

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

総合研究報告書

研究代表者 櫻田尚樹

平成 30 (2018) 年 3 月



## 目 次

### I. 総合研究報告

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

櫻田尚樹 ..... 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 43

III. 研究成果報告会資料集および記録 ..... 47



## I. 総合研究報告



労災疾病臨床研究事業費補助金  
総合研究報告書

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 樺田尚樹 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

- ・ 日本人の前歯に適応したループ径が小さい共振器(6.0mm)も利用可能となった。新しく開発された共振器を用いて、本測定法での定量性を高めるために歯のエナメル質の厚みと信号の応答特性の関係を明らかにした。エナメル質として 0.3mm の厚みの違いが信号に 1.3 倍程度の影響を与えることを確認した。
- ・ 口腔内で安定して線量測定ができるようにこれまでのトラブル事例も踏まえて測定に関する手順書を作成して測定の質が確保できるようにした。これまでのトラブルは試料にラジカルを有する物質が付着することによる(放射線誘発ではないと考えられる)信号の検出と測定時のノイズの混入である。ノイズは電磁波シールドルームの利用で大幅に改善し、測定の安定性が増したが、まだ不対電子を含む物質の付着によると考えられる信号が観測されることがあり、現状ではループの洗浄で対応が可能となっているが、より根本的な対策も求められる。
- ・ 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、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、290MeV の炭素線では Cs-137 線源に比べ約 0.4 の応答であり、本方法が、宇宙飛行士でも対象になり得ると考えられた。また、L band EPR tooth dosimetry においては、Cs-137 線源に比べ医療での X 線では 4 倍程度応答が大きいことを確認した。
- ・ 審美歯科治療により偽陽性となりえることを確認した。
- ・ 地域でのボランティアを対象とした計測では、コミュニケーションを改善させる効果も確認できた。本装置が弁別できる線量は 1Gy 程度であり、福島県内の住民であっても本研究に参加することで得られる線量評価や健康面に関する直接的な利益が期待でき

ない。そのことを承諾し、さらに、研究での参加で電磁波曝露など、不利益を被る可能性があることを理解した上でも、自らの被災体験から研究に協力したいとする地域の住民の協力を得ることができた。本測定は、一人あたりの測定が 10 分間程度で、結果をその場で確認できる特徴がある。コミュニケーションに配慮することで、県民健康調査や他の線量評価に関する調査に協力してこなかった住民（比較的內部被ばく線量が相対的には大きいと推測される集団である）でも、この研究に参加し、住民と研究者間での信頼関係構築に役立つ機会となったと考えられる。

- ・ ボランティアを対象とした計測で歯科 X 線によると考えられる信号が検出され、歯科用 X 線装置での 50 回の照射で信号を検出しうることを確認した。測定の感度が向上したことに伴う医療での放射線曝露の影響の除去が課題であることを再確認した。その一方で、放射性ヨウ素のように特定の臓器に集中的にエネルギーが付与される場合には、感度が確保されないことも現段階の課題であり、事故による放出される放射性核種等の種類や放射線曝露のパターンによっては本方法では対応に限界がある。
- ・ 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。

### (2) 生体内 DNA 損傷レベルの測定

- ・ リン酸化ヒストン H2AX ( $\gamma$ -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。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  $\gamma$ -H2AX アッセイデバイスの予備的な開発および、計画的被ばく者に対する生体内 DNA 損傷レベルを  $\gamma$ -H2AX アッセイによってモニタリングするための条件検討を行った。
- ・ その結果、IVR 実施患者の血液を用いて線量相当の DNA 損傷が検出するとともに、抗酸化剤投与での放射線による DNA 損傷レベルの抑制を確認した。
- ・ また、 $\gamma$ -H2AX 検出を簡便に行うことのできる新規デバイスとして、Polydimethylsiloxane チップに着目し、リンパ球相当のサイズの細胞を固定すると同時に、赤血球等を効率よく排除できる微細構造を試作するとともに細胞固定を行うための表面改質方法を評価した。
- ・ マウスにおいて、被ばく後線量依存的 DNA 損傷が検出され、被ばく線量評価が可能であることを確認した。
- ・ 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  $\gamma$ -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  $\gamma$  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。
- 臨床研究を行う前に、マウスの全身に X 線 0、0.5、2Gy を照射し、経時的に採血し、X バンド EPR により血中抗酸化能を測定した。照射群では線量依存的に抗酸化能の低下が観察され、特に照射 2、4、6 日後の抗酸化能レベルと照射線量には高い相関関係( $r=0.97$  以上)が認められた。この結果から、少なくとも、被ばく線量 0.5-2Gy、被ばく後 2~6 日の範囲内では、本手法により被ばく線量を推定することができると考えられた。放射線災害や放射線を利用したテロでは多くの公衆の中から一般災害でのトリアージ基準に加え、さらに被ばく線量推計によるトリアージが必要である。このため、マウス実験および計画的被ばく者に対する臨床試験を利用して、被ばく線量と連動するバイオマーカーについて解析し、以下の結果を得た。
- マウスに X 線を全身照射し、経時的に X バンド EPR により血中抗酸化能を測定し、被ばく線量と血中抗酸化能の関連を明らかにし、血中抗酸化能測定による被ばく線量推定の可能性が示唆された。
- $\gamma$  H2AX と血中抗酸化能の応答様態が異なることを確認した。
- X バンド EPR による血中抗酸化能測定が既存の他の EPR 測定法よりも優れていることを確認した。

#### (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は、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の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  
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

予期せぬ放射線被ばくが様々な場面において発生する可能性があり、トリージ対応可能な線量評価の重要性が指摘されている。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。

このように、現在のところ線量推計をもとにした緊急被ばく医療でのトリアージは様々な試みが展開されているものの体系化しておらず、原子力規制庁の原子力災害時の医療体制の在り方に関する検討チーム<sup>1</sup>での検討においても、体表面汚染等の放射性物質の計測によるものに留まっており、旧原子力安全委員会の提言「緊急被ばく医療のあり方について」（平成 13 年報告、平成 20 年改訂）において、緊急被ばく医療体制の整備として、原子力施設においては、作業員の応急処置とともに、簡易な測定等による汚染の把握（サーベイランス）、スクリーニングを行った後、除染や汚染の拡大防止の措置を行い、緊急被ばく医療機関に患者を搬送することとされている想定から進展しておらず課題として残っている。

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

最適化を図り、必要な治療を必要なタイミングで始めることに役立つものと考えられる。

しかし、現在のところ、トリアージのための線量評価に関する手法が確立しておらず、多くの対象者に時間及び過度の侵襲も与えずに、0.5-1.0Gy 以上の放射線被ばくの有無やその程度を一定の不確かさの範囲内で検査する方法は未だ確立していない。対策の頑強性を保ち、線量推計結果への信頼性を高めるためには複数の手法による方法を確立する必要がある。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と考えられるからである。

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

この事例からも事故時の対応では、緊急

---

1  
<https://www.nsr.go.jp/disclosure/committe>

[e/yuushikisya/kinkyu\\_hibakuiryo/index.html](https://www.nsr.go.jp/disclosure/committe/e/yuushikisya/kinkyu_hibakuiryo/index.html)

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

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。さらには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<sup>3</sup>。

トリアージの手法としては、これまで各種のバイオアッセイによる線量推計の開発が進められ、事例への適用が試みられており、そのゴールドスタンダードは染色体異常分析である。この方法はリンパ球培養を伴い、結果を得るまでに時間がかかること、その分析技術を有するものが限られるなど課題がある。これに対して、自動検出顕微鏡画像解析システムや高精度 FISH な

どを用い、解析時間を短縮し、検出感度を上げるための改善が試みられているが、結果を得るまでに時間がかかること、低線量放射線の影響は検出されにくいこと、安定型の染色体異常を検出する方法では、累積した放射線被ばくの影響しか検出できないことなどの課題がある。この課題は世界各国で共通し、どの国も国内の研究機関だけでは有事の際の対応が困難であることから、国を超えた研究機関ネットワークが構築されつつある。この活動を促進した事象の一つが、ブラジルのゴイアニアでの医療用線源による環境汚染事象（1987年）であり、国際保健機関による BioDoseNet やヨーロッパでの European RENEB, MULTIBIDOSE projects やその他の多くの取り組みが開始されることとなった。

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

2011年の東京電力福島第一原子力発電所の事故は、バイオ・ドシメトリーに対する国際的な協力体制も含む準備の重要性を再認識させることとなり、新しい対応として、Integrated Clinical Diagnostics System (ICDS) が提案された。提案された、ICDSは、データ管理、品質管理、個人情報保護、地図情報としての可視化、モデリングの要素により

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

<sup>3</sup> 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.

初期対応への貢献が目指されている。このようネットワークでは、標準作業手順書 (SOP (Standard Operating Procedure) ) の作成など品質管理に関わる取り組みも行われている。

#### 【電子スピン法を用いた線量推計手法】

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

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

測定法を米国ダートマス大学 EPR センタ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。

#### 【リン酸化型ヒストン H2AX ( $\gamma$ -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 ( $\gamma$ -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、 $\gamma$ -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、 $\gamma$ -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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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 $\gamma$ -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。

#### 【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<sup>+</sup> (nicotinamide adenine dinucleotide)、NADP<sup>+</sup> (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。

#### 【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(酸化リン酸化)を活性化させる。酸化リン酸化は、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。

#### 【本研究課題で目指すもの】

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

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

#### B. 研究方法

以下の 4 つの研究を実施した。

- (1) 電子スピン共鳴法を用いた線量推計法の開発
- (2) リン酸化ヒストン H2AX ( $\gamma$ -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) エナメル質の厚みが信号に与える影響の検証

エナメル質の厚みが信号に与える影響を検証するために健常な 10 本の日本人の上顎中切歯を用いて X 線を 1, 5, 10, と 20 Gy と段階的に照射し、照射前と照射後でそれぞれ歯肉に隣接する部分、中央部、切縁部部位で EPR 信号を計測した。

エナメル質の厚みは、マイクロフォーカス CT (inspeXio SMX-90CT、島津製作所) を用いて得られた画像を画像解析ソフト (Osirix™ imaging software (Ver. 5.8.5 on MacOS.10.9)を用い Chen の方法により、それぞれの部位において計測した。

歯の構造の違いによる EPR 信号の大きさの違いを電磁波のシミュレーションでも検討した。

### b) オンサイトでの in vivo EPR 測定の課題の検討

装置を福島県に運び測定を実施した。被災地での研究は、倫理的な面に関して特段の配慮が求められることから、事前の説明を徹底し、慎重に研究を進めた。

この装置の検出限界は、in vivo ではよい条件でも 1Gy 程度と考えられ、原発事故の影響を確認することはできず、福島県内の住民であっても本研究に参加することで得られる線量評価や健康面に関する直接的な利益が期待できない。その一方で電磁波曝露などの不利益を被る。このことを十分に説明した上で、災害を経験なさった立場から、測定に対する印象などを率直に語って頂くようにした。測定は、上顎切歯を対象とし、

掃引回数を 20 回とし、その測定を 3 セット繰り返すようにした。

### c) 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, UV-B, UV-C 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。

### d) 高 LET 放射線の応答

高 LET 放射線として 290MeV のカーボンイオンを歯に照射した。照射は、量研機構放射線医学総合研究所の HIMAC で行った。照射は上顎切歯を対象とし、歯がブラッグピークに位置するようにし、10Gy、20Gy、30Gy をそれぞれ 6 本の歯に照射した。

また、別の高 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 12 本の健常な日本人の臼歯に段階的に照射した。中性子は、Be(d,n) 反応により生成させるとともに、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、

### e) X バンドでの測定

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

### f) 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 ( $\gamma$ -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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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、 $\gamma$ -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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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  $\mu$ 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、 $\gamma$ -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  $\mu$ L に EDTA と溶血バッファーを加え、PDMS チップでの  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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の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 $\mu$ 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 $\mu$ L、生理食塩水 100 $\mu$ L と混合後、tert-butyl hydroperoxide (tBuOOH) 20 $\mu$ 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、スピンドア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。

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  $\gamma$ 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  $\gamma$ 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。 $\gamma$ H2AX の foci 数のカウントにはパ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  $\gamma$ 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。

放射線診療による放射線曝露後の生体内 DNA 損傷レベル解析としては本研究においてサンプル調製条件および送付条件に問題がないことを確認したのち、IVR 実施前後の被験者サンプルを茨城大学に送付し、 $\gamma$ -H2AX による DNA 損傷レベルの解析を行った。すなわち、産業医科大学グループによって採取された IVR(Interventional radiology)実施前後の被験者リンパ球における DNA 損傷レベルを $\gamma$ -H2AX アッセイによって測定するための予備的実験として、まず、産業医科大学におけるリンパ球の固定・分離作業および茨城大学までのサンプル送付条件が適当であるかを具体的な試行により検討し、その上で実施した。

#### 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

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

##### 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、フラスコ内で、 $\alpha$ -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- $\gamma$  co-activator-1  $\alpha$  (PGC1- $\alpha$ ) 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(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)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 ( $\gamma$ -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) 日本人の前歯に適応したループ径が小さい共振器(6.0mm)も利用可能となった。新しく開発された共振器を用いて、本測定法での定量性を高めるために歯のエナメル質の厚みと信号の応答特性の関係を明らかにした。エナメル質として 0.3mm の厚みの違いが信号に 1.3 倍程度の影響を与えることを確認した。

2) 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。

3) 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うることも示唆された。

4) 線質による違いを確認し、290MeVの炭素線ではCs-137線源に比べ約0.4の応答であり、本方法が、宇宙飛行士でも対象になり得ると考えられた。また、L band EPR tooth dosimetry また、Cs-137線源に比べ医療でのX線では4倍程度応答が大きいことを確認した。

5) 地域でのボランティアを対象とした計測では、コミュニケーションを改善させる効果も確認できた。本装置が弁別できる線量は1Gy程度であり、福島県内の住民であっても本研究に参加することで得られる線量評価や健康面に関する直接的な利益が期待できない。そのことを承諾し、さらに、研究での参加で電磁波曝露など、不利益を被る可能性があることを理解した上でも、自らの被災体験から研究に協力したいとする地域の住民の協力を得ることができた。本測定は、一人あたりの測定が10分間程度で、結果をその場で確認できる特徴がある。コミュニケーションに配慮することで、県民健康調査や他の線量評価に関する調査に協力してこなかった住民（比較的内部的に被ばく線量が相対的には大きいと推測される集団である）でも、この研究に参加していただけた。

6) ボランティアを対象とした計測で歯科X線によると考えられる信号が検出され、歯科用X線装置での50回の照射で信号を検出しうることを確認した。測定の感度が向上したことに伴う医療での放射線曝露の影響

の除去が課題であることを再確認した。

その一方で、また、放射性ヨウ素のように特定の臓器に集中的にエネルギーが付与される場合には、感度が確保されないことも現段階の課題である。

7) 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<sup>4</sup>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。

8) 口腔内で安定して線量測定ができるようにこれまでのトラブル事例も踏まえて測定に関する手順書を作成して測定の質が確保できるようにした。これまでのトラブルは試料にラジカルを有する物質が付着することによる放射線誘発ではないと考えられる信号の検出と測定時のノイズの混入である。ノイズは電磁波シールドルームの利用で大幅に改善し、測定の安定性が増したが、まだ未知のノイズが観測されることがあり、その対策が必要だと考えられた。

## 2) リン酸化ヒストン H2AX ( $\gamma$ -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 $\gamma$ -H2AX アッセイデバイスとしてのPDMSチップ上への細胞

4

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

ct/pdf\_h25/35.pdf

## 導入方法および固定効率の評価

本研究での検討を踏まえ、リンパ球相当の人工蛍光ビーズ (9.9  $\mu\text{m}$  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、その固定効率などを確認した。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。PDMS チップを用いたリンパ球分離のための細胞固定構造の検討では、リンパ球細胞を拡散・固定するために、より低速遠心が可能な遠心機を用いて PDMS チップシステム用の治具を作製した。また、細胞固定構造の入口径と出口径を様々なサイズの組み合わせで作成し、リンパ球の固定効率および、リンパ球以外の血球細胞の除去率について検討した。その結果、ある一定のリンパ球固定は認められるものの、多くの細胞が固定されることなく流出してしまっていた。

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

全身被ばくマウスを用いた生体内 DNA 損傷レベル解析でも、産業医科大学から送付された放射線被ばくマウス由来のリンパ球サンプルを用いて  $\gamma$ -H2AX に対する免疫染色を行った。その結果、線量依存的な DNA 損傷の誘導が確認された。

計画的被ばく者を対象とした被ばく後生体内 DNA 損傷レベル解析では、産業医科大学から送付された IVR 実施患者由来リンパ球細胞を用いて  $\gamma$ -H2AX に対する免疫染色を行った結果、IVR 直後の患者リンパ球細胞において明確な  $\gamma$ -H2AX フォーカスの増加

が検出された。IVR 直後の生体サンプルで  $\gamma$ -H2AX フォーカスとして検出される DNA 二重鎖切断量は、IVR 検査によって予想される放射線量に比例していた。また、すべての患者において、 $\gamma$ -H2AX レベルは検査後時間経過とともに減少しており、IVR によって誘導された DNA 損傷が修復されていることが示された。いずれの患者においても、検査 1 週間後には照射前レベルまで DNA 損傷が減少していた。今回、対象患者の一部には IVR 検査前に抗酸化剤の投与が行われており、DNA 損傷誘発に対する抗酸化剤の効果を検討したところ、 $\gamma$ -H2AX レベルのわずかながら低下が確認された。

全身被ばくマウスを用いた生体内 DNA 損傷レベル解析でも、産業医科大学から送付された放射線被ばくマウス由来のリンパ球サンプルを用いて  $\gamma$ -H2AX に対する免疫染色を行った。その結果、線量依存的な DNA 損傷の誘導が確認された。

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

#### 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

全身被ばくマウスを利用した被ばく後 DNA 損傷レベルの解析では、マウス全身に 0、0.5、1、3、5 Gy の X 線を照射し、照射後のリンパ球中の  $\gamma$ H2AX の foci 数を解析したところ、照射群ではいずれの線量においても照射 1 時間後に foci 数が最大となり、その後、経時的な foci 数の減少がみられた。0.5 Gy 照射群では照射後 3 日で非照射群と

同じレベルまで foci 数が減少し、1 Gy 照射群では照射後 7 日で非照射群と同じレベルまで foci 数が減少したが、3 および 5 Gy 照射群では照射後 7 日においても非照射群より多くの foci 数が観察され、照射する線量による経時的な変化の違いが確認された。

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。

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

## 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 $\mu$ L : 100 $\mu$ 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  $\mu$ M、システイン濃度が 20~30  $\mu$ 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  $\gamma$ 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、 $\gamma$ 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  $474 \pm 293$  [mGy]、DAP で  $51 \pm 30$  [mGy $\times$ cm<sup>2</sup>]であった。透視時間は  $9.3 \pm 5$  [分]、撮影シリーズ数は  $16.5 \pm 8.4$  [回]、撮影フレーム数は  $1907 \pm 752$  [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。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 $\gamma$ H2AX foci 数の変化

リンパ球中の  $\gamma$ 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  $\gamma$ 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に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

ヒト細胞を用いて、1Gy 以上の急性照射でミトコンドリア酸化損傷が検出され、線量依存的にその頻度が増加することを明らかにした。一方、長期分割照射では、抗酸化機能の低下により蓄積する過剰な活性酸素が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の過程で発生する活性酸素が原因であり、放射線と抗酸化剤の併用で抑制することが可能である。さらに、神経幹細胞を用いた組織幹細胞の放射線応答の解析では、放射線によるミトコンドリア酸化損傷は神経幹細胞では検出されず、放射線抵抗性を示すことを明らかにした。

#### 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 ( $\gamma$ -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、 $\gamma$ -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、 $\gamma$ -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 フォーカス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、 $\gamma$ -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、 $\gamma$ -H2AX は誘導され、DNA 修復と共に、 $\gamma$ -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  $\gamma$ -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 ( $\gamma$ -H2AX)を用いた生体内 DNA 損傷レベルの測定による線量評価

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

バイスの開発に向けて技術的な課題を抽出した。

IVR 実施患者の血液を用いて線量相当の DNA 損傷が検出するとともに、抗酸化剤投与での放射線による DNA 損傷レベルの抑制を確認した。

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

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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -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ったと考えられた。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 DNA 損傷レベルを  $\gamma$ H2AX を指標に解析し、過去に Redon らがミニ豚やサルで得た結果と傾向は同じであることを確認した。さらに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、 $\gamma$ 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 $\mu$ L であり、 $\gamma$ 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 $\mu$ L 程度に抑えられる。トータル 150 $\mu$ 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。

#### 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られる。

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、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 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ )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。mDNA 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、それを読まれた岩崎先生が 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。<sup>5</sup>

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。

同様の背景を持つものとして、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、このように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

<sup>5</sup> 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)

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。

一方、この課題は初期の対応や線量把握とも関連すると考えられる。完璧な情報はあり得ず、どのような対応システムでも、「使えるか」「使えないか」ではなく「どう使うか」が問われることになる<sup>6, 7</sup>。

## 6) 本研究で検討した各種線量評価の総合的な検討

事象発生時の対応としてはどのようなことが要求されるだろうか？事象はいつ発生するか未知であり、国による本格的な対応には1日から3日程度要するかもしれない。装置の準備や持出も円滑になされるかどうか課題となるかもしれない。異なる組織のスタッフがチームを組んで仕事することで効率性を保つことにも課題があるかもしれない。混乱した状況では情報の流れが整理されないかもしれない。その一方で事故の影響を受けた人々は不安に駆られるだろう。

このような場合、比較的多数の方々の測定が必要になるだろう。東電福島第一原発事故では、吸入による内部被ばく線量の推定のための体表面汚染のスクリーニングの測定への対応が迫られることになった。

これよりもスケールが小さい1万人の計測でどの程度のスタッフが必要だろうか。初日はスタッフの教育、資材の準備、1万人分の血液試料の採取に費やされると仮定しよう。平均して各試料あたり情報を得てラ

ベルを貼るのに5分必要で12時間休みなしで働くとしよう。シフト制で24時間稼働すると仮定しよう。 $\gamma$ -H2AXでは百人程度のボランティアスタッフが必要だと考えられる。

バイオ・ドシメトリーで試料が得られるまでの時間と結果が得られるまでの時間を考えてみよう(表1, 表2)。

それぞれの手法の対応は十分だろうか？

EPR in vivo tooth dosimetryでは5分間があれば一人測れる。装置が一台あれば、1日12時間の稼働を仮定すると、一台で一日142人で、1週間で1,000人程度が計測できることになる。

$\gamma$ -H2AXでは、装置のスループットに依存する。同時に5千検体が処理可能な装置であると、24時間で6グループの計測を考えると一日で3万検体が処理可能となる。

以上の考察からは、大規模な集団が影響を受けるような放射線緊急事象では、不測の事態に対応する必要があることや多数の検査ニーズに対してタイミングよく対応することが求められることになる。高スループットの $\gamma$ -H2AXでは結果を得るのに2日程度かかり、試料採取に膨大なマンパワーが必要であるのに対し、EPR in vivo tooth dosimetryは試料採取や測定に要する時間は短くてすむが、スループットが小さいことから、実際の対応は一台の装置では容易ではないことが改めて確認された。

以上、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

6 高橋真理子. 社会学者が明らかにした SPEEDI の教訓 放射能影響予測システムは「使えるか」「使えないか」ではなく「どう使うか」  
<http://webronza.asahi.com/science/article>

s/2018030800003.html

7 寿楽浩太,菅原慎悦.「SPEEDI」とは何か,それは原子力防災にどのように活かせるのか?茨城県東海村平成28年度地域社会と原子力に関する社会科学支援事業

(EPR)によるシグナルから線量を推計する装置を国内で唯一開発・保有していることから、この装置の活用についてけんとうするとともに、それに加えて電子スピン共鳴法を使った関連技術(X bandのEPRを使ったごく少量の血液の採取で検査できる抗酸化能測定キット)を使った研究も進め、さらにはリン酸化型ヒストン H2AX ( $\gamma$ -H2AX)を用いたDNA損傷モニタリング法による生体内DNA損傷を迅速かつ高感度

にモニタリングする手法や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も含め、これらの特徴を生かす方法を検討してきた。

その結果、各指標の特徴を踏まえて、アッセイのタイミング、放射線照射が局所に限定された部分被曝であるかどうか、また曝露した放射線特異性などを考慮して、各種の手法を組み合わせ対応することが現実的であると考えられた。

表1. バイオ・ドシメトリーで試料が得られるまでの時間

バイオ・ドシメトリー法	W1=事象発生時から試料が得られるまでの時間	W2=事象発生時から試料を採取しうる最長時間
EPR in vivo tooth	0	生涯
嘔吐までの時間	10 分間から 4 時間	正確な思いだし: 2 - 10 日間?
$\gamma$ H2AX	3-30 分間	1 - 48 時間
リンパ球減少率	12 時間	48 時間
二動原体染色体	0-1 日間	時間補正されれば 6 月以内
核小体	0-1 日間	年

表2. バイオ・ドシメトリーで結果が得られるまでの時間

	P2 試料輸送	P3 試料調整	P4 分析	P5 結果報告	W3 総処理時間
EPR in vivo tooth	0 分	5 分間	<1 分間	0	<10 分間
嘔吐症状	0	0	0	0	<5 分間
$\gamma$ H2AX	2-12 時間	In P4 4 時間	2.5 分間	24-36 時間	1-2 日間
リンパ球減少率	2-12 時間	8 時間 [3つの結果]	10 分間	24-36 時間	1.5- 2 日間
二動原体染色体	1-96 時間	46-48 時間	1 時間	24-36 時間	5-9 日間
核小体	12-24 時間	70-76 時間	8-15 分間	24-36 時間	4-5 日間

## 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 ( $\gamma$ -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  $\gamma$ -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

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

本研究はトリージの基準となる 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、 $\gamma$ 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、 $\gamma$ 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。

#### 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

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

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。

この研究には、平成 28 年 2 月 22 日に国立保健医療科学院で開催された院内セミナー『電子スピン共鳴法を用いた生体計測（オキシメトリと線量計測）』での議論も反映されています。このセミナーで話題提供いただいた 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医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

##### 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) Miyake M, Nakai Y, Yamaguchi I, Hirata H., Kunugita N, Williams BB, Harold MS. In vivo radiation dosimetry using portable L-band EPR: On-site measurement of volunteers in Fukushima Prefecture, Japan. *Radiation Protection Dosimetry*,172, 248-253, 2016.
  - 5) Yamaguchi I, Sato H, Kawamura H, Hamano T, Yoshii H, Suda M , Miyake M, Kunugita N. L Band EPR tooth dosimetry for heavy ion irradiation. *Radiation Protection Dosimetry*, 172, 81-86, 2016.
  - 6) 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.
  - 1) Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells. *Cell Cycle* 16(6):565-573, 2017.
  - 7) Shimura T, Kunugita N. Mitochondrial reactive oxygen species-mediated genomic instability in low-dose irradiated human cells through nuclear retention of cyclin D1 *Cell Cycle* 15(11):1410-1414, 2016.
  - 8) Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. Severe mitochondrial damage associated with low-dose radiation sensitivity in ATM- and NBS1-deficient cells. *Cell Cycle* 15(8):1099-1107, 2016
  - 9) Shimura T, Sasatani M, Kamiya K, Kawai H, Inaba Y, Kunugita N. Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in low-dose irradiated human fibroblasts.

- Oncotarget. 7 (3):3559-70, 2016.
- 10) 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.
  - 11) Shimura T. Targeting the AKT/cyclin D1 pathway to overcome intrinsic and acquired radioresistance of tumors for effective radiotherapy. *Int J Radiat Biol*. 2:1-5,2016.
  - 12) 山口一郎、尾本由美子、原田美江子、栗原せい子、樺田尚樹. 東京都豊島区の公園で線源が発見された事例への公衆衛生的な対応. *日本放射線安全管理学会誌* 2016; 15 (2): 186-192.
  - 13) 山口一郎. 放射性物質テロへの公衆衛生対応. *保健医療科学* 2016; 65(6): 569-575.
  - 14) 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.
  - 15) 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
  - 16) 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
  - 17) 茂呂田孝一, 盛武敬, 孫略, 石原隆宏, 熊奈津代, 村田聡美, 山田貴大, 岡崎龍史: 患者被ばく線量低減に向けた DICOM RDSR (病院内医療用画像規格線量レポート) 情報の収集. *Journal of UOEH (産業医科大学雑誌)* 2016 ; 38 (4) : 325-335
2. 学会発表
- 1) 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) 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
  - 3) 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
- 4) 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 1<sup>st</sup> international symposium of the network-type joint usage/research center for radiation disaster medical science.: 2017;.2. P.59.
  - 5) 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 1<sup>st</sup> international symposium of the network-type joint usage/research center for radiation disaster medical science.: 2017;.2. P.59.
  - 6) Nakamura AJ, Suzuki M, Redon CE, Kuwahara Y, Yamashiro H, Abe Y, Takahashi S, Fukuda T, Isogai E, Bonner WM, Fukumoto M. The Causal 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.
  - 7) 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.
  - 8) 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.
  - 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) Nakamura A, Sasatani M, Shimura T, Kato M, Maruyama R, Iioka T, Sawai Y, Kobayashi J, Komatsu K and Kamiya K. The use of  $\gamma$ -H2AX

- assay for validation of radioprotective effect of tempol against acute and chronic low-dose radiation exposure. 14th International Workshop on Radiation damage to DNA; 2016.3.20 - 24, Melbourne, Australia.
- 12) Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K and Kunugita N. A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells. The 1<sup>st</sup> international symposium of the network-type joint usage/research center for radiation disaster medical science –Scientific underpinning for restoration from a radiation disaster; 2017.2. P.59
  - 13) Sun L, Energy and ROS metabolism in radioresistant brain tumor stem cells; 2016.11. Loma Linda University Medical Center, California, USA.
  - 14) Sun L, Moritake T, Kohzaki M, Ootsuyama A and Okazaki R: 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; 2016.11. San Francisco, USA.
  - 15) Nakamura AJ, Suzuki M, Redon CE, Kuwahara Y, Bonner WM and Fukumoto M. DNA damage induction in bovine lymphocytes after the Fukushima nuclear accident. 62nd Annual international meeting Radiation Research Society; 2016.10.16 - 19, Hawaii, USA.
  - 16) Yamaguchi I, Terada H, Yunokawa T, Shimura T, Kunugita N. How to talk about risk regarding ethical considerations? - Lessons learned from local public health activities in Fukushima. ISEE-ISES-AC2016;2016.6.26-29: Sapporo, Japan. ac2016\_ab\_0152
  - 17) Yamaguchi I, Sato H, Kawamura H, Hamano T, Yoshii H, Suda M, Miyake M and Kunugita N. L Band EPR Tooth Dosimetry for neutron. IRPA 14; 2016.5.9-13: Cape Town. P03.60
  - 18) 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
  - 19) 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)
  - 20) Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. Mitochondrial DNA damage responses in ATM- and NBS1-deficient cells. 第 59 回日本放

- 射線影響学会；2016.10. P.23
- 21) 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
- 22) 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
- 23) 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.
- 24) 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
- 25) 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
- 26) 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.)
- 27) 樺田 尚樹, 三宅 実, 中村 麻子, 盛武 敬, 志村 勉, 山口 一郎. 緊急被ばく医療が必要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開発. 第87回 日本衛生学会学術総会；2017年3月26日-28日、宮崎. 日本衛生学雑誌 . 72 卷 Suppl. Page S255.
- 28) 三宅 実、中井康博、山口一郎、岩崎昭憲、中井 史、小川尊明、大林由 美子、樺田尚樹 ポータブル型生体 EPR (Electron Paramagnetic Resonance: 電子常磁性体共鳴法)を用いた放射線被ばく線量測定-福島在住のボランティアからの計測一、第70回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会；2016年4月16-17日、福岡
- 29) 樺田 尚樹、山口 一郎、志村 勉、三宅 実、中村 麻子、盛武 敬. 緊急被ばく医療が必要とされるような事故発生時におけるトリアージのための線量評価手法の検討. 第89回日本産業衛生学会；2016年5月24-27日、福島
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 志村勉、笹谷めぐみ、河合秀彦、神谷研二、櫻田 尚樹. 低線量長期放射線照射におけるミトコンドリア由来活性酸素の蓄積と酸化ストレスによる細胞周期制御機構への影響. 第 59 回日本放射線影響学会；2016.10. P.24
- 35) 加藤正尊、飯岡俊英、丸山里奈、澤井裕一、中村麻子、笹谷めぐみ、神谷研二、小林純也、小松賢志、志村勉 抗酸化剤 Tempol による放射線誘発の DNA 損傷抑制効果の検討. 第 59 回日本放射線影響学会；2016.10. P.46
- 36) 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
- 37) 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
- 38) 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
- 39) 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
- 40) 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
- 41) 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
- 42) 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

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

- 43) 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
- 44) 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
- 45) 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) Nakamura AJ. Evaluation of radiation-induced DNA damage using gamma-H2AX as a biosimulator. 第2回レジリエント・コミュニティ国際シンポジウム, Apr. 14-15, 2016, 郡山市中央公民館, 郡山、福島.
- 2) 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.
- 3) 中村麻子 リン酸化ヒストン H2AX ( $\gamma$ -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.

- 4) 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

- 5) 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 $\gamma$ -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. 研究成果の刊行に関する一覧表



平成27-29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
Mamoru Kato, Koichi Chida, Takashi Moritake, et.al	Direct dose measurement of patient during percutaneous coronary intervention procedures using radiophotoluminescence glass dosimeters.	Radiation Protection Dosimetry		doi:10.1093/rpd/ncw263	2016
Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N.	A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells.	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
Tsutomu Shimura, Ichiro Yamaguchi, Hiroshi Terada, Naoki Kunugita.	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;
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	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 ンサイエンス学 会年会 (SEST2017)講 演要旨集	38(5)	214-215	2017
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

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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)	565-673	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.	Radiation Research	187(5)	630-636	2017
Kamiya K, Sasatani M, Xi Y, Kajimura J, Kawamura T, Piao J, Masuda Y, Honda H, Kubo K, Mikamoto T, Watanabe H, Xu Y, Kawai H, Shimura T, Noda A, Hamasaki K, Kusunoki Y, Zaharieva E.	Overexpression of Rev1 promotes the development of carcinogen-induced intestinal adenomas via accumulation of point mutation and suppression of apoptosis proportionally to the Rev1 expression level.	Carcinogenesis	38(5)	570-578	2017
Miyake M., Nakai Y., Yamaguchi I., Hirata H., Kunugita N., Williams BB., Harold MS	In vivo radiation dosimetry using portable L-band EPR : On-site measurement of volunteers in Fukushima Prefecture, Japan	Radiation Protection Dosimetry,	172(1-3)	248-253	2016
Yamaguchi I, Sato H, Kawamura H, Hamano T, Yoshii H, Suda M , Miyake M, Kunugita N.	L Band EPR tooth dosimetry for heavy ion irradiation. Radiation Protection Dosimetry, 172, , 2016.	Radiation Protection Dosimetry,	172(1-3)	81-86	2016
Mamoru Kato, Koichi Chida, Takashi Moritake, et.al:Radiation Protection Dosimetry,	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, Kunugita N.	Mitochondrial reactive oxygen species-mediated genomic instability in low-dose irradiated human cells through nuclear retention of cyclin D1	Cell Cycle	15(11)	1410-1414	2016
Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N.	Severe mitochondrial damage associated with low-dose radiation sensitivity in ATM- and NBS1-deficient cells.	Cell Cycle	15(8)	1099-1107	2016
Shimura T, Sasatani M, Kamiya K, Kawai H, Inaba Y, Kunugita N.	Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in low-dose irradiated human fibroblasts.	Oncotarget.	7 (3)	3559-70	2016
Mamoru Kato, Koichi Chida, Takashi Moritake, et.al	Direct dose measurement of patient during percutaneous coronary intervention procedures using radiophotoluminescence glass dosimeters.	Radiation Protection Dosimetry,	doi:10.1093/rpd/ncw263		2016
Shimura T.	Targeting the AKT/cyclin D1 pathway to overcome intrinsic and acquired radioresistance of tumors for effective radiotherapy.	Int J Radiat Biol.	2	1-5	2016
山口一郎、尾本由美子、原田美江子、栗原せい子、樺田尚樹.	東京都豊島区の公園で線源が発見された事例への公衆衛生的な対応.	日本放射線安全管理学会誌	15 (2)	186-192	2016
山口一郎	放射性物質テロへの公衆衛生対応	保健医療科学	65(6)	569-575	2016
茂呂田孝一、盛武 敬、孫 略、石原隆宏、熊奈津代、村田聡美、山田貴大、岡崎龍史	患者被ばく線量低減に向けたDICOM RDSR(病院内医療用画像規格線量レポート)情報の収集.	Journal of UOEH(産業医科大学雑誌)	38(4)	325-335	2016

### Ⅲ. 研究成果報告会資料集および記録



# 平成 29 年度労災疾病臨床研究事業の成果報告会

## 抄録・資料集

「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：櫛田尚樹)」研究班

平成 30 年 2 月 23 日

国立保健医療科学院 生活環境研究部

〈プログラム〉

13:30 研究代表者挨拶：櫛田尚樹（国立保健医療科学院）

第一部 物理的手法による線量評価

○外部専門家による講演

13：40 豊田新先生（岡山理科大学）

X band EPR tooth dosimetry (EPR の基礎紹介を含む)

○研究班の成果報告（電子スピン共鳴法を用いた線量推計法の開発）

14:05 (1)山口一郎（国立保健医療科学院）

研究班での成果報告（これまでの開発経緯も含めて）

14:30 物理的手法による線量評価に関する全体討議

14:50 休 憩

第二部 生物学的手法による線量評価

○研究班の成果報告

15：10 (2)中村麻子(茨城大)

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

15：35 (3)盛武敬(産業医大)

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

○外部専門家による講演

16:00 数藤由美子先生(放医研)

細胞遺伝学的線量評価法

16:25 生物学的手法による線量評価に関する全体討議

16：50 櫻田尚樹(国立保健医療科学院)

閉会挨拶

ポスター発表等

糖鎖の切断を指標とした評価法：飯塚 大輔先生（放医研）

ミトコンドリア酸化損傷を指標生物学的手法による線量評価（志村勉）

機器展示（ポスター展示を含む）

L band EPR tooth dosimetry

$\gamma$ -H2AX を用いた生体内 DNA 損傷レベルの測定による線量評価システム

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システム

ポスターは 14:50 から 15:10 の 20 分間の休憩時間を利用して参加者に見て頂く予定としております。

また、16:50-17:30 の時間でも機器展示を対応させて頂く予定です。測定を体験したい方も歓迎します。

懇親会

本院食堂にて午後 5 時 30 分から午後 7 時。実費として 3 千円を徴収させていただく予定です。

## 事故被ばく時におけるトリアージのための線量評価手法の検討

櫻田 尚樹（研究班代表：国立保健医療科学院）

東日本大震災に伴う東京電力福島第一原子力発電所事故においては、環境中への大量な放射性物質の放出を伴う大規模な災害となった。幸いにして原発サイト内での緊急作業従事者においても、外部被ばくおよび内部被ばく線量の合算した実効線量で100 mSvを超えた者が167名、内250 mSvを超えた者が6名、最大で約680mSvと評価され、急性放射線障害を発生する線量の被ばくは無かった。しかしチェルノブイリ事故では急性放射線症候群による死亡者も多数発生した。また国内においても、1999年のJCO臨界事故により、急性放射線症候群を伴いその後の精力的な治療にも係らず2名死亡事例が発生した。放射線被ばくは、このような事故事例だけでなく、東京オリンピック・パラリンピック競技大会などマスコギャザリングにおけるダーティボム等テロ対策も想定しておく必要がある。

これら予期せぬ放射線被ばくが様々な場面において発生する可能性があり、トリアージ対応可能な線量評価の重要性が指摘されている。しかし、現在のところ、事故発生時における対象者の優先度を決めた選別（トリアージ）のための線量評価に関する手法が確立普及しておらず、多くの対象者に時間及び過度の侵襲も与えずに、0.5-1.0Gy以上の放射線被ばくの有無やその程度を一定の不確かさの範囲内で検査する方法の確立が課題である。対策の頑強性を保ち、線量推計結果への信頼性を高めるためには複数の手法による方法を確立する必要がある。

トリアージの手法としては、これまで各種のバイオアッセイによる線量推計の開発が進められ、事例への適用が試みられており、そのゴールドスタンダードは染色体異常分析である。この方法はリンパ球培養を伴い、結果を得るまでに時間がかかること、その分析技術を有するものが限られるなど課題がある。この課題は世界各国で共通し、どの国も国内の研究機関だけでは有事の際の対応が困難であることからBioDoseNetやヨーロッパでのEuropean RENE, MULTIBIDOSE projectsやその他の多くの取り組みが開始されることとなった。

今後も事故、核テロ等が発生した際には、多数の被災者に対し除染とともに、1Gy相当以上の被ばく時トリアージのための線量評価が必要となる。

研究班では、1) Lバンド電子常磁性共鳴測定法(EPR)による線量推計、2) リン酸化型ヒストンH2AX( $\gamma$ -H2AX)を用いたDNA損傷モニタリング法、3) 抗酸化能の動態解析、4) 特定遺伝子座突然変異頻度検出法、小核試験、などについて検討してきた。

