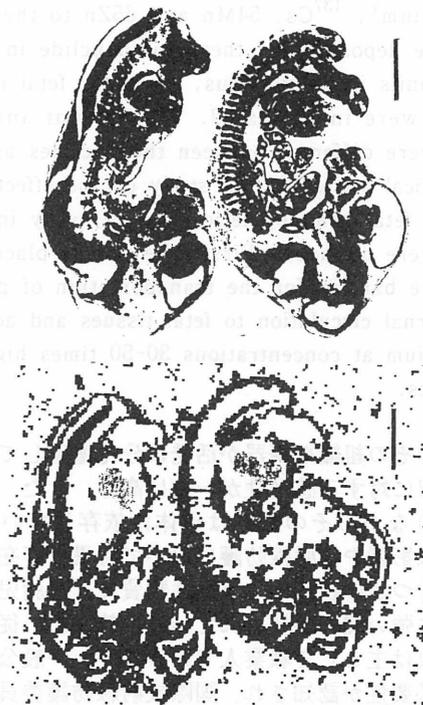


Fig.1. A photograph and autoradiogram of the fetuses after maternal injection of ¹⁴C-thymidine. In the autoradiogram, the region with red to orange color are those with the higher accumulation of ¹⁴C: the inner layer of the brain tissue facing the brain cavity (ventricular zone), the dorsal thalamus, the spinal cord, the palate and the liver. Horizontal bar shows 2.5mm. The same tissue section was stained with hematoxylin and eosin after autoradiography and photographed.

平均濃度としては、トリチウムの胎児濃度は母体の濃度を上回らないことが示唆された。一方、トリチウム化合物の中でも、チミジンのような化合物はその化学的性質により特定の組織や部位に高濃度に沈着することが予測される。そこで³Hチミジンの胎児における局所集積を検討するため、オートラジオグラフィによる定量が可能な¹⁴Cチミジンを妊娠17日の母体に投与して、局所的な分布と濃度をバイオイメージングアナライザーにより求めた。その結果、Fig.1に示すように、脳（特に中脳の脳室側顆粒層）や肝臓の中心部に高い集積を認め、その濃度は母体の肝臓の2-3倍程度となることが明らかとなった。

[考察]

母体による放射性物質の摂取に伴い胎児が受ける放射線量の推定には、コンパートメントモデル法と濃度比法が提唱されている。コンパートメントモデル法とは、母体と胎児ならびに胎児付属器官をコンパートメントに設定し、相互の間の放射性物質の移動をいわゆるコンパートメントモデルでシミュレーションすることで、胎児の放射性物質の濃度をもとめ、それを時間積分して線量を求めようとするものである。この方法は、生理学的に妥当であり、かつ実際の動きを詳細に追跡できるが、現在の所このようなコンパートメントモデルを策定するに足るデータの蓄積されている放射性核種は極めて限られている。一方、濃度比モデルは、胎児での平均濃度は母体のそれより低いか等しく、胎児における各臓器間の相対濃度は母体と同じ比率であると仮定して、胎児中の放射性物質の濃度や線量を求めようとするものである。

本研究の主眼は、このような濃度比モデルがはたして普遍的に成り立ち、このモデルによって計算された胎児の放射線量が安全側のものとなるかを検討することにあつた。その結果、¹³⁷Csおよび⁵⁴Mnでは、観察期間中に胎児の放射能濃度が母体の放射能濃度を上回ることはなく、濃度比モデルの適用の可能性を示唆したが、一方、⁶⁵Znでは投与後24-48時間において胎児の放射能濃度が有意に母体の放射能濃度より高く、母体濃度を基準として濃度比モデルを策定すると胎児の線量が過小評価される危険性のあることが示された。また、トリチウムでは、胎児の平均線量として評価すると、母体の平均線量を上回る事例は見られなかったが、局所線量という観点から見ると、チミジンのような化学形で存在する場合は、トリチウムにより胎児臓器の局所線量は、母体の平均線量よりかなり高くなるということが示唆されるデータが得られた。

今回のデータは、従来、知見の少なかった核種や、トリチウムの化学形による移行量の違いを明らかにし、また、その局所沈着の可能性を示唆した点で、放射線毒性学上重要である。また、本研究の一部は、現在、国際放射線防護委員会で策定中の胎児モデルに利用される予定であり、胎児線量評価を介して放射線安全研究に寄与した。しかし、本研究の最も重要な点は、少なくとも、ある種の放射性核種の胎児濃度は母体濃度を上回る可能性があり、また、平均濃度としては上回ることがなくても局所線量としては、母体の対応する臓器に比べ高い線量を与える可能性があることを示した点である。著者らは、暫定的に濃度比モデルを利用して胎児の線量評価が行われることを否定しないが、今後、より生理学的に妥当性があり、かつ、多くの動

物実験データで裏付けられたコンパートメントモデルを確立するために、この種の実験を強力に押し進める必要があると考えている。

2) 超ウラン元素等による胎児期被曝の 骨髄造血器系への影響

上記1)の研究の見地からいえばプルトニウム等の超ウラン元素は、胎児への影響を考えなくてよい元素である。これは、超ウラン元素が体液の組成下では水酸化物重合体を形成し、胎児への移行が極めて少ないことによる。すなわち、濃度比モデルでいえば母体と胎児の濃度比は極めて小さく、胎児が有意な被曝を受けるとは考えられない元素である。Table 2にプルトニウムの胎児移行率に関して今までに発表された動物実験データのいくつかをまとめて示す。実験動物の種類、プルトニウムを投与した妊娠日令、プルトニウムの臓器沈着量を解析した妊娠日令等が実験によりまちまちであるが、胎児と母体に分布するプルトニウムの濃度比は総じて1を大きく下回る値であり、このことからプルトニウムの内部被ばくに関しては放射線防護上母体を防護すれば胎児も防護しようと考えられたのである。しかしながら1980年代英国の核関連施設周辺において小児白血病の発生率増加を示す疫学調査研究がいくつか報告されたことから、超ウラン元素の胎児移行ならびに胎児影響を再検討する必要性が叫ばれ、1980年代末以降英国の研究グループを中心にいくつかの研究が行われた。その結果、プルトニウムの胎児移行率は極めて低く、受ける線量も有意な影響を受けるとは考えられないような低い線量であるが、胎児及び新生児の造血器系に有意な影響が見られるとの報告がなされた。そこで、本研究ではプルトニウムの胎児移行についてさらに詳細な検討を加えると共に、胎児造血器に遅延性の障害がもたらされる機序について検討することを目的に以下のような研究を行った(5, 6)。

Table 2. List of animal data on the fetoplacental transfer of plutonium

Species	Days of gestation		Fetus: mother ratio	Reference	
	Injection	Analysis			
Guinea pig	10	17	0.14	Morgan et al. (1991)	
	10	Birth	0.002		
	20	27	0.0006		
	30	37	0.0075		
	30	Birth	0.006		
	50	57	0.054		
	60	61	0.035		
	60	Birth	0.035		
	7	Birth	0.0015		
	8	11	0.2		
Rat	9	10	0.22	Sikov and Andrew (1979)	
	9	12	0.015-0.25		
	9	14	0.013-0.075		
	9	18	0.01	Sikov and Andrew (1979)	
	9	20	0.008		
	9	Birth	0.008	Sikov (1986)	
	11	12	0.13		
	11	14	0.06	Sikov and Andrew (1979)	
	15	16	0.025-0.1		
	15	18	0.05-0.1	Sikov (1986)	
	15	20	0.075		
	15	Birth	0.05	Sikov and Mahlum (1968,1976)	
	19	20	0.025-0.1		
	Mouse	19	Birth	0.13	Morgan et al. (1991)
		13	14	0.17	
13		16	0.27	Mason et al. (1991)	
13		Birth	0.22		
4		17	0.019	Sikov and Andrew (1979)	
8		Birth	0.008		
9		Birth	0.021	Bluzat et al. (1966)	
14		Birth	0.062		
17		Birth	0.12-0.19	Mason et al. (1991)	
19		Birth	0.04		
16		18	0.11-0.48	Bluzat et al. (1966)	
			Weiss and Walburg (1979)		

[材料および方法]

プルトニウムの胎児移行率を求める実験では、妊娠中期以降のC3H系マウスにクエン酸プルトニウムを体重1g当たり400Bq静脈内注射し、24時間後に母体肝臓及び受胎産物

を取り出し、組織溶解液を用いて可溶化した後、液体シンチレーション計測によりプルトニウム濃度を測定した。

プルトニウムの胎児造血系へ及ぼす影響に関する実験では、妊娠4日目のC3H系およびBDF1系マウスに30-900Bq/gのクエン酸プルトニウムを投与し、妊娠17日目にと殺して胎児と胎児付属器官を取り出し、そのプルトニウム濃度を測定すると共に、胎児肝臓を常法に従って分散細胞とし、別に垂致死線量の放射線を照射しておいたマウスに投与することにより、肝臓に含まれる造血幹細胞のコロニー形成能(CFU-S)を調べた。また、妊娠初期における胎児の各部が受ける放射線量を調べるため、妊娠6, 8, 10日の受胎産物を子宮ごとに取り出し、バイオイメージングアナライザー(BAS3000)を用いた定量的オートラジオグラフィにより胎児各部のプルトニウム濃度を求めた。

Table 3. ²³⁹Pu Concentration in conceptuses 1 day after intravenous administration of plutonium citrate to pregnant mice

Days of pregnancy at injection	²³⁹ Pu Concentration (% IA/g tissue)			
	Decidua	Yak sac	Fetus	Fetal liver
10.5	1.19 ± 0.47 (41 ± 12)	7.68 ± 3.61 (9 ± 2)	0.03 ± 0.01 (30 ± 6)	n.d
11.5	0.94 ± 0.23 (65 ± 13)	8.55 ± 0.86 (14 ± 5)	0.04 ± 0.01 (72 ± 8)	n.d
12.5	1.29 ± 0.17 (72 ± 13)	9.43 ± 2.23 (22 ± 4)	0.04 ± 0.01 (134 ± 9)	n.d
13.5	1.71 ± 0.77 (88 ± 10)	8.62 ± 3.34 (32 ± 7)	0.07 ± 0.02 (207 ± 19)	n.d
14.5	3.04 ± 0.48 (101 ± 15)	13.69 ± 3.44 (38 ± 4)	0.12 ± 0.02 (350 ± 36)	n.d
15.5	3.49 ± 1.17 (117 ± 26)	16.07 ± 3.99 (36 ± 6)	0.13 ± 0.02 (457 ± 71)	0.24 ± 0.15 (33 ± 13)
16.5	4.76 ± 0.38 (103 ± 17)	21.20 ± 2.71 (35 ± 4)	0.12 ± 0.02 (732 ± 43)	0.27 ± 0.05 (50 ± 11)

Values in parentheses are tissue weights (mg).
n.d: not determined.

[結果]

Table 3に、プルトニウムを妊娠中期以降のマウスに注射し、24時間後に母体肝臓及び受胎産物中のプルトニウム濃度を測定した結果を示す。母体肝臓における高濃度の沈着に対し胎児及び胎児肝臓には極めて僅かな沈着しか認められず、その比は他の研究者が種々の実験条件下で得た胎児と母体に分布するプルトニウムの濃度比と類似していた。しかしながら胚外組織である卵黄嚢には母体肝臓と同程度或いはそれ以上の高濃度のプルトニウム沈着が認められた。卵黄嚢は絨毛膜胎盤が形成されるまで、胚に栄養を供給するとともに選択的に胎児への物質移行を阻止するバリアとして機能していることが知られており、プルトニウムが卵黄嚢のバリア機能により特異的に蓄積し、胚・胎児への移行が阻止されていると考えられる。

妊娠4日にクエン酸プルトニウムを母体に投与した後、妊娠17日に取り出した胎児肝臓における造血細胞コロニー形成能(CFU-S)をTable 4に示した。極めて興味深いことに、BDF1マウスではプルトニウムの投与により胎児肝臓中の造血幹細胞数が対照と比較して約半分に減少するのに対し、C3Hマウスでは10倍量以上のプルトニウム投与によっても影響が認められないことを見出した。このような

マウス系統差が生ずる原因として1) BDF1マウスとC3Hマウス間でプルトニウムの受胎産物への移行量、受胎産物中の分布が異なる可能性 2) プルトニウムのα線に対する造血組織(造血幹細胞あるいは造血微小環境)の放射線感受性が異なる可能性が考えられた。そこでプルトニウムの受胎産物への移行量、受胎産物中の分布を定量的オートラジオグラフィと液体シンチレーションカウンティングにより詳細に検討した。その結果、妊娠6, 8, 10, 13および17日における受胎産物各部でのプルトニウム濃度は、C3HとBDF1マウスの間で有意な差は認められなかった(Table 5, 6)。

Table 4. Effect of ²³⁹Pu injected on day 4 of gestation on the number of CFU-S in the foetal liver on day 17 of gestation^a

Dose ^b (kBq/kg)	Injection route	Mouse strain	
		C3H	BDF1
0	—	1877 ± 291	2389 ± 109
30	intraperitoneal	1801 ± 204	1636 ± 276 ^c
300	intravenous	2035 ± 568	1192 ± 492 ^c
300	intraperitoneal	1951 ± 342	1255 ± 210 ^c
900	intraperitoneal	1947 ± 287	1304 ± 79 ^c

^a Values are mean ± SD of CFU-S per foetal liver.

^b Plutonium was maternally injected on day 4 of gestation (kBq/kg body weight).

^c Significant difference between control and plutonium injected group.

Determined with Student's t-test (significance level $p < 0.05$).

Table 5. Relative concentration of ²³⁹Pu in fetoplacental tissues of BDF1 and C3H mice determined by quantitative autoradiography^a

Days of gestation	Fetoplacental tissue	Mouse strain	
		BDF1	C3H
6	Inner cell mass ^b	194 ± 90	182 ± 75
	Trophoblast	415 ± 135	471 ± 235
	Decidua	10 ± 3	15 ± 3
	Perimetrium	1109 ± 698	2163 ± 928
	Background	2 ± 0	2 ± 0
8	Foetus	3 ± 1	3 ± 1
	Placenta	5 ± 1	8 ± 3
	Yolk sac, Trophoblast	140 ± 34	196 ± 103
	Decidua	4 ± 1	5 ± 3
	Perimetrium	959 ± 583	1278 ± 509
10	Background	2 ± 0	2 ± 0
	Foetus	3 ± 0	3 ± 0
	Placenta	3 ± 1	3 ± 0
	Yolk sac, Trophoblast	196 ± 50	138 ± 65
	Decidua	3 ± 0	2 ± 0
Perimetrium	303 ± 119	175 ± 87	
	Background	2 ± 0	2 ± 0

^a Plutonium was administered intraperitoneally at 300kBq/kg body weight on day 4 of gestation. On each day 6, 8 or 10 of gestation two mice of each strain were sacrificed and their uterine were used for quantitative autoradiography. Values are mean PSL(photostimulated luminescence) ± SD and based on analysis by measuring PSL in 20 fields of each fetoplacental region of interest in several thin sections.

^b Inner cell mass is the embryonic region surrounded by trophoblast.

