

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

原子力発電は世界的なエネルギー需要の増大から推進されているが、大規模な放射線被ばく事故・災害が発生するリスクをはらんでいる。その際、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。それは放射線量に応じて引き起こされる障害が異なるからであり、治療計画を立てる上で線量測定は重要な情報となる。一般に個人被ばく線量計など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が、それを生物学的線量評価法（バイオドシメトリー）と呼ぶ。現在、ヒトの被ばく線量を推定する事が可能なバイオドシメトリーは、末梢リンパ球の染色体異常を計測することである。末梢リンパ球の染色体異常は古くから線量評価法として用いられているため正確な線量評価が可能であるが、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（同定されたバイオマーカーに対する抗体を作成し、抗原抗体反応を利用したウエスタンブロット法、酵素免疫測定 (ELISA) 法など）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分画した尿サンプル(4Gy 照射後 24 時間の時点での尿と未照射個体の尿、雄)について質量電荷比 (m/z) 1000～4000 の範囲で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。最終的にこの手法では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) が放射線被ばくの

バイオマーカー候補と推測された。マイクロピペットに装着して使用できる脱塩、濃縮用チップ ZipTip または OMIX を用い、尿サンプルの脱塩、濃縮を行い、MALDI-TOF MS 解析を行ったところ、 m/z 2746 (Protein virilizer homolog のペプチド断片) が放射線被ばくのバイオマーカーと候補と推測された。

各抗体作製時に使用した合成ペプチドを試料にし、ウエスタンブロット法による検出を試みたところ、Hepcidin 2、Uromodulin (尿中内部標準とするペプチド断片) ならびに Kidney androgen regulated protein の各合成ペプチドが検出可能であった。

次に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で行った。尿サンプルを電気泳動の試料とするためには、カリウムイオンを除く必要があるために、ナノセップ遠心ろ過デバイスを用いた脱塩、濃縮を行った。その結果、Hepcidin 2 分子が雌マウス尿中に存在することが明らかとなった。しかしながら、これまでのところ雄マウス尿中に含まれる Hepcidin 2 ならびに雌雄マウス尿中に含まれると推測された Uromodulin ならびに Kidney androgen regulated protein のペプチド断片を検出することはできなかった。

ELISA 法によるバイオマーカーとなる尿中代謝産物の定量性を持った検出法を開発するために測定条件を検討した。Hepcidin 2、Uromodulin ならびに Kidney androgen regulated protein の各抗体の作製の際に用いた合成ペプチドを用いた ELISA 法の検討では各抗体は各抗原 (合成ペプチド) を十分に認識していることが明らかとなった。次に ELISA 法を用いた尿サンプル中の各ペプチドの検出を試みた。尿サンプルに対し、等量の 2mM ジチオスレイトールを加え、37°C、30 分処理し、検討を行ったところ、尿中の Hepcidin 2 が検出されていることが示唆された。しかしながら雄マウスから得られた尿サンプルでも検討を行ったが、雌マウスと同様の結果を得ることができなかった。Uromodulin ならびに Kidney androgen regulated protein はウエスタンブロット法の検討と同様に今のところ検出できていない。今年度も引き続き条件検討を行っている。

3. 今後の展望

本事業では放射線被ばくの尿中バイオマーカーの探索とその測定法の確立を目指すものであり、昨年度はバイオマーカーの探索に注力した。しかしながら尿サンプルを用いた質量分析計での検討は多量の Major urinary protein (マウス尿中で最も存在量の多いタンパク質) の影響もあり、予想よりも昨年度同定できたバイオマーカーの数が少なかった。また、ELISA 法を用いた高感度検出系の確立も前述の Major urinary protein の影響か、雌マウスにおける尿サンプルでのみ検出が可能である。今年度は昨年度に引き続きバイオマーカー探索をおこなうとともに、高感度検出系の開発を試み、バイオドシメトリーの検討を行う。