原著論文

遺伝的影響予測シミュレータ「WAMSIM」 —動植物への低 LET 放射線照射実験における遺伝的影響を予測する WAM モデルシミュレーター—

角山 雄一^{*1, #}, 尾上 洋介^{*2}, 鈴木 和代^{*3}, 高西 康敬^{*4}, 佐藤 文^{*4},
真鍋 勇一郎^{*5}, 和田 隆宏^{*6}, 土岐 博^{*7}, 坂東 昌子^{*7}

(2020 年 4 月 23 日受付)

(2020 年 10 月 5 日採択)

Genetic Effects Simulator “WAMSIM” —WAM Model Simulator for Predicting Genetic Effects of Low LET Radiation on Plants and Animals—

Yuichi TSUNOYAMA,^{*1, #} Yosuke ONOUE,^{*2} Kazuyo SUZUKI,^{*3} Yasutaka TAKANISHI,^{*4} Jo SATO,^{*4}
Yuichiro MANABE,^{*5} Takahiro WADA,^{*6} Hiroshi TOKI^{*7} and Masako BANDO^{*7}

Long-term biological irradiation experiments require considerable materials and time until to obtain analytical results. Thus, if the results that might be obtained can be predicted when designing an experiment, that information is very useful to those who will perform the experiment. However, there has not been any simulator that can accurately predict such results. This was due to the inadequacy of the mathematical model used for the prediction. Therefore, we have newly created a genetic effect prediction simulator “WAMSIM” based on the calculation principle of a mathematical model “WAM (Whack-A-Mole) model” that can show the variation of genetic effects in a dose rate-dependent manner. Since the WAM model includes the time component as a parameter, it is possible to estimate the fluctuation of the genetic effect even in experimental conditions in which the dose rate changes over time and/or in fractionated irradiation. In this report, we have actually used WAMSIM to predict the effects on the next generation in mice that have been continuously irradiated with low LET radiation for a long period of time or in mice that have received fractionated irradiation. As a result, we have obtained some important findings to keep in mind when conducting irradiation experiments.

KEY WORDS: genetic effect, hereditary effect, WAM model, simulator, LQ model, LNT, dose rate effect, dose rate, mutation frequency, low LET.

I 緒 論

放射線を動植物に照射してその影響を解析する実験を行おうとする場合、得られる結果を実験計画段階で予測しておくことは大変有益である。たとえば、寿命の長い動植物を解析対象としその遺伝的影響を調べるのであれば、照射個体の次世代が得られるまでには相当長い期間を見込まなければならない。あるいは、低線量・低線量率の放射線照射影響の調査などでは、生物照射に係る時間が数十日から数百日間にわたる事例もある。このよう

に照射実験や解析にかかる時間が長期化すると、動植物の飼育培養や照射のための資器材の確保及び変異解析にかかる諸費用など、それなりのコストを長期間にわたり見込んでおくことが必須となる。したがって、実験結果をあらかじめ知ることができるシミュレーションツールがあれば、そこから得られる結果予測は上記のような実験を行う者にとって非常に重要な情報となる。しかしこのような予測ツールで、精度よく予想を導くことができ、なおかつさまざまな生物種に適応可能な、いわゆる汎用性の高いシミュレータはこれまでに存在しなかった。そ

ここで我々は、このような要件を満たす遺伝的影響予測シミュレータを新たに作成することにした。

遺伝的影響予測シミュレータを構築するにあたり、まずは予測精度が高い数理モデルが必須となる。確率的影響に関する数理モデルとしては、これまでにショウジョウバエなどの動物実験や広島・長崎原爆被爆者の寿命調査のデータを近似して得られた直線比例モデルや、標的説とよく合致する直線-二次曲線モデル (LQ モデル) が従来引用されてきた。なかでも LQ モデルは、放射線防護の分野や腫瘍への分割照射などでも重用されてきた。ところが、これら歴史あるモデルは、いずれも生物が本来有している DNA 損傷修復や免疫等の異常細胞除去といった仕組み、いわゆる線量率効果が十分には考慮されておらず、影響が時間経過にしたがって一方的に蓄積し続けることになる。つまり、これらのモデルをシミュレータの計算原理とした場合は、影響の予測結果が過剰評価となることは明らかであった。

