

平成 10 年度新規課題  
(厚生省)

◎国立公衆衛生院

1. 無機金属元素による放射線障害回復機構に関する研究

◎国立健康・栄養研究所

2. 炎症としての、放射線による細胞障害の解析及びそれを鎮静・正常化する栄養因子等に関する研究
3. 放射線照射を利用した生体内における酸化・抗酸化の評価システムの構築と応用

◎国立医薬品食品衛生研究所

4. 照射食肉等の検知法に関する研究
5. 生薬の電子線滅菌ならびに遺伝子解析法を主体とした照射生薬の検知法に関する研究
6. 新規グルココルチコイド受容体の検索及びその臨床応用に関する基礎的研究
7. 低線量放射線による微生物毒素産生能の低減化に関する研究

◎国立感染症研究所

8. ラジオアイソトープを用いた phage display モノクローナル抗体による高感度な毒素及び他の病原因子の検出法の開発
9. 放射線被照射宿主におけるウィルス感染の病態とその対策の基盤的研究

◎国立小児病院

10. 放射線感受性を決定する新規生体分子の機能解明とその応用に関する研究

◎国立療養所静岡東病院

11. てんかん原性形成機序に関する生化学的研究

## 原子力関係事業の進捗状況

省庁名(厚生省)

事 項	年 度	事業実施期間	平成8年度 までの実績	平成9年度 計画	平成10年度 計画	平成11年度 計画	平成12年度 計画	実施機関名 又は委託先	備 考
無機金属元素による放射線障害 回復機構に関する研究	平成10年度 ～ 平成13年度				細胞レベルにおける回復機構を検討するため、実験動物の全身にX線を照射した(～2Gy)後24時間目に脾臓細胞と骨髓細胞を採取し、それぞれ mitogens と GM-CSF 添加、培養した細胞における①元素の細胞内あるいは細胞膜へのとりこみ(膜の透過性も調べるため <sup>45</sup> Caと同時に添加、測定する)、②細胞内成分との結合(HPLC等による)、③各種濃度の元素を添加して、in vitroで培養した細胞の活性化( <sup>3</sup> H-Thymidineのとりこみを指標とするDNA合成能)を中心に調べる。一部は、両細胞における <sup>24</sup> Mgや <sup>59</sup> Feのとりこみについても検討する。	照射後、全身における生理的修飾作用を受けない細胞自体の機能や作用を調べるため、非照射動物から採取した細胞につきin vitroで照射後、前年度に調べた各事項を中心に調べる。	全身照射後に元素を各種多量に皮下投与して活性化させた細胞につき、上記各事項を中心に調べる。一部は、元素と元素、元素とcytokineなどを照射後の動物に投与して、防護の複合効果を調べる。	国立公衆衛生院	

## 無機金属元素による放射線障害回復機構に関する研究（新規）

## 1. 目的

過去一連の研究において、重致死線量照射後主として24時間目のマウスへ無機金属元素（亜鉛、コバルト、マンガン、マグネシウムなど）を多量に投与すると、死亡率の明らかな低下を観察した。その原因解明の一端として、まず、亜鉛とコバルトの放射性同位元素（ $^{65}\text{Zn}$ 、 $^{60}\text{Co}$ ）をトレーサとして使用し、全身からの排せつや、組織・臓器への移行、蓄積、排せつ、消化管からの吸収率への影響などを調べた。その結果、①亜鉛については、多量経口投与の場合、照射により骨、血液および脾臓において、相対的な亜鉛のとりこみ量の増大を認めた。また、②コバルトについても照射により、脾臓、血液、腎臓において相対的なとりこみ量の増大を認めた。このため、これら造血系、免疫系細胞における両元素のとりこみ量の増大は放射線障害回復との関連を示唆したので、その回復機構を調べる目的から、元素のうち、まず、 $^{60}\text{Co}$ につき、細胞内へのとりこみを測定すると、明らかなとりこみ量増大を示した。 $\text{Co}$ 元素がこのような細胞にとりこまれること自体これまでほとんど報告例がない。一方、 $\text{Zn}$ についてはDNA合成時に細胞に多量にとりこまれることが既に知られているが、障害回復との関連やとりこみ量、などについては不明である。いずれにしても上記元素の細胞へのとりこみは、障害回復過程における細胞レベルの防護のメカニズムを示唆している。すなわち、無機金属元素投与により、細胞レベルにおける①DNAの修復、②有効な生体成分の産生、③酵素の活性化、などが促進される可能性がある。そこで、これら細胞レベルにおける防護のメカニズムを調べるため、元素の細胞内へのとりこみ、細胞内成分との結合、細胞活性化などを中心に検討し、さらに、個体全身レベルについても、上記元素間の複合効果やその効果機構、などを調べる。

## 2. 平成10年度研究計画

本年度においては、まず、細胞レベルにおける回復機構を検討するため、実験動物の全身にX線を照射した（ $\sim 2\text{Gy}$ ）後24時間目に脾臓細胞と骨髓細胞を採取し、それぞれmitogeneとGM-CSF添加、培養した細胞における①元素の細胞内あるいは細胞膜へのとりこみ（膜の透過性も調べるため $^{60}\text{Co}$ と同時に添加、測定する）、②細胞内成分との結合（HPLC等による）、③各種濃度の元素を添加して、in vitroで培養した細胞の活性化（ $^3\text{H}$ -Thymidineのとりこみを指標とするDNA合成能）を中心に調べる。一部は、両細胞における $^{24}\text{Mg}$ や $^{55}\text{Fe}$ のとりこみについても検討する。

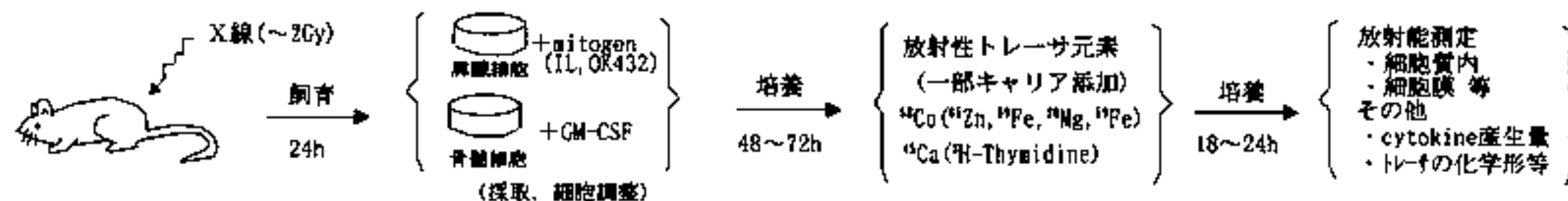
## 3. 平成10年度概算要求額

概算要求総額	4,067 千円	(0 千円)
(内訳)		
(1)消耗品費	3,265 千円	(0 千円)
(2)印刷製本費	32 千円	(0 千円)
(3)通信運搬費	129 千円	(0 千円)
(4)借料・損料	100 千円	(0 千円)
(5)賃金	330 千円	(0 千円)
(6)雑役務費	157 千円	(0 千円)
(7)職員旅費	54 千円	(0 千円)

## 無機金属元素による放射線障害回復機構に関する研究

## 1. 細胞レベルの機構

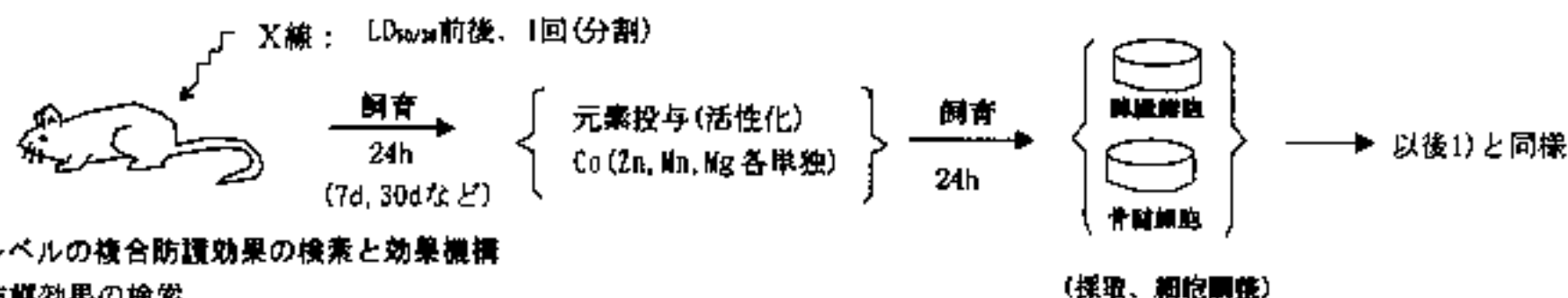
## 1) 全身照射後の細胞について



## 2) 非照射個体から採取した細胞をin vitroで照射

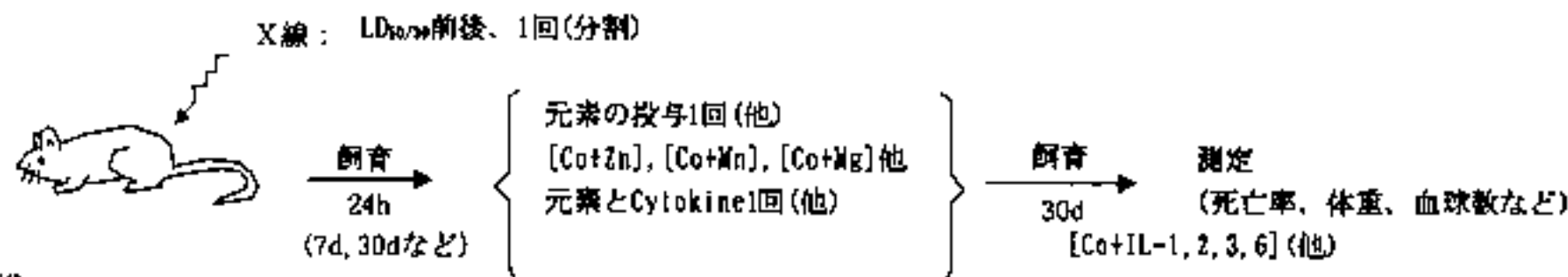


## 3) 全身照射後元素を多量投与(活性化)



## 2. 全身レベルの複合防護効果の検索と効果機構

## 1) 複合防護効果の検索



## 2) 効果機構

全身レベルの複合元素(放射性トレーサ)の排せつ・組織・臓器中の元素の存在状態、などを調べる。

原子力関係事業の進捗状況

省庁名(厚生省)

