

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461906

研究課題名(和文)放射線被曝に由来するDNA過酸化物質・染色体の解析と抗酸化物質による予防法の開発

研究課題名(英文) Basic study of the peroxide production in mouse's tissue by X-ray irradiation, and protective effects of the anti-oxidizing agent(extracts from basidiomycetes) on radiation damages.

研究代表者

宇野 隆(UNO, TAKASHI)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30302540

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)：4.5Gyの全身照射マウスの血漿から照射5～7日後に8-OHdGが検出され、胸腺や脾臓の組織からは照射5日前後で陽性像が認められた。8-BrdGでは胸腺・脾臓組織に照射5日前後の早い時期に陽性像が確認された。8.0Gy全身照射マウス生存率に対して「担子菌抽出物」投与群では明らかな生存率の上昇(約2倍)が認められた。投与開始時期の検討から、この放射線防護機序はラジカルスカベンジャーとしての働きではなく、照射により傷害を受けた細胞の回復または修復に作用する可能性が示唆された。また、照射マウスの精子数およびリンパ球の活性が「担子菌抽出物」投与により増加する傾向が認められた。

研究成果の概要(英文)：This present study was planned to investigate on peroxide productions (8-OHdG and 8-BrdG) after the X-ray exposure to mice, and protection effects from radiation damages by antioxidant prescription (extracts from basidiomycota : "extracts").

(1) The peroxide of DNA (8-OHdG) was detected in 4.5Gy irradiated mice plasma for 5 to 7 days after irradiation. The positive spots (8-OHdG) of thymus and spleen preparations in mice were detected in 5 days after irradiation. The positive spots of an oxidative stress marker (8-BrdG) in thymus, spleen were detected in 1 day and/or 3days after irradiation. (2) The survival rate of the male ICR mice exposed to 8.0Gy whole-body X-ray irradiation, all administered groups of "extracts" were increase the survival rate. The radiation death was caused by the radiation intestinal damages (sepsis by mouse's enteric bacteria). The sperm count and lymphocyte activity in irradiated mice were suggested to elevated by "extracts" administration.

研究分野：医学薬学

キーワード：放射線治療生物学 過酸化物質 放射線防護

## 1. 研究開始当初の背景

(1) がん放射線治療では治療装置等高精度化により、正常組織の被ばく線量が低減可能となった。しかし強度変調放射線治療のような最新の照射技術では、高線量域が腫瘍に集中するため、正常組織の高線量ひばく容積が縮小する。しかし、その代償として低線量を被ばくする領域が従来の照射法よりも外側まで拡大する。また、医療以外にも福島第一原子力発電所の事故により発生した放射性物質の拡散では、現場で働く作業員および周辺の一般公衆に対する微量の放射線被ばく影響が国民に懸念されている。ヒトに対する放射線被ばく線量と DNA 過酸化物との関連を解析することは、放射線障害を推定して障害の予防に寄与する可能性があると思われる。

(2) 放射線照射による障害は生体分子に反応性に富むラジカル種を生じさせ、DNA や脂質などの損傷を引き起こすことによって発生する。DNA 修飾は修復酵素により修復されるが、修復の際に間違った塩基配列になる可能性がある。この修復ミスが細胞の増殖やその抑制を制御する遺伝子で生じた場合には、発がんへと発展していくと考えられており、DNA 修飾の修復ミスを減少させて発がんへの過程を断つことが重要と考えられる。最近、DNA 過酸化物の初期生成物である 8-OHdG(8-ヒドロキシデオキシグアノシン)や早期炎症性バイオマーカーである 8-BrdG(8-プロモデオキシグアノシン)が注目されている。これらの DNA 過酸化物の研究は、主に食品による抗酸化作用を評価するために研究されており、放射線照射および障害との関連についての報告は少ない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では、マウスの全身照射を実施して照射線量と DNA 過酸化物の動態を解析する。指標とするマーカーは DNA 酸化物質

8-OHdG と早期炎症性 8-BrdG であり、これら過酸化物質の増減と照射線量および照射後の経過時間との関係について解析する。

(2) 免疫担当細胞の活性化、全身照射に対するマウスの生存率の上昇が認められている「培養担子菌抽出物」の放射線防護効果について DNA 過酸化物との関連を検討して放射線障害からの機序を解析する。

