

## 放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和3年度年次報告書（詳細版）

研究課題名	複数の生物学的指標を組み合わせた長期放射線影響の予測と社会実装に向けた取り組み
研究期間	令和3年4月1日～令和4年2月28日

	氏名	所属機関・職名
主任研究者	盛武敬	量子科学技術研究開発機構・首席研究員
分担研究者	中村麻子	茨城大学・教授

	氏名	所属機関・職名
研究協力者	志村勉	国立保健医療科学院生活環境研究部・上席主任研究官
研究協力者	千田浩一	東北大学・教授
研究協力者	鈴木正敏	東北大学・講師
研究協力者	稲葉洋平	東北大学・助教
研究協力者	孫略	産業技術総合研究所・研究員
研究協力者	鈴木孝明	群馬大学・教授

研究要旨	<p>大規模放射線災害の発生時には、生物学的指標による線量推定（バイオドシメトリ）が不可欠である。対策の頑強性を保ち、線量推定結果への信頼性を高めるため、複数の手法を組み合わせた線量推定システムを確立する必要がある。今年度は、血液抗酸化能・リンパ球 DNA 損傷・リンパ球ミトコンドリア損傷・リンパ球 Nrf2 発現の 4 指標組み合わせが、各指標単独よりも精度良く被ばく線量を推定することを明らかにした。同時にその実用化に向け、微量なヒト血液サンプルの DNA 損傷測定を現場で迅速かつ簡便に行うための新規マイクロ流路チップと、チップへの送液を全自動で行うための送液モジュールを開発した。一方、マウス実験により、被ばく後の血液および眼球の長期的な炎症反応と抗酸化能の変化を解析し、血液と眼球とでは抗酸化能に関する応答が若干異なることを明らかにした。広島長崎の原爆被爆者で観察されたような長期的な炎症反応は、マウスでは観察できなかった。</p>
キーワード	晩期障害、バイオドシメトリ、レドックス、ミトコンドリア、DNA 損傷、テロメア

## I 研究目的

原子力発電所の事故や原爆投下などの予期せぬ放射線災害では、放射線作業従事者や不特定多数の市民が被ばくし、その生命や健康が脅かされる。放射線災害発生時の初期対応において、対象者の被ばく線量を推定することは非常に重要である。1 Gy 以上の被ばくの場合、被ばく線量情報はトリアージ（患者の重症度に基づく医療・治療の優先度の決定および選別）の基準となり、医師が治療計画を立てるうえで必要となる<sup>1</sup>。また、対象者において数週間から数ヶ月後に起こる可能性がある健康被害を医師が把握（予測）するのにも役立つ。1 Gy 以下の被ばく（治療が必要とされるレベル）の場合には、医師が被ばく者に対して放射線晩期障害（がん、白内障など）を発症するリスクについてカウンセリングする際に被ばく線量情報が必要となる。被ばく線量が 50 mGy 未満ならば、対象者に大きな安心感を与えられる可能性がある<sup>2</sup>。

放射線作業従事者は日頃から線量計を装着しているものの、一般的なガラス線量計にはビルドアップ特性があるため、70 度で 30 分程度のプレヒートを行うか室温で 24 時間静置しないと正しい結果が得られず、被ばく線量情報を得るまでに時間がかかる。一般市民に至っては、そもそも線量計を所持していない。また、放射線災害では全身急性被ばく、全身慢性被ばく、局所急性被ばくといった様々な被ばくパターンがあり、同一被ばく線量であっても異なる生物学的影響が想定される。そのため、事後に被ばく線量を推定できる「生物学的指標を用いた簡便かつ迅速な線量推定（バイオドシメトリ）」が必要となる<sup>3</sup>。

バイオドシメトリには、細胞遺伝学的な手法、DNA 損傷を検査する手法、タンパク質や RNA の発現変化を指標とする方法、歯のエナメル質に形成される有機ラジカルを電子スピン共鳴 (ESR) によって測定する方法などがあり、いずれも研究開発段階または部分的実用段階にある。これらの一部の手法は、過去の被ばく事故（東海村 JCO 臨界事故、チョルノービリ原子力発電所事故、ゴリアニア被曝事故、サン・サルバドルコバルト 60 照射施設の放射線被曝事故）における線量推定に使用され、治療法の立案や予後の予測に役立ったとされている<sup>4</sup>。現在のゴールドスタンダードは細胞遺伝学的手法（循環リンパ中の染色体異常の数を調べる方法）で、国際基準も設定されている（ISO19238、International Atomic Energy Association Technical Report Series No. 405 (IT405)）。国際標準規格とされているのは ISO19238 の方で、18,216 円（税込）で購入する必要がある。一方、無料で閲覧できる IT405<sup>2</sup>には、二動原体を指標とした解析法、転座を指標とした解析法、未成熟染色体凝集法、小核アッセイ法の 4 つが記載されており、これらの検出限界は 0.3~0.5 Gy 程度とされている。二動原体の場合、目視による解析が必要で、それには熟練者でも 1 検体あたり 30 時間は必要となる<sup>5</sup>。また、二動原体の解析、転座の解析、小核アッセイ法には細胞培養が必要で、それには 48 時間かかる。細胞培養を必要としない未成熟染色体凝集法は 4 手法の中で最も早く結果が得られるが、それでも 6 時間程度は必要となる<sup>5</sup>。つまり現状では、災害現場（付近）で短時間に多数の被ばく者を対象として実施できるバイオドシメトリは存在しない。各指標の長所・短所・交絡因子を考慮して複数の指標によって検査することで、対策の頑強性を保ちつつ線量推定結果への信頼性を高める必要がある。

米国では、原子爆弾等による被害を想定し、6 日間で 100 万人に対してバイオドシメトリが実施できる能力を有することを目標としている<sup>6</sup>。本邦では、管見の限りそのような数値目標は設定されていないが、福島第一原発事故を教訓に原子力災害対策指針が制定され（平成 24 年 10 月）、重点的に対策すべき地域として原発から 5 km 圏内を「確定的影響を回避する PAZ：予防的防護措

置を準備する区域」、30 km 圏内を「確率的影響のリスクを最小限に抑える UPZ：緊急防護措置を準備する区域」と定めた。これにより、国の防災基本計画（原子力災害対策編）において、当該地域を含む地方公共団体は UPZ 外への広域避難計画を策定した。PAZ、UPZ 内の人口が最多なのは東海第二原発で、PAZ 内が約 8 万人、UPZ 内が約 90 万人である<sup>7</sup>。放出される放射性物質の量も関係するので、バイオドシメトリ実施に関する数値目標（発生後 XX 時間以内に XX 例の検査を実施するなど）を一概に述べることはできないが、災害現場で低侵襲かつ迅速に実施できるバイオドシメトリは絶対に必要であると考え。我々は、測定誤差、環境誤差、個人差、被ばく後の時間経過等を加味した堅牢なバイオドシメトリを行うために、複数の指標を組み合わせることが必要であると考えている。

酸化ストレス（活性酸素の増加）は様々な病気の一因となっている。放射線を照射した培養細胞では、ミトコンドリアでの活性酸素産生の増加が細胞死や細胞老化の一因となっていることが報告されている<sup>8-10</sup>。また、慢性的な放射線被ばくを受ける医療従事者、福島第一原発事故で被災した牛、チョルノービリ原発付近の高線量地域に生息する松の木に関する調査でも、酸化ストレス関連指標が増加しているとの報告がある（ちなみに、このような慢性被ばくでは活性酸素を打ち消す抗酸化能も増加している）<sup>11-13</sup>。興味深いことに、放射線晩期障害の多く（例えば、がん、白内障、高血圧、慢性炎症、動脈硬化など）は、酸化ストレスの亢進によっても引き起こされる<sup>14</sup>。それらのことから、放射線晩期障害の発症は被ばくによる酸化ストレスの増加によって仲介されている可能性があると考えられる。そこで我々は、放射線被ばくという物理現象と生物影響とをつなぐ鍵として、酸化ストレス（関連指標）に着目した。我々のこれまでの研究から、「i-STrap 法を用いた血液抗酸化能」「Parkin を指標としたリンパ球のミトコンドリア損傷」「Nrf2 を指標としたリンパ球の酸化ストレス応答」の3つが（主に急性被ばくの）新規バイオドシメトリ指標となることを報告した<sup>15</sup>。また、既知のバイオドシメトリ指標である「 $\gamma$ H2AX を指標としたリンパ球の DNA 損傷」をより簡便・迅速に測定・定量するためのシステムの開発も行っている。さらに、これらの4つの指標を組み合わせた複合バイオドシメトリを提案した<sup>15</sup>。

晩期障害は、急性障害よりしきい線量が低い傾向にある（表 I-1）。放射線との関連がわかりづらいうえ、長い時を経て症状が現れるため、一部の被ばく者にとって晩期障害発症のリスクは、心理的なストレスとなる。また、原子力災害などの場合、災害発生当初は高い線量率でも時間経過とともに低下することから、単純な総線量や線量率では晩期障害との関連は正確に説明できない。そのため、線量率の変化を指標として採用する必要がある。このような背景から、平成29年3月31日に国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所 放射線リスク・防護研究基盤準備委員会が中心となって『放射線リスク・防護研究基盤準備委員会報告書』をまとめ、「放射線により誘導されると考えられる疾患について、将来的にその疾患の発症に繋がるバイオインディケーターや初期症状を同定することが重要である」と提言し、科学的知見が不足している線量・線量率範囲を示した<sup>16</sup>。

以上を踏まえ、我々は本研究期間内に、マウスを用いて「血液抗酸化能＋ミトコンドリア損傷＋酸化ストレス応答＋DNA損傷の4指標複合バイオドシメトリ」の実証実験を行う。さらに、DNA損傷（ $\gamma$ H2AX）の測定を現場で迅速かつ簡便に行うための新規マイクロ流路チップを引き続き開発する。また、被ばく後長期にわたる血液抗酸化能、ミトコンドリア損傷、酸化ストレス応答、DNA損傷の長期的変化を明らかにし、これらが晩期障害のインディケーターとなりうるか解析を行う（我々が着目する各指標とその他関連因子（死亡、組織損傷、慢性炎症）との関連を明らか

にする)。

表I-1 代表的な急性放射線障害と晩期障害のしきい線量

障害	臓器 / 組織	潜伏期	しきい線量*
一時的不妊	精巣	3～9週	約0.1 Gy
永久不妊	精巣	3週	約6 Gy
	卵巣	1週以内	約3 Gy
造血能低下	骨髓	3～7日	約0.5 Gy
皮膚発赤	皮膚 (広い範囲)	1～4週	3～6 Gy以下
皮膚熱傷	皮膚 (広い範囲)	2～3週	5～10 Gy
一時的脱毛	皮膚	2～3週	約4 Gy
白内障 (視力低下) #	眼	数年以上	0.5 Gy
循環器疾患**#	脳	数年以上	0.5 Gy
循環器疾患**#	心臓	数年以上	0.5 Gy
がん#		数年以上	約0.1～0.2 Gy***

\* 臨床的な異常が明らかな症状のしきい線量 (1%の人々に影響を生じる線量)

\*\* 個別の疾患についてはしきい線量が定義されていない

\*\*\* しきい線量は定義されないが、非被ばく群と比べて有意に発症する線量

# 晩期障害

出典：国際放射線防護防護委員会2007年勧告、国際放射線防護委員会報告書118(2012年)、放射線による健康影響等に関する統一的な基礎資料 令和3年度版より作成