年度 事項	事業実施期間	平成8年度 までの実績	平成9年度 計画	平成10年度 計画	平成11年度 計画	平成12年度 計画	実施機関名 又は委託先	備考
炎症としての、放射線による細胞障害の解析及びそれを鎮静・正常化する栄養因子に関する研究	平成10年度 平成12年度			X線照射した線維芽細胞の増殖を、照射していない細胞に移す。又はメンブレン・インサート付きシャーレで一緒に培養する等により、再現性よく傷害伝播を観察するための基礎条件を確立する。X線照射された細胞が発現する免疫因子をRT-PCR法、ノーザン法で解析し傷害を伝播する因子の検出を絞る。X線照射した細胞の増殖中の、それらのサイトカインをELISA法で検出定量し、傷害を伝播する因子をほぼ同定する。	前年度に引き続いて、傷害伝播因子を同定する。そのサイトカインを細胞に添加して、細胞の反応を見る。細胞死が起きる場合、それがアポトーシスによるものか、末端標識法及びDNAラダー検出法で調べる。どの様なメカニズムで細胞死が起きるのか解析する。	傷害伝播を観察する系に傷害伝播因子の可溶性レセプターやアンタゴニスト、栄養因子を添加して、放射線による炎症反応を鎮静化、正常化するものをスクリーニングする。どんなメカニズムでそれが引き起こされるのか研究する。	国立健康・栄養研究所	この研究により傷害伝播の機構が解明できる。又、放射線傷害を抑える治療法の開発につながる可能性がある

炎症としての、放射線による細胞障害の解析及びそれを鎮静・正常化する栄養因子等に関する研究  
新規（平成10～12年度）

〔研究の目的〕

我々は前々課題で放射線によるDNA損傷を解析したが、それは放射線の高い致死率から予想される程度よりはるかに軽微で、しかもその大部分は短間のうちに修復される事がわかった。放射線が細胞に膜損傷も与えること、そのDNA損傷の中には修復し難い二本鎖切断のような傷害も含むことを考慮にいれても、放射線の致死率は説明できない。そこで、放射線を照射された細胞内で起きる炎症反応に注目した。以前から、X線照射したヒト線維芽細胞の培養地を頻繁に替えると生存率が上がる場合がある事、X線照射した細胞の培地を照射していない細胞に加えると細胞の状態が悪くなる(?)事があり、照射した細胞の培地に何かが含まれていると考えてきた。皮膚の線維芽細胞や表皮角化細胞もある種の炎症サイトカインを分泌する事が報告され、実際にRT-PCR法で確かめたものもある。

本研究では放射線による細胞障害を単にDNA損傷という面からだけでなく、もっと広く、炎症として捉え、分子免疫学的に解析する。特に、細胞レベル、個体レベルの放射線障害の実験結果から推測された「傷害伝播」という現象に注目し、傷害を伝播する免疫因子（サイトカイン）を同定して、傷害伝播の機序を明らかにするほか、その際に傷害伝播因子の可溶性レセプターやアンタゴニスト、各種の栄養因子を添加して、傷害伝播を抑制し、炎症反応を鎮静・正常化するものを見つける。本研究は、放射線障害を抑える治療法の開発につながる可能性がある。

又、放射線による炎症反応の研究は報告が少なく、特に傷害伝播については非常に少ない。本課題によって放射線障害の重要な部分を明らかにしたい。

〔平成10年度研究計画〕

初年度の今年度は、まず細胞培養の条件、照射条件等を再検討して、再現性よく傷害伝播の現象を観察できるようにする。次に、X線照射された細胞が発現する免疫因子を解析する事により、傷害伝播因子の候補を絞り、培地中のサイトカインを定量して、傷害伝播因子をほぼ同定する。

〔平成10年度概算要求〕

概算要求総額

5,124千円（ 0千円）

（内訳）

(1) 備品費（マイクロプレートリーダー一式）

737千円（ 0千円）

(2) 消耗品費

4,025千円（ 0千円）

(3) 印刷製本費

32千円（ 0千円）

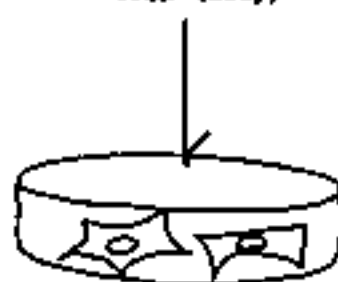
(4) 賃金

330千円（ 0千円）

## 本課題の着眼点

細胞に何程度のDNA損傷を与える処理をすると....

X線 (20Gy)



生存率 (コロニー形成能) 0.1%以下 (ほぼ全滅)

紫外線 (1J/m<sup>2</sup>)

約100% (大体全部生存)

アルキル化剤 (ジメチル硫酸, 50  $\mu$ M)

20~30%

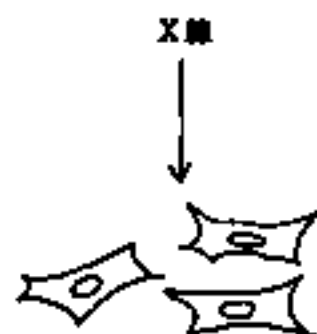
何故、X線はこんなに致死率が高いのか?

理由1→

DNA損傷以外のダメージがある

例、膜損傷、DNAの二本鎖切断...

照射されていない細胞



免疫因子 (インターロイキンなど) を放出



細胞死

理由2→

傷害を伝播する機構が存在

## 研究項目

1. 傷害伝播の現象をしっかりと捉える  
(細胞の培養条件、照射量、照射後の時間等を検討)

2. 傷害伝播因子を同定する

a) まずmRNAレベルで、X線照射された細胞が発現する免疫因子を解析し、候補を絞る (RT-PCR法、ノーザン法)

b) X線照射した細胞の培養中のサイトカインをELISA法で調べる  
→  $\gamma$ -TNF $\alpha$ レベルが重要



傷害伝播の機構が明らかになる

3. 傷害が伝播された細胞はどう反応し、細胞死が見られる場合にはそれはアポトーシスか? どんな機序でそうなるのか?

4. 傷害伝播の系に栄養因子等を追加して、放射線による炎症反応を鎮静・正常化するもの、傷害伝播を抑制するものをスクリーニング



放射線障害を抑える治療法の開発につながる可能性

初年度は  
この部分  
を行います

原子力関係事業の進捗状況

省庁名(厚生省)

年度 事項	事業実施期間	平成8年度 までの実績	平成9年度 計画	平成10年度 計画	平成11年度 計画	平成12年度 計画	実施機関名 又は委託先	備 考
放射線照射を利用した生体内における酸化・抗酸化の評価システムの構築と応用	自平成10年度 至平成12年度			X線照射条件 (線量、照射時間、照射対象)と DNAや脂質の 酸化損傷、抗酸化物質の低下、 抗酸化酵素系の変動を測定。 運動負荷動物を用いた微弱な 損傷の増幅に関する検討。	化学物質の暴露、高齢動物高 血圧や糖尿病などの疾病動物を 用いた微弱な損傷の増幅に関する 検討。	評価実験系の 基礎検討の確立 微弱な損傷を 有する動物にビ タミンC、Eを 投与し、酸化・ 抗酸化評価系の 妥当性を検証。	国立健康・ 栄養研究所	放射線(X線)の照射を利用した生体内における 酸化・抗酸化評価システムの構築を確立する。



項目名（新規） 放射線照射を利用した生体内における酸化・抗酸化の  
評価システムの構築と応用

〔研究の目的〕

生体成分である脂質やDNAの酸化損傷は、癌や動脈硬化などの疾患、ならびに老化に関与する。それ故、生体内の酸化・抗酸化状態の評価、ならびに抗酸化性を有する食品成分の生体内における有効性が注目されている。本研究は、放射線照射が生体成分に容易に酸化損傷を誘発できることを利用し、1) 疾病の発症初期や微量の化学物質暴露、強度の運動負荷の条件などにおける微弱な酸化損傷を2次的な放射線照射により増幅して容易に検出し易くする実験手法の開発、2) 生体内において食品成分の抗酸化能が正確に評価できる実験系の構築をおこない、その手法が生理病理へ応用できるようにすることである。本研究で得られた結果は、同時に食品や栄養を介した放射線障害の予防、放射線治療を考える上においても貴重な資料になり得るものと考えられる。

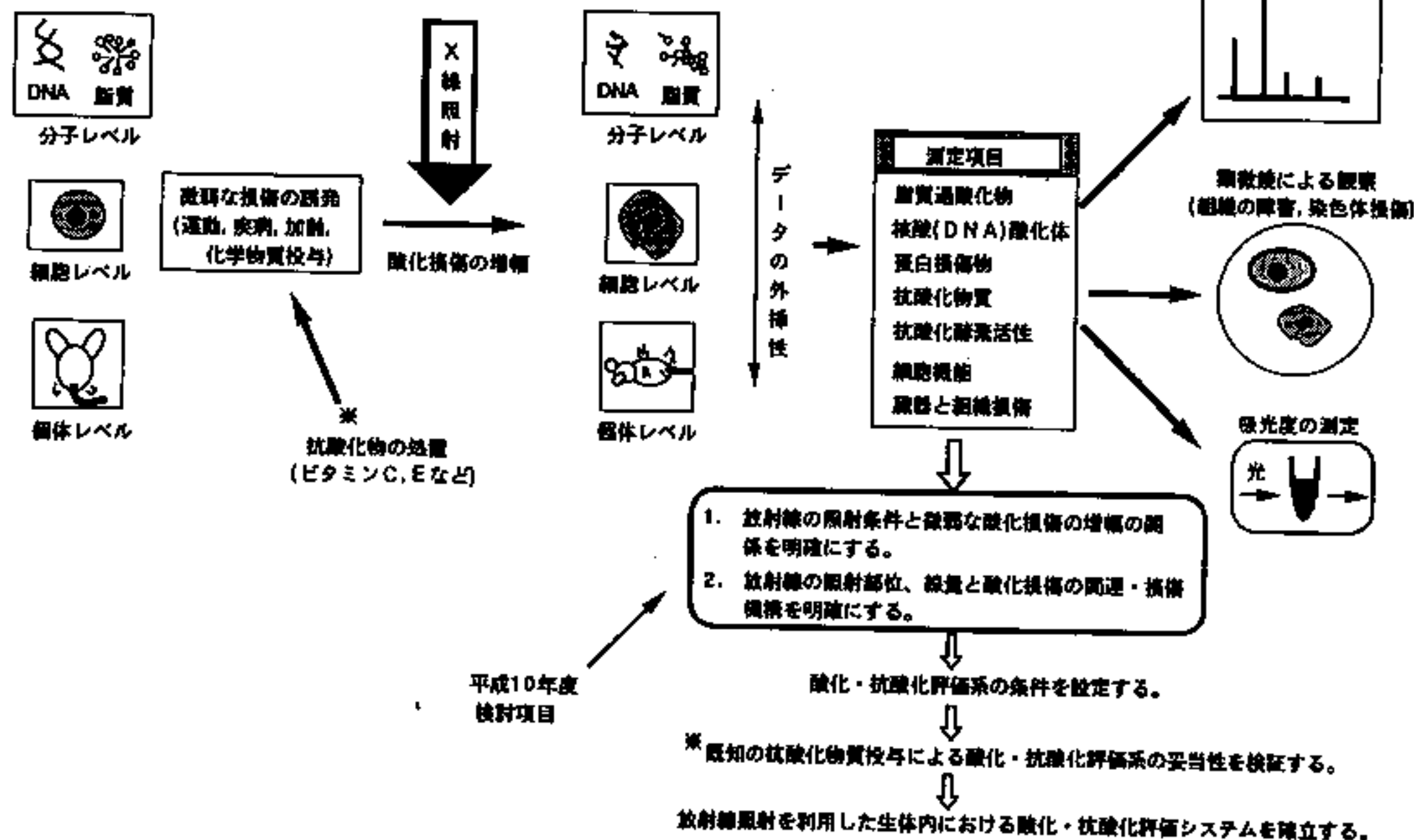
〔平成10年度研究計画〕

平成10年度は、X線照射条件（時間と線量）と照射後のDNAや脂質の酸化損傷度、抗酸化防御系の変動を系統的に検討する。次にこの結果を踏まえ、微弱な酸化損傷を誘発したラットやマウスの細胞や個体全体にX線照射し、微弱な酸化損傷の増幅作用に関する検討を行う。

