

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

（分担）DNA 損傷レベルおよびテロメア長測定による放射線被ばく線量評価—放射線の痕跡から辿る—

分担研究者：中村 麻子（茨城大学 理学部 教授）

研究要旨

現代社会において懸念されている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 (γ -H2AX) の検出方法が挙げられるが、 γ -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されておらず、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 γ -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。そこで、本研究では γ -H2AX による DNA 損傷のモニタリングという分子学的技法と、ナノマイクロデバイス技術を結びつけることで、これまでにない放射線被ばく管理のための新規 DNA 損傷モニタリングシステムを開発する。またその一方で、DNA 損傷の指標である γ -H2AX は DNA が修復されると消失し、被ばく後の時間経過とともに減少する。線量評価が可能な期間を被ばく後より長く、高精度の線量評価を確立するためには、いくつかの生物学的指標を組み合わせることが重要であると考え。放射線は生体内に酸化ストレスを誘導することから、ミトコンドリアの酸化損傷レベルに加え、グアニン塩基が豊富な染色体末端構造であるテロメアの酸化損傷（酸化による短縮や構造異常）も線量評価のための生物学的指標としての可能性を有している。

本研究では、放射線被ばくを現場で評価するための新規 γ -H2AX 検出システムの開発を行った。特に、 γ -H2AX 検出をより簡便にかつ迅速に行うための全自動化・大量生産化を目指した開発を行い、これらの研究成果をもとに、放射線被ばくによる健康リスクを評価することを目的とした大学発ベンチャー企業の立ち上げを行った。

キーワード：H2AX、DNA 二本鎖切断、テロメア、線量評価、MEMS

研究協力者

鈴木孝明（群馬大学 教授）

I. 研究目的

原子力規制委員会「原子力災害対策指針」（平成 29 年 3 月 22 日全部改正）に基づき緊急被ばく医療体制の整備が進められる中で、検討課題として迅速な線量評価手法の確立が求められている。放射線の線量を測定する方法はさまざまであり、一般的な方法としてガイガー・ミュラー・カウンター（GM カウンター）やガラスバッジがある。しかし、事前にそれらの線量評価機器を携行・装着しておくことが必須であり、事故などによる予期せぬ被ばく時には個人が受けた放射線量を計測することができない。また、これらが測定するのは物理的な線量であり、放射線被ばくした人の生物学的影響を知ることは難しい。放射線被ばくによる健康影響を正しく評価するために生物学的指標を用いた生物影響評価が重要なことは間違いない。そこで本研究では生物学的影響の指標として放射線誘発の DNA 二本鎖切断（double-strand break: DSB）に着目し、DNA DSB のバイオマーカーとして γ -H2AX を用いた。DNA 損傷のバイオマーカーである γ -H2AX は、1.2mGy 相当の低線量放射線の線量評価が可能であるほどに高感度であるとともに、染色体異常解析などの線量評価法と比較して簡便に検出が可能である¹。しかしながら、 γ -H2AX の検出は実験室ベースで行われているのが現状であり、緊急被ばく時に迅速な線量評価を行うためには、 γ -H2AX の検出を現場で行うための新規システムの開発が必要となる¹。そこで本研究では γ -H2AX の検出を迅速かつ簡便に「現場」で行うことを可能とするマイクロデバイスの開発を行う²。

その一方で、 γ -H2AX の検出は DNA 損傷修復に伴い時間経過とともに消失していくことから、被ばく後時間が経過した後も信頼性のある線量評価そしてリスク管理を行うためには、細胞の代謝によって消失することのない、「放射線被ばく痕跡」となる生物学的指標が必要となる。そこで、本研究では放射線被ばくの長期的な線量評価指標としてテロメア損傷についてその有効性を検討する。本研究開発により、DNA 損傷だけでなく、ミトコンドリア損傷指標としての Parkin と Nrf2 の検出（分担研究 志村）や抗酸化能（主任研究者 盛武）、そしてテロメア損傷などの複数の生物学的指標を組み合わせた新しい、信頼性の高い線量評価手法が確立できると期待される。

昨年度までに微量血液からリンパ球を分離し、 γ -H2AX の検出を行うことができるマイクロ流路チップの構造や表面加工などをほぼ確立し、特許出願に至った（特願 2019-238400）。そこで、今年度は開発した DNA 損傷測定のためのマイクロ流路チップに適した小型線量評価機器の開発として、シリンジポンプを活用したプロトコルの確立、 γ -H2AX 評価のための必要なプログラムの開発および大量生産に向けた微細構造の改良などを検討する。また、昨年度に続いて、同一動物サンプルを用いた放射線被ばく線量評価指標としての γ -H2AX 検出についてサンプル数を増やすことで再現性および正確性について検討を行った。

