

令和 2 年 11 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18349

研究課題名（和文）住居制限区域解除に向けた低線量放射線の健康影響評価の基礎的検討

研究課題名（英文）Study on the health effects of low-dose irradiation in restricted area

研究代表者

片岡 隆浩（Kataoka, Takahiro）

岡山大学・保健学研究科・助教

研究者番号：40509832

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、X線照射後の脳の酸化ストレス状態を評価することである。本実験結果から、低線量X線照射は酸化ストレスの指標である過酸化脂質量を減少し、抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）活性を増加することがわかった。また、0.5Gy照射とアスコルビン酸投与の併用はLPO量を有意に減少させたことから、抗酸化の複合効果も示唆できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に、酸化ストレスは種々疾患の原因となることが報告されている。他方、放射線も酸化ストレス因子の1つである。酸化ストレスの観点から、X線照射が脳に与える影響について評価した結果、X線照射1日後に脳の酸化ストレスが高まるが、7日後には正常に戻るということがわかった。これより、X線照射が脳に与える酸化ストレスは一過性であることが示唆できた。放射線の利用は医療や原子力分野など多岐にわたる。酸化ストレスの観点から被ばくの影響を明らかにしたことに学術的・社会的な意義がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to evaluate the oxidative stress in the brain after X-irradiation. Results showed that low-dose irradiation mostly showed decrease in lipid peroxide (LPO) levels, increase in superoxide dismutase (SOD) activities and heat shock protein (HSP) levels. In addition, the combined use of 0.5 Gy irradiation with ascorbic acid administration showed a significant decrease in lipid peroxide level, suggesting the combined effect of antioxidant.

研究分野：放射線健康科学

キーワード：X線照射 脳 酸化ストレス 抗酸化機能

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

低線量 X 線や  $\gamma$  線照射は、マウス諸臓器中の抗酸化機能を亢進し、酸化ストレス誘導の各種疾患を抑制する可能性のあることを報告してきた (Kataoka J Radiat Res 2013)。例えば、低線量 X 線照射によりマウス足の虚血 再灌流障害に伴う足浮腫が (Kataoka et al. J Radiat Res 2007)、凍結脳損傷による脳浮腫 (Yoshimoto et al. Inflammation 2012) がそれぞれ抑制することを報告してきた。これら疾患は活性酸素種により誘導されることが報告されているが、低線量 X 線照射は諸臓器中の抗酸化機能を亢進させることで、虚血 再灌流障害に伴う足浮腫や凍結脳損傷による脳浮腫を抑制することを報告してきた。

原爆被爆者の疫学調査により、0.5Gy 以上の被ばくで脳卒中のリスクが高まることが明らかになってきた (Shimizu et al. BMJ 2010)。他方、脳卒中の発症には酸化ストレスが関与することが報告されている (Blesa et al. Front Neuroanat 2015)。放射線も酸化ストレスを与える因子のひとつであるため、被ばく直後の脳の酸化ストレスの状態を評価することは重要である。

### 2. 研究の目的

福島第一原子力発電所の事故以来、低線量放射線による健康不安対策が急務である。特に、住居制限区域の解除にあたり、低線量放射線の長期被ばくは避けられない。総線量で考えた場合、10mSv/年で 50 年居住したとすれば 0.5Sv の被ばくに相当するため、脳卒中のリスクが高まる可能性がある。本課題はそれら健康不安の解決の一助とすることを目的とする。本研究では、X 線照射後の脳の酸化ストレス状態を評価するために、酸化ストレスの指標である過酸化脂質 (LPO) 量、抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性の線量依存性や、酸化ストレスにより誘導される Heat Shock protein (HSP) 70 についても分析した。また、低線量 X 線照射とアスコルビン酸 (AA) 投与の併用がマウス脳中の酸化ストレスに及ぼす効果に関して検討した。

### 3. 研究の方法

8 週齢・雄の BALB/c 系マウスを馴致期間 1 日の予備飼育の後に実験に供した。なお、本研究は岡山大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

BALB/c 系マウスの全身に 0.1・0.5・1.0・2.0 Gy の X 線をそれぞれ均等照射し、また対照として Sham 照射した。各照射の 4 時間・2 日・7 日後にそれぞれ炭酸ガスの過剰吸入により安楽死させ、脳を摘出し試料に供した。X 線照射装置は、MBR-1520R-3 (Hitachi Power Solutions Co., Ltd, Ibaraki, Japan) を用い、所定の線量 (管電圧; 150 kV, 管電流; 20 mA, フィルター; 0.5 mm Al 及び 0.2 mm Cu, 焦点ターゲット間距離; 43.5 cm) を照射した。

