

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10337

研究課題名(和文)細胞同調法及びFISH法を応用した新たな高精度染色体線量評価法の確立

研究課題名(英文)Development of new high resolution chromosome biodosimetry method using cell synclonization and FISH

研究代表者

吉田 光明(Yoshida, Mitsuaki)

弘前大学・被ばく医療総合研究所・教授

研究者番号：60182789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、広範囲の被ばく線量に対応する高精度な線量評価法の確立を目的として細胞同調法とPCC法を併用することの有用性を確認した。これまでの研究から、0～15Gyの広範囲にわたって、8時間のリリースにより、高頻度のG2/M期の細胞を得られることが明らかとなり、細胞同調法の併用の有効性を確認できた。また、様々な条件下で環状染色体の頻度に影響があるか否かの解析を行った結果、同一のリリース時間で比較すると大きな差は得られなかった。一方、同じリリース時間で線量を変えて解析した結果、線量依存性が確認された。現段階では環状染色体の判定基準があいまいであることから、基準を明確に定めることが急務と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現実の被ばく事故を想定した場合に0～20Gyの広範囲にわたって一つの手法で線量評価が可能となれば、早期に被ばく線量の推定に大きく貢献する。本研究において解析の対象とした環状染色体も線量依存性があることから、細胞同調法を用いて方法が確立することが急務と考えられる。本研究で得られた結果は未だ改良の余地があることが明らかとなった。また、環状染色体の解析基準も国際的に早急に確立することが必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we confirmed the usefulness of using the cell synchronization method and the PCC method together in order to establish a highly accurate dose evaluation method corresponding to a wide range of exposure dose. From the previous studies, it has become clear that the 8-hour release over a wide range of 0 to 15 Gy can obtain high-frequency G2 / M phase cells, confirming the effectiveness of the combination of cell synchronization methods. In addition, as a result of analyzing whether or not the frequency of cyclic chromosomes is affected under various conditions, no significant difference was obtained when compared at the same release time. On the other hand, as a result of analyzing by changing the dose at the same release time, dose dependency was confirmed. At this stage, it is considered urgent to clearly define the criteria, as the criteria for circular chromosomes are ambiguous.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：染色体線量評価法 PCC-ring法 細胞同調法

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

1. 研究開始当初の背景

放射線被ばく事故において被災者の被ばく線量を推定する事は、その後の医療対応を進めていく上で極めて重要なプロセスである。現在、細胞遺伝学的線量評価法には二動原体染色体法 (**dicentric : dic**)、染色体転座法、**PCC-ring** (未成熟染色体凝縮) 法、微小核 (**micronucleus : MN**) 形成法の 4 種類の手法があり、被災者の被ばくの形態に応じて線量評価方法を選択しなければならない。これらの手法の中でも特に **dic** を指標とした線量評価法 (**dic 法**) は急性外部被ばくにおける評価では最も信頼性が高い方法とされ、“**Gold Standard**” と呼ばれている。しかし、**dic 法** は染色体標本の作成過程において様々な凝縮度を持つ染色体像が出現するため、解析の対象とする分裂細胞の選択が不可欠である事から、染色体解析に熟練した技術や能力が必要である事、**dic** の判定を行う上で指標となる第一次狭窄 (動原体: **centromere**) の判定自体にも時間を要する等の弱点がある。このような染色体凝縮度の違いは分裂刺激剤に対するリンパ球の細胞分裂を開始する反応の違いによって生ずると考えられる。また、高線量の放射線被ばくでは分裂細胞の細胞周期の停止や細胞死が誘導され、二動原体染色体を用いた線量評価が適用出来ない場合があることから、間期 (**G1, S, G2** 期) 細胞核の **DNA** を強制的に凝縮させる事により染色体を構築させて、構造異常とりわけ判定が容易な環状染色体 (**ring**) を解析する未成熟染色体凝縮 (**Premature Chromosome Condensation : PCC**) 法が用いられている。**PCC** を誘導した場合には細胞周期の **G1, S, G2, M** 期の **4** ステージを基本として、細胞周期の進行状況に応じて様々な **PCC** 像が得られ、これらの中から **G2/M** 期の **PCC** 像を **ring** 解析の対象として、線量推定を行わなければならない。このような染色体凝縮度の違いによる細胞選択や異常の判定における問題が染色体線量評価に多大な時間を要する大きな原因となっている。**dic** 法、転座法、**PCC-ring** 法を行う上で全ての手法に共通した問題が分裂刺激剤で処理されたリンパ球の細胞周期のズレの問題であることは明らかである。このように現有の染色体線量評価法は被ばくの形態によって異なった手法を使用しなければならず、どのような染色体像が得られるかが、その後の線量評価に大きく影響を及ぼし、場合によっては線量評価が不可能な事態さえ招きかねない。我々はこれまで、**PCC** 法、**centromere-FISH** 法、簡易的 **C-バンド** 法と **dic** 法を併用する事によって、低線量から高線量域まで、どのような被ばくにも対応可能な方法を確立した (未発表)。これらの手法にさらに細胞同調法を適用することによって、一定の凝縮度を有する染色体像を解析の対象とすることにより解析の高度化を図る。

