

## 1-1 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

主任研究者：盛武敬（産業医科大学産業生態科学研究所放射線衛生管理学 准教授）

分担研究者：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）

分担研究者：中村麻子（茨城大学理学部 教授）

若手加速：マヘッシュ・プラサド・ベカル  
（産業医科大学産業生態科学研究所放射線衛生管理学 特任助教）

### 研究要旨

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。

研究代表者と研究分担者は、被ばく後早期（数分～数日）の生体応答をそれぞれ異なる観点から研究してきた。本研究では、各々の研究をバイオドシメトリ手法に昇華させ、さらにそれらを組み合わせることによって、感度と精度が担保された、簡便性・迅速性・経済性に優れたバイオドシメトリシステムの技術基盤構築を目指す。具体的には、①血液抗酸化能、ミトコンドリア損傷、DNA 損傷、テロメア損傷について、被ばく後の変化パターンとメカニズムを明らかにする ②これら生物学的指標を測定する簡便かつ迅速な手法の開発を行う ③これら生物学的指標を組み合わせたバイオドシメトリシステムを社会実装するための提案を行う。

初年度（H30 年度）は、被ばく後の血液抗酸化能の変化パターンをマウス実験によって詳細に調べた。また、被ばく後のミトコンドリア損傷やテロメア損傷を細胞実験によって定量した。さらに、DNA 損傷評価（ $\gamma$ -H2AX 染色）を迅速化するデバイスの開発やミトコンドリア損傷を定量するシステムの構築を行った。

次年度（H31/R1 年度）は、微量ヒト血液サンプルを用いて DNA 損傷を迅速かつ簡便に定量する新規マイクロ流路チップ「PDMS チップ」を開発し、これを用いて放射線被ばく評価が可能であることを示して特許出願した。また、新たな線量推定指標として、血漿過酸化脂質、血漿抗酸化能、リンパ球 NRF2 発現、リンパ球テロメア長、血球代謝物の定量を試みた。血漿過酸化脂質、血漿抗酸化能の定量では十分な精度・感度が認められなかったが、リンパ球 NRF2 発現、リンパ球テロメア長、血球代謝物の定量では線量依存的かつ鋭敏な変化が認められ、工夫次第でこれらが有用な線量推定指標となる可能性を示した。継続して行ってきた i-STrap 法〔血液（全血）抗酸化能測定法〕を用いた実験では、局所急性被ばくや全身慢性被ばく後の抗酸化能の変化を明らかにしつつあり、今後も引き続きデータを取得する予定である。さらに、3 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）による線量推定手法の精度・感度を評価するため、新たな実験を開始した。

最終年度 (R2 年度) は、リンパ球ミトコンドリア損傷とリンパ球 NRF2 発現が新規バイオドシメトリ指標となりうることをマウス実験により明らかにした。さらに、前年度 (H31/R1 年度) に開発したマイクロ流路チップを実用化するため、ベンチャー企業を立ち上げた。i-Strap 法による局所急性被ばくや全身慢性被ばく後の血液抗酸化能変化の解析を継続し、データを積み上げた。放射線被ばくしたマウスの高次脳機能障害を解析し、1Gy 以上の被ばくで、有意な不安度の増加と短期記憶障害が観察された。初年度に提唱した「組み合わせによる線量推定手法に関する実験」を実施した。日本放射線影響学会においてワークショップを主催し、本研究の成果を専門家らと議論した。

**キーワード：**放射線災害、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

## 研究協力者

孫略（産業技術総合研究所健康工学研究部門 研究員）  
千田浩一（東北大学災害科学国際研究所 教授）  
河合秀彦（広島大学大学院医歯薬保健学研究院 准教授）  
鈴木孝明（群馬大学大学院理工学府知能機械創製部門 教授）

## 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、生命や健康が脅かされる。放射線災害発生初期対応において、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。1Gy 以上の被ばくの場合、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と選別）の基準となり、医師が治療計画を立てる際に必要となる。さらに、数週間から数ヶ月後に対象者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。また、1Gy 以下の被ばく（治療が必要とされるレベル）の場合、医師が被曝者に対して放射線晩発障害（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線量情報が必要となる。被ばく線量が 50mGy 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 (1)。

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°C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想定され、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。

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。

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 および International Atomic Energy Association Technical Report Series No. 405 (IT405)）。国際標準規格は ISO の方であるが、18,216 円（税込）で購入する必要がある。無料で閲覧できる IT405 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 つが細胞遺伝学的手法のバイオドシメトリとして記載されている。これらの検出限界は 0.3~0.5Gy 程度とされているが、二動原体の場合、目視による解析には熟練者でも 1 検体あたり 30 時間必要となる (2)。また、二動原体の解析、転座の解析、小核アッセイ法では、48 時間の細胞培養を必要とする。細胞培養を必要としない未成熟染色体凝集法が一番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 (2)。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に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し、対策の頑強性を保ち、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 (3)。本邦では、そのような数値目標は管見の限り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 5km 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」、30km 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 内の人口が約 8 万人、UPZ 内の人口が約 90 万人である (4)。放出される放射性物質の量も関係するので、一概にバイオドシメトリ実施に関する（発生後 XX 時間以内に XX 例の検査を実施するといった）数値目標を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える。さらに、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は、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 (5-7)。また、慢性的な放射線被ばくを受ける医療従事者や福島第一原発事故で被災した牛、チェルノブイ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）(8-10)。興味深いことに、放射線の晩発影響の多く（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ことが知られている。それらのことから、晩発影響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 (11)。そこで、我々は放射線被ばくという物理現象と生物影響をつなぐ鍵として、酸化ストレス（関連指標）に着目した。

本研究では、①酸化ストレスに着目した新規バイオドシメトリ指標の開発を行った。主任研究者の盛武が血液抗酸化能を、分担研究者の志村がミトコンドリア損傷を指標としたバイオドシメトリの開発を行った。②分担研究者の中村が DNA 損傷を指標としたバイオドシメトリを迅速化

するためのデバイスを開発した。③これら 3 指標（血液抗酸化能・ミトコンドリア損傷・DNA 損傷）を組み合わせた複合バイオドシメトリ理論を提唱し、その検証実験を行った。④被ばく後の中長期的な抗酸化能変化を調査し、高次脳機能への影響を調べた（若手加速）。

この主任研究者の報告書では、主任研究者の成果の詳細と研究の総括について報告する。分担研究者の成果の詳細については、各分担研究者の報告書をご参照いただきたい。

## II. 研究方法

ここには、研究代表者が実施した研究(実験)方法を記載する。研究分担者の研究(実験)方法については、分担者の報告書をご覧ください。

### 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

#### ① 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 0.69Gy/min、焦点～テーブル面距離 550mm、管電圧 150kV、電流 20mA、フィルター 0.2mmCu および 0.5mmAl の条件下で、回転させながら照射した。

下記③の全身慢性照射のポジティブコントロールとして実施した急性照射には、産業医科大学 RI センターに設置されたガンマセル（セシウム 137）装置を用いた。線量率は約 0.65Gy/min であった。

#### ② 局所急性照射

マウスの腹腔内に 200 $\mu$ L/20g の三種混合麻酔（メドミン・ドルミカム・ベトルフェール）を注射してマウスを完全に眠らせ、照射対象である左脚以外を遮蔽板（X 線管側から順に、鉛 0.5mm 厚、アルミ 3mm 厚、真鍮 3mm 厚をを重ねた）により遮蔽した。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 0.816Gy/min、焦点～テーブル面距離 550mm、管電圧 150kV、電流 20mA、フィルター 0.2mmCu および 0.5mmAl の条件下で、回転させながら照射した。なお、蛍光ガラス線量計を用いて測定した遮蔽効率は約 96.5%であった。

#### ③ 全身慢性照射

産業医科大学 RI センターに設置されたガンマ線（セシウム 137）照射装置を用いて照射を行った。照射中は、マウスを 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、ガンマ線照射台の上で飼育した（図II-1）。線量率は 12.5mGy/h または 42mGy/h とした。



図II-1 ガンマ線照射装置の写真

### 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（5MM ; goldenrod）を穿刺し、1.5mL マイクロチューブ（BIO-BIK）に採血した。抗凝固剤として 2000U のヘパリンナトリウム（和光純薬）20 $\mu$ L を使用し、採血後は水中保存した。

### 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-2）

#### ① i-Strap ステップ 1 《反応》

Reaction tube（キット同梱）に、常温に戻した Solution A (tert-butyl hydroperoxide (tBuOOH) ; キット同梱) を各 20 $\mu$ L 分注し、生理食塩水を 100 $\mu$ L 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、常温に戻した Solution B (2-diphenylphosphinoyl-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole N-oxide (DPhPMPO) ; 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、3000xg 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 0.3g が入っている）に入れて軽く

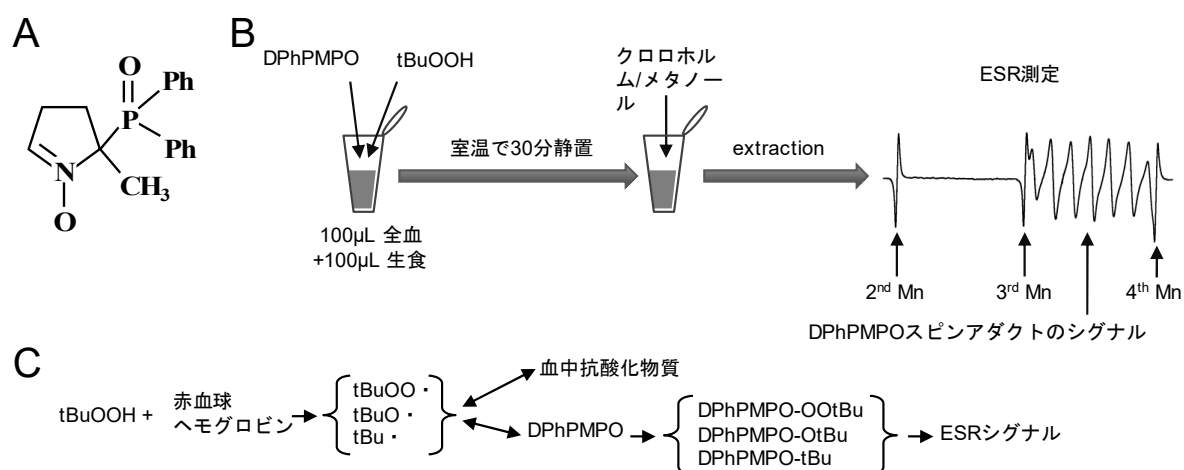
攪拌し、氷中で15分間冷却した後、 $-80$ 度で保存した。

### 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  $160\mu\text{L}$  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 :  $9.423719000\text{GHz}$ 、マイクロ波出力 :  $2.00000\text{mW}$ 、フィールドセンター :  $332.000\text{mT}$ 、スイープ幅 :  $0.3000\text{mT}$ 、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 ( $\text{Mn}^{2+}$ ) 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

