

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 29 年度総括・分担報告書

研究代表者 櫻田尚樹

平成 30 (2018) 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

櫛田尚樹 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 31
山口一郎・三宅実・志村勉

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 51
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 58
盛武敬

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 84
志村勉

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 97

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 櫻田尚樹 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

- ・ オンサイトで計測できるように車載型とする場合の課題を検討した。低電磁界環境として電波シールドルームでは S/N が 2 倍程度向上した。このように電磁波シールドルームの利用でノイズが改善していたが、車載型のシールドルームを想定した場合、内部での電磁波吸収が不十分であると空洞共振によりノイズが増加しうることを確認した。この結果を踏まえ、車載可能なシールドテントの開発において内部での電磁波吸収にも配慮されることとなり、この課題の解決も図られることが期待される。
- ・ 紫外線の影響に関して、X band での高感度な測定では影響を与えうることが知られており、L band で切歯を用いることからその影響が懸念されるが、UVB だけではなく UVA でも保守的な想定でも太陽光で数十年分の曝露でないとトリアージに相当する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 UVA および UVB により信号が見えることがあると考えられ、今後、感度がより向上すると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ことも示唆された。
- ・ 線質による違いを確認し、中性子場での応答がほぼ混合 γ 線による応答で説明が付けられることを確認した。
- ・ 被災した動物(牛)の歯でも測定を試みた結果を解析し、今後の課題を整理した。Lband での検出は困難であるが X band では原発事故による放射線曝露を検出しうる可能性があると考えられた。

(2) 生体内 DNA 損傷レベルの測定

- ・ 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 アッセイデバイスの開発に関しては人工蛍光ビーズによる構造評価に加え、培養細胞を用いた構造評価、放射線照射細胞を用いた DNA 損傷モニタリング評価、さらにはヒト末梢血サンプルをもちいたデバイスの実用性について評価を開始し、実用化に向けての課題を整理した。

(3) Xバンド EPR による被ばく後抗酸化能の動態解析

- ・ 多数の一般市民が被ばくするような大規模放射線災害では、生物学的指標を用いた線量推定によるトリアージが不可欠である。これまでにいくつかの手法が開発されているものの、今現在、大規模放射線災害時に利用できるような高感度かつ高精度で簡便性・迅速性・経済性に優れたバイオドシメトリー法は存在しない。対策の頑強性と線量推計結果への信頼性を高めるためには、複数の手法を組み合わせた「線量推定システム」の構築が必要となる。「放射線照射後、ミトコンドリアの活性酸素種(ROS)産生が増加して細胞が酸化ストレス状態に陥る」ことが近年相次いで報告されているが、これらの研究は全て細胞レベルでの検討であり、生体での実験はほとんど行われていない。本研究ではトリアージの基準となる 1Gy 前後の被ばくが生体の抗酸化能に影響を与えるか検討を行

った。その結果、ヒトを対象とした臨床研究（線量既知の臨床 IVR 実施患者を対象としたもので、検査(放射線被ばく)前後の血液を採取し、酸化ストレス、DNA 損傷、その他の血液指標の変化を解析した）で 0.5～3 Gy 被ばく後 2～24 日で線量依存的に血液抗酸化能が低下することを明らかにし、血液抗酸化能の測定が線量推定法として有用であることを示した。さらに本研究では、計画被ばく者(医療目的で心臓カテーテル検査を受ける患者)を対象にした。その結果、検査後に DNA 損傷量の増加といくつかの指標の変動を見出した。

- ・ 本抗酸化能測定法と γ H2AX 法とを組み合わせることで、被ばく直後から 10 日後程度までのシームレスな線量推定が実現可能となる。引き続き、推定の正確性の担保はもとより、簡便かつ迅速で安価な実施に向けた研究開発が期待される。

(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

- ・ 放射線は核 DNA と同様に、ミトコンドリア独自の DNA(ミトコンドリア DNA; mtDNA)に損傷を与えるため、細胞核に加えて、ミトコンドリアは放射線の主な標的器官であると考えられている。mtDNA の修復効率には核 DNA と比べると低いことから、放射線の影響はミトコンドリアに顕著に現れることが予想される。
- ・ 放射線による DNA 損傷の修復にはエネルギーが必要である。放射線照射後のミトコンドリアの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は、発生源のミトコンドリアを攻撃し、酸化損傷を与える。被ばく後時間が経過した場合の線量評価の指標として、上記の DNA 損傷応答、活性酸素、ミトコンドリア損傷などが想定される。
- ・ ヒト培養細胞を用いた我々の解析から、1 Gy 以上の X 線照射でミトコンドリア損傷が観察されることを明らかにした。この結果から、ミトコンドリア損傷は、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。
- ・ ミトコンドリア損傷は、急性照射、慢性照射、分割照射など照射条件と細胞の分化度、放射線感受性別に、線量依存的に誘導されることを明らかにした。
- ・ DNA 損傷のセンサーである ATM は、放射線による核 DNA 損傷のシグナルをミトコンドリアに伝え、放射線応答における核とミトコンドリア間のクロストークに重要な働きを持つことを明らかにした。
- ・ ミトコンドリアの機能不全は、発がんに関与していることが知られている。ミトコンドリア損傷の解析は、単に放射線の被ばく線量の把握だけでなく、放射線影響の高感度検出という点においても重要であり、今後も継続した解析が必要であることを示した。

以上、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、本システムの社会実装が現実的なものになり得ることが検証されるとともに、今後のさらなる研究課題の方向性を示した。

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 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
吉井裕	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 主幹研究員
濱野 毅	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 室長
須田 充	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 主査
小川原亮	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 博士研究員
佐藤斉	茨城県立医療大学保健医療学部 教授
鈴木孝明	群馬大学 准教授
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
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
孫略	筑波大学 医学医療系 助教
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
渡邊純平	同仁グローバル
清永美樹	同仁グローバル

A. 目的

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」においては、原子力災害時における緊急被ばく医療体制の整備として、簡易な測定等による汚染の把握、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。大規

模な事故発生時における対象者の優先度を定める選別（トリアージ）のための線量評価に関する手法の確立は、解決すべき課題となっている。

トリアージの手法としては、細胞遺伝学的な手法がゴールデン・スタンダードであるが、その他の手法の開発も進められている。EUでは、様々な線量評価法を組み合わせ

せたツールの開発が進められている (Multibiodose)。しかしながら、多くの対象者に短時間で、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を検査する方法は未だに確立しておらず、質のよい結果を得るには複数の手法による方法を確立する必要がある。この課題に対し、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・保有しており、これまで、線量評価を事故現場で行うことを想定しフィールドでの測定の実用性 (Radiation Protection Dosimetry, 2016) や歯のエナメル質の厚みの影響 (Health Physics, 2017)、種類が異なる放射線への応答特性 (Radiation Protection Dosimetry, 2016) の検証を進めてきた。本研究は、この手法に追加して、新たな手法も組み合わせて原子力災害時等の高線量被ばく者の迅速なスクリーニング法開発の実現を目指すものであり、国内におけるこれらの技術を組み合わせた緊急時の線量評価の実施可能性を明らかにし、その方法を確立することを目標としている。このように本研究は、労災疾病臨床研究事業費補助金の研究課題のうちトリアージのための線量評価手法の確立に資することを目的としており、放射線業務従事者の被ばく線量の測定及び評価に関する研究推進の趣旨に合致したものであり今後の放射線防護技術の発展の観点からも意義のある研究であると考えられる。

本研究では 4 つの課題を実施したことから、以下にそれぞれの研究の目的を述べる。

1. 電子スピン法を用いた線量推計手法

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) 装置で計測するものである。

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 センター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られる。本研究は、この手法を緊急時のトリアージに実際に用いる際の課題を明らかにすることを目的として実施した。

2. 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

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、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た。この課題を克服するために、アッセイデバイスの開発を行った。特に、放射線照射した培養細胞を用いて Polydimethylsiloxane (PDMS) チップでの γ -H2AX アッセイが可能であるか、また放射線量に依存した DNA 損傷レベルが検出可能であるかの評価をおこなった。さらに、ヒト末梢血サンプルを用いて PDMS チップにおけるリンパ球分離の効率および DNA 損傷の検出評価を行った。

3. 抗酸化能や酸化ストレス度に着目した手法

一方、放射線と酸化ストレスとの関連は深く、放射線には直接作用(=直接 DNA 構成分子を電離し DNA 損傷を誘導する)と間接作用(=水分子を電離することで発生した活性酸素 ROS(Reactive Oxygen Species)が DNA を損傷させる)の 2 つの生物学的作用があることが古くから知られている。さらに近年の報告から、放射線照射後数時間から数日にわたり、ミトコンドリアからの ROS 産生量が増加して細胞が酸化ストレス状態に陥ることが知られるようになった。このように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。しかしなが

ら、これらの報告は全て細胞株を使用した実験であり、放射線照射後の「生体」でどのようなレドックスバランス(ROS と抗酸化能のバランス)の変化が現れるのかはほとんどわかっていない。

レドックスバランスは好気性生物にとって非常に重要である。至適な量の ROS は生体または細胞の生理的活動に重要な役割を果たす。しかし、ROS の増加や抗酸化システムの低下は酸化ストレスを誘導し、様々な疾患に繋がる。それゆえ、レドックスバランスは個人の生活習慣、食事、健康度の指標になりうると考えている。血液のレドックス状態(抗酸化能や酸化ストレス度)に関する論文は多数存在するが、そのほとんどは血漿または血清を対象としている。血液成分の残り 50%を占める血球(主に赤血球)のレドックス状態に関してはほとんど調べられていなかった。近年、Chaleckis は若年者と高齢者の赤血球中のメタボライトを LC-MS(Liquid Chromatography - Mass spectrometry)で測定し、還元型グルタチオン、NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide)、NADP⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)などのレドックス関連分子の量が両者間で大きく異なることを示した。これは、赤血球のレドックス状態が健康度や身体の状態を推し量る重要なマーカーとなりうる可能性があることを示唆している。

このような背景のもと、本研究ではマウス血液(全血)の抗酸化能を全く新しい電子スピン共鳴(ESR)スピントラップ法を用いて解析し、放射線被ばく後の「生体」のレドックスバランスの変化を評価し、新規バイオドシメトリ手法として有望であるかどうかの検証を試みた。また、被ばく後のレドッ

クスバランスの変化がリンパ球の DNA 損傷量の変化とどのように関連するかも検証した。さらに、計画被ばく者から採血し、線量指標となるバイオマーカーの探索を行った。

4. 放射線曝露の指標としてのミトコンドリア損傷

放射線による生物学的標的である DNA の二重鎖切断は、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。このため、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重要である。放射線は、核 DNA と同様に mtDNA に損傷を与える。mtDNA はヌクレオソーム構造を持たないことからヒストンタンパク質による防護効果が働かない、また、核 DNA と比較して DNA の修復効率が低いことから、DNA 損傷が残存するため、放射線の影響が顕著に現れることが予想される。

以上のことから、我々は、新たな生物学的線量評価の指標として、ミトコンドリアを想定している。放射線による DNA 損傷に対する細胞応答にはエネルギーが必要で、放射線は、ミトコンドリアのエネルギー生産（酸化的リン酸化）を活性化する。酸化的リン酸化は、酸素を消費して最終的に ATP を産生するが、その過程で一部の酸素から活性酸素が発生する。過剰な活性酸素は酸化ストレスとなり、発生源のミトコンドリアに酸化損傷を与える。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（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。この parkin に対する抗体を用いたタンパク質発

現量の定量と染色で、parkin のミトコンドリアへの局在とフォーカス形成を評価し、損傷を持つミトコンドリアの検出可能である。これまでヒト培養細胞を用いた我々の解析から、1Gy 以上の X 線急性照射 3 時間以降にエネルギー産生に伴うミトコンドリアからの活性酸素が増加し、その後、6 時間以降にミトコンドリアに損傷を誘導することを明らかにした（Shimura Cell Cycle. 16 (24):2345-2354, 2017）。

本研究では、被ばく初期を核の DNA 損傷で、被ばくから時間が経過した際にはミトコンドリア損傷を指標として、両者を組み合わせた放射線の被ばく線量を評価する方法の確立に取り組んだ。多くの指標を用いることで、より高精度の線量評価法の確立が期待される。

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とした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開発

a) 紫外線の影響の検証

本測定法は、上顎切歯を対象とすることから、紫外線の影響も受けることが研究計

画の審査でも指摘を受けた。本測定法の紫外線による影響を調べるために、それぞれ3本の歯にUV-Aをそれぞれ段階的に曝露させた。曝露後にL band EPR tooth dosimetryを行った。

b) 電磁波ノイズの影響を調べるために電磁波シールドテントを用いて、L band EPR tooth dosimetryを行った。

c) 高LET放射線の応答

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照射した。中性子は、Be(d,n)反応により生成させるとともに、照射する場の放射線特性を変えるために、鉛やポリエチレン、カドミウムを用いた場をつくり、その特性を把握すると共にそれぞれの場で放射した歯のL band EPR tooth dosimetryをおこなった、

d) 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ヒトの歯のエナメル質にX線を段階的に照射し、X band EPRで計測しバックグラウンドレベルを調べた。

e) 動物の歯の測定

被災動物の歯を非破壊的にL band EPRで計測するとともに歯科用タービンを用いてエナメル質を削り取り、追加照射法により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) 培養細胞を用いた γ -H2AXアッセイデバイスとしてのPDMSチップ上への細胞導入方法および固定効率の評価

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、比較的シンプルなV字微細構造加工を施したPDMSチップにリンパ芽球細胞が固定可能か検討した。また、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。これまでの本研究で効果的にリンパ球相当の人工蛍光ビーズを固定することができる構造が確立したことから、培養リンパ芽球細胞(TK6)をもちいて解析に十分な細胞数の固定が可能であるかを検討した。また、細胞の流路内への導入に関して、押し込み法、自然滴下法、さらには遠心法の効果を検討した。

b) 放射線照射培養細胞を用いたPDMSチップによるDNA損傷レベル解析

TK6細胞に、0, 1, 5 GyのX線を照射し、30分後に各サンプルをPDMSチップに滴下、流路内でパラホルムアルデヒド(PFA)による細胞固定を行った。その後、十分な洗浄を行ったのちに γ -H2AXに対する免疫蛍光染色を流路内で行った。なお、免疫蛍光染色は操作の簡便性を目的として、 γ -H2AXに対する一次抗体に直接蛍光色素が結合している抗体を用いる直接蛍光染色法で行った。染

色した PDMS チップは、蛍光顕微鏡にて観察を行い、細胞数および γ -H2AX 陽性細胞の検出を行った。

つぎに、より幅広い放射線線量評価が可能であるかを確認するために、培養細胞 TK6 に、0, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 Gy の X 線を照射し、同様の実験を行った

c) ヒト末梢血を用いた PDMS チップによる DNA 損傷レベル解析

緊急被ばく時のトリアージとしての PDMS チップを用いた γ -H2AX アッセイでは、微量の生体サンプルの解析を目指している。そこで、数マイクロリットルのヒト末梢血を PDMS チップに導入し、リンパ球の分離および γ -H2AX 解析が可能であるかを検討した。まず、放射線未照射のヒト末梢血サンプル 5 μ L に抗凝固剤である EDTA を加え、PDMS チップに滴下した。その後、PFA による固定、 γ -H2AX に対する免疫染色を行った。次に、リンパ球細胞の固定効率に対する赤血球の影響を検討するために、ヒト末梢血サンプル 5 μ L に EDTA と溶血バッファーを加え、PDMS チップでの γ -H2AX アッセイを行った。最後に、*ex vivo* で放射線照射したヒト末梢血サンプルを PDMS チップに滴下し、PDMS チップでの γ -H2AX に対する免疫染色を行った。

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

a) 全身被ばくマウスを利用した被ばく後の生体内レドックス等の解析

全身に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。7 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 線を線量率 0.88/分で照射した。付加フィルタは 0.2mmCu と 0.5mmAl を採用した。照射線量は 0, 0.5, 1, 2, 3Gy とした。血液(全血)の抗酸化能の測定には電子スピン共鳴(ESR)スピントラップ法を使用した。

照射直後と 1, 2, 4, 6, 9, 16, 24, 50 日後に、ヘパリンナトリウムが入ったエッペンチューブにマウス血液を採取した。採血にはアニマルランセットを使用し、可能な限り同一個体から連続採血することでマウス使用数の低減に努めた。採取した全血 100 μ L を新規スピントラップ剤 2-diphenylphosphinoyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole N-oxide (DPhPMPO) 20 μ L、生理食塩水 100 μ L と混合後、*tert*-butyl hydroperoxide (tBuOOH) 20 μ L を加えて反応を開始させ、室温で 30 分静置した。その後クロロホルム/メタノールを加えて振盪、遠心を行い、スピンドラクトが含まれる有機層を抽出して-80 $^{\circ}$ C のディープフリーザーで保存した。ESR 測定時、室温に戻して専用の扁平セルに封入し、以下の条件で測定した。マイクロ波周波数 9.422 GHz、マイクロ波強度 2 mW、中心磁場 332.0 mT、掃引幅 0.3 mT、掃引時間 4 分、時定数 0.3 秒。

測定原理:tBuOOH と血中のヘモグロビンとのフェントン反応によりラジカルが生成される。生成された tBuOOH 由来のラジカルは全血中の抗酸化物質と DPhPMPO の競合反応によって消去され、DPhPMPO と結合したラジカルが多いほど(=血中抗酸化能が低いほど)、大きな ESR シグナルとして観察される。

b) 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

全身に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。7 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 線を線量率 0.88/分で照射した。付加フィルタは 0.2mmCu と 0.5mmAl を採用した。照射線量は 0, 0.5, 1, 3, 5 Gy とした。照射から 1 時間後と 1, 3, 7 日後に、ヘパリンナトリウムが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 数のカウントにはバブリックドメインソフトの 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、本研究で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。

c) 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

心臓カテーテル検査を受け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。

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

a) 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、プラスチック内で、 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。

a-1) 放射線照射

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 か月間の長期分割照射 (総線量 0.46 または、2.6Gy) を行った。広島大学原爆放射線医科学研究所、放射線照射施設内の Cs-137 を線源とした低線量率照射装置を利用し、一日当たり、0.01Gy または、0.1Gy の線量で、4 日間照射した (総線量 0.04Gy または、0.4Gy) 照射 24 時間後に、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-1) 放射線によるミトコンドリア量、機能への影響の検討

ウエスタンブロッティング法で、ミトコンドリア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。細胞の抽出液を分画し、ミトコンドリア画分と細胞質、核画分に分け、parkin タンパク質の局在を検討した。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(O₂⁻)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 により標識され分解される。この選択的排除機構であるミトコンドリアのオートファジー (マイトファジー) により、ミトコンドリアの質は保たれている。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。

(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

本研究におけるヒト末梢血サンプルを用いた実験は、すでに茨城大学生命倫理規定に基づいた申請書を作成し、審査委員会による承認を受けているものである（承認番号 150401、研究課題名「新規放射線誘発 DNA 損傷モニタリングシステムの開発」）。また、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も承認を受けた。動物実験は産業医科大学動物実験管理規定にも則して行われた。

ヒト対象試験は社会保険直方病院で心臓カテーテル検査を受ける患者を対象とし、事前に社会保険直方病院倫理審査委員会より承認を受けた。患者には事前に研究の内容、副作用の可能性、匿名性の確保、不利益を被ることなくいつでも研究への参加中止を請求できることを説明し、書面でインフォームドコンセントを得た患者のみを対象とした。

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

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、以下の成果を得て、実用化に向けた課題を整理した。

1) オンサイトで計測できるように車載型とする場合の課題を検討した。院外でも測定を行うことにより、周辺での家電製品の使用や測定場所の電磁波強度が S/N と関係することを確認した。低バックグラウンド環境として電波暗室では S/N が 2 倍程度向上した。このように電磁波シールドルームの利用でノイズが改善したが、車載型のシールドルームを想定した場合、内部での電磁波吸収が不十分であると空洞共振によりノイズが増加しうることを確認した。この結果を踏まえ、車載可能なシールドテントの開発において内部での電磁波吸収にも配慮されることとなった。

2) 紫外線の影響に関して、X band での高感度な測定では影響を与えうるが、L band では、UVA でも保守的な想定でも太陽光で数十年分の曝露でないとトリアージに相当する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 UVA および UVB により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

を与えることも示唆された。

3) 被災した動物（牛）の歯でも測定を試みた結果を解析し、今後の課題を整理した。L band での検出は困難であり、『東日本大震災福島第一原子力発電所事故の被災動物の歯を用いた電子スピン法による被ばく線量評価法の確立』として公表しているデータ¹はより吟味が必要と考えられる一方で、X band では原発事故による放射線曝露を検出する可能性があると考えられた。この場合、有機物に由来すると考えられる native signal の除去やそのバックグラウンドレベルでの変動の把握が重要となる。

b)放射線照射培養細胞を用いた PDMS チップによる DNA 損傷レベル解析

PDMS チップ上で γ -H2AX に対する免疫染色が可能であることを確認するために、TK6 細胞に放射線を 0, 1, 5Gy 照射し、30 分後に PDMS チップに導入した。PDMS チップにパラホルムアルデヒド溶液および γ -H2AX に対する免疫染色用液を順次導入し、PDMS チップ上での免疫染色を行った。その結果、放射線照射サンプルにおいて高い γ -H2AX 陽性細胞が検出された。また、陽性細胞数は 5Gy 照射サンプルが最も高いレベルであった。その一方で、流路内全体の蛍光シグナルのバックグラウンドが非常に高く、免疫染色溶液を流路内から十分に排出するための遠心操作が必要であることが明らかとなった。今後、免疫染色反応の後に 2000rpm の遠心を 30 秒間行うこととした。次に、PDMS チップを用いた γ -H2AX アッセイによって、より幅広い放射線線量域の

線量評価が可能であるかを検討するために、0, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 Gy を照射した TK6 細胞の解析を行った。その結果、一部のサンプルについて流路内の閉塞が発生し、結果が得られなかったものの、解析が可能であった 0.2, 0.5, 2Gy のサンプルについては、線量依存的な γ -H2AX の上昇が認められた。

c)ヒト末梢血を用いた PDMS チップによる DNA 損傷レベル解析

ヒト末梢血を PDMS チップに滴下し、リンパ球細胞の固定効率の検討を行ったところ、EDTA 非添加サンプルは急速な血液凝固を生じ、チップ流路内に細胞が目詰まりしたが、EDTA 添加サンプルでは十分な流速を保ったまま導入することが可能であった。その一方で、TK6 細胞を用いたときと比較して、リンパ球固定構造へのリンパ球細胞の固定効率は 10%程度に低下していた (TK6 細胞では 30%程度の固定効率)。その理由として、血液に含まれる大量の赤血球がリンパ球細胞を押し出す形で流路内を流れていることが原因ではないかと考え、次に溶血バッファーを用いて赤血球の溶血を行った。その結果、溶血によって生じた大量の細胞膜成分などが流路内を閉塞することになった。そのため、ex vivo 照射した末梢血サンプルについても、PDMS チップ内での閉塞が発生し、線量評価実験を行うことが出来なかった。

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

1
<https://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/joint/produ>

1. 全身被ばくマウスを利用した被ばく後の生体内レドックス等の解析

被ばく直後にはいずれの線量でもコントロールと比較して有意な差は認められなかったが、被ばく後 2 日ではいずれの線量においてもコントロールより有意に抗酸化能が低下していた。0.5, 1 Gy では 6 日目まで同じ程度の抗酸化能低下が継続した。2, 3 Gy では 6 日目まで引き続き抗酸化能の低下が継続し、6 日目以降は回復に転じた。また、被ばく後 2~24 日は被ばく線量と抗酸化能低下の間に有意な相関関係が確認できた(相関係数 >0.9 ; $P<0.05$)。

さらに、この結果をもとに、カットオフ値(CV)、偽陽性率(FP)、偽陰性率(FN)、正診率(AC)を求めた。1 Gy の被ばくの有無を識別するとした場合、2~6 日の間では正診率が 80%以上となることがわかった。

なお、本実験は 2 名の実験者によって行われたが、結果はほとんど一致していた。

2. 抗酸化能測定における交絡因子の解析

抗酸化能は様々な疾患と関連し、生活習慣や運動等により変化することが報告されている。そこで我々が使用した測定法が放射線以外の因子によって影響を受けるか確認を行った。今回は血液成分濃度、強制水泳によるストレス、抗酸化薬の投与による影響、マウスの週齢による影響を評価した。

はじめに、血液と生理食塩水の混合比率(通常の実験では 100 μ L : 100 μ L)を変えて ESR シグナルがどのように変化するか解析した。その結果、血液の割合が高くなるほど

ESR シグナルが低下し、血液濃度とシグナル強度の逆数が直線関係を示した。このことから、ヘモグロビン濃度が 1/2 に減少あるいは 2 倍に増加してもラジカルの発生量にほとんど寄与しないことがわかった。つまり、血中の何かしらの成分によりラジカルが消去されていることが確定的となり、本実験系が全血抗酸化能を測定できていることがほぼ確実に断言できた。

次に、マウスを強制水泳させた後に抗酸化能を測定した。その結果、水泳の有無は抗酸化能測定の結果に影響しないことが示された。

次に、採取した血液にビタミン C または N-Acetyl-L-cysteine (NAC)を投与し、抗酸化能を測定した。その結果、シグナルを有意に減少させるにはビタミン C を 10mM、NAC を 30mM 加える必要があることがわかった(Fig.7)。正常マウスの血中ビタミン C 濃度が 40~60 μ M、システイン濃度が 20~30 μ M であることを考えると、正常範囲内の濃度であるビタミン C またはシステインはほとんど結果に影響しないことがわかった。さらに、人間での試験において、1 日のビタミン C 推奨投与量(成人で 2g)を投与しても最高血中濃度は約 0.4mM であるため、短期的なビタミン C サプリメントの服用も測定結果には影響を与えないと考えられる。しかしながら、一部のクリニック等でがん治療として行われている高濃度ビタミン C 療法では投与直後の最高血中濃度が 24mM に達することが報告されており、この場合は測定結果に影響を及ぼす可能性が十分にある。

また、preliminary な結果であるが、7 週齢(若齢)と 72 週齢(高齢)のマウスの抗酸化能

を比較したところ、有意差は認められなかった。

3. 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

マウスの全身に 0, 0.5, 1, 3, 5 Gy の X 線を照射し、照射後 1 時間, 1, 3, 7 日のリンパ球中の 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後 1 時間で 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、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。

4. DNA 損傷レベルの解析と抗酸化能の解析を組み合わせた線量推定法の提案

上記の結果から、 γ H2AX 法は被ばく直後から 1, 2 日以内の線量推定に適しており、抗酸化能法は被ばく後 2~10 日前後までの線量推定に適していると考えられる。よってこの 2 つの手法を組み合わせることで、被ばく直後から 10 日前後まで正確かつシームレスな線量推定が実現できると考えられる。

5. 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

5-1 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のうち、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。

5-2 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 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。

5-3 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最大用量 2000mg /日を参考に、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。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。

5-4 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 が形成され、それが血中や尿中に排出されることが示されている。

本研究では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。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。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 名だけ非常に大きな値を示した患者がい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。

5-5 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顕著な変化は認められなかった。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り、0.5 Gy 以上の全身被ばくにより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。

5-6 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。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。

5-7 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、SOD 活性、血液抗酸化能を解析した。

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た。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端を反映している可能性がある。

SOD とはスーパーオキシドディスムターゼの略で、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。ゆえに

SOD 活性とは、スーパーオキシド消去活性という意味である。検査前ではアスコルビン酸投与群の方が、SOD 活性が高くなっており、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。検査直後は検査前より SOD 活性が 10～20%上昇、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。

一方、ESR 法を用いた血液抗酸化能測定では、検査前後で抗酸化能の有意な変化は見られなかった。カテーテル検査は被ばく線量が低く、被ばく範囲も局所的であるためと考えられる。また、アスコルビン酸投与の有無による抗酸化能の変化も観察されなかった。これはマウス実験と照らし合わせても妥当な結果と考えられる。

