

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01919

研究課題名（和文）放射線被ばく事故に対応したDNA損傷解析による被ばく線量評価法の開発と実用化

研究課題名（英文）Development of exposure dose evaluation method by DNA damage analysis corresponding to radiation exposure accident

研究代表者

清水 喜久雄（Shimizu, Kikuo）

大阪大学・放射線科学基盤機構附属ラジオアイソトープ総合センター・准教授

研究者番号：20162696

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 9,500,000円

研究成果の概要（和文）： DNA損傷を評価する際に従来の一対のプライマーに代わり二対のプライマーを使用したところ検出感度が上昇した。

次に生細胞の評価法の検討を行なった。ウシの全血にガンマ線を照射した後にDNAを精製しリアルタイムPCRにより線量の評価を行った。血液からのDNAについてもPCRを阻害する損傷が残ることが示され被ばくした方からの血液を採取した場合についても本手法が適用できることが示された。

さらに、デジタルPCR法の適用による誤差の低減を検討した。デジタルPCR法では原理的には1分子のDNAの違いを検出でき高精度な解析が可能である。得られた結果から従来のリアルタイムPCR法と比較して誤差が低減した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではPCR法に注目し、DNA鎖切断量を指標とした吸収線量の新規評価法を開発し実用化を目指した。本研究期間で、評価精度及び感度の向上が達成できた。また、緊急被ばく時に被ばくされた方から血液採取を行い、血液中のDNAの解析による被ばく線量を評価することが可能であることも示した。

生体試料を対象として被ばくした放射線量を評価するためには、迅速に、大量のサンプルを処理可能であること、熟練した技術を必要としない手法であることが求められる。本研究で得られた結果はこれらの課題を解決するために重要である。

研究成果の概要（英文）： Two pairs of primers were used instead of the conventional pair of primers when evaluating DNA damage. The detection sensitivity was increased.

Next, the evaluation method of living cells was examined. After irradiating whole bovine blood with gamma rays, DNA was separated and purified, and the dose was evaluated by real-time PCR. It was shown that DNA collected from blood also had damage that inhibits PCR, and that this method can be applied to cases where blood was collected from exposed persons. Furthermore, the reduction of error by applying the digital PCR method was examined. In principle, the digital PCR method can detect the difference in DNA of one molecule and enable highly accurate analysis. From the obtained results, it was shown that the error was reduced as compared with the conventional real-time PCR method.

研究分野：分子放射線生物学

キーワード：線量評価 qPCR デジタルPCR DNA損傷 緊急被ばく

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

福島第一原子力発電所の事故以降、原子力技術や放射線を利用した産業や医療などの現場において、放射線安全・管理技術の確実な実施および向上が求められている。現在、放射線安全・管理のために、放射線量のモニタリングを目的として半導体式線量計や OSL 線量計、ガラスバッジなどが実用化されている。これらの技術の原理は物理反応や化学反応を用いたものである。一方で、放射線による生体影響の要因は、DNA を中心とした生体分子の損傷、特に修復が困難である DNA 二本鎖切断が主であると考えられている。米国研究評議会 (NRC) 内の放射線影響研究評議会の BEIR-VII 報告書では、放射線発がんの機序として DNA 損傷(特に DNA 二本鎖切断)起源の突然変異説が採用されている。そこで申請者らは、DNA を素材にした電離放射線の吸収線量の評価を行う手法の研究を実施してきた。

申請者らは、2011 年度から科研費を活用し、リアルタイム PCR (Real-Time Polymerase Chain Reaction) を用いた DNA 鎖切断収量を指標とした吸収線量の新規評価法について検討を進めてきた (図 1 参照)。リアルタイム PCR とは、極めて微量な DNA 溶液から特定の DNA 断片 (数百から数千塩基対) だけを選択的に増幅させ、初期の鋳型 DNA 量を評価する手法である。本研究はこれを被ばく線量測定に応用するというものであり、ポリメラーゼ連鎖反応による増幅率がサンプルの鋳型 DNA の量に比例することに着目し、未損傷の鋳型 DNA の量すなわち DNA の損傷量を評価するものである。2011 年度から開始した第 1 ステップの基礎的研究では、数 Gy 領域のガンマ線の吸収線量の増加に伴って、DNA 合成効率が低下していることを明らかにした。この DNA 合成効率の低下は、鋳型 DNA に生成した損傷や鎖切断に起因すると考えられる。

さらに、2015 年度から開始した第 2 ステップの研究では、線種すなわち LET (線エネルギー付与) が異なるガンマ線および粒子線による DNA 損傷の収量が異なることを本手法で検出できることを明らかにし、線量評価に向けた成立性を高めてきた。

