

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591355

研究課題名（和文）DNA 損傷部位に集積する蛋白質を用いたストロンチウム治療後放射線組織障害の検討

研究課題名（英文）Radiotoxicity after Sr-89 therapy for bone metastasis using γ -H2AX Foci of DNA damage in lymphocytes

研究代表者

道合 万里子 (DOAI MARIKO)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：40515673

研究成果の概要（和文）：放射線ストロンチウム治療の副作用としてリンパ球の一過性減少は問題視されているが、直接どの程度の放射性組織障害性があるか解明されていない。よって DNA 損傷部位に集積する蛋白質を用い放射性ストロンチウム治療後放射線組織障害の検討を行った。ストロンチウム投与前後で採血を施行し γ -H2AX 抗体で免疫染色を行い DNA 損傷の個数を測定した。その結果を用いて健常者血液に対し外照射より得た標準線から推定放射線線量を測定し得た。放射性組織障害の評価法として γ -H2AX を用いた新しい評価方法が確立できたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of our study was to evaluate the degree of radiotoxicity to lymphocytes after strontium-89 therapy for bone metastases using γ -H2AX foci immunodetection. DNA damage to lymphocytes induced by Sr-89 *in vivo* should result in increased numbers of cells with nuclear foci stained by γ -H2AX. γ -H2AX foci immunodetection in lymphocytes may detect radiation-induced DNA damage associated with strontium-89 therapy for bone metastases, and may facilitate estimation of the radiation doses absorbed with this therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：ストロンチウム、放射線組織障害、リンパ球、 γ -H2AX

1. 研究開始当初の背景

従来の骨転移の除痛目的で行われてきた放射線外部照射療法は、広範な病変に対しては困難である。そのような場合も含めて、それに代わる可能性がある放射性ストロンチウム内部照射療法が、臨床現場で主に造骨性骨転移患者の除痛目的で認可・導入されている。しかしながら、実際には放射性ストロンチウム治療で様々な副作用が報告されてきた。特にリンパ球に関しては、血中数の一過性の減少を認めた報告は多い。ところが、放射性ストロンチウム治療に伴う生体内のリンパ球自体への直接的影響である放射性組織障害に関する検討は、我々が予備的に行った以外には現在まで見られない。

そこで今回、放射性ストロンチウム治療について、血液の中で最も放射線感受性が高いと考えられているリンパ球に対して、どの程度の放射性組織障害が出現するのか、DNA 損傷部位に集積することが知られているおよび γ -H2AXを用いて基礎的に検討しようと考えた。

γ -H2AX (リン酸化ヒストンタンパク質)とは DNA 損傷時の最も早期の細胞応答の一つである H2AX(ヒストンタンパク質)の 139 番セリン部位のリン酸化のことをいう。よって特異的な蛍光標識抗体を用いることで、DNA 損傷を視覚的に検出することが可能となる

実験として γ -H2AX に対する抗体で細胞の免疫染色を行うと、DNA 損傷部位が核内の点として染色され、光学顕微鏡で DNA 損傷の個数を数えることができる。これを用いて、治療前後の末梢血リンパ球に発生する DNA 損傷数を定量する。

治療によるリンパ球の被曝線量は、正常リンパ球を外部照射してできる DNA 損傷数と照射量との関係から求めた標準線より推定する。治療後の放射性組織障害の経時変化を追跡することで、影響が時間的にいつまでどの程度残存するかを明らかにすることが可能となる。

2. 研究の目的

造骨性骨転移患者の除痛目的で認可・導入されている放射線ストロンチウム内部照射療法の副作用としてリンパ球の一過性減少は問題視されているが、リンパ球自体に直接どの程度の放射性組織障害性があるか解明されていない。よって DNA 損傷部位に集積する蛋白質を用いた、放射性ストロンチウム治療後放射線組織障害の検討を行い、直接的なリンパ球への照射量の推定を得られると考え、また方法が確立されれば、本治療による放射性組織障害性の短期的な副作用評価の簡便

法として臨床的にも普及することも考えられる。

3. 研究の方法

血液中のリンパ球層を分離しリンパ球を得る。分離したリンパ球を 3 回 PBS を用いて洗浄し、RPMI medium 上で調整する。特殊スライドガラス上に固定したリンパ球に、 γ -H2AX に対する抗体で細胞の免疫染色を行い、DNA 損傷部位が核内の点として染色された個数をそれぞれ 30 個ずつ計測を行う。

基礎的検討

正常者 (6 名) の血液を採取し、*In vitro* で採取した血液に対し電子線外部照射の実験で、それぞれ 0.5Gy, 1Gy, 2Gy, 3Gy と段階的に外部照射し、上記方法で免疫染色し核内の点をカウントし、統計処理を行う。外部照射してできる DNA 損傷数と照射量との関係から求めた標準線より推定する。