II. 研究方法

令和 2 年度は γ -H2AX 検出のための新規デバイス開発および被ばく線量評価指標としての有効性検討のため以下の実験を行った。

1. γ -H2AX 検出の全自動化および大量生産化に向けた PDMS チップの改良

PDMS マイクロ流路チップを用いた γ -H2AX 検出の全自動化を目的として、まずは、PDMS チップへのシリンジポンプを利用した試薬導入の検討を行った。シリンジポンプによる薬剤の送液制御方法には、inlet 側からの加圧によるタイプ（陽圧）と、outlet 側から吸引するタイプ（陰圧）との 2 つの可能性がある。そこで、あらかじめ真空デシケーター内で十分に脱気を行った親水加工済みの PDMS チップに両パターンでの送液実験を行った。具体的には、PDMS チップの inlet より PBS を滴下し、流路内を PBS で充填した後、PBS で希釈したヒト末梢血を 7 マイクロリットル程度流し込み、流路内構造にリンパ球を捕獲した。20%パラホルムアルデヒドを流路に滴下することで細胞固定を行い、洗浄を十分に行った後に、退色防止剤を含む DAPI 溶液を流しこみ封入した。染色した PDMS チップは蛍光顕微鏡下で観察を行い、蛍光画像を取得後、送液制御方法の評価を流路内におけるリンパ球捕獲効率をもとに行った。

また、 γ -H2AX 検出を被ばく線量評価指標として用いるためには、 γ -H2AX 検出の全自動化とともに PDMS チップの低コストでの大量生産化が重要である。そこで、これまでの PDMS チップとは異なり、よりシンプルな流路構造および捕獲構造の検討を行った。具体的には、PDMS チップの inlet より PBS を滴下し、流路内を PBS で充填した後、PBS で希釈したヒト末梢血（あらかじめ X 線を 0, 1, 5Gy ex vivo 照射したサンプル）を 7 マイクロリットル程度流し込み、流路内構造にリンパ球を捕獲した。20%パラホルムアルデヒドを流路に滴下することで細胞固定を行い、洗浄を十分に行った後に、 γ -H2AX に対する一次抗体および蛍光二次抗体による蛍光免疫染色を行った。染色した PDMS チップは蛍光顕微鏡下で観察を行い、リンパ球の捕獲効率とともに、線量依存的な γ -H2AX レベルの評価を行った。

2. γ -H2AX 検出のための PDMS チップ開発のための計測プログラムの開発

現在開発中の PDMS チップは最終的に全自動化および大量生産化を目指しているが、PDMS チップが実際に実社会で利用されるためには、データの安定性などの観点から、ある一定レベルのリンパ球捕獲効率を常に維持する必要がある。これまでリンパ球の捕獲効率は蛍光顕微鏡下で観察を行い、画像を取得後、目視にて計測を行ってきた。そこで、本研究では様々なタイプのリンパ球捕獲構造を認識するとともに、リンパ球捕獲効率を自動で計測するための新規プログラムの開発を行った。具体的には ImageJ の Fiji プログラムと Python プログラムを組み合わせることで、捕獲構造の認識および、そこに捕獲されたリンパ球の認識を迅速に行うことのできるプログラムを開発した。

3. 全身照射マウス由来リンパ球における γ -H2AX 免疫蛍光染色および測定（昨年度に引き続き 2 回目の実験）

研究代表者である盛武班が作成した全身照射マウス由来のリンパ球を用いて γ -H2AX 免疫蛍光染色を行った。研究代表者のグループによって X 線 0, 1, 3Gy を照射されたマウスから経時的に（1 日後、2 日後、3 日後、7 日後）に血液サンプルを採取し、2%パラホルムアルデヒドによっ

て血液細胞を固定した。固定された血液サンプルはグリセロールを添加し、凍結保存したのちに茨城大学に送付された。血液サンプルを PBS で数回洗浄後、細胞をサイトスピンによってスライドガラスに張り付けた。その後、 γ -H2AX に対する一次抗体および蛍光二次抗体による蛍光免疫染色を行った。染色後は十分に洗浄し、退色防止剤を含む PI 溶液により封入した。染色したスライドサンプルは蛍光顕微鏡下で観察を行い、蛍光画像を取得後、DNA 損傷レベルの解析を行った。昨年度実施した実験結果との再現性、相関性について検討を行った。

