

平成29年度

文部科学省 国家課題対応型研究開発推進事業  
英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業

【テーマ2】放射線影響に係る基礎基盤研究  
放射線影響モデル動物を利用した  
生物影響解明のための多元的アプローチ

弘前大学

東北大学

新潟大学

北海道科学大学

量研機構・放医研

三浦富智・吉田光明\*・葛西宏介・有吉健太郎\*

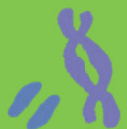
鈴木正敏・篠田壽・木野康志・岡壽崇\*

山城秀昭

中田章史

柿沼志津子・飯塚大輔・尚奕・鶴岡千鶴

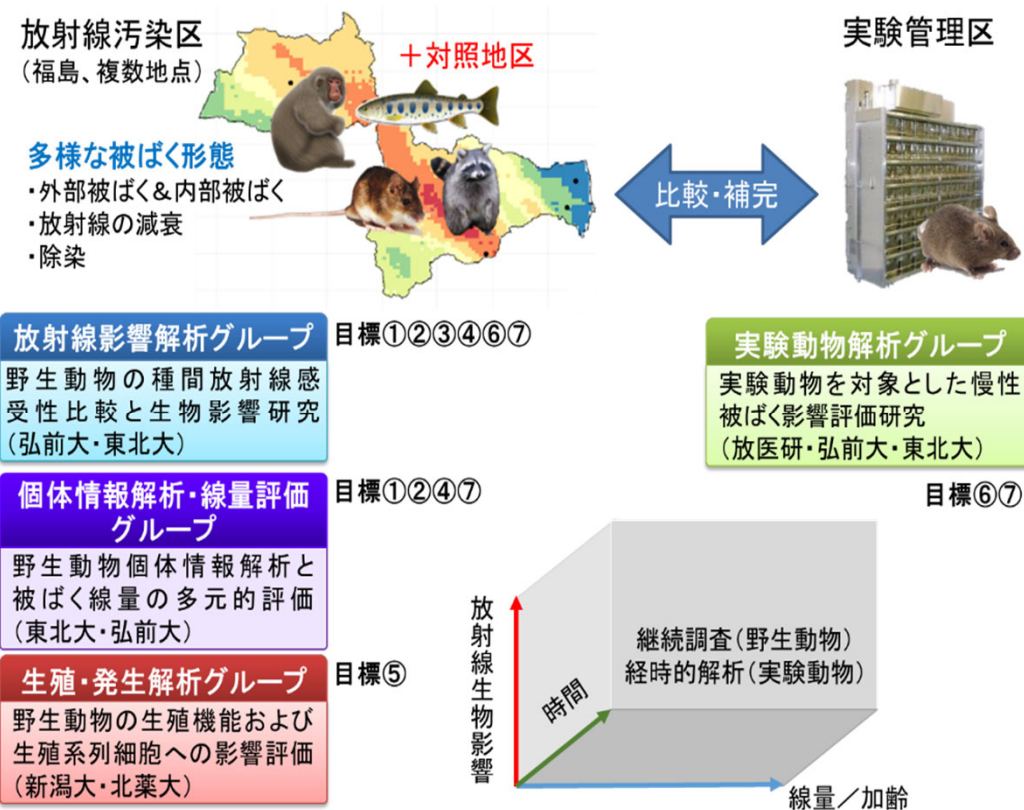
\*採択時の所属



# 研究目標

2011年から採取・保存してきた生体試料を有効活用するとともに継続的な調査を行い、放射線汚染地域に生息する野生動物（アカネズミ、ニホンザル、アライグマ、ヤマメ）と実験マウスを比較し、多元的な生物影響解析を行う。

- ① 生物試料の採取と線量評価
- ② 低線量慢性被ばくによる酸化ストレス応答
- ③ 生物種間の放射線感受性比較
- ④ DNAおよび染色体損傷比較による放射線応答の解明
- ⑤ 生殖・受精能に及ぼす影響の解明
- ⑥ 放射線被ばく影響からの回復メカニズム解析
- ⑦ 物生体試料・樹立細胞株のアーカイブ化





# ①線量評価：IP法による内部被ばく解析

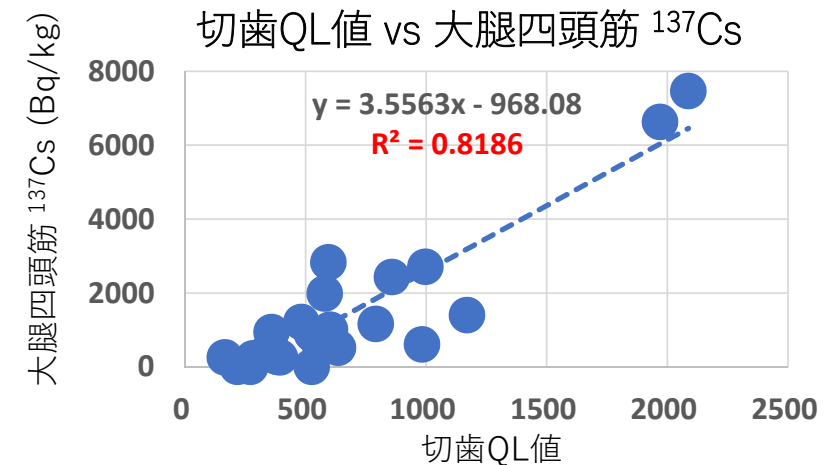
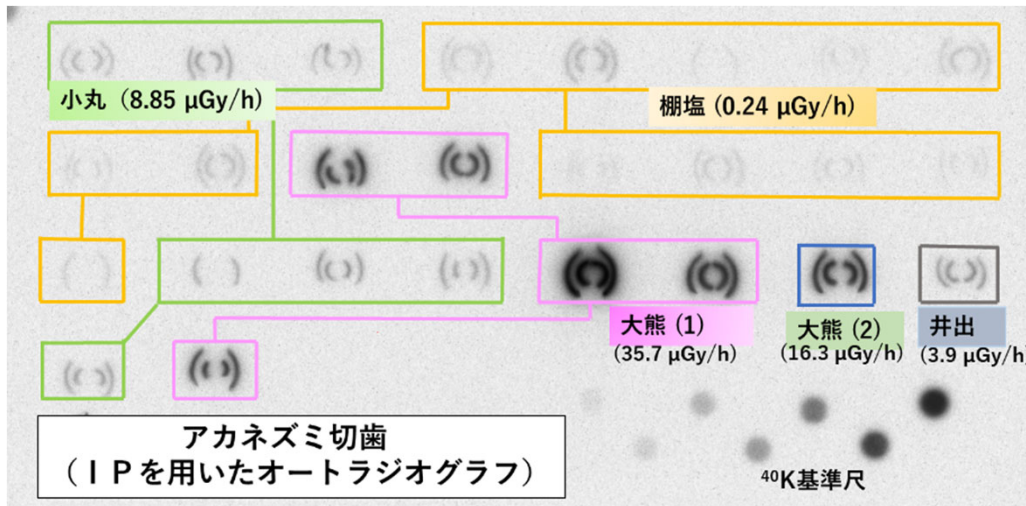
アカネズミ顎骨



