

労災疾病臨床研究事業費補助金

緊急被ばく医療が必要とされるような
事故発生時におけるトリアージのための
線量評価手法の確立に関する研究

平成 28 年度 総括・分担研究年度終了報告書

研究代表者 櫻田尚樹

平成 29 (2017) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

緊急被ばく医療が必要とされるような事故発生時におけるトリアージのための
線量評価手法の確立に関する研究

樺田尚樹 1

II. 分担研究報告

1. 電子スピン共鳴法を用いた線量推計法の開発 1 9

山口一郎・三宅実・志村勉

資料：電子スピン共鳴法を用いた線量推計法に関する標準手順書 4 1

2. リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX)を用いた生体内 DNA 損傷レベルの測定による線
量評価 6 6

中村麻子・盛武敬

3. 被ばくによる生体内 DNA 損傷レベルの測定と X バンド EPR による被ばく後抗酸
化能の動態解析 7 2

盛武敬

4. ミトコンドリア酸化損傷を指標生物学的手法による線量評価 8 4

志村勉

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 9 5

I. 総括研究報告

労災疾病臨床研究事業費補助金
総括研究年度終了報告書

緊急被ばく医療が必要とされるような事故発生時における
トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究

研究代表者 榎田尚樹 国立保健医療科学院生活環境研究部 部長

研究要旨

本研究では、EPR(Electron paramagnetic resonance)技術を用いた線量評価として口腔内の歯を直接、L-band EPR 法により放射線誘発ラジカルを測定する放射線被ばく線量測定法やこれまでに確立されている生体内 DNA 損傷モニタリング手法との連携による EPR 技術を用いた線量評価感度の向上を目指すとともに、抗酸化能の動態解析を行うことで簡便なバイオ・ドシメトリー法の確立を試み、専門的治療を必要とする 1 Gy 以上の被ばくのトリアージを可能にすることを目指して実施した。

(1) Lバンド EPR 法による線量評価

- ・ 口腔内で安定して線量測定ができるようにこれまでのトラブル事例も踏まえて測定に関する手順書を作成して測定の質が確保できるようにした。
- ・ 紫外線の影響に関して、UVB では太陽光で数十年分の曝露でないと信号が検出されないことを確認した。
- ・ 審美歯科治療により偽陽性となりえることを確認した。

(2) 生体内 DNA 損傷レベルの測定

- ・ リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX) 検出を簡便に行うことのできる新規デバイスとして、Polydimethylsiloxane チップに着目し、リンパ球相当のサイズの細胞を固定すると同時に、赤血球等を効率よく排除できる微細構造を試作するとともに細胞固定を行うための表面改質方法を評価した。
- ・ IVR 実施患者の血液を用いて線量相当の DNA 損傷が検出するとともに、抗酸化剤投与での放射線による DNA 損傷レベルの抑制を確認した。
- ・ マウスにおいて、被ばく後線量依存的 DNA 損傷が検出され、被ばく線量評価が可能であることを確認した。

(3) Xバンド EPR による被ばく後抗酸化能の動態解析

- ・ マウスに X 線を全身照射し、経時的に X バンド EPR により血中抗酸化能を測定し、被ばく線量と血中抗酸化能の関連を明らかにし、血中抗酸化能測定による被ばく線量推定の可能性が示唆された(特許申請中)。
- ・ γ H2AX と血中抗酸化能の応答様態が異なることを確認した。
- ・ Xバンド EPRによる血中抗酸化能測定が既存の他の EPR 測定法よりも優れていることを確認した。
- ・ また、線量既知の臨床 IVR 実施患者の抗酸化能と γ H2AX の解析を 10 例実施した。この 10 例の結果を基に、追加実験を実施中である。

(4) ミトコンドリア酸化損傷を指標とした生物学的手法による線量評価照射法の検討

- ・ ヒト細胞では、1Gy 以上の急性照射でミトコンドリア酸化損傷が観察されることを明らかにした。
- ・ ミトコンドリア酸化損傷は、照射法と細胞の分化度別に、線量依存的に誘導される。
- ・ 本方法は、線量評価だけでなく放射線影響を評価する指標としても重要である。

今後、これまでの検討で見いだした課題を解決していくことで、本研究課題の最終目標である災害派遣型 EPR 線量評価ユニットで最終的に急性被ばく 1Gy 以上を分別可能な、効果的な線量評価法・トリアージシステムとして社会実装するための成果が得られたと考えられ、最終年度に災害派遣型 EPR 線量評価ユニットの基本デザインを完成させる。

研究分担者

盛武敬 産業医科大学産業生態科学研究所放射線健康医学 准教授
中村麻子 茨城大学理学部 准教授
志村勉 国立保健医療科学院 生活環境研究部 上席主任研究官
山口一郎 国立保健医療科学院 生活環境研究部 上席主任研究官
三宅実 香川大学 医学部 歯科口腔外科学 教授

研究協力者

平田拓 北海道大学 大学院情報科学研究科 教授
中井康博 香川大学 医員
井上一彦 鶴見大学 非常勤講師
豊田新 岡山理科大学 理学部 教授
五十嵐友紀 産業医科大学産業生態科学研究所職業性中毒学 講師
孫略 産業医科大学産業生態科学研究所放射線健康医学 産業医学基礎研究医員
千田浩一 東北大学災害科学国際研究所
稲葉洋平 東北大学災害科学国際研究所
志賀匡宣 同仁化学研究所
石田和彦 同仁グローバル
渡邊純平 同仁グローバル

A. 目的

予期せぬ放射線被ばくが様々な場面において発生する可能性があり、トリージ対応可能な線量評価の重要性が指摘されている。しかし、現在のところ線量推計をもとにした緊急被ばく医療でのトリージは

様々な試みが展開されているものの体系化しておらず、原子力規制庁の原子力災害時の医療体制の在り方に関する検討チーム¹

¹ https://www.nsr.go.jp/disclosure/committee/youshikisya/kinkyu_hibakui

での検討においても、体表面汚染等の放射性物質の計測によるものに留まっており、旧原子力安全委員会の提言「緊急被ばく医療のあり方について」（平成 13 年報告、平成 20 年改訂）において、緊急被ばく医療体制の整備として、原子力施設においては、作業員の応急処置とともに、簡易な測定等による汚染の把握（サーベイランス）、スクリーニングを行った後、除染や汚染の拡大防止の措置を行い、緊急被ばく医療機関に患者を搬送することとされている想定から進展しておらず課題として残っている。

一方、大量の被災者が生じる事象では、緊急被ばく医療機関に患者を搬送するためには線量トリアージが必要となる。線量計などを用いた評価がなされていない場合には、バイオ・ドシメトリーやそれに替わる代替手段を用いた検討が必要となる。バイオ・ドシメトリーとは、生体試料や生理学的試料を材料として、被ばく線量を推定する手法である。バイオ・ドシメトリーは医療が必要な被災者をトリアージで選び出すことで救命し、大量の放射線に曝露していないにもかかわらず曝露していると思われている被災者に大量の放射線を曝露していないことを示し、事態を正確に把握することで対応の最適化を図り、必要な治療を必要なタイミングで始めることに役立つものと考えられる。

しかし、現在のところ、事故発生時における対象者の優先度を決めた選別（トリアージ）のための線量評価に関する手法が確立しておらず、多くの対象者に時間及び過度の侵襲も与えずに、0.5-1.0Gy 以上の放射線被ばくの有無やその程度を一定の不確か

さの範囲内で検査する方法は未だ確立していない。対策の頑強性を保ち、線量推計結果への信頼性を高めるためには複数の手法による方法を確立する必要がある。

比較的多数の方を対象にバイオ・ドシメトリーを実施した例としては、平成 11 年 9 月 30 日に茨城県東海村で発生した JCO ウラン加工工場での臨界事故での住民等の対応がある。この事例では、周辺住民への最初の対応として、1)リンパ球数の計測、2)染色体分析法による線量推計、がなされている。リンパ球は周辺住民 1,844 人に対して行われ、8 名が 910 個/ μ L であり、これら 8 名が染色体分析法の対象となり、幼児を除く 7 名で検査が実施され国内の関係機関の協力も得て線量推計がなされた。同様にホールボディカウンターによる検査で ^{24}Na の生成が確認されていた近隣作業所従事者 7 名、JCO 従事者 26 名、消防士 3 名を対象に染色体分析法が実施され線量推計がなされている。

この事例からも事故時の対応では、緊急被ばくのトリアージとしてだけではなく事後的な線量評価が求められること、偽陽性に対してさらなる検討が求められること、自衛隊、消防、警察、場合によっては現場に立ち入った報道機関の関係者なども含むいわゆるファーストレスポnderと呼ばれる人たちの対応も求められる²ことが改めて確認された。

トリアージの手法としては、これまで各種のバイオアッセイによる線量推計の開発が進められ、事例への適用が試みられてお

2

<https://www.niph.go.jp/journal/data/62-2/201362020010.pdf>

[ryo/index.html](https://www.niph.go.jp/journal/data/62-2/201362020010.pdf)

り、そのゴールドスタンダードは染色体異常分析である。この方法はリンパ球培養を伴い、結果を得るまでに時間がかかること、その分析技術を有するものが限られるなど課題がある。これに対して、自動検出顕微鏡画像解析システムや高精度 FISH などを用い、解析時間を短縮し、検出感度を上げるための改善が試みられているが、結果を得るまでに時間がかかること、低線量放射線の影響は検出されにくいこと、安定型の染色体異常を検出する方法では、累積した放射線被ばくの影響しか検出できないことなどの課題がある。この課題は世界各国で共通し、どの国も国内の研究機関だけでは有事の際の対応が困難であることから、国を超えた研究機関ネットワークが構築されつつある。この活動を促進した事象の一つが、ブラジルのゴイアニアでの医療用線源による環境汚染事象（1987年）であり、国際保健機関による BioDoseNet やヨーロッパでの European RENEB, MULTIBIDOSE projects やその他の多くの取り組みが開始されることとなった。

米国では、核災害に対応すべく、2005年に科学的、政策的な基盤となる考え方の整理が試みられ、2009年に Radiation Laboratory Network (Rad-LN)が提唱され、2010年に Biodosimetry Architecture to incorporate the U.S. strategy for medical countermeasures development が提唱された。

2011年の東電福島原発の事故は、バイオ・ドシメトリーに対する国際的な協力体制も含む準備の重要性を再認識させることとなり、新しい対応として、Integrated Clinical Diagnostics System (ICDS) が提案された。提案された、ICDS は、データ管理、

品質管理、個人情報保護、地図情報としての可視化、モデリングの要素により初期対応への貢献が目指されている。このようネットワークでは、標準作業手順書 (SOP (Standard Operating Procedure)) の作成など品質管理に関わる取り組みも行われている。

一方、生体試料を用いた物理的な方法として、EPR(Electron paramagnetic resonance) 技術を用いた線量評価は、従来少量の試料で感度高く評価可能な X-band 法により抜去歯を用い広島・長崎の原爆被爆者の線量評価にも応用されてきた。この方法は、昨年度の報告書にも示したように歯エナメル質のハイドロキシアパタイト結晶格子内部に放射線によって形成される炭酸ラジカルが経時的に安定であることを利用し、それを電子スピン分光 (EPR) 装置で計測しており、JCO ウラン加工工場での臨界事故では死後にご遺体から採取した歯を用いて線量が検証されている。一方、チリで 2005年12月に発生した事例や 2006年の6月から8月にアフリカのセネガルとコートジボアールで発生した事例では、フランスの Percy の軍の訓練病院に搬送された患者で、緊急被ばく医療での利用として、歯だけではなく骨も利用した線量が電子スピン共鳴法を用いて推計されており、IAEA の TECDOC や国際標準化機構 (ISO WG18, EPR Subgroup) によるその標準化も進められている。

しかし、X-band 法は、電磁波の生体内での透過の問題により、生体での測定は原理的に不可能であった。これに対して、口腔内の歯より直接、L-band EPR 法により放射線誘発ラジカルを測定する放射線被ばく線量測定法を米国ダートマス大学 EPR センタ

一と共同開発研究を行ってきた現在の検出感度は、Ex-vivoでのX線1 Gy照射標本で、感度90%、特異性80%であり、これがIn vivoでも達成できるとトリアージとしては現状でも利用可能な性能であると考ええる。

バイオアッセイによる方法として、リン酸化型ヒストン H2AX (γ -H2AX) を用いた DNA 損傷モニタリング法は、生体内 DNA 損傷を迅速にモニタリングする新しい方法として期待されている。しかしその一方で、 γ -H2AX アッセイを含めほとんどの影響評価アッセイは生体サンプルの調製、 γ -H2AX に対する免疫染色工程、さらには蛍光顕微鏡による検出など、実験行程の複雑さという背景から実験室ベースで行われることがほとんどであり、事故現場のような『現場』における解析作業は困難な現状である。

そこで、迅速な DNA 損傷レベルのモニタリングを可能とするアッセイデバイスの開発を含めた γ -H2AX による線量評価システムの構築により、トリアージ対応可能な迅速な線量評価法の確立を目指す。また、被ばく量の明確な計画的被ばく者の生体内 DNA 損傷レベルを γ -H2AX アッセイを用いて測定し、 γ -H2AX アッセイによる被ばく線量推計と被ばくのトリアージが可能であるかを検討するための予備的な解析を行う。

さらに、近年、培養細胞等を用いた実験により、放射線照射数時間以降にミトコンドリアからの活性酸素産生が亢進することが明らかとなっている。これにより細胞内の酸化還元バランス(レドックスバランス)が酸化方向に傾くことにより放射線影響が増強すると考えられる。この手法に関して本年度は放射線照射後の生体内レドックス

バランスを測定し、被ばく線量推計とトリアージ利用可能か解析することも目的とした。

これらの課題に対し、本研究班はヒトを対象として計測できる L バンド電子常磁性共鳴測定法 (EPR) によるシグナルから線量を推計する装置を国内で唯一開発・保有している背景を有している。加えて電子スピン共鳴法を使った関連技術 (X band の EPR を使ったごく少量の血液の採取で検査できる抗酸化能測定キット) を使った研究も進め、さらにはリン酸化型ヒストン H2AX (γ -H2AX) を用いた DNA 損傷モニタリング法による生体内 DNA 損傷を迅速かつ高感度にモニタリングする手法を検討してきた背景も有する。

ここで改めて留意が求められると考えられるのが偽陽性への対応である。放射線防護面で安全側に対応する場合には一定の放射線曝露があつたにもかかわらずそれを見逃すことを避けることが求められるが、これが結果として、本当は一定以上の放射線曝露をしていなかったにも関わらず誤って、その可能性を提示することになる。上述の JCO 事故でのリンパ球の結果がこれにあたる。これに限らず、何らかのイベントによる曝露量を大きく見積もることは小さく見積もることとは異なった問題をもたらさう。

一方、この課題は初期の対応や線量把握とも関連すると考えられる。JCO 事故では、周辺住民等の避難・屋内退避の要請に関して、現地では、東海村が事故当日である 9 月 30 日午後 3 時に施設から半径 350m 圏内の住民に対し避難を要請することを決定したが、この決定は、政府の初動対応が不十

分であったため、政府や茨城県の指導・助言を待たずに、村が独自に行ったものである³。東京電力福島第一原子力発電所事故での対応では当初想定していた対応に沿った原子力安全委員会からの助言が現場に到達せず、独自の判断基準で双葉郡内の自治体や田村郡三春町で安定ヨウ素剤が配布される事態となるなどの混乱もその後のリスク認知に影響を与えているとも考えられる。

以上より複数の方法を組み合わせて、判定の質を向上させる必要があると考えられるが、本研究では、被ばく線量の評価に関し、国内における実施可能性、汎用性について実証的な研究を進め、生体試料を用いた複数の方法を組み合わせた初期の線量評価法を確立することを目的とした。

B. 研究方法

以下の4つの研究を実施した。

- (1) 電子スピン共鳴法を用いた線量推計法の開発
- (2) リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX)を用いた生体内 DNA 損傷レベルの測定による線量評価
- (3) 被ばくによる生体内 DNA 損傷レベルの測定と X バンド EPR による被ばく後抗酸化能の動態解析
- (4) ミトコンドリア酸化損傷を指標に生物学的手法による線量評価

1) 電子スピン共鳴法を用いた線量推計法の

3

http://www.sangiin.go.jp/japanese/annai/chousa/rippou_chousa/backnumber/2013pdf/20130308131.pdf

開発

a) 審美歯科治療を受けた歯での EPR 信号の解析

過去に陽性とされた信号を再吟味した。

b) 手順書の整備

口腔内で安定して線量測定ができるようにこれまでのトラブル事例も踏まえて消耗品の準備等に関する手順書を作成して測定の実質が確保できるようにした。

c) 紫外線の影響の解析

紫外線の影響が信号に与える影響を検証するために健常な3本の日本人の臼歯を用い UVB を段階的に照射し L band EPR dosimetry により EPR 信号を計測して、昨年度、UVC を照射した結果と比較した。

d) 高 LET 放射線としての中性子による応答

高 LET 放射線として量研機構放射線医学総合研究所の Neutron exposure Accelerator System for Biological Effect Experiments (NASBEE) を用いて中性子を12本の健常な日本人の臼歯に段階的に照射した。中性子は、Be(d,n) 反応により生成させた。

e) X バンドでの測定

歯科用タービンを用いて削り取られたエナメル質に X 線を段階的に照射し、X band EPR で計測した。

2) リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX)を用いた生体内 DNA 損傷レベルの測定による線量評価

a) γ -H2AX アッセイデバイスとしての PDMS チップおよび小型遠心機の検討

c) 放射線診療による放射線曝露後の生体

内 DNA 損傷レベル解析

3) 被ばくによる生体内 DNA 損傷レベルの測定と X バンド EPR による被ばく後抗酸化能の動態解析

- a) 全身被ばくマウスを利用した被ばく後生体内レドックス解析
- b) 放射線診療による放射線曝露後の生体内反応の解析

4) ミトコンドリア酸化損傷を指標生物学的手法による線量評価

- a) 放射線によるミトコンドリア量、機能への影響の検討
- b) 活性酸素の測定
- c) ミトコンドリア酸化損傷検出系の確立
- d) 組織幹細胞の低線量放射線影響の解析
- e) 抗酸化剤 N-アセチルシステインを用いたミトコンドリア損傷軽減の検討

(倫理面への配慮)

(1) 電子スピン共鳴法を用いた線量推計法の開発

本研究・調査の実施にあたっては、厚生労働省・文部科学省の「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」にもとづき、国立保健医療科学院における倫理委員会に、また各分担研究者所属機関の倫理委員会に申請・承認を経て実施している（国立保健医療科学院(NIPH-IBRA#12092)および香川大学医学部(Heisei#24-4)にて承認済み）。さらに民間保険にも加入し測定を実施した。

実施にあたっては、倫理指針に則り、調査開始に当たり、本研究の目的・意義・方法・侵襲度・予測される危険性などについて説明し十分な理解を得るようにした。参

加は、本人に不利益を被らせることがないように配慮した。また、いつでも自由意志で参加の同意の撤回ができ、途中で参加を中止しても、本人に何ら不利な取り扱いを受けないことを保障した。この様な内容について十分に説明を行い、調査を実施し、情報の漏洩がないように努めた。データは被験者が特定できないように、個人情報識別管理者の管理の下で、被験者番号を付けて連絡可能匿名化し分析した。

(2) リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX)を用いた生体内 DNA 損傷レベルの測定による線量評価および(3) 被ばくによる生体内 DNA 損傷レベルの測定と X バンド EPR による被ばく後抗酸化能の動態解析

動物実験は産業医科大学動物実験及飼育倫理審査委員会より承認を受けた。動物実験は産業医科大学動物実験管理規定に則して行われた。

ヒト対象試験は社会保険直方病院倫理審査委員会より承認を受けた。

利益相反情報は必要に応じて各研究機関の COI 委員会の審査を受けた。

C. 研究結果

1) 電子スピン共鳴法を用いた線量推計法の開発

a) 審美歯科治療を受けた歯での EPR 信号の解析

信号の形状から弁別可能であると考えられた。最近の審美歯科治療の進歩との関係から、審美歯科治療で偽陽性をもたらしかることを念頭においた対応が必要だと考えられた。

b) 手順書の整備

口腔内で安定して線量測定ができるようにこれまでのトラブル事例も踏まえて消耗品の準備等に関する手順書を作成して測定の質が確保できるようにした。

c) 紫外線の影響の解析

UVB では太陽光で数十年分の曝露でないと信号が検出されないことを確認した。10年以上では、信号が検出されうるかもしれないので、そのことを検討。

d) 高 LET 放射線としての中性子による応答

高 LET 放射線として量研機構放射線医学総合研究所の NASBEE を用いて中性子を健常な日本人の臼歯に段階的に照射した。

Cs-137 線源による γ 線に比し EPR 信号の応答は 3 割程度であり、照射後 2 時間程度からの測定では、放射化核種による信号の増強は確認できない程度であったが、フェーディングに関しては完全に否定できない結果が示唆された。

e) X バンドでの測定

歯科用タービンを用いて削り取られたエナメル質に X 線を段階的に照射し、X band EPR で計測した。診断領域の X 線に対して 20 mGy 程度の追加被ばくを検出しようと考えられたが、試料によるバックグラウンドでの EPR 信号の大きさにバラツキがあり、事故による放射線曝露の検出限界を小さくするための工夫が求められることが改めて確認された。

2) リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX)を用いた生体内 DNA 損傷レベルの測定による線量評価

PDMS チップを用いたリンパ球分離の

ための細胞固定構造の検討では、リンパ芽球細胞を拡散・固定するために、より低速遠心が可能な遠心機を用いて PDMS チップシステム用の治具を作製した。また、細胞固定構造の入口径と出口径を様々なサイズの組み合わせで作成し、リンパ球の固定効率および、リンパ球以外の血球細胞の除去率について検討した。その結果、ある一定のリンパ球固定は認められるものの、多くの細胞が固定されることなく流出してしまっていた。

計画的被ばく者を対象とした被ばく後生体内 DNA 損傷レベル解析では、産業医科大学から送付された IVR 実施患者由来リンパ球細胞を用いて γ -H2AX に対する免疫染色を行った結果、IVR 直後の患者リンパ球細胞において明確な γ -H2AX フォーカスの増加が検出された。IVR 直後の生体サンプルで γ -H2AX フォーカスとして検出される DNA 二重鎖切断量は、IVR 検査によって予想される放射線量に比例していた。また、すべての患者において、 γ -H2AX レベルは検査後時間経過とともに減少しており、IVR によって誘導された DNA 損傷が修復されていることが示された。いずれの患者においても、検査 1 週間後には照射前レベルまで DNA 損傷が減少していた。今回、対象患者の一部には IVR 検査前に抗酸化剤の投与が行われており、DNA 損傷誘発に対する抗酸化剤の効果を検討したところ、 γ -H2AX レベルのわずかながら低下が確認された。

全身被ばくマウスを用いた生体内 DNA 損傷レベル解析でも、産業医科大学から送付された放射線被ばくマウス由来のリンパ球サンプルを用いて γ -H2AX に対する

免疫染色を行った。その結果、線量依存的な DNA 損傷の誘導が確認された。

3) 被ばくによる生体内 DNA 損傷レベルの測定と X バンド EPR による被ばく後抗酸化能の動態解析

全身被ばくマウスを利用した被ばく後生体内レドックス解析では、被ばく後に一過性に酸化還元バランスが特徴的な変化を示すことが確認された。この結果は我々が以前に培養細胞を用いて得られた結果と一致していた。

全身被ばくマウスを利用した被ばく後 DNA 損傷レベルの解析では、マウス全身に 0、0.5、1、3、5 Gy の X 線を照射し、照射後のリンパ球中の γ H2AX の foci 数を解析したところ、照射群ではいずれの線量においても照射 1 時間後に foci 数が最大となり、その後、経時的な foci 数の減少がみられた。0.5 Gy 照射群では照射後 3 日で非照射群と同じレベルまで foci 数が減少し、1 Gy 照射群では照射後 7 日で非照射群と同じレベルまで foci 数が減少したが、3 および 5 Gy 照射群では照射後 7 日においても非照射群より多くの foci 数が観察され、照射する線量による経時的な変化の違いが確認された。

計画的被ばく者を対象とした被ばく後の生体内反応の解析では、2016 年 1 月～2016 年 2 月に社会保険直方病院で心臓カテーテル検査を実施した患者で、インフォームドコンセントの取得できた 10 例（空気カーマ： 474 ± 293 [mGy]、DAP： 51 ± 30 [mGy \times cm²]、透視時間： 9.3 ± 5 [分]、撮影シリーズ数： 16.5 ± 8.4 [回]、撮影フレーム数： 1907 ± 752 [回]) を対象として研究を実施し、被ばく前後における血球数等の変化として、

リンパ球数が検査直後にコントロール群で軽度(13%程度)の低下が見られたのに対して、アスコルビン酸投与群では低下が見られなかった。本研究で見られた、検査直後のコントロール群におけるリンパ球数の減少は放射線が原因であることを否定できないが、過去の報告とは観察された時期、線量が異なった。また、被ばく前後における血中脂質指標の変化として検査翌日の酸化 LDL と中性脂肪値は、アスコルビン酸投与群では検査前と同等まで回復していたのに対し、コントロール群では検査前よりわずかに上昇(10%程度)していた。被ばく前後におけるレドックス指標の変化として、血中ラジカル生成能と SOD 活性を解析したところ、アスコルビン酸投与群では一貫して、コントロール群より低値となった。検査翌日でアスコルビン酸が定常状態に戻った後も低い状態が維持されていたことは興味深く、アスコルビン酸の防護作用の一旦を反映している可能性がある。

4) ミトコンドリア酸化損傷を指標生物学的手法による線量評価

ヒト細胞を用いて、1Gy 以上の急性照射でミトコンドリア酸化損傷が検出され、線量依存的にその頻度が増加することを明らかにした。一方、長期分割照射では、レドックス制御の異常により蓄積する過剰な活性酸素がミトコンドリア酸化損傷を誘導することを明らかにした。ミトコンドリア酸化損傷はエネルギー代謝の過程で発生する活性酸素が原因であり、放射線と抗酸化剤の併用で抑制することが可能である。さらに、神経幹細胞を用いた組織幹細胞の放射線応答の解析では、放射線によるミトコンドリア酸化損傷は神経幹

細胞では検出されず、放射線抵抗性を示すことを明らかにした。

D. 考察

1) 電子スピン共鳴法を用いた線量推計法の開発

本研究課題の最終目標である災害派遣型 EPR 線量評価ユニットで最終的に急性被ばく 1Gy 以上を分別可能な、効果的な線量評価法・トリアージシステムの一部として電子スピン共鳴法を用いた線量推計法も組み込めるように、これまでのトラブル例を元に、口腔内で安定して線量測定ができるような課題の整理が行われた。また、紫外線の影響に関して、UVB では太陽光で数十年分の曝露でないと信号が検出されないことを確認するとともに審美歯科治療により偽陽性となりえることを確認し、この測定法の限界の見極めを深めた。来年度にそれらの課題を克服し、災害派遣型 EPR 線量評価ユニットの基本デザインを完成させる。

2) リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX)を用いた生体内 DNA 損傷レベルの測定による線量評価

リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX) 検出を簡便に行うことのできる新規デバイスとして、Polydimethylsiloxane チップに着目し、リンパ球相当のサイズの細胞を固定すると同時に、赤血球等を効率よく排除できる微細構造を試作するとともに細胞固定を行うための表面改質方法を評価し新規デバイスの開発に向けて技術的な課題を抽出した。