（倫理面への配慮）

本研究で用いるヒト培養細胞は市販されている培養細胞による解析であり、倫理委員会の審査は必要としない。本研究におけるヒト血液サンプルを用いた実験は、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」）。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。参加は、本人に不利益を被らせることがないように配慮する。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する。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る。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する。

III. 研究結果

1. γ -H2AX 検出デバイスの開発および線量評価デバイスとしての有効性検討

DNA 損傷を迅速かつ簡便に現場で行うために、新規マイクロ流路チップを開発した。昨年度まではヒト血液サンプルを用いて解析に十分なリンパ球をトラップし、線量依存的な γ -H2AX 検出が可能な PDMS チップの開発に成功したが、本年度は全自動化および大量生産化にむけての開発を行い、実社会で利用可能な線量評価デバイスとしての有効性を検討した。その結果、従来よりも簡素な捕獲構造を持つ PDMS チップでも、解析に十分なリンパ球捕獲効率を示すことが明らかとなった（なお、特許出願中であるので一部の数値は非公表とする）。

表 1：大量生産化にむけて開発した PDMS チップでのリンパ球捕獲効率評価（一部）

#	流路長 (mm)	流路幅 (mm)	アスペクト比	構造幅 (μ m)	構造長 (μ m)	捕獲部 (μ m)	流路細胞数	非捕獲細胞数	捕獲細胞数	捕獲構造数	捕獲効率	捕獲クオリティ
I	*	*	*	*	*	5	1791	146	1645	4128	43.4	91.8
II	*	*	*	*	*	5	1841	163	1678	5120	36.0	91.1
III	*	*	*	*	*	5	888	172	716	2700	32.9	80.6
IV	*	*	*	*	*	5	999	85	914	2680	34.1	91.5
V	*	*	*	*	*	5	236	77	159	465	34.2	67.4
VI	*	*	*	*	*	5	536	165	371	1196	31.0	69.2
VII	*	*	*	*	*	5	868	239	629	1280	49.1	72.5

さらに、本年度開発した大量生産型の PDMS チップを用いても γ -H2AX 検出を行うことができるか検討したところ、従来のチップと同様に、線量依存的な DNA 損傷評価が可能であることが明らかとなった。当該 PDMS チップは知財化に向けて 2020 年 9 月に特許申請を行った。今後は、PDMS チップでのより低線量被ばくサンプルを用いた γ -H2AX アッセイを行うことで、線量評価領域の検討を行っていくとともに、チップの実装化に向けた検討を行っていく。

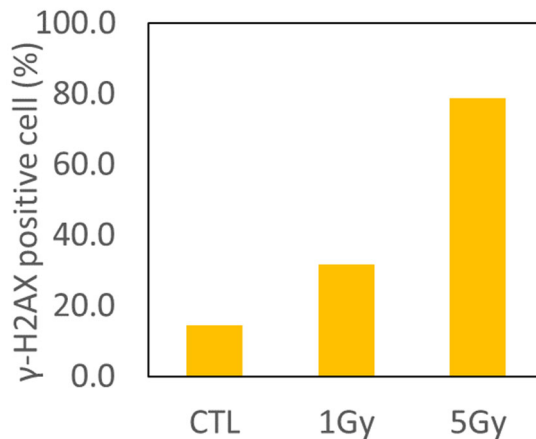


図 III-1 PDMS チップを用いた γ -H2AX 検出による放射線照射血液サンプルの DNA 損傷レベルの経時変化

2. γ -H2AX 検出のための PDMS チップ開発のための計測プログラムの開発

本研究では様々なタイプのリンパ球捕獲構造を認識するとともに、リンパ球捕獲効率を自動で計測するための新規プログラムの開発を行った。具体的には ImageJ の Fiji プログラムと Python プログラムを組み合わせることで（図 III-2）、捕獲構造の認識および、そこに捕獲されたリンパ球の認識を迅速に行うことのできるプログラムを開発した。



図 III-2 ImageJ の Fiji プログラムと Python プログラムによる微細捕獲構造の自動認識プログラムの概念

プログラムについては、現在も開発段階であるものの、開発当初の段階と比較して多数の捕獲

構造を個別に認識できるようになっており（図 III-3）、開発したプログラムが様々な捕獲構造を有する PDMS チップの性能評価および実装化に非常に有用であることを期待させるものである。当該プログラムについても特許申請を検討している。

