

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06667

研究課題名(和文) DNA損傷を指標とした放射線量測定法の開発と実用化

研究課題名(英文) Development of the new radiation monitoring system using DNA molecules as a radiation sensor

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：電離放射線による生物影響の直接的な評価のために、生体由来物質を用いた迅速かつ高感度である新しい手法の開発は重要である。本研究課題では、分子生物学、放射線生物学に基づいたDNAを用いた新しいシステムの開発を行った。遺伝子の発現量解析に用いられるリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)を用いてDNA分子の放射線損傷の化学収量を拡大して定量化し、PCRによるDNA合成の効率が線エネルギー付与(LET)の増加に伴って減少することを明らかにした。この手法による個人被ばく線量計測の開発に道筋がつけられた。また、個人被ばく線量計を携帯しない場合の緊急時被ばく線量の評価法にも使用できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で個人被ばく線量を生体影響を指標として評価する方法が確立できた。また宇宙空間で宇宙飛行士が受ける粒子線などの宇宙線の被ばく影響を生物学的効果比(RBE)を加味した評価が可能になると期待される。さらに数時間で結果がでるので血液からのDNAを使用し緊急被ばく時の被ばく線量評価にも適用が可能である。こうして放射線業務従事者の安全確保を飛躍的に向上させることができる。LETが高い炭素線などのイオンビームでは直接効果が増加し鎖切断の比率が高くなるのでPCR反応に及ぼす効果はより大きくなる。今後の研究により高LET放射線や混成場での被ばく管理をより実際的に行える手法を確立できると考えている。

研究成果の概要(英文)：It is important to develop new rapid and sensitive methods using bio-derived materials for direct evaluation of the biological effects of ionizing radiation. In this research project, we developed a new system using DNA based on radiation chemistry, molecular biology and radiation biology. The chemical yield of radiation damage of DNA molecules is expanded and quantified using real-time polymerase chain reaction (qPCR) used for gene expression level analysis, and the efficiency of DNA synthesis by PCR increases with the increase of linear energy transfer (LET) Revealed to decrease. The development of personal exposure dosimetry based on the new principle by this method has been paved. In addition, it can be considered that it will be used for the evaluation method of emergency exposure dose when not carrying a personal exposure dosimeter.

研究分野：分子放射線生物学

キーワード：バイオドシメトリー DNA線量計 緊急時被ばく線量評価

## 1. 研究開始当初の背景

福島第1原子力発電所の事故以来、放射線被ばく線量の迅速な測定が求められてきた。従来の物理的・化学的作用に基づく線量計に加えて、生体分子を用いた線量計の開発は、線量計測手法の選択の幅を拡げ、原子力・放射線・医療関係などの現場に対しても意義が大きい。近年大幅に進化してきた分子生物学の最先端手法を用いることで、感度および精度についても従来法より優位となる可能性を有している。さらに、評価に必要な時間は1時間程度が想定され、迅速な測定に対応できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

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し、実用化をめざす。

(本研究の具体的な目的) 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×放射線加重係数)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

PCR法の原理から、鋳型となるDNAに放射線照射による損傷があれば、ポリメラーゼ連鎖反応を阻害すると考えられる。すなわち、ポリメラーゼ連鎖反応でのDNA合成効率から、鋳型として機能するDNA量を評価でき、ここからDNA鎖の損傷量を明らかにできる。ここで得られて損傷量はDNAに吸収された放射線量に比例することから放射線量を推定できると考えられる。

## 4. 研究成果

ターゲットとなるDNAサンプルとして、塩基配列が既知である*S. cerevisiae*の出芽酵母S288c株のDNAを用いた。ウラシル代謝に関与する*URA3*遺伝子領域804bpをPCR法により増幅させた。DNAサンプルは、TE緩衝液(10mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 8.0)中に濃度1μg/ml、1サンプルあたりの容量が10μlとなるように調整した。DNAサンプルをポリプロピレン製の1.5mlチューブに封入し、千代田テクノロ大洗研究所の線源を用い、線(LET:0.2KeV/μm)を0.05-1Gy照射した。また、比較としてDNAサンプルに対し、量子科学技術研究開発機構放射線医学総合研究所HIMACのシンクロトロンを用いて加速した炭素粒子線(290MeV/n, LET:50keV/μm)を0.05-1Gy、同機構の高崎量子応用研究所イオン照射研究施設(TIARA)のAVFサイクロトロンを用いて加速した炭素粒子線(20MeV/n, LET:107keV/μm)およびネオン粒子線(13MeV/n, LET:352keV/μm)をそれぞれ0.05-1Gy照射した。すべての照射は常温で行った。これらの照射したDNAサンプルを鋳型とし、リアルタイムPCRシステム(Bio-Rad社)を用い、蛍光インターカレーター剤としてSYBR Greenを加え、PCR反応ごとの増幅DNA量を評価した。PCR反応に要する時間は約90分であった。