IVR 実施患者の血液を用いて線量相当の DNA 損傷が検出するとともに、抗酸化剤投

与での放射線による DNA 損傷レベルの抑制を確認した。

マウスにおいて、被ばく後線量依存的 DNA 損傷が検出され、被ばく線量評価が可能であることを確認した。

3) 被ばくによる生体内 DNA 損傷レベルの測定と X バンド EPR による被ばく後抗酸化能の動態解析

全身被ばくマウスを利用した実験では DNA 損傷レベルを γ H2AX を指標に解析し、過去に Redon らがミニ豚やサルで得た結果と傾向は同じであることを確認した。計画的被ばく者を対象とした被ばく後生体内反応の解析では、心臓カテーテル検査の患者を対象にしたことから、平均被ばく線量は空気カーマ(≒最大皮膚線量)で 474 mGy と比較的低かったことなどから、今後放射線との関連を精査する必要があるものの、検査直後で検査前より SOD 活性が上昇していた点や検査翌日にアスコルビン酸が定常状態に戻った後も血中ラジカル生成能が低下していた点などは非常に興味深い。このように生体レベルでも放射線照射による酸化還元バランスの変化が認められとともに抗酸化剤の投与がその変化を修飾することが示唆された。来年度は継続してデータを収集し、放射線災害等におけるトリアージ法としての可能性を詳細に検討する。

4) ミトコンドリア損傷を指標生物学的手法による線量評価ミトコンドリア損傷を指標生物学的手法による線量評価

放射線照射後、活性酸素量が増加し、酸化ストレスを誘導することが知られている。このことを利用し、活性酸素の発生源であ

るミトコンドリアの酸化損傷を指標に、線量評価に取り組んだ。ミトコンドリア DNA (mtDNA) は、核 DNA と比較して、DNA 修復効率が低いことから、放射線による mtDNA 損傷が長期間残存することが予想され、被ばく線量を評価する指標として適していると考えられる。ミトコンドリア酸化損傷の解析は、線量評価だけでなく、放射線発がん、非がん影響評価においても重要であると考えられる。

今後は、DNA 損傷とミトコンドリア酸化損傷を同時に検出し、より精度の高い線量評価法の確立が可能かどうかを検討する。

細胞レベルでの線量評価で得られた知見が、個体レベルでも同様かどうか、また、人への応用可能かどうかを検討する。

E. 結論

1) 電子スピン共鳴法を用いた線量推計法の開発

紫外線の影響に関して、UVB では太陽光で数十年分の曝露でないと信号が検出されないことや審美歯科治療により偽陽性となりえることを確認するとともに、口腔内で安定して線量測定ができるようにこれまでのトラブル事例も踏まえて測定に関する手順書を作成して測定の質が確保できるようにした。来年度にそれらの課題を克服し、災害派遣型 EPR 線量評価ユニットの基本デザインを完成させる。

2) リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX)を用いた生体内 DNA 損傷レベルの測定による線量評価

リンパ球分離および γ -H2AX アッセイ

デバイスとしての PDMS チップの開発、細胞の拡散・固定を行うための小型遠心機の加工等を行った。改善すべき課題が明確となったので、今後さらなる微細構造の改良を行い、血液から迅速にリンパ球を分離し解析できるデバイスの開発を引き続き目指す。また、低線量計画的被ばく後の生体内 DNA 損傷レベルを γ -H2AX アッセイによってモニタリングすることが可能であることが示された。来年度はより幅広くかつ細やかな被ばく放射線量評価を行うための γ -H2AX アッセイの検討だけでなく、その他の線量評価データとの相関性も検討することで、トリアージのための総合的線量評価手法の確立を目指す。

3) 被ばくによる生体内 DNA 損傷レベルの測定と X バンド EPR による被ばく後抗酸化能の動態解析

生体レベルでも放射線照射によるレドックスバランスの変化が認められ、放射線災害等におけるトリアージ法として利用できる可能性が示唆された。来年度は種々の交絡因子の影響等について検討し、実施可能性を詳細に検討する。

4) ミトコンドリア損傷を指標生物学的手法による線量評価ミトコンドリア損傷を指標生物学的手法による線量評価

ミトコンドリア酸化損傷は、1Gy 以上の被ばくのトリアージを可能にする線量評価のための新たな生物学的線量評価の指標として期待される。今後は、この指標を用いて、動物個体やヒトでの検証が求められる。ミトコンドリア酸化損傷は、単に線量評価だ

けでなく、放射線の影響に対する生物応答も反映していることから放射線影響の評価においても重要であると考える。

謝辞

研究に協力頂いた被験者の皆様に厚く御礼申し上げます。また、中間評価においてコメントを下された評価者にも感謝申し上げます。

この研究を継続的に支援下さっている EPR Center for the Study of Viable Systems, Geisel School of Medicine at Dartmouth のハロルド・シュワルツ教授およびアン・フラッド教授にも感謝申し上げます。

本研究の一部は、国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所の中性子発生用加速器システム (NASBEE) の生物照射室を利用して行われました。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyake M., Nakai Y., Yamaguchi I., Hirata H., Kunugita N., Williams BB., Harold MS In vivo radiation dosimetry using portable L-band EPR : On-site measurement of volunteers in Fukushima Prefecture, Japan.. Radiation Protection Dosimetry, 172, 248-253, 2016
- 2) Yamaguchi I, Sato H, Kawamura H, Hamano T, Yoshii H, Suda M, Miyake M, Kunugita N. L Band EPR tooth dosimetry for heavy ion

irradiation. Radiation Protection Dosimetry, 172, 81-86, 2016.

- 3) Mamoru Kato, Koichi Chida, Takashi Moritake, et.al: Direct dose measurement of patient during percutaneous coronary intervention procedures using radiophotoluminescence glass dosimeters. Radiation Protection Dosimetry, doi:10.1093/rpd/ncw263, 2016
- 4) Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells. Cell Cycle (in press).
- 5) Shimura T, Kunugita N. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated genomic instability in low-dose irradiated human cells through nuclear retention of cyclin D1 Cell Cycle 15(11):1410-1414, 2016.
- 6) Nakamura AJ, Suzuki M, Redon CE, Kuwahara Y, Yamashiro H, Abe Y, Takahashi S, Fukuda T, Isogai E, Bonner WM, Fukumoto M. The causal relation between DNA damage induction in bovine lymphocytes and the Fukushima nuclear power plant accident. Radiation Research (in press)
- 7) Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. Severe mitochondrial

- damage associated with low-dose radiation sensitivity in ATM- and NBS1-deficient cells. *Cell Cycle* 15(8):1099-1107, 2016
- 8) Shimura T, Sasatani M, Kamiya K, Kawai H, Inaba Y, Kunugita N. Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in low-dose irradiated human fibroblasts. *Oncotarget*. 7 (3):3559-70, 2016.
- 9) Nakamura AJ, Suzuki M, Redon CE, Kuwahara Y, Yamashiro H, Abe Y, Takahashi S, Fukuda T, Isogai E, Bonner WM, Fukumoto M. The causal relation between DNA damage induction in bovine lymphocytes and the Fukushima nuclear power plant accident. *Rad Res.* (accepted) (2016)
- 10) Mamoru Kato, Koichi Chida, Takashi Moritake, et.al: Direct dose measurement of patient during percutaneous coronary intervention procedures using radiophotoluminescence glass dosimeters. *Radiation Protection Dosimetry*, doi:10.1093/rpd/new263, 2016
- 11) Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells. *Cell Cycle* (in press).
- 12) Kamiya K, Sasatani M, Xi Y, Kajimura J, Kawamura T, Piao J, Masuda Y, Honda H, Kubo K, Mikamoto T, Watanabe H, Xu Y, Kawai H, Shimura T, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Zaharieva E. Overexpression of Rev1 promotes the development of carcinogen-induced intestinal adenomas via accumulation of point mutation and suppression of apoptosis proportionally to the Rev1 expression level. *Carcinogenesis* (in press).
- 13) Shimura T. Targeting the AKT/cyclin D1 pathway to overcome intrinsic and acquired radioresistance of tumors for effective radiotherapy. *Int J Radiat Biol.* 2:1-5,2016.
- 14) 山口一郎、尾本由美子、原田美江子、栗原せい子、樺田尚樹. 東京都豊島区の公園で線源が発見された事例への公衆衛生的な対応. *日本放射線安全管理学会誌* 2016; 15 (2): 186-192.
- 15) 山口一郎. 放射性物質テロへの公衆衛生対応. *保健医療科学* 2016; 65(6): 569-575.
- 16) 茂呂田孝一, 盛武 敬, 孫 略, 石原隆宏, 熊奈津代, 村田聡美, 山田貴大, 岡崎龍史: 患者被ばく線量低減に向けた DICOM RDSR (病院内医療用画像規格線量レポート) 情報の収集. *Journal of UOEH (産業医科大学雑誌)* 2016 ; 38 (4) : 325-335

2. 学会発表

- 1) Ichiro Yamaguchi, Hitoshi Sato, Hiraku Kawamura, Tuyoshi Hamano, Hiroshi Yoshii, Mituru Suda, Minoru Miyake and Naoki Kunugita. L Band EPR Tooth Dosimetry for neutron. IRPA 14; 2016.5.9-13: Cape Town. P03.60
- 2) Minoru Miyake, Ichiro Yamaguchi, Yasuhiro Nakai, Hiroshi Hirata, Naoki Kunugita, and Harold M. Swartz. In-vivo tooth dosimetry using L band EPR - The research involving human subjects related to Fukushima nuclear power plant accident-. IRPA 14; 2016.5.9-13: Cape Town. P03.62
- 3) Lue Sun, Takashi Moritake, Masaoki Kohzaki, Akira Ootsuyama and Ryuji Okazaki: Energy and ROS metabolism in radioresistant brain tumor cells. Society for Redox Biology and Medicine's 23rd Annual Meeting, a joint meeting with the Society for Free Radical Research International. San Francisco, USA. November 2016
- 4) 招待講演、Lue Sun: Energy and ROS metabolism in radioresistant brain tumor stem cells. Loma Linda University Medical Center, California, USA. November 2016
- 5) Nakamura AJ, Suzuki M, Redon CE, Kuwahara Y, Bonner WM and Fukumoto M. DNA damage induction in bovine lymphocytes after the Fukushima nuclear accident. 62nd Annual international meeting Radiation Research Society, Oct 16 - 19, 2016, Hawaii, USA.
- 6) Nakamura A, Sasatani M, Shimura T, Kato M, Maruyama R, Iioka T, Sawai Y, Kobayashi J, Komatsu K and Kamiya K. The use of γ -H2AX assay for validation of radioprotective effect of tempol against acute and chronic low-dose radiation exposure. 14th International Workshop on Radiation damage to DNA, Mar 20 - 24, 2016, Melbourne, Australia.
- 7) Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K and Kunugita N. A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells. The 1st international symposium of the network-type joint usage/research center for radiation disaster medical science –Scientific underpinning for restoration from a radiation disaster. 2017.2. P.59
- 8) Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. Mitochondrial DNA damage responses in ATM- and NBS1-deficient cells. 第59回日本放射線影響学会 ; 2016.10. P.23
- 9) 三宅 実、中井康博、山口一郎、岩崎昭憲、中井 史、小川尊明、大林由美子、樺田尚樹 ポータブル型生体 EPR (Electron Paramagnetic Resonance:

電子常磁性体共鳴法)を用いた放射線被ばく線量測定—福島在住のボランティアからの計測—、第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会；2016 年 4 月 16-17 日、福岡

- 10) 樺田 尚樹、山口 一郎、志村 勉、三宅 実、中村 麻子、盛武 敬. 緊急被ばく医療が必要とされるような事故発生時におけるトリアージのための線量評価手法の検討. 第 89 回日本産業衛生学会；2016 年 5 月 24-27 日、福岡
- 11) シンポジウム指名発表、孫略、盛武敬：放射線白内障の新事実：第 32 回 NPO 法人日本脳神経血管内治療学会学術総会、放射線防護委員会シンポジウム、神戸、11 月、2016 年
- 12) 五十嵐友紀、孫略、川崎祐也、李云善、平川晴久、河井一明、盛武敬、放射線被ばく時におけるアスコルビン酸の体内解毒システムに与える影響の評価、第 34 回産業医科大学学会総会、北九州、10 月、2016 年
- 13) 志村勉、笹谷めぐみ、河合秀彦、神谷研二、樺田 尚樹. 低線量長期放射線照射におけるミトコンドリア由来活性酸素の蓄積と酸化ストレスによる細胞周期制御機構への影響. 第 59 回日本放射線影響学会；2016.10. P.24
- 14) 加藤正尊、飯岡俊英、丸山里奈、澤井裕一、中村麻子、笹谷めぐみ、神谷研二、小林純也、小松賢志、志村勉. 抗酸化剤 Tempol による放射線誘発の DNA 損傷抑制効果の検討. 第 59 回日本放射線影響学会；2016.10. P.46

3.その他

- 0) Nakamura AJ. Evaluation of radiation-induced DNA damage using gamma-H2AX as a biodosimeter. 第 2 回レジリエント・コミュニティ国際シンポジウム, Apr. 14-15, 2016, 郡山市中央公民館, 郡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 発明の名称：放射線被ばくの判定方法
出願番号：特願 2017-30440
出願日：平成 29 年（2017 年）2 月 21 日
発明人：孫略、盛武敬、平山暁、千田浩一

- 2) 本研究で開発される γ -H2AX アッセイデバイスおよびシステムについても特許出願予定である。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II. 分担研究報告

災疾病臨床研究事業費補助金
分担研究報告書（案）

電子スピン共鳴法を用いた線量推計法の開発

研究分担者	山口一郎	国立保健医療科学院	生活環境研究部	上席主任研究官
研究分担者	三宅実	香川大学医学部	歯科口腔外科学講座	教授
研究分担者	志村勉	国立保健医療科学院	生活環境研究部	上席主任研究官
研究協力者	平田拓	北海道大学	大学院情報科学研究科	教授
研究協力者	井上一彦	鶴見大学	非常勤講師	
研究協力者	豊田新	岡山理科大学	理学部	教授
研究協力者	中井康博	香川大学医学部	歯科口腔外科学講座	医員

研究要旨

事後的な線量評価手法として、口腔内の歯をそのまま用いる L バンド・マイクロ波を用いた生体 EPR（電子常磁性共鳴分光）線量計測法が開発されている。本院もこの研究に参画し、本システムが本院にも設置されている。これまでの研究で、診断領域の X 線曝露では ex vivo での測定では 1 セットの測定（1 分間）のみでもトリアージで求められる 2Gy の曝露を見落とす確率を十分小さくできている。この方法は、核災害や大規模な放射線被曝事故等における緊急被ばく医療のトリアージにも利用が可能だと考えられ、緊急被ばく医療が必要とされるような事故発生に労働者が巻き込まれた際に、トリアージのための線量評価にも用いることが考えられる。そこで、L バンド EPR を主に、電子スピン共鳴法を用いた線量推計法の事故時等の適用について検討し、実用化に向けた課題の整理を試みた。

- ・ 口腔内で安定して線量測定ができるようにこれまでのトラブル事例も踏まえて測定に関する手順書を作成して測定の質が確保できるようにした。
- ・ これまでのトラブルは試料にラジカルを有する物質が付着することによる放射線誘発ではないと考えられる信号の検出と測定時のノイズの混入である。ノイズは電磁波シールドルームの利用で大幅に改善し、測定の安定性が増したが、まだ未知のノイズが観測されることがあり、その対策が必要だと考えられる。
- ・ 紫外線の影響に関して、UVB では太陽光で数十年分の曝露でないと信号が検出されないことを確認した。ただし、太陽紫外線でも長期間にわたり曝露すると信号が見えることがあると考えられ、太陽光に歯が露出され続けた場合には、高齢者では影響を与えうるかもしれない。

これまでの検討で本研究課題の最終目標である災害派遣型 EPR 線量評価ユニットとして急性被ばく 1Gy 以上が分別可能な、効果的な線量評価法・トリアージシステムを運用するためのシステムデザインの課題が絞り込まれ、本システムを社会実装が現実的なものになり得ることが検証された。

A. 研究目的

昨年度の報告書にも示したように、残存した不対電子を電子スピン共鳴法により計測し、線量を推計 EPR (Electron paramagnetic resonance) dosimetry は、X-band 法により抜去歯を用い広島・長崎の原爆被爆者の線量評価にも応用されてきており、緊急被ばくの利用としては、チリで 2005 年 12 月に発生した事例や 2006 年の 6 月から 8 月にアフリカのセネガルとコートジボアールで発生した事例では、フランスの Percy の軍の訓練病院に搬送された患者で歯だけではなく骨も利用した線量が推計されており¹、IAEA の TECDOC²や国際標準化機構 (ISO WG18, EPR Subgroup) によるその標準化³も進められている。

この方法は、昨年度の報告書にも示したように歯エナメル質のハイドロキシアパタイト結晶格子内部に放射線によって形成される炭酸ラジカルが経時的に安定であることを利用し、それを電子スピン分光 (EPR) 装置で計測している。

しかし、X-band 法は、電磁波の生体内での透過の問題により、測定するためには試料を細かく砕き、試料管に入れて計測する必要があることから生体での測定は原理的

に不可能であった。これに対して、米国ダートマス大学のシュワルツ教授らは、事後的な線量評価手法として、口腔内の歯をそのまま用いる L バンド・マイクロ波を用いた生体 EPR 線量計測法を開発している。L バンド・マイクロ波は生体内でも透過する性質を持つために、試料を砕く必要がなく、そのまま計測ができる。この原理を利用して生体のオキシメトリーの研究も展開されている。

この方法は、核災害や大規模な放射線被曝事故等における緊急被ばく医療のトリアージや事後的な線量評価に利用できると考えられる。当部に開発された機器を設置しており、シュワルツ教授らと共同研究を実施中である。測定中の風景を図 1 で示す。



図 1-1. 測定中の風景 (国立保健医療科学院の電波暗室内での計測)

モバイル化された *in vivo* tooth EPR dosimetry 装置は、米国ダートマス大学の Geisel School of Medicine に設置されている EPR Center for the Study of Viable Systems で開発されたもので、1.15 GHz (L-band) のマイクロ波が 41 mT の磁石の間に照射される。磁石の重量は 30kg であ

1

<http://www.radioprotection.org/articles/radiopro/pdf/2008/05/000224.pdf>

2

<http://www-pub.iaea.org/books/iaeaabooks/6646/Use-of-Electron-Paramagnetic-Resonance-Dosimetry-with-Tooth-Enamel-for-Retrospective-Dose-Assessment>

3

<https://www.iso.org/standard/53662.html>

り、磁石の間は 17 cm である。用いたサーフェスコイル型リゾネータは、上顎切歯での計測のためにデザインされたものであり、EPR Center at Dartmouth で開発されものと北大で開発されたものがそれぞれ使用可能となっている。装置の総重量は約 100kg であるが、装置が 120V で作動するために昇圧トランスを用いている。今年度、置き換えたトランスは、S/N そのものの改善は確認できていないが、S/N の変動が小さくなっている。なお、ダートマス大学で新しく開発されている装置は、総重量が 40 kg を切っており、持ち運びだけではなく取り扱いが容易で安定性も増すようにさらに改良が進められている。



図 1-2. 搬入時の梱包

これまでの研究で、診断領域の X 線曝露では ex vivo での測定では 1 セットの測定 (3 秒間のスキャンを 20 回繰り返すので、1 分間の計測となる) のみでもトリアージで求められる 2Gy の曝露を見落とす確率を十分に小さくできている。

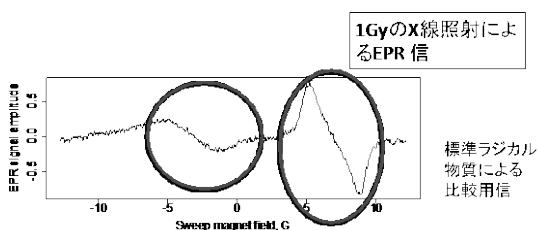


図 2. 1Gy 照射した歯での計測例 (in vitro)

今年度、研究に協力して下さっていた方に本院の電波暗室において 3 秒間スキャンを 20 回繰り返してデータを得ることを 5 セット行った結果を示す。陽性対照は、150kV で発生させた X 線を用いて 20Gy 照射した歯で同様に計測したものである。

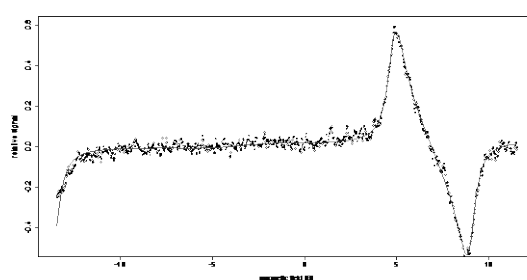


図 3-1. 電波暗室でのボランティアを対象にした測定結果 (1 回目)

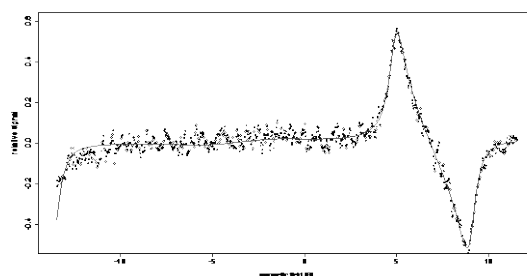


図 3-2. 電波暗室でのボランティアを対象にした測定結果 (2 回目)

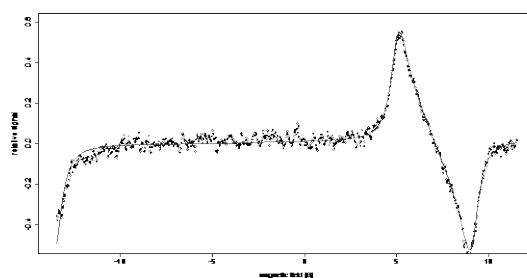


図 3-3. 電波暗室でのボランティアを対象にした測定結果 (3 回目)

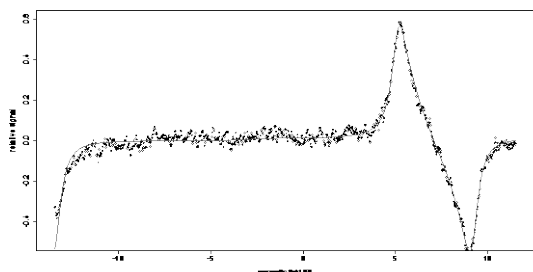


図 3-4. 電波暗室でのボランティアを対象にした測定結果 (4 回目)

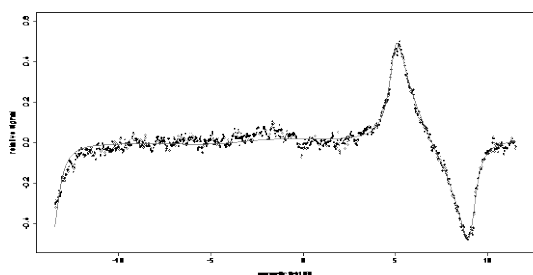


図 3-5. 電波暗室でのボランティアを対象にした測定結果 (5 回目)

この方法は、核災害や大規模な放射線被曝事故等における緊急被ばく医療のトリアージにも利用が可能だと考えられ、緊急被ばく医療が必要とされるような事故発生に労働者が巻き込まれた際に、トリアージのための線量評価にも用いることが考えられる。

また、それだけではなく、トリアージを必要としない事象において、その場で自身の結果がスペクトルとして提示されることから、予期せず放射線曝露を受けた人々とのコミュニケーションツールとしての有用で

あることが昨年度の研究での示唆されている。

以上を踏まえて、本研究課題の最終目標である災害派遣型 EPR 線量評価ユニットで最終的に急性被ばく 1Gy 以上を分別可能な、効果的な線量評価法・トリアージシステムとして社会実装するために、L バンド EPR を主にして、電子スピン共鳴法を用いた線量推計法の事故時等の適用上の課題について本年度も検討した。

B. 研究方法

1. 審美歯科治療を受けた歯での EPR 信号の解析

昨年度の研究で EPR 信号が検出した例のうち、信号の形状が特異なものを再吟味した。

2. 手順書の整備

オンサイト等において口腔内で安定して線量測定ができるようにこれまでのトラブル事例を分析し、その分析も踏まえた課題の検討を行った。

3. 紫外線の影響

昨年度の検討では、UV-C を曝露させた歯では、実験室で汎用して用いられる 8 W の紫外線照射装置でも一時間程度の UV-C の照射により本装置で検出可能な EPR 信号が検出され、明瞭な曝露量-信号関係が確認されたことから、今年度は UV-B を照射して、曝露量-信号関係の検証を試みた。UV-C と異なり UV-B は太陽紫外線に含まれているので、実際の影響について検証することになる。

試料は 3 本で、段階的に曝露させ、それぞれの曝露後に L band EPR dosimetry を行った。紫外線は、100W のキセノン光源を用いた(朝日分光株式会社の LAX-103)。この照射装置で UV-B ミラーモジュールを用いて 240-300nm の波長を選択的に取り出し、さらに 280nm の波長への透過性を持たせたフィルタ (バンドパスフィルタ LX0280) を用いて UV-B を得た。照射野を均一にするためのロッドレンズを用い照射野サイズを、20 mm としたので、この装置での UVB の露光量は 4212 mJ/cm² になる。

陽性対照としては、20Gy の X 線照射した歯を測定した際に得られる EPR 信号とした。この X 線照射は、日立メディコの X 線装置 (MBR-1505R2) を用い、管電圧 150 kV、管電流 4 mA、フィルタを 0.1 mm の銅と 0.3 mm のアルミニウムとして照射したものである。

照射した紫外線の波長分布を図 4 に示す。

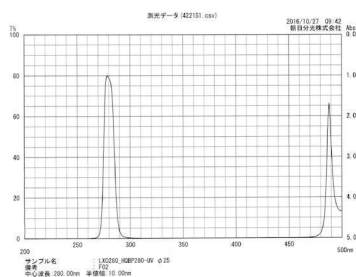


図 4. 照射した紫外線の波長分布

4. 高 LET 放射線の応答

歯のエナメル質の主要な組成はハイドロキシアパタイトである。高 LET 放射線として中性子を歯に照射した。照射は、放射線医学総合研究所の NASBEE で行った (総線量 60Gy)。照射は日本人の健常な臼歯を

対象とし (N=12)、ポリエチレンのスラブのファントムを用いて行った。中性子は、Be(d,n) 反応で得た。



図 5. NASBEE で照射のセッティング



図 6. 歯をセットするファントム

5. X バンドでの測定

歯科用タービンを用いて削り取られたエナメル質に X 線を段階的に 20mGy, 40mGy, 80mGy と照射し、それぞれ照射後に X band EPR で計測した。測定の場合は、電磁波出力: 2mW、磁場変調: 0.2mT、掃引幅: 5mT、時定数: 0.03s、掃引回数 40 回とし、その測定を 3 回繰り返した。データの解析は、Alexander Ivannikov 博士が開発したコードを用いた。

6. 動物の歯の測定

被災動物の歯を非破壊的に L band EPR で計測することを計画していたが、試料が利用できず、測定を断念せざるを得なかつ

た。

(倫理面への配慮)

本研究・調査の実施にあたっては、厚生労働省・文部科学省の「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」にもとづき、国立保健医療科学院における倫理委員会に、また各分担研究者所属機関の倫理委員会に申請・承認を経て実施している（国立保健医療科学院(NIPH-IBRA#12092)および香川大学医学部(Heisei#24-4)にて承認済み）。さらに民間保険にも加入した。

実施にあたっては、倫理指針に則り、調査開始に当たり、本研究の目的・意義・方法・侵襲度・予測される危険性などについて説明し十分な理解を得るようにした。参加は、本人に不利益を被らせることがないように配慮した。また、いつでも自由意志で参加の同意の撤回ができ、途中で参加を中止しても、本人に何ら不利な取り扱いを受けないことを保障した。この様な内容について十分に説明を行い、調査を実施し、情報の漏洩がないように努めた。データは被験者が特定できないように、個人情報識別管理者の管理の下で、被験者番号を付けて連絡可能匿名化し分析した。