Table 6. Concentration of ²³⁹Pu in fetoplacental tissues on day 13 and 17 of gestation after the administration on day 4 of gestation^a

13 Day of gestation					
Dose ^b	Mouse strain	Injection route	Fetoplacental tissues		
			Placenta	Yolk sac	Foetus
300	BDF1	i.p.	0.263 ± 0.127	1.793 ± 0.025	0.012 ± 0.003
300	C3H	i.p.	0.304 ± 0.040	1.456 ± 0.391	0.010 ± 0.001
17 Day of gestation					
Dose ^b	Mouse strain	Injection route	Fetoplacental tissues		
			Placenta	Yolk sac	Foetal liver
30	BDF1	i.p.	0.707 ± 0.290	3.920 ± 0.482	0.137 ± 0.005
30	C3H	i.p.	1.020 ± 0.428	3.715 ± 1.385	0.110 ± 0.046
300	BDF1	i.v.	0.614 ± 0.236	3.225 ± 1.115	0.086 ± 0.039
300	C3H	i.v.	0.644 ± 0.234	2.212 ± 0.336	0.065 ± 0.031
300	BDF1	i.p.	0.588 ± 0.204	2.566 ± 0.741	0.068 ± 0.018
300	C3H	i.p.	0.629 ± 0.135	2.454 ± 0.596	0.061 ± 0.022
900	BDF1	i.p.	0.332 ± 0.101	1.155 ± 0.425	0.032 ± 0.014
900	C3H	i.p.	0.362 ± 0.069	1.395 ± 0.331	0.037 ± 0.006

^a Values are mean ± SD of the relative concentration of ²³⁹Pu, expressed as percentages of the injected dose per g wet weight of the tissue and are based on analysis of pooled foetal tissues from each dam. Values in parentheses are weight(mg) of the tissues and denote the mean ± SD.

^b Plutonium was administered on day 4 of gestation (kBq/kg body weight).

[考察]

BDF1系マウスにおいて、母体に投与されたプルトニウムによって胎児の造血器系に傷害が現れることは、Lordらによってすでに報告されている。また、ベルギーのVan Den Heuvelらは、妊娠14日目のBalb/c系マウスに²⁴¹Amを投与し、出生児の骨髓造血機能を種々の指標を用いて評価し、比較的未熟な造血幹細胞の機能を測定する長期骨髓培養(LTC)の値が479kBq/kg以上の²⁴¹Am投与により顕著に減少すること、その影響が出生後長期間に及ぶことを報告した。このように、胎児に移行するプルトニウムの量は極めて少ないにも関わらず、種々の指標から造血器の障害発生が示唆される原因は、現在のところ明らかではない。さらに興味深い知見は、本研究で明確に示されたように、このような影響がマウスの系統間で異なることである。すなわちBDF1系マウスでは造血器系の障害が検知されるのに、C3H系マウスでは認められない。このようなマウス系統差が生ずる原因として1) BDF1マウスとC3Hマウス間でプルトニウムの受胎産物への移行量、受胎産物中の分布が異なる 2) プルトニウムのα線に対する造血組織(造血幹細胞あるいは造血微小環境)の放射線感受性が異なることが考えられた。しかし、Table 5,6に示したように²³⁹Puの受胎産物への移行、分布、滞留にC3HとBDF1マウスの間で有意な差が存在しないことが明らかとなった。このことは、翻ってプルトニウムのα線照射に対する胚・胎児の造血組織(造血幹細胞あるいは造血微小環境)の感受性にマウス系統差が存在する可能性を示唆している。

3) X線照射後の胎児肝臓

赤血球造血能の経時的变化

上記2)の研究でも明らかになってきたように、胎児や妊娠母体の造血系細胞の放射線感受性は、成熟個体のそれとは異なる可能性が考えられる。造血能の障害は、小児白血病等の造血器疾患の原因となるだけでなく、間接的に種々の放射線による胎児影響の原因、または修飾因子となることが予測される。たとえばMoleらは、広島・長崎での胎内被ばくでの重度精神発達遅滞の発生に、母体および胎児での赤血球造血能の低下に伴う胎児脳組織への酸素供給量の不足が関連しているとの仮説を立てている。胎内被ばくによる精神発達遅滞は、第一義的には、発達中の胎児の脳組織が直接、電離を受けることによる。しかしMoleらの仮説については、UNSCEARでも検討すべき課題としている。そこで、胎内被ばくによる重度精神発達遅滞との関連も考慮にいれ、Fe-59を用いてマウス胎児の肝臓における赤血球造血能の放射性感受性の経時的变化を調べる研究を実施した(7、8)。

[材料および方法]

実験動物にはC57Bl妊娠マウスを用いた。この系統では通常妊娠19日目で出産する。赤血球造血能はFe-59-citrateまたはFe-59標識マウスプラズマを用いて、in vivoとin vitroでの胎児肝臓への取り込みから測定した。In vivoの取り込みでは、妊娠15日目に24から284cGyのX線を照射し、妊娠17日目にFe-59-citrateを母体に静脈内投与した。妊娠18日目に胎児肝臓を取り出し、heme分画とnonheme分画へ取り込まれるFe-59を測定した。In vitroの取り込みでは、妊娠9日目・11日目・13日目・15日目のいずれか一

度だけ189cGyのX線を照射した。胎児の肝臓が採取可能となる胎齢12日目以降に、1日ごとに肝臓を採取してHanks液で細胞浮遊溶液を作製した。この胎児肝臓細胞浮遊溶液にFe-59標識マウスプラズマを加え、37度でインキュベートした後、heme分画に取り込まれたFe-59を測定することにより、胎児肝臓の赤血球造血能を測定した。

[実験結果]

in vivoにおける胎児肝臓nonheme分画へのFe-59の取り込みは、Fig.2に示すように線量の増加に比例して明確な増加が認められた。一方、胎児肝臓のheme分画への取り込みも線量の増加に伴いわずかながら増加する傾向にあった。in vitroでは、Fig.3に示したように、非照射群の胎齢12日目では、添加されたFe-59の約5%がheme分画に取り込まれ、その後、取り込みは増加し、胎齢16日目でピークとなり添加したFe-59の45%程度がheme分画に取り込まれた。これ以降のとり込みは減少し、出産前日の胎齢18日目では添加したFe-59の10%がheme分画に取り込まれていた。一方、妊娠9日目でX線を189cGy照射された群では、照射により胎齢12日目から16日目までの取り込みが有意に減少し、赤血球造血能の低下が生じていた。妊娠11日目でX線を照射された群では、照射2日後と3日後の胎齢12日と13日でheme分画への取り込みが非照射群に比べて有意に減少していた。胎齢16日目では逆に照射群の取り込みが非照射群の取り込みを有意に上回った。これらの結果、照射群での取り込みのピークは対照群より1日遅い胎齢16日となった。妊娠13日目に照射された群では、照射1日後・2日後で取り込みが有意に減少し、取り込みのピーク時期が胎齢17日と後ろにずれた。妊娠15日目に照射された群では、照射1日後・2日後・3日後で取り込みが有意に減少し、照射群が非照射群を上回ることはなかった。

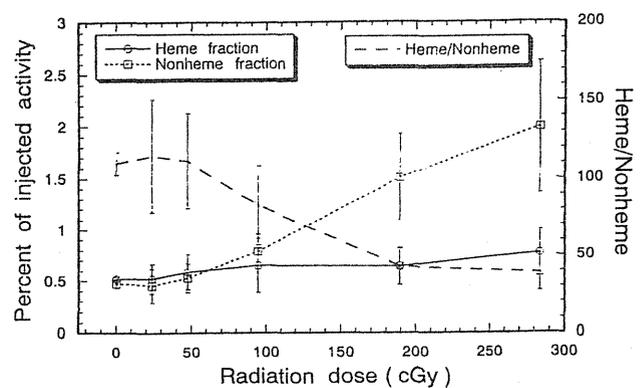


Fig.2. Effect of X-ray irradiation of 24 to 284cGy on in vivo Fe-59 uptake into heme and nonheme fractions of fetal liver.

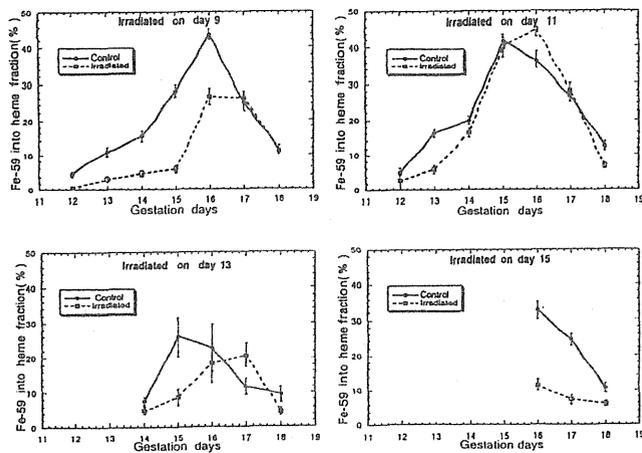


Fig.3. Serial changes in in vitro Fe-59 uptake into the heme fraction of fetal liver in C57BL/6J mice after irradiation on day 9,11,13 or 15 of pregnancy.

[考察]

in vivoの実験で、heme分画へのFe-59の取り込みがわずかながらも増加したことから、照射により胎児肝臓の赤血球造血能が亢進したかのようにも考えられる。しかし胎児肝臓のheme分画とnonheme分画に取り込まれたFe-59の比をとってみると、図2のように94.5cGy以上の線量で有意に減少している。胎児の赤血球造血能が亢進しているならばこの比は増加するはずである。そこでin vivo実験での胎児肝臓heme分画への取り込み増加は、照射による母体赤血球造血能の低下の結果、母体で利用されなくなったFe-59が増え、胎児にまわってきたもので、胎児肝臓の赤血球造血能の亢進によるものではないと考えられた。これらの結果から、胎児肝臓のheme分画へのFe-59のin vivoでの取り込み量は、胎児肝臓の赤血球造血能の指標とはなりえないと判断された。in vitro実験からは以下の結果が得られた。1) いずれの時期に照射をされても、照射後1-3日間は胎児肝臓の赤血球造血能が低下した。2) 特に妊娠9日目で照射された群では、照射後6日間にわたり非照射群の20-30%程度に減少し、一番強い影響が認められた。3) 妊娠9日目・11日目・13日目に照射され群では、照射により胎児肝臓の赤血球造血能の発達が遅れる可能性が示唆された。以上の結果から、189cGyと言うような高線量では、胎児肝臓の赤血球造血能の低下により、必要な時期に必要な量の酸素が胎児の脳に供給されない可能性が示唆された。広島・長崎で認められた胎内被ばくによる精神発達遅滞のしきい値は0.15G程度である。この程度の低い線量では母体および胎児の赤血球造血能が低下することは考えられない。胎内被ばくによる精神発達遅滞の第一義的原因は発達中の神経細胞への電離作用によるものである。しかし1Gy以上の高線量の場合に生ずる重度の精神発達遅滞では、Moleらの言うように、脳組織への酸素供給不足が放射線の電離作用による傷害を増強している可能が示唆された。

[研究発表]

- 1.Sato, I., Matsusaka, N., Kobayashi, H., Tsuda, S., and Nishimura, Y.: Distribution of Mn-54 and Zn-65 in mouse fetuses, *Radioisotopes*, 45: 774-449, 1996.
2. Matsusaka, N., Yamakawa, Y., Sato, I., Tsuda, S., Kobayashi, H., and Nishimura, Y.: Organ distribution of ¹³⁷Cs in mouse fetuses and their dams. *Radioisotopes*, 46: 214-218, 1997.
- 3.Takeda, H., Nishimura, Y., and Inaba, J.: Transfer of tritium to prenatal and neonatal rats from their mothers exposed to tritiated compounds. *Radiation Protection Dosimetry*, 53: 281-284, 1994.
4. Takahashi, S., Kubota, Y., Koshimoto, C., Sato, H., and Hatashita, S.: Distribution of carbon-14 and associated radiation dose in rat fetal brain and liver after maternal injection of ¹⁴C-thymidine. *Radiat. Res.*, 140: 10-16, 1994.
5. Kubota, Y., Takahashi, S., Sato, H.:Effect of maternal injection of ²³⁹Pu on the number of CFU-S in the foetal liver of C3H and BDF1 mouse. *Int. J. Radiat. Biol.*, 72:71-78, 1997.
- 6.Kubota, Y., Sato, H., Koshimoto, C. and Takahashi, S.: Transfer of ²³⁹Pu to mouse fetoplacental tissues. *J. Radiat. Res.*, 34: 157-163 1993.
7. Joshima, H. and Tamanoi, I.: Fetal liver erythropoiesis following in utero irradiation. 10th International Congress of Radiation Research, Wurzburg, Germany, 1995.
8. Joshima, H.:Decrease of erythropoiesis in the fetal liver of X-ray irradiated pregnant mice. *J. Radiat. Res.* 177-184, 1996.

II. 放射線ならびに放射性物質の胎児影響に関する研究

2. 発生過程における中枢神経系等の組織構築と その放射線損傷に関する研究

広部知久、石川裕二、田口泰子 (生物影響研究部)、伏木信次 (京都府立医大・老化研)

Effects of Radiations on the Histogenesis of Central Nervous Systems in Development

Tomohisa Hirobe, Yuji Ishikawa, Yasuko Taguchi (Division of Biology and Oncology), and
Shinji Fusiki (Department of Dynamic Pathology, Research Institute for
Neurological Diseases and Geriatrics, Kyoto Prefectural University of Medicine)

We investigated the effects of continuous exposure to gamma-rays during corticogenesis on the migration of neuronal cells in developing cerebral cortex. Pregnant mice were injected with 0.5 mg of bromodeoxyuridine (BrdU) on day 14 of gestation to label cells in the S phase. The mice were then exposed to ^{137}Cs gamma-rays (dose rates of 0.1, 0.3, and 0.94 Gy/day) continuously for 3 days. Brains from 17-day-old embryos and offspring at 3 and 8 weeks after birth were processed immunohistochemically to track the movements of BrdU-labeled cells. Comparative analyses of the distribution pattern of BrdU-labeled cells in the cerebral cortex revealed that (1) the migration of neurons was delayed during the embryonic period in mice irradiated at 0.94 Gy/day, (2) in 3-week-old mice, there was a significant difference in the distribution pattern of BrdU-labeled cells in the cerebral cortex between the mice irradiated prenatally and control, and (3) in 8-week-old mice, there were no differences in the distribution pattern of BrdU-labeled cells between control and animals irradiated with 0.1 and 0.3 Gy/day. In contrast, in the animals irradiated with 0.94 Gy/day, the significant difference in the distribution pattern of the labeled cells relative to control was maintained. These results suggest that the migration of

neuronal cells in mouse cerebral cortex is disturbed by continuous prenatal irradiation at low-dose and some modificational process occurred during the postnatal period.

On the other hand, in the mouse cerebellum, four days after irradiation with 0.5 or 1 Gy, BrdU-labeled cells were mainly seen in the inner granular layer, which was also the case in non-irradiated mice. However, following 2 Gy irradiation BrdU was found not only in the inner granular layer, but also in the Purkinje cell layer. This distribution was also seen at 2 and 4-6 weeks after irradiation. In animals irradiated with 1 Gy 4-6 weeks after irradiation, the proportion of labeled cells present in the inner granular layer decreased, while labeled cells in the Purkinje cell layer increased. On the other hand, 0.5 Gy irradiation did not change the distribution of labeled cells, except that the proportion of labeled cells in the inner granular layer decreased at 2 weeks after irradiation. The number of labeled cells in the cerebellar cortex per unit area decreased with time and dose. These results suggest that 2 Gy irradiation induces a migratory delay, abnormal distribution, and cell death of the granular neurons of mouse cerebellum.

