



グループ研究「低線量放射線影響評価のための
実証研究並びに発がん機構に関する研究」

(平成8～12年度)

最終報告書

平成13年10月

放射線医学総合研究所

Final Report on the Group Research :
Studies on the Low Dose Radiation Risk
and Carcinogenesis

(April 1996 ~ March 2001)

October 2001

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

目 次
[CONTENTS]

序

- I. 低線量放射線影響評価のための実証的研究 (佐々木俊作) 1
[Experimental Study on Long-term Effects of Low Dose Radiation
as a Basis of Risk Assessment]
・ 発表原著論文 15
- II. 放射線発がんの遺伝的要因に関する研究 (荻生俊昭、石井洋子、島田義也、
(西村まゆみ、辻秀雄、柿沼志津子、杉村勇、中田有紀子、小林森、佐渡
敏彦、若菜茂晴、奥本正昭、鈴木文男、樋野興夫) 28
[Effects of Genetic Factors on Radiation Carcinogenesis]
- III. 放射線発がんの分子機構に関する研究 44
(辻秀雄、石井洋子、勝部孝則、鵜飼秀樹、渡邊文晶、西森千春)
[Studies on Molecular Mechanisms of Radiation Carcinogenesis]]

序

本研究グループは「低線量放射線影響評価のための実証的研究並びに発がん機構に関する研究」を研究課題として、平成8年度に新しい組織として発足し、平成12年までの5年間、時限組織として研究を行った。

低線量・低線量率被ばくの影響については社会の関心が高く、また原子力発電所や再処理施設などで働く労働者など、低線量・低線量率放射線の被ばくを受ける可能性のある人における影響をいかに評価するか、放射線管理の基準をいかに設定するかなどは重要な課題である、にもかかわらず、その実態はほとんど解っていない。このため、我が国においては、原子力安全委員会は平成8年、環境放射能安全研究年次計画（平成8年度～平成12年度）を立案するに当たり、低線量放射線の生物影響研究を生物影響研究の大きな柱とした。また、平成13年度からの環境放射能安全研究年次計画（平成13年度～平成17年度）においては、新たに制定した重点研究分野に取り上げられており、低線量放射線生物影響研究の重要性は認識されている。

本研究グループの発足に当たっては、低線量放射線の生体影響のうち、最も重要である晩発影響について研究を進めることとした。研究の推進に当たっては、低線量放射線被ばくの長期的影響の実態を詳細かつ包括的に把握することが、まず重要であると考え、長期動物実験による実証的研究を進めることとした。また、これらの晩発影響発生の背景にある法則性は何なのか、どのような機構によりがんが発生するのかを知ることは、リスクを総括的に考える上で必要であると考え、発がんリスクの大きさを修飾する遺伝的要因、あるいは放射線による発がん機構の基礎的な情報を得ることとした。これらの研究は3サブグループ体制で進められた。

第1サブグループは、「低線量放射線影響評価のための実証的研究」を研究課題とし、低線量放射線の影響評価の基礎資料として重要な実験データを求め、リスク解析のための数理モデルを開発し、その有用性を実証することを目標とした。このため、照射されたマウスを終生飼育し、発生したがん及び非がん病変についての実験データを収集し、(1) 幼若期の低線量被ばくによる長期的影響についての発現の時間的パターンを含めた包括的把握、(2) 幼若期における反復照射の影響の解析、(3) 長期的影響に関する発がん感受性の年齢依存性についての検討を進めた。

第2サブグループは、「放射線発がんの遺伝的要因に関する研究」の研究課題のもとに研究を進めた。がんが発生しやすいか否かは個体差があるが、それに関与する遺伝子はどのようなものがあるか、その作用とどのようながんの発生が関連するのかを把握すること

を目標とした。このため、放射線発がん感受性の異なる系統のマウスや、放射線高感受性マウスを用いて、放射線発がん感受性に関わる遺伝的要因を解析するとともに、各系統マウスの放射線や化学物質による発がんの特性（発生率、潜伏期間、標的臓器、腫瘍型など）の解析を行った。

第3サブグループは「放射線発がんの分子機構に関する研究」を課題とし、野生型マウスと放射線高感受性 Scid マウスに放射線で誘発された胸腺リンパ腫を用い、その中から発がんに関与する遺伝子群を同定し、それら遺伝子の変異と発がんにおける役割を明らかにし、放射線発がんの過程を明らかにすることを目標とした。このため、放射線により Scid マウスに誘発された胸腺リンパ腫から培養細胞株を多数樹立し、ヒトT細胞リンパ腫発生に関与する遺伝子群から Scid マウス発がんに関与している遺伝子群を同定し、その突然変異を同定し、発がんにおける当該遺伝子の役割を解析する研究を進めた。

それぞれの研究成果は、以下の各サブグループの報告を読んできたいが、特記すべきこととして、第1サブグループにおける幼若マウスを使った生涯リスクの解析は重要な知見を与える研究であるとして、国際的にも高い評価を得ていることがあげられる。また、第2サブグループでは、放射線誘発胸腺リンパ腫の LOH 解析から、Ikaros 遺伝子の変異は放射線発がん特異性が高いことを示したこと、Scid マウスにおいて胸腺リンパ腫発生の線量効果関係を明らかにしたこと、第3研究グループでは、Scid マウスの胸腺リンパ腫発生において Nochl 遺伝子が重要な役割を果たしていること、Nochl 遺伝子の部分的欠失が Scid 変異に関係して生じることを明らかにしたことは大きな成果である。

これらは5年間という短い期間での研究であり、未だ成果をまとめている途中ではあるが、その成果は、将来的に放医研の知的財産として評価され、また、独立行政法人として新に発足した放医研のプロジェクト研究において、更に発展する基礎となるものと考えている。

皆様のご批判と今後へのアドバイスを頂ければ幸甚である。

総合研究官 荻生 俊昭

I 低線量放射線影響評価のための実証的研究

佐々木俊作 (放射線医学総合研究所第3研究グループ)

Experimental Study on Long-term Effects of Low Dose Radiation as a Basis of Risk Assessment

Shunsaku Sasaki

Low-dose Radiation Effects and Carcinogenesis Research Group,
National Institute of Radiological Sciences

This study was aimed at elucidation of long-term effects of various doses of gamma rays exposed during the intrauterine, neonatal or juvenile period in comparison with those after irradiation during the adult period. Female B6C3F1 mice were irradiated during the intrauterine, neonatal, juvenile, young adult or middle-age adult period with Cs-137 gamma rays. All the mice were allowed to live out entire life span under a specific pathogen-free condition, and mean life span, age-specific mortality and lifetime incidences of neoplasms were examined for each experimental group. Using the life shortening as a comprehensive measure of long-term effects, age-dependence of susceptibility for long-term effects was analyzed. Mice of the neonatal and juvenile period were shown to be more susceptible for induction of over-all long-term effects than mice of the intrauterine and adult period. Temporal variation of the age-specific mortality was apparently not independent on age at the time of irradiation. Analysis of age-associated change of susceptibility for induction of neoplasms resulted in the conclusion that age dependence of susceptibility is inherent for each type of neoplasm. Mice of the late fetal and neonatal period were shown to be highly susceptible for induction of tumors of the endocrine glands. Statistically significant increase in incidence was detected for induction of pituitary tumors and ovarian tumors after irradiation at 7 days of age with 10 cGy.

I. 緒論

この研究は胎生期、新生児期、小児期の被曝による長期影響の特徴を成体期被曝の場合と対比しながら明らかにすることを目的とする。人類集団における放射線被曝の影響に関する疫学研究の結果は胎生期ならびに小児期は放射線発がんに関して著しく感受性が高いことを示唆している。しかしながら追跡期間が十分ではないので生涯リスクを推定できないのが現状である。胎生期ならびに小児期の被曝による発がんに関するこれまでの疫学研究と実験研究の概要について述べる。

妊娠中のX線被曝と小児がん過剰発生との相関を初めて示したのはStewart et al.(1958)によるイギリスにおける大規模な調査である¹⁾。同様の相関はMacMahon(1962)によるアメリカにおける調査においても認められた²⁾。一方、原爆胎内被曝者においては小児がんの過剰発生が見られないことがJablon and Kato(1970)により報告され³⁾、胎内被曝と小児がんの間に因果関係があるかどうかについて論争が行われた。初期の実験研究においては胎生期照射に

よる発がん効果は認められなかった。Uptonらはマウスの胎内被曝による長期影響に関する実験を行い、白血病ならびに固形腫瘍の発生率は全く増加しなかったと報告している⁴⁾。Cahill et al.(1975)はトリチウム水を飲料水に入れて全妊娠期間にわたって経口投与する実験を行った⁵⁾。母親には乳腺腫瘍が発生したが子供には発生しなかった。胎生期のラットは成体期よりも乳腺腫瘍誘発に関して感受性が低いことを示している。1977年の国連科学委員会(UNSCEAR)報告は「実験動物の胎生期が放射線発がんに関して感受性を持つかどうかはむしろ疑わしい」と結論した⁶⁾。しかし1973年にWalinder and Sjodenは妊娠後期のマウスへの放射性ヨウ素の投与により子供に甲状腺腫瘍が誘発されることを示している⁷⁾。発生率は子供の方が母親よりも高かった。これは上述の乳腺腫瘍の場合と逆である。しかし放射性ヨウ素は甲状腺に存在し続けるので、有効な照射の時期がいつであるかは明確でない。胎生後期のマウスへの照射により腫瘍発生率が増加することを明確に示したのはSasaki et al.(1978)の論文が最初で

ある^{8,9)}。すなわち、胎生16-18日齢のX線照射により下垂体、卵巣、肝、肺の腫瘍の発生率が増加し、胎生12日齢の照射によっては腫瘍発生率増加は認められなかった。Schmahl and Kriegel (1980)は胎生後期のX線分割照射により卵巣腫瘍が誘発されることを示した¹⁰⁾。また、Schmahl(1984)はSasaki et al.の実験を追試し、胎生12日齢の照射によっては腫瘍発生率は増加しないことを確認した¹¹⁾。この研究グループはラットを用いた実験も行っており、妊娠後期におけるストロンチウム 90の投与により子供に髄膜腫と下垂体腫瘍が誘発されたことを報告している(Schmahl and Kollmer, 1981)¹²⁾。Kusama and Yoshizawa (1982)はマウスの胎生15日齢にX線を照射し腫瘍発生率を検討したが増加を認めなかった¹³⁾。胎生15日齢は16日齢以後よりも感受性が低いことを意味していると思われる。Covelli et al. (1984)はマウスの17日齢に中性子線を照射した後に固形腫瘍の発生率が増加したと報告している¹⁴⁾。Sasaki and Kasuga (1986)は胎生17日齢におけるガンマ線190、380、570 cGyの効果を出生後0日齢照射の場合と比較した。いずれの場合にも下垂体腫瘍、卵巣腫瘍、肝腫瘍、肺腫瘍、骨腫瘍ならびにリンパ腫が誘発されるが、卵巣腫瘍、肝腫瘍、骨腫瘍、リンパ腫の発生率は新生児期照射グループの方が高かった。また、平均寿命は新生児期照射群の方が明らかに短かった¹⁵⁾。1986年UNSCEAR報告は1977年報告の結論を修正して、胎生期の動物は放射線発がんに関して感受性を持つと結論した¹⁶⁾。1990年代においても胎生後期のマウスは放射線発がんに関して感受性があることを示す実験結果が発表された。Di Majo et al (1990)は中性子線により肝腫瘍が誘発されること¹⁷⁾、Nitta et al. (1992)はX線ならびに中性子線により下垂体腫瘍などが過剰発生することを明らかにした¹⁸⁾。Devi and Hossein (2000)は胎生後期のX線25 cGy照射により卵巣腫瘍の発生率が増加したと報告している¹⁹⁾。Benjamin et alによるビーグル犬を用いた約25年を要した大規模実験がこのほど終了した。胎生55日齢のガンマ線照射により甲状腺腫瘍やリンパ性白血病が誘発されることを明らかにした²⁰⁻²²⁾。このように実験動物の胎生後期は放射線発がんに関して感受性を有することが明らかである。器官形成期以前の照射により腫瘍発生率が増加したという報告はない。原爆胎内被爆者においてがんの発生率が増加していることを初めて報告したのは1988年のYoshimoto et al.の論文である²³⁾。増加が認められたのは小児がんではなく成人がんである。その後9年を経たDelongchamp et al. (1997)の論文によれば症例数はあまり増加していないが発生率が高いことは確かであり、出生後5才未満での被爆者における発生率と差が認められないということである²⁴⁾。Doll and Wakefordは1997年に胎内被曝による発がんについて総説を発表している²⁵⁾。診断用X線被曝と小児がん過剰発生の相関はまちがいないと述べており、1 cGyにより相対リスクが約1.4になるという従来から

の数値は正しいと述べている。ただし、妊娠の最後の3か月間(third trimester)が感受性が高いことは確実であると述べていることはこれまでとは異なる。動物実験の結果を取り入れているようである。胎生期が放射線発がんに関して著しく感受性が高いかどうかについてはさらに検討が必要である。

次に小児期の被曝による放射線発がんの特徴について疫学研究ならびに実験研究によりこれまでに明らかになっていることの要点をまとめる。Lindop and Rotblat (1962)はX線による平均寿命短縮効果に関する感受性の年齢依存性をマウスの広い年齢幅について検討し、幼若期は成体期よりも明らかに高感受性であることを示した²⁶⁾。しかし腫瘍発生率を調べたのは若い成体期についてのみであったので発がんに関する年齢依存性についてはデータを提供していない。Vesselinovitch et al. (1971)はマウスの誕生直後から42日齢までの期間の発がんに関する感受性を検討した²⁷⁾。このような短い期間でも感受性が変動することを示したが、飼育期間が短いのでこの研究は限定された意義しか持ち得ない。放射線による発がん効果は長期間にわたって持続するのでこれを把握するためには長期飼育できれば終生飼育が必要である。終生飼育実験により放射線発がんに関する感受性の年齢依存性を調べた研究は意外に少ない。Upton et al.の論文⁴⁾やCovelli et al.の論文¹⁴⁾はこのような方法による研究である。我々は終生飼育実験により多種類の腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性を新生児期照射による発がんの特徴に重点を置きつつ広範囲の年齢について検討した²⁸⁻³⁰⁾。ここでは実験研究の結果と疫学研究の結果を対比して腫瘍の種類別に述べる。疫学研究の中では広い年齢幅の知見が含まれていることにおいて原爆被爆者の追跡調査の結果³¹⁻³⁴⁾が圧倒的に優れている。白血病は骨髄性ならびにリンパ性のいずれも小児期に原爆に被爆した人々において過剰発生している。実験研究の結果もこれと一致している。Upton et al.の実験では骨髄性白血病は誕生直後の照射によっては誘発されないが14日齢以後の照射によって過剰発生している。Covelli et al.は3か月齢の照射により誘発され19か月齢の照射によっては誘発されないことを示している。我々の実験においても骨髄性白血病は新生児期の照射によっては発生せず、35日齢以後の照射により誘発されている。マウスの新生児期の発生段階はヒトの胎児期に対応していることには注意が必要である。これについては後で論議する。一方、リンパ性白血病はマウスの新生児期や胎生後期の照射によっても誘発される。感受性が高い時期がより早い時期であるといえる。小児期の被曝により誘発されやすい腫瘍の一つに甲状腺腫瘍がある。原爆被爆者についての調査結果は明確にこれを示している。また、胸腺肥大の治療照射を小児期に受けた人々や頭部真菌症の治療のためにX線照射を小児期に受けた人々において甲状腺腫瘍が発生している³⁵⁻³⁷⁾。被曝の時期が若ければ若いほど感受性が高いことが明らかになっている。チェルノブイリ原発事故時に小児期にあっ

た人々において甲状腺癌が多発していることが UNSCEAR2000年報告にまとめられている³⁸⁾。これは放射性ヨウ素の取り込みによる甲状腺の照射に起因している。マウスにおいては胎児への放射性ヨウ素の投与によっても甲状腺腫瘍が起こることは上述の通りである。また、ビーグル犬を用いた Benjamin et al. による実験においても新生児期のガンマ線照射により甲状腺腫瘍が誘発されている。小児期被曝により誘発されやすい重要な癌の一つに乳癌がある。原爆被爆者についての調査結果は Tokunaga et al. (1994) により報告されている³⁹⁾。Modan et al. (1989) による頭部真菌症の治療のためにX線照射を受けた子供達についての調査は小児期は放射線による乳癌誘発に関して著しく感受性が高いことを示している⁴⁰⁾。ラットでは誕生後数日においてすでに感受性を有するようになっていくことが示されている (Huggins and Fukunishi, 1963)⁴¹⁾。上述のようにラットの胎児期は乳腺腫瘍誘発に関して感受性が低いことが明らかになっている。感受性が最高となるのは新生児期ではなく、ラットでは思春期前後である。小児期は内分泌器官や内分泌系の支配を強く受ける器官における放射線による発がんに関して感受性が高いと言えるかもしれない。マウスやラットでは新生児期や胎児期の照射により下垂体腫瘍が誘発される。この腫瘍が人類においても誘発されやすいかどうかは明確でない。しかし、顔面の血管腫の治療を目的として小児期に放射線照射を受けた人々において脳腫瘍と共に下垂体腫瘍の発生率が増加していると報告されている (Karlsson et al., 1998)⁴²⁾。脳腫瘍も小児期の被曝により誘発されやすい腫瘍である。頭部真菌症の治療に伴いX線に被曝した子供においても脳腫瘍が過剰発生した。実験動物ではマウスは感受性が低いがラットやビーグル犬では誘発されている。卵巣腫瘍はマウスにおいて放射線被曝後に高い頻度で誘発される腫瘍である。新生児期から若い成体期が感受性が高く中年成体期の照射によっても発生する。最も感受性の高い時期は思春期前後と見られる。原爆被爆者において卵巣腫瘍の過剰発生が初めて報告したのは1987年の Tokunaga et al. の論文である⁴³⁾。感受性の年齢依存性は明確でないといわれているが、現在では卵巣腫瘍の発生率増加は明白である。我々の実験ではマウスの新生児期、胎生後期ならびに思春期に近い小児期の照射により骨腫瘍の発生率が増加した。原爆被爆者における発生率増加は報告されていないが、小児がんの放射線治療後や骨髄移植を伴う小児白血病治療のための放射線全身照射の後に骨腫瘍が発生している⁴⁴⁾。我々は新生児期のマウスへの照射により肝腫瘍が高い頻度で誘発されることを明らかにした。この結果は Maisin et al. (1996) の実験によっても確認されている⁴⁵⁾。Cologne et al. (1999) は原爆被爆者において肝細胞癌の発生率が高いことを報告している⁴⁶⁾。しかし発生率が増加しているのは若い成人期において被曝した人々であって小児期において被曝した人々ではない。この相違については後で検討する。

小児期が放射線発がんに関して感受性が高いことを示唆する知見は少なくないが、原爆被爆者の場合であっても追跡期間はまだ十分ではなく生涯リスクを正確に推定できないことが放射線リスク評価における重要な問題として残されている。特に、固形がんについては潜伏期が長いので生涯リスク推定が困難である。もしも相対リスクが時間的に一定であれば相対リスクモデルにより推定できるのであるが、小児期被曝の場合には相対リスクは時間と共に減少することが示されている。Kellerer and Barclay (1992) は age-attained model というリスクプロジェクションモデルを提唱した⁴⁷⁾。このモデルはある特定の年齢における固形がんの発生率は線量に依存するが被曝時年齢には依存しないというモデルである。このモデルが正しければ、成年期被曝のデータから小児期被曝によるリスクを推定できることになる。固形がんの誘発に関して感受性は年齢によらずほぼ等しいというわけであるが、これが正しいかどうか疑問である。疫学研究によってこれを検証できないので、実験研究により検証することは意義があると考えられる。

低線量影響評価における重要な問題の一つは線量効果関係の形状である。原爆被爆者における固形癌の誘発に関する線量効果関係は線形であると報告されている。発がんのプロセスは多段階的であり、複数の遺伝子に突然変異が起こる必要があるとされている。もしもそれらの突然変異の全てを放射線により引き起こすのであれば、線量効果関係は線量の累乗に比例するはずであり下に凸となる曲線となるはずである。しかし実際には線形であることについて Pierce and Mendelsohn (1999) は放射線発がんに必要な突然変異のうちたった一つの突然変異を起こすのであって、その他の突然変異は自然に起こると考えれば説明できると述べている⁴⁸⁾。しかし実験研究の結果は固形腫瘍の誘発に関する線量効果関係は多様であることを示している^{49, 50)}。Pierce and Preston (2000) は固形がんの線量効果関係を再検討し、直線的比例関係はかなり低い線量まで成り立つことを示している⁵¹⁾。しかし、線量効果関係の形状を決定するさまざまな要因については、発がんのメカニズムとも関連するので、さらに検討する必要があると考えられる。

II. 材料と方法

この実験において用いたマウスは B6C3F1 の雌である。C57BL/6JNrs の雌と C3H/HeNrs の雄を 6 週齢において受取り飼育施設において雑種一代を生産した。両系統は本研究所において SPF 動物として維持されているものである。B6C3F1 マウスも SPF 状態において終生飼育された。胎生 17 日齢、出生後 0、7、35、105、365、550 日齢において ¹³⁷Cs のガンマ線を照射した。線量は 10 cGy から 570 cGy の範囲である。線量率は実験を行った時期により異なるが、Table 3 に示す実験では 80.3 cGy/min であった。それぞれの実験においてはその都度対照グループを設置した。この報告においては二つの対照グループのデータが示

されている。個体数はそれぞれ885と1003である。平均寿命は両群の間で差がなかった。照射グループのサンプルサイズは低線量の場合に大きく、高線量の場合には相対的に小さく設定した。

データ解析に用いた統計学的方法は、Student's *t*-test、 χ^2 -test、Fisherの直接確率法などである。直線回帰ならびに曲線回帰は最小2乗法を用いた。数理モデルの選定は赤池の情報量基準(AIC)により行った。その他の方法については実験結果の中で述べる。

III. 結果

1. 感受性の年齢依存性

Table 1に平均寿命短縮ならびに腫瘍誘発に及ぼす照射時年齢の影響に関するデータを示す。線量は190 cGyである。平均寿命短縮は単純ではあるが放射線長期影響の鋭敏かつ包括的尺度である。550日齢に照射されたグループの平均寿命は対照グループと差がないが、その他のグループの平均寿命は有意に短縮した。最も大きな短縮は35日齢ならびに0日齢に照射されたグループに見られた。105日齢に照射されたマウスにおいても明確な寿命短縮が認められたが、0日齢や35日齢被曝の場合に比べれば小さい。胎生17日齢照射グループにおいても平均寿命は短縮した。しかしその短縮は0、35、105日齢照射グループにおける短縮に比べて小さいといえる。この結果は胎生後期の照射による長期影響は相対的にあまり大きくないことを示している。365日齢被曝グループの平均寿命も有意に短縮したが、短縮効果はより若い年齢のそれに比べてより小さかった。

個体あたりの腫瘍数がこの表にまとめられている。厳密に言えば、固形腫瘍の種類数の平均値である。放射線照射を受けない対照群においては0.540という数値である。190 cGyのガンマ線照射によりこれが増加している。放射線の発がん作用を意味するものである。全ての照射グループにおいてこの数値が増加している。550日齢照射グループにおいては平均寿命は短縮しなかったが、固形腫瘍数は増加した。この年齢の照射によっても発がん効果があることを示すものである。しかし550日齢の照射の発がん効果はより若い年齢の照射に比べればはるかに小さいものであることが明らかである。0日齢照射グループにおける平均固形腫瘍数は1.396という極めて大きな数値であった。平均値が1をはるかに超えるということは非常に大きな発がん効果であるということである。35日齢の照射も大きな発がん効果を持ち、固形腫瘍数の平均値は1.325に達した。マウスの性成熟期は約42日齢であるので、35日齢はまだ小児期に対応する時期である。若い成体期である105日齢の照射の発がん効果はより小さく、平均腫瘍数は0.864であった。胎生17日齢の放射線照射も明らかに発がん効果を持ち、腫瘍数は0.989であった。胎生17日齢のマウスの放射線発がんに関する感受性は0日齢や35日齢のマウスよりは低い、若い成体期のマウスとほぼ同等であって中年成体期よりはるかに高いといえる。365日齢ならびに550日齢に照射されたグ

ループにおける平均固形腫瘍数はそれぞれ0.709、0.663であった。

次に個別の腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性について述べる。下垂体腫瘍は高齢期に発生する致死的な腫瘍である。自然発生率はかなり高く8.0%である。胎生17日齢の190 cGy照射により31.2%に達した。0日齢照射グループの発生率は24.9%であり、新生児期も感受性を有していることが明らかである。一方、35日齢以後の照射は下垂体腫瘍の発生率を増加させなかった。卵巣腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性は下垂体腫瘍の場合とは全く異なる。自然発生率は1.8%であり、全ての照射グループにおける発生率はこれを有意に上回った。最高の発生率は35日齢照射グループに見られ、38.8%に達した。0日齢ならびに105日齢も感受性が高く、発生率はそれぞれ30.3、24.7%であった。胎生17日齢は相対的に感受性が低く、発生率は7.5%であった。365日齢ならびに550日齢照射グループの発生率はそれぞれ7.1、6.7%であった。肝腫瘍は若い時期の照射により誘発されやすい腫瘍の一つである。自然発生率は19.7%であり、0日齢照射グループの発生率は48.0%であった。35日齢照射グループの発生率は31.3%であり、発生率増加は統計学的に有意であった。その他のグループの発生率は対照グループと差がなかった。ハーダー氏腺腫瘍誘発に関する感受性の年齢依存性はこれまでに述べた3種類の腫瘍の場合のいずれとも異なっている。自然発生率は1.8%であり、発生率が増加したのは35日齢照射グループと105日齢照射グループのみであった。胎生期ならびに新生児期の照射によっては発生率は増加しなかった。これらの結果から誘発に関する感受性の年齢依存性はそれぞれの腫瘍に特有であると結論できる。

2. 年齢別死亡率に及ぼす照射時年齢の影響

対照グループにおける年齢別死亡率は約850日齢まで指数関数的に増加している。その後増加率はゆるやかになる。年齢別死亡率はリスクの対象となるマウス日あたりの死亡数として表現している (Table 2)。照射群においてはそれぞれの年齢別死亡率が全て増加している。例えば、胎生17日齢照射グループにおける年齢別死亡率は全ての年齢において増加している。つまり、ある特定の年齢において生き残ったマウスが引き続く期間において死亡する確率は常に対照グループの年齢別死亡率よりも高いことを意味する。年齢別死亡率の生涯にわたる増加は放射線の長期影響の特徴である。平均寿命短縮と年齢別死亡率増加とのあいだには対応関係が認められる。すなわち、年齢別死亡率の増加が最も大きいのは0日齢照射グループと35日齢照射グループである。胎生17日齢照射の効果はより小さい。105日齢すなわち若い成体期の照射も年齢別死亡率をかなり大きく増加させたが、0日齢や35日齢照射の効果よりは小さい。中年成体期照射による年齢別死亡率増加は若い成体期の照射の効果より小さい。550日齢の照射によっては年齢別死亡率増加は認められなかった。年齢別死亡率増加効果は照射時年齢に依存しているこ

とが明らかである。

3. 新生児期照射による固形腫瘍誘発に関する線量効果関係

0日齢のガンマ線0.48、0.95、1.43、1.90、2.38、2.85、3.80ならびに5.70 Gy照射による固形腫瘍誘発に関する線量効果関係を検討した。その結果は別添論文にまとめた。ここではその要点について述べる。平均寿命は0から5.7 Gyの範囲では線量の一次と二次の項を持つ関数に従って短縮するという関係が成り立ち、0から2.85 Gyの範囲では線量に比例して短縮するという関係が成り立っていた。肝腫瘍、下垂体腫瘍、卵巣腫瘍、肺腫瘍ならびに骨腫瘍の発生率に関する線量効果関係を解析した。いずれの線量効果関係も線量の増加に伴う発生率の増加、ピークに達した後の線量の増加に伴う発生率の減少というパターンが見られた。線量の増加による発生率の減少は潜在的癌化細胞に対する致死作用ならびに死因の競合によると考えられるのでこれらを含む数理モデルにより解析した。肝腫瘍、下垂体腫瘍、卵巣腫瘍ならびに肺腫瘍については放射線の誘発効果は線量に比例し、骨腫瘍の誘発に関しては線量の2乗に比例するという解析結果を得た。線量効果関係は得られなかったが、副腎腫瘍、腎臓腫瘍、血管腫ならびに消化管腫瘍の発生率増加が認められた。

4. 放射線に起因する死亡とその発現の時間経過

放射線に起因する死亡を過剰死亡(excess mortality)と読んでいく。放射線照射後の年齢別死亡率の増加は放射線に起因することは明らかであり、これに基づいてそれぞれの年齢における過剰死亡を求めた。これらを累計して生涯過剰死亡を計算した。解析の方法はすでに発表した(Sasaki, 1992)⁵²⁾。Fig. 1に全死因による年齢別死亡率増加に関する線量効果関係と生涯過剰死亡に関する線量効果関係を示す。年齢別死亡率に関する線量効果関係は指数関数がよく適合する。Fig. 1においては年齢別死亡率に関する相対リスクを縦軸にとっている。線量Dにおける相対リスクをRR(D)とすると、 $RR(D) = \exp(aD)$ という関係式が成り立つ。線量Dにおける生涯過剰死亡をEM(D)とすると、 $EM(D) = 1 - \exp(-aD)$ という関係式が成り立つことになる。なお、相対リスクに関する関係式として線量の一次と二次の項を持つ関係式もかなりよく適合するが、指数関数の方がよりよく適合していた。Fig. 2に累積過剰死亡を年齢に対してプロットしている。これは過剰死亡発現の時間経過を表わすものである。この結果から過剰死亡の発現は線量に依存して早くなることが明らかである。

5. 低線量放射線の長期影響

7日齢にガンマ線を10、19、48、95、190、285、380ならびに475 cGy照射し終生飼育し、長期影響を検討した。この実験は以前の実験とは別個に実施されたので、対照群は新たに設置した。サンプルサイズは低線量グループが大きく高線量グループは小さ

く設定した。Table 3に平均寿命、胸腺リンパ腫、下垂体腫瘍ならびに卵巣腫瘍の発生率をまとめた。また、これらに関する線量効果関係をFig. 3に示す。対照群の平均寿命は871.1日であり、10 cGy照射グループのそれは857.3日であった。この差は統計学的に有意であった。胸腺リンパ腫の発生率は190 cGyまでは増加せず、より高い線量を被曝したグループにおいて増加した。つまり、低線量によっては増加しなかった。下垂体腫瘍の自然発生率は8.1%、10 cGy照射グループの発生率は11.6%であった。この増加は統計学的に有意である。卵巣腫瘍の対照グループにおける発生率は2.2%、10 cGyにおいては14.7%であった。この差は十分に有意であった。このように10 cGyの照射による影響が検出された。

IV. 考察

Anderson et al.は2000年に発がんに関する感受性の年齢依存性についてのレビューを発表している⁵³⁾。化学物質による発がん重点が置かれているが放射線発がんについても広くまとめて考察している。胎生期や小児期が特別に感受性が高い場合があることをがんの種類別にまとめ、がんの予防の観点から考えて胎生期や小児期の特徴についてはさらに研究が必要であると述べている。我々がこれまでに発表した論文はこのレビューの中で繰り返し引用されている。グループ研究として実施された今期の研究においては従来知見を確認すると共に新たな知見が得られた。特に、新生児期の低線量照射による長期影響に関しては重要な進展があったといえよう。発がんに関する感受性の年齢依存性はそれぞれの腫瘍に特有であるが、平均寿命短縮や固形腫瘍の個体あたりの平均数という包括的尺度で比較すると、放射線による長期影響に関して感受性が高いのはここに示した実験における年齢区分では0日齢、7日齢ならびに35日齢である。35日齢は性成熟期にさほど遠くない小児期に対応している。0日齢と7日齢はマウスでは新生児期であるが、その発生段階はヒトの胎生後期、より正確にはthird trimester、に対応している。マウスとヒトでは誕生時の発生段階が大きく異なっている⁵⁴⁾。動物実験の結果の解釈にはこの点に配慮する必要がある。化学物質による発がんの場合にはその代謝が問題となるので胎盤が存在するかどうかが決定的な意味を持つであろう。しかし放射線の外部照射の場合にはこの問題はない。マウスの新生児期が放射線による長期影響に関して感受性が高いという事実はヒトの胎生期のthird trimesterが感受性が高いことを強く示唆していると考えている。しかしこの点についてはさらに検討が必要かもしれない。マウスの胎生17日齢の照射によって長期影響が引き起こされることを再確認した。新生児期や小児期に比べれば感受性がより低いといえる。胎生17日齢はマウスでは胎生後期であるが、その発生段階はヒトの胎生期のsecond trimesterに対応しているといつてよいであろう。従って、ヒトではsecond trimesterは放射線の長期影響に関して感受性を持つが後続の発

