

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

医薬基盤研究所; 野村 大成、梁 治子、足立 成基、
阪大医; 中島 裕夫、本行 忠志、
近大理工/原研; 藤川 和男、伊藤 哲夫、
神戸隈病院 松塚 文夫

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

Taisei Nomura, Haruko Ryo, Shigeki Adachi, Nomura Project National Institute of Biomedical Innovation, Ibaraki, Osaka 567-0085

Hiroo Nakajima, Tadashi Hongyo, Graduate Schools of Medicine, 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

Fumio Matsuzuka, Kobe Kuma Hospital, Kobe, Hyougo

E-Mail: n5nomura@nibio.go.jp

Abstract: To study the risk of cosmic radiation, two projects, effects on human organs and tissues maintained in super-SCID mice and transgenerational effects in the offspring of mice exposed to radiation were carried out;. Morphological and functional (hormone secretion) changes and/or mutations were induced in human thyroid tissues by high doses and high dose rate of X- and γ -rays (9-33 Gy) and reactor neutron (0.2 Gy x 6), but not by same doses with low dose-rate of γ -rays, showing apparent dose rate effects in human thyroid tissues. Neutron (0.2 Gy x 4) induced bigger changes in gene expression than 2 Gy of γ -rays, suggesting high RBE of neutron. Microsatellite mutations and lymphocytic leukemia were induced dose-dependently in the offspring of N5 male mice exposed to 0.2 and 0.4 Gy of neutron. The incidence was 10 folds higher than our former X-ray and γ -ray studies, again suggesting high RBE.

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。

宇宙環境利用による新技術の開発等が大きく期待される一方、宇宙環境および宇宙放射線による人体への影響評価が不可欠である。ヒト臓器・組織置換 Super-SCID マウスを用いることにより、放射線照射による、ヒト組織（甲状腺、等）の形態、機能、遺伝子変異、遺伝子発現への直接影響評価を行った。また、未来の長期宇宙生活を考え、放射線等の子孫におよぼす影響（がん、遺伝変異等、野村レポートに

よる）を、中性子線等を用い、推定することにより、未来世代への影響を考慮した。

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った。

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 10^7 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 (Fig. 1)。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 ¹³⁷Cs シミュレーターを用い、線量率 1.07Gy/min、および 0.23 mGy/min 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、Radioimmuno-assay 法により、ヒト甲状腺ホルモン(T₃)を測定した。

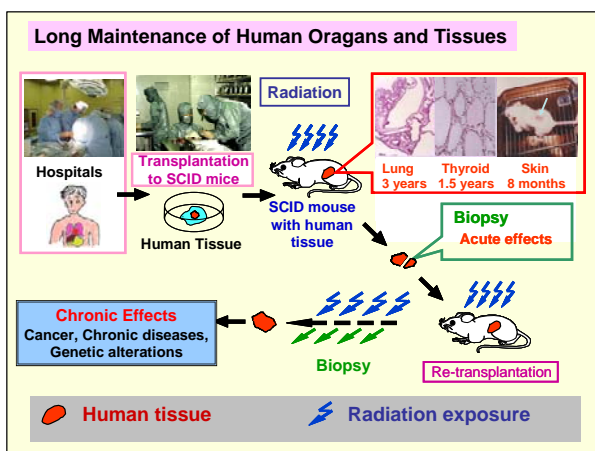


Fig.1 SCID biotechnology to maintain human organs and tissues for space study

ガンマ線高線量率照射では、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のと差がなかった。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±19 pg/ml, mean ± SE, n=10) に対し、図のごとく高線量率照射群で、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±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。

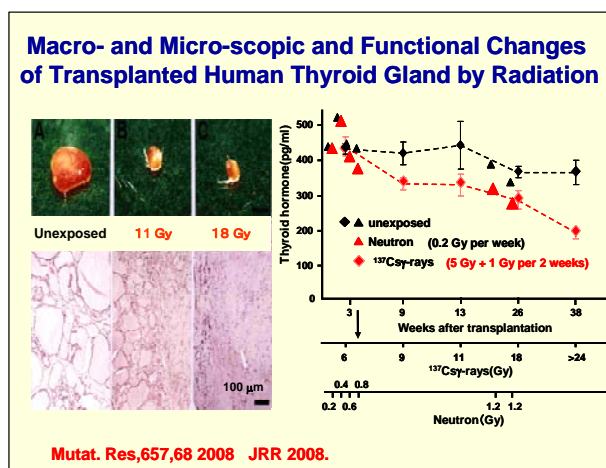


Fig. 2 Morphological and functional (hormone secretion) changes in human thyroid tissues in SCID mice exposed to γ -rays and neutron.

