

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461869

研究課題名(和文) PCCとPNA-FISHによる二動原体染色体解析の被ばく線量評価への適用性の検証

研究課題名(英文) Availability of combined PCC and PNA-FISH method to cytogenetic biodosimetry

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：未成熟染色体凝縮(PCC)とPNA-FISH及びcentromere-FISHを併用して染色体異常を解析し、低線量から高線量まで広範囲に適用できる線量評価法の確立を目的として、健常者より採取した血液を線量0～25Gyまで17ポイントの線量で照射し、PCC-ring法、PCC-FISH法、DCA-FISH法、ギムザ法の4種類の染色法により解析を行った。その結果、PCC-FISH法、DCA-FISH法において最も効率よく染色体異常を検出することができた。また、低線量から高線量域まで染色体異常頻度に線量依存性が確認されたことから、1つの検量線を作成することが可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In order to determine the treatment condition for premature chromosome condensation, we investigated the PCC frequency, cell cycle stage and the length of chromosome #2 in normal and irradiated lymphocytes from healthy donor. We found that treatment by 50nM Calyculin A for 30 min. is available for the analysis of chromosome abnormalities including both ring and dicentric chromosomes. In the present study, we also analyzed the availability of staining methods; PCC-ring, PCC-FISH, DCA-FISH and Giemsa staining for the chromosome analysis to establish the method for cytogenetic biodosimetry covering the range from low (1-5Gy) to high (over 5Gy to 25Gy) dose radiation. The results indicates that the frequencies of dicentric chromosome are higher in PCC-centromere FISH and DCA-centromere FISH than Giemsa staining method. Furthermore, it will be possible to establish the standard curve used in the wide range of radiation to estimate radiation dose in the radiological accident.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：染色体線量評価 PCC法 Dic法 FISH法

1. 研究開始当初の背景

東海村 JCO 事故や福島第一原子力発電所事故などの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、被ばく者の末梢血リンパ球における染色体異常とりわけ二動原体染色体(dicentric: dic)を指標とした線量評価法(dic 法)は最も信頼性が高い方法とされている。しかし、dic 法は染色体解析に熟練した技術や能力が必要である事、解析の対象とする細胞の選択に染色体凝縮が影響する事、解析自体にかなりの時間を要する等の弱点がある。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、間期細胞核の DNA を強制的に凝縮する事により染色体を構築させて構造異常(環状染色体)を解析する未成熟染色体凝縮(PCC)法が用いられている。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、被ばく形態が不明な場合には線量評価が困難な状況となる可能性がある。したがって、いかなる被ばく形態においてもより正確かつ迅速な染色体線量評価法の確立が急務である。被ばくの線量評価法の一つとして用いられている PCC 法は、オカダ酸やカリクリン A 等のいわゆるタンパク質脱リン酸化酵素阻害剤処理によって間期細胞核の DNA を強制的に凝縮させ、染色体を構築させて異常を解析する方法である。染色体解析の対象となるのは細胞周期の G2/M 期の細胞であるが、これらのステージの染色体形態には大きな違いがあり、線量評価を実施する上で、その対象である二動原体染色体をターゲットとして解析するのは極めて困難である。このような二動原体染色体の検出は、近年開発された動原体に特異的なペプチド核酸(PNA)プローブによる分子雑種形成(FISH)法を適用する事によって可能となり、いかなる形態の染色体であっても正確かつ迅速な解析を実施する事が出来る。

2. 研究の目的

本研究では被ばく者の線量評価に用いられている手法の一つである未成熟染色体凝縮(PCC)法と染色体上の動原体とテロメア特異的な PNA(ペプチド核酸)プローブを用いた FISH 法を併用して、二動原体染色体(dic)や環状染色体(ring)の頻度を解析する事により、低線量から高線量まで広範囲に適用できる、正確かつ迅速な生物学的線量評価法の確立を目的とする。放射線被ばく事故の生物学的線量評価に用いられている二動原体染色体法は最も信頼性が高い手法とされているが、染色体異常の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。また、PCC 法はそのメカニズムが十分に解明されておらず、線量評価法として

