

Development, Aging and Cancer, Tohoku University), Ms. Lanlan Haku, Mr. Kengo Kuroda, Ms. Guo Yijie, Dr. Hiroshi Yoneyama, Mr. Hirokazu Watanabe (Laboratory of Animal Microbiology, Graduate School of Agricultural Sciences, Tohoku University), Mr. Koji Abe, Mr. Shogo Nakamura, Mr. Takashi Sugimoto, Mr. Ryota Tsuruya, Mr. Masaya Udagawa (Laboratory of Radiochemistry, Graduate School of Science, Tohoku University), and several medical students of Tohoku University for the commitment to this project.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: Manabu Fukumoto. Performed the experiments: TF Y. Kino YA HY HN YS AI T. Sekine EI Manabu Fukumoto. Analyzed the data: Y. Kino T. Sekine SS. Contributed reagents/materials/analysis tools: Y. Kuwahara T. Shimura Motoi Fukumoto HS YO M. Fukumoto. Wrote the paper: TF Y. Kino T. Sekine Manabu Fukumoto.

References

1. Kinoshita N, Sueki K, Sasa K, Kitagawa J, Ikarashi S, et al. (2011) Assessment of individual radionuclide distributions from the Fukushima nuclear accident covering central-east Japan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 19526–19529.
2. Yasunari TJ, Stohl A, Hayano RS, Burkhardt JF, Eckhardt S, et al. (2011) Cesium-137 deposition and contamination of Japanese soils due to the Fukushima nuclear accident. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 19530–19534.
3. Bowyer TW, Biegalski SR, Cooper M, Eslinger PW, Haas D, et al. (2011) Elevated radioxenon detected remotely following the Fukushima nuclear accident. *J Environ Radioact* 102: 681–687.
4. Sinclair LE, Seywerd HC, Fortin R, Carson JM, Saull PR, et al. (2011) Aerial measurement of radioxenon concentration off the west coast of Vancouver Island following the Fukushima reactor accident. *J Environ Radioact* 102:1018–1023.
5. Tsumune D, Tsubono T, Aoyama M, Hirose K (2012) Distribution of oceanic ¹³⁷Cs from the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant simulated numerically by a regional ocean model. *J Environ Radioact* 111: 100–108.
6. Calabrese E. (2011), Improving the scientific foundations for estimating health risks from the Fukushima incident. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(49): 19447–8.
7. Endo S, Kimura S, Takatsuji T, Nanasawa K, Imanaka T, et al. (2011) Measurement of soil contamination by radionuclides due to the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident and associated estimated cumulative external dose estimation. *J Environ Radioact* 111:18–27.
8. ICRP (2001) Doses to the embryo and fetus from intakes of radionuclides by the mother. ICRP Publication 88 Ann ICRP 31 (1–3).
9. Danscher G (1981) Light and electron microscopic localization of silver in biological tissue. *Histochemistry* 71: 177–186.
10. Agnew WF, Curry E (1972) Period of teratogenic vulnerability of rat embryo to induction of hydrocephalus by tellurium. *Experientia* 28: 1444–1445.
11. Agnew WF (1972) Transplacental uptake of ^{127m}Tellurium studies by whole-body autoradiography. *Teratology* 6: 331–337.
12. ICRP (1994) Age-dependent doses to members of the public from intake of radionuclides: Part 2 Ingestion Dose Coefficients. ICRP Publication 67 Ann ICRP 23 (3–4).
13. Inaba J, Matsusaka N, Ichikawa R (1967) Whole-body retention and tissue distribution of cesium-134 in new-born, young and adult rats. *J Radiat Res (Tokyo)* 8: 132–140.
14. Bandazhevsky YI (2003) Chronic Cs-137 incorporation in children's organs. *Swiss Med Wkly* 133: 488–490.
15. Romanenko A, Kakehashi A, Morimura K, Wanibuchi H, Wei M, et al. (2009) Urinary bladder carcinogenesis induced by chronic exposure to persistent low-dose ionizing radiation after Chernobyl accident. *Carcinogenesis* 30: 1821–1831.
16. Beresford NA (1989) The transfer of Ag-110m to sheep tissues. *Sci Total Environ* 85: 81–90.
17. Polachek AA, Cope CB, Williard RF, Enns T (1960) Metabolism of radioactive silver in a patient with carcinoid. *J Lab Clin Med* 56: 499–505.
18. Danscher G, Lochter LJ (2010) In vivo liberation of silver ions from metallic silver surfaces. *Histochem Cell Biol* 133: 359–366.
19. Mullen AA, Stanley RE (1974) Absorption, distribution and milk secretion of radionuclides by the dairy cow. III. Radiotellurium. *Health Phys* 27: 279–284.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1

Yu Liu^a, Hiroaki Higashitsuji^{a,*}, Hisako Higashitsuji^a, Katsuhiko Itoh^a, Toshiharu Sakurai^b, Kazuhiko Koike^c, Kiichi Hirota^d, Manabu Fukumoto^e, Jun Fujita^{a,*}

^a Department of Clinical Molecular Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, 54 Shogoin Kawaharacho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

^b Department of Gastroenterology and Hepatology, Faculty of Medicine, Kinki University, 377-2 Ohno-Higashi, Osaka-Sayama, Osaka 589-8511, Japan

^c Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

^d Department of Anesthesia, Kyoto University Hospital, 54 Shogoin-Kawaharacho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

^e Department of Pathology, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai 980-8575, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2013

Available online xxx

Keywords:

PSMD10

HIF-1

FIH-1

Oncogene

Hemangioma

ABSTRACT

Gankyrin (also called p28 or PSMD10) is an oncoprotein commonly overexpressed in hepatocellular carcinomas. It consists of 7 ankyrin repeats and interacts with multiple proteins including Rb, Cdk4, MDM2 and NF- κ B. To assess the oncogenic activity *in vivo*, we produced transgenic mice that overexpress gankyrin specifically in the hepatocytes. Unexpectedly, 5 of 7 F2 transgenic mice overexpressing hepatitis B virus X protein (HBX) promoter-driven gankyrin, and one of 3 founder mice overexpressing serum amyloid P component (SAP) promoter-driven gankyrin developed hepatic vascular neoplasms (hemangioma/hemangiosarcomas) whereas none of the wild-type mice did. Endothelial overgrowth was more frequent in the livers of diethylnitrosamine-treated transgenic mice than wild-type mice. Mouse hepatoma Hepa1-6 cells overexpressing gankyrin formed tumors with more vascularity than parental Hepa1-6 cells in the transplanted mouse skin. We found that gankyrin binds to and sequester factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1), which results in decreased interaction between FIH-1 and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and increased activity of HIF-1 to promote VEGF production. The effects of gankyrin were more prominent under 3% O₂ than 1% or 20% O₂ conditions. Thus, the present study clarified, at least partly, mechanisms of vascular tumorigenesis, and suggests that gankyrin might play a physiological role in hypoxic responses besides its roles as an oncoprotein.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Gankyrin (also called p28, p28^{GANK} or PSMD10) was identified as an oncoprotein commonly overexpressed in hepatocellular carcinomas (HCCs) [1]. Gankyrin was also independently isolated as p28, a supposed component of the 26S proteasome, but recent studies have demonstrated that p28 associates only with free 19S particles of the 26S proteasome or their precursors and functions as a chaperone to guide their assembly [2]. As expected for a protein consisting of 7 ankyrin repeats [3], gankyrin interacts with

multiple proteins and shows a variety of activities. For example, gankyrin binds to Rb and Cdk4, and accelerates phosphorylation and degradation of Rb to activate DNA synthesis genes [1]. Gankyrin binds to the E3 ubiquitin ligase MDM2, thereby facilitating ubiquitylation and degradation of p53 [4]. Gankyrin binds to NF- κ B and suppresses its activity by modulating acetylation via SIRT1 [5]. Gankyrin binds to hepatocyte nuclear factor 4 α , which determines hepatocyte differentiation status and enhances its degradation [6]. Gankyrin activates PI3K/AKT/mTOR/hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signaling [7].

Most solid tumors contain hypoxic regions, and one of the most important cellular factors involved in the hypoxic response which promotes angiogenesis, anaerobic metabolism and resistance to apoptosis is HIF-1 [8,9]. HIF-1 is a heterodimeric transcription factor composed of a constitutively expressed β subunit and an inducibly expressed α subunit (HIF-1 α). Under aerobic conditions, HIF-1 α is hydroxylated by specific prolyl hydroxylases at two conserved Pro residues in a reaction requiring oxygen. Hydroxylation

Abbreviations: CAD, C-terminal transactivation domain; DEN, diethylnitrosamine; FIH-1, factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1; firefly-luciferase, F-Luc; H&E, hematoxylin and eosin; HBX, hepatitis B virus X protein; HCC, hepatocellular carcinoma; HIF, hypoxia-inducible factor; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction; SAP, serum amyloid P component.

* Corresponding authors. Fax: +81 75 7514977.

E-mail addresses: hhigashi@virus.kyoto-u.ac.jp (H. Higashitsuji), jfujita@virus.kyoto-u.ac.jp (J. Fujita).

0006-291X/\$ - see front matter © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.093>

Please cite this article in press as: Y. Liu et al., Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.093>

facilitates binding of von Hippel–Lindau protein, a component of the ubiquitin protein ligase, to HIF-1 α , leading to its proteasomal degradation. The ability of HIF-1 α to activate transcription is also prevented by factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) [8–10]. FIH-1 hydroxylates a specific Asn residue in HIF-1 α , and disrupts interaction of HIF-1 α with the transcription co-activators p300 and CBP. Under hypoxic conditions, prolyl hydroxylase and FIH-1 activities are inhibited by substrate (O₂) deprivation, resulting in HIF-1 α stabilization and binding to the p300/CBP complex, thus allowing HIF transactivation.

Since gankyrin plays important roles in cell proliferation and apoptosis, is overexpressed in most HCCs, and confers tumorigenicity to non-malignant cells, we produced transgenic mice that overexpressed gankyrin specifically in the hepatocytes to assess its oncogenic activity *in vivo*. Unexpectedly, the mice developed vascular tumors (hemangioma/hemangiosarcomas) in the liver, and so we have tried to elucidate the underlying mechanisms for vascularization.

2. Materials and methods

2.1. Transgenic mice

To express gankyrin specifically in the liver, cDNA for the mouse wild-type gankyrin N-terminally tagged with 2 \times FLAG was cloned into the pBEPBglII expression vector containing the hepatitis B virus X protein (HBX) promoter [11]. Fertilized eggs were obtained from C57BL/6 mice, and transgenic mice were produced at the Center for Animal Resources and Development, Kumamoto University, Japan. A plasmid containing the human serum amyloid P component (SAP) promoter [12] and expressing mouse wild-type gankyrin N-terminally tagged with 3 \times FLAG was also constructed, and transgenic mice were produced with this at the Genome Information Research Center, Osaka University, Japan, using eggs from D2B6F1 mice. For genotyping, DNA was extracted from the tail of each mouse and analyzed by Southern blotting using gankyrin cDNA as probe.

2.2. Treatment of mice

A single intraperitoneal injection of diethylnitrosamine (DEN, Sigma, 25 mg/kg of body weight) was administered to 14-day-old transgenic and control male mice. Groups of animals were euthanized at 8 months after injection, and the livers were removed, examined for visible lesions, and paraffin embedded after fixation in 10% buffered formalin.

For tumor formation, cells (2 \times 10⁶) were suspended in 0.1 ml of PBS and injected subcutaneously into the back of athymic BALB/c mice (Japan SLC Inc.). Each mouse received Hepa1-6 cells on one side and Hepa1-6/GK cells on the other side. All experiments involving mice were approved by the Animal Research Committee of Kyoto University, and conducted in accordance with the institutional and NIH guidelines for the care and use of laboratory animals.

2.3. Human materials

Eighteen specimens of HCC were taken by needle biopsy before initiation of the treatment at Kinki University Hospital, Japan. The study protocol was approved by the institutional review boards, and written informed consent was obtained from all patients for subsequent use of their collected tissues.