摘出した上下顎切歯



棚塩 2017秋-2018春

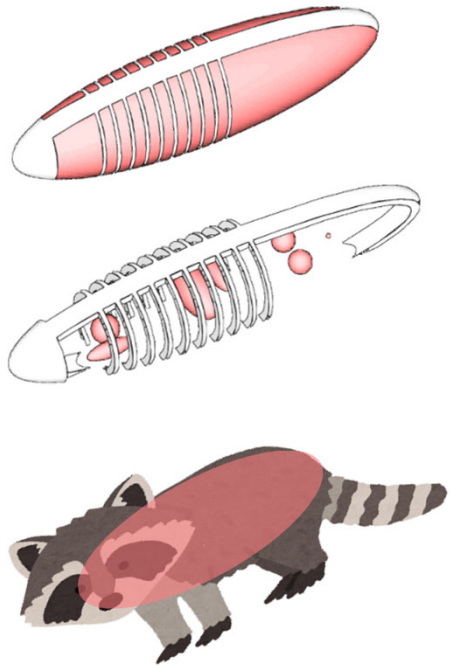


本手法を応用し、数mgの試料の線量評価が可能な方法を開発した。

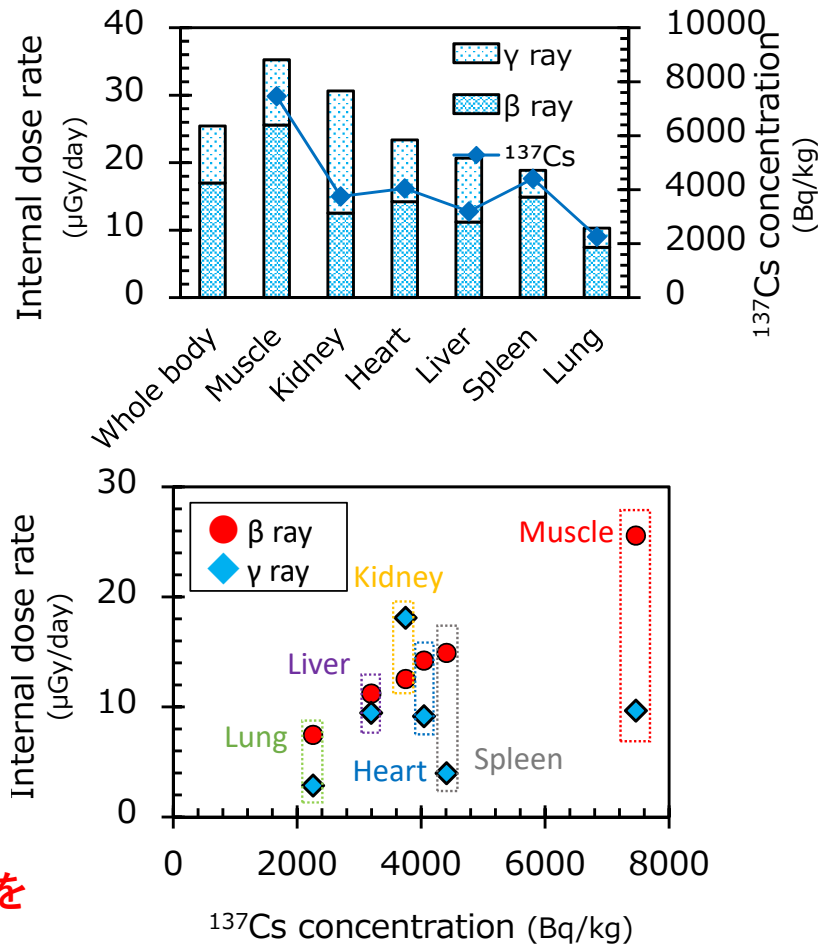




# ①線量評価：内部被ばく線量の推定（アライグマ）

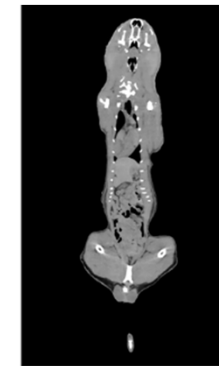


アライグマのファントムを  
新たに構築

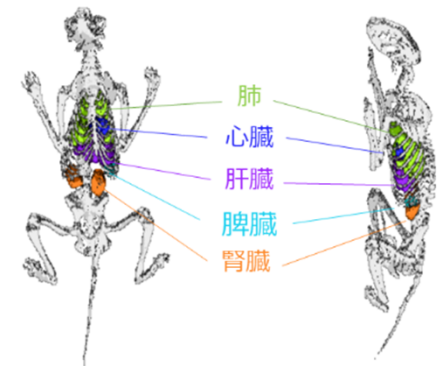


## 精密なモデルでの計算

精密に被ばく量を推定するためにアライグマ2頭（体重:4.20 kg, 6.34 kg）の**ボクセルファントム**を作製し、数値シミュレーションにより被ばく線量を推定



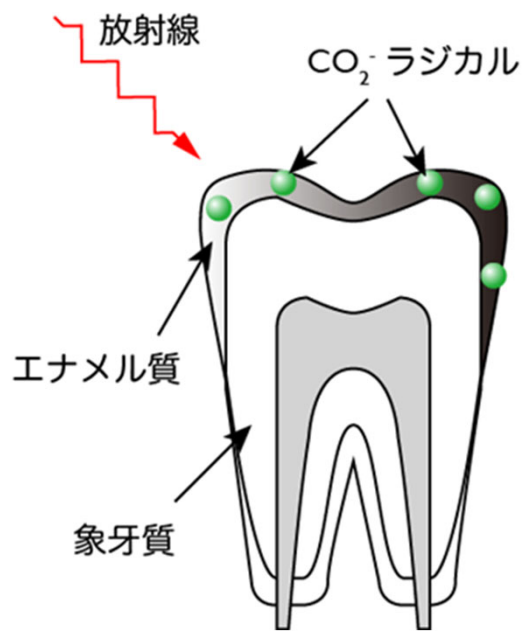
アライグマX線CT画像



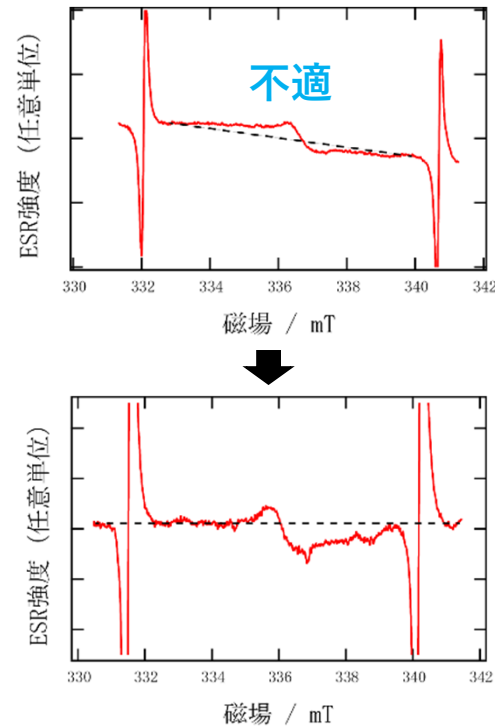
ボクセルファントム



# ①線量評価：外部被ばく線量の推定（アライグマ）

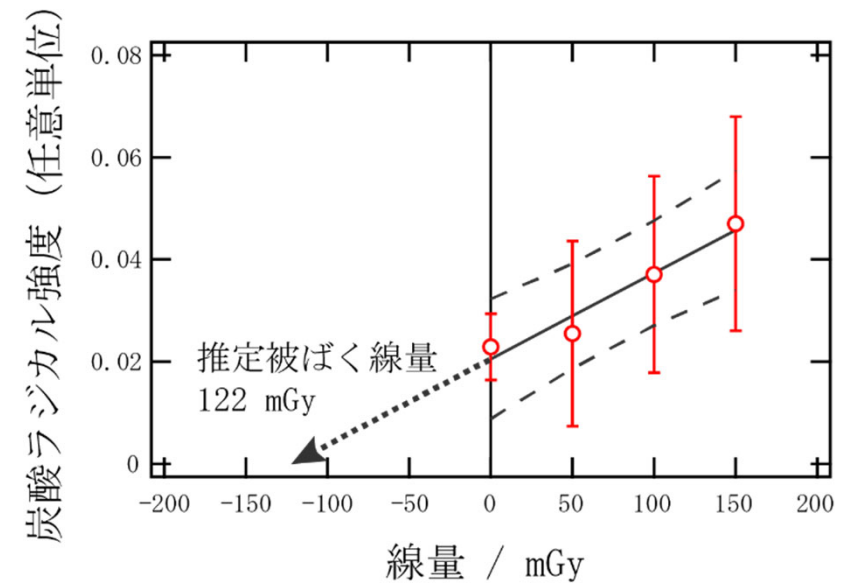


ヒトで用いられるエナメル質の炭酸ラジカル測定をアライグマに適用



複数回の化学処理による  
**ESRスペクトルの改善**  
(アライグマ)

## アライグマの歯におけるESR検量線

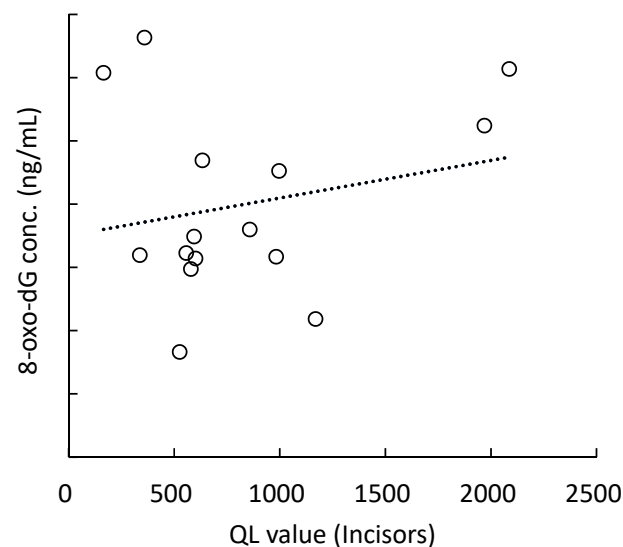
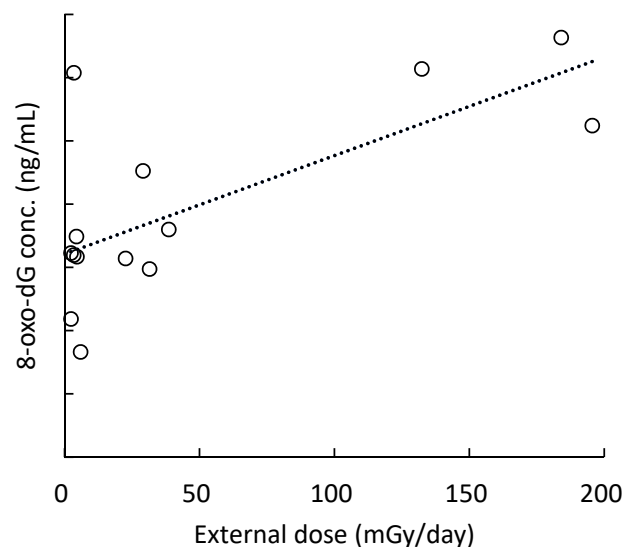


**より低い線量評価が可能になった**

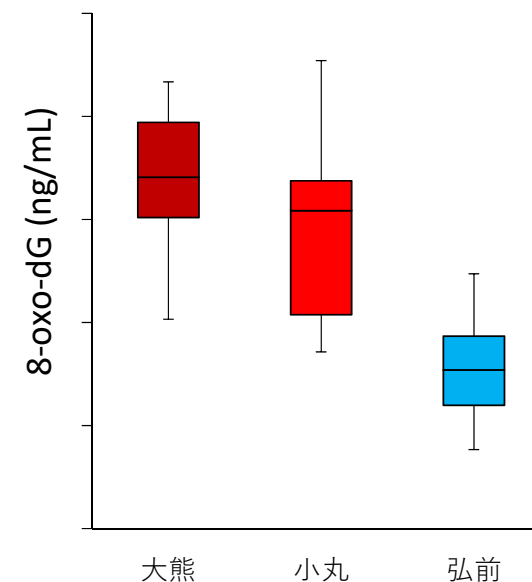


## ②低線量慢性被ばくによる酸化ストレス応答 野生動物肝臓中の酸化ストレスマーカー8-oxo-dG解析

アライグマ肝臓中の8-oxo-dG濃度



アカネズミ肝臓中の8-oxo-dG濃度



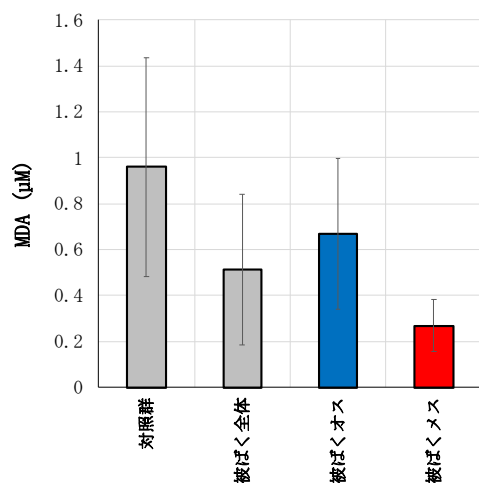
酸化ストレスマーカーである8-oxo-dGのアライグマ肝臓中の濃度は、硬組織のQL値および推定外部被ばく線量と正の相関を示した。また、アカネズミの肝臓においても、空間線量の違いを反映していた。