$\text{tBuOOH}$  と血液中のヘモグロビンが反応し、 $\text{tBuOO}\cdot$  (tert-butylperoxyl radicals) が生成される。 $\text{tBuOO}\cdot$  はさらに血中の物質と相互作用し、 $\text{tBuO}\cdot$  (tert-butylloxy radicals) や  $\text{tBu}\cdot$  (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 (血中抗酸化剤能力が低い) 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. 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  $3000\text{g}$ 、 $4$  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 (IM SI-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  $70\mu\text{L}$  添加して IM SI-3511 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。

## 6. 赤血球 NADP+および NADPH の定量

赤血球 NADP+および NADPH の定量には、NADP/NADPH Assay Kit (同仁化学研究所) を使用し

た。採取した血液を 1000xg で 10 分間遠心して血漿と血球を分離し、取り出した赤血球 20 $\mu$ L に Extraction Buffer (キット同梱) 500 $\mu$ L を加えて懸濁した後、12,000xg、4 度で 5 分間遠心した。遠心後、上清 450L を Filtration チューブ (キット同梱) に入れて 12,000xg、4 度で 10 分間遠心し、濾液 50 $\mu$ L ずつを分注して、測定まで-80 度で保存した。総 NADP+/NADPH 測定用は、4 度で解凍して Control buffer (キット同梱) 100 $\mu$ L を加えた。NADPH 測定用は、室温解凍後に 60 度で 1 時間加熱し、室温に戻した後、Control buffer (キット同梱) 100 $\mu$ L を加えた。規定量の Dye Mixture (キット同梱)、Assay Buffer (キット同梱)、Enzyme (キット同梱) を各サンプルに加え、37 度で 1 時間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー (Varioskan LUX ; Thermo Fisher) で 450nm のフィルターを使い、それぞれの吸光度を測定した。測定後、標準曲線によって吸光度から濃度に変換し、総 NADP+/NADPH および NADPH の量を求めた。NADP+の量は、総 NADP+/NADPH から NADPH の量を引くことにより算出した。

#### 7. 赤血球 NAD+および NADH の定量

赤血球 NAD+および NADH の定量には、NAD/NADH Assay Kit (同仁化学研究所) を使用した。採取した血液を 1000xg で 10 分間遠心して血漿と血球を分離し、取り出した赤血球 20 $\mu$ L に Extraction Buffer (キット同梱) 500 $\mu$ L を加えて懸濁した後、12,000xg、4 度で 5 分間遠心した。遠心後、上清 450L を Filtration チューブ (キット同梱) に入れて 12,000xg、4 度で 10 分間遠心し、濾液 50 $\mu$ L ずつを分注して、測定まで-80 度で保存した。総 NAD+/NADH 測定用は、4 度で解凍して Control buffer (キット同梱) 100 $\mu$ L を加えた。NADH 測定用は、室温解凍後に 60 度で 1 時間加熱し、室温に戻した後、Control buffer (キット同梱) 100 $\mu$ L を加えた。規定量の Dye Mixture (キット同梱)、Assay Buffer (キット同梱)、Enzyme (キット同梱) を各サンプルに加え、37 度で 1 時間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー (Varioskan LUX ; Thermo Fisher) で 450nm のフィルターを使い、それぞれの吸光度を測定した。測定後、標準曲線によって吸光度から濃度に変換し、総 NAD+/NADH および NADH の量を求めた。NAD+の量は、総 NAD+/NADH から NADH の量を引くことにより算出した。

#### 8. 血清 NO の定量

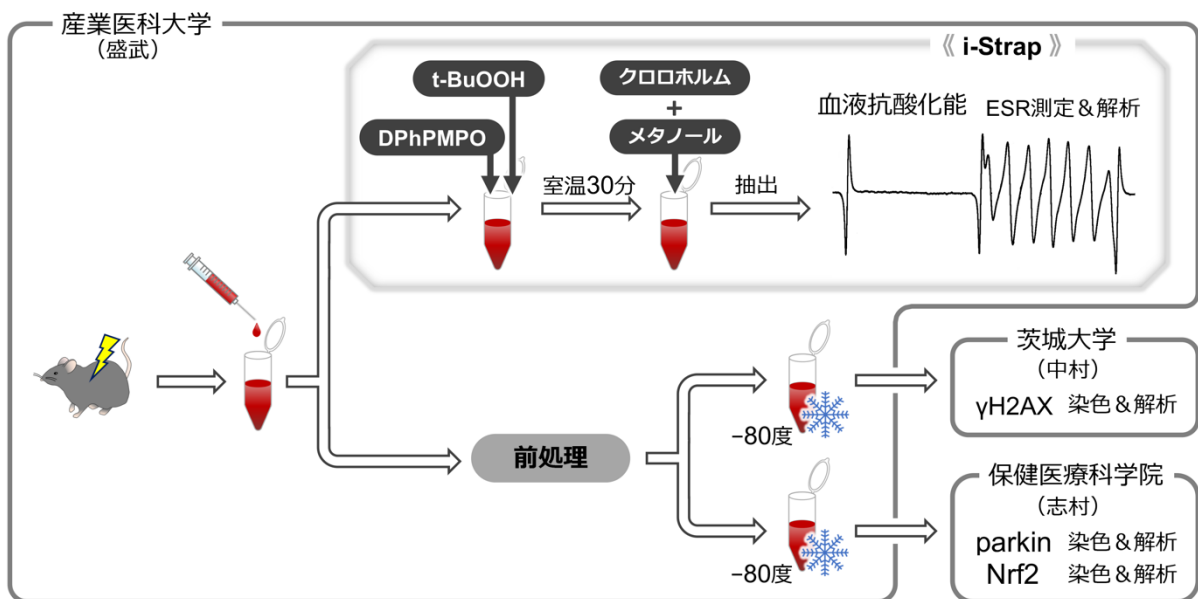
血清の NO (実際には NO<sub>2</sub><sup>-</sup>+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>の量) を NO<sub>2</sub>+NO<sub>3</sub> Assay Kit-CII (Colorimetric) ~Griess Reagent Kit~を使用して測定した。採取した血液を 1200xg で 15 分間遠心し、血清と血球を分離した。除タンパクには、Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-10 membrane (Millipore) を使用した。純水で予洗後、血清を入れて 4000xg、4 度で 20 分間遠心し、濾液を新しいチューブに入れて測定まで-80 度で保存した。室温で解凍後、規定量の補酵素 (キット同梱)、還元酵素 (キット同梱) を加えて、室温で 2 時間静置した。その後、試薬 A (キット同梱) を加えて 5 分間静置し、さらに試薬 B を加えて室温で 10 分間静置した。マイクロプレートリーダー (Varioskan LUX ; Thermo Fisher) で 540nm のフィルターを使い、それぞれの吸光度を測定した。測定後、標準曲線によって吸光度から濃度に変換した。

9. 3 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+Nrf2 発現）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、Nrf2 発現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 3mL の Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) を入れ、1000xg で 30 秒間遠心することで、Ficoll-Paque PLUS を多孔質バリアの下へ移動させた。その後、全血 1.2~1.5mL と PBS1.5mL を順に入れ、700xg、室温で 25 分間遠心した。多孔質バリアの上にリンパ球の白濁層が観察できるので、それを回収して PBS を加え、300xg、室温で 5 分間遠心した。上清を破棄後、再度 PBS を入れて wash し、300xg、室温で 5 分間遠心して PBS を取り除く。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）0.5mL を加えて懸濁し、室温で 10 分間静置して固定する。500xg、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後、PBS で 3 回 wash し、-80 度で保存した。ドライアイスを含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。



図II-3 組み合わせ実験のスキーム

10. 急性全身被ばく後の高次脳機能障害の評価

2-①に示した方法でマウスに全身急性 X 線照射を行い、7 日後にオープンフィールドテスト、Y-迷路試験、高架式十字迷路テストを行った。

オープンフィールドテストは、新規環境下での自発的な活動性を測定するテストであり、ストレス・不安レベルなどの情動行動機能を評価できる。今回は、直径 60 cm の円形容器の中心にマウスを入れて 10 分間の行動を解析し、フィールド中心付近に滞在した時間を評価指標とした。



Y-迷路試験は、互いに 120°の角度で接続された 3 本のプラスチック製アームを用いて、マウスの認知障害（短期記憶）を定量化するテストである。今回は、1 本のアームにマウスを入れた後、5 分間自由に行動させ、直近 2 回とは異なるアームに入った割合を算出した。

高架式十字迷路テストは、壁を持つアーム（クローズドアーム）と壁のないアーム（オープンアーム）を高所（約 50cm）で組み合わせた十字の迷路であり、不安様行動がテストされる。今回は、クローズドアームにマウスを置いた後、5 分間自由行動させ、オープンアームに滞在した時間を計測した。

#### 11. 機械学習を用いた高次脳機能障害の評価

オープンフィールドテストで得られた数値（平均行動速度、方向転換、旋回、区画横切り、立ち上がり、内外滞在時間、内外行動時間、内外行動距離など）を機械学習の一つである自己組織化マップ（SOM）にインプットし、その行動特性を評価した。

#### 12. 急性全身被ばく後のホルモン量の評価

2-①に示した方法でマウスに全身急性 X 線照射を行い、7 日後に脳（全脳、扁桃体、海馬）および血漿に含まれるホルモン量をメーカープロトコルに従って測定した。セロトニン（ImmuSmol SAS；国内代理店フナコシ）、ドーパミン（ImmuSmol；SAS）、GABA（Aviva Systems Biology Corporation；フナコシ）、コルチゾール（Enzo Biochem Inc.；国内代理店コスモバイオ）を測定した。

#### 13. 統計学的评价

抗酸化能の経時的变化については、two-way ANOVA post hoc Dunnett's multiple comparisons test を使用し、対応する 0Gy との有意差検定を行って  $p < 0.05$  を有意とした。高次脳機能障害については、two-way ANOVA post hoc Tukey's multiple comparisons test を使用し、各群の有意差検定を行って  $p < 0.05$  を有意とした。

