

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04994

研究課題名(和文) 低線量放射線の健康不安対策としての被曝と精神的ストレスによる脳への影響の比較評価

研究課題名(英文) Comparative evaluation of the effects of low-dose radiation on the brain due to radiation exposure and mental stress as a measure against health anxiety

研究代表者

山岡 聖典(Yamaoka, Kiyonori)

岡山大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：00314683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、低線量X線または低線量率線照射による強制水泳(FST)に伴う無動時間の抑制効果と酸化ストレスを評価した。低線量X線照射した結果、0.5Gy X線の事後照射は脳の酸化ストレスを軽減することにより、FSTに伴う無動時間を抑制することが示唆できた。低線量率線を事前照射した結果、3.0mGy/h照射により肝臓中のsuperoxide dismutase活性が有意に減少した。他方、肺中のカタラーゼ活性は3.0mGy/h照射により有意に増加した。これより、強制水泳試験と低線量X線または線照射の照射はFST誘導無動時間を抑制するが、酸化ストレスの程度は臓器により異なることが示唆できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、放射線と精神的ストレスが及ぼす酸化ストレスの程度について明らかにした。東電福島第一原発事故に伴う放射線の健康影響について、放射線と他の生活因子による複合ストレスの影響を評価することは重要である。本研究の結果、低線量放射線照射は脳中の抗酸化機能を亢進させることで強制水泳試験に伴い増加する無動時間を抑制することが明らかとなり、低線量の場合、悪影響はみられなかったことから低線量放射線の健康不安対策として有用な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effects of low-dose X- or -irradiation on the forced swim test (FST)-immobility and oxidative stress in mouse organs. Results showed that 0.5 Gy X-irradiation after FST inhibits FST-induced immobility and oxidative stress in brain of mice. The superoxide dismutase (SOD) activity in the liver of the 3.0 mGy/h -irradiated mice were significantly lower than those of the non-FST-treated mice. The CAT activity in the lungs of mice exposed to 3.0 mGy/h -irradiation was higher than that of non-FST treated mice and mice treated with FST. These findings suggest that low-dose irradiation inhibits FST-induced immobility and that the effects of low-dose-irradiation on FST are highly organ-dependent.

研究分野：放射線健康科学

キーワード：低線量放射線 強制水泳試験 酸化ストレス 無動時間 脳 肝臓 腎臓 肺

1. 研究開始当初の背景

原爆被災者の疫学調査結果から、短期・高線量率で 0.5Gy 以上の被曝の場合に脳卒中のリスクが高まることが報告されていた (Shimizu, BMJ, 2010)。従って、線量率を考慮しない場合、仮に 10mSv/年で 50 年間に亘り福島原発事故周辺に居住した場合には 0.5Sv の総被曝量になるため、脳卒中のリスクが高まる可能性があった。また、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た (Blesa, Front Neuroanat, 2015)。

他方、放射線も酸化ストレス因子の一つであるが、原爆被災者のような短期・高線量率被曝の場合は何十年後の脳卒中リスクを高めることに直接的な役割を果たすとは考えにくい。また、低線量の X 線または γ 線照射はマウス諸臓器中の抗酸化機能を亢進させることにより、種々の酸化ストレスを軽減することを我々は明らかにしていた (Kataoka J Radiat Res 2013)。照射により生体内で活性酸素種が産生され、この活性酸素種が細胞構成成分・タンパク質・DNA などを酸化させることにより生体に有害な影響を起こしていることは周知の事実であった。しかし、照射により受けた酸化ストレスが数十年後の疾患に関与するとの報告は疫学調査のみであり、照射初期の酸化ストレスの影響との関連性を動物実験的に検討することは重要であった。

