

ヒト臓器・組織置換マウス等を用いた宇宙放射線の人体および継世代リスクの基礎評価

阪大・院・医/工 野村大成、 阪大・院・医 中島裕夫、本行忠志、梁 治子、足立成基、
Le Thi Thanh Thuy、岩城紘幸、 近畿大・理工 藤川和男、 近畿大・原研 伊藤哲夫

Risk of Cosmic Radiation on Human Organs and Tissues Maintained in SCID Mice and Transgenerational Effects

Taisei Nomura, Hiroo Nakajima, Tadashi Hongyo, Haruko Ryo, Shigeki Adachi, Le Thi Thanh Thuy, Hiroyuki Iwaki, Graduate Schools of Medicine and Engineering, Osaka University, Suita, Osaka 565-0871,

Kazuo Fujikawa, Tetsuo Itoh, Institute of Science and Technology and Atomic Energy Research Institute, Kinki University, Higashiosaka, Osaka 577-8502

E-Mail: tnomura@radbio.med.osaka-u.ac.jp

Abstract: Radiation (γ -rays and neutron) induced morphological and functional damage, mutations and change of gene expression in the human thyroid tissues maintained in improved SCID mice. Microsatellite mutation and leukemia were first detected significantly in F₁ progeny of N5 male mice exposed to 0.4 Gy of fission neutron.

Key words; Space Radiation, Neutron, Human Thyroid Gland, SCID Mice, Microsatellite Mutation, Leukemia, F₁ Progeny

宇宙に人を送り込む試みは、人類の素晴らしい未来を予感させる。宇宙での人類の生活は、将来必要に迫られることが考えられるし、宇宙環境を利用した新技術の開発等が大きく期待される。従って、人類が宇宙生活を行うにあたり不可欠なのが宇宙環境および宇宙放射線による人体影響、即ち、忘れた頃に頭をもたげてくるがんや生活習慣病の防御である。また、当の本人だけでなく、次世代への影響も無視することはできない。

しかし、人体影響評価は、汚染事故後の疫学調査か動物実験、あるいは、生体とは大いに異なる培養細胞実験しかなすべがなかった。動物実験には大きな限界（種差等）があり、ヒト臓器・組織を用いた新たな実験法が開発が不可欠である。拒絶反応をなくした重度複合免疫不全（severe combined immunodeficient）マウス（SCID マウス）を開発、改良することにより、ヒト正常組織の形態と機能を2年以上の長期にわたり維持可能なヒト組織置換マウスの作製に成功し、宇宙環境と宇宙放射線のヒト組織への直接影響を究明することが可能となった（Fig. 1）（Nomura et al J. Radiat. Res., 1990）。

本研究では、宇宙環境、宇宙放射線被曝を想定した地上実験を行うため、ヒト臓器・組織の中でも放射線に高い、あるいは、致命的な感受性を示す臓器であり、ヒトの成長に最も重要な役割をもつ甲状腺組織を用い、調査研究を行うことにより、人体組織に及ぼす宇宙環境、宇宙放射線の影響を定量的に評価する新たな研究システムの開発を試みている。

また、放射線、化学物質被曝によるマウス孫におよぼす影響は、野村が40年にわたり研究してきたものであるが、長期宇宙生活、宇宙よりの帰還

後を考えるとその子孫におよぼす影響を中性子線においても地上実験を行い、リスクを推定する必要がある（Nomura, Nature, 1982）。

放射線源としては、¹³⁷Cs ガンマ線照射に加え、宇宙放射線（陽子線等）による飛翔体内のヒト被曝の主たる放射線である中性子線の影響解析を行う必要がある。

1. ヒト臓器・組織置換 SCID マウスを用いた人体影響の基礎評価

IgG および IgM 値が検出限度以下 (<1 μ g/ml) の C. B17-*scid/scid* マウスを20代以上、選択的兄妹近親交配し、正常 T, B 両細胞機能の出現（leaky マウス）と白血病高発を防いだ改良 SCID マウスより *scid* 遺伝子を C57BL/6J に導入した C57BL/6J-*scid/scid* (N₁₁F₂₀) にバセドー病患者より治療上、やむを得ず切除されたヒト甲状腺の残余組織を移植した。

