

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

（新たな生物学的評価法の指標としてのミトコンドリア損傷の検討）

志村 勉（国立保健医療科学院・上席主任研究官）

研究要旨

緊急被ばく医療では適切な治療法を選択するため、被災者の被ばく線量の把握が求められる。放射線被ばくの第一の指標として放射線感受性の造血組織の白血球数の減少が知られている。残った血液試料の放射線応答を解析することで、より正確な被ばく線量評価に利用可能と考える。本研究ではマウス白血球細胞を用いて、新たな放射線被ばくの生物学的指標（バイオマーカー）として酸化ストレスに着目し、線量評価法の確立に取り組んだ。目的のタンパク質の発現は蛍光免疫法による染色で検出し、蛍光量は蛍光顕微鏡を用いた画像解析、または、フローサイトメーターで定量した。フローサイトメーターの解析では測定時間が大幅に短縮されたが、蛍光顕微鏡の画像解析と同等の感度は得られなかった。DNA 損傷の指標である γ -H2AX の染色結果から、5 Gy の X 線マウス全身照射では、DNA 損傷が照射 1 日後も残存していた。ユビキチン化酵素 Parkin は、エネルギー産生のできないミトコンドリアに局在し分解に関わる。これを利用してミトコンドリアの酸化損傷を検出した。転写因子 Nrf2 は酸化ストレス下で活性化され、酸化ストレス応答に必要な遺伝子の発現誘導を行う。この 2 つの指標は、Parkin では 1 Gy 以上で、Nrf2 では 0.1 Gy 以上の照射で染色が観察され、DNA 損傷よりも感度良く放射線に応答することを明らかにした。マウスの全血を用いる場合と Ficoll の密度勾配で遠心分離した抹消血単球を用いた場合で比較し、蛍光免疫法で陽性細胞を検出するには大量にある赤血球の除去の操作が不可欠であることを明らかにした。

本研究では被ばく線量評価のための新たな指標として Parkin と Nrf2 を明らかにした。いくつかの放射線応答の反応が異なる指標を用いることで、高精度の線量評価法が可能になる。放射線の酸化ストレスは発がんに関わることから酸化ストレス指標は単に線量評価だけでなく、被ばくによる将来の発がんリスク評価にも活用が期待される。

キーワード： 生物学的指標、ミトコンドリア、活性酸素、Parkin、Nrf2

研究協力者

河合秀彦（広島大学大学院医歯薬保健学研究院・准教授）

I. 研究目的

I. 原子力発電所事故などの大規模放射線災害では、一度に多くの住民が被ばくすることが想定される。そのため、原子力規制委員会の「原子力災害対策指針」（令和元年 7 月 3 日一部改訂）に基づき緊急被ばく医療体制の整備が進められている。緊急時に、放射線の専門的治療が必要なのかどうかを迅速に判断し、治療の優先度を定める選別（トリアージ）を行うには、被災者の被ばく線量を把握する必要がある。特に放射線急性障害を引き起こす 1 Gy 以上の被ばくをしたかどうかの判断が求められる。また、1 Gy 以下の線量では、将来被ばくが原因でがんになるリスクがどれくらいあるのかを把握するのに重要である。しかし、大集団を対象とした迅速で簡便な線量評価法は確立していないのが現状である。本研究では、バイオマーカーを用いた線量評価法の確立を研究目的とする。本研究の解析に用いた 3 つの指標を図 1 に示す。放射線により核内の DNA が損傷し、DNA 二本鎖切断の指標であるヒストンのリン酸化（ γ -H2AX）が誘導される。細胞小器官ミトコンドリアは活性酸素の発生源である。放射線による DNA 損傷はミトコンドリアを活性化し、副産物として活性酸素が発生する。活性酸素は近傍のミトコンドリアに酸化損傷を誘導する¹。ミトコンドリア