次に、C57BL/6J マウス (8 週齢, ) を材料とし、全身に 0.5Gy の X 線を均等照射し、また対照として Sham 照射した。その 2 時間後にアスコルビン酸 (500 mg/kg 体重) を投与した。投与から 4 時間後に炭酸ガスの過剰吸入により安楽死させ、脳を摘出し試料に供した。

LPO 量を分析するため、10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えてホモジナイズし、0.5 M ブチル化ヒドロキシアニソール含むアセトニトリル 10  $\mu$ L を加え、遠心分離 (4  $^{\circ}$ C, 15000  $\times$ g, 10 分) し、その上澄み液を試料とした。LPO 量は、不飽和脂肪酸の過酸化により生じた分解物であるマロンジアルデヒド (MDA) を BIOXYTECH LPO-586 Assay Kit (Oxis International Inc. (USA)) を用い比色定量法で測定した。すなわち、N-メチル-2-フェニルインドール、MDA 及びヒドロキシアルケナルにより 45  $^{\circ}$ C で安定な色素を生成させ、これを 586 nm の吸光度で測定した。

スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性を分析するため、試料に 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を加えホモジナイズした後に遠心分離 (4  $^{\circ}$ C, 12000  $\times$ g, 45 分) し、得られた上澄み液を分析用濃度に調製した。SOD 活性は、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 還元法により Wako-SOD test (Wako Pure Chemical Industry, Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて分析した。すなわち、NBT における阻害率を 560 nm の波長を使用し吸光度を測定した。SOD の酵素単位は、対照反応を 50% 阻害するのに必要な SOD 単位を 1 単位とした。

いずれの試料のタンパク質量についても、Protein Quantification Kit-Rapid (同仁化学研究所 (株) (熊本)) を用い、Bradford 法で測定した。

HSP 量の分析は、ウェスタンブロッティング法を用いた。得られたバンドを Image Lab によりボリュームデータを求めた。また標準タンパクとして、 $\beta$ -actin を同様に測定した。

各測定値は、関係図表中に平均値 (Mean)  $\pm$  標準誤差 (SEM) で表した。テューキーの多重比較検定 をそれぞれ用いた。

### 4. 研究成果

#### X 線照射によるマウス脳中 LPO 量の変化特性

Sham 照射 4 時間後と 0.1Gy 照射 7 日後の LPO 量は、2.0 Gy 照射に比べ有意に高かった (図 1 A)。また、0.1Gy 照射 2 日後と 2.0Gy 照射 4 時間後と 7 日後の LPO 量の割合は、Sham に比べ有意に低かった (図 1 B)。これより、本実験条件での X 線照射は脳中の酸化ストレスを軽減することが示唆できた。