最近、理論物理学者の坂東昌子らが、遺伝的影響の変動を線量率依存的に表すことができる数理モデル「WAM モデル (Whack-A-Mole model, もぐらたたきモデル)」を構築している¹⁻⁷⁾。WAM モデルの最大の特徴は、直線比例モデルや LQ モデルでは考慮されていなかった「時間成分 (t)」が数式に含まれているところにある。これにより、総照射線量に対する影響の増減だけでなく、線量率に応じた影響についても高い精度で再現することが可能となった^{5,6)}。たとえば、過去に報告されているショウジョウバエ、マウス、トウモロコシ、キクなどへの照射実験から得られた変異発生頻度の実測値と、WAM モデルにより算出した理論値とは、さまざまな照射線量及び照射線量率において非常によく一致していた^{4,7)}。ま

た坂東らは、WAM モデルを応用することで、線量率依存的な遺伝的影響について、生物種を超えて統一的に理解することが可能であることも示してきた⁴⁾。

WAM モデルの最大の利点のひとつは、経過時間に応じた変異発生頻度の推移を求めることができる点にある。すなわち、時間成分 (t) を入力することで、長期間の連続照射中に線量率が変動するような場合や、照射が任意のタイミングで中断されるといったいわば変則的な分割照射スケジュールであるような実験条件などであっても、サンプリング時点での変異発生頻度を予測することが可能となった。つまり、従来モデルでは非常に困難であった複雑な照射条件における影響の予測もできるようになったのである。このような予測は、総照射線量に対する影響評価に重きをおいてきた従来モデルでは不可能であった。そこで我々は、この WAM モデルを計算原理とする遺伝的影響予測シミュレータ「WAMSIM」を作成することにした。この新たなツールは、2019 年 6 月よりオンラインで公開している (<http://radi.rirc.kyoto-u.ac.jp/wam/>)。WAMSIM では、複雑に線量率が変動するようなタイムスケジュールでの照射実験であっても、変異発生頻度の変動を視覚的にグラフ表示することができる。これにより、従来モデルでは予測困難であった実験条件の場合であっても直観的に予測結果を把握することが可能となった。本稿では、実際に生物照射実験を行う者が WAMSIM を利用しようとする場合に必要となる各パラメータの求め方 (II, 2) と、シミュレータの活用事例として、WAMSIM により判明したマウス照射実験を行う際に十分留意すべき点 (III) について紹介する。

*1 京都大学環境安全保健機構放射性同位元素総合センター；京都府京都市左京区吉田近衛町 (〒 606-8501)

Radioisotope Research Center, Agency for Health, Safety and Environment, Kyoto University; Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8501, Japan.

*2 日本大学文理学部情報学科；東京都世田谷区桜上水 3-25-40 (〒 156-8550)

Department of Information Science, College of Humanities and Sciences, Nihon University; 3-25-40 Sakurajosui, Setagaya-ku, Tokyo 156-8550, Japan.

*3 京都大学医学部附属病院先制医療・生活習慣病研究センター；京都府京都市左京区聖護院川原町 53 (〒 606-8397)

Preemptive Medicine and Lifestyle Related Disease Research Center, Kyoto University; 53 Shogoin-kawahara-cho, Sakyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 606-8397, Japan.

*4 埼玉大学理工学研究科；埼玉県さいたま市桜区大久保 255 (〒 338-8570)

School of Science and Engineering, Saitama University; 255 Shimo-

Okubo, Sakura-ku, Saitama-shi, Saitama 338-8570, Japan.

*5 大阪大学大学院工学研究科環境エネルギー工学専攻；大阪府吹田市山田丘 2-1 (〒 565-0871)

Department of Sustainable Energy and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Osaka University; 2-1 Yamadaoka, Suita-shi, Osaka 565-0871, Japan.