（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」）。

### III. 研究結果

#### 1. 慢性全身被ばく後の血液抗酸化能の変化

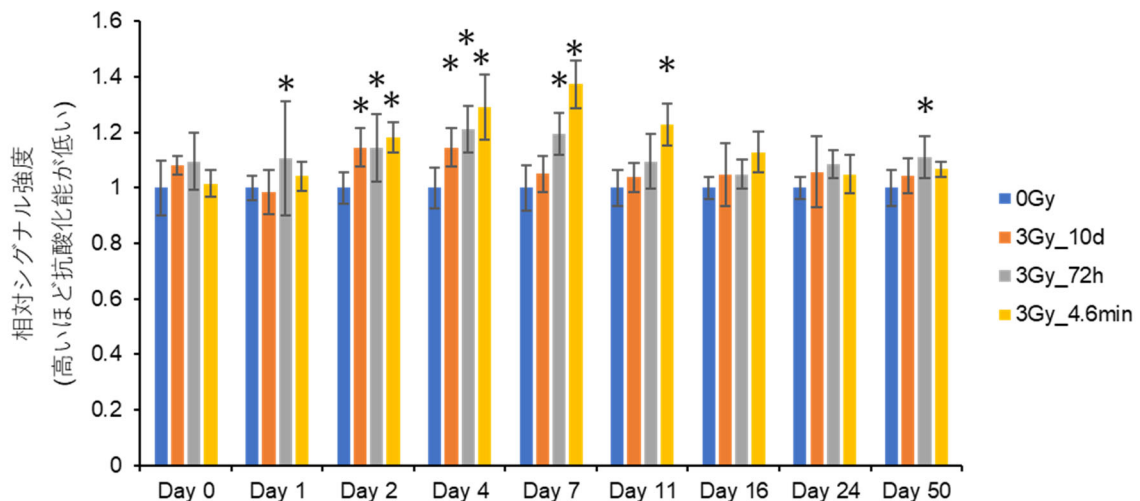
X 線による急性全身被ばく後の血液抗酸化能の変化を i-STrap 法によって解析した結果は、昨年度までの研究報告書をご参照いただきたい。ここでは、慢性全身被ばくの結果について述べる

こととする。

マウスの全身に、線量率 12.5mGy/h で 10 日間、または 42mGy/h で 3 日間、いずれも総線量 3Gy となるように連続でガンマ線を照射した。ポジティブコントロールとして、線量率 0.65Gy/min のガンマ線を使用して 3Gy を急性照射した群を設定した。照射終了直後～50 日後まで経時的に採血し、i-Strap 法を用いて血液抗酸化能を測定したデータを示す (図III-1)。

急性照射では、照射終了 2 日後から有意な抗酸化能低下が観察され、7 日後がピークとなった。その後は徐々に戻り始め、16 日後には 0Gy と有意差が無いまでに戻った。一方、慢性照射 42mGy/h (3 日間) では、1 日後から有意な抗酸化能低下が観察され、4 日後と 7 日後がピークとなった。その後は徐々に戻り始め、11 日後には 0Gy と有意差が無いまでに戻ったが、50 日後に再び有意差がついた。慢性照射 12.5mGy/h (10 日間) では、2 日後から有意差がつき、4 日後がピークと思われた。その後は有意差がつかなかった。

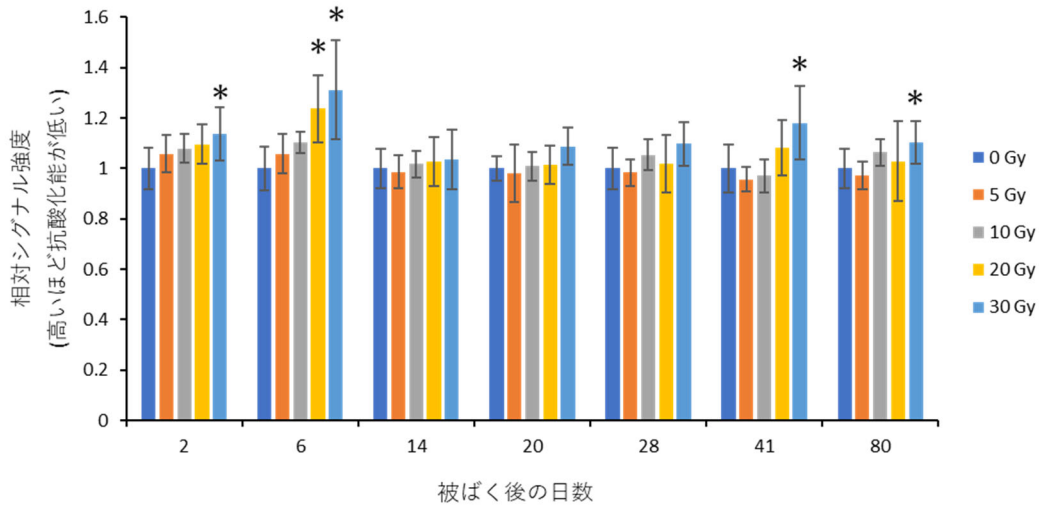
以上のように、線量率が高くなるほど、抗酸化能が大きく低下し、回復に時間を要す結果となった。また、抗酸化能低下のピークは、線量率が低くなるほど前倒しになる傾向にあった。照射終了直後には有意差がつかなかった。詳細な検討が必要であるが、被ばく中は抗酸化能が低下しない可能性があると考えられる。



図III-1 慢性全身被ばく後の血液抗酸化能の変化。\*: P<0.05 v.s. 0 Gy

## 2. 急性局所被ばく後の血液抗酸化能の変化

マウスの左脚大腿部に 5, 10, 20, 30Gy を照射し、2～80 日後に全血の抗酸化能を i-Strap 法によって調べた。結果を図III-2 に示す。10Gy 以下の被ばくは有意差がつかなかったが、20Gy では 6 日後で有意差がつき、30Gy では 2, 6, 41, 80 日後に有意差がついた。

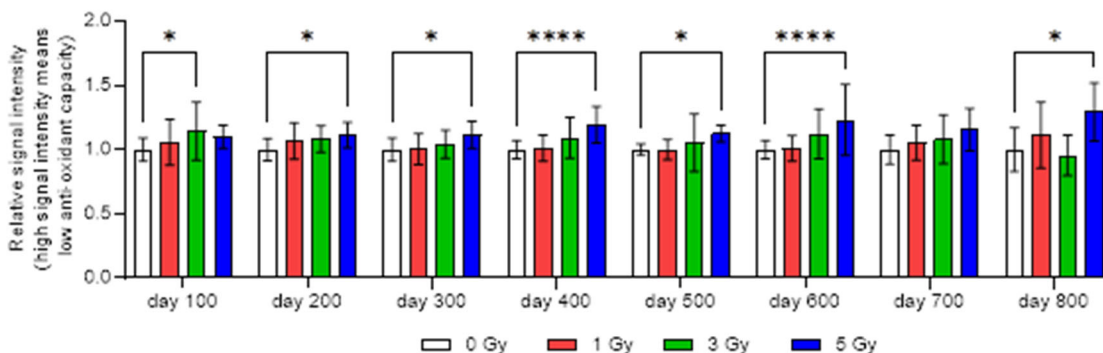


図III-2 急性局所被ばく後の血液抗酸化能の変化。\*: P<0.05 v.s. 0 Gy

### 3. 急性全身被ばく後の血液抗酸化能の変化（長期）

これまでに、急性全身被ばく 50 日後までの血液抗酸化能の変化を示してきた（昨年度と一昨年度の報告書を参照）。興味深いことに、2Gy と 3Gy の被ばくでは 50 日後でも有意な抗酸化能低下が観察され、それ以降どのように変化するかは不明であった。そこで、0, 1, 3, 5Gy 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抗酸化能の変化をモニタリングした。その結果を図III-3 に示す。

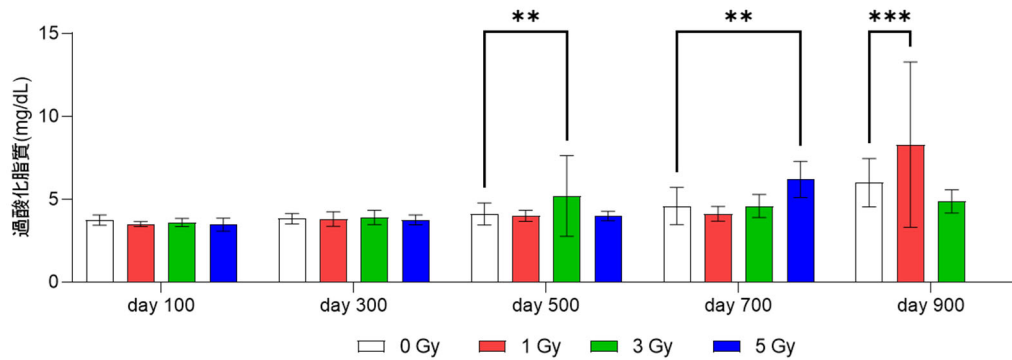
100 日以降、1Gy 群に有意差がつくことはなかった。3Gy 群では 100 日目に有意差があったが、それ以降はなかった。5Gy 群では 200～600, 800 日後で有意差があった。ただし、5Gy 群は 800 日に到達するまでにマウスが死亡するので、800 日後に解析できたのは 2 匹だけであった。1Gy 群では 16 日後に 0Gy 群との有意差がなくなったことから、線量依存的にコントロールレベルまで回復するのに時間がかかることが示唆された。



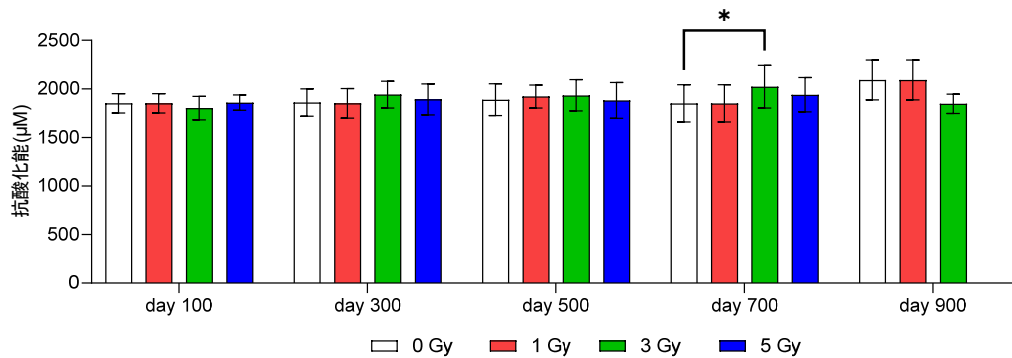
図III-3 急性全身被ばく後の血液抗酸化能の変化。\*: P<0.05, \*\*:P<0.01, \*\*\*:P<0.001, \*\*\*\*:P<0.0001 v.s. 0 Gy

#### 4. 急性全身被ばく後の血漿抗酸化能と血漿過酸化脂質量の変化（長期）

被ばく後 100 日以降の血漿過酸化脂質レベルと血漿抗酸化能の解析を行った。その結果を図III-4, 5 に示す。過酸化脂質は、被ばく後 500 日以降で有意に増加し、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。