緒言

胎児への放射線被曝影響は主に致死、奇形の発生を指標にしてそのリスクが評価されているが、そのほとんどが高線量・高線量率の照射の影響にもとづいている。本研究では、低線量放射線による精神発達障害の発生機構の解明を目指し、中枢神経系の発生分化、特にその組織構築等の基礎研究とそれに対する放射線影響を調べた。

実験方法

マウス大脳皮質および小脳形成期にDNA合成期にある細胞をBrdUで標識してその細胞周期の中で産み出された神経細胞の移動を追跡する方法を用いて神経細胞の移動に対する低線量放射線の影響を調べた。また、神経細胞の分化の特徴のひとつとしてのシナプス形成にも焦点をあてて調べた。シナプス形成に対する低線量放射線の影響を解析するため、胎生13日のBC3F1系統のマウスの胎児にX線

を0.1, 0.25, 0.5, 1 Gy急照射した。生後1日に4%パラホルムアルデヒドで脳を固定し、パラフィン切片を作製した。シナプス形成に重要なタンパク質や酵素の抗体を用いて酵素抗体間接法をおこなった。ジアミノベンチジン発色により黄褐色に染色された軸索や神経突起をもつ神経細胞の分布を大脳皮質で観察した。

また、メダカを用いて中枢神経の形成過程を解析しモデル動物としての重要性を検討した。

結果

マウス (BC3F1) の胎生14日目にX線を照射し、胎生17日目、生後2週目、3週目および8週目に脳を固定しBrdUでラベルされた細胞の分布を抗BrdU抗体を用いた酵素抗体間接法のより調べた (Fig.1)。大脳皮質の発生過程において、神経細胞は、胎生14日目から19日目頃にかけて脳室帯から中間帯、皮質原基内側部分、皮質原基外側部分さらに辺縁層へと移動する。胎生17日目 (照射後3日目) に固定して調べたものでは0.5Gyおよび1Gy照射群で、脳室帯や中間帯に分布する細胞が多く、皮質原基外側部分に分布する細胞が少なかった (Fig.1A)。このことは0.5Gyないし1GyのX線照射で神経細胞の移動が抑制されたことを示唆している。生後2、3および8週目においても有意に細胞の分布が変化していた (Fig.1B-D)。この効果は0.1から1Gyすべての照射群でも認められた。従って、低線量X線は神経細胞の分布の乱れも引き起こすことが示唆される。

妊娠16日令のマウス胎児にX線を照射した場合は、14令に比べて顕著な効果がみられなかった。また、0.94Gy/day、0.3Gy/dayおよび0.1Gy/dayの線量率で胎令14日目から17日目まで3日間ガンマ線の連続照射すると、0.94Gy/day (総線量:2.8Gy) 照射群では神経細胞の移動の抑制と分布の乱れが見られたが、0.3Gy/day (総線量:0.9Gy) と0.1Gy/day (総線量:0.3Gy) 照射群では神経細胞の分布の乱れのみ見ら

れた。

次に、マウス (BC3F1) の6日目にX線を照射し、4日目、2週間および4~6週間後に小脳を固定してBrdUでラベルされた細胞の分布を調べた (Fig.2)。小脳の顆粒神経細胞は、生後6日目から10日目頃にかけて、外顆粒層、分子層、プルキンエ細胞層、内顆粒層外側部分さらに内顆粒層内側部分へと移動する。生後10日目 (照射後4日目) に固定した場合には、2Gy照射群でプルキンエ細胞層や内顆粒層外側部分に分布する細胞が多く、内顆粒層内側部分への分布は有意に少なかった (Fig.2A)。この結果は、X線によって小脳顆粒神経細胞の移動が抑制されたことを示唆している。2Gy照射群では細胞の分布の傾向が照射後2および4~6週間でも変わらなかった (Fig.2B,C)。また、0.5Gyおよび1Gy照射群においても有意に細胞の分布が変化した。従って、低線量X線は小脳顆粒神経細胞の分布の乱れを引き起こすことが示唆される。

また、シナプス形成に重要なタンパク質や酵素については、シナプシン、シナプトフィシン、神経性酸化窒素合成酵素、誘導性酸化窒素合成酵素などを調べた結果、いずれの場合もX線照射個体において反応陽性細胞が線量に応じて減少した。

一方、モデル動物としてのメダカの中枢神経の形成過程を観察した結果、メダカの脳の形態は、調べた近交系5種類すべてにおいて異なっていた。HO4C系統のメダカに10GyのX線を照射したところ、稚魚に行動異常が見られ、視蓋が小さくなっていった。また、この系統の1細胞期の胚にX線を照射すると大脳の奇形がみられ、後期胚に照射した場合には、視蓋の発生が影響を受けた。

考察

妊娠14日及び16日令マウス胎児の大脳の神経細胞をBrdUで標識し、0.1-1GyのX線を照射すると、その細胞の発生過程での移動の遅れがみられた。また、形成された大

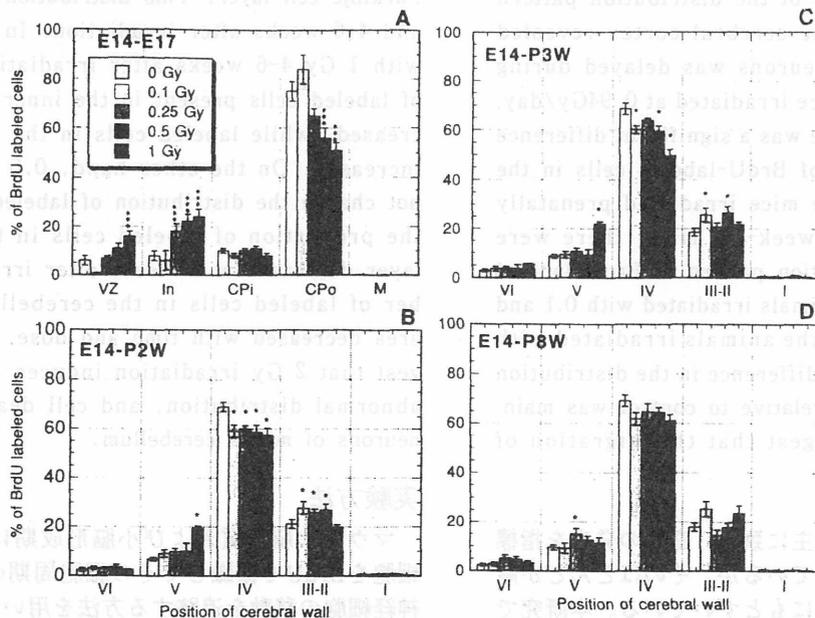


Fig. 1. The relative positions of BrdU-labeled cells in the mouse neocortex on 3 days (A), 2 weeks (B), 3 weeks (C), and 8 weeks (D) after X-irradiation. Error bars show the standard errors of the mean. VZ: ventricular zone, In: intermediate zone, CPi: inner cortical plate, CPo: outer cortical plate, M: marginal zone.***P<0.001, **P<0.01, *P<0.05 vs 0 Gy.

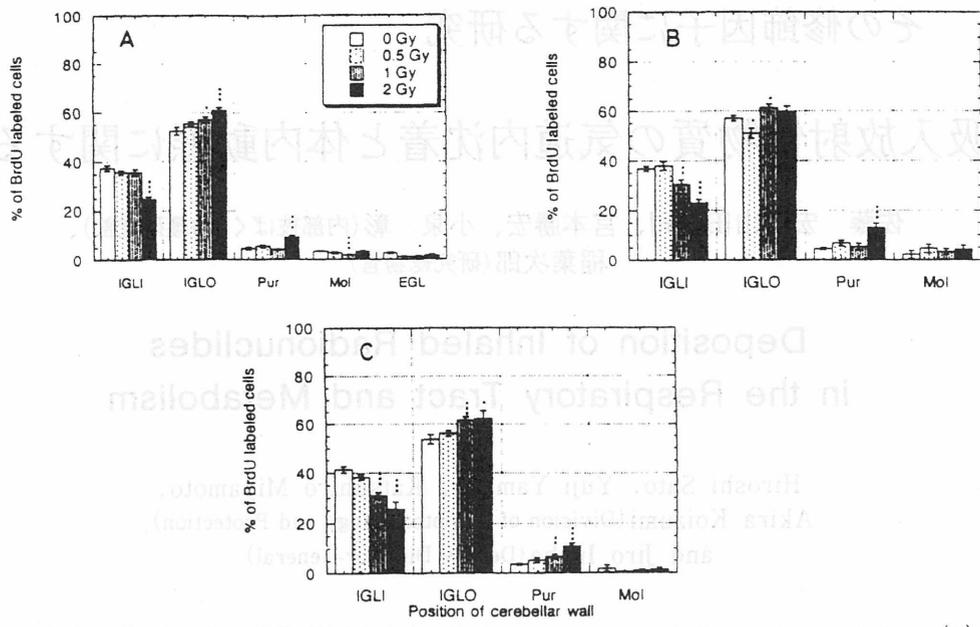


Fig. 2. The relative distribution of BrdU-labeled cells in the mouse cerebellar cortex on 4 days (A), 2 weeks (B), and 4-6 weeks (C) after X-irradiation. Animals were irradiated either 0.5, 1, or 2 Gy. IGLI: inner half of inner granular layer, IGLO: outer half of inner granular layer, Pur, Purkinje cell layer, Mol, molecular cell layer, EGL, external granular layer. *, **, and ***: Results significantly different from control by t-test at 95, 98, and 99% confidence limits, respectively.

脳皮質における分布の乱れが観察された。妊娠14日令胎児の照射が16日令胎児照射より影響が大きかった。0.1Gy/dayおよび0.3Gy/dayの線量率で胎令14日から17日までの3日間ガンマ線の連続照射をしても、大脳皮質形成期の神経細胞の移動にはほとんど影響がみられなかった。一方、小脳顆粒細胞層の形成期(生後6日)にX線(0.5-2Gy)を照射すると外顆粒層の細胞死が著しく、生後2週までに細胞数が減少した。また、シナプス形成に重要なタンパク質や酵素の抗体を用いて酵素抗体間接法をおこなった結果、ジアミノベンチジン発色により黄褐色に染色された軸索や神経突起をもつ大脳皮質神経細胞の分布に関しては、シナプシン、シナプトフィシン、神経性酸化窒素合成酵素(nNOS)、誘導性酸化窒素合成酵素(iNOS)のすべてにおいて放射線は線量に応じて反応陽性細胞を減少させた。これらの結果から、低線量X線は、神経細胞のシナプス形成も抑制すると考えられる。

一方、魚類のメダカの脳の形態は5種類の近交系で異なることがわかった。また、近交系メダカHO4CにX線(10Gy)を急照射すると、ふ化した稚魚に異常遊泳個体が増加し、その視蓋は非照射のものより小さいことがわかった。メダカの脳・神経系の正常発生も記載し、1細胞期を含む発生各時期の胚に対するX線照射の影響についても調べた。1細胞期照射では脳奇形が生じること、および後期胚照射では増殖域の細胞死のために視蓋が十分成長せず、稚魚は孵化後に行動(遊泳)異常を示すことを新たに見出した。

結論

胎児への放射線被曝影響は主に致死、奇形の発生を指標にしてそのリスクが評価されているが、そのほとんどが高線量・高線量率の照射の影響にもとづいている。低線量放射線による精神発達障害の発生機構、中枢神経系の発生分

化、特にその組織構築等に対する放射線影響は重要な課題である。マウスの大脳や小脳の神経細胞が低線量のX線によって移動や細胞死がもたらされることがわかったことは意義深い。実験動物の脳の発生に対する放射線の影響に関するデータがヒトの脳の放射線による発生異常に外挿できるかを検討することが将来は必要である。

研究発表

- (1) 田口、伏木、木下、石川、広部：日本放射線影響学会 第36回大会、広島、1993.10.
- (2) 田口、伏木、木下、石川、広部：日本放射線影響学会 第37回大会、福岡、1994.10.
- (3) 田口、伏木、木下、石川、広部：日本放射線影響学会 第38回大会、千葉、1995.10.
- (4) 田口、伏木、木下、石川、広部：日本放射線影響学会 第39回大会、大阪、1996.11.
- (5) Ishikawa, Y.: Neurosci. Res., 24, 313-317, 1996.
- (6) Ishikawa, Y. and Hyodo-Taguchi, Y.: Mutation Res., 389, 149-155, 1997.
- (7) 田口、伏木、木下、石川、広部：日本放射線影響学会 第40回大会、京都、1997.11.
- (8) Fushiki, S., Hyodo-Taguchi, Y., Kinoshita, C., Ishikawa, Y. and Hirobe, T.: Acta Neuropathol. 93, 443-449, 1977.
- (9) Hyodo-Taguchi, Y., Fushiki, S., Kinoshita, C., Ishikawa, Y. and T Hirobe, T.: J. Rad. Res., 38, 87-94, 1997.
- (10) Hyodo-Taguchi, Y., Fushiki, S., Kinoshita, C., Ishikawa, Y. and Hirobe, T.: J. Rad. Res., 39, 11-19, 1998.

Ⅲ. アルファ放射体による内部被ばくの生物学的影響と その修飾因子に関する研究

1. 吸入放射性物質の気道内沈着と体内動態に関する研究

佐藤 宏、山田裕司、宮本勝宏、小泉 彰(内部被ばく・防護研究部)、
稲葉次郎(研究総務官)

Deposition of Inhaled Radionuclides in the Respiratory Tract and Metabolism

Hiroshi Sato, Yuji Yamada, Katsuhiko Miyamoto,
Akira Koizumi (Division of Radiotoxicology and Protection),
and Jiro Inaba (Deputy Director-General)

A. Modeling of larynx and tracheo-bronchial regions for aerosol deposition study

New cast models of larynx and tracheo-bronchial (TB) regions were developed for aerosol deposition study. Stereo-lithography method was applied to the modeling. Geometrical shape and dimensions of the larynx were originally determined based on a human anatomical data. Those of the TB region were given by Weibel's bifurcation model data. Total depositions in the cast were measured for monodisperse aerosols ranging from 0.01 to 0.3 μm in diameter. Deposition efficiency increased with decreasing particle size and flow rate.

B. Effects of firing temperature on the metabolism of plutonium inhaled into the rats

Wistar rats were inhaled PuO_2 produced by firing Pu hydroxide at 1150 and 400°C and the difference in lung

retention, excretion and translocation of Pu between the both firing temperature were studied. The clearance of Pu from lung was relatively faster in rats exposed to PuO_2 fired at 400°C (low temperature group) than in the rats exposed to PuO_2 fired at 1150°C (high temperature group). The fecal excretion of Pu was larger in the low temperature group than high temperature group and the ratio of fecal excretion to urinary excretion was higher for low temperature group than high temperature group. The amounts of Pu, although, translocated from lung the organs, even liver, were very small, the re-distribution of Pu to liver was higher in the low temperature group. This study suggests that the lung retention of Pu is slightly affected by the firing temperature of PuO_2 in rats.

A. 呼吸気道模擬モデル

1. 緒言

国際放射線防護委員会ICRPにおいて検討されていた呼吸気道モデルがPub.66(1994)として発表された。本モデルはPub.30(1979)に替わるもので、その中でエアロゾル粒子沈着モデルも大幅に手直しされるなど、呼吸気道内における沈着問題は今、大きな関心を集めている。しかしながら、呼吸気道における沈着現象を実験的に調べ、これを理論的に解析・解明することは容易ではなく未だ十分な知見が得られているとは言えない状況にある。

沈着実験研究には、ヒトからデータを直接得る方法から動物実験、あるいは全くの工学的実験までいろいろなアプローチがあるが、何れも1つでは十分ではなく、それぞれに限界がありお互いに補完しあっていく必要がある。これらの中で著者らはこれまで工学的手法で生体に如何に近づけるかということで、呼吸気道の鑄型というキャストモデルを用いた実験的アプローチをしてきた。しかし、今

回は沈着機構の解明に焦点を絞るため、「生体に近いモデル」を目指すのではなく「解析し易いモデル」による沈着実験を追い求めた。ここでは、この目的のため呼吸気道模擬キャスト作成法の新提案とこれを用いて得られたエアロゾル沈着データを示す。

2. 実験方法

呼吸気道内エアロゾル沈着機構解明にとって「解析し易いモデル」ということで、形態学的に幾何モデル化し易い部位、つまり、喉頭部及び気管-気管支部をまず選んだ。気管-気管支部についてはWeibelの対称2分岐モデルを基本に分岐構造を持った直円管で表現した。喉頭部については解剖学的所見を参考に直円管・放物球・楕円球などを組み合わせて出来るだけ単純に表現した。こうしてできた幾何表現モデルの具現には3次元光造形法を利用した。呼吸気道模擬キャストの作成にはFig.1に示したような方法に

で行った。まず、Weibelの対称2分岐モデルの数値データを3次元CADデータに展開した。これを基にレーザービームで光硬化樹脂に照射し、0.178mmの厚みで100層にも積層して気管-気管支部模擬キャストを作成した。分岐次数が8分岐の気管-気管支部模擬キャストをFig.2に示した。エアロゾル沈着実験は、胸郭を模擬したチャンバ内にキャストを吊して行った。実験には蒸発-凝縮法により発生させたNaClエアロゾルを静電分級器で単分散化したエアロゾルを用い、0.01~0.3 μm 径範囲でキャスト内粒子径別沈着率を凝集核測定器CNCで調べた。なお、沈着実験に先立ちキャスト表面には静電気防止剤を塗布し、静電気による沈着影響を防止した。

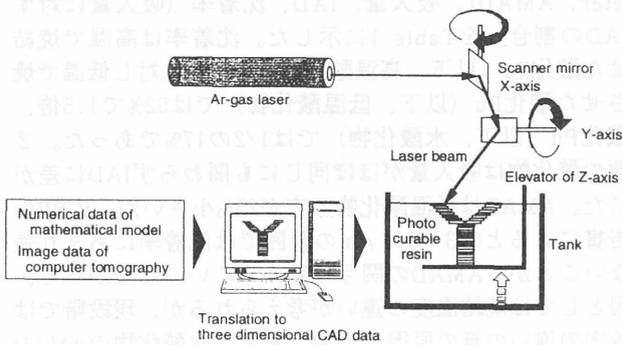


Fig.1 Casting method for the respiratory tract model by stereo-lithography.

