

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293270

研究課題名(和文)細胞周期進行指標の放射線感受性評価への応用と染色体異常頻度に及ぼす背景因子の解明

研究課題名(英文)Application of cell cycle progression index to radiosensitivity evaluation and analysis of background factors on chromosome aberration

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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト末梢血リンパ球を培養し、染色体異常頻度に及ぼす臨床検査指標を検索するとともに、放射線感受性評価法としての細胞周期進行指標(CPI)の有用性について検討した。動脈硬化関連指標の一つである足関節上腕血圧比(ankle brachial pressure index: ABI)は3Gy X線照射により誘導される二動原体染色体頻度およびCPIとの間に相関が認められた。また、CPIと血糖値の間に正の相関が認められた。

以上より、動脈硬化症患者において放射線誘発性染色体異常が増加することが示唆され、また、CPIは放射線個人感受性の評価法として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the clinical laboratory index on chromosome aberration and examined the usefulness of cell cycle progression index (CPI) as a radiosensitivity evaluation tool. Ankle brachial pressure index (ABI), one of the indexes related to atherosclerosis, was correlated with the frequency of dicentric chromosomes induced by 3 Gy X-ray irradiation and CPI. In addition, a positive correlation was found between CPI and blood glucose level. It is suggested that radiation induced chromosomal abnormalities increase in patients with arteriosclerosis and that CPI may be useful as a method for evaluating radiation individual susceptibility.

研究分野：細胞遺伝学的線量評価

キーワード：細胞遺伝学的線量評価 緊急被ばく医療 染色体異常 放射線感受性 メタボリックシンドローム

1. 研究開始当初の背景

緊急被ばく医療における線量評価でゴールドスタンダードとして用いられる二動原体染色体 (DIC) 法では放射線感受性の影響はないとされているが、低線量被ばくや慢性被ばくにおける細胞遺伝学的被ばく線量評価において、放射線感受性と染色体異常頻度との関係は明らかではない。さらに、同じ線量を用いた放射線治療の効果および正常組織への障害は個人差が著しいことから、放射線治療の治療プロトコルの立案において個人の放射線感受性の評価は極めて重要となる。また、放射線感受性評価法として G2 アッセイが用いられるが、近年新たな評価法の開発が試みられている。血液培養上清にカフェインを加え、細胞周期停止の廃止を指標とした評価法が提案された。

上述のごとく、緊急被ばく医療における染色体異常を指標とした細胞遺伝学的被ばく線量評価や放射線治療の治療プロトコルの立案において、個人の放射線感受性の評価が重要となる。しかしながら、染色体異常頻度と個人放射線感受性の関係は不明であり、個人放射線感受性の評価法についてはいまだ確立されていない。

2. 研究の目的

我々はこれまでに細胞周期の進行度に着目した新規被ばく線量評価指標 (Cell cycle Progression Index: CPI) を開発した。本研究では、CPI 及び染色体異常と放射線感受性との関連性の有無を明らかにし、染色体異常頻度に関与する背景因子を解明すると同時に簡便な放射線感受性評価法の開発を主な目的とする。

3. 研究の方法

(1) インフォームドコンセントの得られた健康ボランティアよりヘパリンおよび EDTA 採血し、2 または 3Gy の X 線を照射した。その後、血液を 4 または室温で 6~168 時間保存し、多項目自動血球分析装置 XE-5000 (シスメックス) を用いて血球分析を行うと共に、PHA 刺激血液培養後の分裂指数を解析した。
 (2) インフォームドコンセントの得られた被験者より末梢血を採取後、3Gy の X 線 (1.0 Gy/min) を照射した。DNA 修復後に単核球画分 (PBMC) を分離した後、20% 牛胎児血清 (FBS) または 20% 自己血清 (AS) 加 RPMI1640 培地で PBMC 浮遊液を調整し、PHA 刺激下で 48 時間培養した。染色体標本を作成し、4% ギムザ染色後、分裂中期像を撮影し、二動原体染色体 (Dic) 頻度を解析した。
 (3) インフォームドコンセントの得られた被験者より末梢血を採取後、0 または 3Gy の X 線を照射した。DNA 修復後に単核球画分 (PBMC) を分離した後、20% 牛胎児血清 (FBS) または 20% 自己血清 (AS) 加 RPMI1640 培地で PBMC 浮遊液を調整し、PHA 刺激下で 48 時間

培養した。なお、培養終了 30 分前に calyculin A を添加し、早期染色体凝縮を誘導した。染色体標本を作成し、4% ギムザ染色後、光学顕微鏡下で PCC ステージを分類し CPI を算出するとともに、臨床検査指標と比較解析した。

4. 研究成果

(1) ヘパリン採血では凝固抑制が不十分であり、4 保存下では非照射血液および X 照射血液ともに白血球数および血小板数の顕著な減少や血液凝固が認められた。また、4 で保存したヘパリン血において、未成熟血小板画分 (IPF) が保存時間に対して正の相関を示した。一方、EDTA 採血では、全血培養時に分裂期細胞を得ることができなかったが、分離リンパ球培養ではヘパリン採血と比較して、分裂指数の低下は認められなかった (図 1)。以上より、ヘパリン採血では全血培養および分離リンパ球培養ともに室温保存が推奨されるが、冷蔵保存が必要な場合には、EDTA 採血を行い、分離リンパ球培養をすることで分裂期細胞を得ることができる可能性がある。