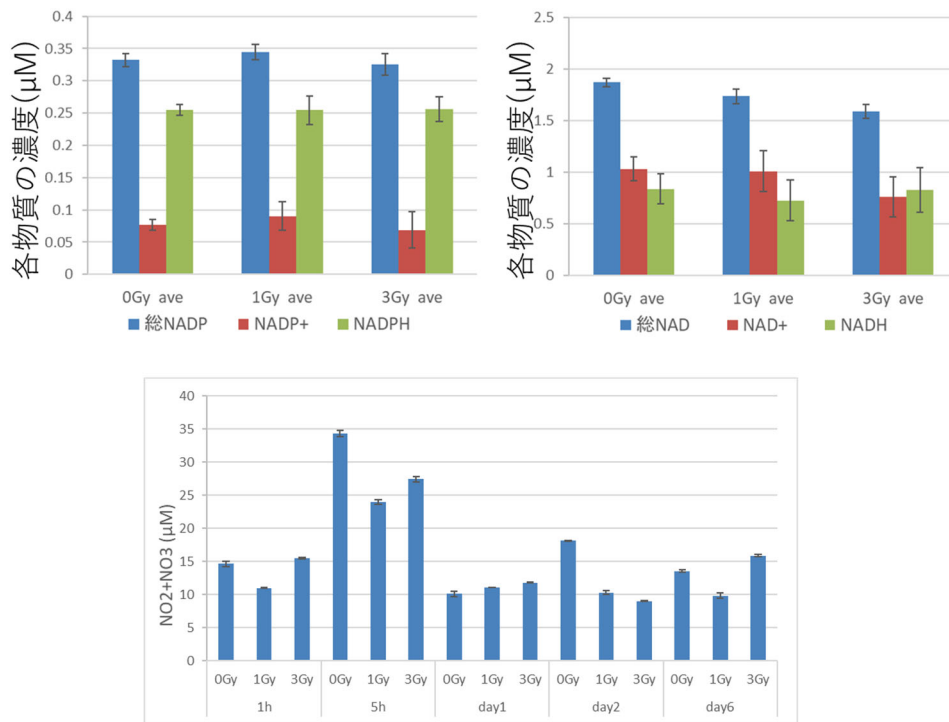
図III-4 急性全身被ばく後の血漿抗酸化能の変化。\*: P<0.05, \*\*:P<0.01, \*\*\*:P<0.001, \*\*\*\*:P<0.0001 v.s. 0 Gy



図III-5 急性全身被ばく後の血漿過酸化脂質量の変化。\*: P<0.05, \*\*:P<0.01, \*\*\*:P<0.001, \*\*\*\*:P<0.0001 v.s. 0 Gy

#### 5. 急性全身被ばく後の赤血球 NADPH、NADH、血清 NO の測定（短期）

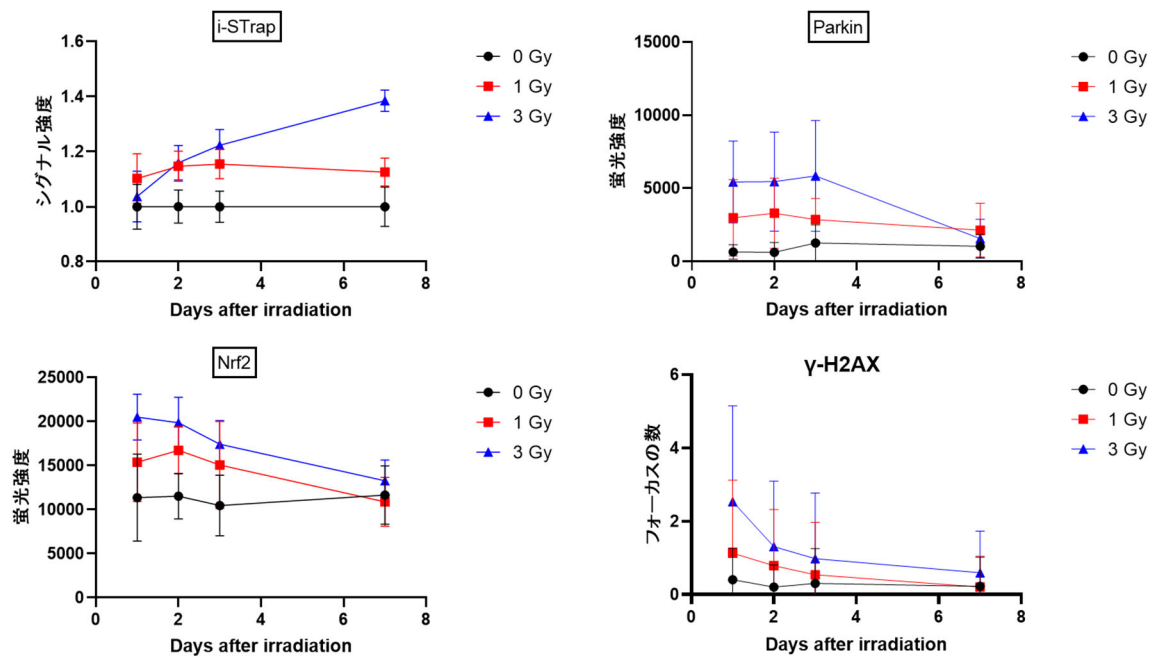
昨年度までに、急性全身被ばく後には血液抗酸化能 (i-STrap)、赤血球のグルタチオン量、血漿過酸化脂質レベルが変化することを明らかにした。赤血球の GPx 活性、GR 活性、SOD 活性は変化しなかった。そこで今年は、グルタチオン代謝と関連がある NADP<sup>+</sup>、NADPH、NAD<sup>+</sup>、NADH、NO の量を解析した。結果を図III-6 に示す。NADP<sup>+</sup>、NADPH、NAD<sup>+</sup>、NADH は、被ばく後 2 日目に採血して測定した。NADP<sup>+</sup>、NADPH の量は変化しなかった。また、NADH も変化がなかったが、NAD<sup>+</sup>はわずかながら線量依存的に減少傾向にあったため、総 NAD<sup>+</sup>/NADH もわずかに減少傾向にあった。NO はいくつかのタイミングで変化があったが、変化の特徴を捉えられなかった。



図III-6 急性全身被ばく後の赤血球 NADPH、NADH、血清 NO の変化

## 6. 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+Nrf2 発現）による線量推定手法の精度・感度を評価するための実験

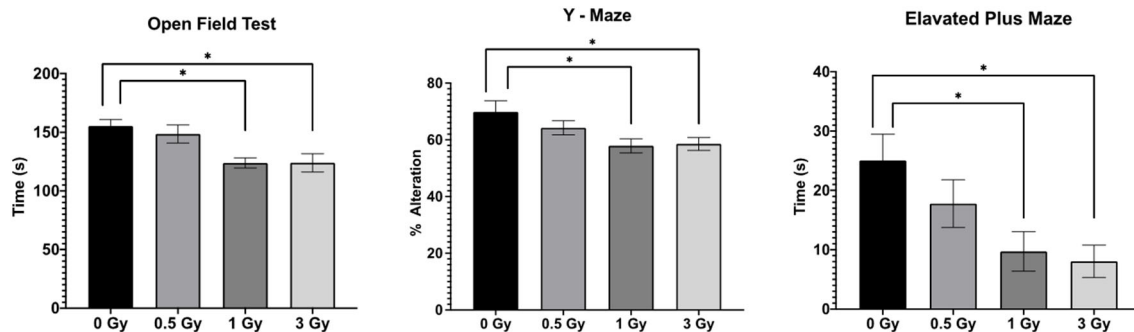
一昨年度に提案した複数指標組み合わせによるバイオドシメトリ理論を実証するため、昨年度は n=4 で予備的な実験を行い、本年度は昨年度の内容に調整を加えた n=12 で再実験を行った。実験スキームは図II-3 の通りである。マウスに照射した後、同一マウスから採取した血液で i-STrap、 $\gamma$ H2AX、parkin、Nrf2 の測定を行った。照射、採血、i-STrap は産業医大で実施した。 $\gamma$ H2AX、parkin、Nrf2 については、前処置までを産業医大で行い、サンプルを茨城大学または保健医療科学院に郵送し、中村と志村がそれぞれ染色&カウントを行った（図II-3）。まず、各指標単独の結果を図III-7 に示す。i-STrap 法による抗酸化能は主に被ばく後 7 日目あたりに（他の指標に比べ）有効である可能性が高く、 $\gamma$ H2AX は発生 24 時間以内、parkin、Nrf2 は 1~3 日後に強い傾向にあることが示され、おおむねこれまでどおりの結果が得られた。なお、新型コロナによる影響で進捗が遅れが生じて一部解析途中であるため、詳細な診断能に関する検討は実施できていない。



図III-7 全身急性被ばく後の各血液指標の変化。

## 7. 高次脳機能障害（行動学的異常）の評価

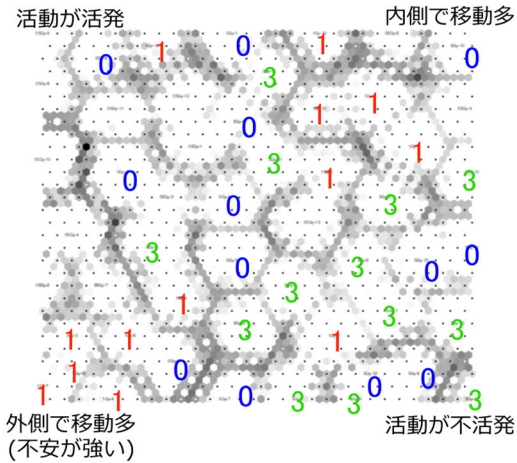
結果を図III-8に示す。オープンフィールドテストでは、1Gy以上の被ばくで、中央部に滞在する時間が短くなった。マウスには本来、狭い場所を好む習性や新規探索を行う習性がある。ゆえに、中央部を探索する時間が減少した（比較的安心できる壁際付近の滞在時間が長くなった）という結果から、照射後にやる気が損なわれた（うつ状態になった）と評価できる。また、高架式十字迷路テストでも、オープンアームに入った回数が減少したことから、照射後にやる気が損なわれた（うつ状態になった）と評価できる。さらに、Y-迷路試験では、新しいアームに入る回数が減少したことから、短期記憶障害が起きている可能性が示唆された。



図III-8 全身急性被ばく後の行動学的変化。\*:  $P < 0.05$  v.s. all groups. (2021, JRR, In press)

8. 高次脳機能障害（機械学習による行動学的異常）の評価

オープンフィールドテストの結果を SOM で解析した。その結果と考察を図III-9 に示す。なお、本機械学習は神崎訓枝先生（国立研究開発法人日本原子力研究開発機構）との共同研究によって行われたものである。

