

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：82602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12212

研究課題名(和文) 低線量放射線の酸化ストレス応答及び循環系非がん影響へのイメージング手法による検索

研究課題名(英文) The study on the low dose radiation on oxidative stress and cardiovascular systems on maize

研究代表者

牛山 明 (USHIYAMA, Akira)

国立保健医療科学院・生活環境研究部・上席主任研究官

研究者番号：60291118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：放射線ばく露によって循環器障害に繋がるリスクの科学的根拠を探索するため、生きたまま同一部位の微小循環動態の観察が可能である生体顕微鏡システムを用いて、放射線ばく露後の同一部位の微小循環動態を生体顕微鏡下で経時的に評価し、循環指標への影響を明らかにすることを目的とする。また酸化ストレス応答を発光イメージングで検出することで放射線ばく露によって生じる酸化ストレスの可視化も同時に行い、酸化ストレス応答の発生部位と循環動態との関連性を調べ、放射線による循環器障害に関する因果関係ならびにメカニズムを検討した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the scientific basis of risk leading to cardiovascular disorders due to radiation exposure, we used the intravital microscope system, which is possible to observe the microcirculatory dynamics of the same region for long time. We clarified the influence on the circulation index. In addition, oxidative stress caused by radiation exposure was visualized by detecting oxidative stress response by luminescence imaging, and the relationship between oxidative stress response generation site and circulatory dynamics was examined.

研究分野：環境生理学 循環生理学

キーワード：生物影響 低レベル放射線 微小循環 生体顕微鏡 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

原爆被爆者の寿命調査において、放射線の非がん影響としての循環器疾患のリスクの増加が報告されている。また国際放射線防護委員会 (ICRP) では、ICRP Publication 118(2012年)で、白内障、循環器ともに500mGyのしきい線量が提示されている。一方で東京電力福島第一原発事故以降、100mSv以下の低線量放射線による健康影響が懸念されているところであるが、低線量長期放射線被ばくによる心血管系への影響については、疫学及び生物学的知見は明らかに不足しており、生物学的な解析による新たなデータの蓄積とメカニズムの解明が必要である。

放射線は細胞傷害性を持つが、血管組織内でどの細胞が標的になるのか、明らかでない。放射線照射後に炎症性マーカーが亢進されることから、放射線誘発炎症反応が細胞傷害性に関与すると考えられている。我々は、マウスの微小生理環境、特に微小循環動態を観察する目的で、背側皮膚透明窓法 (DSC法) および頭蓋窓法 (CW法) を利用し、微小循環床の長期にわたる連続観察を行う実験系を整備してきており、これらの方法を用いて、放射線の標的細胞の同定とともに、時間空間的な細胞傷害性の反応を長期的に追従できることが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、DSC法、CW法の特徴である生体の血流状態を生きたままリアルタイムに観察できるという特徴を生かし、白血球-血管内皮の相互作用、炎症性マーカーの亢進を指標に微小循環系における細胞傷害性を同一個体で経時的に検出し、低線量領域も含めた放射線の線量依存性を検討することを目的とする。また、酸化ストレス可視化トランスジェニックマウスを用いて、微小環境における酸化ストレスの発光イメージングを行い、放射線の標的細胞 (標的微小組織) を明らかにする。体内の臓器については、生きたまま観察する手法がないため、放射線照射後解剖摘出し、臓器のホモジネートのルシフェラーゼ活性を測定し、放射線線量との関係を明らかにする。

本研究では、国民の関心の高い低線量放射線による健康被害、特に循環系への影響の機構解明に取り組む研究である。生体の血流動態をリアルタイムに観察できる観察系の特徴を生かして、血管組織内での細胞傷害性を起こす放射線の線量を明らかにするとともに、近年開発された酸化ストレス可視化トランスジェニックマウスを用いることで、酸化ストレスの発生を追従し、細胞傷害性の時間空間的相関を明らかにする点に特色がある。

3. 研究の方法

本研究では、放射線や紫外線の酸化ストレスを生体内で可視化するため酸化ストレス可視化トランスジェニックマウス (OKD48マウス)

を用いる。併せて血液循環指標との関連を明らかにするため、微小環境 (微小循環領域) の生体顕微鏡的観察の手段として背側皮膚透明窓 (DSC) または頭蓋窓 (CW) をマウスに装着し、皮膚と脳軟膜を対象とした微小環境におけるイメージングを行う。放射線ばく露後の微小循環動態の指標としては、DSC内の皮膚またはCW内の脳軟膜において、蛍光色素を用いた微小血管造影や白血球の *in vivo* 蛍光染色を行う。また、同時に放射線ばく露後のルシフェラーゼによる化学発光を観察し、その酸化ストレス応答を解析する。これらより微小領域の酸化ストレス応答と微小循環動態について総合的に解析を行い、放射線ばく露による循環器系への生体影響について時間空間的な影響評価を *in vivo* イメージングを通じて明らかにする。

酸化ストレス可視化トランスジェニックマウス (OKD48マウス) は、学術機関に対しオスメス1匹ずつの2匹が頒布されることとなっており、実験に供するため、その2匹から3世代程度繁殖を行い、実験のために安定して供給できる体制を整える。それ以降以降も引き続き繁殖を行いつつ、一部を実験用として供するシステムを整える。

