

【その他（研修報告）】

高 LET および低 LET 電離放射線の細胞への影響 ～CELET course 2024 研修会報告～

佐藤 亮介^{*1} 福士 舞^{*1} 門前 曜^{*1,2}

2024年12月18日受付, 2025年1月29日受理

要旨：筆者らは、2024年11月11日から同年11月22日にかけて、スウェーデン王国ストックホルム市にあるストックホルム大学にて開催された Cellular effects of high and low LET ionizing radiation - introduction to radiation biology Courseに参加した。2週間で構成された研修の中で、とりわけ染色体異常を検出する方法、DNA損傷を検出する方法の講義や実習の様子を中心に筆者らの体験も交えて紹介する。本研修プログラムは電離放射線の遺伝子への毒性影響についての研究手法を取得することを目的に開催されており、世界各国から学歴を含む背景の異なる約30名の大学院生や若手研究者が参加した。実習は4つのグループに分かれて実施し、最終日にはグループディスカッションが行なわれた。特に生物学的線量評価としてグローバルスタンダードである二動原体染色体検出解析の他、有糸分裂指数分析、FISH解析及び γ -H2AX計数評価の実習では、参加者間で多くの意見交換が行われた。これら筆者らのCELETでの経験は、最新の放射線生物解析技術といたいたい刺激を忘れず、当該大学院研究で取り組んでいたプロジェクト研究をさらに邁進する意欲へつながると共に、本研修参加を読者に勧めたいものとなった。

キーワード：電離放射線、LET、生物学的影響、染色体異常、 γ -H2AX

I. はじめに

2024年11月11日から22日の日程で、スウェーデン王国ストックホルム市にあるストックホルム大学にて、Cellular effects of high and low LET ionising radiation - introduction to radiation biology Course (CELETコース) が開催され、筆者らは参加する機会をいただいた。コース名の英文にある通り、高LET電離放射線および低LET電離放射線の細胞への影響を学ぶ入門の研修プログラムである。本研修は、欧州地域におけるRadoNormプロジェクトのもと講義と実習で構成され¹⁾、細胞遺伝学や免疫遺伝学を重点的に放射線生物学的影響の検出技術を学んだ(表1)。

筆者らの所属する弘前大学大学院保健学研究科は、当該コース参加施設であるストックホルム大学放射線防護研究センターとの部局間学術協力協定を締結して11年目となった。現在も盛んに学術交流が進められている中、今回、当該コースへの参加となった。当該コースには、世界各国から約30名の大学院生や若手研究者が参加し、学歴も研究分野も様々なバックグラウンドを持つ参加者となった。本邦からは筆者ら2名(福士、佐藤)のみであった。本研修参加者らは、4つのグループに別れて実習を進めた。

