

特別研究「低レベル放射線の人体に対する危険度の推定に関する調査研究」

(昭和48～57年度)

最 終 報 告 書

昭和58年11月



放射線医学総合研究所

Final Report “Risks due to Low Level Radiation Exposure”

Project Research in FY 1973 — 1982

November 1983

National Institute of Radiological Sciences

Anagawa, Chiba, Japan

目 次

特別研究「低レベル放射線の人体に対する危険度の推定に関する調査研究」 総括

寺島 東洋三 1

I 放射線による晩発障害の危険度の推定に関する調査研究 概説

関 正 利 7

1. 放射線による腫瘍発生について

— CV と SPF マウスと線量効果関係 —

太津 裕司, 小林 森, 古瀬 健, 野田 攸子, 春日 孟 9

Various Types of Tumors Induced by Irradiation and Their Relationship to Dosage, and Conventional and Specific Pathogen-free Mice

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

2. 近交系マウスの加齢性変化に関する病理学的研究

山極 順二, 椎名 悦子, 成毛千鶴子 19

Histopathological Studies on Aging Alterations in Inbred Strains of Mice

J. Yamagiwa, E. Shiina and C. Naruke

3. 各種照射様式による放射線発癌に関する研究

(1) 連続照射による寿命短縮と死因分析

佐藤 文昭, 川島 直行, 福津久美子, 関 正利, 太津 裕司

古瀬 健, 小林 森, 野田 攸子, 白貝 彰宏, 丸山 隆司 29

Influence of Physical and Biological Factors on Radiation Carcinogenesis

Some Delayed Effects of Continuous Irradiations in Mice

F. Sato, N. Kawashima, K. Fukutsu, A. Shiragai, T. Maruyama,

S. Kobayashi, T. Furuse, Y. Noda, H. Otsu and M. Seki

(2) 感受性の年齢依存性

佐々木俊作, 春日 孟, 川島 直行 36

Influence of Physical and Biological Factors on Radiation Carcinogenesis

Age-dependence of Susceptibility to Radiation Carcinogenesis

S. Sasaki, T. Kasuga and N. Kawashima

4. 造血の“場”の機能と副腎皮質ホルモンが放射線誘発骨髄性白血病の

発症に及ぼす影響に関する研究

関 正利, 吉田 和子, 西村まゆみ, 野島久美恵 44

Factors which Influence the Induction of Myeloid Leukemia of C3H/He Mice by Irradiation

M. Seki, K. Yoshida, M. Nishimura and K. Nojima

5. 血液幹細胞動態よりみた放射線誘発白血病の発症機序

平嶋 邦猛, 別所 正美, 陣内 逸郎, 川瀬 淑子

大谷 正子, 室橋 郁生, 奈良 信雄, 早田 勇 51

Experimental Studies on the Mechanism of Radiation-Induced Myeloid Leukemogenesis Based on Hemopoietic Stem Cell Kinetics

K. Hirashima, M. Bessho, I. Jinnai, Y. Kawase, M. Ohtani,

I. Murohashi, N. Nara and I. Hayata

6. 放射線発がん要因の免疫学的ならびに遺伝学的解析	
佐渡 敏彦, 武藤 正弘, 神作 仁子, 久保 えい子 小林 森, 五日市ひろみ, 相沢 志郎, 片岡 泰	62
Immunologic and Genetic Host Factors and Cellular Events in Radiation Carcinogenesis in Mice	
T. Sado, M. Muto, H. Kamisaku, E. Kudo, S. Kobayashi, H. Kurokawa-Itsukaichi, S. Aizawa and Y. Kataoka	
7. 放射線による白血病発現機構の細胞遺伝学的研究	
石原 隆昭, 早田 勇, 南久松真子, 加藤やよい, 河野 清一	70
Cytogenetic Studies in Hematopoietic Cells After Irradiation: The Role of Chromosome Abnormalities in the Development of Leukemia	
T. Ishihara, I. Hayata, M. Minamihisamatsu, Y. Kato and S. Kohno	
8. 放射線による細胞のトランスフォーメーションの研究	
寺島東洋三, 安川美恵子, 崎山比早子, 岡田 安弘 渡部 郁雄	79
<i>In Vitro</i> Cell Transformation by Ionizing Radiation	
T. Terasima, H. Otsu, H. Sakiyama, M. Yasukawa, Y. Okada and I. Watanabe	
II 放射線による遺伝障害の危険度の推定に関する調査研究 概説	
中井 斌	88
General Activities of Genetic Effects Research Group	
S. Nakai	
1. 霊長類リンパ球を用いた放射線誘発染色体異常の線量効果に関する研究	
戸張 巖夫, 堀 雅明, 平井 百樹, 高橋 永一 辻 秀雄, 宇津木豊子, 中井 斌	92
Studies on Dose-Response Relationship for Chromosome Aberrations in Peripheral Lymphocytes of Primates	
I. Tobari, E. Takahashi, M. Hori, M. Hirai, H. Tsuji, T. Utsugi and S. Nakai	
2. 培養細胞における放射線突然変異の線量効果に関する研究	
佐藤 弘毅, 稲葉 浩子, 堀 雅明, 塩見 忠博, 塩見 尚子	102
Studies on Dose-Response Relationship of Radiation-Induced Mutations in Cultured Mammalian Cells	
K. Sato, H. Hama-Inaba, M. Hori, T. Shiomi and N. Hieda-Shiomi	
3. 霊長類の実験システムの開発に関する研究	
北爪 雅之, 岡本 正則, 中井 斌	110
Effects of Radiation on Monkey and Hamstar Germ Cells	
M. Kitazume, M. Okamoto and S. Nakai	
III 内部被曝の障害評価に関する調査研究 概説	
松岡 理	119
General Activities of Radiotoxicology Research Group	
O. Matsuoka	

1. 内部被曝実験施設の設計に関する研究		
(1) 実験施設の設計	松岡 理, 小泉 彰, 福田 俊, 小木曾洋一 石樽 信人, 高橋千太郎, 山田 裕司	125
(2) 放射線廃棄物の処理に関する研究	松岡 理, 小泉 彰, 福田 俊, 山田 裕司 宮本 勝宏, 森 貞次	127
Studies on Design of Research Laboratory for Radiotoxicology	O. Matsuoka, A. Koizumi, S. Fukuda, Y. Yamada, K. Miyamoto and T. Mori	
2. 放射性核種の代謝に関する比較動物学的研究	— とくに粒子状物質の代謝に関して —	
	松岡 理, 高橋千太郎, 久保田善久, 飯田 治三	134
Comparative Studies on the Behavior of Particulate Materials Several Mammals	O. Matsuoka, S. Takahashi, Y. Kubota and H. Iida	
3. アルファ放射体の体内被曝線量評価に関する比較実験動物学的研究	松岡 理, 石樽 信人, 関口 昌道	143
Studies on Methodology in Dose Estimation for Internally Deposited Alpha- Emitters	O. Matsuoka, N. Ishigure and M. Sekiguchi	
4. 内部被曝の影響に関する比較動物学的研究	松岡 理, 小木曾洋一, 福田 俊, 飯田 治三	153
Studies on the Effects of Internal Emitters	O. Matsuoka, Y. Ogiso, S. Fukuda and H. Iida	
5. 放射性エアロゾルの動物吸入法に関する研究	松岡 理, 山田 裕司, 久保田善久, 福田 俊, 飯田 治三	163
Methodological Studies on the Inhalation of Radioactive Aerosol	O. Matsuoka, Y. Yamada, Y. Kubota S. Fukuda and H. Iida	
6. 超ウラン元素の体内摂取事故対策に関する基礎的研究	/	
	松岡 理, 佐藤 宏	173
Fundamental Studies on Decorporation of Plutonium	O. Matsuoka and H. Sato	
IV 核融合炉の開発に伴うトリチウムの生物学的影響に関する調査研究 概説	松平 寛通	179
Biological Effects of Tritium	H. Matsudaira	
V 予算と施設について		184

特別研究「低レベル放射線の人体に対する 危険度の推定に関する調査研究」 総括

寺 島 東洋三
(科学研究官)

1. 経緯

昭和41年より3年にわたった「放射線障害の回復に関する調査研究」、44年より4ヶ年継続した「放射線医学領域における造血器移植に関する調査研究」という2つの特別研究によって、放医研の生物・医学研究グループの中に血液学、免疫生物学、分子および細胞生物学、遺伝学などの領域が根付き、あるいは新たな再生の機運を迎えた。その背景をおいて昭和46年は新しい苦悩と模索の年として記憶される。6月に生物プロジェクト検討委員会（のちに生物影響専門委員会）が故江藤秀雄科学研究官を中心にもたれ、放医研における生物効果研究のオリエンテーションと問題点が論議された。内部被曝障害、身体的影響、遺伝的影響、疫学的研究、研究の基本理念などが論議の内容であったと思われる。委員会の中で松岡、中井、春日、村松が(1)内部被曝の特殊性、(2)低線量域の線量効果関係の問題点(バックグラウンドの意味、他の環境物質との相関作用、線量率効果など)、(3)実験生物よりヒトへの効果の外挿の方途(霊長類を含む中型動物、ヒト培養細胞の利用など)、(4)発がん機構の解明(分子レベルの変化、ビールの関与など)などを論じ、問題点の所在はかなり明らかとなってきた。しかしプロジェクトの実現には社会的要請と放医研の研究および施設のレベルとのギャップ、経常研究との関係、現行特別研究とのつながり等々の困難が大きく、とくに低線量の身体的効果の研究方針については検討が長引いた。

7月、委員会は限らない諸種の問題点を止揚して、(1)中型動物による研究の重点的推進、(2)ヒトへの外挿に必要な知見をめざすとともに、障害検知に必要な実験生物系の確立を基本方針とし、身体的障害については当面、白血病を中心として発がん機構の研究、遺伝的障害は霊長類の体細胞、生殖細胞の染色体異常、突然変異などの予備的研究、内部被曝障害ではヒトへの外挿のパラメーターを求める方向に方針

をしほり、当面は研究棟建設をめざす予備的段階をすすめ、疫学についてはさらに慎重検討ということになった。本プロジェクト案は当研究所にとってきわめて遂行困難な諸点を内包しており、それらを克服するため国外情報の調査・収集、国外研究機関における研修制度の確立、適切な外部研究者への研究委託制度、多段階的な弾力的運営、基礎生物学的能力の開発などの新企画を提案し、それらを媒介としてプロジェクトの成功と同時に所内外への波及効果をも企てたものであった。同年秋には本プロジェクトに関し多数の所内研究員に対しその学問的必然性と社会的要請について説明会が催された。ヨーロッパ諸国では晩発障害研究連合が動き始め、その12月には国内の諸研究グループの間で日本晩発効果研究グループが結成されており、ついで47年1月末には原子力委員会（有沢委員長代理）が放医研の企図しつつあった環境放射線および放射能の人体に及ぼす影響に関する調査研究と国内・外の同種研究との分担、協調について報告が要請された。これら一連の出来事は当時の内外の情勢の急速な流れを如実に示している。

47年3月「原子力平和利用にともなう環境放射線および放射能の人体に及ぼす影響に関する調査研究」の研究計画大綱が完成した。これは「環境放射線による被曝線量の推定に関する調査研究」と「放射線の生物学的危険度の推定に関する調査研究」とを併合したもので、原子力施設に由来する被曝線量とそのリスクを総合的に評価する目的をもったナショナル・プロジェクトの一環であった。この計画は同年2月以降所内の多数の勧告と批判によって改定を重ねたが、起案者は学問のあり方と社会的要請とのほごまに悩み、ある種の視点の相異は解決されずに終わった。同3月半ばこの大綱は原子力委員会によって承認され、48年度の予算作製に向けて立ち上った。同年3月末、寺島は米国の諸施設、中井は米国およびヨーロッパ各

国の施設を訪問し低線量生物効果の、松岡は5月に米国、ヨーロッパ諸国の内部被曝影響の研究の現状と施設をそれぞれ調査した。

科学技術庁はこのナショナル・プロジェクトの発足のため各界の学識経験者よりなる環境・安全専門部会（のち環境放射能安全研究専門部会）を設置し、同年12月に至るまで7回の低線量分科会を開催、放医研より提出した「放射線の人への危険度の推定に関する研究」を中心にナショナル・プロジェクトとしての低線量分科会中間報告書（昭和47年12月1日）をとりまとめた。その後、これは48年6月に至って第1次の報告書として完成した。これらの各界の意見や勧告のバックアップにより、放医研のプロジェクトは昭和48年度に「低レベル放射線の人体に及ぼす危険度の推定に関する調査研究」の名の下に10ヶ年の遂行期間をもつ特別研究として開始された。

2. 本特別研究の構成と方針

本特別研究は、(1)放射線による晩発障害の危険度の推定、(2)放射線による遺伝障害の推定、(3)内部被曝の障害評価の三つによって構成された。

(1)は晩発障害と称するものの、実質的には放射線による白血病発症を含めて発がんの研究をめざした。先行した特別研究によって醸成された血液学、免疫生物学の基盤の上に、技術部動植物課の実績による数種の近交系マウス、そのSPF（specific pathogen-free）を利用した研究計画が立てられた。放射線発がんは原理的には亜致死損傷をうけた（つまり半どろしの）細胞がその遺伝子を変化させて高い増殖性を獲得し（細胞レベルの出来事）、その異常細胞が個体の中で促進的、抑制的な様々の因子の影響の下に生き残り、あるいはさらに増殖の自律性を得て悪性化するに至るもの（個体レベルの出来事）であると考えられた。つまり入力としての放射線量の生物効果（出力）は個体内の細胞性、体液性の免疫機能や内分泌因子、生理活性物質、細胞間相互作用、など多種のステップによって修飾された結果であるといえる。個体の応答能力や秩序維持力をひとくちに制御機構とよぶならば、この機構は内在性因子としての加齢や外来性因子である病原体や環境物質（食品、薬品を含む）の影響下にあるので、出力である発がんリスクは個体と環境との二重の関数の支配下にあるといえる。疫学からえられるリスクはヒト集団に対する入力と出力の関係を示すことができるが、これはコン

トロールされた実験系での研究を俟って正しく意義づけられるであろう。晩発障害の研究は入出力関係つまり線量効果関係を各種のマウス系統、各型の腫瘍についてしらべ、それらに対する物理的要因（線量率効果）、年齢依存性をみて腫瘍誘発の基礎知見を深めるとともに、上述のような放医研のもつ基礎のうえに制御機構の寄与を解明するという方針で進められた。

(2)の遺伝障害の問題点として、そのリスクの推定にヒトの数量的データをうることがほとんど不可能であること、マウスでの研究は国外で25年余の蓄積があるが、その結果のヒトへの適用性について確証のないこと、低線量域の影響をすることは従来の個体レベルの研究方法では事実上不可能であることがただちに認識された。遺伝的リスクに関して放医研は昭和35、36年遺伝研究部において数十万匹のショウジョウバエを用い、致死突然変異を指標として8Rに至る直線的線量効果関係を確認したが、ヒトの危険度推定に至る方途を欠いた。本特研においては第1にこの困難を克服するためヒトに近縁の霊長類（カニクイザル）を採用して比較・類推によるヒトへの接近を試みた。第2に低線量域（放射線防護技術の観点よりみて線量限度レベル——5レム——が関心線量であるため、現時点ではこれを低線量域と定義するのが妥当である）の効果を第1近以として把むため生殖細胞における遺伝障害——染色体異常と突然変異——をしらべようと企図した。その計画の重要なリファレンスはガラス器内培養の可能なヒトとサル、マウスの体細胞の遺伝障害であって、これらの種のデータから低線量域の効果と比較動物学的なパラメーターがえられ、ついでサルの生殖細胞のデータをうることによって間接的にヒトの遺伝障害を推定しようものと期待された。以上のような細胞での実験技法の開発によって、莫大な数の個体を用いる従来の実験法の困難が回避された。第3に遺伝要素の障害が疾病として発現する過程がリスク率に大きく係わると考えられるが、この問題に対するアプローチは胚のガラス器内培、遺伝疫学的指標などの研究技術の開発を待ち、時期をみて着手することとした。

(3)の内部被曝はヒトの放射線被曝のなかで対応上重要性をもつものの1つであり、低レベル放射性核種の影響の研究は不可欠と考えられた。

その障害評価の研究は放射性核種の投与量とその影響、影響を修飾する諸要因（核種の化学形やその代謝など）に関するものと二大別される。

とくにプルトニウム（Pu）の内部被曝では実際上体内の線量はきわめて微視的かつ不均等な分布を呈し、外部被曝によるリスクにもとづいてそのリスクを推定することは極めて困難である。これまで欧米において遂行された、あるいは着手されている研究のすべては齧歯類、イヌで行われているが、その成果をヒトに外挿・適用するところに現在の最大の問題が残されていると考えられた。放医研では昭和40年より5年半にわたって「プルトニウムによる内部被曝に関する調査研究」と称する特別研究を実施し、全身ラジオ・オートグラフィなどの新しい手法を用い、また肺モニター等を開発し、吸入実験、Pu粒子代謝、影響の修飾因子に関し成果を収めた。本特別研究では上述の基礎の上に多種動物の比較動物学的研究を行ない、Puのリスクをヒトに外挿・適用に必要な主要な科学的根拠を求めることを主眼とした。併せてこれまで本邦において行われなかったPu吸入事故に対する緊急医療対策の生物学的、化学的基礎に関する研究を実施することとした。

これら3グループの研究は昭和48年度（初年度）に晩発障害は6、遺伝障害、内部被曝障害それぞれ1研究単位で出発したが、漸次体制を拡大し、最終年度には各8、3および6単位となった。

昭和55年に至り、これまで特別研究「原子力施設等に起因する環境放射線被曝に関する調査研究」の一部として、また54年度には指定研究として進めてきたトリチウム影響の研究を、核融合会議（昭和50年11月設立）の生物影響分科会計画（昭和53年）と呼応して、松平をグループリーダーとする「トリチウムの生物影響に関する調査研究」とし、本特別研究の第4の柱とした。この研究グループはトリチウムの生体内動態、動物細胞およびDNAへの効果、生殖腺と初期発生の障害などを精力的に研究し、昭和57年その内容の拡大とともに独立した特別研究として展開することとなった。

以上の4グループの研究はいずれも遂行上極めて困難であり、しかし同時に強い社会的要請をうけ、他方そのゴールは生物・医学の深处に結びついているものであって、技術的にも学問的にも、それらの重要性は極めて高いものと判断された。したがって研究遂行のための体制、期間、それに伴う予算面においても従来の特別研究にみられない規模に達した。社会的要請にどう応えるかは直接的に達成されるものではなく、1つには放射線のリスクの国際的検討の場（国際放射線防護委

員会、国連科学委員会）に成果を提供することによって国際的コンセンサスに寄与し、第2に放射線障害の本質の理解を深めて、これを環境毒性学（environmental toxicology）に演繹するという価値ある任務を果たすものであるとされた。

3. 本特別研究とナショナル・プロジェクト

本特別研究は原子力委員会の企画したナショナル・プロジェクトの主要な一環として位置付けられたため、原子力局で策定された環境放射能安全研究専門部会の研究計画に寺島、中井、松岡は絶えず参画・寄与した。本研究所の成果は昭和53年度より実施された環境放射能安全研究発表会（科技厅原子力局）において毎年報告されてきた。本特別研究と平行して他の研究機関（科技厅、文部省の研究委託費、助成費によって支えられた）との協力が進められた。その内の1つは、原子力安全研究協会を母体とする低線量影響調査専門委員会（委員長田島弥太郎、のち江上信雄及び菅原努）により48年より実施された発がん遺伝的リスクに関する諸研究であった。それらの成果は本特別研究の推進に有力な情報を提供しつつあったばかりでなく、国内の放射線リスク研究のプロモーターとしても意義があらたかったと考えられる。

4. 特別研究遂行に係わる施設の整備と技術支援部門との関係

晩発障害の研究グループにとってSPFマウス、CCV（clean conventional）マウスを繁殖、実験観察することは緊急の要求であった。技術部実験動物課は繁殖施設を従来のSPF照射実験棟に拡大して対応し、他方、昭和49年から53年にわたって晩発障害実験棟を建設した（実験施設の建設参照）。これに先立つ48年（初年度）には、建設敷地を将来構想の上に設定し、水生動物飼育池を移設、更新した。折からの第1次石油危機は実験棟の予定規模の40%縮小を余儀なくさせ、かつ引きつづく遺伝および内部被曝実験施設の実現を著るしく遅延させた。佐渡、黒沢（当時技術課長）、寺島、松本（動植課）らは同棟全般およびSPF、CCV使用施設の基本的デザインを行なった。

遺伝障害の研究のための霊長類照射実験棟の建設は特研班長より研究総合会議への要請（昭和50年5月）に伴って検討され始めた。しかし所内研究員からの主として環境安全性に関する疑義と不安が表明され、とくに用地選定は困難を極めた。

昭和51年、中井らは所内の懇談会、実験動植物委員会等において研究計画、安全対策等を説明した。他方、研究の進捗により迅速な対応を迫られたため、昭和52年に至り、従来の第2ガンマ線照射棟の改造に踏み切った。これにより中井、福田(俊)らのデザインを基礎とする技術部の設計の下にカンクイザル50頭を収容しうる施設が霊長類飼育管理体制への所内の批判に抗して敢行され、翌53年に完成した。前述の経緯もあって、棟は動物の安全管理に慎重な考慮を払い、照射をはじめとし手術、解剖に至るまでのほとんどすべての実験手技を隔離された棟内で可能にするのもであった(実験施設の建設、参照)。霊長類照射実験棟の稼働に伴ない、昭和54年実験動物取扱安全衛生管理規程が制定され、ただちに実験動物安全会議が設置され、作業者の健康安全、周辺環境安全と動物の健康管理が系統化されるに至った。

晩発障害実験棟、霊長類照射実験棟での研究の遂行に関連して、技術部動植物管理課に検疫研究室(昭和47年度)と実験動物開発室(昭和51年度)が新設された。

内部被曝障害の研究にとってPu 取扱い可能な実験施設の建設は必須であった。研究の初期(昭和48、49年)、このグループは中型動物(ビーグ犬、サル)の飼育、繁殖、その自動化および系統作出等の技術開発のために第2研究棟屋上に飼育繁殖室を設置した。昭和51年、内部被曝実験準備室の発足とともに実験施設の設計に関する研究に着手し、排水処理、空調・換気、放射性動物死体処理の3点を中心として第1次概念設計を行なった。ついで翌52年には第2次概念設計が完成した。この実験棟はPuを扱うため核燃料規制法の制限のうちで生物学的実験を行うため、とくにアルファ放射性的動物廃棄物を如何に処理し、管理区域内に保管するかが慎重に検討された。昭和53年、調整設計に入り、施設の概要が決定した。同54年には実施設計を行ない、また核燃料取扱い施設の安全審査を受けて認可された。

建設用地に関しては51年度来さまざまな角度から検討されて来たが、53年に入り最終的には生物学的研究の遂行上の有利性を確保するため本所内に決定した。54年度、内曝棟建設・運営委員会が発足、棟の目的、機能、などが検討された。他方所内研究員に対し、用地、施設の規模、研究内容が説明された。また隣接5町内会その他に対し数回の説明会を催した結果、千葉市の建設承認がえられた

次第であった。

54年度末、建設はスタートし、57年度末には廃棄物処理プラントを残してほぼ完了した。

トリチウムの研究グループは昭和55年以来、適切な研究施設の建設が望めないまま、既存のR1棟、細胞培養施設、温室などを利用して研究を進めた。生物効果に関する諸実験にはR1棟の高レベルエリア(HL1~4室)、54年に組み立てられたトリチウム汚染動物室などが用いられた。研究の進展についてトリチウムの使用量も増大し、低レベル・トリチウム廃液のための貯溜槽、トリチウム汚染生物の処理・処分の技術的開発が必要となってきた。

5. 特別研究の成果

昭和48年発足時に研究体制のほぼ整っていたのは晩発障害の研究グループのみで、その実質的な成果が挙げたのは特研期間の後半に限られた。前半(48~53年)の研究成果は研究経過中間報告書(NIRS-R-7)として昭和53年に記録されている。全期間を通じての成果の数は原著(別冊特別研究「低レベル放射線の人体に及ぼす危険度の推定に関する調査研究」原著集を参照)、研究発表を含めて200件を越えた。その間の主だった活動を下に列記する。

- 昭和47年度、放射線発がん研究とその周辺(寺島)、第15回日本放射線影響学会シンポジウム(金沢)。
- 48年度、放医研における晩発効果研究の動向について(寺島)、第16回日本放射線影響学会シンポジウム(名古屋)。
- 49年度、低レベル放射線の人体に対する影響に関する研究の現状と今後の進め方(中井)、原安協パネル討論会(東京)。
- 51年度、遺伝的影響の推定(中井)、原子力安全研究総合発表会(東京)。
- 52年度、「発がん遺伝障害——放射線のリスク評価をめざして——」、第9回放医研シンポジウム(千葉)。
- 53年度、ヒト及びサルのリンパ球での放射線誘発染色体異常(中井)、IAEA国際協同研究会議(エジンバラ)。放射線の晩発障害(佐渡、春日、佐藤(文))、IAEAシンポジウム(ウィーン)。
- 56年度、長期動物実験における諸問題(佐藤

(文)、関、武藤)、第7回日本晩発障害研究グループシンポジウム(東京)。

プルトニウム障害評価の生物学的根拠(松岡)、日本医学放射線学会生物部会(福岡)。

発がん性からみた放射線のリスク評価(寺島)、第14回原子力安全研究総合発表会(東京)。

Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics(オーガナイザー、松平)、日米核融合協力プログラム(千葉)。

57年度、プルトニウム内部被曝研究の現状(松岡)、第21回原子力総合シンポ

ジウム(東京)。

実験動物からヒトへの外挿を考えるにあたって(松岡)、第30回日本実験動物学会談話会(東京)。

「発癌——放射線を中心として——」、第14回放医研シンポジウム(千葉)。

上述の活動や原著を通して、本特別研究は国内外のリスク研究に寄与し、放射線障害論の本質に関するわれわれの認識を深め、かつは基礎生物学との間に多くの接点を発見してきたことは少なからぬ成果であった。その内容は各グループ毎に概説される。

なお、本特別研究の遂行に伴って、放医研の研究体制の内部的充実、施設々備の大巾な拡充がなされたことを附言する。

6. 特別研究の分担者と研究課題【昭和56年度のものを記録】

班 長 寺島東洋三(科学研究官)

I 放射線による晩発障害の危険度の推定に関する調査研究

グループ総括者 関 正 利(生理病理研究部長)

分 担 者		研 究 課 題
サブグループ	1. 大津裕司、小林 森、野田攸子、安川美恵子(生理病理研究部)、寺島東洋三(科学研究官)	放射線発癌の機構の研究。*
"	2. 山極順二、椎名悦子、成家千鶴子(技術部)	近交系マウスの加合性変化に関する病理学的研究。
"	3. 佐藤文昭、佐々木俊作、川島直行、福津久美子(障害基礎研究部)、関正利、大津裕司、小林森、野田攸子(生理病理研究部)、白貝彰宏(物理研究部)	各種照射様式による放射線発癌に関する研究。
"	4. 渡部郁雄、崎山比早子、大津裕司、古瀬健、安川美恵子(生理病研究部)、寺島東洋三(科学研究官)	放射線による細胞のトランスフォーメーションの研究。
"	5. 佐渡敏彦、武藤正弘、神作仁子、久保ゑい子(生理病理研究部)	放射線発癌要因の免疫学的並びに遺伝学的解析の研究。
"	6. 平嶋邦猛、別所正美、陣内逸郎、川瀬淑子、大谷正子(障害臨床研究部)	血液幹細胞動態よりみた放射線誘発白血病発症機序の研究。
"	7. 関 正利、吉田和子、西村まゆみ、野島久美恵(生理病理研究部)	細網内皮系、体液性因子等の造血統御機構が放射線白血病の発症機序に演ずる役割の研究。
"	8. 石原隆昭、早田勇、南久松真子、平野やよい(障害基礎研究部)	放射線による白血病発現機構の細胞遺伝学に関する研究。

II 放射線による遺伝障害の危険度の推定に関する調査研究

グループ総括者 中井 斌(遺伝研究部長)

サブグループ 1. 佐藤弘毅、稲葉浩子、堀 雅明、塩見忠博、培養細胞における放射線突然変異の線量効

- | | | |
|---|---|------------------------------------|
| | 塩見尚子（遺伝研究部） | 果関係に関する研究。 |
| “ | 2. 戸張厳夫，高橋永一，中井斌，字津木豊子，
松田洋一，（遺伝研究部）北爪雅之，岡本
正則（技術部） | 霊長類による放射線の長期微量照射の遺伝
学的効果に関する研究。 |
| “ | 3. 中井斌，辻秀雄，高橋永一，戸張厳夫，佐
藤弘毅（遺伝研究部） | 低線量放射線による染色体異常の線量効果
に関する研究。 |
| “ | 4. 北爪雅之，岡本正則（技術部），中井斌，松
田洋一（遺伝研究部） | 霊長類の実験システムの開発に関する研究。 |

Ⅲ 内部被曝の障害評価に関する研究

グループ総括者 松岡 理（内部被曝研究部長）

- | | | |
|--------|---|-----------------------------------|
| サブグループ | 1. 松岡理，小泉彰，小木曾洋一，福田俊，石
樽信人，高橋千太郎，山田裕司，宮本勝宏
（内部被曝研究部），森貞次（技術部） | 内部被曝実験施設の設計，運転に関する研
究。 |
| “ | 2. 松岡理，高橋千太郎，久保田善久，飯田治
三（内部被曝研究部） | 放射性核種の代謝に関する比較動物学的研
究。 |
| “ | 3. 松岡理，小木曾洋一，福田俊，飯田治三
（内部被曝研究部） | 内部被曝の影響に関する比較実験動物学的
研究。 |
| “ | 4. 松岡理，山田裕司，久保田善久，飯田治三
（内部被曝研究部） | 放射性エアロゾルの動物吸入法に関する研
究。 |
| “ | 5. 松岡理，石樽信人，関口昌道（内部被曝研
究部） | アルファ放射体の体内被曝線量評価に関す
る比較実験学的研究。 |
| “ | 6. 松岡理，佐藤宏（内部被曝研究部） | 超ウラン元素の体内摂取事故対策に関する
基礎的研究。 |

Ⅳ トリチウムの生物影響に関する調査研究 **

グループ総括者 松平寛通（生物研究部長）

- | | | |
|--------|---|--------------------------------------|
| サブグループ | 1. 新井清彦，樫田義彦，武田洋（環境衛生研
究部），渡部輝久（環境放射生態学研究部） | トリチウムの生体への取込みと生体内での
動態に関する研究。 |
| “ | 2. 川島勝弘，星野一雄，平岡武，山口寛（物
理研究部），河村正一，渡利一夫（化学研
究部），松平寛通，上野昭子，古野育子（生物
研究部），坪井篤，田中薫（障害基礎研
究部） | 動物細胞を用いるトリチウムの生物効果の
解析に関する研究。 |
| | 3. 江藤久美，田口泰子，山田武，湯川修身，
中沢透，浅見行一，山口武雄，松平寛通
（生物研究部）鹿島正俊（障害基礎研究部），
上島正久（養成訓練部） | トリチウムの身体的効果に関する研究。 |
| | 4. 平島邦猛，杉山始（障害臨床研究部） | トリチウムによる人の放射線障害とその診断，
予防に関する調査研究。 |

* 昭和48～52年の間，春日孟（現東京医科歯科大学 病理学教室）によって担当された。

** 昭和55，56年の2年間，本特研に包括された。

I 放射線による晩発障害の危険度の推定

に関する調査研究 概説

関 正 利

(生理病理研究部)

本研究グループは、遺伝、内曝と共に、特別研究「低レベル放射線の人体に対する危険度の推定に関する調査研究」の一部門として昭和48年に発足し、以後10年に亘って研究活動を行ない、昭和57年度を以て一応の終了をむかえた。このグループの究極的な目標は、低線量および低線量率域におけるヒトの発癌のリスク評価に資するような実験的成果を得ることであった。

そもそも低線量領域におけるリスク評価には二つのアプローチがある。一つは放射線被曝者についての疫学的研究であり、他の一つは動物実験であるが共に一長一短がある。前者はサンプルの不均一性、殊に被曝線量の不確かさが避けられないし、後者については常にヒトと動物との種差が問題になる。更に25ラド以下で腫瘍発生率の有意差を求める為には膨大な数の動物が必要となる。これは非現実的であると云う観点から、発がん実験は50ラド以上数百ラドを中心に行ない、併せて放射線による発がんのメカニズム及びその発症を支配する諸要因を解明することを当面の目標とした。

昭和48年度に編成された研究グループは、寺島東洋三生理病理研究部長（現科学研究官）をリーダーとし、1) マウスの放射線誘発腫瘍の研究（春日）2) 放射線誘発白血病の研究（平嶋）3) 白血病と造血の“場”に関する研究（関）4) 免疫能への放射線の影響に関する研究（佐渡）5) 放射線による染色体異常に関する研究（石原）6) 放射線による細胞のトランスフォーメーションに関する研究（寺島）の6研究サブグループにより研究を開始した。昭和49年度からは、新たに近交系マウスの病理学及び飼料の影響に関する研究（山極）が加った。昭和51年寺島が科学研究官に昇任したのに伴って、関正利病理第2研究室長が生理病理部長に昇任し、併せて晩発障害研究のグループリーダーとなった。又同年より各種照射様式による放射線発がんに関する研究（佐藤）が新たに参画して計8サブグループとなった。

昭和53年6月、かねて建設が進められていた晩発障害実験棟が完成稼働した。本棟においてはC V及びS P Fマウス 19,000 匹が飼育出来、これにより初めて比較的規模の大きい実験が可能となった。又佐藤サブグループは第1 γ 線棟を改造することにより、懸案であった低線量率照射実験を開始した。これより先春日孟病理第1研究室長の東京医科歯科大学への転出があり、後任の天津裕司室長が同研究サブグループを引き継いだ。

10年間の研究成果の要約は以下の通りである。天津（春日）サブグループは4系統のマウス照射による腫瘍発生を病理学的に検討し、その種類と発現様式が、原爆被曝者のそれに類似することを明らかにした。 γ 線による連続照射実験を行った佐藤は、線量率が下がる程がんに対する影響は顕著に低下することを証明し、同サブグループの佐々木は、照射時の年令について検討した結果、腫瘍のタイプにより新生期が効果大なもの、成体期が効果大なもの及び年令依存性に乏しいものの三種が存在する事を明らかにした。

白血病については、これが晩発障害として最も重要なものに属するという認識から、数サブグループが独自の観点から検討を行った。平嶋等は照射された個体では、僅か0.25 Gyでも、白血病ウイルスに対する感受性が有意に高進すること、3 Gy照射後18日目にして既に前白血病細胞の出現があること、しかし疾患としての白血病に進展する為には、造血系の再生過程が密接に関すること等注目すべき知見を得た。関等は白血病細胞の増殖には、いわゆる造血の“場”の細胞の機能が関与すること、又C3Hマウスが照射により骨髄性白血病を多発し、50ラド1回照射でも有意の増加を示すこと、300ラド照射直後のプレドニン投与が発現頻度を有意に増加せしめることを知った。これ等の白血病発症に対するいわゆる免疫監視機構の意義は、佐渡サブグループの研究によれば従来主張されて来た程大きいものではない。又同サ

ブグループによれば胸腺リンパ腫の発生にはウイルスの関与が考えられるという。被照射ラットの骨髓細胞の染色体を検索した石原は、照射によって生じた異数性クローンは高い増殖性を示し、その増殖動態は白血病のそれに類似すること、両者の差異は自律性の有無に尽きる事等を明らかにし、同サブグループの早田はマウス骨髓性白血病の90%以上にNo.2染色体の部分欠失のあることを見出した。

*in vitro*におけるトランスフォーメーションを研究した寺島サブグループは、いわゆるフオカスの形成が二つのクローンの接点に生ずる場合があること、照射後トランスフォーメーション損傷の80%は細胞内の機構により除去されること、血清中の因子がトランスフォーメーションの発生に極めて重要な影響力を持つこと等を明らかにした。最後に動物実験の基礎的データの収集に取り組んだ山極は、無菌動物作出技術の開発に成功した他、系統特異性疾患、エサの種類による腫瘍発生パターンの差異等について多くの知見を得た。特に最後のものは、他の発がんサブグループの研究に、その成果を活用することが出来た。

以上の研究成果のあるものは、低レベル放射線の発癌のリスク評価に直結するものではない。しかしこれ等を踏まえて、次に述べる様な放射線発がんについての一つの概念が固まりつつあることは、大きな成果と云えよう。

発がんの二段階仮説によれば、幹細胞の遺伝子に起る不可逆的な変化（初発）は、その後何等かの促進を受けることにより初めて疾患としてのがんが発達するという。放射線発がんの場合も、DNAに起った損傷が疾患としてのがんに直結するものではなく、その間に種々の生体内で起る出来事が介在し、これが促進効果として働いた時、初めて発がんに至ると考えられる。この事は *in vitro* 発がんにおける血清因子の存在、系統差による発がんの様相の差異、骨髓性白血病発症に対するホルモンの影響、同じく被照射個体における白血病ウイルス感受性の高進や、造血系再生の有する意義等によって、明確に示された。

この様な生体反応乃至統御機構と促進作用の関係については、今後も更に検討を加える必要がある。しかし低線量域におけるリスク評価を、中線量域からの外挿によらず、直接導き出す為には、異った発想によるアプローチが必要である。動物を用いた発がん実験にせよ、培養細胞によるトラ

ンスフォーメーションの研究にせよ、その検出精度は極めて低く、特に低線量域においては、バックグラウンドに対する有意性を求めることは、不可能に近い。もし一箇の細胞が放射線によって腫瘍化したか否かを確実に決定する方策が見出されれば、検出精度は飛躍的に向上し、低線量におけるリスク評価も直接的なデーターとして求め得るであろう。現状ではこの様な1箇の細胞の放射線に特異な腫瘍化の確定は極めて困難と云はざるを得ない。しかしマウスの骨髓性白血病に特定の染色体異常が発見された事は、この問題に希望の灯をともすものであった。今後、発がん遺伝子に対する、あるいはその表現としての細胞表面構造の異常、特に増殖統御機構に対するリセプターの異常等について、分子生物学的乃至細胞化学的な研究を進展させれば、がんの本質に直結する何等かの指標（がんの生物学的指標）を知ること、あながち不可能ではないと考えられる。

最後に、吾国においては研究組織もいわゆる縦割り型になる事が多いが、10年間の特別研究を通じて、各グループ間に協同乃至協調の気運が生じた事は、大きな精神的副産物であった。早田による染色体の研究が、平嶋、佐渡、山極、関等の各研究グループから材料の提供を受けて初めて成立した事はその最大のものであるが、その他にも佐渡の老令マウスを平嶋サブグループで幹細胞解析に利用したこと、佐藤のマウスの死因解析を大津サブグループが分担した事、山極の飼料についてのデーターを関サブグループが利用した事等、枚挙に暇が無い。この様な協力関係を今后益々発展せしめることが、放医研における晩発障害の研究を進める上で、最も大切なことの一つであろうと思はれる。（関正利）

1. 放射線による腫瘍発生について

— CV と SPF マウスと線量関係 —

大津裕司, 小林 森, 古瀬 健, 野田攸子 (生理病理研究部)
春日 孟 (現: 東京医科歯科大学医学部)

Various Types of Tumors Induced by Irradiation and Their Relationship to Dosage, and Conventional and Specific Pathogen-free Mice

H. Otsu, S. Kobayashi, T. Furuse, Y. Noda and T. Kasuga*.
Division of Physiology and Pathology, *Department of Pathology,
Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University.

Induction of neoplasms, as well as life-shortening, is the most important of the late effects of whole-body irradiation, and the incidence of tumor is a known variable with increasing radiation doses.

The oncogenic effectiveness of X-rays and gamma-rays was investigated in 4 different strains of mice which were specific pathogen-free, male C57BL/6J and C3H/He mice, and also male C56BL/6N and DBA/2 mice reared under conventional conditions. A single whole-body irradiation of graded doses from 100 to 800R were given to mice at 12 weeks of age at dose rate of 100 rad/min.

Six types of tumors, such as, thymic lymphoma, myeloid leukemia, reticulum cell sarcoma, non-thymic lymphoma, liver tumor and lung tumor, were observed in more than 10% of the mice (maximum incidence) in each strain. Furthermore, a wide variety of neoplasms of organs other than above tumors was encountered sporadically in mice which died more than 20 months after radiation. However, not enough cases were examined in order to determine a statistical difference in such tumors. The inci-

dence of each type of tumors showed remarkable variations according to the different strains of mice and simultaneously the spectrum of tumors varied depending on different strains of mice.

Thymic lymphoma and myeloid leukemia developed at earlier age than other tumors and were lethal, whereas most other tumors occurred late in life and were rather incidental to the cause of death. There were peak incidences of thymic lymphoma (33.3%) in C57BL/6J mice exposed to 700R and of myeloid leukemia (8% and 15%) in DBA/2 and C3H/He mice exposed to 200R. With thymic lymphoma, the period from the time of onset to death was prone to be shortened, and the appearance of the tumor trended to be earlier with increasing doses ranging from 600R to 800R. A similar tendency was found in mice dying of myeloid leukemia after exposure to doses from 100 to 300R.

Four inbred strains had little spontaneous incidence of thymic lymphoma and myeloid leukemia, but all strains had a relatively high spontaneous incidence of reticulum cell sarcoma, liver tumor and lung tumor. Reticulum cell sarcoma considerably varied as to spontaneous

incidence among different strains, and only in C57BL/6J mice did the tumor occur most frequently. In irradiated mice, reticulum cell sarcoma showed the tendency of gradual decrease in incidence (from 44% to 3%) with increasing doses (from 100 to 800R).

Mice in all strains spontaneously developed liver tumors, mostly benign, on the order of, at least, several per cent. Especially in C3H/He strain of mice, the tumors appeared spontaneously in 84.6%, of which 4.3% showed malignant character. Irradiation enhanced the incidence of malignant liver tumor depending of the dose, (15.8% and 15.4% for 100R and 300R respectively). The tumors consisted of either hepatocellular or hepato-cholangiocellular carcinoma and metastasized to the lung.

In mice used in the present life-span study, lung tumors were observed at frequencies of 2.2% to 16.7% depending on strains, but the incidence was not increased significantly by exposure to increasing doses of radiation. The results seemed to disagree with those reported by other authors (Lorenz and Ullrich). However, this disagreement was assumed to be due to difference between life-span study and serial sacrifice study.

In additional studies on the serial sacrifice experiment, male C57BL/6J mice exposed to a single whole-body gamma-ray irradiation at graded doses were examined at specified times, starting from 9 to 25 months after radiation. Non-irradiated control group was followed until 30 months. Lung tumors were not induced within the first 9 months in any of the irradiated groups. Between 12 and 15 months after radiation lung tumors appeared in 1.0% to 5.0% of mice in all groups, including control. The incidence with 3 and 5 Gy reached a peak (13.6% and 19.4%, respectively) 20 months after irradiation, but the incidence in the other groups including control slowly increased to the level of 3% to 6% during this period. In 25 months, the incidence of the 3 Gy group levelled off at 13.5%, but the incidence of the 5 Gy group declined to 6.4%. Mice in the other dose groups

showed the incidence of low percentage (1.9% to 3.5%), whereas the incidence of the control group increased to 10.9% in 25 months and levelled off at 9.3 in 30 months. The results indicated that the peak incidence of tumors in irradiated mice was seen at 20 months, 5 months earlier than in control and the incidence was augmented by 25% to 6% of unirradiated control value.

Lung tumor incidence at 20 months demonstrated the relationship proportional to doses over the range of 0 to 5 Gy. This was consistent with the results of other authors. The incidence of lung tumor within 20 and 25 months was summed up as 13.5% in the 3 Gy group. This value agreed with the total final incidence of lung tumors (14.0%) in the 3 Gy group of life-span study with SPF C57BL/6J mice, of which more than 80% survived longer than 25 months. The same relationships between incidences obtained from life-span study and sacrifice study were verified in the 5 Gy exposure group and control group. These findings strongly suggested that lung tumors were developed during the 20 month period, thereafter, these tumors only grew larger but no new ones were likely to develop.

To summarize present data, it was found that a variety of tumors developed after radiation, either early or late in life depending on the tumor types, either high or low in incidence of a given type of tumor depending on strains of mice. Some tumors, i.e., tumors of liver and lung, spontaneously developed in mice with a given strain dependence. In this connection, it is worth considering whether radiation directly induces tumors or only promotes development of tumors initiated spontaneously earlier in life. Results of lung tumor experiments suggested the latter possibility, although tumors of very low spontaneous incidence may not be explained in the same way.

The timing of tumor emergence and their incidence in mice in relation to dose showed a similarity to those in patients with some malignancies after exposure to atomic bomb explosions; with regard to lung tumor, the latency in a

few strains of mice did not seem to be related with radiation dose, whereas its dose-dependence was evident with myeloid leukemia.

On the basis of these results it is thought to be possible to promote a more precise estimate of risk to humans regarding their exposure to low level radiation, and further animal experiments

with suitable strains of mice are called for in order to make such estimates as reliable as possible.

[The former half of these studies were performed chiefly by T. Kasuga and summarized by H. Otsu.]

〔緒 言〕

放射線による動物の寿命短縮とそれに関連した腫瘍の発生は晩発障害のうちでも特に重要な問題として注目されている。そして、現に、原爆被曝者集団などの放射線被曝者集団にあっては、白血病をはじめ過剰の腫瘍の発生が報告されてきた。従って人体に対する低レベル放射線の危険度を推定するにあたって、腫瘍の発生が重視されるのは当然である。被曝によるヒトの腫瘍発生の危険度を推定する場合、ヒトの放射線被曝者集団から得られた情報をこの推定に全面的に適応出来れば最も好都合と考えられるのだが、しかし、ヒトの集

団は実験集団でなく、その構成の均質性がやや劣り、また、必要とする情報がそこから総て入手出来るものではない。そこで不足の情報は動物実験により補なわなければならない。この考えに基づいて、腫瘍発生率に対して依存性の高いとされる線量と動物の系統との相関性につき種々の検討をする。

〔実験結果と考察〕

飼育環境（SPFとCVの比較）と腫瘍発生率
実験の概要は表1に示したようにX線を通常環

表1. 実験方法および発生した主な腫瘍とその発生率

実験方法	I	II	III	IV
動物数	380	560	385	278
動物系統	C ₅₇ BL/6N	DBA/2	C ₅₇ BL/6J	C ₃ H/He
飼育条件	CV	CV	SPF	SPF
動物性差	♂	♂	♂	♂
照射時週令	12	12	12	12
線質	200 K VX線	200 K VX線	¹³⁷ Cs γ線	¹³⁷ Cs γ線
線量	100～400	100～400	100～400	500～800
照射回数	1	1	1	1
線量率(R/分)	95～98	95～98	99～101	99～101
照射部位	全身	全身	全身	全身
実験動物数/対照動物数	335/45	487/73	162/80	143/80
発生した腫瘍の種類	腫瘍発生率 実験群(%) / 対照群(%)			
胸腺リンパ腫	2.4/0	1.8/0	1.3/0	13.3/0
非胸腺リンパ腫	2.1/2.2	2.7/0	8.0/0	10.5/0
細網肉腫	0.3/0	0/0	34.6/51.3	16.1/51.3
骨髄性白血病	0.6/2.2	3.5/0	3.7/0	2.8/0
肝腫瘍	6.3/0	3.9/9.6	14.2/8.8	5.6/8.8
肺腫瘍	5.4/2.2	4.7/4.1	14.2/11.3	7.7/11.3
腎腫瘍	1.2/0	0/0	1.2/0	0.7/0
皮膚腫瘍	0.3/0	0.2/0	1.2/0	0.7/0
骨腫瘍	0.9/0	0.4/0	0/2.5	2.1/2.5
対照群の50%生存期間(月)	21	18	29	29

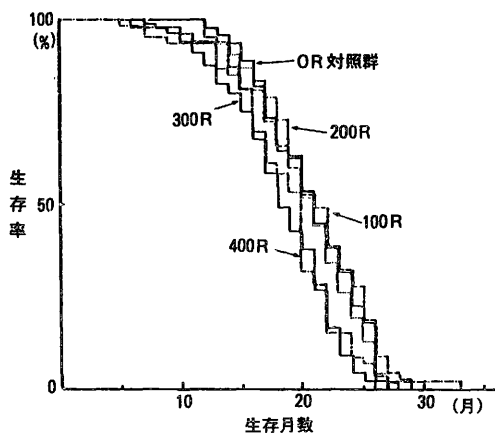


図1 実験I 生存率曲線

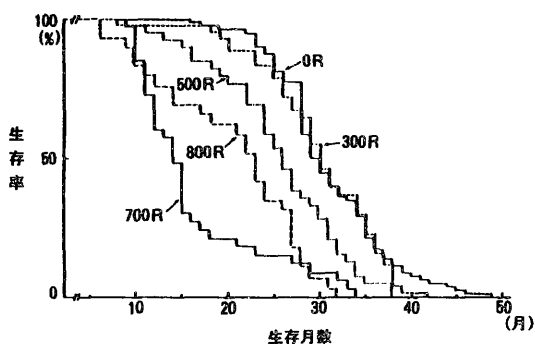


図2 実験III 生存率曲線

境 (conventional: C V) 下で飼育したマウスに照射した2群と, r 線を特殊病原細菌を取り除いた (Specific pathogen free: SPF) 環境下で飼育したマウスに照射した2群とで実験結果を検討をする。C V飼育とSPF飼育とでは寿命に7~8月の長短の差が生じており (表1, 図1, 2), PF

飼育により照射後, さらに長期間にわたって腫瘍発生を観察することができるので遅発性の腫瘍の検索に適している。放射線に被曝した実験群は諸臓器に腫瘍が発生しているが, その発生率が少数点以上である腫瘍は表1の腫瘍の種類にある胸腺リンパ腫, 非胸腺リンパ腫, 細網肉腫, 骨髄性白血病, 肝腫瘍, 肺腫瘍, 腎腫瘍, 骨腫瘍と皮膚腫

表2

肺腫瘍発生率
— 経時的検索 (C₅₇ BL/65 - SPF) —

被曝線量	9			12			15			20			25			計		
	担腫瘍匹数	検索匹数	比率 (%)	担腫瘍匹数	検索匹数	比率 (%)	担腫瘍匹数	検索匹数	比率 (%)	担腫瘍匹数	検索匹数	比率 (%)	担腫瘍匹数	検索匹数	比率 (%)	担腫瘍匹数	検索匹数	比率 (%)
O R	0	38	0	1	55	1.8	1	49	2.0	2	58	3.4	6	55	10.9	10	254	3.9
50 R	0	43	0	0	56	0	2	60	3.3	3	53	5.7	1	53	1.9	6	265	2.3
100 R	0	40	0	1	57	1.8	2	62	3.2	2	55	3.6	3	66	4.5	8	280	2.9
300 R	0	49	0	1	56	1.8	1	59	1.7	8	59	13.6	7	52	13.5	17	275	6.2
500 R							1	20	5.0	6	31	19.4	3	47	6.4	10	98	10.2

表3

肺腫瘍発生率
— マウス系統差について —

実験群 肺腫瘍発生動物数 系 統	300 R		O R	
	動物数	比率	動物数	比率
A / He	15/23	65.2	28/63	44.4
C ₃ H / He	4/60	6.1	1/98	1.0
C ₅₇ BL/6 J	1/61	1.6	1/57	1.7

瘍であった。それらの腫瘍のうち最初の六つの腫瘍の頻度が高かったのでこれらの腫瘍を中心として検討する。一般に全身照射を受けた動物では全身諸臓器に腫瘍が発生することが知られており, 臨床的にも, 白血病の発生に遅れて, 肺, 胃, 子宮や卵巣など諸臓器に腫瘍の発生がみられることが, 原爆被曝者集団で認められている。

白血病は被曝後, 比較的早期 (図6 b, 7) か

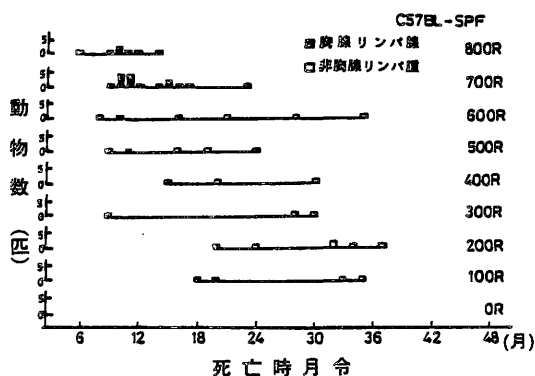


図6-b 死亡時月令分布 — 担リンパ腫動物 —

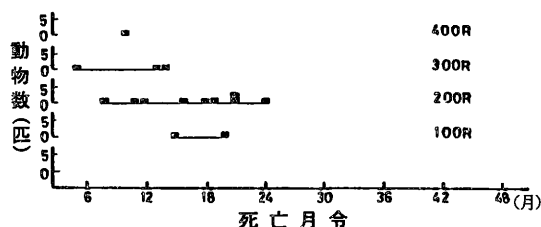


図7 死亡時月令分布 — 担骨髄性白血病 —

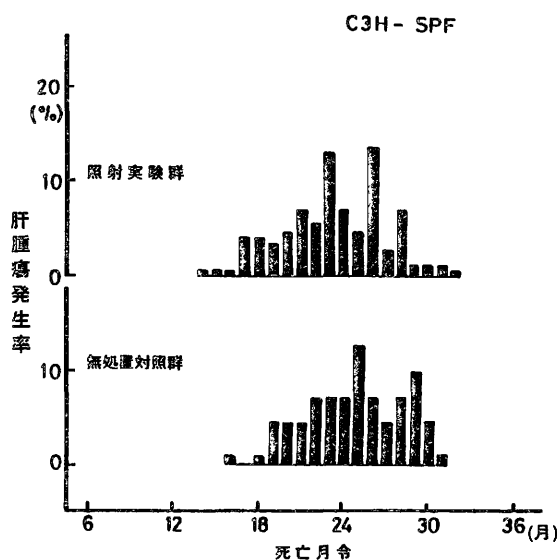


図9 死亡時月令分布 — 担肝腫瘍 —

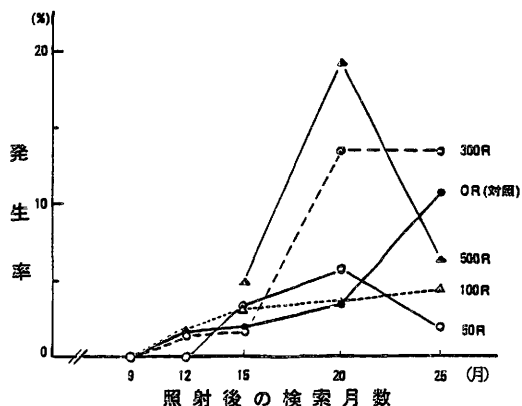


図11 肺腫瘍発生率 — 経時的検索 —

ら発生するが、肝や肺などの他の組織より発生する腫瘍は白血病より遅く発生する傾向があるので(図9, 11), 照射された後生存日数の長いSPF実験群では全体としての腫瘍発生率が高くなっている(表1)。腫瘍発生率を追跡する場合に、被曝後の感染症の要因を取り除くことが、放射線により惹起される腫瘍発生率を正確に把握することにつながる事が確かめられた。

線量、腫瘍の種類とその発生率

胸腺リンパ腫と骨髄性白血病は照射後、比較的早期に各群に発生している(表1, 図3, 4, 6b 7)。

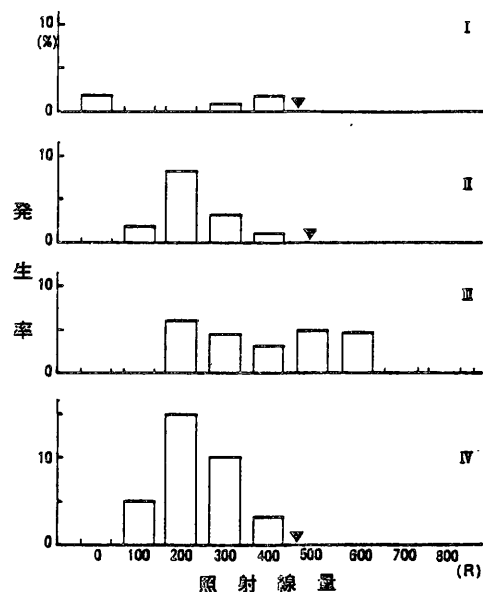


図3 骨髄性白血病発生率

胸腺リンパ腫は600 R以下の低線量域では数%で高い発生率はみられないが、700 Rで実験動物の33% (11匹/33匹) に特異的に高率に発生し、その前後の600 Rや800 Rの照射を受けた群よりも高い値を示しており、700 Rが胸腺リンパ腫の至適線量に相当すると考えられる。同じ系統を使用した Kaplan (1952) の広範な実験でも1回の照射ではほぼこの結果と同様な結果が示されているが、951 Rを8日間隔で4回に分割照射をすると98%の高率に胸腺リンパ腫を発生させることが出来るとして、1回照射と分割照射との照射方法の相違が腫瘍発生率に及ぼす影響を示している。

骨髄性白血病においても、その発生は100~600 Rの間で数%みられるが、実験ⅡとⅣ群において200 Rで照射された群に高率の発生が認められており、この腫瘍発生における最適の線量と考えられる。

両腫瘍ともに自然発生率は低いか、あるいは殆ど発生しない、一方、照射を受けた動物群には数

%であるが発生がみられ、ある線量に特異的に高率に発生するので、発生率と線量との間には依存性が認められる。しかし、原爆被曝者集団ではリンパ腫は骨髄性白血病と比較して少なく、骨髄性白血病は被曝線量の高い群に多く発症している。この報告と動物実験の結果とは白血病の性質と骨髄性白血病発生率と線量との相関性について相異がみられた。

細網肉腫は実験Ⅲ群に好発しており、その大部分は20ヶ月令以降に死亡したマウスにみられ(図6-a)、しかも自然発生率がほぼ50%で、照射線

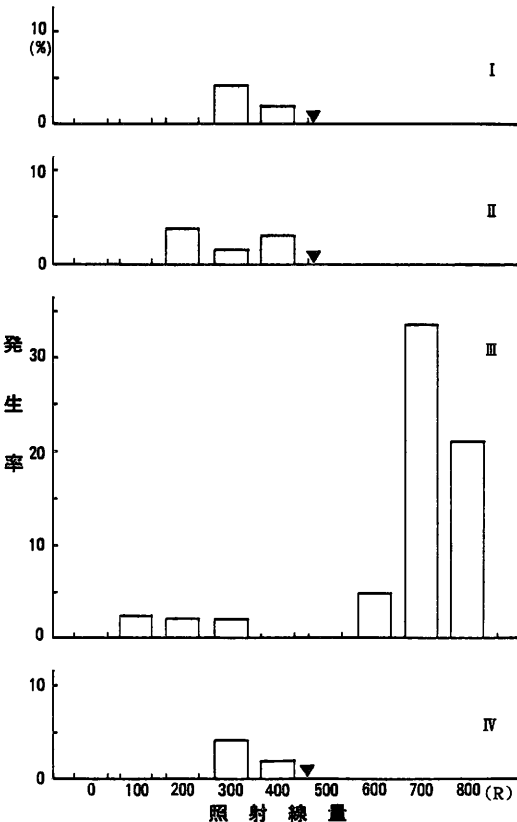


図4 胸腺リンパ腫発生率

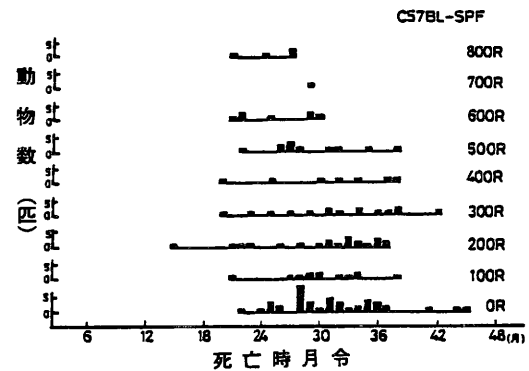


図6-a 死亡時月令分布—担細網肉腫動物—

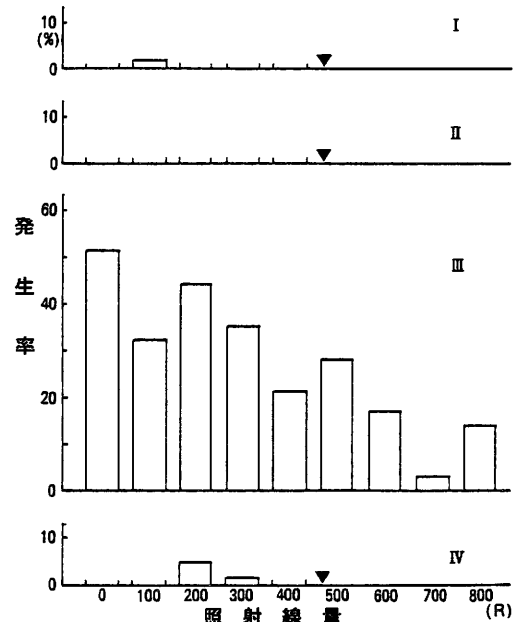


図5 細網肉腫発生率

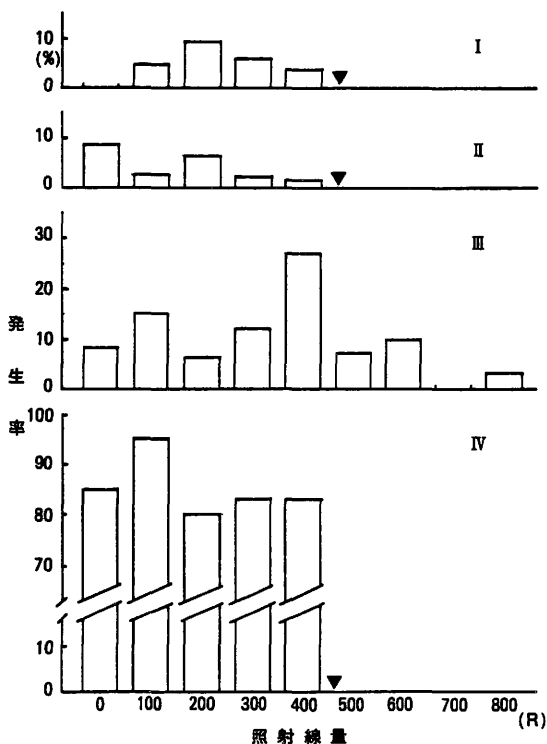


図8 肝腫瘍 — 発生率 —

量が多くなるにつれて、担細胞肉腫動物率が減少してゆく傾向がみられた (図5)。この線量と担腫瘍動物率の関連は他の多くの実験においても示されている。臨床的には被曝による増加については殆ど報告されていない。

次に上皮性の腫瘍のうち比較的高頻度に発生するのは肝腫瘍と肺腫瘍である (表1, 図8, 10)。肝腫瘍はほとんどの実験群に発生するが、死亡したマウスに肝腫瘍が自然発生率より有意に高率に認められたのは実験Ⅲ群の400 Rの照射を受けた動物群であった。この400 Rの線量がこの動物の肝腫瘍発生における最適の線量であると考えられる。さらに、実験Ⅳ群では自然肝腫瘍発生が高率であり、100 Rを受けた動物群のみが、死亡時に肝腫瘍を他の被曝群より多く持っていた。しかし、対照群との間に有意差は認められなかった。ただし、この肝腫瘍のうちには肺に転移をする悪性の性格を有する即ち癌腫であるが、肝癌が照射を受けたマウスの11.3%に発生し、対照群の発生率4.3%に対して有意差をみとめた。各々の実験群

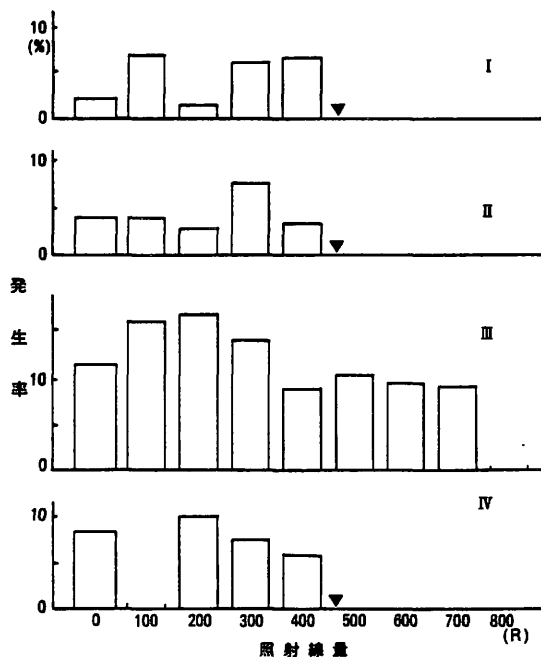


図10 肺腫瘍発生率

では、数%から10数%に肝癌が発生したが、そのうち100 Rと300 Rに被曝した群は10数%と肝癌の発生が多く、対照群より有意に高率であった。肝腫瘍においては、マウスの系統により、放射線によるその発生率が有意に高率になったり、その自然発生率からあまり変化しなかったり、肝癌が発生したりと、同一線量、線質に対して質的に、量的に異なる反応がみられた。他の研究結果も同様に肝腫瘍の発生率は系統や照射条件でかなりの相違があり、特に照射時の年齢に発生率が依存することが報告されており、幼若期に被曝すると肝腫瘍発生率が増加する。次に、肺腫瘍はほとんど全ての実験群に認められているが、自然発生率に対して有意に高率に発生した実験群はみられない。各実験群においてやや高率な発生を示す線量域が100 R～300 Rに僅かにみられる程度である (図10)。肺腫瘍は照射を受けた日令数には無関係で、肺組織の受けた線量に比例して増加するといわれているが、その様な結果は図10には表われていない。

照射から腫瘍が原因で死亡するまでの期間と腫瘍動物が照射を受けてから、そこに腫瘍が発生するまでの期間即ち腫瘍の潜伏期は動物が生存している間は可視的部位に発生しない限り正確には把

握することは困難である。しかし胸腺リンパ腫のような悪性度の高い腫瘍は発生すると周囲組織に浸潤増殖して動物を仆すので、剖検により腫瘍を確認し、少なくとも死亡時より以前に腫瘍は発生しており、潜伏期より短期日であると考えられるのであるが、正確に言うならば照射から腫瘍で死ぬ（腫瘍死）までの期間ということになる。特に終生飼育実験から潜伏期を推定することは困難であるので、潜伏期に代って、ここでは照射から腫瘍死までの期間につき線量との関係を主な腫瘍について検討する。

各実験群とも最も早期に出現する腫瘍死例は胸腺リンパ腫である。出現の時期は照射線量と相関があり、実験Ⅲ群（図6b）でみると800R照射群では5ヶ月令（照射後2ヶ月）から、700R照射群では9ヶ月令から出現し、その後8ヶ月のうちに殆どの症例が発生してしまい、以後、胸腺リンパ腫による死亡は認められなくなる。この線量が多くなるにしたがって、胸腺リンパ腫で死亡する時期が早まるという、線量と腫瘍死時期との相関性は他の実験でも同様の結果が得られている。

骨髄性白血病（図7）においても同様の傾向がみられている。他の実験でも同じように早期に死亡が出現し、発生頻度も早期に増加し、出現する期間の幅も狭少化する傾向があることが示されている。臨床的にも急性骨髄性白血病では高線量被曝者集団の方が早期に発症し、発症数が早い時期に集中する傾向があり、実験の結果との相関性がみられる。

一方、腫瘍発生が動物の死亡と密接な関連のない、細網肉腫（図6a）、肝腫瘍（図9）、肺腫瘍では上記の腫瘍のような死亡時期と線量との相関性は明瞭ではなかった。

線量と腫瘍発生時期（表2、図11）

放射線被曝から腫瘍発生までの時期は前記したように腫瘍発生が致命的である場合は、剖検により、或る程度まで推定が可能であるが、腫瘍発生が全身に及ぼす影響が少ない場合には、他病死の剖検で偶然に観察されるのであって、このような腫瘍の発生の動態の把握は困難である。しかし、放射線被曝動物での非白血病性腫瘍発生率は白血病と比較しても多いこと、また臨床的にも肺、甲状腺、卵巣や乳腺に発生する上皮性腫瘍は白血病発症後に発症がみられる主要な腫瘍であるので、実験的に放射線の条件と上皮性腫瘍の発生については十分その要因を分析する必要がある。そこで、

従来の終生飼育観察に代えて、腫瘍の発生と線量関係を検討するために経時的に動物を剖検観察をした。実験条件は実験Ⅲとほぼ同じであるが、マウスの照射時の日令を28日令にした。上皮性腫瘍としての実験的、臨床的に発生頻度の高い肺腫瘍を選んだ。

腫瘍発生と潜伏期（表2、図11）

肺腫瘍は照射後9ヶ月ではいずれの実験群においても観察されず、同12ヶ月になり実験群も無処置対照群とともに発生がみられたので、潜伏期は9～12ヶ月の間にあることが推測され、白血病で指摘したような照射により肺腫瘍発生が早まることは、この実験には認められない。他の実験結果では早期（100日以前）に死亡した動物にも肺腫瘍が観察されているのでマウスの系統による差は当然考えられる。特に肺腫瘍好発系とされているA系マウスでは3週令で発生が観察され、潜伏期はこのような系統では短いことが考えられる。

腫瘍発生率と被曝後の期間（表2、図11）

被曝後15ヶ月目でも肺腫瘍発生率は線量によって差がみられない。20ヶ月では300Rと500R被曝群に発生率の増加があり、対照群とは有意に差が認められた。50Rと100R被曝群は対照群とは発生率が殆ど同じである。さらに被曝後25ヶ月目になると、実験群に発生率の増減はあるが対照群との有意差はみられなくなる。この時期では、500Rの高い線量の群では発生率の減少がみられ、300Rの線量群では20ヶ月と同率で、対照群の発生率のみが増加し、50Rと100R被曝群では発生率の増加は殆どみられないで、各々の実験群間に有意差が認められなかった。肺腫瘍発生は300Rと500Rの照射を受けると、被曝後15ヶ月から20ヶ月の間に発生率が増加し、その後、増加がみられないことから、肺腫瘍は9～20ヶ月の間に腫瘍としての組織の形成が完成してしまい、20ヶ月以降には新たな腫瘍の形成は起らないで、発育のみが起ると考えられる。一方 無処置対照群では照射群より5ヶ月遅く腫瘍形成が完成し、25ヶ月群で10.9%、30ヶ月で9.3%（4/43例）とほぼ等しい発生率を示し、照射群と同様な現象を示し300Rの群と平行関係を現わしている。この結果、肺腫瘍発生には一定の時期に腫瘍形成期が存在し、この時期は照射により自然発生腫瘍形成期より早まるが、50・100Rなどの低い線量では早まることはないと考えられる。同様な現象については Lorenz（1950）により実験的に報告されている。臨床的に

は原爆被曝者の被曝による過剰肺癌死亡年令はほぼ60才で、被曝時の年令にあまり依存していない資料が提示されており、強直性脊椎炎のX線治療患者における肺癌死亡年令についても被曝時年令に及ぼす影響は僅かであるといわれ、肺癌死亡の始まる年令がほぼ一定していることからヒトでも動物実験に認められた肺癌形成時期の存在が示唆される。

終生飼育検索結果と経時的検索結果

終生飼育検索と経時的検索との結果について比較をする。終生飼育ではSPF環境下では特に12ヶ月以前に死亡する実験マウス数が少なく、早期に惹き起こされる病変を検索することが困難である。またそれ以降にあって動物の死亡が偶発的であるので、時間を区切って、病変の発生率の比較をする時に、動物数が不揃いである欠点が出てくる。肺腫瘍発生率の経時的検索において、死亡率の低い、照射後20ヶ月間の腫瘍発生状態は把握が困難である。OR～300Rの群のマウスの80%は25ヶ月以降になって死亡するか(図2)、実際、肺腫瘍が高率に発生しているのは、死亡前、数ヶ月から10ヶ月の間であり(図11)、この間の現象を後れて、集積して観察しているのが、終生飼育検索ということになる。例えば対照群に自然発生する肺腫瘍は照射後20ヶ月から発生率が増加し2530ヶ月ではほぼ同率(10.9と9.4%)となる。この群は上記のように大部分が、腫瘍発生率の高い期間を経て死亡しているの、この期間の発生率を反映して、近似した発生率(11.3%)を示している。300R照射群においても同様な現象が認められている。

肺腫瘍は系統により自然発生率、および放射線照射により惹起される肺腫瘍発生率もかなり異なることは多くの研究報告にみられる。この実験で用いられてきたC₅₇BL/6JとC₃H/Heは肺腫瘍好発系ではない。同一条件での肺腫瘍発生を系統別に比較をすると、自然肺腫瘍発生率300R照射後12ヶ月での肺腫瘍発生の検索結果(表3)の上に相違が明瞭に現われている。

臨床的には被曝者に発生した肺癌は組織学的に未分化小細胞癌に有意差が認められたと報告されているが、実験的には肝腫瘍に認められたような組織学的相違は殆ど認められなかった。

肺腫瘍の発生率は線量に比例して増加すると言われており、その実験での肺腫瘍発生率の比較検討はこの実験(図11)の照射後15～20ヶ月に相当

する時期で行われることが多く、このグラフの結果ともほぼ一致していることが認められた。

〔総括〕

1. 4系統のマウスに100～800Rまで100R刻みの線量(線量率95～100R/分)の全身照射により、マウスの全身諸臓器に多くの種類の発生がみられた。そのうち、各群にほぼ共通して多い腫瘍は胸腺リンパ腫、非胸腺リンパ腫、細網肉腫、骨髄性白血病、肝腫瘍であった。各々の発生率は系統差が著明であった。

2. 剖検で、最も早期にみられる腫瘍は胸腺リンパ腫で、次いで骨髄性白血病、そして、その他の腫瘍は12ヶ月以上を経てから認められた。胸腺リンパ腫と骨髄性白血病はマウスに致命的であるが、他の腫瘍が致命的である可能性は少ないことを確かめた。

3. 胸腺リンパ腫は700Rに、骨髄性白血病は200Rに、肝腫瘍は400Rにと、腫瘍発生の最適線量が組織により相違し、低線量から高線量に分布することを認めた。

4. 胸腺リンパ腫と骨髄性白血病では線量が高いほど、早期に剖検で観察される動物数が増え、また観察期間が短かく限局される傾向がある。

5. 肝腫瘍は照射により悪性化が起り、肺転移発生症例が有意に増加する。

6. 肺腫瘍は照射により増加の傾向は認めるが、全剖検数に占める割合は有意には増えない。しかし、線量が多くなるにしたがって、発生率が対照と比較して有意差を生ずる程高まる時期があり、自然発生率の上昇の時期より数ヶ月早期に認められる。これ等の時期はマウスの系統により著しい相違がみられる。

7. 特異な病原体から隔絶した環境下(SPF)では長期間の飼育実験が可能になり、多段階の線量に惹起される遅発性腫瘍の検索と、高レベルの照射の実験とが可能になった。

おわりに、この1回全身照射実験により、全身1回被曝の線量と発生様式などに類似性が認められた。今後、さらに実験を重ね、低レベルの危険度の推定をより確実なものにすることが出来ると思う。

〔研究経過〕

この10年間にわたる研究の前半5年(表1に示された4実験)は前任者であり、現東京医科歯科大学医学部病理第二講座・教授 春日 孟博士が

主として担当された。後半の5年は大津が中心となり、研究が継続され、ここに研究総括がなされた。

謝 辞

本研究の遂行に当って、マウスの生産、および管理に、また、照射装置の保守管理に御協力いただいた動植課および技術課の方々に深甚なる謝意を表します。さらに、日々、実験動物の飼育観察に当られた、平井、河村、松原、四方、土橋、篠原の諸氏に感謝いたします。

〔研究発表〕

春日 孟, 実験動物の癌と加齢, 都老人研・日本学術会議老化研究委員会シンポジウム「老化と癌化」, pp 23~32, 1976.

Kasuga, T., Sado, T., Noda, Y., Terasima, T. and Kitagawa, T., Radiation-induced tumors in C57BL f/6J Nrs (SPF) and C3Hf/HeMsNrs (SPF) strain male mice. pp 29-41, in Late biological effects of ionizing radiation. Vol 11, Vienna, International Atomic Energy Agency, 1978.

Kasuga, T., Noda, Y., Sada, T. and Furuse, T., Naturally occurring and radiation-induced tumors in SPF mice, and genetic influence in radiation leukemogenesis. pp 452-455, in Recent Advances in Gerontology. Tokyo, XI International Congress of Gerontology, 1978.

2. 近交系マウスの加齢性変化に関する 病理学的研究

山極順二, 椎名悦子, 成毛千鶴子 (技術部動植物管理課)

Histopathological Studies on Aging Alterations in Inbred Strains of Mice

J. Yamagiwa, E. Shiina and C. Naruke

Laboratory of Veterinary Pathology and Microbiology, Animal and Plant Supply Section,
Division of Technical Services

The main investigation dealt with the influences of low level radiation to the experimental mice (Experiment IV). In addition to this subsidiary investigations composed of three fundamental studies were carried out (Experimental I, II and III).

Experiment I — Technological improvements on the production and conservation for germ-free animals. The sterilization of conservation materials, such as diet, feed-water, bedding materials, cages, air and other materials for germ-free animals were developed and the optimal conditions were determined.

Experiment II — Pathological studies on aged three strains of mice as a basis for the low level radiation experiments (Experiment IV).

Each strains were found to show characteristic aging processes in their life.

1. CF#1/Nrs(NRH) strain: Generally the life span was short, particularly in female mice. It was noticed clinically that chronic uremia developed with age. The uremia was based histopathologically on glomerulosclerosis.

2. C57BL/6JNrs strain: It generally had long life span. Disorders of endocrine systems occurred with aging, and a remarkable consequence was

hormogenic senile alopecia. It was also noted that a portion of the most aged class of the animals manifested a lymphosarcomatosis.

3. C3H/HeMsNrs strain: It generally had long life span. Main agedependent diseases of the strain were heart failure, based on left atrial thrombosis and/or cardiomyopathic disease, and hepatomas, mostly benign in nature, and mammary gland tumors.

Experiment III — Pathological studies of influence of diet on aging. Three kinds of diet were prepared for this purpose. The rations used were manufactured by "F" and "O" Co. LTD. in Japan, and also "B" Co. LTD. in U.S.A. in accordance with diet components originally prescribed for cancer research by National Institute of Health (U.S.A.). C3H/He mice fed with these diets were maintained under the same conditions and they were subjected to pathological examinations at specified intervals. The results revealed the incidence of the disease among three groups: remarkable were liver tumors and anemia in the male and female mice, and disease of genital organs in female at the twelve months after birth. The lowest incidences of above 3 diseases were detected in "O" diet fed mice.

Experiment IV — Influences of low level radiation in relation to aging was the final object of present research. The experiments were carried out with a total of 537 C3H/He mice under the following conditions 1) Diet: NIH open-formula for mouse and Rat ration (made by Oriental yeast Co. LTD., Japan), 2) Specific pathogen free conditions in the barrier, 3) Temperature: $24^{\circ}\text{C} \pm 1$, 4) Humidity: $50\% \pm 5$, 5) Radiation dose: 0 rad, 10 rad, 50 rad and 300 rad. Summary of the experiment IV: a) There is no well-defined difference in pathological findings

between 0 rad and 10 rad irradiated mice. b) 10 rad irradiated female mice has a tendency to live longer than 0 rad female mice (55 days, on the average). c) Some life shortning was observed in 50 rad irradiated mice (Male: 705 ± 131 , Female: 698 ± 144 days). d) Apparent life shortning was observed in 300 rad irradiated mice (Male: 613 ± 138 , Female: 638 ± 133 days). Incidence of leukemic diseases and Harder's gland tumor were obviously higher than the other experimental groups.

