


分置

PNC  J1295 91-001

社内資料

本資料は 〇/年 10月 〆日付けで登録区分、
変更する。

[技術情報室]

放射線防護等へのバイオテクノロジーの 適用に関する調査研究（I）

（動力炉・核燃料開発事業団 委託研究成果報告書）

1991年 3 月

株式会社野村総合研究所

本資料の全部または一部を複写・複製・転載する場合は、下記にお問い合わせください。

〒319-1184 茨城県那珂郡東海村大字村松4番地49
核燃料サイクル開発機構
技術展開部 技術協力課

Inquiries about copyright and reproduction should be addressed to:
Technical Cooperation Section,
Technology Management Division,
Japan Nuclear Cycle Development Institute
4-49 Muramatsu, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki, 319-1184
Japan

© 核燃料サイクル開発機構 (Japan Nuclear Cycle Development Institute)

この資料は、動燃事業団社内における検討を目的とする社内資料です。ついては、複製、転載、引用等を行わないよう、また第三者への開示又は内容漏洩がないよう管理して下さい。また今回の開示目的以外のことには使用しないよう注意して下さい。

本資料についての問い合わせは下記に願います。

〒107 東京都港区赤坂 1 - 9 - 13
動力炉・核燃料開発事業団
技術協力部 技術協力室



放射線防護等へのバイオテクノロジーの
適用に関する調査研究（Ⅱ）

野村総合研究所

要 旨

近年、ライフサイエンスの研究レベルは飛躍的に向上し、生体を研究するためのツールとして、遺伝子工学、蛋白工学、糖鎖工学、発生工学、細胞操作技術など従来では到底実現できない実験系を作成すること、及びその利用による生物の研究が行われるようになってきている。

これらの研究ツールは、原子力開発や放射線利用の分野でも、生物や環境への影響、環境保全、環境修復などにこの研究においても、研究の新たな局面を拓く有用な手法となることが期待されている。本調査研究においては、原子力分野におけるバイオテクノロジーの適用の可能性を探るという視点から、原子力分野と関連するライフサイエンス全体の調査を実施した。

本報告書は、株式会社野村総合研究所が動力炉・核燃料開発事業団の委託により実施した研究の成果である。

契約番号：020D0092

事業団担当部課室および担当者：東海事業所 安全管理部 環境安全課 住谷 秀一

【目 次】

I 章 研究分野の設定と概要

1. 研究分野の設定方針…………… I - 1
2. 研究分野の設定…………… I - 3
 - 1) 「生物を放射性核種の集積装置としてモニタリングする」というスタンスから派生する研究課題…………… I - 3
 - (1) 放射性核種を集積する生物に関する研究…………… I - 3
 - (2) 集積機構の解明・利用…………… I - 4
 - (3) 放射性核種の集積解除方法の開発…………… I - 4
 - 2) 「生物が放射性核種を集積あるいは放射線を被曝することによって受けた影響をモニタリングする」というスタンスから派生する研究課題…………… I - 4
 - (1) 放射線被曝による生体内の異常分子出現の観測…………… I - 6
 - (2) 放射線被曝による代謝変化の観測…………… I - 6
 - (3) 放射線被曝による細胞に対する影響の観測…………… I - 6
 - (4) 放射線被曝による損傷の修復、放射線耐性機構の解明…………… I - 7
 - (5) 放射線被曝による遺伝情報の発現状態の変化の観測…………… I - 7
 - (6) 放射線被曝の影響回避方法の開発…………… I - 7
 - (7) 放射線ホルミシス…………… I - 7
 - 3) その他の研究…………… I - 7
 - (1) 生物元素変換…………… I - 7

II 章 研究分野の概説

1. 放射性核種を集積する生物に関する研究…………… II - 1
 - 1) 放射性核種を高濃度集積する生物を研究する意義・目的…………… II - 1
 - 2) 海洋生物の放射性物質代謝パラメーター…………… II - 2
 - 3) 放射性核種濃縮の解析例…………… II - 5
 - (1) 植物プランクトン…………… II - 5
 - (2) 貝類…………… II - 5
 - (3) 甲殻類…………… II - 8

(4) 魚類	II - 9
4) 放射性核種高濃縮生物	II - 10
5) 重金属を高濃度に集積する生物	II - 12
6) 今後の課題と研究テーマ	II - 12
(1) 高濃縮生物の探索	II - 12
(2) 実験用生物としての飼育(培養)技術の獲得	II - 13
2. 集積機構の解明・利用	II - 14
1) 集積機構について	II - 14
2) バイオソープション(biosorption)	II - 15
(1) バイオソープションの概念	II - 15
(2) 藻によるウランの濃縮	II - 18
(3) 微生物によるウランの濃縮(吸着)	II - 20
(4) バイオソープションにおける今後の課題	II - 22
3) バクテリアリーチング	II - 23
(1) バクテリアリーチングの意義	II - 23
(2) バクテリアリーチングとは	II - 23
(3) バクテリアリーチングに関与する微生物	II - 24
(4) バクテリアリーチングの原理	II - 24
(5) バクテリアリーチングの応用	II - 27
(6) バクテリアリーチングの問題点とバイオテクノロジー適用の可能性	II - 31
3. 放射性核種の集積解除方法の開発	II - 37
1) 集積解除の方法	II - 37
2) 安定ヨウ素	II - 37
3) キレート剤	II - 38
(1) 汚染除去剤としてのキレート剤の種類	II - 38
(2) ルテニウムの汚染除去	II - 39
(3) ストロンチウムの汚染除去	II - 40
(4) 大環状化合物を配位子とする金属錯体の利用可能性と問題点	II - 41
(5) キレート剤のドラッグデリバリーシステム(DDS)	II - 43
(6) キレート剤使用のTPOと副作用の問題	II - 44

4) 天然物の利用	II - 45
4. 放射線被曝による生体内の異常分子出現の観測	II - 47
1) 分子レベルにおける評価パラメーター	II - 47
(1) 分子レベルでの影響把握の意義	II - 47
(2) DNAの損傷	II - 49
(3) 染色体レベルでの影響	II - 53
(4) 酵素に対する影響	II - 59
(5) 膜に対する影響	II - 61
2) 観測系の開発	II - 65
(1) 新規観測手段	II - 65
5. 放射線被曝による代謝変化の観測	II - 73
1) 代謝変化の観測の意義	II - 73
(1) 代謝の概念	II - 73
(2) 代謝系への影響を観測する場合の対象	II - 73
2) 代謝変化の観測	II - 75
(1) 核酸・糖・脂質の合成量に対する放射線の影響	II - 75
(2) 臓器等における代謝系の変化	II - 77
6. 放射線被曝による細胞に対する影響の観測	II - 79
1) 細胞レベルでの放射線影響を評価する意義	II - 79
(1) 放射線影響評価における単細胞系と多細胞系	II - 79
(2) 多細胞系における細胞の分類	II - 80
(3) 幹細胞の特徴	II - 82
(4) 細胞レベルにおける放射線影響評価の意義	II - 84
2) 単細胞系における評価	II - 84
(1) 生存率曲線(増殖死による影響の評価)	II - 84
(2) その他の評価パラメーター	II - 85
3) 多細胞系における評価	II - 86
(1) 脾臓コロニー形成法	II - 86

(2) 放射線照射時における幹細胞の挙動	II - 87
(3) 今後期待される多細胞系における影響評価系	II - 88
7. 放射線被曝による損傷の修復、放射線耐性環境の解明	II - 90
1) 損傷修復・耐性機構解明の意義	II - 90
2) 放射線耐性生物	II - 90
(1) 各種生物の放射線耐性	II - 90
(2) 放射線抵抗性細菌	II - 91
3) 放射線被曝による影響を最小化するメカニズム	II - 93
(1) 損傷修復系の研究現状	II - 93
4) 放射線抵抗性細菌の抵抗性の機構	II - 96
(1) DNA修復系	II - 96
(2) 放射線の酸素効果に対するスーパーオキシドディムスターゼ(SOD)による影響最小化	II - 97
5) 修復系の人為的な操作による生物の改変	II - 98
6) 研究動向と研究の方向	II - 99
8. 放射線被曝による遺伝情報の発現状態の変化の観測	II - 104
1) 放射線照射と遺伝情報の発現制御	II - 104
2) 遺伝情報発現系のエラーとしてのがん	II - 105
3) 遺伝情報の発現変化の観測対象	II - 106
9. 放射線被曝の影響回避方法の開発	II - 108
1) 放射線防護剤の開発	II - 108
2) 放射線防護剤の現状	II - 109
3) 放射線防護剤開発の方法論	II - 109
(1) 生体内の防護メカニズム	II - 109
(2) 放射線防護剤の評価系	II - 110
(3) 放射線防護剤の具体例	II - 111

(4) 味噌	II - 112
4) 今後の課題	II - 112
10. 放射線ホルミシス	II - 114
1) 放射線ホルミシスの概念とその解釈	II - 114
2) 放射線ホルミシス現象の実証	II - 117
(1) ホルミシス解明のアプローチ	II - 117
(2) 観測対象となる表現形と生物	II - 117
3) 放射線ホルミシスと放射線防護	II - 127
4) 放射線ホルミシスの積極利用の可能性	II - 127
11. 生物元素変換	II - 129
1) 生体内元素変換の可能性	II - 129
2) 今後の研究方向	II - 131
Ⅲ章 生体分析のためのバイオテクノロジー	
1. 生体解析方法の進展	Ⅲ - 1
(1) 分離精製技術	Ⅲ - 1
(2) 計測技術	Ⅲ - 1
(3) 遺伝情報解析技術	Ⅲ - 1
(4) 遺伝情報改変技術	Ⅲ - 1
2. バイオテクノロジー分野における分離精製技術	Ⅲ - 2
(1) 分離精製技術の重要性	Ⅲ - 2
(2) 主要な分離精製法概論	Ⅲ - 3
3. 遺伝情報改変の方法	Ⅲ - 13
1) 生物の遺伝情報改変法の進展	Ⅲ - 13
2) 遺伝子交換のプロセス	Ⅲ - 14
3) 相同組換えのステップ	Ⅲ - 15

4) 遺伝子改変細胞の単離法	III - 17
5) 遺伝子改変の現状と課題	III - 17
6) 放射線影響解明への応用	III - 18
4. PCR法	III - 20
1) PCR法の開発の歩みとその利用	III - 20
2) PCR法の応用によるクローニング法とシーケンス法の技術開発	III - 24
(1) シーケンス法	III - 24
(2) クローニング法	III - 26
5. 生体の非破壊計測におけるNMRの利用	III - 31
1) IN VIVO NMRの利点	III - 31
2) IN VIVO NMR測定の概要	III - 31
3) IN VIVO NMRの使用例	III - 33
(1) IN VIVO NMRで得られる情報	III - 33
(2) 共鳴線強度による代謝物濃度の変化の測定	III - 35
(3) 磁化移動法による代謝速度の測定	III - 36
IV章 放射線防護からみた研究分野	
1. 放射線防護とバイオテクノロジー	IV - 1
2. 緊急被曝とバイオテクノロジー	IV - 2
V章 研究テーマの提案と分析	V - 1
1. 研究テーマの分析フォーマット	V - 1
2. 研究テーマの提案	V - 2

I . 研究分野の設定と概要

I. 研究分野の設定と概要

1. 研究分野の設定方針

研究分野の設定にあたっては、新規に研究に着手するため、その研究領域がいかなる理由、目的のもとに設定されるかという研究に対するフィロソフィーが要求される。研究目的の設定が研究対象、研究方法の検討に優先し、研究目的の設定には研究を開始する理念・フィロソフィーが優先する。生物に対する放射線の影響は様々な角度から研究されており、これらは真理を追求するという点では共通しているものの、その研究の背景と目的は少しずつ異なっている。既存の研究との共通点、既存の利用可能な手段・成果を検討する場合にも研究のフィロソフィーや研究目的との整合性が判断基準となるのであり、中心概念となるべきものの確立が要求される。既存の研究内容はこの中心概念に沿って整理されるべきものである。

本調査においては、満たされるべき基本的な研究内容の条件は以下の2点である。

- | |
|---|
| <ol style="list-style-type: none">1. 環境モニタリングに関連する研究2. バイオテクノロジーの適用される研究 |
|---|

この両者を兼ねる研究テーマの設定が本調査の大きな目的の一つであり、発展しつつあるバイオテクノロジーの技術体系が環境モニタリングに対してどのような貢献が可能性として考えらるかを検討するものである。

しかしながら、直接的に「環境モニタリング」という概念に対して、要素分解的な「バイオテクノロジー」が適用可能な研究テーマを設定することは、マクロ的な視点とミクロ的な視点を結合させることであり、即座にこれに合致した研究テーマの設定は困難と考えられる。そのため、それぞれの特性を考慮した上でのマクロとミクロの接点を探索する作業が必要となる。

このような目的から環境モニタリングを考える場合には、環境モニタリングに新たな要素を導入するかあるいは、環境モニタリングの概念を拡張することが要求される。

一方、バイオテクノロジーという手法は、遺伝子、蛋白質、糖、脂質といった生体内分子の観測・操作、生体内代謝の分析・観測、未知の生理活性物質の探索といった実験系の構築に威力を発揮するが、実験目的が明確であることと実験系が構築

可能であることが必要であり、実験目的なきところにテクノロジーの適用は考えられない。すなわち、何を研究するのかという目標が設定された後にバイオテクノロジーの適用が考えられるべきであって、その接点の探索のためには概念の拡張によって環境モニタリングの側からの接近が必要となってくる。

従来の環境モニタリングにおける線量の測定や核種分布の追跡では、生物は放射性核種を蓄積・濃縮する「一種の装置」として取り扱われており、生物を灰化して接種した放射性核種を測定を行っている。本来的には、環境を観測するという概念は放射性核種の分布にとどまらず、「生きた生物の状態」を観測し、放射線の影響を推測するというレベルにまで達していることが望ましい。すなわち環境モニタリングにおける生物のモニタリングは、

生物を「死せる放射性核種の集積装置」として捉えるだけでなく、生物は生きているのであって「生きた生物としての状態の変化」を追うことによって実際に環境下の生物が受けている影響を観測する。

という概念にまで拡張されることが理想である。このフィロソフィーを基礎にして、環境モニタリングと生物に関連する研究について、研究分野とその背景・目的の整理を行い、新規の研究目的の設定の参考とする。環境モニタリングにおける生物を考える場合に、「生きた生物をモニタリングする視点」としては、大きく分けて

A. 生物を放射性核種の集積装置として捉える

B. 生物が放射性核種を集積あるいは放射線を被曝することによって受けた影響をモニタリングする

という2つのスタンスがある。前者は既存のスタンスであり、後者は実際にモニタリング業務を展開するには解決すべき課題が多いと考えられるスタンスである。それぞれの視点ごとに研究課題の設定が可能であり、両者ともバイオテクノロジーの適用による研究の進展が期待される。

一方、本報告書においても一つの大きな目的である「放射線防護」という視点から研究を捉えなおすことも行う（IV章）。これは、放射線と生物に関連する研究が進展し、従来とは全く異なった技術、方法による放射線防護への貢献がバイオテクノロジーには期待されるためである。放射線防護のための基準作成においてもバイオテクノロジーの進展による新たな基準、安全性の指標などができる可能性があり、今後の研究の進展の仕方によっては、ICRPの勧告内容を変更させるだけのインパクトを持つ内容の研究も今後は行われていくものと期待される。

2. 研究分野の設定

研究分野の設定に際しては、前項で示した生物に対する2種類の視点に準拠した研究分野の整理を行い、各分野における発展的な課題の抽出を試みる。従って、研究分野は、次のように大別される。

A：「生物を放射性核種の集積装置として捉えるする」というスタンスから派生する研究課題

B：「生物が放射性核種を集積あるいは放射線を被曝することによって受けた影響をモニタリングする」というスタンスから派生する研究課題

以下、この分類にしたがって研究分野とその目的を概観する。

1) 「生物を放射性核種の集積装置としてモニタリングする」というスタンスから派生する研究課題

このスタンスでは、「生物が放射性核種を集積すること」が中心命題であり、集積する理由、集積の促進・解除が研究対象となる。

(1) 放射性核種を集積する生物に関する研究

放射性元素濃縮特性の高い生物に関して、その種類や生態を研究する。濃縮比の高い生物のスクリーニングや指標生物としての有効性を検討する。

(2) 集積機構の解明・利用

濃縮比の高い生物の集積機構の解明を目指す。濃縮係数の差が生じる原因を解明することによって環境における放射性物質の存在状態と循環に対する基礎的な知見が提供される。また、原燃料であるウランを集積する生物の集積機構を解明し、積極的に利用することによって、ウランの海水からの回収やバクテリアリーチング等資源問題への解決も重要課題である。

(3) 放射性核種の集積解除方法の開発

生物内（特に人体）に集積された放射性核種の体外放出のために放射性核種の体外排出を促進する方法（キレート剤の使用等）を開発する。薬剤の開発においては医薬品開発の方法論の積極的な導入が必要となる。

2) 「生物が放射性核種を集積あるいは放射線を被曝することによって受けた影響をモニタリングする」というスタンスから派生する研究課題

放射線による確立的な影響を評価する場合に注意すべき事柄は、観測事象の表面的な状態変化を追跡するだけでは不十分であるという点である。生体は外界からの環境因子に対して、その影響を最小限にとどめる方策を有しており、これは生体内の正常な機能を維持するための手段であって、もし生体内に変化が起こっても、それが可能な範囲内であれば、その変化を打ち消してもとの正常な機能に戻す作用がある。すなわち、生体内のすべての機能は生命維持という大切な目的に向けてバランスよく統一されており、これらの機能はバランスよく動いているのが正常な状態である。

しかし、生命維持のための障害修復機能には限度があり、これを上回る力をもった外的環境因子が作用すれば、バランスが打ち破られ機能障害が起こって病的な状態となる。

外的環境因子の影響を観測する場合には、外的環境因子による影響に対する修復系の作用を常に念頭においておく必要がある。つまり、非確率的影響以下の刺激の影響を考える場合には、修復系による影響の最小化を考慮する必要があり、修復可能限度程度の刺激に対しては、外的環境因子の影響と修復系の相互作用で考える必要があるという点である。生物の被る影響＝生物の状態変化を観測する場合には常にこの問題があり、放射線の影響を考える場合においても、単純な状態変化を観測するだけでは放射線の影響を直接評価できず、影響を単純化するようなモデル実験

系を考える場合も修復系を考慮したものであることが必要である。したがって、影響の観測系を構築するに際しては

- ・ 刺激因子による状態変化を観測するパラメーターの設定と観測の妥当性
- ・ 変化に対する修復系の作用解明
- ・ 刺激因子による影響と修復系のバランス

を考慮することが必要となる。最終的には、影響・修復系のデータベース化までを行い、影響評価の最適パラメーターを明確化する根拠を提出することがこのスタンスの最終目標である。

放射線を被曝することによる影響を観測する場合には、生命活動に対する影響をどの段階で評価するかが問題となる。生物を構成する分子のレベルから分子の集合体、オルガネラ、細胞、組織、器官、個体、集団までの生物の階層構造のどのレベルを評価していくのかという観測レベルの設定が影響評価には重要であり、観測対象の選択とその選択の影響評価における妥当性の検討が要求される。(図 I-1 参照)。それぞれのレベルでの機能に対する影響を評価することで個体レベルまでの影響を推測することになるが、観測レベル、観測する機能のうち、放射線影響を評価する上で最も重要な対象は、DNA およびその高次の構造である染色体である。これは、影響評価において、標的理論に最も合致する生体構成物質が DNA であるという理由による。遺伝子レベルでの影響が最終的に高レベルの生命活動に対してどのように波及しているかを推定・実証することは現在のサイエンスの水準では部分的にしか行われていない。最終的な目標は、マイクロ(分子レベル)に観察される放射線の影響とマクロ(器官、個体)に観察される放射線の影響の間の相関をとることであるが、現在の水準はマイクロあるいはマクロの影響だけを観測するにとどまり、観測パラメーターの妥当性が検討されている段階にある。したがって、現段階においては、各レベルにおける放射線影響を的確に評価する手段を開発することが課題となっている。

(4) 放射線被曝による損傷の修復、放射線耐性機構の解明

放射線に対する耐性が強い生物に関して、その耐性の究明を行い、生物種による放射線感受性の差が生じる理由を明かにする。DNAの損傷修復系や免疫系等による生物の影響最小化の機構を解明する。これは、人体に対する放射線の影響を最小化する方法に対する基礎的な知見を得ることになる。修復系の人為的操作による弱体化・強化・欠損化、外来因子としての修復系の導入、複数の修復系の相互作用の解明、新規（未発見）修復系の探索等が将来的な研究ターゲットである。

(5) 放射線被曝による遺伝情報の発現状態の変化の観測

放射線を被曝することによる遺伝情報の変化、情報の発現の変化とその影響を観測する方法を開発する。細胞内の特定物質の誘導や、細胞のガン化等が含まれる。

(6) 放射線被曝の影響回避方法の開発

放射線被曝による影響を最小限にするための生物的な防護方法を開発する。具体的には、急性障害に対して生体内に存在する防護物質、防護機構を強化したり、生体内類似物質を投与する方法を開発する。

(7) 放射線ホルミシス

放射線ホルミシスの種類と原因を解明する。低線量放射線による「正の効果」が何故生じるのかを解明することによって、放射線影響のしきい値に対する議論に根拠を提出し、しきい値以下の線量の積極的な利用の可能性を探索する。

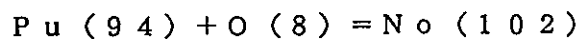
3) その他の研究

環境モニタリングとは直接関係がないが動燃と野村総合研究所との打ち合わせで出てきた研究分野についても検討する。

(1) 生物元素変換

生体内において、元素が創造されているらしいという報告があり、ニワトリがカ

リウムをカルシウムに変換している可能性が指摘されている。生体内元素変換を厳密に証明することができれば、物質の不変性が生体内においては必ずしも真ではなくなり、生物の物質変換のメカニズムが操作可能になるならば



の反応によって、プルトニウムを半減期55秒のノーベリウムに変換可能となり、放射性廃棄物問題は一挙に解決する。

Ⅱ．研究分野の概説

1. 放射性核種を集積する生物に関する研究

1) 放射性核種を高濃度集積する生物を研究する意義・目的

近年、微量金属の定量方法の進歩に伴い、放射性核種を含む公害金属に対する海洋生物の反応に関する研究が可能になり、生体内核種、重金属の生化学、生理学、細胞学、組織病理学的機構とその影響の予測、それらが原因となる生化学的影響等研究が幅広く行われている。

これまでに陸圏環境に棲息する生物については、放射性物質の分布、分配、挙動、農畜産物への移行、調理、加工による除去および食品摂取に起因する放射性物質の人体組織や臓器における蓄積とそれに起因する被曝線量算定のための計算モデルやパラメーターの関する研究が行われている。

一方、海洋生物については、沿岸海域と深海域における放出された放射性物質の環境物質と生物への分布・蓄積とその変動を把握して、放射性物質の移行・循環の経路と移行量およびこれに影響する因子について研究されている。

放射性核種を集積する生物を研究する意義は以下にあげることが主に考えられる。

- ・生物濃縮の原因・機構を究明することは、生物モニタリングにおける基礎的な知見を提供する。
- ・海水中に微量に含有している金属元素（特に放射線核種）を高濃度に濃縮する能力は注目に値し、生物を改変することでこの能力を利用できる可能性がある。バイオロジカルリーチング（生物による金属元素の回収）の可能性を探ることになる。
- ・高濃度に放射線核種を集積する機構は解明されていないがメカニズム解明以前にどのような生物が高濃度に放射線核種を集積しているかについての網羅的な知見が不十分でありかつ整理されていないこと。
- ・高濃度に濃縮する生物は、環境モニタリングにおいても重要であること。

陸圏、水圏のうち、極めて高濃度集積するのは水圏の生物であることが知られており、研究材料として注目されるのは水圏生物である。

2) 海洋生物の放射性物質代謝パラメーター

1945年から1960年代後半にかけて大気圏内において大規模核実験がおこなわれた後、放射性降下物中の特定放射性核種を特定の海洋生物が高濃度に濃縮することが報告されて始め、現在は多くの濃縮係数の高い生物が報告されている。

海洋生物にとって第一の環境は海水であり、第二に他の堆積物及び他の生物である。放射性核種が海水からの生物へ移行することはよく知られている。

生物が放射性核種を濃縮することに関して検討されてきた内容は、

- ①濃縮係数
- ②臓器分布（局在性）
- ③生物学的半減期

の3点である。

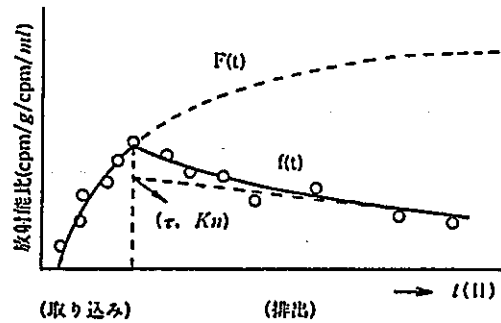
海洋における放射生態学的研究は、フィールド研究と放射性物質をトレーサーとした室内実験が行われている。前者は開放系での生物への放射線核種の取り込みの検討であり、後者は閉鎖系での検討であって条件を単純にして放射線核種の代謝のパラメーターを明かにするものである。閉鎖系でのトレーサー実験は、大規模な水槽で実験を行ったとしても実際の海洋で起こっている現象を再現することは不可能であるが、実験系を単純化することによって、そこで起こっている現象を動的に把握することが可能であることが利点となっている。すなわち、環境水中の放射能のレベルの変動に伴う生物の汚染状況を推定する方法は、