5-8 被ばく前後における γ H2AX foci 数の変化

リンパ球中の γ H2AX foci 数を解析したところ、検査後に有意な foci 数上昇が認められた。さらに、検査後の foci 数と被ばく線量(インターベンショナル基準点における空気カーマ : AK (mGy))が正の相関を示した。これにより γ H2AX 法は局所低線量被ばくに対しても有用であることが示唆された。

一方で、検査前に foci 数が高い患者が数名存在するが、これはカテーテル挿入後(本格的な検査前)に採血を行ったため、カテーテル挿入時に使用した数秒の X 線照射によって上昇したと考えられる。

以上のように異なるパターンを示すことを明らかにし、両者を組み合わせることでより正確な線量推定が可能となることを見

出した

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

4-1. 放射線照射によるミトコンドリアへの影響解析

我々は、ヒト正常線維芽細胞 MRC-5、TIG-3 細胞を用いて、放射線によるミトコンドリアへの影響を解析した。照射条件は以下の 3 つの方法を用いた：急性照射、分割照射を 1 か月間（長期分割照射）、慢性照射（0.01Gy または、0.1Gy/day で4日間）。これまでの解析から、放射線照射後にミトコンドリアの生合成が促進され、細胞内のミトコンドリア量が増加することを明らかにした(Shimura, *Oncotarget* 7 (3):3559-70, 2016)。我々は、さらに、放射線によるミトコンドリアの呼吸機能への影響を解析した。JC-1 色素は正に荷電しているため、ミトコンドリアの膜電位に依存して局在し、膜電位を効果的にモニタリングすることが可能である。急性照射（0Gy から 10Gy）24 時間後の試料と非照射コントロールを比較して、JC-1 の染色に変化は見られなかった。同様に、急性照射でミトコンドリア複合体 IV シトクロム c オキシダーゼ(cytochrome c oxidase, COX)の活性変化は観察されなかった。一方、長期の分割照射では、最後の照射から 24 時間後に、ミトコンドリア膜電位の上昇、COX の活性化、細胞内の ATP 量の増加が観察された。このミトコンドリアの呼吸機能の活性化は、分割照射の間、細胞培養液に 1 mM の抗酸化剤 N-アセチルシステイン (N-acetyl-cysteine : NAC) を投与すると抑制された。これらの結果から、長

期放射線照射は、ミトコンドリアのエネルギー産生を活性化し、その過程には、活性酸素が関与することを明らかにした。

4-2 DNA 損傷応答の解析

放射線による DNA 損傷は、細胞の防御機構である DNA 修復により、修復される。DNA 修復を実行するためには、エネルギーが必要で、ミトコンドリアの呼吸が活性化され、エネルギーを供給すると考えられる。我々は、DNA 損傷応答と DNA 修復について、二重鎖切断 (DSBs: double strand breaks) の指標であるヒストン H2AX のリン酸化 (γ -H2AX) と組み換え DNA 修復タンパク質 Rad51 の DSBs への集積を検討した。低線量 (0.4Gy) 急性照射 24 時間後では、 γ -H2AX と RAD51 のフォーカス形成は観察されず、放射線が誘導する DSBs が修復されたことが考えられる。一方、同じ総線量の慢性照射と分割照射では、照射 24 時間においても、 γ -H2AX and Rad51 フォーサイが観察され、DNA 損傷応答が持続することを明らかにした。

4-3. 放射線による活性酸素の誘導

ミトコンドリアのエネルギー生産、酸化リン酸化では、酸素を消費するが、一部の酸素はスーパーオキシドアニオン(O_2^-)に変換され活性酸素が発生する。 O_2^- は、反応性が高く、毒性を持つため、細胞内のレドックス (酸化還元) 制御機構により無毒化される。しかし、過剰な活性酸素は酸化ストレスとなり、DNA、脂質、タンパク質を酸化して、酸化損傷を与える。放射線照射後の活性酸素量の変化を、ミトコンドリアからの O_2^- は MitoSOX™ Red 試

薬で検出し、蛍光量をフローサイトメーターで定量した。1Gy の照射 3 時間後からミトコンドリア由来の活性酸素が増加し、24 時間後に照射以前の状態に戻ることが示された。ミトコンドリアからの O_2^- はミトコンドリア呼吸鎖複合体 I (NADH:ユビキノン還元酵素) と III (補酵素 Q-シトクロム c レダクターゼ) から発生することが知られている。呼吸鎖複合体 I の阻害剤ロテノンと呼吸鎖複合体 III の阻害剤アンチマイシン A は、ミトコンドリアの電子伝達を阻害して活性酸素を発生させる。これらの阻害剤を用いて、放射線が誘発する活性酸素の生成機構を検討した。阻害剤のみ、放射線と併用させた両方の場合において、 O_2^- の増加が観察された。さらに、グルコースの代謝が O_2^- の増加に関与するかどうかを、グルコースの拮抗阻害剤 2-deoxy-D-glucose (2-DG) を用いて検討した。事前投与によって、放射線照射後の O_2^- の増加は観察されなかった。このことから、放射線による O_2^- の発生には、グルコース代謝が関与することを明らかにした。

4-4. 活性酸素によるミトコンドリア損傷の誘導

ミトコンドリアから発生する O_2^- は、近傍のミトコンドリア DNA を攻撃することが考えられる。ミトコンドリアの質を保つため、損傷を持つ機能不全のミトコンドリアはマイトファジーにより分解される。マイトファジーに関わる parkin (E3 ユビキチンライゲース) で染色し、膜電位の低下した機能不全のミトコンドリアを検出した。予想したように、ロテノン処理は、放射線照射と同様に、活性酸素の増加により parkin の

フォーカス形成を誘導した。しかし、アンチマイシン A では、活性酸素を増加するにも関わらず、parkin のフォーカス形成は誘導されなかった。また、アンチマイシン A は放射線誘発のミトコンドリア損傷を抑制することを明らかにした。以上のことから、アンチマイシン A によって、呼吸鎖複合体 III から発生する活性酸素は、ミトコンドリア損傷の誘導に関与しないことが考えられる。2-DG によるグルコースの代謝阻害では、放射線誘発の活性酸素量の増加はみられず、ミトコンドリア損傷の誘導も起きないことを明らかにした。以上の結果から、放射線による細胞の代謝、呼吸鎖複合体 I からの活性酸素の発生がミトコンドリア損傷の誘導に関与することを明らかにした。

4-5. 急性照射、慢性照射、分割照射によるミトコンドリア損傷の検討

急性照射、長期分割照射、慢性照射によるミトコンドリアへの影響解析を行った。総線量 0.04 と 0.4Gy とし、照射 24 時間後のミトコンドリア損傷を計測した。前述したように、1Gy よりも低い線量での急性照射では parkin フォーカスの形成は誘導されない。一方、慢性照射と分割照射では、0.4Gy の低線量の放射線により parkin で染色される細胞が増加することを明らかにした。放射線高感受であることか知られている DNA 損傷のセンサーである ATM を欠損細胞では、1Gy 以上の照射でも parkin のフォーカス形成が誘導されない。このことから、ATM が放射線による parkin フォーサイの誘導に関与することが示唆された。

一月間の長期分割照射期間におけるミトコンドリア損傷量の変動を parkin のフォ

ーカス形成を持つ細胞を指標に測定した。非照射コントロールの細胞では、31 日間の培養で、parkin のフォーカス形成は誘導されなかった。一方、分割照射では、21 日目(総線量 0.3 または 1.5Gy) から parkin のフォーカス形成を持つ細胞が観察された。ウェスタンブロッティング法を用いたタンパク定量実験においても、長期放射線照射後 parkin はミトコンドリア分画に蓄積することを明らかにした。以上の結果から、放射線誘発のミトコンドリア損傷は、照射条件、照射期間に影響を受けることを明らかにした。

4-6 核 DNA 損傷応答とミトコンドリアの放射線応答の相互作用

放射線照射後の核 DNA 損傷とミトコンドリア損傷の関係を明らかにするため、 γ -H2AX と parkin の染色により、放射線照射後の経時変化を検討した。1Gy の X 線照射後すぐに、 γ -H2AX は誘導され、DNA 修復と伴に、 γ -H2AX は消失した。その後、3 時間後からの活性酸素の増加の後の遅い時間に parkin フォーサイを持つ細胞が観察された。さらに、ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤 mito-TEMPO は、放射線照射後初期(1 時間後)の核 DNA 損傷は抑制できないが、照射 6 時間後では、核 DNA 損傷とミトコンドリア損傷の両方を抑制することを明らかにした。これらの結果は、初期の DNA 損傷は放射線の直接作用で、ミトコンドリアの酸化ストレスは、関与しないが、後期の DNA 損傷を誘導することを明らかにした。ATM の阻害剤 KU-55933 や ATM 欠損細胞では、放射線照射後の γ -H2AX と parkin のフォーカス形成が抑

制されることから、ATMは核DNA損傷の認識と核からミトコンドリアへの損傷シグナルの伝播において、重要な働きを持つことが示された。

上記の研究成果は、英文論文としてまとめ、雑誌 Cell Cycle に報告した (Cell Cycle. 2017;16 (24):2345-2354)。

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るとともに、将来、車載型とするために課題も整理した。また、紫外線の影響に関して、UVBやUVAは限定的でありトリアージ目的では大きな妨げとはならないことを確認するとともに歯科放射線診療だけではなく、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。さらに放射線の種類による応答の違いの知見を得て、本測定法の原理にも迫るためのデータが得られた。

この研究で明らかになった課題は解決が可能であると考えられ、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、本システムの社会実装が現実的なものになり得ることが検証された。

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

第2版PDMSチップを用いた今回の実験では、具体的な実験方法の確立を行うとともに、培養細胞TK6の放射線線量評価が0~5Gyの範囲で可能であることを示唆するデータが得られた。これは、本事業が目指す1~2Gyの被ばくの有無を評価するトリアージとしての有効性を強く支持するものである。今後、より幅広い放射線線量に対しても、PDMSチップを用いた γ -H2AXによる線量評価が可能であるかどうかを検討する必要がある。

次に、ヒト末梢血サンプルを用いたPDMSチップでの γ -H2AXアッセイでは、人工蛍光ビーズや培養細胞と比較して、リンパ球固定構造への固定効率が非常に低い結果となった。これは、リンパ球細胞自身の柔軟性が高く、固定構造をすり抜けてしまったことに加え、大量に含まれる赤血球細胞による押し出しの効果があつたと考えられた。また、溶血による赤血球の排除は、かえって流路の閉塞を発生させることも明らかとなった。赤血球はリンパ球細胞以上に柔軟性に優れていることから、今後は、溶血ではなく、十分な流路内の流速によって固定構造内を通過させるほうが適していると考えられた。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再検討する必要がある

と考える。

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

1. 全身被ばくマウスを利用した実験

全身被ばくマウスを利用した実験では被ばく後に血液抗酸化能が線量依存的に特徴的な変化パターンを示すことを世界で初めて明らかにした(論文投稿中)。また、 γ H2AX foci 数解析と抗酸化能測定とを組み合わせることで、被ばく直後から 10 日前後までシームレスな線量推定が可能になることを示した(特許出願中)。抗酸化能測定に必要な血液量は全血 100 μ L であり、 γ H2AX 測定に必要な血液量も中村らが本研究班で進めているデバイスを使用すれば全血 50 μ L 程度に抑えられる。トータル 150 μ L の採血は一般的な血液検査と比較しても極めて微量であり、指先採血で十分に対応可能である。これは大規模放射線災害の混乱下で線量推定を実施しなければならないことを考える上で、非常に大きな優位性であると考ええる。

しかし、未だ実験室ベースの研究であり、今後の実用化に向けた開発が必要である。また、抗酸化能が低下するメカニズムは現在不明であり、さらなる解析が必要である。

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にしている。平均被ばく線量が空気カーマ(=最大皮膚線量)で 474 mGy と比較的低いこと、局所被ばくであること、一定量の出血を伴うこと、一定量の造影剤(ヨード系)を血管内に投与することなどの条件を考慮する必要

がある。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。

4) ミトコンドリア損傷を指標にした生物学的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える。

放射線の生物学的標的である核 DNA 損傷の生物影響の解析が進められ、DNA 修復、細胞周期監視機構、細胞死の誘導などの DNA 損傷応答が明らかにされた。DNA 損傷応答を実行するためには、エネルギーが必要で、ミトコンドリア呼吸機能が活性化される。我々は、放射線照射によるミトコンドリアへの影響を解析し、ミトコンドリア膜電位の増加と COX の活性化によりミトコンドリアの呼吸機能が亢進することを明らかにした。ミトコンドリアの活性化の後、副産物として活性酸素量が増加し、ミトコンドリアに損傷を誘導する。

ミトコンドリアは、細胞内の活性酸素の

発生源である。呼吸により、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I と III から活性酸素が発生する。複合体 I では、活性酸素はミトコンドリア DNA があるマトリックスに放出される。一方、複合体 III からはミトコンドリア内膜から両側に活性酸素が放出される。我々は、呼吸の阻害のため、ロテノンまたは、アンチマイシン A を用いた。ロテノンによるミトコンドリア呼吸鎖複合体 I での電子伝達系の阻害により活性酸素が増加する。この活性酸素の増加により、ミトコンドリア損傷が誘導される。一方、アンチマイシン A によるミトコンドリア呼吸鎖複合体 III の阻害では、活性酸素が増加するにも関わらず、ミトコンドリア損傷は誘導されない。以上より、我々は、ミトコンドリア損傷の誘導には、呼吸鎖複合体 I からの活性酸素が関与することを明らかにした。

急性照射の放射線応答は一過性であるのに対し、長期分割照射では、慢性的な DNA 損傷応答が誘導される。DNA 損傷応答は、ミトコンドリアの呼吸機能を活性化する。副産物として持続的に発生する活性酸素は細胞内のグルタチオン量を低下させる。このため、抗酸化機能の低下による活性酸素の蓄積は、ミトコンドリア酸化ストレスを誘導する。以上のことから、急性照射と分割照射の照射条件の違いで、ミトコンドリアの放射線応答が異なることを明らかにした。

神経幹細胞を用いた解析から、高い DNA 修復効率により、放射線によるミトコンドリア損傷も起こらないことが示された (Cell Cycle 16 (6):565-573, 2017)。神経幹細胞を増殖因子の添加なしで培養し、分化誘導した神経細胞では、繊維芽細胞と同様に、持続的な DNA 損傷応答がミトコンドリア

損傷を誘導することを明らかにした。このことから、残存する DNA 損傷が DNA 損傷応答を誘導し、ミトコンドリアに損傷シグナルが伝わり代謝活性化され、活性酸素の発生がミトコンドリアに損傷を誘導することが考えられる。

ATM は、ミトコンドリアのマイトファジーにも関与する。ATM の欠損は、マイトファジーの消失、ミトコンドリア機能不全による持続的な酸化ストレスを誘導することが ATM 欠損マウスの解析により明らかにされている。ATM 欠損細胞では、放射線照射後のミトコンドリアの活性化や活性酸素の増加、parkin のフォーカス形成が観察されない。ミトコンドリアの放射線応答が機能しないため、ミトコンドリアのフラグメンテーションが観察され、細胞死が誘導される (Cell Cycle 15(8):1099-1107, 2016)。結果として、ATM 欠損細胞では、放射線に高感受性を示す。

ATM は、放射線照射後の核、ミトコンドリア間のクロストークに関与する。核 DNA 損傷によって、ATM は活性化され、DNA 損傷シグナルを標的分子に伝える。ATM は細胞内の AMP/ATP 量を監視する AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化や peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α (PGC1 α) の発現誘導を介して、ミトコンドリアの生合成の制御に関与する。活性酸素は、エネルギー代謝の副産物として発生する。通常の細胞では、放射線照射後の活性酸素の増加が観察されるが、ATM 欠損細胞では、活性酸素の変動は観察されない。mito-TEMPO によるミトコンドリアの酸化ストレスの除去により、放射線照射後の遅い時期に観察される核 DNA 損傷

は抑制される(Cell Cycle. 2017;16 (24):2345-2354)。

放射線によるミトコンドリア損傷は、酸化DNAの指標である8-OHdGの蓄積で観察される。mtDNAの変異は、呼吸機能の低下となり、ミトコンドリアからの活性酸素を増加させる。ミトコンドリアの機能低下は細胞のがん化に寄与し、多くのがん細胞で、正常細胞とは異なるエネルギー代謝異常が報告され、がん細胞の増殖能獲得や低酸素状態での細胞増殖の適応に関与している。また、ミトコンドリア酸化ストレスは、がんの微小環境に影響を与え、がん細胞が生育しやすい環境を形成することが考えられる。放射線はミトコンドリアにどのような影響を及ぼし、放射線発がんに関与するのかを理解明らかにすることは、ヒトの放射線による健康影響を理解する上で重要である。核DNA損傷とミトコンドリア損傷は、1つの試料で同時に検出を行うことが出来るため、染色に必要な数時間でこれらの指標の評価が可能であり、より迅速な評価法の確立が期待される。緊急被ばく時のトリアージのための線量評価法の確立は、早急に検討が必要な課題であり、本研究で得られた成果に対する社会への貢献は大きい。このため、今後も放射線によるミトコンドリアへの影響について、継続した解析が必要である。

5) バイオ・ドシメトリーの意義

バイオ・ドシメトリーには、過去の曝露の確認だけでなく、これまでの研究で示されたように生体の応答が確認できる利点があ

る。

過去の曝露の確認に関しては、1987年度～1990年度にかけて、奥羽大学・歯学部の島野 達也教授により個人の生涯線量計としての歯の検討(研究課題番号:62440078)と題する研究が科研で実施された。この研究では、生涯線量計としての歯について検討し、医療被曝の実態についても評価していくとしていた。

この研究は、生涯で受ける程度の比較的小さい線量の検出を目標としたものであり、バイオ・ドシメトリーでの新しい展開を目指したものだとも考えられる。その後の展開としては、2000年1月にIsotope newsに尾内能夫先生が、自身の抜けた歯を保存しており、それを用いた線量推計を望んでおられることを書かれ、それを讀まれた岩崎先生がEPR測定法で線量を推計することにもつながった。尾内先生は、医学物理分野で仕事をされ、Ra-226を扱うことで相当量の放射線を受けられており、自身の推計値とEPR測定法との比較を望まれたのである。²

このエピソードは過去の曝露を調べることができることを物語っている。平成10年8月31日付、基安発第21号となる労働省労働基準局安全衛生部長から都道府県労働基準局長あての通達「放射線による被ばく事故防止の徹底について」においても被ばく線量の測定の徹底が示されている。この方法は、モニタリングが不十分であった例に対しても曝露した線量に関して何らかの情報を与えるかもしれない。

線量に加えた情報として有用と思われる

² IWASAKI M, MIYAZAWA C, CHIDA T, TAKAHASHI F, ONAI Y. Dental ESR Dosimetry of a Medical Physicist Who Received

Occupational Radiation Exposure for Almost 40Y. Health Physics 83(4) 534-538(2002)

のは、生体の防御反応である。バイオ・ドシメトリーでは、放射線により生体が受けたダメージだけではなく、その回復の状態や回復能力に関係した情報も得られることが期待される。やむを得ず比較的高い線量を受けた場合に、体がそれに対応していることのデータを確認することが放射線に曝露した方に役立つかもしれない。

5) 線量評価で留意事項

事後的な線量評価において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っ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。これはタイプ 1 のエラーであり、バックグラウンドの変動の制御にも依存する。このためどの程度の曝露を見逃さずに見つけるかと同様に、バックグラウンドの変動の程度を明らかにしておくことが、その測定法の限界の理解に有用であると考えられる。

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。このように、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、本システムの社会実装が現実的なものになり得ることが検証されるとともに、今後のさらなる研究課題の方向性を示した。

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

リンパ球分離および γ -H2AX アッセイデバイスとしての PDMS チップの開発を継続して行った。培養細胞を用いた実験では、線量評価デバイスとしての有用性が証明され、緊急被ばく時における「現場」での線量評価が可能であることが示唆された。その一方で、血液サンプルから十分なリンパ球を固定分離することはできず、今後の改善課題が明確となった。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。以上、本研究結果もトリアージのための総合的線量評価手法の確立に大きく貢献したといえる。

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

本研究はトリアージの基準となる 1Gy 前後の被ばく後の生体の血液抗酸化能が線量依存的に変化することを、

ESR を用いたスピントラップ法により世界で初めて明らかにした(論文投稿中)。さらに、 γ H2AX 法と抗酸化能測定を組み合わせることにより、被ばく直後から 10 日後程度までシームレスな線量推定が実現できることを示唆した(特許出願中)。今後の基礎研究・技術開発により、より高精度で高感度、迅速、安価、簡便なシステムの構築を目指して行きたい。

さらに、本研究では計画被ばく者(医療目的に心臓カテーテル検査を受ける患者)を対象に検査(放射線被ばく)前後の血液を採取し、酸化ストレス、DNA 損傷およびその他の血液指標がどのように変化するか解析した。その結果、検査後において DNA 損傷量の増加といくつかの指標が変動することを見出した。このことから、 γ H2AX 法は局所低線量被ばくに対しても有用であることが示唆され、医療被ばくや放射線従事者被ばくを管理、測定、把握する上で重要な指標になりうることを考えられた。

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

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。また、以下のことを明らかにした。

- ・長期分割照射では、より低線量で、レドックス制御異常による活性酸素が蓄積し、ミトコンドリア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(呼吸鎖複合体 I から発生する活性酸素)が原因で、放射線と抗酸化剤の併用で抑制することが可能である。

- ・放射線照射後の核、ミトコンドリア間の相互作用に、ATM が重要な働きを持つことを明らかにした。

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。また、中間評価において有益なコメントを下さった評価者にも感謝申し上げます。

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・フラッド教授には、この研究を継続的に支援下さっておりますことにも感謝いたします。また、セミナーへの参加者にも感謝申し上げます。平成 30 年 2 月 23 日に開催した本研究の成果発表会で専門家としてご講演いただいた岡山理科大学の豊田新先生と量研機構放射線に学総合研究所の数藤由美子先生やご参加下さった皆様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

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Umakoshi M., Yamaguchi I., Hirata H., Kunugita N., Williams B., Swartz H., Miyake M. In vivo Electron Paramagnetic Resonance Tooth Dosimetry: Dependence of Radiation-induced Signal Amplitude on the Enamel Thickness and Surface Area of ex vivo Human Teeth., *Health Physics*, 113(4):262-270, 2017
- 2) Sun L, Moritake T, Ito K, Matsumoto Y, Yasui H, Nakagawa H, Hirayama A, Inanami O, Tsuboi K. Metabolic analysis of radioresistant medulloblastoma stem-like clones and potential therapeutic targets. *PLoS ONE*. 12(4). e0176162. 2017.
- 3) 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*. 187(5):630-636, 2017.
- 4) 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 EK, Kamiya K. 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*. 38(5):570-578, 2017.

- 5) 志村勉、櫻田尚樹 ミトコンドリアの放射線応答と放射線発がんへの影響 *放射線生物研究* 2017;52:183-193.
- 6) 盛武 敬, 茂呂田 孝一, 人見 剛: 実測法と推定法による脳血管内治療患者の被ばく線量評価 ~生物学的線量反応関係解明への応用可能性~. *放射線生物研究*, 52 (4), 385-401, 2017

2. 学会発表

- 1) Sun L, Inaba Yo, Sato K, Hirayama Ak, Tsuboi K, Okazaki Ry, Chida Ko, and Moritake Tak, Changes in blood antioxidant capacity after irradiation: A novel biodosimetry method. The 8th Annual Meeting of the International Society of Radiation Neurobiology. International Congress Center EPOCHAL TSUKUBA. Ibaraki. Japan. February 9-10, 2018
- 2) Shimura T and Kunugita N. Radiation-induced mitochondrial damage in neural progenitor stem cells and differentiated cells. The 8th Annual Meeting of the International Society of Radiation Neurobiology. 2018;2. P.25
- 3) Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, 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.: 2017;.2. P.59.
- 4) Nakamura AJ, Suzuki M, Redon CE, Kuwahara Y, Yamashiro H, Abe Y, Takahashi S, Fukuda T, Isogai E, Bonner WM, Fukumoto M. The Causal Relationship between DNA Damage Induction in Bovine Lymphocytes and the Fukushima Nuclear Power Plant Accident. 2nd International Symposium of Quantum Beam Science at Ibaraki University; 2017.12.8-10, Ibaraki, Japan.
 - 5) Nakamura AJ, Tetsuka R, Takahashi K, Tamura T, Suzuki T and Hirayama R. Evaluation of novel radioprotective drug and development of DNA damage monitoring micro-nano device for triage of radiation exposure. 63rd Annual international meeting Radiation Research Society; 2017.10. 15 - 18, Cancun, Mexico.
 - 6) Miyake M, Nakai Y, Yamaguchi I, Hirata H, Kunugita N and Swartz HM. In-vivo tooth dosimetry using a deployable L band EPR spectrometer. International Conference on Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy and Imaging of Biological Systems (EPR-2017); 2017.7.16-22:Morgantown, WV, USA.
 - 7) I. Yamaguchi, Y. Nakai, M. Miyake, N. Kunugita. Influence of Ultraviolet Rays in In Vivo EPR Tooth Dosimetry. ISMAR 2017; 2017.7.23-28, Québec, Canada.
 - 8) Yamaguchi I, Kunugita N, Shimura T, Okuda H, Goto Y, Svendsen E, Orita M, Hayashida N, Fukushima Y and Matsuda N. Risk communication issues to be solved -How should we seek a research question? -. The 1st International Symposium of the Triangle Project with Hiroshima University, Nagasaki University and Fukushima Medical University - Scientific Underpinning for Restoration from a Radiation Disaster ; 2017.2.21- 22. Hiroshima, Japan.
 - 9) 中村麻子 ヒストンH2AXのバイオロジー:DNA 損傷修復から上皮間葉葉転換まで,第 5 回ヒストンバリエーション研究会 ; 2018.2. 10, 首都大学東京, 八王子 (invited talk)
 - 10) 稲葉洋平、孫略、佐藤圭創、平山暁、盛武敬、千田浩一：血液抗酸化能を指標とした放射線被ばく線量の推定、第 23 回日本集団災害医学会総会・学術集会、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市、2018 年 2 月 1 日～3 日
 - 11) 孫略、稲葉洋平、佐藤圭創、平山暁、岡崎龍史、坪井康次、千田浩一、盛武敬：電子スピン共鳴法を用いた被ばく後の血液抗酸化能レベルの測定、茨城大学理学部公開シンポジウム(第 11 回 Quantum Medicine 研究会、茨城大学重

- 点研究講演会)、茨城大学理学部 K 棟
インタビュースタジオ、茨城県水戸市、
2018 年 1 月 28 日
- 12) 山口一郎、樺田尚樹. 放射線緊急時におけるトリアージのための生体内の歯を用いた線量評価手法の検討. 日本公衆衛生学会第 76 回総会 ; 2017.10.31-11.2 ; 鹿児島. 同抄録集 p. 595.
- 13) 山口一郎、三宅 実、中井 康博、志村勉、樺田尚樹. 放射線緊急時におけるトリアージとしての L band EPR tooth dosimetry. 日本放射線影響学会第 60 回大会 ; 2017 年 10 月 25 日-28 日、千葉. 講演要旨集. P83
- 14) 山口一郎. 放射性物質の環境放出への対応を想定した訓練シナリオ-医療用放射性核種を想定した事例-. 日本放射線事故・災害医学会 第 5 回年次学術集会. 2017 年 9 月 16 日、東京. 抄録集
- 15) 山口 一郎. 放射性同位元素使用施設等の規制見直しの概要. 放射線管理フォーラム「医療機関にある線源の防災とセキュリティ対策を具体的に考える」. 第 73 回日本放射線技術学会総会学術大会 ; 2017 年 4 月 13 日-16 日、横浜. 日本放射線技術学会総会 73 回学術大会予稿集. P.123(2017.)
- 16) 孫略、稲葉洋平、佐藤圭創、平山暁、坪井康次、千田浩一、盛武敬:ラジカル消去能を指標とした被ばく線量推定、第 56 回電子スピンサイエンス学会年会、東京工業大学大岡山キャンパス、東京都、2017 年 11 月 2 日~4 日
- 17) 孫略、稲葉洋平、佐藤圭創、平山暁、坪井康次、千田浩一、盛武敬:電子スピン共鳴法を用いた被ばく後の酸化ストレスレベルの測定、日本放射線影響学会第 60 回大会、京葉銀行文化プラザ、千葉県千葉市、2017 年 10 月 25 日~28 日
- 18) 孫略、稲葉洋平、佐藤圭創、平山暁、坪井康次、千田浩一、盛武敬:被ばく影響の測定、平成 29 年度若手放射線生物学研究会専門研究会、東京大学アイソトープ総合センター、東京都文京区、2017 年 9 月 2 日~3 日
- 19) 孫略、五十嵐友紀、川崎祐也、李云善、河井一明、佐藤圭創、平山暁、坪井康次、盛武敬:虚血性心疾患患者に対する血中脂質ラジカル消去能測定と関連因子の同定、第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会、つくば国際会議場、茨城県つくば市、2017 年 6 月 28 日~29 日
- 20) 孫略、稲葉洋平、佐藤圭創、平山暁、坪井康次、千田浩一、盛武敬:血中脂質ラジカル消去能を指標とした放射線影響測定、第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会、つくば国際会議場、茨城県つくば市、2017 年 6 月 28 日~29 日
- 21) 志村勉.ATM が制御する核とミトコンドリアの放射線応答 第 60 回日本放射線影響学会 ; 2017.10. P.91
- 3.その他
- 1) 山口一郎 電子スピン共鳴法を用い

た線量推計法開発, 平成 29 年度労災
疾病臨床研究事業の成果報告会, Feb
23, 2018, 国立保健医療科学院, 和光、
埼玉.