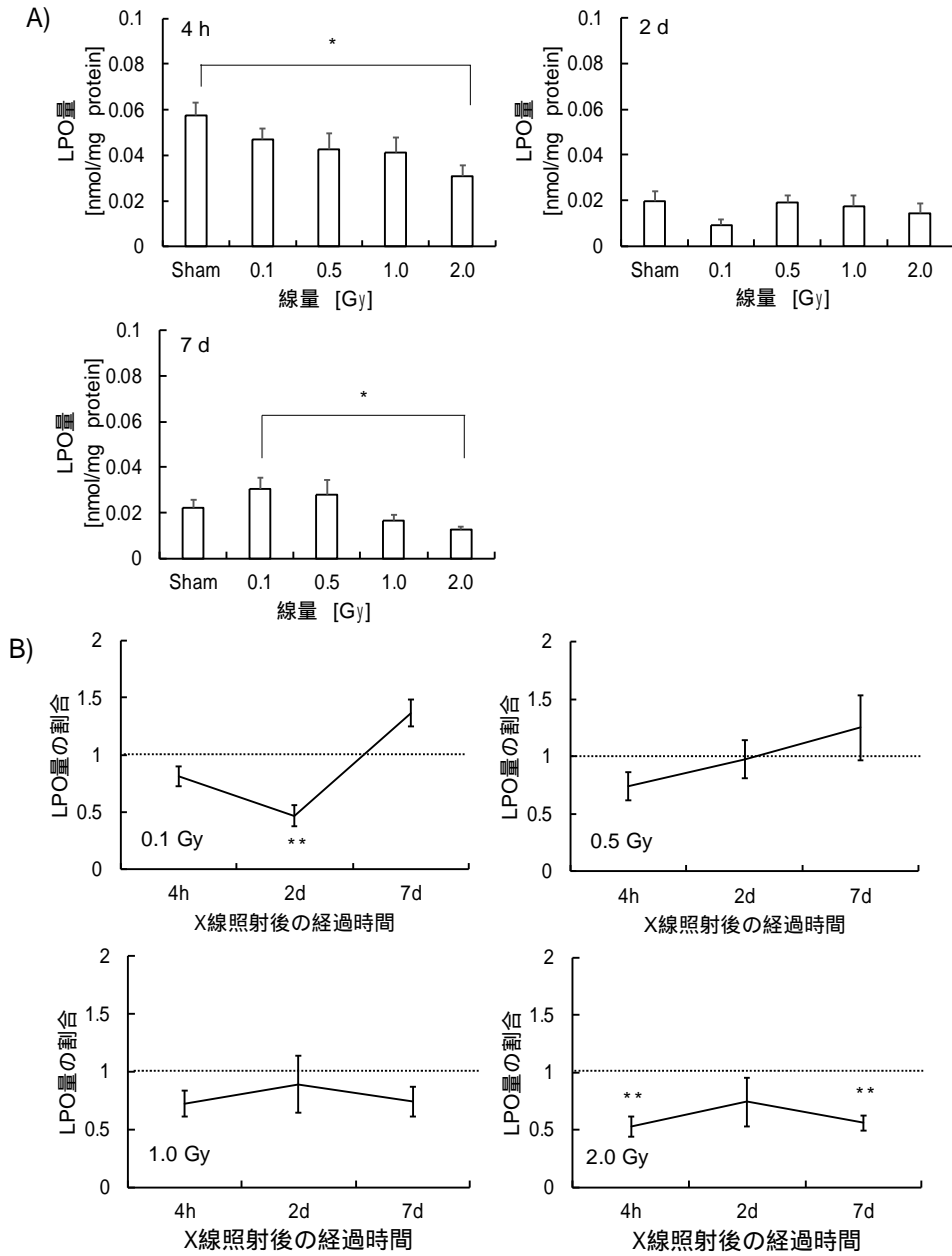


図1 X線照射によるマウス脳中LPO量の変化特性  
N=5-6, Mean ± SEM, \*P<0.05, \*\*P<0.01

**X線照射によるマウス脳中SOD活性の変化特性**

2.0Gy照射2日後SOD活性は, 0.1Gy, 0.5Gy, 1.0Gyに比べ有意に高かった(図2A)。0.1Gy照射2日後のSOD活性はShamに比べ有意に低かったが, 1.0Gy照射4時間後と2.0Gy照射4時間後と2日後のSOD活性はShamに比べ有意に高かった(図2B)。これより, 1.0Gyと2.0Gy照射でSOD活性が増加することが示唆できた。

**X線照射によるマウス脳中HSP70量の変化特性**

HSP70量は有意な差はないものの, 1.0Gy照射4時間後, 0.5Gy, 1.0Gy及び2.0Gy照射の2日間後で, それぞれ増加する傾向を示した。HSP70は酸化ストレスにより増加することが報告されていることから, 1.0Gy, 2.0Gy照射では照射直後から, 0.5Gy照射では照射2日後に酸化ストレスを受けていることが推察された(図3)。

**低線量X線照射とAA投与の併用が脳中LPO量とSOD活性に及ぼす効果**

脳中のLPO量は, 0.5GyのX線照射とAA投与の併用により有意に減少したことから, 低線量X線照射とアスコルビン酸投与の併用はマウス脳中の酸化ストレスを軽減するなど示唆できた。(図4)