緒 言

本研究グループの研究課題は当初本特研に用いられるであろうゲツ菌類に関する病理学的なコントロール・データを採取する事を主眼としていた。しかしながら、動物実験にまつわる種々の問題点が指摘されなことから、下記に示す通り、副研究課題を設定し、問題解決を計りつつ研究目標に向わねばならなかった。

昭和50年に本特研に参加以来、直接的に研究課題に関する実験的研究に至る実験過程は大きく下記に示すごとく4つの実験に分ける事が出来る。

実験 Ⅰ. 近交系マウスの無菌化・維持に関する開発研究

経常研究・特別研究など本研究所で用いられているマウス（自家生産）の種親（たねおや）の定期交換に必須の無菌動物の作出・維持技術の確立。研究期間：昭和50年4月～52年3月（2年）。

実験 Ⅱ. 本実験（長期飼育）に用いる主力動物（マウス）の選抜の為の老化に関する比較病理学的研究

SPF（Specific Pathogen Free）化された3系統のマウスを飼育し、その老化の病理学的特徴を明確にする。研究期間：昭和49年11月～53年3月（3年4ヶ月）。

実験 Ⅲ. 本実験（長期飼育）に用いる主力動物（マウス）を飼育する飼料の開発とその老化の病理学的比較検討。

アメリカ合衆国、国立衛生研究所（NIH）が発癌実験に指定した公開指定配合飼料組成に準拠する飼料を日本国内飼料メーカー2社、アメリカ合衆国1社に製造を依頼、3種の飼料を同一条件下において同系マウスに給与。研究期間：昭和50年10～54

年3月（3年5ヶ月）。

実験 Ⅳ. 近交系マウスの加齢性変化（Aging alteration）に関する病理学的研究——低レベル放射線の加齢に及ぼす影響——

低レベル放射線（10ラド： γ 線1回照射）の生体に対する影響を病理学的に解析する目的で、対照として0ラド（純対照）、50ラド（中レベル放射線）ならびに300ラド（高レベル放射線）の3群を設定し、照射動物、飼育環境（温度・湿度・微生物・飼育者）、飼料（NIH指定配合飼料）、飲水等を一定にした条件下で実験を行い、老化のパターンが放射線によって変換されるか否かを明確にする。研究期間：昭和54年1月～58年3月（4年2ヶ月）。

実験結果と考察

実験 Ⅰ. 近交系マウスの無菌化・維持に関する開発研究

本特別研究で用いられるマウスは飼育環境では、SPF（Specific Pathogen Free）のバリアー内及びCCV（Clean conventional）の準バリアー内の2種に大別され、これら動物は大部分当所生産による近交系動物である。これら動物（マウス）はいずれも無菌動物（Germ-Free）を起原とするが、実験動物の場合、ある一定期日毎に種親（たねおや）を交換しなければならない規定、すなわち、近交を維持しなければならない義務を有している。しかしその無菌動物作出技術が確立していない為に短期日で汚染事故を反復して来ていた事から、本実験を行った。実験結果の概要を表1に示す通りであるが、無菌飼育に関連する全て

の物質の消毒・滅菌方法，オートクレーブ等の滅菌用機器，消毒液・滅菌液等の管理（性能・特性などの熟知）を徹底化させる事が結論として導き出された。

滅菌の困難な物質は飼料ならびに飲水で，飼料の場合固型飼料（13mm ϕ \times 20~23mm）の中に熱電対を装着し温度測定をすると雰囲気は規定温度に達するが，特に飼料中心部は規定温度に達する事はなく，仮に中心部温度を上げるとすれば周囲の大部分は規定以上の温度となり，飼料中の栄養素は破壊される結果を生ずる為，放射線滅菌飼料（5

メガラド照射）を用いる事となった。又飲水も同様に滅菌瓶の中心部まで温度が上昇せず，蒸溜水（滅菌水）を煮沸し，それをオートクレーブ滅菌するという前処理操作を行う事で解決した。又床敷の滅菌は，オートクレーブ内の設置位置，容器形状等により不完全な場合が出現し，汚染事故の重大な要因と考えられた。

実験 II．本実験（長期飼育）に用いる主力動物（マウス）の選抜の為の老化に関する比較病理学的研究

実験対象は当所生産近交系マウス，3系統すな

表 1 無菌動物維持の為の飼育機材の滅菌法一覧

No	機 材・物品名	消 毒・前処理法	滅 菌 法	滅菌温度	滅菌時間	備 考
1.	ビニール製隔離飼育装置	清 拭（100 % アルコール）	2 % 過酢酸 500 cc	室 温	3 日	寿命 1 年～1 年 6 月
2.	空 気（隔離装置注入用）	濾 過（フィルター 3 回）	2 % 過酢酸	室 温	271 / min	—
3.	ロックキャップ・バンド	清 拭（100 % アルコール）	2 % 過酢酸浸漬	室 温	1 日	寿命 3 月～6 月
4.	ステリルロック	清 拭（滅菌ガーゼ）	2 % 過酢酸 100 cc 散 布	室 温	1 時間	寿命 1～2 週
5.	スリーブ（ビニール製）	清 拭（滅菌ガーゼ）	2 % 過酢酸 250 cc 散 布	室 温	1 時間	寿命 1 日
6.	飼料（放射線滅菌 5 MR） オリエンタル酵母 kk	浸 漬（ビンホール・テスト） ビニール 3 重包装（真空）	2 % 過酢酸 100 cc 散 布	室 温	1 晩	直ちに搬入
7.	飲 水（蒸溜水）	煮 沸（10 分：薬缶）	高圧蒸気滅菌（滅菌瓶） 滅菌缶使用	121/℃	100 分	寿命 2～3 週
8.	床 敷（木クズ）	高圧蒸気滅菌（大量処理） 100～119℃：85 分	高圧蒸気滅菌（専用器） 滅菌缶使用	121/℃	100 分	—

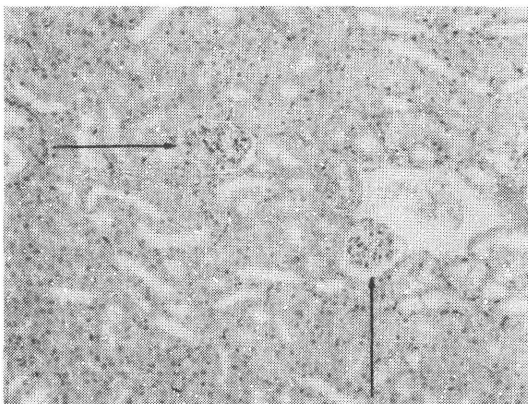


図 1. 腎：コントロール症例，糸球体（矢印）。
CF #1 マウス。雌。117 日齢。ヘマトキシリン・エオジン染色。150 倍。検 № S 0159。

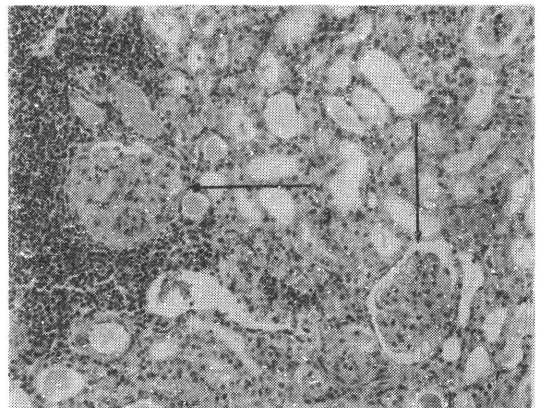


図 2. 腎：糸球体硬化症例，糸球体（矢印）。
間質に細胞浸潤（写真右側）。CF #1 マウス。雌。530 日齢。ヘマトキシリン・エオジン染色。150 倍。
検 № S 0032。

わち、1. CF # I /Nrs(現在NRH)マウス、2. C57BL/6JNrs マウスならびに3. CH/HeMsNrs である。

マウス1 (CF#I /Nrs)は当所生産施設で近交化されたマウスである。雌で若齢時より糸球体硬化症(図1 & 2)に罹患し、生涯にわたって慢性尿毒症状態を持続する為、その全身性影響から短命、雄の罹病率は雌に比較して低い様に見受けられるが、5匹飼(群飼)が闘争により不可能の為その詳細は明らかではない。

マウス2 (C57BL /6JNrs)は全身発育不全動物多発系であるが、その他に内水頭症、脱毛症、甲状腺発育不全ならびに下垂体発育不全等の多発系である事を明らかにした。

しかし、循環器系における器質的障碍の発生が低い事から系統としては長寿系に属するものと考えられたが、前述の理由から、個体の老化のバラツキが多く本研究には好ましい系統とは考えられなかった。

マウス3 (C3H/HeMsNrs)は中年期より肝腫瘍(Adenoma~Adenocarcinoma)が多発する系統で、その平均発生率は70~80%に達する。しかしながら肝腫瘍が直接的に死因と密に関連すると判断されたのは、老齢時における肝腫瘍組織内走行細血管の破綻~組織壊死に起因する出血死(血腹)が観察された例に限定された。本系統は性格温順、長寿で本実験には適したものと判断された。

実験Ⅲ. 長期動物実験用飼料の開発と飼育試験動物に関する病理学的研究

生物体にとって毎日の食生活(飼料)は、その老化過程に重要な影響を与えるであろう事は言うまでもないが、とりわけ2~3年の寿命であるゲッ歯にとってのそれは、長寿命動物に比較して飼料から摂取される物質からの影響を充分増幅して考察しなければならないと考えられた。

特に、放射線(低線量)、微毒物質の生体に対する慢性影響(いわゆる晩発効果)を微視的に捉える研究には飼料(使用する原材料の影響)の影響について明らかにする必要があると考えられたのである。

実験は3種の飼料をC3H/HeMsNrs マウスに可及的同一条件下において給与・飼育し、生後6, 12, 18, 25ヶ月に殺処分し病理学的検索に供した。結果生後6月齢時には各飼料給与群に著変は観察されなかった。

特記すべき病理学的変化は図1および図2に示

されるごとく、生後12ヶ月ならびに18ヶ月齢時における日本2飼料メーカーの製造になるF-NIHならびにO-NIH両飼料を給与された雌・雄C3H/Heマウスにおける疾病の発生率の相異であった。すなわち、1. 肝腫瘍の12月齢時ならびに18ヶ月齢時における出現率の相異である。F-NIH飼料での発生は12ヶ月齢時に既に80%(雄)に達しているが、O-NIH飼料給与例では40数%と約1/2の発生しか認められておらず、18月齢時における肝腫瘍保有率は同じであるが、腫瘍保有期間すなわち心臓への負担等を考察するならばその老化過程は著しく飼料により変換されていると見るべきが妥当である。雌における同腫瘍の発生は同様の傾向がうかがわれる。2. 雌においては更に卵巣ならびに子宮水腫が明らかな有意な発生率をF-NIH給与群は示している。結論として可成早期より老化が進んでいるものと理解される。これら事実は単なる各栄養素の配合比率が一義的意味を老化にはたしているのではなく、原材料中の蛋白・脂肪・ホルモン等の質が密接に関与する事を物語っている。本研究によって実際問題として市販され、日常たえず供給される飼料の質的問題が実験そのものの質を左右する問題を包含しているものと考えられた。

実験Ⅳ. 近交系マウスの加齢性変化(Aging alteration)に関する病理学的研究 一低レベル放射線の加齢に及ぼす影響一

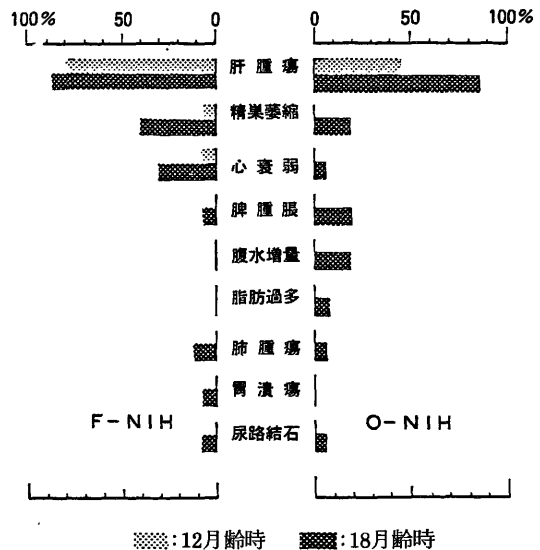


図3. 実験Ⅲ 主要実験結果 一飼料と老化の相関一
C3H/He 雌マウスにおける
各疾病発生率

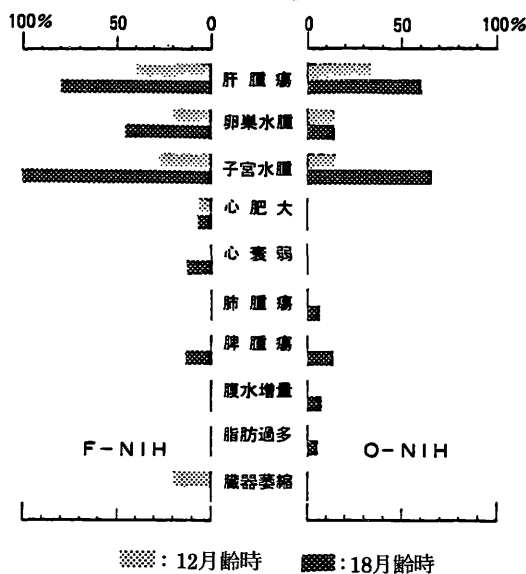


図4. 実験Ⅲ 主要実験結果 — 飼料と老化の相関 —
C3H/He 雌マウスにおける
各疾病発生率

実験はA群：頻死期～へい死まで飼育・観察。
B群：経時的（照射後6，10，12ならびに18月に安楽死）に検索し老化過程の解析を行う事を主たる目的とする2群に分けた。

実験結果の一部A群については表2ならびに表3に示すごとくである。平均生存日数の中で興味ある事実は、10ラド照射雌における832±114日という4群8系中突出する値である。頻死期殺例

表2 実験Ⅳ-A群 照射実験個体数一覧

照射線量	0ラド	10ラド	50ラド	300ラド	合計
雄	39	40	33	30	142
雌	34	35	37	31	137
合計	73	75	70	61	279

が各群・系共に全体の約2/3を占める事実は病理解剖学上新鮮材料を実験に供していた事を物語るものである。即ち、結果の信頼度を決定する。

平均白血球数ならびに赤血球数は頻死期殺例に限られたが、白血球数では300ラド照射雌・雄の突出は白血病の発病（生）率と密接な関係にあるのは云うまでもないが、OR（純対照群）雌における白血病発生率も注目すべき値である。赤血球数については300ラド照射群雌・雄、50ラド照射群雌の値はいずれも臨牀的に貧血症の数値であり、その一部が白血病に起因している事は明らかと考える。

出血性胃潰瘍の発生（図5&6）については10ラドおよび50ラド照射群において性差がなく、300ラド照射群雌における発生の低い事実は興味深く今後の検討課題の一つとなる。

肝腫瘍の発生（図7，8，9，10&11）に線量依存傾向はほとんど窺われない。むしろ種属特異

表3

実験Ⅳ-A群 主要実験結果

照射線量	0ラド		10ラド		50ラド		300ラド	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
平均生存日数	736 ± 127	777 ± 88	722 ± 148	832 ± 114	705 ± 131	698 ± 144	613 ± 138	638 ± 133
頻死期殺例数(%)	76.9	70.5	68.4	71.8	74.1	72.9	73.3	70.9
へい死例数(%)	23.1	29.5	31.6	28.2	25.9	27.1	26.7	29.1
平均赤血球数 ×10	778 ± 392	636 ± 371	694 ± 335	771 ± 278	792 ± 416	580 ± 224	489 ± 374	470 ± 227
平均白血球数	9,173	10,729	13,889	7,745	7,428	8,148	27,629	17,280
出血性胃潰瘍	35.8 ± 7.6	16.1 ± 6.6	19.4 ± 6.5	12.5 ± 5.8	29.0 ± 8.1	27.0 ± 7.2	23.3 ± 7.7	6.4 ± 4.3
肝腫瘍	82.0 ± 2.6	81.8 ± 6.7	84.2 ± 5.9	78.1 ± 7.9	83.8 ± 6.6	54.0 ± 8.1	86.6 ± 6.2	70.9 ± 8.1
白血球病	20.5 ± 6.4	35.2 ± 8.1	18.4 ± 6.2	12.5 ± 5.8	6.4 ± 4.3	18.9 ± 6.4	43.3 ± 9.0	25.8 ± 7.8
肺腫瘍	28.2 ± 7.2	17.6 ± 6.5	21.0 ± 6.6	21.8 ± 7.2	25.8 ± 7.8	13.5 ± 5.6	23.3 ± 7.7	29.0 ± 8.1
脾腫瘍	2.5 ± 2.5	11.7 ± 5.5	15.7 ± 5.9	9.7 ± 5.1	3.2 ± 3.1	2.7 ± 2.6	3.3 ± 3.2	3.2 ± 3.1
ハーダ腺腫瘍	2.5 ± 2.5	14.7 ± 6.0	5.2 ± 3.6	6.2 ± 4.2	6.4 ± 4.3	5.4 ± 3.7	26.6 ± 8.0	32.2 ± 8.3

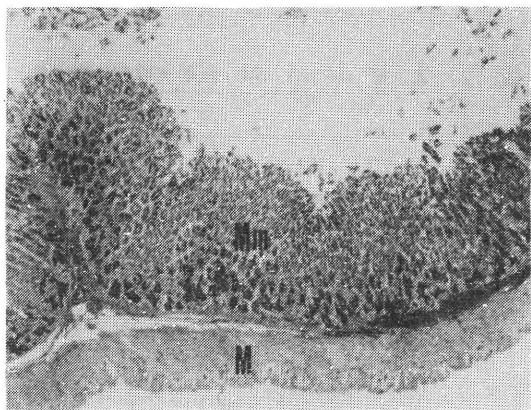


図5. 胃：コントロール症例。Mm：粘膜，M：筋層。
C3H/Heマウス。雄。257日齢。ヘマトキシリン・
エオジン染色。60倍。検№S 0951。

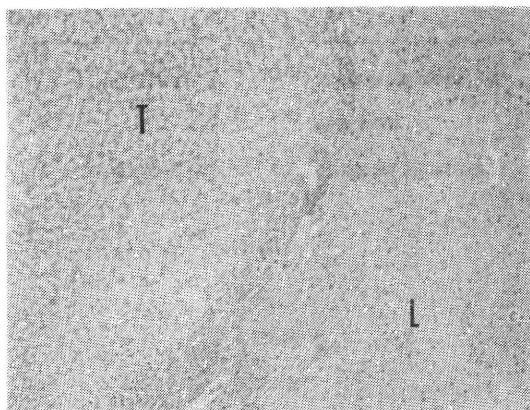


図7. 肝：肝腫瘍症例(初期)，T：腫瘍部(写真左側)
L：正常肝組織(写真右側)，腫瘍部は組織の脂肪化
が進行し明るく境界を鮮明にする。C3H/Heマウス。
雄。257日齢。ヘマトキシリン・エオジン染色。3
7.5倍。検№S 0952。

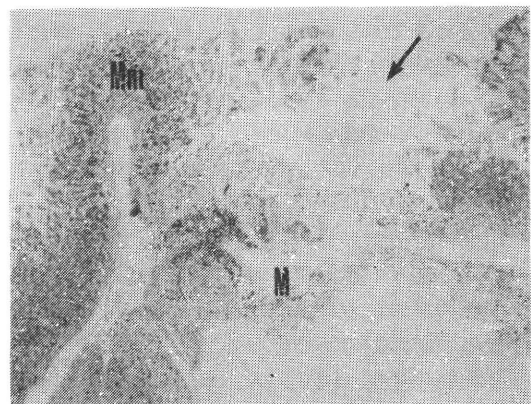


図6. 胃：潰瘍症例。潰瘍病巣(太矢印)，粘膜の剥
離，粘膜細胞の萎縮，出血，細胞浸潤。C3H/Heマ
ウス。雄。713日齢。300ラド照射。ヘマトキシリ
ン・エオジン染色。60倍。検№S 1326。

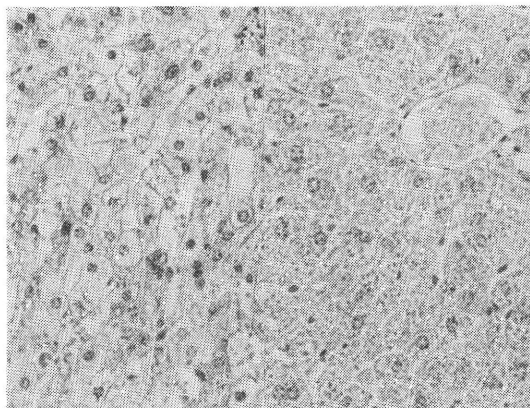


図8. 肝腫瘍組織
図 T部の拡大。
300倍。

図9. 肝正常組織
図 L部の拡大。
300倍。

性に加えて飼料（食物）因子が強く作用している
事実（実験Ⅲ）が明確になったと考えるべきであ
ろう。

白血病発生（図12&13）については既に血球の
項で述べたが，0ラド群の発生率が高く，逆に10
ラド群（雌）ならびに50ラド群（雄）で低かった
事実は放射線と白血病発生の相関において興味深
く，10ラド照射の危険度の推定からして現在遂行
中の第2次実験においてこれら事実がより明らか
にされるであろう。

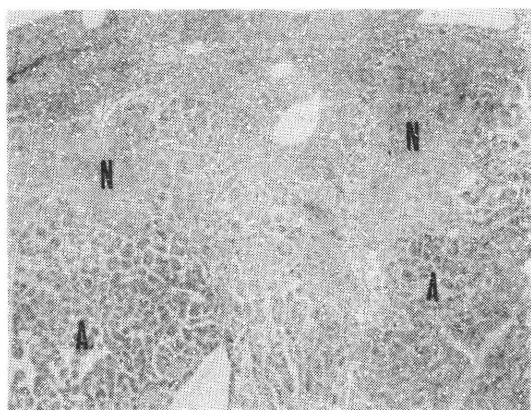


図10. 肝：肝腫瘍症例(陳旧)，N：壊死腫瘍組織，A：腺様構造を示す腫瘍組織。C3H/Heマウス。雄。540日齢。ヘマトキシリン・エオジン染色。37.5倍。検№S 1231。

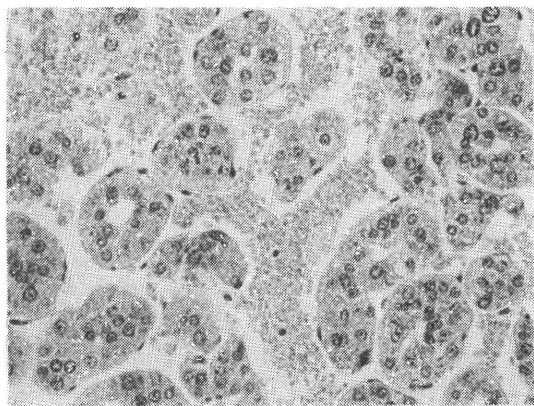


図11. 肝：腫瘍組織。図10(A)の拡大。300倍。

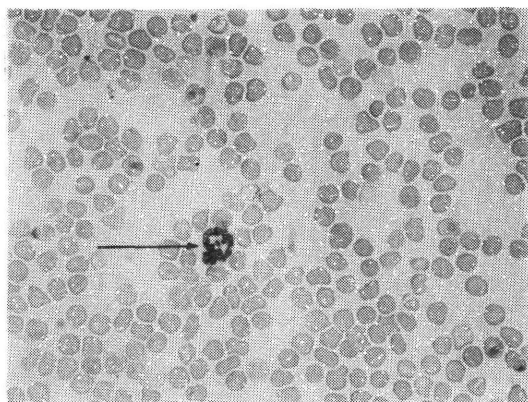


図12. 末梢血液像：コントロール症例，好中球(矢印)。C3H/Heマウス。雄。260日齢。300ラド照射。メイグリュンワルド・ギムザ染色。600倍。検№S 1007。

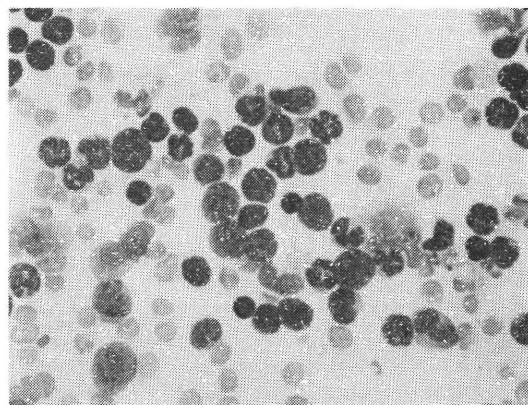


図13. 末梢血液像：骨髄性白血病症例(腫瘍細胞→大型)。WBC：126,300個，RBC：138万個/mm³。C3H/Heマウス。雄。734日齢。300ラド照射。メイグリュンワルド・ギムザ染色。600倍。検№S 1302。

肺腫瘍の発生(図14&15)に線量依存傾向はほとんど見出し難い。

脾腫瘍の発生(図16&17)については，0ラド群(雌)ならびに10ラド群(雌・雄)が他群・系に比較して高い事実は興味深く白血病発生と同様第2次実験結果が期待される。

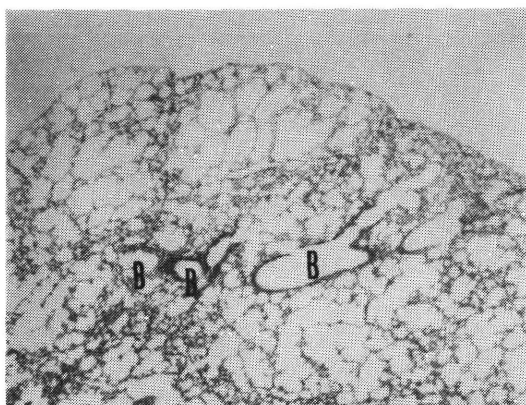


図14. コントロール症例, B: 気管支横断面。C3H/Heマウス。雄。257日齢。ヘマトキシリン・エオジン染色。37.5倍。検№S 0941。

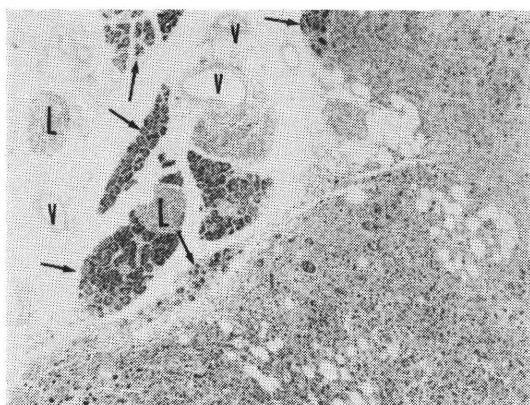


図16. 脾臓腫瘍。→印: 残存脾組織, L: ランゲルハンス島, V: 血管。C3H/Heマウス。雄。619日齢。10ラド照射。ヘマトキシリン・エオジン染色。60倍。検№S 1381。

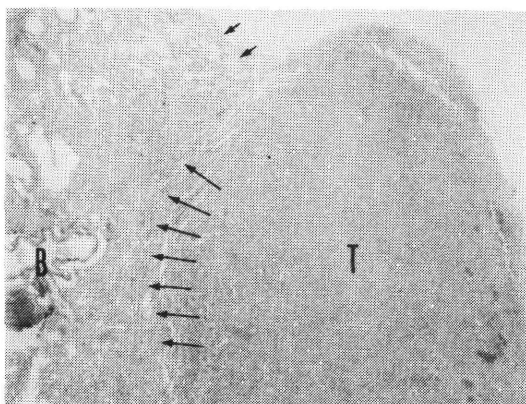


図15. 肺: 肺腫瘍症例, T: 腫瘍塊, →印: 浸潤境界部, ⇨印: 正常肺組織。C3H/Heマウス。雄。590日齢。ヘマトキシリン・エオジン染色。37.5倍。検№S 1275。

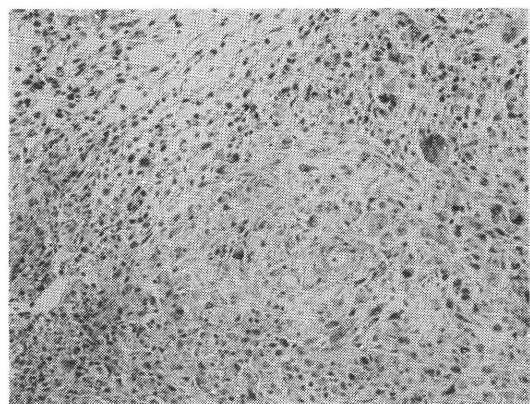


図17. 脾臓腫瘍。図16の拡大。300倍。

ハーダー腺腫瘍の発生 (図18& 19) は 300 ラド群 (雌・雄) で突出した値を示し、明らかに線量依存性を有する腫瘍発生と看做させるべきであろう。又、0 ラド群 (雌) の発生がこれに次いでおり、本腫瘍発生には性差が存在する傾向も観察され、更に10ラドならびに50ラド群ではむしろ抑制されていると見るべきなのかもしれない。

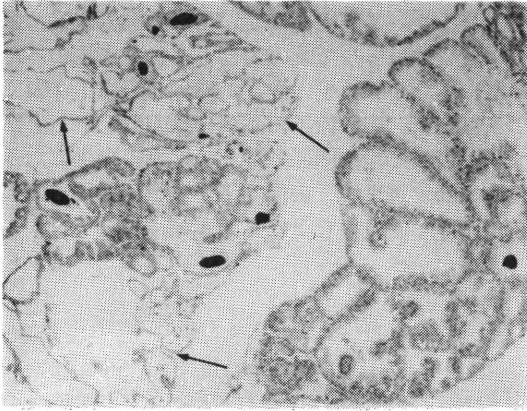


図18. ハーダー腺：コントロール症例，→印部腺組織は萎縮を示す。C3H/Heマウス。雌。565日齢。300ラド照射。ヘマトキシリン・エオジン染色。60倍。検№S 1235。

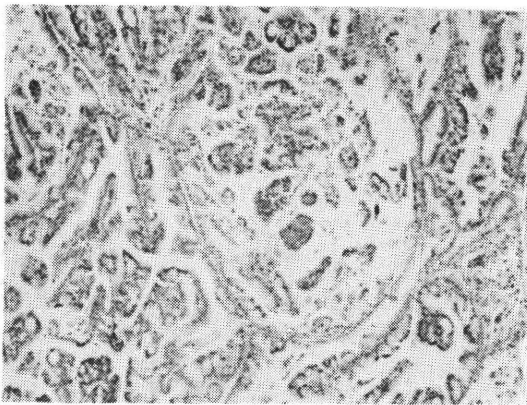


図19. ハーダー腺(瞬膜腺)腫瘍：嚢胞状分葉構造を示す。C3H/Heマウス。雌。653日齢。300ラド照射。ヘマトキシリン・エオジン染色。60倍。検№S1311。

0ラド、10ラド、50ラドならびに300ラド照射群の実験結果から危険度の推定を行うならば、300ラド（高線量）はマウス個体に対して障害性を有していると看做すべきであろう。即ち、寿命短縮、白血病発生ならびにハーダー腺腫瘍発生に何らかの役割をはたしている事は明らかである。

照射線量50ラド群（中線量）では寿命において僅かながら、0ラド群ならびに10ラド群に比較して短縮されている傾向が窺われるが、有意ではない。又、各疾病の発生では一部を除き0ラド群と比較するとむしろ抑制傾向がある様にも見受けられる。

照射線量10ラド群（低線量）は実験Ⅳの主目的実験である事は既に述べたが、今回の実験結果から0ラド群（純対照）に比較して、寿命ならびに各種疾病発生において特記すべき差異は観察されず、むしろ寿命では延長の傾向さえ窺う事が出来たのである。又病理学的に白血病ならびに腺腫瘍の発生において雌・雄の発生差に逆転が見られる事実は性ホルモン線量相関の一つの問題として今後検討が期待される点であろう。

総 括

1. 本研究所実験動物（ゲッ歯類）の生産・供給の根源である無菌動物の作出・維持に関する開発研究を行い、それを完成させた（実験Ⅰ）。
2. 本特別研究動物実験用マウス3系統について比較病理学的見地からそれらの老化過程を究明し、各系統に特有の病が存在する事を明らかにした（実験Ⅱ）。
3. 実験動物用飼料の質は老化過程と密接な相関を有するとして、アメリカ合衆国、国立衛生研究所が発癌実験用飼料として公開した指定配合飼料組成に準拠した飼料を日本国内飼料メーカー2社、アメリカ合衆国1社に製造を依頼し、3種NIH飼料をC3H/Heマウスに給与し、その老化過程を検索した。その結果から日本国内飼料メーカー〇社のものを可とした。疾病発生の差異は飼料原材料の差異と看做された（実験Ⅲ）。
4. 実験Ⅰ、ⅡおよびⅢを全ての基礎として低レベル放射線照射による老化過程の変換（いわゆる晩発効果と一般に云われる）について病理学的な検討を加えた。使用線量は0ラド（純対照）、10ラド（低レベル線量：目的線量）、50ラド（中レベル対照線量）ならびに300ラド（高レベル対照線量）とし、生後10～11週齢時に1回照射した（実験Ⅳ）。
5. 実験Ⅳの結果、10ラド照射群は0ラド群（純対照）に比較して明らかな放射線障害を示す結果を得る事は出来なかった。

謝 辞

特別研究「低レベル放射線の人体に対する危険度の推定に関する調査研究」には8年間参画、研究面では「近交系マウスの加齢性変化（Aging alteration）に関する病理学的研究」を主題として、実験動物を用いた「老化の病理学」、「老化と低レベル放射線の病理学」を積重ね、検疫関係では実

験動物の種々の疾病の診断・防疫に専念してまいりました。しかしいずれの路も日暮れて遠しの感を禁じ得ませんが、波風の中を何とか航海出来ましたのも、歴代所長・研究官、歴代管理部長、企画課、会計課、庶務課の各位、又同じ技術部の部長はじめ技術課、安全課、動植物管理課の数多くの方々の御支援、御助力の賜物と考え、特研を去るに当り改めて深甚なる感謝の意を捧げるもの

発表論文

- 1) 山極順二, 内田晴康, 松本恒弥, 椎名悦子, 中村弘子: ヌードマウス (nu/nu) に関する臨床繁殖学的研究 — 自家生産の基礎的資料 —, 放医研年報, **NIRS — AR — 19**, 42—44, 1976
- 2) 山極順二, 岩田寿雄, 内田晴康, 椎名悦子, 長沢文男, 松本恒弥: 無菌 (Germ-free) マウスに関する研究, 放医研年報, **NIRS — AR — 20**, 46—50, 1977
- 3) 山極順二, 椎名悦子, 富田静男, 早尾辰雄, 内田晴康: SPFマウスの加齢性変化 (Aging alteration) に関する病理学的研究 I. CF # /Nrs マウスの腎病変と加齢, 第80回日本獣医学会 (病理), 大阪, 1975
- 4) 山極順二, 山極三郎, 椎名悦子, 富田静男, 早尾辰雄, 沢田卓也: SPF マウスの加齢性変化に関する病理学的研究 II, C 57BL / 6JNrs マウスの脱毛症と加齢, 第81回日本獣医学会 (病理), 東京, 1976
- 5) 山極順二, 山極三郎, 椎名悦子, 富田静男, 早尾辰雄, 沢田卓也: SPF マウスの加齢性変化に関する病理学的研究 III. C 57BL / 6JNrs マウスの剖検時主病変の日齢による推移, 第82回日本獣医学会 (病理), 岩手, 1976
- 6) 山極順二, 山極三郎, 椎名悦子, 鈴木克枝, 富田静男, 早尾辰雄, 沢田卓也: SPF の加齢性変化 (Aging alteration) に関する病理学的研究 IV. C3H/HeMsNrs マウスの心臓疾患と加齢, 第83回日本獣医学会 (病理), 神奈川, 1977
- 7) 山極順二, 山極三郎, 椎名悦子, 斎藤美津: S P Fマウスの加齢性変化 (Aging alteration) に関する病理学的研究 V. 加齢の共通指標 (気管腺), 第85回日本獣医学会 (病理), 東京, 1978
- 8) 山極順二, 山極三郎, 椎名悦子, 斎藤美津, 松下悟: S P Fマウスの加齢性変化 (Aging alteration) に関する病理学的研究 VI. 実験的飼料とC 3 Hマウスの加齢, 第87回日本獣医学会 (病理), 東京, 1979
- 9) Hayata, I., Ishihara, T., Hirashima, K., Sado, T., and Yamagiwa, J.: Partial Deletion of Chromosome #2 in Myelocytic Leukemias of Irradiated C3H/He and RFM Mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**, 843 — 848, 1979
- 10) 椎名悦子, 山極順二: 実験用マウスの白血球算定用稀釈液 (S — Y法) の開発研究, 医学のあゆみ, **126** 1983
- 11) 山極順二, 山極三郎, 椎名悦子, 吉原締子: 近交系マウスの加齢性変化 (Aging alteration) に関する病理学的研究 VII. 胃潰瘍とその病理発生, 第91回日本獣医学会 (病理), 東京, 1981
- 12) 山極順二, 椎名悦子, 成毛千鶴子: S P F の加齢性変化 (Aging alteration) に関する病理学的研究 VIII. 低レベル放射線の加齢に及ぼす影響, 放医研年報, **NIRS — AR — 23** ~25, 1980 ~ 1982
- 13) Hayata, I., Seki, M., Yoshida, K., Sado, T., Yamagiwa, J., and Ishihara, T.: Chromosomal Aberrations Observed in 52 Mouse Myeloid Leukemias, *Cancer Res.*, **43**, 367 — 373, 1983

3. 各種照射様式による放射線発癌に関する研究

(1) 連続照射による寿命短縮と死因分析

佐藤文昭, 川島直行, 福津久美子 (障害基礎研究部),
関正利, 大津裕司, 古瀬健, 小林森, 野田攸子 (生理病理研究部),
白貝彰宏, 丸山隆司 (物理研究部)

Influence of Physical and Biological Factors on Radiation Carcinogenesis: Some Delayed Effects of Continuous Irradiations in Mice

F. Sato, N. Kawashima, K. Fukutsu, A. Shiragai*¹, T. Maruyama*¹, S. Kobayashi*²,
T. Furuse*², Y. Noda*², H. Otsu*² and M. Seki*²
Division of Radiation Hazards; *¹ Division of Physics;
*² Division of Physiology and Pathology

Late effects from continuous exposures to ionizing radiations are the potential hazards from which workers in nuclear industries or the general public might suffer. Especially sparing effects and a dependence of late effects on ages at terminated exposures have been matters of serious concern for the time being. A large experiment on continuous irradiations has been in progress from the above points of view since 1977. This paper reports on results of life shortening and on interim results of tumour induction. The source of gamma-rays is Cs-137 of 10.1 Ci as of August 1978. Dosimetry was carried out with an ionization chamber and a thermoluminescence dosimeter, of which details have already been published (A. Shiragai et al., J. Radiat. Res. 21: 118, 1980). Daily doses used in the experiments were 37.4 rad, 8.4 rad and 2.9

rad as of July, 1978. A total of 2900 C57BL/6 female and male mice in 'conventional' conditions were used throughout the experiments. The exposures for 15 weeks with 37.4 rad/day started from 4 weeks of age (AF1 group for female mice), from 19 weeks of age (AF2, female), from 34 weeks of age (AF3, female) or from 49 weeks of age (AF4, female). The accumulated doses were 3900 rad. Mean life spans of the unirradiated controls are 696 ± 11 days for the females (UF) and 725 ± 15 days for the males (UM). The mean survival times after the end of exposures are 65 ± 7 days for AF1, 107 ± 7 days for AF2, 143 ± 11 days for AF3 and 158 ± 9 days for AF4. The exposures at younger ages obviously induced larger life shortenings than those at older ages. The same may be said of male mice. As a whole the female mice are more

radiosensitive than the male mice. The exposures to 8.4 rad/day from 4 weeks of age were originally designed to continue for 476 days and expected to accumulate doses up to 3900 rad. However some of the mice died before the end of exposures and then mean accumulated doses of the groups (BF for female, BM for male) are somewhat lower than the expected 3900 rad. The mean life span of BF is 514 ± 10 days with mean accumulated dose of 3500 rad and that of BM is 594 ± 12 days with 3700 rad. There are statistically significant life shortenings in both of BF and BM. A single dose of 389 rad from a Co-60 source was given to another mice (SF for female and SM for male) at 4 weeks of age. Mean life spans of SF and SM are 541 ± 15 days and 612 ± 19 days, respectively which are almost the same as those of BF and BM in the base of same sexes. Namely the accumulated dose of 3500 or 3700 rad delivered with 8.4 rad/day is almost equivalent to the single dose of 389 rad in the induction of life shortening. The exposures to 2.9 rad/day from 4 weeks of age for 698 days brought about deaths of some mice before the end of the exposures. Mean life span of the female mice exposed to 2.9 rad/day is 628 ± 10 days with mean accumulated dose of 1640 rad. The life shortening of the female mice is statistically significant. Male mice exposed to 2.9 rad/day has a mean life span of 723 ± 10 days

with mean accumulated dose of 1800 rad. The life shortening of the male mice is not statistically significant.

Comprehensive histological studies on all of the above mentioned mice are in progress. The exposures to 37.4 rad/day for 15 weeks induce thymic lymphomas (TL) in the female mice. Although the incidences of TL are higher in the groups exposed at younger ages, the female mice at 49 weeks of age (AF4) are still sensitive to induction of TL by the radiations. The mean latent periods seem to be shorter in the groups exposed at younger ages. The large life shortening in AF1 comes from the high incidence and the earlier occurrence of TL. The same may be said of male mice.

From the facts described above, we may conclude that terminated exposures to 37.4 rad/day induce large life shortenings and thymic lymphomas depending on the ages at exposures. The exposures at younger ages induce larger effects. The exposures to 8.4 rad/day from 4 weeks for 476 days induce life shortenings. Although the effects of 37.4 rad/day or 8.4 rad/day are similar in both sexes, the female mice are more radiosensitive. The exposures to 2.9 rad/day from 4 weeks of age for 698 days induce a life shortening in female mice but not in male mice.

〔結 言〕

放射線による危険度の推定は広範な疫学的調査に基づいて行なわれている。こうしたヒトのデータには、種々の不備な点があり、危険度推定に今なお多くの困難を生じている。危険度推定に伴う問題点の中で、特に動物実験との関係で重要な問題としては、線量率効果、被曝時年令の影響、線質効果や非特異的寿命短縮の有無などがある。さらに具体的に記すと、線量率効果については負の線量率効果もありうるので、1回被曝である原爆被曝生存者のデータは危険度の推定に用いるべきでないという主張もないわけではない (Kneale et al., 1978)。この主張は、職業被曝や一般公衆の被曝は通常、連続被曝の形をとるということ

に関連している。腫瘍の発生率と潜伏期の長さは一般的には被曝時年令の影響を受ける。肺腫瘍の潜伏期は広島、長崎の若年被曝者で長くなっているが、この事実は他の疫学的調査結果とは必ずしも一致しない (BEIR III 報告書, 1980)。上に記した問題は危険度推定に伴う問題のごく1部にすぎないが、こうした分野での実験的研究は不完全な疫学的データを補完するという重要な役割を果たすものと考ええる。このような観点から、職業被曝や一般公衆の被曝モデルとしてマウスを用いて、ガンマ線の連続照射による発癌実験を行った。本報告は研究が開始された昭和52年度から本特別研究が終了した昭和57年度までの6年間の研究成果をまとめたものである。

【実験結果と考察】

(1) 線量測定

第1ガンマ線棟第2照射室は図1、図2に示したように半径5mの円形の地下室である。部屋の

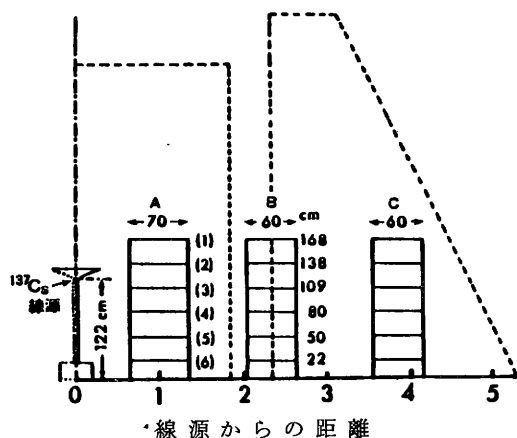


図1. 第1ガンマ線棟第2照射室の測面図。

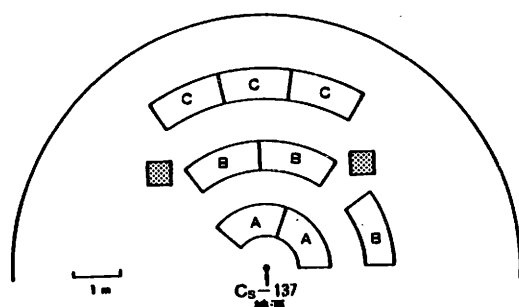


図2. 第1ガンマ線棟第2照射室の平面図。

中心にある10.1Ci(昭和53年8月現在)のCs-137線源が遠隔操作により床面格納容器から出し入れされるようになっている。照射時には床面より122cmの高さにある。線量測定には電総研で校正した容積12ccの空気電離箱線量計(応用技研製)及びMSO-S TLD(大日本塗料製)を用いた。電離箱を用いて飼育架台のない場合の空中線量分布と既存の鉄板製棚上のマウス飼育ケージ内の線量分布を測定し、その結果に基づいて架台の配置場所を決定し、円弧型の金網製棚をもつ架

台を作製した。その際、4, 10および40rad/dayに近い線量率が得られるように配慮した。次にこの架台を配置し、あらためて電離箱を用いて、ケージ内で上記の線量率が得られるような各段の棚上のケージの位置を決めた。さらに照射・飼育条件でTLDを用いてケージ中心位置での線量を確認した。またTLDをマウス腹部に手術挿入し、マウスの被曝線量の実測を試みた。その結果を表1に示した。ケージ内平均線量とマウスの被曝線

表1 マウスの吸収線量率 (rad/22-hr day)
1978年12月現在

棚	ケージ内平均値	マウス実測値
A	36.6	37.0
B	9.5	8.3
C	3.5	2.9

表2 実験群の種類と照射条件

性	群名	匹数 ¹⁾	照射開始 日令	平均照射期間 (日)	平均蓄積線量 (rad)
雌	AFO	150	28	54	1963 ²⁾
	AFI	149	28	107	3905 ²⁾
	AF2	148	133	106	3894 ²⁾
	AF3	141	238	107	3892 ²⁾
	AF4	146	343	108	3896 ²⁾
	BF	149	28	476	3549 ³⁾
	CF	198	29	698	1640 ³⁾
	SF	150	28	—	389
	UF	203	—	—	—
雄	AMO	149	28	54	1969 ²⁾
	AM1	150	28	107	3906 ²⁾
	AM2	150	133	106	3887 ²⁾
	AM3	148	238	107	3885 ²⁾
	AM4	137	343	108	3901 ²⁾
	BM	148	28	476	3683 ³⁾
	CM	199	28	698	1802 ³⁾
	SM	150	28	—	389
	UM	199	—	—	—
計		2864			

1) 照射群では照射開始時の匹数、非照射群では4週令の匹数

2) 照射中の死亡マウスを除く。

3) 照射中の死亡マウスも含む。

量とは、線源から遠くなる程違いが大きくなることがわかった。最終的な線量の推定値としてはマウスを用いた実測線量を使用することとした。マウスは1日22時間の照射を受けた。所定の蓄積線量を得るための照射期間を計算する際には、物理的崩壊を考慮した。

(2) 実験群について

用いたマウスは雌雄のC57BL/6(CV)で、連続照射でも胸腺リンパ腫が多発するとの予測で、この系統を選んだ。実験群は表2に示したように18群2864匹である。群名A, B, Cはそれぞれ図2のA棚, B棚, C棚に対応しており、Fは雌、Mは雄を表わしている。A棚での高線量率照射は胸腺リンパ腫の誘発を目的とした実験である。その日線量、蓄積線量、照射開始年令は、Upton et al. (1960), Leshner et al. (1965), Upton et al. (1970) のデータを参考にして決めた。これらの文献から、連続照射による胸腺リンパ腫誘発のための最適条件を推定すると、4週令を含む照射で、日線量が数10rad/日、蓄積線量が数千radとなる。AFOまたはAMO群は、AFIまたはAMI群で後半の連続照射を中止した群に相当している。そこで、それぞれの2群の胸腺リンパ腫の発生率を比較することにより、後半の部分の連続照射が依然としてその腫瘍誘発に効果的であったかどうかを知ることができる。BFまたはBM群は日線量が低いので胸腺リンパ腫の多発は期待されないが、雄の肺腫瘍、雌の卵巣腫瘍などの誘発が予想された。CFまたはCM群はさらに日線量が低く、寿命短縮が検出できるかどうかの境界にあると予想された。SFまたはSM群は⁶⁰Coガンマ線の1回照射群で線量率は37~34rad/minであった。その線量はBFまたはBM群の寿命短縮と同じになることを期待して、ほぼ10分の1とした。

各群の動物数は第一種の過誤の確率を0.05、第二種の過誤の確率を0.2として、発生率10%と20%の差または30%と50%の差が有意となるように選んだ。その数は150匹から200匹となり、CF, CM, UF, UM群に約200匹を用い、その他の群には約150匹を用いた。平均値の差の検定は2群の検定は2群の等分散性が否定されない時はStudentのt検定を行い、それが否定される時にはWelchの検定を行った。データ処理には電算機ACOS-6を用いた。なお、4週令のマウスに⁶⁰Coガンマ線(線量率35~30rad/分)の1回照

射を行いLD₅₀(30)を調べた。その結果、雌のLD₅₀(30)は683rad(95%信頼区間は677—690rad)で雄は714rad(705—723rad)であった。

(3) 寿命短縮

高線量率で約3900radの蓄積線量を受けた群の寿命短縮を表3に示した。これらの寿命短縮は、

表3 37rad/日の照射群の寿命短縮

性	群名	平均蓄積線量 (rad)	照射日令	寿命短縮 (日)	寿命短縮 (%)
雌	AF1	3905±1	28~135	496	88.4
	AF2	3894±1	133~239	356	76.5
	AF3	3892±2	238~345	214	60.1
	AF4	3896±2	343~451	107	40.2
雄	AM1	3906±1	28~135	527	89.4
	AM2	3887±2	133~239	280	56.9
	AM3	3885±2	238~345	188	45.4
	AM4	3901±2	343~451	141	42.7

照射終了時の平均余命を同じ日令の非照射群の平均余命から引いたものである。寿命短縮率(%)は上記の寿命短縮を非照射群の平均余命の百分率として表わしたものである。表3から知られるように寿命短縮は絶対値についてもまた百分率についても、若年時の照射で大きい。図3に雌の高線量率群の生存曲線を示した。非照射群UFの生存曲線に比べ、若年時照射で寿命短縮が大きいことが、この図からも明らかである。AFO群はAFI群の後半の照射を中止した群に対応しているが、寿命短縮率はAFOが70.9%, AFIが88.4%

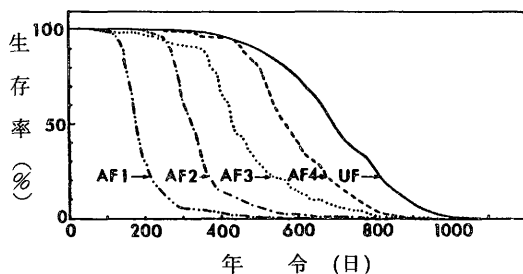


図3. 37rad/日で3900radの照射をうけた雌マウスの生存曲線(記号については表2を参照)。

であった。このことからAFIの後半の照射も「Wasted radiation」ではないことを示している。雄についても同様に寿命短縮はそれぞれAMOが67.5%, AMIが89.4%であった。

日線量の低い群の平均寿命を表4に示した。2.9

表4 対照群, 2.9rad/日および8.3rad/日の照射群と1回照射群の平均寿命

性	群名	線量率	平均蓄積線量 (rad)	平均寿命±SE (日)	
雌	UF	0	0	696±11	
	CF	2.9rad/日	1640	628±10	**
	BF	8.3rad/日	3549	514±10	**
	SF	34rad/分	389	541±15	**
	UM	0	0	725±15	**
	CM	2.9rad/日	1802	723±10	NS
	BM	8.3rad/日	3683	594±12	**
	SM	34rad/分	389	612±19	**

(註) 対照群に対する有意差: **P<0.01
NSP>0.05

rad/日の照射を受けた雌マウスは有意の寿命短縮を示したが、雄マウスでは全く寿命短縮を示していない。8.3rad/日の照射は雌雄のマウスに寿命短縮を生じた。1回照射群SF, SMの線量はBFやBM群の10分の1程度として、寿命が同じになることを期待した。結果は表4に示した通りで、BFとSFの寿命に有意差は見られなかった。BMとSMの寿命にも有意差は見られなかった。このことは約390radの1回照射による寿命短縮は約3500または3700radの連続照射の寿命短縮とはほぼ等しいことを示している。図4にUF,

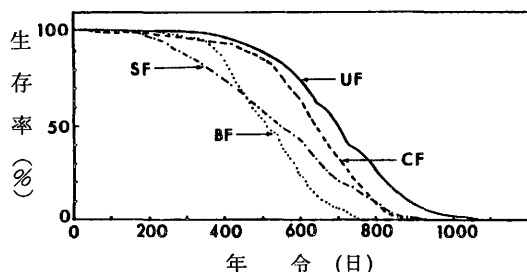


図4 対照群, 2.9rad/日および8.3rad/日の照射群と1回照射群の生存曲線(雌)。

CF, BFおよびSFの生存曲線を示した。BFとSFの平均寿命には有意差がないが、生存曲線の形は異なっている。1回照射群の方が早い時期から死亡が観察されており、この関係は雄のBMとSMの間にも見られている。

年令別死亡率の計算例を図5に示した。390rad

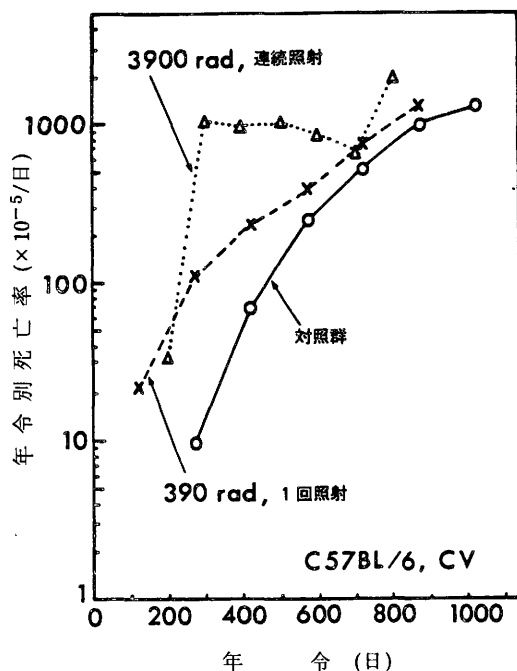


図5 対照群, 1回照射群および19週令から37rad/日の照射を受けたマウスの年令別死亡率(雌)。

の1回照射群の年令別死亡率は若年時で対照群との差が大きい。37rad/日の群は蓄積線量も大きく、対照群の年令別死亡率とは著しく異なっている。対照群の年令別死亡率が上に凸であることは、死亡数分布が正規分布に近いことを示唆する。実際にこの対照群の生存曲線を正規確率紙にプロットすると、図6のように直線が得られた。この事は死亡数の時間分布(または寿命の分布)が正規分布に従っていることを示している。

(4) 組織学的所見

死後変化の著しい個体を除いて、全例について詳細な組織学的検索を行った。現在までに得られた結果は以下の通りである。37rad/日の照射群に最も多く誘発された腫瘍は胸腺リンパ腫であった。最も高率に発生したのは4週令と19週令から

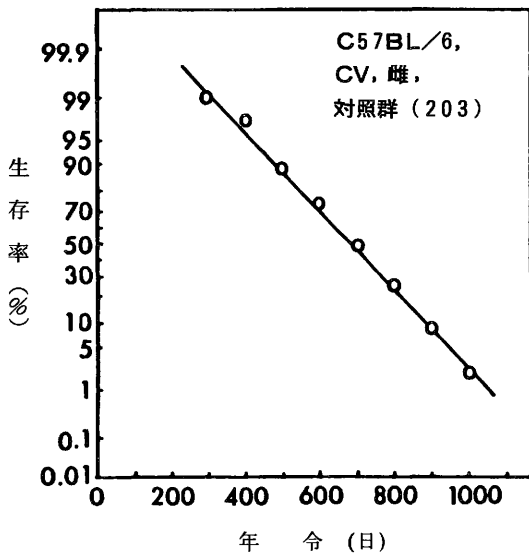


図6. 正規確率紙にプロットした対照雌マウスの生存曲線。

照射を開始した実験群で、ほぼ60%のマウスに胸腺リンパ腫が認められた。次いで34週令照射開始群、49週令照射開始群の順で、その腫瘍発生率は約20%に減少していた。図7に雌マウスの胸腺リ

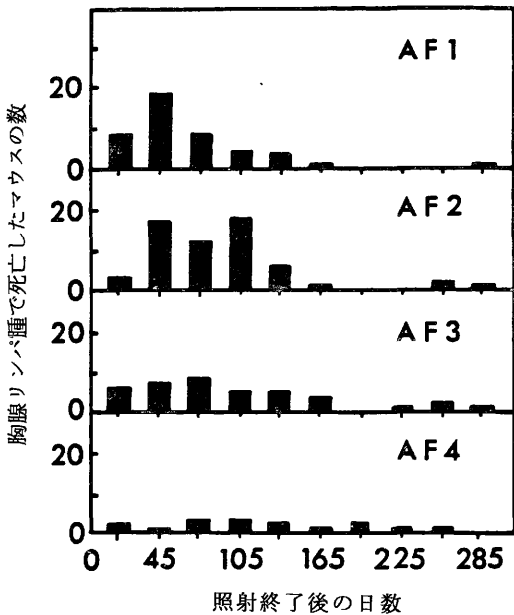


図7. 種々の年令で37rad/日の連続照射を受けた雌マウスに発生した胸腺リンパ腫(記号については表2を参照)。

ンパ腫の発生状況を示した。若年時の照射で潜伏期が短い傾向を示している。胸腺リンパ腫は胸腺から縦隔洞内に発育し、さらに心のう、胸膜、肺など近傍組織に連続性に浸潤増殖し、主として気管支周囲および肺動脈外膜に沿って肺組織内の浸潤増殖像が著明で、無気肺の状態が惹起され、マウスは死亡している。この病像から胸腺リンパ腫はマウスにとって致命的になることが明らかになった。こうした37rad/日による胸腺リンパ腫の誘発には性差はほとんど見られなかった。これらの群の他の主要な死因は、肺炎、敗血症などの感染症と脳出血であった。8.3rad/日の連続照射で死亡した個体の約半数は肺炎などの感染症による死亡である。この群には胸腺腫(10~20%)や脳出血(2~6%)による死亡も認められた。37rad/日や8.4rad/日の連続照射では、雄の方に腫瘍の組織型が多種類である傾向がみられる。

[総括]

C57BL/6 (CV) マウスを用いて、連続照射による発癌実験を行った。線量率(日線量)効果、照射時年令の影響、性差などについて以下に列記するような結果が得られた。

(1) 37rad/日で約3900radの照射による寿命短縮は若年時の照射ほど大きい。胸腺リンパ腫も高令時照射群より若年時照射群で誘発率が高い。誘発率は低いが、約1年令から照射した群にも胸腺リンパ腫の誘発が認められた。この腫瘍の潜伏期は若年照射で短い傾向を示している。性差は殆ど見られていない。

(2) 同一の蓄積線量で日線量を37rad/日から8.3rad/日に下げると、胸腺リンパ腫の誘発と寿命短縮が著しく減少する。

(3) 約3900radの1回照射(34rad/分)と約3500 または3700rad連続照射(8.3rad/日)は、ほとんど同じ寿命短縮を生ずる。

(4) 2.9rad/日で雌マウスに約1600radの照射を行うと、若干の寿命短縮が見られたが、同一の日線量で雄マウスに約1800radの照射を行った場合には寿命短縮は認められなかった。上記の線量に近い線量を37rad/日で与えると、寿命短縮は著しい。

以上の結果から、線量率を下げると影響は著しく小さくなり、負の線量率効果のようなものは認められない。胸腺リンパ腫の潜伏期は若年時照射で短い傾向を示しているが、これはヒトの固形腫

瘍のデータとは一致しない。本実験に使用したマウスの組織学的な検索は現在も続行中であり、今後発表される低線量率のデータに重大な関心が寄せられている。

謝辞

本研究の遂行に当ってマウスの生産および照射施設の維持管理に協力された技術部動植課および技術課に謝意を表す。

〔研究発表〕

1. Shiragai, A., Sato, F., Kawashima, N., Kobayashi, S., Otsu, H., Seki, M. and Maruyama, T. : Absorbed Dose Estimates in a Prolonged Caesium — 137 Gamma Irradiation Facility for Mice. *J. Radiat. Res.*, 21, 118—125, 1980.
2. 大津裕司：低線量率照射による発がん，第14回放医研シンポジウム報文集（印刷中）。

3. 各種照射様式による放射線発癌に関する研究

(2) 感受性の年齢依存性

佐々木俊作 (障害基礎研究部)

春日 孟 (生理病理研究部,

現所属: 東京医科歯科大学医学部)

川島 直行 (障害基礎研究部)

Influence of Physical and Biological Factors on Radiation Carcinogenesis: Age-dependence of Susceptibility of Radiation Carcinogenesis

S. Sasaki, T. Kasuga*, and N. Kawashima

Division of Radiation Hazards; *Department of Pathology, Faculty of Medicine,
Tokyo Medical and Dental University

This study was designed to elucidate the role of age at the time of irradiation as one of the biological factors influencing on radiation carcinogenesis. A particular interest was taken in carcinogenesis after irradiation at perinatal period.

Both sexes of B6WF₁ mice were irradiated at a late fetal period of 17 days of intrauterine age or at neonatal period within 24 hours after birth with doses ranging from 150 to 600 R of X-rays. The irradiated and control mice were allowed to live through life span, and careful autopsies were carried out. Age-specific and final incidences of various types of neoplasms were determined basing on histological examination. Neonatal mice were found to be highly susceptible to induction of the thymic lymphoma, liver tumor, and pituitary tumor. Dose-response relationship for the thymic lymphoma was different from

those for other tumors. The thymic lymphoma developed at a high incidence of approximately 50% after irradiation with 600 R, but there was no excess in incidence after irradiation with 200 R. The peak incidences were observed in mice irradiated with 400 R for the liver tumor and pituitary tumor. Statistically significant increase in incidence was detected in mice irradiated with 200 R for these two neoplasms. Mice of the late fetal stage were found to be able to respond to carcinogenic action of X-rays, though their susceptibility was lower than that of neonate except for the pituitary tumor. The lymphosarcoma developed during 100 to 300 days of age at a incidence of 23% in the female and 21% in the male after irradiation at late fetal period. Pathological type of the lymphosarcoma was not only thymic but also non-thymic which was characterized by systemic enlargement of lymph nodes

and massive infiltration into the various organs. Female mice of late fetal period seemed to be fairly susceptible to induction of the pituitary tumor, since the final incidence reached to 32% after irradiation with 150 R. There was statistically significant increase in incidence of the liver tumor in mice irradiated fetally, though it was apparent that susceptibility of fetal mice is lower than that of neonatal mice. Incidences of the ovarian tumor, lung tumor, and Harderian tumor were slightly but significantly higher than the control in mice irradiated neonatally and fetally. The bone tumor and adrenal tumor showed tendency to increase in incidence, but there was no significant difference from the control in this experiment.

Age-dependence of susceptibility to induction of various types of tumors was examined using female B6C3F₁ mice which were maintained in specific pathogen free condition. Mice were irradiated at a late fetal period of 17 days of intrauterine age, neonatal period of 0-day-old, suckling period of 7-day-old, pubertal period of 5-week-old, or young adult period of 15-week-old with doses ranging from 190 to 570 rad of ¹³⁷Cs gamma rays. The lymphosarcoma developed more frequently in mice irradiated at

0-day-old or 7-day-old than mice expised as adult. Susceptibility of mice at the late fetal period appeared to be not different from that of young adult. The myeloid leukemia did not develop after irradiation at fetal, neonatal, or suckling period, while irradiation of pubertal or adult mice lead to increase in incidence of this type of neoplasm. Neonatal and suckling mice were highly susceptible to induction of the liver tumor, but irradiation at pubertal or young adult period was not effective to induce the liver tumor. The malignant liver tumor was observed most frequently in a group irradiated at 7-day-old. The highest incidence of the ovarian tumor was seen in mice irradiated at pubertal period, though this type of tumor developed in excess in all irradiated groups. Mice of perinatal period are shown to be prone to develop the pituitary tumor when radiation was given. Slight but statistically significant increase in the bone tumor was detected after irradiation during bone growing period, namely from fetal to pubertal period, while adult mice seemed to be resistant to radiation-induced bone tumorigenesis. These results showed clearly that the perinatal period of mice is quite different from the adult in tumor spectrum after irradiation.

〔緒 言〕

被曝時の年齢は放射線発がんに影響を与える生体側の重要な要因の1つである。この研究では特に胎生期から性成熟期までの発育期の照射の効果を明らかにすることに重点を置いた。この時期に関心を持つ理由は次の通りである。(1)その第1は放射線生物学的に興味のある時期であるという点である。発がんの標的となる臓器や組織における増殖動態がそれぞれ固有の変化をこの期間に起す。また、発がんに影響を与える、あるいはその可能性があるとされる内分泌系や免疫系の活動状態も年齢と共に変化する。照射時年齢のちがいによる発がん効果の差異についての正確な情報が得られるならば、放射線発がんに影響する生体側の諸要因のそれぞれの相対的重要性をある程度推定できるであろうと考えた。

(2)放射線発がん実験に用いられる好適な実験系

はさほど多くはない。マウスのリンパ腫と骨髄性白血病、ラットの乳腺腫瘍が代表的な実験系であり、それぞれ特徴のある情報が得られている。放射線発がんに関して成り立つ普遍妥当性と腫瘍による特殊性を明らかにして行くためには、上記以外にも好適な実験系が必要である。この実験においては、照射時年齢と線量の異なるマウスの各実験群を終生飼育することから、放射線発がん研究のための新たな実験系を見出すことを1つの目的として行われた。(3)ヒトの胎児期被曝による発がんに関する疫学調査には、報告により大きな差異がある。すなわち、広島・長崎における原爆胎内被爆者には小児がんの発生率は増加しなかったと報告されているが、胎児期に診断用X線に被曝したことと小児がんの発生率増加との間には相関があるという報告がいくつか存在する。この問題を

強く意識して実験が計画された。一方、動物実験からの知見は充分とはとうてい言えないと思われた。1960年代までの最も信頼度の高いとされる実験はRF系マウスを用いたものであり、その結果は胎生期の照射によっては骨髄性白血病と胸腺リンパ腫の発生率は増加しなかったというものであった。1970年代に入ると、胎生末期のB6C3F₁マウスへの照射により肝腫瘍と肺腫瘍の発生率の増加が認められたという報告が出された。放射性ヨウ素の甲状腺腫瘍誘発については、胎生後期の投与の方が成体への投与よりも大きな効果を持つことを明確に示した実験の結果が、マウスとラットについて別々の研究グループによりほぼ同時に報告された。当研究所においてはマウスをその生涯にわたって良好な条件で飼育することが可能であり、長期実験に適した系統を選択することも可能である。この点を活用して胎生期のマウスへの照射の発がん効果を詳細に検討する実験を計画した。また、マウスはヒトに比べてはるかに早い発育段階で出生するので、新生期の照射の発がん効果を明らかにすることにも重点を置いた。

〔実験結果と考察〕

(1) 実験の概要

大別して3種類の実験を行なった。実験ⅠはC57BL/6JとWHT/Htとの雑種第1代、すなわちB6WF₁を用いたCV条件での終生飼育実験である。この実験では周生期の照射による発がんの特徴を明らかにすることに重点を置いた。実験ⅡはC57BL/6JとC3H/Heとの雑種第1代、すなわちB6C3F₁を用いたCV条件での800日令まで観察である。この実験は比較的小規模ではあるが、線量を300Rのみにしぼり照射時年齢の効果を相互に比較できるように計画された。第Ⅲの実験はB6C3F₁マウスを用いたSPF条件での最も規模の大きい終生飼育である。この実験では、特に潜伏期の長い腫瘍や発生率の増加がさほど大きくはない腫瘍についての正確な情報を得ることに重点を置いた。これらの実験では腫瘍の最終発生率のみならず、年齢別発生率を求め、いわゆる潜伏期の短縮に関しても情報を得ることに努めた。以上の主たる実験のはかに、胎生中期の照射の効果をj知るためにB6WF₁とC3Hを用いた小規模な実験を行なった。また、胎生末期の照射のリンパ肉腫誘発効果を確認するために、B10を用いた実験を追加した。

(2) 周生期の照射による発がんの特徴

B6WF₁マウスの実験の結果を述べる。出生当日と胎生17日の照射の効果を対比しながら実験は進められた。マウスはヒトよりもはるかに早い発生段階で出生することは周知の事実であるが、マウスの胎生後期以後の各日令がヒトの胎令の何日に対応するかを決めることは必ずしも容易ではない。しかしながら、Rughらの記載等から推定して、マウスの胎生17日はヒトの約100日令前後に対応していると見られるし、マウスの新生期はヒトの胎生後半に対応していると見てよいようである。この点を強く意識して実験計画を立てた。図1は出生当日にX線を400R照射された雌における主な腫瘍の年齢別発生率を対照群のそれらと比較したものである。発生率の顕著な増加が見られた腫瘍は、胸腺リンパ腫、肝腫瘍および下垂体腫瘍で

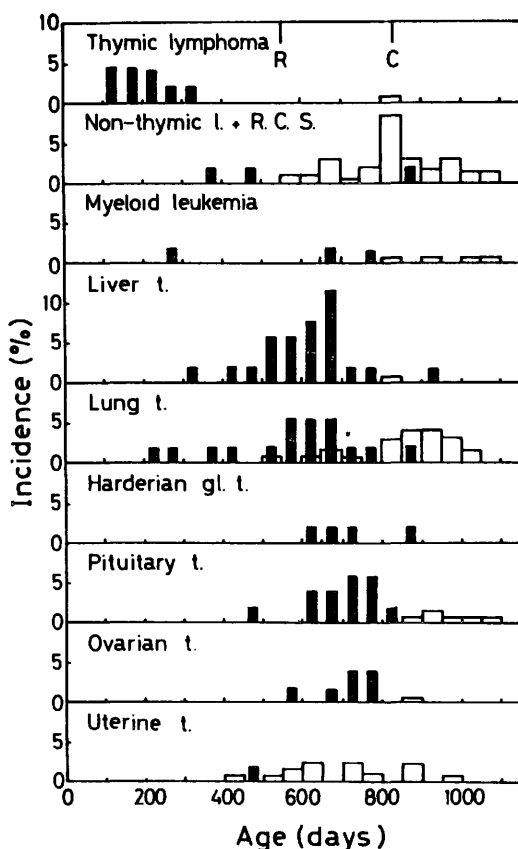


図1. 出生当日にX線を400R照射されたB6WF₁雌マウスにおける代表的腫瘍の年齢別発生頻度分布。■は照射群、□は対照群。

ある。さほど顕著ではないが発生率の増加が認められたのは、肺腫瘍、卵巣腫瘍、Harderian 腺腫瘍である。増加の傾向が認められたが統計的に有意ではなかったものに骨髄性白血病がある。骨髄性白血病はこの時期の照射によっては誘発されなかった。対照群でかなりの発生率が高いが照射によって発生率が全く増減しなかったのは線維肉腫などの軟部腫瘍である。いわゆる細網肉腫と子宮の平滑筋肉腫は照射により著減した。図2には胎生17日令に300Rを照射された雌における年令別発生頻度分布である。明らかに腫瘍発生スペクトラムは対照群のそれと異なる。つまり、胎生後期は放射線による腫瘍誘発に関して感受性を持っているのである。最も増加が大きいのは下垂体腫瘍であり、肝腫瘍と肺腫瘍がこれに次ぐ。この線量では胸腺リンパ腫は発生しなかった。概して、新生期と胎生後期のレスポンスは似ていると言えよう。感受

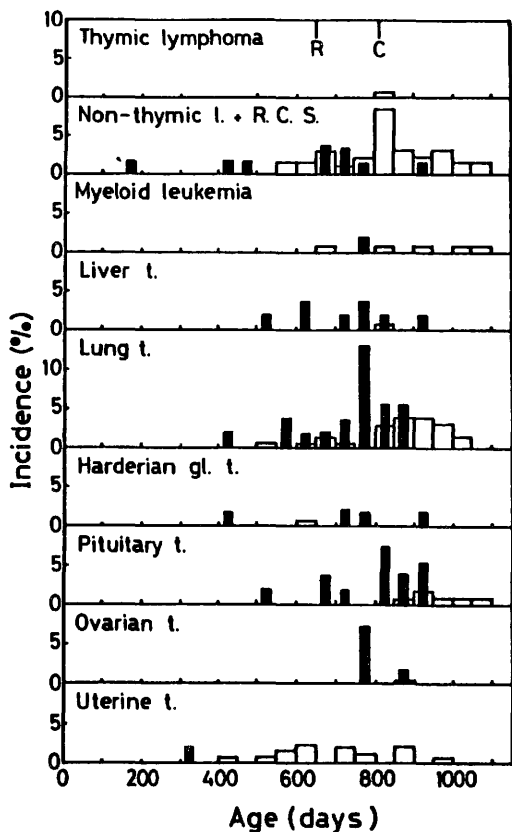


図2. 胎生17日にX線300Rを照射されたB6W F₁雌マウスにおける代表的腫瘍の年令別発生頻度分布。■は照射群、□は対照群。

性の比較は、実験ⅡとⅢの結果を見ながら後程述べることにする。新生期の照射により発生率が大幅に増加する胸腺リンパ腫と肝腫瘍について、その年令別頻度分布に及ぼす線量の影響と性差を図3と4に示す。胸腺リンパ腫の発生時期は線量により影響を受けない。線量効果関係は下に凸の曲線であり、直線性は否定できる。一方、肝腫瘍は照射線量に依存して潜伏期が短縮する。この効果は雄において著しい。線量発生率関係のピークは400Rに見られ、その発生率も雄の方が高い。照射線量200Rでは、胸腺リンパ腫の発生率には有

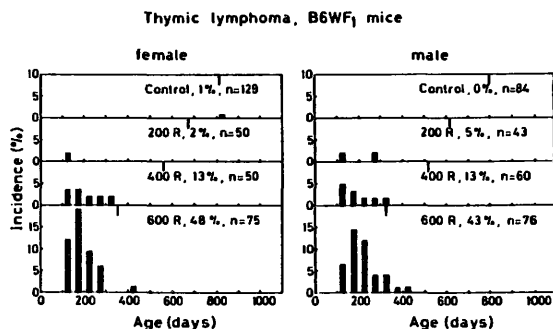


図3. 出生当日にX線を照射された雌雄のB6W F₁マウスにおける胸腺型リンパ肉腫の年令別発生頻度分布。線量は上から0, 200, 400, 600R. 最終発生率は各段の右上に示す。

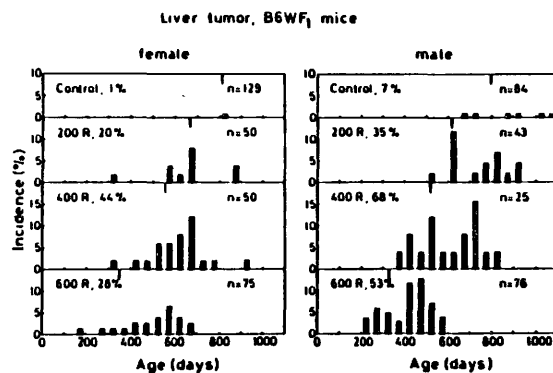


図4. 出生当日にX線を照射された雌雄のB6W F₁マウスにおける肝腫瘍の年令別発生頻度分布。線量は上から0, 200, 400, 600R. 最終発生率は各段の右上に示す。

の増加は認められないが、肝腫瘍の発生率増加は十分に有意である。さて、胎生後期や新生期の照射によって何種類もの腫瘍の発生率が増加したのであるが、その組織学的特徴は決して“小児がん”と相同のものではないことは注目しておくべきであろう。

(2) 腫瘍誘発に関する感受性の年令依存性

胎生17日、出生後0日、7日、5週、15週の感受性を比較した。B6C3F₁ マウスを用いた実験ⅡとⅢの結果の中から述べるが、リンパ肉腫についてのみはB6WF₁ マウスのデータを示す。

(3.1) リンパ肉腫 図5に雌のB6WF₁ マウス

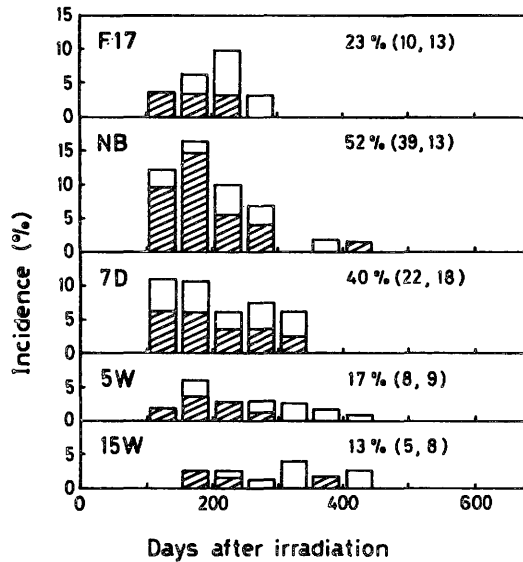


図5. リンパ肉腫の誘発に関する感受性の年令依存性。照射後の照射後の日令に対する発生頻度分布として表現した。▨と□は、それぞれ胸腺型と非胸腺型のリンパ肉腫の発生率。B6WF₁ 雌マウス、X線600R。照射令は上から胎生17日、出生当日、7日、5週、15週。

にX線を600R照射後のリンパ肉腫の発生頻度分布と最終発生率を示す。最も高い発生率をもたらしたのは0日の照射であり、7日の照射がこれに次ぐ。特筆すべきことは、胎生17日の照射によってもリンパ肉腫の発生が見られたことである。その発生率は新生期照射場合より低い、5週や15週照射の場合より低いことはない。新生期の照射後に発生するリンパ肉腫は胸腺型が多いが、他の時

期の照射後に発生するものは、非胸腺型がかなり含まれる。頸部や腋窩リンパ節などの表在性のリンパ節が腫大するリンパ肉腫で、しばしば全身にびまん性に広がる。胎生後期や新生期の照射により発生する非胸腺型リンパ肉腫には全身び漫型が多い。(3.2) 骨髄性白血病 図6はB6C3F₁ 雌マウス

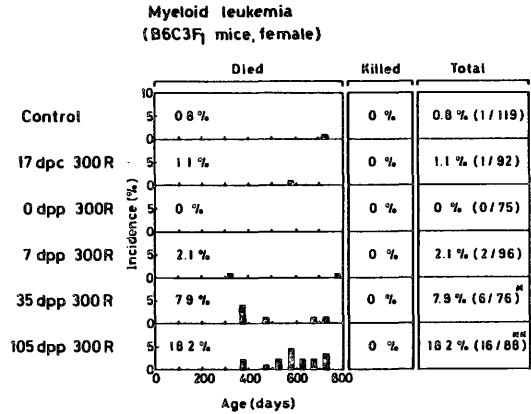


図6. 骨髄性白血病の誘発に関する感受性の年令依存性。B6C3F₁ 雌マウス(CY), X線300R。dpc, dppはそれぞれ妊娠日令、出生後日令を表わす。

にX線を300R照射した後の骨髄性白血病の年令別発生頻度分布の比較である。胎生17日と新生期の照射によつては発生率は増加しない。15週の照射が最も効果が大きく、5週令照射の効果はこれよりやや小さい。B6C3F₁ マウスにおける骨髄性白血病の発生時期はR F系マウスで報告されているよりはかなり遅い。マウスの胎生後期や新生期には肝において活発に造血が行われているが、これらの幹細胞は骨髄性白血病誘発の標的細胞にはなり得ないのかもしれない。

(3.3) 肝腫瘍 図7に実験Ⅱの結果をまとめた。0日令と7日令の照射により肝腫瘍の発生率は大幅に増加した。悪性腫瘍の誘発に関しては7日令の照射が最も効果が大きい。胎生17日令の照射によつても発生率は有意に増加したが、5週令と15週令の照射によつては発生率が増加しなかった。従来の報告を見ると、成体への放射線照射のみでは肝腫瘍は誘発されていないが、これに加えて肝部分切除や四塩化炭素により増殖を誘起すると照射線量に応じて腫瘍発生率が増加することが知られている。周生期のマウスが肝腫瘍誘発に関して高い感

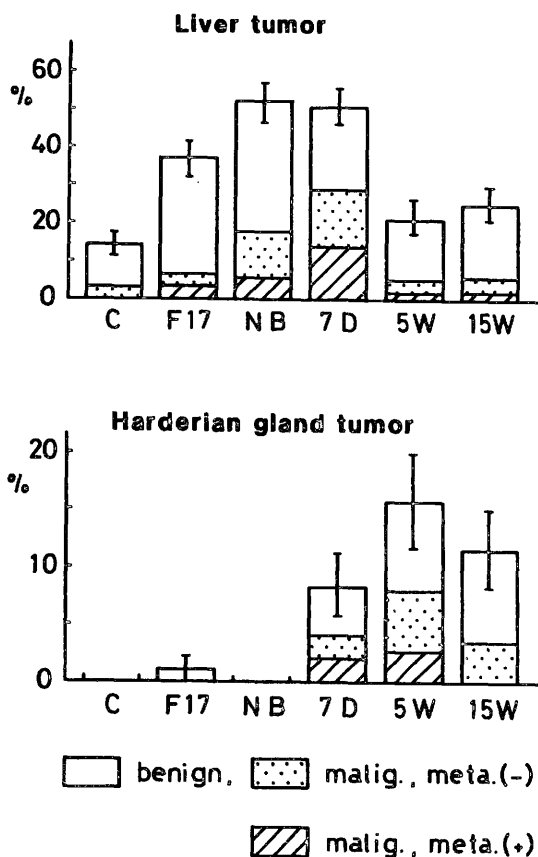


図7. 肝腫瘍（上段）とHarderian腺腫瘍（下段）の誘発に関する感受性の年齢依存性。B6C3F₁雌マウス(CV), X線300R. 実験群は左から対照群, 胎生17日照射群, 出生当日照射群, 7日令照射群, 5週令照射群, 15週令照射群。

受性を持つことは、この時期の肝細胞の高い増殖活性と強く相関しているように思われる。

（3.4）Harderian 腺腫瘍 この腫瘍は肝腫瘍の場合とは逆に成体期の照射の方が効果大きい。7日令はかなり高い感受性を有する（図7の下段）。周生期の感受性が低いことと、この時期の腺が小さくかつ増殖活性が低いことは相関しているように思われる。

（3.5）下垂体腫瘍 この腫瘍の潜伏期は全ての腫瘍の中で最も長い。実験Ⅲの結果を図8に示す。新生期は成体期より明らかに感受性が高く、胎生後期は新生期と同等あるいはやや高い感受性を有する。線量発生率関係は190rad で既にプラトーに達していると思われる。

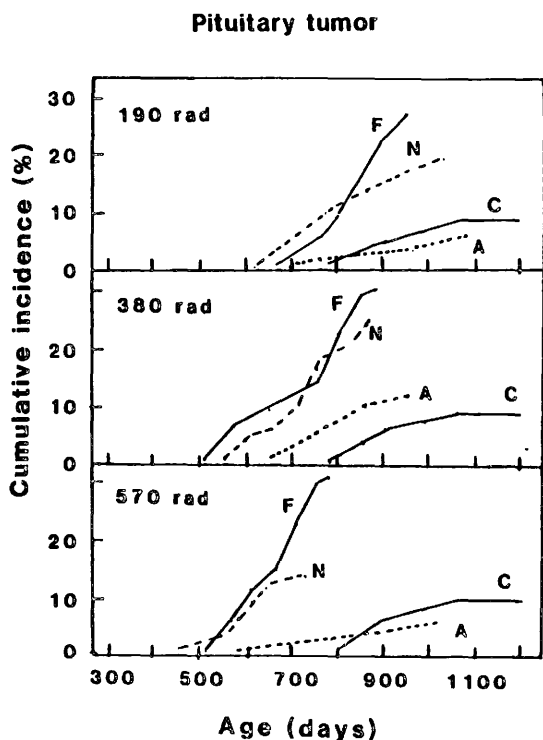


図8. 下垂体腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性。B6C3F₁雌マウス(SPF), ¹³⁷Csガンマ線。図中の記号C, F, N, Aはそれぞれ対照群, 胎生17日照射群, 出生当日照射群, 15週令照射群を表わす。

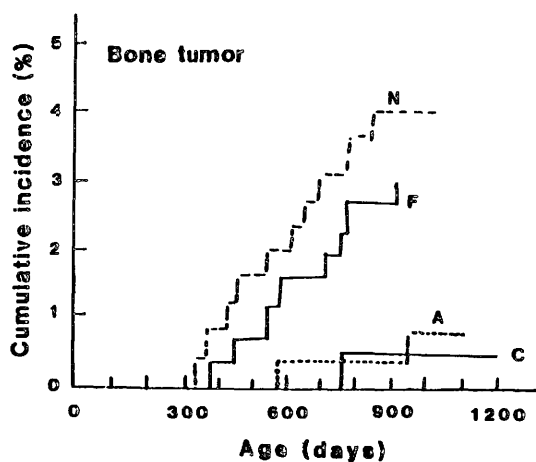


図9. 骨腫瘍の誘発に関する感受性の年齢依存性。B6C3F₁雌マウス(SPF), ¹³⁷Csガンマ線。図中の記号C, F, N, Aの意味は図8と同じ。各照射群のデータは線量により分けずに合せられた。

(3.6) 骨腫瘍 最終発生率はさほど高くないが、照射による発生率増加は有意であった。図9は実験Ⅲの結果である。15週令の照射は発生率を増加させなかったが、新生期と胎生後期の照射により骨腫瘍が発生した。この図には示されていないが、5週令の照射も骨腫瘍誘発に関して有効であった。腫瘍発生部位は全身の骨格に分布したが、腰椎と後肢が最も多かった。

(3.7) その他の腫瘍 卵巣腫瘍は全ての照射群において発生率が増加していたが、最も高い発生率は5週令照射群に見られた。肺腫瘍の発生率は200～400R 照射群において増加していた。感受性の年令依存性は明瞭ではなかったが、周生期の照射の方が成体期のそれよりやや効果が大きい傾向が見られた。副腎の腫瘍も照射により増加したが、感受性の年令依存性ははっきりしなかった。

(4) 胎生中期の照射の腫瘍誘発効果

胎生12日のB6WF₁ マウスにX線200Rを照射した終生飼育実験では、寿命短縮は認められたが腫瘍発生率の増加は全く見られなかった。むしろ発生率が低減した腫瘍がいくつかあった。この低減は寿命短縮によるものであろうと推察される。C3H雄マウスの胎生12日にガンマ線142 radを照射した実験では寿命では寿命短縮効果は認められなかった。肝腫瘍の発生率は対照群よりもやや低かったが有意差ではなかった。これらの事実から胎生中期のマウスは放射線による腫瘍誘発に関する感受性を全く持たない結論された。

〔総括〕

これまでに述べた実験により得られた腫瘍誘発に関する感受性の年令依存性をまとめたのが表1

表1 B6WF₁ マウス及びB6C3F₁マウスにおける腫瘍誘発に関する感受性の年令依存性

腫 瘍	胎生中期	胎生後期	新 生 期	思 春 期	成 体 期
リ ン パ 肉 腫	—	+	++	++	+
骨 髄 性 白 血 病	—	—	—	—	++
肝 腫 瘍	—	+	++	(+)	—
Harderian 腺腫瘍	—	(+)	(+)	+	+
下 垂 体 腫 瘍	—	++	++	+	(+)
卵 巣 腫 瘍	—	+	+	++	+
肺 腫 瘍	—	+	+	(+)	(+)
骨 腫 瘍	—	+	+	+	—

(+) …増加の傾向が見られるが、有意差とならないことが多い。

である。この表では5週令を思春期、15週令を若い成体期と表現した。それは、マウスの性成熟は35～40日に起り、骨格の成長は約100日令まで続くことが知られていることによる。腫瘍の型によりその誘発に関する年令依存性はそれぞれ異なっている。大別して、新生期の照射が大きな誘発効果を持つ腫瘍、若い成体期の照射が大きな誘発効果を持つ腫瘍、感受性の年令依存が大きい腫瘍の3つに分けることができよう。新生期の照射が誘発効果が大きい腫瘍は、リンパ肉腫、肝腫瘍、下垂体腫瘍

である。若い成体期の照射が大きい誘発効果を持つ腫瘍は骨髄性白血病と Harderian 腺腫瘍である。表1から明らかなように、思春期は新生期と若い成体期の中間の性格を持ち、腫瘍発生スペクトラムは広い。成体期に達すると感受性が低下する腫瘍がいくつか存在する。胎生後期のマウスのレスポンスは新生期のそれに似ている。下垂体腫瘍の場合を除いて、感受性は新生期のそれよりかなり低い。胎生後期のマウスが放射線発がんに関して感受性を持つという実験結果のほとんどは新

知見である。放射性ヨウ素によるマウスの甲状腺腫瘍 (Walinder and Sjoden, 1973), 同じくラットの甲状腺腫瘍 (Sikovら, 1973) X線による肝腫瘍と肺腫瘍 (Vesselinovitchら, 1974)の誘発に関して胎生期の投与または照射が効果を持つという報告が存在する。興味深いのは, 胎生後期の照射が発がん効果を持つという点が今回の我々の実験結果と一致しているという事実である。

放射線発がんに関する感受性の年齢依存性については今後次の点についてのデータを得る必要がある。第1は胎生期の何日令から感受性を有するようになるかについてである。第2は, 若い成体期に達した後に中高令期に至るまでに感受性がどのように変化するかについてである。

発 表

1. Sasaki, S., Kasuga, T., Sato, F., and Kawashima, N. : Late Effects of Fetal Mice Irradiated at Middle or Late Intrauterine Stage. *Gann*, **69**, 167-177, 1978
2. Sasaki, S., Kasuga, T., Sato, F., and Kawashima, N. : Induction of Hepatocellular Tumor by X-irradiation at

これまでの実験から, 肝腫瘍, 下垂体腫瘍, Harderian 腺腫瘍などのいわゆる固型腫瘍は, 低線量側ではリンパ造血系の腫瘍よりも誘発されやすいかもしれないことが示唆されている。放射線による固型腫瘍誘発に関する研究はリンパ造血系腫瘍に比べて手薄である。固型腫瘍を誘発するための条件をこれまでの研究で知ることができたので, データの集積を図りつつ研究を深めて行きたいと考えている。

謝 辞

本研究の遂行に当って, 動植物管理課の多くの方々および非常勤職員渡辺トラヨ氏, 渡辺照子氏の御協力をいただいた。ここに記して謝意を表する。

Perinatal Stage of Mice. *Gann*, **69**, 451-452, 1978

3. Sasaki, S. and Kasuga, T. : Life-shortening and Carcinogenesis in Mice Irradiated Neonatally with x Rays. *Radiat. Res.*, **69**, 313-325, 1981
4. 佐々木俊作 : 周生の照射による発がん, 第14回放医研シンポジウム報文集 (印刷中)

4. 造血の“場”の機能と副腎皮質ホルモンが放射線誘

発骨髓性白血病の発症に及ぼす影響に関する研究

関 正利, 吉田和子, 西村まゆみ, 野島久美恵
(生理病理研究部)

Factors which Influence the Induction of Myeloid Leukemia of C3H/He Mice by Irradiation

M. Seki, K. Yoshida, M. Nishimura and K. Nojima.
Division of Physiology and Pathology

1) Development of *in vitro* CA membrane method.

A method of hematopoietic colony formation with peritoneal cell layer *in vitro* has been developed. The cell layer consisted of macrophage and fibroblast (M-F layer) is formed on the surface of cellulose acetate membrane (CA membrane) inserted into peritoneal cavity of mouse. M-F layer elaborates CSF and the granuloid colonies develop in this M-F layer *in vitro*, as well as *in vivo* after bone marrow cell seeding. When erythropoietine is added in culture medium, development of the erythroid colonies is also observed. Heavy X-irradiation of the M-F layer prior to bone marrow cell seeding has an augmentative effect on the growth of granuloid colonies.

Radiation-induced myeloid leukemia cells, which form only clusters in the usual methylcellulose culture, grow into colonies consisted of several hundreds cells in M-F layer, suggesting contribution of some microenvironmental factor(s). Production of leukemic virus by M-F layer was also proved by this new culture system.

2) Study of radiation leukemia of C3H/He mice

with special reference to the effect of adrenocortical hormone.

Male conventional and SPF C3H/He mice, 8–10 weeks of age, were administered metyrapone *per os* for 12 days in order to introduce hypoadrenocortical condition. At the middle day of this treatment, the mice were subjected to 50, 150, 300 and 500 rads of single whole body irradiation. CV mice were irradiated by X-ray and SPF mice by γ -ray, respectively. Mice without metyrapone treatment were also irradiated in the same manner. Two groups of mice irradiated 300 rads with or without metyrapone treatment were injected with 1 mg of predonine just after the irradiation. Intact and metyrapone treated mice served as unirradiated control. Each experimental group was consisted of more than 100 mice.

Four types of hematopoietic neoplasm were classified by means of morphological and hematological examinations and transplantation assay; thymic lymphoma, non-thymic lymphoma, myeloid leukemia (including erythroleukemia and megakaryoblastic leukemia) and reticulosarcoma type A. Incidence of myeloid

leukemia revealed clear dose-response relationship, having a peak at about 300 rads. Thymic and non-thymic lymphoma also increased by irradiation. Reticulosarcoma didn't show any relationship with irradiation. While metyrapone treatment didn't affect the incidence of any type of leukemia, however, administration of predonine promoted the occurrence of myeloid leukemia, significantly.

〔緒 言〕

実験血液学近年の進歩は、造血幹細胞の分化増殖の統御について、幾多の知見を明らかにした。特に重要なのは、種々の分化段階の幹細胞が、それぞれ独自の刺激因子、抑制因子によりその増殖の統御を受けること、更に造血組織の基質細胞が、いわゆる造血の“場”として、これらの統御機構の中核的な役割を演ずることである。この様な“場”の機能は又、白血病の発症にも少なからぬ関わりを持つものと考えられる。

白血病という疾患は、造血幹細胞の腫瘍化と定義される。放射線の晩発障害としての白血病を考える場合、造血幹細胞に対する直接的影響、すなわちこれに腫瘍性トランスフォーメーションを起させる初発としての効果と、これを疾患として成立せしめる促進効果を考えねばならない。前者はDNAに与えられた比較的微弱な損傷として理解されるが、後者は照射によって斉らされた個体レベルでの異常、例えばホルモンの変動、免疫機能の変調、微弱な感染症の成立等が、直接・間接に関与することによって造血系を刺激し、トランスフォームした幹細胞の腫瘍としての増殖を斉らすものと考えられる。換言すれば照射による白血病誘発の過程には、複雑な生体統御機構が本質的に関与しているのである。もしこの統御機構の一部に、何かある歪みを与えてやれば、これが白血病発生頻度の変化として現われて来る可能性がある。これは一方では白血病を起し易い“体質”の解明の手かかりともなろうし、又発症頻度を有意に増加せしめ得れば、現在直接的な証明が極めて困難な低線量域（50ラド以下）での危険度を検証する手段ともなり得るであろう。

以上の観点から、吾々は標記の課題を掲げて、10年間にわたる研究を行って来た。当初は“場”の機能をより良く理解し、殊に白血病細胞増殖と

In this strain of mice, very high natural incidence of hepatic tumor was observed, which was not affected by irradiation. Complication of leukemia and hepatoma was encountered very frequently, especially after 450 days of experiment. Increase of Harder's gland tumor, sarcoma of soft part, adrenal and bone tumor by irradiation was also proved.