また、精神的ストレスも環境酸化ストレス源であることを我々は報告していた (Yamato et al, Radioisotopes, 2016)。原爆被災者には「震災」という強い精神的ストレスを受けているが、上述のごとく精神的ストレスも酸化ストレス源であることから、被曝の影響なのか精神的ストレスの影響なのかの定量的評価がされていなかった。したがって、原爆被災者に脳卒中のリスクが高まるといふ事実知見には、精神的ストレスも加味した影響であると考えられた。このため、精神的ストレスと被曝のリスクの差異を明確にする必要があった。また、低線量照射は脳の酸化ストレスを抑制するとの我々の報告 (Kataoka J Radiat Res 2013) と原爆被災者は脳卒中を誘発するとの報告は矛盾するため、精神的ストレスの関与と解明が重要であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、東電福島第一原発事故に伴う被曝の影響と精神的ストレスの影響の差異を、酸化ストレス度に着目し明確にすることであった。すなわち、精神的ストレスを模擬したモデル動物の酸化ストレス評価と、低線量放射線がそれら酸化ストレスに及ぼす影響の解明である。

3. 研究の方法

(1) X 線照射

BALB/c マウス (8 週齢,) を用いて 1 群 7 匹とし、X 線照射装置 MBR-1520R-3 (HITACHI 製) を用い、フィルタ Al 0.5mm, Cu 0.2mm, 管電圧 150kV, 管電流 20mA, 焦点 テーブル間距離 43.5cm, 線量率 1.21Gy/min の条件下で、Sham・0.1・0.5・1.0・2.0Gy を各群に照射した。拘束ストレスなどの環境条件を同一にし、ヒール効果などの影響を回避するため、円柱形の容器にマウス入れ、10 秒で 1 回転させながら均等照射した。

(2) γ 線照射

BALB/c マウス (8 週齢,) を用いて 1 群 7 匹とし、それぞれ Sham, 0.6 mGy/h (総線量 0.1 Gy), 3.0 mGy/h (総線量 0.5 Gy) の低線量率 (137Cs) γ 線照射をした。

(3) 強制水泳試験 (FST)

10 分, 1 回/日, 計 5 日の FST を以下の要領で実施した。すなわち、高さ 25cm, 直径 10 cm の円筒に 15cm の高さまで水を入れ、水温を 25 ± 1 とし、強制水泳の環境を用意した。また、その様子をカメラで 10 分間撮影した。1 回目の FST は X 照射 4 時間後に行った (事前照射)。5 回目の FST から 3 日後に X 線照射を行い、その 4 時間後に 6 回目の FST を行った (事後照射)。

1 回目の FST は γ 線照射終了直後に行った。FST 終了直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。無動時間の測定は、測定者がマウスの照射分類を把握できない 3 人の観察者が行った。

(4) 試料分析

過酸化脂質 (LPO) 量の分析手順は、次の通りであった。すなわち、脳と 9 倍量の 10mM のリン酸緩衝液 (PBS) (pH 7.4) のホモジネート 1mL に対し 10 μL のアセトニトリルと 0.5M の 2,6-ジ-t-ブチル-p-クレゾールを加えてホモジナイズし、遠心分離 (4 °C, 15000 × g, 10 分) した上澄み液として調製した。LPO 量は、BIOXYTECH LPO-586 assay kit (Oxis International, Inc., USA) を用いた比色定量法により求めた。また、タンパク質量を Bradford 法で定量し、上記で得られた LPO 量をこの値で除することにより単位タンパク質当たりの LPO 量を算出した。

SOD 活性の分析手順は、次の通りであった。すなわち、各臓器に 9 倍量の 10mM PBS を加えホモジナイズし、遠心分離 (4 °C, 12000 × g, 45 分) した上澄み液として調製した。SOD 活性は、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 還元に基づく SOD アッセイキット-WST (同仁化学分子技術社, 熊本) を用いた、ニトロブルーテトラゾリウム還元法により分析した。上記で得られた SOD 活性をタンパク質量で除することにより単位タンパク質当たりの SOD 比活性を算出した。

総グルタチオン (GSH) 量は、BIOXYTECH 製 GSH-420 Assay Kit (Oxis International, Inc., USA) を用い、色素体のチオンの生成に基づいて分析した。すなわち、各臓器に 9 倍量の 10mM リ

ン酸緩衝液 (PBS) を加えホモジナイズし、懸濁液 30 μ L と沈殿剤 (5% トリクロロ酢酸) 60 μ L を加え遠心分離 (4, 3000 \times g, 10 分) した上澄み液として調製した。上澄み液 30 μ L にバッファ・還元剤・発色試薬・発色促進液それぞれ 30 μ L を順に加えて、インキュベート (30 分, 暗所) を行い、測定した。上記で得られた総 GSH 量をタンパク質量で除することにより単位タンパク質量当たりの総 GSH 量を算出した。