- ・生物の持つ固有のその核種の取り込み定数 (μ)
- ・排出定数 (β)

を知ることによって可能となり、この定数を閉鎖系での実験によって算出することが可能である。

一般に、海産生物による放射性物質の蓄積及び排出曲線は指数関数で近似される。例えば、生物を放射性物質濃度一定の海水中で τ 日間飼育し、その後非汚染の海水中で排出を調べた実験結果は、図II-1-1のように表される。

図 II - 1 - 1 放射性物質の取り込み曲線と排出曲線



μ_n : 取り込み定数 $\frac{K_n}{1 - e^{-\beta_n \tau}} \cdot \beta_n (\text{day}^{-1})$
 β_n : 排出定数 (day^{-1})
 K_n : $t = \tau$ の時の第 n 番目のコンポーネントの値
 (cpm/g/cpm/ml)
 τ : 取り込み期間 (day)

出所) 放射線科学 Vol. 33, No. 8 (1990)

このとき n 個のコンポーネントより成る排出曲線 $f(t)$ 及び取り込み曲線 $F(t)$ は次式で近似される。

$$F(t) = K_1 e^{-\beta_1(t-\tau)} + K_2 e^{-\beta_2(t-\tau)} + \dots + K_n e^{-\beta_n(t-\tau)} \quad (t \geq \tau)$$

$$F(t) = \frac{K_1}{1 - \exp(-\beta_1 \tau)} (1 - \exp(-\beta_1 t)) + \frac{K_2}{1 - \exp(-\beta_2 \tau)} (1 - \exp(-\beta_2 t)) + \dots$$

$$(1 - \exp(-\beta_1 t)) + \dots$$

$$\dots + \frac{K_n}{1 - \exp(-\beta_n \tau)} (1 - \exp(-\beta_n t))$$

最小二乗法により $f(t)$ の各コンポーネントの K 及び β を求め、 $F(t)$ に代入して取り込み曲線が完成する。

したがって、濃縮係数 (CF) は取り込み曲線 $F(t)$ が平行に達した時 ($t = \infty$) に得られ、次のように表現される。

$$CF = F(\infty) = \frac{K_1}{1 - \exp(-\beta^1 \tau)} + \frac{K_2}{1 - \exp(-\beta^2 \tau)} + \dots$$

$$+ \frac{K_n}{1 - \exp(-\beta^n \tau)}$$

生物またはその臓器中の放射性物質濃度と環境水の濃度との比として定義される濃縮係数（CF）は生物と環境水との間に濃度の平衡関係が達成された時の、いわば究極的な生物の濃度を推定するために環境完全評価等でも利用されている。しかし原子力施設周辺海域では放出放射性物質の海水中濃度を支配する要因があまりにも多く、生物と環境水との間で平衡関係が成立することは考えにくい。濃縮係数は海産生物を通してのヒトの被曝線量を推定する上でより安全側に評価する点で有効であり、静的な数値である。

海洋生物が体内に放射性物質を蓄積するのは次の2つからである。

①環境水（海水）

②汚染された飼料生物の補食（食物連鎖）

①の環境水からの場合には、閉鎖系でのトレーサー実験からその生物種の固有の定数（取り込み定数 μ （/日）、排出定数 β （/日））を求めることによって時間（日）の関数として体内濃度を表現することができる。つまり環境水の濃度変動に応じた現実的な生物の放射線核種濃度を知ることができ、いわば動的解析が可能になっている。

②の汚染された飼料生物の摂取による蓄積は、生物から生物への食物連鎖によるものである。独立（自家）栄養の生物以外は、すべて他の生物またはその死骸を餌としているため、養分とともに放射性核種を取り込んでいる。体内への蓄積は、飼料の種類、吸収率、摂餌率、飼料の放射性物質濃度（または濃縮係数）、代謝系へ入った放射性物質の排出速度等によって異なっている。従って、天然にいる生物の体内にある放射性物質のうち、摂餌行為（食物連鎖）による全量への寄与率を正確に把握することは不可能である。

また堆積物からも生物に放射性核種が移行するが、これには2つの場合がある。堆積物から海水に放射性核種が容出し、生物に移行する場合とデトタリス食性の生物の消化管に入った堆積物から直接生物に吸収される場合である。海水経由の移行はその移行率が極めて小さいため実際上は問題とならない。

食物連鎖による放射性核種の移行は常に海水からの直接の移行との比較で考える必要がある。すなわち、放射性核種の蓄積を考える場合には、海水からの移行の大きさに対して食物連鎖による移行を無視できるか否かを評価することが重要とされている。

3) 放射性核種濃縮の解析例

(1) 植物プランクトン

海洋では光合成によって植物プランクトンが無機物質を有機物質に変換し、これが食物連鎖の底辺を支えている。海洋における有機生産量の大部分を占めているため植物プランクトンは、放射性物質の生物濃縮に直接あるいは、間接の影響を及ぼしている。特に沿岸域では、栄養塩が多いため種類や量も多い。植物プランクトンは、代謝速度が速く水質汚染は直ちに植物プランクトンの汚染を引き起こし、その結果これらを飼料とする低次消費生物に短期間に汚染は拡大する。原子力施設からの沿岸域への放射性物質の放出はまず、植物プランクトンに取り込まれ食物連鎖を通じて広がるのが推測されている。植物プランクトンのクラミドモナス（緑藻）、キートセラス（珪藻）、スケルトネマ（珪藻）、パプロバ（黄色鞭毛藻）、プロロセントラム（渦鞭毛藻）を培養し、これに放射性物質を添加して経時的に放射能濃度比を調べ、実験開始後10日目における上記5種の比の結果を表Ⅱ-1-1に示す。

表Ⅱ-1-1 植物プランクトンの海水に対する放射能比（取り込み10日目）

	¹⁰⁹ Cd	⁵⁷ Co	²⁰³ Hg	¹¹³ Sn	⁸⁵ Sr	¹³⁷ Cs	⁵⁴ Mn	⁵⁹ Fe	⁶⁵ Zn
Chla.	1100	30	100	220	10	2	1300	1250	5400
Chae.	200	200	260	600	6	2	500	400	400
Skel.	40	130	130	300	2	1	700	1800	140
Pavl.	100	400	100	200	1	2	500	1000	110
Proro.	250	20	1800	700	10	1	450	900	650

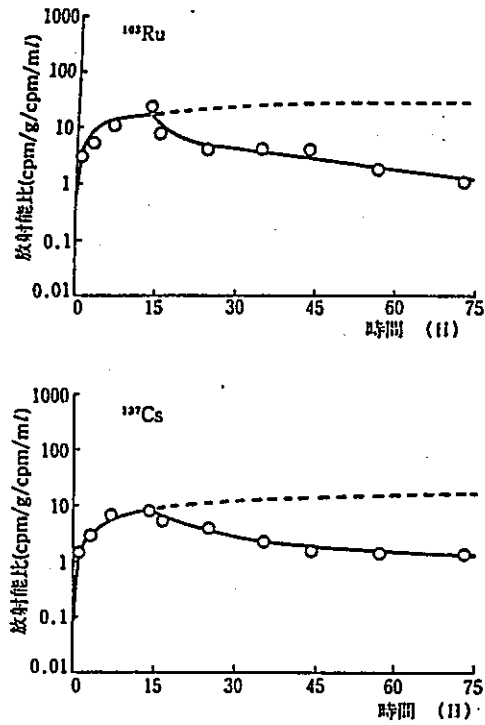
出所) 放射線科学Vol. 33, No. 8 (1990)

各核種の蓄積の程度はプランクトンの種類によって異なり、核種によって蓄積されやすいものとされにくいものがある。

(2) 貝類

ウバガイは、ハマグリやアサリと同様に二枚貝の一種であり、沿岸のやや深い砂地に棲息している。図Ⅱ-1-2は、ウバガイ軟体部の海水からの¹⁰³Ruと¹³⁷C

図Ⅱ-1-2 ウバガイ軟体部の取り込みと排出



出所) 放射線科学Vol. 33, No. 8(1990)

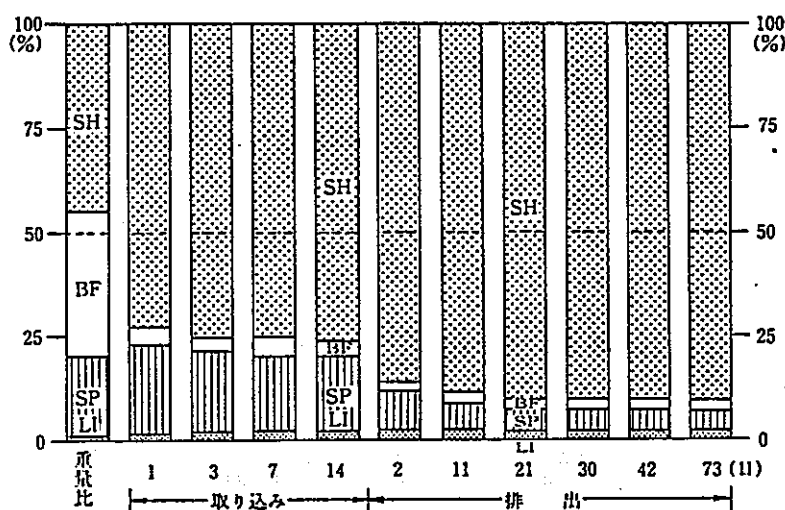
の取り込みと排出を示したものであり、実測値をもとに計算した軟体部全体の濃縮パラメーターは表Ⅱ-1-2である。これらの値は、ウバガイ可食部の濃縮パラメーターとして環境水中のRuとCsの濃度が変動した場合でも時間(日)の経過と共に変動する体内濃度を推定することが可能である。図Ⅱ-1-3、図Ⅱ-1-4は実験期間中のウバガイの貝殻(SH)、軟体部(SP)、体液(BF)、肝臓(LI)の ^{103}Ru と ^{137}Cs の分布の変化を示したものである。 ^{103}Ru は、貝殻(SH)に多く分布し、 ^{137}Cs は、筋肉部で代表される軟体部(SP)に90%以上が分布しているように核種によって分布状況は異なる。また、 ^{103}Ru の体液(BF)や肝臓(LI)のように時間変化の少ないものもあり、これらの臓器において排出速度が遅いことが推察される。

表 II - 1 - 2 ウバガイ軟体部のパラメータ

	構成割合 %	取り込み定数 k	排出定数 β	n/β	濃縮係数 CF	生物学的半減期 $T_{1/2}$ (日)
Ru	short comp.	25	4.5097	0.4328	10	2
	long comp.	75	0.1768	0.0068	20	78
Cs	short comp.	18	1.2698	0.3192	4	2
	long comp.	82	0.3665	0.0247	15	28

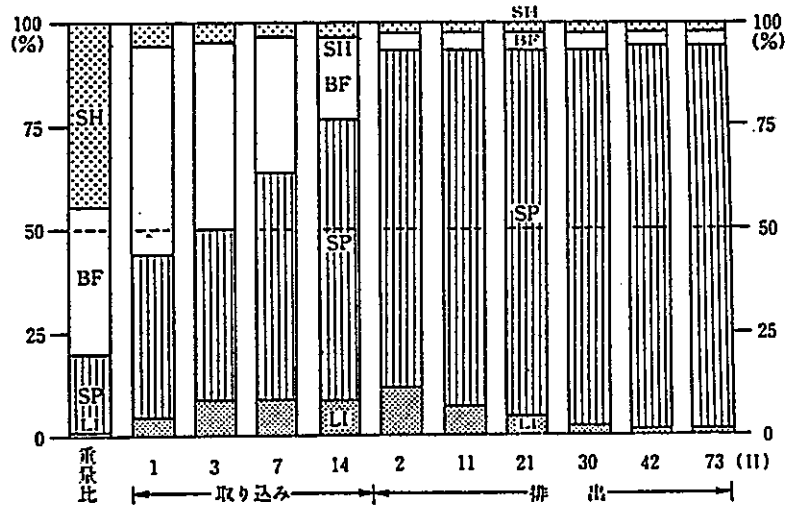
出所) 放射線科学 Vol. 33, No. 8 (1990)

図 II - 1 - 3 ウバガイ部位における ^{105}Ru の分布の変化



出所) 放射線科学 Vol. 33, No. 8 (1990)

図 II - 1 - 4 ウバガイ部位における ^{137}Cs の分布の変化



出所) 放射線科学 Vol. 33, No. 8 (1990)

(3) 甲殻類

クルマエビとヒラツメガニは、沿岸における甲殻類資源としての重要種であり、この両者の濃縮パラメーターを表 II - 1 - 3 にあげる。核種によって濃縮係数にかなりのバラツキがあり、水銀の濃縮係数が高いことが特徴である。

表 II - 1 - 3 クルマエビとヒラツメガニの濃縮パラメーター

Radionuclide		α	β	$T_{b_{1/2}}$ (day)	CF
^{57}Co	prawn	0.29	0.0201	35	15
	crab	0.38	0.0116	60	33
^{203}Hg	prawn	14.60	0.0015	450	10,000
	crab	4.75	0.0022	315	2,200
^{113}Sn	prawn	1.50	0.0384	18	50
	crab	2.19	0.0253	27	100
^{137}Cs	prawn	0.21	0.0153	45	15
	crab	0.09	0.0424	16	2
^{54}Mn	prawn	0.12	0.0135	51	20
	crab	0.69	0.0258	27	30
^{59}Fe	prawn	0.97	0.0378	18	30
	crab	1.50	0.0281	25	50
^{65}Zn	prawn	0.61	0.0063	110	100
	crab	3.09	0.0033	210	1,000

出所) 放射線科学 Vol. 33, No. 8 (1990)

(4) 魚類

ハマチを汚染海水と汚染飼料の投与でそれぞれ飼育し、体内量からどちらの経路による蓄積が多いかを比較したものが、表Ⅱ-1-4および表Ⅱ-1-5である。天然では、核種によって異なり、 ^{106}Ru - ^{106}Rh 、 ^{90}Sr は環境水から、 ^{54}Mn 、 ^{65}Zn から、 ^{144}Ce - ^{144}Pr は両者からの寄与が多いことがわかる。

更に同様な方法で核種の生物で実験した結果から、海洋生物が放射性核種を蓄積する主要な経路をまとめたものを表Ⅱ-1-6にあげる。

表Ⅱ-1-4 餌料及び環境水を通して汚染されたハマチ全身の放射能の比較

Radionuclide	Concentration factor of food (D_{cf})	Body burden via food (F_f)	Body burden via water (F_w)	$\frac{D_{cf} \cdot F_w}{F_f}$
^{144}Ce - ^{144}Pr	83	45	32	60
^{106}Ru - ^{106}Rh	37	61	93	60
^{90}Sr	70	341	364	80
^{137}Cs	80	5160	636	10
^{54}Mn	81	48	30	50
^{65}Zn	86	518	222	40
^{60}Co	81	431	262	50

出所) 放射線科学Vol. 33, No. 8(1990)

表Ⅱ-1-5 天然における海産物の主たる放射性核種蓄積経路

Radionuclide	CF of food organisms (A)	$\frac{D_{cf} \cdot F_w}{F_f}$		Principal pathway
		(B)	(B)/(A)	
^{144}Ce - ^{144}Pr	20	60	3	water and food
^{106}Ru - ^{106}Rh	3	60	2×10^1	water
^{90}Sr	2	80	4×10^1	water
^{137}Cs	40	10	2.5×10^{-1}	food and water
^{54}Mn	550	50	9×10^{-2}	food
^{65}Zn	2000	40	2×10^{-2}	food
^{60}Co	100	50	5×10^{-1}	food and water

• THOMPSON et al. UCRL-50564, Rev.1 (1972)

出所) 放射線科学Vol. 33, No. 8(1990)

表 II - 1 - 6 海洋生物による放射性物質蓄積経路

核種	魚類	軟体動物			棘皮類
		頭足類	巻貝	二枚貝	
^{144}Ce	W+F	-	-	-	-
^{106}Ru	W	-	-	-	-
^{90}Sr	W	-	-	-	-
^{60}Co	W+F	W+F	W	F	W+F
^{137}Cs	W+F	-	W+F	W+F	W+F
^{65}Zn	F	F	F	F	F
^{54}Mn	F	F	W+F	F	F
^{131}I	F	-	F	-	-

W: Water, F: Food

出所) 放射線科学 Vol. 33, No. 8 (1990)

4) 放射線核種高濃縮生物

通常の生物が放射性核種が蓄積するのに比べて、異常に高い濃縮係数を示す生物の存在が知られており、これらはその濃縮機構だけでなく、その核種を生体内においてどのように利用しているかについても興味もたれている。表 II - 1 - 7 に現在知られている主な高濃縮生物の例を示す。

表 II - 1 - 7 放射性核種高濃度濃縮生物の例

核種	生物名	学名(部位)	濃縮係数
^{90}Sr	単細胞緑藻	<i>Carteria</i> sp.	60000
^{90}Sr	原生動物	<i>Acantharia</i> (針状骨)	60000
^{238}U	単細胞植物プランクトン	<i>Chlamydomonas</i> sp.	1000
		<i>Synechococcus elongatus</i>	1000
^{99}Tc	褐藻類	<i>Fucus serratus</i>	1500
^{99}Tc	環形動物		10-1100
^{60}Co	軟体動物	マダコ(鰓心臓)	100000
^{60}Co	シャコガイ	<i>Iridacna crocea</i> (腎臓)	60000

出所) 放射線科学 Vol. 33, No. 8 (1990)

放射性核種の高濃度濃縮生物で最も知られるのは、マダコである。頭足類は循環系に鰓心臓という特殊な臓器を持つが、マダコの鰓心臓の濃縮係数は、水槽飼育25日間後で33,000に達し、総体重に対する重量割合で0.2%にしかならない鰓心臓に約60%もの ^{60}Co が集積している。しかも30日以上排出実験の期間内で ^{60}Co の減少が観察されず、生物学的半減期の算出が不可能であり、蓄積はするが排出はしないという特殊な器官である。

シャコ貝の1種であるヒメジャコは、臓器特異的に高濃度濃縮をする生物として知られる。貝全体では、濃縮係数は数百のレベルであるが、腎臓での濃縮係数は、約58,000と計算され、実効半減期も770日と長い。

これら放射性核種と結合しているのは、シャコ貝では分子量3000程度のペプチドであり、他種の頭足類でも似た傾向が観察されているがペプチドのアミノ酸配列までは不明である。イイダコの外套膜腔内に有機形および無機形の放射性 Co を注射した結果からは、両化学形の Co とも鰓心臓への著しい分布が見られ、同じ放射性核種である ^{54}Mn 、 ^{65}Zn では濃縮は観察されず Co 特異的な濃縮であることが判明している。

海藻のうち、 ^{137}Tc の濃縮は紅藻や緑藻では10前後で低いが褐藻では高く、870(マコンブ)~35000(ウミノトラオ)であり、褐藻の高さが特徴的である。

この他に植物における金属濃縮の例として特殊なものとしてシダ植物が知られている。シダ植物は同じ土壌で生育している他の植物に比べて、数百倍以上ものウラニウムを特異的に摂取、濃縮し、また数 pCi/g のラジウムを蓄積している¹⁾。シダ植物としてこれらの元素は必須であるとは考えにくい、そこから出る放射線が有効に働いている可能性は考えられる。自然放射線の直接利用として藍藻類やゾウリムシのように明かに自然のバックグラウンドレベルの放射線で生長促進効果が観察されていることから研究の余地はあるものと考えられる。

またワラビやゼンマイを多量に摂取するとガンになりやすいといわれているがこれもウラニウムの生物濃縮による可能性が考えられ検討の余地がある。

5) 重金属を高濃度に集積する生物

重金属の濃縮も同じ金属濃縮の観点からメカニズムの研究では共通項が多く、生体内での金属の利用という観点からも注目されるため、放射性核種の濃縮を研究する場合には、関連事項として取り扱う。

原索動物、ホヤの血球細胞に高濃度のバナジウムが蓄積することが知られている。バナジウムを放射化分析によって分析した結果を富山大学の道端らは報告している。(Michibata, H. et al.: Biol. Bull., 171, 672 (1986))

ナツメボヤとスジキレボヤの血球細胞にはそれぞれ $21 \mu\text{g}/\text{mg}$ 乾重量、 $5 \mu\text{g}/\text{mg}$ 乾重量のバナジウムが含有しており、さらに *Ascidia gemmata* の血球細胞には、 $78 \mu\text{g}/\text{mg}$ 乾重量のバナジウムが含まれていることを明かにした。これは、海水に溶解しているバナジウムの濃度 35mM と比較すると最大約 400 万倍に相当する。道端らは、形態的に分類される9種類のホヤの血球細胞のうちの single ring cells と呼ばれる指輪状の形態の細胞がバナジウムを集積していることを見いだしている。

海水に溶解しているバナジウムは5価の陰イオンであるのに対し、血球細胞に含まれるバナジウムは4価もしくは3価の陽イオンである。このため、血球細胞にはバナジウムの濃縮機構に関係する還元物質が含有していることが想定されている。

道端らは、低pH条件下でバナジウムと結合した低分子化合物を抽出し、電子スピン共鳴法による観察でこの物質に含まれるバナジウムは4価のバナジル錯体であり、5価のバナジウム化合物にも親和性を示すことから新規の金属担体である可能性があるとしている (Michibata, H. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 141, 251 (1986))。分類学的に脊椎動物と無脊椎動物の中間に位置する動物が極めて高濃度の遷移金属元素を濃縮していることは、濃縮の機構の解明のみならず、生体における金属の利用を研究する意味でも格好の研究材料であるといえる。

6) 今後の課題と研究テーマ

(1) 高濃縮生物の探索

放射性核種を高濃度に濃縮する生物を探索することは、現在までに主要な生物に関しては行われてきているが全ての生物種に対して網羅的に行われてきたわけではない。とりわけ海洋生物は種類が多く、その全てが探索されていないため、高濃縮生物が現在検討されている他にも存在する可能性がある。濃縮の形式が生物によって異なることは容易に想像され、また臓器による局在性が極端であるような濃縮の

形態では、濃縮機構の解明を行うときに研究が容易になったり、逆に困難になったりすることがあると考えられる。そのため、高濃縮生物の濃縮機構を解明していく上で、研究材料となる生物の種類は多いほうが望ましく、さらなる高濃縮生物の探索が必要である。

スクリーニングに際しては、濃縮率、臓器分布、生物学的半減期を検討することになるが、その作業量が膨大になるため簡便な方法を開発する必要がある。

また対象とする生物も海洋生物にとどまらず、陸圏生物や各種微生物も対象とするべきであろう。

したがって、新規高濃縮生物の探索にあたっての課題は以下の通りである。

- ・ 簡便な濃縮程度の分析方法の開発
- ・ 対象生物の拡大と採取方法の検討（重金属の濃縮も含む）
- ・ 局在性の検討

（２）実験用生物としての飼育（培養）技術の獲得

高濃度に濃縮する生物が見つかった場合に、その生物の濃縮機構の解析が可能であるかどうかは実験材料としての取扱いの容易さにかかっている。濃縮機構を解明するためには、特定の器官、臓器への濃縮プロセスや放射線核種を取り込む担体を探索する必要があるがそのためには、生物を大量に入手する必要がある。実験材料として取り扱う場合には、繁殖や飼育の方法を獲得すると同時に、そのコストも問題となり、低コストでの飼育方法の開発が必要である。したがって以下の点が課題となる。

- ・ 実験動物の大量入手の方法の開発
- ・ 飼育（培養）・育種のための繁殖方法の開発
- ・ 低コスト化

【参考文献】

- 1) Koyama, M., M. Shirakawa, J. Tanaka, Y. Yamagata, and T. Matubara (1987)
J. Radiat. Nucl. Chem. 112, 4898

2. 集積機構の解明・利用

1) 集積機構について

放射性核種を高濃度に集積する生物が存在し、どのような放射性核種をどの程度集積するかに関する知見はある程度集まっているものの、特定の核種をいかにして濃縮しているかというそのメカニズムに関する知見は、ほとんど得られていないといってもよいのが現状である。特定の核種が生体内に取り込まれる場合には、生体全体にその核種が分布していたり、特定の器官に集中的に分布していたりするが、これはその生物特有の金属集積機構によるものである。 ^{60}Co の濃縮率が10,000と極めて高いマダコの場合には、鰓心臓に60%が集積されており、シャコ貝では腎臓における濃縮係数が58,000という例にも見られるように、極めて高濃度に金属を濃縮する場合には生体内中の特定の器官にその金属が集中して蓄積されていることが多い。生体内において一定濃度以上の金属は毒としての作用をもっており、その毒性から逃れるために生物は特殊な防御機構と集積機構を備えており、これらを完備している生物だけが特定金属を高濃度に濃縮することが可能になっていると推測される。また、特定の生物が特定の金属を濃縮する生物学的な動機についても不明の点が多い。濃縮している金属を積極的に利用しているのか、ただ単に濃縮しているだけであるのかについても全く不明のことが多い。これは、特定金属を濃縮する能力を獲得するに至った進化的な経過とも関連があり、生物学的に興味を持たれるところである。