2.4. Cell culture and DNA transfection

U-2 OS cells, HEK293 cells, HEK293T cells, mouse hepatoma Hepa1-6 cells and their transfectants were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 37 °C and 5% CO₂ as described [4]. For mild hypoxic conditions, cells were placed in a modular incubator chamber and flushed with a gas mixture containing 1 or 3% O₂, 5% CO₂, and balance N₂.

Calcium phosphate-DNA coprecipitation method was used for DNA transfection. Plasmids encoding, gankyrin, shRNA for gankyrin, HIF-1 α , FIH-1, and their fusion proteins have been described previously [4,5,10,13].

2.5. Pathological analyses

The immunohistochemical staining was performed on 4- μ m-thick paraffin sections of tissues fixed in 10% buffered formalin as described [14]. The sections were incubated with the primary antibodies against endothelial cell markers CD31 (dianoba GmbH) and CD34 (Abnova), followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-rat immunoglobulin antibody (Santa Cruz Biotechnology), and were developed in Diaminobenzidine colorimetric reagent solution (DAKO). They were counterstained with hematoxylin. To assess the presence of the atypical proliferative lesion of endothelial cells, at least 1 section from 4 lobes was examined under a microscope.

2.6. Analyses of gene expression and protein interactions

Preparation of cell lysates, immunoprecipitation, and Western blot analysis were performed as described [4]. Rabbit polyclonal anti-gankyrin, anti-VEGF-A, anti-HIF-1 α , anti-FIH-1, anti- β -actin, and biotin-conjugated anti-HA antibodies (all from Santa Cruz Biotech.), anti-Myc tag antibody (MBL), anti-FLAG and biotin-conjugated anti-FLAG antibodies (Sigma), mouse monoclonal anti-HA antibody (Roche), and rabbit polyclonal antibody raised against recombinant mouse gankyrin were used as the primary antibodies in Western blotting.

For immunoprecipitation, mouse anti-HA antibody (Roche), rabbit anti-FLAG antibody, and biotin-conjugated anti-FLAG and anti-HA antibodies were used.

Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) analysis was done as described [14]. The relative levels of gankyrin and VEGF-A mRNAs were determined by RT-qPCR using β -actin and GAPDH mRNA for normalization. Primer sequences used were as follows: gankyrin (human, 5'-TCTCAAGCCATCTGTGTG-3' and 5'-TGGTGATGTTGGACTCCTCA-3'), VEGF-A (human, 5'-AAAA CTGCTGGTGCCCAAG-3' and 5'-ATTAACCCAGGCCACCTT-3'; mouse, 5'-CAGGCTGCTGAACGATGAA-3' and 5'-TATGTGCTGGCITTTGGTGAG-3'), β -actin (human, CTACGTCCGCTCGACTTCGAGC and GATGGAGCGCCGATCCACACGG), GAPDH (mouse, 5'-ACAACCTTGTG AAGCTCATTCTCTG-3' and 5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCCTTGG-3').

2.7. Reporter assays

The reporter plasmids p2.1 and p2.4 contain wild-type and mutant copies, respectively, of the hypoxia response element (HRE) from the *ENO1* gene upstream of an SV40 promoter and firefly luciferase (F-Luc) coding sequences [13]. U-2 OS cells were cotransfected with either p2.1 or p2.4, pRL vector expressing Renilla luciferase (pRL-CMV, Promega) and plasmids expressing HA-FIH-1 and FLAG-gankyrin or gankyrin-shRNA [4].

The GAL4 reporter plasmid GAL4E1bLuc containing five GAL4-binding sites upstream of an E1b TATA sequence and the F-Luc gene, and GAL4-expressing plasmids GalA(531–826) and

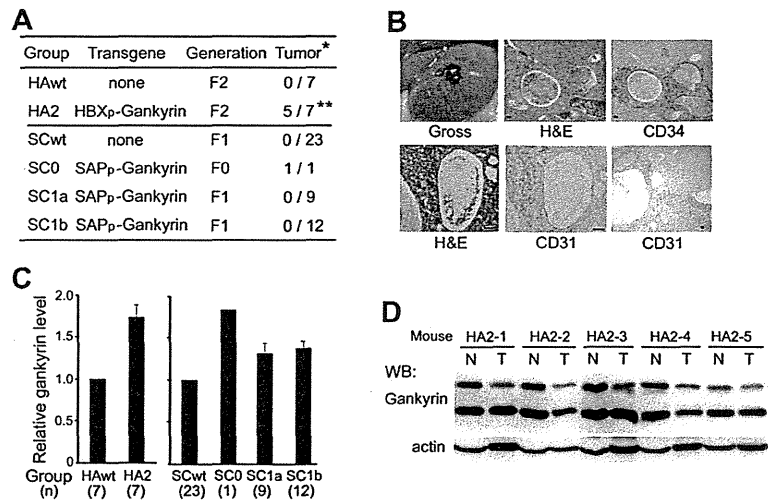


Fig. 1. Vascular tumors in gankyrin-transgenic mice. (A) Incidence of hepatic tumors. Gankyrin was expressed in hepatocytes by using HBX promoter (HBXp) or SAP promoter (SAPp). *number of mice with hepatic tumors at 22 months of age/total number of mice. ** $P < 0.05$ compared with HAwt group. (B) Gross and microscopic appearances of hepatic vascular lesions in transgenic mice. H&E, hematoxylin and eosin staining. CD31 and CD34, immunoperoxidase staining for CD31 and CD34, respectively, using diaminobenzidine as substrate. Bar, 50 μm . (C) Gankyrin expression in the non-tumorous liver. Lysates prepared from indicated mice were analyzed by Western blotting and densitometry. Bars are average \pm SD of total gankyrin levels normalized with actin levels, and expressed as relative to those of wild-type mice. (D) Expression of endogenous and exogenous (arrowhead) gankyrin in the tumor (T) and non-tumorous portion (N) of the liver from indicated F2 transgenic mice. Western blot analysis.

GAL4-N803 expressing the C-terminal transactivation domain (CAD) of the wild-type and FIH-1-insensitive HIF-1 α , respectively, fused to the GAL4 DNA-binding domain were described previously [15]. U-2 OS cells were cotransfected with GAL4E1bLuc, pRL-CMV, GAL4-expressing plasmids, and plasmids expressing FLAG-gankyrin or gankyrin-shRNA.

Transfected cells were exposed to mild hypoxia (1 or 3% O₂) for 48 h and harvested for dual luciferase assays (Promega) as described [5].

2.8. Statistical analysis

To determine whether the means of two groups are significantly different from each other, the Student's *t*-test and chi-square test were used. All statistical analyses including Fisher's exact

probability test were performed using the JMP software (SAS Institute). A *P* value less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Vascular neoplasms developed in the liver of gankyrin-transgenic mouse

The HBX promoter [11] was first used to direct hepatocyte-specific expression of the wild-type gankyrin in transgenic mice. Two founder (F0) mice were obtained and subsequently mated with wild-type mice to produce F1 offspring containing the transgene. F1 mice were then mated with wild-type mice to produce F2 offspring. When F0, F1 and F2 mice were sacrificed at 9–13 months

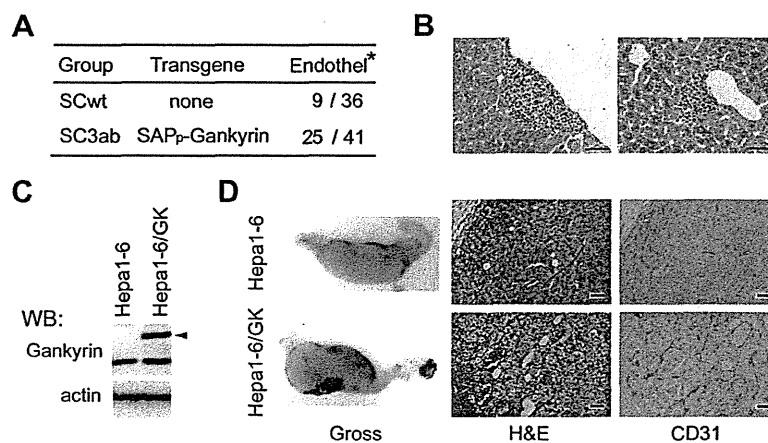


Fig. 2. Increased vascularity of hepatic tumors overexpressing gankyrin. (A) Vascularity in the livers of gankyrin-transgenic (SC3ab) and wild-type (SCwt) mice with diethylnitrosamine (DEN)-induced HCCs. Eight months after DEN treatment, mice were sacrificed and tumor vascularity was evaluated microscopically. *Number of mice with endothelial overgrowth in the liver/number of mice administered DEN. $P < 0.05$ between these groups. (B) Typical examples of atypical proliferation of endothelial cells in (A). H&E stain. Bar, 50 μm . (C) Expression of endogenous and exogenous (arrowhead) gankyrin in Hepa1-6 and Hepa1-6/GK cells analyzed by Western blotting. (D) Vascularity of Hepa1-6 and Hepa1-6/GK tumors in nude mouse skin. Typical gross and microscopic (H&E and immunoperoxidase staining of CD31) appearances of formalin-fixed paraffin-embedded tumors. Bar, 50 μm .

Please cite this article in press as: Y. Liu et al., Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.093>

of age, no hepatic tumor was observed (data not shown). At 22 months of age, however, 5 of the remaining 7 male F2 developed hepatic vascular tumors, whereas no tumor was found in the control mice (Fig. 1A and B). The protein level of gankyrin in the non-tumorous liver of transgenic mice was about 1.7-fold compared with that of wild-type mice (Fig. 1C). The tumors consisted of large somewhat irregular vascular channels lined by endothelial cells. In some areas elongated or spindle-shaped endothelial cells lined vascular spaces, formed solid sheets, with an atypical nucleus, suggesting malignancy (Fig. 1B). Immunohistochemical analysis demonstrated that the tumor cells expressed the endothelial cell markers CD31 and CD34. The expression of gankyrin was less in the vascular tumors than non-tumorous liver tissues (Fig. 1D). Taken together, these results indicated that the observed tumors were hemangioma/hemangiosarcomas.

To increase the expression level of transgene in the liver, we next produced gankyrin-transgenic mice using the SAP promoter [12]. At the age of 22 months, one of the 3 F0 mice developed hemangioma/hemangiosarcomas, but none of its F1 offspring and other 2 F0 mice (Fig. 1A). In the F0 with vascular tumors, the transgene was integrated into more than one locus, resulting in inheritance of less integration sites and lower levels of gankyrin expression in the offspring (Fig. 1C and data not shown).

3.2. Increased vascularity in tumors overexpressing gankyrin

To evaluate the effect of gankyrin on angiogenesis in the liver, we used the DEN-induced hepatocarcinogenesis model. At 8 months after DEN treatment, 100% of wild-type mice and SAP promoter-driven gankyrin-transgenic mice (F4) developed hepatocarcinomas. Multiplicity of tumors was not different between the two groups, but the incidence of microscopic vascular lesions characterized by angiectasis and atypically proliferating endothelial cells was significantly higher in the transgenic mice than wild-type mice (Fig. 2A and B).

To further examine the effect of gankyrin on neovascularization, we stably overexpressed FLAG-tagged gankyrin in mouse Hepa1-6 hepatoma cells (Hepa1-6/GK cells, Fig. 2C). Two weeks after inoculation, both Hepa1-6 and Hepa1-6/GK cells formed tumors, and tumor vascularity was grossly more prominent in the Hepa1-6/GK tumors compared with Hepa1-6 tumors in all 6 mice inoculated (Fig. 2D). Immunohistochemical staining with anti-CD31 endothelial marker antibody demonstrated increased blood vessel density in Hepa1-6/GK tumors compared with Hepa1-6 tumors. Thus, overexpression of gankyrin increased the neovascularization.