*1 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:0172-39-5959

66-1, Honcho, Hirosaki, Aomori, 036-8564, Japan

*2 弘前大学生体応答科学研究センター

Research Center for Biomedical Sciences, Hirosaki University

〒036-8564 青森県弘前市本町66-1 TEL:0172-39-5959

66-1, Honcho, Hirosaki, Aomori, 036-8564, Japan

Correspondence Author monzens@hirosaki-u.ac.jp

昨年も同コースに参加された報告がなされているが²⁾、本稿では、主に筆者らが経験した実習内容の一部とそのグループディスカッションの様子に焦点を当て紹介したい。

表1 CELET course 2024 の全日程

| Date | Event | Lecturer |
|--------------|--|-----------------------------|
| Mo 11/11 | 09:00 – 10:30 Chromosomal aberrations | Christian Johannes |
| | 10:45 – 12:15 DNA damage and repair | Penny Jeggo |
| | 14:00 – 17:00 Harvesting cells for aberrations – group 3 | Zuza |
| | 14:00 – 17:00 GammaH2AX exercise – group 4 | Nadia |
| | 14:00 – 17:00 Scoring – group 1 and group 2 | Maddi, Samuel, and Prabodha |
| Tue 12/11 | 09:00 – 10:30 Factors which influence cellular radiosensitivity | Lovisa Lundholm |
| | 10:45 – 12:15 Combined exposures of radiation and other stressors | Helga Stopper |
| | 14:00 – 17:00 Dosimetry exercise – group 4 | Andrzej |
| | 14:00 – 17:00 FISH exercise – group 1 | Prabodha |
| | 14:00 – 17:00 Scoring – group 2 and group 3 | Maddi and Samuel |
| Wed 13/11 | 09:00 – 10:30 AI and its use in radiation research | Beata Brzozowska |
| | 10:45 – 12:15 Bystander effects of radiation | Munira Kadhim |
| | 14:00 – 17:00 Dosimetry exercise – group 3 | Andrzej |
| | 14:00 – 17:00 FISH exercise – group 2 | Prabodha |
| | 14:00 – 17:00 Scoring – group 1 and group 4 | Maddi and Samuel |
| Thu 14/11 | 09:00 – 10:30 Radiation effects on the immune system and the use of radon to treat autoimmune diseases | Serga Candeias |
| | 10:45 – 12:15 Radiation-induced micronuclei | Anne Vral |
| | 14:00 – 17:00 Dosimetry exercise – group 2 | Andrzej |
| | 14:00 – 17:00 FISH exercise – group 3 | Prabodha |
| | 14:00 – 17:00 Scoring – group 1 and group 4 | Maddi and Samuel |
| Fri 15/11 | 09:00 – 10:30 Statistical analyses of experimental results from low and high throughput approaches in radiation research | Joanna Polanska |
| | 10:45 – 12:15 Radiation-induced gammaH2AX foci | Harry Sherthan |
| | 14:00 – 17:00 Dosimetry exercise – group 1 | Andrzej |
| | 14:00 – 17:00 FISH exercise – group 4 | Prabodha |
| | 14:00 – 17:00 Scoring – group 2 and group 3 | Maddi and Samuel |

| | | |
|--------------|--|---------|
| Sat 16/11 | Trip to Uppsala 18:00 Dinner at SU | All |
| Sun 17/11 | Sunday – free. | |
| Mo 18/11 | 09:30 – 13:00 Harvesting cells for aberrations – group 1 | Zuza |
| | 09:30 – 13:00 GammaH2AX exercise – group 3 | Nadia |
| | 09:30 – 13:00 Scoring – group 2 and group 4 | Andrzej |
| | 14:00 – 17:00 gH2AX analysis and scoring – all groups | Nadia |
| Tue 19/11 | 09:30 – 13:00 Harvesting cells for aberrations – group 2 | Zuza |
| | 09:30 – 13:00 GammaH2AX exercise – group 1 | Nadia |
| | 09:30 – 13:00 Scoring – group 3 and group 4 | Andrzej |
| | 14:00 – 17:00 Scoring – all groups | Andrzej |
| We 20/11 | 09:30 – 13:00 Harvesting cells for aberrations – group 4 | Zuza |
| | 09:30 – 13:00 GammaH2AX exercise – group 2 | Nadia |
| | 09:30 – 13:00 Scoring – group 1 and group 3 | Andrzej |
| | 14:00 – 17:00 Scoring – all groups | Andrzej |
| Thu 21/11 | 17:00 – Swedish food tasting | |
| | 09:30 – 12:00 Scoring and preparing presentations – all groups | Andrzej |
| Fri 22/11 | 14:00 – 17:00 Scoring and preparing presentations – all groups | Andrzej |
| Fri 22/11 | 09:30 – 12:00 Presentation of results, discussion, all groups | All |
| | End of course | Andrzej |

II. 染色体異常解析の研修

細胞核内にある DNA が損傷すると、染色体の構造変化パターンには 2 種類存在する。一つは染色分体異常である切断や交換であり、もう一つは染色体異常である転座・欠失・二動原体染色体・無動原体であり、それぞれ安定型と不安定型に区別される。これらの発生要因は、電離放射線や化学物質、またはその他の遺伝毒性ストレスによるものである。染色体異常を観察することで、放射線被ばくによる影響をモニタリングすることが可能である。

これら染色体異常のうち二動原体染色体は、2 つの動原体を持つ異常染色体であり、電離放射線に対して線量依存的な出現頻度がみられるため、異状染色体数を計数することで生物学的放射線被ばく線量評価（バイオドシメトリ）に用いられる（図 1）。

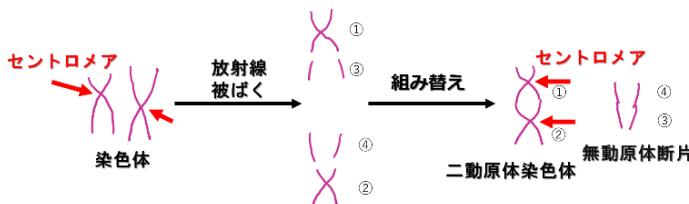


図 1. 二動原体染色体の発生プロセス

本実習では、高線量率の 2 グレイ (Gy) の γ 線が照射された血液リンパ球を専用培地で培養後 4 時間、19 時間、24 時間の標本、4 Gy の γ 線が照射された血液リンパ球を 24 時間された標本、及び高線量率の 1 Gy の α 線が照射さ