成果の環境保健行政への貢献：

晩期障害のしきい値には不確実性があるうえ、その症状は被ばく後数年～数十年を経て発生する。発生の予兆については未だ解明されておらず、現状では、事前に対策を講ずることが難しい。そこで、①本研究により申請者らの見出した指標が晩期障害のリスク予測マーカーとして機能することが分かれば、福島原発事故における被ばく者に適応することで、健康不安の軽減や適切な医療介入につながると期待される。②本研究で行う福島サル試料の測定は、マウスとヒトの橋渡しの役割を担うだけでなく、福島環境影響を理解する上での重要なデータとなる。③本研究により $\gamma$ H2AX免疫染色に関する装置の研究開発が進めば、指標としての実用化の早期実現が期待できる。

今年度(初年度)は、急性被ばくに対する4指標複合バイオドシメトリの実証実験と、急性被ばく後の長期抗酸化能変化の解析を行った。同時に、微量のヒト血液サンプルを用いてDNA損傷の測定を現場で迅速かつ簡便に行うための新規マイクロ流路チップと、チップへの送液を全自動で行うための送液モジュールを開発した。さらに、ヒト試料とサル試料の収集を開始した。

## II 研究方法

ここには、主任研究者が実施した研究(実験)方法を記載する。分担研究者の研究(実験)方法については、分担者の報告書をご覧いただきたい。

## 1. マウスの飼育

6 週齢のオスの C57BL/6J マウスを日本 SLC 社より購入した。マウスは 1 ケージに 4 匹入れ、12 時間の明暗サイクル（明期 7:00-19:00）、室温 22~25 度、自由摂食・給水瓶方式下で、アイソレータ内にて飼育した。ケージには床敷を使用し、週に 1 回滅菌洗浄ケージに交換した。餌はオリエンタル酵母工業（株）の MF をオートクレーブにて滅菌したものを使用した。水も餌同様、滅菌したものを使用した。7 日間飼育した後、X 線照射した。

## 2. 放射線照射（全身急性照射）

マウスを小動物実験用簡易吸入麻酔装置（NARCOBIT-E；夏目製作所）に入れ、セボフルラン（富士フィルム和光純薬）を用いて麻酔した。ガス濃度は、導入 5%、維持 3%。眠らせたマウスを照射専用容器に入れ、X 線照射装置（MBR-1520R-3；日立パワーソリューションズ）にて、線量率 0.69 Gy/min、焦点～テーブル面距離 550 mm、管電圧 150 kV、電流 20 mA、フィルター 0.2 mmCu および 0.5 mmAl の条件下で、回転させながら照射した。

## 3. 採血

照射時と同様に麻酔をして眠らせたマウスの右頬に、アニマルランセット（5 MM；goldenrod）を穿刺し、1.5 mL マイクロチューブ（BIO-BIK）に採血した。抗凝固剤として 2000 U のヘパリンナトリウム（富士フィルム和光純薬）20  $\mu$ L を使用し、採血後は氷中保存した。

## 4. i-STrap 法（正式名称：i-STrap W.B.：同仁グローバル・同仁化学研究所社製）による血液抗酸化能測定（図II-1）

### ① i-STrap ステップ 1《反応》

Reaction tube（キット同梱）に、常温の Solution A（2-diphenylphosphinoyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole N-oxide（DPhPMPO）；キット同梱）を 20  $\mu$ L ずつ分注し、生理食塩水 100  $\mu$ L を加えてボルテックスで攪拌したのち、サンプル（全血）を 100  $\mu$ L 加え、さらにボルテックスで攪拌した。そこへ、常温の Solution B（tert-butyl hydroperoxide（tBuOOH）；キット同梱）を 20  $\mu$ L ずつ、各チューブ 10 秒間隔で加え、ボルテックスで攪拌した。全てのチューブに添加後、さらにボルテックスで攪拌した。1 本目のチューブへの Solution B 添加時点から 30 分間、常温で静置した。

### ② i-STrap ステップ 2《抽出》

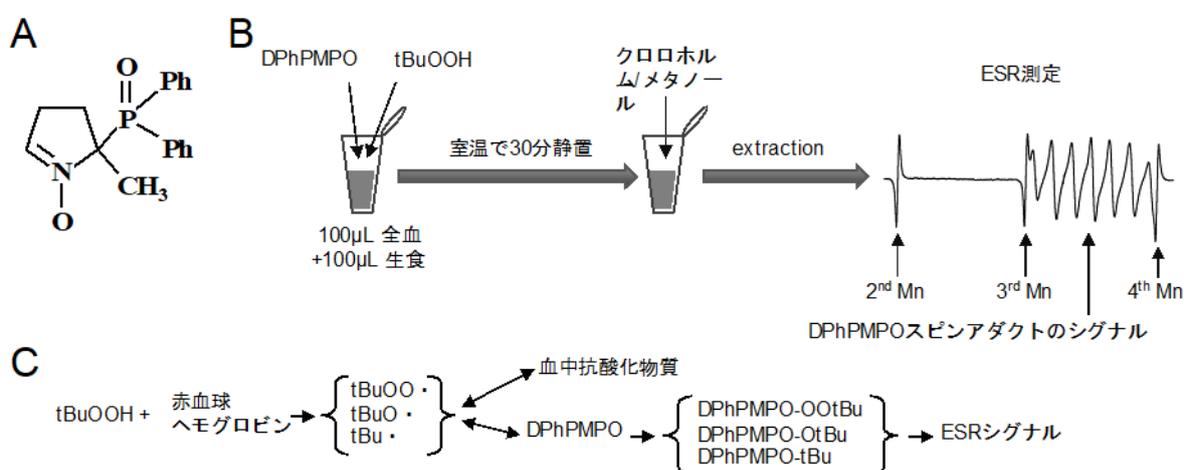
30 分間の静置後、Reaction tube にクロロホルム/メタノール（2：1）溶液を 1000  $\mu$ L ずつ、各チューブ 10 秒間隔で添加（揮発性溶媒のため、マイクロピペット内のエアを十分に置換してから、リバースピペッティング法にて添加）し、1 本目のチューブへのクロロホルム/メタノール溶液添加時点から 10 分間、ボルテックスで攪拌した。攪拌後、予め 4 度に冷却した冷却遠心機（KUBOTA）に Reaction tube をセットし、チューブ内の温度が 4 度となるように 5 分間予冷却した後、4 度、3000 xg で 10 分間遠心した。遠心終了冷却後、上層（水層）をマイクロピペットで吸引して廃棄した。続いて、下層（クロロホルム/メタノール層）をマイクロピペットで分取し、Dehydration tube（キット同梱。乾燥剤として、硫酸ナトリウム 0.3 g が入っている）に入れて軽く攪拌し、氷中で 15 分間冷却した後、-80 度で保存した。

### ③ i-Strap ステップ3 《ESR 測定》

解凍して常温に戻した各サンプル 160  $\mu$ L を石英フラットセル (RST-LC09F ; Flashpoint) に引き入れ、X バンド ESR 分光法 (JES-TE200 ; 日本電子) によって測定した。ESR 条件は、マイクロ波周波数 : 9.423719000 GHz、マイクロ波出力 : 2.00000 mW、フィールドセンター : 332.000 mT、スイープ幅 : 0.3000 mT、掃引時間 : 4.0 分、時定数 0.3 秒とした。DPhPMPO スピン付加物強度のシグナルは、左から 2 本目のマンガンマーカー ( $Mn^{2+}$ ) 強度によって補正された。

### ④ i-Strap の抗酸化能測定原理に関する説明

tBuOOH と血液中のヘモグロビンが反応し、tBuOO $\cdot$  (tert-butylperoxyl radicals) が生成される。tBuOO $\cdot$  はさらに血液中の物質と相互作用し、tBuO $\cdot$  (tert-butyloxy radicals) や tBu $\cdot$  (tert-butyl radicals) が発生する。これらのラジカルは、血液中の抗酸化剤または DPhPMPO と競合的に反応する。したがって、血液に含まれる抗酸化剤の量が少ない (血液抗酸化能が低い) と、DPhPMPO によって捕捉されるラジカルが増え、高い ESR シグナルが観察される。



図II-2 i-Strap の実験工程と原理 (A) DPhPMPO の化学構造式 (B) 実験工程 (C) 測定原理

### 5. 4 指標組み合わせ (血液抗酸化能+DNA 損傷+ミトコンドリア損傷+酸化ストレス応答) による線量推定手法の精度・感度を評価するための実験 (図II-3)

採取した血液 (全血) のうち、100  $\mu$ L を i-Strap 実験に使用し、残りを DNA 損傷、ミトコンドリア損傷、酸化ストレス応答解析用として以下の手順で前処理を行った。

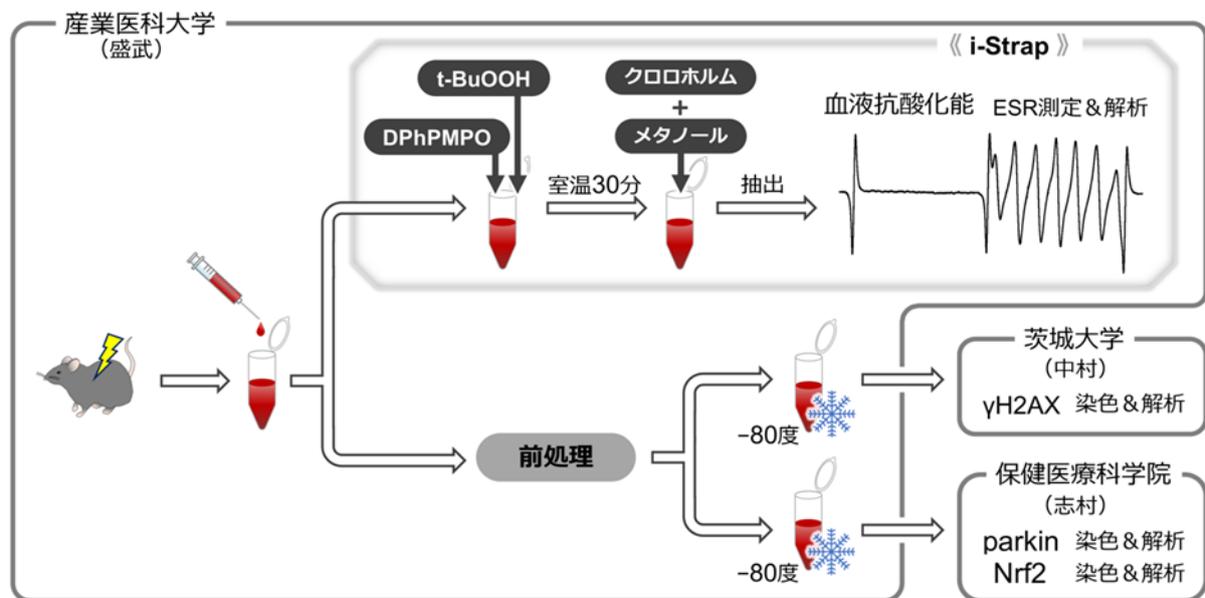
#### 《前処理手順》

Leucosep リンパ球分離チューブ (greiner) に 3 mL の Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) を入れ、1000 xg で 30 秒間遠心して Ficoll-Paque PLUS を多孔質バリアの下へ移動させた。その後、全血 1.2 ~ 1.5 mL と PBS 1.5 mL を順に入れ、700 xg、室温で 25 分間遠心した。多孔質バリアの上に溜まった白濁層 (リンパ球) を回収して PBS を加え、300 xg、室温で 5 分間遠心した。上清を廃棄後、再度 PBS を入れて wash し、300 xg、室温で 5 分間遠心して PBS を取り除いた。リンパ球のペレットに 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 (和光純薬工業) 0.5 mL を加えて懸濁し、室温で 10 分間静置して固定した後、500 xg、室温で 5 分間遠心し、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を取り除いた。PBS で 2 回 wash した後、PBS 220  $\mu$ L で懸濁して -80 度で保存した。ドライアイ