- 2) 中村麻子 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, 平成 29
年度労災疾病臨床研究事業の成果報
告会, Feb 23, 2018, 国立保健医療科学
院, 和光、埼玉.
- 3) 盛武敬 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, 平成
29 年度労災疾病臨床研究事業の成果
報告会, Feb 23, 2018, 国立保健医療科
学院, 和光、埼玉.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 4) 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
出願人：産業医科大学、筑波技術大学、東
北大学

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

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

- ・ オンサイトで計測できるように車載型とする場合の課題を検討した。電磁波シールドルームの利用でノイズが改善したが、車載型のシールドルームを想定した場合、内部での電磁波吸収が不十分であると空洞共振によりノイズが増加しうることを確認した。この結果を踏まえ、車載可能なシールドテントの開発において内部での電磁波吸収にも配慮されることとなった。
- ・ 紫外線の影響に関して、**X band** での高感度な測定では影響を与えうるが、**L band** では、**UVB** だけでなく **UVA** でも保守的な想定でも太陽光で数十年分の曝露でないとトリアージに相当する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 **UVA** および **UVB** により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ことも示唆された。
- ・ 高 **LET** 放射線曝露に対する応答のうち中性子による応答は、中性子場の混合 γ 線の寄与が大きいと考えられた。
- ・ 被災した動物(牛)の歯でも測定を試みた結果を解析し、今後の課題を整理した。**L band** での検出は困難であるが **X band** では原発事故による放射線曝露を検出しうる可能性があると考えられた。

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

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いる。

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、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。ダートマス大学で新しく開発されている装置は、さらに改良が進められており小型化が達成されている。

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これまでの本研究での示唆されて

いる。

さらに事故などの放射線曝露への対応として補償のあり方が社会的な課題となっている。この課題に関しては、眼の水晶体の線量限度の引き下げが日本でも見込まれており、線量限度を担保していても、水晶体混濁のしきい値を超えることが想定される事態となっている。また検査法の発展により、自覚的な症状を有しないサブ・クリニカルな変化しての水晶体混濁も水晶体の後方散乱光強度により検出可能となっており、加齢と共に白内障の罹患率が高くなることから、その公平な補償における放射線曝露の把握が課題になり得るとも考えられ、その手法として電子スピン共鳴法の活用も議論されている¹。

以上の状況を踏まえて、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これまでの結果を踏まえてさらに検討した。

B. 研究方法

1) 紫外線の影響の検証

本測定法は、上顎切歯を対象とすることから、紫外線の影響も受けることが研究計画の審査でも指摘を受けた。本測定法の紫外線による影響を調べるために、それぞれ

¹ Jeffery CJ, Clark SM, Pinks TR, Stokes RP J. A proposed method for retrospective eye dose assessments for the purposes of resolving

cataract compensation claims. Radiol Prot. 35(1):229-33. doi: 10.1088/0952-4746/35/1/229. Epub 2015 Feb 19.

3本の歯にUV-Aを段階的に曝露させた。曝露後にL band EPR tooth dosimetryを行った。また、UV-Bの曝露も追加的に行った。

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)。UVBに関しては、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、20mmとしたので、この装置でのUVBの露光量は4212 mJ/cm²になる。

UVAに関しては、UVA用のミラーモジュールUVAとバンドパスフィルタLX0320を用いて、UV-Aの紫外線を得た。ロッドレンズを用いた照射野のサイズを20mmとしたので、この装置でのUVAの露光量は約8200mJ/cm²になる。太陽光と比較した場合、JISの基準太陽光(JISの基準太陽光は、夏の日中の光量を基準)の分光放射照度データとLAX-103を比較するために、UVAの波長315~400nmで積算(台形法)してみると、LAX-103の方がおおよそ11倍くらい高い値になる。

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150kV、管電流4mA、フィルタを0.1mmの銅と0.3mm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1に示す。

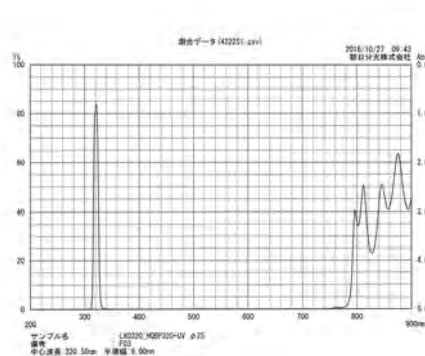


図1a. 照射した紫外線(UVA)の波長分布

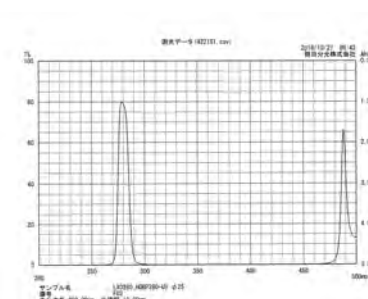


図1b. 照射した紫外線(UVB)の波長分布

2) 高LET放射線の応答

高LET放射線として量研機構放射線医学総合研究所のNASBEEを用いて中性子を日本人の臼歯に照射した。中性子は、Be(d,n)反応で得た。照射は日本人の健常な臼歯を対象とし(N=11)、まずポリエチレンのスラブのファントムを用いて行った(N=6)。

その後、図2に示すような条件で、照射する場の放射線特性を変えるために、鉛やポリエチレン、カドミウムを用いた場をつくり、その特性を把握すると共にそれぞれの場で放射した歯のL band EPR tooth dosimetryをおこなった。またフェーディングの影響を調べるために照射終了直後か

らの測定を行った。昨年度の計測では照射室内が中性子照射により放射化したため照射直後に照射室に入室できず、減衰を待つ必要があった。今年度は照射口を塞いで照射をターゲット付近で行うことで、室内への中性子量の漏えいを小さくし、照射直後から照射室に入室できるようにした。



図 2 a. ターゲット近傍での室内での照射でのγ線量の計測

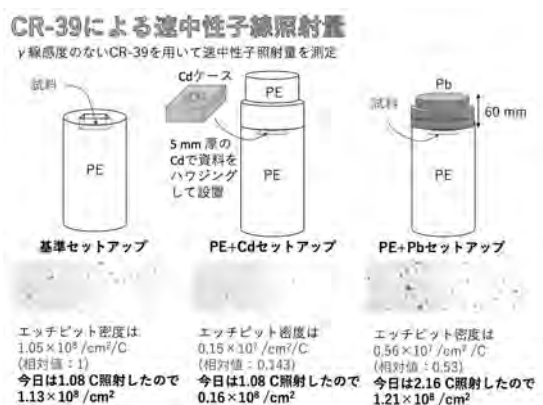


図 2 b. ターゲット近傍での室内での照射での中性子線量の計測

3) シールドテントを用いた測定

1GHz 程度の電磁波に対して 40dB 程度の電磁波シールド能力を持つシールドテントを用いて、L band tooth dosimetry を行

い、信号ノイズ比を計測した。測定は電波シールドルーム近傍の低電磁界レベルと思われる空間でも行うと共に、シールドテントにグラウンドを設置した場合やシールドテント内に電波吸収体を設置した場合とも比較した。

4) 動物の歯の測定

被災動物の歯を非破壊的に L band EPR で計測するとともに歯科用タービンを用いてエナメル質を削り取り、追加照射法により X band EPR で計測した。測定の条件は、最初の非破壊的な L band での計測は、掃引幅 2.5 mT、掃引時間 30 s、掃引回数 20 回、20kHz での磁場変調 0.4 mT とし、5 セット繰り返した。参照用の試料として、¹⁵N-PDT を用いた得られたスペクトルを解析し、微分波形のピーク間距離を信号の強度とした。陽性対照としては、20Gy の X 線照射した歯を用いた。

また、X band での測定は、エナメル質を削り出し X 線を段階的に 20mGy, 40mGy, 80mGy と照射し、それぞれ照射後に計測した。測定条件は、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。追加照射法は X 線照射を用い、管電圧 150 kV、管電流 5 mA で 0.1 mm の銅と 0.3 mm のアルミニウムのフィルタを用いた照射した。この照射では Cs-137 でのγ線に比べて 4 倍程度応答が大きいことが確認されている。

(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) 紫外線の影響の検証

UVB を照射した結果を図 3 で示す。図 3a は与えた単位面積あたりの紫外線エネルギーを示し、図 3b は一日 2 時間の太陽紫外線を想定したものを示している。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。

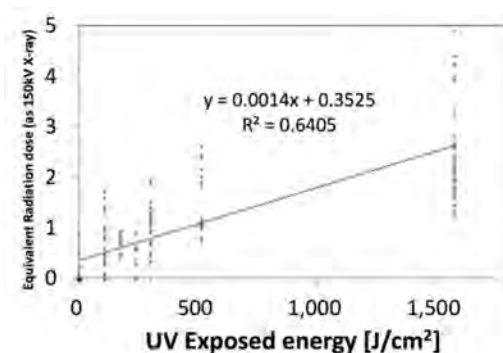


図 3a. 照射した単位面積あたりの紫外線エネルギーと電子スピン共鳴信号の関係

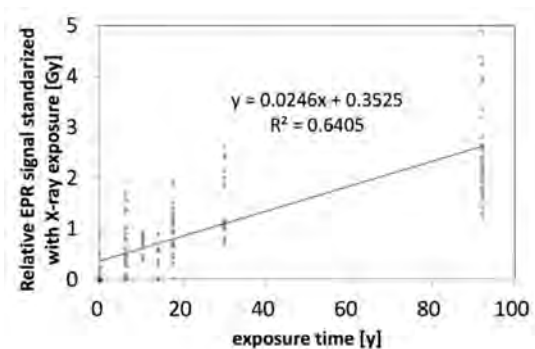


図 3a. 照射した紫外線 B（照射年換算）と電子スピン共鳴信号の関係

一日 2 時間の太陽紫外線の曝露を想定した。

なお、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 倍くらい高いと昨年度の検討から考えられている。

UVA を照射した結果を図 4 に示す。照射した紫外線の量は、一日 2 時間の太陽紫外線を想定し、照射年数で示している。

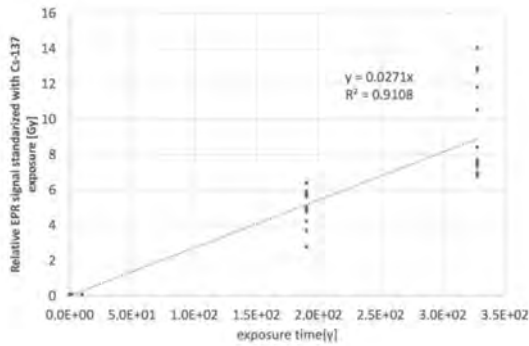


図 4. 照射した紫外線 4 (照射年換算) と電子スピン共鳴信号の関係 (一日 2 時間の太陽紫外線の曝露を想定している)

2) 高 LET 放射線の応答

2.1) 中性照射場での応答

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 5 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。

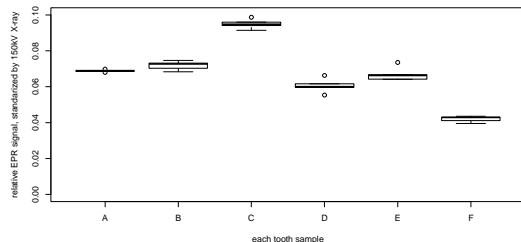


図 5. 中性子線に対するヒトの歯を試料として用いた場合の電子スピン共鳴法による相対的な線量応答

ここでは 150kV の X 線照射時に対する相対的な応答を示している。

2.2) フェーディングの影響

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、今年度は、照射室内への中性子の漏え

いを小さくするよう工夫した上で、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。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。結果を図 6 に示す。チューニング条件の変化によると考えられる相対的な応答の低下が観察されているが、照射直後からの読み取りでも明確なフェーディング現象が観察できていない。

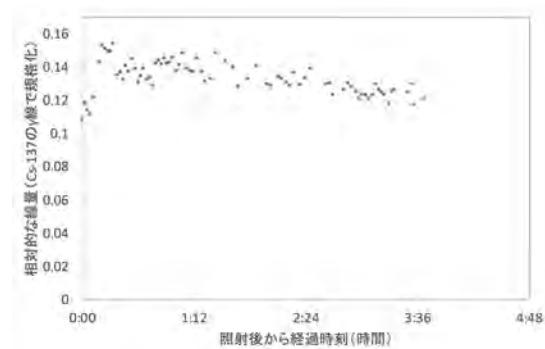


図 6. 中性子照射後の EPR 信号の変化

中性子場の特性を変えて実験した様子を図 7 に示す。照射口からの中性子の漏えいを小さくするために照射口を覆うような構造としている。



図 7a. 照射口からの中性子の漏えいを小さくするために照射口を覆うような構造としたファントム



図 7c. 照射口がファントムで覆れつつあるところ

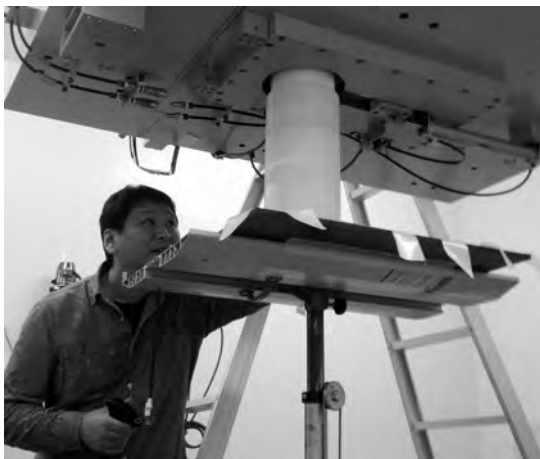


図 7b. 照射口を覆うようにファントムを挿入しているところ



図 7d. γ 線量を減らすために鉛板を追加したところ



図 7e. 照射される γ 線量を減らすために追加された鉛板



図 7e. 中性子を減速させるためにポリエチレンを追加しているところ



図 7e. 照射される熱中性子量を減らすためにカドミウムの箱に試料を挿入しているところ

γ 線と EPR 信号の大きさの関係を図 8 に示す。表 1 に示すように γ 線の線量でほぼ EPR 信号の大きさの説明がつかうことが分かった。

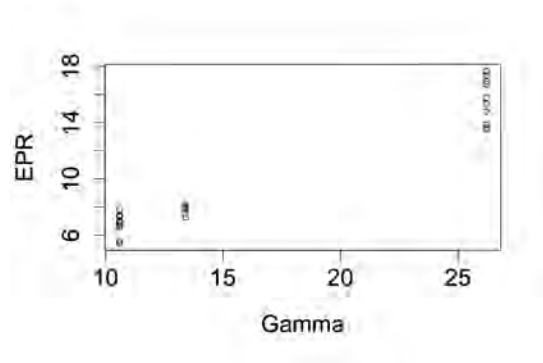


図 8. γ 線と EPR 信号の大きさの関係

表 1. 回帰分析の結果

	推定値	標準誤差	t 値	p 値
Gamma	0.59	0.03	18	4e-15

3) シールドテントを用いた測定

4) 動物の歯の測定

対象とした牛の情報を表 2 に示す。

表 2. 対象とした牛の情報

耳標 ID	性	生年月日
12416 04378	♀	2006/12/26
12425 47537	♀	2007/9/2
08597 08639	♀	2012/6/1
08597 98738	♀	2012/9/5
08597 98783	♀	2012/10/10

L band で計測した結果を表 9 に示す。測定した全ての試料で陽性の信号は目視できなかった。

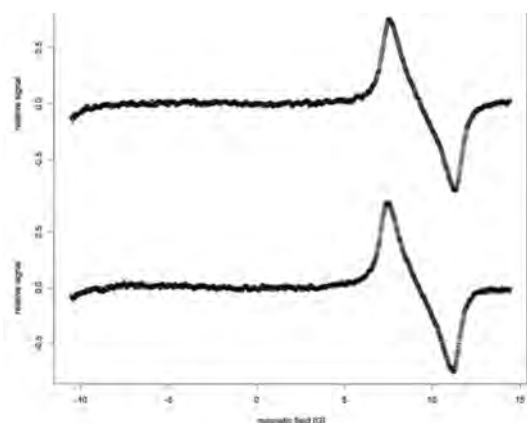


図 10. L band で計測した牛の歯の例
 (耳標 ID 12425 47537 2007/9/2 生まれ)
 想定条件: 20 scans、scan range of 2.5 mT
 a scan time of 30 seconds、a modulation amplitude of 0.4 mT

X band で計測した結果を表 10 に示す。得られた値の不確かさもいくつかの試料で示した。この不確かさは追加線量法での推計の結果得られた分布のパラメータを用いた乱数により発生させた 100 回での試行結果として示されている。箱ひげ図の中央の太線はデータの中央値 (メディアン) を示す。箱の最上端は第 3 四分位数、箱の最下端は第 1 四分位数をあらわす。また、上側のひげおよび下側のひげは、(第 1 四分位数 $-1.5 \times$ (第 3 四分位数 - 第 1 四分位数)) 以上 (第 3 四分位数 $+1.5 \times$ (第 3 四分位数 - 第 1 四分位数)) 以下の範囲で、それぞれ最も大きいデータ点および最も小さいデータ点を指す。丸はひげより大きいデータ点または小さいデータ点、すなわち外れ値をあらわす。

耳標 ID 12425 47537 2007/9/2 生まれ

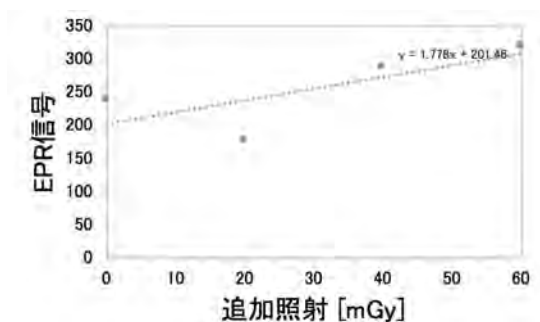


図 11a1. 測定例 (Cs-137 換算: 453 mGy)

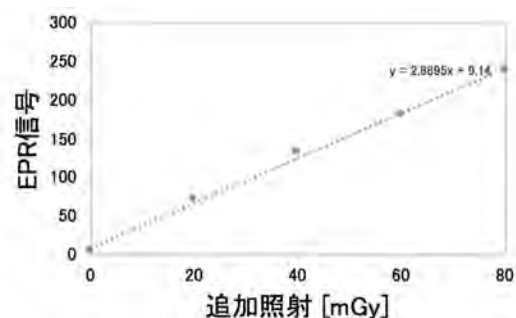


図 11a2. 測定例 (Cs-137 換算: 13 mGy)

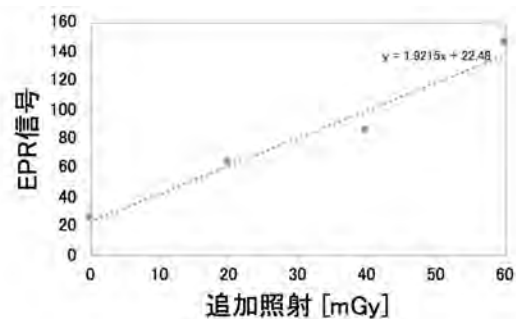


図 11a3. 測定例 (Cs-137 換算: 30 mGy)

耳標 ID 12416 04378 2006/12/26 生まれ

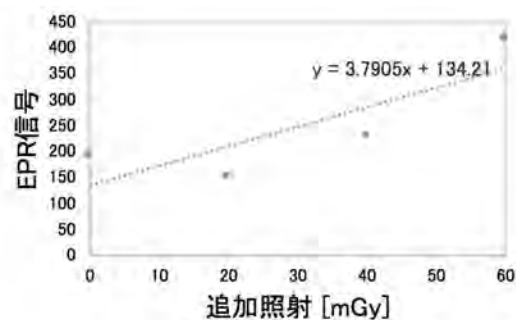


図 11b1. 測定例 (Cs-137 換算: 142 mGy)

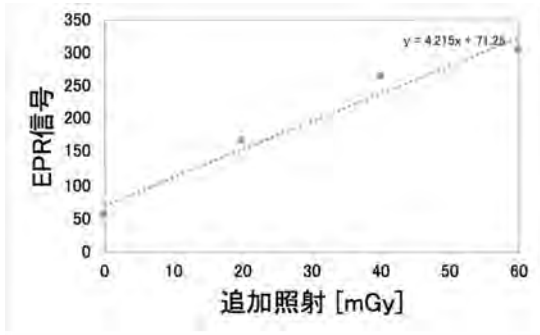


図 11b2. 測定例 (Cs-137 換算: 67 mGy)

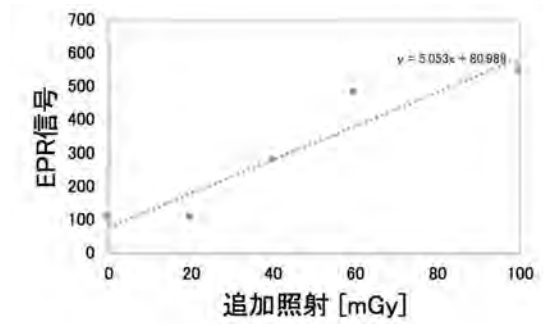


図 11b5. 測定例 (Cs-137 換算: 64 mGy)

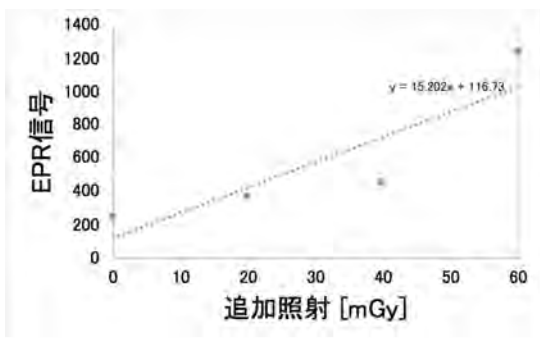


図 11b3. 測定例 (Cs-137 換算: 31 mGy)

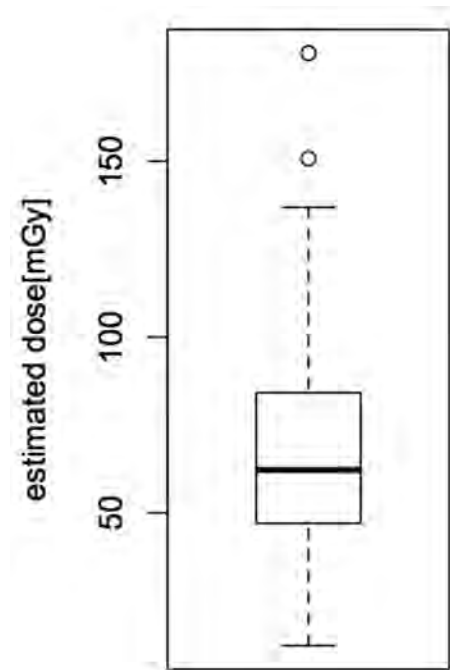


図 11b5a. 推計値の分布

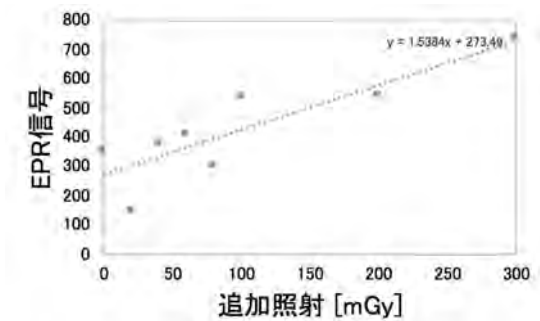


図 11b4. 測定例 (Cs-137 換算: 30 mGy)

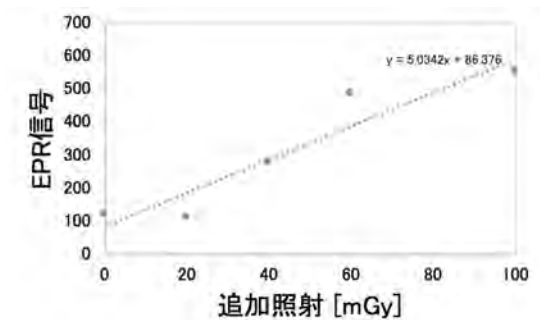


図 11b5. 測定例 (Cs-137 換算: 69 mGy)

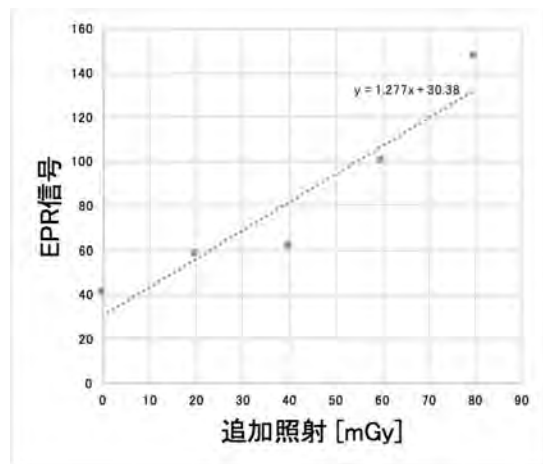


図 11b6. 測定例 (Cs-137 換算： 95 mGy)