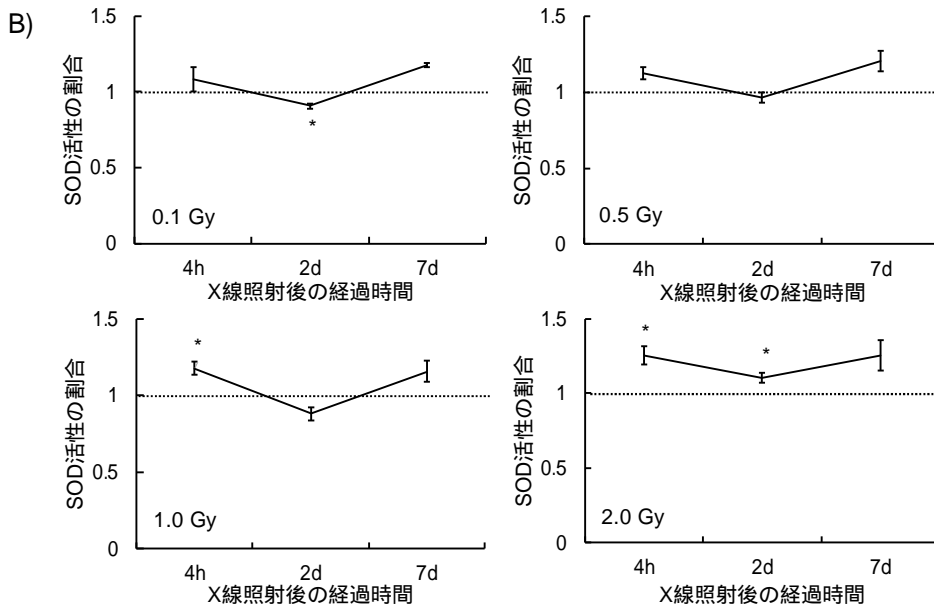
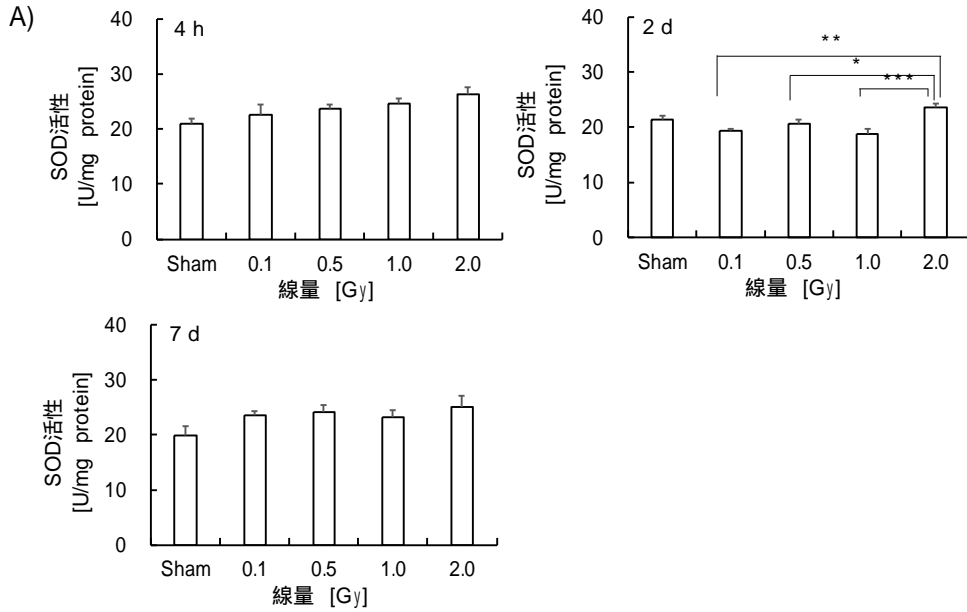


図2 X線照射によるマウス脳中SOD活性の変化特性  
N=6, Mean ± SEM, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