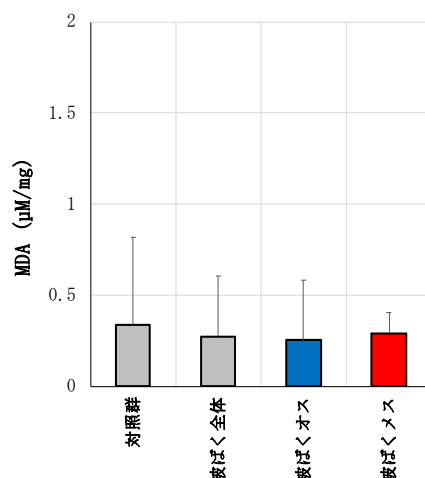
## ②低線量慢性被ばくによる酸化ストレス応答 アライグマにおける血液、組織中の酸化ストレスマーカー解析

### 酸化ストレス状態（MDA濃度）

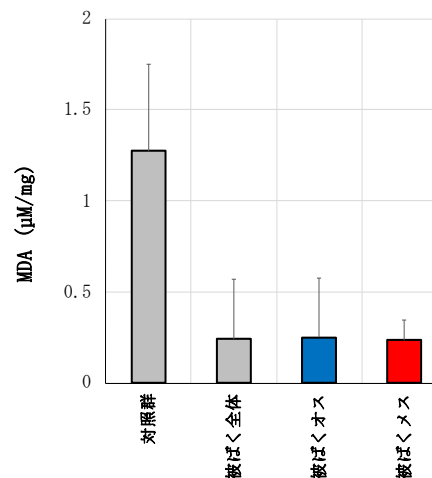
血漿



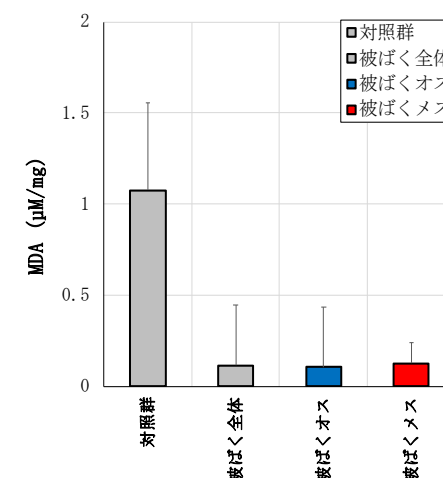
大腿筋



肝臓



腎臓

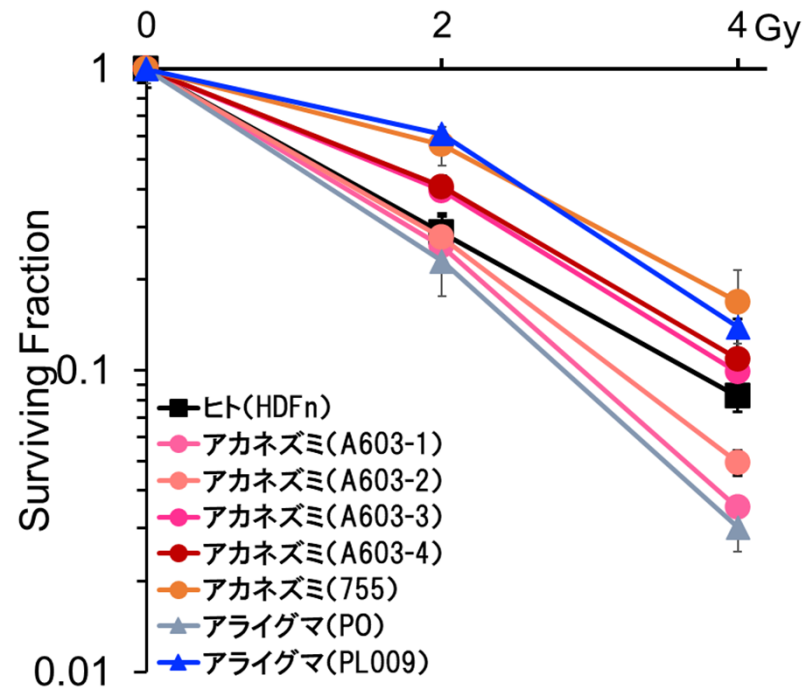


被ばく群でMDA濃度が低下傾向を示す

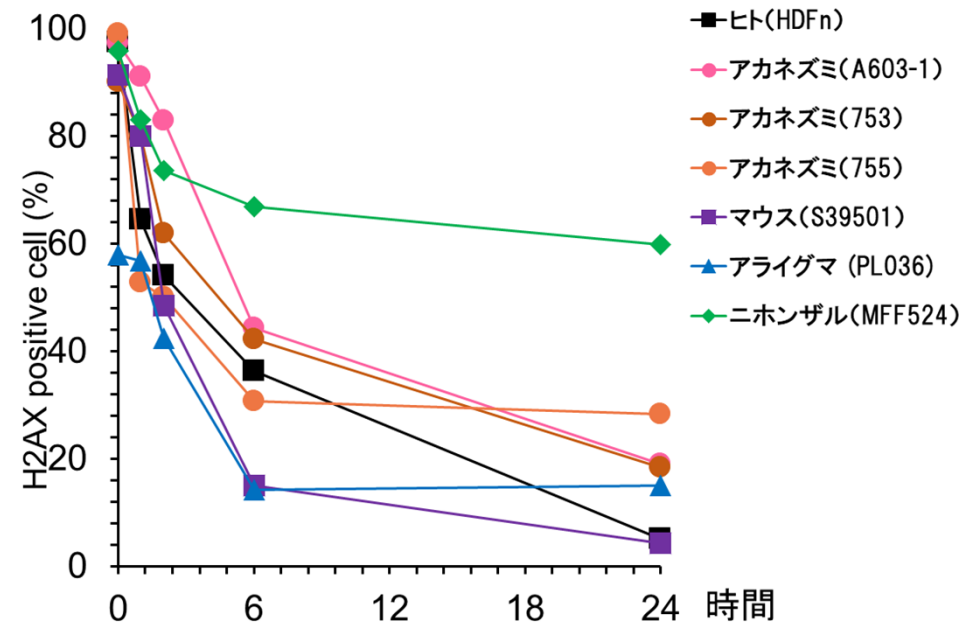


### ③生物種間の放射線感受性比較

#### コロニー形成法による感受性試験



#### DNA損傷 ( $\gamma$ H2AX) 消失速度



種間で放射線感受性が異なるが、種間の差以上に個体差が大きい



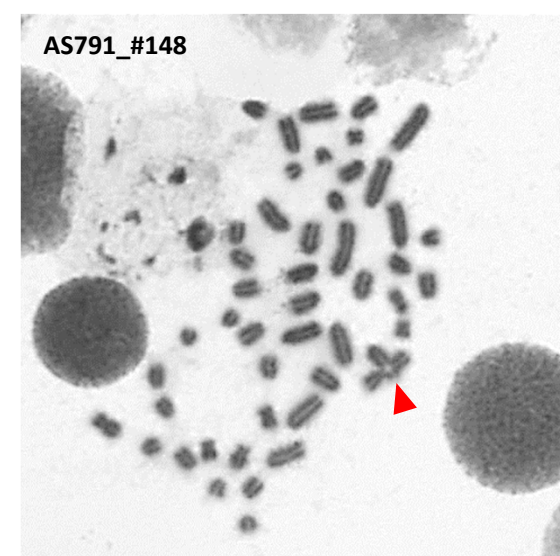
# ④DNAおよび染色体損傷比較による放射線応答の解明

野生動物（アカネズミ・アライグマ）における不安定型染色体異常解析

## アライグマ

| Comparison                     |                     | r       |
|--------------------------------|---------------------|---------|
| Frequency of cells with CA vs. | QL value (incisors) | 0.0707  |
|                                | QL value (Tibia)    | -0.0400 |
|                                | Cs-137 activity     | -0.1473 |
|                                | External dose       | 0.0224  |
|                                | 8-oxo-dG conc.      | 0.2454  |
| Dic frequency vs.              | QL value (incisors) | 0.4363  |
|                                | QL value (Tibia)    | 0.6107  |
|                                | Cs-137 activity     | 0.9327  |
|                                | External dose       | 0.4724  |
|                                | 8-oxo-dG conc.      | -0.1500 |
| ace frequency vs.              | QL value (incisors) | 0.4187  |
|                                | QL value (Tibia)    | 0.4358  |
|                                | Cs-137 activity     | -0.1612 |
|                                | External dose       | -0.2454 |
|                                | 8-oxo-dG conc.      | -0.5224 |
| chtg frequency vs.             | QL value (incisors) | -0.1442 |
|                                | QL value (Tibia)    | -0.1697 |
|                                | Cs-137 activity     | -0.2532 |
|                                | External dose       | 0.3938  |
|                                | 8-oxo-dG conc.      | 0.3198  |
| chtb frequency vs.             | QL value (incisors) | -0.2311 |
|                                | QL value (Tibia)    | -0.1634 |
|                                | Cs-137 activity     | 0.3022  |
|                                | External dose       | 0.2057  |
|                                | 8-oxo-dG conc.      | 0.0728  |

