

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06666

研究課題名(和文) 線量計開発を指向したマイクロ波誘電吸収システムの高度化

研究課題名(英文) Improvement of Microwave-Dielectric Absorption Spectroscopic System for the Development of Dosimeter

研究代表者

泉 佳伸 (IZUMI, Yoshinobu)

福井大学・附属国際原子力工学研究所・教授

研究者番号：60252582

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロ波誘電吸収による生体分子の評価を線量評価に応用する研究を実施した。これは、実用化されている物理現象に基づく手法に対して、生体分子の変化を模擬できる点で画期的である。プラスミドDNA及び酵素で鎖切断した試料の誘電吸収特性を評価した。濃度依存のスローブからDNAの切断収量評価が可能となり、生成物毎のG値を求める事も可能にした。また、測定中には避けられない測定値のドリフトについては、同時計測した環境データをフィードバックし、リアルタイムで迅速に測定値を補正するプログラムを開発し、実装した。その結果、測定精度が大幅に向上した。これは、線量計として応用する際の線量精度向上に直結する結果である。

研究成果の概要(英文)：Micro-wave dielectric absorption spectroscopy has been applied to dosimetry using DNAs. Enzyme-induced strand break of DNA could be estimated, and showing that yields of radiation-induced single- and double-strand breaks could be estimated. We succeeded in reduce the drift of measured value by simultaneous measurement of temperature and real-time calibration.

研究分野：放射線化学、放射線生物学、放射線防護学

キーワード：DNA マイクロ波 誘電率 放射線

1. 研究開始当初の背景

申請者が特許出願済の「マイクロ誘電吸収による生体分子等の構造評価技術」を被ばく線量評価に応用するための基礎的研究を推進すると共に、その精度や感度の向上を目指す事とした。

実用化されている被ばく線量計測技術は、無機物での格子欠陥等の物理的計測が主流であるが、一方では、人体の被ばくの場合、DNAをはじめ、生体分子の変化が健康影響を引き起こすと言われている。したがって、被ばくに伴うDNAの変化を高感度を実施できれば望ましい。しかし、ゲル電気泳動等の従来技術では微小変化に対して感度が不足していた。

現在でも状況は大きく変わっていないが、研究開始当初、DNAが熱、薬品、紫外線、電離放射線などの外的ストレスの影響によって変化した場合にそれを検出・評価する手法としては、ゲル電気泳動やコメットアッセイ法が既に普及していた。また、PCRやシーケンス解析を用いた一連の遺伝子塩基配列解析等が一般的である。しかし、いずれの手法においても前処理が必要なために作業が複雑であったり、薬品の使用が不可欠で経済的ではない。また、特に生物分野において広く普及しているゲル電気泳動では感度が低く、DNAに起こったわずかな変化を検出することは困難である。コメットアッセイは、単一細胞ゲル電気泳動(single cell gel electrophoresis, SCGE)を使ったDNA損傷計測の際に威力を発揮するシステムであるが、コメットアッセイは結果が得られるまで数時間を要する。

一方、マイクロ波を使った測定としては、ESRでラジカルを検出・分析する試みは長年行われてきた。但し、一般的に普及しているX-bandのESRでは溶媒となる水によるマイクロ波の吸収が大きく(図1)、水溶液系での分析には適さない。そこで、L-bandのESRでの分析が提案された。しかし、測定感度が非常に低く、実用的でないと考えられている。また、原理的にもESRでは不対電子を持たない安定分子(放射線的作用で生成する最終生成物)に対しては感度を持たないため、適用できない。