OKD48マウス (8~10週齢) に背側皮膚透明窓 (DSC) または頭蓋窓 (CW) を既に確立している方法により外科的に装着したのちに、それらが酸化ストレス応答によりルシフェラーゼを誘導することを以下の方法により確認する。OKD48マウスを開発した Iwawaki らによって、除毛したマウス全身へのUVA刺激により、ルシフェラーゼが誘導されることが報告されている (Scientific Reports, 2012)。したがって本研究においてもポジティブコントロールとして、紫外線UVAを照射した際のDSC内の観察対象領域においてルシフェラーゼの化学発光の強さを測定し、のちの放射線ばく露との比較の基礎とする。

なお化学発光の観察には、暗空間が必要であることから、備品として顕微鏡システムを置く暗箱を購入し顕微鏡およびEMCCDカメラは既存のものを適用する。

放射線ばく露については小動物用エックス線照射装置 (Faxitron社 CP-160) を用いて、マウス全身にエックス線 (3~5Gy) を照射し、数時間~24時間程度経たものを実験に供する。チャンパー内の微小血管床の血流動態を明らかにするために、尾静脈よりFITC-デキストラン (平均分子量150kDa) を投与することで毛細血管レベルまでの血管蛍光造影を行う。また、同じく尾静脈よりローダミン6Gを投与し血流中の白血球を生体内蛍光染色し、血流動画を取得することにより、白血球-内皮相互作用 (白血球の血管内皮へのローリングや粘着現象) を明らかにする。同時にルシフェラーゼ発光による酸化ストレス応答の検出をおこなう。DSC内の微小環境におけるルシフェラーゼ発光の分布が均一

でない場合、上記の血管造影や白血球-内皮相互作用との相関の有無について、イメージング処理によりその微小環境の特異性について検討する。なお、エックス線照射実験においては、体内臓器もばく露されるため、DSC法による皮膚血管の観察以外にもCW法による脳軟膜血管の観察を平行して行うとともに、これらのイメージング終了後には、採取した各臓器のホモジネートのルシフェラーゼ活性を測定し臓器レベルの酸化ストレス応答も調べる。また一方、低線量放射線で抗酸化活性が活性化されるという報告もあることから、ばく露後のスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンについて定量化をおこなうと共に、血液中のTNF- α 等の炎症性サイトカイン濃度についても検討し、放射線ばく露による全身性の炎症反応との関連性も検討する。

平成28年度は、27年度に引き続き放射線ばく露時の変化についての検討とその量反応関係を明らかにした。また放射線ばく露が遠位の組織に対して影響を与えるか否かを検討するため、照射の際に観察部位を鉛で覆うことにより、局所が防護された場合にその他の部位に照射されたエックス線の影響について酸化ストレス応答ならびに微小循環動態を調べ、その影響を明らかにする。一方、数Gyレベルの非常に強い線量の影響以外にも、比較的低線量(0.1~1Gy程度)の単回ばく露および繰り返しばく露について、どのような酸化ストレス応答が見られるかについても、DSC法による皮膚およびCW法による脳軟膜の双方について観察・検討を行う。併せてこの条件においても、照射後の臓器を採取し、その臓器レベルでの酸化ストレス応答を定量化し、低線量被ばくの際の非がん影響について、総合的に考察を加えることとする。

本課題に関しては、動物実験ならびに遺伝子改変動物を用いることから組換えDNA実験に該当する。研究の実施にあたっては、国立保健医療科学院におけるそれぞれの当該委員会に審査申請を行い、承認を得た上で実験をおこなった。

4. 研究成果

本研究では、生体顕微鏡システム、並びに発光観察システムを用いて、微小循環動態、並びに生体内ルシフェラーゼの発光のイメージング観察を実施した。

微小循環動態について白血球の粘着能については、マウスの背側皮膚透明窓(Dorsal Skinfold Chamber)を用いて、ローダミン6Gを静脈内投与を行うことで白血球の挙動をin vivo生体顕微鏡で観察することが可能である。本研究では低線量の繰り返しばく露が、微小循環における白血球の粘着能に対して、影響を与えることはないことを明らかにした。

また、酸化ストレスについては、酸化スト

レス応答遺伝子組み換えマウス(OKD-Lucマウス)を用いて実験を行った。非常に強い単回ばく露により酸化ストレスを惹起することをあきらかにしたが、低線量の繰り返しばく露が与える影響については本実験系では有意な酸化ストレス誘導は検出されなかった。

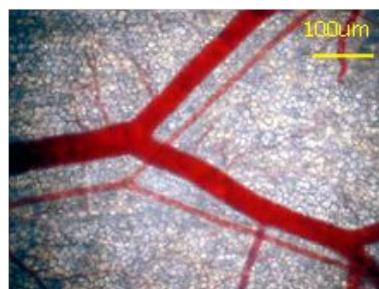


図1 本研究で使用した背側皮膚窓(DSC)(写真上)とその生体顕微鏡像(写真下)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛山 明 (USHIYAMA, Akira)
国立保健医療科学院 生活環境研究部
上席主任研究官
研究者番号：60291118

(2) 研究分担者

服部 研之 (HATTORI, Kenji)
明治薬科大学 薬学部 講師
研究者番号：90306663

(3) 研究分担者

志村 勉 (SHIMURA, Tsutomu)
国立保健医療科学院 生活環境研究部
上席主任研究官
研究者番号：40463799