## アカネズミ



大熊町の空間線量率： $>30 \mu\text{Gy/h}$ （捕獲地域付近では $>100 \mu\text{Gy/h}$ ）  
しかし、二動原体染色体（Dic）は観察されない

一方、大熊町のアカネズミ捕獲地点より空間線量が低い地域で捕獲されたアライグマでは、Dicが観察された。

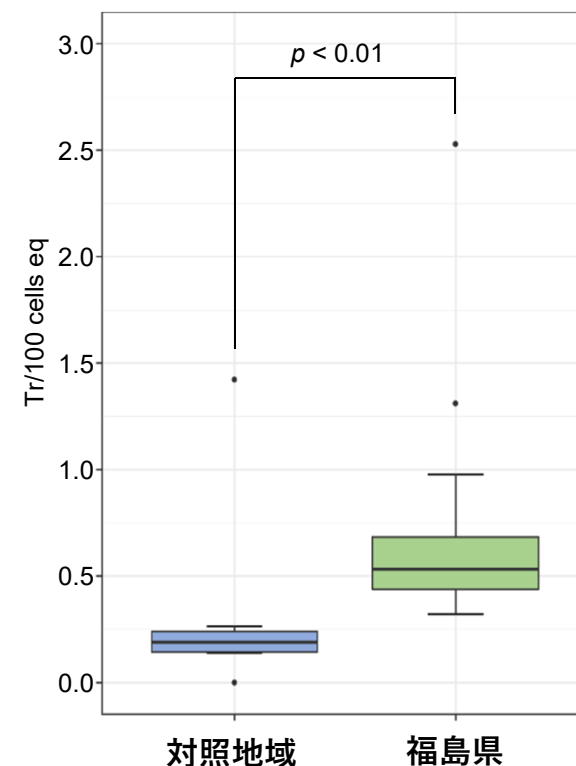
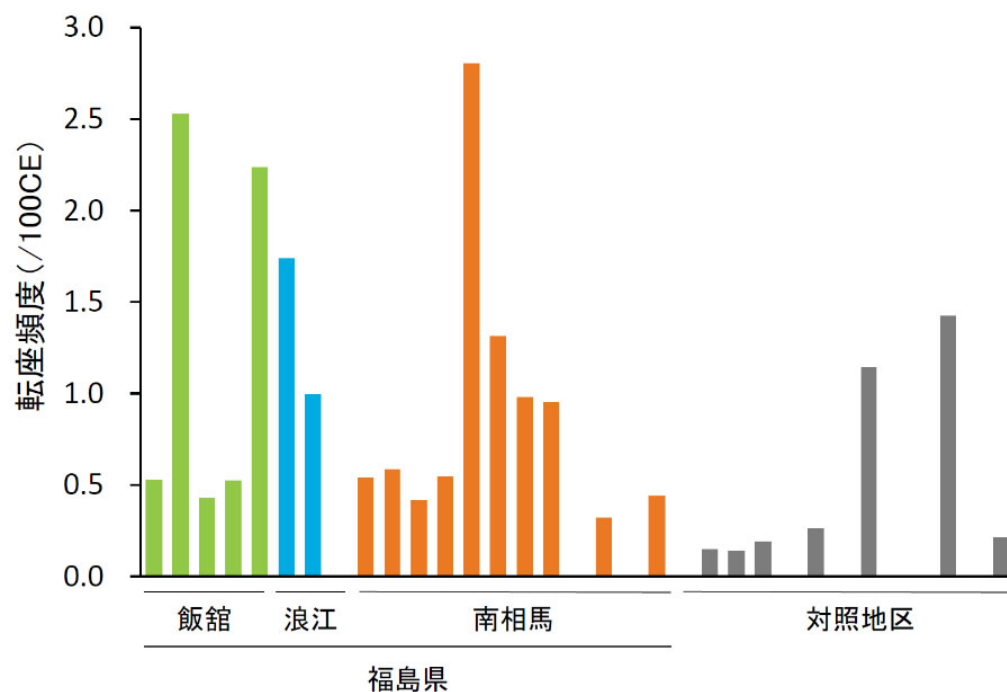
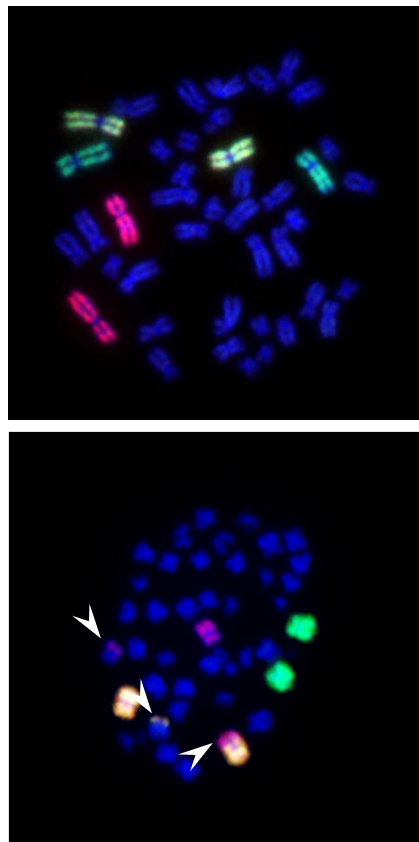
**Dic誘導において種間で差が認められる**





## ④DNAおよび染色体損傷比較による放射線応答の解明

野生動物（ニホンザル）における安定型染色体異常（転座）解析

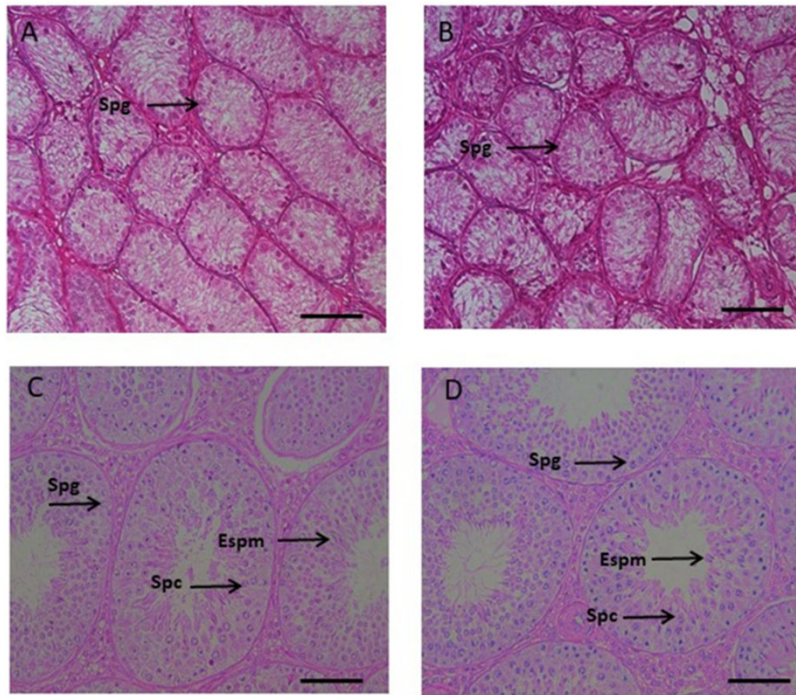


福島県産ニホンザルのリンパ球における染色体転座頻度は対照地域に比べて有意に高い





## ⑤生殖・受精能に及ぼす影響の解明 アライグマにおける精巣の成熟と精子形成

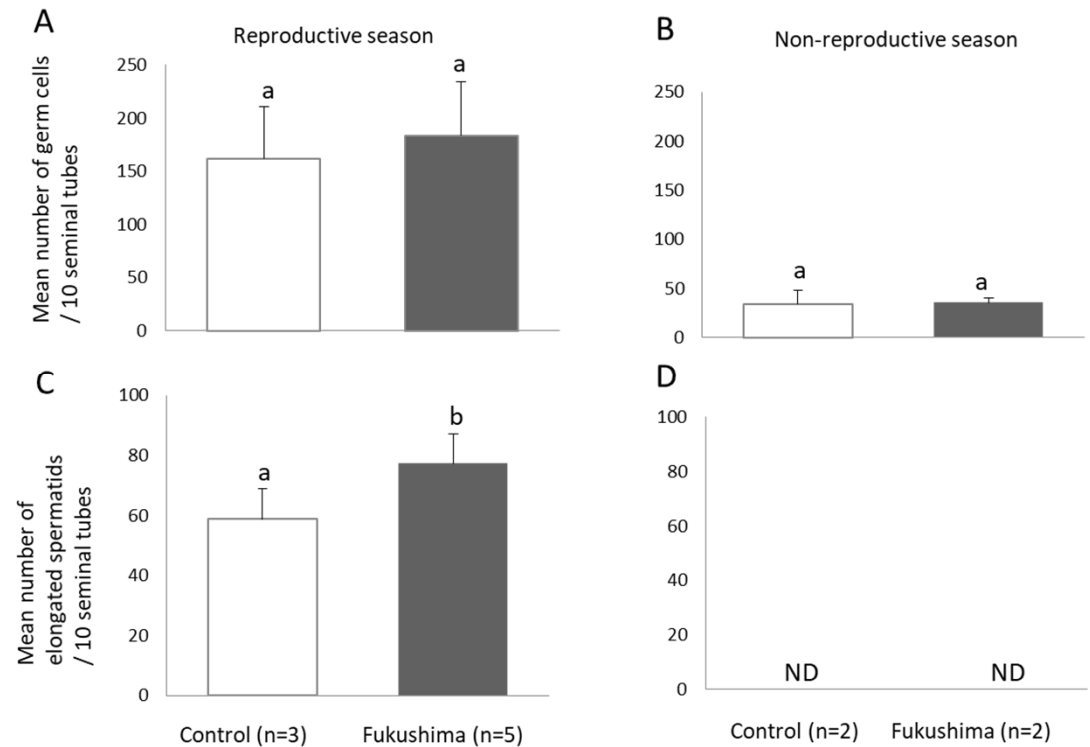


非繁殖期及び繁殖期のアライグマ精巣の染色像

非繁殖期：(A)弘前及び石狩 (B)福島

繁殖期：(C)弘前及び石狩 (D)福島

Spg, 精原細胞; Spc, 精母細胞; Spm, 円形精子細胞;  
Espm, 伸長精子細胞. Scale bar = 100  $\mu$ m



非繁殖期及び繁殖期のアライグマ精巣の精細管内の精細胞数と伸長精子細胞の割合

(A)繁殖期の精細胞数の割合 (B) 非繁殖期の精細胞数の割合

(C)繁殖期の伸長精子細胞数の割合 (D) 非繁殖期の伸長精子細胞数の割合

$p < 0.05$  (a vs. b)