C. 研究結果

1. 審美歯科治療を受けた歯での EPR 信号の解析

EPR 信号が検出されている例の中で、信号の形状が典型的なものとは異なる例があった。

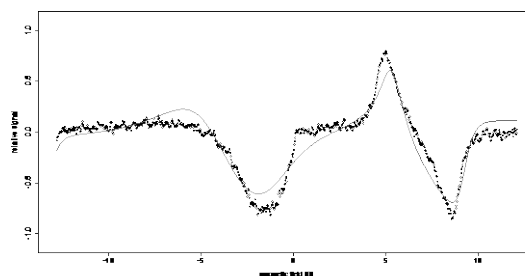


図7 .観察されていた信号の形状が典型的なものとは異なる信号例

この歯をよく観察したところ、審美歯科治療を受けていたことが判明した。治療を受けていない箇所では信号が検出できなかった。このことから、審美歯科治療を受けることでラジカルが保持されない素材が歯に加えられると、それにより誤って陽性と判断する危険性があると考えられた。

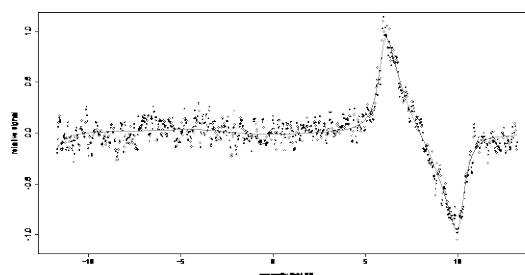


図8 .同じ歯で人工物を使っていない箇所に測定部位を変えた結果、信号が見えなくなったことを示す例

2. 手順書の整備

A. これまでのトラブル例の分類

これまでのトラブル事例を以下のように分類した。

- 磁場掃引
 - 低磁場側の掃引のトラブル

- 高磁場側の掃引のトラブル
- 掃引範囲の偏位
- ・ ノイズ
 - 非周期的
 - 周期的
- ・ 異常な形状の信号
- ・ 信号の読み取り不能

以下、これらのトラブルの原因と対策を検討した。これまでに問題となっていたノイズは電波暗室で計測することで小さくできていくと共に、これらのトラブルは全て、その後解消できている。一部の検討はより過酷な環境での計測を想定し、その対策を提示するものとなっている。

B. 磁場掃引時のトラブル

【低磁場側の掃引のトラブル】

磁場掃引のトラブルは、磁石の温度に関係していると考えられた。磁石の温度は、装置の幾何学的な条件や電気的な環境に影響を与えることで磁場の強さに影響を与えていると考えられる。

低温では低磁場側で掃引の不調が発生すると考えられた。この現象は冬に観察された。

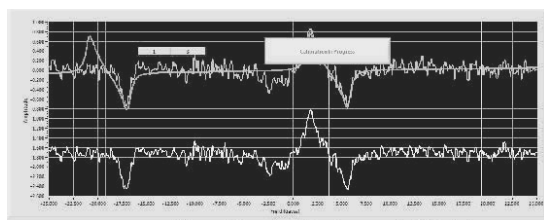


図 9 .低磁場で掃引に不具合が発生している例（PDTの低磁場側のピークの形状が変化している）

この課題は、ウォーミングアップで磁石を温めることで解決した。

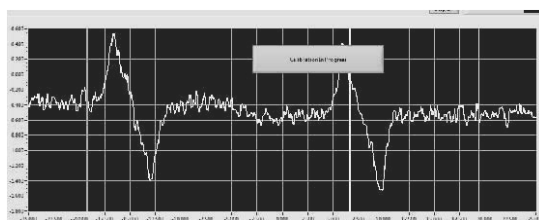


図 10 .十分なウォーミングアップ後に改善している例

【高磁場側の掃引のトラブル】

高温では高磁場側で掃引の不調が発生すると考えられた。この現象は電磁石に電流を流し続けた際に観察された。

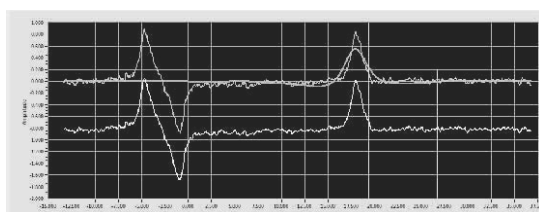


図 11 .高磁場で掃引に不具合が発生している例（PDTの高磁場側のピークの形状が変化している）

【掃引範囲の偏位】

磁場掃引が変位することもあった。

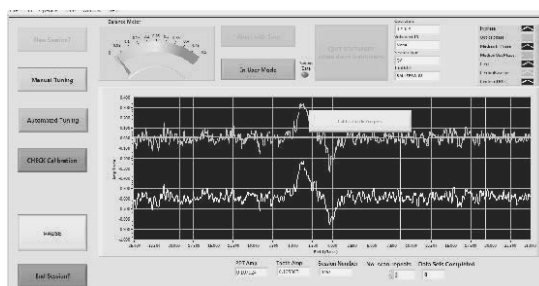


図 12 .磁場掃引の変位例

【その他の磁場掃引でのトラブル】

制御（電圧・電流）スイッチの設定誤りで発振現象が観察された。

【掃引のトラブルの防止・対策】

これらのことから、装置が置かれている環境の温度が制御できることや移動中にウォーミングアップの時間を確保することや磁石が熱くなりすぎたときに冷却することが対策として考えられた。

また、設定の誤りが、これらのトラブルを引き起こすことが考えられるので、エンドユーザーが不用意に設定を変更させないようにすることも必要だと考えられる。現在は、装置の開発中であるために機能を制約できないが、フィールドで使う際には、通常使用と研究使用などでモードを切り替え、ヒューマンエラーを小さくすることも考えられる。

D. ノイズ

ノイズには、周期的なノイズと非周期的なノイズが観測されることがある。このうち、非周期的なノイズでは電波暗室を使うことで室外の人の移動などによるノイズが低減した。その一方、様々な周波数の極低周波としての振る舞いをするノイズが、電波暗室周辺で比較的大きな電力を使っていると考えられる時に観測された。以下にその例を示す。

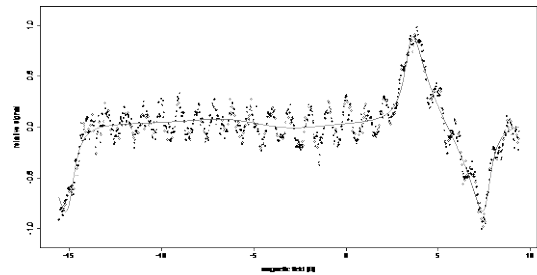


図 13-1. 周期的なノイズ例 1

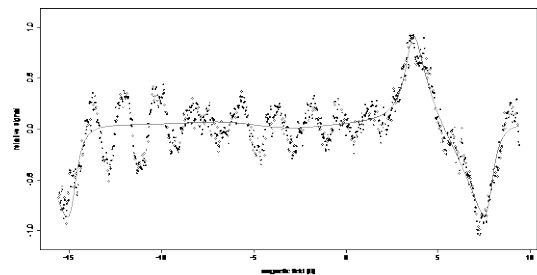


図 13-2. 周期的なノイズ例 2

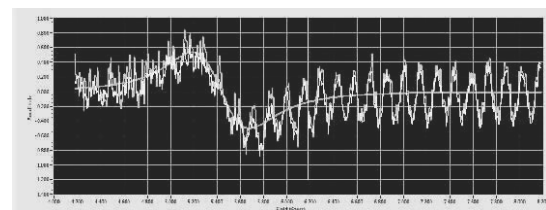


図 13-3. 周期的なノイズ例 3

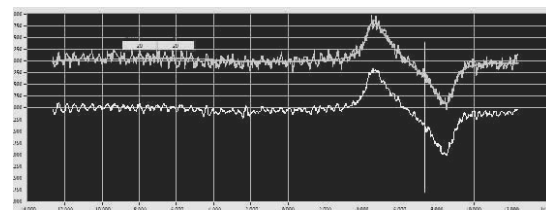


図 13-4. 周期的なノイズ例 4

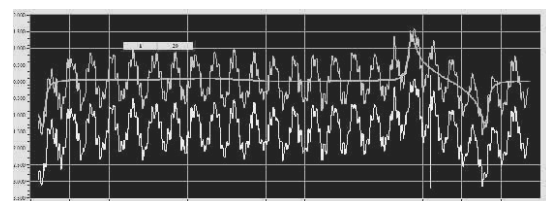


図 13-5. 周期的なノイズ例 5

E. 異常な形状の信号

以下の図に示すように「こぶ」のような波形が得られることがあった。

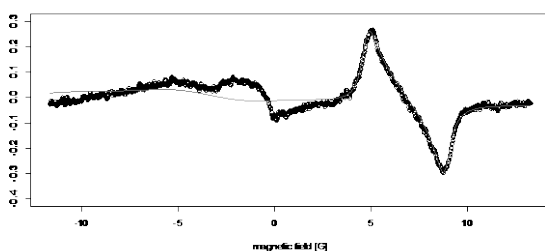


図 14. 異常な形状の信号例

この波形は、測定を繰り返していると増強したり減少することがあり、これらは洗浄により解消した。この現象はこれまでも認識されており、空気中のエアロゾルに含まれる対電子を持つ成分がループ等に付着することが原因として考えられるが原因物質の同定には至っていない。対策としては、共振器のループの洗浄が手順として定められており、これまでのところ、その対応で解決している。

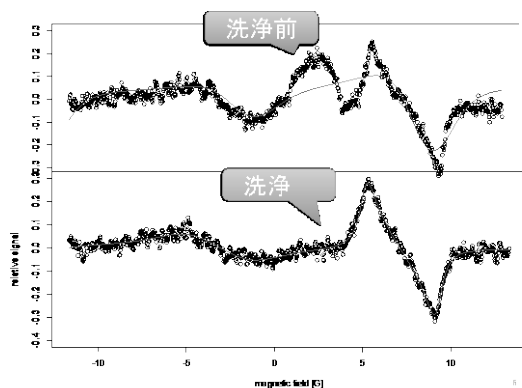
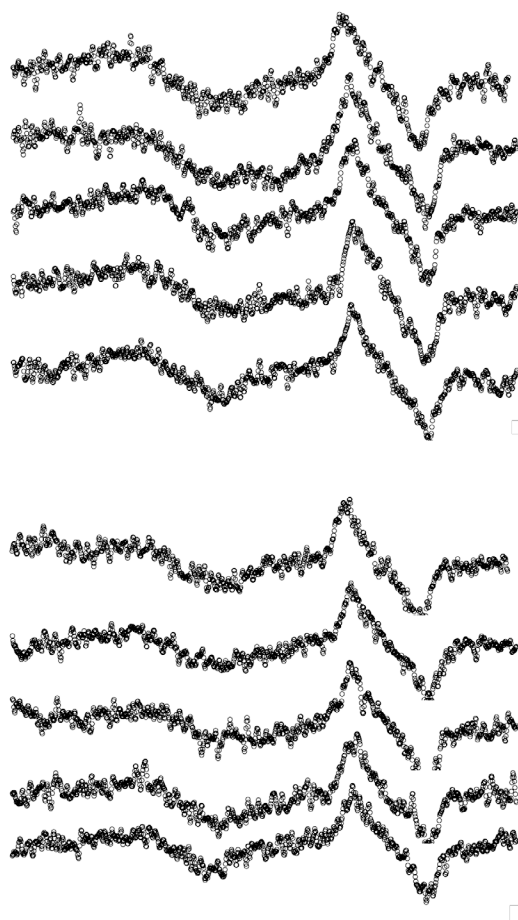
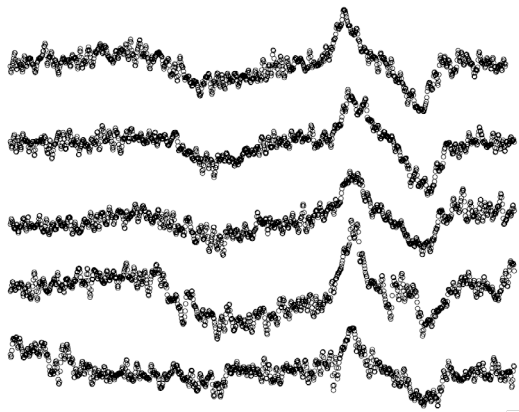


図 15. 異常な形状の信号の洗浄対応での解決例

F. AFC が機能してしない例

現在の装置は、検出器によって AFC の制御法が異なっており、検出器を取り替えた際に切り替えを行わないと、AFC が機能しないことになっている。このため操作者のエラーにより AFC が機能を発揮しないことが起こりえる。以下に、AFC が機能せずに測定中に S/N が低下した例を示す。





□

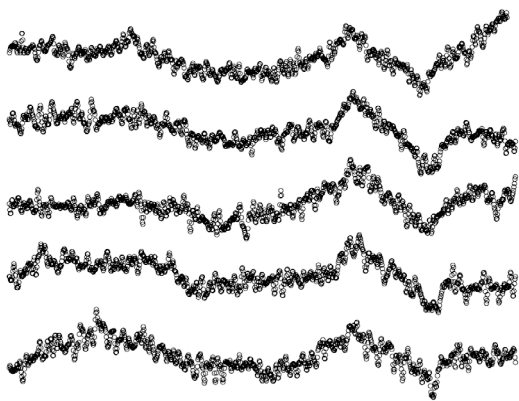


図 16. 測定中に AFC が作動せず、測定条件の悪化により S/N が低下した例

ここでは 20 回のスキャンを行っており、上から順にそのスキャンの結果を示す。

G. 信号の読み取り不能例

これまでのところモジュレーションアンプやロックインアンプの故障の他にトランスの不具合の事例があった。また、検出器の不具合やケーブルの接続不良の例もあった。今後、ケーブルの接続部の劣化の事例が起きるかもしれない。この他、信号読み取り不能にまでは至っていないが工学的な問題によりベースラインの変化・傾きが発生した例がある。

H. その他のトラブルや潜在的なリスク

これまでのところヒト対象とした測定でリスクを与えるようなトラブルは報告されていないが、措置の不具合や予期しないことによる潜在的なリスクがあり得る。このため、吸引器を備える共に保険に加入している。

測定は振動の影響を受けるために、測定場所で振動があると測定の質が低下する。このため、振動の影響を減らす工夫が有効であると考えられる。

また、解析にコンピュータを用いるために情報セキュリティ上のリスクが発生しうるが個人情報をコンピュータ上では扱うことはなく、インターネットへの接続はトラブルへの対応時に限られている。本システムは LabView を用いており、アプリケーションソフトウェアや OS の更新も必要になる。

I. 一般的な対応

1. ノイズ時のみ稼働している装置

冷凍機などモーターがついている装置と、測定計の回路を、同じ電源から取っていると、電源を介してノイズが乗る場合がある。モーターやポンプなどが少しでも帯電していると、モーター回転によりノイズを発生しうる。

精密測定器や回路への影響を考えるとグラウンドも別に確保することがよいと考えられる。また、より低ノイズである電源から電力を確保するのが良いと考えられる。その際、精密測定系電源と、モーターなどの機械・一般系電源は、グラウンドも分けることがよいと考えられる。何故なら、グラウンドもノイズを介することがあるからであ

る。

2. 特定の回路や装置が、劣化してノイズ発振しうる

ノイズが出現した際には、順に機器のスイッチを切るなどして、ノイズ増減を確認し、ノイズ源を特定することが考えられる。ただし、本装置は、全ての機器がそろわないと信号が取れない。

また、太いグラウンド線を用意して、回路などグラウンド側に誘電体を近づけて、ノイズが減らないか確認することも考えられる。

3. ケーブルの接続部などの劣化

ケーブルの接続部などが劣化していることが疑われる場合には、アルミホイルで接続部を覆い変化がないかどうか観察する。このことは、ケーブルや回路などのグラウンドを補強することに相当する。

4. 何も接続されていない端子

何も接続されていない端子(ケーブルをとりつける口)があれば、BNCなどの50オームターミネーターで、終端する。これは、信号の反射などでノイズになることがあるのを防ぐためである。本装置ではそれに相当する箇所はなかった。

ノイズの問題は一筋縄では行かないので、全ての場合に対応できる明確な回答はないが、意味のある対策を行えば効果はあることから、この装置を設置する車に必要な工夫を施すことが求められる。

3. 紫外線の影響の検証

JISの基準太陽光の分光放射照度データ

でのUVBの波長280~315nmでの積算(台形法)による比較から、この照射野の大きさでは、UVB領域の紫外線が太陽光に含まれるそれに比べておおよそ180倍くらい高いと考えられた【添付資料、紫外線波長】。

UVBの照射でも長時間の照射では信号が確認された。また、この信号は概ね照射時間に比例していると考えられた(図17)。

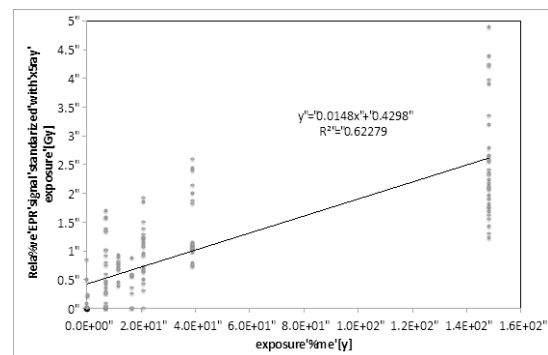


図17. 紫外線(UV-B)照射時のEPR信号
ここではJISの基準太陽光が夏の日中の光量を基準としていることから、一日あたり2時間、夏の日中の太陽紫外線に歯がさらされると仮定している。

信号が紫外線照射前でEPR信号の読み取り値が大きかった例を以下に示す。

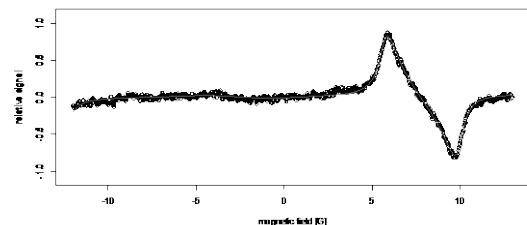


図18-1. 紫外線照射前に0.9Gy(150kVのX線照射に対して)相当の信号と読み取られた例

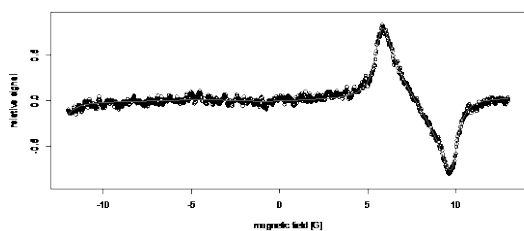


図 18-2. 紫外線照射前に 0.5Gy (150kV の X 線照射に対して) 相当の信号と読み取られた例

約 3 ヶ月間相当の紫外線照射で EPR 信号の読み取り値が大きかった例

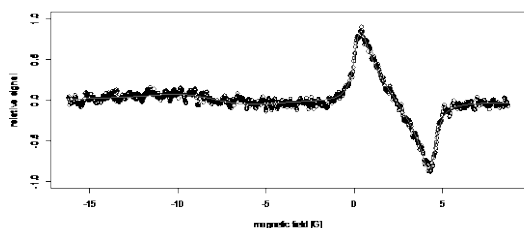


図 19. X 線で 1.7Gy 相当の信号と読み取られた例

4. 高 LET 放射線の応答

それぞれの歯別に計測した単位線量あたりの EPR 信号を図に示す。歯による線量の応答の違いが大きいが、150kV の X 線照射に比べると、平均で 8% (範囲: 2-15%) の応答が観測された。

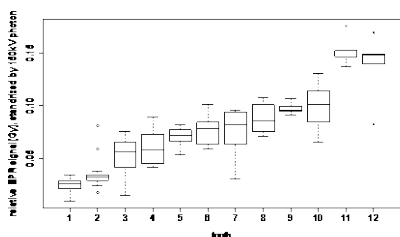


図 20 150 kV X-ray と比較した歯別の単位

線量あたりの EPR 信号 (相対値)

中性子に照射した歯は放射化するために減衰させないと施設外に持ち出せない。そこで、加速器施設に EPR 装置を搬入し、管理区域内でフェーディングを観測した。



図 21. NASBEE の管理区域に持ち込んだ EPR 装置

ここで照射室への入室が許可されたレベルで試料を取り出し、EPR 信号を計測した。10Gy を照射し、その後、持ち出し基準に達してから 1 時間 40 分間の変化を示す。用いた歯は一本のみである。

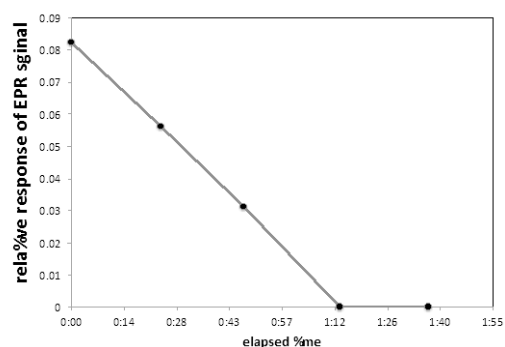


図 22. 中性子照射後の時間経過に対する応答

時間とともに EPR 信号が低下した。以下は、時間の経過とともに変化した信号を示す。

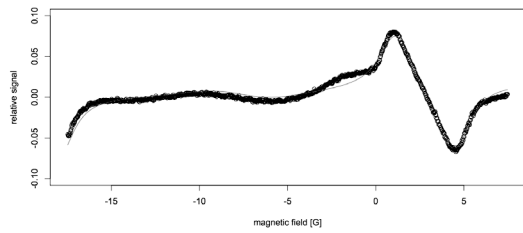


図 23-1. 照射後の EPR 信号の変化(その 1)

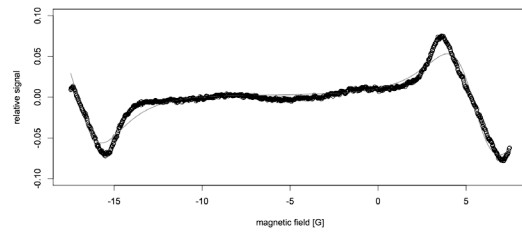


図 23-5. 照射後の EPR 信号の変化(その 5)

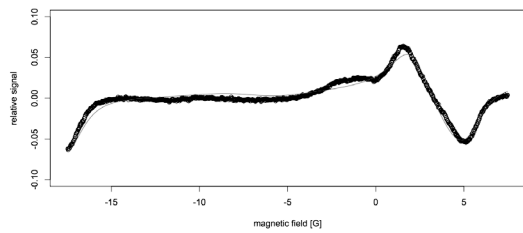


図 23-2. 照射後の EPR 信号の変化(その 2)

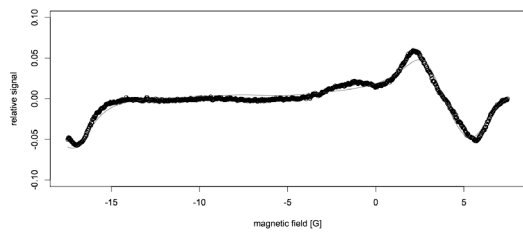


図 23-3. 照射後の EPR 信号の変化(その 3)

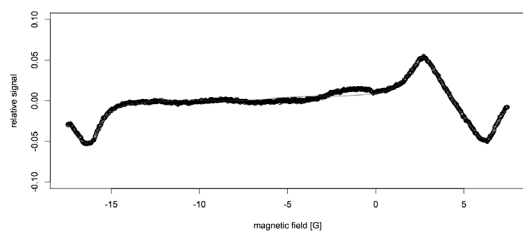


図 23-4. 照射後の EPR 信号の変化(その 4)

5. X バンドでの測定

付加線量法による線量推定例を示す。

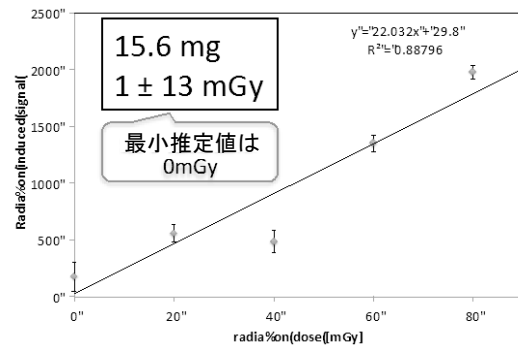


図 24-1. 付加線量法による線量推定例

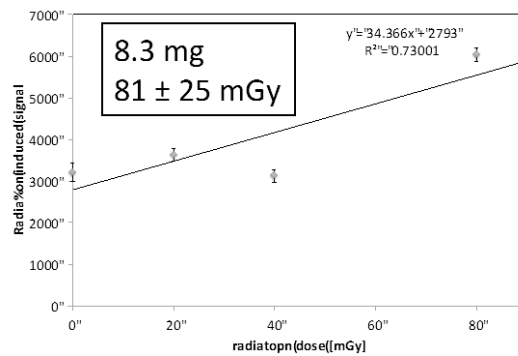


図 24-2. 付加線量法による線量推定例

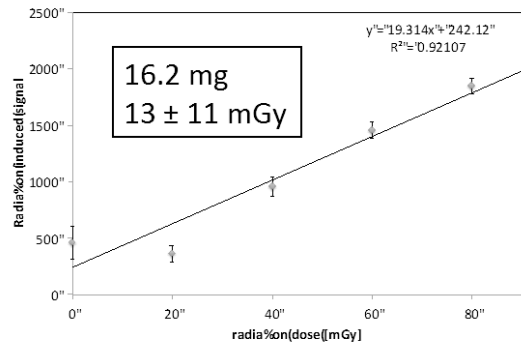


図 24-3. 付加線量法による線量推定例

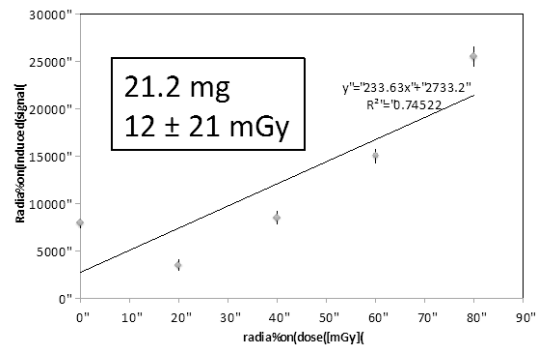


図 24-6. 付加線量法による線量推定例

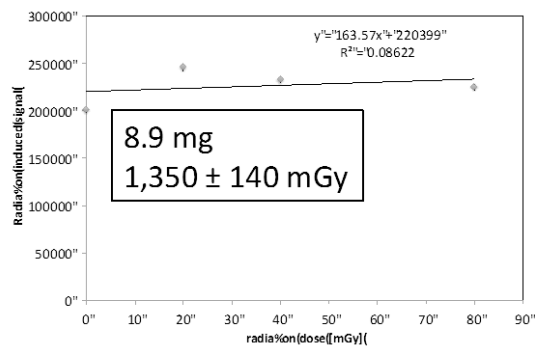


図 24-4. 付加線量法による線量推定例

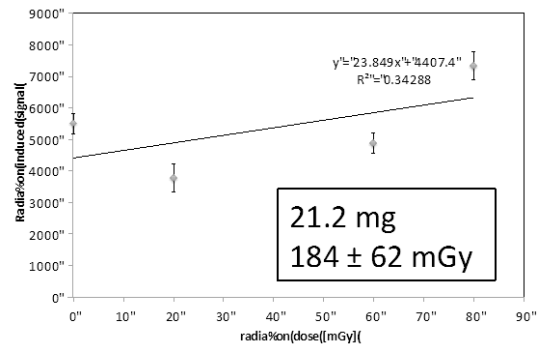


図 24-7. 付加線量法による線量推定例

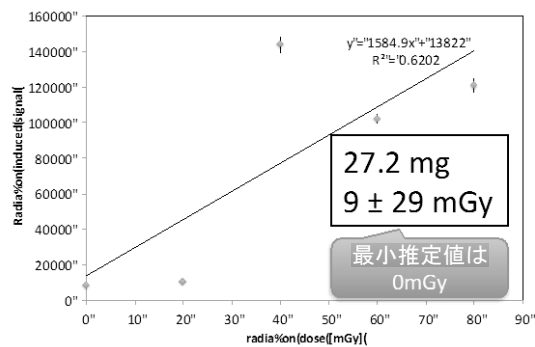


図 24-5. 付加線量法による線量推定例

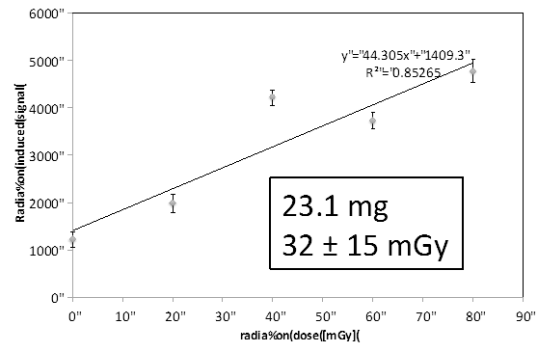


図 24-8. 付加線量法による線量推定例

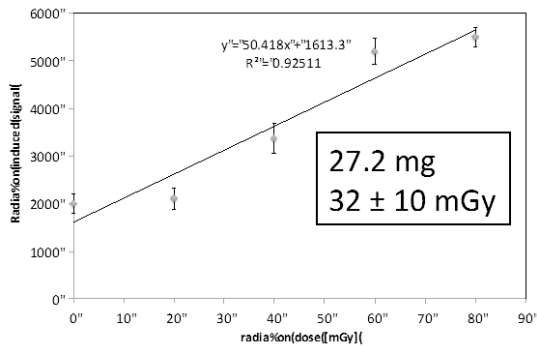


図 24-9. 付加線量法による線量推定例

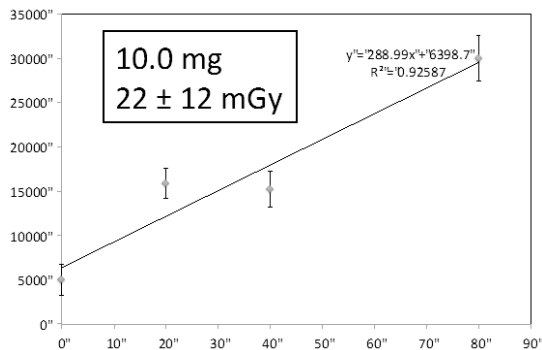


図 24-10. 付加線量法による線量推定例

図に示すように、照射した線量に応じて、EPR 信号が増加した。歯科用タービンでエナメル質を削り出すだけの方法でも、X 線の照射で 20mGy の増加が検出可能であった。その一方で追加照射前の読み取り線量には大きな違いがあった。

