

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23561012

研究課題名(和文) DNA鎖切断を指標とした放射線吸収線量の新規評価法の開発

研究課題名(英文) Evaluation of the DNA Lesions Caused by Ionizing Radiation Using the Polymerase Chain Reaction

研究代表者

清水 喜久雄 (Shimizu, Kikuo)

大阪大学・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) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、DNA鎖切断量をリアルタイムPCRを用いた手法により解析した。その結果、リアルタイムPCR法で評価した切断量と照射した放射線量が強い相関関係にあることがわかった。またLETが異なる放射線による影響を評価できる可能性を示すことができた。すなわち、DNA損傷を評価することにより、LETを加味して放射線量を評価できることを示したものである。本手法により、等価線量を直接的に評価することが可能になり、異なる種類の放射線の被ばくの恐れのある場所での放射線被ばく量を測定できるようになると期待される。

研究成果の概要(英文)：The biological dosimeter that measures biological responses to ionizing radiation is useful for radiation protection. We report the development and characterization of a gamma-ray irradiation dosimetry system based on Real-time PCR methodology. Real-time PCR is used to amplify and simultaneously quantify a targeted DNA molecule. If there are no limitations due to limiting substrates or reagents, at each extension step, the amount of DNA target is doubled, leading to exponential amplification of the specific DNA fragment. The essential point of this assay is that DNA lesions caused by ionizing radiation block DNA synthesis by DNA polymerase, resulting in a decrease in the amplification of a damaged DNA template compared with that of non-damaged DNA templates.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：総合工学・原子力学

キーワード：DNA線量計 個人被ばく線量 LET

## 様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究は DNA 損傷という生体反応を指標として電離放射線の吸収線量の評価を行おうとするものです。従来の物理・化学的反応を用いた方法と原理的に異なる方法を開発し、重粒子線、陽子線などの LET の異なる複数の放射線が存在する混成場においても作業者の安全確保ができる線量評価法の確立をめざします。

### 2. 研究の目的

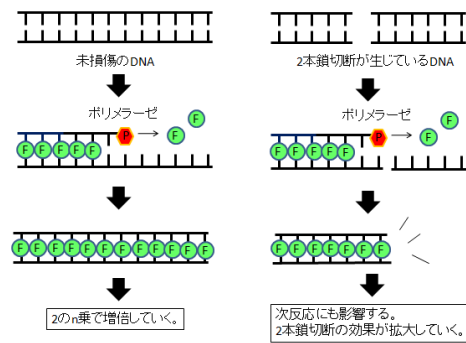
DNA 損傷量を最新の技術により評価し、次の各項目の達成を目的としています。損傷量と電離放射線の吸収線量との関係を求めることにより等価線量(吸収線量×放射線荷重係数)を直接的に測定すること。この方法による“DNA 線量計”を開発すること。緊急被ばく時の線量評価並びに、宇宙空間での高エネルギー粒子線の被ばく評価を迅速に実施する方法を確立すること。

### 3. 研究の方法

評価法の原理について

まずはじめに DNA 鎖切断量の評価の基本的原理を概説する。PCR 法とは Polymerase Chain Reaction の略で、試験管内で生化学反応を用いて DNA を指数関数的に増幅させる手法である。今回用いるリアルタイム PCR 法はその DNA 増殖の過程を蛍光色素を用いて過時的に観測する手法である。反応は長時間継続するとプラトーに達するが、反応初期ではポリメラーゼ連鎖反応による増幅率は、サンプルの鋳型 DNA の初期量に比例する。そこで DNA 鎖の損傷があった場合、損傷の位置で反応は停止するのでポリメラーゼ連鎖反応は阻害され、DNA 増幅は DNA 鎖の損傷度合に比例して減少していくことになる。この原理を利用し吸収線量を算出することが可能であると考えられる。(右上図参照)

吸収線量の測定のために DNA 損傷を評価の基準とした新しい方法の開発を行う。そのため線や原子力研究開発機構(TIAR



A) のサイクロトロンで発生させたイオンビームなど LET の異なる電離放射線を DNA に照射し、その DNA を鋳型としてリアルタイム PCR を行い反応の進行をモニタリングする。また DNA 線量計の可能性についても検討する。リアルタイム PCR 反応では下記の事項の最適化を図る。