集積機構は、金属が集積されるプロセスと集積された後の金属の存在（蓄積）状態に分けて考えることができる。前者の解明には、生体内の金属代謝全般に対する知見が蓄積していることが必要であり、その解明には生物種によっては時間を要する。後者はバイオテクノロジー等の分析手法によって解明できる部分が多い。金属が生体内に濃縮される場合には、その金属の存在状態が問題となり、元素の化学形によって生体内に濃縮されるか否かが決定されているものと考えられる。バナジウムを濃縮するホヤの例にも見られるように海水中に溶解しているバナジウムが5価の陰イオンであるのに対し、血球細胞中では3価または4価であることから、取り込みの際には生体内で酸化還元反応が起こっている場合も想定され、他の研究対象となる生物においても生体内での化学形がどのようになっているかを知ることが重要であると考えられる。金属は生体内でイオンとして存在し、通常金属に対して結合している生体内結合物質が存在する。シャコ貝は ^{60}Co に対して分子量3000程度のペプチドを結合させていることが知られているが、金属に結合するペプチ

ドや蛋白の場合、チオール基を含むアミノ酸（システインやメチオニン）を多く含んでいることが予想される。金属に対して生体内で結合している物質がどのようなものであるかについての分子生物学的な研究は進展しておらず、これらの結合物質の同定・単離・構造決定が集積機構解明の第一の研究目標である。

金属に対する結合物質の同定・単離・構造決定は、既に確立している分離精製技術や蛋白質のアミノ酸配列決定法、遺伝子配列決定法、NMRなどを使うことによって解析することが可能であり、これらの解明が放射性核種集積の解明の糸口となることが期待される。結合物質の構造が決定されると結合物質の誘導・合成がどのように起こるが、また結合物質と相互作用している生体内の分子は何かといった研究課題が派生してくるものと予想される。

2) バイオソープション (biosorption)

(1) バイオソープションの概念

自然環境の汚染のひろがり、金属のより効率的な回収およびリサイクルの必要性の増加により、工場排水の毒物除去や金属の回収に対してバイオテクノロジーの応用することに大きな関心が持たれている。そのために、生物の物理化学的な金属吸着を利用した金属の回収・除去、さらには放射性廃棄物の処理を行う試みが研究レベルで進展している。生物の物理化学的な吸着を利用することをバイオソープション（生物吸着）といい、一つの研究領域として確立しつつある。

例えば、微生物およびその生産物は他の生体物質と同様に、可溶性あるいは微粒子状の金属および放射線核種の効率的な蓄積し、特にきわめて希薄な外部濃度からも効率的に蓄積する¹⁾。これには物理学的な吸着作用、すなわちバイオソープションから代謝に依存する様々な過程（例えば、輸送、タンパク質合成）まで多種多様な機構が関与していると考えられる。バイオソープションを利用したシステムは、伝統的な処理法に取って変わる、あるいはさらに強化する方法として期待されており、また一部、鉱業や冶金においては実際に使用されようとしている²⁾。しかしながら、このバイオソープションを用いた廃棄物処理の工業的実用化が詳細に検討されるようになったのは最近のことであり³⁾、金属バイオマスの相互作用の多くの部分は未開拓のままである。

現在、核廃棄物処理へのバイオテクノロジーの応用に多くの興味が集中している。原子力業界は現在、放射性廃液の処理を物理化学的技術（例えばイオン交換樹脂、凝集作用、限外ろ過など）に依存しており、比活性の高い核廃液は未処理のまま

貯蔵されている。D. Roach (PA Technology, Royston, UK) の調査によると、放射線核種の除去のために開発・応用しうる技術としては、短期的にはバイオマスそのものを、中期的には修飾／非修飾の生体高分子を用いたバイオソープションを基本とすべきであるとしている⁴⁾。長期的には、リグニン、キチン、キトサン、セルロース以外の生体高分子も利用できる可能性を秘めているが、しかしこれには遺伝子工学あるいはタンパク質工学を応用する必要があるであろう（例えば適当なメタロチオネインやシデロフォアの生産など）。原子力産業からの廃棄物がしばしば毒性を持つという理由から、短期的にみてバイオソープションが利用される最大の機会は、既に死んでいるバイオマスを使うことである。ある種の排水は強酸性（ $pH < 1$ ）であるが、カビ類のバイオマスはそのような条件でも依然トリウム（Th）を除去できると C. White (University of Dandee) が報告している。ペレット状のバイオマスを利用したバイオリアクターは彼らが調べた最も効果的なシステムであった。しかし、技術的な可能性だけでなく経済的な実現可能性の検討は不十分である。

カビの細胞壁中に含まれるキチン、キトサンのような成分の金属吸着能は、細胞を水酸化物で処理することによって向上する。D. S. Wales と B. F. Sager

(British Textile Technology Group, Didsbury, Manchester) は、水酸化物で処理したカビバイオマスが水を含んだ紙状フィルターに組み込まれていく過程を報告した。しかしながらスケールアップに伴う最大の問題は、多数のカビフィルターが流入水の流速を落とすことである。このカビフィルター、またこのようなりアクターの実用化ができるかどうかは、工業的に通用する流速を得ることができるかどうかにかかっている（1時間当たりカラムあるいはリアクター容量の10倍以上）。

生物の排泄物やバイオマス由来の産物も同様に、金属あるいは放射性核種の除去のために利用できる可能性を秘めている。

キトサンの工業生産は甲殻類動物の殻から得られるキチンに依存しており、キチンを脱アセチル化して生産される。

この生物吸着剤の原料として有望なキチンは、甲殻類の殻から年間40,000トン以上とれると見積もられている。O. Skaugrud (Protan A/S, Drammen, Norway) は、新たに開発した技術としてキトサンでコートした大きな表面積をもったシリカを紹介した。これはろ過法に匹敵する効率で金属を除去できる。

生きた生物体であれ死んだ生物体であれ、あるいはまた生物の生産物であっても、それが金属回収システム中で使用される際には、吸着剤としての形状が重要である。固化バイオマスは充填層型あるいは流動層型のリアクターとして利用価値が大きい⁵⁾。ある種のカビはペレット状に生育し、またそのような状態で使用されうるが、ポリアクリルアミドゲルや泡状・網状の組織にバイオマスを固定化するとさらに有力な製品を提供することになる。

微生物が生育中に発現する機構を利用した簡単な吸着処理法も存在する。しばしばそのような“活性の高い”系は、工業的な利用中に効力を失う。しかしながら、L.E. Macaskie (University of Oxford) は、Citrobacter 属の金属耐性ホスファターゼは、休止細胞中でも連続的に機能すると報告した。この酵素はリン酸を含む有機分子から HPO_4^{2-} を解離させ、金属を細胞結合型の金属リン酸水素塩 (MHP O_4) として沈殿させる。この金属リン酸水素塩はバイオマス 1 g あたり 9 g にも達する (乾燥菌体量の 900%)。このタイプのシステムは金属含有溶液と同様に、扱いにくいウラン-トリプルチン酸廃棄物の処理にも応用可能であると考えられる。

バイオソープションの研究の多くが環境保護に関連している一方で、もっと積極的に貴金属を回収するための応用も考えられる。微生物は金、銀あるいはガリウムを蓄積することができ、そしてガリウムは細菌あるいはカビのシデロフォアと複合体を形成しようと A.T. Bull, D.J. Gascoyne, J.A. Connor (University of Kent) は報告した。このような研究の経済的価値は明らかであるが、バイオソープションを使った金属回収システムが商業規模で実現するには、多くの要因が絡んでいる。その要因としては、吸着能、選択能、回収率、また伝統的な方法との競合の問題、そして厳しい使用条件に耐えるかどうかなどが含まれる。伝統的処理方法に取って代わるには、除去効率が 90% 以上、処理能力はバイオマス 1 g 当り金属 150 mg 以上でなければならない^{2,7)}。バイオマスに依存した多くの吸着システムがこの要求を満たしてはいるが、金属を除去する際に十分な選別能力をもっていない。この問題は場合によっては特別な菌株を使用したり、流出過程を操作することにより解決できるであろう^{1,2,6)}。

米国において、バイオマスを使った金属吸着システムの開発は大部分、貴金属の回収に向けられている。これを環境保護などの方面へ応用するいは、バイオソープションの改良のみならずタンパク質工学、遺伝子工学を積極的に取り入れたプロセスの改善が必要である。さらに、研究室レベルで実現可能な研究がスケールアップ可能かどうかを確かめるために、化学工学の前進も求められる。大規模なシステムが、今後 5~10 年の間に開発されるであろう⁴⁾。環境浄化という世界的な政治動向が続く中で、行政の担当官や関係企業が、バイオソープションを利用した金属の除去・回収システムの開発のために必要とされる大規模な援助体制を取りうるかどうか興味もたれる。

(2) 藻によるウランの濃縮

① 概説

藻類のなかには海水中に溶存しているウランをかなり高濃度に集積捕集する能力をもったものが知られている。イシゲ¹³⁾は海水中のウランを $3 \mu\text{g/g}$ 程度に濃縮することができる。西独のユーリッヒ原子力研究所では種々の微細藻類を使って海水ウランの濃縮実験が行われている⁸⁻⁹⁾。同研究所の Heide ら⁹⁾によると、海産性微細緑藻を高ウラン培地で培養し、X線で変異をおこさせた藻株は10日間の連続培養で生藻体中に海水中の1000倍量のウランを濃縮することができるという。

宮崎医科大学医学部の坂口らは、種々の生物体を使って淡水系および海水系に溶存しているウランの濃縮実験を行っているが¹⁰⁻¹⁴⁾、淡水産性微細緑藻の一種である *Chlorella regularis* は *Chlamydomonas* や *Scenedesms* などに比べ淡水系から多量のウランを体内に濃縮できることを見出した¹⁰⁾。この藻はまた銅、マンガン、カドミウムなどの重金属イオンもかなり高濃度に体内に濃縮することができる。この *Chlorella* によるウランの取込みはきわめて短時間に行われ、 $0 \sim 30^\circ\text{C}$ の範囲ではほとんど温度の影響を受けないし、またDNAや NaN_3 のような代謝阻害剤の影響もほとんど受けない。

また一方、生藻体に取り込まれたウランの81%はEDTAによって溶出され、取込み量の75%が細胞磨砕物の $26,000 \times \text{g}$ 沈澱部に存在している。また一方、*Chlorella* 藻体を沸とう水で処理し物質代謝を停止させた熱処理藻体は、生藻体よりも多量のウランを集積捕集することができる^{11, 12, 14)}。これらのことから *Chlorella* によるウランの取込みは物質代謝とはほとんど無関係に行われ細胞表面への物理化学的吸着性が強いものと考えられ、藻体中のウランはEDTAによって容易に置換される配位子と結合しているものと思われる¹⁰⁾。しかし、*Chlorella* によるウランの取込みは *Chlorella* が生育している溶液中の共存イオンの影響を著しく受ける¹¹⁾。ウランが共存する炭酸イオンと安定な錯イオン $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ 、 $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ を形成し、*Chlorella* はこれらの錯イオンを吸収することができないことに起因しているものと考えられる。

天然海水からは1時間の取込み時間ではほとんどウランを取り込むことができない。しかし、炭酸イオンを除去した海水からはウランをよく取り込むことができる(表II-2-1)。また、*Chlorella* によるウランの取込みは海水のpHの影響を著しく受ける。このことはpH6以上では海水中のウランは大部分が炭酸イオンとの錯イオン $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$ 、 $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ として存在しているため *Chlorella* はこれらの錯イオンを吸収することができないことによるものと考えられる。

微細藻類の海水ウラン集積捕集能は、藻種の違いによってかなり異なる¹²⁾。数種の海産性微細藻類を使って天然海水 (U 1 p p m) からのウラン集積能を調べてみたら (表 II - 2 - 2)、Synechococcus と Chlamydomonas に高い濃縮係数が認められた。

表 II - 2 - 1 *Chlorella regularis*による海水からのウランの取込み

	藻体中のウラン量 ($\mu\text{g/g dry wt.}$)	
	生藻体	熱処理藻体
ウランのみを含む水溶液	4,050	19,800
天然海水	~ 0	~ 0
脱炭酸処理を行った天然海水	4,860	19,100
人工海水	~ 0	~ 0
炭酸イオンのぞいた人工海水	4,360	16,360

出所) 坂口孝司、他:農化、53、211(1979)

表 II - 2 - 2 海水産性微細藻類による海水からのウランの取込み

種 名	藻体中のウラン量 ($\mu\text{g/g dry wt.}$)
<i>Chlorella</i> sp. 1	257
<i>Chlorella</i> sp. 2	292
<i>Dunaliella tertiolecta</i> 1	197
<i>Dunaliella tertiolecta</i> 2	108
<i>Chlamydomonas</i> sp.	1,429
<i>Synechococcus elongatus</i>	1,764
<i>Calothrix crustacea</i>	40.7
<i>Porphyridium cruentum</i> 1	23.8
<i>Porphyridium cruentum</i> 2	16.7
<i>Platymonas</i> sp.	54.1

出所) 坂口孝司、他:農化、53、211(1979)

② バイオテクノロジー適用の可能性

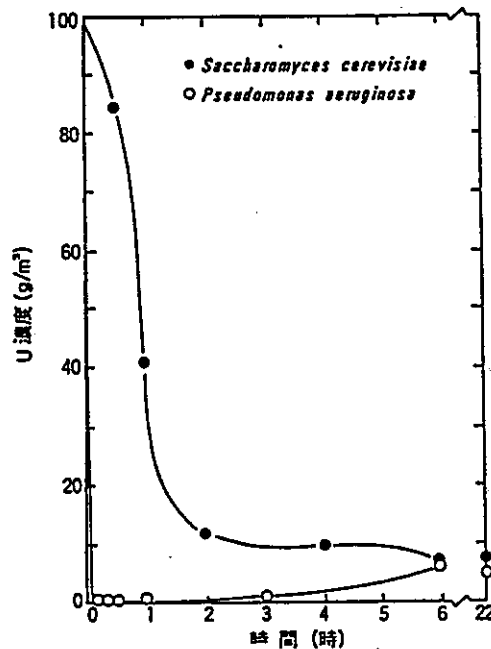
このように、微細藻類によるウランの取込みはウラニルイオンの化学種、藻の種類、環境条件の違いによって著しい影響を受けるが、ウランがどのような機構で生体内に取り込まれるかについては不明の点が多い。

したがって、メカニズムが不明の機構に対しては、人為的に遺伝的な変異を起こさせることによってウランの取り込みを強化した変異種の育種と変異部位の同定や取り込みに関与する遺伝子のクローニング等、遺伝学的、遺伝子工学的な方法によるウラン取り込み機構の解明に加えて、取り込み初期に有効であると考えられる細胞表面の構造を解析し、細胞表面構造を模した人工ウラン吸着膜によるウランの回収方法の検討も課題である。

(3) 微生物によるウランの濃縮(吸着)

Strandbergら¹¹⁾によって行われた微生物によるウラン吸収の研究は注目される。微生物によるウランの吸収または吸着は極めて迅速であり、図II-2-1に示すように100mg/lの濃度に対して*Pseudomonas aeruginosa*を400mg/l添加すれば10秒以内でウラン濃度は0になった。また、*Saccharomyces cerevisiae*でも同様な実験を行った結果、2時間程度で溶液中のウランの90%を吸着したと報告している。

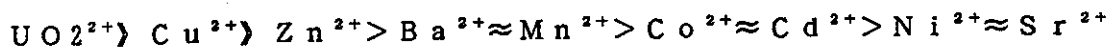
図II-2-1 微生物による溶液からのウランの除去



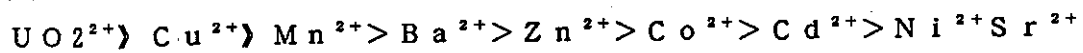
出所) 「米国における最新のバイオテクノロジーの動向(2)」より

電顕などの観察結果から、P. aeruginosaは、ウランを細胞内に吸収し、S. cerevisiaeは細胞壁に吸着していることが判明している。菌体乾燥重量に対するウラン濃度は10~15%であった。このような吸収、吸着現象が利用する上で好都合であるのは、他の重金属よりウランに対する親和性が強いことである。これに関する研究はすでにNakajimaら¹²⁾によって行われている。彼らは、Chlorella regularisに対する種々の重金属の親和性を検討した結果、つぎに示すようにウラン(VI)は他の重金属よりきわめて親和性が高いことが判明している。

生細胞では



熱処理菌体では



これらの微生物によるウラン濃縮は生体の物質代謝とは無関係で細胞物質への物理化学的吸着による。細胞壁や細胞質を構成している種々の物質とウランの結合性を検討した結果、カルボン酸系、リン酸多糖系またはポリフェノール系化合物が吸着に関与していることが明らかになっている。これらの化合物の金属の選択的吸着傾向を示す構造と機能の解明が望まれる。

(4) バイオソープションにおける今後の課題

金属に対する吸着特性が非常に高い生物が存在すること、及びその生物の産生する化合物に対する物理化学的な吸着がその主な要因であることという点がこのような生物・化合物を利用していく上で幾つかの重要なヒントがある。生物の生物学的な活動によって金属が吸着されているのではないため、より理想的な化合物を設計し、生物に生産させてその生産物を利用して金属回収を行える可能性がありかつそのプロセスには生命活動を関与される必要がないこと、また吸着化合物を改変し人類が化学合成によって生産できるならば、より効率のよい金属回収が行えるという点である。貴金属の場合には、その回収コストが非常に重要であるが、核廃棄物の場合には、コストよりも回収率や安全性が重視されるため、吸着機能が高ければ、現在使用されているカラムよりも安価である限り使用することができる。また、吸着化合物の金属特異的な吸着現象は、化合物の金属認識の問題としても興味深く、金属～有機化合物相互作用に研究材料としても優れている。

金属とトラップする構造はどのようになっているかは、現在我々が手中にしている様々な分析手段を利用することによって、可能な範囲にあるものと考えられる。

またもともとの生物生産物よりも吸着効率がよく、コストの低い吸着物質を遺伝子工学や蛋白質工学を利用することで開発・生産することができるならば、広く金属回収の方法としての普及も考えられよう。

3) バクテリアリーチング

(1) バクテリアリーチングの意義

高品位鉱を産出できる鉱山のほとんどが開発しつくされ、今後新しい鉱山の発見も困難な状態にあるといわれている現在、今まで見捨てられていた低品位鉱や、採掘が困難な深部鉱床からも有用金属を回収しなければならない必要に迫られている。従来の採鉱冶金法では、採掘および採掘した鉱石を運び出す過程、浮遊選鉱を行うために鉱石を微粉末にする過程等で莫大なエネルギーを消費しなければならなかった。低品位鉱資源化の必要性が高まり、さらに1973年に始まった石油危機で、従来の採鉱冶金法で消費しなければならなかった莫大なエネルギーをできるだけ節約しようという気運も相まって、バクテリアリーチングが注目されるようになった。

(2) バクテリアリーチングとは

バクテリアリーチングとは、微生物の代謝活性、または微生物の代謝生産物を利用して、不溶性の鉱石から目的とする金属を金属イオンとして溶出させる技術である。Mを2価の金属とすると、バクテリアリーチングで行われている生物反応は一般に、次式で表すことができる。



すなわち、不溶性の金属サルファイドMSは、細菌の作用によって可溶性の金属硫酸塩に変換される。こうして生成する金属イオンは、セメンテーション、溶媒抽出法等を用いて金属として回収される。

現在、銅とウランに対して工業的規模のバクテリアリーチングが実施されているが、アメリカ合衆国における銅生産額の10%以上がバクテリアリーチングによるものと概算されている¹⁷⁾。しかし、バクテリアリーチングが本格的に実施され始めたのは、鉄酸化細菌、硫黄酸化細菌等バクテリアリーチングに関与する微生物の生理が明らかにされ始めた1950年以降の事で、比較的その歴史はまだ浅い。

(3) バクテリアリーチングに關与する微生物

化学合成独立栄養細菌ばかりでなく、化学合成従属栄養細菌も、鉍石からの金属イオンの溶出に關与していると考えられているが、有機物含量が比較的少なく、高濃度の重金属イオンが存在する酸性環境下において金属イオンの抽出に主として關与している細菌は、化学合成独立栄養細菌である鉄酸化細菌 *Thiobacillus ferrooxidans*、硫黄酸化細菌 *Thiobacillus thiooxidans* を中心とした *Thiobacillus* 属の細菌である。1888年に Winogradsky が化学合成独立栄養細菌の存在を提唱して以来、硝化細菌、水素細菌、硫黄細菌、光合成細菌等がつぎつぎに発見されていったが、鉄酸化細菌の発見はずっと遅れ、1947年 Colmer と Hinkle が酸性鉍山排水中の2価鉄の酸化を、極端に早める生物因子を単離したときに始まる。¹⁸⁾

thio- は硫黄を、bacillus は細菌の形状が桿上であることを、thiooxidans および ferrooxidans はそれぞれ硫黄および Fe^{2+} を酸化できる事を意味している。したがって *Thiobacillus thiooxidans* は、硫黄化合物を酸化できる桿状の細菌を、*Thiobacillus ferrooxidans* は硫黄化合物と Fe^{2+} の両方を酸化できる桿状の細菌を意味する。両者は植物と同様に、菌体を構成している炭素原子を空気中の炭酸ガスを固定して賄わなければならない事から独立栄養細菌と呼ばれている。

Thiobacillus 属細菌の中には、生育の最適pHを中性域にもつもの、硫黄化合物のほかにも有機化合物をもエネルギー源炭素源にできるもの、硫黄化合物のほかにも有機化合物をもエネルギー源炭素源にできるもの、硫黄化合物と有機化合物の両方を増殖に必須とするもの、嫌気条件下で硝酸イオンを還元して窒素ガスを生成し増殖できるもの等、多彩な微生物を包含しているが、これらもバクテリアリーチングに關与していると考えられる。

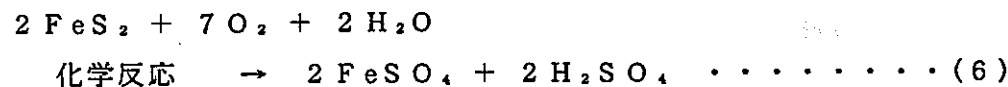
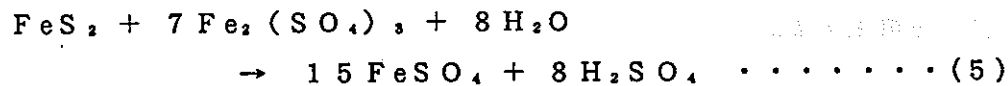
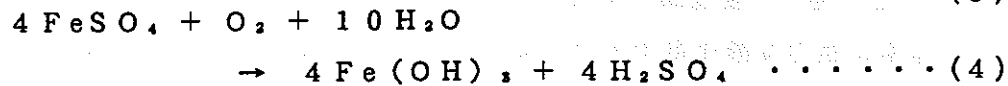
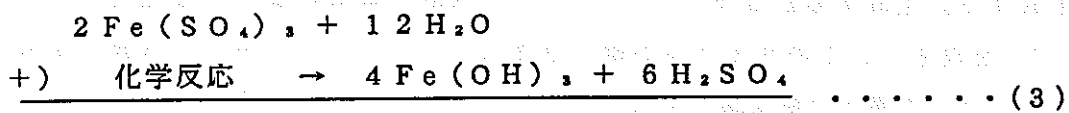
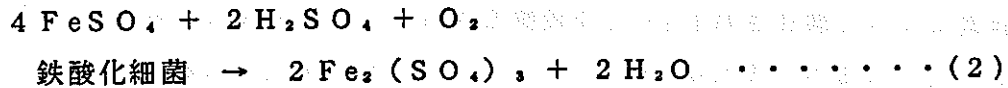
Sulfolobus 属の細菌は60°C以上の高温条件下で硫黄をエネルギー源として酸化できる。この細菌は分類的には、メタン生成細菌や絶対好塩性細菌と同じ古細菌に分類される。また Brierley らは45~70°Cの範囲で硫黄と Fe^{2+} の両方を酸化できる鉄酸化細菌によく似た好熱好酸性の独立栄養細菌を分離し、この菌がモリブデンのリーチングにすぐれている事を見いだした。¹⁹⁾

鉍石を大量に推積すると内部の温度は80°Cにも達するといわれているので、これらの好熱好酸性菌は特殊環境下におけるバクテリアリーチングへの応用が期待されている。

(4) バクテリアリーチングの原理

鉄酸化細菌の最も特徴的で重要な酵素は、鉄酸化酵素および硫黄酸化酵素である。

鉄酸化細菌のエネルギー源である Fe^{2+} は、pH3 以下では空気中の酸素で自動酸化されにくく安定なので、鉄酸化細菌は普通 pH3 以下の酸性条件下に生息している。鉄酸化細菌は Fe^{2+} を(2)式に従って酸化する。生成する硫酸第二鉄はさらに化学的に加水分解され、水酸化第二鉄を生ずる [(3)式]。1モルの硫酸第一鉄が酸化されるとき、正味1モルの硫酸が生成し、環境は硫酸酸性になる [(4)式]。硫酸第一鉄の主たる源は、黄鉄 FeS_2 で、黄鉄鉱は Fe^{3+} や分子状酸素によって化学的に酸化され $FeSO_4$ を生成する [(5)および(6)式] ²⁰⁾。

