

日本学術振興会産学協力研究委員会「放射線の利用と生体影響第 C195 委員会」

第一分科会（基礎研究分科会）

活動成果報告

\*C195 委員会及び分科会の活動趣旨・概要等については以下のウェブサイトをご参照ください。

<http://radi.rirc.kyoto-u.ac.jp/c195/>

## 第一分科会の目的

生物に対する高線量の放射線照射が細胞に傷害を与え、変異を誘発し、ヒトでは白血病など健康被害が生じることは広く知られており、これらの分子機構や高線量放射線被ばくの生体影響については活発な研究が展開されてきた。一方、100mSv 程度の低線量放射線被ばくでは、ヒトやモデル動物での発がんリスクは検出されない。しかし、世代を越えて低線量長期被ばくした場合の遺伝的影響や発がんリスクについては精度の高い評価法が確立しておらず、評価に耐えうる実際のデータも少ない。そのために、低線量放射線被ばくの生体影響については、高線量データを外挿して間接的に推測されているに過ぎない。現状では、国や国際機関において、いわゆる閾値なし線形(Linear Non-Threshold: LNT)モデルを採択しながら、自然放射線被ばくなども考慮して現実的には、ALARA (As Low As Reasonably Achievable)の原則に基づいて「合理的に達成可能な限り低く」という放射線影響の防御基準が設定・勧告されている(マウス班参考文献 1)。現時点での公的な科学的根拠となっている LNT モデルは、細胞や遺伝子などについての知識が乏しく、研究手段も極めて限られていた 1960-80 年代の研究結果から提唱されたものであるが、今日に至るまで、その妥当性や限界などは検証されていない。このような状況は、近年、社会的な様々な問題を生み出している。福島第一原発の事故に伴う環境への放射能汚染が住民の健康にどのような影響を及ぼすのか、科学的に明確にアナウンスできないことから、不安や困惑を引き起こして住民の生活に大きな影響を及ぼしている。また、除染や避難などの行政の判断にも費用対効果の評価も含めて曖昧さが解消されていない。放射線の医療応用についても、低線量放射線被ばくのリスク評価の曖昧さが新技術の開発・導入や医療従事者の労働衛生などに大きな影を落としている。

第1分科会では、低線量、低線量率の放射線被ばくによる生体影響、特に放射線による突然変異や染色体再編の誘発を中心にして、それらの解明を実験的なアプローチと理論的なアプローチの両面から目指すことを目的とした。そのために、研究プロジェクトを立案して自力で研究費を獲得した上で、新たな研究組織を立ち上げて、マウスと培養細胞を用いた低線量、低線量率の放射線被ばくによる突然変異誘発の実験データの取得とそのデータに基づく理論的な解析を実現するための具体的な取組を行うこととした。

幸いにも、2021 年度より3年間の研究プロジェクト「低線量長期被ばくマウスおよび細胞の超高感度変異検出に基づく放射線影響と変異誘発機構の解析」が環境省の放射線健康管理・健康不安対策事業に採択され、委員会活動の後半3年間の期間に実際の研究に取り組むことが実現できた。採択された研究プロジェクトの概要を以下に記す。

- ① 突然変異および染色体再編の分子機構の専門家(真木委員)、マウスを用いた分子遺伝学・ゲノム生物学の専門家(権藤委員、大野委員、内村委員)、放射線生物学の専門家(松本委員、島田委員)、放射線生体影響の理論的研究の専門家(角山委員、和田委員、土岐委員、坂東委員)、疫学・統計学の専門家(佐藤委員)などからなる異分野横断的な研究組織を構築する。
- ② 全ゲノム解析による突然変異の検出と世代間での比較に基づく精密な変異率解析法をマウス交配家系(権藤委員)とマウスおよびヒト細胞のクローン化培養系統(松本委員)に適用する。
- ③ 低線量生涯被ばくマウス(権藤委員、内村委員、島田委員)と低線量被ばく培養細胞(マウスおよびヒ

ト細胞、松本委員、島田委員)の変異率の計測を行う。

④実験的アプローチの結果をもとに理論的アプローチの検証を行う(角山委員、和田委員、土岐委員、坂東委員)。

このように、第1分科会では、低線量・低線量率放射線被ばくの生体影響について、分子生物学、マウス遺伝学、放射線生物学、核物理学などの様々な分野の研究者を結集して、権藤委員により最近確立された精密な変異頻度・変異率計測の新技术を用いて低線量放射線被ばくによる変異誘発の実際のデータを取得し、LNTモデルの検証を行うものである。

(第1分科会座長 真木寿治)

※ 本章は委員会報告書より抜粋

## 1. マウス班（権藤委員）

### 1.1. マウス班の背景とマウスモデル利用の検討

放射線の生体への影響を明らかにするため、実験解析が不可能なヒトに替わって、モデル生物を用いた解析が歴史的に進められて来た。なかでも、ヒトと同じ哺乳類でありながら、成体で約 30g と小さく限られた飼育施設でも多数のケージで繁殖させうるマウス(*Mus musculus*)は、日照時間を調節することで3～4ヶ月の世代交代で、年を通して交配繁殖させるシステムも古くから確立され遺伝学研究に活用されている(2)。とくに、放射線被ばくの次世代への影響を明らかにするための Megamouse Project (3) が 1950 年代から大規模に展開され、高線量率急照射によってマウスゲノムに変異が誘発されることを明らかにした(4)。しかし、低線量被ばく、なかでも数 mGy/day 以下の低線量率で長期被ばくした場合の影響については、変異検出方法の限界から知見もデータもないまま 21 世紀を迎えた。一方、ゲノム科学の進展は著しく、2001 年にはヒトゲノム配列概要版(5)が、2002 年にはマウスゲノム配列概要版(6)が参照配列として発表公開され、次世代シーケンサーの出現によってヒトやマウスのゲノムでも、数週間と 1000 ドル程度で解読できる最先端技術が次々と利用可能になった。自然変異が 1 匹のマウスに世代あたり 30 個程度の新たな変異が生じていること(7)など、基礎物理学研究所研究会「放射線の生体影響解明への分野横断による挑戦」(2019 年 5 月 23 日)で権藤委員が紹介した。こういった背景を踏まえ、第 1 分科会では次世代シーケンサーを用いる親子解析（トリオ解析）を駆使することで低線量率長期被ばくによる生体影響解明に必須な非照射群を 10 匹ほど解析すれば数百のバックグランド変異が実験的に検出でき、わずかな放射線誘発変異でも有意差が検出できる可能性があることを議論し、第 1 部会を中心にマウス全ゲノム解読による放射線の生体影響実験解析の検討を開始した。

### 1.2. マウス被ばく実験計画の検討（2019–2020 年度）

第 1 部会では、2019 年からマウス被ばく実験(権藤委員担当)と、ヒトおよびマウス被ばく培養細胞実験(松本委員担当)を並行して進め、まず生殖細胞変異と体細胞変異の比較を実現し、さらに、数理モデル(角山委員担当)との分野横断型融合研究によって、ヒトへの橋渡しまで視野に入れた解析研究を計画立案し、外部資金獲得を目指しながら、研究プロジェクトを開始した。また、国際会議での発表も含め、本計画の必要性と実現性の発表も 2020 年から本格的に開始した。

鍵を握るマウス被ばく実験では、低レベル線量率での生涯被ばくの予備実験として、東海大の施設においてマウスケージから 30cm 離れた 2MBq の  $^{22}\text{Na}$  を線源とした環境下でのマウス交配を 2020 年 8 月 31 日に開始した。30cm の距離において、ガンマカウンター実測値で 0.15mGy/day の低線量率が得られ、低線量率被ばく実験が実現した。同時に、同じ G0 ペアから生まれた同腹 G1 ペアを用いて、非照射コントロール群交配も 8 月 31 日に交配を開始した。

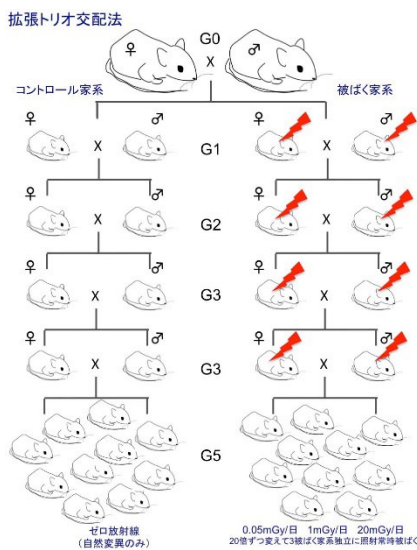
被ばく実験では、低レベルから中レベルの複数の線量率でのマウスへの放射線照射が必要となる。しかし、東海大での予備実験の条件以上の高い線量率の照射、特に変異誘発が見込まれるレベルの線量率での照射実験は東海大施設では不可能である。そこで、坂東委員の提案を受けて、環境科学技術研究所（環境研）の協力を要請したところ、環境研理事長である島田委員よりマウス生涯被ばく実験に対して環境研が協力することについての具体的な協議が提案された。2020 年 8 月 25 日に実験担当の権藤、松

本両委員が環境研を訪問し、現地にて研究設備の見学と協議を行った。環境研の低線量生物影響実験棟では  $^{137}\text{Cs}$  ガンマ線を用いた 0.05mGy/day, 1mGy/day, 20mGy/day といった低線量率で長期に被ばくさせながら大規模にマウスを交配飼育できる世界でもユニークな実験施設であること、また、松本委員が担当する細胞班の研究にも同じ線量率で培養細胞にも照射実験が可能な設備も備わっていること、さらに、環境研でのこれまでの研究成果が第1分科会で計画している研究に大きく役立つこと、特に 20mGy/day での放射線被ばくがマウスに変異を誘発する条件（ポジティブコントロール）として有望であることが分かった。協議の結果、幸いにも、我々の研究プロジェクトの遂行には最良の実験施設を使用することが可能となり、具体的な生涯被ばくマウスの交配・飼育の段取りやスケジュールについても最初の打合せができた。また、環境省の放射線健康管理・健康不安対策事業への応募についても、環境研施設の使用と具体的な照射条件を明記して申請することとした。その甲斐もあり、第1分科会が計画した研究プロジェクト「低線量長期被ばくマウスおよび細胞の超高感度変異検出に基づく放射線影響と変異誘発機構の解析」が環境省事業に採択され、2021年度から3年間の研究を開始することとなった。

### 1.3. 2021年度の研究経過

採択された課題「低線量長期被ばくマウスおよび細胞の超高感度変異検出に基づく放射線影響と変異誘発機構の解析」にて提案計画した環境科学技術研究所低線量生物影響実験棟における 0.05mGy/day, 1mGy/day, 20mGy/day の低線量率長期継世代被ばく3家系、および、非照射コントロール家系の交配と被ばくを図1に概略する。