DNA (mtDNA) はヌクレオソーム構造を持たないことや修復効率が低いため、放射線影響が顕著に現れることが考えられる。このことから、ミトコンドリア損傷は放射線の応答を高感度に検出可能なバイオマーカーとして活用できると考える。ミトコンドリア損傷は、膜電位の低下したエネルギー産生のできない異常なミトコンドリアの分解に関わ

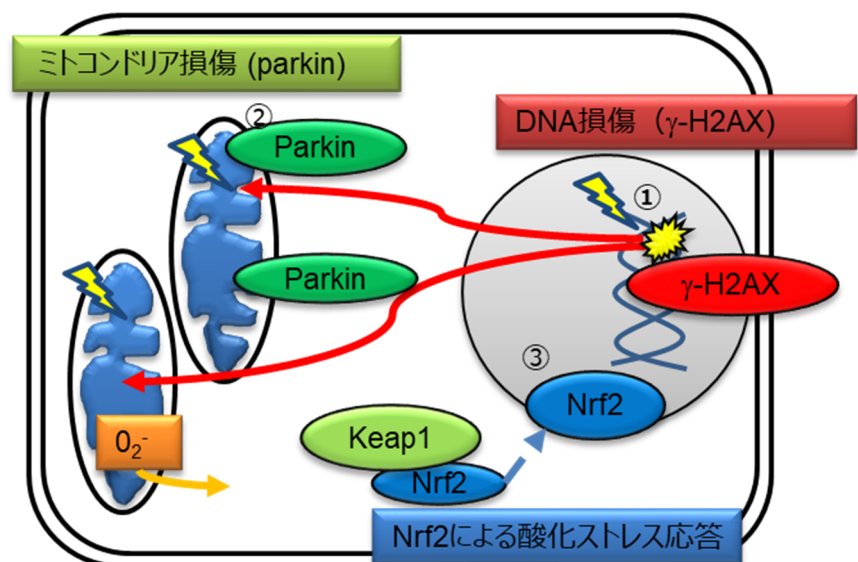


図1 3つの生物学的指標

る Parkin に対する抗体を用いて検出した。さらに、酸化ストレス防御の生体内センサーである Nrf2（NF-E2-related factor 2）を解析した。Nrf2 は生体の恒常性維持に重要な転写因子で、酸化ストレス応答に関わる遺伝子群を活性化する。被ばく後時間が経過しても、線量評価を迅速かつ評価可能な期間を長く、高精度に実施するためには、いくつかの生物学的指標を組み合わせた線量評価法の確立が重要である。

II. 研究方法

1. マウスの飼育と照射方法

C57BL6 マウス 5 週齢（オス、体重 24-27g）は、日本エスエルシーより購入した。マウスは専用の飼育ケージで、気温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 5\%$ 、明暗が 12 時間ごとに調節される環境で飼育

し、1 週間ほど動物実験施設で飼育環境に適応させてから実験を開始した。動物実験は国立保健医療科学院の動物実験委員会で承認を得たのち、倫理指針を遵守して行った。マウスへの放射線照射は、X 線照射装置(アクロバイオ株式会社 Faxitron CP-160 型)を用いて、線量率 0.6 Gy/min で、0.1~5 Gy の照射を行った。

2. 採血と血球分析

照射 1、2、7 日後に麻酔下で解剖後に心採血を行い、採取した血液はヘパリンと混ぜ凝固を阻害し、チューブに回収した。theVetScan HM2 cell counter（Abaxis 社）で血球数を測定した（図 2）。