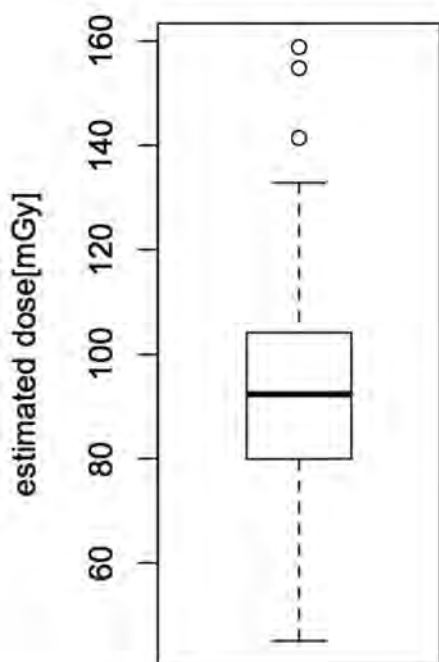


図 11b6a. 推計値の分布

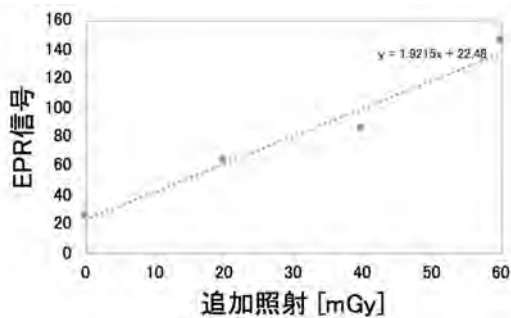


図 11b7. 測定例 (Cs-137 換算： 47 mGy)

耳標 ID 08597 08639 2012/6/1 生まれ

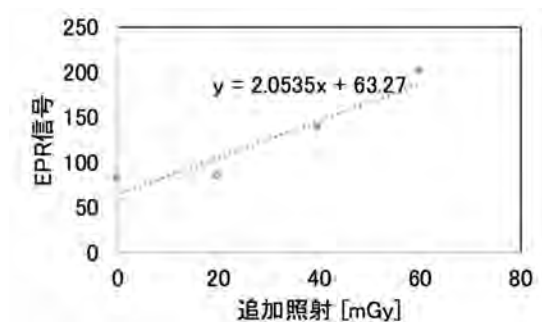


図 11c1. 測定例 (Cs-137 換算： 123 mGy)

シールドテント内外での計測結果を図 11 に示す。右からシールドテント内、シールドテント外（電波シールド室の外側で本院では低バックグラウンド環境であると考えられる）、シールドテントをグラウンドにつないだ場合、シールドテント内に電波吸収体においた場合を示している。

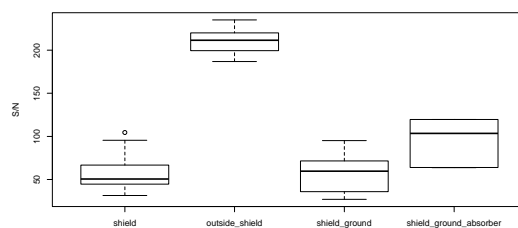


図 9. 環境の違いによる信号ノイズの違い
箱ひげ図の中央の太線はデータの中央値（メディアン）を示す。箱の最上端は第 3 四分位数、箱の最下端は第 1 四分位数をあらわす。また、上側のひげおよび下側のひげは、(第 1 四分位数-1.5×(第 3 四分位数-第 1 四分位数)) 以上 (第 3 四分位数+1.5×(第 3 四分位数-第 1 四分位数)) 以下の範囲で、それぞれ最も大きいデータ点および最も小さいデータ点を指す。丸はひげより大きいデータ点または小さいデータ点、すなわち外れ値をあらわす。

D. 考察

1) 紫外線の影響の検証

これまでの検討で UV-CやUVBの曝露で明瞭な曝露量-信号関係が確認されるとともに 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。

今年度、UV-A に関しても検討した結果、UVA の照射でも長時間の照射では信号が検出することが確認された。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。

トリアージへの影響に対しては、2Gy 以上に相当する信号が得られるのは、一日2時間の太陽光への歯の露光を仮定した場合でも50年以上必要となるために、トリアージ目的では妨げとなる可能性は小さいと考えられた。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。

ただし、長年の曝露では X band だけではなく L band での照射でも信号を検出しうると考えられることから、信号が得られた場合の解釈で注意必要とも考えられた。

2) 高 LET 放射線の応答

2.1 測定結果

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。照射室への入室は、照射室内の放射化の程度に依存するので、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、室内の構造物等での放射化を減らし、必要なクーリングタイム

を短くすることから、ほぼ照射直後からの入室が可能となった。

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、照射直後からの測定でも、放射化核種による信号の増強は確認できず、完全に否定はできないものの明確なフェーディングは確認できなかった。

中性子量は、CR-39 を用いたエッチピット密度 [cm^{-2}] で解析した。エッチピット密度では無視できないエネルギー依存性が確認されており、前方、または周囲の構造物によって校正曲線が変化する。また、図でも示されているようエッチピットの大きさに多様性があり、どのような反応が生じているかをさらに詳細に解析する必要があると考えられる。このため線量ではなくエッチピット密度のままの解析となっている。エッチピット密度は速中性子によって CR-39 内で反応した数に等しいと考えられるので相対的な影響という意味では議論できるが、絶対線量の議論には至っていない。絶対線量の解析は現在アルゴリズムが開発中であり、今後、その情報も提供されることが期待される。

それぞれのセットアップでの放射線計測結果を以下に示す。

PE セットアップ

・ Gamma: 13.4 Gy, EPR 読み取り : 7.8 Gy,
Ratio: 0.59 ± 0.006

・ 速中性子寄与(CR-39) : $1.13 \times 10^8 / \text{cm}^2$

PE+Cd セットアップ

・ Gamma: 26.2Gy , EPR 読み取り : 15.6 Gy, Ratio: 0.64 ± 0.065

・ 速中性子寄与(CR-39) : $0.16 \times 10^8 / \text{cm}^2$

PE+Pb セットアップ

- Gamma: 10.6Gy, EPR 読み取り : 6.8 Gy,
- Ratio: 0.70 ± 0.007
- 速中性子寄与(CR-39) : $1.21 \times 10^8 / \text{cm}^2$

PE+Cd セットアップでは γ 線で2倍、速中性子をほぼ一桁小さくするセットアップに成功していると考えられる。

PE+Pb セットアップでは γ 線が0.79倍、速中性子が1.07倍とほぼPEセットアップと同様の照射場になっている。

PE+Cd で照射量を半分にするれば、PE セットアップに比べ γ の影響を1倍、速中性子影響を0.07倍にする体系も可能ではないかと考えられた。

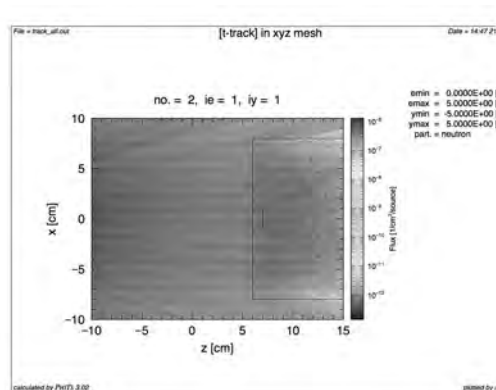
このように場の特性を変化させることで、検出器応答の理解を深めることができると考えられる。

2.1 計算結果

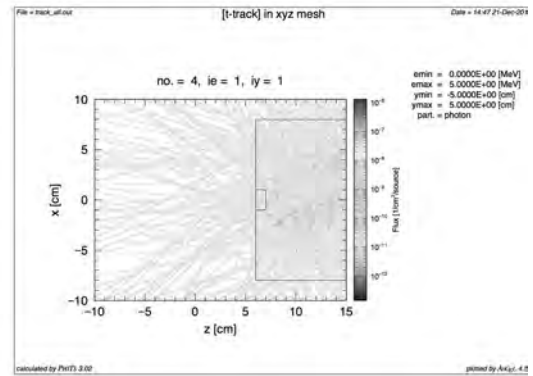
Be に D を入射させ発生させた中性子および光子により試料への照射を模擬した計算結果を示す。計算は PHITS を用いて行った。

(標準設定)

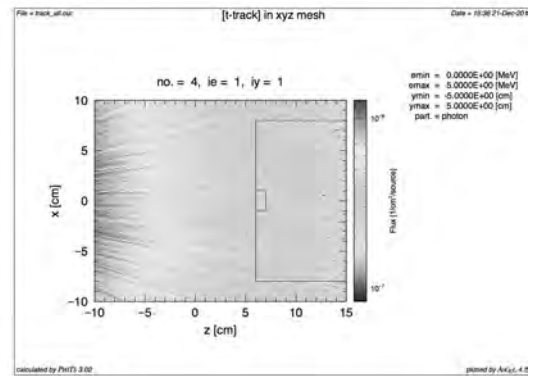
- 中性子を照射し、中性子を追跡



- 中性子を照射し、光子を追跡

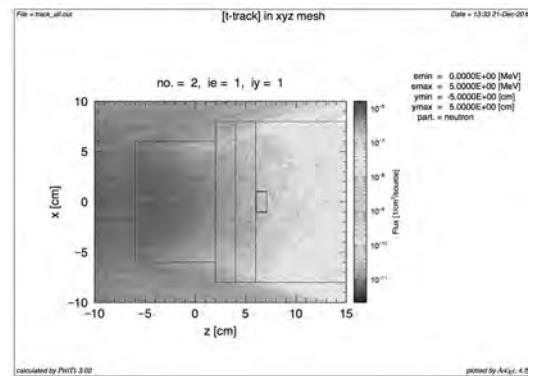


- 光子を照射し、光子を追跡

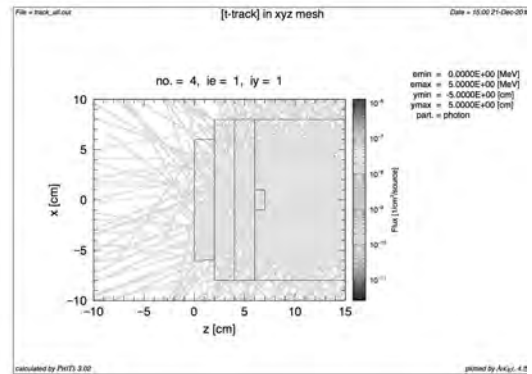
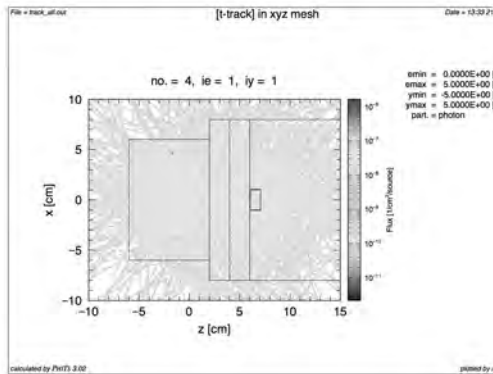


PE+Cd セットアップ

- 中性子を照射し、中性子を追跡

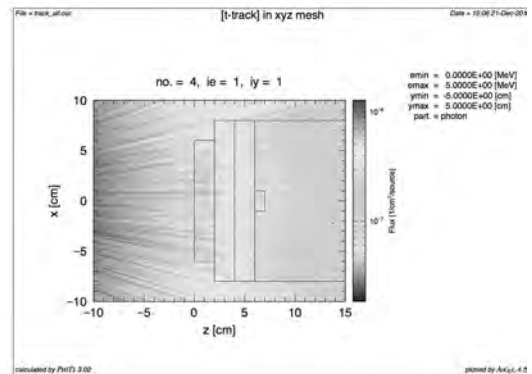
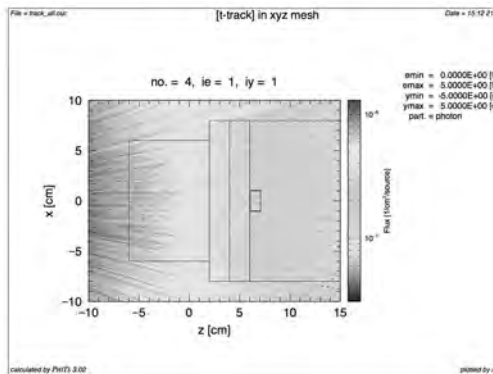


- 中性子を照射し、光子を追跡



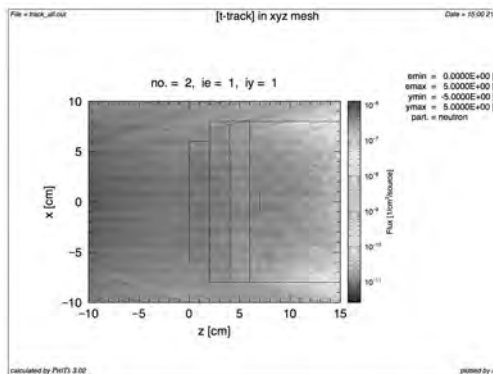
- 光子を照射し、光子を追跡

- 光子を照射し、光子を追跡



- PE+Pb セットアップ

- 中性子を照射し、中性子を追跡



- 中性子を照射し、光子を追跡

標準セットアップに対して試料へのエネルギー付与は、Be に D を入射させて発生した光子に対して、Pb+PE セットアップで $5.65\text{E}-01 \pm 3.41\text{E}-01$ 、PE+Cd セットアップで $4.71\text{E}+00 \pm 2.89\text{E}+00$ となり、中性子に対して、Pb+PE セットアップで $6.02\text{E}-01 \pm 1.32\text{E}-01$ 、PE+Cd セットアップで $2.42\text{E}-01 \pm 7.33\text{E}-02$ となった。ターゲット近傍では様々な反応が生じ得るので計算の質を向上させるには、幾何学的条件の再現の質を向上させる必要がある。

3) シールドテントを用いた測定

電波シールドは電磁界強度が低く、それに伴い良好な S/N が得られていたが、より空間が狭いシールドテントでは、想定したよ

うな S/N が得られず、かえってシールドテント外の方が良好な S/N が得られることがあった。テントをグラウンドと接続することでは改善せず、この原因として、高周波帯の電磁波が比較的狭い空間内で空洞共振を起こしていることが考えられた。シールドテント内での計測での S/N はテント内に電波吸収体を持ち込むことで改善しており、このような電波吸収体や吸収パネルでの電磁波の減衰も有効であることが示唆され、車載搭載型とする場合の検討課題になると考えられた。

4) 動物の歯の測定

被災動物を対象にした放射線の生物影響に関する研究が進められている。現在の日本では、家畜はクリーン・フィーディングしても出荷できない状況にある。このため、研究でしか貢献できない状況であり、この研究の質を高める必要がある。

このため、被災動物でも線量評価のニーズがある。なぜなら、初期の線量は計測できていないからであり、その推測のために材料が必要だからである。これまでの推計では、福島県双葉郡浪江町小丸地区の空間線量を外部被ばく線量と見なすと、初期被ばく線量を含め、2011年3月以降の6年間の積算でウェザリング効果も考慮すると約 1 Sv とされており、今回対象とした福島県双葉郡大熊町の牛の空間線量の積算は、小丸地区と比較すると 14% となるので、およそ 160 mSv 程度と推定されている。同じ地区にいる牛に装着したガラスバッジからは、2013年12月からの積算線量では 60mGy 程度となっており、初期線量を考慮すると、その 4 倍 (240mGy) 程度になると推計さ

れている。ただし、この推定は、原子力発電所の事故以降、同じ牧場内で継続して被ばくしていた場合に限ることとなる。大熊町の牛の一部は、震災後に他の牧場から預かっている牛もいるので、それぞれの経緯を踏まえて推計する必要がある。

電子スピン共鳴法は積算線量が評価可能であることから、東京電力福島第一原子力発電所事故に被災した牛が受けた放射線の量の推定を試みたことになる。

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、今年度は以下の成果が得られた。

- 1) オンサイトで計測できるように車載型とする場合の課題を検討した。低電磁界環境として電波シールドルームでは S/N が 2 倍程度向上した。このように電磁波シールドルームの利用でノイズが改善していたが、車載型のシールドルームを想定した場合、内部での電磁波吸収が不十分であると空洞共振によりノイズが増加しうることを確認した。この結果を踏まえ、車載可能なシールドテントの開発において内部での電磁波吸収にも配慮されることとなり、この課題の解決も図られることが期待される。
- 2) 紫外線の影響に関して、X band での高感度な測定では影響を与えうることが知られており、L band で切歯を用いることからその影響が懸念されるが、UVB だけではなく UVA でも保守的な想定でも太陽光で数十年分の曝露でな

いとトリアージに相当する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 UVA および UVB により信号が見えることがあると考えられ、今後、感度がより向上すると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ことも示唆された。

- 3) 線質による違いを確認し、中性子場での応答がほぼ混合γ線による応答で説明が付けられることを確認した。
- 4) 被災した動物(牛)の歯でも測定を試みた結果を解析し、今後の課題を整理した。L band での検出は困難であるが X band では原発事故による放射線曝露を検出する可能性があると考えられた。

このように、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、本システムの社会実装が現実的なものになり得ることが検証されるとともに、今後のさらなる研究課題の方向性を示した。

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キーコム株式会社、朝日分光株式会社、メディカル・エイド株式会社よりそれぞれご提供頂きました。

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

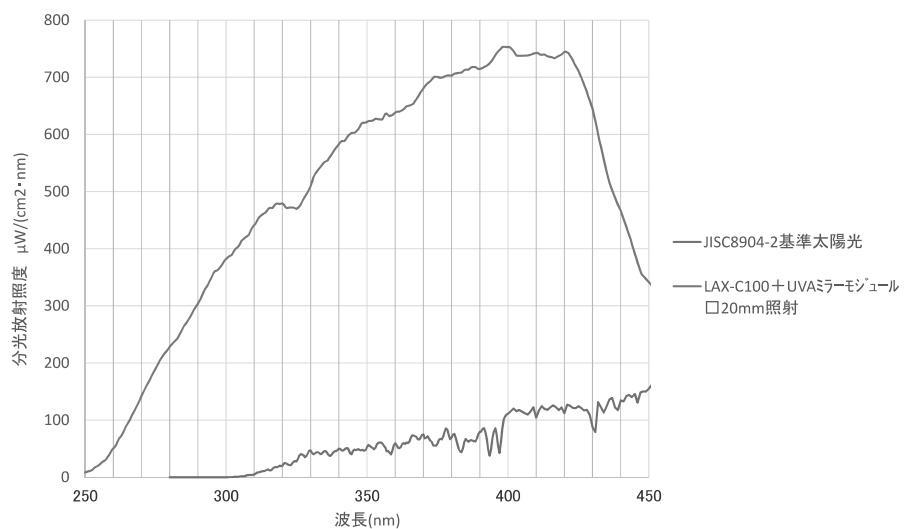
- (1) Umakoshi M., Yamaguchi I., Hirata H., Kunugita N., Williams B., Swartz H., Miyake M. In vivo Electron Paramagnetic Resonance Tooth Dosimetry: Dependence of Radiation-induced Signal Amplitude on the Enamel Thickness and Surface Area of ex vivo Human Teeth. *Health Physics*, 113(4):262-270, 2017

学会発表業績

- 1) Miyake M, Nakai Y, Yamaguchi I, Hirata H, Kunugita N and Swartz HM. In-vivo tooth dosimetry using a deployable L band EPR spectrometer. *International Conference on Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy and Imaging of Biological Systems (EPR-2017)* ;

- 2017.7.16-22:Morgantown, WV, USA.
- 2) Yamaguchi I, Nakai Y, Miyake M, Kunugita N. Influence of Ultraviolet Rays in In Vivo EPR Tooth Dosimetry. ISMAR 2017; 2017.7.23-28, Québec, Canada.
- 3) Miyake M, Yamaguchi I, Nakai Y, Hirata H, Kunugita N, and Swartz HM. 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
- 4) Yamaguchi I, Nakai Y, Miyake M, Kunugita N. Do influences of ultraviolet rays disturb in vivo EPR tooth dosimetry? ESR 応用計測・ルミネッセンス年代測定・FT 研究会 2017 年度合同研究会 ; 2018 年 2 月 10 日-12 日、東京. 講演要旨集. P
- 5) 井上一彦、中井康博、三宅実、山口一郎、志村勉、樺田尚樹、夏堀雅宏. 牛の歯を用いた電子スピン共鳴法による線量測定 ESR 応用計測・ルミネッセンス年代測定・FT 研究会 2017 年度合同研究会 ; 2018 年 2 月 10 日-12 日、東京. 講演要旨集. P
- 6) 山口一郎、三宅 実、中井 康博、志村勉、樺田尚樹. 放射線緊急時におけるトリアージとしての L band EPR tooth dosimetry. 日本放射線影響学会第 60 回大会 ; 2017 年 10 月 25 日-28 日、千葉. 講演要旨集. P83
- 7) 山口一郎、樺田尚樹. 放射線緊急時に
- おけるトリアージのための生体内の歯を用いた線量評価手法の検討. 日本公衆衛生学会第 76 回総会 ; 2017.10.31-11.2 ; 鹿児島. 同抄録集 p. 595.
- 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

光量比較_LAX-C100(UVA) vs JIS基準太陽光 ※参考値



添付資料、紫外線照射装置での UVA の照射時の基準太陽光との光量比較

牛の歯の X band EPR の不確かさ評価を R で行うためのコード

```
#-----データの入力例 1
```

```
dose <- c(0,20,40,60,80) #追加照射線量 (mGy)
esr <- c(40.4,58.2,61.5,100,147.2) #EPR での信号読み取り結果
sd <- c(6.6,6.3,5.8,5.6,7.2) #EPR での信号読み取りでの標準偏差
```

```
#-----データの入力例 2
```

```
dose <- c(0,20,40,60,100)
esr <- c(106,107,278.2,479.1,546.3)
sd <- c(44.4,42.9,34.4,36.9,46.6)
```

```
#-----シミュレーション
```

```
#n :試行数
```

```
n <- 100
```

```
result <- NULL #線量推計結果の格納ベクトルの初期化
```

```
#データの長さ #照射した線量の種類
```

```
col <- length(dose) #category for exposed radiation
```

```
for (j in 1:n)
```

```
{
```

```
data_simu <- array(dim=c(col,1)) #simulated data of EPR signal
```

```
data_simu_connect <- NULL #connected simulated data of EPR signal
```

```
for (i in 1:col){
```

```
mean_esr <- esr[i] #EPR 信号の読み取り値を正規乱数で発生させるための算術平均値
```

```
sd_esr <- sd[i] #標準偏差
```

```
data_simu_part <- rnorm(1, mean=mean_esr, sd=sd_esr) #正規乱数を用いて読み取り値  
を発生
```

```
data_simu_connect <- append(data_simu_connect,data_simu_part) #それをつなげてい  
く
```

```

}

data <- data.frame(DOSE=dose, ESR=data_simu_connect) #data flame

lm_result <- lm(ESR~DOSE, data) #回帰分析

result[j] <- lm_result$coefficients[1]/lm_result$coefficients[2] #追加照射法による線量推
計結果

# result[j] <-
summary(lm_result)$coefficients["Estimate"]["(Intercept)"]/summary(lm_result)$coeffi
cients["Estimate"]["DOSE"] #別の検定結果の取り出し法
}

#-----作図
par(ps = 16)
par (mex = 1.5)

boxplot(result, ylab="estimated dose[mGy]

```


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 教授

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 アッセイデバイスの開発を継続して行った。これまでの人工蛍光ビーズによる構造評価に加え、本年度は培養細胞を用いた構造評価、放射線照射細胞を用いた DNA 損傷モニタリング評価、さらにはヒト末梢血サンプルをもちいたデバイスの実用性について評価を開始した。

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。放射線被ばくの生物影響を評価する生物学的方法として、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生体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、放射線照射した培養細胞を用いて Polydimethylsiloxane (PDMS) チップでの γ -H2AX アッセイが可能であるか、また放射線量に依存した DNA 損傷レベルが検出可能であるかの評価をおこなった。さらに、ヒト末梢血サンプルを用いて PDMS チップにおけるリンパ球分離の効率および DNA 損傷の検出評価を行った。以上の実験を遂行することに

より、開発中の PDMS チップによる γ -H2AX アッセイが被ばく線量推計と被ばくのトリアージとして有効であるかを検討した。

B. 研究方法

1. 培養細胞を用いた PDMS チップ上への細胞導入方法および固定効率の評価

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。昨年度までの研究で効果的にリンパ球相当の人工蛍光ビーズを固定することができる構造が確立したことから、本年度は、培養リンパ芽球細胞 (TK6) をもちいて解析に十分な細胞数の固定が可能であるかを検討した。また、細胞の流路内への導入に関して、押し込み法、自然滴下法、さらには遠心法の効果を検討した。

2. 放射線照射培養細胞を用いた PDMS チップによる DNA 損傷レベル解析

TK6 細胞に、0, 1, 5 Gy の X 線を照射し、30 分後に各サンプルを PDMS チップに滴下、流路内でパラホルムアルデヒド (PFA) による細胞固定を行った。その後、十分な洗浄を行ったのちに γ -H2AX に対する免疫蛍光染色を流路内で行った。なお、免疫蛍光染色は操作の簡便性を目的として、 γ -H2AX に対する一次抗体に直接蛍光色素が結合している抗体を用いる直接蛍光染色法で行った。染色した PDMS チップは、蛍光顕微鏡にて観察を行い、細胞数および γ -H2AX 陽

性細胞の検出を行った。

つぎに、より幅広い放射線線量評価が可能であることを確認するために、培養細胞 TK6 に、0, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 Gy の X 線を照射し、同様の実験を行った。

3. ヒト末梢血を用いた PDMS チップによる DNA 損傷レベル解析

緊急被ばく時のトリアージとしての PDMS チップを用いた γ -H2AX アッセイでは、微量の生体サンプルの解析を目指している。そこで、数マイクロリットルのヒト末梢血を PDMS チップに導入し、リンパ球の分離および γ -H2AX 解析が可能であるかを検討した。まず、放射線未照射のヒト末梢血サンプル 5 μ L に抗凝固剤である EDTA を加え、PDMS チップに滴下した。その後、PFA による固定、 γ -H2AX に対する免疫染色を行った。次に、リンパ球細胞の固定効率に対する赤血球の影響を検討するために、ヒト末梢血サンプル 5 μ L に EDTA と溶血バッファを加え、PDMS チップでの γ -H2AX アッセイを行った。最後に、*ex vivo* で放射線照射したヒト末梢血サンプルを PDMS チップに滴下し、PDMS チップでの γ -H2AX に対する免疫染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究におけるヒト末梢血サンプルを用いた実験は、すでに茨城大学生命倫理規定に基づいた申請書を作成し、審査委員会による承認を受けているものである (承認番号 150401、研究課題名「新規放射線誘発 DNA 損傷モニタリングシステムの開発」)。

C. 研究結果

1. 培養細胞を用いた PDMS チップ上への細胞導入方法および固定効率の評価

これまでの実験から、リンパ球相当の人工蛍光ビーズ (9.9 μm 径) が十分に固定される細胞固定構造を有するチップを第2版 PDMS チップとして今年度の実験を行った。まず、TK6 細胞のチップへの導入方法として、1) マイクロピペットによる押し込み法、2) 自然滴下による導入法、3) 遠心力による導入法を検討した。その結果、PDMS チップを十分に真空ポンプにより脱気することによって、自然滴下でも十分な細胞が流路内に導入できることを確認した。この結果は、よりシンプルな実験操作によって細胞の PDMS チップへの固定が可能であることを示している。

2. 放射線照射培養細胞を用いた PDMS チップによる DNA 損傷レベル解析

PDMS チップ上で γ -H2AX に対する免疫染色が可能であることを確認するために、TK6 細胞に放射線を 0, 1, 5Gy 照射し、30 分後に PDMS チップに導入した。PDMS チップにパラホルムアルデヒド溶液および γ -H2AX に対する免疫染色用液を順次導入し、PDMS チップ上での免疫染色を行った。その結果、放射線照射サンプルにおいて高い γ -H2AX 陽性細胞が検出された (図 1)。また、陽性細胞数は 5Gy 照射サンプルが最も高いレベルであった。その一方で、流路内全体の蛍光シグナルのバックグラウンドが非常に高く、免疫染色溶液を流路内から十分に排出するための遠心操作が必要であることが明らかとなった。今後、免疫染色反応の後に 2000rpm の遠心を 30 秒間行うこととした。次に、PDMS チップを用いた γ -H2AX アッセイによって、より幅広い放射線線量域の線量評価が可能であるかを検討するために、0, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 Gy を照射した TK6 細胞の解析を行った。その結果、一部のサンプルについて流路内の閉塞が発生し、結果が得られなかったものの、解析が可能であ