確立された手法とは言い難い。

3. 研究の方法

PCC 法の至適条件の検討

末梢血からリンパ球を分離し、48 時間培養する。種々の濃度のカリクリン A およびオカダ酸で、処理時間を変えてリンパ球を処理し、PCC 頻度を解析する。また、照射および非照射リンパ球を用いて至適条件を第 2 番染色体の長さを指標として検討する。

PCC 法と PNA-FISH 法の併用の検討

培養した照射および非照射分離リンパ球を用いて、PCC 法と PNA-FISH 法を併用して環状染色体を解析する。

PCC 法と centromere-FISH 法を併用した二動原体染色体法の検証

採取した血液を線量で種々の線量で照射し、0、0.057、0.1、0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、5、6、7.5、10、15、20、25Gy で照射し、48 時間培養を行い、PCC-ring 法、DCA-FISH 法、PCC-FISH 法(dic 解析)、ギムザ法(dic 解析)により染色体異常(二動原体染色体や環状染色体)を解析する。

4. 研究成果

未成熟(早期)染色体凝縮(PCC)の処理条件の決定

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、間期細胞核の DNA を強制的に凝縮する事により染色体を構築させて構造異常(環状染色体)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。しかし、現在用いられている PCC 法ではリンパ球の培養時間、タンパク質脱リン酸化阻害剤の染色体凝縮に対する影響など、放射線で誘発される染色体異常を解析する上での基礎的なデータが乏しく、未だ最適な方法として線量評価に用いられている状況ではない。本研究では PCC 法を利用した線量評価法の制度の向上を目的として、まず、タンパク質脱リン酸化阻害剤であるオカダ酸とカリクリン A の染色体凝縮に対する作用を解析した。まず、カリクリン A およびオカダ酸の種々の濃度と処理時間で非照射リンパ球を処理し、PCC の頻度を解析した(図 1)

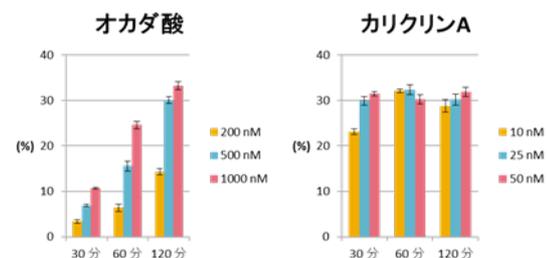


図 1. オカダ酸およびカリクリン A の処理条件(時間と

濃度)とPCC頻度

その結果、オカダ酸では長時間および高濃度によってPCC頻度が上昇していることが明らかとなった。一方、カリクリンAでは10nM、30分処理において有意にPCC頻度が低下していたものの、それ以外の処理条件では大きな差がないことが分かった。このように、PCC誘導の頻度に関しては、オカダ酸1000nM、120分処理とカリクリンAが10~50nM、30~120分処理においてほぼ同等であったことから、コストおよび作業工程を考慮した場合にカリクリンA、50nM、30分処理が至適処理の候補と考えられる。本実験において得られた結果は非照射リンパ球を対象としていることから、同様の処理条件で(X線、10Gy)照射されたリンパ球におけるPCC頻度についても解析を行い、非照射リンパ球と比較した(図2)。