〔平成10年度概算要求〕

概算要求総額	4,344	千円（0千円）
（内訳）		
（1）施設備品費	0	千円（0千円）
（2）消耗品費	3,982	千円（0千円）
（3）印刷製本費	32	千円（0千円）
（4）賃金	330	千円（0千円）

## 放射線照射を利用した生体内における酸化・抗酸化の評価システムの構築と応用



年度 事項	事業実施期間	平成8年度 までの実績	平成9年度 計 画	平成10年度 計 画	平成11年度 計 画	平成12年度 計 画	実施機関名 又は委託先	備 考
照射食肉等の検知法に関する研究	平成10年度 ↓ 平成13年度			照射肉類の検知 に有用とされるD NA解析法につい て、これを実際に 実施する上で必要 な装置の調査を行 い、分析法を確立 する。さらに、必 要ならばこの方法 の改良を行う。	初年度の実績に 基づき、引き続き DNA解析法の確 立を目指し、照射 条件、温度条件、 保存条件等の検知 に対する影響を調 べる。照射した種 々の食品、特に肉 類について、確立 した検知法を用い その適用性を検討 する。	炭化水素法、シ クロブタノン法等 を検討し、実際に 役立つように改良 等を行い、実用化 を目指す。	国立医薬品食品衛 生研究所	

## 9. 照射食肉等の検知法に関する研究（新規）

### 研究の目的

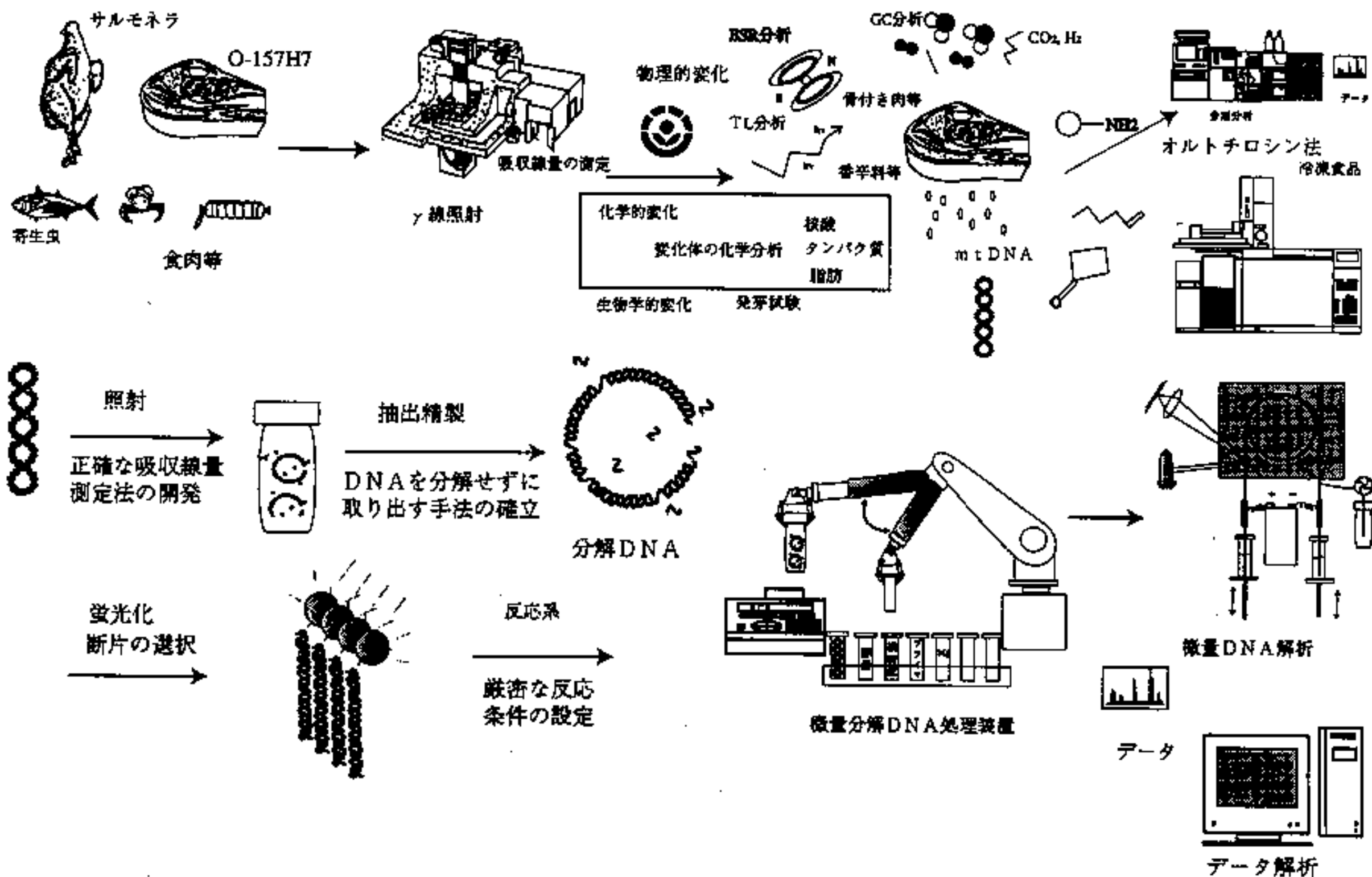
照射食品は国際的にみて、その重要性が高くなりつつあり、その検知を的確に行うことが、WHO等の機関により求められている。我が国においても、貿易自由化の流れの中で照射食品検知法のシステムを構築する必要がある。本研究では、O-157の原因食品として推定され、注目を集める食肉類を中心に、IAEAから提案されているDNA解析法、炭化水素法等の手法をもとにそれぞれを検討し、照射食品検知システムの確立を目指している。

### 平成10年度研究計画

平成10年度は、“照射冷凍食品の検知法”の研究で得られた成果の一部をもとに、DNA解析法の技術の確立、食品中のDNAの照射による変化を検知する手法の最適化等を行う。

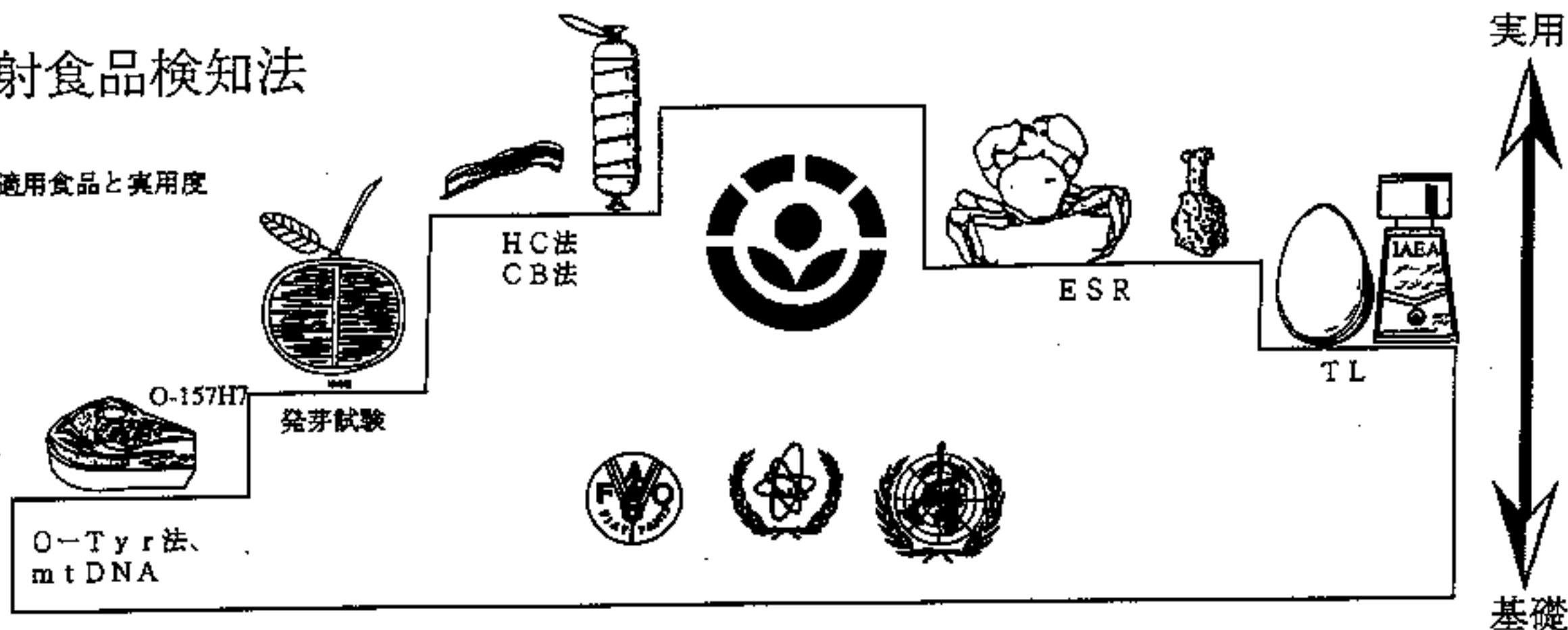
### 平成10年度概算要求

概算要求額	15,411千円（0千円）
（内訳）	
（1）職員旅費	101千円（0千円）
（2）試験研究費	15,310千円（0千円）
備品費	8,033千円（0千円）
消耗品費	7,120千円（0千円）
印刷製本費	32千円（0千円）
雑役務費	125千円（0千円）

