

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

黄色ブドウ球菌性表皮剥脱素 (ET) は、新産児や幼児に発症するリッター病、膿痂疹 (とびひ) の病原因子である。ET は血清型により A と B の 2 種に分けられ、*eta* 遺伝子はフェージに、*etb* 遺伝子はプラスミド上に存在する。表皮剥脱はセリン (Ser) プロテアーゼ活性により生ずると報告されているが、我々は ET をテトラニトロメタン処理することにより表皮剥脱活性と抗原性が失われることを見いだした。テトラニトロメタンによるチロシン (Tyr) 残基のニトロ化が ET を不活化することから、Tyr が活性中心であると推測した。今回、ET の活性中心は従来報告されている Ser ではなく Tyr であることを明らかにするために、プラスミドにクローニングした *eta* 遺伝子へ変異を導入し、表皮剥脱活性と抗原性を調べた。セリンプロテアーゼの活性中心とされている Ser-195 ならびに残る 16 残基の Ser に変異を導入したところ、各変異 ETA の活性と抗体に対する反応性に変化は見られなかった。一方、Tyr-17-18 ならびに Tyr-225-232 に変異を導入すると表皮剥脱活性と抗原性は完全に失われた。

eta 遺伝子上流には、プロモーター配列として -35 TTGTTT, -10 TATAAT があり、TATAAT の 39 bp 下流に S-D 配列 GGATGA が位置しており、さらに 6 bp 下流に開始コドン ATG が存在する。*eta* 遺伝子のプロモーターから 11bp 上流には 1382 bp の ORF が存在し、この部分が欠落すると ETA の産生が著しく減少することから、この ORF によりコードされ ETAexp は *eta* 遺伝子を活性化する機能を有していると考えられる。ETAexp タンパクと *eta* 遺伝子プロモーター配列を含む 381 bp の DNA 断片を gel mobility shift assay にかけてところ、band shift が認められた。この結果、ETAexp はプロモーター配列に結合して、逆転反復配列が存在するプロモーター領域の構造に変化を起こさせ、RNA polymerase による転写を増加させていることが推測された。

II. 放射線耐性生物における耐性機構の解析

緩歩動物門に属するクマムシは、乾燥すると肢をちぢめて干からび、樽と呼ばれる状態になる。樽になると高温、高圧、紫外線、放射線などの極限状態に耐性になることが報告されている。今回、東京都下水道局有明水再生センターより活性汚泥の提供を受け、クマムシを回収し、性状を調べた。クマムシから DNA を抽出し、18S-rDNA を増幅して、DNA 塩基配列を決定したところ、活性汚泥より採取されたクマムシは *Hypsibiidae* 科の *Isohypsibius* 属、*Eremobiotus* 属、*Thulinus* 属および *Macrobiodidae* 科の *Ramazzottius* 属と 95% の相同性を示した。形態からは同一種で、和名ゲスイクマムシであると同定された。ゲスイクマムシを乾燥させると樽様の形態になるが、完全な樽にはならず、水を加えても蘇生することはなかった。ゲスイクマムシに、高崎量子応用研究所のコバルト 60 照射施設において γ 線を照射し、経過を観察した。10kGy および 7.5kGy では照射 4 時間後における生存率は 0% であった。照射後 24 時間での生存率は、1.0kGy、非照射、3.0kGy、5.0kGy の順に高く、72 時間では 1.0kGy、3.0kGy、5.0kGy、非照射の順となった。この結果より、適度に放射線を被ばくしたゲスイクマムシは非照射に比べ生存率が高くなる事が分かった。

III. 放射線測定法の開発

肺がんの原因物質のひとつとされる空気中ラドン濃度の測定を目的として、新たな測定法の開発を行っている。世界保健機構は 2009 年に室内ラドン濃度の参考レベルとして 100Bq/m³ を提案し、この値を実現することが困難な国においても 300Bq/m³ を超えないことを要求している。現在、ラドンの測定にはトルエンを用いた液体シンチレーション測定法が用いられているが、トルエンは揮発性が高く、引火点が低いため取扱いに注意を要する。そこで我々は、揮発性が低く、引火点が高いシリコンオイルを溶媒として用いたシリコンオイル・シンチレータによるラドンの測定を試みた。メチルフェニル基を保有する HIVAC F4 (信越化学工業) を溶媒として用い、第 1 蛍光体として 2,5-diphenyloxazole を 7g/l に、第 2 蛍光体として 1,4-Bis (5-phenyl-2-oxazolyl) benzene を 0.2g/l に加え、シリコンオイル・シンチレータとした。シリコンオイル・シンチレータはトルエンシンチレータと同様にラドンを溶解する性質を持っていた。このため、ラドンを含む水と振盪することによりラドンを抽出す

ることができた。計数効率はトルエンシンチレータと同等であった。また、揮発性が低いため、バブリング法により空气中ラドンを捕集し、測定することが可能である。

〔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。2010年度は、9講座・研究室の28名、2カリキュラムの12名の合計40名(うち女性12名)が実験・研究を行った。RI受入件数は12件、使用核種は ^{32}P 、 ^{51}Cr 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^3H などであり、使用量合計733MBqであった。

2. 研究

「黄色ブドウ球菌の病原因子の解析」については、黄色ブドウ球菌性表皮剥脱素が従来報告されてきたセリンプロテアーゼではないことを明らかにした。これはブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群の発症機構を解明する上で大きな進展である。今後、毒素の基質を解明する必要があると考えている

「放射線耐性生物における耐性機構の解析」については、活性汚泥から採取したゲスイクマムシを用いることにより、今後さらに研究を進展させることができると思われる。「放射線測定法の開発」については、シリコンオイル・シンチレータによるラドン測定について液体シンチレーション・スペクトロメトリーの国際学会、および成医会において発表を行い、論文として投稿済みである。より使いやすいシリコンゴム・シンチレータの開発を目指している。

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88名が受講した。施設管理部署の一次立入者を対象とした教育訓練を年度初めに3回実施し16名が受講した。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3名が受講した。研究室配属学生2講座9名が6週間の実習を行った。

研究業績

Ⅲ. 学会発表

- 1) 櫻井 進(河野臨床医学研究所), 吉沢幸夫, 保科定頼, 町田勝彦. 黄色ブドウ球菌性表皮剥脱素血清型A遺伝子を活性化する調節遺伝子. 第55回日本ブドウ球菌研究会. 東京, 7月.
- 2) 吉沢幸夫, 櫻井 進(河野臨床医学研究所), 保科

定頼, 町田勝彦. 黄色ブドウ球菌性表皮剥脱素血清型Aの活性中心に関与するTyrならびにHis72, Asp120, Ser195への変異の導入. 第55回日本ブドウ球菌研究会. 東京, 7月.

3) 吉沢幸夫, 箕輪はるか, 瀧上 誠. シリコンオイルシンチレータを用いたラドン測定法の開発. 第127回成医会総会. 東京, 10月. [慈恵医大誌 2010: 125(6): 214-5]

4) Yoshizawa Y, Minowa H, Takiue M. Determination of radon using silicone oil scintillator. LSC2010: Advances in Liquid Scintillation Spectrometry. Paris, Sept.