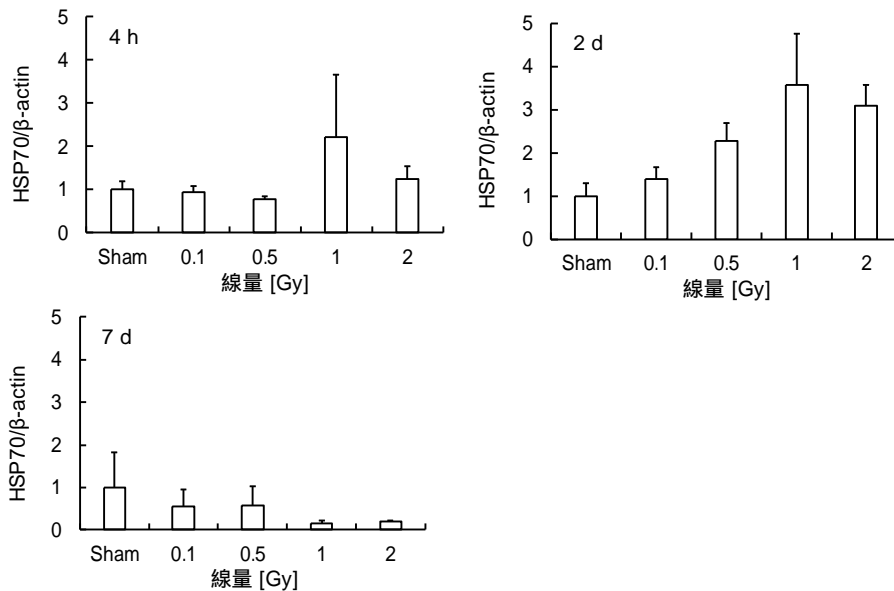


図3 X線照射によるマウス脳中HSP70量の変化特性  
N=4-6, Mean ± SEM

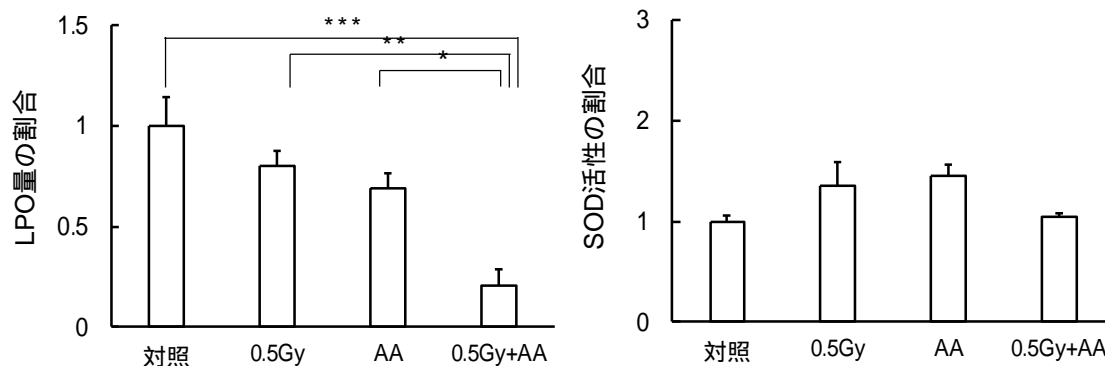


図4 低線量 X 線照射と AA 投与の併用が脳中 LPO 量と SOD 活性に及ぼす効果  
 Mean ± SEM, N = 6, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001

## 5. 主な発表論文等

### 〔原著論文〕(計 1 件)

Takahiro Kataoka, Yuto Yunoki, Norie Kanzaki, Kaori Sasaoka, Yusuke Kobashi, Tsuyoshi Ishida, Katsumi Hanamoto and Kiyonori Yamaoka. Basic study on enhancement of antioxidant function by Low-dose irradiation in mouse brain and its combined effect with ascorbic acid. *Radioisotopes* 69, 45-53, 2020

### 〔学会発表〕(計 7 件)

片岡隆浩, 他, 低線量放射線がマウス脳に及ぼす酸化ストレスの検討, 日本原子力学会 2018 年春の年会, 2018 年

片岡隆浩, 他, X 線照射がマウス脳に及ぼす酸化ストレスの線量と経過時間依存性の検討, 第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2018 年

片岡隆浩, 他, X 線照射がマウス脳に及ぼす酸化ストレスの評価, 第 55 回アイソトープ・放射線研究発表会, 2018 年

片岡隆浩, 他, X 線照射によるマウス脳中抗酸化機能の変化特性に関する検討, 第 43 回中国地区放射線影響研究会, 2018 年

片岡隆浩, 他, X 線照射によるマウス脳中の酸化ストレス状態の変化特性に関する検討, 日本原子力学会 2018 年秋の大会, 2018 年

片岡隆浩, 他, X 線照射によるマウス脳中の酸化ストレス状態の変化特性に関する検討, 日本放射線影響学会第 61 回大会, 2018 年

片岡隆浩, 他, 低線量 X 線照射とアスコルビン酸投与の併用によるマウス脳中の酸化ストレス緩和に関する基礎的検討, 日本原子力学会中国・四国支部第 12 回研究発表会, 2018 年

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名: 山岡聖典

ローマ字氏名: (YAMAOKA Kiyonori)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。