生段階に比べれば感受性はより低いのではなかろうかと推察している。

マウスの新生児期は下垂体腫瘍ならびに卵巣腫瘍の誘発に関して著しく感受性が高いことが明らかになった。7日齢のガンマ線10 cGyの照射によってこれらの腫瘍の発生率が統計学的に有意に増加した。ヒトにおいては小児期が甲状腺腫瘍の誘発に極めて感受性が高いことが示されており、実験動物においても同様である。これらの事実から幼若期は内分泌器官の腫瘍の誘発に関して感受性が高いことが一般的特徴であると結論できると考えられる。代表的内分泌系攪乱物質であるdiethylstilbestrol (DES)をマウスの胎生後期に投与すると下垂体腫瘍が高い頻度で誘発され、より低い頻度で卵巣腫瘍が発生することが示されている⁵⁵⁾。我々の実験では下垂体腫瘍は胎生17日齢の照射により最も高い頻度で発生した。マウスの胎生後期や新生児期の照射により内分泌系の攪乱が引き起こされているのではないかと思われる。これにより長い潜伏期の後に腫瘍が発生することはもちろん重要であるが、非がん性の長期影響としての内分泌系の攪乱が起こっているとすればこれも極めて重要である。今後この点について徹底的に研究する必要があると考える。

マウスの新生児期は肝腫瘍の誘発に関して感受性が高いことは今回の実験においても確認された。しかし肝腫瘍の誘発に関する感受性については大きな種間差があることを指摘しておきたい。ラットは放射線による肝腫瘍の誘発に関して極めて感受性が低いのである。放射線単独ばかりでなく部分肝切除と組み合わせても誘発されないし、新生児期に照射しても誘発されない^{56, 57)}。自然発生率は一般にマウスではかなり高くラットでは低い。マウスにおいてはHa-rasの突然変異を持つ細胞のクローンが若い年齢において認められることが見い出されている⁵⁸⁾。全ての細胞にではなく一部の細胞に自然突然変異が起こるという点が興味深い。ラットではこのようなことは報告されていない。この自然突然変異が肝腫瘍の自然発生率の差と放射線による誘発に関する感受性の差に関係している可能性がある。ラットにおける化学物質による肝腫瘍誘発の場合には放射線はプロモーターのように作用することがある。我々はラットにフルオレニルアセタミドを投与して後4週間を経てからX線を照射すると肝腫瘍誘発効果が顕著に大きくなることを見い出している⁵⁹⁾。このような種間差についての研究から放射線発がんのメカニズムに関する重要な事実が得られるかもしれない。

放射線照射後長期間にわたり年齢別死亡率が増加し続けることを示した。この増加は明らかに照射時年齢により異なっている。従って、年齢別死亡率増加は線量に依存するが照射時年齢には依存しないというage-attained modelには全く適合しないといえる。疫学データによってはこのモデルが正しいかどうかを判定することはできない。その理由は小児期や若齢期被曝後の年齢別死亡率の変動に関する疫学データはまだ十分ではないためである。このモデルを用

いれば生涯リスクを過小評価することになるであろう。一方、相対リスクモデルを用いれば過大評価することになる。生涯リスクを正確にプロジェクトするためには感受性の年齢依存性を組み込む必要がある。腫瘍の種類によって感受性の年齢依存性が異なることが重要である。

腫瘍誘発に関する線量効果関係の形状が腫瘍の種類により異なることを示した。胸腺リンパ腫誘発に関する線量効果関係にはしきい値があるように見える。肝腫瘍、下垂体腫瘍、卵巣腫瘍、肺腫瘍の誘発に関する線量効果関係は上に凸であるが、潜在的腫瘍細胞の誘発効果は線量に比例しているという解析結果を得た。固形腫瘍であっても骨腫瘍の場合には誘発効果は線量の2乗に比例していると思なされる。これらは新生児期のマウスへの場合である。ラットの腎臓へのX線局部照射による腫瘍誘発には非常に大きな線量を必要とし、その線量効果関係には明らかなきい値があるようである⁶⁰⁾。一方、遺伝的に負荷のあるEkerラットにおいては腎腫瘍の誘発に関する線量効果関係は線形であって感受性が高いと報告されている⁶¹⁾。これらの事実は発がんに関連する遺伝子に変異があると放射線発がんに関与する感受性が高くなることを示している。年齢により発がんに関する感受性が異なることを述べたが、線量効果関係の形状も照射時年齢により異なるようである。成体期のマウスを用いたUllrich and Storerの実験では肺腫瘍、下垂体腫瘍、ハーダー氏腺腫瘍の誘発に関する線量効果関係はlinear-quadratic (L-Q)であると報告されている⁴⁹⁾。若い成体期のマウスへの照射による肝腫瘍の誘発に関する線量効果関係もL-QであるとDi Majo et al.が報告している⁶²⁾。Mendelsohnは固形腫瘍の誘発に必要な複数の遺伝子変異のうち放射線はたった一つの変異を起こすだけであってその他は自然に起こるという興味深い仮説を提唱しているが、これが一般性があるかどうかはむしろ疑問である。固形腫瘍の誘発に関する線量効果関係はここに述べたように条件により異なっている。これらの変更要因と線量効果関係の形状の関係について詳細に知る必要がある。

放射線に被曝した集団における放射線に起因する死亡の分率、すなわち過剰死亡分率、に関する線量効果関係を示した。その数値はかなり大きなものである。例えば0.95 Gy被曝グループでは37%が放射線被曝に起因して死亡したという結果である。全死因を問題としているので、がんばかりでなくもし起こってればがん以外の死因も含まれる。過剰死亡分率は年齢別死亡率増加から求めるものであり、十分な客観性がある。放射線の長期影響の包括的尺度の一つとして活用できると考える。過剰死亡発現の時間的パターンはFig. 2に示したようにシグモイドである。これがどのような関数により表現できるかについては目下検討中である。

今期の研究において新生児期の反復照射の効果の実験も行いその結果を得ている。しかしここでは述べなかつた。その理由は解析が完了していないから

である。できるだけ早く取りまとめて論文として発表したいと考えている。

研究発表

- 1) Sasaki, S. and Fukuda, N.: Dose-response relationship for induction of solid tumors in female B6C3F1 mice irradiated neonatally with a single dose of gamma rays. *J. Radiat. Res.*, **40**, 229-241, 1999.
- 2) Sasaki, S.: Age-dependence of susceptibility for long-term effects of ionizing radiation. In: "Radiation and Homeostasis" (Sugahara, T., ed.), Elsevier, Amsterdam, (in press).

文 献

- 1) Stewart, A., Webb, J. and Hewitt, D.: A survey of childhood malignancies. *Br. Med. J.*, **1**, 1495-1508, 1958.
- 2) MacMahon, B.: Prenatal X-ray exposure and childhood cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **28**, 1173-1191, 1962.
- 3) Jablon, S. and Kato, H.: Childhood cancer in relation to prenatal exposure to atomic bomb radiation. *Lancet*, **2**, 1000-1003, 1970.
- 4) Upton, A. C., Odell, T. T. Jr. and Sniffen, E. P.: Influence of age at time of irradiation on induction of leukemia and ovarian tumors in RF mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **104**, 769-772, 1960.
- 5) Cahill, D. F., Wright, J. F., Godbold, J. H., Ward, J. M., Laskey, J. W. and Tompkins, E. A.: Neoplastic and lifespan effects of chronic exposure to tritium. II. Rats exposed in utero. *J. Natl. Cancer Inst.*, **55**, 1165-1169, 1975.
- 6) United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: Sources and Effects of Ionizing Radiation. Report to the General Assembly with Annexes. United Nations, New York, 1977.
- 7) Walinder, G. and Sjoden, A.: Late effects of irradiation on the thyroid gland in mice. III. Comparison between irradiation of foetuses and adults. *Acta Radiol. Ther. Phys. Biol.*, **12**, 201-208, 1973.
- 8) Sasaki, S., Kasuga, T., Sato, F. and Kawashima, N.: Late effects of fetal mice X-irradiated at middle or late intrauterine stage. *Gann*, **69**, 167-177, 1978.
- 9) Sasaki, S., Kasuga, T., Sato, F. and Kawashima, N.: Induction of hepatocellular tumor by x-ray irradiation at perinatal stage of mice. *Gann*, **69**, 451-452, 1978.
- 10) Schmahl, W. and Kriegel, H.: Ovary tumors in NMRI mice subjected to fractionated X-irradiation during fetal development. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **98**, 65-74, 1980.
- 11) Schmahl, W.: Long-term effects after prenatal irradiation. In: "Effects of Prenatal Irradiation with Special Emphasis on Late Effects" (Streffer, C., Patrick, G. eds.), Commission of the European Communities, Brussels, pp. 89-99, 1984.
- 12) Schmahl, W. and Kollmer, W. E.: Radiation-induced meningeal and pituitary tumors in the rat after prenatal application of strontium-90. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **100**, 13-18, 1981.
- 13) Kusama, T. and Yoshizawa, Y.: The carcinogenic effects of fetal and postnatal radiation in female mice. *J. Radiat. Res.* **23**, 290-297, 1982.
- 14) Covelli, V., Di Majo, V., Bassani, B., Rebessi, S., Coppola, M. and Silini, G.: Influence of age on life shortening and tumor induction after X-ray and neutron irradiation. *Radiat. Res.*, **100**, 348-364, 1984.
- 15) Sasaki, S. and Kasuga, T.: Life shortening and carcinogenesis in mice irradiated at the perinatal period with gamma rays. In: "Life-Span Radiation Effects Studies in Animals: What Can They Tell Us" (Thompson, R. C. and Mahaffey, J. A., eds.), Nat. Tech. Info. Service, U. S. Dept. of Energy, Springfield, Virginia, pp. 357-367, 1986.
- 16) United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: Genetic and Somatic Effects of Ionizing Radiation, Report to the General Assembly with Annexes. United Nations, New York, 1986.
- 17) Di Majo, V., Coppola, M., Rebessi, S. and Covelli, V.: Age-related susceptibility of mouse liver to induction of tumors by neutrons. *Radiat. Res.*, **124**, 227-234, 1990.
- 18) Nitta, Y., Kamiya, K. and Yokoro, K.: Carcinogenic effect of in utero Cf-252 and Co-60 irradiation in C57BL/6NxC3H/HeF1 (B6C3F1) mice. *J. Radiat. Res.*, **33**, 319-333, 1992.
- 19) Devi, P. U. and Hossain, M.: Induction of solid tumors in the Swiss albino mouse by low-dose foetal irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, **76**, 95-99, 2000.
- 20) Benjamin, S. A., Lee, A. C., Angleton, G. M., Saunders, W. J., Miller, G. K., Williams, J. S., Brewster, R. D. and Long, R. I.: Neoplasms in young dogs after perinatal irradiation. *J. Natl. Cancer Inst.*, **77**, 563-571, 1986.
- 21) Benjamin, S. A., Saunders, W. J., Lee, A. C., Angleton, G. M. and Mallinckrodt, C. H.: Non-neoplastic and neoplastic thyroid disease in beagles irradiated during prenatal and postnatal development. *Radiat. Res.*, **147**, 422-430, 1997.
- 22) Benjamin, S. A., Lee, A. C., Angleton, G. M., Saunders, W. J., Keefe, T. J. and Mallinckrodt, C. H.: Mortality in Beagles Irradiated during Prenatal and Postnatal Development. II. Contribution of Benign and Malignant Neoplasia. *Radiat. Res.*, **150**, 330-348, 1998.
- 23) Yoshimoto, Y., Kato, H. and Schull, W.J.: Risk of cancer among children exposed in utero to A-Bomb radiations, 1950 - 84. *Lancet*, **665-669**, 1988.
- 24) DeLongchamp, R. R., Mabuchi, K., Yoshimoto, Y. and Preston, D. L.: Cancer Mortality among Atomic Bomb Survivors Exposed In Utero or as Young Children, October 1950-May 1992. *Radiat. Res.*, **147**, 385-395, 1997.

- 25) Doll, R. and Wakeford, R.: Risk of childhood cancer from fetal irradiation. *Br. J. Radiol.*, **79**, 130-139, 1997.
- 26) Lindop, P. J. and Rotblat, J.: The age factor in the susceptibility of man and animals to radiation. *Br. J. Radiol.*, **35**, 23-31, 1962.
- 27) Vesselinovitch, W. E., Simmons, E. L., Mihailovich, M., Rao, K. V.N. and Lombard, L.S.: The effect of age, fractionation and dose on radiation carcinogenesis in various tissues of mice. *Cancer Res.*, **31**, 2133-2142, 1971.
- 28) Sasaki, S. and Kasuga, T.: Life shortening and carcinogenesis in mice irradiated neonatally with X rays. *Radiat. Res.*, **88**, 313-325, 1981.
- 29) Sasaki, S.: Influence of the Age of Mice at Exposure to Radiation on Life-Shortening and Carcinogenesis. *J. Radiat. Res.*, **32** Suppl. 2, 73-85, 1991.
- 30) Sasaki, S.: Age-dependence of susceptibility to carcinogenesis by ionizing radiation in mice. *Radiat. Environ. Biophys.*, **30**, 205-207, 1991.
- 31) Shimizu, Y., Kato, H. and Schull, W. J.: Studies of the mortality of A-bomb survivors. Report 9. Mortality, 1950-1985: Part 2. Cancer mortality based on the recently revised (DS86). *Radiat. Res.*, **121**, 120-141, 1990.
- 32) Preston, D. L., Kusumi, S., Tomonaga, M., Izumi, S., Ron, E., Kuramoto, A., Kamada, N., Dohy, H., Matsui, T., Nonaka, H., Thompson, D. e., Soda, M. and Mabuchi, K.: Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part 3. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma. *Radiat. Res.*, **137**, s68-s97, 1994.
- 33) Thompson, D. E., Mabuchi, K., Ron, E., Soda, M., Tokunaga, M., Ochikubo, S., Sugimoto, S., Ikeda, T., Terasaki, M., Izumi S. and Preston, D. L.: Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987. *Radiat. Res.*, **137**, S17-S67, 1994.
- 34) Pierce, D. A., Shimizu, Y., Preston, D. L., Vaeth, M. and Mabuchi, K.: Studies of the mortality of atomic bomb survivors. Report 12, Part I. Cancer: 1950-1990. *Radiat. Res.*, **146**, 1-27, 1996.
- 35) Shore, R. E., Woodward, E., Hildreth, N., Dvoretzky, P., Hempelmann L. and Pasternack, B. S.: Thyroid tumours following thymus irradiation. *J. Natl. Cancer Inst.*, **74**, 1177-1184, 1986.
- 36) Ron, E., Modan, B., Preston, D. L., Alfandary, E., Stovall, M. and Boice, J. D.: Thyroid neoplasia following low-dose radiation in childhood. *Radiat. Res.*, **120**, 516-531, 1989.
- 37) Ron, E., Lubin, j. H., Shore, R. E., Mabuchi, K., Modan, B., Pottern, L. M., Schneider, A. B., Tucker, M. A. and Boice, J. D.: Thyroid cancer after exposure to external irradiation: A pooled analysis of seven studies. *Radiat. Res.*, **141**, 259-277, 1995.
- 38) United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation: Sources and effects of ionizing Radiation. Report to the General Assembly with Annexes. United Nations, New York, 2000.
- 39) Tokunaga, M., Land, C. E., Tokuoka, S., Nishimori, I., Soda, M. and Akiba, S.: Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, 1950-1985. *Radiat. Res.*, **138**, 209-223, 1994.
- 40) Modan, B., Chetrut, A., Alfandary, E. and Katz, L.: Increased risk of breast cancer after low-dose irradiation. *Lancet*, 629-631, 1989.
- 41) Huggins, C. and Fukunishi, R.: Cancer in the rat after single exposures to irradiation or hydrocarbons. Age and strain factors, hormone dependence of the mammary cancers. *Radiat. Res.*, **20**, 493-503, 1963.
- 42) Karlsson, P., Holmberg, E., Lundell, M., Mattsson, A., Holm, L-E. and Wallgren, A.: Intracranial Tumors after Exposure to Ionizing Radiation during Infancy: A Pooled Analysis of Two Swedish Cohorts of 28,008 Infants with Skin Hemangioma. *Radiat. Res.*, **150**, 357-364, 1998.
- 43) Tokuoka, S., Kawai, K., Shimizu, Y., Inai, K., Ohe, K., Fujikura, T. and Kato, H.: Malignant and benign ovarian neoplasms among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-80. *J. Natl. Cancer Inst.*, **79**, 47-57, 1987.
- 44) Curtis, R. E., Rowlings, P. A., Deeg, H. J., Shriner, D. A., Socie, G., Travis, L. B., Holowitz, M. M., Witherspoon, R. P., Hoover, R. N., Sobocinski, K. A., Fraumeni, J. F., Boice, J. D., Schoch, H. G., Sale, G. E., Storb, R., Travis, W. D., Kolb, H-J., Gale, R. P. and Passweg, J. R.: Solid cancers after bone marrow transplantation. *New Engl. J. Med.* **336**, 897-904, 1997.
- 45) Maisin, J. R., Gerber, G. B., Vankerkom, J. and Wamhersie, A.: Survival and Diseases in C57BL Mice Exposed to X Rays or 3.1 MeV Neutrons at an Age of 7 or 21 Days. *Radiat. Res.*, **146**, 453-460, 1996.
- 46) Cologne, J. E., Tokuoka, S., Beebe, G. W., Fukuhara, T. and Mabuchi, K.: Effects of radiation on incidence of primary liver cancer among atomic bomb survivors. *Radiat. Res.*, **152**, 364-373, 1999.
- 47) Kellerer, A. M. and Barclay, D.: Age dependences of in the modeling of radiation carcinogenesis. *Radiat. Protect. Dosimetry*, **41**, 273-281, 1992.
- 48) Pierce, D. A., and Mendelsohn, M. L.: A Model for Radiation-Related Cancer Suggested by Atomic Bomb Survivor Data. *Radiat. Res.*, **152**, 642-654, 1999.
- 49) Ullrich, R. L. and Storer, J. B.: Influence of γ irradiation on the development of neoplastic diseases in mice. II. Solid tumors. *Radiat. Res.*, **80**, 317-324, 1979.
- 50) Covelli, V., Coppola, M., Di Majo, V., Rebessi, S. and Bassani, B.: Tumor induction and life shortening in BC3F1 female mice at low doses of fast neutrons and X rays. *Radiat. Res.*, **113**, 362-374, 1988.
- 51) Pierce, D. A. and Preston, D. L.: Radiation-related cancer risks at low doses among atomic bomb survivors. *Radiat. Res.*, **154**, 178-186, 2000.
- 52) Sasaki, S.: Influence of dose and age at radiation exposure on attributable risk in mice. Proceedings of International Congress on Radiation Effects and Protection, pp. 223-228, Japan Atomic Energy Research Institute, 1992.

- 53) Anderson, L. M., Diwan, B. A., Fear, N. T. and Roman, E.: Critical windows of exposure for children's health: Cancer in human epidemiological studies and neoplasms in experimental animal models. *Environ. Health Persp.*, **108**, Suppl. 3, 573-594, 2000.
- 54) Rugh, R.: The Mouse. Its Reproduction and Development. Burgess, Minneapolis, 1968.
- 55) Walker, B. E., and Kurth, L. A.: Pituitary tumors in mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Cancer Res.*, **53**, 1546-1549, 1993.
- 56) Christov, K.: Liver cell proliferation and failure of X radiation to produce hepatomas in rats. *Radiat. Res.*, **74**, 378-381, 1978.
- 57) Kitagawa, T., Nomura, K. and Sasaki, S.: Induction by X-irradiation of adenosine triphosphatase-deficient islands in the rat liver and their characterization. *Cancer Res.*, **45**, 6075-6082, 1985.
- 58) Moulds, B. A. and Goodman, J. I.: Spontaneous mutation at codon 61 of the Ha-ras gene in the nascent liver of B6C3F1, C3H/He and C57BL/6 mice. *Mutat. Res.*, **311**, 1-7, 1994.
- 59) Mori, H., Iwata, H., Morishita, Y., Mori, Y., Ohno, T., Tanaka, T. and Sasaki, S.: Synergistic effect of radiation on N-2-fluorenylacetamide-induced hepatocarcinogenesis in male ACI/N rats. *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 975-978, 1990.
- 60) Maldague, P.: Comparative study of experimentally induced cancer of the kidney in mice and rats with X-rays. In: "Radiation-Induced Cancer", International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 439-458, 1969.
- 61) Hino, O., Klein-Szanto, A. J. P., Freed, J. J., Testa, J. R., Brown, D. Q., Vilensky, M., Yeung, R. S., Tartof, K. D. and Knudson, A. G.: Spontaneous and radiation-induced renal tumors in the Eker rat model of dominantly inherited cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 327-331, 1993.
- 62) Di Majo, V., Coppola, M., Rebessi, S., Bassani, B., Alati, T., Saran, A., Bangrazi C. and Covelli, V.: Radiation-induced mouse liver neoplasms and hepatocyte survival. *J. Natl. Cancer Inst.*, **77**, 933-940, 1986.
- 63) Mendelsohn, M.L.: A simple reductionist model for cancer risk in atomic bomb survivors. In: "Proceedings of 26th NIRS Symposium", National Institute of Radiological Sciences, Chiba, pp. 185-192, 1995.

Table 1. Mean life span, number of solid tumors and incidences of tumors in female B6C3F1 mice irradiated at various age with 190 cGy gamma-rays

Age at irradiation	Number of mice	Mean life span, days	Number of solid tumors	Pituitary tumors, %	Ovarian tumors, %	Liver tumors, %	Harderian tumors, %
Control	885	864.8	0.540	8.0	1.8	19.7	1.8
Day 17, IU#	93	831.2*	0.989***	31.2***	7.5***	22.6	1.1
Day 0	332	759.1***	1.369***	24.9***	30.3***	48.0***	0.3*
Day 35	80	752.8***	1.325***	8.8	38.8***	31.3**	17.5***
Day 105	81	788.7***	0.864***	7.4	24.7***	17.3	12.3***
Day 365	141	804.1***	0.709**	4.3	7.1***	22.7	1.4
Day 550	178	859.8	0.663*	9.0	6.7***	23.0	0.0*

IU: intrauterine period

Statistical difference from the control *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001

Table 2. Temporal variation of age-specific mortality (number of deaths per 10,000 mouse · day at risk) in mice irradiated at various ages with 190 cGy

Age, days	Age at irradiation, days						
	Control	17, IU#	0	35	105	365	550
50-250	0.06	0.00	0.30	0.63	0.00	0.00	0.00
250-450	0.28	0.54	1.37**	1.28	1.30	0.00	0.57
450-550	1.26	2.20	4.74***	9.44***	5.23*	0.71	1.72
550-650	4.57	5.62	13.3***	7.32	8.22	13.4***	7.18
650-750	13.0	19.1*	30.6***	39.6***	26.8**	33.5***	13.1
750-850	38.9	48.5*	82.3***	77.4**	60.6*	51.0*	38.9
850-950	68.2	86.3*	142***	86.7	92.4	78.6*	54.1*
950-1050	107	189*	227*	225	145	189*	115

IU: intrauterine period

Statistical difference from the control *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001

Table 3. Mean life span and incidences of tumors in female B6C3F1 mice irradiated at 7 days of age with gamma-rays

Dose, cGy	Number of mice	Mean life span, days, \pm SE	Thymic lymphomas, %, \pm SE	Pituitary tumors, %, \pm SE	Ovarian tumors, %, \pm SE
0	1003	871.1 \pm 4.8	0.4 \pm 0.2	8.1 \pm 0.9	2.2 \pm 0.5
10	1388	857.3 \pm 4.2	0.5 \pm 0.2	11.6 \pm 0.9	14.7 \pm 1.0
19	393	842.5 \pm 6.4	0.5 \pm 0.4	14.0 \pm 1.8	23.4 \pm 2.1
48	283	817.0 \pm 7.1	0.0 \pm 0.0	18.4 \pm 2.3	41.7 \pm 2.9
95	205	782.1 \pm 8.4	0.5 \pm 0.5	25.4 \pm 3.0	44.4 \pm 3.5
190	203	723.9 \pm 11.4	2.0 \pm 1.0	33.0 \pm 3.3	47.3 \pm 3.5
285	232	656.5 \pm 11.2	4.7 \pm 1.4	38.8 \pm 3.2	37.9 \pm 3.2
380	196	608.8 \pm 13.5	7.7 \pm 1.9	38.3 \pm 3.5	30.6 \pm 3.3
475	94	552.3 \pm 17.2	9.6 \pm 3.0	23.4 \pm 4.4	19.1 \pm 4.1

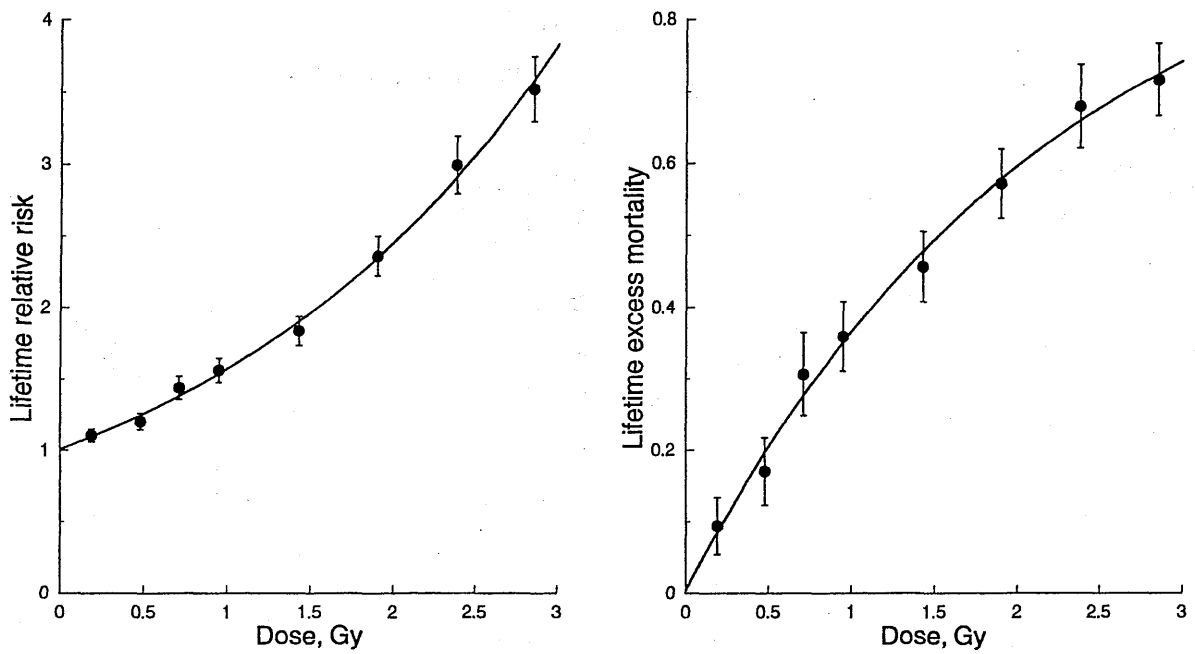


Fig. 1. Dose-response relationship for the lifetime relative risk for age-specific mortality (left) and the lifetime excess mortality from all causes of death (right) in female B6C3F1 mice irradiated with gamma rays at day 0 of the neonatal period.

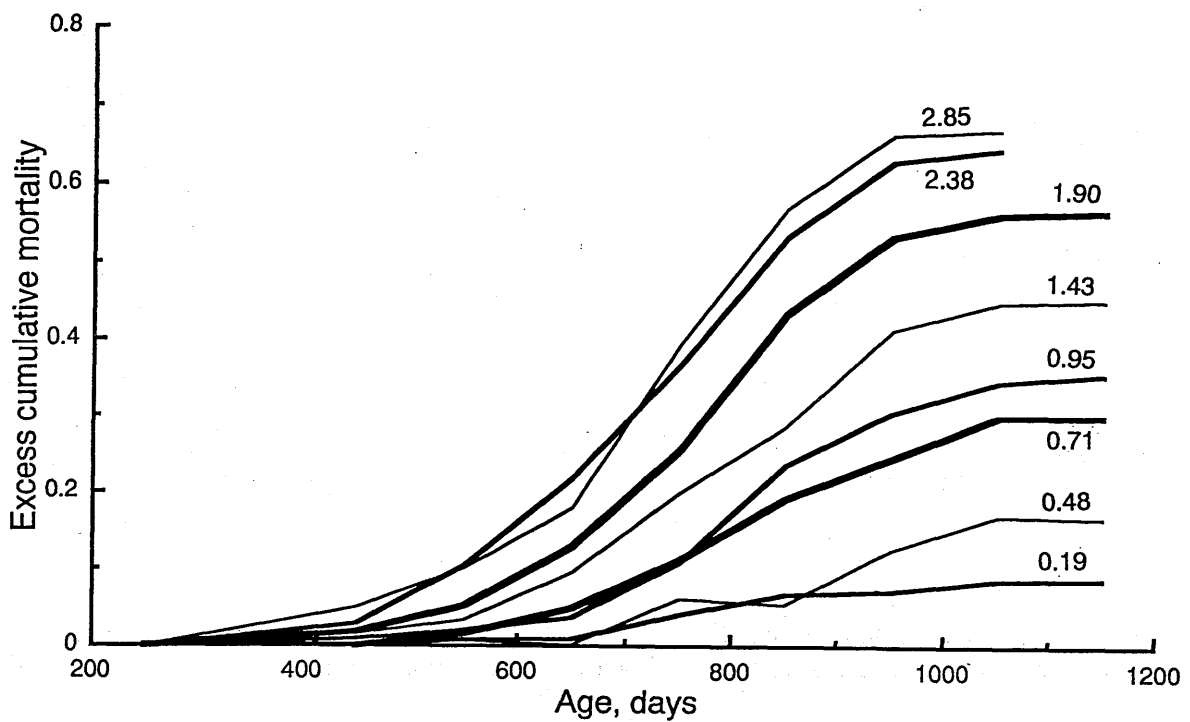


Fig. 2. Temporal pattern of expression of the excess mortality in female B6C3F1 mice irradiated with 0.19, 0.48, 0.71, 0.95, 1.43, 1.95, 2.38 or 2.85 Gy gamma rays at day 0 of the neonatal period.

