

# 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 櫛田尚樹（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 千円を徴収させて頂く予定です。

## 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、そのゴールデン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、原爆の被曝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  $\gamma$ -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 日後にかけて継時的に採血し、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。

## 細胞遺伝学的線量評価法

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  
千葉市稲毛区穴川 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、樺田尚樹

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。