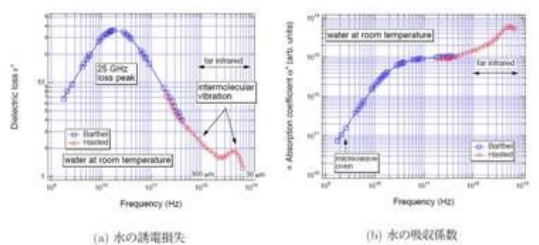


図1 マイクロ波領域における水の誘電吸収及び誘電損失

同じくマイクロ波を利用した水溶液系での生体関連物質の分析でも、誘電吸収のよう

に双極子モーメント変化に基づいた検出を行えば、水系においても、DNAの様な試料に対して測定可能であると考えたが、その様な適用例はなかった。そこで、水溶液中に存在する各種DNAの濃度とマイクロ波吸収周波数シフトとの関係や、放射線の線量とマイクロ波吸収周波数シフトとの関係についてデータを収集し、申請者が過去に特許出願を行った。(特開2012-122795, 『生体由来分子その他の含水性有機高分子を含む試料の変化評価方法及びこの方法に用いられるマイクロ波空洞共振器』)なお、マイクロ波を利用した誘電吸収に関する関連技術では(特開2005-43142, 『光照射による分子挙動の観測方法』)がある。しかし、DNAが構造変化した様な生体系材料の最終安定生成物の検出を視野に含めてはいない。また近年では、汎用高分子材料の劣化評価等に応用され、良い結果が得られている(平成19-22年度経済産業省 原子力安全・保安院 高経年化事業『マイクロ波検出技術を用いた高分子材料への放射線照射による経年劣化測定技術の評価手法開発』、研究代表者:砂川武義)が、水溶液系やDNA等の生体材料への応用事例ではない。

したがって以上より、DNAの切断等に伴って起こるコンフォメーション変化をはじめとする構造変化を、マイクロ波誘電吸収に基づいて高感度に評価する手法はこれまでのところ、申請者のグループによる測定以外には報告例がない。平成24~26年度の科学研究費補助金事業(課題番号:24561039)において、これに関する研究を推進し、一定の成果を得た。本課題では、さらに高度化を施し、システムの性能アップを図ることを目指した。

2. 研究の目的

既に上述した様に、DNAを試料とした線量計測手法については未だに実用化されていない。そこで、DNA評価による個人被ばく線量計への応用のために、マイクロ波誘電吸収法の高度化や従来法から基礎的知見を取得し、マイクロ波誘電吸収法の応用・発展に資する事を目的とした。

3. 研究の方法

マイクロ波誘電吸収測定システムの安定化

これまでの研究から、マイクロ波誘電吸収法測定装置を用いてDNAの構造変化(二本鎖切断)を検出可能であることが示されていた。しかし、実験値のバラつきや低線量域における共振周波数 f の弁別の困難さは、本手法を線量測定に用いる上で克服すべき課題であった。不安定の主要因は、温度変化に伴う空洞共振器筐体の伸縮、湿度変化に伴う共振器内部の気体の誘電率の変化である。この問題を解決するために、測定値への温度による影響を調べるための実験を以下の手順で実施した。

測定装置である空洞共振器の表面（試料固定のためのセルホルダー付近）に熱電対を貼り付け、デジタルマルチメーターに接続することで温度測定を可能にした。空洞共振器に設置されているセルホルダーを空洞共振器から取り除き、内部には空気以外の試料がない状態で、実験室内に備え付けてあるエアコンの設定温度を変動させ、20～30 の間で室温を変化させた。種々の温度でマイクロ波誘電吸収法による測定を行い、共振周波数 f を測定時の空洞共振器の温度と共に記録した。湿度による測定値への影響を抑えるため、コンプレッサーから乾燥空気を行って流量で常に送り、かつ保温容器内にシリカゲルを設置することで湿度の変動を抑えた。

上記方法で得られた測定値の温度スロープから、マイクロ波誘電吸収と温度を同時計測し、リアルタイムで温度補正を行えるプログラムを開発し、実装した。誘電損失の逆数に対応する Q 値の測定については、精度の劣化をさせることなく精度よく測定を行える様に、「獵犬法」でパワースペクトルの半値幅を求められる様にプログラム開発した。

照射に伴う切断生成物の分析と分別

DNA が放射線照射されると、主に 1 本鎖切断、2 本鎖切断を生じる。又、塩基の脱離や酸化反応等も同時に生じる。これらの生成物の分析には、従来はゲル電気泳動法等が用いられてきたが、前処理を必要としたり、感度が悪い等の欠点があった。本研究課題で提案している手法は感度に優れており、これまでも照射済 DNA の分析等を行ってきた。しかし、測定のアウトプットであるマイクロ波応答特性は誘電損失や誘電吸収等の物性を示すに過ぎず、又、照射後の DNA の殆どは未反応であり、その中にごく微量の鎖切断生成物が混ざっている状態であり、1 本鎖や 2 本鎖等の切断生成物毎の収量を算出する事は不可能であった。

