

生物の放射線影響に関する研究

研究総括責任者 大阪大学大学院工学研究科
教授 藤井 俊行

生物の放射線影響に関する研究では、平成29年度は下記の4件の研究が採択、実施された。

- (1) マウス・培養細胞を用いた放射線誘発傷害ならびに傷害を修飾する因子に関する研究
- (2) 核分裂放射能によるヒト臓器・組織障害の発生機構
- (3) 原子炉中性子線によって生じるDNA損傷種の解明
- (4) 中性子線によるDNA損傷とその修復の分子機構

以下、総括する。

- (1) マウス・培養細胞を用いた放射線誘発傷害ならびに傷害を修飾する因子に関する研究

これまでに、マウスに曝露後1時間以内にサルナシ果汁を単回経口投与によって、小核誘導を抑制する効果があることが見出されている。本研究では、X線照射前または後の被験物質の経口投与が、小核形成に及ぼす影響について調べている。また、サルナシ果汁中に含まれる有効成分の候補としてイソケルセチンに着目し、抑制効果について調べた。

現在、データ解析を行っており、今後、作用機構などについて検討が進められている。これまでに、腹腔内投与についての有効な結果は報告されているが、経口投与の有効例は報告されていない。本研究は経口投与の有効例についての最初の成果であり、さらに小核形成の防護機構の解明が期待できる。

- (2) 核分裂放射能によるヒト臓器・組織障害の発生機構

T細胞、B細胞機能を欠如し、LPSに無反応のSuper-SCID (C3H/HeJ/NOs-scid:LPS-)マウスにヒト正常甲状腺組織を移植し、中性子線ならびにガンマ線を照射して、経過観察を行っている。マウスは平成29年11月と平成30年1月に照射を行い、計12匹である。11月照射群は、照射28~31日後に組織を摘出し、再移植を行い、経過観察中である。1月照射群(照射再移植マウス2匹含む)は、現在もマウスは生存しており、こちらも経過観察中である。C3H/HeJ-md+;scid/scid LPS- マウスの毛の色は、現在4ヶ月を過ぎ、徐々に色が薄くなってきている。今後は、これらヒト甲状腺組織を経時的に摘出して、遺伝子発現や遺伝子変異を観察し、必要に応じて照射を行う。これまでに、移植ヒト甲状腺組織に中性子線照射し、照射後2週間での影響をとらえることができた。そこで、中性子線照射により特異的に発現

が見られた 14 遺伝子について、照射後長期間における影響を観察する予定である。

本研究では、ヒト臓器・組織置換 SCID マウスを用いて放射線影響を調べ、特に中性子と X、 γ 線の影響の違いについて調べられている。そして、放射線照射によるヒト臓器・組織障害の発生機構の解明に貢献するものである。

(3) 原子炉中性子によって生じる DNA 損傷種の解明

電離放射線 DNA 損傷に関する研究の多くは、 γ 線や X 線などによるものが殆どで、それ以外の線質、例えば中性子線による損傷の様態は不明な点が多い。そこで、本研究では、中性子線によって生じる DNA 損傷の特徴を調べるため、pUC19 プラスミド DNA 水溶液に中性子線照射し、アガロースゲル電気泳動による DNA 損傷分析が行われた。

実験結果より、中性子線の線量に応じて一本鎖切断の生成を示す type II の収量が増加し、その収量は γ 線や X 線の収量より大きく、高 LET の重粒子線の収量に類似している。一方、DNA 二本鎖切断は 0.9 Gy までの照射でほとんど検出されず、酸化塩基損傷を含むクラスター DNA 損傷が生じていることがわかった。

今回の照射実験では、ラジカルスカベンジャー能がほとんどない条件の照射サンプルであり、今後は細胞内条件を模した 1M DMSO 条件下で照射実験を行う予定である。

中性子照射によって生じる DNA 損傷については、X 線、ガンマ線にくらべて、十分に解明されていない点が多く、本研究の成果が期待される。

(4) 中性子線による DNA 損傷とその修復の分子機構

本研究では、原子炉照射された細胞の生存率、突然変異率、分子の存在量および存在状態を解析することにより、中性子線による DNA 損傷とその修復の分子機構の特徴を明らかにすることを目的とする。特に、DNA 二本鎖切断の修復機構のひとつである非相同末端結合(non-homologous end joining; NHEJ)に関わる分子群の欠損細胞、部分欠失体や変異体発現細胞、阻害剤などを用いて解明する点が本研究の特徴である。マウス白血病由来 M10 細胞、正常あるいは変異 XRCC4 遺伝子導入細胞、Ku70 欠損マウス、DNA-PKcs 欠損(scid)マウス由来の胎児線維芽細胞、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞、ヒト B リンパ球由来 TK6 細胞、ヒト唾液腺癌由来 HSG 細胞に原子炉照射、X 線、 γ 線照射を行った。タンパク質の発現量、翻訳後修飾(リン酸化)状態は、ウェスタン・ブロッティング法によって調べた。原子炉照射を行った細胞における XRCC4 タンパク質のリン酸化について検討中である。特に、マウス胎児線維芽細胞を用いた XRCC4 のリン酸の検出は、条件の最適化が必要である。

本研究では、細胞実験の最適条件が得られれば、中性子線による DNA 損傷の NHEJ による修復についての解明が進むことが期待できる。

以上のように実施された 4 件の研究課題のうち 2 件が、マウスの中性子照射実験で、その影響について調べたものである。しかし、2 件の研究手法は全く異なり、それぞれユニークな研究である。次の 2 件は、中性子による DNA 損傷に関するもので、ひとつは、DNA 損傷の線質効果について注目した研究で、もうひとつは、修復機構の解