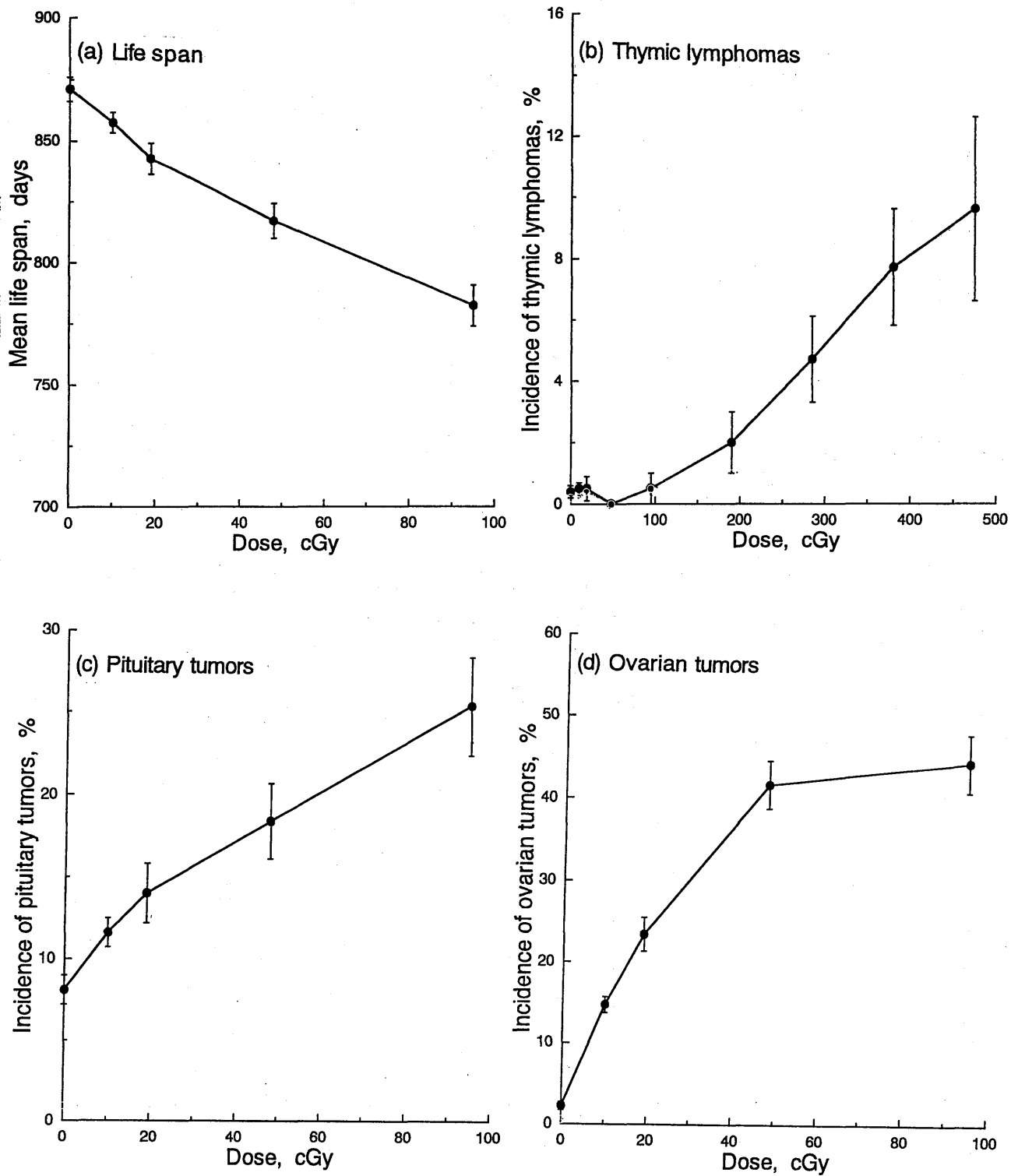


Fig. 3. Dose-response relationships for life-shortening (a), incidence of thymic lymphomas (b), pituitary tumors (c) and ovarian tumors (d) in female B6C3F1 mice irradiated with gamma rays at day 7 of the neonatal period.

Dose-response Relationship for Induction of Solid Tumors in Female B6C3F₁ Mice Irradiated Neonatally with a Single Dose of Gamma Rays

SHUNSAKU SASAKI* and NOBUO FUKUDA

Research Group of Low-Dose Radiation Effects and Carcinogenesis, National Institute of
Radiological Sciences, 9-1, Anagawa 4-Chome, Inage-Ku, Chiba 263-8555, Japan

(Received, October 21, 1998)

(Revision received, July 22, 1999)

(Accepted, August 24, 1999)

Tumorigenesis/Life shortening/Dose-response/Neonatal mice/Gamma rays

Our previous studies showed that mice during infancy are highly susceptible to the induction of several types of solid tumors. The present study was designed to elucidate the dose-response relationships for induction of solid tumors after exposure to 0.48–5.70 Gy of ¹³⁷Cs gamma rays in the neonatal period in female mice. A total of 2988 mice were allowed to live out their life span under a specific pathogen free condition and lifetime incidences of liver, pituitary, ovarian, lung and bone tumors were recorded. The dose-response curves for liver, pituitary, ovarian and lung tumors were convex upward in the dose range examined, and were composed of three parts: an initial rapid increase of incidence at doses below 1 Gy, a gradual increase to the highest incidence, and a decrease in incidence with increasing dose in the higher dose range. The dose which induces neoplasm at the highest incidence seemed to be different for each type of solid tumor. The shape of the dose-response curve for induction of bone tumors was quite different from that for other solid tumors; the initial slope of the curve was concave upward. Dose-response relationships were analyzed using a model that allows for tumorigenic effect, inactivation of potentially tumorigenic cells and competing risks. The results showed that the tumorigenic effect was proportional to the dose of gamma rays for induction of liver, pituitary, ovarian and lung tumors; whereas the tumorigenic effect for bone tumors was proportional to the square of the dose. A significant increase in incidence was also found for gastrointestinal tumors, kidney tumors, adrenal tumors and hemangiomas of spleen, although dose-response relationships could not be analyzed.

INTRODUCTION

One of the uncertainties in the risk assessment of ionizing radiation is cancer risk after irradiation in childhood¹⁻³). Epidemiological investigations have suggested a high susceptibil-

*Corresponding author: Tel; 043-206-3162, Fax; 043-256-8301, E-mail; sasaki@nirs.go.jp

ity of children to radiation carcinogenesis⁴⁻⁹). However, the risk estimation and dose-response relationship remain to be elucidated.

Life span experimental studies are of biological importance for the assessment of cancer risk. In our earlier studies, the age-dependence of susceptibility to radiation-induced life-shortening and carcinogenesis was examined¹⁰⁻¹⁴). It has become evident that from the neonatal period to puberty, mice are more susceptible to life-shortening effect of radiation than in the intrauterine period and adulthood. The age-dependence of susceptibility to radiation-induced carcinogenesis was shown to be inherent to each type of neoplasm. Liver, pituitary, lung, ovarian, and bone tumors, and thymic lymphomas were induced more effectively by irradiation during the juvenile period than that during the intrauterine or adult period; whereas, young adult mice were most susceptible to induction of myeloid leukemias and Harderian gland tumors^{11,13,14}). These results prompted us to design further experimental studies to elucidate the characteristics of carcinogenesis following exposure of juvenile mice to lower doses of radiation. Also, we tried to improve the methods of analyzing the carcinogenic effect of radiation. In this report, dose-response relationships for the induction of liver, pituitary, ovarian, lung and bone tumors after irradiation in the neonatal period with gamma rays ranging from 0.48 to 5.70 Gy are presented.

MATERIALS AND METHODS

Experimental procedures

The first generation female hybrids of C57BL/6JNrs and C3H/HeNrs strain mice (B6C3F₁) were used in this experiment. Because pituitary tumors developed in excess after X-irradiation in the neonatal period only in the female B6WF₁ mice¹⁰), females were selected for the study. Both parent strains and the hybrid mice were kept in a specific pathogen-free condition. The hybrid mice were irradiated at day 0 (within 24 h after birth) with 0.48, 0.95, 1.43, 1.90, 2.38, 2.85, 3.80 or 5.70 Gy gamma rays from ¹³⁷Cs at a dose rate of 0.87 Gy/min. After weaning at day 25-30, all the female hybrid mice were allowed to live out their life span. Cages were checked once a day, 6 days a week, for dead mice. The gross findings of autopsy were noted and recorded on photographs; thereafter, the major organs and sites of suspected neoplastic diseases were processed for histological examination. A total of 2988 mice were used in this experiment. The sample size of each group is shown in Table 1.

Methods of analysis

The dose-response relationship for life-shortening was fitted by the following equation:

$$\text{MLS}(D) = \text{MLS}(0) \cdot (1-f(D)) \quad (1)$$

where $\text{MLS}(D)$ represents mean life-span in a group irradiated with dose D ; $\text{MLS}(0)$, mean life-span in the control group; and $f(D)$, dose-dependent function for shortening of mean life-span. As $f(D)$, a linear or linear-quadratic model was applied: $f(D) = a_1D$ or $f(D) = a_1D + a_2D^2$.

The dose-response relationship for induction of a specific type of solid tumor was analyzed using a model which includes dose-dependent tumorigenesis, decrease in incidence by competing risks and inactivation of potentially tumorigenic cells. This model can be described by the following equation:

$$I_{\text{obs}}(D) = I_{\text{obs}}(0) \cdot (1 - g(D)) \cdot (1 + h(D)) \cdot k(D) \quad (2)$$

where $I_{\text{obs}}(D)$ represents observed incidence in a group irradiated with dose D ; $I_{\text{obs}}(0)$, observed incidence in the control group; $g(D)$, dose-dependent function for the decrease in incidence by competing risks; $h(D)$, function for increase in incidence by radiation-induced tumorigenesis; and $k(D)$, function for decrease in incidence by radiation-induced inactivation of potentially tumorigenic cells. For the decrease in incidence by competing risks, a linear or linear-quadratic relationship was used: $g(D) = b_1D$ or $g(D) = b_1D + b_2D^2$. For the tumorigenic effect of radiation, a linear, linear-quadratic or quadratic relationship was applied: $h(D) = c_1D$, $h(D) = c_1D + c_2D^2$ or $h(D) = c_2D^2$. The decrease in incidence due to inactivation of the potentially tumorigenic cells was fitted by an exponential relationship: $k(D) = \exp(-dD)$. The dose-response relationship for the observed incidence (equation 2) is composed of two components; the dose-response relationship for expected spontaneous incidence in the irradiated group ($I_{\text{spt}}(D)$) and the relative risk for development of tumor ($RR(D)$):

$$I_{\text{spt}}(D) = I_{\text{obs}}(0) \cdot (1 - g(D)) \quad (3)$$

$$RR(D) = (1 + h(D)) \cdot k(D) \quad (4)$$

The expected spontaneous incidence in the irradiated group was calculated with the following equation:

$$I_{\text{spt}}(D) = \sum(N_i(D) \cdot \varepsilon_i(0) / N(D)) \quad (5)$$

where $N_i(D)$ represents the number of mice that died during interval i of age in the irradiated group ($i = 1, 2, \dots, n$); $\varepsilon_i(0)$, the age-specific prevalence in the control group; and $N(D)$, the total number of mice in the irradiated group. The age-specific prevalence was defined as the fraction of mice that died with a specific type of tumor during interval i . The relative risk for the development of a specific type of tumor was calculated as a ratio of observed incidence to expected spontaneous incidence.

Parameters of dose-response relationships were estimated with the method of least squares, in which the algorithm was obtained by the damping Gauss-Newton method and the weighting factor was the reciprocal of the obtained value. Models for the function $f(D)$, $g(D)$ and $h(D)$ were selected using Akaike's information criterion (AIC)¹⁵. Statistical difference was examined with the χ^2 -test for tumor incidence and frequency of death before weaning, and with Student's t -test for mean life-span, number of tumors and relative risk. The level of significant difference was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Mortality before weaning and life-shortening

The frequency of death during the period before weaning in the control group and irradiated groups is shown in Table 1. Deaths during pre-weaning seemed to be mainly due to deficient exocrine activity of the mammary gland of mother mice, because the stomach of the dead mice was not filled with milk. Frequencies of death before weaning in the irradiated groups were not different from that in the control group, even after irradiation with 5.7 Gy, the highest dose examined here. These results indicate that neonatally irradiated mice did not die from radiation-induced acute effects in this experiment.

Mean life-spans of female mice in control and irradiated groups are summarized in Table 1. Mean life-spans of all the irradiated groups were significantly shorter than that of the control group. For function $f(D)$ in equation 1, a linear-quadratic model was selected based on the information criterion. Values of parameters a_1 and a_2 were obtained by regression analysis: $a_1 = 0.0548 \pm 0.0027$, $a_2 = 0.0049 \pm 0.0006$. The dose-response relationship for the mean life-span was described by the following equation:

$$\text{MLS}(D) = \text{MLS}(0) \cdot (1 - 0.0548D - 0.0049D^2)$$

Table 1. Mortality during pre-weaning and mean life-span

Dose (Gy)	Number at birth	Number of deaths before weaning	Mortality during pre-weaning % \pm SE	Number of female mice at weaning	Mean life-span, days \pm SE
0.00	1878	93	4.9 \pm 0.5	885	864.8 \pm 4.6
0.48	962	48	5.0 \pm 0.7	453	842.0 \pm 6.4
0.95	712	31	4.4 \pm 0.8	338	807.9 \pm 7.4
1.43	701	37	5.2 \pm 0.8	331	785.6 \pm 7.8
1.90	694	32	4.6 \pm 0.8	332	758.1 \pm 7.5
2.38	433	23	5.1 \pm 1.1	205	721.2 \pm 10.7
2.85	567	25	4.4 \pm 0.9	272	700.1 \pm 9.9
3.80	169	9	5.1 \pm 1.7	81	635.0 \pm 17.1
5.70	196	11	5.7 \pm 1.7	91	453.4 \pm 15.8

All neoplasms and all solid tumors

The frequency of neoplasm, number of neoplasms per mouse, frequency of solid tumor and number of solid tumors per mouse are summarized in Table 2. These comprehensive measures of tumorigenesis increased significantly after irradiation with 0.48 Gy, the lowest dose in the present experiment. In particular, the increase in the number of solid tumors per mouse was marked. A dose-dependent increase in the comprehensive measures of tumorigenesis was observed up to 1.9 Gy and these values reached a plateau over the dose range 1.9 to 2.85 Gy. The number of solid tumors per mouse in a group irradiated with 5.7 Gy was smaller than those irradiated with lower doses.

Table 2. Frequency of neoplasms, number of neoplasms per mouse, frequency of solid tumors and number of solid tumors per mouse

Dose (Gy)	Frequency of neoplasms, % \pm SE	Number of neoplasms per mouse, mean \pm SE	Frequency of solid tumors, % \pm SE	Number of solid tumors per mouse, mean \pm SE
0.00	87.7 \pm 1.1	1.09 \pm 0.02	46.9 \pm 2.3	0.54 \pm 0.02
0.48	91.8 \pm 1.3	1.44 \pm 0.04	74.8 \pm 4.1	1.05 \pm 0.05
0.95	95.0 \pm 1.2	1.57 \pm 0.05	80.5 \pm 4.9	1.24 \pm 0.06
1.43	92.4 \pm 1.5	1.59 \pm 0.05	83.1 \pm 5.0	1.29 \pm 0.06
1.90	94.0 \pm 1.3	1.61 \pm 0.05	89.1 \pm 6.0	1.47 \pm 0.09
2.38	91.2 \pm 2.0	1.55 \pm 0.06	87.8 \pm 6.5	1.40 \pm 0.08
2.85	95.6 \pm 1.2	1.64 \pm 0.05	88.9 \pm 5.7	1.48 \pm 0.07
3.80	93.8 \pm 2.7	1.52 \pm 0.08	85.2 \pm 10.3	1.39 \pm 0.13
5.70	92.3 \pm 2.8	1.23 \pm 0.07	65.9 \pm 8.5	0.98 \pm 0.11

Liver tumors

Hepatocellular and cholangiocellular tumors were included in the category of liver tumors, but hemangioma in the liver was not. The majority of the liver tumors were malignant or benign hepatocellular tumors. The observed incidence, expected spontaneous incidence, and relative risk for the development of liver tumors are summarized in Table 3. The increase in the observed incidence and relative risk was significant in all irradiated groups. The dose-response curve for observed incidence (Fig. 1) was upward convex, and seemed to be composed of three parts: 1) a rapid increase in the incidence at doses below 0.95 Gy, 2) a gradual increase in the dose range 0.95 to 2.85 Gy, 3) a decrease in incidence with increasing dose at doses above 2.85 Gy. Parameters of the dose-response relationship were obtained by regression analysis. Expected spontaneous incidences in the irradiated groups decreased almost linearly with increasing dose, and parameter b_1 of function $g(D)$ was estimated to be 0.120 ± 0.002 . As function $h(D)$ for tumorigenic effect, a linear model was selected based on the information criterion and the estimated value of parameter c_1 was 1.739 ± 0.128 . Parameter d of function $k(D)$ for inactivating effect was estimated to be 0.082 ± 0.015 . Therefore, the dose-response relationship for the observed incidence was described by the following equation:

Table 3. Observed incidence, expected spontaneous incidence and relative risk for development of liver tumors

Dose (Gy)	Observed incidence, % \pm SE	Expected spontaneous incidence, % \pm SE	Relative risk \pm SE
0.00	19.7 \pm 1.2	19.7 \pm 1.2	
0.48	39.3 \pm 2.3	18.3 \pm 1.3	2.14 \pm 0.19
0.95	42.0 \pm 2.6	17.1 \pm 1.3	2.46 \pm 0.24
1.43	46.5 \pm 2.5	16.3 \pm 1.3	2.85 \pm 0.27
1.90	53.8 \pm 3.1	14.8 \pm 1.3	3.64 \pm 0.39
2.38	57.6 \pm 3.3	13.7 \pm 1.3	4.22 \pm 0.49
2.85	62.9 \pm 2.8	12.9 \pm 1.4	4.87 \pm 0.57
3.80	58.0 \pm 5.3	10.5 \pm 1.6	5.53 \pm 1.00
5.70	46.2 \pm 5.0	6.7 \pm 1.4	6.88 \pm 1.62

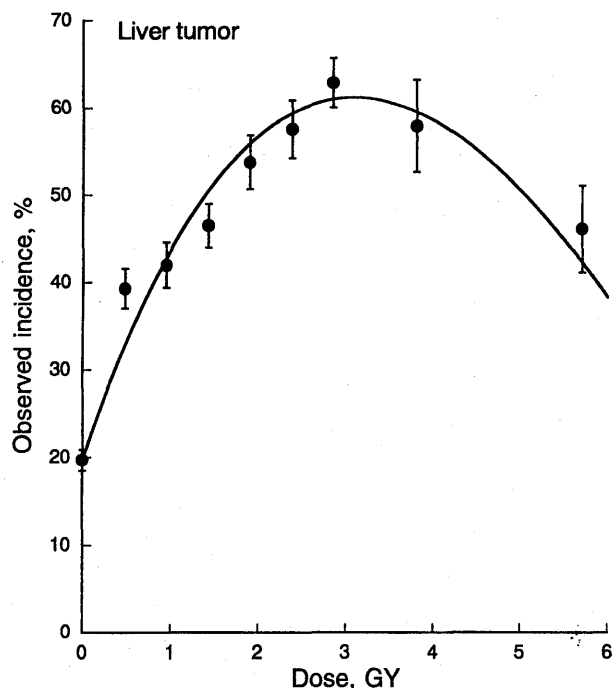


Fig. 1. Incidence of liver tumors as a function of dose of gamma rays. Vertical bars represent standard errors. The dose-response relationship is shown as a curve obtained by regression analysis.

$$I_{\text{obs}}(D) = I_{\text{obs}}(0) \cdot (1 - 0.120D) \cdot (1 + 1.739D) \cdot \exp(-0.082D)$$

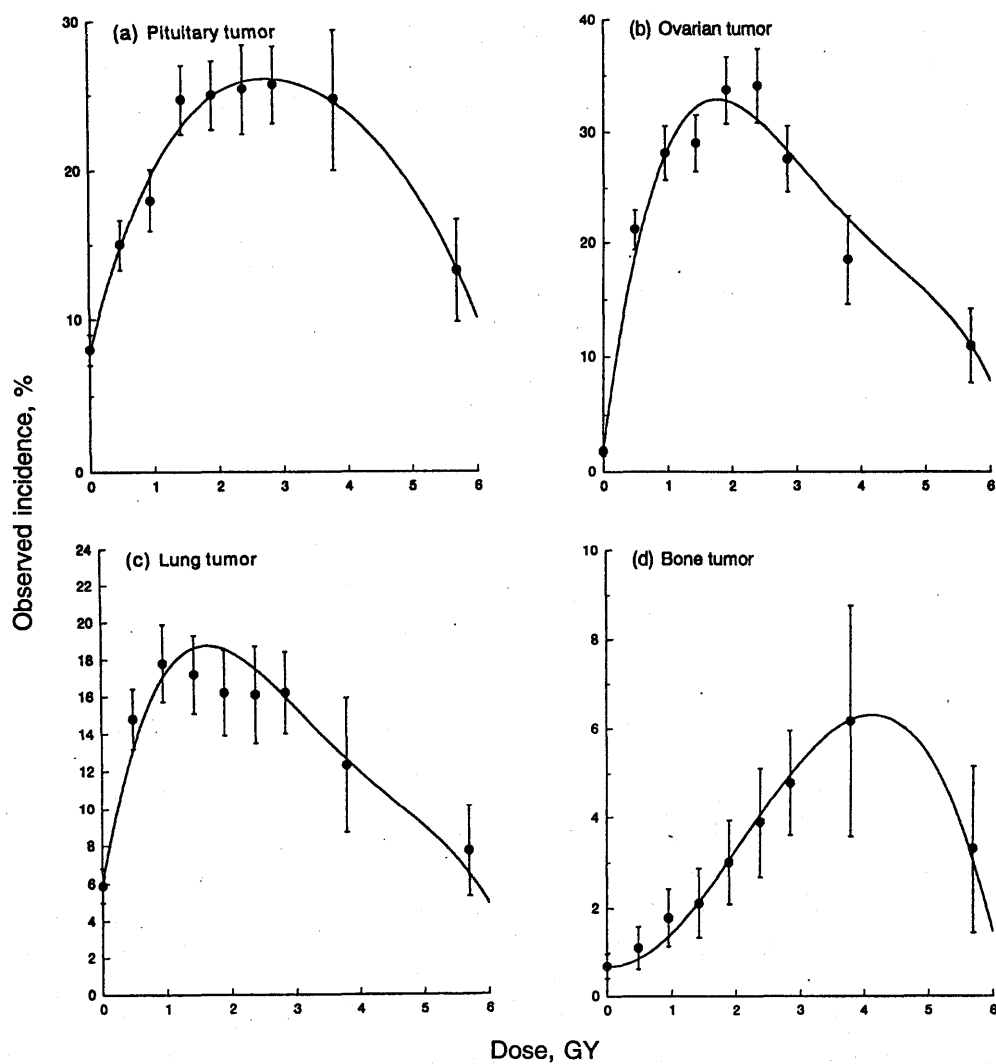
Pituitary tumors

Tumors of the anterior lobe of the pituitary gland were late-occurring and lethal neoplasms. The results are summarized in Table 4. The dose-response relationship for the observed incidence is shown in Fig. 2a. Pituitary tumors developed in excess with a significant difference in all irradiated groups. A dose-dependent increase in the observed incidence was found up to 1.43 Gy; whereas, the incidence was not affected over the dose range 1.43 to 3.8 Gy. The observed incidence was significantly lower in the group irradiated with 5.7 Gy than 3.8 Gy. Values of parameters for the dose-response relationship were obtained by regression analysis. As function $g(D)$ for decrease in the expected spontaneous incidence, a linear-quadratic model was selected, and parameters b_1 and b_2 were estimated to be 0.107 ± 0.019 and 0.0033 ± 0.0042 , respectively. As the dose-response relationship for the relative risk, we selected a model which includes dose-linear tumorigenic effect and exponential killing of potentially tumorigenic cells. Parameters c_1 and d were estimated as 2.306 ± 0.189 and 0.186 ± 0.021 , respectively. Using obtained values of parameters, the dose-response relationship for the observed incidence was described by the equation:

$$I_{\text{obs}}(D) = I_{\text{obs}}(0) \cdot (1 - 0.107D - 0.0033D^2) \cdot (1 + 2.306D) \cdot \exp(-0.166D)$$

Table 4. Observed incidence, expected spontaneous incidence and relative risk for development of pituitary tumors

Dose (Gy)	Observed incidence, % \pm SE	Expected spontaneous incidence, % \pm SE	Relative risk \pm SE
0.00	8.0 \pm 1.0	8.0 \pm 1.0	
0.48	15.0 \pm 1.7	7.8 \pm 1.0	1.92 \pm 0.33
0.95	18.0 \pm 2.1	7.4 \pm 1.0	2.45 \pm 0.43
1.43	24.7 \pm 2.3	7.2 \pm 1.0	3.39 \pm 0.55
1.90	25.0 \pm 2.3	6.4 \pm 0.9	3.88 \pm 0.66
2.38	25.4 \pm 3.0	6.1 \pm 0.9	4.18 \pm 0.78
2.85	25.7 \pm 2.6	5.3 \pm 0.9	4.86 \pm 0.92
3.80	24.7 \pm 4.7	3.5 \pm 0.8	5.95 \pm 1.62
5.70	13.2 \pm 3.4	2.5 \pm 0.6	5.06 \pm 1.03

**Fig. 2.** Incidences of pituitary tumors (a), ovarian tumors (b), lung tumors (c) and bone tumors (d) as a function of dose of gamma rays. Vertical bars represent standard errors. The dose-response relationships are shown as curves obtained by regression analysis.

Ovarian tumors

Histological types of ovarian tumors were granulosa cell tumors, tubular adenomas and luteal cell tumors. The observed incidences, expected spontaneous incidences and relative risks are summarized in Table 5. The dose-response relationship for the observed incidence is shown in Fig. 2b. Irradiation with gamma rays significantly increased the observed incidence and relative risk at all dose levels examined here. The observed incidence increased rapidly in the dose range 0 to 0.95 Gy and peaked at 2.38 Gy. At doses above 2.85 Gy, the incidence decreased with increasing dose. The expected incidences of spontaneous ovarian tumors in the irradiated groups seemed to decrease with increasing dose, and parameter b_1 was estimated to be 0.0441 ± 0.0073 . The dose-response relationship for the relative risk was fitted by a model which includes dose-linear tumorigenic effect and exponential inactivation of potentially tumorigenic cells, and parameters c_1 and d were estimated to be 26.84 ± 1.69 and 0.516 ± 0.063 , respectively. Based on these analyses, the dose-response relationship for the observed incidence was described by the following equation:

$$I_{\text{obs}}(D) = I_{\text{obs}}(0) \cdot (1 - 0.0441D) \cdot (1 + 26.84D) \cdot \exp(-0.516D)$$

Table 5. Observed incidence, expected spontaneous incidence and relative risk for development of ovarian tumors

Dose (Gy)	Observed incidence, % \pm SE	Expected spontaneous incidence, % \pm SE	Relative risk \pm SE
0.00	1.81 \pm 0.45	1.81 \pm 0.45	
0.48	21.2 \pm 1.8	1.80 \pm 0.46	11.7 \pm 3.1
0.95	28.1 \pm 2.4	1.77 \pm 0.47	16.2 \pm 4.4
1.43	29.0 \pm 2.5	1.74 \pm 0.46	16.9 \pm 4.8
1.90	33.7 \pm 3.0	1.70 \pm 0.52	19.9 \pm 6.3
2.38	34.1 \pm 3.3	1.59 \pm 0.48	21.8 \pm 7.0
2.85	27.6 \pm 2.9	1.55 \pm 0.51	17.8 \pm 6.1
3.80	18.5 \pm 3.9	1.39 \pm 0.57	13.2 \pm 6.1
5.70	11.0 \pm 3.2	1.31 \pm 0.58	8.4 \pm 3.4

Lung tumors

Histological types of lung tumors were adenocarcinoma and adenoma. Results of experiments are given in Table 6 and the observed incidences are plotted against dose in Fig. 2c. The observed incidence in the group irradiated with 0.48 Gy was significantly higher than that in controls. Over the dose range 0.95 to 2.85 Gy, there was no difference in incidence; thereafter, the incidence decreased with increasing dose. Values of parameters for the dose-response relationship were estimated by regression analysis. The expected spontaneous incidences decreased almost linearly with increasing dose and the estimated value of parameter b_1 was 0.063 ± 0.005 . As function $h(D)$ for tumorigenic effect, a dose-linear model was selected and parameter c_1 was estimated to be 3.958 ± 0.299 . The value of parameter d for killing effect was 0.464 ± 0.025 . From these analyses, the dose-response relationship for the

Table 6. Observed incidence, expected spontaneous incidence and relative risk for development of lung tumors

Dose (Gy)	Observed incidence, % \pm SE	Expected spontaneous incidence, % \pm SE	Relative risk \pm SE
0.00	5.9 \pm 0.8	5.9 \pm 0.8	
0.48	14.8 \pm 1.7	5.5 \pm 0.8	2.68 \pm 0.48
0.95	17.8 \pm 2.1	5.2 \pm 0.8	3.35 \pm 0.63
1.43	17.2 \pm 2.0	5.1 \pm 0.8	3.38 \pm 0.64
1.90	16.2 \pm 2.3	4.9 \pm 1.0	3.23 \pm 0.82
2.38	16.1 \pm 2.6	4.9 \pm 1.1	3.28 \pm 0.85
2.85	16.2 \pm 2.2	4.8 \pm 1.1	3.27 \pm 0.91
3.80	12.3 \pm 3.6	4.5 \pm 1.5	2.27 \pm 1.19
5.70	7.7 \pm 2.4	4.1 \pm 2.7	1.86 \pm 1.28

observed incidence was obtained as the equation:

$$I_{\text{obs}}(D) = I_{\text{obs}}(0) \cdot (1 - 0.063D) \cdot (1 + 3.958D) \cdot \exp(-0.464D)$$

Bone tumors

Histological types of bone tumors were osteosarcoma, osteoma, chondrosarcoma and chondroma. The observed incidences, expected spontaneous incidences and relative risks are shown in Table 7 and the observed incidences are plotted as a function of dose in Fig. 2d. The increase in incidence was significant in mice irradiated with 1.90, 2.38, 2.85 or 3.80 Gy. The shape of the dose-response curve was quite different from those for other solid tumors. The initial slope of the curve was concave upward. The highest incidence was observed in the group irradiated with 3.8 Gy, and the incidence was lower at 5.7 Gy than at 3.8 Gy. Values of parameters were estimated by regression analysis of dose-response relationships for the expected spontaneous incidences and for the relative risks. Parameters b_1 and b_2 of the dose-response relationship for the expected spontaneous incidences were estimated to be 0.150 ± 0.006 and 0.0016 ± 0.0011 , respectively. The relative risks continued to increase over the dose

Table 7. Observed incidence, expected spontaneous incidence and relative risk for development of bone tumors

Dose (Gy)	Observed incidence, % \pm SE	Expected spontaneous incidence, % \pm SE	Relative risk \pm SE
0.00	0.68 \pm 0.28	0.68 \pm 0.28	
0.48	1.10 \pm 0.49	0.62 \pm 0.26	1.79 \pm 1.09
0.95	1.78 \pm 0.65	0.56 \pm 0.25	3.18 \pm 1.84
1.43	2.11 \pm 0.77	0.52 \pm 0.24	4.04 \pm 2.38
1.90	3.01 \pm 0.92	0.48 \pm 0.25	6.24 \pm 3.73
2.38	3.90 \pm 1.21	0.42 \pm 0.24	9.39 \pm 6.12
2.85	4.78 \pm 1.17	0.39 \pm 0.24	12.29 \pm 8.16
3.80	6.17 \pm 2.59	0.29 \pm 0.26	20.84 \pm 20.08
5.70	3.30 \pm 1.85	0.06 \pm 0.05	51.64 \pm 50.19

range 0 to 5.7 Gy, and parameter d for killing effect could not be obtained. As function $h(D)$ for tumorigenic effect, a quadratic model was selected based on the information criterion and the value of parameter c_2 was estimated at 1.487 ± 0.043 . From these analyses, the dose-response relationship for the observed incidences was obtained as the equation:

$$I_{\text{obs}}(D) = I_{\text{obs}}(0) \cdot (1 - 0.150D - 0.0016D^2) \cdot (1 + 1.487D^2)$$

Other solid tumors

The dose-response relationships for other solid tumors could not be analyzed, because tumor incidences were too low in control and irradiated mice. When the data of the irradiated groups were pooled, it became evident that several types of solid tumors developed in excess after irradiation. The total number of irradiated mice was 2103 and the mean dose was 1.77 Gy. Incidences of gastrointestinal tumors, kidney tumors, adrenal tumors and hemangiomas of spleen in the irradiated mice were significantly higher than in those in the control group as shown in Table 8.

Table 8. Incidences of gastrointestinal tumors, kidney tumors, adrenal tumors and hemangiomas of spleen

	Control	Irradiated
Number of mice	885	2103
Incidence, % \pm SE		
Gastrointestinal tumors	0.58 ± 0.25	1.50 ± 0.27
Kidney tumors	0.00 ± 0.00	0.76 ± 0.19
Adrenal tumors	0.11 ± 0.11	1.57 ± 0.27
Hemangioma of spleen	0.34 ± 0.20	1.19 ± 0.23

DISCUSSION

The increase in the incidence of liver, pituitary, ovarian and lung tumors was significant in mice irradiated with 0.48 Gy, the lowest dose examined here. The most reliable data on the induction of solid tumors in adult mice by single exposure to low-LET radiation comes from experiments using female RFM mice which were irradiated at 12 weeks of age with graded doses of gamma rays from ^{137}Cs ¹⁶). It was reported that incidences of ovarian tumors and Harderian gland tumors were significantly higher in mice irradiated with 0.5 Gy than in control mice; whereas the increase in incidence of pituitary tumors and lung tumors was not significant when mice were irradiated with doses lower than 2 Gy. An increase in incidence was detected only for ovarian tumors after irradiation with 0.25 Gy. When mice were exposed to 0.1 Gy, no type of solid tumor developed in excess. In a life-time study using female BC3F₁ mice which were irradiated with graded doses of X rays at 4 to 6 weeks of age, the increase in the incidence of ovarian tumors was significant at 0.16 Gy¹⁷). But the increase in the incidence of

other solid tumors was significant when mice were irradiated with doses higher than 1 Gy. Results of the present study, therefore, indicate that mice during the neonatal period are extremely susceptible to the induction of many types of solid tumors. Further experimental studies are necessary to examine whether an increase in the incidence of solid tumors is detectable after irradiation with lower doses.