*6 関西大学システム理工学部物理・応用物理学；大阪府吹田市山手町 3-3-35 (〒 564-8680)

Department of Pure and Applied Physics, Faculty of Engineering Science, Kansai University; 3-3-35 Yamate-cho, Suita-shi, Osaka 564-8680, Japan.

*7 大阪大学核物理研究センター；大阪府茨木市美穂ヶ丘 10-1 (〒 567-0047)

Research Center for Nuclear Physics, Osaka University; 10-1 Mihogaoka, Ibaraki-shi, Osaka 567-0047, Japan.

Corresponding author; E-mail: tsunoyama.yuichi.5s@kyoto-u.ac.jp

II 理論と方法

1. WAM モデル

次の二項式が WAM モデルである^{5,6)}。また、WAM モデルの概念図を Fig. 1 に示す。

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

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、 d は線量率である。また、式 (1) 中の A 項と B 項は次式 (2.1, 2.2) で表すことができる。

$$A = a_0 + a_1 d \quad (2.1)$$

a_0 : バックグラウンド環境下で発生・増殖する変異 [hour⁻¹]
 a_1 : 追加照射線量 1 Gy あたりに発生する変異 [Gy⁻¹]

$$B = b_0 + b_1 d \quad (2.2)$$

b_0 : 自然の細胞死 [hour⁻¹]
 b_1 : 追加照射線量 1 Gy あたりに放射線照射による細胞死 [Gy⁻¹]

従来の直線比例モデルや LQ モデルでは、照射線量が大きくなるにつれて塩基損傷や DNA 鎖切断などが蓄積し、その結果として細胞の生存率が下がる、あるいは発がんや遺伝的影響などの症状の確率が上昇すると考える。これら従来モデルは、高線量を一瞬で照射するような条件であれば実験結果を非常に良く近似することができる^{8,9)}。このような照射条件では照射総線量に依存して生体分子の損傷が一方的に増大し続けるからだ。ところが、たとえば長期間の低線量放射線照射や分割照射といった、線量率効果が期待できるような照射条件では、

実験結果とモデルとが大きく乖離する。つまり、低線量率照射や分割照射については、従来とは異なる概念やモデルが必要となることを意味している。

そこで WAM モデルでは、新たな概念として、DNA 損傷と修復の結果として発生する変異細胞の動的な平衡状態を想定する (Fig. 1)。放射線により DNA が損傷すると、その多くは体内に備わる DNA 損傷修復機構により修復される。あるいは DNA 損傷細胞はアポトーシス等により排除され、健康な細胞に置換される。これらの修復や排除の仕組みを免れた細胞は、DNA 塩基の変異 (mutation) や配列異常が固定されると変異細胞 (Mutated cell) となる。この変異細胞の発生過程が WAM モデル (式 1) の A 項 (式 2.1) である。また、その一方で変異細胞はアポトーシスや免疫機構などにより排除されることも有り得る。線量率が高ければ放射線に起因する細胞死も起こるだろう。この変異細胞の排除過程が B 項 (式 2.2) である。これらの過程はどれも健康な体内において常に行われていることであり、正常な生体のホメオスタシスの範疇にある。そこで我々は、DNA 損傷細胞も変異細胞も細胞が「健康な状態 (Healthy State)」にあると定義した。そして、親世代 (実験における照射世代) の生殖細胞において、発生と排除の差し引きの結果として残る変異細胞が、次世代における遺伝的影響 (Hereditary disorder) の直接的な原因となると考えた。ただし、変異配列によっては顕性とならない場合もあれば、遺伝的多型 (genetic polymorphism) や進化 (Evolution) といった個体や種にとってポジティブな影響となる場合もある。

2. WAMSIM を利用する場合のパラメータ算定方法

ウェブ公開版の WAMSIM では、W. L. RUSSELL らに

Fig. 1 A schematic diagram of the WAM model.