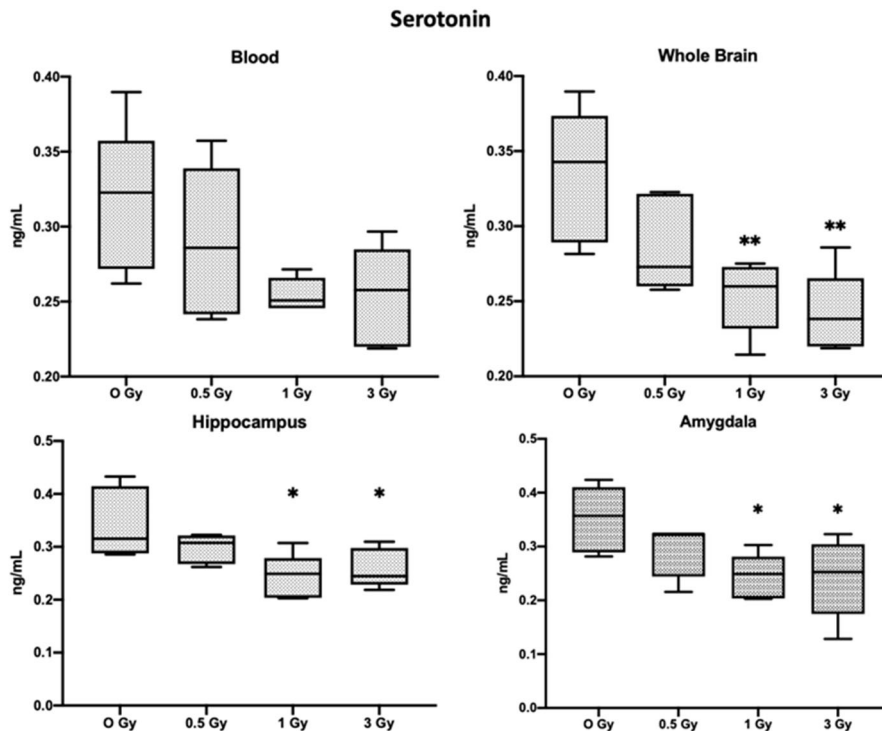


オープンフィールドで得られた結果を自己組織化マップ(SOM)で解析した結果。0は非照射群、1は1Gy、3は3Gyの特徴量を抽出した場所。  
 左上に抽出量が多いほど活動が活発であることを示し、逆に右下に抽出量が多いと不活発であることを示す。  
 右上に抽出量が多いとフィールドの内側での移動が多いことを示し、左下に抽出量が多いと外側での移動が多いことを示す。（オープンフィールドでは不安が大きいと外側(壁に近いところ)での運動が増える）  
 1Gy群が左下に集まり、不安が大きいたことがわかる。3Gy群では右下でに集まり、活動が抑えられていることがわかる。

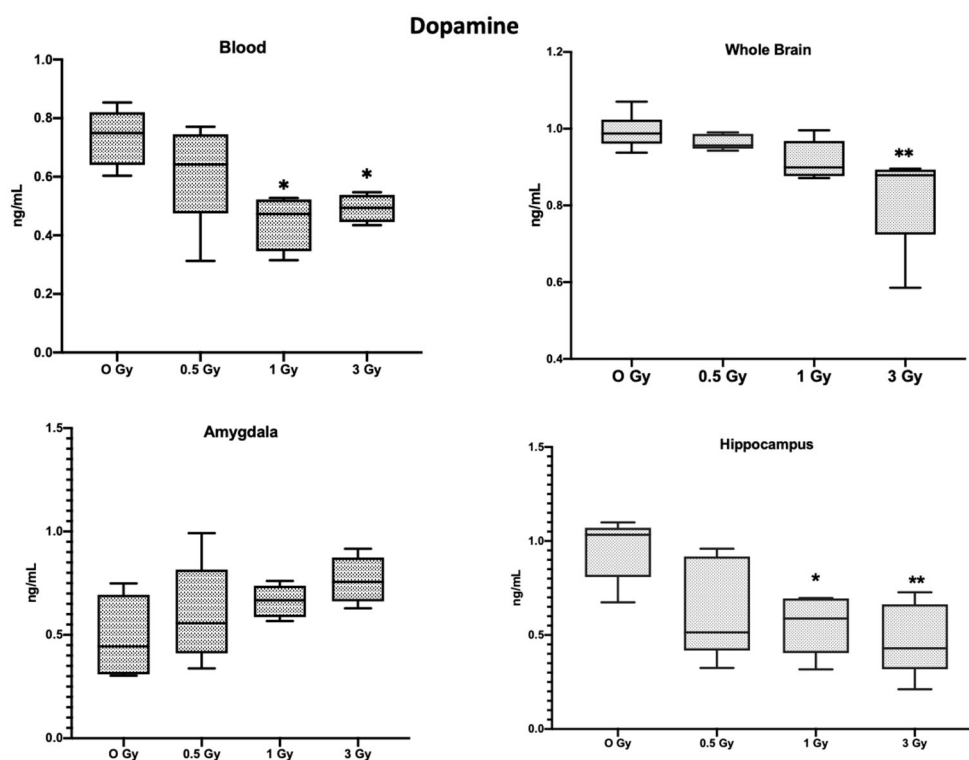
図III-9 機械学習による行動学的異常の解析結果。

9. 高次脳機能障害（ホルモン量）の評価

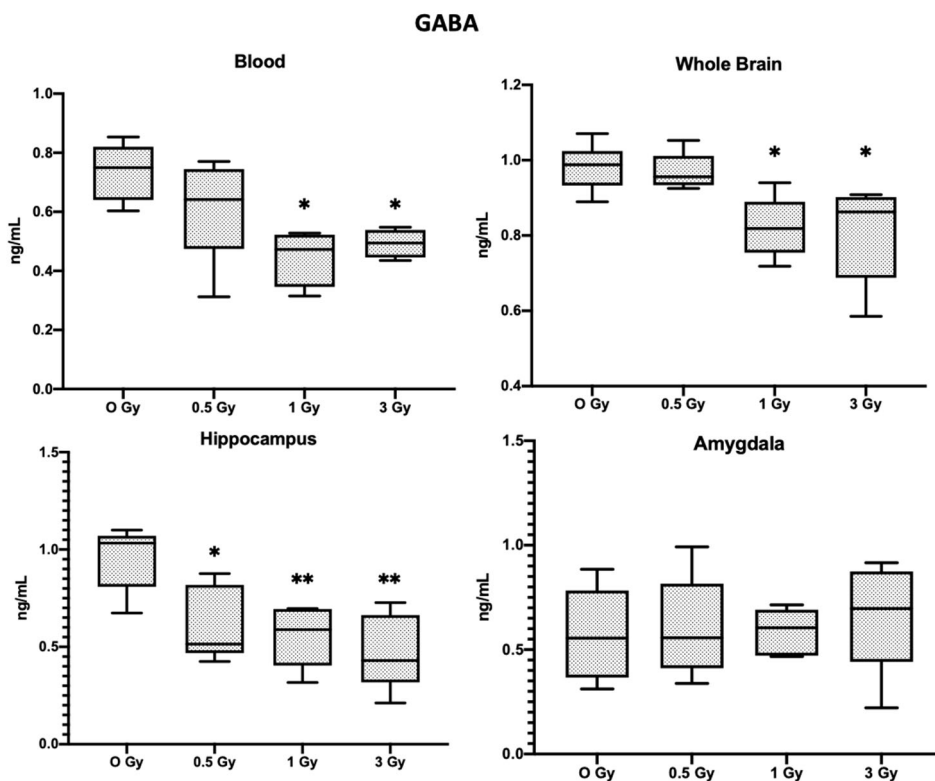
血中および脳内のホルモン量を図III-10～13 に示す。セロトニン、ドーパミン、GABA の減少とコルチゾールの増加が確認できた。



図III-10 全身急性被ばく後のセロトニン量の変化。\*: P<0.05, \*\*: P<0.01 v.s. all groups.

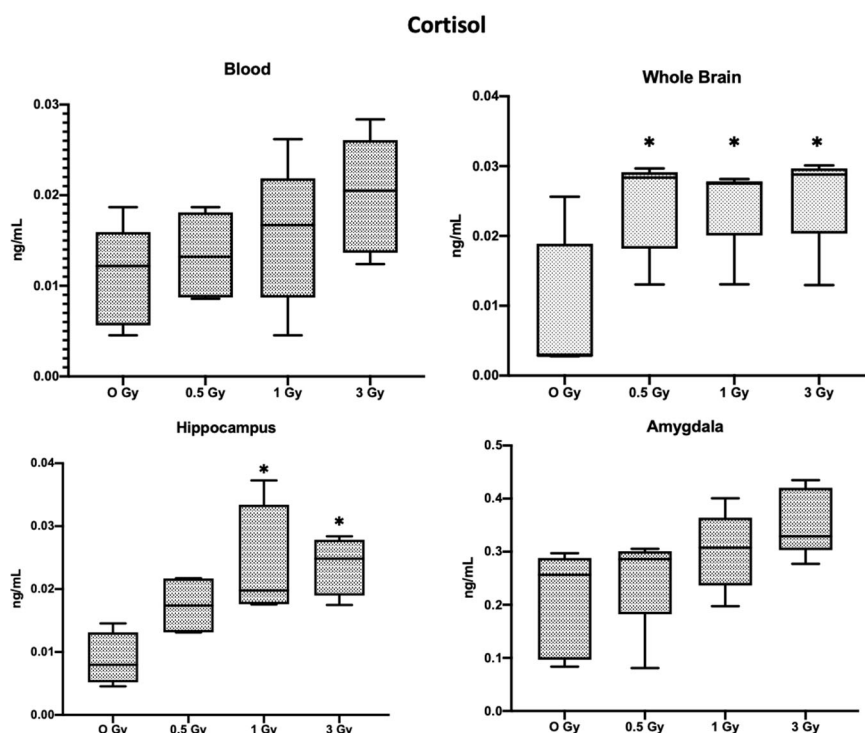


図III-11 全身急性被ばく後のドーパミン量の変化。\*: P<0.05, \*\*: P<0.01 v.s. all groups.



図III-12 全身急性被ばく後の GABA 量の変化。\*: P<0.05, \*\*: P<0.01 v.s. all groups.





図III-13 全身急性被ばく後のコルチゾール量の変化。\*: P<0.05, \*\*: P<0.01 v.s. all groups.