“場”の機能の関わりを追求することを目的として、*in vitro* CA膜法と名付けた新培養法を開発した。又これと平行して、大規模な動物実験の系統を撰ぶ為の予備実験を行ない、C3H/Hefマウスが、照射により高率に骨髄性白血病を起すことを知った。晩発障害実験棟の完成と共に、この系統のマウスによる骨髄性白血病発生頻度の線量効果関係、及び副腎機能の異常が如何なる修飾効果を有するかにつき、大規模な動物実験を行った。以下順を追ってその成果を報告する。

実験Ⅰ 白血病と造血の“場”に関する研究

in vitro CA膜法の開発とその応用

〔実験方法〕

セルローズ・アセテート膜（CA膜）の小片をマウスの腹腔中に手術的に挿入し、その表面にマクロファージ・線維芽細胞層（M-F層）を形成せしめ、これを人工的な造血の“場”として、その中に造血細胞のコロニーを形成させる *in vivo* CA膜法を基とし、培養条件下でコロニーを形成せしめるのが *in vitro* CA膜法である。その詳細は原著その他に譲るが、この培養法ではM-F層がCSF産生能を有する為、特別の刺激因子を加えることなく顆粒球系コロニーが形成され、又エリトロポエチンを加えることにより赤芽球系コロニーも形成される。

この方法を用い、放射線によりC3H/Heマウスに誘発された可移植性骨髄性白血病細胞（H1KMY細胞）の増殖動態を調べ、通常のメチルセルローズ培養法のそれと比較した。

また白血病ウィルスとの関係を調べる為、フレンドウィルスを接種したマウスにCA膜を挿入、そのM-F層の移植、ウィルス産生能についての電顕的検索を行ない、この様なM-F層の造血コロニー形成能を検索した。

〔結 果〕

1) H I K M Y細胞の増殖

H I K M Y細胞はC S Fを添加したメチルセルローズ培養法によってはクラスター（構成細胞数50ヶ以下）は形成するものの、コロニー（構成細胞数50ヶ以上）迄は発達しない。この白血病性クラスター形成細胞は、H I K M Y細胞を移植されたマウスでは移植後3～4週にかけて急激に増加し、5週目には 1×10^5 箇の骨髓細胞当り1760箇に達した。一方、*in vitro* CA膜法によれば、H I K M Y細胞はM—F層中で増殖して、数百箇の細胞から成るコロニーを形成する。このコロニーは骨髓芽球、前骨髓球程度の幼若細胞より成るが、これらはペルオキシターゼ反応陰性及至弱陽性で、且調べた範囲ではすべてのコロニーよりH I K M Y細胞特有のマーカー染色体が証明されたことから、白血病性コロニーと考えられた。

このコロニー形成細胞も、マウスの体内で移植3～4週にかけて急激に増加し、5週目には 10^5 箇の骨髓細胞中に2466箇と、メチルセルローズ法によるクラスター数と、ほぼ同レベルの増加を示した。

M—F層の培養上清を加えてメチルセルローズ法によりH I K M Y細胞の培養を行ったが、白血病性コロニーは出現しなかった。

2) 造血の“場”とウイルス性白血病との関係

フレンドウイルスに感染したマウスが形成したM—F層を電顕的に検索すると、線維芽細胞よりC型ウイルスの芽出が確認された。この様なウイルス産生能はM—F層を4000ラド照射した後、7日間培養した時点にも存在し、これを正常マウスに移植すると、すべての動物が定型的なフレンド白血病により死亡した。

このM—F層を用いて、*in vitro* CA膜法により、正常骨髓細胞を培養すると、エリトロポエチンを加えること無く赤芽球系コロニーが形成され、更にこれにエリトロポエチンを加えると、正常M—F層に比しはるかに良好な赤芽球系コロニーの発達が見られた。又正常では殆んど出現しない骨髓巨核球のコロニーが出現した。

〔考 察〕

造血の“場”のモデルとしての*in vivo* CA膜法を基として、*in vivo* CA膜法の欠点の一つであった宿生からの影響を除いた形で、“場”の機能を

検索することが可能となった。

in vitro CA膜法で検索した結果、白血病細胞の増殖には“場”の機能が深い関わりを持つこと、“場”の細胞が白血病ウイルスの産生母地として働くこと等が明らかとなり、白血病の発症・進展に対する“場”の機能の意義を明確にした。

実験Ⅱ 放射線誘発骨髓性白血病と副腎機能との関係についての予備実験

〔実験方法〕

本所生産の、生後8～10週令のC3H/Hef CV雄マウス32匹を、副腎皮質ホルモン合成阻害剤であるメチラポン（MP：メトピロン、CIBA 社製）を2.5mg/mlに溶解した飲料水により、12日間飼育した。飲用開始後6日目に、X線により300ラド全身照射した。マウスはその後通常の飲料水、固型飼料（船橋農場製）により、実験動物観察棟（dirty conventional）で飼育し、経過を観察した。死亡したマウスは剖検により死因を検索した。

〔結 果〕

照射後285日から504日迄の期間に、10例が白血病により死亡した。この白血病はすべて、赤白血病を含む骨髓性白血病であった。

〔考 察〕

従来マウスの放射線誘発白血病の大部分は、胸腺リンパ腫を主体とするリンパ性白血病であって、骨髓性白血病はR F M、S J L/J等比較的特殊な系統にのみ見出されていた。一方ヒトの放射線誘発白血病の大部分は骨髓性であって、この食い違いが動物実験からの外挿の障害の一つとなっていた。今回の予備実験で、極めてありふれた、従って充分の供給数を期待出来る系統が骨髓性白血病誘発実験に使用出来ることが明らかとなった。更に、副腎皮質機能不全の状態が、白血病発生を促進する可能性も示唆されたので、晩発障害実験棟の完成と共に、大規模な実験を開始することとした。

実験Ⅲ 放射線誘発骨髓性白血病と副腎機能との関係についての本実験

〔実験方法〕

マウス：放医研自繁のC3H/Hef雄マウス（C V及びS P F）の生後8～10週令を用いた。これらは晩発棟C V飼育室（Clean Conventional）及

びSPF飼育室において、NIH処方飼料（オリエンタル酵母社製）により飼育した。

照射：CVマウスはX線により、200KV、20mA、0.5mmCu + 0.5mmAl、60~65R/min、FSD50cmの条件で全身一回照射した。

SPFマウスは¹³⁷Csガンマーセルにより100R/minで同様に照射した。線量は共に50、150、300及び500ラドである。

メチラボン投与：予備実験と同じ。

プレドニン投与：300ラド照射及びMP+300ラド照射マウスの一部には、照射直後1mgのプレドニンを皮下注射した。

実験群の構成：表1に示す通りである。ただしマウス供給数の関係から、一回の実験は各群共10匹程度とし、毎月1回10ヶ月にわたり実験を反覆した。

表1. 各実験群における動物数

実験群	CV	SPF
対 照	110	100
メチラボン投与 (MP)	110	116
50 R	108	111
MP+50 R	109	120
150 R	110	111
MP+150 R	110	104
300 R	109	109
MP+300 R	111	115
300R+プレドニン(P)	109	105
MP+300R+P	110	109
500 R	110	106
MP+500 R	110	112

表2. 造血系新生物の発生頻度

実験群	CV (%)				SPF (%)			
	M	T	NT	RS	M	T	NT	RS
対 照	0.9	0	0	8.2	1.0	0	1.0	14.0
MP投与	2.7	0	0.9	6.4	1.7	0	0.9	7.8
50 R	2.8	0	1.9	5.6	5.4	0	1.8	9.9
MP+50 R	8.3	0	0.9	5.5	3.3	0	1.7	14.2
150 R	20.0	0.9	0	5.5	9.9	0	1.8	10.8
MP+150 R	17.3	0	0	4.5	15.4	0	1.0	12.5
300 R	22.9	0	0.9	5.5	22.0	1.8	2.8	9.2
MP+300 R	25.2	0	3.6	4.5	23.5	0	3.5	9.5
300 R+P	38.5	0	0	4.6	39.0	0	1.0	10.5
MP+300 R+P	31.8	0	0.9	3.6	35.8	0	1.8	6.4
500 R	13.6	0	2.7	4.5	16.6	1.9	3.8	15.1
MP+500 R	10.9	1.8	3.6	8.2	15.2	2.7	5.4	8.0

M……骨髄性白血病

T……胸腺リンパ腫

NT……非胸腺型リンパ腫

RS……細網肉腫A型

診断及び分類：死亡動物はすべて剖検し病理学的に検索した。白血病により瀕死状態となったものは屠殺して血液学的検索を行うと共に、脾細胞 1×10^7 ケを同系雌マウスに移植し、腫瘍性を検討した。又一部は染色体学的検索に供した。

造血系腫瘍は次の分類に従った。

1. 骨髄性白血病（赤白血病。骨髄巨核芽球性白血病を含む）
2. 胸腺リンパ腫
3. 非胸腺型

リンパ腫 4. 細網肉腫A型

【結 果】

1) 線量効果関係

造血系腫瘍の発現頻度を表2に示す。この系統の雄マウスの骨髄性白血病及び非胸腺型リンパ腫の自然発症頻度は、CV、SPF共1%程度で、胸腺リンパ腫は全く発生しない。細網肉腫A型は

CVで8.2%，SPFで14%と可成高率に自然発症する。MP投与では骨髓性白血病の僅かな増加が見られたが、有意性は疑問である。

照射は骨髓性白血病、非胸腺型リンパ腫を有意に増加させ、又少数ながら胸腺リンパ腫を発現せしめた。

骨髓性白血病は300ラドをピークとし、それ以下では線量にはほぼ比例する増加が観察された。CVとSPFについて比較すると、300ラド迄はSPFがCVより低値であり、500ラドでは逆に高値である。メチラポン投与の効果については、同一線量間で比較した場合、その頻度の高低には一定傾向が無いので、その差は誤差範囲内とみなされた。細網肉腫A型については、線量効果関係は全く認められなかった。

以上のデータに基づき、r線の白血病誘発に関するRBEを0.8とし、骨髓性白血病、胸腺型及び非胸腺型リンパ腫の三者を合併して画いた線量効果曲線が図1である。なお、CV・SPF両者の50ラド照射群及びMP+50ラド照射群の骨髓

性白血病の頻度は、非照射対照群・非照射メチラポン投与群のそれに比し、 $P<0.05$ で有意であった。

プレドニン投与の4群（CV及びSPF）は、同一線量でプレドニンを投与しなかった4群に比し、骨髓性白血病の有意の増加（ $P<0.0001$ ）、胸腺リンパ腫の無発生が共通して観察された。骨髓性白血病+胸腺リンパ腫+非胸腺型リンパ腫の頻度も、 $P<0.01$ の危険率で有意であり、プレドニンによる骨髓性白血病の増加は、リンパ腫からの転換で無いことが示された。

2) 造血系新生物の生物学的性状

白血病による死は、照射後最短125日で観察されたが、800日を越えるものもあった。骨髓性白血病による死が最も多発するのは、照射後1年半の時期である。一方、胸腺リンパ腫は若年期に限られ、老壮期には見られない。非胸腺型リンパ腫は全期間に汎って見られる。細網肉腫は1年未満では発生せず、被曝後2年目頃に多発する。これ等是一般に線量が高い程早期に発生する傾向があるが、例外も多いので、この点についての線量効果関係は求め得ない。

骨髓性白血病について、平均生存日数をCVとSPFで比較すると、明らかに前者が短縮を示した。300ラド照射の各4群における平均値と標準偏差は、CVでは 465 ± 20.9 日、SPFでは 516 ± 18.4 日で $P<0.02$ で有意差を示した。又明白な白血病症状を示してから死に至る迄の期間はCVでは 8 ± 5.3 日、SPFでは 18 ± 14.2 日と有意差を示した。

これ等の白血病の可移植性を表3に示すが、細

表3. 造血系新生物の移植成績

白血 病 病 型	症例数	移 植 成 績	
		例数	%
骨 髄 性 白 血 病	105	90	85.7
胸 腺 リ ン パ 腫	4	4	100
非胸腺型リンパ腫	7	5	71.4
細 網 肉 腫	16	4	25.0

網肉腫A型以外は高い陽性成績を示した。これ等は染色体学的にはすべて提供者由来であり、骨髓性白血病の場合、早田が見出したNa2染色体の異常は継代によっても維持されていた。

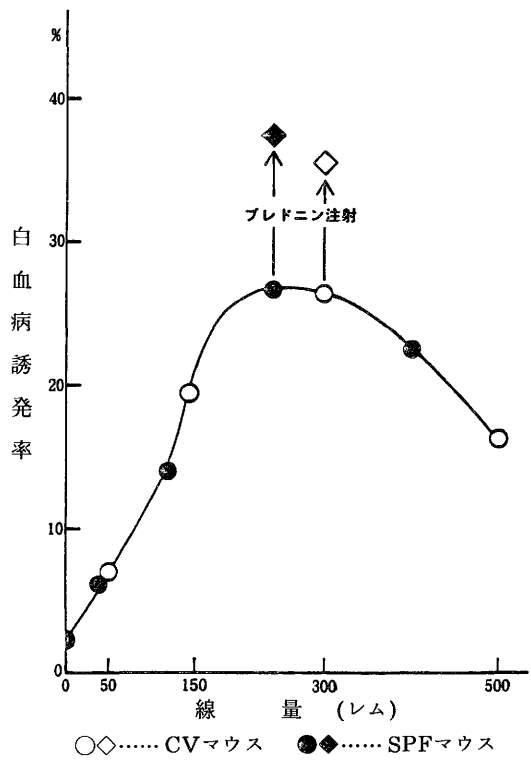


図1. 白血病誘発の線量曲線。

3) その他の腫瘍との関係

C3H/He マウスは、生後200日以降になると肝腫瘍を高率に自然発症する。その殆んどは肝細胞腫で、良性の腺腫と肝細胞癌を区別する。自然発症の頻度はCVでは93.6%，うち26.5%は悪性であり、SPFでは、85.7%，うち27.4%が悪性であった。

照射は肝腫瘍全体の発生頻度及び悪性腫瘍の発生頻度には殆んど影響を与えない。

肝腫瘍は例え良性腺腫であっても、出血、梗塞等を起し、死因となることがある。実験開始後1年迄は全く問題にならなかった肝腫瘍による死は、それ以後は急激に増加するので、死因の競合を来すようになる。肝腫瘍を主因として死亡した個体で、白血病の合併が病理学的に確認された率は、CVで3.8%，SPFで2.5%であった。

表4は細網肉腫を除く全白血病に、固型腫瘍を

表4. 白血病と固型腫瘍との合併率

	CV (%)		SPF (%)	
	肝腫瘍	その他	肝腫瘍	その他
対 照	0	0	50.0	0
MP	75.0	0	33.3	33.3
50 R	80.0	0	75.0	0
MP+50 R	50.0	10.0	66.7	0
150 R	56.5	4.3	61.5	15.4
MP+150 R	57.9	15.8	64.7	11.8
300 R	69.2	23.1	41.4	10.3
MP+300 R	62.5	9.4	48.4	22.6
300R+プレドニン	64.3	16.7	42.9	7.1
MP+300R+プレドニン	55.6	11.1	59.0	7.7
500R	38.9	16.7	39.1	34.8
MP+500 R	61.1	11.1	53.8	15.4

合併する頻度である。肝腫瘍の合併は、450日以降に死亡した例で著しく高い。その他の腫瘍としては、肺腫瘍(CV44.8%，SPF30.3%)，ハーダー腺腫瘍(CV17.2%，SPF36.4%)，副腎腫(CV17.2%，SPF9.1%)等が主なものである。

〔考 察〕

本実験で得られた骨髓性白血病発生についての

線量効果関係は、Upton 等がRFMマウスについて示したものと基本的には同一であり、300ラド附近にピークを持つ山型の曲線が得られた。特に50ラド照射が、非照射群に比し、5%の危険率で有意差を示したことは重要であり、今後更に検討を加える必要がある。ヒトの場合長崎のデータでは、50ラドで白血病は増加していない。

照射が直接もしくは間接的なストレスとして、副腎皮質ホルモンの一過性上昇を齎らすことは、良く知られた事実である。一般に副腎皮質のストレスに対する反応性は極めて個体差が大きい、これが白血病発症を支配する要因となり得るか否かを検討する為に、本実験は企画された。しかしメチラポン投与は、骨髓性白血病の誘発頻度に有意な影響を与えなかった。従って副腎皮質機能の低下状態は、骨髓性白血病発症に直接的な関わりを持たぬものと結論される。

これに対してプレドニン投与は、骨髓性白血病の頻度を有意に増加せしめた。その機構は今回の実験では明らかでないが、プレドニン自体の発癌性は、現在進行中の追加実験(開始後約700日)のデータからは、おおむね否定される。従って投与されたプレドニンの薬理作用が、何等かの促進効果を齎したものと考えねばならない。最も可能性のあるのが免疫系機能の減弱であって、放射線の作用とプレドニンの効果が相加されることにより、通常より強く且長期に汎る機能減退が起る可能性がある。これがトランスフォームした造血幹細胞の排除を妨げるか、あるいは照射後に起る感染症を助長することにより、顆粒球系の増殖刺激を長びかせ、これが促進効果となって骨髓性白血病の誘発率を高めることが考えられる。

C3H/He マウスは骨髓性白血病研究にとって優れた実験系であるが、唯一の欠点は肝腫瘍の多発である。照射後450日以降の白血病発症率は、死因の競合により多少の影響を受けているものと考えねばならない。

〔総 括〕

1) 造血の“場”の実験モデルとして、*in vitro* CA膜法を開発し、これを用いて白血病細胞増殖に際しての、“場”の機能の関与を明らかにした。又“場”の細胞が白血病ウイルスの産生母地として働くことを明らかにした。

2) C3H/He マウスの全身照射による白血病誘発実験を行ない、骨髓性白血病の発生頻度は

300ラド附近をピークとする典型的な線量効果曲線を描くことを明らかにした。又50ラド全身照射が、骨髄性白血病を有意に増加せしめることを知った。

副腎皮質機能低下は、白血病の頻度に影響しないが、プレドニン投与は、骨髄性白血病を有意に増加せしめることを知った。

3) 以上の様に、放射線による骨髄性白血病の誘発は、造血の“場”の機能及びホルモンにより、大きく影響されるものであることが結論される。

〔研究発表〕

- 1) 吉田和子, 関 正利: *in vitro* CA膜法による造血コロニー, 組織培養 **2**, 166—170, 1976.
- 2) Yoshida, K.: A Method of Hematopoietic Colony Formation In Vitro with Peritoneal Macrophage and Fibroblast Layer. *Acta Haem Jap.* **42**, 1—8, 1979.
- 3) 関 正利, 吉田和子: 白血病と造血の“場” 最新医学, **34**, 967—972, 1979.
- 4) Seki, M. and Yoshida, K.: Hematopoietic microenvironments. *Recent Advance in RES Research*, **20**, 37—45, 1980.
- 5) 関 正利, 吉田和子: 造血の“場”におけるマクロファージの役割, 医学のあゆみ, **119**, 655—661, 1981.
- 6) 関 正利: 造血系新生物, 実験動物の血液学 (関 正利, 平嶋邦猛, 小林好作編), ソフトサイエンス社 (東京), 121, 1981.
- 7) 関 正利, 吉田和子: 白血病細胞増殖と微小環境, 白血病のすべて第2版 (中尾喜久編), 南江堂 (東京), p.110, 1981.
- 8) 関 正利: 造血の“場”, 日本血液学全書 I. 血球の分化 (新版日本血液学全書刊行委員会編), 丸善 (東京), 389, 1982.
- 9) 関 正利, 吉田和子: 白血病の発症と進展を支配する要因, 血液幹細胞, その動態と分化 (妹尾左知丸編), 福武書店 (岡山), p.489, 1982.
- 10) 関 正利, 吉田和子: セルローズ・アセテート膜法, 同上, p. 531,
- 11) Hayata, Y., Seki, M., Yoshida, K., Hirashima, K., Sado, T., Yamagiwa, J. and Ishihara, T.: Chromosomal Aberrations Observed in the 52 Mouse Myeloid Leukemias. *Cancer Res.*, **43**, 367—373, 1983.

謝辞 本研究の遂行は、優秀な実験動物の供給、晩発障害実験棟の良好な管理、運営なくしては不可能であった。これ等の業務に携わった皆様に、厚く感謝致します。

又床替、水交換等実験動物の飼育管理の裏方を務められた歴代の研究補助者の皆さんにも深謝する次第です。

5. 血液幹細胞動態よりみた放射線誘発白血病の 発症機序

平嶋邦猛, 別所正美, 陣内逸郎, 川瀬淑子,
大谷正子 (障害臨床研究部)
室橋郁生 (病院部)
奈良信雄 (東京医科歯科大学医学部)
早田 勇 (障害基礎研究部)

Experimental Studies on the Mechanism of Radiation-Induced Myeloid Leukemogenesis Based on Hemopoietic Stem Cell Kinetics

K. Hirashima, M. Bessho, I. Jinnai, Y. Kawase, M. Ohtani, I. Murohashi*¹,
N. Nara*², and I. Hayata*³

Division of Radiation Health; *¹ Hospital; *² Tokyo Medical and Dental University;

*³ Division of Radiation Hazards

Experimental studies using inbred strain of mice, which show genetically a high incidence of myeloid leukemia after irradiation, can provide a suitable model system for human leukemia by a low dose radiation. The recent accumulation of clinical and experimental evidences is supporting the idea that abnormal proliferation and differentiation of hemopoietic stem cells play an essential role in the establishment of leukemia.

Present studies were promoted with the concept of malignant transformation of hemopoietic stem cells following radiation and subsequent predominance over marrow components, and consisted of two main subjects.

(1) The increased susceptibility of hemopoietic stem cells to Friend leukemia virus after a whole-body irradiation.

Preliminary experiments clearly demonstrated

that target cells for malignant transformation by Friend leukemia virus (FV) are pluripotential hemopoietic stem cells manifested as CFU-S by the splenic colony-forming method. Change of susceptibility to FV of CFU-S from C3H/He mice were measured by following two different methods.

At various times after single 1.5 and 3 Gy whole-body X-irradiation, a given volume of FV suspension was injected; one day thereafter spleen cells were collected and transplanted into BC3F1 mice. Ten days after transplantation, the number of tumor cell colonies (TCFU) in the spleen was counted. Secondly, at various times after lower doses of radiation (0.1 to 1.5 Gy), the marrow cells were collected, incubated with FV at 37° for 30 min and transplanted into BC3F1 mice, followed by the TCFU counting.

Following irradiation, the values of TCFU which represented the quantity of malignantly transformed CFU-S, increased significantly as compared with those of unirradiated control. The value of TCFU/CFU-S, determined two weeks after irradiation, indicates a susceptibility of CFU-S to FV. It revealed the linear dose-response relation over the dose range of 0.25 to 1.5 Gy. Together with other experimental results, it clearly demonstrated that the stem cells became more susceptible to FV during the regeneration period after irradiation, being indifferent from the immunosuppressive effect of irradiation.

(2) Experimental studies on the mechanism of radiation-induced myeloid leukemogenesis.

After a single whole-body X-irradiation of 3 Gy to male RFM/MsNrs strain mice, the occurrence of myeloid leukemia was found since 4 months and ceased 11 months.

The cumulative incidence reached 24.5%. The deletion of the #2 chromosome was detected in more than 90% of myeloid leukemic mice. Analysis to detect potentially leukemic cells (PLC) in irradiated mice was performed by the transplantation assay technique; i.e., at various times after 3 Gy to male mice, spleen cells were collected from irradiated mice without overt leukemia and transplanted into syngeneic 5 Gy-irradiated female recipients. Three months thereafter, recipients were sacrificed and the origin of leukemic cells was determined by the sex chromosome analysis if they were leukemic. PLC, as detected by the transplantation, were found in irradiated mice from 18 to 197 days after irradiation. The origin of leukemic cells was determined as donor-origin. PLC were never

detected when the spleen cells from unirradiated mice were transplanted.

The average rate of detection of PLC was 37.1% during this period. The maximal rate was observed during 3 to 4 months after irradiation and reached 83.3%. The peak rate of PLC was apparently higher than and preceded 3 months that of overt leukemia. This result led us to the idea that a fraction of mice having PLC developed overt leukemia later.

Simultaneously, change of pluripotent stem cells (CFU-S) and granuloid committed stem cells (CFU-C) in the marrow were measured after 3 Gy. The immediate decrease of CFU-S in the femur recovered to the pre-irradiation level within 1 month, whereas the recovery of CFU-C delayed and finally completed in 205 days' period. This prolonged depression of CFU-C compartment was clearly related with the presence of PLC. Moreover, the fraction of CFU-C in DNA synthesis increased in mice during the depression period as verified by the suicide experiments. In addition, lipopolysaccharide (LPS), a potent stimulator of differentiation of CFU-C to granuloid cells, administered after 3 Gy increased the incidence of overt myeloid leukemia. Present results were summarized as follows: a whole-body X-irradiation of 3 Gy to RFM mice induced the transformation of stem cells to PLC. The transformation was strongly associated with the proliferative state of CFU-C compartment induced by radiation. The proliferation of PLC clone resulted in the development of overt leukemia after 3 months or later, with a possible involvement of regulatory mechanism of the organism.

〔緒 言〕

放射線被曝に起因すると考えられる白血病発症の報告は、既に1911年、Jagié の報告にみられる。その後、放射線および放射線取扱者にみられた白血病の症例報告は、放射線と白血病発症の因果関係を示唆するものではあったが、これらの職業人被曝者の場合は、大線量の放射線被曝の結果であり、白血病発症には、放射線被曝線量の“し

きい値”が存在するのではないかと長い間考えられてきた。

1957年、Lewis は、1940年代に集積してきた放射線と白血病に関する疫学的データ（放射線科医、強直性脊椎炎X線治療、原爆被曝後生存者、胸腺肥大放射線治療児など）を基に検討を加え、白血病は1個の造血細胞にひき起こされる放射線

誘発突然変異に起因するものと考えざるを得ないので、白血病発生と放射線被曝の因果関係は、“しきい値”のない直線比例関係が成立するものとし、その比率は、100万人につき1ラドあたり年間1～2例の白血病発生になるものと見解を発表した。

この考えは、今日でもICRPの白血病による死亡のリスク評価基準、20/10⁶人/レムに生きている。

しかし、この考えに対し、Bruesらは、50～100ラドの所に、強直性脊椎炎X線治療患者や原爆被災者の例では、“しきい値”が存在するのではないかと考え、事実、疫学データで、数レムの線量で、白血病発生の有意差が立証されたのは、Stewart, MacMahonらの成績についてのみであり、しかもこの成績は、胎児被曝の場合である。今日、原子力産業の伸展に伴い、現実に被曝線量として問題となるのは数レムから10レム程度の低線量被曝の晩発性効果としての発がん（白血病発生）である

疫学調査において放射線被曝による発がんの増加分（過剰）を求める時の誤差を同じレベルに保つための必要な調査人数は、被曝線量の2乗に逆比例するといわれる。したがって、100ラドの被曝について10⁴人の調査人数が必要であれば、10ラドの場合は10⁶人という莫大な調査人数が必要となり、低線量被曝の影響を直接人間の集団の疫学調査から求める事は非常に困難な事が理解されるであろう。

疫学調査に対してマウスを用うる実験的検索の秀れている点として、マウスの放射線による白血病誘発率が高率で数%から適当な条件を選らべば、100%にも達するという点がまずあげられる。次に、マウスは、1920年代以降の実験の積みあげにより、純系化が進んでいる事がある。ヒトは、いうまでもなく雑種の動物集団であり、それに職業、環境などの因子が複雑に関与しているので、放射線影響の研究は単純ではない。マウスは、ある系統の動物を選び、適当な照射条件を設定すれば、発症している白血病の型と頻度が一定しているという利点もある。

しかし、一方、マウスを用うる放射線誘発白血病研究が、ヒトの被曝研究のモデルとして従来不適とされてきた論議として、マウスの放射線誘発白血病は胸腺リンパ腫の発症が多く、ヒトの放射線誘発白血病で主として問題となる骨髄性白血病の解析に、どこまでモデル実験系としての役割を果たし得るかということがある。次に、マウス白

血病では、ウイルスの関与が大きい事が実証されているにもかかわらず、ヒト白血病では、ウイルスの関与が実証し難いという事があった。

しかしながら、これらの難点については、マウスでも特殊な系統を選べば、骨髄性白血病の放射線誘発実験系を組む事は可能であること、また、最近のヒトでの成人T細胞白血病（adult T-cell leukemia）の研究成果から、ヒト白血病の発症も、レトロウイルス（retrovirus）の関与があることが明らかにされるに及んで、問題は水解したように思われる。

以上のような背景の下に、われわれは、放射線被曝の晩発性影響の研究に実験動物としてマウスを選び、骨髄性白血病発症のメカニズムを詳細に検討することを計画した。骨髄性白血病の発生は、臨床的な染色体解析及びglucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD)のアイソザイムの検索から、一ケの血液幹細胞の白血病細胞化に由来することが明らかにされている。また、1960年代以降の実験血液学の進歩に伴い、血液幹細胞の定量的解析法が可能となってきた。

そこで、われわれは、放射線誘発白血病発症のメカニズムを、血液幹細胞動態を中心として、検索を進める事とした。

われわれのこの10年間の研究過程は、大別すれば、2つの部分にわけられる。その一つは、研究の前半期になされたもので、白血病ウイルスと血液幹細胞の放射線被曝による関係を検討した成績である。次いで、放射線誘発骨髄性白血病の好発系であるRFM/MsNrs系マウスの供給が充分におこなわれるようになった研究の後半期になされた、骨髄性白血病の放射線誘発機序の解析実験である。

【実験結果と考察】

I Friend 白血病ウイルスの標的細胞に関する研究

1957年、Friendにより、発見されたC-タイプRNAウイルスによる赤白血病に関し、そのウイルスの標的細胞を明らかにするために以下の実験を行った。

1959年、Friendより癌研に譲られddY/OM系マウスで累代維持されてきたFriend白血病ウイルス株を放医研自繁のC3H/He系マウスに移植し、約7年間にわたって症状の発現が一定化してきた材料を用いて検索を進めた。

C3H/He系マウスにX線全身照射1.5Gyと、制がん剤 cyclophosphamide (CY) 215 mg/kg 一回注射後の多分化能幹細胞 CFU-S (colony-forming cell in spleen) と、赤芽球系に方向づけられた幹細胞 ERC (erythropoietin responsive cell) と、赤芽球の障害からの回復動態は、著しく異なった回復動態を示す事は先に見出していたので、この点を応用して次の実験を行った。X線 150 ラド照射、CY 215 mg/kg 一回注射後、種々の時期に、一定量の Friend 白血病ウイルスを接種して7日目の脾重量の変化を比較することにより、ウイルスの標的細胞を推定しようと試みた。その結果は、CFU-Sの障害回復曲線と最もよく一致した脾重量の変動が明らかにされた。

さらに、脾臓中の腫瘍化した細胞の定量法として、ThomsonのTCFU法 (tumor colony-forming unit) を用いて検討を行うと、ウイルス接種後一週間後の脾臓中の腫瘍細胞量は、ウイルス接種時におけるCFU-Sの量と最も良く一致することが証明された。(図1)

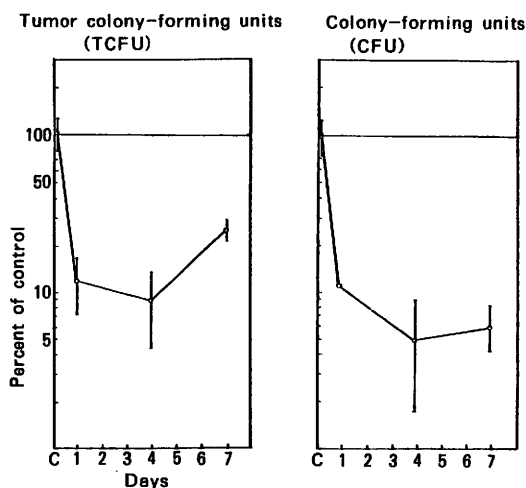


図1 X線1.5Gy照射後のCFU-Sの回復動態と照射後の各時期にFriend白血病ウイルスを接種し1週後の脾臓中のTCFUの数

II 放射線被曝後の血液幹細胞の Friend 白血病ウイルスに対する感受性の変化に関する研究

マウスの放射線誘発白血病の発症機序の一つの要因として、放射線照射により障害された造血細胞が回復してゆく過程で、再生期の活発な増殖期

にある細胞が、白血病ウイルスに対して感受性が高くなる機序が存在するのではないかということが、Upton & Kaplanらによって想定されてきた。そこで、われわれは、Friend 白血病の実験系で、この点を実験的に検討した。

C3H/He系マウスにX線3Gy及び1.5Gy一回全身照射を行った後、長時間にわたって、骨髓、循環血、脾臓中のCFU-Sの回復動態を検討すると、図2、図3に示すような結果となる。すなわち、1.5Gy照射後では第2週より第4週にかけて、流血中および脾臓中のCFU-Sの量が、正常対照動物に比較して増加する時期が、一過性に

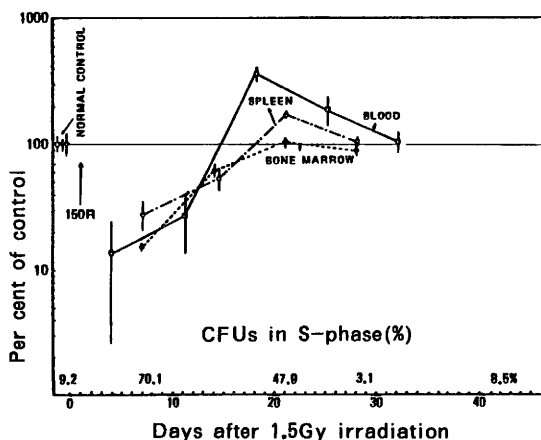


図2 X線1.5Gy全身1回照射後の骨髓、脾臓、循環血中のCFU-S量の経時的変化

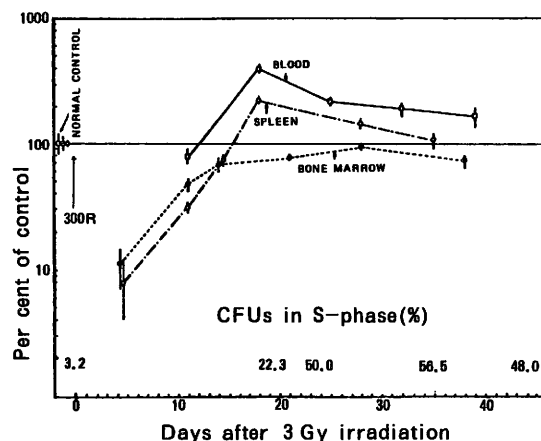


図3 X線3Gy全身一回照射後の骨髓、脾臓、循環血のCFU-S量の経時的変化

出現する。照射線量をふやして3 Gy にすると、その効果はさらに著明で、第2週以後、第6週にいたってもその効果は遷延して認められる。さらに、このような時期の骨髓中のCFU-Sの cell-cycle 上の状態を検討するために、比放射能の高い(50.7 Ci/m Mol)の ^3H -thymidine と37℃ 30分孵置した後に移植して効果をみる所謂 suicide 実験をおこなってみると、正常対照動物骨髓CFU-Sでは、10%以下の細胞しか cell-cycle 上になく、残りはいわゆる休止期(G_0)の状態にあるのに対して、照射後の回復期にあるCFU-Sは、DNA合成期にある細胞の比率が著しく増加する事実が認められた。

次に、1.5 Gy、3 Gyラド照射後の各時期に、十分量の Friend ウイルスを接種し、24時間後に、脾臓細胞を回収して、TCFU法により検討した所、照射後のCFU-Sの活発な再生期に一致して、Friend ウイルスにより腫瘍化する細胞の量が著増する現象が証明された。

このような効果が、さらに低線量照射の後も証明されるか否かについて、次のような実験を行った。

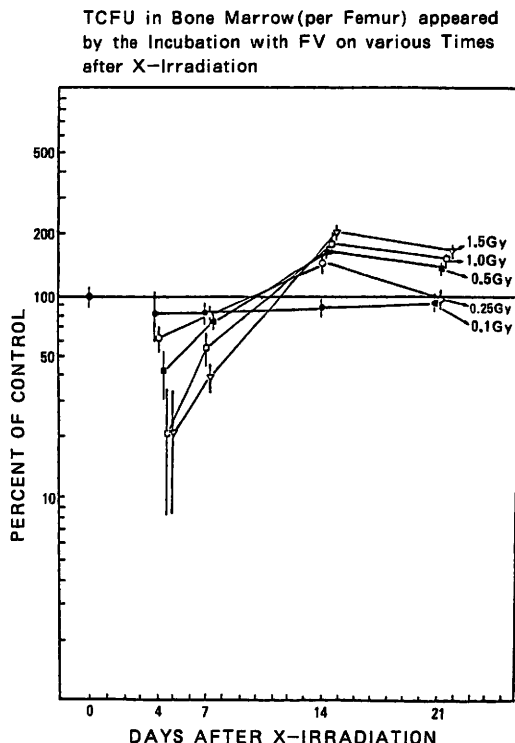


図4 Friend白血病毒により白血病細胞化した幹細胞の量

C3H/He 系マウスに、0.1, 0.2, 0.5, 1, 1.5 Gy一回X線全身照射を行った後、CFU-Sの回復動態を検討した。ついで、各線量照射後、経時的に採取した骨髓細胞の一定量を、一定量の Friend 白血病毒と37℃30分間孵置した後、3回洗滌し、これをBC3F1系マウスに接種するTCFU法を用いて、白血病毒により、白血病化した幹細胞の量を求めた。

その結果は、図4に示すように、0.5~1.5 Gy照射後に、非照射対照動物に比し、多くの幹細胞が白血病細胞化する現象が、照射後2~3週に認められた。

ここで表現された値は、白血病細胞化した幹細胞の量そのものなので、幹細胞1ヶあたりの白血病毒に対する感受性を示すために、白血病化した幹細胞の量TCFUをそのときの幹細胞量CFU-Sで除したTCFU/CFU-Sを求めて、照射後2週間目と3週間目の成績を、線量を横軸にして示したのが図5である。幹細胞の Friend

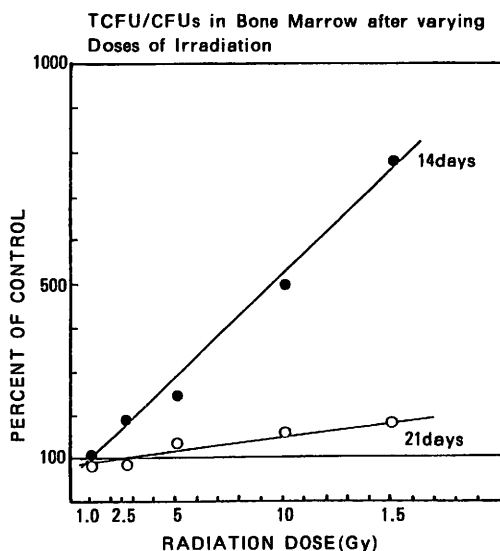


図5 X線全身一回照射後、2週、3週後の幹細胞の Friend白血病毒に対する感受性の差

白血病毒に対する感受性は、照射後2週間目にもっとも高まり、線量との間に直接的な比例関係が成立する。3週間後には比例関係は見られるが、感受性は低下してくる。

以上の Friend 白血病毒を用いた研究成績の結果は、従来、理論的には推定されながらも、

はっきりした実験的成績の乏しかった放射線誘発白血病発症機序のメカニズムの一つである放射線被曝後、内因性又外因性白血病ウイルスに対する標的細胞の感受性増大を初めて定量的に明らかに示したものである。特に、0.25 Gy 以上で2週間目に直接的な被曝線量との間に効果関係が認められた事は特筆に価する。

Ⅲ 放射線誘発骨髓性白血病発症機序の研究

緒言の所で述べたように、原爆被災者及び強直性脊椎炎放射線治療患者などの疫学的調査で、最も明確な放射線被曝の晩発性効果は、骨髓性白血病発症の増加である。適当な動物実験系を用いて、放射線照射により骨髓性白血病を頻度高く発症させることが出来れば、ヒトの晩発性効果のモデル実験系として極めて有用な事は明らかである。マウスの骨髓性白血病の放射線誘発は、今日まで、A. C. Upton らの Oak Ridge での莫大な実験成績や Mole の最近の実験である。マウスを用いる骨髓性白血病の放射線誘発実験は、原爆被災生存者などにみられる骨髓性白血病の頻度が、 10^{-5} から 10^{-4} に上昇する程度であるのに対して 10^{-2} ~ 10^{-1} に上昇すると云う頻度数が1000倍も高く、またマウスは、40年にわたって純系動物を作る努力が続けられたため、遺伝的素因を均一にした生体について実験解析を行うことが可能で、さらに有害細菌から隔離した飼育条件を定める事により、生体にかかる放射線の影響を、ヒトのような雑種の種々の生活環境を異にする集団での疫学調査で得る事の不可能な低線量域で検討できると云う利点がある。

マウスの骨髓性白血病発症については、適当な好発系を選ぶことがまず重要である。従来までの報告では、Upton らの RFM/Un 系、SJL 系、Mole の CBA 系での実験が、信頼できる実験動物系である。

まことに幸運にも、放医研においては、1959年、故宮田久寿博士によって、Furth, Upton より Freiburg 大学を通じて、Upton らが1950年代に広汎な実験を行った RFM/Un 系マウスが系統維持されていることがわかったので、この特別研究の開始と同時にこの RFM/MsNrs 系マウスの実験用繁殖を開始した。この系統の繁殖は、他系に比べ、幾多の難点があったが、それを克服し、数年後に系統的な実験が開始できたのは、一にかゝって長沢文男技官をはじめとする放医研動植課の努力によるものである。われわれは、RFM系マウ

スの生産が軌道にのり実験に必要な数の動物数が得られるまでの間、従来使用してきた C3H/He 系マウスを用いた予備実験を行った。

佐渡、早田、山極グループと協力の下に、 r 線全身1回照射 2.86, 5.72 Gy を SPF C3H/He 系雄マウスに行った動物を、3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月、18ヶ月後に殺し、佐渡による免疫能の検索、早田による染色体異常の検索、山極による病理学的検索に加えて、平嶋らは、血液幹細胞の検索を行った。その詳細は、1979年の放医研シンポジウム報告に述べたが、多分化能幹細胞 CFU-S は、照射後12ヶ月後には、照射前値に復したが、顆粒球系幹細胞 CFU-C は、一旦、6ヶ月後には回復傾向を示したが、再び減少し、12ヶ月、18ヶ月後には、照射前値の約50%の値しか示さなかった。すなわち、CFU-C の回復遅延である。そして、5.72 Gy 照射群では12ヶ月後に5匹中1匹、2.86 Gy 照射群では、18ヶ月後に3匹中1匹に骨髓性白血病の発症をみた。発症した2匹のマウスの何れにも、早田により、第2番染色体の長腕欠損と云う特徴的な構造異常が認められた。

この予備実験の成績に元気づけられて、RMF 系マウスを用いて、X線3 Gy 全身一回照射後の血液幹細胞動態と骨髓性白血病発症の関連を詳細に検討した。

生後2ヶ月の時点で一回X線照射を行ったRMF/MsNrs 系マウスの累積骨髓性白血病発症率を求めると、発症は、照射後4ヶ月後よりはじまり、11ヶ月後に終焉し、累積発症率は24.5%であった。そして、発症したマウスの90%以上に、2番目の染色体の構造異常が認められた。

次に、血液幹細胞が放射線照射により、突然変異をおこして白血病細胞化をおこす発がんの第一段階 (initiation) が、照射後の何時から起るかについて詳しい検索を行った。用いた実験手技は、Furth や Haran-Gehra が、胸腺リンパ腫の前白血病細胞 (preleukemic cells, potential leukemic cells) のアッセイ法に用いた移植アッセイ法である。その原理は、照射動物から継時的に造血組織の一部をとり出し、同系の半致死量全身照射マウスに移植し、数ヶ月後に白血病発症を検するもので、照射により transform した幹細胞 (白血病性幹細胞) を、それが活発な増殖をひきおこす環境に移しかえて、白血病の発症を増巾させるものである。

実際的手段としては、3 Gy 照射した雄マウスを、

照射後、経時的に殺し、その脾臓細胞の中、 10^7 ヶを、3～6 Gy X線全身照射雌マウスに移植し、2～3ヶ月後に殺して白血病の発症を検した。もし、白血病発症がおこってあれば、白血病細胞の性染色体を検討することにより、その起源が、donor由来か Host 由来かを検討した。その結果、全てが、donor 由来であることが証明された。

この実験結果を図示したものが、図6である。

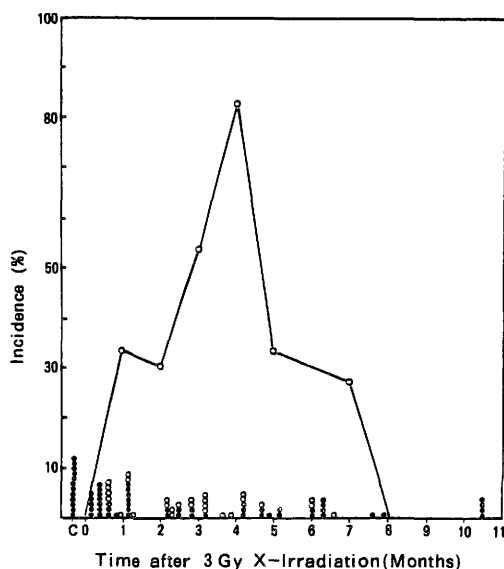


図6 白血病化した幹細胞(PLC)の出現率

照射後18日目以降の donor からの脾細胞移植によって骨髄性白血病の発症が認められた(図の白丸)。一方、照射を行わなかった対照動物及び照射後227日以降の donor からの脾細胞移植によって発症をみることはなかった(図の黒丸)。

この実験結果より明らかにされたことは、放射線誘発骨髄性白血病の発症が明らかになるのは、照射後4ヶ月以降であるのに、被曝個体中には、照射後18日以降に、白血病細胞化した幹細胞 (potential leukemic cells, PLC) が既に存在しているということであり、また、被曝後ある期間(227日間)以後には、PLCは存在しなくなるということである。またさらに重要な点は、移植アッセイ法によるPLCの証明率は、白血病の発症率よりも著しく高率であるということである。(図7)

次に、このような放射線照射実験系で、血液幹

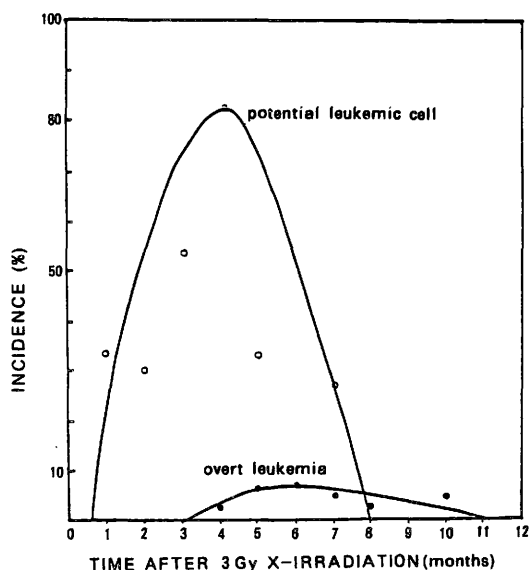


図7 白血病化した幹細胞(PLC)の出現率と白血病発症率の比較図

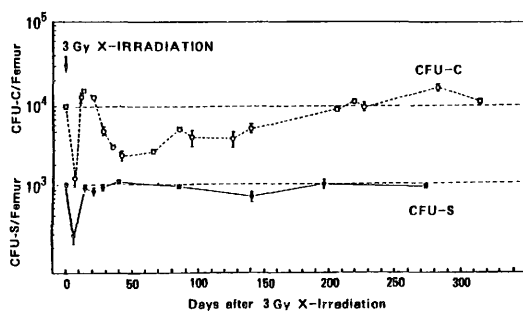


図8 X線3Gy全身照射後のCFU-SおよびCFU-C(骨髄中)の回復動態(RFM/MsNrs 8)

細胞はどのような動態を示すかについて検討した。3 Gy全身照射後、脾コロニーアッセイ法により多分化能幹細胞(CFU-S)を、また軟寒天培養法により顆粒球系幹細胞(CFU-C)を経時的にアッセイした結果をまとめたのが図8である。

照射後、CFU-Sは一時減少するが、30日までのうちに、ほぼ完全に照射前値に回復し、以後274日後までの成績では変化は認められない。これに対して、CFU-Cは、照射直後の減少から一過性の回復が、照射後2～3週後に認められるが、その後再び減少し、照射後210日に至って、やっと照射前値にまで回復した。

この成績は、既述の C3H/He 系 SPF マウスを用いた成績と、時間的なズレはあるが、一致した CFU-S と CFU-C の回復動態の差を示す。さらに、照射後、回復が遅延している状態の CFU-C の、DNA 合成期にあるものの比率を ^3H -チミジン自殺実験を用いて検討すると、S 期にあるものの比率が、照射後 4 ヶ月の時点で、非照射対照に比し明らかに高率であることが証明された。

この結果は、3 Gy 照射後、CFU-C は、長期間にわたって減少状態が続くが、一方、活発な再生増殖状態にある事を示している。

白血病発症に関連して、この CFU-C の回復遅延の時期が、PLC の証明された時期と非常に良く一致する点は、最も注目すべき結果である。(図 9)

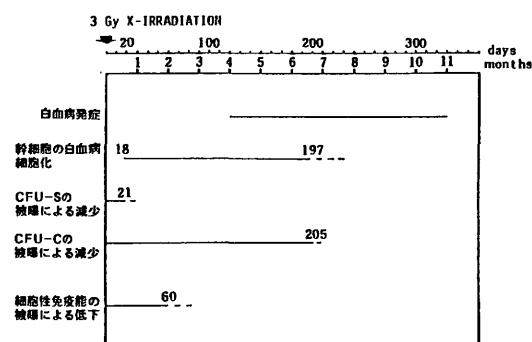


図 9 放射線誘発骨髄性白血病(RFM-3 Gy 全身照射)の発症に関与する各因子の照射後の変化: CFU-S 多分化能幹細胞, CFU-C 顆粒球系幹細胞

一方、この実験条件下での細胞性免疫能の変化については、GVH 反応致死実験により検討したが、照射後 94 日では完全に回復する事が証明され、免疫能に関しては、少なくとも T-リンパ球の関与する細胞性免疫能は、PLC の出現及び白血病発症とは関係がないように見られた (図 9)。

以上の結果を総括して考えると、放射線被曝によって、血液幹細胞の一部に、突然変異が引き起こされ、その中のある細胞は、いくつかのステップを経て遂に白血病細胞化した幹細胞 (PLC) のクローンに成長する。この PLC のクローン化が成立するには、顆粒球系幹細胞 (CFU-C) の回復遅延が重大な役割を演ずる。PLC のクローン化には、照射後少なくとも 18 日間を要する。

CFU-C が完全に正常値に回復すれば、PLC のクローンの発生はおこらなくなると云う事になる。

以上の実験結果からわれわれは、次のように考えた。

骨髄性白血病の発症機序は、放射線被曝による幹細胞の突然変異に始発する (initiation)。ついで、突然変異が白血病細胞クローンにまで成長するには、促進 (promotion) の過程が必要である。放射線被曝による突然変異の頻度が低い所謂低線量被曝の場合は、特に第 2 の promotion の過程が重要である。われわれの上記の移植アッセイ法は、血液幹細胞の強制的な増殖分化促進、所謂、“SOS” 細胞交代を誘発すると云う promotion を高めた結果であると考えられる。そこで、次に、下記のような実験を行った。

3 Gy 全身照射後、種々の promotor を投与した時、白血病発症率、発症病型がどのように変化するかと云う事である。X 線照射を生後 2~3 ヶ月の時期に行い、その直後に、種々の処置をおこなって白血病発症を検した。処置としては、① X 線照射のみ、② X 線 + 1 mg の hydrocortisone (HC) 一回注射、③ 25 μg の lipopolysaccharide (LPS) 一週毎 4 回注射、④ 20 mg の urethane (URTH) 一週毎 4 回注射を行った。また対照として、非照射動物群をおいた。22 週後までの白血病の発症状況は、図 10 に示したようになる。対照群では、骨髓

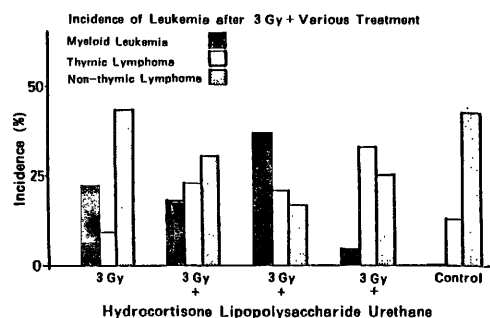


図 10 X 線全身 3 Gy 照射後の各種 promotor 処置による白血病発症の変化

性白血病 (ML) の発症は 0 %, 胸腺リンパ腫 (TL) 13 %, 非胸腺リンパ腫 (NTL) は 42 % であるのに対し、X 線のみでは、ML 26 %, TL 9 %, NTL 43 % であり、X 線 + HC 処理では ML 18

%, TL23%, NTL32%であり, X線+LPS処理ではML33%, TL21%, NTL17%であり, X線+URTH処理では, ML4%, TL33%, NTL25%であった。

この結果から, 3 GyのX線照射により, 骨髓性白血病発症頻度は高まるが, 非胸腺型リンパ腫の発症頻度は変わらない。強力な顆粒球の promotor と考えられる LPS のX線との組合せでは, 骨髓性白血病の頻度が高まり, 胸腺リンパ腫の promotor と考えられている URTH とX線の組合せでは, 予想通り, 胸腺リンパ腫の頻度が高まる事が, RFM/MsNrs 系雄マウスにおいても証明された。

〔総括〕

既述のように, ヒトの晩発性障害の中で最も重要な白血病発症の増加の機序を明らかにするために, モデル実験系としてマウスを用う事は, 発症率が高いこと, 観察期間がヒトに比べて短期間ですむこと, 遺伝的に選択された純系動物を環境因子の影響の少ない飼育条件で観察する事により, 実験精度を高める点で有利である。

このことは, ヒトの疫学的観察成績では, 観察数から到底不可能な 0.5 Gy 以下の低線量域での効果を解析する上で重要である。

さらに, マウスの放射線照射で従来問題とされてきた胸腺リンパ腫多発, ウイルス関与の問題点も, RFM系のような骨髓性白血病の好発系をヒトのモデル実験系として選ぶこと及び, 最近のヒト成人T細胞白血病(ATL)のウイルス依存性の

証明と云い事実によって, 解決されたかに思われる。

われわれは, 特別研究の第一段階において, 外因性白血病ウイルスである Friend 白血病ウイルスを用いて, 放射線被曝後の活発な再生期にある血液幹細胞が, Friend 白血病ウイルスによって白血病化されやすくなると云う事実を証明した。その効果は, 0.25 Gy 以上においては, 被曝線量と直線的な効果が認められた。

次いで, 特別研究の第2段階においては, 放射線誘発骨髓性白血病好発系である RFM/MsNrs 系マウスを用い, 放射線被曝後, 初期の段階(3 Gy 被曝後18日目以降)より, 白血病化した幹細胞が被曝個体内に成立している事実及び, この幹細胞の白血病細胞化が, 血液幹細胞の被曝後の活発な再生過程(増殖と分化)に密接な関連を持つ事実を, 初めて明らかにし得た。

今後, 低線量域における実験を進展させる事により, ヒトの低線量域での骨髓性白血病発症機序についても, 新しい情報が得られ, メカニズムの解明に資するものと考えられる。

〔謝辞〕

本実験の成果は, 秀れた実験動物の供給と維持に努力された放医研動物課諸氏の努力なくしては得られなかったものである。おわりに, 満腔の感謝の意を表します。また, 実験動物の飼育補助業務に献身的な努力をはらわれた中村ツエ, 篠原澄子両氏に感謝します。

〔研究発表〕

- 1) Hirashima, K. and Kumatori, T.: The Changes of the Susceptibility of the Hemopoietic Stem-Cells to Friend Leukemia Virus. Nakao, K., Fisher, J. W. and Takaku, F. ed. Erythropoiesis. Univ. of Tokyo Press, P. 121-130, 1975.
- 2) Hirashima, K. and Kumatori, T. The Increased Susceptibility of Hematopoietic Stem-Cells to Friend Leukemia Virus in the Repopulation period. Seno, S., Takaku, F. and Irino, S. ed. Topics in Hematology (Proc. 16th International Congress of Hematology). Excerpta Medica, Amsterdam, p. 297-299. 1977.
- 3) Hirashima, K.: Experimental Study on the Hemopoietic Reconstitution after Bone Marrow Transplantation following Stem-Cell Kinetics. *Acta Haemat. Jpn.*, 40, 40-47, 1977.
- 4) Hayata, I., Ishihara, T., Hirashima, K., Sado, T. and Yamagiwa, J.: Partial Deletion of Chromosome #2 in Myelocytic Leukemias of Irradiated C3H/He and RF-M Mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 63, 843-848, 1979.
- 5) Nara, N., Hirashima, K. and Momoi, H.: Effects of Leukemic Cells on Hematopoiesis in Radiation-Induced Murine Erythroleukemia. *Acta Haemat.*, 66, 168-173, 1981.

- 6) Nara, N., Bessho, M., Hirashima, K. and Momoi, H. : Effects of Chloramphenicol on Hematopoietic Inductive Microenvironment. *Exp. Hemat.*, **10**, 20-25, 1982.
- 7) Nara, N., Miyamoto, T., Hirashima, K. and Momoi, H. : Effects of Aclacinomycin-A on Murine Leukemia. *Blood*, **60**, 188-193, 1982.
- 8) Bessho, M. and Hirashima, K. : Experimental Studies on the Mechanism of Leukemogenesis following Hemopoietic Stem-Cell Kinetics. *Acta Haemat. Jpn.* **45**, 1307-1313, 1982.
- 9) Havata, I., Seki, M., Yoshida, K., Sado, T., Yamagiwa, J. and Ishihara, T. : Chromosomal Aberrations observed in 52 Mouse Myeloid Leukemia. *Cancer Res.*, **43**, 367-373, 1983.
- 10) 平嶋邦猛：脾コロニー形成法による血液幹細胞動態の研究, 最新医学, **28**, 1720-1732, 1973.
- 11) 平嶋邦猛：造血幹細胞の各種機能的検索法に関する比較検討, 日血会誌, **37**, 651-652, 1973.
- 12) 平嶋邦猛：造血機構の放射線照射及び制癌剤による障害の基礎的解析, 癌の臨床, **21**, 533-537, 1975.
- 13) 平嶋邦猛：腫瘍治療に伴う造血障害の基礎的問題点, 癌の臨床, **21**, 691-696, 1975.
- 14) 平嶋邦猛：造血幹細胞の分化とその調節, 細胞生物学シンポジウム, **27**, 73-80, 1975.
- 15) 平嶋邦猛：造血幹細胞からみた白血病発症機序, 最新医学, **34**, 988-994, 1979.
- 16) 平嶋邦猛：血液幹細胞動態よりみた放射線誘発白血病発生機序 発癌と遺伝子障害, (寺島東洋三, 中井 斌, 平嶋邦猛編), 技術寄与研究会(東京), p. 109-118, 1979.
- 17) 別所正美, 平嶋邦猛：顆粒球の異常産生とC S F, 血液幹細胞・その動態と分化(妹尾左知丸編), 福武書店(岡山), p. 277-294, 1982.
- 18) 平嶋邦猛：血液幹細胞動態からみた骨髓性白血病発症機序, 血液幹細胞, その動態と分化(妹尾左知丸編) 福武書店(岡山), p. 375-399 1982.
- 19) 奈良信雄, 別所正美, 川瀬淑子, 大谷正子,

平嶋邦猛：放射線誘発マウス骨髓性白血病を用いた制癌薬～aclacinomycinAの薬剤感受性試験, 医学のあゆみ, **122**, 168-169, 1982.

〔総 説〕

- 1) 関 正利, 小林好作, 平嶋邦猛：実験動物の血液学, ソフトサイエンス社, 東京, 1981.
- 2) 平嶋邦猛：骨髓移植, 血液と脈管, **4**, 311-322, 1973.
- 3) 平嶋邦猛：造血幹細胞, 臨床検査, **18**, 389-395, 1974.
- 4) 平嶋邦猛, 川瀬淑子, 大谷正子：造血幹細胞(カラーグラフ), 臨床検査, **18**, 370-371, 1974.
- 5) 平嶋邦猛：造血管移植の歴史と造血幹細胞, 最新医学, **29**, 1549-1558, 1974.
- 6) 平嶋邦猛：白血病と造血幹細胞, クリニカ, **3**, 55-60, 1976.
- 7) 平嶋邦猛：血液幹細胞と放射線障害, 臨床科学, **13**, 174-181, 1977.
- 8) 平嶋邦猛：Colony forming Unit (CFU) の概念とその assay 法, 日本臨床, **36**, 2694-2700, 1978.
- 9) 平嶋邦猛：骨髓移植(基礎的問題), 血液疾患最近の進歩(高久史磨編), 金原出版(東京), p. 18-25, 1978.
- 10) 平嶋邦猛：造血, 生物科学のためのアイソトープ実験法(松平寛通編), 東大出版(東京), p. 256-264, 1978.
- 11) 平嶋邦猛：骨髓移植の展望, 診断と治療, **66** 2239-2242, 1978.
- 12) 平嶋邦猛：臨床からみた放射線障害, 産業医学ジャーナル, **2**, 12-20, 1979.
- 13) 平嶋邦猛：血液幹細胞と放射線障害, 臨床血液, **120**, 867-878, 1979.
- 14) 平嶋邦猛：多潜能幹細胞測定法(青木延雄, 柴田昭編), 中外医学社(東京), p. 1-8, 1980.
- 15) 平嶋邦猛：ウイルスと白血病, 新版白血病のすべて(中尾喜久編), 南江堂(東京), p. 77-85, 1981.
- 16) 別所正美, 平嶋邦猛：放射線と造血幹細胞, クリニカ, **8**, 961-972, 1981.
- 17) 平嶋邦猛：多分化能幹細胞A 血液幹細胞 CFU-S, 新版日血全書, 丸善(東京), p. 63-85, 1982.
- 18) 平嶋邦猛：放射線と白血病発生の関係, 臨床医, **8**, 408-409, 1982.

- 19) 平嶋邦猛：晩発性放射線症，日本臨床，40，
1284 — 1285，1982.
- 20) 平嶋邦猛：放射線と白血病，変異原と毒性，
5，508 — 517，1982.

6. 放射線発がん要因の免疫学的ならびに 遺伝学的解析

佐渡敏彦, 武藤正弘, 神作仁子, 久保えい子, 小林 森,
五日市ひろみ, 相沢志郎 (生理病理研究部)
片岡 泰 (東京女子医大, 実験動物研究施設)

Immunologic and Genetic Host Factors and Cellular Events in Radiation Carcinogenesis in Mice

T. Sado, M. Muto, H. Kamisaku, E. Kubo, S. Kobayashi, Y. Kataoka*,
H. Kurokawa-Itsukaichi and S. Aizawa
Division of Physiology and Pathology; *Experimental Animal Center,
Tokyo Women's Medical College

1) Analysis of Life-long Effects of Radiation on Immune System.

Extensive studies on the life-long effects of radiation on immune system were conducted using BC3F₁/Cum, B6C3F₁/Nrs and C3Hf/HeMsNrs strain mice which were maintained (a) under relatively unclean conventional environment, (b) under microbiologically clean but not barrier-sustained environment, or (c) under barrier-sustained SPF conditions during the entire period of investigation. They were exposed to 150 R to 600 R of X- or ¹³⁷Cs γ -rays at the age of 10–15 weeks. At varying intervals thereafter, the exposed as well as the age-matched control mice were evaluated individually for various immunologic parameters: (i) antibody response of the intact mice to a T cell-dependent antigen, SRBC, (splenic PFC count or serum hemagglutinin titer determinations), (ii) ability of intact mice to reject allogeneic skin grafts, (iii) splenic NK cell activity, (iv) counts of splenic T and B cells, (v) proliferative response of splenic

lymphocytes to mitogens (PHA, ConA, LPS), (vi) mixed lymphocyte reaction (MLR) by splenic lymphocytes, (vii) ability of spleen cells to generate cytotoxic (killer) T cells following MLR in vitro.

The results indicated that in general the initial dose-dependent suppression of all immunologic parameters was followed by a rapid recovery during the next few months. The more important was a finding that once the immune competence of the exposed mice was restored to the level of age-control group, the rate of aging of the immune competence of the exposed mice was not significantly different from that of the unexposed mice for most immunologic parameters examined (Fig. 1). There was only one exception for this generalization: MLR by splenic lymphocytes of B6C3F₁/Nrs mice that had been exposed under unclean conventional environment to 200 or 400 R of X-rays 18 months earlier was significantly lower than that of the age control mice. However, repeated experiments

using animals maintained under clean conventional or SPF environments failed to reconfirm this observation, suggesting that this apparent late radiation effects on alloantigen reactivity was not likely to be due to radiation effect alone but was probably due to combined effects of radiation and infections. Thus, all the results obtained so far provide no conclusive evidence for acceleration of aging of the immune system as a result of earlier exposure to radiation during young adulthood.

In view of the fact that radiation-induced neoplasms normally develop long time after radiation exposure, i.e., after complete restoration of the immune system, these results suggest that radiation-induced suppression of the immune surveillance function does not constitute a major factor in radiation carcinogenesis.

2) Analysis of Genetic and Immunologic Host Factors and Cellular Events in Radiation Lymphomagenesis.

Three H-2 congenic B10 background strain (B10, H-2^b; B10.BR, H-2^k; B10.A, H-2^a) and C3H/HeMsNrs (H-2^k) strain mice were exposed to fractionated doses of X-rays (170 R \times 4) during the period of 1–2 months after birth and cumulative lymphoma incidence curves were compared. The results indicated that in all H-2 congenic B10 strains tested the incidence of lymphomas (mainly thymomas) was nearly 100% with a latent period of 100 to 300 days whereas the incidence in C3H strain mice was significantly lower (~30%) (Fig. 2). This result indicates that a gene or genes which is (are) not contained within the H-2 complex has (have) a critical influence on the development of thymomas following fractionated radiation exposures.

Examination of immunologic functions of the exposed animals during preleukemic period following radiation exposure indicated that they were indeed significantly suppressed. However, injection of huge number of normal lymphocytes soon after the lymphomagenic radiation treatment had no effect on the incidence of thymomas (Fig. 3). This result suggests that immunosuppression during early post-exposure pe-

riod has no important bearing on the development of thymomas.

We then analyzed the time course of the regeneration of CFU-S and pre-T cells in the bone marrow and differentiation of functional T cells within the regenerating thymus of the irradiated mice. It was found that regeneration of bone marrow precursors proceeded very rapidly during the first month following radiation exposure. On the other hand, the differentiation of helper and cytotoxic T cell precursors within the regenerating thymus became significantly disturbed as the tumor progressed, indicating that regeneration of functional T cell precursors and evolution of thymomas proceeded simultaneously within the regenerating thymus until eventually the tumor cells becoming outnumbered the normally differentiating T cells.

Finally, we reexamined, with the use of B10.Thy 1 congenic strain mice, the earlier results by Kapan and others that lymphomas could develop from lymphocytes present in the nonirradiated parental thymuses grafted into thymectomized, fractionally irradiated H-2 semi-incompatible recipient mice. The results indicated that 37 out of 91 thymectomized, irradiated B10.Thy 1.2 mice which were grafted subcutaneously with neonatal thymuses from B10.Thy 1.1 donor mice developed lymphomas of which 75% (21/28) were shown to have originated from grafted thymuses. These results reemphasize the indirect mechanism for development of radiogenic lymphomas which was postulated earlier by Kaplan and his associates, albeit attempts to reveal viral involvement in this process have not been successful yet.

緒 言

免疫学の立場から放射線発がんの問題を研究するには2つの局面からのアプローチが考えられる。その1つは、よく言われているように、放射線発がんの場合にも、放射線によって誘発された宿主の免疫監視機能の低下が、発がんを促進する要因となっているかどうかを明らかにすることであろう。免疫系は造血系と同様に放射線に対して非常に感受性であることが知られている。しかしながら、免疫系に対する放射線の長期的な影響についてのわれわれの知識は非常に限られており、この領域の確かな知識なしには放射線発がんにおける免疫系の役割を正当に評価することはできない。また、放射線発がんの問題から離れて、一般論としての放射線の晩発生物効果を理解する上でもこの種の知見は不可欠であると考えられる。

免疫学の立場から放射線発がんの問題を研究する場合のもう1つのアプローチは、免疫系の組織臓器における腫瘍発生の細胞性機構を探ることであろう。たとえば、放射線発がんの実験モデルとして古くから研究されてきたマウスの胸腺原発のリンパ性白血病(胸腺腫)があるが、その発生機序に関しては未だに不明の部分が多い。

このようなわけで 免疫グループでは、本研究計画の第1段階で免疫系におよぼす放射線の影響を長期にわたって詳しく解析すると共に、被曝時年令と免疫系の回復あるいはエイジングとの関係をも調べることを計画した。そして、第2段階では、胸腺腫の発生機序を探る上で極めて有用であると考えられる特殊系統(B10.Thy 1.1系)マウスを4年がかりで育成したあと、放射線によって誘発される胸腺腫について、腫瘍発生過程における細胞事象——特に骨髄・胸腺の相互作用——および腫瘍発生に寄与すると考えられる宿主要因の遺伝学的ならびに免疫学的解析を計画した。

実験結果と考察

1. 免疫系におよぼす放射線の晩発効果に関する基礎的研究(昭和48年～57年)

1) 普通飼育環境に維持されたBC3F₁/Cum およびB6C3F₁/Nrs マウスにおける研究(昭和48～53年)

アメリカ合衆国テネシー州 Cumberland 農場から購入されたBC3F₁/Cum マウスおよび放医研で生産されたB6C3F₁/Nrs マウスを10～15週

令で、150 R～450 RのX線全身照射後、経時的にいくつかの免疫学的指標について調べ、同令の非照射マウス(対照群)の免疫機能と比較した。この実験で用いられた免疫学的指標は、(1) SRBCに対する抗体産生能(脾における溶血斑形成細胞数)、(2) 同種皮膚移植拒絶能、(3) 脾細胞のPHAおよびLPSに対する増殖応答、(4) 混合リンパ球反応、(5) 脾の全有核細胞数およびT、Bリンパ球数であった。これらの実験の結果は、照射後6カ月以上も経過すれば、たゞ1つの例外を除いて、照射群と対照群との間に免疫機能には全く有意の差が見られないことを示した。この例外というのは、照射後18～19カ月目に調べられた混合リンパ球反応についての結果で、

この場合、照射群では対照群に比して明らかに有意の低下を示した。しかしながら、この実験では脾の有核細胞数が全体として照射群で大巾に増加しているのが認められた。ところが、その後微生物学的にクリーンな環境に飼育管理されたB6C3F₁/Nrs マウスを使って 上と全く同じ実験を繰り返したところ、脾の有核細胞数についても、混合リンパ球反応についても、照射群との間に有意の差は見られないことがわかった。これらの結果は、不特定多種類の微生物による汚染環境下で長期飼育されたB6C3F₁マウスでは、恐らく照射群では対照群に比して、照射後の免疫機能抑制期における微生物の侵襲の影響が残っていて、全体として脾における造血系の過形成のために、過剰の非リンパ系細胞(特に食細胞)の存在によって混合リンパ球反応が抑制された可能性が考えられる。

その後、微生物学的にクリーンな環境に維持されたB6C3F₁/Nrs マウスについて、照射後21～22カ月に、大規模な免疫機能検索を追加したが、脾細胞のPHA、ConA、LPSに対する反応性、混合リンパ球反応、およびキラーT細胞誘導能のすべてについて対照群と照射群との間で有意差は認められないことがわかった。

2) SPF環境下に飼育されたC3Hf/HeMsNrs マウスにおける研究(昭和51～57年)

免疫系におよぼす放射線の長期的な影響を調べる場合に、感染の影響を最少限度に抑えて、放射線の影響だけを解析するためには、できるだけ微生物学的にクリーンな動物を使って実験を行うことが望ましい。そこで次の実験では、SPF環境

に維持されたC3Hf系マウスを材料として免疫系におよぼす放射線の効果を詳しく解析することにした。

a) 若い成体(10~11週令)で照射された場合の効果

まず最初の実験では、10~11週令で150~600 Rの ^{137}Cs ガンマ線全身照射直後から22カ月まで経時的に各種の免疫機能の検索を行った。調べられた免疫学的指標は次の通りである。(1) SRBCに対する抗体産生能(血中抗体価による)、(2) 脾細胞のNK活性、(3) 脾のT、B細胞数、(4) 脾細胞のmitogen(PHA, ConA, LPS)に対する反応性、(5) 2種類のアロ抗原に対する混合リンパ球反応、(6) 脾細胞のアロキラーT細胞誘導能。これらの実験結果の概要を図1に示す。これらの図から明らかなように 調べられたすべての指標について、照射直後には線量に依存した免疫機能の低下が認められたが、時間の経過と共に免疫機能は急速に回復し、照射後3カ月以上経過すると、すべての免疫学的指標について、同令の対照群と照射群との間で有意差は見られないことがわかった。

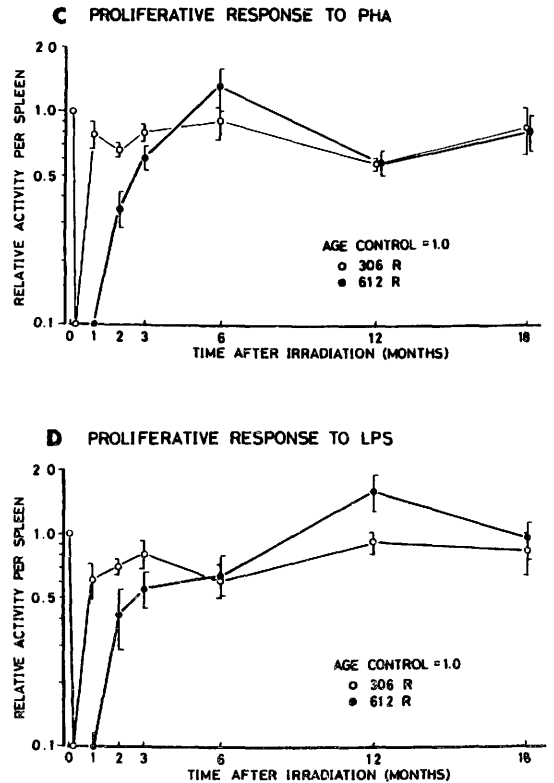
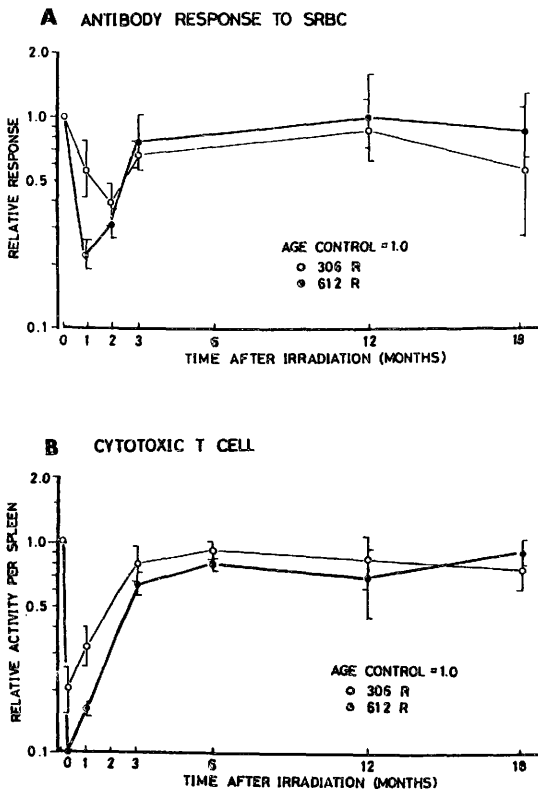


図1. 免疫系におよぼす放射線の効果。

これらの実験中に、照射群では免疫機能が対照群のレベルに回復したあとで、総計10数%の個体に骨髄性ならびにリンパ性白血病(リンパ腫を含む)が発生したが、このような個体ではほとんど例外なしに免疫活性は検出されなかった。その他の実質性臓器の腫瘍の場合には、担がん個体でも免疫機能は必ずしも低下していないことが認められた。正常マウスに骨髄性白血病細胞を移入したマウスについてのモデル実験では、脾に含まれる白血病細胞があるレベルを越えると脾細胞の示す免疫活性は著しく低下することが認められた。この結果は、放射線の免疫系におよぼす直接的な効果と、放射線によって誘発されたリンパ腫や白血病による間接的な抑制効果とを区別して考える必要があることを示している。

b) 新生期被曝の効果

生後24~48時間に153, 306, 612 Rの ^{137}Cs ガンマ線を全身照射後、死亡曲線を調べる一方、経時的に種々の免疫機能の検索を行った。その結果、(a) 612 R照射群では対照群に比して個体の発

育が全般的に著しく抑えられ、免疫機能の発達も不十分で、対照群のレベルに達しないままで、12カ月から18カ月目頃までの間に大部分の個体が死亡した。(b) 306R照射群では3カ月および6カ月では種々の免疫学的指標について対照群との間に有意差はなかったが、12カ月令ではSRBCに対する抗体産生能およびキラーT細胞誘導能が対照群に比して有意の低下を示した。したがって、この群では免疫機能の加齢促進効果があったことが示唆される。(c) 153R照射群では少なくとも18カ月までは、調べられたすべての免疫学的指標について対照群との間に有意差は認められなかった。

c) 被曝時年令と免疫系の回復との関係

放射線の免疫系におよぼす長期的な影響を考える場合に、被曝時年令と免疫系の回復およびその後の加齢変化との関係は重要である。そこで、3、6、12、18カ月令のC3Hf系マウスを612Rの¹³⁷Csガンマ線で全身照射後3、6、12カ月目に幾種類かの免疫機能を調べた。その結果、SRBCに対する抗体産生能と脾細胞のmitogenに対する増殖応答能力は、すべての実験群で照射後6カ月までに対照群のレベルまで回復したが、キラーT細胞誘導能力に関しては、12カ月令以後に照射された場合には対照群のレベルまで回復しないことがわかった。

3) 免疫系におよぼす放射線の効果に関する研究の総括

これまでに進めてきた免疫系におよぼす放射線の効果に関する研究から得られた知見は次のようにまとめることができる。

①免疫機能を持った個体が亜致死量の放射線に被曝した場合には、被曝直後では調べられたすべての免疫機能について、線量に依存した機能低下が見られるが、被曝後3～6カ月の間に、すべての免疫機能がほぼ対照群のレベルに回復する。

②若い成体が亜致死量の放射線に被曝した場合には、免疫機能が一旦対照群のレベルに回復したあとで、被曝群の方が対照群よりも早くから免疫機能の減退が始まるという証拠は得られなかった。しかし、新生期に306R全身被曝した場合には、放射線が免疫系の老化を促進している可能性を示唆する結果が得られた。

③生涯のいろんな時期に亜致死量の放射線に被曝した場合には、被曝時年令に関係なく、多くの免疫機能は被曝後6カ月までには同令の対照群のレベルまで回復するが、12カ月令以降に被曝した

場合にはある種のT細胞機能は対照群のレベルまで回復しなかった。

④被曝後における免疫系の回復およびその後における免疫系の加齢変化は、検出系によっては、動物が維持されていた飼育環境によってかなり影響を受ける場合がありうる事が示唆された。病原性あるいは非病原性の微生物による侵襲が広汎に起こりうる環境では、恐らく被曝直後の免疫機能低下期における感染が、免疫系の回復や老化に影響を与えるかも知れない。

⑤白血病にしろその他の腫瘍にしろ、放射線によって誘発されるがんが発生する時期は、すべての個体で免疫系がほぼ正常のレベルに回復したあとであることを考えると、放射線による免疫監視機能の低下が発がんを促進しているという解釈は成り立ちにくいように思われる。しかし、このことは免疫系が何らかの形で発がんの過程に関与している可能性を全面的に否定するものではない。

2. 放射線によって誘発される胸腺腫の発生機序に関する研究(昭和54年～57年)

1) 胸腺腫誘発に寄与する宿主の遺伝的要因の検討

放射線によってマウスに誘発される胸腺腫の発生率は、系統によってかなり異なることが知られている。われわれは、胸腺腫の発生率に寄与する宿主の遺伝的要因のうち、特に第17染色体に位置するH-2複合体(マウスの主要組織適合遺伝子複合体)のちがいの影響を調べた。H-2複合体に注目した理由は、(1)放射線による胸腺腫の発生にはある種の白血病ウイルス(MuLV)が関与している可能性が強く示唆されていたこと、および、(2)H-2複合体の中には、幾種類かの白血病ウイルスを含むいろんな種類のウイルスに対する感受性あるいは抵抗性を支配する遺伝子が含まれていることが知られていることによる。

図2はH-2ハプロタイプを異にする系統のB10バックグラウンドのマウス(B10, H-2^b; B10.A, H-2^a; B10.BR, H-2^k)とC3H/He(H-2^k)マウスを生後33±3日目から8日おきに170RのX線を4回全身照射した場合の胸腺腫の発生率を示したものである。図から明らかなように、B10系マウスではH-2ハプロタイプに関係なく、照射後100日から300日目までの間にはほぼ100%の個体が胸腺腫を発生したが、C3H系マウスではせいぜい30%の個体が胸腺腫(非胸腺型のリンパ腫を含む)を発生しただけであ

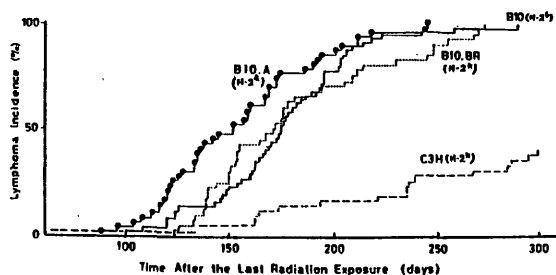


図2. 放射線誘発胸腺腫の発生率におよぼす遺伝要因の影響。

った。この結果は、われわれの期待に反して、用いられた実験条件のもとでは、H-2 複合体に含まれる遺伝子のちがいは胸腺腫の発生率にはほとんど影響がなく、H-2 複合体に含まれていないある種の遺伝子が重要な役割を果たしていることを強く示唆している。この問題に関しては、最近アメリカの Meruelo ら (1981) が、放射線によって誘発される胸腺腫の発生率を支配している主要な遺伝子の1つが第2染色体に位置していることを報告している。胸腺腫発生におけるこの遺伝子の役割の解明は今後の重要な研究課題である。

2) 胸腺腫の発生における宿主の免疫系の役割

胸腺腫の発生における宿主の免疫系の役割を探るために、胸腺腫誘発処置を施したあと、経時的に宿主の免疫機能 (SRBC に対する抗体産生能、NK 細胞活性、キラーT細胞誘導能など) を調べた。その結果、脾あたりの免疫活性は胸腺腫が発生するまでの間に対照群のレベルまで回復することにはなかったが、一定数の脾細胞あたりで比較すると、処置後3カ月目では処置群と対照群との間で有意差は認められないことがわかった。一方、胸腺腫誘発処置後24時間に大量のリンパ球を移入

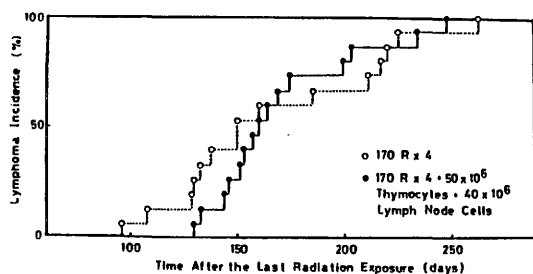


図3. 胸腺腫誘発処置後における大量のリンパ球移入が胸腺腫の発生率におよぼす効果。

して宿主の免疫機能を回復させても、胸腺腫の発生率は全く影響を受けないこともわかった (図3)。これらの結果は、処置後に見られる宿主の免疫機能の低下は、直接的には胸腺腫の発生を促進する役割を果たしているわけではないことを示唆している。

3) 胸腺腫誘発過程における細胞事象の解析

a) 胸腺腫誘発処置後の骨髓における前駆細胞の動態

B10.BR系マウスを胸腺腫誘発処置後、1日目から120日目までの間に、胸腺細胞の前駆細胞を生産する骨髓におけるCFU-Sと前T細胞の回復動態を調べたところ、処置後の1カ月間にCFU-Sと前T細胞の増殖分化が著しい速度で進行していくことがわかった。これらの細胞の中には、放射線によって遺伝物質にある変化を受けたものが含まれており、それらが胸腺へ移動したあとと直接あるいは間接に胸腺腫細胞へと進展していくと予想される。

b) 胸腺腫発生過程における胸腺内でのT細胞の機能分化とその攪乱

胸腺腫誘発処置を受けたB10.BR系マウスの胸腺におけるヘルパーT前駆細胞の活性を経時的に調べたところ、処置後4カ月頃まではそのような胸腺の中でも正常なヘルパーT前駆細胞の分化は進行しているが、それと並行して腫瘍細胞への進展も進んでいて、胸腺内に占める腫瘍細胞の割合が全胸腺細胞の90~95%を占めるようになると、もはやヘルパーT細胞活性は検出することができなくなることが示唆された。また、キラーT前駆細胞についても同様の傾向は認められたが、この場合にはヘルパーT前駆細胞よりも強くその分化成熟が阻害されていることを示唆する結果が得られた。

c) 胸腺腫発生における放射線の間接効果：放射線による細胞がん化因子の誘導

1956年にKaplan らが (C57BL x C3H)F₁ マウスの胸腺を摘出後170R x 4回照射し、それにC57BL系の新生仔マウス胸腺を移植すると、放射線に照射されていない移植胸腺由来のリンパ球から胸腺腫が発生することを報告して以来、放射線誘発胸腺腫の発生には放射線によって誘発された感染性の因子 (ウイルス) が関与していると考えられるようになった。しかしながら、これまで多くの研究者の努力にも拘らず、そのことを直接的に証明するような結果はまだ得られていない。この

ことに関連して、Kaplan らが用いた実験系は親系の胸腺をF₁ マウスに移殖するという系であったので、免疫学的には必ずしも適当な組合せではないといううらみがあった。われわれは、放射線発がんのしくみを理解する上で極めて重要なこの問題を解決するためには、まず第1に免疫学的に最も理想的だと考えられるThy 1 congenic 系統のマウスの組合せを用いてこの実験が追試されるべきであると考え、昭和51年より4年がかりでB 10, Thy 1.1 系統の育成を行った。すなわち、まずB10系マウス(Thy 1.2 抗原をコードする *Thy 1^b* 遺伝子を持っている)とNRH/Nrs系マウス(Thy 1.1 抗原をコードする *Thy 1^a* 遺伝子を持っている)とのF₁ マウスをB10系マウスに戻し交配したあと、Thy 1.1 抗原をマーカーとしてB10系マウスに11代の戻し交配を繰り返し、それ以後は兄妹交配により、B10系の遺伝的背景の中にThy 1^a 遺伝子を持ったB10, Thy 1.1 系統を育成した。

そこで、Kaplan の方法にしたがって、胸腺摘出したB10, Thy 1.2 系マウスを170 R 4回照射後、B10, Thy 1.1 系マウスの新生仔胸腺を移植し、再生してきた胸腺に発生した腫瘍細胞がThy 1.1 抗原を持っているかそれともThy 1.2 抗原を持っているかを調べた。その結果、これらのマウスに発生した胸腺腫の約75%のものが放射線に照射されていない移植胸腺内に含まれていたリンパ球に由来するものであることが再確認された。

4) 放射線による胸腺腫誘発の細胞性機構

これまでに得られた知見をもとにして、放射線によって誘発される胸腺腫の発生過程で起こる細胞事象を整理してみると次のようなモデルが考えられる。

胸腺腫誘発処置により、①まず胸腺および骨髓における細胞の枯渇が起こったあと、1カ月の間に骨髓においてCFU-Sと前T細胞の著しい再生が起こる。②次いで、恐らく胸腺に入ったそれらの細胞の子孫から、細胞がん化因子(放射線によって誘発された遺伝子組換えによって活性化されたがんウイルスか?)が放出される。③それらの細胞がん化因子が胸腺内で再生しつつあった未熟なT細胞に感染 transfection して、それらを腫瘍化させる。この過程で起こる細胞あるいは分子機構を明らかにしていくことは今後の重要な研究課題である。

総 括

これまでに述べてきた結果から、放射線に被曝した個体のがんが発生する場合に、宿主の免疫監視機能の低下ががん細胞の増殖をプロモートしている可能性は、一般に考えられているほど大きくないように思われる。しかし、この解釈は微生物学的に非常にクリーンな環境に飼育管理されたマウスについて得られた知見にもとづいており、不特定多種類の微生物の感染がいろんな程度に起り得る普通飼育環境のもとでは、免疫機能低下期における感染が造血系を刺激し、それが直接間接に宿主のがん発生時期や頻度に影響を与える可能性があることは指摘しておく必要がある。

放射線誘発胸腺腫は、標的組織における細胞動態、機能分化の解析が容易である上に、移植実験も容易で、しかも感受性および抵抗性系統があるなど放射線発がんのしくみを探るための実験モデルとして好適であると思われる。このことに関連して、当研究室で育成されたThy 1 congenic 系マウスを用いて、胸腺腫は必ずしも放射線に被曝した組織細胞から直接発生するとは限らないことが再確認されたことの意義は大きいと思われる。この知見がすべての放射線発がんのモデルとなりうるかどうかには疑問があるとしても、最近急速に研究が進められているがんウイルスあるいはがん遺伝子に関する知見からすれば、こゝで得られた知見が一般化できる可能性もないとは言えない。そういう意味でも、胸腺腫誘発における放射線の間接効果の細胞学的ならびに分子学的機序を明らかにすることは非常に重要であると思われる。

謝 辞

本実験計画の遂行にあたっては、実験用マウスの生産供給の面で技術部動植物管理課のスタッフ一同に大層お世話になった。特に長沢又男氏には、4年間にわたるB10, Thy 1.1 congenic 系統の育成に熱心に協力して頂いた。同氏の協力なくしては、この系統の育成は不可能であった。また、実験用マウスの飼育管理に関しては、前田久江、加藤キク、石橋美枝子氏の協力を得た。これらの方々に心から謝意を表したい。

発表論文

- 1) 佐渡敏彦：放射線免疫学とその周辺，放射線生物研究，**12**，6—22，1977.
- 2) 佐渡敏彦：小林 森，神作仁子，黒川ひろみ，片岡 泰，免疫監視機能と放射線，発癌と遺伝障害（第9回放医研シンポジウム報文集），**NIRS—M—27**，74—82，1977.
- 3) Sado, T., Kobayashi, S., Kamisaku, H., Kurokawa, H. and Kataoka, Y. : Immunological Competence of Aging Mice that had been Exposed to X-or Gamma-rays During Young Adulthood. *Late Biological Effects of Ionizing Radiation*, 115—125, IAEA, Vienna, 1978.
- 4) Kasuga, T., Sado, T., Noda, Y., Terasima, T. and Kitagawa, T. : Radiation-induced Tumors in C57BLf/6JNrs (SPF) and C3Hf/HeMsnrs (SPF) Strain Male Mice. *Late Biological Effects of Ionizing Radiation* 29—41, IAEA, Vienna, 1978.
- 5) Sado, T. : Late Effects of Radiation on Immune System; A review. *Radiat. Res.* Proc. 6th ICRR, Okada, S. et al. (eds.), 688 — 697, Tokyo, 1979
- 6) Sado, T., Hoshino, H., Kamisaku, H. and Tanooka, H. : Absence of Correlation between T-Lymphocyte Activity and Development of Carcinogen-induced Skin Tumor in Mice. *Gann*, **70**, 755 — 762, 1979
- 7) Hayata, I., Ishihara, T., Hirashima, K., Sado, T. and Yamagiwa, J. : Partial Deletion of Chromosome #2 in Myelocytic Leukemias of Irradiated C3H/He and RFM Mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**, 843—848, 1979
- 8) Tanooka, H., Kitamura, Y., Sado, T., Tanaka, K., Nagase, M. and Kondo, S. : Evidence for Involvement of Mast Cells in Tumor Suppression in Mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **69**, 1305—1309, 1982
- 9) Muto, M., Sado, T., Hayata, I., Kamisaku, H., Nagasawa, F. and Kubo, E. : Reconfirmation of Indirect Induction of Radiogenic Lymphomas Using Thymectomy, Irradiated B10 Strain Mice Grafted with Neonatal Thymuses From Thy 1 Congenic Donors. *Cancer Res.*, **43**, 3822—3827, 1983

7. 放射線による白血病発現機構の 細胞遺伝学的研究

石原隆昭, 早田 勇, 南久松真子, 加藤やよい
(障害基礎研究部)
河野晴一 (東邦大学理学部)

Cytogenetic Studies in Hematopoietic Cells After Irradiation: The Role of Chromosome Abnormalities in the Development of Leukemia

T. Ishihara, I. Hayata, M. Minamihisamatsu, Y. Kato and S. Kohno*
Division of Radiation Hazards; *Department of Biology, Faculty of Science,
Toho University

The studies have been undertaken with an aim of clarifying the biological significance of chromosome aberrations in leukemogenesis by radiation. The studies were made on: I. the clonal transformation of cells with radiation-induced chromosome abnormalities and their proliferation in bone marrow of rats irradiated with 700R of X-rays in relation to their chromosomal characteristics, and, II. the specific chromosome changes in myelocytic leukemia developed in irradiated mice, and the role of chromosome abnormalities in the genesis of various mouse leukemias. The results of the studies are given in the following:

I: 1) A close correlation was recognized between the size of chromosomally abnormal clones formed in bone marrow of irradiated rats and the chromosome constitution of such clone cells. It was revealed that clone cells with unbalanced chromosome constitutions, especially those with aneuploidy, showed higher proliferation than

those with balanced chromosome constitutions. Unbalanced chromosome constitutions and aneuploidy are chromosome aberrations highly observed in leukemic cells.