よるマウスへのX線・γ線照射実験¹⁰⁾の結果より求めた値⁵⁾を各パラメータの初期設定値としている。マウスへの放射線照射実験の場合はこれらの初期設定値をそのまま用いることも可能だが、マウス以外の動植物種やマウスの変異株を用いる実験(後述)でWAMSIMを利用する場合は、一遺伝子座あたりの自然変異発生頻度(spontaneous mutation frequency; F_s)と4つのパラメータ(a_0 , a_1 , b_0 , b_1)の値を生物種や株ごとに求め、WAMSIM上で設定する必要がある。そこで、以下に各パラメータの算出手順を示す。

(1) 自然変異発生頻度(spontaneous mutation frequency; F_s)の決定

放射線を照射していない状態、すなわちバックグラウンド線量率における変異発生頻度 F_s を実測により求める。きわめて低い値になることが容易に予想されるため、正確な値を求めるためには十分な個体数を準備する必要がある。なお、Web公開版のWAMSIMでは F_s は F_0 と表記されており、その初期値はRUSSELLらによるマウスへのX線・γ線照射実験¹⁰⁾より算出した1.0E-05が設定してある。RUSSELLらは、コントロール実験として非照射の雄マウスと雌マウスの交配により誕生した仔において、7つの遺伝子座における変異個体の発生を調べたが¹¹⁾、531,500匹中28匹が変異体であった。また、同様の別実験においては157,421匹中11匹であった¹⁰⁾。すなわち、バックグラウンド線量率における変異発生頻度は仔1万匹に対してわずか1~2匹程度であった。このマウスの例からもわかるとおり、自然変異発生頻度を精度よく求めるためには、十分な個体数を確保しなければならないことがわかる。ただし、高度な先進技術ではあるが、一細胞を対象とした遺伝子変異解析が実施できるような場合は、解析する細胞数が個体数の代わりとなり得るので、個体数確保の問題は解消される可能性がある。

また、表現型により変異個体を判別する場合は、変異を効率よく検出する手法の構築も必須である。MULLERはハエのオスのX染色体上における劣性致死変異を検出するCIB法⁸⁾を、RUSSELLらは7つの遺伝子座が劣性ホモオスのマウスを用いたSLT法¹¹⁾を用いている。

それから、生物種によっては照射個体の成熟度によって F_s が変動するような場合も想定される。この点は真偽やそのメカニズムについて科学的に精査すべきことではあるが、とりあえずはこのような変動の可能性を少しでも排除できるよう、なるべく同じ年齢(生物種によっては日齢や月齢)での影響比較を行うような配慮が必要

である。また、実験室で扱われる動植物の場合は、同一生物種であってもさまざまな飼育系統あるいは培養株が存在する。バックグラウンド線量率での変異発生頻度 F_s はその系統や株ごとに求めておくことが望ましい。WAMSIMの $F_s(F_0)$ の初期設定値1.0E-05は、RUSSELLらが用いていた近交系マウスの系統(C3Hと101、及びそのハイブリッド)における値であり、たとえば近年の実験でよく用いられる腫瘍発生率の高い系統や免疫機能を低下させた系統の場合は、 F_s は初期設定値よりも高い値となるものと予想される。

(2) a_1 の算定

式(1)は変形すると

$$F(t) = \frac{A}{B} (1 - e^{-Bt}) \quad (3.1)$$

であるので、 F_s がすでに求まっているのであれば、照射による過剰な変異発生頻度 $E(t)$ は以下のように記すことができる。

$$E(t) = \left(\frac{A}{B} - F_s \right) (1 - e^{-Bt}) \quad (3.2)$$

このとき、照射時間 t が非常に短かければ、 $E(t)$ は総線量 $D = d \times t$ に比して増大する。

$$E(t) \approx a_1 \cdot D \quad (3.3)$$

よって、 a_1 を求めるためには、高線量率の放射線を照射する実験を行うのが最も簡便な方法である。このような照射条件であれば、照射開始後の比較的短時間において、照射による変異発生頻度が直線比例的に起こる様子が観測されるであろう。ただし、この式はサンプリングポイントにおける F_s が一定である場合にのみ用いることができる。よって、 a_1 を求める実験を実施する際には、 F_s が変動する要素を極力排除することに留意する必要がある。