3.3. Increased VEGF expression induced by gankyrin

Since HIF-1-mediated expression of VEGF stimulates angiogenesis [8,9], we analyzed expression of HIF-1 α and VEGF-A. As shown in Fig. 3A, expression levels of VEGF-A protein and mRNA were higher in the livers of gankyrin-transgenic mice compared to wild-type mice. Overexpression of gankyrin in Hepa1-6 cells also increased protein level of VEGF-A, although the HIF-1 α level was not increased. (Fig. 3B).

Transcriptional activation of the VEGF gene in response to hypoxia is mediated by binding of HIF-1 to HRE [13]. To examine whether gankyrin affects transcriptional activity mediated by HRE, we transfected U-2 OS cells with HRE-Luc reporter plasmid. Gankyrin enhanced the luciferase activity induced by mild hypoxia (3% O₂) by 4-fold, but only 1.5-fold or no enhancement at 1% or 20% O₂ concentration, respectively (Fig. 3C and data not shown). Conversely, suppression of gankyrin expression by shRNA reduced the luciferase activity. When HRE was mutated, the luciferase activity was not increased by hypoxia, and the enhancing effect

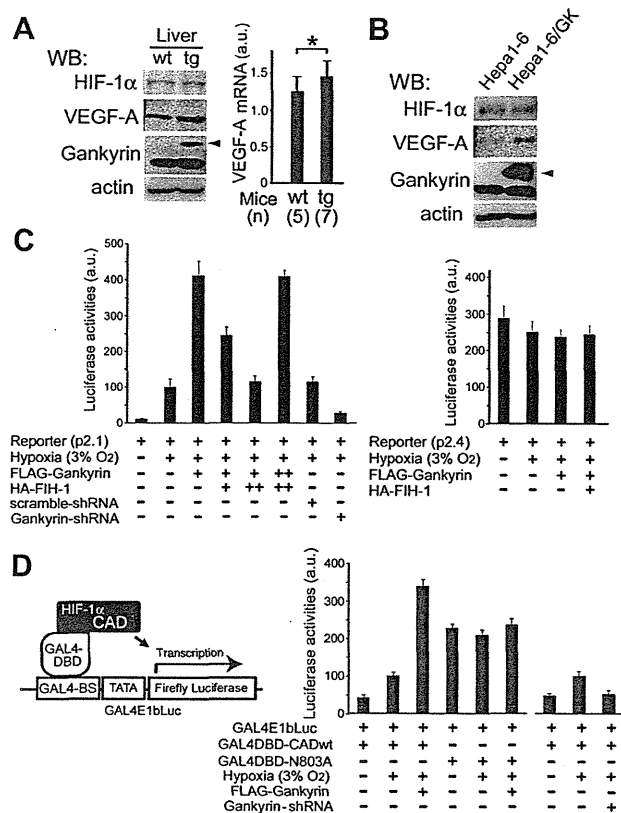


Fig. 3. Increased VEGF expression induced by gankyrin. (A) VEGF-A and HIF-1 α expression in the livers of wild-type (wt) and gankyrin-transgenic (tg) mice. Western blotting (left) and RT-qPCR (right). Arrowhead, FLAG-Gankyrin. VEGF-A transcript levels were normalized with GAPDH levels. Values are average \pm SD. * $P < 0.05$. a.u., arbitrary unit. (B) Effects of gankyrin on expression of VEGF-A. Hepa1-6 cells and Hepa1-6 transfectants overexpressing FLAG-Gankyrin (Hepa1-6/GK) were analyzed by Western blotting. Arrowhead, FLAG-Gankyrin. (C) HRE-dependent transcriptional activation. U-2 OS cells were cotransfected with *ENO1*-Luciferase (Luc) reporter plasmids (p2.1) or mutated reporter plasmids lacking the HIF-1 recognition sequence (p2.4), and plasmids expressing R-Luc, FLAG-Gankyrin, HA-FIH-1, gankyrin-shRNA, and scrambled-shRNA as indicated. 48 h later, some dishes were transferred to hypoxic conditions. After further 48-h incubation, cell lysates were analyzed for Luc activity. F-Luc activity was normalized with R-Luc activity. Values are average \pm SD from 3 independent experiments. a.u., arbitrary unit. (D) Asn803-dependent increase in HIF-1 α transcriptional activity. U-2 OS cells were cotransfected with Gal4-F-Luc reporter plasmids (GAL4E1bLuc), plasmids expressing GAL4 DNA-binding domain (DBD) fused to wild-type (wt) or N803A mutant C-terminal half (CAD) of HIF-1 α , R-Luc, and FLAG-Gankyrin and gankyrin-shRNA as indicated. After 48 h of hypoxic incubation, Luc activities were measured and expressed as in (C). GAL4-BS, GAL4-binding sites. a.u., arbitrary unit.

of gankyrin was not observed, indicating that the effect was mediated by HRE.

We next examined whether gankyrin affects transcriptional activity of HIF-1 α . We employed a reporter system composed of the F-Luc gene whose expression is controlled by GAL4-binding elements (GAL4E1bLuc, Fig. 3D) and the HIF1 α -CAD fused to the GAL4 DNA-binding domain [13]. Compared with normoxia (20% O₂), luciferase activity was 2.5-fold higher at 3% O₂ concentration (Fig. 3D). Overexpression of gankyrin further increased the HIF-1 α activity by 3-fold, whereas suppression of gankyrin reduced it. At 1% or 20% O₂ concentration, however, these effects of gankyrin were not observed (data not shown). When fusion protein of HIF-1 α -CAD mutated at Asn803 was used, gankyrin showed no effect. Since Asn803 is the critical residue for FIH-1 to inhibit HIF-1 α activity, these results suggest that the effect of gankyrin was mediated by FIH-1.

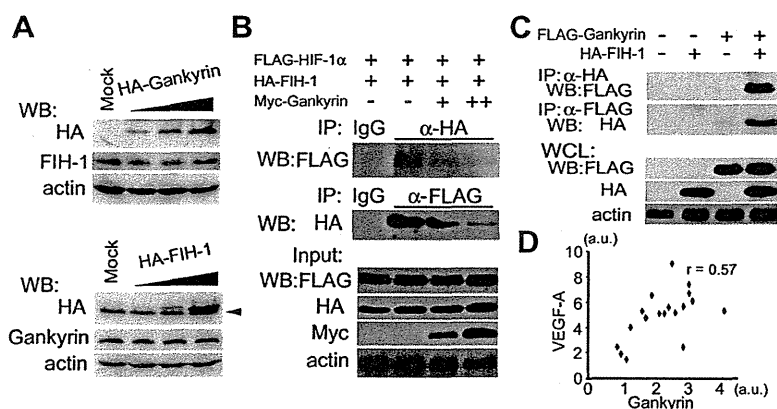


Fig. 4. Binding of gankyrin to FIH-1. (A) Effect of gankyrin on FIH-1 protein level. HEK293 cells were transfected with increasing amounts of plasmids expressing HA-gankyrin or HA-FIH-1, or empty vector (Mock) as indicated. 48 h later, cell lysates were analyzed by Western blotting. Arrowhead, non-specific bands. (B) Effect of gankyrin on binding of HIF-1 α to FIH-1. HEK293T cells were cotransfected with plasmids expressing FLAG-HIF-1 α , HA-FIH-1, and Myc-tag-gankyrin, and cultured at 3% O₂ for 48 h. Cell lysates were immunoprecipitated (IP), and precipitants and inputs were analyzed by Western blotting (WB) using the indicated antibodies. (C) Interaction of gankyrin with FIH-1. HEK293T cells were cotransfected with plasmids expressing FLAG-Gankyrin and HA-FIH-1, and cultured at 3% O₂ for 48 h. Cell lysates were immunoprecipitated, and precipitants and inputs were analyzed by WB as in (B). WCL, whole cell lysates. Experiments were repeated three times with similar results. (D) Scatter plot of mRNA levels of gankyrin and VEGF-A in human hepatocellular carcinoma specimens. a.u., arbitrary unit.

3.4. Sequestration and inhibition of FIH-1 by gankyrin

We examined whether or not gankyrin suppresses FIH-1 expression. Overexpression of gankyrin did not affect FIH-1 level (Fig. 4A). When FIH-1 was overexpressed, the gankyrin level did not change, either. Thus, we suspected that gankyrin might affect the interaction of FIH-1 and HIF-1 α . As shown in Fig. 4B, binding of FIH-1 and HIF-1 α was suppressed by gankyrin. As FIH-1 binds ankyrin repeat domain proteins [16] and gankyrin contains 7 ankyrin repeats [3], we checked the possibility that gankyrin binds to FIH-1. HA-FIH-1 and FLAG-gankyrin were coimmunoprecipitated by either anti-HA or anti-FLAG antibody from cells cultured at 3% O₂, but not or only slightly at 1% or 20% O₂ concentration, respectively (Fig. 4C and data not shown). These results demonstrate that gankyrin binds to and sequester FIH-1, resulting in decreased interaction between FIH-1 and HIF-1 α and increased activity of HIF-1 under mild hypoxic conditions. When we further examined the mRNA levels of gankyrin and VEGF-A in biopsy specimens of human HCC, a moderate positive correlation ($r = 0.57$, $P < 0.02$) was found (Fig. 4D), suggesting that the gankyrin–FIH-1 interaction might have some clinical relevance.

4. Discussion

Hemangioma/hemangiosarcomas are occasionally seen in mouse liver with incidences less than 3% [17]. In the present study, 71% of the F2 transgenic mice overexpressing HBX promoter-driven gankyrin developed hepatic hemangioma/hemangiosarcomas, whereas none of the wild-type mice did. This phenotype was probably not due to random insertional mutagenesis in the transgenic mice as it was also observed in F0 mice expressing SAP promoter-driven gankyrin. In the subsequent generations of this F0, however, gankyrin levels were decreased and no hemangioma/hemangiosarcoma developed. The finding that mice with 70% increase, but none with 35% increase in the protein level of hepatic gankyrin developed hemangioma/hemangiosarcomas (Fig. 1C) suggests that there is a critical level of gankyrin to show this phenotype.

How does overexpression of gankyrin in hepatocytes induce endothelial cell-derived tumors? As gankyrin induces dedifferentiation of HCCs [6], it may also induce transdifferentiation of hepatocytes into endothelial cells. A more feasible explanation, however, would be that gankyrin facilitates a sustained release

of angiogenic growth factors, providing the milieu leading to hemangiosarcoma formation [18]. Consistent with this notion, endothelial overgrowth was more frequent in the HCCs of gankyrin-transgenic mice than wild-type mice after DEN treatment. Furthermore, mouse hepatoma transfectants overexpressing gankyrin induced more neovascularization than parental cells when subcutaneously inoculated into nude mice. VEGF-A was the first identified member of the VEGF family, and mice with transgenic VEGF-A expressed in the liver have increased vascularization and vascular permeability [19]. When myoblasts overexpressing VEGF-A are transplanted into limb or heart muscle of mice, they induce hemangiomas [20]. In the present study, VEGF-A level was higher in the liver of gankyrin-transgenic mice compared with wild-type mice, and gankyrin increased VEGF-A expression in cultured hepatoma cells. Thus, VEGF-A probably contributed to formation of hemangioma/hemangiosarcomas in the gankyrin-transgenic mice.

HIF-1 is a major factor regulating the level of VEGF, and despite induction of multiple angiogenic target genes such as adrenomedullin and placental growth factor, VEGF is essential for HIF-1 mediated neovascularization [21]. Hypoxia induces changes in the hydroxylation status of well-conserved Pro and Asn residues of HIF-1 α , resulting in protein stabilization and transcriptional activation [8,9]. Signaling through receptor tyrosine kinases induce HIF-1 expression by increasing the rate of HIF-1 α protein synthesis via PI3K/Akt/mTOR pathway [8], and gankyrin activates this to promote VEGF expression [7]. In the present study, the HIF-1 α protein level was not increased in cells overexpressing gankyrin. Reporter assays indicated, however, that HIF-1 transcriptional activity was increased by gankyrin, and that it was dependent on Asn803 of HIF-1 α . FIH-1 hydroxylates this residue and inhibits transcriptional activity [8–10]. In addition to HIF-1 α , proteins containing ankyrin repeat domains are common targets for hydroxylation by FIH-1, and I κ B α as well as Notch-1 block the FIH-1-mediated HIF-1 α repression by sequestering FIH-1 [22]. In this case, the recognition of each substrate and their relative affinity for FIH-1 is an important determinant of FIH-1 sequestration and consequently HIF regulation. Consistent with the recent study using recombinant proteins [16], gankyrin and FIH-1 were co-immunoprecipitated from cell lysates. Furthermore, overexpression of gankyrin reduced the amount of HIF-1 α bound to FIH-1, suggesting a higher affinity for FIH-1 of gankyrin than HIF-1 α at mild hypoxia. As expected, gankyrin increased the HIF-1 transcriptional activity in reporter

assays, which was dependent on FIH-1. Interestingly, the binding of gankyrin to FIH-1 and enhancement of HIF-1 activity were dependent on the O₂ concentration.