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、Radioimmuno-assay 法により、ヒト甲状腺ホルモン(T₃)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 (Fig. 2)。

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、Table 1 に示したごとく、8-33 Gy 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おらず、非常に高い線量率効果を示した。

中性子線 0.2 Gy 6 回照射ヒト甲状腺組織置換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* 遺伝子の変異は、中性子線照射後 5-13 ヶ月では検出されていない。

Table 1

Mutations in Human Thyroid Gland (Graves Disease, 20 ys) in SCID Mice after High and Low Dose Rate ¹³⁷Cs γ -irradiation

| Dose (Gy) | Dose rate (mGy/min) | No. | No. of mutation | Mutation | | | | |
|-----------|---------------------|-----|-----------------|----------|-------|-------|-----|------------------|
| | | | | p53 | K-ras | c-kit | RET | β -catenin |
| 8 - 33 | 1189 | 20 | 8 (0.4) | 5* | 0 | 3** | 0 | 0 |
| 8 - 33 | 0.23 | 14 | 0 (0.0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Unexposed | — | 26 | 0 (0.0) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

* 12 Gy (142 CCT→CTT; Pro→Leu; 180 GAG→CA.), 14 Gy (148 GAT→CAC; Asp→Asp; 152 CCG→CCA; Pro→Pro), 16 Gy (142 CCT→CTT; Pro→Leu) p < 0.01
 ** 11 Gy (557 TGG→CGG; Trp→Arg; 825 GTT→GCT; Val→Ala), 12 Gy (825 GTT→GCT; Val→Ala)

3) 遺伝子発現異常

Affymetrix社製のマイクロアレイ (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 ¹³⁷Cs ガンマ線を線量率 1.07Gy/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、GeneChip での解析を行った。Table 2 に示したごとく、 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、照射線量とともに増加した。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。非照射群では、ヒト甲状腺の原組織に比べ、移植 1 週間で遺伝子発現は、1-2% 変化するものの、2-4 週間ではそれ以上の変化はない。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 (Table 2)。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。

Table 2

Changes in Gene Expression (8500 genes) in human Thyroid Tissues after Neutron- and γ - Exposure

| Source | Dose | Gene expression | |
|----------------------------------|------------|-----------------|---------|
| | | > X 4 | < x 1/4 |
| Neutron* | 0.2 Gy x 2 | 6.5 | 9.5 |
| Neutron* | 0.2 Gy x 3 | 21.0 | 16.5 |
| Neutron* | 0.2 Gy x 4 | 17.8 | 31.9 |
| ¹³⁷ Cs γ -rays | 1 Gy | 11 | 11 |
| ¹³⁷ Cs γ -rays | 3 Gy | 33 | 30 |

*Human thyroid tissues in SCID mice were exposed to 0.2 Gy of neutron 1-4 times weekly and compared with concurrent unexposed controls. Mutat. Res,657,68 2008 JRR 2008.

4) まとめ

(1) ヒト甲状腺組織、骨髄細胞等放射線高感受性組織に対し、ガンマ線、中性子線等の影響を捉えることが出来た (必要線量：遺伝子変異>>形態、機能変化>遺伝子発現変化)。

(2) ヒト甲状腺組織でのガンマ線の高い線量率効果 (修復能) を証明した (遺伝子変異>機能、形態変化)。

(3) 中性子線 (0.2-0.6 Gy) はヒト組織で高い RBE を示した (遺伝子発現、機能変化；4～7)。

(4) 宇宙実験にはいつでも対応できる。

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、20 年前に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あったが、ロケットの不備等が続き、中断されたままになっていた。

今回、N5 雄マウスに中性子線 0.2、0.4 Gy 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た (Fig. 3)。

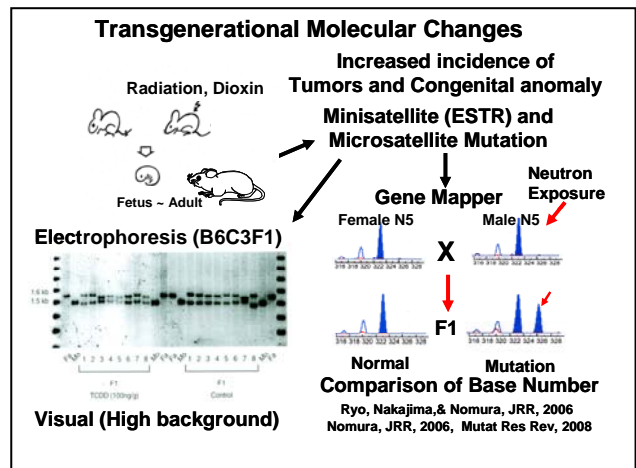


Fig. 3 A method to detect microsatellite mutations in mice; comparison with usual electrophoresis method.