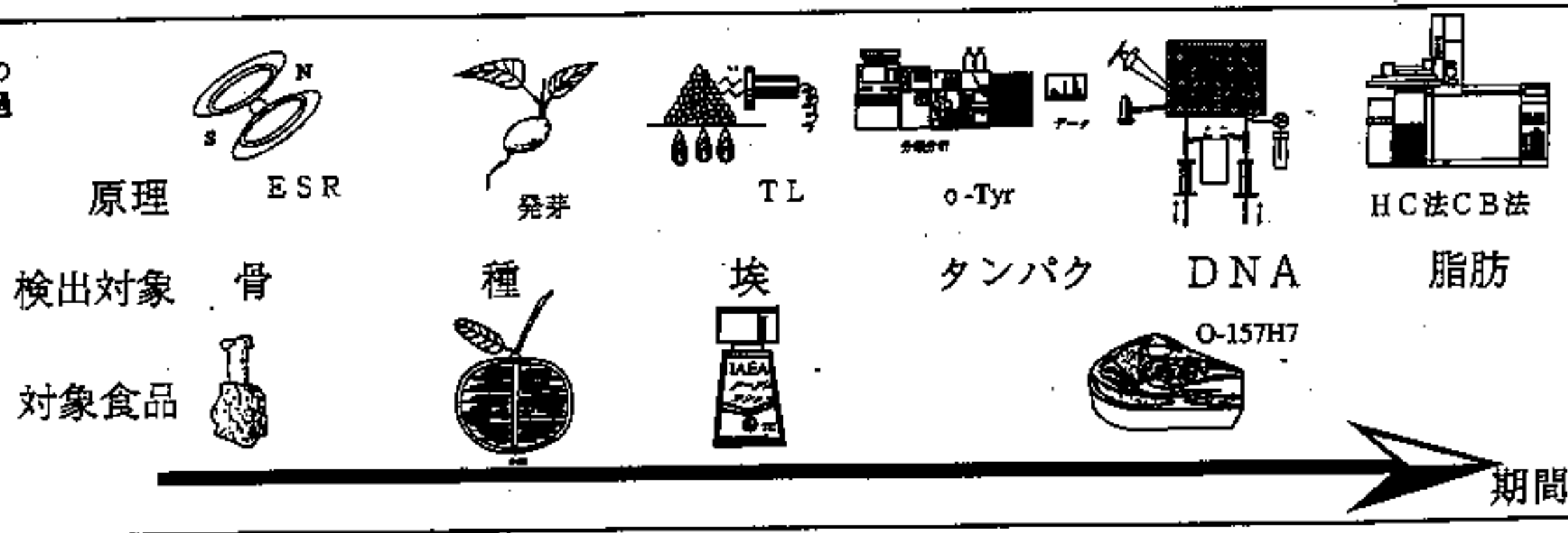


# 照射食品検知法

その適用食品と実用度



衛試での  
検討経過



年度 事項	事業実施期間	平成8年度 までの実績	平成9年度 計 画	平成10年度 計 画	平成11年度 計 画	平成12年度 計 画	実施機関名 又は委託先	備 考
生薬の電子線滅菌ならびに遺伝子 解析法を主体とした照射生薬の検 知法に関する研究	平成10年度 } 平成13年度			根類生薬の粉末 形態における電子 線の透過率を測定 し汚染細菌、真菌 についての滅菌効 果を検討する。 根類生薬の基原 植物を生育させ、 内在DNAの生体 からの分離を行い、 乾燥生薬からの 分離の最適条件を 検討する。	葉類生薬、果実 生薬の全形および 粉末形態での電子 線による滅菌効果 を菌数ならびに有 効成分の変動によ り検討し、生薬類 に適した試料台の 設計を試みる。 植物体から分離 したDNAについて RAPD分析ならび にRFLP分析を行 う。また、乾燥生 薬についてDNA分 離を完成させる。	種子類生薬の全 形および粉末形態 での電子線による 滅菌効果を検討す ると共に生薬に適 した試料台を試作 する。 生薬の内在遺伝 子の特異性をRAP D分析、RFLP分 析により統行す る。特定が可能と なった一部の遺伝 子については照射 前後の乾燥状態の 生薬との比較を行 う。	国立医薬品食品衛 生研究所	(平成13年度) 草類、樹皮類生薬につ いて電子線による滅菌効 果を検討すると共に、生 薬に適した試料台の改良 を行い、生薬への電子線 滅菌法の導入を計る。 生薬の照射滅菌に対す る検知法として遺伝子解 析法を完成させる。

## 7. 生薬の電子線滅菌ならびに遺伝子解析法を主体とした 照射生薬の検知法に関する研究（新規）

### 【研究の目的】

生薬の微生物汚染はその特性から避け難く医薬品としての品質を損なう原因となるため、種々の滅菌法が試みられているがいずれも有効成分の変質を招きやすく、より有効な滅菌法の確立が求められている。そこで、平成6年度から9年度において $\gamma$ 線照射による滅菌法を検討し、同法が成分に与える影響が少なく、低線量の範囲内で有効な結果を示すことを明らかにした。

本研究では、近年急速に改良が進み、設備と制御の簡便性から利用の拡大が要望されている電子線加速器を応用し、諸外国に先駆けて生薬への滅菌法を開発し、 $\gamma$ 線照射法による成果を指標に検証することにより実用化への確立を図る。また、海外における照射滅菌の実状を考慮すると照射の検知法は重要であることから、より普遍性の高いと見込まれる遺伝子解析技術を用いて生薬内在遺伝子の照射による変動を解析し、新たな検知法の確立を目指す。

### 【平成10年度研究計画】

平成10年度は、生薬の汚染菌に対する電子線の滅菌効果と透過性による有効領域について検討する。また、検知法研究の初期段階として、乾燥した生薬からの遺伝子の分離を目的に、生薬起源植物からのDNA抽出を行い、内在遺伝子の特定を行う。

### 【平成10年度概算要求】

#### 概算要求総額

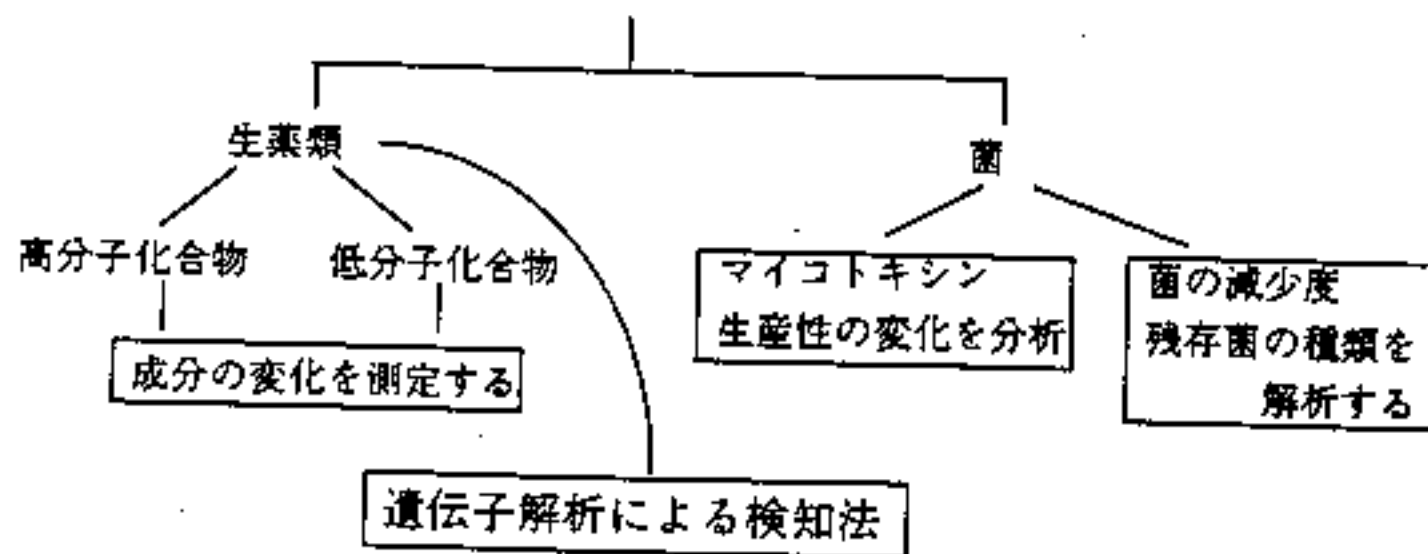
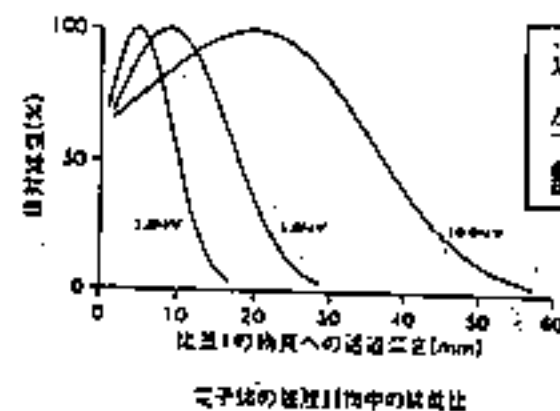
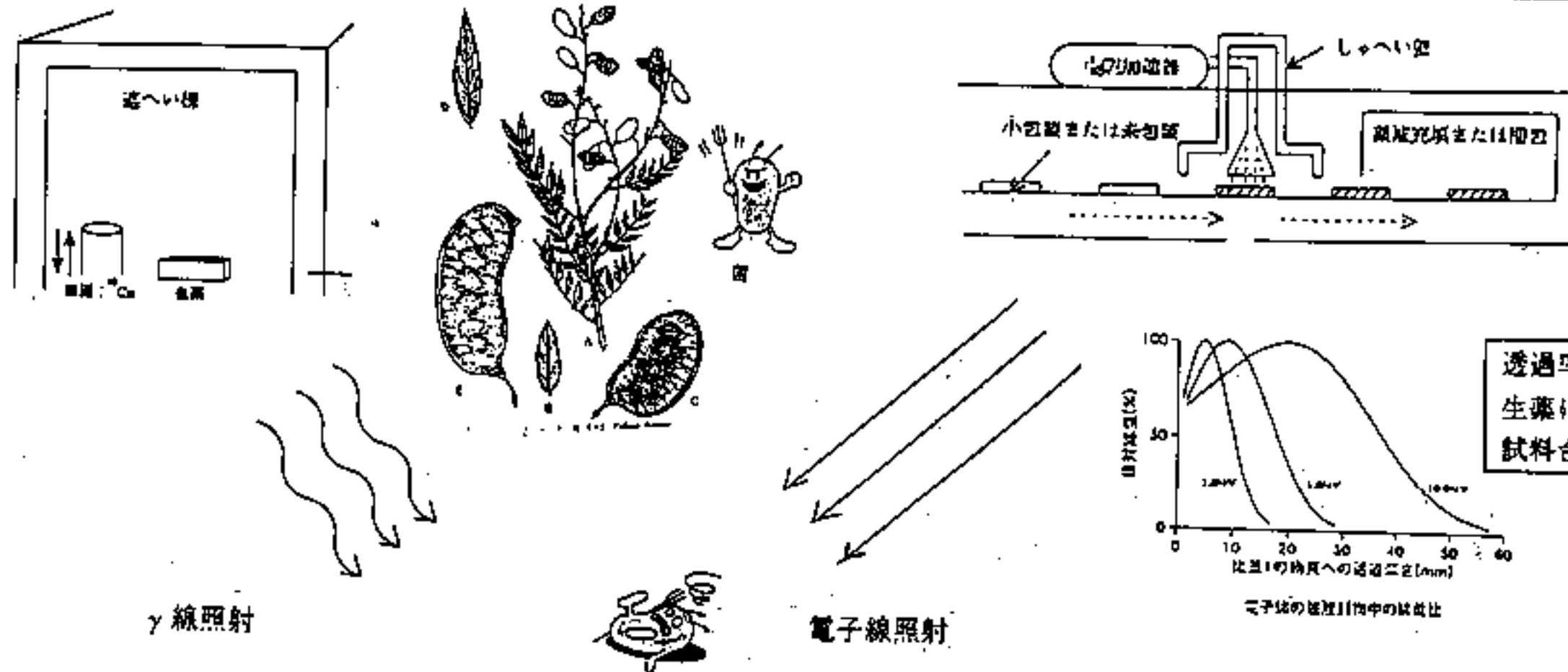
12,606千円