まず、G0 マウス1ペアおよびそのペアから得られた同腹 G1 マウス4ペアを日本クレアから購入する



ことで、もっとも初動に時間を要すると想定された交配開始に必須な同腹4ペア雌雄を揃えるための1世代を短縮した。実際に、馴化ののち2021年8月25日からコントロール家系を含む上記4群のG1交配と被ばくを環境科学技術研究所において開始できた。20日後の9月15日から次々と産仔が得られ始めた。コントロール家系において当初G2産仔が得られず10月26日の全体班会議でも交配継続に加え追加購入の可能性など検討したものの、その後、コントロール家系においても順調に産仔が得られたことを11月30日の成果発表会でも報告した。最終的に2021年度には、コントロールから49匹、0.05mGy/日照射家系から46匹、1mGy/日照射家系から26匹、20mGy/日家系から27匹のG2マウスがそれぞれ得られ、全ての家系ですでにG2交配も始めており、G3マウスも得られ始めた。

図1. 継世代生涯被ばくの模式図

以上、環境科学技術研究所において、大規模な生涯継代被ばくを2021年度計画通りG3世代まで得た。しかし、誕生日や産仔数に偏りが見られた。そこで、本研究をさらに加速させるため、東海大学で予備実験として進めていた $^{22}\text{Na}$ ガンマ線0.15mGy/日被ばく家系とそのコントロール家系両群から条件の揃ったG4マウスが9匹ずつ得られていることが確認できた。各世代で次世代に至る期間の長短はあったものの、両家系9匹ずつのG4マウスは1匹を省き2022年10月20日から11月22日のほぼ1ヶ月以内の間に生まれた。被ばく家系の1匹だけ2022年9月6日とさらに1.5ヶ月ほど早いものの、個々のマウスの出生

日は記録があるため、この数ヶ月における変異検出数の違いについても別途補正比較検証可能である。2021年度は、この総数18仔と大元のG0ペアの全ゲノム解読を実施し総容量2.3TBのビッグゲノム解読データを得た。

図1に示す変異蓄積系では、コントロール家系でも、被ばく家系でも、自然変異が一定の自然変異率で同程度生じ、世代ごとに蓄積されて行く。被ばく家系でのみ、放射線誘発変異が世代時間に比例してさらに増加蓄積する。原理的には、同じG0ペアからこののべ18匹は得られているので、それぞれの群で検出された変異数を差し引けば、誘発変異が得られるはずである。しかし、実際には、全ゲノム解読によって検出される変異は、すでに公開されているマウスゲノム参照配列との違いでまず検出されたものなので、そもそもG0ペアのゲノムから検出される変異数が、新たに生じた自然変異数や誘発変異数に比べると膨大な数となるため、まず、G0ペアがすでに有していた変異数を差し引かなければ精度の高い新規の変異検出は得られない。また、変異スペクトル解析によって放射線による変異誘発の分子機構まで解析するには、新規に生じた変異だけを解析する必要もあり、そのためにもG0ペアがすでに有していた変異は除外する必要がある。新規の変異をバイオインフォマティクス解析によってビッグデータから抽出するに当たり、まず、本家系からどのように被ばく誘発変異が生じるか、また、どの世代で生じたかなど令和4年度から高速に識別するフィルタリングについても今年度検討を開始した。また、実際の交配様式も、産仔の生日や数などに基づいてバックアップを活用しながらなるべく独立な変異が蓄積される二重いとこ交配で同等に得られたG4世代を被ばく群およびコントロール群を9仔ずつ選別して全ゲノム解読しており、実際の交配家系において、新たに生じた変異がG4までにメンデル遺伝に基づきどのように蓄積されていくか理論集団遺伝学的な解析にも着手した。

#### 1.4. マウスモデル系における誘発変異データのヒトへの外挿の妥当性

マウスなどモデル系における結果がどのように有効にヒトへの影響を知る上で活用できるか、また、これまでマウスやショウジョウバエなどでは放射線被ばくによって次世代に有意に変異が誘発されてきたものの、ヒトにおいて明確に再現性高く検出された例がほとんどないことについて、考察を深め、国際会議（研究成果物7）及びそのプロシーディング（研究成果物11）で公開発表した。一方、ヒトでは、放射線被ばく影響として、2021年に、Chernobyl原発事故作業員とその家族の大規模WGSを用いた解析が発表された（8）。のべ105家系において130人の子どもとともに総数340名のWGSデータを比較解析し、新たな変異を検出して同地域における被ばく歴のない集団と比較するという方法としても規模としても最新かつ最大の解析と言える報告である。父親と母親の被ばく歴は、それぞれ0 - 4,080 mGy（平均値365mGy、中央値29mGy）と0 - 550 mGy（平均値19 mGy、中央値2.1 mGy）であり、網羅的な比較にも関わらず、どのカテゴリーにおいてもコントロール群との違いが全く検出されなかった。一方で、マウスにおいても4 Gy 急照射した親から生まれた仔マウスにおける同様のWGS解析結果が2020年に発表され（9）、塩基置換では被ばく前に同じマウスから生まれた仔マウスと有意な差は見られなかったものの、小さな挿入欠失変異が、被ばく後のマウスから生まれた仔マウスでは変異数が有意に増加していた。このヒトとマウスにおける結果の違いについて、国際会議及びプロシーディングでは以下のように指摘した。1) まずChernobyl被ばくにおいて総線量の記録はあるものの、線量率と被ばく期間が明確でない。すなわち、マウスにおける4 Gy 急照射被ばくに対し、作業員の場合、低線量率で長期に被ばくしたことで誘発変異が検出できなかった可能性がある。2) マウスの場合、被ばく後、妊性が十分に回

復し誘発変異がもっとも検出されやすいことがすでにわかっている時期に交配し産仔を得ている。一方で、Chernobyl コホートでは作業現場から少なくとも 2 年以上経過してから子どもが生まれている。除染作業員など比較的高線量での放射線業務に従事した場合、作業を離れて一定期間は子をもうけないよう助言されるケースも多く、このこともヒトでは一般的に変異が見つからない時期における解析が多い可能性を示唆する。

当然ながら、ヒトにおいて人体実験を実施することは許されず、放射線被ばく量について、線量率や被ばく期間を計画してデータを取得することは不可能である。ヒトにおいて解析可能なケースは、原子爆弾の被ばく者や原発事故における被ばく者とその家族のようにもともと予期せず、不幸にして被ばくしたケースに限られる。この場合、被ばく条件については事後にさまざまな状況データを駆使して推定するしかない。比較的、計画的かつ定量的な被ばくとしては、がん患者の放射線診断や治療、また、その作業員など限られ、子どもを予定する場合には診断治療前にもうけるよう勧められる。放射線作業従事者は、基本的には ALARA の原則に従って 影響がないと想定される防護基準以内での作業を求められ、線量バッジなどから越えた場合には作業現場から離れることを指示される。そのほかに、ヒトにおいては、食生活はもとより、喫煙習慣など、個々人の違いから地域地域の違いが多様であり、さらには、遺伝的背景の違いが加わるため、放射線被ばく影響をそういったヒト集団から検出しても、さまざまな環境および遺伝要因の違いが、検出される変異の違いに加算されるため、データの解釈も困難で、統計的有意差も出にくくなる傾向となっている。

マウスや培養細胞を用いた実験解析では、本研究のように、線源、線量率、被ばく期間、被ばく様式など、すべて前もって計画し、実施にあたりすべて記録を取ることが可能である。ヒトでは限られた条件下でしかデータが得られないものの、モデル系であれば、事前に計画立案した被ばく条件下でデータ取得が可能である。鍵となるモデル実験結果がどこまでヒトへ外挿できるかという課題についても、WGS 法など超高感度な変異検出が可能となったいま、その外挿可能範囲と限界点を含めた実験検証を推し進めるべき準備がようやく揃ったと言える。

## 1.5. 2022 年度の研究経過

2021 年度に全ゲノム解読した  $^{22}\text{Na}$  ガンマ線 0.15mGy/日被ばく家系 9 仔とその非照射コントロール家系 9 仔から得たビッグデータから変異抽出について、全ゲノム解読データのインフォーマティクス解析に実績 (9) のある放射線影響研究所の内村有邦博士に依頼し快諾を得て共同研究を開始した。内村博士の参画によって新たに生じた変異の抽出が急速に進んだ。

これまでの全ゲノム解読による変異抽出解析では、本研究で用いている 150bp ショートリードデータでは、似た配列が多すぎて正確にゲノムのどの配列由来か同定できないため、ゲノムの半分強を占める反復配列領域を解析対象から最初のステップで除外するのが常法であった。一方、内村インフォーマティクスパイプラインでは反復配列も除外することなく全ゲノムに対してマッピング/アラインメントする方法を確立し実績を上げている (9)。具体的には、解読するゲノム DNA サンプルを 500bp にランダムに断片化したシーケンシング用テンプレートの両端 150bp をペアエンドで解読していることを活用して、片方が反復配列由来の 150bp でももう片方の 150bp がユニーク配列であれば「向き」も考慮した上でそこから 500bp 前後離れたゲノム領域を探索することで反復配列でもユニークにマッピング/アラインメントさせるなど大幅に解析領域を拡張できる。

その結果、0.15mGy/日×400日被ばくした第4世代(G4)マウス9仔から95.2(±6.2)変異を、非照射群9仔から100.4(±14.8)変異を1仔平均検出することに成功した。従来のSLT法における「30年で非照射50万匹のマウスから28個検出」という解析限界と比較し、最先端全ゲノム解読技術を用いると1匹の非照射群マウスから総数100個の変異を2年以内に検出可能という2021年度の理論計算上の提唱(研究成果物7,8)を超えて、G4まで蓄積すれば1匹で100変異検出できることを実証した。

一方、環境科学技術研究所において2021年度に開始した大規模継世代生涯被ばく開始したマウスから、2022年度に0.05mGy/日×400日、1mGy/日×400日および非照射系統から予定通りG4世代が得られた。ところが、20mGy/日ではG2メスが不妊となり、変則的に非照射G2メスと交配し、20mGy/日×300日被ばくしたG3世代が得られた。総被ばく線量は6Gy(=20mGy/日×300日)であり、当初、目的とした急照射4Gyの論文(9)と比較可能な被ばくマウスおよびその非照射コントロールマウスが得られた。

最終的に2022年度には、東海大学において全ゲノム解読した20個体(TOKAI)からG0ペアにはなくG4世代までに新たに生じて蓄積された変異検出に成功するとともに、環境科学技術研究所において得られた0.05mGy/日×400日、1mGy/日×400日および非照射系統からそれぞれ4仔ずつ合計12個体(IES1)と、20mGy/日×300日被ばくと上記の変則交配で得られたG3世代6仔と非照射コントロールG3世代6仔の合計12個体(IES2)、さらに、そのオリジナルのG0ペア2個体とあわせて総数26個体からゲノムDNAを抽出して全ゲノム解読を完了した。

