

【報告】

電離放射線の細胞影響に関する短期研修 CELOD 2019 印象記

佐藤 嘉晃* 西田 晃規*

(2019年 8月 19日受付, 2019年 9月 19日受理)

要旨: 2019年4月29日から5月10日にかけてスウェーデン王国のストックホルム大学にて開催された CELOD2019 course に参加した。本研修は電離放射線の細胞影響に関する短期研修であり, 放射線生物影響を理解することを目的に, EU圏の大学院生及び35歳以下の若手研究者を対象に行われた。本研修は放射線生物影響をテーマに講義及び実習から構成されていた。本稿では, 本研修で行われた講義, 実習, 研修内イベントの内容を簡単に紹介する。

キーワード: CELOD 2019, 電離放射線, 放射線生物学

I. はじめに

2019年4月29日から5月10日にスウェーデン王国のストックホルム大学にて開催された電離放射線の細胞影響に関する短期研修「CELOD: Cellular effects of ionising radiation - introduction to radiation biology」に参加した。CELODは2012年から開催されており, 放射線生物影響の基礎から最新の知見を理解してもらうことを目的に行われている。対象者をEU圏の大学院生及び35歳以下の若手研究者としているため, 参加者のほとんどはイタリア共和国, ドイツ連邦共和国, フランス共和国, ポーランド共和国などのヨーロッパの学生・研究者であった。また, スtockホルム大学の学部生も数人参加していた。筆者らは所属している弘前大学大学院保健学研究科がストックホルム大学の放射線防護研究センターと部局間協定を結んでいるため, 特別に本研修に参加させていただいた。研修は講義と実習から構成されている。表1に本研修の日程を示す。筆者らは, 海外短期研修が初めての経験だったこと, 同年代を含めた若手研究者の方々と交流することができる機会であることから, 期待に胸を躍らせて参加した。以下に本研修で行われた講習, 実習, イベントの概要について記載する。



図1 研修会場であるストックホルム大学

*弘前大学大学院保健学研究科 放射線技術科学領域
Department of Radiation Science, Hirosaki university graduate school of Health Sciences
〒036-8564 青森県弘前市本町 66-1 TEL:0172-33-5111
66-1, Honcho, Hirosaki-shi, Aomori, 036-8564, Japan
Correspondence Author h18gg205@hirosaki-u.ac.jp

表2 CELOD course 2019 日程

	29, April (Monday)	30, April (Tuesday)	1, May (Wednesday)	2, May (Thursday)	3, May (Friday)	4, May (Saturday)
Morning (9:00-12:30)	Lecture1	Lecture3	a holiday (May day)	Lecture5	Lecture7	Trip to Uppsala
	Lecture2	Lecture4		Lecture6	Lecture8	
Lunch						
Afternoon (14:00-17:00)	Scoring Aberration	Dosimetry	a holiday (May day)	gamma H2AX	Scoring Aberration	
	Lunch					
	6, May (Monday)	7, May (Tuesday)	8, May (Wednesday)	9, May (Thursday)	10, May (Friday)	
Morning (9:00-12:30)	Scoring Aberration	FISH	Scoring Aberration	Aberration	Presentation	
	Lunch					
Afternoon (14:00-17:00)	Scoring Aberration	Scoring gamma H2AX foci	Scoring Aberration	Scoring Aberration		

II. 講義概要

講義は第1週目の午前に90分間の講義が2回行われた。合計8名の専門家によって染色体異常, DNA損傷応答, 放射線感受性やバースタンド効果など主な電離放射線による生物影響や放射線曝露固体に対する細胞遺伝学的線量評価に関する講義が行われた。以下に講義の内容を紹介する。