The dose-response relationships for the age-adjusted incidences of pituitary tumors and lung tumors in female RFM mice irradiated as young adults were reported to be described by a linear-quadratic model¹⁶. The present study showed that the tumorigenic effect of gamma rays on the induction of these tumors was proportional to dose in neonatal mice. The dose-response relationship for induction of liver tumors in male CBA mice irradiated at 3 months old with X rays was fitted by a linear-quadratic model and that in male BC3F₁ mice of the same age was fitted by a quadratic model¹⁸. The tumorigenic effect of gamma rays for induction of liver tumors was dose-linear when mice were irradiated neonatally as shown in the present experiment. These findings suggest that the shape of the dose-response curve is influenced by age at the time of irradiation.

It is not clear whether there is a threshold in the dose-response relationship for the induction of solid tumors by low LET radiation. An analysis of the dose-response relationship for induction of ovarian tumors in RFM mice after irradiation with gamma rays resulted in a conclusion that a threshold plus dose-linear model described well the relationship over the dose range 0 to 0.5 Gy¹⁶. The threshold dose was estimated to be 0.11 to 0.12 Gy. A similar result was obtained in an experiment using BC3F₁ mice irradiated with X rays¹⁷. We showed that the tumorigenic effect of gamma rays on the induction of ovarian tumors was proportional to dose in mice irradiated in the neonatal period over the dose range examined here. However, our data were not sufficient to determine whether there is a threshold in the dose-response relationship for induction of ovarian tumors.

Information on the dose-response relationship for induction of bone tumors by external irradiation with low LET radiation is restricted to a few studies. The existence of a threshold-like dose in dose-response relationships for induction of skin tumors and bone tumors was ascertained in a series of studies in which the back of female ICR mice was repeatedly exposed to beta rays from ⁹⁰Sr-⁹⁰Y^{19,20}. Skin tumors and bone tumors developed after repeated lifetime exposure to 0.75 Gy or higher doses; whereas repeated irradiation with 0.5 Gy did not induce these tumors. Age at first exposure to beta rays was 7 weeks. It is apparent that single whole-body exposure to gamma rays in the neonatal period is effective in inducing bone tumors. Analysis has shown that the tumorigenic effect of a single exposure to gamma rays in the neonatal period is proportional to the square of the dose. The existence of a threshold dose, however, could not be excluded, because the incidences of bone tumors in groups irradiated with doses lower than 1.43 Gy were not significantly different from the background incidence.

The present study has expanded knowledge on tumorigenesis following exposure to radiation in the neonatal period in mice. The increase in incidence was significant for the development of gastrointestinal tumors, kidney tumors, adrenal tumors and hemangiomas of spleen, although the dose-response relationship could not be analyzed. Therefore, a significant increase in the incidence was detected for the development of 9 types of solid tumors. As

shown in our previous studies, myeloid leukemias did not develop in excess after irradiation in the neonatal period and thymic lymphomas could not be induced by irradiation with doses lower than 1.9 Gy in B6WF₁ and B6C3F₁ mice¹⁰⁻¹⁴). It has become evident that mice of the neonatal period are susceptible to the induction of various types of solid tumors by radiation.

An increase in the observed incidence does not reflect directly the tumorigenic effect of radiation which is also influenced by competing risks and inactivation of potentially tumorigenic cells as described in the 1986 UNSCEAR report²¹). Several statistical methods have been proposed to avoid confusion resulting from competing risks²²⁻²⁵). As a measure of radiation-induced tumorigenesis, we used relative risk for the development of neoplasms, which is not affected by competing risks. The relative risk for development of neoplasms was defined as the ratio of the observed incidence to expected spontaneous incidence in the irradiated group. The inactivation of potentially tumorigenic cells is not negligible in an analysis of the dose-response relationship for radiation-induced tumorigenesis, because a decrease in incidence with increasing dose was frequently observed following localized irradiation with high doses²⁶⁻²⁹). Therefore, the value of relative risk is determined by the tumorigenic effect and inactivation of potentially tumorigenic cells. From these considerations we constructed a model of the dose-response relationship for the observed incidence which was represented as equation 2. This model may be widely applicable to the analysis of the tumorigenic effect of radiation and other agents.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a grant from the Research Fund for Biological Effects of Low-Dose Radiation from the Japan Science and Technology Agency. We are grateful to Dr. T. Kasuga and Dr. H. Matsudaira for helpful discussion.

REFERENCES

1. National Academy of Sciences, Committee on the Biological Effects of Ionizing Radiations (1990) Health Effects of Exposure to Low Levels of Ionizing Radiation (BEIR V). National Academy Press, Washington, DC.
2. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (1988) Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation. Report to the General Assembly with Annexes. United Nations, New York.
3. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (1993) Sources, Effects and Risks of Ionizing Radiation. Report to the General Assembly with Annexes. United Nations, New York.
4. Shimizu, Y., Kato, H. and Schull, W. J. (1990) Studies of the mortality of A-bomb survivors. Report 9. Mortality, 1950-1985: Part 2. Cancer mortality based on the recently revised (DS86). *Radiat. Res.* **121**: 120-141.
5. Thompson, D. E., Mabuchi, K., Ron, E., Soda, M., Tokunaga, M., Ochikubo, S., Sugimoto, S., Ikeda, T., Terasaki, M., Izumi S. and Preston, D. L. (1994) Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987. *Radiat. Res.* **137**: S17-S67.
6. Pierce, D. A., Shimizu, Y., Preston, D. L., Vaeth, M. and Mabuchi, K. (1996) Studies of the mortality of atomic bomb survivors. Report 12, Part I. Cancer: 1950-1990. *Radiat. Res.* **146**: 1-27.

7. Ron, E., Modan, B., Preston, D. L., Alfandary, E., Stovall, M. and Boice, J. D. (1989) Thyroid neoplasia following low-dose radiation in childhood. *Radiat. Res.* **120**: 516–531.
8. Modan, B., Chetrut, A., Alfandary, E. and Katz, L. (1989) Increased risk of breast cancer after low-dose irradiation. *Lancet*: 629–631.
9. Shore, R. E., Woodward, E., Hildreth, N., Dvoretzky, P., Hempelmann L. and Pasternack, B. S. (1986) Thyroid tumours following thymus irradiation. *J. Natl. Cancer Inst.* **74**: 1177–1184.
10. Sasaki, S. and Kasuga, T. (1981) Life shortening and carcinogenesis in mice irradiated neonatally with X rays. *Radiat. Res.* **88**: 313–325.
11. Sasaki, S. and Kasuga, T. (1986) Life shortening and carcinogenesis in mice irradiated at the perinatal period with gamma rays. In: *Life-Span Radiation Effects Studies in Animals: What Can They Tell Us*, Eds. R. C. Thompson and J. A. Mahaffey, pp. 357–367, Nat. Tech. Info. Service, U. S. Dept. Energy, Springfield, Virginia.
12. Sasaki, S. (1987) Consequences of prenatal irradiation in mice: Carcinogenesis and CNS damage as a basis for human risks. In: *Radiation Research. Proceedings of the 8th International Congress of Radiation Research*, Eds. E. M. Fielden, J. F. Fowler, H. Hendey and D. Scott, Vol. 2, pp. 652–657, Taylor & Francis, London.
13. Sasaki, S. (1991) Influence of the age of mice at exposure to radiation on life-shortening and carcinogenesis. *J. Radiat. Res.* **32** Suppl. **2**: 73–85.
14. Sasaki, S. (1991) Age-dependence of susceptibility to carcinogenesis by ionizing radiation in mice. *Radiat. Environ. Biophys.* **30**: 205–207.
15. Akaike, H. (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Transact. Automat. Contr.* **AC19**: 716–723.
16. Ullrich, R. L. and Storer, J. B. (1979) Influence of γ irradiation on the development of neoplastic disease in mice. II. Solid tumors. *Radiat. Res.* **80**: 317–324.
17. Covelli, V., Coppola, M., Di Majo, V., Rebessi, S. and Bassani, B. (1988) Tumor induction and life shortening in BC3F₁ female mice at low doses of fast neutrons and X rays. *Radiat. Res.* **113**: 362–374.
18. Di Majo, V., Coppola, M., Rebessi, S., Bassani, B., Alati, T., Saran, A., Bangrazi C. and Covelli, V. (1986) Radiation-induced mouse liver neoplasms and hepatocyte survival. *J. Natl. Cancer Inst.* **77**: 933–940.
19. Ootsuyama, A. and Tanooka, H. (1991) Threshold-like dose of local beta irradiation repeated through the life span of mice for induction of skin and bone tumors. *Radiat. Res.* **125**: 98–101.
20. Ootsuyama, A. (1996) Skin and bone tumors induced by repeated beta-irradiation of mice: Threshold effect and p53 mutations. *J. Radiat. Res.* **37**: 151–159.
21. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation (1986) Genetic and Somatic Effects of Ionizing Radiation, Report to the General Assembly with Annexes. United Nations, New York.
22. Kaplan, E. L. and Meier, P. (1958) Non-parametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* **53**: 457–481.
23. Ullrich, R. L. and Storer, J. B. (1979) Influence of γ irradiation on the development of neoplastic disease in mice. I. Reticular tissue tumours. *Radiat. Res.* **80**: 303–316.
24. Prentice, R. L., Peterson, A. V. and Marek, P. (1982) Dose-Mortality Relationships in RFM Mice following ¹³⁷Cs γ -Ray Irradiation. *Radiat. Res.* **90**: 57–76.
25. Storer, J. B., Mitchell, T. J. and Fry, R. J. M. (1988) Extrapolation of the relative risk of radiogenic neoplasms across mouse studies and man. *Radiat. Res.* **114**: 331–353.
26. Yuhas J. M. and Walker, A. E. (1973) Exposure-response curve for radiation-induced lung tumors in the mouse. *Radiat. Res.* **54**: 261–273.
27. Burns, F. J., Albert R. E. and Heimbach, R. D. (1968) RBE for skin tumors and hair follicle damage in the rat following irradiation with alpha particles and electrons. *Radiat. Res.* **36**: 225–241.
28. Maldague, P. (1969) Comparative study of experimentally induced cancer of the kidney in mice and rats with X-rays. In: *Radiation-Induced Cancer*, pp. 439–458, International Atomic Energy Agency, Vienna.
29. Ogiso, Y., Yamada, Y., Iida, H. and Inaba, J. (1998) Differential dose responses of pulmonary tumor types in the rat after inhalation of plutonium dioxide aerosols. *J. Radiat. Res.* **39**: 61–72.

II. 放射線発がんの遺伝的要因に関する研究

荻生 俊昭、石井 洋子、島田 義也、西村 まゆみ、辻 秀雄、
柿沼 志津子¹、杉村 勇¹、中田 有紀子¹、小林 森²、
佐渡 敏彦³、若菜 茂晴⁴、奥本 正昭⁵、鈴木 文男⁶、樋野 興夫⁷

¹客員研究官、²客員協力研究員(元生理病理研究部)、³大分県立看護科学大学、
⁴実験動物中央研究所研究プロジェクト推進センター、⁵大阪府立大学先端科学研究所、
⁶広島大学広島大学原爆放射能医学研究所、⁷癌研究所実験病理部

II. Effects of Genetic Factors on Radiation Carcinogenesis

Toshiaki Ogiu, Hiroko Ishii-Ohba, Yoshiya Shimada, Mayumi Nishimura, Hideo Tsuji,
Shizuko Kakinuma¹, Isamu Sugimura¹, Yukiko Nakata¹, Shigeru Kobayashi², Toshihiko Sado³,
Shigeharu Wakana⁴, Masaaki Okumoto⁵, Fumio Suzuki⁶, and Okio Hino⁷

¹Research Associate、²Guest Research Associate、
³Oita University of Nursing and Health Sciences、⁴Central Institute for Experimental Animals、
⁵Osaka-Prefecture University、⁶Hiroshima University、⁷Cancer Institute

The most important risk of low-dose radiation is development of tumors. Radiation carcinogenesis is affected by physical factors such as quality, dose and dose rates, and also biological factors such as gender, age and genetic background. The aim of this project is to clarify the effects of, specifically, genetic factors on radiation carcinogenesis. This project has three major active programs as written below.

(1) Radiation-associated loss of heterozygosity in radiogenic T-cell lymphomas in mice:

Although ionizing radiation is a potent carcinogenic agent, little is known about possible radiation signatures. In order to find the tumor suppressor locus associated with radiation carcinogenesis, we determined the frequency and distribution of loss of heterozygosity (LOH) of X-ray-induced thymic lymphomas of B6C3F1 mice, and compared the results with those for spontaneous lymphomas and *N*-ethylnitrosourea (ENU)-induced lymphomas. A unique locus with frequent LOH in chromosome 11 was detected and the novel tumor suppressor gene, *Ikaros*, has been identified in radiation-induced thymic lymphomas. The results also indicate that *Ikaros* inactivation takes place in close association with radiation exposure.

(2) Carcinogenesis in immunodeficient mutant C.B-17 Scid mice:

The Scid mouse is immunodeficient and also radiosensitive because of point mutation in the DNA-PKcs gene. To analyze effects of *Scid* mutation on radiation carcinogenesis, Scid, C.B-17 and their F1 mice were irradiated with 1 to 3 Gy gamma-rays. Scid mice were extremely susceptible to the induction of thymic lymphomas by ionizing radiation. To examine development of radiogenic tumors in other organs, irradiated Scid mice were transplanted with normal bone marrow cells of C.B-17 mice. This treatment completely reduced development of thymic lymphomas, but no excess of other tumors was demonstrated comparing with that in C.B-17 and F1 mice. This may indicate that *Scid* mutation just correlate with induction of thymic lymphomas but not other tumors.

(3) Radiosensitivity in LEC rats:

The LEC rat is a mutant strain that spontaneously develops heritable hepatitis due to copper accumulation, caused by mutation of the copper transporting ATPase gene (*Atp7b*). In addition, radiosensitivity has also been reported. We analyzed linkage between radiosensitivity and the predisposing *Atp7b* gene in (F1 x LEC) backcross rats cross with the F344 rat. Our results clearly demonstrated an absence of any significant association between radiosensitivity and *Atp7b* gene. Now we are trying to establish congenic F344 strain by introducing LEC radiosensitive gene.

1. はじめに

放射線のリスクの中で最も重要なものは発がんである。発がんは、線質、線量や線量率などの物理的要因により左右される。しかし、同じ被ばく状況でも個人や民族により発がんの標的臓器や発がん感受性は異なる。これは、各個人の感受性は遺伝的要因に支配されており、また感受性を支配する遺伝子は臓器により異なるためであると考えられる。従って、放射線発がんに関与する遺伝的要因を解明することにより、被ばく者個人のリスクの予測や、その低減化に資することを目的として研究を進めた。

本研究課題で進めた研究内容は、大きく次の3つに分けられる。

1. 放射線誘発胸腺リンパ腫に特異的なゲノム変異の解析
2. Scid マウスを用いた動物個体レベルの放射線発がん
3. LEC ラットの放射線感受性

以下、それぞれの内容について報告する。

2. 放射線誘発胸腺リンパ腫に特異的なゲノム変異 (Radiation signature) の解析

発癌は放射線の最も重要な人体影響の一つである。特に低線量放射線による発癌リスクは社会的関心が高い。しかし、人の場合、発生する腫瘍の80%以上は環境因子が原因であると推測されており、また、放射線被ばくにより発生した腫瘍が自然発生したものと病理学的に区別がつかないために、放射線の発癌リスクの評価が不正確となる。放射線によって誘発される腫瘍に特異的なマーカー (痕跡) があれば、発癌のリスク推定をより正確に行うことが期待

されるが、そのようなマーカーに関する情報が少ないのが現状である。しかし、ラドンに被ばくしたウラン鉱山労働者の肺癌には、*p53* 遺伝子のコドン 249 の AGG→ATG の特異的な変異が観察されており、また、チェルノブイリ原子力発電所の事故後に増加している小児甲状腺癌には *RET* 遺伝子が *PTC3* 遺伝子とリアレンジメントする頻度が高く、その部位に反復配列が存在するという特徴があることが報告されている。これは放射線の痕跡 (radiation signature) の存在を示唆しているものと考えられる。しかし、ヒトの場合、被ばくしたヒトから発生した癌であっても、その原因にタバコや食事 (化学物質) 等の放射線以外の多くの要因も発がんに関わることから、放射線が原因で発生したと判断することが極めて難しい。そこで、発癌の原因となる諸因子をコントロールできる動物実験が有用となる。本研究では、放射線に特異的なゲノム損傷 (放射線の痕跡) を検討することを目的とした。そこで、マウスに、放射線や化学発癌剤であるエチルニトロソウレア (ENU) によって胸腺リンパ腫を誘発し、自然発生や化学発癌剤で誘発したリンパ腫ではなく、放射線で誘発したリンパ腫にのみ観察される特異的なゲノム変異の存在について探索した。

材料と方法

マウスは、腫瘍の自然発生率が比較的低い B6C3F1 雌マウス (チャールズ・リバー社) を用いた。母親の B6 系統は、胸腺リンパ腫を誘発しやすく (感受性)、逆に、父親の C3H マウスは、抵抗性である。胸腺リンパ腫は、生後5週齢のマウスに 1.6 Gy の X 線を1週間間隔に4回照射するか、400ppm エチルニトロソウレア (ENU) 水溶液を6週間飲料水として投与する事によって誘発した (図1)。胸腺リンパ腫は非処理群では20%以下と低く、発癌剤の処理によって

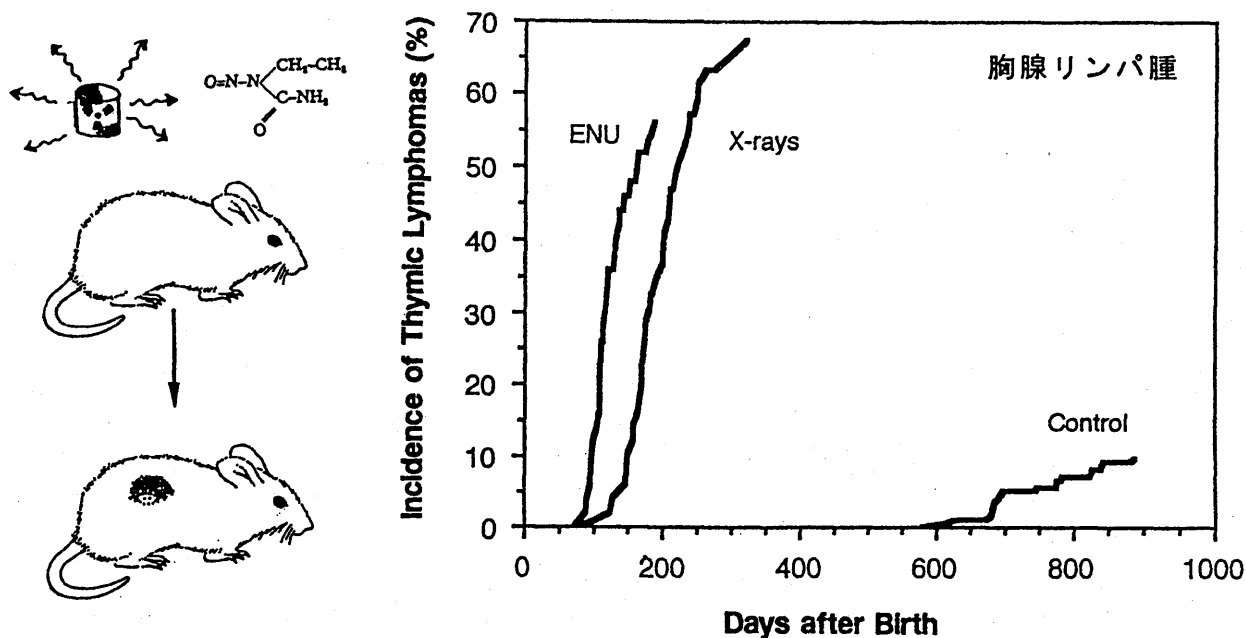


図1. X線、エチルニトロソウレア処理した B6C3F1 雌マウスにおける胸腺リンパ腫発生の経時変化。発がん処理は、生後5週目から行った。

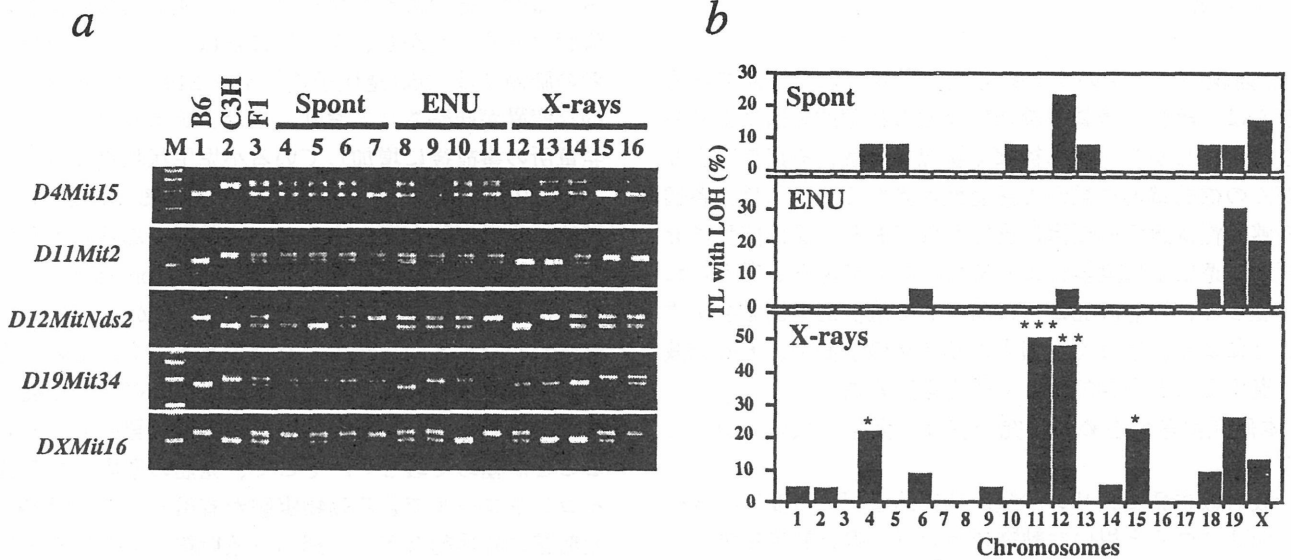


図2. (a) 自然発生、ENU 誘発、X線誘発胸腺リンパ腫のLOHパターン。LOHを示すリンパ腫では、増幅産物が1バンドになっている。(b) LOHの染色体分布。* $P < 0.05$ 、第4染色体は、ENU 誘発リンパ腫について、第15染色体は、自然発生とENU 誘発リンパ腫に対し有意。** $P < 0.01$ 、ENU 誘発リンパ腫に対し、有意。*** $P < 0.01$ 、自然発生とENU 誘発リンパ腫に対し、有意。

60%以上のマウスに発生した。これらの腫瘍からDNAおよびRNAを抽出し、58座位に対応するマイクロサテライトマーカーを用いてゲノムのヘテロ接合性の消失(LOH)を調べた。次いで、LOH領域にマップされる遺伝子について、RT-PCR法により遺伝子発現を、さらに塩基配列を決定して突然変異の有無を検討した。また、胸腺リンパ腫発生の主要原因であるN-, H-, K-rasの突然変異についても検討した。

LOH検索に用いたマイクロサテライトは、以下の通りである。

D1Mit17, D1Mit64, D1Mit94, D2Mit90, D2Mit101, D2Mit200, D2Mit343, D3Mit14, D3Mit49, D4Mit15, D4Mit89, D4Mit232, D5Mit15, D5Mit101, D6Mit15, D6Mit93, D6Mit366, D7Mit56, D7Mit154, D7Mit332, D8Mit31, D8Mit88, D9Mit4, D9Mit18, D9Mit110, D10MitN1, D10Mit42, D10Mit271, D11Mit2, D11Mit14, Acrb, D12MitNds2, D12Mit14, D12Mit37, D12Mit63, D13Mit35, D13Mit9, D13Mit64, D14MitNki1, D14Mit14, D14Mit265, D15Mit28, D15Mit43, D16Mit12, D16Mit88, D16Mit152, D17Mit39, D17Mit66, D17Mit76, D17Mit164, D18Mit7, D18Mit40, D18Mit59, D19Mit16, D19Mit34, D19Mit38, DXMIT16 and DXMit186.

LOH解析

ゲノムのヘテロ接合性の消失(LOH)は、癌抑制遺伝子の存在領域のひとつのマーカーとして広く調べられている。全染色体58座位にわたってLOHを検索したところ、リンパ腫当りのLOHの頻度は、放射線誘発リンパ腫で1.7座位、ENU誘発リンパ腫で0.6座位、自然発生リンパ腫では0.9座位であり、放射線誘発リンパ腫で最も頻度が高かった(図2)。染色体別には、第4、11、12、19染色体とX染色体

に高頻度にLOHが観察された。第4、12、19そしてX染色体では、X線誘発以外の腫瘍においてもLOHが観察されたが、第11染色体におけるLOHは、X線誘発リンパ腫の約50%という高頻度で認められ、放射線特異的であると考えられた。第11番染色体には、ヒトの癌の50%に突然変異がみられるというp53の癌抑制遺伝子がマップされている。しかし、第11番染色体で最もLOHが多く見られる領域(共通LOH領域)は、p53とは異なるセントロメア側に1.6 cMの範囲にマップされた。この領域をさらに狭くマップするために、(BALB×MSM)マウスに同じく放射線によって発生した胸腺リンパ腫(129個)についても同様に解析したが、共通領域は狭くならなかった。この領域には、LIF(Leukemia inhibitory factor)、OSM(Oncostatin M)、NF2(Neurofibromatosis 2)、Ikaros、EGFR(Epidermal growth factor receptor)などのT細胞の増殖分化を制御するいくつかの候補遺伝子がマップされている。そこで、放射線ハイブリッド法を用いて、LOH領域のマーカーとこれらの遺伝子の位置関係をさらに検討した。その結果、Ikaros遺伝子のみがこのLOH領域に存在することが明らかとなり、Ikaros遺伝子が候補遺伝子であると推測した(図3)。

Ikaros 遺伝子の突然変異解析

Ikarosは、Kruppel型のzinc finger転写因子であり、リンパ球の増殖、分化の制御因子である。まず、Ikarosの発現レベルをRT-PCR法で調べた。その結果、発現のないものが37例中5例(14%)に、短いPCR産物を発現しているものが11%(4/37)見つかった(図4)。塩基配列を決定したところ、短いPCR産物は、ちょうどN末のzinc fingerの一部を欠くアイソフォーム(Ik-4、Ik-6、Ik-8)および、エクソン6の30塩基(10アミノ酸、KSSMPQKLG)を欠損す

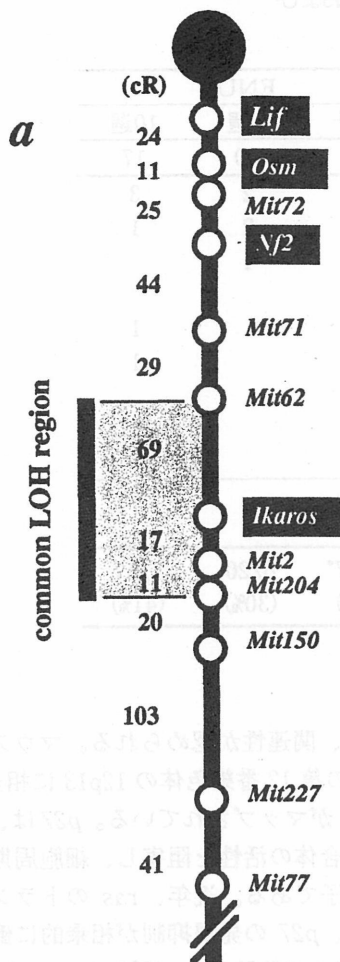


図3. 放射線ハイブリッド法を用いた共通 LOH 領域と各遺伝子 (*Lif*, *Osm*, *Nf2*, *Ikaros*) の位置関係。

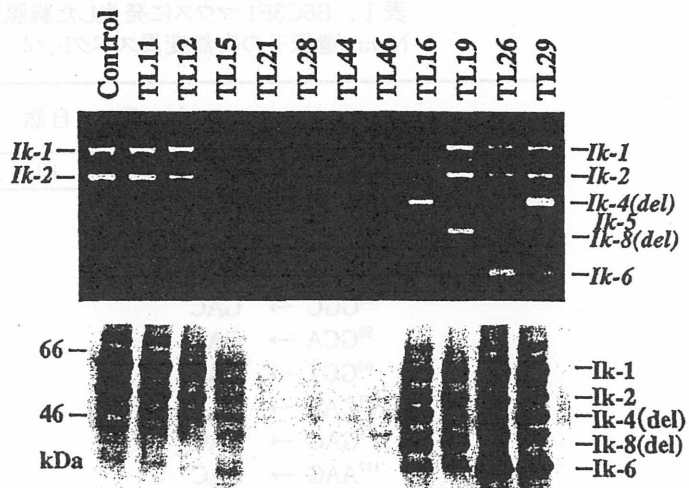


図4. *Ikaros* 遺伝子の発現パターン(上が RT-PCR, 下がウェスタンブロットの結果)。TL21、28、44、46 は、発現が認められない。TL16、19、26、29 は、短いアイソフォームが発現している。

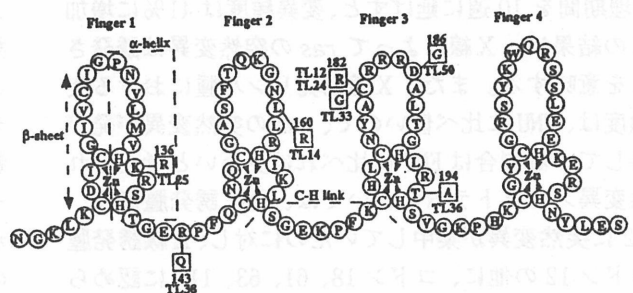


図5. 胸腺リンパ腫にみられる *Ikaros* のN末 zinc finger 領域におけるアミノ酸置換変異の分布。

るアイソフォーム (*Ik-6(del)*, *Ik-8(del)*) であることが明らかとなった。このアイソフォームの生成には、エクソンイントロン接合部位の塩基配列の突然変異が考えられたが、突然変異は認められなかった。現在のところ、なぜ、zinc finger を含むエクソンをスキップするのか機構は不明である。

次に、*Ikaros* 遺伝子の塩基配列レベルでの突然変異を検討した。その結果、8例にミスセンス変異が見つかった(図5)。これらの変異は、全てN末の zinc finger 領域に集中して観察された。特に、finger 3のシステイン(コドン 182)には、3例の変異が見つかり、突然変異のホットスポットである可能性がある。また、変異したアミノ酸は、*Ikaros* ファミリーである *Aiolos* や *Helios* も同じアミノ酸を有しており、これらの転写因子の機能に必須のアミノ酸であると考えられた。また、1例に、エクソン3に-GG-の挿入変異が見つかり、zinc finger の前でストップコドンが生じるナンセンス変異であった。この変異は、エクソン3を使わない *Ik-2* には影響を与えない。事実、ウェスタンブロットで、*Ik-1* はなかったが、*Ik-2* は存在した。点突

然変異8例中、トランスバージョンが2例、トランジションが6例だった。

Ikaros の変異と *Ikaros* 座位の LOH との関係を検討した。その結果、*Ikaros* が発現していないものと突然変異をもつものは、*Ikaros* 座位が LOH になっていたが、短いアイソフォームを持つものは LOH を示さなかった。また、*Ikaros* 座位が LOH を示すにも関わらず、*Ikaros* に変異がないリンパ腫が8例あり、*Ikaros* 以外の癌抑制遺伝子がこの近傍に存在することが推測された。

ras 突然変異

胸腺リンパ腫では、癌遺伝子である *K-ras* と *N-ras* の突然変異が多いことが報告されている。そこで、得られた胸腺リンパ腫について、*K-ras*, *N-ras* の変異を PCR-SSCP 法にてスクリーニングし、突然変異のあったものについては、TA クローニングして突然変異の配列を決定した。自然発生リンパ腫には、一例も *ras* の変異は認められなかった。しかし、X線誘発リンパ腫の17%、ENU誘発リンパ腫の30%に *K-ras* もしくは *N-ras* の突然変異が認められた(表1)。

表1. B6C3F1 マウスに発生した胸腺リンパ腫の K-ras および N-ras 遺伝子の突然変異スペクトラム

ras遺伝子の突然変異		処 理	自然	X線	ENU		
					合計	6週	10週
		TLの数	13	41	37	20	17
K-ras	¹² GGT →	GAT		1	5	2	3
		GTT		1	3	2	1
		TGT			1	1	
	¹⁸ GGC →	GAC		1			
	⁵⁹ GCA →	GAA			1		1
	⁶⁰ GGT →	GAT			1		1
	⁶¹ CAA →	CAC		1			
	⁶³ GAG →	AAG		2	1		1
¹¹⁷ AAG →	AAC		1				
N-ras	²³ CTA →	ATA		1			
	⁶¹ CAA →	AAA			1	1	
合 計			0/13 (0%)	8/41 (20%)	13/37* (35%)	6/20 (30%)	7/17 (41%)

* P<0.02.

