

アイソトープ実験研究施設

教授：福田 国彦 放射線診断学
(兼任)

講師：吉沢 幸夫 放射線測定法，分子遺伝学

教育・研究概要

I. 黄色ブドウ球菌の病原因子の解析

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は代表的な院内感染菌であったが，90年代初めより医療行為と無関係な人に感染を起こす市中感染型 MRSA (CA-MRSA) が蔓延し始めた。CA-MRSA は，健康な人に感染症を引き起こす強い病原性を保有する他に，一部の β -ラクタム薬に感受性であること，パントン・バレンタイン・ロイコシジン (PVL) 毒素を産生する等の特徴をもっている。これらの株の由来を明らかにするため，CA-MRSA67株に溶原化している PVL 変換ファージを解析したところ，形態の異なる2種の PVL ファージが見いだされた。これら2種のファージと SCCmec 型の相関は見いだされず，PVL ファージが黄色ブドウ球菌に溶原化した後に，PVL 産生菌が SCCmec を獲得して MRSA になったと考えられた。

グリコペプチド系抗菌薬のひとつであるタイコプラニン[®]は， β -ラクタム薬との併用療法において良好な結果を示す。細胞壁合成の素材に結合するグリコペプチド系抗菌薬と細胞壁合成酵素に結合する β -ラクタム薬の併用は相乗効果が期待される。しかし，バンコマイシンを用いた場合には，セフピロムやセフチゾキシムとの併用により拮抗現象が見られる。一方，これら PBP3 あるいは PBP4 への親和性が低い β -ラクタム薬との併用においてもタイコプラニンは拮抗現象を示さない。この原因として，タイコプラニンが第2の作用機序として細胞膜への作用を有する可能性が考えられる。我々は細胞膜に存在する ABCA トランスポーターをタイコプラニンの標的と想定し，ABCA 産生量変異株の作成を試みた。abcA 遺伝子は pbp4 遺伝子とプロモーター領域を共有しているために，abcA 遺伝子欠損株を作成すると PBP4 産生量に影響を与えてしまう。そこで，アンチセンス RNA 法により ABCA 産生量を減少させ，薬剤への感受性の変化を調べた。発現調節が可能なプロモーターとして xyl/tet プロモーターを用いて，その下流に PCR 法で作成した abcA 遺伝子のアンチセンス DNA を結合した。ア

ンヒドロテトラサイクリンによりアンチセンス RNA を発現誘導したところ，黄色ブドウ球菌 SH1000 株において，タイコプラニンへの感受性が1管分増加することが分かった。

II. 放射線耐性生物における耐性機構の解析

クマムシは緩歩動物門に属する体長 0.5~0.8mm の微小動物で，放射線に高度耐性であることが知られている。慈恵大学・西新橋校舎周辺のコケより採取したチョウメイムシ科のクマムシ (Macrobiotus) を X 線照射装置 (MBR-1520R, 日立メディコテクノロジー) を用いて 10 匹ずつ 300Gy の X 線を照射した。照射前・照射終了5分後・2時間後にそれぞれの試料から DNA を抽出し，GenomiPhi V2 DNA Amplification kit (GE Healthcare) を用いて増幅した。増幅した DNA をアガロースゲル電気泳動法を用いて調べたところ，照射終了5分後のクマムシでは 500bp 前後の低分子量 DNA 断片が未照射クマムシの約 180% に増加していることが観察された。一方，照射終了2時間後に抽出した試料では，低分子量 DNA 断片は未照射クマムシの約 160% であった。照射後の時間経過により低分子量 DNA 断片の割合が減少し，それに伴い高分子量 DNA 断片が増加していることが観察され，クマムシは X 線により損傷を受けた DNA を短時間で修復していると考えられた。

III. 高屈折率セラミックを用いたチェレンコフ光測定

高屈折率透光性セラミック「ルミセラ」(村田製作所) を媒体として，¹⁴C から放射される軟 β 線をチェレンコフ計測により測定した。測定機としてマイクロプレート用液体シンチレーションカウンタ MicroBeta TriLux (Wallac-PerkinElmer) を用いて，フィルタカセットにセラミックと放射性試料を装着することにより，簡便に ¹⁴C の β 線を測定できた。この時，透光度の改善されたタイプ Z の計数効率率は 5% であった。

IV. 日常生活用品の放射化分析

金・銀・白金を添加したと称する基礎化粧品について，金属元素の含有量を中性子放射化分析法により定量した。化粧品 13 種を日本原子力研究機構の研究用原子炉 JRR-3 を用いて，熱中性子束 5.2×10^{13} (n/cm²・sec) で 10 分間照射した。照射後 2 日間冷却した後，Ge 半導体検出器で 300~30000 秒測定した。標準試料として，原子吸光用標準溶液と