Lecture 1では, Prof. Christian Johannes (デュースブルクエッセン大学, ドイツ連邦共和国)より放射線誘発染色体異常をテーマに初回の講義が行われた。放射線による主な生物影響の1つである染色体異常に焦点が当てられた。ここでは, 植物, 昆虫細胞からヒト細胞へ移行した染色体解析の歴史, 染色体の構造について説明が行われ, 染色体解析の手順・手法, 染色体異常の種類が詳細に紹介された。染色体解析法の一つに FISH (fluorescence *in situ* hybridization)法がある。この方法では, その染色体に特異的な蛍光色素を標識することで何番の染色体か調べることができ, ギムザ染色ではわからない転座を調べることができると説明を受けた。後述するが, 実習では実際に FISH法による染色体異常解析を行った。

Lecture 2では, Prof. Penny Jeggo (サセックス大学, グレートブリテン及び北アイルランド連合王国)より, 放射線誘導性 DNA 損傷及び修復をテーマに講義が行われた。こ

ここでは、DNA二本鎖切断(DSB)の生成過程やDSB修復機構(非相同末端結合や相同組換え)について説明が行われた。また、修復機構やそれに関連して細胞周期の停止、アポトーシスの過程における分子メカニズムまで深く紹介された。この分子メカニズムは放射線生物学の基礎であり、染色体異常分析やリン酸化ヒストン γ H2AX 解析を行う意義を知る上でも非常に重要であった。生物分野以外のバックグラウンドを持つ参加者は分子メカニズムに関わる部分においてかなり不慣れなところがあり、多くの質問が寄せられていた。

Lecture 3では、Dr. Serge Candéias(グルノーブルバイオサイエンス&バイオテクノロジー研究所, フランス共和国)より、免疫系に対する放射線の影響をテーマに講義が行われた。ここでは、感染症やがんにおける免疫機構の概要から始まり、放射線生物学において働く免疫機構について細胞間シグナル伝達や各細胞の役割、生物分野以外のバックグラウンドを持つ参加者にもわかりやすく詳細に説明が行われた。また、癌の免疫寛容や免疫機構の放射線治療への応用や、低または高線量被ばくの際に働く炎症防御機構についてもこれまでの知見を分子メカニズムまで詳細に紹介された。

Lecture 4では、Prof. Munira Kadhim(オックスフォードブルックス大学, グレートブリテン及び北アイルランド連合王国)より、放射線バイスタンダー効果をテーマに講義が行われた。バイスタンダー効果とは放射線ばく露細胞から周辺の非ばく露細胞に働く非標的効果である。ここでは、バイスタンダー効果について得られているこれまでの知見(ギャップジャンクションや細胞外溶解性因子, エキソソームの関与)やバイスタンダー効果に関する実験方法が紹介された。細胞外小胞の1つであるエキソソームはmicroRNAの受け渡しなどに関与している細胞間情報伝達分子として近年注目されている。バイスタンダー効果もエキソソームに関連があると知り非常に興味深い内容だった。

Lecture 5では、Dr. Lovisa Lundholm(ストックホルム大学, スウェーデン王国)より、細胞の放射線感受性に影響を与える要因をテーマに講義が行われた。ここでは、放射線感受性に関する法則であるベルゴニー・トリボンドーの法則と組織ごとの放射線感受性や物理(線量や線質)・化学(酸素や放射線増感剤・防護剤)・生物(細胞周期や被ばくの範囲・年齢)的側面から放射線感受性に影響する因子について紹介された。放射線感受性はベルゴニー・トリボンドーの法則を基準に多くの要因が複雑に絡んで影響を与える。放射線治療ではこういった感受性の変化を利用する試みもあり、これらを理解する上で重要であると感じた。

Lecture 6では、Prof. Joanna Polańska(シレジア工科大学, ポーランド共和国)より、放射線研究におけるハイスループット分析をテーマに講義が行われた。ここでは、ハイスループットスクリーニングと呼ばれる膨大な数の遺伝子、タンパクの生物学的活性等を自動的に解析する方法について、その歴史の紹介や統計学的解析に関する詳細な説明が行われた。遺伝子解析及びその統計学的解析には様々な種類があり、生物学研究には欠かせない過程である。研究内容に合わせて適切な解析手法を用いる必要があり、それを理解するために非常に重要な講義であった。