#### （内 訳）

（1）設備備品費	6,375千円（0千円）
（2）消耗品費	5,374千円（0千円）
（3）印刷製本費	32千円（0千円）
（4）賃金	471千円（0千円）
（5）雑役務費	248千円（0千円）
（6）職員旅費	106千円（0千円）



# 生薬の電子線滅菌ならびに遺伝子解析法を主体とした照射生薬の検知法に関する研究 (新規)



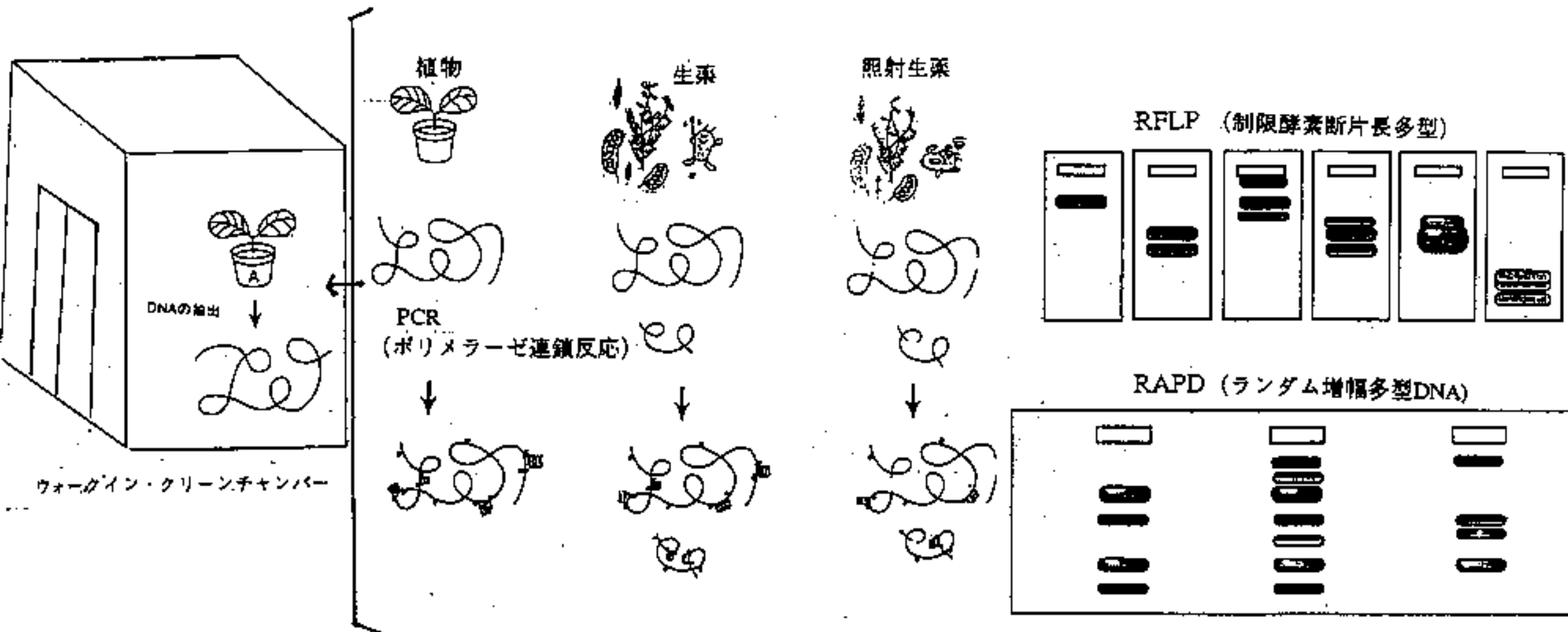
電子線滅菌が有利な  
生薬の種類、剤型、  
包装形態を特定する

生薬への電子線滅菌の導入

生薬の電子線滅菌ならびに遺伝子解析法を主体とした照射生薬の検知法に関する研究（新規）

生薬基源植物の内在DNAを抽出  
 照射前後の生薬からのDNAを抽出  
 PCRによりDNAを増幅  
 RAPD法による遺伝子解析を行う  
 RFLP法による遺伝子解析を行う

検知法の確立



年度 事項	事業実施期間	平成8年度 までの実績	平成9年度 計	平成10年度 計	平成11年度 計	平成12年度 計	実施機関名 又は委託先	備 考
新規グルココルチコイド受容体の 検索及びその臨床応用に関する 基礎的研究	平成10年度 ┌ 平成13年度			<sup>3</sup> H標識リガンド 結合能を指標とす る新規受容体の各 種性状の解明	<sup>3</sup> H標識ハガンド 結合能を指標とす る新規受容体の精 製	新規受容体に対す る抗体の作製 → 新規受容体の部分 一次構造の解明 → 新規受容体遺伝子 のクローニング、 塩基配列の決定 → 新規受容体蛋白及 びmRNA量測定 法の確立と、その 患者組織における 測定、治療成績と の比較	国立医薬品食品衛 生研究所	平成13年度は平成12年度 に引き継ぎ新規受容体蛋 白及びmRNA量の測定 法の確立と、その患者組 織における測定治療成 績との比較を行う予定で いる。

## 10. 新規グルココルチコイド受容体の検索及びその臨床応用に関する基礎的研究（新規）

### 1. 目的

グルココルチコイドは様々な疾患の治療に幅広く用いられる有用な薬剤であるが、その至適投与量の設定は困難であり、同じ量を治療に用いても患者によりその効き目は異なり思ったほどの治療効果が得られない場合や逆に副作用を起こすことがあり問題となっている。このグルココルチコイドの作用は特異的な受容体を介していることが知られていることから、このような感受性の違いは患者により受容体のレベルが異なることに原因があると考えられる。この受容体に関しては従来一種類知られていたが、治療における有効濃度が受容体の結合の飽和に要する濃度よりはるかに高いことから、新規受容体の存在が示唆されていたがその存在については不明であった。しかしながら最近我々は新規受容体の存在を確認することに成功し、実際グルココルチコイド作用発現に関与していることを示唆する結果も得ている。

先程の患者におけるグルココルチコイド感受性の違いがこの新規受容体レベルの不均一性に由来するならば、グルココルチコイド療養を行う必要のある患者でその新規受容体量を予め測定しておくことにより、例えば受容体量が少ない患者では多めの投与量、また逆に受容体が多い患者では低めの投与量を設定するなど各患者にあった至適な投与量を設定することが可能になると思われる。

本研究においてはこのような新規受容体量の測定がグルココルチコイド療法を行う上での診断法として有用であるかどうか、新規受容体測定法を確立して、実際に各種グルココルチコイド療法を行った患者において測定しその発現量と過去の治療成績と比較することにより検討し、その臨床応用を目指すことを目的とする。

### 2. 平成10年度研究計画と要求概要

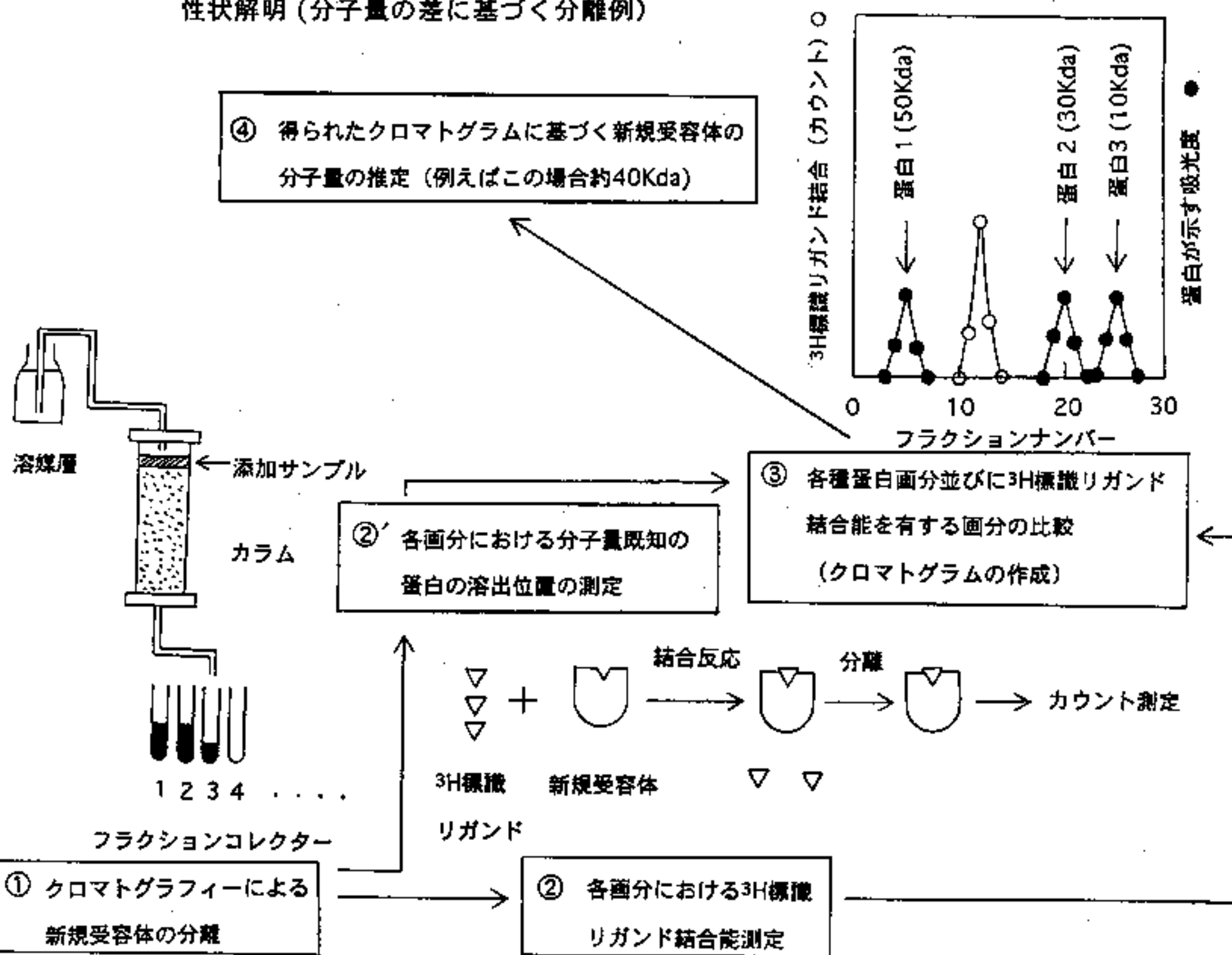
本年は次年度に行う予定にしている新規受容体の精製を円滑に行うための基礎的検討として新規受容体の性状解明を行う予定にしている。新規受容体の性状の解明は肝細胞抽出物から得た濾心上清を各種原理の異なるクロマトグラフィーで分画し、各画分における<sup>3</sup>H標識リガンドの結合能を測定することにより行う。その際一度に多数の画分において種々の異なる濃度の<sup>3</sup>H標識リガンドを用いて結合測定を行う必要がある。そこでその測定を円滑に行うために、備品としてリガンド結合能測定装置を要求している。また下記に示すような新規受容体の性状解明に必要な各種消耗品も要求している。