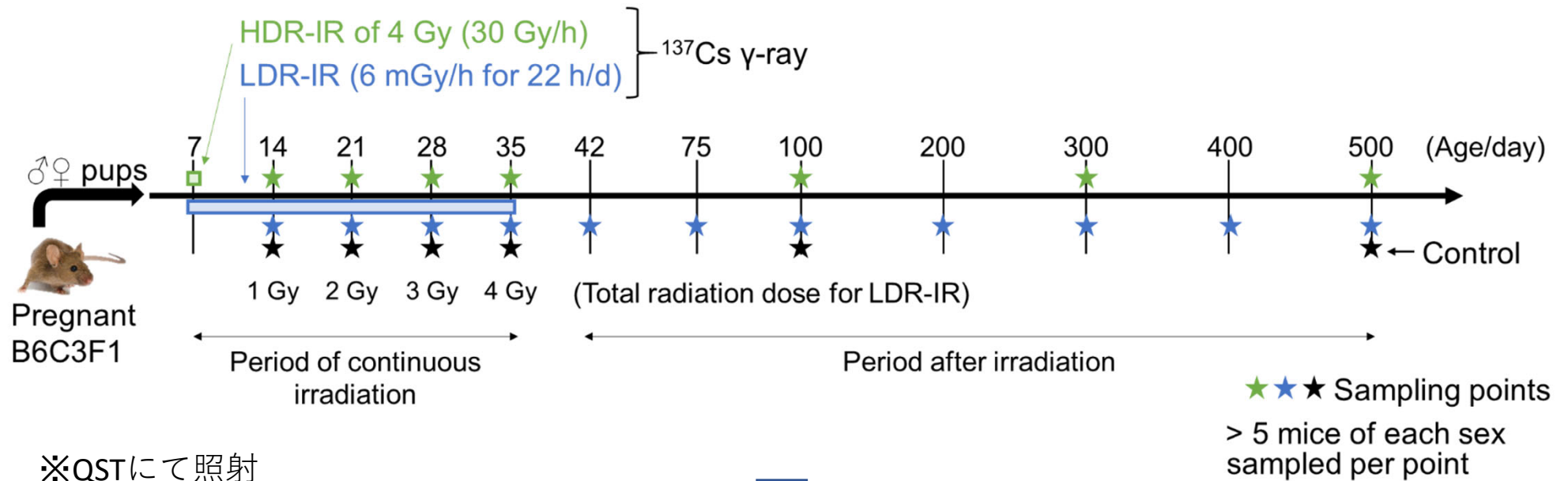
**福島県で繁殖期に捕獲されたアライグマでは、精細管内の伸長精子細胞の割合が有意に増加した。**



Miura T, Hirosaki Univ.



## ⑥実験動物を対象とした慢性被ばく影響評価研究



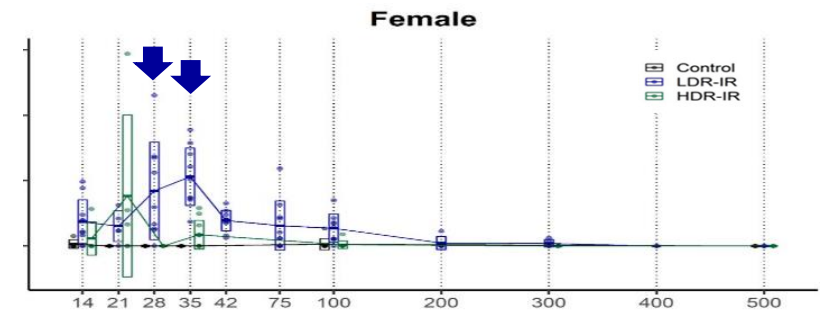
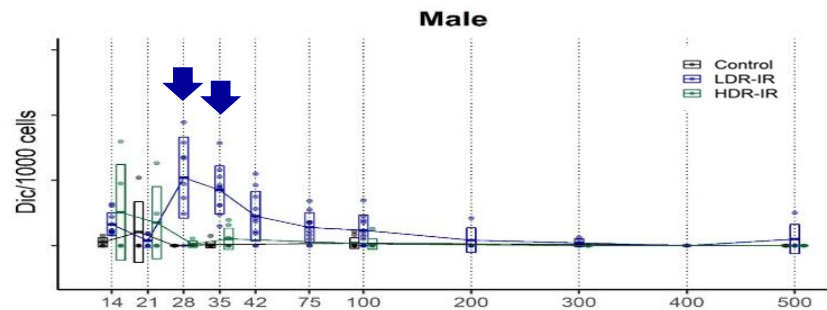
染色体異常の動態解析、酸化ストレス応答解析  
生殖巣の組織学的解析・精子の機能評価・DNA修飾解析・遺伝子発現解析  
病理組織学的解析・発生腫瘍のDNA変異解析



# ⑥DNAおよび染色体損傷比較による放射線応答の解明

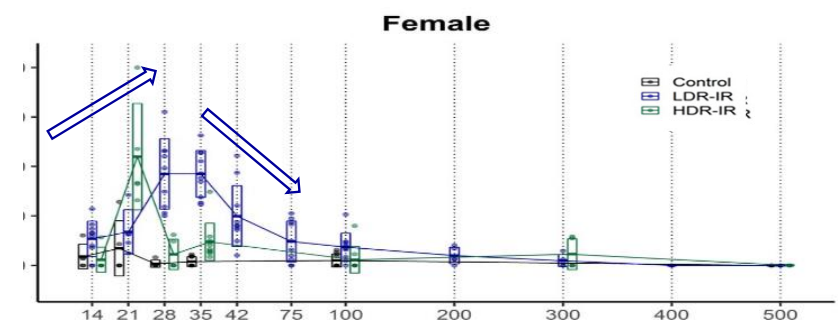
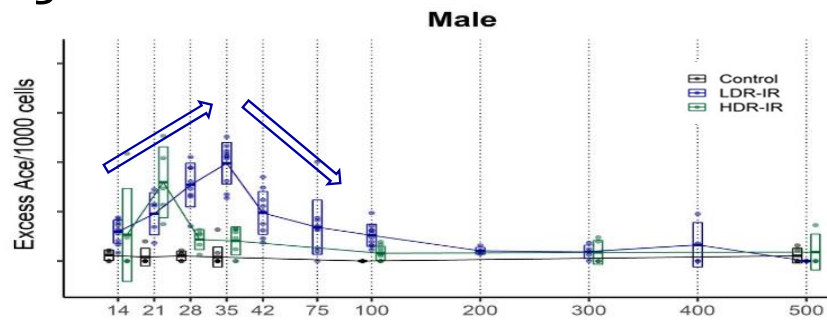
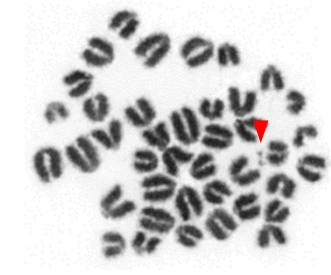
## 実験照射マウスにおける不安定型染色体異常解析

