

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04939

研究課題名(和文)PCRおよび生体試料を用いた新規放射線被ばく評価の実用化のための研究

研究課題名(英文)Development of the new monitoring method for radiation exposure by using polymerase chain reaction

研究代表者

松尾 陽一郎 (MATUO, YOUICHIROU)

福井大学・学術研究院工学系部門・准教授

研究者番号：90568883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)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、未損傷鋳型DNA量を評価する手法を開発した。検討項目として、実際の使用状況を模擬した検証を行った。また、低LET放射線であるガンマ線および、高LETに属する炭素線を照射した場合のDNA損傷について評価した。さらに、ガンマ線を照射したDNAに対し、APサイトおよび酸化塩基を鎖切断に変換する酵素処理を行うことで、PCRによりDNA損傷の種類を区別できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAなどの生体分子への放射線の影響を直接的に検出・評価することにより線量評価を行う従来の手法は、感度が低く、低線量の放射線領域に適用することは難しい。本研究は、PCRという分子生物学の分野で用いられる技術を用いた、DNA鎖切断の評価に基づく新しい個人被ばく線量計開発を見据えた挑戦的な研究である。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と考えられる。また、放射線影響に基づく線量評価から放射線影響の評価までの幅広い分野に適用できる可能性を有する。

研究成果の概要(英文)：In this project, we focused on the fact that the amplification rate by polymerase chain reaction (PCR) is proportional to the amount of template DNA in a sample and developed a method to evaluate the amount of intact template DNA. As an item to consider, we conducted a verification that simulated actual usage conditions. We also evaluated DNA damage when irradiated with gamma rays, low-LET radiation, and carbon rays, which are high LET. Furthermore, by treating DNA irradiated with gamma rays with an enzyme that converts AP sites and oxidized bases into strand breaks, it has been shown that it is possible to differentiate the types of DNA damage using PCR.

研究分野：放射線生物学、原子力工学

キーワード：放射線 DNA損傷 放射線影響

1. 研究開始当初の背景

これまでに個人の放射線被ばく線量を測定するために、OSL 素子やフィルムバッジ等が実用化されているが、これら既存の個人線量計で用いられるメカニズムは、光刺激ルミネッセンス現象やフィルムの感光作用などの物理・化学的作用を応用したものである。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二本鎖 DNA 切断が主であると考えられている。米国研究評議会(NRC)内の放射線影響研究評議会の BEIR-VII 報告書(2005)では、放射線発がんの機序として DNA 損傷(特に DNA 鎖切断)起源の突然変異説が採用されている。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が主であると考えられている。

生体分子の放射線による損傷を検出する手法としては、プラスミド DNA を対象としたゲル電気泳動(Milligan, J. R., et al., Radiat. Res. 145, 442-448, 1996) やコメットアッセイがある(Mckelvey-martin, V. I. et al., Mutation Res. 288, 47-63, 1993)。これらの手法は、損傷を受けた DNA を電気泳動により分離し、ゲル中の DNA 分子を蛍光染色した後、画像分析して損傷量を評価するという原理であり、精度がよく、定量性が高い一方で、評価に長時間必要な上に、ゲル中の蛍光を読み取る検出感度に限界があり比較的高線量の研究にのみ適応されるという課題があった。放射線による生体分子の損傷を高感度・簡便に検出する手法は、放射線による安全管理や放射線医療分野での治療計画立案のために重要である。そこで申請者らのグループは、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てきた。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。本手法の原理としては、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(図 1)。これまでの研究により、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が明らかとなった(Y. Matuo, et al., Radiation Measurements, 55, pp.93-95, 2013)。この DNA 合成効率の低下は、鋳型 DNA に生成した脱塩基や酸化損傷および鎖切断に起因すると考えられる。

本研究では、いまだ解決できていない課題である(i)感度の向上、(ii)実用化に向けた DNA 素子化の検討、(iii)線質・線量の推定方法の確立、に対応した課題を設定した。

2. 研究の目的

原子力研究施設や放射線利用施設などでの安全管理のために、個人被ばく線量計や人体組織に近い水等価な化学線量計が使用されている。より実際の生体試料に使い DNA などを利用して放射線による影響を評価し、被ばく線量評価が可能な手法を開発・整備し、これを併用することが理想的であると考えられる。本研究は、DNA 損傷という生体反応を指標として、電離放射線による DNA 損傷の収量を評価し、生体試料を用いた吸収線量を推定するための新規手法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、(i)感度の向上、(ii)実用化に向けた DNA 素子化の検討、(iii)線質・線量の推定方法の確立、の 3 つの課題を設定した。

(i)感度の向上:

DNA の配列が異なる場合、DNA 鎖切断の収量が異なる可能性がある。オリゴヌクレオチドの塩基配列として、URA3 遺伝子の一部の配列と TGT 配列のほかに TGT 配列のグアニン(G)の有無での比較として、5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'のようにチミン(T)が連続した配列(以降 TTT 配列と表記する)の三種類の配列の蛍光修飾オリゴヌクレオチドを用いた。オリゴヌクレオチドの 5'末端を蛍光物質(6-FAM)、3'末端をクエンチャー物質(TAMRA)で蛍光修飾した URA3 配列、TGT 配列、TTT 配列の蛍光修飾オリゴヌクレオチドを合成し、PBS 緩衝液を溶媒として 100nM に調整した。大阪大学産業科学研究所にて、コバルト 60 線源を用いてサンプルに 10~100mGy のガンマ線(LET: 0.2keV/μm)を照射した。蛍光スペクトル測定のために蛍光分光光度計 FP-8500(JASCO)を用いた。蛍光分光光度計の測定条件として、バンド幅を 2.5nm、走査速度を 50nm/min、蛍光波長の測定範囲を 500~550nm、励起波長は 494nm とした。

(ii)実用化に向けた DNA 素子化の検討:

実際に放射線作業従事者が、本手法に拠る DNA 素子を使用する場合、DNA を長期間・小型化した状態で携帯する必要がある。また、大量のサンプル処理を実現しなくてはならない。このための検討を行う必要がある。

実際の使用状況を模擬した検証として、出芽酵母の URA3 遺伝子領域をサンプルとし、1ng/μl に TE 緩衝液で希釈した溶液を湿式として、室温の条件で 30 日間保存した。また、1ng/μl に TE 緩衝液で希釈した溶液をガラス上に固定した場合を乾式として、それぞれ PCR による DNA 合成効率を評価した。

(iii)線質・線量の推定方法の確立：

低 LET(線エネルギー付与)の放射線であるガンマ線、および高 LET 放射線である炭素粒子線を照射した場合の、DNA 鎖に生じる損傷の収率について PCR を用いて評価した。出芽酵母 S288c の *URA3* 領域の DNA(804 bp)を PCR により増幅し、精製したサンプル(0.1 pg/μl)に対して、大阪大学産業科学研究所コバルト 60 照射施設にてガンマ線照射した。また、量子科学技術研究開発機構の HIMAC にて、炭素線(LET:13.3keV/μm)を照射した。吸収線量をそれぞれ 0-1Gy である。デジタル PCR(Pro Flex PCR system)を用いて DNA 損傷の収率を評価した。

また、PCR を用いた本手法により、DNA 鎖切断や AP サイト(脱塩基部位)切断および塩基の酸化といった DNA 損傷の種類を区別できるかどうか明らかではなかった。そこで、ガンマ線を照射した DNA に対し、酸化塩基および AP サイトを鎖切断に変換する酵素処理を行うことで、損傷の種類を区別できるかどうか検証した。具体的には、TE 緩衝液に出芽酵母 S288c の *URA3* 領域(804 bp)の DNA 1 ng/μl となるよう調製した。大阪大学産業科学研究所コバルト 60 照射施設のガンマ線を 0.05-1 Gy、常温下で照射した。また、照射したサンプルに対して Fpg 酵素(BioLab 社)を添加し、37°Cで 1 時間培養し、塩基損傷及び AP サイトを鎖切断に変換した。酵素処理を行ったサンプル及び未処理のサンプルを鋳型 DNA として、PCR を行った。PCR は、Mini-Opticon(CFD-3120、Bio-Rad 社)を使用し、236 bp の領域を増幅させた。未照射の場合の未損傷鋳型 DNA 量を基準値とし、吸収線量に伴う未損傷鋳型 DNA 量の変化を評価した。

4. 研究成果

(i)感度の向上：

図 1 に PBS 緩衝液に溶解させた蛍光修飾オリゴヌクレオチドの γ 線を照射した際の各配列の蛍光強度比の結果を示す。TTT が連続する配列内に G が 1 塩基含む配列は、ランダムな塩基配列(出芽酵母の *URA3* 遺伝子座の一部の配列)と比較して、DNA 鎖切断が生じやすいことが示された。塩基配列を変化させることで、DNA 損傷評価の感度が変わることが示唆された。

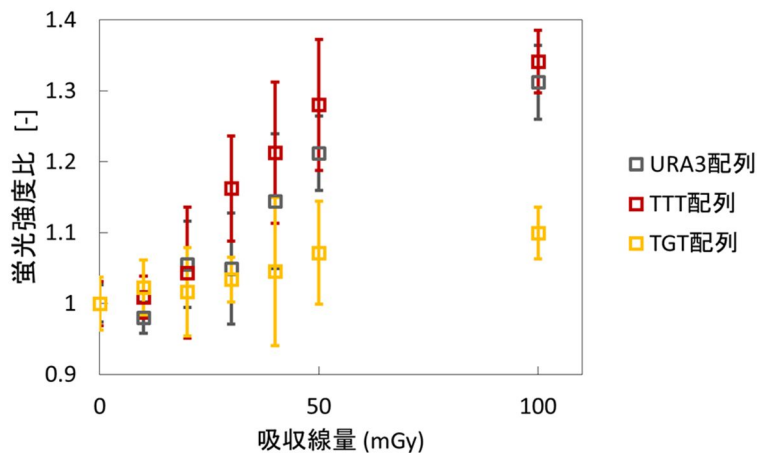


図 1 PBS 緩衝液に溶解させた蛍光修飾オリゴヌクレオチドの γ 線を照射した際の各配列の蛍光強度比 (励起波長; 494 nm, 極大蛍光波長; 517 nm、サンプル数 5、エラーバーは標準偏差を表す)