Lecture 7では、Dr. Anne Vral(ゲント大学, ベルギー王国)より、放射線誘発微小核をテーマに講義が行われた。微小核とは細胞核から独立して存在する核状構造物であり、放射線影響を定量するために汎用されている指標である。ここでは、微小核の形成過程や微小核の測定法である細胞質分裂阻害小核アッセイ法(CBMN法)について説明がされた。また、CBMN法を用いた線量評価の利点(他の細胞遺伝学的評価よりも迅速で簡便, 自動化が可能)についても紹介されていた。実習6で記載するScoring aberrationでは、放射線曝露細胞における微小核の解析を行った。

Lecture 8では、Dr. Harry Scherthan(ブンデスヴェール放射線生物学研究所, ドイツ連邦共和国)より、放射線誘発 γ H2AXをテーマに講義が行われた。 γ H2AXとは細胞のDSBの指標である。ここでは、放射線によるDSBの生成から修復までに関わる分子メカニズムや α 線放出核種であり核医学分野で用いられる放射線医薬品ゾーフィゴ(^{223}Ra)を用いた研究(ゾーフィゴ投与前立腺がん患者サンプルのDNA損傷応答)について紹介されていた。

III. 実習概要

実習は研修1週目の午後と2週目に4グループに分かれて行われた。実験では、実際に学内のラボで各個人またはペアになってサンプルの調製や薬剤処理を行い解析・測定をするテーマが4つと事前に用意されたサンプルを用いて解析方法を学ぶテーマが2つ企画された。以下に各実習内容を紹介する。

実験: Dosimetryでは、ラドンガスの線量測定、線量率と線源からの距離の関係、放射線のエネルギースペクトルの測定を行った。初めにラドンガスの線量測定を行った。 ^{226}Ra 線源(図2)から得られたラドンガスを線量計とともにタッパーに封入し、封入後の経過時間とそのときの線量率を計測した。

図 2 ^{226}Ra 線源

測定器はラドン濃度の測定で用いられる SARAD 社（ドイツ連邦共和国）DOSEman を使用した。

次に、 γ 線源からの距離と線量率の関係を測定し、距離の逆二乗則について検証した。実験では、測定器を初めて扱う人もおり、測定直後の数値を読み取る誤った使い方をする人もいた。最後に、 ^{207}Bi 、 ^{133}Ba 、 ^{22}Na 、 ^{137}Cs と未知線源や市販のヨウ素添加塩やバナナのエネルギースペクトルを鉛板で遮蔽した場合も含めて測定し、遮蔽によるスペクトルの変化を観察した。バナナには K が豊富に含まれており、 ^{40}K 由来と思われるピークも観察された。

実験：gamma H2AX では、事前にカバースリップ上で培養された細胞が参加者それぞれに配布され、それを用いて gamma H2AX の免疫蛍光染色の手技を学んだ。細胞をメタノールにて固定処理後、0.2% Triton X を用いて透過処理を行った。リン酸緩衝液で洗浄後、あらかじめ調製された gamma H2AX の 1 次抗体（アルブミン含有リン酸緩衝液で希釈）を添加し、30 分間反応させ、以降暗所にて作業を続けた。洗浄後、2 次抗体（1 次抗体と同様に希釈されたもの）を同様に反応させた。DAPI により核染色後、洗浄してスライドガラスを被せ、蛍光顕微鏡で解析した。筆者らは生物実験を行ったことがあったため、作業は容易であったが、生物学以外のバックグラウンドの参加者は 1 つ 1 つの作業にかなり苦戦していた。実験中に、隣の参加者から各処理作業について説明を求められることもあり、わかりやすくかつ英語で説明することにはかなり苦戦した。