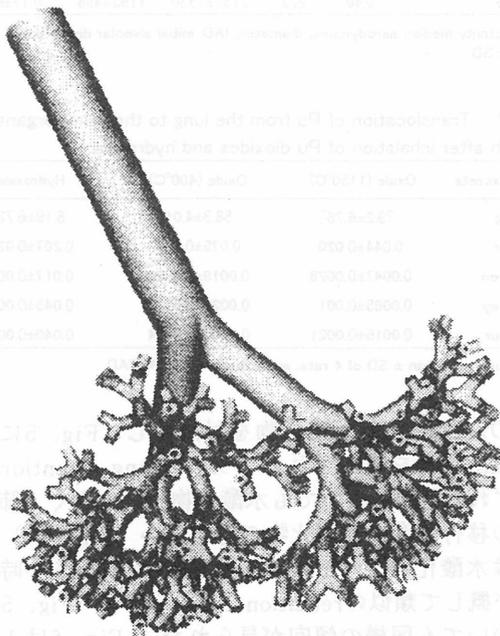


Fig.2 Tracheobronchial cast model of photo-curable resin.

3. 実験結果及び考察

7分岐モデルを用いたエアロゾル沈着実験の結果をFig.3に示した。空気の流れは気管から気管支末端へという吸気の方で、流量は1.5、4、10l/mの定速流である。粒子径が0.01~0.3 μm で1%以下であった沈着率は粒子径が小さくなるにつれて上昇し、0.01 μm では10%以上になった。特に流量が少ない1.5l/mにおいては40%に達した。このように分岐次数が比較的浅い7分岐までの気管支部においても、粒子径が小さく、流量が少ない場合はかなりの高率で粒子沈着が生じることがわかった。図中に示した理論曲線は単純な直円管の連結体を仮定し、拡散沈着のみを考慮した場合の沈着予測である。予測値は実験値に近いところもあるが、これだけで沈着を説明することは困難である。次に気道分岐次数の違いによる沈着率の差異を調べた。Fig.4には7分岐モデルと4分岐モデルの沈着率を示した。分岐次数が少ない場合には、当然の結果ながら沈着率は低く観察された。両モデルにおける沈着率の差がちょうど5、6、7分岐目までにおいて沈着した成分となる。今回用いたような実験系では0分岐からn分岐までの気道全域における全沈着率しか測定できないが、分岐次数が異なるモデルを組み合わせることで各分岐次数毎の沈着率を評価できる。

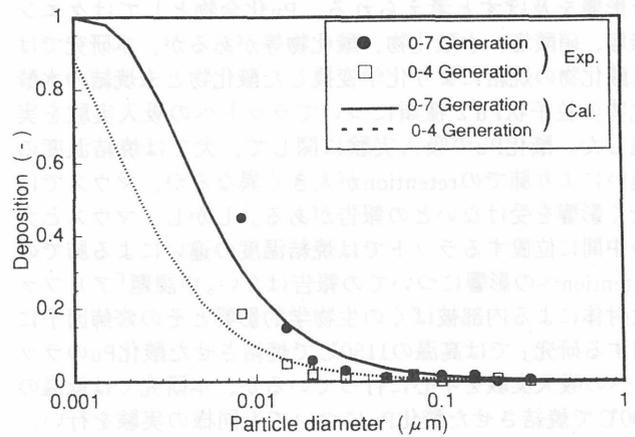


Fig.3 Aerosol deposition efficiencies within the tracheobronchial cast with 0-7 generations.

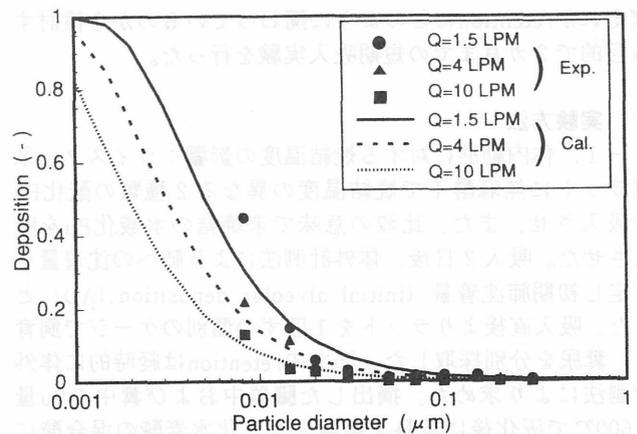


Fig.4 Comparison of aerosol deposition efficiencies at an air flow rate of 1.5 liter/min for casts with 0-7 and 0-4 generations.

4. 結論

従来の気道モデルは樹脂を体内に注入するなどして鋳型を作成。これを沈着実験に使用していたが、形状が複雑な肺深部に対しては鋳型法は適用できないという背景があった。しかし今回、3次元光造形法による気道モデルを世界で初めて実用化し、これを沈着実験に適用できることを実証した。また、超微小サイズ（ナノメートル）エアロゾルの高強度沈着現象を鼻咽頭部に続いて気管-気管支部でも観察できた。ICRPの肺沈着の旧モデル（Publ.30モデル、1979）と新モデル（Publ.66モデル、1994）との大きな違いの1つが鼻咽頭部における超微小サイズエアロゾルの高強度沈着を認めたことである。これはラドンのように超微小サイズエアロゾル（ラドン分野では通例、フリー成分あるいは非付着成分と呼ばれる）が存在する場合の吸入被曝線量の算定に大きな差異をもたらすことを意味する。

B. ラットに吸入されたPuの

体内動態に及ぼす焼結温度の影響

1. 緒言

吸入されたPuの体内動態に影響を与える因子としてはPuの化学形、粒子状Puの粒子径、酸化Pu生成時の焼結温度、初期沈着量などが考えられる。特にPuの化学形はその溶解性に大きく関わってくるため、肺に沈着後の代謝に大きな影響を及ぼすと考えられる。Pu化合物としてはクエン酸塩、硝酸塩、水酸化物、酸化物等があるが、本研究では水酸化物の焼結により化学変換した酸化物と未焼結の水酸化物の粒子状Pu 2種類についてラットへの吸入実験を実施した。酸化Puの吸入実験に関して、犬では焼結温度の違いにより肺でのretentionが大きく異なるが、マウスでは全く影響を受けないとの報告がある。しかし、マウスと犬の中間に位置するラットでは焼結温度の違いによる肺でのretentionへの影響についての報告はない。中課題「アルファ放射体による内部被ばくの生物学的影響とその修飾因子に関する研究」では高温の1150℃で焼結させた酸化Puのラットへの吸入実験を中心に行っているが、本研究では低温の400℃で焼結させた酸化Puについても同様の実験を行い、2種類の温度で焼結させた酸化Puの肺でのretention、肺から全身への移行、糞尿への排泄が焼結温度により異なるのか否かを検討した。また、吸入後に沈着した肺において、肺の細胞内の微細分布に違いがあるのか、違いがあるならばそれがretentionにどのように関わっているのかを検討する目的で2カ月までの短期吸入実験を行った。

2. 実験方法

2-1. 体内動態に対する焼結温度の影響：ウイスター系雌ラットに無麻酔下で焼結温度の異なる2種類の酸化Puを吸入させ、また、比較の意味で未焼結の水酸化物Puを吸入させた。吸入2日後、体外計測法により肺への沈着量を算定し初期肺沈着量（initial alveolar deposition, IAD）とした。吸入直後よりラットを1匹ずつ個別のケージで飼育し、糞尿を分別採取した。肺でのretentionは経時的に体外計測法により求めた。摘出した臓器中および糞中のPu量は600℃で灰化後に試料を硝酸とフッ化水素酸の混合酸に溶解し、液体シンチレーションカウンター（液シン）で計測することにより求めた。尿中のPu量は直接、液シンで測定して求めた。

2-2. 細胞内分布に対する焼結温度の影響：2-1と同様にPuを吸入させたラットより肺を摘出、4匹分をまとめて0.25Mシヨ糖液中ワーリング・ブレンダーにてホモジナイズし、通常の細胞分画法により以下の画分に分けた。750gで10min遠心分離後の沈渣を核画分、3,000g、12minおよび30,000g、25minの沈渣をそれぞれミトコンドリア、リソゾーム画分とした。30,000g上清を更に105,000gで60min遠心分離して得られた沈渣をミクロゾーム、上清を可溶画分とした。各画分を精製後、0.25Mシヨ糖液に懸濁し、液シンで放射活性を測定してPu量を求めた。

3. 実験結果及び考察

3-1. 体内動態に対する焼結温度の影響：ラットに吸入されたPuの粒子径（activity median aerodynamic diameter, AMAD）、吸入量、IAD、沈着率（吸入量に対するIADの割合）をTable 1に示した。沈着率は高温で焼結させた酸化Pu（以下、高温酸化物）の35%に対し低温で焼結させた酸化Pu（以下、低温酸化物）では52%で1.5倍、水酸化物Pu（以下、水酸化物）では1/2の17%であった。2種類の酸化物は吸入量がほぼ同じにも関わらずIADに差が生じた。AMADは低温酸化物の方が25%小さいが、ICRPの報告書によると0.3~0.4 μmの範囲では沈着率にあまり差がないことからAMADの関与は考えにくい。したがって、原因としては焼結温度の違いが考えられるが、現段階では沈着率の違いの真の原因は不明である。水酸化物のAMADは高温酸化物とほぼ同じであるがIADは1/2であり、これは化学形の違いに起因したものであろう。2種類の酸化物

Table 1. Initial alveolar deposition of plutonium dioxide and hydroxide

Chemical form	Firing temp.(°C)	AMAD (μm)	σ _g	Inhaled	IAD	IAD/Inhaled
dioxide	1150	0.38	1.7	4102±581*	1398±88	0.35±0.043
dioxide	400	0.29	2.1	3873±660	2005±498	0.52±0.070
hydroxide		0.40	2.2	7131±1330	1193±498	0.17±0.051

AMAD: activity median aerodynamic diameter, IAD: initial alveolar deposition.
*: mean ± SD.

Table 2. Translocation of Pu from the lung to the other organs 1 month after inhalation of Pu dioxides and hydroxide

Organ/Excreta	Oxide (1150°C)	Oxide (400°C)	Hydroxide
Lung	79.2±6.78*	58.3±4.01	6.10±6.72
Liver	0.044±0.020	0.075±0.037	0.207±0.025
Spleen	0.0047±0.0028	0.0019±0.0090	0.017±0.0024
Kidney	0.0065±0.001	0.0028±0.0010	0.045±0.0057
Femur	0.0015±0.0021	0.0004±0.0004	0.040±0.0025

*The values are mean ± SD of 4 rats, and expressed as % IAD.

の肺でのretentionを水酸化物を対照としてFig. 5に示した。高温酸化物を吸入されたラットのlung retentionは吸入後いずれの時期においても水酸化物より大きく、肺から全身への移行速度は水酸化物の方が速い（Fig. 5A）低温酸化物は水酸化物よりlung retentionがやや小さい時期もあったが概して類似のretention curveを描く（Fig. 5B）。排泄についても同様の傾向が見られた。Fig. 6は1日当たりの排泄率の経時変化をに示したものであるが、糞および尿中への排泄率は水酸化物の方が高温酸化物より高く、特に尿中への排泄率が水酸化物では0.1-0.3%で酸化物の0.05-0.1%に対し数倍高い値を示した（Fig. 6A）。一方、

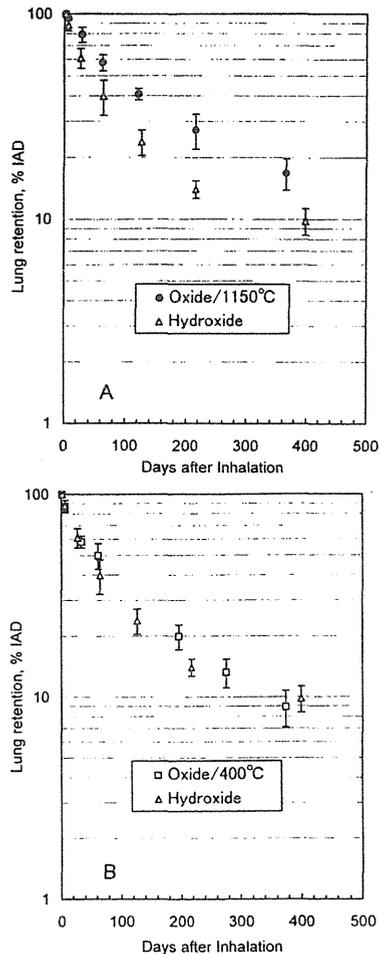


Fig.5 Ling retention of Pu following inhalation of PuO₂ fired at 1150°C(A) and 400°C(B)

低温酸化物では糞中への排泄率が水酸化物よりやや低い傾向が見られたが尿中への排泄はほとんど同じ様に推移し、非常によく似た排泄パターンを示した (Fig. 6B)。肺から全身へ移行したPuの吸入1カ月後の臓器分布をTable 2に示した。各臓器中のPu存在量はいずれも1%未満で少なかったが、酸化物と水酸化物で分布率に違いが見られた。すなわち、2種類の酸化物の臓器分布はほぼ同レベルであったが、水酸化物では数倍高い割合で存在していた。特に骨への分布率の違いが大きく、1桁以上の差が見られた。以上のように、焼結温度の異なる2種類の酸化物をラットに吸入させた場合lung retentionに差が生じるが、その差はイヌの場合ほどは大きくない。しかし、マウスの場合のように全く差がないという結果でもない。一般に小さい動物ほど物質の代謝速度が速いと考えられるが、マウス、ラット、イヌ3種類の動物のデータの違いは代謝速度の違い、すなわち動物種差によるものと考えられる。

また、酸化Puと水酸化Puを吸入させたラットについて、IADが異なる吸入群において吸入沈着後のPuの臓器分布がどのように異なるか、IADと臓器分布との関連性を検討した。比較したのは、低温酸化物でIADが500Bq (低IAD群)と2000Bq (高IAD群)、水酸化物で200Bq (低IAD群)と1000Bq (高IAD群)である。対象臓器は肝、脾、腎、大腿骨。Fig. 7は低温酸化物の吸入1カ月後における対象臓器の分布率を個体毎に示したものである。いずれの臓器においても高IAD群の方が臓器への分布率は小さい。特に腎、大腿骨で差が大きく、大腿骨では約40倍の差がある。Fig. 8は水酸化物の吸入1カ月後の結果を示したものであるが、肝、