対策の頑強性を保ち、線量推計結果への信頼性を高めるためには、観察可能時間、自動システム化の可能性、指標として放射線特異性などを検討し、複数の手法による評価方法を確立する必要がある。

本日は、関連領域の研究者を交え、今後の研究発展のためのネットワーク作りも視野に、幅広い先生方にご参加いただいて情報共有する場としていただきたい。

豊田 新

岡山理科大学

ヒドロキシアパタイトの結晶からなる人の歯のエナメルは、ESR（電子スピン共鳴、またはEPR, 電子常磁性共鳴）線量計測に用いるのに適切な試料であることが見いだされた。これは、放射線によってヒドロキシアパタイトの結晶中に、安定なラジカルが生成され、数十年の後であっても蓄積したラジカルをESRによって定量することによって、過去の被曝線量を求めるものである。線量計を所持していない場合にも、個人それぞれの被曝線量が、推定値ではなく実測値として求められることが方法の特徴である。

実用的な最初の線量計測の研究は、日本で最初に行われ、原爆の被爆者の歯について線量が求められた (Ikeya et al., 1984)。この後、ロシア最初の核燃料再処理施設の労働者 (Romanyukha et al., 2000)、ウラルの核事故による汚染地域の住民 (Wieser et al., 1996)、チェルノブイリ原子力発電所事故に関連した労働者や周辺の住民 (Chumak et al., 1996; 1999)、セミパラチンスク核実験場周辺の住民 (Zhumadilov et al., 2006)、JCO 事故 (Shiraishi et al., 2002) などの被曝線量が求められ、疫学的研究との対応も行われてきている。国際線量比較を通して線量計測技術の進歩が確認され、最近ではこの手法についてのISOの標準が作成されるようになっている (ISO, 2013)。

線量計測の実験手順としては、抜歯した歯からエナメルを機械的、あるいは化学的な手法で抽出した後、ESR 測定を行い、信号強度を定量し、標準試料の線量応答直線にあてはめてその信号強度に対応する被曝線量を求める。この中で 5Gy 程度以下の低線量の計測ではスペクトルの解析に数値処理プログラムを用いることが重要である。歯のエナメルには、線量応答のある  $\text{CO}_2^-$  の信号に有機物と思われる信号が重なっているため、これらの信号を分離して線量応答のある信号の強度を定量する。この数値計算プログラムの開発によって、1Gy 以下の線量が求められるようになった。

上記のように手法がほぼ確立した歯のエナメルを用いた線量計測であるが、標準試料の研究室間相互比較、最小検出線量の推定、事故被曝線量を求める際に必要となるバックグラウンド線量の計測など、特に低線量の被曝の定量に関しては、まだ多くの課題がある。一方、現在の方法では抜歯して試料を得る機会を待たなければならないことが、最大の問題であるため、試料を得やすい乳歯や、環境の線量を知ると言う意味で動物の歯を用いる可能性について検討が進んでいる。

## 電子スピン共鳴法を用いた線量推計法の開発

山口一郎<sup>1)</sup>、三宅 実<sup>2)</sup>、中井 康博<sup>2)</sup>、志村勉<sup>1)</sup>、櫛田尚樹<sup>1)</sup>

国立保健医療科学院<sup>1)</sup>、香川大学 医学部歯科口腔外科学講座<sup>2)</sup>

**【背景】**緊急時のトリアージのための線量評価が課題となっている。このうち電子スピン共鳴(EPR)を利用した計測は、放射線照射により歯エナメル組織に生成された安定な炭酸ラジカルを計測し放射線線量を推定するものであり、これまで X-band により原爆被爆者などの被曝線量の測定に使われてきた。この従来の方法に加え、口腔内の歯を用いて直接、計測できる L-band の計測法を開発を進めてきた。

**【目的】** トリアージのための線量評価手法のうち、EPR を用いた手法について開発の現状と課題を提示する。

**【方法】** モバイル化された装置を用いた L-band tooth EPR dosimetry により得られた結果を解析するとともに課題を検討した。

**【結果】** L-band EPR 法では、口腔内の歯より直接、放射線誘発ラジカルが測定でき、これまで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。現在の性能は、Ex-vivo で診断領域の X 線での 1 Gy 照射において、感度 9 割, 特異度 8 割となっている。測定の質を向上させるためにはノイズ低減が求められ電磁波シールドでより安定的に測定できたが電磁波の反射が課題として残った。太陽紫外線は結果に大きな影響を与えないことを検証しつつあるが、口腔内の歯がどの程度直

接日光に曝されるかが限界を決定する。また、放射線診療でも線量を検出しうることを確認した。

さらに、歯科治療に用いる材質による偽陽性にも注意する必要があることが確認された。

**【考察】** トリアージの手法として、これまで各種のバイオアッセイによる線量推計法が開発されており、様々な改善も試みられている。しかし、それぞれ限界があり、多くの対象者に時間及び過度の侵襲を与えずに、0.5-1.0Gy 以上の放射線曝露を一定の不確かさの範囲内で検査する方法は未だ確立していない。線量推計結果への信頼性を高めるためには、複数の手法による評価方法を確立する必要があり、本方法は、過去の放射線診療の影響を受けるなどの限界はあるが、他の生物学的な線量評価法と場面に応じて組み合わせることで評価の質を向上させることができると考えられる。また、緊急時の対応としては結果がその場で直読できることから対応への信頼性を確保することにも有益であることが示唆された。

本研究は労災疾病臨床研究事業費補助金により多施設共同研究として実施した。研究に協力下さった方々や助言下さったダートマス大学のシュワルツ教授に感謝を申し上げる。

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

中村 麻子<sup>1)</sup>、高橋 健太<sup>1)</sup>、田村 隆大<sup>2)</sup>、鈴木 孝明<sup>2)</sup>

茨城大学・理学部<sup>1)</sup>、群馬大学大学院理工学府<sup>2)</sup>

【背景】放射線被ばくの影響を正確に知るためには、被ばく後の迅速かつ経時的な DNA 損傷レベルの評価が重要であることは疑う余地がない。高感度かつ簡便に DNA 損傷レベルをモニタリングする方法としてリン酸化 H2AX ( $\gamma$ -H2AX) の検出方法が挙げられるが、 $\gamma$ -H2AX モニタリングを『現場』で行うための簡便かつ小型な汎用性の高いシステム開発はこれまでにないままに、これまで以上に簡便なサンプリング、長期的かつ安定的なサンプルの保存、そして  $\gamma$ -H2AX レベルの迅速な解析を可能とするアッセイデバイスの開発が求められている。

【目的】トリアージのための線量評価手法のうち、Polydimethylsiloxane (PDMS) マイクロ流体チップを用いた簡便な  $\gamma$ -H2AX アッセイ手法について開発の現状と課題を提示する。また、 $\gamma$ -H2AX による線量評価が可能な線量域および時間域の明確化も行う。

【方法】PDMS チップ上での  $\gamma$ -H2AX アッセイにより得られた結果を解析するとともに課題を検討した。また、放射線照射後の各種生体サンプルにおける  $\gamma$ -H2AX レベルの検出を行い、線量評価の可能性を検討した。

【結果】放射線 0, 1, 5Gy 照射し 1 時間培養した TK6 細胞を試作型 PDMS チップに数マイクロリットル滴下後、細胞をチップ流路内の固定構造にトラップした。その後、 $\gamma$ -H2AX 免疫染色を行い顕微鏡下で損傷細胞を検出した。その結果、照射サンプルにのみ明瞭な  $\gamma$ -H2AX シグナルが検出されたとともに、線量依存的なシグナルの増加が確認された。PDMS チップ上に固定した細胞で  $\gamma$ -H2AX の免疫染色が可能であること、チップ上での操作によって人工的な DNA 損傷が発生しないことを確認した。その一方で、ヒト末梢血サンプルを用いた  $\gamma$ -H2AX アッセイでは、末梢血からのリンパ球の分離固定効率が約 1.5% と大変低いものであるなど、今後の改善課題を確認した。

【考察】本研究では、作成した PDMS チップを用いることで、①蛍光人工ビーズおよび培養細胞のチップ構造への固定、②チップ上での  $\gamma$ -H2AX の免疫染色、③ $\gamma$ -H2AX 染色による放射線照射の評価、が可能であることが示された。しかしながら、微量ヒト末梢血サンプルを用いた実験では、線量評価を可能とするためのリンパ球分離効率が得られていないため、今後固定構造の検討や血液サンプルの滴下前処理の検討などが必要であると考えられた。

本研究は労災疾病臨床研究事業費補助金により多施設共同研究として実施した。

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

盛武敬<sup>1)</sup>、中村麻子<sup>2)</sup>、五十嵐友紀<sup>3)</sup>、孫略<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>産業医科大学産業生態科学研究所放射線健康医学

<sup>2)</sup>茨城大学理学部

<sup>3)</sup>産業医科大学産業生態科学研究所職業性中毒学

<sup>4)</sup>筑波大学医学医療系

【背景】大規模放射線災害時のトリアージには、1Gy 程度の被ばくの有無を見分ける精度と感度を有した線量推定法が必要である。また、様々な被ばく形態や個人差、環境要因等による誤差を想定し、複数の指標による推定を行うことが望ましい。そのため、我々は既知の線量推定法の弱点を補うような新しい線量推定法の開発を行っている。近年、「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、「生体」でどのようなレドックス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。

【目的】本研究では、放射線被ばく後の生体(血液)の抗酸化能測定を試み、新しい線量推定法として応用可能か検討を行った。

【方法・全血抗酸化能測定】新規スピントラップ剤 DPhPMPO を使用した電子スピン共鳴(ESR)スピントラップ法により、全血抗酸化能を評価した。具体的手法は次の通りである。血液とスピントラップ剤 DPhPMPO を混合後、ラジカル発生剤 t-BuOOH を加えて 30 分静置。クロロホルム/メタノールによってスピニアダクトが含まれる有機層を抽出し、X バンド ESR で測定した。

【方法・マウス実験】オスの C57BL/6 マウスの全身に 0.5, 1, 2, 3Gy の X 線を照射し、直後から 50 日後にかけて継続的に採血し、抗酸化能を測定した。

【結果】放射線照射後 2~24 日にかけて線量依存的な血液抗酸化能の低下が観察された。被ばく線量と抗酸化能の低下度には直線性が認められた(相関係数>0.9)。また、照射線量に比例して消去能の低下が観察される期間が長くなった。生理的範囲内の抗酸化物質(ビタミン C、NAC、トロロックス)の投与と強制水泳によるストレスは結果に影響しないことを確認した。

【考察】放射線照射後に全血の抗酸化能が線量依存的に低下することを世界で初めて明らかにした。全血抗酸化能が新たな線量推定の指標となりうることを示した。さらに、変化パターンの異なる全血抗酸化能とリンパ球の DNA 損傷数( $\gamma$ H2AX 法)とを組み合わせることで、シームレスな被ばく線量推定が実施できる可能性を示した。

本研究は労災疾病臨床研究事業費補助金により多施設共同研究として実施した。研究に協力下さった方々や助言下さった先生方に感謝を申し上げる。

数藤由美子

量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所

本講演では、細胞遺伝学的な線量評価法について、実際の適用例を交えて紹介し、大規模放射線事故・テロに対応するための課題と研究開発動向について紹介する。

### (1) 細胞遺伝学的な線量評価法の原理と適用例

放射線被ばく事故・事件における緊急被ばく医療では、患者の重症度に基づく振り分け（トリアージ）と治療計画の立案のために、被ばく線量の評価が必要である。当たった線量と生成された染色体構造異常の頻度との間に一定の線量効果関係があることを利用して、実際に生体が被ばくした線量の推定を行うことができる（細胞遺伝学的な線量評価法）。放射線により切断され誤って2個の染色体が融合した二動原体染色体の生成頻度を指標とした二動原体染色体分析法は、国際的に標準化された代表的な生物線量評価法で、最も信頼性の高い手法のひとつとして役立てられてきた。近年では蛍光 in situ ハイブリダイゼーション法を用いて染色体異常を検出する線量評価法も開発された。さらには、患者検体を受け入れて即日におよむ大まかな線量評価が可能な手法（PCDC法）が開発された。放射線医学総合研究所では、放射線被ばくが疑われた患者を受け入れ、実際に細胞遺伝学的な線量評価を実施し、被ばく医療の診断を支えている。

## (2) 細胞遺伝学的な線量評価の迅速化

現在、大規模な放射線事故・テロに備えて、細胞遺伝学的な線量評価をいっそう迅速化するため、様々な研究開発が進められている。①実験機器の自動化、②染色体異常解析の自動化（顕微鏡画像解析システム、フローサイトメーター）、③ネットワーク化による協力体制作り（プロトコールの国際標準化、分析力の均質化・向上のための訓練）について概説する。

## ESI-FT MS を用いた放射線被ばくの尿中代謝産物探索

飯塚大輔

広島大学原爆放射線医科学研究所 分子発がん制御研究分野

(現所属) 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 放射線影響研究部

千葉県稲毛区穴川4-9-1、043-206-3160、iizuka.daisuke@qst.go.jp

ハイスループットな生物学的線量評価法確立のニーズは高まっている。本研究の目的は electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry (ESI-FT MS) を用いた低分子量の尿中放射線被ばく応答分子の同定であり、最終的な目標は緊急被ばく医療の初期トリアージの際に用いることのできる高感度生物学的線量評価法の確立である。被ばく前と被ばく後8時間で採取したマウス尿の ESI-FT MS を用いた解析により被ばくの代謝産物候補を9個同定した。次に経時変化を観察したところ、これらの代謝産物のうち、thymidine と thymine (もしくは imidazoleacetic acid) が線量依存的に有意に増加していた。これらの分子は放射線被ばくのバイオマーカーとしてすでに報告されている分子であった (Tyburski et al., *Radiat Res*, 2008, Lanz et al., *Radiat Res*, 2009 など)。

Phenyl glucuronide は線量に依存せず、被ばく後8時間で有意に減少していた。Histamine と 1-methylhistamine は MS/MS 測定により新規に同定された候補分子であり、被ばく後72時間で線量依存的に有意に増加していた。ELISA による 1-methylhistamine の定量を行ったところ、4 Gy 被ば

く後 72 時間で有意に増加していた。Thymidine、cytosine ならびに thymine といった代謝産物の尿への排出は DNA の分解や細胞のターンオーバーといった放射線被ばくの初期に起こる事象が関与している。これらの分子は被ばく後 48 時間までに検出されなくなるが、一方で histamine や 1-methylhistamine は炎症に関連し、被ばく後 72 時間まで増加していた。これらのことは、被ばく後短～中期における histamine や 1-methylhistamine の有用性を示唆している。

以上の結果は ESI-FT MS を用いた尿メタボローム解析が放射線被ばく応答分子の同定において強力なツールであり、尿中 1-methylhistamine は急性かつ高線量の、放射線被ばく応答分子である可能性が示唆された。

(Iizuka D, Yoshioka S, Kawai H, Izumi S, Suzuki F, Kamiya K., *J Radiat Res.* 58(3):273-280, 2017.)

## 新たな生物学的指標(ミトコンドリア損傷)を用いた線量評価手法の検討

志村勉、山口一郎、櫛田尚樹

国立保健医療科学院

【背景】旧原子力安全委員会の提言「緊急被ばく医療のあり方について」(平成 13 年報告、平成 20 年改訂)においては、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、原子力施設においては、作業員の応急処置とともに、簡易な測定等による汚染の把握(サーベイランス)、スクリーニングを行った後、除染や汚染の拡大防止の措置を行い、緊急被ばく医療機関に患者を搬送することとされている。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、解決すべき課題として指摘されている。

【目的】本研究では、ミトコンドリア損傷を指標とした線量評価法を検討し、被ばく線量評価のための指標として有効であるかどうかを明らかにする。

【方法】ヒトの正常細胞を用いて、*in vitro*でX線を照射し、パーキンソン病原因遺伝子 parkin の抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、ミトコンドリアの膜電位の低下を検出して放射線によるミトコンドリア損傷誘導を評価した。核 DNA 損傷は、損傷部のヒストン H2AX のリン酸化 ( $\gamma$ -H2AX) で検出した。

【結果】ヒト正常細胞では、1Gy以上の急性照射3時間後からミトコンドリア損傷の誘導が観察された。照射24時間後のミトコンドリア損傷の解析により、線量依存的にその頻度が増加した。一

方、長期分割照射や慢性照射では、より低い線量でミトコンドリア損傷が誘導された。これらの結果は、照射法の違いや照射線量で、ミトコンドリアの放射線応答が異なることを示唆している。ミトコンドリア損傷は、エネルギー生産の過程で副産物として発生する活性酸素が原因であり、抗酸化剤 N-アセチルシステインで活性酸素を除去することで、軽減することが可能である。以上より、ミトコンドリア損傷は、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

**【考察】**核 DNA 損傷とミトコンドリア損傷を組み合わせることで、被ばく直後から被ばく後より長くまで、線量評価が可能な期間を延長することが期待される。今後は、この指標を用いて、動物個体やヒトでの検証が求められる。ミトコンドリア損傷は、単に線量評価だけでなく、放射線の影響に対する生物応答も反映していることから放射線影響の評価においても重要であると考えられる。

## 研究成果報告会での発表や質疑の記録

山口：では、時間になりましたので報告会を始めたいと思います。皆さんご多用のところ、この会にご参加いただきまして誠にありがとうございます。また、この会の準備に当たりまして、外部の専門家で岡山理科大学の豊田先生と放医研の数藤先生には大変お世話になりました。御礼を申し上げます。この報告会は、労災疾病臨床研究事業のトリアージに関する研究成果を発表して、皆さんからご意見いただく場です。では、会の開催にあたりまして、この研究班の研究代表者の樺田からご挨拶を申し上げます。

樺田：皆さん、こんにちは。科学院の生活環境研究部、この建物全体が生活環境研究部長をしています樺田です。今、山口から紹介ありましたように、この課題で厚生労働省の労災疾病事業の研究費で3年間、研究させていただいたのですけれども、今年度が終わりになりますので、その報告会、班会議を兼ねて——この領域というのは、やはり限られた人しかいないものですから、もう少しネットワークをつくって研究の進展のために拡大していく必要もあるのかなと思います。関係者の方々に、きょう一緒に成果発表として、皆さん方の研究の成果を発表いただく機会をつくって情報を共有しようかなと思ひまして、こういう場をつくらせていただきました。

そういう趣旨ですので、記録を取らせていただいていますけれども、できればこれを文字起こしして冊子のような形で、情報共有できるようなものを作っていければなと思っていますので、それについてもご了解いただければと思います。冊子を作るときには、またそれぞれの発表する先生方に、公開できる限度というのがあるでしょうから、了解を頂いた上で作っていきなりたいと思います。これから先、皆さん方がネットワークをつくっていくためのきっかけになるものということで、そういうことについてもご理解いただいて、ご協力をお願いしたいと思います。

なかなかこの科学院の組織というものが、ご存じない方も多いと思いますので、最初に少し紹介がてら簡単に科学院のことをお話ししていきます。今、国立保健医療科学院と申すけれども、もともとは東大の医科研の隣に、白金に国立公衆衛生院というのがありました。公衆衛生院と他の組織、病院管理研究所、感染研の一部など、その辺が一緒になったものです。こちらに平成14年ぐらいに移ってきたのですけれども、組織が合体していますので1つだけの名前を継続するわけにいかないの、新しく保健医療科学院という名前になったそうなのです。私は、もうこの名前になってから移ってきた者です。

ですので、なかなかこの保健医療科学院というのが馴染みがなくて、何をやっているところか分からないというところがあるようです。元の公衆衛生院時代には、その中の学部の一つとして放射線衛生学部などというのもありましたから、チェルノブイリの事故であった

り JCO の事故のときなども対応させていただいたり、残念ながら約 7 年前の福島事故の後、飲食品等の基準値設定などが急ぎ行われていきましたけれども、あれの基礎資料になるようなところ、JCO の事故やチェルノブイリのときも対応させていただいたりしてきたところです。

そういう実験系、こちらは実験系で、その中の一つとして放射線のところもありますし、今すぐ国会で賑やかになっているたばこ対策、そういったことに対しての基礎資料を作っていたり、厚生労働省の中に浄水、水の供給ということに関して実験的なエビデンスを出せるところというのは、ここしかありません。この下に水道プラントが、相当大きいのがあって、実験的な研究ができるようなところ、そういう全体、実験系をまとめて生活環境研究部という 1 つの部になっています。

一方、本来のこの科学院の目的というのは、自治体職員の研修の場ということ。保健所長さんであったり保健所で働いている人、あるいは地方衛生研究所で働いている人、そういった人たちに日々の活動を行なっていただく上で、いろいろな情報共有をする場の研修を提供していったり、政策が変わったときのその情報を真っ先にお知らせする場としての研修を提供したりということ。厚生労働省関係の公衆衛生の研修機関として、唯一の場でもあるということ。そういった施設であるということをご理解いただいたらと思います。

まずは私のほうから少しこの背景を紹介ということで、簡単に 5~6 枚、スライドを紹介させていただきますけれども、ここにおられる方は基本的にはこの領域の人たちばかりなので、ごくありきたりのところになります。

7 年前の福島事故のときには、幸いにして、中のサイトで働いている人たちも急性症状が、確定的影響が認められるような高い被ばくの方がなかったのも、実際こういったトリアージのための線量評価というのは必要ない状態に収まってくれたのです。あの年、あのときも、私や今挨拶をしていた山口などが、発災後すぐに厚生労働省の災害対策本部に入っていたのです。爆発が起こって緊急被ばくになった場合に、dosimetry をどうするのかということで、この後、中村先生にもお話させていただきますが、 $\gamma$ -H2AX など、そういったものの適用がどうなのかという議論があったところです。

(樺田スライド 2)

これは海外の事例ですけれども、ヨーロッパではそういったところでいろいろなマーカーについて MULTIBIODOSE というふうな、コンソーシアムをつくって情報共有をしているところです。染色体異常であったり、小核、Micronucleus 試験であったり、 $\gamma$ -H2AX を調べたり、あるいは X-band の EPR を使って調べていくということ。今回は、こういったものについて基礎的な情報と実際やっているところを見ていただくという感じです。

(櫛田スライド3)

私たちの研究班の中では、今 EPR に関しても先ほどの X-band でしたけれども、L-band といって生体の歯を使用した方法を検討しています。X-band の場合であれば、どうしても抜歯したものなどになってきますので、生体の生の状態での歯を使って、トリアージが必要なレベル、かなり高いレベルになりますけれども、1Gy を超えるか超えないかのようなのはすぐに評価できるというようなシステムをつくりましょうということです。アメリカのダートマス大学でこういう機械を作られているのですが、それを約 10 年前、こちらでコピーを作らせていただいて、日本の中で今唯一、L-band の EPR の機械を持っているという状態です。

現物については、そちらの外のフロアに今出していますので、そちらで後の休み時間など終わった後にも見ていただく予定にしています。

こちらがレファレンスのシグナルですが、線量依存的にその放射線のシグナルが取れますよといったようなもので、これは詳しいところは後で山口から紹介します。

(櫛田スライド4)

これは中村先生にご紹介いただく  $\gamma$ -H2AX ですが、これに関してもきれいに、これは非常に感度が高く、低い線量のところからドーズレスポンスが取れるのです。課題になってくるのは、非常に早い段階から修復が行われるので、減衰していくということなので、どのタイミングで評価するかということが非常に重要になってくるわけです。そういう  $\gamma$ -H2AX など、いろいろなシグナルを使うことによって、時間依存的なところも調整しながら線量評価ができるというところが必要になってきます。

(櫛田スライド5)

これは私自身が以前やっていたものなのですが、特定遺伝子座の突然変異を検出する系ということです。生物実験で HPRT の遺伝子座の研究などというのは随分昔からされていましたが、この辺は培養が必要になったり、あるいは今 *T cell receptor* 遺伝子や *PigA* 遺伝子というのがフローサイトメーターで検出できるような系が作られているのです。この *PigA* や TCR など、HPRT もそうですけれども、遺伝子に放射線で傷が付くと細胞表面の表面マーカー、作られるタンパクが変わってくるので表面マーカーが発現しなくなります。それをフローサイトメーターで検出しようというものなのですが、発現するまでに時間がかかってくるということなので、トリアージとして使うにはなかなか難しい。後で翻って線量評価したりするというのに関しては、ある程度使えるところもありますけれども、やはりそういうタイミングの問題を考慮しながらやっていかないとけないというのがあります。

(櫛田スライド6)

これはまた後で山口からも出てきますけれども、今お話ししたようにいろいろなマーカーがあります。まずは臨床的なものとしては、かなり高い線量になってくると、吐き気あるいは実際嘔吐（おうと）するというのが出てきますけれども、その潜伏期間から相当な線量であるということが評価できます。先ほどの $\gamma$ -H2AXであったり、これも検査としてリンパ球の減少、アポトーシスですぐ減っていきますから、そういうリンパ球の減少、染色体異常、消化器の臨床症状、そういったものをそれぞれがどういう特徴を持っているのかというのを示していますけれども、このエクスペクションタイム（発現時間）です。まず放射線被ばくからのエクスペクションタイムがどれぐらいなのか。また、実際、その後、先ほど $\gamma$ -H2AXなどリカバリ（修復）があるのでという話をしましたけれども、継続性がどの程度あるのかです。

もう一つは、放射線の特異性がどうなのか、また、部分被ばくしたときにどうなのか、ドーズレートとして遷延照射されたときと急性被ばくのとときで反応性がどうなのか、こういったもののそれぞれの組み合わせの中で考えていけないといけないのです。先ほどのヨーロッパの MULTIBIDOSE などというコンソーシアムの中でも、いろいろなものが組み合わせられてされているというのが現状というところです。

（樺田スライド7）

さらに、これが、実際事故があったというようなときに線量評価しようと思うと、どの程度の時間で準備できるのか、ラボの中で研究レベルでやっているときには時間の融通というのは利くわけですがけれども、現場で発症、対応しないといけないときどうなのかということです。試料の輸送時間であったり試料調整、あるいは分析するための時間、そういった観点からいろいろ見ていったら、トータルとして1サンプル見るのにこれぐらいかかってきますよということです。

後で見ていただく L-band の EPR であれば、設置できれば1人測るのに10分ぐらいで、大体トリアージに必要な線量というのは出てくるでしょう。臨床症状などというのは、これは問診、ヒアリングしていくところになりますけれども、リンパ球の減少というのも、自動血球計測装置、カウンターがあれば非常に早い段階から見ることでもあります。 $\gamma$ -H2AX は比較的早くできますけれども、これも時間がかかっているところがあったので、現場で測れるものを作っていきますよということで、中村先生のほうでいろいろと細工したものを作って、今、概要を後で見てもらいたいようなものも持ってきていただいています。こちら、染色体異常や小核試験に関しては培養が必要になってきたりするところもあったりするので、時間がかかってきます。この辺をどういうふうに調整していくのかということもあったわけです。

（樺田スライド8）

それを全部まとめると、このような感じかなと、これは他でまとめていただいていたものをそのまま借用しています。被ばく後の経過時間からどういう適用なのかということで、24時間以上たっていくと、先ほどの $\gamma$ -H2AX というのはかなり限界になってきます。被ばく線量が1Gy未満のようなときであれば、L-bandのEPRというのはなかなかぎりぎりぐらいかな、今0.5Gyや1Gyぐらいを目指して弁別できるところを調整していこうということが、L-bandでようやくされているようなところになります。

実際、対象者がどれぐらい発生するかによって、マスギャザリング、これから東京オリンピック、パラリンピックなどのときに、ダーティーボムやテロなどが発生して多数になったというときに、どれぐらい解析しないといけないのかということです。非常に多くなってくるとなる $\gamma$ -H2AXなどが数多くこなせるところがありますけれども、他の選択肢というのが難しくなってきたりというバランスもあるところを考えると、いろいろな指標について評価できる場をつくっていかないといけないよねということです。それらについて、ちょうど日本の中で第一人者として研究を進めていただいている先生方に今回集まっていますので、お互い情報共有しましょうと。

また、この研究班は今年度ちょうど最後ですけれども、これから先もいろいろところでグラントをつくられたりしています。そういった中で、顔が見える関係をつくって、申請していった情報を共有できるような場がつけられたらいいなと思ひまして、こういう場をつくらせていただきました。ということで、私からの紹介、背景は以上です。あとは進行を山口にまた任せます。

山口：本日は2つの部に分かれていまして、前半が物理的な電子スピン共鳴を使ったものです。最初に豊田先生から、X-bandの電子スピン共鳴を使った線量推計法に関しましてご講演いただきます。ご講演の中で、電子スピン共鳴法を使った線量推計の基本的なことに関してもご説明いただくこととしています。では、よろしくお祈いします。

豊田：ご紹介いただきました岡山理科大学の豊田と申します。きょうはどうもお招きいただきまして、ありがとうございます。きょうのお話は、基礎的なところからというご依頼でしたので、そのように準備してきています。ただ、今もお話がありましたように、私はX-bandでの計測をしておりますので、現状ではトリアージに使用するという話にはなりません、その背景になっているところをお話しすると私は理解しました。

(豊田スライド2)

生体線量計測、今さら説明することもないと思いますが、生体を使って測るということです。利点としては、線量計を所持していないときに測れる、線量計がなくてもいいのです。歯を使ったX-bandによるESR計測では試料を人体から採取しないといけないという問題があります。血液ならいいのしょうけれども、なかなか歯を抜いてくださいというわけに

いかないということです。

次に、利点でもあり欠点でもあるのは、測定できる量が過去の集積線量であるということです。生涯の集積線量が出てくるのは、それはある意味では利点なのですが、事故の線量を知りたいというときにはバックグラウンドを差し引く必要があるという問題があります。バックグラウンドというのは、自然放射線や医療放射線のことです。

(豊田スライド3)

ESR と EPR という2つの用語が出てきましたがこれらは同じことです。歯のエナメル以外の計測では、爪について研究が今進みつつあります。髪の毛については、信号が不安定だということで、あまり最近では研究されていないようです。

それで、抜歯して歯を測ると、どの程度をもって高いという問題がありますけれども、X-band では感度が高くなります。L-band よりいいわけです。

ただ、一方で試料の入手が困難になります。人の歯をそのまま L-band で測るのは、感度はそれほど高くないけれども、トリアージに適切です。ドローバックとしてそういう関係になっているということです。きょうは、原理のお話をし、実際にどのようにして計測をするかという話をし、実例を少しご紹介したいと思います。

(豊田スライド4)

それで、電子スピン共鳴とは何かという話から始めます。

(豊田スライド5)

今、申し上げましたが、電子スピン共鳴 (ESR) 、電子常磁性共鳴 (EPR) ということがあり、前者が化学系、後者が物理系で使われているという習慣になっています。私は ESR を使っています。それはともかく、この電子スピン共鳴というのは、そもそも不対電子を検出する手法です。

(豊田スライド6)

この図は、電子が球で描かれていてあまりよくないのですが、本来電子は雲なので、すから・・・、分かりやすく古典的に言えば電子は回転をしている、スピン量子数というのがあるわけです。なので、電子は磁石です。電荷を持っているものが回転していますから、磁場が発生するというので磁石になっています。

(豊田スライド7)

磁石になっているので、磁場の中に置かれた時に、磁気モーメントが磁場の方向を向けばエネルギーレベルが低く、磁場と反対の方向を向けばエネルギーレベルが高くなります。これをゼーマン分裂とって、このエネルギーをゼーマンエネルギーといいます。このゼーマンエネルギーの差に等しい——電子というのはエネルギーレベルがあれば光を吸収すると

いう性質があるので——、光を吸収して、下のエネルギーレベルから上のエネルギーレベルに上がります。上がったあとは、格子にエネルギーを与えて下へ戻るのも、また光を吸収するという過程を繰り返すことで ESR を測れるということになります。

端的に言うと、ESR とは不対電子は磁場中でマイクロ波を吸収する現象です。この  $g\beta$  というのが電子の磁気モーメントになっています。磁気モーメント掛ける磁場がエネルギーになるので、これが共鳴条件になります。

(豊田スライド 8)

これが普通の X-band の装置の写真です。この大きな部分が電磁石です。磁場中でマイクロ波の吸収を見るので、試料をここに入れてマイクロ波を入れて、ここにディテクターがあって測るという装置です。

ESR は一種の分光測定法で、要するにマイクロ波の吸収を検出します。普通の分光法の場合は光の周波数を変えるのですが、これの装置は一種のマイクロ波の回路になり、試料を入れた時点でマイクロ波の共振周波数というのは決まってしまうので、マイクロ波を変えられないので、つまりエネルギーレベルの差の方は変えられないので、これを一定にしておいて磁場をスキャンして、ゼーマン分裂の幅を変えて、吸収する磁場を求めるとというのが原理になっています。

(豊田スライド 9)

この ESR が分かりにくいのはその波形にあります。吸収スペクトルとして、普通の分光法では吸収波形になるのですが、ESR ではこれの微分形がスペクトルとして出てくるというのが非常に分かりにくいところです。感度を上げるために磁場変調というのをされていて、磁場をスキャンするのですが、スキャンはゆっくりです。例えば何十秒というオーダーでスキャンするのですが、ここに 100 キロヘルツの磁場変調をかけるのです。

そうすると、この磁場変調に応じて出力が変動する成分が ESR の成分だということなので、その 100 キロヘルツに応じて変わる成分だけを取り出すということで感度を上げています。横軸の磁場をこれだけ振ると、出力としてこれだけの差が出てくるので、差分、要するに微分形で出てくるということになります。なので、1つの信号として、スペクトルの波形としては、一旦増えてそのあと減ってというセットでこれで 1つの波形ということになるのです。これが少し分かりにくい点です。

被ばくすると不対電子ができるわけなので、被ばくの線量というのは不対電子量に対応しているわけですが、その不対電子の量というのは、吸収波形のこの面積になります。なので、本来この面積を定量しないといけませんが、この線の形が変わらなければ微分しても比例関係は変わりませんので、普通は、この微分形の peak-to-peak を取っ

て信号強度と言っています。

つまり、波形が同じなら相対的に強度を比較する分にはどこを取って比較しても大丈夫です。

(豊田スライド 10)

これは昔、私の先生が漫画を学生が描いた図で、線量計測の原理を説明しています。物質中では電子は対になっています。対になっているというのは化学結合しているということで、そこに放射線がやってきて電離をし、電離したものは元に戻るのですけれども、穴に落ちたりお母さんにつかまったりすると元に戻れません。これは不純物など格子欠陥を表していて、そういう準安定に存在できる場所があって、そこにとらえられた不對電子が、放射線を浴びると増えていくということで線量を測っているということです。

(豊田スライド 11)

これも言うまでもないのですが、この図のここが歯のエナメルの部分です。この部分が非常に感度の高い線量計素子になっているので、この部分を抽出して測ります。象牙質というのは要らないので、後で述べますが、取り除くということになります。ヒドロキシアパタイトですが、化学式はこうなりますけれども、この中に  $\text{CO}_2$ -ラジカル、要するに不純物として多分炭酸ラジカルが入っていて、それが放射線によって  $\text{CO}_2$ -ラジカルを作ります。このラジカルは線量計測をするだけではなくて年代測定にも使ったりできる、これは 100 万年のスケールで安定なラジカルができるということになります。

(豊田スライド 12)

検出限度については、最近の新しく提案された方法からすれば適切な推定ではないかもしれませんが 29mGy という報告があります。研究の歴史ですが、以前にこの論文があったらしいのですが、実用的な線量計測の手法として最初の報告は、私の先生である池谷先生の、Ikeya et al. (1984)が最初だと思います。同じころ、ドイツでも歯を用いた実用的な線量計測の研究が始まっています。

(豊田スライド 13)

これまでの研究例ですが、旧ソ連の核燃料再処理工場の Mayak の労働者の被ばく線量、Mayak から Techa に流された放射性核種で被ばくした住民、あるいはチェルノブイリ、それからセミパラチンスク、それから JCO 事故などがあります。

(豊田スライド 14)

次に、実際にどうやって線量を測定するかということなのですが、今申し上げたようにエナメルをまず抽出しまして、それから ESR の測定をして、線量応答がある信号成分を抽出して線量を算出する、という順番になります。

(豊田スライド 15)

まず歯のエナメルの抽出ですけれども、これには今2種類あって、機械的に分離する方法と化学的に抽出する方法があります。これは併用してもいいのですけれども、研究室ごとに好みがあるようです。

(豊田スライド 16)

私は機械的なほうを使っています。歯を内側、外側に切り分け、これはそういうふうにするというのが一応流儀になっているのですけれども、象牙質をドリルで一生懸命除きます。目で見て象牙質がなくなったなというところで終わるということです。

(豊田スライド 17)

それから、化学的な手法では、アルカリを使って超音波洗浄機中 60°C で 24 時間というのが、標準的なプロトコルになっています。両方を併用するというようなこともあるようです。実際にはこのような感じで、超音波洗浄機中で処理をします。

(豊田スライド 18)

次に、信号の処理です。ESR の測定をして出てくる信号というのは、これは、9Gy の吸収線量の試料のスペクトルですが、2つの成分があります。1つは CO<sub>2</sub>-ラジカルで、これは線量応答のある信号なのですけれども、この A です。それから B が、これは有機物という言い方をするのはあまりよくないかもしれないのですが、最近 native と言っています。歯にもともとある、線量応答のない信号です。これらが重なってこういう信号になっているので、この A の CO<sub>2</sub>-ラジカルの信号の成分だけを取り出すことが結構重要な点になります。

(豊田スライド 19)

これが照射をしていない歯です。200mGy でこれぐらい、1Gy でこれぐらいなのですけれども、ここのところに 1Gy になってようやく先ほどの——どうしてこういう形になるかという説明はする時間がないのでしませんが、A の成分が見えています。200mGy では、何らかの信号強度があると判断できます。ここのところが少し膨れて、ここが少しへこんでいる感じです。ですから、200mGy ぐらいでようやく目で見てあるかしらという感じなのです。

(豊田スライド 20)

これでは定量はできないので、定量するプログラムが開発されています。スペクトルを数値計算で処理をして、CO<sub>2</sub>-の成分の信号強度を算出してくれるソフトなのですけれども、世界的に今2種類あって、これは両方もロシアの方が作成したものです。このことによって検出限界が劇的に改善しました。

(豊田スライド 21)

実際にどうやっているかという、このような式を使ってローレンツ型の曲線をフィットするというところでやっているようです。

(豊田スライド 22)

具体的にこの図のようなこととなります。430mGy の歯のエナメルについて、赤い線が測定されたものです。これをプログラムにかけると青い **native** の信号と緑色の  $\text{CO}_2$ -の信号に分かれて、これらを足し合わせると黒になっているので、まあ合っています。この辺は少しずれていますけれども、そのずれた分がオレンジ色で示されています。こういう形で分離をすることになります。それで信号強度を決めますと、線量に対して信号強度が増えていくことがわかります。

(豊田スライド 23)

次に、線量の算出方法ですが、2種類やり方がありまして、1つが付加線量法、1つがキャリブレーション法です。付加線量法というのは、そのものの試料を使って追加で照射をしていきます。そうしますと、こういうふうが増えていけば、これを外挿すると、ここからこの間が被ばく線量ということになります。

もう一つは、標準試料を使って求めた検量線を使用する方法です。検量線があれば、これだけ信号強度があればそれに対応する線量として求めることができます。今ではキャリブレーション法を使うのが常識になっています。

(豊田スライド 24)

付加線量法の特長としては、その試料だけがあればいいということです。ですから、検量線を使うときには、どの試料についても感度が一定だという仮定があるわけですが、その仮定をしなくもいいということです。ただ、何段階か分けて照射をするわけなので、数段階分の試料がないと困ります。また、照射してしまうと照射前の情報がなくなってしまうます。こういう利点、欠点があります。

(豊田スライド 25)

一方、キャリブレーション法では、標準試料が、検量線を作成するのに必要になります。ただ、もし歯一個一個に感度にばらつきがあれば、正確に出ないということになります。それから、これは元の情報が保存されます。標準試料があつて、しかもそれが、そんなに **ESR** というのは毎日感度が変わるものではないので、感度が一定であるということであれば、とにかく試料 1 個を測るだけで、すぐに線量を得ることができるので、キャリブレーションのほうが好まれています。

(豊田スライド 26)

ただ、標準試料をどうやって作るかという問題があり、個々のラボがそれぞれ標準試料を持っているという現状があつて、新たに線量計測をしようと思うとそれを作らなくては行けないということがあります。

(豊田スライド 27)

うちは、後でお話をしますが、奥羽大学から頂いた歯の中から信号が小さいものを選んで標準試料にしています、このような線量応答になります。

(豊田スライド 28)

それで、ここはどうしても接点が 0 にならないのです。これを延ばしていくと、試料にもともとあるバックグラウンドの 32mGy ということになってしまうので、ここをどういう処理をするかというのは実は問題だと思っていますところです。

(豊田スライド 29)

先ほど申し上げました、感度が一定であるという仮定がどれくらい成り立っているかというのが、この論文にあるわけですが、平均値を 1 にして感度を取ると、このようなばらつきをしています。ここにありますが、標準偏差が 0.1、要するに 10% ぐらい、平均的に 10% ぐらいばらつきがあるという報告で、これぐらいの精度で現状では線量計測をしているということになります。