った 0.2, 0.5, 2Gy のサンプルについては、線量依存的な γ -H2AX の上昇が認められた。

3. ヒト末梢血を用いた PDMS チップによる DNA 損傷レベル解析

ヒト末梢血を PDMS チップに滴下し、リンパ球細胞の固定効率の検討を行ったところ、EDTA 非添加サンプルは急速な血液凝固を生じ、チップ流路内に細胞が目詰まりしたが、EDTA 添加サンプルでは十分な流速を保ったまま導入することが可能であった。その一方で、TK6 細胞を用いたときと比較して、リンパ球固定構造へのリンパ球細胞の固定効率は 10%程度に低下していた (TK6 細胞では 30%程度の固定効率) (図 2)。その理由として、血液に含まれる大量の赤血球がリンパ球細胞を押し出す形で流路内を流れていることが原因ではないかと考え、次に溶血バッファーを用いて赤血球の溶血を行った。その結果、溶血によって生じた大量の細胞膜成分などが流路内を閉塞することになった。そのため、ex vivo 照射した末梢血サンプルについても、PDMS チップ内での閉塞が発生し、線量評価実験を行うことが出来なかった。

D. 考察

第2版 PDMS チップを用いた今回の実験では、具体的な実験方法の確立を行うとともに、培養細胞 TK6 の放射線線量評価が 0~5 Gy の範囲で可能であることを示唆するデータが得られた。これは、本事業が目指す 1~2 Gy の被ばくの有無を評価するトリアージとしての有効性を強く支持するものである。今後、より幅広い放射線線量に対しても、PDMS チップを用いた γ -H2AX による線量評価が可能であるかどうかを検討する必要がある。

次に、ヒト末梢血サンプルを用いた PDMS チップでの γ -H2AX アッセイでは、人工蛍光ビー

ズや培養細胞と比較して、リンパ球固定構造への固定効率が非常に低い結果となった。これは、リンパ球細胞自身の柔軟性が高く、固定構造をすり抜けてしまったことに加え、大量に含まれる赤血球細胞による押し出しの効果があつたと考えられた。また、溶血による赤血球の排除は、かえって流路の閉塞を発生させることも明らかとなった。赤血球はリンパ球細胞以上に柔軟性に優れていることから、今後は、溶血ではなく、十分な流路内の流速によって固定構造内を通過させるほうが適していると考えられた。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再検討する必要があると考える。

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 チップの開発を継続して行った。培養細胞を用いた実験では、線量評価デバイスとしての有用性が証明され、緊急被ばく時における「現場」での線量評価が可能であることが示唆された。その一方で、血液サンプルから十分なリンパ球を固定分離することはできず、今後の改善課題が明確となった。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。

以上、本研究結果はトリアージのための総合的線量評価手法の確立に大きく貢献したといえる。

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

該当なし

2. 学会発表

- 1) 中村麻子 ヒストン H2AX のバイオロジー : DNA 損傷修復から上皮間葉転換まで、第 5 回ヒストンバリエーション研究会, Feb 10, 2018, 首都大学東京, 八王子 (invited talk)
- 2) Nakamura AJ, Suzuki M, Redon CE, Kuwahara Y, Yamashiro H, Abe Y, Takahashi S, Fukuda T, Isogai E, Bonner WM, Fukumoto M. The Causal Relationship between DNA Damage Induction in Bovine Lymphocytes and the Fukushima Nuclear Power Plant Accident. 2nd International Symposium of Quantum Beam Science at Ibaraki University, Dec 8-10, 2017, Ibaraki, Japan.
- 3) Nakamura AJ, Tetsuka R, Takahashi K, Tamura T, Suzuki T and Hirayama R. Evaluation of novel radioprotective drug and development of DNA damage monitoring micro-nano device for triage of radiation exposure. 63rd Annual international meeting Radiation Research Society, Oct 15 - 18, 2017, Cancun, Mexico.
- 4) 中村麻子, 手塚諒哉, 笹谷めぐみ, 志村勉, 神谷研二 抗酸化剤による高LET放射線に対するDNA損傷防護効果の検討 日本宇宙生物科学会 第31回大会, Sep 21-22, 2017, 前橋.
- 5) 高橋健太, 田村隆大, 鈴木孝明, 中村麻子, PDMS チップを用いた DNA 損傷モニタリングシステムの開発, 日本放射線影響学会 第 60 回大会, Oct 26-28, 2017, 千葉.

3. その他

- 1) 中村麻子 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, 平成 29 年度労災疾病

臨床研究事業の成果報告会, Feb 23, 2018,
国立保健医療科学院, 和光.

学外研究協力者
鈴木 孝明 群馬大学 准教授

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

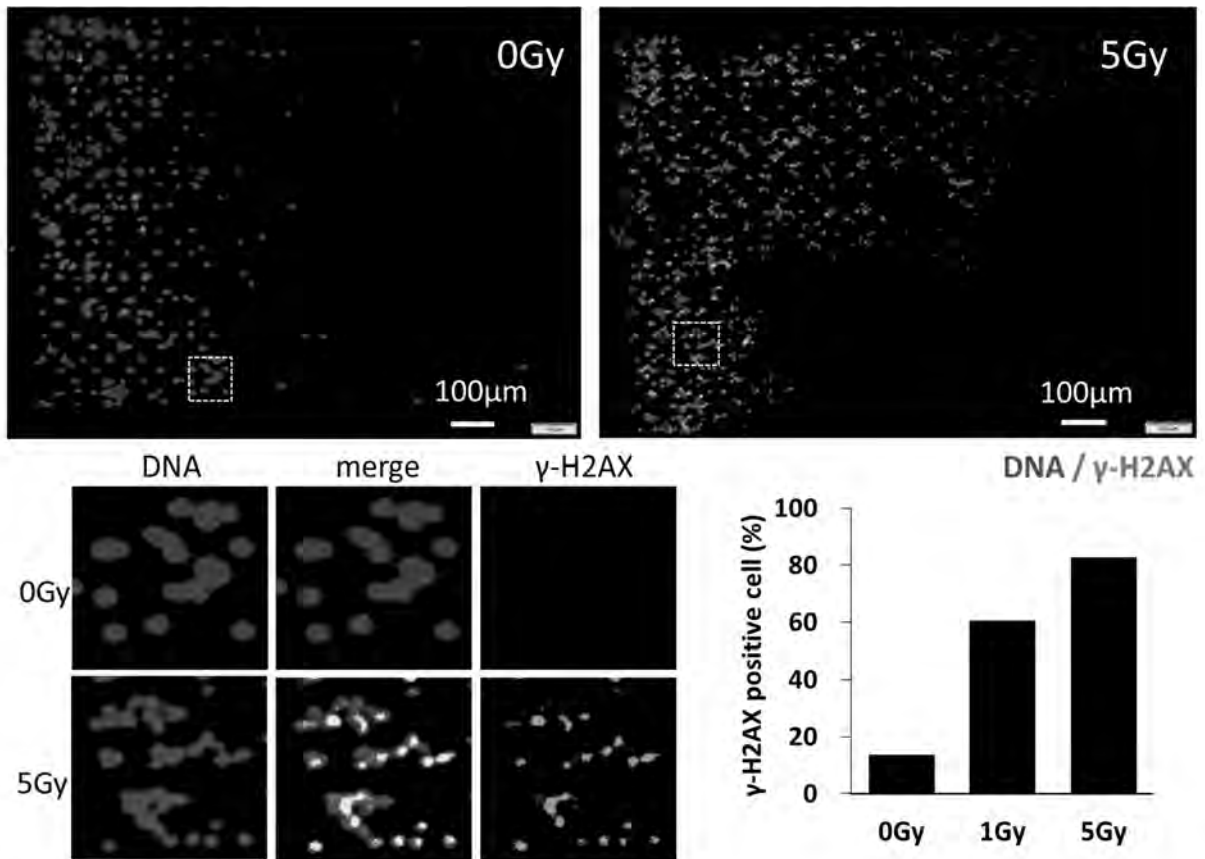


図1：放射線照射TK6細胞に対するPDMSチップ上での γ -H2AX染色結果
 5Gy照射細胞では強い γ -H2AXシグナルが検出されている。 γ -H2AX陽性細胞の割合を示すグラフから、線量依存的に陽性細胞が上昇していることが分かる。

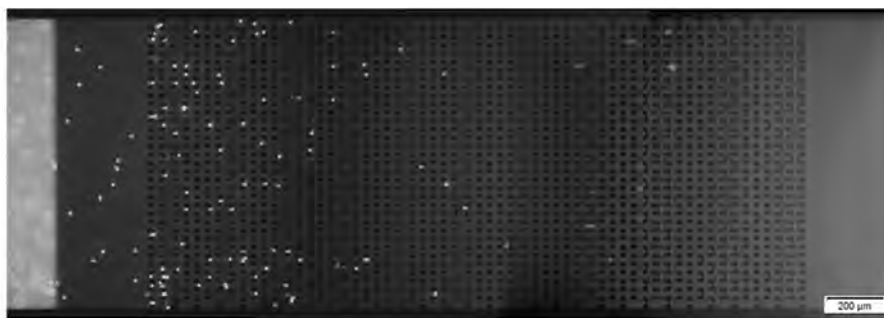


図 2 : PDMSチップへのリンパ球細胞固定効率の検討
ヒト末梢血細胞にEDTAを添加し、PDMSチップに滴下したもの。DAPIによる核染色の結果から、リンパ球固定構造の10%程度への細胞固定が確認された。

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	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	筑波大学医学医療系	助教

研究要旨

多数の一般市民が被ばくするような大規模放射線災害では、生物学的指標を用いた線量推定によるトリアージが不可欠である。これまでにいくつかの手法が開発されているものの、今現在、大規模放射線災害時に利用できるような高感度かつ高精度で簡便性・迅速性・経済性に優れたバイオドシメトリ法は存在しない。対策の頑強性と線量推計結果への信頼性を高めるためには、複数の手法を組み合わせた「線量推定システム」の構築が必要となる。「放射線照射後、ミトコンドリアの活性酸素種(ROS)産生が増加して細胞が酸化ストレス状態に陥る」ことが近年相次いで報告されているが、これらの研究は全て細胞レベルでの検討であり、生体での実験はほとんど行われていない。本研究ではトリアージの基準となる1Gy 前後の被ばくが生体の抗酸化能に影響を与えるか検討を行った。その結果、0.5~3 Gy 被ばく後2~24 日で線量依存的に血液抗酸化能が低下することを明らかにし、血液抗酸化能の測定が線量推定法として有用であることを示した。本抗酸化能測定法と γ H2AX 法とを組み合わせることで、被ばく直後から10 日後程度までのシームレスな線量推定が実現可能となる。引き続き、推定の正確性の担保はもとより、簡便かつ迅速で安価な実施に向けた研究開発が期待される。

さらに本研究では、計画被ばく者(医療目的で心臓カテーテル検査を受ける患者)を対象に検査(放射線被ばく)前後の血液を採取し、酸化ストレス、DNA 損傷、その他の血液指標の変化を解析した。その結果、検査後に DNA 損傷量の増加といくつかの指標の変動を見出した。

A. 研究の目的

バイオドシメトリによる線量推定・トリアージは、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への対応において不可欠であり、晩発障害のリスクの推定にも有用である。歯のエナメル質に形成される長寿命有機ラジカルの ESR 定量やリンパ球の染色体異常の定量

によって線量推定ができることは、これまでも報告されている。しかしながら、これらの方法は災害時の混乱下で多数の被ばく者に適応できる状態には至っていない。さらには被ばくの形態を考慮し、個人差や環境要因を極力排除し、より正確な推定を行うためには、複数の手法を組み合わせた推定が望ましい。

放射線と酸化ストレスとの関連は深く、放射線には直接作用(=直接 DNA 構成分子を電離し DNA 損傷を誘導する)と間接作用(=水分子を電離することで発生した活性酸素 ROS が DNA を損傷させる)の2つの生物学的作用があることが古くから知られている。さらに近年の報告から、放射線照射後数時間から数日にわたり、ミトコンドリアからの ROS 産生量が増加して細胞が酸化ストレス状態に陥ることが知られるようになった。この遅発性の ROS はアポトーシス、細胞生存率、突然変異の誘導等に関与していることが報告されている。しかしながら、これらの報告は全て細胞株を使用した実験であり、放射線照射後の「生体」でどのようなレドックスバランス(ROS と抗酸化能のバランス)の変化が現れるのかはほとんどわかっていない。

レドックスバランスは好気性生物にとって非常に重要である。至適量の ROS は生体または細胞の生理的活動に重要な役割を果たす。しかし、ROS の増加や抗酸化システムの低下は酸化ストレスを誘導し、様々な疾患に繋がる。それゆえ、レドックスバランスは個人の生活習慣、食事、健康度の指標になりうると考えている。血液のレドックス状態(抗酸化能や酸化ストレス度)に関する論文は多数存在するが、そのほとんどは血漿または血清を対象としている。血液成分の残り 50%を占める血球(主に赤血球)のレドックス状態に関してはほとんど調べられていなかった。近年、Chaleckis は若年者と高齢者の赤血球中のメタボライトを LC-MS で測定し、還元型グルタチオン、NAD⁺、NADP⁺などのレドックス関連分子の量が両者間で大きく異なることを示した。これは、赤血球のレドックス状態が健康度や身体の状態を推し量る重要なマーカーとなりうる可能性があることを示唆している。

このような背景のもと、本研究ではマウス血液(全血)の抗酸化能を全く新しい電子スピン共鳴(ESR)スピントラップ法を用いて解析し、放射線被ばく後の「生体」のレドックスバランスの変化を評価し、新規バイオドシメトリ手法として有望であることを明らかにした。また、被ばく後のレドックスバランスの変化がリンパ球の DNA 損傷量の変化と異なるパターンを示すことを明らかにし、両者を組み合わせることでより正確な線量推定が可能となることを見出した。さらに、計画被ばく者から採血し、線量指標となるバイオマーカーの探索を行った。

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

全身に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。7 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 線を線量率 0.88/分で照射した。付加フィルタは 0.2mmCu と 0.5mmAl を採用した。照射線量は 0, 0.5, 1, 2, 3Gy とした。血液(全血)の抗酸化能の測定には電子スピン共鳴(ESR)スピントラップ法を使用した。

照射直後と 1, 2, 4, 6, 9, 16, 24, 50 日後に、ヘパリンナトリウムが入ったエッペンチューブにマウス血液を採取した。採血にはアニマルランセットを使用し、可能な限り同一個体から連続採血することでマウス使用数の低減に努めた。採取した全血 100 μ L を新規スピントラップ剤 2-diphenylphosphinoyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole N-oxide (DPhPMPO) 20 μ L、生理食塩水 100 μ L と混合後、tert-butyl hydroperoxide (tBuOOH) 20 μ L を加えて反応を開始させ、室温で 30 分静置した。その後クロロホルム/メタノールを加えて振盪、遠心を行い、スピンアダクトが含ま

れる有機層を抽出して-80 のディープフリーザーで保存した。ESR 測定時、室温に戻して専用の扁平セルに封入し、以下の条件で測定した。マイクロ波周波数 9.422 GHz、マイクロ波強度 2 mW、中心磁場 332.0 mT、掃引幅 0.3 mT、掃引時間 4 分、時定数 0.3 秒 (Fig.1A-C, Fig.2)。

測定原理：tBuOOH と血中のヘモグロビンとのフェントン反応によりラジカルが生成される。生成された tBuOOH 由来のラジカルは全血中の抗酸化物質と DPhPMPO の競合反応によって消去され、DPhPMPO と結合したラジカルが多いほど(=血中抗酸化能が低いほど)、大きな ESR シグナルとして観察される (Fig.1D)。

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

全身に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。7 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 線を線量率 0.88/分で照射した。付加フィルタは 0.2mmCu と 0.5mmAl を採用した。照射線量は 0, 0.5, 1, 3, 5 Gy とした。照射から 1 時間後と 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受け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受ける患者を対象とし、事前に倫理委員会の承認を得て実施した。患者には事前に研究の内容、副作用の可能性、匿名性の確保、不利益を被ることなくいつでも研究への参加中止を請求できることを説明し、書面でインフォームドコンセント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 Fig.3 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

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。

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

結果を Fig.4 に示す。被ばく直後にはいずれの線量でもコントロールと比較して有意な差は認められなかったが、被ばく後 2 日ではいずれの線量においてもコントロールより有意に抗酸化能が低下していた。0.5, 1 Gy では 6 日目まで同じ程度の抗酸化能低下が継続した。2, 3 Gy では 6 日目まで引き続き抗酸化能の低下が継続し、6 日目以降は回復に転じた。また、被ばく後 2~24 日は被ばく線量と抗酸化能低下の間に有意な相関関係が確認できた(相関係数 >0.9 ; $P<0.05$) (Fig.5)。

さらに、この結果をもとに、カットオフ値(CV)、偽陽性率(FP)、偽陰性率(FN)、正診率(AC)を求めた (Fig.6)。1 Gy の被ばくの有無を識別するとした場合、2~6 日の間では正診率が 80%以上となることがわかった。

なお、本実験は 2 名の実験者によって行われたが、結果はほとんど一致していた。

3. 抗酸化能測定における交絡因子の解析

抗酸化能は様々な疾患と関連し、生活習慣や運動等により変化することが報告されている。そこで我々が使用した測定法が放射線以外の因子によって影響を受けるか確認を行った。今回は血液成

分濃度、強制水泳によるストレス、抗酸化薬の投与による影響、マウスの週齢による影響を評価した。

はじめに、血液と生理食塩水の混合比率(通常の実験では 100 μ L : 100 μ L)を変えて ESR シグナルがどのように変化するか解析した。その結果、血液の割合が高くなるほど ESR シグナルが低下し、血液濃度とシグナル強度の逆数が直線関係を示した。このことから、ヘモグロビン濃度が 1/2 に減少あるいは 2 倍に増加してもラジカルの発生量にほとんど寄与しないことがわかった。つまり、血中の何かしらの成分によりラジカルが消去されていることが確定的となり、本実験系が全血抗酸化能を測定できていることがほぼ確実に断言できた (Fig.7)。

次に、マウスを強制水泳させた後に抗酸化能を測定した。その結果、水泳の有無は抗酸化能測定の結果に影響しないことが示された (Fig.7)。

次に、採取した血液にビタミン C または N-Acetyl-L-cysteine (NAC)を投与し、抗酸化能を測定した。その結果、シグナルを有意に減少させるにはビタミン C を 10mM、NAC を 30mM 加える必要があることがわかった (Fig.7)。正常マウスの血中ビタミン C 濃度が 40~60 μ M、システイン濃度が 20~30 μ M であることを考えると、正常範囲内の濃度であるビタミン C またはシステインはほとんど結果に影響しないことがわかった。さらに、人間での試験において、1 日のビタミン C 推奨投与量(成人で 2g)を投与しても最高血中濃度は約 0.4mM であるため、短期的なビタミン C サプリメントの服用も測定結果には影響を与えないと考えられる。しかしながら、一部のクリニック等ではがん治療として行われている高濃度ビタミン C 療法では投与直後の最高血中濃度が 24mM に達することが報告されており、この場合は測定結果に影響を及ぼす可能性が十分にある。

また、preliminary な結果であるが、7 週齢(若齢)と 72 週齢(高齢)のマウスの抗酸化能を比較したところ、有意差は認められなかった。

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

マウスの全身に 0, 0.5, 1, 3, 5 Gy の X 線を照射し、照射後 1 時間, 1, 3, 7 日のリンパ球中の 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後 1 時間で 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、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 (Fig.8)。

3. DNA 損傷レベルの解析と抗酸化能の解析を組み合わせた線量推定法の提案

上記の結果から、 γ H2AX 法は被ばく直後から 1, 2 日以内の線量推定に適しており、抗酸化能法は被ばく後 2~10 日前後までの線量推定に適していると考えられる。よってこの 2 つの手法を組み合わせることで、被ばく直後から 10 日前後まで正確かつシームレスな線量推定が実現できると考えられる (Fig.9)。

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のうち、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 および Fig.10 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 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最大用量 2000mg /日を参考に、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。Fig.11 に患者の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。

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 が形成され、それが血中や尿中に排出されることが示されている。

本研究では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(Fig.12)。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。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名だけ非常に大きな値を示した患者がい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顕著な変化は認められなかった(Fig.13)。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り、0.5 Gy以上の全身被ばくにより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(Fig.14)。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(Fig.14)。

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、SOD活性、血液抗酸化能を解析した(Fig.15)。

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た。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端を反映している可能性がある。

SODとはスーパーオキシドディスムターゼの略で、スーパーオキサイド(スーパーオキシド)の消去物質のことである。ゆえにSOD活性とは、スーパーオキサイド消去活性という意味である。検査前ではアスコルビン酸投与群の方がSOD活性が高くなっており、これはアスコルビン酸がスーパーオキサイド消去能を有するためだと考えられる。検査直後は検査前よりSOD活性が10~20%上昇、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。

一方、ESR法を用いた血液抗酸化能測定では、検査前後で抗酸化能の有意な変化は見られなかった(Fig.16)。カテーテル検査は被ばく線量が低く、被ばく範囲も局所的であるためと考えられる。ま

た、アスコルビン酸投与の有無による抗酸化能の変化も観察されなかった。これはマウス実験と照らし合わせても妥当な結果と考えられる(Fig.16)。

3-8 被ばく前後における γ H2AX foci 数の変化

リンパ球中の γ H2AX foci 数を解析したところ、検査後に有意な foci 数上昇が認められた(Fig.17)。さらに、検査後の foci 数と被ばく線量(インターベンショナル基準点における空気カーマ: AK (mGy))が正の相関を示した(Fig.18)。これにより γ H2AX 法は局所低線量被ばくに対しても有用であることが示唆された。

一方で、検査前に foci 数が高い患者が数名存在するが、これはカテーテル挿入後(本格的な検査前)に採血を行ったため、カテーテル挿入時に使用した数秒の X 線照射によって上昇したと考えられる(Fig.17)。

D. 考察

1. 全身被ばくマウスを利用した実験

マウス実験では被ばく後に血液抗酸化能が線量依存的に特徴的な変化パターンを示すことを世界で初めて明らかにした(論文投稿中)。また、 γ H2AX foci 数解析と抗酸化能測定とを組み合わせることで、被ばく直後から 10 日前後までシームレスな線量推定が可能になることを示した(特許出願中)。抗酸化能測定に必要な血液量は全血 100 μ L であり、 γ H2AX 測定に必要な血液量も中村らが本研究班で進めているデバイスを使用すれば全血 50 μ L 程度に抑えられる。トータル 150 μ L の採血は一般的な血液検査と比較しても極めて微量であり、指先採血で十分に対応可能である。これは大規模放射線災害の混乱下で線量推定を実施しなければならないことを考える上で、非常に大きな優位性であると考えられる。

しかし、未だ実験室ベースの研究であり、今後の実用化に向けた開発が必要である。また、抗酸化能が低下するメカニズムは現在不明であり、さらなる解析が必要である。

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にしている。平均被ばく線量が空気カーマ(=最大皮膚線量)で 474 mGy と比較的低いこと、局所被ばくであること、一定量の出血を伴うこと、一定量の造影剤(ヨード系)を血管内に投与することなどの条件を考慮する必要がある。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。

E. 結論

本研究はトリアージの基準となる 1Gy 前後の被ばく後の生体の血液抗酸化能が線量依存的に変化することを ESR を用いたスピントラップ法により世界で初めて明らかにした(論文投稿中)。さらに、 γ H2AX 法と抗酸化能測定を組み合わせることにより、被ばく直後から 10 日後程度までシームレスな線量推定が実現できることを示唆した(特許出願中)。今後の基礎研究・技術開発により、より高精度で高感度、迅速、安価、簡便なシステムの構築を目指して行きたい。

さらに、本研究では計画被ばく者(医療目的に心臓カテーテル検査を受ける患者)を対象に検査(放射線被ばく)前後の血液を採取し、酸化ストレス、DNA 損傷およびその他の血液指標がどのように変化するか解析した。その結果、検査後において DNA 損傷量の増加といくつかの指標が変動することを見出した。このことから、 γ H2AX 法は局所

低線量被ばくに対しても有用であることが示唆され、医療被ばくや放射線従事者被ばくを管理、測定、把握する上で重要な指標になりうることが考えられた。

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

- 盛武 敬, 茂呂田 孝一, 人見 剛: 実測法と推定法による脳血管内治療患者の被ばく線量評価 ～生物学的線量反応関係解明への応用可能性～. 放射線生物研究, 52 (4), 385-401, 2017
- 孫略, 稲葉洋平, 佐藤圭創, 平山暁, 坪井康次, 千田浩一, 盛武敬: ラジカル消去能を指標とした被ばく線量推定, 第 56 回電子スピンサイエンス学会年会(SEST2017)講演要旨集, p214-215 2017 年
- Lue Sun, Takashi Moritake, Kazuya Ito, Yoshitaka Matsumoto, Hironobu Yasui, Hidehiko Nakagawa, Aki Hirayama, Osamu Inanami, Koji Tsuboi. Metabolic analysis of radioresistant medulloblastoma stem-like clones and potential therapeutic targets. PLoS ONE. 12(4). e0176162. 2017
- 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, Yohei Inaba, Keizo Sato, Aki Hirayama, Koji Tsuboi, Ryuji Okazaki, Koichi Chida and Takashi Moritake. Changes in blood antioxidant capacity after irradiation: A novel biodosimetry method. The 8th Annual Meeting of the International Society of Radiation Neurobiology. International Congress Center EPOCHAL TSUKUBA. Ibaraki. Japan. February 9-10, 2018
- 稲葉洋平, 孫略, 佐藤圭創, 平山暁, 盛武敬, 千田浩一: 血液抗酸化能を指標とした放射線被ばく線量の推定, 第 23 回日本集団災害医学会総会・学術集会, パシフィコ横浜, 神奈川県横浜市, 2018 年 2 月 1 日～3 日
- 孫略, 稲葉洋平, 佐藤圭創, 平山暁, 岡崎龍史, 坪井康次, 千田浩一, 盛武敬: 電子スピン共鳴法を用いた被ばく後の血液抗酸化能レベルの測定, 茨城大学理学部公開シンポジウム (第 11 回 Quantum Medicine 研究会, 茨城大学重点研究講演会), 茨城大学理学部 K 棟インタビュースタジオ, 茨城県水戸市, 2018 年 1 月 28 日
- 孫略, 稲葉洋平, 佐藤圭創, 平山暁, 坪井康次, 千田浩一, 盛武敬: ラジカル消去能を指標とした被ばく線量推定, 第 56 回電子スピンサイエンス学会年会, 東京工業大学大岡山キャンパス, 東京都, 2017 年 11 月 2 日～4 日
- 孫略, 稲葉洋平, 佐藤圭創, 平山暁, 坪井康次, 千田浩一, 盛武敬: 電子スピン共鳴法を用いた被ばく後の酸化ストレスレベルの測定, 日本放射線影響学会第 60 回大会, 京葉銀行文化プラザ, 千葉県千葉市, 2017 年 10 月 25 日～28 日

- 孫略、稲葉洋平、佐藤圭創、平山暁、坪井康次、千田浩一、盛武敬：被ばく影響の測定、平成 29 年度若手放射線生物学研究会専門研究会、東京大学アイソトープ総合センター、東京都文京区、2017 年 9 月 2 日～3 日
- 孫略、五十嵐友紀、川崎祐也、李云善、河井一明、佐藤圭創、平山暁、坪井康次、盛武敬：虚血性心疾患患者に対する血中脂質ラジカル消去能測定と関連因子の同定、第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会、つくば国際会議場、茨城県つくば市、2017 年 6 月 28 日～29 日
- 孫略、稲葉洋平、佐藤圭創、平山暁、坪井康次、千田浩一、盛武敬：血中脂質ラジカル消去能を指標とした放射線影響測定、第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会、つくば国際会議場、茨城県つくば市、2017 年 6 月 28 日～29 日
- 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