スを詰めた発泡スチロール箱に入れ、ヤマト運輸社に委託して研究分担者の中村と志村へ送付し、中村が  $\gamma$ H2AX、志村が parkin と Nrf2 の解析を行った。

《parkin と Nrf2 の解析手順》

届いた凍結細胞を解凍し、集細胞遠心装置サイトスピン（サーモフィッシャー社）を使用して血液細胞をスライドガラスに定着させた。Parkin 抗体を用いたミトコンドリア損傷の検出には 0.2% トライトンを、Nrf2 の抗体を用いた染色では 0.5% のトライトンを使用して室温で 10 分間静置し、膜透過の処理を行った。非特異的結合を抑えるため、PBS で溶解した 5% ウシ胎児アルブミンで室温 15 分間のブロッキング処理を行った後、1 次抗体、蛍光標識された 2 次抗体を用いて、順に室温 1 時間の抗体反応を行った。細胞核は 4  $\mu$ g/mL のヘキストで染色した。蛍光免疫染色したスライドガラスは、蛍光顕微鏡 Keyence BZ-X710（キーエンス社）で観察した。内蔵の CCD カメラにて 1 枚のスライドに対して無作為に蛍光画像 5~10 枚を取得した後、解析ソフト Hybrid Cell Count software を用いて画像解析を行った。ヘキストで青く染まる細胞核の領域を選択し、細胞数と細胞核における Parkin（ミトコンドリア損傷）および Nrf2（酸化ストレス応答）の輝度の総量を自動で計測し、数値化した。



図II-3 組み合わせ実験のスキーム

6. 血漿過酸化脂質および血漿抗酸化能の定量

採取した血液を 3000 xg、4 度で 15 分間遠心し、血漿と血球を分離した。血漿をマイクロピペットで取り出して新しいチューブに入れ、測定時まで -80 度で保存した。血漿過酸化脂質および血漿抗酸化能の測定には、免疫反応測定装置スポットケム (IMSI-3511 ; アークレイ) とその専用試薬スポットケム i-Pack Oxystress Test を使用した。4 度保存してある i-Pack Oxystress Test を常温に戻してから、血漿を 70  $\mu$ L 添加してスポットケムにセットし、測定した。測定された酸化ストレス度 (OS) を血漿過酸化脂質、抗酸化力 (AP) を血漿抗酸化能とした。

## 7. 赤血球グルタチオン量の定量

赤血球グルタチオン量の定量には、GSSG/GSH Quantification Kit (同仁化学研究所) を使用した。採取した血液を 1000 xg で 10 分間遠心して血漿と血球を分離した。取り出した赤血球を 10 倍量の 5-スルホサリチル酸溶液 (富士フイルム和光) で溶血し、8000 xg で 10 分間遠心分離してタンパク質を除去した。サンプルと緩衝液を混合し、37°C で 1 時間インキュベートした後、基質と酵素/補酵素の作業溶液を加えた。10 分間インキュベートした後、Varioskan LUX プレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) を用いて、412 nm で吸光度を測定した。

## 8. 血漿サイトカインの定量 (被ばく後 50 日以降)

採取した血液を 1000 xg で 10 分間遠心して血漿と血球を分離し、Cytometric Bead Array (日本 BD) を用いて IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-10、IL-1 $\beta$ 、IL-4、TNF、MCP-1 の量を解析した。96 well plate に血漿を分注し、Capture Beads を加えて 5 分間シェイクした後、室温で 1 時間静置した。さらに Detection Reagent を加えて 1 時間室温遮光で静置後、遠心して上清を取り除き、wash buffer で洗浄、フローサイトメトリーにより蛍光強度を測定した。取扱説明書記載の検出限界は、IL-6 : 1.4 pg/mL、IFN- $\gamma$  : 0.5 pg/mL、IL-10 : 9.6 pg/mL、IL-1 $\beta$  : 1.9 pg/mL、IL-4 : 0.3 pg/mL、TNF : 2.8 pg/mL、MCP-1 : 2.7 pg/mL である。

## 9. 血清 IL-6 の定量 (被ばく後 7 日以内)

採取した血液を 1000 xg で 10 分間遠心して血清を分離し、Mouse IL-6 ELISA Kit (日本 BD) を用いて解析した。抗体がコートされた 96 well plate に血清を分注し、2 時間室温で反応させた。血清を取り除いた後 Wash Buffer で洗浄し、Working Detector を入れて室温で 1 時間反応させた。さらに Wash Buffer で洗浄後、TMB One-Step Substrate Reagent を加えて 30 分間室温遮光で反応させた。Stop Solution を加えて反応を止め、Varioskan LUX プレートリーダー (Thermo Fisher Scientific 社) にて 450 nm で吸光度を測定した。取扱説明書記載の検出限界は 3.8 pg/mL である。

## 10. 全血球計算

全血をヘパリン入りのチューブに採取し、pocH-100iV 装置 (シスメックス) を用いて分析した。

## 11. 統計学的評価

抗酸化能やその他指標の線量依存的変化については、two-way ANOVA post hoc Dunnett's multiple comparisons test または welch の t 検定を使用して対応する 0 Gy との有意差検定を行い、 $p < 0.05$  を有意とした。その他に行った検定については、研究結果の本文中や図中に記載している。

(倫理面への配慮)

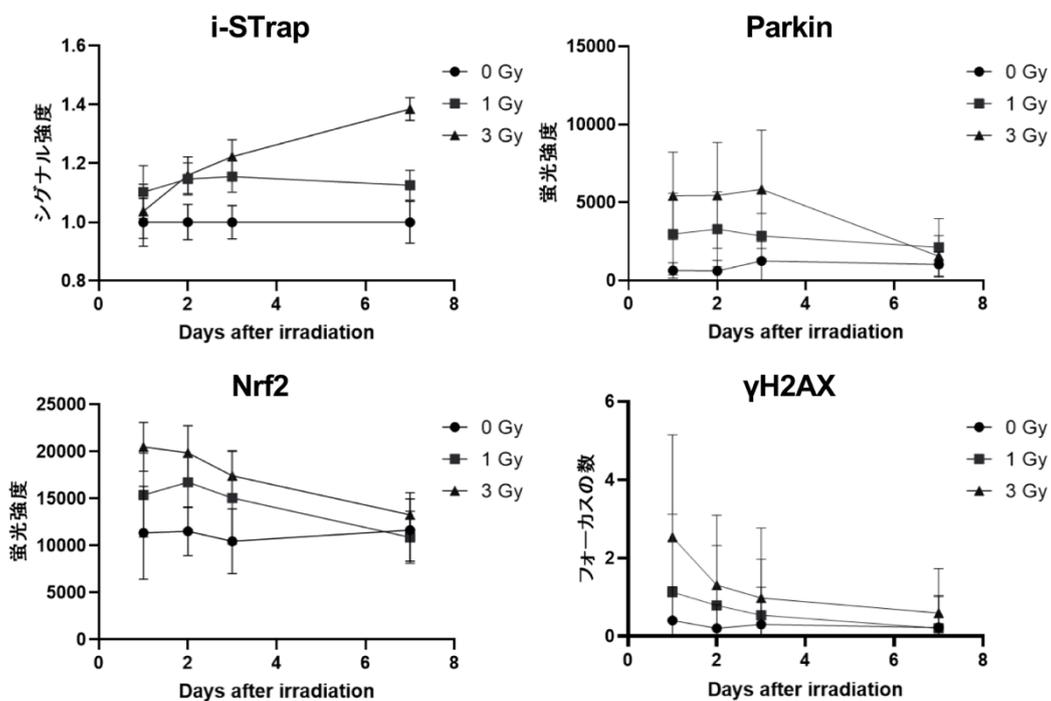
本研究における動物実験は、所属施設の動物実験倫理委員会の許可を得て実施した (産業医大 : 承認番号 AE-15009、研究課題名「放射線暴露後の血中抗酸化能変化およびそれに付随する影響に関する研究」; 量子技術研究開発機構 : 承認番号 2-1017、研究課題名「放射線暴露後の血中抗酸化能変化およびそれに付随する影響に関する研究」)。

## III 研究結果

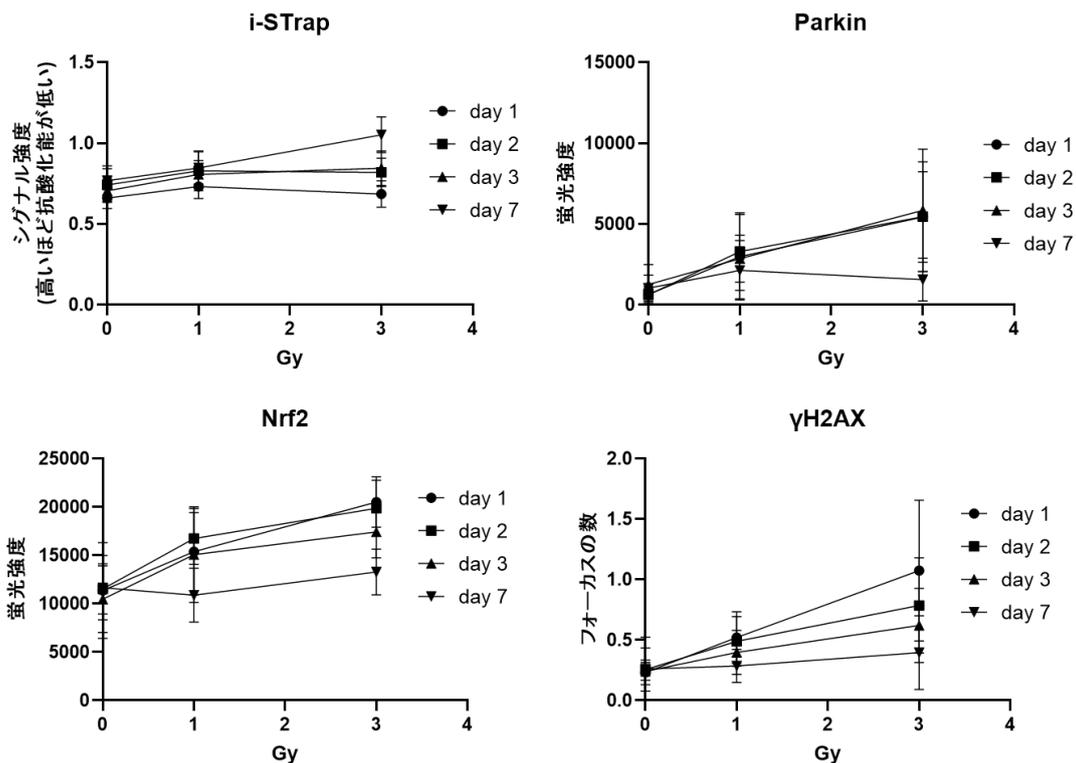
1. 複数指標組み合わせ（血液抗酸化能+DNA損傷+ミトコンドリア損傷+酸化ストレス応答）による線量推定手法の精度・感度の評価

提案している4指標組み合わせによるバイオドシメトリ理論を検証した。実験スキームは図II-3の通りである。マウスの全身に急性照射した後、同一マウスから採取した血液でi-STrap、 $\gamma$ H2AX、parkin、Nrf2の測定を行った。i-STrapは、照射・採血を含む全行程を産業医大で実施した。 $\gamma$ H2AX、parkin、Nrf2については、照射・採血～前処置までを産業医大で行い、サンプルを茨城大学または保健医療科学院に郵送し、中村と志村がそれぞれ染色&カウントを行った（図II-3）。