(豊田スライド 30)

次に、実際にどのような研究が行われたかという例ですが、これが日本で行われた、世界でも初めて原爆被爆者について線量計測が行われた例です。当時は付加線量法を使っていて、しかも信号分離のプログラムがなかったので、native の信号を取らないように、スペクトルのこのところを取っていて、これでも正確に取れているとは言いがたいものがあると思いますけれども、それでも一応こういう、2Gy、3Gy という線量が得られています。当時は T65D という線量体系だったのですか、これと比較して、屋内にいてシールドリングの効果があつた小さい値になっているなど、そういう議論がなされたのはこれが最初です。

(豊田スライド 31)

それから、セミパラチンクスの核実験、これは少し私に関わったのでご紹介しますけれども、旧ソ連が水爆実験をして実験区域から外に漏れ、この辺の村の方が被ばくしたという事故です。

(豊田スライド 32)

これが被ばくしていない、コントロールの村の方の測定結果ですが、これに対して、ドロンという放射線の雲が通過したという地域ではこのような結果になっています。横軸が歯のエナメルが生成した年です。歯のエナメルが結晶化してから不対電子の蓄積が始まるので、結晶化した年を横軸にとると、これは 1949 年以降には見当たらないけれども、それ以前にできた歯で被ばくしているという例があるということです。なので、これはセミパラチンクスの実験による被ばくであると、そういう議論です。

(豊田スライド 33)

それから、これは私の論文ですけれども、では、そもそも日本人にはどれぐらいバックグラウンドがあるのかを調べました。そもそも線量計測の目的というのは、事故による線量を求めたいわけですけれども、実際にはバックグラウンド線量を含めた被ばく線量の総量が測定されます。バックグラウンド線量というのは、自然放射線だけではなくて医療被ばく線も入ってしまいます。ですから、このバックグラウンドがそもそもどれぐらいなのかということの研究する必要があるのではないかと思います。

(豊田スライド 34)

(豊田スライド 35)

これは福島県の歯で、これはちょうど東電の事故の前になるのです。郡山の奥羽大学に歯学部があるのですが、47本歯を頂いて、計測しました。

(豊田スライド 36)

これが結果です。年齢に対してだんだん増えていくような傾向はあるのだけれども、ばらつきは大きいということです。それで、最大で 250mGy というのが出るのです。これは全く、いわゆる歯科放射線の情報や医療被ばく線量などという情報なしに、そういう情報なしにやっているのです。ですから、そういうコントロールなしにやると、こういう線量が出てきてしまうようです。マイナスのも出てくるのです。これは信号処理するとどうしても出てきてしまうので、そのまま載せています。

(豊田スライド 37)

使用した歯は親知らずなので 12 歳から 16 歳ぐらいにエナメルができるので、年齢に対してここを原点にするべきです。バックグラウンドとしての自然放射線の被ばく、少しこれはデータが古くて、実際にはもう少し高いと思うのですけれども、これぐらいだというデータがあるので、それで直線を引くとこのような感じです。ですから、自然放射線による被ばくではなさそうな線量が得られていると言えます。

それで、1つ考えられるのは歯科放射線で、歯科放射線の写真 1 回当たり大体 2 から 4mGy だそうです。

(豊田スライド 38)

ただ、低エネルギーの X 線に対しては信号の生成効率が高いという、これはよく知られた事実で、光子のエネルギーを横軸に取ってコバルト、———普通はキャリブレーションはコバルトの 1MeV の  $\gamma$  線に対して行います———に対して低エネルギーの X 線になると、コバルトで構成したときに対してこれぐらい、10 倍ぐらい、これで 8 倍ですか、これはいろいろなデータがあるのですけれども、8 倍や 10 倍など出てしまうので、その分を考慮しないといけないということがあります。

ですから、歯科放射線というのは非常に線量というのは小さいのですけれども、この感度の差がγ線に換算して10倍とすれば、ESRで見るときには無視していいわけではない、少し考えなければいけない、そういう可能性があります。

(豊田スライド 39)

取りあえず平均値を取って、傾きをここから引いてやると、0.87mGy/yになります。これが説明できるかどうかということなのですが、先ほどの自然放射線を引くと0.5mGy/yぐらいになるのです。先ほどの生成効率が、歯科X線だとすると0.1mGy/yです。ですから、これぐらいはあっても不思議ではないかもしれないということになります。なので、事故放射線の線量を求めるときには、医療放射線量を引かないといけません。

(豊田スライド 40)

少しはしょった結論で申し訳ないのですが、少し統計的な解析をしますと、歯科X線被ばくの記録がないときには、200mGy以下というのは区別ができないのではないかなということになりました。それから、証明することは困難だけれども、100mGy程度であれば、ある程度の確率で言うことができます。それから、集団、ですから、全員が同じように被ばくをしていますということが分かっているならば、100mGy程度でも求められる可能性が高い、これが私の2012年の論文の結論になっています。

(豊田スライド 41)

(豊田スライド 42)

この手法に関して国際線量比較が行われていて、分かりやすいのが2005年に発表された論文でして、これは各ラボで、これだけの線量を当てた歯が送られてきて、どれぐらいきちんと測れたかという、そういうものです。標準試料は主催者側が提供しているので、標準試料と測りなさいという歯が送られてきてやったという例です。

(豊田スライド 43)

そうしますと、700mGyという高い線量でも割とばらつくのです。これが176mGyです。うちは12番だったのですけれども、79mGy、100mGyを切ると、やはりばらつきは大きいのです。平均すればこうなるのですけれども、これは5サンプル測った平均がこうだという話なので、1個ずつというのはやはり少しばらつきが大きいのです。こうしたことを踏まえて標準化に向けて今ISOの標準が作られつつあります。

(豊田スライド 44)

(豊田スライド 45)

(豊田スライド 46)

(豊田スライド 47)

今後の課題としてはこういうことが考えられます。誤差をきちんと評価するということ

と、あと標準試料が各ラボによってばらばらなので、それをきちんと見なくてはいけないだろうということと、先ほど申しあげました切片の問題です。ですから、純粋な native の信号とは何かというところが、ですから 32mGy と出たのが本当に 32mGy なのか、それとも 32mGy 相当のそもそも native の信号、もともとの信号があるのか、この辺を区別するのが非常に難しいです。

それから、最小検出感度など、この辺をもう少しきちんとやっていく必要があるでしょう。それから、私のご紹介した論文ですけれども、バックグラウンド線量というのは福島県の 47 本の例しかないので、今後そういうことをきちんと研究する必要があると思います。実際に測って見たときに線量が出たとして、これは本当に有意な線量かどうかを議論するために、こういう基礎データが必要になります。

それから、あとは永久歯に代わる歯の試料を見ていくというような、私は乳歯を最近やっているのですが、そういうことをやる必要があるでしょうということ所で時間でしょうか。もう少し……。

樺田：大丈夫です。どうぞ続けて。

(豊田スライド 51)

豊田：山口先生の話で出てくるので、これだけ私の先生の名誉のためにあれなのですけれども、ダートマス大学で開発されているのですが、もともとは池谷先生が論文を、これは私と一緒に働いた学生ですけれども、これが多分最初です。このユニットの特徴は、L-band ではなくて X-band で計測しているということなのです。これはキャビティから漏れてくる X-band のマイクロ波で測っていて、この方式はまだ実現されていないのです。というところで終わります。どうもありがとうございました。(拍手)

山口：X-band の EPR dosimetry に関しまして、原理面から実際の応用利用に関しましてご説明いただきました。いかがでしょうか。今のご講演内容に関しまして、ご質問お願いできますでしょうか。

中村：すみません。茨城大学の中村なのですけれども、ペー数がないので分からないのですけれども、日本人の歯の測定結果のばらつきがありましたよね。あれは年齢は横に振ってあるのですけれども、性別というのはどのような、何かそういう結果はあるのですか。

豊田：性別は分かりません。

中村：分からないのですね。その情報はないのですね。

豊田：ですから、歯がそもそもあってそれを分析しているので、年齢は歯医者さんが見れば分かるのですけれども。

中村：性別情報はないということ。

豊田：分からないです。

山口：個人特性に応じてバックグラウンドがどうかというのがより分かっていくと、より精度が高まっていくのでしょうか。

豊田：うーん、そうですね。

山口：よろしいでしょうか。物理的な線量評価に関しましては、この後、まとまったディスカッションの時間を設けていますので、そこで議論できればと思います。ありがとうございました。

では、L-bandの講演に移りたいと思います。

(山口スライド1)

こちらは先ほどの豊田先生のお話があったものでして、最初に考えられた in vivo での測定法だそうですが、これが現在どうなっているのかについてお話をしたいと思います。こちらの X-band であったそうなのですが、私どもは L-band の装置を使っています。

(山口スライド2)

現在の L-band 法を使った線量推計法の現状、実用に向けた検討状況、また、この測定法の特性に関して検討を進めていますので、それに関しても発表したいと思います。

(山口スライド3)

これが現在の状況でして、外側に今日、部屋の外に装置が置いてありますので、ぜひご覧いただきたいと思います。下がデモで示している測定でして、標準ラジカル物質を使ったものによる信号と放射線によって作られた炭酸ラジカルによる信号が示されています。先ほどの講演でもありましたように、放射線に対する応答はエネルギー依存があります。ここは 150kV の X 線を使ったものとなっています。Cs-137 の場合には、これに比べると少なくとも 4 倍くらい信号は小さいと思います。

(山口スライド4)

こちらは信号を解析するソフトウェアの画面でして、こちらもきょう部屋の外に装置が置いてあります。このような画面で信号を観察しています。

(山口スライド5)

こちらは樺田部長から紹介がありました各測定法の特徴を述べたものなのですが、補足しますと、ラジカル特異性は、EPR の場合にはラジカル特異性はあるのですが、ラジカルは放射線以外のものでも存在し得ます。信号があった場合にラジカルの存在は間違いのないと思うのですが、それが放射線誘発かどうかに関して、場合によっては吟味が必要ではないかと思われ、装置があればすぐ分かるのですが、装置がないと持って行かないといけないという限界はあります。

(山口スライド6)

結果ですが、これは 150kV の管電圧で照射した X 線照射の結果をお示しします。この装置はいろいろな方の貢献で成り立ってしまっていて、この使っている Resonator は北大の平田先生が作られたものです。また、装置を実際に運転して、装置を使って実験していく上でいろいろトラブルが発生するのですが、キーコムの方に、今日いらして頂いていますけれども、大変お世話になっています。

(山口スライド 7)

(山口スライド 8)

こちらが 10Gy で、こちらが 2Gy のものです。

(山口スライド 9)

(山口スライド 10)

(山口スライド 11)

この後、1Gy を照射したもの、未照射のもの、ここにお示しをしていますが、この測定の感度特異度は線量情報を見せずに信号、スペクトルを判定して、どれぐらい正しく判定できるのかということについても検証しています。

課題としましては、こちらは未照射なのですが、ノイズがあたかも信号として見えなくもないこともあって、特異度に関してバックグラウンドのノイズを減らさないと、誤って信号ありと判定する可能性が高くなるので、ノイズレベルをどう下げるのかがポイントだと考えています。

(山口スライド 12)

実用化に向けた検討では、実際に装置を運び出して測定するというところを行っています。

(山口スライド 13)

こちらは福島県に行って行ったものでして、このときに、今回の原発事故では最も被ばくした東電の方でも 0.7Gy といわれていますが、その多くはヨウ素 131 を吸入したものですので、そういったばく露に関してはこの装置は無効です。

甲状腺にたまったヨウ素 131 からの  $\beta$  線は歯には飛んでいきませんから、この測定法で線量を見つけるのは難しいので、福島の方にとってこの研究に参加する利点は全くないのです。事故を経験した方にこの研究に参加していただいて測定体験を伝えて、経験をして、実際に事故を経験した方がこういった測定法に関してどういうお考えをお持ちなのかというのを、お考えをお聞きする調査を行っています。こういった場面で訪問して行っているものです。

(山口スライド 14)

(山口スライド 15)

いろいろ場所を変えて行った結果なのですが、S/N を示していますが、抜いた歯に

比べて生体の歯では S/N に違いがありまして、どうしても生体では S/N が悪くなっています。

(山口スライド 16)

(山口スライド 17)

抜いた歯の状態に比べて、口腔内の歯ではノイズレベルが相対的に大きくなっていて、いかに差を小さくするのがポイントになっています。

(山口スライド 18)

これまでのところ、それぞればらつきはあるのですが、口腔内のほうが、ノイズが相対的に大きくて S/N がこのように低下をしていて、この差を小さくしたいと考えています。

(山口スライド 19)

(山口スライド 20)

課題は幾つかありますが、まず試料のサイズによる影響なのですが、やはり歯が大きいほうが、信号が大きくなります。これは抜歯した歯なのですが、エナメル質の厚みが厚いほうが信号は強くなります。定量的な評価をする際に、どうしても生体には個体差がありますので、そういったことへの配慮が必要ではないかというのを示すデータです。

(山口スライド 21)

その他、測っている途中で、こういうふうによく分からない信号が見えてくるということが、起きています。

(山口スライド 22)

これが何かに関してはまだきちんと決着がついていないのですが、汚れが原因と考えていまして、ループを洗うことで改善がされていますが、具体的に汚れが何かというのは、まだ解決できていません。

(山口スライド 23)

課題としては、測定の標準化、こちらの手順をこの研究で決めました。また、いろいろなトラブルが起り得ますので、幅広い経験を持ったエンジニアの方のサポートが重要ではないかと思っています。これに関しましては、今回の研究班ではキーコムさんに、開発者側と秘密保契約を結んでいただいてバックアップを頂いています。

(山口スライド 24)

こちら、ノイズの点に関してはさらにデータをお示ししたいと思うのですが、このように測定する場所によって、国立保健医療科学院、こちらの電波シールド室なのですが、あと放医研に行った場合、福島に行った場合というふうに、場所によって S/N が変わっています。私どもの実験室はあまりいい環境ではないことが判明しましたので、今はこちらの電波シールド室を使っています。

(山ロスライド 25)

(山ロスライド 26)

電波シールド室で電磁界強度を測っているのですが、4 程度、電磁界のノイズが小さいので、電波をシールドすることで信号の質は良くなっていましたが、電波シールド室は必ずしも電波の反射に関して十分な考慮がされていません。中で電波を発信しますので、小さいシールドテントを使うと中で電波を反射してしまうということも判明しましたので、今電波シールドを作っている会社では、中に電波発生装置があることも想定をして、吸収に関しても工夫するようなものを今開発されていますので、今後そういったものに搭載できればと思っています。

(山ロスライド 27)

(山ロスライド 28-32)

こちらは電波シールドルームで測ったもので、必ずしも反射に関して十分な対応はなされていないのですけれども、このように、これまでより改善したデータが得られていました。

(山ロスライド 33)

また、その他の影響なのですが、測定の安定性に関して装置一般に言えるかと思うのですが、立ち上げ時にやはり変動が大きくて、ウォーミングアップを十分取ると同時に、やはり低い温度のほうがより変化が小さいので、温度制御に関しても、高い温度で変化をする可能性があるので、測定場所の温度に関しても配慮が必要ではないかと考えています。

(山ロスライド 34)

その他の課題として懸念されるのは、紫外線の影響です。こちら、今の方法では、前の切歯を測っており、紫外線の影響が懸念されますので、紫外線の C と B と A で照射をしています。

(山ロスライド 35)

こちらは紫外線の C を照射したものでして、このように変動は大きいのですが、紫外線が増えると応答が増えることが懸念されています。

ただ、太陽紫外線では紫外線 C の混入は小さいと思われますので、恐らくこの影響は受けないのではないかと考えています。

(山ロスライド 36)

こちらは UVB を照射したもので、同じようにばらつきは大きいのですが、こちらでも照射量を増やすと信号が増えてきています。

(山ロスライド 37)

こちらは仮に 1 日 2 時間、太陽紫外線をばく露するという仮定で照射した年数と EPR 信号の関係を示しています。ここでは X 線を照射した場合の信号当たりで考えているのです

が、このような結果です。これは X 線の場合ではあるのですが、トリアージに関して影響を与えることに関しては、1日2時間紫外線を浴びるというのかなり保守的だと思われるので、トリアージの目的に関しては大きな妨害にはならないのではないかと考えています。

(山口スライド 38)

こちらは UVA です。UVA も同様に、照射時間が増えると信号が増えてきていました。こちらは Cs-137 の線源での応答で換算をしたものですが、UVA では量は増えるのですが、効率が下がるので、結果としてこちらも、トリアージに関しては大きな影響を与えるためには、やはり相当量のばく露が必要ではないかと考えています。

(山口スライド 39)

こちらは紫外線の影響のまとめとして、L-band のトリアージ、そして大きな線量に関しては、前の歯で測ることに関してそれほどそれが大きな限界を与えるものではないと考えています。

(山口スライド 40)

その他の問題で、先ほどの講演とも関係するのですが、実際の事例でも陽性例が検出されています。こちらはそうなのですが、こちらは当初、私たちはこういった結果が出ることは想定していませんでしたが、その場でインタビューをしたら、相当回数医療で、歯科での X 線検査を相当受けておられました。どれだけ受けたのかという数を記録して計算をしたり、あとは香川大で X 線装置を使って再現をしたのですが、やはり信号が見えました。歯科での X 線の検査は実効線量としては小さいのですが、局所に集中的に線量を与えるために、この方法では医療での影響は受けることになるので、その影響に関して考慮が必要だと考えています。

(山口スライド 41)

そのことから、この検査は原発事故の影響に関して今回ポジティブにはなり得ないのですが、医療に関しては、こちらは従事者のデータなのですが、実効線量として 20mSv を超える方がこれほどいらっしゃるという、300 人ぐらいですか、データなのです。手の線量に関して年間 0.5Gy 超える方が、長瀬ランダウア社のデータですと、昨年度は 1 人だったのですが、毎年数人おられるのです。なので、そういった方がポジティブコントロールとして貢献いただけるとありがたいと考えています。

(山口スライド 42)

それらの応答特性のことなのですが、量研機構 放医研の方々にご協力いただきまして、高 LET の放射線を照射したものに対する応答を調べています。

(山口スライド 43)

中性子による応答は当然小さいと、ハイドロキシアパタイトは水素が少ないので、反跳陽子が少ないがために応答が小さいことはこれまでも報告はされていたのですが、よりそれを定量的に評価しようとしています。

(山口スライド 44)

そのために、より高い中性子線量まで照射をしようとしていまして、その高い中性子線量場の特性をより精密に測って、そこでの $\gamma$ 線、中性子線の量を測定するとともに、よりその照射場の条件に、再現した計算が行われているところです。

(山口スライド 45)

こちらを照射する場の特性を変えるために鉛を使って光子を減らしたり、低いエネルギーの中性子を減らしたりとしているのですけれども、条件を変えて応答を見て $\gamma$ 線や中性子の量を計測します。

(山口スライド 46)

これは中性子の量を計測したものなのですけれども、こういったふうにピットを観察しますと中性子だけの応答ではないものもあるようです。

高速中性子が引き起こす応答に関しても、きちんと、その場がどういう特性になるのかというのは、物理の方がより線量率が高い場としてターゲット近傍での放射線場(照射室内での放射化を避けるためにターゲット近傍で室内への漏洩中性子線量を減らした照射が行われています)の特性も調べておられます。その成果も使って、こういった放射線の種類によってどういう応答があるのかに関して、よりきちんと調べていこうと思っています。

(山口スライド 47)

中性子照射場での応答に関しましては、ほとんどが混合している $\gamma$ 線の影響で説明はつくのではないかと考えています。

(山口スライド 48)

こちらは、照射する場の特性を変化させて応答を変えて、こういった種類の放射線がどれだけ利いているのかということと比較しているところです。

(山口スライド 49)

こちらはまとめですけれども、実際、装置を外に持って行っても使えることが確認されています。紫外線の影響に関しましては、トリアージ目的に関しては大きな限界は与えないと考えています。品質の確保、向上が課題であって、こちらはさらにノイズレベルを低くして検出限界を上げていきたいと考えています。

また、この測定法の基礎となる部分に関しまして、現象論だけではなくてより原理的なものに近づくために、異なった種類の放射線への応答に関してきちんと調べているところです。

その他、こういった方法を実際に使うために、実際に信号がある方を測ってみることも重要だと思っています。今試みているのは、放射線の治療を受ける患者さんにご協力いただいて治療前の測定をしているところなのですが、そういった患者さんであったり、医療従事者の方で高い線量を受けた方の貢献を求めたいと考えています。

(山口スライド 50)

この研究は多くの方に支えられて進められてきています。私からの発表は以上です。(拍手)

では、前半の物理的な線量評価法に関しまして、皆さまから議論をお願いしたいと思います。それと発表内容に対する質問も歓迎します。

樫田：皆さん、初めての人もいて、なかなか緊張感みか分からないので、もしよろしければ、ぱっとお名前と所属ぐらい少し自己紹介を先に、アイスブレイク的にしておいていただけますでしょうか。最初にもお話ししたように、ネットワークづくりも含めてということですので、後のディスカッションのためにも簡単に少し自己紹介でもしていただいたら質問もしやすいかなと思うのです。

(自己紹介部分は中略)

中村：質問なのですけれども、先ほど、測定環境がやはり重要だというお話をされていたではないですか。

山口：はい。

中村：今、例えばこの写真にあるように現場に持って行ったときに、その現場の環境というので、すごくデータがぶれたりすることはないのですか。お聞きしたような気もするのですけれども。

山口：そうですね。中井さんと一緒にこういった場で試して測って見たのですが、まず6月に行って、空調が入っていないけれども温度がすごく高いというときには、ノイズレベルが上がって、あまりにも装置が熱くなってしまったというところもありましたし、何か近隣で動力源を使うとノイズが増えるのではないかと疑っています。何か中井さん、補足がありますか。いろいろトラブルがありましたよね。

中井：そうですね。

山口：急ぎよ、扇風機を使ったりというのもありましたけれども。

中井：本当に今山口先生がおっしゃったように、熱がかなりノイズの原因にはなってるのですが、装置を使えば使うほどどんどん発熱してきて、時間がたてばどんどんノイズが増えてきたので、今写真に示しているように機械を扇風機で冷やしました。

山口：これはそうですね。

中井：はい。それで多少は改善するのです。それとあとは、やはり周囲で電源を使われて、本当に、ここでは多分なかったと思うのですけれども、別の場所で測定したときに、掃除機が動いていたり、そのレベルでも少しノイズが増えたりなどというのはありました。

山口：この装置は廊下を人が通るだけでも反応していますので、携帯電話の発信する以外に、少し離れた場所で人が通っても、画面を見ていると気が付くという感じです。

このため、事故が起こった直後どういう場所でやるのがよいかを考える必要がありますが、アイデアとしては、まず準備としてはファーストレスポonderの方に対してあらかじめ信号を取っておいてはどうか。教育の機会に最初に信号を取るような時間を取ってはどうかというアイデアと、もう一つ、現場で測るときに、中で電波を吸収する機能を持って電磁波シールドがあるような、これからそういったテントが開発されてきて、そういったテントを積んだ車が販売される予定で、レンタル予定と聞いていますので、そういったサービスが供給されると、より安定した環境で測定可能になるのではないかと期待しています。

樺田：この研究班のときも、最終ゴールとしてはそういった形で、何かある程度トラックなどに載せられるような装置にしておいて現場に行ける、それが、これだけでなくて、この後お話しいただく中村先生の分なども一緒にセットができるような環境が、実際つくらなくてもどこまでできそうかということの探求はやろうという感じでした。

もう一つは、これはラジカル測定であり直接の放射線を計測するものではないものから、原発事故直後など周辺環境の線量率が上がったという形で、サーベイメーターのときのバックグラウンドの影響のようなものは気にしなくていいというところも利点と思うのですけれども。

山口：そうですね。高バックグラウンドになると線量計だと高バックの影響を受けてしまいますので、甲状腺の体外計測はそうですし、ダストサンプリングしたデータに関しても明らかに高バックの影響を受けています。鉛 5 センチの遮へいがあっても低いエネルギーのピークは、フォールアウトしたものの影響が大き過ぎて、ピークのプルーム通過時でない時間帯の 10 分間程度のダストサンプリングで得たフィルタでは、環境の高バックグラウンドの影響を受けてしまって定量性に影響を与えるということはありません。高バックグラウンドの場合の測定対応も今回の反省点だと思います。

ですが、それも別の環境省の総合研究推進事業のほうで、そういった線量再構築に課題で当時得られたスペクトルに関して、フォールアウトの高バックの影響を取り除くような工夫も今試みているところです。

豊田：国際会議などに行くと、実際に例えば核爆弾がワシントンに落ちたときのような、そのような発表があるのですけれども、日本の何か文化として、そういう緊急時に対応を考えるということ自体が何かタブーのように感じているような、そういう何か雰囲気を感じる

わけです。ですから、そもそもこういう研究というのは可能なのでしょうかという辺りから、やるのだったらやるときちゃんとやはりやるべきだし、「日本ではこんなのはできないよ」のような、何かそのような文化の問題です。

樺田：なかなか難しいことです。それは最後に、もしよろしければ、全部終わったときに何かコメントいただければありがたい、環境省さんなどもコメントいただければありがたいのですけれども、今豊田先生が言われたところは本当に厳しいところです。うちなどは部としては公衆衛生における健康危機を守るということで、健康危機管理研究部というのがそもそも1つあるのです。公衆衛生分野全体のもの、感染症を含めていろいろなものを対応しましょうというのがあります。

そこで、最初に私が言った研修を提供するというので、私が着任したのが9年前なのですけれども、最初の1年目、2年目のときに、まさにこういう緊急被ばく医療があるようなときの対応をどうしなければいけないようなことを、JCOの事故やチェルノブイリの事故を踏まえてお話ししていたのです。けれども、自治体職員の人たちはぼかんと、何でそのようなことを聞かなければいけないのかなという環境だったのです。

福島の事故が発生して、その対応ということで確かに皆さん非常にエネルギーを割いて、ご苦労いただきながら今やっつけていただいているところですが、全般としてやはり非常に難しいという領域です。こういう放射線のことだけではなくて、感染症のことであったり水の問題であったり、そういったことを含めて科学院の中でもいろいろトライアルはしているところですが、そういったのは研究分野あるいはグラントの面も含めて、いろいろなところとも関わって、また相談は広げていきたいなと思うところです。

数藤：対象は、基本的に一般住民ということですか。

樺田：どの対象ですか。

数藤：ここの研究対象、つまり目標。職業被ばく。

樺田：このトリアージの対象ですか。

数藤：この研究班です。

樺田：このトリアージの対象は、福島のような事故があったときのファーストレスポンドーもそうですし、先ほどお話ししたように、マスギャザリングとしてオリンピックやワールドカップのときに、ダーティーボムなど、そういったものでテロ対策、そういったものも含めてというところです。

諸澄：豊田先生が日本的な文化ということを指摘されていましたが、私もがんセンターにいたとき、やはり口腔外科領域の放射線治療というのは、50Gy、75Gyぐらい浴びる線量なわけです。ですから、そういった方々、あとはセシウム針の舌がんの治療、そういった医療機関との協力というのは、共同研究と言われるとまた臨床研究の問題になりますけれ

ども、協力というのはいできないものですか。

樺田：がん放射線の治療の場合には、できるだけやはり正常組織を守るということで、そこが、治療計画を立てるときに、すごく正常組織を外す工夫というのは今されているところですよ。

ただし、やはり一番線量は高くなっていく対象者になりますので、そこ（放射線治療患者）を一番ご協力いただければやりたいよねと、ずっと言っているところなのですけども、残念ながらデータを提供できるところに至っていないというのが現実のところなんです。確かにそれをやらないといけません。放射線治療患者は線量評価をきちんとされた人たちになってくるので、その情報の下でこちらと併せていくというのが絶対必要になってくるとは思います。何か山口さんから。

山口：患者さんに協力いただくことに関しまして、今試行が始まったところです。また、この測定の意義なのですが、福島に行つての感想なのですが、そこで三宅先生と——香川大の三宅先生はこの装置の開発に関しましては、ダートマス大学に留学されたときに、最初の時点で貢献された方ですが、三宅先生は、この研究に参加することの不利益に関してすごく強調された話をされたのですが、参加した方は前向きだったのです。

まず1つのポイントは、この測定法ってリアルタイムで結果が見えるので、透明性が高いということがあると思います。その場でスペクトルが見えるので、自分が1次的なデータの生産に貢献したことが目に見えやすいことと、この研究は事故前からやっていたという説明もあって、研究そのものに対して貢献したいという気持ちを皆さん持たれていました。

確かに、豊田先生がおっしゃったように最悪のことを考えて何か準備をするというのは、すごく負担ではあるのですが、実際に、私も福島に行つてこの測定をやることに関しては葛藤を持っており、懸念もしていたのですが、実際やってみると、住民の方から受け入れられたということだったと思います。

その一方で、リアルタイムで出た数値を伝えられるときには配慮が必要となりました。検査を行う前に、この検査が研究に協力する方には不利益しかもたらさないことを強調し、原発事故で住民の方々が受けられたレベルの線量はわからないことを、三宅先生は伝えておられました。どうですか。歯科医師の立場として、三宅先生の行動から何か感じることはありましたか。コメントできますか。難しいですか。

中井：今は、ちょっと。

山口：この研究の限界というのを事前に伝えてあります。原発事故で受けた線量に関して、レベルが低いのでこの測定では分からないということも明確に伝えて、ですから研究に参加しても線量を知るという観点では利益はないということも、もちろん伝えてあります。その結果の信号が見えた例があつて、それは歯科での放射線だと考えられるのですけれども、そこ

は時間を取って確認をしています。この陽性例は、少なくとも東電福島第一原発事故の影響ではないと確信できますので、そうではないということを明確に伝えるために、原因に関してそのとき慎重にやりとりをして情報を得ています。

廣田：いいですか。すごく基本的なことを聞いてしまうかもしれないのですけれども、先ほどから結構テロ対策でというのが目的として挙がっていると思うのですけれども、そういう場合ってどれぐらいの線量を想定しているものなのですか。何か医療などと数十 Gy で、今回福島、先ほど福島は、もっと違うとおっしゃったのか、福島の事故となると相当低いではないですか。

すごく幅があると、なかなかアプローチ方法が変わってくるのではないかとすると、テロと一言で言ったときに、どれぐらいの範囲をカバーするのか、それともテロの中でもこれぐらいの線量のところをカバーしますという意味で、幾つかアプローチ法を考えるということを考えているのか、どちらかなと思いました。

山口：目的としては、トリアージで、ある程度侵襲的な治療が必要な方をきちんと見つけるというものです。

廣田：では、もう数 Gy で。

山口：なので、2Gy 相当の方を見逃さないようにするというのが目的となっています。

廣田：ありがとうございます。

山口：では、よろしければ、いったんここで休憩を取りたいと思います。20 分間休憩を取りたいと思います。お疲れさまでした。

樺田：飯塚さんと志村さんのポスターをそこに置いてありますので、あと機械を外に実際置いていますし、この後、中村先生から紹介いただくような器具も展示しています。中村先生のものなど説明を聞いたほうが、後でないと分かりにくいところがあるかと思うので、それぞれ、お菓子などもありますのでそれをつまみながら、空いた時間で見いただきたらと思いますので、よろしくお願いします。

山口：では、再開をしまして後半に移りたいと思います。後半は生物学的な線量評価です。

研究班から中村先生と盛武先生にご発表いただきます。では、よろしくお願いします。

中村：それでは、茨城大学の中村です。よろしくお願いします。

(中村スライド 1)

きょうはタイトルにあるような内容で、放射線の線量を評価する一つの方法としてご紹介させていただきます。最初にこの H2AX と、何度も登場していますリン酸化 H2AX について、簡単にご説明させていただきます。

(中村スライド2)

通常、DNAはこのような形でヒストン8量体に2周半ぐらい巻き付くような形で、ヌクレオソームを形成して核の中にうまいこと収まっています。そのヒストン8量体は、分解しますとこのような形で教科書的にはいわれているのですが、その中のコアヒストンのH2Aというものが、実は細かく見るといろいろな種類があります。その中の一つ、これは平均すると10%ということなので、細胞の種類であったり、動物によっては高いものですと25%だったりするのですが、そのうちの一部分がH2AXという少し種類の型が異なるバリエーションというものになっています。

このH2AXというのが、構造を見ますと、基本的には親であるH2Aとアミノ酸配列はほとんど変わらないのですが、H2AXだけのほうはC末端側に少し長めの、いわゆるテールと呼ばれるアミノ酸がくっついていて、その中でも特にC末端側のSQモチーフと呼ばれるところが、このアミノ酸配列が非常に、酵母からヒトまで非常に高く保存されているということが分かります。

(中村スライド3)

非常に高く保存されているということは、生物学的に何かしら非常に重要な意義を持っているということになるのですが、実際このセリン、ヒトの場合ですと139番目のセリン残基になりますが、こちらのほうはDNA損傷に伴ってリン酸化を受けると、そういう変化が起こります。このリン酸化されたH2AX、特にセリンの139がリン酸化されたH2AXを、私たちは $\gamma$ -H2AXと呼んでいます。

今、DNA損傷とともに $\gamma$ -H2AXが発生するというお話をしたのですが、実際、例えばこのような形でここにDNAの2本鎖切断が入りますと、その傷の周辺のヌクレオソームを構成しているヒストンのH2Aがリン酸化を受けます。

(中村スライド4)

このリン酸化というのは、ここの傷を中心にお互いにバツと広がっていくのですが、全部のH2AXがリン酸化されるわけではありませんので、そのリン酸化、 $\gamma$ -H2AXになっている部分というのは、あくまでも傷の周辺だけということになります。ですので、 $\gamma$ -H2AXに特異的な蛍光色素を持った抗体で免疫染色をしますと、このような形で、これは赤が核ですが、1つのドット、1つの $\gamma$ -H2AXのシグナルをこういった形で可視化することができます。これというのは、突き詰めると1つのDNAの2重鎖切断を見ているということになりますので、1つのDNAの傷を1つのフォーカスで検出することができるということになります。

この方法が1998年に発見されたのですが、それ以前、DSB、DNAの2本鎖切断、傷というのはどうやって検出されていたかといいますと、昔はパルスフィールドという方

法で、DNA が断片化している様子を見ました。ただし、この場合は非常にたくさんの DSB がないと検出ができないというものでした。コメットアッセイというものも 1 つの細胞当たりの断片化を見るのですけれども、そこそこ傷がないと、なかなか検出が難しいです。

それに対して  $\gamma$ -H2AX アッセイというのは、いろいろな方法があるのですけれども、先ほどご紹介した免疫染色を使った方法ですと、1 つのフォーカス、つまり 1 つの DSB を検出することが可能ですので、DSB を検出、かつ、1 つの細胞当たり何個の傷があるかという形で定量することのできる、最も感度の高い方法だと言えます。

(中村スライド 5)

実際、DSB の量というのは放射線に相当するかというような実験になりますけれども、これは血液サンプルにさまざまな放射線を照射して、先ほどご紹介した  $\gamma$ -H2AX のフォーカスというのがどのように増えていくのかというのを見た、そういうデータになります。0.02Gy、です。20mGy に相当しますが、そこからもう既にフォーカスの有る無しが、差がついてくるわけです。それというのは非常にきれいに線量に依存して増加しているというのが、お分かりになるかと思います。

(中村スライド 6)

ですので、これを使うと何個の傷があると、例えばこれだと、大体 1 つの細胞に 6 個ぐらいフォーカスがあると 0.6Gy の照射に相当するかなということが分かるということになります。実際、非常に高感度の  $\gamma$ -H2AX の検出というのは、既に医療現場ではさまざまなところで線量評価として使われています。

どれが一番小さいですか。多分、ここら辺の CT スキャンのデータなどは非常に線量が低いのがお分かりになるかと思います。これなど 2mGy などになっています。かつ、全てのデータが、ばらつきがあるものもあるのですけれども、非常にきれいに線量依存的に比例関係で見えるというのも分かるかと思います。ですので、 $\gamma$ -H2AX を使うということでもれくらい被ばくしたのかというのを検出することができるということになります。

(中村スライド 7)

本事業では、トリアージということで、先ほど山口先生からもありましたけれども、1Gy、2Gy ぐらいの被ばくをしているのかしていないのか、1Gy 以上の被ばくなのか、あるいは 0.5Gy、あるいはもっと低い線量なのかというところを評価する、それが必要になってきます。ですので、放射線被ばく、線量評価としての  $\gamma$ -H2AX アッセイというのが本当に大丈夫なのか。これは  $\gamma$ -H2AX の性質も考えてのことなのですけれども、迅速な DNA 損傷モニタリングというか、 $\gamma$ -H2AX アッセイを簡単にする、迅速に行うデバイスの開発ということになります。

(中村スライド 8)

こちらは、先ほど少しだけお話ししましたが、NIH でやった実験になります。やはりテロを前提として、線量の分からないダーティーボムなどが来たときに、どれぐらいの放射線被ばくをしたのかということを知るようになるための、 $\gamma$ -H2AX アッセイの有効性というのを確認した実験になります。サルに放射線、これはかなり高い線量だと思いますが、照射した後に  $\gamma$ -H2AX アッセイを行ってこの線量評価ができるかという、そういう実験になります。

(中村スライド 9)

こちらは、8.5Gy、結構高い線量を照射されたサルの血液中の DNA 損傷になります。明らかに非常にたくさんのレベルの DNA 損傷が誘発されています。それがだんだん修復されているというのが分かるかと思います。これをグラフにしますと、横軸が線量です。縦軸が  $\gamma$ -H2AX のフォーカスの数になります。そうしますと、例えば 1 日ぐらいを見ていただくと分かりやすいのですが、照射後 1 日のフォーカスの数というのを線量ごとにプロットしています。そうしますと、非常にきれいな比例関係が見えてきます。

ということは、線量が分からない場合でも、例えば 4 個のフォーカスが検出されたとすれば、逆にこれをたどっていくと、これはどれぐらいですか、6Gy ですか、もう少し低いですか、それぐらいの放射線に被ばくしたということが分かるということになります。ですので、これは末梢血ですけれども、による  $\gamma$ -H2AX アッセイを用いた線量評価は十分に可能であるということになります。

(中村スライド 10)

こちらは、次にお話しされる盛武先生との共同で行ったマウスに対する同様の実験なのですが、0.5Gy という少し小さめの線量でも同様の実験をしていますが、非常にきれいに線量依存的にフォーカスの数が増えています。さらに、それは修復とともに減少しているというのが分かるかと思います。先ほどのサルと全く同じです。これは 1 個体ですので、まだあまりきれいなグラフではないのですが、これを使えばおおむね線量評価ができるということが分かるかと思います。

ここまでお話しすると、「いや、これ十分いいじゃないか。血液を採ってきてそこにあるフォーカスの数を見れば線量が分かる。ばっちりだ」と思うのですが、これは既にお話があったのですが、残念なというか、いいことなのですが、DNA 損傷というのは、傷ができますと、その後きちんと修復されるわけです。

(中村スライド 11)

これが一般的な DNA 損傷の発生とその修復の kinetics をグラフ化したものですが、できた傷というのは大体 30 分ぐらいでマックスになります。そのマックスになった DNA 損傷というのは、時間とともにどんどん修復されていて、細胞レベルですと大体もう 12 時間ぐ

らいたてば全ての傷が修復されると考えられています。

個体レベルですともう少し時間、スパンは長めになるのですが、これは細かいところはいいのですが、マウスに照射していろいろな臓器で DNA 損傷がどのように変化したかというのを見たグラフです。照射前と比較すると 24 時間、遅くとも 48 時間ぐらいたてば、ほぼ照射する前のレベルまで DNA 損傷は修復されているというのがお分かりになるかと思います。

(中村スライド 12)

つまり、 $\gamma$ -H2AX のフォーカスを見ればどれぐらい被ばくしたかが分かるとは言いましたが、ここには実はタイムフレームというか、それが有効な時間枠があるということになります。実際それを証明したというか、それが如実に出たのが、福島原発エリアの 20 キロ圏内に取り残された家畜です。牛の血液を使って  $\gamma$ -H2AX アッセイをするという、そういう実験を行いました。

ただ、この実験は、**Sampling period**、いわゆる牛の血液を採った時期というのが、早いものでも 2011 年 11 月です。要するに、原発事故からもうかなり時間がたったときの血液サンプルということになります。ですので、先ほどのグラフを考えていただきますと、原発事故そのものによって、そのときの放射線被ばくというものの影響は、ほとんど修復されているということになります。

(中村スライド 13)

実際、そうしますと、確かに福島エリアの牛、家畜の血液中にはコントロールよりも非常に高いレベルの DNA 損傷が検出されたのですが、この牛の推定される内部被ばく線量、外部被ばく線量というものは、この数値にはマッチしないということになります。そうしてきますと、やはり  $\gamma$ -H2AX アッセイというのは非常に感度が良くて、線量を評価する上では非常に有効ではあるけれども、その有効な時間枠というのをやはり考えなければいけないということになります。

(中村スライド 14)

やはり緊急被ばく医療が必要とされるときは、もう時間との戦いですので、そういう被ばく線量を評価する上で本当に何が必要かということ、やはり迅速かつ簡便に、24 時間以内、遅くとも 48 時間、72 時間以内に  $\gamma$ -H2AX アッセイを完了できる、そういうシステムが必要になってくるだろうということになります。