(3) a_0 , b_0 の算定

任意の線量率で連続照射を行い、放射線照射完了までに得られたサンプルにおける変異発生頻度が自然発生頻度 F_s より有意に大きな値となるような照射条件を探す。そのような照射条件を見つけたら、照射を停止してからしばらくの期間(変異発生頻度が F_s に近い値に下がるまでの期間)において何点かサンプリングし、変異率が次第に減少して行く経過を観測する。その期間がどれくらいなのかをあらかじめ知ることは容易ではないが、WAMモデルに従えば照射終了後の変異発生頻度は時

間経過につれて漸次減少することになる (Fig. 4 参照)。なお、この場合変異発生頻度は $\exp^{-b_0 d}$ にしたがって減少するはずなので、これにより b_0 が定まる。

F_s が一定なのであれば、式 (1) より以下の式 (3.4) と表せる。

$$F_s = \lim_{t \rightarrow \infty} (t; d=0) = \frac{a_0}{b_0} \quad (3.4)$$

b_0 が変異率測定により算出できれば、この式 (3.4) と上記 (1) で求めた F_s により a_0 が算定できる。

(4) b_1 の算定

b_1 の求め方は何とおりか考えられるが、ここでは最も簡単な方法を紹介する。一定の線量率で連続照射を行う実験を行い、照射中の任意の時点で何点かサンプリングを行い各点における変異発生頻度を測定する。WAM モデルに従うのであれば、照射時間が十分に長ければ Fig. 2 に示すように遺伝的影響と線量率効果は釣り合うことになる。すなわち Fig. 1 における変異細胞の発生と排除が平衡に達すれば、変異発生頻度はプラトーになる。このプラトーな状態は次式 (3.5) で表すことができる。

$$F(\infty) = \frac{a_0 + a_1 d}{b_0 + b_1 d} \quad (3.5)$$

これにより、プラトーに達したときの変異発生頻度と、これまでに求めた a_0 , b_0 , a_1 の値から b_1 が求まる。我々の計算では、マウスにおける低線量率放射線の連続照射の場合は、プラトーに達するまでにおよそ 1 か月の照射が必要であることが示されている (Fig. 2)。この例は、プラトーに達するまでにはそれなりの照射期間を要することを意味している。ただし、ここでの解説は省略するが、プラトーに至らなくても、直線近似とのずれからプラトーに至るまでの時間を予測して b_1 を求めることは数学的に可能である。

最近の坂東らによる研究によれば、パラメータ b_1 は細胞死の発生量と密接に関係する値であるとの見通しである。また、生物種によらず b_1 の値は大きくは変わらない可能性があるとのことである。これが正しいのであれば、 b_1 については RUSSELL のマウス照射実験から定めた初期設定値をそのまま用いても予測結果に大きな差異はないということになる。今後の研究の進展を待ちたい。

以降本稿では、WAMSIM の活用事例として、マウスに対する低 LET 放射線照射実験における結果の予測を行う。また、この予測から明らかとなった実験上留意すべき事項をいくつか紹介する。

III シミュレータ予測結果

1. 変異発生の平衡状態

WAM モデルを用いれば、低線量率で長時間照射し続けるような条件において、どれくらいの連続照射時間で変異発生頻度がプラトーに達するのかを予測することが可能である。Fig. 2 は、マウスに対して 1, 4, 7, 10 mGy/h の低 LET 放射線 (エクス線・γ線) を最長 1 年間 (8,760 時間) 照射し続けた場合に、照射直後に交配を行ったと仮定して、照射次世代において誕生すると予想される変異個体の発生頻度の推移を、WAMSIM を用いてグラフ化したものである。点線部分はバックグラウンド線量率における変異発生頻度 F_s (WAMSIM では F_0) である。 F_s 及び 4 つのパラメータ (a_0 , a_1 , b_0 , b_1) には、RUSSELL らのマウス実験から得た値⁵⁾を用いている。また、以降のグラフはすべて WAMSIM により出力された .csv ファイルを本論稿用に編集したものである。