2) The cells with chromosome abnormalities in bone marrow of living rats were observed almost every month using repeatable bone marrow biopsy technique. It was found that among various types of chromosomally abnormal cells present at earlier period, only a few types of them could survive, proliferate and establish themselves as clones with the lapse of time after irradiation.

Further, obvious enlargement of a clone accompanied by an acquirement of a new chromosome change was observed in the course of clonal proliferation of cells with radiation-induced chromosome abnormalities. Such secondary chromosomal evolution is the phenomenon generally observed at the time of acute transformation of chronic myelocytic leukemia in man.

3) Clone cells were transplanted into lethally irradiated recipient rats, and the manner of their proliferation in the newly given environment was followed up. The results of the experiment have shown that the establishment of a chromosomally abnormal cell as a clone and the further proliferation of such a clone depend on the interrelationship between the genetic characteristics of a cell, which have a primary importance, and an environment where such cells grow.

As have been described so far, the proliferation of cells with radiation-induced chromosome abnormalities has a pattern similar to that of the proliferation of leukemic cells, and it is hard to recognize differences between the two cell populations. However, there seems to be a basic difference in genetic specificities of the cells constituting the two cell populations: the former showing proliferation under control and the latter going on autonomous proliferation beyond control.

II: 1) Chromosome analysis was made in a total of 52 cases of mouse myelocytic leukemia (50 radiation-induced and 2 spontaneous cases) with G and Q banding techniques. All the leukemic cells from the 52 cases possessed marker chromosomes which can not be observed in normal marrow cells. Especially noted was a partial deletion in No. 2 chromosome observed in 49 of 52 cases (94%) irrespective of the strain, sex and history of radiation exposure.

2) The commonly observed partial deletion in

No. 2 chromosome, however, was not always identical in size or manner of deletion. As shown in Fig. 2, the deletion in No. 2 chromosome took the form of one of the 7 types. Detailed analysis with G and Q banding techniques revealed that in spite of the difference in size and manner of the deletion, a portion ranging from regions C to D in No. 2 chromosome is commonly missing from all the 7 types of the deletion. The finding strongly suggests that the specific portion (regions C and D) in No. 2 chromosome is playing an important role in the genesis and proliferation of mouse myelocytic leukemia. Recently, 3 genes located in the central long arm of No. 2 chromosome have been found to be related to the development of mouse leukemia. How the specific portion of the deletion commonly missing from No. 2 chromosome described here corresponds to the location of the 3 genes seems to be the most important task assigned to our project.

3) As another specific chromosome aberration, the abnormality in No. 6 chromosome highly (72.7%) recognized in mouse granulocytic leukemia should be noted. Whether the abnormality in No. 6 chromosome is involving a limited specific portion of this chromosome or not is a problem to be solved in the future studies. The role of the abnormality in the development of mouse granulocytic leukemia must be also clarified.

緒 言

Nowell と Hungerford によって 1960 年にヒトの慢性骨髄性白血病に共通して特有な染色体異常（フィラデルフィア染色体）が存在することが明らかにされたが、Boveri (1914) 以来古くから提唱されてきた染色体変化と発がんとの関係が、この発見によってよりはっきりとした形で取り上げられるようになった。最近ではさらに染色体分染法の開発とあいまってヒトや実験動物において白血病をはじめとするいろいろな腫瘍にそれぞれを特徴づける染色体異常の存在が広く見出され、発がんに対する染色体変化の役割が重

要な課題となっている。

本研究は、このような見地に立って放射線による白血病発生に対して染色体変化が如何なる役割をもつかを明らかにすることを目標に研究を進めてきた。

昭和48年(1973年)に本研究が開始されて以来57年度の終了時までの研究課題は以下の如くである。

1) 放射線による染色体異常クローンの生成と進展、その生物学的意義(昭和48~49年度)

2) 放射線による異数性クローンの生成とその特性に関する研究(昭和50~52年度)

3) 放射線による白血病発現機構の細胞遺伝学的研究 (昭和53~57年度)

1)および2)は前半の5年間における主題で、ラットを用い放射線照射によって造血組織に誘発される染色体異常細胞のクローン化およびその進展と染色体特徴との関連を、また、3)は後半の5年間において主力がそそがれた課題で、放射線照射マウスに発生した骨髓性白血病における共通した特有な染色体変化の存否とそれら染色体異常の白血病発生に対する役割について、それぞれ検討した。それらの成果は 1)および 2)をⅠ、3)をⅡとして以下に述べる。

実験結果と考察

Ⅰ X線照射ラットの骨髓における染色体異常細胞クロンの生成と進展

1) 染色体異常細胞クロンの成立進展と染色

体特徴との関連

研究経過中間報告書 (1978) において述べたが、それ以後さらに実験を追加し、合計31個体のラット (生後3ヵ月) に700RのX線照射を行い約10ヵ月後の骨髓について染色体分染法によって解析した。その結果、31個体において73タイプの染色体異常細胞クローンが観察された。これら73タイプの存在頻度は1.7%から78.6%の範囲にあり、このうち53タイプ (72.6%) は均衡型で、相互転座 ($\frac{42}{53}$)、逆位 ($\frac{8}{53}$) および両者の複合型 ($\frac{3}{53}$) 残り20タイプ (27.4%) は不均衡型で、これらには染色体欠失 ($\frac{11}{20}$)、重複 ($\frac{2}{20}$)、それらの複合 ($\frac{7}{20}$) が認められる。

次に、これら73タイプのクローンのうち骨髓細胞集団の $\frac{1}{4}$ (25%) 以上を占めるような大型クローンと $\frac{1}{4}$ 以下の小型クローンに分けて染色体異常のタイプとの関連を検討した結果が表1である。

表1 放射線誘発染色体異常細胞クロンの染色体構成と出現頻度

出現頻度(%)	100—25.0	24.9—10.0	9.9—5.0	4.9—0	合計
均衡型	8	12	17	16	53 (72.6%)
不均衡型	14(6)*	3(1)*	1	2(1)*	20 (27.4%)
合計	22	15	18	18	73 (100%)

* () 内は異数性クロンの数を示す

この表に明らかな如く、大型22クローンにおいては、少数の存在である不均衡型が14クローン (64%) と過半数を占め、特に、このうち5クローンはモノソミー、1クローンはトリソミーの異数性を示す。これに対して小型51クローンにおいては、均衡型が45クローン (88%) と大多数で不均衡型は6クローン (12%) に過ぎない。以上の観察結果は、はっきりとクロンの進展拡大と細胞のもつ染色体型とが関連していることを示している。しかしながら、その多くが不均衡型であるという特徴をもつ大型クローンにおいても、それらの染色体変化に特定染色体が高率に関与することはなく、それぞれ変異に富み、モノソミーを示すクローンも特定した染色体の欠失によるものではない。しかし、クローン全体についてみると、染色体変化に関与する染色体はNo 1, 4, 15および18がやや高率、モノソミ

ークロンの欠失する染色体は小型の中部着糸点染色体 (No.15~20) に集中する傾向がある。

2) 骨髓穿刺法による染色体異常細胞クロンの経時的追跡

放射線照射線量と染色体異常生成の間にははっきりとした線量反応関係が成立する。放射線によって生成される染色体異常は、不安定型 (Cu) と安定型 (Cs) の2つに大別され、このうちCu細胞は細胞分裂に伴って急速に細胞集団から除外されるが、これに対してCs細胞は細胞分裂によって失われることなくクローンを形成し、集団に拡大していく可能性をもっている。ここではこのような特性をもつCs細胞が骨髓細胞集団中でクローンとして成立、拡大する過程を骨髓穿刺法を用いて経時的に追究した。まず、ラット (生後3ヵ月) に700RのX線照射を行い、7個体についてほぼ

表2 X線照射(700R)ラットにおける染色体異常細胞クローンの経時的变化

観察材料*	照射後の月数	ク ロ ー ン												クローン以外の異常細胞	正常細胞	観察細胞数
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L			
骨	1	6	2	3	3	1	1							5	22	43
	2	1	2	3	5	1				1				2	25	39
	3		4	2	1	8	1	2		1					21	40
	4					2								1	4	7
	5				2	17	3			6					29	57
	6			1	2	8	8		2	4					19	44
髄	7				1	14	8		5	4				1	28	61
	9					16	22			4					15	57
	10					5	14		1	2					7	29
	14					18	16		1	6					17	58
	16					27	19		4	1					6	57
末梢リンパ球	11				2	7	1				3	3	4	10	29	59

* 骨髓は直接観察法により、末梢リンパ球はPHA添加培養法によってそれぞれ観察した。

1カ月に1度の割合で穿刺針を用いて大腿骨より骨髓細胞を採取してその中に含まれる染色体異常細胞の動向を追跡した。表2はその中の1例で、照射後1カ月から16カ月までの追跡結果である。表の如く照射1カ月の骨髓においてはすでに不安定型異常は消失し、いろいろなタイプの安定型異常が観察され、あるものははっきりとしたクローン(A)としての成立が認められている。しかし、2カ月目においてはそれらの頻度に変動が起りクローンAは著しく減少し、さらに3カ月目ではクローンAは観察されなくなり、以後16カ月までの観察では指摘されていない。これに対して照射後1および2カ月目では単独の存在であったクローンEは3カ月目には最も高頻度となり、16カ月では集団全体の約半数を占めるまでに拡大した。また、クローンFも同様に5カ月以降に著しく拡大し、16カ月では集団全体の33%に達するクローンに進展している。その他の6個体の追跡観察結果もこの結果とほぼ類似する傾向が得られている。

骨髓穿刺法を用いた染色体異常細胞の追跡観察結果についてはすでに中間報告書においても述べており、追跡観察過程におけるモノソミー細胞の出現と細胞の高増殖性の発現とが密接に関係していることを明らかにしている。

3) 致死量X線照射ラットに移植した染色体異

常骨髓細胞クローンの動向

染色体異常細胞クローンの成立および進展は、放射線照射後の骨髓の回復増殖過程を通じて行われるものであるが、クローンの成立進展はこの回復過程における骨髓細胞の増殖する環境要因と密接に関り合っている。この両者の関連を明らかにするための一手段として、致死量(900R)のX線照射を行った2時間後のラット(生後3ヶ月)を宿主として、その宿主にX線照射(700R)によって誘発された染色体異常クローンの存在の確認されている骨髓細胞を移植して、移植3週間後におけるそれらのクローンの宿主骨髓内での増殖進展の状態を検討した。その結果は、クローンの成立進展は細胞自身のもつ染色体構成とそれらが増殖する環境との相互関係によることを強く示唆した。これらの結果はすでに中間報告書において報告した。

それ以後移植実験が継続され、移植から観察までの期間を3週間から5カ月間に延長して移植した染色体異常クローンの動向を追跡した。その結果、移植前の骨髓に存在したクローンの宿主中の動向については、ほぼ同程度の頻度で保持されているもの、消失したもの、あるいは移植前より拡大したもの、また、このクローンの拡大と新しい二次的な染色体変化の出現とが対応したものなど

が認められた。他方、移植前に指摘しえなかったクローンが出現し、大型クローンに発展したものの、さらに宿主由来の染色体異常クローンが骨髓全体を占有し、移植骨髓細胞が全く消失している場合も存在する。これら移植後5カ月において観察されている大型クローン（占有頻度25%以上）は7タイプで、このうち3タイプが移植骨髓由来、4タイプが宿主由来である。また、これら7クローンの染色体構成は1クローンを除いてすべて不均衡型で、うち1クローンは異数性を示している。

今回の移植法による染色体異常クローンに関する実験結果は、クローンの成立進展に關与する第一義的な重要性は細胞の遺伝的特性そのものにあり、増殖する環境は第二義的な役割を果たすにすぎないことを示した。

II 放射線照射マウスに発生した骨髓性白血病における染色体研究

1) 研究対象としたマウス骨髓性白血病

本研究は「放射線による晩発障害の危険度の推定に關する調査研究」の各研究グループとの協力のもとに実施されたものである。

ここで研究対象となったマウス骨髓性白血病は52例であるが、実験条件および発症原因の違いから以下の4つに区分される。イ) 生後2～5ヶ月目にX線またはr線150～575ラドの全身一時照射後6～20ヶ月CVまたはSPF条件下で飼育中に発症した23例：C3H/He(♂13, ♀2), RFM(♂5, ♀2), B6C3F1(♀2)。ロ) イ)と同一条件で放射線照射を行なう前または後に副腎皮質ホルモン(プレドニン)およびその抑制剤(メトピロン)等を種々の組合せで投与し、CVまたはSPF条件下で飼育中に発症した雄C3H/He 27例。

ハ) 週1回27週間にわたって尾静脈より瀉血を行った100個体中で発症した雌RFM 1例。ニ) 自然発生のみられた雄C3H/He 1例である。

上記52例の病理学的ならびに細胞学的特徴については関正利博士によって詳細に検討がなされ、骨髓芽球性(myeloblastic)5例、顆粒球性(granulocytic)22例、骨髓単球性(myelomonocytic)17例、および単球性(monocytic)8例に分類された。

2) マウス骨髓性白血病に認められる特異的染色体異常

前述の骨髓性白血病52例については骨髓、脾臓あるいはその両者を用いQ-およびG-一分染法によって染色体解析がなされた。これら52例の白血

病細胞のすべてに、正常細胞には見出されないマーカー染色体(構造異常染色体)が認められた。

図1は各例に見出されたマーカー染色体の各染色体への分布を示したものである。この中で特筆さ

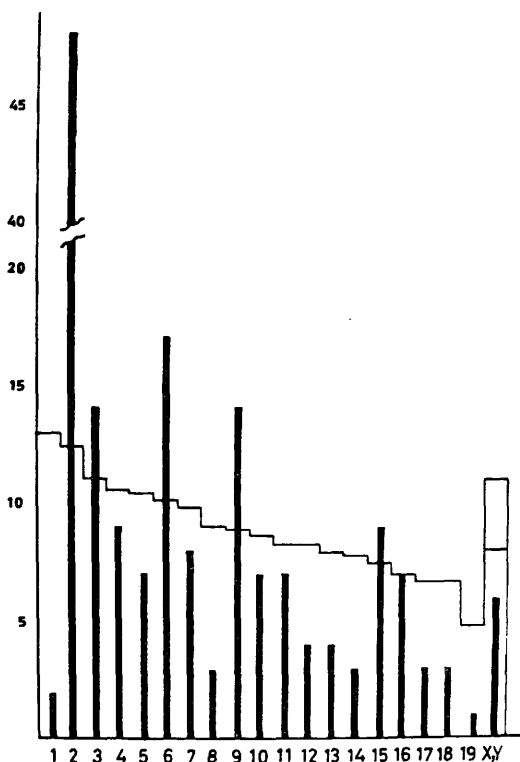


図1 52例のマウス骨髓性白血病におけるマーカー染色体の各染色体(1～19, XY)への分布。
折線は各染色体の相対的長さを示す。

れることは52例中49例(94%)と高頻度に第2番染色体における異常が認められたことである。この第2番染色体における異常は、49例ともすべて染色体の部分欠失を伴っている。しかしこれらの部分欠失の大きさ、欠失の仕方など一定したものでなく、図2に示されているように7タイプに分類される。7タイプ中タイプIには端部欠失が、タイプII III IVにはそれぞれ欠失部分の大きさの異なる中間部の欠失が、タイプV VIには中間部および端部両方の欠失が、残りの1タイプには中間部欠失を伴う第6番染色体との転座を示す複雑な異常が、それぞれ認められた。これらの各タイプの出現頻度はタイプI：13例(25%)、タイプII：19例(36.5%)、タイプIII：9例(17.3%)、

タイプIV：3例（5.8%），タイプVおよびVI：各2例（各3.8%），第6番染色体の転座型：1例（1.9%）で第2番染色体が正常を示すものは3例（5.8%）にすぎない。このように大多数のマウス骨髄性白血病を特徴づけている第2番染色体の部分欠失については，詳細なQ-およびG-一分染法による解析の結果，7タイプとも図2に示されているように共通してリジョンCとDにわたる部分が欠失していることが明確にされた。

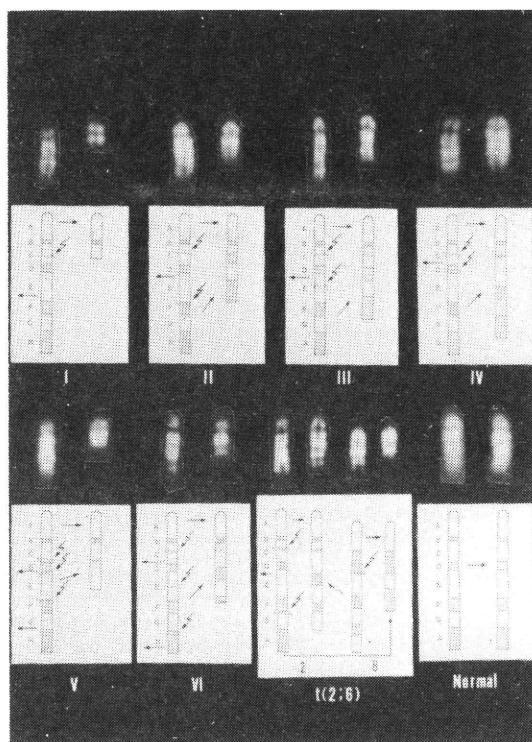


図2 52例のマウス骨髄性白血病に見られた7タイプの第2番染色体の部分欠失とその模式図。

以上の共通欠失部分をもつ第2番染色体異常は，リンパ性白血病，赤白血病に見出されることはなく，赤白血病を除いた骨髄性白血病に特異的な変化であることが強く示された。しかし骨髄性白血病の各病型と第2番染色体異常の各タイプとの間には全く関連が認められなかった。

最近，第2番染色体長腕の中部に，放射線誘発

白血病感受性遺伝子 *Ril-1*，放射線白血病ウイルス感受性遺伝子 *RLVil-1* および アベルソンネズミ白血病ウイルスと相同性をもつ *c-abl* 遺伝子のそれぞれの遺伝子座が存在することが，前者は Muruelo らが免疫学的手法によって，後者は Goff らが細胞融合の方法によって明らかにしている。*Ril-1* および *RLVil-1* の両遺伝子はマウスのリンパ性白血病の発症に関連し，また *c-abl* 遺伝子はヒトの慢性骨髄性白血病に特有な *Ph¹* 染色体転座と関わり合いをもっている。第2番染色体に座位するこれらの遺伝子とマウス骨髄性白血病の第2番染色体異常とがどのような関連をもっているかは現在のところ全く不明であるが，マウス骨髄性白血病の発生の遺伝的背景を考える上で注目される。

3) マウス骨髄性白血病におけるその他の数的および構造的異常

52例のマウス骨髄性白血病においては，第2番の特異的染色体異常に加えて，染色体の数的異常および第2番以外の染色体における構造的異常が全例において認められた。

それらのうち，第2番染色体について高頻度に見られるのは図1に示される如く，第6番染色体における異常で，構造的異常が16例に，数的異常（トリソミー）が6例に認められた。興味あることに，これら第6番染色体における異常は，顆粒球性白血病に高頻度に見られ，構造的異常を示す16例中12例（75%），数的異常を示す6例中4例（67%）がこれに属している。この観察事実は，顆粒球の分化増殖に対する第6番染色体の重要性を物語る。

染色体の数的異常としてY染色体の数の変異が雄46例中33例（71.7%）と高い頻度で認められた（表3）。それらは，Y染色体の増加を示すもの13例，欠失を示すもの13例，増加と欠失を示す両方のクローンの存在するもの7例であった。Y染色体の欠失はいろいろな腫瘍細胞やヒトの老齢個体の骨髄細胞などにおいてその存在が報告されている。しかし，Y染色体の増加についての報告は非常に少ない。Y染色体の数的変異の生物学的意義については明らかでないが，白血病の増殖過程で生じたもので，細胞の白血病化とは直接関連したものとは考え難い。

表3 52例の骨髓性白血病マウスの造血細胞における染色体数変異 (BM: 骨髓 SP: 脾臓)

症 例	組 織	染 色 体 数 分 布																	数的変異の主因
		正常細胞																	
		40	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	4n			
1	BM	6				6	36	2										+15, -Y	
2	SP					4	44	1	1									-13	
3	BM			1	1	2	39	6	1									-Y, +Y	
4	"			5	3	2	39												
5	"					10	15	9	7	2	5		2			1		-Y, +Y	
101	SP					20	26	4										-Y, +Y	
102	"	1				2	42	5											
103	BM					47	2	1										tan (9; 13)	
104	"					8	36	5	1										
	SP			I	3	2	31	13										+Y	
105	"	1				3	45	1										+6	
106	"	5	1		4		34	2		1	2					1		+Y	
107	"	5			1	2	10	1								31			
108	"	3				7	33	7										+Y	
109	BM					20	12	13	5									-Y, +Y	
110	SP	6			1	16	25	2										-Y, +Y	
111	BM			1		1	43	5											
112	"					10	20	15	3	2								+13, +Y	
113	"						44	6										+X	
114	"					47		3										+6, -Y	
115	"						6	44										+6	
116	"					26	18	6										+Y	
117	SP				1	1	41	6	1									+6, +Y	
118	BM					4	29	6								11			
	SP	1				1	44	3	1									+Y	
119	"			1		9	34	6										-Y	
120	"					2	28	7								13		+ Mar	
121	"			1	1	34	8	4	2									+1, -Y	
122	"	1			1	3	40	5										+Y	
201	BM	1(recip)				49													
202	AS						50											+15	
203	BM	1			2	43	4											-Y	
204	"	1				29	16	3	1									-Y	
	SP				1	39	10											-Y	
205	BM	1				1	8	29	9	2								+4, +Y	
206	"					21	25	4										-Y, +Y	
207	SP	1			1	1	5	18	19	5								+6, +Y, +2Y	
208	BM				1	45	4											-Y	
209	SP					5	12	21	1							11		+Y	
210	BM				3	34	9	3	1									+15, + Mar, -Y	
211	"					10	34	6										-Y	
212	SP					23	15	8	4									-Y, + Mar,	
213	"					3	44	2	1									+Y	
214	"	3				1	42	4										-Y, + Mar	
215	"	1				1	40	7								1		+5, +8, -Y	
216	BM			1	5	33	6	5										-Y	
217	"					3	38	7	2									-Y, +Y	
301	"	1(recip.)				1	42	6										+12	
	SP					3	47											+12	
302	BM					3	43	4										+Y	
303	"			2	1	46	1											rob (15; 18)	
304	SP				3	5	17									25			
305	"					44	6											-19	
306	"					2	35	13										+6	
351	BM	31				1	18												
352	SP	3				2	2			2	2	10	17	12				+7, +14, +15, +X +2X, +3X, +2Mar	

総 括

I : 1) 放射線照射によってラットの骨髓に生成される染色体異常クローンの大きさと染色体構成との間には密接な関連が認められ、不均衡型染色体異常、特に異数性を示すクローンが均衡型を示すクローンを凌駕する高い増殖性を示すことが明らかにされた。不均衡型あるいは異数性は白血病など悪性腫瘍細胞に高率に観察される染色体異常であるが、この両者に共通する高増殖性とこれらの染色体変化がどのように関連しているかが今後に残された重要な課題である。

2) 骨髓穿刺法によってほぼ月1回の割合で骨髓に認められる染色体異常細胞クローンの動向を観察したが、多数タイプの異常細胞の中から時間的経過とともに少数タイプに収斂し、増殖拡大によってある場合には骨髓集団の多くが単一クローンによって置き換える過程が追跡された。この過程は白血病細胞1個を出発点とした増殖拡大によって白血病発症に至る過程と極めて類似するものである。また、この過程において新たな染色体変化の付加とクローンの著明な拡大との対応も認められたが、この二次的な染色体変化の出現はヒトの慢性骨髓性白血病の急性転化などにおいて普遍的にみられる現象である。

3) 致死量X線照射を行った宿主に移植した骨髓に含まれる染色体異常細胞クローンの動向によって、クローンを構成する細胞自身とそれらが増殖する環境との相互関係を検討した。その結果、細胞自身のもつ遺伝的特性が第一義的な重要性をもち、それに第二義的に増殖における環境要因が加わってクローンが成立し、進展拡大することが示唆された。この成立進展過程は、白血病における一細胞の白血病化過程と一白血病細胞を発症に導く過程と非常に類似するものである。

4) 以上総括したように放射線誘発染色体異常骨髓細胞の増殖動態は白血病細胞の増殖動態と非常に類似するパターンを示し、両細胞集団の間には

細胞遺伝学的な特異性は認められない。この両細胞集団における基本的な相違は、細胞集団を構成する細胞のもつ遺伝的特性に基因するもので、一方は調節下の増殖を、他方は自律的な増殖を、それぞれ示すことにある。

II : 1) 放射線誘発マウス骨髓性白血病50例および自然発生骨髓性白血病2例、合計52例における染色体について分染法を用いて詳細に検討した。その結果、系統、性別、放射線照射、非照射にかかわらず49例(94%)において共通して第2番染色体の特定部分(C-D)を含む部分欠失が認められた。このことは第2番染色体の特定部位が骨髓性白血病の発生および増殖に対して重要な役割をもつことを強く示唆した。すでに述べたが、最近、第2番染色体の長腕中部に座する白血病発生に関与すると考えられている3つの遺伝子——特に骨髓性白血病発生に関連が予想されるc-abl遺伝子——と上記の染色体部分欠失がどのように対応するか、両者の染色体上の位置関係を決定することが急務である。

2) 第2番染色体異常をもつ骨髓性白血病はすべて白血病細胞1個を出発点とする単一細胞起原であることが細胞遺伝学的に確かめられた。しかし、細胞における第2番染色体異常の誘発と白血病発症までの過程は明らかにされていない。これらの動態を明確化するためには前白血病期あるいは白血病発症初期の詳細な細胞遺伝学的検索によらなければならない。これらの解明は今後に残された重要な課題である。

3) 第2番染色体異常以外では顆粒球性白血病に高率(72.7%)に出現する第6番染色体の異常が目される。この異常には第6番染色体の特定部分に関与しているものかどうか、さらに例数を増して検討するとともに、その遺伝的要因を解析し、第6番染色体異常の顆粒球性白血病における役割を明確にする必要がある。

発 表

1. Kohno, S. and Ishihara, T. : Radiation-induced Aneusomic Clones in Bone Marrow of Rats. *Mutat. Res.*, **35**, 121—128, 1976
2. Kohno, S. and Ishihara, T. : Highly Proliferative Monosomic Clones in the Bone Marrow of Irradiated Rats. *Proc. Japan Acad.*, **58**(Ser. B), 69—73, 1977
3. Kohno, S. and Ishihara, T. : Clonal

- Proliferation and Karyotypic Features of Cells in Bone Marrow after Irradiation. *Radiat. Res.*, Proc. 6th Int. Cong. *Radiat. Res.*, S. Okada, M. Imamura, T. Terasima, and H. Yamaguchi, eds., Toppan Printing Co., Tokyo, 526—533, 1979
4. 石原隆昭, 熊取敏之: 細胞遺伝学, 新版日本血液学全書1 (新版日本血液学全書刊行委員会編), 血球の分化, 丸善(東京), 413—430, 1982
 5. Hayata, I., Ishihara, T., Hirashima, K., Sado, T. and Yamagiwa, J.: Partial Deletion of Chromosome #2 in Myelocytic Leukemia of Irradiated C3H/He and RFM Mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**, 843—848, 1979
 6. Hayata, I.: Cytogenetical Study on Radiation-Induced Leukemia. *Acta Haematol. Jpn.*, **45**, 135—141, 1982
 7. Hayata, I., Seki, M., Yoshida, K., Hirashima, K., Sado, T., Yamagiwa, J. and Ishihara, T.: Chromosomal Aberrations Observed in 52 Mouse Myeloid Leukemias. *Cancer Res.*, **43**, 367—373, 1983
 8. 早田 勇: 染色体異常と白血病発症 B, 第14回放医研シンポジウム報文集 (印刷中)

8. 放射線による細胞のトランスフォーメーション の研究

寺島東洋三 (科学研究官)

安川美恵子, 崎山比早子, 岡田安弘, 渡部郁雄
(生理病理研究部)

In Vitro Cell Transformation by Ionizing Radiation

T. Terasima*, H. Otsu, H. Sakiyama, M. Yasukawa, Y. Okada and I. Watanabe
Division of Physiology and Pathology; *Deputy Director

In view of carcinogenesis and leukemogenesis as the most important late effect of radiation, investigation of carcinogenic response of cultured mammalian cells to X-ray was of considerable value. Present studies involved enhanced and altered proliferative capacity of human, hamster and murine cells by radiation, and the use of 10T-1/2 cells derived from C3H/He mouse embryo were found most successful.

(1) In the early phase of our transformation (TF) studies, human diploid cells (HT-73) derived from embryonic tissue and cell lines of trisomy 21 (Down syndrome), kindly provided by Dr. M.S. Sasaki, Kyoto University, were used. None of these irradiated in the lag and the plateau phases produced morphological TF. However, 5 clones of ETR cells (trisomy 21) exposed to 2.79 Gy of X-rays revealed enhanced proliferative capacity in terms of plating efficiency and saturation density. However, implantation of ETR clones into nude mice (Balb nu/nu) did not induce any nodule formation.

(2) Golden hamster cells in the early passages and hamster cells line (Ni1 1C1) were tested for X-ray-induced TF colony, focus and anchorage-

independent growth. All of these tests failed to obtain any promising results.

(3) Tests were carried out for radiation enhancement of focus formation of rat kidney cells (NRK) infected with Rous sarcoma virus (B-77). In the dose range from 10 to 600 rad, the number of focus increased by 10 to 90% without any clear dose-dependence. It has not been known whether the increased number of foci is associated with introduction of viral genome or activation of oncogene.

(4) Most of TF studies were conducted with C3H 10T-1/2 cells generously provided by late Prof. C. Heidelberger, which possessed a stable ability of contact-inhibition in the plateau phase. Since stem cells are assumed to be a most important target for carcinogenesis, the plateau phase cells were exclusively used to study TF response of non-proliferating cells to X-ray. Irradiated plateau phase cells were trypsinized and plated out in multiple assay dishes for development of TF focus. TF frequency was obtained on the number of survival basis.

The dose response curve consisted of 3 phases: the 1st phase (0–0.5 Gy) showed the increase

of TF with Do of ca. 0.3 Gy; the 2nd phase (0.5–4 Gy) the increase with Do of 1.4 Gy; the 3rd phase (more than 6 Gy) no increase at the level of 5×10^{-3} .

Change in TF damage during the post-irradiation period was determined. The result demonstrated that TF yield decreased rapidly until 6–7 hr, showing a temporal coincidence with repair of potentially lethal damage, and then tended to increase slightly during subsequent 1–2 days. The removal of TF damage was found to be inherent capacity of cells. Remarkable finding was that some batch of fetal calf serum contained a factor which interferes with the damage removal process.

As expected from removal of TF damage occurring during the early post-irradiation period, two-dose fractionation experiments revealed that TF yield was lowered when a total dose of 100–400 rad was given in 2 equal split doses at 3 to 15 hr intervals.

Distinct from above action of serum on damage removal, serum in the growth medium gave rise to various TF yield in a batch-dependent manner. By using low yield serum (LYS) and high yield serum (HYS), serum replacement experiments were carried out in order to determine the transition phase at which HYS-susceptible, initiated cells were converted into HYS-insusceptible cells. Results showed that the ex-

pression of insusceptibility to HYS completed on 10 to 14 days after X-ray. Radioimmunoassay of biologically active substances in many batches of serum was made to identify a major serum factor affecting TF yield. Items tested including 11 hormones and vitamins, did not exhibit any correlation with TF yield.

Examination of 14 clones of type III and 5 clones of type II focus were carried out for their growth properties, ability of anchorage-independent growth and tumorigenicity in immune-depressed, syngeneic mice. It was found from above tests that there was the close correlation between the last two and morphological transformation required some interaction of TF cells with adjacent normal cells.

In summary of results obtained, (1) culture serum exerted promotive action, to a considerable extent, on TF; therefore, the investigation for promotion, in general, is of primary importance in assessment of carcinogenic risks by radiation, and may provide a basis for chemoprotection of cancer development; (2) TF damage is complex in nature as compared to simple mutation, presumably involving alteration of regulatory mechanism or even of subcellular elements; (3) *in vitro* TF studies were confirmed to be one of powerful approaches in elucidating molecular and cellular nature of TF and development of malignancy.

〔緒 言〕

発がんは(1)標的細胞が非致死的損傷をうけてトランスフォームする過程と、(2)制御機構の働いている個体の中でのトランスフォーム細胞の悪性化、という図式でおおまかには把握される。本研究は(1)を目標とし、放射線による培養哺乳類細胞のトランスフォーメーションをしらべることによって放射線発がん損傷の修復、固定、発現とそれらに関わる物理的因子(分割照射、線量率の変化)、および生物学的因子(細胞増殖、体液因子など)の影響をしろうと試みた。第2に、ヒト細胞を用いたトランスフォーメーションの実験系を確立し、動物種(マウス)とヒトとの比較をめざした。

放射線による *in vitro* トランスフォーメーション

は1966年 Borek & Sachs によつてはじめて有効な実験系が確立されたといえる。Borek 他はゴールデン・ハムスター胎児の早期培養をX線照射して細胞の piled-up 構造と方向性の乱れを特徴とするトランスフォーム集落を誘発しうること、その細胞の子孫(クロン)はハムスターに線維肉腫をつくることを証明した。その後、腫瘍ウイルス(SV40)のマウスおよびヒト細胞への導入によるトランスフォーメーションがX線照射によつて増強されることが Todaro (1968) によつて報告されている。1973年に至り Reznikoff 他はC3Hマウスの胎児より継代培養細胞系を開発し、Terzaghi & Little (1976) はこれを用いてX線トランスフォーメーションに成功した。おくれ

て難波他（1979）はCo— γ 線で照射されたヒト培養細胞（WI—38）の子孫にトランスフォーム細胞を検出したが、定量性（線量との関係）も、したがって放射線との因果関係も明らかにしていない。

昭和48年（1973）、本研究の開始に当たってわれわれはヒト胎児細胞、および白血病好発疾病とされるダウン症の胎児細胞を用いて、50年度にはゴールデン・ハムスター細胞、51年度以降 Rez nikoff 他（1973）によって開発されたC3Hマウス継代培養細胞を用いて実験を行なった。その成果が以下に述べられる。

〔実験結果と考察〕

(1) ヒト胎児細胞およびダウン症胎児細胞（trisomy 21）による研究（昭和48～50年度）。

ヒト胎児線維芽細胞はすべて佐々木正夫氏（東医歯大）より分与された。いずれも胎児皮膚由来で、正常細胞はクロン化されHT73（46XY；石原隆昭氏による）と称され7～13代培養が、ダウン症細胞（47XY+21）は8～9代培養が実験に用いられた。培地はF10・HI（Ham, 1963）に非働化された仔牛血清または仔牛胎児血清および一定量の抗生物質を添加したものであった。実験の詳細は特別研究中間報告書（NIRS—R—7）に記載されたとおりである。

ヒト胎児HT—73細胞では播種後5時間でも、プラトー期でも、300R照射後8週培養し、それ

ぞれ7400～7500生残集落の中1つのトランスフォーム集落をも検出しえなかった。

ダウン症細胞（TR細胞）では放射線誘発染色体異常の頻度も高いので、トランスフォーメーションの発生を期待したが、正常胎児細胞と同様にトランスフォーメーションを検出しえなかった。しかし300R照射をうけたTR細胞の160～200日培養よりえた5系統のクロン（ETR）はTR細胞より増殖力が高く、より長期間継代が可能であった。表1はETRと対照との増殖飽密度と集落形成率を示す。染色体数は両者に差がないが、ETRにはクロンを形成する異常がみられた（石原隆昭氏による）。ETR細胞もTR細胞もヌードマウス（Balb nu/nu）に腫瘍をつくることはなかった（平嶋邦猛氏による）。

結論として、ヒトHT細胞ではX線によってトランスフォーム・フォーカスをつくることはなかったし、TR細胞では増殖力の一過性の増強がみられたが、ヌードマウスに腫瘍性を示すことはなかったといえる。

(2) ハムスター胎児細胞および継代細胞（Nil 1 C1）による研究（昭和49～50年度）。

ゴールデン・ハムスター胎児の第2代培養を種々の条件で照射したが、2～3週間の培養でトランスフォーム集落は確認されなかった。それは未照射にも多くの上皮細胞性、線維芽細胞性の piled—up 集落が観察されたからである。それゆえ実験の一部では軟寒天集落形成力（10日～6週培養）がしらべられたが、集落は検出できなかった。Nil 1 C1細胞でもトランスフォーム集落およびフォーカスを誘発することはできなかった（詳細は中間報告 NIRS—R—7 をみよ）。

(3) Rous 肉腫ビールスによるトランスフォーメーションに対するX線の効果の研究（昭和52～53年度）。

RNA腫瘍ビールスのゲノムが provirus として細胞に導入されることが照射により増強されるかどうか、導入によって腫瘍遺伝子（oncogene）の活性化が生じるかどうか、がしらべられた。B—77ビールスをNRK（ラット腎細胞）に感染させ、その前後にX線を照射すると、B—77によるフォーカスの形成は10～600Rの線量域で1.1～1.9倍に増加したが、線量依存性はみられず、増強効果の意味は明らかにならなかった。

(4) C3Hマウス由来10T1/2細胞での研究（昭和51～57年度）。

表1 照射をうけたヒト細胞クロンの増殖力

細胞系	増殖飽密度(per cd)	集落形成率
被照射細胞		
ETR—51	0.24×10^5	約 9 %
52	0.44	7.5
53	0.36	2.3
61	0.50	11.0
62	0.36	6.5
未照射対照		
TR—I	0.17	—
TR—IIA	0.28	1.1, 0.04
TR—IIB	0.23	0.19

註 ETRは300R照射後のヒトダウン症細胞のクロン、TRは未照射蒙古症細胞（東医歯大、佐々木正夫氏より分与された）。

1975 年, われわれは C. Heidelberger 教授 (Wisconsin 大学) より 10T1/2 (クローン 8, 第 4 代) の分与をうけた。この細胞は C3H/He マウス胎児より Reznikoff 他 (1973) によって樹立された偽 2 倍体線維芽細胞で, 接触増殖阻止能 (contact inhibition) を示す。メチルコランスレン処理をすると, 8 週後に単層培養上にトランスフォーム・フォーカスが生じ, ガラス器内発がんの有力な実験系の一つとされた。

1976 年 Terzaghi & Little は X 線による 10T1/2 細胞のトランスフォーメーションに成功し, 実験系としての有用性を確立した。

寺島他は本細胞のプラトー期培養を用いて実験を進めるべく企図した。プラトー期の 10T1/2 細胞は完全な接触増殖阻止を示し, その非増殖状態は個体における発がんの標的細胞 (幹細胞) のモデルとして有効であると考えられたからである。

実験法の詳細は原著¹⁾に述べられた。照射後 8 週間の培養で出現するトランスフォーム・フォーカスは図 1 にみる通り, 強い塩基色素親和性, 細胞

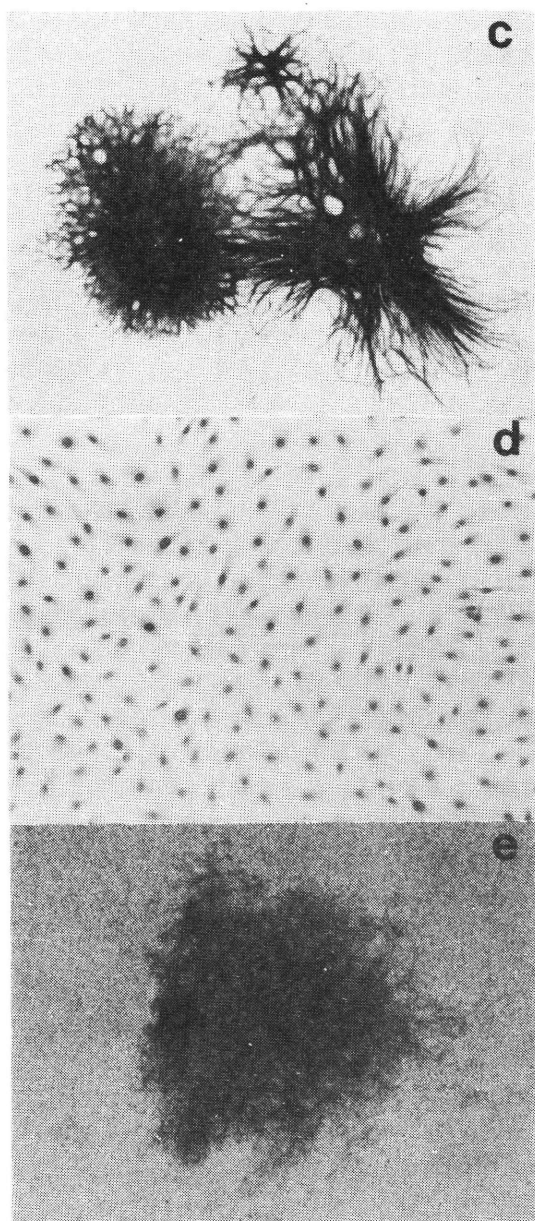
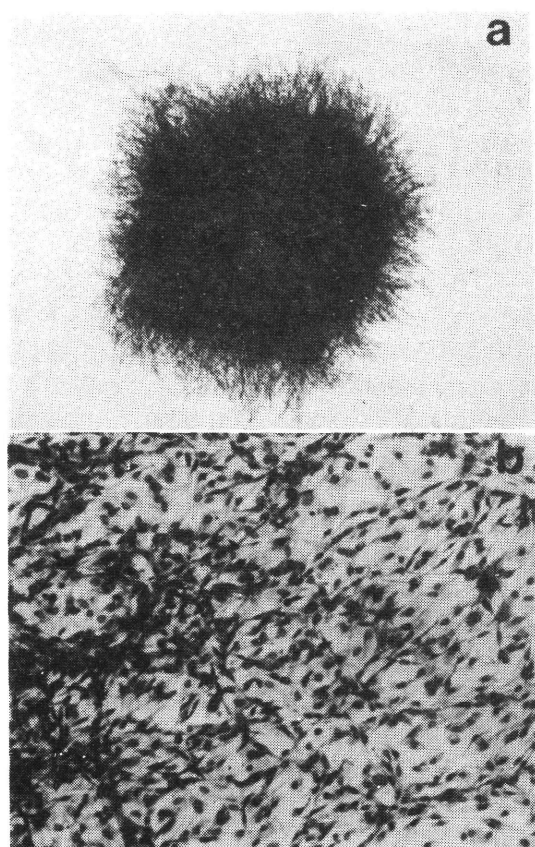


図 1. トランスフォーム・フォーカスとトランスフォーム細胞。

a, c はⅢ型のフォーカス, b はフォーカス辺縁, e はⅡ型のフォーカス, d は正常の 10T $\frac{1}{2}$ 細胞 (b と同倍率)。

の三次元的重なり合い構造 (piled-up structure) とフォーカス辺縁の無方向性 (disorientation) を特徴としており, その程度によりⅡ型, Ⅲ型と分類される。以下にえられた成果を要約する²⁾。

(a) 線量効果関係

X線によるフォーカスの発生頻度（生残細胞当たり）は図2に示されるように3相より成る。第1

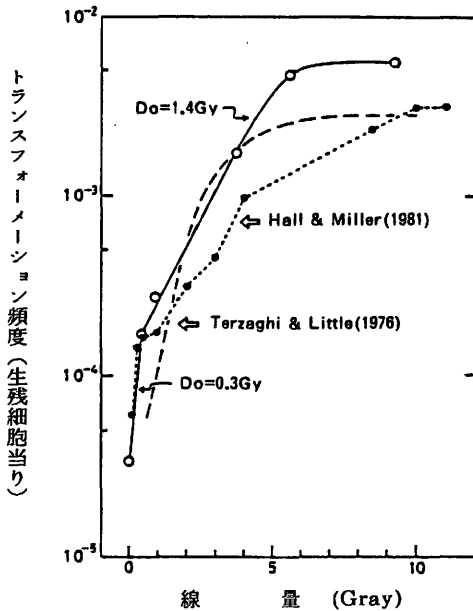


図2. プラトー期10T $\frac{1}{2}$ 細胞のトランスフォーメーションの線量効果関係。

各点(白丸)は1~10万個の生残集落を観察してえられた。破線、点線は米国の2グループのデータを示す。

相は低線量域 (0~50 rad) で30 rad, 第2相は中線量域 (100~600 rad) で140 rad の D_0 をもって線量の増加について増加する。それ以上の線量では見かけ上飽和する。第1相をみるにトランスフォーメーションは 10^{-4} の分画に single hit的に発生する。

(b) トランスフォーム損傷の除去

プラトー期細胞に誘発されたトランスフォーム

損傷は、図3に示すごとく、照射後6~7時間にわたってその80%が除去され、引き続き7~48時間に軽度の損傷附加がみられる(血清A, C)。Little 他(1975)は同じ細胞で照射後フォーカスが急増加することを示し、それが潜在致死損傷の修復によるとしているが、本実験によって全く修正された。

図3 血清Bでは損傷の除去がみられない。つまり損傷除去は血清依存的な過程で、表2にロットの異なる7種の血清の結果で示されるとおりであ

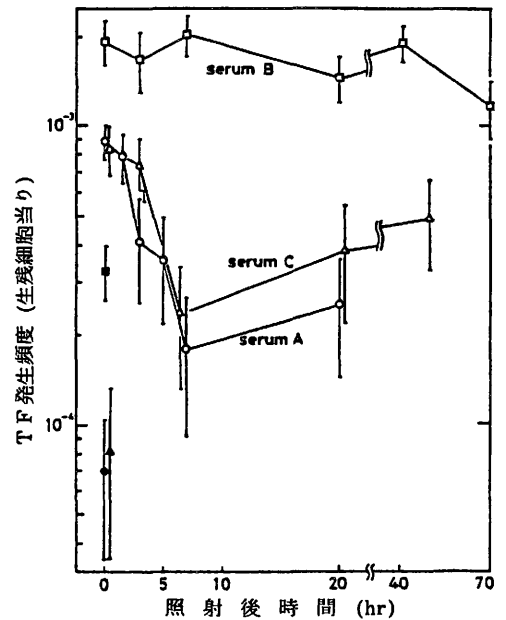


図3. プラトー期細胞に生じたトランスフォーム損傷の照射後変動。

白印は372 rad照射後の変動、黒印は自然発生率を示す。TF=トランスフォーメーション。

表2 TF損傷の照射後変化と培養血清の影響¹⁾

培 養 血 清 (コード)	T F 頻 度		比 率
	Ohr	6(〜7)hr	
牛胎児血清			
ロット # 7 0 3 2 4 (A)	8.9 ± 1.2 × 10 ⁻⁴	1.8 ± 0.9 × 10 ⁻⁴	0.2
# 7 1 2 1 6 (B)	1 9.3 ± 3.1	2 0.3 ± 3.2	1.1
# 8 1 2 3 1 (C)	8.3 ± 1.6	2.3 ± 1.0	0.3
# 9 0 1 1 2 (D)	2 5.8 ± 7.7	1 3.7 ± 5.2	0.5
# 9 0 3 2 3 (E)	3 6.5 ± 7.9	6.1 ± 2.9	0.2
# 9 0 3 1 4 (F)	3 4.7 ± 8.0	1 6.6 ± 4.9	0.5
牛 血 清			
# 7 1 2 3 0 (G)	1 4.4 ± 5.5	1 1.2 ± 5.4	0.8
BME培地 (無 血 清)			
	6.1 ± 1.8	1.5 ± 0.9	0.2

る。無血清の培養でも80%の損傷除去（比率0.2）が起るところをみると、細胞は元来損傷除去能力をもっており、血清中にその阻害因子があると考えられる。つまりトランスフォーメーション損傷はおそらく遺伝子に固定される前に血清内の（あるいは環境の）因子によって著るしく影響されるものである。

（C）分割照射の影響

前項に述べた如く、トランスフォーム損傷は概して照射後急速に除去されるので、細胞が分割照射を受ければフォーカス頻度が低下するのは当然期待される。実際100～400radの2等分割照射実験では、最初の5時間の間隔では明らかな低下を示し、以後15時間にかけて軽度の上昇がみられた。

Borek, Miller 他³⁾の米国の実験結果は5時間間隔でフォーカスが増加するとしているが、これは増殖細胞の特殊な条件下のことである。

（d）トランスフォーム・フォーカスの発生機構

フォーカスの発生には放射線損傷をうけた細胞同志の接触が必要とされる場合があり、その形態学的証拠が得られている³⁾。そのような機序の可能性を示唆するデータは Haber 他（1977）、Kennedy 他（1980）によってもえられている。

（e）トランスフォーム細胞のクロンのガラス器内性状と腫瘍形成能⁴⁾

照射後トランスフォームしたと思われる不透明の集落（opaque colonies）が19個クローニングされ、各クロンの形態学的性状（フォーカス型の同定）、増殖性状（増殖率、飽和密度、軟寒天集落数）と同型C3Hマウスへの皮下移植による腫瘍形成力がしらべられた。

表3にみられるように、クロンの内14個はⅢ型、5個はⅡ型であった。各クロンの増殖率も、飽和密度も非トランスフォーム細胞と比べるとⅡ型、

表3 軟寒天集落形成と腫瘍形成の比較

フォーカス のタイプ	TFクロン	継代数	寒天集落数 (10^5 細胞当 り)	腫瘍移植率 (10^6 細胞を 5-6匹マ ウスに接種)	タイプ別 移植率	
Ⅲ	Tf-1	4	19	6/6,	13/14 (93%)	
	Tf-4	5	22	4/6		
	Tf-7	6	50	4/6		
	Tf-10	4	0.5	0/6		
	Tf-12	5	8	2/6		
	Tf-13	4	16	6/6		
	Tf-17	4	4	6/6		
	Tf-18	4	21	6/6		
	Tf-19	6	59	1/6,		
	Tf-20	5	38	5/6		
	Tf-21	6	uncountable	6/6		
	Tf-6	5	132	2/6		
	Tf-9	5	2	1/6		
	Tf-16	5	6	2/6		
Ⅱ	Tf-3	5	0	0/6	1/4 (25%)	
	Tf-8	6	0	0/6		
	Tf-14	4	0	n. d.		
	Tf-2	5	n. d.	2/5		
	Tf-5	4	n. d.	0/6		
	SP-Tf					4
X-nonTf		6	0	0/5		
10TI/2		12	0	0/6		
培養液				0/6		

Ⅲ型の順に高くなる。

重要な所見は表3に示されるフォーカスの型と軟寒天集落形成力と同系マウスへの腫瘍形成率の相関である。要約するとⅢ型はすべて軟寒天集落を形成する能力をもち、同時に腫瘍形成力を示す。したがって形態学的型別はトランスフォーム細胞の腫瘍性のもっとも簡便にして正確な判断基準であり、軟寒天集落形成力の検査はマウスへの移植に代りうるものである、ということである。

(f) トランスフォーメーションの発生に対する血清の効果^{1, 5)}。

この問題は放射線による細胞トランスフォーメーションのもっとも困難にして、かつ意義の深い研究領域であった。

トランスフォーメーションの誘発は放射線照射に先立つ培養(前培養)と照射後の検定培養との二つの操作より成る。前培養に用いる血清と検定培養に用いる血清と区別してフォーカスの頻度を

表4 前培養血清と検定培養血清のトランスフォーメーションへの効果

実験グループ 番 号	前 培 養 血 清	検 定 培 養 血 清	フォーカス発生頻度
1	ロット # 8 1 2 3 1	ロット # 8 1 2 3 1	$8.3 \pm 1.6 \times 10^{-4}$
2	# 8 1 2 3 1	# 8 1 2 0 1	2.9 ± 6.4
3	# 9 0 3 2 3	# 8 1 2 3 1	6.2 ± 2.6
4	# 9 0 3 2 3	# 9 0 5 0 9	3.6 ± 7.9
5	# 9 0 3 1 4	# 8 1 2 3 1	3.3 ± 1.8
6	# 9 0 3 1 4	# 9 0 5 0 9	3.4 ± 8.0
7	# 7 1 2 3 0	# 8 1 2 3 1	1.4 ± 5.5

註 プラター期細胞を372rad 照射、ただちにトリプシン処理のち 8週間
の検定培養を行なった。

みると(表4),検定培養血清に依存して値は3~10倍も変ることがわかる。これは8週間の検定培養の間に起こるトランスフォーメーションの発現(expression)に血清因子が大きく作用するためである。もしフォーカス発生頻度の低い血清(low yield serum, LYS)と高い血清(high

yield serum, HYS)とを手に入れることができれば,LYSで始まった検定培養を種々の間隔でHYSにおき替えてゆくことによって,照射後どの時点でHYSに対する感受性が消失するかが知られるであろう。図4の各頻度はその時点でHYSにおき替えられたときの値を示している。この結果はLYS中のトランスフォーム損傷は数日~2週間までに固定され,発現され,したがってHYSに対する感受性を失なってゆくことを示すものである⁶⁾。

トランスフォーメーションに影響する血清因子とは何かをわれわれは求めてきた。この数年間に用いられた多数のロットの牛血清がラジオイムノアッセイなどによって甲状腺ホルモン,副腎ホルモン,下垂体ホルモン,その他の生理活性物質など11項目について測定されたが,トランスフォーメーションと因果関係を示す単一の因子はみいだされなかった。

〔総 括〕

(1) 放射線によるヒト細胞のトランスフォーメーションの3年にわたる研究はほとんど不成功に終

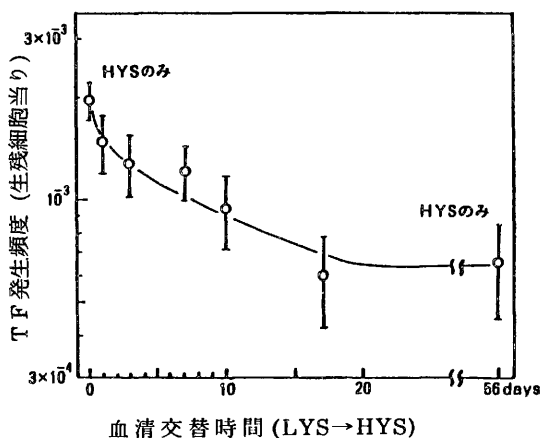


図4 トランスフォーム損傷の発現に対する検定培養血清の影響。

った。トランスフォーメーションは動物種によってきわめて感受性の差が大きいものである。しかし放射線に対するDNAの損傷、修復に著しい差がないとすれば、感受性の差は、固定されたトランスフォーム損傷が発現に至る促進過程（promotion）の差であると考えざるをえない。ヒト細胞は促進因子（promotive factor）に対して比較的感受性が低いであろう。今後、ヒト細胞に対する促進因子を解明することが、ヒトへのリスク推定に重要であると思われる。

(2) マウス細胞はトランスフォーメーションの機構の解析に有力な手段であることがわかった。図5にまとめられるように、トランスフォーム損傷

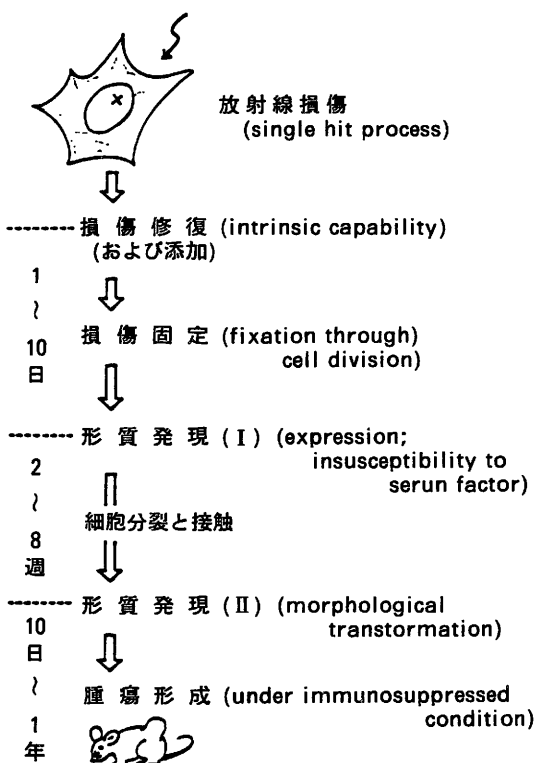


図5. トランスフォーメーション発生の模型。

が発現するには10日～2週間の細胞増殖（おそらく10数分裂）が必要とされる。その発現には血清中の因子が極めて顕著なはたらきを示し、化学物質発がんの研究で知られてきた非生理的促進因子

（TPA、リングビアトキシン、サッカリン、フェノバルビタールなど）と同等あるいはそれ以上の作用を示すものである。今後、促進因子の研究はがん研究の中心的課題の一つとなるであろう。その成果によってわれわれは発がんの化学的防護（chemoprotection）の方途を見出すであろうし、発がんのリスクを変えることも可能であるかもしれない。

図5にみるように、フォーカスの発生には細胞間接触による相互作用も必要とされる証拠がえられた。

また血清因子には初期トランスフォーム損傷の除去を阻害する能力も証明された。これは当該損傷が従来考えられていたような単純なDNAの変異や染色体異常ではないことを示している。

これらの知見を総合して、トランスフォーメーションの研究はリスクの動力学的あるいは定量的研究とともに、発がんの機構論により著しい寄与をすると考えられる。

(3) マウス細胞の放射線トランスフォーメーションをプラトー期細胞を用いて行なったのは本研究をもって嚆矢とする。前述の如く、発がんの標的細胞であるという認識に立てば、米国その他の諸国の研究に先行した本研究の意義は少なからぬものといえる。

この条件での線量効果関係はほぼ確立され、分割照射の効果は増殖細胞を用いた米国の諸成果と全く異なった。プラトー期細胞は非増殖状態なので、分割照射、低線量率照射のさいに問題となる細胞増殖の影響からは全く開放されていることを附言したい。

(4) 本研究を遂行するうえでの最大の困難は培養に用いる良好な仔牛胎児血清の入手であった。研究費の不足によって、良質、悪質種々の血清を用いざるをえなかったことが、実は米国の成果と異なる本研究の独特な成果となり、同時に推進力でもあったと思われる。

謝 辞

本研究の遂行に当って照射装置の整備に協力された技術部技術第2係、病理組織学的研究に協力をいただいた生理病理研究部、古瀬、小林、野田の諸氏に謝意を表する。

〔研究発表〕

1. Terasima, T., Yasukawa, M. and Kimura, M. : Radiation—induced Transformation of IOT1/2 Mouse Cells in the Plateau Phase ; Post—irradiation Changes and Serum Dependence. *Gann*, **72**, 762 — 768, 1981.
2. 寺島東洋三, 大津裕司, 安川美恵子, 岡田安弘, 渡部郁雄 : 放射線発がん細胞トランスフォーメーション, 第14回放医研シンポジウム報文集 (印刷中).
3. Okada, Y. S. and Watanabe, I. : Frequent Appearance of Radiation—induced Transformation in Junctional Areas of Colonies. *Gann*, **69**, 91—98, 1978.
4. Ohtsu, Y., Yasukawa, M. and Terasima, T. : In Vitro Properties and Tumorigenicity of Radiation—transformed Clones of Mouse IOT1/2 Cells. *J. Radiat. Res.*, **24**, 118 — 130, 1983.
5. Terasima, T., Yasukawa, M. and Kimura, M. : Development of Insusceptibility to Serum Factor During the Radiation Transformation Process. *Br. J. Cancer*, **47**, 439 — 442, 1983.

II 放射線による遺伝障害の危険度の推定

に関する調査研究 概説

中 井 斌
(遺伝研究部)

General Activities of Genetic Effects Research Group

S. Nakai
Division of Genetics

The present report deals with research project on genetic risk estimation of low dose and low-dose rate irradiation. It is of great importance for this work to elucidate dose-effect relationships of induction of mutations and chromosome aberrations. For this purpose we have conducted the studies on detection of mutations and chromosome aberrations using systems of cultured mammalian cells and lymphocytes of man and monkey. Special atten-

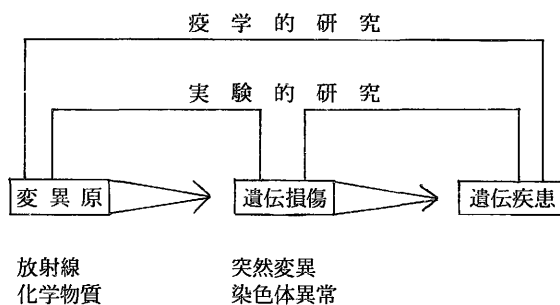
tion has been given to clarify role of repair influencing the dose-effect relation. It is noted that we have established monkey rearing system and facility in order to investigate the genetic risks applicable to human being. A few lines of studies listed below were undertaken by scientists in the Division of Genetics in collaboration with the staff of the Primate Research Laboratory of NIRS.

I. 研究の現状とその背景

放射線の遺伝障害は晩発（発がん）効果とならんで放射線の生物影響の二大対象となるものである。したがって、放射線の遺伝リスクの評価に必要な科学的データを得ることは、放射線の安全管理の基礎となる線量基準の設定の科学的根拠として不可欠である。

放射線リスク評価の中心的課題は、種々の条件下における線量と効果の関係、すなわちリスク係数を求めることにある（UNSCEAR, ICRP等）。遺伝障害については、疫学的研究手法を適用することが実際上不可能なため、実験動物を用い、放射線による遺伝損傷を介する各過程の

科学的分析のデータを用いたシステムの予測によりリスク評価が行われる。



現在における遺伝リスクの評価は、このような考え方の下にマウス、サルなどの実験動物の研究

表1 ヒトが低L E T放射線1 ラドを低線量で照射されたとき
誘発される種々の種類の遺伝損傷の危険度

(国連報告 1977)

リスク算出根拠	1 0 0 万の配偶子照射 当りの誘発率の期待値		第1世代100万 出生当りの発現	
	精原細胞	卵 子	男	女
(1)優性突然変異				
マウス骨格突然変異	4	—	20	3~9
マウス角膜突然変異	0.35	—	15	2~7
(2)相 互 転 座				
マーモセット	17~87	低 い	—	—
アカゲザル	2~11	低 い	—	—
(3)相互転座よりの不均衡産物				
マーモセット	34~174	低 い	2~10	—
アカゲザル	4~22	低 い	1~1	—
(4)X染色体消失	非常に低い	低 い	低 い	低 い
(5)他の染色体異常	—	—	—	—

データがその基礎をなしており、これに基づく最新のリスク評価(リスク係数)は国際的なレベルでは、UNSCAR 報告などにおいて与えられている。

しかしながら、リスク評価は実験的データの得られない場合もあるので多くの仮定を含まざるを得ず、したがって今日与えられているリスク係数は多くの不備な点があるばかりでなく、精度、信頼度の点で多大の問題点を残している。その主要な科学的問題点は次のものがあげられる。

(1) 低レベル放射線の効果

高線量、高線量率の条件下で得られたリスク係数の低レベル領域での適用性

(2) ヒトへの適用性

実験動物のデータを基礎としているため、ヒトへの適用性の保証と外挿のための生物種差のデータの欠除

(3) 遺伝損傷(突然変異と染色体異常)と遺伝性疾患をつなぐ相互関係のデータ

II. 特別研究の狙い

(1) 低線量域の実験データを求めること。

従来は、高線量(突然変異では約30~50 R、染色体異常では約20~30 R)のデータから外挿により低線量域のデータを推定していた。このため本研究では、末梢血染色体異常、培養細胞での突然変異など、適切な材料、方法を選択することによ

り線量限度(許容線量)5 R付近の実験データを直接得るとともに、低線量効果の理論的推定の基盤となる誘発機構の解析とパラメータをうることを企図した。

(2) 霊長類を放射線研究のための実験材料として確立し、必要なデータを得ること。

放射線の遺伝リスクの研究には、実験動物を用いざるを得ないが、このためヒトへの適用性に問題を生ずる。この問題を解決するため、ヒトに近縁の霊長類を実験動物として確立し、これを用いてヒトとの相互関係に関する科学的情報を得る。特に、従来不備であった染色体異常に関する量的データを求めるとともに、あわせて遺伝リスク推定の上で、国際的にも多くの異論のある生殖細胞の染色体異常の線量効果関係のデータを得るためその基礎固めを行った。

III. 特別研究の成果とその意義

(1) 低線量効果の研究

①ヒトの末梢血を用い、国際的にも従来のデータで得られていなかった許容線量レベル(2×10^{-3} $\mu\text{Ci/ml}$)を含む低レベル・トリチウムの染色体異常の線量効果を明らかにし、低線量域で線量効果が二相性を示すことを明らかにした。

②ヒトおよびサル(末梢血を用い、許容線量(5 R)レベルの低線量電離放射線の染色体異常の線

量効果関係の実験データを得、30R以下では線量効果の非直線性を示唆する結果を得た。

③マウス培養細胞系を用い、電離放射線による突然変異誘発の25R～300Rまでの線量効果のデータを得、この範囲では線量効果が直線関係を示すことを明らかにした。

④マウス培養細胞よりDNA損傷の修復欠損株を多数分離、その分子生物学的、遺伝学的特性を明らかにし、放射線による突然変異、染色体異常のリスク係数が修復と密接に関係することを実証し、しきい値と修復の相互関係を示唆する重要な知見を得た。

(2) ヒトへの適用性に関する生物種差の研究

①放射線の遺伝リスク研究のため霊長類（カンクイザル）を実験動物として用いるに必要なシステムを確立した。

②末梢血材料では、ヒト、サル染色体異常誘発に対し、高線量率では生物種差がないが、低線量率では種差があり修復能に生物種差のあることが示唆され、また有効腕数を染色体異常誘発の生物種差のパラメータとする従来の仮説は用い難いことを示した。

③遺伝効果の新しい指標として、精子の形態異常が有効なことを、カンクイザル、ゴールデンハムスターを用い、その線量効果関係、感受期のデータによって実証し、また形態異常誘発の生物種差は染色体異常誘発の場合と平行関係にあることを明らかにした。

④放射線による培養細胞の突然変異の誘発率は、ヒト、マウス間では大差のないことを示唆する結果を得た。

以上の成果は、国際雑誌に十数編の科学論文として発表され、そのほとんど全部が国連報告にも多数引用されると共に、国際学会（ICRR）においても高く評価されている。

これらの成果は遺伝リスク評価の科学に対し次の意義を有するものと考えられる。

(1) 放射線遺伝学の研究

①放射線誘発の染色体異常の誘発機構に関するlinear—quadratic modelの生物学的機構の解析を行い、線量率と修復の関係について新たな知見を得た。

②放射線遺伝学研究、特に生殖細胞での染色体異常研究のためのユニークな霊長類の実験系を確立した。

③哺乳類培養細胞系に於て最高水準のDNA損

傷修復欠損の遺伝システムを確立し、突然変異、染色体異常研究に独自の基盤を作った。

(2) 放射線遺伝リスク評価の問題

①細胞レベルの研究の視点から遺伝損傷（突然変異、染色体異常）について従来のデータより約一けた低い放射線の線量効果関係の実験データを得た。

②ヒトを含む霊長類及び培養細胞の実験データから、遺伝リスク評価の基本的課題であるヒトの適用性につき、生物種差と修復能の関係を示唆する重要な知見を得た。

(3) 放射線の安全の問題

①従来、我が国ではほとんど欠けていた放射線の遺伝リスク評価のための研究体制を整え、実験データを提出し、我が国の放射線の安全管理に科学的基盤を与えた。

②国際的にも従来得られていなかった許容線量レベルの低線量域のデータを得て、低レベル放射線の効果について見通しを与え、その社会的受容に信頼性を付与した。

IV. 将来への展望

今次特別研究によってようやく遺伝リスク評価の研究体制は概ね整ったと考えられるが、しかし国際的にも現在の遺伝リスク評価にはなお多くの科学的問題点を有する。したがって、積極的に次の研究を進め、国際的にも我が国の責任を学問的貢献によって果すとともに、我が国の原子力の社会的受容の面でも十分の信頼性を得る必要がある。

(1) 霊長類による放射線染色体異常のリスク推定の研究

生殖細胞の染色体異常、特に相互転座、遺伝リスクに直接関係するものが、現在国連報告のリスク係数の範囲には約10倍の開きがある。

本次特研によって、霊長類生殖細胞の研究のユニークなシステムが確立したので、本問題を解明し、我が国のデータによって遺伝リスク評価に直接寄与する必要がある。

(2) 培養細胞によるヒトの放射線突然変異のリスク推定の研究

広島、長崎のヒトのデータの解析の最近の結果では、マウスなどによって与えられたリスクの予想値は数倍過大である可能性が示唆されている。本次特研によって培養細胞による突然変異推定システムは、ほぼ確立したので、ヒト/マウスの突然変異のリスク係数と修復能に関する異同のデー

タを得て本問題の解明に貢献した。

(3) 放射線による遺伝障害の検出システムの開発に関する研究

ヒトの精子など生殖細胞で直接遺伝損傷を検出する系を確立することは、放射線のヒトの疫学的

研究に新たな手段を提供する途を開くのみならず、遺伝損傷の伝達機構解明にも有力な手段を提供するので、将来の研究動向を予見して開発研究を進めることが必要である。

1. 霊長類リンパ球を用いた放射線誘発

染色体異常の線量効果に関する研究

戸張巖夫, 堀 雅明, 平井百樹, 高橋永一, 辻 秀雄,
宇津木豊子, 中井 斌 (遺伝研究部)

Studies on Dose-Response Relationship for Chromosome Aberrations in Peripheral Lymphocytes of Primates

I. Tobari, E. Takahashi, M. Hori, M. Hirai,
H. Tsuji, T. Utsugi and S. Nakai
Division of Genetics

To estimate the genetic effects of ionizing radiation to human population, it is of great importance from theoretical and practical viewpoints to obtain information on the relationships between the yield of chromosome aberrations and dose at low dose levels. In the present studies, special emphasis was laid on the induction of chromosome aberrations by low-dose radiation as well as by radiation at low dose rate. The results obtained are summarized as follows; 1) The experimental results on the chromosome aberrations induced in human lymphocytes by tritium at the very low dose level showed that the types of chromosome aberrations were mostly chromatid types and the dose-response relationships observed in both tritiated water and ^3H -thymidine were composed of two phases. That is, at higher dose range the yields of chromatid breaks increased linearly with dose, while those at lower dose range were significantly higher than would be expected by a downward

extrapolation from the linear relation, suggesting that partial-hit or partial-target kinetic events appear at very low dose exposure.

2) The yields of dicentrics at high dose level (100–300 rad) of γ -acute-irradiation were not significantly different among three species, squirrel monkey, crab-eating monkey and slow loris in spite of difference in chromosome arm number. Furthermore, dose-response relationships for these species were consistent with that for man and well fitted to the linear-quadratic model. From these results it can be pointed out that the chromosomal radiosensitivity of these species is essentially the same as that of man, at least in the lymphocytes system.

3) A comparison of dicentric yields in lymphocytes between man and crab-eating monkey after acute (49.6 rad/m) and chronic (0.285 rad/m) γ -irradiations made it clear that with acute irradiation there was no significant difference between them, but for the chronic irradiation

tion a significant difference was found between the species. The species difference observed for chronic irradiation was almost entirely due to change in the value of α in the linear-quadratic equation. From the results of post-irradiation incubation experiment, it was indicated that G_0 -repair capacity for chromosomal damages leading to dicentrics may be different between man and the monkey.

4) The dose-response relationships for dicentrics obtained from the combined data of low-dose (5–50 rad) experiments with those of high-dose (100–400 rad) experiments had a good fit to the linear-quadratic model for man, but not for crab-eating monkey. When the linear regression lines between 0 and 30 rad were calculated, the human data gave a satisfactory fit to a linear model, as theoretically expected, whereas this was not so for the monkey. Furthermore, there was some suggestive evidence for the existence of a plateau in dicentric yields between 10–30 rad for the monkey and between 20–30 rad for human lymphocytes, but more data would be needed to verify this suggestion for human

lymphocytes.

5) Two mutant cells, M10 and Q31, were examined for chromosomal aberrations induced by γ -rays and ultraviolet light (UV), as compared with mouse lymphoma L5178Y cells. M10 cells are sensitive to ionizing radiation and 4NQO and Q31 cells are UV and 4NQO sensitive cells isolated from L5178Y cells, with regard to killing effects. After γ -irradiation, the frequency of chromosomal aberrations in M10 cells was much higher than that in L5178Y cells and in Q31 cells chromosomal aberrations were only as frequent as in L5178Y cells. After exposure of UV, the yield of chromosomal aberrations in Q31 cells was significantly higher than that in L5178Y cells, but it was not so in M10 cells. From these results, M10 cells may be hypersensitive to γ -rays, but not to UV, while Q31 cells may be hypersensitive to UV, but not to γ -rays. The hypersensitivity of M10 cells to γ -rays may result from a defect in the ionizing-radiation repair mechanism as has been suggested to occur in ataxia telangiectasia cells. Q31 cells may be deficient in a UV-like repair pathway.

〔 緒 言 〕

染色体異常は突然変異と並んで遺伝障害の代表的なものであり、その数量的取扱いが比較的容易なことから放射線の遺伝的リスクを推定するための重要な指標となる。我々はヒトおよびヒトに近縁なカニクイザルの体細胞（リンパ球）を用いて、放射線による染色体異常の誘発頻度と線量との関係を明らかにすることによって、放射線感受性および回復能における種差の有無を調べ、その要因の解明のための研究を行った。特にヒトに対する放射線の遺伝的リスクを推定するためには、低レベル放射線の遺伝的リスクを明らかにすることが最も重要な問題の一つであり、この事に重点を置いて研究を進めた。

これら放射線による遺伝リスク推定の研究の今日の課題として次のものが挙げられる。

近年、原子力平和利用としての原子力発電の発展に伴い、将来、原子炉および核燃料再処理施設から環境中に放出されるトリチウムの量が膨大

することが予想される。したがって世界的にトリチウムの濃度が上昇すると、個人の被曝線量の増加はわずかでも、世界人類集団の被曝線量を考えるなら、その遺伝線量はかなり大きいものとなり、遺伝的障害も無視できないことも予想される。したがってトリチウムによる内部被曝の遺伝障害について、特に低線量域における線量効果関係のデータもヒトへのリスク推定に必要なものである。

一方、ヒトに対する放射線の遺伝的リスク推定のために利用されているデータはハツカネズミを実験動物として行われた実験から得られたものがその大部分を占めており、これらのデータのヒトへの外挿の妥当性には種々の問題が包含されている。Brewen ら（1973）が提起した放射線による染色体異常の誘発頻度と実験動物種の染色体数との相間関係の有無を明確にすることは、上述の“外挿の妥当性”に関する問題を解明する有力な手がかりとなるものである。

また原理的課題として、染色体異常の Linear-quadratic model は高線量域での実験結果から

低線量域での遺伝障害を予測するためのものであり、したがって低レベル放射線の遺伝的リスクを推定する基本原理と云える。この理論では、二動原体染色体、相互転座などの染色体異常は、本質的には有効な二つのイオン化による染色体損傷に起因すると考える。この仮説に基づく、誘発染色体の収量(Y)は線量(D)の一次の項に比例する単一イオン飛跡の効果と、線量の二次の項に比例する二つのイオン飛跡の効果の和に等しくなり、 $Y = \alpha D + \beta D^2$ の関係が成立つ。この仮説が正しいとすると、低線量では二つのイオン飛跡による染色体損傷の確率は著しく減少することになるので、この場合、 $Y = \alpha D$ の直線式に近似することが期待される。また低線量率照射のもとでは、一方のイオン飛跡による損傷は、他のイオン飛跡による損傷が生ずるまでの間に修復され、その結果 $Y = \alpha D$ に近づくことが予測される。したがって低レベル放射線のリスク予測は、 $Y = \alpha D$ から外挿される値が理論的予測値となる。したがって、これら理論的予測値の実証的検定が重要な課題となる。さらに低線量放射線の遺伝障害を明らかにするためには、低線量域での線量効果関係の解明に、修復機構が密接に関係している。この解明のためには、修復欠損の種々の突然変異培養細胞を用いることが最も有効な解決手段である。近年、Satoら(1979)はマウスの白血病細胞、L5178Yより細胞死に関して放射線高感受性の細胞の分離に成功した。これらの細胞が染色体レベルでも高感受性であれば、染色体損傷の修復機構を解明するための有力な実験材料となりうる。

上記の観点から下記に述べる研究を行った。

(1)低レベル・トリチウムの染色体異常誘発効果に関する研究

(2)霊長類における放射線誘発染色体異常と染色体有効腕数に関する研究

(3)放射線誘発染色体異常の出現頻度に及ぼす低線量率効果の研究

(4)ヒトおよびカニクイザル G_0 期リンパ球における染色体異常、特に低線量域における線量効果関係に関する研究

(5)放射線高感受性培養細胞における染色体異常の研究

【実験結果と考察】

(1)低レベル・トリチウムの染色体異常誘発効果に関する研究(昭和50～51年度)。

ヒトの培養リンパ球に対する種々の ^3H 標識物質の効果を染色体異常を指標として分析し、誘発される染色体異常の型とその濃度効果を比較検討した(実験の詳細は原著^{1),2)}に記載された通りである)。トリチウムの許容レベル $3 \times 10^{-4} \mu\text{Ci/ml}$ を含む種々の濃度のトリチウム水 ($1 \times 10^{-4} \sim 10 \mu\text{Ci/ml}$) と ^3H -チミジン ($1 \times 10^{-6} \sim 100 \mu\text{Ci/ml}$) によって誘発される染色体異常は、いずれの場合にも、そのほとんどが染色分体型の切断であった。トリチウム水の場合、高濃度域で二動原体、あるいは環状染色体の染色体型の異常が観察されたが、 ^3H -チミジンの場合には、高濃度域でもこの染色体型の異常は観察されなかった。 ^3H -

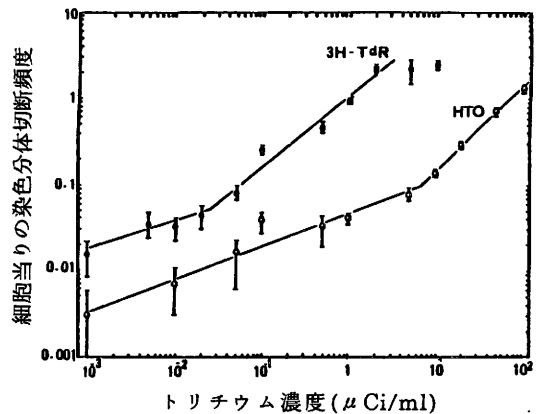


図1. トリチウム水(HTO)と ^3H -チミジン(^3H -TdR)による染色体異常の濃度効果曲線。

濃度と染色体異常の発生率の関係を図1に示してある。トリチウム水、 ^3H -チミジンいずれの場合にもその濃度効果曲線は、ある濃度のところで折れ曲がって、いわゆる二相性を示している。トリチウム水の場合、 $5 \mu\text{Ci/ml}$ 以上の濃度では、濃度効果曲線が $Y = 0.02 D^{0.95}$ (Y は細胞当りの染色体分体切断数、 D は濃度) となり、染色体切断の単一ヒット反応をよく反映しているが $5 \mu\text{Ci/ml}$ 以下の濃度では、 $Y = 0.09 D^{0.12}$ のいわゆる勾配となる。 $0.001 \mu\text{Ci/ml}$ 以下の極低濃度では、対照区の染色体異常発生率(0.04)と等しく、統計的有意差は認められなくなる。

一方、 ^3H -チミジンの場合は、 $3 \times 10^{-2} \mu\text{Ci/ml}$ のところで曲線が折れ曲がっている。高濃度域では、濃度効果曲線が $Y = 1.17 D^{0.70}$ となり、トリチウム水と同様、単一ヒット型のカイネテックスを示しているが、低濃度域では $Y = 0.13 D^{0.12}$ で、トリチウム水の場合と同様にゆるい勾配となって

いる。さらに³H-チミジンの染色体誘発はトリチウム水の場合に比べて、約100倍ほど高い。このことは、染色体異常の直接的標的である染色体DNAに³H-チミジンが特異的にDNA複製期に取り込まれるためであろうと考えられる。

トリチウムの内部被曝による本研究の最もユニークな点は、染色体分体の切断に関して明らかな二相性の濃度効果曲線を示したことである。この結果の最も妥当な説明の1つは、細胞自体のもつ放射線障害の回復能力の効果が、低線量域で顕著になることによる、と考えることである。すなわち、低濃度域でβ線によって誘発される染色体DNAの切断の低度が低く、したがってこの領域では細胞の修復能力によって切断の大部分が修復されるので、染色体の切断頻度は減少する。一方高濃度域では、細胞の修復能力に比べて染色体DNAの切断数が上回ることになり、濃度に比例して誘発率が上昇すると解釈される。他に考えられるモデルは、染色体分体の切断のためには、その標的に対していくつかのDNA鎖切断の蓄積が必要とする考え方である。これらのモデルの当否は現在のところいずれとも断じがたい。実際には、染色体分体の切断はこれら両者のバランスによって生じていることも十分考えられる。

(2) 霊長類における放射線誘発染色体異常と染色体有効腕数に関する研究(昭和49～51年度)。

放射線誘発染色体異常についてBrewenら(1973)が6種の哺乳動物の培養リンパ球による比較研究の結果、放射線により誘発される交換型染色体異常の出現頻度は種のもつ染色体有効腕数に比例して増加するとの仮説を提唱し、その後この仮説の正当性が国際的に論議的となった。本研究は、染色体有効腕数の異なる3種の霊長類、カニクイザル(腕数83)、リスザル(腕数77)、スロー・ロリス(腕数99)を用いて上記の仮説の正当性を検討した。

各種雄3個体ずつから採血し、100～400ラドのγ線照射後、49時間培養し染色体異常の出現頻度を比較した(実験の詳細は原著³⁾を参照されたい)。図2は交換型染色体異常(二動原体+環状染色体)の頻度と線量との関係を示したものである。これら異常の線量効果関係は次のように表わされる。

$$\text{カニクイザル: } Y = (1.32 \pm 1.84) \cdot 10^{-4}D + (7.07 \pm 0.70) \cdot 10^{-6}D^2$$

$$\text{リスザル: } Y = (4.82 \pm 0.59) \cdot 10^{-4}D +$$

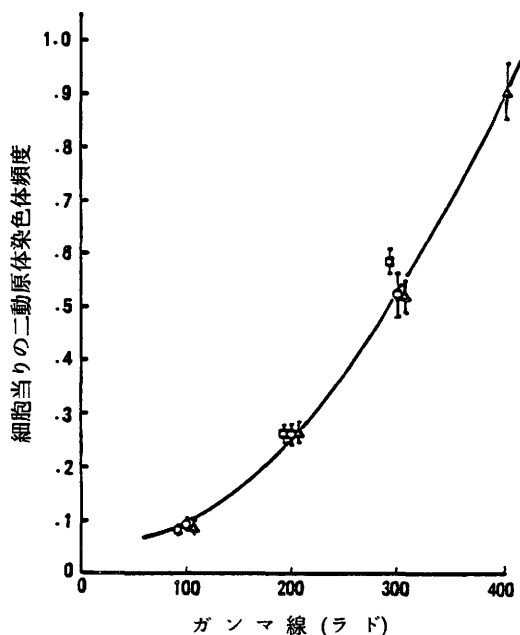


図2. リスザル(○), カニクイザル(□), ノロマザル(△)のリンパ球におけるγ線誘発染色体異常と線量との関係。直線はヒトリンパ球における線量効果曲線($Y=4.4 \cdot 10^{-4}D+4.92 \cdot 10^{-6}D^2$) (Sasaki, M., 1971)。

$$(4.73 \pm 0.22) \cdot 10^{-6}D^2$$

$$\text{スロー・ロリス: } Y = (5.60 \pm 0.75) \cdot 10^{-4}D + (4.70 \pm 0.21) \cdot 10^{-6}D^2$$

3種の回帰式間には有意差はなく、さらにヒトのリンパ球で得られた線量効果、 $Y = 4.4 \cdot 10^{-4}D + 4.92 \cdot 10^{-6}D^2$ (Sasaki, M. S., 1971) と近似している。

以上の結果から、(1)霊長類については、リンパ球での染色体異常を指標とした放射線感受性には種差はみられず、有効腕数には依らないことが確認された。したがって、Brewenらの提唱した仮説は正当ではない。(2)4種の霊長類から得られた線量効果関係はlinear-quadratic modelによく適合する。(3)少くとも急照射においてはサルについて得られた実験データから直接ヒトに対する放射線の遺伝的影響を推定することができる、と結論される。

(3)放射線誘発染色体異常の出現頻度に及ぼす低線量率効果の研究(昭和51～53年度)。

ヒトにおける放射線の遺伝的リスクを推定するために、染色体異常の出現頻度を指標として、ヒトおよびサルの放射線感受性および修復能におけ

る種差の有無を調べ、その要因を解明する目的で、ヒトおよびカニクイザルのリンパ球に γ 線の急照射を行い、両種間の線量率効果に関する差異を調べた。さらに種差の要因を明らかにする目的で染色体異常の出現頻度に対する細胞死の効果に関する実験を行った。

3-1) 線量率効果に関する実験

ヒトおよびカニクイザルの G_0 期のリンパ球に γ 線の急照射(49.6 rad/min) および緩照射(0.285 rad/min)を行い、48時間培養後、二動原体染色体(Dicentrics)の出現頻度を調べた(実験の詳細は原著⁴⁾を参照されたい)。図3から明

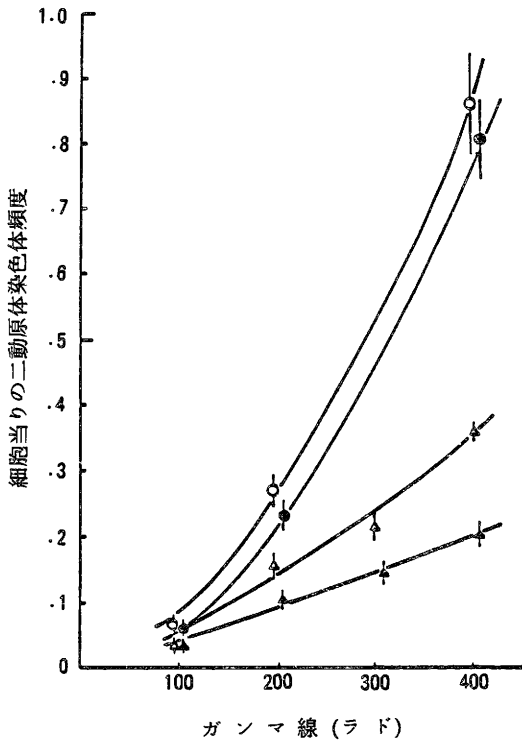


図3. γ 線急照射および緩照射による誘発染色体異常の頻度と線量(急照射(49.6rad/min);○ヒト, ●サル, 緩照射(0.285rad/min);△ヒト, ▲サル)。

らかなように、急照射においてはヒトとサルとの間に統計的有意差はなく極めて近似した線量効果関係が得られた。一方緩照射の場合には、線量の増加に従い dicentrics の出現頻度に関して両種間に著しい差異がみられた。すなわち 400rad ではヒトでは細胞当たり 0.357 ± 0.026 であるのに対しサルでは 0.202 ± 0.020 と有意に低くなっている。急照射で得られた線量効果曲線と緩照射で得

られたそれとを比較してみると、ヒトおよびサルのいずれにおいても明やかな線量率効果がみられるが、その効果には著しい種差が存在する。すなわちヒトに比べてサルの方が線量率効果が大きいことが結論される。急および緩照射で得られた結果を linear-quadratic model, $Y = \alpha D + \beta D^2$ に当てはめて α と β を推定すると表1となる。 α

表1

VALUES OF COEFFICIENTS α AND β ESTIMATED BY FITTING THE DICENTRIC YIELDS TO THE LINEAR-QUADRATIC EQUATION ($Y = \alpha D + \beta D^2$)

Dose rate	Species	$\alpha \pm S. E.$ ($\times 10^{-4}$)	$\beta \pm S. E.$ ($\times 10^{-6}$)
49.6 rad/min (acute irradiation)	Man	4.40 ± 1.50	4.29 ± 0.42
	Cem	2.74 ± 0.96	4.33 ± 0.27
17.1 rad/h (chronic irradiation)	Man	4.78 ± 1.61	0.99 ± 0.47
	Cem	4.50 ± 0.74	0.14 ± 0.21

Cem, Crab-eating monkey.