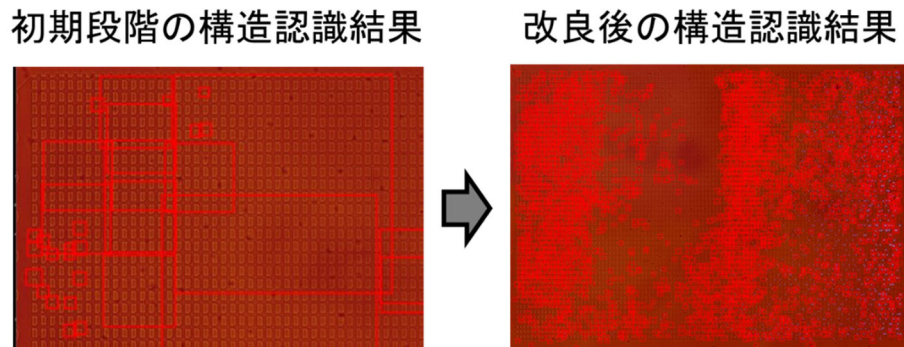


図 III-3 開発中のプログラムによる微細捕獲構造の自動認識結果

3. 同一生体サンプルを用いた放射線被ばく線量評価指標としての γ -H2AX の有効性検討（2 回目）

昨年度に引き続き同一のマウスサンプルを用いて複数の評価指標を解析し、指標の組み合わせによる放射線被ばく線量評価データの検出精度、検出限界、そして再現性について検討を行った。具体的には、X 線照射 1 日～7 日後のマウス由来の生体サンプルを用いて、 γ -H2AX アッセイによる DNA 損傷レベルの検出を行った。その結果、それぞれのタイムポイントにおける線量と γ -H2AX フォーカス数は比例関係にあり（図 III-4）、 γ -H2AX アッセイによる線量評価が高精度であることを示している。

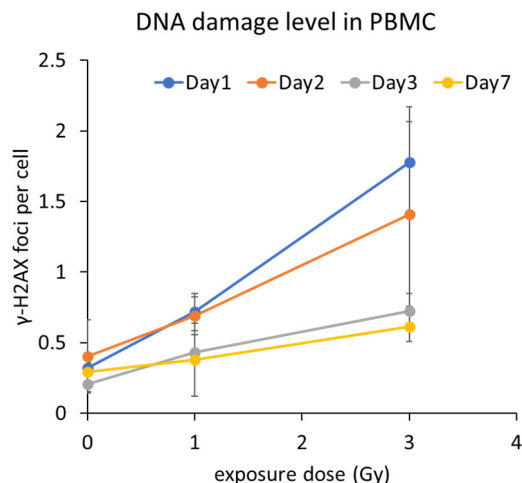


図 III-4 全身照射マウス由来リンパ球における DNA 損傷レベルの経時変化（昨年度と今年度の実験結果をまとめたもの）

また、昨年度の結果と同様に、照射 7 日後を除き、すべてのタイムポイントにおいて非照射、1Gy 照射、3Gy 照射の γ -H2AX フォーカス数は有意差をもって検出された。このことは、 γ -H2AX アッセイによる照射 3 日後までは 1Gy 以上の放射線被ばくの線量評価が可能であることを示唆している。

IV. 考察

今年度は DNA 損傷レベルの検出および放射線被ばく線量評価を迅速に行うための PDMS マイクロ流路チップについて、大量生産化および解析の全自動化を見据えた開発を行った。その結果、安定的に血液サンプルから一定量のリンパ球を捕獲することのできる大量生産型の PDMS チップの開発に至った。また、当該チップを用いた γ -H2AX を用いた DNA 損傷検出実験では、線量依存的な DNA 損傷の検出を確認することができた。送液制御については陽圧ではなく陰圧による制御が適していることを確認した。以上、 γ -H2AX 検出による被ばく線量評価ツールとして社会実装を行うための成果が十分に得られたと考えられる。また、昨年度までの結果から、放射線被ばく後のテロメア長短縮は照射後数週間維持されることを確認していることから、今後は、テロメア長短縮検出のための PDMS チップへの展開を検討する。

同一生体サンプルを用いた γ -H2AX を用いた DNA 損傷レベルの検出および被ばく線量評価実験においては、照射 3 日後（72 時間）までは、1Gy 以上の放射線被ばくをした際に γ -H2AX 検出により正確に被ばく線量を推定することができることを示している。

V. 結論

福島第一原発事故のような放射線事故において最も重要なことは、被ばく線量をいち早く評価し、その生物学的リスクを予測・対応することである。そのためには、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 γ -H2AX を用いた DNA 損傷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必要である。本研究では現場での γ -H2AX アッセイを可能とする新規デバイスの開発を行い、微量のヒト血液サンプルから迅速かつ簡便にリンパ球を分離捕獲する PDMS チップを作成することに成功した。また、同じチップ上で γ -H2AX フォーカスの検出が可能であることも確認した。さらに、作成した PDMS チップを社会実装するために必要な大量生産化、全自動化に向けた改良を行うことができた。このような線量評価デバイスは放射線に対する健康リスクを正確に理解するために非常に有効であると考えられる。また分担研究者らは、開発に取り組んでいる線量評価システムを用いて放射線被ばくリスクを評価するとともに人々に安心を提供するための大学発ベンチャーを立ち上げた。