そこで、未反応のプラスミド DNA 及び酵素反応により 1 本鎖又は 2 本鎖切断させた試料の誘電吸収特性を、L バンドマイクロ波誘電吸収法により評価し、濃度依存性を求めた。制限酵素による切断には 1 本鎖切断は Nb.BsrD1 を、2 本鎖切断は EcoR1 を用いて、普及している方法・手順により切断生成物を準備した。切断後の試料を精製し、それぞれが純粋な未切断、1 本鎖切断、2 本鎖切断の DNA からなることをアガロースゲル電気泳動法により確認した。

その後、マイクロ波誘電吸収法により、それぞれの試料について濃度の校正直線（検量線）を求めた。

4. 研究成果

マイクロ波誘電吸収測定システムの安定化

20～30 間の設定温度で変化する室温で測定した共振周波数 f の温度変化の結果を **図 2** に示す。この図での近似直線は最小二乗法

を用いて描いた。 R^2 値は 0.971 であり、よい直線性を示した。また、温度の上昇によって共振周波数が低周波数側にシフトすること、この時の共振周波数の温度による変化率は -25.7kHz/ となることを確認した。なお、保温容器内の湿度は 33～49%の間であった。

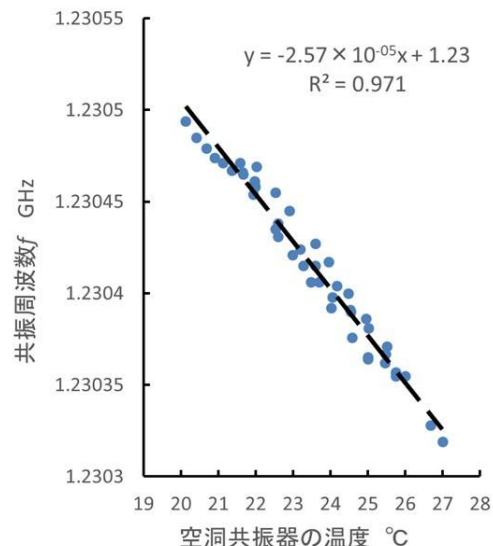


図 2 共振周波数 f の温度依存性

得られた共振周波数の温度による変化率は -25.7kHz/ を用いて、マイクロ波誘電吸収と温度を同時計測し、リアルタイムで温度補正を行えるプログラムを開発し、実装した結果、**図 3** に示す結果が得られた。補正前と比較してスロープが軽減されただけでなく、直線性 (R^2 値) が向上し、精度向上に成功した。また、 Q 値についても精度劣化させることなく迅速測定が行える様に「獵犬法」を用いて半値幅を求め、それによる測定時間の短縮だけではなく、測定時間の短縮による温度ドリフトの影響の軽減も行える様になった。

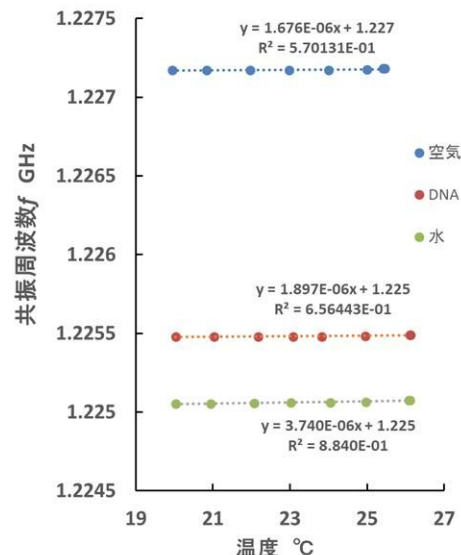


図 3 補正後の共振周波数 f の温度効果（試料：空気、DNA、水）

照射に伴う切断生成物の分析と分別

プラスミド DNA 及び酵素反応により 1 本鎖又は 2 本鎖切断させた試料の誘電吸収特性を、L バンドマイクロ波誘電吸収法により評価し、濃度依存性を明らかにした。(図 4) 濃度依存性のスロープの差から、照射で得られた DNA (未損傷と鎖切断生成物の混合物) について切断収量評価が可能になり、測定値のアウトプットから線量評価に応用できるだけでなく、例えばそれぞれの照射生成物毎の G 値を求める事も可能にした。

