

放射線被ばくのバイオマーカー測定法開発の基盤研究

(受託者) 国立大学法人広島大学

(研究代表者) 飯塚大輔 原爆放射線医科学研究所

(研究開発期間) 平成22年度～23年度

1. 研究開発の背景とねらい

2011年に発生した東京電力福島第一原子力発電所事故を受け、世界中で原子力発電の是非が再考されているが、多くの国々は重要なエネルギー源として継続的に原子力発電を行っており、新興国の一部ではなお原子力発電を推進している。また、放射線を利用した医療技術の高度化に伴い、放射線診断・治療機器の普及も拡大しつつある。そのため必然的に放射線被ばく事故や災害の危険性の増大が懸念されている。放射線被ばく事故・災害に際しては、広範な被ばくを疑われる者に対して迅速且つ正確な客観的被ばく線量測定・リスク評価が重要となる。一般に個人被ばく線量計を所持していない場合の線量測定は生体から得られる試料をもとに行われる（生物学的線量評価法、バイオドシメトリー）。現在、末梢リンパ球の染色体異常を指標としたバイオドシメトリーがヒトの被ばく線量の推定に用いられているが、染色体の異常を顕微鏡で観察するという煩雑で熟練した技術を要するため、広範な被ばくを疑われる集団から、個々のデータを取得、解析して被ばく線量測定・リスク評価し、それらを治療優先順序の選別（トリアージ）に用いる事は極めて困難である。

近年、生体データの網羅的解析技術の開発が急速に進められ、これまで検出できなかった特定の疾患特異的生体応答因子（バイオマーカー）の同定が可能となっている。

本事業の目的は、放射線事故・災害時にも応用可能な生物学的放射線被ばく線量推定技術の開発である。まず、マウスを放射線被ばく生体モデルとして、広範且つ非侵襲的に採取が可能な尿中代謝産物の網羅的解析（プロテオーム解析）を行う事で放射線被ばくに高感受性の応答性因子を同定する。具体的には放射線照射されたマウスの尿中に特異的に検出されるペプチド等を質量分析によって同定し、それらをバイオマーカーとしてプロファイリングを行うと共に、同定された個々のバイオマーカーの高感度な検出法の開発を試みる。開発した高感度検出系を用いて、それぞれの尿中代謝産物バイオマーカーの被ばく線量に対する質的・量的な経時変動を解析し、解析結果に基づいた正確なバイオドシメトリー技術の確立を試みる。加えて異なる系統のマウスでの再現性を検討することにより、汎用性の高いヒト放射線被ばくバイオドシメトリーの開発及び緊急被ばく医療におけるトリアージ技術開発の礎を築くものとする。

2. 研究開発成果

放射線照射マウス尿中に含まれるタンパク質やペプチドの変化を見るために、高速液体クロマトグラフィー、固相抽出チップ（ZipTipまたはOMIX）ならびにペプチドマスフィンガープリンティング法により処理した尿サンプルについて、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（MALDI-TOF MS）による放射線被ばくに特異的な分子の測定ならびにその分子の同定を行うMS/MS測定を行った。最終的に本事業開始以前に判明していたm/z 2820（hepcidin-2）に加え、m/z 1720（Kidney androgen regulated proteinのペプチド断片）、m/z 2746（Protein virilizer homologのペプチド断片）ならびにAdipsinが放射線被ばくのバイオマーカー候補と推測された。

本事業では同定された個々のバイオマーカーの高感度な検出法を開発し、それをもとにバイオドシメトリーの基盤構築を行うこととしていたため、前述のバイオマーカー候補となる分子ならびに内部標準の候補となる分子に対する抗体をうさぎやラットで作製した。それらの抗体を用い、尿サンプル中の各分子を検出するための検討をウエスタンブロット法やELISA法で行ったところ、一部の雌尿における hepcidin-2 ならびに尿中 Adipsin のみ検出することができた。検出出来なかったものは今後の検討課題である。Adipsin の変化については、抗体を用いてウエスタンブロットを行った結果、被ばくにより Adipsin の糖鎖が切断されたことが明らかとなった。

前述の通り、高感度検出系を確立するために様々な検討を行った結果、抗原抗体反応を利用するのではなく、質量分析計を用いた解析が最良であると示唆されたため、以下の検討は質量分析計で行った。前述のバイオマーカー候補となる分子について被ばく線量と被ばく後の経過時間の関係を解析したところ、被ばくにより Kidney androgen regulated protein ならびに Protein virilizer homolog のペプチド断片が増加する傾向にあること、そして Adipsin の糖鎖の切断が促進される傾向にあったが、それは被ばく線量や経過時間に依存していなかった。一方で hepcidin-2 は比較的低い線量 (0.25 Gy や 0.5 Gy) とそれ以上の線量 (1 Gy、2 Gy、4 Gy) とで異なる挙動を示すことが明らかとなった。また、1 Gy 以上の被ばくでは線量に依存して尿中での hepcidin-2 量が最も多くなる時間が遅延する傾向にあった。また、これらは使用したマウスの系統や被ばく時年齢に影響を受けることが示唆された。

前述のとおり、hepcidin-2 のみが被ばく線量や経過時間を反映する分子であったため、hepcidin-2 測定結果を用い、バイオドシメトリーを行った。被ばくしていないマウスならびに被ばく前のマウスの hepcidin-2 量の平均値を算出し、そこにその標準偏差 3 倍分を足した値 (average+3SD) を閾値 (0.366) とし、その値を上回ったか否かで被ばくを推定する方法を本事業では用いた。その結果、被ばく後 8 時間と 120 時間から 168 時間に増加するパターン、72 時間を中心に増加するパターン、そして 72 時間に増加する場合は前後何日間増加するか、である程度の線量が反映されていることが前述の測定系により明らかとなった。

この結果を用い、実際にバイオドシメトリーを行ったところ、今回実施した線量ではある程度、被ばく線量を推定できるような検出パターンを示したが、その挙動は複雑であるため、この方法で精確なバイオドシメトリーを行うことは不可能であると思われた。

3. 今後の展望

平成 22 年度は主に放射線被ばくの新規尿中バイオマーカーの探索とその測定法の開発に注力し、2 個のバイオマーカー候補となる分子を同定できた。平成 23 年度もさらに 1 個のバイオマーカー候補となる分子を同定することができた。さらに hepcidin-2 に関して、線量や時間に依存して尿中で増加する事が明らかとなり、継続的に尿を調べることにより幾つかのパターンを示すことから、ある程度被ばく線量を推定できるような検出パターンを示したが、その挙動は複雑であるため、精確なバイオドシメトリーは困難であることが示唆された。多くの分子を放射線被ばくのバイオマーカーとして同定することを想定していたが、結果的に hepcidin-2 のみが線量や時間に依存して尿中で増加した。その hepcidin-2 の挙動も複雑で、単純に数式化することには困難が予想されたため、閾値を用いた評価法を本事業では用いた。今後も継続して放射線被ばくの尿中バイオマーカーの探索を行っていく予定である。