近畿大学原子炉 UTR-KINKI（熱出力 1 W, 炉心部最大熱中性子 10⁷ n/cm²/sec）における放射線照射線量率は、およそ毎時 0.2 Gy 中性子線 + 0.2 Gy ガンマ線である。実験信頼度を上げるために C57BL/6J マウスを照射野（中央ストリンガー）に入れ中性子線およびガンマ線量を確認した。

1) 甲状腺微細構造・機能の障害

Graves 病患者より治療上、やむを得ず切除されたヒト甲状腺の残余組織を 5-6mm³ の大きさに切断し、SCID マウスの左右背部皮下に移植した。ヒト甲状腺組織を移植した SCID マウスが死亡、ある

いは衰弱した時は、ヒト甲状腺組織を取り出し、他の SCID マウスに同様の方法で移植・継代し、マウスの世代を超えて長期維持を計った。これらヒト甲状腺組織移植 SCID マウスに、Gammacell 40 Exactor および、コンピュータ制御した ^{137}Cs シミュレーターを用い、線量率 1.07Gy/min、および 0.23 mGy/min

ヒト甲状腺組織移植SCIDマウスを用いた宇宙環境・宇宙放射線の人体影響評価技術の開発

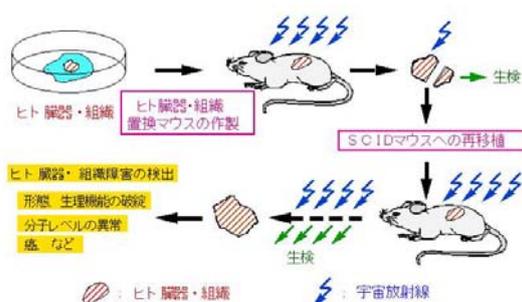


Fig.1 SCID technology for space study

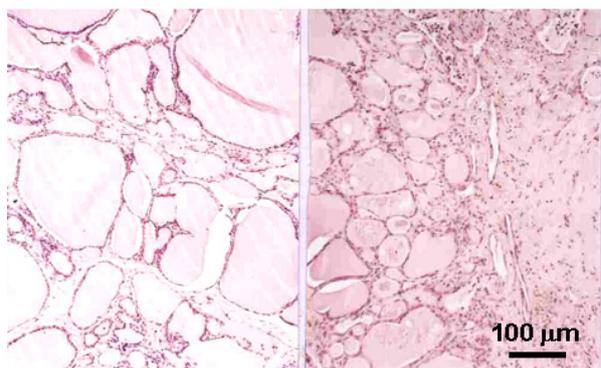


Fig. 2 Human thyroid tissue. Left; untreated. Right; irradiated (11 Gy of γ -rays)

で、ヒト甲状腺を移植した SCID マウスに 1 週間毎に 1Gy の γ 線照射を行った。経時的に SCID マウスに移植したヒト甲状腺を生検し、放射線による微細構造の変化を調べた。また、ヒト甲状腺を移植した SCID マウスより末梢血液を採取し、Radioimmunoassay 法により、ヒト甲状腺ホルモン (T_3) を測定した。

8 Gy 高線量率照射では、移植ヒト甲状腺組織の萎縮が強く、組織学的にも濾胞の消失が高度にみられたのに反し (Fig. 2)、低線量率照射では、肉眼的、組織学的変化は僅かであった。非照射ヒト甲状腺組織片の肉眼所見と組織学的所見は移植前のもとの差がなかった。移植ヒト甲状腺組織よりの甲状腺ホルモン分泌に関しては、非照射対照群 (446 \pm

19 pg/ml, mean \pm SE, n=10) に対し、高線量率照射群で低く (303 \pm 69, n=10)、ヒト甲状腺ホルモンの分泌能の低下が認められたのに対し、低線量率照射 (440 \pm 15, n=5) では差がなく、人体組織で、強い線量率効果 (低線量率照射による障害の低下) が存在することを示している。

ヒト甲状腺を移植した C57BL/6J-*scid* マウス 11 匹 (ヒト甲状腺 22 個) に毎週、中性子線ならびにガンマ線 0.2Gy を繰り返し計 6 回照射した。経時的に、SCID マウスに移植したヒト甲状腺を生検し、放射線による微細構造の変化を調べたところ、ガンマ線、X線、高線量率照射実験の場合と同様濾胞の減少と変性が見られた。また、ヒト甲状腺を移植した SCID マウスより末梢血を採取し、Radioimmunoassay 法により、ヒト甲状腺ホルモン (T_3) を測定したが、やはり高線量率照射実験と同じ結果であった。ガンマ線低線量率照射実験の場合と大いに異なる。