We have demonstrated in this study that sustained overexpression of gankyrin in hepatocytes, although at a low level, can induce liver hemangioma/hemangiosarcomas in mice. Gankyrin sequesters FIH-1 from HIF-1 α to activate HIF-1 and increase production of VEGF, which at least partly contributes to hemangioma/hemangiosarcoma formation. Further studies will clarify why spontaneous hemangioma/hemangiosarcomas are extremely rare in humans in contrast to experimental animals [18], and shed light on mechanisms of vascular tumorigenesis as well as hepatocarcinogenesis. The present study also suggests that gankyrin might play a physiological role in hypoxic responses besides its roles as an oncoprotein.

Acknowledgments

We thank Profs. R.J. Mayer, University of Nottingham, U.K. and Ryuzo Sakata, Kyoto University for helpful suggestions, and Ms. Fumiyo Kataoka for technical assistance. This work was partly supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan, the Japan Society for the Promotion of Science, Cooperative Research Program of IDAC, Tohoku University, Global COE Program "Center for Frontier Medicine", MEXT, Japan, and the Japan Smoking Research Foundation.

References

- [1] H. Higashitsuji, K. Itoh, T. Nagao, et al., Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas, *Nat. Med.* 6 (2000) 96–99.
- [2] H.C. Besche, A. Peth, A.L. Goldberg, Getting to first base in proteasome assembly, *Cell* 138 (2009) 25–28.
- [3] S. Krzywdka, A.M. Brzozowski, H. Higashitsuji, et al., The crystal structure of gankyrin, an oncoprotein found in complexes with cyclin-dependent kinase 4, a 19 S proteasomal ATPase regulator, and the tumor suppressors Rb and p53, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 1541–1545.
- [4] H. Higashitsuji, H. Higashitsuji, K. Itoh, et al., The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53, *Cancer Cell* 8 (2005) 75–87.
- [5] H. Higashitsuji, H. Higashitsuji, Y. Liu, et al., The oncoprotein gankyrin interacts with RelA and suppresses NF-kappaB activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 363 (2007) 879–884.
- [6] W. Sun, J. Ding, K. Wu, et al., Gankyrin-mediated dedifferentiation facilitates the tumorigenicity of rat hepatocytes and hepatoma cells, *Hepatology* 54 (2011) 1259–1272.
- [7] J. Fu, Y. Chen, J. Cao, et al., P28GANK overexpression accelerates hepatocellular carcinoma invasiveness and metastasis via phosphoinositol 3-kinase/AKT/hypoxia-inducible factor-1 α pathways, *Hepatology* 53 (2011) 181–192.
- [8] G.L. Semenza, HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20 (2010) 51–56.
- [9] M.Y. Koh, G. Powis, Passing the baton: the HIF switch, *Trends Biochem. Sci.* 37 (2012) 364–372.
- [10] P.C. Mahon, K. Hirota, G.L. Semenza, FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity, *Genes Dev.* 15 (2001) 2586–2675.
- [11] K. Koiike, K. Moriya, K. Ishibashi, et al., Expression of hepatitis C virus envelope proteins in transgenic mice, *J. Gen. Virol.* 76 (1995) 3031–3038.
- [12] K. Araki, O. Hino, J. Miyazaki, K. Yamamura, Development of two types of hepatocellular carcinoma in transgenic mice carrying the SV40 large T-antigen gene, *Carcinogenesis* 12 (1991) 2059–2062.
- [13] G.L. Semenza, B.H. Jiang, S.W. Leung, Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 32529–32537.
- [14] A. Umemura, Y. Itoh, K. Itoh, et al., Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and insulin-like growth factor-binding protein 5 expression in human hepatocellular carcinoma, *Hepatology* 47 (2008) 493–502.
- [15] B.H. Jiang, J.Z. Zheng, S.W. Leung, et al., Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α , *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 19253–19260.
- [16] S.E. Wilkins, S. Karttunen, R.J. Hampton-Smith, et al., Factor inhibiting HIF (FIH) recognizes distinct molecular features within hypoxia-inducible factor- α (HIF- α) versus ankyrin repeat substrates, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 8769–8781.
- [17] T. Harada, A. Enomoto, G.A. Boorman, R.R. Maronpot, Liver and gallbladder, in: R.R. Maronpot (Ed.), *Pathology of the Mouse*, Cache River Press, Vienna, IL, 1999, pp. 119–183.
- [18] S.M. Cohen, R.D. Storer, K.A. Criswell, et al., Hemangiosarcoma in rodents: mode-of-action evaluation and human relevance, *Toxicol. Sci.* 111 (2009) 4–18.
- [19] P. Leppänen, I. Kholová, A.J. Mähönen, et al., Short and long-term effects of hVEGF-A(165) in Cre-activated transgenic mice, *PLoS One* 1 (2006) e13.
- [20] M.L. Springer, A. Banfi, J. Ye, et al., Localization of vascular response to VEGF is not dependent on heparin binding, *FASEB J.* 21 (2007) 2074–2085.
- [21] S. Oladipupo, S. Hu, J. Kovalski, et al., VEGF is essential for hypoxia-inducible factor-mediated neovascularization but dispensable for endothelial sprouting, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108 (2011) 13264–13269.
- [22] D.H. Shin, S.H. Li, S.W. Yang, et al., Inhibitor of nuclear factor-kappaB α derepresses hypoxia-inducible factor-1 during moderate hypoxia by sequestering factor inhibiting hypoxia-inducible factor from hypoxia-inducible factor 1 α , *FEBS J.* 276 (2009) 3470–3480.

福島第一原子力発電所事故に伴う 被災家畜の臓器別放射性セシウム 濃度

福本 学, 被災動物放射能評価グループ*

福島第一原子力発電所（福島原発）の爆発事故以来、放射線の健康影響に国民的関心が集まっている。事故の結果として、大量の核分裂物質であるテルル 129m (^{129m}Te)、ヨウ素 131 (^{131}I)、セシウム 134 (^{134}Cs)、及びセシウム 137 (^{137}Cs) が環境中へ飛散した。その詳細については東京電力のホームページに掲載されている。2011年4月22日をもって福島原発から半径20 km 圏内が警戒区域として設定され、原則的に立ち入り禁止となった。住民が避難した後、圏内には牛3,400頭、ブタ31,500頭そして鶏63万羽が取り残された。5月12日、政府は福島県に対して残留家畜の安楽死処分を指示した。

文部科学省と米国エネルギー省は共同で福島原発から半径80 km 圏内の航空機による地上1 mにおける空間線量分布の計測を行った。しかし、このデータはあくまでも空間線量であって体内に摂取された放射性物質の濃度を反映していないため、我々は警戒区域内で殺処分された家畜の臓器別放射性物質の同定と濃度計測を行った。2011年8月29日から11月15日にかけて福島原発から南西の1村の52頭と北側の

1市の27頭の合計79頭の牛の採材が可能であった。その内訳は雌成牛63頭（妊娠3頭を含む）、胎児牛3頭、雄仔牛10頭、雌仔牛3頭であった。 γ スペクトロメータ測定においていずれかの試料で ^{134}Cs 、 ^{137}Cs 、銀110m (^{110m}Ag)、 ^{129m}Te のピークを認めた。体内に取り込まれた放射性物質はいったん血流へ入ること、放射性セシウムが全臓器で検出されたこと、検出された放射性物質の中で ^{137}Cs の半減期が最も長いことから、血中 ^{137}Cs の放射能濃度を種々の比較の基準とし、放射能は最も飛散が大きかった3月15日に遡って物理的崩壊による減衰の補正を行った。 ^{110m}Ag は全頭の肝と8%の牛の末梢血中で検出された。興味深いことに、短半減期の ^{129m}Te が腎特異的に検出され、頻度は62%であった。末梢血と各臓器の ^{137}Cs 放射能濃度は相関しており、相関係数は臓器によって異なっていた（図1）。これにより血中放射性セシウム濃度を計測することによって各臓器別にセシウム濃度を推定できることになる。放射性セシウム濃度は異なる部位の骨格筋間で有意差はなく、血中セシウムの21.3倍であった。心筋は横紋筋であるにもかかわらず骨格筋に比較して集積量は低かった。牛は捕獲された地区によって3グループに分類できた。グループ1とグループ3は同一の地域で福島原発の北側に位置している。グループ1では畜舎内で飼育されており、飼料はあまり放射性物質に汚染されていなかったが雨水を摂取していた。グループ3

* 東北大学農学研究科 磯貝恵美子, 福田智一, 理学研究科 木野康志, 高等教育センター 関根勉, 歯学研究科 篠田壽, 加齢医学研究所 桑原義和, 志村勉, 福本基, 山形大学理工学研究科 阿部靖之, 新潟大学農学部 山城秀昭, 放射線医学総合研究所 三枝新, 理化学研究所筑波研究所 小幡裕一

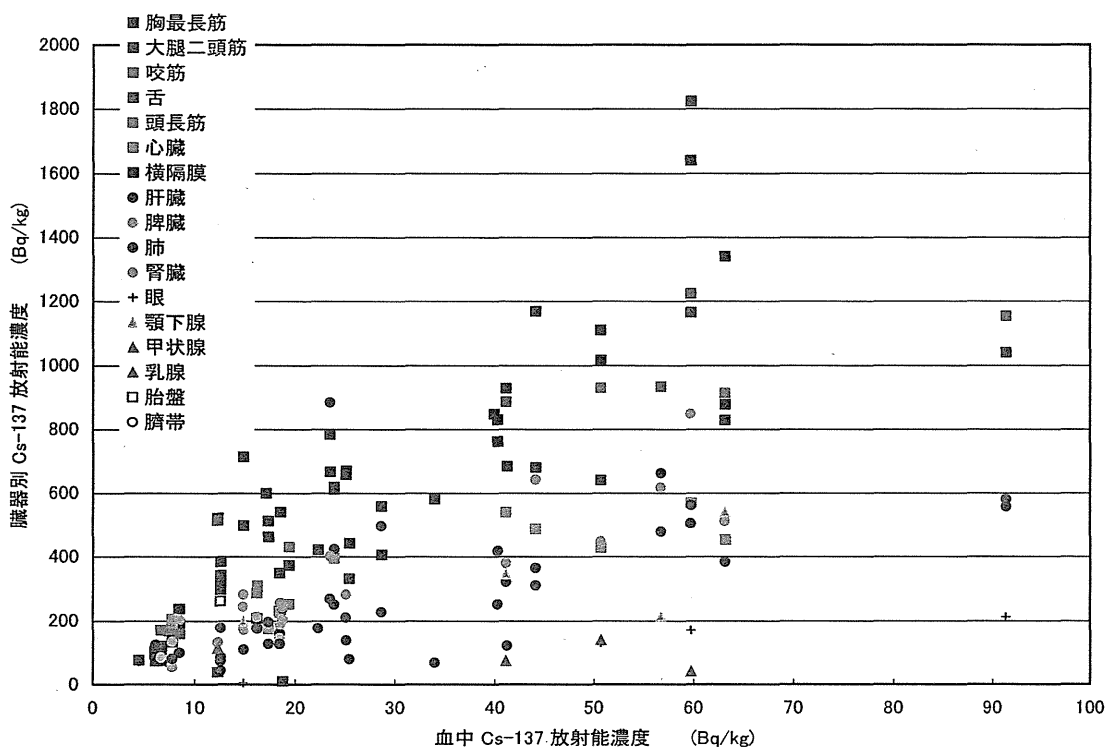


図1 全血中の Cs-137 濃度と臓器別に集積した Cs-137 濃度の関係

は屋外での放れ畜状態であった。グループ2は原発の南西に位置しており、放れ畜状態であった。

母体から胎児への放射性物質がどれくらい移行するかは大きな関心事である。今回、意外にも3頭の妊娠牛が見付かったが、我々はそれらの牛において親・胎児の臓器別放射能の比較を行った。放射性セシウムの放射能濃度は、臓器に関わらず胎児では母親の1.3倍であった。しかしながら、 ^{110m}Ag と ^{129m}Te の両方とも胎児では検出できなかった。安楽死前に3組の母親・仔牛のつがいを確認できた。これらの仔牛は原発事故後に生まれたもので、授乳と草食の混合であった。この場合も臓器に関わらず、放射性セシウム濃度は仔牛の方が母親牛よりも高かった。放射線に対する感受性が成人よりも小児に高いことから、放射性セシウムの小児に対する影響についてより一層の注意が必要であろう。