## 1.6. 2023年度の研究経過

2022年度に変異抽出および家系解析が急速に進展したことを受け、2023年度計画では当初から内村博士に研究協力者として加わってもらった。さらに、C195委員会にも総会の承認を受け委員に就任してもらった。2022年度に<sup>22</sup>Na 0.15mGyガンマ線被ばくした変異がTOKAIマウス群から抽出でき非照射コントロール群との比較が可能になったのに続いて、2023年度にはまず2022年度末に得たIES1およびIES2マウス群の全ゲノム解読ビッグデータから内村パイプラインによる変異抽出を実施し、家系解析を進めた。

2023年度環境省研究調査事業の第1回班会議を、C195委員会第1分科会第1回研究会とともに、5月29日に、青森県六ヶ所村の環境科学技術研究所にてそれぞれ独立に開催し、得られたばかりの解析結果の報告とともに今後の方針の検討など行った。

まず大きな発見として、変則的に20mGy/day継世代生涯被ばくしたIES2マウス群で、塩基置換型変異が非照射コントロール群と比較して有意に変異が増加していた(p<0.005)。上述の通り、20mGy/day継世代生涯被ばくではG2メスが不妊となり、非照射コントロール群のG2メスを交配して得られたG3マウス6仔を解析したため、G2メス自身の被ばくは成熟卵子が減数分裂期で休止した後からであり放射線被ばく影響はほとんどない。すなわち、有意な検出変異数の増加はほとんどG2オス由来のみと考えられる。オスのみの継世代蓄積にも関わらず、塩基置換が20mGy/dayの長期被ばくによって次世代に有意に誘発されるという結果は、放射線誘発としてはもっとも低い線量率であり大きな発見と考えている。

一方、0.15mGy/day(TOKAI)および0.05mGy/day, 1mGy/day(IES1)における新たな変異は、その非照射コントロール群も含め、全て、二重いとこ交配を含めた完全に同一の交配様式を通して蓄積されてい



る。また、G4 世代までの被ばく日数も約 400 日とほぼ同一である。そのため、検出変異数そのもので線量率の違いを直接比較検討できる。結果として、0.05mGy/day、0.15mGy/day、1mGy/day いずれにおいても非照射コントロール群と比較して全く有意差は検出されなかった。

### 1.7. マウス班の研究成果のまとめ

2021-2023 年度の 3 年間に実施したマウス長期継世代生涯被ばく実験から、以下の研究成果を上げることができた。

1) 2 年で G4 世代まで蓄積した継世代影響を、1 匹あたり 100 個の検出変異と比較して高精度に統計検証できることを実証した。

2) 今回、東海大学と環境科学技術研究所という全く異なる施設および飼育環境下において、非照射コントロール群 3 点 (TOKAI、IES1、IES2) が得られ、その比較からマウス実験にも関わらず極めて再現性の高い結果が得られた。このことは検出変異数が従来の SLT 法と比べ検出変異数が桁違いに多くなったためと考えられ、ごく低線量率においても長期被ばくした影響を科学的に検証できることを強く示唆する。

3) これまで再現性よく放射線誘発による塩基置換を検出した例はなく、本研究で用いた方法によって高速高精度に次世代影響を実験検証し、科学的データに基づいて防護基準など再検証していく扉が開かれた。

4) 暫定的ながら、1 mGy/day までは放射線影響が次世代には生じず、1 mGy/day から 20mGy/day において次世代にリスクが現れてくる可能性を示唆している。とくに、これまで実験検証していく上で、有意に変異を誘発する最小被ばく線量率と被ばく期間が未知であったため、ネガティブデータが出た時の解析方法の妥当性を検証するためのポジティブコントロール実験の設定が困難であった。本研究によって、20mGy/day において 3 世代 300 日被ばくさせることで有意に誘発変異が増加することが明らかとなり、低線量・低線量率被ばくリスク評価の解析方法そのものの妥当性を評価する基準として提案する。

### 1.8. マウス班の今後の展望

これまでのマウス班での研究成果は放射線リスク評価に新たな扉を開いたものと判断している。現在、小さな挿入欠失変異解析や mutational signature 解析を進めている。また今回は、C57BL/6J という 1 つのマウス近交系の遺伝的背景において、塩基置換に検出変異対象を絞り込んで得られた実験結果である。今後、ヒト集団の個人ごとの遺伝的背景の違いによるリスク評価につなげていくため、異なる遺伝的背景のマウスを用いたモデル解析が一つの方向性となる。また、塩基置換に加え、放射線の高線量率急照射ですでに明らかとなっている欠失や転座といった染色体レベルの大きな遺伝的变化が低線量率長期被ばくで生じるかどうかの検証も必須である。さらに、複数実施したコントロール実験の比較から、飼育施設や実験担当者が異なっても極めて再現性の高い結果が得られることも明らかになったので、今後は摂食条件やストレスレベルの違いなど、異なる生活環境において放射線の生体影響がどのように現れるかといったモデル実験の検証も重要な課題と考えられる。

参考文献：

- 1) ICRP publication 103. The 2007 recommendations of the International Commission on Radiation Protection, ICRP Annals of the ICRP 2007; 37 nos 2 - 4.
- 2) Gondo Y. Trends in large-scale mouse mutagenesis: from genetics to functional genomics, Nat Rev Genet, 2008; 9: 803-810.
- 3) Russell WL. X-ray-induced mutations in mice, Cold Spring Harb Quant Biol, 1951; 16: 327-336.
- 4) Russell WL, Russell LB, Kelly E. Radiation dose rate and mutation frequency, Science, 1958; 128: 1546-1550.
- 5) Lander ES et al., Initial sequencing and analysis of the human genome, Nature, 2001; 409: 860-921.
- 6) Waterson RH et al., Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome, Nature, 2002; 420: 520-562.
- 7) Uchimura A, Higuchi M, Minakuchi Y, Ohno M, Toyoda A, Miura I, Wakana S, Nishino J, Yagi T. Germline mutation rate and the long-term phenotypic effects of mutation accumulation in wild-type laboratory mice and mutator mice, Genome Res, 2015; 25: 2245-2249.
- 8) Yeager M, et al. Lack of transgenerational effects of ionizing radiation exposure from the Chernobyl accident, Science, 2021; 372: 725-729.
- 9) Satoh Y, et al. Characterization of induced mutations in offspring derived from irradiated mouse spermatogenesis and mature oocytes, Sci Rep, 2020; 10: 37.

研究成果物（学会発表・論文）：

1. Gondo Y. Comparison of mutation detection systems in the mouse for low-dose radiation effects, WS1 Latest Study for Genetic Effects of Radiation (English session), 日本放射線影響学会第 62 回大会（招待ワークショップ講演）、2019 年 11 月 14 日、京都
2. Gondo Y. High precision risk assessment system with large-scale control experiments in the mouse, Environmental Mutagenesis & Genomics Society (EMGS) Virtual Annual Meeting, Sept 12 – 16, 2020 (Online Poster)
3. Gondo Y. Development of whole-genome sequencing system to detect induced mutations by lifetime-exposure for several generations to low-dose radiation, ICRP: International Conference on Recovery after Nuclear Accidents, “Radiological Protection Lessons from Fukushima and Beyond.” Nov 29 – Dec 4, 2020 (Online Poster)
4. Gondo Y. Massive detection of germline mutations in mammalian genome by whole genome sequencing, MCBIOS and MAQC Joint 2021 Virtual Conference, April 28, 2021 (Online poster)
5. 榎藤洋一. 低線量長期被ばくマウスおよび細胞の超高感度変異検出に基づく放射線影響と変異誘発機構の解析, 令和 3 年度放射線健康管理・健康不安対策事業（放射線の健康影響に係る研究調査事業）キックオフミーティング, 2021 年 5 月 26 日, 東京
6. 榎藤洋一. 特定座位テストから見え得る変異、WGS から見える変異、未だ見えない変異, WS5 継世代影響のメカニズムの理解に向けて「マウスを用いたゲノム変異研究の観点から」日本遺伝学会第

93 回大会(GSJ2021)ワークショップオンライン招待講演, 2021 年 9 月 9 日,

7. Gondo Y. Detection of transgenerational genetic effects based on whole-genome sequencing in the mouse model, The 30<sup>th</sup> Anniversary International Symposium 2021 “Environmental Dynamics of Radionucleotides and Biological Effects of Low Dose-Rate Radiation, Sept 28, 2021 (online 招待講演).
8. 榎藤洋一. 低線量長期被ばくマウスおよび細胞の超高感度変異検出に基づく放射線影響と変異誘発機構の解析, 令和 3 年度放射線健康管理・健康不安対策事業 (放射線の健康影響に係る研究調査事業) 成果報告会, 2021 年 11 月 30 日, 東京
9. Pan B, Ren L, Onuchic V, Guan M, Kusko R, Bruinsma S, Trigg L, Scherer A, Ning B, Zhang C, Glidewell-Kenney C, Xiao C, Donaldson E, Sedlazeck FJ, Schroth G, Yavas G, Grunenwald H, Chen H, Meinholz H, Meehan J, Wang J, Yang J, Foox J, Shang J, Miclaus K, Dong L, Shi L, Mohiyuddin M, Pirooznia M, Gong P, Golshani R, Wolfinger R, Lababidi S, Sahraeian SME, Sherry S, Han T, Chen T, Shi T, Hou W, Ge W, Zou W, Guo W, Bao W, Xiao W, Fan X, Gondo Y, Yu Y, Zhao Y, Su Z, Liu Z, Tong W, Xiao W, Zook JM, Zheng Y, Hong H. Accessing reproducibility of inherited variants detected by short-read whole genome sequencing, *Genome Biol*, 2022; 23: 2. (査読あり原著論文)
10. Uchimura A, Matsumoto H, Satoh Y, Minakuchi Y, Wakayama S, Wakayama T, Higuchi M, Hashimoto M, Fukumura R, Toyoda A, Gondo Y, Yagi T. Early embryonic mutations reveal dynamics of somatic and germ cell lineages in mice, *Genome Res*, 2022; 32: 945-955. (査読あり原著論文)
11. Gondo Y. Detection of transgenerational genetic effects based on whole-genome sequencing in the mouse model, *Radiat Prot Dosimetry*, 2022; 198:1137-1142. (査読あり原著論文)
12. Gondo Y, Yoneya M, Takana S, Komura J, Kimura M, Ohno M, Matsumoto Y, Maki H. Development of the expanded outbreeding method for the genetic risk assessment of low-dose-rate long-exposure to gamma-ray in the mouse, 日本放射線影響学会第 65 回大会シンポジウム SY4 “Find needles from the haystack: next generation study detecting mutation in the whole genome” (English session, 招待講演), 2022 年 9 月 17 日, 大阪
13. 榎藤洋一. 低線量長期被ばくマウスおよび細胞の超高感度変異検出に基づく放射線影響と変異誘発機構の解析, 令和 4 年度放射線健康管理・健康不安対策事業 (放射線の健康影響に係る研究調査事業) 成果報告会, 2022 年 11 月 28 日, オンライン開催
14. 榎藤洋一. 遺伝と遺伝子は違う : 化学変異原から放射線まで, 日本遺伝学会第 95 回大会シニアランチオンワークショップ (招待講演), 2023 年 9 月 7 日, 熊本
15. Gondo Y, Uchimura A, Yoneya M, Takana S, Komura J, Kimura M, Ohno M, Toki H, Bando M, Tsunoyama Y, Matsumoto Y, Maki H, Shimada Y. High-precision detection of de novo mutations and application to risk assessment for the low-dose-rate longtime exposure to radiation. The 14<sup>th</sup> International Workshop on Advanced Genomics (14GW) “Complete human genome and beyond,” Oct 23 – 25, 2023, Tokyo (国際会議ポスター発表)
16. Gondo Y, Uchimura A, Yoneya M, Takana S, Komura J, Kimura M, Ohno M, Toki H, Bando M,