H.知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1.特許出願

出願中

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

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

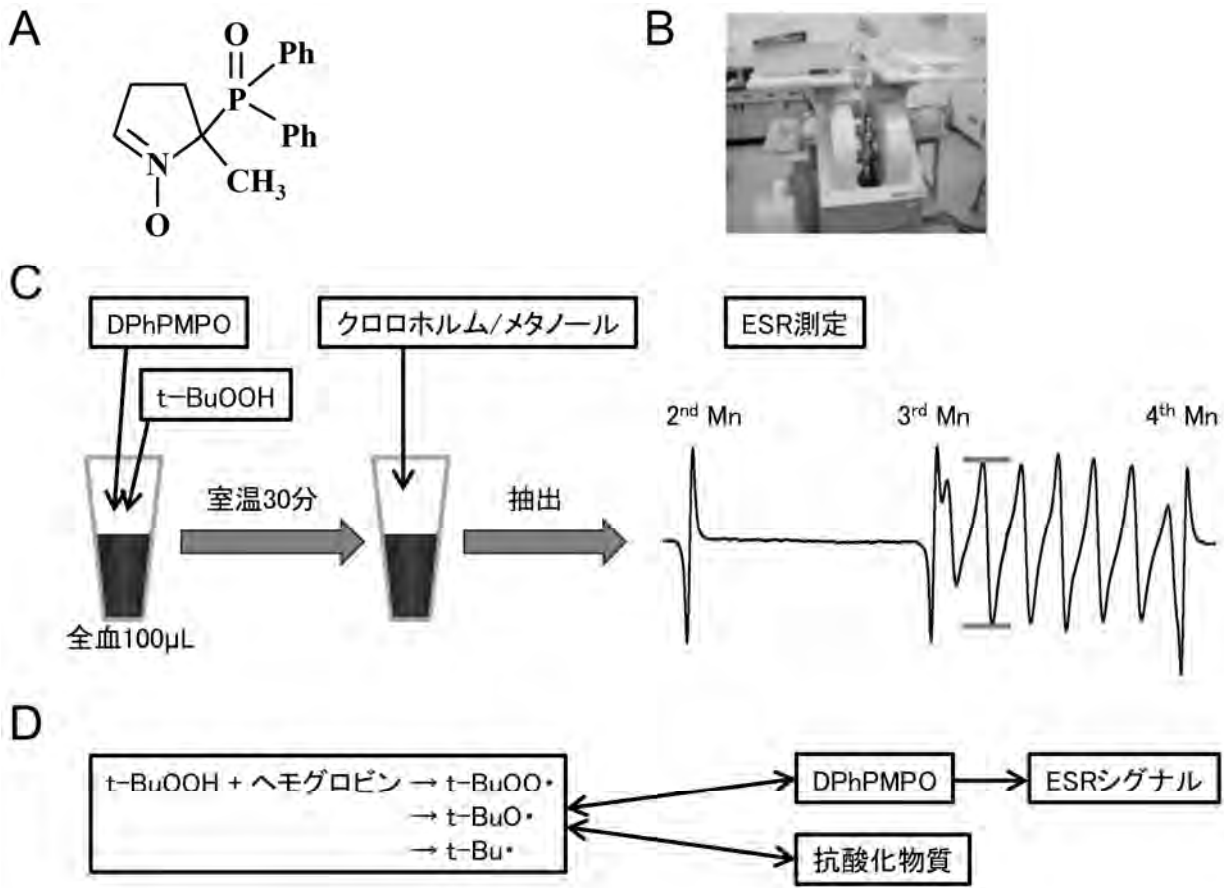


Fig.1 (A) DPhPMPOの構造式。(B) X band ESR の写真。(C) 抗酸化能測定の手順の模式図。(D) 反応プロセスの模式図。

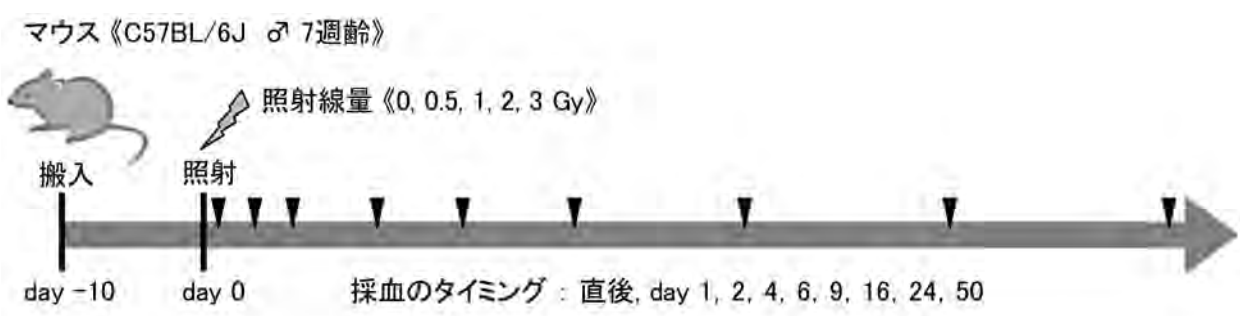


Fig.2 マウス実験手順。

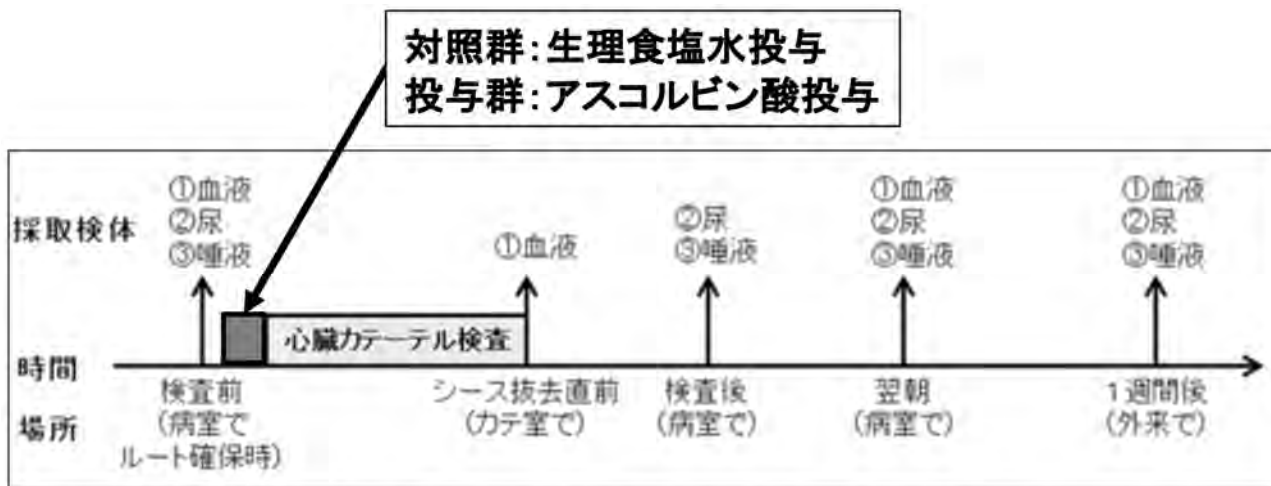


Fig.3 計画的被ばく者を対象とした被ばく後生体内反応の解析の生体サンプル回収スキーム。

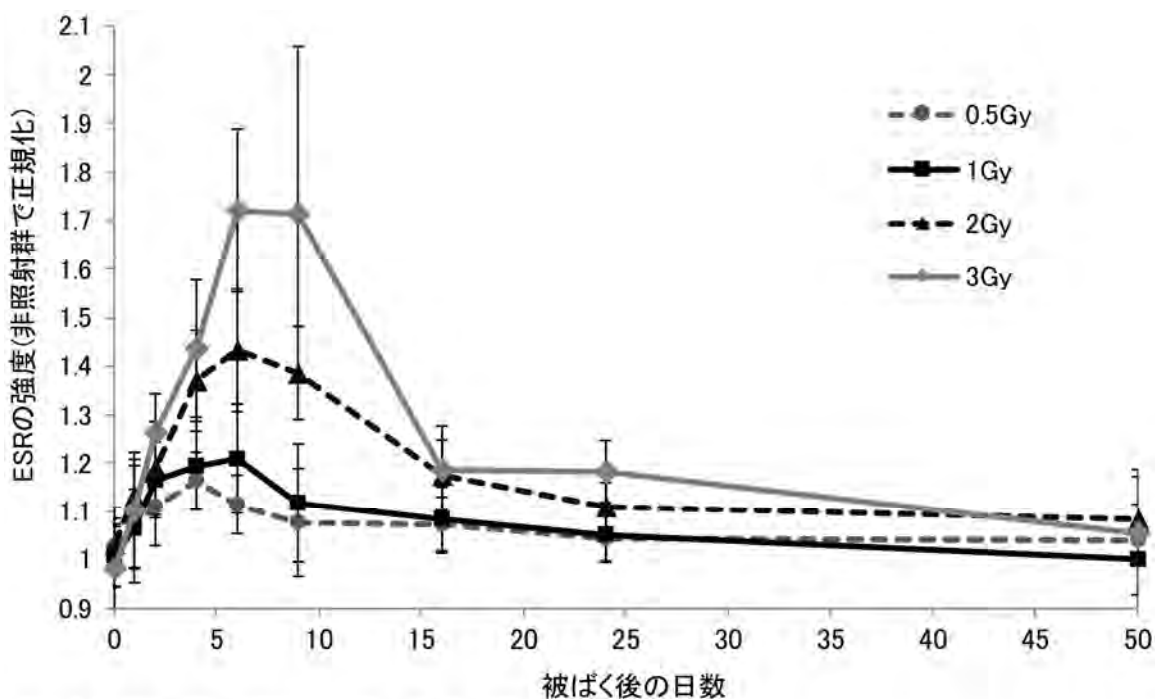


Fig.4 全身被ばく後のマウスの血液抗酸化能の変化。

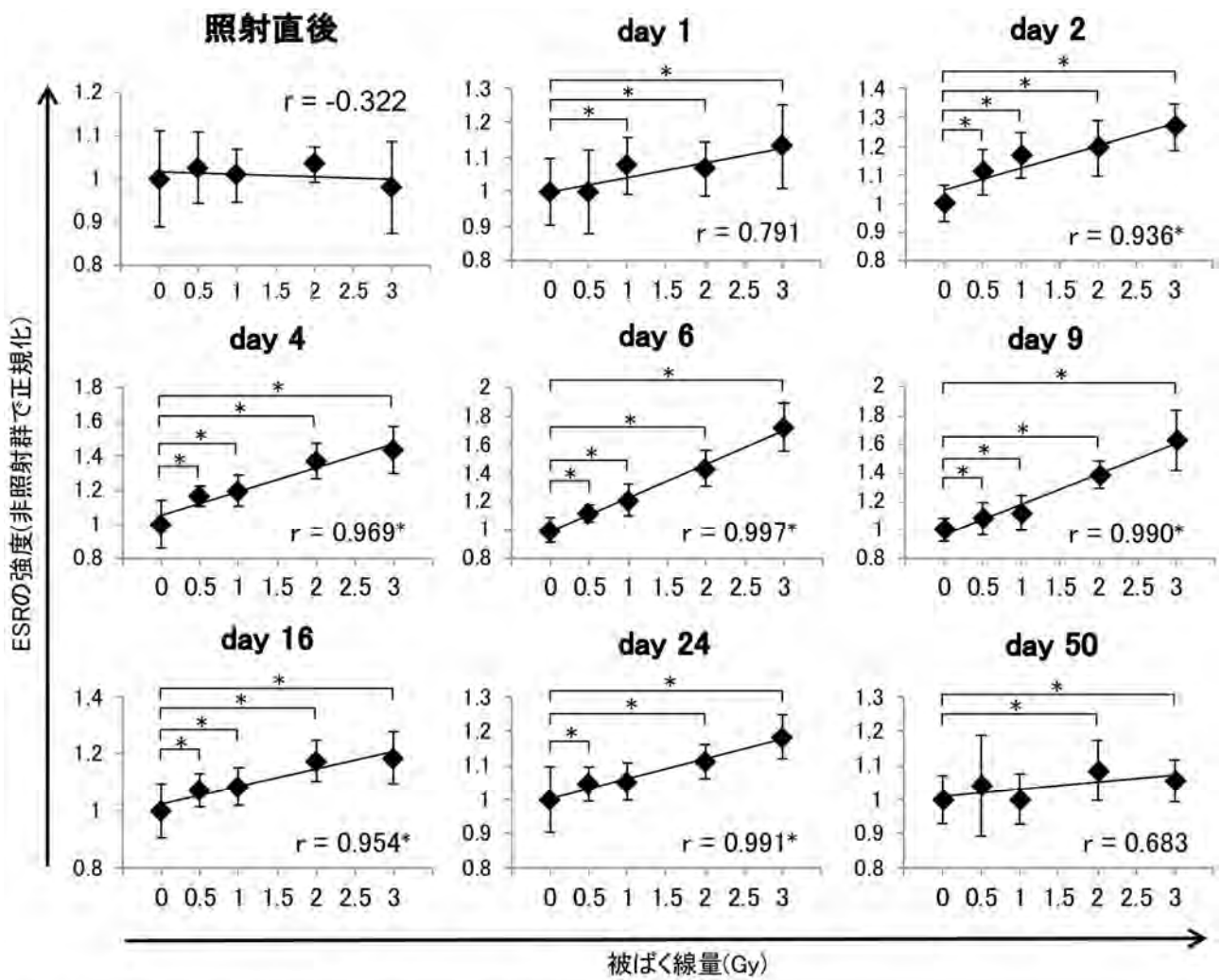
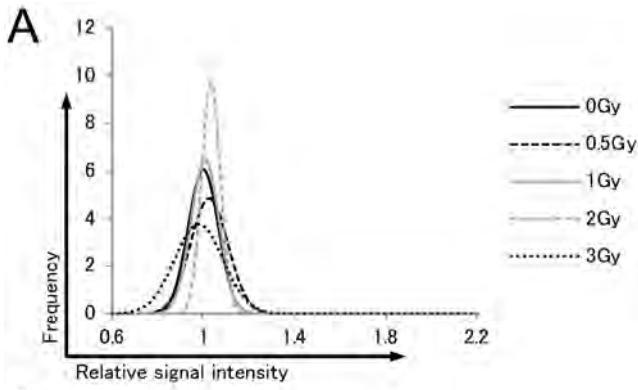
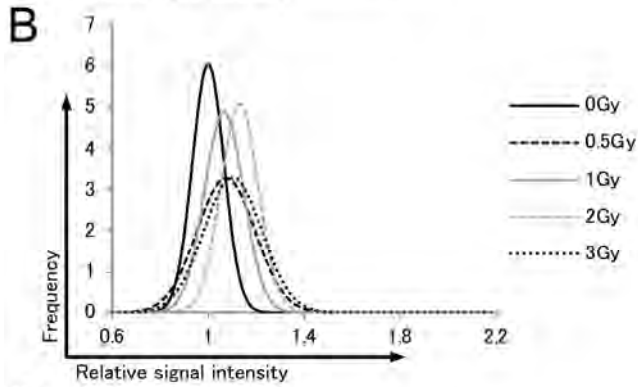


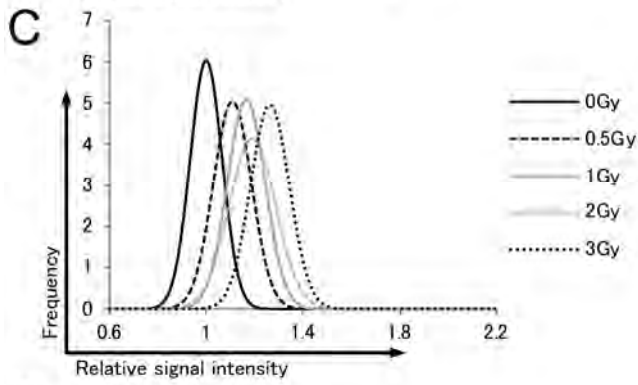
Fig.5 全身被ばく後のマウスの血液抗酸化能の変化。



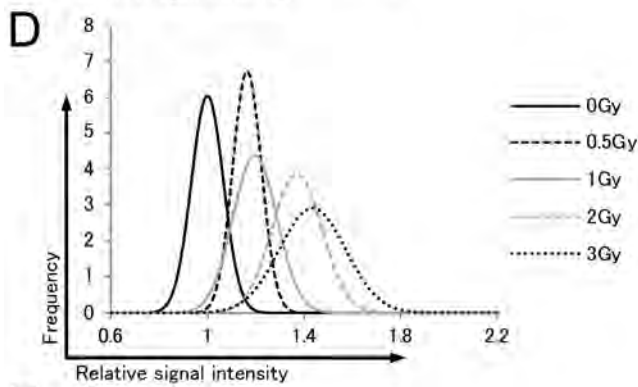
30 min	CV (vs. 0Gy)	FP (%) (vs. 0Gy)	FN (%) (vs. 0Gy)	AC (%) (vs. 0Gy)
0.5Gy	1.013	42.2	43.7	57.1
1Gy	1.004	47.7	47.5	52.4
2Gy	1.017	39.9	34.0	63.1
3Gy	0.990	55.9	53.7	45.2



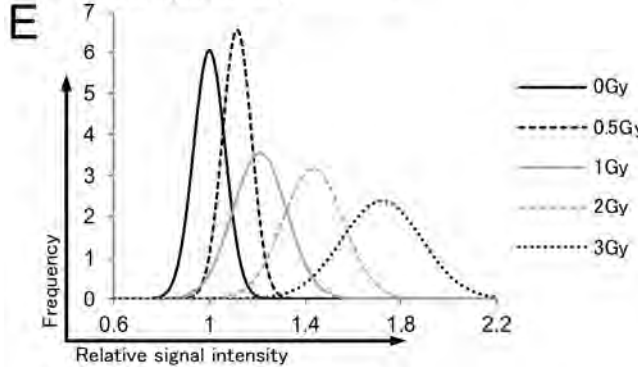
Day 1	CV (vs. 0Gy)	FP (%) (vs. 0Gy)	FN (%) (vs. 0Gy)	AC (%) (vs. 0Gy)
0.5Gy	1.037	28.6	37.9	66.7
1Gy	1.033	30.8	34.3	67.5
2Gy	1.065	16.1	20.3	81.8
3Gy	1.051	21.8	33.6	72.3



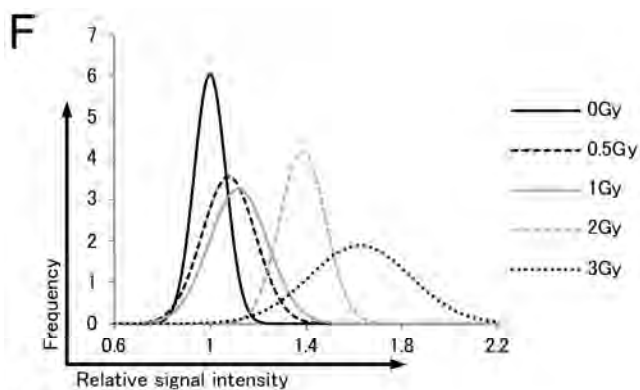
Day 2	CV (vs. 0Gy)	FP (%) (vs. 0Gy)	FN (%) (vs. 0Gy)	AC (%) (vs. 0Gy)
0.5Gy	1.054	20.5	24.5	77.5
1Gy	1.083	10.4	14.4	87.6
2Gy	1.095	7.4	16.1	88.2
3Gy	1.132	2.3	5.0	96.4



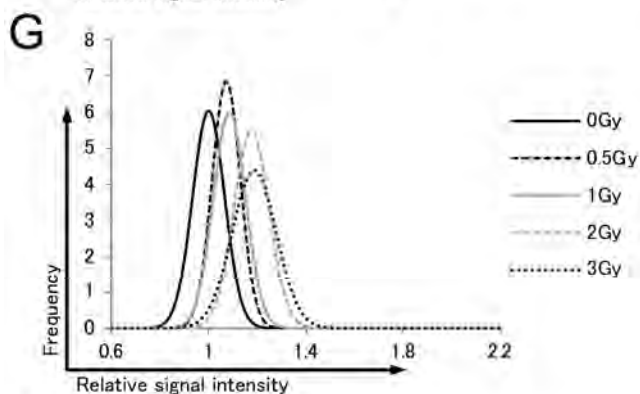
Day 4	CV (vs. 0Gy)	FP (%) (vs. 0Gy)	FN (%) (vs. 0Gy)	AC (%) (vs. 0Gy)
0.5Gy	1.082	10.7	8.3	90.5
1Gy	1.098	6.9	14.1	89.5
2Gy	1.185	0.3	3.6	98.1
3Gy	1.218	0.0	5.6	97.2



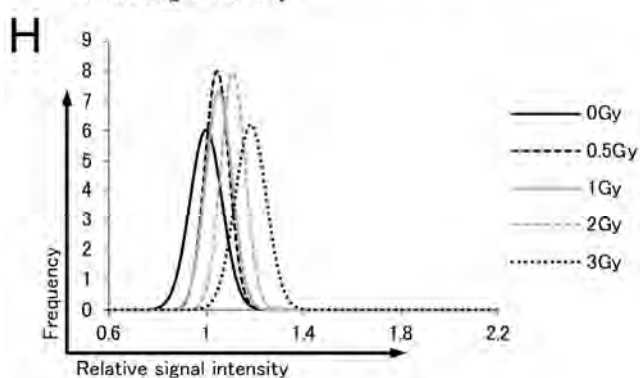
Day 6	CV (vs. 0Gy)	FP (%) (vs. 0Gy)	FN (%) (vs. 0Gy)	AC (%) (vs. 0Gy)
0.5Gy	1.058	19.1	17.0	81.9
1Gy	1.105	5.5	17.5	88.5
2Gy	1.217	0.1	4.3	97.8
3Gy	1.360	0.0	1.6	99.2



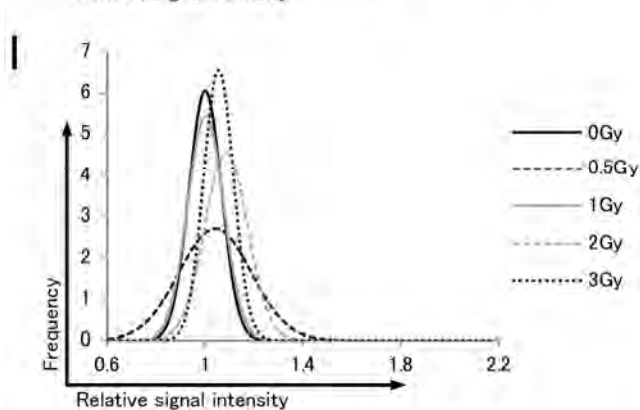
Day 9	CV (vs. 0Gy)	FP (%) (vs. 0Gy)	FN (%) (vs. 0Gy)	AC (%) (vs. 0Gy)
0.5Gy	1.039	27.7	36.4	68.0
1Gy	1.059	18.5	31.4	75.1
2Gy	1.193	0.2	2.1	98.9
3Gy	1.313	0.0	6.9	96.6



Day 16	CV (vs. 0Gy)	FP (%) (vs. 0Gy)	FN (%) (vs. 0Gy)	AC (%) (vs. 0Gy)
0.5Gy	1.036	29.1	26.6	72.2
1Gy	1.043	25.9	26.0	74.0
2Gy	1.088	9.1	11.3	89.8
3Gy	1.094	7.8	15.1	88.5



Day 24	CV (vs. 0Gy)	FP (%) (vs. 0Gy)	FN (%) (vs. 0Gy)	AC (%) (vs. 0Gy)
0.5Gy	1.023	36.6	32.5	65.4
1Gy	1.026	34.5	31.5	67.0
2Gy	1.056	20.0	13.4	83.3
3Gy	1.092	8.2	7.6	92.1



Day 50	CV (vs. 0Gy)	FP (%) (vs. 0Gy)	FN (%) (vs. 0Gy)	AC (%) (vs. 0Gy)
0.5Gy	1.020	37.9	44.5	58.8
1Gy	1.001	49.5	49.6	50.5
2Gy	1.043	25.9	31.3	71.4
3Gy	1.027	34.0	32.7	66.7