チェルノブイリ原発事故の際、ベラルーシのゴメリ州では内分泌臓器に放射性セシウムの集積が多いと報告されていたが、我々の結果から、甲状腺に集積している放射性セシウム濃度は低く、その影響は想定されていたよりも小さいと考えられる。

放射性銀は核分裂生成物ではなく、安定銀の中性子による放射化の産物である。今回の計測では全頭の肝に ^{110m}Ag の放射能が検出されたが血中濃度との相関は認めなかった。文科省の線量地図によれば、6月14日時点での土壤中における ^{110m}Ag の放射能は、 ^{137}Cs の1/10~1/20であった。しかし、我々の結果では ^{110m}Ag と ^{137}Cs の放射能濃度はほぼ同レベルであった。肝は銀集積の第一義的な標的臓器であることが明らかとなった。

3月15日の段階で土壤中の $^{129m}\text{Te}/^{137}\text{Cs}$ 放射能濃度比はグループ2の採材場所で0.34、グル

ープ3で1.41であった。放射性物質の飛散から7か月後であってもなお、腎に ^{129m}Te が検出されたことは驚きであった。文科省の線量地図によれば、原発からの方角によって $^{129m}\text{Te}/^{137}\text{Cs}$ 比は一定であったことを考えると腎における ^{129m}Te の濃縮は特異的である。もう1つの放射性テルルである ^{132}Te の半減期は76.3時間であり、その放射壊変物は甲状腺に集積する放射性ヨウ素132 (^{132}I)である。さらに経口摂取されたテルルは甲状腺に集積しやすいという報告がある。これらを考え合わせると、テルルによる甲状腺障害は無視できない可能性がある。本稿は福島原発事故に伴う警戒区域内の家畜臓器についての放射能分布についての初めての報告である。現在、牛以外にも豚について採材を進めており、今後更にイノブタなど他の動物へも対象を拡げて放射線内部被曝に係る動物臓器の

ーカイクの構築、土壌など環境中の放射能測定結果と比較すること、経時的な濃度変化の測定による実効半減期を算定すること、放射線内部被曝による急性変化の組織学的検索、放射性物質の組織内分布の解析などを行うことによって一般の放射線防護に役立つ研究としたい。

【謝辞】

本研究は関係省庁、福島県、関係市・村、多くの院生、学生の方々の力の結集した結果です。関係各位に深甚の謝意を表します。

また、加齢医学研究所の支援、東北大学総長裁量経費、文部科学省特別経費ならびに平成23年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業による支援をいただきました。ここに深甚の謝意を表します。

(東北大学加齢医学研究所)

被災動物における放射能と人との関わり

福本 学*

1. プロローグ・時系列を振り返って

平成 23 年 3 月 11 日、午後 2 時 46 分、筆者は研究室で執務中だった。突然の大きな揺れ、それは今までに経験したことがない大きな、そして長い揺れで周りの事物はスローモーションのように歪んで揺れている。いつ終わるのか、この世の終わりかという感であった。阪神淡路大震災のときは京都にいたが、揺れの持続時間は全く比較にならなかった。

当日は夕方から雪模様となり、寒い一夜を自宅で過ごした。電気ガス水道が遮断されて通信手段が壊滅した中で、地震の 1 時間後に大津波が襲来しているとは全く想像できないことであった。仙台にいる自分達だけが被災者と勝手に思い込んでいた。地震と津波の結果、限定した一都市とか地域という点ではなく、大いなる面としての大災害となった。そのため、東京との情報・物流が全く遮断された翌朝の新聞発行は地方紙の河北新報のみであった。それを見て驚愕した。巨大津波が押し寄せて海に没した気仙沼が燃えている¹⁾。

翌 12 日に東北大学の原子科学安全専門委員会が片平本部で招集された。バスもガソリンもないので私の所属する加齢医学研究所から片道 30 分を徒歩で向かった。そこで東北大学福島第一原子力発電所事故対策本部が立ち上がった。しかし、「どうも原発が怪しい、最悪メルトダウンが起こってチェルノブイリ事故位のことを覚悟しなければいけない。東北大は原発に一番近い総合大学なので放射性物質の心配もあるが何らかの対応が必要になるだろう。しかしあらゆるインフラが壊滅した仙台には情報は伝わって来ない、とにかく情報は東京に集中している。」という内容の一方的な伝達のみであった。東京が主な被災地であつたら、混乱はこんなものではないことを実感するとともに、一流国の日本でチェルノブイリと同じほどの酷いことが起こるはずがないと信じていた。

電気が通じたのは 14 日の夕刻であった。やっと点いたテレビでは、地震と津波のニュースはほとんどなくなり、テレビの画面は東京電力福島第一原子力発電所(原発)の高さ 14m の津波による全電源喪失とそれに続く冷却不能、そして白煙上がる爆発事故か、ポポポポ〜ンという公共広告機構の声ばかりであった。当初、東大特任教授が NHK テレビで「心配ありません、原子炉は停止しているので」と言っていた。

3 月 13 日新聞が一斉に炉心溶融の報道をし、その前後に 20km 圏内住民に避難指示がでてから、いつの間にか彼の特任教授の言葉が「完璧に安全な原子炉はありません、安全をとことん追求すれば経費負担が大きくなり過ぎて現実的ではありません」、「核実験をやっていた頃は皆さんもっと被ばくしていた」という論調となった。そのうち、3 月 15 日になって 2 号機の水素爆発があり世界に緊張感が走った。

3 月 11 日から 28 日目の 4 月 7 日にとつともなく大きな余震に見舞われた。実質的には 3 月 11 日の本震よりも大きな揺れで研究室の被害はこちらによる方が大きかった。最初は海の中で起こっていた地震が余震を繰り返す度に陸地へ上がり、内陸へ、そして南へ向かっている、という。福島原発はこれ以上もつのだろうか、と多くの人々が不安を感じていたが、地震そのものによる炉心の影響はなかったようである。東京電力は、原発事故について、発生当初から 3 月末までにセシウム 134 (^{134}Cs)、 ^{137}Cs 各 1×10^{16} ベクレル (Bq) を放出していたが、4 月の放出率はその 1% 未満まで落ちているとの見解を示した²⁾。

4 月 22 日政府は、原発から半径 20~30km 圏内に出していた「屋内退避指示」を解除し、新たに「計画的避難区域」と「緊急時避難準備区域」に設定し直し、住民の避難を進めるよう福島県知事らに指示した。さらに、福島第一原発から 20km 圏内が「警戒区域」に指定され、立入り禁止となった。警戒区域は元々畜産が盛んで、福島県の発表では牛 4000 頭 (農水省では約 3400 頭)、豚 3 万頭、鶏 63 万羽、馬 100 頭

*東北大学加齢医学研究所 病態臓器構築研究分野
(Manabu Fukumoto)

などの家畜が取り残された。しかし警戒区域の設定後、立ち入り禁止となり家畜の飼育が不可能なため、畜舎から放たれて野生化したり、施設内で餓死したりして放置されたままとなった。政府は、家畜の衛生面への配慮や放射性物質に汚染された肉が消費者の食卓に上ることを懸念して、5月12日警戒区域内に残されている家畜について、所有者の同意を得た上で殺処分する方針を固め、福島県に指示した。

NEDO（新エネルギー・産業技術総合開発機構）から、「東北地方の震災復興の一助としてなにか大きな産業基盤の構築を考えている、放射線影響を研究している立場から意見具申をしてもらいたい」というお話を頂いた。5月17日NEDO本部で発表した際、「警戒区域内に沢山の家畜が放置されており、安楽殺処分の対象となっている。家畜は放射性物質に汚染されているはずであり、普段では全く不可能な壮大な放射性物質の投与実験を行なっているようなものである。このような貴重な試・資料を保存、生かさずして日本の科学者の面目は立たない。広島長崎の原爆被爆者の記録が放射線外部被ばくの人体影響を知るためのゴールドスタンダードであるならば、今回の福島原発の被災家畜は内部被ばく資料のゴールドスタンダードになる。不幸なことではあるが放射線の生物影響は事故からしか学べない。しかし警戒区域内の家畜から採材してアーカイブを構築する取っ掛かりと資金がない」と開陳したところ、「確かに極めて重要なことであるがNEDOの本旨ではないし、話が大きすぎて単一省庁で把握できることではない」という意見であった（図1）。

賛同はされても具体的な支援なし、と落胆しながらも仙台への帰途、なんとかせねば、今の我々ではなく次世代に残せる役に立つことをせねばならない、と思い直した。東北大学内外の生物、放射線関係の研究者に電話で声かけを行い、皆からアーカイブの構築の実施協力の承諾を得た。連絡と支援依頼先は10人くらいでも実質2日で済んでしまった（図2）。ただし研究者はみな各々自我を持っているために共同研究者に筆者の思い、願いである、「次世代の財産となる可能な限り良質な資料を残す」を理解してもらうことは大変に努力が必要であった。

次に警戒区域へ入り採材する算段である。具体的方策がなんとも思い浮かばず、飛び込みで複数省庁を当たった。わかったことは、行政の縦割りと各市町村長の権限が強いこと、縦割り行政だからこそ横串を通して今までになかったことを実現するのが政治力、であった。6月4日から数回、福島県庁を訪れ現地災害対策本部や県農林水産課の担当者と話した。霞が関の官僚は「是非やって下さい」とエールを送ってくれても東京から福島への出向は毎週人が替わるか長くても1ヶ月のローテーションなので中長期的な交渉は無理であった。地方行政側は「今までになかったことだ。ひとつができないから全てできない」、大学人は「今までに経験したことがないからここに来て交渉している。どれもできないならば、どこからならできるか」という論理は真っ向からぶつかった。公益性の担保、警戒区域内の物品の持ち出しなど、ひとつひとつクリアし、最終的に福島県民の、そして震災からの復興に貢献できるかが論点となった。