Tsunoyama Y, Matsumoto Y, Maki H, Shimada Y. A multidisciplinary challenge to assess the eext-generation risks of low-dose-rate long-term gamma-ray exposure by whole-genome sequencing in the mouse model. ICRP2023, Nov 8, 2023, Tokyo (Invited oral presentation)

17. 権藤洋一. ミュータジェネシス研究の今昔: 誘発変異から自然変異へそしてまた誘発変異へ, 環境エピゲノム研究会 2023 秋季ネットシンポジウム, 2023 年 11 月 18 日(オンライン招待講演)

(権藤 洋一)

## 2 細胞班（松本委員）

松本は上記の権藤の研究と連携をとりながら、細胞レベルでの低線量・低線量率放射線影響の解析を行った。一つは細胞生存率に着目した解析で、もう一つは変異に着目した解析である。

### 2.1. Part 1 細胞生存率に着目した低線量・低線量率放射線影響の解析

#### 背景と目的

放射線の生物影響、特に X 線や  $\gamma$  線のような低 LET 放射線の生物影響は、一般に、線量率が小さくなるにつれて低下する傾向がある。これは「線量率効果」と呼ばれ、培養細胞、モデル動物、ヒト疫学などを含むさまざまな生物学的システムで認められ、がんの放射線治療や放射線防護の重要な基礎の一つとなっている。低線量率照射は分割照射の 1 回あたりの線量と照射間隔を小さくした極限で、線量率効果は照射中に亜致死損傷(SLD)が修復されることによるものと考えられている。しかしながら、その分子メカニズムには不明の部分が多く残されており、線量率効果がどの DNA 修復経路に関係しているのかが明らかにされていない。

放射線によって生じるさまざまな DNA 損傷の中で、最も重篤と考えられる DNA 二本鎖切断(DSB)は、相同組換え(HR)と非同源末端結合(NHEJ)によって修復される。HR は NHEJ に比べて精度が高いと考えられているが、脊椎動物細胞においては姉妹染色分体を必要とするため、S 期の後半から G2 期に限定されると考えられている。一方で、NHEJ は細胞周期を通じて機能し、G1 期ではほぼ全ての DSB、G2 期でも 70~80%の DSB の修復に関わると考えられている。NHEJ においては、Ku70、Ku86(あるいは Ku80)、DNA 依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット(以下、DNA-PKcs)、XRCC4、DNA ligase IV などが重要な役割を担う。

そこで、線量率効果と NHEJ による DSB 修復との関係を明らかにすることを目的として、京都大学大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センターを利用し、Ku および DNA-PKcs 欠損細胞における線量率効果を調べた。

#### 方法と結果

DNA-PKcs、Ku70 あるいは Ku86 を欠損する 4 種類のげっ歯類細胞とその対照となる 4 種類の細胞を用いた。具体的には、DNA 修復遺伝子欠損細胞として、DNA-PKcs に変異を持つ重症複合免疫不全(SCID)マウス由来の胎仔線維芽細胞(以下、MEF)、Ku70 遺伝子ノックアウト(Ku70<sup>-/-</sup>)マウス由来の MEF、チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79B 由来 Ku86 遺伝子変異株 XR-V15B、チャイニーズハムスター卵巣細胞 CHO-K1 由来 Ku86 遺伝子変異株 xrs-5 である。また、それぞれの対照として、SCID マウスの親系統である CB17 マウス由来の MEF、Ku70<sup>-/-</sup> MEF にマウス Ku70 cDNA を導入した細胞(Ku70<sup>-/-</sup>+Ku70)、V79 細胞、CHO-K1 細胞を用いた。

高線量率(HDR)照射は、コロニー形成のために低密度で細胞をディッシュに播種した後、Gammacell 40 Exactor (<sup>137</sup>Cs)を用いて、0.855~0.911 Gy/min の線量率で、室温で行った。また、低線量率(LDR)照射では、低密度で細胞をディッシュに播種後、低線量率長期照射設備(<sup>137</sup>Cs)内に設置された CO<sub>2</sub> インキュベータ(設定温度 37.0°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5.0%)中に置いて、1.0 または 1.1 mGy/min で照射しながら 1~2 日の培養を行

った。いずれも照射終了後、8-15日の培養を行い、形成されたコロニーを計数し、コロニー形成効率(コロニー数/播種細胞数)と生存率(照射細胞のコロニー形成効率/非照射細胞のコロニー形成効率)を求めた。

結果を図1に示す。対照細胞では、いずれもLDR照射の方がHDR照射より生存率が高く、一般的な線量率効果を示した。SCIDも対照細胞と同様、一般的な線量率効果を示した。しかし、Ku70<sup>-/-</sup>細胞では、LDR照射の方がHDR照射より生存率が大きく下がり、線量率効果の逆転が見られた。また、Ku86遺伝子に変異を持つXR-V15Bとxrs-5は、LDR照射とHDR照射でほぼ同じ生存率を示し、線量率効果の消失が見られた。これらの結果から、線量率効果にKuが関与していることが示された。

次に、LDR照射の細胞周期分布への影響を調べた。LDR照射した細胞をEdU存在下で30分培養した後、クリック反応によってEdUをAlexa Fluor 488で標識するとともに、PIによるDNAの染色を行い、フローサイトメトリーで解析した。その結果、Ku70<sup>-/-</sup>ではLDR照射後にS期細胞の割合の減少とG2/M期細胞の割合の増加が顕著に見られた。一方、対照細胞であるKu70<sup>-/-</sup>+Ku70、SCIDでは、S期細胞の割合の減少、G2/M期細胞の割合の増加ともわずかで、CB17ではいづれも見られなかった。XR-V15BはKu70<sup>-/-</sup>とSCIDの中間程度の変化を示した。このように、G2/M期への蓄積が線量率効果の消失・逆転と相関があることが明らかになった。

### 考察および今後の課題

Mitchellらは、ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞を用いて、0.37~1.54 Gy/hの範囲で線量率の低下に伴い細胞生存率が低下すること、つまり線量率効果が逆転することを報告しているが、いずれもHDR照射(1.43 Gy/min)時よりは高い細胞生存率を示している(Mitchell et al. *Radiat Res* 1979; 79: 537-551.)。また、松本も携わったTomitaらの研究では、KuあるいはDNA-PKcsを欠損するトリ、ヒト細胞を1 mGy/hrの条件で照射しながら培養した場合、対照細胞やHR欠損細胞よりも非照射に対する増殖遅延が大きいことを示している(Tomita et al. *Journal of Radiation Research* 2008; 49: 557-564.)。また、Krederらはパルス状の照射によって平均1 Gy/hrでの照射を行い、対照細胞ではHDR連続照射より生存率が上がるが、NHEJあるいはHR遺伝子に異常を持つ細胞では変わらないことを示している(Kreder et al. *Journal of Radiation Research* 2004; 45: 385-391.)。Tomitaら、Krederらの結果はいずれもLDR照射時の細胞生存・増殖におけるNHEJの重要性を示すものであるが、線量率がTomitaらの研究では今回の研究に比べて60分の1程度と低く、一方、Krederらの研究では15倍程度高い点に違いがある。

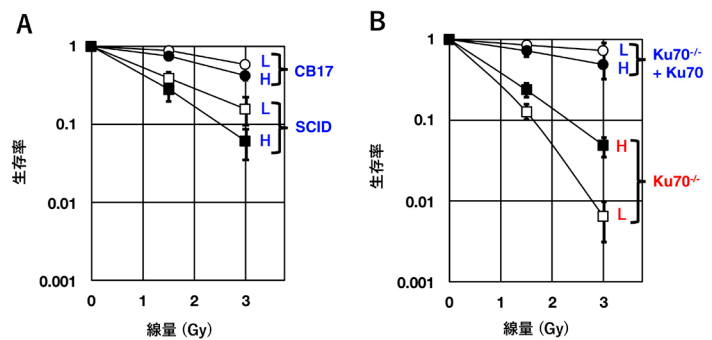


図1 DNA-PKcs 欠損細胞(SCID)、Ku70 欠損細胞(Ku70<sup>-/-</sup>) およびこれらの対照細胞(CB17、Ku70<sup>-/-</sup>+Ku70)の高線量率(HDR)、低線量率(LDR)  $\gamma$  線照射後の生存率曲線。Tsuchiya et al. *Journal of Radiation Research*, 62: 198-205, (2021)より。

線量率効果の要因として、照射中の(1)DNA 損傷の修復、(2)細胞の増殖、(3)(その時点で生き残っている細胞の)細胞周期の分布の変化が考えられる。(1)、(2)については一般的に生存率を増加させる方向に働くが、(3)については生存率を減少させる方向に働く場合がある。(1)の DNA 修復については、HR は S 期後半と G2 期でしか機能しないため、Ku 欠損細胞にとって G1 期での DNA 損傷は致命傷になりやすいと考えられる(図 2)。今回の LDR 照射の線量率では照射時間が細胞周期と同等かそれより長くなるため、照射開始時にどの時期にあった細胞も必ず G1 期を通過すると考えられる。以前の Kreder の研究では照射時間が最大 10 時間程度で、細胞周期と同等かそれより短くなるため、今回の研究ではこの影響がより顕著に現れたことが考えられる。(2)の細胞増殖と(3)の細胞周期分布の変化については、細胞周期解析の結果から、Ku 欠損細胞は G2/M チェックポイントの働きにより、放射線感受性が高い G2/M 期に蓄積するとともに、細胞増殖が抑えられていると考えられた。なお、以前の Mitchell の研究では、HeLa 細胞の場合 0.37 Gy/h (約 10 mGy/min)以上で G2/M 期での細胞周期停止が起こることを示している。Ku 欠損細胞は DSB 修復能が低いため、より低い線量率で G2/M 期への蓄積が起こったと考えられる。