今までなぜそれがなかなか難しかったのかといいますと、やはり採血です。血液サンプルで  $\gamma$ -H2AX アッセイは可能なのですが、採血していきますと、血液成分というのは非常にいろいろな血液細胞が混ざっています。その中で  $\gamma$ -H2AX アッセイができる血球細胞というのは、リンパ球のみになります。ですので、従来ですと、採血してきたものを非常に

丁寧に、リンパ球を分離してスライドを作製して $\gamma$ -H2AX アッセイを行うという、ある程度全自動化はされていますけれども、やはりなかなか手間のかかる、そういう実験になっていました。

(中村スライド 15)

そこでいろいろ考えたのですけれども、この分離その他、 $\gamma$ -H2AX アッセイ全てを1つの小さな小型のチップでできるような、そういうものができないだろうか。それを考えて、実際本プロジェクトではそれを検討していきました。着目したのは、随分前からかなり話題になっていた **Microfluidic chip**、流路チップです。マイクロ流路チップ、それに少し着目してみました。もともと **Microfluidic chip** というのは、血液の分離などによく使われる、そういうものだったので、何とかこれを利用できないかということで、これを中心に開発を考えました。

そのときに私たちは、完全に生物屋ですので、こういうものを作るなどということは全くもってできない、苦手なのです。最近、大学間の交流というか社会連携など、そういうのを積極的に後押しするシステムがあったものですから、群馬大学の工学部の鈴木先生という方が、非常にマイクロデバイスの技術で、すごくトップを行ってらっしゃる方で、その方とお話をすることができました。

実際、マイクロナノデバイスというのは、**MEMS** という分野らしいのですけれども、想像もできないぐらい非常に小さく、かつ、精密な構造を作ることができるそうなのです。私はあまり、よく分からないのですけれども、これを使えば、先ほどの目的としている、全血からリンパ球だけを採ってきて、さらにその採ってきたリンパ球で  $\gamma$ -H2AX を行って解析をするということができないかと考えたわけです。

実際、最初はトライアンドエラーをずっと続けなければいけませんので、まずこのようなものを作ってみました。もともとのチップを何で作るかということなのですけれども、非常に加工がしやすい **PDMS** チップ、シリコンの一種です。これは実際外にあるので触っていただいても結構かと思うのですけれども、本当にシリコン製のゴムのようなものになっています。ここに少し、何ですか、横棒が見えるかと思うのですけれども、ここの中に非常に小さな構造が詰まっているとお考えください。これも後で顕微鏡で、実際小さな微細構造を見ていただくことができるようにはしています。

こういうふうに図を描くとイメージしやすいかなと思うのですけれども、この微細構造を使って、キャッチャーのようなものなののですけれども、これを使って一番欲しいのは、少し分かりにくいかもしれないのですけれども、ここのいわゆるリンパ球と呼ばれるものです。リンパ球だけをトラップしたい。だけれども、小さな赤血球であったり大きなマクロファージだったり、そういうものは、単球などは逆に排除したいということで、網目構造という

か、トラップ構造をうまく利用してリンパ球の分離というのを試みました。

実際、これは写真でこの線の部分、流動の部分の写真なのですが、右から左に向かって液体が流れていくとお考えください。蛍光ビーズを流してみますと、このような形でトラップ構造にトラップされているのが分かるかと思います。見えますか。これは今左側が、方向があちこちで申し訳ないのですが、今左から右に向かってリンパ球相当のサイズの蛍光ビーズが流れているということになります。そうしますと、だんだんこのトラップ構造の中にビーズがトラップされていく様子が分かるかと思います。

このチップを使って、実際これは単球に相当する少し大きめのビーズと、リンパ球に相当する、小さめというか、10 マイクロメートル径のビーズというのを混ぜた状態で、実際先ほどの流動の中に流してみますと、27 マイクロの大きなものはここでほとんどトラップされて、10 マイクロのリンパ球相当のビーズというのは、このリンパ球の固定構造でかなりしっかりと固定されているというのが分かるかと思います。

ここまで開発したところで、では、いよいよこれを使って本当に放射線の線量が評価できるのかという実験を行いました。これが培養系の細胞です。培養の浮遊細胞の TK6 という細胞に Ex-vivo で放射線を照射しました。このときは 0 と 1 と 5Gy の放射線を照射しています。その細胞を、先ほど動画で見ていただいたように実際にチップの中に流します。流した状態で今度は  $\gamma$ -H2AX の染色溶液を入れてあげます。実際顕微鏡で見えますと、このような形で、なかなかうまくいくのです。トラップされている位置が少し一部に偏ってはいますが、解析するには十分な細胞がトラップされています。

そうしますと、 $\gamma$ -H2AX の染色がされている細胞という形で今このデータは取っていますが、照射されていない細胞に比べて、明らかに照射細胞では  $\gamma$ -H2AX の陽性反応が高いです。1 と 5 の間、これが線量依存的吗かというところ、まだ実験回数は 1 回ですので、どうなのかなというところはあるかもしれませんが、少なくとも非照射と照射の間には大きな差がありますので、これは明確に区別ができるだろうということになります。

そうしますと、先ほどは培養細胞ですので、一番の目的はヒトの血液細胞です。1 滴の血液細胞で同じ実験ができるかということが一番の問題になります。実際これが、ヒトの末梢血を 5 マイクロ程度、本当にごく微量です。5 マイクロ程度流した画像になります。見ていただくと大量の細胞が、これはほとんど赤血球なのですが、大量の細胞がワッと一気に流れているのがご覧いただけるかと思います。

今までのビーズなどを使った実験というのは、あくまでも単球細胞とリンパ球細胞という、それぐらいのポピュレーションでしか実験をしなかったのです。当然なのですが、血球の中には赤血球があり得ないぐらいたくさんありますので、ここは流れているなど思ったものが実はほとんど赤血球なのです。

これが実際、これは流し始めなのですけれども、その後どうなるかという、これは動画ではなく静止画ですが、何となくお分かりいただけるかと思うのですが、大量の赤血球がここにスタックしてしまうという、そういう非常に残念な結果になってしまいました。なかなか排除し切れないのです。

もともとの予定としては、赤血球は全部この間をすり抜けてワッと流れてくれるという予定だったのですけれども、想像以上に赤血球が多かったということになります。実際、その赤血球があまりにも大量にスタックしていますので、最終的にトラップできたリンパ球はこの程度しかいないという、非常に残念な結果になっています。

(中村スライド 16)

ここまでなのですけれども、実際、きょうのお話として今までのまとめをさせていただくと、 $\gamma$ -H2AX アッセイ自体は、やはり非常に高感度な放射線被ばく線量を評価するためのツールであると言えますかと思いますが、それが可能な時間枠であったり線量域というのを明確にすることは重要だと考えています。

それを克服するための一つの方法として、簡便なデバイスというのを、 $\gamma$ -H2AX デバイスというのを開発しているわけですけれども、見ていただいたように、実際の血液サンプルの分離・固定については、まだまだトライアンドエラーを繰り返して解決していかなければいけない課題があると考えています。

ですが、バイオ細胞を使った実験では、被ばくしたサンプルの検出というのは十分可能であると言えます。きょうはあまり細かく話しませんでしたけれども、このデバイスは5マイクロぐらいの血液サンプルで可能ですし、実際非常に低コストです。ですので、十数円で1回のアッセイは終わりますので、そういう意味では、大量の解析をしなければいけないときには有効ではないかなと考えています。

ですが、やはりこれはまだまだ先が長いのですので、実装化に向けた具体的開発というのを継続していければいいかなと考えています。以上です。ありがとうございました。(拍手)

山口：いかがでしょうか。お願いします。

数藤：国際標準化機構の **Biodosimetry** グループで毎回話し合うのですけれども、やはり  $\gamma$ -H2AX はフローサイトメトリー派と顕微鏡派に分かれることや個体差、バックグラウンドの変動というのがあって、今のところ、前回の会議でもまた見送りになっています。

ただ、使えることは分かっているので、予定された職業被ばくや医療の計画的被ばくの方には、検体採取時間のコントロールができるので有効ということで、国際原子力機関では新しくラボを立てる方向にありまして、そういうところで医療被ばくに焦点を当てた **Biodosimetry** という動きが出ています。

あと、それからデバイス開発なのですが、2年前のフランスでのフランス CEA と放医研

の合同研究会合で CEA が発表したのですが、やはりオンサイト、小さな、原理的には ELISA のような方法で、オンサイトでできるものができたという発表がありました。それが 0、1、2、3Gy の検量線ができていたのですが、発売するといううわさが出たきりになっていて、何か機器が販売されているのかヨーロッパでしか買えないのか分からないのですけれども、いずれにしても  $\gamma$ -H2AX からスタートしているようです。

中村：そのフランスのものはウエスタンブロットをベースにしているもので、論文は見たことがあるのですけれども、3人がオペレーターとしてポジショニングが決まっています。ただ、全体として眺めてみると、やはり細胞からタンパク質を抽出してきて、それをメンブレンにドットブロット上にこうして、それをウエスタンブロットで解析するというものです。

数藤：何かプレートリーダー的な……。

中村：プレートリーダー的です。ドットブロットを 96 穴のような形にして、ウエスタンブロットはいわゆる蛍光ベースの、Alexa などのいわゆる蛍光色素ベースでのディテクターなので、プレートリーダーのようなのでやるという話なのです。

ただ、そうすると、フローサイトメトリーもそうなのですけれども、全部ひっくるめてになってしまうのかなというのは常に私は気になっています。今回は  $\gamma$ -H2AX がポジティブかネガティブかというだけのデータしかお示ししていないのですけれども、 $\gamma$ -H2AX の一番強みは、1つの細胞当たり何個のフォーカスがあるかという、その絶対的な DNA 損傷量を定量できることだと思っています。

数藤：それは、飽和するのは何 Gy ぐらい、つまり顕微鏡下で難しくなるのは、どれぐらいの量からなのですか。

中村：上のほうですか。

数藤：はい。

中村：上のほうは 2Gy、3Gy ぐらいあるとサチュレーション（飽和）してきます。

数藤：それで今もめて問題になっているのですね。

中村：そうですね。ですから、ターゲットをどの方にするかということなのだと思います。

数藤：つまり、トリアージというのは 1~2Gy と 3~4Gy がポイントなので、サチュレーションの限界もあって、少し標準化が遅れています。

中村：そうですね。

山口：なるほど。

中村：多分先ほどの、一番最初にお見せした、線量がワッとなっているものなどを見ていただくと、これですね、これですと 1.5、2、3まではいけます。フォーカスは1個です。ただ、3ぐらいからやはりフォーカスが重なってきてしまって、5Gy などもうベタッなので分離が難しくなるというところなのですけれども、これを見ると 1 と 1.5、2 ぐらいまでは確

実に差があるので、そういう意味では、トリアージをどこに取るかという厳密な定義の話になってくるかもしれないですけども。

廣田：今の話なのですけれども、定義自体は、例えば見分けがつかなくても、細胞1個当たりの数は数えられないかもしれないですけども、光量にしてしまえば、いけないのですか。

中村：フローサイトメトリーなどは結構そういうのでやっているのですけれども、アポトーシスという細胞死が起こったときにも、実はこの  $\gamma$ -H2AX というのはポジティブになって陽性になってしまって、そのときはいわゆる細胞全体が、べた塗りとよく言うのですけれども、非常に強いシグナルが出るのです。ただ、それが本当に、例えば 10Gy の線量に相当するかといったら、またそこは違うので、そこがまた難しいところです。

数藤：どういうバックグラウンド値を引くかは難しいのですよね。

中村：そうです。本当にそうです。

廣田：すみません。基本的なことになってしまうかもしれないのですけれども、そもそも何でリンパ球でないと駄目なのですか。

中村：他の赤血球では駄目かと。

廣田：はい。

中村：まず、赤血球は核がないです。

廣田：ああ、なるほど。

中村：マクロファージなどは、もともと細胞としての、半減期というか、製造の日数が少ないので、実は DNA 損傷反応が起こらないのです。DNA 損傷に関係する、PK、DNA-PK など、ある一部の修復タンパク質が存在しないなどとなっていますので、こういう典型的な反応をするわけではない。

廣田：生じるような細胞ではないと駄目ということですか。

中村：そうですね、はい。

廣田：ありがとうございます。あと、すみません、これは何で数えるか、目視で蛍光顕微鏡で数えるのですか。

中村：これは最終的には自動で、自動化を考えています。

廣田：画像検出のようなので。

中村：はい。今結構いろいろなところから、 $\gamma$ -H2AX のフォーカスを数える全自動のシステムというのはつくられているので、それを最終的には搭載してという、それを目指しています。

廣田：あと、すみません、もう一個だけいいですか。

中村：はい。

廣田：ごめんなさい。福島県で牛を測ったときに、予測される線量とその数が違っていたとおっしゃっていたのではないですか。多めに出たというふうにおっしゃったのですか。

中村：いや、全く相関が……。

廣田：逆ですか。

中村：逆でもなく、もう相関がないという、そういうことです。高いのが低く出たりなど……。

数藤：それは、本来の生態学のように、きちんと耳などにラベリングして GPS など追跡してないのですね。ですから、もう（行動調査の確認の）しょうがない……。

中村：そこまでのデータはないので、あくまでそのときの捕獲した牛の、例えば血液中のセシウム濃度など、それから推測するしかないので、本当に先生が言われるように、その個体がどこ……。 (注釈：以下続くように  $\gamma$ -H2AX のフォーカスでの評価は、その時点直近の被ばく線量を評価する指標になるので、積算の線量との相関は評価できないことなどの議論)。

数藤：前、ニホンザルを頼まれたのですけれども……。

中村：ですが、どこにいたか分からないのですよね。

数藤：その原発事故前にラベリングしていないから無理です。

中村：どういう人生をたどってあなたはその線量を保持しているのかなどというのは、本当に分からないのです。そういう意味では難しいです。

数藤：ですよ。

廣田：では、基本的には、線量予測のほうがかうまくいっていないからずれていたというふうにご考慮されるのですか、それとも線量以外の原因で  $\gamma$ -H2AX のほうなのか。

中村：いや、それはもう線量とは関係なく、線量が間違っているなどではなく、最初に言ったように 48 時間でできた傷は修復されてしまうので、今見ている牛の血液で出ている  $\gamma$ -H2AX が、いつ何によってできたのか分からないのです。

数藤：内部被ばくかもしれないのですか。

中村：内部被ばくかもしれないです。実際、血液を見ると、フォーカスを持っている細胞と持っていない細胞というのが結構はっきり分かれるので、フォーカスを持っているほうは多分、どこかのタイミングですぐ近くに線源なりがあって放射線があたって上がったのだらうなと思います。

廣田：放射線が当たるか、先ほどアポトーシスでも出ると言っていたので、何か放射線以外でもアポトーシスのように出るという、そういう候補は他にもあるのですか。

中村：もちろんあります。

廣田：そうなのですか。

中村：放射線以外でも出てしまうので、そこがまた難しいところです。

廣田：ありがとうございました。

山口：限界がありつつも、新しい利用法として医療での利用という興味深い話もありました。線量評価に関しては、ある時期以降に関しては、きちんと測定もされていて外部被ばくは評価されているのですけれども。

数藤：ファーストレスポonderなど、計画的出動は可能なので使えると思います。

山口：そうですね。そういった、過去の履歴が分かっていることに関しては、情報があるものに関しては利用できると思います。

数藤：採血時間がコントロールできますよね。

山口：はい。

数藤：そういう人たちは交代しているはずなので。

山口：そうですね。そういった、さまざまな方法があるのですけれども、それぞれの特徴を生かして活用することが重要だという話です。ありがとうございました。

では、時間になりましたので、次は盛武先生の発表に移りたいと思います。被ばくした後の抗酸化能を指標にして評価するという事です。お願いします。

盛武：盛武です。よろしくお願いします。

(盛武スライド1)

今ご案内いただきましたように、放射線が当たった後にどのようなことが起こってくるのかについて解析しております。ただし、私どもの関心は当たった直後というわけではなく、タイムスケールとしては、数日からせいぜい1週間ぐらい、この辺りの時間帯に注目をした研究です。中村麻子先生とは、先ほどの $\gamma$ -H2AXのところでもコラボさせていただきました。また、五十嵐先生については後ほど話が出てきたところで改めてご紹介したいと思います。

(盛武スライド2)

そもそも大規模放射線災害における被ばく線量の推定では、どの位の線量レベルが目的なのかですが、こちらにありますとおり、被ばく後2~3日以内に0.5から1Gy程度の被ばくがあったのか、あるいはそれ以上のものがあったのか、あるいは全くなかったのかということが知りたい、これが非常に大事な線量の数値になってまいります。

これをきちんときれいに見分けるためにどういった方法があるのか。今まで知られている物理的手法による推定、例えば線量計を持っていけば当然きれいな数値が出てまいります。あと内部被ばくであれば、ホールボディカウンター等でどれだけの被ばくがあるか推し量ることができます。

そして、先ほど歯の電子スピン共鳴、こちらで歯にラジカル化したシグナルを測定、共鳴現象で測定する、こういうものがあります。あるいは臨床症状からの推定としましては、吐き気が来たり下痢があったり発熱、皮膚障害、意識障害などが起きるとされていますけれど

も、このようなことから大ざっぱにはありますが推定することができます。

そして、生物学的手法、ここが私どもに与えられた課題なのですけれども、によっても推定することができます。例えば血液を採取してきて、その数を数えたり、染色体異常を数えたり、あるいは中村先生のような  $\gamma$ -H2AX 分析をすると被ばく線量がおおよそ分かって来ますが、現在様々な研究が世界中で進んでいます。

ただ、この生物学的手法には限界があります。個人差が最も大きな問題です。同じ遺伝子を、遺伝的バックグラウンドを持った動物を、業者から購入した実験動物を使っても、非常に差が大きくて、得られた絶対値、検査測定値だけをもって何か線引きをしようすると、時々大きな落とし穴にはまってしまうのは、よく経験することです。

もちろん精度の問題は重要ですし、感度、特異度、あと今の時代は、簡便さ、迅速性、このようなことをクリアしなければ、大規模災害時における被ばく線量の推計、これに資する生物学的手法としては、なかなか確立しがたいところもあろうかと思えます。もちろん経済性も大事です。際限なく天井知らずにお金をかけていいというわけではありません。

現在求められていることは、既存の推計法の弱点を補完して、今のところということですが、実現可能な被ばく線量推計法というものを開発してこれを実施できる体制をつくっていききたい、こういうことが求められています。

そして、私の担当する生物領域で頂いた研究のコンセプトなのですけれども、一口に被ばくと言っても、さまざまな被ばく形態がありますが、例えば全身被ばくだったり、部分被ばくだったり、事故の状況によりさまざまです。もちろん個人差も非常に大きいですし、環境要因も大きく異なるでしょう。そのようなものを全て込みで、複数の指標の組み合わせによって総合的に推計しようと考えています。

このコンセプトに至る私の根底にあったモチベーションなのですけれども、私は以前放医研ゲノム診断研究グループに所属しておりまして、放射線に当たったときにどの遺伝子が特異的に動くのだろうか、唯一無二のものを探してこいという、何か宝探しのような大きなプロジェクトを実施してきた経験があります。もちろんこれはすごく崇高なプロジェクトで、きっと世界に1つしかない遺伝子を見つければ、これをターゲット、マーカーとして追い掛ければ、放射線をいつどれぐらい浴びたということが分かる、あるいはがん治療に放射線に効く、効かない、放射線に感受性が高い、低いということが分かるようになるだろうという夢を抱いて研究をしておりまして。

もちろん幾つか成果は出てはまいりましたが、これはなかなか大掛かりな研究で、数億円、数十億円かかるようなプロジェクトでして、決して毎年 200 万円や 300 万円位の研究費で追い求めていくような研究ではないということを痛感しており、ものすごいフラストレーションをためた記憶がありました。そういう、何というか、自分の中での葛藤がありまして、

逆転の発想をしてみようと考えたのです。

私自身は医者ですから日頃から血液検査をオーダーすることなどは日常でした。しかし、実は血液検査などをやっても、（語弊はありますが）大したデータは出でこないのです。例えば、赤血球〇〇個/mL、白血球〇〇個/mL、リンパ球〇〇個/mL、その上・下限値と見比べながら、この人はどのような病気なのかな、何千何百という診断名の中から1つを、ないしは数個を絞り込んで、患者さんに提示して、それのお薬を出す、あるいはさらに検査をする、そのようなことを日々普通にやっているわけです。ですから、唯一無二のマーカーを用いて、例えば「白血球だと7,500を超えて7,600までの間だと何病である」といった、そのような診断法ではないわけです。

さまざまな個人差、全くバックグラウンドが違う患者の数値の中から、全体として、もわっとした情報の中から、これとこれを組み合わせると、このような感じになり、しかもCRP（炎症を示す検査値）がこの辺から立ち上がって、あるいは将来消えていくだろうなど、そういう時間的な経過も含めて、総合的に患者がどのような状況にあるのかという判断を下していく、というのは、もう身に染みてよく理解していました。そういう私自身のバックグラウンドがあったので、もう開き直ってしまったのです。唯一無二の被ばくマーカーを探すのは俺の力では無理だということで、総合力でいきましょうということを考えました。それで、もともとの私の研究バックグラウンドは酸化ストレスでしたので、放射線によるフリーラジカルの生成を見ていましたので、とくに電子スピン共鳴法を実験手技としてよく使っていましたので、今の研究にいきついたわけです。

（盛武スライド3）

今分かっていることとして、培養細胞に放射線を照射しますと、数時間から、数日後にわたって、ミトコンドリアから電子が漏れ出してきます。そこで近傍の酸素が還元され始め、いろいろな、reactive oxygen species（ROS）、活性酸素が増加します。そして、細胞が酸化ストレス状態に陥っていくということが、おおむねコンセンサスが得られています。

（こちらの）実験データを細かくは見なくて結構なのですが、横軸にROSのレベルをとりますと、細胞が放射線に当たってしばらくしますと、（フローサイトメトリーのピークが）右側にシフトするというので、細胞の中が酸化状態の方に進み始めるという現象は、もう既に捉えられています。

その原因なのですが、ROSの生成現場、これは大まかエネルギーの産生の生成工場であるミトコンドリア、ここであることは間違いないかと思うのですが、そのミトコンドリアの形態的な異常であったり、NADPH オキシダーゼの減少、このようなことが原因とされています。

ただ、いろいろな論文をみると、非常に照射線量が高い実験によるものが多いです。おお

むね 6Gy や 8Gy 以上です。要するに、ミトコンドリアが完全に形態学的変化を起こすぐらいのレベルの放射線を当てるといような実験が多いのです。今回我々が目指す 1Gy 程度の被ばくレベルは、トリアージとしては大きい数字かもしれないのですが、細胞実験ばかりやっている人間からすると、1Gy というのは決して大きくはなくて、細胞実験でいい結果を出すにはなかなか難しい低い線量レベルです。ということで、生体での研究はあまり行われていません。当然、線量が小さくなればなるほど、生物学的に得られるデータというのは誤差が大きくなっていきます。

(盛武スライド 4)

また(この図は)、抗酸化物質、これを放射線照射後に、照射後です、放射線が当たる前ではなくて当たった後に照射することによって、得られる生存率曲線、放射線生物を学ぶと最初に書かされるグラフです。横軸に線量、縦軸に生きた細胞が何個残っているか、**survival fraction**、が示されます。放射線量が上がると細胞の生存率がぐっと下がります。こういうグラフが得られるのですが、抗酸化物質を放射線照射後に入れても細胞を助けるような働きをするということが、意外と、これは 2015 年、比較的最近、こういう論文が出てまいりました。

それが非常に、1Gy という、われわれが目指す線量域に近い線量において、こういう現象が十分に見られるということが分かってまいりました。ということは、抗酸化物質が酸化ストレスから体を守る力、これをトータルの抗酸化能という言葉を使いますと、この抗酸化能というのは、われわれが観察したい 1Gy 程度の被ばく領域でも重要な役割を示している可能性がある結論付けることができますと思います。

ちなみに、このような(細胞生残率の)実験は非常に簡単なので、学生さんに最初にやらせる実験なのですけれども、実は私は放医研に行ってポスドクをやったときに、これは全然成功しなかったのです。ビタミン C、E など、その他もろもろの抗酸化剤をシャーレに入れても大体失敗するのです。ということで、この実験ほど簡単でありながら成果を出すのが難しいものはないでしょう。簡単にできたのは DMSO ぐらいです。あれは非常に防護効果がきれいに出来ますけれども、あとアミフォスチンなど、アメリカ軍が使っているような防護剤、そういうものを使って少し出たことはあるのですが、一番欲しかった結果、医者ですから生体にすぐ応用したいということでビタミン C を追い掛けていたのですが、はなかなか出ませんでした。

本当はここに示すようなデータ (Kobasigawa *et al.*, *Radiat Res* 2015) をさっさと出せばよかったですけれども、この先生が使っている薬は、いわゆるビタミン C の仲間です。こういうもので出されたので、僕としては自分が出せなかったのはしゃくだったのですけれども、非常にありがたい。これで僕たちの目指すレベルというか、1~2Gy の辺りで、か

つ、放射線、酸化ストレス、こういうキーワードで攻めていくのは決して無茶な話ではないと少し安堵（あんど）したわけです。

そして、私たちの研究の目的は、被ばく後の生体、マウス、この抗酸化能の挙動というものを明らかにしていきたいと考えました。このような抗酸化能の挙動というものは、放射線災害時の被ばく線量や健康被害推定の指標として使えるのではないかと発想しまして、研究を進めてきました。

実は、このときに既にゴールドスタンダードとして $\gamma$ -H2AXという素晴らしいものがあるということは知っていました、日本で誰がやっているのだろうかということ、実はRedonさんという方の論文がたくさんあったので知ってはいたのですが、そのなぜか2番目にAsako Nakamuraといつも書いてあるのです。これは日本人ではないかと、どのような人なのだろうかかと、ずっと興味は持っていたのです。何と樗田先生にこの研究班に入らないかと声を掛けられたときに、そのチームに中村さんがいるよと言われて、もしここに誘っていただかなくても恐らくここ1~2年ぐらいで別ルートで個人的に「中村先生、よろしくお願ひします」と言っていたと思うのですけれども、それが1年ぐらい早く前倒ししていただいたことに、ここで改めて感謝したいと思います。

(盛武スライド5)

そのようなことがありまして、実はもくろみがあったのです。もう少し先に行くと、私のもくろみももう少し見えてまいります。ここが血液抗酸化能、ここが私たちのオリジナルのところ。どのようなことをしているか。血液抗酸化能といっても広いのもう少し言及しますと、血液中の脂質ラジカル消去能、これを抗酸化能として測定してやろうというものです。

商品名、これはまだ製品販売になっていないものですが、もしかしたらならないかもしれないという、少し目の見ないトラップ剤になってしまいますが、i-Strap-W.B.、whole bloodですね。全血で測定しますと。製造は同仁さん——同仁って、活性酸素の研究をやっている方だと、いろいろと試薬キット等があります。あとグルタチオンなどもそうです。私たちは同仁と一緒に共同で研究してまいりました。

フェニル基が2個付いた、ここに示すような構造のDPhPMPO、これはスピントラップ剤です。これはラジカルをトラップして安定なラジカルに変えてやる、一般にスピントラップ剤といいますが、これを血液に混ぜます。そこにt-ブチルヒドロペルオキシド、これも一緒に混ぜてやります。ここがスタートになります。

それで、しばらく調製しまして、最終的に電子スピン共鳴を測定します。絵に描いたらこれだけ簡単なものなのですけれども、t-ブチルヒドロペルオキシド、これと血液中のヘモグロビンが反応しまして、このような脂質のラジカルがいっぱいできてきます。血液の中に

すごく出てきます。

このラジカルと、最初に言いました DPhPMPO、これが反応を起こしまして安定な——いくらたくさん脂質ラジカルができるといってもやはり寿命がありますので、スッとこちらのトラップ剤がトラップしてあげないと、やがては消えていってしまいます。ここでトラップしますと安定な ESR シグナルとなって、このような7本のスペクトルが描かれます。

先ほど最初の講演で、皆さん覚えてらっしゃると思うのですが、大体このシグナルの高さの比で相対的な定量が、半定量ができます。僕たちが X-band で使う外部標準は Mn (マンガン) です。マンガンは1、2、3、4、5、6と6つの吸収スペクトルを示しますが、大体3番目と4番目の間に欲しいスペクトルが出てくるのですが、残念なことに基準として使いたい3番目のマンガンのシグナルがこの DPhPMPO スピンアダクトのシグナルとかぶりまして形が崩れていますので、これは高さの基準としては使えないということで、2番目の Mn を外部標準として使います。このマンガンは誰とも干渉しませんので、きれいなスペクトルが取れています。この2番目の Mn 高と、DPhPMPO スピンアダクトのスペクトルの中でも一番安定して取れるこの左から2番目のシグナル高、この比をもって抗酸化能の判定をしました。

当然、全てのラジカルがトラップされてしまえば、全部 100%、ESR シグナルになってしまうのですが、当然ながら血液の中には、抗酸化物質をそもそも持っています。これとの競争反応が起こってきます。そうすると、相対的にラジカルが DPhPMPO にトラップされるウェートが下がってきます。ですから、もともとの体の中の抗酸化物質がたくさんあれば、DPhPMPO スピンアダクトの ESR シグナルは小さくなる、そのような仕組みです。

ここがポイントと書きましたけれども、電子スピンとはいっても、私はスピントラップ法という方法を使っています、これは直接対象のラジカルを測る方法ではなく、どちらが最初か分かりませんが、ESR で最も多く使われている解析法の一つです。新しく開発したトラップ剤を使うことで、感度と、あと安定性が、大きく改善しております。

この安定性に関しましては、非常に大事なことでして、私が昔放医研で一番よく使っていた DMPO というトラップ剤があるのですが、大体放射線の直接作用で出てきた OH ラジカルの測定をして、10分から15分ぐらいでもうほとんど ESR シグナルが、半減、3分の1減してしまいますので時間が勝負という実験だったのですが、この DPhPMPO によって、かなりびっくりしたというか、ほとんど減衰なく測定することができるようになりましたので、非常にありがたく思っています。

あと、ここもポイントなのですが、全血がたった 100 マイクロリットルでいいのです。マウス 1匹に1回、顎の後ろの静脈からランセットで採血した全血、1滴、2滴、3滴、4滴ぐらいありますと十分に測定ができます。あと、やろうと思えば作業工程は自動化できます。

(盛武スライド6)

長くなりましたけれども、次はマウスの照射実験なのですが、放射線を照射しまして継時的に採血をして抗酸化能を測定してまいりました。照射した線量は0から3Gy、その間にも少し実験をやっていますが、この辺は後でまたその場でご説明したいと思います。

(盛武スライド7)

これが結果です。縦軸に ESR のシグナルを取っていますので、照射後数日でぎゅっと上がっているということは抗酸化能が下がっていることを意味します。頭の中で逆転させてください。上方向に行くというのは抗酸化能が高いのではなくて、抗酸化力、要するに防御力は下がっているのだという見方をしていただきたい。

ここが正常範囲です。青印は0.5Gyです。横軸には日数です。10日、20日、30日、40日、50日、この線は青が0.5、赤が1Gy、緑が2Gy、紫が3Gy、このような感じで照射後のトレンドがあります。平均値ですけれども、非常にきれいな値が出ています。ここを見て、ご覧のとおり、誤差は生物実験につきものです。こういう誤差がありますので、一体どれだけ信頼できるトリアージ材料、手段となり得るのかということがやはり心配になります。

(盛武スライド8)

一応検証をかけてみました。ROC解析、ご存じの方が多いでしょうか。Area Under the Curve、この下の面積、これがぐっと広がって高くなれば、非常に高い弁別能、先ほどの、こういう分布があるわけです。例えばこの点であれば高いほうはこちら、低いほうはこちらまで、それがエラーバーとして標準偏差でループしていますけれども、こういう分布があるので、緑の分布があります。当然、重なります。あまり重なり過ぎて、全部重なってしまえば2つのグループは識別できないということになるのですけれども、分布が離れてくれればいいのです。あるいは、その分布がシャープであれば、とてもよく弁別できます。

これを解析するのに、ROC解析をよく使います。これを見ていただくと、結果はこの表に書いてありますが、例えば1Gyで1時間後にはまだ0.5ですから、ほとんど直線ですので、非照射群、これでいうと全く照射しなかった群のデータと比べて、全く識別などできませんよ。この抗酸化能測定は被ばく後すぐやっっては駄目ということが分かるわけです。

しかし、Day2ぐらいになってきますと、これです。非常にきれいに弁別ができる、識別ができるということになります。表の赤文字は大体0.9と、90%以上の面積になったものを書いています。ですから、この辺りで非常に高い非照射群との識別が可能で、赤文字の部分がこういう非照射群との識別が可能だということになります。

ですから、私たちが求めている1Gyくらい、この辺を見ると、2日目、3日目、4日目、5日目、せいぜい1週間、ここ辺りが非常によいターゲットになるだろうと結論付けられました。例えばEPRであれば2Gy、これはRadiation Protection Dosimetryにあったのですけれど

も、0.9、ダイセントリックもこれぐらいでしょうか。これらの既存の線量評価法と比べてどうでしょう。自画自賛ではないですけども、そこそこ頑張っているのではないかなという気持ちでいます。

(盛武スライド9)

ただ、やはり生物実験ですので、交絡因子がいっぱいあります。例えば血液、最初100 $\mu$ Lでいいと言ったのですけれども、これは薄い血液だったらどうなる、濃い血液だったらどうなるのか。当然、その中に入っている抗酸化物質の量が効いてきますので気になるところです。全血の量と生食で水割りをした実験結果ですが。水が0、これは全血100%、逆に左側だと薄い血です。そうしますとシグナル強度が違ってきてしまうということで、血液の量というのが大事です。逆に言うと、血液の中に抗酸化力の基があるのだよという証明にもなっています。

あとストレス、マウスが非常に強いストレスに置かれているとバックグラウンドになるのではないかなと、やはり気になってしまうわけです。ですけども、これは僕たちが実験をやる時間はなかったのも同仁化学さんのデータを頂きましたけれども、マウスに強いストレスを与えてもコントロール群と比べてほとんど影響がなかったのです。マウスの強制水泳による影響はみられませんでした。

あとビタミンCです。ビタミンCというのは水溶性の非常に強い抗酸化物質ですので、しかも食品にいっぱい入っていますよね。たくさん取れば、もしかしたらヒトではサプリを飲んでいたら全然測定できないのではないかという危惧がありましたので、実験をやりました。ご覧のとおり、1ミリモル、10ミリ、30、と非常に高い濃度では当然、抗酸化力はアップします。抗酸化能の評価に効いてきてしまいます。バックグラウンド(雑音)になってしまいます。

数グラムのビタミンCを人体に投与するという治療があります。高濃度ビタミン投与、大体5~6グラムぐらいを点滴でジュッと入れることになるのですけれども、それでも血中ビタミンCは0.2ミリモルぐらいにしか上がりませんから、一般的に治療で使っているレベルでは、もう全くビタミンCの影響など受けていないと考えていいと思います。直前に何を食べたかは関係ない、そういうことです。

同じように、これがNアセチルシステイン(NAC)、システインのSH基がありますので、これも非常に強い抗酸化作用があります。これもビタミンCと同じように非常に高濃度であれば影響しますが、通常考えている量では、この辺では影響を受けないという、我々にとって非常に都合の良い結果となりました。

(盛武スライド10)

あと少しおまけにやった実験なのですけれども、老化したことによってデータが違って

きてしまうのではないかと。これについても今のところあまり影響はなさそうです。

あと Trolox です。これはビタミン E の水溶性のものなのですが、こういうものでも大して影響は受けません。ああ、しめしめ、有り難しです。もしかしたら、今度は測定者の技や、サンプル調整までの時間によって何か問題があるのではないかなと、そういうことも検証したのですが、これも大して差がなかったということで、いいところばかり持ってきたように感じられるかもしれませんが、今のところ信頼の置けるデータだと思っています。

これは、ちなみに DMPO でスピントラップすると、あっという間にスピンアダクトのシグナルが減衰してしまいます。ですけれども、DPhPMPO を使うと非常に長く生きていますということです。

(盛武スライド 11)

このスライドが、3 年前に私がこういう図を作りたいということで樺田先生に話をもち掛けたのが正にこれです。左縦軸が  $\gamma$ -H2AX、被ばく直後にピュッと高くなって直ぐに落ちていきます。これは中村先生からの  $\gamma$ -H2AX 解析結果です。線量に依存して非常に高い立ち上がり、しかもさっと消えていく、こういうグラフです。

これと右縦軸に私たちの抗酸化能のグラフを 1 枚のグラフに描くことで、これで放射線の被ばく、どこにどれぐらいしたのかを考えようと思いました。しかもターゲットはこの辺り（被ばく後数日）の時間帯です。被ばくした直後に血液を採るということは普通ないです。被ばく後 1 日目以降、体育館に押し込められていますから（避難）、救い出された後の数日から、せいぜい 2 週間、この辺りが測定対象でしょう。この辺りの対象者の被ばくの線量を推定するのに、 $\gamma$ -H2AX と抗酸化能のどちらか一方だけでは、例えば  $\gamma$ -H2AX だけでは、2 日目以降はもう何も見られませんが、逆に、抗酸化能だけでは、0 日、1 日ではバックグラウンドと差が出ないので何とも言えませんが、こうやって 2 つの指標を組み合わせると何が言えますかという問いです。

例えばこの辺に、2 日目に 2Gy ぐらいの被ばくが起こった人がいたとしたら、この辺にありそうです。ですから、2Gy だと、紫色は 0.5Gy、緑色は 1Gy、ですので、この辺に抗酸化能の値は来るでしょうし、一方、 $\gamma$ -H2AX は 2 日目ですと 0 になって来るでしょう。実はそこが大事なのです。 $\gamma$ -H2AX はさっと立ち上がってきれいに消えてくれるというのが、僕にとってはありがたいのです。だから尾っぽを引かれてしまいますと分からないことだらけになってしまいますが、逆に、 $\gamma$ -H2AX がいないということが非常に重要な、例えば 3 日目以降です。3 日目以降に  $\gamma$ -H2AX が尾を引いてくれないということが、実は僕にとっては非常にありがたいことで、このようなグラフが欲しかったのですが、これを 3 年間でようやく得ることができました。

(盛武スライド 12)

この成果に関しまして一応特許出願をして、このように2つ、ないしは無限に、測定のパラメータを増やしていいわけですが、これによって被ばく線量を総合力で判定していくことができるという点について特許出願を済ませています。あと、線量依存的血液抗酸化能低下に関する論文はもう投稿してありますので、今結果を待っているところです。i-Strap 法、または、その他のレドックス測定法というのは、大規模災害の発生後、1~2週間程度における線量推計法として、単独でももちろん有用なのですけれども、 $\gamma$ -H2AX の様に、上がってすぐ消えてくれるマーカーと組み合わせることで、より信頼性のある線量推計法になるということをお示しできたと思います。

(盛武スライド 13)

ただ、残念ながら、この3年間ではメカニズムは分かりませんでした。手を出す時間もなかったということで、少し残念ではありましたが、続きの研究をやります。志村さんにやってもらいたいのは、先ほど全くメカニズムにタッチできなかったということで、ほとんどミトコンドリアが原因だと思っていますので、そこを深く追究していただきたいのです。あと中村先生には引き続き、より実用化を目指した  $\gamma$ -H2AX 測定法の開発を、 $\gamma$ -H2AX はさっと上がってさっと消えてくれればもういいのです。消えてくれて結構、あとは私たち抗酸化能に任せろよと、そのような総合力で研究をしていきたいと考えています。

(盛武スライド 14)

この実験をやってくれているのは、つい去年まで私の教室にいたポストクの孫先生、今筑波大の助教になって異動しています。

(盛武スライド 15)

実は彼は臨床の循環器内科医の五十嵐先生、彼に医療被ばくによる生体サンプルの研究を実施して頂きます。実は私は医療被ばくの研究が半分以上のウエートを占めていまして、特に物理的線量計を使って dosimetry を実施していますが、一番大事なのは生体影響の方なのです。なぜお医者さんたちが放射線被ばく、医療被ばくに全く興味がないのかと、その原因の一つとして、それらが医者のご得意とする生物学とは全然関係していなかったということにあると考えており、この問題点の解決を彼に託して、臨床現場から血液を採ってきて抗酸化能も測りますし、 $\gamma$ -H2AX も測りますし、ということを経後3年間でやっていきたいと思っています。Bekal 氏にはマウスの高次機能の変化を調査してもらいます。放射線に当たったマウスの行動学的な解析をしていきたい、脳の形態学的な解析も併せて進めていきたいと思っています。以上です。ありがとうございました。(拍手)