臨床的検討

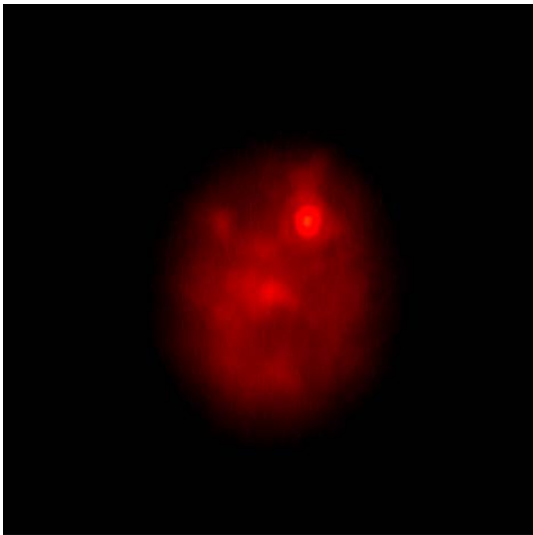
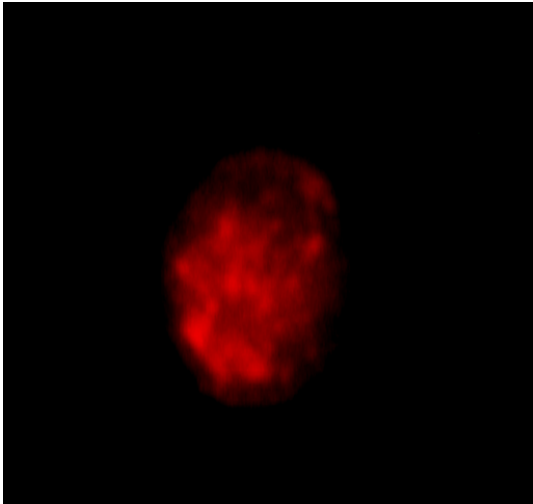
放射性ストロンチウムを用いた放射線内部照射療法の治療前、治療後 1 日以内に患者 7 名より採血した末梢血リンパ球に対し同方法で免疫染色を行い、核内の点をカウントし統計処理を行う。

外照射で求めた標準線を用いて、推定放射線量を測定する。

4. 研究成果

ストロンチウム治療後においてリンパ球の DNA 損傷部位が核内の点として染色されていることを確認した。健常者血液に対し外照射より得た標準線から推定放射線量を測定した。





上記は実際の観察画像であり、青染はリンパ球の核全体の染色である。核形状が均一なものをカウント対象とし、形状がいびつものや染色が不均一なものは除外した。

赤染が γ -H2AX 抗体で染色した像であり、内部のドットの数をカウントした。固定法としてはリンパ球はある程度の厚みを持ち固定しており、1 核内それぞれ focus を変えながら赤染の強いものをカウントした。

蛍光顕微鏡にて DNA 損傷の個数を測定した。30 個核の平均ドット数は下記の表の通りである。

	Pre	Post
Case1	0	7
2	0	10.6
3	0	12.7
4	1	6.2
5	0.4	8.1
6	1.4	4.5
7	0.5	5.1

放射線ストロンチウム治療前後における平均ドット数は、治療前で 0.5 ± 0.5 、治療後 7.7 ± 3.0 であり、治療前後で有意差を持ってドット数の増加を認めた。

また標準線を用いた推定放射線量は 1.1Gy であった。

現段階では症例数は少ないがリンパ球に対する放射線組織障害の基本的評価法として、 γ -H2AX を用いた新しい評価方法が確立できたと考えられる。

治療スケジュールの関係で治療後の放射線組織障害の経時変化を追跡は今回は検討できていないが、今後経時的に観察を行い、影響が時間的にいつまでどの程度残存するかを検討を継続していく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 道合万里子、渡邊直人、高橋知子、谷口 充、利波久雄、岩淵邦芳、萱野大樹、福岡 誠、絹谷清剛

The 25th, Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Milan Italy, MiCo
October 27-31, 2012, Radiotoxicity after radioisotope therapy for using γ -H2AX foci of DNA damage in lymphocytes

- ② 道合万里子、渡邊直人、高橋知子、谷口 充、利波久雄、萱野大樹、福岡 誠、絹谷清剛
第 52 回日本核医学会学術総会、札幌、ロイトン札幌、2012 年 10 月 11～13 日
アイソトープ治療におけるリンパ球の放射線組織障害評価に関する検討（第 2 報）
- ③ 道合万里子、渡邊直人、高橋知子、谷口 充、利波久雄、岩淵邦芳、萱野大樹、福岡 誠、絹谷清剛
第 71 回日本放射線学会、横浜、パシフィコ横浜、2012 年 4 月 12～15 日、アイソトープ治療におけるリンパ球の放射線組織障害評価に関する検討

6. 研究組織

(1) 研究代表者

道合 万里子 (DOAI MARIKO)
金沢医科大学・医学部・助教
研究者番号：40515673

(2) 研究分担者

渡邊 直人 (WATANABE NAOTO)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：40210926

(3) 連携研究者

岩淵 邦芳 (IWABUCHI KUNIYOSHI)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号：10232696