## 3. 研究の方法

(1) 使用動物：ICR および CS 雄マウスを 4~5 週齢にて購入(日本 SLC 社)し、約 1 週間程度の予備飼育後に実験に使用した。

(2) X 線発生装置：当研究室に設置されている X 線発生装置(MBR-1520R-3:日立メデコ社)を用いて管電圧 150kV、管電流 20mA、線量率 3.1~3.5Gy/分で照射を実施した。

(3) 照射方法：マウスを直径 25mm x 厚さ 45mm (12 区分)のアクリル製照射用ケージに入れ、無麻酔で全身照射を実施した。

(4) マウス血液中 8-OHdG 濃度の測定および組織の免疫染色：マウスに 4.5Gy の X 線照射を実施し、照射 1 日から 28 日後のマウスを過麻酔にて安楽死させて腹大静脈からヘパリン加採血を行なった。血液は直ちに血漿に分離して 8-OHdG の測定まで保存した。また、これらのマウスから放射線に感受性の高い胸腺および脾臓を摘出して 8-OHdG および 8-BrdG の免疫染色を行なった。これらの血中濃度の測定および組織の免疫染色は(株)ヘルスケアシステムズに依頼した。

(5) 培養担子菌抽出物：*Agaricus blazei Murrill*、岩出101株の培養菌糸体と子実体の熱水抽出物(蛋白質グルカン数%を含む多糖体、以下：抽出物)を岩出菌研究所より提供を受け、さらに精製を加えた。

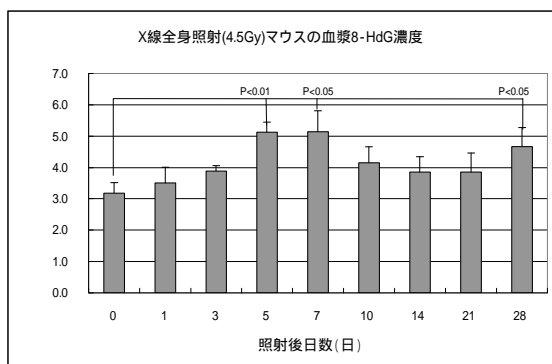
(6) 精子数の計測：マウスを過麻酔により死亡させ、両側の精巣上体尾部(epididymis)を採取した。直径3cmのシャーレにHEPES-HIFメチウムを入れ、精巣上体尾部をハサミにて10

回程度カットして37℃にて20分培養する。残渣を除き精子溶液とし血球計算板にて測定した。両側の精巣上体に存在する精子数を総数とした。

(7) マウス脾リンパ球のトリチュウム・チミジン取り込み試験：過麻酔により死亡させた正常マウスより脾臓を摘出してX線照射によって傷害を受けたリンパ球に対して[3H]-Thymidine(以下：[3H]-TdR)の取り込み量からDNA合成能を測定して損傷の程度を推定した。また、コンカナバリンA(以下：ConA)を使用してT細胞分裂能力を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 4.5Gy 全身照射マウス (CS、5週齢)の血漿 8-OHdG 濃度：マウスの血漿には非照射時においても 3.17ng/ml の 8-OHdG が認められた。照射 5~7 日後では 8-OHdG の有意な上昇 (約 1.65 倍) が認められ、28 日後には約 1.5 倍の有意差を伴う増加みられた。その



他、照射 1~3 日後および 10~21 日後では、1.2~1.3 倍の増加傾向がみられた。

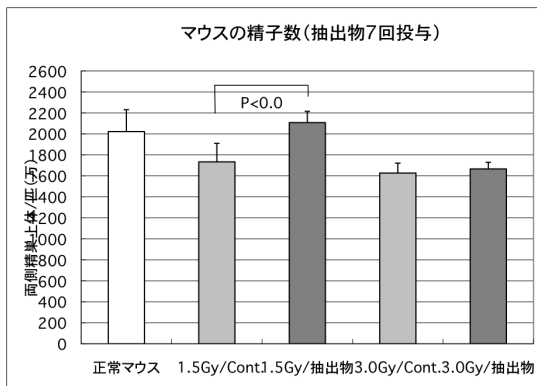
(2) 4.5Gy 照射マウスの胸腺・脾臓組織における 8-OHdG および 8-BrdG の免疫染色：放射線に感受性の高いマウスの胸腺組織標本からの免疫染色では、照射 3 日および 5 日後で 8-OHdG 陽性像が認められた。脾臓の標本では、照射 5 日、7 日後に 8-OHdG の陽性像がみられた。さらに 8-BrdG では、胸腺標本で照射 3 日後に陽性像が確認され、脾臓標本からは照射 1 日および 3 日後の早い時期に陽性像が認められた。