検量線の取得のために、0.001-100μg/mlの濃度で段階希釈した標準試料に、蛍光インターカレーター剤としてSYBR Greenを加えPCRを行った。得られた検量線をもとに、線を照射したDNAに対する未損傷DNA量を評価したところ線の吸収線量の増加に伴ってCt値が高くなり(PCR反応が阻害され、DNA合成量が一定になるまでのサイクル数が遅延することを意味する)、線の吸収線量が上昇するにつれてDNA損傷量が増加していることが明らかとなった。低LET放射線の線照射の場合および高LET放射線の粒子線照射の場合ともに吸収線量が増幅するにつれて、未損傷の鋳型DNA量が減少する傾向が見られ、また吸収線量が等しいにもかかわらず、線に比べて粒子線照射の場合では鋳型として機能しないDNA量が増加した。これらの結果は、本手法によりDNA切断でのLET効果を評価できることを示している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. “Biological effects of carbon ion beams with various LETs in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*,” Youichirou Matuo, Yoshinobu Izumi, Yoshiya Furusawa, Kikuo Shimizu, *Mutat. Res.* 810, 45-51 (2018) ( 査読有り )
2. 「放射線照射による DNA 損傷の新評価手法の検討」松尾陽一郎、平山 誠、川井良太、砂川武義、清水喜久雄、泉 佳伸、*放射線生物研究*、**53**, 223-240 (2018) ( 査読有り )
3. 「DNA損傷の検出と放射線量評価への応用」松尾陽一郎、清水喜久雄 *放射線と産業* 12月号 (2017) 143、15-20 ( 査読無し )
4. 「リアルタイム PCR 法を用いた DNA 損傷の定量化とその放射線量評価法への応用」清水喜久雄、中嶋隆登、松尾陽一郎、日高雄二、佐藤典仁、山本幸佳 *日本放射線安全管理学会誌* 15(1) 52-58 (2016) ( 査読有り )

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1.Y. Matuo, Y. Izumi, N. Sato, T. Yamamoto, K. Shimizu “The direct measurement method to radiation dose on the DNA using polymerase chain reaction” AOCR5 May 20-24, 2018 Melbourne, Australia.
- 2.松尾陽一郎、泉佳伸、清水喜久雄：“放射線による DNA 損傷の定量評価に関する研究” 日本保健物理学会 第 51 回研究発表会、札幌 2018 年 6 月 29-30 日
- 3.松尾陽一郎、泉 佳伸、長谷純宏、坂本綾子、清水喜久雄：“放射線による DNA 損傷の定量評価に関する検討” 日本保健物理学会 第 50 回研究発表会、大分 2017 年 6 月 28-30 日
- 4.松尾陽一郎、泉 佳伸、古澤佳也、下川卓志、清水喜久雄：“重粒子線による突然変異誘発の分子機構の解析 “, 日本放射線影響学会 第 60 回大会, 千葉 2017 年 10 月 25-28 日
- 5.Y. Matuo, Y. Izumi, N. Sato, T. Yamamoto, K. Shimizu “Development of the new radiation monitoring system using Quantitative polymerase chain reaction” The 13th International Workshop on Ionizing Radiation Monitoring, Dec.2-3, 2017 Oarai, Ibaraki Japan.
- 6.Y. Matuo, Y. Izumi, K. Shimizu, “Dosimetric application of biological technique by evaluating DNA lesions induced with various LET ion beams exposure” The 11th International Workshop on Ionizing Radiation Monitoring, Dec.3-4, Oarai, Ibaraki Japan 2016.
- 7.松尾陽一郎、泉 佳伸、清水喜久雄：“放射線による DNA 損傷の定量評価に関する検討及び線量評価への応用”, 第 15 回日本放射線安全管理学会学術大会, 岡山 2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日

〔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：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：松尾陽一郎  
ローマ字氏名：Youichirou Matuo  
所属研究機関名：福井大学  
部局名：学術研究院工学系部門  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：90568883

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

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。