山口：今後の展望を含んでの話でした。いかがでしょうか。

廣田：はい。

山口：お願いします。

廣田：面白い話をありがとうございました。酸化ストレス状態というのは、何で数日間ぐらい続くものなのですか。すみません。全然その辺の基本的なことが分かっていません。

山口：タイムスケールですね。

廣田：はい。

山口：生体の反応ですが、いかがですか。

廣田：DNA 損傷など、割とすぐ出てきますので。

盛武：そうですね。DNA が切れたらすぐ出てきますよね。そこはこれから志村先生にしつかりと研究していただきたいところではあるのですけれども、もちろん私たち、私の中にも答えは、だろうというものはあります。何で酸化ストレスが——日々私たちの体の中ではエネルギーを、ATP を作るためにエンジンを回しているわけですよね。そこで酸素が絡んできて、そこでものすごい活性酸素というのがばらばら出ているのです。それを周りの強力な抗酸化物質が一生懸命押さえ込んでるので、取りあえず病気にならずに済んでいると、そういう状況なのです。

ですけれども、恐らく DNA がブチッと切られると、一生懸命修復する、先ほど  $\gamma$ -H2AX でありましたけれども、これをエネルギー論的に考えたら、やはり離れているものをくっつけるわけですから、当然エネルギーを消費しないとくっつくわけがないです。生物屋さんというのは、その観点がすぼと抜けているのですけれども、絶対そのような魔法のようなことは起こり得ないわけで、必ず離れているものを付けようしたらエネルギーが必要だということで、一生懸命エネルギーを使うわけです。細胞が修復するためには非常に大量のエネルギーを使うわけです。

当然そこで酸素を使いますし ATP も使いますし、酸化ストレスがいっぱい出てくるわけです。それがちょうどぎゅっと上がってくるタイムスケールになるのかなと。ある程度落ち着くと、もう戻っていいよということでベースラインに近づきますと。

廣田：抗酸化物のような、酸化するのにあらがうようなシステムはもともと細胞に付いているのだけれども、それでは追い付かないぐらいの酸素発生が中で起きているということなのですか。

盛武：基本的に、細胞が生き残るということは追い付いているわけです。

廣田：浴びた直後、修復などするためにエネルギーをたくさんつくりなさいと。

盛武：はい。ところが、先ほど 3Gy までしか当てなかったのですけれども、これを、では、もっと 8Gy、10Gy 当てたらどうなるかといったら、ずっとカーブが天井のように突き抜けていって、要するに戻ってこなくなるのです。

廣田：もう完全に。

盛武：そうです。ですから、おまえはもう駄目だと、負けたということで抗酸化力が枯渇した状態、もう自衛隊がゼロになった、戦えないぞという状態においおいなっていきます。ただ、頑張ってくれば元の状態に戻りますと。その threshold は数 Gy ぐらいになると思うのですけれども、まだその実験まで、今のところでは分かっていません。

山口：今のご質問の答えを探しているのは、志村さんの研究に関するのですよね。

志村：はい、今後です。あと1~2年です。

山口：マウスの不安って、少し思ったのですが、0.5Gy って、もしかしたらマウスがオゾンを感じることはないのですか。

盛武：いや、オゾンということを初めて今考えました。

山口：動物が放射線を感じるという研究の中では、分かったこととしてオゾンを感じていたという例もあります。

盛武：ああ、そうなのですか。オゾンですか。いや、ごめんなさい。目からうろこです。そこは少し今後、先生、ここを本拠地にしますので、今後ディスカッションを深く頂ければと思います。

山口：そうですね。研究者も頑張っているということがきちんと伝わっていくといいかなと思います。

盛武：はい、ありがとうございます。

山口：ありがとうございました。では、最後、この生物学的な線量評価では、今新しい方法の発表があったのですが、細胞遺伝学的な検査がゴールドスタンダードになっています。そちらの実際の事例にも適用しているという話がありましたけれども、実際現場でもご活躍されている立場からお話を頂きます。こちらは、さまざまな研修も行われているのですよね。では、お願いします。

数藤：もう時間がないので、これで終わりとはいかないので…（会場笑い）。

MULTIBIODOSE というのは現在基本的な生物学的線量評価の現場の考え方です。いろいろな研究者が異なる手法で（線量評価を）分担してやるということで現実に進んでいるのですが、今日また、はそういったことも含めて、どうしても物理系の方やお医者さんや生物学者で考え方が少しずつずれていて、何といたしまししょうか、物理、数学系の方の数値を出すような、それから（医療）現場はアバウトで、患者さんがどうなるかがしっかり予測できることが重要というトリアージレベルの数値を求められるのです。そういったことも含めてお話ししようかと思います。

これが、いわゆる細胞遺伝学的な手法を示しています。現在の DNA マイクロアレイ (CGH 解析) も細胞遺伝学と呼んでいるのですけれども、これはクロマチンを流出させて FISH をやっているような図です。放射線被ばくで重要なのは、一個一個の細胞が異なる DNA、異

なるゲノムサイトの異常を生じるということで、DNA マイクロ次世代シーケンサーでシングルセルで調べる時代になってきたので、今後、1,000人ゲノムプロジェクト以降進められている、もっとたくさんの人の多様性が分かれば、それも使える日が来るかもしれませんが、現実に今起きた事故に対してどうするかという話を、今日はしたいと思います。

(数籐スライド2)

これも省略してもいいかもしれませんが、やはり線量で症状の出方を、早く出る症状はこの部分かということがもう分かっています。大体この辺から8Gy以上、マウスだとまだ生きていますが、人だと8Gyだと神経障害などで、この辺もJCOの亡くなられた方たち、これではもう消化管が回復しないような高線量だったということです。結局、この症状が出ない期間もあるということも重要です。

(数籐スライド3)

これは少し古い例で今では違うかもしれませんが、よく使われている(図表)でして……。

樺田：電池がなくなったようですので、そちらを。

数籐：1~2Gyと3~4Gyが重要な理由というのが、おうちに帰して(自宅待機の経過観察)もいいかどうか、それから幹細胞移植などの入院準備がいつ頃必要になるかどうか、その準備をしなければいけないか、無菌室の予約が必要かのような、そういったこともありまして、いろいろな治療を予測するという必要があります。

(数籐スライド4)

従って、線量評価というのは被災者がどのくらいの放射線を浴びたかを推定すること、特に事故後の初期段階の目的というのは、治療計画の立案、準備と予後の予測、緊急医療処置のための患者の振り分けです。これがトリアージです。物理学的線量、生物学的線量、臨床症状からの推定など総合的に、被災直後からどんどん入ってくる、増えていく、これらの情報を考慮しながらどんどんとより正確な判断をしますが、現場は待つことができないので、そのときそのときのデータでやっていくということです。

(数籐スライド5)

これらの、もちろん放射線被ばくでDNAが損傷しますと修復に失敗して細胞が死ぬ場合もありますし、ある頻度で突然変異となっていくということが起きます。それで、放射線被ばくによって、先ほどの(ご説明したような)ゲノムの損傷が、細胞分裂の中期、染色体という形で観察することが可能です。きれいに修復されれば元に戻りますが、線量が上がるほど修復の失敗率が上がります。これは相互転座といいまして、切れたもの同士の交換が起きている。交換の仕方も、動原体といわれる紡錘(ぼうすい)糸着糸点に当たるところが2つになってしまうような異常になります。

(数籐スライド6)

こちらは（相互転座）には正常なので、細胞分裂（失敗せず）でも生き残る可能性の高い異常で、こちらは断片化してしまって、これは細胞分裂についてられません。なので、2分の1の確率で死んでいくこともあるというような不安定型異常です。

（数籐スライド7）

これが、いわゆる細胞遺伝学的な、線量評価に使われている手法です。これは二動原体染色体、ギムザ染色の二動原体や環状染色体、断片などが観察されます。これは中性子線 1Gy を実験照射したものです。小核法、これも断片は取り残されて中に入っていないというような状態です。

それから、これは少し面白い方法で、どのような動物でもヒトでもいいのですけれども、分裂中期で回収した細胞とヒト末梢血リンパ球を細胞融合させると、自然とヒトのクロマチンが、このように染色体のような形を取るのので、これによって染色体の断片など異常を見ることができます。ここで重要なのが、細胞培養が必要ない、つまり患者さんがいらしたその日に検査ができるということです。

もう一つ、化学的な誘導法になるのですが、これは単純に2～3日間の細胞培養が必要で、G2期に当たるのですが、こういうふうに観察しやすいのです。リングが二重になります。リングというのは線量が上がると出てくるので、JCO 臨界事故のように 5Gy 以上の患者さんのときは、このように見えやすい標本を使ったりもされたようです。面白い、一番大事なのは、被ばく線量とゲノムの1細胞当たりの染色体異常の頻度に特定の関係があって、線質によっても特徴があることが分かっているのです。

それともう一つ、実験的照射と生体の本当の被ばく者とのデータがほぼ一致することも、1960年代から始まった染色体研究でほぼ分かっています。なので、実験照射によってこのような線量効果曲線を作っておけば、患者さんがいらして染色体異常頻度を見たときに線量が分かるということです。線質によって異なる検量線を用意しておく、あるいはγ線一本に絞ってγ線相当量ということで考えて、つまり、例えば宇宙飛行士ですといろいろな種類のものを被ばくするわけですが、その総合的な効果、個体の細胞への効果を見ることができます。

もう一つ大事なのは、そもそも、これは次世代シーケンサーやDNAのマイクロアレイの解析が難しい理由ですが、もう一つはポワソン分布をすることです。つまり、ものすごくまれな現象なので、ものすごい数の細胞を観察しないとはいけません。特に線量が低いほど、数千、数万の細胞を本来は見なければいけません。

（数籐スライド8）

それから、ポワソン分布の増加を見ることで、被ばくしていないリンパ球と被ばくしたリンパ球が存在することが分かり、局所被ばくを検出することができます。体積比、身体のだ

ことというのは分からないのですが、身体の何%の体が被ばくしたかはこれで分かります。

今リンパ球と言っていますが、患者さんから採りやすいのは、皮膚や毛根の細胞よりは今は採血が一番楽なので、急性期、非侵襲的な手法として血液を利用します。その中でもリンパ球が一番、一番放射線にセンシティブなので使っています。

(数籐スライド9)

先ほどもお見せしました二動原体（ギムザ染色の図）、これは分かるのですが、残念ながら、本来この中には転座の起きた染色体もあるかもしれませんが、この手法（ギムザ染色）ですとそれは分かりません。

ただし、この二動原体が重要なのは、実は恐らく今日のお話の中で唯一バックグラウンドがゼロ値というマーカー（インディケーター）です。どのような人を見ても、大体1,000細胞以上見て、ゼロあるいは1個、そういったように年齢も男女も人種も関係なくほぼゼロという、したがって直近の放射線被ばくで起きていると推定できるものです。

二動原体分析というのは、既に、そもそも染色体分析自体が臨床細胞遺伝学の分野で、細胞分離から標本作製まで自動化されています。もちろん大手の検査会社だけかもしれませんが、ZEISSやライカのシステムを使って顕微鏡検出部分も自動化されています。この前のような震災と合わさったような原発事故などが起きたときに、その時点で、そういう検査会社の方は協力できる部分があるかといったような話も実際しました。

画像解析の自動化も、ライカやZEISSなどで2000年頃から既にあって、臨床細胞遺伝の検査、つまり出生前診断や白血病の患者さんの寛解などのチェックには、既に使われています。ただし、一般的にそういう臨床検査では20個から100個の細胞を観察するのですが、先ほど言いましたように線量評価では1,000個以上見るということで、その辺の画像解析の自動化というのは、今開発段階にあります。

これは顕微鏡システムなので、これは8連ですが、ここにボックス型で60枚だったか100枚だったか一度に標本（スライドガラス）をセットし、もう一日中動かし続けて、ここに顕微鏡オイルの注入ボックスも付いているようなのを買えます。こちら（当ラボに）は8連で2台。そんなに撮影できても判定できないのもあります。あと、お金がないというのもあります。

それで、せっかくなので動画を。どれぐらい早いかと。私が学部4年生の頃は1個の細胞に15分かけて、カメラでポジフィルムに撮って現像に出していたのですが。今これはスライドガラスの12点の焦点合わせをしています。終わったので、分裂中期（細胞）、メタフェーズ探しを今始めます。大体数分で1,000細胞をディテクト（検出）してくれます。

山口：早いですね。

数藤：もう半分できました。これは福島原発事故のときは1台しか持っていなかったのです

が、すぐにシンガポールから ZEISS が送ってくれて貸してくれているという状態で、数カ月後に新しいのを購入し、送ってもらうのに数カ月かかる間は借りて、そういったご協力を受けていました。

これで一応高精度にするために 10 倍 (対物レンズ) から 63 倍に変えて撮影が始まるというものです。これはもちろん蛍光はフィルターは 10 連で 10 種類の蛍光の FISH などもできます。もちろん  $\gamma$ -H2AX、小核法もこれで可能です。

(数籐スライド 10)

福島原発事故で二動原体の例を申し上げますが、これは私たちが用意した、本来は 0、0.5、1、2、3、4、5Gy の検量線を持っていたのですが、250mSv 制限という 3 月から 12 月までの間の緊急作業員について設定があったので、この辺りをカバーする詳しい検量線を作りました。こういったような式です。これは一応、実際測ったものというのは正常だったのですが、12 人の患者といえますか、個人線量計は津波で流れたりなど、いろいろなことがありましたので、いろいろな、幾ら浴びたか分からない人、それから、緊急で駆り出されて、4 月 1 日以降、全員個人線量計は回ったのですけれども、今まで使い慣れていた機械と違うために、ブザーの音が 80mSv なのか 250 なのか分からないような人が来ています。

(数籐スライド 11)

それで、ぴったりの数値的には、皆さん 170mGy 以下です。もちろんこれ (医療現場で) は 95%信頼限界で判定しますので、高い方の数値でみて、300 以下だったということはこれで分かりました。これは少しついでに、論文には載せていませんけれども、コントロールと比較しても、コントロール所見の方は、ここで言う 170 の人たちがこちら辺にいらっしやいます。あとは内部被ばくと言いましても、血球リンパ球はリンパ球としてはセシウムだろうと外部からの被ばくだろうと、リンパ球自体は外部被ばくを受けているので、これは (リンパ球として) 外部被ばくということになります。それで、300mGy 以下という診断をしたのですが、実際に症状は出ていませんということでご安心いただいたということです。

このときもちろん患者さんがいらして、細胞第 1 回目分裂、できるだけ vivo に近い状態を観察するので、48 時間の培養の後で 50 時間目ぐらいにトリアージの結果を出して、すぐに患者さんとドクターには伝えてあります。そして、内部被ばくを継続的に調べるので、1 週間後に来院されたときに精度の高いお答えを返すというやり方です。

(数籐スライド 12)

現在、さらに、画像を撮るだけでなく、撮られた染色体が二動原体の判定まで自動で出してくれます。大体、1 人のプロフェッショナルが観察するのに、1 細胞に染色体は 46 本あるので 46 秒かかります。なので、大体 1 人の患者さんの 1,000 細胞を見るのに 16 時間、徹夜しなければ、普通に勤務していたら 2 日かかるのです。それを 2 分ぐらいで 1,000 細胞を

(自動) 判定してくれます。

ところが、検量線を描きますと、これは本来の人の目でみて作られた検量線で、かなり違うカーブが描かれて、念のため、フォールス・ポジティブ、フォールス・ネガティブをチェックすると、さらに変わってきます。それで、結局何が違うかといいますと、全部を拾ってないのです。4割から6割の染色体だけを拾って、時々、ダイセントリック（二動原体染色体）などは拾ってくれない、隣り合っているだけなのに異常だと判定してしまうようなことはまだあります。

結局、今のところ分かっているのは、マニュアル（目視観察）でフォールス・ポジティブの再チェックをかければ精度は上がって、1~2Gy 以上かどうかの判定はできます。ただし、それをしないとバックグラウンドとここの差は、もう見えないということになります。

これは主だった、放医研だけでなくフランス、IRSN やドイツ BfS などのような、放医研的なこういうのの担当、国立のような担当機関もこのテストをして論文を出していて、このような結論に今至っています。その他にさまざまな研究グループが独自の開発をしていますが、今のところ一応国際標準的に信頼されているのがこのやり方です。

(数籐スライド 13)

さらに、数年前からですが、フローサイトメトリーを使った二動原体解析ですね。これは今 Millipore が出している二動原体分析機です。面白いのですけれども、単なるフローサイトメーターではなくて CCD カメラが付いていて、これもフォールス・ポジティブをきちんとチェックすると精度が上がります。このように、ただ撮ったのでは 1Gy と 2Gy の差や 2 と 3 の差などははっきり言えなくて、4Gy 以上なら確実かな、のような状況なのですが、CCD を取り入れることでここは補正されます。

(数籐スライド 14)

ただし、これを見直すという、そういったことでまた時間がかかるのと、フローサイトメトリーの二動原体分析は結局培養に 2 日間要するので、最初の 48 時間というネックは減少しません。現在、最新の論文でここ（プレゼン）に総説を——名前しか入れてないのですね。その後続々と、Health Canada のグループが小核法と  $\gamma$ -H2AX の論文をその後出しまして、これが一番新しい総説になっています。

ただ、これはやはりテロなどの対策で軍などが支援しているようなところは持っているのですが、カナダの人に聞いたところ 8,000 万（円）ぐらいの機械なので、そうこのラボが持っているものでもないため、放医研では一応普通のフローサイト（メトリー）でこれができないか、つまり、震災のことも考えて他の地域でも、これを持っていないてもできないかといったことをしている人もいます。

さらに進みまして、二動原体、ギムザでなく動原体とテロメアの標識をして、本当に二動

原体、これは3個ですけれども、断片と動原体できちんと見分けて、これは今フランスが画像解析の自動化を既に論文を出しました。

(数籐スライド 15)

さらに、先ほどの細胞融合したものに、この PNA-FISH を当てて、私たちが世界で初めて二動原体分析をしました。

(数籐スライド 16)

これが重要なのは、まず短時間、患者さんがいらしてから細胞融合して FISH を、PNA probe という非常に結合力が高くてハイブリダイゼーション 30 分以下で済むというような手法で、これで、しかも私たちは 50 細胞だけの観察でトリアージをしようということでやりまして、実際やりました。

(数籐スライド 17)

これは二動原体と断片の(線量効果曲線で、) 50 細胞でも、1Gy、2Gy、3Gy はあまり重ならないということですので、面白かったのは採血タイミングです。細胞遺伝学の手法が Biodosimetry に適している理由というのは、いつ採血しても大丈夫だということです。これはその例なのですが、フラグメントはすぐに修復が起きて、実は 1 時間以内にもうがくつと落ちて、このようになります。従来のギムザだとこちらだけしか区別がつかないのでこれでカウントしていたのですが、二動原体はその 30 分後ぐらいからフラットの状態になるので、患者さんをいつ採血しても同じ答えが出るということになります。こういった部分も重要です。

最近、一番新しい国際標準化は、転座を解析するというものです。本来、全部の染色体を色分けする FISH 法、Multiplex FISH というのがあるのですが、これが大体 10 検体で 40 万円ぐらいするプローブなのです。それから、解析では、こういう異常があると、機械(PCの解析プログラム)はその他というところに全部押し込んでしまうので、結局人が観察し直すので、機械でも 15 分以上かかってしまうということで、私たちは 3 つの染色体を選んでスクリーニングをしようということです。

(数籐スライド 18)

実際、1、2、4(番染色体)を選びまして、ゲノムの 23%、交換型染色体異常の 40%を検出しています。このように、これこそ訓練していない人が見てもすぐ分かる染色体異常です。このように、私たちは 2 人並んで画面を見るので、一度に 1 枚 1 秒以下で判定をしています。現在、私たちは、これを自動解析するソフトウェアの開発をしているところです。

もちろん検量線もありまして、これはトータルな検量線ですが、二動原体と転座を分けますと、二動原体、トータルで、被ばく直後の方から 4 週間以内に見ることができますし、転座だけを使うと 30 年前ぐらいの事故まで調べることができるものです。

(数籐スライド 19)

重要なのが、区別が、150 ミリ (mGy) くらいからですときちんと区別がつくということが分かっています。そこで今、放医研では現在、ストラテジーとして 24 時間、被ばく医療ダイヤルがありまして、連絡がありましたら血液を頂いて、本当に必要なときは 6 時間以内に、トリアージの結果、患者さんは 2Gy 超えかどうか、いうための手法、それから、もっと精度の高い二動原体分析で、まず 50 時間後に、50 から 100 細胞で迅速結果を出して、それから、その後ゆっくり (時間をかけてより多くの細胞を) 見て、より数値的に精度の高い結果を出します。

それから、必要に応じて 3-color FISH をやります。特に、いつ事故が起きたか分からない、何年前の、特に今回の東電の (原発事故で) 2 万人の、3 月から 12 月までの方たちの (疫学) 事業を主にやっていますが、今調査するので、この手法を採ることにしています。

(数籐スライド 20)

今、以上のような手法は全て国際原子力機関のマニュアル化と、さらに、これはまだ研究段階のものも含まれるのですが、研究段階であっても現実に検査室として標準化したものが国際標準化機構です。今あるのは、先ほどの質疑のときにありました小核法と二動原体、それから、複数の患者が発生するような二動原体、mass casualty での二動原体です。

現在、私たちは、FISH による translocation assay (転座分析法) を確立しました。今 (国際標準化機構では) 投票中で、恐らく 6 月の会議で確定、最終版が出ます。これらのものは PDF 版があり、こちら (国際原子力機関のマニュアル) はフリーダウンロード、こちらは (国際標準化機構のマニュアル) 結構高いのですけれども、買えるはずですが。これはもちろん品質管理、ラボラトリーのいろいろな決まりを全て含んでいて、あと患者さんへの質問事項、医療被ばく歴、職業被ばく歴、薬は何を飲んでいますか、何か月前にレントゲンをやりましたかといったようなことがあります。

現在、放医研では、トロトラスト、第五福竜丸、臨界事故、福島、宇宙飛行士。あと、これは別の用件で放医研に来られたのですが、たまたま心カテの局所被ばくを見いだしてしまったという面白い例なのですが。先日といたしますか、昨年 6 月のプルトニウム事故などをやっています。

これはおのおの倫理審査と同意書取得は終わっているのでお見せしますが、6 月に事故発生翌日に 5 名受け入れて、担当医の判断でオーダー、2 万ベクレルということだったので、これは染色体を測れるレベルということでオーダーが来ました。翌日、採血が決まったので、私たちは (患者数が) そんなに人数いないときは、検査というのは必ず結果を出さないといけないので、疫学や普通の研究と違って一人一人に答えをあげないといけないので、3 系統で安全を取っています。必ずどれかの培養条件が当たるというようなやり方です。

福島のときは、一番最初に何人患者が発生するか分からなくて、私自身は人類学出身で人類遺伝学をやっていたので、200人、100人の検体を3通りといったような経験はやっていました。なので、一応200人までは受け入れますと。それ以上ならIAEAや皆さんの協力で、横浜か広島か韓国にラボを立てて追加解析するといった話をやっていましたが、大洗は最初から5人と分かっていたので、放医研で全部受けました。もう、すぐに48時間培養後、その日のうちに二動原のトリアージ報告をして、ついでにといいいますか、FISH分析もやって、ここはもう安全だと分かったのでゆっくりと、25日の退院のときにお話をしたということです。

(数籐スライド21)

プルトニウムということなので、一応、放射線管理をしてもらってこういった検査をやりまして、いずれにしても皆さんバックグラウンドレベルで安心していただいたということ、外部被ばくという意味です。現在、まだ画像解析の自動化が確定していないので、どうしても細胞の観察には協力が必要です。患者が5人超えたらお願いするつもりで、こういったような、また、震災のときのことも考慮して、各地にばらけて各地で担当できるようなものになっています。

(数籐スライド22)

もちろん国際協力もありまして、きょう最初に先生がお話してくださいました最も有名なのがヨーロッパ、MULTIBIDOSEをやっているヨーロッパで、これは日本ではそうはいかないのですが、ヨーロッパですと国ごとに担当を決めて、イギリス、フランス、ドイツは二動原体、フランスは $\gamma$ -H2AXなど、そういうふうに、あと発現変動担当など、実践研究的な分野まで踏み込んでラボごとに担当を決めています。

あとはラテングループといって、ラテンアメリカとラテン系の言語を話す国々で組んだり。中国、日本は国内に持っているのですが、韓国も合わせてアジアネットワークを昨年立ち上げました。Health Canadaはとても頑張っていて、カナダでは通常の臨床検査技師さんたちのネットワークで、普段は普通の染色体検査を毎日やっている人が、いざというときも助けてくださるようなネットワークをつくっています。

(数籐スライド23)

これは第2回のヨーロッパ(Intercomparison Study)、初めて第2回でEU以外のお誘いもかかって、私たちは初めて参加しました。ここで見えるように、ある線量を照射された血液が送られてくるのですが、ラボで随分違うというのが分かると思います。つまり、クオリティーがラボごとに違ってしまって、そうすると、画像を配られても違う判定になってしまいます。

これは今年度やった、初めてのアジアネットワークでの第1回のIntercomparisonです。放

医研は大体今まで3回、いろいろな Intercomparison に参加して、大体ほぼ一致する結果を出しているのですが、少し違うのではないかというような結果の出るラボもありますが、大事なものは、採択した細胞の数が違い過ぎるのです。これは、判定ができると思った細胞の数がそもそも違っていています。つまり、判定基準が人によって全然違うために各ラボが検量線を共有できないという状態になっています。そこで、今画像解析のソフトを作ろうという動きになっています。

(数籐スライド 24)

以上、今回(のプレゼンでは)、金谷先生の、特に細胞融合の PCC 法の FISH で厚労科研に出したものの、分担研究の細胞でお世話になりました。ご清聴ありがとうございました。

(拍手)

もう閉会の時間です。すみません。

山口：非常にまとまった話で、今の世界の情勢を踏まえての話でした。

廣田：いいですか。

山口：はい、お願いします。

廣田：最後おっしゃっていた、各ラボで判定できると判断できた細胞の数が違っていたとおっしゃったではないですか。結構、こうやって見るとすごくカラフルで分かりやすいというのが売りなのかなと思って……。

数藤：今のは(違いが生じるというのは)二動原体、ギムザ染色(の場合)です。

廣田：ああ、そうなのですね。

数藤：ねじれているだけで二動原体と思う人と、きちんと各々ねじれて重なっている部分が濃いので、それはねじれだと分かる人とあるのです。ただ、面白いのが、間違える人は安定して間違えるとそういう検量線ができて、同じ人が患者さんを受けるとその検量線にかけるので、最終的な数値は一致するのです。

廣田：なるほど。

数藤：ただ、私たちのラボの経験で、同じ人(検査者)で不機嫌な日と元気いっぱいの日で比べたりなど、結構、何かそういう下調べを私たちのところはきちんとやっていて、安定していて、必ず国際標準でも2人以上でダブルチェック(すること)と決まっています。ただ、現実の事故を受けたような国の人が国際標準(機構のプロトコール作成)に参加していないものです。

私たちは、本当に毎回毎回、事故が起きて実際の対応をしているので、その瞬間的な、(事故直後)3日以内はもうそういうのはおいておいて、とにかく2人で違う細胞を500ずつ見て、それぞれに有意差がなければ足してしまうようなことを最初の段階ではやっています。後で(1日後)一応、全員で投票といいますか、意見が一致しない細胞について話し合うと

いったことを必ずやっています。

廣田：ありがとうございます。

山口：まさに緊急時を考えた品質管理ですね。

中村：個人差が出てしまったりするので全自動のモニタリングのシステムなどを開発中だと言われたのですけれども、下世話な話なのですけれども、そういう開発の予算というのはどこから出てくるのですか。そういうのってなかなか予算が取りづらいと。

数藤：私財を投げ打ってと言いたいです。

中村：あとは、やはりそれを開発する、顕微鏡会社というのですか、のメーカーさんが多いのですか、それともソフトウェアをメインにされて……。

数藤：正直言いまして、これは転座ですと普通の臨床検査会社でも需要があるので良いのですけれども、二動原体というのはほとんどないのです。なので、売れません。最初から（使用する）ラボの数は分かっているのです。ただし、確実に売れるのは原発を今建設中の国で、東南アジアががんが今（顕微鏡システムを）買っているのです（その分は増えるでしょう）。だけれども、基本的に（解析）ソフトウェアというのは、割と今のところ作っている、例えば PHE や IRSN が開発しているのは割とフリーで配られているので、原則として無料という余計についてきてくれる企業はないといえますか、どうでしょう。

中村： $\gamma$ -H2AX も結構、自動カウントのシステムはあるのですけれども。

数藤：先ほどの DC スコアは 1 セット 350 万（円ぐらい）で、今度 Windows10 になってしまうから参ったなど。2 台で 700 万です。

中村：例えばリンパ球のような細胞だと、血球細胞がミックスされている中で、そこに赤血球もある、単球もあるといったら、先ほど言ったようにリンパ球だけが  $\gamma$ -H2AX のフォーカスを、反応するわけですね。そうすると、細胞というレベルではスクリーニングするけれども、これを取ってほしくない、これで  $\gamma$ -H2AX のフォーカスを取ってほしいのような微妙なわがままを聞いてくれるシステムをつくってくれる会社さんがなかなか、難しく、かゆいところに手が届きません。

数藤：Biodosimetry の国際会議や国際学会に集まりますと、結局いざというときは二動原体がやはり良い、しかも熟練の人が 50 個、顕微鏡下で見て終わるのが一番早いと言っています。

中村：そうなのですか。

数藤：しかも安いのです。トータル 1,000 円しないのではないですか。私たちは、そういう（患者でない）依頼、委託を受けるときはお金を頂いていますが、しょうがないので主に時給で換算です。試薬代は本当に 1,000 円しないのです。（システムを作ってくれる会社は）何か、ですが、今入札すると、びっくり、聞いたこともない中国などのベンチャーが……。

中村：が、よく。

数藤：そういうところが取ったりするので、結構、どこがいいというのは分かりにくいですよね。

山口：最後、困ったときには人、熟練した人が重要であるという話ですね。

数藤：今、ですから、染色体分野の皆さんは高齢化していて、ボランティアで登録制にして、例えば産休に入っている検査技師さんなど、そういった方のプーリングをしようかという話もあります。

樺田：その人の技術の継承って、どの程度できているのですか。

数藤：私たちは研修などもやりますけれども、基本的にそうならないように、FISH法を取り入れたのは、誰が見ても結果が明瞭ということ、それから画像解析ソフトの開発も、最初に誰かが決めた基準でそれで見られるようにと、現実的にはそうするしかないという感じですよ。

あとは、全国の日本人類遺伝学会の、私も指導士を持っているのですが、臨床細胞遺伝学の認定制度があって、それはもうはるかに難しいGバンド（分析）など、そういったことをやってらっしゃる方々のプールがあります。大体100人ちょっと（2017年4月現在で190名）いらっしゃるので、この前の震災のときも一応学会側からお声掛けがありました。そもそも培養のもちろんプロですし、違うのは、72時間培養ではない、普通の出生前診断はできるだけたくさんの細胞を見たいので、数を増やすため2回目分裂まで持っていくのです。

ですが、これはもうin vivoに近いということで48時間止めをするので、そこだけを間違えないという訓練で済むのです。一応そういうことは考えてやっていますが、やはり臨床検査も今どんどん違う世界になってきていて、染色体ではない世界に今なってきているので、実際何か維持するのは、こういう誰でもできるシステムに変えていくしかないのではないかと考えています。

樺田：その100人ぐらいのプールの方々というのは、所属は検査機関ですか。

数藤：ばらばらです。大学が多いです。あとは臨床検査会社で2人ぐらい持っていたり、あと、もともとヒトゲノムプロジェクトのときにゲノムマッピングをやっていた人たちが、そういうシステムを立ち上げていらっしゃるので、そういうところの先生のお弟子さんのような、います。指導士と認定士がいると研修施設認定ができるので、うちは一応なっていますけれども。

山口：他いかがでしょうか。では、時間も過ぎましたので、これで閉会としたいと思います。本日は皆さまのご参加いただきまして、今後につながる議論もできて大変よかったですし、豊田先生と数藤先生には国際的な観点から貴重なコメントを頂けて、大変感謝しています。では、最後、部長、お願いします。

檮田：すみません。皆さん、本当に長い時間ありがとうございました。研究的にどうやってやっていこうかのような感じの新しいアイデアのところと、最後ご紹介いただいたように、やはり実際使うとなると、SOP、標準作業手順書を作っていくような形できちんと評価できるようなシステムをつくっていかないと、それを維持するためにラウンドロビンスタディーなどもやりながら、みんな技術を伝承しながらというところも求められるのでしょうか、そのバランスの中で今後こういった領域をどうつくっていくのかと。

あまりこういうのを準備しなくていい環境が一番いいのですけれども、やはり準備しておかないことにはどうしようもないものですから、きょうはこういう機会を取らせていただきました。ぜひ皆さん、またこれから先、学会も何とか、お互い情報共有をしながらこういうネットワークができればと思いますので、またご協力をよろしくお願いします。本当にどうもありがとうございました。（拍手）

平成27-29年度労災疾病臨床研究事業

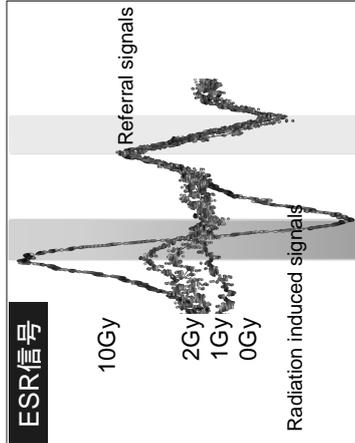
## 緊急被ばく医療が必要とされるような 事故発生時におけるトリアージのための 線量評価手法の確立に関する研究 (150803-02)

180223 成果発表会・国立保健医療科学院別館棟5階

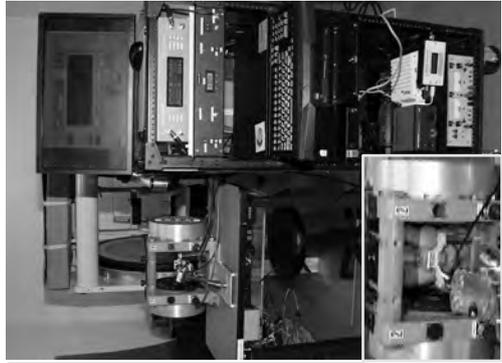
国立保健医療科学院・生活環境研究部  
櫻田尚樹

### 緊急被ばく医療が必要となるような際のトリアージのための 事後的な被ばく線量評価手法の確立

L band EPR法による生体歯牙を用いた線量評価



右:ポータブル型EPR計測装置。マグネットは電動で昇降する台に設置した小型電磁石で、重量約29kg、操作部(コンソール、電源)もキャスターが付いており、容易に運べる。重量は約60kg。マイクロ波制御装置も改良され、旧型に比べ検出感度が向上している。



文科研, 労災疾病臨床研究事業費, ダートマス大学等

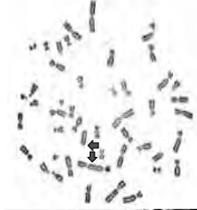
### 緊急被ばく時線量評価体制: 海外の情勢

- **Multibiodose**

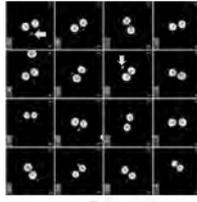
<http://www.multibiodose.eu/>



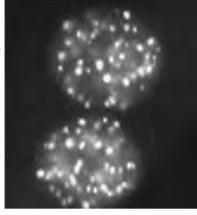
染色体異常



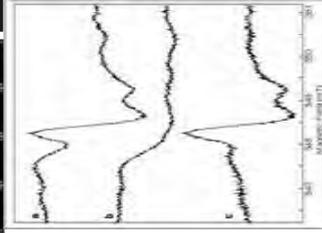
小核試験



γ-H2AX assay



二本鎖DNAの損傷  
マーカーとして知られる  
リン酸化ヒストン  
H2AXのフォーカス

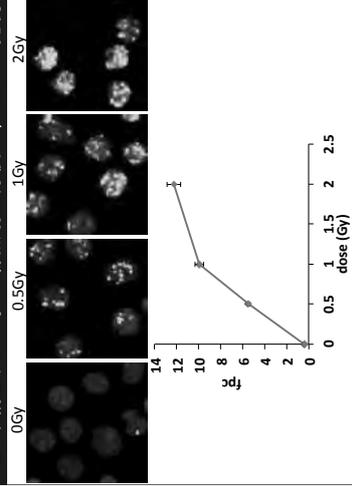


X band EPR

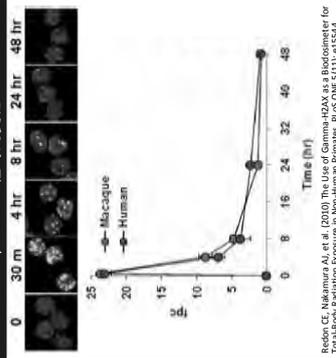


### γH2AXによる放射線被ばく線量評価

ヒト末梢血リンパ球にX線照射50分後のγ-H2AXの発現



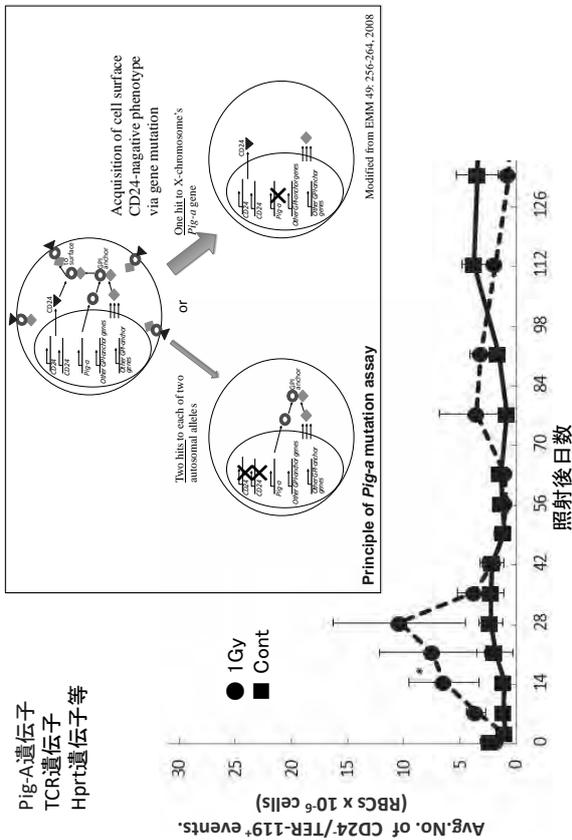
ヒトおよびサルの末梢血リンパ球に2Gy照射後の  
γ-H2AXの経時的変化



Reich et al., *Nebrask J Med*, 1976. The decay of γ-H2AX as a biochemical marker for total-body irradiation exposure in non-human primates. *PLoS ONE* 5:11111 (2010).