2. 研究の目的

放射線被ばく事故の細胞遺伝学的線量評価法には二動原体染色体 (**dic**) 法、染色体転座法、**PCC-ring** 法、微小核形成 (**MN**) 法があるが、**MN** 法以外は解析の対象とする染色体像の凝縮度に応じて細胞を選択する必要がある事、解析に熟練した能力が必要である事、解析自体に時間を要するという弱点がある。本研究では、**dic** 法、転座法、**PCC** 法の高精度化 (迅速性と正確性の向上) を目的として、従来の細胞培養法に新たに細胞同調法を応用する事により、新たな高精度染色体線量評価法を確立する。また、血液培養に際し、血液の採取法 (抗凝固剤の種類) や培養を開始するまでの血液の保存条件などを再検証する。

3. 研究の方法

本研究では正常末梢血リンパ球および照射 (X 線、 γ 線: 0~25Gy) リンパ球を用いて、染色体線量評価における染色体異常 (二動原体、染色体転座、環状染色体) の解析に適した染色体像を得るために **MTX** および **Thymidine** を用いた細胞同調法を応用し、その条件の検証を行う。また、実験結果から得られた細胞同調法の適正な条件のもとで作成された染色体標本を用いて染色体異常の解析を行う。

血液の採取法や保存条件の再検証に関しては、ヘパリン採血管および EDTA-2K 採血管を用い、採血を行った。また、血液サンプルの保管に関しては、放射線照射の有無 (0 および 3 Gy X 線)、冷蔵 (5.2 ± 1.0 °C) および室温 (20.3 ± 0.1 °C) 保管、血液保管の期間 (6、24、48、72 および 168 時間)、抗凝固剤の種類 (ヘパリンおよび EDTA-2K) を組み合わせて合計 60 条件に分割した。EDTA-2K 採血群はさらに EDTA 洗浄群として、2% FBS および 60 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin 含有 RPMI 1640 培地に血液を浮遊させ遠心 (室温、 $300 \times g$ 、8 分間) し上清を除去した。細胞のペレットを同じ培地で再浮遊させ、この工程を 3 度繰り返すことによって EDTA を除去した。それぞれの条件に関して、細胞分裂頻度を解析した。

4. 研究成果

(1) リリース時間の検討

細胞同調法を併用した **PCC** 法を行い、**PCC** ステージ分類を行った。(照射: 0, 5, 10, 15, 20 Gy) リリース 6~7 時間では、X 線を 0 Gy と 5 Gy を照射したときに高頻度に **G2/M-PCC** を捉えることが出来たが、5 Gy を超えると **G2/M-PCC** の頻度は低下し、それに伴って **S-PCC** の頻度が高くなった。リリース 9~10 時間では、5~20 Gy の高線量の X 線照射時でも高頻度に **G2/M-PCC** を捉えることが出来たが、照射 0 Gy 時での **G2/M-PCC** 頻度が低く、**G1-PCC** 頻度が高くなった。リリース 8 時間では、0~20 Gy の照射線量すべてで高頻度に **G2/M-PCC** が得られた。この結果から、現段階ではリリース時間は 8 時間が最適だと決定した。

(2) 細胞同調の有無の確認（照射線量：0 Gy リリース時間：8 時間）

フローサイトメトリーによる DNA 量の解析を行うことで、MTX による S 期前半の細胞同調が起きているかどうかの確認を行った。各培養時間で PCC-index を求めた結果、培養 40 時間（リリース前）の時点で細胞同調併用法側での S 期細胞周期停止による G2/M-PCC 頻度減少が見られ、48 時間（リリース後）の時点で細胞周期が再開し、細胞同調併用法で効率よく G2/M-PCC を捉えることが出来た。この結果から、MTX による S 期細胞同調は効率よく起きていることが分かった。

(3) 従来法と細胞同調併用法の比較（被ばく線量の影響）

）フローサイトメトリーによる比較（線量：0, 5, 10 Gy）(表 1)