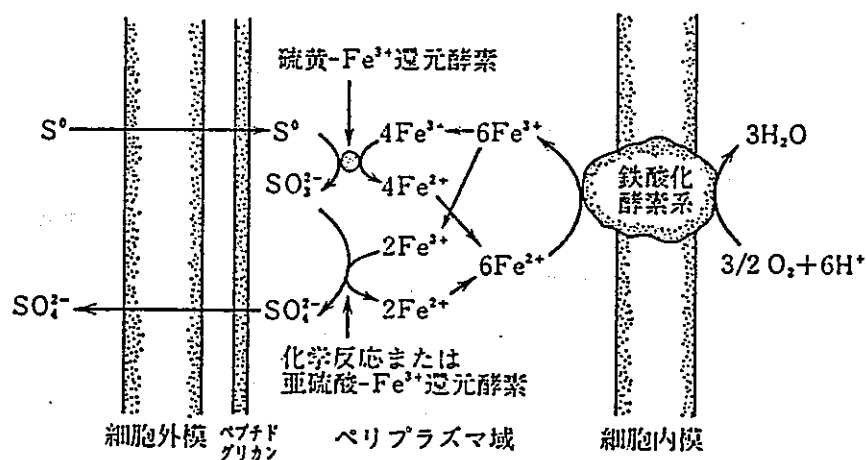


鉄酸化酵素系は鉄酸化細菌の細胞内膜とペリプラズム域に存在している²¹⁾。 Fe^{2+} の電子が、鉄酸化酵素系の構成成分である銅タンパク質^{22)、23)}、c型チトクロム、チトクロム酸化酵素を經由して最終電子受容体である分子状酸素に渡される鉄酸化機構が提案されている。最近山中らは、鉄酸化細菌から鉄酸化酵素を高度に精製し、これが Fe^{2+} の電子を酸性条件下でチトクロム c-552 に伝達する事を示した²⁴⁾。

鉄酸化細菌は元素硫黄を酸化できるが、その方法は硫黄細菌²⁵⁾の場合とほぼ同様であると考えられてきた^{26)、27)}。まず還元型グルタチオンの存在下で元素硫黄の8員環が化学的に開裂しポリサルファイドが生成する^{20)、28)}。ポリサルファイドは硫黄酸化酵素の作用で分子状酸素によって酸化され亜硫酸を生成する。亜硫酸は2種類の方法でさらに硫酸まで酸化される。その一つは、亜硫酸-チトクロムc還元酵素が関与するもので、もう一方はアデノシン-5'-ホスホスルフェート還元酵素およびアデノシンジリン酸スリフリラーゼが関与する。

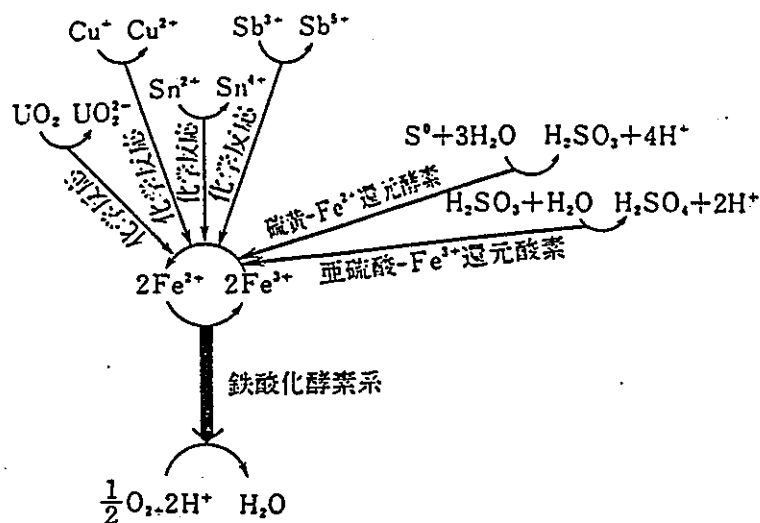
松尾らは鉄酸化細菌中に従来報告のなかった新しいタイプの硫黄酸化に關与する酵素、硫黄- Fe^{3+} 還元酵素²⁸⁾、および亜硫酸- Fe^{3+} 還元酵素³⁰⁾の存在を報告している。両酵素の特徴は、無機硫黄化合物を酸化する際の電子受容体がチトクロムではなく Fe^{3+} である点にある。鉄酸化細菌は可溶性の Fe^{3+} が多量に存在する環境下で生育し続けてきたから、他の生物とは異なったユニークな酸化還元酵素を進化の過程で作り上げたとしても不思議はない。硫黄- Fe^{3+} 還元酵素が鉄イオンで連結した新しい硫黄酸化経路を現在提案している。(図II-2-2、図II-2-3)²⁹⁾、³¹⁾、³²⁾。すなわち、元素硫黄はペリプラズム域に入った後硫黄- Fe^{3+} 還元酵素によって酸化され Fe^{2+} と亜硫酸を生成する。亜硫酸は亜硫酸- Fe^{3+} 還元酵素で酸化されるか、または Fe^{3+} によって化学的に酸化され硫酸イオンと Fe^{2+} を生成する。生成する計6モルの Fe^{2+} は、鉄酸化酵素によって酸化され6モルの Fe^{3+} を再生し、このサイクルが繰り返されるというものである。鉄酸化細菌は鉄イオンを介して種々の重金属をも酸化する事が知られている(図II-2-3)。 Fe^{3+} は非常に強力な酸化剤であり、 UO_2 、 Cu^+ 、 Sn^{2+} 、 Sb^{3+} 等を化学的に酸化する事ができる³³⁾。この際生成してくる Fe^{2+} は、鉄酸化酵素によって酸化され Fe^{3+} を再生する。

図II-2-2 T. ferrooxidans A P19-3株において提案されている新しい硫黄酸化経路



出所) 参考文献29)

図 II - 2 - 3 鉄酸化酵素が関与する無機化合物の酸化反応 [W. J. Ingledew(1982) と T. Sugioら(1987および1988a)をもとにして作製]



出所) 参考文献29)

(5) バクテリアリーチングの応用

2種類の金属溶出機構が提案されている。その一つは直接接触機構で、細菌が硫化鉱石表面に付着し、その硫黄部分を硫酸にまで酸化するという機構である。もう一方は間接触機構と呼ばれ、鉱石中の金属あるいは硫黄成分が Fe^{3+} によって化学的に酸化され金属硫酸塩となって溶出する機構である。

この機構における鉄酸化細菌の役割は、単に生成する Fe^{2+} を素早く酸化し Fe^{3+} を再生する事にある。実際のバクテリアリーチングにおいては両者を区別して考える事は困難で、多分同時に働いていると考えられている。バクテリアリーチングは多種類の金属の回収に対して応用できる。T. fによって金属イオンを浸出させることのできる鉱物は、Duncanら²⁸⁾ によって表II-2-3のようにまとめられている。ほとんどが金属硫化物であるが、この他にも二酸化マンガンのような酸化物を浸出した例も知られている^{29), 30)}。ここでは鉄酸化細菌を用いた黄銅鉱 CuFeS_2 からの銅の回収と、ウラン鉱石からのウランの回収について述べる。

表 II - 2 - 3 T. f によって酸化される鉱物

鉱物名	化学組成	
硫ひ鉄鉱	Arsenopyrite	$Fe_2As_2S_2$
斑銅鉱	Bornite	Cu_5FeS_4
黄鉄ニッケル鉱	Bravoite	$(Ni, Fe)S_2$
輝銅鉱	Chalcocite	Cu_2S
黄銅鉱	Chalcopyrite	$CuFeS_2$
輝コバルト鉱	Cobaltite	$CoAsS$
銅藍	Covellite	CuS
硫ひ銅鉱	Enargite	$Cu_3(As, Sb)S_4$
白鉄鉱	Marcasite	FeS_2
鉄閃亜鉛鉱	Marmatite	$(Zn, Fe)S$
針ニッケル鉱	Millerite	NiS
輝水鉛鉱	Molybdenite	MoS_2
雄黄	Orpiment	As_2S_3
黄鉄鉱	Pyrite	FeS_2
磁硫鉄鉱	Pyrrhotite	Fe_7S_8
閃亜鉛鉱	Sphalerite	ZnS
黄錫鉱	Stannite	Cu_2FeSnS_4
四面銅鉱	Tetrahedrite	$Cu_8Sb_2S_7$
紫ニッケル鉱	Violarite	$(Ni, Fe)_3S_4$

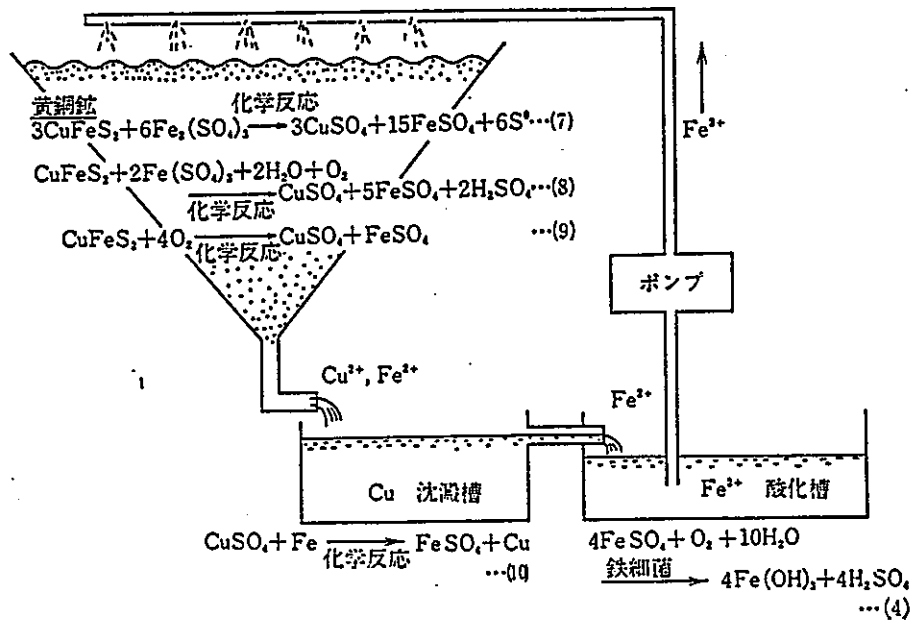
出所) 参考文献28)

①銅のバクテリアリーチング

バクテリアリーチング法を用いると、従来法では経済的にペイしなかった0.25~0.5%しか銅を含まない低品位の銅鉱石からも銅の回収が可能となる。漏斗状の容器の中には黄銅鉱を含む低品位鉱を堆積させる(図II-2-4)³⁴⁾。漏斗は水が洩れにくい岩板からなる谷間を想定すると理解しやすい。この低品位鉱に Fe^{3+} を多量に含む硫酸酸性溶液を散布すると、(7)式、(8)式に示すように Fe^{3+} によって黄銅鉱が化学的に酸化され、硫酸銅、硫酸第一鉄、元素硫黄等を生成する。黄銅鉱の一部は空気中の酸素によって化学的に酸化される[(9)式]。こうして生成する元素硫黄は硫黄細菌、鉄酸化細菌によって硫酸へと酸化される。 Cu^{2+} と Fe^{2+} を含む硫酸酸性の浸出液は沈澱槽に導かれ、これに金属鉄が添加される。イオン化傾向の違いによって、金属鉄は Fe^{2+} に、 Cu^{2+} は金属銅となって沈澱する[(10)式]

〕。沈澱した銅は回収され、さらに精錬されて商品化される。一方、 Fe^{2+} 濃度がさらに高まった浸出残液は鉄酸化槽に導かれ、鉄酸化細菌の作用によって Fe^{3+} に変換される。 Fe^{3+} と鉄酸化細菌を含む硫酸酸性溶液はポンプで汲み上げられ、再び低品位鉱上に散布され、この過程が繰り返される。

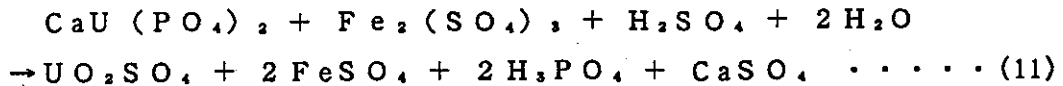
図 II - 2 - 4 鉄酸化細菌を用いた黄鉄鉱からの銅の回収



出所) A. D. Agate(1973)

② ウランのバクテリアリーチング

ウラン鉱石として閃ウラン鉱 U_3O_8 、人形石 $CaU(PO_4)_2$ 、磷灰ウラン鉱 $Ca(UO_2)(PO_4)_2$ 等が知られているが、これは黄鉄鉱のような鉄を含む鉱石と共存しているのが普通である。ウランは普通不溶性の4価のウランとして鉱石中に存在しているが、 Fe^{3+} によって化学的に酸化され、6価のウランになると硫酸ウランルとなって溶けでてくる [(11)式、(12)式] ^{35), 36)}。



Fe^{3+} のみの場合より鉄酸化細菌が共存する方がウランの酸化は速やかに進行する。鉄酸化細菌の促進効果は、生成する Fe^{2+} を鉄酸化細菌が素早く酸化し Fe^{3+} を再生する点にあると考えられている。

Dispirito ら³⁶⁾ は、鉄酸化細菌の洗浄細胞が UO_2 を UO_2^{2+} に直接酸化し、その際炭酸ガスが固定される事を観察しているので、直接法によるウランの溶出もあると考えられる□(13)式 □。



カナダのDenison鉱山においては、低品位鉱のインプレースリーチングに対してT. f の適用が試みられ、1983年には、80 t のウランをバクテリアリーチングにより回収している³⁷⁾。

Tuovinenらをはじめとするウランの生物濃縮に関する基礎的な研究は、かなり行われている³⁸⁻⁴⁶⁾。それらをまとめると、ウラン溶出に及ぼすpH、Fe濃度、ウラン鉱石密度の影響、溶出反応、動力学および指標となる Fe^{2+} および FeOH^{2+} 濃度の応用、ウランと Fe^{3+} の共沈、Thiobacillus ferrooxidans細胞壁および細胞内におけるウランの分布、ダンプおよびヒープリーチングにおける生物学的な因子、生物学的な U^{4+} から U^{6+} への直接酸化、ウラン酸化と2酸化炭素固定の関係などである。

一方、分子生物学的な研究はこれからであり、Thiobacillusのプラスミドは確認されているものの、そのウラン耐性機構の研究はなされていない。

バクテリアリーチングは発掘せずに採鉱できるので、鉱脈が深く鉱物の含有量が低い貧鉱に有効であることから注目されており、アメリカ合衆国議会特別調査⁴⁷⁾およびMacGregor⁴⁸⁾によれば、カナダのStanrockウラン鉱山では1962年に13,000kg以上の酸化ウランを微生物浸出によって得た。

その後、いくつかの報告があるが(Fisher⁴⁹⁾, Anderson and Ritchie⁵⁰⁾, Marrs⁵¹⁾ いずれもパイロット試験であったり開発途上である旨の報告であり、その大規模な実用化の成功例がみあたらない。これは現在の物理化学的な方法に比較してバ

クテリアリーチングは時間がかかること、浸出液の注入および回収方法、ウランの濃縮方法などがいまだ未完成であるためであり、今後さらに発展されることが望まれている。

(6) バクテリアリーチングの問題点とバイオテクノロジー適用の可能性

今後、利用される鉱石中の有用金属の含有率が低下していくことが予想され、バクテリアリーチングの有用性は増加すると考えられる。しかしながら、技術的に解決すべき課題は多く、バイオテクノロジーの適用も含めて概説する。

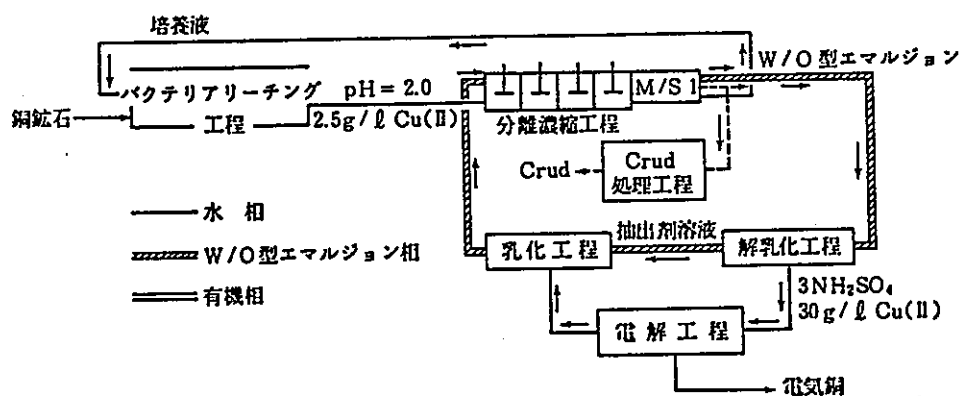
① 浸出金属の選択性の問題

バクテリアリーチングでは、浸出する金属に選択性がない。菌体の育種によって選択性を持たせようと試みた例もある⁵³⁾が、浸出が間接酸化機構で進行する限り、このバクテリアに選択性を期待することはできない。このため、浸出液中には、鉱石に含まれていた金属が、濃度に差はあっても、すべて溶解してくる。その上、培養液中の目的とする金属イオン濃度が低いことが多い。

そこで、金属の回収には、電解工程に障害を与える金属イオンの除去と、目的とする金属イオンの濃縮が必要になる。この方法として、液体膜による分離プロセスとの組み合わせが考えられる。

中塩⁵²⁾らによる銅のバクテリアリーチング湿式精錬プロセスを示すと図Ⅱ-2-5のようになる。乳化型液膜の有機相に含まれる抽出試薬を変えることにより、目的とする金属を選択的に濃縮することが可能となる⁵³⁾。

図Ⅱ-2-5 バクテリアリーチングを組み入れた湿式精錬プロセスの一例



出所) 中塩文行:ケミカルエンジニアリング、29、58(1984)

② 菌の増殖速度の問題

T. f は、有機物のない培地と強酸性という、雑菌の入りにくい環境で生育するので、取扱いが容易なバクテリアであるが、その最大の欠点は、増殖速度が遅いことであろう。

多くの研究者は、T. f を単独で使用するよりも、地中に共存する硫黄酸化菌あるいは硫黄還元菌と混合して使用する方が、金属のリーチング速度を増大させることができるという指摘している^{53)、54)、55)}。しかし、このような共存菌体がどのような相互作用をしているのかは明らかでなく、この点についての研究が必要である。大きな増殖速度あるいは金属のリーチング速度を有するバクテリアを作り出すためには、最終的には遺伝子組み替えの技術が必要であり^{56)、57)}、この方面からのアプローチが望まれている。

③ 高温菌との組み合わせ

T. f は、増殖に最適な温度が $30 \pm 5^\circ\text{C}$ であり、細菌学的には、中温菌に分類されているが、最近になって、より高温下で鉄や硫黄を酸化する能力を持つ *Sulfolobus* あるいは *Sulfolobus* 属のバクテリアが発見され、リーチングに使用されている^{52)、57)、58)}。これらのバクテリアは、 50°C または 80°C においても増殖を続け、金属のリーチングを行うが、二酸化炭素を固定できない従属栄養細菌である。

鉱物から化学的作用によるリーチングを行うときには、高温の方が浸出速度が向上するので、これらの高温菌との組み合わせも、今後の重要な課題である。

II 章 2. 集積機構の解明・利用の参考文献

バイオソープション

- 1) Gadd, G.M. (1988) in Biotechnology (Vol.6b, Special Microbial Processes), (Rehm, H.-J., ed.), pp.401-433, VCH Verlagsgesellschaft
- 2) Hutchins, S.R., Davidson, M.S., Brierley, C.L. (1986)
Annu. Rev. Microbiol. 40, 311-366
- 3) Eccles, H. and Hunt, S., eds (1986)
Immobilisation of Ions by Biosorption, Ellis Horwood
- 4) Ashley, N.V., Pope, N.R. and Roach, D.J.W. (1987)
Department of the environment-Commissioned Research on Radioactive Waste Management, DOE, UK, Reference Doe/RW/88.008, Sector 2.3
- 5) Gadd, G.M. and White C. (1989)
Biotechnol. Bioeng. 33, 592-597
- 6) Macaskie, L.E. and Dean, A.C.R. (1989)
in Biological Waste Treatment (Mizrahi, A., ed.),
pp. 159-201, Alan R. Liss
- 7) Brierley, J.A., Goyak, G.M. and Brierley, C.L. (1986)
in Immobilisation of Ions by Biosorption (Eccles, H. and Hunt, S., eds),
pp.105-117, Ellis Horwood

藻によるウランの濃縮

- 8) K. Schwochau, et al.: Kernforschungsanlage Julich GmbH, Julich (1977)
- 9) E.A. Heide, et al.: Naturwissenschaften, 60, 431 (1973)
- 10) T. Horikoshi, et al.: Agric. Biol. Chem., 43, 617 (1979)
- 11) A. Nakajima, et al.: ibid., 43, 625 (1979)
- 12) T. Sakaguchi, et al.: J. Ferment. Technol., 56, 561 (1978)
- 13) 坂口孝司, 他: 農化, 53, 211 (1979)
- 14) T. Horikoshi, et al.: J. Ferment. Technol., 57, 191 (1979)

微生物によるウランの濃縮

- 15) Strandberg, G.W., S.E. Strandberg, S.E. Shumate II. and J.R. Parrot: Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulations of uranium by Saccharomyces cerevisiae and Pseudomonas aeruginosa. Appl. Environ. Microbiol., 4, 237-245 (1981)

- 16) Nakajima A., Horikoshi T., Sakaguchi T.: In Effects on the uptake of uranium by *Chlorella regularis*, *Agri. Biol. Chem.*, 43, 625-629 (1979)

バクテリアリーチング

- 17) Brierley, C.L.: *Sci. Am.*, 247, 42 (1982).
- 18) Colmer, A.R. and M. E. Hinkle: *Science*, 106, 253 (1947).
- 19) Brierley, L.E. and L.E. Murr: *Science*, 179, 488 (1973).
- 20) 今井和民: 独立栄養細菌. p.142, 化学同人 (1984).
- 21) Ingledew, W.J., J.C. Cox and P.J. Halling: *FEMS Microbiol. Lett.*, 2, 193 (1977).
- 22) Cobley., J.G. and A. Haddock: *FEBS Letters*, 60, 29 (1975).
- 23) Sugio, T., T. Tano and K. Imai: *Agric. Biol. Chem.*, 45, 405 (1981).
- 24) Fukumori, Y., T. Yano, A. Sato and T. Yamanaka: *FEMS Microbiology Letters*, 50, 169 (1988).
- 25) Suzuki, I.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 28, 85 (1974).
- 26) Silver, M. and D.G. Lundgren: *Can. J. Biochem.*, 46, 1215 (1968).
- 27) Vestal, J.R. and D.G. Lundgren: *Can. J. Biochem.*, 49, 1125 (1971)
- 28) Sugio, T., C. Domatsu, O. Munakata, T. Tano and K. Imai: *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1401 (1985)
- 29) Sugio, T., W. Mizunashi, K. Inagaki and T. Tano: *J. Bacteriol.*, 169, 4916 (1987)
- 30) Sugio, T., T. Katagiri, M. Moriyama, Ye Lizhen, K. Inagaki and T. Tano: *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 153 (1988a).
- 31) Sugio, T., W. Mizunashi, T. Tano and K. Imai: *Agric. Biol. Chem.*, 50, 2755 (1986).
- 32) Sugio, T., K. Wada, M. Mori, K. Inagaki and T. Tano: *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 150 (1988b).
- 33) Ingledew, W. J.: *Biochem. Biophys. Acta.*, 683, 89 (1982).
- 34) Agata, A.D: *NML. Technical J.*, 15, 25 (1973).
- 35) 富塚 登: *化学と生物*, 14, 715 (1977).
- 36) DiSpirito, A.A. and O.H. Tuovinen: *Arch Microbiol.*, 133, 28 (1982)
- 37) D. Wadden et al.: *Can. Metall. Q.*, 24, 127 (1985)
- 38) Tuovinen, O. H. and A. A. DiSpirito: A biological transformation and accumulation of uranium with emphasis on *Thiobacillus ferrooxidans*. *Current perspectives in microbial ecology*. H.J. Klug, C.A. Reddy, edes.