岩石標準試料 (GSJ) JA-2, JR-2 を用いた。その結果 4 種類の試料から銀が, 7 種類の試料から白金が, 2 種類の試料から金が検出された。また, 明らかに亜鉛が含まれている試料が 1 試料あった。砒素濃度は全 13 試料で 2ppm 以下であることが確認された。

「点検・評価」

1. 施設

アイソトープ実験研究施設は, 本学における放射性同位元素 (RI) を用いた基礎医学・生化学研究の実施と支援を行っている。2008 年度の使用実績は, 12 講座・研究室の 42 名, 2 カリキュラムの 17 名の合計 59 名 (うち女子 16 名) が 33 課題のもとに実験を行い, RI 受入 40 件, 譲渡 1 件, 使用量合計約 2.0GBq であった。

昨年度の定期検査・定期確認での口頭指導事項への対応として 1. 有機溶媒焼却装置を燃焼温度が測定できるよう改良および点検記録の整備 2. ガンマ線照射装置の点検記録・放射線の量の測定記録・使用記録の整備 3. 汚染検査記録の表題を「汚染の状況の測定記録」へ変更および測定の方法, 排気口, 排水口の汚染状況の欄を追加 4. 3 月毎の排気中放射能濃度限度を計算により確認等を行った。

2. 研究

放射線と分子遺伝学の二つのテーマで研究を行っている。

放射線測定法として, 高屈折率セラミックを用いたチェレンコフ測定を開発し, プレート式液体シンチレーションカウンタや排水中の β 核種モニタへの応用を検討している。測定可能な核種として ^{14}C の他に ^{63}Ni 等が考えられる。放射化学分析法を用いて, 金・銀・白金を添加したと称する基礎化粧品に含まれる金属元素を定性・定量し, 人体に影響を与える量は含まれていないことを明らかにした。

黄色ブドウ球菌を材料に病原因子の解析を行っている。黄色ブドウ球菌において, アンチセンス RNA 法を用いることにより遺伝子の発現を抑制できることを明らかにした。また, ファージを分離・精製する技術を用いて, 市中感染型 MRSA の保有する PVL 変換ファージを解析することにより, これらの菌株は複数の起源をもつことを明らかにした。ブドウ球菌の SCC $_{mec}$ 獲得機構を解明することが重要である。

極限状態に生息する生物として海洋微生物やクマムシを材料に環境適応遺伝子を検索している。X 線照射したクマムシから DNA を抽出し, アガロー

スゲル電気泳動法を用いて調べることにより, X 線により断片化した DNA が短時間の内に修復されていることが明らかになった。2008 年 6 月, 海洋研究開発機構の研究調査船「淡青丸」による第 KT-08-13 次研究航海に参加し, 東京湾・相模湾・太平洋黒潮流域において海水および水深 4,000m の海底堆積物より細菌を採取し, DNA の抽出と解析および微量元素欠乏・過剰条件での培養を試みている。

3. 教育

放射線障害防止法に基づく教育訓練を年 10 回実施し 114 名が受講した。講座・研究室・カリキュラムの計 59 名が放射線業務従事者として当施設に登録した。大学院共通カリキュラムにおいて RI 基礎技術の取得を目的とした 1 コース 3 日間の実習を行い, 2 コース計 7 名が受講した。研究室配属 10 名が 2 週間実習を行った。一時立入者への教育訓練を 3 回行い, 17 名が受講した。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Ma XX¹⁾, Ito T¹⁾, Kondo Y¹⁾, Cho M¹⁾, Yoshizawa Y, Kaneko J²⁾, Katai A (Kinan General Hospital), Higashiide M (Kotobiken Medical Laboratories), Li S³⁾ (Tohoku University), Hiramatsu K¹⁾ (Juntendo University). Two different Panton-Valentine leukocidine phage lineages predominate in Japan. J Clin Microbiol 2008; 46(10): 3246-58.

III. 学会発表

- 1) Minowa H, Yoshizawa Y, Takiue M. Cherenkov counting of Carbon-14 using a translucent ceramic with high refractive index. Advances in Liquid Scintillation Spectrometry International Conference, 2008. Davos, May.
- 2) 古田悦子(お茶大), 箕輪はるか, 岡田往子(武蔵工大), 中原弘道(都立大). 化粧品の放射化分析. 2008 日本放射化学会年会・第 52 回放射化学討論会. 広島, 9 月.