0 Gy 時には従来法より細胞同調併用法で G2/M-PCC を高頻度に捉えることが出来た。(p = 0.006) また 5 及び 10 Gy でも従来法と同程度の G2/M-PCC を確保できた。

表 1 フローサイトメトリーの測定結果（左：従来法 右：細胞同調併用法）

線量[Gy]		G0+G1	S	G2+M	total	線量[Gy]		G0+G1	S	G2+M	total
0	①	49.2	28.4	22.4	100	0	①	50.4	33.4	15.6	100
	②	51.9	28.5	19.6	100		②	50.9	33.2	15.3	100
	③	50.2	27.6	22.3	100		③	45.2	37.3	16.9	100
	平均値	50.4	28.1	21.5	100		平均値	48.9	34.6	16.0	100
5	①	58.1	18.2	23.3	100	5	①	56.7	21.0	21.3	100
	②	59.4	19.3	20.6	100		②	56.7	20.8	22.0	100
	③	61.1	20.2	17.9	100		③	55.6	24.1	19.4	100
	平均値	59.6	19.3	20.6	100		平均値	56.3	22.0	20.9	100
10	①	57.6	19.1	23.0	100	10	①	55.8	20.5	23.1	100
	②	59.7	18.2	21.8	100		②	54.1	20.1	25.2	100
	③	59.5	17.7	22.4	100		③	57.9	21.8	19.9	100
	平均値	58.9	18.3	22.4	100		平均値	55.9	20.8	22.7	100

）標本算定による比較（線量：0, 5, 10, 15, 20 Gy）

0 及び 5 Gy 時には従来法より細胞同調併用法で G2/M-PCC を高頻度に捉えることが出来た。(0 Gy : p < 0.001 5 Gy : p = 0.002) また、10 及び 15 Gy では従来法と同程度の G2/M-PCC を確保できたが、20 Gy では従来法の方が細胞同調併用法よりも G2/M-PCC が高頻度になった。(p = 0.006)

(4)細胞同調法を併用した場合の、各条件下における環状染色体の解析

本研究では、細胞同調法において MTX 処理した後のリリース時間を変えて各細胞周期の細胞の頻度を解析したが、同時のそれぞれの条件において環状染色体の頻度を解析した。また、リリース時間を固定し、照射する線量を変えて、同様に環状染色体の頻度を解析した。その結果、リリース時間が 6～8 時間において、照射線量 7 Gy では有意な差は認められなかった。また、リリース時間を 10 時間に固定し、種々の線量で照射し環状染色体の頻度を解析した結果、線量依存性が確認された。また、従来の PCC 法と細胞同調法を併用した PCC 法において、0～20Gy の照射線量で環状染色体の出現頻度を解析した結果、細胞同調法を併用した場合に、環状染色体の頻度が従来の PCC に比較して、低い値を示した。

(4) 血液サンプルの MI 値に対する保管期間、抗凝固剤の種類、および照射の影響

室温で 6 時間保管した非照射のヘパリン血における MI は、21.5-29.3%という高い値を示した。これらのサンプルの MI 値は 24 時間でピークに達し、その後の保管期間においては低下し続けた。一方 EDTA 血より得られた MI はすべてわずか 0-4%と低かった。さらに、血液を 48 時間培養した後、これらの血液サンプルは凝固しており、分裂中期像を観察することができる細胞は非常に少なかった。しかし、EDTA を洗浄し除去することにより、14.1-26.7%という高い MI が得られることが明らかとなった。さらに、照射した血液サンプルにおいては MI が 5-10%減少した。興味深いことに、最大 72 時間までの保管した室温保管したヘパリン血、冷蔵保管したヘパリン血、および冷蔵保存した EDTA 血から高い MI 値を得ることができた。しかし、168 時間保管した後、5 名のドナーのうちの 2 人（ドナー A および D）からの血液サンプルは、これら 3 つの条件下で依然として 15% 程度の MI を示した。対照的に、同じ条件下で保存した、他の 3 人のドナーにおいての MI は、0-6.2%と有意に低かった。各ドナーからの血液サンプルについての MI の変化は、3 つ全ての条件（室温保管したヘパリン血、冷蔵保管したヘパリン血、および冷蔵保存した EDTA 血）について同様であった。

【考察】

(1) リリース時間の検討

細胞同調法を併用した PCC 法では、精度を向上させるために、リリース時間の最適時間を設定することが重要となる。今回の実験ではリリース時間を 6, 7, 8, 9, 10 時間に設定し、この