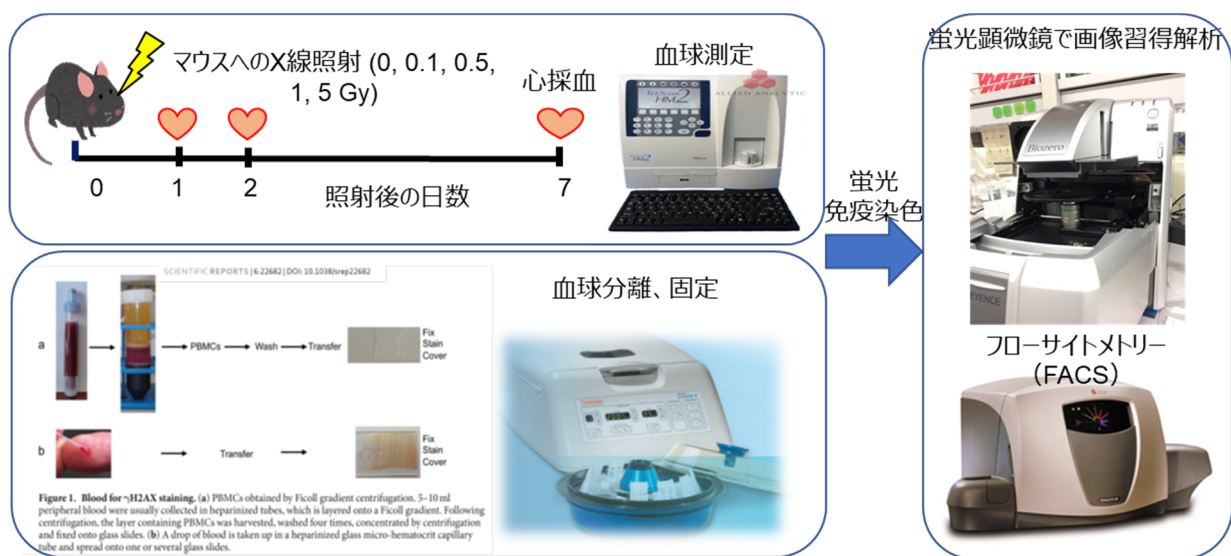


図2 動物実験による評価

3. 血液細胞の分離、分離した単核球の固定

15ml 遠心管に 3ml の Ficoll (Tianjinhaoyang Biological Manufacture 社)を準備し、心臓から採血した血液と等量の phosphate-buffered saline (PBS) で希釈した後に上層にのせ、400×g で 30 分間アクセルなし、ブレーキなしの条件で遠心を行った。遠心後、上部から下に向かって、血漿層(血清と血小板の混合物)、Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC: 抹消血単核球層)、Ficoll 液、顆粒球層(好中球)、赤血球層の 5 層に分離される。最上層の血漿層を除去後、2 層目の PBMC を回収した。PBMC を PBS で洗浄した後に、1.5ml チューブの中で 4%パラホルムアルデヒドを用いて室温 10 分間で固定を行い、PBS で洗浄した後にサイトスピン集細胞遠心装置（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（図 2）。

4. 血液細胞を用いた蛍光免疫染色法

膜透過の処理については、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、 γ -H2AX、または Nrf2 の抗体を用いた染色では 0.5% のトライトンを使用し、室温 10 分間行った。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、順番に室温 1 時間の抗体反

応を行った。細胞核は 4ug/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、キーエンス社 蛍光顕微鏡 Keyence BZ-X710 で観察した。CCD カメラで 1 つのスライドに対して無作為に蛍光画像を 5 枚~10 枚取得した後、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、細胞数の計測と細胞核における Parkin（ミトコンドリア損傷）、 γ -H2AX（DNA 損傷）、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。

5. フローサイトメーターを用いた蛍光検出

マウス末梢血単核細胞をチューブの中で Parkin 抗体を用いて蛍光免疫染色をした後に、蛍光量をフローサイトメーター（FC500: BD 社）で定量した。

6. 染色に使用した抗体

一次抗体には、Rabbit Anti-Nrf2 antibody (abcam #ab31163)、PARK2/Parkin Polyclonal antibody (Proteintech #14060-1-AP)、 γ -H2AX [p Ser139] antibody (Novus Biologicals #NB100-384)のいずれかを使用し、二次抗体は Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed secondary antibody, Alexa Fluor 488 (Invitrogen #A-11034) を使用した。