同じ NHEJ に関連する遺伝子でも、Ku 欠損細胞では線量率効果が消失あるいは逆転する一方、DNA-PKcs 欠損細胞では線量率効果が正常に見られた理由については、一つの可能性として NHEJ における DNA-PKcs の機能が Ku より部分的であることなどが考えられる。今後、他の NHEJ 欠損細胞や HR 欠損細胞、さらには多重遺伝子欠損細胞を用いた検討を行うことで、線量率効果のメカニズムをより明らかにできることが期待される。

この結果は、がん放射線治療への応用可能性も考えられる。たとえば、低線量率放射線源を用いた密封小線源治療において、Ku の発現を siRNA や shRNA を用いた RNA 干渉で抑制したり、Ku-DNA 結合阻害剤(Gavande et al. *Nucleic Acids Res* 2020; 48: 11536-11550.)などで阻害したりすることにより、治療効果を向上させられる可能性が考えられる。

## 謝辞

この研究は、主に東京工業大学環境・社会理工学院融合理工学系原子核工学コースの土屋尚代氏によって行われた。細胞周期解析にあたっては、現日本学術振興会海外特別研究員(英国・オックスフォード大学)、東京工業大学特別研究員の塚田海馬博士にご協力頂いた。また、低線量率放射線照射実験にあた

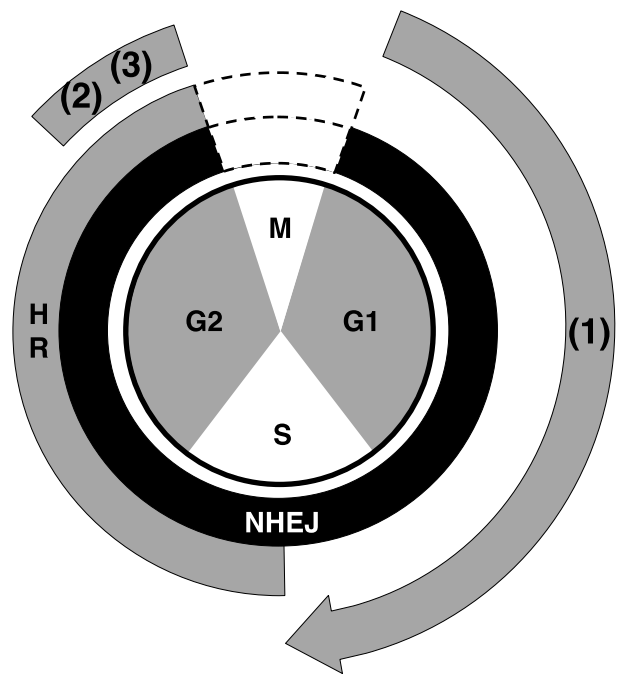


図 2 Ku 欠損細胞の低線量率放射線高感受性についての考察。(1)G1 期から S 期前半にかけて DSB が修復できず、致命傷となる。(2)G2/M チェックポイント活性化により、放射線高感受性の G2/M 期に細胞がアレストされる。(3)G2/M 期でのアレストのため、細胞増殖が抑制される。Tsuchiya et al. *Radiation Protection and Dosimetry*, 2022 より。

っては、京都大学大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センターの設備を利用させて頂くとともに、さまざまな支援を頂いた。現在国際医療福祉大学成田保健学部の小林純也教授は、研究当初は京都大学に在職されていた時期に所内連絡者として設備利用にご協力頂き、その後も引き続き、ご指導、ご協力頂いた。小林先生が異動されてからは、原田浩教授・センター長のご高配ならびに研究室の方々のご好意により、新型コロナウイルスによる困難な状況下でも研究を進めることができた。京都大学大学院理学研究科の孟慶梅博士には低線量率長期照射にご協力頂いた。この研究は一部、環境省放射線の健康影響に係る研究調査事業の一環として行われた。また、日本学術振興会科学研究費補助金(15H02817、20H04334)の支援を受けた。ここに心より御礼申し上げる。

## 附記

本報告は、京都大学大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センター発行の放生研ニュース掲載原稿をもとに、改変を加えたものである(土屋 尚代、松本 義久. 放生研ニュース 2021; 169: 4-6.)。

## 2.2. Part 2 変異に着目した低線量・低線量率放射線影響の解析

### 背景と目的

自然変異、放射線誘発変異の定量的研究の歴史は古いが、外見、薬剤耐性など視認が容易な表現型の変化を与える遺伝子に注目した研究(特定座位(SLT)法)が長らく行われてきた。SLT法による研究としてよく知られる Russell らの研究では、約 50 万匹のマウスを用いて、総数 28 個の変異を検出した(Russell and Kelly. *PNAS* 1982; 79: 539-541)。2010 年前後より、次世代シーケンサ(NGS)の登場により、全ゲノム解読(WGS)が可能となった。以降、ヒトやマウスの個体レベルで、WGS による変異研究が増えていることは前述の通りである。細胞レベルでの変異研究も、薬剤耐性などに注目した SLT 法によって行われてきた。その中で、最も代表的なものとして、核酸代謝経路に注目したものがある(図 3)。HPRT、TK 遺伝子が存在すると aminopterin で de novo 経路を阻害しても、hypoxanthine, thymidine を原料として salvage 経路による合成が可能である。しかし、毒性塩基 6-TG、TFT 存在下ではこれらを核酸に取り込み、致死となる。HPRT、TK 遺伝子が変異により失活していると、いわゆる HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine)培地中で生存できない。しかし、6-TG、TFT 存在下ではこれらを取り込まないため生存可能となる。細胞レベルにおいても、WGS 法は繰返し配列など解読が難しい領域はあるものの 30-50%の領域をカバーでき、表

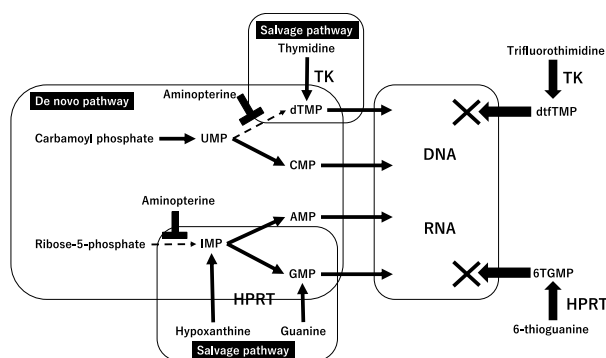


図 3 核酸代謝経路とこれを利用した細胞レベルでの SLT 法による変異検出の原理

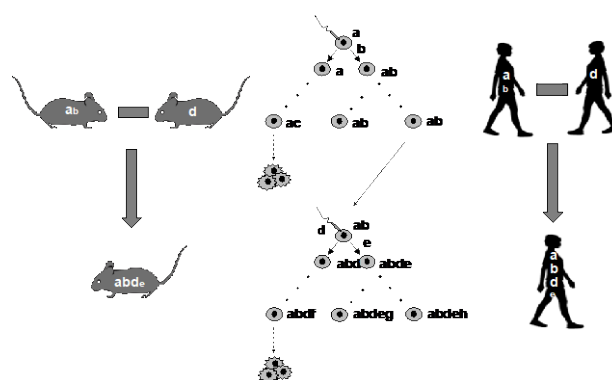


図 4 個体レベルと細胞レベルでのゲノム変異とその継承



現型によらず変異を検出可能という優位性があると考えられるが、WGS を適用した研究は現時点では個体レベルに比べ非常に限られている。個体の場合は親子のゲノムを同時に回収することが可能である一方、細胞の場合は分裂すると親細胞は残らない。一方、個体を構成する細胞は基本的に受精卵を起源とするクローンであるから、親子でのゲノム比較は本質としてはその受精卵のゲノム比較である(図 4)。以上の考察を基に、クローン細胞集団に注目し、細胞レベルでの WGS による変異解析方法の確立を試みた。また、これを用いて、低線量率照射下で培養したヒト、マウス細胞で変異解析を行うことにより、個体と細胞、マウスとヒトの橋渡しをすることを目的として、本研究を行った。

## ヒト正常線維芽細胞 NB1RGB を用いた自然変異および低線量率 $\gamma$ 線誘発変異解析

ヒト新生児皮膚線維芽細胞 NB1RGB は 15 分裂世代のものを理研 Cell Bank から入手した。低線量率連続照射は、環境科学技術研究所(以下、環境研)の $^{137}\text{Cs}$ 線源低線量率細胞照射設備を利用して行った。線量率は、国際宇宙ステーションに近いと考えられる 1 mGy/day、およびマウス低線量率連続照射実験で有意な寿命短縮、腫瘍増加が認められている 20 mGy/day の 2 条件とした。なお、毎日、22 時間照射を行い、2 時間は照射を止めた。これは、権藤らのマウスの照射条件と合わせるためである。今回の実験では 21 日の照射・培養後、96 ウェルプレート を 37°C に維持して環境研から東工大に搬送し、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% に設定したインキュベータ中に一晩静置した。翌日、ウェルを顕微鏡で観察し、増殖が見られたウェルから細胞を回収し、96 ウェルプレート およびディッシュに播種し、再び培養した。

図 4 個体レベルと細胞レベルでのゲノム変異とその継承

クローン細胞集団は、非照射、1 mGy/day、20 mGy/day の各条件から 2 クローンずつを得た。また、バルク細胞集団と 10 クローンを混合したプールを含め 8 サンプルの WGS 解析を行った。細胞からのゲノム DNA 調製は、NucleoSpin Tissue キット(MACHEREY-NAGEL)を用いて当研究室において行った。以降の作業は業者(株式会社クラボウ)に委託した。ライブラリーは TrueSeq Nano DNA library kit (Illumina)を用いて行い、Illumina platform を用いて、ペアエンド、リード長 151 塩基、平均カバレッジ 32-36 回の解析を行った。UCSC のヒト基準ゲノム配列 hg38(2,934 Mbp)を参照配列として用いて、塩基配列マッピングを行い、塩基置換、塩基挿入・欠失、大規模挿入・欠失、コピー数増加・減少、転座などを検出した。

ヒト基準ゲノム配列 hg38 との比較の結果、いずれのサンプルでも、約 460 万の単塩基変化(Single nucleotide variation; SNV)、600~750 のコピー数変化(Copy number variation; CNV)、約 1 万の構造変化(Structural variation; SV)がコールされた。これらのほとんどは NB1RGB がもともと有していた hg38 との違いであり、培養の過程で生じたものはごく一部と考えられた。hg38 の総塩基長が 29 億 3400 万であることから、約 0.16%の違いとなるが、これは一般的な個人差の推定値(0.1%)とほぼ一致している。