- ASM, Washington, D.C. (1984)
- 39) Di Spirio A.A. and O.H. Tuovinen: Uranous ion oxidation and carbon dioxide fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*, *Arch. Microbiol.*, 133, 228-32(1983)
 - 40) Di Spirito A.A., M. Silver, L. Voss and O.H. Tuovinen: Flagella and pili of iron-oxidizing *Thiobacilli* isolated from a *Appl. Env. Microbiol.*, 43, 1, 196~1,200(1982).
 - 41) Tuovinen, O. H., P. Hiltunen and A. Vuovinen: Solubilization of phosphate, Uranium and iron from apatite-and uranium-containing rock samples in synthetic and microbiologically produced acid leach solutions, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17, 327~333(1983).
 - 42) Tuovinen, O. H. and J. C. Hsu: Effect of pH, iron concentration and pulp density on the solubilization of uranium from ore materials in chemical and microbiological acid leach solutions regression equation and confidence band analysis. *Hydrometallurgy*, 12, 141~149(1984).
 - 43) Tuovinen, O.H.: Some characteristics of iron-oxidizing *Thiobacilli* isolated from uranium mine leach liquors In *Biogeotechnology of Metals*(Karavaiko, G. I. & S.N. Groudev, eds.) Center of International Projects GKNT. Moscow, USSR(1985).
 - 44) Vuovinen, A., P. Hiltunen and O.H. Tuovinen: Speciation of ferrous and ferric iron associated with the indirect bacterial leaching of uranium ore materials, *J. Ferment. Technol.*, 63, 337~342(1985).
 - 45) Vuovinen, A., P. Hiltunen and O.H. Tuovinen: Redox and precipitation reactions of iron and uranium solubilized from ore materials, *Hydrometallurgy*, 15, in press(1986).
 - 46) Tuovinen, O.H.: Acid leaching of uranium ore materials with microbial catalysis. *Biotechnology and Bioengineering Symp.* John Wiley & Sons. Inc. (1986).
 - 47) アメリカ合衆国議会特別調査、遺伝子工学の現状と未来、農林水産省農林水産技術会議事務局監修、家の光協会出版(1983).
 - 48) MacGregor, R.A.: Recovery of U_3O_8 by underground leaching Annual general Meeting. Montreol, April, 1964. *Transactions*, LXIX, 162~166 (1966).
 - 49) Fisher, J.R.: Bacterial leaching of Elliot Lake uranium ore. Annual Western Meeting. Winnipeg, October, 1965. *Transactions*, LXIX, 167~171

- (1966).
- 50) Anderson, J.S. and M.I. Ritchie.: Solution mining of uranium, Mining Congress Journal., 20~26(1968).
 - 51) Marrs, L.F.: Underground leaching of uranium at the pitch mine, Momong Congress Journal, 35~43(1970).

 - 52) A.P.Mehta et al.:Biotechnol.Bioeng., 24, 919(1982)
 - 53) K.A.Natarajan et al.:Microbiol.Eff.Metall.Process, p.1(1985)
 - 54) 橋本健治:”反応工学” P.255.培風館(1979)
 - 55) M.A.Blancarte-Zurita et al.: Biotechnol.Bioeng., 28, 751(1986)
 - 56) M.A.Blancarte-Zurita : Fundam.Appl.Biohydrometall., p.247(1986)
 - 57) M.J.Southwood et al.: Fundam.Appl.Biohydrometall., p.98(1986)
 - 58) J.Puhakka et al.:Acta.Biotechnol., 6, 345(1986)
 - 59) P.C.Miller et al.:Fundam.Appl.Biohydrometall., p.23(1986)
 - 60) J.Puhakka et al.:Acta.Biotechnol., 6, 345(1986)
 - 61) A.S.Atkins et al.: Process Biochem., 23, 3(1986)
 - 62) 中塩文行:”カキカエツツニアリカ”, 29, 58(1986)
 - 63) T.C.Lo et al.:”Handbook of Solvent Extraction”, John Willey & Sons, New York(1983)
 - 64) H.M.Tsuchiya et al.: Biotechnol.Bioeng., 16, 991(1974)
 - 65) A.A.Nicolaidis: J.Chem, Tech.Biotechnol., 38, 167(1987)
 - 66) P.L.Wichlacz: Biotechnol.Bioeng.Symp., No.16, 319(1986)
 - 67) S.N.Groudev: Fundam.Appl.Biohydrometall., p.43(1986)
 - 68) L.Keller et al.: Biotechnol.Bioeng., 24, 83(1982)

3. 放射性核種の集積解除方法の開発

1) 集積解除の方法

汚染物質除去の研究は、骨髄移植を含む放射線防護剤の研究、放射線皮膚障害の治療的研究と並んで、緊急被曝医療における大きな柱の一つである。

事故の際の汚染は①体外（体表面）汚染と、②体内（内部）汚染とに二大別される。体外汚染は、主として事故現場において処置され、特殊な場合を除き除染可能である。しかし同時に起り得る体内汚染の除去は、進入した核種により困難さの度合が異なる。

食品等から経口で摂取したり、皮膚汚染したりすることによって体内に取り込まれた放射性核種を体外に排出させるための方法は、安定ヨウ素の投与を除いては、現在のところキレート剤を投与し、放射性核種や重金属と錯体を形成させて体内に沈着することなく排出させることが唯一の手段となっている。しかしながら、キレート剤は体内の必要な金属とも錯体を形成するため、体内の金属濃度を変化させるため正常な代謝系に対しても阻害要因として働き、放射性物質の除去効果以外にも副作用を生じるため、その効果と毒性のバランスから現在、人体に使用できるキレート剤はCa-EDTAのみとなっている。本節では、安定ヨウ素の投与とキレート剤の使用についてその現状と課題を述べる。

2) 安定ヨウ素

甲状腺にはヨウ素が集積するため、放射性のヨウ素が吸入あるいは、経口摂取された場合には、安定ヨウ素化合物の投与が実施されており、放射性ヨウ素の除去に対しては確立された方法である。安定ヨウ素の投与は他の放射性核種に対して線量を減らすことはないがヨウ素に対しては有効な方法である。ヨウ素¹³¹の摂取後、甲状腺中の放射能は1～2日で最大に達し、約6時間以内に最大値の50%に達する。大量の食事を取らない限り、100mgの安定ヨウ素の投与後5分以内で甲状腺によるヨウ素の取り込みは通常阻止される。放射性ヨウ素にさらされる前、あるいはさらされた後できるだけ早く、錠剤を服用することによって、安定ヨウ素の効果は最大になる。ヨウ素¹³¹の単一摂取の後6時間後でさえ、潜在的な甲状腺線量を約1/2に減らすことができるが、投与が遅れて摂取の1日後になると減少はほとんど期待できないといわれる。

安定ヨウ素の投与に関しては、投与のタイミングに問題があり、投与の必要性の判断が重要である。

3) キレート剤

(1) 汚染除去剤としてのキレート剤の種類

体内に摂取された有害金属イオンの除去・排泄を目的としたキレート剤は、次の3種類に分類することができる。

①直鎖状化合物：通常キレート剤と呼ばれている化合物

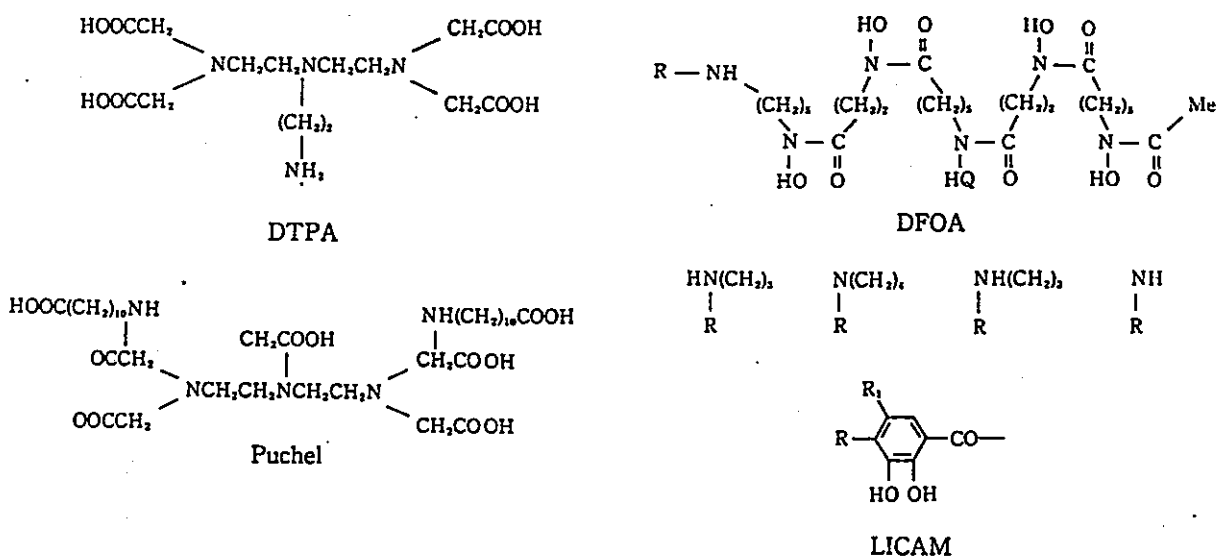
例：EDTA、DTPA、Puchelなど。

②大環状化合物：環状骨格の分子で、その環の中に金属イオンを抱摂する化合物

例：クラウンエーテル、クリプタンドなど。

③Biomimics：微生物由来のキレート剤 (Ionophore)

例：Desferrioxamine (DFOA)、およびそのBiomimics；例えばLICAM。



キレート剤の金属イオン親和性を示す目安として、通常、反応速度論的な考え方から、安定度定数 (生成定数) K_f が用いられている。

$$K_f = [ML] / [M] [L]$$

([M]、[L]、[ML] は金属イオン、配位子、金属キレートの濃度)

平衡状態では金属キレートの生成と解離の速度が等しい。

$$k_1 [M] [L] = k_{-1} [ML]$$

(k_1 、 k_{-1} は金属キレートの生成および解離の速度定数)

したがって、安定度定数 K_1 は速度定数の比 k_1/k_{-1} に等しい。 k_1 は金属イオン固有(配位状態により多少変化する)であるから、安定度定数を決定するのは金属キレート解離の速さである。そして、 k_1 は一般的には非常に大きいので、錯体の生成は瞬時、平衡に達する。しかし、 k_1 の小さい金属イオン、例えばPt(II)、Cr(III)、Ru(III)など、は錯体反応が平衡に達するには長時間を要する。このような金属イオンに対してキレート剤療法は、あまり期待できず別の療法の開発が必要である。

(2) ルテニウムの汚染除去

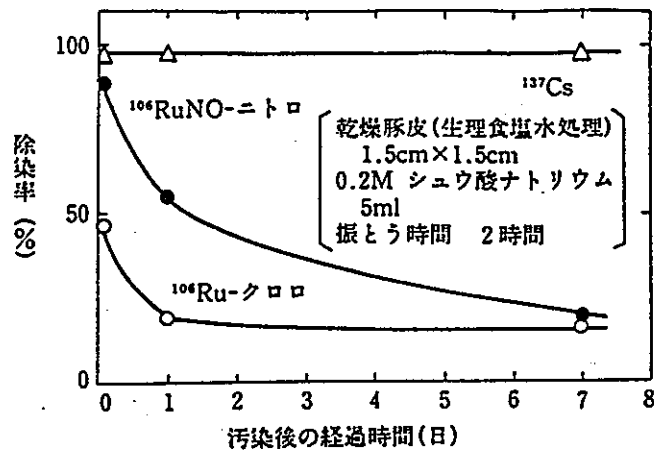
ルテニウム(Ru)は、Ruが0から8までの全ての酸化数の化合物が知られている唯一の元素で、その上多重酸化状態を示すため¹⁾、きわめて取り扱いが難しい元素であり、実験結果の再現性が低いこともしばしば指摘されている。

核分裂によって生成する¹⁰³Ru、¹⁰⁶Ruは核分裂収率も比較的大きく、チェルノブイリ原子炉事故の際には、¹³⁷Cs、¹³¹Iなどとともによりアウト中の重要成分として注目された核種である²⁾。化学分離の困難さから、低レベル放射性廃液の海洋への放出基準も他核種に比べて大きな値が与えられている。

動物および人における代謝の研究から、経口摂取した場合には消化管での吸収は小さいことが示されているが、問題となるのは粉塵としての吸入で、肺に沈着すると排泄はきわめて難しい。緊急時の対応としては、経口摂取の場合は胃洗浄を行い、下剤、クロールサイアザイド、DTPAの投与を、また、吸入の場合は肺洗浄とクロールサイアザイドの投与がやや有効とされている³⁾。しかし、化学形によりそれぞれ代謝が異なるのでその効果は一定しないと思われる。

これに対して、皮膚の汚染除去に関してはこれまでほとんど報告がなく、豚皮を酸化物およびニトロシルニトロ化合物で汚染させた後、通常、除染剤として使用されているシュウ酸ナトリウムを用いて検討した実験が放医研の竹下らによって報告されている(図II-3-1)³⁾。¹³⁷Csは汚染後の経過時間に関係なく高い除染率が得られるのに対し、¹⁰⁶Ruの場合には時間の経過とともに両化学種とも除染されにくくなる。

図 II - 3 - 1 シュウ酸ナトリウム溶液による除染



出所) 放射線科学 Vol. 33, No. 12 (1990)

また、Ruの気体状化合物 (RuO_4) が近年注目されているが^{11)・12)}、人体汚染事故例⁵⁾は皮膚汚染のメカニズムが一般的な汚染と異なることを示している。すなわち、高酸化状態の RuO_4 が皮膚と接触して還元され、不溶性の酸化物 (RuO_2) を生成して付着しているものと考えられる。したがって、除染については RuO_2 を溶解する除染剤が必要で、予備的検討の結果、 NaClO や KIO_4 のような酸化剤で高酸化状態の陰イオン (RuO_4^{2-} 、 RuO_4^-) にする方法が有望であるとされている³⁾。しかし、 RuO_4 が皮膚表面と化学的に結合したり、あるいは一部が吸収される可能性もあり、この方面の研究の進展が期待されている⁶⁾。

(3) ストロンチウムの汚染除去

放射性ストロンチウム (以下 $^*\text{Sr}$ で略) は原子半径が Ca と似ている金属元素であるため、骨に沈着する。骨は微細な骨結晶からできており、骨結晶総表面積は驚くほど大きい。血中に入った $^*\text{Sr}$ は、まず骨結晶が保有する保有水層中に拡散した後、骨結晶表面の Ca 原子とイオン交換を行い、さらに再結晶現象により結晶格子の内部にまで入り込む。 $^*\text{Sr}$ が骨に集まるのは、主としてこのような物理現象によるものであるため、極めてその速度は速い。破骨細胞と造骨細胞による骨の代謝・再構築は成人でも絶えず行われており、上記の物理現象に加えて生理現象によっても、 $^*\text{Sr}$ は骨の深部にまで摂取され、長く留まることになる。

$^*\text{Sr}$ に限らず原子半径が Ca と似ている金属原子の陽イオンは、上と同じ原理で骨に集まる。

血中の ^{90}Sr を非イオン化すれば、Caとのイオン交換反応が生じなくなるので骨に集まらなくなるため、キレート剤の投与によって骨への集積は阻害できる。したがって、 ^{90}Sr が血中にイオンとして存在しているうちにキレート剤で処置することが必要となっている。また投与するキレート剤は、 ^{90}Sr とキレートできる化合物でも、血中にCaイオンが大量に存在するため、Caと著しくキレート錯体を形成しにくいものである必要がある。EDTAはこの理由により ^{90}Sr 解毒には全く役立たない。

生活環境全体が ^{90}Sr で汚染された場合は、常時 ^{90}Sr が体内に僅かずつ摂取される。このような事態では、解毒剤も常時使用しなければならないがキレート剤を注射し続けるわけにはいかない。急性毒性だけでなく慢性毒性もあるからである。

このような理由から、色田らは⁷⁾、クエン酸Na・Caならびに低りん食の効果を報告している。クエン酸はクレブス回路の代謝物質で体内で常時産生されている有機酸であり、 ^{90}Sr とキレートする性質をもっている。Na塩として注射すると低Ca血症を起こして危険であるが、Na・Ca塩として投与すれば急性毒性は低く、排泄されなかったものは、代謝されるため問題はないとしている。

低りん食は ^{90}Sr の排泄促進に著名な効果があり、食事中的りん含量を正常の $1/4 \sim 1/5$ とすると、骨のCa含量を変化させることなく、 ^{90}Sr の尿への排泄を非常に増加させることができる⁸⁾。 ^{90}Sr の骨からの離れ易さを大きくするのみならず、腎からの排泄され易さ(クリアランス)を大きくする。クエン酸Na・Caも含めてキレート剤は、汚染初期に投与することが必要であり時期を失すると無効になるが、低りん食の効果は持続的である。骨結晶を洗って尿へ ^{90}Sr を運び出すCaの量が著しく増加することが、低りん食の効果の理由と考えられている。

低りん食とクエン酸の組合せなど、低りん食の効果を更に強めることも確認されている。食事療法として低りん食を摂取することが面倒である場合には、制酸剤として使われている水酸化アルミニウムゲルを飲むことによってりん酸がAI塩となって吸収されなくなるため、低りん食と同じ効果を期待できる⁹⁾。

(4) 大環状化合物を配位子とする金属錯体の利用可能性と問題点

生体には、ヘム、ビタミン B_{12} など環状配位子を持つ金属錯体が酵素の活性中心成分として、あるいは活性化剤として強い生理作用を持つものがある。一方、バリノマイシンのような環状化合物がアルカリ金属、アルカリ土類金属イオンの膜輸送に関与している。

これら、環状化合物の特徴は、配位原子を大環状体としたときの”固体効果”あるいはエントロピー効果による錯体安定度の増加、環の内孔径が制限されてい

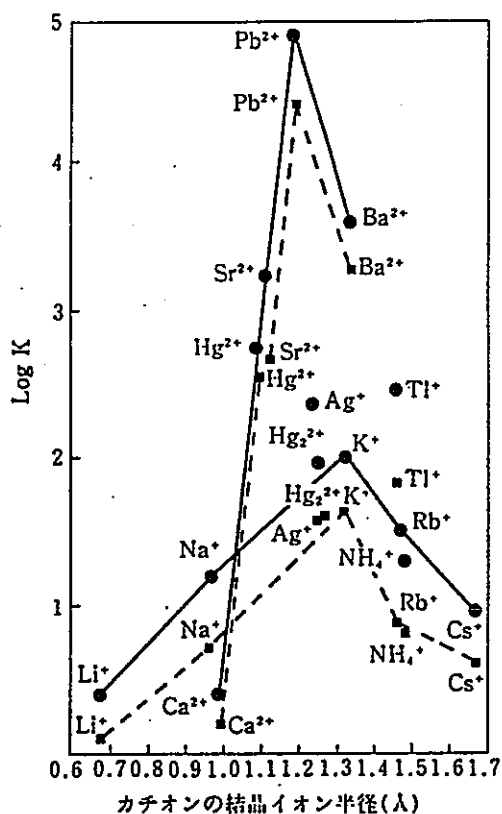
ることによるカチオンを取り込む際の選択性の向上、および特異な錯体構造による機能の発現である。

環状ポリアミンの一つであるサイクラム1の Cu^{2+} に対する錯化平衡定数は、鎖状のトリエチレンテトラミンの実に3万倍以上も大きい。これはサイクラムと Cu^{2+} の錯体に限ったことではなく、一般に大環状ポリアミンは重金属イオンに対して10の数乗倍の錯形成能を示す。ポリエチレンポリアミンのような鎖状ポリアミン自体ですら、極めて強い多座配位子として金属イオンを錯体として捕捉するものの代表的存在であるから、大環状ポリアミンはまさに理想的な重金属イオン捕捉体というべきだろう。

一方、大環状ポリエーテル、いわゆるクラウンエーテルはアルカリ金属イオンやアルカリ土類金属イオンなどを強く捕捉することが明らかにされている。図II-3-2は金属イオンの結晶イオン半径と水溶液中のクラウン化合物2と金属イオン M^{n+} の錯化平衡定数(K)の関係を示したもので、 $\log K$ の値は $\text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{K}^{+} > \text{Na}^{+} > \text{Ca}^{2+}$ となっている。 Cs^{+} のような大きなカチオンでの安定性の低さは、このカチオンが大きすぎてクラウンエーテルの内孔に適合しないことを意味する。

また、3のような双環性の配位子(クリプタンド)は単環のクラウンエーテルに比べてはるかに選択的にカチオンを取り込む能力が高い。

図II-3-2 ログkとカチオンのイオン半径との関係



出所) 放射線科学 Vol. 33, No. 12 (1990)

放医研の柴田らはこれらの知見をもとに $Gd-DOTA-4$ が、 Sr の選択的捕集剤として 2 および 3 が利用できることを示している。

人体からの汚染除去に大環状配位子を応用するには、配位子単独では毒性が強いこと、イオンの取り込み反応が遅いことなど、今後解決しなければならない課題が多いがそのキレート剤としての優れた性質を活かす方法の開発が期待される。

(5) キレート剤のドラッグデリバリーシステム (DDS)

① DDS とは

近年、医薬品の投与方法の改善が試みられており、薬剤搬送システム (ドラッグデリバリーシステム、DDS) という考え方が重視されている。DDS においては「可能な限りの薬効の向上と毒性の低減のために、治療すべき病巣にのみ、必要な量だけの薬物を、必要な時間だけ滞在させる」ための徐放性、標的指向性、感受性の 3 要素が議論されている。糖衣状にするか注射化するかといったものでなく、薬剤輸送のためのシステムの開発が薬物の過剰投与の回避、副作用の最小化という意味で重視され、そのための方法論が各種提案されている。従来はあまり検討されてこなかったが、薬物の誘導、放出のコントロールをキレート剤においても行うことが可能になれば、それだけ副作用も低減し、効果も上がることが期待できる。キレート剤の DDS は、検討の余地が十分にあり、特定の核種が特定の臓器に集中する場合に、その核種を排出するための薬剤の副作用が強い場合には有効な DDS と組み合わせることによって、従来であれば副作用を恐れて投与できないキレート剤も効果的に使用できる可能性を秘めている。

② キレート剤に要求される標的指向性

吸入摂取、特に粒子状の金属化合物は肺に沈着し、一部は肺の $M\phi$ に取り込まれる。 ^{59}Fe -水酸化鉄コロイド (以下、 Fe -コロイド) のような可溶性の粒子状化合物をラットの肺 $M\phi$ に取り込ませ、培養系に移すと、時間の経過に伴い Fe が培地中に放出される。ここでキレート剤が存在すると Fe 放出が促進される。代表的キレート剤である $Ca-DTPA$ $10mM$ で 8 時間培養すると、放出が対照の 4 倍に促進される。同様の効果は動物実験においても認められる。気管内挿管により Fe -コロイドをラット肺に負荷し、初期排泄終了後に $Ca-DTPA$ $300\mu mol/rat$ を同様の方法で肺に投与すると肺への Fe 滞留が有意に低下し、糞尿中への

排泄が低下増加する。特に尿中への排泄が強く促進され、Ca/DTPAの腹腔内投与では全く効果がない。これは、肺に沈着した金属化合物に対してはキレート剤の付着部位への投与が必要であり、標的指向性がキレート剤の投与においても要求されることの例である。

キレート剤のもう一つの特徴として、細胞膜を通過できないことが挙げられる。すなわち、細胞内の金属に対しては効果がない。しかし、何らかの方法により細胞内に取り込ませることにより、膜を通過できない故に効果が不十分であるという欠点を補うことができる。DTPA自身は低分子化合物であるが、他の高分子化合物と結合させることによりDTPAの高分子化が可能である。高分子化されたDTPAはphagocytosis、pinocytosisによりMφ内へ取り込まれる。Fe-コロイドを取り込んだ培養Mφにおいて、高分子DTPAの培地中への存在によりCa-DTPAの2～5倍の放出促進効果が得られる。

③キレート剤に要求される徐放性

キレート剤を生体へ投与すると比較的短時間でほとんどが尿中へ排泄されてしまい、24時間後に体内に残っているのはわずか1%といわれる。このためムダが多くて効果が十分に発揮されているとはいえない。そこで不溶性の H_3-DTPA (Ca-DTPAは H_3-DTPA のCa塩)を膜で包んで生体に埋め込み、体液で徐々に可溶化されて体内へ放出される方法でキレート剤の効力増強が可能である。これはキレート剤のDDSにおける徐放性の効果の例である。血中のDTPA濃度の経時変化をみると、Ca-DTPA 3 mmol/kgの腹腔内投与では4時間後に検出限界以下であるのに対し、埋め込み法では H_3-DTPA 120 μ mol/ratで16時間後も血中濃度をあるレベルで維持できる。Fe-コロイドを静脈内負荷したラットからのFe除去効果をCa-DTPA腹腔内投与と H_3-DTPA 埋め込みで比較すると、埋め込みの方が2～3倍高い効果が得られる。

(6)キレート剤使用のTPOと副作用の問題

内部被ばく摂取事故対策を考える前提条件は原則として放射性物質取扱施設、とりわけ原子力施設のように日常的に作業が行われている施設の従事者に限定される。これまでの事故対策の概要は放射性物質の摂取事故が発生した場合、生命に関わるような重大な負傷を伴う場合を除き、摂取量の算定とその障害リスクの推定が実施され、その結果から判断して放射性物質除去剤の投与が開始される。

プルトニウム事故における除去剤使用において、最も重要なことは除去剤の効

果は摂取後から投与開始までの時間が短ければ短いほど高く、投与時間が遅れるにつれて急速に小さくなるので、事故後いかに早く除去剤の投与を開始するかにある。プルトニウムの高い除去効果が期待できるのは血液中にある期間で、少なくとも摂取後2～3日までである。標的器官である骨に沈着すると除去不能になるためである。