の値は急および緩照射いずれの場合にも、ヒトとサルとで有意差はなく、また β の値も急照射では、両種間に差はみられないが、緩照射ではサルはヒトよりも有意に低くなっており、その値はほとんどゼロに等しい。この事は、two ion tracks によって生ずる染色体損傷の大部分が修復されることを示唆している。ヒトについても β の値が急照射のときの約1/4にまで低下していることから、two ion tracks による染色体損傷の修復が存在すると考えられる。

以上の結果から、ヒトおよびカニクイザルのいずれのリンパ球においても、Wolff (1972) や Purrott & Reeder (1976 a, b) らが提起した G_0 -repair が作用している可能性が考えられるが、長時間にわたる照射時間中に dicentrics をもつ細胞が選択的に除去され、その結果緩照射では dicentrics の頻度が急照射に比べて低くなったという可能性も考えられる。

3-2) 染色体異常の出現頻度におよぼす細胞死の効果に関する実験

ヒトおよびカニクイザルのリンパ球に 400 rad の γ 線急照射(49.6 rad/min)を行い、0, 2, 4, 6, 24時間放置後PHAを含む混合培養液に移し、dicentrics の頻度と mitotic index を調べた。細胞当たりの dicentrics の頻度は照射後ではヒトで 0.86, サルで 0.80 であったが、4時間後にはそれぞれ 0.53 に減少し、以後24時間までほとんど

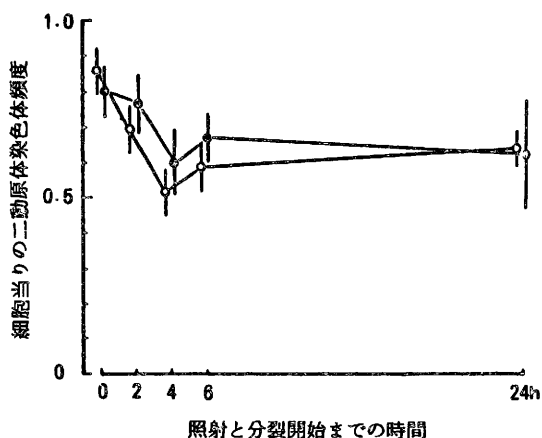


図4. γ 線照射(400rad)後の培養時間と二動原体染色体の頻度。○, ヒト; ●, カニクイザル。

変化はみられなかった(図4)。この減少の割合はヒトおよびサルともに約25%と推定される。一方, mitotic index はヒトとサルのいずれについても照射後2時間目に最低となり以後ほとんど変

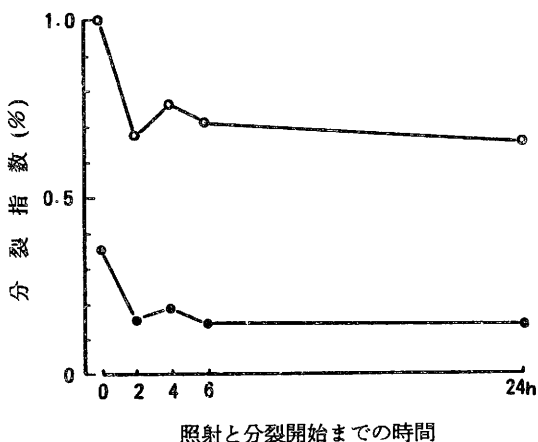


図5. γ 線照射(400rad)後の培養時間と mitotic index. ○, ヒト; ●, カニクイザル。

らなかった(図5)。すなわちヒトでは 1.00 % (0時間) から 0.68% に, サルでは 0.34% から 0.15% に減少しており, この減少の割合は約30~50%と推定される。

以上の結果から, 緩照射の過程で dicentrics をもつ細胞が選択的に死滅し, その結果として dicentrics の頻度が減少することが示唆された。しかし細胞死による dicentrics の消失のみによって, 急照射と緩照射の差異を十分説明することは不可能である。すなわち 400 rad 照射において緩

照射による頻度の減少は, ヒトで約55%, サルで約75%と推定される。一方, 細胞死による dicentrics の消失の割合はヒト, サルともに約25%と推定されるので残りの部分, ヒトで30%, サルで50%が G_0 -repair によるものと考えられる。したがって, 線量率効果に関してみられたヒトとサルとの種差の要因は, G_0 期の細胞の染色体損傷の修復能の違いによるものと推定される。

(4)ヒトおよびカニクイザル G_0 期リンパ球における染色体異常, 特に低線量域における線量効果関係に関する研究(昭和53~55年度)

50rad 以下の低線量域における線量効果関係を明らかにするために, ヒトおよびカニクイザルの末梢血を採取し, γ 線の急照射(49.6rad/min)を行った。用いた線量は 5, 10, 20, 30, 50rad であった。低張処理後, 固定を行い空気乾燥法によって染色体標本を作成した(実験の詳細は原著⁵⁾を参照されたい)。ヒトおよびカニクイザルのリンパ球における γ 線誘発二動原体染色体の頻度と線量との関係を図6に示す。linear-quadratic

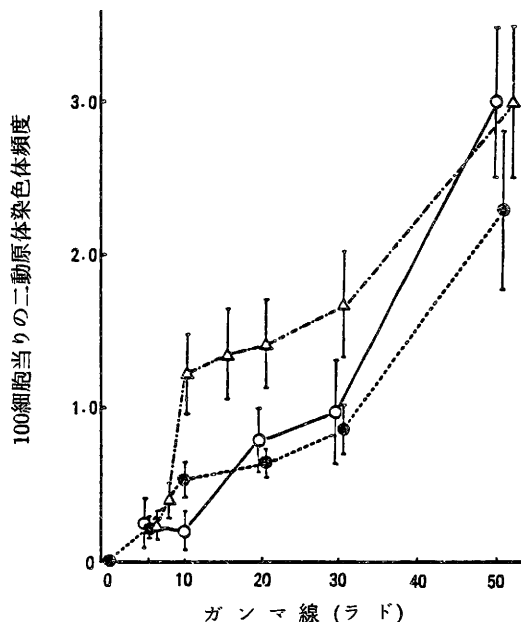


図6. γ 線誘発二動原体染色体に関する線量効果関係。○, ヒト; ●, サル; △, ヒト(Luchinik & Sevan-kaev, 1977)。

model の理論から, 低線量域での線量効果関係は直線式, $Y = \alpha D$ になることが予測される。高線量域での実験結果から α/β の値はヒトおよびサルで約50~100 rad の間と推定されるので, 5~

30rad で得られた結果から直線回帰を求めたところ、ヒトでは $Y = -0.003 + 0.034 D$, サルでは $Y = 0.106 + 0.026 D$ が得られた。観察値が直線式に適合するか否かを t 検定を用いて調べた結果、ヒトではよく一致するが、サルでは一致せず、特に10radにおいて期待値より有意に高い観察値が得られた。さらに本実験で得られたデータと高線量域(100~400 rad)で得られた予測値との差を統計的に調べた結果、ヒトでは linear-quadratic model によく適合するがサルでは適合しないことが明らかとなった。

近年、Luchinik & Sevankaev (1976) はヒトリンパ球を用いて50rad以下の r 線照射実験を行い、染色体異常の誘発頻度と線量との関係について10~30radの間にプラトーが存在することを報告している。サルについて得られたデータに基づいて10~30radの間の回帰係数を求めたところ、 0.015 ± 0.004 となりこの値はゼロと有意差がないことが明らかとなった。このことは少くともリンパ球においては二動原体染色体の出現頻度と線量との間にプラトーが存在し得ることを示唆している。一方、ヒトにおいても20~30radの間に同様のプラトーが存在しているようであるが、観察細胞数が十分でないため結論を出すには至らなかった。

本研究では低線量域における線量効果関係は linear-quadratic model から期待される直線性と有意に異なることを明らかにしたが、同様の結果が小核形成 (Jessen & Ramel, 1976), 突然変異, 発癌 (von Borstel, 1976) の研究においても報告されており、種々のタイプの遺伝障害の誘発に低線量照射がより効果的であることを示唆しているとともに、高線量域で働く修復とは異なる修復機構が低線量域での障害に作用することを示唆している。

(5)放射線高感受性培養細胞における染色体異常の研究(昭和55~57年度)

上記のように染色体異常の誘発に修復機構の関与が示唆されたので、放射線によるDNA損傷の修復欠損と考えられるマウス白血病細胞(L5178Y)由来の r 線高感受性株(M10)および紫外線(UV)高感受性株(Q31)を用いて自然発生および r 線、UV誘発染色体異常と姉妹染色分体(SCE)の出現頻度を調べた(実験の詳細は原著^{6,7)}を参照されたい)。

1) 染色体異常

自然発生染色体異常には染色分体型と染色体型の両者が観察された。その頻度(細胞当りの切断数)はL5178Y:0.075, Q31:0.188, M10:0.403でQ31は親株に比べて約2.5倍、M10は約5倍高かった。

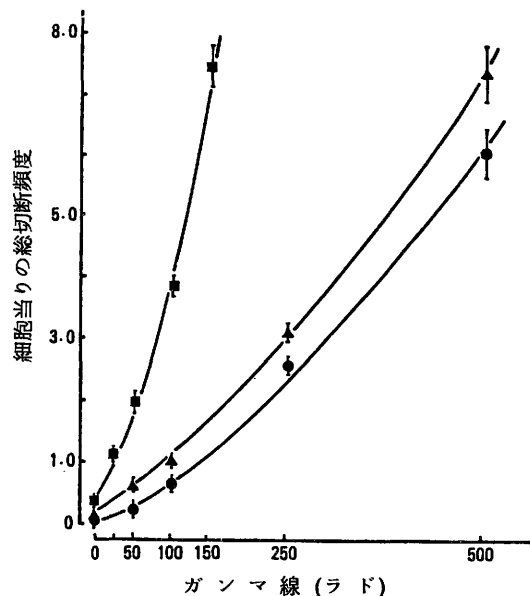


図7. マウス白血病細胞(L5178Y)およびそれに由来する変異株(M10, Q31)における r 線誘発染色体切断の線量効果関係。●, L5178Y; ■, M10; ▲, Q31。

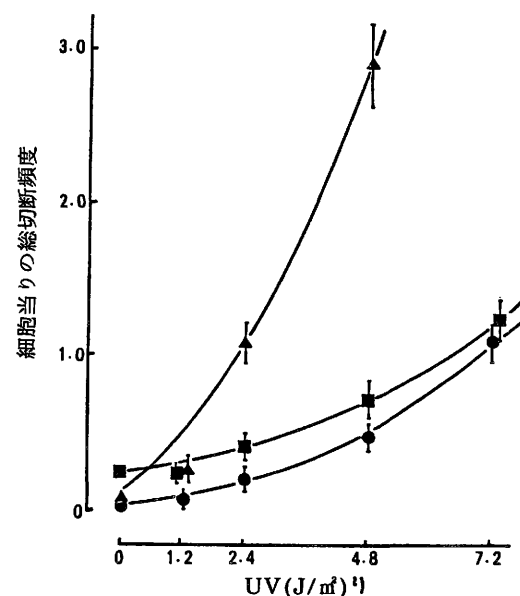


図8. マウス白血病細胞(L5178Y)およびそれに由来する変異株(M10, Q31)における紫外線誘発染色体切断の線量効果関係。●, L5178Y; ■, M10; ▲, Q31。

図7, 8はそれぞれ r 線およびUVによって誘発された染色体切断の頻度と線量との関係を示したものである。この図から明らかなようにM10は r 線に高感受性であり, Q31はUVに高感受性であった。この結果はSatoらの細胞死に対する結果と一致しており, 細胞死の要因として染色体異常が深く関与していることを示している。

2) 姉妹染色分体 (SCE)

L5178Y, M10およびQ31細胞を平衡塩類倍溶液中で r 線またはUV照射し, BrdUを含む培養液中で2細胞周期培養した後, ヘキスト+ギムザ染色により姉妹染色分体の染分けを行い, SCEを計数した。図9から明らかなようにM10,

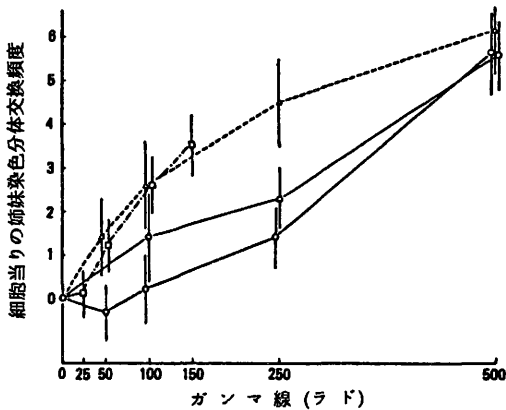


図9. マウス白血病細胞(L5178Y)およびそれに由来する変異株(M10, Q31)における r 線誘発SCEの線量効果関係。○, L5178Y; □, M10; △, Q31。

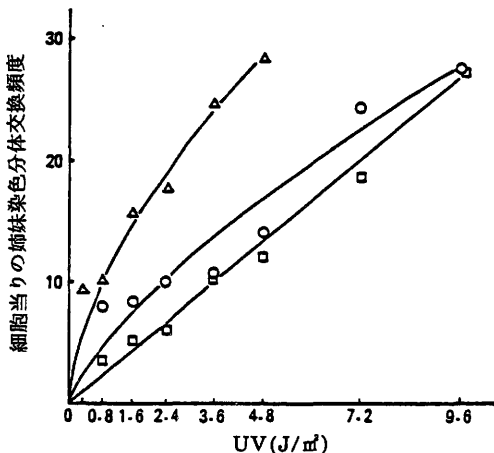


図10. マウス白血病細胞(L5178Y)およびそれに由来する変異株(M10, Q31)における紫外線誘発SCEの線量効果関係。○, L5178Y; □, M10; △, Q31。

Q31いずれの細胞においても r 線誘発SCEの頻度はL5178Yのそれと有意差はなかった。一方図10から明らかなようにUV誘発SCEの頻度に関してはM10は野生株(L5178Y)と等しい頻度を示したが, Q31は野生株の約2倍の誘発頻度を示した。

以上の結果とSatoらの実験結果からQ31細胞は細胞死, 染色体異常およびSCEのいずれについても紫外線高感受性であることが明らかとなった。このことからQ31細胞は紫外線によって生成されるDNAピリミジン二量体の除去に関わる修復系に欠損があると思われる。一方, M10細胞は細胞死, 染色体異常に関しては高感受性であるがSCEに関しては高感受性を示さなかった。したがってM10細胞は r 線によるDNA損傷の修復系に欠損があると思われる。またM10細胞における未修復の放射線障害はSCE誘発に関与しないことが明らかとなった。この機構については明らかでない。

〔総括〕

ヒトおよびカニクイザルの体細胞(リンパ球)における放射線誘発染色体異常に関する線量効果関係から次のことを明らかにすることができた。

1) トリチウムの内部被曝による染色分体切断の線量効果関係は明らかな二相性を示し, 許容線量レベルの低線量域の線量効果は高線量域の約1/10ヒットの線量効果しか示さないことを明らかにした。このことは細胞自体のもつ放射線障害の修復能力の効果が低線量域で顕著になることを示唆するが, 決論をだすには至らなかった。

2) 高線量域においては, ヒトおよびサル of いずれにおいても線量効果関係はlinear-quadratic modelによく適合し, かつ両種間に差異がないことから, 少なくとも高線量域においてはサルのデータから直接ヒトの遺伝的リスクを推定することができることを明らかにした。

3) 低レベル放射線(低線量, 低線量率)の遺伝的効果には, ヒトとサルとの間に差異があり, その要因の一つとして G_0 期における修復能に種差があることが明らかとなった。

4) 低線量域における線量効果関係はヒトではlinear-quadratic modelによく一致するが, サルでは一致せず, 10~30radの間にプラトーが存在することを明らかにしたが, ヒトでも20~30radの間にプラトーが存在していると思われるが

結論を出すには至らなかった。

5) マウス白血病細胞 (L5178Y) 由来の突然変異株 Q31 細胞は細胞死、染色体異常、姉妹染色分体のいずれについても紫外線高感受性であることが明らかとなった。また M10 細胞は細胞死、染色体異常に関しては γ 線高感受性を示したが、姉妹染色分体に関しては親株と同じ感受性を示した。これらの放射線高感受性細胞は低レベル放射線による染色体損傷の修復とその誘発機構を解明するための有効な実験材料であることが明らかとなった。

本研究は体細胞 (リンパ球) における二動原体染色体 (不安定・非対称型染色体異常) を指標として用いたが、遺伝的リスクを推定するためには生殖細胞を通じて後代に伝達される相互転座 (安定・対称型染色体異常) の方がより直接的、かつ実際の指標であることはいうまでもない。したがって、本研究における体細胞における二動原体染色体異常の線量効果関係のデータは、生殖細胞における *in vivo* での照射実験で得られる転座の出現頻度と線量および線量率との関係との比較においてより価値あるものである。この為直接生殖細胞のデータを得るため、我々は現在カニクイザルの精巣への急照射 (30rad/min) 実験を遂行中であり、自然発生相互転座の頻度についてはすでに精度の高い発生率を得ている。すなわち 4,700 の精母細胞を調べた結果、自然発生率は $0.09 \pm$

0.04% であった。この値は他の哺乳動物で得られたものとほとんど大差ないことが明らかとなった。また照射群に関してもデータが得られつつあるところである。今までに得られた r 線誘発相互転座の頻度は、100 rad では 2.05 ± 0.16 (41/2000) 200 rad では 2.50 ± 0.50 (25/1000) および 300 rad では 1.35 ± 0.13 (27/2000) であり、他の哺乳動物 (マウス、ウサギ、モルモット等) で得られた誘発頻度よりも有意に低いが、アカゲザルで得られた頻度 (van Buul, 1983) より有意に高い結果が得られている。今後さらに例数を増やすとともに、極低線量率照射による誘発相互転座の頻度と線量との関係を明らかにし、低レベル放射線の生殖細胞および体細胞における遺伝的効果の比較によってより信頼度の高いリスク推定値を得ることが期待できる。

【謝 辞】

本研究のためにリスザルおよびノロマザルを使用させて頂いた東京農大近藤典生教授に深く謝意を表します。

またトリチウム取扱い、その他に援助を頂いた当研究所、樫田義彦博士をはじめ、環境衛生研究部の諸氏に、線量測定をして頂いた物理研究部、白貝彰弘主任研究官および実験遂行に御協力下さった岡本正則研究員、森谷純子氏に感謝の意を表します。

【発 表】

- (1) 堀 雅明, 中井 斌: 低レベル・トリチウムの遺伝的効果について、特に染色体異常を中心に, 保健物理, 11, 1-11, 1976
- (2) Hori, T. and Nakai, S.: Unusual Dose-response of Chromosome Aberrations Induced in Human Lymphocytes by very Low Dose Exposures to Tritium, *Mutat. Res.*, 50, 101-110, 1978
- (3) Hirai, M. and Nakai, S.: Dicentric Yields Induced by r -radiation and Chromosome Arm Number in Primates, *Mutat. Res.*, 43, 147-158, 1977
- (4) Takahashi, E., Hirai, M., Toabari, I. and Nakai, S.: Dose-response Relations for Dicentric Yields in Go Lymphoc-

- ytes of Man and Crab-eating Monkey Following Acute and Chronic r -irradiation, *Mutat. Res.*, 60, 357-365, 1979
- (5) Takahashi, E., Hirai, M., Tobari, I., Utsugi, T. and Nakai, S.: Radiation-induced Chromosome Aberrations in Lymphocytes from Man and Crab-eating monkey, *Mutat. Res.*, 94, 115-123, 1982
 - (6) Takahashi, E., Tsuji, H., Shiomi, T., Sato, K. and Tobari, I.: Characteristics of r -ray-induced Chromosomal Aberrations in Mutagen-sensitive Mutants of L-5178Y Cells, *Mutat. Res.*, 106, 225-236, 1982
 - (7) Takahashi, E., Tobari, I., Shiomi, T. and Sato, K.: Chromosomal Hypersensitivity in Mutant M10 and Q31 Mouse

Cells Exposed to Ultraviolet Radiation
(UV) and 4-nitroquinoline-1-oxide (4
NQO), *Mutat. Res.*, **109**, 207-217,
1983

2. 培養細胞における放射線突然変異の 線量効果に関する研究

佐藤弘毅, 稲葉浩子, 堀 雅明,
塩見忠博, 塩見尚子 (遺伝研究部)

Studies on Dose-Response Relationship of Radiation-Induced Mutations in Cultured Mammalian Cells

K. Sato, H. Hama-Inaba, M. Hori,
T. Shiomi and N. Hieda-Shiomi
Division of Genetics

It is generally accepted that mutation induction by radiation or chemicals is originated from misrepaired DNA lesions before or during DNA replication. Unrepaired or misrepaired lesions may bring about cell death. Therefore it is reasonable to assume that dose-effect relation to induction of mutation is modified by the activity of DNA repair normally present in wild-type cells. This activity is thought to depend upon various factors; both internal (cell type and stage, species of organism irradiated) and external (quality and dose of radiation) conditions. Accordingly understanding of basic mechanisms of DNA repair, particularly in relation with mutation induction in mammalian cells, will give valuable information for genetic risk estimation. For this purpose we have attempted to study repair-deficient mutants of cultured mammalian cells. Two mutants, one is hypersensitive to the lethal effects of ultraviolet light (UV) and the other is hypersensitive to killing by X and γ -rays, have been isolated from mouse lymphoma L5178Y cells. Characterization of these mutants

including dose-response relationships in terms of mutations have been performed. The results obtained are summarized as follows:

(1) UV-sensitive mutants: We have isolated a number of UV-sensitive mutants of L5178Y cells by devising the cell suspension spotting method. More than 60 UV-sensitive mutants isolated were classified into four complementation groups by cell hybrid analysis. Of these mutants, Q31 (group I) was defective in excision repair and exhibited inefficient recovery of DNA synthesis after UV irradiation. The dose-responses for mutation induction showed that the frequency of UV-induced mutations to 6-thioguanine resistance is much higher in Q31 than in L5178Y cells. When compared at equitoxic doses, the frequency is still higher in Q31 than in L5178Y cells, suggesting that Q31 is defective in error-free repair for mutation induction. Q31 cells are cross-sensitive to the inactivation by 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO). However, cell hybrids between Q31 and parental L5178Y showed that function of Q31-mutant gene was

recessive with respect to UV-sensitivity, but semi-dominant with respect to 4NQO.

(2) X and γ ray-sensitive mutant: The radiation-sensitive mutant M10 has been isolated from L5178Y cells by using a replica-plating method. The frequencies of 6-thioguanine resistance in the mutant and parental cells were measured after irradiation with ^{60}Co γ -rays (62 R/min). The dose-response curve for mutation induction in L5178Y cells was linear up to 300 R and the induced mutation frequency in this dose range was $2.8 \times 10^{-7}/\text{R/locus}$. At higher doses the frequency deviated upward from linearity. The induced mutation frequency in M10 cells was substantially higher than that in L5178Y cells in the dose range from 25 to 125 R. However, when the frequency is plotted as a function of survival,

there is no significant difference between M10 and L5178Y cells. The finding suggests that M10 cells are defective with respect to the repair function for X and γ -ray induced damage which causes both mutation and killing effects. On the other hand, M10 cells were cross-sensitive to the cytotoxic effects of 4NQO. Analysis of the somatic cell hybrids between M10 and L5178Y cells revealed that the function of mutant gene of M10 cells was recessive with respect to X-ray sensitivity but semi-dominant with respect to 4NQO. From these results it is assumed that survey of human population on the sensitivity of radiomimetic chemicals like 4NQO may provide the means for detection of heterozygotes regarding the genes defective in DNA repair which leads to genetic diseases.

〔緒 言〕

遺伝的障害の危険度推定のためには、放射線発がんの場合と異なり、ヒトについて直接疫学的データを得ることはほとんど不可能であり、このため染色体異常と遺伝子突然変異を指標とした線量効果関係の実験データがその基礎になる。遺伝子突然変異の実験的データに関しては、W. L. Russellら、A. G. Searleら、およびM. Lyonらによるマウスの特定遺伝子座を用いた膨大な研究があり、線量率効果など重要な知見が得られており、これを基礎にして現在のリスク推定が行なわれている。しかし、その知見のヒトへの外挿に際しての問題点として、1は生殖細胞の各成熟段階における放射線感受性が、ヒトとマウスで異なっていることであり、これについては生殖細胞の培養系の開発を待つしかない。その2は、線量効果関係における直線性からのずれとしきい値の有無に関しての情報の不足である。これまでの研究によってヒトの培養細胞では50—200R、あるいは、100—300Rの範囲の線量—突然変異頻度関係は、ほぼ直線であり、他方、マウスでは200—400Rではほぼ直線、500—600Rで直線よりも速く増加することが、わかっている。ここでの問題点は、マウス細胞で200R以下の成績がないことと、直線性からのずれおよびしきい値と修復系との関連性がわかっていないこととである。この点を明らかにするためには修復欠損株があれば有用である。

これらの諸点を考慮して、我々は次の計画を立てた。すなわち Knaap and Simonsが用いたのと同じマウス細胞株を使用して、200R以下のガンマ線量での線量効果関係を求めることと、この細胞株から修復欠損株を分離することである。修復欠損株では野生株に比べて同じ放射線損傷でもその効果が拡大されて現われる。すなわち致死効果が高く出るので、この株は放射線に対して高感受性になる筈である。この原理に基づいて得られる修復欠損株と野生株とを用いて放射線誘発突然変異の低線量域における線量効果関係を解明することは、リスク推定に資する情報を提供することになると考えられる。

〔実験結果と考察〕

(1) 突然変異形質の選択

突然変異マーカーとしては種々あるが、頻度測定に使用できるものは少ない。たとえば、アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ〔EC 2.4.2.7〕(Atkins and Gartler, Genetics 60, 781—792, 1968)やチミジンキナーゼ〔EC 2.7.1.21〕(Littlefield, Biochim. Biophys. Acta, 95, 14—19, 1965)の遺伝子は常染色体上にあり(二倍性)、しかも欠損は劣性形質なので、この遺伝子座の突然変異を検出するには、あらかじめこの座に関する異型接合体を用意する必要がある。これは非常に手間がかかり実用

的とはいえない。またジフテリア毒素耐性は相互優性だが、マウス細胞はもとも耐性なので利用できないし、ウアバイン耐性も優性だが、この変異は電離放射線によっては誘発されない(Arlett et al., Matation Res., 33, 261—278, 1975)ため本研究には適していない。ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPR T)[EC 2・4・2・8]は、ヒポキサンチンおよびグアニンをそれぞれイノシン酸およびグアノシン1リン酸にかえる酵素でその遺伝子はヒト、ハムスターおよびマウスではX染色体に乗っていることが知られている。雄由来の細胞は、X染色体を1本しかもたないのでこの遺伝子に関しては半接合であり、雌由来の細胞は2本のX染色体をもつが、一方は不活化しているのでやはりこの座に関しては機能的半接合である。このため劣性変異でも容易に検出できる。グアニンの類似体である6—チオグアニン(図1)は、HGPR Tによ

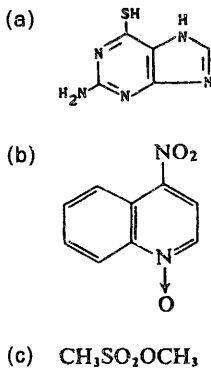


図1 (a) 6—チオグアニン, (b) 4—ニトロキノリン—1—オキシド, (c) メチルメタンスルホン酸。

ってリン酸リボースが付いて6—チオグアノシン—1リン酸となり、さらに3リン酸になって細胞に対して毒性を示すようになる。HGPR T欠損株ではこの最初の段階の反応が起こらないために6—チオグアニン耐性になる。さらにHGPR Tは再利用系の酵素であるので、これが欠損しても細胞の生存その他に影響を与えない利点がある。これらの性質を勘案して突然変異マーカーとして6—チオグアニン耐性を採用することにした。

(2) 紫外線感受性変異株の分離(昭和52—57年度)

(A) ヒトFL細胞

宿主細胞回復能を欠除した変異株の分離を試みた。すなわち紫外線によって不活化したI型ヘルペスウイルスをヒトFL細胞に感染させた。ウイルスDNA上の紫外線損傷を修復しうる細胞は回復したウイルスによって殺され、この能力を欠く細胞のみ生き残る。この操作を2回繰返して生き残った238クローンのうち19株が、紫外線感受性であった。これらのうちで少なくともUVS—1とUVS—2は、安定な紫外線感受性を示した(表1)が、X線生存曲線に関しては両株と親株との

表1 紫外線生存曲線のパラメータ

Cell	D ₀ (J/m ²)	n	D _q (J/m ²)
FL	7.8	1.8	4.6
UVS—1	2.9	2.2	2.3
UVS—2	3.7	2.1	2.7
L5178Y	3.0	1.6	1.4
Q31	0.7	1.0	0

注 線量率 0.4 J / m² / sec。

間で差がなかった。宿主細胞回復能についてはUVS—2では低下していたが、UVS—1では親株とはほぼ同じであった¹⁾。これらの株の染色体数の中央値はFLおよびUVS—1が55、UVS—2が54であり、正常ヒト染色体数46からずれた異数性を示した。これらの株での6—チオグアニン耐性突然変異頻度は非常に低く測定が難しかった。これはこれらの株では活性X染色体が、2本以上存在するためによると考えられる。

(B) マウスL5178Y細胞

L5178Y細胞を突然変異誘発剤で処理してから集落を形成させ、これからレプリカ法を用いて変異株を分離した。以下に得られた成績を要約する。

(a) 4—ニトロキノリン—1—オキシド(4NQO)による選択

4NQO(図1)に対して高感受性のQ31株は紫外線に対しても親株よりも感受性が高かった²⁾(表1)。

(b) 紫外線による選択

紫外線に対して高感受性になった61変異株を細胞懸濁液スポット法を用いて分離した。このうちの8株についての相補性検定の結果、4相補性群に分類できることを明らかにした³⁾。これらの株はすべて4NQOに対して交叉感受性を示した。またQ31株はI群に属する。

(c) 紫外線誘発突然変異の線量効果

6-チオグアニン耐性突然変異については、L5178Yおよびそれから由来する株では代謝協同現象(薬剤感受性細胞と耐性細胞が接触すると感受性細胞で作られた毒性ヌクレオチドが、耐性細胞へ移送されて耐性細胞が殺される現象)がないため、平板あたり多数の細胞を植え込むことができる。また最適形質発現時間は野生株では12J/m²までの紫外線量では7日間で十分で、直線の線量効果関係が得られた。しかし、Q31株では2.4J/m²までは7日間でよいが、それ以上4.0J/m²までの線量では14日間を要すること、この条件下では紫外線量とともに誘発突然変異頻度が増加すること、およびその頻度は野生株のそれよりも高いことがわかった⁴⁾(表2)。また生存率を横軸にとり、誘発突然変異頻度を縦軸にとった図を描くと、どちらの株でも直線とはならず、しかも同じ生存率で比較してもQ31変異株

は親株に比べてはるかに高頻度で突然変異が誘発されることがわかった。このことは紫外線の致死作用と突然変異誘発作用は平行せず、変異株ではその差が特に著しいことを示している。

正常ヒト細胞では紫外線誘発突然変異にしきい値のあることが報告されているが、われわれのマウス細胞ではしきい値があるという証拠は得られていない。

(d) 除去修復および複製後修復

L5178YおよびQ31株について紫外線照射後のピリミジン二量体の除去修復能を紫外線特異的エンドヌクレアーゼを用いて測定したところ、親株には活性が認められたが変異株ではこの能力が欠損していた⁵⁾。複製後修復に関しては両株間に大きな違いは認められなかった。

(e) DNA合成障害の回復

紫外線量に対する照射直後のDNA合成の障害度は、野生株とQ31株との間で有意の差は見られなかった。しかし照射後保温してからDNA合成速度を調べると野生株では数時間後にはほぼ正常に戻ったが、Q31株では回復が悪く、10J/m²ではまったく回復が見られなかった⁶⁾。

(f) L5178Y細胞とQ31細胞の優性劣性検定

雑種細胞は紫外線抵抗性となったが、4NQOに対しては中間の感受性を示した⁹⁾。すなわち、紫外線感受性は劣性であり、4NQO感受性は半優性である。このことは4NQO感受性を指標として色素性乾皮症(紫外線、4NQO感受性)の異型接合の検出ができることを示している。

(3) 電離放射線感受性変異株の分離(昭和52-57年度)

マウスL5178Y細胞からX線型の損傷を起こすといわれる放射線類似作用物質であるメチルメタンスルホン酸(図1)に対して高感受性になった変異株の分離を試み、数万のクローンを選別法を用いて選択してM10株を得た。この株はX線に対しても親株よりもD₀値(直線部分における37%生存線量)で比較して、7.3倍高感受性であったが紫外線に対しては親株同様抵抗性であった⁷⁾。

(a) ガンマ線感受性

L5178YおよびM10株の⁶⁰Co—ガンマ線生存曲線を図2に示す⁸⁾。この曲線から計算されるD₀およびn(外挿値)は、それぞれL5178Y株で175Rおよび1.2であり、M10株で35Rおよび1.0である。このようにM10株

表2 紫外線誘発6-チオグアニン耐性突然変異

UV Dose (J / m ²)	Cell	
	Q31	L5178Y
0	3	3
0.8	13	—
1.6	34	—
2.0	—	9
2.4	50	—
3.2	71	—
4.0	88	11
6.0	—	12
8.0	—	18
12.0	—	20

注: 10⁵ 生存細胞あたりの変異細胞数。

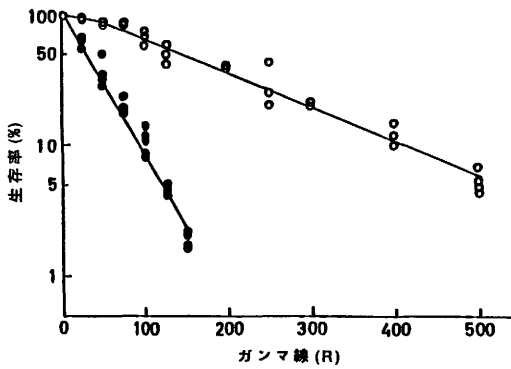


図2 L5178Y(○)およびM10(●)細胞のガンマ線生存曲線。線量率62R/分。

はガンマ線の致死効果に対しても野生株よりも約5倍感受性が高い。

(b) ガンマ線誘発突然変異の線量効果関係⁸⁾

6-チオグアニン耐性突然変異を用いる場合、L5178Yおよびそれから由来した細胞では60 mmの培養皿あたり 5×10^5 細胞を播いても突然変異体の収率に影響がないことがわかったので、この条件を用いてL5178YおよびM10株における自然突然変異頻度を測定してみると、両株とも15日までの培養期間中あまり変動せず生存細胞あたり $3-5 \times 10^{-5}$ であった。ガンマ線誘発突然変異についてはL5178Y株では25, 50, 75, 100, 125, 200, 250, 300, 400, および500Rの各線量で照射後、3-4, 6-7, 9-10, 12-13

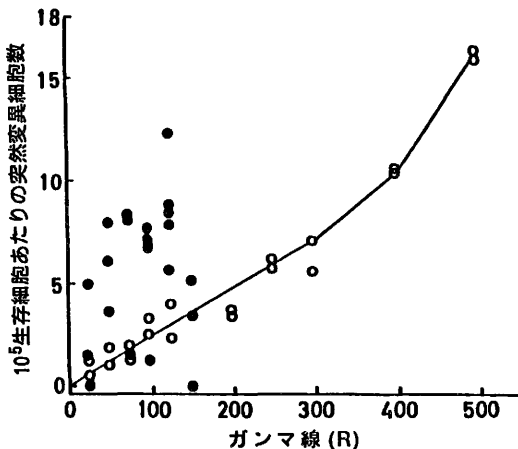


図3 L5178Y(○)とM10(●)細胞における6-チオグアニン耐性突然変異のガンマ線誘発。

および15日のそれぞれの形質発現時間をおいてから6-チオグアニン耐性突然変異頻度を測定した。M10株では25, 50, 75, 100, 125, および150Rの各線量で形質発現時間3-4, 6-7, 9-10, 12-14, 15-16, 18-20および21-22日の後に測定した。最適形質発現時間は線量により実験ごとに多少異なっていたので、最大の突然変異頻度を採用した。それらの結果は図3に示してある。図から明らかなようにL5178Y株では、300Rまでは誘発突然変異頻度は線量に応じてほぼ直線的に増加し、300-500Rの線量域ではもっと急な勾配で増加した。300Rまでについては単位線量あたりの誘発突然変異頻度はこの遺伝子座では $2.8 \times 10^{-7}/R$ であった。この値は Knaap と Simons (Mutation Res.30, 97-110, 1975) が同じ細胞株の同じ遺伝子座でX線誘発突然変異頻度を200-600Rで求めた値 $(1-3 \times 10^{-7}/R)$,

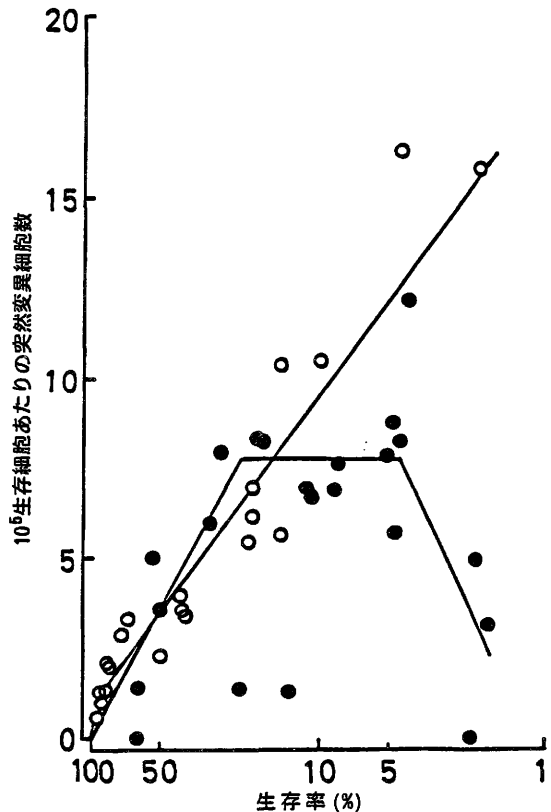


図4 L5178Y(○)とM10(●)細胞における生存率とガンマ線誘発6-チオグアニン耐性突然変異頻度との関係。

中村と岡田 (Mutation Res., 83, 127—135, 1981) がガンマ線の急および緩照射で得た線量効果曲線の一次の係数 0.77×10^{-7} (50rad/分), 1.4×10^{-7} (0.8rad/分), さらに上野ら (Radiation Res., 91, 447—456, 1982) によるガンマ線緩照射の成績 8×10^{-8} とほぼ一致している。

他方、電離放射線高感受性変異株 M10 でのガンマ線による突然変異誘発は 75R まではほぼ直線的に増加し、100R 以上では減少する傾向を示した (図 3)。この減少は、高線量では細胞致死効果が強いので誘発された突然変異細胞が増殖能を失い回収できなくなるために起こると考えられる。75R までの同一線量でのガンマ線誘発突然変異頻度は、M10 細胞では L5178Y 細胞よりも約 4 倍高い。生存率と誘発突然変異との関係については L5178Y 細胞と M10 細胞とではほぼ同じであった (図 4)。

(c) 優性劣性検定

M10 細胞と L5178Y 細胞の雑種細胞は X 線に対しては抵抗性であったが、4NQO に対しては中間の感受性を示した。すなわち、X 線感受性形質は劣性であり、4NQO 感受性形質は半優性である。このことはルイ・バー症候群 (X 線感受性) のうちの 4NQO にも感受性のグループについては異型接合を検出できることを示している。

[総括]

以上の成績をまとめて次に記す。

(1) 放射線誘発突然変異測定に最適のものとして 6-チオグアニン耐性を採用した。

(2) ヒト FL 細胞からウイルス自殺法を用いて紫外線感受性変異株を分離したが、異数性のため突然変異測定に利用できなかった。

(3) 細胞懸濁液スポット法を考案して、近二倍体のマウス L5178Y 細胞から紫外線感受性変異株を多数分離した。これらは 4 相補性群に分類されることがわかった。これらの変異株は 4NQO に対しても交叉感受性を示した。第 I 群に属する Q31 株について詳しく調べた。

(4) L5178Y および Q31 株では紫外線によって突然変異が線量依存性に誘発される。同一線量あるいは同一生存率と比較しても Q31 株の方が L5178Y 株よりも誘発突然変異頻度が非常に高い。

(5) L5178Y 細胞はある程度の除去修復能

をもっているが、Q31 細胞では除去修復が欠損している。

(6) 紫外線によって DNA 合成は阻害されるが、L5178Y 株では照射後数時間で非照射レベル近くまで回復するが、Q31 株ではその回復が悪い。

(7) Q31 と L5178Y 両株の細胞雑種を形成して調べると、紫外線感受性は劣性、4NQO 感受性は半優性を示した。

(8) マウス L5178Y 細胞からレプリカ法で電離放射線感受性変異株 M10 を分離した。

(9) ガンマ線誘発突然変異の線量効果曲線は L5178Y では 25R から 300R まではほぼ直線で、線量 (R) あたりの誘発率は 2.8×10^{-7} であった。M10 株では 75R まで線量とともに増加を示し、同一線量では L5178Y 株の約 4 倍の頻度であった。同じ生存率で比較すると両株の間に差はなかった。

(10) M10 株は 4NQO にも交叉感受性を示し、L5178Y 株との雑種細胞では電離放射線感受性は劣性であり、4NQO 感受性は半優性であった。

これらの事実から哺乳類細胞は紫外線損傷と電離放射線損傷とをはっきり区別して独立の機構で修復していることがわかる。修復欠損株では放射線の致死作用に対してのみならず突然変異誘発作用に対しても感受性が高くなっており、しかも少なくとも紫外線に関しては致死損傷と突然変異性損傷とは必ずしも同じでないことが明らかになった。また放射線感受性は他の薬剤に対する交叉感受性を伴い、さらにそれが半優性形質であることを示した。このことは放射線感受性に関して異型接合であっても化学物質の影響を受けるということであり、人類集団のなかで劣性修復欠損に関して異型接合である人はかなりの頻度 (数パーセント) を占めるので、社会的に重大な問題となり今後の検討が必要である。

紫外線損傷の修復については種差が明らかにあり、ヒト細胞は効率の高い除去修復能をもっているが、マウス細胞では効率が低い。このことを反映していると考えられるのが突然変異を指標とした線量効果関係で、ヒト細胞では、 1.2 J/m^2 以下の紫外線量では 6-チオグアニン抵抗性突然変異がほとんど誘発されない、すなわち、しきい値があることが明らかにされている。

(Maher and McCormick, Radiation Resea-

rch, pp.584—588, 1979)。しかし、われわれが調べたマウス細胞ではしきい値はみられなかった⁴⁾。このしきい値の存在と修復能とが関連していることは除去修復能を欠く色素性乾皮症細胞を用いるとしきい値が消失することから支持される (Maher and McCormick, 前出)。

他方、電離放射線については、ヒトとマウスでは卵母細胞の放射線感受性が異なることが報告されている。しかし、体細胞については種差があるという報告はなくわれわれがマウス細胞を用いて得た成績を他の研究者によるヒト細胞の結果と比較しても大きな差異はみられない。放射線誘発6—チオグアニン抵抗性突然変異の線量効果曲線をみてもどちらの細胞にもしきい値は存在しない。ヒト繊維芽細胞における遺伝子突然変異のX線誘発頻度は50—200ラド範囲で 3.1×10^{-7} / ラド (Cox and Masson, Mutation Res., 37, 125—136, 1976) ないし 50—300R の線量域で 2.1×1.0^{-7} / R (De Ruijter and Simons, Mutation Res., 69, 325—332, 1980) と報告されている。これに対してマウス細胞では 200—400R の範囲で $1.0—1.8 \times 10^{-7}$ / R (Knaap and Simons, Mutation Res., 30, 97—110, 1975) という報告があり、またわれわれの成績では 25—300R の線量域で線量効果関係はほぼ直線となり、そこでの誘発率は 2.8×10^{-7} / R であった⁸⁾。これらの事実から明らかなように 300—400R 以下の線量域での遺伝子突然変異誘発率についてはヒトとマウスの細胞は互いによく似ている。400R 以上では線量効果関係は直線よりも上方にずれる。

〔文 献〕

1. Shiomi, T., and Sato, K.: Isolation of UV—Sensitive Variants of Human FL Cells by a Viral Suicide Method. Somat. Cell Genet., 5, 193—201, 1979.
2. Sato, K., and Hieda, N.: Isolation of a Mammalian Cell Mutant Sensitive to 4—Nitroquinoline—1—Oxide. Int. J. Radiat. Biol., 35, 83—87, 1979.
3. Shiomi, T., Hieda—Shiomi, N., and Sato, K.: Isolation of UV—Sensitive Mutants of Mouse L5178Y Cells by

これらの in vitro で得られた成績は in vivo での実験結果と比較検討する必要がある。マウス精原細胞照射の効果が特定遺伝子座突然変異で測定されており、それによると 600R までは直線的に増加し、それ以上では低下する。直線部分の誘発率は遺伝子座あたり 2.2×10^{-7} / R ないし 1.7×10^{-7} / R であった。この値はヒトおよびマウスの培養細胞で得られた値に極めて近い。このことは体細胞を用いた突然変異の実験結果から生殖細胞における誘発率を推定できることを示しており、リスク推定に寄与する。放射線感受性動物はまだみつかっていないので利用できないが、培養細胞の放射線感受性変異株を用いたわれわれの実験から低線量放射線によっても突然変異が高頻度で起こることがわかったので、生殖細胞の場合でも同様の効果を予想することができる。さらにわれわれは放射線とともに放射線類似作用物質を利用することによって放射線高感受性に関する異型接合体の同定ができることを示して、ヒト集団中の高リスク群検出への道を拓いた。

今後、変異株における高感受性の機構について放射線照射後のDNA合成ならびにDNA鎖切断と再結合を調べ修復との関連性を明らかにする計画である。

〔謝 辞〕

本研究の遂行に当って放射線照射ならびに放射性物質取扱いに協力をいただいた技術部の方々に謝意を表します。また激励、助言ならびに援助をいただいた遺伝研究部長をはじめ研究部の方々に感謝します。

- a Cell Suspension Spotting Method. Somat. Cell Genet., 8, 329—345, 1982.
4. Sato, K., and Hieda, N.: Mutation Induction in a Mouse Lymphoma Cell Mutant Sensitive to 4—Nitroquinoline—1—Oxide and Ultraviolet Radiation. Mutation Res., 71, 233—241, 1980.
5. Sato, K., and Setlow, R.B.: DNA Repair in a UV—Sensitive Mutant of a Mouse Cell Line. Mutation Res., 84, 443—455, 1981.
6. Hama—Inaba, H., Hieda—Shiomi, T., and

- Sato, K. : Recovery from Post—Irradiation Inhibition of DNA Synthesis in an Ultraviolet—Sensitive Mutant Mouse Cell. *Mutation Res.*, 104, 305—309, 1982.
7. Sato, K., and Hieda, N. : Isolation and Characterization of a Mutant Mouse Lymphoma Cell Sensitive to Methyl Methanesulfonate and X Rays. *Radiation Res.*, 78, 167—171, 1979.
 8. Shiomi, T., Hieda—Shiomi, N., Sato, K., Tsuji, H., Takahashi, E., and Tobari, I. : A Mouse Cell Mutant Sensitive to Ionizing Radiation is Hypermutable by Low Doses of γ —Radiation. *Mutation Res.*, 83, 107—116, 1981.
 9. Shiomi, T., Hieda—Shiomi, N., and Sato, K. : Studies on Three Mutagen—Sensitive Mutants of Mouse L5178Y Cells. I. Characterization of the Hybrids between L5178Y and Mutagen—Sensitive Mutants. *Mutation Res.*, 95, 313—325, 1982.

3. 霊長類の実験システムの開発に関する研究

北爪雅之, 岡本正則 (技術部動植物管理課)
中井 斌 (遺伝研究部)

Effects of Radiation on Monkey and Hamster Germ Cells

M. Kitazume, M. Okamoto and S. Nakai*
Division of Technical Services, *Division of Genetics

The present status of genetic risk estimation mostly depends upon the data obtained from the studies of animals, particularly of the mouse. This circumstance raises the question how to extrapolate from mouse data to man. To solve this problem more information is needed with regard to interspecific comparison on genetic damages induced by radiations. For this purpose we have attempted to establish monkey system (*Macaca fascicularis*) as an experimental animal in order to obtain cytogenetic data after radiations. Much effort has been given on development of the animal care technique including inspection of ill health and reproduction. Also we have devised radiation instrument and monkey cage suitable for the works of acute and chronic irradiation. Further studies were performed to develop the assay system of genetic damages at the level of germ cells (gamete) in monkey and hamster. The results obtained are summarized as follows;

(1) Induction of morphological sperm abnormality by ionizing radiation in golden hamster and cynomolgus monkey, *Macaca fascicularis*.

The test of sperm abnormality is recently utilized as a simple assay system in mammals for

assessing genetic effects of radiation as well as of chemical mutagens. We have examined production of sperm abnormalities after irradiation by X-rays in terms of the time courses and the dose-response relations. The sensitive periods for the productions of morphological abnormality with respect to sperm head and neck were 3–6 weeks and 4–8 weeks in hamster and monkey, respectively, suggesting that these sensitive periods coincide to the stages of early spermatocyte or late spermatogonia. These sensitive periods were not much different from the period in the mouse (5–7 weeks: Bruce, 1974). Dose-response experiment showed that, unlike the mouse data, humped dose-response curves for induction of sperm abnormality in both monkey and hamster were represented, and the yields were declined at higher dose range over 500 rad. The dose exponents at low-dose range were around 2 in both monkey and hamster. These dose-response data indicated that yields of sperm abnormality of monkey and hamster appeared to be significantly lower than those of mouse at the same dose range, similar to the production of translocations.

(2) Effect of X-ray irradiation on the ability of

in vitro fertilization of golden hamster spermatozoa.

Technique for *in vitro* fertilization will provide useful tools for direct analysis of the chromosome abnormality of spermatozoa, since *zona pellucida*-free eggs of golden hamster is capable of fusing spermatozoa of different species including man. To test this system we have undertaken preliminary study of radiation effect using hamster sperm and hamster eggs in a *in vitro* system. The rate of *in vitro* fertilization of irradiated hamster spermatozoa at 6 weeks after X-irradiation of 200 rad markedly reduced (47.7%) in comparison with the control value (92.6%). In contrast, fertilization rates of spermatozoa obtained at 3 and 9 weeks after irradiation were 97.7 and 90.6%, respectively,

〔緒 言〕

放射線のヒトでの遺伝的リスクを推定するために必要なデータは直接ヒトについてのデータは求められず、このため、従来リスクの推定は主としてマウスでの実験データに頼っていた。しかし、マウスのデータはヒトに適用する際に問題が残る、このためリスク推定の見地からヒトに近縁のサルの実験データを得ることが最近国際的にも特に重視されている。しかし、サルは実験動物として未だ未完成であり、遺伝的研究を行うためには前提としてサルの実験動物としてのシステムを開発する必要がある。本研究は放射線と遺伝リスク推定のためのサルの実験動物システムの開発を目指し、(1)サルの生殖細胞について放射線遺伝学的研究を行なうために必要なカニクイザルの飼育繁殖及び衛生管理技術の確立に関する研究、(2)遺伝損傷の検出のための放射線による精子の形態異常の研究、(3)受精卵において放射線による配偶子の遺伝損傷を検出するために体外受精の研究を行った。

1) 放射線遺伝学的研究のためのカニクイザルの実験動物化及び衛生管理技術の開発に関する研究

実験動物を研究に用いる場合、その遺伝的体質、疾病及び飼育環境の3条件がコントロールされていることが必要であるが、他の実験動物種に比較し野生由来のカニクイザルはこれらの点に多くの

which were not significantly different from each control value (92.7 and 93.1%). Thus it is concluded that the sensitive period during spermatogenesis to radiation with respect to reduction of fertilizing ability of spermatozoa coincides with the times of production of morphological sperm abnormality mentioned above and reduction of sperm number. The data on *in vitro* fertilization of irradiated spermatozoa with various doses of X-rays (50—600 rad) observed at 6 weeks after irradiation showed that the fertilization rates reduced as almost dose-dependent manner. These data strongly suggest that ionizing radiation significantly affects fertilizing ability of spermatozoa through the injury to spermatogenesis, presumably due to production of abnormal sperm or reduction of sperm number, or both.

問題点を有している。特に疾病の点に関しては、ヒトとの共通感染症を多く保有しており飼育管理及び実験の際にはサルからの感染防止に十分な注意が要求される。これらの観点から、本研究では照射実験を実施するために必要な実験動物学的な基礎研究を行った。一方、51年以来霊長類実験棟建設の準備を進め、54年9月にサル用浄化槽、洗浄滅菌室、飼育室及び照射実験室を備えた実験棟が完成し飼育が開始された。

a) 野生由来カニクイザルの実験動物化 (47～57年度)

飼育環境を一定にする目的で、人工飼料(サル用固型飼料およびビタミンC剤)への切替、室内の照明時間14時間明、10時間暗の照明にするとともに室内温湿度を温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ を基準として飼育管理を行った。また、飼育管理作業を安全で効率よく行うため飼育管理作業マニュアルを作成した。さらに霊長類実験棟での多頭飼育化及び自家繁殖による計画生産に備え、新型ケージの製作、ケージ内交配方式の改善を行い、57年度までに7頭の仔ザルの生産、育成に成功した。またケージ内個別繁殖方式を改善し、繁殖育成用の2連結ケージを試作することにより群交配及び群飼育方式の導入を試みた。

b) 衛生管理技術の確立

① 一般飼育群: 各種の検査(一般健康検査、ツ反検査、血液検査、寄生虫卵検査、ウイル

表－1. サル定期検査項目及び実施回数 ※

検査項目	検査内容	回数
一般検査	(1) 体重, 体長, 体温測定, 口腔内検査	1回/月
	(2) 視診(排泄物, 栄養状態, 外傷, 顔貌)	1回/日
	(3) 回診(健康状態の観察, 観察記録のチェック) ＜検疫室＞	
細菌検査	腸内細菌科の菌を指標(赤痢菌, サルモネラ菌, 病原性大腸菌)	4回/年 ※※
外部および 内部寄生虫 卵検査	外部寄生虫(ダニ, その他)	1回/年
	内部寄生虫(糞便中の虫卵の有無) ＜外注＞	1回/年
ツベルクリ ン検査	コッホのオールドツベルクリン(OT)100IU(液量は0.1ml)を 右上眼瞼の皮内に接種判定	2回/年
血液検査	GOT, GPT, BUN, TP, Albumin, Glucose, ヘマトク リニット, 白血球, 赤血球数など	4回/年 ※※
ウィルス検 査	プール, 血清学的検索 Adeno virus(A), Herpes symplex(H), Herpes 1,2(H), varicella - zoster virus(H), Cytomegalo virus(H), Measles virus(PM), Polio virus 1,2,3(PC), Japanese encephalitis virus(T), Rubella vi- rus(T), Mumpus virus(PM) ＜外注＞	1回/年

※ 一般飼育群についての基準を示す。

※※ 実施に際しては、血液、細菌検査はなるべく重複せず、年間平均的に行うよう留意する。

ス検査を実施した結果(表1) ツ反検査において雄1頭が連続4回陽性もしくは疑陽性であったので殺処分した。また、検査時には異常の認められなかった雌1頭が急性心不全のため死亡した。その他の検査においては、すべて正常で異常は認められていない。

② 検疫群：検疫群においても各種の検査を実施した結果、一般飼育群に比較して血液性状値およびウィルス抗体価において若干の変動が認められた。

③ 実験群： $^{137}\text{CS} \cdot r$ 線を精巣部に局部照射(100, 200, 300 rad)した実験群においても同様の各種の検査を実施した結果、血液性状値

で赤血球・白血球数が照射後増加の傾向が認められた。なおツ反検査、腸内細菌検査においては異常は認められていない。

c) 飼育・実験機具類の試作、開発

① 飼育ケージ：日常の飼育作業、動物の生活環境および実験への影響などを検討し飼育ケージの改良を行った。

② 急照射用サル固定器： $^{137}\text{CS} \cdot r$ 線源を用い精巣への局部照射を行うため、①精巣以外の臓器の防護、②サルの安全固定、③固定器からの散乱線を最小にすることなどを考慮し固定器を開発した(図1)。

③ 長期微量照射用ケージ：長期微量照射実験

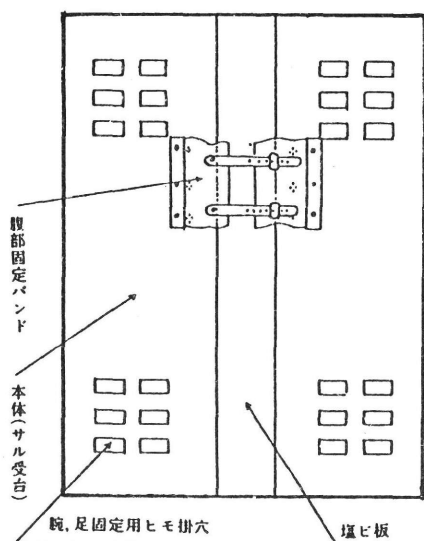
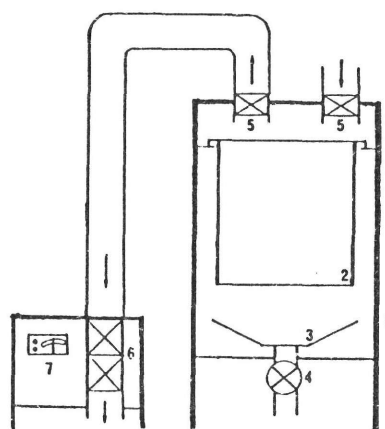


図1 急照射用サル固定器平面図



- 1 アイソレータ
- 2 ケージ
- 3 汚物受皿
- 4 排水口バルブ
- 5 プレフィルター(給排水用)
- 6 ヘパフィルター
- 7 フィルターチャンパー

図2 長期微量照射用アイソレータケージ略図

中のサルを飼育するケージは、①サルとヒトとが接触するとき放射線照射による疾病の発生に対し、安全であること、②長期実験に対応し、洗浄、消毒が容易にできることを重点として、二重構造を持った陰圧式アイソレータケージを試作した(図2)。

④ 霊長類照射実験装置：本装置は水平(微量照射時)方向および垂直(急照射時、液体試料用)方向に照射可能である。

2) 精子形態異常による放射線の遺伝損傷の検出に関する研究

遺伝損傷のテストの方法には特定遺伝子座法に代表される哺乳動物の個体を用いる方法があるが、このためには膨大なマウス数を必要とし、その実施は容易でない。したがって、もし、哺乳類の配偶子、とくに精子を材料とする遺伝損傷のテスト方法が確立されるなら、これらの欠点を除くことが出来ることになる。マウスの精子によるX線の影響の定量的研究が Bruce & Wyrobek(1974)らにより報告された。その後、Bruce(1979)らの本方法による各種の化学物質変異原性に関するテストについての報告がある。我々はゴールデンハムスターおよびカニクイザルを用い放射線照射による精子形態異常に関する定量的な実験を行った。

【実験結果と考察】

a) 精子形態異常の型と分類

げっ歯類(マウス、ハムスターなど)の精子頭部は図-3-1に示すように鉤状であるが、霊長類(ヒト、サルなど)の精子頭部は図-3-2に示すように楕円形である。また、精子の形態異常の型は頭部、頸部、複合(頭部+頸部)及びその他(中片部、尾部など)の異常に分類されるが遺伝損傷テストのため重要なのは、頭部及び頸部異常である。

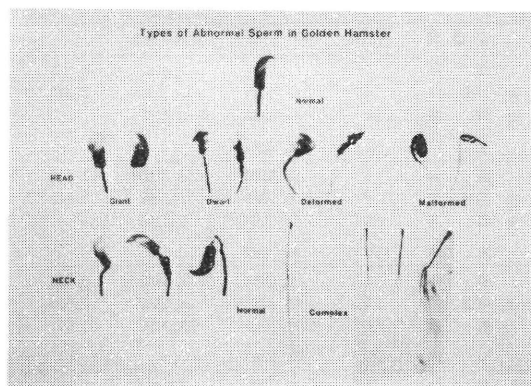


図3-1 ゴールデンハムスター精子の形態異常の種類。

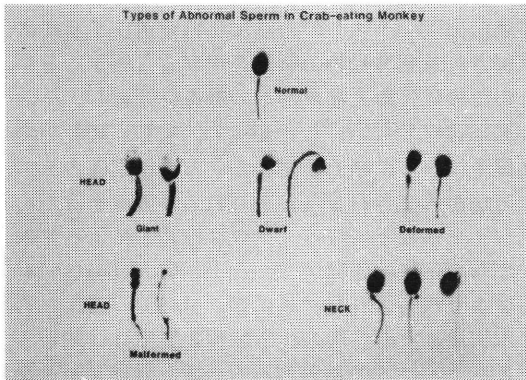


図 3-2 カニクイザル精子の形態異常の種類。

表-2. X線照射(200rad)したゴールデンハムスター精子の観察結果。

照射後の 時間(週)	観 察 精 子			精子数 個体数 計	異常精子出現率 (%)				
	観察数	スライ ド数	精 巢 上体数		頭 部	頸 部	中片部	尾 部	
	(平均)	(平均)							
1	1,600	2.5	2	2	16,000	0.59	2.97	13.49	15.00
3	1,834	7.5	2	2	55,000	4.02	1.62	16.00	13.76
6	1,100	7.5	2	2	33,000	5.47	2.49	20.90	28.60
9	1,250	5.0	2	2	25,000	0.73	1.35	21.35	29.80
12	1,000	5.0	2	2	20,000	0.57	1.16	19.30	28.40
総 計					149,000				

表-3. 異常精子の出現頻度に関する分散分析。
(X線200rad照射6週間後)

	変 動 因	自由 度	平 方 和	平均平方和	F
頭 部 異 常	個 体	1	2,6101	2,6107	0,229
	精 巢 上 体	4	45,6614	11,4154	5,573 **
	誤 差	24	49,2720	2,0530	
	全 体	29	96,9331		
頸 部 異 常	個 体	1	18,2520	18,2520	11,410
	精 巢 上 体	4	6,3987	1,5997	3,813 **
	誤 差	24	10,0680	0,4195	
	全 体	29	34,7187		
中 片 部 異 常	個 体	1	2,8833	2,8833	0,198
	精 巢 上 体	4	58,3467	14,5867	0,610
	誤 差	24	573,6040	23,9002	
	全 体	29	634,8340		
尾 部 異 常	個 体	1	0,4323	0,4323	0,023
	精 巢 上 体	4	73,7947	18,4487	0,719
	誤 差	24	616,0920	25,6705	
	全 体	29	690,3190		

** 1% で高度に有意 * 5% で有意

b) 観察数と精度

表-2 に示した観察結果の分散分析を行うと頭部及び頸部異常は動物個体またはプレパラートによる違いは有意ではないが精巢上体の違いに関してはわずかに有意 (5%) である (表-3)。実験毎のバラツキは小さく再現性は極めて良好である。したがって、実験条件 (動物種、変異原など) で多少の相異はあるものの 1 実験区当り最低 1000 精子を観察すればよく、また、処理区と対照区との差が 1% 以上であればおおむね有意であると考えてよい。

c) 精子形態異常の型と放射線感受期

ゴールデンハムスターに 200 KVP の X 線 (線量率 47 ~ 48 rad/min) 及びカニクイザルに $^{137}\text{CS} \cdot r$ 線 (線量率 30 rad/min) を精巢へ局部照射した結果、出現した精子形態異常の型のうち、放射線に感受性なのは頭部及び頸部の形態異常である (図-4)。中片部及び尾部の形態異常は実験区によって著しい変動があり、放射線照射による影響は認められない。一方、放射線に対する感受期

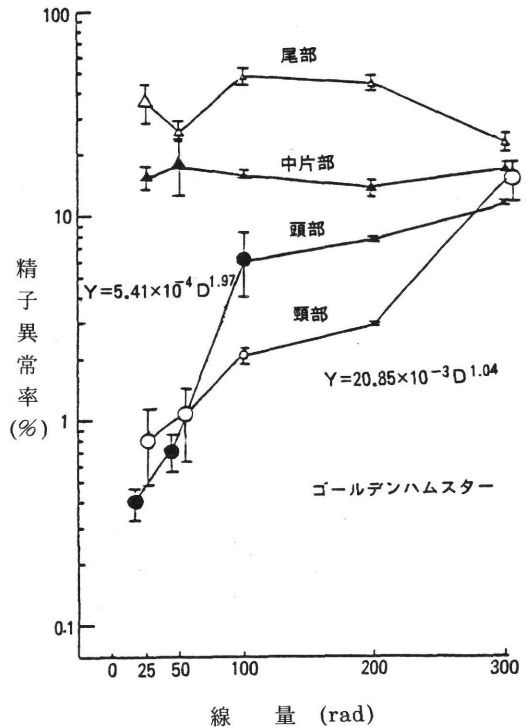


図 4. X線照射 6 週後における形態異常精子の線量効果。

はマウス、ゴールデンハムスター及びカニクイザルはそれぞれ照射後3～8週間の間にピークが認められる(図-5)。したがって、この精子形態異常の放射線感受期は生殖細胞分裂の精原細胞分裂後期ないしは減数分裂前期にあるものと推定される。それ故、我々が実施した精子形態異常の研究からこれら三種間における生殖細胞の分裂期間は減数分裂以降から精子形成に至る時間的経過については大差ないものと思われる。

d) 線量効果とカイネテックス

ゴールデンハムスターでの精子頭部形態異常の線量効果は我々の実験結果から100 radまでは線量に比例して直線的に増加する指数2の曲線であり、100 radをこすと曲線の勾配はゆるくなり、400～500 radでピークをなし、600 radではかえって減少する(図-6)、この場合の倍加線量は約50 rad付近であると考えられる。一方、マウスでの線量効果はBruce (1974)によると3/2の指数をもつ指数曲線であり、その倍加線量は約30 radと考えられている。このようにハムスターはマウスに比較して頭部形態異常の出現率が低く、この生物種による効果の相違はLyonら(1975)によって得られたマウス、ハムスターの相互転座の線量効果曲線に近似し、他のげっ歯類と著しい対照をなしている。図-6に示すようにカニクイザルの精子形態異常の線量効果は、マウスよりも低く、ハムスターに近いことがわかった。この結果はアカゲザルの相互転座の誘発率がマウスに比較し低いことが報告されているのと考えあわせると興味深い。

放射線により誘発される精子形態異常とくに頭部形態異常は遺伝損傷の指標としてその有効性は明らかである。しかしながら、遺伝損傷の機構との関係はまだ十分には明確ではない。精子形態異常の原因として考えられるのは、1) 染色体異常、2) 遺伝子突然変異、3) 精子形成における遺伝情報の発現過程での損傷の三者で今後、これらの機構の解明が必要である。今後動物個体の配偶子とくに精子を用いてその遺伝損傷を直接検出する指標の開発研究の進展によってヒトの集団における遺伝損傷のモニタリングをヒト精子を用い個人レベルで行う可能性も考えられ今後の検討が必要である。

- 3) ゴールデンハムスター卵子の体外受精及び体外培養に関する研究
- ヒトの生殖細胞への放射線障害の線量効果を明

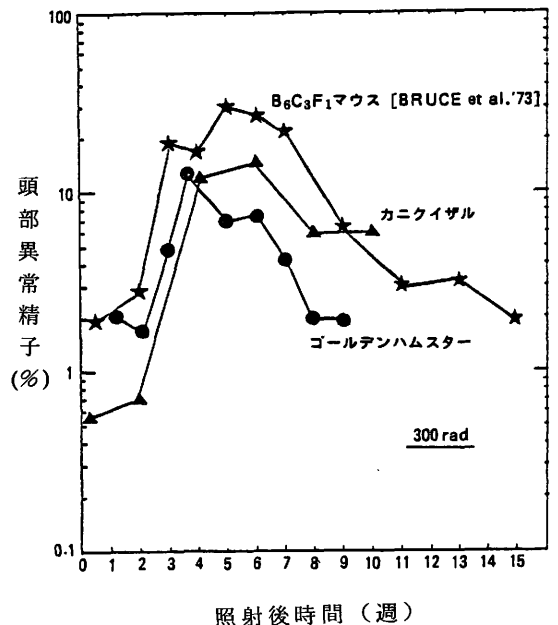


図5. 放射線照射後における頭部形態異常精子の出現頻度。

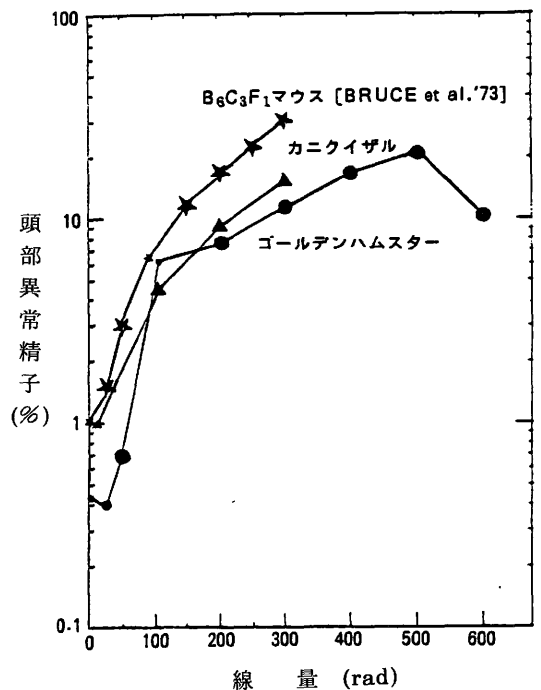


図6. 放射線照射による精子頭部形態異常の線量効果。

らかにするためには、生殖細胞に対する遺伝損傷を受精卵の段階で検知できる実験系の開発が必要と考えられる。このためには、生殖細胞を体外で生存させ受精を成立させること、及び染色体分析を行うために得られた受精卵を第一卵割期を越えて発生させる培養条件を確立することが必要である。

本研究ではハムスター卵子が異種精子をも取り込む性質を有することに着目し、この種を用いて照射後の異種精子の遺伝損傷を検出する方法を確立するためにその基礎実験を試みた。しかし、ハムスター卵子の体外受精法はマウス、ラットに比較し、技術的に確立されていないため、まず、1) マウスを用いて体外受精の実験系を確立すること、2) この系を用いてハムスター卵子の体外受精法を検討し、2細胞期に至るまでの培養条件を確立すること、3) さらに、体外受精法を用いX線照射後の雄より得た精子の受精能力の検討を行った。

〔結果及び考察〕

a) ICR, C3H及びBC3F₁の各系統マウスを用いた系統内及び系統間の体外受精試験(表-4)。ICR系精子を用いた場合は高率に受精が起きたのに対し、C3H及びBC3F₁系精子を用いた場合は低率で、特にC3H系における受精率は著しく低率であった。これらの結果から、精子の受精能獲得及び卵子への精子侵入にはICR系統由来の精子が有効であること。さらに、F₁雌由来の卵子を用いた体外受精は受精率が高いことが示唆され、この原因については今後の研究が必要である。
b) ゴールデンハムスターを用いた体外受精の成立及び2細胞期への発生におよぼす培地内の有効成分の検討(表-5、及び表-6)。まず、前核

表-4. 精巢上体精子を用いたマウス卵子の体外受精における系統内及び系統間の受精成績。

配偶子		供試動物 総 数	検査卵子 総 数	受精卵* (%)
精子	卵子			
ICR	ICR	24	353	304 (86.1)
ICR	BC3F ₁ **	13	281	255 (90.7)
ICR	C3H	1	44	35 (79.5)
BC3F ₁	BC3F ₁	9	240	109 (45.4)
BC3F ₁	ICR	2	57	41 (71.9)
C3H	C3H	21	393	43 (10.9)

* 雌雄の前核を有する卵子

** F₁雑種 (C57BL♀×C3H♂)

表-5. 牛血清アルブミン(BSA)又は同種血清(HS)を含む培地内で精巢上体精子の前培養を行った時のハムスター卵子の体外受精成績。

培地組成		検査卵子 ^a 総 数	精子侵入 卵子総数 (%)	受精卵		
前培養用	受精用			受精初期 ^b	前核期 ^c	総 数 (%)
BSA	BSA	251	102 (40.6)	47	54	101 (40.2)
HS	BSA	549	474 (86.3)	30	443	473 (86.1)

a: 授精後4～6時間培養し検査を行った。

b: 細胞質内に膨大精子頭部を有し、第2減数分裂後期から終期を示す卵子。

c: 雌雄の前核を有する卵子。

表-6. ハムスター体外受精卵の24時間培養後における2細胞期への発生成績。

培地組成		検査卵子 総 数	精子侵入卵	
前培養用	受精用		2-細胞期(%)	総 数(%)
HS*	BSA**	398	121 (30.4)	179(44.7)
HS	HS	58	1 (1.7)	30(51.7)

* 同種血清

** 牛血清アルブミン

期の受精率においては、牛血清アルブミン(BSA)の添加された完全合成培地(マウス用)では低率であるのに対し、同種血清(HS)を含む培地内では有意に受精率が向上(40.2%対86.1%)した。また雌雄の前核形成率もHS区は93.6%(443/473)と高率を示し、精子侵入卵のほとんどは前核を有すること、さらに、24時間培養後においても、2細胞期に達していた卵子の割合は30.4%(HS—BSA区)で精子侵入卵に対する割合は67.5%と、同種血清が有効であることが明らかとなった。ハムスター卵子の体外受精における受精卵の第1卵割期、及び第2細胞期への発生に関する報告例は少く(Yanagimachiら, 1964及びWhittinghamら, 1974)、しかも2細胞期以降への発生の成功例は報告されていない。この要因として、完全合成培地のみでは体外受精は誘起されず、受精成立に導くためには生体由来物質(血清、卵胞液、副腎抽出液等)の添加が必要であることが考えられる。一方、最近得られた知見(Leibfriedら, 1982)では、ハムスターの受精に有効な生体由来物質の分

析がなされ、 β -アミノ酸(タウリン、ヒポタウリン)を含む合成培地内で高率に受精が起きることから、今後はこの成分を用いた検討も必要と思われる。

c) X線照射後のゴールデンハムスターにおける精子の体外受精能についての検討。X線 200 及び 300 rad 照射後の精子濃度(精巣上体尾部当り)の経時的推移を検討した結果(図-7), 対照に比較して照射区では、照射後3週より急激に精子数は減少し、4~6週後にピークに達し、その後再び増加が認められ回復することが知られた。この精子(照射後3、6、及び9週目)を用い体外受精を行うと、照射後6週目で受精率が有意に(47.7%対92.6%)低下した。これらの結果から、体外受精能はX線照射後6週目に低下し、その後回復すること、また、その放射線感受期は精原細胞期から精母細胞期であることが推察され、精子濃度及び精子形態異常の結果とほぼ一致することが明らかとなった。

一方、照射後6週目における精子数及び受精率の線量効果関係を検討した結果、線量の増加に伴い精子数は直線的に減少することが認められた(図-8)。また、受精率についても各実験区毎の変動があるものの、精子数の結果と同様線量の増

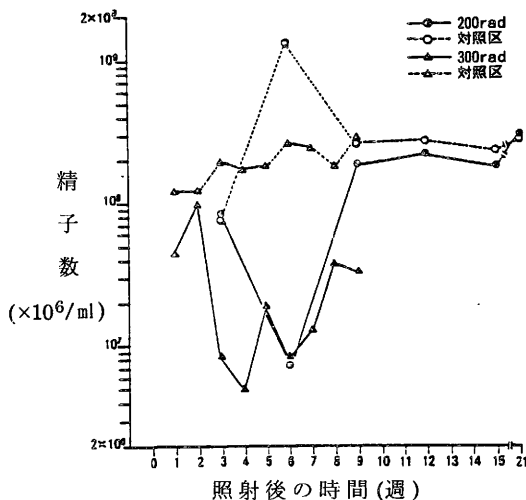


図7. X線照射後のゴールデンハムスターにおける精子数の経時的変動。

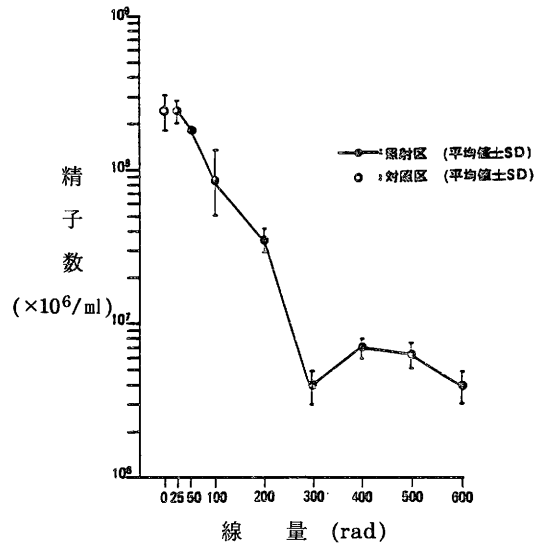


図8. X線照射後6週目のゴールデンハムスターにおける精子数の線量効果。

加に伴い急速に受精能が低下することが明らかとなった。

照射区において受精率が低下した原因は明らかではないが、照射区の受精卵の大部分が前核期に発生していた事実から、卵子に侵入し得た精子は少なくとも形態的には正常に前核期まで発生可能と考えられ、精子への放射線の影響は主として卵子への侵入能力に関係するものと考えられる。今後は精子濃度、精子運動性、精子形態異常、及び相互転座 (Lyonら, 1975) の結果の相関についてさらに詳細な検討を必要とする。

〔総括〕

(1) カニクイザルの飼育管理、衛生管理に必要な、器具、装置改良と、必要なノウハウを獲得し、放射線研究のための実験動物としての技術を確立した。

(2) 放射線による精子の形態異常の研究を行ない、ゴールデンハムスター、カニクイザルを用いて、放射線感受期、線量効果を明らかにし、精子形態異常が、放射線の遺伝障害の有力な指標となることを明らかにした。

(3) ゴールデンハムスターを用い、その体外受精の条件を検討し、X線照射の体外受精能への効果を調べ、放射線による体外受精能の低下は精子

の形態異常、精子数の減少と平行関係にあることを明らかにした。

〔謝 辞〕

本研究課題の遂行に当り、指導と援助をいただ

いた国立予研筑波医学実験用霊長類センター所長本庄重男博士、北里大学獣医畜産学部教授豊田裕博士及び技術的協力をいただいた技術部動植課検疫室山極順二博士、技術第二係の諸氏に対して感謝いたします。

〔研究発表〕

1. 中井 斌, 岡本正則, 戸張巖夫, 平井百樹, 高橋永一, 辻 秀雄: 霊長類実験棟と放射線による遺伝的リスクの研究, 放射線科学, **23**, 32 - 35, 1979
2. 岡本正則, 北爪雅之, 渋谷信江, 中井 斌, 豊田 裕: ハムスター卵子の体外受精, とくに2細胞期への発生について, 家畜繁殖学雑誌(抄録) **27**, 52, 1981
3. 北爪雅之, 岡本正則, 渋谷信江, 中井 斌: ゴールデンハムスター精子の形態異常におよぼす

放射線の影響, 日本放射線影響学会第24回大会講演要旨集, 154, 1981

4. 岡本正則, 北爪雅之, 豊田 裕, 中井 斌: ゴールデンハムスター精子の体外受精能におよぼす放射線の影響, 日本放射線影響学会第25回大会講演要旨集, 246, 1982

5. 北爪雅之, 岡本正則, 豊田 裕, 中井 斌: ゴールデンハムスターおよびカニクイザル精子の形態異常におよぼす放射線の影響, 日本放射線影響学会第25回大会講演要旨集, 245, 1982

Ⅲ 内部被曝の障害評価に関する調査研究 概説

松 岡 理
(内部被ばく研究部)

General Activities of Radiotoxicology Research Group

O. Matsuoka
Division of Comparative Radiotoxicology

Research subgroups for internal emitters actually established at 1976 as the starting body in Division of Radiation Hazards.

Since then, members of this research group has increased from year to year and, finally, the present 6 research subgroups were organized. Research program of each subgroup had, therefore, different initiation date and study time.

The major purpose of this group were two; the first objective was to construct new "Research Laboratory for Radiotoxicology", which required very wide range of studies on safety problems associated with Pu experiments and on related waste treatment. The second objective was to conduct the preliminary research for transuranium elements, which involved inhalation technology, decorporation mechanism, metabolism and the biological effects. Emphasis of this program was laid on obtaining the biological parameters useful for extrapolation of risk data from animal to human.

Following 6 programs were performed during 1976-1983.

- 1) Studies on the design of research facility for radiotoxicology and associated waste treatment plant. (1976-1983)
- 2) Comparative studies on behavior of particulate

materials in several species of mammals. (1978-1983)

- 3) Studies on the methodology of dose estimation for internally deposited alpha-emitters. (1978-1983)
- 4) Studies on the *in vivo* dynamics of internal emitters, in relation to physiological activities of bone, lymph node and alveolar macrophage. (1978-1983)
- 5) Methodological studies on the inhalation of radioactive aerosol. (1978-1983)
- 6) Fundamental studies on decorporation of plutonium. (1980-1983)

New research facility was started to construct in 1980 after safety examination by the authorities concerned. The waste treatment plant designed to be integrated in the facility is expected to complete in 1984.

1) Research

To obtain the basic knowledge on the behavior of particulate material, age and species difference of colloidal carbon clearance from peripheral blood of mice, rats, rabbits and dogs were comparatively investigated. Results suggested that phagocytic activity was nearly identical among various species. Only exception was rabbits which showed significantly low activity.

Difference in the extraction efficiency of colloidal carbon by the liver between rat and rabbit was examined with a constant flow, non-circulating perfusion system. The perfusion test of rabbit liver showed a relatively lower phagocytic efficiency than that of the rats.

Major target organs of Pu such as bone, lung and associated lymph nodes were the object of this research. Lymph node as a major pathway of particulate materials from the lung was investigated morphologically and functionally. Localized deposition of particles in lymph node of mice following administration through eight different routes was examined comparatively. Time-dependent change in characteristic localization of particles in the lymph node was demonstrated ultramicroscopically.

Lung alveolar macrophage of rat as a transporter of inhaled asbestos particle was examined functionally and biochemically by Oghiso (at Georgetown University, U.S.A.). The results showed that asbestos-phagocytized macrophages produced some chemoattractant for other macrophages and leucocytes.

To compare the effects of bone seeking α -emitter such as Pu and Am on bone, exact correspondence of bone metabolic stage in each animal species had to be known. Bone growth and ossification process of several mammals were compared by setting mutual stage evaluation criteria. The results showed that rodents and rabbit were considerably different in ossification pattern from human and other primate, and suggested that bone ossification stage was divided into three stages in all species and can be used for biological age correspondence.

In vivo measurement of Pu lung burden and dosimetric technique of Pu in tissues were investigated. As to the characteristics of CR-39 plastics in tissue and thermoluminescence response of LiF were examined. As a result, CR-39 plastics will generally be advantageous than that of LiF as tools to obtain information on the location of α -emitters. It was known that LiF was useful for rough but rapid estimation of radioactivity whereas CR-39 for precise determination of the location of α -emitters.