D. 考察

1. 審美歯科治療を受けた歯での EPR 信号の解析

審美歯科治療を受けた歯で EPR 信号が得られることを確認した。信号の形状から弁別可能であると考えられたが、最近の審美歯科治療の進歩との関係から、審美歯科治療で偽陽性をもたらしかることを念頭においた対応が必要だと考えられた。

2. 手順書の整備

口腔内で安定して線量測定ができるようにこれまでのトラブル事例も踏まえて消耗品の準備等に関する手順書を作成して測定の質が確保できるようにした。

3. 紫外線の影響の解析

昨年度の検討で UV-C の曝露で明瞭な曝露量-信号関係が確認されたが、それに加えて今年度は UVB による歯への長期間照射で L band EPR でも信号が検出することが確認された。しかし、UVC に比べると応答は小さく、UVB では太陽光で数十年分の曝露でないと信号が検出されないことを確認した。歯が太陽光に露出されやすい状況では 10 年以上で、信号が検出されうるかもしれないので、そのことを検討する必要があると考えられた。今後、UV-A についても検討する。

4. 高 LET 放射線としての中性子による応答

高 LET 放射線として量研機構放射線医学総合研究所の NASBEE を用いて中性子を健常な日本人の臼歯に段階的に照射した。

Cs-137 線源による γ 線に比し EPR 信号の応答は 3 割程度であり、照射後 2 時間程度からの測定では、放射化核種による信号の増強は確認できない程度であったが、フェーディングに関しては完全に否定できない結果が示唆された。フェーディングの影響として短半減期核種による放射線の影響も考えられるが、PHITS を用いた計算では、生成される放射化核種のうち ^{24}Na による歯の吸収線量は約 1mGy に留まっており、

減衰の時間経過からも一致しなかった。また放射線安全上の制約から、管理区域内であっても、照射後、一定のクーリング期間を空けないと試料を扱えないことの制限があり、より短い半減期の影響は確認できなかった。このように、その現象の理解には至らなかった。結果のスペクトルに含まれているように測定中に磁場が変化し、掃引範囲が低磁場側に変化していることから単に経過時間中の測定の質の変化としての信号の低下を示している可能性もあるのでさらに検討が必要だと考えられる。

持ち出しへのクーリングは中性子による室内の構造物等での放射化に依存するので、中性子の照射口をポリエチレンなどで被いそこで中性子を減速させ補足することでクーリングタイムを短くすることが考えられる。

5. Xバンドでの測定

歯科用タービンを用いて削り取られたエナメル質に X 線を段階的に照射し、X band EPR で計測した。診断領域の X 線に対して 20 mGy 程度の追加被ばくを検出しようと考えられたが、試料によるバックグラウンドでの EPR 信号の大きさにバラツキがあり、事故による放射線曝露の検出限界を小さくするための工夫が求められることが改めて確認された。このバラツキの原因としては、医療での放射線曝露だけではなく、職業によっては太陽紫外線も影響を与えうるかもしれない。EPR tooth dosimetry においては、想定しているのよりも大きな信号が得られた場合には、医療での放射線の影響を取り除くことが不可欠となる。このために歯のそれぞれの面での応答を比較す

るだけではなく、放射線の種類より生成される試料内のラジカルの性質の違いに基づく、マイクロ波の出力を変えた場合の飽和特性の違いを利用して弁別するような、歯の中の深さ別のラジカルの信号応答の特性の違いを利用して医療での放射線曝露の影響を除く試みも模索されている。

6. 動物の歯の測定

昨年度の EPR の信号が検出された試料もあったが、より慎重な検討が求められると考えられた。L band EPR による測定は非破壊的なだけではなく試料に不可逆性の変化をもたらさないので繰り返して計測することができる。

その一方で、被災動物が生活していた環境によっては、歯のエナメル質に比較的大きな線量を受けることも考えられる。例えば、放射性セシウムが降下した地表に寝ることを考えると、被災動物での皮膚の細胞への線量は、Cs-137 の降下量を 1MBq/m² と仮定とすると 4、ICRU report 56 に示されている係数を用いると、接触部の皮膚の吸収線量は、0.14mGy/h 程度と推定される。このことから、1 日 8 時間の接触を仮定すると 1.1mGy/d 程度となり、4 ヶ月間の接触で 130mGy/4M 程度の線量となり得る。このように歯が線源と近いと β 線の影響を受けるために比較的線量が大きくなり得る。

今後の展開としてはウシ以外の動物も対象にすることが考えられるが、この方法で線量を推計するには、それぞれの動物のエ

4

<http://ramap.jmc.or.jp/map/mapdf/pdf/air/20110828/cs137/5640-D.pdf>

ナメル質での炭酸ラジカルのバックグラウンド量を知るだけでなく、線量再構築上、それぞれの動物の生態も知る必要があると考えられる。このような検討が昨年度なされており、今年度、生物学的なアプローチで被災動物での放射線の影響が検出されており、本法でも今後、検証されることが望まれる。

7.今後の展望

(測定における品質管理)

歯を用いた電子スピン共鳴法による線量測定での課題として、事故由来の線量を過大に評価することが考えられる。

この大きな理由は医療での放射線曝露が影響を与えることで、昨年度の L band での研究でもその影響が無視できないことが示されているが、X band でも課題とされており、広島や長崎の被爆者の歯を使った調査では、歯の測定部位別の応答を調べることで医療での放射線曝露の影響を除く試みがされており、最近の長崎の被爆者を対象とした研究でもよい成果が得られつつあるが(放射線災害・医科学研究拠点第1回国際シンポジウム)、まだ、完全には解決しておらず、特に小さい線量の場合がより課題となっている。

この他には未知の要因も考えられ、想定したのよりも大きな EPR 信号が得られた場合には結果の解釈を慎重に行う必要があると考えられる(EPR Biodosimetry 2015)。

また、新しい技術を取り入れた取り組みとの連携もこの方法による計測での質の向上に必要であると考えられる。

(過去の線量がわかることの利点)

EPR 測定法では、被ばく歴が過去に渡って調べられる特徴を有する。労働者のうち、医療分野の放射線業務従事者では、線量限度を超える方が、一定数存在しうることが、個人線量測定協議会のデータから推測される。このうち実効線量に関してはモニタリングの不適切さが関係している可能性がある。線量計を防護衣の外側につけていたにも関わらず、誤って防護衣の内側に付けていたと解釈して線量を評価すると過大になる。しかし、皮膚や眼の等価線量のモニタリングでは、そのような大きな過大評価は考えがたく、眼の等価線量の評価でゴーグルの効果を見込んでいなかったとしても、眼の水晶体にはゴーグル周囲から回り込んでくる放射線も線量に寄与することから、線量限度を超える労働者が医療分野では一定程度いると考えられる。線量の等価線量の線量限度は 0.5Gy であり、長年、このような曝露をしている場合には、放射線診療で放射線を受けた患者だけではなく、本測定で放射線が検出される可能性がある。なお、昨年度の検討で「長年放射線の透視業務に従事した放射線業務従事者では抜去歯を用いた計測で明瞭な EPR 共鳴信号が検出されている」としたのは、上述したように精巧な治療で歯に人工物が利用していることによると考えられた。

(災害派遣型 EPR 線量評価ユニットの設計の考え方)

これまでの経験で様々なノイズ要因があり、それを減らす工夫が必要なことが考えられる。環境要因のうち、温度や湿度は昨年度の検討でも影響を与えることが示唆されていたが、今年度、より明瞭な現象が確

認され、温度環境の維持が求められることが改めて示された。温度環境で影響が考えられるのは、比較的過酷な環境となる建築物における衛生的環境の確保に関する法律の事務所衛生基準規則での室温の範囲に関する努力義務を逸脱する場合であり、特に磁石の温度が影響を与えていることが考えられたので、その部分を一定の温度とできると、そのような環境であっても、より安定に稼働させることができると考えられた。また、電磁波シールドが有用なことがこれまでの検討でも明らかとなっており、金網を全体に被せることは不可能ではないと考えられるので、院外に持ち出し計測する場合でも、可能であれば、ポータブル装置の周囲に電磁波シールドを施すべきであると考えられた。また、電磁波発生源となる装置の制御や、振動への対策も重要となる。

このようなエンジニア面での検討では専門スタッフの確保が必要となる。今年度は専門の業者が秘密保持契約を結び、対応する体制を整備し、トラブルの解決や課題の理解に大きく役だった。

以上の検討は、本研究課題の最終目標である災害派遣型 EPR 線量評価ユニットの設計において有益なものであると考えられる。現場に装置を持ち込み計測することは、東京電力福島第一原子力発電所事故では体外計測を行う WBC 検査を行う車両で活用されており、本研究はその高度化を図るものだと考えられる。

なお、トリアージとして用いる EPR dosimetry に関して、装置の無線化も利用した装置の小型化がダートマス大学で進められており、よりコンパクト化がなされており、その利用も想定される。

E. 結論

電子スピン共鳴法を用い、歯を対象に測定する方法を検討し、以下の成果が得られた。

- 1) 口腔内で安定して線量測定ができるようにこれまでのトラブル事例も踏まえて測定に関する手順書を作成して測定の質が確保できるようにした。
- 2) これまでのトラブルは試料に不対電子を有する物質が付着することによる放射線誘発ではないと考えられる信号の検出と測定時のノイズの混入である。ノイズは電磁波シールドルームの利用で大幅に改善し、測定の安定性が増した。これらを踏まえて災害時に利用する車両のデザインを行うのが有益だと考えられた。
- 3) 紫外線の影響に関して、UVB では太陽光で数十年分の曝露でないと信号が検出されないことを確認した。ただし、太陽紫外線でも長期間にわたり曝露すると信号が見えることがあると考えられ、何からの要因により太陽光に歯が露出され続けた場合には、高齢者では影響を与えうるかもしれない。

本研究課題の最終目標である災害派遣型 EPR 線量評価ユニットで最終的に急性被ばく 1Gy 以上を分別可能な、効果的な線量評価法・トリアージシステムとして社会実装するための課題の整理がさらに進められた。

謝辞

研究に協力頂いた被験者の皆様に厚く御礼申し上げます。本研究では技術的な支援を株式会社キーコム社および朝日分光株式会社より提供頂きました。また、理化学研究所 仁科加速器センター 田中 鐘信氏から測定の実の向上について一般的なご示唆を頂きました。

この研究を継続的に支援下さっている EPR Center for the Study of Viable Systems, Geisel School of Medicine at Dartmouth のハロルド・シュワルツ教授およびアン・フラッド教授にも感謝申し上げます。

本研究の一部は、国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所の中性子発生用加速器システム (NASBEE) の生物照射室を利用して行われました。試料の計測は三川さと子さんに援助頂きました。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyake M., Nakai Y., Yamaguchi I., Hirata H., Kunugita N., Williams BB., Harold MS In vivo radiation dosimetry using portable L-band EPR : On-site measurement of volunteers in Fukushima Prefecture, Japan.. Radiation Protection Dosimetry, 172, 248-253, 2016
- 2) Yamaguchi I, Sato H, Kawamura H, Hamano T, Yoshii H, Suda M , Miyake M, Kunugita N. L Band EPR

tooth dosimetry for heavy ion irradiation. Radiation Protection Dosimetry, 172, 81-86.

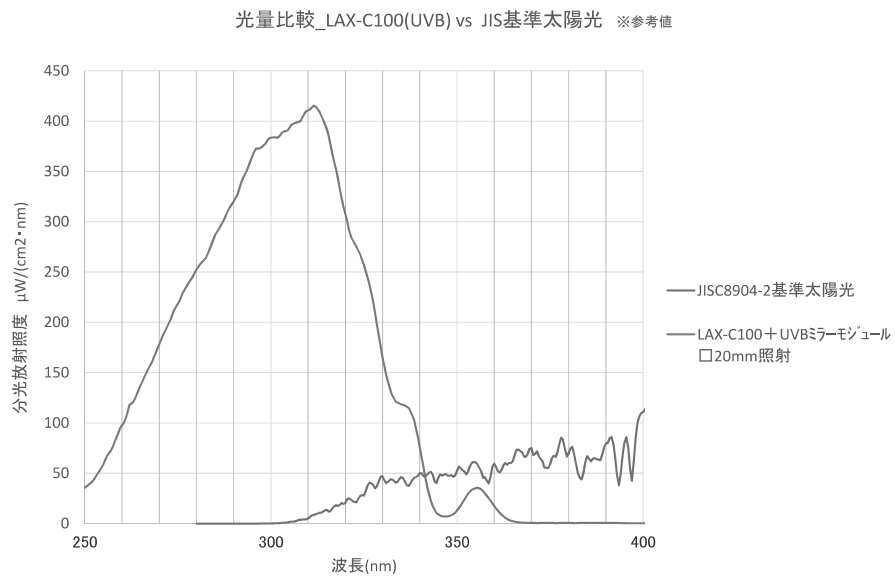
- 3) 山口一郎、尾本由美子、原田美江子、栗原せい子、樺田尚樹. 東京都豊島区の公園で線源が発見された事例への公衆衛生的な対応. 日本放射線安全管理学会誌 2016; 15 (2): 186-192.
- 4) 山口一郎. 放射性物質テロへの公衆衛生対応. 保健医療科学 2016; 65(6): 569-575.

2. 学会発表

- 1) Ichiro Yamaguchi, Hitoshi Sato, Hiraku Kawamura, Tuyoshi Hamano, Hiroshi Yoshii, Mituru Suda, Minoru Miyake and Naoki Kunugita. L Band EPR Tooth Dosimetry for neutron. IRPA 14; 2016.5.9-13: Cape Town. P03.60
- 2) Minoru Miyake, Ichiro Yamaguchi, Yasuhiro Nakai, Hiroshi Hirata, Naoki Kunugita, and Harold M. Swartz. In-vivo tooth dosimetry using L band EPR - The research involving human subjects related to Fukushima nuclear power plant accident. IRPA 14; 2016.5.9-13: Cape Town. P03.62
- 3) 三宅 実、中井康博、山口一郎、岩崎昭憲、中井 史、小川尊明、大林由美子、樺田尚樹 ポータブル型生体 EPR (Electron Paramagnetic Resonance: 電子常磁性体共鳴法) を用いた放射線被ばく線量測定—福島在住のボランティアからの計測—、第 70 回 NPO

- 法人日本口腔科学会学術集会；2016年4月16-17日、福岡
- 4) 樺田 尚樹、山口 一郎、志村 勉、三宅 実、中村 麻子、盛武 敬. 緊急被ばく医療が必要とされるような事故発生時におけるトリアージのための線量評価手法の検討. 第89回日本産業衛生学会；2016年5月24-27日、福島
- 3.その他
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

添付資料、紫外線照射装置の基準太陽光との光量比較



資料

電子共鳴法を用いた線量測定法標準手順書

ヒトの歯を用いた口腔内と口腔外での線量測定

Version 1.0 (2017年3月)

1. スペクトロメータの物理的なセットアップ

- 1) 変調コイルは、永久磁石と一体化して設置されていて一体化しており、位置のずれや振動の影響が最小化されている。(図 1 と 2)
- 2) 電磁波シールドを必要に応じて設置する。電磁波シールドの必要性や効果はスペクトロメータが設置された環境に依存する。この電磁波シールドは、電磁波の吸収体と伝導性のアルミニウムから構成されている。この電磁波シールドは外部からの電磁波の影響や内部の電磁波の外的な要因（例えば操作者）による反射を防ぐ。
- 3) 磁石の近傍に鉄製の部品が置かれると（例えば磁石の外側に鉄製の椅子を配置したり磁石の内側にレンチを置くと）、磁場にわずかな影響を与えうる。これらは測定中に動かさなければ、測定そのものに影響を与えることはないと考えられる。測定環境を安定的なものにするように配慮されなければならない。
- 4) 共振器の位置を調整し、検出器ループが永久磁石（と変調コイル）の中心軸上に位置するようにする。ループが作る面は磁石が設置された面と直交するようにする。共振器はステンレスで出来た連結型のアームの遠位端に小さいネジを利用して装着することができる。この装着システムを用いることで共振器は連結型のアームから電氣的に独立される。共振器は連結型のアームにしっかりと固定され、動いたり振動しないようにする必要がある。これらはノイズの主要な原因である。(図 1 と 2)
- 5) RF のポートとブリッジをケーブルでつなぎ合わせる (AFC のポートとブリッジやケーブルをつなぎ合わせる必要があるものがある。北大のリゾネータではカップリング調整用のポートと電源装置をケーブルでつなぎ合わせる)。(実用的には、これらのケーブルは接続したままにしてもよいだろう) (図 2 と 3)

共振器の RF ポート（“RF”とラベルされ、共振器のマッチング用のノブに近いところにある）は、SMA ケーブルを用いてブリッジにある RF ポートと接続される。

同様に、共振器の AFC ポートはブリッジの背面にある“AFC”ポートに接続される。

全てのケーブルの接続は、定期的に確認されなければならない。

ブリッジからロックイン・アンプの接続は半永久的なもので調整の必

要はない。これらは、BNC 接続である。(図 4)

これらの接続は確実に安定的であることが絶対的に重要である。接続の不良や振動はノイズの大きな原因になる。これらの接続は、用手的に締める必要がある。(可能であれば、小さな SMA のフィンガーレンチを用いて)。ただし強く締めすぎると接続分にダメージを与え信号通信に障害をもたらさう。コネクタの回転チップのみ回転するようにすべきである。ケーブル全体の回転は内側にあるシールド用のメッシュワイヤを破壊し、ケーブルの不良につながる可能性がある。

- 6) 物理的な振動は測定中のノイズの主要な原因となり得る。ケーブルで何らかの振動を感じる場合には、震動源を明らかにして対策を講じる必要がある。また、振動はケーブルの接続を徐々に弱めることになる。



図 1: EPR スペクトロメータ装置の全景
上からディスプレイ、ロックインアンプ、ブリッジ、制御用コンピュータ、サージ防止装置、変調アンプが示されている。この下に磁場掃引用の電源装置がある。

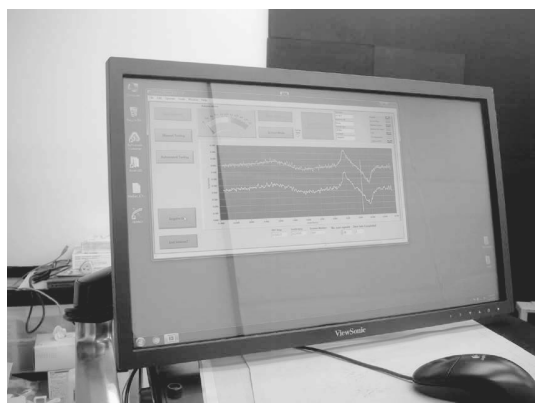


図 2: ディスプレイ

図 3: ロックインアンプとブリッジ



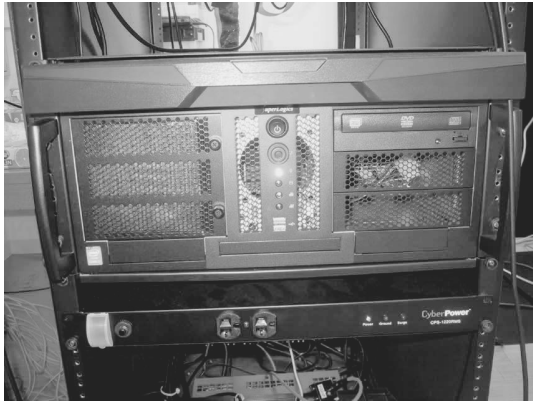


図 4: 制御用コンピュータとサージ防止装置



図 5: モジュレーションアンプ、周波数カウンタ、磁場掃引用電源装置

2. スペクトロメータの電源を投入する

- 1) サージ防止の電源制御装置の電源を入れる。スペクトロメータシステムの磁場変調用アンプ、周波数メータと磁場掃引用の KEPCO の電源制御装置以外の電源は全て（電磁波発生ブリッジ、ロックインアンプ、制御用コンピュータとモニター）、ここを介して供給されている。検査台の昇降システムは別に電源が供給されている。
- 2) それぞれの電子機器の電源を投入する(図 5)
 - KEPCO の電源制御装置
 - 磁場変調用アンプ
 - 電磁波発生ブリッジ
 - ロックインアンプ
 - 制御用コンピュータ
- 3) 制御用コンピュータにログインする
- 4) データ取得用ソフトウェアをデスクトップの“Scan Control” のアイコンをダブルクリックすることで起動させる。

3. スペクトロメータの動作をテストする

- 1) 新しい測定を開始するための制御ソフトウェア・ウインドの左上にある「New session」ボタンをクリックし、測定者名（リゾネータのセットの担当者とスキヤンの担当者のそれぞれ）を入力する。測定の種類は、in vitro 計測の Ball Zero の測定を選択する。
 - 2) サンプルをサンプル保持台にセットし、検出器のループをサンプルにフィットさせる。検出器のループと試料の中心が一致し、ループの角度が磁場に対して平行になっていることを確認する。
 - 3) マッチングを合わせる。制御ソフトウェア・ウインドの左上にある「New session」ボタンの下にある「Manual tuning」ボタンをクリックし、共振器のノブを左右に回し、Q-dip がもっとも深くなるようにする。
 - 4) 周波数とフェーズを合わせる。制御ソフトウェア・ウインドの「Manual tuning」ボタンの下にある「Automated tuning」ボタンをクリックする。
 - a. 北大の共振器を使う場合には高周波の attenuation を on にする。（attenuation が off の場合の高周波の出力は 100mW である）
 - 5) キャリブレーションを行う
 - a. 「Calibration」ボタンをクリックするとキャリブレーションが行われる。
 - 6) 測定
 - a. 設定（以下の設定はオペレータが変更する必要はない）
 - 磁場の掃引幅は 25 Gauss であるが変化させる必要はない
 - 掃引時間は 3 秒でスキヤン回数は 20 回
 - 16 dB 減衰はオフ（フルパワーの 100mW になる）
 - 4 ガウスの変調
 - 時定数は 50 ms
 - 感度は 500 uV（検出器による）
- もしスペクトルが得られない場合には、以下のことを確認すること。
- 全ての機器の電源が投入されていることを確認すること
Verify that all instruments are turned on (例：変調アンプや磁場掃引用の KEPCO)

- 全てのケーブルが適切に取り付けられていることを確認すること。
- スキャン範囲を広げてみる。

7) 信号ノイズ比 Signal-to-Noise Ratio (SNR)を確認する

この作業は通常は必要ない。trouble shooting mode でこのメニューが用意されている。

4. 20Gy を照射した歯でテスト計測する

1) Insert the standard 20 Gy を照射した標準試料をサンプルホルダにセットする。検出器のループをサンプルにフィットさせる。検出器のループと試料の中心が一致し、ループの角度が磁場に対して平行になっていることを確認する。

- a. Ball Zero の測定と同様にマッチング（「Manual tuning」）と周波数とフェーズ「Automated tuning」を合わせる
- b. スキャンは以下の条件で 5 回繰り返す。

- スキャン範囲は 25 ガウス
- それぞれのスキャンは 3 秒
- 減衰 (attenuation) は 0 dB (最大出力の 100 mW)
- 変調は 4 ガウス
- 時定数は 50 ms
- 感度は 500 uV

5. In vitro と in vivo 測定

スペクトロメータの準備- 上記に従いスペクトロメータを準備し、動作が正常なことを確認する。上記の準備で得られたスペクトラムは保存しておく必要がある。上記の準備は少なくとも、日々のセッションの開始前と開始後に行う必要がある。

In vitro 測定 – この測定は上記の 20Gy を照射した標準試料の計測と同じである。必要なことは試料を変えることである。

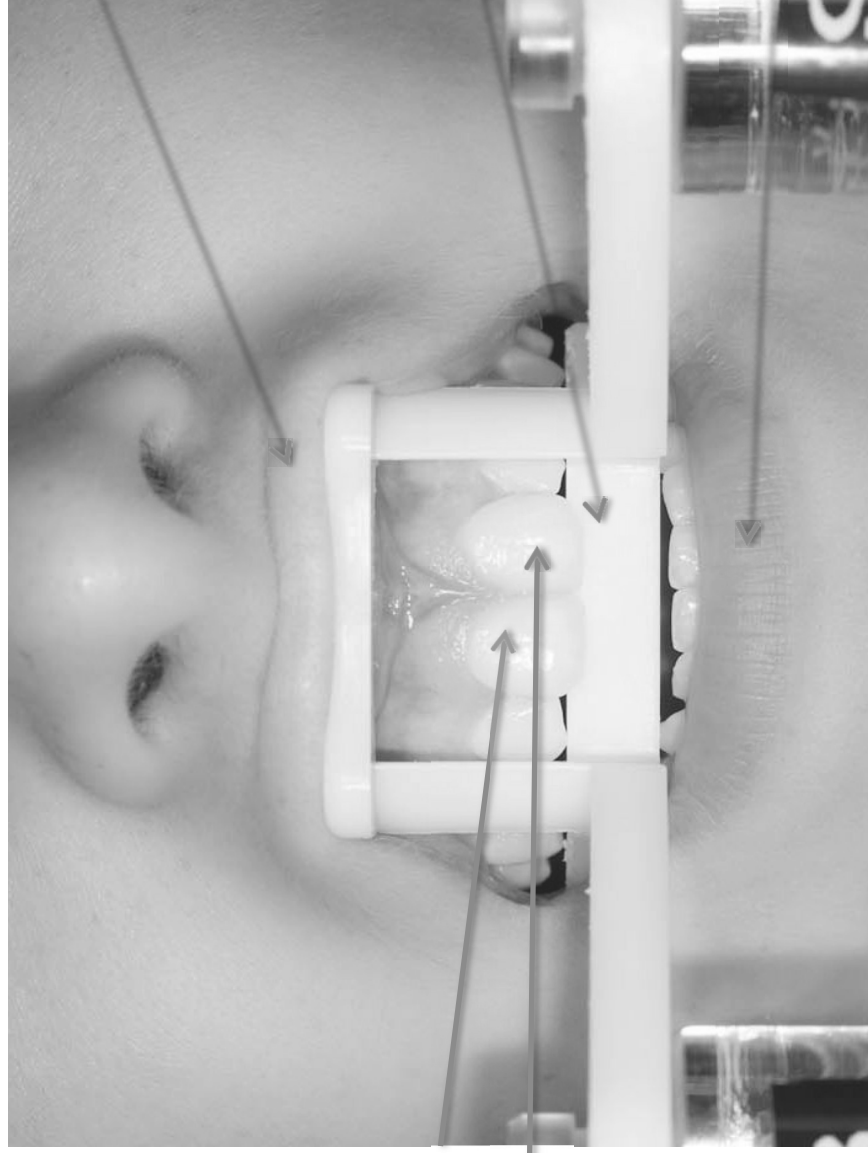
スキャンは 3 秒間で 20 回が標準であるが、スキャン時間やスキャン回数を増加させると SNR が向上する。

