

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01861

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実用化

研究課題名（英文）Practical application of exposure dose evaluation method by DNA damage analysis for radiation exposure accidents

研究代表者

清水 喜久雄（Shimizu, Kikuo）

福井大学・附属国際原子力工学研究所・特命教授

研究者番号：20162696

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,800,000円

研究成果の概要（和文）：原子力施設での安全管理ではガラス線量計などが開発されているが、人体組成に近い生体組織等を利用して放射線によるDNA損傷を評価できる線量計の開発が必要である。生体試料を用いて被曝した放射線量を推定する研究も進んでおり、ヒト末梢血リンパ球の不安定型染色体異常に注目した手法は確立されている。

しかしこの手法は熟練した技術が求められ、被曝量を推定するまでに時間を要する。本研究ではこれらの課題を克服するためPCR法を用いて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た。本手法では生体試料を対象として被曝した放射線量を迅速に評価することができ大量の試料の処理も可能で熟練した技術を必要としない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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うものである。従来の物理・化学的反応を用いた方法ではプラスチックやガラスなど非生体物質を素子として用いていたところ、本手法で目指すのは生体試料かつ放射線影響のターゲットそのものであるDNAを素子として用いた線量評価手法である。従来では放射線加重係数などをもとに実効線量を求めて放射線安全管理を行っていたが、本手法は係数を用いずに、DNA損傷量を解析することで放射線影響の程度を評価する新しい方法である。原子力施設等での緊急被曝事象にも迅速に対応でき社会的にも有用である。

研究成果の概要（英文）：For safety management at nuclear facilities, glass dosimeters and other devices have been developed, but it is necessary to develop a dosimeter that can evaluate biomolecules and DNA damage caused by radiation using biological tissue that has a composition similar to that of the human body. Research is also progressing to estimate the radiation dose exposed using biological samples, and a method focusing on unstable chromosomal abnormalities in human peripheral blood lymphocytes has been established. However, this method requires skilled technique and takes time to estimate the amount of radiation exposure. In this study, to overcome these issues, we developed a new method for evaluating absorbed dose using the PCR method as an indicator of the amount of DNA strand breaks. This method allows rapid evaluation of the radiation dose exposed to biological samples, can process large amounts of samples, and does not require skilled techniques.

研究分野：分子放射線生物学

キーワード：qPCR DNA damage dosimetry radiation

1. 研究開始当初の背景

2011年に発生した東京電力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。

そこで本研究では、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について開発した。特に、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た。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。これまでに、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てきた。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ことを明らかにしてきた。さらに、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。また、第3ステップの研究として、ウシ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い、吸収線量に伴うDNA損傷収量の増加を確認し、バイオドジメトリ(生物試料を用いた線量評価)として有効であることを確認した。緊急被ばく時の吸収線量の評価に適用するために残る課題としては、放射線作業環境での実用を模した試験を経て、高感度かつ迅速に、線質の異なる放射線が混在した放射線被ばく量を評価できることを示すことである。さらに、PCRによる解析結果と細胞中のDNA鎖切断をリンクして評価することができ、放射線影響すなわち実効線量を間接的に評価できることを示すことである。

2. 研究の目的

これまでの研究により、ウシ血液に放射線を照射した場合の血球中のDNAを対象とした評価が可能であることを示してきた。しかしながら、被ばく線量測定手法として適用する場合、細胞中に生じたDNA鎖切断と、PCRによって評価されたDNA切断量の関係を明らかにする必要がある。また、DNA鎖損傷に関するデータについて、ガンマ線と比較して中性子の報告例の少ない。PCRによる中性子線照射したDNA損傷についても評価した。また、実用化に向け、感度の向上を検討する必要がある。複数のプライマーを用いることで、PCRによって増幅するDNA領域を拡大することにより感度を向上させる方法について検討した。また、デジタルPCRを用いることで、1分子レベルでの評価を行った場合の感度の向上について検討した。最後に、放射線取扱施設での使用を模擬した実験を行った。本研究は、次の3つの項目に分けて実施した。①PCRにより細胞中のDNA鎖切断収量を推定する検討、②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)、③放射線取扱施設での実証実験をもとにした課題の抽出と解決、を行った。これらの成果を踏まえ、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最終目的とした。

3. 研究の方法

①PCRにより細胞中のDNA鎖切断収量を推定する検討:

哺乳動物細胞であるCHO-K1(チャイニーズハムスター卵巣単上皮細胞)にガンマ線を照射した場合のDNA二本鎖切断について、 γ H2AX 蛍光免疫染色法を用いて評価した。ガンマ線照射は大阪大学産業科学研究所のコバルト-60線源を用い、吸収線量は0~5Gyである。蛍光免疫染色にはDNA Damage Detection Kit- γ H2AX-Green(同仁化学研究所)を用いた。DSB部位に集積した γ H2AXに一次抗体を添加し、その後に染色溶液を及び二次抗体を添加し、その後、蛍光顕微鏡により細胞核あたりの γ H2AXのfoci数を計測した。

また、これまでDNA鎖損傷に関するデータについて、ガンマ線と比較して報告例の少ない中性子線の照射を行い、比較を行った。出芽酵母S288c株のゲノムDNAを生成し、PCRによりURA3遺伝子(804bp)を増幅させて得られたDNA分子を、TE緩衝液に溶解したものをサンプルとした(DNA濃度:1 μ g/ml)。サンプルに対し、大阪大学産業科学研究所の、コバルト-60線源を用い、ガンマ線を10~100Gy照射した。また、大阪大学の中性子発生装置OKTAVIANを使用して14MeVの高速中性子を照射した。MJ MiniOpticon PTC-1148サーマルサイクラー(Bio-Rad)を使用して、テンプレートDNAサンプルに対してqPCRを行い、ポリメラーゼ反応を阻害するDNA損傷量を評価した。

②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):

通常の PCR では 1 対のプライマーを用いて PCR を行う。2 対のプライマーを用いて PCR を行うことで、評価できる DNA 領域が広がり、感度が向上することが予想された。そこでね PCR によって増幅する DNA 領域を拡大することにより感度を向上させる方法について検討した。出芽酵母 S288c の URA3 領域 (804 bp) のサンプル DNA を 1 ng/ μ l になるように TE 緩衝液に溶解した。大阪大学産業科学研究所のコバルト-60 ガンマ線源からのガンマ線 0-1 Gy をサンプルに照射した。1 対のプライマーを用いて URA3 遺伝子のうち 236 bp を増幅した場合(シングルプライマー)、および 2 対のプライマーを用いて URA3 遺伝子のうちの 236 bp と 193 bp を増幅した場合について、リアルタイム PCR により DNA 損傷を評価した。

また、実際の現場では、100mGy 以下の比較的 low 線量での照射による DNA 鎖切断を評価する必要がある。本研究ではデジタル PCR を用いることで、1 分子レベルでの評価を行い、100mGy 以下の線量でも検出できるかどうか検討した。

③放射線取扱施設での実証実験をもとにした課題の抽出と解決:

実際の現場を模擬した環境として、軟 X 線発生装置(最大出力:5mA、60Vp)がある実験室内に、常温(25°C)にて 1 か月間、DNA を設置した場合の DNA 損傷量について、リアルタイム PCR により評価した。

4. 研究成果

項目①PCR により細胞中の DNA 鎖切断収量を推定する検討:

哺乳動物細胞である CHO-K1 (チャイニーズハムスター卵巣単上皮細胞)にガンマ線を照射した場合の DNA 二本鎖切断について、 γ H2AX 蛍光免疫染色法を用いて評価した。CHO 細胞でのガンマ線照射による γ H2AX foci 数の結果を図 1 に示す。培養を行わない場合、吸収線量の増加とともに foci 数、すなわち DNA 二本鎖切断の頻度が上昇した。一方で、3Gy 以上の照射では、DNA 二本鎖切断の頻度は一定となる傾向が観測された。PCR により得られた DNA 損傷量と吸収線量の関係においても、一定の吸収線量以上による DNA 損傷量の飽和の傾向がみられている。PCR による DNA 鎖切断頻度について、PCR による評価と類似していることが示された。