VI. 次年度以降の計画

今後は、PDMS チップを用いた全自動での γ -H2AX 検出システムの構築に向けて、プロトコルの確立に加え、小型顕微鏡や送液制御装置の開発などを行う必要がある。そのために、大学発ベンチャーをハブとして様々な専門分野の研究者や企業などと協働する予定である。

最終的には、本研究で確立した γ -H2AX 検出やテロメア短縮評価などの様々な線量評価指標を組み合わせながら、人々に放射線被ばくに対するリスク評価を正確に行うとともに、安心を提供する必要があると考える。

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

該当なし

イ) 学会発表等

1) 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、WS07-02、福島 (オンライン)、口頭、招待、国内、査読なし

2) 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、PS30-04、福島 (オンライン)、ポスター、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". Biomed Res Int. 2020 Apr 8;2020:4703286. doi: 10.1155/2020/4703286.

エ) 受賞

該当なし

オ) 特許

1) 「健康リスク評価システム及び健康リスク評価法」特許出版番号：特願 2020-145593、出願日：令和 2 年 8 月 31 日、発明者：国立大学法人茨城大学 中村麻子・高橋健太

2) 「白血球捕捉デバイス」特許出版番号：特願 2020-163378、出願日：令和 2 年 9 月 29 日、発明者：国立大学法人茨城大学 中村麻子・高橋健太、NOK 株式会社 小森隆幸

カ) 環境行政への活用・貢献実績

1) 大学発ベンチャー株式会社 Dinow が Fukushima Tech Create・ビジネスアイデア事業プログラム（福島イノベーション・コースと構想重点分野シード創出支援プログラム）に採択。事業名称「DNA 損傷評価を用いた放射線被ばく健康管理システム」

VIII. 引用文献

- 1) Nakamura AJ, Suzuki M, Redon CE, Kuwahara Y, Yamashiro H, Abe Y, Takahashi S, Fukuda T, Isogai E, Bonner WM, Fukumoto M. The causal relation between DNA damage induction in bovine lymphocytes and the Fukushima nuclear power plant accident. *Radiation Res.* (2017) 187:630-636.
- 2) Tamura T, Suzuki T. Seamless Fabrication Technique from Micrometer to Millimeter by Combining 3D Printing and Photolithography, *Japanese Journal of Applied Physics*, 2019

Development and future application of a novel DNA damage monitoring system using PDMS microfluidic chip

Asako J. Nakamura¹⁾, Kenta Takahashi¹⁾, Fumiya Ishii¹⁾, Takaaki Suzuki²⁾

¹⁾Dept. Biol. Sci., Fac. Sci., Ibaraki Univ., Japan

²⁾Sch. Sci. Tech., Gunma Univ., Japan

Key words: H2AX, PDMS microfluidic chip, DNA damage, telomere, biodosimeter

Abstract

The risk of radiation exposure by space radiation, radiation therapy and unexpected radiation accident are concerned in modern society. To understand the biological effect of ionizing radiation on organisms, it is essential to assess the absorbed dose by exposure. DNA damage detection using the phosphorylated histone H2AX (γ -H2AX) is more suitable due to its high sensitivity that detects the DNA damage equivalent to 1.2 mGy radiation dose and, rapidity of obtaining results. However, γ -H2AX assay is performed in the laboratory and a few challenges for being performed “on-site” remain. Therefore, in this study we developed Polydimethylsiloxane (PDMS) microfluidic chip that isolate lymphocytes from peripheral blood to perform γ -H2AX assay on it. Here, we performed the γ -H2AX assay of peripheral blood cells that were exposed to different doses of X-ray on the PDMS chip and showed the dose-dependent increase of DNA damage.

On the other hand, the γ -H2AX assay is problematic since the γ -H2AX foci disappear by about 72 hours after radiation exposure depending on DNA damage repair. To solve this problem, we evaluated the shortening of telomere length as a biodosimeter for assessment of exposure dose at later than 72 hours after exposure.

As a result, our data strongly show that PDMS chip is usable in DNA damage evaluating device and make it possible to assess the biological effects of radiation rapidly on-site. Our data also suggest that the measurement of telomere length might suitable biodosimeter to evaluate the exposure dose later than a week after radiation exposure.