各指標単独の測定結果（経時的変化）を図III-1に示す。i-STrapは（他の指標に比べて）被ばく後7日目あたりに有効である可能性が高く、 $\gamma$ H2AXは被ばく後24時間以内、parkin、Nrf2は被ばく後1～3日目に強い傾向にあることが示され、これまでどおりの結果が得られた。各指標単独の線量依存性を解析したところ、i-STrapはday7、parkinはday1～3、Nrf2はday1～2で直線性が良く、 $\gamma$ H2AXは全てのタイムポイントで直線性が良かった（図III-1）。なお、Nrf2と $\gamma$ H2AXは時間経過とともに直線が寝てくることが観察された（図III-2）。

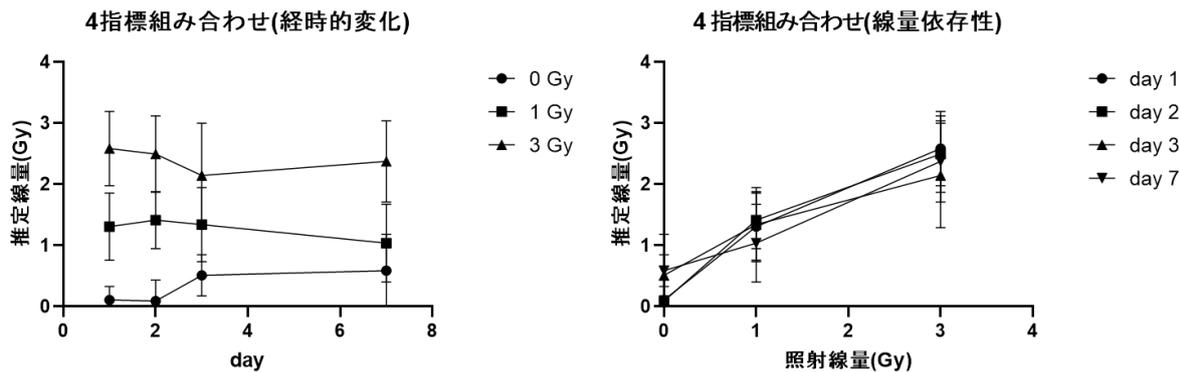


図III-1 被ばく後の血液抗酸化能（i-STrap）、DNA損傷（ $\gamma$ H2AX）、ミトコンドリア損傷（parkin）、酸化ストレス応答（Nrf2）の経時的変化。



図III-2 被ばく後の血液抗酸化能 (i-Strap)、DNA損傷 ( $\gamma$ H2AX)、ミトコンドリア損傷 (parkin)、酸化ストレス応答 (Nrf2) の線量依存性。

次に、4指標を組み合わせた場合の線量依存性と経過時間依存性を解析した (図III-3)。重回帰分析を用いて各タイムポイントの推定線量を求めた (最小二乗法により求めた係数を各指標に乗じた値の和が推定線量となる) ところ、経時的に値が増減することなく、どのタイムポイントにおいても安定して推定できる (タイムポイントの違いによる過大評価や過小評価がない) ことが分かった (図III-3)。また、いずれのタイムポイントでも直線性が良いことが示された。さらに、各指標単独および4指標組み合わせのばらつきを、二乗平均平方根誤差 (RMSE)、R二乗、直線の有意性 p値として表現したところ、4指標組み合わせは、各指標単独よりRMSEが小さく、R二乗が大きい結果となり、タイムポイントによるばらつきが小さいことが分かった (表III-1)。また、診断能の指標として算出したROC曲線の下部面積 (Area Under the Curve: AUC) は、4指標を組み合わせた場合の方が各指標単独の場合よりも値が大きくなり、診断能が良い傾向にあることが分かった (表III-2)。



図III-3 4指標を組み合わせた場合の線量依存性と経過時間依存性。

表III-1 単指標と4指標を組み合わせた場合の推定のばらつきの評価。

▼ RMSE : 誤差の指標 (小さいほど良い)				
	day 1	day 2	day 3	day 7
全血抗酸化能	1.28	1.24	1.11	0.809
ミトコンドリア損傷	0.959	0.9998	0.997	1.277
酸化還元	0.937	0.845	1.047	1.234
DNA損傷	0.905	0.998	1.0167	1.247
<b>組み合わせ</b>	<b>0.603</b>	<b>0.653</b>	<b>0.926</b>	<b>0.844</b>
▼ R二乗 : 予測線量と実測線量の差の指標 (1に近いほど良い)				
	day 1	day 2	day 3	day 7
全血抗酸化能	0.004	0.06	0.263	0.602
ミトコンドリア損傷	0.442	0.393	0.396	0.009
酸化還元	0.465	0.566	0.335	0.0747
DNA損傷	0.503	0.396	0.3723	0.057
<b>組み合わせ</b>	<b>0.799</b>	<b>0.763</b>	<b>0.525</b>	<b>0.605</b>
▼ P値 : 有意差				
	day 1	day 2	day 3	day 7
全血抗酸化能	0.711	0.147	0.0014	0.0001
ミトコンドリア損傷	0.0001	0.0001	0.001	0.5811
酸化還元	0.0001	0.0001	0.002	0.1067
DNA損傷	0.0001	0.0001	0.0001	0.0085
<b>組み合わせ</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>	<b>0.0001</b>

表III-2 単指標と4指標を組み合わせた場合の推定の診断能の評価。下線：P<0.05。

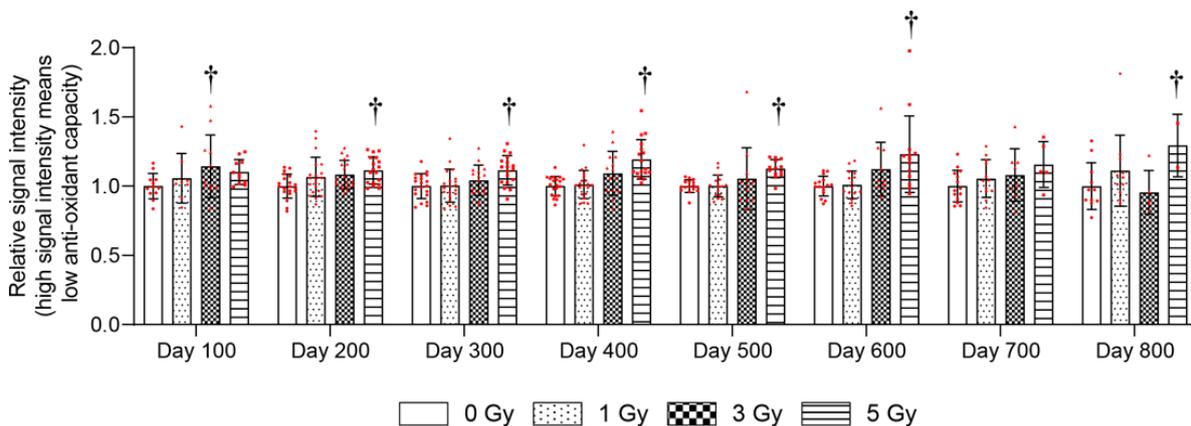
▼ AUC : 0 Gy vs 1Gy				
	day 1	day 2	day 3	day 7
全血抗酸化能	<u>0.770</u>	0.704	<u>0.840</u>	<u>0.778</u>
ミトコンドリア損傷	<u>0.889</u>	<u>0.813</u>	<u>0.854</u>	0.674
酸化還元	0.736	0.917	0.771	0.569
DNA損傷	<u>0.951</u>	<u>0.868</u>	<u>0.840</u>	<u>0.750</u>
<b>組み合わせ</b>	<b>1.000</b>	<b>0.993</b>	<b>0.910</b>	<b>0.736</b>

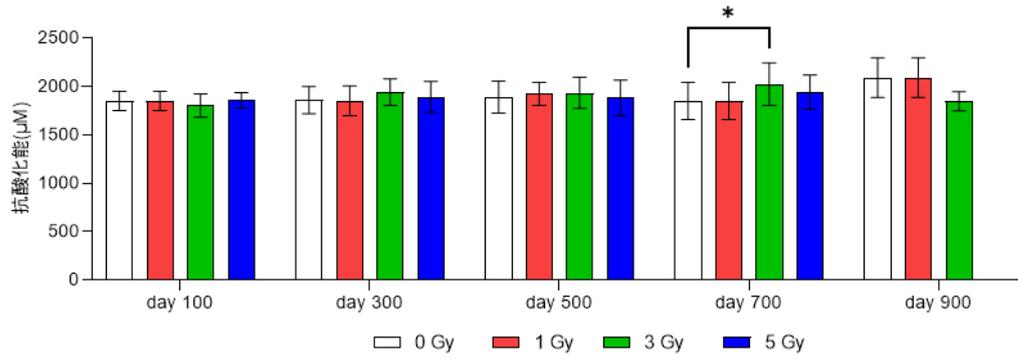
▼ AUC : 0 Gy vs 3 Gy				
	day 1	day 2	day 3	day 7
全血抗酸化能	0.590	0.708	<u>0.896</u>	<u>0.972</u>
ミトコンドリア損傷	<u>0.973</u>	<u>0.979</u>	<u>0.938</u>	0.611
酸化還元	<u>0.944</u>	<u>0.965</u>	<u>0.944</u>	0.660
DNA損傷	<u>1.000</u>	<u>0.938</u>	<u>0.938</u>	<u>0.770</u>
<b>組み合わせ</b>	<b>1.000</b>	<b>1.000</b>	<b>1.000</b>	<b>0.965</b>

## 2. 急性全身被ばく後のレドックス状態の変化（長期）

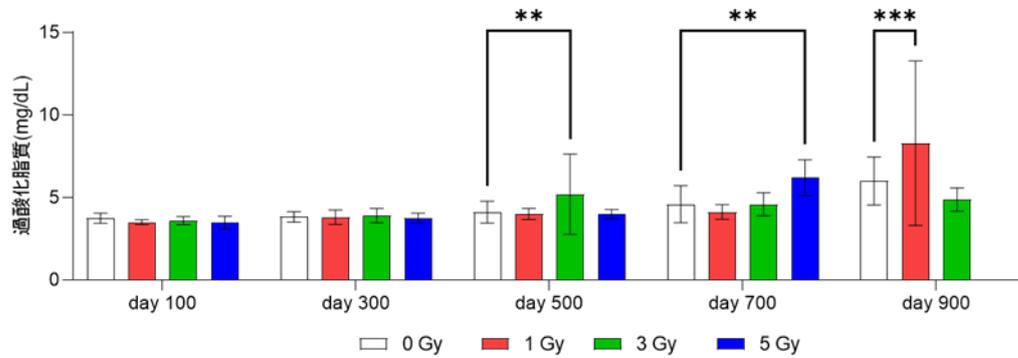
上記のように、レドックス状態に関連する各指標は放射線被ばく後短期間に変化することが明らかとなった。しかし、被ばく後数十年に発症する晩期障害については、このような短期間の変化が直接的に関与するとは考えにくい。そこで、0, 1, 3, 5 Gyを全身急性照射したマウスを死亡するまで飼育し、100日毎に採血を行ってレドックス状態の各指標の変化をモニタリングした。図III-4にi-STrap法で測定した血液抗酸化能の変化、図III-5に比色法で測定した血漿抗酸化能の変化、図III-6に比色法で測定した血漿過酸化脂質の変化、図III-7に酵素法で測定した赤血球グルタチオン量の変化を示す。また、図III-8に全血球計算の結果を示す。