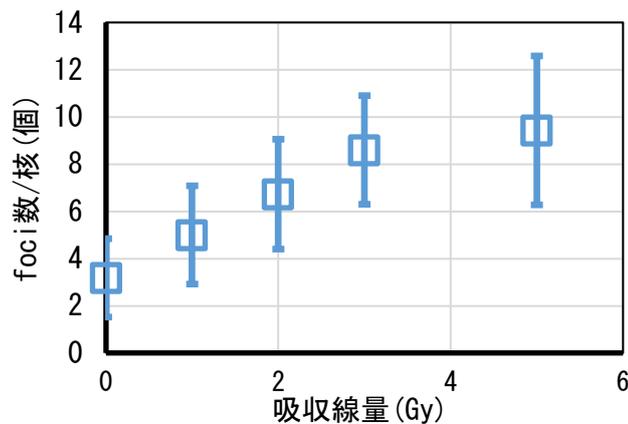


図 1 CHO 細胞にガンマ線を照射した場合の細胞あたりの γ H2AX foci 数

図 2 に 14MeV 中性子とガンマ線による DNA 損傷収率の評価結果を示す。ガンマ線照射の場合、DNA 損傷の割合は吸収線量に応じて増加した。ただし、14 MeV 中性子線の場合、50 Gy を超えると DNA 損傷率の傾きは緩やかとなった。この傾向は、14 MeV 中性子がガンマ線と比較して、よりポリメラーゼ反応を阻害する複雑な DNA 損傷を引き起こすことを示唆している。最小二乗近似によりガンマ線照射と 14 MeV 中性子照射による DNA 損傷のスロープを比較したところ、14 MeV 中性子はガンマ線と比較して qPCR をより阻害する DNA 損傷を引き起こす傾向があることが示された。スロープの傾きから、14 MeV 中性子はガンマ線の 1.13 倍の DNA 損傷を引き起こすと推測された。コロニー形成単位-脾臓による骨髓幹細胞の 10%生存率の RBE は、14MeV 中性子では 1.4、15MeV 中性子では 1.2 であり、PCR による解析結果と類似していると考えられる[1]。

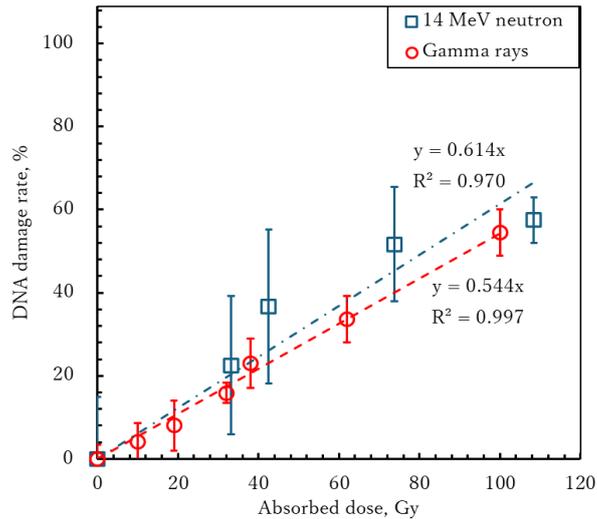


図2 14MeV中性子およびガンマ線を照射した場合のDNA損傷量

項目②実際の現場環境で求められる低線量放射線での評価が可能な方法の検討(感度の向上)

複数のプライマーを用いることで、PCRによって増幅するDNA領域を拡大することにより感度を向上させる方法について検討した。ガンマ線を照射した際の未損傷のPCR鋳型DNA量を図3に示す。図3より、ダブルプライマーを使用した際のPCR鋳型DNA量は、シングルプライマーを用いた際のPCR鋳型DNA量よりも減少傾向を持つことが示唆されたがT検定では有意な差が見られなかった。初期スロープの比較では、ダブルプライマーを使用した方ではスロープの傾斜が大きくなったことから、増幅範囲が拡大し、シングルプライマーで検出できないDNA損傷が検出された可能性がある。今後はデジタルPCRを用いてDNA1分子レベルでDNA損傷評価を行う事で検出感度の向上の評価ができる可能性を持つ。

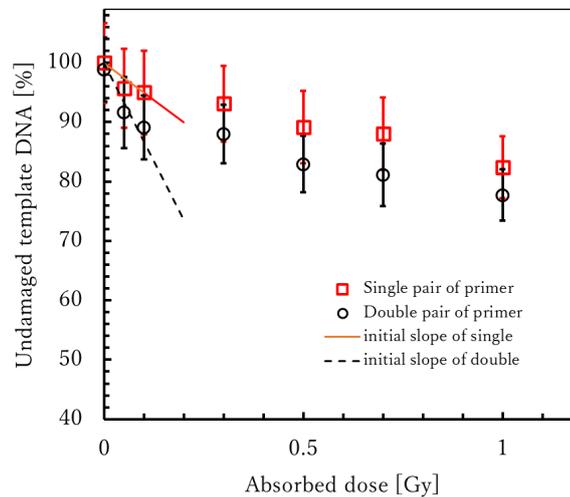


図3 ガンマ線を照射した場合の未損傷PCR鋳型DNA量

デジタルPCRを用いることで、1分子レベルでの評価を行い、100mGy以下の線量でも検出できるかどうか検討した。出芽酵母S288cのURA3領域(804bp)のサンプルDNAを10pg/μlになるようにTE緩衝液に溶解した。大阪大学産業科学研究所のコバルト-60線源からのガンマ線0~1Gyをサンプルに照射した。デジタルPCR(ProFlex PCR System, Applied biosystems社)を用いてURA3遺伝子の一部の236bp領域を増幅した。