中で最も適した時間を見極めた。リリース時間を6～7時間に設定すると、0, 5 Gy 照射群では効率よくG2/M-PCCを確保することが出来たが、15, 20 Gy 照射群では頻度の低下が見られた。また、それに伴いS-PCCの頻度増加が見られた。細胞核内に存在するDNAは放射線被ばくにより損傷される。その際、DNA損傷を修復するために細胞周期の一時停止が起こるため、細胞周期の進行は正常なものに比べて遅くなる。つまり、リリース時間が6～7時間では高線量被ばくを受けた際にはリリース時間が足りなくなるものと考えられる。また、リリース時間を9～10時間に設定すると、15, 20 Gy 照射群では他のリリース時間に比べて効率よくG2/M-PCCを確保できたが、非照射群においてG2/M-PCCの頻度低下が見られた。また、それに伴いG1-PCC頻度の増加が見られた。これはリリース時間が9～10時間では、正常な細胞において培養時間が長くなりすぎるために、細胞周期がG2期やM期を通り過ぎ、2周目のG1期に到達してしまうことが理由だと考えられる。これらの時間と比較すると、リリース8時間では非照射群から20 Gy照射群までバランスよくG2/M-PCCを確保できているため、今回は8時間が最適な時間だと考えた。

(2) 細胞同調併用 PCC 法の適用性

従来のPCC法と細胞同調法を併用したPCC法で、PCCステージ分類にて比較したところ、0, 5 Gy照射群では細胞同調併用法の方が効率よくG2/M-PCCを捉えることができた。また、10, 15 Gy照射群でも従来法と同程度のG2/M-PCCが確保できた。しかし、20 Gy照射の際には従来法の方がG2/M-PCCは高頻度となった。これらの結果から、0～15 Gyにおいて、細胞同調法のPCC法への適用性が期待される。また、20 Gyやそれ以上の高線量被ばくを受けると、リリース時間で調節せずともG2/M期に存在するチェックポイントの影響により細胞周期が停止するため、20 Gy以上の高線量被ばく下においては細胞同調法を併用する必要はないものと考えられる。

PCC法はこれまで5 Gy以上の高線量被ばくに有用な方法とされてきたが、細胞同調法を併用することで、セントロメアFISH法を用いた、5 Gy以下の線量範囲における線量評価が可能となることが示唆される。

(3) 照射血液における環状染色体の頻度

PCC法を用いた場合の環状染色体の頻度による線量評価法は、未だに完全に確立された方法とはいえ、国際標準規約(ISO)においても標準化されていない。しかしながら、5 Gy以上の被ばく事故ではPCC-ring法を用いざるを得ないのが現状である。これらの要因として最も重要な問題は環状染色体の判別であり、観察者によってその頻度が左右される事、また、PCCを誘導するカリクリンAの処理によって、染色体が過剰に凝縮するという現象があり、環状染色体の判別が出来ない場合がある。このような過剰な染色体凝縮を防ぐ方法として、本研究で細胞同調法を併用したが、環状染色体の頻度がまちまちであり、これも観察者による環状染色体の判別の違いによるものと考えられる。今後はさらに細胞同調の条件を詳細に検討し、過剰な染色体凝縮を抑制する条件を見出す事、また、環状染色体の判別に一定の基準を設定することが必要とされる。

(4) 血液サンプルのMI値に対する保管期間、抗凝固剤の種類、および照射の影響

IAEAの勧告によれば、細胞遺伝学的線量評価のために使用するヘパリン血は、18-25 °Cで保管される必要がある¹⁾。採血管の製造業者でも、ほぼ同様の温度範囲で血液を保管することを推奨している。いくつかの研究間比較研究でこの勧告が検証され、75時間まで保存された血液サンプルに適していることがわかった。また本研究では、室温で保存されたヘパリン血が細胞遺伝学的線量評価およびMIの測定に係る解析に最も適していることを示した。

ヘパリンはアンチトロンビンに結合し、トロンビンおよび他の凝固因子の活性を中和する。この中和活性は37-25 °Cの間の温度で最も効果的であるが、15 °Cでは低下し、そして0 °Cでは不完全となる。そのため、冷蔵条件下で保存されたヘパリン血では、抗凝固作用が不完全となり、血小板の凝集塊が形成され、それがWBC、リンパ球、および血小板の凝集を引き起こす。このことから、ヘパリン血における細胞数はEDTA血よりも低くなる傾向があり、長期保管の後では著しく減少した。阿部らは、2000個の分裂中期像を用いたDic解析は、CTスキャンのような医療被ばくで見られる100 mSv未満の放射線被ばくを検出するのに有用であると報告している。したがって、このような血液の保管・輸送条件は、極端に低線量の曝露が疑われる場合に十分な分析可能な分裂中期像を得るために特に重要である。