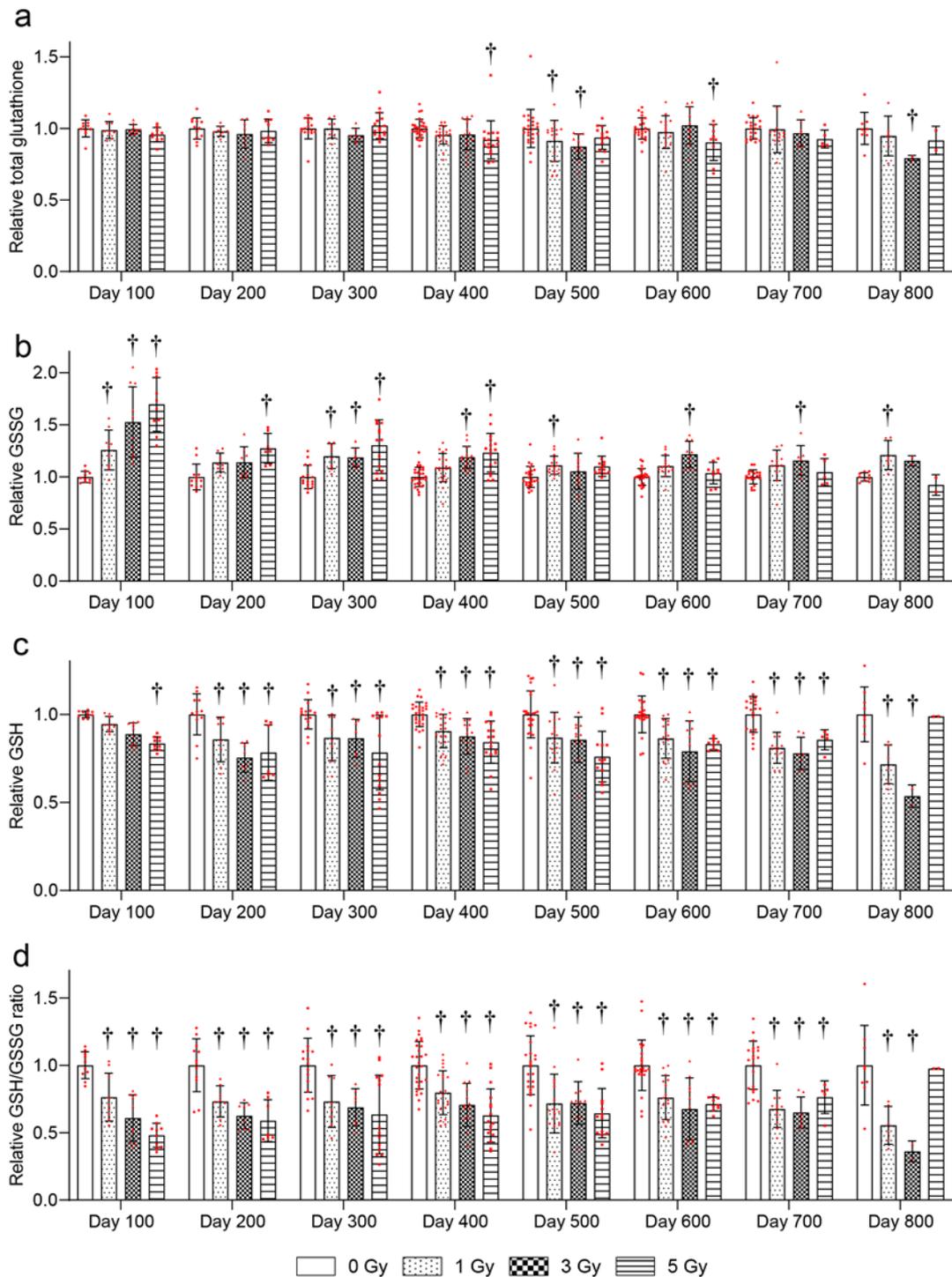
図III-4 放射線被ばく後のi-STrap法で測定した血液抗酸化能の変化。†は0 Gy群と比較して有意な違い（P<0.05）があることを示す。各タイムポイントの0 Gyにより正規化。赤点は各マウスの値、棒グラフは平均、エラーバーは標準偏差を示す。PMID: 33762608より引用。 <https://www.nature.com/articles/s41598-021-86187-1>



図III-5 放射線被ばく後の比色法で測定した血漿抗酸化能の変化。\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001、\*\*\*\*P<0.0001。棒グラフは平均、エラーバーは標準偏差を示す。

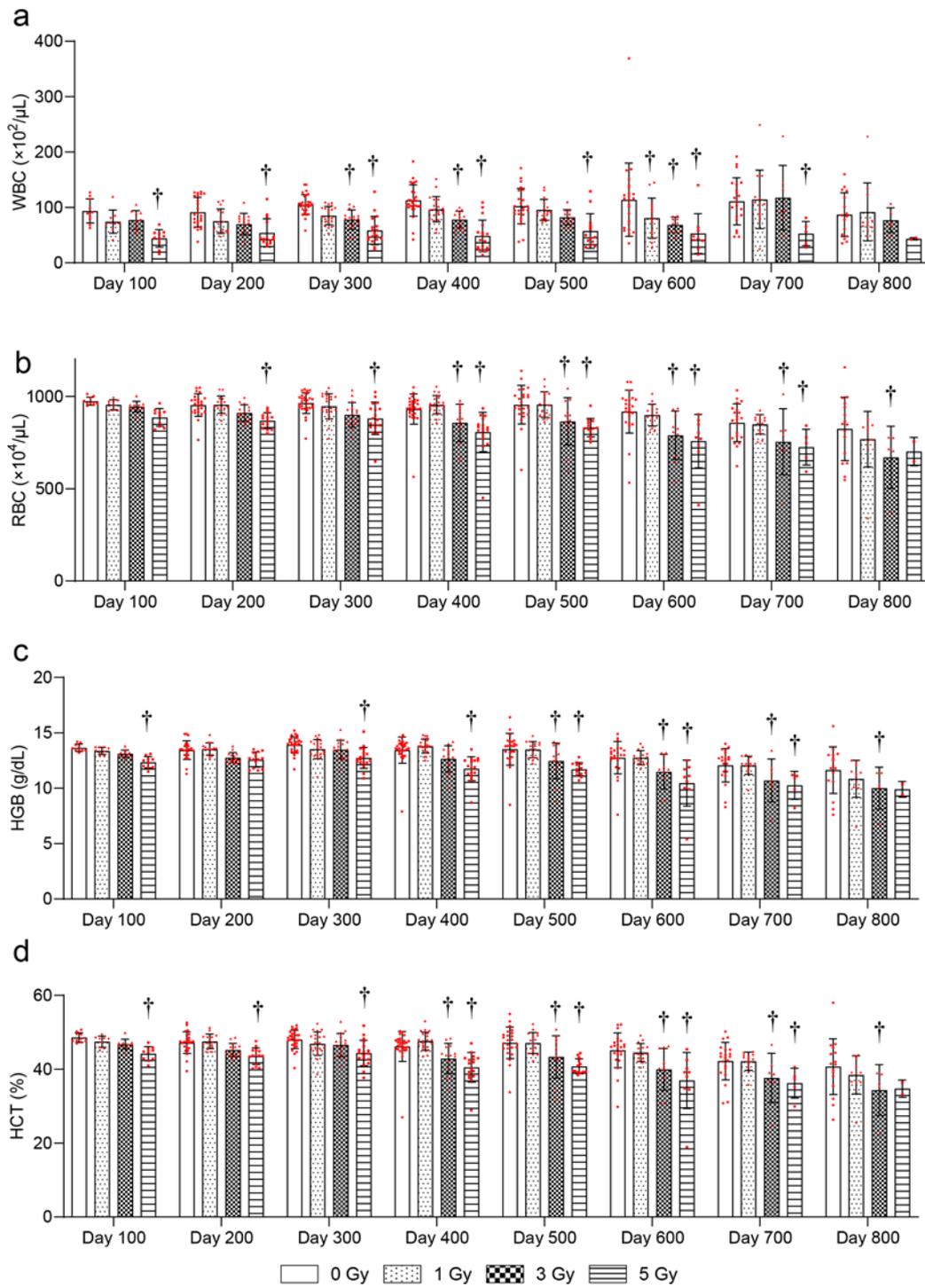


図III-6 放射線被ばく後の比色法で測定した血漿過酸化脂質量の変化。\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001、\*\*\*\*P<0.0001。棒グラフは平均、エラーバーは標準偏差を示す。

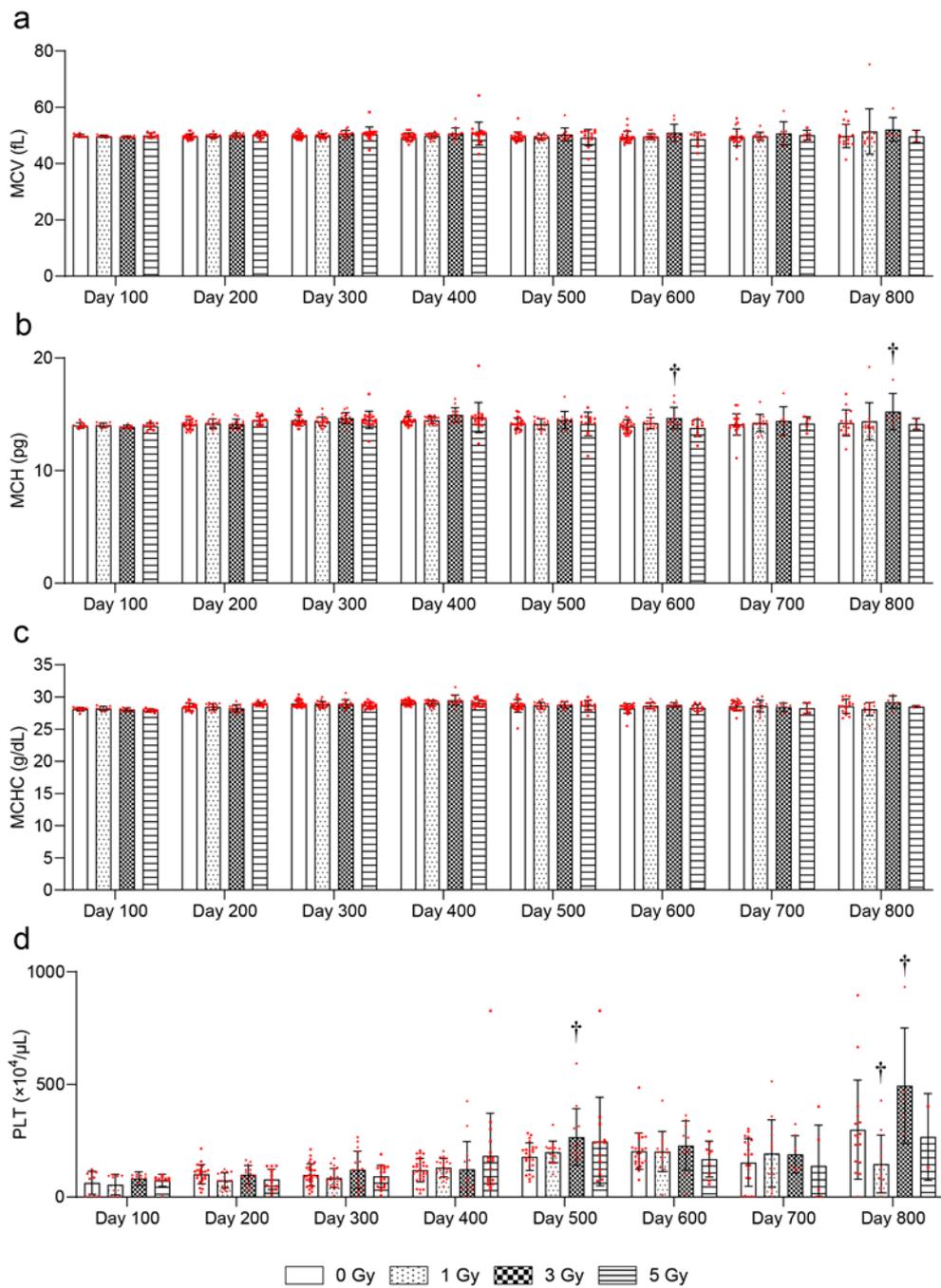


図III-7 放射線被ばく後の酵素法で測定した赤血球グルタチオン量の変化。†は0 Gy群と比較して有意な違い ( $P < 0.05$ ) があることを示す。GSH : 還元型グルタチオン、GSSG : 酸化型グルタチオン。各タイムポイントの0 Gyにより正規化。赤点は各マウスの値、棒グラフは平均、エラーバーは標準偏差を示す。PMID: 33762608より引用。