ENU の処理期間を 10 週に延ばすと、変異頻度は 41% に増加する。この結果は、X線によって ras の突然変異は誘発されることを意味する。また、X線誘発リンパ腫における突然変異頻度は、ENU に比べ低いので、ras の突然変異が発がんに寄与している割合は ENU に比べれば少ないと考えられる。突然変異スペクトラムについては、ENU 誘発腫瘍は、コドン 12 に突然変異が集中していたのに対し、X線誘発腫瘍ではコドン 12 の他に、コドン 18、61、63、117 に認められた。X線誘発腫瘍の特徴は、スペクトラムが広いことが特徴であるのかもしれない。中性子線で誘発された胸腺リンパ腫では、他の腫瘍では一例も見つかっていない K-ras のコドン 146 の突然変異が見つかっていたり、HPRT などの特定遺伝子における点突然変異の場合も突然変異は全てのエクソンに広くみつかっており、この考えを支持している。突然変異のタイプに関しては、X線、ENU に関わらず、トランジションとトランスバージョンが同程度であった。先ほどの Ikaros の変異を併せて考えると、放射線によって直接形成されるトランスバージョン型が比較的低頻度なので、これらの点突然変異の形成に放射線が直接関与しているとは考えにくい。

ras 遺伝子の突然変異と第 6 染色体のアリルの不均衡性

PCR-SSCP 法で、K-ras 遺伝子の突然変異を調べている過程で、正常の K-ras 遺伝子を消失しているリンパ腫があった。おそらく、K-ras のマップされている第 6 染色体のテロメア領域に LOH があることを示唆するもので、この領域について LOH 検索を行った。X線誘発リンパ腫では、K-ras の突然変異をもつ 7 つのリンパ腫のうち、43% (3/7) は、この領域に LOH を示し、一方、K-ras の突然変異のない場合、1% 以下 (1/34) のリンパ腫にしか LOH は観察されなかった。即ち、K-ras の突然変異と第 6 染色体のテロ

メア領域の LOH には、関連性が認められる。マウスのこの染色体領域は、ヒトの第 12 番染色体の 12p13 に相当し、ここには、p27 (Kip1) がマップされている。p27 は、種々のサイクリン/Cdk 複合体の活性を阻害し、細胞周期を負に制御する癌抑制遺伝子である。近年、ras のトランスフォーメーション活性に、p27 の発現抑制が相乗的に働くことが報告されている。我々の胸腺リンパ腫においても、K-ras の変異と p27 の変異は、共同して発がんに寄与していると推測された。

B6C3F1 における第 6 染色体の LOH は、5 例中 4 例が、C3H のアリルが残るタイプであったことから、突然変異は C3H 由来の K-ras に偏って起こったと推測できる。この偏りが、親の性 (父方か母方) によるのか、系統 (B6 か C3H) によるのかを明らかにするために、逆のかけ合わせの C3B6F1 において消失バンドの偏りを比較した。しかし、残念ながら、この F1 においては、46 例中 1 例にしか LOH は観察されなかった。

考察

本研究から、(1) ゲノムのヘテロ接合性の消失 (LOH) は、放射線誘発胸腺リンパ腫に高く、放射線特異的に第 11 番染色体の LOH が存在すること、(2) この LOH 領域にリンパ球の増殖、分化因子である Ikaros がマップされ、Ikaros 遺伝子が高頻度 (~50%) で複数のメカニズムで異常になっていること、(3) ras の変異は、放射線誘発では比較的低いこと (~20%)、(4) ras 変異は、第 6 番染色体の LOH と相関していることなどが明らかとなった。以上の結果から、B6C3F1 マウスの放射線による胸腺リンパ腫の発生において、LOH が重要であり、特に、第 11 番染色体の LOH に伴う Ikaros の変異が大きく寄与していることが示された。

Ikaros は、未分化な造血幹細胞のリンパ球系列へのコ

ミットメントや、T細胞の増殖分化に関わる zinc finger をもつ転写因子である。本研究の解析から、Ikaros は癌抑制機能を持ち、その機能の消失は少なくとも2つの様式で起こることが示された。すなわち、典型的な癌抑制遺伝子のように、LOH により2つのアレルともにその機能を消失する場合（発現なしと点突然変異）とドミナントネガティブ型の変異を起こすことにより正常アレルの Ikaros の機能もなくす場合である。後者は、LOH を伴わない。実際、Ikaros を発現しないノックアウトマウスでは、生後、しばらくたってから、異常分化したT細胞が胸腺内に現れ、強い増殖活性を持つことが報告されている。また、ドミナントネガティブ型の Ikaros を持つマウスは、生後すぐは、正常にT細胞の発生が進行するが、3週後から異常分化が始まり、3ヶ月以内に胸腺リンパ腫が発生することが報告されている。これらの結果は、本研究の結果、即ち、Ikaros は、2つのアレルの機能喪失もしくは1つのアレルがドミナント型になることが細胞をトランスフォーメーションへ導くという推測と一致する。今後は、Ikaros が異常になってどのような経路で癌化が進行していくのか、Ikaros の下流の遺伝子の同定が重要であろうと考えている。

では、放射線なぜ LOH が増加するのだろうか。近年、2本鎖 DNA の切断によって高まる組み換え修復のまちがひによって、LOH 形成が促進されるということが報告されている。X線は直接2本鎖切断を生成するので、これによって放射線誘発リンパ腫における高い LOH が説明できると思われる。しかし、なぜ第11番染色体のセントロメア領域に特に多発するのは説明できない。我々は、LOH 解析から、Ikaros 座位を挟んで、組み換え頻度の高い領域があることを明らかにしている（未発表）。この部位のゲノムの構造解析を行うことにより、なぜX線でこの領域に LOH が多発するのかがわかると期待される。

現在、“分子疫学”という新しい学問が盛んになってきている。これは、がんが臨床的に明らかになる前に、体内で起こっている変化をつきとめることや、がんになりやすい遺伝的な要因を明らかにし、これを生体指標（マーカー）として用いることで、将来発生するかもしれないがんをいち早く予言し、予防に役立てようとするものである。さらに、この分野において、癌細胞において異常がみついている遺伝子の変異のパターンから、がんの原因物質を推定しようと研究も盛んになっている。例えば、ひとの癌の約半数に異常が見られる *p53* 遺伝子を例にとると、アフラトキシンで誘発された肝がんにもみられるコドン 249 の G→T の変化が、紫外線が原因の皮膚癌にもみられる C→T の変化、たばこが原因の肺癌にもみられるコドン 248 や 273 の G→T の変化、魚のごげ成分（ヘテロサイクリックアミン）による -GGGA- 配列の G の欠失などが報告されている。一方、自然発生腫瘍では、CpG 配列において G→A に変化していることが多い。同様に、放射線による発がんにおいても、放射線による生体指標を同定することは、発がんメカニズムの解明のみならず、がんのリスク評価に大きく貢献することが期待されている。しかし、放射線は種々の DNA 損傷

をつくるので、現在までのところ生体指標の存在にはどちらからといえば否定的な考え方が強い。しかし、ラドンによる肺癌のコドン 249 の G→T や、チェルノブイリ原子力発電所の事故後の小児甲状腺癌における *RET* 遺伝子と *PTC* 遺伝子との再構成、 β 線によるマウスの皮膚癌には、小さな欠失や挿入が観察されており、放射線の DNA 損傷の特異性を反映している損傷も示唆されている。さらに、本研究で、X線によって誘発したマウス胸腺リンパ腫において、他の原因で発生したリンパ腫に比べ、高頻度で特異的な LOH 領域が存在することと *Ikaros* 遺伝子の突然変異が明らかとなった。突然変異のパターンによって、発がんの原因物質を特定するまでには、まだまだ情報が足りない。しかし、DNA との付加体や発がん物質の被ばく状況、染色体異常などの他の情報と合わせることによって、発がんの原因をより正確に推測することができると期待できる。

3. Scidマウスを用いた動物個体レベルの放射線発がん（線量依存性と遺伝的要因の研究）

重症複合免疫不全症（Scid）マウスは、免疫系細胞における V(D)J 組み換えができないと同時に、放射線に対する感受性が高い。その原因は突然変異による DNA 依存性プロテインキナーゼの触媒サブユニット（DNA-PKcs）分子の一部欠失による DNA 二本鎖切断修復能の低下であることが知られている。この DNA-PKcs の機能の障害による DNA 損傷修復能の低下と発がん感受性、発がんの特性について解析を行った。

今回の一連の研究で用いた C.B-17/Icr-Scid マウス（Scid マウス）、C.B-17/Icr マウス（C.B-17 マウス）、および C3H Scid マウスは日本クレア（CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan）より購入し、放医研動物管理室の協力により、帝王切開による清浄化の後、マウス生産施設に導入し、動物管理室によって生産されたものである。また、交雑初代 F1 マウスは、C.B-17 マウスを母親とし、Scid マウスを父親として動物飼育室内で交配して得た子を用いた。

Scidマウスの放射線発がん実験

Scid マウスを用い、DNA-PKcs 能の欠失したマウス個体レベルでの放射線発がんの組織特異性や線量依存性を調べ、DNA-PKcs と放射線感受性、放射線発がん感受性の関連性を調べることを目的として、Scid マウス（Scid 遺伝子ホモ；Scid/Scid）とその親系統である、C.B-17 マウス（野生型；+/+）、およびそれらの交雑初代 F1 マウス（Scid 遺伝子ヘテロ；Scid/+）を用いて γ 線照射による発がん実験を行った。

表 2 に、雌の Scid マウス、C.B-17 マウス、および F1 マウスに発生した主な腫瘍についての結果を示した。このほか骨髓性白血病、腎臓、脾臓、脳、骨、軟部、脳下垂体、胃、小腸、大腸などの腫瘍の発生は、ごくわずかであるか、もしくはみられなかった。Scid マウスでは、1 Gy 以上の線

量群で、70%以上の個体に胸腺リンパ腫が発生し、照射後20週～40週で死亡したために照射後の平均生存期間の顕著な短縮がみられ、結果として競合的に他の腫瘍発生を抑制した。

C.B-17マウスおよびF1マウスの主な自然発生腫瘍は、肺腫瘍、副腎腫瘍、リンパ腫（非胸腺リンパ腫）、子宮腫瘍などであり、胸腺リンパ腫、肺腫瘍、卵巣腫瘍の発生率は低かった（1～10%前後）。放射線照射（1Gy以上）により、肝腫瘍、卵巣腫瘍が誘発され、それぞれ30%台、60%台に増加したが、胸腺リンパ腫発生率の増加は、非照射群と比べて統計的に有意ではなかった。表2の腫瘍発生率の中で、胸腺リンパ腫以外の腫瘍については、1)放射線照射に依存せず、線量によって増加も減少もしなかったものをAグループ（肺腫瘍、副腎腫瘍）、2)放射線照射に依存して腫瘍発生が誘発されたものをBグループ（肝腫瘍、卵巣腫瘍）、3)放射線照射によって腫瘍発生がやや減少したものをCグループ（乳腺腫瘍、非胸腺リンパ腫、子宮腫瘍）と3グループに分けて示した。このグループ分類は、次の項で述べる骨髄移植実験結果の検討の参照とした。

表2に示したように、C.B-17マウスでは腫瘍発生パターンをA、B、Cの3グループに分けることができたが、F1マウスでも同じ傾向が見られ、Scid遺伝子がヘテロになったことによる影響はほとんどの腫瘍ではみとめられな

った。卵巣腫瘍の発生については、F1マウスの1～2Gy照射群ではC.B-17マウスとはほぼ同じである。F1マウスの3Gy照射群では野生型マウスに比べ発生率が低下したが、これがScid遺伝子がヘテロになった影響が否かは不明である。

図6には、Scidマウスの胸腺リンパ腫による生存時間解析の結果を示した。照射後の平均生存期間の短縮は線量依存性が見られたが、1、2、3Gy各群間で有意差はみられなかった。中・低線量域（1Gy）以下の線量域におけるScidマウスの胸腺リンパ腫発生については今後の検討課題である。

胸腺以外の組織におけるScidマウスの放射線誘発腫瘍発生

胸腺細胞では放射線照射によってV(D)J組み換えが誘発されることから、Scidマウスの胸腺リンパ腫発生にはDNA-PKcsの一部欠失による異常なV(D)J組み換えが関与している可能性が示唆された。しかし、DNA-PKcsは放射線によるDNA二重鎖切断修復にも関与しているので、V(D)J組み換えを行わない胸腺以外の組織における放射線発がん促進作用の有無を調べるためには、早期の死亡原因となる胸腺リンパ腫の抑制が必須である。そこで、放射線照射直後のScidマウスに非照射野生型マウスの骨髄細胞（ 10^7 cells/マウス）を移植して免疫系を再建し、胸腺リンパ腫の発生を抑制することにより、胸腺以外の組織にお

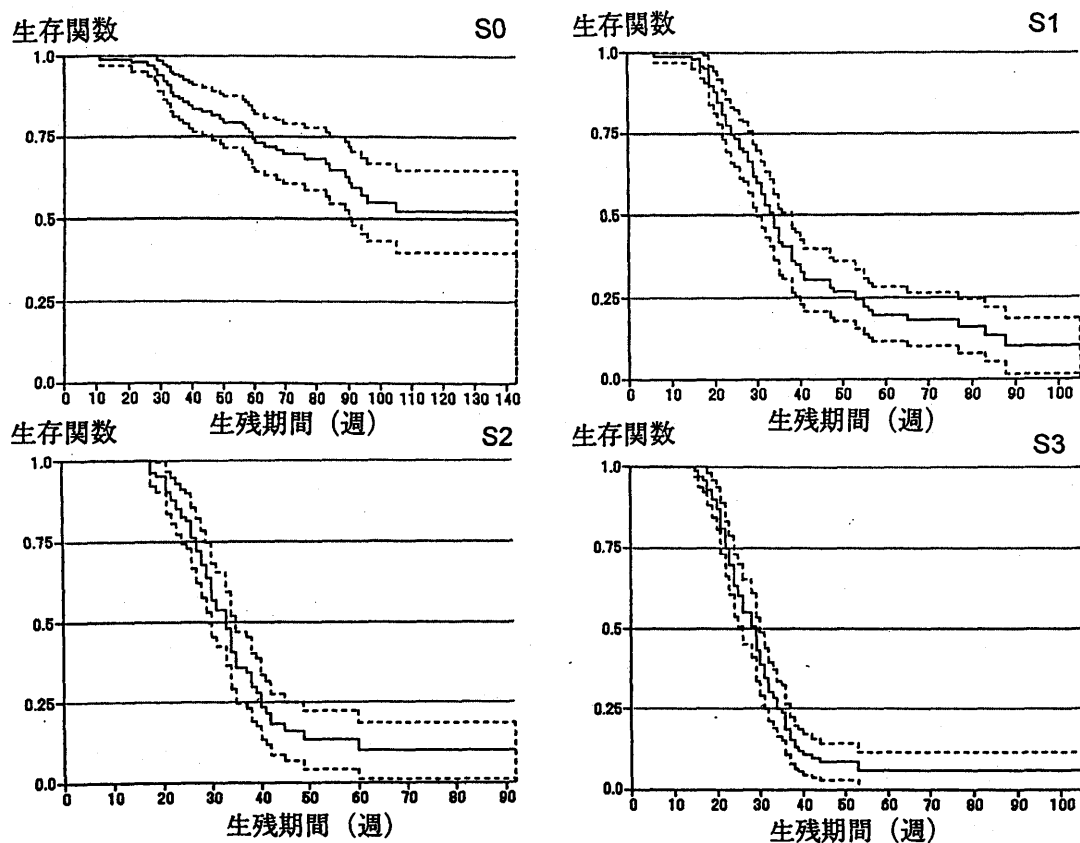


図6. 胸腺リンパ腫発生によるScidマウスの放射線照射後の生存関数。Scidマウスの照射0、1、2、3Gy各実験群(それぞれ図の中にS0、S1、S2、S3と示す)における胸腺リンパ腫による生存関数をカプランマイヤー法(Greenwoodによる近似)で推定した。マウスは8週令で照射し、その時点をも横軸に0週として表し、縦軸に生存関数の推定値(実線)とその95%信頼区間を点線で表した。

表2. 放射線照射によるScid、C.B-17、F1各マウスの腫瘍発生

実験群	動物	照射線量 (Gy)	動物数 (匹)	担癌動物数 (%)	平均生存期間 (週)	腫瘍 (%)											
						A			B			C			C		
						胸腺	肺	副腎	肝臓	卵巣	乳腺	非胸腺 リンパ腫	子宮				
S0	scid	0	108	93.5	75.7	38	29.6	26.9	13.9	7.4	7.4	18.5	53.7				
S1	scid	1	106	97.2	38.4	71.7	8.5	8.5	11.3	15.1	0	14.2	5.7				
S2	scid	2	106	98.1	30.2	82.1	1.9	2.8	2.8	0.9	0	13.2	0				
S3	scid	3	106	85.8	32.4	70.8	0	0.9	1.9	0.9	0	18.9	3.8				
C0	C.B-17	0	100	95	98.5	1	43	42	10	8	12	68	44				
C1	C.B-17	1	100	95	89.4	2	42	40	21	67	16	49	18				
C2	C.B-17	2	100	95	84.2	5	42	38	31	60	17	54	20				
C3	C.B-17	3	100	94	79.6	5	41	44	39	60	4	53	21				
F0	F1	0	106	92.5	103	4.7	34	35.8	8.5	1.9	11.3	64.2	28.3				
F1	F1	1	105	98.1	91.3	2.9	30.5	41.9	21	58.1	22.9	55.2	15.2				
F2	F1	2	103	98.1	89.5	0.9	34	34	35.9	65	6.8	55.3	13.6				
F3	F1	3	107	92	79.4	6	30	32	32	38	6	48	10				

雌の8週令マウスに、¹³⁷Csγ線一回全身照射した後、SPF環境下で終生飼育し、死亡動物の病理解析を行った。照射線量としては、0、1、2、3Gyの4群を設定した。Scidマウスとその野性型であるC.B-17系統マウス、およびそれらの交雑初代F1マウスについての発癌実験結果を表1に示した。すべて病理解析結果であるが、実験群F3のみは結果が解析中のため動物数50番目までの腫瘍発生率の結果を示した。

表3. 骨髄移植による胸腺リンパ腫発生の抑制

実験群	動物	移植骨髄 ドナー	動物数 (匹)	担癌動物数 (%)	平均生存期間 (週)	腫瘍 (%)											
						A			B			C			C		
						胸腺	肺	副腎	肝臓	卵巣	乳腺	非胸腺 リンパ腫	子宮				
1	scid 3Gy	scid	90	67.8	54.6	41.1	16.7	1.1	0	0	0	7.8	0				
2	scid 3Gy	C.B-17	90	55.6	96.3	0	25.6	12.2	2.2	4.4	1.1	18.9	1.1				
3	scid 0Gy	C.B-17	90	95.6	91.4	17.4	26.7	11.1	3.3	6.7	21.1	38.9	16.7				
4	C.B-17 3Gy	C.B-17	57	94.7	79.6	10.5	35.1	14.0	3.5	57.9	14.0	35.1	1.8				
5	C.B-17 3Gy	scid	57	96.5	87.4	3.5	38.6	15.8	3.5	71.9	21.0	45.6	0				
6	C.B-17 0Gy	scid	57	96.5	102.1	3.5	31.6	14	1.8	8.8	33.3	54.4	3.5				

宿主として、8週令の雌Scidマウスあるいは雌C.B-17マウスを用い、照射後ただちにドナー(雄マウス)の大腿骨から調製した骨髄細胞(10⁷ cells/マウス)を静脈注射した。表には示さないが、死亡時にY染色体を持つ骨髄細胞の割合から骨髄細胞の置換率を調べた結果、3Gy照射マウス(実験群1,2,4,5)の骨髄細胞はすべてドナー由来に置き換わっていたが、非照射Scidマウス(実験群3)では部分的に置換され、非照射C.B-17マウスへのScid骨髄細胞移植(実験群6)ではほとんど骨髄は置換されれていなかった。表2の結果は病理解析中なので、解剖時の肉眼所見を示した。

る発がん性を調べた。

その結果を表3に示す。3 Gyの γ 線を照射したScidマウスに、C.B-17マウスの骨髓細胞を移植した実験群2では、胸腺リンパ腫の発症は完全に抑制された。しかし、0 Gy照射ScidマウスにC.B-17マウスの骨髓細胞を移植した実験群3と比較しても、統計的に有意差をもって放射線で誘発された腫瘍は見られなかった。C.B-17マウスでBグループ(表2)に分類された腫瘍(肝腫瘍、卵巣腫瘍)については、実験群2と実験群3の間で有意差がなかった。Cグループに分類された乳腺腫瘍、非胸腺リンパ腫、子宮腫瘍は、C.B-17マウスやF1マウスと同様にScidマウスでも放射線照射群で腫瘍発生率が減少していた。卵巣腫瘍に関しては個体レベルではむしろ放射線により腫瘍の発生が抑制された。卵巣腫瘍に関してはScidマウスでは3 Gyという線量は多すぎる可能性があるため、線量を下げて検討する必要がある。これらの結果から、放射線による腫瘍の発生にScid遺伝子変異が関与するのは、V(D)J組み換えの行われる胸腺に限られている可能性が示唆された。

C3H Scidマウスの放射線感受性と発癌感受性

Scid変異の発現における遺伝的要因の実態を解明するために、C3HマウスにScid変異を導入したコンジェニック系統のC3H Scidマウスの放射線感受性を調べ、C.B-17系統を背景とするScidマウスのデータと比較した(図7)。C3H Scidマウスの野生型系統であるC3HマウスとC.B-17マウス

では放射線感受性に差はなく、両系統ともにLD_{50/30}は約7 Gyであったが、Scid変異を有するマウスでは、C.B-17 ScidマウスのLD_{50/30}値が4.2 Gyであったのに比べ、C3H Scidマウスでは2.2 Gyと有意に感受性が高かった。

以上の一連の動物実験では、雌マウスを使ったが、これは卵巣腫瘍が放射線で高頻度に誘発される腫瘍なので、その発生を解析の対象としたためである。しかし、マウス生産施設内で飼育していたC3H Scidの雄マウスでは、胸腺リンパ腫の自然発症年齢が早かったため、4系統の雄マウスについても放射線感受性を調べた。その結果、野生型マウスの放射線感受性では、C.B-17マウスとC3Hマウスの系統差も、また雌雄間の性差もなかったが、ScidマウスではC3H ScidマウスでもC.B-17 Scidマウスでも雄のLD_{50/30}値は雌のLD_{50/30}値より小さく、放射線感受性が高いという結果を得た。C.B-17 ScidマウスとC3H Scidマウスの交雑初代F1マウスでは、どちらの系統を母親にしても違いがなく、C.B-17 Scidマウスとほとんど一致する値を示した。

図8にC.B-17 ScidマウスとC3H Scidマウス(雌)の胸腺リンパ腫発生率を示した。C3H Scidマウスは胸腺リンパ腫の自然発生率が高く、0.5 Gy以上の放射線照射によって腫瘍発生率はむしろ低下した。C3H Scidマウスでは放射線による発がん感受性が低いのではなく、0.5 Gyでも線量が多すぎるといことも考えられる。C3H Scidマウスを導入したのは、C.B-17 ScidマウスでわずかにみられるV(D)J組み換え(リーキーと呼ばれる現象で機能をもたない免疫グ

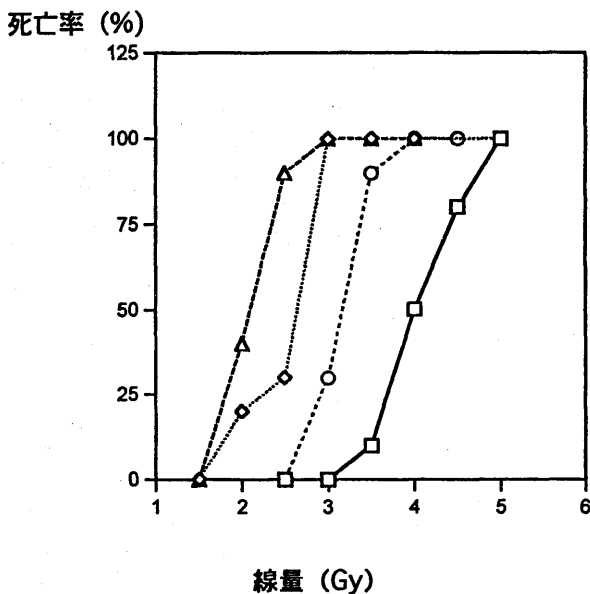


図7. C.B-17 Scidマウス、C3H Scidマウスそれぞれの雌雄の放射線感受性。各点あたり10匹のマウスを用い、8週令で、横軸に示した線量の¹³⁷Cs γ 線の全身一回照射(線量率毎分約0.5 Gy)を行って、照射後30日までの死亡率を縦軸に表した。□: Scidマウス(雌)、○: Scidマウス(雄)、◇: C3H Scidマウス(雌)、△: C3H Scidマウス(雄)。

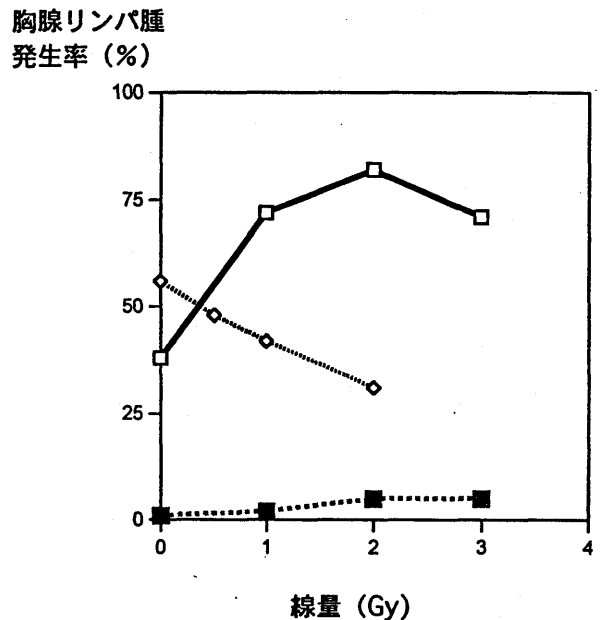


図8. C.B-17 Scidマウス、C3H Scidマウス、C.B-17マウスの胸腺リンパ腫発生率。C.B-17 Scidマウス(□)、C.B-17マウス(■)については各点100匹、C3H Scidマウス(◇)については各点50匹の雌マウスを用いた。横軸に示した線量の¹³⁷Cs γ 線を8週令のマウスに照射し、終生飼育したときの胸腺リンパ腫発生率を縦軸に示した。C3H Scidマウスについては3 Gy照射するとほとんどのマウスが照射後30日以内に死亡するので3 Gyの代わりに0.5 Gyを用いた。

ロブリンが産生される)がC3H Scidマウスではほとんどみられないという報告があったからである。しかし、C3H Scidマウスにおいても、リーキー現象は程度の差こそあっても皆無ではなかった。V(D)J組み換えの関与を完全に排除するには異なる動物実験系を用いなければならない。

C.B-17 ScidマウスとC3H Scidマウスの交雑初代F1マウスを使った発がん実験はまだ終了していないが、一方の系統を母親とし、他の系統を父親としても、また逆の組合せにしても、F1マウスの胸腺リンパ腫の自然発生率はC.B-17 Scidマウスに近い値であって、胸腺リンパ腫発生の線量依存性もC.B-17 Scidマウスに近いという予備的データを得ている。放射線感受性を指標として、C.B-17 ScidマウスとC3H Scidマウスを使って染色体上の遺伝子マーカーの連鎖解析を試みた結果、Scid遺伝子変異の放射線感受性、発癌感受性の効果を修飾(促進あるいは抑制)する複数の遺伝子の存在が示唆されたので、遺伝子の染色体上の位置と既知の遺伝子との関連について検討中である。

まとめ

以上のScidマウスを用いた放射線発がん動物実験から、全身照射を受けたScidマウスの腫瘍発生は、胸腺に特異性の高い現象であること、また、胸腺リンパ腫の発生を骨髄移植によって抑え、長期間飼育しても、V(D)J組み換えを行わない胸腺以外の組織では放射線誘発腫瘍発生の促進はみられないことが実験的に証明された。すなわち、この放射線高感受性突然変異動物実験においては、Scid遺伝子変異によるDNA-PKcsに欠失があっても、DNA二本鎖切断修復能の低下による放射線高感受性と、V(D)J組み換えが関係する胸腺の発がん高感受性の間には異なるメカニズムが存在する可能性が示された。また、Scid遺伝子変異による放射線急性障害あるいは発がんのメカニズムに関わる遺伝的要因の探索に有用な動物実験系として、遺伝的背景を異にするC.B-17 ScidマウスとC3H Scidマウスを用いた解析から、Scid遺伝子変異を有する動物の発がん感受性を修飾する遺伝子の存在が示唆された。

4. LEC ラットの放射線感受性

1985年にLECラットでは、遺伝性の劇症肝炎が発生することが報告された。その後、この原因は体内での銅代謝に関与するATPaseをコードするAtp7b遺伝子の部分的欠失によるものであることが明らかにされた。この遺伝子はヒトの銅代謝に関与し、Wilson病の責任遺伝子でもあるATP7B遺伝子に対応する遺伝子であった。Atp7b遺伝子の欠失は900塩基対以上にも及んでいる。銅は肝細胞に蓄積し、蓄積した銅によりOHラジカルが発生することにより、肝細胞が障害され、高度の黄疸を伴う劇症肝炎が発生し、約半数が死亡する。死を免れても最終的には肝癌の発生に至る症例も多い。

このLECラットは劇症肝炎を発症するのみならず、免疫系の異常があり、また放射線高感受性を示すことも報告されている。林らは、LECラットとWKAHラットを用いて放射線感受性の遺伝学的解析を行い、(LEC×WKAH)F1マウスのLECラットへの退交配(バッククロス)ラットでは、感受性の子と抵抗性の子が1:1に分離したことから、感受性は常染色体性単一遺伝子に支配されていることを報告している。彼らはまた、銅や過酸化水素のみならず放射線によってもラジカルができることから、LECラットでは銅の蓄積が放射線感受性に関わる可能性を示唆した。

今回の研究では、ヒトWilson病責任遺伝子ATP7Bに相同性を持つAtp7b遺伝子と、放射線感受性との間に連鎖があるか否かの検定をおこなった。また、F344ラットに放射線感受性の導入を行い、コンジュニック系統を作成することを試みている。

F344ラットとLECラットは日本チャールスリバー社から購入し、晩発棟動物室で兄妹交配により系統を維持するとともに、それらの系統間の交配に用いた。実験に当たっては、放医研の「実験動物取扱安全衛生管理規定」および「実験動物に関する指針」に従って動物を取り扱った。

放射線感受性の解析

4週齢のLEC、F344および(F344×LEC)F1ラット、各照射線量群当たり20~21匹(雌雄各10~11匹)を用いてX線(200kVp、36~37Gy/分:信愛250、島津製作所)を一回照射した。照射に用いた線量はLECラット、2.0~4.0Gy、F344ラットとF1ラット、5.0~7.5Gyであった。照射後、30日間観察したが、各線量毎の死亡率に性差は見られなかったため、雌雄のデータを併せて解析を行った。LECラットは2.0Gyでは全例生存し、3.5Gyでは全例死亡した。他方、F344ラットとF1は7.0Gy以上の線量で全例死亡した(表4)。