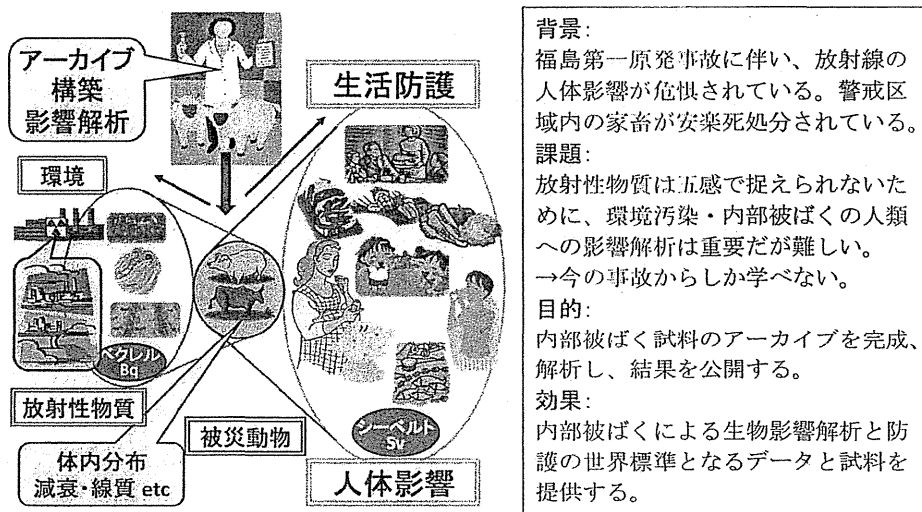
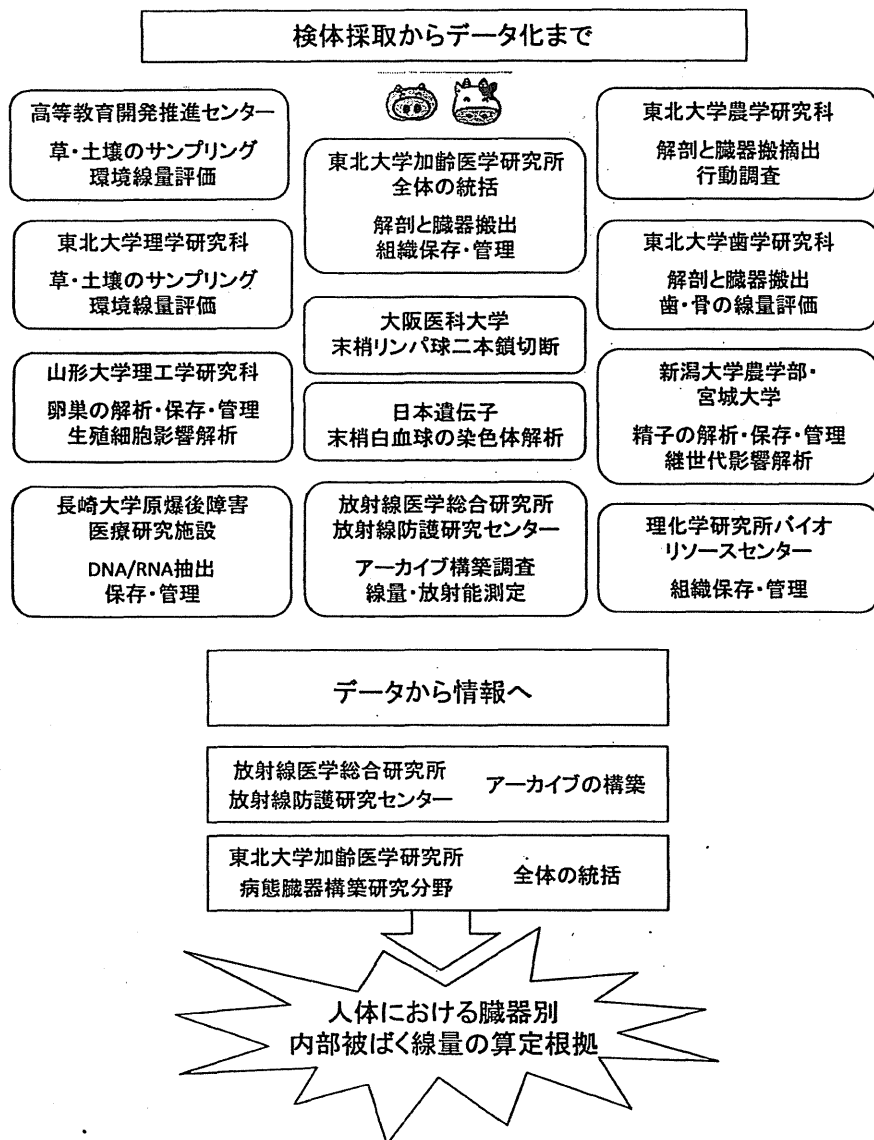


図1 今回たちあげたプロジェクトの概略



放射線内部被ばくの生物やヒトへの影響を正しく知るための基礎的なプロジェクトである。全日本の体制で、環境を含めて、殺処分される家畜の内部被ばく量を臓器別に正確に計測し、計測した臓器を後世に残すことが目的である。近い将来に計測技術がさらに発達し、放射線生物学の知識が深まることは疑いがなく、この事業で保存された試・資料は人類、地球への放射線影響を知るために必須である。このような事業は、科学技術の発達、人々の理解、経済的な裏付け、情報の公開のどれが欠けても不可能であるため、世界でも日本以外では不可能である。このプロジェクトを遂行して行くために、すでに強固な研究の準備態勢は整っている。

図 2

次に現場での交渉である、被災した酪農家にどのようにお願いして、研究用の採材についての了承を得るかであった。家畜保健衛生所の獣医さんと酪農家、市町村との日頃の信頼関係なくしての承諾はありえないことであった。

多くの困難を乗り越えて警戒区域内へ入城できたのは8月29日であった。その記念すべき第一日はあいにく、外国出張中であり、農学部の教員が主体であった。良質なデータとするためには「頭数よりも臓器数」の意味が通じず、第1回目は残念ながら警戒区域内へ立ち入って採材を始めてみた、という結果になった。引き続き毎週1回程度のペースで採材があり、多い日で12頭の解剖をすることが

可能であった。机上の話ではなく実際に始めてみると、あらゆる想定外が待っていた。炎天下、埋却場の狭い壕内での解剖、手袋からは滝のような汗が流れ出るし、冬は地べたからの寒気と早い落日に追い立てられた。優に体重500kgの牛は、一度クレーンで壕内へ置かれたら二度と動かすどころか体位変換も不可能で、ヒトとは全く異なる大きさと臓器位置に当惑した。また、小型動物やヒト用解剖道具では全く歯が立たない。埋却作業員はできるだけ早くに警戒区域外へ退避したいのでどンドンせつつくし、1頭あたり30分くらいという超短時間での作業のため、頭から消石灰をまかれる、という状態であった(図3)。

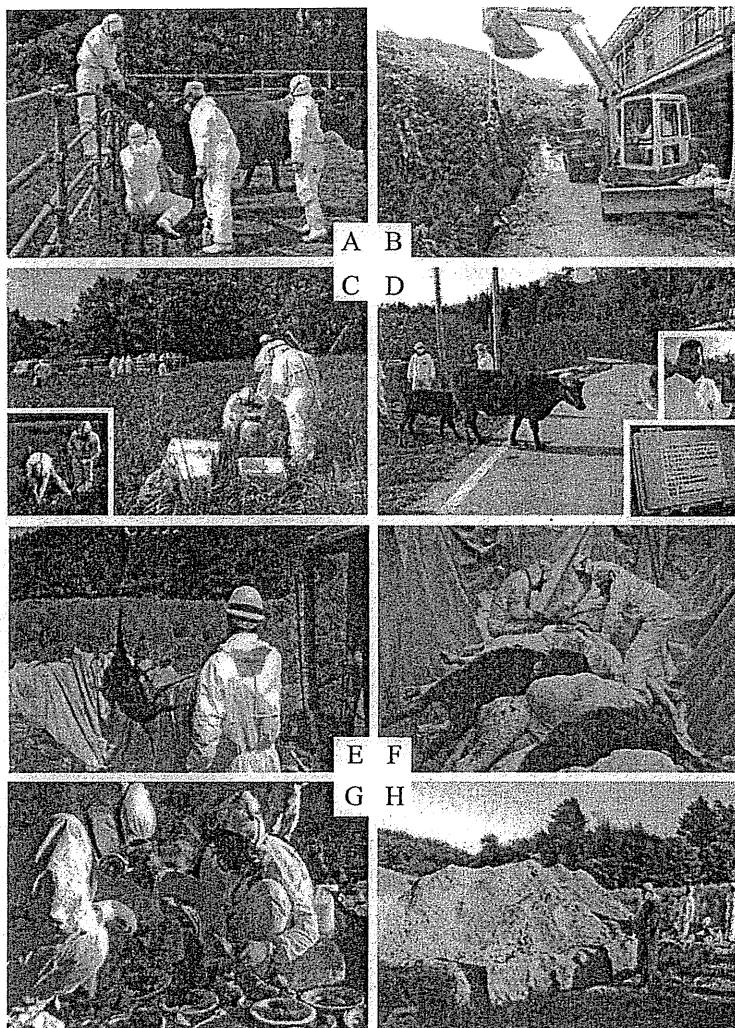


図3

A: 餌付けを行い、追い込み柵に入った牛に深麻酔を施行したあと、頸静脈から採血し、放射能計測や染色体分析を行った。

B: 筋弛緩剤で安楽殺された牛は重機でダンブカーへ移された。

C: 捕獲した周囲で土壌と牛の菌型のある草を採取し、環境と食餌と体内の放射性物質の関連を知る手がかりとした。

D: 捕獲个体数の減少から、線量計を搭載したGPS端末を牛にとりつけて牛の行動範囲をリアルタイムに確定し、捕獲の効率を高めることにした。

E: 深さ3mに掘った埋却塚にビニールシートが張られ、その中にクレーンで1頭ずつ降ろされた。

F: 消石灰の散布されるまでの30分以内に解剖・採材を行った。

G: 臓器は地上へ運ばれ、凍結、線量測定、組織標本用に分割して収納した。

H: 埋却前に僧籍を有した作業員が鎮魂の読経を行い、我々は黙祷を捧げた。

そしてなんといっても一番の悩みは実施に必要な経費捻出である。後に骨切り用電動鋸, 自家発電機を購入し, 血球分離用に小型遠心機を持ち込み, レンタカーは今だに借りっぱなしが続いている。臓器保存用の超低温冷凍庫 20 台, ガンマスペクトロメーターの購入, そして使い捨て防護服その他の維持費用の捻出も課題であった。今やらなければいつできる, 他に誰がやる, という信念ゆえに我慢できた反面, それだけに精神的な負担の大きさは人生終わりに差し掛かった身には大変に堪えた。熱意は通じるもので文部科学省を始め関係省庁の理解と, 東北大学総長裁量経費による支援, 加齢医学研究所からの研究費の前借りでなんとか糊口をしのごうことができた。23年10月半ばで捕獲が終了するか越冬せずに死んでしまうであろう, との予想は外れて, 現在(平成24年10月26日現在)に至るも捕獲を

逃れた家畜が野良状態となっている。

余談になるが, 平成23年6月30日に都内の食肉処理場で解体された南相馬市の農家が出荷した肉用牛11頭から国の暫定規制値(500 Bq/kg)を超える放射性セシウムが検出されたのを皮切りに, 食肉から次々と放射性セシウムが検出された。本来考えられていた汚染地域外である宮城県登米市から出荷された牛肉からも検出され, ほとんどの都道府県に流通していることも判明した。3月19日農林水産省は, 原発周辺県に対して, 飼料・水・飼養場所等の飼養管理上の注意事項を通知していた³⁾。しかし, 農家に周知されなかったために, 原発事故直後に牧草や天日干ししていた稲わらが雨とともに降ってきた放射性物質で汚染し, それを与えていたために起こったと考えられている。環境中に放散した放射性物質による汚染がいかに広範囲に拡散するのかを物語っている。

2. 放射線の生物影響と規制⁴⁾

広島・長崎の原爆で明らかのように、体外からの放射線の急性大量被ばくは死をもたらす。死を免れても、発がんリスクを上昇させることが疫学調査から知られている。しかし0.1グレイ(Gy:吸収線量の単位)以下の被ばくでは影響が明確でない。発がんは被ばく後、年単位の潜伏期間をおいてから起こる晩発性影響のひとつである。被ばくによって発症したのか否かという因果関係が不明なこともあるため、国際放射線防護委員会(ICRP)は、放射線による発がんリスクは線量に比例し、しきい線量はないと仮定している。被ばくを規制する行政はこの考え方を採用している。

