

機関番号：11501  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20790876  
 研究課題名(和文)放射線照射マウスにおける発生フリーラジカルの定量分析と経時変化の解析  
 研究課題名(英文) Quantitative and time-course analyses of oxidative stress in irradiated mice/rats.  
 研究代表者  
 野宮 琢磨 (NOMIYA TAKUMA)  
 山形大学・医学部・助教  
 研究者番号：60436201

研究成果の概要(和文):近年は少量の血液より体内の酸化ストレスやフリーラジカルの発生を間接的に捕らえることが可能になった。放射線の効果はフリーラジカルの発生と密接に関係していることが従来から知られ、今回はその放射線をラットに照射して酸化ストレスを計測した。経時的な解析では酸化ストレスの上昇は照射後3日目に一過性に見られることが分かった。高線量を照射したラット群に生じた皮膚反応の出現に応じて血中酸化ストレス値も増加していた。

研究成果の概要(英文): Recently, oxidative metabolites have been able to be measured by simple small device. Radiation used in radiotherapy causes free radicals and oxidative metabolites, and irradiation causes dermatitis and sometimes causes skin ulcer in the irradiated site. We analyzed the relationships between the value of oxidative metabolites and skin reactions. As a results, a significant correlation was shown between irradiation dose and skin grade. And a significant correlation was also shown between the value of oxidative metabolites and irradiation dose. It was suggested that the value of oxidative metabolites seems to be useful for estimating degree of skin reaction and time to appear skin reaction after irradiation.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療生物学

#### 1. 研究開始当初の背景

放射線が物質に照射されると、放射線が直接物質を電離する直接作用と、水や酸素を電

離することによりフリーラジカルや活性酸素を生じ、これらが周囲の物質に影響を与える間接作用の2つの反応が起こる。人体への

影響もこの間接作用が多くを占めていると言われているが、フリーラジカルは周囲との反応が非常に早い(マイクロ秒~ミリ秒単位)ため直接補足することは非常に困難である。しかし近年はフリーラジカルや活性酸素の反応物で寿命の長い物質を計測することで発生フリーラジカルの量を近似的に定量することが可能となった。

## 2. 研究の目的

人の組織は80%が水分で構成されており、主な放射線障害は水分子に由来するOH, H, e-, HO2, H3Oなどのフリーラジカルによって引き起こされる(Scholes G, 1973;Draganic ZD, 1976)。酸素存在下では、水和した電子や水素原子が酸素分子と反応し、HO2, O2-といったラジカルを生成する(Cohen GM, 1987; Teebor GW, 1988)。発生したフリーラジカルによりDNA, RNA, 蛋白質、細胞膜に障害が生じ、損傷や細胞死がもたらされる。

この反応は癌細胞だけではなく正常細胞にも起こり、放射線治療を行う上では有害な事象の一つとなっている。特に頭頸部領域のがんに対する放射線治療では、照射野が広範になり皮膚・粘膜と病変が近接しているため、皮膚炎や粘膜炎がほぼ必発である。これらの障害が患者の苦痛の一因となり評価と対策が大きな課題となっている(Chang VT, 2003; Palazzi M, 2007)。

しかし現状では5段階の副作用のグレード分類(CTCAE ver.3)は存在するがフリーラジカルという観点で副作用の指標は存在しない。フリーラジカル測定値はパラメトリックな連続変数であり、これまでの皮膚などの主観的グレード分類より客観的評価分類を定義しやすいと考えられる。この関連性を検討し、客観的評価方法を確立する事と、その延長としてフリーラジカル除去剤の開発・有効性の検証・臨床への応用が当研究の最終到達点である。

## 3. 研究の方法

### (1) フリーラジカル計測法

#### 1-1、測定法の概要:

生体における酸化還元作用を計測する方法は電子スピン共鳴(ESR)などが代表的な方法として挙げられ、他にガスクロマトグラフィ法や電子捕捉法などが挙げられる。しかしながら、これらは煩雑で大掛かりな装置を必要とし、施設の整った環境でしか計測できなかった。これに対する簡便な方法としてフェ

ントン反応を利用した活性酸素代謝物(ROMs: reactive oxygen metabolites)測定法が開発された。

フリーラジカルは様々な種類があるが、種類によってはナノ秒レベルで消失するものもあり、生体での直接測定は非常に困難である。そのため測定は体内のフリーラジカルを直接分析するものではなく、活性酸素やフリーラジカルにより損傷(酸化反応)を受けた脂質・蛋白質・核酸を計測する事により予想されるフリーラジカル量を定量する。活性酸素やフリーラジカルに酸化反応を受けた脂質・蛋白質・核酸のマーカーとなるものとして、ヒドロペルオキシドを定量する(Ritov VB, 1996; Devamanoharan PS, 1996)。

### (2) 動物実験における検討

2-1、照射マウス(またはラット)におけるフリーラジカル量と時間の関係:

マウス皮膚に放射線(X線・ガンマ線・電子線)を照射し、照射前、照射直後、10分後、20分後、30分後、60分後、3時間後、6時間後、12時間後、24時間後...の血液を採取し、上記方法にて発生したフリーラジカル量を計測する。照射する部位は右大腿とし、照射線量は最初2Gy(グレイ)で計測する。採血は照射野内と照射野外の皮膚より行うが、困難であれば尾静脈より採取する。マウスは5-10匹用い、その平均値を計測する。この実験でフリーラジカル測定値の変動、経時的変化の大まかな予測をつけ、計測の最適時間を算出する。

これとは別に、皮膚に放射線皮膚障害を発生させる程度の高線量を照射することにより放射線皮膚障害モデルのマウス(またはラット)を作成する。このときの照射線量、皮膚障害のグレード、フリーラジカル測定値を計測し、これらに相関があるかどうかを解析する。皮膚反応のグレードは過去の放射線照射による皮膚障害を検討した実験報告に基づいて行う。照射線量は低線量、中間線量、高線量の3群程度に分けて照射を行い、一群当たりのマウス(またはラット)の数は4-8匹として比較解析を行う。

## 4. 研究成果

各群のラットに対する放射線照射後の酸化ストレス値と時間の変化を図1に示す。0Gy, 2Gy, 30Gyの各群の経時変化では、2Gy

群において酸化ストレス値が高い傾向が見られ、統計学的に有意であった ( $p=0.018$ , repeated-measure ANOVA).

図2に各群の照射後3日目の酸化ストレス値の平均値を示す。0Gy群、2Gy群、30Gy群の平均(+標準偏差)は各々441.3 (+65.7)、601.8 (+106.0)、443.0 (+79.4)であった。群間比較を行った結果、0Gy群と2Gy群、2Gy群と30Gy群の間に有意差が見られた(0Gy vs. 2Gy:  $p=0.034$ , 2Gy vs. 30Gy:  $p=0.028$ )。0Gy群と30Gy群の間に有意差は見られなかった ( $p=N.S.$ )。

各群の照射後7日目の酸化ストレス値の平均値は次の通りであった。0Gy群、2Gy群、30Gy群の平均(+標準偏差)は各々371.5 (+57.2)、416.0 (+19.2)、365.6 (+73.1)であった。群間比較を行った結果、0Gy群、2Gy群、30Gy群、いずれの群間にも有意差は見られなかった ( $p=N.S.$ )。

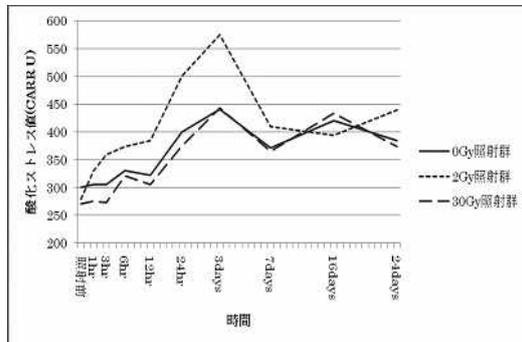


図1. 酸化ストレス値の経時変化

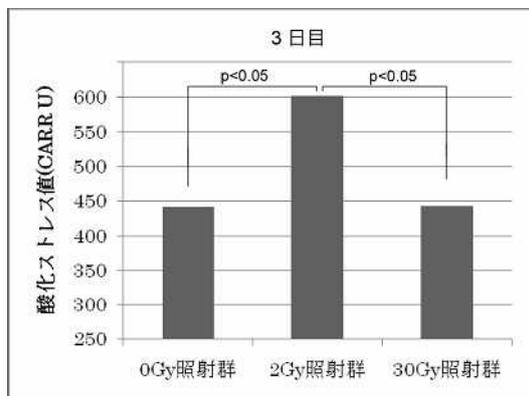


図2. 酸化ストレス値(3日目)

各群ラットに対する放射線照射後の皮膚障害の変化と時間の変化を図3に示す。皮膚障害の各群の[照射前

/Day3/Day7/Day16/Day24/Day31/Day38]の平均グレードは、30Gy群で

[0/0/0/0.8/1.0/1.4/1.4/1.5/1.2/1]、50Gy群で[0/0/0/1.1/1.6/3.2/3.0/2.5/ 2.5/2.0]、70Gy群で

[0/0/0/2.9/3.4/3.8/3.5/3.3/3.0/2.0]であった。0Gy群は非照射のため当然ながら皮膚障害は全く出現していない。障害グレードは放射線照射量に応じて70Gy群、50Gy群、30Gy群の順により重度の皮膚障害が発生する傾向が見られ、群間に有意差が見られた ( $p < 0.001$ )。どの群でも放射線照射後16日目から障害が出現し始め、24-31日目にかけて皮膚障害のピークが見られた。