この中から、4 段階のフィルター操作を通して、真の変異抽出を行った。まず、6 個のクローン細胞集団の初期コールから、バルク集団でコールされた変異を差し引く操作を行った(Germline フィルター)。このフィルターによって、SNV は約 3 万個まで、すなわち約 150 分の 1 に絞られた。次に、Mapping quality が 20 未満、リード数が 10 未満あるいは 100 以上など信頼度が低いと思われるコールを除外した(第 1 次クオリティフィルター)。続いて、新規変異はヘテロと考えられることから、変異アレル頻度(Variant allele

frequency; VAF)が 0.35 未満あるいは 0.65 以上のコールを除外した(VAF フィルター)。最後に、一塩基多型のデータベース(dbSNP)に存在するコールや Strand bias があるコールを除外した(第2次クオリティフィルター)。その結果、6つのクローン細胞集団でいずれも 750~1,200 個の単塩基置換、約 2,500 個の小規模挿入・欠失が得られた。ここでも、非照射、1 mGy/day 照射、20 mGy/day 照射での差は認められなかった。また、今回の実験では、第一次クローンの始原細胞から第二次クローンの始原細胞までの分裂回数は細胞計数の結果から 17 回と見積もられた。変異頻度を計算すると、1 塩基、1 分裂あたり  $6.3 \times 10^{-9}$  となった。これは、以前の Milholland らの研究(Milholland et al. *Nature Communications* 2017: 15183)で算出された 1 塩基、1 分裂あたり  $2.66 \times 10^{-9}$  という値とオーダーが一致している。

上記の通り、権藤のマウス個体照射実験では単塩基置換に関して、1 mGy/day では非照射と比較して差が認められなかったものの、20 mGy/day で顕著な増加が認められている。一方、ここで細胞照射では単塩基置換で差が見出されなかったことについては、いくつかの理由が考えられる。まず、ここでの細胞照射期間は 21 日であり、積算線量としても 420 mGy であることが挙げられる。権藤のマウス個体照射実験では、実質的にはオスマウスの授精前の線量が寄与すると考えられるが、それでも積算線量はこれよりはかなり高くなると考えられる。また、1 mGy/day あるいは 20 mGy/day の低線量率放射線で徐々に蓄積していく変異を今回のクローン作製法で捉えられるのかということも重要な問題である。クローン細胞集団の WGS 解析を行う場合、その始原細胞が持つヒト基準ゲノムとの差異は基本的に全ての細胞が持つため、ホモであれば 100%、ヘテロであれば 50%のアリル頻度で検出されるはずである。しかし、始原細胞が分裂してできた細胞(これを第一世代細胞と呼ぶ)細胞に生じた変異はその半分、第一世代細胞が分裂してできた細胞(これを第二世代細胞と呼ぶ)で生じた変異はさらにその半分と段々に減少する。マウス実験の状況と比較すると、数世代後の細胞を始原細胞として再びクローンを作製すれば、それまでに生じた変異を蓄積しており、これを検出することが可能となるのではないかとということが考えられた。本研究でも低線量率照射後のクローン細胞集団から再度単一細胞由来クローンの作製を試みたが、本実験で用いた NB1RGB は限られた分裂寿命を持ち、世代を経るごとに増殖能が低下していくことで、取得には至らなかった。

### ヒトリンパ球細胞 TK6 細胞を用いた自然変異および中性子・X 線誘発変異解析

ヒト TK6 細胞は、TK6 は男児由来であるため、X 染色体上にある HPRT 遺伝子の変異を薬剤(6-thioguanine; 6-TG)耐性として検出が可能である。また、17 番染色体上に存在する TK 遺伝子の一方のアレルが変異によって不活性化しているため、TK 遺伝子のもう一方のアレルに生じた変異を薬剤(trifluorothymidine; TFT)耐性として検出できる。これらの特長から、TK6 は長年変異原評価などに頻用されており、本研究で開発する方法と従来の SLT 法での効率や精度の比較検討に適していると考えられた。そこで、TK6 細胞を用いて、クローン集団作製と WGS 解析を行った。

本実験では、放射線源として、近畿大学原子力研究所の原子炉(UTR-KINKI)および X 線照射装置 MBR-1520R-3(Hitachi)を用いた。原子炉は定格 1 W で運転され、試料を挿入した中央部では、 $\gamma$ 線、中性子線各 0.2 Gy/h で、室温で 2.5 時間の照射を行った。X 線照射は、管電圧 150 kV、管電流 20 mA に設定し、0.5 mm の Al と 0.1 mm の Cu をフィルターとして用い、線量率は 0.97 Gy/min であった。照射の 10~14 日前に細胞を 96 ウェルプレートにウェルあたり平均 0.1 個となるように播種し、細胞増殖が見られたウェルの細胞を近大に搬送し、同一ウェル由来細胞(すなわち、同一クローンの細胞)から非照射、

原子炉照射、X線照射の3群となる細胞を分取した。細胞を再び東工大に搬送し、96ウェルプレートに低濃度で播種し、単一細胞由来クローンの単離を試みた(第二次クローン)。分取した残りの細胞はそのまま培養を続けた(第一次クローン)。非照射、原子炉照射、X線照射の第二次クローンが揃ったものを選択し、対応する第一次クローンとともにWGS解析を行った。ゲノムDNAの調製、WGS解析については上記と同様である。

ヒト基準ゲノム配列hg38との比較の結果、第一次、第二次クローンのいずれにおいても約450万個のSNVがコールされた。ここから上記と同様の4段階のフィルター操作により、新規に生じた変異の絞り込みを行った。NB1RGBの場合はバルク培養した細胞の変異をgermlineフィルターで除外したが、ここでは第一次クローンに存在する変異を除外した点が異なる。最終的に、いずれの第二次クローンでも約300個の単塩基置換、2,100~2,900個の小規模挿入・欠失が検出された。非照射と比べて、原子炉照射、X線照射で多いという傾向は見られなかった。

この研究では、まず、単一細胞に由来する第一次クローンと第二次クローンを作製することに成功した。これにより、第二次クローンのWGS結果から第一次クローンの結果を差し引くことで、第一次クローンの始原細胞から第二次クローンの始原細胞までの間に新たに生じた変異を抽出する系を確立した。ここでは、主にSNVの解析を行ったが、単塩基置換、小規模挿入・欠失ともに1Gyの原子炉照射(中性子とγ線の混合場)、X線照射による増加は認められなかった。放射線誘発変異には線量依存性が認められることから、より高い線量では増加が検出できる可能性はある。ただし、1Gyの原子炉照射ではかなりのクローン形成効率低下があり、より高い線量ではクローン取得そのものが難しくなる可能性も考えられる。また、小規模欠失については、総数では差が認められなくとも、結合部位での塩基配列相同性(マイクロホモロジー)の有無や大きさで分類することで非照射細胞と照射細胞での差異が現れる可能性も考えられる。SVやCNVについても同様である。これらについて引き続き解析を行っている。

### ヒトリンパ球細胞TK6細胞を用いた低線量率γ線誘発変異解析

先に述べたように、ヒト正常線維芽細胞NB1RGBを用いて低線量率γ線誘発変異解析を行った。その結果を踏まえ、低線量率照射下で形成させたクローン細胞集団から照射終了後に再びこのクローン細胞集団を作製することが重要であると考えられた。しかし、分裂寿命に限りがあるNB1RGBでは第二次クローンを形成することは現時点で成功に至っておらず、非常に困難であると考えられた。一方、上述のように、ヒトリンパ球TK6細胞では第二次クローンを取得することができた。そこで、ヒトリンパ球細胞TK6細胞を用いてヒト正常線維芽細胞NB1RGBと同様の方法で低線量率γ線誘発変異の解析を行った。本報告書執筆時点では、まず、第一次、第二次クローンを取得し、WGS解析を進行中である。

### 謝辞

この研究は、主に東京工業大学環境・社会理工学院融合理工学系原子核工学コース博士課程のMilai Enkhbaatar氏、修士課程のDulguun Tsumbuukhuu氏によって行われた。環境科学技術研究所での低線量率放射線照射実験では、生物影響研究部の杉原崇博士にご協力頂いた。また、近畿大学原子力研究所での原子炉照射、X線照射実験では、松田外志朗教授、山西弘城教授・所長にご協力頂いた。この研究は一部、日本学術振興会学術研究助成基金(21K19842)の支援を受けた。低線量率放射線照射のゲノムに与える影響の解析は、環境省環境省放射線の健康影響に係る研究調査事業の一環として行われた。中性子のゲノ

ムに与える影響の解析は、中部電力公募研究の一環として行われた。ここに感謝申し上げる。

研究成果物（学会発表・論文）：

1. Tsuchiya H, Shimada M, Tsukada K, Meng Q, Kobayashi J, Matsumoto Y. The role of DNA double-strand break repair through non-homologous end joining in the dose-rate effect in terms of clonogenic ability. *Radiation Protection Dosimetry*, **198**: 990-997 (2022).
2. Tsuchiya H, Shimada M, Tsukada K, Meng Q, Kobayashi J, \*Matsumoto Y. Diminished or inversed dose-rate effect on clonogenic ability in Ku-deficient rodent cells. *Journal of Radiation Research*, **62**: 198-205, (2021).
3. 土屋 尚代、松本 義久. 「線量率効果」のメカニズムに迫る：Ku 欠損細胞における線量率効果の消失・逆転. *放生研ニュース*, **169**: 4-6 (2021).
4. Hisayo Tsuchiya, Kaima Tsukada, Mikio Shimada, Junya Kobayashi, ○Yoshihisa Matsumoto. Involvement of Ku protein in the dose rate effect. (土屋 尚代, 塚田 海馬, 島田 幹男, 小林 純也, ○松本 義久. 線量率効果における Ku タンパク質の関与.) 日本放射線影響学会第 62 回大会, 令和元年 11 月 14-16 日, 京都大学吉田キャンパス(京都), P1-30.
5. Hisayo Tsuchiya, Kaima Tsukada, Mikio Shimada, Junya Kobayashi, Yoshihisa Matsumoto. DNA double-strand break repair function for low dose-rate radiation and Dose-Rate/Inverse-Dose-Rate Effect. The 6th Asian Congress on Environmental Mutagens (ACEM) and the 48th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (JEMS), 18-20 November 2019, Hitotsubashi Hall (Tokyo), P-38 (Poster).
6. Yoshihisa Matsumoto. Basic Mechanisms for DNA Double-strand Break Repair. Second International School on Radiation Research (ISRR-2020), 6-20 September 2020, E-Conference (Google Meet), Scientific Session 1.
7. 土屋 尚代, 島田 幹男, 塚田 海馬, 孟 慶梅, 小林 純也, 松本 義久. DNA 二重鎖修復タンパク質 Ku 欠損細胞における線量率効果. 日本放射線腫瘍学会生物部会第 58 回学術大会, 令和 3 年 6 月 4 日, オンライン, OS1-5(口頭発表).
8. Hisayo Tsuchiya, Mikio Shimada, Kaima Tsukada, Qingmei Meng, Junya Kobayashi, ○Yoshihisa Matsumoto. The role of DNA double-strand break repair through non-homologous end joining in the dose-rate effect in terms of clonogenic ability. Institute for Environmental Sciences International Symposium, 27-29 September 2021, Online, PB-09 (Poster).
9. Enkhbaatar MILAI, Takashi SUGIHARA, Mikio SHIMADA, Yoichi GONDO, Yoshihisa MATSUMOTO. Whole-genome sequencing-based mutation analysis in human fibroblast NB1RGB. 日本放射線影響学会第 65 回大会, 令和 4 年 9 月 15-17 日, 大阪公立大学(大阪), PS1-17(ポスター発表).
10. Yoshihisa Matsumoto. Molecular Radiation Biology on DNA Damage Response for Radiotherapy and Radioprotection in Next Generation. 5th Asian Congress of Radiation Research, 16-20 Nov 2022, DAE Convention Center (Mumbai, India), PL-2 (Plenary talk).
11. Enkhbaatar MILAI, Takashi SUGIHARA, Mikio SHIMADA, Yoichi GONDO, Yoshihisa MATSUMOTO. Whole-Genome Sequencing Analysis on Irradiated Human Cell. 日本原子力学会関東・甲越支部第 21 回若手研究者・技術者研究討論会, 令和 5 年 1 月 10-12 日, 東京工業大学(東京), no.8(ポスター).