7. 統計処理

エラーバーは標準偏差を示す。全ての実験は、少なくとも 3 回以上の独立した試料を用いて繰り返し実験を行った。エクセル統計 2012 解析ソフトを用いて、一元配置 ANOVA 後に、Dunnett 法を用いて、多重比較検定を行った。

（倫理面への配慮）

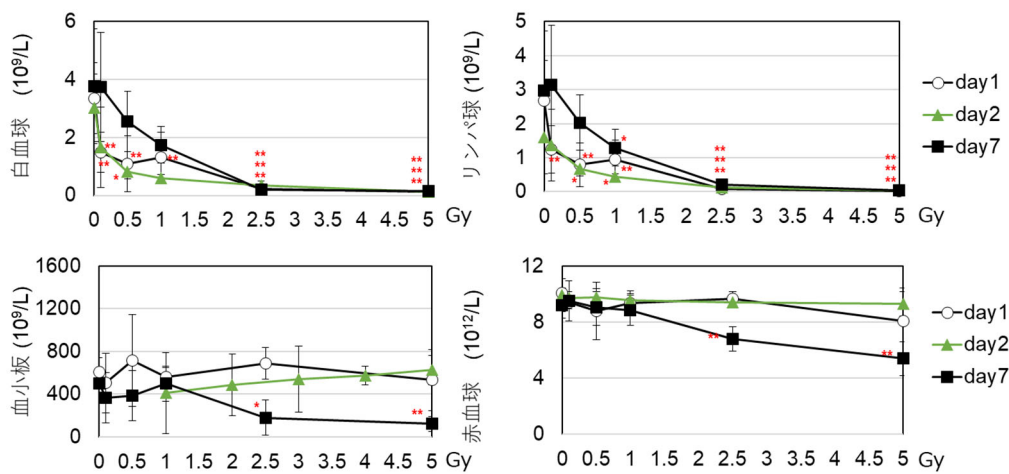
本申請研究では実験動物を用いての解析であり、倫理委員会の審査は必要としない。動物実験については、所属する機関の動物委員会により実験計画の承認を得て実施している。

III. 研究結果

1. 放射線被ばくによる白血球数、血小板、赤血球の減少

マウス全身照射による血液細胞への影響を解析するために、心採血によって採取した血液の一部を用いて、Abaxis 社の the VetScan HM2 cell counter で血液細胞数を測定した。照射一日後を白丸で示す。放射線照射で白血球とリンパ球の細胞数が減少し、0.5 Gy 以下の線量では、7 日目に回復が見られた。一方の 1 Gy 以上では、回復は見られなかった。血小板と赤血球では、高線量の放射線照射で 7 日目に影響が観察された。放射線影響が観察される時期の違いは、それぞれの細胞の寿命が関係していると考えられる。以上の結果から、白血球数の減少は、放射線被ばくの第一の指標であることを示した。