れた血液リンパ球を培養後 24 時間の標本それが、A-E とランダムに名前がつけられたものが配られた。そして顕微鏡で染色体異常の種類毎にスコアリングし、A-E の 5 標本それぞれで 50 細胞ずつ観察して評価した。筆者が実際に観察した標本及びその様子を図 2 に示す。



図 2. 筆者・福士による顕微鏡を使用した染色体異常のスコアリングの様子

原子力災害の際、個人被ばく線量の評価にバイオドシメトリの利用が国際原子力機関から推奨されていること、またとりわけ二動原体染色体頻度評価はグローバルスタンダードであることが説明された。しかしその評価の安定性には十分な訓練が必要とされている点が普及拡大のための課題である。この点から筆者・福士のグループでは、その計数技術を学ぶと共に、染色体異常数と学業レベル、染色体異常数と性別の違い、及び染色体異常数と視力の計 3 パターンについて、関連性があるかユニークな提案のもと比較検討も行った。図 3 にその一例として、染色体異常数と学業レベル（学士、修士、博士）の比較検討の結果を示す。グループ内での議論の結果、学業レベルによるスコアに差はみられないという結論に至った。

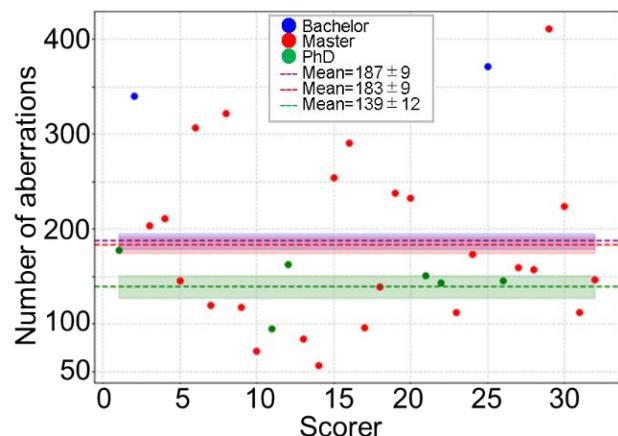


図 3. 筆者のグループで検討した染色体異常数と学業レベルとの関係
横軸をナンバリングされた受講生
縦軸を異常のカウント数とする

その他、染色体異常数と性別や視力の間でも検討したものの、違いはみられなかった。本実習のグループ内で議論を進めて解析したこのような発想は、筆者・福士にとって思いつかなかった上、とても新鮮で面白く感じた。

III. 有糸分裂指数分析に関する研修

有糸分裂指数は、細胞生物学を考える上でとても重要な指標であり、ある時点における有糸分裂期にある細胞の割合を把握すると共に、細胞増殖、細胞毒性、細胞周期の進行に対する外的要因の影響についての理解を助ける。有糸分裂を中期で停止させて解析するためには、細胞培養時にコルセミドを加え、紡錘体の形成を阻害する必要がある。細胞遺伝学では、塩化カリウム KCl やクエン酸ナトリウムのような低張性溶液がよく用いられ、どちらの溶液も細胞の膨潤（および溶解）を誘導して染色体観察を容易にさせること。

本研修では、KCl とクエン酸ナトリウムの 2 種類の低張液が 2 つの温度条件下（室温と 37°C）で分裂指数及び染色体形態に及ぼす影響をヒト細胞株である RPE-1 細胞を用いて比較した。また、2 種の低張液と温度が分裂活性に影響を与えるかも調べた。はじめに、低張液（グループ 1,2 では 0.075 M の KCl を、グループ 3,4 では 1% のクエン酸ナトリウムを添加）で 50 時間培養した細胞にコルセミドを添加し、更に 2 時間培養した。この時、培養温度条件は、グループ 2,3 は室温、グループ 1,4 は 37°C にてそれぞれ培養した。培養後、細胞は回収し、遠沈によってペレットとした。その後、固定液を氷冷下で添加し、固定細胞はスライドに滴下して沈着させた上でギムザ染色をおこない標本とした。