LD_{50/30}の計算にはBehrensの方法を用いた。LD_{50/30}値はLECラットでは2.6Gy、F344ラットでは6.3Gy、F1ラットでは5.5Gyであった。即ち、LECラットとF1ラットあるいはLECラットとF344ラットの間には、はっきりした感受性の相違があり、F1とLECラットの間でも感受性に差が見られた。同じ線量を被曝したF1ラットとLECラットの間では生存期間にも差が見られ、7.0Gy照射後のF1ラットとF344ラットの平均生存期間はそれぞれ13.3±1.9日(n=21)と18.7±4.0日(n=20)で、有意の差であった(t-test: p<0.01)。

表4. 各線量におけるLEC、F1およびF344ラットの死亡率(%)

ラット	線量 (Gy)											
	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5
LEC	0	36	83	100	100							
F1							0	36	83	98	100	
F344							0	0	11	70	100	100

林らは、LEC ラット、WKAH ラット、およびそれらの F1 ラットを用いた解析で、それぞれの LD_{50/30} 値を 3.0 Gy、7.8 Gy、7.2 Gy と報告しているが、今回の結果はその値に類似しており、LEC ラットは放射線に非常に感受性が高いことが改めて証明された。一方、F1 ラットは相当に抵抗性ではあるが、野生型ラットよりは感受性が高いことも、林らの結果と一致した。このことは、放射線感受性遺伝子は部分的優性 (partial dominance) であることを示す現象であり、我々が解析した放射線高感受性 Scid マウスにおける放射線感受性の検定の際にも同様の現象が見られた。

放射線感受性と *Atp7b* 遺伝子の連鎖の解析

次に、放射線感受性と *Atp7b* 遺伝子の間に連鎖があるか否かの解析を行った。まず雌の F344 ラットと雄 LEC ラットを交配し、得られた (F344×LEC) F1 ラットを LEC ラットに退交配 (バッククロス) し、得られた子ども (BC ラット) を実験に用いた。BC ラットが 3 週齢になった時に尻尾の一部を採取し、-30℃の冷凍庫に保存した。4 週齢時に、4.0~4.5 Gy の X 線を照射し、30 日間観察して各個体の放射線感受性を決定した。

各個体のサザン法による *Atp7b* 遺伝子のタイプの解析に当たっては、凍結保存した尻尾の細胞から DNA を抽出し、制限酵素 Pst I で切断し、1% アガロースゲルで電気泳動した後、フィルターに転写した。その後、³²P でラベルした Wilson 病原因遺伝子の一部 (フォワードプライマー-3310-3329、リバースプライマー-4080-4099 で増幅した RT-PCR 産物) を用い、ハイブリダイゼーションを行った。この領域は LEC ラットで欠失しているため、F344 ラットの DNA ではバンドが出現するが、LEC ラットの DNA ではバンドが出現しない。

各個体毎に放射線感受性と *Atp7b* 遺伝子の型を対応させ、連鎖の解析を行った (表 5)。放射線高感受性を示した BC ラット 81 匹の内、*Atp7b* 遺伝子が LEC 型を示したラットが 36 匹、F344 型を示したラットが 45 匹であった。一方、放射線抵抗性を示した BC ラット 40 匹の内、*Atp7b* 遺伝子が LEC 型を示したラットが 21 匹、F344 型を示したラットが 19 匹であった。この結果は、感受性ラットと抵抗性ラットそれぞれで、*Atp7b* 遺伝子はおおよそ 1:1 で LEC 型と F344 型に分離することを示しており、放射線感受性と *Atp7b* 遺伝子には連鎖が無いことが明らかになった。

また、この解析では、BC ラットで放射線高感受性動物と抵抗性動物は 81 匹と 40 匹でほぼ 2:1 になったが、このことは、放射線感受性を支配する遺伝子は、単一ではない可能性を示唆するものと考えられた。

放射線感受性遺伝子導入コンジュニック系統の作出

新しい放射線高感受性ラット系統を樹立するために、LEC ラットの放射線感受性遺伝子を F344 ラットに導入し、コンジュニックラット系統の作出を進めた。

表 5. 放射線感受性と *Atp7b* 遺伝子型の組合せと各々の [(F344 × LEC)F1 × LEC] ラットの匹数

放射線感受性と <i>Atp7b</i> 遺伝子の表現型		
放射線感受性 ^a	遺伝子型 ^b	動物匹数
感受性	LEC	36
	F344	45
抵抗性	LEC	21
	F344	19

^a 放射線感受性は、X 線を 4.0 Gy または 4.5 Gy 照射後、30 日間観察して決定した。

^b 遺伝子の表現型はサザン法で決定した (LEC: LEC ラット型遺伝子型、F344:F344 ラット型遺伝子型)。

まず、雌 F344 ラットに雄 LEC ラットを交配し、得られた F1 ラットを雄 F344 ラットに交配して N2 世代を得た。この世代以降は感受性遺伝子をヘテロで持つ子供と野生型遺伝子の子供が生まれるため、感受性遺伝子がヘテロで入っているか否かの検定が必要である。そのため、後世代検定法を採用した。各世代の雌マウスは雄 LEC ラットと交配し、その子供が 4 週齢になった時に、4.5 Gy 照射し、30 日間観察した。複数の死亡動物が出た場合、感受性遺伝子がヘテロで入っていると判定し、その母親を雄 F344 ラットと交配し、次の世代を得るという方法で、コンジュニック系統の作成を進めている。平成 12 年度末で第 10 世代まで得られている。

各世代毎に、LEC ラット由来のゲノムは半分ずつに減っていく計算であるので、第 10 世代では、LEC ラット由来のゲノムは約 0.1% である。

今後の予定としては、第 13 世代では LEC ラット由来のゲノムは約 0.01% になるので、第 13 世代で雌雄のラットの感受性検定を行い、ヘテロ同士で交配し、感受性遺伝子ホモの雌雄を得、コンジュニック系統として樹立する予定で、系統の樹立に更に 2~3 年を見込んでいます。

5. 謝辞

本研究を遂行するに当たり、ご指導いただいた大分県立看護科学大学の佐渡敏彦先生に感謝いたします。また、長期実験のために動物の衛生状態を維持してくださった、松下 悟、早尾辰雄両氏をはじめ実験動物植物開発管理室の皆様へ感謝いたします。さらに、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、小原えり子さん、徐幸順さん、南口昌美さん、野村賢敏さん、永井絢也さん、甘崎探都子さん、久保 歩さんには多くの実験のサポートを得、心から謝意を表します。

6. 誌上発表(論文、総説等)

1. Kobayashi, S., Otsu, H., Noda, Y., Ogiu, T.: Comparison of dose-dependent enhancing effects of γ -ray irradiation on urethan-induced lung tumorigenesis in athymic nude (*nu/nu*) mice and euthymic (*nu/+*) littermates. *J. Cancer Res. Clin Oncol.*, **122**, 231-236, 1996.
2. Shimada, Y., Ito, H.: Heterogeneous ageing of macrophage-lineage cells in the capacity for TNF production and self renewal in C57BL/6 mice. *Mech. Aging Develop.*, **87**, 183-195, 1996.
3. 島田 義也: ガードナー仮説を支持する動物実験はあるか? ~ガードナー説の生物学的妥当性~, “父親の被ばくと小児白血病 ~ガードナー仮説に対する検討~” (英国白血病調査検討会), pp.85-104、原子力安全研究協会、1996.
4. 島田 義也: 電離放射線のがん誘発に関する線量および線量率の効果 (20~37)、“放射線防護のための低線量・低線量率における放射線発がんリスク” (翻訳)、原子力安全研究協会、1996.
5. 島田 義也: TNF- α とその受容体、“血管新生のメカニズムと疾患” (編集: 室田、井藤) pp.105-116、医薬ジャーナル社、1996.
6. Ogiu, N., Nakamura, Y., Ijiri, I., Hiraiwa, K., Ogiu, T.: A statistical analysis of the internal organ weights of normal Japanese people. *Health Phys.*, **72**, 368-383, 1997.
7. Kobayashi, S., Nishimura, M., Shimada, Y., Suzuki, Kobayashi, S., Nishimura, M., Shimada, Y., Suzuki, F., Matsuoka, A., Sakamoto, H., Hayashi, M., Sofuni, T., Sado, T., Ogiu, T.: Increased sensitivity of *scid* heterozygous mice to ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Res.*, **72**, 537-545, 1997.
8. Kinebuchi, M., Matsuura, A., Ogiu, T., Kikuchi, K.: Deviated overexpression of TCR- β , TCR- γ , CD-4, and CD-8 on thymic lymphomas induced by 1-propyl-1-nitrosourea. *J. Immunol.*, **159**, 748-756, 1997.
9. 島田 義也: 低線量・低線量率放射線による寿命短縮、“放射線発がんに関する閾値問題の検討” (発がんの閾値問題検討会) pp.66-78、原子力安全研究協会、1997.
10. 島田 義也: TNF- α 、“血管新生療法—基礎と臨床—” (編集: 内田、小塚) pp.58-62、真興交易医書出版社、1997.
11. Ogiu, T.: Radiation Carcinogenesis. In: “Text Book of Human - Radiation Interaction”. pp.233-252, Natl. Inst. Radiol. Sci., Chiba, 1997.
12. Watanabe, H., Ogiu, T., Nishimura, M., Masaoka, Y., Kurosumi, M., Takahashi, T., Oguri, T., Shoji, S., Katoh, O.: Comparison of tumorigenesis between accelerated heavy ion and X-rays in B6C3F1 mice. *J. Radiat. Res.*, **39**, 93-100, 1998.
13. Watanabe, H., Ogiu, T., Nishimura, M., Fujimoto, N., Kido, S., Ishimura, Y., Shiraki, K., Kuramoto, K., Hirata, S., Shoji, S., Katoh, O.: Induction of ovarian tumors by heavy ion irradiation in B6C3F1 mice. *Oncology Report*, **5**, 1377-1380, 1998.
14. Ogiu, T., Nishimura, M., Shimada, Y., Kobayashi, S., Ishii-Ohba, H., Maekawa, A.: Chemical and radiation carcinogenesis in experimental animals. In: “Comparative Evaluation of Environmental Toxicants” (ed. by J. Inaba and Y. Nakamura), pp. 233-241, Kodansha Scientific Ltd., Tokyo, 1998.
15. Nishimura, M., Wakana, S., Kakinuma, S., Mita, K., Ishii, H., Kobayashi, S., Ogiu, T., Sado, T., Shimada, Y.: Low frequency of *ras* gene mutation in spontaneous and gamma-ray-induced thymic lymphomas of *scid* mice. *Radiat. Res.*, **151**, 142-149, 1999.
16. Okochi, E., Watanabe, E., Shimada, Y., Takahashi, S., Wakazono, K., Shirai, T., Sugimura, T., Nagao, M., Ushijima, T.: Preferential induction of guanine deletion at 5'-GGGA-3' in rat mammary glands by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine. *Carcinogenesis*, **20**, 1933-1938, 1999.
17. 荻生 俊昭: 放射線の生体影響とその修飾 —実験発がんを中心として—. *放射線科学*, **42** (Suppl.), 2-6, 1999.
18. 島田 義也、西村 まゆみ、柿沼 志津子、若菜 茂晴、奥本 正昭: 放射線誘発腫瘍に特異的なゲノム変異. *放射線科学*, **42** (Suppl.), 58-63, 1999.
19. 石井 洋子、西村 まゆみ、小林 森、島田 義也、荻生 俊昭、鈴木 文男、佐渡 敏彦: *Scid* マウスの放射線感受性と発がん感受性. *放射線科学*, **42** (Suppl.), 70-75, 1999.
20. 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: 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. 特別研究「放射線被曝のデトリメントとその修飾に関する生物学的調査研究」最終報告書、pp.1-8, 1999.
21. Shimada, Y., Nishimura, M., Kakinuma, S., Okumoto, M. and Wakana, S.: Loss of heterozygosity in radiation-induced thymic lymphomas in B6C3F1 mice. In: “Proceedings of the Third Japan-France Workshop on Radiobiology, Imaging and Environmental Sciences”. Natl. Inst. Radiol. Sci., Chiba, pp.1933-1938, 1999.
22. Ogiu, T., Nishimura, M., Watanabe, F., Ukai, H., Ishii-Ohba, H., Shimada, Y., Tsuji, H., Sakurai, J., Hino, O.: Absence of linkage between radiosensitivity and the predisposing *Atp7b* gene mutation for heritable hepatitis in the LEC rat. *Radiat. Res.*, **154**, 113-116, 2000.
23. Shimada, Y., Nishimura, M., Kakinuma, S., Okumoto, M., Shiroishi, T., Clifton, K.H., Wakana, S.: Radiation-associated loss of heterozygosity at the *Znfn1a1* (*Ikaros*) locus on chromosome 11 in murine thymic lymphomas. *Radiat. Res.* **154**, 293-300, 2000.

24. Ogiu, T., Ishii-Ohba, H., Kobayashi, S., Nishimura, M., Shimada, Y., Tsuji, H., Watanabe, F., Suzuki, F., Sado, T.: Radiation Carcinogenesis in Radiosensitive Mutant Scid Mice. In "Proceedings of International Symposium on Biological Effects of Low Dose Radiation" ed. by F. Sato, Y. Yamada, J. Onodera, pp.56-62, Inst. Environ. Sci., Aomori, 2000.
25. Shimada, Y., Nishimura, M., Kakinuma, S., Wakana, S., Okumoto, M.: Unique loss of heterozygosity of murine thymic lymphomas as a candidate of radiation signature. In "Proceedings of International Symposium on Biological Effects of Low Dose Radiation" ed. by F. Sato, Y. Yamada, J. Onodera, pp.248-249, Inst. Environ. Sci., Aomori, 2000.
26. Ogiu, T., Ishii-Ohba, H., Kobayashi, S., Nishimura, M., Shimada, Y., Tsuji, H., Watanabe, F., Suzuki, F., Sado, T.: Chemical and radiation Carcinogenesis in experimental animals. In: "Comparative Evaluation of Environmental Toxicants" ed. by J. Inaba and Y. Nakamura, pp.233-241, Kodansha Scientific Ltd., Tokyo, 2000.
27. 島田 義也、西村 まゆみ、加治 和彦: TNF- α 、[室田 誠逸、佐藤 靖史 編、血管新生研究の新展開]、医薬ジャーナル社、pp.230-237, 2000.
28. 荻生 俊昭、島田 義也: 放射線によるがんの発生。遺伝、57、70-75、2000.
29. Watanabe, N., Okochi, E., Y. Shimada, Y., Yanagihara, K., Yoshida, M., Takahashi, S., Mochizuki, M., Sugimura, T., Nagao, M., Ushijima, T: Single nucleotide instability without microsatellite instability in rat mammary carcinomas. *Cancer Res.*, 61, 2632-2640, 2001.
30. Shimada, Y., Nishimura, M., Kakinuma, S., Ogiu, T., Suzuki, G., Nakata, Y., Sasanuma, S., Mita, K., Sado, T.: Characteristic association of K-ras gene mutation with loss of heterozygosity in X-ray-induced thymic lymphomas of B6C3F1 mice. *Int. J. Radiat. Biol.*, 77, 465-473, 2001.
31. Nishimura, M., Kakinuma, S., Wakana, S., Mita, K., Sado, T., Ogiu, T., Shimada, Y.: Reduced sensitivity to and ras mutation spectrum of N-ethyl-N-nitrosourea-induced thymic lymphomas in adult C.B-17 Scid mice. *Mutat. Res.*, 486, 275-283, 2001.
32. Nose, M., Uzawa, A., Ogiu, T., Suzuki, G.: OK-432 reduces mortality and bacterial translocation in irradiated and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)-treated mice. *J. Radiat. Res.*, 42, 191-200, 2001.
33. 島田 義也、久保 歩、西村 まゆみ、柿沼 志津子、荻生 俊昭、藤高 和信: 航空機乗務員の発がんリスクに関する考察、放射線科学、44、178-183、2001.
34. Kakinuma, S., Nishimura, M., Sasanuma, S., Mita, K., Suzuki, G., Katsura, Y., Sado, T., Shimada, Y. (2001) Spectrum of Ikaros inactivation and its association with loss of heterozygosity in radiogenic T-cell lymphomas in susceptible B6C3F1 mice. *Radiat. Res.* (in press)
35. Kakinuma, S., Nishimura, M., Shimada, Y.: Differences of molecular alteration between radiation-induced and N-Ethyl-N-Nitrosourea-Induced thymic lymphomas in B6C3F1 in mice. In Proceedings of International Symposium on Radiation and Homeostasis. Elsevier Science, Netherlands, (in press).
36. Ogiu, T., Ishii-Ohba, H., Kobayashi, S., Nishimura, M., Shimada, Y., Tsuji, H., Ukai, H., Watanabe, F., Suzuki, F., Sado, T.: Development and Molecular Analysis of Thymic Lymphomas Induced by Ionizing Radiation in Scid Mice In Proceedings of International Symposium on Radiation and Homeostasis. Elsevier Science, Netherlands, (in press).
37. Koike, S., Ando, K., Oohira, C., Ogiu, T.: A retrospective analysis of tumor induction in mice after fractionated irradiation with carbon ions. In Proceedings of International Symposium on Radiation and Homeostasis. Elsevier Science, Netherlands, (in press).

7. 口頭発表

1. 荻生 俊昭、西村 まゆみ: 第 85 回日本病理学会総会、SCID マウスを用いた放射線感受性と発がん感受性の関連性の解析。東京、1996.4.
2. 荻生 俊昭: 第 7 回愛知県がんセンター公開シンポジウム、マウスの scid 遺伝子変異と胸腺リンパ腫の発生。名古屋、1996.7.
3. Ogiu, T.: The first Japan-France Workshop on Radiology, The scid mutation and carcinogenesis. Chiba, 1996.9.
4. 島田 義也、西村 まゆみ、辻 秀雄、石井 洋子、荻生 俊昭: X線およびエチルニトロソ尿素で誘発されたマウス胸腺リンパ腫のミニサテライト (Pc-1) の変異。第 55 回日本癌学会総会、横浜、1996.10
5. 荻生 俊昭、西村 まゆみ、石井 洋子、島田 義也: N-エチル-N-ニトロソ尿素 (ENU) による STS/A マウスの胸腺リンパ腫の発生。第 55 回日本癌学会総会、横浜、1996.10.
6. 古野 育子、巽 紘一、武藤 正弘、寺岡 弘文*、渡邊 文晶、荻生 俊昭: SCID マウス由来胸腺リンパ腫細胞のガンマ線による HPRT 突然変異。日本放射線影響学会 第 39 回大会、大阪、1996.11.
7. 渡辺 敦光*、荻生 俊昭、正岡 良之*、荘司 俊益*、加藤 修*: 重粒子線並びにX線照射によるマウスの発がん性について。日本放射線影響学会 第 39 回大会、大阪、1996.11.
8. 荻生 俊昭、西村 まゆみ、向川原 綾、石井 洋子、小林 森、島田 義也: 放射線高感受性 C.B-17 Scid マウスにおける leaky 現象と胸腺リンパ腫発生の関連性について。日本放射線影響学会 第 39 回大会、大阪、1996.11.
9. 石井 洋子、西村 まゆみ、小林 森、島田 義也、鈴木 文

- 男、祖父尼 俊雄、佐渡 敏彦、荻生 俊昭：Scid マウスの放射線発がん。第 14 回放影研・原医研・放医研—研究交流セミナー、千葉、1997.6.
10. 島田 義也、西村 まゆみ：パネル討論。第 34 回理工学における同位元素研究発表会、東京、1997.6.
 11. 島田 義也、西村 まゆみ、辻 秀雄、荻生 俊昭、奥本 正昭、若菜 茂晴：放射線誘発胸腺リンパ腫に特異的に見られるミニサテライト変異と LOH。第 56 回日本癌学会総会京都、1997.10.
 12. 古野 育子、巽 紘一、武藤 正弘、渡邊 文晶、荻生 俊昭：SCID マウス由来リンパ腫細胞のガンマ線誘発 HPRT 突然変異の線量率効果。日本放射線影響学会第 40 回大会、京都、1997.11.
 13. 島田 義也、西村 まゆみ、若菜 茂晴、荻生 俊昭、柿沼 志津子、三田 和英：X線誘発胸腺リンパ腫にみられる *K-ras*、*N-ras* の突然変異。日本放射線影響学会第 40 回大会、京都、1997.11.
 14. 渡辺 敦光、荻生 俊昭、黒住 正雄、荘司 俊益、加藤 修：マウスにおける重粒子線の RBE に関する研究。日本放射線影響学会第 40 回大会、京都、1997.11.
 15. 西村 まゆみ、若菜 茂晴、三田 和英、石井 洋子、荻生 俊昭、辻 秀雄、佐渡 敏彦、島田 義也：scid マウスの放射線誘発リンパ腫は *K-ras* の突然変異率が低い。日本放射線影響学会第 40 回大会、京都、1997.11.
 16. 寺岡 弘文、山本 真由美、永木 澄子、湯本 佳子、白川 仁、荻生 俊昭、吉田 充輝：DNA 2 重鎖切断末端結合の分子機構。第 20 回日本分子生物学会、京都、1997.12.
 17. Ogiu, T., Nishimura, M., Shimada, Y., Ishii-Ohba, H., Maekawa, A.: Chemical and Radiation Carcinogenesis in Experimental Animals. International Workshop on Comparative Evaluation of Health Effects of Environmental Toxicants Derived from Advanced Technology, Chiba, 1998.1.
 18. Nishimura, M., Wakana, S., Mita, K., Ishii, H., Kakinuma, S., Ogiu, T., Tsuji, H., Sado, T., Shimada, Y.: Low frequency of *K-ras* mutation in radiation-induced thymic lymphomas in scid mice. The 89th Annual Meeting of American Association of Cancer Research, New Orleans, U.S.A., 1998.3.
 19. Shimada, Y., Nishimura, M., Wakana, S., Ogiu, T., Mita, K.: Loss of heterozygosity and *K-ras* mutations in radiation-induced thymic lymphomas in B6C3F1 mice. The 89th Annual Meeting of American Association of Cancer Research, New Orleans, U.S.A., 1998.3.
 20. 石井 洋子、西村 まゆみ、小林 森、島田 義也、荻生 俊昭、鈴木 文男、佐渡 敏彦：Scid マウスの放射線感受性と発がん感受性。第 30 回放医研シンポジウム、千葉、1998.11.
 21. 島田 義也、西村 まゆみ、柿沼 志津子、若菜 茂晴、奥本 正昭：放射線誘発腫瘍に特異的なゲノム変異。第 30 回放医研シンポジウム、千葉、1998.11.
 22. 柿沼 志津子、西村 まゆみ、佐渡 敏彦、荻生 俊昭、三田 和英：放射線誘発胸腺リンパ腫における T 細胞分化因子に発現異常。日本放射線影響学会第 41 回大会、長崎、1998.12.
 23. 島田 義也、西村 まゆみ、柿沼 志津子、若菜 茂晴、奥本 正昭：X線誘発腫瘍に見られるゲノム変異。日本放射線影響学会第 41 回大会（ワークショップ）、長崎、1998.12.
 24. 西村 まゆみ、柿沼 志津子、佐渡 敏彦、荻生 俊昭、島田 義也：放射線誘発胸腺リンパ腫発生過程における T 細胞亜集団の変化。日本放射線影響学会第 41 回大会、長崎、1998.12.
 25. 辻 秀雄、鶴飼 英樹、勝部 孝則、石井 洋子、島田 義也、西村 まゆみ、三田 和英、荻生 俊昭：scid マウスに生じた放射線誘発胸腺リンパ腫では癌遺伝子 Notch 1 が高率に変異している。日本放射線影響学会第 41 回大会、長崎、1998.12.
 26. 石井 洋子、西村 まゆみ、島田 義也、辻 秀雄、荻生 俊昭：scid マウスの放射線誘発胸腺リンパ腫に対する骨髄細胞移植の影響。日本放射線影響学会第 41 回大会、長崎、1998.12.
 27. 勝部 孝則、佐々木 由香、橋本 直子、高久 学、上田 龍、辻 秀雄、荻生 俊昭、石井 洋子、富樫 伸：マウス cortactin 転写産物の 2 つのアイソフォーム。第 21 回日本分子生物学会年会、横浜、1998.12.
 28. 渡辺 文晶、寺岡 弘文、小松 賢志、鈴木 文男、今井 高志、相良 雅之、辻 秀雄、荻生 俊昭：DNA 依存性プロテインキナーゼによる E2F 転写活性化の制御。第 21 回日本分子生物学会年会、横浜、1998.12.
 29. 柿沼 志津子、西村 まゆみ、佐渡 敏彦、荻生 俊昭、島田 義也：放射線誘発胸腺リンパ腫における T 細胞分化因子の発現異常。第 21 回日本分子生物学会年会、横浜、1998.12.
 30. 辻 秀雄、鶴飼 英樹、勝部 孝則、渡辺 文晶、石井 洋子、島田 義也、西村 まゆみ、柿沼 志津子、荻生 俊昭、三田 和英：放射線誘発 scid 胸腺リンパ腫における高率ながん遺伝子 Notch1 (Tan1) の DNA 再編成。第 21 回日本分子生物学会年会、横浜、1998.12.
 31. 鶴飼 英樹、三田 和英、石井 洋子、荻生 俊昭、辻 秀雄：scid マウス胸腺リンパ腫に特異的に発現する遺伝子の探索。第 21 回日本分子生物学会年会、横浜、1998.12.
 32. Shimada, Y., Nishimura, M., Kakinuma, S., Okumoto, M., Wakana, S.: Loss of heterozygosity at *Ikaros* allele as a candidate signature of radiation lymphomagenesis. The 11th International Congress of Radiation Research, Dublin, 1999.7.
 33. Kakinuma, S., Nishimura, M., Sado, T., Ogiu, T., Mita, K., Shimada, Y.: Altered expression of transcription factors in thymic lymphomas induced by X-rays in B6C3F1 mice. The 11th International Congress of Radiation Research, Dublin, 1999.7.

34. Tsuji, H., Ukai, H., Katsube, T., Ishii, H., Shimada, Y., Nishimura, M., Mita, K., Ogiu, T.: High incidence of DNA rearrangements of Notch 1 in radiation-induced thymic lymphomas of scid mice. The 11th International Congress of Radiation Research, Dublin, 1999.7.
35. Katsube, T., Inano, H., Onoda, M., Togashi, S., Ogiu, T., Tsuji, H.: Molecular analysis of the cortactin/zo-1 complex in ionizing radiation induced rat breast cancers. The 11th International Congress of Radiation Research, Dublin, 1999.7.
36. Ukai, H., Mita, K., Ishii, H., Ogiu, T., Tsuji, H.: Isolation of genes highly or specifically expressed in thymic lymphomas of scid mice. The 11th International Congress of Radiation Research, Dublin, 1999.7.
37. 石井 洋子、西村 まゆみ、島田 義也、辻 秀雄、荻生 俊昭：scid マウスの胸腺リンパ腫発生と骨髄移植について。第 52 回日本細胞生物学会大会、東京、1999.8.
38. 柿沼 志津子、島田 義也：放射線誘発胸腺リンパ腫における T 細胞分化因子 *Ikaros* の発現異常。第 9 回 Kyoto T cell Conference、京都、1999.10.
39. 児玉 靖司、鈴木 啓司、鈴木 文男、島田 義也、渡邊 正己：適応応答と遺伝的不安定性の誘導。日本放射線影響学会第 42 回大会、広島、1999.10.
40. 永井 絢也、西村 まゆみ、柿沼 志津子、比田井 静、荻生 俊昭、笹沼 俊一、三田 和英、茅野 文利、島田 義也：放射線で誘発した肝腫瘍の LOH と *Hras* 遺伝子の突然変異。日本放射線影響学会第 42 回大会、広島、1999.10.
41. 島田 義也、柿沼 志津子、西村 まゆみ、奥本 正昭、若菜 茂晴：放射線誘発胸腺リンパ腫に特異的にみられる第 11 番染色体 LOH マッピングとがん関連遺伝子の発現。日本放射線影響学会第 42 回大会、広島、1999.10.
42. 辻 秀雄、鶴飼 英樹、勝部 孝則、石井 洋子、荻生 俊昭：放射線誘発 scid マウス胸腺リンパ腫におけるがん遺伝子 Notch1 の遺伝子内欠失。日本放射線影響学会第 42 回大会、広島、1999.10.
43. 西村 まゆみ、柿沼 志津子、山本 大輔、石井 洋子、鈴木 元、中田 有紀子、荻生 俊昭、佐渡 敏彦、島田 義也：放射線誘発胸腺リンパ腫発生過程における T 細胞亜集団の変化 (第 2 報)。日本放射線影響学会第 42 回大会、広島、1999.10.
44. 柿沼 志津子、西村 まゆみ、久保 歩、永井 絢也、笹沼 俊一、三田 和英、荻生 俊昭、馬嶋 秀行、桂 義元、佐渡 敏彦、島田 義也：放射線誘発胸腺リンパ腫における T 細胞分化因子の発現異常の解析。日本放射線影響学会第 42 回大会、広島、1999.10.
45. 石井 洋子、西村 まゆみ、島田 義也、荻生 俊昭：scid マウスの放射線感受性と胸腺リンパ腫発生に対する遺伝的背景の影響。日本放射線影響学会第 42 回大会、広島、1999.10.
46. 能勢 正子、鶴澤 玲子、荻生 俊昭、鈴木 元：放射線照射マウスに対する G-CSF と OK-432 投与効果：生存と腸内細菌叢のバクテリアルトランスロケーションについて。日本放射線影響学会第 42 回大会、広島、1999.10.
47. Ogiu, T., Ishii-Ohba, H., Kobayashi, S., Nishimura, M., Shimada, Y., Tsuji, H., Watanabe, F., Suzuki, F., Sado, T.: Radiation Carcinogenesis in Radiosensitive Mutant Scid Mice. International Symposium on Biological Effects of Low Dose Radiation, Aomori, 1999.10.
48. Shimada, Y., Nishimura, M., Kakinuma, S., Wakana, S. and Okumoto, M.: Loss of heterozygosity of murine thymic lymphomas as a candidate of radiation signature. International Symposium on Biological Effects of Low Dose Radiation, Aomori, 1999.10.
49. 安藤 興一、大平 知佐、小池 幸子、荻生 俊昭、馬嶋 秀行、野島 久美恵：高 LET 放射線照射による腫瘍発生。日本放射線腫瘍学会第 12 回学術大会、1999.11.
50. 柿沼 志津子、西村 まゆみ、三田 和英、荻生 俊昭、佐渡 敏彦、島田 義也：放射線誘発胸腺リンパ腫における *Ikaros* の変異解析。第 22 回日本分子生物学会年会、1999.12.
51. 辻 秀雄、鶴飼 英樹、勝部 孝則、石井 洋子、荻生 俊昭：放射線誘発 scid 胸腺リンパ腫におけるがん遺伝子 Notch1 の介在欠失は in frame で生じる。第 22 回日本分子生物学会年会、福岡、1999.12.
52. 鶴飼 英樹、荻生 俊昭、辻 秀雄：AMF 法と Suppression PCR 法を融合した簡便で再現性の高い新規発現遺伝子解析手法 (Suppression-3'AMF) の構築。第 22 回日本分子生物学会年会、福岡、1999.12.
53. 勝部 孝則、富樫 伸、山下、橋本 直子、高久 学、上田 龍、石井 洋子、荻生 俊昭、辻 秀雄：マウス乳腺上皮細胞株 HC11 における cortactin の機能解析。第 22 回日本分子生物学会、福岡、1999.12.
54. Ishihara, H., Tanaka, I., Furuse, M., Wan, H., Shimada, Y., Nishimura, M., Nojima, K., Ando, K.: Enhancement of the retrotransposition of the limited subtype of the interstitial A-particle element in tumor cells from C3H/He Inbred mice. 18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Birmingham, UK, 2000.5.
55. 柿沼 志津子、島田 義也：マウス胸腺リンパ腫において *Ikaros* は複数のメカニズムで不活化されている。第 10 回 Kyoto T cell Conference、京都、2000.6.
56. 荻生 俊昭、石井 洋子、小林 森、西村 まゆみ、島田 義也、辻 秀雄、渡邊 文晶、鈴木 文男、佐渡 敏彦：放射線発がんにおける Scid 変異の影響—遺伝的要因による放射線発がんの修飾—。日本放射線影響学会第 43 回大会、東京、2000.9.
57. 大平 知佐、安藤 興一、小池 幸子、荻生 俊昭：重粒子線照射されたマウス下肢部に誘導された腫瘍について。日本放射線影響学会第 43 回大会、東京、2000.9.
58. 石原 弘、田中 泉、島田 義也、西村 まゆみ：C3H マウス由来の胸腺リンパ腫および骨髄性白血病さいぼう