内部被ばくは放射性物質が水や食物を介した経口摂取や空気を介した経気道摂取することによって起こる。東京電力福島第一原発の爆発事故によって、大量の放射性物質が環境中へ飛散した。この事故を契機として放射線、特に放射性物質による内部被ばくの人体影響が全世界の一大関心事となった。放射能は物理学的に徐々に減衰し、摂取された放射性物質は生物学的に排泄される。内部被ばくの減衰率は物理学的半減期と生物学的半減期から導かれる実効半減期によって表現されている。一方、化学的性質によって特定の標的臓器に濃縮される。そのため内部被ばくでは標的臓器は持続的に低線量率の放射線に被ばくすることになるが、どの細胞がどれだけ被ばくしたかを知ることは不可能に近い。ヨウ素は、甲状腺ホルモンの成分のひとつであるために、チェルノブイリ原発事故では放射性ヨウ素が甲状腺に集積して甲状腺発がんの原因となったと恐れられている。しかし、ヨウ素131の実効半減期が約7日と短いために正確な被ばく線量は計測できていない。原発から放散する放射性物質には、放射性セシウムのように自然界に本来は存在しない人工放射性物質が含まれている。そのため、自然界には人類誕生以前から放射性物質や放射線が存在していると言われても、原発事故に対する人々の恐怖はますます募っている。内部被ばくの人体影響を定量化することは困難であるが防護のために必要なことである。

放射線の生物影響は、放射線の種類、エネルギー、被ばくした臓器や組織によって様々である。そのため人体影響を統一的に表現するための単位として

実効線量シーベルト(Sv)が定義されている。放射線の内部被ばくによる人体影響を議論していると、放射性物質から1秒あたりに放出される放射線数である放射能ベクレル(Bq)がいつの間にかSvになっている。さらに規制のために用いられる放射能の基準値(Bq/kg)は、科学的思考によって導きだされたものではあるが、純粋に科学的な値ではない。放射線による人体への悪影響が知られている以上、放射線と放射性物質は規制する必要がある。しかし、一般人もいわゆる専門家も~Svの算出根拠を疑うことなくそこで思考停止している。放射性同位元素を用いた動物実験が困難である以上、放射線生物学から人体影響を知り、規制値を策定するまでの道のは遠い。放射線事故や放射線治療による影響解析から影響評価をする以外に人体影響を定量化する方策はない、と言っても過言でない。

3. 牛の放射能計測からわかったこと^{5,6)}

原発事故の結果として、大量の核分裂物質であるテルル129m(^{129m}Te)、ヨウ素131(^{131}I)、 ^{134}Cs や ^{137}Cs などが環境中へ飛散した。その詳細については東京電力のホームページに掲載されている。文部科学省と米国エネルギー省は共同で福島原発から半径80km圏内の航空機による地上1mにおける空間線量分布の計測を行った。しかし、このデータはあくまでも空間線量であって体内に摂取された放射性物質の濃度を反映していないため、我々は旧警戒区域内で殺処分された家畜の臓器別放射性物質の同定と濃度計測を行った。

平成23年8月29日から11月15日にかけて福島原発から南西の1村の52頭と北側の1市の23頭さらに胎仔も含めて79頭の牛からの採材が可能であった。いずれの場所も原発から半径10kmと20kmの間の圏内であった。その内訳は雌成牛63頭(妊娠3頭)、雄仔牛10頭、雌仔牛3頭であった。ゲルマニウム半導体検出器によるγ線スペクトロメトリにおいていずれかの試料で ^{134}Cs 、 ^{137}Cs 、銀110m(^{110m}Ag)、 ^{129m}Te のピークを認めた。

体内に取り込まれた放射性物質は一旦、血流へ入ること、放射性セシウムが全臓器で検出されたこと、 ^{134}Cs と ^{137}Cs の放射能濃度は例外なく両者ともほぼ等しかったこと、検出された放射性物質の中で ^{137}Cs の半減期が最も長いことから、血中 ^{137}Cs の放射能濃

度を種々の比較の基準とし、放射能は最も飛散が大きかった3月15日に遡って物理的崩壊による減衰の補正を行った。 ^{110m}Ag は全頭の肝と8%の牛の末梢血中で検出された。興味深いことに、短半減期の ^{129m}Te が腎特異的に検出され、頻度は62%であった。末梢血と各臓器の ^{137}Cs 放射能濃度は相関しており、相関係数は臓器によって異なっていた(図4)。血中放射性セシウム濃度を計測することによって各臓器別にセシウム濃度を推定できることになる。放射性セシウム濃度は骨格筋で最も高く、異なる部位の骨格筋間で有意差はなく、血中セシウムの21.3倍であった。心筋は横紋筋であるにも関わらず骨格筋に比較して集積量は低かった。

牛は捕獲された地区によって3グループに分類できた。グループ1とグループ3は同一市で福島原発の北側に位置している。グループ1は畜舎内で飼育されたため、飼料はあまり放射性物質に汚染されていないが雨水を摂取していた。グループ3は屋外に放れ畜状態であった。グループ2は原発の南西の村で放れ畜状態であった。

母体から胎児へ放射性物質がどれくらい移行するかは大きな関心事である。我々は捕獲作業に伴って見つかった3頭の妊娠牛において親・胎児の臓器別放射能の比較を行った。放射性セシウムの放射能は、臓器に関わらず胎児では母親の1.3倍であった。しかしながら、 ^{110m}Ag と ^{129m}Te の両方とも胎児では

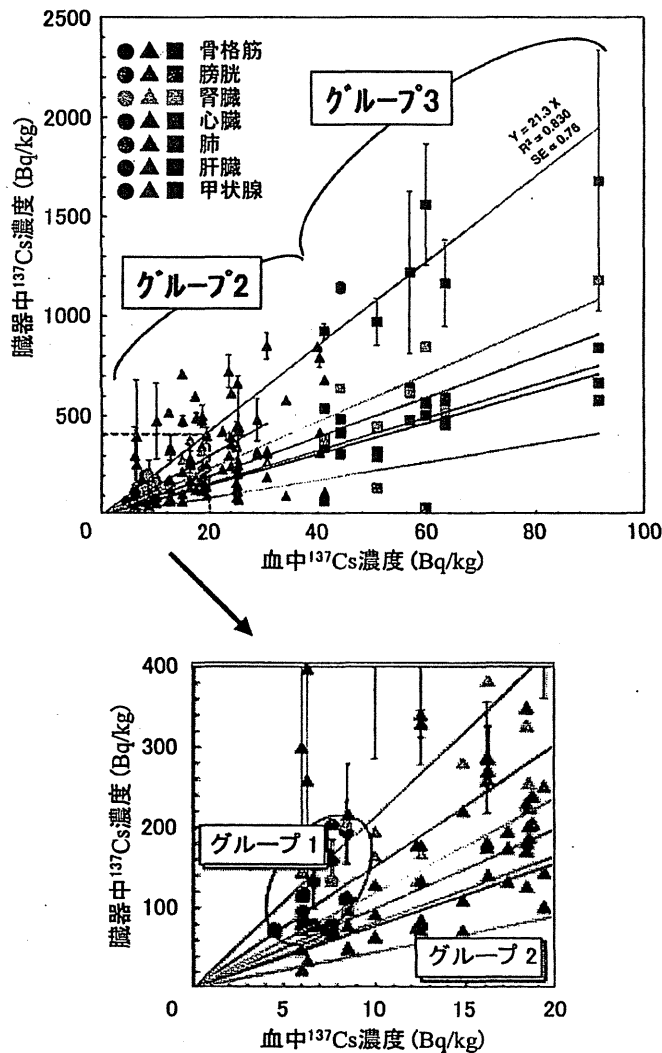


図4 横軸：血中の ^{137}Cs 濃度，縦軸：臓器の ^{137}Cs 濃度
 下図：血中濃度20 Bq/kg以下部分の拡大
 両者の間にはほぼ一次相関がみられる。
 傾きは臓器に応じており、骨格筋で最も大きい。

検出できなかった。安楽死前に3組の母・仔牛のつがいを確認できた。これらの仔牛は原発事故後に生まれたもので授乳と草食の混合であった。この場合も臓器に関わらず、放射性セシウム濃度は仔牛の方が母親牛よりも高かった。放射線に対する感受性が成人よりも小児に高いことから、放射性セシウムの小児に対する影響についてより一層の注意が必要であろう。チェルノブイリ事故の際、ベラルーシのゴメリ州では内分泌臓器に放射性セシウムの集積が多いと報告されていたが⁷⁾、我々の結果から、甲状腺に集積している放射性セシウム濃度は低く、その影響は想定されていたよりも小さいと考えられる。

放射性銀は核分裂反応産物ではなく、安定銀の中性子による放射化の産物である。今回の計測では全頭の肝に^{110m}Agの放射能が検出されたが血中濃度との相関は認めなかった。文科省の線量地図によれば、6月14日時点での土壌中における^{110m}Agの放射能は、¹³⁷Csの平均0.57%であった⁸⁾。しかし、我々の結果では^{110m}Agの¹³⁷Csに対する放射能濃度比は土壌中で0.5%以下なのに肝ではほぼ同レベルであった。肝は銀集積の第一義的な標的臓器であることが明らかとなった。

平成23年3月15日の段階で土壌中の^{129m}Te/¹³⁷Cs放射能濃度比はグループ2の採材場所で0.34、グループ3で1.41と報告されている⁹⁾。放射性物質の飛散から7ヶ月後であってもなお、腎に^{129m}Teが検出されたことは驚きであった。文科省の放射能地図によれば、原発からの方角によって^{129m}Te/¹³⁷Cs比は一定であったことを考えると、腎における^{129m}Teの濃縮は特異的である。もう一つの放射性テルルである¹³²Teの半減期は76.3時間であり、その放射壊変物は甲状腺に集積する放射性¹³¹Iである。さらに経口摂取されたテルルは甲状腺に集積しやすいという報告がある。これらを考え合わせると、放射性テルルによる甲状腺障害は無視し得ない可能性がある。現在、牛以外に豚などについても採材を進めている。豚では血中放射性セシウムに比較した横紋筋中のセシウム濃度は牛の半分くらいであった。

4. 今後の課題

我々は、福島原発事故に伴う警戒区域内の家畜臓器における放射性物質と放射能分布について詳細な検討を行ってきた。平成24年10月末日現在、

牛217頭、豚57頭、猪豚3頭から採材が可能であった。今後さらにヒトに近い猿や、アカネズミなど他の小動物へも対象を拡げて放射線内部被ばくに係る動物臓器のアーカイブの構築を目指している。検討核種もヨウ素129やストロンチウム90の計測も目指している。これらの試料を利用して、土壌など環境中の放射能分布と比較することによって放射性物質の環境汚染と動物種を越えた臓器内分布、経時的な濃度変化の測定による臓器別実効半減期の算定、各臓器の線量評価、放射線内部被ばくによる急性変化の組織学的検索、低線量内部被ばくマーカーの探索などを行うことによって一般の放射線防護に役立つ研究としたい。

強調すべきは、蓄積した放射性物質の放射能は数値としては計測可能であるが生物影響を反映しているとは言いがたい。さらに本事業から明らかになった、放射性物質はセシウムばかりが問題ではないなどの問題点をひとつずつ丁寧に解決していく努力が必要である。さらに貴重なアーカイブを次世代の財産となるよう努力する必要がある。

5. エピローグ・個人的歴史¹⁰⁾

トロトラストはα線を放射する二酸化トリウムのコロイド溶液で、第二次世界大戦中に傷痍軍人に使用された血管造影剤である。投与されて起こる症状はトロトラスト症と呼ばれており、投与後数十年して肝に悪性腫瘍を発症した。通常、肝がんの80%以上の症例は肝実質細胞由来の肝細胞癌であるが、トロトラスト症では胆管上皮由来の肝内胆管癌と血管内皮由来の血管肉腫が多く、人体における内部被ばくによる放射線発がんの最適なモデルと考えられている。トロトラスト症患者の多くは死後に病理解剖されたため、肝を中心として貴重な病理試料は臨床経過、解剖記録そして線量評価の揃ったヒト放射線発がんに関する総合的な資料となっている。