In vivo (患者や研究協力者を対象にした) 測定

- a. 測定前に歯のサイズを計測する。歯のサイズの計測は、歯科キャリパーを用いて行う。測定は歯の最大幅に沿うだけではなく、それと鉛直な方向についても行うこと。得られた歯のサイズを記録すること。
- b. 70%アルコールでリゾネータを拭き、清潔なラップを用いてリゾネータを覆うこと。ラップは、患者や研究協力者毎に交換する。
- c. 患者の位置を調整する。椅子や机の高さを調整し、測定中快適な姿勢が保持できるようにする。ヘッドレストに頭を押し付けることで、測定中、頭を快適に保持できるようにする。患者の動きは測定のノイズ源となり、測定の誤りを持たす可能性がある。
- d. バイトブロックの使用は、この手順書の付録文書を参照のこと。
- e. 患者の位置を調整し、バンドで軽く頭を固定し、バイトブロックで歯を露出させた後、歯の表面を脱脂綿で軽く拭う。
- f. 可動アームを動かし、検出器のループを歯の表面に軽く接触させる。ループの下端が歯の下縁から 1mm 程度上側に位置するようにする。ループが作る面は、磁石の面に対して垂直とする。ループの位置決めは測定の質に大きな影響を与えるので正確に位置させるようにする。ループの位置が決まったら、可動アームを固定させる。
- g. マッチングとチューニングを *in vitro* 測定と同様に行う。
- h. スキャンは以下の条件で 3-5 回繰り返す。
 - スキャン範囲は 25 ガウス
 - それぞれのスキャンは 3 秒
 - 減衰 (attenuation) は 0 dB (最大出力の 100 mW)
 - 変調は 4 ガウス
 - 時定数は 50 ms
 - 感度は 500 μ V

測定時にはこのようなツールを使います

測定者が
すること
歯の表面を
乾燥させ、小
さい器具で一
つの歯を測り
ます



ポイントは
何ですか？

唇を持ち上げま
す。唇が歯にあ
たらぬように
してください

歯を突き出して
前に出るように
してください

舌と下唇と顎の
力を抜いて下さい

ヒント:

- ・ 上唇をそつと上の部分に乗せて下さい。
- ・ 上の歯をプレートにそつと乗せ下さい。楽にできる体勢を探すことが大切です。
- ・ 二つの歯をしっかりと前に出してください。操作者が歯の表面の水分を綿で取ります。乾燥させます。
- ・ 測定のための小さいループをあなたの歯にあてます。危険はありません。違和感があればおっしゃって下さい。
- ・ このループは唇や歯茎に触れないようにします。湿ると測定に影響を与えるからです。
- ・ 測定中は動かないようお願いいたします。楽にしてそのままで居てください。体が動くとも測定に影響を与えます。

国立保健医療科学院 生活環境研究部		原本	Version # 0
この文書のキーワード	生体を対象にした計測でのデバイス製品の衛生管理		
原稿作成者と日付	確認者と日付	労災疾病臨床研究事業費補助金の状況	
山口一郎：平成29年2月27日 (EPR Center for the Study of Viable Systems, Geisel School of Medicine, Lebanon, NHの作成のオリジナル版に基づく)	榎田尚樹：平成29年3月21日		

標準手順書

文書番号： 46.0
 文書題目： 生体を対象にした計測での再利用製品の衛生管理

改訂履歴 (必要に応じて行を追加すること)

版.	日付	変更箇所と変更作業への貢献者
0	平成29年2月27日	初稿作成：山口一郎、中井康博、三宅実、三川さと子
1		
2		

配布先:

コピー番号	コピー者	配布先
原本 (紙媒体)	国立保健医療科学院生活環境研究部 秘書：石場さん	国立保健医療科学院生活環境研究部で平成29年3月○日から利用可能
電子媒体 1	NIPHNET	NIPHNETで平成29年3月○日から利用可能
電子媒体 2	香川大学医学部内ネットワーク	香川大学医学部内ネットワークで平成29年3月○日から利用可能

標準手順書に従った手技を行うものに求められる資質：

(標準手順を実施するために求められる技能／資格をリストする。この手順書で参照され必要とされている他の標準手順で求められるものも含む。)

国立保健医療科学院の規定で求められる実験業務従事者に求められる実験従事トレーニングを受けていること；最初は資格を持つユーザーにスーパーバイズされること

標準手順：

1.0 目的

再利用消耗品の洗浄法を明確にする。再利用消耗品とはバイトブロック、バイトブロック固定具、歯科用鏡、ピンセットであり、この取り扱い法を決めることで安全にヒトを対象とした測定で用いることができる。

2.0 定義

本手順書は3つの章に分けられる。全ての再利用可能消耗品は、3つの手順のうち2つを用いる。：

1. "水洗い" --全ての再利用可能消耗品に適用され、オートクレーブや衛生洗浄前の表面の汚れ、染み、シリコンパッド、あるいは、接着剤の除去を含む
2. オートクレーブ -- オートクレーブ可能な全ての消耗品に適用する。(例) バイトブロック、バイトブロック固定具、金属製の歯科用鏡、ピンセット。これらの消耗品では、オートクレーブを用いた殺菌によりボランティア間での交差汚染のリスクを減らす。
3. 衛生洗浄 --オートクレーブが利用できない全ての再利用可能消耗品に適用される。(例) プロトタイプのバイトブロック、ファスナー、プラスチック製の歯科用鏡。これらの消耗品は、70%のエチル・アルコール溶液に浸すことで、オートクレーブの代替としてボランティア間での交差汚染のリスクを減らす。
4. この文書での(A) と (B)とラベルされた容器は、容器を区別するためである。

3.0 論理的根拠

再利用可能消耗品はボランティア間で交差汚染の原因となる可能性があるので、使用時に衛生的にする必要がある。

4.0 参照すべき標準手順書や他の文書

なし

5.0 方法

1. 水洗い (全ての再利用可能消耗品に適用)
手袋
容器 --2
洗剤

歯ブラシか小さいブラシ
サンドペーパー – 細かいもの
滅菌水か水道水
吸収パッド

2. オートクレーブ時に用いる品物

手袋
オートクレーブされる消耗品（例）バイトブロック、バイトブロック固定具、金属製の歯科用鏡、ピンセット
オートクレーブ用袋- 小さいものと中くらいのもの
ロール綿- バイトブロックとともにオートクレーブされる（バイトブロック1つにつき2つ）
マーカー
オートクレーブ

3. 衛生洗浄で用いられる品物

手袋
オートクレーブされない消耗品（例）プロトタイプของバイトブロック、ファスナー、プラスチック製の歯科用鏡。
ふた付きの容器- 2
70% エチル・アルコール
滅菌水か水道水
吸収パッド
洗浄対象のそれぞれのプロトタイプของバイトブロック1個に対してオートクレーブされたロール綿2個入った包み。
ポリのチューブは15.24 cmでカットし、片方を加熱してシールする（反対側は開放のまま）。
ヒート・シーラー
カラーの保護用の粘着テープ
マーカーかペン

6.0 方法

a) 細かくは次に記載されていることに正確に従うこと

注意: 下記に示された設定値の許容範囲は、測定または提案された研究を実施するために必要以上に許されていない。この文書を参照して行う全ての承認された研究計画は、いかなる設定値もその許容範囲を明らかにしておく必要がある。

I. 水洗い

1. 手指を手指消毒薬か石けんを用いて洗浄する。
2. 手袋をつける。
3. 物品についている全ての付け加えられたもの（シリコン・パッドや接着剤）を取り除く（図1）。
4. 紙やすりを用いてバイトブロックに付着した口紅のように落ちにくい染みや粘着テープを取り除く（図2）。



図 1. 粘着性のシリコン・パッドを取り除く



図 2. 紙やすりを用いて粘着物を除去する

5. 洗うものを容器(A)に洗剤とともに入れる (図 3)。
6. 水を容器(A)に加え (温水が望ましい) 内容物を完全に水没させる。

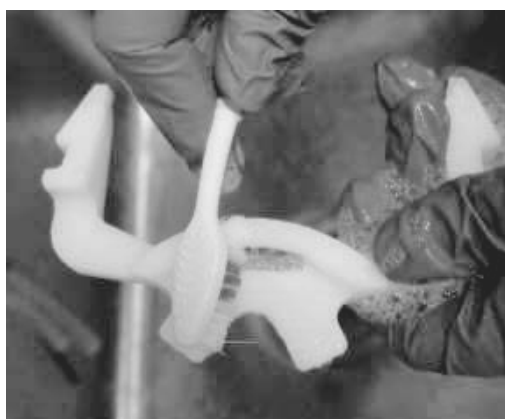


図 3. 容器(A)に洗剤を加える



図 4. バイトブロックをブラシでこする

7. 歯ブラシか小さいブラシを用いそれぞれの部品が洗浄されるようにする (図 4)。
 8. ブラッシングの後、それぞれの部品を別の容器(B)に入れる。
 9. 蒸留水か水道水を容器(B)に入れ、部品が水に浸かるようにする。
 10. 部品が流れ落ちないように注意して容器(B)から水を流しに注意深く捨てる (図 5)。
- コツ: 水を容器から出す際には、部品が流れ落ちないように容器の蓋を用いることが有用です。



図 5. 部品が流れ落ちないように蓋を用いて水を外に出す。

11. 7 と 8 を 2 回繰り返す(全部で 3 回水ですすぐ)
12. 水分を吸収するために吸収パッドの上に物品を重ねないように広げて、上から別の吸収パッドで覆う



Figure 6. Supplies drying in-between two absorbent blue pads

13. そのまま乾かす- 通常、数日間
14. 空になった容器(A) をシンクに入れて、泡を取り除き、双方の容器を室内で乾燥させる
15. 手袋を捨てる

II. オートクレーブによる滅菌

1. 手指を手指消毒薬か石けんを用いて行う
2. 手袋をつける。
3. (洗浄した) 物品を適切な大きさのオートクレーブ用袋に入れる (図 7,8) :
 - a. 小さなオートクレーブ用袋
 - i. 緩く包装されたロール綿~6-8 (生体計測で被験者に用いる)
 - b. 中くらいのオートクレーブ用袋
 - i. 1つのバイトブロックと 2つのロール綿
 - ii. 1つのピンセットや1つの歯科用鏡

- iii. 緩く包装されたロール綿~20-25 (プロトタイプのバイトブロックで用いる)
- 4. マーカーを用いてオートクレーブ用袋にオートクレーブした日付を記入する



図 7 と 8. オートクレーブ用の大きな袋と小さい袋 (滅菌前)

注: バイトブロックは最初の利用(1)と 2 回以上(2+)の利用の種別を記入すること

- 5. 物品を入れたオートクレーブ用袋をオートクレーブ・バスケットに入れる- 詰めすぎないようにしてオートクレーブに入れる



図 9. 詰めすぎでないオートクレーブ・バスケット

- 6. 手袋を捨てる。
- 7. 20-30 分の乾燥後に、オートクレーブ製造者の指図書に従い滅菌する。
- 8. オートクレーブ用袋の色が変わったことを確認する (図 10, 11)。



図 10 と 11. 色が変わりオートクレーブされたことを示すロール綿（それぞれの大きさの袋）
9. これで物品が利用可能となる。

III. 衛生洗浄

1. 手指を手指消毒薬か石けんを用いて洗浄する。
2. 手袋をつける。
3. 洗浄する物品を容器(A)に入れて、十分な量の 70% エチル・アルコールを加え、物品を水没させる。容器に蓋をし、20 分間浸たす（図 12）。



図 12. 70% エチル・アルコール溶液に浸されている再利用可能物品

4. 手袋を捨てる

注意: プロトタイプのバイトブロックは、定められた以上の時間エチル・アルコール溶液に浸すと柔らかかくなり脱色します。

5. 手袋をつける

6. アルコール溶液から物品を取り出し清潔な吸収パッドの上に置く(図 6 を参照)。

7. 70% エチル・アルコール溶液を決められた廃液タンクに廃棄する。その際に蓋や容器のない面が不潔なものに触れないように注意する。

8. 手袋を付け替える。

9. 容器(A)に物品を戻す。

10. 十分な量の水道水か蒸留水を容器(A)に加え、物品をすすぐ。

11. 容器(A)から水を流しに捨てる。その際に物品がシンクに落ちないように注意する(図 5 を参照)。

コツ: 水を容器から出す際には、部品が流れ出ないように容器の蓋を用いることが有用です。

12. 9 と 10 を 2 回繰り返す(全部で 3 回水ですすぐ)

13. 物品を取り出し清潔な吸収パッドの上に置く(図 6 を参照)。

14. 手袋を捨てる

15. そのまま乾かす- 少なくとも、3 時間

16. 最終的な使用準備

a. プロトタイプのバイトブロック

i. 手指を手指消毒薬か石けんを用いて洗浄する。

ii. ロール綿の入った中くらいの大きさのオートクレーブ用袋を開ける。

iii. バイトブロックと同じ数の予め準備したポリチューブ袋を集める。



図 13. ロール綿の滅菌



図 14. ヒートシーラーを用いたポリのチューブ作成

iv. シリコンパッドの入った袋を開ける。

v. 物品のカバーしている青色のパッドを取り除く。その下にある物品に触らないようにする。

vi. 手袋をつける。

vii. 用意しているバイトブロックの 2 倍の数のシリコンパッドを取り出し、清潔な物品用の青の吸収パッドの上に置く。

viii. 2つのシリコンパッドを保持している紙を取り除き、バイトブロックの咬合面にそれぞれのシリコンパッドを接着する。

ix. viii の手順を残りのバイトブロックに適用する。



図 15-17. バイトブロックへのシリコンパッドの接着(手順 viii)

- x. 手袋をした手で清潔なものを扱い、反対側の手で汚れたものを扱うようにする
- xi. 口を開けたプラスチック製の袋を汚れたものを扱う側の手に持ち、オートクレーブ袋から二つのロール綿を取り出し、それらをプラスチック製の袋に入れる。
- xii. 清潔側の手を用いて、バイトブロックのドッキングアームをつまみ、プラスチック製の袋に入れる。入れたら袋を区分しておいておき、その作業を残りの袋で繰り返す。



図 18. ポリチューブ袋にロール綿を入れる

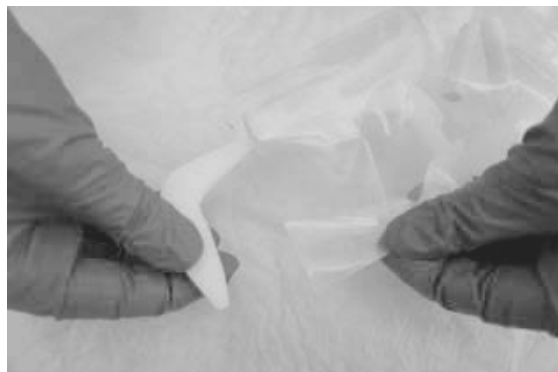


図 19. 清潔なバイトブロックを袋に入れる

- xiii. 手袋を捨てる。
- xiv. それぞれの袋を閉じます。それぞれの袋には一つのバイトブロックと2個のロール綿が入っています。これを手順4で準備したヒートシーラーで閉じます。
- xv. 袋に色つきのマスキングテープを貼り、「清潔」と書きバイトブロックが滅菌された日付とあなたのイニシャルも記入します。



図 20. バイトブロックが入った袋をヒートシーラーで封じます



図 21. 準備されたバイトブロック

b. その他の衛生的に洗浄された消耗品

- i. 容器(B)の蓋を取り除き、清潔な側を下にして清潔な青の吸収パッドの上に置きます
- ii. 手袋を付けます
- iii. 乾かされた「アルコールに浸けた消耗品」を清潔容器(B)に入れ蓋をします。
- iv. 手袋を破棄します。
- v. 容器 (B)に洗浄した日付とあなたのイニシャルをラベルします。



図 22 と 23. 日付がラベルされた清潔にされた消耗品
17. 消耗品が利用可能になりました。

国立保健医療科学院 生活環境研究部 EPR Center for the Study of Viable Systems, Geisel School of Medicine, Lebanon NH		原本	Version # 0
この文書のキーワード		共振器の銀色のループの簡易洗浄	
原稿作成者と日付	確認者と日付	労災疾病臨床研究事業費補助金の状況	
山口一郎：平成29年2月27日 (EPR Center for the Study of Viable Systems, Geisel School of Medicine, Lebanon, NHの作成のオリジナル版に基づく)	榎田尚樹：平成29年3月21日		

標準手順書

文書番号： 55.0
 文書題目： 共振器の銀色のループの簡易洗浄

改訂履歴 (必要に応じて行を追加すること)

版.	日付	変更箇所と変更作業への貢献者
0	平成29年2月27日	初稿作成：山口一郎、中井康博、三宅実、三川さん
1		
2		

配布先:

コピー番号	コピー者	配布先
原本 (紙媒体)	国立保健医療科学院生活環境研究部 秘書：石場さん	図書館で平成29年3月〇日から利用可能
電子媒体1	NIPHNET	NIPHNETで平成29年3月〇日から利用可能
電子媒体2	香川大学医学部内ネットワーク	香川大学医学部内ネットワークで平成29年3月〇日から利用可能

標準手順書に従った手技を行うものに求められる資質：

(標準手順を実施するために求められる技能／資格をリストする。この手順書で参照され必要とされている他の標準手順で求められるものも含む。)

国立保健医療科学院の規定で求められる実験業務従事者に求められる実験従事トレーニングを受けていること；最初は資格を持つユーザーにスーパーバイズされること

標準手順：

1.0 目的

共振器の銀色のループの安全で効果的な簡易洗浄法を記述する。

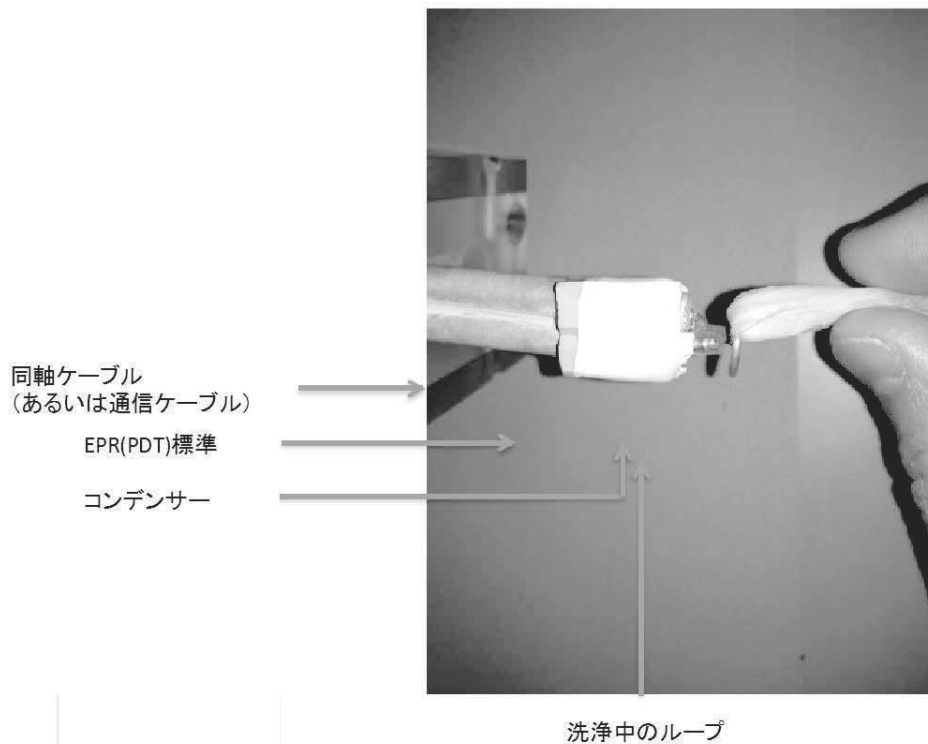
2.0 Definitions

ループ： NM シリーズの共振器では9999の銀が用いられている。

同軸ケーブル（あるいは通信ケーブル）：銀色のループと共振器ボックスを接続する一つの湾曲しないケーブル

コンデンサ：ループや同軸ケーブルの根元の近くにある小さくて半田付けされた部品

PDTのアンブル：EPR測定標準物質であるPDTを含む小さなガラス製のチューブ。同軸ケーブルにブルーパテとvirgin Teflonで固定されており、共振器のループに近接している。この部品は壊れやすく、力を余分に加えると破壊される。



3.0 論理的根拠

共振器のループは、時として何らかの物質により汚染し、ノイズが増えたり、共振器の性能に影響を与えることがある。このため、定期的な70%アルコールを用いた「簡易的な」洗浄や問題発生時の簡易的な洗浄が必要である。しかしながら、この過程で、共振器のループや同軸ケーブルが湿気を帯びたり、あるいは／かつ、PDTのアンプが移動することがあるので、洗浄時には注意が必要であり、洗浄後は十分な時間を経過した後に測定に用いる必要がある。簡易的ではない洗浄が必要になることは稀であり、その洗浄にはより高い専門性が求められる。簡易的ではない洗浄は標準手順書56.0に記述されている。

4.0 参照すべき標準手順書や他の文書

標準手順書56.0 簡易的ではない共振器のループ、コンデンサ、同軸ケーブルの洗浄

5.0 物品

- キムワイプ
- 共振器のループ (洗浄対象の)
- 同軸ケーブル
- 標準PDT アンプ
- コンデンサ

共振器ループ (通常は、共振器ボックスにPDTアンプとともにセットされてい

- る)
70% アルコール

6.0 方法

いつこの方法を用いるべきか：

- a) 定期的に行う。測定を行う日は、少なくとも一回は行う。測定に先立って行うのが便利であるが、洗浄後は完全に乾くまで放置し、乾燥してから測定に用いること。
- b) 問題がしばしば現れ、ボールゼロの測定でも通常では生じない基線の変動が生じたりノイズが多い信号が継続して観察されたりした場合にも行うこと。

IV. 水洗い

16. 手指を手指消毒薬か石けんを用いて洗浄する。

ボールゼロの測定で観測される基線の変動（画面例を下に示す）は、歯の RIS（放射線誘発信号）のように見えることもあれば、それとは明らかに異なるように見えることもある。EPR 信号として検出されることもあれば検出されないこともある。適切なフェーズに生じることもあれば生じないこともある（この場合、共振器により検知された信号は実際の EPR 信号とは異なる）。下に示す画面では、歯の信号の近傍に奇妙な信号が見られる。この信号はボールゼロの測定では観測されてはならないものである。ボールゼロの測定で通常ではない信号が観察された場合には報告すること。この報告により簡易ではない洗浄が必要となることがある。

洗浄過程での注意点：

注意 #1: - PDT のアンプル（EPR 標準物質）は洗浄中に触ったり動かしてはなりません。位置を変えることは測定に影響を及ぼします。もしも、洗浄中に PDT の位置が変化した場合は、必要に応じてテストや修理を行えるように共振器を管理するエンジニアに報告すること。

注意 #2: コンデンサや同軸ケーブルを洗浄しようとしなさい。それが汚れているように見える場合には、専門家による簡易ではない洗浄が必要かどうかを調べるために報告すること。

注意 #3: 洗浄後、測定する際には、ループや他の部品が完璧に乾いているようにすること。

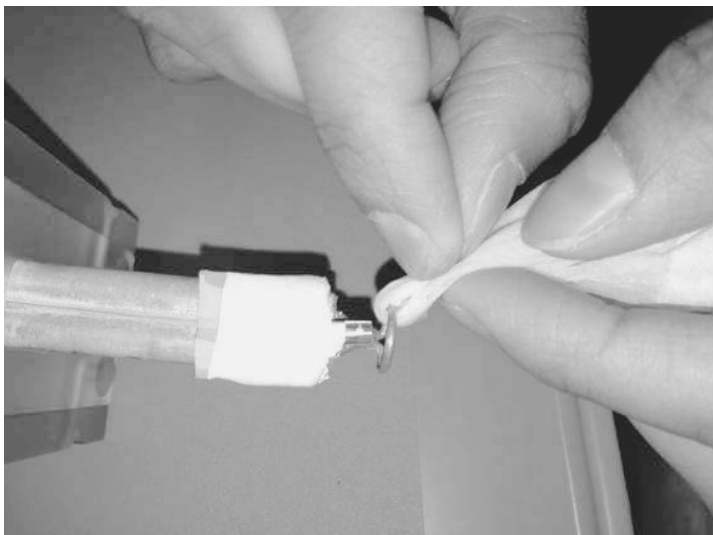
注意 #4: ループに強い圧を加えないこと。圧を加えるとループは曲がることもある。ループが曲がった場合には報告し、専門のエンジニアによって調べられ位置が調整される。

洗浄過程

1. 清潔なキムワイプを取る。
2. キムワイプの端に 70% アルコールを吹きかける。吹きかける量が多いと完全に乾かすのに時間がかかることになる。
3. スプレーした端を丸めて細い線状にする。

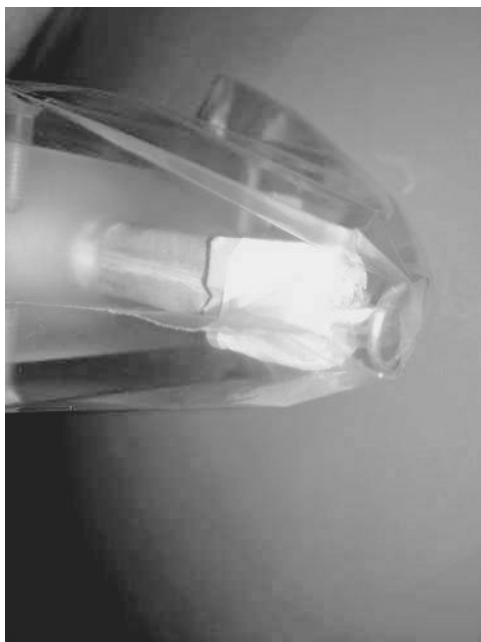


- 丸めた端をつまみループの内側にスライドさせ、ループを包み込むようにワイプする。ループの全ての面を2から3回ワイプする。その際に標準物質である PDT やコンデンサや同軸ケーブルには触らないようにする。



- ループを洗浄した後は、少なくとも 10 分間以上乾かしてから使うこと。あるいは、セッション間の保管に備えること。

6. 共振器をセットしたままにする：ループにサンドイッチ・バックを被せる。



7. 共振器を取り外して保管する：リゾネータ保持箱にループとボックスを保護するクッションを入れ
て保管する。



リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX)を用いた 生体内 DNA 損傷レベルの測定による線量評価