2. 研究の目的

(研究の全体構想) 本研究はポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を用いて、放射線による DNA 損傷を指標として、緊急被ばく時の吸収線量の評価を行うものである。従来の物理・化学反応を用いた被ばく線量測定手法と原理的に異なり、生体影響の要因となる DNA 損傷に基づく評価手法である。線質の異なる放射線が混在した状況であっても、DNA 損傷に基づいて被ばく量の評価を可能にする、これまでにない新しい手法の確立を目指す。

(本研究の具体的な目的)

PCR により細胞中の DNA 鎖切断収量を推定する検討、実際の放射線作業の現場環境で求められる低線量放射線 (mGy レベル) での評価が可能な方法の検討 (感度の向上)、得られた成果を踏まえ、DNA を用いた被ばく線量測定手法を確立し、緊急被ばく時の線量評価に資することを究極的な目的としている。

3. 研究の方法

項目 PCR により細胞中の DNA 鎖切断収量を推定する：血液に放射線を照射し、血球中の DNA を対象とした評価を行う。またデジタル PCR (QuantStudio 3D) を用いて、DNA の損傷分子数を評価する。これにより感度の上昇が期待される。

項目 ウシ血液から抽出された DNA の解析を行い、緊急被ばく時での適応の可能性を調べる。

4. 研究成果

1) 感度向上についての検討

リアルタイム PCR では、通常、1 対のプライマーを用いて最大 200bp の領域を増幅する。リアルタイム PCR の本来の目的である遺伝子発現量解析のためには 200bp 程度の増幅領域で可能であるが、本研究の鋳型 DNA の損傷を評価する目的としては、感度は増幅領域に比例すると考えられ、感度向上のために増幅領域の拡大が求められる。そこで通常では一対のプライマー(シングルプライマー)を使用するところ、二対のプライマー(マルチプライマー)を使用することで PCR の増幅領域を拡大することを検討した(図 1)。

TE 緩衝液に出芽酵母 S288c の *URA3* 領域 (804 bp) の DNA を 0.01 ng/ μ l となるよう調製し、ポリプロピレン製の 0.5 ml チューブに 200 μ l 封入した。大阪大学産業科研究所コバルト 60 照射施設のガンマ線(LET: 0.2 keV/ μ m)を 0.1 - 1 Gy まで常温で照射した。照射したサンプルを鋳型 DNA として PCR を行った。PCR は、Bio-Rad 社の Mini-Opticon(CFD-3120)を使用した。プライマーとして 236bp の領域を増幅するプライマーと、さらに下流側に 193bp の領域を増幅する 193bp の領域を増幅するプライマーを用いる場合(マルチプライマー)と比較した。

ガンマ線を照射した場合の未損傷鋳型 DNA 量の変化を図 2 に示す。吸収線量の増加に伴って未損傷鋳型 DNA の量は減少することが示された。さらにマルチプライマーを用いた場合、一つのプライマーを用いた場合よりも未損傷の鋳型 DNA の量が減少することが示された。これは PCR の増幅領域が拡大したことにより、DNA 損傷を評価する範囲が広がった結果として、感度が向上したことを示唆している。

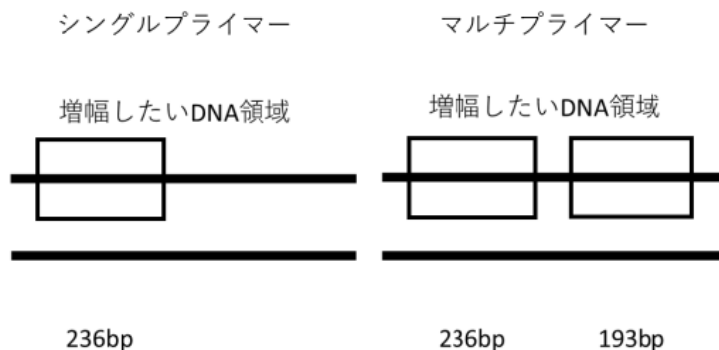


図 1 シングルプライマーとマルチプライマーの増幅領域

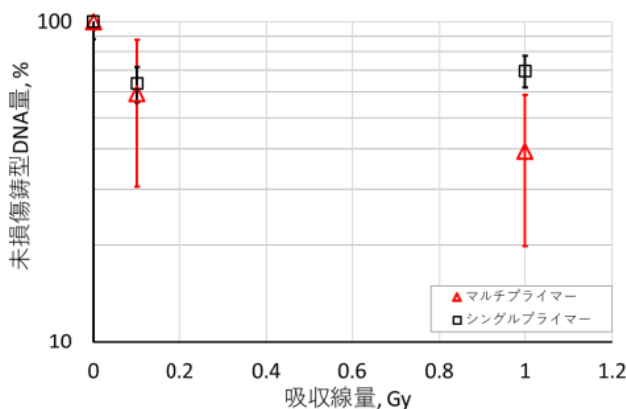


図 2 シングル、およびマルチプライマーを用いた PCR 鋳型 DNA 量の吸収線量に対する未損傷鋳型 DNA 量(サンプル数 N = 6)