<https://www.nature.com/articles/s41598-021-86187-1>



図III-8a 放射線被ばく後の血球変化。†は0 Gy群と比較して有意な違い ( $P < 0.05$ ) があることを示す。WBC : 白血球数、RBC : 赤血球数、HGB : ヘモグロビン、HCT : ヘマトクリット値。赤点は各マウスの値、棒グラフは平均、エラーバーは標準偏差を示す。PMID: 33762608より引用。 <https://www.nature.com/articles/s41598-021-86187-1>



図III-8b 放射線被ばく後の血球変化。†は0 Gy群と比較して有意な違い ( $P<0.05$ ) があることを示す。MCV：平均赤血球容積、MCH：平均赤血球色素量、MCHC：平均赤血球色素濃度、PLT：血小板数。赤点は各マウスの値、棒グラフは平均、エラーバーは標準偏差を示す。PMID: 33762608より引用。 <https://www.nature.com/articles/s41598-021-86187-1>

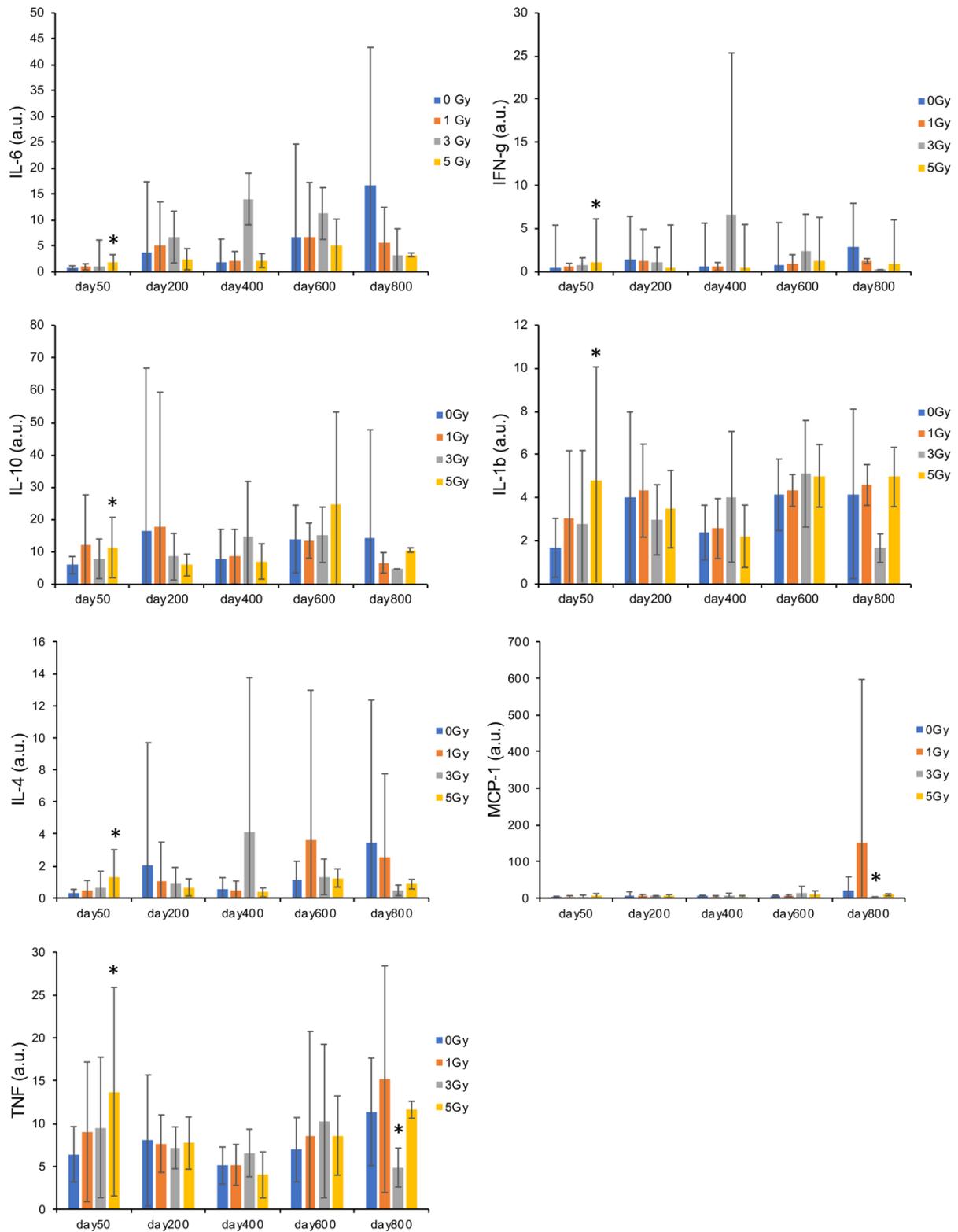
血液抗酸化能では、100日以降、1 Gy群に有意差がつくことはなかった。3 Gy群では100日目に有意差があったが、それ以降はなかった。5 Gy群では200～600, 800日後で有意差があった。ただし、5 Gy群では800日に到達する前に死亡してしまうマウスがいたため、800日目に解析できたのは2匹だけであった。血漿過酸化脂質は、被ばく後500日以降で有意に増加し、血漿抗酸化能は被ばく後700日で有意に増加した。しかし、被ばく線量依存性は無かった。

赤血球の総グルタチオン量は、1 Gy被ばく後500日、3 Gy被ばく後500日、5 Gy被ばく後400, 600日で、0 Gy群に比べ有意に減少した。酸化型グルタチオン (GSSG) 量は、1 Gy被ばく後100, 300, 500, 800日、3 Gy被ばく後100, 300, 400, 600, 700日、5 Gy被ばく後100～400日で、0 Gy群に比べ有意に増加した。還元型グルタチオン (GSH) 量は、1 Gy被ばく後200～800日、3 Gy被ばく後200～800日、5 Gy被ばく後100～700日で、0 Gy群に比べ有意に減少した。GSH/GSSG比は、1 Gy被ばく後100～800日、3 Gy被ばく後100～800日、5 Gy被ばく後100～700日で、0 Gy群に比べ有意に減少した。

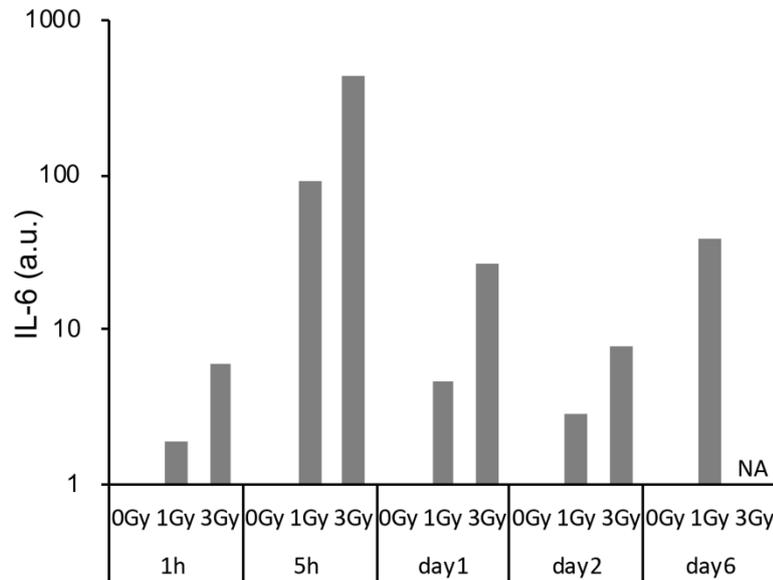
グルタチオンの含有量は臓器によって異なる。血液の場合、赤血球中には血清/血漿中の1000倍近いグルタチオンが含まれている<sup>17</sup>。そこで、全血球計算を行い、赤血球数などの変化も同時に解析した。白血球 (WBC) 数は、1 Gy被ばく後600日、3 Gy被ばく後300, 400, 600日、5 Gy被ばく後100～700日に、0 Gy群と比較して有意に減少していた。赤血球数 (RBC) は、3 Gy被ばく後400～800日、5 Gy被ばく後200～700日に、0 Gy群と比較して有意に減少していた。ヘモグロビン (HGB) は、3 Gy被ばく後500～800日、5 Gy被ばく後100, 300～700日に、0 Gy群と比較して有意に減少していた。ヘマトクリット (HCT) は、3 Gy被ばく後400～800日、5 Gy被ばく後100～700日に、0 Gy群と比較して有意に減少していた。平均体積 (MCV) には、放射線被ばくによる変動は見られなかった。平均体積ヘモグロビン (MCH) は、3 Gy被ばく後600, 800日で0 Gy群に比べ有意に増加した。平均血色素濃度 (MCHC) には、放射線被ばくによる変動は見られなかった。血小板 (PLT) は、1 Gy被ばく後800日で0 Gy群に比べ有意に減少したが、3 Gy被ばく後500, 800日においては0 Gy群に比べ有意に増加していた。

### 3. 急性全身被ばく後の炎症反応の変化

炎症反応は酸化ストレスを誘発することが知られており、広島長崎の原爆被爆者では炎症反応が亢進しているとの報告もある<sup>18,19</sup>。このことから、本研究で観察された被ばく後の長期的な抗酸化能の変化は炎症に起因するのではないかと考え、血漿中の炎症関連サイトカインの定量を行った。IL-6、IFN- $\gamma$ 、IL-10、IL-1 $\beta$ 、IL-4、TNFについては、5 Gy被ばく後50日で有意に増加することが示された (III-9)。MCP-1、TNFは、3 Gy被ばく後800日で有意に低下していた。期待していたような長期的な炎症の兆候は観察できなかった。一方で、5 Gy被ばく後50日で有意なサイトカイン増加がみられたので、早期 (被ばく後1～6時間) のIL-6の量を測定した。被ばく後5時間をピークに線量依存的な増加が観察され、被ばく後早期に炎症が起こることを確認した (III-10)。推測するに、5 Gy被ばく後50日で各種サイトカイン量が増加していたのは、早期の炎症反応が終息していなかった (初期の炎症のしっぼを見ていた) ものと思われる。



図III-9 放射線被ばく後の血漿炎症関連サイトカインの変化。\*は0 Gy群と比較して有意な違い (P<0.05) があることを示す。棒グラフは平均、エラーバーは標準偏差を示す。



図III-10 放射線被ばく後の血清IL-6の変化。棒グラフは平均を示す。

#### 4. 全身被ばく後の組織の抗酸化能変化

マウスの全身に異なる線量率で放射線を照射し、経時的にマウスを安楽死させて臓器（脳、肺、肝臓、大腿骨、眼球）を摘出し、抗酸化能関連指標を測定した。現在実験中、もしくは論文投稿中である。