- における特定型 IAP の媒介するゲノム異常. 日本放射線影響学会第 43 回大会、東京、2000.9.
59. 島田 義也、西村 まゆみ、柿沼 志津子、久保 歩、永井、荻生 俊昭、佐渡 敏彦：マウス胸腺リンパ腫における *K-ras* 遺伝子の突然変異と LOH 分布の相関. 日本放射線影響学会第 43 回大会、東京、2000.9.
 60. 永井 純也、西村 まゆみ、柿沼 志津子、石井 洋子、荻生 俊昭、三田 和英、笹沼 俊一、佐渡 敏彦、島田 義也：マウス胸腺リンパ腫における *K-ras* 変異と LOH 分布パターンの被ばく時年齢依存性. 日本放射線影響学会第 43 回大会、東京、2000.9.
 61. 柿沼 志津子、西村 まゆみ、久保 歩、永井、笹沼 俊一、三田 和英、荻生 俊昭、馬嶋 秀行、桂 義元、佐渡 敏彦、島田 義也：放射線誘発胸腺リンパ腫において *Ikaros* は複数のメカニズムで不活化されている. 日本放射線影響学会第 43 回大会、東京、2000.9.
 62. 西村 まゆみ、柿沼 志津子、石井 洋子、中田 有紀子、荻生 俊昭、佐渡 敏彦、島田 義也：放射線誘発 *scid* マウス胸腺リンパ腫における T 細胞亜集団の変化. 日本放射線影響学会第 43 回大会、東京、2000.9.
 63. 鶴飼 英樹、蓼沼 磨貴、石井 洋子、荻生 俊昭、辻 秀雄：放射線誘発 *scid* マウス胸腺リンパ腫の解析：レトロトランスポゾンの挿入による変異型 IL-2R β 蛋白の異常発現. 日本放射線影響学会第 43 回大会、東京、2000.9.
 64. 辻 秀雄、鶴飼 英樹、勝部 孝則、石井 洋子、荻生 俊昭：放射線誘発 *scid* マウス胸腺リンパ腫における癌遺伝子 *Notch1* へのレトロトランスポゾンの挿入. 日本放射線影響学会第 43 回大会、東京、2000.9.
 65. 甲斐 倫明、三枝 新、島田 義也：発ガン数理モデルを用いた C57BL マウスの放射線誘発看取用の死亡率解析. 日本放射線影響学会第 43 回大会、東京、2000.9.
 66. 渡邊 直子、大河内 江里子、島田 義也、柳原 五吉、高橋 智、望月 正隆、長尾 美奈子、杉村 隆、牛島 俊和：PhIP により誘発したラット乳癌における一塩基不安定性の存在. 第 59 回日本癌学会総会、横浜、2000.10.
 67. Kakinuma, S., Nishimura, M., Kubo, A., Nagai, J., Sasanuma, S., Mita, K., Ogiu, T., Majima, H., Katsura, Y., Sado, T., Shimada, Y.: Altered expression of transcription factors in thymic lymphomas induced by X-rays in B6C3F1. 5th International Society for Preventive Oncology, Geneva, 2000.10.
 68. Nishimura, M., Kakinuma, S., Wakana, S., Mita, K., Ishii, H., Nakata, Y., Sado, T., Ogiu, T., Shimada, Y.: *Kras* gene mutations in gamma-ray-induced and N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced thymic lymphomas in *scid* mice. 5th International Society for Preventive Oncology, Geneva, 2000.10.
 69. Shimada, Y., Nishimura, M., Kakinuma, S., Okumoto, M., Wakana, S.: Radiation-associated loss of heterozygosity at the *Ikaros* locus on chromosome 11 in murine thymic lymphomas. 5th International Society for Preventive Oncology, Geneva, 2000.10.
 70. 柿沼 志津子、西村 まゆみ、中田 有紀子、馬嶋 秀行、三田 和英、荻生 俊昭、佐渡 敏彦、島田 義也：放射線誘発胸腺リンパ腫における *Ikaros* の不活化メカニズムの解析. 第 23 回日本分子生物学会年会、神戸、2000.12.
 71. 藤本 真慈、柿沼 志津子、島田 義也、河本 宏、桂 義元：放射線誘発マウス胸腺リンパ腫における TCR β 鎖遺伝子の再構成. 第 23 回日本分子生物学会大会、神戸、2000.12.
 72. 鶴飼 英樹、蓼沼 磨貴、石井 洋子、荻生 俊昭、辻 秀雄：放射線誘発 *scid* マウス胸腺リンパ腫の解析：Intracisternal A particle の挿入による IL-2R 受容体の恒常的活性化. 第 23 回日本分子生物学会年会、神戸、2000.12.
 73. 辻 秀雄、鶴飼 英樹、勝部 孝則、石井 洋子、荻生 俊昭：放射線誘発 *scid* マウス胸腺リンパ腫におけるレトロトランスポゾンの挿入による癌遺伝子 *Notch1* の異常 mRNA の産生. 第 23 回日本分子生物学会年会、神戸、2000.12.
 74. 勝部 孝則、富樫 伸、荻生 俊昭、辻 秀雄：アクチン繊維結合タンパク質 *cortactin* は ZO-1 と細胞間接着部位で共存する. 第 23 回日本分子生物学会年会、神戸、2000.12.
 75. 鶴飼 英樹、蓼沼 磨貴、石井 洋子、荻生 俊昭、辻 秀雄：Intracisternal A particle の挿入による IL-2 受容体の恒常的活性化. 国立遺伝学研究所シンポジウム、三島、2001.3.
 76. Shimada, Y.: Behavior of stem cells in radiation carcinogenesis. Interactional Workshop on Mathematical Modeling in Carcinogenesis, Kyoto, 2001.3.
 77. Kakinuma, S., Nishimura, M., Shimada, Y.: Differences of molecular alteration between radiation-induced and N-Ethyl-N-Nitrosourea-Induced thymic lymphomas in B6C3F1 in mice. International Symposium on Radiation and Homeostasis. Kyoto, 2001.7.
 78. Ogiu, T., Ishii-Ohba, H., Kobayashi, S., Nishimura, M., Shimada, Y., Tsuji, H., Ukai, H., Watanabe, F., Suzuki, F., Sado, T.: Development and Molecular Analysis of Thymic Lymphomas Induced by Ionizing Radiation in *Scid* Mice. International Symposium on Radiation and Homeostasis. Kyoto, 2001.7.
 79. Koike, S., Ando, K., Oohira, C., Ogiu, T.: A retrospective analysis of tumor induction in mice after fractionated irradiation with carbon ions. International Symposium on Radiation and Homeostasis. Kyoto, 2001.7.

Ⅲ. 放射線発がんの分子機構に関する研究

辻 秀雄、石井 洋子、勝部 孝則、
鶴飼 英樹¹、渡邊 文晶²、西森 千春¹

(¹重点研究支援協力員、²科学技術特別研究員)

Ⅲ. Studies on Molecular Mechanisms of Radiation Carcinogenesis

Hideo Tsuji, Hiroko Ishii, Takanori Katsube,
Hideki Ukai¹, Fumiaki Watanabe², Chiharu Nishimori¹

(¹Priority Research Supporting Staff, ²National Institute Postdoctoral Fellow)

The identification of oncogenes responsible for the induction of tumors by radiation is fundamental to elucidate the molecular mechanisms of radiation carcinogenesis. We have demonstrated that scid mice defective in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination are highly sensitive to induction of thymic lymphomas (TLs) by radiation. To clarify genes involved in TL development in mice, 57 TL cell lines derived from scid as well as wild-type strains were established. We searched in TLs for rearrangements of oncogenes known as the responsible genes for human T cell leukemias/lymphomas by Southern blot hybridization, and found the abnormalities of the oncogene *Notch1* at high frequencies. Of 31 radiation-induced scid TLs, 11 (35%) exhibited DNA rearrangements whereas 20% (2 of 10) of wild-type TLs displayed abnormalities, suggesting an important role of *Notch1* abnormality in TL induction by radiation. Analysis of abnormalities revealed that the major types of DNA rearrangements in scid TLs were intragenic

deletions and insertions of intracisternal A particles whereas those of wild-type strains were a deletion and an insertion of murine leukemia virus. These results are in contrast to the abnormalities found in spontaneous human T cell leukemias/lymphomas in which the major rearrangements are chromosomal translocations to T cell receptors, suggesting a different mechanism for the formation of DNA rearrangements in radiation-induced TLs. Analyses by RT-PCR, RACE, and Northern blot hybridization demonstrated the formation of abnormal mRNAs corresponding to genomic DNA abnormalities. Western blotting revealed that several types of abnormal Notch1 proteins including truncation of extracellular domain and proteins composed of only intracellular domains were formed. Since it is known that the intracellular domain of the Notch1 protein functions as an active form for transcription, these results imply that dysregulated *Notch1* plays a role in mouse TL development.

1. 緒言

放射線はがんを誘発することは広島・長崎の原爆被爆者の研究^{51,61}やChernobylの原子力発電所の事故による放射線被爆者の研究^{9,75}より明かである。放射線の発がんリスクの推定はこれらのヒトの疫学データを中心に行われてきた。しかしながら、これらの膨大な結果を用いても低線量

や低線量率のリスクの推定は困難である。この問題に関して放射線損傷に対する細胞の反応機構やそれらの機構と発がんとの関係を明かにしていくことがリスクの正しい判断に欠くことができないと指摘されている^{37,81}。放射線が多段階発がん過程の一過程に作用し、遺伝的変化を起し、それが発がんに関与するならば、遺伝的変化そのものを明

かにすることが第1に必要となる。その変異の様式を調べることにより、放射線特異的変異が存在するか否かが明かとなる。放射線損傷修復のうち、DNA 2本鎖切断の修復誤りが細胞の放射線反応の決定的因子であることが明かにされてきた^{27,36,80}。DNA 2本鎖切断は非相同末端修復過程により修復される^{15,42}が、欠失や再編成のような遺伝子/染色体突然変異が損傷修復誤りとして生じる⁷⁸。このような変異ががん関連遺伝子に生じれば細胞はがん化の1段階を進むことになる。

放射線発がんに関与するがん関連遺伝子の同定は放射線発がん過程の解明にとって必要である。既にいくつかの遺伝子が放射線誘発腫瘍の解析から同定されている^{37,65}が、その数は今だわずかである。放射線の発がんリスクの推定のための基礎的研究として、マウスに生じた胸腺リンパ腫をモデル腫瘍として放射線発がん過程に関与するがん関連遺伝子の同定とその機能の解析を、非相同末端結合修復やV(D)J組み換えが不全な scid マウス^{1,8,10,17,29,59}とその野生系統を用いて行った。ヒトのT細胞白血病/リンパ腫の発生に作用するがん遺伝子は既に10数個同定されており、それらの多くはT細胞受容体(TCR)との転座を起こしている^{45,64,74,79}。転座誘発の機構にV(D)J組み換えが関与している考えられている^{32,45,64,74,79}。これらのがん遺伝子を解析したところ、数種のがん遺伝子の変異を認めた。そのうち、*Notch1* 遺伝子がDNA再編成を起こしていたので報告する。

Notch1 遺伝子はショウジョウバエで細胞分化を制御する遺伝子として同定された^{2,3,28}。成虫原基の前駆細胞から羽、眼、剛毛等の分化を制御する。哺乳類において、*Notch1* 遺伝子はショウジョウバエの場合と同様に細胞の分化を制御し、筋原細胞から筋細胞の分化^{33,71}、神経前駆細胞から神経細胞の分化²¹、胚発生の体節形成¹⁶、顆粒球の分化^{5,53}、T細胞の増殖・分化^{19,20,66,68,84}等に関与している。*Notch1* たんぱく質は膜貫通レセプターであり、細胞外に36回のEGF様リピート(EGFR)と3回のLin-12/Notchリピート(NLR)を、細胞内に転写因子RBP-J κ と結合するRAMドメイン、6回のankyrinリピートとそれに続く転写活性化ドメイン、さらにその3'側にPESTドメインを持つ^{2,3,28}。*Notch* 遺伝子はファミリーを形成し、*Notch1*、2、3、4の4個の似通った遺伝子が存在する^{46,82,85}。リガンドが細胞外のEGFRに結合すると、細胞内ドメインは切断され、核内に移行し、RBP-J κ に結合し、転写因子として作用する。

Notch1 遺伝子はヒトのT細胞白血病/リンパ腫においてTCR β と転座を起こしている²²ことから、がん遺伝子と考えられてきた。*Notch1*の細胞内ドメインのみをもつ遺伝子をマウスに導入するとT細胞白血病が発生する^{4,58}ことから、がん遺伝子と同定されている。*Notch1* 遺伝子は他の腫瘍においても変異している^{13,88}。さらに、*Notch2* 遺伝子も猫の胸腺リンパ腫の発生に関与しており⁶⁹、*in vitro*の形質転換能を有する¹³。*Notch4* 遺伝子^{47,67}はマウス乳がんに変異がみついている。

Notch1 遺伝子が放射線誘発胸腺リンパ腫でDNA再編成を起こしているという報告はない。本研究で見出した*Notch1* 遺伝子の変異は欠失や挿入であり、ヒトのT細胞白血病で認められるがん遺伝子の変異、転座とは異なっていた。その変異頻度は高く、*Notch1* 遺伝子は胸腺リンパ腫の発生に関して主要ながん遺伝子として機能することをこの結果は示している。

2. 材料および方法

マウス全身照射実験:C.B-17マウスおよびSTSマウスに1.6Gyあるいは2.4GyのX線を1週間隔で4回全身照射し、終生飼育し、胸腺リンパ腫を発生させた。対照実験として、C.B-17マウスにエチルニトロソウレアを2~10週間飲料水として与えた。放射線高感受性突然変異系統のscidマウスを2GyのX線あるいは0.1~2Gyの γ 線で照射した。胸腺リンパ腫の発生を肉眼的所見の異常から判断し、開腹し、胸腺を採取した。解剖学的所見および組織標本の観察により、胸腺リンパ腫であることを確認した。

胸腺リンパ腫培養細胞株の作成:胸腺リンパ腫の一部を細胞株の作成に用いた。組織を細かく碎き、ES培養液(日本水)に懸濁し、37度、5%CO₂存在下で培養した。リンパ腫細胞の増殖に伴い、DNA、RNA、たんぱく質試料を作成した。

Notch1 遺伝子のゲノム構造の決定:既報の*Notch1* cDNAの塩基配列よりPrimerを作成し、ゲノムDNAのPCRにより*Notch1* 座位のゲノムDNAを合成した。制限酵素で切断し、制限酵素地図を作成した。*Notch1* ゲノム断片をpT7Blue Vectorにクローニングし、DNAシーケンサー(ABI Prism310 genetic analyzer)を用いて塩基配列を決定した。

サザンハイブリダイゼーション:*Bam*HIで切断したゲノムDNAをアガロース電気泳動で分離し、通常の方法でナ

イロンフィルターに移した。エクソン3から3'末端までのNotch1遺伝子座位のゲノムDNAをPCRにより増幅し、約5kbのゲノム断片をプローブとして通常の方法でサザンハイブリダイゼーションを行った。

Notch1 遺伝子変異の検出: 胸腺リンパ腫におけるNotch1遺伝子の変異を検出するために、サザンハイブリダイゼーションにより同定された変異領域をPCRあるいはウォーキングにより分離し、その異常塩基配列を決定した。さらに、mRNAの変異を検出するために、cDNAのPCRあるいは5'および3' RACE (rapid amplification of cDNA ends) により変異cDNA断片を分離し、その異常な塩基配列を決定した。

ノーザンハイブリダイゼーション: total RNAよりmRNAを分離し、尿素で変成した後、アガロース電気泳動で分離した。分離したmRNAをナイロンフィルターに移し、mRNAの異常をNotch1 cDNAをプローブとして通常の方法で検出した。

ウェスタンハイブリダイゼーション: 細胞よりRIPAバッファーでたんぱく質を分離し、ポリアクリルアミド電気泳動によりたんぱく質を分離した。たんぱく質をフィルターに移し、C末端のペプチドを認識する抗Notch1抗体をプ

ローブとしてNotch1たんぱく質を検出した。

3. 結果

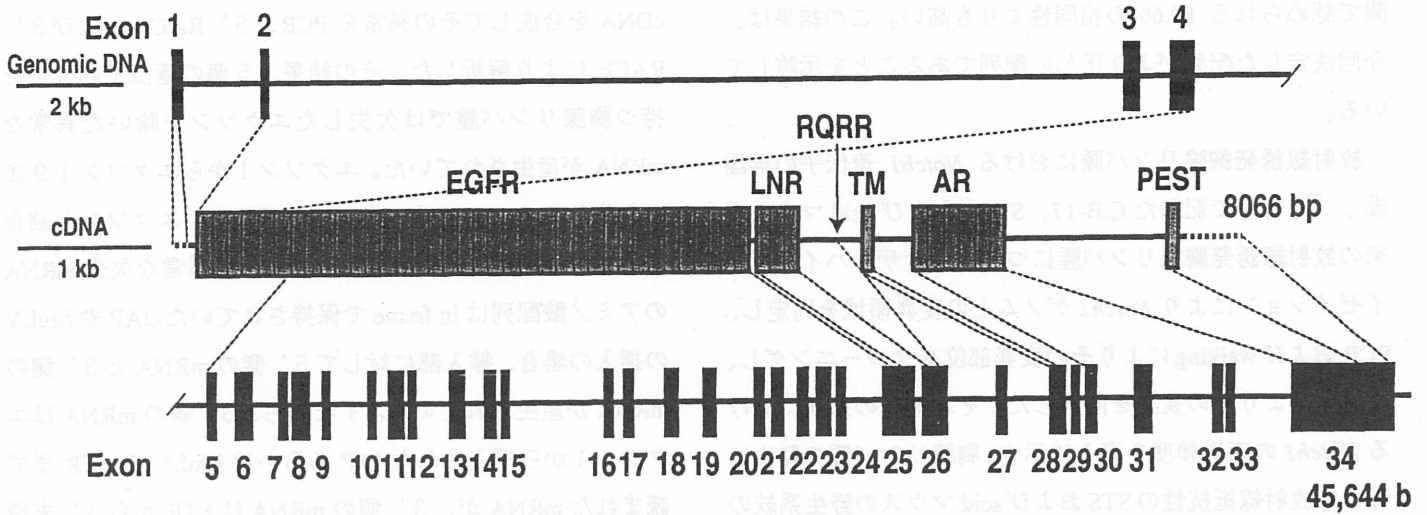
マウスNotch1遺伝子のゲノム構造:放射線誘発胸腺リンパ腫におけるがん遺伝子の変異を詳細に調べる上で、その遺伝子のゲノム構造を決定することが重要である。図1に今回変異を調べたNotch1遺伝子のゲノム構造を示す。Notch1遺伝子は34個のエクソンより成り、45.6kbに渡って存在した。Notch1たんぱく質は図1に示される様に膜貫通たんぱく質であり、細胞外にEGF様繰り返し(EGFR)が36個、Lin-12/Notch繰り返し(LNR)が3個、LNRと膜貫通部位(TM)の間にNotch1たんぱく質を切断するfurin-like convertaseの認識配列であるRQRRが存在する。細胞内にアンキリンリピート(AR)が6個とPEST領域が存在する。EGFRはエクソン2~25に、LNRはエクソン25~26に、TMはエクソン28に、ARはエクソン30~34に、PESTはエクソン34に存在する。エクソンはイントロン2を除いてほぼ一様に分布していた。cDNAの塩基配列を決定したところ、既報(MMNOTCHA)のアミノ酸配列と98.4%の相同性が認められた。すなわち、2531個のアミノ酸のうち41個のアミノ酸が異なっていた。ヒトのNotch1(HSTAN1)ア

Table 1. Frequencies of Notch1 rearrangements in radiation-induced mouse thymic lymphomas

Strains	Treatments	Abnormality /TLs ^a (%)	Deletion (%)	Insertion		Inversion (%)
				IAP ^b (%)	MuLV ^c (%)	
STS	X-ray, 2.4Gyx4	1/5(20)	1/5(20)	0/5(0)	0/5(0)	0/5(0)
C.B-17	X-ray, 0.5Gy or 1.6Gy x 4 or 3Gy	1/5(20)	0/5(0)	0/5(0)	1/5(20)	0/5(0)
	ENU, 2-10w	1/6(17)	1/6(17)	0/6(0)	0/6(0)	0/6(0)
scid	Spontaneous or γ -ray, 0.1Gy	1/4(25)	0/4(0)	1/4(25)	0/4(0)	0/4(0)
	γ -ray, 0.25Gy or 0.5Gy	3/12(25)	2/12(17)	1/12(8)	0/12(0)	0/12(0)
	γ -ray or X-ray, 2Gy	7/16(44)	4/16(25)	2/16(13)	0/16(0)	1/16(8)

a, thymic lymphomas; b, intracisternal A particle; c, murine leukemia virus

Fig.1 Genomic Structure of Mouse Notch1 Gene



Amino Acid Sequence Homology

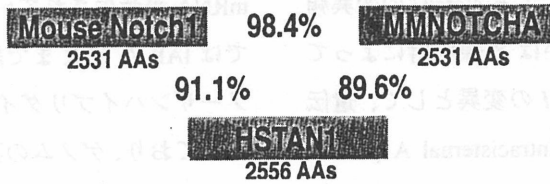
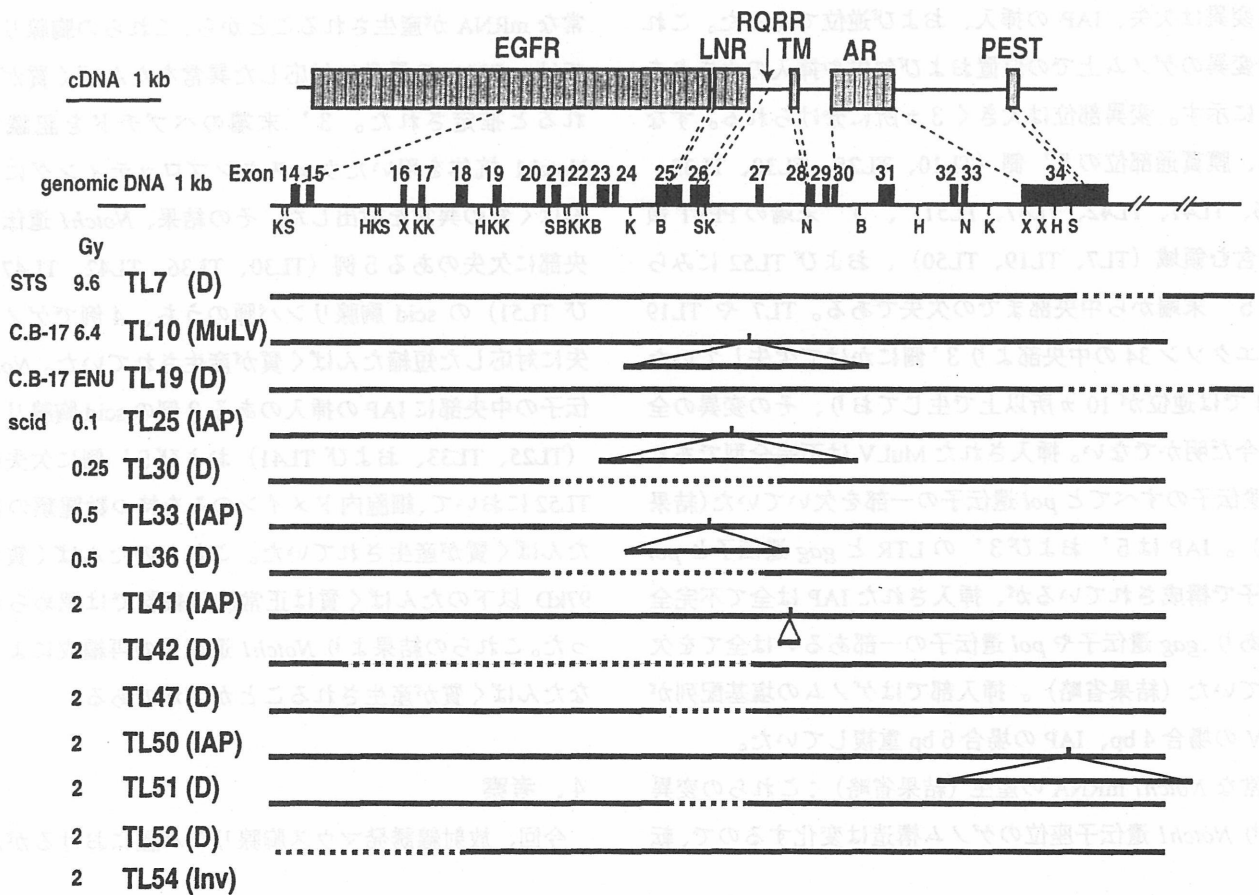


Fig.2 Deletions and IAP Insertions in Notch1 Locus



ミノ酸配列との相同性は、今回決定した配列では 91.1% であり、既報のマウスの配列(MMNOTCHA)とヒトの配列の間で認められる 89.6%の相同性よりも高い。この結果は、今回決定した配列がより正しい配列であることを示唆している。

放射線誘発胸腺リンパ腫における *Notch1* 遺伝子の再編成：「材料」で記した C.B-17、STS、および *scid* マウス由来の放射線誘発胸腺リンパ腫について、サザンハイブリダイゼーションにより *Notch1* ゲノム上の変異領域を同定し、PCR および walking によりその変異部位をクローニングし、塩基配列よりその変異を同定した。それぞれの系統における *Notch1* の変異頻度を表 1 に示す。胸腺リンパ腫の発生に関して放射線抵抗性の STS および *scid* マウスの野生系統の C.B-17 において、X 線あるいは ENU 投与における *Notch1* の再編成の頻度は約 20% である。*scid* マウスにおいて、自然発生あるいは 0.1Gy の γ 線照射による *Notch1* の変異頻度は 25% であり、2 Gy の γ 線あるいは X 線照射によってその変異頻度は増加している。*Notch1* の変異として、遺伝子内欠失、レトロトランスポゾンの intracisternal A particle (IAP) やマウス白血病ウイルス (MuLV) の挿入および遺伝子内逆位が認められた。野生系統の STS や C.B-17 における変異は欠失および MuLV の挿入であった。*scid* マウスにおける変異は欠失、IAP の挿入、および逆位であった。これらの変異のゲノム上での位置および欠失や挿入の大きさを図 2 に示す。変異部位は大きく 3 ヶ所に分けられる。すなわち、膜貫通部位の 5' 側 (TL10、TL25、TL30、TL33、TL36、TL41、TL42、TL47、TL51)、3' 末端の PEST 領域を含む領域 (TL7、TL19、TL50)、および TL52 にみられる 5' 末端から中央部までの欠失である。TL7 や TL19 ではエクソン 34 の中央部より 3' 側にかけて欠失していた。TL54 では逆位が 10 ヶ所以上で生じており、その変異の全貌は今だ明かでない。挿入された MuLV は不完全型であり、*gag* 遺伝子のすべてと *pol* 遺伝子の一部を欠いていた (結果省略)。IAP は 5' および 3' の LTR と *gag* 遺伝子と *pol* 遺伝子で構成されているが、挿入された IAP は全て不完全型であり、*gag* 遺伝子や *pol* 遺伝子の一部あるいは全てを欠失していた (結果省略)。挿入部ではゲノムの塩基配列が MuLV の場合 4 bp、IAP の場合 6 bp 重複していた。

異常な *Notch1* mRNA の産生 (結果省略)：これらの変異により *Notch1* 遺伝子座位のゲノム構造は変化するので、転

写される mRNA に異常が生じると推定された。*Notch1* 遺伝子に変異のある胸腺リンパ腫細胞株より mRNA を分離し、cDNA を合成してその異常を PCR、5' RACE および 3' RACE により解析した。その結果、5 個の遺伝子内欠失を持つ胸腺リンパ腫では欠失したエクソンを除いた異常な mRNA が産生されていた。エクソン 1 からエクソン 19 まで欠失した TL52 では上流の未知遺伝子のエクソンと融合した mRNA が産生されていた。これらの異常な欠失 mRNA のアミノ酸配列は in frame で保持されていた。IAP や MuLV の挿入の場合、挿入部に対して 5' 側の mRNA と 3' 側の mRNA が産生されていた。すなわち、5' 側の mRNA はエクソン 1 から挿入された IAP あるいは MuLV の LTR まで読まれた mRNA が、3' 側の mRNA は LTR から 3' 末端までの mRNA が産生されると推定された。3' 末端に変異のある TL7 や TL19 では融合したゲノム DNA を転写した mRNA が産生されていた。3' 側に IAP が挿入された TL50 では IAP の LTR まで読まれた mRNA が産生されていた。ノーザンハイブリダイゼーションの結果は上記の結果と対応しており、ゲノムの再編成に応じた異常な mRNA の産生は確実に起こっている。

異常な *Notch1* たんぱく質の産生 (結果省略)：*Notch1* 遺伝子に DNA 再編成が起こっている胸腺リンパ腫では異常な mRNA が産生されることから、これらの胸腺リンパ腫では mRNA の異常に対応した異常なたんぱく質が産生されると推定された。3' 末端のペプチドを認識する抗 *Notch1* 抗体を用いたウェスタンブロットティングによりたんぱく質の異常を検出した。その結果、*Notch1* 遺伝子の中央部に欠失のある 5 例 (TL30、TL36、TL42、TL47、および TL51) の *scid* 胸腺リンパ腫のうち、4 例でゲノムの欠失に対応した短縮たんぱく質が産生されていた。*Notch1* 遺伝子の中央部に IAP の挿入のある 3 例の *scid* 胸腺リンパ腫 (TL25、TL33、および TL41) および 5' 側に欠失のある TL52 において、細胞内ドメインのみを持つ数種類の *Notch1* たんぱく質が産生されていた。これらのたんぱく質のうち 97kD 以下のたんぱく質は正常胸腺細胞では認められなかった。これらの結果より *Notch1* 遺伝子の再編成により異常なたんぱく質が産生されることが明かである。

4. 考察

今回、放射線誘発マウス胸腺リンパ腫におけるがん遺伝

子の解析を行い、*Notch1* 遺伝子が高頻度に変異していることを見出した。*Notch1* 遺伝子は放射線誘発胸腺リンパ腫の発生に関してがん遺伝子として作用することをこの結果は強く示唆する。既にヒトの T 細胞白血病/リンパ腫において *Notch1* 遺伝子の変異は報告されており²²⁾、それによるとヒトにおいては *Notch1* 遺伝子は細胞外領域の EGFR で切断され、T 細胞受容体 (TCR) β 遺伝子座位に転座している。

ヒトの T 細胞白血病/リンパ腫で解析されたがん遺伝子の変異の多くは TCR 遺伝子との転座である^{45,64,74,79)}。切断点近傍に TCR の V(D)J 組み換えの過程で働く *Rag* 遺伝子の認識配列(RSS)が認められることから、がん遺伝子の転座は V(D)J 組み換え装置の異常に依って生じると推定されている^{64,79)}。我々が見出した *Notch1* 遺伝子の異常は野生系統および *scid* マウスのいずれにおいても転座以外の異常であり、主に欠失と挿入であった。これらの異常が転座と同様に V(D)J 組み換え装置の誤りにより生じるのか否かは現在まで明かではない。*scid* マウスは DNA の非相同末端結合修復および V(D)J 組み換えのいずれも不全である^{8,10,29,59)}。*scid* マウスにおける胸腺リンパ腫の発生率は野生系統における発生率に比べて著しく高いので、これらのいずれかの不全が胸腺リンパ腫の発生に関与していると推定される。切断された DNA の結合過程は上記の 2 つの過程で似通っているため、これらの過程を区別するには V(D)J 組み換えの DNA 切断過程で作用する *Rag* 遺伝子のノックアウトマウスにおける胸腺リンパ腫の発生を調べる必要がある。現在まで *Rag-KO* マウスにおいて放射線誘発胸腺リンパ腫の発生実験が行われている^{50,56,60,86)}。それによると、放射線照射した *Rag-KO* マウスは胸腺リンパ腫を誘発しない^{50,86)}ことから、胸腺リンパ腫の発生に V(D)J 組み換え過程が関与すると推定される。しかしながら、それらの実験では胸腺リンパ腫の発生を短期間 (18 週以内) しか確認しておらず、長期に渡る実験が必要である。また *Rag-KO* マウスにおける胸腺リンパ腫の発生とがん遺伝子の変異との関係を *Notch1* 遺伝子を指標に調べることは、*Notch1* 遺伝子が胸腺リンパ腫の発生に関して主要ながん遺伝子であることから興味ある問題である。