## 10. 分担者実施の研究

分担者により、 $\gamma$ H2AX 測定用チップの開発、バイオドシメトリ指標としてのテロメア長測定の有用性の検討、バイオドシメトリ指標としてのミトコンドリア損傷 (parkin 染色) の有用性の検討、バイオドシメトリ指標としての Nrf2 の発現解析の有用性の検討、などを行っている。それらに関しては、各分担者の報告書をご参照いただきたい。

## IV. 考察

<局所急性被ばく、全身慢性被ばく後の抗酸化能の変化>

生体内の酸化還元バランスは、好気性生物にとって非常に重要である。適切なレベルの活性酸素 (ROS) は細胞の生存や生理的機能において重要な役割を果たすが、ROS の増加や抗酸化システムの低下は酸化ストレスを引き起こし、様々な病気の原因になる。一方、放射線は DNA の直接電離や DNA 付近の H<sub>2</sub>O の電離を引き起こし、その際に産生された ROS によって DNA に損傷を与える。さらに、放射線照射後はミトコンドリアの ROS 産生が増加し、酸化ストレスが増加する。この放射線によって誘発された遅延性酸化ストレスは、培養細胞レベルではアポトーシス、細胞老化、突然変異に対して部分的に寄与する (5-7)。しかし、「放射線が生体の酸化還元状態にどのような影響を与えるか」を調べた論文は、わずかである。

血液は、細胞成分（主に赤血球）と非細胞成分（血漿、血清）からなる。しかし、ほとんどの研究が非細胞成分にのみ焦点を当てており、赤血球に着目した研究は少ない。2016年に柳田らの研究グループが、液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）によってヒトの赤血球と血漿の代謝物を定量し、14種の年齢関連代謝物のうち、酸化還元関連代謝産物である酸化型グルタチオン、NAD<sup>+</sup>、NADP<sup>+</sup>を含む6種が赤血球に豊富に含まれていることを示した（12）。2019年、同グループは絶食による赤血球、血漿、全血それぞれの代謝物の変化パターンを解析し（13）、2020年に全血からフレイル（虚弱体質）の代謝物マーカーを同定した（14）。この事は、赤血球の酸化還元状態を含む代謝活性が健康状態および体調の重要なマーカーであることを示唆している。本研究で用いている i-STrap 法は、ラジカルの量を直接測定することができる電子スピン共鳴（Electron Spin Resonance : ESR）を用いて全血の抗酸化能を測定する、というユニークな方法である。この方法は佐藤圭創教授と同仁化学研究所が共同開発したものであり、我々はそこから技術提供をいただいている。i-STrap の基本的な特徴は一昨年度の報告書に記載した通りで、血球の抗酸化能に（血漿より）強く依存することがわかっている。これは、血球中により多くの抗酸化物質が含まれているからであると考えられる。

一昨年度から昨年度にかけ、我々は、マウスの全身に急性照射を行い、経時的に採血して i-STrap 法による血液抗酸化能の解析を行った。その結果、0.5Gy 以上の急性被ばく後に一過性の血液抗酸化能低下が観察されることを、世界で初めて明らかにした。また、0.5~3Gy では線量依存的な抗酸化能低下、3Gy 以上では 3Gy と同等の抗酸化能低下が観察された。血液抗酸化能低下のピークは被ばく後 1 週間程度のところにあった。さらに、ROC 曲線の AUC (Area Under ROC Curve) を用いて診断能を評価したところ、照射後 1 日目では i-STrap より血漿過酸化脂質の方が診断能が高かったが、染色体異常法や歯の EPR といった既存方法より良いとは言えないと判断した。一方で、照射後 2~9 日目においては、i-STrap が既存方法と同程度の診断能を持つことがわかった。昨年度からは、局所急性被ばく、全身慢性被ばく後の血液抗酸化能の変化について実験を行った。

3.11 の福島原発事故では、作業員が汚染水に足をつっこみ、その足が被ばくしたケースがあった。医療分野では、放射線治療や画像下治療（IVR）などによる局所医療被ばくが皮膚障害を引き起こしたケースがある。そのため、局所急性被ばくにおいても血液抗酸化能がバイオドシメトリ指標として利用できるか、解析した。その結果、10Gy 以下では有意な抗酸化能の変化は認められず、バイオドシメトリ指標としての利用性はないと考えられた。一方、20Gy、30Gy の皮膚障害の発生を伴う被ばくでは、線量依存的な抗酸化能低下が観察された。特に興味深いのは、皮膚炎が照射後 10 日前後で現れるのに対して、抗酸化能の低下はそれよりも前（2 日目とか 6 日目）に現れたという点である。この結果から、抗酸化能と皮膚炎とは関連があると考えられ、抗酸化能低下は放射線皮膚炎の予想指標となりうると思われる。放射線治療や画像下治療（IVR）の副作用として発症する患者の皮膚炎の予想マーカーとして、抗酸化能が利用できるかもしれない。先行研究では、被ばく後 1~2 日目から予防的治療を始めると、その後に発生する皮膚障害の程度が低減できることを報告しており、被ばく後早期の皮膚炎の発症予測には一定の意義があると考えられる。しかし、マウスの皮膚炎が 20Gy で発症するのに対して、ヒトでは 2~3Gy で発症するので、臨床試験によって注意深く診断能の検証を行う必要がある。さらに、脚だけでなく、体の他の部位（頭部、腹部など）を照射した場合にどのような抗酸化能の変化が観察されるか調べるのが

必要である。

原子力発電所の事故による被ばくは、慢性被ばくであることが多い。我々は、慢性被ばくによる血液抗酸化能の変化を明らかにする実験を開始した。まずは、総線量を 3Gy として、3 日間照射 (42mGy/h)、10 日間照射 (12.5mGy/h) し、血液抗酸化能を測定した。ポジティブコントロールとして、急性被ばく (0.65Gy/min) を同時に測定した。その結果、線量率依存的な抗酸化能低下が観察され、その低下のピークが線量率依存的に後ろ倒しになることが明らかとなった。また、低下した抗酸化能がコントロールレベルに戻るまでに要する時間は、線量率依存的に増加した。さらに、照射直後は抗酸化能が変化しないことも分かった。今後は、線量率や総線量を下げて、抗酸化能低下が見られなくなるポイントを明らかにしたい。

#### <全身急性被ばく後の長期的な抗酸化能の変化>

一般的に、急性影響より晩発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。晩発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。3Gy の被ばくでは 100 日後まで抗酸化能の低下が確認され、5Gy では 600 日後まで抗酸化能の低下が確認された。短期の結果と照らし合わせると、被ばく線量が高いほど抗酸化能の回復に時間がかかることが分かった。このような抗酸化能の低下が放射線晩発障害発症の一因となっているかもしれない。一方で、血漿抗酸化能と血漿過酸化脂質量に有意差があったのは照射後 500 日以降であった。これについては、加齢に伴って個体差や生存バイアスも出てくるタイミングであるため、考察が難しいと判断した。

#### <全身急性被ばく後の赤血球 NADPH、NADH、血清 NO の測定 (短期)>

昨年度までに、全身急性被ばく後 2~16 日で赤血球のグルタチオン量が増加することを報告した。しかしながら、GPx、GR といったグルタチオンサイクルを回す酵素の活性に変化はなく、抗酸化能酵素の一つである SOD の活性にも変化がなかった。そこで本年度は、酸化型グルタチオンから還元型グルタチオンに変換されるときに、電子供与体、補酵素として働く NADPH とその酸化型である NADP<sup>+</sup>、エネルギー代謝経路 (解糖系や TCA サイクル) などで補酵素として機能する NADH とその酸化型である NAD<sup>+</sup>の量を測定した。マウスの全身に 1,3Gy を照射後、2 日目に採血し、NADPH、NADP<sup>+</sup>、NADH、NAD<sup>+</sup>の量を測定した。この線量およびタイミングは、有意に全血抗酸化能とグルタチオン量が低下するポイントである。結果、NADPH、NADP<sup>+</sup>に有意な変化はなかった。また、NADH も被ばくによる変化はなかったが、NAD<sup>+</sup>は 3Gy 群で低下していた。NAD<sup>+</sup>は、エネルギー産生反応の補因子の 1 つであり、加齢に関連して減少し、様々な疾患の発症につながる。最近、動物モデルを用いた研究によって「NAD<sup>+</sup>の細胞内レベルを上昇させることが、老化を遅らせ、筋肉機能の回復や脳での神経再生を促進し、代謝性疾患に対する保護作用をもたらす」と報告されている (15)。

一酸化窒素 (NO) は多彩な生理活性を有するガス分子である。還元型グルタチオンと反応し、酸化型グルタチオンへと導く (16) と同時に、抗酸化物質の誘導効果もある (17)。我々は、NO の代謝物である NO<sub>2</sub><sup>-</sup>と NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を経時的に定量した。その結果、被ばく群では非被ばく群に比べ、一部のタイミング (5 時間後、2 日後) で低下傾向にあった。しかし、線量依存性がないこととその他

のタイミングでは有意な変化がなかったことから、何かを説明するには不十分であると考えた。

#### <複合バイオドシメトリの有用性の検討>

一昨年度は概念を提唱し、昨年度は予備実験を行った。本年度は、昨年度の経験を踏まえて本格的な確認実験を実施した。昨年度の実験と本年度の実験は、主に以下の点で異なる。①昨年度は「血液抗酸化能 (i-Strap)+リンパ球  $\gamma$ H2AX+リンパ球 Parkin+血小板 Parkin」の4指標であったが、本年度は「血液抗酸化能 (i-Strap)+リンパ球  $\gamma$ H2AX+リンパ球 Parkin+リンパ球 Nrf2」とした。②昨年度はリンパ球  $\gamma$ H2AX の前処理としてグリセロールストックを作成したが、本年度はリンパ球分離溶液を用いた遠心法によりリンパ球を分離した。③昨年度はリンパ球 Parkin+血小板 Parkin の前処理として全血スミアを作成したが、本年度は  $\gamma$ H2AX 同様にリンパ球分離溶液+遠心法によりリンパ球を分離した。なお、分離したリンパ球は固定後、染色まで-80度で保存した。

新型コロナウイルスの感染拡大を受けて一部のデータ解析に遅れが生じており、完全なデータセットが得られていないため統計解析が一時中断している状態である。しかしながら、各指標ごとに傾向を見てみると、これまでに報告した結果と同じであった。

#### <被ばくによる高次脳機能障害の評価>

(放射線) 災害による避難生活などでは、環境変化等によって精神状態が不安定 (心理ストレス) になる。一方で、脳腫瘍に対する放射線治療により頭部に被ばくすると、高次脳機能障害 (IQ の低下など) が起こることが知られているが (18)、1Gy 以下の比較的低線量で高次脳機能障害が発生するか否か、発生するとしたらどんなメカニズムなのか、ということはほとんど明らかになっていない。本研究では、0.5~3Gy をマウスに急性全身照射し、7日後の抗酸化能を測定した。先行研究では、マウスを用いた3Gy以上での報告しかなかったが、我々は1Gy以上の被ばくで不安が増加することを明らかにした。さらに、その原因として、脳内ホルモンバランスの異常があることを明らかにした。放射線災害時により良い精神保健医療を行うためには、放射線と避難生活による高次脳機能障害を区別して対応することが望ましいと考えられる。本研究は放射線による高次脳機能障害について理解を深める一助となると考えている。

#### <福島復興への貢献 (環境保健行政への貢献)>

我々の行った研究はマウス実験である。ヒトでどうなるかは臨床研究 (ヒトサンプル) で明らかにするしかないが、一般的にヒトはマウスより放射線感受性が高いとされているので(19)、基本的には、マウスで使った線量と同程度の線量の被ばくならば我々の見出したパラメータは動く可能性が高い、と考えている。逆にこれらのパラメータが動かなければ、急性障害を心配する必要はないと考えられる。

現在、避難指示解除線量は20mSv/年となっているが、最近の報告では、慢性被ばくでも累計100mSvを超えると白内障のリスクが増加することが指摘されている (20)。帰還者に対し、物理線量の把握と同時に、我々が見出したような生物学指標に基づくモニタリングと健康管理を行うことで、潜在的な晩発障害のリスクを評価できるかもしれない。