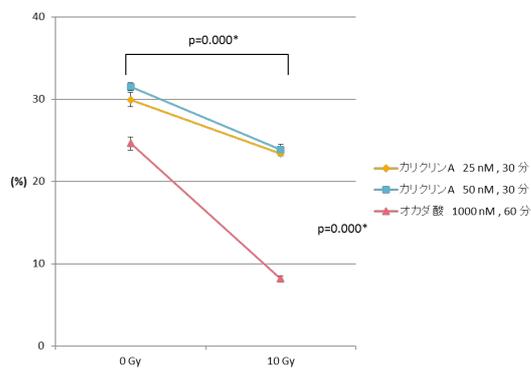


図2. 照射、非照射リンパ球におけるPCC頻度の比較

その結果、オカダ酸1000nM、60分処理では、カリクリンAに比べ、優位にPCC頻度が低下することが明らかとなった。このことは、照射されたリンパ球においてPCCを誘導するためにはオカダ酸よりもカリクリンAの方が最適である可能性が示唆された。しかし、PCC法において、もっとも重要とされるのが、染色体の凝縮度である。高頻度のPCCが得られたとしても、染色体凝縮度が強いと、線量評価のための対象となる環状染色体の判定が困難となる。そこで、本研究では、ヒト染色体の中から第2番染色体を対象として、PCC誘導後の染色体長を測定し、カリクリンAの処理条件の検討を行った(図3)。その結果、カリクリンAの処理時間および濃度に依存して第2番染色体の凝縮度が強いことが判明した。これまでの結果を総合的に判断すると、事故時に高線量被ばくが疑われる場合に実施するPCC処理では、カリクリンA、50nM、30分処理が至適処理条件と考えられる。

さらに、染色体異常とくに環状染色体を対象として異常頻度を求め、線量評価を行う場合、対象とする染色体像の細胞周期におけるステージが問題となる。現状では、G2/M期のPCC像が最も至適とされていることから、本処理条件における各細胞周期の頻度を非照射リンパ球および照射リンパ球を用いて解

析した(図4)。その結果、カリクリンA、50nM、30分処理を行った照射リンパ球においてG2/M期のPCCが最も高頻度に観察された。また、オカダ酸では至適条件と考えられる1000nM、60分処理においてG2/M PCCの頻度が最も高かった。照射リンパ球においてG2/M-PCCの頻度が非照射リンパ球に比べて、有意に上昇するというのは、分裂刺激剤であるPHA(フィトヘマグルチニン)で刺激され、細胞周期に入ったリンパ球の放射線による影響のため、細胞周期の進行が遅れていることに起因すると考えられる。したがって、高線量放射線による被ばく事故では、上述したように今回得られた処理条件が最適と考えられる。