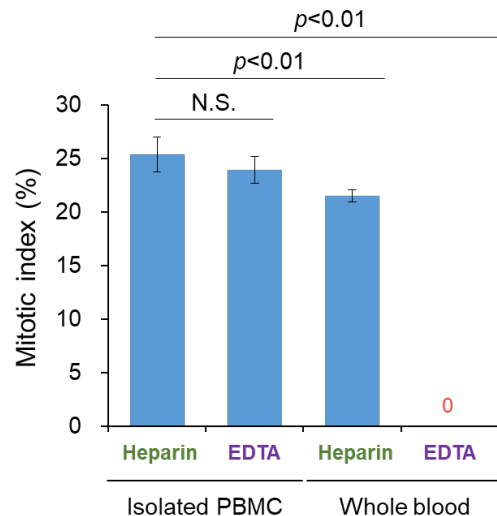


図 1. 抗凝固剤による末梢血リンパ球の分裂頻度 (MI) における抗凝固剤の影響。

(2) 3Gy X 線照射後の抹消血リンパ球における Dic 頻度と動脈硬化指標ならびに糖尿病指標との関係性を解析した結果、20%FBS および AS 加培養群において、Dic 頻度と動脈硬化関連指標の一つである足関節上腕血圧比 (ankle brachial pressure index: ABI) との間に正の相関が認められた (図 2)。また、AS 添加培養液では FBS 添加培養液に比べて Dic 頻度が増加する傾向が認められ、患者血清中に Dic 頻度に影響を及ぼす因子の存在が示唆された。以上より、動脈硬化症は、放射線被ばくにより誘発される染色体異常頻度に影響を及ぼす可能性が示唆され、線量評価の検量線作成において考慮が必要になると考えられる。

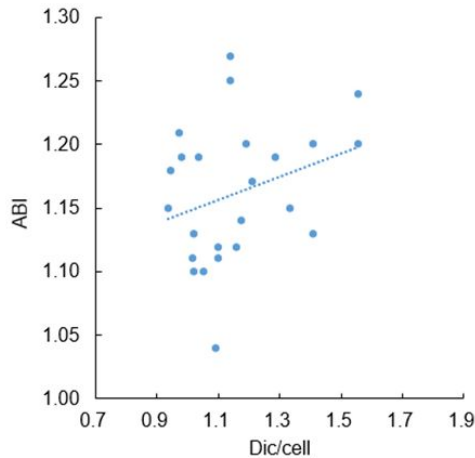


図 2. 3Gy X 線照射後の抹消血リンパ球における Dic 頻度と足関節上腕血圧比の相関解析.

(3) 早朝空腹時血糖、ヘモグロビン A1c (HbA1c)、ABI、心臓足首血管指数 (CAVI)、動脈硬化指数 (R-AI) と CPI の間の相関係数、有意確率を求めたところ、R-AI と 20%FBS 培養群との間に相関が認められた (20%FBS 培養群 0 Gy : $r = -0.420, p = 0.033$ 、20%FBS 培養群 3 Gy : $r = -0.396, p = 0.045$)。しかし、CPI と Dic 頻度には相関が得られなかった (図 3)。以上から多様な背景を持つ集団を対照とした場合、線量評価並びに放射線感受性評価における CPI の適用は困難になると考えられる。

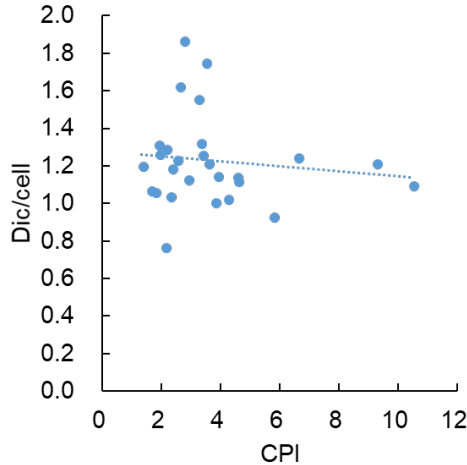


図 3. 20%AS 添加群における CPI と Dic 頻度との相関解析.

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 1 件)

(1) 金浜朱希、藤嶋洋平、川森詩織、成田房恵、萩野繁樹、有吉健太郎、吉田光明、山田恭吾、真里谷靖、三浦富智。細胞遺伝学的被ばく線量評価における抗凝固剤および血液保存温度の影響。青森県臨床検査技師会誌，41: 24-26, 2016 (査読なし)

[学会発表](計 3 件)

- (1) 三浦富智、藤嶋洋平、金浜朱希、川森詩織、成田房恵、萩野繁樹、有吉健太郎、吉田光明、葛西宏介、山田恭吾、真里谷靖。バイオドシメトリーにおける抗凝固剤および血液保存温度の影響。日本放射線影響学会第 59 回大会，2016 年 10 月 26 ~ 28 日，広島県広島市 (ポスター発表)。
- (2) 三浦富智、藤嶋洋平、有吉健太郎、東谷彩香、Goh Valerie Swee Ting、中田章史、葛西宏介、阿部悠、吉田光明。細胞遺伝学的線量評価における課題～メタフェーズ頻度と線量評価に及ぼす背景因子～。日本放射線影響学会第 60 回大会，2017 年 10 月 25 ~ 28 日，千葉県千葉市 (口頭発表)
- (3) Fujishima Y, Miura T, Kanahama S, Hagino S, Azumaya A, Kawamori S, Goh VST, Ariyoshi K, Nakata A, Kasai K, Yamada K, Mariya Y, Yoshida MA. The influence of the blood storage temperature and anticoagulant for cytogenetic biodosimetry. EPRBioDose2018, 11 - 15 June 2018, Munich I Germany (accepted)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

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

阿部 悠 (ABE, Yu)

福島県立医科大学・医学部・助手
研究者番号：00722472

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

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

坂井 晃 (SAKAI, Akira)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：70284221

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