## V. 結論

本研究の 3 年間を通し、基礎実験レベルで潜在的な新規バイオドシメトリ指標として、血液抗酸化能 (i-STrap による測定)、リンパ球ミトコンドリア損傷 (Parkin 染色)、リンパ球 Nrf2 発現の 3 つを提案した。リンパ球 DNA 損傷 ( $\gamma$ H2AX 染色) を迅速に実施するための流路チップを開発し、放射線災害の現場 (避難場所) での実施に近づいた。また、当該流路チップの実用化に向けてベンチャー企業を立ち上げた。さらに、組み合わせによるバイオドシメトリの理論を提唱し、検証実験を実施した。

## VI. 次年度以降の計画

本研究で見出した 3 つの新規指標と測定の迅速化に成功した DNA 損傷の計 4 指標を災害現場で実用化するため、それらの橋渡し研究を推進する。今後は、ヒト (医療被ばくの患者、放射線医療従事者、広島長崎原爆被爆者、福島の被災者) のサンプルを用いた試験に取り組む必要がある。また、解析の精度や安定性を高める方法の開発、迅速に検査するための医療機器の開発など、実用化に向けた取り組みも必要となる。DNA 損傷の流路チップはすでに橋渡し段階にあるため、早く社会実装 (販売) ができるように中村先生にはご尽力いただきたい (なお、主任研究者は当該ベンチャーとは 1 円も利益相反がない)。

一方で、最近の報告では慢性被ばくでも累計 100mSv を超えると白内障のリスクが増加することが示唆されている (20) ことから、福島の避難解除基準とされている 20mSv/年は、少し心配な数値である。ゆえに、今後は我々が見出した指標と慢性被ばくおよび晩発障害との関連を解析することも重要ではないかと考えている。

## VII. この研究に関する現在までの研究状況、業績

### ア) 論文・雑誌等

1. Sun, L., Inaba, Y., Sogo, Y., Ito, A., Bekal, M., Chida, K., & Moritake, T. (2021). Total body irradiation causes a chronic decrease in antioxidant levels. *Scientific reports*, 11(1), 1-9.
2. Mahesh Bekal, Lue Sun, Susumu Ueno and Takashi Moritake. Neurobehavioral effects of acute low dose whole body irradiation. *Journal of Radiation Research*. 2021 In Press.
3. Shimura T, Nakashiro C, Narao M, Ushiyama A. Induction of oxidative stress biomarkers following whole-body irradiation in mice. *PLoS One*. 2020. 15(10):e0240108. doi: 10.1371/journal.pone.0240108. 査読あり
4. Sun L, Inaba Y, Kanzaki N, Bekal M, Chida K, Moritake T. Identification of potential biomarkers of radiation exposure in blood cells by Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry. *International journal of molecular sciences*. 2020. 21(3). 812. 査読あり
5. Sun L, Igarashi T, Tetsuka R, Li YS, Kawasaki Y, Kawai K, Hirakawa H, Tsuboi K, Nakamura AJ, Moritake T\*. Pilot clinical study of ascorbic acid treatment in cardiac catheterization. *J Radiat Res*. 2019.

Jun 28. doi:10.1093/jrr/rrz038. 査読あり

6. Shimura T, Koyama M, Aono D, Kunugita N. Epicatechin as a promising agent to countermeasure radiation exposure by mitigating mitochondrial damage in human fibroblasts and mouse hematopoietic cells. *The FASEB J.* 2019. 33(6). 6867–6876. 査読あり
7. Sun L, Inaba Y, Sato K, Hirayama A, Tsuboi K, Okazaki R, Chida K, Moritake T\*. Dose-dependent decrease in anti-oxidant capacity of whole blood after irradiation: A novel potential marker for biodosimetry. *Scientific Reports.* 2018. 8(1). 7425. 査読あり
8. Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. Radiation-Induced Myofibroblasts Promote Tumor Growth via Mitochondrial ROS-Activated TGF $\beta$  Signaling. *Molecular cancer research.* 2018. 16(11). 1676-1686 査読あり
9. Kunoh T, Shimura T (co-first author), Kasai T, Matsumoto S, Mahmud H, Khayrani A, Seno M, Kunoh H, Takada J. Use of DNA-generated gold nanoparticles to radiosensitize and eradicate radioresistant glioma stem cells. *Nanotechnology.* 2018. doi.org/10.1088/1361-6528/aaedd5. 査読あり

イ) 学会発表等

1. Shimura T, Nakashiro C, Narao M, Ushiyama A. Use of oxidative stress biomarkers for radiation biodosimetry in emergency radiation incidents. 日本放射線影響学会第 63 回大会、2020 年 10 月、11. P50 福島 (オンライン)、口頭、招待、国内、査読なし
2. 志村勉、牛山明：大規模災害におけるトリアージのための放射線被ばく線量評価法の検討、第 57 回全国衛生化学技術協議会年会、2020 年 11 月、11. P236-237 宮崎 (オンライン)、紙面、一般、国内、査読なし
3. Nakamura AJ, Takahashi K, Ishii F, Suzuki T. Development and future application of a novel DNA damage monitoring system using PDMS microfluidic chip. 日本放射線影響学会第 63 回大会、2020 年 10 月、福島 (オンライン)、口頭、招待、国内、査読なし
4. Takahashi K, Aoki Y, Tamura T, Suzuki T, Nakamura AJ. Novel method for biodosimetry using PDMS micro fluidic chip. 日本放射線影響学会第 63 回大会、2020 年 10 月、福島 (オンライン)、ポスター、一般、国内、査読なし
5. 盛武敬：大規模放射線災害初期対応のための新規生物学的被ばく線量推定法と IoT による核物質探索訓練システムの開発、第 10 回 東北大学災害科学研究拠点セミナー 兼 第 23 回「災害と健康」学際研究推進セミナー、2019 年 9 月、宮城、口頭、招待講演、国内、査読なし
6. 盛武敬、孫略、稲葉洋平、千田浩一：急性放射線被曝評価への iStrap 応用、第 57 回電子スピンスイエンス学会年会、2018 年 11 月、北海道、口頭、シンポジウム講演、国内、査読なし
7. 孫略：血液抗酸化能を指標とした大規模放射線災害における被ばく線量推定法の開発、第 46 回日本放射線技術学会秋季学術大会、2018 年、宮城、口頭、シンポジウム講演、国内、査読なし
8. 盛武敬：大規模放射線災害や核テロを想定した学生教育訓練用仮想放射線測定システム“USOTOPE”、第 46 回日本放射線技術学会秋季学術大会、2018 年、宮城、口頭、シンポジウム講演、国内、査読なし

9. Shimura T, Koyama M, Aono D, Kunugita N. Epicatechin as a promising agent to countermeasure radiation exposure by mitigating mitochondrial damage in human fibroblasts and mouse hematopoietic cells. 日本放射線影響学会第 62 回大会、2019 年 11 月、京都、ポスター、一般、国内、査読なし
10. Takahashi K., Hirayama R, Shimokawa T, Shimura T, Nakamura AJ. Evaluation of radioprotective effect of piceatannol. 日本放射線影響学会第 62 回大会、2019 年 11 月、京都、ポスター、一般、国内、査読なし
11. Fujikawa Y, Fujiwara T, Sato A, Shimura T, Kodama S, Tsujimura T, Todo T. Rev31-deficient medaka provides an excellent model for studies of intestinal tumor development. 日本放射線影響学会第 62 回大会、2019 年 11 月、京都、口頭、一般、国内、査読なし
12. 孫略：放射線と istrap、第 2 回九州トランスレーショナル ESR 研究会、2019 年 2 月、宮崎、口頭、招待、国内、査読なし
13. 盛武敬：大規模放射線災害への備え: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構築、第 2 回九州トランスレーショナル ESR 研究会、2019 年 2 月、宮崎、口頭、招待、国内、査読なし
14. Bekal M, Sun L, Ueno S, Moritake T. Effect of low dose radiation on Cognition, Cortisol, Serotonin and Antioxidant status. The 10th IBRO World Congress of Neuroscience. September 2019. Korea. ポスター、一般、国際、査読あり
15. Bekal M, Sun L, Kanzaki N, Ueno S, Okazaki R, Moritake T. Acute effects of low doses of Radiation on cognition. The 2nd GI-CoRE Summer School for Radiation Biology 2019 & Hokkaido Summer Institute 2019 – Radiation Biology School. August 2019. 北海道、ポスター、一般、国際、査読なし
16. Bekal M, Sun L, Ueno S, Okazaki R, Moritake T. Behavioural alterations induced by One Gy irradiation. 日本放射線影響学会第 62 回大会、2019 年 11 月、京都、ポスター、一般、国内、査読なし
17. 志村勉、笹谷めぐみ、河合秀彦、神谷研二、小林純也、小松賢志、樺田尚樹：放射線誘発がん関連線維芽細胞は、活性酸素による TGF $\beta$  シグナリング経路の活性化を介してがんの増殖を促進する、日本放射線影響学会第 61 回大会、2018 年 11 月、長崎、口頭、一般、国内、査読なし
18. Takahashi K. Development of novel DNA damage monitoring system using PDMS micro fluidic chip-. The 14th International Student Conference. December 2018. 茨城、口頭、一般、国際、査読なし
19. 高橋健太、田村隆大、鈴木孝明、中村麻子：PDMS マイクロ流路チップを用いた DNA 損傷評価システムの開発、日本放射線影響学会第 61 回大会、2018 年 11 月、長崎、口頭、一般、国内、査読なし
20. 高橋健太、田村隆大、鈴木孝明、中村麻子：PDMS マイクロ流路チップを用いた DNA 損傷評価システムの開発、日本宇宙生物科学会第 32 回大会、2018 年 9 月、宮城、口頭、一般、国内、査読なし
21. 孫略、坪井康次、盛武敬：スピントラップ法による血液抗酸化能測定を指標とした被ばく線量推定、第 71 回日本酸化ストレス学会・第 18 回日本 NO 学会合同学術集会、2018 年 5 月、

京都、口頭、一般、国内、査読なし

22. ベカル・マヘシュ、孫略、神崎訓枝、上野晋、岡崎龍史、盛武敬： Acute effects of low doses of radiation on cognition、日本放射線影響学会第61回大会、2018年11月、長崎、ポスター、一般、国内、査読なし
23. 孫略、坪井康次、盛武敬：被ばくによる生体レドックス状態の変化、日本放射線影響学会第61回大会、2018年11月、長崎、口頭、一般、国内、査読なし