従来モデルであれば、直線比例または直線-二次曲線形で照射総線量の増加に伴って頻度は増し続けるはず

Fig. 2 Prediction of the results of continuous irradiation experiments in mice by WAMSIM. In the graph (a), the horizontal axis is the time (hour), and in (b), the total irradiated dose.

である。しかし WAMSIM の予測結果は、これとは大きく異なっている。先述のとおり、ある総線量に達すると変異発生頻度は一定となり、その後は変異の増減が全く見られなくなる (Fig. 2(b))。また、いかなる線量率の場合も、照射開始から約 1 か月後 (1,000 時間より手前) には一定となる (Fig. 2(a))。なお、照射総線量と線量率、変異発生頻度変化の関係については、鳥瞰図が文献⁶⁾に掲載されているのでそちらも参照のこと。

2. 分割照射における休止期間の影響

WAMSIM では、従来モデルである LQ モデルとの比較が可能である。LQ モデルでは、損傷や変異を排除する仕組みを考慮しない。したがって、照射を止めても影響が蓄積したままということになり、線量率効果を表現することができない。しかし実際の生体内においては、放射線によるダメージが残存し続けるということはある得ず、照射を止めれば回復や排除の仕組みの効果が顕在化するはずである。WAM モデルの場合は、照射を止めた瞬間から式 1 の B 項にしたがって影響が解消していく。Fig. 3 は、10 mGy/h、10 日間 (240 時間) の照射を二回行うと仮定し、その際に照射休止期間を 5 日間 (120 時間)、あるいは 30 日間 (720 時間) 設けた場合の変異発生頻度の変動について、両モデルの違いに注目して示したものである。一点鎖線 (LQ tc1) と破線 (LQ tc2) が LQ モデルによる変動予測である。5 日間、30 日間いずれの長さの休止期間においても変異発生頻度は一定であり、下がることはない。これに対し、WAM モデルに

Fig. 3 Comparison of predictions in the LQ model and the WAM model at different rest periods of the two-fractionated irradiation experiments.

よる予測では (WAM tc1, tc2), 照射が休止されるとその期間に応じて変異発生頻度が減少する。また照射期間中であっても、WAM モデルの場合は、一方的に上昇し続ける LQ モデルとは異なり、一定のダメージの回復効果が見られる。したがって、LQ モデルによる予測結果はいずれの時点においても WAM モデルより大幅に高い値となっている。

3. 照射終了後から交配開始までの期間の影響

Fig. 4 は、20, 40, 80, 200 mGy/h でそれぞれ 1,000, 500, 250, 100 時間連続照射を行った場合の変異発生頻度の変化を図示したものであり (点線はバックグラウンド線量率), 照射終了時をグラフ横軸の 1,500 時間のところに合わせてある。線量率の高低にかかわらず、照射を停止した直後から変異発生頻度は漸減し始め、やがてどの場合においてもバックグラウンドとほぼ同じ値になる。つまり、照射を終了してから次世代を得るために交配を行うまでの期間を長くとりすぎると、たとえば照射終了から 1,000 時間もあれば、どんな線量・線量率で照射を行ったとしても結果的に遺伝的影響の差の検出が困難になる。この予測結果は、遺伝的影響を調べる実験を計画する際には、照射終了から交配あるいは変異の検出を開始するまでの期間を計画段階で揃えておくことが必須であり、またその期間を不用意に長くしない方がよいということを意味している。

