

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24651042

研究課題名(和文)採血時間に依存しない高速性・安定性を備えた被ばく線量評価バイオマーカー

研究課題名(英文)Development of a novel biomarker which useful for biodosimetry in the radiation emergency medicine

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大規模放射線災害時には速やかに被ばく線量を推定する必要がある。本研究では、メタボロミクスによる新規被ばくバイオマーカーの検索を目的とした。

ヒト末梢血モデルにおいては、末梢血に5 GyのX線を照射し、分離リンパ球をPHAで刺激培養した。また、マウス被ばくモデルでは、マウスにX線を照射し、7日後に採血した末梢血の分離リンパ球を分裂刺激剤で刺激培養した。培養上清および細胞抽出液を解析試料として高極性カラムおよび四重極・飛行時間型質量分析計により試料を分析後、主成分分析(PCA)を行った。解析により、被ばく線量評価マーカー候補となるメタボライトが複数検出された。

研究成果の概要(英文)：It is necessary to estimate immediately the individual exposure dose in a large-scale radiation accident. In this study metabolomics were performed in human peripheral blood ex vivo irradiation model or mouse in vivo irradiation model in order to develop a novel biomarker which useful for biodosimetry in the radiation emergency medicine.

In human peripheral blood ex vivo irradiation model, whole blood was irradiated with X-ray. And, mice were irradiated with x-ray in mouse in vivo irradiation model. The isolated lymphocytes were cultured in the presence of mitogen. The supernatants and cell extracts were applied a non-targeted MS-based metabolomics analysis using a high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. Multivariate analysis of the obtained metabolites showed clear separation between the groups in both human and mouse irradiation model, and some candidates which useful for biomarker were detected in irradiated group.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：緊急被ばく医療 バイオドシメトリー バイオマーカー 放射線 メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

生物学的被ばく線量評価の国際的ゴールドスタンダードである二動原体性染色体(DIC) (IAEA, Vienna 2001) 法には48時間の培養が必要であり、さらに解析に時間を要することから、大規模災害時の大量傷病者発生の際には直ちに結果を報告することが困難となる。一方、血清中タンパク質 (Ossetrova NI, Int J Radiat Biol. 2009, Health Phys. 2010) を指標とした線量評価は、高速処理可能であるが被ばく後の経時的变化が著しく、また、連続照射における正確な動態が不明である。従って、高速処理可能かつ生体試料(血液)採取時間に依存しない被ばく線量評価バイオマーカーの開発が必要である。我々は末梢血リンパ球培養による染色体変異を指標とした被ばく線量評価を実施しており、染色体変異解析と検体を共用可能である。

2. 研究の目的

生物学的被ばく線量評価において、大規模放射能汚染事故の大量傷病者発生に対応可能な高速処理可能かつ生体試料(血液)採取時間に依存しない被ばく線量評価バイオマーカーの開発が必要である。本課題は、UPLC-MS/MS システムを用い、ヒト末梢血リンパ球 ex vivo 被ばくモデルにおける代謝物の網羅的解析を行い、採血時間に依存しないハイスループット被ばく線量評価バイオマーカーの開発を目的とする。また、新規被ばく線量バイオマーカーに及ぼす放射線感受性影響を染色体異常解析と比較解析すると共に、測定法の最適化及び簡易測定法の開発を行う。さらに、住民や作業員の連続被ばくへの対応を想定し、動物照射モデルを用いて新規バイオマーカーの有用性を検証する。本研究により開発されるバイオマーカーは、染色体解析への前段階スクリーニング法としての応用が期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒト末梢血 ex vivo 被ばくモデル

20代の男女8名の末梢血に5 Gy (1.0 Gy/min) のX線を照射し、分離リンパ球をPHA刺激下で培養後、経時的(0, 24, 48 h)に回収・処理した。培養上清および細胞抽出液を解析試料として高極性カラムおよび四重極・飛行時間型質量分析計(Q-TOF/MS)により試料を分析後、Marker View®(AB SCIEX)による主成分分析(PCA)を行った。

(2) マウス in vivo 被ばくモデル

C57BL/6J マウスに、0.75 Gy および 1.5 Gy のX線(1.0 Gy/min)を照射し、7日後に採血した末梢血の分離リンパ球を concanavalin A および phytohaemagglutinin 刺激下で24時間培養した。培養後に細胞浮遊液を回収し、高速液体クロマトグラフィーおよび四重極・飛行時間型質量分析計(Q-TOF/MS/MS)により培

養上清および細胞抽出液中の代謝物を網羅的に分析し、さらに Marker View®(AB SCIEX)による主成分分析(PCA)を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト末梢血 ex vivo 被ばくモデル

PHA 刺激下で培養した PBL の細胞内メタボライトについて PCA による解析を行った。positive mode および negative mode では、培養時間(0, 24, 48 h)および X 線照射群と非照射群との間で各群のプロットが散在しており、グルーピングは困難であった。しかし、negative mode の 0 時間対 24 時間培養の組み合わせに着目すると、scores plot において培養時間および X 線照射群・非照射群との間でグルーピングが可能であった。この組み合わせについて loadings plot を解析した結果、複数のメタボライトを検出することができた。また、0 時間対 48 時間培養の組み合わせにおいても同様の結果を得ることができた。以上のことより、negative mode に関しては、X 線照射および培養時間の 24 時間後、48 時間後それぞれでグルーピングに寄与する分子の存在が示唆される。