2) 生細胞の評価法の検討

被ばく患者からの血液を採取し、PCR による DNA 損傷を評価することの成立性を検討する。ウシの全血にガンマ線を照射した後に DNA を分離・精製しリアルタイム PCR により線量の評価を行った。

ウシ全血液(日本生物材料センター)200 μ l に対し、大阪大学産業科学研究所のコバルト 60 線源を用いてガンマ線照射を行った。照射後、QIAamp® DNA Mini Kit を用いてゲノム DNA を精製した。TE 緩衝液(pH8.0)により濃度 10.0 μ g/ μ l に希釈したサンプルに対し、リアルタイム PCR を行った。ウシに普遍的に存在するシクロム C 遺伝子 CYCS の一部分を、以下のプライマー CYCS1F、CYCS1R を用いて増幅した。

CYCS1F (forward) : GACCTCCCAGCTCCATCAAACATCTCA

CYCS1R (reverse) : CTAGAAAAGTGTAAGACCCGTAATATAAG

ウシ全血液にガンマ線を照射したのちの DNA についての、未損傷鋳型 DNA の解析結果を図 3 に示す。PCR により増幅させたモデルの DNA を対象としたこれまでの結果(図 2)と同様、ウシ全血液から抽出した場合の未損傷鋳型 DNA についても、吸収線量の減少に伴って減少した。血液から採取した DNA についても、PCR を阻害する損傷が残ることが示された。この結果は、被ばくした方からの血液を採取した場合についても本手法が適用できることを示している。

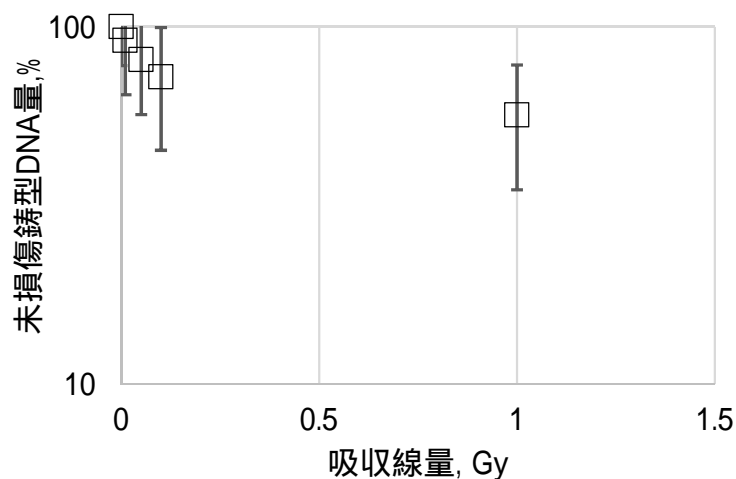


図 3 ウシ血液に対してガンマ線を照射しリアルタイム PCR で解析を行った結果(N=6)。

3) デジタル PCR 法の適用

デジタル PCR 法とは DNA 一分子についての PCR 反応を同時に数万回の反応を行い、増幅の有無からサンプル中の DNA 分子数を絶対定量することができる分子計数法である。原理的には 1 分子の DNA の違いを検出可能であるため、本研究に適用した場合、高精度な解析が可能であると考えられる。

TE 緩衝液に *URA3* 遺伝子領域(804 bp)の DNA を 0.01ng/ μ l となるよう溶解したものを DNA サンプルとした。DNA サンプルをポリプロピレン製の 0.5ml チューブに封入したものに、大阪大学産業科学研究所コバルト 60 照射施設のガンマ線(LET: 0.2 keV/ μ m) を 0.05 - 10 Gy まで常温で照射した。照射したサンプルの容量は 200 μ l である。照射したサンプル(1.8 μ l)について、

QuantiStudio 3D Digital PCR システムを用い、TaqMan プローブ法により約 200bp の領域に対し PCR を行った。得られた結果から未損傷鋳型 DNA の分子数($n/\mu\text{l}$)を評価した。

結果を図 4 に示す。ガンマ線の吸収線量の増加に伴って、未損傷 DNA 分子数が減少することが確認できた(0.1 Gy の場合を除く)。従来のリアルタイム PCR 法と比較して、誤差が低減することが示された。