結果を図4に示す。DNA合成の効率は吸収線量の増加とともに低下することが示された。この結果はDNA損傷がDNA合成反応の速度に影響を与えることを示している。さらに、t検定(0Gy対最大1Gy)により、本手法の最小感度は30mGyであることが示され(p<0.01)、これまでの定量PCRと比較して感度が向上したことが明らかとなった。

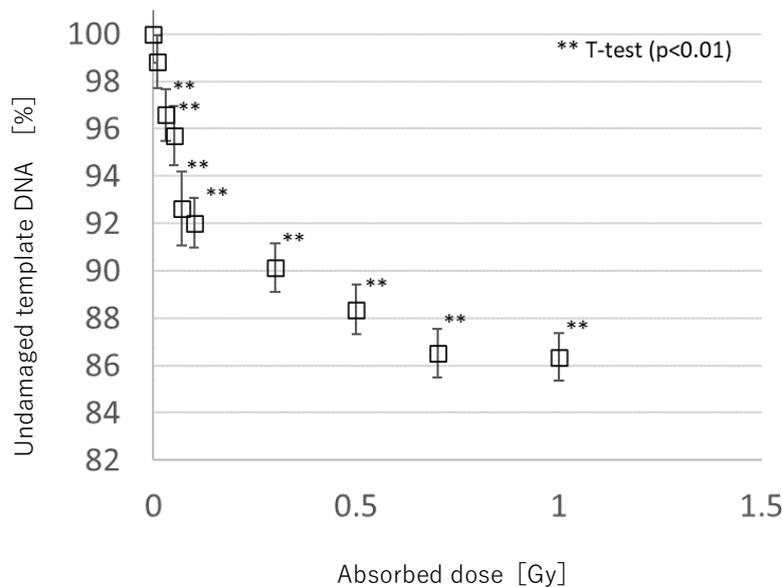


図4 デジタルPCRによるガンマ線を照射した場合の未損傷PCR 鋳型 DNA 量

項目③放射線取扱施設での実証実験をもとにした課題の抽出と解決：

実際の現場を模擬した環境として、軟X線発生装置(最大出力:5mA、60Vp)がある実験室内に、常温(25℃)にて1か月間、DNAを設置した場合のDNA損傷量について評価した。出芽酵母S288cのURA3領域(804bp)のサンプルDNAを1.0 ng/μlになるようにTE緩衝液に溶解した。軟X線発生装置がある実験室と、同じ温度条件である実験室に保管したサンプルについて、リアルタイムPCR(MJ Mini, Bio-Rad社)によりDNA損傷量を比較した。軟X線発生装置がある実験室と、同じ温度条件である実験室に保管したサンプルについて、DNA損傷の頻度は、誤差の範囲内で一致した。なお、軟X線発生装置表面の軟X線の漏洩は1 μSv/h以下であることが検査によりわかっており、本結果に問題はない。今後、実際に被ばくしたケースを模擬的に作り出し、ガラスバッチと併用するなどの検討を行う必要があると考えられる。

参考文献

[1] Ainsworth, E., Kelly, L. S., Mahlmann, L. J., Schooley, J. C., Thomas, R. H., Howard, J., Alpen, E. L., Response of Colony-Forming Units-Spleen to Heavy Charged Particles. Radiat. Res., 96, 180-197 (1983).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 村岡壮志, 松尾陽一郎, 清水喜久雄, 久米恭, 泉佳伸
2. 発表標題 放射線照射した酵母細胞の野生株およびRAD52遺伝子欠損株を用いたDNA鎖切断修復遺伝子の発現量解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 北野龍樹, 松尾陽一郎, 清水喜久雄, 泉佳伸
2. 発表標題 出芽酵母のDNA鎖切断修復遺伝子欠損株を用いた放射線感受性の評価
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口雅, 松尾陽一郎, 久米恭, 清水喜久雄, 泉佳伸
2. 発表標題 ポリメラーゼ連鎖反応を用いた放射線によるDNA損傷評価手法の検討
3. 学会等名 第4回放射線安全管理学会・保健物理学会合同大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamaguchi M., Matuo Y., Shimizu K., Izumi Y.
2. 発表標題 Study on proton beam-induced DNA damage by using PCR
3. 学会等名 The 15th international Workshop on Ionizing Radiation Monitoring (国際学会)
4. 発表年 2023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	久米 恭 (Kume Kyo) (50359238)	公益財団法人若狭湾エネルギー研究センター・研究開発部・室長 (83401)	
研究分担者	泉 佳伸 (Izumi Yoshinobu) (60252582)	福井大学・附属国際原子力工学研究所・教授 (13401)	
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
---------	---------