(ii)実用化に向けた DNA 素子化の検討：

湿式として TE 緩衝液中に室温の条件で DNA 保存した場合、および乾式としてガラス上に固定した DNA に対して PCR 効率を評価した。湿式については 30 日間、乾式についても同様に 30 日間の保存によっても PCR による評価効率が低下しないことが示された。

(iii)線質・線量の推定方法の確立：

図 2 に、炭素線および比較としてガンマ線を DNA に照射した場合の、吸収線量の増加に伴う未損傷の PCR 鋳型 DNA 量を示す。結果として、炭素線(LET:13.3keV/μm)を照射した場合、ガンマ線を照射した場合と比較して未損傷の鋳型 DNA 量が増加した。1Gy では DNA 損傷の収率が約 3% 高くなることが示された。これはガンマ線照射と比較して、炭素線によって、PCR を阻害する DNA 損傷が多く生じたことを意味している。

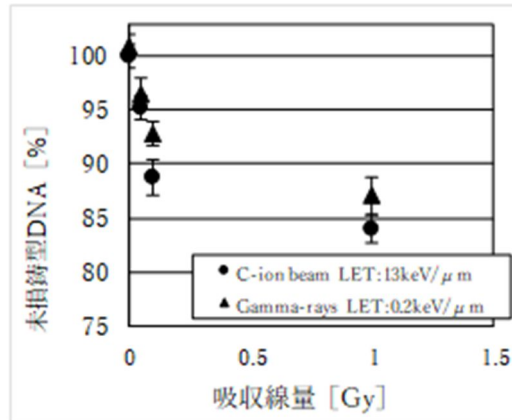


図2 炭素線およびガンマ線を DNA に照射した場合の、吸収線量の増加に伴う未損傷の PCR 鋳型 DNA 量 (N = 4)

ガンマ線を照射した場合のみ損傷鋳型 DNA 量の変化を図 3 に示す。吸収線量の増加に伴って、未損傷の PCR 鋳型 DNA 量が減少する傾向が確認できた。また、Fpg 酵素処理によって塩基損傷及び AP サイトを鎖切断に変換した方が、未処理のものよりも鋳型 DNA 量が減少した。本研究で使用した PCR 試薬は、AP サイトでは反応が阻害され、塩基損傷では乗り越え合成を行うことが報告されている[1]。したがって、PCR で評価している DNA 損傷は鎖切断と AP サイトが混在したものであることが実験結果より示唆された。以上のことから、PCR により DNA 損傷の種類を区別できる可能性が示された。

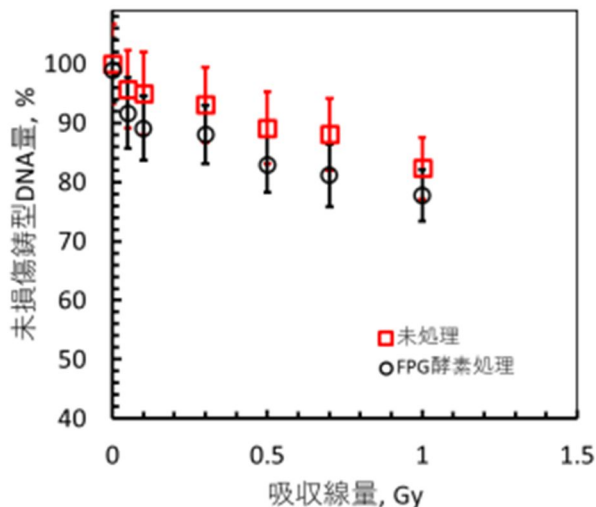


図3 FPG 酵素処理の有無によるガンマ線を DNA に照射した場合の、吸収線量の増加に伴う未損傷の PCR 鋳型 DNA 量 (N = 6)

参考文献

[1] Jan A. S. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 323, pp. 823-830 (2004).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山口雅、松尾陽一郎、清水喜久雄、久米恭、泉佳伸
2. 発表標題 PCR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回日本保健物理学会・日本放射線安全管理学会合同大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Miyabi YAMAGUCHI, Youichirou MATUO, Kikuo SHIMIZU and Yoshinobu IZUMI.
2. 発表標題 Study on proton ion beam-induced DNA damage by using PCR.
3. 学会等名 The 13th International Workshop on Ionizing Radiation Monitoring (IWIRM). (国際学会)
4. 発表年 2022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	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)	

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
---------	---------