それぞれの条件下における標本解析の結果、KCl を室温で投与した場合に分裂指数が最も高い結果となった。また、クエン酸ナトリウム添加による処理は、37 °C のインキュベーションと組み合せることで、良好な低張処理が得られることがわかった。

IV. Fluorescence in situ hybridization (FISH) 解析の研修

FISH 法は、細胞内にある特異な DNA や RNA の相補配列に蛍光標識したプローブを結合させて検出する技術である³⁾。この標本観察は蛍光顕微鏡を利用する。例えば、染色体異常の検出が応用例として挙げられる。この技術は、ギムザ染色法 (FISH 法より安価で簡易) と比較して以下の特徴がみられる。

- ① 特定の DNA または RNA 配列を標的とするため、特異性が高い。
- ② マルチカラーFISH 法により、異なる標的を色分けが可能である。

以上の特徴を講義で理解した後、グループ実習にて与えられた 50 枚の FISH 画像から転座、二動原体染色体、環状染色体をスコアリングした。転座と二動原体染色体の比率は、被ばく後時間経過と共に変化する。転座は被ばく後、長期において検出されるものの、二動原体染色体は被ばく後、数日で減少していく特徴を持つ。したがって、「二動原体染色体／転座」の比が高値であれば、被ばく直後であることを意味する。

実習では、画像によって染色体の蛍光色が異なったり、セントロメアが描出されていなかったりと、スコアリングが困難な画像も含まれており、それら不確かさ要素も含め評価した。実際にスコアリングすると、筆者・福士はこれら染色画像への慣れ(熟練度)が必要であることを感じた。また、二動原体染色体の評価及び転座の評価を FISH 法にて経験し、個々に評価のばらつきがみられたことから、計数方法に一貫性をもたせる重要な性を感じた。

V. γ-H2AX アッセイの研修

γ-H2AX アッセイの手法とその解析方法を学ぶ実習が行われた。γ-H2AX とは、DNA 損傷時(特に二本鎖切断: DSBs)に発生する分子で、ヒストンタンパクである H2A の一つである⁴⁾。DSBs が生じると、H2A のセリン 139 がリン酸化されてリン酸化 H2AX (γ-H2AX) が生成される。これにより、損傷箇所に修復タンパクが集まり、DNA 修復が効率よく進むようサポートされる。よって γ-H2AX は DNA 損傷の指標として、がん研究や放射線効果の評価に用いられる。本実習の γ-H2AX アッセイには RPE-1 細胞が用いられ、その手順を以下に紹介する。

- (a) 細胞を 1ml の 70% エタノールにて 10 分間固定する。
- (b) 1ml の 0.2% Triton X を加え、室温で 5 分間インキュベートし、細胞膜の透過処理を進める。その後、2ml のリン酸緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄する。
- (c) 第一免疫染色；スライドガラス状に接着させた標本に一次抗体（抗マウスリン酸化ヒストン H2AX モノクローナル抗体）を添加し、パラフィルムで覆い、湿潤を保つ。湿潤チャンバー内で 37°C、30 分間インキュベートする。2ml の PBS で 2 回洗浄する。
- (d) 第二免疫染色；暗所にて蛍光標識二次抗体（抗マウス IgG-FITC 抗体）を添加し、パラフィルムで覆い、湿潤を保つ。湿潤チャンバー内で 37°C、30 分間インキュベートする。その後 2ml の PBS で 2 回洗浄する
- (e) 核染色用 DAPI による染色を室温で行い、10 分間インキュベートする。その後 2ml PBS で 2 回洗浄する。
- (f) マウンティング処理を行い、カバーガラスで封入する。その後蛍光顕微鏡で観察（図 4）。

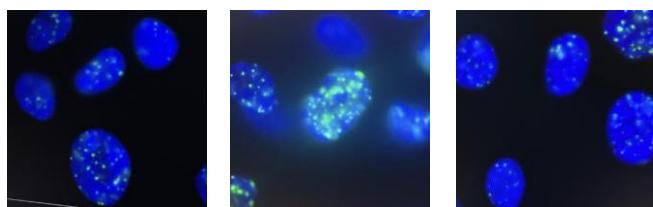


図 4. 観察された γ -H2AX 染色部位の画像。
細胞核が青色, γ -H2AX 染色部位が緑蛍光を示す。



図 5. 実習中の様子

以上の手順で進めた標本の解析は, ImageJ や Fiji に取り込み, その蛍光抗体の局在 (Foci) を計数した。標本は, コントロール群, 放射線照射 0.2 Gy, 0.4 Gy, 0.8 Gy の計 4 サンプルとなった。その結果, 大きな Foci (LF), 小さな Foci (SF) 及びそれらの合計 (TF) に分類し, 図 6 のような線量依存的に増加する特徴的結果となった。