# 特定遺伝子座突然変異検出系

Pig-A遺伝子  
TCR遺伝子  
Hprt遺伝子等



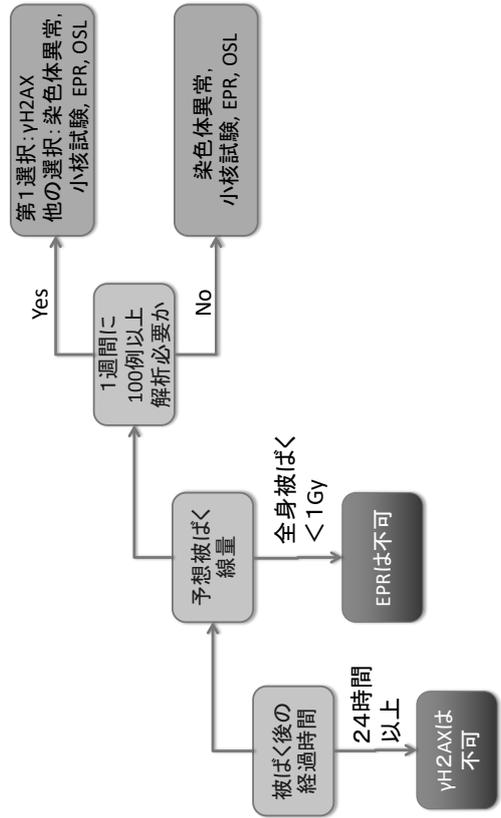
# バイオ・ドシメトリーで結果が得られるまでの時間

	試料輸送	試料調整	分析	結果報告	総処理時間
EPR in vivo tooth	0分	5分間	<1分間	0	<10分間
嘔吐症状	0	0	0	0	<5分間
γH2AX	2-12時間	4時間	2.5分間	24-36時間	1-2日間
リンパ球減少率	2-12時間	8時間	10分間	24-36時間	1.5-2日間
二動原体染色体	1-96時間	46-48時間	1時間	24-36時間	5-9日間
小核試験	12-24時間	70-76時間	8-15分間	24-36時間	4-5日間

# バイオ・ドシメトリーで評価可能な時間帯と特徴

バイオ・ドシメトリー法	事象発生時から試料が得られるまでの時間(発現時間)	評価可能最長時間	放射線特異性	部分照射への対応可能性	遅延照射への対応可能性	感度 (Dose range) (Gy)
EPR in vivo tooth	0	生涯	有	有	有	1->10
嘔吐までの時間	10分間から4時間	正確な思いだし: 2-10日間?				1-
γH2AX	3-30分間	1-48時間				0.2-5
リンパ球減少率	12時間	48時間				0.25-
二動原体染色体	0-1日間	時間補正されれば6月以内	有	有	有	0.1-5
小核試験	0-1日間	年		有	有	0.3-5

# まとめ: 被ばく線量評価法の選択手順



# X band EPR tooth dosimetry

豊田 新  
岡山理科大学

2018年2月23日 国立保健医療科学院

## 生体線量計測

- ▶ 生物学的手法
  - 血液の遺伝子の解析
- ▶ 物理学的手法
  - 電子スピン共鳴 (ESR)
    - ・ 歯のエナメル: 最も一般的に行われ、手法が確立
    - ・ 爪
    - ・ 髪の毛
  - 抜歯して歯を分析 高感度 試料の入手が困難
  - 人をそのまま測定 感度は低い トリアージに適切

## 生体線量計測

- ▶ 生体の一部を測定することによって過去の被曝線量を求める。
  - Retrospective dosimetry (遡及的線量計測)
- ▶ 利点
  - 線量計を所持していない場合にも、線量計測が可能
  - 過去の集積線量が測定できる。
  - 個人の線量を個々に求めることができる。
- ▶ 欠点
  - 試料を人体から採取する必要がある。
  - バックグラウンドを差し引く必要がある。
  - 「その事故」の線量ではなく、集積線量である。

## 歯のエナメルを用いたESR線量計測

- ▶ 電子スピン共鳴の原理
- ▶ 測定法の原理
- ▶ 線量測定の方法
- ▶ 線量計測の実際
- ▶ 測定の実例
- ▶ 新しい応用
- ▶ まとめ

## 電子スピン共鳴

- ▶ 磁気共鳴の一種
- ▶ 核磁気共鳴 (NMR) と原理は同じ
- ▶ 電子スピン共鳴
  - Electron Spin Resonance (ESR)
- ▶ 電子常磁性共鳴
  - Electron Paramagnetic Resonance (EPR)

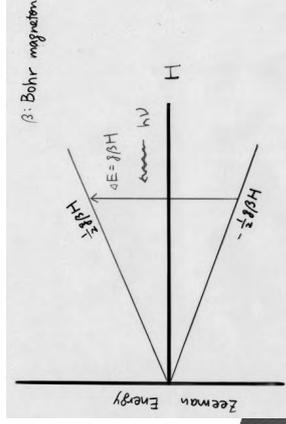
## ESRとは

- 電子は、磁場中におかれると、その磁気モーメントが磁場に平行または反平行の状態をとる。

ゼーマンエネルギーの差に等しいマイクロ波を吸収する(電子スピン共鳴, ESR)。

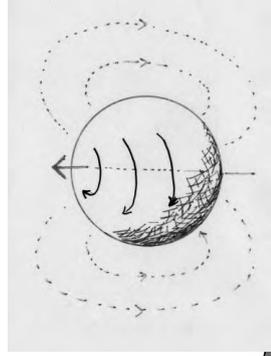
共鳴条件

$$h\nu = g\beta H$$



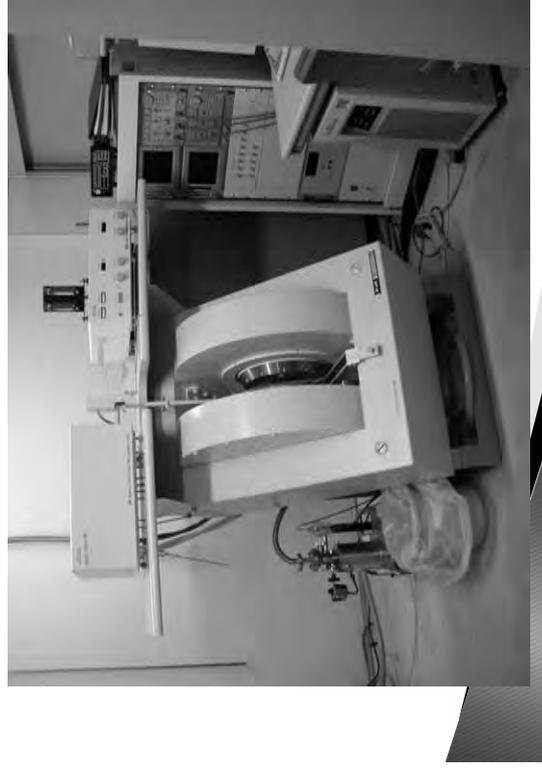
## ESR(電子スピン共鳴)とは

- ▶ 不対電子のゼーマン効果を利用して、  
**不対電子を検出する。**

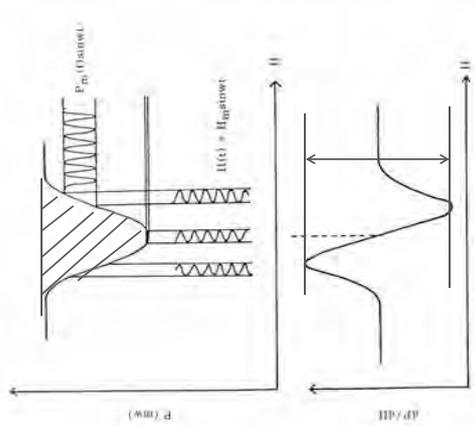


電子はスピン(回転)しているため、小さな磁石とみなすことができる。

## ESR測定装置 日本電子 JES-PX2300



## ESR測定のおしこみ



- ▶ 磁場変調
- ▶ 吸収曲線の微分形が得られる。
- ▶ 不対電子量は吸収波形の面積
- ▶ 波形が同じなら微分しても相対的に強度は同じ

## 歯のエナメルを用いたESR線量計測

- ▶ 結晶性の良いヒドロキシアパタイト $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
- ▶ 感度の高いESR線量計素子
- ▶ 放射線によって $\text{CO}_2$ -ラジカルを生成
- ▶ 100万年のスケールで安定
- ▶ 蓄積被曝線量を計測できる。

著作権処理がなされていないために図を削除しています。

## ESR年代測定・線量計測の原理

- ▶ 著作権処理がなされていないために図を削除します

## 歯のエナメルを用いたESR線量計測

- ▶ 高感度
  - 検出限度 約30mGy (Romanyuka et al., 2006)
- ▶ 特別な検出装置が不要で、人の被曝線量を個々に計測することが可能
- ▶ 放射線事故の被曝線量計測に用いられてきた
  - 原爆被爆者
  - チェルノブイリ原子力発電事故
  - JCO臨界事故
- ▶ 抜歯の必要性

## 研究の歴史

- ▶ 歯のエナメルに線量応答のある信号を発見  
Brady et al. 1968
- ▶ 実用的な線量計測
  - 原爆被爆者 Ikeya et al. 1984
  - Mayak の労働者 Romanyukha et al. 2000
  - Techa 川周辺の住民 Wieser et al. 1996
  - チェルノブイリ原子力発電所事故 Chumak et al. 1996, 1999
  - セミパラチンスク核実験場周辺の住民 Zhumadilov et al. 2006
  - JCO 事故 Shiraishi et al. 2002

## 歯のエナメルの抽出

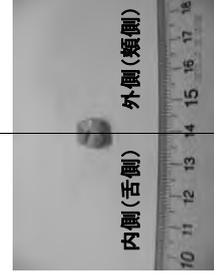
- ▶ 機械的に分離する方法
- ▶ 化学的に抽出する方法

## 歯のエナメルを用いた線量計測の方法

- ▶ エナメルの抽出
- ↓
- ▶ ESR測定
- ↓
- ▶ 線量応答のある信号成分の抽出
- ↓
- ▶ 線量の算出

## 機械的手法によるエナメル抽出

歯を内側(舌側)と外側(頬側)に切断した後、象牙質を削り取る



## 化学的手法によるエナメル抽出

歯を内側(舌側)と外側(頬側)に切断

アルカリによる化学処理

20-30% NaOH or KOH

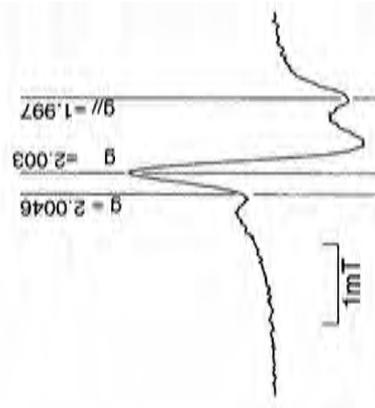
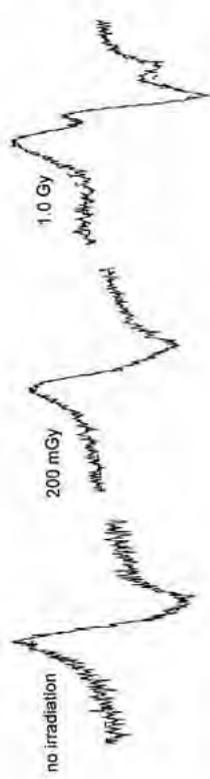
超音波洗浄機中

60°C

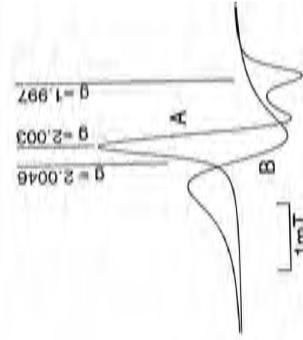
24時間



## ESRスペクトル



9 Gy 被曝した  
人の歯のエナメルのESR信号



A:  $\text{CO}_2^-$  ラジカル  
B: 有機物

スペクトルの数値計算処理方法の改善  
による検出限界の改善

“Dosimetry” (Koshta et al., 2000)

“New ER” (Ivannikov et al., 2001)

## 線量応答のある信号成分の抽出

$$F(H) = A + B H + A_B f_B(H) + A_H f_H(H) + A_I f_I(H) + A_A f_A(H)$$

$A + B H$  : a linear background component

$A_B f_B(H)$  : an axial background component

$A_H f_H(H)$  : a radiation induced axial component

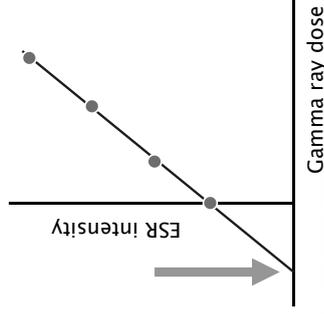
$A_I f_I(H)$  : a radiation induced isotropic component

$A_A f_A(H)$  : some unknown signal.

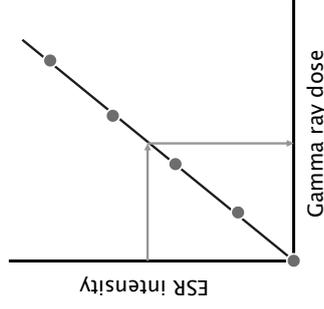
f : ローレンツ型の曲線

## 線量の算出

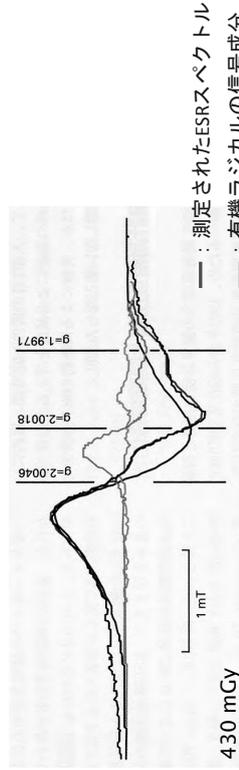
▶ 付加線量法



▶ キャリブレーション法



## 線量応答のある信号成分の抽出



- : 測定されたESRスペクトル
- : 有機ラジカルの信号成分
- : CO<sub>2</sub>-信号の成分
- : 求められたCO<sub>2</sub>と有機ラジカルの信号から再構成した成分
- : 測定スペクトルと再構成したスペクトルの残差

## 付加線量法

- ▶ その試料のみで線量の測定が可能
- ▶ 数段階の線量の付加が必要
- ▶ 個々に感度が異なる場合、その感度を補正できる
- ▶ 数段階に分けられるだけ試料が得られないときは、照射と測定を繰り返すことになる。
- ▶ もとの情報が失われる。

## キャリブレーション法

- ▶ 標準試料が必要
- ▶ 個々に感度にばらつきがあれば、正確に線量を求めることができない。
- ▶ もとの情報が保存される。
- ▶ 試料を1つ測定するだけで線量を得ることができる。
- ▶ 問題点
  - どのようにして健常な歯の試料を得るか

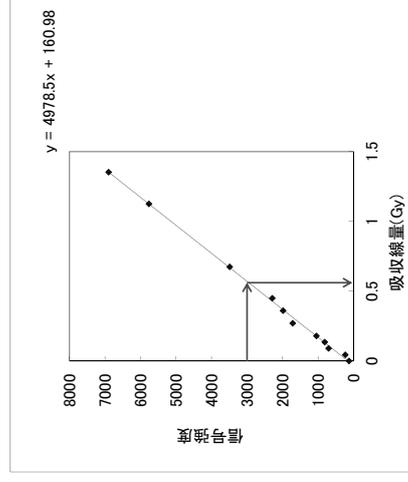
## 標準試料の作成

- ▶ 奥羽大学から福島第一原子力発電所事故前に、バックグラウンドの計測用に約50本の親知らずを提供していた。
- ▶ 第3回国際標準比較の際の標準試料をもとに線量が計測されていた。
- ▶ 0mGyに近い数試料を選んでESRで計測
- ▶ これらの試料の中で、さらに、信号分離プログラムを用いて得られたRIS(CO<sub>2</sub>-信号)の値0に近いものを選び、混合し、γ線を照射した。

## 標準試料の作成方法

- ▶ 被曝のできる限り少ない歯を選ぶ
- ▶ エナメルを抽出する
- ▶ 最大1-1.5Gyまでの正確なガンマ線照射を行う。
- ▶ 測定をし、信号分離をして校正直線を得る。

## 標準試料



$$\text{吸収線量} = \frac{\text{信号強度} - 160.94}{4978.8}$$

試料にもともとあるバックグラウンド 32mGy

## 線量応答の試料依存性

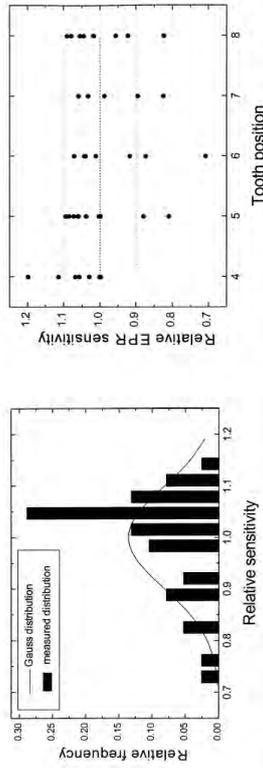


Fig. 2. Frequency distribution of the EPR sensitivity of 38 enamel samples from Egypt. The mean value (1.00) and standard deviation (0.10) of the measured sensitivity was used to calculate its corresponding Gaussian distribution.

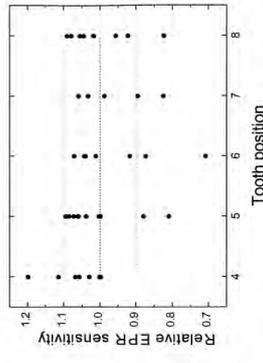


Fig. 4. EPR sensitivity of 38 Egyptian (tooth enamel) samples in dependence on the tooth position. Included are the mean value, 1.00, (dashed line) and the borders of the standard deviation,  $\pm 0.10$ , (dotted lines).

Wieser et al. (2001)

## 原爆被爆者

▶ Ikeya et al. (1984) 長崎・広島の原爆被爆者の歯を測定

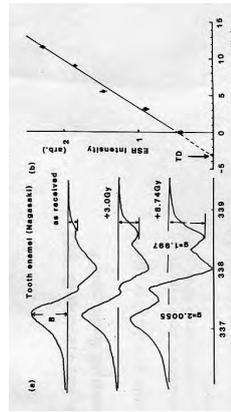


Table 1. Total dose of atomic bomb radiation (TD) using ESR signals of shell buttons and tooth enamel from survivors at Nagasaki (N) and Hiroshima (H).

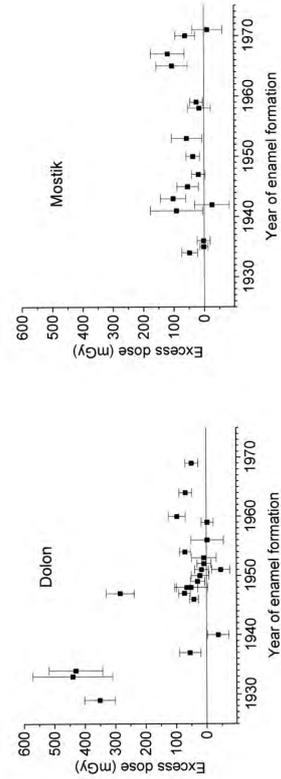
Place & Material	Ground Distance (m)	Slant Distance (m)	T65D (Gy)	TD (ESR) (Gy)	Shielding* (cm)	Condition
N Enamel	691	855	32.46	1.9	33	in N-Hospital
N Shell button	1300	1394	2.62	3.1	?	light diarrhea
N Enamel	1400	1488	1.76	1.6	2	W.b.c. decrease in wooden house
N Enamel	1800	1870	0.38	0.5	7	in brick bldg.
H Enamel	770-1000	962-1155	7.99-2.56	2.0	6-15	unknown
H Enamel	2080	2080	0.02	0.6	7	in H-Castle
						A-Bomb Symptom
						unknown

\*A larger TD than T65D presumably due to secondary induced radiation and experimental error as well as imprecise T65D is indicated by ? mark.

## セミパラチンスク 核実験による 周辺住民の被曝

著作権処理がなされていないために図を削除しています。

## 被曝のあった村となかった村の対照 (Ivannikov et al., 2006)



## 日本人のバックグラウンド線量 (Toyoda et al., 2012)

- ▶ ESR線量計測によって求めるもの
- ▶ 線量計測の目的
  - 放射線事故による被曝線量
- ▶ 実際に求められる値
  - バックグラウンド線量を含めた被曝線量の総量
- ▶ バックグラウンド線量の定量の必要性
  - 国、地域、生活習慣によって異なる

## エナメルの抽出

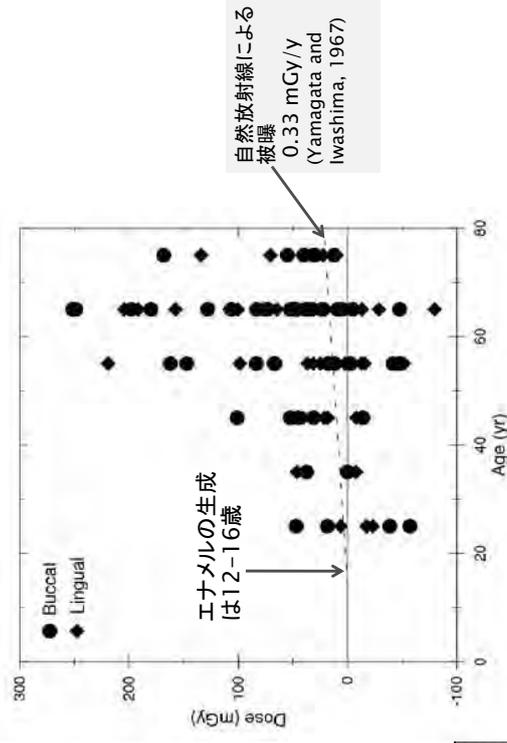
- ▶ 頬側と舌側に切断
- ▶ 歯科用ドリルで象牙質を取り除く
- ▶ ニツパにより0.5-1.4 mmの粒径にそろえる
- ▶ 10日ほどおいてESR測定

## 日本人の歯のバックグラウンド線量の計測

- ▶ 医学的な理由で抜歯した健康な歯
  - 第三大臼歯(親知らず)
- ▶ 奥羽大学より47本を提供
- ▶ 20-70歳代(歯科医による年齢の推定)



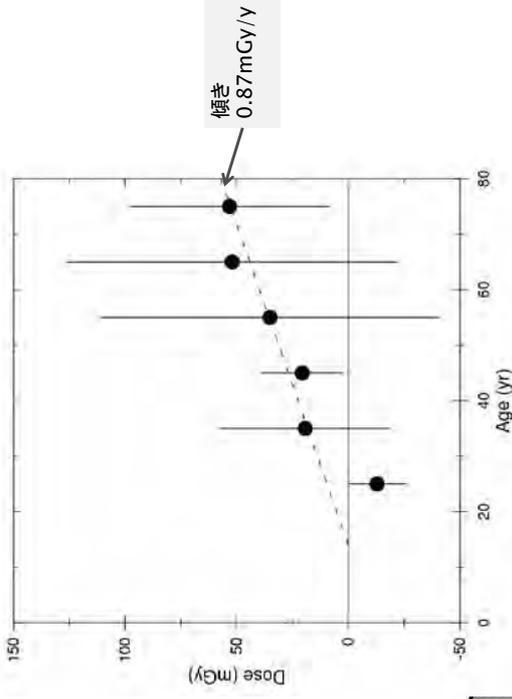
## 日本人の歯の測定結果：年齢との相関



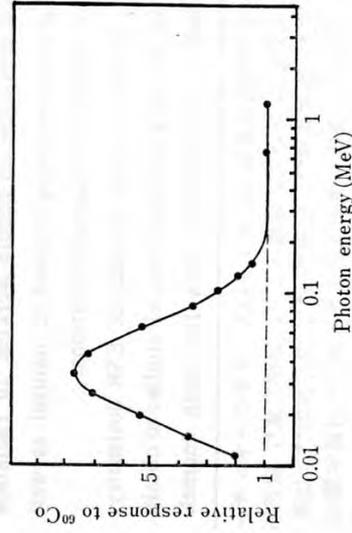
## 日本人の歯の測定結果

- ▶ 最大で250mGy程度の被曝線量が得られた。
- ▶ 自然放射線の被曝によっては説明できない。
- ▶ 歯科放射線の可能性
  - 写真撮影1回あたり2-4mGy
  - 低エネルギーのX線に対しては生成効率が高い。
  - ガンマ線に換算して1回あたり20mGy程度となる可能性がある。

## 平均値と年齢の相関



## ESR信号生成のエネルギー依存性



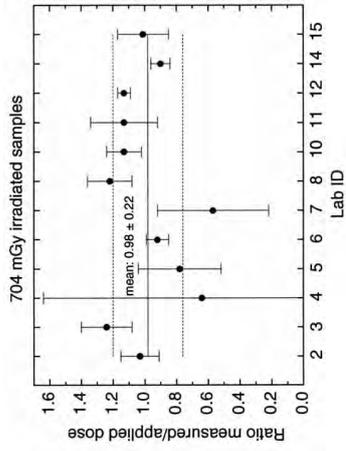
Iwasaki et al., 1991

- ▶ ESRで求められる線量として、平均的に年間0.87mGyの放射線を受けている。
- ▶ 医療放射線として0.5mGy/y, 生成効率を補正すると0.1 mGy/y 程度
- ▶ 事故放射線の線量を求めるときには、この医療放射線量を差し引く必要がある。
- ▶ 個々の歯科X線被曝の記録を持っていることが望ましいが、それが無い場合には、200mGy以下の被曝が確実にあったことを証明することは困難。
- ▶ 100mGy程度であればある確率で被曝していたという議論は可能。
- ▶ 集団の被曝線量であれば、100mGy程度でも求められる可能性が高い。

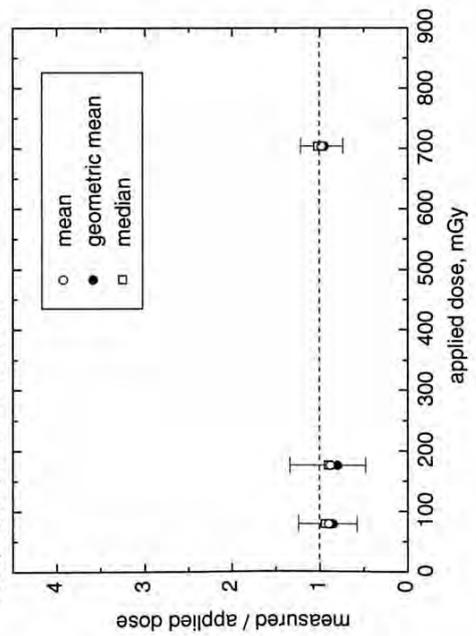
# 国際線量相互比較

(Wieser et al., 2005)

- ▶ 各研究室が試料を準備
- ▶ 主催者側がガンマ線を照射
  - 79 mGy
  - 176 mGy
  - 704 mGy
- ▶ 主催者側が標準試料を提供
- ▶ 各研究室の実験手順によって被曝線量を求める

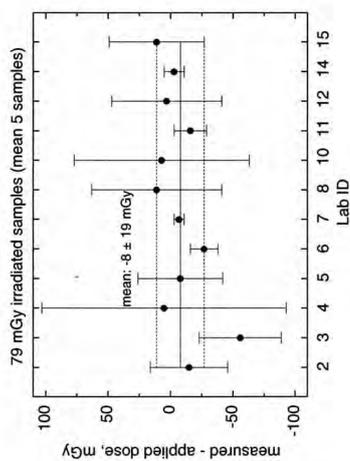


3rd International Intercomparison on EPR Tooth Dosimetry  
2003, Results of 12 Laboratories



## 今後の課題

- ▶ 標準試料のばらつきに依存する求められた線量の誤差の評価
- ▶ 標準試料の“標準化”
- ▶ 純粋な“native”の信号とは？
- ▶ 最小検出限度
- ▶ 実用的な最小検出限度
- ▶ 差し引くべきバックグラウンド線量の推定方法の確立
- ▶ 永久歯に代わる歯の試料



## 標準化に向けて

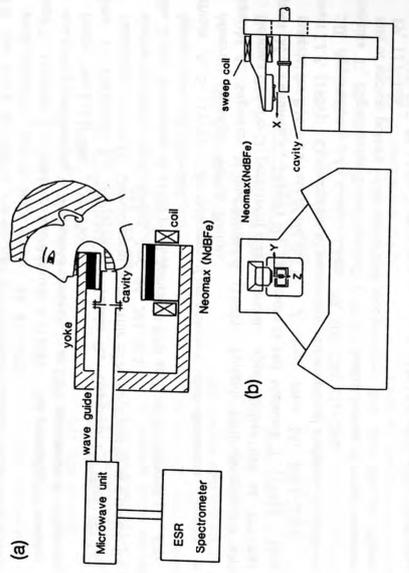
- ▶ ISO 13304-1 Radiological protection - Minimum criteria for electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy for retrospective dosimetry of ionizing radiation - Part 1: General principles (2013)
- ▶ ISO 13304-2 Radiological protection - Minimum criteria for electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy for retrospective dosimetry of ionizing radiation - Part 2: Ex-vivo tooth enamel dosimetry
  - CD (Committee Draft) を作成中

## 永久歯に代わる測定材料の可能性

- ▶ 乳歯
- ▶ 動物の歯
  - 牛
  - いのしし
  - ネズミ
  - 鹿
  - ラクダ

## In-vivo ESR 線量計測

- ▶ 抜歯しないで線量計測を行う
- ▶ 水分に吸収されにくいマイクロ波バンド(1GHz)を使用
- ▶ 大規模の放射線事故時の被曝可能性のある市民のトリアージュに使用することを目的
- ▶ 正確な線量を求めるのではなく、2Gy程度の被曝の有無を迅速に診断
- ▶ 有機物信号を一緒に測定(信号を分離できない)



H. Ishii and M. Ikeya: An electron spin resonance system for in-vivo human tooth dosimetry. *Jpn. J. Appl. Phys* 29 (1990) 871-875.

## アメリカ・ダートマス医科大学 Swartz博士のグループ



## 測定限界

Fattibene et al. (2011) Radiation Measurements,  
46, 765-771

## 紫外線の影響

Jiao et al. (2007) Jour. Radiat. Res. 48, 21-29.  
粉碎した歯に太陽光を照射



# 放射線緊急時における トリアージとしての L band EPR tooth dosimetry

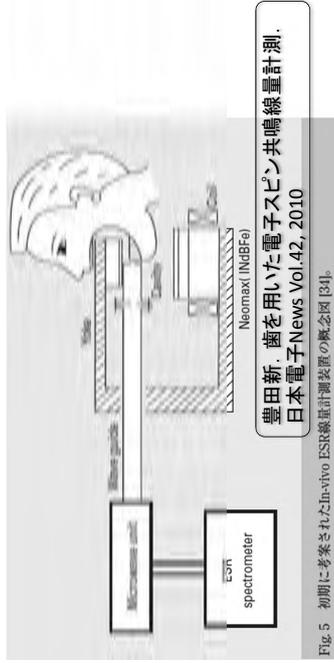


Fig. 5 初めに考案されたIn-vivo ESR線量計測装置の概念図 [34].  
 山口 一郎(1), 三宅 実(2), 中井 康博(2), 志村 勉(1), 櫻田 尚樹(1)  
 1)国立保健医療科学院生活環境研究部 2)香川大学医学部歯科口腔外科

平成29年度労災疾病臨床研究事業費補助金  
 トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

## 内容

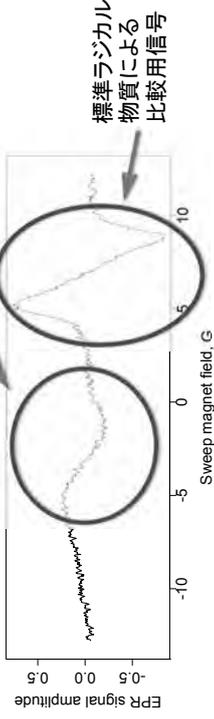
- In vivo tooth dosimetryとは？
- 実用化に向けた検討状況
- 特性の把握の試み

# EPR in vivo tooth dosimetryとは？



放射線照射で歯のエナメル質に形成された不安定な  
 炭酸ラジカルを電子スピン共鳴法で  
 計測して線量を推計する方法

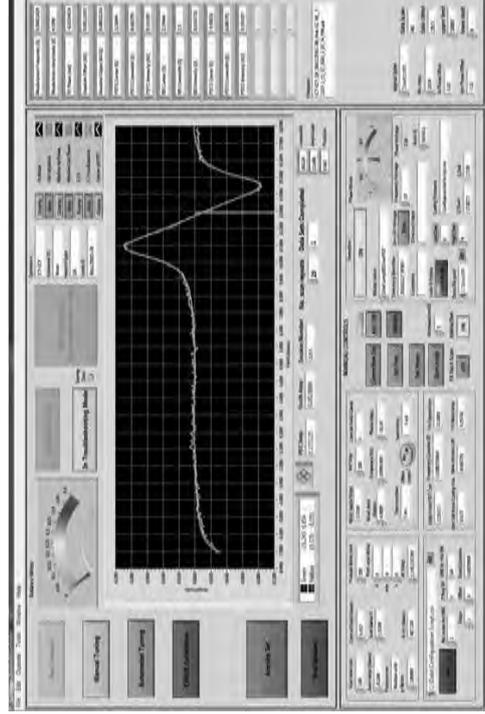
1GyのX線照射によるEPR信号



標準ラジカル  
 物質による  
 比較用信号

平成29年度労災疾病臨床研究事業費補助金  
 トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

## 北大の共振器での測定例



# バイオ・ドシメトリーで評価可能な時間帯と特徴

## Ann Flood先生によるまとめ

バイオ・ドシメトリー法	対象生物から材料が得られるまでの時間(発現時間)	処理可能な最長時間	放射線特性	部分照射への対応可能性	照射範囲への対応可能性	照射線量 (Gy)
EPR in vivo tooth	0	生涯	有	有	有	1->10
嘔吐までの時間	10分間から4時間	正確な思い出し、2-10日間?				
$\gamma$ H2AX	3-30分間	1-48時間				0.25
リンパ球減少率	12時間	48時間				0.25-
二動原体染色体	0-1日間	時間矯正されれば6月以内	有	有	有	0.1-5
小核試験	0-1日間	年	有	有	有	0.3-5

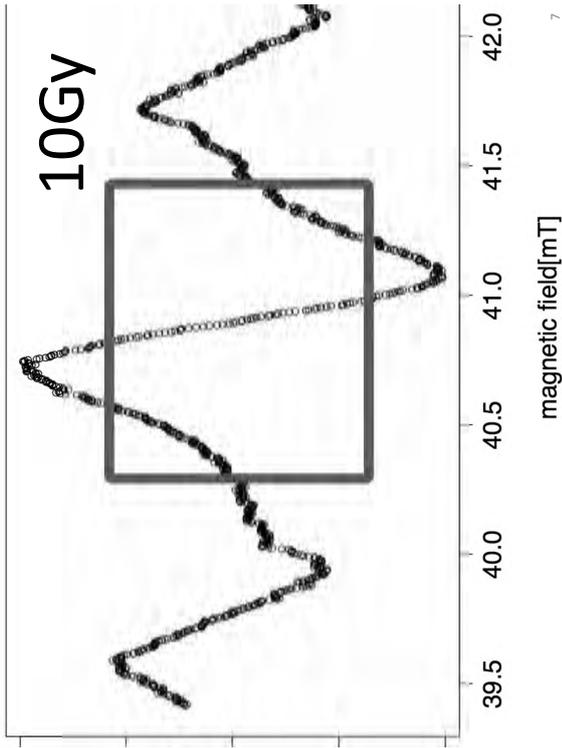
  

試料輸送	試料調整	分析	結果報告	総処理時間	
EPR in vivo tooth	0分	5分間	<1分間	0	<10分間
嘔吐症状	0	0	0	0	<5分間
$\gamma$ H2AX	2-12時間	4時間	2.5分間	24-36時間	1-2日間
リンパ球減少率	2-12時間	8時間	10分間	24-36時間	1.5-2日間
二動原体染色体	1-96時間	48-48時間	1時間	24-36時間	5-9日間
小核試験	12-24時間	70-76時間	8-15分間	24-36時間	4-5日間

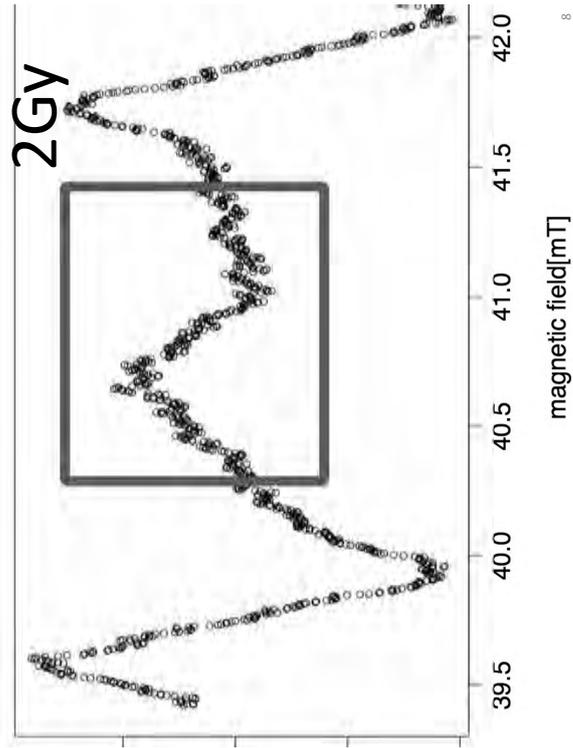
ラジカル特性性はあるが...

装置を運ぶ必要がある

5



7



8

どこまでわかるか？

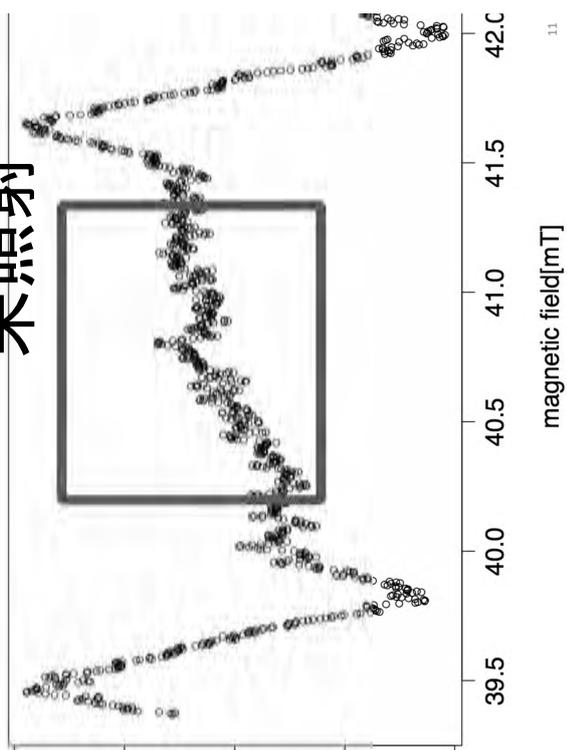
150 kVのX線を照射した場合

Cs-137線源よりも  
応答がよいので  
エネルギー依存への  
配慮が必要

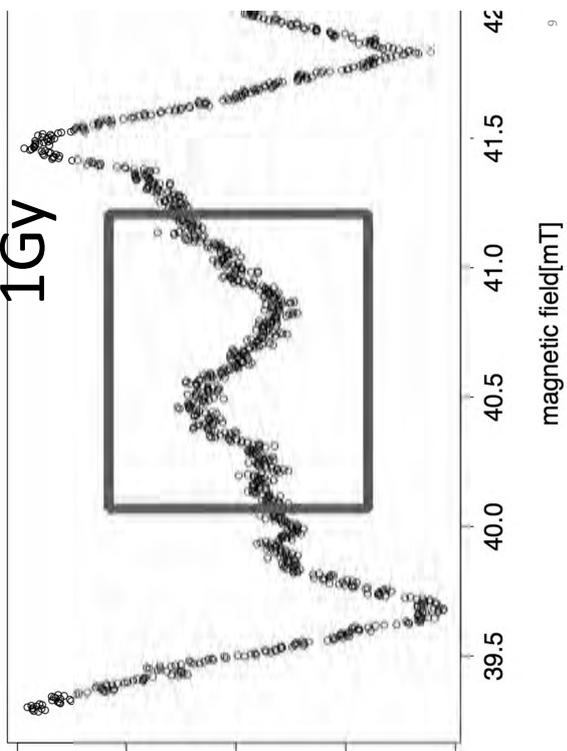
平成29年度学術振興会特別研究員奨励費補助金  
トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

6

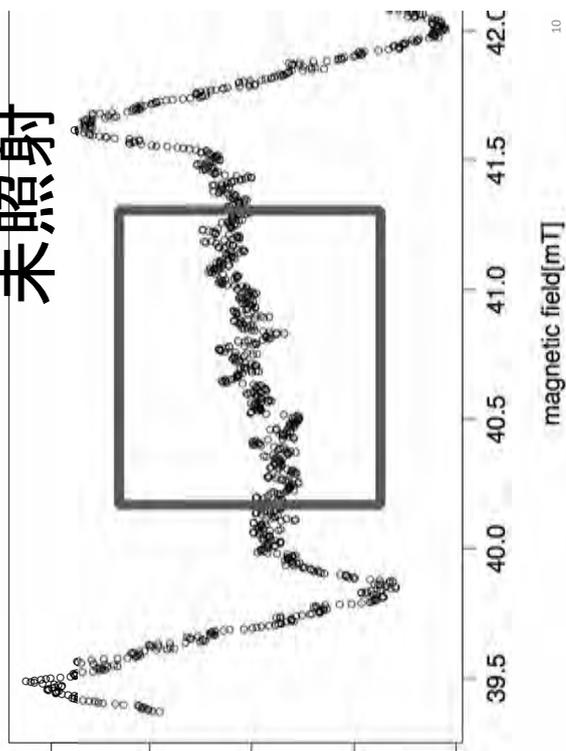
未照射



1Gy



未照射



## 実用化に向けての検討

実際に用いることができるか？  
妨害となる要因はないか？

## 施設から装置を運び出して測定



Dosimeter including the console and magnet were designed for totally transportable and also can be transported by a small vehicle equipped an air-suspension.