Monte Carlo simulation of low energy photon released from mathematical phantoms constructed based on CT image data of lungs was carried out to obtain the information for calibrating of Pu lung monitor. Result suggested that the above calibration method will be useful to increase the accuracy of measuring Pu activity in accidental inhalation.

As a preliminary studies on Pu inhalation, technological study on aerosol generation, measuring of aerosol particle size and development of animal inhalation technique with simultaneous measurement of respiratory parameters were performed: large particle elutriator was developed and tested for its performance; the accuracy of body plethysmography during inhalation was analyzed theoretically and experimentally.

Fundamental studies on the decorporation of Pu from the human body were carried out. *In vitro* measurement of action of chelating agents against polymerization of Pu was developed. Protracted administration of DTPA was investigated by *in vitro* testing system with cellophane bag. To clarify the mechanism of bone deposition of Pu, fractionation of bone tissue were carried out. Glycoproteins, such as sialoprotein and chondroitin sulfateprotein complex, were the major target for Pu binding.

Studies on the toxicity of chelating agents are very important in developing decorporation procedure of Pu. Acute and chronic toxicity studies of Ca-DTPA and Zn-DTPA are in progress.

2) Technological developments

To develop the technologies for the treatment of biological waste associated with Pu research in the new facility, treatment procedure of Pu contaminated materials was investigated. Microwave dehydration of animal carcasses and multi-step processing of residual sludge resulted from the biodisk treatment of radioactive excreta were tested in the experimental scale. The prototype of incinerator for multi-step dry decomposition was designed and its performance was tested.

Results and experiences obtained from above studies were useful for designing waste treatment plant of the laboratory.

1. 内部被曝影響研究の意義

低線量放射線の障害評価のなかで内部被曝の影響は特異な立場を有している。それは放射性核種の体内摂取による被曝は、放射線の生物作用という点では外部被曝の場合と本質的には同じであるが、プルトニウム (Pu) のようなアルファ放射体の場合には、アルファ線の体内での飛程が僅か数十 μ 程度に留まること、特定の臓器の特定の部位にその分布が局限していることから、その影響のタイプもその程度も大幅に異なる。更にその障害は、その核種の体内代謝や線質に密接に関連しているので動物種差がいちじるしく表現されるのが内部被曝の特徴である。したがって実験動物で得られた結果を人類へ適用 (人類へ外挿) するのはいちじるしく困難である。

本研究では多種類動物の同時使用 (マルチスピーシスアプローチ) によって各種の外挿のパラメータを求めることによって障害評価の精度を高めることを重点と考えた。

2. 内部被曝サブグループの研究体制の整備

内部被曝サブグループの人員構成は他のグループの場合とことなり、本特別研究が開始されてから4年後、昭和51年度に内部被曝実験準備室が障害基礎研究部に併設されたことにより、新規の研究グループが昭和55年までに徐々に形成された。この経過を略記すると次のごとくである。

- (1) 昭和51年 内部被曝実験準備室新設
松岡 理併任, 小泉 彰, 福田 俊, 新規採用
- (2) 昭和52年 石樽信人, 高橋千太郎, 山田裕司, 新規採用
- (3) 昭和53年 宮本勝宏, 飯田治三, 新規採用
- (4) 昭和54年, 佐藤 宏, 久保田善久, 新規採用
- (5) 昭和55年, 関口昌道, 新規採用
- (6) 昭和57年, 内部被ばく研究部新設
全員を新研究部へ配置換

研究スタッフの充足が上記の如く徐々に行われたため、特研として実施された6課題は、その発足の時間、研究期間そしてその進展の程度もそれぞれことになっている。

3. 研究成果の概要

- a) 粒子状物質の代謝に関する研究について、

一般にイオン状放射性物質の代謝の動物種差に関しては、かなりの放射性核種について代謝の速度に関して体サイズ依存性がすでに証明されている。しかし Pu のような重合体を体内で生じやすい元素や、粒子状物質の代謝の速度の種差については従来一定の支配法則が得られず、実験動物データのヒトへの適用に関しての困難を形成している。本研究においてはまず個体のレベルで血流中からのカーボンコロイド粒子の消失速度、すなわち肝を主とする網内系の機能にあきらかな年令差があること、またその年令変化のタイプがどの動物でもほぼ一定で、出生後、成熟と共に機能が減少し、成熟に達すると一定の値になり、その値を保つようになる。その最終到達レベルはウサギ以外ではほぼ一定であることがあきらかにされた。更に検討のレベルを個体から器官のレベルに下げて、個体では制御しきれない諸要因、たとえば肝血流量、血中濃度を一定にして環流実験を実施したところ、個体レベルでの動物種差の傾向がたしかめられ、更に細胞レベルでの検討によってウサギの網内系機能の特異性は肝を構成している網内系の細胞と肝細胞の存在比率が他の動物とはことなり低いためであると推定された。このように個体から器官、そして細胞とレベルを順次上げて種差を検討した結果、粒子状物質の網内系による処理には体サイズ依存性がないことがあきらかにされたことは今後の危険度評価のうえでの意義は大きい。今後、肝臓からの転移の速度の支配要因、また肺からの粒子の移動速度についての種差の支配要因の検討が期待されよう。

一方骨に関しての外挿に関する本研究での重要な収獲は骨化に関する比較動物学的検討の結果である。これは従来の Pu の骨に関する代謝、障害に関するデータにおける動物種差の傾向の不一致に解決のいとぐちを与えるものと信じられる。本研究での成果は、6種の実験動物について四肢骨の骨化のパターンに動物種差があり、とくにゲッ歯類およびウサギには骨端核の融合が完成しないで未融合の途中段階にそのまま留まる骨端核がかなりあること、またこの不完全融合を除いても骨化がほぼ安定する時期はゲッ歯類やウサギでは性成熟等とくらべてはるかにおくれ、マウスやラットでは14~17週を要することがあきらかにされた。このことは従来の Pu に関する小動物での実験はすべてヒトやイヌの場合とくらべて骨の成熟という点でことなった時期で実験が開始されているこ

とを意味し、データの不一致の原因もこのことが大きな要因となっていたことが想像され、今後の比較動物学的検討にあたっての生物学的 Stage の対応のための確実な根拠が得られた意義は大きい。またヒトの骨のモデルとしてはサルが最良で、ついでイヌであることがあきらかにされた。

骨化に関する比較動物学的情報があきらかになつたので、今後の課題としては、骨のターンオーバーの比較であり、modeling, remodelingタイプの動物種差をあきらかにすることが今後の課題となろう。

肝と骨とならんで Pu の重要な標的器官として粒子状 Pu の呼入摂取の場合の肺およびリンパ節がある。この吸入粒子の肺からのリンパ節、肝および骨への転移の速度および障害の発現の様式について従来動物種差について一定の傾向がみとめられていない。本研究においてはこの問題について、まず最初に従来ほとんどデータのない粒子の吸入の場合の代謝および障害に関連するリンパ節の役割をあきらかにするため、リンパ節の構造、機能をあきらかにすることから研究を開始した。まず最初にカーボンコロイドをマウスに8種の投与部位で投与して、各々の場合の支配リンパ節をあきらかにした。ついで血流からの経路、リンパ経路、およびマクロファージを介する経路などのリンパ節への経路によって、粒子がリンパ節内で主として沈着する部位がそれぞれことなることをあきらかにした。次にリンパ節内面に沈着した粒子がリンパ節内をどのような経路で移動してゆくかを光学顕微鏡、電子顕微鏡でしらべ、マウスのリンパ節の通過には約1ヶ月を要することがあきらかにされた。このことは粒子のリンパ節通過時間が肺からの転移の速度を支配する重要な要因の一つであると推定されるので、今後ことになった動物種でのリンパ節での通過時間の測定が外挿の精度向上のために重要な課題となろう。

肺からリンパ節への粒子の輸送には肺泡マクロファージが主な役割を演じており、同時に粒子を貪食した肺泡マクロファージの行動が肺の障害の発現にどのような役割を演じているかを知るかが次の課題となる。この問題に関して二つのアプローチがなされた。1つは肺洗浄によって得られたウサギの肺泡マクロファージの培養を用いてなされるラテックス粒子（ $1\mu\text{m}$ および $2\mu\text{m}$ 径）の貪食能の *in vitro* テストであり、マクロファージの貪食能が粒子径に無関係に一定時間には一定の

数を貪食すること、貪食能の飽和は貪食粒子の数ではなく貪食の総量に関係することなど興味ある事実をあきらかにした。もう一つのアプローチは小木曾研究員が米国ジョージタウン大学の環境保護庁のアスベスト吸入障害のプロジェクトに参加して進められたもので、吸入後のラットの肺洗浄によって得られたマクロファージが同類のマクロファージおよび白血球を誘引する物質を産生すること、そしてそれがアスベストによる肺の障害の発現機序と深く関連していることをあきらかにしつつある。アスベストの吸入による肺の障害の発現の機序がプルトニウムの場合と非常に類似していると考えられるので、これらの得られつつある結果は、近い将来プルトニウム吸入の動物での実験へ関連させられると考えられる。

生物学的な問題で代謝、障害と並んでもう一つ重要なものとして生体除染の研究がある。事故等で大量のプルトニウムを体内に摂取してしまったとき体外へこれを人為的にとり除くには二つの方法がある。一つは物理的手段として肺洗浄と呼ばれる方法で、特殊な二重管を気管内に挿入することによって片方ずつの肺に生理食塩水を注入したり、またもどしたりして肺を洗う方法である。本特別研究では肺洗浄の技術の安全性の確立と、肺泡マクロファージの採取の技術の確立をかねてビーグル犬での肺洗浄が行われ、血液 O_2 、血液 CO_2 、血液pH等の呼吸ガス値が安全性の指標として検討され少くともイヌでは安全に肺洗浄が実施できる技術がほぼ確立されたことは、肺泡マクロファージに関する実験研究にも大きな役割を果たすであろう。一方DTPAなどのキレート剤による体外追出しは、現在まで Pu 投与実験は出来ないで、基礎的検討を次の三点について実施した。一つはキレート剤の重台阻止作用の *in vitro* での測定法の開発で、もう一つはキレート剤の血中濃度の長期間維持の方法の検討であり、三つ目は骨組織を構成する成分を分画して、どの分画が Pu と最も高い親和性をもつかをしらべることである。これらの研究は開始後日も浅く、まだまとまった成果を得ていないが、一応の研究の方向づけと基礎がきざれたと考えている。

キレート剤の有効性の向上と共にもう一つ別な重要な面として、キレート剤の毒性或は安全性の検討がある。本特研においてはこの点をラットを用いてまず、脳脱出や、骨格の異常等の催奇形性の検討から始め、急性毒性そして慢性毒性の研究

と現在進展している。これらの研究はDTPAの投与量を下げてより現実に近い条件での実験を今後つづける必要があるが、動物の数や飼育観察の労力等大規模実験の継続にはかなりの困難を伴うことが予想される。

以上述べた生物学的研究と共に、Pu を動物に吸入するための技術の開発が行われた。動物へ吸入させるエアロゾルの発生技術、発生したエアロゾルの粒子径、粒子濃度の計測技術、多数の動物に一樣な濃度で吸入させる技術の開発が非汚染の各種標準粒子を用いて続けられた。一方吸入したPu 量を推定するため、呼吸量を吸入中に測定するボディプレチスモグラフによる方法を検討した結果、非常に精度で呼吸量が測定できるようになった。

吸入によって動物へ与えた Pu の量はエアロゾルの濃度と呼吸量の積で表現されるが、実際に肺に沈着した Pu の量は体外から外部計測によって推定することになる、この計測は17KeVという低エネルギーのX線の計測のため測定胸壁や肋骨による吸収等のため測定の精度はいちじるしく低い、このためこの測定の計数効率を評価する方法が種々研究されている。本特別研究では、単純数理モデルを用いた場合と、2種の胸部ファントムのX線CT像を用いた場合の二つについてモンテカルロシミュレーションによる胸部沈着 Pu からのLX線の胸壁からの吸出率の計算を行って計数効率を求め比較した。このCTによる方法は個人別の計数効率を求めうる将来性のある方法であるが被曝線量低減が課題である。プルトニウムの体内分布の微細構造の測定も障害評価においては重要な意義をもつが、本特別研究では二つの異なるタイプの微小線量計の比較研究が行われた。熱ルミネッセンス線量計として LiF を用いて α 線に対する応答特性および検出限界が検討され、体内埋込み測定の可能性も検討された。更に組織レベルの微小分布の検討用として新しい固体飛跡検出器であるCR-39プラスチックの α 線応答特性が、エネルギーとピット径との関連、バルクエッチング率等の検討が行われた。これらの両検出器の組合せた使用によって α 放射体の体内での線量分布の微細構造が従来より精度高く評価できるようになることが期待できる。

4. 内部被曝実験施設建設に関連する検討

本特別研究を実施するにあたっての最大の目的

の一つは、我国に從來なかった超ウラン元素を使用した。イヌ、サル等の中型動物の動物実験が安全に実施しうる実験研究施設を建設することであった。このためには、核燃料規制法にもとづく放射線防護の見地からの規制と、これとは全く関連のない動物施設としての諸問題を調整し、とくに施設内で発生するアルファ放射性の動物廃棄物の完全処理の方法の完成をめざす必要があった。このため特研においては当初から内部被曝実験施設の設計を最重要テーマの一つにあげ、その検討の設計、放射性廃棄物の処理の二つの段階に分けて実施した。

施設の設計に関しては設計担当のエンジニアリング会社と密接な連携のもとに調査研究を進め、第1次概念設計（昭和51年度）には主として空調、給排気設備、放射性し尿処理、放射性動物死体処理設備についての概念設計を実施した。第2次概念設計（昭和52年度）では本施設に固有の特殊実験室の設備機能、構造仕様を検討し、建屋の基本構造を定める建築計画、防災計画を立案した。調整設計（昭和53年度）は実施設計発注の仕様書を目標に建築設計会社との共同作業で、更に核燃料規制法に基づく安全審査の資料準備をも目標とした。全体計画を行い、従来の個別の概念設計を見直し、その統一、調和をはかり、配置計画、廃棄物処理計画を実施した。

以上の設計に関する検討結果は建設省による実施設計へ受けつがれ、安全審査、建設の承認を受け、昭和54年度内に着工できた。

放射性廃棄物の処理に関しては、放射性死体のマイクロ波による脱水乾燥の方法がまず検討され、各種の予備テストののち最終的には1/5スケールの中間試験機を試作し、これを用いて各種の検討を実施し、良好な成績を得ることができ本プラントの設計に必要なデータを得た。

排水処理に関しては、し尿を含む排水の処理に回転円板による接触酸化法を想定し、小型のテスト機を作り、非汚染、RI使用でのテストをくり返し、各種のデータを得てこれを本プラントの設計に反映させることができた。更に乾燥汚泥および乾燥死体の最終処理の方式として乾留灰化方式を提案し、種々の検討を加え、最終的には1/2スケールの実験機をつくってテストし、その成果を本プラントの設計に反映させることができた。

放射性排気の処理に関しては、HEPAフィルターの粒子透過性についても実験を行い、最透過

粒子径を新しく求め、従来よりも低い $0.1\ \mu\text{m}$ 附近にあることを実証した。また新しいフィルター
の素材の検討や、フィルターの現場テスト法の検討なども行っているが、これらはいずれも新実験
施設の運転に直接適用される予定である。

1. 内部被曝実験施設の設計に関する研究

〔緒 言〕

プルトニウムなど高度の危険性を有するアルファ線放射核種による内部被曝の障害評価の研究には、これまで我国に建設経験のない特殊な施設が必要である。すなわち各種実験動物を長期にわたって安定して飼育・維持できることと、アルファ核種を最も危険度の高い吸入投与法によって投与するなど核燃料物質を取扱うために必要な高度の安全性を有すること、の2つを同時に満足する施設でなければならない。このような施設の設計には、場合によって相矛盾する設備機能が要求されることや建設経験の十分でない設備が必要となることなど多くの技術的課題が予想された。そのため施設設計には概念設計、調整設計および実施設計の3段階の設計レベルを設定し、51年度および52年度にそれぞれ第1次、第2次の概念設計を、53年

度に調整設計を実施した。これらを基礎として54年度に建設省関東地方建設局によって実施設計が、同時に放射性廃棄物処理設備の基本設計を並行して実施し、建屋の実施設計に反映された。

一方、内部被曝実験施設には放射性動物死体、放射性し尿排水など実験動物に由来する放射性廃棄物の処理設備が不可欠である。特に使用するのがプルトニウムなどの核燃料物質であり、動物性廃棄物が腐敗しやすく、施設内で処理し保管しなければならない。動物性アルファ廃棄物の処理は我国にはほとんど経験がなく解決を要する多くの技術的課題がある。内部被曝実験施設独特の廃棄物処理技術の確立は、実験施設の成立に不可欠であると同時に施設設計に重大な影響を及ぼすため、概念設計等の設計作業に並行して調査・研究を進めてきた。

(1) 実験施設の設計

松岡 理，小泉 彰，福田 俊，小木曾洋一，
石樽 信人，高橋千太郎，山田 裕司（内部被ばく研究部）

〔研究結果と考察〕

(I) 設計の進め方

設計担当エンジニアリング会社と緊密な連携のもとに調査、検討を進め、また、関連プラントや装置等の技術を検索し、メーカーとの技術的な討議、実施調査あるいは実証試験を行なって設計内容に反映させた。

(II) 第1次概念設計（昭和51年度）

第1次概念設計では、内部被曝実験施設に必須の3つの設備、すなわち①動物飼育および核燃料物質取扱いの双方に必要な機能を満足させる空調・給排気設備、②放射性し尿排水を含めた排水処理設備、③放射性動物死体処理設備、の概念設計を主目標とし、それぞれ成立し得ることを確認した。

空調・給排気設備は、機能上重要な位置を占め、

その設計が建屋の構造設計に大きく影響することがわかった。

排水処理設備については既存の水処理技術の比較検討の結果、まず動物し尿に由来する排水中の有機物を生物学的浄化法により除去し、つぎに既存の技術である放射性物質除去設備に送る方式が適当であると結論された。

放射性動物死体処理には、後述の多段階処理法を採用し、各段階について現在手に入る機器によって構成し得ることがわかった。

以上の3つの設備の概念設計を土台とし、施設の全体計画を試みた。その結果、実験棟は空調・換気あるいは給排水などに関連する機能的要請が高度のため、その維持管理の点で、各フロア間にメカニカルフロアを設置すべきであると結論された。

第2次概念設計では、本施設に固有の特殊な実験室の設備機能、構造仕様の検討、施設建屋の基本構造を定める建築計画、超ウラン元素取扱施設を考慮した防災安全計画を実施した。

特殊実験室として、プルトニウム吸入実験関連実験室、投与動物飼育室など内部被曝実験の特殊性を有する各種実験室を対象として、その設備機能および構造について、主に放射線安全の観点から検討した。また各実験室について取扱う放射能レベル、作業の危険性などでグレードを設けて分別した。

防災計画ではアイソトープ取扱いに伴う安全性の評価のみならず、火災対策、地震対策、核物質防護、さらには騒音、悪臭の対策では種々の検討の結果スプリンクラーおよび排煙装置を本棟では採用できないことがわかり、防火区画の細分化を検討した。耐震対策については各施設設備の重要性を基礎に耐震設計基準を定めた。

(Ⅳ) 調整設計（昭和53年度）

調整設計は、実施設計発注の際の仕様書になり得る設計グレードを目標とし、そのため設計担当を建築設計会社とした。また、施設建設に先立って必要となる核燃料等規制法に基づく安全審査への資料準備も目標とした。

調整設計では、まず全体計画を行ない個別の概念設計の統一、調和を図り、そののち敷地内配置計画、建築計画、設備計画、安全対策、放射線管理、廃棄物処理計画を実施した。

建築計画では、各フロアの性格を規定する断面配置計画、各フロアの実験室等の配置計画、管理エリア、実験エリア、ダクトスペースを位置決定するゾーニング、人間、物品等の動線計画を行なった。建屋の構造計画では耐震構造を追求するとともに、プルトニウム施設に要求される気密性を確保するためクラック発生防止工法の検討も行なった。

設備計画では設備管理および運転経費軽減を考慮した省エネルギーシステムを導入し、系統別給排水量、部屋別換気量、空調熱負荷計算等具体性の高い検討を行なった。また、電気設備についても、負荷計算に基づく電力設備、動力設備のみならず、非常用電源計画（自家発電設備等）、通信設備の設計を行なった。

上述の如く調整設計は非常に具体性の高い設計を実施でき、実施設計の初段階である基本設計に匹敵する設計グレードの内容にし得た。このこと

は引き続き建設省による実施設計がスムーズに進行し、ひいては54年度内に安全審査、建設の承認を経て着工できたという点で大きな意義があった。(V) 放射性廃棄物処理設備基本設計（昭和54年度）

前述のように54年度には内部被曝実験棟の実施設計が建設省によって進められた。この実施設計に対し、放射性廃棄物処理設備の建設に必要な事項を予め反映させておく必要があった。すなわち、処理設備建設時の機器、タンク等の搬入口、機器設置スペース、埋込金具、配管、上水、電気、蒸気等のユーティリティーなどを建築設計、設備設計の側で用意するためである。そのためには、廃棄物処理設備の設計グレードが基本設計程度の精度を要することから原子力プラントエンジニアリング会社を設計担当とし、建物の実施設計と並行してプラントの基本設計を行なった。

廃棄物処理設備基本設計では排水処理設備、動物死体処理設備、特殊廃液処理設備、固体廃棄物処理設備および放射線管理設備の具体的内容を決め、実験施設の稼動に伴う放射性廃棄物の処理方式、設備を明らかにした。

排水処理設備には概念設計時の基本システムが採用され、回転円板式接触酸化法によって有機成分を微生物処理したのち活性炭吸着によって放射性物質を除去する方式とした。また排水処理から2次的に排出される汚泥スラッジの乾燥設備を新たに導入した。

動物死体の処理には、冷凍破砕—マイクロ波脱水—乾留灰化—密封保管のシステムフローを採用し、機器の構成、材質の検討等を行なった。

固体廃棄物処理設備は焼却処理設備と圧縮減容設備で構成され、可燃性廃棄物、エアフィルタ、乾燥汚泥スラッジの処理設備であり、別棟の処理施設に設置することとした。

放射線管理設備は実験棟の放射線管理上必要となる排気モニタ、排水モニタおよび中央監視盤等の設備である。特にプルトニウムなどのアルファ核種のモニタリング機器の精度は $\beta-r$ 核種用に比べ十分でなく、検討すべき点が多くあった。

1. 内部被曝実験施設の設計に関する研究

(2) 放射性廃棄物の処理に関する研究

松岡 理, 小泉 彰, 福田 俊,
山田 裕司, 宮本 勝宏 (内部被ばく研究部)
森 貞次 (技術部技術課)

Studies on Design of Research Laboratory for Radiotoxicology

O. Matsuoka, A. Koizumi, S. Fukuda, Y. Yamada, K. Miyamoto and T. Mori*

Division of Comparative Radiotoxicology,

*Division of Technical Services

Research on hazard caused by internal emitters like plutonium requires a facility of special functions. The safety in handling alpha-emitters and the stable performance of equipments for rearing experimental animals must be assured. Therefore, preliminary design of the facility was made in parallel with R & D on the experimental scale.

1) Preliminary design of the research laboratory.

Preliminary and basic design works were carried out for 4 years period.

(i) Conceptional planning I (1976)

In the first stage of conceptional design, the fundamental ideas were formed as to the equipment for treating radioactive animal carcasses, the plant for the treatment of radioactive animal excreta, and the equipment for air-conditioning and ventilation.

(ii) Conceptional planning II (1977)

In the second stage, basic conceptions were established concerning principal framework of the facility, requirement for the safety devices and equipmental functions of special laboratory rooms.

(iii) Semi-general planning (1978)

Based on the ideas formed in the first and the second stages, the coordination and adjustment were made among arrangement of laboratories, construction program, equipmental design and radiation safety control system. The execution design was established in 1979 and the construction of the laboratory was undertaken by the Ministry of Construction and is expected to complete in 1984.

(iv) General planning of radioactive waste treatment equipments

Principles for the treatment of all kinds of radioactive wastes were worked out and the mechanical layout for each treatment was completed in close cooperation with a professional engineering team. Based on this plan, execution design and construction of the waste-treatment equipments have been implemented by the Ministry of Construction. (Completion is expected to be in 1984)

2) R & D on radio-active waste treatment

(i) Treatment of radioactive animal carcasses

A new method of waste treatment of animal

carcass contaminated with plutonium was proposed. A multi-step process was designed and tested. This process was composed of the following steps: microwave dehydration, heat decomposition and ashing. The incinerator developed was endowed with sufficient air-tightness and was able to achieve stable decomposition and ashing with a relatively small quantity of flyash and exhaust gas.

(ii) Treatment of radioactive waste water

Behaviors of several radioisotopes (^{60}Co , ^{137}Cs , ^{85}Sr , ^{144}Ce , ^{154}Eu) in biological oxidation process of waste water containing radioactive animal excreta were investigated. As a result, it was observed that decontamination factors for lanthanide (^{144}Ce , ^{154}Eu) were larger than other nuclides tested and isotopes were accumulated in

organic sludge. Further, accumulation factors of each isotope in precipitated sludge and active sludge were determined. It appeared that physical surface absorption and biological incorporation were taking part in the accumulation.

(iii) Collection performance of air filters

Performance of high efficiency air filters, which have been used widely in nuclear technology field, were measured. In the result, it was found that the most penetrating particle size through HEPA (High Efficiency Particulate Air) filter were in the range from 0.10 to 0.18 μm in diameter. It was confirmed that overall penetration factor of two HEPA filters fixed in series could be described as a product of the factor of each filter.

(I) 放射性動物死体の処理に関する研究（昭和51～55年度）

プルトニウムなどの核燃料物質を含む動物死体は、従来の専門機関にその処理を委託することはできず、また凍結保管は長期間の保管方法としては安定性を欠く。したがって、内部被曝実験施設のように放射性動物死体の排出がさけ得ない施設では施設内に処理設備の用意が必要である。そのため動物死体に適した処理方式を検索したが、通常の焼却処理には、動物死体が自燃性を有しないこと、死体中に含まれる放射性物質が激しい燃焼反応によって排ガス中に移行しやすいことなどから、プルトニウムなどを含む動物死体の処理方法としては適当でないと考えられた。そこで放射性動物死体を排出する実験研究の内容に基づいて限定される処理目標を設定し、新しい処理方法である多段階処理法を立案した。この方法は死体の凍結保管→破碎→脱水→熱分解（乾留）→灰化→密封・保管、というプロセスで処理するもので、乾留ガスをプルトニウムを含まない形で取出し、プルトニウムのようなアイソープを排ガス中へ飛散させないで灰化しようとする考え方に基づいている。本研究はこの新しい処理方法の設備設計に必要な知見を得るための基礎的研究であり、前述の概念設計と互関性を持たせながら実施した。本研究は次のごとく段階を踏んで実施した。

①プロセス検証実験

まず、ごく少量（数g）の死体についてマイクロ波による脱水、熱分解ガスの無煙燃焼、灰化時の ^{60}Co の飛散などを検討し、本プロセス成立の可能性を確かめた。この実験によりマイクロ波脱水において死体の破裂、発煙、コゲつきなど好ましくない現象が観察され、マイクロ波出力の制御の必要が示唆された。ついで家庭用電子レンジ（出力600W）に出力制御機構を取り付けて脱水実験を行なった。その結果、異常現象が出力制御で防止できること、ほぼ完全に乾燥でき、重量が30%程度に減少できること、アイソープ実験により非揮発性元素は排ガス移行がほとんど無いこと、などがわかった。

②試験装置の開発

上記の実験結果に基づき、52年度に目標処理能力の1/10の装置を設計・試作し実用化を目指した研究を実施した。

マイクロ波脱水には、高出力（2Kw）装置を試作し、脱水完了検知方法として入射波と反射波の比が使用できること（図1）、死体重量に対するマイクロ波出力の比を低くするとアイソープの飛散量を軽減できること（表1）、ホルマリン保存死体の脱水も可能なことなど実用面での多くの知見を得ることができた。本研究により開発されたマイクロ波脱水装置は、 β - γ 用死体処理装置として市販され、多用されるに至っている。

一方、熱分解・灰化処理装置には電気外部加熱方

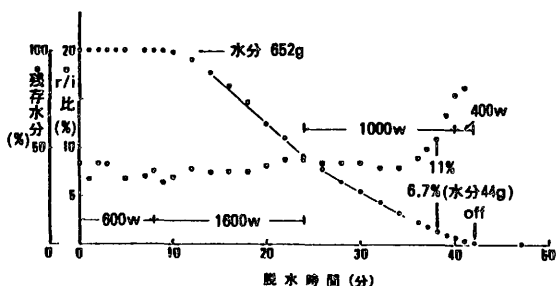


図1 マイクロ波脱水時のMW反射比(r/i比)と死体中水分量の経時変化

脱水試料：ラット凍結死体 1155 g

・印：残存水分の割合(%)

○印：反射波出力÷入射波出力(%)

表1 マイクロ波脱水時のアイソトープの飛散量

装置 核種	家庭用電子レンジ (改良型 600 W)	高出力脱水装置 (出力 2 KW)
^{60}Co	6.1×10^{-6} 以下	6×10^{-6} 以下
^{137}Cs	3.8×10^{-5} 以下	1.6×10^{-5} 以下
^{55}Sr	1.7×10^{-4} 以下	—
^{144}Ce	3.3×10^{-4} 以下	—
試料と重量	マウス, 30 g	ラット, 200 g

式の乾留灰化炉を試作し、死体の分解速度、灰化速度を調べ、灰化に比べ分解に要する時間が非常に短いこと、熱分解する成分が比較的高温(500～600℃)まで存在することがわかり、炉形設計の基礎データが得られた。また分解ガス、燃焼ガスの成分分析により理論必要空気量の計算、腐食性ガス成分量から炉材の選定に必要なデータが得られた。

③乾留灰化装置の開発研究

実験施設の設計が進展するに伴い、動物死体処理設備は排水処理に伴って発生する汚泥の処理設備と一体化することになった。これは汚泥の排出

量が予想以上に大であることが推定されたことと、建築設計が固まり限られたスペースを有効に使用するためと、廃棄物処理設備運転のマニッパを軽減するために効果的と考えられたからである。排水処理から出る汚泥は動物死体と同様に自然性が無く、腐敗しやすい性質であると同時に連続的、かつ多量に排出される。さらに汚泥は焼却処理の際フライアッシュとなって排ガスへ飛散しやすいと考えられる。そのため、動物死体の処理法として検討してきた乾留灰化法が汚泥処理に最適と考えられ、動物死体と汚泥とを処理対象とした乾留灰化装置を研究・開発することとなった。この研究はエンジニア会社との共同研究の形で昭和55年に実施し、種々の検討、実験の結果、最終的に目標処理能力の1/2の実験炉を設計・試作することによって新しい炉形の成立を実証することができた。すなわち、高い気密性のある炉体で負圧を維持させつつ安定な乾留灰化を行なわせることができ、大きな減容効果、少ない排ガス量、低濃度ばい塵量など必要な性能を実証することができた。この研究により内部被曝実験施設で必要となる動物死体および排水処理、汚泥の処理に関する研究は、自動運転制御化などメーカーの課題を残すのみとなり完了することとなった。

(II) 放射性排水処理に関する研究(昭和52～57年度)

内部被曝実験施設から排出される排水中のアイソトープは主に実験動物のし尿からくると考えられる。このような排水は生物学的浄化プロセスを通して有機物を除去したのち、既存のアイソトープ除去技術で浄化しなければならない。しかし、各種のアイソトープが生物学的浄化プロセス中でどのような挙動をとるか、また通常のR I除去技術が生物学的浄化プロセスを経た排水に対しても通常通りの能力を発揮し得るかは不明である。これらの点は排水処理設備の設計や安全性の評価のためには不可欠な知見である。そのため、52年度から放射性し尿浄化実験装置の開発に着手し、1～2ℓ/日の汚水を浄化できる超小型の浄化装置を試作し、浄化装置を試作し、浄化能力を持たせることに成功した。表2にこの装置の浄化能力を示す。

この実験装置を用い ^{60}Co 、 ^{137}Cs 、 ^{85}Sr 、 ^{144}Ce 、 ^{154}Eu を含む汚水の浄化実験から次の点が明らかになった。

①生物学的浄化プロセスの ^{144}Ce 、 ^{154}Eu に対す

表2 汚水浄化実験装置の性能

水 質 指 標	除 去 率
生物学的酸素要求量 (BOD)	93.5%
化学的酸素要求量 (COD)	84.4%
浮遊物質 (SS)	96.8%以上

る除染係数はそれぞれ40以上、400以上と高く、同じ遷移元素であるプルトニウムに対しても除去能力が期待される。

②除染係数の小さい核種でも汚泥への濃縮が観察され、汚泥の種類によって濃縮係数が異なることがわかった (表3)。このことから汚泥へのアイソ

表3 汚泥による ^{137}Cs , ^{144}Ce の濃縮係数

槽No.		第1槽	第2槽	第3槽
汚泥の種類	槽内汚泥			
	^{137}Cs	7.3	4.6	7.4
回転円板 付着汚泥	^{144}Ce	288	254	97
	^{137}Cs	27	43	33
	^{144}Ce	386	345	104

濃縮係数 = 汚泥の比放射能 ÷ 槽内水の比放射能

トープ濃縮には微生物の体内取込みと、有機物表面への物理化学的吸着の2種の機構があると考えられる。また汚泥へのアイソトープ濃縮の結果は汚泥処理設備に対し放射線安全への十分な配慮の必要性を示唆している。

③し尿汚水の中の ^{60}Co は凝集沈殿処理によって除去できなかった。このことは ^{60}Co の汚水中之での溶存状態が水溶液中とは異なっていることを意

味しており、既存のアイソトープ除去技術の能力に影響する可能性を示している。他の核種でもこのような溶存状態の差が存在し得ると考える必要がある。

(Ⅲ)放射性排気処理に関する研究 (昭和55年～57年度)

内部被曝実験における実験動物へのプルトニウム吸入投与法は放射線安全上最も危険性の高い作業である。この実験におけるプルトニウムエアロゾル排気あるいは廃棄物焼却炉の排ガスの処理が実験施設の安全性維持の中心的課題である。この排気の浄化には通常HEPAフィルターと呼ばれる高性能エアフィルターが使用される。HEPAフィルターは $0.3\mu\text{m}$ 径のDOPエアロゾル粒子を99.97%以上除去する性能を有する。しかし内部被曝実験施設で問題となる排気中のプルトニウムは濃度が高く、またエアロゾル粒子径も小さいと考えられる。そこで実験施設の稼動前に安全性を確認する目的で55年度より、エアフィルターの粒子捕集性能を評価する研究に着手した。

① $0.3\mu\text{m}$ 以下の粒子に対する捕集性能

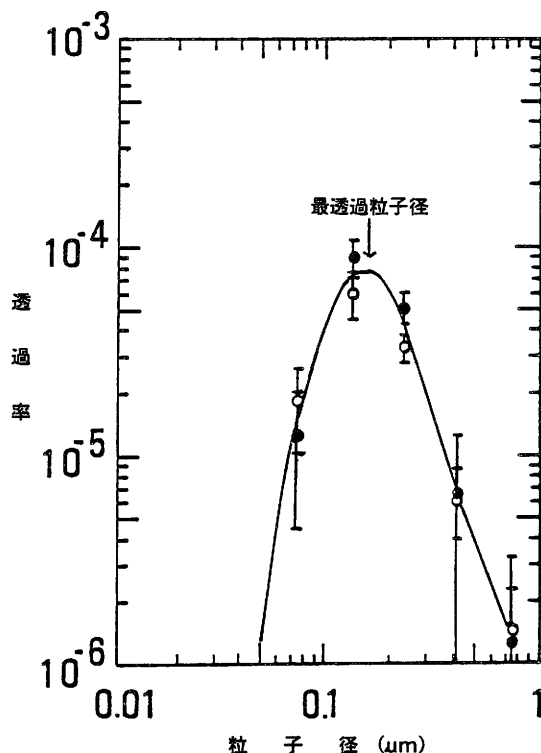


図2 HEPAフィルタの粒子径別透過率

HEPAフィルターの捕集性能は $0.3\mu\text{m}$ の基準粒子径で評価されているが $0.3\mu\text{m}$ 以下の粒子径での捕集性能を測定した結果、図2に示す通り $0.1\mu\text{m}$ 付近まで捕集性能は低下し、 $0.1\mu\text{m}$ 以下では再度捕集性能が上昇することがわかった。すなわち、フィルターを最も透過しやすい粒子径（最透過粒径）の存在が観察された。この結果から、 $0.3\mu\text{m}$ という従来の基準粒子径に対し疑問が生じることとなった。最透過粒径での捕集性能は $0.3\mu\text{m}$ 粒子に比べ20倍程度低く、エアフィルターの性能を最透過粒径での捕集性能によって評価することが最も安全側の評価になると考えられる。この最透過粒径は種々のエアフィルターを測定した結果、 $0.1\sim 0.2\mu\text{m}$ の範囲にあることがわかった。

②多段フィルターでの後段フィルターの捕集性能

HEPAフィルターを2段に使用した場合の粒子捕集性能を図3に示す。従来多段フィルターシステムでの後段のフィルターは性能が低下すると考えられていたが、測定結果では2段フィルターの透過率は1段の透過率の積に等しくなり、捕集性能の低下は認められなかった。プルトニウム施設のように排気フィルターに高い除染効果が求められる施設では多段フィルターシステムが採用されているが、本研究の結果から後段フィルターも有効に働いていると考えられる。

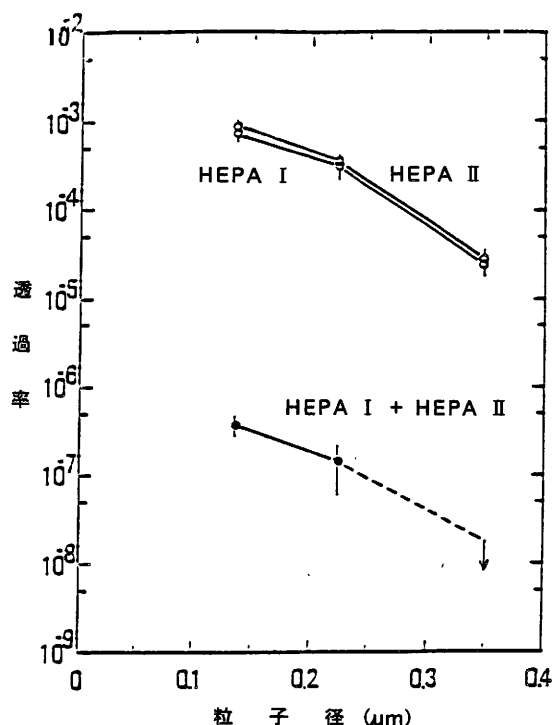


図3 2段フィルターの粒子径別捕集性能

- ・印：1段フィルターの透過率
- 印：2段フィルターの透過率

表4 各種フィルター素材の透過率

フィルターの種類	0.1ミクロン粒子 ($0.12\sim 0.17\mu\text{m}$)	0.2ミクロン粒子 ($0.17\sim 0.27\mu\text{m}$)	0.3ミクロン粒子 ($0.27\sim 0.42\mu\text{m}$)	圧損 (mmH_2O)
中性能フィルター (定格95%)	5.9×10^{-2}	6.1×10^{-2}	3.2×10^{-2}	5.7
HEPAフィルター (定格99.97%)	6.6×10^{-4}	4.1×10^{-4}	3.0×10^{-5}	17.2
新HEPAフィルター：O社 (定格99.9999%)	3.1×10^{-6}	8.2×10^{-7}	6.3×10^{-9}	23.1
新HEPAフィルター：C社 (定格99.999%)	1.6×10^{-6}	4.9×10^{-7}	—	29.2

エアロゾル：DOP（多分散）

濾過面速： 2.4 cm/s

測定器：レーザー光散乱式測定器

③より高性能なエアフィルター

プルトニウムエアロゾルを発生させる吸入実験では、排気中プルトニウム濃度は非常に高い。したがって、安全性を向上させるには従来型HEPAフィルターよりさらに性能の高いエアフィルターが望まれる。最近、微小エアロゾル用として市販されている新型エアフィルターの素材濾紙を入手して、その性能を従来型HEPAフィルターと比較した。その結果、表4に示す通りHEPAフィルターよりかなり高い捕集性能が認められた。したがって、この新しい素材を用いたエアフィルターが従来型HEPAフィルターより高性能である可能性が認められた。このようなフィルターが入手できるとすると、実験施設から外部への放射性物質放出量をさらに低減することができ、施設の安全性を容易に高めることが可能となる。

〔総 括〕

(1)内部被曝実験施設は先進諸外国にもいくつかあり、本研究の準備段階、あるいは途中においても施設見学等の調査を行なった。しかし、諸外国と日本とでは放射線安全に対する社会的要請あるいは法的規制がまったく異なっており、このことが施設設計における多くの技術的課題をかかえる要因であった。すなわち、放射性物質投与動物の飼育方法、廃棄物の処理方法など国外にも例の無い対応策を必要とした。しかし、3年間にわたる予備的設計、あるいは外部機関との共同研究などの各ステップごとに、問題点を認識・整理しながら設計を進めることによって、57年末までになんとか調和のとれた設計が施設全体について完了できた。特に、廃棄物の焼却処理設備は動物死体、汚泥スラッジといった処理経験のほとんど無い廃棄物が対象であり、解決しなければならない課題が多くあった。

今後の課題としては施設設計と実際の施設運転状況とのギャップの問題があると思われるが、内部被曝実験施設のようにあまり例のない施設の運転経験は、他分野の施設設計あるいは施設管理に

多くの知見を提供すると思われる。

(2)プルトニウム等のアルファ放射核種を含む動物性廃棄物の処理の研究は他の廃棄物処理と比べ大きな特殊性がある。すなわち、どのような処理プロセスについてもきびしい空気汚染への配慮が必要であり、また死体、し尿といった動物性廃棄物は処理経験があまりなく、これまでの処理技術をそのまま使用できることが少ない。

動物死体の処理に関する本研究において、乾留灰化装置の基礎的研究が焼却炉設計の基礎データを提供したが、マイクロ波脱水技術は設計の方針変更により最終的には設備設計に反映されなかった。しかし、開発された技術が β - γ 用脱水装置として製品化、市販されるに至っており無駄ではなかったと思われる。

放射性し尿処理の研究は、これまであまり知見が無かったため、排水処理設備の設計に反映すること大であった。すなわち、汚泥へのアイソトープ濃縮の結果から、設備の機種選定、品質管理においてグレードアップが計られたこと、消毒薬残存量の測定から消毒中和装置が導入されたこと、などである。しかし、最も有用な知見は実際に稼動した設備で実測されたデータから得られると思われる。このような知見は運転管理に有用ばかりでなく、今後の類似設備の設計に非常に役立つものと思われる。

排気処理に関する本研究によって、通常用いられるエアフィルター設備が放射線安全上有効かつ重要な設備であることが示された。また、これまで不明であった微細粒子の捕集効率が測定された結果、エアフィルターの除染係数の評価がより正確になると思われる。さらにエアフィルターの種類を選定すれば、捕集性能あるいは放射線安全性を容易に向上させ得ることが示された。今後は、エアフィルター装着時の品質検査技術、日常の管理技術としてのインプレステスト技術の開発が施設の質を維持する上で必要になると思われる。

〔発 表〕

(1) 松岡 理, 小泉 彰, 福田 俊: 放射性動物死体の処理に関する基礎的研究(第1報) —多段階処理の考え方とその可能性—, 保健物理, 14, 11—17, 1979

(2) 松岡 理: 内部被曝実験棟の建設とプルトニウムの生物学的安全性研究, 日本原子力学会誌, 21, 768—772, 1979

(3) 松岡 理: マイクロ波脱水法の意義と問題点,

- Pure Chemicals "Daiichi", 10, 13—21, 1979
- (4) 小泉 彰, 福田 俊, 松岡 理: 放射性動物死体の処理に関する研究 (第2報) —マイクロ波加熱脱水処理の基礎的検討—, 保健物理, 15, 25—31, 1980
- (5) Yamada, Y. Miyamoto, K. Mori, T. and Koizumi, A.: Collection Performance of Air Filters for DOP Particles below $0.3\ \mu\text{m}$ Diameter. Hoken Butsuri, 17, 461—467, 1982
- (6) Yamada, Y. Miyamoto, K. Mori, T. and Koizumi, A.: Penetration of Submicron Aerosols through High Efficiency Air Filters. Health Physics (in press)

2. 放射性核種の代謝に関する比較動物学的研究

— とくに粒子状物質の代謝に関して —

松岡 理, 高橋千太郎, 久保田善久,
飯田 治三 (内部被ばく研究部)

Comparative Studies on the Behavior of Particulate Materials in Several Mammals

O. Matsuoka, S. Takahashi, Y. Kubota and H. Iida
Division of Comparative Radiotoxicology

In order to assess the toxicity of particulate radionuclide, such as polymelic plutonium it is important to know their behavior and metabolism in the living body. The present study were undertaken to obtain some fundamental knowledge about the movement of particulate radionuclide in peripheral blood, alveolar macrophages and placenta by employing model particles. Three different kinds of particles were used, i.e., colloidal carbon, ^{198}Au -colloid and iron dextran to simulate various physico-chemical state of plutonium except for its α -emitting capacity.

(1) Age and species differences of colloidal carbon clearance from peripheral blood of mice, rats, rabbits and dogs were investigated. The blood clearance of carbon was more rapid in the young than in the old for all the species examined. Liver blood flow, phagocytic activity of the liver and whole circulating blood volume may be the factors involved in this age difference of the blood clearance of carbon. The rate of colloidal carbon clearance in the rabbit was significantly slower than in other three species. This species difference may be attributable to the extraction efficiency of carbon by the liver.

(2) Difference of the extraction efficiency of

colloidal carbon by the liver between rat and rabbit was examined with a constant-flow, non-recirculating perfusion system. In both species, a diminution in perfusate flow produced an increased extraction efficiency. The extraction efficiency also increased with a decrease in the carbon concentration of the perfusate. Under identical conditions regarding the flow rate and carbon concentration, the perfused liver of the rabbits showed a relatively lower phagocytic efficiency than that of the rats.

(3) The dependence of the phagocytosis of particulate materials on their size was studied in rabbit alveolar macrophages cultured in suspensions or monolayers with Latex particles of 1 or 2 μm in diameter. In suspension culture, there was no significant difference in the average number of particles phagocytized by macrophages between 1 and 2 μm particles in the identical conditions as to particle concentration and the incubation time. In monolayers, it was difficult to compare the average number of 1 μm particles phagocytized by macrophages with that of 2 μm ones in the identical condition as to the particle concentration, since the sedimentation velocities of particle in medium were different

between both particles. The sign of saturation was observed when the average number of phagocytized particles reached approximately 10 particles per macrophage in either case of suspension culture with 1 or 2 μm particles and approximately 45 of 1 μm and 10 of 2 μm particles in monolayers.

(4) In order to investigate how particulate materials are transferred across the placenta and how they are deposited in the system, colloidal carbon and iron dextran were injected i.v. into near term mice, and the placenta and fetal membrane were examined by light and electron microscopy. In the rats injected with colloidal carbon, a large amount of these particles was deposited in trophoblast cells adhering to the Reichert's membrane, whereas they rarely deposited in the cells of labyrinth. On the other hand, iron dextran were deposited both trophoblast

cells locating in labyrinth and adhering Reichert's membrane. Electron microscopic examination revealed that the Reichert's membrane may be a significant barrier for selective transport for both particles in yolk sac placenta, and that the first and third layer of trophoblast cells may constitute a barrier for colloidal carbon and for iron dextran, respectively, in chorioallantoic placenta. In addition, the amount of biologically inert particles transferred to the fetus was determined by using ^{198}Au -colloid. The transferred amount was very small, being approximately 0.018 and 0.005% for ^{198}Au -colloid of 5 and 30 nm in diameter, respectively, of the administered dose per litter at 24 hours after injection. The radioactivity of fetal membranes was as high as placental tissue, suggesting that the yolk sac placenta have an important role for the transfer of particulate materials from mother to fetus.

プルトニウムなどの超ウラン元素は、生体内において、(1)イオン状または、タンパクとの結合型で挙動する場合、(2)水酸化物の重合体を形成し、コロイド状(粒子状)で挙動する場合がある。本研究の最終目的は、後者の粒子状超ウラン元素の生体内挙動、代謝を明らかにし、超ウラン元素による内部被ばくの障害評価の精度向上に必要なデータを提供することである。

すでに、種々の粒子状物質の生体内挙動、代謝に関する検討が網内系組織の形態と機能に関連して行なわれている。それによれば、一般に粒子の生体内の動きは、網内系の機能や、臓器への血流量といった生体側の生理的要因、あるいは、粒子径や表面荷電といった粒子の物理化学的性状によって影響される。しかし、粒子状超ウラン元素においては、さらに、粒子自体の放射線効果、重合の進展に伴う粒子の粗大化等の修飾が加わるので、その挙動はより一層複雑なものになると推察される。一方、内部被ばくの障害評価は、最終的にはヒトを対象とするものであり、ヒトと実験動物における生理的な差異を考慮したものでなければならない。我々は、これらの諸点をふまえ、以下の構想で粒子状超ウラン元素の生体内挙動、代謝の検討を進めることとした。第一に粒子径の

均一な、毒性の少ない標準粒子の生体内挙動について検討し、生体における異物粒子処理の一般的過程を明確にし、さらに、粒子状超ウラン元素の生体内挙動について検討し、両者の比較から超ウラン元素の代謝の特異性を明らかにする。第二に、一動物種に偏せず、多種の実験動物で同様の実験を行い、種差がもたらす生理的変動が、生体の異物処理に及ぼす影響と程度を明確にし、実験動物で得られた結果の人への外挿を可能とする。

粒子状物質の挙動、代謝に関する過去の研究には、非常に微細な電顕レベルでの報告や、反対に、網内系機能の臨床検査的な報告、あるいは、特殊な粒子を用いた報告なども多く、粒子状超ウラン元素の生体内挙動の検討に必要な基礎データとなりうる報告は限定されている。とくに、動物種差に関する報告や、胎盤のような主な網内系臓器以外の器官での粒子の挙動に関する研究は、ほとんどみられない。それ故、以下の三点を当面の目標として研究を行った。(1)末梢血中における標準的な粒子の挙動と、それにはたす肝臓の役割を比較動物学的な立場から明らかにすること。(2)粒子状超ウラン元素の吸入において重要な役割を有する肺マクロファージの貪食能に関して検討すること。(3)超ウラン元素の胎児移行において問題となる胎

盤での粒子の沈着様式，胎児移行機序等を明らかにすること。

(I) コロイドカーボン粒子の末梢血中消失速度に関する研究（昭和53年～57年）

現在までのところ，粒子状物質の末梢血中消失速度における年令差，動物種差などについて言及した報告はほとんどみられない。本研究の目的は，標準粒子の一つであるコロイドカーボンを用い，ラット末梢血中消失速度における年令差と，それをもたらす要因を明らかにし，さらに，マウス，ウサギ，イヌを用いて同様の検討を行い，動物種差とその支配要因を明確にすることである。

供試動物は，C₃H系マウス，ウイスター系ラット，日本白色種ウサギおよびビーグル犬である。コロイドカーボンを静注後，経時的に採血し血中カーボン濃度を定量した。血中消失速度は，い

ゆるコロイドクリアランス係数（K値）を用いて表した。

年令差，性差の検討に先立ち，投与量と消失速度の関係を調べ，適切な投与量について検討した。消失速度は投与量の増加に伴い低下し，さらに体重100gあたり20mg以上を投与すると，消失速度は，投与後10～20分間は大きく，その後，小さくなった。本現象は，Biozzi とも報告しており，一時的に血中に多量のコロイドカーボンが存在することによる粒子の凝集，粗大化によるものと推察される。したがって粒子の初期凝集がおこらない範囲での最大投与量は体重100gあたり15mg程度と推察され，以下の実験では，すべてこの投与量を用いた。

各年令の雄ラットにおけるコロイドカーボン消失速度を表1に示した。血中消失速度は，生後14

表1 ラット末梢血中からのコロイドカーボン消失速度に認められた年令差

週令	供試動物数	K 値	体重 100. g あたりの肝重量	体重 100 g あたりの全循環血液量
3	6	0.060 ± 0.012 ^{a*}	4.66 ± 0.15 ^{a*}	9.1 ± 1.2 ^{a*}
6	5	0.057 ± 0.013 ^a	4.37 ± 0.24 ^a	8.5 ± 0.7 ^b
10	6	0.034 ± 0.003 ^b	3.76 ± 0.68 ^b	7.6 ± 0.9 ^c
14	6	0.025 ± 0.007 ^c	3.14 ± 0.32 ^c	7.3 ± 1.0 ^d
37	5	0.021 ± 0.004 ^c	3.23 ± 0.08 ^c	6.9 ± 0.7 ^d
68	4	0.022 ± 0.003 ^c	2.92 ± 0.23 ^d	6.8 ± 0.9 ^d

* 数値は平均値±標準偏差で示す。異なる肩文字（a，b，c，d）の間で有意差が認められる（p<0.05）。

週令までは急激に低下するが，以後，ほぼ一定となった。次に，この様な年令差をもたらす生理的要因について検討した。Gabrieli らは，粒子の血中消失速度に関する理論的な考察から，肝によって除去される粒子の血中消失速度（K値）は，肝血流量，全血量，肝による粒子除去能に依存するとした。そこで，ラット末梢血中からの粒子消失速度に認められた年令差が上記いずれの要因によるものかを，生後7および17週令の雄ラットで検討した。全血量に関しては消失曲線を時間0分以外挿して求めたが，明らかな年令差を認めた（表1）。肝血流量を Dobson らの方法で測定したとこ

ろ，7週令のラットは17週令のものより約1.5倍の肝血流量（単位体重あたり）を示した。また，肝によるカーボンの除去率を，投与後8～16分で門脈より採血することによって求めたところ，あきらかに17週令のラットは7週令のものに比べ低い除去率を示した。以上の結果，ラットにおけるコロイドカーボン血中消失速度に認められた年令差には，上記した三つの，いずれの要因も関与しているものと推察された。

各年令のマウス，ウサギおよびイヌにおけるK値を図1に示した。縦軸にK値，横軸に平均寿命の均等分したのをとると，マウス，ラットおよ

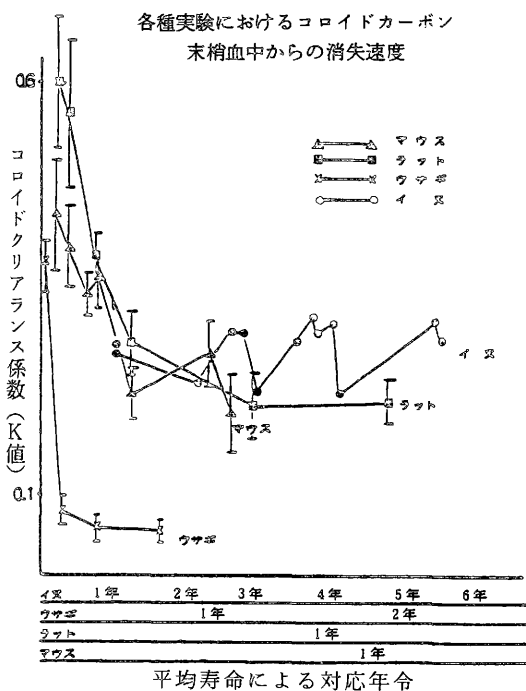


図1. 各種実験動物におけるコロイドカーボンの末梢血中消失速度。

びイヌのK値は、おおむね同じパターンで変動し、有意な差はみられなかった。一方、ウサギにおいては、いずれの年令においても、他の三種の動物に比べてコロイドカーボンの消失速度は小さかった。前述の如く、K値を変動させる主な生理的要因には、肝血流量、全血量、肝による粒子除去能が考えられるが、文献調査の結果、全血量、肝血流量が、このように大きくK値を変動させるほど、ウサギにおいて特異的な値でないことが判明した。それ故、ウサギにおいて特異的にコロイドカーボンの血中消失速度の小さい理由は、主に肝による粒子除去能の差によると推察された。(Ⅱ) ラットおよびウサギ灌流肝による異物粒子の除去能に関する研究(昭和55年～57年)

前節の研究で、静注したコロイドカーボン粒子の血中消失速度は、ウサギで特異的に小さく、その支配要因は肝による血中異物粒子除去能の差であると推察された。そこで、ラットおよびウサギ灌流肝を用い、直接的に両動物種の肝臓による血中異物粒子除去能を測定した。

供試動物は、ウイスター系ラットおよび日本白色種ウサギ、用いた灌流装置は、いわゆる Mor-

timore 型灌流装置であり、灌流液は同種血液をヘパリン加 Hank's 液で希釈したものである。肝による粒子除去率(ER)は、 $ER = (Ca - Ce) / Ca$ より求めた。但し、Ca は門脈より注入する、Ce は肝静脈より流出する灌流液中カーボン濃度である。一例として、ラット灌流肝におけるERの経時的な変動、灌流液中カーボン濃度との関係を図2に示した。ERは灌流開始後2～3

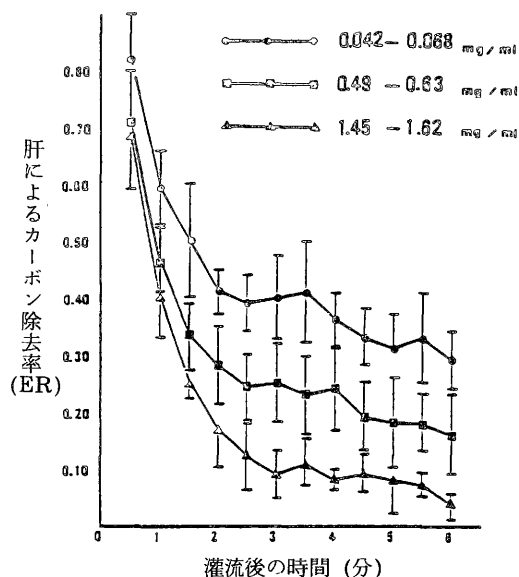


図2. ラット灌流肝によるコロイドカーボンの除去、とくに、灌流液中カーボン濃度と除去率について。

分間急激に低下し、以後、ゆっくりと低下した。初期の急激な低下は、肝に残存するコロイドカーボンを含まない血液による灌流液の希釈に由来する見かけの低下であり、一方、その後認められるERのゆるやかな低下は、網内系細胞の飽和によると推察された。

灌流液中カーボン濃度および灌流液流量を種々変化させた時の、両動物の灌流肝におけるERを表2に示した。いずれの動物種においても、灌流液流量並びに灌流液中カーボン濃度の増加に伴い、ERは明らかに低下した。また、灌流液流量および灌流液中カーボン濃度が同一レベルにあるとき、ラット肝はウサギ肝の1.6～2.4倍のERを示した。このことより、in vivoにおけるコロイドカーボン血中消失速度がウサギにおいて非常

表2 ウサギおよびラットの灌流肝による灌流液中コロイドカーボン除去率

動物種	供 試 動物数	灌流液中カーボン濃度 (mg / ml)	灌 流 液 流 量 (ml / g tissue)	肝によるカーボン 除去率 (ER)	ラット / ウサギ
ラット	5	1.35 — 1.62	0.83 — 1.24	0.121 ± 0.030	1.6
	7	0.49 — 0.63	0.96 — 1.09	0.249 ± 0.070	2.0
	5	0.042 — 0.068	0.85 — 1.16	0.386 ± 0.048	2.4
	6	0.48 — 0.56	1.67 — 2.20	0.133 ± 0.034	1.9
	6	0.53 — 0.61	0.42 — 0.56	0.392 ± 0.072	2.4
ウサギ	5	1.36 — 1.80	0.82 — 1.08	0.075 ± 0.010	1.6
	6	0.56 — 0.69	0.91 — 1.03	0.127 ± 0.033	2.0
	6	0.055 — 0.071	0.87 — 0.98	0.160 ± 0.008	2.4
	5	0.52 — 0.60	1.95 — 2.11	0.071 ± 0.005	1.9
	5	0.50 — 0.62	0.47 — 0.51	0.162 ± 0.030	2.4

注. 灌流液流量, カーボン濃度は上記の範囲内で用いられた。ラット / ウサギはラットにおけるERをウサギのERで除したものである。

に小さな値を示した主たる原因は、肝による粒子除去能の動物種差であると推察された。

(Ⅲ) 培養肺マクロファージによるラテックス粒子の貪食に関する研究—とくに粒子径と貪食の関係—(昭和55年～57年)

前節では、末梢血中における異物粒子の挙動、とくにその消失速度に関し、肝の網内系細胞による粒子の貪食、除去との関連から検討した。本研究の目的は、超ウラン元素の吸入摂取において重要な役割をはたす肺マクロファージ(肺Mφ)の肺における異物除去能、処理能を明確にするため、細胞レベルでの粒子状物質貪食能を検討することである。1960年後半、Myrvik らにより肺Mφの培養法が確立されて以来、肺Mφの形態、機能に関する多数の研究がなされてきた。しかし、吸入される粒子が多様な粒子径を有している事実にもかかわらず、現在までの肺Mφに関する研究において粒子径と貪食能の関係について検討したものはほとんどない。それ故、1および2μmの粒子径を有するラテックス粒子を用い、肺Mφの貪食能に及ぼす粒子径の影響について検討した。

肺Mφは日本白色種ウサギより肺洗浄によって採取し、10%牛胎児血清加 Eagle MEM 液で培養した。培養には、静置単層培養と振とう培養を用い、1時間の前置培養後、ラテックス粒子を負

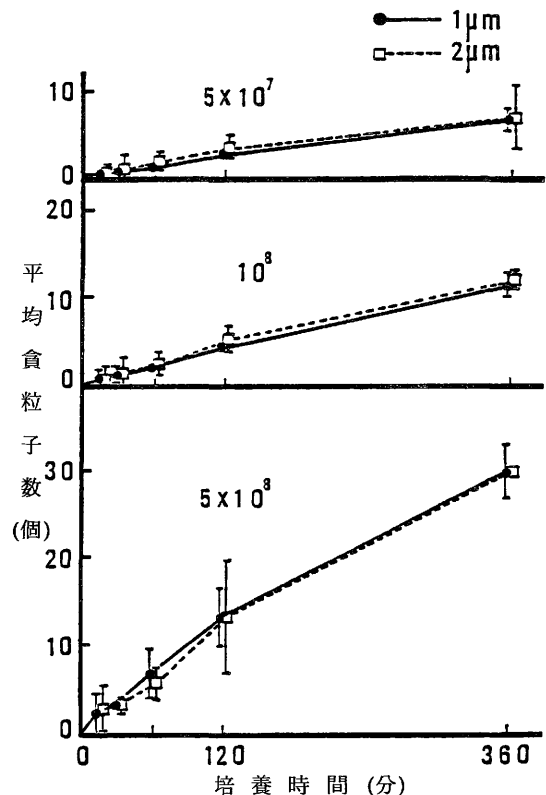


図3. 振とう培養された肺マクロファージによるラテックス粒子の貪食

荷、一定時間培養後、常法に従い固定、染色し、食食された粒子数を鏡検にて算定した。

振とう培養時間、負荷粒子濃度と1細胞当りの平均食食粒子数との関係を第3図に示した。培養時間や負荷粒子濃度が同一条件下では、 $1\mu\text{m}$ と $2\mu\text{m}$ の粒子間で平均食食粒子数に差が認められなかった。すなわち、食食される粒子数、粒子容積は、粒子径に関係なく、それぞれ負荷した粒子数、粒子容積に依存した。第4図に、単層培養で

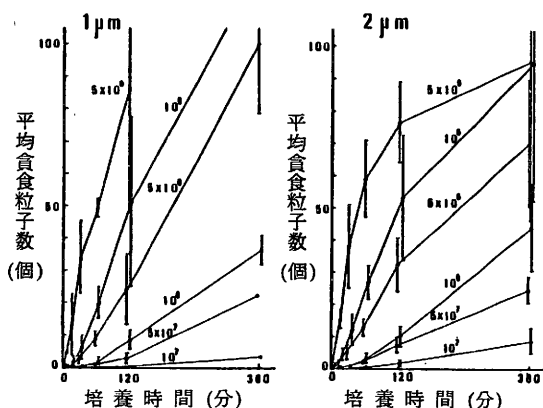


図4. 単層培養された肺マクロファージによるラテックス粒子の食食。

の肺Mφにおける培養時間、負荷粒子濃度と平均食食粒子数との関係を示した。単層培養では粒子の沈降がみられ、それ故、細胞付近の粒子濃度は培養時間の経過に伴ない増大する。粒子径により沈降速度が異なるので、同一の粒子濃度において $1\mu\text{m}$ と $2\mu\text{m}$ の粒子径の違いが、肺Mφの食食能に及ぼす影響を比較検討することは困難であった。次に肺Mφの食食能が飽和の傾向を示す時点での平均食食粒子数について検討した。振とう培養法では $1\mu\text{m}$ 、 $2\mu\text{m}$ 粒子共に約10個の粒子が食食された時点で飽和の傾向が認められ始めたが、単層培養では $1\mu\text{m}$ の場合約50個、 $2\mu\text{m}$ の場合は約10個で飽和の傾向が認められ始めた。このように、飽和の現象が認められ始める時点での平均食食粒子数が培養法により異なることの原因等については、現在のところ不明である。

(Ⅳ) 二、三の粒子状物質の胎盤への沈着と胎児移行に関する研究 (昭和54~57年)

原子力産業の発展に伴ない、一般公衆の超ウラン元素による被ばくの潜在的な危険性が増大し、妊娠中の女性が被ばくする可能性も否定しえない。近年、Sikovらは超ウラン元素が妊娠に及ぼす影響や、胎児への移行に関し報告している。しかし、彼らの研究は、主として胎児への移行量に関して注目し、移行機序等については論じられていない。一方、超ウラン元素がしばしば生体内を粒子状で挙動していることが知られているが、このような粒子状物質の胎盤沈着、胎児移行に関しては不明な点が多くある。そこで、重合体プルトニウムの如き粒子状超ウラン元素の胎盤への沈着、胎児移行に関する基礎的な知見を得る目的で二、三の標準粒子をトレーサーとし、粒子状物質の胎児・胎盤系における挙動を検討した。

供試動物は、 C_3H 系マウスおよびウイスター系ラットであり、胎児への物質移送がもっとも活発であると推察される妊娠末期に実験を行った。トレーサー粒子として、コロイドカーボン、放射性金コロイドおよび含糖水酸化鉄コロイドを用いた。前二者は典型的な生物学的不活性粒子として選択し、水酸化鉄コロイドは生体内で代謝される粒子であり、また、重合体プルトニウムと挙動が似ているとされていることから選択した。

a. 妊娠末期のマウス胎盤へのコロイドカーボンの沈着様式と胎児への移行経路に関する組織学的検索

コロイドカーボンを妊娠18日目のマウスに静注し、経時的にと殺、常法にしたがって胎盤への粒子沈着様式を光、電顕レベルで検索し、以下の結論を得た。

絨毛尿膜胎盤の迷路部分の栄養膜細胞には、コロイドカーボンの沈着は認められず、電顕的にも、カーボン粒子は、栄養膜第I層細胞の母体血液腔に面した細胞表面にのみ付着して存在していた。それ故、コロイドカーボンは、この絨毛尿膜胎盤経路では胎児へ移行せず、栄養膜第I層細胞が有効なバリアーの役割を有しているものと推察された。一方、ライヘルト膜に付着している栄養膜細胞には、小球状に凝集した多量のコロイドカーボンの沈着を認めた。本結果は、迷路部の栄養膜細胞と、ライヘルト膜に付着しているものと間に、何らかの機能的差異があることを示唆していると思われた。

コロイドカーボン投与後6時間で、ライヘルト膜内や壁側卵黄包内胚葉細胞にカーボン粒子が認

められ、それ故、コロイドカーボンがこの経路で胎児へ移行する可能性がある。しかし、その移行量は栄養膜細胞に沈着した量に比べはるかに微量であり、このような粒子状物質の卵黄包胎盤経由での胎児移行においては、ライヘルト膜が有効なバリアーの一つであると推察された。

b. 妊娠末期のラットにおける ^{198}Au - コロイドの胎児移行量に関する検討

上述したコロイドカーボンをトレーサとした実験では、胎児・胎盤系に沈着した粒子の量を定量することは不可能である。そこで、コロイドカーボンと比較的生体内挙動が似ているとされている ^{198}Au - コロイドをトレーサーとして、生物学的不活性粒子の胎児・胎盤系への沈着量について検討した。金コロイドは平均粒子径が5および30 nm のものを用い、静注後2および24時間後にと殺、胎児、胎盤、胎膜および羊水中の放射量を

測定した。

その結果、胎児への移行量は非常に少なく、投与後24時間で粒子径が5および30 nm の金コロイドにおいて、それぞれ、1 腹あたり投与量の0.018 および0.005 % であった。一方、胎膜には、かなりの高濃度で金コロイドは沈着した。過去に多くの研究者が、げっ歯類における母児間物質交換では、卵黄包膜経由の移行(卵黄包胎盤)が重要であると報告しているが、金コロイドが胎膜に高濃度で沈着した事実も、粒子状物質の胎児移行において、この経路が重要であることを示している。

粒子径が胎児移行量に及ぼす影響を検討するため、胎児、胎盤および胎膜に沈着した金コロイドの量を、母体血中金コロイド濃度と胎盤系を灌流する血液量より計算された胎盤系へ到達した金コロイドの総量で除することにより、いわゆる、extraction ratio (ER) を求めた(表3)。その

表3 胎児、胎盤および胎膜への ^{198}Au - コロイドの沈着、移行量と、取込み率

粒子径		到達した金コロイドの総量	沈着量および移行量 (%)	取り込み率 ($\times 10^2$) (extraction ratio)
5nm	fetus	82	0.018	2.2
	fetal membrane	822 %	0.278	35.2
	placenta		0.083	10.1
	fetus		0.0052	1.9
30nm	fetal membrane	276 %	0.094	34.1
	placenta		0.024	8.7

注. 到達した金コロイドの総量は、24時間の実験期間中、胎児・胎盤系を灌流した血液中の ^{198}Au - コロイドの総量を投与量に対する%で表示した。

結果、胎児、胎膜、胎盤の間でERは大きく異なるが、粒子径による有意な差は認められなかった。このことは、 ^{198}Au - コロイドの胎児移行において、5および30nm の間の粒子径の差は、胎児・胎盤系への金コロイドの沈着、移行率に影響しないことを示している。

c. 妊娠末期のマウス胎盤における含糖水酸化鉄コロイドの沈着と胎児への移行について、

生体内で代謝される粒子として、含糖水酸化鉄コロイドをトレーサーとして選択し、マウス胎盤への沈着と胎児移行経路について検討した。

母体への静注後1分で鉄コロイド粒子は絨毛尿膜胎盤の母血流内のみ凝集して存在し、栄養膜細胞やライヘルト膜には認められなかった。投与後30~60分で、迷路部の栄養膜細胞に強く、胎児血管内皮に弱く鉄反応が認められた。電顕的にも、第I・II層の栄養膜細胞間隙や、第II層細胞内に水酸化鉄コロイド粒子を認めたが、第III層から胎児側には認められなかった。それ故、水酸化鉄コロイドの絨毛尿膜胎盤経由の移行においては、栄養膜第II、III層が有効なバリアーと推察される。一方、投与後3時間を経ると、卵黄包膜側板にも

鉄の反応が認められ、この経路での胎児移行も示唆された。電顕的には、ライヘルト膜に付着した栄養膜細胞内に鉄コロイドの凝集がみられたが、膜内にはみられなかった。したがって、鉄コロイドの卵黄包經由の移行においても、コロイドカーボンの場合と同様に、ライヘルト膜と付着する栄養膜細胞がバリアーの役割をはたしているものと推察された。Green らは、クエン酸プルトリニウムのマウス胎盤における沈着様式をオートラジオグラフィによって検索し、プルトリニウムがライヘルト膜に付着した栄養膜細胞にかなり多く沈着することを報告したが、本実験成績より考えて、このプルトリニウムは、クエン酸塩の形で細胞に取り込まれたのではなく、むしろ生体内で重合、コロイド化したプルトリニウムが、ライヘルト膜によって胎児移行を阻止されていると考えるのが適切である。

〔総括〕

コロイドカーボンの末梢血中消失速度に関する研究から、いくつかの有益な知見を得た。すなわち、粒子状物質の末梢血中消失速度に年令差、種差の存在すること、その支配要因は肝血流量、全血流量、肝による粒子除去能であること、ウサギにおける消失速度が特異的に小さく、その原因は肝による粒子除去能にあること等である。すでに、ヒトでの肝血流量等に関するデータが得られているので、今回のデータと合せ、ヒト末梢血中からの粒子消失速度を外挿法によって求めることが可能となった。本事実とはまた、実験動物の末梢血中からの重合体プルトリニウムの消失に関するデータから、ヒトでの値をある程度外挿することが可能であることを示している。

肺Mφに関する研究は、研究開始年度が遅く、また、実験手技の習得に時間を要したため、in vitro での貪食能と粒子径の関係をウサギでのみ

検討できたにすぎない。肺Mφは吸入された粒子状超ウラン元素に対する生体側の first barrier として重要であり、今後、in vivo の実験も加え、多種類動物での広範な研究が求められる。

胎盤における粒子状物質の沈着様式、胎児移行に関しては過去ほとんど検討されておらず、今回の研究により繁殖生理学の面での貴重な知見が得られた。また、超ウラン元素の胎盤沈着、胎児移行を検討していく上での示唆にとむ種々の知見が得られた。しかし、げっ歯類を用いた今回の実験が、ヒトでの粒子状物質の胎盤における挙動を推定するには、非常に不適切であったことは否めない。なぜなら、げっ歯類では粒子状物質は主に卵黄包臓側板を經由して（卵黄包胎盤）移行することが明らかとなったが、ヒトの卵黄包胎盤は妊娠初期にその機能を失ない、げっ歯類の如き卵黄包胎盤は妊娠中期以降は認められないことが知られているからである（図5）。したがって、今後、同様

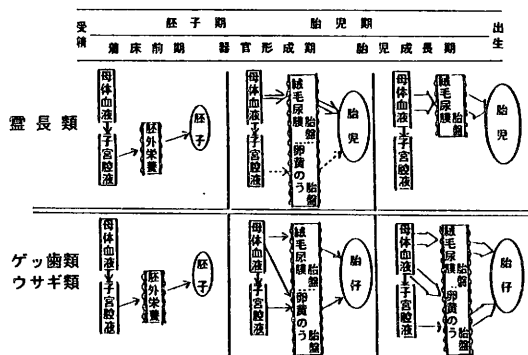


図5. 霊長類とげっ歯類における胎盤構造と機能の差。

な実験をヒトと胎盤の構造、機能が類似しているサル類等を用いて行う必要がある。

〔文 献〕

1. Takahashi, S. and Matsuoka, O.: Age and Sex Differences in the Clearance of Intravenously Injected Colloidal Carbon from Peripheral Blood in Rats. J. Toxicol. Sci., 5, 1—9, 1980
2. Takahashi, S. and Matsuoka, O.: Clearance of Intravenously Injected Colloidal Carbon from Peripheral Blood in Mice, Rats, Rabbits and Dogs. J. Toxicol. Sci., 5, 215—223, 1980
3. Takahashi, S. and Matsuoka, O.: Cross Placental Transfer of ¹⁹⁸Au—colloid in Near Term Rats. J. Radiat. Res., 22, 242—249, 1981

4. 高橋千太郎, 松岡 理: 妊娠末期のマウスにおけるコロイドカーボンの胎盤への沈着と胎児への移行について, 家畜繁殖学雑誌, **28**, 96—99, 1982
5. 高橋千太郎, 松岡 理: 妊娠末期のマウス胎盤における鉄デキストランの沈着と胎児への移行について, 実験動物, **31**, 253—258, 1982
6. Takahashi, S., Iida, H. and Matsuoka, O.: Phagocytosis of Colloidal Carbon in Perfused Liver of Rats and Rabbits. J. Toxicol. Sci., **7**, 83—91, 1982

3. アルファ放射体の体内被曝線量評価に関する 比較実験動物学的研究

松岡 理, 石樽信人, 関口昌道 (内部被ばく研究部)

Studies on Methodology in Dose Estimation for Internally Deposited Alpha-Emitters

O. Matsuoka, N. Ishigure and M. Sekiguchi
Division of Comparative Radiotoxicology

[A] Track Registration Characteristics of CR-39 Plastic Detector and Thermoluminescence Responses of LiF TLD to α -particles in the Energy Region of a Few MeV

The absorbed dose from α -emitters incorporated in tissues is delivered in highly located regions around the emitters owing to the short track range and high LET of α -particles. To determine precisely the locations of α -emitters in tissues is essential to evaluate the absorbed dose to specific tissue and would therefore play a large part in risk estimation.

As a technique to visualize the deposition of α -emitters with respect to tissue structures, the application of CR-39, a lately developed track detector, was investigated on its registration characteristics for α -particles. This report, in addition, gives thermoluminescence responses of LiF TLD to α -particles as determined for a semi-microscopic level technique to estimate the dose distribution in animal tissue.

(1) First of all, a simple and useful apparatus was designed and constructed in order to irradiate LiF and CR-39 with strictly defined α -particles.

(2) For LiF, relative sensitivity to α -particles was measured, which enabled us to determine the activity concentration around the detector from its light output data.

(3) For CR-39, bulk-etch rate, which is one of the most fundamental characteristics in plastic track detector, was measured by changing the concentration of NaOH solution from 10 to 30% and the etching temperature from 50 to 70°C. The results contributed to the standardization of etching procedures.

(4) Distributions of etch pit diameters in CR-39 were measured after irradiations with different α -beams. From the relationship obtained between the mean diameter and the α -energy, a possibility was suggested to determine α -particle energy.

Comparison between the properties of CR-39 and LiF as α -particle detectors is given collectively as follows, though several problems yet remain to be solved.

As to the power to recognize the location of α -emitter, which is one of the most important properties, CR-39 was far superior to LiF; in CR-39, we could locate emitted α -particles to

within ten microns. For LiF, on the other hand, the power was considered to be almost equal to the size of detector — a mm order.

The etch pit diameter decreased almost linearly with the α -energy at the early stage of etching. The energy resolution was evaluated from the deviation in the measured distribution of etch pit diameters and found to be about 1.8 MeV. For LiF, on the other hand, it will be unable to expect to determine α -particle energy.

However, reading of LiF TLD was more simple than counting of etch pit in CR-39. LiF will be more useful in some cases that rapidness is required prior to preciseness in determining activity concentration.

As a minimum detectable limit for activity concentration, 0.9 (nCi/cc)-day was evaluated in LiF from the measured relative sensitivity to α -particles and the calculated energy of α -particles residual at the surface of the detector by a simple Monte Carlo simulation. For CR-39, background tracks will vary dependently with the stock conditions and the stock time after polymerization of the detector. This problem should be solved in future.

As a result, though the application of CR-39 will generally be advantageous than that of LiF as a technique to obtain the information on the location of α -emitters, it is to be desired that these two materials should be used properly considering the purposes in addition to their properties; LiF will be adapted to rough but rapid estimation of activity concentration and CR-39 to precise determination of the locations of α -emitters with respect to animal tissues.

[B] Monte Carlo Simulation of Low Energy Pho-

ton Escape from Lungs of Mathematical Phantoms Constructed with CT Image Data

While Pu lung monitors are generally calibrated experimentally with phantoms or volunteers, also theoretical approaches by Monte Carlo method are often used as supplement. This method enables us to predict most sensitive detector position of each subject, the calibration factor and the exit photon spectrum, if physique of the subject is expressed mathematically and exactly.

We devised to use computed tomography (CT) image data which have quantitative anatomical informations to express physique of a subject. CT scanings were performed to an Alderson Rando phantom, which is often used in calibration of a lung monitor, and a Humanoid Lung-Chest phantom; with the image data obtained, mathematical phantoms were constructed as 3 dimensional arrays of the CT numbers. Monte Carlo simulations were executed of low energy photon escape from sources uniformly deposited in the lungs of the mathematical phantoms. In these calculations, the CT numbers were transformed into linear attenuation coefficients of bone, those of lung tissue or those of other soft tissues. The escape fractions for the whole solid angle of Pu-239 LX-ray photons generated in the lungs of Rando and Humanoid phantoms were $0.73 \pm 0.02\%$ and $0.29 \pm 0.01\%$, respectively. And, the exit points calculated for the Rando phantom were concentrated in the hypochondriac regions.

Consequently, the results of calculations reflected differences of physique of scanned subjects sensitively; as a test of physical phantoms, this method was also useful.