カタラーゼ (CAT) 活性は、過酸化水素 / ペルオキシダーゼアッセイキット (Cayman Chemical, USA) を用いて分析した。すなわち、各臓器に 9 倍量の 10mM PBS を加えホモジナイズし、遠心分離 (4, 10000 \times g, 15 分) した上澄み液として調製した。上記で得られた CAT 活性をタンパク質量で除することにより単位タンパク質量当たりのカタラーゼ比活性を算出した。

(5) 各測定値は Tukey 's Test 法により検定を行い、関係図中に平均値 (Mean) \pm 標準誤差 (SEM) として示した。P 値は、 $P < 0.05$, 0.01 , 0.001 で各々有意差有りとした。

4. 研究成果

(1) X 線の事前照射による無動時間と脳中酸化ストレス関連指標の変化特性

X 線照射 5 日目の場合、0.1Gy 照射したマウスの無動時間は sham または 0.5Gy のそれより、各々有意に短かった。同様に、1 日目と 2-5 日目の平均を比較した場合、0.5Gy 照射では 1 日目は 2-5 日目に比べ有意に短かった (図 1)。これより、低線量 X 線照射は強制水泳試験に伴う無動時間を抑制することが示唆できた。

強制水泳は脳に酸化ストレスを誘導することが報告されている (Nayanatara, Thai J Physiol Sci, 2005) が、酸化ストレスに関連する指標はいずれも有意な変化がなかった (図 2)。我々は今までにマウスの脳の抗酸化機能亢進のピークは照射約 4 時間後であることを報告してきたが (Yamaoka, Free Radic Biol Med 1991)、本研究では照射 4 日目の状態を分析したため、抗酸化機能の関与を明らかにすることができなかった。