明に関する重要な研究である。これまでの生物の放射線影響に関する研究は、X線、ガンマ線をもちいたものが多く、中性子照射影響については少ない。そのため、4件の研究課題は生物の中性子影響を解明するために重要であり、今後のさらなる発展を期待する。

(1) マウス・培養細胞を用いた放射線誘発傷害ならびに傷害を修飾する因子に関する研究

代表者：有元佐賀恵（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科）

〔要約〕

X線の生物影響にたいする防御について、マウス・培養細胞を用いた研究を継続した。X線によるDNA障害のマーカーとして末梢血小核誘導を用い、X線曝露による末梢血小核形成を減少させる天然成分の検索を行った。先の研究において、サルナシ果汁は、曝露後1時間以内の単回経口投与によって、小核誘導を抑制する効果があることを見出した。また、サルナシ果汁ばかりでなく、50%メタノール抽出画分、さらに、ポリフェノール成分を効率よく吸着するH-20樹脂吸着画分に強い小核抑制効果が見られた。したがって、サルナシ果汁中には、曝露後投与によって、X線曝露により誘導される末梢血小核を抑制できる成分、おそらくポリフェノール類が含まれることが明らかになった。そこで、サルナシ果汁中に含まれる有効成分の候補として、果汁中に2.3 mg/100g(サルナシ)含有が報告されているイソケルセチンに着目し、X線曝露後の投与により、末梢血小核形成を抑制できかどうかの検討を行った。現在、データ解析を行っており、今後、作用機構などについて検討する予定である。

(2) 核分裂放射能によるマウスおよびヒト臓器・組織障害の発生機構

代表者：野村大成（医薬基盤・健康・栄養研究所）

〔要約〕

本研究では、ヒト臓器・組織置換 SCID マウスを用い、実際に被曝あるいは被曝の恐れのある核分裂放射能、特に、東海村事故で問題になった中性子線、放射性ヨード・セシウムなど、社会的に重要、かつ緊急性のあるものを選び、ヒト臓器・組織機能を数年にわたる継代維持を可能にした超重度複合免疫不全マウス(super-SCID マウス)に移植したヒト臓器・組織(甲状腺、肺、等)への慢性毒性、形態、機能、遺伝子変異、遺伝子発現への影響について、我々のもつ最新の迅速高感度測定技術を用いて研究を行っている。

長らく、UTR-KINKI の利用が不可能であったが、29年度になりやっと利用可能となった。

ヒト正常甲状腺は、Graves病患者より、IRBの承認のもと治療上やむを得ず切除された甲状腺組織の譲渡を受け、C3H/HeJ-md+;scid/scid LPS- マウスの左右背部皮下に移植した。平成29年度は、平成29年11月15日、平成30年1月17日計12匹にそれぞれ3時間の照射を行った。そのうち6匹の移植組織(平成29年11月15日の照射)は、摘出後再移植を行い、経過観察中である。平成30年1

月 17 日照射群 6 匹(平成 29 年 11 月 15 日照射再移植マウス 2 匹含む)は、現在もマウスは生存しており、こちらも経過観察中である。

(3) 原子炉中性子線によって生じる DNA 損傷種の解明

代表者: 寺東宏明(佐賀大学総合分析実験センター)

[要約]

電離放射線(以下、放射線)の生物効果は、遺伝物質 DNA に傷害を与えることにより表出するが、放射線 DNA 損傷に関する研究の多くは、 γ 線やX線などによるものに集中し、それ以外の線質による損傷の様態は不明な点が多く残されている。本研究では中性子線によって生じる DNA 損傷の特徴を探るため、pUC19プラスミド DNA 水溶液を近畿大学原子炉にて中性子線照射に供し、アガロースゲル電気泳動により DNA 損傷分析を行った。その結果、中性子線の線量に応じて一本鎖切断の生成を示す type II の収量が増加し、その収量は γ 線やX線の収量より大きく、重粒子線の収量に類似していることから、高 LET 放射線に特徴的と考えられた。一方、DSB は 0.9 Gy までの照射でほとんど検出されなかったが、酵素処理分析により酸化塩基損傷を含むクラスター DNA 損傷が生じていることがわかった。今回の結果はラジカルスカベンジャー能がほとんどない状態での照射サンプルから得られたものであり、今後は細胞内条件を模した 1 M DMSO 条件下でサンプルの分析を行っていく。

(4) 中性子線による DNA 損傷とその修復の分子機構

代表者: 松本義久(東京工業大学・科学技術創成研究院・先導原子力研究所)

[要約]

本研究の目的は、中性子線の DNA 損傷の特徴とその DNA 修復機構を明らかにすることである。特に、種々の DNA 損傷の中で最も重篤と考えられる DNA 二本鎖切断とその主要な修復機構の一つである非相同末端結合に注目し、NHEJ に関わる分子群の欠損細胞、部分欠失体や変異体発現細胞、阻害剤などを用い、原子炉照射後の細胞生存率、突然変異率、分子の存在量および存在状態を解析することより、原子炉中性子線による DNA 損傷とその修復の分子機構の特徴を明らかにすることを目的として行った。

平成 29 年度は、原子炉運転再開を受けて、従来用いてきたマウス細胞に加え、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞、ヒトBリンパ球由来 TK6 細胞、ヒト唾液腺癌由来 HSG 細胞に原子炉照射または X 線照射を行い、細胞増殖や生存率を指標とした感受性と DNA 損傷応答分子群の解析のための試料を取得した。