RUSSELL らの実験では、たとえば X 線をおよそ 800 mGy/min で数時間照射するといった急照射条件の場合は、一時不妊からの回復を待つための期間を設けていた。一方で 0.009 ~ 0.08 mGy/min で数十日間にわたり γ 線を照射するような緩照射条件のときはそのような期間は考慮していない。またいずれの照射条件においても、精原細胞への影響のみを検出するという目的のため、照射から 7 週間後以降の交配で産まれた仔のすべてを解析対象としていた。当時でも照射後から交配開始までの期間が回復期にあることは知られていたはずだが、その期間を全照射条件で揃える、あるいは回復課程を詳細に調べるといった解析はさほど重視されていなかったようだ。以前我々は、WAM モデルの予測精度を確かめるため、RUSSELL らのマウス照射実験データと WAM モデルから導き出される理論値との整合性を検証している⁷⁾。その際に、一点の照射条件 (7 mGy/min, 約 12 時間照射) だけは、実際のデータと WAM による理論値とが合致しなかった。RUSSELL らはこの照射条件を緩照射条件の範疇に分類していたが、実際には急照射と緩照射

Fig. 4 Effects of the interval between the completion of irradiation and the start of mating.

の中間条件に相当する。前述のとおり、当時は照射終了後の期間についてはあまり厳密に調整されていなかったこともあって、正確なところは不明だが、推論として彼らがこの期間を他の緩照射条件よりも長く置いたと仮定するとデータと理論値はよく一致させることができた⁷⁾。もし今後、同様な実験を行うのであれば、照射終了後に時間が経過すると遺伝的影響は次第に解消されるという点を十分に念頭に置き実験計画を立てるべきである。

IV ま と め

WAM モデルを計算原理とする遺伝的影響予測シミュレータ「WAMSIM」をマウスに用いた場合の実験結果の予測例を示すとともに、この予測により明らかとなった実際に照射実験を行う際に留意すべき点をいくつか紹介した。WAMSIM により判明したことの要点は以下のとおりである。

(1) 自然放射線環境下での変異発生頻度を正確に求めておくこと。

過去のさまざまな照射実験をふり返ると、この点が疎かにされている事例が少なくない。自然変異発生頻度は同じ生物種でも、飼育系統（培養株）ごとに異なる可能性がある。また、同一系統（株）であっても成熟段階に応じて変動することも予想される。自然変異発生頻度の値 (F_s) は、その後の予測を行う際に基盤となるものであるのしっかりと求めておく必要がある。

(2) 連続照射実験を行う場合、照射期間がある程度経過すれば変異発生頻度は平衡に達する。

一度平衡に達すれば、それ以上長期に照射し続けても

頻度の増減は見られず一定のままとなる。また、平衡に達した時の頻度の値は、線量率に依存する。たとえば、照射影響がなかなか観測されないような場合に、総照射線量の増加を期待してむやみに放射線を照射し続けても一向に結果が得られいことも十分に起こり得る。これは、従来モデルによる予測とは大きく異なる点である。照射し続けても変異発生頻度の増加がみられないような場合は、総線量ではなく線量率を上げるべきである。

(3) 分割照射の場合は、照射休止期間の長さや休止を行うタイミングに留意する。

休止期間が長ければ長いほど、影響が解消される機会が増える。また、変異の発生と消失は経時的に変動するので、比較実験を行う場合は休止の時期を揃えるなどの配慮も必須である。

(4) 照射終了後から交配開始（解析開始）までの期間の長さは一定に揃える。

照射終了から交配開始までの時間は、比較サンプル間で揃えるとともに、あまり長い時間をおかないことも重要である。もしもこの期間を長くとりすぎると、次第に線量率による違いが検出しにくくなる。

(2) から (4) は、照射や休止、サンプリング、交配など、これらのタイムスケジュールを正確に意識して実験を行うことが重要であるということを意味している。総照射線量に応じて変異発生頻度が一方的に蓄積するような従来モデルが念頭にあると、この点が軽視されがちである。実際、本稿で何度も引用している RUSSELL らの実験においても、その論文等から照射終了やサンプリング、そして交配のスケジュールを読み取ることが不可能な場合が幾度もあった⁷⁾。もしもこれまでに動植物への分割照