筆者は以前からトロトラスト症患者の資料を収集し、整理し、利用してヒトにおける放射線による発がん機構の解明に携わっている。今までに考えられていた放射線の発がん機構は以下である。放射線によって遺伝子に傷が生じる。細胞増殖に有利な変異がDNA複製を経て固定されてがん化に必要な突然変異となる、という発がんモデルである。しかし、トロトラスト症から明らかとなった長期微量の放

射線内部被ばくによる発がん機構は、そのような単純なものではなく、生体反応の結果がん化に至ることを明らかにした。

先人はトロトラスト症患者のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを残した。ほとんどが今から30年以上前に作製されたもので、当時はPCRの発想はおろか、遺伝子もわかっていなかった。顕微鏡用標本から遺伝子解析が可能な世の中になるとは誰も想像だにしていなかった。トロトラスト症アーカイブの構築に携わって、筆者は正確な関係するデータの整った貴重な試料を残すことが必要であること、今の世代ではなく、次世代にとって財産を残すことが今を生きる世代の責務であることを身に沁みて体得していた。この経験が今回の研究立案と速やかな実行の基礎となっていた。

謝 辞

東北大学大学院農学研究科 磯貝恵美子, 福田智一, 理学研究科 木野康志, 高等教育開発推進センター 関根勉, 歯学研究科 篠田壽, 千葉美麗, 鈴木敏彦, 清水良央, 高橋温, 加齢医学研究所 桑原義和, 鈴木正敏, 志村勉, 福本基, 井上和也, 高橋慎太郎, 工藤千春, 常小紅, 諸橋明子, 大津堅, 山形大学大学院理工学研究科 阿部靖之, 新潟大学農学部 山城秀昭, 宮城大学食産業学部 小林仁, 森本素子, 放射線医学総合研究所 三枝新, 理化学研究所バイオリソースセンター 小幡裕一の諸氏ならびに、いわき家畜保健衛生所, 相双家畜保健衛生所, 関係省庁, 福島

県, 関係市・村, 多くの院生, 学生の方々の力の結集した結果です。文部科学省震災復興特別経費, 東北大学総長裁量経費, 国立がん研究センターがん研究開発費, 生物系特定産業技術研究支援センター, 農林水産技術会議, 東北大学加齢医学研究所などの支援によって本事業の実施は初めて可能となりました。各位に深甚の謝意を表します。

参考文献

- 1) 福本 学: 東日本大震災 1. 病理研究者として被災して. 病理と臨床. 29(7):775-81, 2011.
- 2) 東京電力プレスリリース 東北地方太平洋沖地震の影響による福島第一原子力発電所の事故に伴う大気および海洋への放射性物質の放出量の推定について (平成24年5月現在における評価) http://www.tepco.co.jp/cc/press/2012/1204619_1834.html
- 3) 農林水産省 牛肉からの暫定規制値を超える放射性セシウムの検出について <http://www.maff.go.jp/j/syouan/0720.html>
- 4) 福本 学: 低線量放射線の人体影響: わからないことがわからない. 日本原子力学会誌. 54(8):521-6, 2012.
- 5) 福本 学, 被災動物放射能評価グループ: 福島第一原子力発電所事故に伴う被災家畜の臓器別放射性セシウム濃度. アイソトープニュース. No. 696, 10-3, 2012.
- 6) Fukuda T, Kino Y, Abe Y, Yamashiro H, Kuwahara Y, Nihei H, Sano Y, Irisawa A, Shimura T, Fukumoto M, Shinoda H, Obata Y, Saigusa S, Sekine T, Isogai E, Fukumoto M. Distribution of Artificial Radionuclides in Abandoned Cattle in the Evacuation Zone of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant. (PLOS ONE accepted)
- 7) Bandazhevsky YI (2003) Chronic Cs-137 incorporation in children's organs. Swiss Med Wkly 133: 488-490.
- 8) 文部科学省放射線モニタリング. <http://radioactivity.mext.go.jp/en/>
- 9) Endo S, Kimura S, Takatsuji T, Nanawasa K, Imanaka T, et al. (2011) Measurement of soil contamination by radionuclides due to the Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant accident and associated estimated cumulative external dose estimation. J Environ Radioact:18-27.
- 10) 福本 学: 放射線病理学: トロトラスト症から. 病理と臨床. 29(7):761-8, 2011.

福島原発警戒区域内の家畜における放射性物質の動態

福本 学 (東北大学 加齢医学研究所・被災動物線量評価グループ*)

放射線の生物影響と規制

広島・長崎の原爆で明らかのように、体外からの放射線の急性大量被ばくは死をもたらす。死を免れても、発がんリスクを高くすることが疫学調査から知られている。しかし0.1Gy以下の被ばくでは影響が明確でない。発がんは被ばく後、年単位の潜伏期間をおいてから起こる晩発性影響のひとつである。被ばくによって発症したのか否かという因果関係が不明なこともあるため、国際放射線防護委員会(ICRP)は、放射線による発がんリスクは線量に比例し、しきい線量はないと仮定している。被ばくを規制する行政はこの考え方を採用している。環境中から、水や食物を介した経口摂取や空気を介した経気道摂取によって起こる内部被ばくの放射線源として問題になるのが放射性物質である。東京電力福島第一原子力発電所の爆発事故によって、大量の放射性物質が環境中へ飛散した。この事故を契機として放射線の人体影響が全世界の一大関心事となった。放射能は物理学的に徐々に減衰し、摂取された放射性物質は生物学的に排泄される。内部被ばくの減衰率は物理学的半減期と生物学的半減期から導かれる実効半減期によって表現されている。一方、化学的性質によって特定の標的臓器に濃縮される。そのため内部被ばくでは標的臓器は持続的に低線量率の放射線に被ばくすることになるが、どの細胞がどれだけ被ばくしたかを知ることは不可能に近い。ヨウ素(I)は、甲状腺ホルモンの成分のひとつであるために、チェルノブイリ原発事故ではI-131が甲状腺に集積して甲状腺発がんの原因となったと恐れられている。しかし、I-131の実効半減期が約7日と短いために正確な被ばく線量は計測できていない。原発から放散する放射性物質には、放射性セシウム(Cs)のように自然界に本来は存在しない人工放射性物質が含まれている。そのため、自然界には人類

誕生以前から放射線が存在していると言われても、原発事故に対する人々の恐怖は益々募っている。内部被ばくの人体影響を定量化することは困難であるが防護のために必要なことである。

放射線の生物影響は、放射線の種類、エネルギー、被ばくした臓器や組織によって様々である。そのため人体影響を統一的に表現するための単位として実効線量シーベルト(Sv)が定義されている。放射線の内部被ばくによる人体影響を議論していると、放射性物質から1秒当りに放出される放射線数である放射能ベクレル(Bq)がいつの間にかSvになっている。さらに飲食物における放射能濃度を規制するための基準値は、ICRPによって科学的思考の結果導きだされたものではあるが、仮定が多く、純粋に科学的な値ではない。大量の放射線による人体への悪影響が知られている以上、放射線と放射性物質は規制する必要がある。動物実験が困難であるため、放射線生物学から人体影響を知り、規制値を策定するまでの道のりは遠い。放射線事故や放射線治療による影響解析から影響評価をする以外に人体影響を定量化する方策はない、と言っても過言でない。

牛の放射能計測からわかったこと

原発事故の結果として、大量の核分裂物質であるテルル(Te)-129m、I-131、Cs-134、Cs-137などが環境中へ飛散した。その詳細については東京電力のホームページに掲載されている。文部科学省と米国エネルギー省は共同で福島原発から半径80km圏内の航空機による地上1mにおける空間線量分布の計測を行った。しかし、このデータはあくまでも空間線量であって体内に摂取された放射性物質の濃度を反映していないため、我々は警戒区域内で殺処分された家畜の臓器別放射性物質の同定と濃度計測を行った。平成23年8月29日から11月15日にか

けて福島原発から南西の1村の52頭と北側の1市の23頭の計79頭の牛の採材が可能であった。いずれの場所も原発から半径10kmと20kmの間の圏内であった。その内訳は雌成牛63頭(妊娠3頭)、雄仔牛10頭、雌仔牛3頭であった。γスペクトロメータ測定において、いずれかの試料でCs-134とCs-137、銀110m(Ag-110m)、テルル129m(Te-129m)のピークを認めた。体内に取り込まれた放射性物質は一旦、血流へ入ること、放射性Csが全臓器で検出されたこと、Cs-134とCs-137、両者の放射能濃度の関係は例外なく臓器によらずほぼ等しかったこと、検出された放射性物質の中でCs-137の半減期が最も長いことから、血中Cs-137の放射線濃度を種々の比較の基準とし、放射能は最も飛散が大きかった3月15日に遡って物理的崩壊による減衰の補正を行った。Ag-110mは全頭の肝と8%の牛の末梢血中で検出された。興味深いことに、短半減期のTe-129mが腎特異的に検出され、頻度は62%であった。末梢血と各臓器のCs-137放射能濃度は相関しており、相関係数は臓器によって異なっていた(図1)。血中放射性セシウム濃度を計測することによって各臓器別にセシウム濃度を推定できることになる。放射性セシウム濃度は異なる部位の骨格筋間で有意差はなく、血中セシウムの21.3倍であった。心筋は横紋筋であるにも拘わらず骨格筋に比較して集積量は低かった。牛は捕獲された地区によって3グループに分類できた。グループ1(図1のplot1)とグループ3(plot3)は同一市で福島原発の北側に位置している。グループ1は畜舎内で飼育されたため、飼料はあまり放射性物質に汚染されていなかったが雨水を摂取していた。グループ3は屋外に放れ畜状態であった。グループ2(plot2)は原発の南西の村で放れ畜状態であった。

母体から胎児へ放射性物質がどれくらい移行するかは大きな関心事である。我々は捕獲作業に伴って見つかった3頭の妊娠牛において親・胎児の臓器別放射能の比較を行った。放射性セシウムの放射能は、臓器に関わらず胎児では母親の1.2倍であった。しかしながら、Ag-110mとTe-129mの両方とも胎児で

は検出できなかった。安楽死前に3組の母・仔牛のつがいを確認できた。これらの仔牛は原発事故後に生まれたもので授乳と草食の混合であった。この場合も臓器に関わらず、放射性Cs濃度は仔牛の方が母親牛よりも高かった。放射線に対する感受性が成人よりも小児に高いことから、放射性Csの小児に対する影響についてより一層の注意が必要かも知れない。チェルノブイリ事故の際、ベラルーシのゴメリ州では内分泌臓器に放射性Csの集積が多いと報告されていたが、我々の結果から、甲状腺に集積している放射性Cs濃度は低く、その影響は想定されていたよりも小さいと考えられる。

放射性銀は核分裂反応産物ではなく、安定銀の中性子による放射化の産物である。今回の計測では全頭の肝にAg-110mの放射能が検出されたが血中濃度との相関は認めなかった。文科省の線量地図によれば、6月14日時点での土壤中におけるAg-110mの放射能は、Cs-137の1/10-1/20であった。しかし、我々の結果ではAg-110mとCs-137の放射能濃度はほぼ同レベルであった。肝は銀集積の第一義的な標的臓器であることが明らかとなった。

3月15日の段階で土壤中のTe-129m/Cs-137放射能濃度比はグループ2の採材場所で0.34、グループ3で1.41であった。放射性物質の飛散から7ヶ月後であってもなお、腎にTe-129mが検出されたことは驚きであった。文科省の放射能地図によれば、原発からの方角によってTe-129m/Cs-137比は一定であったことを考えると、腎におけるTe-129mの濃縮は特異的である。もう一つの放射性TeであるTe-132の半減期は76.3時間であり、その放射壊変物は甲状腺に集積する放射性I-132である。さらに経口摂取されたTeは甲状腺に集積しやすいという報告がある。これらを考え合わせると、Teによる甲状腺障害は無視し得ない可能性がある。現在、牛以外にも豚について採材を進めている。豚では血中放射性Csに比較した横紋筋中のCs濃度は牛の半分くらいであった。