研究分担者 中村 麻子 茨城大学理学部 准教授

研究分担者 盛武 敬 産業医科大学産業生態科学研究所放射線健康医学 准教授

研究協力者 五十嵐友紀 産業医科大学産業生態科学研究所職業性中毒学 講師

研究協力者 孫略 産業医科大学産業生態科学研究所放射線健康医学 産業医学基礎研究医員
(現；筑波大学 陽子線医学利用研究センター)

研究要旨

リン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX)を用いた DNA 損傷モニタリング法は生体内 DNA 損傷を迅速かつ高感度にモニタリングする方法として期待されている。本年度は、有効な放射線線量評価を現場で行うシステム作りのための γ -H2AX アッセイデバイスを継続的に開発するとともに、放射線被ばく動物モデルおよび計画的被ばく者における生体内 DNA 損傷レベルを γ -H2AX アッセイによって測定した。

A.研究目的

放射線被ばくは、東京電力福島第一原発事故に代表されるような予期せぬ放射線被曝などを含め、様々な場面において発生する可能性があり、線量評価やそれによる基づく生体影響（発がんリスク）評価予測の重要性が指摘されている。放射線被ばくを生物学的な手法によりの生体影響を評価する方法として、一般的には染色体異常分析が用いられるが、この方法は結果を得るまでに時間がかかること、低線量放射線の影響は検出されにくいこと、あくまでも累積した放射線被ばくの影響しか検出できないことなどの問題を抱えていた。それに対し、これまで申請者を含めた研究チームにより開発されたリン酸化型ヒストン H2AX (γ -H2AX) を用いた DNA 損傷モニタリング法は、生体内 DNA 損傷を迅速にモニタリングする新しい方法として期

待されている。しかしその一方で、 γ -H2AX アッセイを含めほとんどの影響評価アッセイは生体サンプルの調製、 γ -H2AX に対する免疫染色工程、さらには蛍光顕微鏡による検出など、実験行程の複雑さという背景から実験室ベースで行われることがほとんどであり、事故現場のような『現場』における解析作業は困難な現状である。そこで、これらの課題を克服した迅速な DNA 損傷レベルのモニタリングを可能とするアッセイデバイスの開発を含めた γ -H2AX による線量評価システムの構築により、トリアージ対応可能な迅速な線量評価法の確立を目指す研究を実施している。本年度は昨年度から継続してアッセイデバイスの開発を行った。特に、血液サンプルから解析対象であるリンパ球を分離するための細胞固定構造について評価を行った。また、被ばく量の明確な計画的被ばく者や照射

マウスの生体内 DNA 損傷レベルを γ -H2AX アッセイを用いて測定し、 γ -H2AX アッセイによる被ばく線量推計と被ばくのトリアージが可能であるかを検討した。

B. 研究方法

1. PDMS チップを用いたリンパ球分離のための細胞固定構造の検討

迅速な γ -H2AX アッセイデバイスとして、従来の密度勾配遠心法ではなくチップ上に拡散させること、あるいはその他の簡便な方法でリンパ球分離を行い、さらには同じチップ上で DNA 損傷レベルの解析も行うことのできるデバイスを想定し、Polydimethylsiloxane (PDMS) チップに着目した。学外研究協力者である群馬大学鈴木孝明准教授の有する三次元リソグラフィ技術を用いることで様々な微細構造を PDMS チップに作成することが可能である。本年度は、血球細胞のサイズがその種類によって異なることを利用して、リンパ球細胞のみをチップ上に固定するための微細構造加工を施した PDMS チップを数パターン試作し、その固定効率について検討を行った。

2. 計画的被ばく者を対象とした被ばく後生体内 DNA 損傷レベル解析

本事業の研究分担者である盛武らのグループ（産業医科大学）によって採取された IVR (Interventional radiology) 実施前後の被験者リンパ球における DNA 損傷レベルを γ -H2AX アッセイによって測定し、被ばく線量との相関性を検討した。具体的には、被験者から採取された血液サンプルは産業医科大学にて分離・固定処理し、冷凍条件で茨城大学まで発送した。茨城大学に到着したサンプルを用いて γ -H2AX による DNA 損傷レベルの計測を行い、IVR 検査による予想被ばく線量との相関性について検討し

た。IVR の条件および対象患者情報については研究分担者盛武グループの報告書を参照。

3. 全身被ばくマウスを用いた生体内 DNA 損傷レベル解析

本事業の研究分担者である盛武らのグループ（産業医科大学）によって採取された放射線被ばくマウス由来のリンパ球サンプルを茨城大学に送付し、 γ -H2AX による DNA 損傷レベルの解析を行った。マウスへの照射条件については研究分担者盛武グループの報告書を参照。

3. 倫理面への配慮

ヒト対象試験は研究分担者である盛武グループですでに承認を受けているものである。また、動物実験についても研究分担者である盛武グループですでに承認を受けているものである。

C. 研究結果

1. PDMS チップを用いたリンパ球分離のための細胞固定構造の検討

これまで、遠心力を用いて PDMS チップ上にリンパ球細胞を拡散・固定するために、小型卓上遠心機に独自の治具を作成したが、用いた遠心機では遠心力が若干強く、リンパ球の固定量は不十分であった。そこで、今年度はより低速遠心が可能な遠心機を用いて PDMS チップシステム用の治具を作製した。

血中には、 γ -H2AX アッセイに適しているリンパ球（10-12 μm 径）のほかに、大量の赤血球（7-8 μm 径）や血小板（2-4 μm 径）が存在しており、PDMS チップ上に効率よくリンパ球のみを固定する特殊微細構造が必要となる。今年度は、細胞固定構造の入口径と出口径を様々なサイズの組み合わせで作成し、リンパ球の固定効率および、リンパ球以外の血球細胞の除去率について検討した。その結果、ある一定のリンパ

球固定は認められるものの、多くの細胞が固定されることなく流出してしまっていた。

2. 計画的被ばく者を対象とした被ばく後生体内 DNA 損傷レベル解析

産業医科大学から送付された IVR 実施患者由来リンパ球細胞を用いて γ -H2AX に対する免疫染色を行った結果、IVR 直後の患者リンパ球細胞において明確な γ -H2AX フォーカスの増加が検出された (図 1)。IVR 直後の生体サンプルで γ -H2AX フォーカスとして検出される DNA 二重鎖切断量は、IVR 検査によって予想される放射線量に相関していた。また、すべての患者において、 γ -H2AX レベルは検査後時間経過とともに減少しており、IVR によって誘導された DNA 損傷が修復されていることが示された。いずれの患者においても、検査 1 週間後には照射前レベルまで DNA 損傷が減少していた。今回、対象患者の一部には IVR 検査前に抗酸化剤の投与が行われており、DNA 損傷誘発に対する抗酸化剤の効果を検討したところ、 γ -H2AX レベルのわずかながら低下が確認された。

3. 全身被ばくマウスを用いた生体内 DNA 損傷レベル解析

産業医科大学から送付された放射線被ばくマウス由来のリンパ球サンプルを用いて γ -H2AX に対する免疫染色を行った。その結果、線量依存的な DNA 損傷の誘導が確認された (図 2)。

D. 考察

今回検討した細胞固定構造のサイズおよび配置では、固定構造に向かう液体の流れが比較的弱く、多くの細胞が固定構造を避けるように流れてしまっていた。今後、より効率的にリンパ球を分離・固定するため、固定構造の間隔や出口径のサイズなどの条件を検討する必要があると考える。また、流速についても遠心機を用い

る方法のほかにも、吸引などの方法も合わせて検討する必要がある。

計画的被ばく者を対象とした臨床研究では、照射した線量相当の DNA 損傷が γ -H2AX アッセイによって検出されたことから、 γ -H2AX アッセイによる線量評価の有効性が強く示唆された。IVR 検査のような部分被ばくでは γ -H2AX フォーカスを有する細胞と、そうでない細胞とが混在することになる (図 1)。しかし、今回、細胞あたりの γ -H2AX フォーカス数が予想被ばく線量に相関していたことは、全身被ばくだけでなく、部分被ばくにおけるトリアージにおいても γ -H2AX アッセイが有用である可能性を示している。また、抗酸化剤投与患者では IVR 検査後の γ -H2AX レベルが非投与患者に比べて低い傾向にあったことから、抗酸化剤投与による放射線誘発 DNA 損傷の抑制効果が示唆された。今後、対象患者数を増やし継続的に解析することで、被ばく線量と γ -H2AX レベルの相関性を明確にし、トリアージのための定量バイオマーカーとしての評価を行っていく。

全身被ばくマウスを用いた γ -H2AX アッセイでは、今回用いた 0.5Gy から 5Gy 被ばくにおいて線量依存的な γ -H2AX レベルの増加が被ばく後に検出されたことから、より正確な定量バイオマーカーとしての有効性を確認するためにも、今後は様々な線量の放射線被ばくを想定し実験を行っていく必要がある。

E. 結論

リンパ球分離および γ -H2AX アッセイデバイスとしての PDMS チップの開発、細胞の拡散・固定を行うための小型遠心機の加工等を行った。改善すべき課題が明確となったので、今後さらなる微細構造の改良を行い、血液から迅速にリンパ球を分離し解析できるデバイスの開発を引

き続き目指す。また、低線量計画的被ばく後の生体内 DNA 損傷レベルを γ -H2AX アッセイによってモニタリングすることが可能であることが示された。来年度はより幅広くかつ細やかな被ばく放射線量評価を行うための γ -H2AX アッセイの検討だけでなく、その他の線量評価データとの相関性も検討することで、トリアージのための総合的線量評価手法の確立を目指す。

F.健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記入

G.研究発表

1.論文発表

1) Nakamura AJ, Suzuki M, Redon CE, Kuwahara Y, Yamashiro H, Abe Y, Takahashi S, Fukuda T, Isogai E, Bonner WM, Fukumoto M. The causal relation between DNA damage induction in bovine lymphocytes and the Fukushima nuclear power plant accident. *Radiation Research* (in press)

2.学会発表

- 1) Nakamura AJ, Suzuki M, Redon CE, Kuwahara Y, Bonner WM and Fukumoto M. DNA damage induction in bovine lymphocytes after the Fukushima nuclear accident. 62nd Annual international meeting Radiation Research Society, Oct 16 - 19, 2016, Hawaii, USA.
- 2) Nakamura A, Sasatani M, Shimura T, Kato M, Maruyama R, Iioka T, Sawai Y, Kobayashi J, Komatsu K and Kamiya K. The use of γ -H2AX assay for validation of radioprotective effect of tempol against acute and chronic low-dose radiation exposure. 14th International Workshop on Radiation damage to DNA, Mar 20 - 24, 2016, Melbourne, Australia.

3.その他

- 1) Nakamura AJ. Evaluation of radiation-induced DNA damage using gamma-H2AX as a biodosimeter. 第2回レジリエント・コミュニティ国際シンポジウム, Apr. 14-15, 2016, 郡山市中央公民館, 郡山

H.知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1.特許出願

本研究で開発される γ -H2AX アッセイデバイスおよびシステムについては特許出願予定である。

2.実用新案登録

なし

3.その他

学外研究協力者

鈴木 孝明 群馬大学 准教授

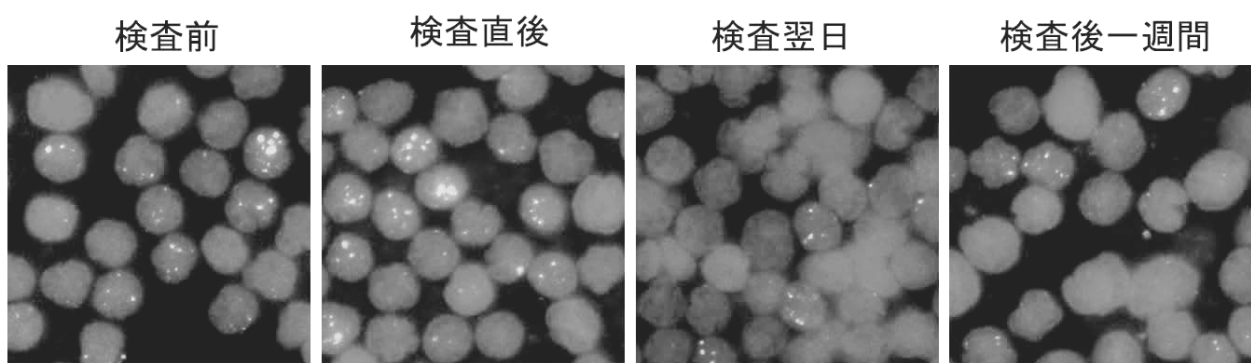


図1 IVR実施前後の患者由来リンパ球細胞に対する γ -H2AX免疫染色
IVRによる放射線誘発 γ -H2AXフォーカスがはっきりと検出されている。時間経過とともに、誘発したDNA損傷が修復され γ -H2AXフォーカスが減少している。

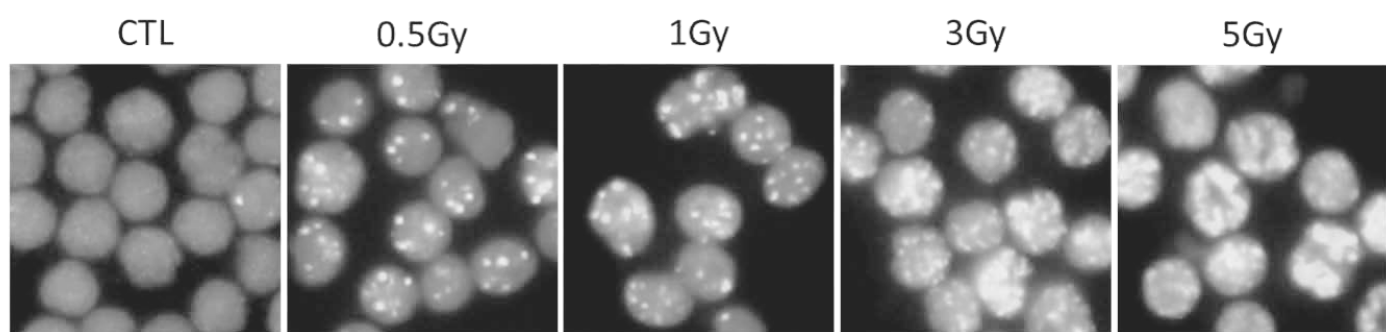


図2 0.5 - 5Gy全身照射後のマウスリンパ球細胞における γ -H2AX免疫染色
照射後1時間では、放射線量依存的に γ -H2AXフォーカス数が増加していることがわかる。

被ばくによる生体内 DNA 損傷レベルの測定と X バンド EPR による被ばく後レドックスバランスの解析

研究分担者	盛武敬	産業医科大学産業生態科学研究所放射線健康医学	准教授
研究分担者	中村麻子	茨城大学理学部	准教授
研究協力者	五十嵐友紀	産業医科大学産業生態科学研究所職業性中毒学	講師
研究協力者	孫略	産業医科大学産業生態科学研究所放射線健康医学	訪問研究員

研究要旨

多数の一般市民の放射線被ばくを伴う放射線災害や放射線を利用したテロでは、一般災害でのトリアージ基準に加え、さらに被ばく線量推計によるトリアージが必要である。専門的な治療を必要とする 1 Gy 以上の被ばく者を多くの公衆の中から選別するため、計画被ばく者またはマウスから生体サンプルを取得し、線量指標となるバイオマーカーの解析を実施した。

A. 研究目的

公衆が放射線被ばくする状況というのは広島・長崎の原爆による被ばく、チェルノブイリや福島第一原子力発電所の事故などが思い出されるが、医療用または非破壊検査用線源の取り扱いミスや紛失盗難などによる被ばくも考えられる。さらに近年の世界情勢の変化により、核や放射線を利用したテロのリスクが顕在化している。

このように公衆が放射線被ばくする事故/事件が発生した際には、一般災害でのトリアージ基準に加え、さらに被ばく線量推計によるトリアージが必要である。そのためには、被ばく線量と連動するバイオマーカーを明らかにし、それをトリアージに利用できる方法で検出することが求められる。

酸化還元バランス(レドックスバランス)とは、生体内の活性酸素・フリーラジカルとそれらを還元する酵素や物質のバランスのことである。このバランスが、(放射線を含む)様々な要因によって

崩れ、活性酸素・フリーラジカルが増加してしまうことで、生活習慣病、血管疾患、がんの発症につながる。

近年、培養細胞等を用いた実験により、放射線照射数時間以降にミトコンドリアからの活性酸素産生が亢進することが明らかとなっている。これにより細胞内の酸化還元バランス(レドックスバランス)が酸化方向に傾き、放射線影響が増強すると考えられる。本年度は昨年度に引き続いて放射線照射後の生体内レドックスバランスを測定し、被ばく線量推計とトリアージ利用の可能性を評価した。

B. 研究方法

1. 全身被ばくマウスを利用した被ばく後生体内レドックス解析

放射線照射したマウスの血中の酸化還元バランスを解析した。マウスは8週齢のオスの C57BL/6 マウスを使用し、株式会社日立パワーソリューション

ヨンズ製のX線照射装置により、150kVpのX線を0.88/分の線量率で照射した。付加フィルタは0.1mmCuと1mmAlを採用した。

2. 全身被ばくマウスを利用した被ばく後DNA損傷レベルの解析

放射線照射したマウスのリンパ球のDNA損傷レベルの解析を行った。マウスは8週齢のオスのC57BL/6マウスを使用し、株式会社日立パワーソリューションズ製X線照射装置により、150kVpのX線を0.88/分の線量率で照射した。付加フィルタは0.1mmCuと1mmAlを採用した。照射線量は0、0.5、1、3、5 Gyとした。照射1時間、1、3、7日後に、ヘパリンナトリウムの入ったエッペンチューブにマウス血液を採取し、リンパ球分離試薬によりリンパ球を分離した。リンパ球は4%パラフォルムアルデヒドを使用して固定した後、蛍光免疫法により γ H2AXの染色を行った。蛍光顕微鏡を用いて1細胞(核)あたりに存在する γ H2AXのfoci数を評価することで、DNA損傷レベルの定量を行った。 γ H2AXのfoci数のカウントにはフリーソフトのfociカウンターを使用した。

なお、マウスの照射、採血、リンパ球分離・固定は産業医科大学で行い、前年に確立した輸送手法により茨城大学に搬送し、茨城大学で γ H2AXの染色とfoci数の評価を実施した。

3. 計画的被ばく者を対象とした被ばく後生体内反応の解析

心臓カテーテル検査を実施する患者の体液を検査実施前後で取得し、被ばく線量と各種指標の変動を観察した。また、一部患者にはアスコルビン酸を検査前に投与し、アスコルビン酸による放射線防護作用も同時に解析した。

これらは、社会保険直方病院で心臓カテーテル検査を実施する患者を対象とし、事前に倫理委員会の承認を得て実施した。患者には事前にインフォームドコンセントを行い、研究の内容、副作用の可能性、匿名性の確保および不利益を被ることなくいつでも研究への参加を中止する請求ができることを説明し、書面で同意を得た患者のみを対象とした。

以下の表1~3に対象患者情報、取得した被ばく関連パラメータ、採取した生体サンプル、評価項目を示した。また、研究のスキームを図1に示した。

表1 対象患者情報

試験期間	2016年1月~2016年2月
患者数	10例
年齢	73.6歳
性別	男4、女6

表2 被ばく関連パラメータ

空気カーマ	DAP
撮影回数	撮影フレーム数
透視時間	3次元撮影数

表3 採取した試料および評価項目

試料	評価項目
血液	EPR 酸化還元バランス リンパ球DNA損傷 血中抗酸化物質 など
尿	8-OHdG
唾液	8-OHdG

対照群:生理食塩水投与
投与群:アスコルビン酸投与

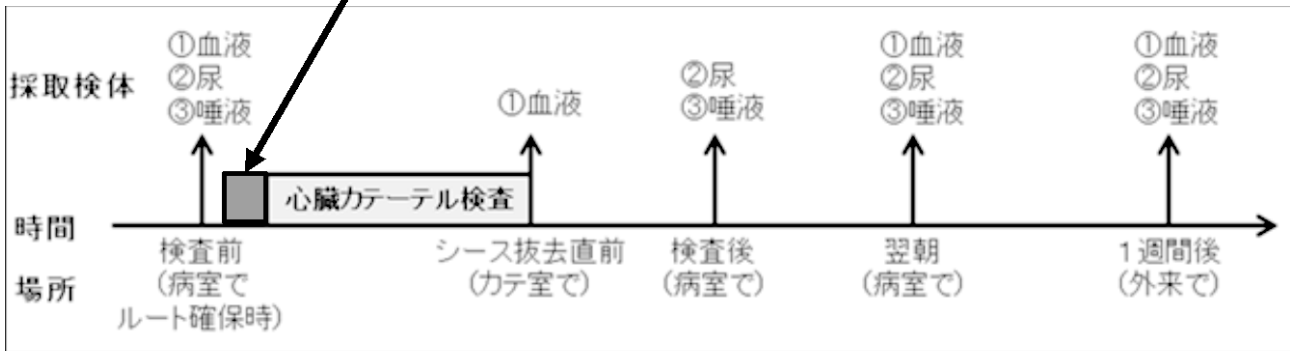


図1 計画的被ばく者を対象とした被ばく後生体内反応の解析の生体サンプル回収スキーム

4. 倫理面への配慮

動物実験は産業医科大学動物実験及び飼育倫理審査委員会より承認を受けた。動物実験は産業医科大学動物実験管理規定に則して行われた。

ヒト対象試験は社会保険直方病院倫理審査委員会より承認を受けた。

マウス全身に0.5-7 GyのX線を照射し、経時的に採血を行い、血中の酸化還元バランスを電子スピン共鳴(electron paramagnetic resonance ; EPR)

法により解析した。その結果、被ばく後に一過性に酸化還元バランスが特徴的な変化を示すことが確認された。この結果は我々が以前に培養細胞を用いて得られた結果と一致していた。

C. 研究結果

1. 全身被ばくマウスを利用した被ばく後生体内レドックス解析

2. 全身被ばくマウスを利用した被ばく後 DNA 損傷レベルの解析

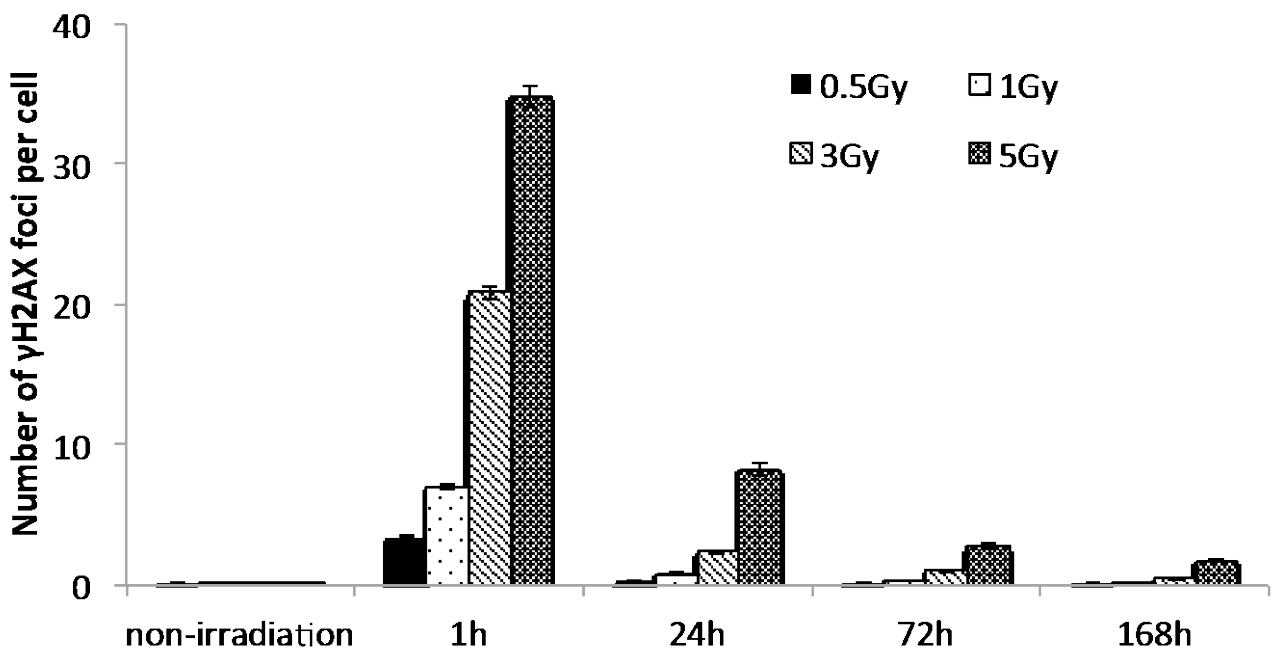


図2 全身被ばくマウスのリンパ球に形成される γ H2AX fociの数

マウス全身に 0、0.5、1、3、5 Gy の X 線を照射し、照射 1 時間、1、3、7 日後のリンパ球中の γ H2AX の foci 数を解析したところ、照射群ではいずれの線量においても照射 1 時間後に foci 数が最大となり、その後、経時的な foci 数の減少がみられた。0.5 Gy 照射群では照射後 3 日で非照射群と同じレベルまで foci 数が減少し、1 Gy 照射群では照射後 7 日で非照射群と同じレベルまで foci 数が減少したが、3 および 5 Gy 照射群では照射後 7 日においても非照射群より多くの foci 数が観察された(図 2)。

3. 計画的被ばく者を対象とした被ばく後生体内反応の解析

3-1 試験実施の状況

2016 年 1 月～2016 年 2 月に社会保険直方病院で心臓カテーテル検査を実施した患者で、インフォームドコンセントの取得できた 10 例を対象とした。患者情報は表 1 の通りである。

3-2 被ばく線量に関する結果

患者 10 例の被ばく線量は、空気カーマで 474 ± 293 [mGy]、DAP で 51 ± 30 [mGy \times cm²]であった。透視時間は 9.3 ± 5 [分]、撮影シリーズ数は 16.5 ± 8.4 [回]、撮影フレーム数は 1907 ± 752 [回]であった。(平均 \pm 標準偏差)

また、空気カーマと Dose area product (DAP)値の相関係数 $r=0.99$ 、空気カーマと透視時間の相関係数 $r=0.30$ 、空気カーマと撮影回数の相関係数 $r=0.83$ 、空気カーマと撮影フレーム数の相関係数 $r=0.79$ となり、既存の報告とほぼ一致した。

3-3 血中アスコルビン酸量の変化

今回の研究では対象とした 10 例をランダムにアスコルビン酸投与群とコントロール群に振り分けた。アスコルビン酸投与群には、インタビュー

フォーム記載の 1 日の最大用量 2000mg を参考に、患者体重 1kg あたり 20mg をカテーテル検査前に静脈投与した。コントロール群には、同量の生理食塩水を投与した。図 3 に患者血中アスコルビン酸量を示す。カテーテル検査前(アスコルビン酸投与直後)では血中アスコルビン酸量が一番高く、検査後にはやや低下したものの、コントロール群に比べ高い状態が維持されていた。検査翌日にはコントロール群と同じ量まで戻っていた。

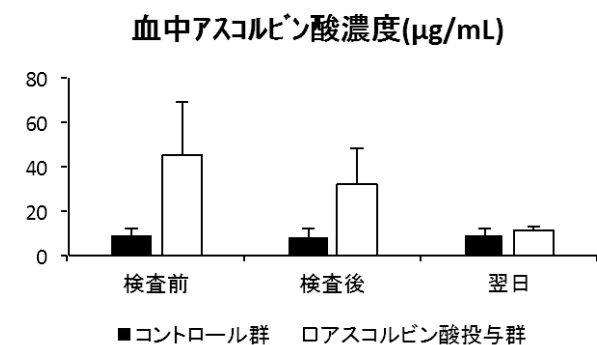
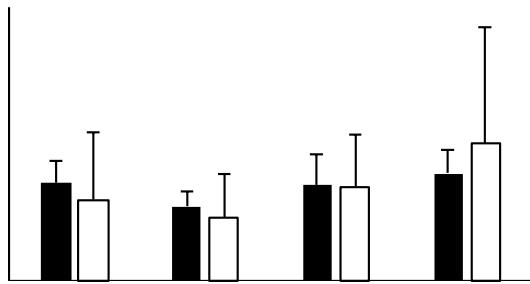