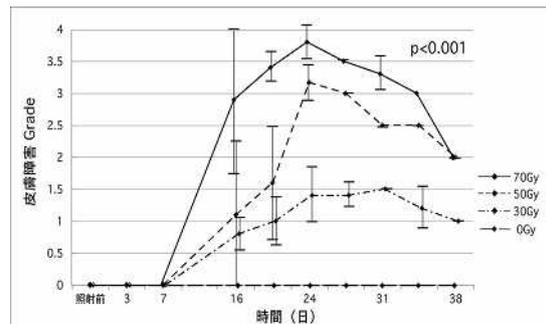


図3. 皮膚障害と照射線量の関係

次に各群のラットに対する放射線照射後の酸化反応物の測定値と時間の変化を図4に示す。各時点[照射前/Day3/Day7/ Day16/ Day24/Day31/Day38]での平均測定値は0Gy群で[299.2/412/368.4/373.4/ 347.6/364.8/340]、30Gy群で[271/443/ 365.6/433.6/ 374.2/ 391.6/377.6]、50Gy群で[371.4/ 498.6/ 452/530/497.7/ 468.7/ 395.5]、70Gy群は[313.4/498.6/426/548.4/484.2/455/387]であった。

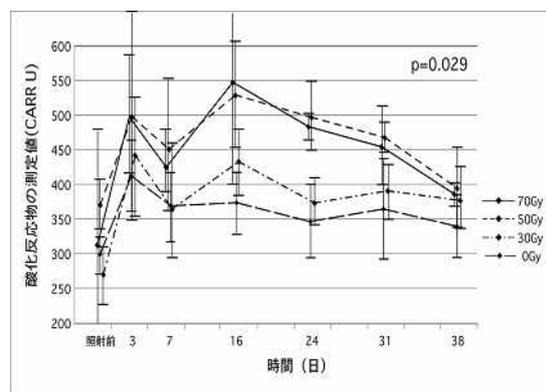


図4. 各群の酸化ストレス値の経時変化

酸化反応物の測定値の全体の変化としては、30Gy 群と 50Gy 群/70Gy 群の間には有意差がみられた( $p = 0.029$ )。50Gy 群と 70Gy 群の差は明確ではないが照射線量が多いほど酸化反応物の測定値も高い傾向がみられた。どの群でも皮膚障害の出していない照射後 3 日目に酸化反応物の一過性の上昇が見られ、16 日目に再度酸化反応物の測定値のピークがありそれ以降は徐々に低下する傾向が見られた。酸化反応物の測定値の二度目の上昇～低下まで期間は、皮膚障害の出現～障害の改善の時期とほぼ一致していた。

今回の実験では放射線被曝に対する急性期の反応として活性酸素種(Reactive Oxygen Species)が増加することが示された。低線量照射群では放射線が誘因と考えられる酸化ストレス値のピークが見られた。これまで d-ROMs テストはヒトの喫煙や糖尿病などで上昇することが報告されていたがヒトの放射線被曝後の変化の報告はまだ無い。ラットという哺乳動物における照射反応はヒトにおける被曝後の酸化ストレス反応を計測することに応用できるのではないかと考えられる。また、酸化ストレス値により組織の損傷を指標化できれば線量の調節やラジカルの中和剤投与など治療適応の選択指標へも応用できる可能性があると考えられる。しかし、30Gy 照射群の奇異な反応に関しては更なる検証が必要と考えられた。また、高線量被曝後の晩期放射線障害が形成された段階において酸化ストレス値が障害とどのように相関するかも今後の検討の課題と考えられる。

## 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 2 件)

金子 崇、後藤 準、野宮琢磨、根本建二。放射線照射後のラットにおける酸化ストレス値の経時変化。山形大学紀要(自然科学) 第 17 巻第 2 号 p31-39, 2011 査読有

金子 崇、後藤 準、野宮琢磨、根本建二。放射線照射後のラットにおける酸化反応物測定値と皮膚障害の関係。山形大学紀要(医学), 29(1): 19-28, 2011 査読有

[学会発表](計 3 件)

野宮琢磨、太田伊吹、村上弥沙子、鈴木志恒、和田仁、根本建二。放射線照射ラッ

トにおける血液酸化ストレス値と急性期反応・晩期皮膚障害の関係。第 23 回日本放射線腫瘍学会、千葉、浦安, 2010.11.18 野宮琢磨、太田伊吹、小林篤紀、村上弥沙子、鈴木志恒、和田仁、根本建二、金子崇、後藤 準。放射線照射後のラットにおける酸化ストレス値の経時変化—急性期の反応—。第 121 回北日本地方会、山形, 2010.6.25

野宮琢磨、太田伊吹、小林篤紀、村上弥沙子、鈴木志恒、和田仁、根本建二、金子崇、後藤 準。放射線照射後のラットにおける酸化ストレス値と晩期皮膚障害の関係。第 121 回北日本地方会、山形, 2010.6.25

[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

野宮 琢磨 (NOMIYA TAKUMA)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 60436201

### 研究協力者

根本 建二 (NEMOTO KENJI)

山形大学・医学部・教授

研究者番号: 60436201

金子 崇 (KANEKO TAKASHI)

山形大学・医学部医学科

後藤 準 (GOTO JUN)

山形大学・医学部医学科