しかし、摂取事故から除去剤投与までの過程には解決しなければならない多くの現実的な問題点がある。例えば内部被ばくで重要な核種であるプルトニウムのようにアルファ物質の体内摂取量の測定や障害リスクの算定は短時間では困難である。さらに、体表面の汚染があると2次的な汚染拡大を避けるために体表面汚染の除去に時間がかかる。事故発生から除去剤を投与するまでにいかに早く進めるかが問題となる。

さらにキレート剤の毒性（副作用）の問題がある。これまでの放射線事故で使用された除去剤では除去効果が高いとされているものの多くは、少なくともわが国ではいわゆる医薬品として使用許可されていないものである。すなわち副作用については事前に十分な検討がなされておらず、副作用が不明確であるため医師が実際に使用するときに投与の量、方法、間隔、期間などについて正確な判断ができない状態になっている。したがって当然医薬品でない除去剤の候補の多くは、まだ医薬品であっても日常的に使用されることが少なく、医師だけでなく投与を受ける者にとっても、このような問題を現場の医師に一任することには無理があり、放射線事故専門の医師が必要である点とその医師のための意志決定を支援するためのツールを整備する必要がある。

具体的には「汚染者の状態の把握のための計測手段の開発」と「副作用と汚染のバランスを考えた使用可能な医療的手段の最適化のためのデータベースの整備」が要求されよう。

一方、放射性物質による人体汚染事故に備えて、放射性物質の除去効果の増大と薬としての副作用を低減するためには除去剤だけでなく、防護剤、排泄促進剤などについても、新たな薬の開発と同時に既成の薬品からの選択とその使用方法の検討が必要である。

4) 天然物の利用

医薬品ではなく、自然食品の中にも除去剤として利用できる可能性がある。自然食品は一般には毒性がなく、量的な制限も少なく、事故直後から放射性物質を摂取した当事者が直ちに服用できる利点がある。具体例としては、プルトニウム

の場合では、プルトニウムの骨沈着は骨基質へのキレート結合によるものである
ので、吸収されやすいカルシウムを多く含む自然食品である牛乳やカルシウム製
品などの摂取が効果的である可能性がある。ヨードであればコンブが効果的であ
ると想定される。動物実験等で実験的な証明が必要であるが、有効な結果が得ら
れれば従来の除去剤の問題点である医薬品としての許可や毒性などの問題は生じ
ない点で有効である。さらに予防策として、放射性物質取扱施設の従事者が日常
的にこれらのものを飲食できるような対策をとることは容易に実行できることで
あり、放射線防護法の一つとして検討に値する。食品中に含有される有効成分と
してカルシウムやヨードだけでなく、その他の成分についても検討することが必
要であろう。その上で、有効成分を強化した機能性食品としての当事者の摂取で
きるような利用形態になっていることが望ましい。

また、生体内においても金属代謝についてもホメオスタシスが働いているもの
と考えられ、本来持っている代謝機能があるはずであり、この機能を解明し、強
化する手段を開発することで体内汚染を除去するという可能性についても将来的
には検討するべきであろう。

- 1) : 渡利、今井、西村、甲田；原子力学会誌、28、493、1986
- 2) : 放射線事故の緊急医療；放医研編、ソフトサイエンス社、1986
- 3) : 竹下、渡利、今井、西村；保健物理学会第25回研究発表会、1990
- 4) : 竹下、渡利、今井、小泉；保健物理、25、19、1990
- 5) : G. E. Webber, J. W. Harrey；Health Phys., 30、355、1976
- 6) : 西村、竹下、今井、渡利、稲葉；日本放射線影響学会第33回大会発表予
定、1990
- 7) : 放射性ストロンチウムの代謝と生体内汚染除去の方法。色田幹雄、松島美
一、医学のあゆみ、39、671～676、1961
- 8) : 放射線ストロンチウムの解毒排泄。鶴藤丞、色田幹雄、石橋貞彦、赤松稔、
第3回日本アイソトープ会議報文集796～798、1959
- 9) : 放射線防護剤研究の展望、色田幹雄、Isotope News, No 428、2～6、
1990

4. 放射線被曝による生体内の異常分子出現の観測

1) 分子レベルにおける評価パラメーター

(1) 分子レベルでの影響把握の意義

放射線を受けることによって生体が影響を受けている事実を把握する場合に、分子レベルでの変化の観測は、放射線影響の初期の過程およびその後の影響の実態を分子的な証拠として押さえることになり、影響評価の確かな根拠を提出する。

この場合にも前項で述べたように、

- ① 観測対象の設定
- ② 観測対象の妥当性の検証
- ③ 観測方法の開発

が必要となっている。とりわけ、分子の変化の簡便な方法の開発が実際の観測においては極めて重要であり、これらが最終的な目的であるヒトに対する影響の評価に際して要求される。ヒトに適用することが不可能である場合には、モデル系としての他の生物での観測の実施あるいは、試験管内での単純な実験等による観測が必要となる。

放射線被曝によって生じる放射線生物作用の初期過程は、分子レベルでスタートする。放射線のエネルギーは、放射線の経路に沿ってその近傍の分子に与えられ、経路に近いところには、電離で生ずる分子の陽イオンと電子のイオン対、少し離れたところには電子励起された分子とその分解によって生じた中性のラジカルが集中的に生じ、スパーを形成する。初期過程においてその反応は、分子レベルでの影響が核酸・タンパク質・糖・脂質等の生体構成成分に及び、これらがより高次の構造であるクロマチンや生体膜の構造と機能に影響を与えている。

生物体高分子は、すべて炭水化物、脂質、タンパク質、核酸およびその複合体によって構成されており、これらは放射線照射によって主鎖結合の切断（放射線分解）と分子間の化学的結合による架橋によって分子量の変化を受ける。したがって、放射線影響を分子レベルで観測する場合に最も観測しやすいパラメーターは、分子量変化である。

①架橋形成

架橋形成は、インビトロ（試験管内反応）での研究が進展しており、単純な実験系において架橋における各種の条件が検討されている。架橋形成においては、0.25 Mrad以上の線量では、巨大分子の性質が劇的に変化し、流動性を失い、弾力性を持つことが知られている。ドラステックな変化に必要な最低線量は r_g (Mrad) は、

$$r_g = 0.48 \times 10^6 / M_w \cdot G$$

(G : 架橋値(通常は1~3)、 M_w : 平均分子量)

で与えられている。 r_g の値が500 rad以下、平均分子量が 10^6 程度の場合が多くの生体高分子に当てはまる値である。架橋形成による小さな化学変化でも分子によっては生体に大きな影響を与えるため、最低線量以下でもその影響を無視することは危険である。不飽和度の大きい分子では、より低い線量でも架橋が起こる。連鎖反応によって巨大分子間での架橋が起こり、急速に分子量が増大し、分子配置が変化する。また水中で放射線照射すると、感受性が増大するがこれは、水ラジカルが付近の巨大分子と反応するためであり、放射線の間接作用と呼ばれている。

架橋においては、巨大分子の濃度は重要であり、濃度が低いほど低い線量で架橋が起こるが、0.5%以下になると必要とされる線量が急速に増大する。これは、架橋の競合が分子間と分子内で起こっているため、低濃度では、分子内の架橋が優先して起こるためである。これが生体内においては、様々な分子の集合体であるため、インビトロにおけるような単純な反応ではなく、複雑な架橋形成が生じていると推測される。

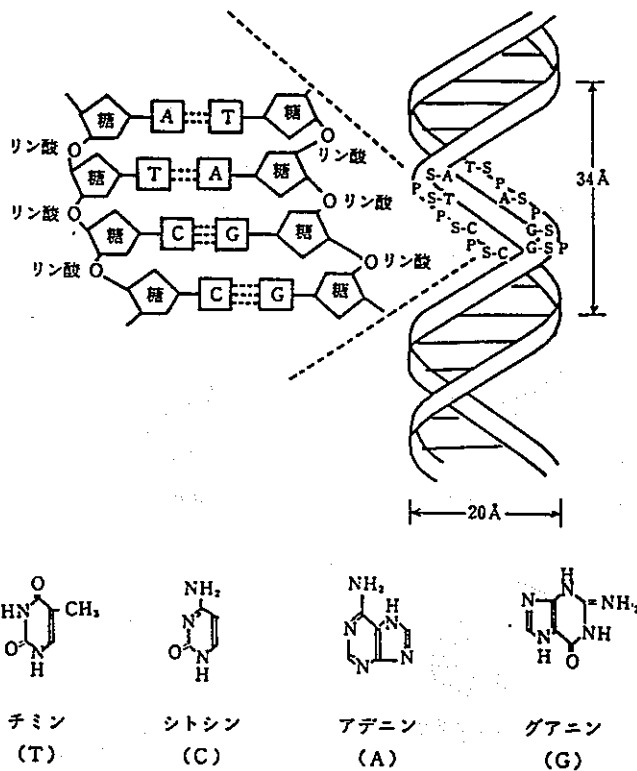
②主鎖の切断

放射線照射によって主鎖のC-C結合が切断され、分子量が低下してもろくなる。高分子での二重結合の生成程度は、放射線の照射量に比例する。一般に二重結合の多い高分子は照射とともにその量は減少し、二重結合の少ないものは照射によって増加する。また高分子に対する照射によって気体が発生する。これらは、主鎖の切断や側鎖の切断で生じると考えられている。例えば、タンパク質が照射されるとペプチド結合が攻撃を受けやすく、アンモニアガスが発生する。放射線によって主鎖が切断されると切れ目にラジカルが生じ、主鎖の切断部位が残る。また分子量が減少し、分子の運動性が増す。

(2) DNAの損傷

異常分子が放射線照射によって生成するが検出の対象となるDNAの異常分子の種類について整理しておく。人間の細胞には120億個のデオキシリボ核酸(DNA)が含まれ、直径が20Åで全長が10~20mmの二重らせんDNAの鎖が9分子のヒストンタンパク粒子に巻きついて46本の染色体を形成している。4種類の塩基(チミン、シトシン、アデニン、グアニン)を側鎖にもつデオキシリボースがリン酸によってエステル結合してDNA分子鎖を形成している。2本のDNA高分子鎖は4個の塩基の合計5本の水素結合によって弱く結合して右巻きらせん状になっている(図II-4-1)。

図II-4-1 DNA二重らせん構造と塩基の構造



チミンとシトシンはピリミジン塩基、アデニンとグアニンはプリン塩基と呼ばれる

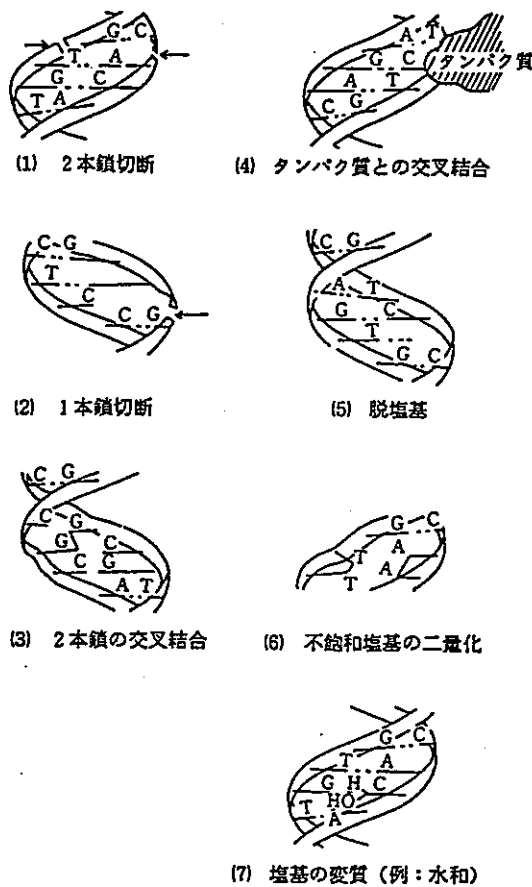
生体に放射線が照射されると、細胞や核の中に電離した分子や励起分子が数万~数十万個も生じると推定されている。SetlowとPollardによると10 Gy (1000rad)の放射線を吸収したとき、1個の細菌細胞は、その 6.3×10^4 個の核酸分子のうち42個が直接作用、144個が間接作用でうけた損傷をもつ計算になると報告し

ている。放射線を照射した場合に、電離分子あるいは励起分子が核の中のDNA分子のどの部位と反応しどのような化学変化を受けるかについては様々な可能性がある。

大腸菌に放射線を照射し、DNAを分離して超遠心法で調べると、照射線量が多いほど分子量が低下している。このことは図II-4-2の(1)、(2)のようにDNA鎖の切断が起こっていることを示している。乾燥したDNAの場合には、これと反対に分子量が増大することを考えると、図3の(3)、(4)のように架橋反応が起きていることが推測される。

しかし、DNA鎖が少し切断されているだけでバクテリアが著しく失活していることもあることから、DNAの架橋や切断だけでなく、図3の(5)、(6)のように主鎖に結合している4種類の塩基が分解したり、二量化するなどの反応によって細胞が失活する可能性もある。

図II-4-2 放射線によるDNA損傷の化学変化



遺伝子内の点部の変化によって起こる点突然変位はDNA塩基の変化によるものであり、アデニンやグアニンなどのプリン塩基より2倍も感受性の高いチミンやシトシンなどのピリミジン塩基の変化が原因であると考えられている。

このほかに、放射線によるDNAの重要な変化は2本のDNA鎖間に働いている水素結合の切断である。DNAを徐々に加熱すると、二重らせんがほどけて1本鎖になり、このことによって生じる260nmの吸収が増大する。DNA水溶液に放射線を照射した場合にも同様の現象が観測されるから、二重らせんを形成していた水素結合が放射線照射によって破壊されたことがわかる。

DNA水溶液に放射線を照射して調べられた結果を表II-4-1にあげる。

表II-4-1 DNA水溶液の γ 照射における各種変化のG値

	DNA濃度(%)	G値
塩基の遊離	0.5	0.04~0.07
架橋	—	0.08
2本鎖切断	—	0.15
1本鎖切断	0.5	0.4~0.8
塩基変化	0.1	2.0
水素結合切断	0.1	6~60

水素結合破壊のG値は他の化学変化のG値より著しく大きくこの変化は、いずれもDNAの生物学的機能を阻害すると考えられるがどの変化がどの程度寄与しているかを定量的に特定することは困難である。

マウスやヒトの細胞に致死線量(100ラド)の放射線を照射すると約60万個の分子が損傷を受け、この中に数千個の損傷DNAが含まれる(1重量%として)という。この損傷の主なものは1本鎖切断(80~90%)であるが、2本鎖の同時切断(10~15%)や塩基などの化学変化も起こる(表II-4-2)。

表II-4-2 ヒト細胞に致死線量(100ラド)の放射線が照射された場合のDNA損傷

	損傷 (個数)	50%修復 所要時間(分)
1本鎖切断	400~1000	2~5
2本鎖切断	40~60	30~80
アルカリあるいは エンドヌクレアーゼで 切断される損傷	100~1000	—
チミングリコール生成	50	30~60
修復されない切断	17	—
合計	500~2000	

しかし、いずれの損傷も修復酵素の働きによっておそかれはやかれ修復され、完全にもとの構造にもどらないのは特別な部位の2本鎖の同時切断であると考えられている。そして、この未修復の2本鎖の同時切断数が多いほど細胞死も多く起こるという関係が成り立つと報告されている¹⁷⁾。

DNA主鎖が切断される化学反応では、主鎖切断のG値はリン酸脱離の値にほぼ等しいが、末端基がリン酸基となるような主鎖切断としては3'-炭素あるいは5'-炭素とリン酸のエステル結合の切断が考えられる。

チミジンモノホスフェート(TMP)水溶液の放射線分解反応において、3'-ヌクレオチド(3'-TMP)の脱リン酸反応のG値は比較的大きく、DNA切断のG値とほぼ等しいが、5'-ヌクレオチドの場合は小さい(0.14)。

いろいろなニトロベンゼン誘導体を添加すると、一電子還元電位の大きい(親電子性の尺度)ものほど無酸素下におけるV-79-379A細胞の放射線失活を増感している¹⁷⁾。他方、これらの化合物を添加すると、G値の小さい5'-ヌクレオチドの脱リン酸反応は増感されるが、G値の大きい3'-ヌクレオチドの場合は抑制される。脱リン酸反応を主鎖切断反応と考えて求めた両者の和はニトロ化合物を添加してもあまり増感されていない。このような理由から、脱リン酸主鎖切断反応そのものが細胞死の決定反応であるという結論には至っていない。

他方、酸素、ミソニダゾールやN-オキシル化合物はいずれも低酸素性細胞の放射線失活を増感する。しかし、DNA水溶液に放射線を照射した場合の主鎖切断に対するこれらの化合物の影響を調べると、前2者は増感するがN-オキシル化合物は増感しない^{17, 21, 22)}。このことにより、主鎖切断以外にもDNA損傷の増感機構が存在する可能性が推測されている。

DNA水溶液の放射線分解反応を研究した結果によると、塩基の分解と遊離のG値の合計は1.39で、主鎖切断(0.4-0.8)やリン酸脱離よりはるかに起こりやすいことがわかっている。DNA構成塩基の反応性は

チミン > シトシン > アデニン

の順序で、ピリミジン塩基と呼ばれる前2者の放射線感受性はプリン塩基の2倍も大きく、糖が結合していても、主として塩基が反応していることが判明している。また、DNAの二重らせん構造を形成する役割を果たしている水素結合切断のG値はDNA主鎖切断の値の10~20倍も大きくそれだけラジカルの攻撃を受けやすくなっている。

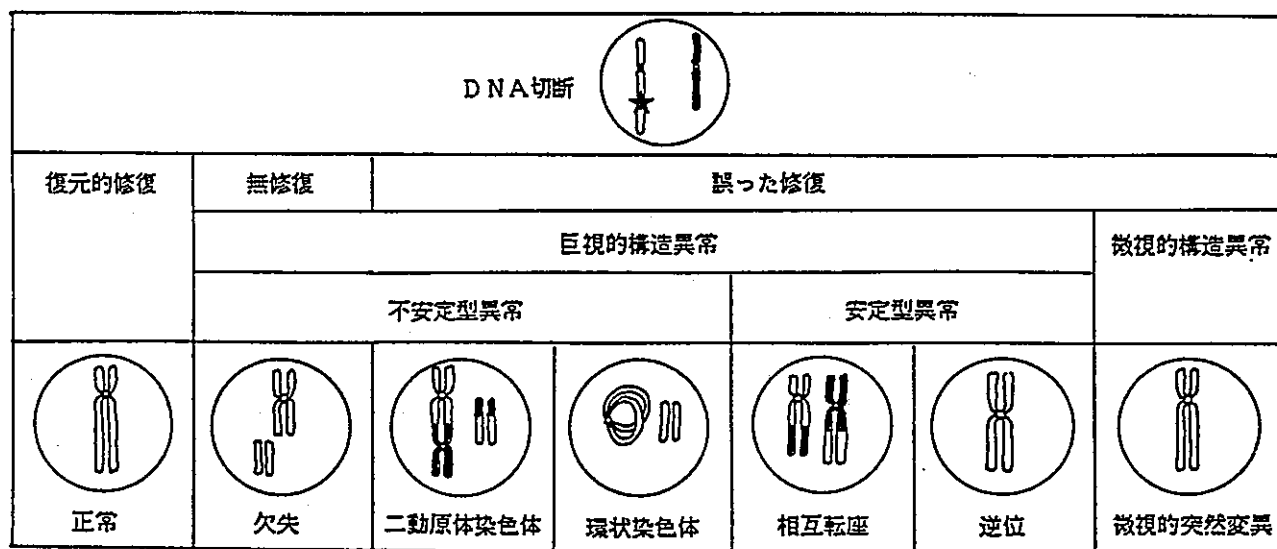
また、鍵谷らは各種DNA関連化合物水溶液の放射線分解反応を研究し、最も大きい反応性を有するチミン水溶液の放射線化学反応に注目し、チミンのヒドロキシル化反応が細胞死に深く関わっていることを報告している。

(3) 染色体レベルでの影響

発がんや遺伝的影響など確率的影響には実験的にも疫学調査でも現在のところ線量反応関係は低線量域では明確ではないがゼロ影響の領域は存在しないという仮定にたって評価されている。従って低線量被曝が及ぼす人体影響の数量化は放射線防護の重要な課題となっている。

染色体の構造異常は放射線に対して非常に敏感な生物反応の1つである。染色体の基本構造はDNAである。DNAに切断が生ずると細胞はそれを修復する能力を持っているが、修復に誤りが起こるとDNAがつなぎかえられ、結果的には染色体が本来の形と異なって認められる。1個の切断の消費エネルギーは約100 eVと推定されているから、かなり敏感な反応である。修復の異常が起こる割合は全体の1%以下と推定されているので、大部分の切断はもとに復元されるが、残りの切断が染色体の構造として表現されることになる(図II-4-3)。

図II-4-3 放射線による染色体異常の種類



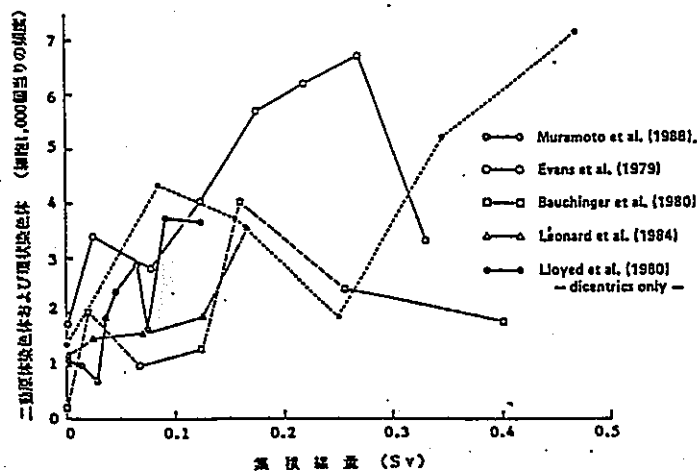
ヒトの末梢血を採取しリンパ球に出現する染色体異常をモニタリングする試みは現在最もよくなされている方法である。血液の採取は比較的容易に行なえる。また、放射線治療や事故被曝など高線量被曝の実際例で、生体内でもリンパ球同様に染色体異常が形成されるという証拠もあり、リンパ球の染色体異常は低線量被曝に対する定量性のある有力な生物学的指標として、その利用に期待が寄せられている。

一方、近年の遺伝子工学の進歩によりPCR法という技術がもたらされた。PCR (polymerase chain reaction) は、通常約4000塩基対 (bp) までの長さの、特定DNA塩基配列をその近傍の塩基配列に相補的な二つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅する方法である。この方法によって、1個の精子、1個の細胞、1本の毛髪、細胞中のウイルス等の遺伝情報を得ることができる。PCR法を用いてDNAの変異を検索する研究が現在進められている。

これらの方法により、被曝線量と被曝に起因する染色体異常の関係が明らかにされれば、まず染色体異常のモニタリングが生物学的線量計としての意味をもつことになる。さらに、観察される染色体異常を健康影響の評価に直結させることができれば、低線量放射線の健康に対する影響を具体的に解明する上で大きな前進となることが期待される。

現在われわれは、人為的放射線に関して法的規制を受け、容認できると思われるレベル (線量当量限度) を超えないように制限されている。低線量放射線の健康に対する影響が具体的にカウントされれば、安全性と当量限度が直結したものとなると考えられる。

図II-4-4 放射線作業従事者における集積線量と抹消血リンパ球の染色体異常の頻度 (阿波章夫博士の集計による)



出所) 阿波ら

図II-4-4はこれまでに報告された原子力発電所作業従事者におけるリンパ球の染色体調査の結果である。線質は主としてγ線であるが、いずれも当然ながら線量当量限度以下の被曝である。出現頻度が低いことによる統計的ゆらぎ、線量率の

個人差、年齢、線量モニターと全身平均線量とのずれなど多くの不確実要素によるデータのばらつきは避けられないところであるが、集積線量とともに染色体異常の頻度の上昇が認められる。集積線量と共に染色体異常の頻度の上昇が認められる。集積線量と共に染色体異常頻度の関係に関しては、比例関係があるとか、線量依存性がない等の解釈がなされてきたが、これには体内におけるリンパ球の動態が密接に関係していて、線量効果は必ずしも単純ではない。二動原体染色体や環状染色体は不安定型染色体と呼ばれ、それらを持つ細胞は分裂しても子孫の細胞を作れない。即ち、細胞1世代限りである。いま、1日当たりdSvの線量率で被曝しているとする。染色体異常はA dtに従って上昇する。(Aは単位線量当りの形成率、tは被曝開始からの日数)ところが、リンパ球には寿命(細胞1世代の長さ)があり、 $e^{-\lambda t}$ に従って集団から消去することになる(リンパ球の平均寿命は $1/\lambda$ 日)。従って、染色体異常の頻度はこの増加要素のバランスできまり、