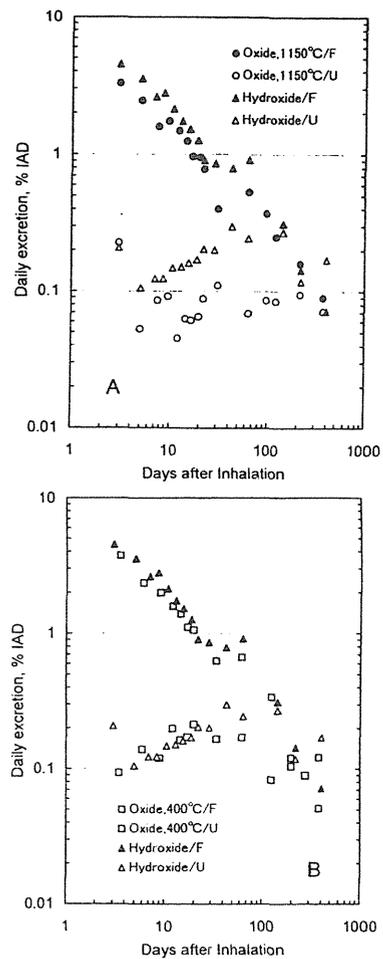


Fig.6 Daily fecal and urinary excretion of Pu following inhalation of PuO₂ fired at 1150°C(A) and 400°C(B)

大腿骨でやや違いが見られる程度で全体としてはあまり差は見られない。酸化物ではIADが1桁ないし2桁違う場合に臓器分布が異なると報告されている。確かに低温酸化物ではIADが数倍違っても臓器分布に差が見られたが、水酸化物では酸化物の場合のような違いが見られなかったことから化学形の違いによることは容易に推測できる。しかしそのメカニズムは不明である。酸化物でのIADによる臓器分布の違いはlung retentionの違いによると思われる。肺では酸化物の溶解がある速度で少しずつ進むとすると高IAD群では単位時間当たり可溶化される割合が低IAD群に比べて小さくなる。このようなことがIADの違いによって臓器分布が異なる原因になっているのではないと思われる。

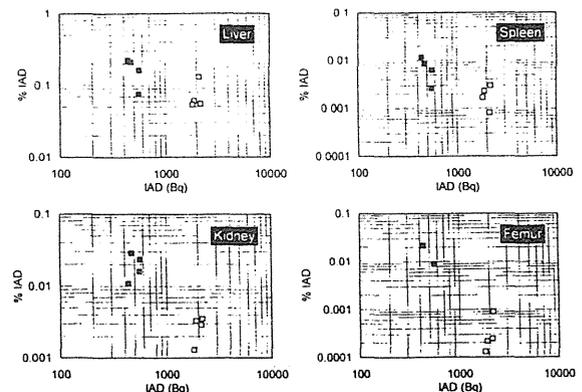


Fig.7 Effect of IAD on the tissue distribution of Pu following inhalation of PuO₂ fired at 400°C

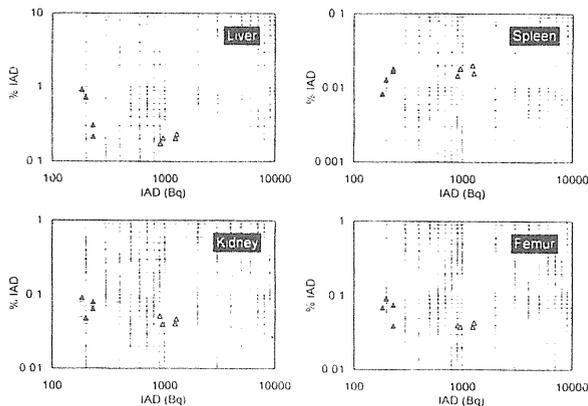


Fig.8 Effect of IAD on the tissue distribution of Pu following inhalation of Pu hydroxide.

3-2. 細胞内分布に対する焼結温度の影響：Fig. 9に示したように、高温酸化物では1週間後、約60%がミトコンドリアに存在し、残りはリソゾームと核に存在していた。ミトコンドリア画分のPu量は徐々に増加し、9週間後には80%がミトコンドリアに存在していた。リソゾーム中のPu量は投与後の時間により多少の変動はあるが、実験期間中を通してほぼ20%であった。核画分のPuはリソゾームと1週目に約20%であったが、2週目に数%に減少した後は実験期間中を通してほぼ同じレベルであった。水酸化物の場合は1週目に80%がミトコンドリアに存在し、2週目に60%に減少した後は大きな変動は見られなかった。リソゾーム中のPu量は高温酸化物の場合と同様のレベルで推移したが、4週目から9週目にかけて逆に増加する傾向が見られた。核では、1週目が数%でその後4週目まで徐々に増加したが、9週目では1週目のレベルまで減少した。ミクロゾーム、可溶画分にはPuはほとんど存在しなかった。細胞内のPuはリソゾームに存在するといわれている。本実験においてもPuはリソゾームに存在した。しかしミトコンドリアには更に数倍に達する量のPuが存在していて、ミトコンドリアがPuの細胞内での代謝に大きく関わっていることを示唆する結果が得られた。ただ、肺を構成する種々の細胞を一緒にして細胞分画しているためどの細胞がPuの代謝に大きく関わっているかは不明である。また、実施した細胞分画法ではリソゾームとミトコンドリアをクリアに分画できないためリソゾームの中でも重い成分 (heavy lysosome) はミトコンドリア画分に含まれていたことが十分に考えられる。もしそれが事実ならば、細胞内のPuはやはりリソゾームに存在することになるが、これを明らかにするには更なる検討が必要である。

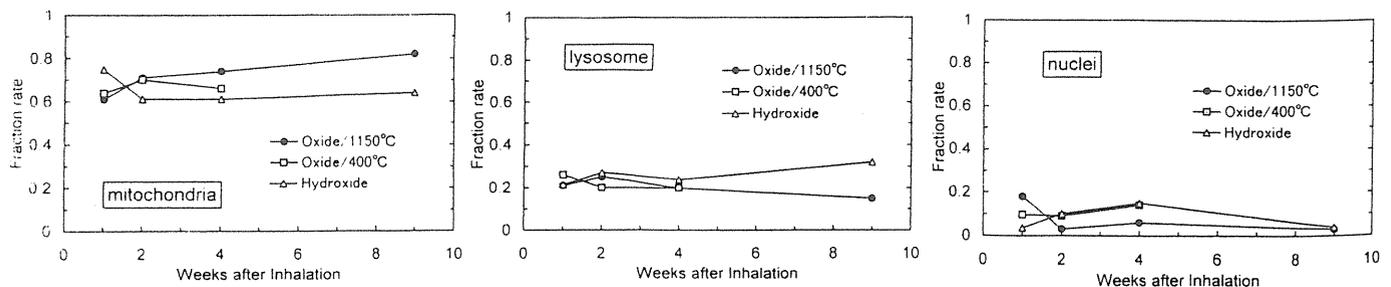


Fig.9 Sub-cellular distribution of Pu following inhalation of PuO₂ fired at 1150 and 400°C and Pu hydroxide.

4. 結論

焼結温度の異なる2種類の酸化Pu及び水酸化Puをラットに吸入させて肺への沈着、沈着したPuの肺から全身臓器への移行、糞尿中への排泄について検討し、焼結温度により何れも違いが見られた。マウスでは焼結温度の影響がなく、イヌでは焼結温度によりlung retentionが異なることは知られていたが、ラットでの報告はなかった。今回の一連の実験でラットでもイヌほど顕著ではないが差が見られたことより、体重がラットの1/10ほどのマウスでは差がなく、ラットの約30倍のイヌでは顕著な違いが見られていることを考慮すると、マウスとイヌでの違いは動物種差によるものである可能性が高いことが示唆された。しかし、酸化Puのlung retentionがどうして焼結温度により異なるのかは未だ不明である。酸化Puの物理化学的性状が焼結温度により異なるためではないかと考えられるが現時点では推測の域を脱しない。また、焼結温度差によるlung retentionの違いと肺の細胞内の微細分布との関連を裏付ける結果は得られず、細胞内分布がPuのlung retentionに関与しているか否かは明らかではない。

[研究発表]

1. Yamada, Y., Koizumi, A., Fukuda, S., Inaba, J., Cheng, Y.S., Yeh, H.C. : Hoken Butsuri, 29, 23-31, 1994.
2. Inaba, J., Ishigure, N., Oghiso, Y., Sato, H. : J. Radiat. Prot. Dosim., 53, 335-337, 1994.
3. 佐藤, 高橋, 久保田, 越本 : 日本放射線影響学会第37回研究発表会, 福岡, 1994.10.
4. Esaka, F., Takahashi, S., Sato, H., Kubota, Y., Kikuchi, T., Furuya, K.: J. Toxicol. Sci., 20, 103-108, 1995.
5. 山田, 小泉, 稲葉 : 日本保健物理学会第30回研究発表会, 水戸, 1995.5.
6. 山田, 小泉, 稲葉 : 第12回エアロゾル科学・技術研究討論会, 八王子, 1995.8.
7. 佐藤, 山田, 石博, 仲野, 榎本, 小泉, 宮本, 小木曾, 福田, 飯田, 高橋, 久保田, 稲葉 : 日本放射線影響学会第38回研究発表会, 千葉, 1995.11.
8. Sato, H. : The 1st Japan-France Workshop on Radiobiology, Chiba, 1996.9.
9. Yamada, Y., Koizumi, A., Inaba, J. : Workshop : Intakes of Radionuclides, France, 1997.9
10. Yamada, Y., Koizumi, A., and Inaba, J. : J. Radiat. Prot. Dosim., 79, 269-272, 1998.

Ⅲ. アルファ放射体による内部被ばくの生物学的影響と その修飾因子に関する研究

2. アルファ放射体による内部被ばくのバイオドシメトリに関する研究

石樽信人、仲野高志、榎本宏子、小木曾洋一、山田 裕 (内部被ばく・防護研究部)、
稲葉次郎 (研究総務官)

Studies on Biodosimetry in the Internal Exposure by Alpha-particle Emitters

Nobuhito Ishigure, Takashi Nakano, Hiroko Enomoto, Yoichi Oghiso,
Yutaka Yamada (Division of Radiotoxicology and Protection)
and Jiro Inaba (Deputy Director-General)

A basic study has been carried out to develop a biologically based method for estimating alpha doses (biodosimetry) in animal exposure experiment in our institute. In the biodosimetric method, alpha dose to the cells sampled from the exposed animals is estimated by comparing the cytotoxic or cytogenetic response observed in the cells with the response of the cells exposed to alpha-particles *in vitro*, where the dose is known.

A device to irradiate a monolayer of cultured cells with alpha-particles *in vitro* using Am-241 source (3.3×10^7 Bq) was designed. This device can be used conveniently in a common laboratory by a small number of researchers. The device performs as follows: (1) The energy of alpha-particles at the entrance of the cell layer is 3.2 MeV with a standard deviation of 0.25 MeV, (2) the incident angle to the cell layer is 82.8 degrees with a standard deviation of 3.2 degrees, (3)

the fluence rate is $4.7 \times 10^5 \text{ cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$, (4) the average LET for a cell layer $5 \mu\text{m}$ thick is 138 keV/ μm , (5) the average dose rate for a cell layer $5 \mu\text{m}$ thick is 0.10 Gy/min. and (6) a temperature and CO₂ concentration conducive to cell cultivation are maintained during irradiation.

V79 Chinese hamster cells were irradiated normally with alpha-particles using the device mentioned above. The survival curve was exponential with a D_{37} of 0.97Gy, which corresponds to the cross section of $22 \mu\text{m}^2$. The dose response for micronucleus induction using a cytocharasin B blocking technique fitted well to a linear relationship: $Y=0.019+0.111D$, where Y is the number of micronuclei per binucleated cell and D is the alpha-particle dose in Gy. This result supports the validity of the micronucleus induction rate as the endpoint index of cell doses.

I. 緒言

1. 意義と目的

ICRPの新しい呼吸気道モデルでは、器官の平均線量ではなく細胞の線量を精密に評価するよう求められている。こうした細胞の線量が臓器平均線量以上にリスクの有効な目安たり得るためには、放射毒性学の基礎としての実験動物における発がんデータも、臓器や組織の平均線量ではなく、細胞の線量を基準にして再評価されなければならない。ベータ・ガンマ放射体への被ばくでは、臓器平均線量と細胞の線量との差異は小さい。しかし、アルファ放射体の内部被ばくでは、アルファ線の飛程がきわめて短いため、細胞の線量は臓器平均線量から大きく隔たって分布する。こうした細胞の線量を正しく評価するためには、組織の微細形態や放射体の沈着微細分布が定量的に正確に決定されな

ければならないが、これは決して容易な作業ではない。そこで、本研究においてはアルファ放射体に被ばくした動物の細胞に生じる細胞遺伝学的変異等を測定することにより、物理学的手法のみでなく、生物学的指標からアルファ線線量を評価する“バイオドシメトリ”の開発に必要な基礎的検討を行う。

2. バイオドシメトリの基本的考え方

動物への吸入投与実験におけるバイオドシメトリの基本的な考え方は次の通りである。まず、線量を評価する組織から採取した細胞、たとえば気管支上皮細胞等を初代培養する。この細胞に、アルファ線エネルギー、入射方向、線量等のよく制御されたアルファ線を照射する。次にアル

ファ線照射により細胞に生じる細胞遺伝学的変異等を定量し、これを細胞線量に対してプロットする。この線量反応曲線は、バイオドシメトリのいわばレファレンススケールとなる。アルファ放射体を吸入投与したラットから同じ種類の細胞を採取し、そこに生じている生物学的な変化を定量する。これを、すでに作成してある線量反応曲線、すなわちレファレンススケールと比較・参照することによって、その細胞が実際に受けた線量を推定しようという考え方である。

II. アルファ線インビトロ照射装置

緒言で述べたバイオドシメトリのレファレンススケールを作成するためには、培養細胞に、線量等のよく制御されたアルファ線を照射する装置が不可欠である。本研究では、こうした目的に使用するアルファ線インビトロ照射装置を試作した。

1. 装置の概要

概略図をFig.1に示す。装置全体は炭酸ガスインキュベータの中に格納され、照射中も培養条件が保持される。パルスモーターで駆動されるステージの上にコリメータ付きのアルファ線源を載せ培養細胞に下から垂直に照射する。なお、細胞は薄いマイラー膜を底面にもつ特殊なガラス製培養皿で培養される。ステージをマイコン制御により左右・前後にat randomに動かすことにより、照射面におけるアルファ線のフルエンスを一様にする。培養皿は、リモート

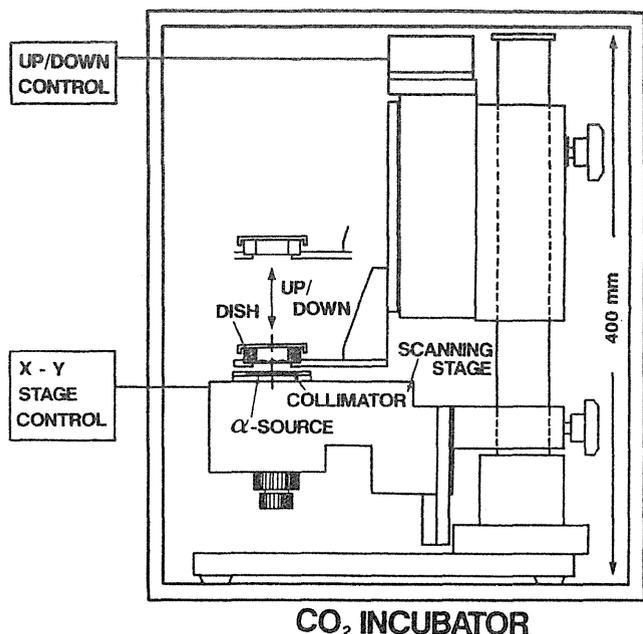


Fig.1 Schematic diagram of the device for *in vitro* irradiation with alpha-particles designed in the present study.