ウ) 書籍・総説

1. Furukawa S, Nagamatsu A, Neno M, Fujimori A, Kakinuma S, Katsube T, Wang B, Tsuruoka C, Shirai T, Nakamura AJ, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Harada H, Kobayashi M, Kobayashi J, Kunieda T, Funayama T, Suzuki M, Miyamoto T, Hidema J, Yoshida Y, Takahashi A. Space Radiation Biology for “Living in Space”. (Academic Editor: Ono S.) BioMed Research International. Hindawi.(2020) 25pages: <https://doi.org/10.1155/2020/4703286>.
2. Shimura T, Yamaguchi I, Kunugita N, Encyclopedia of Environmental Health, 2nd Edition. Fukushima nuclear disaster: Emergency response to the disaster, Toshihiro Kawamoto ed, ELSEVIER : 2019
3. Nakamura AJ\*. Assessment of DNA Damage Induction in Farm Animals After the FNPP Accident. "Low-Dose Radiation Effects on Animals and Ecosystems. Long-Term Study on the Fukushima Nuclear Accident" (2019): 153-161.
4. 孫略：被ばくによる血中抗酸化能低下メカニズムの解明と応用、放影協ニュース、東京：放射線影響協会、2019年、No.99 p16-17
5. Shimura T\*, Yamaguchi I, Terada H, Kunugita N. Lessons learned from radiation biology: Health effects of low levels of exposure to ionizing radiation on humans regarding the Fukushima accident. Journal of the National Institute of Public Health. 埼玉：国立保健医療科学院. 2018. 67:115-122.
6. Kunugita N, Shimura T, Terada H, Yamaguchi I. Tokyo Electric Power Company Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant accident and public health. Journal of the National Institute of Public Health. 埼玉：国立保健医療科学院. 2018. 67: 2-10.
7. Terada H, Yamaguchi I, Shimura T, Svendsen E.R., Kunugita N. Regulation values and current situation of radioactive materials in food. Journal of the National Institute of Public Health. 埼玉：国立保健医療科学院.2018. 67: 21-33.
8. Yamaguchi I, Shimura T, Terada H, Svendsen E.R., Kunugita N. Lessons learned from radiation risk communication activities regarding the Fukushima nuclear accident. Journal of the National Institute of Public Health. 埼玉：国立保健医療科学院.2018. 67: 93-102
9. Tauchi H, Toyoshima-Sasatani M, Nagashima H, Shimura T, Umata T, Tachibana A. Tritium biology in Japan: A search for a new approach. Fusion Engineering and Design. Amsterdam : ELSEVIER.2018. 128:28-32.
10. 孫略：ESRによる放射線影響の測定、電子スピンスイエンズ Vol.16 Autumn Issue、神戸：電子スピンスイエンズ学会. 2018. 通号 31 p98-103 2018年



エ) 受賞

1. Bekal M. Silver Award; The 2nd GI-CoRE Summer School for Radiation Biology. August 2019. 国際
2. 高橋健太、田村隆大、鈴木孝明、中村麻子、日本宇宙生物科学会第 32 回大会 優秀発表賞、2018 年 9 月、国内
3. 中村麻子、平成 30 年度茨城大学学長学術表彰・奨励賞受賞、2018 年 12 月、国内
4. 中村麻子、第 6 回バイオテックグランプリ、DNA 損傷モニタリングシステム「iKnowDamage」プロジェクト、「ルート賞」「吉野家賞」、2019 年 9 月、国内
5. 中村麻子、第 2 回茨城テックプラングランプリ、DNA 損傷モニタリングシステム「iKnowDamage」プロジェクト、「日本メクトロン賞」「オーディエンス賞」、2018 年 11 月、国内
6. 孫略、日本影響学会奨励賞、2021 年 2 月、国内

オ) 特許

1. 特許出願：孫略、盛武敬、千田浩一、稲葉洋平、放射線被ばくによる皮膚炎発生の予測、産総研、産業医大、東北大、特願 2020-072182、出願日：2020 年 04 月 14 日、国内
2. 特許出願：中村麻子、固液分離装置、特願 2019-239400、出願日 2019/12/27
3. 特許出願：中村麻子、健康リスク評価システム及び検鏡リスク評価方法、特願 2020-145596、出願日 2020/08/31
4. 特許出願：中村麻子、白血球捕捉デバイス特願 2020-163378、出願日 2020/09/29

カ) 環境行政への活用・貢献実績

1. 株式会社 Dinow 創業、中村麻子 CTO、
  - ①第 4 回めぶきビジネスアワード特別賞受賞
  - ②世界最大のアクセラレーター・ベンチャーキャピタルである Plug and Play Japan 社のプログラムの hardtech & health 部門に採択

## VIII. 引用文献

1. Iaea. *Cytogenetic analysis for radiation dose assessment*2001.
2. 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.
3. Flood, AB, Ali, AN, Boyle, HK, *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*. 2016; **111**(2): 169.
4. 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.
5. Kobashigawa, S, Kashino, G, Suzuki, K, *et al.* Ionizing radiation-induced cell death is partly caused by increase of mitochondrial reactive oxygen species in normal human fibroblast cells. *Radiation research*. 2015; **183**(4): 455-64.

6. Ogura, A, Oowada, S, Kon, Y, *et al.* Redox regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung carcinoma A549 cells. *Cancer letters*. 2009; **277**(1): 64-71.
7. Tominaga, H, Kodama, S, Matsuda, N, *et al.* Involvement of reactive oxygen species (ROS) in the induction of genetic instability by radiation. *Journal of radiation research*. 2004; **45**(2): 181-8.
8. Volkova, PY, Geras'kin, SA, Kazakova, EA. Radiation exposure in the remote period after the Chernobyl accident caused oxidative stress and genetic effects in Scots pine populations. *Scientific reports*. 2017; **7**(1): 1-9.
9. Urushihara, Y, Kawasumi, K, Endo, S, *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*. 2016; **11**(5): e0155069.
10. Malekirad, AA, Ranjbar, A, Rahzani, K, *et al.* Oxidative stress in radiology staff. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2005; **20**(1): 215-8.
11. Sun, L, Inaba, Y, Sogo, Y, *et al.* Total body irradiation causes a chronic decrease in antioxidant levels. *Sci Rep*. 2021; **11**(1): 6716.
12. Chaleckis, R, Murakami, I, Takada, J, *et al.* Individual variability in human blood metabolites identifies age-related differences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016; **113**(16): 4252-9.
13. Teruya, T, Chaleckis, R, Takada, J, *et al.* Diverse metabolic reactions activated during 58-hr fasting are revealed by non-targeted metabolomic analysis of human blood. *Scientific reports*. 2019; **9**(1): 1-11.
14. Kameda, M, Teruya, T, Yanagida, M, *et al.* Frailty markers comprise blood metabolites involved in antioxidation, cognition, and mobility. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020; **117**(17): 9483-9.
15. Katsyuba, E, Mottis, A, Zietak, M, *et al.* De novo NAD<sup>+</sup> synthesis enhances mitochondrial function and improves health. *Nature*. 2018; **563**(7731): 354-9.
16. Baldelli, S, Ciccarone, F, Limongi, D, *et al.* Glutathione and Nitric Oxide: Key Team Players in Use and Disuse of Skeletal Muscle. *Nutrients*. 2019; **11**(10): 2318.
17. Buckley, BJ, Marshall, ZM, Whorton, A. Nitric oxide stimulates Nrf2 nuclear translocation in vascular endothelium. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003; **307**(4): 973-9.
18. Kahalley, L, Okcu, MF, Ris, MD, *et al.* IQ change within three years of radiation therapy in pediatric brain tumor patients treated with proton beam radiation therapy versus photon radiation therapy. *American Society of Clinical Oncology*; 2013.
19. Chancellor, JC, Blue, RS, Cengel, KA, *et al.* Limitations in predicting the space radiation health risk for exploration astronauts. *npj Microgravity*. 2018; **4**(1): 8.
20. Su, Y, Wang, Y, Yoshinaga, S, *et al.* Lens opacity prevalence among the residents in high natural background radiation area in Yangjiang, China. *Journal of Radiation Research*. 2021; **62**(1): 67-72.

# Construction of a technological platform for a dosimetry system combining biological indices applicable in the event of a large-scale radiation disaster

Takashi Moritake<sup>1</sup>, Tsutomu Shimura<sup>2</sup>, Asako J. Nakamura<sup>3</sup>, Mahesh Bekal<sup>3</sup>

*<sup>1</sup>Department of Radiological Health Science, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan. <sup>2</sup>Department of Environmental Health, National Institute of Public Health. <sup>3</sup>Department of Biological Sciences, College of Science, Ibaraki University.*

**Key word:** Radiation disaster, biodosimetry, redox, mitochondria, DNA damage, telomeres

## Abstract

Dosimetry based on biological indices (biodosimetry) is essential in the event of a large-scale disaster. To maintain a robust response to a radiation disaster and to increase the reliability of dosimetry readings, biodosimetric methods involving multiple techniques must be devised. The principal investigator and co-investigators have previously studied body responses soon (several minutes to several days) after radiation exposure from different perspectives. One aim of the current study is to translate those findings into biodosimetric techniques. A second aim of this study is to combine those techniques to construct a technological platform for a biodosimetric system with assured sensitivity and accuracy and exceptional simplicity, rapidity, and economic viability.

In specific terms, this study will: 1) ascertain patterns of changes in and mechanisms of the anti-oxidative capacity of blood, mitochondrial damage, deoxyribonucleic acid (DNA) damage, and telomeric damage after radiation exposure; 2) develop simple, rapid techniques to measure these biological indices; and 3) propose a biodosimetric system combining the identified biological indices for widespread implementation.

The first year, we used experiments with mice to examine patterns of changes in the anti-oxidative capacity of blood after radiation exposure in detail. Mitochondrial and telomeric damage were assayed after radiation exposure in experiments with cells. In addition, a device was developed to more rapidly assess DNA damage ( $\gamma$ H2AX staining) and a system was constructed to assay mitochondrial damage. Advantages of combining multiple techniques have also been considered.

The second year, we developed a microfluidic chip that rapidly and conveniently quantifies DNA damage. We measured plasma lipid peroxide, plasma antioxidant capacity, lymphocyte nuclear respiratory factor (NRF) 2 expression, lymphocyte telomere length, and blood cell metabolites to investigate whether or not they are useful as a new index for dosimetry. Sufficient accuracy and sensitivity could not be attained for

plasma lipid peroxide and plasma antioxidant capacity. Quantification of lymphocyte NRF2 expression, lymphocyte telomere length, and blood cell metabolites may become useful in dosimetry. However, further innovation is necessary for its application. We also analyzed the blood antioxidant capacity after local acute exposure and whole-body chronic exposure with the i-STrap method. Furthermore, we started an experiment that evaluates the accuracy and sensitivity of a dosimetry method that combines three indices—blood antioxidant capacity, DNA damage, and mitochondrial damage.

In the third year, mouse experiments revealed that lymphocyte mitochondrial damage and lymphocyte NRF2 expression could be used as novel biodosimetric indices. We launched a venture to commercialize the microfluidic chip developed in the second year of the study. We continued to accumulate data on blood antioxidant capacity changes observed after local acute and total-body chronic exposures; the data were analyzed using the i-STrap method. Analysis of mice after exposure to radiation exceeding 1 Gy revealed a significant increase in brain dysfunction, including anxiety and memory loss. We also conducted an experiment involving the biodosimetric techniques employing the biological index combination proposed by us in the first year of the study. We organized a workshop at the 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Japanese Radiation Research Society to discuss the results of this study with experts.