鋳型の選択やプライマーの設計、増幅の長さなどの反応条件 照射条件 再現性 DNA 線量計への適応

また、電離放射線の照射により DNA には塩基の酸化、欠落などとともに 1 本鎖や、2 本鎖切断がおきるが鎖切断以外の損傷では PCR 反応が進行する可能性があり、検出感度の低下を招くことが予想される。そこで損傷を鎖切断に変える操作を PCR 反応の前段階で加えることにより感度の向上を計る。

### 4. 研究成果

放射線照射により DNA 鎖切断を主体とする損傷が生成するが、炭素線、ガンマ線によるそれぞれの損傷程度は位置的及び空間的な相違が見られることが予測される。そこで我々は、DNA ポリメラーゼ連鎖反応を応用した、DNA 鎖切断の評価手法を新たに構想し、解析を実施している。

原理としては、鋳型 DNA 上に生じた損傷の程度が、ポリメラーゼ連鎖反応の効率と相関関係を持つことを利用したもので、ポリメラーゼ連鎖反応による増幅割合からサンプルの鋳型 DNA の損傷程度を予測するものである。出芽酵母 S288c の URA3 領域(804 bp)を PCR 法によって増幅し精製した反応物を DNA サンプルとした。DNA サンプル量は 0.1 -1.0 ng/1

反応とした。DNA サンプルに対し、放射線医学総合研究所 HIMAC で炭素イオン粒子 (290 MeV, LET : 50 keV/μm) を照射した。また千代田テクノロ大洗研究所でガンマ線 (LET:0.2KeV)を照射した。吸収線量は 1.0 Gy - 100.0 Gy であった。照射したサンプル DNA を鋳型とし、EcoTM Real-TimePCR System (illumina®)を用い、未損傷の鋳型 DNA の量を評価した。リアルタイム PCR 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 量を評価するものである。ポリメラーゼ連鎖反応による増幅率は、サンプルの鋳型 DNA の量に比例するため、未損傷の鋳型 DNA の量、すなわち DNA の損傷量を評価することができると考えられる。

Fig.1は異なる LET の放射線を照射した場合の鋳型 DNA の失活の割合を示す。Fig.1は、ガンマ線照射と比較して炭素線照射の場合は直線の傾きが大きいことを示している。二本鎖切断や AP サイトの生成が数 bp 以内に複数生じた場合(クラスター損傷)、酵素活性が強く阻害されることが報告されている。従って本結果は、ガンマ線照射と比較して、炭素線照射では多くの二本鎖切断が数 bp 以内に生じ、DNA の合成効率を低下させたことを示していると考えられる。本研究課題では、DNA 鎖切断量をリアルタイム PCR を用いた手法により解析した。その結果、リアルタイム PCR 法で評価した切断量と照射した放射線量が強い相関関係にあることがわかった。また LET が異なる放射線による影響を評価できる可能性を示すことができた。すなわち、DNA 損傷を評価することにより、LET を加味して放射線量を評価できることを示したものである。本手法により、等価線量を直接的に評価することが可能になり、異なる種類の放射線の被ばくの恐れのある場所での放射線被ばく量を測定できるようになると期待される。

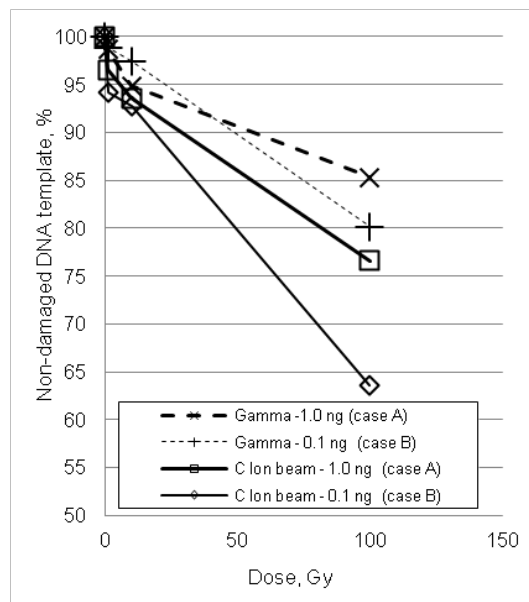


Fig.1 リアルタイム PCR による DNA 合成効率の評価

## 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4件)

Youichirou Matuo, Yoshinobu Izumi, Norihito Sato, Takayoshi Yamamoto, Kikuo Shimizu “Evaluation of DNA lesions caused by high-LET radiation using the polymerase chain reaction” *Radiation Measurements* 55, 93-95 (2013)