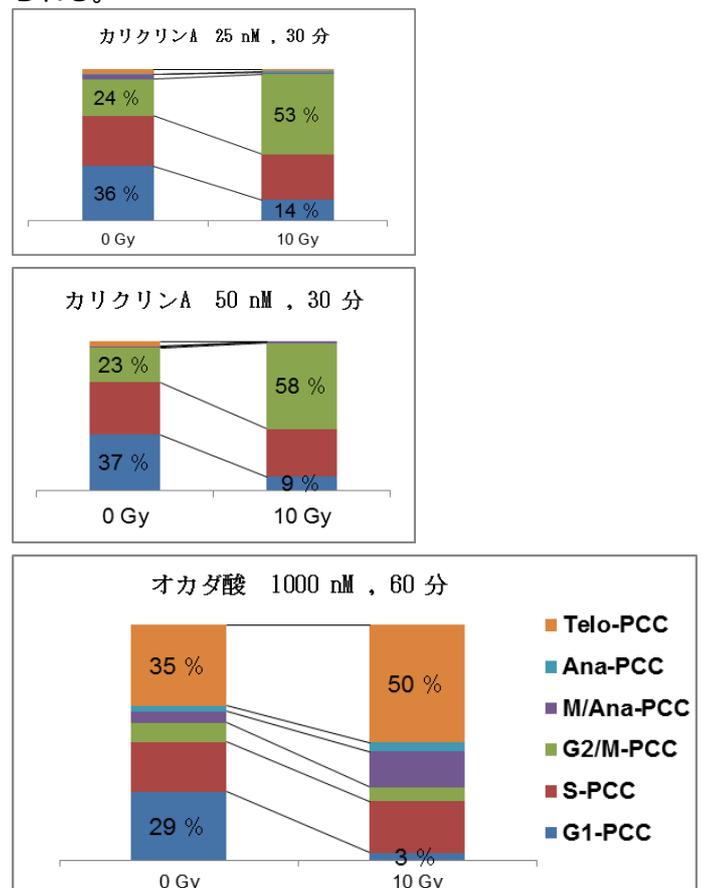


図4. カリクリンAおよびオカダ酸で処理された非照射、照射リンパ球における各細胞周期のステージの頻度

PCC法とPNA-FISH法の併用の検討

PCC法による染色体線量評価は基本的にはギムザ染色によって行われる。仮にPCCを誘導し、二動原体染色体が判別可能であるならば、正確かつ効率よく線量評価が可能となるはずである。しかし、一般にPCCを誘導した場合、動原体の位置を示す第一次狭窄の判定が非常に困難であることが多い。したがって、PCC法においては識別が容易な環状染色体を対象としている。しかし、環状染色体に関しても、判別が極めて難しい場合もあることから、容易に染色体異常を判別できる手法の検討を行った。本研究では最近注目されてきているFISH法の一つであるPNA-FISH法を用い

て、動原体とテロメアを染め分け、染色体異常の判定がどのようになるかの検討を行った。20代男性3名(検体番号I, F, H)から採取した血液をX線、10Gyで照射し、48時間培養を行い、環状染色体の検出頻度についてギムザ染色による解析との比較を行った。本実験におけるPCC誘導にはオカダ酸を用いた。表1に示したように、検体番号I以外のF, HではPNA-FISHの併用により、環状染色体の頻度が上昇していた。このことより、PNA-FISHの併用により環状染色体の頻度算定の精度が上がる事が考えられる。また検体番号Iの環状染色体頻度が上昇していない理由として、染色体の長さが短く、環状染色体が観察しにくいことが考えられる。よってPNA-FISHを併用する際にはある程度の染色体の長さが必要である。

検体	ギムザ染色	PNA-FISH
F	0.70/cell	0.94/cell
H	0.54/cell	0.70/cell
I	0.52/cell	0.54/cell

表1. PNA-FISH法とギムザ法による染色体異常頻度の比較

また、この結果は、PCC誘導試薬に対する染色体凝縮の感受性が個人によって異なる可能性を示唆している。しかし、PNA-FISH画像では、動原体が赤、テロメアが緑、それ以外の染色体領域は青、バックが黒と、識別をしなければならぬ色の情報が多く、解析は非常に困難であることが明らかとなった。

PCC法とcentromere-FISH法を併用した二動原体染色体法の検証

現在、放射線被ばく事故における外部被ばく線量の推定には、5Gy以下の場合、二動原体染色体法が、5Gyを超える高線量被ばくが疑われる場合には、二動原体法とPCC-ring法の2つの手法を適用しなければならない。また、線量評価を行うための検量線についても、二動原体用とPCC-ring用の2つを作成しなければならない。したがって、線量評価の迅速化という観点から考慮すると、いかなる被ばく状況に対しても適用可能な手法の開発および0~25Gyまでの広範囲にわたる検量線の作成が望まれる。そこで、本研究では、広範囲の放射線量をカバーする線量評価法の開発及び検量線の作成を目的として、PCC法およびcentromere-FISH法を併用し、二動原体染色体の頻度、環状染色体の頻度を解析した。同時にギムザ染色により解析した結果との比較も行った。まず、20歳代の健常人から血液を採取し、線量により、0、0.057、0.1、0.25、0.5、0.75、1、2、3、4、5、6、7.5、10、15、20、25Gyで照射し、48時間培養を行い、PCC-ring法、DCA-FISH法、PCC-FISH法(dic解析)、ギムザ法(dic解析)により染

色体異常の解析を行った。3名の健常人におけるPCC-ring法の結果を図5に示す。細胞当たりの環状染色体の頻度が散在する結果となった。この原因として、放射線感受性が異なる可能性があるが、PCC誘導に対して、各人の染色体凝縮度にも差が存在する可能性も考えられる。また、20、25Gyといった高線量域において頻度が低下しているのは、染色体異常の解析技術に問題がある可能性も示唆される。