実験：FISH では、事前に用意されたスライド上のサンプルを用いて FISH 標本の作製を行った。スライド上のサンプルに対し 1 番、2 番及び 4 番を染色する混合 DNA プローブを加え、その後サンプルとプローブを熱変性させ、染色体上の DNA に蛍光標識 DNA プローブをハイブリダイズさせた。その後、カバーガラスを除き、スライドを洗浄、乾燥させた。さらに、DNA 染色のため DAPI を滴下し、蛍光顕微鏡にて観察した。1 番染色体は赤く、2 番染色体は緑に、4 番染色体は黄色に蛍光し、その他の染色体は DAPI によ

り青く蛍光していた。蛍光の違いから転座を確認することができたが、放射線曝露細胞のサンプルでは特に染色体同士が重なり合っており、観察しにくい印象を受けた。

実験：Chromosomal aberrations では、事前に用意された細胞を用いて、染色体異常解析用の標本スライドの作成を行った。準備された細胞を遠心操作後に上澄みを除去し、緩徐に攪拌しながら 0.075 M KCL 低張液を加え、37 度のウォーターバスにて低張処理を 15 分間行った。その後、固定液（メタノール 3 : 酢酸 1）を用いて固定処理を行った。固定処理後、遠心を行い、固定溶液を加えて懸濁し、数滴をスライドガラスに滴下した。乾燥後、ギムザ染色液にて染色した。細胞を標本することは生物実験において基本であり、我々の班員のほとんども苦勞することなく作成していた。他の班には生物実験を行ったことがない参加者もおり、実験担当者や班員に質問しながら作成し、貴重な体験だったと語っていた。

Scoring of gamma H2AX foci では、無料で入手できる画像処理ソフトウェア Image J を用いて画像中の gamma H2AX foci を自動的に解析する方法を学んだ。事前に持参した PC に Image J ソフトウェアをダウンロードし、用意された解析用のサンプル画像を用いて解析を行った。解析では、認識する foci の大きさなどについて閾値を設定することで、大きい foci や小さい foci、核の数及びそれらの面積を解析してくれる。結果はテキストファイルで出力することができる。自身の研究に応用する場合には細胞種の違いなどから閾値の微調整が必要になるが、大量のデータを解析する場合には大変有効な手法であると感じた。

Scoring aberrations では、事前に用意された染色体標本を用いて環状染色体や二動源染色体などの染色体異常をカウントした。標本は γ 線曝露 4, 19, 24 時間後及び α 線処理したサンプルをギムザ染色したものを使用した。 γ 線曝露後の経過時間の異なるサンプルを使用した目的はそれぞれ細胞周期中の G2 期、S 期、S/G1 期を想定し、細胞周期の違いと染色体異常との関連を考察するためであった。また、 α 線処理細胞を用いることで、線質の違いと染色体異常の発生頻度の違いを考察した。筆者らは表 1 中の Scoring aberration で示した時間でこの作業を行った。最終日までに全サンプルを解析しておけばよいため、なかには観光に出かける参加者もいた。初日の解析には、Lecture 1 で講義をされた Prof. Christian Johannes が解析における参加者の質疑を受けていた。筆者にとって染色体異常解析は初めてのことであったため、小さいが正常な染色体なのか断片化された染色体なのかを区別することができず、何度もその違いについて説明を受けることもあった。染色体に関する知識をほとんど持ち合わせていなかったため、大変勉強になった。



図 3 Scoring aberrations の様子

研修最終日の Presentation では各班に1つ与えられた実験テーマ (Dosimetry, Gamma H2AX, FISH, Chromosomal aberrations) について実験・解析結果を発表した。全ての班がパワーポイントを用いて、班全員でそれぞれの内容を分担して発表していた。著者らはそれぞれ dosimetry と gamma H2AX について発表した。Dosimetry の発表では、各班から集めた実験結果についてそれぞれ考察も含めつつ発表を行った。エネルギースペクトルを測定した未知線源を ^{133}Ba と予想したが正解は公表されなかった。班員で集まれる時間が少なく、発表準備を直前まで行った。Gamma H2AX の発表班は前日に集まりスライドを完成させた。内容は gamma H2AX の概要、DNA 損傷修復における役割、実験方法、解析結果を分担して発表した。筆者らともに発表準備では英語でのディスカッションに慣れてないため苦労した。しかしながら、研修を通して英語に慣れ始めたことや班員とも打ち解けてきたため、楽しく作業できた。発表後に、質疑応答の時間が設けられ、最後に Prof. Wojcik から研修全体の講評が行われ、研修が締めくくられた。修了証は web を介して配布された。