操作により迅速に上下させられるステージの上に乗せる。このステージをコリメータぎりぎりまで下げて照射を開始し、終了する時は同じくリモート操作で培養皿を一気に上げアルファ線の飛程よりも遠くへ離すことによって終了させる。

線源は市販の ^{241}Am の密封線源であり、その表面はごく薄い白金の箔により覆われている。放射能は $3.3 \times 10^7 \text{ Bq}$ であった。

コリメータは、空気層によるアルファ線エネルギーの低下を防ぐため、薄いものにする必要がある。試作した装置では、厚さ0.8mmのセラミック板に直径0.2mmの小ホール10000個を、中心間隔3mmでレーザー光によりあけたものである。

2. 入射方向

コリメータを用いた時のアルファ線の入射角の分布をモンテカルロ法によりシミュレーションした。その結果をFig.2に示す。入射角分布は、平均値が82.8度で標準偏差3.2度の広がりをもつと推定された。パスレングスの分布もシミュレーション計算したが、垂直入射を1とした時の平均パスレングスは1.008となり、ほとんど1に揃っていると推定された。

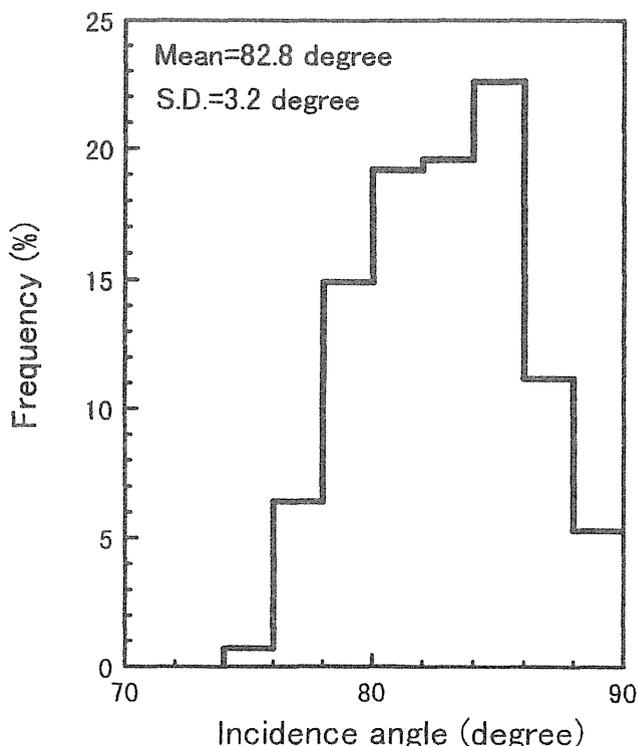


Fig.2 Distribution of the incident angles, which was calculated by Monte-Carlo simulation.

3. 粒子束密度

細胞照射面におけるアルファ粒子の平均粒子束密度とその一様性を調べた。培養皿の位置に固体飛跡検出器CR-39を置き、記録されるアルファ粒子飛跡の密度分布を計数した。即ち、照射後のCR-39をエッチング処理すると、アルファ粒子飛跡一個一個はFig.3に示すように小さな黒点として光学顕微鏡による観察が可能となる。一定面積の微小エリアを照射範囲全域から無作為に抽出し、その中の飛跡の計数値に関する頻度分布を求めた。その結果をFig.4の白いヒストグラムで示す。なお、微小エリア内の平均飛跡数は8.8であった。比較のため、同じ平均飛跡数に対するポアソン分布を計算し、同図に黒のヒストグラムで示した。カイ2乗適合度検定の結果、この両者はよく一致しており、粒子束密度の一様性を確認できた。また粒子束密度の値そのものは $4.7 \times 10^5 \text{ cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ であった。

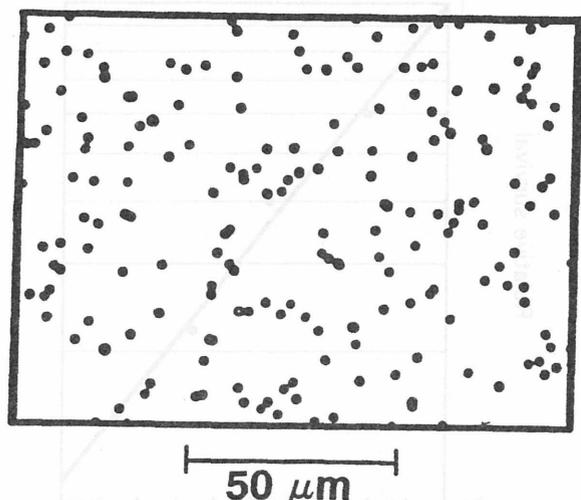


Fig.3 Etched CR-39 plate that was irradiated with alpha-particles at the cell layer position.

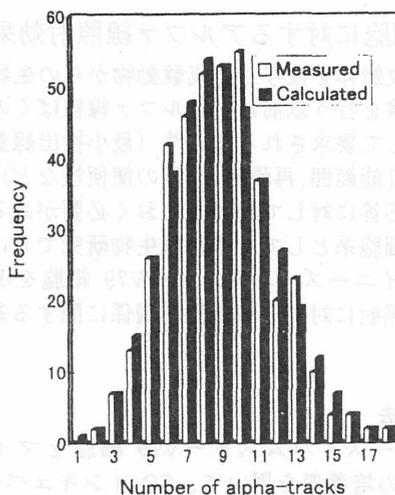


Fig.4 Uniformity of fluence rate at the cell layer position: Frequency distribution of the number of tracks counted in each $25\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$ square on the irradiated CR-39 plate. Randomness of the spatial distribution of incident positions of alpha-particles was verified as a result of the closeness of the fit between the measured frequency distribution and the calculated Poisson distribution.

4. アルファ粒子のエネルギー分布

シリコン半導体検出器によるアルファ粒子エネルギー分布の測定結果をFig.5に示す。吸収体が無い場合、同図の白丸に示すように平均値4.14MeV、標準偏差0.20MeVであった。一方、細胞照射面では、培養皿底面のマイラー膜および線源-薄膜間の3mmの空気層によりエネルギーが吸収されるため、平均値3.20MeV、標準偏差0.25MeVとなった。

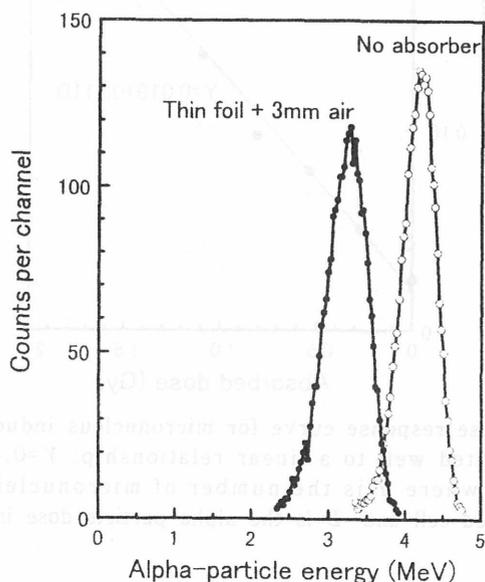


Fig.5 Measured energy spectra of alpha-particles: (○) in vacuum and (●) after the traversal of both a base thin foil and 3 mm in air space, which is the distance between the source surface and the base foil of the culture dish.

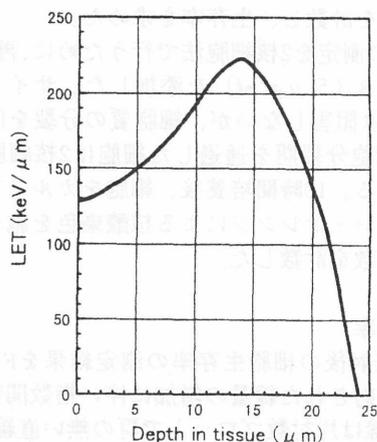


Fig.6 Dependence of LET on the depth of soft tissue for the beam available in the present device, by approximating the values tabulated in ICRU REPORT 36 by a polynomial function of alpha-particle energy.

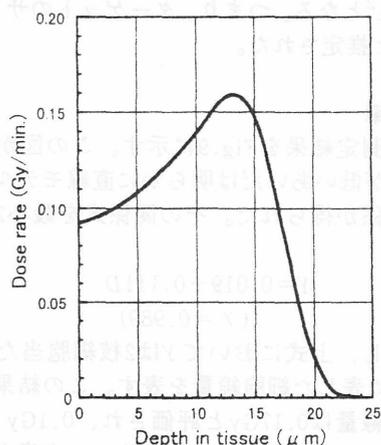


Fig.7 Dependence of absorbed dose on the depth of soft tissue for the beam available in the present device, by approximating the values tabulated in ICRU REPORT 36 by a polynomial function of alpha-particle energy.

5. 線量率およびLET分布

前記第3節の粒子束密度および第4節のアルファ線エネルギー分布の実測値と阻止能の文献値 (ICRU Report 36) とを用い、LETおよび線量率の細胞内深さ分布を計算した。その結果をFig.6とFig.7にそれぞれ示す。細胞の厚みを5 μm と仮定すると、平均線量率は0.10 Gy/min.、平均LETは138 keV/ μm と評価される。

Ⅲ. 培養細胞に対するアルファ線照射効果

アルファ放射体を投与した実験動物からの生物学的試料を用いた実験を行う以前に、アルファ線被ばくのバイオドシメトリとして要求される諸条件（最小検出線量、感度、線量の計測可能範囲、再現性、測定簡便性など）について、種々の細胞応答に対して検討しておく必要がある。そのために、培養細胞系として、放射線生物研究でしばしば用いられるチャイニーズ・ハムスターV79細胞を導入して、アルファ線照射に対する線量反応関係に関する基礎データを得た。

1. 実験方法

チャイニーズ・ハムスターV79細胞をマイラー膜を貼った特製の培養皿を用いて、CO₂インキュベーター内で培養した後、第Ⅱ章で述べた²⁴¹Amを線源にもつアルファ線照射装置によりアルファ線照射を行った。

照射後、トリプシン処理により細胞をマイラー膜から剝がし、一部は、コロニー形成法による細胞生存率を測定するために適当に希釈の後培養皿（ファルコン）に再播種した。他の一部は小核形成頻度の測定のために培養皿内のカバーガラス上に再播種した。

CO₂インキュベーター内で再培養し、1週間後に形成されたコロニーの数を計数し、生存率を求めた。

また、小核数の測定を2核細胞法で行うために、再播種後、サイトカラシンB（5 μg/ml）を添加した。サイトカラシンBは、核分裂は阻害しないが、細胞質の分裂を阻害するので、照射後細胞分裂期を通過した細胞は2核細胞として容易に同定できる。10時間培養後、細胞をカルノア液で固定し、アクリジン・オレンジによる核酸染色を施し、蛍光顕微鏡下で小核数を計数した。

2. 細胞の生存率

アルファ線照射後の細胞生存率の測定結果をFig.8に示す。生存率は照射された線量の増加に伴い指数関数的に減少し、生存率曲線は片対数プロットで肩の無い直線となり、高LET放射線に典型的にみられる線量反応関係を示した。同図より、LD₅₀は0.68 Gyであり、D₃₇は0.97 Gyであることが分かった。0.97 Gyの時のアルファ粒子フルエンスは、0.0454 μm⁻²であり、この値から反応断面積を算出すると、22.0 μm²となる。つまり、ターゲットのサイズは5.3 μm円相当径と推定された。

3. 小核形成率

小核形成の測定結果をFig.9に示す。この図から分かるように、線量が低いあいだは明らかに直線モデルに適合する線量反応関係が得られた。その関係式を最小2乗法で求めたところ

$$Y=0.019+0.111D$$

$$(\gamma=0.989)$$

となった。但し、上式においてYは2核細胞当たりの小核数を、DはGyで表した細胞線量を表す。この結果から小核形成率の倍加線量は0.17Gyと評価され、0.1Gy程度の低線量でもバックグラウンドレベルと比べ、有意な小核頻度の上昇が期待される。それ故、小核形成率は、アルファ線被ばくにおけるバイオドシメトリの指標として有望な候補の一つであると判断された。

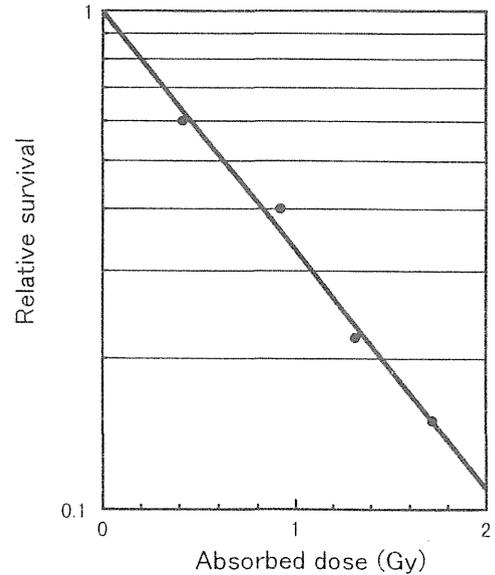


Fig.8 Survival curve for the V79 Chinese Hamster cells exposed to alpha-particles with the energy of 3.2 MeV. The line represents the fit of exponential model with the D₃₇ of 0.97 Gy

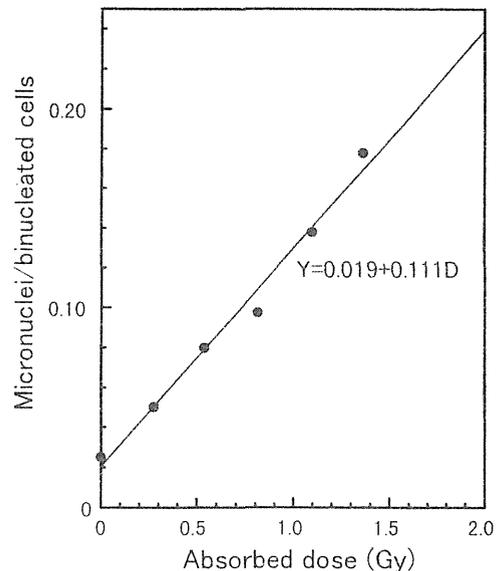


Fig.9 Dose response curve for micronucleus induction, which fitted well to a linear relationship: $Y=0.019+0.111D$, where Y is the number of micronuclei per binucleated cell and D is the alpha-particle dose in Gy.