#### IV 考察

##### <複合バイオドシメトリの有用性の検討>

複合バイオドシメトリについては、2018年度に概念を提唱、2019～2020年度に予備実験、昨年度から今年度にかけて有用性を示す確認実験を行った。まず、4指標それぞれの診断能と4指標組み合わせの診断能をAUC（Area Under the Curve）によって評価した。血液抗酸化能は被ばく後7日目あたり、リンパ球ミトコンドリア損傷とリンパ球NRF2発現は被ばく後1～3日で診断能が高かった。リンパ球DNA損傷は、被ばく後1日目の診断能が最も高かったが、7日目でも十分な診断能を有していた。4指標組み合わせは、被ばく後1～7日まで一貫して高い診断能を保つことができた（8日目以降はやや下がる）。また、4指標組み合わせは被ばく後1～3日にRMSEやR二乗を大きく改善しており、推定誤差を小さくできる可能性が示唆された。今後は、次の段階としてヒトでの標準曲線の作成を目指す。遺伝的要因、生活環境的要因がこれら指標に影響を及ぼす可能性があるため、健常人や放射線治療患者の試料を用いて交絡因子や被ばく応答のヒトデータベースを作成する必要がある。

これまでの我々の研究<sup>15</sup>から、急性被ばくに対する各指標の検出限界（0 Gy群と比較して有意な変化が認められる線量）はそれぞれ最も変化の大きいタイムポイントにおいて、血液抗酸化能が0.5 Gy、ミトコンドリア損傷が1 Gy、酸化ストレス応答が0.1 Gy、DNA損傷が数十mGyであった。慢性被ばくの推定精度（検出限界）については今後調査する必要があるが、これら指標は事故後

急性期の大線量（1 Gy以上）放射線被ばくに対する緊急被ばく医療のトリアージ指標としての利用がおおいに期待できる。なお、ヒトの場合、1 Gyの全身被ばくは死亡のしきい線量と考えられている<sup>20</sup>。

また、本研究で見出された指標を放射線災害や医療で応用するためには、薬事承認を得る必要がある。体外診断用医薬品のクラスIに該当すると考えられるが、そのためには、ヒトサンプル（医療被ばく患者のサンプル）を用いたマーカーポテンシャルの評価が必要となる。

#### <抗酸化能の中長期的変化>

一般的に、急性影響よりも晩期障害の方がしきい線量が低く、リスクの予測も困難である（表I-1）。発がんに関しては線量率依存性があると知られているが、白内障、心疾患、脳疾患に関しては線量率依存性が無く、完全な総線量依存の可能性も考えられている<sup>20</sup>。さらに、これら疾患では、しきい線量が無いが0.5 Gyより低い可能性も指摘されている<sup>21</sup>。そのため、発症の予測につながるバイオマーカーや臨床症状の特定が求められている<sup>16</sup>。我々は晩期障害の多くが酸化ストレス関連疾患であることを考え、マウスを用いて被ばく後中長期的な血液抗酸化能の変化を解析した。今回実施した1, 3, 5 Gyの急性全身照射は原爆投下や原子力発電所の重大事故を想定している。原爆被爆者では1 Gyの被ばくでがん以外の疾患のリスクが有意に増加するとの報告がある<sup>22,23</sup>。また、我々の予備実験で7 Gy以上の照射でほとんどのマウスが14日以内に死亡することが示されていた。ゆえに、本研究では照射線量を1, 3, 5 Gyに設定した。

造血は、哺乳類の体内における主要な生命現象の一つであり、放射線感受性の高いシステムの一つである<sup>20</sup>。血液には採取しやすいという利点もあるため、我々は血液中の抗酸化レベルを様々な方法で分析することにした。その結果、5 Gy群では全血の抗酸化能が慢性的に低下していることがわかった。赤血球 GSH濃度および GSH/GSSG比は、1 Gy以上の照射で慢性的に減少した。また、3 Gy以上の照射により、白血球数、赤血球数、HGBおよびHCT値が減少した。一方で、血漿抗酸化能、血漿過酸化脂質、サイトカイン量は、5 Gy照射群においても長期（被ばく後100日以降）で変化が見られなかった。これらの結果から、赤血球グルタチオン値はこれらのパラメーターの中で最も感度の高い長期的な放射線バイオマーカーである可能性が示唆された。先行のマウス実験では、GSH合成阻害剤であるブチオニンスルホキシミン（BSO）投与により、白内障<sup>24</sup>、脳炎症<sup>25</sup>、高血圧<sup>26</sup>、動脈硬化<sup>27</sup>、HDL値低下<sup>28</sup>、酸化的DNA損傷増加<sup>29</sup>、腫瘍形成<sup>30</sup>などの放射線関連疾患や健康リスクが誘発・悪化すると報告されている。このことから、放射線関連疾患の誘発はGSHレベルの低下を通じて起こる可能性があると考えられる。放射線照射したC57BL/6Jマウスの90%以上が胸腺リンパ腫を発症したとの報告もあり<sup>31</sup>、照射したC57BL/6Jマウスは胸腺リンパ腫によって死亡したと考えられる。*in vitro*および*in vivo*でも、BSO投与により腫瘍細胞の生存率および増殖が減少することが示されており、GSHが腫瘍の増殖にも必須であることが示唆されている<sup>32,33</sup>。しかし本研究では、1 Gy照射によってC57BL/6JマウスのGSHレベルが低下したにも関わらず、寿命は縮まなかった<sup>14</sup>。Richieらも、BSO投与により大腸の腫瘍発生が増加したがマウスの生存期間を短縮することはなかった、と報告している<sup>30</sup>。したがって、GSHレベルの低下が放射線による癌死亡（やがんの進行）に与える影響については今後さらなる研究が慎重に行われるべきであろう。

原爆被爆者においては、放射線が誘発する酸化ストレスレベルおよび血液学的所見の長期的変化について多くの研究がなされているが、抗酸化物質のレベルについて分析した研究はない。原爆被爆者は3 Gy以下の急性全身被ばく（TBI）を受けており<sup>23</sup>、被曝状況は本研究のものと同様

ていると言える。林らは、被爆後約 50 年で原爆被爆者の血漿中の活性酸素レベルが線量依存的に上昇したことを報告した<sup>18,19</sup>。しかし、この結果は我々の研究結果（血漿中の過酸化脂質に変動が無い）と一致しない。同時に林らは、被爆後約50年の原爆被爆者血漿において炎症関連サイトカイン（IL-6、CRP、TNF $\alpha$ 、IL-4、IL-10）を調査し、IL-6、CRP、TNF $\alpha$ 、IL-10と放射線量との間に統計的に有意な関連が認められたとも報告している<sup>19</sup>。我々の今回の研究では、この報告を参考に対象とするサイトカインを選択した（CRPはマウスではほとんど機能しないことが報告されていたため選択しなかった<sup>34</sup>）が、林らの結果とは異なり、長期（100日以上）にわたるサイトカインの変化は観察できなかった。ヒトとマウスでは、放射線応答に違いがあるものと推測される。また林らは、原爆被爆者ではWBC数が増加し<sup>35</sup>、HGB値<sup>36</sup>およびRBC数<sup>37</sup>が減少していると報告している。本研究と比較すると、WBC数は一致しなかったが、RBC数、HGB値は一致した。Chuaらは、7.8 Gy全身被ばく後の生存マウスにおいて、WBC、RBC、PLT数が慢性的に減少していることを報告した<sup>38</sup>。この結果は本研究と一致する。Chuaらは、血球数の減少は全身被ばく後の造血幹細胞および前駆細胞の機能障害によって誘導されることを示唆した<sup>38</sup>。つまり、造血機能、特に白血球分化のどこかで、ヒトとマウスの放射線応答に差がでるものと考えられる。

一方で、放射線治療は酸化ストレスに関連した後期の組織損傷を誘発することが示唆されている<sup>39</sup>。Robbinsらは、10 Gy以上の急性部分照射ラットにおいて、24週間の実験期間中、腎臓で8-hydroxy-2'-deoxyguanosineレベルが継続的に増加したと報告している<sup>40</sup>。Kangらは、マウス肺に15 Gyの放射線を照射すると照射後15~20週で肺のマロンジアルデヒド（MDA）レベルが上昇することを報告した<sup>41</sup>。Yinらは、イヌの肺に18 Gyの放射線を照射すると肺組織の活性酸素レベルが上昇するが、血清のMDAおよび還元酵素（スーパーオキシドディスムターゼおよびグルタチオンペルオキシダーゼ）活性は放射線と関連しなかったと報告している<sup>42</sup>。これらの報告は、放射線治療として局所照射を行っており、線量も本研究よりかなり高い。結果についても、被ばく後に過酸化脂質が増加しないことを報告した本研究とは一致しない。我々の研究を含めいずれの研究も、放射線が長期的なレドックス状態に影響を及ぼすことを示しているが、線量や被ばくの範囲によってレドックス応答が異なることも示唆している。

慢性被ばくにおける酸化還元状態については、いくつかの論文で解析されている。Volkovaらは、チョルノービリ事故の汚染地域に広く分布するスコツマツを分析し、被ばく群におけるGSH/GSSG比とMDAレベルの上昇を見出した<sup>11</sup>。漆原らは、福島第一原発事故の避難区域内の牛を分析し、被ばく群でグルタチオンペルオキシダーゼ活性とMDA値の増加を認めた<sup>12</sup>。Malekiradらは、放射線技師を分析し、被ばく群で総抗酸化能と過酸化脂質のレベルが上昇することを見出した<sup>13</sup>。これらの報告は、慢性的な放射線被ばくが酸化ストレスと抗酸化物質の両方を高めることを示しており、本研究と矛盾している。このことは、線量率および総線量が放射線誘発性抗酸化物質レベル修飾の重要な因子であることを示唆している。

本研究では被ばくマウスの抗酸化能の経時的変化を長期間追跡したが、いくつかの未解決問題を残している。第一に、抗酸化物質のレベルを急性全身被ばく後に分析した点である。生物学的放射線効果の誘発は、被ばく条件（放射線の種類、線量率、照射量、放射線エネルギー付与、総線量など）により異なる。また、全身被ばくモデルは、原子力災害やその他の制御不能な原子力事象を完全に模倣しているわけではない。今後の研究では、部分照射や慢性照射における血液の酸化還元状態の変化と疾患の発症を分析し、血液の酸化還元状態が病気の進行に関係するかどうかを判断する必要がある。第二の問題は、若齢成体（7週齢）のオスのマウスを使用した点である。

生物学的な放射線の影響は、年齢や性別によっても異なることが報告されている<sup>43,44</sup>。さらなる研究により、年齢と性別が放射線誘発抗酸化物質の変化に影響を与えるかどうかを調べる必要がある。第三の問題は、被ばく後700日以降に3 Gy群および5 Gy群においてサンプル数が減少し、統計的検出力が低下した点である。これは、3 Gyおよび5 Gyの照射を受けたマウスのほとんどが700日以前に死亡したためであり、限られた飼育スペースしか利用できずサンプル数を増やせなかったためである。ゆえに、700日以上群における生存率バイアスを考慮する必要がある。

## V 結論

- ① 血液抗酸化能、リンパ球DNA損傷、リンパ球ミトコンドリア損傷、リンパ球酸化ストレス応答の4つの指標を組み合わせたことが、各指標単独よりも精度良く被ばく線量を推定することを明らかにした。
- ② 微量のヒト血液サンプルを用いてDNA損傷の測定を現場で迅速かつ簡便に行うための新規マイクロ流路チップを開発するとともに、チップへの送液を全自動で行うための送液モジュールを開発した。
- ③ 被ばく後の血液の長期的な炎症反応と抗酸化能の変化を解析した。マウスでは広島長崎の原爆被爆者で観察されたような長期的な炎症反応は観察できなかった。

## VI 次年度以降の計画

- ① 4指標の組み合わせによるバイオドシメトリの慢性被ばくに対する推定精度（検出限界含む）の解析を行う。
- ② 引き続き、DNA損傷測定システムの開発を行う。また、健康人ボランティアや放射線治療患者由来の試料、福島野生ニホンザルの試料の測定を行う。
- ③ 血液抗酸化能、リンパ球DNA損傷、リンパ球ミトコンドリア損傷、リンパ球酸化ストレス応答の被ばく後長期的な変化を明らかにし、晩期障害（特に白内障）や臓器のレドックス状態との相関を解析する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

### ア) 雑誌

- 1) Sun, L., Inaba, Y., Sogo, Y., Morikawa, et al. Analysis of whole-blood antioxidant capacity after chronic and localized irradiation using the i-STrap method. *Journal of Radiation Research*, 2022, 63 (1), 30-35.