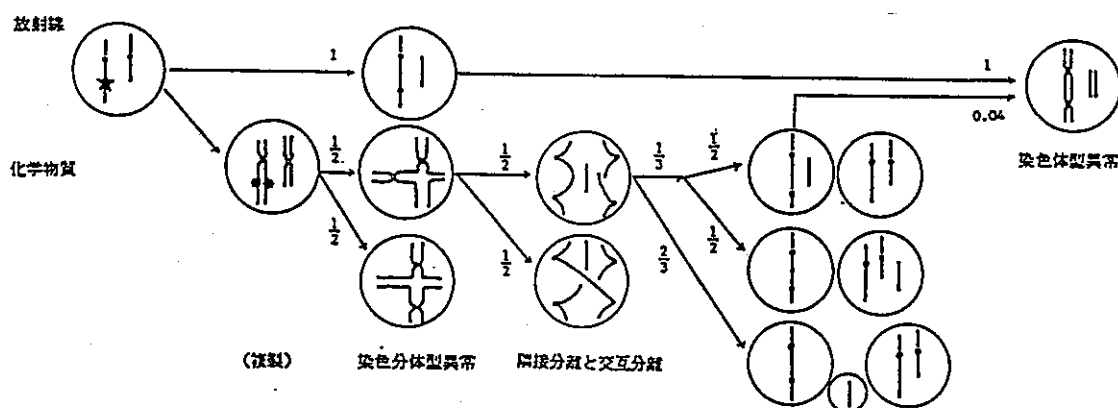
$$Y_v = \frac{A d}{\lambda} (1 - e^{-\lambda t})$$

で表される。集積線量(D)とtとの関係は $t = D/d$ であるので、上の式に従えば、被曝開始当初は集積線量と共に上昇するが、まもなくそれ異常は増加せず、プラトーに到達する。そのプラトー値は $A d/\lambda$ で、集積線量とは無関係で、線量率(d)によって決まる。図II-4-4のデータはこの関係式を満足させるものである。実際にはリンパ球集団は異質であって、平均寿命がさらに長いリンパ球集団も存在するようである。もしそうだとすれば、完全なプラトーとならないで、緩やかな上昇を続けることが予想される。別の職業被曝例の染色体調査の結果に上の式を当てはめてみると、異常形成率として $A = 4 \times 10^{-2} \text{ Su}^{-1}$ が得られる。試験管内実験照射の場合に近い値である。このことは、リンパ球の染色体異常は被曝の生物学的指標として十分に鋭敏であることをもの語っていると同時に、微量線量であっても高線量領域から予測されるような生物反応が起こっていることを示している。

染色体異常を誘発する作用源は放射線に限らない。環境化学物質の中にも染色体異常を誘発するものは多い。然るになぜ放射線被曝の指標となるのか?放射線によって染色体異常が作られるためにはDNAの複製を必要としないが、化学物質や紫外線によるDNAの傷が染色体異常として固定される過程にはDNAの複製を必要とする。この形成機構上の違いが作用源判別を可能にしている。形成される染色体異常の型が、前者の場合、染色体型と呼ばれ、異常の単位が染色体であるのに反し、後者は染色分体型で、異常の単位が染色体分体であって容易に区別することができる(図II-4-5)。しかし、染色分体型の異常から細胞分裂を1回だけ経由して

二次的に染色体型の異常にする可能性がある。派生染色体型異常と呼ばれる異常である。一般に、染色体分析はリンパ球を培養してからその第一回目の細胞分裂で行うことになっているために、その過程が培養中に起こる危険性はないが、生体内でリンパ球が増殖する過程で起こる可能性は否定できない。しかし図Ⅱ-4-5に派生染色体型異常のできる過程を示したように、染色体分体型異常から染色体型異常に移行する確率は約4%と推定される。従って、染色体型の染色体異常を対象としている限り、大部分の染色体異常は電離放射線の被曝を反映しているものと考えてよい。

図Ⅱ-4-5 化学物質によるDNA傷害から染色体型の染色体異常が出現する課程

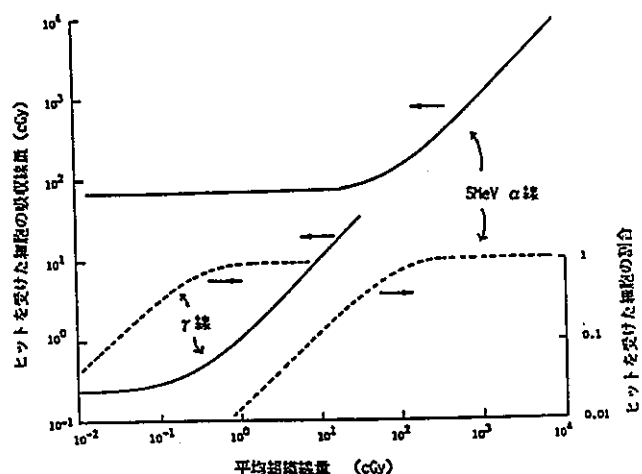


出所) 京大、佐々木

染色体異常が作られる際の出発点となるDNA切断の消費エネルギーが、約100 eVという制約があるとすれば、吸収線量を下げれば無効領域に到達しそうであるが、実際にはそうではない。これは量子としての放射線の性質による。図Ⅱ-4-6に示すように、線量を下げると荷電子(あるいは光子)によってヒットを受ける細胞の割合は減るが、ヒットされた細胞の受ける線量は一定の値から下がることはない。この下限は放射線の線質によって決まってしまう。例えば、 γ 線被曝の場合、全体の線量をいくら下げても、リンパ球1個が受ける平均線量は約0.23cGy以下には落ちない。単にヒットを受けたリンパ球の数が線量に見合って少なくなるだけである。0.23cGyは細胞に障害を起こすに十分な量のエネルギーである。ついでに5 MeVの線の場合もあげたが、この場合には1個のリンパ球が受ける下限は約70cGy

である。全体の吸収線量としては微々たるものであっても、1個の細胞が受ける障害量はかなり大きなものであることが分かる。特にこのようなエネルギー密度の高い放射線の場合、微量線量であっても染色体解析はその検出に大きな威力を発揮する。

図 II - 4 - 6 低線量被曝の場合のヒットを受ける細胞の割合



出所) 京大、佐々木

生物はDNAにできた傷を修復する巧妙な機構を備えている。最近ではDNAにある種の傷を与えると修復機構が誘導され、次に同じ傷を与えても有害効果が軽減される。適応応答と呼ばれる現象である。哺乳動物細胞にも果たして類似の適応応答があるか？最近その存在を示唆する報告が相次いで発表され、注目されている。実験としては、最初にまず細胞を低線量の放射線で照射しておき、その後に第2の照射あるいは科学物質による処理を行い、染色体異常あるいは姉妹染色体分交換を指標として反応を調べる方法がとられている。ふたつの処理による影響が相加的效果を下回ることによって、最初の照射によって惹起された細胞反応が第2の処理による傷害形成あるいは傷害発現の軽減に働いたと解釈するのである。線量領域は1～20 cGyで、一般に放射線防護の分野で関心のある線量より高い線量域であるが、反復被曝のリスク評価に関係する現象であるので今後詳細な研究が必要であろう。

適応応答とは別に、同じく最近急速に関心が高まってきている放射線影響に低線量放射線の刺激効果（ホルメシス）の問題がある。低線量の放射線照射が生体機能

の活性化を誘導する現象である。これらは傷害の形成自体の軽減に働くというよりはむしろリスク評価に際してのベネフィット要因の荷重係数としての意味があると考えられる。従って、刺激効果の場合と違って、刺激因子としての放射線の生体に対する作用は確実に起こっているということを常に念頭におくべきである。リンパ球の染色体異常解析によって、低線量放射線被曝が生体に確実に作用していることを証明している。このような解析は、低線量放射線被曝の人体に与える影響評価において、影響評価の物差しとしてどれだけの価値があるだろうか？

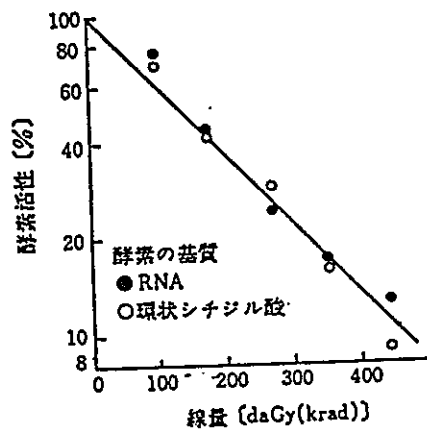
現段階では、直接的リスク評価につながるのは遺伝的傷害のうち次世代に予想される先天性の染色体異常疾患である。UNSCEAR報告等でも採用されているように、精原細胞に1個の染色体転座が生じた場合、次世代に出現する染色体異常個体の種類と頻度はかなりの確からしさを以って推定されている。被曝の指標として解析する染色体異常は二動原体染色体と環状染色体であったが、これと同じ確率で、それぞれに対応して、相互転座と逆位が作られる(図II-4-3)。いわゆる安定型異常であって、細胞分裂によっても失われず、その意味で蓄積型の異常である。連続被曝の場合の不安定型の異常と集積線量との関係は既に述べたが、安定型の異常は、 $Y_s = B d t$ で増え続けることになる。形成率 $B = A$ が成立することはいろいろな実験結果からまず間違いなさそうである。従って、分析精度の高い不安定型異常の頻度から形成率 A を求めておけば、蓄積型異常の頻度を推定することができる。あとは、リンパ球と生殖細胞の形成率の差に問題が残るが、最近の戸帳博士らのサル精原細胞の実験結果を参考にして考えると、低線量率ではリンパ球の値の $1/10 \sim 1/20$ と見積られる。

(4) 酵素に対する影響

放射線照射によって特定の酵素が不活性化されて、その機能を喪失することがあり、不活性化される酵素が重要な代謝系であるような場合には、生体にとって致命的な影響を被ることになり、放射線によって不活性化されやすい酵素とされにくい酵素にはどのようなものがあるのかについての知見を集積することは、放射線影響を考える上で重要である。酵素は生体内において起こるほとんど全ての化学反応を進行させる触媒であり、その実態はタンパク質である。酵素は生体から分離精製が可能であり、生体外で基質に作用させてその反応を計測することが可能である。

放射線による酵素の不活性化は多くの系で研究されており、普通は照射線量を増加していくと、酵素活性は指数関数的に低下する。

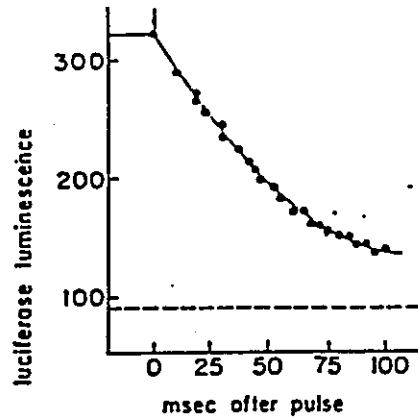
図II-4-7 0.5Mの塩化カリ溶液中におけるリボヌクレアーゼ酵素の⁶⁰Coガンマ線照射による失活



出所) Smith and Adelstein 1965

通常は酵素の不活性化の定量は酵素が放射線照射を受けていない状態で行われている(放射線照射しない状態での活性測定)ことが多いが、例外としてホタルのルシフェラーゼの不活性化の時間分解分析がある。ルシフェラーゼによる発光の変化を定量的に不活性化処理後の時間の関数として追跡できる⁶⁾。放射線によるダメージが現れるのはパルス直後ではなく、なめらかな1次的プロセスに従っている。これは基質と結合した酵素が、放射線でダメージを受けても完全に活性を失うまではそのサイクルを全うすることを意味している。このような活性の減少が一般的な現象であるかどうかは確認されていない。

表Ⅱ-4-1 3 μ sec放射線パルス照射後のホタルルシフェラーゼのATP
依存活性の減少



出所) Patterson, L.K.: Radiation chemistry. US DOE REP. (1983)

この他、水の放射線分解によって生成される物質を基質とする酵素もある。西洋わさびのペルオキシダーゼは H_2O_2 その例であるが、この他に O_2^- についても反応時のコンフォメーション変化と合わせて研究されている。

放射線を酵素に照射することは種々の分子パラメーターを得るためことにも利用されている。例えば、電離放射線による乾燥酵素の不活性化によって分子量を推定することに利用したり（これは他の方法で得られる分子量の値をよく一致する）⁶⁾ ⁷⁾、ラジカルの種類によって攻撃するアミノ酸が異なることを利用して酵素の活性に必要なアミノ酸を決定したりすることに利用されている。例えばリゾチームは、 CNS^{2-} によって不活性化されるがリゾチームの活性部位には、トリプトファンが必要である。この方法によって多くの酵素の活性を発現するために必要なアミノ酸を同定することが可能である⁸⁾。

(5) 膜に対する影響

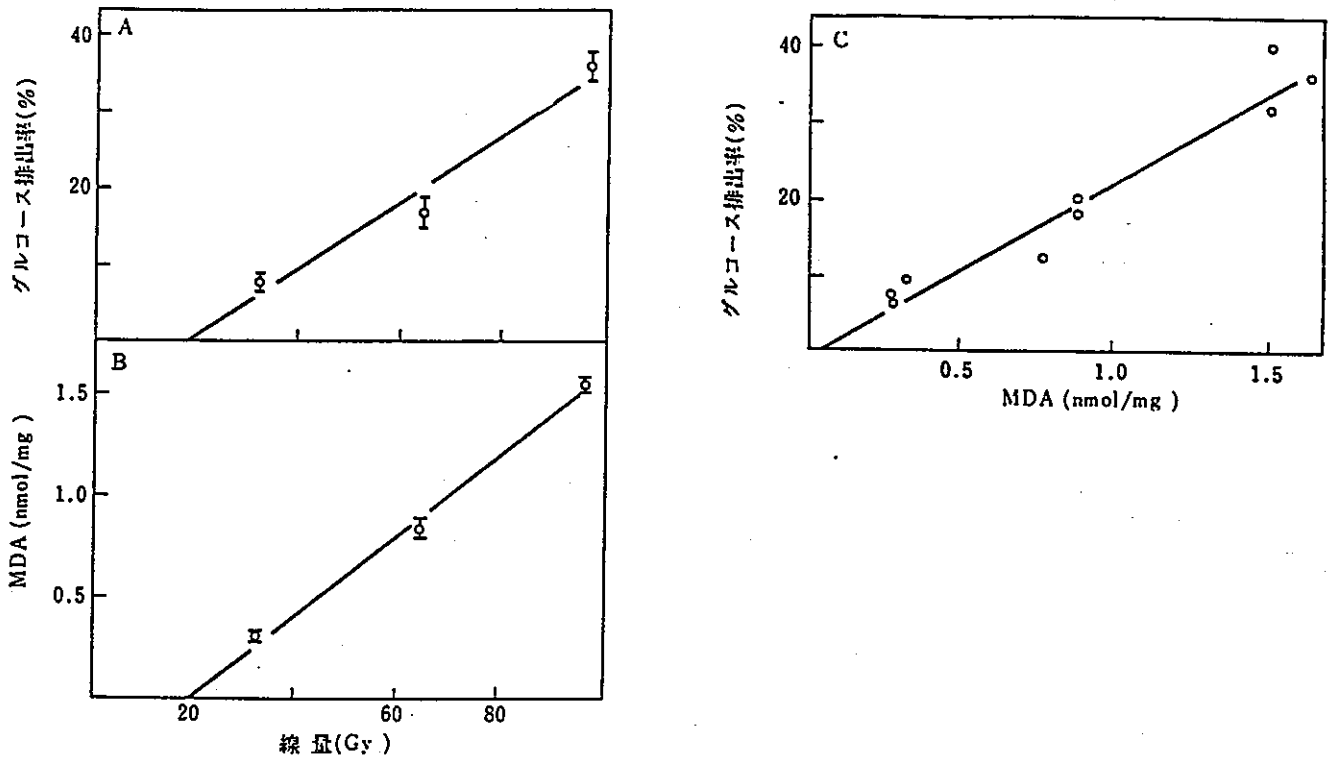
①モデル系での実験

放射線の生体膜に対する影響は細胞が死に至る過程で重要な意味を持っているものと考えられている。生体膜は各種の脂肪酸側鎖を内側に向けて配列したリン酸脂質二重層を基本構造にしており、放射線によって膜内外に生じたラジカルにより、不飽和脂肪酸がラジカル化し、膜構造に損傷をきたすことが判明している。

膜の流動モザイク説が確立され、モデル膜による放射線影響の研究が進展した。PetkuとChelackは⁹⁾、は大豆のレシチンからリポソームを作り、放射線を0.01rad~100radの範囲で与え、232nmの吸収変化で過酸化物の精製を測定し、照射によって生じたラジカルとイオンによって酸化的な連鎖反応が起こり膜脂質の多価不飽和脂肪酸が酸化されることを示した。そしてこのような系では、線量率を下げても照射するほど、一定の変化を起こすのに必要な線量が低下する。これは実際に自然放射線レベルの低い線量率において生体系に生じているメカニズムとのアナロジーがあるものと考えられている。脂質の損傷は、低線量率照射は高線量照射よりもラジカルの再結合の可能性が低いため、障害が大になると考えられる。またその損傷は、スーパーオキシドジムスターゼ(SOD)によって阻害されることから、 O_2 -ラジカルによって進行する過程であることが示された。

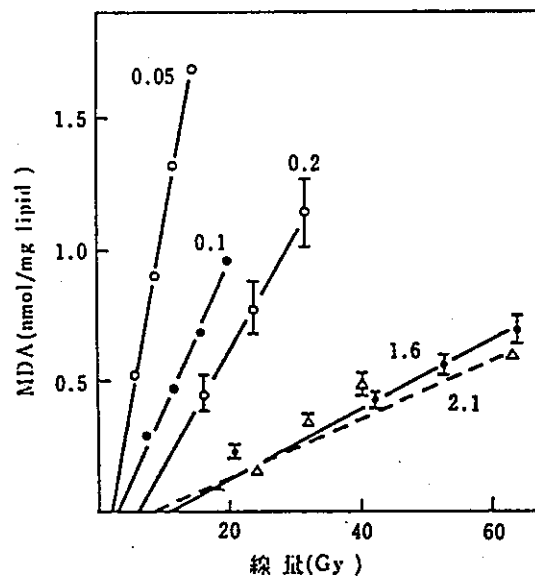
同様に低線量率における損傷効果の増大については、Raleighらも報告している。リノール酸ミセルを空气中でX線照射すると100rad/min以下の線量率で線量率が低いほど、234nmの吸収変化でみた脂質過酸化の収率が大きくなる¹⁰⁾。過酸化の生成物はリノール酸の9位と13位の炭素の二重結合にヒドロパーオキシド(OOH)を持つ物質である。ギ酸とエタノールが照射の影響を抑制することからOHラジカルによって過酸化が進行するものと考えられ、リン脂質二重層で得られたPetkuとChelackの結果が O_2 -ラジカルの関与であったのとは対照的であり、攻撃するラジカルの種類によらず、低線量率のほうが影響が大きい結果がえられており、これは紫外線や太陽光線においても同じである¹¹⁾。放医研の中沢らは、同様の実験を大豆レシチンのリポソームに⁶⁰Co γ 線を照射し、脂質の過酸化生成物であるMDAを指標としてリポソーム中に含有させたグルコースの放射線による流出と対応させた影響を調べている¹²⁾。約20Gyの閾値以上で照射量に比例して過酸化物の生成とリポソーム内のグルコースの流出が起きており、(図II-4-8)線量に対する依存性は、線量率によって異なり、低線量率になるほど線量変化に感受性になる(図II-4-9)。

図 II - 4 - 8 レキチンリポソームの膜透過性とMDAの総量依存性



出所) Nakazawa, T., Nagatsuka, S., :Radiation -induced lipid peroxidation and membrane permeability in liposomes. Int. J. Radiat. Biol.,38:537, 1980.

図 II - 4 - 9 レシチンリポソームのMDA生成の線量率・線量依存性

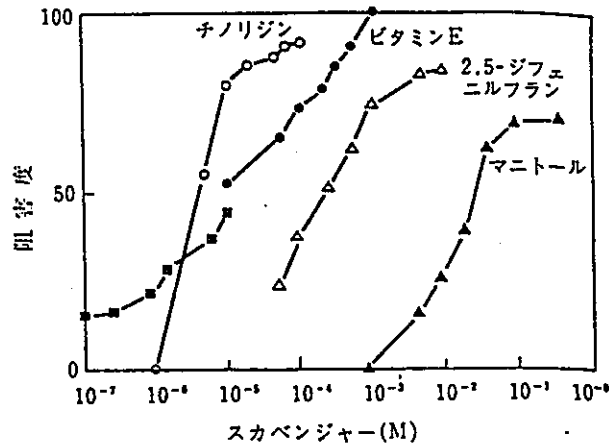


出所) 放射線学会 Vol. 25, No. 8

膜の放射線障害あるいは脂質過酸化反応生成物は、生体系の各種の病因（発ガン、突然変異誘発、老化）と関係していることが指摘されており、膜の損傷の生体における影響の重大さが認識されている。脂質過酸化生成物（MDA）がマウスの皮膚癌を誘発したり、細菌の変異を誘発することが報告されている。

モデル膜系において、放射線照射によって生成するラジカルの分子種を確認するための実験も行われている。酸素存在下で水溶液中に発生するラジカルのうち、特定のラジカルを消去するラジカ消去剤を用いることで影響を与えているラジカル分子種を特定することが可能である。人工膜での実験では、低線量率の放射線による脂質過酸化はSODで阻害されることから、 O_2 によって起こることが確かめられている。図II-4-10に種々のラジカル消去剤の効果を示す。

図II-4-10 放射線による小胞体過酸化に対するラジカル消去剤の効果



出所) Yukawa, O. & Nakazawa, T.: Radiation -induced lipid peroxidation and membrane-bound enzymes in liver microsomes. Int. J. Radiat. Biol., 37:621:1980

②生体系での実験

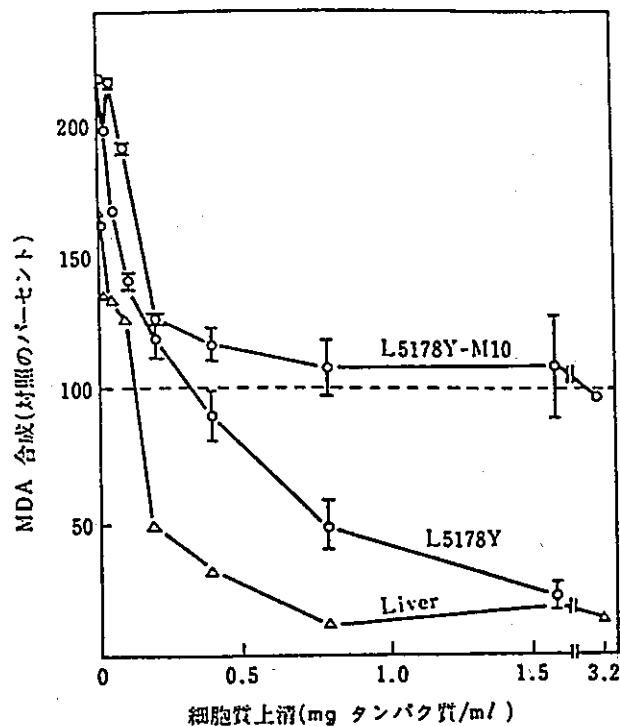
生体に対して放射線照射の影響を評価するために、ラジカル消去剤存在下と非存在下での照射による影響が調べられている。

細菌のアコレプラズマに対する放射線照射の効果は、SODで抑制されることからラジカルの O_2 による膜の損傷を受けていると推定されている¹³⁾。ビタミンE欠乏食を与えたマウスでは正常よりもX線に感受性になり、LD₅₀はほぼ0.25 Gy減少することが認められている¹⁴⁾。

生体内に膜脂質の過酸化を阻害する物質が存在することは、リポソームに放射線を照射した場合の過酸化脂質の生成が生体細胞の細胞質を添加することにより阻害されることで確認されている。図Ⅱ-4-11は、ラット肝臓、培養細胞、放射線感受性の培養細胞の3種類の細胞細胞質を添加して、過酸化脂質の生成の阻害を見た結果である。細胞質の添加量の増大にしたがって、過酸化脂質(MDA)の生成が低下していることから細胞内には脂質の過酸化を阻害する物質が存在することを示している。一方、放射線感受性の培養細胞の細胞質では、低下が見られないことから、放射線感受性と膜の過酸化が何らかの関係があることを示している。

脂質の過酸化による膜障害が放射線の影響として重要な研究課題となっているが、生体細胞には放射線によって起こる障害からの防護機構が存在は確認されているものの、生体内におけるそのメカニズムを解明するには、モデル系でのクリアな結果を直接的に当てはめることはできず、複雑な系での現象の解明が必要であり、その方法論の開発が望まれている。

図Ⅱ-4-11 リポソームの放射線によるMDA生成に対するラット肝臓・L5178Y細胞、放射線高感受性M10細胞の細胞質によるその阻害



出所) 中沢透他 「放射線による膜脂質損傷の機序とその制御、第24回放射線影響学会大会、1981

2) 観測系の開発

(1) 新規観測手段

①モノクローナル抗体によるDNA損傷の検出

放射線や化学物質による細胞死、突然変異あるいは細胞のがん化の機構を解析するには、細胞DNA中に誘起されたDNA損傷を正確に定量する必要がある。がん化あるいは突然変異は生き残った細胞に生じる現象であり、DNA損傷を正確に定量化するためには、細胞が生き残れるような低線量の放射線による損傷を定量化し、かつ個々の細胞におけるDNA損傷をも定量化できることが要求される。このような目的に対して現在注目されているのが、モノクローナル抗体を用いたDNA損傷定量法である。