一方、PCCを誘導した後、動原体に特異的なプローブを用いてFISH法を行うPCC-FISH法によりDicentricを解析したところ、図6に示されるように、線量依存的に二動原体染色体の頻度が上昇していることが明らかとなった。また、通常の方法により作成した標本にcentromere-FISHを行い、二動原体染色体を解析したところ(図7)、1名分のみの結果であるが、非常にきれいな線量依存性が確認された。さらに、ギムザ染色単独の解析においても同様に線量依存性が確認された。

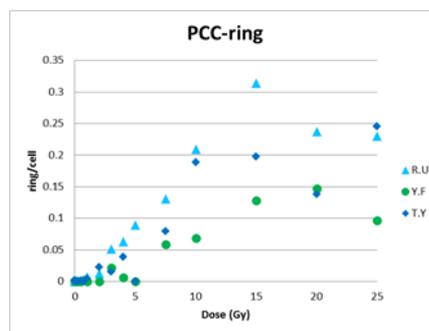


図5. PCC-ring法による染色体異常の解析

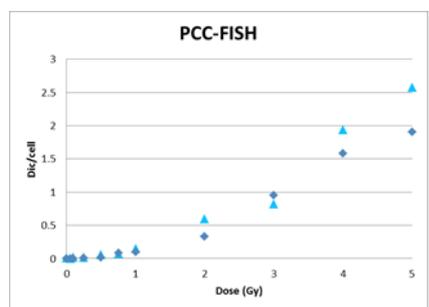
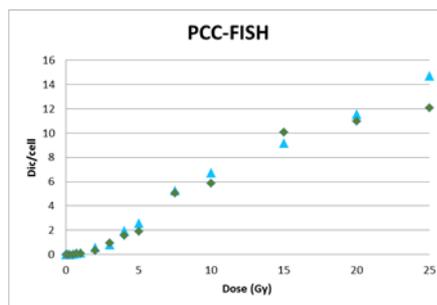


図6. PCC-FISH法による二動原体染色体の解析

今回用いた4種類の染色法(PCC-ring法、PCC-FISH法、DCA-FISH法、ギムザ法)の結果をまとめた。図8に示すようにPCC-ring法が最も検出効率が悪いことが分かる。この点は

さらなる検証が必要と思われる。また、PCC-FISH と DCA-FISH において検出された異常頻度は極めて近い値を示していること、ギムザ染色よりは異常頻度が高いことを考えると、FISH 法により動原体のみを可視化した方が、二動原体染色体の検出効率が上がるということを示している。しかし、上述したようにテロメアも染めるいわゆる PNA-FISH 法は色の情報量が多くなるため、逆に検出効率を低下させる可能性がある。それぞれの解析データを用いて、各染色法における線量評価のための検量線を作成する。本研究における以上の解析の結果、低線量から高線量までどのような線量の被ばくであっても PCC-FISH 法あるいは DCA-FISH 法を用いることによって線量評価が可能となることが示された。

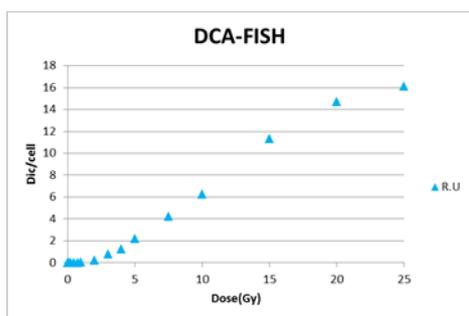


図7. DCA-FISH 法による二動原体染色体の解析

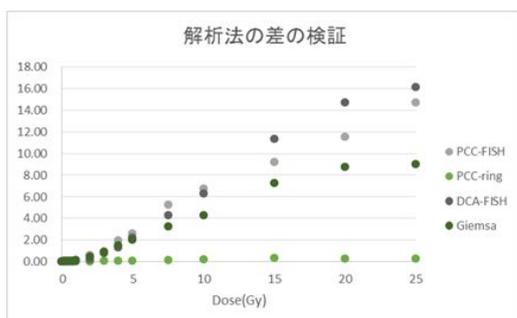


図8. 4種類の解析法の差の検証

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3件)