射実験をすでに行ったご経験があり、その際に従来の概念にしたがって主に総照射線量に重きをおいて照射実験を実施されていたのならば、一度この点に留意してお手持ちのデータを見直されることをお願いしたい。

以上、自然変異発生頻度 F_s と WAM モデルの 4 つのパラメータ (a_0 , a_1 , b_0 , b_1) を実験的に求めることさえできれば、WAMSIM を用いて遺伝的影響の予測を行うことが可能であることを示した。WAMSIM であれば、線量率を変えての連続照射実験や Fig. 3 に示したような変則的な照射スケジュールの分割照射実験についても実験結果を予測できる。ここに示したのは単純な例ばかりであり、たとえば時々刻々と線量率が変化するような長期照射や、一定時間の照射休止期間を設けながら分割照射を何度も繰り返すような実験にも対応できる。WAM モデルは、従来モデルでは困難であった照射条件についても実験結果の予測を可能なものとする。有効に活用されれば、さまざまな放射線照射実験におけるパワーツールとなるものと期待している。

謝 辞

WAM モデル及びシミュレータの構築研究は科学研究費補助金 (16H04637, 15K14291, 15K12204) により行われた。また、WAMSIM ポータルサイトの一部は、関西原子力懇談会学術振興奨学金の支援を受けて整備されたものである。

利益相反の開示

開示すべき利益相反状態はない。

参 考 文 献

- 1) Y. MANABE, K. ICHIKAWA and M. BANDO; A mathematical model for estimating biological damage caused by radiation, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **81**, 104004 (2012).
- 2) Y. MANABE and M. BANDO; Comparison of data on mutation frequencies of mice caused by radiation with low dose model, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **82**, 094004 (2013).
- 3) I. NAKAMURA, Y. MANABE and M. BANDO; Reaction rate theory of radiation exposure and scaling hypothesis in mutation frequency, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **83**, 114003 (2014).
- 4) Y. MANABE, T. WADA, Y. TSUNOYAMA, H. NAKAJIMA, I. NAKAMURA and M. BANDO; Whack-A-Mole Model: Towards unified description of biological effect caused by radiation-exposure, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **84**, 044002 (2015).
- 5) T. WADA, Y. MANABE, I. NAKAMURA, Y. TSUNOYAMA, H. NAKAJIMA and M. BANDO; Dose and dose-rate dependence of mutation frequency under long-term exposure- a new look at DDREF from WAM model, *J. Nucl. Sci. Technol.*, **53**, 1824–1830 (2016).
- 6) M. BANDO, T. KINUGAWA, Y. MANABE, M. MASUGI, H. NAKAJIMA, K. SUZUKI, Y. TSUNOYAMA, T. WADA and H. TOKI; Study of mutation from dna to biological evolution, *Int. J. Radiat. Biol.*, **95**, 1390–1403 (2019).
- 7) Y. TSUNOYAMA, K. SUZUKI, M. MASUGI-TOKITA, H. NAKAJIMA, Y. MANABE, T. WADA and M. BANDO; Verification of a dose rate-responsive dynamic equilibrium model on radiation-induced mutation frequencies in mice, *Int. J. Radiat. Biol.*, **95**, 1414–1420 (2019).
- 8) H. J. MULLER; Artificial transmutation of the gene, *Science*, **66**, 84–87 (1699).
- 9) D. L. PRESTON, E. RON, S. TOKUOKA, S. FUNAMOTO, N. NISHI, M. SODA, K. MABUCHI and K. KOMEDA; Solid cancer incidence in atomic bomb survivors: 1958–1998, *Radiat. Res.*, **168**, 1–64 (2007).
- 10) W. L. RUSSELL and E. M. KELLY; Mutation frequencies in male mice and the estimation of genetic hazards of radiation in men, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 542–544 (1982).
- 11) L. B. RUSSELL; The Mouse House: a brief history of the ORNL mousegenetics program, 1947–2009, *Mutat. Res.*, **753**, 69–90 (2013).