Fig.6 各測定ポイントにおける各被ばく群の分布とカットオフ値(CV)、偽陽性率(FP)、偽陰性率(FN)、正診率(AC)。

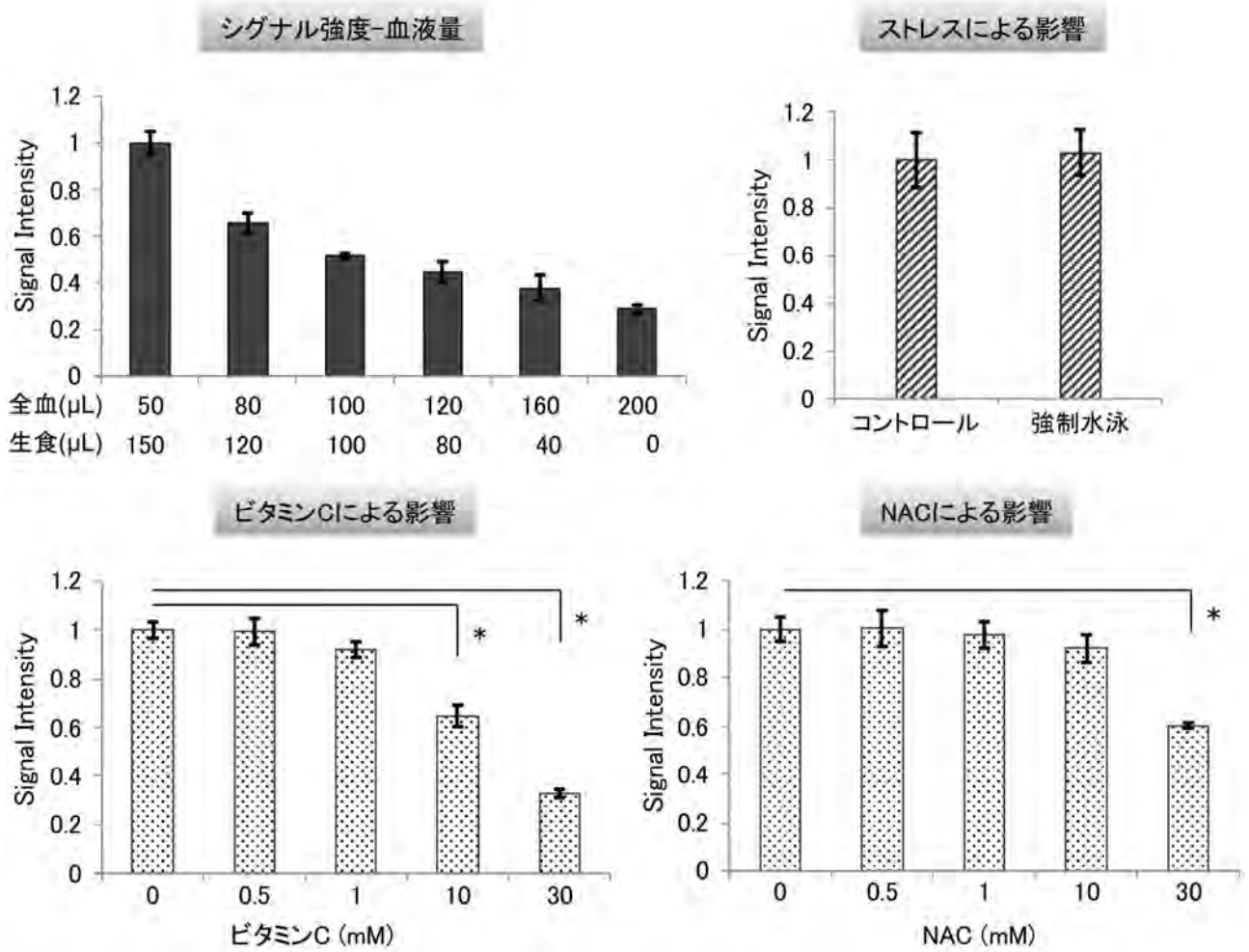


Fig.7 血液濃度、水泳ストレス、ビタミンC、NACによるESRシグナルの変化

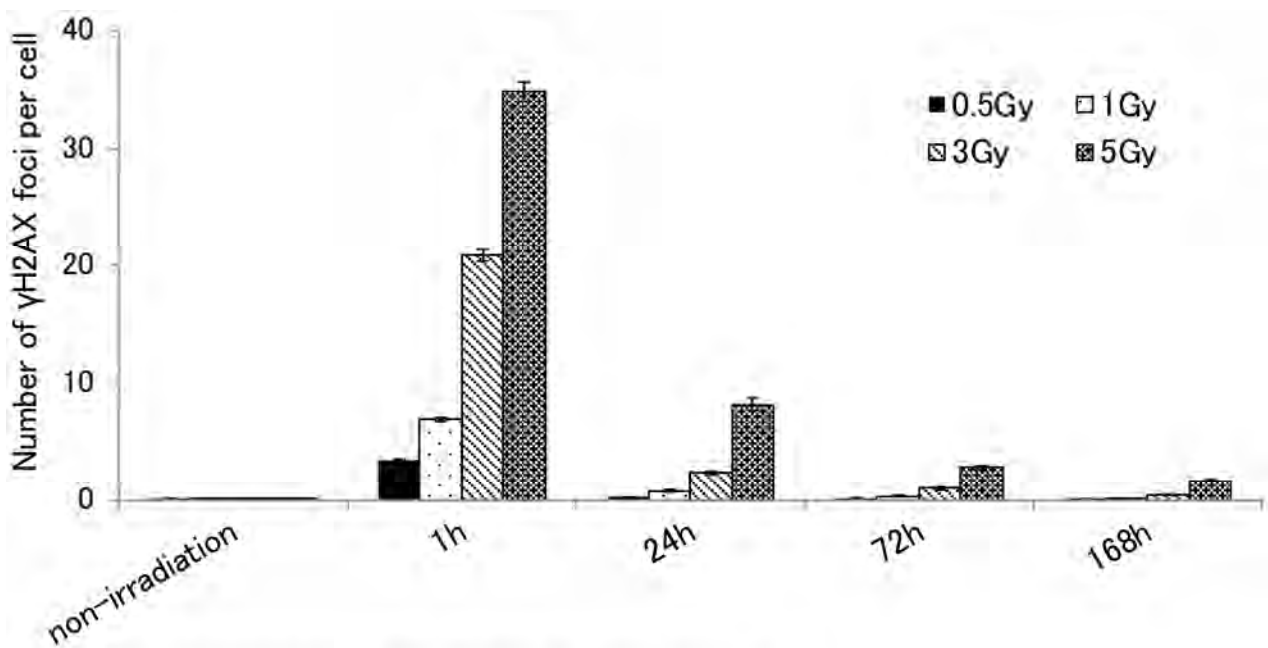


Fig.8 全身被ばくマウスのリンパ球に形成されるγH2AX fociの数

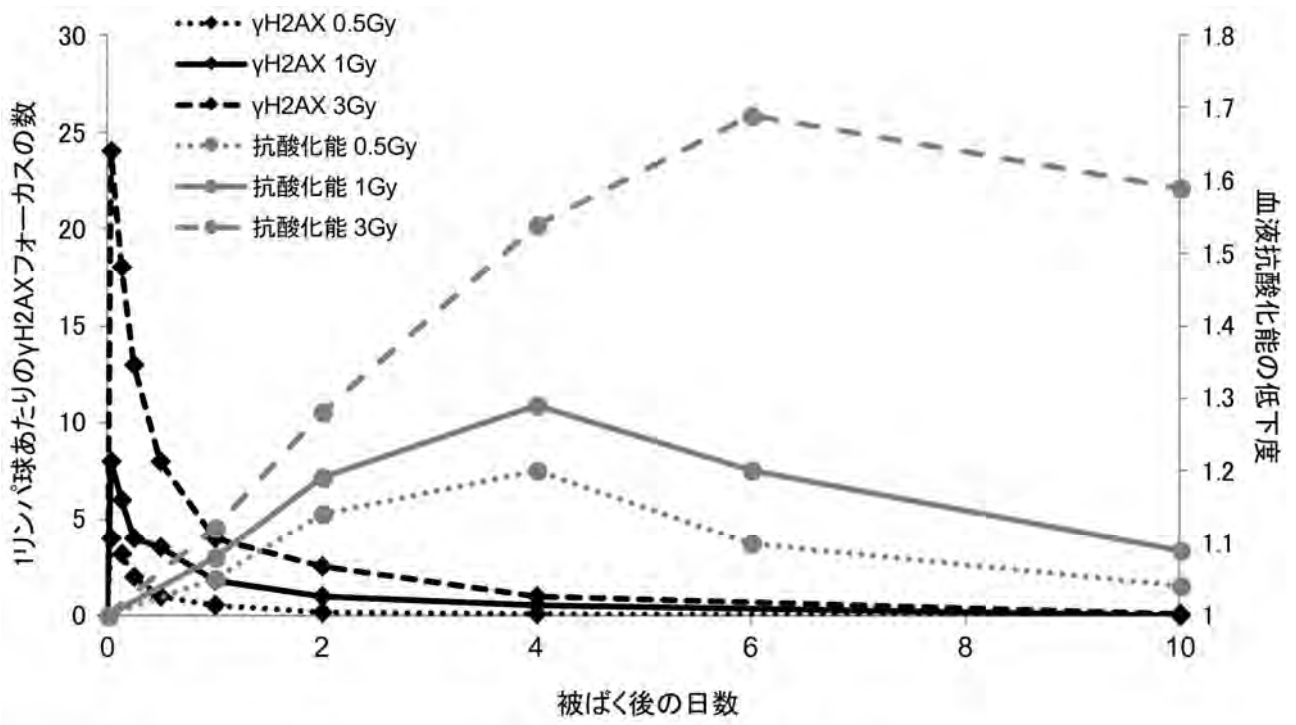


Fig.9 γH2AX法と血液抗酸化能法を組み合わせた被ばく線量推定(模式図)。

Patient's characteristics

	Ascorbic acids (+)					Ascorbic acids (-)					Unpaired t-test				
	1	3	5	7	9	mean	SD	2	4	6	8	10	mean	SD	F-value
Patient's number	2016/1/5	2016/1/6	2016/1/7	2016/1/13	2016/1/19			2016/1/21	2016/1/7	2016/1/7	2016/1/19	2016/1/20			
Examination date	RL	ML	HL	A.U.	M.T.			SM	M.S.	S.Y.	T.Y.	M.O.			
Patient's initial	78	75	70	72	59	70.8	7.26	78	76	73	73	81	76.4	3.58	0.16
Age	M	F	F	M	M			F	M	F	F	F			
Sex	166.2	159.2	149.5	175	161.3	162.24	9.37	152	164.5	147	154.5	146	152.8	7.42	0.12
Body height (cm)	72.7	46.8	46.1	95	54.8	57.08	11.60	33.2	66.7	60.3	48.4	54.1	52.54	12.79	0.57
Body weight (kg)	26.32	18.47	20.63	21.22	21.06	21.69	2.89	14.37	24.65	27.91	20.28	25.38	22.52	5.32	0.73
BMI (kg/m ²)	1560	0	0	1520	1170	850	790.63	500	300	0	0	0	160	230.22	0.098
Smoking (Brinkman index)	-	-	+	+	+			+	-	+	-	-			
Alcohol	-	+	-	-	-			-	-	-	-	+			
Allergy															

Medication	Ascorbic acids (+)					Ascorbic acids (-)						
	1	3	5	7	9	mean	SD	2	4	6	8	10
	CCB, Statin	Statin	CCB, NTG, Statin, VitD	Statin, VitB12	ARB, CCB, Diuretics			Statins	ARB, BB, CCB, NTG, Statin	CCB, Statin	ACEI, CCB, VitD	CCB, Statin, VitD

Diagnosis	Ascorbic acids (+)					Ascorbic acids (-)						
	1	3	5	7	9	mean	SD	2	4	6	8	10
	RA	EA	RA	EA	EA, PAD			EA, OMI	EA, CVD	RA	EA	EA

Risk factors	Ascorbic acids (+)					Ascorbic acids (-)						
	1	3	5	7	9	mean	SD	2	4	6	8	10
	DL	-	DL, DM, HT	DL, DM	DL, HT, HU			CKD	CKD, DL, DM, HT	CKD, DL, HT	HT	HT

Examination types	Ascorbic acids (+)					Ascorbic acids (-)						
	1	3	5	7	9	mean	SD	2	4	6	8	10
	CAG	CAG, LVG	CAG, Ach	CAG, Ach, FFR	CAG, AoG, L/E			CAG, L/E	CAG	CAG, Ach	CAG, Ach	CAG, Ach

Fluoroscopy time (min)	Ascorbic acids (+)					Ascorbic acids (-)									
	1	3	5	7	9	mean	SD	2	4	6	8	10			
Front	28.14	6.08	17.71	20.37	21.79	18.82	8.09	6.11	29.07	40	18.84	39.5	26.70	14.42	0.32
Lateral	42.31	9.7	24.53	8.33	9.64	18.90	14.68	3.08	20.66	56.17	56.98	46.77	36.73	23.87	0.19
total	70.45	15.78	42.24	28.7	31.43	37.72	20.58	9.19	49.73	96.17	75.82	86.27	63.44	34.92	
Front	221.01	53.93	158.8	203.16	163.36	160.05	64.90	49.55	206.38	356.46	178.21	359.37	241.99	130.94	0.25
Lateral	337.81	94.81	257.35	74.62	96.36	172.19	118.26	37.24	209.19	600.98	606.09	417.68	374.24	248.93	0.14
total	558.82	148.74	416.15	277.78	259.72	332.24	158.33	86.79	475.57	957.44	784.3	777.05	616.23	343.01	
Front	3.3	4.5	4.1	5	7.1	4.80	1.43	4.4	16.1	2.8	4.2	3.6	6.22	5.50	0.6
Lateral	4	1.8	1.6	1.6	2.2	2.24	1.01	0.5	3.5	3.4	16.4	3.3	5.42	6.27	0.3
total	7.3	6.3	5.7	6.6	9.3	7.04	1.39	4.9	19.6	6.2	20.6	6.9	11.64	7.76	
Front	11	5	14	6	7	8.60	3.78	6	5	14	15	13	10.60	4.72	0.48
Lateral	8	3	11	2	2	5.20	4.09	3	3	12	13	12	8.60	5.13	0.28
total	19	8	25	8	9	13.80	7.79	9	8	26	28	25	19.20	9.83	
Front	1285	714	1209	500	1624	1066.40	453.88	1293	563	1645	1357	1454	1262.40	412.96	0.5
Lateral	978	466	958	265	213	576.00	370.17	252	355	1415	1179	1345	909.20	560.71	0.3
total	2263	1180	2167	765	1737	1642.40	824.05	1545	918	3060	2536	2800	2171.60	973.67	
Front	4	7	7	7	4	5.50	2.12	4	4	6	6	5	5.00	1.41	
Lateral	3	3	3	3	2	3.00	0.00	2	2	4	4	4	3.00	1.41	
total	7	10	10	10	6	8.50	2.12	6	6	10	10	9	8.00	2.82	

Fig.10 患者情報。

血中アスコルビン酸濃度($\mu\text{g}/\text{mL}$)

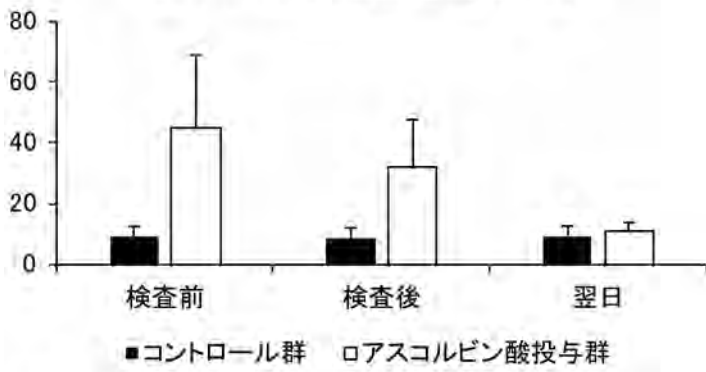


Fig.11 患者血中アスコルビン酸濃度

8-OHdG/creatinine (ng/mg)

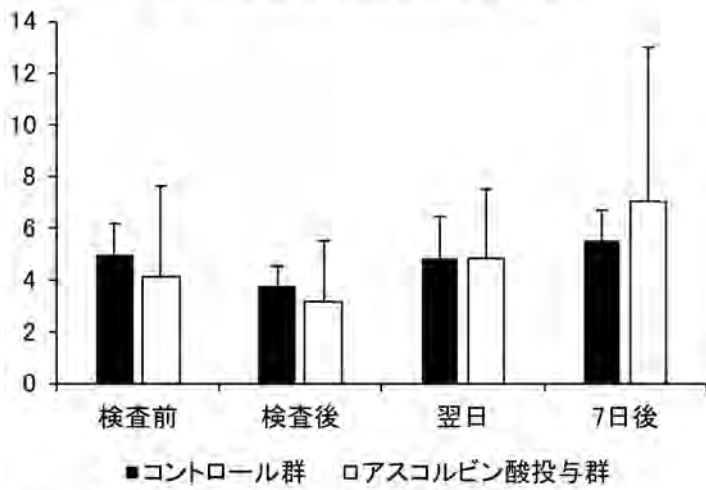


Fig.12 患者尿中8-OHdG濃度

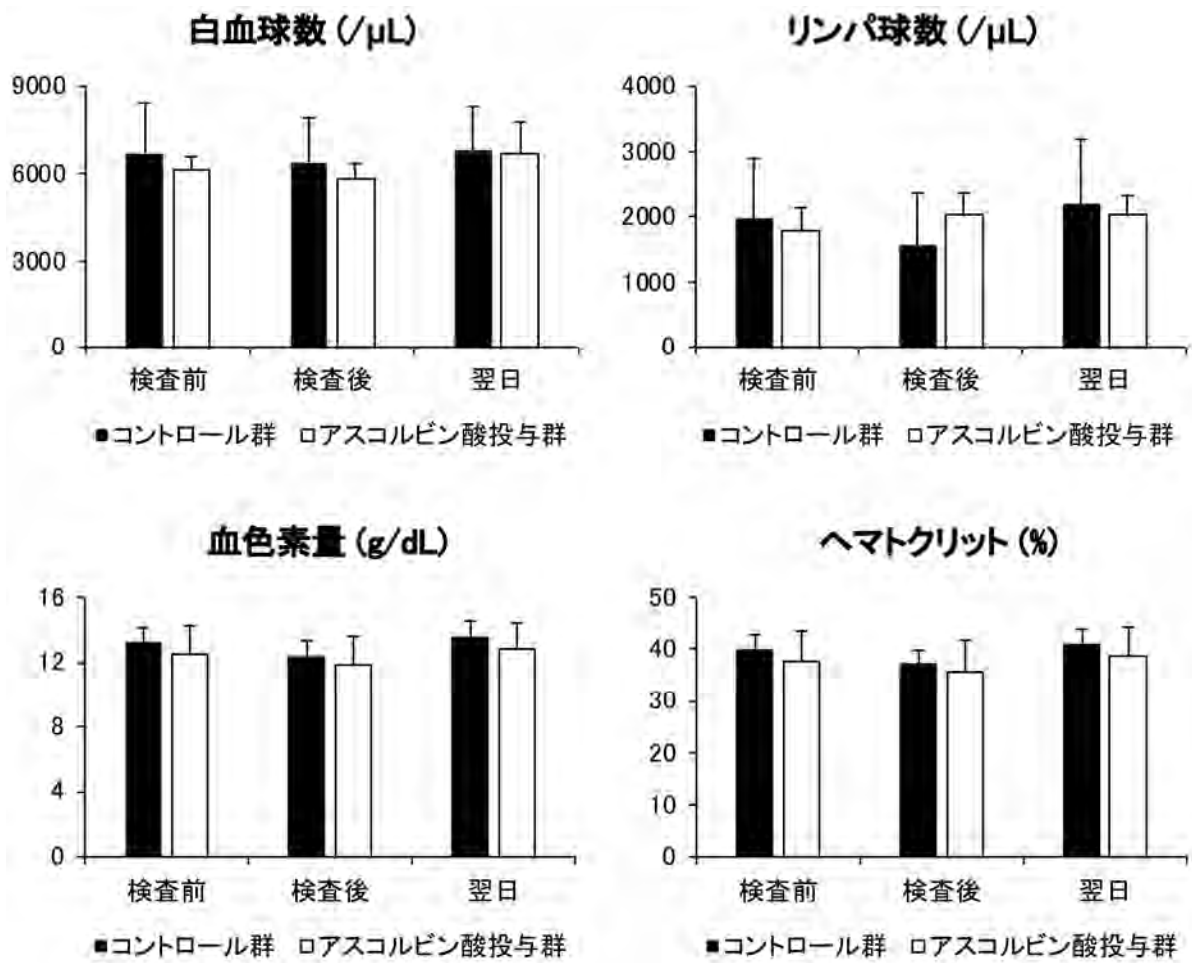


Fig.13 患者白血球数、リンパ球数、血色素量、ヘマトクリット

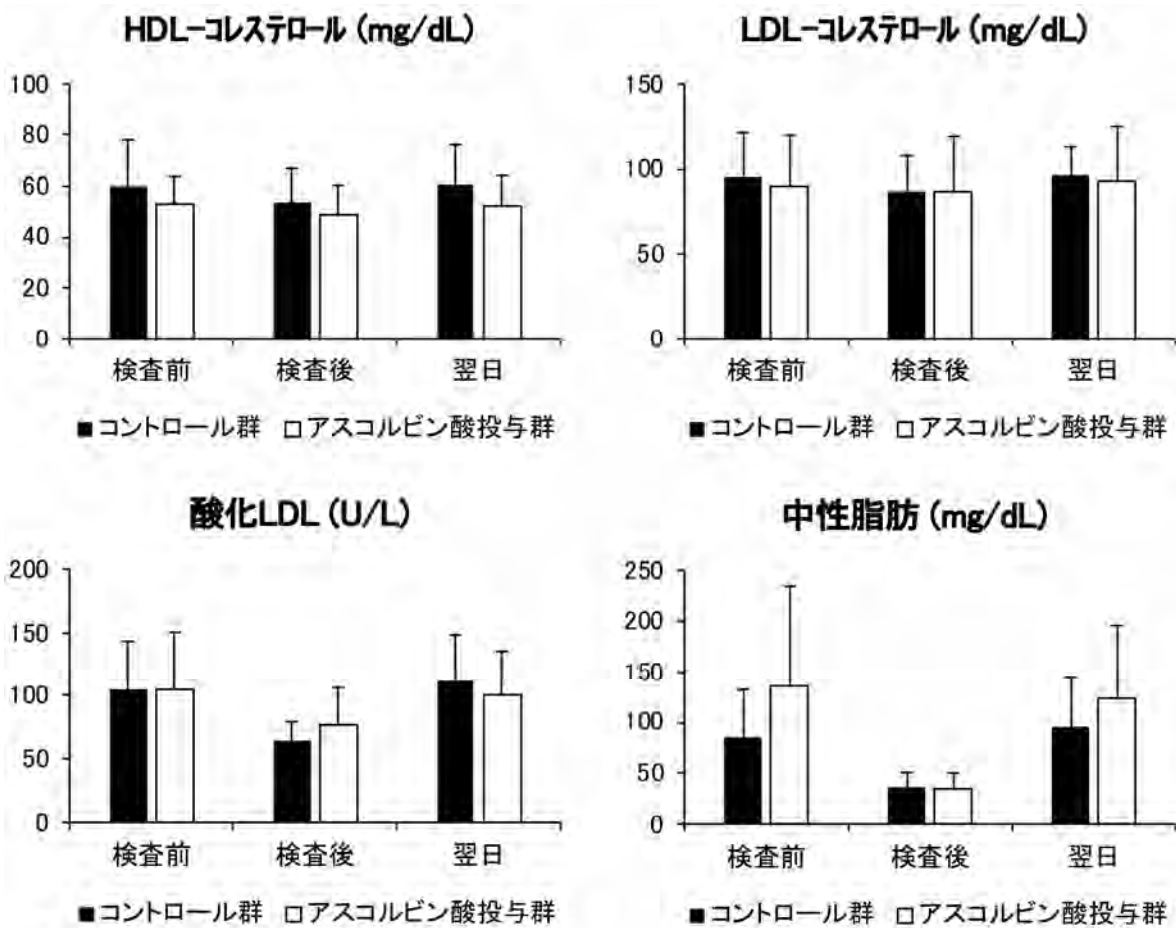


Fig.14 患者HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、酸化LDL、中性脂肪

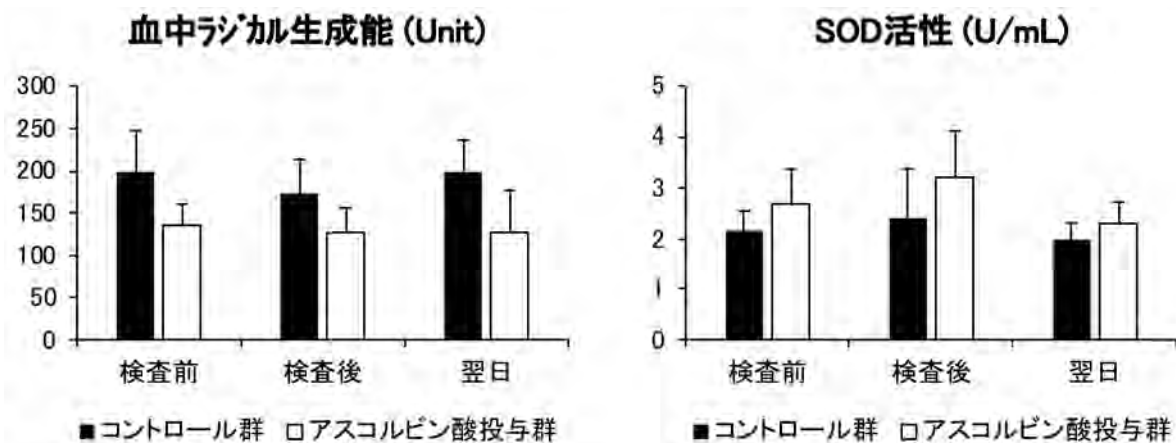


Fig.15 患者血中ラジカル生成能、SOD活性

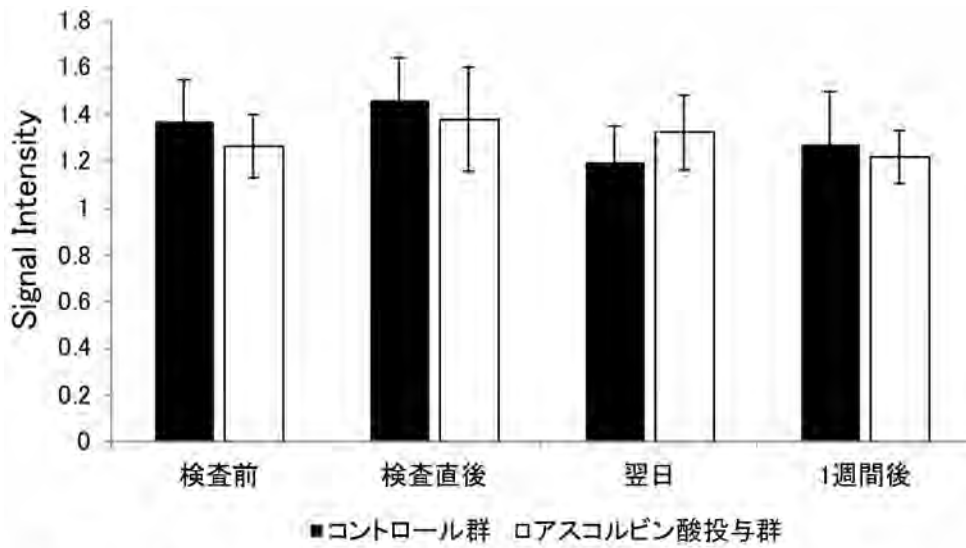


Fig.16 患者血液抗酸化能の変化

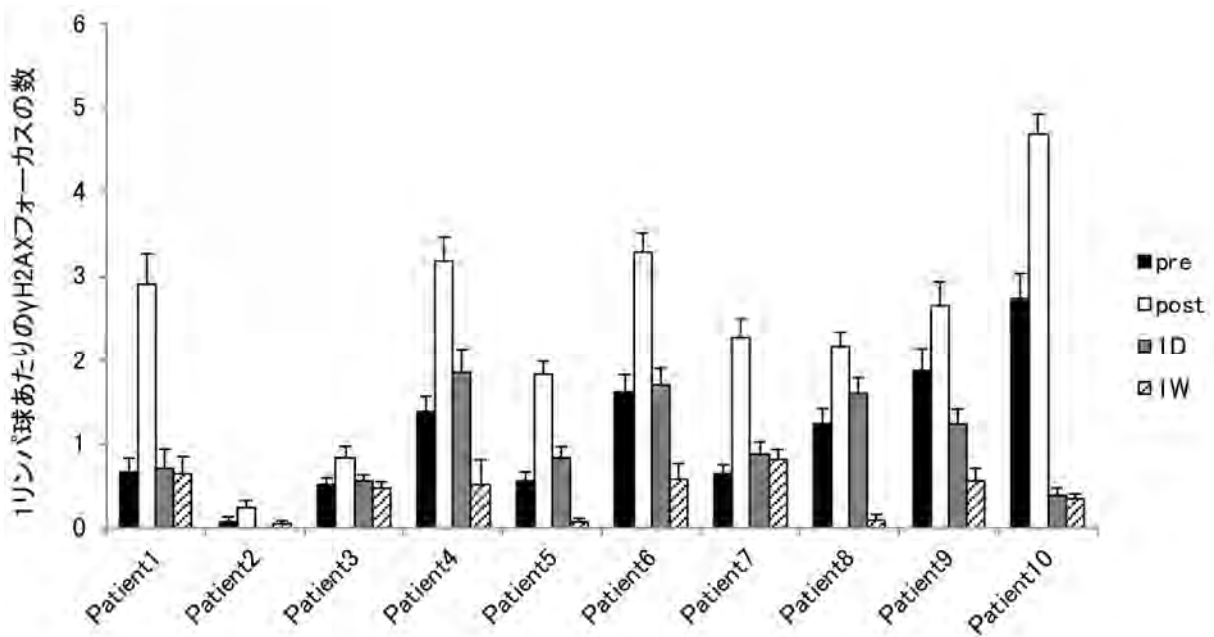


Fig.17 リンパ球あたりの γ H2AXフォーカスの数の変化。

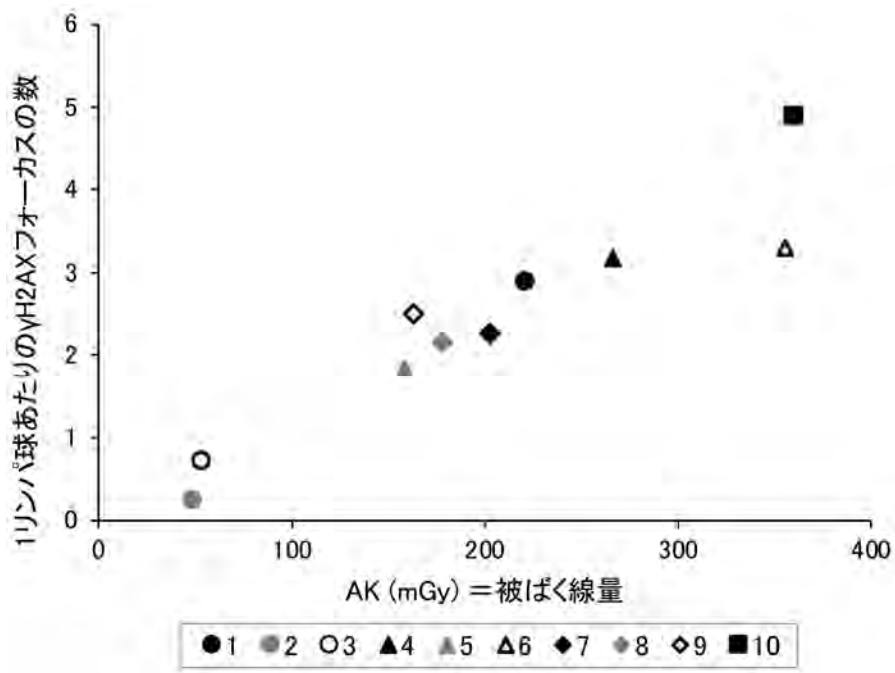


Fig.18 1リンパ球あたりの γ H2AXフォーカスの数の変化

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になります。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) 個人情報が漏洩した場合、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、個人情報の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
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 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、個人情報の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)		(代諾者) *必要な場合のみ
氏名	印	氏名
住所		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