図3 患者血中アスコルビン酸濃度

3-4 被ばく前後における尿中 8-OHdG の変化

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)は DNA の塩基の一つであるデオキシグアノシンの 8 位がヒドロキシル化された状態を指し、DNA の酸化損傷マーカーであり、活性酸素種やフリーラジカルによる生体への影響を反映すると考えられている。すでにいくつかの報告において、放射線によって 8-OHdG が形成し、それが血中や尿中に排出されることが示されている。

本研究においても心臓カテーテル検査実施前後の患者の尿を採取し、8-OHdG 量の変化を解析した(図 3)。予想外であったが、アスコルビン酸投与群、コントロール群ともに、検査直後に一時的な 8-OHdG 量の減少が観察され、翌日には検査前の状態まで回復した。また、検査後 7 日目にアスコルビン酸投与群で 8-OHdG 量がやや高値となっているが、これは 1 名非常に大きな値を示した患者



3 患者尿中8-OHdG濃度

があることが原因である。なぜ大きな値を示したのか、その原因は明らかとなっていない。

3-5 被ばく前後における血球数等の変化

心臓カテーテル検査実施前後の患者の白血球数、リンパ球数、血色素量、ヘマトクリット値を評価

したところ、白血球数、血色素量、ヘマトクリット値については顕著な変化は認められなかった(図4)。リンパ球数は検査直後にコントロール群で軽度(13%程度)の低下が見られたのに対して、アスコルビン酸投与群では低下が見られなかった。リンパ球は放射線感受性の細胞であることが知られており、0.5 Gy以上の全身被ばくにより、リンパ球の減少が認められることが知られている。本研究で見られた、検査直後のコントロール群におけるリンパ球数の減少は放射線が原因であることを否定できないが、過去の報告とは観察された時期、線量が異なる。

3-6 被ばく前後における血中脂質指標の変化

脂質は酸化ストレスの影響を受けやすいとされており、放射線等によって生成された活性酸素等

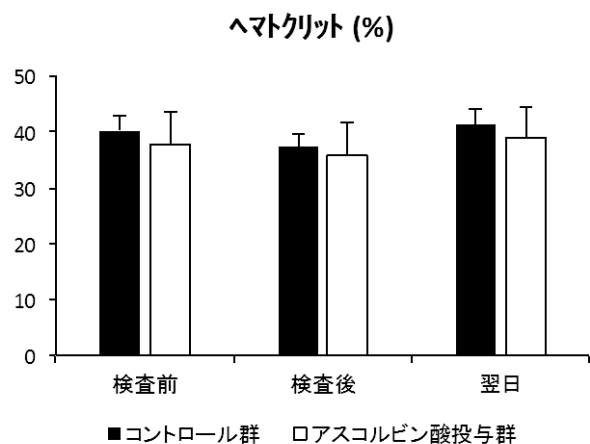
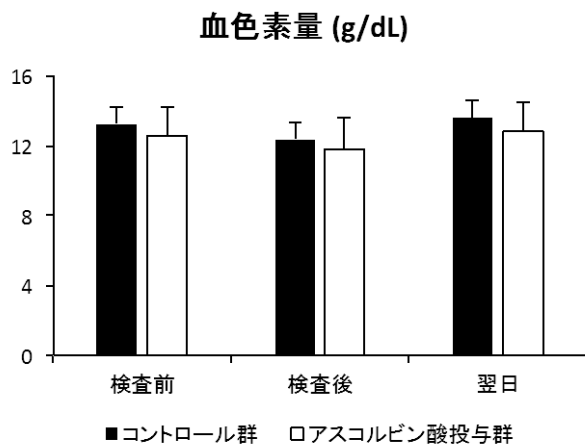
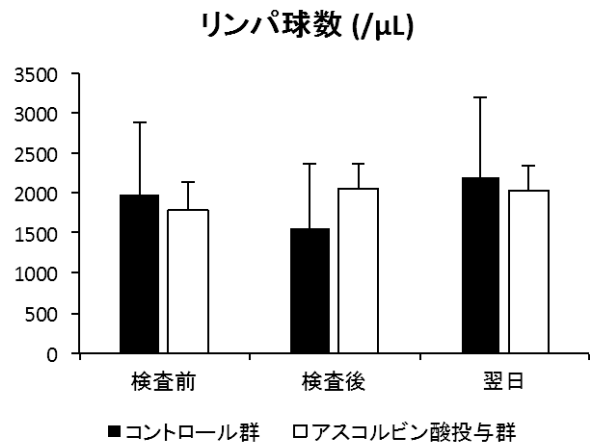
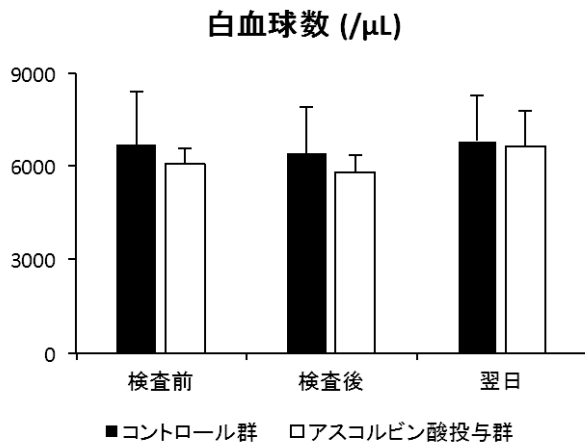


図4 患者白血球数、リンパ球数、血色素量、ヘマトクリット

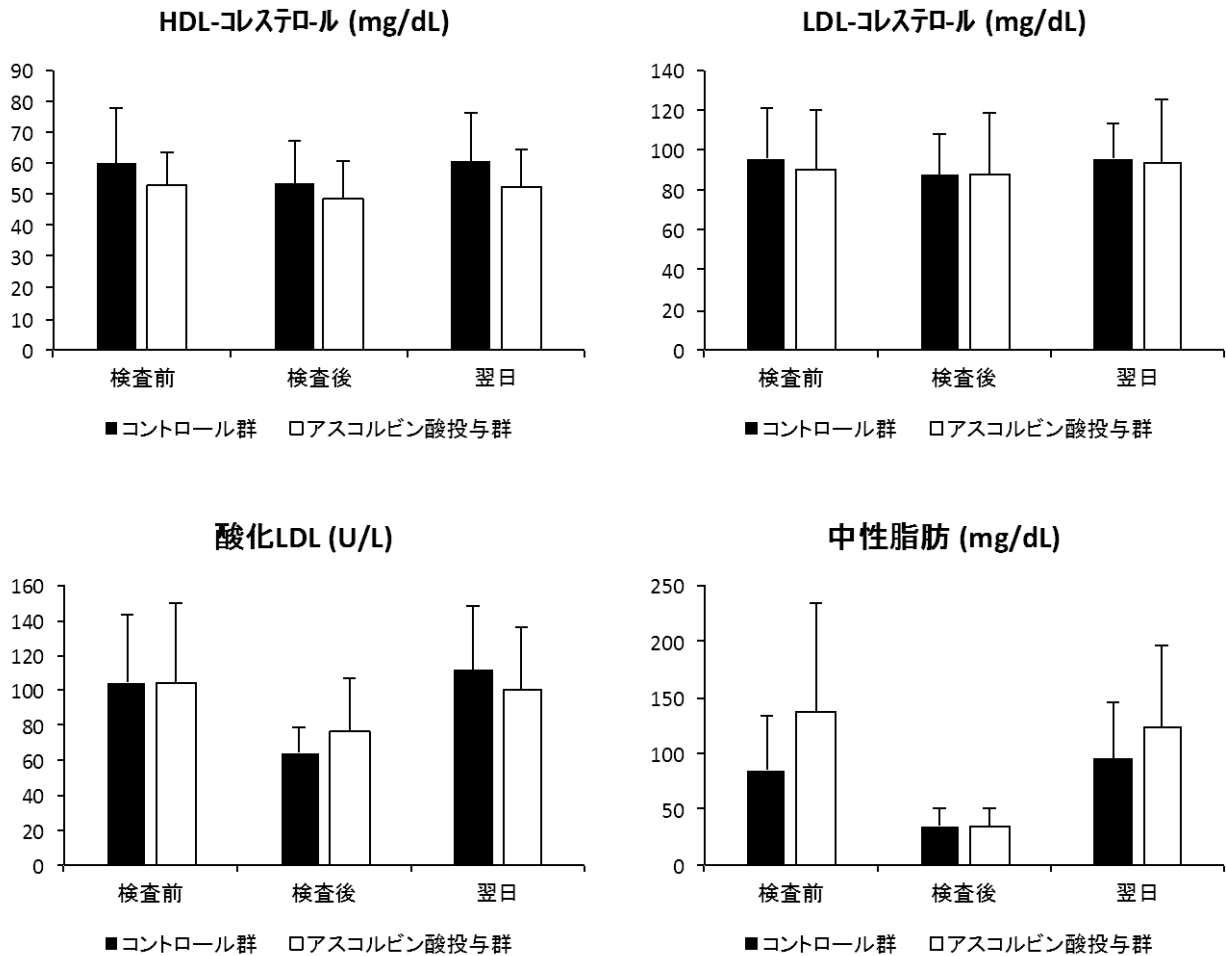


図5 患者白血球数、リンパ球数、血色素量、ヘマトクリット

により脂質ラジカルが形成され、連鎖的脂質過酸化反応(自動酸化)によって過酸化脂質が増加することが知られている。本研究では、血中の LDL-コレステロール、酸化 LDL、HDL-コレステロール、中性脂肪を解析したところ、LDL-コレステロールと HDL-コレステロールは検査後に軽度(10%以内)の低下を認めただけであったが、酸化 LDL と中性脂肪は検査後に 40~60%低下していた(図 5)。また、検査翌日の酸化 LDL と中性脂肪値は、アスコルビン酸投与群では検査前と同等まで回復していたのに対し、コントロール群では検査前よりわずかに上昇(10%程度)していた(図 5)。

3-7 被ばく前後におけるレドックス指標の変化

レドックスバランスの指標として血中ラジカル生成能と SOD 活性を解析した(図 6)。

血中ラジカル生成能は過酸化脂質(LOOH)から形成される脂質ヒドロペルオキシド(LOO \cdot)を呈色法により定量している。血中ラジカル生成能は検査前後で大きな変化は見られなかったが、アスコルビン酸投与群では一貫して、コントロール群より低値となった。検査前と検査直後は血中アスコルビン酸量が交絡因子として存在していた可能性が考えられるが、検査翌日でアスコルビン酸が定常状態に戻った後も低い状態が維持されていたことは興味深く、アスコルビン酸の防護作用の一旦を反映している可能性がある。

SOD はスーパーオキシドディスムターゼの略であり、スーパーオキシド(スーパーオキシド)の消去物質のことであるため、SOD 活性とはスーパーオキシド消去活性という意味になる。検査前ではアスコルビン酸投与群の方が SOD 活性が

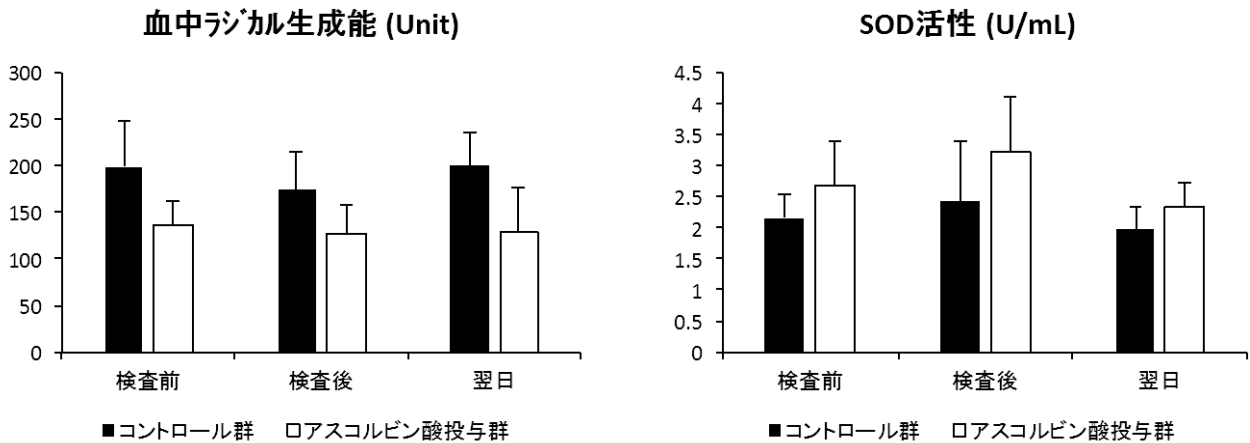


図6 患者血中ラジカル生成能、SOD活性

高くなっており、これはアスコルビン酸がスーパーオキシド消去能を有するためだと考えられる。検査直後では検査前より SOD 活性が 10~20%上昇しており、翌日には検査前の状態まで戻ったが、アスコルビン酸投与群はコントロール群よりやや高値を示した。

D. 考察

1. 全身被ばくマウスを利用した実験

マウス実験では再現性良くデータを得られている。大規模放射線被ばく災害が発生した場合を想定し、実験者間の誤差についても検討している最中であり、来年度には報告できる可能性が高い。また、マウス全身被ばく後の DNA 損傷レベルを γ H2AX を指標に解析した。過去に Redon らがミニ豚やサルで得た結果と傾向は同じであった。

2. 計画的被ばく者を対象とした被ばく後生体内反応の解析

今回は心臓カテーテル検査の患者を対象としており、平均被ばく線量は空気カーマ(≡最大皮膚線量)で 474 mGy と比較的 low、局所被ばくである上に、一定量の出血を伴う、一定量の造影剤(ヨード系)を血管内に投与するなどの条件を考慮する必要がある。しかしながら、今後放射線との関連を精査する必要があるものの、検査直後で検査前よ

り SOD 活性が上昇していた点や検査翌日にアスコルビン酸が定常状態に戻った後も血中ラジカル生成能が低下していた点などは非常に興味深い。

また、被ばく線量依存的に顕著に変化する血液パラメータは見出せなかった。現在は対象患者数を増やすとともに、心臓カテーテル治療(PCI)での解析を実施している。同時に γ H2AX foci 数の測定も実施中である。

E. 結論

生体レベルでも放射線照射によるレドックスバランスの変化が認められ、放射線災害等におけるトリアージ法として利用できる可能性が示唆された。来年度は種々の交絡因子の影響等について検討し、実施可能性を詳細に検討する。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 茂呂田孝一, 盛武敬, 孫略, 石原隆宏, 熊奈津代, 村田聡美, 山田貴大, 岡崎龍史: 患者被ばく線量低減に向けた DICOM RDSR (病院内医療用画像規格線量レポート) 情報の収集。

Journal of UOEH (産業医科大学雑誌) 2016 ; 38
(4) : 325-335

- Mamoru Kato M, Koichi Chida, Takashi Moritake,
et.al: Direct dose measurement of patient during
percutaneous coronary intervention procedures
using radiophotoluminescence glass dosimeters.
Radiation Protection Dosimetry, doi:10.1093/rpd/
ncw263, 2016

2.学会発表

- Lue Sun, Takashi Moritake, Masaoki Kohzaki,
Akira Ootsuyama and Ryuji Okazaki: Energy and
ROS metabolism in radioresistant brain tumor cells.
Society for Redox Biology and Medicine's 23rd
Annual Meeting, a joint meeting with the Society
for Free Radical Research International. San
Francisco, USA. November 2016
- 招待講演、Lue Sun: Energy and ROS metabolism
in radioresistant brain tumor stem cells. Loma
Linda University Medical Center, California, USA.
November 2016
- シンポジウム指名発表、孫略、盛武敬：放射線
白内障の新事実：第32回NPO法人日本脳神経
血管内治療学会学術総会、放射線防護委員会シ
ンポジウム、神戸、11月、2016年
- 五十嵐友紀、孫略、川崎祐也、李云善、平川晴
久、河井一明、盛武敬、放射線被ばく時におけ
るアスコルビン酸の体内解毒システムに与え
る影響の評価、第34回産業医科大学学会総会、
北九州、10月、2016年

出願人：産業医科大学、筑波技術大学、東北大学

2.実用新案登録

なし

3.その他

学内研究協力者

河井一明 産業生態科学研究所職業性腫瘍学
李 云善 産業生態科学研究所職業性腫瘍学
川崎祐也 産業生態科学研究所職業性腫瘍学

学外研究協力者

千田浩一 東北大学災害科学国際研究所
稲葉洋平 東北大学災害科学国際研究所
平山 暁 筑波技術大学保健科学部
志賀匡宣 同仁化学研究所
石田和彦 同仁グローバル
清永美樹 同仁グローバル

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許出願

申請中

発明の名称：放射線被ばくの判定方法

出願番号：特願 2017-30440

出願日：平成 29 年（2017 年）2 月 21 日

発明人：孫略、盛武敬、平山暁、千田浩一

研究へ協力される皆さまへ

平成 年 月 日

この研究の目的は、心臓カテーテル検査に使われる放射線が人体にどのような影響があるのかを詳しく調べる研究です。またビタミンCを投与することにより、放射線の影響がどのように変化するのかを調べ、将来的には体にやさしい心臓カテーテル検査が出来るようにすることを目指しています。

□1. 研究課題名

心臓カテーテル検査における放射線線量とDNA損傷ならびに解毒システムにおけるアスコルビン酸(ビタミンC)の機能解明

□2. 研究期間：平成27年4月～平成28年3月

□3. 研究目的

心臓カテーテル検査の時に受ける放射線の人体への影響を調べるとともに、ビタミンCの投与によりその影響がどのように変化するのかを調べることです。

□4. 研究方法

心臓カテーテル検査の前後、退院後1週間に血液、尿、だ液を採取します。被験者の方によっては心臓カテーテル検査の最中にビタミンCの点滴を行う場合もあります。

□5. 研究への参加の任意性とその同意の撤回

この研究に参加するかどうかは、あなたの自由意思で決めていただくこととなります。この研究に参加されない場合でも、今後あなたが不利益を受けることは一切ありません。また同意された後でも同意を撤回されるのはあなたの自由です。たとえ途中で同意を撤回されても、以後あなたが不利益を受けることは一切ありません。

□6. 予想される利益、危険性及び不利益

- A) ビタミンCの投与の際に、もし不快感など不測の事態が生じた場合には、直ちに投与を中止して適切な処置をとります。
- B) 個人情報漏洩した場合、社会的に不当な扱いを受ける危険性が考えられますが、当院の個人識別情報管理者の管理の下、研究実施責任者によって連結可能匿名化し、情報の徹底管理によって漏洩を防止します。
- C) 本研究に参加したことが原因となって、予測しなかった重篤な副作用などの健康被害を受けたときは、通常の診療と同様に適切に対処いたします。なお、当該健康被害を受けた場合には、保険による補償が受けられます。

7. 個人情報の保護

- A) 採取したあなたの生体試料（血液・尿・だ液）は、解析に使用するまで当院の検査室の冷凍庫に保管します。
- B) あなたの個人情報は、分析する前にカルテや試料の整理簿から、住所、氏名、生年月日を削り、代わりに新しく符号をつけ、あなたとこの符号を結びつける対応表は当院の個人識別情報管理者の管理の下で研究実施責任者が厳重に管理し、あなたの個人情報の漏洩を防止します。このようにあなたの個人情報を連結可能匿名化することにより、研究者が個々の解析結果を特定の個人に結びつけることができなくなります。ただし、解析結果についてあなたに説明する場合など、個々の情報を特定の個人に結びつけなければならない場合には、当院の個人識別情報管理者の管理の下でこの符号を元の氏名に戻す作業を行い、結果をあなたにお知らせすることが可能になります。
- C) この研究終了後、あなたからいただいた生体試料及び個人情報は、研究実施責任者の管理の下、匿名化を確認の後、直ちに廃棄いたします。また同意を撤回された際も、その時点までに得られた生体試料及び個人情報は、同様の方法で廃棄します。

8. 研究成果の公表

この研究によって得られた成果を学会や論文などに発表する場合には、あなたを特定できる氏名、住所などの個人情報は一切使用いたしません。

9. 研究結果の開示

研究結果をあなたが望まれる場合には、あなたに直接説明いたします。

10. 知的財産権について

この研究の成果に基づいて、特許権などの知的財産権が生ずる可能性もありますが、その権利は当院ならびに産業医科大学に帰属しあなたには帰属しません。

11. 費用について

この研究は保険診療の範囲内で行われます。また研究参加の謝礼はありません。

12. 利益相反について

本研究は、国から交付された科学研究費補助金により、産業医科大学の主任研究者のもとで公正に行われます。本研究の利害関係については、産業医科大学利益相反委員会の承認を得ており、公正性を保ちます。

説明者：社会保険直方病院 循環器内科

氏名

印

研究実施責任者：産業医科大学 産業生態科学研究所 職業性中毒学

氏名 五十嵐友紀

印

同意書

社会保険直方病院長 殿

平成 年 月 日

わたしは今回、直方病院および産業医科大学産業生態科学研究所職業性中毒学講座で実施される「心臓カテーテル検査における放射線線量と DNA 損傷ならびに解毒システムにおけるアスコルビン酸（ビタミン C）の機能解明」について、事前に説明文書を受け取り、研究実施担当者から、それに基づいて研究の意義、目的、方法、対象者が被り得る不利益及び危険性、個人情報保護などに関して十分な説明を受けました。さらにわたしが研究の参加に同意した後も、何時でもみずからの意思で、研究参加を取りやめることができること、及び研究参加を取りやめた後も何ら不利益を受けないことについても説明を受けました。

以上のことを理解した上で、わたしの意思により、この研究に参加することに同意いたします。

説明を受け理解した項目は次のとおりです。（〔 〕の中にご自分で○を付けて下さい。）

項 目	説明文書項目
〔 〕 研究の意義、目的および方法	(1-4)
〔 〕 研究参加の任意性とその同意の撤回の自由	(5)
〔 〕 予測される利益、危険性と不利益	(6)
〔 〕 個人情報の保護	(7)
〔 〕 生体試料や個人情報などの保管、使用方法	(7)
〔 〕 生体試料、個人情報や研究結果などの匿名化の具体的方法	(7)
〔 〕 研究終了後及び研究参加の撤回時の生体試料及び個人情報の廃棄方法	(7)
〔 〕 研究成果の公表	(8)
〔 〕 希望による研究結果の開示あるいは非開示	(9)
〔 〕 知的財産権の発生および帰属	(10)
〔 〕 費用の負担に関すること	(11)
〔 〕 利益相反について	(12)

（ご本人）

氏名 印
住所

（代諾者）*必要な場合のみ

氏名 印
住所

説明者：社会保険直方病院 循環器内科 氏名 印

研究実施責任者・連絡先：産業医科大学 産業生態科学研究所 職業性中毒学
氏名 五十嵐友紀 印

同意書

(研究終了後の試料等の取扱いについて)

社会保険直方病院長 殿

平成 年 月 日

わたしは今回、直方病院および産業医科大学産業生態科学研究所職業性中毒学講座で実施される「心臓カテーテル検査における放射線線量と DNA 損傷ならびに解毒システムにおけるアスコルビン酸（ビタミン C）の機能解明」について、事前に説明文書を受け取り、研究実施担当者から、それに基づいて研究の意義、目的、方法、対象者が被り得る不利益及び危険性、個人情報保護などに関して十分な説明を受けました。さらにわたしが研究の参加に同意した後も、何時でもみずからの意思で、研究参加を取りやめることができること、及び研究参加を取りやめた後も何ら不利益を受けないことについても説明を受けました。

以上のことを理解した上で、わたしの意思により、提供する試料等が今回の研究「心臓カテーテル検査における放射線線量と DNA 損傷ならびに解毒システムにおけるアスコルビン酸（ビタミン C）の機能解明」に使用されるとともに、当該研究終了後も平成 32 年 3 月まで保存され、研究実施責任者のもとで将来関連した研究が継続される場合に使用されることに同意いたします。

(本人)

氏名
住所

印

(代諾者) *必要な場合のみ

氏名
住所

印

説明者：社会保険直方病院 循環器内科 氏名 印

研究実施責任者・連絡先：産業医科大学 産業生態科学研究所 職業性中毒学
氏名 五十嵐友紀

労災疾病臨床研究事業費補助金
分担研究報告書

ミトコンドリア酸化損傷を指標とした生物学的手法による線量評価法の検討

研究分担者 志村 勉 国立保健医療科学院生活環境研究部 上席主任研究官

研究要旨

エネルギー代謝を制御する細胞小器官ミトコンドリアは、細胞の恒常性の維持に重要な働きを持つ。ミトコンドリアの機能低下は、発がん、老化、糖尿病、メタボリックシンドローム、心疾患、神経疾患などの原因となる。本研究では、ヒト正常線維芽細胞を用いて、放射線による活性酸素の影響をミトコンドリア酸化損傷を指標に検出し、被ばく線量の把握が可能かどうかを検討した。パーキンソン病原因遺伝子 **parkin** は、ミトコンドリアの膜電位の低下を認識し、機能不全のミトコンドリアの選択的分解を行うミトコンドリアのオートファジー（マイトファジー）に関与する。酸化損傷によるミトコンドリアの呼吸機能の低下を、**parkin** のミトコンドリア局在とフォーカス形成で評価した。1Gy 以上の急性照射でミトコンドリア酸化損傷を持つ細胞が検出され、線量依存的にその頻度が増加した。5Gy 以上の高線量急性照射では、細胞増殖が停止し 1 細胞当たりのミトコンドリア量は増加するが、ミトコンドリアの呼吸機能の亢進は観察されなかった。一方、1 回当たり 0.01 または 0.05Gy で 1 月間の長期分割照射（総線量 0.46 または、2.3Gy）では、ミトコンドリア量の増加と呼吸機能の亢進が観察された。この照射条件では、細胞内の抗酸化物質グルタチオン量が低下し、酸化還元（レドックス）制御異常による活性酸素量の増加によってミトコンドリア酸化損傷が誘導された。さらに、組織幹細胞のミトコンドリア酸化損傷について、ヒト神経幹細胞を用いて解析した。神経幹細胞は分化した神経細胞と比較して長期分割照射に抵抗性を示し、ミトコンドリア酸化損傷を誘導しないことを明らかにした。これらの結果は、急性照射と分割照射の照射法の違いや照射線量、細胞の分化度で、ミトコンドリアの放射線応答が異なることを示唆している。ミトコンドリア酸化損傷は、エネルギー生産の過程で副産物として発生する活性酸素が原因であり、抗酸化剤 N-アセチルシステインで活性酸素を除去することで、軽減することが可能である。

以上より、ミトコンドリア酸化損傷は、1Gy 以上の被ばくのトリアージを可能にする線量評価のための新たな生物学線量評価の指標として期待される。今後は、この指標を用いて、動物個体やヒトでの検証が求められる。ミトコンドリア酸化損傷は、単に線量評価だけでなく、放射線の影響に対する生物応答も反映していることから放射線影響の評価においても重要であると考えられる。