### 3. 平成10年度概算要求（前年度予算額）

概算要求総額	6,998千円(0千円)
(内訳)	
試験研究費	6,998千円(0千円)
備品費	2,879千円(0千円)
消耗品費	4,088千円(0千円)
印刷製本費	32千円(0千円)

# 新規グルコシルチコイド受容体の検索及びその臨床応用に関する基礎的研究

平成10年度計画予定 3H標識リガンド結合能を指標とする新規受容体の各種性状解明(分子量の差に基づく分離例)



年 度	事業実施期間	平成9年度 までの実績	平成10年度 計 画	平成11年度 計 画	平成12年度 計 画	平成13年度 計 画	実施機関名 又は委託先	備 考
予算額(決算額) 事項		千円	14,922千円	千円				
低線量放射線による微生物毒素 産生能の低減化に関する研究	平成10年度 平成13年度	(新規)	低線量の放射線を腸管出血性大腸菌 および <i>Aspergillus flavus</i> に照射 し、その産生するペロ毒素およびア フラトキシン産生能の変化を調べる。 同時に菌株からDNAを抽出し、PCR法 によるペロ毒素産生能を行い、毒素 産生能の変化を調べる。	低線量放射線を照射した基準菌株か ら抽出したDNAを用い、DNAフィン ガープリント法によるDNA鎖の変化 を調べ、毒素産生能の低減化に関連 した遺伝子の同定を試みる。	低線量放射線を照射した基準菌株に 対するパルスフィールド電気泳動法 を行い、菌株の変異と毒素産生能の相 関を見る。臨床分離菌株に低線量の 放射線を照射し、そのDNAの変異を 基準株と比較する。	臨床分離菌株の毒素産生能に対する 低線量放射線の影響を総合的に評価 する。過年度の結果を元に、毒素産 生能の低減化に有効な放射線量の設 定を行う。	国立医薬品食品衛 生研究所	

# 11. 低線量放射線による微生物毒素産生能の低減化に関する研究(新規)

## 1. 目的

病原性微生物には生体内への侵入によって感染症を引き起こす細菌、および微生物が産生する細菌毒素を原因として様々な生理作用を引き起こす細菌がある。後者には重篤な食中毒を引き起こすペロ毒素を産生する腸管出血性大腸菌があり、近年国内で食中毒が多発している。本菌による食中毒は従来のものとは異なり、発症までの潜伏期間が長く、またその産生するペロ毒素の高い毒性から死亡に至る例もある。ペロ毒素は菌体外に放出されると共に菌体内にも蓄積され、生体内で蓄積した際にその毒性が急激に上昇する。一方、真菌にも感染症を引き起こす真菌、およびマイコトキシンを産生する真菌がある。マイコトキシンは各種の代謝酵素の働きによって産生される二次代謝産物で、発ガン性が高いアフラトキシン、オクラトキシンやフモニシン等が知られている。これらのマイコトキシンはその高い毒性から、国内外で独自に食品中の規制値が定められている。従って微生物毒素の産生機構を解明する研究が精力的に行われている。

本研究では細菌毒素とマイコトキシンを病原性を有する微生物毒素として用い、微生物に対する放射線照射によって毒素産生能の低減化を誘導し、その遺伝子および代謝酵素等の変化等を検討し、産生機構を明らかにする。併わせて低線量放射線の有効照射条件の設定を行い、腸管出血性大腸菌の弱毒化株ワクチンへの利用、並びにマイコトキシン非産生真菌の生物農薬への利用等、毒素産生能の低減化した微生物の有効利用に於ける放射線照射の可能性を探索する事を目的とする。

## 2. 平成10年度要求概要

平成10年度は以下の実験を予定している。1) 基準菌株への放射線照射条件の検討。2) 低線量放射線を照射した基準菌株のペロ毒素または各種マイコトキシン産生量の変動を測定。これらの研究遂行には迅速・高感度の毒素定量法の確立が必要である。確立されたペロ毒素を測定する方法は未だなく、高感度測定法の開発が求められている。従来の測定法としては比色定量による酵素免疫法があるが、簡便迅速にペロ毒素を測定する感度は未だに得られていない。最近では化学発光法を用い、高感度な酵素免疫法を実現する試みがなされている。化学発光法により測定感度は10-100倍程の上昇が見込まれる。しかし、その反応時間を一定にしなければならず、現状では多検体の同時測定が困難となっている。多検体の同時測定を実現するためには、比色法に用いられるマイクロプレートリーダーと同様に、短時間に同一条件で化学発光を測定しなければならない。平成10年度に備品として申請するルミノ・イメージアナライザーは、130万画素子を装備したCCDカメラを用いた画像解析システムで、従来のマイクロプレート上の各ウェルを個別に測定する方法とは異なり、化学発光を画像として処理する。従って多数のマイクロプレートを同一条件下で測定が可能となり、簡便迅速に高感度な毒素測定法の構築が可能になる。またペロ毒素産生能の測定にはPCR法を用いたものがある。この方法では菌体からDNAを抽出し、ペロ毒素をコードするDNA断片を用いたPCR法を行い、電気泳動後に得られた泳動線から産生能を検査する。従って、ルミノ・イメージアナライザーは画像解析によるペロ毒素産生能の解析にも用いる。更に放射線照射によって引き起こされるDNA変異の解析にも用いる。

本研究は放射線照射による微生物毒素産生能の低減化に関する研究であり、ガンマ線照射が必須である。当研究所にはガンマ線照射施設がないため、照射実験を外部に委託する費用及び職員旅費が必要である。また、本研究では多数の菌株の分離並びに多検体の毒素産生能を測定を行う為、研究補助員の賃金を計上している。

以上の予算は本研究の迅速な遂行に必須であり、ここに申請する。

## 3. 平成10年度概算要求

### 概算要求総額

12,518千円(0千円)

### (内訳)

#### (1) 職員旅費

160千円(0千円)

#### (2) 試験研究費

12,358千円(0千円)

#### 備品費

7,676千円(0千円)

#### 消耗品費

3,991千円(0千円)

#### 印刷製本費

32千円(0千円)

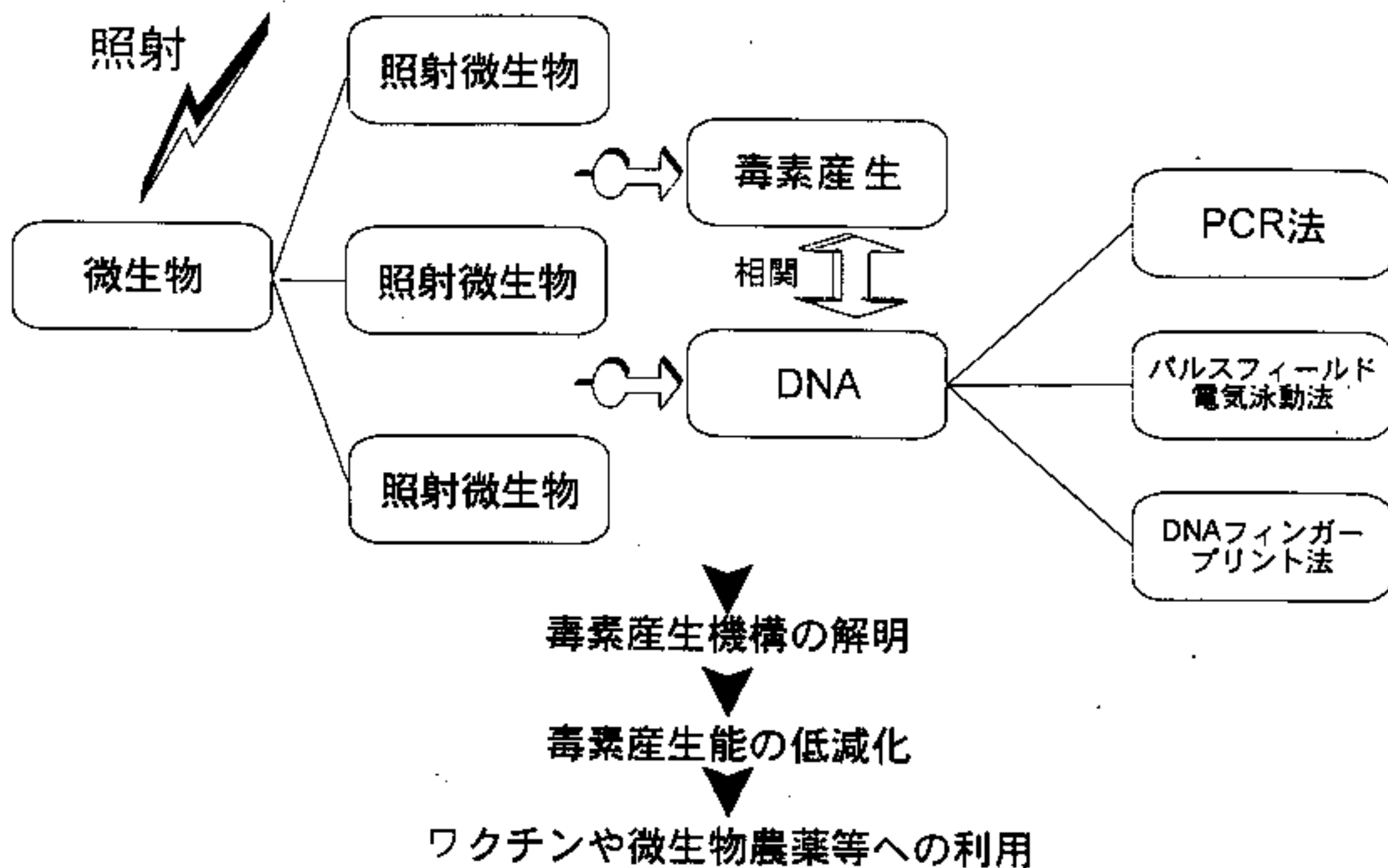
#### 賃金

471千円(0千円)

#### 雑役務費

188千円(0千円)

# 低線量放射線による微生物毒素産生能の低減化に関する研究





原子力関係事業の進捗状況

省庁名(厚生省)

各庁名（厚生省）

年 度	事業実施期間	平成8年度 までの実績	平成9年度 計画	平成10年度 計画	平成11年度 計画	平成12年度 計画	実施機関名 又は委託先	備 考
予算額（決算額） 事項	平成10年度～ 平成12年度			4,702千円				
1. → phage display法によるモノクローナル抗体ライブラリーの作製 2. → 抗体スクリーニングおよび抗体遺伝子のクローン化 3. → 精製Six抗原を用いた基礎実験およびアッセイ系の確立 4. → 他の病原因子（サルモネラ、赤痢など）を用いたアッセイ系の確立と応用			1. → phage display法によるモノクローナル抗体ライブラリーの作製 2. → 抗体スクリーニングおよび抗体遺伝子のクローン化 3. → 精製Six抗原を用いた基礎実験およびアッセイ系の確立 4. → 他の病原因子（サルモネラ、赤痢など）を用いたアッセイ系の確立と応用	3. → 精製Six抗原を用いた基礎実験およびアッセイ系の確立 4. → 他の病原因子（サルモネラ、赤痢など）を用いたアッセイ系の確立と応用	4. → 他の病原因子（サルモネラ、赤痢など）を用いたアッセイ系の確立と応用			