### 二動原体染色体頻度の変化



- Dic頻度：LDR-IR > HDR-IR
- LDR-IRマウスにおいて28および35日齢でDic頻度が増加し、その後減少した。

### Excess acentric fragment の変化

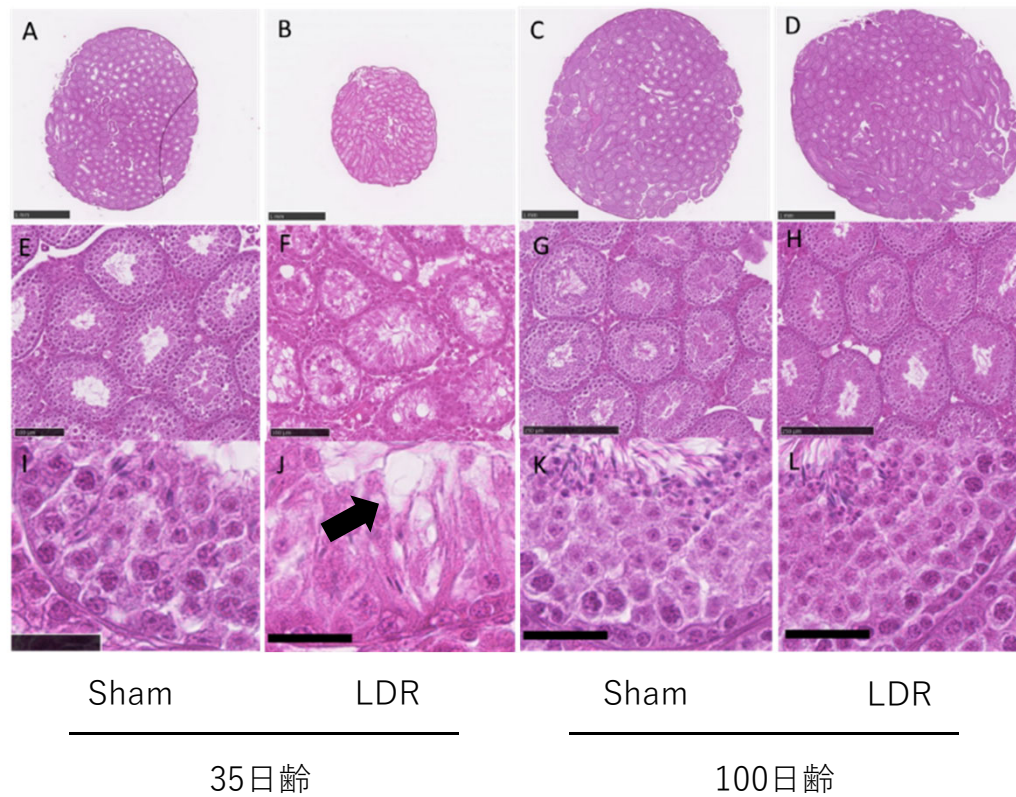


- 過剰染色体断片：LDR-IR > HDR-IR
- LDR-IRマウスにおいて、連続照射期間中は過剰染色体断片頻度が増加し、照射中止後減少した。

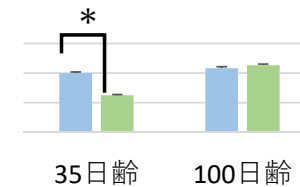




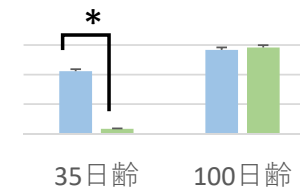
## ⑥生殖・受精能に及ぼす影響の解明 実験照射マウスにおける精巣への影響



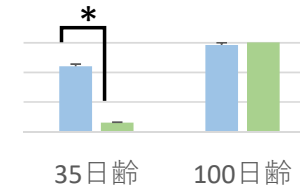
精巣管直径 ( $\mu\text{m}$ )



総生殖細胞数 (個)



総細胞数 (個)



■ Sham ■ LDR \* $p < 0.05$

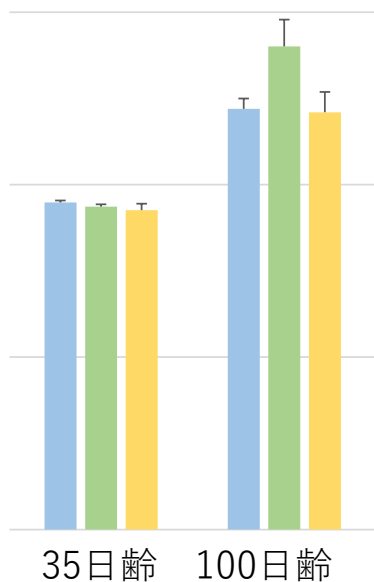
低線量照射35日齢では、分化段階の生殖細胞が減少していたが、セルトリ細胞数は増加傾向にあった。  
100日齢では精巣の成熟および精子形成が回復した。



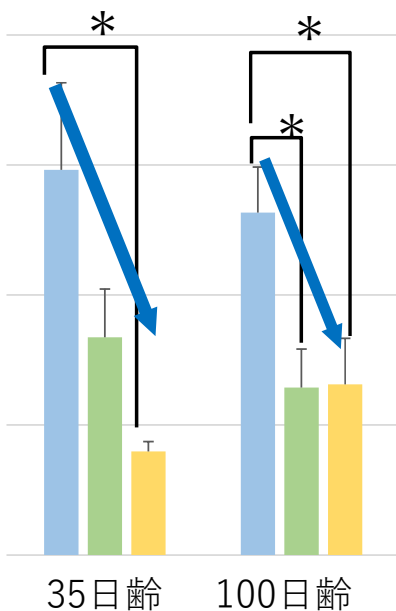


## ⑥生殖・受精能に及ぼす影響の解明 実験照射マウスにおける卵巣への影響

マウスの平均体重

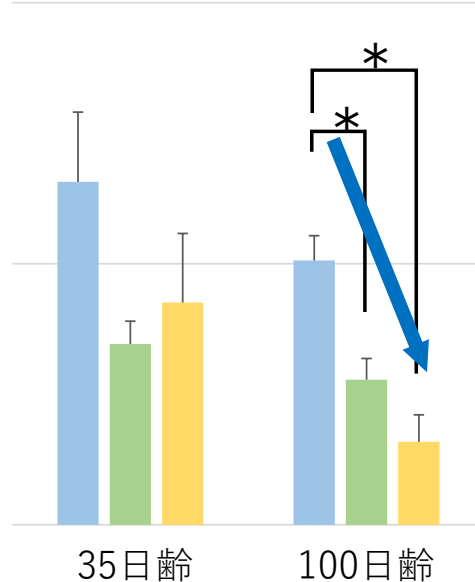


卵巣切片の平均面積



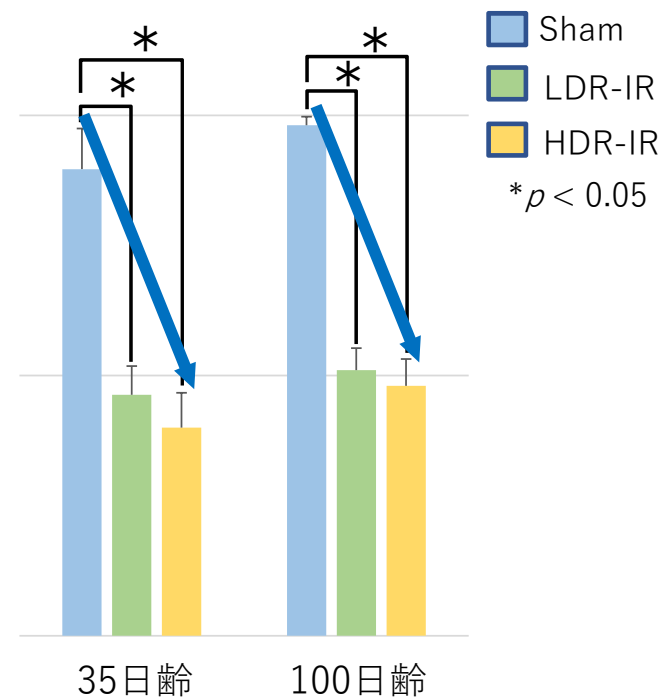
Sham > LDR-IR, HDR-IR

卵胞数 (個/mm<sup>2</sup>)



Sham > LDR-IR ≒ HDR-IR  
(100日齢)

正常卵胞の割合(%)



Sham > LDR-IR ≒ HDR-IR

Sham  
LDR-IR  
HDR-IR  
\* $p < 0.05$

低線量放射線はマウスの妊孕性を低下させ、不妊の原因となり得る

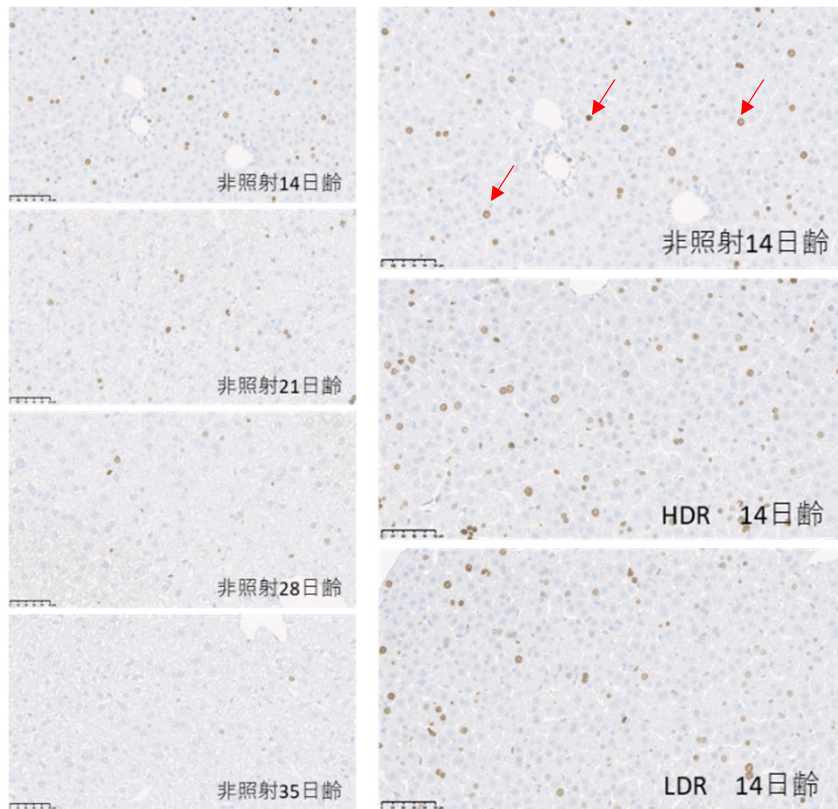




## ⑥実験動物を対象とした慢性被ばく影響評価研究

### 慢性被ばくによる放射線の影響解析：肝臓でのKi-67陽性細胞数の変化

#### 肝臓におけるrepresentativeなKi-67染色像



### LDRの変化は本事業で初めて観察

- Ki-67陽性細胞率（面積あたりの陽性細胞数も同様）は被ばくにより増加するが、成長が止まる時期（35日齢）では被ばくの影響は全く見られなくなる。
- 面積当たりの肝細胞数は被ばくの有無によりかわらないことから、HDR-IRやLDR-IRでは代償性の増殖が起きていると示唆される。
- Caspase-3（アポトーシス細胞死）、p53（DNA修復や細胞増殖停止、アポトーシスに関与）、 $\gamma$ H2AX（DNA二重鎖切断）解析では、特筆すべき変化は認められない。



## ⑦動物生体試料・樹立細胞株のアーカイブ化

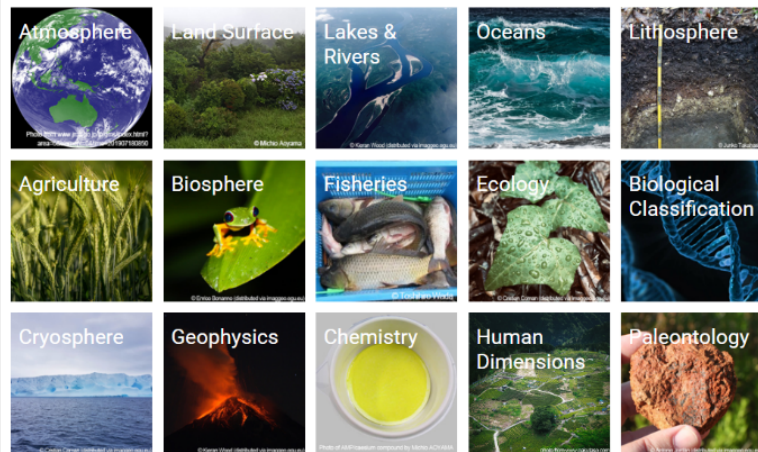
放射能環境動態・影響評価ネットワーク共同研究拠点  
～筑波大学が運用するアーカイブサイト～

Welcome to Environmental Radioactivity Datasets website at  
CRIED, Univ. of Tsukuba

In this web site, you can download dataset(s) which were published with DOI and can use them. You are free to share and adapt the data when you give appropriate credit following Creative Commons Attribution 4.0 International License.