2) 遺伝子変異

p53, *K-ras*, *c-kit*, *β -catenin* および *RET* 遺伝子について、本行らにより開発された放射性同位元素を用いない PCR- 'Cold SSCP' 法および direct sequencing 法により、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer を用いて遺伝子変異の検索を行ったところ、8 Gy 照射では、いずれの遺伝子にも突然変異は誘発されていない。しかし、8-16 Gy 照射により、高線量率照射群で 20 例中に 5 つの *p53* 遺伝子の突然変異が検出された。2 つは codon 142 の突然変異、2 つは codon 148, 152 の Silent mutation であり、1 つは codon 180 の欠失突然変異であった。また、*c-kit* 遺伝子でも 3 つの突然変異が検出された。非照射群および低線量率照射群では、突然変異は見つかっていない。

中性子線照射ヒト甲状腺組織移植マウスから得られたヒト甲状腺組織では、*p53*, *K-ras*, *c-kit*, *β -catenin*, *bak*, *BRAF* および *RET* 遺伝子に関して、中性子線照射後 5-13 ヶ月では、変異は検出されていない。

3) 遺伝子発現異常

Affymetrix 社製の GeneChip (HG Focus array) を用い、ヒト遺伝子 8,500 個の発現異常を調べた。ヒト甲状腺組織移植 SCID マウスに ^{137}Cs γ 線 2 Gy を線量率 1.07Gy/min、および 0.46 mGy/min で照射し、7、14 日後に、ヒト甲状腺組織片を取り出し、mRNA を抽出し、Test Chip にての確認の後、GeneChip での解析を行っている。 γ 線高線量率照射では、非照射群に比べ、4 倍以上の発現の変化 (減少と増加) が照射 7 日目で 5 遺伝子、14 日目で 21 遺伝子に見られた。低線量率照射でも有意の差はなかった。近畿大学原子力研究所において、ヒト甲状腺を移植

した SCID マウスに、0.2Gy 中性子線 1～6 回照射を行い、5 日後にヒト甲状腺組織を摘出し、遺伝子発現異常を検出した。ヒト甲状腺の原組織に比べ、移植 1 週間で遺伝子発現は大きく変化するものの、2～4 週間では大きな変化はない。しかし、原子炉中性子線 0.2 Gy を 2～4 回照射後、同期の非照射組織と比較してみると線量依存性に、発現異常は増加の傾向を示している。本法を用い、RET 遺伝子の発現を調べたが、移植後時間経過、および中性子線照射による発現の増減は見られなかった。

2. 継世代リスクの基礎評価

宇宙での長期滞在計画で注目すべきは、宇宙環境の子孫に及ぼす影響である。遺伝影響（継世代影響実験）は、15 年以上前に、宇宙開発事業団の要請で計画したものであり、少数（2～50 匹）の N5 マウス雄を宇宙に上げ、帰還後被曝雄マウスと正常雌マウスを交配し数千匹の F₁ マウスの発がん、奇形等を観察する予定で、搭載する飼育実験室の試作と予備実験を行っていたが、ロケットの不備等が続き、中断されたままになっている。

今回、N5 雄マウスに中性子線 0.2、0.4Gy を照射し、N5 雌マウスと交配することにより F₁ マウスを作成し、次世代での発がん、奇形等の発生とマイクロサテライト突然変異の検出を行っている (Fig. 3)。

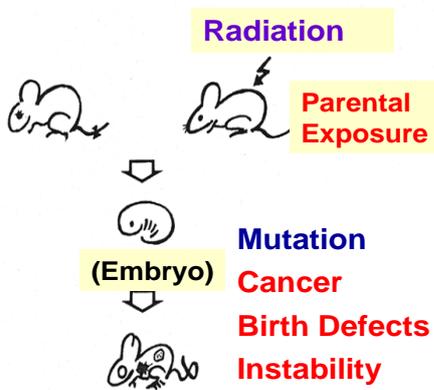


Fig. 3 Transgenerational effects of radiation

1) 宇宙線による遺伝影響（継世代影響）—マイクロサテライト変異

マイクロサテライト変異検出には、両親および F₁ の尾より DNA を抽出し、マウスでの特定の高感受性座位 (n6, n3, n1, n5; 未発表) について特異的プライマーを用い、PCR 産物を Genetic Analyser 3100 でキャピラリー電気泳動し、GeneMapper で解析した (Fig. 4)。ミニサテライト変異と違い、図に示すように科学的かつ客観的成果が得られる。生