培養中に細胞内で生成したメタボライトの中には細胞内にとどまるものだけでなく、培養上清中に遊離してくる分子も存在する。そこで、培養上清についても PCA による解析を行った。negative mode に関しては、細胞抽出液と同様に各群のプロットが散在しており、グルーピングは困難であったものの、positive mode による計測では培養時間(0, 24, 48 h)および X 線照射群と非照射群との間でグルーピングを確認できた。そこで、培養上清の positive mode による解析に注目したところ、0 時間対 24 時間培養のサンプル間で X 線照射の有無および培養時間でグルーピングが可能であり、loadings plot よりメタボライトを複数検出することができた(図 1)。さらに、0 時間対 48 時間培養のサンプル間でも X 線照射の有無および培養時間でグルーピングおよびメタボライトの検出が確認できた。

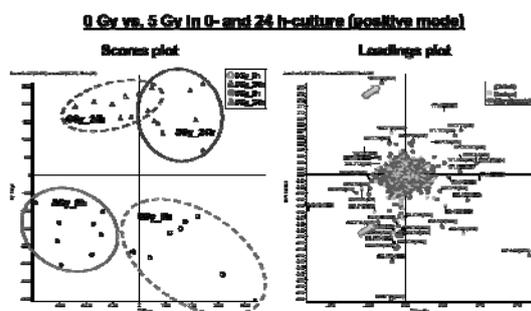


図 1. 培養後 24 時間におけるヒト末梢血リンパ球培養上清中メタボライトの PCA 解析結果。

(2) マウス in vivo 被ばくモデル

PHA および ConA 刺激下で培養した PBL の細胞内メタボライトについて PCA による解析を行った。HILIC カラムを用いた場合, positive mode および negative mode の双方で非照射群, 0.75 Gy 照射群, 1.5 Gy 照射群のグルーピングが可能であった。また, C18 カラムを用いた場合も positive mode および negative mode の双方で 3 群のグルーピングが可能であった (図 2)。それぞれについての loadings plot を解析した結果, 複数のメタボライトを検出することができた。また, ANOVA においても 3 群の有意差が認められたメタボライトが多数検出できた。以上のことより, X 線照射によるグルーピングに寄与する分子の存在が示唆される。

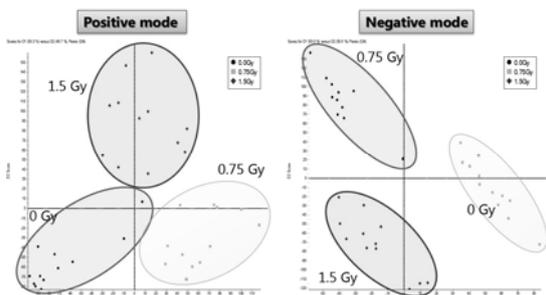


図 2. C18 カラムを用いた培養上清メタボライトの PCA 解析結果。

培養上清についても PCA による解析を行った。こちらも細胞抽出液と同様に, HILIC カラムを用いた場合, positive mode および negative mode の双方で, 非照射群, 0.75 Gy 照射群, 1.5 Gy 照射群のグルーピングが可能であった。C18 カラムを用いた場合も positive mode および negative mode の双方で 3 群のグルーピングが可能であった (図 3)。それぞれについての loadings plot よりメタボライトを複数検出することができた。また, ANOVA においても 3 群の有意差が認められたメタボライトが多数検出できた。したがって, 細胞上清中にも X 線照射によるグルーピングに寄与する分子の存在が示唆される。

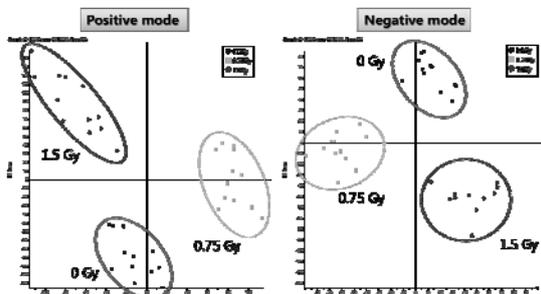


図 3. C18 カラムを用いた細胞抽出液中メタボライトの PCA 解析結果。

それぞれの loadings plot より検出した培養上清中のバイオマーカー候補物質について, Peak View(AB SCIEX)の Formula Finder により解析を行った (表 1)。これにより 8

つの物質について分子式が推定された。

表 1. バイオマーカー候補リスト

	Peaks (mz/rt)	p.value	-log10(p)
1	941.7026/12.04	0.00	9.05
2	286.9896/10.25	0.00	8.94
3	969.7388/9.33	0.00	4.46
4	184.0047/12.38	0.00	4.06
5	409.1129/10.08	0.00	3.51
6	320.1986/8.85	0.00	2.69
7	429.0891/11.38	0.00	2.66
8	101.0588/6.2	0.00	2.64
9	467.1011/5.94	0.00	2.53
10	304.2824/6.64	0.00	2.53
11	445.1197/11.38	0.00	2.51
12	465.6574/11.38	0.00	2.49
13	121.0644/8.52	0.00	2.33
14	462.1468/11.38	0.01	2.20
15	986.7633/12.33	0.01	2.16
16	646.4714/9.56	0.01	1.95
17	248.0335/12.48	0.01	1.92
37	536.16465/11.72	0.04	1.44
38	297.0892/6.45	0.04	1.38
39	390.298/8.56	0.04	1.36
40	260.01/12.34	0.05	1.34
41	519.1371/6.26	0.05	1.34
42	482.3596/8.52	0.05	1.33
43	669.179/10.72	0.05	1.32
44	371.10295/8.2	0.05	1.32
45	357.0489/11.38	0.05	1.32

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 0 件)

[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：
 出願年月日：
 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

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

(2) 研究分担者

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

吉田 光明 (Yoshida, A. Mitsuaki)
弘前大学・被ばく医療総合研究所・教授
研究者番号：60182789

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