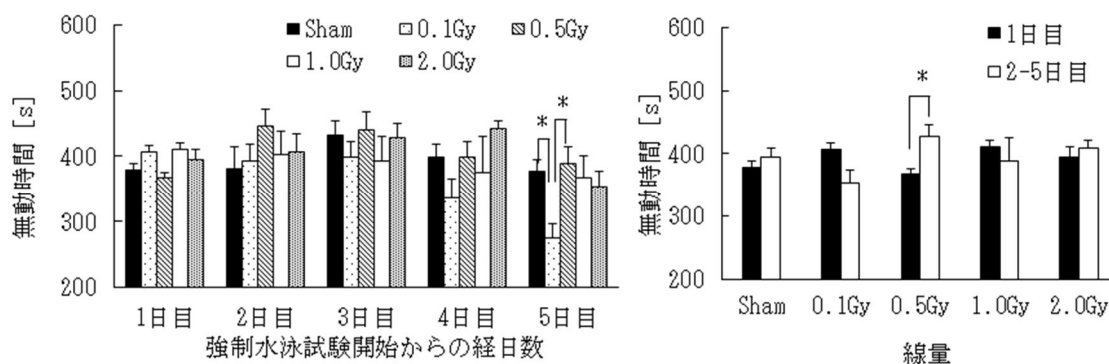


図 1 マウスへの X 線事前照射による強制水泳誘導に伴う無動時間の変化特性 Mean \pm SEM, N=7, * $P < 0.05$

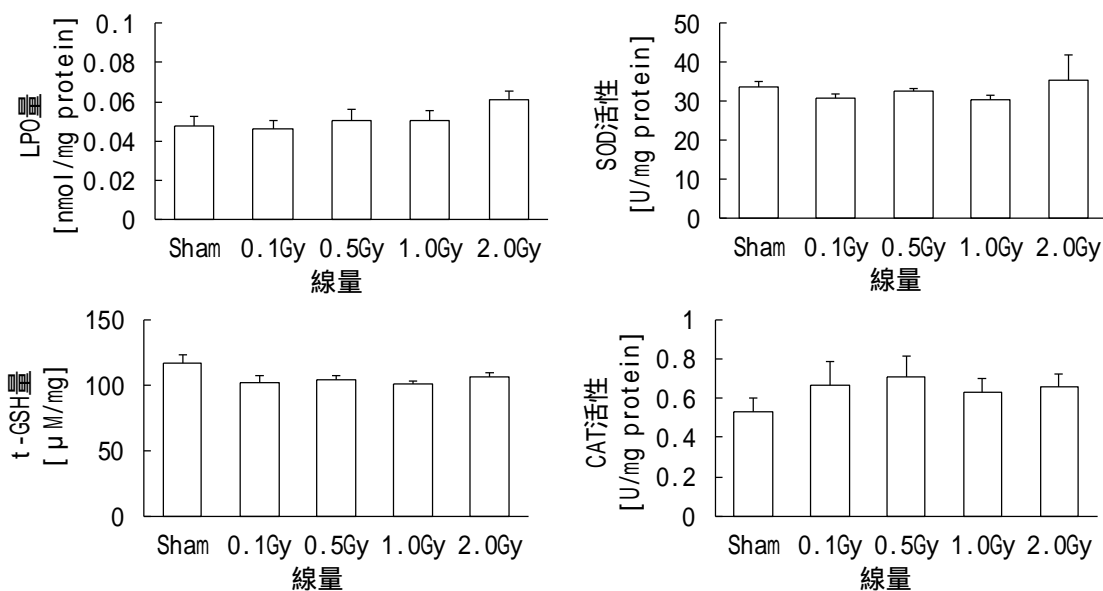


図 2 マウスへの X 線事前照射による強制水泳誘導に伴う酸化ストレス関連指標の変化特性 Mean \pm SEM, N=7

(2) X 線の事後照射による無動時間と脳中酸化ストレス関連指標の変化特性

X 線事後照射後の経過日数を 1 日目、2-5 日目、8 日目に分けて無動時間の線量依存性を比較

した結果、0.1Gyの照射では8日目よりも1日目で、0.5Gyの照射では2-5日目よりも8日目で有意に短くなった(図3)。上述のごとく、FSTは脳中に酸化ストレスを及ぼすが、0.5Gy照射したマウスの脳中LPO量は、Sham照射に比べ有意に減少したことから(図4)、0.5Gy照射による無動時間の抑制には酸化ストレスの軽減が関与している可能性が示唆された。