Notch1 遺伝子のがん遺伝子として作用する機構の全貌は今だ明かではない。*Notch1* 遺伝子は細胞膜に貫通した受容体遺伝子であるとともに、転写因子として作用する^{2,3)}。その機構は次の様である。*furin-like convertase*⁵²⁾により細胞外

ドメインの RQRR で切断された *Notch1* たんぱく質はヘテロダイマーとして膜上に存在する⁹⁾。リガンド (DII や Jagged) が細胞外の EGFR に結合すると、そのシグナルにより^{44,72)} γ -secretase が膜直下で *Notch1* たんぱく質を切断する^{70,76)}。切断された *Notch1* たんぱく質の細胞内ドメインは核内に移行し^{40,77)}、遺伝子のプロモーター領域の RBP-J κ サイトに結合した RBP-J κ 転写因子に結合する⁷⁷⁾。RBP-J κ 転写因子は遺伝子の転写を抑制するが、*Notch1* たんぱく質が RBP-J κ 転写因子に結合すると、遺伝子の転写を促進する^{35,40,77)}。*Notch1* 転写因子が RBP-J κ 転写因子と協同して転写する遺伝子として、*Hes1*~*Hes5*、^{20,41)}、*NF- κ B2*⁵⁷⁾、*IL-6*^{54,62)}、*ERBB-2*¹⁴⁾、*MHC class Ia*、 *β -IFN*、*IL-2R α* 、*GM-CSF*⁷³⁾、*Deltex*^{19,20)}、*Metrin β* 、*Irf-204*、*Pre-T α* ²⁰⁾などが同定されている。したがって、これらの転写されたたんぱく質の働きにより胸腺細胞はリンパ腫に悪性転化すると考えられる。これらの既知の結果より *Notch1* 遺伝子のがん遺伝子として作用するためには、恒常的活性型に変化することが必要である。その機構としてリガンドのシグナルを必要とせず恒常的に転写因子として作用すれば良い。細胞外ドメインを欠いた *Notch1* 遺伝子は転写に関して恒常的活性型であり、このような *Notch1* 遺伝子の動物導入実験において、導入されたマウスは T 細胞白血病/リンパ腫を誘発することが報告されている^{4,58)}。

本研究で認められた *Notch1* 遺伝子の変異には、遺伝子内欠失、IAP や MuLV の挿入、および逆位であった。*Notch1* 座位へのウイルス (MuLV^{26,34,48)} や MMTV⁸⁷⁾) の挿入は自然発生したマウス胸腺リンパ腫の培養細胞、あるいは MuLV や MMTV を強制感染させたマウスの胸腺リンパ腫で報告されている。IAP の挿入について、マウス乳がんにおいて *Notch* 遺伝子ファミリーの *Notch4* に IAP が挿入されていると報告されている⁴⁷⁾。放射線誘発マウス胸腺リンパ腫におけるそれらの挿入については本報告が初めてであり、挿入されたそれらは全て所持する遺伝子の一部が欠失した不完全型であった。これらの挿入が放射線照射したマウスで認められることから、放射線が IAP や MuLV の挿入を誘発していると考えられるが、その機構については現在明かでない。挿入部位は細胞外ドメインの膜貫通部位近傍、および PEST 領域の 5' 側であるが、これらの部位は報告されている部位と一致した^{24,26,34,48)}。これらの挿入によって挿入部に対して 5' 側の mRNA と 3' 側の mRNA が産生され

ていることから、細胞外ドメインのみをもつ Notch1 たんぱく質と細胞内ドメイン、あるいは膜貫通部位と細胞内ドメインをもつたんぱく質の両方が産生されると予想される。3'末端の抗 Notch1 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、たしかに後者のたんぱく質が産生されていることを確認した。これらの異常たんぱく質は既報の恒常的活性化型に対応することから、放射線によって誘発された変異は Notch1 遺伝子を恒常的に活性化させ、活性化型たんぱく質を産生し、がん遺伝子として作用させると判断される。ウェスタンブロッティングの結果は細胞内ドメインの全てを保有するたんぱく質の他にそれよりも短いたんぱく質が数種 (AR の一部から 3' 末端まで含むものと AR を含まないもの) 産生されていた。分子量から判断して、それらのたんぱく質は細胞内ドメインよりなる mRNA に存在するメチオニンのいくつかが翻訳開始点として作用した結果と考えられる。報告によると、細胞内ドメインが転写因子になるためには AR とその 3' 側に続く転写活性化ドメインが必要である⁴⁾。これらの副産物の一部は下流の遺伝子の転写因子として働く可能性がある。膜貫通部位より 5' 側の MuLV の挿入により細胞外ドメインのみを持つたんぱく質が産生され、それらは細胞質および細胞外に分泌されることが報告されている³⁹⁾。それらが転写にどのように作用するかは明かでない。

放射線により Notch1 遺伝子内部に欠失が生じることが明かとなった。遺伝子内欠失を示す 5 例の胸腺リンパ腫において、その欠失領域は膜貫通領域近傍の細胞外領域にあり、4 例で欠失領域を欠いた短縮たんぱく質が産生されていた。それらの欠失領域には convertase が認識する RQRR 配列が存在する。したがって、これらの異常たんぱく質は convertase で切断されず、ヘテロダイマーとしては膜上に存在しないと推定される。convertase 認識配列に突然変異を起こしたたんぱく質は、本実験の結果と同様に、convertase で切断されずに長鎖のまま膜上に存在することが示されている¹²⁾。ウェスタンブロッティングの結果は中央部を欠失したたんぱく質と共に、細胞内ドメインのみからなると思われるたんぱく質が大量に産生されていることから、これらの mRNA では本来の開始点であるメチオニンから翻訳され、生じた短縮たんぱく質はリガンドのシグナルを介さずに γ -secretase により膜直下で切断され転写因子として作用すると考えられる。これらの Notch1 遺伝子の欠失型が

放射線誘発胸腺リンパ腫で認められることから、欠失 Notch1 遺伝子は胸腺リンパ腫のがん遺伝子として作用すると考えられる。この推定の正否は、これらのたんぱく質が活性化転写因子として作用することを調べてはじめて明らかになる。

Notch1 遺伝子に変異のある放射線誘発 scid 胸腺リンパ腫 11 例のうち、4 例で IAP が挿入されていた。また、C.B-17 系統由来の放射線誘発胸腺リンパ腫 1 例で MuLV が挿入されていた。いままで放射線誘発胸腺リンパ腫において Notch1 遺伝子に IAP や MuLV が挿入されているという報告はない。IAP の挿入箇所は 3 例では膜貫通部位の 5' 側近傍、および PEST 領域の 5' 側近傍であった。MuLV は膜貫通部位の 5' 側近傍に挿入されていた。膜貫通部位の 5' 側の挿入部位はイントロンであり、PEST 領域近傍の挿入は最後のエクソン (エクソン 3 4) であった。それらの挿入により Notch1 異常たんぱく質が産生されるので、これらの挿入は Notch1 遺伝子のがん遺伝子に変化させる機能を持つ。IAP や MuLV の挿入はいずれも放射線で誘発した胸腺リンパ腫で認められている。この結果は、放射線が IAP や MuLV のトランスポジションを促進することを示している。IAP のトランスポジションは IAP の mRNA の転写、reverse transcriptase による cDNA の合成、cDNA のゲノムへの挿入の過程が考えられる。放射線はプロモーター、エンハンサーとして働く IAP の LTR を活性化させ²³⁾、IAP の mRNA の転写を促進し^{7,39)}、トランスポジションを促進する⁴⁰⁾ことが知られている。これらの挿入が放射線誘発胸腺リンパ腫に特異的な現象か否かは自然発生胸腺リンパ腫における結果と比較することにより明らかになる。本研究では自然発生胸腺リンパ腫について検討していないので、この点については今後の検討課題である。本研究では IAP の挿入は scid マウスでのみみられ、MuLV の挿入は野生系統の C.B-17 系統でのみみられた。これらの差異が scid マウスの原因遺伝子の DNA-Pkcs 遺伝子の作用と関連しているか否かは野生系統由来の胸腺リンパ腫の例数を増やして比較することが必要である。

本研究において Notch1 遺伝子の変異を調べたゲノム領域はエクソン 3 から 3 4 までであり、promoter 領域からエクソン 2 までの領域については未決定である。胸腺リンパ腫あるいは T 細胞白血病/リンパ腫で Notch1 遺伝子の変異についての報告はわずかであり、放射線誘発胸腺リンパ腫

については皆無である。エクソン1からエクソン18に渡って欠失している TL52 の例から判断されるように、5' 末端領域に変異が生じる可能性がある。この領域を調べることにより、はじめて放射線による *Notch1* 遺伝子の変異頻度が明かになる。

胸腺リンパ腫の発生に関与するがん関連遺伝子は数十に及ぶ^{39,49)}。これらのがん遺伝子の一部は協同して胸腺リンパ腫の発生に関与していることがわかっている。例えば、活性化 *N-Ras* 遺伝子を強発現しているマウスでは T 細胞リンパ腫を発生するが、これらのリンパ腫の 68% には *c-myc* に変異があり、13% には *N-myc* に変異がある³¹⁾。また、*Bmi-1* 遺伝子と *c-myc*³⁰⁾、あるいは *Pim-1* 遺伝子と *L-myc*⁵⁵⁾ が協同して作用することがこれらの遺伝子導入マウスで調べられている。*Pim-1* 導入マウスで発生した胸腺リンパ腫では *c-myc* の発現量が 5~20 倍に増加している⁴³⁾。さらに、放射線誘発胸腺リンパ腫において *K-ras* あるいは *N-ras* 遺伝子の変異と *p53* 遺伝子の変異あるいは trisomy 15 (*c-myc* 遺伝子座位のある染色体) を伴う例が報告されている¹¹⁾。*Notch1* 遺伝子の場合、*c-myc* 遺伝子導入マウスに MuLV を感染させると *Notch1* 遺伝子に挿入されることから、*Notch1* 遺伝子と *c-myc* 遺伝子との協同が示唆されている²⁶⁾。さらに、*E2a-Pbx* キメラ遺伝子導入マウスにおいて感染による MuLV の挿入を調べたところ、88% の胸腺リンパ腫で *Notch1* 遺伝子に挿入されており、挿入によりリンパ腫の発生までの潜伏期間が短縮されたと報告されている²⁴⁾。これらの結果より、*Notch1* 遺伝子は胸腺リンパ腫の発生に関して単独で作用するよりも、他のがん遺伝子と協同して作用していると推定される。我々はその他のがん遺伝子の変異をサザンハイブリダイゼーションにより調べた。*Notch* ファミリーの *Notch2*、*Notch3*、及び *Notch4* には変異はみとめられなかった。この結果は、胸腺リンパ腫の発生に関して *Notch* ファミリーのうち、*Notch1* 遺伝子が特異的に作用していることを示している。*Lmo1*、*Mll*、*IL2Rβ* に変異が認められた。それらの胸腺リンパ腫では今まで *Notch1* 遺伝子の変異は観察されていない。したがって、*Notch1* 遺伝子と協同して作用するがん遺伝子は現在まで同定されていない。しかしながら、今回の *Notch1* 遺伝子の結果はエクソン3以降についての変異についてであり、プロモーターからエクソン2までの間に変異がある可能性が残されている。

がん遺伝子とがん抑制遺伝子は協同して作用することが

p53 の例等で知られている。*scid* マウスの原因遺伝子は *DNA-Pkcs* 遺伝子であり、*scid* マウスでは C 末端に突然変異がある^{1,8)}。そのため、*DNA-Pkcs* 遺伝子は不完全ながら機能していると予想される^{10,25,29,59)}。このような *scid* マウスは胸腺リンパ腫を自然に高発することが知られている^{17,18)}。さらに、*DNA-Pkcs* 遺伝子のノックアウトマウスでは胸腺リンパ腫が 100% 発生することが報告されており⁴³⁾、*scid* 遺伝子のがん抑制遺伝子と考えられている。我々は本研究において *scid* マウスで *Notch1* 遺伝子が高頻度に変異し、その変異は *Notch1* たんぱく質の変異を誘導することを示した。*scid* マウスにおける放射線誘発胸腺リンパ腫の発生頻度は野生系統より著しく高く、その発生時期も野生系統に比べて早い。このことから、*scid* マウスが胸腺リンパ腫を発生しやすいのは *DNA-Pkcs* 遺伝子の不全によるが、胸腺リンパ腫の発生には *DNA-Pkcs* 遺伝子の不全だけではなく、その他のがん遺伝子の働きが必要であることを示している。すなわち、*DNA-Pkcs* 遺伝子の不全と *Notch1* 遺伝子の変異は協同して胸腺リンパ腫の発生に関与していると考えられる。

本研究は放射線発がんに関与するがん関連遺伝子の同定と、その機能の解析のために行われた。放射線の発がんリスクを評価するにあたって、発がんの線量効果関係を明らかにすると共に、発生したがん細胞で変化している遺伝子を同定し、その変異の様式を明らかにすることが重要である。それらを調べることにより、放射線特有の遺伝子変化があるか否か、がん遺伝子の変異頻度はがんの発生頻度とどのような対応関係があるかなどが理解される。このような観点のリスク研究が必要であることは国連原子力放射線影響委員会の報告書 (UNSCEAR) でも指摘されている⁸¹⁾。本研究によって胸腺リンパ腫をモデル腫瘍としてがん遺伝子 *Notch1* の変異のあらましが明らかになった。今後、*Notch1* 遺伝子の全領域に渡りその変異を同定し、放射線によるがん遺伝子の変異頻度を明らかにしたい、また、今回開発されたがん遺伝子の変異の同定法を用いて、低線量と高線量における遺伝子変異の差異や、放射線致死感受性が高く、がんを誘発しやすい *scid* マウスにおけるがん遺伝子の変異の特徴を明らかにしたい。

5. 引用文献

- 1) Araki, R., Fujimori, A., Hamatani, K., Mita, K., Saito, T.,

- Mori, M., Fukumura, R., Morimyo, M., Muto, M., Ito, M., and Tatsumi, K. (1997) *Acad. Sci. USA* **94**, 2438-2443.
- 2) Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M. E. (1995) *Science* **268**, 225-232.
 - 3) Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. and Lake, R. J. (1999) *Science* **284**, 770-776.
 - 4) Aster, J. C., Xu, L., Karnell, F. G., Patriub, V., Pui, J. C. and Pear W. S. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7505-7515.
 - 5) Bigas, A., Martin, D. I. and Milner, L.A. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2324-2333.
 - 6) Blaumuller, C. M., Qi, H., Zagouras, P. and Artavanis-Tsakonas, S. (1997) *Cell* **90**, 281-291.
 - 7) Blumenstein, M., Tessmer, U., Hossfeld, D. K. and Duhrsen, U. (1998) *Cell Biol. Int.* **22**, 563-574.
 - 8) Blunt, T., Gell, D., Fox, M., Taccioli, G. E., Lehman, A. R., Jackson, S. P., and Jeggo, P. A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10285-10290.
 - 9) Bongarzone, I., Butti, M. G., Fugazzola, L., Pacini, F., Pinchera, A., Vorontsova, T. V., Demidchik, E. P. and Pierotti, M. A. (1997) *Genomics* **42**, 252-259.
 - 10) Bosmam M. J. (1989) In *Current Topics in Microbiology and Immunology*, M. J. Bosma, R. A. Phillips, and W. Shuler, eds. (Berlin: Springer-Verlag) pp.3-9.
 - 11) Brathwaite, O., Boyona, W. and Newcomb, E. W. (1992) *Cancer Res.* **52**, 3791-3795.
 - 12) Bush, G., diSibio, G., Miyamoto, A., Denault, J. B., Leduc, R. and Weinmaster, G. (2001) *Dev. Biol.* **229**, 494-502.
 - 13) Capobianco, A. J., Zagouras, P., Blaumueller, C. M., Artavanis-Tsakonas, S. and Bishop, J. M. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6265-6273.
 - 14) Chen, Y., Fischers, W. H. and Gill, G. N. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 14110-14114.
 - 15) Chu, G. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 24097-24100.
 - 16) Conlon, R. A., Reaume, A. G. and Rossant, J. (1995) *Development* **121**, 1533-1545.
 - 17) Custer, A. H., Bosma, G. C. and Bosma, G. C. (1985) *Amer. J. Path.* **120**, 464-477.
 - 18) Danska, J. S., Pflumio, F., Williams, C. J., Hunter, O., Dick, J. E. and Guidos, C. J. (1994) *Science* **266**, 450-455.
 - 19) Deftos, M. L., He, Y. W., Ojala, E. W., and Bevan, M. J. (1998) *Immunity* **9**, 777-788.
 - 20) Deftos, M. L., Huang, E., Ojala, E. W., Forbush, K. A. and Bevan, M. J. (2000) *Immunity* **13**, 73-84.
 - 21) de la Ponpa, J. L., Wakeham, A., Correia, K. M., Samper, E., Brown, S., Aguilera, R. J., Nakano, T., Honjo, T., Mak, T. W., Rossant, J. and Conlon, R. A. (1997) *Development* **124**, 1139-1148.
 - 22) Ellisen, L. W., Bird, J., West, D. C., Soreng, A. L., Reynolds, T. C., Smith, S. D. and Sklar, J. (1991) *Cell* **66**, 649-661.
 - 23) Faure, E., Emanoil-Ravier, R. and Champion, S. (1997) *Arch. Physiol. Biochem.* **105**, 183-189.
 - 24) Feldmanm B. J., Hampton, T. and Cleary, M. L. (2000) *Blood* **96**, 1906-1913.
 - 25) Gao, Y., Chaudhuri, J., Zhu, C., Davidson, L., Weaver, D. T. and Alt, F. W. (1998) *Immunity* **9**, 367-376.
 - 26) Girard, L., Hanna, Z., Beaulieu, N., Hoeman, C. D., Simard, C. and Kozak, C. A. (1996) *Genes Dev.* **10**, 1930-1944.
 - 27) Goodhead, D. T. (1994) *Int. J. Radiat. Biol.* **65**, 7-17.
 - 28) Greenwald, I. (1998) *Genes Dev.* **12**, 1751-1762.
 - 29) Hartley, K. O., Gell, D., Smith, G. C. M., Zhang, H., Dvecha, N., Connelly, M. A., Admon, A., Lees-Miller, S. P., Anderson, C. W. and Jackson, S. P. (1995) *Cell* **82**, 849-856.
 - 30) Haupt, Y., Bath, M. L., Harris, A. W. and Adams, J. M. (1993) *Oncogene* **8**, 3161-3164.
 - 31) Haupt, Y., Harris, A. W. and Adams, J. M. (1992) *Oncogene* **7**, 981-986.
 - 32) Hiom, K., Melek, G. and Gellert, M. (1998) *Cell* **94**, 463-470.
 - 33) Hirsinger, E., Malapert, P., Dubrulle, J. Delfini, M. C., Duprez, D., Henrique, D., Ish-Horowicz, D. and Pourquie, O. (2001) *Development* **128**, 107-116.
 - 34) Hoemann, C. D., Beaulieu, N., Girard, L., Rebai, N. and Jolicoeur, P. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3831-3842.
 - 35) Hsieh, J. J.-D., Henkel, T., Salmon, P., Robey, E., Perterson, M. G. and Hayward, S. D. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 952-959.
 - 36) Hutchinson, F. (1985) *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **32**, 115-154.
 - 37) International Commission on Radiological Protection. (1998) *Genetic susceptibility to cancer*. New York: Elsevier

- Science; ICRP Publication 79: Ann. ICRP28 (1-2).
- 38) Ishihara, H., Tanaka, I., Furuse, M. Tsuneoka, K. (2000) *Radiat. Res.* **153**, 392-397
 - 39) Jankers, J. and Berns, A. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1287**, 29-57.
 - 40) Jarriault, S., Brou, C., Logeat, F., Schroeter, E. H., Kopan, R. and Israel, A. (1995) *Nature* **377**, 355-358.
 - 41) Jarriault, S., Le Bail, O., Hirsinger, E., Pourquile, O., Logeat, F., Strong, C. F., Brou, C., Seldah, N. G. and Israel, A. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 7423-7431.
 - 42) Jeggo, P. A. (1999) *Radiat. Res.* **150**, S80-S91.
 - 43) Jhappan, C. Morse, H. C. 3rd, Fleischmann, R. D., Gottesman, M. M. and Merlino, G. (1997) *Nat. Genet.*, **17**, 483-486.
 - 44) Kidd, S., Lieber, T. and Young, M. W. (1998) *Genes Dev.* **12**, 3728-3740.
 - 45) Korsmeyer, S. J. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* **10**, 785-807.
 - 46) Lardelli, M., Dahlstrand, J. and Lendahl, U. (1994) *Mech. Dev.* **46**, 123-136.
 - 47) Lee, J. S., Haruna, T., Ishimoto, A., Honjo, T. and Yanagawa, S. (1999) *J. Virol.* **73**, 5166-5171.
 - 48) Lee, J. S., Ishimoto, A., Honjo, T. and Yanagawa, S. (1999) *FEBS Lett.* **455**, 276-280.
 - 49) Li, J., Shen, H., Himmel, K. L., Dupuy, A. J., Largaespoda, D. A., Nakamura, T., Shaughnessy, J. D. Jr., Jenkins, N. A. and Copeland, N. G. (1999) *Nature Genet.* **23**, 348-353.
 - 50) Liao, M.-J. and van Dyke, T. (1999) *Genes Dev.* **13**, 1246-1250.
 - 51) Little, M. P. and Muirhead, C. R. (1998) *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 471-480.
 - 52) Logeat, F., Bessia, C., Brou, C., LeBail, O., Jarriault, S., Seidah, N. G. and Israel, A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8108-8112.
 - 53) Milner, L. A., Bigas, A., Kopan, R., Brashem-Stein, C., Bernstein, I. D. and Martin, D. I. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13014-13019.
 - 54) Miyazawa, K., Mori, A., Yamamoto, K. and Okudaira, H. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 7620-7627.
 - 55) Moroy, T., Verbeek, S., Ma, A., Achacoso, P., Berns, A. and Alt, F. (1991) *Oncogene* **6**, 1941-1948.
 - 56) Nacht, M. and Jacks, T. (1999) *Cell Growth Differ.* **9**, 131-138.
 - 57) Oswald, F., Liptay, S., Adler, G. and Schmid, R. H. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2077-2088.
 - 58) Pear, W. S., Aster, J. C., Scott, M. L., Hasserjian, R. P., Soffer, B., Sklar, J. and Baltimore, D. (1996) *J. Exp. Med.* **183**, 2283-2291.
 - 59) Peterson, S. R., Kurimasa, A., Oshimura, M., Dynan, W. S., Bradbury, E. M. and Chen, D. J. (1995) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **92**, 3171-3174.
 - 60) Petiniot, L. K., Weaver, Z., Barlow, C., Shen, R., Eckhaus, M. Steinberg, S. M., Ried, T., Wynshaw-borris, A. and Hodes, R. J. (2000) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **97**, 6664-6669.
 - 61) Pierce, D. A., Shimizu, Y., Preston, D. L., Vaeth, M. and Masubuchi, K. (1996) *Cancer: 1950-1990. Radiat. Res.* **146**, 1-27.
 - 62) Plaisance, S., Berghe, W. V., Boone, E., Fiers, W. and Haegeman, G. (1997) *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3733-3743.
 - 63) Pogue-Geile K. L. and Greenberger, J. S. (2000) *Exp. Hematol.* **28**, 680-689.
 - 64) Rabbits, T. H. (1994) *Nature* **372**, 143-149.
 - 65) Rabes, H. M. (2001) *Med. Pediatr. Oncol.* **36**, 574-582.
 - 66) Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H. R., and Aguet, M. (1999) *Immunity* **10**, 547-558.
 - 67) Robbins, J., Blondel, B. J., Gallahan, D. and Callahan, R. (1992) *J. Virol.* **66**, 2594-2599.
 - 68) Robey, E., Chang, D., Itano, A., Cado, A., Alexander, H., Lans, D., Weinmaster, G. and Salmon, P. (1996) *Cell* **87**, 483-492.
 - 69) Rohn, J. L., Loring, A. S., Linenberger, M. L. and Overbaugh, J. (1996) *J. Virol.* **70**, 8071-8080.
 - 70) Schroeter, E. H., Kisslimgr, J. A. Kopan, R. (1998) *Nature* **393**, 382-386.
 - 71) Shawber, C., Nofziger, D., Hsieh, J. J., Lindsell, C., Bogler, O., Hayward, D. and Weinmaster, G. (1996) *Development* **122**, 3765-3773.
 - 72) Shimizu, K., Chiba, S., Hosoya, N., Kumano, K., Saito, T., Kurokawa, M., Kanda, Y., Hamada, Y. and Hirai, H. (2000)

- Mol. Cell. Biol.* **20**, 6913-6922.
- 73) Shirakata, Y., Shuman, J. D. Coligan, J. E. (1996) *J. Immunol.* **156**, 4672-4679.
- 74) Showe, L. C., and Croce, C. H. (1987) *Annu. Rev. Immunol.* **5**, 253-277.
- 75) Smida, J., Salassidis, K., Hieber, L., Zitzelberger, H., Kellerer, A. M., Demidchik, E. P., Spelsberg, F., Negele, T., Lengfelder, E., Werner, M. and Bauchinger, M. (1999) *Int. J. Cancer* **80**, 32-38.
- 76) Struhl, G. and Adachi, A. (1998) *Cell* **93**, 649-660.
- 77) Tamura, K., Taniguchi, Y., Minoguchi, S., Sakai, T., Tun, T., Furukawa, T. and Honjo, T. (1995) *Curr. Biol.* **5**, 1416-1423.
- 78) Thacker, J. (1992) *Adv. Radiat. Biol.* **16**, 77-117.
- 79) Tycko, B. and Sklar, J. (1990) *Cancer Cell* **2**, 1-8.
- 80) United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and effects of ionizing radiation, 1993 Report to the General Assembly, with scientific annexes. (1993) New York, United Nations, Publication e. 94, IX.2.
- 81) United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and effects of ionizing radiation. 2000 Report to the General Assembly, with scientific annexes. (2000) Annex G. Biological effects at low radiation doses. Vol. II, pp. 73-176.
- 82) Uyttendaele, H., Marazzi, G., Wu, G., Yan, Q., Sassoon, D. and tajewski, J. K. (1996) *Development* **122**, 199-205.
- 83) van der Houven van Oordt, C. W., Schouten, T. G., van Krieken, J. H. J. M., van Dierendonck, J. H. J., van der Eb, A. J. and Breuer, M. L. (1998) *Carcinogenesis* **19**, 847-853.
- 84) Washburn, T., Schweighoffer, E., Gridley, T., Chang, D., Fowlkes, B. J., Cado, D. and Robey, E. (1997) *Cell* **88**, 833-843.
- 85) Weinmaster, G., Roberts, U. J. and Lemke, G. A. (1992) *Development* **116**, 2251-2259.
- 86) Williams, C. J., Grandal, I., Vesprini, D. J., Wojtyra, U., Danska, J. S. and Guidos, C. J. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 400-413.
- 87) Yanagawa, S., Lee, J.-S., Kakimi, K., Matsuda, Y., Honjo, T. and Ishimoto, A. (2000) *J. Virology* **74**, 9786-9791.
- 88) Zagouras, P., Stifani, S., Blaumueller, C. M., Carcangiu, M. L., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 6414-6418.

6. 発表論文

- 1) Teraoka H., Yumoto Y., Watanabe F., Tsukada K., Suma A., Enari M. and Nagata S. (1996) CPB32/Yama/apopain cleaves the catalytic component of DNA-dependent protein kinase in the holoenzyme. *FEBS Letter*, **393**, 1-6.
- 2) Neno M., Mita K., Ichimura S., Cartwright I. L., Takahashi E., Yamauchi M. and Tsuji H. (1996) Heterogeneous structure of the polyubiquitin gene *Ubc* of HeLa S3 cells. *Gene*, **175**, 179-185.
- 3) Ajiro K., Yasuda H. and Tsuji H. (1996) Vanadate triggers the transition from chromosome condensation to decondensation in a mitotic mutant (tsTM13): Inactivation of *p34^{cdc2}/Hi* kinase and dephosphorylation of mitosis-specific H3. *Eur. J. Biochem.*, **241**, 923-930.
- 4) Sugaya K., Sasasuma S., Nohara J., Kimura T., Hongo E., Higashi T., Morimyo M., Tsuji H. and Mita K. (1997) Cloning and sequencing of the largest subunit of Chinese hamster RNA polymerase II gene: identification of a mutation related to abnormal induction of sister chromatid exchanges. *Gene*, **194**, 267-272.
- 5) Todo T., Tsuji H., Ohtoshi E., Hitomi K., Kim S. and Ikenaga M. (1997) Characterization of a human homolog of (6-4)Photolyase. *Mutat. Res.*, **383**, 195-204.
- 6) Nishimura A., Moriya S., Ukai H., Nagai K., Wachi M. and Yamada Y. (1997) Diadenosine 5',5'''-PI,P4-tetraphosphate (4p4A) controls the timing of cell division in *Escherichia coli*. *Genes Cells*, **2**, 401-413.
- 7) Nagasawa M., Watanabe F., Suwa A., Yamamoto K., Tsukada K. and Teraoka H. (1997) Nuclear translocation of the catalytic component of DNA-dependent protein kinase upon growth stimulation in normal human T lymphocytes. *Cell Struct. Funct.*, **22**, 585-594.
- 8) Chibazakura T., Watanabe F., Kitajima S., Tsukada K., Yasukochi Y. and Teraoka H. (1997) Phosphorylation of human general transcription factor IIB by DNA-dependent

- protein kinase--synergistic stimulation of RNA polymerase II basal transcription in vitro. *Eur. J. Biochem.*, **247**, 1166-1173.
- 9) Katsube T., Takahashi M., Ueda R., Hashimoto N., Kobayashi M. and Togashi S. (1998) Cortactin associates with the cell-cycle junction protein ZO-1 in both *Drosophila* and mouse. *J. Biol. Chem.*, **273**, 29672-29677.
 - 10) Takahashi K., Matsuo T., Katsube T., Ueda R. and Yamamoto D. (1998) Direct binding between two PDZ domain proteins canoe and ZO-1 and their roles in regulation of the Jun N-terminal kinase pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Mech. Dev.*, **78**, 97-111.
 - 11) Ukai H., Matsuzawa H., Ito K., Yamada M. and Nishimura A. (1998) *ftsE*(Ts) affects translocation of K⁺-pump protein into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **180**, 3663-3670.
 - 12) Sugaya K., Ajimura M., Tsuji H., Morimyo M. and Mita K. (1998) Alteration of the largest subunit of RNA polymerase II and its effect on chromosome stability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.*, **258**, 279-287.
 - 13) Ogiu T., Nishimura M., Watanabe F., Ukai H., Ishii-Ohba H., Shimada Y., Tsuji H., Sakurai J. and Hino O. (2000) Absence of linkage between radiosensitivity and the predisposing *Atp7b* gene mutation for heritable hepatitis in the LEC rat. *Radiat. Res.*, **154**, 113-116.
 - 14) Ogiu T., Ishii-Ohba H., Kobayashi S., Nishimura M., Shimada Y., Tsuji H., Watanabe F. and Sado T. (2000) Radiation carcinogenesis in radiosensitive mutant scid mice. In 'Proceedings of International Symposium on Biological Effects of Low Dose Radiation' ed. By F. Sato, Y. Yamada, J. Onodera, pp. 56-62, Institute for Environmental Sciences, Aomori.
 - 15) Katsube T., Hashimoto N., Sasaki Y., Yamashita A., Takahashi M., Ueda R. and Togashi S. (2000) Genomic organization, transcription start sites, and chromosomal location of the *Drosophila* cortactin gene. *Genes Genet. Syst.*, **76**, 65-70.
 - 16) Yamashita A., Katsube T., Hashimoto N., Tomita K., Takahashi M., Ueda R. and Togashi S. (2001) Identification of *Xenopus* cortactin: two isoforms of the transcript and multiple forms of the protein. *Zool. Sci.*, **18**, 331-336.