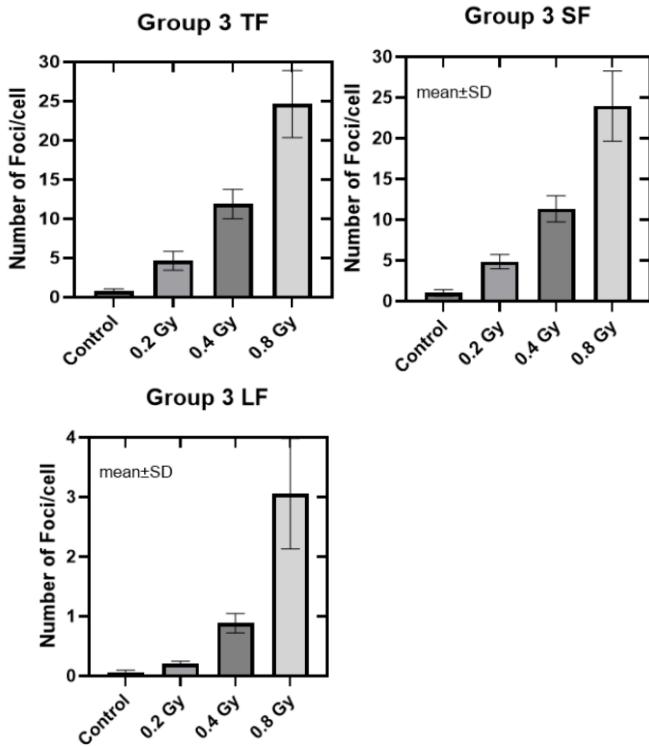


図 6. γ -H2AX の Foci 数と放射線量の関係

更に, 放射線照射条件ごとに Foci 総数と bin の分布をヒストグラムを用いて表示したところ, 線量増大とともに bin

は大きい方向へシフトすることがわかった (図 7)。

VI. グループプレゼンテーション

最終日は, グループごとのプレゼン及び議論が行われ, どの参加者も遠慮ない積極的な発言がみられた。筆者が感じたこととして, どのグループメンバーも高い発想力と解析技術を有していて, 筆者・福士, 佐藤は, 彼らと比べ大きな鍛錬の差を感じた。より正しく迅速に解析できるようになりたいと強く感じたグループディスカッションの時間であった。