労災疾病臨床研究事業費補助金
分担研究報告書

ミトコンドリア損傷を指標とした新たな生物学的線量評価法の検討

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

放射線による生物学的標的は DNA であり、DNA 二重鎖切断は、染色体異常、細胞死の誘導など、放射線の悪影響の主因である。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 (γ -H2AX) の解析は線量評価の有用な指標の一つとして考えられ、本研究班の分担研究者である茨城大学 中村麻子教授らにより解析が進められている。この指標は被ばく後すぐに観察され、高い検出感度を有する長所を持つ。しかし、細胞は防護機構を備えており、DNA が修復されると γ -H2AX は消失し、被ばく後の時間経過とともに減少する。このため、線量評価が可能な期間を被ばく後より長く、高精度の線量評価を確立するためには、いくつかの生物学的指標を組み合わせることが重要であると考えられる。DNA 修復にはエネルギーが必要であり、放射線照射後にミトコンドリアのエネルギー生産が活性化する。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は、発生源のミトコンドリアを攻撃し、酸化損傷を与える。以上より、被ばく後時間が経過した場合には、DNA 損傷応答、活性酸素、ミトコンドリア損傷などが指標として想定される。これまでの報告から、放射線は核 DNA と同様に、ミトコンドリア独自の DNA(ミトコンドリア DNA; mtDNA)に損傷を与えるため、細胞核に加えて、ミトコンドリアは放射線の主な標的器官である。また、核 DNA と比べて、mtDNA の DNA 修復効率は低いことから、ミトコンドリアに放射線の影響が顕著に現れることが考えられる。前年度までのヒト培養細胞を用いた我々の解析から、1 Gy 以上の X 線照射 24 時間後にミトコンドリア損傷が観察されることを明らかにした。この結果から、ミトコンドリア損傷は、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。

本年度は、放射線によるミトコンドリア損傷の出現時間や誘導のメカニズム、照射条件によるミトコンドリアへの影響、核 DNA 損傷応答とミトコンドリアの放射線応答の相互作用についての解析を進めた。我々は、DNA 損傷のセンサーである ATM は、核 DNA の損傷シグナルをミトコンドリアに伝え、核とミトコンドリア間のクロストークに重要な働きを持つことを明らかにした。ミトコンドリアの機能不全は、発がんに深く関与していることが知られている。ミトコンドリア損傷の解析は、単に放射線の線量評価だけでなく、高感度の放射線影響の検出という点においても重要であり、今後も継続した解析が必要であると考える。

A. 研究目的

原子力規制委員会「原子力災害対策指針」(平成 29 年 3 月 22 日全部改正)に基づき緊急被ばく医療体制の整備が進められる中で、検討課題として、1Gy 以上の緊急被ばく医療の優先度を定める選別(トリアージ)を可能にする迅速な線量評価手法の確立が求められている。

生物学的手法による線量評価のゴールドスタンダードは染色体異常の解析で、広島・長崎原爆被爆者、チェルノブイリ事故被災者、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た。この評価法は、事後的な線量評価に有用であるが、緊急時のトリアージのための迅速な線量評価としては、操作の簡便化、自動化による解析時間の短縮など解決すべき課題が指摘されている。海外の取り組み例として EU 内の多国間の協力により、物理学的手法と生物学的手法による様々な線量評価法を組み合わせた線量評価法のツールの開発が進められている

(Multibiodose : http://www.multibiodose.eu/read_more.html)。しかし、多くの対象者に短時間で、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検査する方法は未だに確立していない。このため、本研究班はヒトを対象として、物理学的手法と生物学的手法を

組み合わせた線量評価法の確立に取り組んだ。

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重要である。より高精度に線量評価を行うには、生物学的指標を組み合わせた線量評価法を確立することが必要である。

我々は、新たな生物学的評価の指標として、エネルギー代謝を制御するミトコンドリアを想定している。DNA 損傷応答にはエネルギーが必要であり、放射線照射後にミトコンドリアの酸化的リン酸化が活性化される。酸化的リン酸化は、酸素を消費して最終的に ATP を産生するが、一部の酸素から活性酸素が発生する。過剰な活性酸素は酸化ストレスとなり、発生源のミトコンドリアに酸化損傷を与えるため、被ばく後期の指標として、ミトコンドリア損傷が想定される。パーキンソン病原因遺伝子 parkin

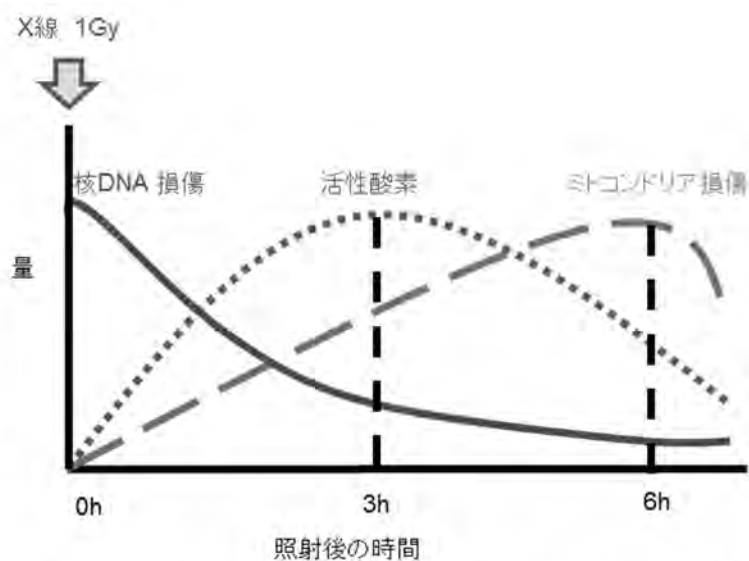


図1 放射線照射後の核DNA損傷、活性酸素、ミトコンドリア損傷の量の変化

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（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。parkin のミトコンドリア局在とフォーカス形成で、呼吸機能が低下した損傷を持つミトコンドリアの検出可能である。これまでヒト培養細胞を用いた我々の解析から、1Gy 以上の X 線急性照射で、活性酸素が増加し、その後、活性酸素の発生源であるミトコンドリアに酸化損傷を誘導することを明らかにした（図 1）（Shimura Cell Cycle, 16 (24):2345-2354, 2017）。放射線は、ミトコンドリア DNA に損傷を与える。ミトコンドリア DNA はヌクレオソーム構造を持たないことからヒストンタンパク質による防護効果が働かない、また、核 DNA と比較して DNA の修復効率が低いことから、DNA 損傷が残存する。以上のことから、放射線の影響が顕著に現れることが予想され、影響評価の指標として有用であると考えられる。

本研究では、被ばく初期を核の DNA 損傷で、被ばくから時間が経過した際にはミトコンドリア損傷を指標として、両者を組み合わせた放射線の被ばく線量を評価する方法の確立に取り組んだ。多くの指標を用いることで、より精度の高い線量評価法の確立が期待される。

B. 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、プラスチック内で、 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。

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 か月間の長期分割照射（総線量 0.46 または、2.6Gy）を行った。広島大学原爆放射線医科学研究所、放射線照射施設内の Cs-137 を線源とした低線量率照射装置を利用し、一日当たり、0.01Gy または、0.1Gy の線量で、4 日間照射した（総線量 0.04Gy または、0.4Gy）照射 24 時間後に、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

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。細胞の抽出液を分画し、ミトコンドリア画分と細胞質、核画分にわけ、parkin タンパク質の局在を検討した。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'-tetraethylbenzimidazolylcarboyanine 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-3. 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 (O₂⁻) 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-4. 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 により標識され分解される。この選択的排除機構であるミトコンドリアのオートファジー (マイトファジー) により、ミトコンドリアの質は保たれている。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 (図2)。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) で DNA 酸化損傷指標である 8-oxoguanosine (8-OHdG) の量を定量した。

B-5 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。

C. 研究結果

C-1. 放射線照射によるミトコンドリアへの影響解析

我々は、ヒト正常線維芽細胞 MRC-5、TIG-3

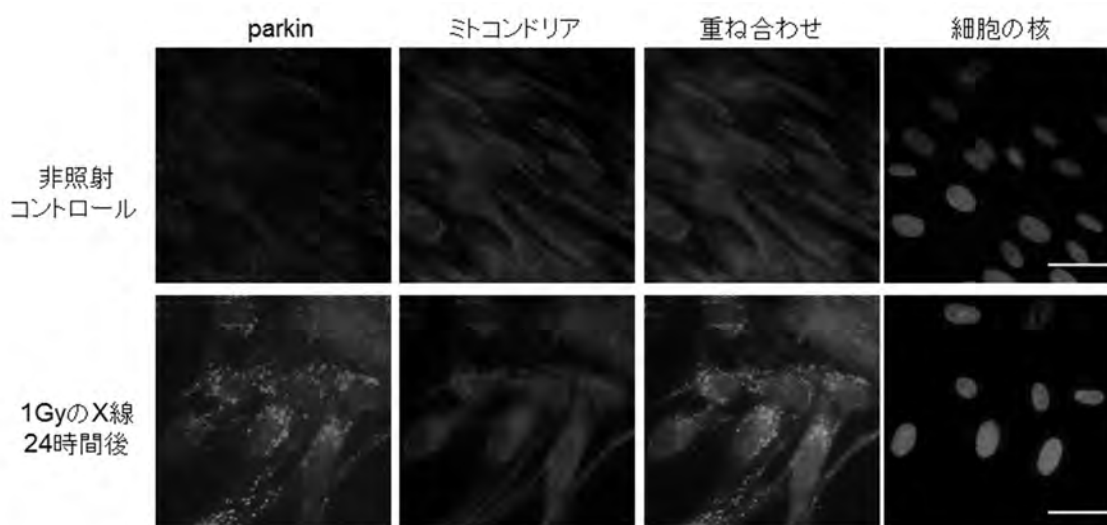


図2ヒト正常線維芽細胞における放射線誘発ミトコンドリア損傷の検出 スケールバーは、50 umを示す。

細胞を用いて、放射線によるミトコンドリアへの影響を解析した。照射条件は以下の3つの方法を用いた：急性照射、分割照射を1か月間（長期分割照射）、慢性照射（0.01Gy または、0.1Gy/day で4日間）。これまでの解析から、放射線照射後にミトコンドリアの生合成が促進され、細胞内のミトコンドリア量が増加することを明らかにした (Shimura, *Oncotarget* 7 (3):3559-70, 2016)。我々は、さらに、放射線によるミトコンドリアの呼吸機能への影響を解析した。JC-1 色素は正に荷電しているため、ミトコンドリアの膜電位に依存して局在し、膜電位を効果的にモニタリングすることが可能である。急性照射（0Gy から 10Gy）24 時間後の試料と非照射コントロールを比較して、JC-1 の染色に変化は見られなかった。同様に、急性照射でミトコンドリア複合体IVシトクロムcオキシダーゼ(cytochrome c oxidase, COX)の活性変化は観察されなかった。一方、長期の分割照射では、最後の照射から 24 時間後に、ミトコンドリア膜電位の上昇、COX の活性化、細胞内の ATP 量の増加が観察された。このミトコンドリアの呼吸機能の活性化は、分割照射の間、細胞培養液に 1 mM の抗酸化剤 N-アセチルシステイン (N-acetyl-cysteine :NAC) を投与すると抑制された。これらの結果から、長期放射線照射は、ミトコンドリアのエネルギー産生を活性化し、その過程には、活性酸素が関与することを明らかにした。

C-2 DNA 損傷応答の解析

放射線による DNA 損傷は、細胞の防御機構である DNA 修復により、修復される。

DNA 修復を実行するためには、エネルギーが必要で、ミトコンドリアの呼吸が活性化され、エネルギーを供給すると考えられる。我々は、DNA 損傷応答と DNA 修復について、二重鎖切断 (DSBs: double strand breaks) の指標であるヒストン H2AX のリン酸化 (γ -H2AX) と組み換え DNA 修復タンパク質 Rad51 の DSBs への集積を検討した。低線量 (0.4Gy) 急性照射 24 時間後では、 γ -H2AX と RAD51 のフォーカス形成は観察されず、放射線が誘導する DSBs が修復されたことが考えられる。一方、同じ総線量の慢性照射と分割照射では、照射 24 時間においても、 γ -H2AX and Rad51 フォーサイが観察され、DNA 損傷応答が持続することを明らかにした。

C-3. 放射線による活性酸素の誘導

ミトコンドリアのエネルギー生産、酸化的リン酸化では、酸素を消費するが、一部の酸素はスーパーオキシドアニオン(O_2^-)に変換され活性酸素が発生する。 O_2^- は、反応性が高く、毒性を持つため、細胞内のレドックス (酸化還元) 制御機構により無毒化される。しかし、過剰な活性酸素は酸化ストレスとなり、DNA、脂質、タンパク質を酸化して、酸化損傷を与える。

放射線照射後の活性酸素量の変化を、ミトコンドリアからの O_2^- は MitoSOX™ Red 試薬で検出し、蛍光量をフローサイトメーターで定量した。1Gy の照射 3 時間後からミトコンドリア由来の活性酸素が増加し、24 時間後に照射以前の状態に戻ることが示された。ミトコンドリアからの O_2^- はミトコンドリア呼吸鎖複合体 I (NADH:ユビキノン還元酵素) と III (補酵素 Q-シトクロム c

レダクターゼ) から発生することが知られている。呼吸鎖複合体 I の阻害剤ロテノンと呼吸鎖複合体 III の阻害剤アンチマイシン A は、ミトコンドリアの電子伝達を阻害して活性酸素を発生させる。これらの阻害剤を用いて、放射線が誘発する活性酸素の生成機構を検討した。阻害剤のみ、放射線と併用させた両方の場合において、 O_2 の増加が観察された。さらに、グルコースの代謝が O_2 の増加に関与するかどうかを、グルコースの拮抗阻害剤 2-deoxy-D-glucose (2-DG) を用いて検討した。事前投与によって、放射線照射後の O_2 の増加は観察されなかった。このことから、放射線による O_2 の発生には、グルコース代謝が関与することを明らかにした。

C-4. 活性酸素によるミトコンドリア損傷の誘導

ミトコンドリアから発生する O_2 は、近傍のミトコンドリア DNA を攻撃することが考えられる。ミトコンドリアの質を保つため、損傷を持つ機能不全のミトコンドリアはマイトファジーにより分解される。マイトファジーに関わる parkin (E3 ユビキチンライゲース) で染色し、膜電位の低下した機能不全のミトコンドリアを検出した。予想したように、ロテノン処理は、放射線照射と同様に、活性酸素の増加により parkin のフォーカス形成を誘導した。しかし、アンチマイシン A では、活性酸素を増加するにも関わらず、parkin のフォーカス形成は誘導されなかった。また、アンチマイシン A は放射線誘発のミトコンドリア損傷を抑制することを明らかにした。以上のことから、アンチマイシン A によって、

呼吸鎖複合体 III から発生する活性酸素は、ミトコンドリア損傷の誘導に関与しないことが考えられる。2-DG によるグルコースの代謝阻害では、放射線誘発の活性酸素量の増加はみられず、ミトコンドリア損傷の誘導も起きないことを明らかにした。以上の結果から、放射線による細胞の代謝、呼吸鎖複合体 I からの活性酸素の発生がミトコンドリア損傷の誘導に関与することを明らかにした。

C-5. 急性照射、慢性照射、分割照射によるミトコンドリア損傷の検討

急性照射、長期分割照射、慢性照射によるミトコンドリアへの影響解析を行った。総線量 0.04 と 0.4Gy とし、照射 24 時間後のミトコンドリア損傷を計測した。前述したように、1Gy よりも低い線量での急性照射では parkin フォーカスの形成は誘導されない。一方、慢性照射と分割照射では、0.4Gy の低線量の放射線により parkin で染色される細胞が増加することを明らかにした。放射線高感受であることが知られている DNA 損傷のセンサーである ATM を欠損細胞では、1Gy 以上の照射でも parkin のフォーカス形成が誘導されない。このことから、ATM が放射線による parkin フォーサイの誘導に関与することが示唆された。

一月間の長期分割照射期間におけるミトコンドリア損傷量の変動を parkin のフォーカス形成を持つ細胞を指標に測定した。非照射コントロールの細胞では、31 日間の培養で、parkin のフォーカス形成は誘導されなかった。一方、分割照射では、21 日目(総線量 0.3 または 1.5Gy) から parkin のフォーカス形成を持つ細胞が観察された。

ウエスタンブロッティング法を用いたタンパク定量実験においても、長期放射線照射後 parkin はミトコンドリア分画に蓄積することを明らかにした。以上の結果から、放射線誘発のミトコンドリア損傷は、照射条件、照射期間に影響を受けることを明らかにした。

C-6 核 DNA 損傷応答とミトコンドリアの放射線応答の相互作用

放射線照射後の核 DNA 損傷とミトコンドリア損傷の関係を明らかにするため、 γ -H2AX と parkin の染色により、放射線照射後の経時変化を検討した。1Gy の X 線照射後すぐに、 γ -H2AX は誘導され、DNA 修復と共に、 γ -H2AX は消失した。その後、3 時間後からの活性酸素の増加の後の遅い時間に parkin フォーサイを持つ細胞が観察された。さらに、ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤 mito-TEMPO は、放射線照射後初期 (1 時間後) の核 DNA 損傷は抑制できないが、照射 6 時間後では、核 DNA 損傷とミトコンドリア損傷の両方を抑制することを明らかにした。これらの結果は、初期の DNA 損傷は放射線の直接作用で、ミトコンドリアの酸化ストレスは、関与しないが、後期の DNA 損傷を誘導することを明らかにした。ATM の阻害剤 KU-55933 や ATM 欠損細胞では、放射線照射後の γ -H2AX と parkin のフォーカス形成が抑制されることから、ATM は核 DNA 損傷の認識と核からミトコンドリアへの損傷シグナルの伝播において、重要な働きを持つことが示された。

上記の研究成果は、英文論文としてまとめ、雑誌 Cell Cycle に報告した (Cell Cycle.

2017;16 (24):2345-2354)。

D. 考察

放射線の生物学的標的である核 DNA 損傷の生物影響の解析が進められ、DNA 修復、細胞周期監視機構、細胞死の誘導などの DNA 損傷応答が明らかにされた。DNA 損傷応答を実行するためには、エネルギーが必要で、ミトコンドリア呼吸機能が活性化される。我々は、放射線照射によるミトコンドリアへの影響を解析し、ミトコンドリア膜電位の増加と COX の活性化によりミトコンドリアの呼吸機能が亢進することを明らかにした。ミトコンドリアの活性化の後、副産物として活性酸素量が増加し、ミトコンドリアに損傷を誘導する。

ミトコンドリアは、細胞内の活性酸素の発生源である。呼吸により、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 I と III から活性酸素が発生する。複合体 I では、活性酸素はミトコンドリア DNA があるマトリックスに放出される。一方、複合体 III からはミトコンドリア内膜から両側に活性酸素が放出される。我々は、呼吸の阻害のため、ロテノンまたは、アンチマイシン A を用いた。ロテノンによるミトコンドリア呼吸鎖複合体 I での電子伝達系の阻害により活性酸素が増加する。この活性酸素の増加により、ミトコンドリア損傷が誘導される。一方、アンチマイシン A によるミトコンドリア呼吸鎖複合体 III の阻害では、活性酸素が増加するにも関わらず、ミトコンドリア損傷は誘導されない。以上より、我々は、ミトコンドリア損傷の誘導には、呼吸鎖複合体 I からの活性酸素が関与することを明らかにした。

急性照射の放射線応答は一過性であるのに対し、長期分割照射では、慢性的な DNA 損傷応答が誘導される。DNA 損傷応答は、ミトコンドリアの呼吸機能を活性化する。副産物として持続的に発生する活性酸素は細胞内のグルタチオン量を低下させる。このため、過剰な活性酸素は、ミトコンドリア酸化ストレスを誘導する。以上のことから、急性照射と分割照射の照射条件の違いで、ミトコンドリアの放射線応答が異なることを明らかにした。

神経幹細胞を用いた解析から、高い DNA 修復効率により、放射線によるミトコンドリア損傷も起こらないことが示された (Cell Cycle 16 (6):565-573, 2017)。神経幹細胞を増殖因子の添加なしで培養し、分化誘導した神経細胞では、繊維芽細胞と同様に、持続的な DNA 損傷応答がミトコンドリア損傷を誘導することを明らかにした。このことから、残存する DNA 損傷が DNA 損傷応答を誘導し、ミトコンドリアに損傷シグナルが伝わり代謝活性化され、活性酸素の発生がミトコンドリアに損傷を誘導することが考えられる。

ATM は、ミトコンドリアのマイトファジーにも関与する。ATM の欠損は、マイトファジーの消失、ミトコンドリア機能不全による持続的な酸化ストレスを誘導することが ATM 欠損マウスの解析により明らかにされている。ATM 欠損細胞では、放射線照射後のミトコンドリアの活性化や活性酸素の増加、parkin のフォーカス形成が観察されない。ミトコンドリアの放射線応答が機能しないため、ミトコンドリアのフラグメンテーションが観察され、細胞死が誘導される (Cell Cycle 15(8):1099-1107, 2016)。結

果として、ATM 欠損細胞では、放射線に高感受性を示す。

ATM は、放射線照射後の核、ミトコンドリア間のクロストークに関与する。核 DNA 損傷によって、ATM は活性化され、DNA 損傷シグナルを標的分子に伝える。ATM は細胞内の AMP/ATP 量を監視する AMP-activated protein kinase (AMPK)の活性化や peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 α (PGC1 α)の発現誘導を介して、ミトコンドリアの生合成の制御に関与する。活性酸素は、エネルギー代謝の副産物として発生する。通常の細胞では、放射線照射後の活性酸素の増加が観察されるが、ATM 欠損細胞では、活性酸素の変動は観察されない。mito-TEMPO によるミトコンドリアの酸化ストレスの除去により、放射線照射後の遅い時期に観察される核 DNA 損傷は抑制される (Cell Cycle. 2017;16 (24):2345-2354)。

放射線によるミトコンドリア損傷は、酸化 DNA の指標である 8-OHdG の蓄積で観察される。mtDNA の変異は、呼吸機能の低下となり、ミトコンドリアからの活性酸素を増加させる。ミトコンドリアの機能低下は細胞のがん化に寄与し、多くのがん細胞で、正常細胞とは異なるエネルギー代謝異常が報告され、がん細胞の増殖能獲得や低酸素状態での細胞増殖の適応に関与している。また、ミトコンドリア酸化ストレスは、がんの微小環境に影響を与え、がん細胞が生育しやすい環境を形成することが考えられる。放射線はミトコンドリアにどのような影響を及ぼし、放射線発がんに関与するのかを理解明らかにすることは、ヒトの放射線による健康影響を理解する上で重要である。

核 DNA 損傷とミトコンドリア損傷は、1つの試料で同時に検出を行うことが出来るため、染色に必要な数時間でこれらの指標の評価が可能であり、より迅速な評価法の確立が期待される。緊急被ばく時のトリアージのための線量評価法の確立は、早急に検討が必要な課題であり、本研究で得られた成果に対する社会への貢献は大きい。このため、今後も放射線によるミトコンドリアへの影響について、継続した解析が必要である。

E. 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、より低線量で、レドックス制御異常による活性酸素が蓄積し、ミトコンドリア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（呼吸鎖複合体 I から発生する活性酸素）が原因で、放射線と抗酸化剤の併用で抑制することが可能である。
- ・放射線照射後の核、ミトコンドリア間の相互作用に、ATM が重要な働きを持つ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. ATM-mediated mitochondrial damage response triggered by nuclear DNA damage in normal human lung fibroblasts. *Cell Cycle*. 2017;16 (24):2345-2354

(2) 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 EK, Kamiya K. 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*. 2017;38(5):570-578.

(3) 志村勉、樺田尚樹 ミトコンドリアの放射線応答と放射線発がんへの影響 *放射線生物研究* 2017;52:183-193.

2.学会発表

(1) Shimura T and Kunugita N. Radiation-induced mitochondrial damage in neural progenitor stem cells and differentiated cells. The 8th Annual Meeting of the International Society of Radiation Neurobiology. 2018;2. P.25

(2) Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, 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.: 2017;.2. P.59.

(3) 志村勉、笹谷めぐみ、河合秀彦、神
谷研二、小林純也、小松賢志、櫻田尚樹
ATM が制御する核とミトコンドリアの放

射線応答 第 60 回日本放射線影響学会 ;
2017.10. P.91

H.知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

平成29年度労災疾病臨床研究事業費補助金
 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
 (150803-02) (研究代表者： 樺田尚樹)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Umakoshi M, Yamaguchi I, Hirata H, Kunugita N, Williams B, Swartz H, Miyake M.	In vivo Electron Paramagnetic Resonance Tooth Dosimetry: Dependence of Radiation-induced Signal Amplitude on the Enamel Thickness and Surface Area of ex vivo Human Teeth	Health Physics	113(4)	262-270	2017
Kato M, Chida K, Moritake T, 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, Komatsu K, Kunugita N.	ATM-mediated mitochondrial damage response triggered by nuclear DNA damage in normal human lung fibroblasts.	Cell Cycle	16 (24)	2345-2354	2017
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	187(5)	630-636	2017
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	16 (6)	565-573	2017
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 EK, Kamiya K.	The causal relation between DNA damage induction in bovine lymphocytes and the Fukushima nuclear power plant accident.	Carcinogenesis.	38(5)	570-578	2017
Shimura T, Yamaguchi I, Terada H, Kunugita N	Lessons learned from radiation biology: Health effects of low levels of exposure to ionizing radiation on humans regarding the Fukushima accident.	Journal of National Institute of Public Health	67(1)	115-122	2018;

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
志村勉、櫻田尚樹	ミトコンドリアの放射線応答と放射線発がんへの影響	放射線生物研究	52(2)	183-193	2017
盛武 敬, 茂呂田 孝一, 人見剛	実測法と推定法による脳血管内治療患者の被ばく線量評価 ～生物学的線量反応関係解明への応用可能性～	放射線生物研究	52 (4)	385-401	2017
孫略、稲葉洋平、佐藤圭創、平山暁、坪井康次、千田浩一、盛武敬	ラジカル消去能を指標とした被ばく線量推定	第56回電子スピンスイエンス学会年会 (SEST2017) 講演要旨集	38(5)	214-215	2017
Sun L, Moritake T, Ito Kazuya, Matsumoto Y, Yasui H, Nakagawa H, Hirayama A, Inanami O, Tsuboi K	Metabolic analysis of radioresistant medulloblastoma stem-like clones and potential therapeutic targets.	PLoS ONE.	12(4).	e0176162	2017