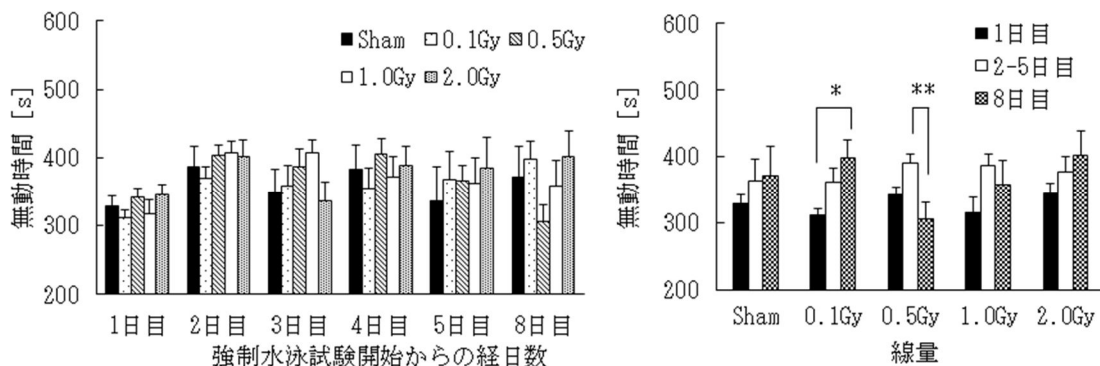


図3 マウスへのX線事後照射による強制水泳誘導に伴う無動時間の変化特性 Mean ± SEM, N=7, *P<0.05, **P<0.01

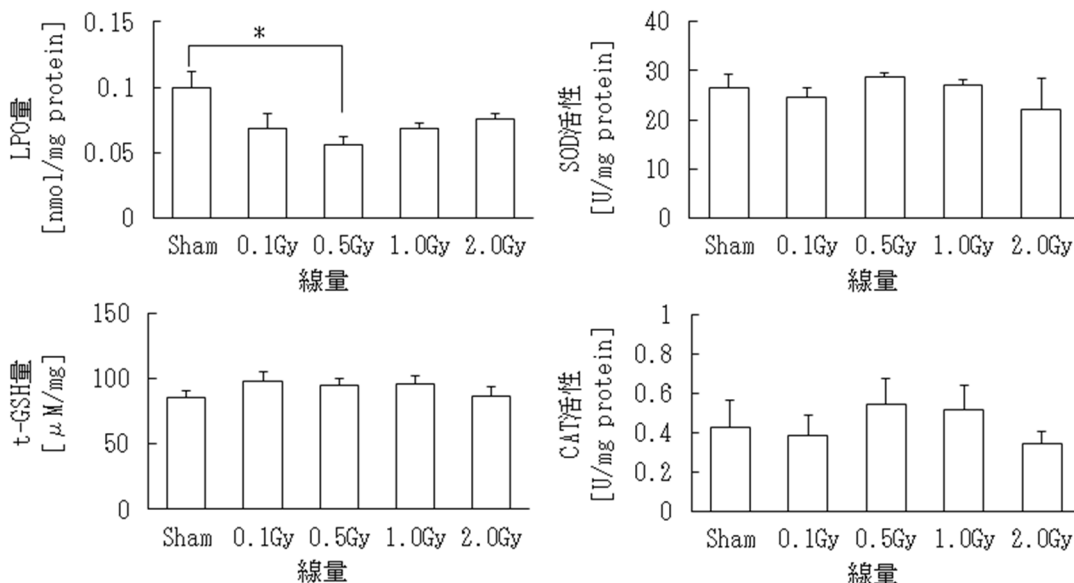


図4 マウスへのX線事後照射による強制水泳誘導に伴う酸化ストレス関連指標の変化特性 Mean ± SEM, N=7, *P<0.05

(3) 線の事前照射による無動時間と脳・肝臓・肺・腎臓中酸化ストレス関連指標の変化特性 FST開始から2日目の3.0 mGy/h線照射の無動時間の1日目のそれに対する比は、Shamのそれに比べ有意に低いことから、低線量率の0.5Gy照射は無動時間の抑制することが示唆された(図5)。

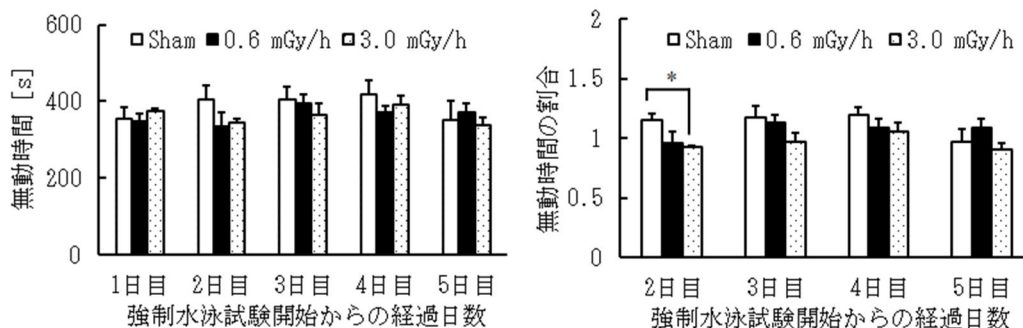


図5 マウスへの線事前照射による強制水泳誘導に伴う無動時間の変化特性 Mean ± SEM, N=7, *P<0.05

脳中のSOD・CATの両活性と腎臓中のt-GSH量は、有意差はないものの線量に依存して漸増傾向にあった。肝臓中のSOD活性とt-GSH量は、3.0 mGy/h照射により有意に減少した。Shamの腎臓中SOD活性は、無処置のそれに比べ有意に低かった。肺中のCAT活性は3.0 mGy/h照射によ