〔はじめに〕

放射線の生物作用を解明する上で、その初期段階の放射線によるエネルギー付与過程を、微小な放射線有感部位において、質的、量的に評価する試みが、被曝の様式、放射線の種類を問わず進められてきている。特に α 放射体による内部被曝では、 α 粒子の飛程が細胞数個分程度と短い上に、

電離、励起が、粒子飛跡と極めて強い相関をもって生じられるため、 α 放射体の体内分布を組織の構造と関連付けて、とりわけ、構造の動物種差を踏まえた上で詳細に検討することが要求されている。

一方、体外計測法による Pu の体内の量及び分布の測定は、マクロなレベルとは言え、線量評価

の1次的データを得る標準的な手法として、その重要性が少しも失われるものではない。これには、 α 壊変に伴い約4%という低収率で放出される平均17 keVの低エネルギーX線を検出することとなる。ために検出に高度な技術を要するのみならず精度向上を目指す上では、むしろ、計測器の校正法が、クリティカルな問題となってきた。

こうした現状を踏まえ、本課題では、線量評価の信頼性を高めるべく、次の研究を行った。

(A) 線量分布実測法への応用を目標とし、微小サイズ検出器の、熱発光線量計及び固体飛跡検出器をとりあげ、各々の α 粒子に対する検出特性を検討した。

(B) Puの体外計測法において、精度向上の鍵とも言える校正法に重点を置き、肺モニターを対象として、主に理論的に検討した。

(A) LiF TLD及びCR-39 プラスチックの α 粒子応答特性

1. 緒言

α 放射体による線量分布を組織の構造と関連付けて、より詳細に検討する試みは、困難が伴うけれども、リスク評価の精度向上に果たす役割は小さくない。

従来のオortラジオグラフィに加え、固体飛跡検出器の応用が、分布実測の一層簡便な手法として検討され始めた。特に、近年開発された熱硬化性プラスチック CR-39 (アリルディグリコールカーボネート) は、検出エネルギー範囲が十分に広いという、幾つかの短所を補って余りある決定的に優れた性質を有しているため、 α 粒子検出材として有望視されている(林 孝義, 1980, 等)。そこで、本研究においては、分布実測法への応用を目標とし、従来実験データの乏しい CR-39 の α 粒子に対する検出特性を調べることにした。また、固体飛跡検出器よりは、ややマクロなレベルでの分布実測法として、熱発光線量計(TLD)をとりあげ、基本特性の検討を行った。

2. 研究経過

[53・54年度] TLDの使用経験を深め、 α 粒子応答特性の概略を把握すると共に実験上の問題点を整理することを目的とし、文献調査並びに予備実験を行った。その結果、従来からの報告のように、応答特性に顕著な高 LET 効果が見ら

れた。しかしこの段階では、照射方法、照射量評価法等において、満足すべき再現性及び精度を得るには至らなかった。

[54・55年度] そこで、本格的な実験に先立ち、照射方法の改善を図って、TLD 及び CR-39 への精密照射を可能とすべく簡易型の α 粒子標準照射装置の開発に着手することとなった。設計、製作した装置の性能試験を行った結果、粒子束密度、エネルギー分布の点で不満は残るものの、目的を、TLD、CR-39 等 α 粒子検出器への標準照射に限れば、使用に充分耐え得る装置の開発が成った。

[56・57年度] この装置を用い、TLD 及び CR-39 の基本特性のうち、特に重要なものについて実験を進めた。

TLD に関しては、LiF について TL 発光量から素子の吸収エネルギーを、ひいては素子周囲の放射能濃度を決定するために必須となる相対感度を各種エネルギーの α 粒子ビームを照射して測定し、感度のエネルギー依存性を求めた。このデータに依って、発光量から放射能濃度への換算係数を得、また、検出限界を評価して、実用化への基礎資料とした。

CR-39 に関しては、まず、固体飛跡検出器の特性のうち最も基礎的な体積エッチング率を、各種エッチング条件下で測定し、エッチング過程の活性化エネルギー等基本的物性データを得ると共に、エッチング操作の標準化を図る参考とすることができた。次に、エッチピットのサイズが、 α 粒子エネルギーの変化にどう応答するかを測定し、エネルギー弁別の可能性を、ひいては、 α 放射体の検出器表面からの距離分布推定の可能性を検討した。

実用に当たっては、当然 α 粒子は、あらゆる方向より検出器へ入射する可能性があるため、検出特性の入射角依存性の知見が必要となる。一方、検出限界及び精度の向上を目指す上で、バックグラウンドの低減は必須である。また、もしも生体への応用を試みるならば、生物側のレスポンスの影響にも、当然考慮が払われねばならない。これら重要課題が残されており、今後も引き続き検討を要する。

3. 結果及び考察

3.1 α 粒子標準照射装置

この装置は、(I)照射用真空容器 (II)真空ポンプ

(Ⅲ)容器内ガス圧測定用水銀マンメータ (Ⅳ)ガスボンベ及び(V) α 粒子の検出に必要な数種のエレクトロニクス機器より構成されている。照射用容器は、 α 線源と α 粒子検出器とを内蔵した直径250 mm、高さ200 mmのステンレス製の円筒で真空を保持し得る構造である。断面を図1に示す。線源と

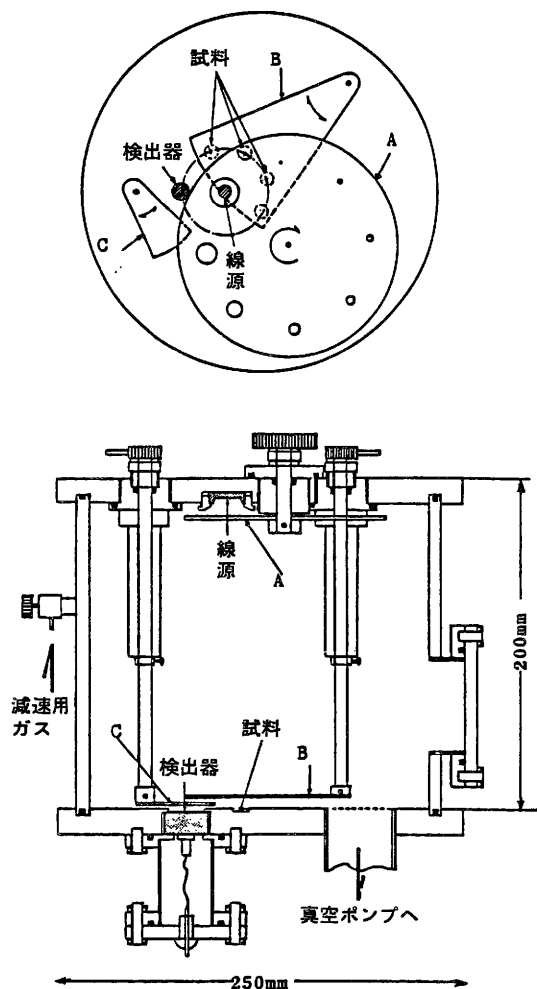


図1. 設計・製作した照射用真空容器の断面図。

して、高強度照射用には ^{210}Po (100 μCi) を、低強度用には、 ^{241}Am の真空蒸着線源(0.15 μCi) を用いた。エネルギーの制御には、所定の圧力に封入した気体分子との相互作用により、 α 粒子を減速させるという原理を採用した。線源が平面的に広がりを持っているので、サイズの異なる8種類の窓のあいた鋼製円板(図1のA)を線源の直

下に設置し、容器外より回転して任意の窓と線源とを軸合わせすることにより粒子束密度の制御を図った。照射時間の制御は、鋼製シールド板(図1のB)を試料の真上に設置し、これを回転することにより行うこととした。金表面障壁型 Si 半導体検出器を、線源に対し、照射試料と幾何学的に同等の位置へ設置することにより、試料へ照射される α 粒子のエネルギー分布及び粒子束密度の測定を可能とした。

α 粒子ビームのエネルギースペクトルを図2に示す。比較的単色性の良い α 粒子ビームの照射が可能となった。ちなみに半値幅は、5.48 MeV の場合0.6%，低エネルギーでは、例えば1.29MeVの場合15%と大きくなるが、これは、エネルギー制御に、 α 粒子と気体分子との相互作用を利用している以上、原理的に不可避の現象である。

以上、粒子束密度、エネルギー範囲等の点で、

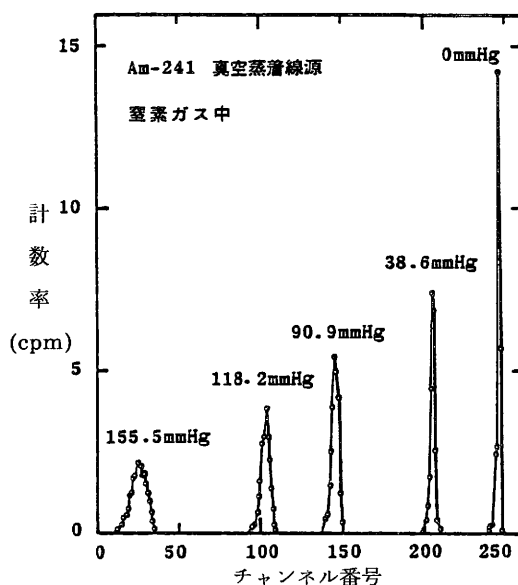


図2. α 粒子ビームのエネルギースペクトラム。

^{241}Am の真空蒸着線源(0.15 μCi)を用い、容器内の窒素ガス圧を種々変化させた場合。

用途は限定されるが、 α 粒子検出器の特性試験用標準 α 粒子の照射には、充分使える装置が得られた。

3.2 LiF TLDの相対感度

TLD素材として、 r 線に対する感度、発光機

構の解明等が比較的進んでいるポピュラーな素材 LiF を選び、相対感度の α 粒子エネルギー 依存性を測定した。ここでは、感度を、(TL 発光量) / (素子が吸収したエネルギー) で定義し、 r 線照射に対する値との比をもって相対感度とした。過去には、熱成型試料での測定 (A. C. Lucas, 1968)、試料前後でのエネルギー変化を極力抑えるべく、薄く展開した試料での測定 (A. R. Laksmanan, 1976)、粉末試料での測定 (B. Jähnert, 1972) 等が見受けられる。同一素材とは言え、 dE/dx の α 飛跡に沿った非一様性、結晶の表面効果等が敏感に影響し、試料の厚み、粉末粒子サイズ等が異なれば、応答特性にも差異を生ずると考えられ、ために、少くとも実用に供するのと同一性状の試料を試験する必要がある。安定した質で長期間に渡って取得の可能な点を考慮し、Harshaw 社製熱成型素子 ($3.2 \times 3.2 \times 0.9 \text{ mm}^3$) を試験した。

測定結果を図 3 に示す。 ^{60}Co からの r 線に対する感度との相対値である。感度は、 r 線照射と比べ約 1 桁低く、エネルギーによって明白に異なり、ほぼ直線的に増加するという結果となった。これは、従来の報告と概ね一致するものである。こうしたエネルギー依存性、即ち、LET 依存性

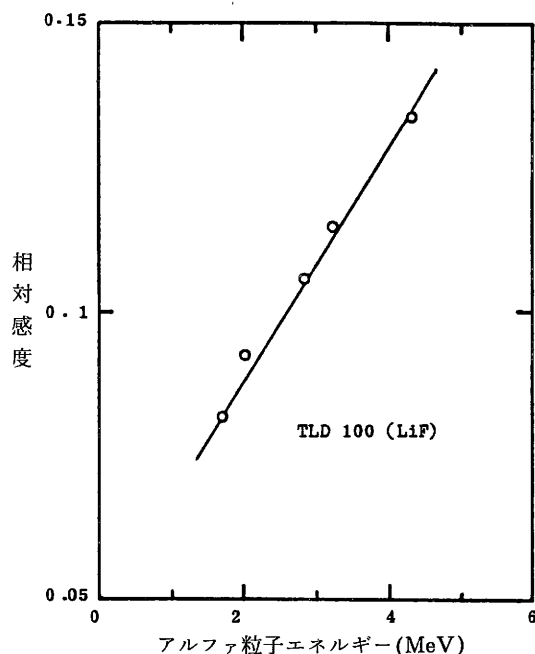


図 3. LiF TLD の、 α 粒子に対する相対感度のエネルギー依存性。試料は Harshaw 社製 TLD 100 リボン。

に関しては、B. Jähnert (1972) の、正孔トラップの飽和効果にその因を求めた理論で一応説明がついたが、ここでは、余り深い追究は避けた。

さて、実用に当たり、第 1 に必要なのは、TL 発光量から、素子周囲の媒質中における Pu 濃度への換算係数である。これは、Pu の分布が均一との仮定のもとで、簡単なモンテカルロ模擬計算を実行し、TLD へ到達した α 粒子個々のエネルギーを求めた上、その値に対応する相対感度を、到達した α 粒子の全数に関して平均化するという手順をふみ、求めることができた。また、 α 試料に対する検出限界を、 r 線に対する検出限界に 2 mR を仮定して求めたところ、 $0.9 (\text{nCi/cc}) \cdot \text{日}$ が得られ、これも合わせて実用への基礎資料とした。

3.3 CR-39 の α 粒子検出特性

固体飛跡検出器は、全体としても、ある一定の速度でエッチングされるが、この速度を体積エッチング率 (以下 V_B と記す) と呼ぶ。これは、それぞれの材質に固有の値であり、エッチピットの計測結果を解析する上で、有用な特性である。まず、 V_B の各種エッチング条件依存性を求めた。

ソーラオプティカルジャパン社より入手した厚さ 1.6 mm の板状試料を数 mm 角に切断し、試料とした。エッチング液には、NaOH 水溶液を用い、温度の変動が $\pm 0.2^\circ\text{C}$ のウォーターバスの中でエッチングを施した。この時、濃度を 10% から 30% の間で 6 段階に、温度を 50°C から 70°C の間で 5 段階に変化させた。エッチングの前と後において、試料の厚さをマイクロメータで測定し、両者の差の $\frac{1}{2}$ をもってエッチングされた厚さと見なした。

プラスチック類は一般的に含水し易い。CR-39 においても、エッチング中の含水、これに伴う膨張が問題となった。この影響を低減する方法を種々検討した結果、試料を、厚さ測定の前に 80°C のオープン中で数時間加温するという簡便な方法により、試料の特性に変化をきたすことなく、吸収された水を蒸発させ得ることが明かとなった。

結果を図 4 に示す。簡単な化学反応速度論的考察から、 V_B は、エッチング温度の逆数に対し、指数関数的に変化すると考えられている。本結果は、この考察を裏付けるものであった。一方、濃度依存性に関しては、便宜的に指数関数で近似を試みたところ、0.99 という高い相関係数が得られた。結果、 V_B は、温度 $T(\text{K})$ 、濃度 $C(\%)$ の関数として、次式のように求められた。

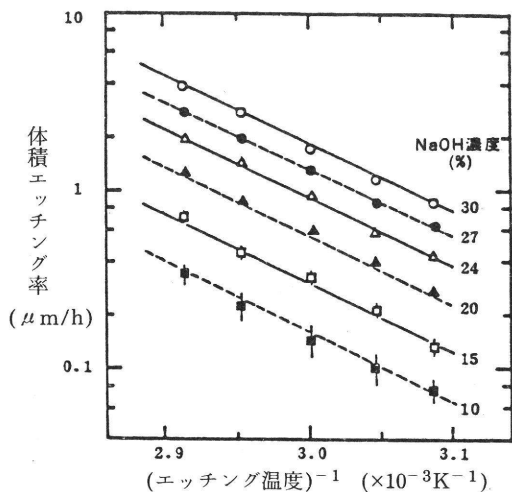


図4. CR-39における体積エッチング率のエッチング条件依存性。

$$V_B = 1.18 \times 10^{10} \cdot \exp(0.122 \times C) \cdot \exp(-8.74 \times 10^3 \cdot \frac{1}{T}) \quad (\mu\text{m/h})$$

一方、図4の傾きから、エッチング過程の活性化エネルギーを求めたところ、0.75 eV が得られ、P. H. Fowler (1980)の値 0.78 eV とよい一致を示した。

以上、この実験は結果のみならず、実験の過程自身をも含めて、エッチング操作の標準化を図るよい参考とすることができた。

α 飛跡のエッチングによる成長は、飛跡に沿った損傷度に関係している。よってエッチピットの直径は、損傷度の大小、ひいては、入射 α 粒子のエネルギーの大小に依存する。各種エネルギーの α 粒子ビームを照射し、エッチピット径とエネルギーとの対応関係を測定した。

エッチピットの写真を図5に示す。エッチピットが、透過光の有効な散乱中心となっており、コントラストの強い像が観察された。これは、画像解析装置による自動計測にとって有利な特徴と思われる。直径分布の測定結果を図6に示す。分布はガウス型を示した。写真像からも推察されたように、直径の均一性はかなり高く、標準偏差で数%以下であった。 α 飛跡は、エッチングの進行に伴い成長したが、その速度は一定値を示していない(図7)。これは、損傷度が飛跡に沿って一様ではないからであり、また、飛跡に沿ったエッチングが、飛跡の終端まで達した後は、体積部分のエッチングと同じ速度でしか進行しないからであ

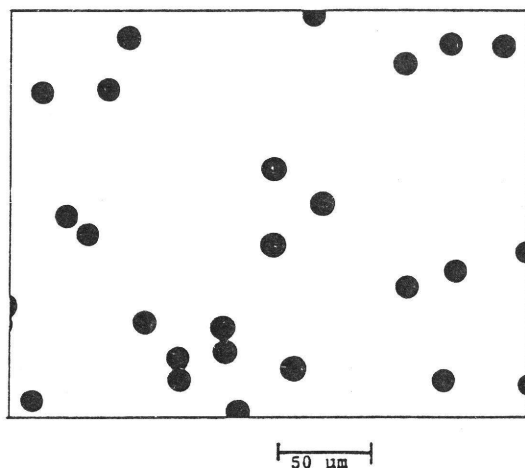


図5. CR-39に記録されたエッチピットの写真。 α 粒子エネルギーは、5.48 MeV。30%, 70°CのNaOH水溶液で4時間エッチングした場合。

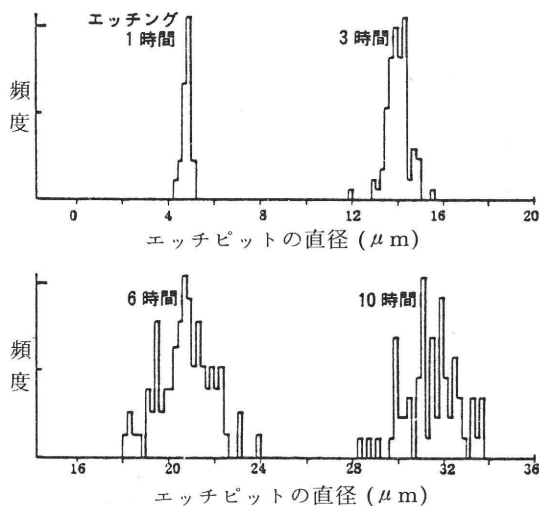


図6. エッチピット径分布のエッチングに伴う推移。 α 粒子エネルギーは、1.29 MeV。各分布の標準偏差は、4.3%(1h), 3.7%(3h), 6.2%(6h), 3.8%(10h)。

ると考えられる。よって、エッチングが初期の間は、低エネルギーの方が、与える損傷が大きいため、大きい直径が観察されるのに対し、反面、飛程が短いため、この関係は、エッチングの進行につれ、やがては逆転すると考えられる。図8は、

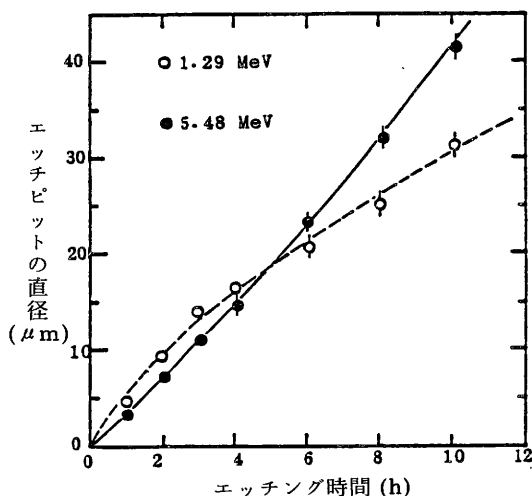


図7. エッチングの進行に伴う平均エッチピット径の増加曲線。 α 粒子エネルギーは、1.29MeV(○), 5.48MeV(●)。

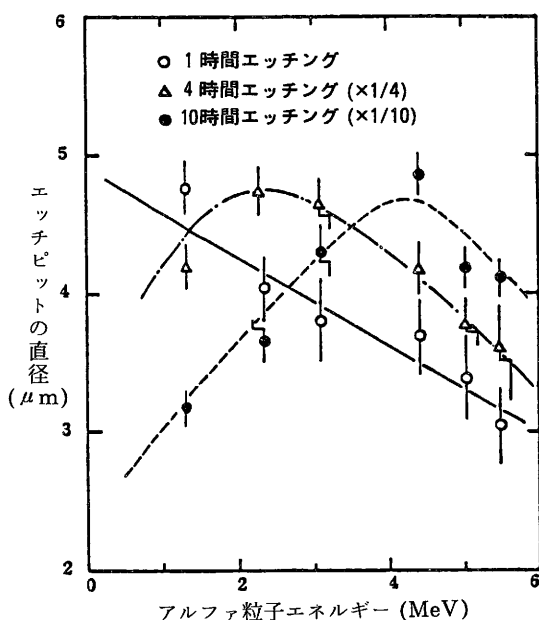


図8. エッチピット径の α 粒子エネルギー依存性。エッチング時間は、1時間(○), 4時間(△), 10時間(●)。

直径とエネルギーとの対応関係を測定した結果である。今議論したごとく、1時間のエッチングでは、エネルギーの減少に伴い、直径は、ほぼ直線的に増加した。しかしエッチングが更に進行した

10時間では、4 MeV 付近を境として、低いエネルギーで逆に減少を示した。この直線関係の成立したエッチング3時間までについて、直線の傾きと、直径分布の半値幅とから、エネルギー分解能を算出したところ、およそ 1.8 MeV が得られた。この分解能は必ずしも良いとは言えないが、生物試料中において、 α 放射体の深さ方向分布の推定に対し、ある程度は利用可能かと考えられる。また、ここで得られたエッチピット径のデータは、 V_B の測定結果と合わせて、トラックエッチング率、臨界角等、実用上有用な特性を明かにするための基礎的データとして重要な意義を持つと考えられる。

なお、実用に際し、感度の α 粒子入射角依存性、バックグラウンドの低減化等、重要課題が山積しており、今後も引き続き検討を進める必要がある。

4. 総 括

CR-39及びLiFの α 粒子検出特性について、共に数々の検討課題を残してはいるものの、現時点で、この両者を比較検討しつつ以下にまとめる。

最も肝腎な位置検出能に関し、CR-39では、10 μm 以下の弁別が可能と考えられるのに対し、LiFでは、元来検出器の大きさよりも小さい位置分解能が望めないため、 mm オーダーと劣る。エネルギー分析の可能性をみても、LiFでは殆んど期待が持てないのに対し、CR-39では、分解能で1.8 MeVと必ずしも良いとは言えないにしても、一応、可能と言える。しかし、反面測定の簡便さにおいては、LiFの方がまさっており、従ってもしも、概略でよいから迅速にデータを得たいような場合があれば、LiFの方が便利なる場合もある。検出限界は、LiFに関し、0.9 (nCi/cc)・日が得られた。一方、CR-39では、バックグラウンドが、重合成型後の日数、保管の状態等に依存すると考えられ、この点、検討が不充分のため、今後、詳細に検討する予定である。

このように、CR-39の方に優れた点が多いと考えられ、従って、CR-39の利用に主眼を置き、LiFには、その補助的手段としての役割を分担させることが望ましいかと考えられる。

発表論文

- (1) Ishigure, N. and Matsuoka, O. : A Simple α -particle Irradiation Chamber for the Calibration of Dosimeters. *Radioisotopes*, **30**, 480-485, 1981
- (2) Ishigure, N., Fukuda, S. and Matsuoka, O. : Estimation of Organ Dose in the Rat Exposed to X-rays for Radiobiological Study by TLD Implantation Method. *J. Radiat. Res.*, **22**, 303-311, 1981
- (3) Ishigure, N. and Matsuoka, O. : The Evaluation of the Effectiveness on Back-

ground Reduction by Nitrogen Gas Flow during Readout of TLD. *Radioisotopes*, **31**, 98-100, 1982

- (4) Ishigure, N. and Matsuoka, O. : Energy Dependence of Etch Pit Diameter in a CR-39 Detector for α -particles with the Energy from 1.29 to 5.48 MeV. *Radioisotopes*, **31**, 447-452, 1982
- (5) Ishigure, N. and Matsuoka, O. : Bulk-etch Rate of CR-39 Detector under Various Conditions of Temperature and Concentration of NaOH Solution. *Hoken Butsuri*, **18**, 17-21, 1983

(B) CT画像データを利用した肺モニタ 計数効率のモンテカルロ計算

1. 緒言

Pu 取扱施設では、不溶性酸化物の Pu エアロゾルを吸入する潜在的危険性に備えて、肺モニタによる *in-vivo* 測定法の研究開発が進められている。

肺モニタが検出する LX 線光子は、Pu が α 崩壊する際に伴って低確率で放出されるものであるが、その平均エネルギーが約 17 keV (組織内半価層約 6 mm) と低いことも加わり、精密な測定法の確立には難点が多い。検出器そのものの検出効率の向上と低バックグラウンド化による感度の改善が必要な上に、計測値を肺内沈着量に変換する校正定数が、被験者の体格や線源の肺内分布によって大きく変化するからである。

肺モニタの校正は、現在各研究所で種々の方法が用いられているが、主に①肺に既知量の線源を沈着させたファントムを計測し、これを被験者の胸壁厚によって補正する方法と、② Mock Pu (Pu 疑似線源) をボランティアに吸入させる方法が用いられている。

一方、理論的なアプローチとして Goans ら (1979) や、Bhati ら (1979) は、モンテカルロ法を用いたシミュレーション計算を行っているが、使用した数学的ファントムが MIRD ファントム (米国核医学会が提唱した内部被曝線量評価用ファントム) であったために必ずしも人体によるデータと一致する結果を得ていない。この方法は、各被験者の体格を正確に反映した数学的ファント

ムの記述ができれば、被験者個人について、最適検出器配置とその時の校正定数、予測される放出光子スペクトルなどを直接計算できる可能性を有している。

本研究では、CT (コンピューター断層撮影) の画像データを用いて数学的ファントムを作成し、より現実的な数学的ファントムの開発を目指すとともに、被験者の胸部の体格を用いた校正方法を探る目的で以下に行われた。

2. 実験結果と考察

第 1 段階として、MIRD ファントムに準じた肺と他の軟組織の 2 成分のファントムによるモンテカルロ計算プログラムを作成し、放医研の大型電算機 ACOS-6 システム 700-S (日電東芝製) で計算を行った。両肺に様な線源分布を仮定し、5~30 万個の光子を発生させた。発生光子の体外放出率 (全立体角) は、 ^{239}Pu の LX 線について約 0.4 %、 ^{241}Am の 59.5 keV γ 線については約 60% であった。

次に、MIRD ファントムより現実的な数学的ファントムを導入するため、2 種の物理ファントムの CT を撮影した。使用したファントムは、Rando ファントム (Alderson 社製) と、Humanoid Lung-Chest ファントム (Humanoid Systems 社製) であり、前者は肺モニタ校正用ファントムとしてしばしば用いられるものである。放医研の X 線 CT 装置 (Pfizer 社製) で、これらの胸部をスライス厚 9 mm でスキャンして得た CT 画像データから、CT 値の 3 次元配列として数学的ファントムを作成した。続いて CT 値から線減衰

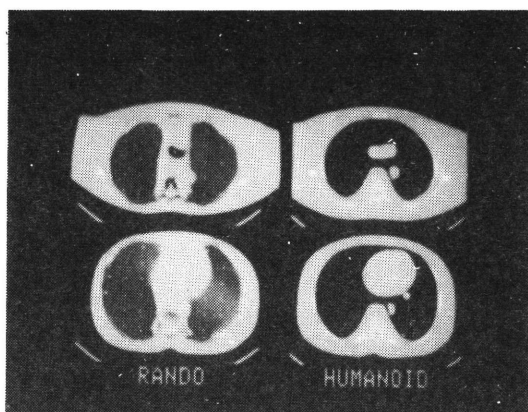


図1 Rando ファントムと Humanoid ファントムのCT画像の例

係数への変換（骨、肺、他の軟組織の3成分）によってモンテカルロ計算を行った（試行回数10万～30万回、線源は両肺に一樣分布）。

図1は、使用した2種のファントムのCT画像であるが、Rando ファントムの右肺下葉部の胸壁厚が著しく薄いのが目立つ。これにより、両ファントムの外見上の体格（胸囲など）に大差がないにもかかわらず、発生光子の体外放出率（全立体角、図2）が、低エネルギーで Rando の方が

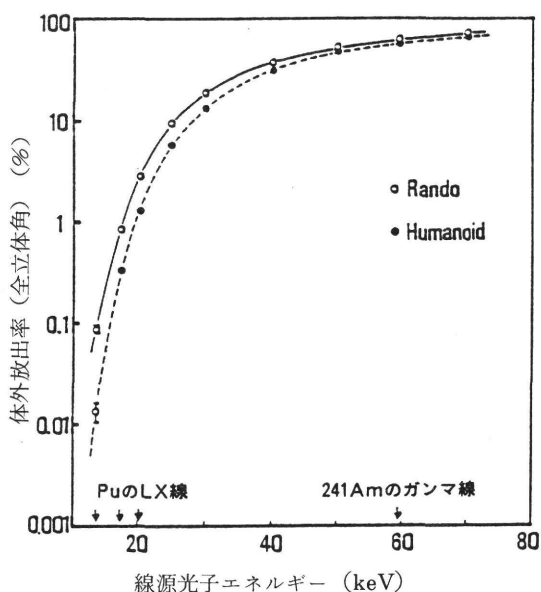


図2 線源光子エネルギーによる体外放出率（全立体角）の変化

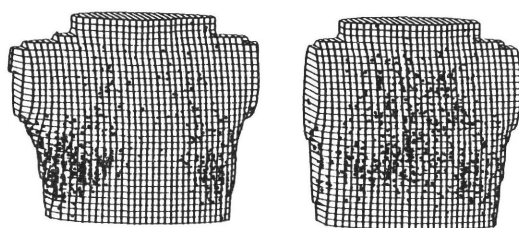


図3 体外放出光子位置分布（ ^{239}Pu 、両肺一樣分布）左：Rando ファントム、試行回数 1.5×10^5
右：Humanoid ファントム、試行回数 3.0×10^5

かなり大きくなっている。放出光子位置分布（図3）においても、Humanoidでは胸部の全面にわたって比較的均一に分布しているのに対し、Randoでは特に右肺の下葉部付近が多い。また、これらファントムの放出光子位置分布は、一般に言われている肺モニタリングの最適検出器配置（直径5インチ程度の検出器2個を、胸骨と鎖骨に接するように対称に置く）にも大きく矛盾する。また、放出光子の前面放出割合においても両ファントム間で有意な差があった（ ^{239}Pu の例で、Randoでは $60.1 \pm 1.5\%$ 、Humanoidでは $85.9 \pm 1.2\%$ ）。

3. 総括

以上のように、CT画像データを用いてモンテカルロ計算を行えば、被写体のすべての体格パラメータを含んだ計算ができるため、被写体間の体格の差異を鋭敏に反映した結果が得られることが明かとなった。ここで使用したRandoファントムの構造上の不備は、製作時のばらつきによるものと考えられるが、これらのファントムを肺モニタの校正に用いる場合には、肺や肋骨の配置が正常なものを厳選する必要がある。その意味でも、CTによる撮影、および本法のような計算は有効である。また、人間のCTデータの利用については、被曝線量の問題があるため、まずは患者等の画像データの利用から進めていくのが妥当であろう。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、CTの撮影等に関

して臨床研究部の飯沼武室長，遠藤真広主任研究官から協力と助言を，また，ファントムについて物理研究部の丸山隆司室長，共立医療電機(株)の協力を，さらにデータ処理に関してデータ処理室の福久健二郎室長から協力をいただきました。ここに厚く謝意を表します。

4. 内部被曝の影響に関する比較動物学的研究

松岡 理, 小木曾洋一, 福田 俊, 飯田治三
(内部被ばく研究部)

Studies on the Effects of Internal Emitters

O. Matsuoka, Y. Oghiso, S. Fukuda and H. Iida
Division of Comparative Radiotoxicology

A. Comparative Studies on the Effect of Internal Emitters in Bone

S. Fukuda, H. Iida and O. Matsuoka
Division of Comparative Radiotoxicology

In order to clarify the mechanism of incorporation of plutonium and other actinides into bone and to seek for measures to decorporate such radionuclides, fundamental experiments on bone growth and DTPA toxicity were carried out.

1) Comparative studies were made on the whole processes of maturation of the secondary ossification centers in the extremity of the mouse, rat, rabbit, dog and monkey. The secondary ossification centers were formed with a common sequence in all the species examined. Based on the ossification processes, three biological stages were identified; the first stage is the period of the appearance of the secondary ossification centers and subsequent rapid development, the second stage is the period of gradual development of them, and the third stage is the period of the complete or incomplete fusion to diaphysis and maturation of bone. It was con-

cluded that each of these stages provides a measure of comparison among these species.

2) As a measure of toxicity of Ca-DTPA and Zn-DTPA which may be used for removal of incorporated radionuclides from the human body, the teratogenic activity was tested with pregnant wistar rats. The chelating agents at 1, 6, 12, 24 and 36 H.D. (H.D. = human dose, 1 H.D. = 30 μ mole/Kg body weight) were injected subcutaneously. The administration was made daily in days 9–13 of gestation. In the dams, no toxic effects were observed. In the fetuses, the decrease of the survival rate was observed in only the group injected with 36 H.D. of Ca-DTPA.

Gross defects, such as exencephaly, microphthalmia, anophthalmia and fusion of ribs were observed in some cases of the group injected with 12, 24 and 36 H.D. of Ca-DTPA. The results demonstrated that Ca-DTPA was relatively teratogenic, whereas Zn-DTPA was not teratogenic even with the schedule of the highest administration. However, no toxic effects of either Ca-DTPA or Zn-DTPA were observed in the dams. The above findings may give useful information for treatment in an emergency.

B. Studies on the Morphology and Function of Lymph Nodes and Alveolar Macrophages

Y. Oghiso and Osamu Matsuoka

It is recognized that lymph node is the major pathway of particulate materials from the lung. To obtain further information of lymph nodes, fundamental studies on the morphology and function of lymph nodes were carried out. Localized deposition of colloidal carbon in lymph nodes following injection by nine differ-

ent routes and sites in mice was examined comparatively. Characteristic localization of particles in the lymph nodes depending on entry routes of particles and changes in their localization in lymph nodes with time after injection were examined by electron microscopy.

Lung alveolar macrophages collected from the rat which had inhaled asbestos fibers were examined functionally and biochemically by Oghiso who has been studying at Georgetown University (USA). The results showed that asbestos-phagocytized macrophages produced some factors which were capable of attracting other macrophages and leukocytes.

〔緒 言〕

内部被曝の影響とくにプルトニウムなどの超ウラン元素の生物影響は、プルトニウムの体内挙動の特異性と、アルファ線の体内での非常に短い飛程（軟組織で30 μ 、骨で10 μ ）のために動物種差が非常に大きいことが推定され、実験動物で得られた結果を人類へ外挿することが極めて困難である。このためプルトニウムの内部被曝で最も重要な(A)骨の障害について骨代謝の関連において、また(B)吸入による肺の障害を粒子状プルトニウムの吸入障害に深く関連するリンパ節、リンパ球、マクロファージの関連において比較実験動物学的検討を実施し、プルトニウムによる障害の発現機序の解明をめざすと共に、実験動物で得られた結果をヒトへ外挿するために必要な各種のパラメータを得ることをめざした。

プルトニウムによる骨の障害に関しては、骨肉腫の誘発に関して、マウス、ラット、イヌの実験結果が米国、ソ連等で得られているが、その代謝のデータおよび、投与量と骨肉腫の発生に一定の効果が観測されず、研究者によってデータの動物種差の傾向が一致しないという場合が多い。このような現象の発現メカニズムを解明することがPuによる人体での骨障害の評価の精度向上に重要な意味をもつ。肺からの粒子状Puの転移の速度に関しても、通常のイオン状諸物質の場合にみられるように体サイズ依存性がみられず、骨の場合と同様に代謝の動物種差の機構をあきらかにすることが重要である。このためには、粒子の肺での行動の基礎的事項を各種の角度から検討するこ

とが必要である、そのために注目すべき系としてリンパ節およびマクロファージを介する系をとりあげて検討した。

A 骨代謝に伴う放射性核種の挙動と除去に関する研究

(福田 俊、飯田治三、松岡 理)

〔諸 論〕

プルトニウム（以下Puと略す）は体内に侵入すると、まず血液中に移行、血液中のトランスフェリンと結合して、標的器官である肝臓と骨に運ばれる。Puの骨への沈着は、骨中に存在する糖蛋白との結合力がトランスフェリンの結合力よりも強いためにおこる。Seidel (1972) は、ラットへ²³⁹Puを静注した6日後に、投与量の62%が骨に、15%が肝臓に存在することを観察した。この比率は時間の経過とともに変化し、徐々に骨への蓄積が増加する。骨に一度沈着したPuは、ほとんど排泄されることはない。Puの身体許容負荷は非常に小さく(0.64 μ g)、わずかな量でも骨肉腫等のガンを誘発する。

Puの人体に及ぼす終局的な影響は発ガンである。この発ガンのリスクを軽減するためには、まず体内に侵入したPuを速やかに、すなわち血液中に存在するうちに除去すること、つぎに骨に沈着したPuを完全に除去することが必要である。

Puの体外除去にはキレート剤の使用が推奨され

ているが、キレート剤の投与だけによる完全な体外除去はできない。その理由の1つに、細胞膜透過性が低いことが考えられる。したがって、本研究では Pu の除去が最も困難である骨への Pu の沈着メカニズム、その後の骨内での動態について骨代謝と関連させて究明することを目的とした。

実験動物の骨や骨代謝に関する研究のうち、骨の成長について特に十分なものはない。本研究では、まず人の骨の特徴を有する実験動物種の選択を目的として、実験動物の骨の成長について検討し、つぎに人のモデルに適した動物種での骨代謝に関する研究を行うこととした。

一方、キレート剤に関しては、Pu の除去効果が大きく生体への障害の少ない薬物が開発されつつあるが、現在、DTPA (diethylene triamine pentaacetic acid) が最も実用的と考えられる。しかし、DTPA の薬物としての安全性は、人体に投与するに十分な確認がなされているとはいえない。今後のデータの蓄積、検討が必要であり、加えて骨からの Pu の除去に関する研究において使用する計画であることから、DTPA の安全性試験も同時に開始した。

さて、Pu の体内侵入の重要経路の1つに吸入経路があるが、Pu の大量吸入の場合の処置の1つに肺洗浄がある。肺洗浄に関する検討は、Pu 除染の観点からは国内では実施されていないこと、肺洗浄によって肺のマクロファージが採取でき、それが骨内の貧食細胞のモデルとして使用できることから、肺洗浄についても検討した。

〔1〕各種実験動物の骨格の成長に関する比較研究 (51～56年度)

本研究は、骨に関して人のモデルとなる実験動物種を選択し、また骨成長に関する年令の対応を目的として遂行した。

骨の成長は、骨端 (epiphysis) に存在する軟骨板における細胞の増殖による。この部位を観察すれば、各種動物の骨の成長過程が最も明確にでき、また多くの成長に関する情報が得られる。この研究の結果の多くは、すでに中間報告書に述べ、個々の論文 (1～2, 5～7) に詳細に報告したので概略を記す。

〔実験結果と考察〕

実験動物は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ (ビーグル犬) およびサル (カニクイザル) を選び、それらの四肢の長骨の成長を出生時より、X線撮

影により観察した。各長骨 (肩甲骨、上腕骨、橈骨、尺骨、大腿骨、脛骨、腓骨) の成熟度は、大和田ら (1953) によって提案された骨年令の評価基準に従って判定した。本基準は骨の成熟度を 0～10 段階に分類したものである。

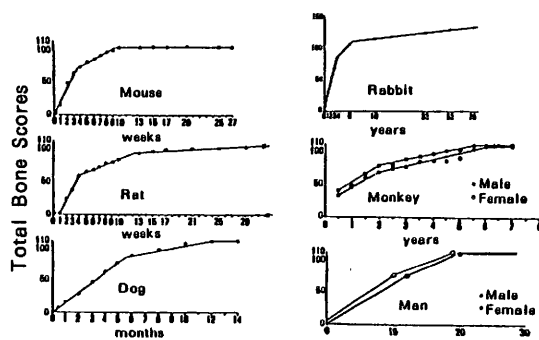


図1. 各種実験動物の骨格成長過程。

図1に各動物種の四肢長骨の成長過程を示した。すべての動物種とも、骨格の成長過程は3つの段階から成り、共通したパターンを表した。第1のコンポーネントは、骨端軟骨板の細胞増殖が盛んでかつ骨化が著しい急速な成長期、第2のコンポーネントは、性発現後のゆるやかな成長期、第3のコンポーネントは性成熟以後の完成期、と生物学的な意義づけができる。それぞれの動物の各コンパートメントは対応し得るので、成長速度の著しく違う動物種間の生物学的な年令対応ができた。また、人の18～20才の時期と各実験動物種の成熟に達する時期が明確になったことから、職業被曝関連の各実験動物の使用開始時期の指標が得られた。しかし、各骨の詳細な観察の結果、マウス、ラット、ウサギでは、成熟に達しても成人骨にみられる成熟骨 (完成した骨) を示す骨端は四肢骨の約半数で、残りの半数の部位は老令期に至っても骨端軟骨板が残存していた。これらの動物種で、骨端軟骨板が長く残存することは、極めて緩徐であるが骨の成長を促し、かつ Pu が沈着しやすい部位であることから、成人骨の Pu の分布との相違があると推察され、ヒトのモデルとしての実験材料としては好ましくないと考えられた。Bourne (1971) は、人の骨代謝が骨の成長に伴って modeling → remodeling と変化するのに、マウス、ラット、ウサギでは、modeling のみに終始すると報告している。一方、イヌ、サルでは、

人の骨と同様に、成熟に達した以後すべての骨が成熟骨を示し、骨の形成の様相も modeling → remodeling と変化する。この研究は、カンクイザルの骨格の成長を初めて明らかにするとともに、人のモデルとしてイヌとサルが適していると推察された。

〔Ⅱ〕実験動物の骨代謝に関する研究(57年度～

人骨のモデルとしてイヌとサルが適していると考えられたが、サルに関しては飼育や衛生管理が難しく、かつ基礎的データが少ないことから、骨代謝の研究には、おもにイヌを使用することにした。

骨代謝の研究で最も汎用されている方法は、テトラサイクリンを用いた新骨形成部のラベリングによる骨形成率、Turnover rate 等の解析である。①骨の in vivo での状態が正確に観察される。②上記したラベリングの観察ができる。③PIXE法などで同時に骨中のミネラルに関する情報が得られる。④沈着したPuの骨内の位置を正確に観察できる等、多くの利点があることから、非脱灰骨標本の作製方法は、動物に一定の間隔(犬の場合8～14日間)をおいて、テトラサイクリンを2回投与し、骨組織を二重ラベルにした後、骨採取し70%アルコールにて固定する(約4日間)。第1段階として、2～3mm厚に切り出した骨標本を軟エックス線撮影し、器官レベルとしての骨全体の構造やその変化を観察する。その後、アルコールにて脱水、methyl methacrylate (MMAと略す)モノマーに浸透、つづいてMMAポリマー樹脂に包埋、重合固化させる(約2週間)。MMAモノマーに浸透させている間に、真空吸引装置にて2～4時間吸引し、MMAを十分に組織内に浸透させることと、MMAポリマー包埋時に樹脂の重合による組織内での気泡の発生を防止することが重要である。MMAの重合固化後、200～300μm厚に薄切(内周刃カッター)後、80μmまで研磨装置にて研磨する。この切片を特殊フィルムにのせ、軟X線撮影を行い、組織レベルでの骨単位やtrabecular骨の石灰化状態を観察する(Contact Micro radiography)。その後再び研磨して、20μm以下の標本作製し、Villanueva bone stainにて染色し、骨および骨細胞を鏡検する(2日)。この標本を蛍光顕微鏡下でみると、新生骨部にテトラサイクリンによって二重にラベルされたラインが検出される。たとえば、この標本における二重のラインの距離から、投与間隔期間におけ

る石灰化速度が知られる。

人では骨代謝や骨疾患の検索材料に、腸骨や肋骨が用いられる。その理由は、腸骨や肋骨が採取しやすいこと、代謝率が高いことがあげられる。

Kimnelら(1982)は、18～52カ月令のビーグル犬の36部位の骨のturnover rateは、人の2～3倍であることから、種々の実験条件や薬物に対して人よりも早く応答する利点があると述べている。この結果は、ビーグル犬の骨代謝が人のそれと類似し、かつ実験結果が短時間で得られることを示す。Liuら(1982)は、ラットにCa欠乏食を12日間与え、破骨細胞の著しい増加と、その後通常にCaを含む飼料の投与により、3日以内に破骨細胞が崩壊、正常骨の状態にもどることを示した。この事実から、著しい障害を及ぼさず、骨に沈着したPuを遊離させることが期待され、同時にキレート剤を投与すれば、骨からの高いPuの除去効果が望まれるかもしれない。この骨吸収を起こす方法は、副甲状腺ホルモンによっても得られるので、今後の検討課題である。

〔Ⅲ〕DTPAの薬物としての安全性に関する研究(56～57年度)

現在、最も信頼できるキレート剤は、DTPA(diethylene triamine pentaacetic acid)のCaとZn塩である。

DTPAを人体に投与するためには、薬物としての安全性を確かめることが必須条件である。しかし、現在まで安全性試験が十分に行われているとはいえない。DTPAの人体への投与量は、1g/70kg体重/日(1 human dose, H. D. と略す、= 30μmole/kg)が推奨されている。本研究では、1 H. D. を基準にしてDTPAの安全性試験を行った。

(1) 急性毒性試験

Wistar系(WM)ラットに、Ca-DTPAまたはZn-DTPAをそれぞれ10, 50, 100 H. D.、経口投与した。投与開始4日後までに、Ca-DTPA 100 H. D. 群の5匹中2匹が、下痢・消瘦を呈し死亡した。この時点の剖検では、Ca-DTPA投与群ではほぼ全例に、Zn-DTPA投与群では、10 H. D. 群の5匹中1匹、50 H. D. 群の5匹中2匹、100 H. D. 群の5匹中4匹に腸出血が観察された。最近の報告では、Ca-DTPAのマウスにおけるcumulative LD₅₀は12mM/Kgとされ、今回のラットの実験結果、Ca-DTPA 100 H. D. 群をみると、100 H. D. (3mM/Kg)

× 4 日 = 12mM/Kg となり, cumulative LD₅₀ に関してマウスとラットでは, 著しい相違はなさそうであった。一方, Zn-DTPA 投与群での死亡例や著しい障害はみられなかったことから, 毒性は Ca-DTPA よりもかなり低いと思われる。

(2) 催奇形性試験⁹⁾

Wistar 系 (WS) ラットの妊娠 9~13 日目に, Ca-DTPA または Zn-DTPA 1, 6, 12, 24, 36 H. D. を, 毎日投与した。全実験期間を通じて臨床観察, 体重測定を, また妊娠 20 日目の剖検時に血液, 血清, 病理組織学的検査を実施した。胎仔に関しては, 外望検査, 体重測定後, アリザリンレッド S とアリューシャンプルーによる骨格の二重染色を行い, 奇形の検索を行った。

その結果, 母ラットではほとんど影響を認めなかった。胎仔に関しては, 表 1 に示すように, Ca-DTPA 36 H. D. 投与群で体重の低下および生存率の減少 (68%) が観察された。胎仔の奇形に関しては, 表 2 に示すように, Ca-DTPA 24 H. D. 投与群で 119 匹中 4 匹 (3.4%) に, 36 H. D. 投与群で 83 匹中 14 匹 (16.9%) に外脳症が, また 36 H. D. 投与群では 83 匹中 4 匹 (4.8%) に小眼球症が, 3 匹 (3.6%) に無眼球症が, 一方 Zn-DTPA 投与群では 12 H. D. 群の 122 匹中

1 匹 (0.8%) に多指症が, それぞれ観察された。DTPA の催奇形性試験は, Fisher ら (1976) がマウスで, Sikov ら (1975) がラットで実施している。Sikov らの結果と比べると, Ca-DTPA の毒性が小さかった。また, Zn-DTPA 投与群では, Sikov らの結果においても毒性は認められていない。したがって, Zn-DTPA の方が Ca-DTPA よりも安全であるといえよう。Forman (1960, 1961) によれば, Ca-DTPA の投与で, 細尿管に硝子様変性と空胞変性を, 尿中にアルブミンや腎実質細胞を観察し, 腎臓障害を示す。今回の実験では Ca-DTPA と Zn-DTPA のそれぞれ 1 H. D.

表 1 ラット胎仔の生存率および体重に及ぼす Ca-DTPA または Zn-DTPA の影響

Group	No. of dam	Survival rate (%)	Mean body weight
No treated group	9	130 / 144 (90.3)	3.03 ± 0.52*g
Isotonic saline group	10	125 / 142 (88.0)	3.77 ± 0.72
Ca-DTPA group	1 H. D.	9	112 / 125 (89.6)
	6 H. D.	8	198 / 106 (92.5)
	12 H. D.	9	96 / 126 (76.2)
	24 H. D.	10	119 / 147 (81.0)
	36 H. D.	10	83 / 121 (68.0)
Zn-DTPA group	1 H. D.	8	110 / 123 (88.4)
	6 H. D.	10	133 / 151 (88.1)
	12 H. D.	10	122 / 133 (91.7)
	24 H. D.	10	113 / 132 (85.6)
	36 H. D.	9	125 / 142 (88.0)

* Mean ± S. D.

表 2 DTPA によるラット胎仔の奇形発現の検査結果

Group	Fetuses malformed/ examined	Malformation observed					
		Fusion of rib		Exence phaly	Micro phthaimia	Ano- phthalmia	Others
		1st & 2nd	Others				
No treated control group	15 / 130 (11.5%)	15 (11.5%)	0	0	0	0	0
Isotonic saline group	20 / 125 (16.0%)	19 (15.2%)	0	1 (0.8%)	0	0	0
Ca-DTPA group	1 H. D.	24 / 112 (21.4%)	24 (21.4%)	0	0	0	0
	6 H. D.	18 / 98 (18.4%)	18 (18.4%)	0	0	0	0
	12 H. D.	32 / 96 (33.3%)	31 (32.2%)	1 (1.0%)	0	0	0
	24 H. D.	64 / 119 (53.8%)	60 (50.4%)	1 (0.8%)	4 (3.4%)	0	0
	36 H. D.	20 / 83 (24.1%)	16 (19.2%)	3 (3.6%)	14 (16.9%)	4 (4.8%)	3 (3.6%)
Zn-DTPA	1 H. D.	17 / 110 (15.5%)	17 (15.5%)	0	0	0	0
	6 H. D.	16 / 133 (12.0%)	15 (12.0%)	0	0	0	0
	12 H. D.	28 / 122 (23.0%)	27 (22.1%)	0	0	0	1* (0.8%)
	24 H. D.	19 / 113 (16.8%)	19 (16.8%)	0	0	0	0
	36 H. D.	16 / 125 (12.8%)	16 (12.8%)	0	0	0	0

* polydactyly

群においては、母親ラットでは腎臓障害はみられなかった。Teylarら(1978)は、妊娠ビーグルへの1H. D. 投与で著しい新生子の奇形・障害を観察している。

催奇形性試験の結果から、Ca-DTPAには催奇形性作用があることが明確になったので、妊婦への投与は禁止されるべきであること、Ca-DTPAの方がZn-DTPAよりも強い毒性があること、妊婦以外の成人に対しても十分な安全性に関する検索が必要であること、がうかがわれた。

(3) 慢性毒性試験

Puの体外除去に対するDTPAの効果は、Puの侵入1日後までが最も大きく、その後急速に小さくなる。完全な体外除去は不可能にしても、DTPAの長期間投与によって、除去率は高くなる。現在、アメリカでは静脈内への投与だけがFDAによって一応認められているが、静脈注射による長期間投与には、注射針のくり返し穿刺による障害、点滴によるので長い投与時間が必要なことなどから、あまり実際的とはいえない。一方、経口投与によれば、静脈内投与による苦痛や長い投与時間が解消される。加えて、実験的にはPuの侵入前にDTPAを投与すると、Puの除去効果が高くなることが示されており、もしDTPAの毒性を考慮して投与量を調整すれば、Puの取扱い作業の種類によっては、その直前のDTPAの投与もPu事故対策の1方法となりえるかもしれない。

そこで、経口投与による慢性毒性試験を行った。

実験は、ウィスター系(WM)ラット約260匹を、Ca-DTPAおよびZn-DTPAのそれぞれ、1, 10H. D.、投与群とControl群に分け、各群雌雄10匹ずつとし、DTPAを飲水に混ぜて投与した。Ca-DTPAはPuの除去効果は高いが、毒性が強いことから、投与期間を3カ月とし、Zn-DTPAは6カ月間投与した。実験動物は、1, 3, 6カ月目にそれぞれ殺処分し、血液検査、血清検査、病理組織学的検索を行った。

現在、実験データの整理中である。全実験期間中に、いずれの群においても下痢・嘔吐等の臨床的な変化、週1回の体重測定結果での異常値、週2~3回の飲水量や定期的な餌摂取量の変化は認められなかった。しかし、剖見ではCa-DTPAとZn-DTPAの1, 10H. D. 投与群のいずれにおいても、消化器系とくに腸に充出血が観察された。

DTPAの同一量を、分割投与すると1回投与

した場合よりも毒性が強いこと、DTPAの生物学的半減期が数時間以内で非常に短いことがすでに報告されている。斉藤(1980)はマウスが終日飲水行動を示すことを観察している。この実験においても、ラットのDTPAの飲水からの摂取が多数回に分けられたと推察されることから、消化器官系への影響が強く出たのかもしれない。ただし、下痢や血便等の症状が認められていないことから、決定的な障害ではなく、投与方法によって改善されるように思われる。いずれにしても、腎障害の検索も含めて、統合的に評価する必要がある。また、催奇形性試験の結果、ビーグル犬の感受性が高いことが示されているので、ビーグル犬についても検討する予定である。

〔IV〕ビーグル犬における肺洗浄技術の検討(57年度)

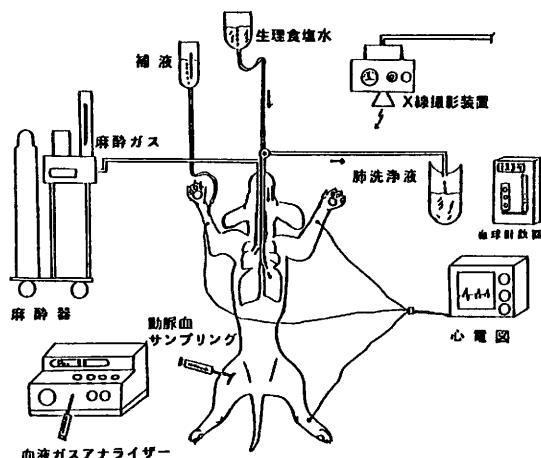


図2. ビーグル犬を用いた肺洗浄実験。

実験は、図2に示すように、ビーグル犬にCarrlensのダブルルーメンカテーテルを気管に挿入し、右のカテーテルでハロセンガス麻酔を行うと同時に、左のカテーテルから生理食塩水を注入して、肺洗浄を行った。肺洗浄による生体への安全性を確認するために、心電図による管理と大腿動脈の留置針から経時的に動脈血を採取し、血液ガス(PO_2 , Pco_2 , pH, Hco_3 等)値の変化を測定した。また、正中皮静脈より乳酸加リンゲル液を点滴投与した。1回の肺洗浄量は、50~100mlとし、血液ガス値と犬の症状を観察しながら、数回くり返した。実験結果は図3に示すとおりで、

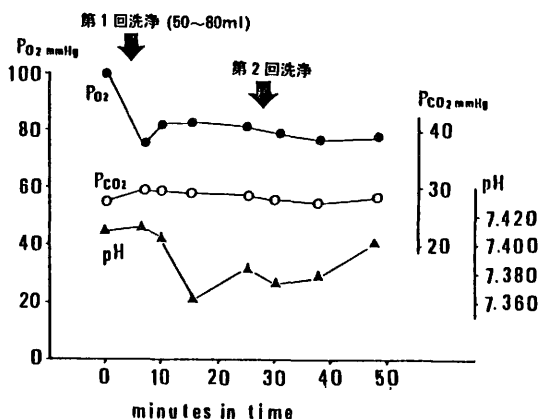


図3. ビーグル犬での肺洗浄における動脈血液ガス値の測定。

Po₂ 値、Pco₂ 値および pH 値のいずれにも著しい影響を与えることなく、肺洗浄ができた。本実験から、1 回当りの注入量を多くしないこと、洗浄水を長く肺内に留めないこと、洗浄水を排出するたびに血液ガス値が正常範囲にもどってから次の注入を開始すること、麻酔管理を正確に行うこと等に注意しなければならないことが知られた。肺洗浄時の X 線写真像から、肺の X 線透過率がやや悪くなり肺内に洗浄水が残ることや造影剤の注入により洗浄液が肺深部まで侵入していることが観察された。しかし、覚醒後の 1 頭に一過性の発咳がみられたが、いずれの犬も何ら副作用と思われる症状を示さなかった。1 頭の片肺の洗浄から、10⁷ 個程度の肺マクロファージが採取された。肺洗浄に関しては、さらに同一動物での反復実施や臨床所見の蓄積が必要であり、また技術訓練が重要であると思われた。

〔総括〕

Pu などの骨親和性放射性物質が一旦骨内に沈着すると、体外へはほとんど排泄されず、その影響として骨のガンを誘発する。Pu の体内での挙動、運命の概略については、ほぼ明らかになっているが、骨基質や骨細胞との関係については不明な点が多く、たとえば Pu の骨内膜への沈着メカニズムにも、糖蛋白との結合による非特異的沈着説と Ca 代謝に類似した新生骨への沈着説があり、現在前者の方が支持される傾向にあるが、*in vivo* での明確な証拠は示されていない。Pu の最大の沈着部位である骨への沈着メカニズムやその

後の挙動を明確にすることは、Pu による障害の評価や最終目的である骨からの Pu の体外除去方法の確立につながる。したがって、本研究では、実験動物の骨代謝の究明と骨からの Pu の除去方法の確立を目的とした。

骨が機能する器官として認識されたのは、近年に至ってであり、したがって実験動物の骨格の成長や骨代謝に関する研究も多いとはいえない。

Pu の骨への影響は、米国を中心として、マウスやラットそしてビーグル犬を用いた大規模な動物実験の結果が報告されている。その結果、それぞれの動物種での結果に著しい相違がみられている。このような多くの報告のデータから、人における Pu の障害評価を正確に実施するには、使用した実験動物の骨の成長や代謝の特徴を明確にし、その特徴による修飾因子を考慮することが重要と考えられる。

したがって、本研究では、まず動物実験に汎用されているマウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル の骨の成長について観察した。四肢長骨の骨端の X 線学的観察から、すべての動物種において、3 つのコンポーネントから成る成長過程が示された。しかし、マウス、ラット、ウサギの四肢長骨の約半数の骨端は、adult に達した後も成熟骨を示さなかった。イヌとサルのそれらは、いずれも人と同様に、adult に至る頃には、成熟骨を示した。この結果から、骨代謝に関する報告結果を併せると、人の骨代謝の研究には、イヌとサルが適していると示唆された。そして、イヌとサルの実験動物学的な諸条件から、イヌが最も適した動物であるが、骨代謝率が人の 2～3 倍であることや未だ十分なデータがないことから、イヌの骨代謝に関する基礎研究が必要と思われた。

DTPA の実験結果からは、Ca-DTPA に強い催奇形性作用があり、妊婦への投与は禁止されるべきであること、Zn-DTPA の方が毒性が弱いことが認められた。国外では、DTPA よりも除去効果が高くかつ薬物として安全なキレー剤の開発が盛んに行われ、加えて DTPA については臨床試験へと進んでおり、我国においてもこの分野の研究が望まれる。また、DTPA の安全性の確認も緊急度が高く、かつ動物種による感受性の差が著しいことがうかがわれることから、さらに多くの検討が必要である。肺洗浄に関しては、臨床医学的、技術的検討や訓練も必要であることが示唆された。

〔発 表〕

1. 福田 俊, 富田静男, 松岡 理: 骨の成長に関する比較実験動物学的研究。第1報マウスにおける骨の成長と化骨, 実験動物, **26**, 103～113, 1977
2. Fukuda, S., Cho, F. and Honjo, S.: Bone Growth and Development of Secondary Ossification Centers of Extremities in the Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*). Exp. Anim., **27**, 387—397, 1978
3. 福田 俊, 松岡 理: ビーグル犬の胎盤重量, 臍帯長および羊水の性状, 性分について, 実験動物, **28**, 69—73, 1979
4. Fukuda, S. and Matsuoka, O.: Cystic Calculosis Repeating in a Beagle Dog. Jpn. J. Vet. Sci., **41**, 413—415, 1979
5. Fukuda, S. and Matsuoka, O.: Maturation Process of Secondary Ossification Centers in the Rat and Assessment of Bone Age. Exp. Anim., **28**, 1—9,

1979

6. Fukuda, S. and Matsuoka, O.: Comparative Studies on Maturation Process of Secondary Ossification Centers of Long Bones in the Mouse, Rat, Dog and Monkey. Exp. Anim., **29**, 317—326, 1980
7. Fukuda, S. and Matsuoka, O.: Radiographic Studies on Maturation Process of Secondary Ossification Centers in Long Bones of the Japanese White Rabbit. Exp. Anim., **30**, 497—501, 1980
8. Fukuda, S., Iida, H., Matsuoka, O. and Shibuya, K.: Studies on Intervertebral Disc Protrusion in Beagles. Jpn. J. Vet. Sci., (In Press)
9. Fukuda, S. and Iida, H.: Toxicological Study on the Safety of DTPA as a drug (I). Teratological Study in the rat. Hoken Butsiri, **18**, 37—42, 1983

B 吸入に伴う肺の障害発現機構に関する研究

(小木曾洋一, 松岡 理)

〔目 的〕

酸化プルトニウム等の不溶性の粒子の吸入による障害を考える場合に生物学的に重要な問題としては肺から粒子状の放射性物質がどのような経路, どのような機構で標的となる器官へ移っていくか, またどのようなメカニズムで標的器官へ移動し, その部位で障害がどのようなメカニズムで生ずるかを明らかにするかが危険度の評価の精度を高めるために重要なことである。吸入された放射性粒子は図1に示すごとく, 呼吸気道の末端では, せん毛によるクリアランスによって上部気道へ送られるか, 肺泡のマクロファージに貪食されて細胞間隙きを通して血管, リンパ管に入りリンパ節に集る。リンパ節では非常に長い間留まりやがて肝臓や骨へ移ってゆく。これらの経路のうちリンパ節の果す役割に関してデータがほとんどないので, まずリンパ節での粒子の行動を解明すること

から始め, マウスにカーボンコロイドをまず各種の侵入経路で粒子が体内に侵入した場合の集積するリンパ節をあきらかにし, ついでリンパ節内での粒子の分布の位置を, リンパ流からリンパ節へ入った場合と, 血流から入った場合とについてミクロのレベルであきらかにした。更にこの分布がかなり長い時間経路をとって移行する状況を約1カ月間にわたって追跡してリンパ節内での粒子の行動をあきらかにしようとした。このことは肺からの粒子の他の臓器への転移の速度の動物種差と関連しているものと考えからである。

吸入された粒子により生ずる肺の障害の発現のメカニズムには粒子を貪食した肺泡マクロファージが肺炎或は肺繊維症ひいては肺ガンの発生に重要な役割を演じていることが考えられ, 肺泡マクロファージに貪食された粒子からの α 線照射によるマクロファージの変性がその一原因と考えられる。このような観点から研究員小木曾洋一は昭和56年6月から米国ジョージタウン大学において, 米国環境保護庁の吸入アスベストの障害に関するプロジェクトに参加し, 肺繊維症の発現のメカニズムの吸入障害の発現とほとんど同じような機構によって生ずると考えられることから放医研にお

ける本格研究の予備的な研究方法の検討、予備的な実験として期待されている。

〔実験結果と考察〕

(1) 各種種投与法によるカーボンコロイドのマウスリンパ節支配の検討（昭和52～56年度）

各種実験動物の全身リンパ節の分布を文献的および実験的に検討しリンパ節のマップを作製したのち、マウスを実験動物として、8つの投与経路で、カーボンコロイドを投与し、支配リンパ節を調べマップとして図示した。投与経路によって支配リンパ節が全くことなること、四肢の場合は左右の投与によっての支配リンパ節が対称でないことがわかった。

(2) リンパ節への侵入経路による節内での粒子分布位置に関する組織学的検討（昭和52～56年度）

リンパ節へ粒子が流入するのには三つの経路があり、血流を介するもの、リンパ管を介するもの、マクロファージを介する経路が考えられる。これらの異なった経路で侵入した粒子はそれぞれリンパ節内の異なった部位に分布することが予想されるので、粒子のリンパ節へのとらえられ方を調べる目的でマウスにカーボンコロイドを三つの経路で与えリンパ節内での分布を光学顕微鏡および電子顕微鏡レベルで検討した結果、血行性ルートでは血管とくにPCV（後毛細管静脈）の内皮細胞に、リンパ行性のルートでは、リンパ洞および汭胞内のマクロファージに分布する。更に局

所で粒子をとらえた遊走マクロファージが汭胞内に入ってくる（血行性或はリンパ性）分布様式の三つが考えられた。

(3) リンパ節内での粒子挙動に関する組織学的——電顕的検索

リンパ節にとり込まれた粒子はかなり長期間リンパ節に留まるがやがてはこれを通過し、他の肝臓や骨などへ移動してゆくことが知られているが、リンパ節内での行動の詳細については不明であった。そこでマウスにコロイドカーボンを尾静脈内に注射後、1時間後にはじまり28日に至る18時点で殺して剖検し、全身のリンパ節の光顕および電顕的観察により粒子の挙動を観察した。この結果、粒子は最終的には14日～28日後には髄洞内皮細胞およびマクロファージにもとりこまれているのが認められ、リンパ系に入って他臓器に移行するであろうことが示唆された。

以上述べた粒子のリンパ節を介する挙動は今後超ウラン元素の体内挙動とくに吸入された粒子の体内挙動の定量的研究や、代謝および影響の評価における動物種差の解明に役立つ基礎的情報としてきわめて有効であると考えられるが、プルトニウム粒子の場合は、更に放出するアルファ線のマクロファージ或は其の他の組織細胞での照射による影響が加わるので状況は一層複雑なものになることが予想され、今後の研究が期待されるところである。

〔発 表〕

1. Oghiso, Y. and Matsuoka, O.: Distribution of Colloidal Carbon in Lymph Nodes of Mice Injected by Different Routes. Japan. J. Exp. Med., **49**, 223—234, 1979

C 吸入アスベスト繊維の呼吸器系での挙動と効果に関する実験的研究

（小木曾洋一, Elliott Kagan※）

〔目 的〕

肺繊維症、肺ガンを引き起こすことが産業医学

2. Oghiso, Y., Fukuda, S. and Iida, H.: Histopathological Studies on Distribution of Spontaneous Lesions and Age Changes in the Beagle. Jpn. J. Vet. Sci. **44**, 941—950, 1982

また公衆医学上からも知られ、そのリスク評価に強い関心が注がれ、Puとの類似性の高いアスベスト線維が肺でどのような挙動を示すのか、またそれがどのような生物学的効果を与えるのかを、実験的に研究した。

※ 米国ジョージタウン大学医学部病理学教室

【方 法】

ラットを3群に分け、アスベストの中でも代表的な Chrysotile と Crocidolite をそれぞれ1群ずつ3カ月間連続吸入曝露し、残る1群は、対照群として新鮮空気に曝露した。これらの動物を定時的に殺処分し、その肺およびリンパ節におけるアスベストの沈着、移行の様式、さらにそれによる病変について組織学的および電子顕微鏡的に検討した。他方、これらの動物の肺洗浄液の構成細胞の性状や酵素レベルの検討もおこない、またとくに肺のマクロファージが分泌するさまざまな成分のうち、炎症細胞を誘引する物質 (Chemotaxin) の同定・分離を試み、アスベストによって生ずる肺病変との関連を検討した。

【結 果】

吸入後、比較的長期間にわたるラットの肺でのアスベスト線維の沈着・移行様式に、2種のアスベストで差異がみとめられた。すなわち、Chrysotile アスベストは比較的にすみやかに肺胞の間質に入りこみ、多くはリンパ節などに移行してしまうと考えられたが、Crocidolite アスベストはかなり長期にわたって肺胞や肺胞壁に沈着・滞留し、その一部がリンパ節に移行して滞留をすることが明らかであった。このほか肺の実質細胞のさまざまな病変の差と併せ、2種のアスベストによる生物効果の差が強く示唆された。

肺洗浄によって得られた細胞を、ガラス粘着率、

粒子貪食率、あるいはエステラーゼ陽性率などで分類してみると、アスベスト吸入動物では、総数も、また割合も対照に比して減じており、電子顕微鏡下でも、それらの細胞の壊死や変性変化が強くみとめられた。このことは、洗浄液上清中に検出される LDH や β -glucuronidase などの酵素レベルの上昇とも併せて、アスベストによる肺細胞への傷害性 (毒性) を示唆するものとして注目された。

次に、肺洗浄液から得た肺マクロファージを培養し、その培養液中に分泌される炎症細胞誘引物質 (Chemotaxin) をしらべたところアスベスト吸入群で、きわめて強く、この物質が検出され、マクロファージや血液中の白血球を誘引することが証明された。この物質の由来、性状決定などは現在なお検討中であるが、その存在はアスベストの吸入による肺の炎症病変成立に重要な役割を担っているものとして注目される。

【今後の展望】

以上の研究は、ほんの一端にすぎないが、自然界、産業界に広く存在する粒子状あるいは線維状などさまざまな物質が、個々の物理・化学性状の相違にもかかわらず、生体内に吸入された後の肺におよぼす生物学的効果の発現においては、基本的な共通のしくみが存在しうることが考えられ、各々を比較検討してゆくことは意義のあることであり、吸入放射性物質のおよぼす影響の研究と密接につながらざるを得ない。

【研究成果の発表】

1. Kagan, E., Oghiso, Y., and Hartmann, D. P. (1983). Enhanced release of a chemotactant for alveolar macrophage following asbestos inhalation. Am. Rev. Resp. Dis. (128, 680-687, 1983).
2. Kagan, E., Oghiso, Y., and Hartmann, D. P. (1983). The effects of chrysotile and crocidolite asbestos on the lower respiratory tract: Analysis of bronchoalveolar lavage constituents. J. Environ. Res. (投稿中)
3. Oghiso, Y., Kagan, E., and Brody, A.

R. (1983). Ultrastructural differences in the deposition patterns of inhaled chrysotile and crocidolite asbestos. Am. J. Pathol. (投稿予定)

(本研究は研究員小木曾洋一が昭和56年6月から現在に至るまで米国環境保護庁のアスベストの吸入障害のプロジェクトに参加し、E. Kagan と共に行った研究であるが、プルトニウムの代りにアスベストを用いた以外は研究のとりくみが方法的にもまた内容的にも放医研の特別研究の延長上にあると考えており、昭和58年6月帰国ののはこの研究を基礎としてプルトニウム研究に移行する予定であるので本報告書に掲載した。)

5. 放射性エアロゾルの動物吸入法に関する研究

松岡 理, 山田 裕司, 久保田善久,
福田 俊, 飯田 治三 (内部被ばく研究部)

Methodological Studies on the Inhalation of Radioactive Aerosol

O. Matsuoka, Y. Yamada, Y. Kubota, S. Fukuda and H. Iida
Division of comparative radiotoxicology

A. Studies on inhalation technology

In order to carry out inhalation experiments, exposure techniques and equipments must be developed to meet toxicological investigators' needs for animal studies of airborne toxicants such as radioactive aerosols. This study includes not only developments of exposure system but also measurements of respiratory parameters of animals during exposure. The exposure system consists of aerosol generator, exposure chamber, aerosol analyzer and so on.

Our first approach was to investigate the operating characteristics of individual equipments. Two aerosol generators, the Lovelace nebulizer used in inhalation experiments and the Hitachi atomizer for atomic absorption analysis, were comparatively examined. The Lovelace nebulizer was operated in an air flow of 1.3 l/min at an operating pressure of 1.4 Kg/cm². The Hitachi atomizer was operated in an air flow of 2.9 l/min at an operating pressure of 0.25 Kg/cm². The size distributions of particles generated by these two aerosol generators were nearly similar. In case of the Lovelace nebulizer, dry particles of methylene-blue uranine had a count median diameter of 0.25 μ m and geometric

standard deviation of 1.6. Satisfactory results on the generation of particles in a respirable size range were obtained except for maximum generating time.

Operating characteristics of aerosol samplers were studied. Electron microscopy can be used for the determination of particle size distribution. Observation area and number of particles counted were inevitably limited by a specimen grid on which the particles were collected. The relationship of size distribution of collected particles to airborne particles is uncertain. A new method was developed to determine the particle collection efficiency of an aerosol sampler by electron microscopy. This "double sampler method" measures the absolute concentration of particles and the particle size distribution. By this method, the particle collection efficiencies of the thermal precipitator and the electrostatic one were determined as a function of particle size. It was confirmed that the size distribution of airborne particles was determined with adequate accuracy by electron microscopy.

Two types of exposure chamber for small rodents were designed and tested. One of them was whole-body exposure type, and the other was nose-only exposure type. Animal restraining

tube equipped in the nose-only exposure chamber enables measurements of respiratory parameters of animals during exposure by whole-body plethysmography. In the nose-only exposure chamber, 10 rats or mice can be exposed simultaneously.

When airborne particles are inhaled, the deposited fraction in the respiratory tract differs depending on the particle size, shape and density among others. As the particle increases in size, it is apt to deposit in the upper respiratory tract, and only a few, if any, reach at the pulmonary region. In order to remove the larger particles, we modified a horizontal elutriator which was based upon the gravitational settling separation. The use of this elutriator permitted selective administration of respirable particles to the animals with appreciable reduction in the undesirable contamination in the part of respiratory tract other than the pulmonary region.

B. The measurement of respiratory volume during inhalation

In the experiment of aerosol inhalation, the estimation of mass of aerosol inhaled by experimental animals is very important in relation to the initial lung deposition and consequent kinetics of the aerosol. Therefore, it is essential to measure the respiratory volume of animals as well as the aerosol concentration during the inhalation.

It was considered to be most appropriate to use the whole-body plethysmography for the measurement of respiratory volume during the inhalation of the radionuclide such as plutonium, because it would not affect the characteristics and kinetics of aerosol inhaled, and only noses of

animals could be exposed to aerosol by use of it that minimized the skin contamination of the aerosol. Investigating how accurately the respiratory volumes of animals were measured by the whole-body plethysmography, the following findings were obtained.

1) Using a respirator which simulated the respiratory movements of animals, the response of the plethysmograph was satisfactory in the range of the respiratory frequencies of 0 to 10 counts per second.

2) In the practical cases, the differences of temperature and humidity between inside and outside of the animal lung were larger than those between inside and outside of the plethysmograph box, suggesting that the change of the gas volume in dead space (connecting tube or respiratory tract) was larger in animal lung than plethysmograph. Therefore, the respiratory volume measured by the plethysmograph was 3-4% larger than true respiratory volume measured in animal nose directly.

3) Provided that the temperature and humidity inside and outside of the plethysmograph box were adjusted to those in the animal lung, the respiratory volume measured in nose directly was identical with the value by the plethysmograph. Therefore, the factors of respiratory system, i.e. respiratory compliance, resistance and inertance would not influence the respiratory volume measured by the plethysmography when animals respired normally.

In conclusion, respiratory volume of small experimental animals could be measured with enough accuracy by the plethysmography, provided that the influence of temperature and humidity was taken into consideration.

際に起り得る経路で最も重要な経路の1つである。しかし、注射、経口投与に比べ、吸入投与は特殊な技術あるいは機器・設備を必要とするなど、実験上、かなりの困難さを伴うため、従来あまり行われて来なかった。

A. エアロゾル吸入実験技術に関する研究 (53年度～57年度)

〔緒 言〕

吸入による放射性物質の体内への取り込みは実

本研究では、放射性物質をエアロゾル粒子化し、マウス・ラット・イヌなどの実験動物に安全・確実に吸入投与する技術の確立を目標とした。また、実験の精度向上のため、吸入エアロゾル粒子の精密測定、吸入中の動物の呼吸量測定についても検討を行った。

〔実験及び考察〕

1. エアロゾル粒子発生法について

エアロゾル粒子発生装置として、米国の放射性エアロゾル吸入実験で多く使用されている Lovelace 型ネブライザーと原子吸光分析用に使用されているアトマイザーを選び、その基礎特性を調べた。

試験分散溶液にはメチレンブルー・ウラニンの 0.1 % 溶液を用い、作動空気圧力 1.4 kg / cm²、流量率 1.3 ℓ / min、あるいは 0.25 kg / cm²、2.9 ℓ / min の作動条件下で発生試験を行った。発生させたエアロゾル粒子の形状・粒子径およびその粒度分布などの粒子特性を調べるために、集塵原理が全く異なるインパクターと熱式サンプラーとを用いて試料採取を行い、それらを電子顕微鏡

にて観察した。図 1 には、対数確率紙上にプロットした累積度数分布を示す。この確率紙上において度数分布曲線がほぼ直線になることから、発生させたエアロゾル粒子の粒度分布はいずれも対数正規分布であることが分った。このときの個数基準中央径 CMD、重量基準中央径 MMD、幾何標準偏差 σ_g を表 1 に示す。

表 1. エアロゾル粒子発生装置の基礎特性の比較

	Lovelace 型 ネブライザー	原子吸光分析用 アトマイザー
作動空気圧力	kg / cm ² 1.4	0.25
作動空気流量率	ℓ / min 1.3	2.9
個数基準中央径	μm 0.23 (0.11)	0.14
重量基準中央径	μm 0.48 (0.22)	0.36
幾何標準偏差	1.6 (1.6)	1.7

() 内は、熱式サンプラーで捕集の場合

エアロゾル粒子発生装置の使用上の問題点として、次のようなことが明らかになった。Lovelace 型ネブライザーは、その構造上分散溶液の連続補給が出来ない。このため連続作動可能時間が最大で約 15 分に制限される。しかも、溶液の液面高は時間と共にかなり変動し、エアロゾル粒子の長時間安定発生に問題がある。一方、原子吸光分析用アトマイザーの場合、作動空気の圧力許容範囲はかなり狭く、最適圧力 0.25 ± 0.03 kg / cm² に精密コントロールする必要がある。また、連続作動可能時間はノズルが上向きの場合、ノズル付近に液の停留が生じるため最大 6 分程度であった。以上、いずれのエアロゾル粒子発生装置にもいくつかの問題点はあるものの、構造が簡単で取り扱い易い割に、吸入実験に適したサブミクロンおよびミクロン領域の粒子が多数得られ、しかも、その分散が比較的小さいという特徴があることが分った。

エアロゾル粒子のサンプリング方法については、予め予想はされたが、原理的に微小粒子に対する捕集効率が劣る慣性衝突方式のインパクターから得た CMD 値は、熱集塵方式の熱式サンプラーに比べ約 2 倍も大きく、サンプリング方法に問題を残した。

2. エアロゾル粒子計測について

エアロゾル吸入実験を定量的に行うためには、

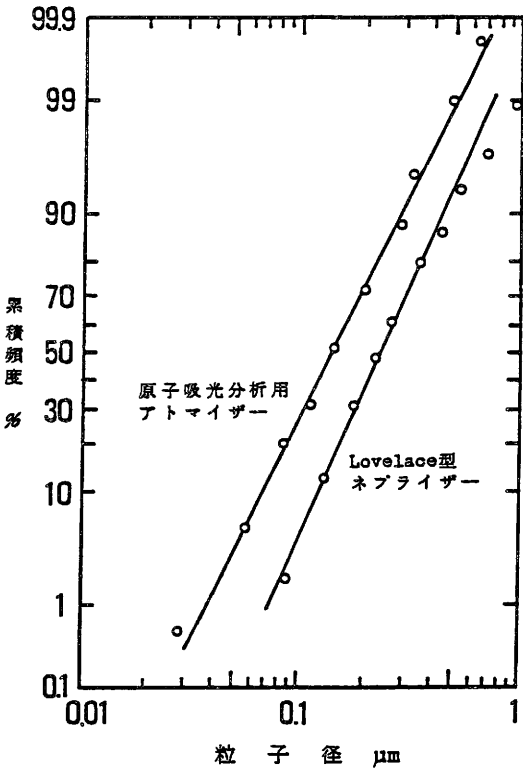


図 1 メチレンブルー・ウラニウム粒子の累積度数分布

エアロゾル粒子を精度良く測定する必要がある。測定すべき粒子性状には、粒子径・形状・密度・濃度などがある。これらを知るために、エアロゾル粒子の慣性・光散乱・拡散現象などを利用した各種測定機器が使用されているが、最も基本的な機器は光学あるいは電子顕微鏡である。しかしながら、顕微鏡法によるエアロゾル粒子計測には問題点がある。顕微鏡自体は既に確立された装置であるが、空气中に浮遊しているエアロゾル粒子を直接見ることは出来ない。そのためエアロゾル粒子をサンプリングする必要があるが、サンプリングされたエアロゾル試料が果して浮遊時の状態を忠実に反映したものであるか否か問題である。そこで、本研究では、まずエアロゾルサンプラーについてその基礎特性を調べた。

顕微鏡観察のためのエアロゾルサンプラーには、各種方式があるが、ここでは熱式と静電式のサンプラーについて粒子捕集特性を調べた。試験エアロゾル粒子には、超音波ネブライザーより発生させた多分散 NaCl 粒子を用いた。サンプラーの粒子捕集エリア内の数点から試料を採取して粒子捕集位置依存性を調べたところ、熱式サンプラーは

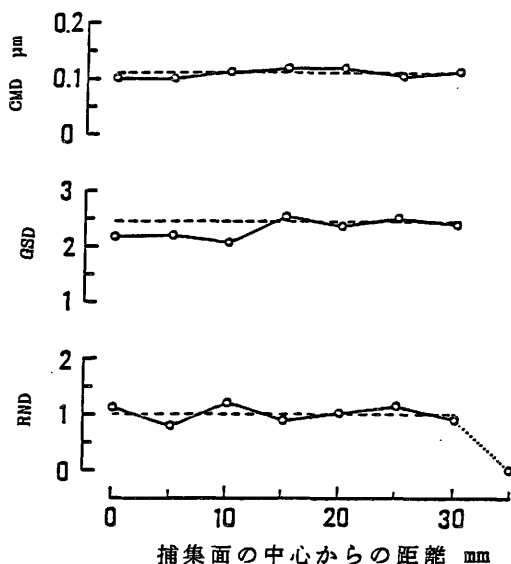


図2 熱式サンプラーの粒子捕集特性

CMD: 個数基準中央径
GSD: 幾何標準偏差
RND: 相対個数密度
(点線は平均値を示す)

半径30mmの円形捕集エリア内では場所に依らず、かなり均一捕集性が高いことが分った(図2参照)。また、捕集密度も一定であった。一方、静電式サンプラーについては、捕集エリア入口から150mm以内では均一捕集されていたが、150～250mmの範囲では個数では個数基準中央径が平均値の1.5～2倍、幾何標準偏差が3倍ほど大きくなり均一捕集が乱れていた(図3参照)。また、捕集密度は捕集エリア入口からの距離に強く依存し、エリア最前部では最後部の16倍の密度で捕集されていた。

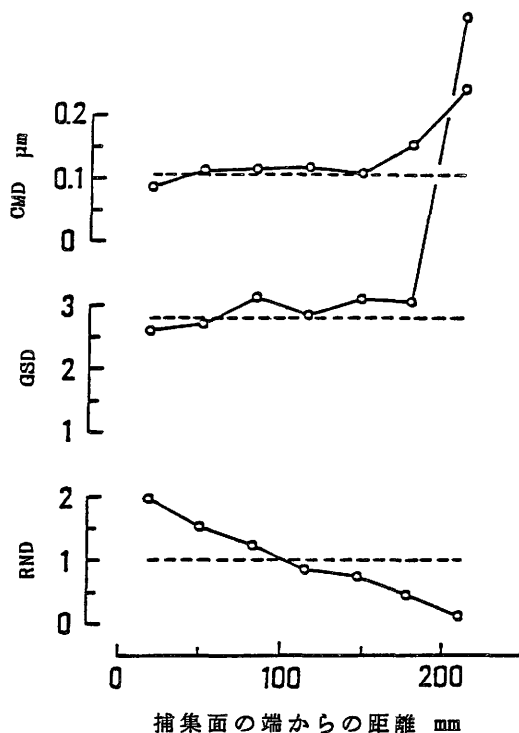


図3 静電式サンプラーの粒子捕集特性

CMD: 個数基準中央径
GSD: 幾何標準偏差
RND: 相対個数密度
(点線は平均値を示す)

次に、これら2台のサンプラーを交互に2度直列接続してサンプリングを行ない、電顕観察によってサンプラーの粒子捕集効率およびその粒子径依存性を調べた。熱式サンプラーは0.1 μm 以下の粒子に対しては90%近い効率を示したが、それより大きな粒子に対しては効率が下り、0.4 μm

粒子では50%になった。一方、静電式サンプラーの粒子捕集効率に粒子径にあまり依存せず、 $0.02 \sim 0.4 \mu\text{m}$ の粒子に対して $80 \pm 10\%$ であった。これらの測定結果より、熱式・静電式のいずれのサンプラーにも粒子捕集特性に一長一短があったが、予めその特性を正確に評価して使用するならば、電頭法によるエアロゾル粒子の精密粒度分布測定が可能であることが分った。

3. 大粒子除去装置について

動物に吸入されたエアロゾル粒子の中で、一般的に大粒子はど鼻咽頭部、気管・気管支部などの上部呼吸気道に沈着し易く、肺深部に到達し難い。従って、肺深部へ効率的に吸入投与するためには、吸入前に大粒子成分を取り除いておくことが望ましい。このため大粒子を選択的に除去する装置の開発を試みた。

大粒子除去装置は安全性・信頼性が高く、しかも取り扱いが容易でなければならないことを考慮し、重力沈降分離方式である多段平行平板型装置を試作した（図4参照）。本装置の大粒子除去性

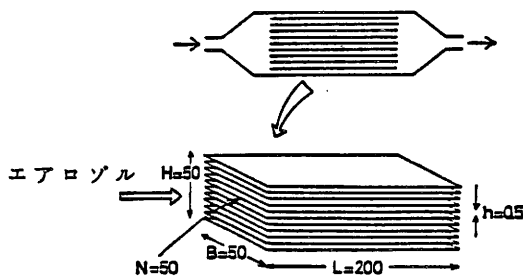


図4 大粒子除去装置の概略

能を調べるために、粒子径が均一で球形であるラテックス粒子を発生させ、装置を透過する粒子の割合を光散乱式粒子計測器で測定した。実験結果は図5に示すように理論計算値とも一致し、その大粒子除去性能が確かめられた。

この結果を基に、本装置による大粒子除去の効果を計算により推測すると次のようになる。例えば、放射能基準中央径が $2 \mu\text{m}$ 、幾何標準偏差が2の対数正規型粒度分布をもつエアロゾル粒子の場合、吸入した粒子の中で肺深部に沈着する割合が0.24から0.29へと効率が約20%高められる。

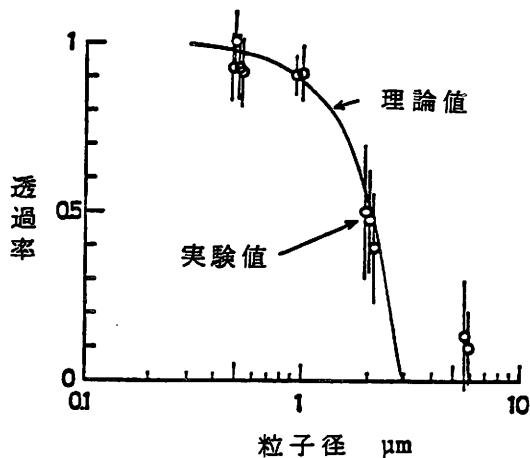


図5 Latex粒子の装置透過率曲線

また、肺深部沈着量と上部呼吸気道沈着量との比においては、2.5から1.5というように、同一肺深部沈着量に対して、上部呼吸気道沈着量が約40%も減少する。上部呼吸気道に沈着した粒子は比較的短期間に動物体外に排出されるので、この上部呼吸気道沈着量の減少は、放射性エアロゾル吸入投与後動物の飼育管理・排泄処理の負担軽減にも役立つと思われる。






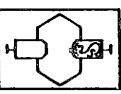
4. エアロゾル吸入法について

エアロゾル吸入実験はエアロゾル粒子の発生・計測あるいは動物呼吸量測定など、個々の基礎的な研究の積み重ねがあつてはじめて可能となる。エアロゾル吸入法に関しては、現在までに表2に示すような検討を行ってきた。

ラット・マウス等の小動物の吸入法に関しては、まず全身暴露型を検討した。例えば、Eu, Sm ミストを1群10匹のラットに吸入させ、肺内に沈着したEu, Sm 重量を中性子放射化分析で定量したところ、ラット一匹当たり $3.53 \pm 0.54 \mu\text{g}$ のEuあるいは $11.9 \pm 2.4 \mu\text{g}$ のSmが各々検出された。30分という比較的短時間で μg 量のエアロゾルを肺内に、しかも動物個体間で大きなバラツキなく吸入沈着させられることが分った。

しかし、このような全身暴露型吸入では、吸入動物の体表汚染が避けられないこと、また、吸入中の動物の呼吸量測定が不可能であることから、次に鼻部暴露型吸入法を検討した。現在、1群10匹用の鼻部暴露型吸入チャンバーの製作を終え、ラテッ

表2. エアロゾル吸入法の検討経過

	吸入方法	呼吸量測定	エアロゾルの種類	投与動物	匹数	実験日
テ ス ト 用 ↓	 全身暴露型 (無固定式)	不可能	カフザシク タルク	ラット	3 3	1979. 5 1979. 6
	 鼻部暴露型 (マスク・ 無固定式)	"	カフザシク カゴゴイド	イヌ	2 6	1979. 5 1980. 7
	 全身暴露型 (固定式)	"	Bu ミスト Sm ミスト	ラット	10 10	1981. 11 1981. 11
	 鼻部暴露型 (マスク・ つり下げ式)	"	メチレンブルー + ウラニン	イヌ	2	1982. 3
	 鼻部暴露型 (固定式)	可能	ポリスチレン ラテックス	ラット	20	1983. 1
	"	"	"	"	"	1983. 2
実 用 ↓	 鼻部暴露型 (GB内設置)	可能	8.58年度 一部試作	(小動物プルトニウム 吸入用)		

クス粒子を使った予備実験を遂行中である。このチャンバーでは、吸入中の動物の呼吸量をプレシスモグラフ方式で測定することが可能である。また、チャンバーへのエアロゾル投入方式もバッフル板付垂直投入方式から Tangential 型水平投入方式に変更し、チャンバー内エアロゾル濃度分布をより均一化するなど改善を施した。

一方、中型動物であるイヌの吸入実験に関しては、現在、イヌ用吸入チャンバー製作のための基礎データを蓄積中である。

〔総括〕

エアロゾル吸入実験を安全・確実に、また精度良く行うため、エアロゾル発生法・計測法・吸入法あるいは動物呼吸量測定法など、個々の基礎的研究を現在まで重点的に遂行して来た。今後は、これらの基礎研究を有機的に結び付け、エアロゾル発生から動物への吸入まで一連の流れにのった吸入実験を目指して研究を進める。

〔発表リスト〕

1. Yamada, Y. and Matsuoka, O. : A Selective Elutriator for Larger Particles in Inhalation Study.
Hoken Butsuri, 15, 263-268, 1980

2. Yamada, Y. : A New Method for the Determination of Collection Efficiency of an Aerosol Sampler by Electron Microscopy.
Atmos. Environ., 17, 369-372, 1983

B. 動物へのエアロゾル吸入法及び吸入中の呼吸量測定に関する研究(55年度～57年度)

〔緒 言〕

エアロゾル吸入実験において動物のエアロゾル吸入量を算定することは、エアロゾルの初期肺沈着量及びその後のエアロゾルの体内挙動の研究と関連して、必須の要件である。そのためにエアロゾル濃度測定に関する研究とタイアップして吸入中の動物の呼吸量測定が不可欠となる。本研究は、吸入中の動物の呼吸量を正確に測定するための技術的検討を目的としたものである。

〔実験内容〕

動物の呼吸量測定には種々の方法があるが、プルトニウム等の放射性物質の吸入中の測定には、Ⅰ) 動物の呼吸及び吸入させる物質に何ら影響を与えない。(動物の鼻部に何らかの測定装置を装着する方法は、エアロゾル粒子の挙動に影響を与える可能性があるため、鼻部での呼吸量測定は不適) Ⅱ) エアロゾルによる動物の体表及び測定器の汚染を避けうる。(鼻部のみエアロゾルに暴露) Ⅲ) 呼吸量の他に幾つかの呼吸生理学的パラメーターを測定しうる。等の条件を満たすものでなければならない。そこでホールボディプレシスモグラフィ (whole-body plethysmography) を使用した動物の呼吸量測定が最適と考えられた。(ボディプレシスモグラフィ: 生体の容

積変化を測定するために密閉したボックス内に動物を入れ、ガス又は液体を介してその容積変化を定量的に測定する方法) ホールボディプレシスモグラフィの原理を図1に示した。動物の呼吸量測定におけるプレシスモグラフィの実用性を保証する条件は、Ⅰ) 呼吸量 Ⅱ) 肺容積変動量 Ⅲ) 胸腹腔容積 (体容積) 変動量 Ⅳ) プレシスモグラフィによる測定値、の以上4値が等しいか或いは極めて近似していなければならないことである。しかしながら Ⅰ) 気道抵抗が大きい場合、動物が努力性換気を行なった場合等において、呼吸量は肺容積変動量、体容積変動量とは必ずしも等しくない。Ⅱ) 体容積変動量はプレシスモグラフィによる volume signal とは、必ずしも等しくない、等の問題点が存在する。そこでプレシスモグラフィによって得られる呼吸量測定値が真の呼吸量と等しいのか或いはどの程度の近似をもって表現できるかを検討する必要があると考えられた。

① 体容積変動量とプレシスモグラフィ測定値との関係。

体容積変動量がプレシスモグラフィによる測定値と必ずしも等しくないのは、プレシスモグラフィボックス内に圧縮可能な空気が、また連結チューブや測定器に抵抗と inertance が存在し、それらの相互作用が空気の動きに影響を及ぼすからである。したがって体容積変動量が同一であっても、呼吸数が変化すると測定値は変動しうる。そこで図2に示した測定系の呼吸数 (レスピレーターの回転数) 応答性を調べた。図3より、この測定系は、小動物 (マウス、ラット) の通常の呼吸数を十分越える範囲で、良好な呼吸数応答特性を有することがわかった。

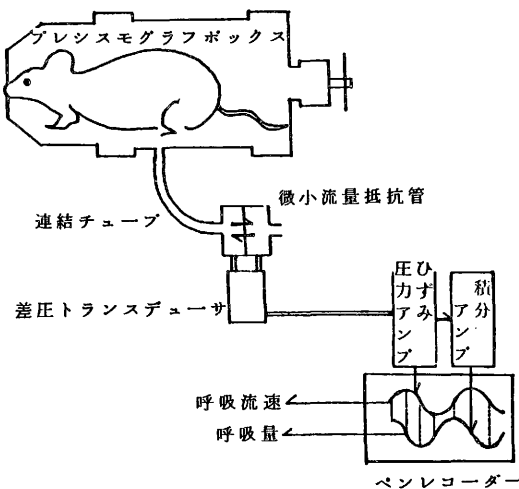


図1 フロータイプホールボディプレシスモグラフィの原理

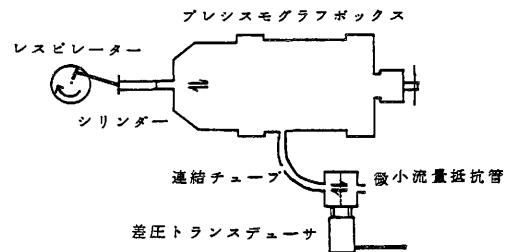


図2 動物の呼吸をレスピレーターで模擬した測定系

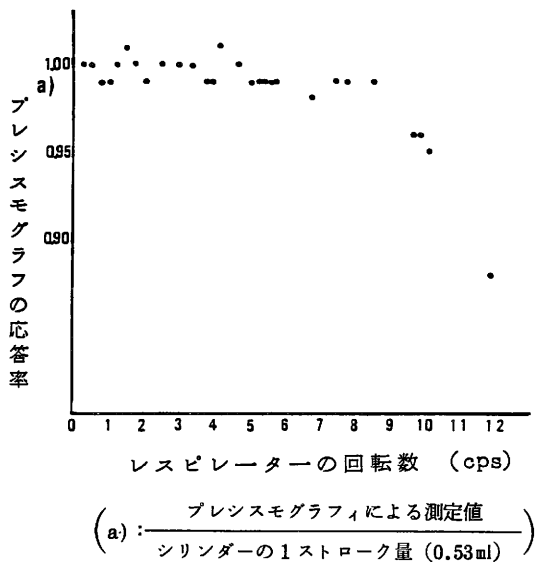


図3 シミュレーションシステムによるプレシモグラフィの呼吸数応答特性

② 呼吸量の直接測定（鼻部測定）とプレシモグラフィによる測定との比較

動物の肺には、肺コンプライアンス（compliance）肺抵抗、肺 inertance の3つのプレシモグラフィ応答性に関連する機械的要因が存在し、これらの相互作用により、呼吸量と体容積変動量とが等しくならない場合が生じる。そこで当所生産の正常なウイスター系ラットを使用し、図4に示すように呼吸量の直接測定とプレシモグラフィによる測定とを比較した。結果（表1）は、プレシモグラフィボックス内、実験室内温湿度を調節せずに双方の同時測定を行なうと明らかにプ

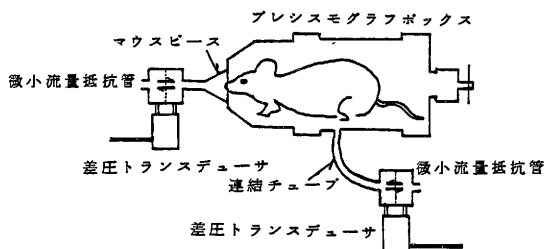


図4 呼吸量の直接測定とプレシモグラフィによる測定との比較

表1 呼吸量の直接測定とプレシモグラフィによる測定との比較

室 温	室内の相対湿度	P / M [※]
25℃	35%	1.055 ± 0.008
24	40	1.039 ± 0.008
28	45	1.030 ± 0.010
22	50	1.043 ± 0.005
26	60	1.045 ± 0.006
28	60	1.040 ± 0.007
28	65	1.041 ± 0.005
27	70	1.035 ± 0.009

$$P / M^{\text{※}} : \frac{\text{プレシモグラフィによる呼吸量測定値}}{\text{鼻口部における呼吸量直接測定量}}$$

年 度	実 施 内 容
55	鼻部暴露型小動物用プレシモグラフィボックスの試作及びその実用性（動物の呼吸量の測定精度）の検討
56	55年度よりの研究を継続 鼻部暴露型イヌ用プレシモグラフィボックスの試作 小動物多数頭同時吸入実験装置の試作（吸入チャンバーに挿入可能なプレシモグラフィボックスの開発）
57	小動物多数頭同時吸入実験装置を使用したラットへのラテックス粒子の吸入投与

レシモグラフィによる測定値の方が大きくなった。これは動物の肺内ガスは36～37℃、ほぼ100%水蒸気飽和であるのに対し、通常プレシモグラフィボックス内のガスは、肺内ガスより温湿度共

に低いため、たとえ体容積変動量と呼吸量が同一であっても、双方のガスが連結チューブやマウスピースなどの死腔 (dead space) を通過して測定器に到る時に実験室内空気との温湿度勾配によるガス容積の変化する率が異なる、すなわち肺からの空気はプレシスモグラフボックスの空気よりも死腔を通過する時の減少率が大きいためであると考えられる。そこでプレシスモグラフボックス内及び実験室内の空気の温度、湿度を調節して死腔における温湿度勾配を除去した系で測定を行なったところ (図5)、体容積変動量と呼吸量は1

温度調節ボックス (恒温器) 36~37°C に調節

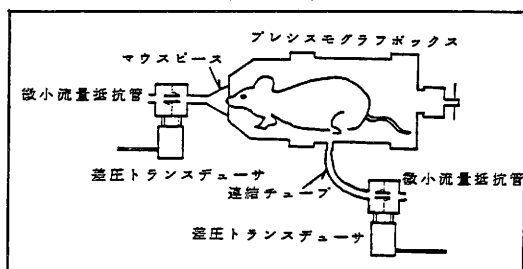


図5 死腔における温湿度勾配を除去した系での呼吸量の直接測定とプレシスモグラフィによる測定との比較

%以下の相違であった。すなわち呼吸器におけるコンプライアンス、抵抗、inertance等のメカニカルな要因は、動物が正常で安静な呼吸をしている場合、プレシスモグラフィによる呼吸量測定に影響を及ぼさないことが確認された。

③ 体容積変動量とプレシスモグラフィによる測定値との関係に影響を及ぼす温度、湿度勾配

図6、7に示したように、連結チューブの死腔が大きくなると、プレシスモグラフボックス内と実験室内の温湿度勾配の影響が測定値に大きく影響する。56年度に試作した小動物多数頭同時吸入実験装置を使用して、吸入中の動物の呼吸量を測定する場合、連結チューブは1 m前後にする必要があり、測定器を通過する空気は、実験室の温湿度であると考えられる。我々の本来の目的は、室温における空気の吸気量をエアロゾル濃度と関連して知ることであるので、このような条件下では、プレシスモグラフボックス内の温湿度が肺内と同じであれば、正確な呼吸量を測定できることになる。

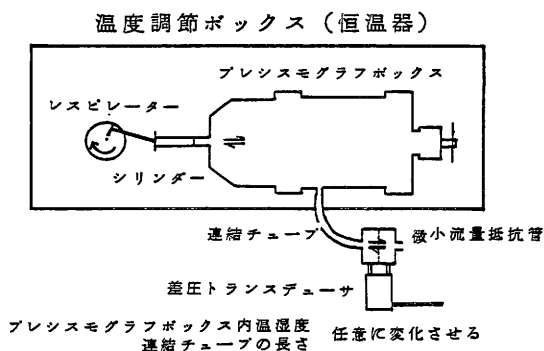
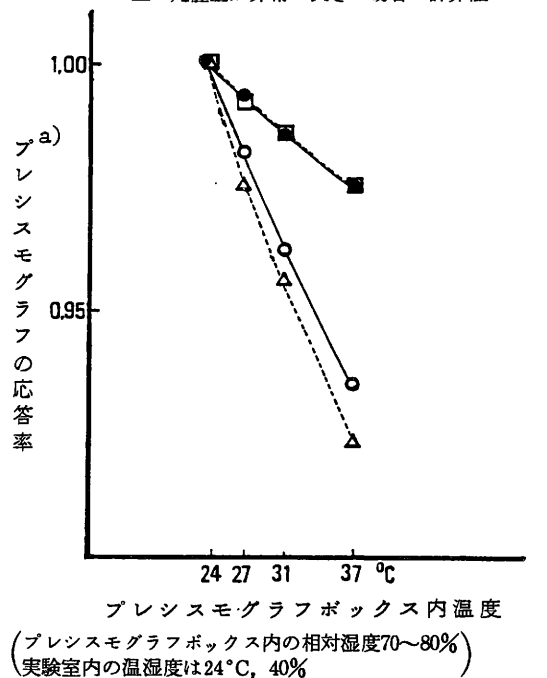


図6 連結チューブの死腔量、温湿度勾配が測定値に及ぼす影響

- : 死腔量0.1ml以下の時の実験値
- : 死腔量2.4mlの時の実験値
- : 死腔量0の場合の計算値
- △: 死腔量が非常に大きい場合の計算値



$$(a) = \frac{\text{各測定値}}{\text{プレシスモグラフボックス内温度24°Cの時の測定値}}$$

図7 連結チューブの死腔量、温湿度勾配が測定値に及ぼす影響

実際には表 1 より、呼吸量より若干大きな測定量（3～4 %）を得ることになる。

〔結 語〕

試作した小動物用プレシモグラフボックスを使用することにより、高い精度で動物の呼吸量を測定しうることを実験的に証明した。56年度に試作した小動物多数頭同時吸入実験装置では、同型のプレシモグラフボックスを10個、吸入チャンバーに挿入できるようにした。この吸入実験装置を使用してラテックス粒子を10頭のラットに吸入させ、吸入中2頭のラットの呼吸量を測定した。今後、吸入中の多数頭動物の呼吸量を同時に或いは均一に測定すること、吸入中の呼吸量を自動的に積算するための技術的検討を行なう必要がある。

6. 超ウラン元素の体内摂取事故対策に関する 基礎的研究

松岡 理, 佐藤 宏 (内部被ばく研究部)

Fundamental Studies on Decorporation of Plutonium

O. Matsuoka and H. Sato

Division of Comparative Radiotoxicology

These studies were designed with a view to evaluate the inhibitory effect of chelating agents on polymer formation of plutonium. Studies on the increase of removal effect, extension of the time during which a therapeutically useful amount of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) is retained in the body, and the mechanism of bone deposition of plutonium may contribute considerably to the treatment for bone deposition of plutonium.