IV. イベント・観光

第1週目の土曜日にはスウェーデン中部の都市ウプサラへの観光が企画された。ウプサラはストックホルムから高速列車で45分程の位置にあり、北欧最古の大学であるウプサラ大学があることでも知られている。ウプサラ到着後、初めにリンネ植物園を訪れた。ここでは、植物学者で現在スウェーデン王国の100スウェーデンクローネ紙幣に描かれているカール・フォン・リンネが居住した当時の家屋や植物園を見学した。他にはスカンジナビア諸国で最大級のウプサラ大聖堂や歴史博物館であるグスタヴィウムを訪れた。また、ウプサラ観光後と最終日の前夜にはパーティーが開かれ、地元料理と共にワインやビールが振る舞われた。その中でも、世界一臭い食べ物と評されるシュールストレミングはチーズやクラッカーとともに食べると意外にも美味しかった。しかしながら、食べた人が分かってしまうほどの強烈なおおいであった。この親睦会のおかげで、班員

以外の方々と交流することができた。交流を深めるために、日本から持参したスナック菓子を渡したところ、ビールのつまみに合うと好評であった。研究以外にそれぞれの国のことについて知ることができたとても良い時間であった。

また、授業と実習の間のランチタイムにはストックホルム大学の隣にある自然歴史博物館を訪れた。ここでは、世界各国からのマンモスやクジラなどの化石や剥製が展示されていた。この他にも、スウェーデンは日照時間が非常に長く、講義や実験が終わった後でもノーベル博物館など多くの観光地を訪れることができた。じっくり観光を楽しむことができた。

V. 最後に

筆者らにとって初めての海外研修であった本研修は、海外の若手研究者達と英語で交流する大変貴重な経験であった。およそ2週間の研修であったが、常に刺激に満ちた時間であり、終わってほしくないというのが率直な感想であった。筆者らは放射線生物学を専門に研究を行っているため、自身の分野に関わる講義や実験では我々の英語力でも内容を理解することができたが、宿泊先のホテルでの日常会話や班員との実験結果に関するディスカッションではかなり苦労した。多くの場面で考えを伝えられない悔しさを感じ、英語の必要性を痛感した。また、懇親会やホテルでの生活では参加者も含め多くの方と交流する機会があり、自身の考え方の幅が広がった。本研修期間を通して良い刺激を受けることができ、今まで以上に研究や語学の研鑽に努めようと強く思った。

VI. 謝辞

CELOD course 2019 への派遣は、弘前大学【戦略3】「被ばく医療における安心・安全を確保するための国際的な放射線科学教育研究の推進」経費の支援を受けて行われた。

また、本研修参加にあたり、機会を与えてくださった弘前大学大学院保健学研究科・中村敏也教授ならびにストックホルム大学 放射線防護研究センター Professor Andrzej Wojcik に感謝申し上げます。



図 4 リンネ植物園前で撮影した集合写真

【Report】

Report on the CELOD 2019, short training course for the cellular effects of ionising radiation

YOSHIAKI SATO* TERUKI NISHIDA*

(Received August 19, 2019 ; Accepted September 19, 2019)

Abstract: The authors participated in CELOD 2019 held at Stockholm University, Sweden from 29 April to 10 May. The purpose of the course is understanding the biological effects of radiation. The majority of participants were graduate students and young radiation researchers under 35 years old. CELOD performed the lectures and exercises about radiation biology. In this report, we introduce the overview of the lectures, exercises and events in CELOD 2019.

Keywords: CELOD 2019, ionising radiation, radiation biology