

高感度 DNA 損傷マーカーを用いた 低線量被ばく家畜の生体影響評価

[1] 組織

代表者：中村 麻子
(茨城大学・理学部)
対応者：福本 学
(東北大学加齢医学研究所)
鈴木 正敏
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：なし

研究費：物件費 19 万 2 千円

[2] 研究経過

現代において放射線による生物学的影響は社会全体が懸念するところであり、特に福島第一原発事故以降は低線量放射線に対する生体影響を明確にすることが喫緊の課題となっている。放射線によって誘発される DNA 損傷の中でも、最も重篤な損傷である DNA 二本鎖切断 (double-strand break: DSB) は、DNA DSB の分子マーカーなどを用いた定量実験などから放射線量に依存して増加するという相関性が明らかとなる一方で、最終的な発がんに関しては「確率論」として考えられているのが現状で、特に低線量放射線による発がんリスクは、大規模な疫学的研究が必要であることや、低線量放射線による損傷の分子レベルでの解析が行われていないこと、さらには放射線発がんそのものが DNA 損傷応答だけでなく様々な組織応答が複雑に活性化することで進行していくことから、いまだ明確にはなっていない。

本研究は低線量放射線被ばくによる DNA 損傷レベル (特に DNA DSB レベル) と発がんリスクの相関性を明確にし、低線量放射線発がんリスク評価を行うことを最終目的とし、福島第一原発事故による被ばく家畜の DNA DSB レベルを、近年その高感度性からも注目されているリン酸化型ヒストン H2AX (γ -H2AX) を用いてモニタリングした。今年度においては、すでに報告されている被ばく家畜生体内の放射性セシウム (^{134}Cs および ^{137}Cs) 濃度や空間線量との比較検討や、それらをもとにして算出された推

定放射線吸収線量と DNA 損傷レベルとの相関性を検討した。また、DNA DSB が検出されたリンパ球の特異性の有無を検討するために、 γ -H2AX と B 細胞、T 細胞マーカーとの共染色による解析を行った。最後に、発がん過程において重要な役割を果たすと考えられている炎症反応について、炎症性サイトカイン CCL2 の発現レベルによってモニタリングするための予備的な実験を行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。

研究期間内における家畜のサンプル採取は対応者のグループによって平成 25 年度までにはほぼ終了しており、平成 26 年度においては分離したリンパ球を用いた実験を研究代表者が行った。また、平成 26 年 9 月および 12 月に、対応者グループよりセシウム濃度などのデータ授受、データ解析の議論を行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第 1 に、避難地域 4 か所から採取された被ばく家畜のリンパ球における γ -H2AX レベルと採材日の関係を検討した結果、いずれの地域においても、採材日が事故発生から経過するほどに γ -H2AX レベル、つまりは血中 DNA DSB レベルの減少が認められた (Fig. 1)。

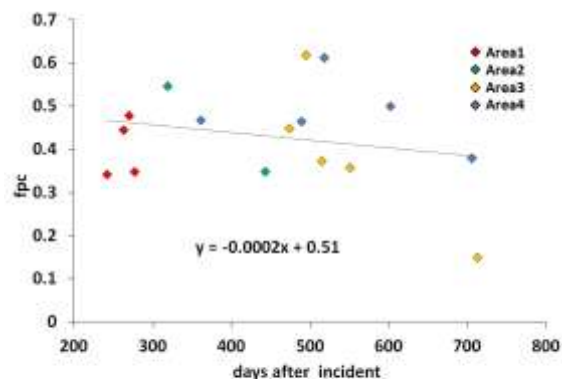


Fig. 1 γ -H2AX レベルと事故後日数の相関性
被ばく牛由来リンパ球に検出された細胞あたりの γ -H2AX フォーカス数 (foci per cell; fpc) を、採材日 (事故後の日数) に対してプロットした。各ドットは同日採材日におけるサンプルの平均値を示す。

第2に、検出された γ -H2AX レベルが実際に測定された被ばく家畜生体内の放射性セシウム (^{134}Cs および ^{137}Cs) 濃度や空間線量とどのような相関性を示すのかを検討するために、家畜骨格筋における放射性セシウムによる推定内部被ばく吸収線量とどのような相関性を示すのか検討した結果、わずかながらの正の相関性を認めたが (Fig.2)、その一方で、空間線量をもとに算出された推定外部被ばく吸収線量との相関性は認められなかった (Fig. 3)。

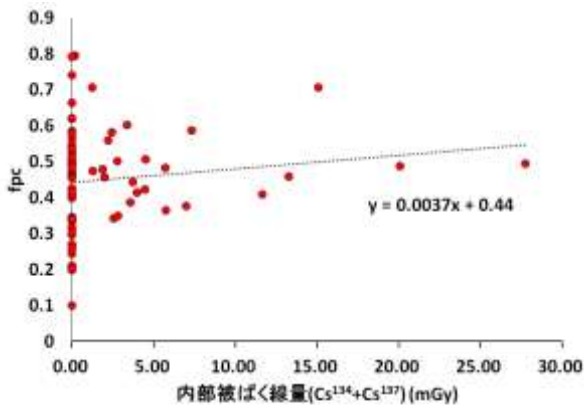


Fig. 2 γ -H2AXレベルと推定内部被ばく吸収線量との相関性
被ばく牛由来リンパ球に検出された細胞あたりの γ -H2AXフォーカス数 (foci per cell; fpc) を、骨格筋から検出された放射性セシウム濃度をもとに算出された推定内部被ばく線量に対してプロットした。各ドットは牛1個体のデータを示す。