り有意に増加した（図 6）。他方、これより、強制水泳試験と低線量率照射の併用による酸化ストレスの程度は臓器により異なることが示唆できた。

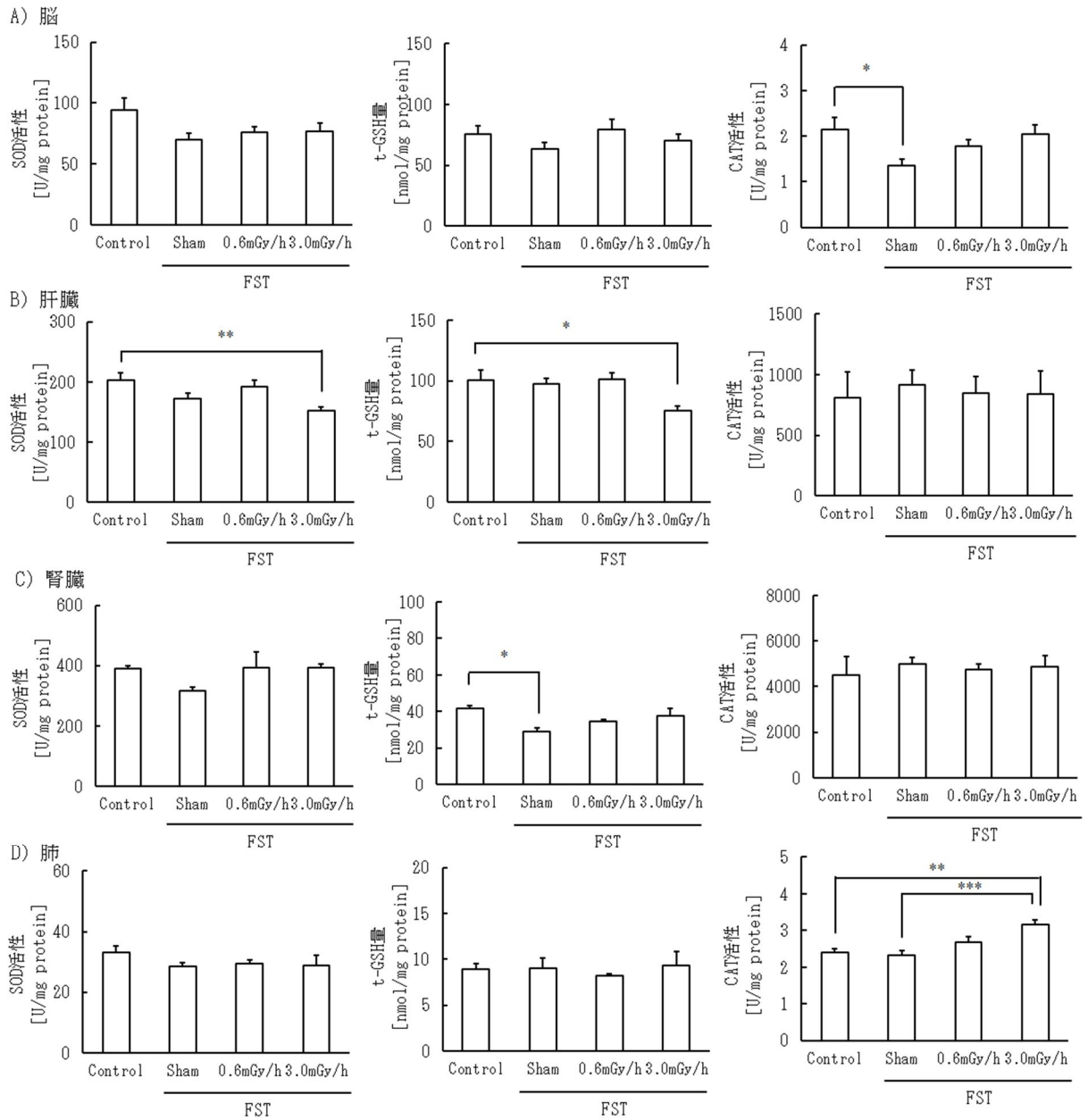


図 6 マウスへの 線事前照射による強制水泳誘導に伴う脳・肝臓・腎臓・肺中の酸化ストレス関連指標の変化特性 Mean ± SEM, N=7, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kataoka Takahiro, Shuto Hina, Yano Junki, Naoe Shota, Ishida Tsuyoshi, Nakada Tetsuya, Yamato Keiko, Hanamoto Katsumi, Nomura Takaharu, Yamaoka Kiyonori	4. 巻 61
2. 論文標題 X-Irradiation at 0.5 Gy after the forced swim test reduces forced swimming-induced immobility in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 517 ~ 523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rraa022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tetsuya Nakada, Takahiro Kataoka, Takaharu Nomura, Hina Shuto, Junki Yano, Shota Naoe, Katsumi Hanamoto, Kiyonori Yamaoka	4. 巻 75
2. 論文標題 The effects of low-dose-rate -irradiation on forced swim test-induced immobility and oxidative stress in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Medica Okayama	6. 最初と最後の頁 169 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takahiro Kataoka, Tsuyoshi Ishida, Yuto Yunoki, Keiko Yamato, Katsumi Hanamoto, Takaharu Nomura, Kiyonori Yamaoka
2. 発表標題 Effects of low-dose X-irradiation on forced swim stress-induced depression in mice
3. 学会等名 9th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡隆浩, 石田毅, 柚木勇人, 大和恵子, 花元克巳, 野村崇治, 山岡聖典
2. 発表標題 低線量X線照射がマウスの強制水泳に伴う無動時間に及ぼす影響に関する検討
3. 学会等名 第72回 日本酸化ストレス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡隆浩, 石田毅, 柚木勇人, 大和恵子, 花元克巳, 野村崇治, 山岡聖典
2. 発表標題 低線量X線照射によるマウスのうつ病症状に及ぼす作用に関する基礎的検討
3. 学会等名 第56回アイソトープ・放射線研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 首藤妃奈, 片岡隆浩, 矢野準喜, 石田毅, 中田哲也, 大和恵子, 花元克巳, 野村崇治, 山岡聖典