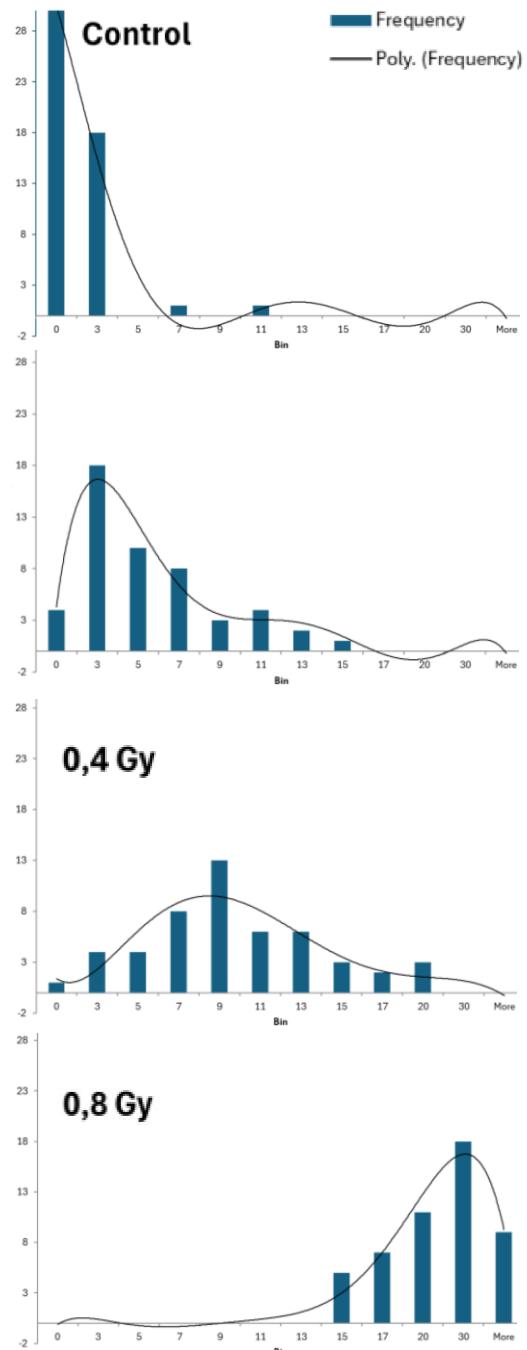


図 7. γ -H2AX の Foci サイズと線量による分布の変化。
横軸を foci サイズ (Bin.), 縦軸をカウント数とする。



図 8. 筆者・福士（左），佐藤（右）の
グループプレゼンテーションの様子

VII. 統括

海外での研修参加は筆者・福士，佐藤にとって初めての経験であり，若手研究者である参加者との交流は大変貴重な時間となった。講義，実習，プレゼンテーション準備と，どれも有意義な内容がこの 2 週間の予定に組まれていた。その講義・実習内容は放射線の生物学的影響についての基礎的な知識と研究技法であり，普段日本語で学ぶ筆者らにとって，英語による研修は刺激的であった。また，筆者らは英語によるコミュニケーションを通し，グループワークを経験したが，全てを完全に理解できなかつたものの，交流の輪の中に入りながら伝えようとする努力が大切だと痛感した。しかしながら，筆者・福士が反省していることとして，あらゆる場面で自分の伝えたいことをうまく英語で思った通りに表現できなかつたことである。また筆者 B は放射線生物学という学問を，母国の日本から離れて国際的に見たとき，いかに本邦のテキスト内では学びされていない広がりがあったこと，そして勉強不足であったことを痛感した。

筆者らは，本研修で学んだ最新の放射線生物解析技術といたいたい刺激を忘れず，現在大学院研究で取り組んでいるプロジェクト研究にさらに邁進する決意を持った。



図 9. 左から福士，Andrzej Wojcik 教授，佐藤

利益相反 開示すべき利益相反はない。

謝辞 本研修プログラムは，弘前大学・生体応答科学研究中心の支援のもと参加した。また弘前大学大学院保健学研究科・ストックホルム大学放射線防護研究センター間の部局間学術協力協定のもと参加が実現した。招待いただいた RadNorm プロジェクト CELET コース主催者であるストックホルム大学放射線防護研究センター Andrzej Wojcik 教授に深謝いたします。

引用文献

- 1) RadNorm ホームページ. <https://www.radonorm.eu/> (2024-12-13)
- 2) 山本慶輔, 千葉満, 門前曉: 電離放射線による細胞への影響評価-CELET course 2023-欧州研修会報告. 保健科学研究 14: 65-71, 2024.
- 3) Meher PK, Lundholm L, Wojcik A: Fluorescence in situ hybridisation for interphase chromosomal aberration-based biological dosimetry. Radiat Prot Dosimetry. 199: 1501-1507, 2023.
- 4) Raavi V, Perumal V, F D Paul S: Potential application of gamma-H2AX as a biodosimetry tool for radiation triage. Mutat Res Rev Mutat Res. 787: 108350, 2021.

【Others (training report)】

Effects of high and low LET ionizing radiation on cells ～CELET course 2024 training report～

RYOSUKE SATO¹, MAI FUKUSHI¹, SATORU MONZEN^{*1, 2}

Received December 18, 2024 ; Accepted January 29, 2025

Abstract: The authors participated in the Cellular effects of high and low LET ionizing radiation – introduction to radiation biology Course (CELET) held at Stockholm University in Stockholm, Kingdom of Sweden from November 11, 2024 to November 22, 2024. We especially focused on the lectures and practical training on methods for detecting chromosomal abnormalities and DNA damage in this two week, and also introduce our own special experiences. This training program was held for the purpose of learning research methods on the toxic effects of ionizing radiation on genes, and approximately 30 graduate students and young researchers from all over the world with different academic backgrounds participated. The practical training was divided into four groups, and a group discussion was held on the final day. In particular, many opinions were exchanged among the participants during practical training on dicentric detection analysis, mitotic index analysis, FISH analysis, and γ -H2AX counting evaluation, which are the world standards for biological dose evaluation. The authors were greatly inspired by their experience at CELET, which led to their desire to further pursue project research in graduate school. We would also like to recommend this course.

Keywords: Ionizing radiation, LET, Biological effects, Chromosomal abnormalities, γ -H2AX