4. 数理解析

本章第3、4節の実験結果に対し、以下のような数理解析を行った。

I個トラックが通過した後の細胞の生存率S(I)は、シングルトラック当たりの致死確率をpとすると、

$$S(I) = (1-p)^I$$

で表される。

また、I個のトラック通過後の小核誘発率N(I)はシングルトラック当たりの小核誘発率をm、自然の誘発率をm₀とすると次式で表すことができる。

$$N(I) = 1 - (1 - m)^I (1 - m_0)$$

一方、前述したように、生存率の測定結果から細胞不活化に対する反応断面積が $22 \mu\text{m}^2$ と評価された。したがって、アルファ粒子フルエンスが f の時、細胞核を通過するトラック数の平均値 M は、 p (シングルトラック当たりの致死確率) と細胞不活化断面積とから次の式のように表すことができる。

$$M = \frac{22}{p} f$$

この平均値 M より、ポアソン統計の式を用いて I 個のトラックが通過する確率 $F(I)$ は

$$F(I) = \left(\frac{M^I}{I!} \right) \exp(-M)$$

と表される。

以上より、アルファ粒子フルエンスが f の時の小核誘発率 $N(f)$ は、 I 個のトラックが通過する確率に生存率と小核誘発率を掛け、 I に関してサメンションすることにより得られる。すなわち、

$$\begin{aligned} N(f) &= \sum F(I) \cdot S(I) \cdot N(I) \\ &= \sum \left\{ \frac{(22f/p)^I}{I!} \right\} \exp\left(-\frac{22f}{p}\right) (1-p)^I \{1 - (1-m)^I (1-m_0)\} \end{aligned}$$

となる。

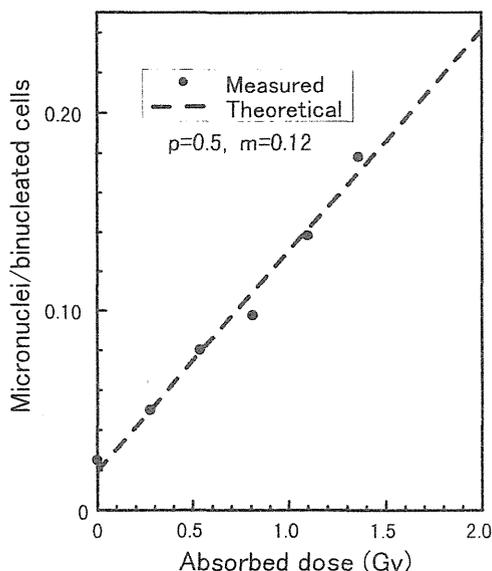


Fig.10 Theoretical prediction for micronucleous induction where p (number of lethal lesion per single track) is 0.5 and m (probability for micronucleous induction) is 0.12, which showed a good fitness to the observed dose response curve for micronucleous induction.

ここで、測定から得られる変数は、小核細胞の割合 N と、アルファ粒子フルエンス f であるから、 p 即ちシングルトラック当たりの致死確率と m 即ちシングルトラック当りの小核誘発率との関係は実験値にフィッティングすることにより知ることができる。

例えば、 p を 0.5 と仮定した時、 m の最適値として 0.12 が得られる。実験値と重ねあわせると Fig.10 のようになり、直線というよりは若干上に凸の曲線になってはいるが実験値とかなり良好な一致を示していると言える。

Fig.11 は、 p をいろいろに仮定し、こうしたフィッティングを行った時の p と m との関係を示したものである。この図より p の増加に伴い m も単調増加を示すということ、ほとんどの領域で m は p よりかなり小さいということが示されている。このように別の実験で p を求めることができれば m も決められる。

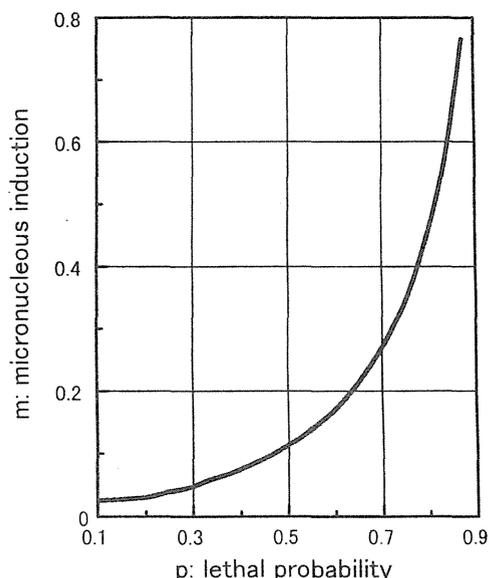


Fig.11 Theoretical prediction for the relationship between p (number of lethal lesion per single track) and m (probability for micronucleous induction).

IV. 結言

アルファ線照射によるチャイニーズハムスタ V79 の細胞生存率および小核形成率を求める実験から、小核形成率は、アルファ放射体吸入投与実験におけるバイオシメトリの指標として有力な候補の一つであることが示された。また、既存の気道上皮細胞株 (SV40T2) を用いた予備的検討から、小核形成効果は V79 細胞よりも高いことが示唆され、吸入被ばくで問題になる気道上皮細胞の線量の評価に小核形成率を指標としたバイオシメトリが適用できる可能性が強く支持された。

小核形成率の測定自体には格段の新奇性があるわけではないが、アルファ線照射による効果を定量的に評価した例は他になく、本特別研究で得られたデータは独自のものと考えられる。

生物学的指標から細胞のアルファ線量を評価することは、プルトニウムのみならず、ラドンの生物影響研究においてもたいへん重要であり、今回の特研の成果を踏まえ、平成10年度に開始された特別研究小課題「ラドンの線量評

価及び生物学的指標に関する研究」として継続発展が見込まれる。

[研究発表]

- 1) Ishigure, N., Nakano, T. and Enomoto, H.: Activity Measurement of Plutonium in Solid Samples by L X-ray Counting with a Phoswich Detector, 保健物理, 28, 195-201, 1993.
- 2) Ishigure, N., Nakano, T., Enomoto, H. and Inaba, J.: Longer Lung Retention of PuO₂ Particles in Rats Measured Using Periodic In Vivo Counting, Radiat. Prot. Dosimetry, 53, 195-198, 1994.
- 3) Ishigure, N., Nakano, T., Enomoto, H., Fukuda, S., Iida, H., Oghiso, Y., Sato, H., Takahashi, S., Yamada, Y., Koizumi, A., Yamada, Y., Miyamoto K. and Inaba, J.: Lung Retention of Pu Following Inhalation of PuO₂ in Rats Measured Using a Whole Body Counter, J. Radiat. Res., 35, 16-25, 1994.
- 4) Inaba, J., Ishigure, N., Oghiso, Y. and Sato, H.: Gastrointestinal Absorption of Americium Administered with Large Amount of Sodium Citrate in Rats, Radiat. Prot. Dosimetry, 53, 335-337, 1994.
- 5) Ishigure, N. and Inaba, J.: Analytical Solution of the Compartment Model for Respiratory Tract Clearance Used in the New ICRP Lung Model, J. Nucl. Sci Technology, 33, 179-186, 1996.
- 6) Ishigure, N., Enomoto, H., Nakano, T. and Inaba, J.: Validity of Am-241 as a Tracer of Inhaled Pu in External Chest Counting, Radiat. Prot. Dosimetry, 79, 133-136, 1998.
- 7) 石樽、仲野、榎本、稲葉: 日本保健物理学会第28回研究発表会, 福岡, 1993.5.
- 8) Ishigure, N., Nakano, T. Enomoto, H. and Inaba, J.: CEC Workshop on Intakes of Radionuclides, Bath, UK, 1993.9.
- 9) 石樽、佐藤、仲野、榎本、稲葉: 日本保健物理学会第29回研究発表会, 敦賀, 1994.5.
- 10) 仲野、石樽: 日本保健物理学会第29回研究発表会, 敦賀, 1994.5.
- 11) 石樽、稲葉: 日本放射線影響学会第37回大会, 福岡, 1994.10.
- 12) 石樽、稲葉: 日本保健物理学会第30回研究発表会, 水戸, 1995.5.
- 13) 石樽、稲葉: 日本原子力学会1995年秋の大会, 東海, 1995.10.
- 14) 石樽、稲葉: 日本放射線影響学会第38回大会, 千葉, 1995.11.
- 15) Ishigure, N., Nakano, T. Enomoto, H., Sato, H. and Inaba, J.: 1996 Int. Cong. Radiat. Prot., Vienna, 1996.4.
- 16) 石樽、榎本、稲葉、生島* (京都教育大): 日本保健物理学会第31回研究発表会, 札幌, 1996.5.
- 17) 仲野、石樽: 日本保健物理学会第31回研究発表会, 札幌, 1996.5.
- 18) 石樽、榎本、稲葉、生島* (京都教育大): 日本放射線影響学会第38回大会, 大阪, 1996.11.
- 19) 仲野、石樽: 日本保健物理学会第32回研究発表会, 奈良, 1997.5.
- 20) Ishigure, N., Enomoto, H., Nakano, T. and Inaba, J.: CEC Workshop on Intakes of Radionuclides, Avignon, France, 1997.9.

Ⅲ. アルファ放射体による内部被ばくの生物学的影響と その修飾因子に関する研究

3. アルファ放射体による内部被ばく発がん その生物学的修飾因子に関する研究

小木曾洋一、山田 裕、飯田治三、福津久美子、石博信人、仲野高志、榎本宏子、
佐藤 宏、山田裕司、小泉 彰、稲葉次郎 (内部被ばく・防護研究部)

Studies on the Carcinogenesis Induced by Internal Alpha-emitters and Its Biological Modifiers

Yoichi Oghiso, Yutaka Yamada, Haruzo Iida, Kumiko Fukutsu,
Nobuhito Ishigure, Takashi Nakano, Hiroko Enomoto,
Hiroshi Sato, Yuji Yamada, Akira Koizumi, and Jiro Inaba
(Division of Radiotoxicology and Protection)

The carcinogenic effects of an alpha-emitter, ^{239}Pu , were investigated by animal experiments as focused on both pulmonary tumors after inhalation exposures to insoluble oxide aerosols and tumor spectra induced by injection of soluble citrate. The life-span study using Wistar strain rats exposed to Pu dioxide aerosols has shown differential dose-related responses of malignancies and histopathological phenotypes of lung tumors, suggesting a threshold dose around 1.0 Gy of the lung dose. As abnormality of tumor-related genes could be supposed for the background of pulmonary carcinogenesis, the mutations of p53 tumor suppressor gene were examined by PCR-SSCP analysis using DNA fragments

extracted from lung tumors. While mutations were detected in 23 cases (about 28%) among 82 lung tumors, their relations to either malignancies, histological phenotypes, dose, or oncogenesis are not yet to be elucidated. The life-span study using C3H strain mice injected with Pu citrate has shown contrast dose responses between osteosarcomas and lymphoid tumors around 10 Gy of the skeletal dose, and further indicated specific tumor spectra differed from low LET radiation exposures as shown by much more frequency of B cell type leukemic lymphomas and none of myeloid leukemias.

緒 言

アルファ放射体のうち、長半減期で体内滞留率が大きく、発がん性が最大とされるが未だ不明確なプルトニウム (^{239}Pu) の人体における発がんリスクを科学的に推定し、その防護・低減化をはかるためには、動物実験による実証解析が必要である。本研究では、プルトニウム化合物の物理化学的性状と被曝形式に依存した体内挙動・線量分布・発がん効果の特異性とそれを修飾する生物学的要因や機構について明らかにすることを目的として、以下のように、最も可能性の高い被曝様式としての不溶性酸化物エアロゾルの吸入曝露および体内移行成分の効果を考慮した可溶性クエン酸塩の注射投与により、それぞれ生涯飼育動物実験と発がん効果に関する種々の検討を行った。

実験方法

(1) 酸化物エアロゾルの吸入曝露実験では、硝酸溶液から水酸化物に変換し、約1150℃に高温焼結して発生させた多分散 $^{239}\text{PuO}_2$ エアロゾル (空気動力学的中央径 AMAD:

0.3-0.4 μm 、幾何学的標準偏差 GSD: 1.8-2.0) を、我々が開発したグローブボックス型小動物吸入曝露チェンバー内でWistar雌ラット (体重140-160g、10-15週齢) に鼻部吸入曝露させた。吸入曝露後6-7日目に、各動物を麻酔下で体外計測装置 (ホスウィツチ型NaIシンチレーション検出器) を用いてLX線 (17keV) を測定することにより、肺における初期沈着量 (Bq) を推定し、蓄積肺線量 (Gy) は既に得られている肺滞留率曲線から求めた。このようにして作成した吸入曝露動物約500匹 (初期沈着量20-3000Bq) を無処置対照群約200匹とともに生涯飼育し、死亡後病理解剖と組織学的検索を行ない、生存率、死因、線量効果等を解析した。また発がん過程と機構を明らかにするため、別に100匹の吸入曝露群 (初期沈着量300-500Bq) と無処置対照群60匹を長期飼育して肺腫瘍発生・発育過程、潜伏期、線量との関係を経時的に検討した。さらにこれらの吸入曝露動物で発生した肺腫瘍におけるがん関連遺伝子の発現とその役割を検討するため、とくにがん抑制遺

伝子p53の突然変異について、肺腫瘍組織の免疫組織染色および抽出DNAのPCR-SSCP解析による検討を試みた。

(2)クエン酸塩の注射投与実験では、硝酸溶液からクエン溶液に変換・滴定し、pH6.8-7.0に調整した単量体クエン酸²³⁹Pu溶液を、C3H雌マウス(体重25-28g、10-12週齢)計360匹に1匹あたり10-12000Bq宛て腹腔内注射投与して、生理食塩水投与対照群100匹とともに生涯飼育し、死亡後病理解剖と組織学的検索を行ない、生存率、死因、線量効果等を解析した。骨線量(Gy)は別に作成した注射投与動物を漸次殺処分して全身の骨組織における沈着量(Bq)を灰化後液体シンチレーション計測して求めた滞留率曲線により計算した。また系統差を明らかにするため、C3Hに加えてC57BL/6およびBC3F1の3系統雌マウス合計550匹(1匹あたり100-5000Bq宛て腹腔内注射投与)と生理食塩水投与対照群合計250匹の生涯飼育実験を行うとともに、一部発がん過程と血液病理学的動態について経時的検討を加えた。

結果および考察

(1)酸化プルトニウム・エアロゾル吸入曝露ラットにおける肺腫瘍誘発とその線量効果

生涯飼育群のうち、これまでにその約8-9割にあたる約600匹が死亡し、病理組織検査を終了しているが、その結果から以下のような所見が得られた。

①対照群と比較して吸入曝露動物の平均生存日数は、肺線量1.0 Gy以下までは有意差をみとめないが、1.5 Gy以上から有意に減少し、これと並行して原発肺腫瘍発生率は1.0 Gy以下の約40%から、1.5 Gyで約66%、さらに5.4 Gyで約97%にまで急増する(Fig.1A)。またこれらの肺腫瘍のうち、腫瘍病巣が限局され、周囲への浸潤・転移のない良性腫瘍は1.0 Gy以下では約35%と大部分を占めているが、1.5 Gy以上から減少し、代わって多発性で浸潤・転移の顕著な悪性腫瘍発生率が急増して6.6 Gyで約90%に達する。このように1.0 Gy近辺での生存期間および悪性度による肺腫瘍発生率の線量効果の差が明らかであるが、悪性腫瘍の発生は、吸入後300日以上から増加して600日目までに最高に達するのに対して、良性腫瘍は600日以上から増加して900日目までに最高に達するように、早期死因の多くはこの悪性肺腫瘍発生によるものであり、遅い時期に発生する良性腫瘍は直接の死因に結び付かないものと考えられた。

②発生した原発肺腫瘍の大部分(99%)は、気管支-細気管支から肺胞部にかけての気道被覆上皮細胞より生じた上皮性腫瘍で、病理組織学的に良性の腺腫(adenoma)と、悪性の腺癌(adenocarcinoma)、腺扁平上皮癌(adenosquamous carcinoma)および扁平上皮癌(squamous cell carcinoma)の4型に分類された。このうち最も多くを占める組織型は腺癌(全体の44%)であり、次いで腺腫(同27%)、腺扁平上皮癌(同22%)、扁平上皮癌(同6%)であったが、この割合はこれまでに米国で報告されている同様な実験結果と比べ、かなり異なっており、各々の発生率の線量効果にも違いがみとめられた。すなわち、腺腫は0.6 Gyで最大(約35%)の発生率を示し、1.5 Gy以上では減少するが、代わって腺癌が増加して2.8 Gyで最大(約47%)の発生率を、また腺扁平上皮癌および扁平上皮癌が4.7 Gy以上から増加して5.4-8.5 Gyの線量域

で最大の発生率をそれぞれ示すことが明らかであった(Fig.1B)。このことは肺腫瘍組織型による誘発線量域が異なることを示すものであり、さらに組織標本上で腫瘍病変の程度・出現数を算定すると、初期化生・増殖病変が0.6-1.5 Gy、腺腫・腺癌病変が1.5-2.8 Gy、扁平上皮癌病変が5.4-6.6 Gyでそれぞれ出現・顕在化するように、腫瘍病変形成にも異なる線量域が存在していることが明らかであった。

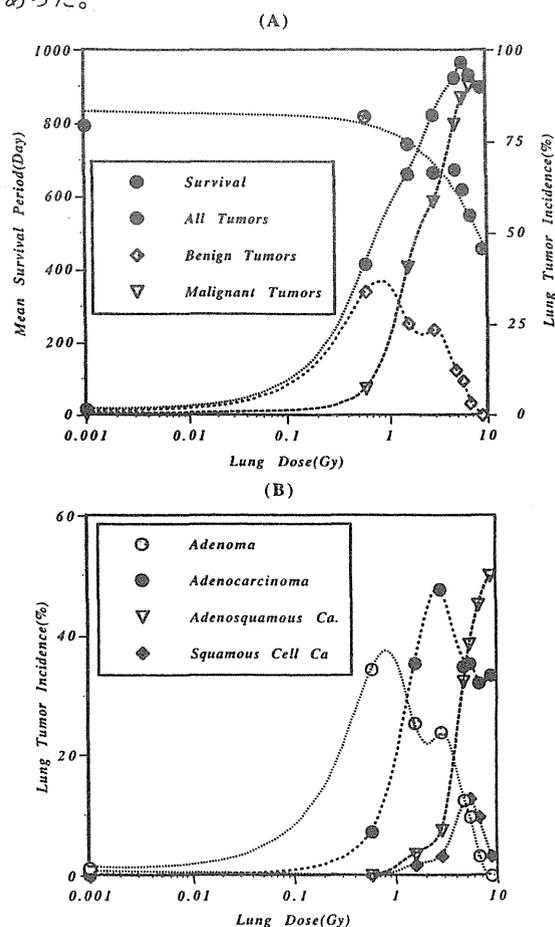


Fig.1. Dose Effect Relationships on Survival and Lung Tumor Induction of ²³⁹PuO₂-Exposed Rats

(A) Lung dose vs. mean survival period and benign or malignant tumor incidences.