仔変異 F₁ 体については、正常 N5 と確認交配をし、突然変異であること (F₂ …に伝わる) を確認している。

現時点ですでに有意の増加がみられており、確固たる成果が得られると思う。人類において、放射線による遺伝的影響が実証されないまま、ミニサテライト変異でも原爆被曝者 F₁、チェルノブイリ被曝者 F₁ で相反する報告がなされている。マイクロサテライト突然変異は、これまでつばめ、麦でしか検出されていなかったが、哺乳動物ではじめて放射線で誘発される可能性が示された。

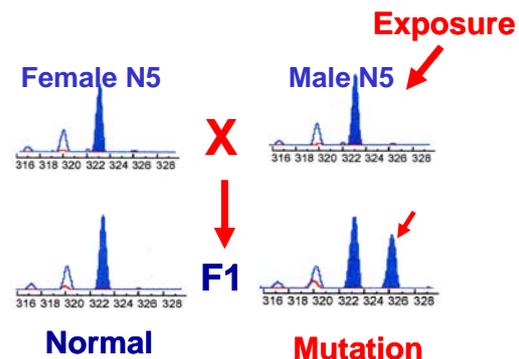


Fig. 4 Microsatellite mutation

マイクロサテライト変異に量効果が見られていることにより、今後ヒト集団での調査に大きな刺激を与えるものと思う。我々の行ったチェルノブイリ被曝住民の子供のマイクロサテライト変異には差はなかったが、これは、被曝量が 50 mSv 以下であったことによるものと思われる (Furitsu, Ryo, Nomura, etc., Mutat. Res., 2005)。

2) 次世代での発がん発生と発生異常

現在、非照射群 227 匹、0.2Gy 照射群 111 匹、0.4Gy 照射群 147 匹の計 485 匹の生存 F₁ マウスを得、1 年間の観察をおこなっている。0.2 Gy 群に 1 例の白血病発生、2 例の固型腫瘍発生を見ている。0.4Gy 照射 F₁ マウスでは 10 例が白血病死、また固型腫瘍も 9 例発生している。非照射群 227 例では、2 例の白血病死があり、2 例の固型腫瘍が発生している。未だ生後 1 年を経っていないマウスが多いが、これまでの X 線、ガンマ線 (2 Gy, 5 Gy) に比べ非常に高い頻度で F₁ マウスに白血病が発生している。外表面の奇形については、今のところ出生仔では増加を認めていない。

3. 宇宙生活による影響（障害）の予防と治療

宇宙環境での生活によるさまざまな人体影響に対し、その予防と治療法を考えておく必要がある。そのために有用と思われるのが、ヒト疾患自然発症

モデルマウスである。医薬基盤研究所野村プロジェクトにおいては、予防、治療法の有効性、安全性を迅速、正確に判定するマウス系統を維持・開発している。今回の報告に関連した、ヒト臓器・組織長期維持マウス系、高感度次世代影響検出系、高感度多種障害（がん、発生異常、突然変異他）検出系等だけでなく、変形性膝関節症自然発症マウスへの重力の影響、重力変化などでパニックになりやすいマウス系統、三半規管異常による平行失調マウス等々宇宙医療研究に役立つだろう。

まとめと展望

ヒト甲状腺置換 SCID マウスを用いた人体組織直接影響評価システムは、軌道上実験、宇宙基地利用研究に用いられる究極の実験系と思い、いつでも打ち上げることが出来るよう準備してきた。しかし、**マウス個体を用いた軌道上実験の中止**が、昨年末、日米で決まり、欧州においても 2010 年まで行われないと知らされた。軌道上・宇宙ステーションでの被曝量（0.2～0.5mGy/日）を考えると、簡単に影響を検出できるとは考えにくいし、搭載するマウス飼育実験装置開発の難しさもある。

しかし、次世代影響評価では、わずかな数のマウスで、中性子線の持つ強力な遺伝的影響と子孫での白血病誘発を初めて示すことが出来た。宇宙での長期滞在では、慎重に対応しなければならない課題である。

（日本宇宙フォーラムー宇宙環境利用に関する公募地上研究、基盤研究Aによる）