平成29年度労災疾病臨床研究事業費補助金  
トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

13

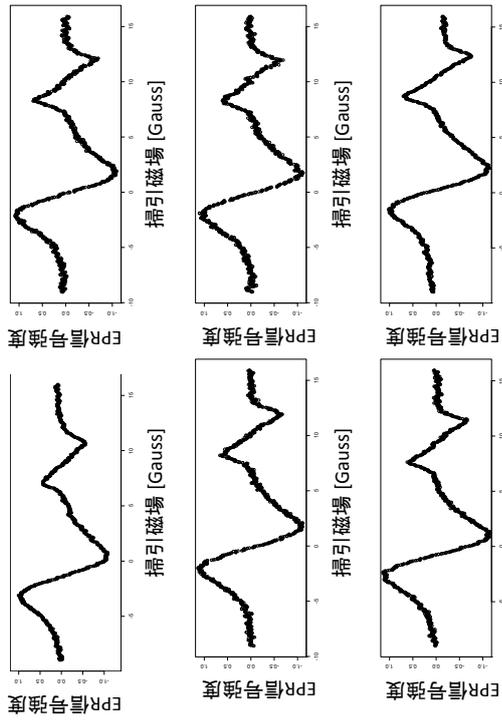
## In vitroとIn vivoの比較

どこまで近づいたか？  
まず in vitro

平成29年度労災疾病臨床研究事業費補助金  
トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

14

20 scans; scan range of 2.5 mT, a scan time of 3 seconds and a modulation amplitude of 0.4 mT



150 kVの  
X線で20 Gy照射

掃引磁場 [Gauss] 掃引磁場 [Gauss] 掃引磁場 [Gauss]  
掃引磁場 [Gauss] 掃引磁場 [Gauss] 掃引磁場 [Gauss]

15

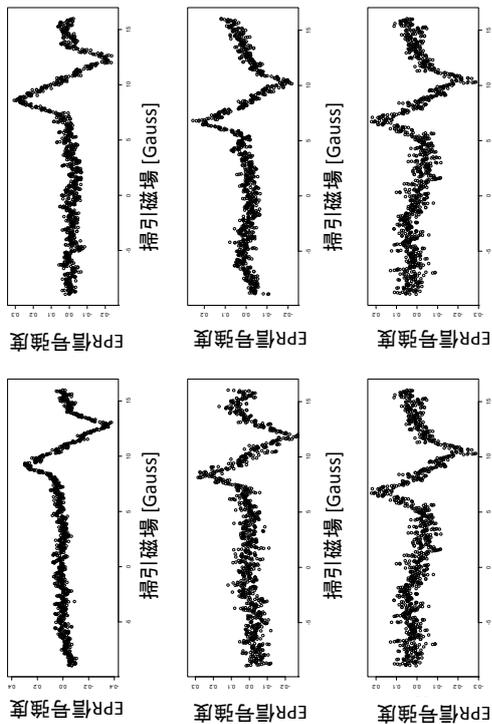
平成29年度労災疾病臨床研究事業費補助金  
トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

## In vivo

平成29年度労災疾病臨床研究事業費補助金  
トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

16

20 scans; scan range of 2.5 mT, a scan time of 3 seconds and a modulation amplitude of 0.4 mT

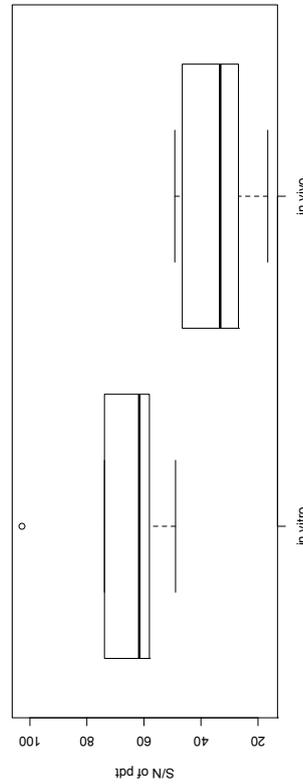


掃引磁場 [Gauss] 掃引磁場 [Gauss] 掃引磁場 [Gauss]  
 平成29年度労災疾病臨床研究事業費補助金 トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

# 課題

平成29年度労災疾病臨床研究事業費補助金 トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

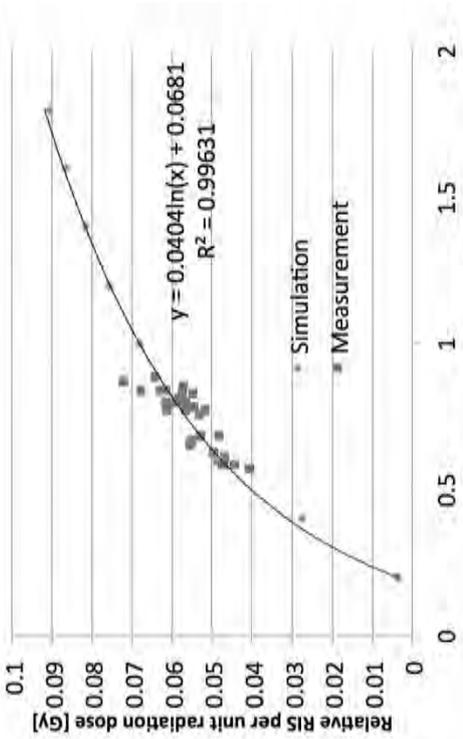
# 標準物質のS/N



- In vitroでもバラツキが大きい
- PDTの信号の大きさは in vivoでは半分程度に低下
- 習熟したり、データ解析対象基準を作るとバラツキを小さくできそう

平成29年度労災疾病臨床研究事業費補助金 トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

# Enamel thickness and RIS, 150kV X-ray



RIS: Radiation Induced Signal

# 測定環境の安定化に向けて

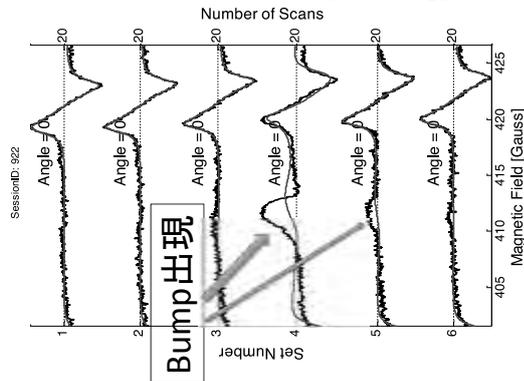
- 手順の標準化
  - Distortionやノイズへの対応
    - 原因の解明とその対策
      - ループの洗浄が効果的であるが、原因物質が未解明
        - » 洗浄の繰り返しが必要なもの
- エンジニアリング面でのサポート体制の確立
- ノイズの軽減
  - 電磁波シールドの活用

File Path: KYOKYO\_DAI\_BALLZERQ08\_NMS\_02\_7922  
Model Name: OneCompRSTwePDT\_Matlab Fit  
Report Generated: 11/13/2015, 1:30 PM  
Collection: 10/22/2015, 12:23 PM - 12:39 PM, Elapsed: 00:16:50

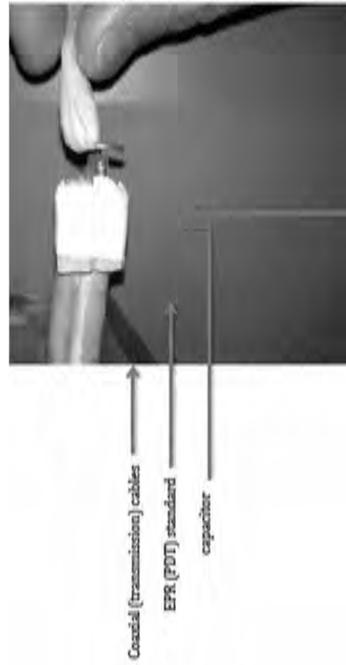
## Data Parameters Value

Reference phase (deg) -16.5  
Scan angle (G) 25  
Scan time (s) 3  
Modulation amplitude (G) 4  
Central field (G) 414.026 - 414.082  
Attenuation (dB) 23000  
Line constant (ms) 1.1575  
RF frequency (GHz) 1.92  
Sweep Calibration (G/Vrms) 1.92  
Oscillator 187.78 - 191.82  
Cand. 0.77 - 0.72  
In Phase Voltage -4.42 - 4.48  
In Phase Offset -0.48 - 0.04  
Out Phase Offset -0.14 - 0.31

Set	Vpp	PDT	Vpp	RIS	SNR	PDT	SNR	RIS	Mod Amp
1	1.3	-0.00571	16.6	0.0729	4.21	0.0965	4.2	0.0965	4.2
2	1.35	-0.00615	19	0.0729	4.2	0.0965	4.2	0.0965	4.2
3	1.34	-0.023	3.7	0.0729	4.08	0.0965	4.08	0.0965	4.08
4	1.3	-0.024	3.55	0.0729	4.15	0.0965	4.15	0.0965	4.15
5	1.35	-0.0885	9.88	0.0729	4.14	0.0965	4.14	0.0965	4.14
6	1.29	-0.0255	13.6	0.0729	4.16	0.0965	4.16	0.0965	4.16
Mean:	1.32	-0.0592	12.7	0.312	4.16	0.0965	4.16	0.0965	4.16
SD:	0.0272	0.0996	5.43	0.277	0.0507	0.0965	0.0507	0.0965	0.0507
SDMean:	0.020637	-1.6155	0.42687	0.88946					

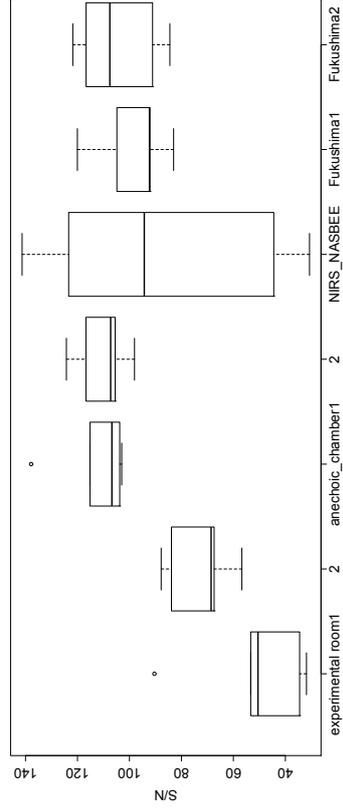


# 検出器のループの洗浄の手順書



**3.0 Rationale**  
The resonator loop can build up contaminant materials increase the noise or otherwise performance of the resonator. Therefore, periodic 'light' cleaning using 70% alcohol and light cleaning in response to occasionally that can affect the performance of the resonator.

# 測定場所別のS/Nの比較



# 国立保健医療科学院の電波暗室



25

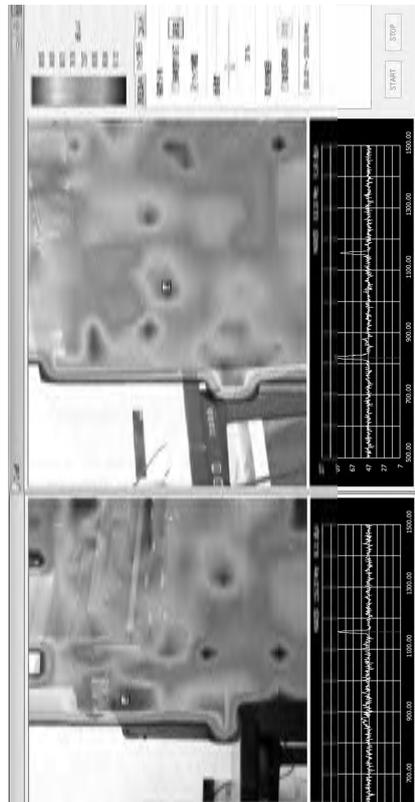
# 電波シールドルームでの測定



平成29年度労災疾病臨床研究事業費補助金  
トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

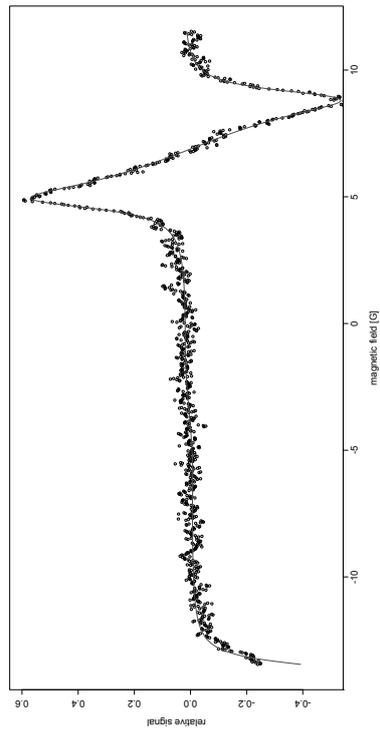
27

# 空間の周波数別の電磁波強度



26

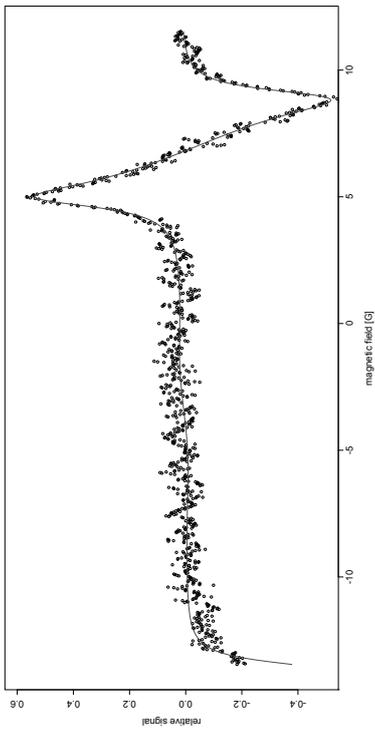
# 1回目



Magnetic field modulation amplitude/Gauss 4.000, Time constant 5 ms  
Scan time/seconds 3.0, No. samples/scan 20, Scan range/Gauss 25.0

28

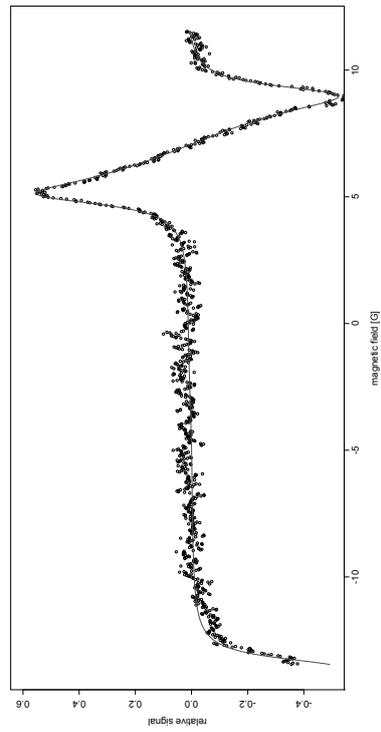
## 2回目



Magnetic field modulation amplitude/Gauss 4.000, Time constant 5 ms  
Scan time/seconds 3.0, No. samples/scan 20, Scan range/Gauss 25.0

29

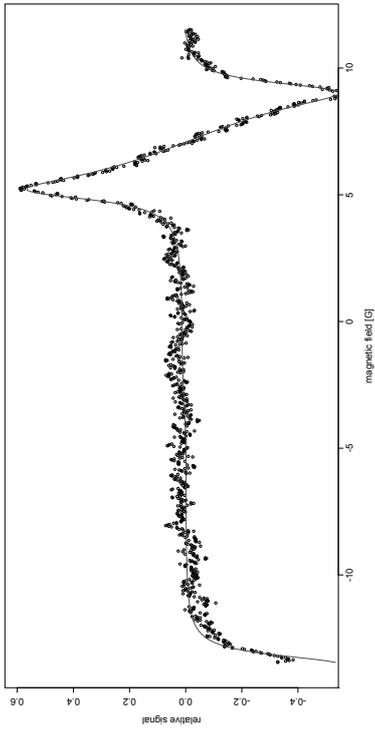
## 3回目



Magnetic field modulation amplitude/Gauss 4.000, Time constant 5 ms  
Scan time/seconds 3.0, No. samples/scan 20, Scan range/Gauss 25.0

30

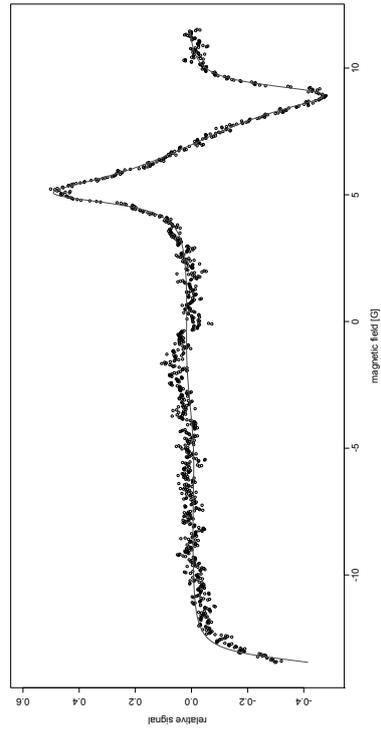
## 4回目



Magnetic field modulation amplitude/Gauss 4.000, Time constant 5 ms  
Scan time/seconds 3.0, No. samples/scan 20, Scan range/Gauss 25.0

31

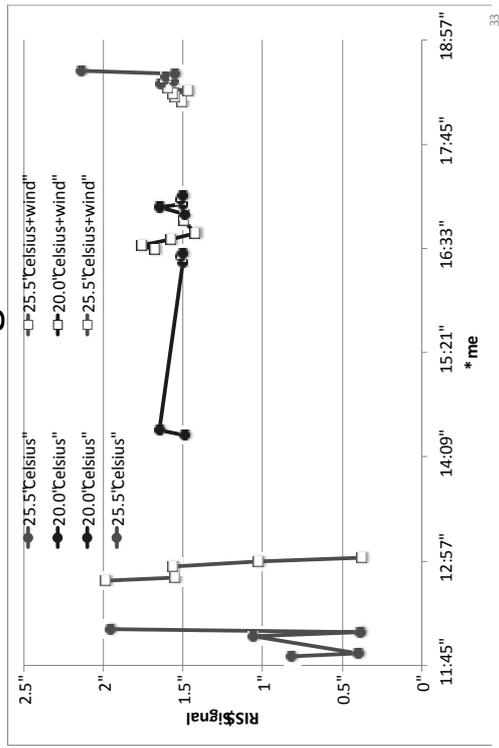
## 5回目



Magnetic field modulation amplitude/Gauss 4.000, Time constant 5 ms  
Scan time/seconds 3.0, No. samples/scan 20, Scan range/Gauss 25.0

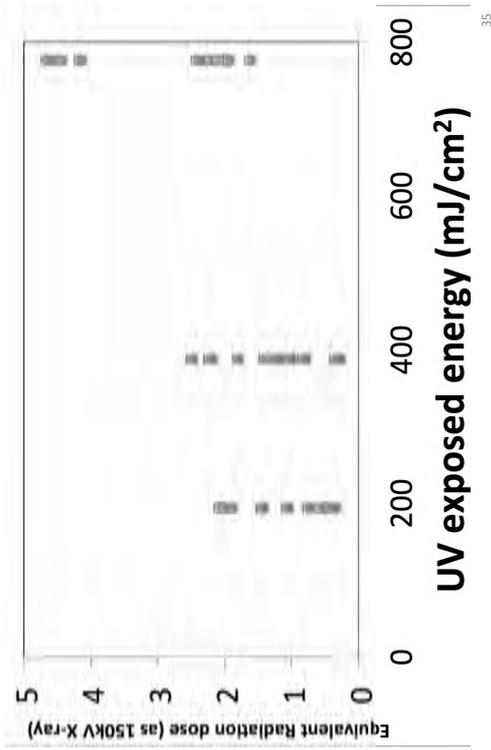
32

## 室温とSignal



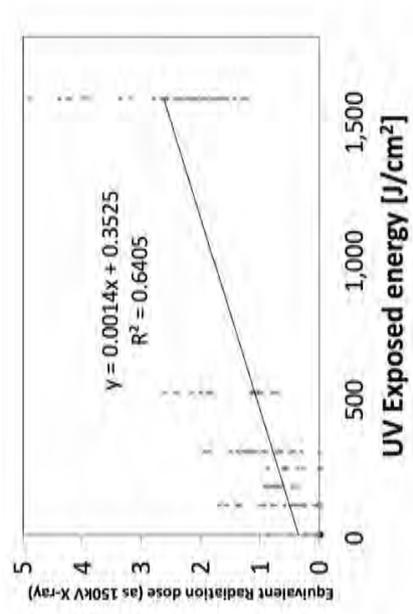
33

## UV-C



35

## UV-B



36

## 紫外線の影響

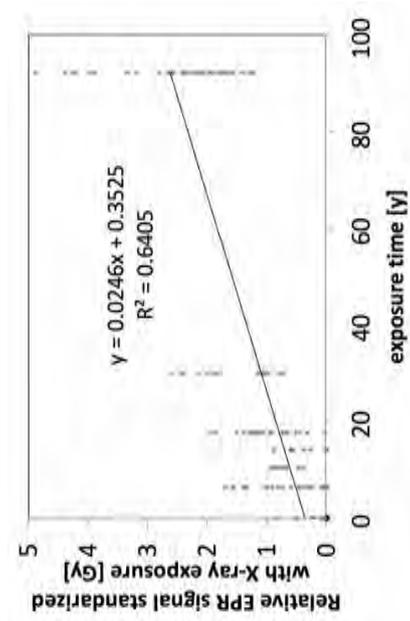
その必要性・現状・今年度の研究

X bandでは砕いた試料に  
紫外線を照射し  
信号を検出した例がある

平成29年度学術振興会特別研究員奨励費補助金  
トリアージュのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

34

## UVB



放射線影響学会 生物学的線量評価法の現状と今後の課題

37

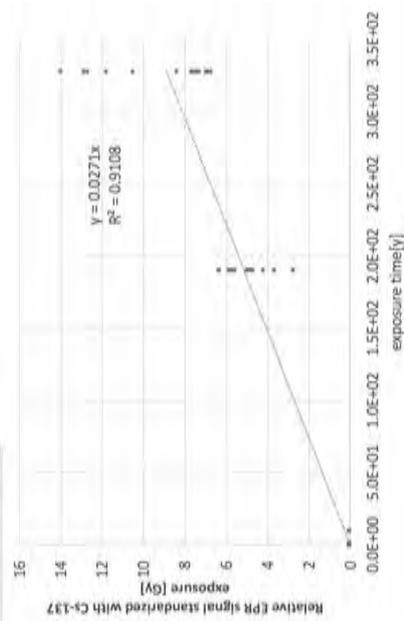
## 紫外線の影響

- 照射量とEPR信号が直線関係
- UV-Cでは、200 mJ/cm<sup>2</sup> の照射量でEPR信号が検出可能
  - おそらく太陽紫外線に含まれる量は無視できる
- UV-Bでは、夏に毎日2時間太陽紫外線を直接曝露する条件では約30年(約0.5 kJ/cm<sup>2</sup>)の照射で約2割の試料が2 Gy (150 kVでのX線照射換算)を超えた
  - トリアージへの影響は限定的だと考えられた
- UV-Aはトリアージに影響を与えるためには相当時間の照射が必要

39

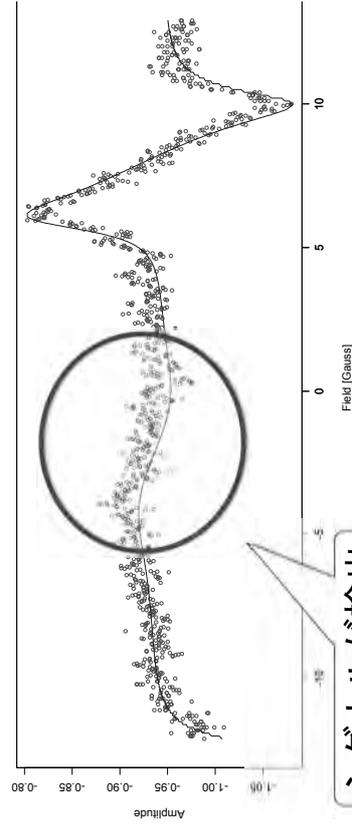
## UVA

Cs-137の照射を想定  
X線に比べると  
1/4程度の応答



38

## 地域での計測例



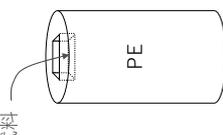
平成29年度学術振興会研究費補助会  
トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

40

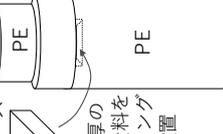


## 実験セットアップと照射線量

本実験では試料を照射ポート内に設置し、Be標的に近づけることで線量率を上げたセットアップを行った。この実験セットアップでは照射後の空間線量が低いため、通常の照射に比べて短い時間で照射室に入室できるというメリットもある。今回は以下の3条件で照射を行った。

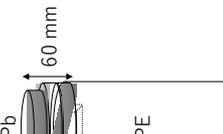


試料



Cdケース  
試料

5 mm 厚の Cd で資料をハウジングして設置



Pb  
試料

60 mm

**基準セットアップ**  
試料後方にPEのみ

$\gamma$ 線線量: 12.4 Gy/C  
今日は1.08 C照射したので  
**γ線は 13.4 Gy 照射した。**

**PE+Cdセットアップ**  
試料後方・前方にPE  
試料はCdケース内

$\gamma$ 線線量: 24.2 Gy/C  
今日は1.08 C照射したので  
**γ線は 26.2 Gy 照射した。**

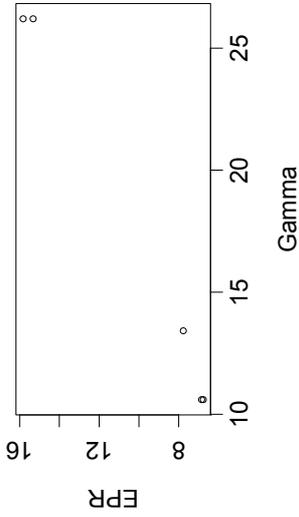
**PE+Pbセットアップ**  
試料後方にPE  
試料前方にPb

$\gamma$ 線線量: 4.90 Gy/C  
今日は2.16 C照射したので  
**γ線は 10.6 Gy 照射した。**

45

小川原亮氏作成資料

## ガンマ線の照射量とEPRの信号の関係



Coefficients:	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	0.56222	0.43203	1.301	0.284057
Gamma	0.57120	0.02291	24.930	0.000142

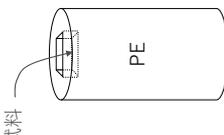
standard error: 0.3717 on 3 degrees of freedom  
Multiple R-squared: 0.9952, Adjusted R-squared: 0.9936  
F-statistic: 621.5 on 1 and 3 DF, p-value: 0.0001415

ほぼ線で説明可能

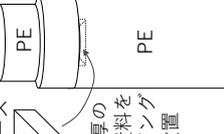
47

## CR-39による速中性子線照射量

γ線感度のないCR-39を用いて速中性子照射量を測定

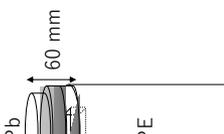


試料



Cdケース  
試料

5 mm 厚の Cd で資料をハウジングして設置



Pb  
試料

60 mm

**基準セットアップ**

エッチピット密度は  $1.05 \times 10^8 / \text{cm}^2 / \text{C}$  (相対値: 1)  
**今日は1.08 C照射したので  $1.13 \times 10^8 / \text{cm}^2$**

**PE+Cdセットアップ**

エッチピット密度は  $0.15 \times 10^7 / \text{cm}^2 / \text{C}$  (相対値: 0.143)  
**今日は1.08 C照射したので  $0.16 \times 10^8 / \text{cm}^2$**

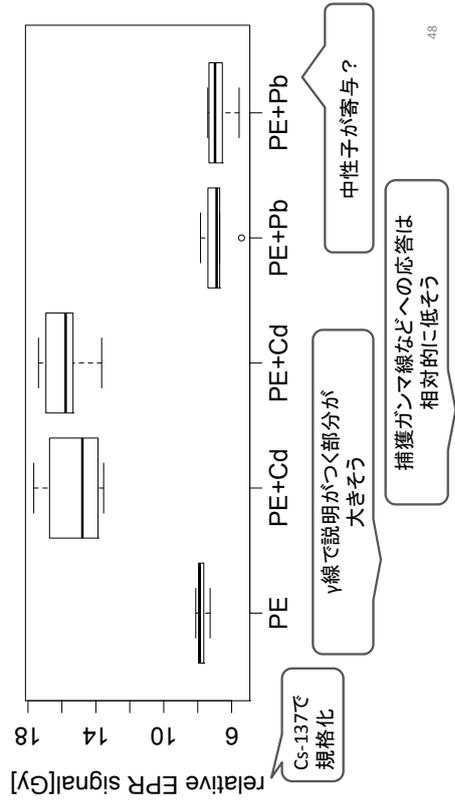
**PE+Pbセットアップ**

エッチピット密度は  $0.56 \times 10^7 / \text{cm}^2 / \text{C}$  (相対値: 0.53)  
**今日は2.16 C照射したので  $1.21 \times 10^8 / \text{cm}^2$**

46

小川原亮氏作成資料

## L band EPR tooth dosimetry



Cs-137で規格化

γ線で説明がつく部分が大きそう

捕獲ガンマ線などへの応答は相対的に低そう

中性子が寄与?

48

## まとめ

- 施設外でも計測できることを確認
- 紫外線BとCの影響を確認
  - トリアージ目的では影響は小さい
- 品質の確保・向上が課題
  - 低電磁波ノイズの移動式の測定環境が望まれる
  - ラジカル物質による汚染の対策が望まれる
    - 検出限界を小さくした場合
- 中性子応答を利用した特性把握の研究が進行中
  - 場の把握が進められている
- 陽性の信号例の積み重ねが必要
  - 放射線に曝露した方の貢献を求めています！

平成29年度労災疾病臨床研究事業費補助金  
トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

49

## 謝辞

- 研究に参加して下さってボランティアの方々に感謝申し上げます。
- 本研究は労災疾病臨床研究事業費補助金(#150803-02)により実施しています。
- 本研究では技術的な支援を株式会社キーコム社より提供頂きました。
  - また、理化学研究所 仁科加速器センター 安全業務室 田中 鍾信副室長から測定の高の向上について一般的なご示唆を頂きました。
- この研究を継続的に支援下さっているEPR Center for the Study of Viable Systems, Geisel School of Medicine at Dartmouthのハロルド・シユワルツ教授およびヒアン・ワット教授にも感謝申し上げます。
- 試料の計測は三川さんと子さんに援助頂きました。
- H25-H28に科研費(26462841)の助成を受けました。
- H26-28に米国NIHよりDart-Dose CMCR のPilot Projectとしてバンド電子スピニング装置を用いた中性子と重粒子線の極を用いた線量測定の研究の支援を受けました。
- 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HIMAC及び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。

平成29年度労災疾病臨床研究事業費補助金  
トリアージのための線量評価手法の確立に関する研究の成果発表会

50

# 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

盛武敬<sup>1)</sup>、中村麻子<sup>2)</sup>、五十嵐友紀<sup>3)</sup>、孫略<sup>4)</sup>

- 1) 産業医科大学産業生態科学研究所放射線健康医学
- 2) 茨城大学理学部
- 3) 産業医科大学産業生態科学研究所職業性中毒学
- 4) 筑波大学医学医療系

## 大規模放射線災害における被ばく線量の推定

### 被ばく線量の推定(線量評価)の目的:

- 治療計画の立案と予後の予測
- 緊急医療措置のための患者の振り分け(トリアージ)
- 被ばくしていない者への不安解消

### 既存の被ばく線量推定の方法:

- 物理的手法による推定・・・個人線量計、ホールボディカウンター、電子スピン共鳴など
- 臨床症状からの推定・・・嘔吐、下痢、発熱、皮膚障害、意識障害など
- 生物学的手法による推定・・・血算、染色体分析、YH2AX分析など



現在求められていること:

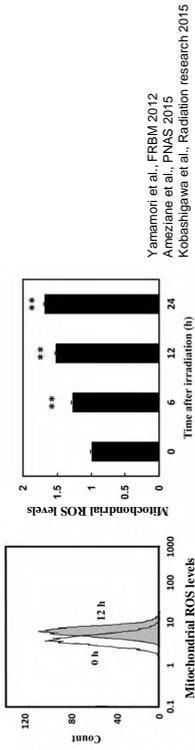
◇ 既存の推定法の弱点を補完し、(現状)実現可能な被ばく線量推定法の開発

我々の基本コンセプト:

◇ 様々な被ばく形態、個人差、環境要因を想定し、複数の指標の組合せによる推定

## 放射線と酸化ストレス

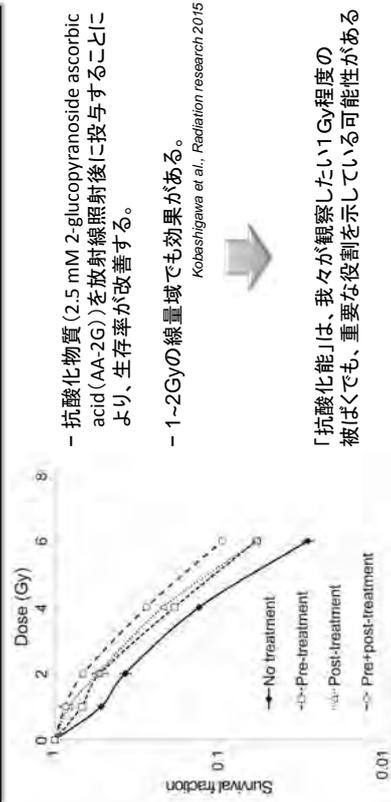
培養細胞に放射線を照射すると、数時間～数日後にわたって、ミトコンドリアからのROS産生が増加し、細胞が酸化ストレス状態に落ち入る。



- ミトコンドリアの形態学的変化、NADPH oxidaseの減少などが原因とされている。

- 照射線量が高い(おおむね6~8Gy以上)。
- 生体レベルでの研究は十分に行われていない。
- 測定誤差が大きい。

## 放射線と酸化ストレス



- 抗酸化物質(2.5 mM 2-glucopyranoside ascorbic acid(AA-2G))を放射線照射後に投与することにより、生存率が改善する。
- 1~2Gyの線量域でも効果がある。

Kobashigawa et al., Radiation research 2015



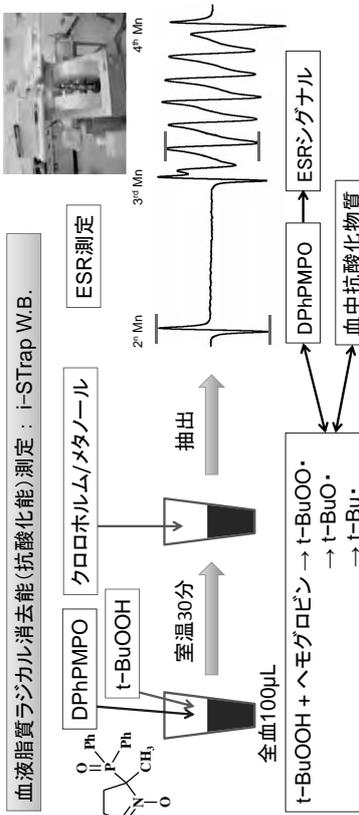
「抗酸化能」は、我々が観察したい1Gy程度の被ばくでも、重要な役割を示している可能性がある

### 研究の目的

- ◇ 被ばく後の生体(マウス)の「抗酸化能」の挙動を明らかにする。
- ◇ 放射線災害時の被ばく線量や健康被害推定の指標としての有用性を評価する。

## 血液抗酸化能測定法

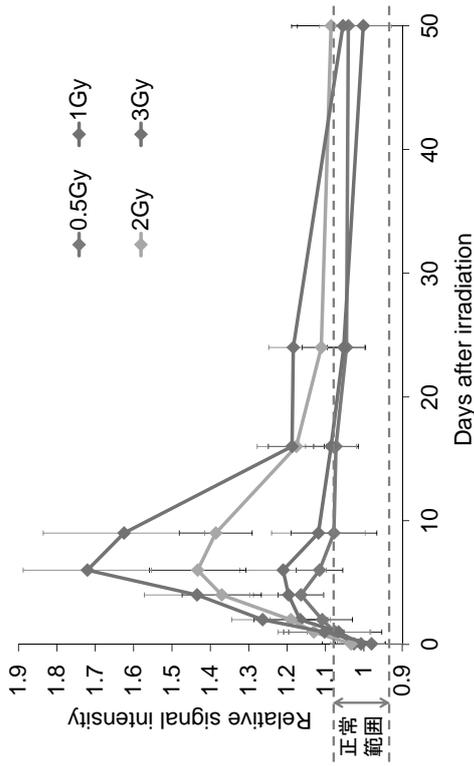
血液脂質ラジカル消去能(抗酸化能)測定: i-STrap W.B.