### イ) 単行本

該当なし

## 引用文献

- 1 櫻田尚樹. 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. 労災疾病臨床研究事業費補助金、報告書（2016）.
- 2 Iaea. *Cytogenetic analysis for radiation dose assessment*. （2001）.
- 3 青木芳朗. バイオドシメトリ概論. *Radioisotopes* 44, 8 （1995）.
- 4 稲葉次郎. バイオドシメトリ—6-世界の放射線事故例にみるバイオドシメトリ. *Radioisotopes*

- 45, 9 (1996) .
- 5 数藤由美子. 放射線被ばく事故・テロに備えた染色体解析による被ばく線量評価法の研究開発. *科学研究費助成事業研究成果報告書* (2020) .
- 6 Flood, A. B. *et al.* Evaluating the special needs of the military for radiation biodosimetry for tactical warfare against deployed troops: comparing military to civilian needs for biodosimetry methods. *Health physics* **111**, 169 (2016) .
- 7 茨城県生活環境部. 避難時間推計シミュレーションの結果について.
- 8 Kobashigawa, S., Kashino, G., Suzuki, K., Yamashita, S. & Mori, H. Ionizing radiation-induced cell death is partly caused by increase of mitochondrial reactive oxygen species in normal human fibroblast cells. *Radiation research* **183**, 455-464 (2015) .
- 9 Ogura, A. *et al.* Redox regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung carcinoma A549 cells. *Cancer letters* **277**, 64-71 (2009) .
- 10 Tominaga, H., Kodama, S., Matsuda, N., Suzuki, K. & Watanabe, M. Involvement of reactive oxygen species (ROS) in the induction of genetic instability by radiation. *Journal of radiation research* **45**, 181-188 (2004) .
- 11 Volkova, P. Y., Geras'kin, S. A. & Kazakova, E. A. Radiation exposure in the remote period after the Chernobyl accident caused oxidative stress and genetic effects in Scots pine populations. *Scientific reports* **7**, 1-9 (2017) .
- 12 Urushihara, Y. *et al.* Analysis of plasma protein concentrations and enzyme activities in cattle within the ex-evacuation zone of the Fukushima Daiichi nuclear plant accident. *PloS one* **11**, e0155069 (2016) .
- 13 Malekiran, A. A. *et al.* Oxidative stress in radiology staff. *Environmental toxicology and pharmacology* **20**, 215-218 (2005) .
- 14 Sun, L. *et al.* Total body irradiation causes a chronic decrease in antioxidant levels. *Sci Rep* **11**, 6716, doi:10.1038/s41598-021-86187-1 (2021) .
- 15 盛武敬、志村勉、中村麻子. 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. 令和2年放射線健康管理・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) 報告書 (2020) .
- 16 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放射線リスク・防護研究基盤準備委員会. 放射線リスク・防護研究基盤準備委員会報告書. (2017) .
- 17 Pinto, J. T. *et al.* Measurement of sulfur-containing compounds involved in the metabolism and transport of cysteamine and cystamine. Regional differences in cerebral metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**, 3434-3441, doi:10.1016/j.jchromb.2009.05.041 (2009) .
- 18 Hayashi, T. *et al.* Radiation dose-dependent increases in inflammatory response markers in A-bomb survivors. *International journal of radiation biology* **79**, 129-136 (2003) .
- 19 Hayashi, T. *et al.* Evaluation of systemic markers of inflammation in atomic-bomb survivors with special reference to radiation and age effects. *The FASEB Journal* **26**, 4765-4773 (2012) .
- 20 Stewart, F. *et al.* ICRP publication 118: ICRP statement on tissue reactions and early and late effects of radiation in normal tissues and organs—threshold doses for tissue reactions in a radiation protection context. *Annals of the ICRP* **41**, 1-322 (2012) .
- 21 藤通, 有., 小佐古, 敏., 吉田, 和. & 浜田, 信. 放射線白内障に対するしきい線量の科学的根拠

- と課題. *保健物理* **48**, 97-103, doi:10.5453/jhps.48.97 (2013) .
- 22 Preston, D. L., Shimizu, Y., Pierce, D. A., Suyama, A. & Mabuchi, K. Studies of mortality of atomic bomb survivors. Report 13: Solid cancer and noncancer disease mortality: 1950-1997. *Radiat Res* **160**, 381-407, doi:10.1667/rr3049 (2003) .
- 23 Yamada, M., Wong, F. L., Fujiwara, S., Akahoshi, M. & Suzuki, G. Noncancer disease incidence in atomic bomb survivors, 1958-1998. *Radiat Res* **161**, 622-632, doi:10.1667/rr3183 (2004) .
- 24 Carey, J. W., Pinarci, E. Y., Penugonda, S., Karacal, H. & Ercal, N. In vivo inhibition of l-buthionine- (S, R) -sulfoximine-induced cataracts by a novel antioxidant, N-acetylcysteine amide. *Free Radical Biology and Medicine* **50**, 722-729 (2011) .
- 25 Díaz-Hung, M.-L. *et al.* Transient glutathione depletion in the substantia nigra compacta is associated with neuroinflammation in rats. *Neuroscience* **335**, 207-220 (2016) .
- 26 Rodríguez-Gómez, I. *et al.* Role of sympathetic tone in BSO-induced hypertension in mice. *American journal of hypertension* **23**, 882-888 (2010) .
- 27 Rosenblat, M., Coleman, R. & Aviram, M. Increased macrophage glutathione content reduces cell-mediated oxidation of LDL and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **163**, 17-28 (2002) .
- 28 Rajasekaran, N. S., Sathyanarayanan, S., Devaraj, N. S. & Devaraj, H. Chronic depletion of glutathione (GSH) and minimal modification of LDL in vivo: its prevention by glutathione mono ester (GME) therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -Molecular Basis of Disease* **1741**, 103-112 (2005) .
- 29 Gokce, G. *et al.* Glutathione depletion by buthionine sulfoximine induces oxidative damage to DNA in organs of rabbits in vivo. *Biochemistry* **48**, 4980-4987 (2009) .
- 30 Richie, J. P., Komninou, D. & Albino, A. P. Induction of colon tumorigenesis by glutathione depletion in p53-knock-out mice. *International journal of oncology* **30**, 1539-1543 (2007) .
- 31 Rivina, L., Davoren, M. J. & Schiestl, R. H. Mouse models for radiation-induced cancers. *Mutagenesis* **31**, 491-509, doi:10.1093/mutage/gew019 (2016) .
- 32 Beatty, A. *et al.* Metabolite profiling reveals the glutathione biosynthetic pathway as a therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Molecular cancer therapeutics* **17**, 264-275 (2018) .
- 33 Otsuki, Y. *et al.* Vasodilator oxyfedrine inhibits aldehyde metabolism and thereby sensitizes cancer cells to xCT-targeted therapy. *Cancer science* **111**, 127-136 (2020) .
- 34 <https://www.funakoshi.co.jp/contents/8754>.
- 35 Neriishi, K., Nakashima, E. & Delongchamp, R. Persistent subclinical inflammation among A-bomb survivors. *International journal of radiation biology* **77**, 475-482 (2001) .
- 36 Wong, F. L., Yamada, M., Sasaki, H., Kodama, K. & Hosoda, Y. Effects of radiation on the longitudinal trends of total serum cholesterol levels in the atomic bomb survivors. *Radiation research* **151**, 736-746 (1999) .
- 37 Kurokawa, Y. The Late Effects of Atomic Bomb Injuries in Hiroshima and Nagasaki. *Nagoya Journal of Medical Science* **82**, 187-202 (1955) .
- 38 Chua, H. L. *et al.* Long-term hematopoietic stem cell damage in a murine model of the hematopoietic syndrome of the acute radiation syndrome. *Health Phys* **103**, 356-366, doi:10.1097/HP.0b013e3182666d6f (2012) .

- 39 Robbins, M. E. & Zhao, W. Chronic oxidative stress and radiation-induced late normal tissue injury: a review. *Int J Radiat Biol* **80**, 251-259, doi:10.1080/09553000410001692726 (2004) .
- 40 Robbins, M. E., Zhao, W., Davis, C. S., Toyokuni, S. & Bonsib, S. M. Radiation-induced kidney injury: a role for chronic oxidative stress? *Micron* **33**, 133-141 (2002) .
- 41 Kang, S. K. *et al.* Overexpression of extracellular superoxide dismutase protects mice from radiation-induced lung injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **57**, 1056-1066, doi:10.1016/s0360-3016 (03) 01369-5 (2003) .
- 42 Yin, Z., Yang, G., Deng, S. & Wang, Q. Oxidative stress levels and dynamic changes in mitochondrial gene expression in a radiation-induced lung injury model. *Journal of radiation research* **60**, 204-214 (2019) .
- 43 Narendran, N., Luzhna, L. & Kovalchuk, O. Sex Difference of Radiation Response in Occupational and Accidental Exposure. *Front Genet* **10**, 260, doi:10.3389/fgene.2019.00260 (2019) .
- 44 Takabatake, M. *et al.* Differential effect of parity on rat mammary carcinogenesis after pre- or post-pubertal exposure to radiation. *Sci Rep* **8**, 14325, doi:10.1038/s41598-018-32406-1 (2018) .

# Prediction of long-term radiation effects by combining multiple biological indicators

Takashi Moritake,<sup>1</sup> and Asako Nakamura<sup>2</sup>

*1 Department of Radiation Regulatory Science Research, National Institute of Radiological Sciences, National Institute for Quantum Science and Technology, 4-9-1, Anagawa, Inage-ku, Chiba 263-8555, Japan*

*2 Department of Biological Sciences, College of Science, Ibaraki University, 2-1-1 Bunkyo, Mito, Ibaraki 310-8515, Japan*

*Keywords:* Late effects, biodosimetry, redox, Mitochondria, DNA damage, telomeres

## **Abstract**

In the event of a large-scale disaster, dosimetry based on biological indices (biodosimetry) is essential for maintaining a robust response to radiation disasters. Consequently, biodosimetric methods involving multiple techniques must be devised to increase the reliability of dosimetry readings. In 2021, we evaluated the accuracy and sensitivity of a dosimetry method that combines four indices: blood antioxidant capacity, DNA damage, nuclear factor-erythroid 2-related factor expression and mitochondrial damage. We found that the combination of the four indices estimated exposure doses more accurately than each indicator applied individually. We developed a novel microfluidic chip for rapid and easy on-site measurement of DNA damage using trace human blood samples, as well as a pumping module to fully automate the pumping of liquid to the chip. We analyzed changes in the long-term inflammatory response and the antioxidant capacity of the blood and eyes of mice after radiation exposure and found that the antioxidant capacity of the eyes and blood differed slightly after irradiation. However, compared to the long-term inflammatory responses observed in atomic bomb survivors from Hiroshima and Nagasaki, no similar responses were observed in mice.