Naoki Zushi, Yuki Ikeda, Fuminobu Sato, Yushi Kato, Kikuo Shimizu, Norihito Sato, Takayoshi Yamamoto, Toshiyuki Iida “Measurement of beta-radioactivity distribution in soil by use of fiber-type radiophotoluminescence glass dosimeter” *Radiation Measurements* 55, 75-78 (2013)

清水喜久雄「DNA 線量計の開発 -バイオドシメトリの新展開-」FB ニュース 第424号 pp12-16 (2012)

Y. Matuo, Y. Izumi, Y. Hase, A. Sakamoto, S. Nozawa, I. Narumi and K. Shimizu “Fundamental Study on molecular mechanism underlying repair of heavy-ion induced DNA damages in the

Saccharomyces cerevisiae”, *JAEA-Review* 2011-043, pp.108, January 2012

〔学会発表〕(計8件)

松尾陽一郎, 中嶋隆登, 泉佳伸, 清水喜久雄 「PCR法によるDNA損傷評価と線量計応用の研究」第12回日本放射線安全管理学会学術大会(札幌、2013年11月)

Youichirou Matuo, Yoshinobu Izumi, Norihito Sato, Takayoshi Yamamoto, Kikuo Shimizu ”Study of the DNA damages caused by radiation exposure using the PCR: Investigation for the improved primer” *9<sup>th</sup> International Workshop on Individual monitoring of Ionizing Radiation*, 2013, 30, Nov-1, Dec Ibaraki, Japan

Ryuto Nakashima, Youichirou Matuo, Yuji Hidaka, Norihito Sato, Takayoshi Yamamoto, Kikuo Shimizu ”Study of the DNA damages caused by radiation exposure using the PCR: Enhancement with modified DNA template”, *9<sup>th</sup> International Workshop on Individual monitoring of Ionizing Radiation*, 2013, 30, Nov-1, Dec Ibaraki, Japan

松尾陽一郎, 泉佳伸, 佐藤典仁, 山本幸佳, 清水喜久雄 「DNA鎖切断を指標とした吸収線量の評価法に関する研究」第11回日本放射線安全管理学会学術大会(大阪、2012年12月)。

Youichirou Matuo, Yoshinobu Izumi, Kikuo Shimizu “Fundamental Study of the Evaluation of the DNA Lesions Caused by High-LET Radiation exposure Using the Polymerase Chain Reaction” CRS-12 & RPSD-2012 (Sep. 2-7, 2012, Nara, Japan)

松尾陽一郎, 泉佳伸, 佐藤典仁, 山本幸佳, 清水喜久雄

「DNA鎖切断を指標とした吸収線量の評価法の検討」日本放射線安全管理学会 第10回学術大会

2012年11月 横浜

Kikuo Shimizu, Youichirou Matuo, Norihito Sato, Takayoshi Yamamoto, ”Development of the Radiation Monitoring System Based on Evaluation of DNA Lesions “ *7<sup>th</sup> International Workshop on Individual monitoring of Ionizing Radiation*, 2011, 3-4, Dec Ibaraki, Japan

Youichirou Matuo, Yoshinobu Izumi, Norihito Sato, Takayoshi Yamamoto, Kikuo Shimizu ”Evaluation of the DNA Lesions Caused by High-LET Radiation Using the Polymerase Chain Reaction” *7<sup>th</sup> International Workshop on Individual monitoring of Ionizing Radiation*, 2011, 3-4, Dec Ibaraki, Japan

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水喜久雄 (SHIMIZU, Kikuo)  
大阪大学・ラジオアイソトープ総合センター・准教授  
研究者番号：20162696

### (2) 研究分担者

飯田敏行 (IIDA, Toshiyuki)  
大阪大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：60115988