項目名 6-1 (新規)

「ラジオアイソトープを用いた、phage displayモノクローナル抗体による高感度な毒素及び他の病原因子の検出法の開発」

1. 目的

細菌感染症では、患者の重症化および感染の拡大を防止するために迅速診断法の開発が重要課題である。迅速診断においては細菌の病原因子などを指標にして検出系を開発する。本研究では、昨年多くの患者を出して問題となった腸管出血性大腸菌O157をモデル系としながら、高感度迅速検出系の開発を目的とする。その際、大腸菌O157が産生するStx毒素を指標に、抗原抗体反応による検出系を目指す。用いる抗体を近年開発されたphage displayモノクローナル抗体法により作製することでラジオアイソトープの利用を可能にし、従来にない感度を有す検出系を目指す。

2. 平成10年度要求概要

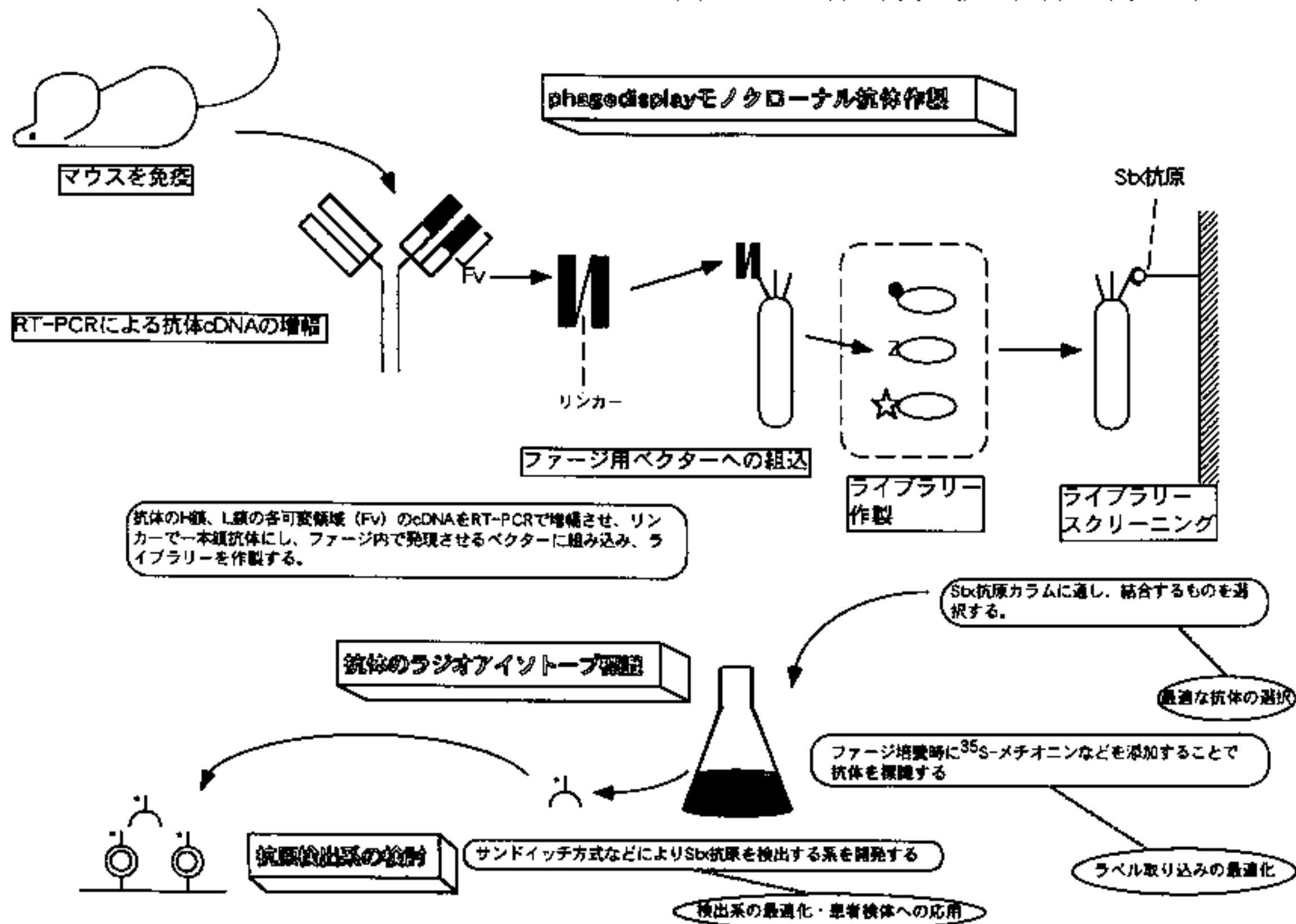
平成10年度は、初年度に当たり、抗Stx抗体のファージライブラリーを作製し、これをスクリーニングすることで利用可能なモノクローナル抗体を選択することに重点を置きつつ、得られた抗体のラジオアイソトープ標識についても検討する。

3. 概算要求額（前年度予算額） 4, 7 0 2 千円（ 0千円）

（内訳）

(1) 設備備品費	0千円 (0千円)
(2) 消耗品費	4, 3 4 0千円 (0千円)
(3) 印刷製本費	32千円 (0千円)
(4) 賃金	3 3 0 千円 (0千円)

6-1 (新規) ラジオアイソトープを用いた、phage displayモノクローナル抗体による高感度な毒素及び他の病原因子の検出法の開発



原子力関係事業の進捗状況

省庁名 (厚生省)

年 度	事業実施期間	平成8年度 までの実績	平成9年度 計 画	平成10年度 計 画	平成11年度 計 画	平成12年度 計 画	実施機関名 又は委託先	備 考
予算額 (決算額) 事 項				7,840千円				
放射線被照射宿主におけるウイルス 感染の病態とその対策の基盤的研究	平成10年度～ 平成12年度			放射線照射型 とインフルエンザウイルス 感染症の関係 の解析。	ヘルペスウ イルス潜伏 感染マウス の作成と放 射線照射に よる再活性 化の検討。	放射線照射が ワクチンの有 効性に与える 影響の解析。	国立感染症 研究所	

項目名 放射線被照射宿主におけるウイルス感染の病態とその対策の基盤的研究 (新規)

1. 目的

感染モデルマウスを用いて、放射線照射治療等によって誘発されることが予想されるインフルエンザウイルス肺炎の照射量と病態の関係を解析し、さらに対策としてのワクチンが照射によってどのような影響を受けるか、またどの程度有効であるか調べることにある。加えて照射によって潜伏ウイルスの再活性化が予想されるが、ヘルペスウイルスをモデルとして照射量と再活性化の関係を調べ対策とすることも目的とする。

2. 平成10年度要求概要

平成 10 年度は初年度としてマウスに対する放射線照射量を変化させインフルエンザウイルス感染による変化を解析する系を確立することを主題とする。

3. 概算要求額 (前年度予算額) 7, 8 4 0 千円 ( 0 千円)

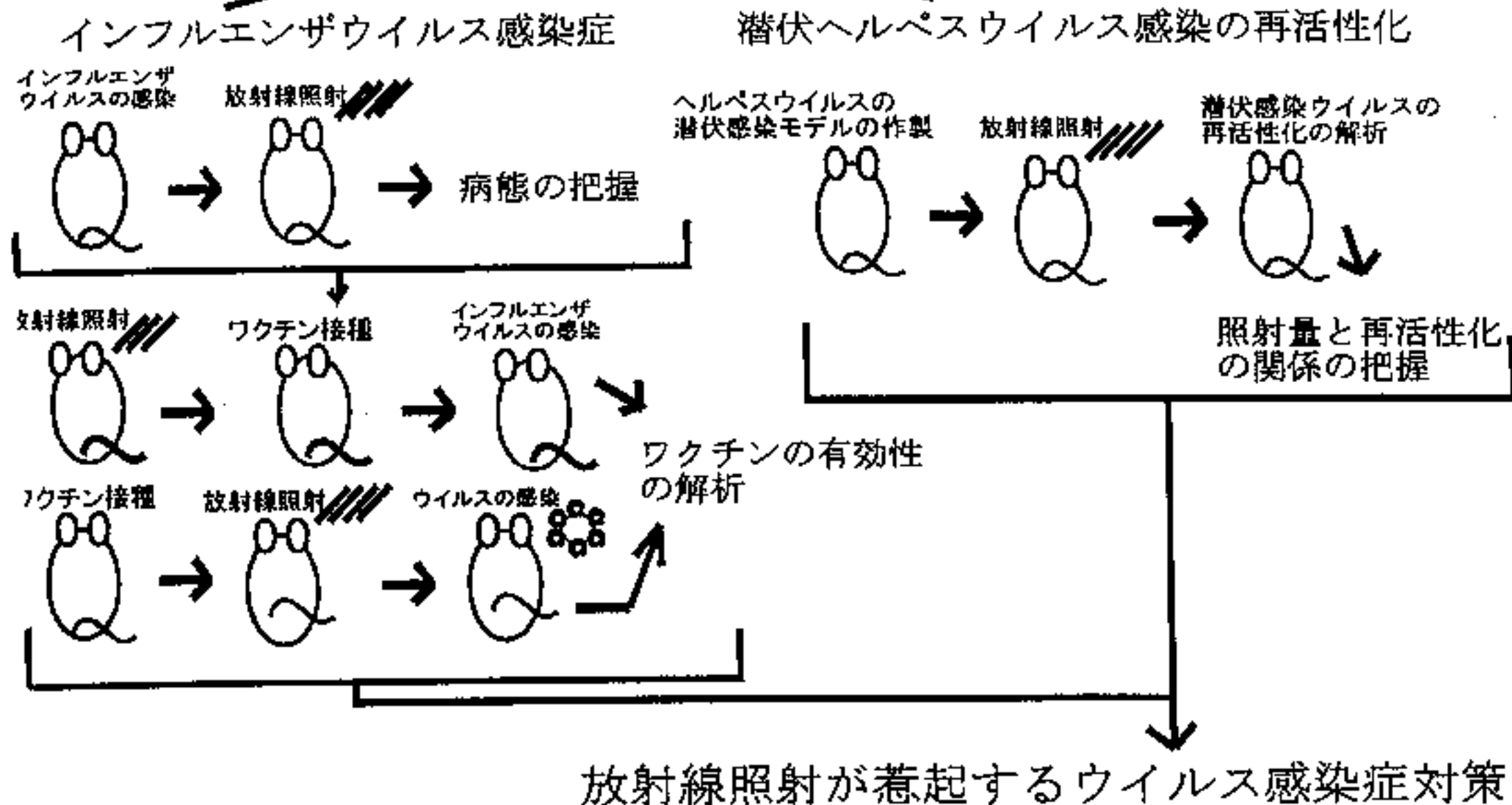
(内訳)

(1) 消耗品費	6, 9 6 0 千円 ( 0 千円)
(2) 印刷製本費	3 2 千円 ( 0 千円)
(3) 賃 金	8 4 8 千円 ( 0 千円)

項目名 放射線被照射宿主におけるウイルス感染の病態とその対策の基盤的研究 (新規)