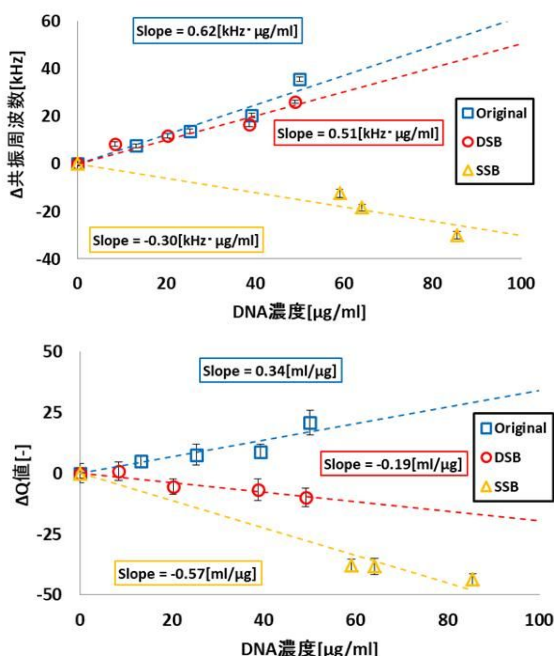


図 4 共振周波数(上図)、Q 値(下図)とプラスミド DNA 濃度の関係

以上の様に、本研究課題の研究期間での成果では測定精度の向上と共に、切断生成物毎の収量評価も可能であることを明らかに出来たが、現在主流である無機物質で起こる物理現象に基づく測定と比較すると感度の点で劣っている。今後は、測定装置・システムの改良だけではなく、反応系である試料に工夫が必要であると考えている。例えば放射線化学反応の増感剤を利用する等である。それと共に、放射線取扱施設での日常の個人被ばく線量計としてではなく、例えば放射線がん治療等の比較的大線量となる対象や、(さらに大線量照射が通例である)放射線プロセスでの線量計測への適用など、応用先の探索も課題となるであろう。

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)

1) “Microwave Dielectric Absorption Spectroscopy, Aiming at Novel Dosimetry

Using DNAs”, Y. IZUMI, M. HIRAYAMA, Y. MATUO and T. SUNAGAWA, *Journal of Radiation Protection & Research*, **43** (1) 21-25 (2017). (査読有)

2) “Evaluation of DNA Damage Using Microwave Dielectric Absorption Spectroscopy”, M. HIRAYAMA, Y. MATUO, T. SUNAGAWA and Y. IZUMI, *Journal of Radiation Protection and Research*, **41** (4) 339-343 (2016). (査読有)

[学会発表](計 6 件)

1) マイクロ波誘電吸収法を用いた DNA の損傷評価 (3), 平山 誠、砂川 武義、坂下 慧至、松尾 陽一郎、泉 佳伸, 日本原子力学会 2017 年秋の大会, (2017 年 9 月) @北海道

2) マイクロ波誘電吸収法を用いた DNA の損傷評価, 平山 誠、松尾陽一郎、砂川 武義、泉 佳伸, 第 54 回アイソトープ・放射線研究発表会, (2017 年 7 月) @東京

3) 放射線照射による血液の損傷評価手法に関する検討, 杉野 友哉、松尾 陽一郎、小島 崇夫、三島 史人、泉 佳伸, 第 54 回アイソトープ・放射線研究発表会, (2017 年 7 月) @東京

4) マイクロ波誘電吸収法を用いた線量測定のための基礎的研究, 坂下慧至、砂川 武義、平山 誠、松尾 陽一郎、泉 佳伸, 日本放射線安全管理学会 第 16 回学術大会, (2017 年 6 月) @大分

5) Evaluation of DNA Damage Using Microwave Dielectric Absorption Spectroscopy, M. Hirayama, Y. Matuo, T. Sunagawa, and Y. Izumi, ISORD-8, (2015 年 7 月) @ Korea

6) Microwave Dielectric Absorption Spectroscopy Aiming at Novel Dosimetry Using DNAs, Y. Izumi, M. Hirayama, Y. Matuo, and T. Sunagawa, ISORD-8, (2015 年 7 月) @ Korea

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
泉 佳伸 (IZUMI, Yoshinobu)

福井大学・附属国際原子力工学研究所・教授
研究者番号：60252582

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
大阪府立大学・助教・小嶋 崇夫 (KOJIMA,
Takao)
福井大学・講師・松尾 陽一郎 (MATUO,
Youichirou)
福井工業大学・教授・砂川 武義 (SUNAGAWA,
Takeyoshi)