12. Tsumbuukhuu DULGUUN, Milai ENKHBAATAR, Takashi SUGIHARA, Mikio SHIMADA, Yoichi GONDO, Yoshihisa MATSUMOTO. Whole genome sequencing and mutation analysis of human cell clones in culture. 第 23 回菅原・大西記念癌治療増感シンポジウム, 令和 5 年 2 月 4-5 日, 聖護院御殿荘(京都), 一般口頭発表 3(口頭).
13. 松本 義久. DNA 損傷と細胞周期. 第 13 回放射線生物学セミナー, 令和 5 年 2 月 18 日, オンライン, 依頼講演(口頭).
14. 松本 義久. 培養細胞系における全ゲノム解読による変異解析. 放射線の利用と生体影響第 195 委員会 第 1 分科会 2023 年度第 1 回研究会, 令和 5 年 5 月 29,30 日, 環境科学技術研究所先端分子生物科学研究センター(青森・六ヶ所), 依頼講演(口頭).
15. Dulguun TSUMBUUKHUU, Enkhbaatar MILAI, Toshiro MATSUDA, Hirokuni YAMANISHI, Mikio SHIMADA, Yoichi GONDO, Yoshihisa MATSUMOTO. Whole genome sequencing and mutation analysis of human lymphocyte TK6 clones in culture. 17th International Congress for Radiation Research, 27-30 August 2023, a la Metropole du Quebec (Montreal, Canada), PS1-37.
16. Enkhbaatar MILAI, Dulguun TSUMBUUKHUU, Toshiro MATSUDA, Hirokuni YAMANISHI, Mikio SHIMADA, Yoichi GONDO, Yoshihisa MATSUMOTO. Whole genome sequencing-based analysis of naturally occurring and radiation-induced mutations in human lymphocyte TK6 clones in culture. 日本放射線影響学会 第 66 回大会, 令和 5 年 11 月 6-8 日, グランドニッコー東京台場(東京), AS3-1(口頭).
17. Enkhbaatar MILAI, Dulguun TSUMBUUKHUU, Takashi SUGIHARA, Mikio SHIMADA, Yoichi GONDO, Yoshihisa MATSUMOTO. Whole Genome Sequencing-Based Analysis of Low Dose Rate Radiation-Induced Mutations in Normal Human Fibroblast NB1RGB in Culture. 7th International Symposium on the System of Radiological Protection, 7-9 November 2023, Grand Nikko Tokyo Daiba (Tokyo), 2101 (Poster).

(松本 義久)

### 3. 理論班（角山委員）

#### 3.1. 理論研究の背景と概要

現行法令や放射線防護分野では総被ばく線量に基づいたリスク評価モデル（直線比例モデル、LQモデル等）を引用する。これらのモデルは、一瞬の高線量放射線被ばくにおける生体影響の評価に用いる限りにおいては最適であるが、低線量率放射線を長時間継続的に被ばくするような環境や線量率が時々刻々と変動する環境での評価には適用できない。これは、従来モデルが被ばくにより損傷した生体分子を修復または除去する仕組みや異常細胞を排除する機構、免疫機能などを全く考慮していないことに起因する。

健康な細胞が放射線による障害から回復する能力を有していること（SLDR や PLDR など）はよく知られる事実である。また個体レベルでは、Russell W.L. らが延べ七百万匹以上のマウスを用いた放射線照射実験（メガマウス実験）を行い、急照射条件よりも緩照射条件の方が、総被ばく線量が同じでも照射後に交配させて次世代の特定遺伝子座位における変異発生頻度（遺伝性影響のリスク）が低いことを明らかにしている。これらは「線量率効果」と呼ばれる実験的事実である。ところが、外部被ばくによるがんリスクについては LQ モデルを基に構築された DDREF を引用し、内部被ばくによる影響については影響が消失減少することは決してないものと仮定し（預託実効線量）、安全側に過剰にマージンをとったリスク評価を行い公衆の安全を担保してきた。このような防護分野におけるデトリメント評価方法は、現在、医療現場や宇宙産業等においても実用面での大きな矛盾をもたらしている。例えば、がん定位放射線治療における分割照射（SRT）においては、患者への照射スケジュールや線量を決定する際には LQ モデルを基盤とした治療効果の評価指標（EQD<sub>2</sub>, BED, ETD など）が用いられるが、照射条件によっては実際の治療効果と評価指標を用いた予測とが一致しないことが既に判明している。また米国では現在、宇宙飛行士の宇宙滞在期間の限度について、従来のデトリメントでは不十分なため、期間限度の見直しや延長が検討されている。これらの事例の他にも、線量率効果がリスク評価に正確に取り入れられていないことに起因する矛盾が多数報告されてきた。

近年構築された「WAM モデル（Whack-A-Mole モデル）」は、生体損傷の修復・排除の仕組み、すなわち「線量率効果」を取り入れた世界初のモデルであり、被ばくによる遺伝性影響の発生頻度を正確に評価及び予測することが可能であるという点において現在唯一のモデルである<sup>25)</sup>。このモデルであれば、線量率が常に変動しているような環境においても、影響発生頻度が経時的に変動する様子を再現することが可能である。さて、WAM モデルを用いてリスク評価や予測を行う際には、モデルが含む4つのパラメータ（後述）の値を設定する必要がある。そこで、モデル構築当初は先述の Russell らの実験値よりパラメータ値を算出していたが、モデルやパラメータ値のさらなる高精緻化を目指そうにも、メガマウス実験による追試等はコスト面からもほぼ実施不可能な状況にあった。ところが今回、全ゲノム解読（WGS）技術を導入できたことにより、実験上の課題を一気に克服できることとなった。

そこで理論研究班は、権藤らによるマウスへの継世代放射線照射実験及び WGS により得られた実測値に対しても、WAM モデルが適用可能か精査した。また、WAM モデルをヒトに適用するためには、ヒト用のパラメータ値を算定する必要があるため、松本らがヒト培養細胞を用いて実施する細胞照射実験から得られる実測値から、ヒト細胞での影響を再現し得るパラメータ値の導出も試みることにした。

### 3.2. WAM モデル (Whack-A-Mole モデル)

WAM モデルでは、正常細胞 (Normal cell)、DNA 損傷細胞 (DNA damaged cell)、変異細胞 (Mutated cell) これら三つの細胞様態が全て健康 (正常) な Healthy State の範疇にあると定義する (図 1)。生体内では、放射線以外の環境要因によっても常に DNA 損傷細胞や変異細胞が生じているが、これらは随時修復あるいは排除され続けているのであるから、その過程を含めて正常な生命現象として捉え、いわゆるホメオスタシスこそが健康の本質であるとし、この Healthy State の範疇から外れた変異細胞が遺伝性影響の発生や発がんの原因となると定義する (図 1)。

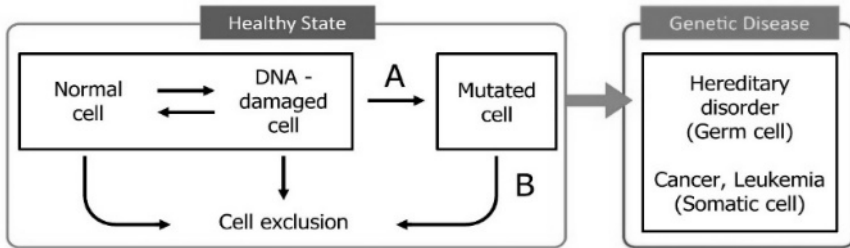


図 1: WAM モデルの基盤となる概念

WAM モデルは、以下の式①に示す二項式で表される。また、式①の A と B は、それぞれ式②の通りである。

$$\frac{dF(t)}{dt} = A - BF(t) \quad \dots \text{式①}$$

$$A = a_0 + a_1 d, \quad B = b_0 + b_1 d \quad \dots \text{式②}$$

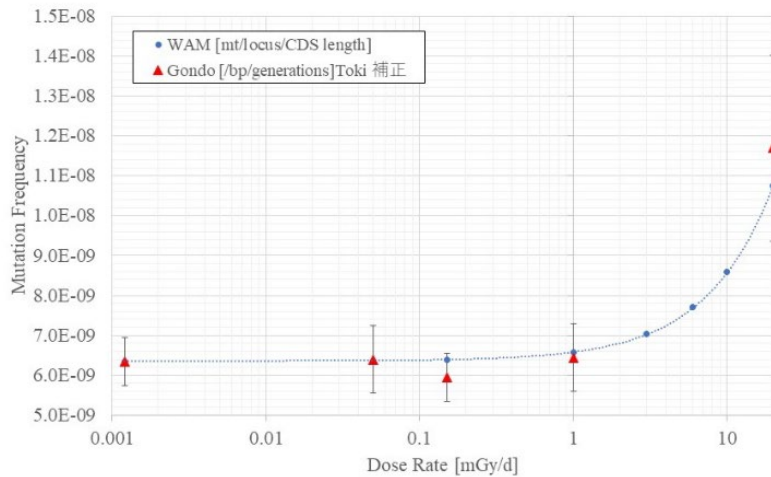
ここで  $F(t)$  は照射個体の次世代における変異個体の発生頻度、 $a_0$  はバックグラウンド環境下で発生する変異 [hour<sup>-1</sup>]、 $a_1$  は追加照射線量 1Gy あたりに発生する変異 [Gy<sup>-1</sup>]、 $b_0$  は自然の細胞死 [hour<sup>-1</sup>]、 $b_1$  は追加照射線量 1Gy あたりの放射線による細胞死 [Gy<sup>-1</sup>]、そして  $d$  が線量率である。このモデルによる計算値が、さまざまな動植物 (*Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Zea mays*, *Chrysanthemum* 等) への放射線照射実験から得られた実測値と極めて良く一致することが既に示されている<sup>2-5)</sup>。