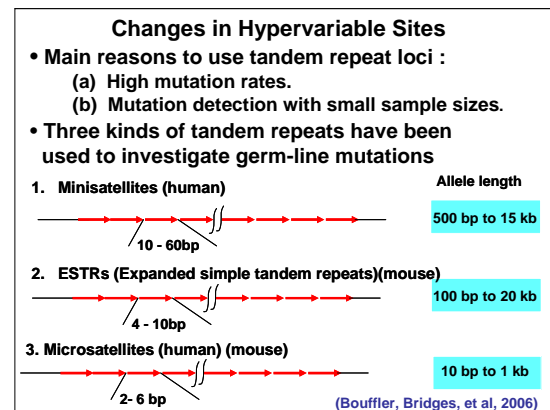


Fig. 4 Tandem repeat loci in mice and humans.

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、Gene Mapperで解析した (Fig. 3)。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) を確認した。

Fig. 5に示すごとく、4つのマイクロサテライト座のうち一つで有意の増加がみられている。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等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ことが示された。

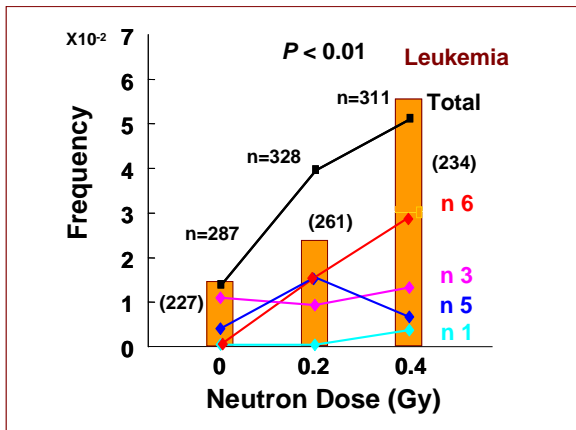


Fig. 5 Microsatellite mutation and leukemia in the progeny of N5 mice exposed to fission neutron

マイクロサテライト変異に量効果が得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, et al, Mutat. Res., 2005)。しかし、高い線量 (平均1.56 Gy) を被曝した原爆被曝者の子供においてもパイロットスタディでは有意の差はなく、調査遺伝子座の放射線感受性、ヒトとマウスのマイクロサテライトの違いについても検討せねばならない (Kodaira, Ryo, Nomura et al, JRR Proceedings, 2008)。

2) 次世代での発がん発生異常

Fig. 5に示すごとく、有意の白血病発生がみられた。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) まとめ

- (1) 中性子線 0.2, 0.4 Gy 精原細胞期照射実験で線量依存性のマイクロサテライト突然変異の誘発を初めて証明した。高いRBEを示している。
- (2) 線量依存性 に白血病の有意な増加を確認した。高いRBEを示している。
- (3) 宇宙実験にいつでも対応できる体制を整えた。
- (4) より高線量の0.6Gyでの確認実験、および、宇宙放射線リスク推定のためにはより低線量0.1Gy照射実験が必要である。

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。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、創薬の有効性、安全性を迅速、正確に評価するため、ヒト疾患自然発症モデルマウス研究をおこなっている。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、変形性膝関節症など生活習慣病自然発症モデルマウス、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と思われ、宇宙環境の人体影響ワーキンググループを2008年度より結成した。

[2008年度発表]

Taisei Nomura, Tadashi Hongyo, Hiroo Nakajima, Li Ya Li, Mukh Syaifudin, Shigeki Adachi, Haruko Ryo, Rajamanickam Baskar, Kazuyasu Fukuda, Yoshihiro Oka, Haruo Sugiyama, and Fumio Matsuzuka, Differential radiation sensitivity to morphological, functional and molecular changes of human thyroid tissues and bone marrow cells maintained in SCID mice. Mutat. Res., 657: 68-76, 2008.

足立 成基, 野村 大成, 梁 治子, 本行 忠志, 中島 裕夫, 猪原 秀典, 藤川 和男, 伊藤 哲夫, 放射線影響学会, 2008.

Nomura, T. Transgenerational (hereditary) molecular changes and cancer in the progeny of mice and humans exposed to radiations, LOWRAD, 2008.

Taisei Nomura. Transgenerational effects from exposure to environmental toxic substances. Mutat. Res. Rev., 659:185-193, 2008

(日本宇宙フォーラム—宇宙環境利用に関する公募地上研究2005-2007、基盤研究Aによる)