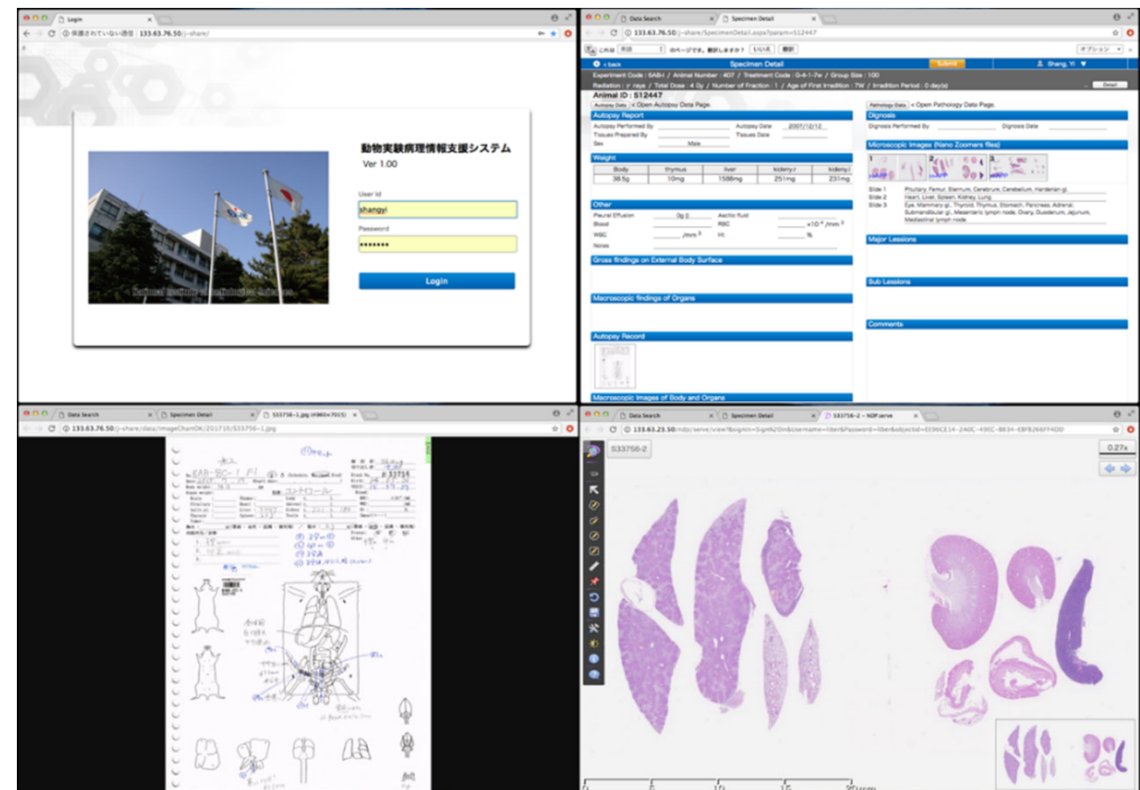


All the published DOI are listed [here](#).



野生動物実験の資料・情報をアーカイブ化

量研機構・放医研に構築されているJ-SHARE  
～動物実験病理情報支援システム～



ラボマウス実験の資料・情報をアーカイブ化

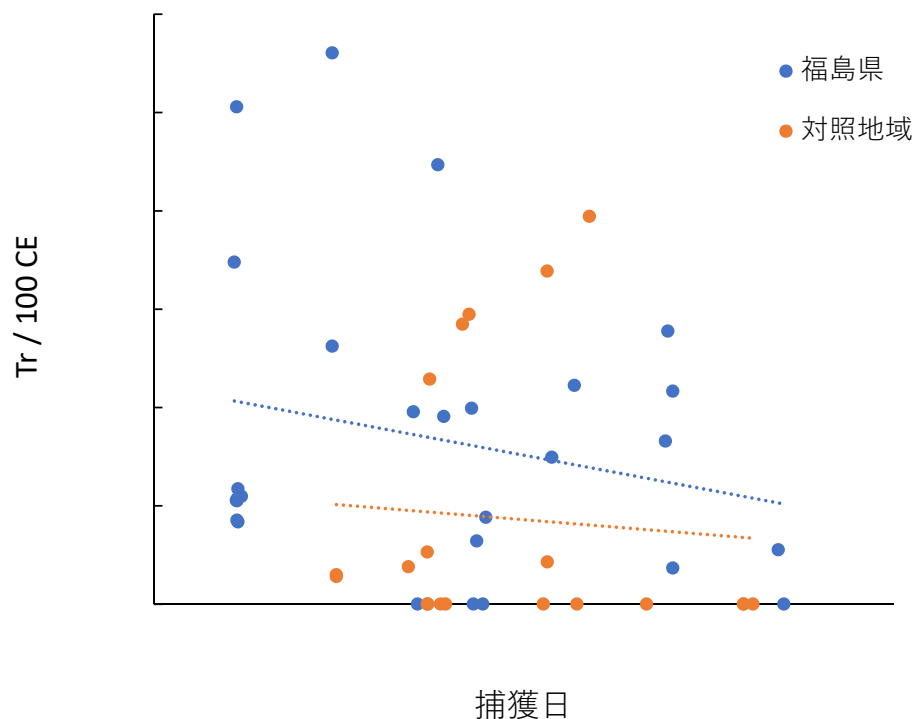


Miura T, Hiroasaki Univ.