1. Sugarman SL, Livingston GK, Stricklin DL, Abbott MG, Wilkins RC, Romm H, Oestreicher U, Yoshida MA, Miura T, Moquet JE, Di Giorgio M, Ferrarotto C, Gross GA, Christiansen ME, Hart CL, Christensen DM. The Internet's role in a biosimetric response to a radiation mass casualty event. *Health Phys.* 2014;106(5 Suppl 2):S65-70

2. Miura T, Nakata A, Kasai K, Nakano M, Abe Y, Tsushima E, Ossetrova NI, Yoshida MA, Blakely WF. A novel parameter, cell-cycle progression index, for radiation

dose absorbed estimation in the premature chromosome condensation assay. *Radiat Prot Dosimetry.* 2014;159(1-4):52-60

3. Y Abe, T Miura, MA Yoshida, R Ujiie, Y Kurosu, N Kato, A Katafuchi, N Tsuyama, T Ohba, T Inamasu, F Shishido, H Noji, K Ogawa, H Yokouchi, K Kanazawa, T Ishida, S Muto, J Ohsugi, H Suzuki, T Ishikawa, K Kamiya, A Sakai: Increase in dicentric chromosome formation after a single CT scan in adults. *Scientific Reports* **5**, 13882; doi: 10.1038/srep13882 (2015).

[学会発表](計4件)

1. Miura T, Abe Y, Nakata A, Kasai K, Yoshida MA. Assessment of Simulated Partial Body Acute Irradiation by Cell-cycle Progression Index in the Premature Chromosome Condensation Assay (poster presentation). The 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015), May 25-29, 2015, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan.

2. Miura T, Obayashi A, Yamaguchi Y, Tsutsumi Y, Akitaya Y, Abe Y, Fujishima Y, Nakata A, Ariyoshi K, Yoshida MA. Comparison of the cell-cycle progression index and ring chromosome for dose estimation using simulated human peripheral blood partial-body irradiation in the premature chromosome condensation assay (poster presentation). *EPR BioDose2015*, October 4-8, 2015, Hanover Inn, Hanover, New Hampshire USA

3. Abe Y, Miura T, Yoshida MA, Ujiie R, Kurosu Y, Kato N, Katafuchi A, Tsuyama N, Ohba T, Inamasu T, Shishido F, Noji H, Ogawa K, Yokouchi H, Kanazawa K, Ishida T, Muto S, Ohsugi J, Suzuki H, Ishikawa T, Kamiya K, Sakai A. Analyses of dicentric chromosome and chromosomal translocation after a single CT scan in adults (poster presentation). *EPR BioDose2015*, October 4-8, 2015, Hanover Inn, Hanover, New Hampshire USA.

4. Abe Y, Miura T, Yoshida MA, Ujiie R, Kurosu K, Kato N, Katafuchi A, Tsuyama N, Ohba T, Inamasu T, Shishido F, Noji H, Ogawa K, Yokouchi H, Kanazawa K, Ohsugi J, Suzuki H, Ishikawa T, Kamiya K, Sakai A. Analyses of Dicentric Chromosome Formation and Chromosomal Translocation after a Single CT Scan in Adults (poster presentation). The 15th

International Congress of Radiation
Research (ICRR 2015), May 25-29, 2015,
Kyoto International Conference Center,
Kyoto, Japan

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

三浦 富智 (Miura Tomisato)
弘前大学・保健学研究科・准教授
研究者番号：20261456

葛西 宏介 (Kasai Kosuke)
弘前大学・保健学研究科・講師
研究者番号：50400148

中田 章史 (Nakata Akifumi)
北海道薬科大学・薬学部・講師
研究者番号：70415420