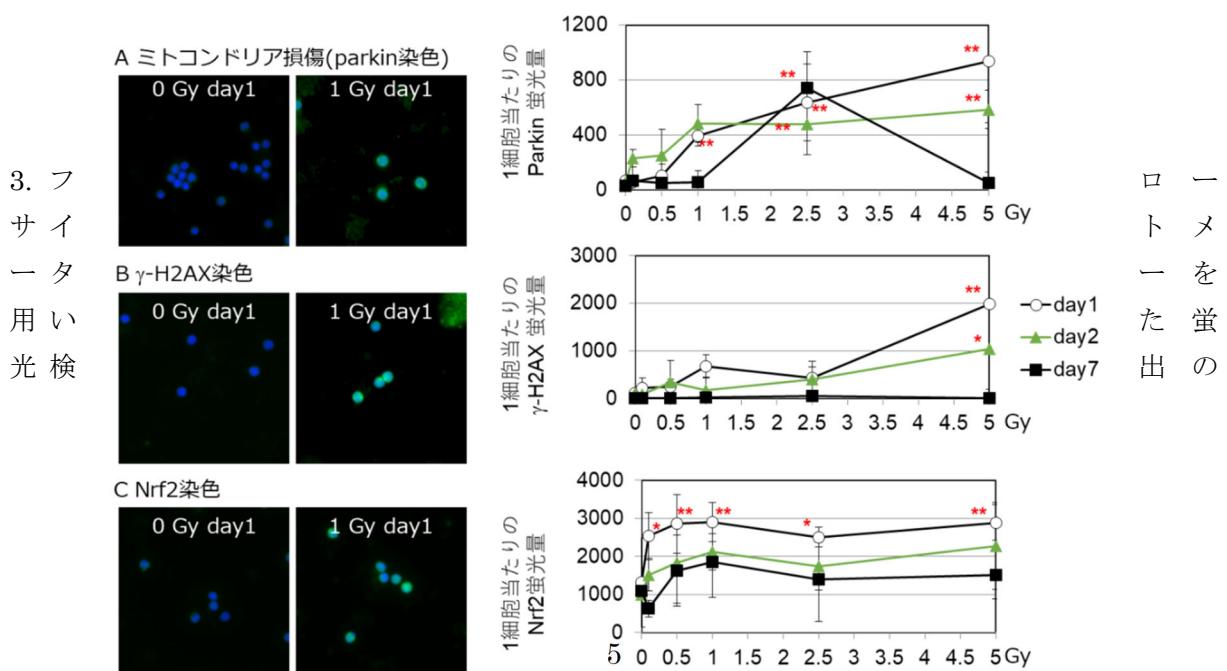
図 III 1 放射線による血液細胞への影響



2. 放射線誘発 DNA 損傷、ミトコンドリア損傷、酸化ストレス応答の解析

血液細胞の染色結果を図 III-2 に示す。1 Gy の全身照射したマウスの血液細胞では、Parkin、Nrf2, γ -H2AX で染色される細胞が観察された。蛍光像を写真撮影し、画像解析ソフトを用いて青く染まる核の部分のみを選択して、輝度を数値化した結果をグラフに示す。非照射細胞の 1 細胞当たりの輝度の平均値をコントロールとして、照射 1、2、7 日後での時間変化を検討した。 γ -H2AX の蛍光強度解析結果から、5 Gy の照射のみで照射 1 日後と 2 日後で有意な輝度の増加が観察された。Parkin は γ -H2AX よりも感度良く、1 Gy 以上の放射線で照射 1 日後と 2 日後に輝度の増加が観察された。Nrf2 では、さらに 1 Gy 以下の低い線量においても蛍光量が増加する結果が得られた。以上のことから、 γ -H2AX よりも、Parkin と Nrf2 のほうがより感度良く放射線に応答することが示された。