2. 発表標題 低線量X線照射による強制水泳試験誘導マウス酸化ストレスの抑制効果に関する検討
3. 学会等名 第44回中国地区放射線影響研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 首藤妃奈, 片岡隆浩, 矢野準喜, 石田毅, 中田哲也, 大和恵子, 花元克巳, 野村崇治, 山岡聖典
2. 発表標題 低線量放射線による強制水泳試験の無動時間と脳中の酸化ストレスの抑制効果に関する検討
3. 学会等名 日本原子力学会中国・四国支部第13回研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 首藤妃奈, 片岡隆浩, 矢野準喜, 石田毅, 中田哲也, 大和恵子, 花元克巳, 野村崇治, 山岡聖典
2. 発表標題 事前または事後の低線量X線照射による強制水泳試験誘導マウス脳の酸化ストレスの抑制効果とその差異
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 首藤妃奈, 片岡隆浩, 矢野準喜, 直江翔太, 石田毅, 中田哲也, 大和恵子, 花元克巳, 野村崇治, 山岡聖典
2. 発表標題 低線量X線照射による抗酸化機能の亢進が強制水泳誘導無動時間を抑制する
3. 学会等名 日本原子力学会 2020年春の年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中田哲也, 片岡隆浩, 野村崇治, 首藤妃奈, 矢野準喜, 直江翔太, 花元克巳, 山岡聖典
2. 発表標題 低線量率 X線照射が強制水泳試験誘導無動時間に与える効果
3. 学会等名 第45回中国地区放射線影響研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 首藤妃奈, 片岡隆浩, 矢野準喜, 直江翔太, 石田毅, 中田哲也, 大和恵子, 花元克巳, 野村崇治, 山岡聖典
2. 発表標題 低線量 X線または X線照射による強制水泳誘導の無動時間の抑制効果に関する検討
3. 学会等名 日本原子力学会中国・四国支部第14回研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shota Naoe, Takahiro Kataoka, Hina Shuto, Junki Yano, Tetsuya Nakada, Tsuyoshi Ishida, Keiko Yamato, Katsumi Hanamoto, Takaharu Nomura, Kiyonori Yamaoka
2. 発表標題 Low-dose irradiation reduces forced swim test-induced immobility and oxidative stress in mice
3. 学会等名 20th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research - International (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	片岡 隆浩 (Kataoka Takahiro) (40509832)	岡山大学・大学院保健学研究科・研究准教授 (15301)	
研究 分担者	野村 崇治 (Nomura Takaharu) (40371702)	一般財団法人電力中央研究所・原子力技術研究所・主任研究員 (82641)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------