(3) 高線量照射マウスに対する「抽出物」の放射線防護効果：8.0Gy 単回全身照射マウス (LD50/30 線量、ICR、6 週齢) に対して明らかな生存率の上昇が認められた。すなわち、マウスの生存率は「抽出物」の投与開始時期によって異なり、照射単独群 (生理食塩水投与：生存率 42%) に対し、「担子菌抽出物」の照射 3 日前投与開始群 (生存率 67%) および照射直後投与開始群 (生存率 75%) より、照射 3 日後からの投与開始群 (生存率 83%) で最も生存率が高い結果が得られた。これらの結果から、「担子菌抽出物」の放射線防護機序は照射によって生じるフリーラジカルの補足剤としての働きではなく、照射後に傷害を受けた細胞の回復または修復に作用する可能性が示唆された。また、被ばくにより死亡したマウスの血液からは腸内細菌が検出され、死因は敗血症と推測された。

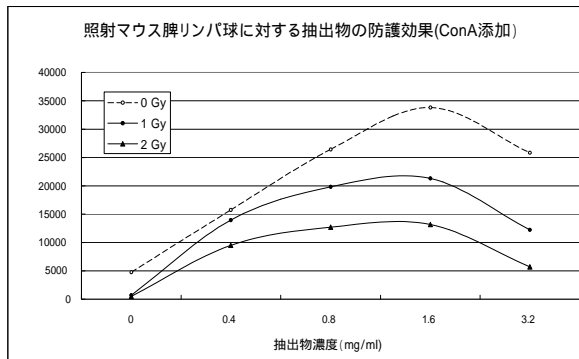
(4) 低線量全身照射マウスによる性腺への影響：単回照射後 (1.5Gy および 3Gy、ICR、6 週齢) の精子数は、正常マウス (非照射) に対して 1.5Gy 照射単独群で約 14% の減少がみられた。しかし「抽出物」投与群では照射による精子の減少がみられず、単独投与群との間に有意差が認められた。一方、3Gy 照射マウスでは「抽出物」投与の有無に関わらず 18~20% の減少がみられた。

4.5Gy 全身照射マウスでは精子数が著しく減少し、照射数週間では正常マウスの 2.0% (照射単独群) および 3.9% (抽出物投与群) の精子数であった。また、精子生存率は、正常マウスの 93.4% に対して 66.1% (照射単独群) および 80.1% (抽出物投与群) であり、4.5Gy の被ばくでは、両群とも永久不妊となる可能性が示唆された。

(5) マウス脾リンパ球に対する被ばく影響と「抽出物」の防護効果 (*in vitro*)：リンパ球は放射線の感受性が高く、1~2Gy の照射により非照射リンパ球の 10~14% にまで [3H]-TdR の取り込み量が低下した。しかし、



「抽出物」の添加により[3H]-TdRの取り込み量の増加が認められた。この増加は添加量に依存して1.6mg/mlまで認められた。「抽出物」0.8mg/ml添加時では、非照射リンパ球に対して[3H]-TdR取り込み量は1Gy照射リンパ球で74.9%、2Gy照射では48%までの回復



がみられた。また、これらの[3H]-TdRの取り込みは照射の後に「抽出物」を添加することにより明らかに増加する傾向が認められた。

以上の結果より、放射線被ばくに非常に感受性の高い精巣やリンパ球に対して「担子菌抽出物」は、被ばくの損傷からの回復もしくは修復に寄与する可能性が示唆された。今後は、低線量被ばくによる性腺の障害について長期に亘る検討を実施したい。

##### 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](査読有り、8件中8件)

[2015年]

1. Hanawa S, Mitsuhashi A, Usui H, Yamamoto N, Watanabe-Nemoto M, Nishikimi K, Uehara T, Tate S, Uno T, Shozu M. Daily low-dose Cisplatin-based concurrent chemoradiotherapy for the treatment of cervical cancer in patients 70

years or older. *Int J Gynecol Cancer*. 2015 Jun;25(5):891-6. PMID:25811592

2. Kurokawa M, Watanabe Nemoto M, Harada R, Kobayashi H, Horikoshi T, Kanazawa A, Togasaki G, Abe Y, Chazono H, Hanazawa T, Okamoto Y, Uno T. Initial experience of radiotherapy plus cetuximab for Japanese head and neck cancer patients. *J Radiat Res*. 2015;56:849-855.