### 【ここがポイント】

- 測定原理はESRのスピンラップ法の1種。
- 新規スピンラップ剤DPhPMPOを使用することで、感度が5倍、安定性が3倍増加。
- 血液(全血)の抗酸化能が測定できる世界唯一の測定法。
- サンプル量は全血100µL(血液4滴)、で低侵襲。
- 全行程全自動化可能。

## 結果①:被ばくマウス血液抗酸化能の経時変化



縦軸:相対シグナル強度(Signal/Mn)・・・高いほど抗酸化能が低い

## マウス実験スキーム・その他実験項目

### 【マウス実験】

マウス: C57BL/6J ♂ 7週齢

照射線量: 0, 0.5, 1, 2, 3 Gy

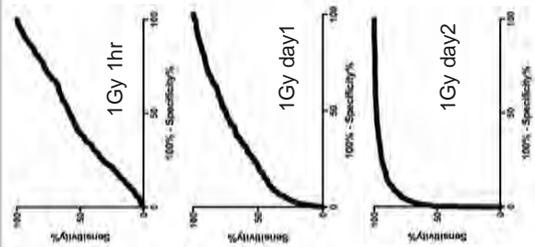
搬入 照射 採血&抗酸化能測定

day -10 day 0 採血のタイミング: 直後, day 1, 2, 4, 6, 9, 16, 24, 50

### 【その他実験】【発表時間の都合上一部のみ紹介】

- i-STrapの特徴に関する解析:
  - 血液濃度がシグナル強度に与える影響
  - 血液成分がシグナル強度に与える影響
  - 再現性・安定性に関する検討
- その他因子が血液抗酸化能に与える影響の解析:
  - 強制水泳ストレス
  - 抗酸化物質(ビタミンC, NAC, トロロックス)投与
  - 老化

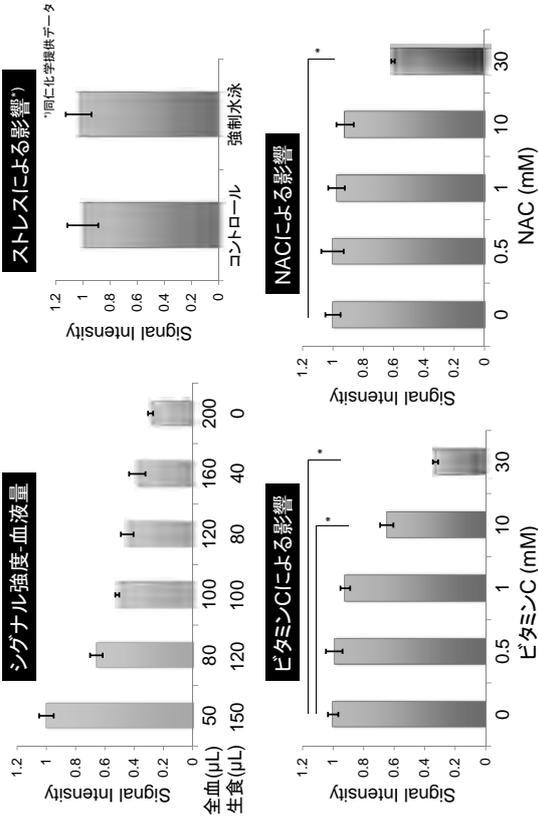
## ROC解析



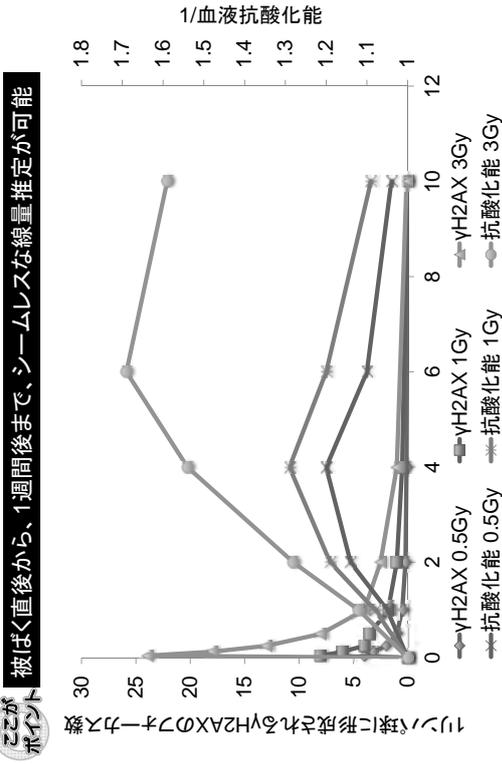
AUC (vs 0Gy)	0.5Gy	1Gy	2Gy	3Gy
1hr	0.617	0.537	0.690	0.532
day1	0.736	0.747	0.890	0.761
day2	0.849	0.945	0.946	0.993
day4	0.968	0.950	0.999	0.998
day6	0.896	0.948	0.998	1.000
day9	0.736	0.796	1.000	0.997
day16	0.808	0.829	0.969	0.959
day24	0.718	0.728	0.914	0.977
day50	0.600	0.521	0.795	0.742
EPR <sup>*)</sup>			0.997	
Dicentric <sup>*)</sup>			0.998	
qPCR <sup>*)</sup>			0.991	

<sup>\*)</sup>Radiation Protection Dosimetry (2016), Vol. 172, No. 1-3, pp. 145-151

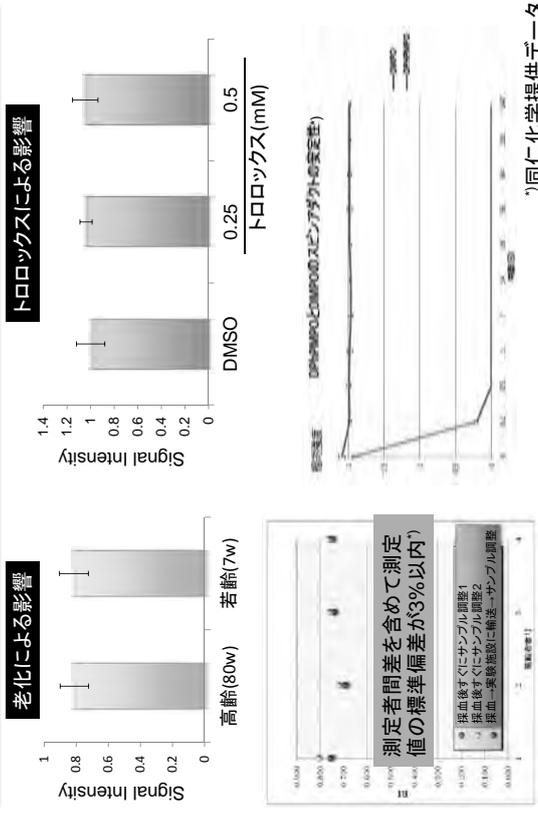
## 交絡因子の検討1



## YH2AX-血液抗酸化能 組み合わせによる線量推定



## 交絡因子の検討2



## 結語・謝辞

- 被ばく線量依存的に血液抗酸化能が低下する現象を見出した。(論文投稿中)
- i-STRap法、またはその他のレドックス測定法は、大規模放射線災害発生(被ばく後、2日~1週間程度)における線量推定手法として有用である可能性を示した。(十分な精度・感度を持ち、現在のところ測定結果に影響する交絡因子はない)
- YH2AXと血液抗酸化能測定を組み合わせることで、被ばく直後から、1週間後まで、シームレスな線量推定が可能となることを示した。(特許出願中)
- 被ばくによって血液抗酸化能が低下するメカニズムはわからないナウ。
- 想像もつかないナウ。
- 本研究は労災疾病臨床研究事業費補助金により多施設共同研究として実施しました。以下の先生方に感謝申し上げます。
  - 佐藤久美子(産業医科大学)
  - 千田浩一(東北大学)
  - 稲葉洋平(東北大学)
  - 児成智美(産業医科大学)
  - 佐藤圭創(九州保健福祉大学)
  - 平山暁(筑波技術大学)
  - 株式会社同仁グローバル(技術指導)
  - 株式会社同仁化学(技術指導)

## ということで、続きの研究やります！

環境省平成30年度放射線健康管理・健康不安対策事業（放射線の健康影響に係る研究調査事業）に採択されました  
課題名：大規模放射線災害に対応できる複数の生物学的指標を組み合わせた線量推定システムの技術基盤構築

### 【研究体制】

- ・ 主任研究者：盛武 敬（産業医科大学）  
血液酸化能を指標とした生物学的線量推定手法の確立
- ・ 分担研究者：志村 勉（国立保健医療科学院）  
新たな生物学的評価法の指標としてのミトコンドリア損傷の検討
- ・ 分担研究者：中村麻子（茨城大学）  
DNA損傷レベルおよびマイクロメア長測定による放射線被ばく線量評価

## 産業医科大学の仲間達

五十嵐 友紀 講師



Mahesh Bekal 特任助教

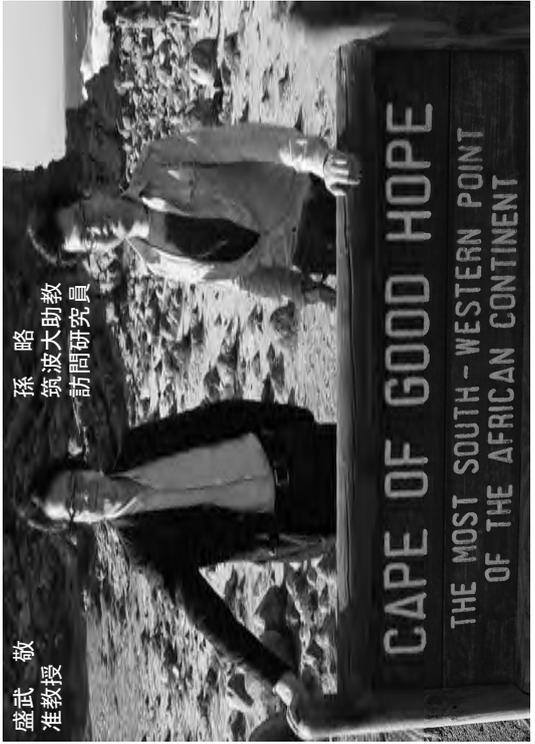


疑似低線量被ばく場としての医療被ばく研究  
IVR被ばくの影響解析と防護法の開発

マウスを用いた低線量被ばくによる高次機能  
への影響(不安)解析と防護法の開発

## 産業医科大学の仲間達

盛武 敬  
准教授

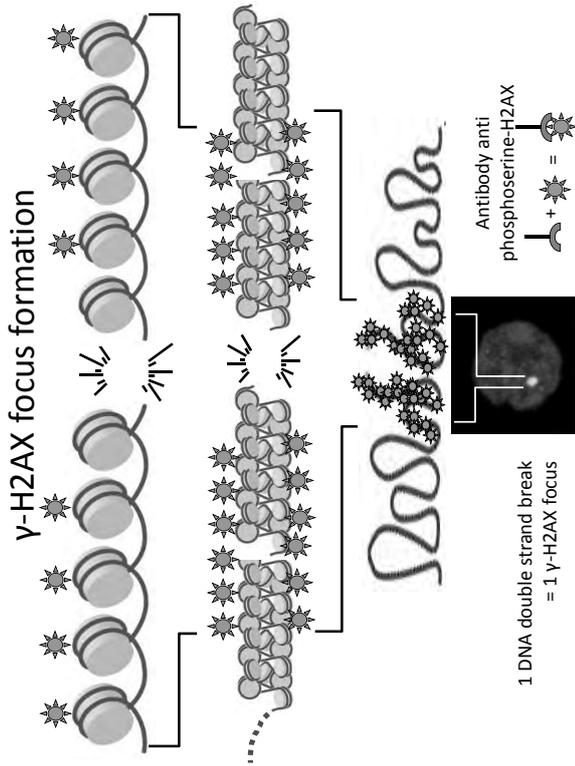
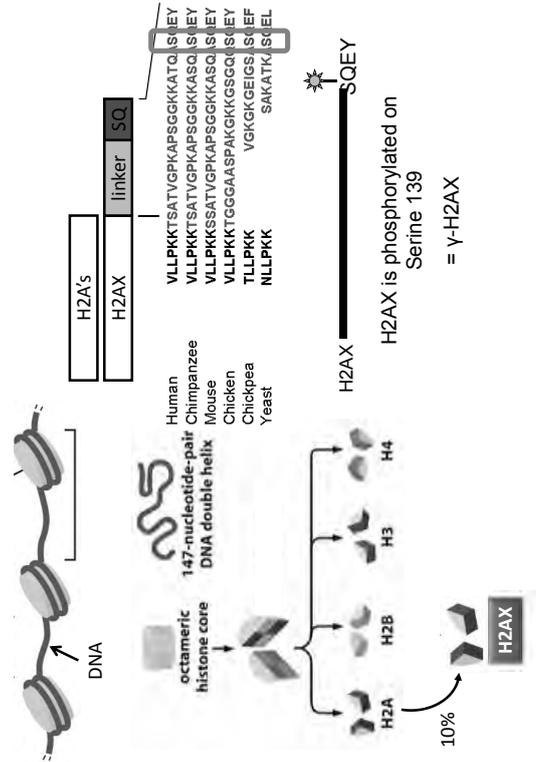


孫 略  
筑波大助教  
訪問研究員

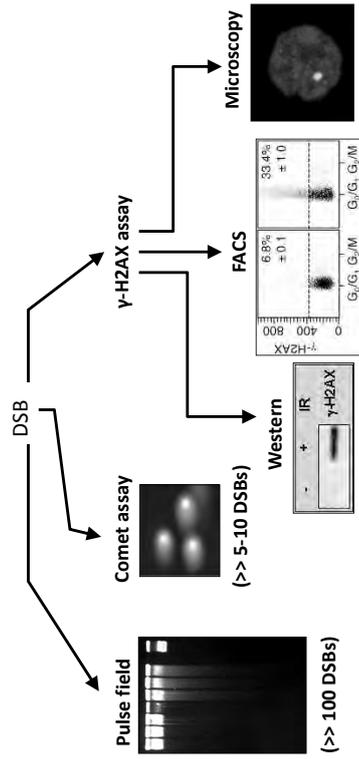
## リン酸化ヒストンH2AX(γ-H2AX)を用いた 生体内DNA損傷レベルの測定による 線量評価

中村麻子 (茨城大学・理学部)

### H2AXとγ-H2AX

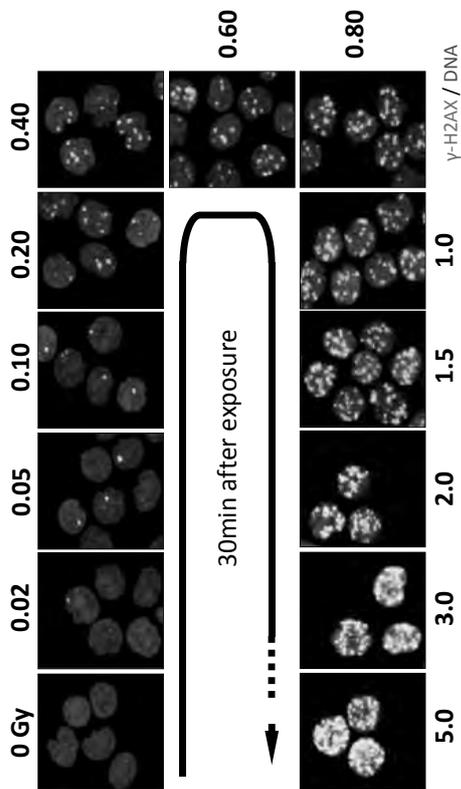


### Detection of DSBs



γ-H2AX assayはDSBを検出・定量することのできる  
もっとも感度の高い方法である

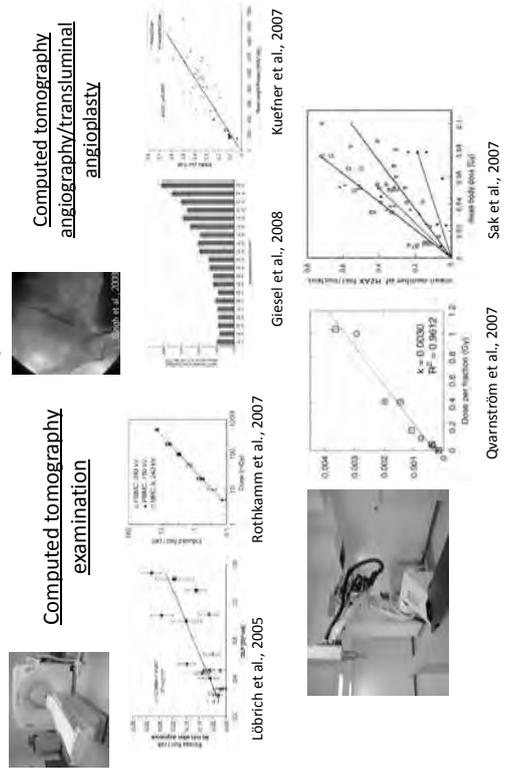
## DNA DSB induction after radiation exposure



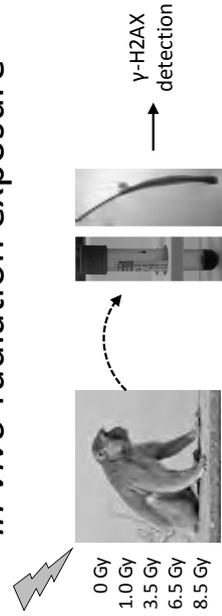
1)放射線被ばく線量評価としてのγ-H2AX  
アッセイ

2)迅速なDNA損傷レベルのモニタリングを  
可能とするデバイスの開発

## γ-H2AX detection in human PBMC after IR exposure



## γ-H2AX detection in macaque after *in vivo* radiation exposure



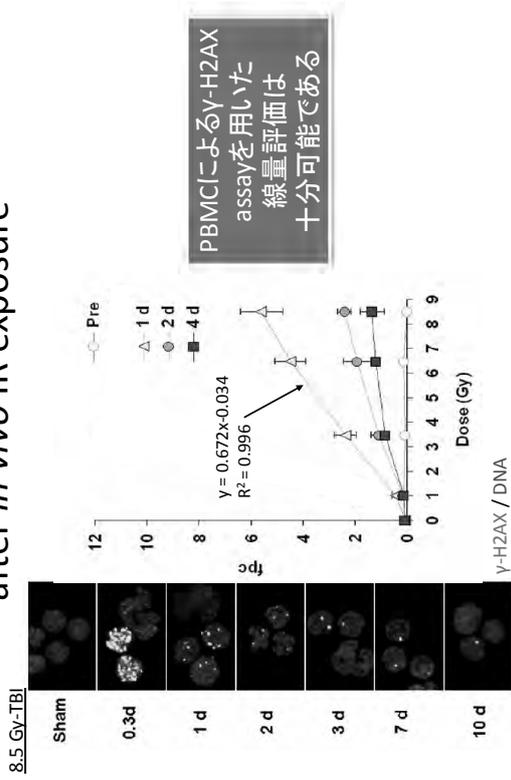
OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

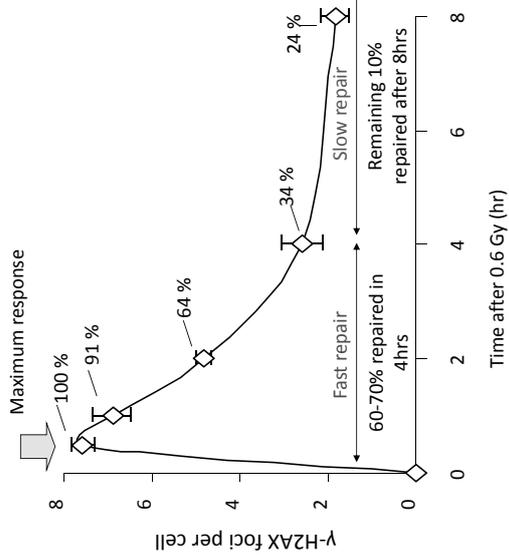
The Use of Gamma-H2AX as a Biosimeter for Total-  
Body Radiation Exposure in Non-Human Primates

Christophe E. Redon<sup>1\*</sup>, Asako J. Nakamura<sup>1</sup>, Ksenia Gouliava<sup>1</sup>, Arifur Rahman<sup>2</sup>, William F. Blakely<sup>2</sup>,  
William M. Bonner<sup>1</sup>

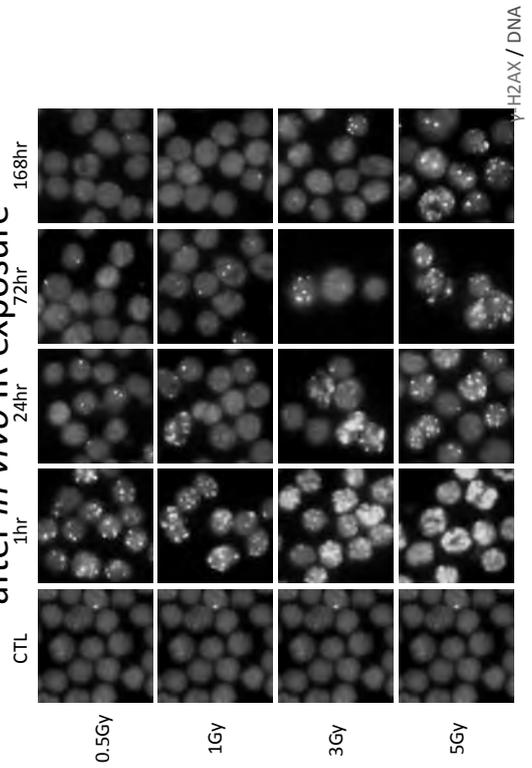
## γ-H2AX detection in macaque PBMC after *in vivo* IR exposure



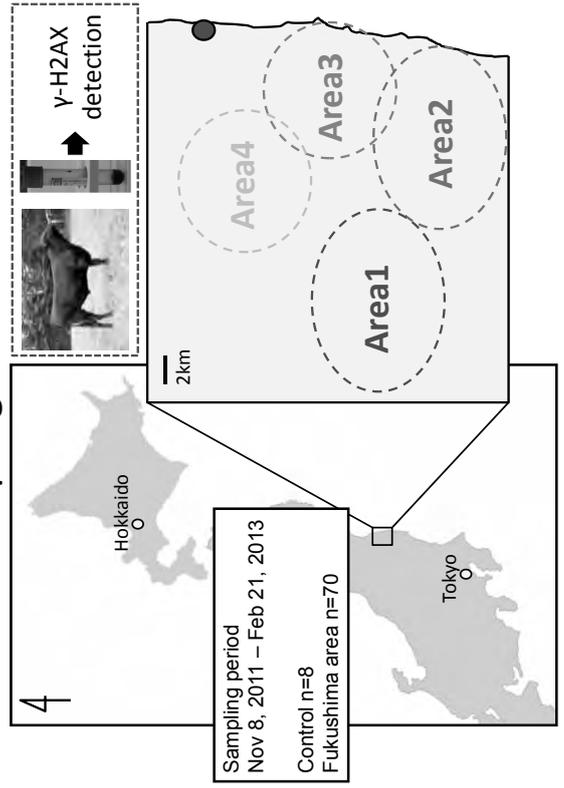
## DNA damage repair kinetics



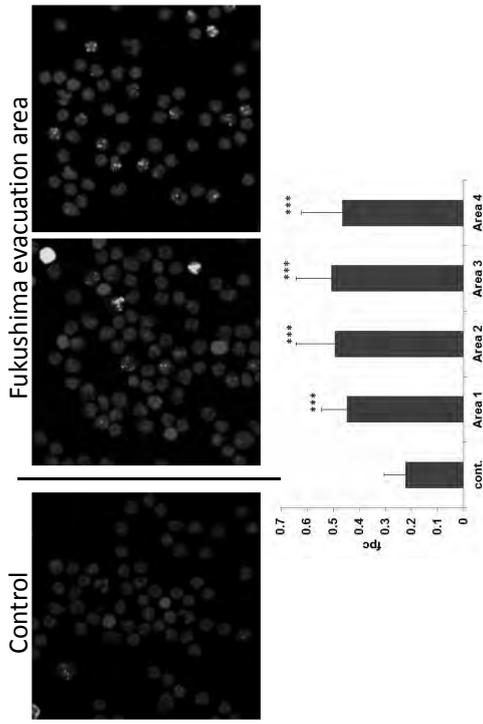
## γ-H2AX detection in mouse PBMC after *in vivo* IR exposure



## Sampling location



## γ-H2AX detection in bovine PBMC from Fukushima evacuation area



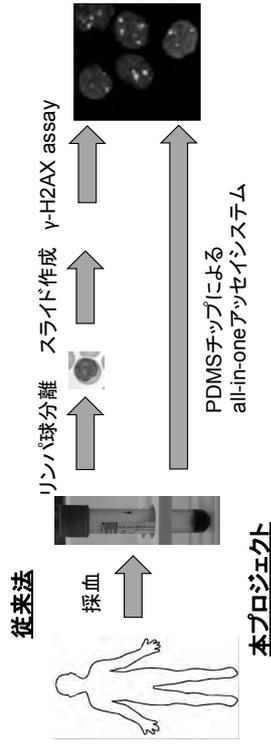
本事業が目的とする緊急被ばく医療が必要とされるような事故発生時に、被ばく者の放射線線量評価、放射線被ばく管理のために、将来的に何を目指していくか。



迅速かつ簡便にγ-H2AX assayを行うことのできるシステムの開発

## バイオマーカー検出のためのマイクロデバイスの開発

ヒト血液サンプルを用いたγ-H2AXアッセイによるDNA損傷モニタリングの概略



## まとめ

### 1) 放射線被ばく線量評価としてのγ-H2AXアッセイの精度向上

- ↑ γ-H2AXアッセイによる放射線被ばく線量評価が可能な線量域・時間域の明確化
- ↑ トリアージのための“バイオマーカーパネル”の提言

### 2) 迅速なDNA損傷レベルのモニタリングを可能とするデバイスの開発

- ↑ 血液サンプルの分離・固定については課題がある
- ↑ 放射線線量依存的なγ-H2AXの検出が可能である (0.5-1Gy以上の被ばくを評価するトリアージとしての有用性)
- ↑ 微量サンプルかつ低コストでの解析が可能である

次ステップ: 実装化に向けた具体的開発

# 細胞遺伝学的線量評価法

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  
数藤由美子

# 急性放射線症 治療の基本方針

(Gy)	1-2	2-4	4-6	6-8	>8
治療	入院、経過観察	速やか(1W以内)にG-CSF かGM-CSF投与開始	入院、速やかに無菌室へ	GM-CSF/G-CSF +EPO+TPO	
		広域スペクトル抗生物質(潜伏期が終わる頃)、抗 真菌剤・抗ウイルス剤(必要に応じ)、SDD (Selective Digestive Decontamination)(6Gy ↑)			
		成分輸血: 血小板、赤血球(必要に応じて)			
		レゲルタミン、エレメンタリーダイエイト投 与、完全経静脈栄養、電解質補正			
		血漿交換(必要に応じ第2または3週～) DICの予防(必要に応じ第2週～)			
					骨髄幹細胞移植(第1週)

# 急性放射線症: 被ばく線量と症状

- ◆ 放射線は目に見えない
- ◆ 症状がでるまでに時間がかかる
- ◆ 被ばく線量と症状に関連がある
- ◆ 放射線被ばくや汚染の測定が可能

血管神経障害

消化管障害

血液・骨髄障害

臨床症状  
なし

低

線量

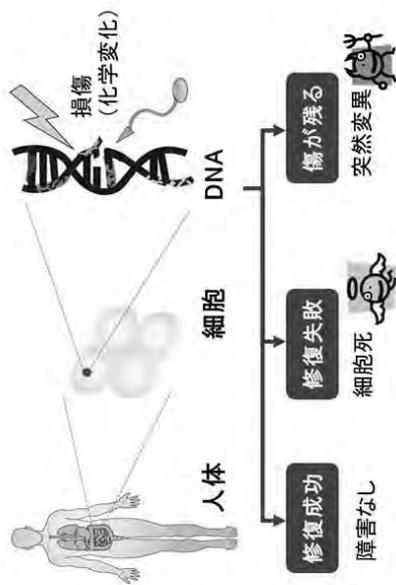
高

# 線量評価とは

- 放射線被ばく事故等の被災者(被ばく者)が、  
どれくらい放射線をあびたかを推定すること。
- 事故発生初期における目的は、
  - 治療計画の立案と予後の予測
  - 緊急医療処置のための患者の振り分け

◇ 物理学的線量推定、生物学的線量推定、臨床症状からの推定  
→ 事故発生後、状況に応じて最大限の情報を得て診断する。

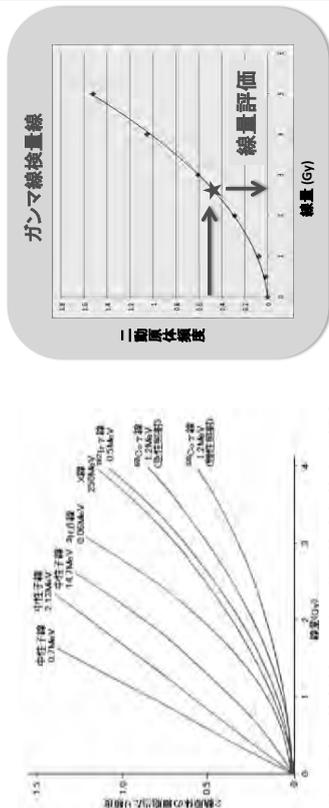
## DNAの損傷と修復・細胞死



放医研e-learningより ([http://www.nirs.go.jp/publication/rs-sci/e\\_learning/index.html](http://www.nirs.go.jp/publication/rs-sci/e_learning/index.html))

## 放射線被ばくによって生じる染色体異常の特徴

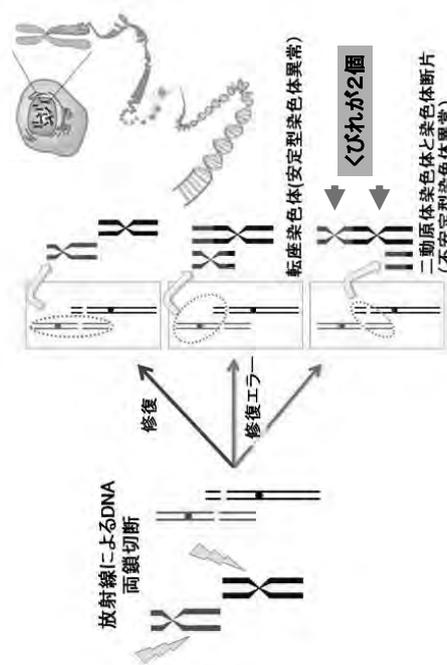
- ③ 染色体異常の頻度と被ばく線量には数理的な関係がある。  
→ あらかじめ細胞の in vitro 照射実験で検量線(線量効果曲線)を作製しておけば、被ばく患者や医療被ばく・職業被ばくを受けた人の線量評価ができる。



線量の異なる放射線による二動原体染色体出現頻度

(R. I. Dufraïn et al, 1980 を改変)  
→ [http://www.nirs.or.jp/atomatica/data/dst\\_detail.php?Title\\_Key=09-02-06-01](http://www.nirs.or.jp/atomatica/data/dst_detail.php?Title_Key=09-02-06-01)

## 放射線被ばくによる染色体異常の形成

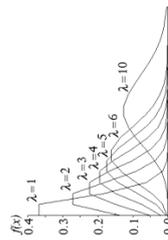


放医研e-learningより ([http://www.nirs.go.jp/publication/rs-sci/e\\_learning/index.html](http://www.nirs.go.jp/publication/rs-sci/e_learning/index.html))

## 放射線被ばくによって生じる染色体異常の特徴

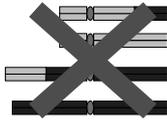
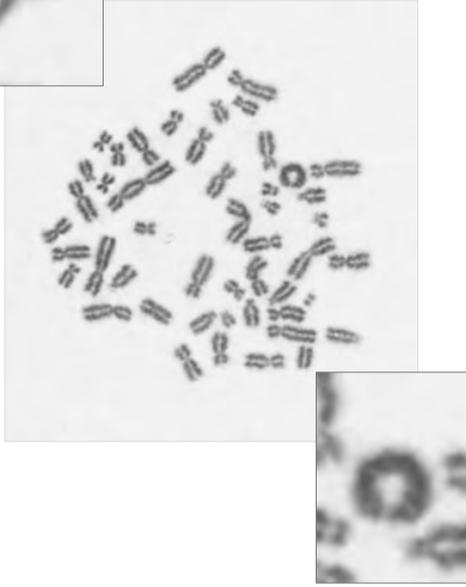
- ① 同じ異常核型の細胞の頻度は低い
- ② ポワソン分布を示す
- ③ 多数の細胞観察を要する

$$f(x) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^x}{x!}$$



→ 顕微鏡で検出するのは両集団由来の細胞 (ポワソン分布から逸脱してみえる)  
\* Dispersion index または u-value で確認  
\* 被ばくした部位の体積(率) および 局所的被ばく線量 を計算する

## 二動原体分析 (ギムザ染色法)



## ガンマ線の被曝線 (線量効果曲線)

$$Y = (0.00015 \pm 0.00017) + (0.0302 \pm 0.0044) \times D + (0.0588 \pm 0.0028) \times D^2$$



\* < 300 mGy (95% UCL)  
→ 急性放射線症候群発症の  
下限 (1 Gy) 以下

\* 急性放射線症候群発症者なし  
という結果と一致

Fig. 6	Fig. 7	Fig. 8	Fig. 9	Fig. 10	Fig. 11	Fig. 12
unknown	1,004	2	0.00199	55	3	174

\*Detailed data and information of the alarm personal dosimeter (APD) record of each worker will be published elsewhere.  
\*The number of chromosomes minus one in a multi-centric chromosome equals dicentric equivalent count.  
\*Lower confidence limit.

## 東電福島第一原発事故



Y. Suto et al. Health Physics 105(4): 366-373, 2013.

## 二動原体分析の自動化

- (1) すでに臨床細胞遺伝学の分野では、細胞分離・培養・染色体標本作製の自動化がなされており、臨床検査会社等では使用されている。
- (2) 画像解析の自動化も2000年頃から発達している。
- (3) ただし生物学的線量評価に適した画像解析ソフトウェアについては開発段階にある。

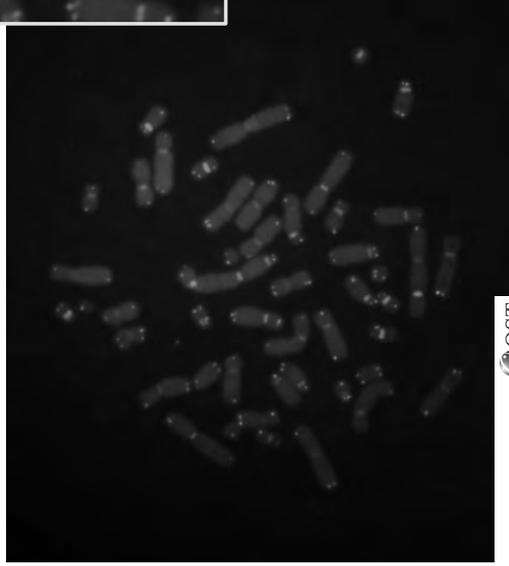
## Automation of chromosome image analysis - metaphase detection (and dicentric scoring) -



## PNA-FISH

(peptide nucleic acid probes for centromeric and telomeric sequences)

*Cytologia* 77: 261-267, 2012.  
*Cytologia* 76: 1-2, 2010.



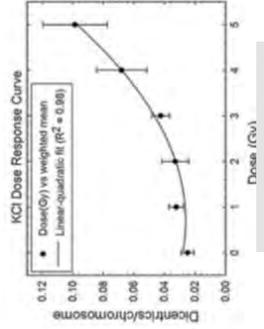
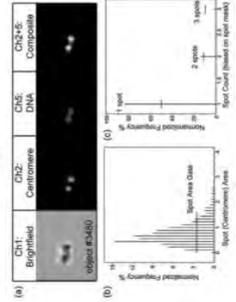
## Imaging Flow Cytometry (FCM)

生物学的線量評価での使用例: ImageStream<sup>x</sup> (IS<sup>x</sup>) Mark II (MilliporeSigma)

Time Delay Integration CCD を用いた蛍光検出機構により、感度と分解能を高く保ち、検出部を通過する細胞画像も同時に取得できる次世代型フローサイトメーター。(総説: R. C. Wilkins et al., 2017)



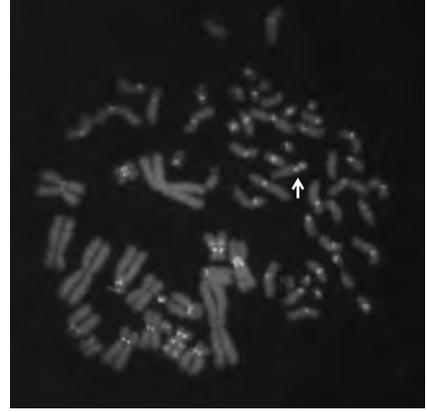
二動原体分析、CBMIN解析、 $\gamma$ H2AX解析などへの応用が開発されつつある。



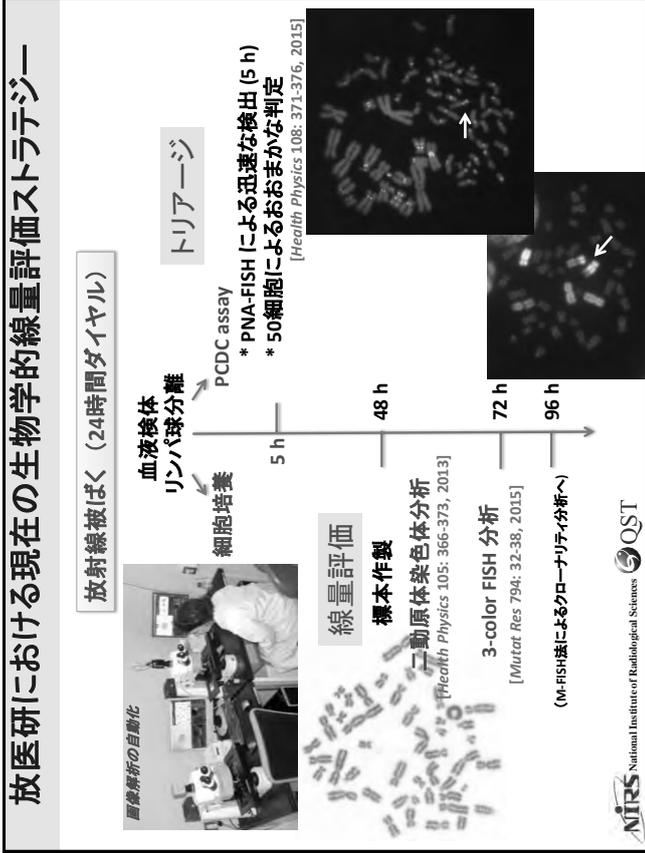
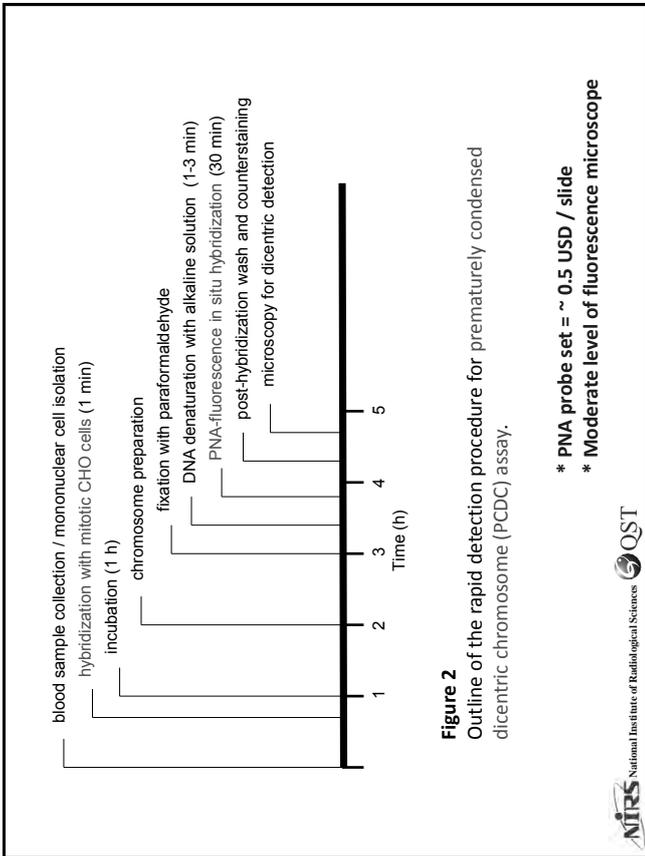
L. A. Beaton et al., 2013

## PNA-FISHによる染色体異常の検出

*Cytologia* 78: 97-103, 2013.  
*Health Physics* 108: 371-376, 2015.



細胞融合によるPCC法  
(premature chromosome condensation)



**3-color FISH**

(Y. Suto et al., 2016)

- \* The DNA amount of chromosomes 1, 2, and 4 comprises about 23% of the whole genome.
- \* The 3-color FISH detects about 39% of the total exchanges.
- \* Dic (DAPI-staining) = Dic (Giemsa-staining)

Chr 1: Texas Red  
Chr 2: FITC  
Chr 4: mix

No detectable aberrations

Translocation

NIRS National Institute of Radiological Sciences QST

国際原子力機関 (IAEA)

国際標準化機構 (ISO)

国際標準化機構 (ISO)

国際原子力機関 (IAEA)

Cytogenetic Dosimetry: Applications in and Preresponse to Radiation Emergencies

INTERNATIONAL STANDARD ISO 19238  
Radiation protection. Performance criteria for cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay for mass casualty

INTERNATIONAL STANDARD ISO 21243  
Radiation protection. Performance criteria for dicentric chromosome assay (DCA) for mass casualty

INTERNATIONAL STANDARD ISO DIS 20046  
Radiation protection. Performance criteria for FISH translocation assay

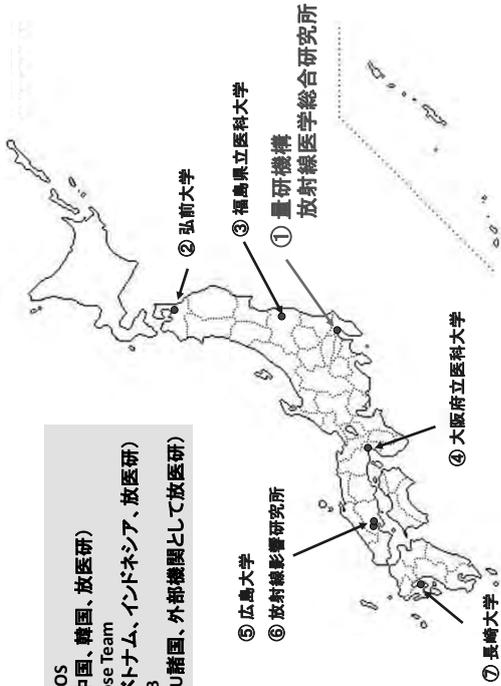
染色体分析による線量評価  
国際標準プロトコール

ISO 17099: Cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay  
ISO 19238: Dicentric Chromosome Assay (DCA)  
ISO 21243: DCA for mass casualty  
(ISO DIS 20046: FISH translocation assay)

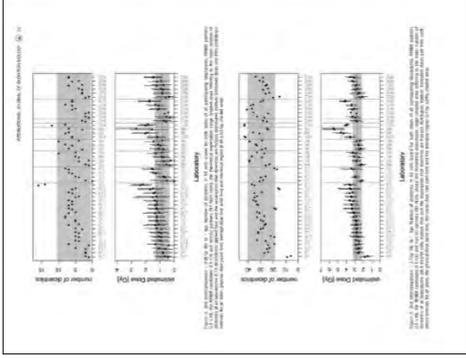
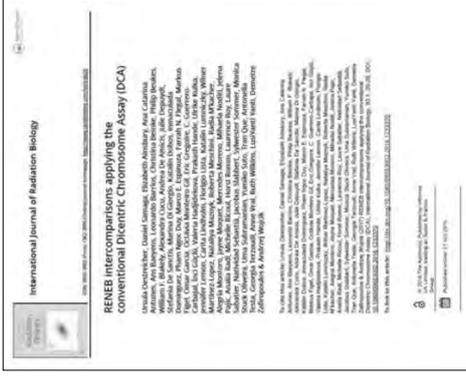
NIRS National Institute of Radiological Sciences QST

## 線量評価のための国内染色体ネットワーク

ARADOS  
(中国、韓国、放医研)  
BioDose Team  
(ベトナム、インドネシア、放医研)  
RENEB  
(EU諸国、外部機関として放医研)

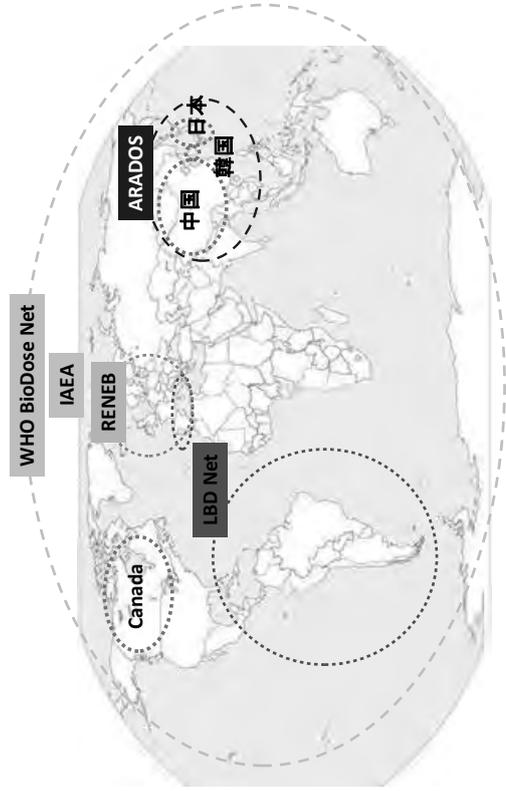


## The 2nd Intercomparison Study



EU ... 23ラボ(17カ国)  
非EU... 19ラボ(16カ国)

## Biodosimetry Networks



## 研究協力／謝辞

放射線医学総合研究所 生物線量評価研究チーム  
緊急被ばく医療支援チーム

東京大学名誉教授 平井百樹先生  
京都大学名誉教授 佐々木正夫先生  
国立保健医療科学院 金谷泰宏先生  
統計数理研究所 間野修平先生  
北海道大学 長田直樹先生  
医薬基盤・健康・栄養研究所 坂手龍一先生  
防衛大学校 高田真志先生  
世界保健機関(WHO), BioDose Net  
国際標準化機構(ISO), Working Group 18 (Biodosimetry)  
Asian Radiation Dosimetry Group (ARADOS)

ほか

<http://www.nirs.qst.go.jp/ENG/core/rmd/05.html>