A. 研究目的

生物学指標を用いた放射線被ばく線量評価では、染色体異常の解析がゴールドスタンダードであり、1999年の東海村JCO臨界事故において被ばくした作業員の線量評価等に用いられている。この解析法では、血液の採取と血液細胞の増殖、分裂期細胞の固定など複雑な操作と時間を要するため、緊急時のトリアージのための線量評価には不向きであると考えられる。このため、専門的治療を必要とする1Gy以上の被ばくのトリアージを可能にする迅速でより簡便な評価方法の確立が求められている。放射線による生物学的標的はDNAと考えられており、DNA二重鎖切断は、染色体異常、細胞死の誘導などの放射線の悪影響の主な原因となる。被ばく線量を核DNAの損傷量で評価するヒストンリン酸化の解析は有用な手段の一つとして考えられるが、指標を組み合わせることによって、より高精度の線量評価が可能である。ミトコンドリアは、放射線適応応答、マイトファジー、バイスタンダード効果など様々な放射線応答に関与する。放射線照射後、ミトコンドリアでATPが合成され、損傷応答に必要なエネルギーを供給する。エネルギー生産の過程で発生する活性酸素は、発生源の近傍にあるミトコンドリアに酸化損傷を誘導する。E3ユビキチンリガーゼ parkin は、膜電位の低下した機能不全のミトコンドリアを認識し、選択的に分解するマイトファジーに関与する。

本研究では、放射線により発生する活性酸素の影響について、活性酸素の発生源であるミトコンドリアの酸化損傷が、被ばく線量評価のための指標として有効であるか

どうかを検討した。parkinのミトコンドリア局在で、酸化損傷によるミトコンドリアの機能低下を評価し、線量効果関係を検討した。急性照射と分割照射、組織幹細胞と分化した細胞でのミトコンドリアの放射線応答を比較した、さらに、抗酸化剤を用いた放射線防護効果について検討した。

研究方法

B-1. 用いた細胞と照射法

ヒト胎児肺由来正常二倍体線維芽細胞MRC-5、TIG-3は、財団法人ヒューマンサイエンス振興財団から購入し、フラスコ内で、 α -MEMにウシ胎児血清を加えた培養液中で、培養した。ヒトATM欠損細胞(AT5VIBA)とその相補細胞(AT5VIBA/ATM-wt)は、京都大学放射線生物研究センター小松教授より譲渡頂いた。これらの細胞は、RPMI1640にウシ胎児血清を加えた培養液中で、培養した。ヒト神経幹細胞 ReNcell VM Human Neural Progenitor Cell Line は、ミリポア社より購入し、神経幹細胞用の培養液に必要な増殖因子を添加し培養した。この神経幹細胞は、増殖因子を添加しないで培養することで、神経細胞に分化することを、神経細胞の指標の発現で確認した。

X線照射装置(日立、MBR-1505R2)を用いて、0.01~10Gyの急性照射(線量率0.49Gy/分)と、1回当たり0.01または0.05Gyの分割照射(線量率0.11または、0.49Gy/分)を1日2回、週5日で1か月の長期分割照射(総線量0.46または、2.6Gy)を行った。照射24時間後に、以下のミトコンドリアの放射線応答と酸化損傷の解析を行った。

B-2. 放射線によるミトコンドリア量、機能への影響の検討

蛍光色素染色試薬 MitoTracker Green FM は、ミトコンドリアの膜電位に関係なく染色され、ミトコンドリア量の検出が可能である。放射線照射後、この試薬で生細胞のミトコンドリアを染色した後、染色量をフローサイトメーターで定量してミトコンドリア量の変化を解析した。ウエスタンブロッティング法で、ミトコンドリア生合成を制御する転写因子 PPAR- γ co-activator-1 α (PGC1- α)の発現量を定量した。さらに、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Quantitative polymerase chain reaction, QPCR) で、核 DNA とミトコンドリア DNA(mtDNA)のプライマーでそれぞれの DNA を増幅し、核 DNA に対する mtDNA の比を測定して、mtDNA 量を定量した。

ミトコンドリアの機能については、ミトコンドリアの膜電位を検出する親油性、陽イオン性の蛍光色素 (5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) で染色した。JC-1 試薬は、膜電位の高いミトコンドリアに凝集し、凝集体はオレンジ色の蛍光色で観察される。一方、膜電位の低下したミトコンドリアは JC-1 単体として緑色で検出される。フローサイトメーターで、2 色の蛍光量をそれぞれ定量し、その比でミトコンドリアの膜電位を測定した。市販のミトコンドリア電子伝達系酵素の複合体 IV シトクロム c オキシダーゼ (Cox) の活性測定キットを用いて、550nm の吸光度の値の変化で、COX の活性を測定した。

B-2. 活性酸素の測定

ミトコンドリアに選択性を持つ MitoSOX™ Red 試薬で、ミトコンドリア由来の活性酸素スーパーオキシドアニオン (O_2^-)を検出した。2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)に対する酸化能で、細胞内の活性酸素量を定量した。活性酸素の無毒化に働く、細胞内抗酸化物質グルタチオンの量を市販の測定キットを用いて定量し、放射線による酸化還元 (レドックス) 制御機構への影響を検討した。

B-3. ミトコンドリア酸化損傷検出系の確立

膜電位の低下した機能不全のミトコンドリアは、parkin により標識され、選択的に分解される。このミトコンドリアのオートファジーであるマイトファジーにより、ミトコンドリアの質が保たれている。膜電位に依存して染色されるミトコンドリア染色試薬 MitoTracker Deep Red と parkin の二重染色で、健康なミトコンドリアと損傷を持つミトコンドリアをそれぞれ検出した。mtDNA の酸化損傷については、mtDNA と核 DNA をそれぞれ抽出した後、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) で DNA 酸化損傷指標である 8-oxoguanosine (8-OHdG) の量を定量した。もう一つの酸化損傷の指標である脱塩基部位 AP (apurinic/aprimidinic) site は、Nucleostain DNA damage quantification kit を用いて、定量した。

B-4. 組織幹細胞の低線量放射線影響の解析

神経幹細胞と分化した神経細胞で放射線によるミトコンドリア酸化損傷を parkin の免疫蛍光染色で比較検討し、組織幹細胞のミトコンドリアの放射線影響を検討した。

B-5 抗酸化剤 N-アセチルシステインを用いたミトコンドリア損傷軽減の検討

N-アセチルシステイン (NAC) は、システインを供給し細胞内のグルタチオン量を増加する。NAC と放射線の併用により、ミトコンドリア酸化損傷の誘導が抑制されるかどうかを parkin 抗体で免疫蛍光染色を行い、検討した。

B-6 倫理面への配慮

本申請研究では市販のヒト培養細胞を用いての解析であり、倫理委員会の審査は必要としない。

B. 研究結果

C-1. 放射線によるミトコンドリア量、機能への影響の検討

ヒト正常線維芽細胞 MRC-5、TIG-3 細胞に、急性照射または、分割照射を1か月間(長期分割照射)行い、照射から24時間後に、生細胞のミトコンドリアを MitoTracker Green FM で染色し、ミトコンドリア量の変化を検討した。細胞周期を解析し、5Gy 以上の高線量の急性照射では、細胞の増殖が停止することを明らかにした。ミトコンドリアの複製は、核 DNA の複製と同時に起こらず、放射線によって阻害されないことが報

告されている。このため、高線量照射後にミトコンドリアのみが複製され、1細胞当たりのミトコンドリア量が増加することを MitoTracker Green FM 染色(図1、上段)と QPCR 法を用いた mtDNA の定量により、明らかにした。さらに、ミトコンドリアの呼吸機能への影響について、細胞を JC-1 で染色してミトコンドリア膜電位を、また、ミトコンドリアの電子伝達系の複合体IVである Cox の活性を測定した。急性照射では、ミトコンドリア量の増加に伴う、ミトコンドリア膜電位の増加と Cox の活性の上昇は観察されなかった。一方、総線量 0.46 または、2.6Gy の長期分割照射では、持続的に細胞は増殖し、細胞周期停止は観察されなかった。ミトコンドリア量の増加は、急性

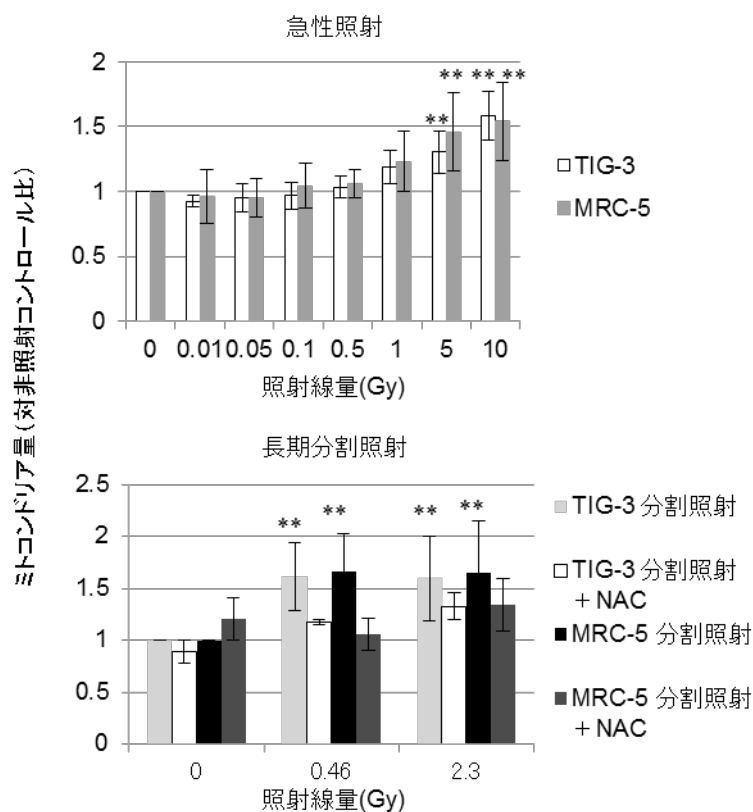


図1 放射線によるミトコンドリア量の変化
エラーバーで、標準偏差を示す。星印2つは有意水準5%で、非照射コントロールに比べて有意な差が認められたことを示す。

照射とは異なりより低い線量で、観察された(図1、下段)。また、長期分割照射で転写因子 PGC1- α の発現量が増加し、ミトコンドリアの生合成が活性化されることを明らかにした。さらに、ミトコンドリア量の増加に伴い、長期分割照射では、ミトコンドリア膜電位と Cox の活性が増加していることを明らかにした。ミトコンドリア量の増加は、分割照射と抗酸化剤 NAC の併用処理で抑制されることから、活性酸素がこの応答に関与することが示唆された(図1、下段)。

C-2.放射線による活性酸素の誘導

ミトコンドリアは酸素を消費し、ATP を産生する。このエネルギー生産の過程で一部の O_2 は、活性酸素スーパーオキシドアニオン($O_2^{\cdot-}$)に変換される。 $O_2^{\cdot-}$ は、ミトコンドリアのスーパーオキシターゼ (MnSOD) により過酸化水素に変換され、さらに、細胞内抗酸化物質グルタチンにより、無毒化される。しかし、グルタチン量の低下などの

レドックス制御の異常により、活性酸素は蓄積する。過剰な活性酸素は、DNA、脂質、タンパク質を酸化して、酸化損傷を与える。MitoSOX™ Red 試薬で、ミトコンドリアの O_2 を染色した後、蛍光量をフローサイトメーターで定量した。1Gy の急性照射3時間後に、活性酸素の増加が観察された。一方、長期分割照射では、グルタチオン量の低下と関連して、 O_2 が増加することを明らかにした。

C-3.放射線によるミトコンドリア損傷の誘導

放射線による $O_2^{\cdot-}$ の増加は、近傍に存在するミトコンドリアを酸化し、照射細胞のミトコンドリアに酸化損傷を誘導すると考えられる。健康なミトコンドリアを MitoTracker Deep Red で、膜電位が低下したミトコンドリアを parkin でそれぞれ区別して検出し、放射線によるミトコンドリア酸化損傷の程度を検討した(図2)。ミトコンドリアに局在する parkin はフォーカスを形成し、点状

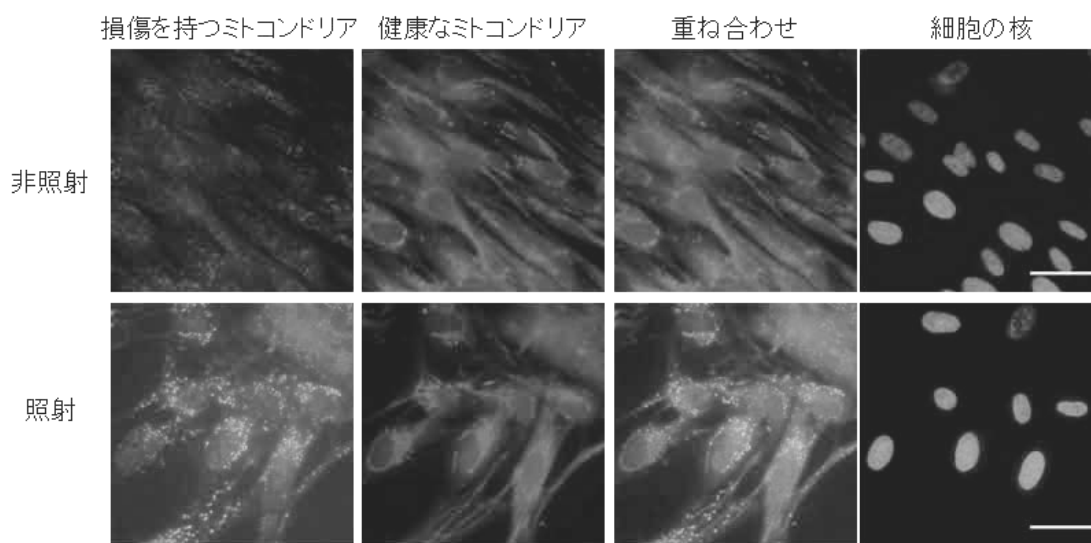


図2放射線によるミトコンドリア損傷の検出
スケールバーは、50 μ mを示す。

の parkin フォーサイとして観察された。低線量の急性照射 (0.4Gy 以下) では parkin フォーサイを持つ細胞の割合は非照射細胞と同程度であった。1Gy 以上の照射で、parkin フォーサイを持つ細胞は、統計学的に有意に検出され、線量依存的に増加することを明らかにした。ATM による DNA 損傷応答ができない放射線高感受性の ATM 欠損細胞では、1Gy 以上の照射においても、parkin フォーサイは観察されず、ATM が放射線照射後の parkin のフォーカス形成に関与することが示唆された。一方、分割照射では、照射期間が 21 日以上で、parkin フォーサイを持つ細胞の数が統計学的に有意に増加することを明らかにした。

mtDNA の酸化損傷については、DNA の酸化損傷の指標である脱塩基部位と 8-oxoguanosine (8-OHdG) の量を測定して検討した。非照射細胞の mtDNA と比較して分割照射した細胞の mtDNA に脱塩基部位と 8-OHdG

の量の増加が観察された (図 3)。放射線による mtDNA の酸化損傷は核 DNA と比較して多いことを明らかにした。

C-4. 組織幹細胞の低線量放射線影響の解析

放射線影響研究では、体内に長期間存在する組織幹細胞への影響を明らかにすることが重要であると考えられている。ヒト神経幹細胞と分化した神経細胞で、ミトコンドリアの放射線応答を比較検討した。MRC-5, TIG-3 と同様に、分化した神経細胞では、長期分割照射後 parkin のフォーカス形成が観察され、ミトコンドリアの酸化損傷が誘導されることを明らかにした。一方、神

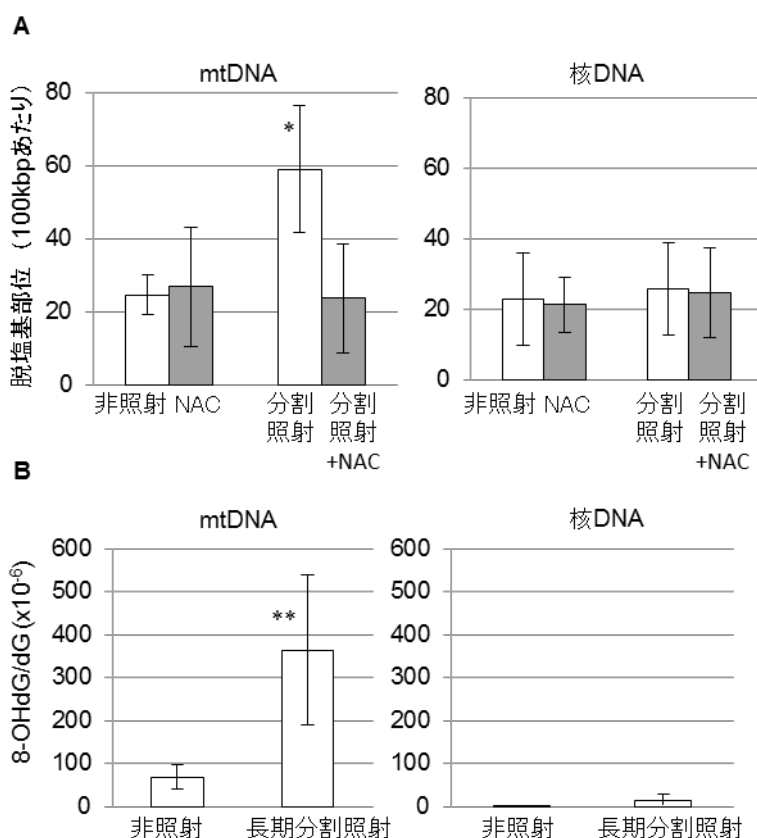


図3 放射線によるmtDNA酸化損傷
エラーバーで、標準偏差を示す。星印1つは有意水準1%で、星印2つは有意水準が5%で非照射コントロールに比べて有意な差が認められたことを示す。

経幹細胞は、長期分割照射に対して抵抗性を示し、活性酸素の発生やミトコンドリア酸化損傷が誘導されないことを明らかにした。

C-5 抗酸化剤 N-アセチルシステインによるミトコンドリア損傷の軽減

NAC は、グルタチオンの生成に必要なアミノ酸システインを供給し、細胞内のグルタチオン量を増加する。NAC による放射線防護効果を parkin のフォーカス形成で検討した。NAC 処理と放射線の併用で、放射線照射後の活性酸素量の発生と parkin のフォーカス形成は抑制された。このことから、NAC はミトコンドリア酸化損傷の軽減に有効であることを明らかにした。

C. 考察

放射線影響研究では、これまで核 DNA の損傷応答に焦点を当て解析が進められ、DNA 修復、細胞周期停止、細胞死の誘導などの放射線応答が明らかにされた。DNA 損傷量を指標としたヒストンリン酸化による生物学的線量評価は有用な手段と考えられるが、時間が経過した試料では、DNA 損傷は修復され消失するため、被ばく線量の把握は困難である。このため、DNA 損傷以外の放射線の痕跡を明らかにし、生物学的指標を組み合わせた線量評価の確立が重要であると考えられる。ミトコンドリアは、独自のミトコンドリア DNA(mtDNA)を持ち、核 DNA と同様に放射線損傷を受ける。mtDNA には、核 DNA が持つヒストンタンパクによる防御機構や 1 部の DNA 修復機構が働かないことから、DNA 修復効率が低いことが知られている。このため、放射線

による mtDNA 損傷は長期間残存することが予想され、被ばく線量を評価する指標として適していると考えられる。放射線照射後、ミトコンドリアの ATP 合成は活性化され、損傷応答に必要なエネルギーを供給する。エネルギー産生の過程で発生する活性酸素は、照射細胞に酸化ストレスを誘導する。本研究では、放射線による活性酸素の影響を、ミトコンドリア酸化損傷を指標に解析し、線量効果関係を検討した。ミトコンドリアの酸化損傷は、照射方法によって異なり、高線量の急性照射では、細胞増殖が停止し、1 細胞当たりのミトコンドリア量は増加するが、ミトコンドリア自体も放射線により損傷を受けるため、ミトコンドリアの呼吸機能の亢進は観察されなかった。ミトコンドリア酸化損傷は、1Gy 以上の照射で観察されることから、専門的治療を必要とする被ばくのトリアージに適していると考えられる。ATM 欠損細胞では放射線によるミトコンドリア酸化損傷は観察されないことから、ATM がこの機構に関与することが示された。一方、長期分割照射では、グルタチオンの低下によるレドックス制御異常により活性酸素が蓄積し、ミトコンドリア酸化損傷を誘導することを明らかにした。ミトコンドリアの活性酸素は、電子伝達系複合体 I (NADH:ユビキノロン還元酵素)と複合体 III (補酵素 Q-シトクロム c レダクターゼ) から放出される。抗酸化剤 NAC により、活性酸素の発生が抑制され、放射線によるミトコンドリア損傷を軽減することが可能である。以上のことから、ミトコンドリア呼吸機能の低下、ミトコンドリア酸化損傷、活性酸素量の増加、レドックス制御異常等の放射線による酸化ストレスの影響

を測定することで、より正確な被ばく線量の把握が可能であると考ええる。

核 DNA に含まれる遺伝子の割合は数%と考えられている。一方、mtDNA はほとんどが遺伝子で構成されるため、mtDNA の変異は、タンパク質の機能損失となり、ミトコンドリアの機能不全となる。ミトコンドリアの呼吸機能の低下は、活性酸素の発生を増加させる。過剰な活性酸素による酸化ストレスは、発がん、老化、様々な疾病（糖尿病、メタボリックシンドローム、心疾患、神経疾患など）の原因となることから、ミトコンドリア酸化損傷の解析は、線量評価だけでなく、放射線発がん、非がん影響評価においても重要であると考ええる。今後は、DNA 損傷とミトコンドリア酸化損傷を同時に検出し、より精度の高い線量評価法の確立が可能かどうかを検討する。生細胞、固定した細胞それぞれについてミトコンドリアを染色する試薬が市販されており、それらの最適な組み合わせを検討する。生細胞でミトコンドリアを染色する実験系では、固定の操作を必要とせず、より迅速な評価法の確立が期待される。

D. 結論

- ・急性照射では、1Gy 以上でミトコンドリア酸化損傷が検出され、線量依存的にその頻度が増加することを明らかにした。
- ・長期分割照射では、レドックス制御異常による過剰な活性酸素がミトコンドリア酸化損傷を誘導することを明らかにした。
- ・ミトコンドリア損傷はエネルギー代謝に伴う活性酸素が原因であり、放射線と抗酸化剤の併用で抑制することが可能である。
- ・神経幹細胞は放射線抵抗性を示すことを

明らかにした。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載

G. 研究発表

1.論文発表

(1) Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells. Cell Cycle (in press).

(2) Kamiya K, Sasatani M, Xi Y, Kajimura J, Kawamura T, Piao J, Masuda Y, Honda H, Kubo K, Mikamoto T, Watanabe H, Xu Y, Kawai H, Shimura T, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Zaharieva E. Overexpression of Rev1 promotes the development of carcinogen-induced intestinal adenomas via accumulation of point mutation and suppression of apoptosis proportionally to the Rev1 expression level. Carcinogenesis (in press).

(3) Shimura T. Targeting the AKT/cyclin D1 pathway to overcome intrinsic and acquired radioresistance of tumors for effective radiotherapy. Int J Radiat Biol. 2:1-5,2016.

2.学会発表

(1) Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K and Kunugita N. A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells. The 1st

international symposium of the network-type joint usage/research center for radiation disaster medical science – Scientific underpinning for restoration from a radiation disaster. 2017.2. P.59

(2) Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. Mitochondrial DNA damage responses in ATM- and NBS1-deficient cells. 第 59 回日本放射線影響学会 ; 2016.10. P.23

(3) 志村勉、笹谷めぐみ、河合秀彦、神谷研二、櫻田 尚樹. 低線量長期放射線照射におけるミトコンドリア由来活性酸素の蓄

積と酸化ストレスによる細胞周期制御機構への影響. 第 59 回日本放射線影響学会 ; 2016.10. P.24

(4) 加藤正尊、飯岡俊英、丸山里奈、澤井裕一、中村麻子、笹谷めぐみ、神谷研二、小林純也、小松賢志、志村勉 抗酸化剤 Tempol による放射線誘発の DNA 損傷抑制効果の検討. 第 59 回日本放射線影響学会 ; 2016.10. P.46

H.知的財産権の出願・登録状況
なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Miyake M., Nakai Y., Yamaguchi I., Hirata H., Kunugita N., Williams BB., Harold MS	In vivo radiation dosimetry using portable L-band EPR : On-site measurement of volunteers in Fukushima Prefecture, Japan	Radiation Protection Dosimetry	172	248-253	2016
Yamaguchi I, Sato H, Kawamura H, Hamano T, Yoshii H, Suda M , Miyake M, Kunugita N	L Band EPR tooth dosimetry for heavy ion irradiation	Radiation Protection Dosimetry,	172	81-86	2016
Mamoru Kato, Koichi Chida, Takashi Moritake, et.al	Direct dose measurement of patient during percutaneous coronary intervention procedures using radiophotoluminescence glass dosimeters., ,	Radiation Protection Dosimetry	doi:10.1093/rpd/ncw263		2016
Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J,	A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between				in press

Komatsu K, Kunugita N.	neural progenitor stem cells and differentiated cells. Cell Cycle				
Shimura T, Kunugita N	Mitochondrial reactive oxygen species-mediated genomic instability in low-dose irradiated human cells through nuclear retention of cyclin D1	Cell Cycle	15(11)	1410 -141 4	2016
Nakamura AJ, Suzuki M, Redon CE, Kuwahara Y, Yamashiro H, Abe Y, Takahashi S, Fukuda T, Isogai E, Bonner WM, Fukumoto M.	The causal relation between DNA damage induction in bovine lymphocytes and the Fukushima nuclear power plant accident. Radiation Research				in press
Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N.	Severe mitochondrial damage associated with low-dose radiation sensitivity in ATM- and NBS1-deficient cells	Cell Cycle	15(8)	1099 -1107	2016
Shimura T, Sasatani M,	Mitochondrial reactive oxygen	Oncotarge t	7 (3)	3559 -70	2016

Kamiya K, Kawai H, Inaba Y, Kunugita N.	species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in low-dose irradiated human fibroblasts				
Nakamura AJ, Suzuki M, Redon CE, Kuwahara Y, Yamashiro H, Abe Y, Takahashi S, Fukuda T, Isogai E, Bonner WM, Fukumoto M.	The causal relation between DNA damage induction in bovine lymphocytes and the Fukushima nuclear power plant accident	Rad Res.			accepted
Mamoru Kato, Koichi Chida, Takashi Moritake, et.al: Direct dose measurement of patient during percutaneous coronary intervention procedures using radiophotoluminescence glass dosimeters		Radiation Protection Dosimetry	doi:10.1093/rpd/ncw263		2016
Shimura T, Sasatani M,	A comparison of radiation-induced	Cell Cycle			in press

Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N	mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells				
Kamiya K, Sasatani M, Xi Y, Kajimura J, Kawamura T, Piao J, Masuda Y, Honda H, Kubo K, Mikamoto T, Watanabe H, Xu Y, Kawai H, Shimura T, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Zaharieva E	Overexpression of Rev1 promotes the development of carcinogen-induced intestinal adenomas via accumulation of point mutation and suppression of apoptosis proportionally to the Rev1 expression level	Carcinogenesis			in press
Shimura T	Targeting the AKT/cyclin D1 pathway to overcome intrinsic and acquired radioresistance of tumors for effective radiotherapy	Int J Radiat Biol.	2	1-5	2016
山口一郎、尾本由美子、原田美江子、栗原せい子、櫻田尚樹.	東京都豊島区の公園で線源が発見された事例への公衆衛生的な対応	日本放射線安全管理学会誌	15 (2)	186-192	2016;
山口一郎	放射性物質テロへの	保健医療	65(6)	569-	2016

	公衆衛生対応	科学		575	
茂呂田孝一，盛武敬，孫 略，石原隆宏，熊奈津代，村田聡美，山田貴大，岡崎龍史	患者被ばく線量低減に向けた DICOM RDSR（病院内医療用画像規格線量レポート）情報の収集.	Journal of UOEH（産業医科大学雑誌）	38（4）	325-335	2016