### 3.3. 理論班の研究成果

#### 3.3.1. 小規模ゲノム変異においても WAM 理論を適用可能であることを示唆

当研究班はまず、権藤・松本ら両研究班が実施する照射実験について、線源・線種・エネルギー・線量・線量率等の照射環境に関する情報を計画段階から両班と共有し、WAM モデルを用いての実験結果の予測を行った。また、照射実験が実施される間に、モデルの精度向上や拡張に有益となり得る知見の収集と整理を行った。

令和 4 年度以降からは、WGS による解析結果が順次得られたので、Russell らのメガマウス実験の実測値から算定した 4 つのパラメータ ( $a_0$ ,  $a_1$ ,  $b_0$ ,  $b_1$ ) の値をそのまま流用し、照射実験結果においても WAM モデルを適用可能か検証した。その結果、マウスへの継世代照射実験においても、WAM モデルは極めて高い適合性を示し、このモデルの評価・予測精度の高さをあらためて示す結



果となった<sup>研究成果物 9-11</sup>。権藤らによるマウスへの最大四世代にわたる継世代照射実験より、線量率が 1.0 mGy/d より低ければ、小規模変異(塩基置換や数塩基程度の挿入・欠失変異)については対照群(非照射群)との有意差が見られないことが明らかとなった(図2 ▲)が、WAMモデルはこのゲノムレベルでの変異の線量率応答性を極めてよく再現していた(図2 ●と点線)。

図2：マウス継世代照射実験のWGS解析結果とWAMモデルによる推定曲線(日本放射線影響学会第66回大会発表資料)<sup>研究成果物 9)</sup>

### 3.3.2. WAMモデルの高拡張性・高汎用性を示唆

当研究班はさらに、マウスにおいて確度の高さが実証されたWAMモデルをヒトに適用するための検討を行った。ヒトの被ばくデータについては、広島・長崎原爆被爆者やChernobyl原発事故被災者におけるコホート研究などがあるが、被ばく放射線の線量率に注目したデータは存在しない。そこで、線量率や被ばく期間が明確に記述されている放射線がん治療や宇宙飛行士のデータに着目し、以下の二点についての研究を行った。

- (a) 放射線がん治療(分割照射)への適用: Seesaw WAMモデルの構築と検証
- (b) 不安定型染色体異常の発生頻度予測への応用: UnCA WAMモデル構築の検討

これらの内、(a)についてはWAMモデルを改変し、腫瘍の体積効果やがん細胞の増殖活性などに関する補正項を加えた新たなモデル「Seesaw WAMモデル」を構築した<sup>研究成果物 6)</sup>。このモデルは、非小細胞肺癌(NSCLC)の分割照射治療を行った患者における実測値と極めて良い一致を示した(図3(a))。また、(b)についてはWAMモデルに放射線がん治療を受けた患者や複数回の長期宇宙滞在ミッションを行った宇宙飛行士から採取した末血漿中のリンパ球における不安定型染色体異常発生頻度に関する実測値を元にしたパラメータ値の調節を試みた。また、線量率を変えて長期照射を行ったマウス個体の脾臓リンパ球中における不安定型染色体異常発生頻度の変動に合致するようモデルに補正項を追加するなど(図3(b))のモデルの再検討を行い、染色体異常についてもWAMモデルを適用可能か検証した<sup>研究成果物 5,7)</sup>。しかしながら、これまでのところ染色体異常については生物種や照射環境の差異を超えて統一的に適用できるようなモデルの構築には至っていない。今後も継続して探求すべき研究課題である。



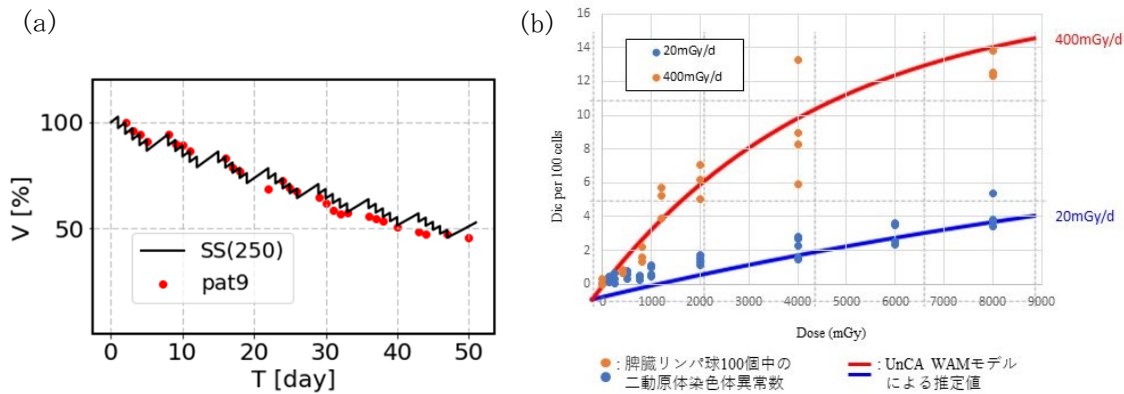


図3 (a) ● : Seesaw WAMモデルの予測値 (腫瘍体積)、実線 : 分割照射治療の実測値  
 (b) マウス脾臓リンパ球中における二動原体染色体異常の発生頻度 (100細胞あたり)

### 3.4. 理論班での研究成果の社会実装への期待

ICRPは現在、原発事故の教訓や医療現場で現存する様々な課題等を踏まえ、新たな主勧告の策定を目指している。2021年より約10年間の計画で研究を推進し、関連知見を積極的に取り入れる予定である<sup>5)</sup>。本研究の成果は、原子力災害被災地や高自然放射線地域の住民でみられる長期間にわたる低線量率放射線被ばく環境や、宇宙での長期滞在あるいは放射線がん治療などにおける中線量率での分割被ばく環境などにも適合する数理モデル及び理論基盤として、将来のICRP主勧告に参考とされるべき重要知見だと我々は位置づけている。今後もICRP等の国際関係機関への働きかけを継続的に努めるべきと考える。

#### 参考文献 :

- 1) Russell WL Kelly EM. Mutation frequencies in male mice and the estimation of genetic hazards of radiation in men, Proc Natl Acad Sci USA, 1982; 79: 542-544.
- 2) Tsunoyama Y Suzuki K Masugi-Tokita M Nakajima H Manabe Y Wada T Bando M. Verification of a dose rate-responsive dynamic equilibrium model on radiation-induced mutation frequencies in mice, Int J Radiat Biol, 2019; 95: 1414-1420.
- 3) Bando M Kinugawa T Manabe Y Masugi M Nakajima H Suzuki K Tsunoyama Y Wada T Toki H. Study of Mutation from DNA to Biological Evolution, Int J Radiat Biol, 2019; 95: 1390-1403.
- 4) Wada T Manabe Y Nakamura I Tsunoyama Y Nakajima H Bando M. Dose and dose-rate dependence of mutation frequency under long-term exposure - a new look at DDREF from WAM model, J Nucl Sci Technol, 2016; 53(11): 1824-1830.
- 5) Manabe Y Wada T Tsunoyama Y Nakajima H Nakamura I Bando M. Whack-A-Mole Model: Towards Unified Description of Biological Effect Caused by Radiation-exposure, J Phys Soc Jpn, 2015; 84: 04400.
- 6) Laurier D Rühm W Paquet F Applegate K Cool D Clement C; International Commission on Radiological Protection (ICRP). Areas of research to support the system of radiological protection,

研究成果物（学会発表・論文）：

1. Tsunoyama Y Toki H Bando M. A Proposal for the Application of Mathematical Models that Accurately Approximate Measured Data to Radiation Protection, ICRP Digital Workshop “The Future of Radiological Protection”, 2021（リモート口頭・招待）
2. Bando M Suzuki K Tsunoyama Y Toki H. Unified Understanding of biological Effects Caused by Radiation – Overcoming LQM Difficulties –, ICRP Digital Workshop “The Future of Radiological Protection”, 2021（リモート口頭）
3. Tsunoyama Y Toki H Suzuki K Bando M. Proposal of a New Model Including Proliferation and Irradiation for Cancer Therapy, the 5th European Radiation Protection Week, 2021（ポスター）
4. Tsunoyama Y Toki H Bando M. Prediction of changes in the frequency of chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes after radiotherapy, the 5th European Radiation Protection Week, 2021（ポスター）
5. 角山雄一, 土岐博, 坂東昌子. 宇宙飛行士の染色体異常と WAM モデル, 第 3 回日本放射線安全管理学会・日本保健物理学会合同大会, 2021（リモート口頭）
6. Bando M, Tsunoyama Y, Suzuki K, Toki H. WAM to SeeSaw model for cancer therapy -overcoming LQM difficulties, *Int J Radiat Biol*, 2021;97(2), 228-239.
7. 角山雄一, 坂東昌子, 土岐博, 宇宙飛行を想定した長期放射線被ばく影響の数理モデルの検討, 第 4 回日本保健物理学会・日本放射線安全管理学会合同大会, 2022, 福岡（口頭）
8. Tsunoyama Y Suzuki K Toki H Bando M. Proposal of New Mathematical Models with Potential to Contribute to Rational Radiation Protection, 6th International Symposium on the System of Radiological Protection; ICRP2021+1, 2022, Vancouver. (e ポスター)
9. 角山雄一, 坂東昌子, 土岐博. マウス継世代照射実験における変異解析の結果と WAM 理論の検証～遺伝性影響におけるバックグラウンドレベルとは?～, 日本放射線影響学会第 66 回大会, 2023, 東京（口頭）
10. Bando M Tsunoyama Yonekura Y Toki H. MRG Data that Revolutionizes the Fundamentals of Radiation Protection over 100 Years and the Theoretical Reproduction and Interpretation by the WAM Model, 7th International Symposium on the System of Radiological Protection; ICRP2023, 2023, Tokyo（ポスター）
11. Toki H Gondo Y Uchimura A Tsunoyama Y Bando M. Statistical analysis of low dose mouse experiments with WGS technology and quantitative reproduction of mutation frequency using Whack-a-Mole model, 7th International Symposium on the System of Radiological Protection; ICRP2023, 2023, Tokyo（ポスター）

（角山 雄一）