In the first experimental study, cerium was used as a simulant of plutonium from the viewpoints of similarities in chemical properties as well as metabolic behavior. Titrations were performed to investigate the inhibition of polymerization with a fixed concentration of cerium ion (Ce^{4+}) and equal, twofold and fourfold concentrations of chelating agents. The suppressive effect on polymerization was judged from the difference of volume of NaOH added in between the presence and absence of chelating agents. Disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA-2Na) showed the dose-dependent suppression of polymerization. And also, it was shown that Ca-DTPA and trisodium citrate depressed it.

For the purpose of delaying the excretion rate

of DTPA into the urine, cellophane tubes were used in the second experimental study. We determined the change of Zn-DTPA concentration leaked from the tube with holding time in dialyzing medium. This model experiment helps estimate the rate of supply of Zn-DTPA into the peritoneal cavity. The leak of Zn-DTPA per unit time, as determined showed its maximum in the first 30 min and then decreased with time. Fifty percent of the initial concentration was leaked within 4 hr, and, 12 hr later, Zn-DTPA retained in the tube was only 10%. It has been reported that, after intravenous injection, DTPA is rapidly and almost quantitatively excreted in the urine. Since it is thought to be able to supply to the blood continuously through the peritoneal fluid with the implant of cellophane tube, this procedure may be applicable to delay the clearance rate of DTPA from the blood.

To resolve the mechanism of bone deposition, the separation of the plutonium-binding materials in bone matrix, and the determination of subcellular distribution of plutonium in bone, subfractionation of bone tissues were carried out. The femurs of the young adult male rabbit were divided into the two regions, diaphysis (D-region) and epiphysis-metaphysis (EM-region). According

to the method of Herring, glycoproteins extracted with 10% EDTA each region were fractionated into the two fractions. The first and second fractions (Fractions I and II) were separated into three and two components by ion-exchange chromatography, respectively. In D-region, component 2 comprised about 50% of the total protein content of fraction I. In EM-region, the proportion of component 1 and 2 was equal and the sum of the two components were about 90% of fraction I. The content ratio of sialic acid to protein in component 1 composed of sialoprotein and chondroitin sulfate-protein complex was the highest among 3 components. Amount of sialic acid determined on a basis of glycoprotein content suggests that D-region contained more sialoprotein than EM-region.

On the other hand, nuclear debris, cell debris and unbroken cells were removed from decalci-

fied bone tissue homogenates, and combined heavy- and light mitochondrial and microsomal fractions were subfractionated by density equilibration in sucrose density gradients. In EM-region, the specific activity of glucose-6-phosphatase (G-6-Pase), marker enzyme of microsome, was found in supernatant and light density fraction, whereas acid phosphatase (APase), marker enzyme of lysosome, showed most of the activity in heavy density fraction. In D-region, G-6-Pase showed a flat and irregular distribution patterns and high activity of APase was found in supernatant only. On the whole, it was not possible to achieve a clear-cut fractionation in this study. Through the present studies, it was known that the decalcification procedure is essential to obtain consistent results for subfractionation of the bone tissues.

〔緒 言〕

プルトニウム (Pu) が生体内に入った場合、重合体は主として肝へ分布するが、単量体は肝以外にも特に骨が重要な標的器官となることが知られている。単量体 Pu は血中の鉄結合蛋白であるトランスフェリンと結合して肝、骨等の組織に運ばれるが、骨へ到達したものは初期にはその表面に沈着する。ストロンチウムやラジウムが骨基質全体に分布するのに対し、骨表面に沈着するのが Pu の骨分布の特徴とされている。骨表面に沈着した Pu は modeling, remodeling により骨内部へ埋め込まれ、骨の細胞は長期にわたり Pu による照射を受ける。そのため、骨肉腫という生物学的に極めて重大な影響を受ける。この影響を軽減するためには、出来る限り早急に Pu を体外へ追い出すことが必要となる。キレート剤によって骨に沈着した Pu を除去できない現状においては、骨へ移行する Pu を減少させることが生物学的影響の軽減には必要不可欠と考えられる。しかし、キレート剤は短時間で尿中へ排泄されてしまうため、キレート剤単独では骨への移行も完全に抑えることができない。したがって、キレート剤の排泄速度を遅くし、血中の有効濃度を長く維持させることが可能になれば、骨へ沈着する前により多くの Pu を除去でき、Pu の骨沈着を極力抑えら

れるかもしれない。更に、Pu がいかにして骨沈着を起こすのか、その機構は不明であり、沈着機構が解明されればそれを基礎として、沈着した Pu をもキレート剤を使用して効率よく除去することが期待できる。

一方、重合体も生体内で徐々に単量体の形として遊離され (解重合)、骨沈着 Pu の 2 次的供給源となりうるため、重合体についても考慮する必要がある。キレート剤は解重合作用を有するといわれているが、これはキレート剤が重合体と長時間共存する場合であり、生体内では排泄が速いため解重合はあまり期待できない。重合体そのものとはキレートを形成できないため、単量体と比較して追い出し効果が弱いことは松岡によって明らかにされているが、血中濃度を長時間維持できればキレート剤の共存する時間を延長することになるため、解重合による効果もある程度期待でき、キレート剤の効果の増強が考えられる。

本研究は、Pu の骨沈着の抑制及び沈着 Pu の除去のための基礎的検討を目的として行った。その経過は以下の 3 つに分けて記述する。

1. Pu の重合阻止及び解重合 (55年度)
2. 血漿中の DTPA 有効濃度の長時間維持 (56年度)
3. Pu の骨沈着機構の解明 (57年度)

〔実験及び考察〕

1. Puの重合阻止及び解重合……本実験ではPuの模擬元素として、次の点からセリウムを使用した。1) 希土類元素に属する。2) 重合体を形成する。3) 骨、肝に分布する。4) 安定同位体を容易に入手できる。5) 放射性同位体(^{144}Ce)の測定が比較的容易である。

まず滴定曲線を作成し、血液のpHに相当する電位に達するまでに加えたNaOH量を求める。セリウムイオンを含む場合〔+ Ce^{4+} 〕のNaOH添加量を a 、含まない場合〔- Ce^{4+} 〕を b とすると、その差($a-b$)は水酸化セリウム〔 $\text{Ce}(\text{OH})_4$ 〕の生成に消費されたNaOH量に相当する。キレート剤が反応系に存在する場合のNaOH量をそれぞれ a' 、 b' とする。 $A = a - b$ 、 $B = a' - b'$ とすると、NaOHとの反応に関与しなかった Ce^{4+} の割合 C は次式から求められる。

$$C = (A - B) \cdot N / (M \cdot P \cdot V)$$

但し、 N 、 M はそれぞれNaOH、 Ce^{4+} の濃度、 P は Ce^{4+} のイオン価(この場合は4)、 V はNaOH添加前の反応系の溶液量を表わす。 A は反応系の Ce^{4+} 濃度と添加するNaOH濃度により決まるので、 B が小さいほど C は大きい。 B が小さくなることは、キレート剤存在下での〔+ Ce^{4+} 〕と〔- Ce^{4+} 〕とのNaOH添加量の差が小さくなることであり、NaOHと反応する Ce^{4+} の濃度が見かけ上減少することを意味する。これは、不溶性の $\text{Ce}(\text{OH})_4$ の生成、すなわち重合体生成が抑制されたものと解釈できる。図1はEDTA-2Naが存在する場合の滴定曲線を示したものであり、 C 値は Ca-DTPA とクエン酸ナトリウムの場合と合わせて表1に示した。EDTAは、高濃度になるに従って C 値が大きくなる傾向を示したが、 Ca-DTPA はこの傾向がなかった。 Ca-DTPA の場合は Ca 自身がDTPAと安定なキレートを形成するため、 Ce-DTPA の生成過程において Ca^{2+} が Ce^{4+} と競合することが考えられ、このため濃度に依存した効果がみられなかったものと推定される。キレート剤の存在により血中での重合が抑制されることが今回の結果から示唆され、キレート剤の重合阻止能はin vitroである程度推測することが可能と考えられる。また、クエン酸も重合を抑制する傾向が示された。 Pu の重合を抑制するものとして種々の複合陰イオンが考えられており、キレート剤、クエン酸等はその中に含まれ

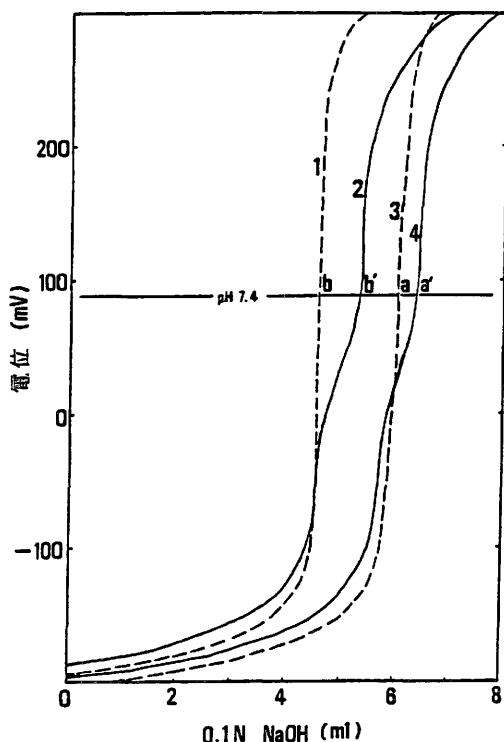


図1 Ce/EDTA 滴定曲線

1は溶媒(4mM H_2SO_4)のみの場合、2は1.6mM EDTA-2Naが存在する場合、3は0.8mM Ce^{4+} が存在する場合、4は Ce^{4+} とEDTAが共存する場合の滴定曲線。

表1. Ceの重合に対するキレート剤の効果

Ce^{4+} の濃度	キレート剤の濃度	C 値
0.8 mM	3.2 mM EDTA-2Na	0.36
	1.6	0.24
	0.8	0.22
	0.4	0.17
	3.2 mM Ca-DTPA	0.25
	1.6	0.34
	0.8	0.32
0.08 mM	1.6 mM EDTA-2Na	0.58
	0.8	0.30
	0.4	0.29
	0.4 mM $\text{Na}_3\text{-Citrate}$	0.25

る。Puを単量体として動物に投与する場合はクエン酸 Pu として投与するが、これはクエン酸が生体内に存在するものであり、かつ重合を阻止する能力があることによるものと考えられるが、今回の結果はそれをある程度示唆するものであろう。

一方、解重合作用を調べるには比較的長い時間を要するため、実験系に対する環境の変化の影響を無視できない。したがって、今後は実験系を改良して影響をできるだけ受けない条件下で、各種キレート剤の解重合作用の強さを比較検討する必要がある。

2. 血漿中の DTPA 有効濃度の長時間維持…
…DTPA 定量法は Bi^{3+} 添加による Bi-DTPA 生成を利用した方法であるため、DTPA が Ca 塩又は Zn 塩の場合は Bi^{3+} との交換により遊離してくる Ca^{2+} 、 Zn^{2+} の Bi^{3+} との競合が考えられる。そこで補正係数 f_{Ca} 、 f_{Zn} を求めた。図 2 より

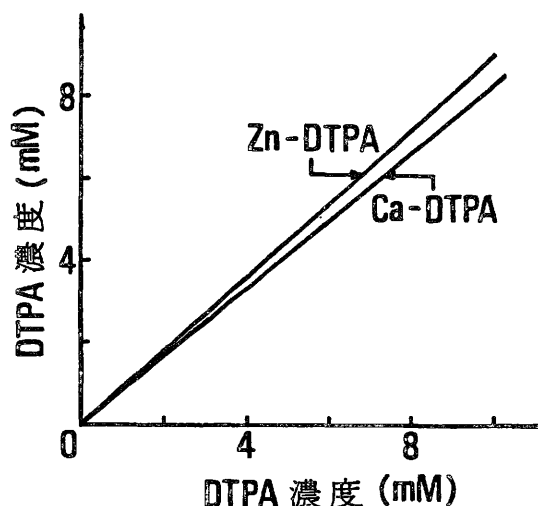


図 2 Ca-及び Zn-DTPA の補正曲線

Ca-及び Zn-DTPA 0~10mM 溶液 1 ml を 0.05N HNO_3 25ml に加え、溶液が黄色から赤色に変化するまでの 1 mM $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ 添加量 A を求める。指示薬はキシレノールオレンジ。DTPA 濃度 C は
 $\text{CmM} = 1\text{mM}(\text{Bi}^{3+}\text{の濃度}) \cdot \text{Aml}/1\text{ml}(\text{試料溶液量})$

f_{Ca} 、 f_{Zn} はそれぞれ 1.22、1.11 であった。Zn-DTPA 溶液をつめた透析チューブを腹腔内に埋め込んだ場合の漏出の経時変化を推測するため、図 3 に示した様な in vitro 実験装置を使用して DTPA のチューブ外への漏出の変化を調べた。測定結果を図 4 に示した。

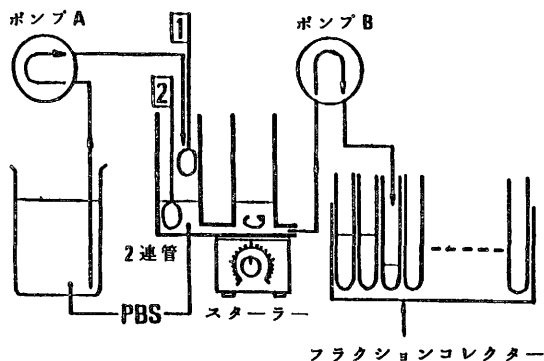


図 3 in vitro 実験装置の概略図

リン酸緩衝液(PBS)の入った 2 連管に 10mM Zn-DTPA 溶液 2 ml をつめた透析チューブをつり下げ(図中の ①)、ポンプ A で PBS を流す。ポンプ B により、同一流速で PBS を一定の時間間隔で採取する。②はチューブを完全に浸した場合。

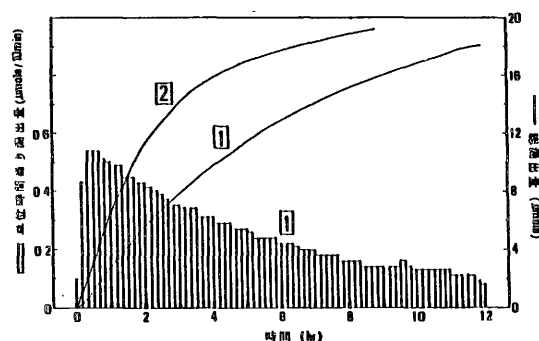


図 4 Zn-DTPA 漏出の経時変化

②の場合は 2 時間で 50% が漏出してしまいうのに対し、①では 50% 漏出に要するのは約 4 時間で、漏出速度は①の方が遅いのは明らかである。腹腔内は、臓器の表面が腹腔液におおわれているという状態に近く、透析チューブを腹腔内に埋め込んだ時の模擬としては①が適していると考えられる。①の場合の単位時間当りの漏出量の変化をみると、約 30 分で最大となった後徐々に減少した。総漏出量でみた場合は、12 時間後にチューブ内に残っている Zn-DTPA は 10% に過ぎなかった。

Ca-又は Zn-DTPA を静脈内に投与した場合と腹腔内に投与した場合の Pu 除去効果を比較すると、同程度であることから血中濃度の変動はほぼ同じと考えられる。一般に、Ca-DTPA を

静脈内に投与すると、動物種による差はあるが、数時間内に50%が尿中へ排泄されてしまい、24時間後の血中のCa-DTPAはわずか数%に過ぎない。Ca-又はZn-DTPAを透析チューブにつめて腹腔内に埋め込んだ場合、in vitroでの結果と同様の経過をたどるとすれば常にDTPAが腹腔内に供給され、静脈内投与と比較して血中からの消失は遅くなると考えられるが、単位時間当りの供給量が時間と共に減少すること、12時間で90%が漏出してしまふことを考慮に入れれば、静脈内又は腹腔内への1回投与と比較しても血中濃度の維持を十分に延長することはあまり期待できないかもしれない。単位時間当りの漏出量を一定に維持できるならば、有効血中濃度を長時間維持することは十分に期待できるであろう。

3. Puの骨沈着機構の解明……102～106日令の雄ウサギより摘出した大腿骨を、筋肉、脂肪等を除去した後に骨幹部と骨端—骨幹部部に分ける。骨髄を除去し、小塊とした後ホモジナイズする。〔糖蛋白の抽出・分離〕ホモジネートから10% EDTAで糖蛋白を抽出後、Herringの方法に基づいて画分I—IIIに分け、各画分は更にイオン交換クロマトグラフィーにより3成分に分ける。図5は骨幹部より抽出した画分IIの溶出パターン

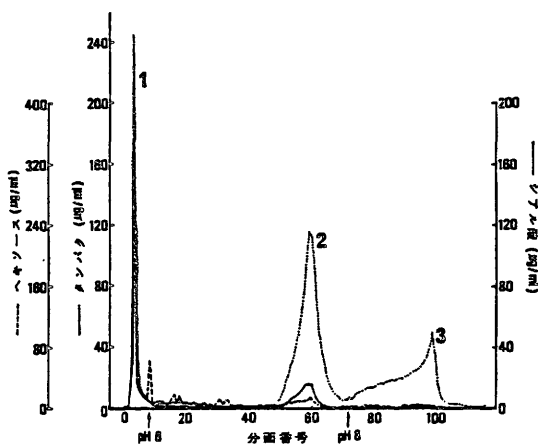


図5 骨幹より抽出した画分IIの溶出パターン

抽出した画分を0.2Mリン酸ナトリウム(pH5.2)に溶解し、イオン交換クロマトグラフィー(Amberlite CG-50)により成分1-3を分離した。カラムの大きさは1×22cm、流速は48ml/hr、分画容量は6.0ml。蛋白はLowry法により定量し、ヘキソース、シアル酸はそれぞれアントロン法、チオバルビツール酸法により定量した。

を示したものであり、溶出後の各画分の糖及びシアル酸含有量も合わせて示した。牛大腿骨骨幹では3画分に分けられることが報告されているが、ウサギの場合は牛で最も多い画分Iを分離できなかった。これが動物種差に寄因するものかは現段階では不明である。

表2に示した3成分の蛋白量の割合をみると、骨幹部では成分2が全体の約5割を占め、残りは成分1と3が大体同じ割合で含まれているのに対し、骨端—骨幹部部では成分1と2が同程度の割合で含まれ、全体の9割を占めているのがわかる。また、シアル酸の蛋白に対する含有率を表3に示したが、骨幹部、骨端—骨幹部部共に成分1の含有率が最も高かった。成分1にはシアロプロテイン(SP)とコンドロイチン硫酸—蛋白複合体(CS

表2. 各成分の蛋白含有率

画 分		成分 1	成分 2	成分 3
II	D*	24.4 %	55.9 %	19.7 %
	E*+ M*	40.6	54.5	4.9
III	D	49.4	—	50.6
	E + M	64.5	—	35.5
II+III	D	25.6	53.2	21.2
	E + M	43.3	48.2	8.5

§ 各画分中の成分1～3の総蛋白量に対する各成分の蛋白含有量の百分率

* D: Diaphysis, E: Epiphysis, M: Metaphysis

表3. 各成分の蛋白含有量に対するシアル酸含有量の比率

画 分		成分 1	成分 2	成分 3
II	D	0.75	0.15	0.06
	E + M	0.45	0.02	N. D.*
III	D	0.40	—	0.06
	E + M	0.50	—	N. D.
II+III	D	0.72	0.15	0.06
	E + M	0.46	0.02	N. D.

* N. D. = not detected

—P)が含まれるが、骨端—骨幹端部では基質に存在するCS—Pが多いためシアル酸含有率は骨幹より低くなったと考えられる。成分2及び3にはそれぞれ糖蛋白I (GP—I)、糖蛋白II (GP—II)が含まれるが、詳細はまだ明らかにされていない。Puは骨膜及び骨内膜におおわれた骨表面に分布するが、骨膜下の骨表面には骨芽細胞が、骨内膜下表面には骨芽細胞、破骨細胞が存在する。骨基質に存在する糖蛋白とPuの結合の強さは $SP \geq GP-II = CS > GP-I$ であることが *in vitro* の結果として報告されているが、骨基質糖蛋白はPuの骨沈着には重要な役割を担っていないともいわれ、骨芽細胞が糖蛋白の合成・分泌を行なうこと及び細胞膜や細胞内小器官にもSPが存在することを考え合せると、細胞内にPuが分布する可能性は高く、細胞とPu沈着との関連についても調べる必要がある。そのためにはまず、骨の細胞の分画法を確立しなければならない。

〔細胞分画〕ホモジネートをEDTAで脱灰後、核、細胞破片を除去し、一般細胞分画法により分画する。更に、ショ糖密度勾配超遠心分離を行なった(図6)。遠心分離後の各画分の蛋白量及び酵素の比活性を図7に示した。骨端—骨幹端部ではグルコース—6—フォスファターゼ (G—6—Pase) はショ糖密度(d)が1.12以下に高い活性がみられ、酸性フォスファターゼ (A Pase) は $d = 1.11$

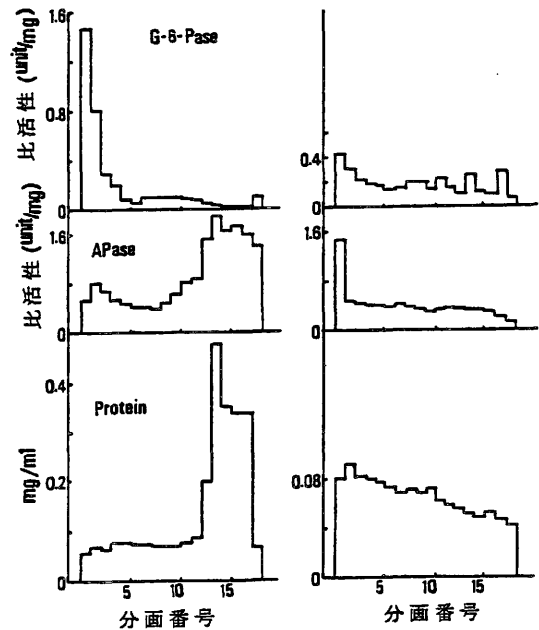


図7 酵素の分布パターン

酸性フォスファターゼ(基質:P—ニトロフェニルリン酸)はリソゾームの指標酵素として、グルコース—6—フォスファターゼ(基質:グルコース—6—リン酸)はミクロゾームの指標酵素とした。左が骨端—骨幹端、右が骨幹。

—1.13に一部、1.21—1.24に大部分の活性が分布していた。しかし、骨幹部ではA Paseが上清にのみ高い活性が認められただけで、他の画分の活性は低く、ほぼ均等に分布する傾向を示した。G—6—Paseについても同様の結果であった。骨端—骨幹端部についてはある程度の細胞分画が行なわれたものと考えられるが、ミトコンドリアを分画できなかったことも含め、検討を加える余地がまだ残されている。骨幹部については十分な分画が出来るまでには至らなかった。骨幹に存在する細胞が骨端—骨幹端部に比べて少ないため、分画に使用した試料の量が不十分であったことが大きな原因と考えられ、この点について更に検討する必要がある。

骨組織は、肝や肺等の軟組織や軟骨組織と異なり、分画前に脱灰という操作をしなければならないため、脱灰による影響を無視できない。骨幹部、骨端—骨幹端部ともに細胞分画をより効率的に行なうための脱灰条件の設定が必要であり、これは今後の重要な課題として残された。

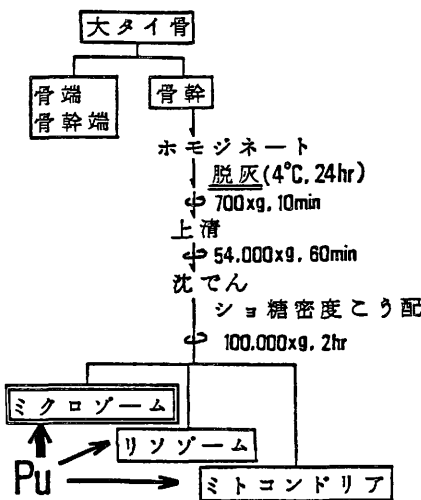


図6 骨の細胞分画法の概略

Pu→は各画分へのPuの予測移行量の割合を示す。

IV 核融合炉の開発に伴うトリチウムの生物学的 影響に関する調査研究 概説

松 平 寛 通
(生物研究部)

Biological Effects of Tritium

H. Matsudaira
Division of Biology

In view of the importance of health effects of tritium for research and development of the nuclear fusion, a project research on the biological effects of tritium has been initiated in 1981, as a program of the project research on the risks due to low level radiation exposure.

This project, being carried out in parallel and in close connection with similar project researches in universities and other national laboratories, aims at better understanding biological effects of tritium to protect workers and general public from possible hazards of this radionuclide to be used as the fuel materials in fusion.

The subjects of the research concern 1) behavior of tritium in the environment and its metabolism in animal tissues, 2) effects at cellular level including basic physics and chemistry, 3) somatic effects, and 4) medical preparedness for

possible human exposure. These studies are now in an embryonic stage but some results obtained are encouraging. Part of them were published in Proceedings of the Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics (Exchange A-25 in the US-Japan Fusion Cooperation Program) as NIRS-M-41 in March 1982 (Eds., Matsudaira, H *et al*).

Due to the limitation of the facilities, the experiments conducted hitherto were preliminary in nature and largely confined to relatively closed systems such as mammalian cells or mouse embryos in culture and fish embryos. With the experience and knowledge for safe handling of tritium, the facilities may be improved to carry out experiments with large number of animals and the scope of the research enlarged to match with the original prospects.

緒 言

将来のエネルギー需要を充すため、核融合炉の研究開発が国の重要政策の一つとして推進されるに至った。現段階ではトリチウムを燃料として用いる方式が最も実現の可能性が高いとされ、そのためかなりの量のトリチウムの取扱いや製造が見込まれている。これに伴い、トリチウムの安全、とくに作業者及び作業所周辺環境に対するトリチ

ウムの生物学的影響の研究が重要視され、原子力委員会及び原子力安全委員会で必要な研究計画が討議され、昭和53年にそのほゞ大綱が提案された。

この計画に沿い、本研究所では昭和54年度より指定研究「トリチウムの生物効果解析のための基盤的研究」を発足させ、トリチウムの生物学的影響研究の推進の準備として、研究方針の樹立、研究体制や施設の整備に着手した。

トリチウム、とくに当面の対象とされるトリチウム水は揮発性で、吸入・経口はもちろん経皮的に人体に取込まれることが知られており、トレーサーレベルをはるかに越えるトリチウムを取扱う必要性からみて、実験者ならびに実験環境の汚染防止がまず問題となった。

そこで、トリチウムの生物効果を解析するための検定系としてできるだけ密閉下で行なえ、しかも高感受性の実験系を開発する一方、必要な量のトリチウムを比較的安全に取扱うことが可能な設備の入手・試作につとめた。

さらに、昭和55年度より特別研究「低レベル放射線の人体に対する危険度の推定に関する調査研究」の一環として、研究グループを組織し、研究施設・設備の充実をはかりながら、予備的研究を進め将来に備えることとした。

主な研究課題について簡単に述べる。なお、本研究は昭和57年度より特別研究「核融合炉の開発に伴うトリチウムの生物学的影響に関する調査研究」に発展し、引き継がれている。

実験結果と考察

1. トリチウムの生体への取込みと生体内での動態に関する調査研究

新井、武田、榎田ら（環衛生）は、生態系と食物連鎖におけるトリチウムの動態、さらに生体内

におけるトリチウムの挙動について研究を進めた。まず、トリチウム標識植物栽培装置およびトリチウム汚染動物飼育装置の試作・改良につとめた。

一方、稲、麦、大豆等をトリチウム水ないしはトリチウム水蒸気存在下で栽培し、栽培条件や組織によるトリチウムの取込みの差、有機成分への変換の割合等を解析し、動物実験に供しうるトリチウム標識飼料の作成に手掛りをえた。さらに、トリチウム水およびトリチウム標識化合物をラットに経口投与し、種々の組織について、揮発（水）成分、不揮発（有機）成分への取込み率、各成分の生物学的半減期等を求め、単位投与量当りの組織の吸収線量を算定した。その結果、標識アミノ酸の場合が吸収線量が最も高く、かつ有機成分からの線量寄与も最大で、トリチウム水による生態系の汚染 → 食物連鎖 → 人の被ばくを考えると、たん白質の重要性が示された（表1）。

渡部（環境放射生態）は、茨城県東海地区の池沼から分離した藻（クラミドモナス）を用い、水棲生物へのトリチウムの移行について研究を開始した。一般に、藻類を含め植物体内へのトリチウム（水）の取込みには光合成の有無が大きな役割をもつことが知られている。そこで、至適培養条件（温度、照度、培養液の種類など）の設定、明暗交代による細胞周期の同調化、接合子形成の条件等について検討を進め、将来にそなえた。

表1 トリチウム標識化合物経口投与によるラット組織の蓄積線量
(1 μCi /体重1 g 当たりのrad数)

組 織	化合物				
		HTO	ロイシン	ブドー糖	チミジン
血	液	1.5	3.9	1.7	2.4
肝	臓	1.2 (9.3)	3.6 (72)	1.5 (29)	2.1 (17)
腎	臓	1.2 (6.9)	3.9 (75)	1.5 (26)	2.0 (16)
睪	丸	1.3 (4.2)	2.1 (58)	1.7 (14)	2.4 (10)
脾	臓	1.2 (8.1)	2.9 (79)	1.4 (24)	2.4 (28)
	脳	1.2 (8.1)	2.8 (64)	1.7 (36)	1.7 (15)
小	腸	1.2 (7.1)	—	—	2.0 (26)
脂	肪	0.3 (64.0)	1.0 (88)	2.6 (90)	0.8 (79)

カッコ内の数値は有機成分よりの寄与（パーセント）

〔研究発表〕

- (1) 新井清彦：第9回放射医研環境セミナー報文集，156－166，1982
- (2) Takeda, H. : J. Radiat. Res., 23, 345－357, 1982

2. 動物細胞を用いるトリチウムの生物効果の解析

川島、星野、平岡、山口ら（物理）は、トリチウムの生物効果比をより正確に求めるために必要なトリチウム β 線の線量評価ならびに線量効果のモデル系の開発につとめた。

トリチウムによる被ばくが主に低線量率被ばくであることから、線量測定に当って、まずフリツケ線量計を低線量率 γ 線の照射に応用可能か否かについて検討を進め、多少の変更を導入することにより、応用可能であることを示した。さらに、トリチウムの低エネルギー β 線（平均5.7 keV）の微視的にみた吸収線量を求めるために、65 kV X線や種々のエネルギーのX線および γ 線について、Rossi カウンタおよびウォールレス・カウンタを用い、マイクロシメトリーで用いられる種々のパラメーターを測定し、理論値との照合を行い、トリチウムを用いる測定にそなえた。

河村、渡利ら（化学）は、揮発性で取扱い上難点のあるトリチウム水のモデル核種として、低エネルギー β 線放射体で不揮発性の ^{63}Ni （67 keV）錯体が利用可能であるか否かの研究に着手した。はじめに ^{63}Ni の測定法を検討し、アスコルビン酸を加えカラークエンチングを除き、通常の液体シンチレーション・カウンタで測定可能であることを見出した。今後適当な ^{63}Ni 化合物の調製に着手する。

上野、古野、松平ら（生物）は、増殖期のマウス白血病培養細胞 L5178 Y を用い、生残率、小核形成、突然変異誘発率などを指標として、トリチウム水の動物細胞に対する効果を解析し、低線量率 γ 線の効果と比較した。トリチウム β 線でも線量率効果がみられるが γ 線とくらべるとその程度は少ない。同程度の線量率の照射で得られた線量－効果関係の解析から、トリチウム β 線の RBE は、細胞死で1.3～1.6、小核形成で1.8～2.3

- (3) Takeda, H. : Proc. Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics, NIRS-M-41, Chiba, 187－204, 1982
- (4) 武田 洋：第9回放射医研環境セミナー報文集，201－212，1982

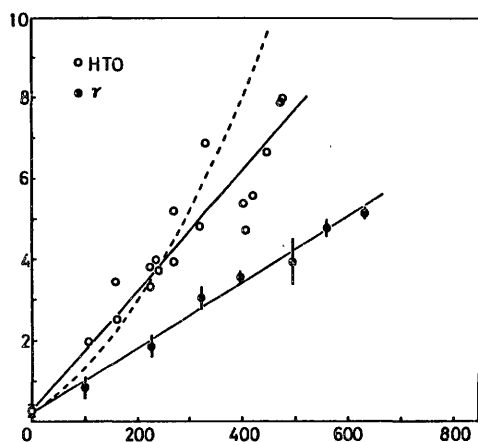


図1 L5178Y細胞におけるトリチウム水による突然変異（6－チオグアニン耐性）の誘発（点線は γ 線の急照射の結果）

突然変異で1.8となった（図1）。増殖細胞に対する効果の中で同位体効果のしめる役割を知る上での重水の効果、さらにトリチウム水と重水との相乗効果等について研究を進めている。また、トリチウムによるDNA分子の損傷の検出法についても検討を加えた。

坪井、田中ら（障基）は、細胞の増殖状態によるトリチウム水の細胞致死効果の差を明らかにする目的で、ラットNRK細胞を用い、対数増殖期と静止期との細胞を低線量率 γ 線で照射し、えられた線量－生残率曲線を比較した。 γ 線の線量率効果は、増殖期でも静止期でも本質的には差がなく、亜致死損傷からの回復では説明できるが、増殖期の細胞ではとくにごく低線量率の場合、照射中の細胞の再増殖の影響が長時間の照射では現われることが明らかになった。今後、トリチウム水を用いる実験に着手する予定。

〔研究発表〕

- (1) Matsudaira, H. : Proc. US/Japan Workshop on Fusion Fuel Handling, JAERI-M 9390, 211-229, 1981
- (2) Ueno, A. M., Furuno-Fukushi, I. and Matsudaira, H. : *Radiat. Res.*, 91 447-456, 1982

3. トリチウムの身体的効果に関する研究

江藤, 田口ら(生物)は, 田口が作出した近交系メダカ (*Oryzias latipes* HO4Cl) の受精卵をトリチウム水で処理し, 孵化直後の稚魚について生殖細胞数を算定し, γ 線の連続照射の場合と比較した。また, 孵化直後のメダカ稚魚では外見および生殖細胞の形態から雌雄の区別ができないため, 山本の性転換法によってまず雌のみを産出する親魚を育て(雄のみを産出する親魚の作出も行っている), えられた受精卵について同様の実験を行った。その結果, しらべた線量率の範囲(ほぼ10-200 rad/日)では, トリチウム β 線, γ 線とも線量率効果がみられなかった。生殖細胞の50%生残線量は, 雌雄こみの場合 β 線で 195 rad γ 線で 350 rad, 雌性生殖細胞の場合 β 線で 140 rad γ 線で 305 rad となり, トリチウム β 線の RBE は 1.8-2.2 であった。なお, 雌性生殖細胞が雄性生殖細胞よりも放射線高感受性であることの証明, 胚期にトリチウム処理を受けたメダカの妊性の変化等については今後の研究にまつ。

鹿島, 上島ら(障基)は, マウス, ラットを用い, トリチウムの内部被ばくによる実験動物の造血器障害についての研究に着手した。まず, 武田, 榎田, 山口らと共同のもとにトリチウム汚染実験動物飼育装置の試作・改良につとめる一方, 放射線による造血器障害の定量的指標として, 多染性赤血球での小核形成がすぐれていることを, X線, γ 線の急照射を用い証明した。ついで, γ 線の緩照射, [^3H] サイミジン, トリチウム水について実験を行ない, トリチウム β 線の RBE 値につい

- (3) Ueno, A. M., Furuno-Fukushi, I. and Matsudaira, H. : Proc. Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics, NIRS-M-41, 19-34, 1982
- (4) Tsuboi, A. : Proc. Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics, NIRS-M-41, 9-18, 1982

て予備的なデータを得つつある。

山田, 湯川, 中沢, 浅見ら(生物)は, トリチウムの被ばくによる哺乳類の初期発生の障害について研究を進めた。まず, 放射線感受性の高いマウス初期胚を試験管内で培養する手技を確立した。ついで, 培養胚をトリチウム水で処理し, 胚盤胞形成率を指標として発生の障害と被ばく時における胚発生の段階との関係を解析し, また, 低線量率 γ 線の効果と比較した。マウスの初期胚は, 発生の進行とともに放射線感受性が低下する。胚の50%致死量でみたトリチウム β 線の RBE は 1-1.7 であった(表2)。

表2 培養マウス初期胚に対するトリチウム水の効果

処理開始時期	50%致死量 (rad/時)		RBE
	トリチウム β 線	^{60}Co γ 線	
前核細胞	1.00 \pm 0.14 (118 \pm 17 $\mu\text{Ci/ml}$)	1.09 \pm 0.26	1
2細胞前期	1.96 \pm 0.16 (230 \pm 18 $\mu\text{Ci/ml}$)	3.34 \pm 0.4	1.7
2細胞後期	3.62 \pm 0.40 (426 \pm 33 $\mu\text{Ci/ml}$)	5.78 \pm 2.5	1.6

さらに, 生物研究部内の他の部員と協力して, トリチウム汚染実験ユニットを試作し, 将来に備えた。

山口ら(生物)は, トリチウムの発がん効果に関し, 予備的な研究を行なった。他部と共同し, トリチウム汚染実験動物飼育装置の試作をはかる一方, 鶏胚皮膚器官培養を用い, 動物細胞の悪性転換を検出する手技を開発し, 将来の実験に備えた。

〔研究発表〕

- (1) Etoh, H. and Hyodo-Taguchi, Y. : Proc. Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics, NIRS-M-41, 156 -

170, 1982

- (2) Hyodo-Taguchi, Y., Aoki, K. and Matsudaira, H. : Proc. Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics, NIRS -

- (4) Yamada, T., Yukawa, O., Asami, K. and Nakazawa, T. : Proc. Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics, NIRS-M-41, 68-84, 1982

4. トリチウムによる人の放射線障害とその診断・予防に関する調査研究

平嶋、杉山ら(障臨)は、重症トリチウム被ばく例の文献的調査から、トリチウムによる人の放射線障害の診断と予後判定上、血液幹細胞の定量が重要であるとの認識にたつて、人の骨髓より

【研究発表】

- (1) Nara, N., Bessho, M., Hirashima, K. and Momoi, H. : Exp. Haematol., 10, 20-25, 1982

総 括

「トリチウムの生物学的影響に関する調査研究」は、プロジェクト研究としての日が浅いため、トリチウムの生体への取込みと代謝に関する研究をのぞくと、ほとんどが密閉系を用いたもので、その結果も予備的なものが多い。内外の研究の動向に照らし将来を考えるとおよそ次の様になるう。

(I) 核融合炉の開発研究は今後とも継続されるのは確かであり、(生物学的)安全に関する研究が平行して行なわれるべきである。その意味から、トリチウムの生物学的影響に関して本格的に取り組む必要がある。

(II) 一般環境に対する影響を目的とした研究、非密封系を用いた生物学的影響たとえば動物を用いた晩発性効果に関する研究等に着手していく必要がある。

(III) これまでの比較的少量のトリチウムの取扱についての経験を生かし、廃棄物処理の問題をもふくめて、施設・設備の拡充、増・新設をはかる必要がある。

(IV) 内外、とくに大学関係の諸機関、原研等さらには米国等(日米核融合研究協力協定)ほかの

M-41, 135-155, 1982

- (3) Yamada, T., Yukawa, O., Asami, I. and Nakazawa, T. : Radiat. Res., 92, 359-369, 1982

Fibroblastoid colony forming unit (CFU-F) を培養する方法を確立し、トリチウムによる被ばくに備えた。一方、X線によるマウスの骨髓性白血病の発生に血液幹細胞 CFU-C が密接な関連をもつことを証明し、トリチウムによる実験に備えた。

- (2) Hirashima, K., Bessho, M., Hayata, I., Nara, N., Kawase, Y. and Ohtani, M. : Proc. Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics, NIRS-M-41, 85-100, 1982

関連研究チームとの討議、情報交換等に立つて研究を推進して行く必要がある。

(V) 現在、研究体制ほかの面でお不備な点もあるが、次第に改善を加え、内外の要望と期待とに答えたい。なお、現在までの成果のあらましは、日米核融合協力計画 Exchanges A-25 によるワークショップ報文集, Proceedings of the Workshop on Tritium Radiobiology and Health Physics, October 27-28, 1981, Eds., Matsudaira, H., Yamaguchi, T., Nakazawa, T. and Saito, C., NIRS-M-41, 1982., 環境と人体におけるトリチウム研究の諸問題(第9回放医研環境セミナー報文集), NIRS-M-42 を参照されたい。トリチウムの代謝と in vitro のモデル系を用いた生物影響については短期間のうちにかかなりの成果をあげ得たと思う。

謝 辞

研究の計画・遂行に当たり、関連各部の研究者の協力、とくに技術部の支援に深甚な謝意を表します。

V 予算と施設について

I 晩発障害実験棟建設経費（予算内容）について

昭和48年度～昭和49年度の2ヶ年計画で予算化されたが、昭和49年の石油危機による資材等の高騰のため建設期間の延期と経費の不足等から昭和52年度に至る5ヶ年計画に変更せざるを得なかった。次に予算内容を示す。

表1. 晩発障害実験棟新設工事
RC-4 3,114㎡

工事区分	全体計画		48年度	49年度	50年度	51年度	52年度
	数量	金額					
建築	1式	329,639	7,356	192,627	108,222	13,004	8,430
電気設備	〃	144,369	0	27,441	27,414	54,290	35,224
機械設備	〃	222,789	0	15,549	15,535	116,269	75,436
計	〃	696,797	7,356	235,617	151,171	183,563	119,090

I-1 晩発障害実験棟建設準備委員会設置 設置及び経過について

晩発障害実験棟の建設に当り、寺島委員長（特別研究班長）他8名の委員により構成され、技術部技術課を事務局として推進することとなった。この間、委員会会議及び建設省との打合せ協議は延約数百回に亘った。委員会での主な審議内容は次の通りである。

- (1) 用地の選定について
- (2) 用地にある既設物の撤去、移設並びに所内周辺での空間線量について
- (3) 建設計画（平面図）及び規模について
- (4) 石油危機による資材等高騰のため建設を延期せざるを得なくなった事情について
- (5) 新築工事の手順並びに詳細工程等について
- (6) 全棟施設配置図面（規模）の検討
- (7) 建設進行状況並びに予算の状況について
- (8) 最終工事内容及び予算状況について

(9) 建設途中での防災規準変更並びに県、市条例の改正等に伴う工事追加等について
以上の様な経過を経て、昭和53年3月に新棟の完成を見るに至った。

I-2 晩発障害実験棟の概要について

1階：実験に供する購入動物並びに生産動物の検疫及び細菌検査の施設（マウス、ウサギ、モルモット等）及び全棟の空調運転用機械室があります。

2階：発癌、白血病、免疫、細胞のトランスフェクション、染色体、加齢等の研究グループの研究室及び実験施設があります。

3階：トレーサ実験に必要なRI使用施設（主としてRI細胞培養室）並びに実験動物（マウス）のX線照射後の飼育及び処置室があります。

4階：SPFマウス照射実験飼育室（ γ 線照射をしたSPF実験動物の長期飼育観察施設と飼育のための飼料及び諸機器具の清浄滅菌処理施設があります。

屋階：主として2階実験室への蒸溜水供給装置と、4階SPF実験動物飼育区域への使用水（塩素添加水）供給装置施設並びに給気機械室、排気機械（RI特殊排気及び一般排気室）施設があります。

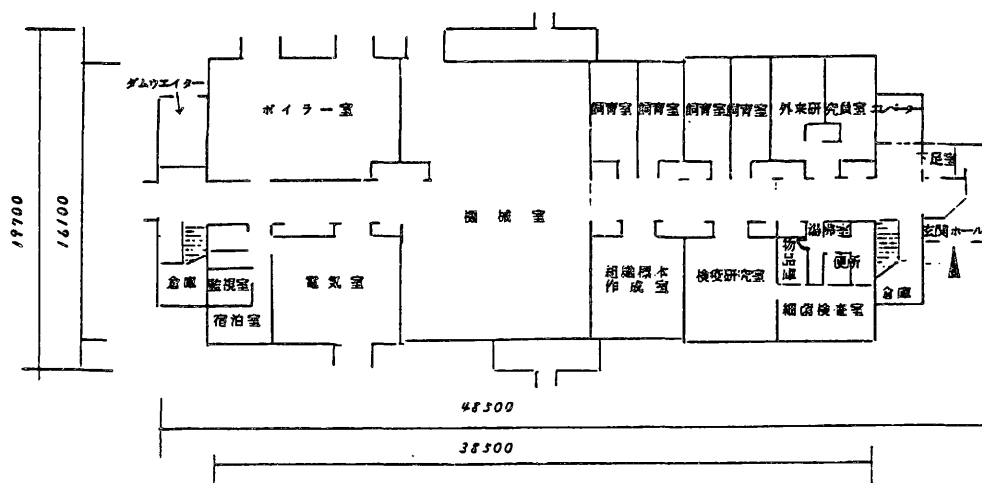
（注）本実験棟におけるマウスの常時飼育数は約19,000匹です。その他ラット、ウサギ、モルモットも飼育します。

I-3 晩発障害実験棟の完成平面図

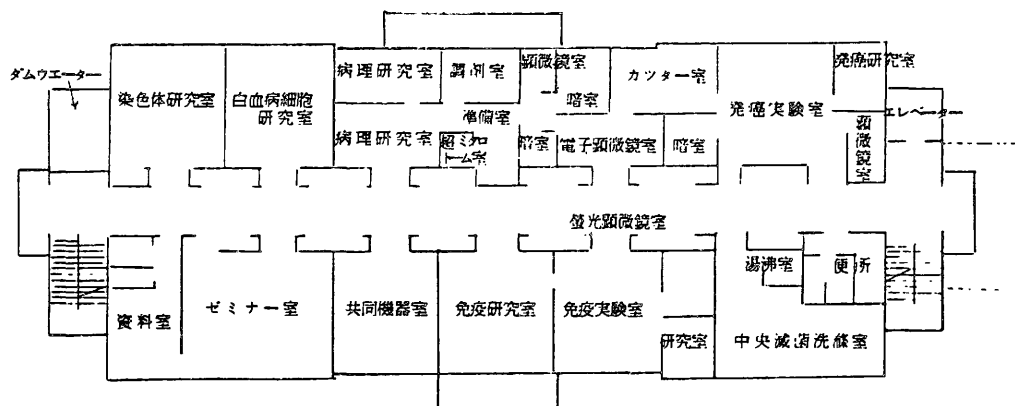
昭和53年3月完成し、棟内の整備等には約1年程度を要した。その後、放射線の低線量影響研究は、益々飛躍的に発展し現在に至っている。また、本研究所における生物領域での動物飼育区域の充実に役立っている。

表 2. 晩発障害実験棟平面図

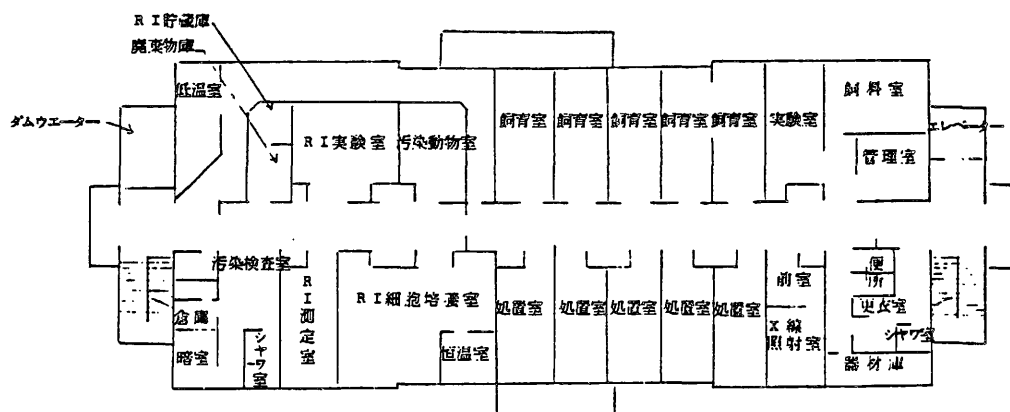
RC-4 3,114 m²



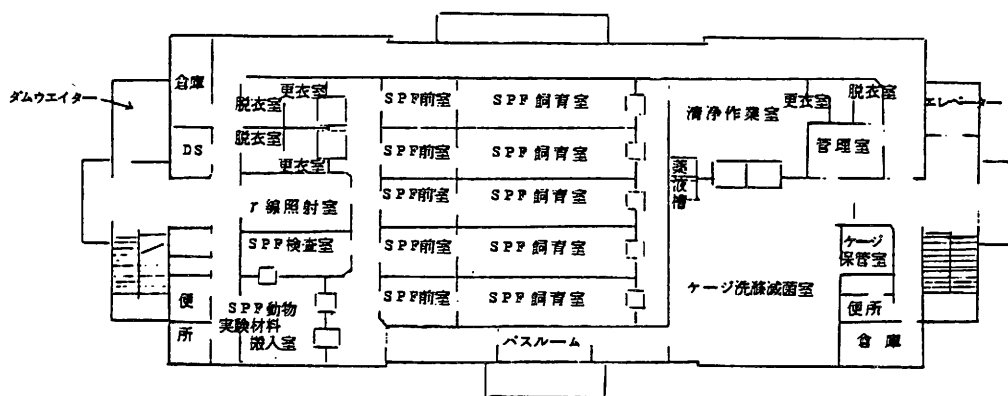
1 階 平 面 図



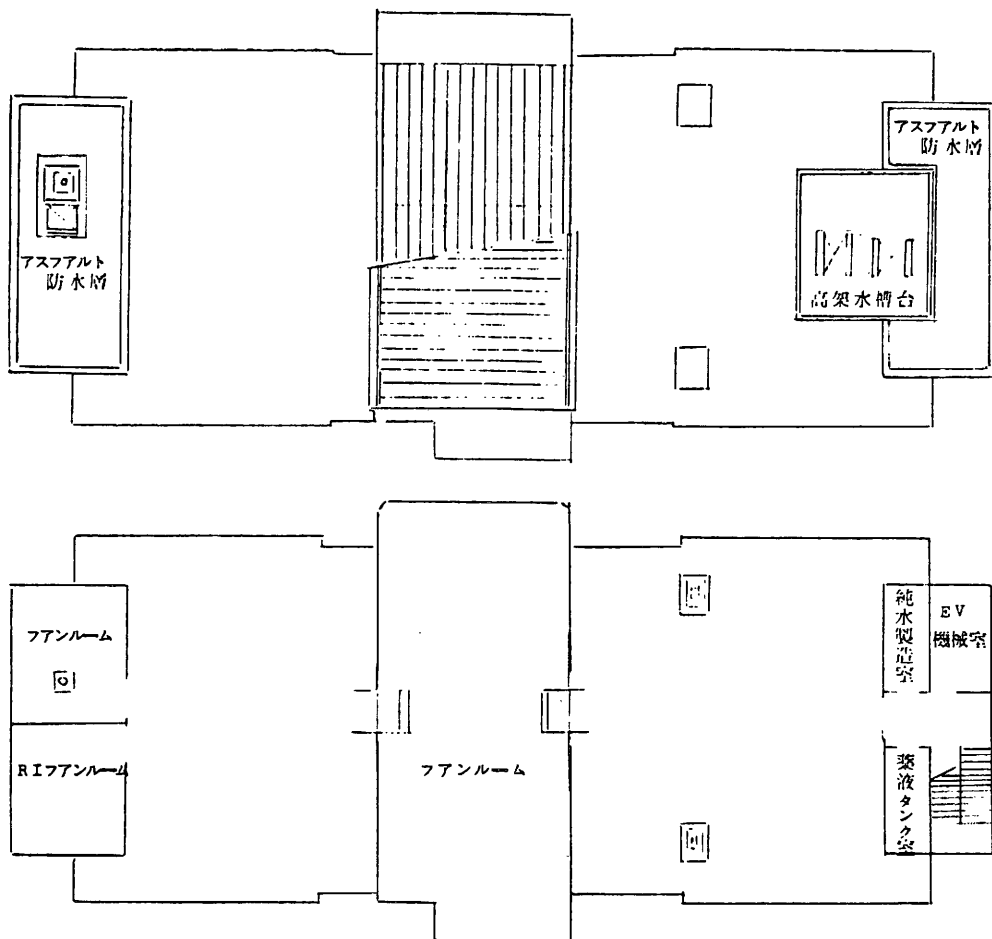
2 階 平 面 図



3 階 平 面 図



4 階 平 面 図



R 階 平 面 図

Ⅱ 霊長類実験棟建設経費（実行内容）について

昭和50年度予算化（サル用長期被曝実験装置）及び昭和51年度予算化（汚物排水処理装置等）を元に昭和52年度より昭和53年度の2ヶ年計画で本実験棟の建設に着手した。建設に当っては、遺伝研究部中井部長を中心に技術課及び管理部の協力をもとに昭和53年4月上旬に完成を見るに至った。次に予算内容を示す。

表 3. 霊長類実験棟(第1 r 線棟)増改築工事
RC-1 217,02 m²

工事区分	全 体 計 画		52年度	53年度
	数量	金 額		
建 築	1 式	千円 31,750	千円 15,550	千円 16,200
電 気 設 備	"	10,560	5,860	4,700
機 械 設 備	"	18,200	12,700	5,500
計		60,510	34,110	26,400

Ⅱ－1 霊長類実験棟の概要について

施設全体を4区域に大別（ヒトからサルへ、サルからヒトへの細菌等の感染度合により区分）し、施設管理を行なっている。

1. A区域

処置室：サルの解剖、臓器の摘出、各種のサルへの処置(精液採取等)、野生入荷ザルの検収作業を行なう室

検査室：細菌検査、サル生体材料の処置、試薬調整を行なう室

検収室：野生入荷ザルの検疫、疾病ザルの隔離するための室

観察室：セシウム137線源の遠隔操作盤、照射実験前及び照射実験後のサルの飼育管理を行なう室

照射室：セシウム137線源の格納装置及び長期微量照射中のサル飼育を行なう室

2. B区域

第1飼育室：検疫終了後のサルの飼育室、サル

の各種検査及び治療、精液採取等の処理を行なう室

第2飼育室：検疫終了後の野生ザルの飼育及び繁殖、育成ザルの飼育管理、交配を行なう室

第3飼育室：サルの交配、繁殖及び育成ザルの飼育管理を行なう室

3. C区域

洗浄室：サルケージ、飼育器具類及び飼育作業衣の洗浄、滅菌、乾燥等並びに汚染廃棄物の滅菌を行なう室

処理槽：サルの糞尿及び飼育室からの排水の処理を行なう室

機械室：処理槽運転のための機械室及び計測器を収納している室

排気室：サル飼育室からの排気用のヘパ及び脱臭用チャコールフィルターを収納している室

4. D区域

実験室：サルを使用して行なう実験室及び検査、試薬調整、各種実験器具を収納している室

培養室：サル精子の検査及び培養、ハムスター精子及び卵子の培養検査並びに試薬調整を行なう室

飼材倉庫：飼育器具類、実験器具類及び消毒薬の保管して置く室

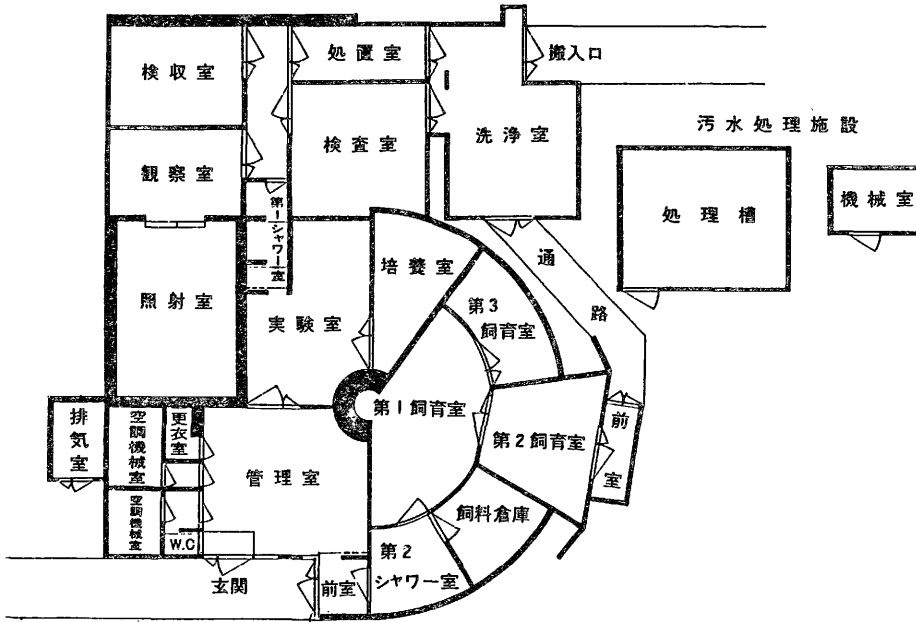
(その他)：サル約50匹を収容することが出来、小規模ながら効率的な運用が期待される。

Ⅱ－2 霊長類実験棟の平面図

昭和54年3月に完成し、棟内の整備等には約1年程度を要した。また、本研究所における生物領域での動物飼育区域の充実に役立っている。

旧第1ガンマ線棟の一部増改築のため、既存施設の転用に難点がある。

表 4. 霊長類実験棟平面図
RC-1 217,02 m²



Ⅲ 内部被曝実験棟建設経費（予算内容）について

昭和54年度～昭和57年度の4ヶ年計画で予算化されたが、着工前に日本で初めての安全審査（施

設建設承認）を受ける研究施設であることから、国、県、市等の諸条例との関係で予想以上に経費が不足したため、本建設計画を変更し、6ヶ年計画として実施せざるを得なかった。次に予算内容を示す。

表 5. 内部被曝実験棟新設工事
SRC-9 13,555 m²

工事区分	全 体 計 画		54年度	55年度	56年度	57年度	58年度	59年度 計画額
	数 量	金 額						
	m ²	千円	千円	千円	千円	千円	千円	千円
建 築	13,555	2,332,130	299,650	696,850	1,006,980	0	307,970	20,680
電 気 設 備		1,030,200		108,900	73,600	563,500	0	284,200
機 械 設 備		1,870,300		254,100	169,400	1,270,500	85,100	91,200
プラント設備 及び関連施設		3,094,600			181,800	217,796	1,453,052	1,241,952

Ⅲ－１ 内部被曝実験棟建設・運営準備委員会の設置及び経過について

内部被曝実験棟の建設に当り、昭和54年4月安本委員長（昭和57年6月より市川委員長）他11名の委員により構成され、技術部技術課及び障害基礎研究部内部被曝実験準備室（昭和57年4月より内部被曝研究部松岡部長）を事務局として推進することとなった。委員会は現在も開催進行中で、これまで延18回開催されている。この間、建設省及び設計会社と綿密な打合せ、協議を行なっている。さらに、本実験棟の基本設計が完成し、核燃料等規制法に基づく安全審査を経て施設建設の承認を受けた昭和50年春に周辺居住地区の住民に対し、延5回に渡り説明会を開催した。

委員会での主な審議内容は次の通りである。

1. 用地の選定について
2. 施設設計（平面図）及び規模について
3. 核燃料等規制法に基づく法的手続きについて
4. 建設進行状況並びに予算について
5. 放射性廃棄物処理計画について
6. 安全性に関する評価について
7. 実験棟の運営準備に関する事項について

以上の様な経過を経て、工事は昭和58年度現在進行中であり、昭和60年3月末に完成が予定されている。

内部被曝実験棟の概要について

地下1階：空調用の熱源機械室、廃棄物処理設備、放射性廃棄物保管庫及び管理区域用排気機械室が設置されている。熱源機械室の床下は、冷温水貯槽となっています。

中地階：廃棄物処理設備の制御室、棟内設備の集中監視装置機械室及びハロン消火ポンプ室がある。

1階：研究室、実験室、会議室、棟内設備の集中監視制御を行なう中央管理室及び全棟の受電設備室が設置されています。

2階：アイソトープ実験に必要な各種実験室、小型実験動物（マウス、ラット、ウサギ等）の飼育室、SPFマウス飼育室、低温実験室及び排気フィルター室、給排気機械室があります。

3階：2階への給排気ダクト、電気、給排水配管等を収容するメカニカルフロアとなっ

ています。また、フロアの一角にサル検査室があります。

4階：アイソトープ等を吸入投与する吸入実験室、アイソトープ投与直後の動物を飼育する代謝室、解剖室等の病理学関係実験室、電子顕微鏡室及び排気フィルタ室、給排気機械室があります。

5階：3階と同様のメカニカルフロアで、一角に工作室があります。

6階：ビーグル犬を繁殖、育成するために必要な各種飼育室、動物管理室等がフロアの半分を占め、残り半分には、実験中のビーグル犬飼育室、組織培養実験室、犬へのアイソトープ投与室、臨床検査室、X線検査室があります。

7階：6階のためのメカニカルフロア及び機械室となっています。

屋上：エレベータ機械室、計装用圧縮空気源室、排気モニター室及びフード用排気ファン、空調設備屋外機等が設置されています。

（その他）規模：地下1階、地上8階

床面積：13,555㎡

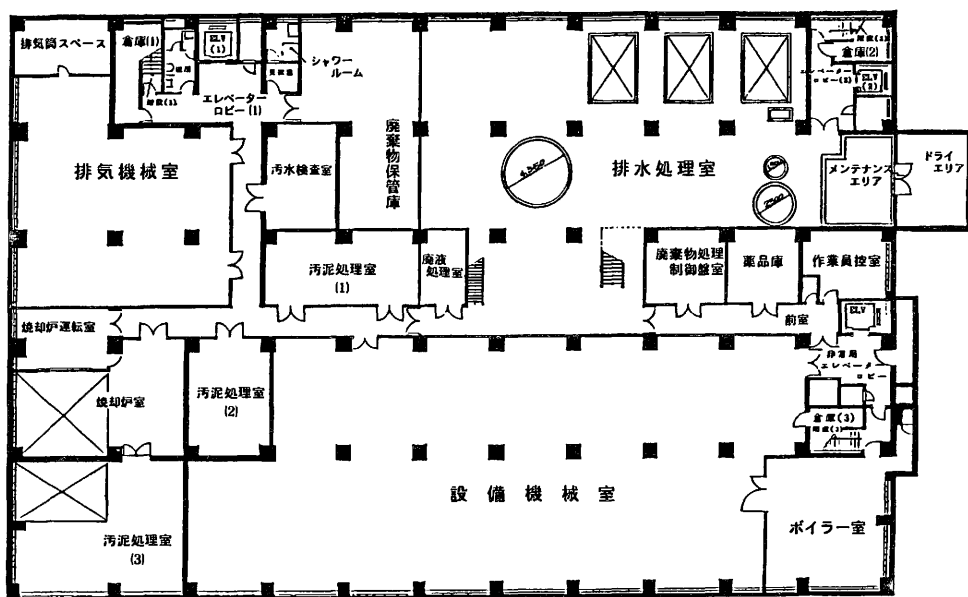
高さ：29.7m

構成：鉄骨鉄筋コンクリート造

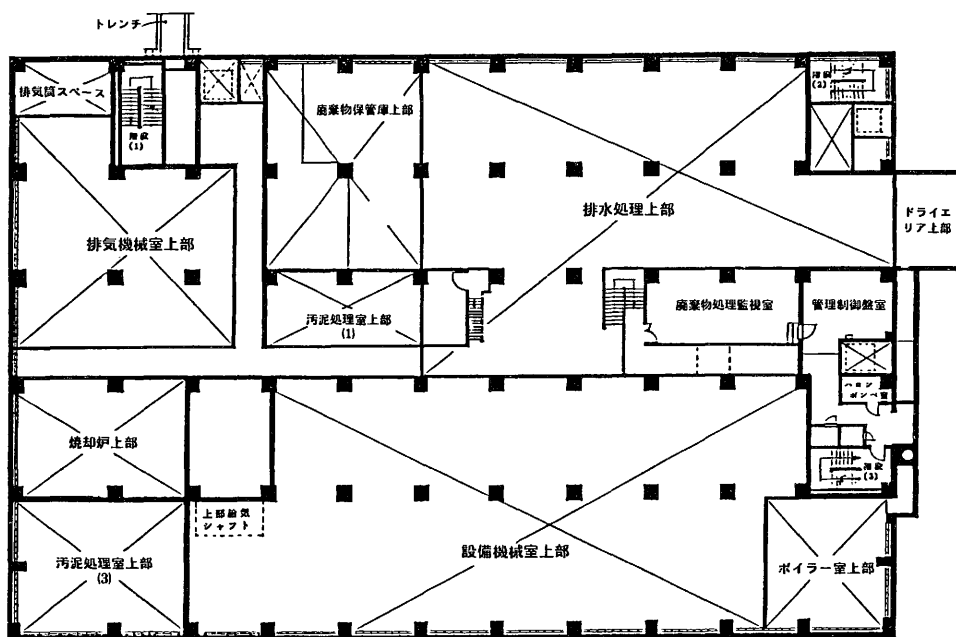
耐震性：耐震Bクラスで設計

Ⅲ－２ 内部被曝実験棟の平面図

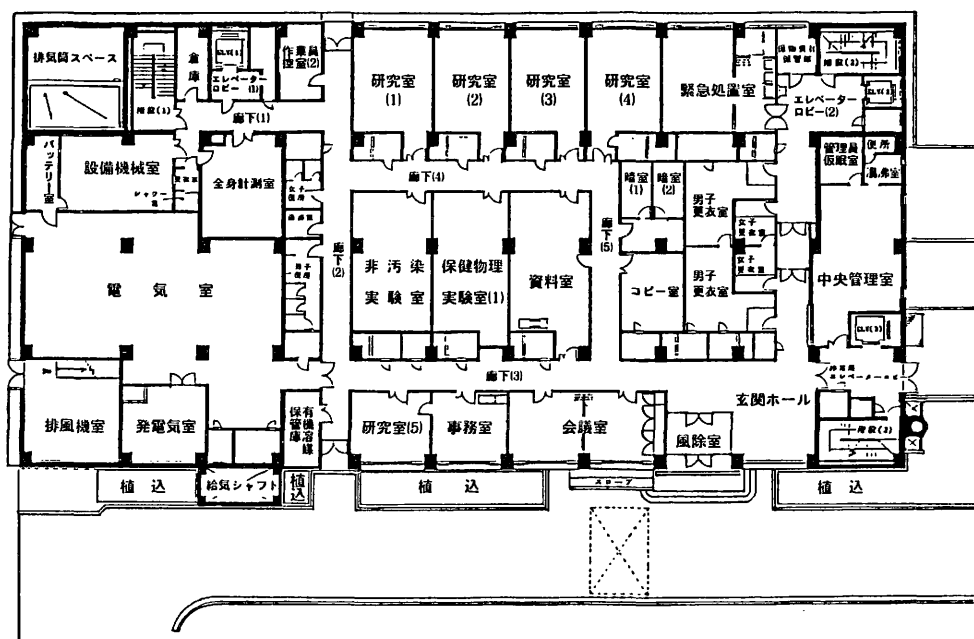
昭和58年6月に1階以上がほぼ完成し、1部の使用を昭和58年10月から開始した。本実験棟の完成によって、今後の内部被曝影響研究が飛躍的に発展することが期待される。また、本研究所における放射線管理区域内動物飼育の充実に役立つものと期待される。



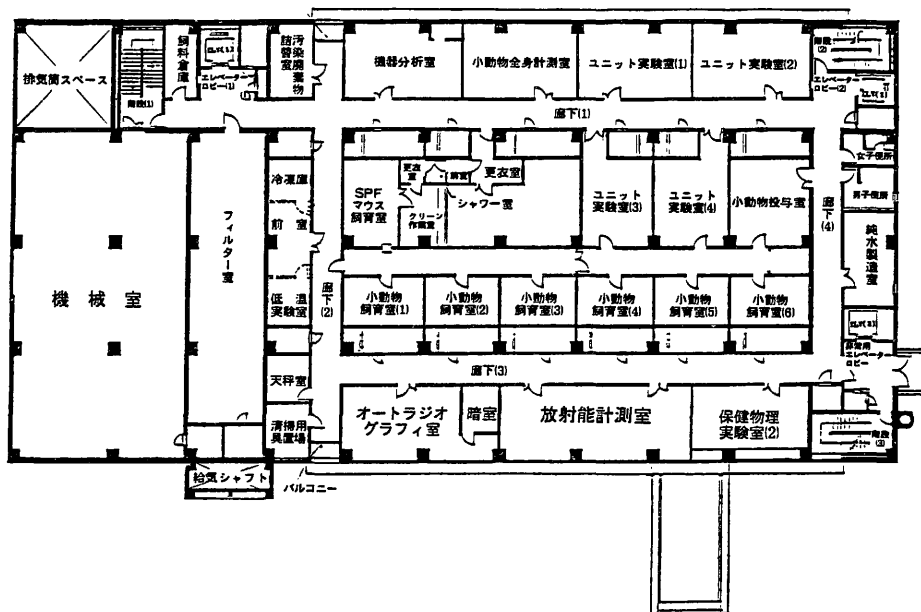
地下1階平面図



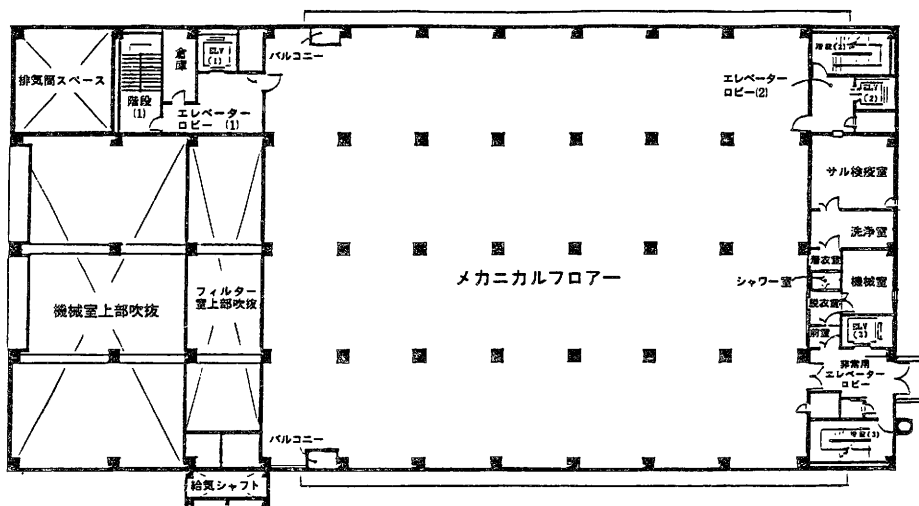
中地階平面図



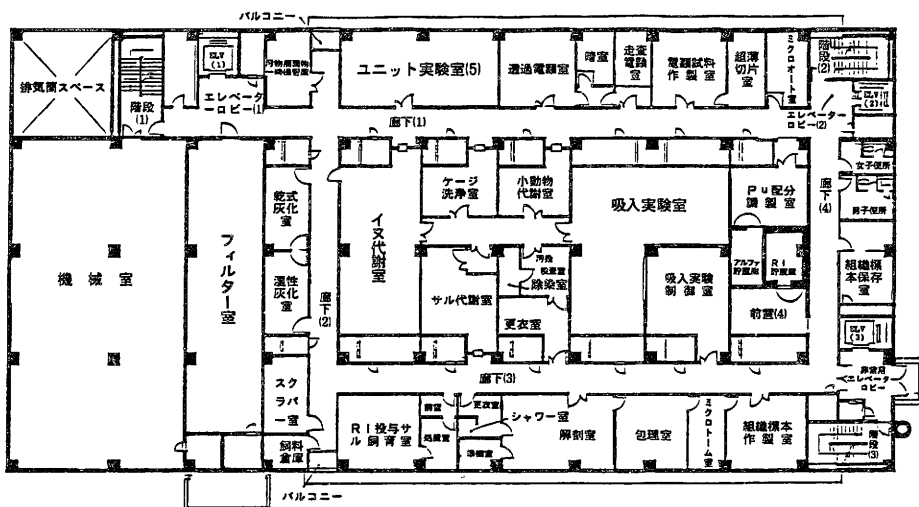
1 階平面図



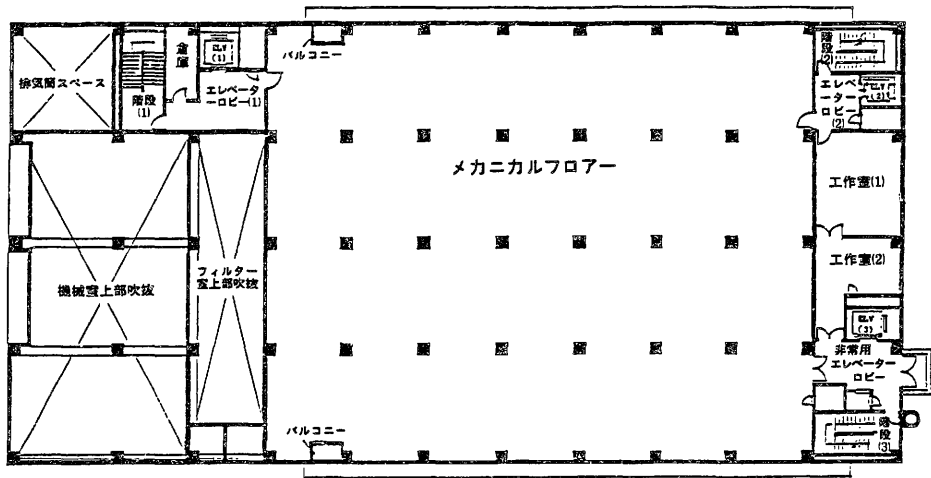
2 階平面図



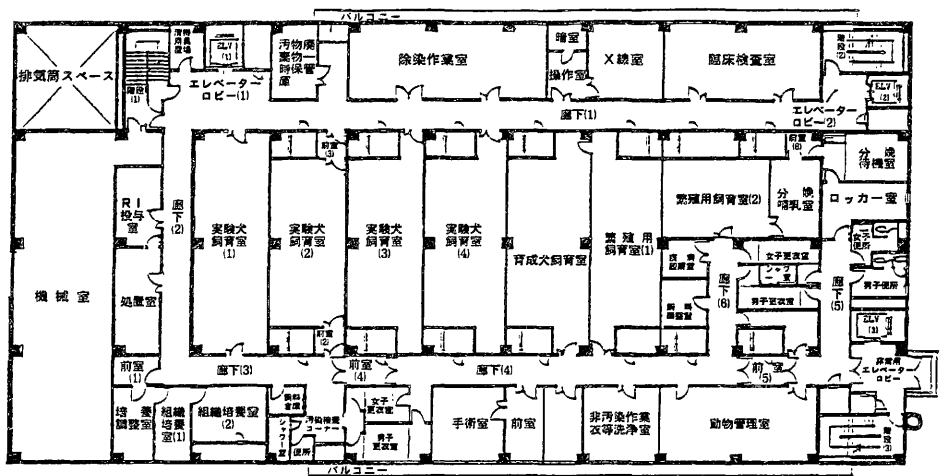
3 階平面図



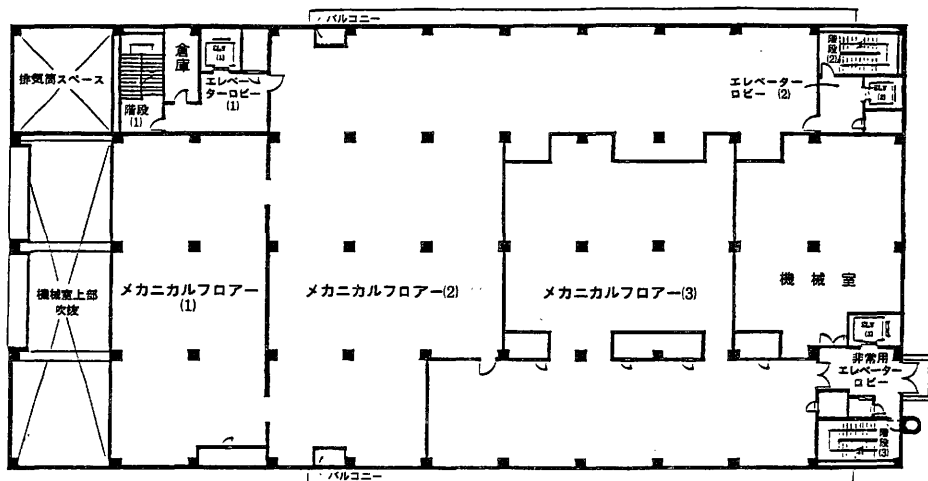
4 階平面図



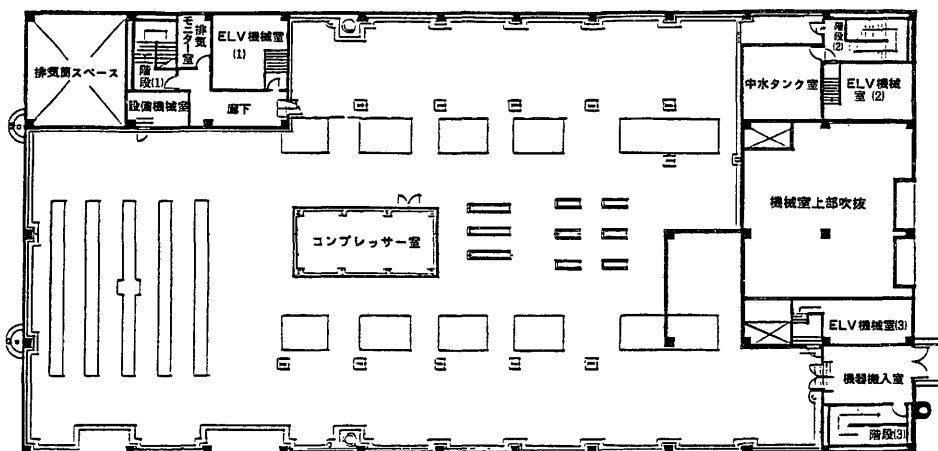
5 階平面図



6 階平面図



7 階平面図



8 階平面図