3. Watanabe Nemoto M, Nozaki-Taguchi N, Togasaki G, Kanazawa A, Kurokawa M, Harada R, Kobayashi H, Isono S, Uno T. New approach to relieving pain and distress during high-dose-rate intracavitary irradiation for cervical cancer. *Brachytherapy*. 2015;14:642-647. PMID: 26024785

[2014年]

4. Mitsuhashi A, Usui H, Nishikimi K, Yamamoto N, Hanawa S, Tate S, Watanabe-Nemoto M, Uno T, Shozu M. The Efficacy of Palonosetron Plus Dexamethasone in Preventing Chemoradiotherapy-induced Nausea and Emesis in Patients Receiving Daily Low-dose Cisplatin-based Concurrent Chemoradiotherapy for Uterine Cervical Cancer: A Phase II Study. *Am J Clin Oncol*. 2014. MID:25144265

5. Harada K, Murakami N, Kitaguchi M, Sekii S, Takahashi K, Yoshio K, Inaba K, Morota M, Ito Y, Sumi M, Suzuki S, Tobinai K, Uno T, Itami J. Localized ocular adnexal mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma treated with radiation therapy: a long-term outcome in 86 patients with 104 treated eyes. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014;88:650-4. PMID:24521680

6. Tomita N, Kodaira T, Teshima T, Ogawa K, Kumazaki Y, Yamauchi C, Toita T, Uno T, Sumi M, Onishi H, Kenjo M, Nakamura K. Japanese structure survey of high-precision radiotherapy in 2012 based on institutional questionnaire about the patterns of care. *Jpn J*

Clin Oncol. 2014; 44:579-86. PMID: 24729623

7. Watanabe Nemoto M, Isobe K, Togasaki G, Kanazawa A, Kurokawa M, Saito M, Harada R, Kobayashi H, Ito H, Uno T. Delayed renal dysfunction after total body irradiation in pediatric malignancies. J Radiat Res. 2014;55:996-1001. PMID:24914103

8. Akutsu Y, Kono T, Uesato M, Hoshino I, Murakami K, Aoyagi T, Ota T, Toyozumi T, Suito H, Kobayashi H, Harada R, Uno T, Matsubara H. Is the Outcome of a Salvage Surgery for T4 Thoracic Esophageal Squamous Cell Carcinoma Really Poor? World J Surg. 2014;38(11):2891-7. PMID:24952078

和文

1. 宇野 隆 . がん患者支援とがんサバイバーの QOL: 9. 再発がんに対する放射線治療 . 産科と婦人科 2013 ; 80 : 217-21.

2. 渡辺未歩 , 宇野 隆 . 放射線治療の最新技術 : IMRT・IGRT・IGBT . 産婦人科の実際 2013;62:929-33.

3. 宇野 隆 . プロメテウス産婦人科がん最新医療 : II 子宮頸がん . 7. 子宮頸がんの同時化学放射線療法 (CCRT) . 産婦人科の実際 2013; 62(s11):1710-14.

[図書] (計 2 件)

1. 宇野 隆 . 食道癌 11. 放射線療法 . 小澤壯治 , 木下芳一 編 . 臨床食道学 . 南江堂 pp.223-226, 2015.

2. 宇野 隆 . 術後治療(特殊組織型を含む) . 11. 放射線治療 . 日本婦人科腫瘍学会編 . 子宮体がん治療ガイドライン 2013 年版 . 金原出版 . pp.106-112, 2013.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

宇野 隆 (UNO TAKASHI )  
千葉大学・大学院医学研究院 教授  
研究者番号 : 30302540

### (2)研究分担者

堀越 琢郎 (HORIKOSHI TAKURO)

千葉大学・医学部附属病院 助教  
研究者番号 : 50456068

### (3)研究分担者

原田 倫太郎 (HARADA RINTARO )  
千葉大学・医学部附属病院 助教  
研究者番号 : 20568662

### (4)研究分担者

齋藤 正好 (SAITO MASAYOSHI )  
千葉大学・大学院医学研究院 特任研究員  
研究者番号 : 80118885

### (5)研究分担者

井上 幸平 (INOUE KOUHEI )  
千葉大学・医学部附属病院 助教  
研究者番号 : 40312053

### (6)研究分担者

磯部 公一 (ISOBE KOUICHI )  
東邦大学・医学部 准教授  
研究者番号 : 80334184