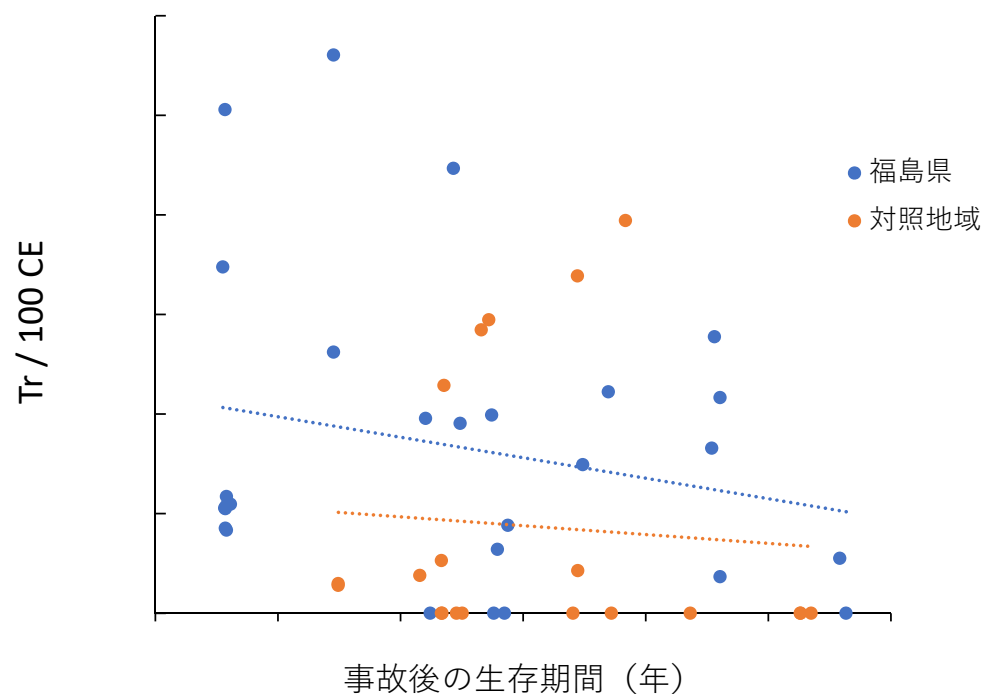


## ⑧放射線被ばく影響からの回復メカニズム解析 ニホンザルにおける染色体転座頻度の変化

### 捕獲日と転座頻度



### 事故後の生存期間と転座頻度



転座頻度において、累積性の増加が認められない  
東電福島第一原発事故後、転座頻度は減少傾向にある

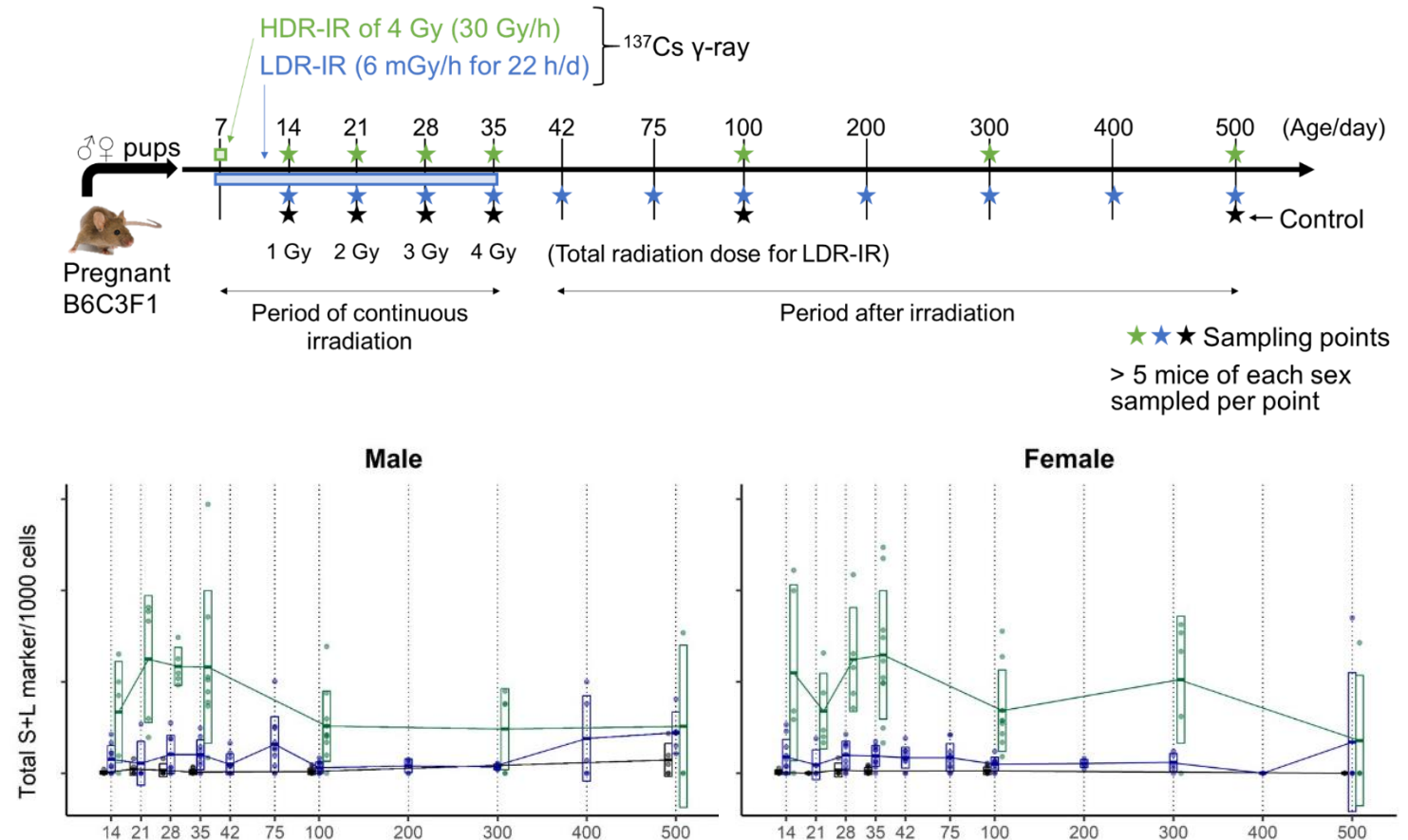




## ⑧放射線被ばく影響からの回復メカニズム解析 実験照射マウスにおけるマーカー染色体頻度の変化



マーカー染色体  
染色体転座等により形成される



**高線量率急性照射群 (HDR-IR) : 半減期は長く、500日齢まで検出される**

**低線量率連続照射群 (LDR-IR) : 照射期間中は累積性の増加、その後減少し、半減期はHDR-IRよりも短い**





## ⑧放射線被ばく影響からの回復メカニズム解析 実験照射マウスにおける生殖細胞の回復

### マウスでは低線量放射線によって

#### 精巣

精巣の  
発育不良

分化段階の  
生殖細胞の減少

支持細胞である  
セルトリ細胞は増加傾向

これらの影響は

放射線照射の停止後に精子形成が正常に回復

精子の先体は正常であり、受精能がある

#### 卵巢

卵巢の  
発育不良

卵胞数、  
正常卵胞率の減少

卵胞発育が  
未発育段階で停止

これらの影響は

放射線照射の停止後も長期化

高線量放射線被ばくと同程度





# 研究成果と解決すべき課題(1)

## 低線量慢性被ばくの生物影響解明

### 【野生動物】

- 放射線被ばくにより誘導される染色体異常型は種間で異なる可能性
- 放射線汚染地域では加齢非依存性に転座頻度が有意に増加
- 低レベルながら酸化ストレスが持続
- 被ばく線量依存性に肝臓中の8-oxo-dG濃度が増加する。

### 【ラボマウス】

**福島県放射線汚染地域よりも数十倍線量率が高い**

- 不安定型染色体異常頻度は慢性被ばく期間中に増加するが、被ばく後は減少
- 造血細胞障害による造血系構築が遅延
- 若齢期の慢性被ばくでは、放射線被ばくの生物学的影響が顕在化
- 急性被ばくと低線量慢性被ばくでは、DNA突然変異プロファイルが異なる

### 今後の課題

- 慢性的な酸化ストレスの増加がもたらす影響について解析が必要
- 各エンドポイントの被ばく形態と検出限界の関係性を明らかにする
- 線量率効果を詳細に解析する必要がある
- 造血系の再構築プロセスの詳細な解析が必要
- バイオマーカーの個体レベルでの意義の解明





## 研究成果と解決すべき課題(2)

### 生殖・発生における放射線被ばく影響

#### 【野生動物】

##### 精巣

- ・ アライグマ精子の先体は一部欠損している割合が高い。
- ・ 繁殖期のアライグマ精巣の精細管内における精原細胞・精母細胞及び伸長精子細胞は、正常に分化・退行している。

##### 卵巣

- ・ 繁殖期および非繁殖期のアライグマ卵巣では、卵胞発育と卵子形成が観察され、対照比較して、形態的な差は認められない。
- ・ 被災アカネズミ凍結保存精子を用いて体外受精を行った結果、正常に受精し、かつ2細胞期まで発生。

#### 【ラボマウス】

##### 精巣

- ・ 若齢マウスにおいてダメージを受けた精細胞は、100日齢に達した後は精子形成が回復。
- ・ 精巣における *Izumo1* 発現は、精子形成の退行に依存。

##### 卵巣

- ・ 低線量慢性被ばくマウスでは卵巣の発育不良、卵胞数減少、正常卵胞減少、卵胞発育が未発育段階で停止。
- ・ 被ばく後75日経過してもそれらは回復しない。
- ・ 低線量放射線はマウスの妊孕性を低下させ、不妊の原因となり得る。

#### 今後の課題

- ・ 慢性被ばくにおける不妊リスクの解析
- ・ 精巣と卵巣における各幹細胞の詳細な解析が必要
- ・ 遺伝子発現変化とエピジェネティックな変化の解析





## 研究成果と解決すべき課題(3)

### 放射線被ばくからの回復プロセス

#### 【野生動物】

- 事故発生年度から空間線量の減少に伴い、染色体異常頻度が減少
- 空間線量率減少後も軽度な酸化ストレスの変動が継続
- 酸化ストレス状態の継続による軽微なDNA損傷が蓄積する可能性

#### 【ラボマウス】

- 急性被ばくマウスでは、400日齢以降の体重増加が抑制
- 肝臓組織では、被ばく後、増加した細胞増殖活性が継続
- 放射線被ばく後も精子幹細胞が残存し、増殖・分化して精子形成能を回復

環境回復により、個体への放射線影響は回復するものの、発達期での影響大

#### 今後の課題

- 回復プロセスの評価に有用なエンドポイントの開発
- 発がんプロセス等の晩発影響の解析
- DNA変異プロファイルの詳細な解析





# 本事業の自己評価

## ● 得られた成果と目標との関係性

本事業で新たな知見が得られ、当初想定を上回る成果が得られた。

## ● 成果の新規性、革新性

### 【技術開発】

- ・微量試料IP解析法の開発
- ・異種間受精能解析法の開発
- ・ESR解析用試料のノイズ除去法の開発

### 【特筆すべき新規知見】

- ・野生動物における放射線感受性には個体差がある。
- ・放射線被ばくしたマウス肝臓において代償性の肝細胞増殖が認められる
- ・若齢期に低線量率放射線に暴露したマウスでは精巣の発達が遅滞するが、その後回復する。
- ・雌マウスでは、低線量率放射線暴露が妊孕性を低下させ、不妊の原因となり得る。
- ・生物学的半減期が長いとされている染色体転座において、累積性の増加が認められない。

## ● 研究の効果（原子力の基礎基盤の強化への効果等を記載）

低線量率慢性被ばくによる生物影響が認められるが、細胞の代償性増殖や異常細胞の寿命による排除により、環境回復とともに生体内の放射線影響が正常化されることが確認された。一方で、ラボマウスに用いた線量率で若齢期の個体が連続被ばくした場合は、卵子形成に障害を及ぼす可能性があることから、避難誘導を含めた放射線防護の強化に努める必要がある。

## ● 今後の発展の方向性 次項参照





## 今後実施すべき事項

### ➤ 若齢個体における生殖影響の線量並びに線量率依存性の解明

若齢マウス被ばくモデルを野生動物における被ばく線量率を含む複数の線量率において同様の解析を行い、若齢個体の放射線生物影響における線量・線量率依存性を明らかにする必要がある。

### ➤ 放射線影響における外部被ばくと内部被ばくの比較

放射線被ばくの健康影響を明らかにするためにも、高自然放射線地域での解析を含め、外部被ばくと内部被ばくの比較が必要となる。

### ➤ 放射線の個体（人）感受性に関する研究

本研究において野生動物の放射線感受性における個体差が顕在化した。放射線個体（人）感受性に影響を及ぼす因子の解明は、放射線の健康リスクを評価するうえで、重要な課題の一つである。

### ➤ 染色体異常の生物学的半減期

被ばく時の年齢や線量率により染色体異常の生物学的半減期が異なると推測される。放射線の健康リスク評価や被ばく線量推定において重要な課題である。