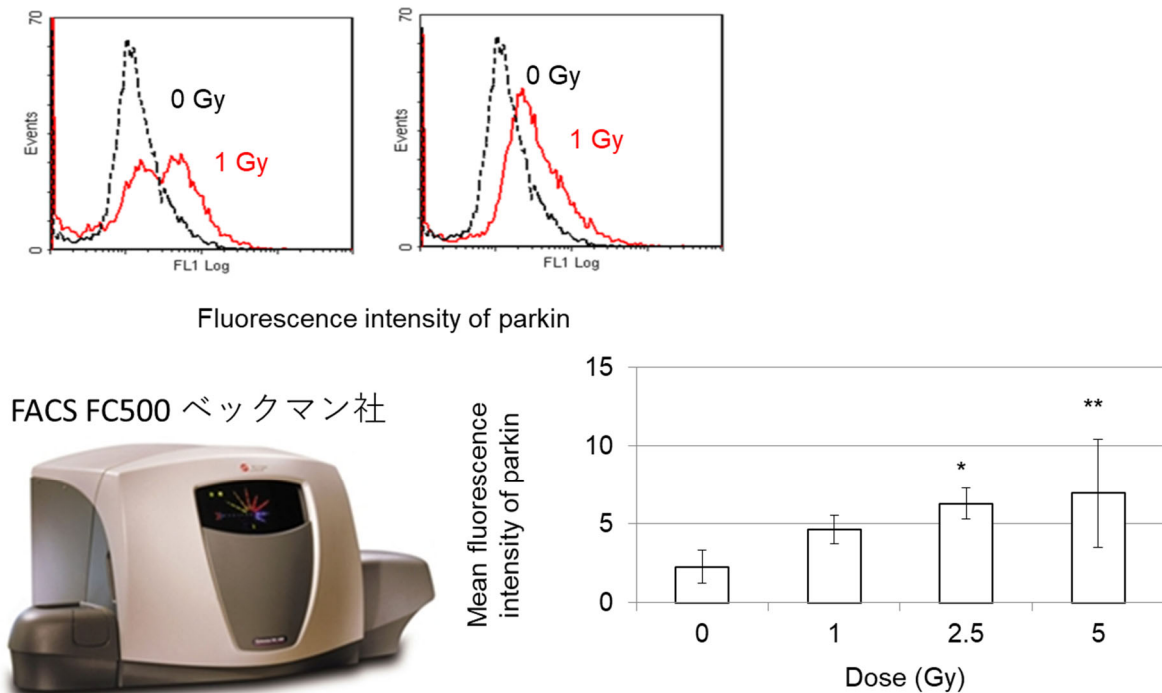
図 III-2 免疫染色の結果



迅速化

Ficoll で分離したマウス末梢血単核細胞を用いて、チューブの中で Parkin 抗体を用いて蛍光免疫染色を行いフローサイトメーターで検出した。黒の点線の非照射コントロールと比べて、照射した血液細胞では、Parkin のシグナルの増加が観察された。しかし、蛍光顕微鏡と同等の感度は得られず、2.5 Gy 以上の照射で統計的に有意に Parkin のシグナルの増加が検出された。

図 III-3 3. フローサイトメーターを用いた蛍光強度解析結果



IV. 考察

本研究では線量評価のため、酸化ストレスバイオマーカーの有効性を検討した。前年度までの全血を用いた血液滴下法²(マウスから採取した血液を採取してそのままスライドガラスに定着させる方法)での染色では、染色像が汚く γ-H2AX と Parkin は 5.0 Gy でのみ放射線応答が観察され、Nrf2 の放射線応答は検出されなかった。全血を用いる染色方法では、血液細胞中にある大量の赤血球が抗体反応を阻害し、バックグラウンドのシグナルが高くなることが考えられる。Ficoll による末梢血単核細胞の分離で赤血球を除去することにより、Parkin と Nrf2 で 1 Gy の被ばくが検出できることを明らかにした。

蛍光強度を検出する方法の迅速化について検討した。蛍光顕微鏡を用いた画像習得、画像解析では、個々の細胞の染色状態を確認できる利点はあるが、解析結果を得るまでに時間がかかる。これについては、ロボット等を用いた自動化による迅速化が必要である。しかし、現場で測定を行うことを想定した場合には、装置の持ち運びが困難であることから不向きと考えられる。一方、フローサイトメーターは大量の染色した細胞の蛍光量を迅速に検出することができ、最近では装

置の軽量化が進んでいる。フローサイトメーターを用いた蛍光検出では、蛍光顕微鏡と同等の感度は得られず、2.5 Gy 以上の照射で統計的に有意に **Parkin** のシグナルの増加が検出された。染色の正確性、感度を向上するため、今後は染色法の最適化を行う必要があると考える。