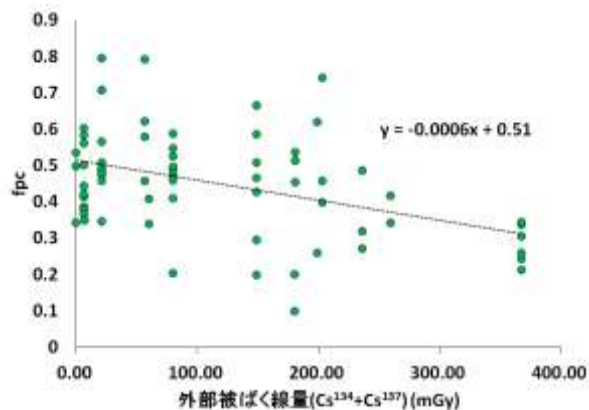


Fig. 3 γ -H2AXレベルと推定外部被ばく吸収線量との相関性
被ばく牛由来リンパ球に検出された細胞あたりの γ -H2AXフォーカス数 (foci per cell; fpc) を、採材日の空間線量をもとに算出された推定外部被ばく線量に対してプロットした。各ドットは牛1個体のデータを示す。

次に、昨年度までの共同研究結果から γ -H2AX フォーカスはすべての細胞に同様に検出されるのではなく、フォーカスを有している細胞数の割合が増加することによって、全体の γ -H2AX レベルが上昇していることが分かっていることから、 γ -H2AX が検出されたリンパ球に特異性があるかどうかについて検討した。具体的には T 細胞を特異的に認識する CD3 抗体と γ -H2AX 抗体との共染色を行い、T 細胞と B 細胞、それぞれについて γ -H2AX フォーカス陽

性細胞の割合および γ -H2AX フォーカス数を検討した。その結果、T 細胞と B 細胞に違いは認められなかった。

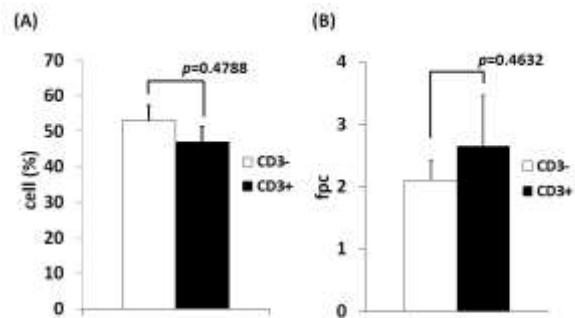


Fig. 4 γ -H2AXフォーカス陽性細胞の細胞特異性
(A) γ -H2AXフォーカスを有する細胞におけるCD3陽性細胞 (T細胞) と陰性細胞 (B細胞) の割合。Fisher's exact testによる有意差検定を行った。(B) CD3陽性細胞 (T細胞) と陰性細胞 (B細胞) における細胞あたりの γ -H2AXフォーカス数 (foci per cell; fpc)。Student's t-testによる有意差検定を行った。

最後に、被ばく家畜における炎症反応の活性化を検討するために、血清サンプル中に含まれる炎症性サイトカインCCL2の濃度をELISA法によって測定した。本年度は予備的実験として、採取された血清サンプルが ELISA 法に用いることが可能であることを確認した (data not shown)。

(3-2) 波及効果と発展性など

放射線、特に低線量放射線に被ばくした際の発がん影響については研究者や医療従事者だけではなく社会全体が検討しなければいけない問題である。これまでの研究により被ばく家畜のリンパ球におけるDNA DSB レベルがコントロールよりも有意に高く、その損傷レベルは20 mGyの急性被ばく線量に相当することが分かっていたが、今回のような慢性的な放射線被ばく条件下では、実際の放射性セシウム濃度から算出された推定吸収線量とDNA DSB レベルとの直接的な相関性は認められなかった。このことは、スナップショット的に解析されるリンパ球中のDNA DSB レベルが、慢性的な放射線照射によるDNA損傷誘発と並行して活性化させるDNA損傷修復の平衡値として検出されている可能性を示唆している。以上、本研究で得られた結果は、慢性的な低線量放射線被ばくの生体影響評価が非常に難しいことを改めて認識させるものであり、今後はDNA DSB レベルのモニタリングとともに、炎症反応、細胞老化反応などの組織応答を総括に行うことで発がんリスクを評価していく予定である。

[4] 成果資料

得られた実験結果をもとに、論文作成中である。