(B) Lung dose vs. incidences of lung tumor types.

③このように発生肺腫瘍の悪性度・組織型・病変形成により線量域が異なること、一定の閾値線量域が存在する背景には、様々な要因が考えられる。このうち最も考えられる要因として、吸入エアロゾル粒子の物理化学的性状、とくに粒子径の差にもとづく呼吸気道内沈着・線量分布・線量率および標的気道上皮細胞の感受性の違いがあげられるが、腫瘍発生・悪性化および癌化等発がんの分子機構、とりわけがん関連遺伝子とその産物の異常発現も深く関わっているものと考えられる。このうち、悪性化・癌化に関わるとされるp53癌抑制遺伝子の突然変異について検討を試みた。まず306例の肺腫瘍について核内p53タンパクの蓄積程度を特異抗体による免疫染色により調べてみると、良性の腺腫全てを含む約83%の腫瘍例が陰性であり、残り約17%の癌腫が弱陽性ないし陽性を示し、陽性例の多くは腺扁平上皮癌および扁平上皮癌であった(Table 1)。次いで

Table 1 Intranuclear p53 Protein Accumulation and Lung Tumor Types in ²³⁹PuO₂-Exposed Rats

Histological Types	No. Examined	p53 Protein Accumulation*		
		Negative	Slight	Positive
Adenoma	84	84	0	0
Adenocarcinoma	136	121	14	1
Adenosquamous Carcinoma	68	41	25	2
Squamous Cell Carcinoma	18	9	5	4
Total	306	255	44	7

* Criteria for positivity by immunohistochemistry: negative, not detectable in all nuclei; slight, detectable in 10% or less of all nuclei; positive, detectable in 30% or more of all nuclei of tumor cells

これらのうち、82例の肺腫瘍標本からDNAを抽出し、ラットのp53エクソン5~8ごとに作成したプライマーを用いたPCR-SSCP解析を試みたところ、23例(約28%)でいずれかのエクソンに異常が検出されたが、正常(野性型)と比較して腫瘍組織型および核内タンパク陽性度との間に特別な違いはみとめられなかったものの、変異例のうち大部分にあたる20例でエクソン5あるいは6に異常がみとめられたことが特徴であった(Fig.2)。さらにこれら23例について突然変異部位のシーケンスを行ったところ、エクソン5および6に異常をみとめた11例でコドン141~219にわたるG→AまたはC→Tの置換点突然変異がみとめられたものの、他の12例では正常な塩基配列を示すという結果が得られた。従って、現在のところp53突然変異の肺腫瘍発生・悪性化・癌化との関連については明らかでない。

(2) クエン酸プルトニウム注射投与マウスにおける発がんとその線量効果

体内摂取された可溶性プルトニウムの最終沈着臓器である骨の腫瘍に加えて、骨髄幹細胞の照射によって生じるであろう造血・リンパ系腫瘍の発生について、生涯飼育マウスによる検索の結果、以下のような所見が得られた。

①C3Hマウスの生涯発がん実験においては、対照群と比較して骨線量2.9 Gy(投与量500 Bq)以上で、平均生存日数および50%生存日数の有意な減少が明らかにみとめられ、これらの実験群では投与後200日前後より腫瘍性病変および白血球減少、貧血、循環器・肝・腎障害等非腫瘍性病変による累積死亡率が急増していることから、早期の腫瘍死ないし非腫瘍死による生存期間の短縮と考えられた。

②誘発された腫瘍のうち、最も高率に発生する骨腫瘍は大部分が椎骨および四肢骨の骨肉腫であり、骨線量1 Gy(投与量100 Bq)以上から急増し、6-8 Gy(投与量1000-5000 Bq)で最高の発生率(96%)に達するが、10 Gy(投与量5000 Bq)以上から漸次減少した(Fig.3)。一方、対照群の約20%にみとめられるリンパ性腫瘍は、投与群では骨線量1-8 Gy(投与量100-5000 Bq)ではほとんどみられず、10 Gy(投与量5000 Bq)以上から増加して、25 Gy(投与量5000-10000 Bq)で最高(36%)に達した。このことから、骨線量10 Gy近辺での骨腫瘍とリンパ性腫瘍の対比的線量効果が明らかであった。

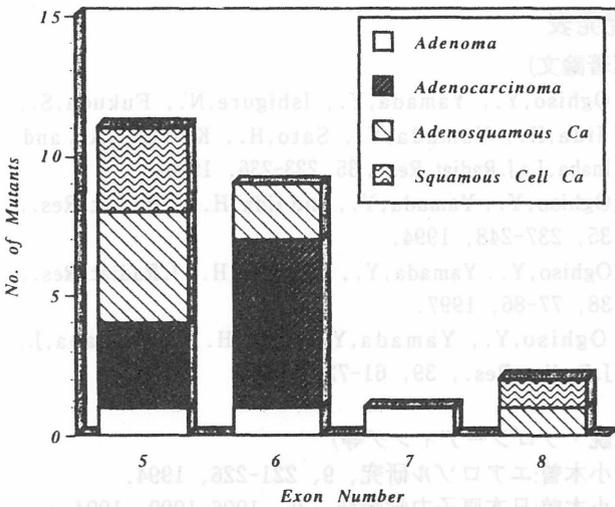


Fig.2. PCR-SSCP Analysis on p53 Mutations of Lung Tumors from ²³⁹PuO₂-Exposed Rats
Distribution of mutants and lung tumor types in each exon.

④吸入曝露によって誘発される肺腫瘍の発生時期・病変形成過程および線量・時間との関係を明らかにするため、新たに作成した吸入曝露動物について経時的検討を行ったところ、吸入後1-3カ月目までに惹起される炎症病変と肺胞マクロファージの形態・機能変化、3-6カ月目までに生じる線維化病変および気道上皮細胞の増殖・化生病変という過程の後、1年目から肺線量1-2Gyに達した動物において、腺腫および腺癌病変が出現・増加してくる傾向が明らかにされている。引続き吸入後2年目までの経時的検索とp53等がん関連遺伝子異常に関する解析を施行中である。

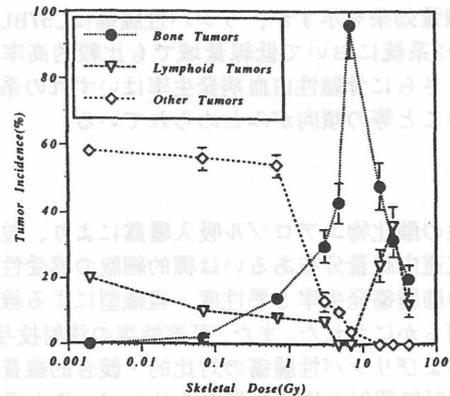


Fig.3. Dose Effect Relationships on Tumor Incidences of Citrate-Incidence Mice
Skeletal dose vs. incidence of each tumor

③さらに肝細胞癌、卵巣癌、肺癌等その他の固形腫瘍の発生率は、骨線量1 Gy(投与量100 Bq)以上から著減し、10 Gy(投与量5000 Bq)以上では発生率ゼロとなったが、これは骨腫瘍およびリンパ性腫瘍との競合によるものと考えられた。なお、低LET放射線の外部照射等でしばしば誘発される骨髄性白血病等造血系腫瘍は、対照群・投与群全て

において全くみとめられなかったので、線質あるいは線量率と骨髓幹細胞の感受性等の差が示唆された。

④上記の高線量域で有意の発生がみとめられたリンパ性腫瘍は、対照群と投与群との間に発生時期および組織形態の違いがみられた。すなわち対照群では700日以上遅い時期に発生するのに対し、投与群では多くが150-200日の早期に発生する傾向が明らかであり (Fig.4)、その組織型も対照群で多くみられる胸腺リンパ腫は少なく、B細胞性白血病ないし悪性リンパ腫が増加していることが特徴であった (Table 2)。これらの結果は、低LET放射線の外部照射で誘発される胸腺リンパ腫の発生機構とは異なり、骨髓前駆細胞から胸腺を介することなく発生・増殖するB細胞リンパ腫の発病機構の存在する可能性を示唆している。

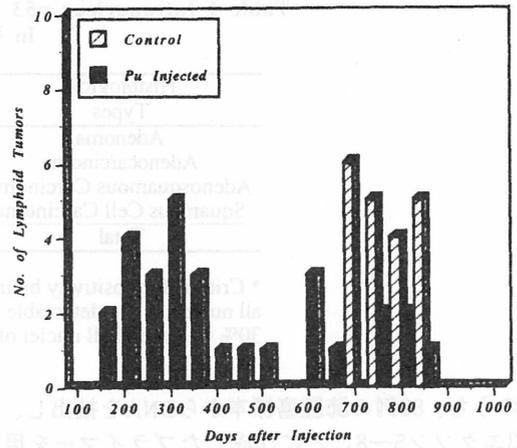


Fig. 4. Onset Time of Lymphoid Tumors from ^{239}Pu Citrate-Injected Mice
Numbers of lymphoid tumors appeared after injection

Table 2. Histological Phenotypes of Lymphoid Tumors in ^{239}Pu Citrate-Injected Mice

Experimental Group	No. Lymphoid Tumors	Histological Phenotypes*				
		Thymic Lymphoma	B Cell Lymphoma	T Cell Leukemia	B Cell Leukemia	Malignant Histiocytoma
Control	20	5	8	0	0	7
Pu Injected	29	1	13	2	13	0

* Differential diagnosis by immunohistochemistry using Thy1.2 and B220 monoclonal antibodies

⑤このような外部照射と異なる発生腫瘍スペクトルの違いが、線質・線量分布・線量率等物理的要因のみならず、マウス感受性の遺伝的背景によるものであるのかを明らかにするため、自然発生腫瘍スペクトルの異なる3系統 (肝腫瘍が多いC3H、胸腺リンパ腫の多いC57BL/6、およびそれらの雑種BC3F1) の雌マウスによる生涯発がん効果の比較検索を施行中である。現在までに、約6割の動物の病理検索を終えており、骨腫瘍発生率はいずれの系統でもほぼ同様な線量効果を示すが、リンパ性腫瘍はC57BL/6およびBC3F1の2系統において低線量域でも比較的高率に発生すること、さらに骨髓性白血病発生率はいずれの系統でも極めて低いこと等の傾向がみとめられている。

結論

不溶性の酸化エアロゾル吸入曝露により、粒子径・線量率・気道内線量分布あるいは標的細胞の感受性に依存した高率の肺腫瘍発生率と悪性度・組織型による線量効果の違いが明らかにされた。また、可溶性塩の注射投与により、骨腫瘍およびリンパ性腫瘍の対比的・競合的線量効果と、低LET放射線照射の場合と異なるリンパ・造血系腫瘍等誘発腫瘍スペクトルの違いが明らかにされた。これらはいずれもアルファ核種による発がんの特異性を示すものであるが、その背景や機構については明らかでなく、吸入曝露による肺腫瘍誘発に関しては、粒子径・化学形・線量率等、また注射投与による発がんに関しては、種差・系統差・年齢差等の比較をそれぞれ重点項目としながら、それぞれ発がんの特異性と分子機構についてさらに解析を加える必要がある。

研究発表

(原著論文)

- Oghiso, Y., Yamada, Y., Ishigure, N., Fukuda, S., Iida, H., Yamada, Y., Sato, H., Koizumi, A., and Inaba, J.: J. Radiat. Res., 35, 223-236, 1994.
- Oghiso, Y., Yamada, Y., and Iida, H.: J. Radiat. Res., 35, 237-248, 1994.
- Oghiso, Y., Yamada, Y., and Iida, H.: J. Radiat. Res., 38, 77-86, 1997.
- Oghiso, Y., Yamada, Y., Iida, H., and Inaba, J.: J. Radiat. Res., 39, 61-72, 1998.

(総説・プロシーディング等)

- 小木曾: エアロゾル研究, 9, 221-226, 1994.
- 小木曾: 日本原子力学会誌, 36, 1006-1009, 1994.
- Oghiso, Y., Ishigure, N., Yamada, Y., Sato, H., Fukuda, S., and Inaba, J.: Proc. 10th Intl. Congress Radiat. Res., Wutzburg, Germany, 315, 1995.
- 小木曾, 山田, 飯田, 福津, 福田: 保健物理, 33, 308-313, 1998.

(学会口頭発表等)

- 小木曾, 山田, 飯田, 福田, 石樽, 稲葉: 日本放射線影響学会第36回大会, 広島, 1993.10.
- 山田, 小木曾, 飯田, 佐藤: 日本放射線影響学会第36回大会, 広島, 1993.10.
- 小木曾, 山田, 石樽, 福田, 山田, 飯田, 稲葉: 日本放射線影響学会第37回大会, 福岡, 1994.10.

4. 小木曾、山田、飯田:日本放射線影響学会第38回大会、千葉、1995.11.
5. 山田、Okinaka、Chen:日本放射線影響学会第38回大会、千葉、1995.11.
6. Oghiso, Y., Yamada, Y., Ishigure, N., Fukuda, S., Iida, H., Yamada, Y., Sato, H., Koizumi, A., Nakano, T., Enomoto, H., and Inaba, J.: 2nd Japan-Italy Workshop on Radiation Effects and Biomedical Applications, Rome, 1995.12.
7. 小木曾、山田:日本放射線影響学会第39回大会、大阪、1996.11.
8. 小木曾:日本放射線影響学会第39回大会、大阪、1996.11.
9. 小木曾:日本原子力学会第35回大会、東京、1997.3.
10. 山田、福津、小木曾:日本放射線影響学会第40回大会、京都、1997.11.
11. Oghiso, Y.: Intl. Workshop on Indoor Radon Exposure and Its Health Consequences, Chiba, 1997.10.
12. Oghiso, Y., and Yamada, Y.: 2nd Japan-France Workshop on Radiobiology and Isotopic Imaging, Paris, 1998.2.