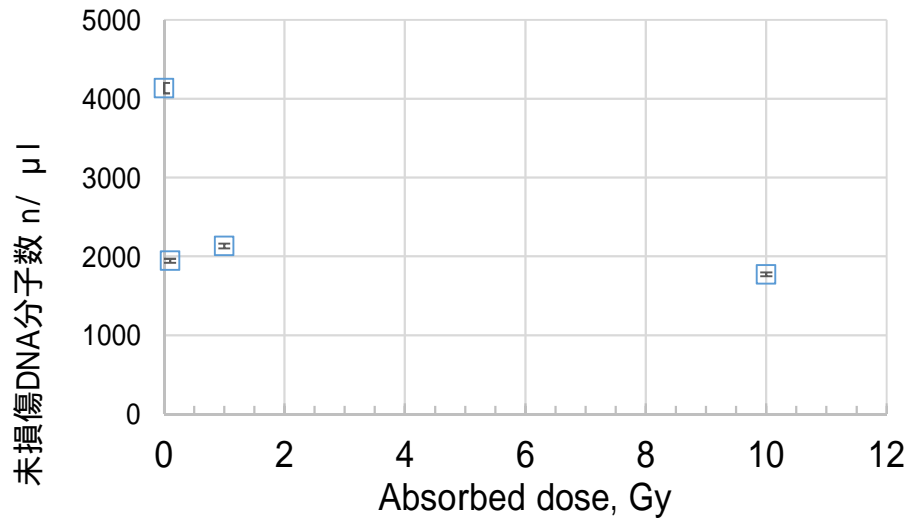


図 4 デジタル PCR による *URA3* 領域に対する未損傷鋳型 DNA の評価(N=3)。

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 1件）

1. 著者名 Y. Matuo, Y. Izumi, A. N. Sakamoto, Y. Hase, K. Satoh, K. Shimizu	4. 巻 3
2. 論文標題 Molecular Analysis of Carbon Ion Induced Mutations in DNA repair deficient strains of <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Quantum beam Sci	6. 最初と最後の頁 1-4
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 -

1. 著者名 松尾 陽一郎、平山 誠、川井 良太、砂川 武義、清水 喜久雄、泉 佳伸	4. 巻 53
2. 論文標題 放射線照射によるDNA損傷の新評価手法の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 223-240
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 松尾陽一郎、泉佳伸、下川卓志、清水喜久雄
2. 発表標題 炭素およびネオン粒子線照射による出芽酵母の突然変異誘発の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丹羽啓太、松尾陽一郎、清水喜久雄、泉佳伸
2. 発表標題 放射線照射による出芽酵母の突然変異誘発に関する研究
3. 学会等名 日本放射線安全管理学会 第19回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口雅, 松尾陽一郎, 清水喜久雄, 泉佳伸
2. 発表標題 ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)を用いた放射線によるDNA損傷評価手法の開発
3. 学会等名 日本放射線安全管理学会 第19回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水喜久雄, 松尾陽一郎, 山口雅, 泉佳伸, 秋山庸子, 駁丸佳輝, 玉置真悟, 佐藤文信
2. 発表標題 DNA 損傷を指標とした 放射線量評価法の開発
3. 学会等名 日本保健物理学会 第53回研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 K. Shimizu, T. Matuo, Y. Izumi, N. Sato, T. Yamamoto
2. 発表標題 Quantification of DNA damages by Real-time PCR Reaction and Its Application to Radiation Monitoring System
3. 学会等名 3rd International Conference on Dosimetry and its Applications Lisbon, Portugal (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Matuo, Y. Izumi, T. Shimokawa, K. Shimizu
2. 発表標題 Molecular analysis of carbon ion beam induced mutations in the budding yeast <i>S. cerevisiae</i> .
3. 学会等名 ICRR2019, Manchester, England (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水喜久雄、松尾陽一郎、泉佳伸
2. 発表標題 リアルタイムPCRを用いた放射線によるDNA損傷の評価に関する検討
3. 学会等名 第62回 放射線化学討論会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kikuo SHIMIZU , Youichirou MATUO , Yoshinobu IZUMI , Norihito SATO, Takayoshi YAMAMOTO
2. 発表標題 Development of the new radiation monitoring system using DNA molecules as a radiation sensor
3. 学会等名 IRPA2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾陽一郎、泉佳伸、清水喜久雄：
2. 発表標題 放射線によるDNA 損傷の定量評価に関する研究
3. 学会等名 日本保健物理学会 第51回研究発表会、
4. 発表年 2018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	佐藤 文信 (Sato Fuminobu) (40332746)	大阪大学・工学研究科・教授 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	松尾 陽一郎 (Matuo Youichirou) (90568883)	福井大学・学術研究院工学系部門・准教授 (13401)	

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