2011 年に起きた福島原発事故を教訓として、原子力災害に対する備えが進められている。迅速かつ高感度の線量評価法を確立することで、大規模災害時に多数の被災者の選別が可能となり、被ばく線量に応じた治療を迅速に行うことで、多くの人の救命につながると考えられる。低線量においても放射線高感受性の人（反応が大きく表れる人）では医療が必要になる。個人の放射線感受性によってバイオマーカーの反応が異なることから、集団から放射線高感受性の人の特定に利用可能と考える。酸化ストレスは発がんにも関与することから、酸化ストレス応答を測定することで、放射線被ばくが原因で将来がんになるリスクの評価にも活用できるのではないかと考える。いくつかのバイオマーカーを組み合わせることで、線量評価の正確性や感度の向上が期待される。

V. 結論

- ・放射線被ばくの第一の指標としては、白血球の減少が観察された。
- ・照射から 1 日後では、**Parkin** と **Nrf2** は γ -H2AX よりも、放射線に高感度に応答することが示された。放射線応答の異なる複数の指標を用いることで、より高精度の線量評価法を確立することが期待される。
- ・血液スメアの染色像が汚いことから染色には、赤血球の除去は不可欠であることを示した。

VI. 次年度以降の計画

今後は、実験の再現性を確認し、生物学的指標が利用できる評価の期間について検討を行う必要がある。また、染色法の最適化、迅速化を行う必要がある。**Ficoll** を用いた抹消血単球層の分離には、30 分間の遠心操作が必要で、さらに **Ficoll** の洗浄を含めて、細胞の固定までに 2 時間かかる。染色法の迅速化を検討するため、**Lyse/Fix Buffer** を用いて赤血球の溶解と白血球の固定を同時に行うことで検査時間の短縮が可能と考える。また、別の方法としては、分担研究者の中村は、リンパ球を迅速に分離するチップ技術の開発を進めている。この方法では、短時間での細胞の固定が可能である。

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) 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
- 2) 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

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

ウ) 書籍・総説

該当なし

エ) 受賞

該当なし

オ) 特許

該当なし

カ) 環境行政への活用・貢献実績

該当なし

VIII. 引用文献

- 1) Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, et.al. ATM-mediated mitochondrial damage response triggered by nuclear DNA damage in normal human lung fibroblasts. Cell Cycle 2017; 16:2345-54.
- 2) Heylmann D, Kaina B. The gammaH2AX DNA damage assay from a drop of blood. Scientific reports 2016; 6:22682.

Use of oxidative stress biomarkers for radiation biodosimetry in emergency radiation incidents

Tsutomu Shimura

Department of Environmental Health; National Institute of Public Health • Chief Senior Researcher

Key word: , Biological marker, mitochondria, ROS, Parkin, Nrf2

Abstract

Dose assessment is required to determine appropriate therapeutic strategies and prognoses for severe radiation victims on radiation emergency medicine. We need to improve biodosimetry techniques to urgently, reliably and sensitively evaluate radiation dose. Double strand breaks marker γ -H2AX is thought to be a powerful tool for assessment of radiation doses. However, this marker cannot be used to assess past exposures that occurred a few days prior because γ -H2AX foci disappear after DNA repair. Other than nuclei, mitochondria are major radiation target and the site of reactive oxygen species (ROS) generation. Radiation activates mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) in response to DNA damage and mitochondrial ROS appear as by-product of OXPHOS. Excess concentrations of ROS resulted in oxidative damage that was in turn recognized by parkin, leading to mitochondrial autophagy (mitophagy) to protect the quality of mitochondria. The Nrf2 transcription factor controls major cellular antioxidant responses.

Mouse blood smears or peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolated using Ficoll - Paque™ PLUS centrifugation were used for immunostaining with oxidative biomarkers of parkin or Nrf2. Both markers of oxidative stress were more sensitive and persistent over time than nuclear DNA damage. Combining γ -H2AX, parkin, and Nrf2 biomarkers may be useful for extending dose assessment time after emergency radiation incidents.

Biodosimetry technique is beneficial to screen the highly radiation sensitive population in large nuclear incidence. Oxidative stress biomarkers serve as not only for radiation dose assessment but also for evaluation of radiation risks on humans.