EDTA血から得られたリンパ球は分裂および増殖が不十分であることから、染色体を解析するための血液培養には適していないことは周知の事実である。PHAによるリンパ球の幼弱化および細胞周期の進行にカルシウムイオンが必要となるが、EDTAはカルシウムイオンをキレートし、1.2-1.6mMの濃度でリンパ球の幼弱化を完全に阻害する。本研究では、冷蔵条件下で保存されたEDTA血中のEDTAが洗浄によって除去されれば、分裂中期像の解析のために細胞培養することが可能であることが新たに発見された。本研究の結果に基づくと、細胞遺伝学的線量評価のために血液サンプルを輸送する場合、EDTA血を寒冷条件下で保管・輸送することが、代替手段になる可能性があることを示唆している。血液サンプルを保存するこの方法は、抗凝固剤としてヘパリンを用いることが困難であり得る緊急条件下で特に有用である。また血液サンプルを輸送中に気候学的要因のためにサンプルを室温に維持することが困難となることが予想される

場合にも有用であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1)Fujishima Y, Kanahama S, Hagino S, Natsubori S, Saito H, Azumaya A, **Ariyoshi K**, Nakata A, Kasai K, Yamada K, Mariya Y, **Yoshida MA**, **Miura T**. Influence of anticoagulants and storage temperatures on blood counts and mitotic index of blood samples collected for cytogenetic biodosimetry. Int. J. Radiat. Biol., 95, 186-192, 2019 (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

(1)**Mitsuaki Yoshida**, **Kentaro Ariyoshi**, Akifumi Nakata, Kosuke Kasai and **Tomisato Miura** : Current status and future issues of chromosome dose assessment in radiation emergency medicine, IAEA Consultancy Meeting for NA9_39 Project, Meeting title: STS (Science, Technology and Society) education support on return in the context of low-dose radiation, 福島市 2019 年 1 月 16 日 ~ 17 日.

(2)**Mitsuaki Yoshida**: Biological Dosimetry by Chromosome analysis, Biodosimetry International Seminar in the RHI, KHNP, 2018 年 8 月 23 日, ソウル.

(3)Fujishima Y, **Miura T**, Kanahama S, Hagino S, Azumaya A, Kawamori S, Goh VST, **Ariyoshi K**, Nakata A, Kasai K, Yamada K, Mariya Y, **Yoshida MA**: The influence of the blood storage temperature and anticoagulant for cytogenetic biodosimetry. EPR BioDose 2018, PP-37, Munich (Germany), 2018 年 6 月

(4) **三浦富智**, 藤嶋洋平, **有吉健太郎**, 東谷彩香, Goh Valerie Swee Ting, 中田章史, 葛西宏介, 阿部悠, **吉田光明**: 細胞遺伝学的線量評価における課題 ~ 分裂頻度と線量評価に及ぼす背景因子 ~ . 日本放射線影響学会第 60 回大会, 千葉市, 2017 年 10 月 25 ~ 28 日.

(5)Blakely WF, Subramanian U, **Miura T**, Hsiao HK, Bolduc DL.: Use of Multiple Endpoints with the Premature Chromosome Condensation Assay for Total-and Partial-body Dose Assessment. 2017 RRS Annual Meeting, Grand Fiesta Americana -Coral Beach- (Cancun, Mexico), 2017 年 10 月 15 ~ 18 日.

(6)氏家里紗、藤嶋洋平、阿部 悠、中田章史、葛西宏介、**三浦富智**、津山尚宏、**有吉健太郎**、**吉田光明**、坂井 晃: 未成熟(早期)染色体凝縮と FISH 法を併用した二動原体染色体線量推定法の検討 日本放射線影響学会大 59 回大会、2016 年 10 月 26 日 ~ 28 日、広島市

(7)**三浦富智**、藤嶋洋平、金浜朱希、川森詩織、萩野繁樹、成田房江、**有吉健太郎**、**吉田光明**、葛西宏介、山田恭吾、真里谷 靖: バイオドシメトリーにおける抗凝固剤および血液保存温度の影響 日本放射線影響学会大 59 回大会、2016 年 10 月 26 日 ~ 28 日、広島市

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 三浦 富智

ローマ字氏名: (**Tomisato Miura**)

所属研究機関名: 弘前大学

部局名: 保健学研究科

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): **20261456**

研究分担者氏名: 有吉 健太郎

ローマ字氏名: (**Kentaro Ariyoshi**)

所属研究機関名: 弘前大学

部局名: 被ばく医療総合研究所

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 50462750

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。