要求内容について解りやすく詳細に記載する。(図等を入れること)

## 放射線照射によって惹起されるウイルス感染症



事業名 (国立機関原子力試験研究費)

(厚生省・国立小児病院)

年 度	事業実施期間	平成8年度 までの実績	平成9年度 計 画	平成10年度 計 画	平成11年度 計 画	平成12年度 計 画	実施機関名 又は委託先	備考
予算額(決算額)		千円						
事項		6,236	7,939	8,511				
放射線による細胞 障害からの生体の 防御機構の解明と 高発癌家系におけ るその機能障害に 関する研究	平成7年度 ～ 平成9年度	Ataxia Telangiectasia, Li-Fraumeni家 族構成員の細胞 における放射線 照射に対する細 胞生物学的異常 の分子メカニズ ムを解明し、がん を生じやすい 遺伝的背景とし て被曝時の1) 細胞周期制御機 構の障害と2) 細胞死誘導機構 の障害が関係し ていることを明 らかにした。 ヒト、マウスの オルニチンデカ ルボキシラーゼ アンチザイム遺 伝子の全遺伝子 構造を解明し、 細胞死感受性決 定分子の一つで あることを解明 した。	Ataxia Telangiectasia 細胞の放射線に 対する細胞死、 細胞周期制御異 常解明に向けて AT遺伝子産物 に対する抗体の 作成、類似遺伝 子のクロニング を行う。 ヒト、マウスの オルニチンデカ ルボキシラーゼ アンチザイムの 抗体を用いて、 その組織分布や 発生学上の意 義、放射線照射 に対する抵抗性 を獲得する上で の機能的な意義 等を解明する。 アンチザイムイ ンヒビターの遺 伝子をクロニン グし、放射線 感受性決定機構 の上での機能を 解明する。	放射線障害にお ける細胞周期阻 害因子の役割を 解明する。酵母 からは乳癌に至 るまで保存され ている、TPR (tetratripepti de repeat)モ チーフを保持す る新しい細胞周 期制御遺伝子 JP-3の全塩基配 列、生物学的機 能を解明する。 最近新たにクロ ーニングした細 胞周期阻害因子 p21変異体の 放射線障害から の生体防御にお ける役割、p21 の発現制御機構 の解明を行う。 アンチザイムイ ンヒビターの 放射線発癌への 関与を解明す る。インヒビタ ー抗体を作成す る。	JP-3遺伝子導入 による細胞周期 の変化の解析と 放射線に対する 細胞死などの変 化の解析。 p21の細胞内 局在決定分子の 同定と遺伝子構 造の解明。イン ヒビター遺伝子 導入による放射 線感受性の変化 の解析。	JP-3に対する 抗体の作成と 細胞内局在の 決定。 p21細胞内 局在決定分子 の遺伝子クロ ーニング。放 射線発がんの 保りの解 明。 アンチザイム インヒビター 遺伝子の発現 障害による 放射線発がん への影響の解 明。	国立小児病院	
放射線感受性を決定 する新規生体分子の 機能解明とその応用 に関する研究	平成10年度 ～ 平成12年度							

項目名 放射線感受性を決定する新規生体分子の機能解明とその応用に関する研究 (新規)

1. 目的

放射線障害による発癌の分子機構を解明することにより、放射線感受性を決定する新規の生体分子を単離同定する。これに基づいて放射線発癌はもとより一般の発癌の機序解明にも寄与しうる分子機構の解明をめざす。

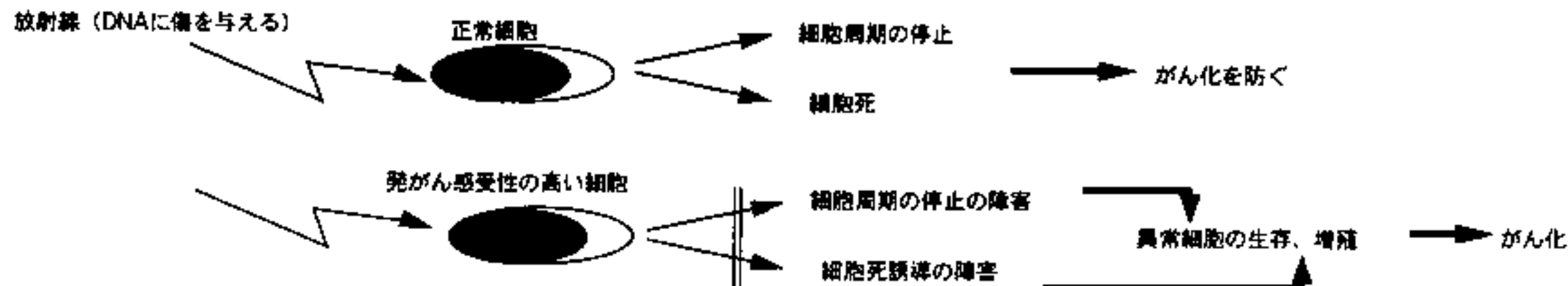
2. 平成10年度要求概要

放射線障害における細胞周期阻害因子の役割を解明する。酵母からほ乳類に至るまで保存されている、TPR (tetrapeptide repeat)モチーフを保持する新しい細胞周期制御遺伝子JP-3の全塩基配列を決定する。我々が最近新たにクローニングした細胞周期阻害因子p21変異体の放射線障害からの生体防御における役割、p21の発現制御機構の解明を行う。アンチサイムインヒビターの放射線発癌への関与を解明する。インヒビター抗体を作成する。

3. 概算要求額	8,511千円 ( 0千円)
(内訳)	
消耗品費	8,126 ( 0千円)
印刷製本費	32 ( 0千円)
賃金	353 ( 0千円)



## 前期(平成7-9年)研究において明らかになった放射線高発がん家系細胞の問題点



## 取り組むべき課題とアプローチ

### 取り組むべき課題

1. 細胞周期の停止機構を明らかにする
2. 細胞死誘導の分子機構をあきらかにする

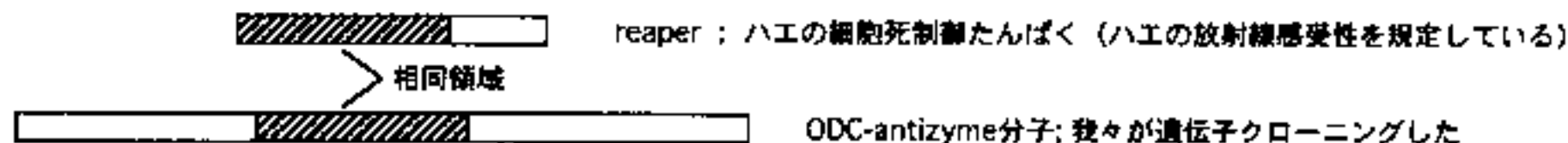
### 課題へのアプローチ

1. 未知の細胞周期制御蛋白特にG2/M制御蛋白の同定と放射線感受性の関連
2. 細胞周期G0/G1阻害蛋白p21の細胞内局在と細胞死抑制機構の関連
3. 細胞死遺伝子(アンチザイム)のインヒビター遺伝子のクローニング
4. p21細胞内局在決定因子の同定
5. アンチザイムの変異やインヒビターが細胞死抵抗性を通して発がん感受性を高めている可能性の解明

平成10年度予定

次年度以降予定

アンチザイム遺伝子は前期の研究によってクローニングに成功した



原子力関係事業の進捗状況

省庁名（厚生省）

年 度 事 項	事業実施期間	平成8年度 までの実績	平成9年度 計 画	平成10年度 計 画	平成11年度 計 画	平成12年度 計 画	実施機関名 又は依頼先	備 考
抗てんかん薬の作用機序に 関する生化学的研究	平成7年度～ 平成9年度	培養大脳神 経細胞にお けるフォス ファチジル イノシトー ル（PI）代 謝回転の 測定法を確 立し、培養 条件による 変化の基礎 的検討を行 った。また PI代謝回 転に及ぼす 興奮性及び 抑制性神経 伝達物質の 影響を検討 した。	神経伝達物 質によって 引き起こさ れるPI代 謝回転に及 ぼすけいれ ん誘発剤や 抗てんかん 薬の効果を 検討する。	培養大脳神 経細胞にお ける主要な セカンドメ ッセンジャ ーcAMP 量の測定法 を確立し、 培養状況に 伴う変動を 測定する。 またグリア 細胞培養系 を確立する 。	培養神経細 胞のcAMP 量に及ぼ す神経伝達 物質や、受 容体-GTP 結合タン パク質-A デニレート シクラーゼ 複合体の各 部位に影響 を及ぼす物 質の効果の 検討を行う 。	cAMP系 に及ぼす神 経伝達物質 等の影響に 対する抗て んかん薬や けいれん誘 発剤の効果 の検討、ま たグリア細 胞系との相 互作用の検 討を行う。	国立療養所 静岡東病院	
てんかん原性形成機序に関 する生化学的研究	平成10年度～ 平成12年度							

項目名 てんかん原性形成機序に関する生化学的研究（新規）

1、目的

てんかんは脳神経細胞の過剰発射に由来した反復発作を主徴とする脳の慢性疾患であり、発作発現の基盤には長期持続性のけいれん準備状態が存在すると考えられる。けいれん発現の際の神経細胞の過興奮状態は、興奮性と抑制性の情報伝達系のアンバランスによると考えられる。細胞外からの刺激に応答して神経細胞内で起こる反応の一つであるcAMP生成系に及ぼす神経伝達物質、けいれん誘発剤、抗てんかん薬の作用について培養神経細胞系を用いて研究し、てんかん原性形成機序にせまりたい。

2、平成10年度要求概要

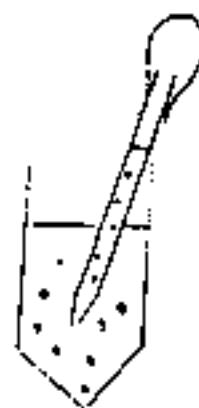
初年度は基本的な研究条件の検討を行う。無血清培地で培養したラット培養大脳神経細胞におけるcAMP量の測定、培養条件に伴う変化の基礎的検討、培養グリア細胞系の確立と免疫染色等による固定を行う。

3、平成10年度概算要求

概算要求総額（前年度予算額）	4,045千円（0千円）
（内訳）	
（1）消耗品費	3,801千円（0千円）
（2）印刷製本費	32千円（0千円）
（3）賃金	212千円（0千円）

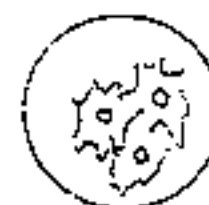
# てんかん原性形成機序に関する生化学的研究

妊娠ラット → 胎児脳の摘出 → 細胞の分散 → 培養皿上で培養液とともにインキュベートする



神経細胞

グリア細胞



免疫染色による同定

刺激、抗てんかん薬  
存在下の刺激

細胞分画

cAMP量の変動の測定

刺激の種類

抗てんかん薬の効果

他の細胞との相互作用

# 神経系の情報伝達

電気信号が直接神経細胞から神経細胞へ伝わるionotropic transmissionと細胞内セカンドメッセンジャーを介するmetabotropic transmissionに大別される。