モノクローナル抗体を用いたDNA損傷の定量法は、

- ①検出感度が高い
- ②サンプルが小量でよい
- ③アイソトープ標識を使用する必要がない
- ④個々の細胞においても定量が可能である
- ⑤組織や細胞内における損傷の分布を調べることが可能である

といった利点がある。抗血清に比べてはるかに優れている点は、モノクローナル抗体が同一の抗原を認識する均一の抗体の集合であるため精度が高いこと、一つの抗原に対して種々の特異性を持った抗体ができるため、幅広い実験が可能であること、ハイブリドーマにより抗体が無限に生産できること、標識アミノ酸を用い抗体を全く傷つけることなく標識できるなどがあげられる。

DNA損傷を認識するモノクローナル抗体として現在報告されているものは、

- ・DNA中の thymine dimer¹⁶⁾ (ただし thymine dimer であるというしっかりした証明はない)、
- ・DNA中の 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine (thymine glycol)¹⁶⁾、
- ・aflatoxin B₁ modified DNA^{17)、18)}、
- ・guanine imidazole ring-opened-aflatoxin B₁ DNA¹⁹⁾、
- ・O⁶-methyldeoxyguanosine²⁰⁾、
- ・O⁶-ethyldeoxyguanosine^{21)、22)}、
- ・O⁴-ethyldeoxythymidine²¹⁾、

- ・ $7\beta - 8\alpha - \text{dihydroxy} - 9\alpha$,
- ・ $10\alpha - \text{epoxy} - 7, 8, 9, 10 - \text{tetrahydrobenzo [a] pyrene (BPDE - I)}$
modified DNA¹⁹⁾,
- ・ BPDE - I - deoxy - guanosine²²⁾ に対するモノクローン抗体がある。

これらを用いたDNA損傷定量法の検出感度が高いことは、220,000 thymine 当たり1個生じた thymine glycolが定量できたり¹⁴⁾、1,355,000ヌクレオチド当たり1個生じた aflatoxin B₁ modified DNAが定量できたり¹⁷⁾、 10^7 個の deoxyguanine 当たり1個の $O^6 - \text{methyl deoxyguanosine}$ が定量できる¹⁸⁾ ことから明白であろう。Swenbergら²¹⁾ は、ラットに微量の DEN (diethylnitrosamine) を持続的に投与後生ずる hepatocellular carcinomaが、hepatocyte DNA中の $O^6 - \text{ethyldeoxyguanosine}$ ではなく、 $O^4 - \text{ethyldeoxythymidine}$ と深く関与することを発見したが、この結果はモノクローン抗体を用いた検出系が高感度であったために成し遂げられたものである。また、個々の細胞においてDNA損傷を定量できることが紫外線誘発DNA損傷に対するモノクローン抗体によって示されている。スライドガラス上で正常ヒト線維芽細胞を培養した後、 $50\text{J}/\text{m}^2$ の紫外線を照射する。細胞をカルノー液で固定し、紫外線誘発DNA損傷を認識する³H-標識モノクローン抗体を処理した後、オートラジオグラフィを行い得た結果をから定量された。細胞核上に紫外線によるDNA損傷を示すグレインが生じていることが分かるであろう。この細胞核上のグレイン数は $10 - 50\text{J}/\text{m}^2$ の照射線量間で直線性がある。

以上のように、今までに報告されたDNA損傷を認識するモノクローン抗体の数はそれほど多くなく、これらの方法を実際のDNA損傷の定量に用いた報告は非常に少ない。しかしながら、いままで述べてきたようにこの定量法は今までできなかった新しい可能性を有しており、近い将来新しい現象を発見する有力なツールとなることが期待される。

② DNA染色体の変異検出

a. 各種方法論

DNAの変異検出法としては、塩基配列分析、制限酵素断片長分析、特定対立遺伝子構造を持つオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション法(ASO)、オリゴヌクレオチドオライゼーションアッセイ(OLA)、リボヌクレアーゼA(RNase A)法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(DGGE)、化学的ミスマッチ開裂法等がある。いずれの方法にも、アイソトープ、蛍光色素で標識したプローブが必要である。これらの方法を、PCRで増幅したDNA中の変異検出に用いれば、短時間で精度の高いデータが得られる。塩基配列分析は、クローニングを必要としないダイレクトシーケンス法を使えば、大幅に能率が向上する。また、RNase A法に、増幅DNA試料を使うと、鮮明な結果が得られ、スクリーニングに使える技法となった。

二本鎖DNAのヘリックス構造が変性する温度(T_m)は塩基配列に固有である。含有する変性剤(尿素-ホルムアミド)に濃度勾配をつけたゲル上で、二本鎖DNA(100~600bp)を電気泳動する(DGGE)と、 T_m の低い塩基配列を持つDNAは、 T_m の高いDNAに比べて、変性剤濃度の低いところで変性を開始する。変性が生じると、ゲル上での移動度が減少するため、 T_m に差のあるDNAを分離することが可能である。二本鎖DNA中にミスマッチがあると、 T_m は激減する。Myrcらは、正常型塩基配列を持つ ^{32}P ラベル一本鎖DNAプローブを用い、DNA:DNAヘテロ二本鎖のDGGEを行い、塩基置換、欠失等の変異を検出した。また、佐藤らは、一本鎖DNAプローブより簡単に作れるRNA二本鎖のDGGEを用い、RNA:DNA二本鎖のDGGEを行い、通常ならば塩基配列分析によってのみ検出される多型性塩基置換を、日本人集団中に検出した。

PCR増幅DNAのDGGEを行った後、エチジウムブロマイドで染色する方法を用いれば、 ^{32}P でラベルしたプローブを作製する必要がない。この方法では、正常型の個体、または塩基置換、小さな欠失、挿入等の変異のある塩基配列に対してホモ接合の個体から得たDNAを増幅し、変性後再アニールしてDGGEを行うと、各々1本のバンドが検出される。ヘテロ接合体のDNAからは、正常型の二本鎖、異常型の二本鎖、ミスマッチを持つ2種類の二本鎖の合計4本が検出される。約600bpのDNA断片中には、同一温度で変性する一連の塩基配列(ドメイン)が2~4個存在し、最も T_m の高いドメイン中の変異は検出できない。G、Cを主とする T_m の高い塩基配列(GC-クランプ)をPCRで導入し、これを克服することが可能である。

これらのほかに、*Thermus aquaticus* (Taq) DNAポリメラーゼの特性を利用した、既知変異検出法がある。第一は、変形型と同一の塩基を3'末端に持つプライマーを上流側に使うもの、第二は正常型と変異型の塩基配列を持つ2種のプライマーの5'末端に、各々赤または緑の蛍光色素をつけたものを上流側プライマーとし、下流側プライマーとあわせて3個使うものである。プライマーと鋳型DNAが完全に相補的でないと、Taqポリメラーゼによるプライマー伸長が抑制され、PCR産物が激減することを利用し、変異型、正常型、それらのヘテロ接合型と識別する。多数の細胞中に混在する少数の変異細胞も検出できる。

b. 異常検出のマイクロとマクロ

放射線被曝と染色体異常の関係を研究するには、マクロに染色体異常をとらえるアプローチ方法と、マイクロに染色体異常をとらえるアプローチ方法との2つがある。前者の例としては、リンパ球の染色体異常の解析があり、この方法は、染色体レベルの巨視的な構造異常に着目しているものである。後者の例としては、PCRを用いたDNA中の変異の検索があげられ、前者に比べると微視的な遺伝子レベルの異常に着目したものである。後者の方法は、厳密な染色体異常を解析する点では優れているが、反面特定の遺伝子をターゲットにしないという短所ももっている。したがって、どの部分の異常を検出するかというプローブの選択に妥当性が要求される。

マクロな異常検出のアプローチにおいては、リンパ球の染色体異常の解析が直接的リスク評価が可能であった。しかしながら、ヒトの健康への影響という面からは、こうした血中リンパ球に見られる細胞学的変化の意味はまだほとんどわかっていない。今後の職業被曝者の疫学的調査研究が必要である。

遺伝的障害のうち、他の微視的突然変異の危険度に関しては橋渡しとなる十分なデータがないが、放射線による微視的突然変異のかなりの部分(約70%)は欠失突然変異であることが分かっており、機構的には染色体異常と共通点が多いので、染色体異常(蓄積型)と並行して上昇していると予想される。両者を関係づける定量的データが得られれば突然変異の危険度評価も可能となるであろう。健康への影響のうち発がんは健康障害の最も重要な部分を占める。実際のがんを見ると、がん特有の染色体異常が観察される場合が多く、発がんによってそれらの染色体異常が原因に関与していると考えられているが、それらの染色体異常の形成に放射線が直接関与するかどうか今のところ全く不明である。発がんは多段階的に起こるため、放射線の関与のしかたも単純ではない。また、放射線の発がん作用の中には突然変異作用の他にプロモーション作用も知られている。放射線発がんの基礎過程が分からない

ことには放射線で作られた染色体異常の発がんに対する意味づけには説得力がない。今までのところは単に「染色体障害作用」と「発がん作用」という変異源物質の評価で採用されているような定性的並行関係に基づいた危険度評価の域を出ていない。低線量領域の発がんの線量効果関係は議論の多いところであるが、染色体異常と発がんの定量的並行関係が低線量被曝で成立するかどうか疑問な点も多い。染色体異常は放射線被曝の鋭敏な指標であるが、それを一歩進めて、観察される染色体異常を健康影響の評価に直結させるためには、その背景となる基礎研究の進展が必要である。

c. 染色体異常と指標とする問題点

染色体異常を指標とした場合の安全評価にも問題が残っている。われわれは自然バックグラウンド放射線に被曝されて生活しており、日本の場合、その放射線量は100ミリム/年といわれている。この自然バックグラウンド放射線の線量は地域によって異なり、それにより、自然環境放射能の高い地域の住民の末梢血リンパ球染色体異常の度合いは、自然放射能の低い地域の住民と比べて有意に高いと報告されている。

染色体異常の出現頻度は、こうした環境放射線によるバックグラウンドの影響は勿論のこと、年数や遺伝的要因、更には培養方法によっても差が生じることが指摘されている。それゆえ、特定の地域での一般住民集団における染色体異常出現率を調査することは、職業被曝の影響を知る上でも重要である。

すなわち、染色体異常を指標とするばあいには、バックグラウンド、地域差や個体差を考慮した上での評価が必要となり、染色体異常が検出された場合の原因推定が非常に難しいことがあげられる。

Leonardらは、原発作業員と、化石燃料を燃やす火力発電所作業員の染色体異常出現率を比較研究し、原発より火力で染色体異常出現率が有意に高いという結果を報告している。この報告は、今後のエネルギー問題を考える際非常に興味深く、我が国での調査の必要性が考えられる。

d. 今後の研究方向

平成元年度より、科学技術庁の原子力基盤技術総合的研究（原子力基盤クロスオーバー研究）の4課題のうちの1課題「放射線リスク評価・低減化」のもとで、「放射線による染色体異常の高速自動解析システムに関する研究」が、5ヶ年計画で進められている。染色体の自動解析システムの開発は、世界各地で数多くの研究

者によって、より完全な自動化を目指して努力がなされている。ようやく近年になり、コンピューター画像処理の技術的進歩により一部の染色体異常の自動解析が可能になり実用に供されるに至った。放射線による染色体異常の自動解析はこれからの課題であるが、現在の技術水準にさらに新しい分析技術を加えれば、放射線による染色体異常の検出も技術的に可能と考えられる。このプロジェクト研究（主査：放医研・障害基礎研究部、佐藤弘毅部長）は放射線医学総合研究所、国立予防衛生研究所、国立衛生試験所、国立病院医療センターの国立4研究所と、理化学研究所が、大学や民間企業と共同研究で実施しており、また、イギリスのMRC研究所等の海外の研究機関との共同研究も進めている。

現在研究の進められている主なテーマとしては、セグメンテーション（重なったり接触したりし合っている染色体を画像処理により切り出すこと）のアルゴリズム開発と処理のスピードアップという点が重視されている。セグメンテーションと、セントロメアの位置決定をオペレーターが肉眼判定した後であれば、それ以降の染色体分析については現在のシステムでも正解度の高い自動判定が可能である。そのために各国各研究グループで様々な工夫をこらした研究がなされている。

最近、コペンハーゲンのDr. Lundsteenの考案した方法は、これまでの染色体自動分析法の発想を転換するものとして注目されている。その方法によると、1人の患者の10個の細胞について分析可能な染色体のみを分析し、例えば第1番染色体が間違いなく正常である細胞が1個でもあれば、その患者の第1番染色体は正常であると判定し、その他の染色体（1番から22番とXY染色体）の全てにつき同様な判定を下し、部分的判定結果を足し合わせ、その患者の染色体に異常があるかどうかを自動判定するものである。この方法はモザイクや癌や放射線誘発染色体異常の分析には不適切であるが、身体の全ての細胞に同じ異常染色体を持つ先天異常の患者や羊水の検体には有効な方法である。

また、最近注目を集めているIn situ hybridization法の研究については、現在セグメンテーションの重要性からセントロメア（動原体）の染め分けより、テロメア（染色体末端部）の染め分けの方がさらに重要な課題であると指摘されている。In situ hybridization法は、画像が単純で処理し易く優れている将来性の高い染色法であるが、問題点として、陽性染色率が100%にならないこと、及び人工的バックグラウンドが生ずること等が挙げられている。

こうした染色体異常を自動解析する技術が確立されれば、煩雑な統計処理が容易に、短期間に行えることが期待される。このことは、特に低線量被曝とそれによる染色体異常の相関関係をより確かなものとする上で極めて意義深いと考えられる。

【参考文献】

- ¹⁾:D. H. Bell, J.M. Gould, and L.K. Patterson, Radiat. Res., 90: 518-525(1982).
- ²⁾:D. E. Lea, K.M. Smith, B. Holmes and R. Markham, Parasitology 36: 110-118(1944).
- ³⁾:A. J. Swallow, radiation Chemistry of Organic Compounds, Pergamon Press, New York; pp.256(1960)
- ⁴⁾:R. H. Bisby, R.B. Cundall and A.K.Davies, Photochem. Photobiol.28: 825-37(1978)
- ⁵⁾:Petkau, A. & Chelack, W.S. :Radioprotective effect of superoxide dismutase on model phospholipid membranes. Biochim. Biophys. Acta, 433:445~456, 1976
- ⁶⁾:Releigh, J.A.,Kremers, W. & Gaboury, B. :Doserate and oxygen effects in models of lipid membranes :linoleic acid. Int. J. Radiat. Biol., 31:203~213, 1977
- ⁷⁾:Mandal, T.K.,Ghosh, S., Sur, P. & Chatterjee, S.N. :Effect of ultraviolet radiation on the liposomal membrane. Int. J. Radiat. Biol., 33:75, 1978
- ⁸⁾:Nakazaya, T. & Nagatsuka, S. :Radiation-induced lipid peroxidation and membrane permeability in liposomes. Int. J. Radiat. Biol., 38:537, 1980
- ⁹⁾:Petkau, A. & Chelac, W.S. :Protection of *Acholeplasma laidlawii* B by superoxide dismutase. Int. J. Radiat. Biol., 26:421, 1974
- ¹⁰⁾:Konings, A.W.T. & Drijver, E.B. :Radiation effects on membranes. I. Vitamin E deficiency and lipid peroxidation. Radiat. Res., 80:494, 1979
- ¹¹⁾:Strickland, P.T. and Boyle, J.M.: Photochem. Photobiol., 34. 595 (1981)
- ¹²⁾:Leadon, S.T. and Hanawalt, P.C.: Mutation Res., 112. 191(1983)
- ¹³⁾:Haugen, A., et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4124(1981)
- ¹⁴⁾:Groopman, J.D., et al.: Cancer Res., 42, 3120(1982)
- ¹⁵⁾:Hertzog, P.J., et al.: Carcinogenesis, 3, 825(1982)
- ¹⁶⁾:Wild, C.P., et al.: *ibid.*, 4, 1605(1983)

¹⁷⁾:Wani, A.A., et al.: *ibid.*, 5, 1145(1984)

¹⁸⁾:Swenberg, J.a., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 1692(1984)

¹⁹⁾:Santella, R.M., et al.: *Carcinogenesis*, 5, 373(1984)

5. 放射線被曝による代謝変化の観測

1) 代謝変化の観測の意義

(1) 代謝の概念

代謝とは、新陳代謝の略称であり、絶えず外界との疎通をはかりながら生きている全ての生物が、各種の生命活動の推進のために必要とする物質を、外界から摂取した比較的簡単な無機物質や有機化合物を素材として合成する活動と外界から吸収したエネルギーを生体内の化学反応に利用できる形に変換する活動を指す。代謝の目的は、次の4つの項目に分類できる。

- ①食物や太陽光からのエネルギーの獲得
- ②外部から摂取した栄養素の、生体構造の部分品や生体高分子合成のための前駆体への転換
- ③それらの構築素材を用いたタンパク質、核酸、脂質などの各種生体成分の合成
- ④細胞が必要とする種々の生理活性物質の合成と分解

代謝を物質の側から見ると、同化（合成）と異化（分解）に大別できる。核酸、タンパク質、多糖、脂質などの高分子化合物、あるいは複雑な化合物をより簡単な分子から合成する反応が同化であり、逆にこれらの高分子や巨大分子を乳酸、酢酸、アミノ酸、オリゴペプチド、二酸化炭素、水、尿素、アンモニアあなどの簡単な分子にまで分解するのが異化である。

同化はエネルギーを消費し、異化はエネルギーを遊離させるため、これに共役してエネルギー代謝系が作動してATP等の形でエネルギーの貯蔵が行われる。このようにATPの合成と分解を中心としたエネルギー代謝は物質代謝と密接に共役している。

(2) 代謝系への影響を観測する場合の対象

生体内で起こる化学反応の種類は非常に多いが基本的な代謝経路については把握されており、生物に共通する代謝系、動物特有の代謝系、植物特有の代謝系、微生物などに見られる2次代謝などが知られているが、放射線照射による代謝系への影響を観測する場合には、2つのスタンスがある。

一つは、放射線による障害が代謝系が影響を受けることによるものである場合にどのような代謝系がダウンしていることによる障害であるのかを特定することにある。この問題は非常に複雑である。代謝系を担うものは、酵素であり、酵素が放射線によってその活性や機能に障害を受けているのか、あるいは酵素をコードしている遺伝子に変異を起こした結果、酵素に変異が起こって代謝系が障害を受けているのかを特定することは困難であるためである。遺伝子の変異による代謝機能の低下であるのか、酵素に対する放射線の障害による代謝系の機能低下であるのかを特定することなく、結果として代謝系の機能低下を検出することが放射線による機能障害の原因を究明することにつながる。言い替えると機能障害の原因を代謝レベルにまで落として観測するかまたは、分子レベルでの障害を上位の機能である代謝系にまで上げて観測するかのどちらかということになる。

この場合の観測対象となるのは、分子レベルでの放射線影響が非常に理解されている場合には、生体内で実際にその酵素が障害を受けた場合に代謝系全体がどのような影響を評価することが必要となるが、生体に対して放射線照射した場合には、全ての代謝系が影響を受けるため、単一の代謝系に対する影響を評価することは不可能であり何らかのモデル系を構築することにより、その影響を評価することになる。一方、分子レベルでの放射線影響に関しては全く理解されておらず、個体レベルでの影響が評価されている場合には、影響を受けていると想定される代謝系に照準を合わせてその代謝系に対する影響を評価することが必要である。

もう一つは、放射線によって受けた各種の機能障害を回復するために働く代謝系に対する観測である。放射線による被爆を受けた場合には、平常時とは異なる代謝系が作動するかあるいは、平常から機能している代謝系の機能強化が起こっていると考えられる。これらの緊急時に機能している代謝系の機能の変化を観測することが分子レベルでの観測と細胞レベルでの観測の間を埋める意味でも重要である。

この場合の観測対象となる代謝系は、主に損傷修復系やラジカルを消去する物質群の生合成に関与した代謝系である。

代謝の変化を観測するアプローチでは、代謝の概念も広く、またその代謝系に対する放射線照射の影響を観測することで得られる情報は何かということを確認に定義することは難しく、現在のところ代謝系への影響を観測した実験から得られる情報は限られるが、観測手段の工夫によってより精密な観測を目指すことが必要である。

2) 代謝変化の観測

代謝変化の観測には様々なアプローチがあり、代謝が変化することを報告する文献は多いがその原因を究明するまで踏み込んだ内容の文献はほとんど見受けられない。

(1) 核酸・糖・脂質の合成量に対する放射線の影響

放射線照射された場合に、代謝系が影響を受けることにより、主要な生体構成成分が個々の代謝系への影響の合計としてどのように変動しているかを捉える実験が行われており、基礎的な知見として重要である。

Osmanら¹⁾は、2種の糸状菌 *Aspergillus flavus* と *Penicillium natatu* に対して近紫外線 (Near UV) と遠紫外線 (Far UV) の照射による核酸、糖、脂質、蛋白質合成に対する影響を見ている。近紫外線、遠紫外線照射はともに全可溶性蛋白質量 (TSP) を増大させ、蛋白合成を促進または誘導している。DNA と RNA の合成は、近紫外線と遠紫外線で2つの糸状菌それぞれ逆の方向を示した (表 II - 5 - 1, 2)。

表 II - 5 - 1

Effect of NUV irradiation on total soluble protein (TSP) and nucleic acids in *P. notatum* and *A. flavus*, as mg/g fresh weight mycelium

Irradiation (min)	<i>P. notatum</i> : TSP	DNA	RNA	<i>A. flavus</i> : TSP	DNA	RNA
Dark	138.7 ± 6.2*	3.3 ± 0.7	14.9 ± 1.0	36.1 ± 3.2	2.0 ± 0.5	13.7 ± 1.0
10	142.5 ± 4.2	4.8 ± 0.5	12.8 ± 0.9	39.6 ± 2.4	1.1 ± 0.2	13.2 ± 0.7
20	140.9 ± 3.3	3.8 ± 0.2	9.6 ± 1.0	45.6 ± 6.6	2.1 ± 0.3	20.7 ± 2.1
60	165.1 ± 7.6	3.1 ± 0.3	8.5 ± 0.7	55.2 ± 2.2	3.3 ± 0.5	18.0 ± 1.2
120	167.9 ± 7.0	3.2 ± 0.5	8.9 ± 0.2	57.6 ± 1.9	5.8 ± 0.2	16.1 ± 0.9
240	162.2 ± 3.5	3.1 ± 0.1	8.2 ± 0.5	48.0 ± 4.3	4.6 ± 0.3	12.4 ± 0.3

* ± Standard error of the mean.

出所) 文献 1

表 II - 5 - 2

Effect of FUV irradiation on total soluble protein (TSP) and nucleic acids in *P. notatum* and *A. flavus*, as mg/g fresh weight mycelium

Irradiation (min)	<i>P. notatum</i> : TSP	DNA	RNA	<i>A. flavus</i> : TSP	DNA	RNA
Dark	138.7 ± 6.2*	3.3 ± 0.7	14.9 ± 1.0	36.1 ± 3.2	2.0 ± 0.5	13.7 ± 1.0
5	92.2 ± 4.1	2.8 ± 0.1	15.0 ± 2.1	82.9 ± 9.3	2.7 ± 0.3	12.4 ± 0.9
10	139.4 ± 2.4	2.9 ± 0.3	19.7 ± 0.9	83.2 ± 2.3	1.9 ± 0.1	16.6 ± 2.1
15	153.9 ± 7.2	3.4 ± 0.5	16.8 ± 1.0	92.5 ± 3.2	2.2 ± 0.1	16.5 ± 1.1
20	165.7 ± 9.3	3.0 ± 0.2	16.8 ± 0.8	73.0 ± 5.7	2.3 ± 0.2	17.3 ± 0.9
25	164.4 ± 3.2	3.0 ± 0.1	15.6 ± 0.8			

* ± Standard error of the mean.

出所) 文献 1

脂質の合成過程には紫外線照射は影響を与えず (表 II - 5 - 3)、全可溶性糖は近紫外線照射では 2 種の糸状菌で逆の反応を示している (表 II - 5 - 4)。

表 II - 5 - 3

Effect of UV irradiation on total lipid in *P. notatum* and *A. flavus*, as mg/g fresh weight mycelium

Irradiation (min)	NUV irradiation:		Irradiation (min)	FUV irradiation:	
	<i>P. notatum</i>	<i>A. flavus</i>		<i>P. notatum</i>	<i>A. flavus</i>
Dark	26.5 ± 1.0*	25.1 ± 0.1	Dark	26.5 ± 1.0	25.1 ± 0.1
10	25.8 ± 0.8	24.2 ± 0.1	5	25.6 ± 0.9	25.3 ± 0.1
20	27.4 ± 0.2	25.6 ± 0.1	10	26.8 ± 0.2	26.5 ± 0.3
60	27.6 ± 0.7	26.3 ± 0.1	15	27.4 ± 0.1	
120	27.9 ± 0.1	29.0 ± 0.9	20	27.9 ± 0.1	26.8 ± 0.7
240	29.2 ± 0.1	26.5 ± 0.1	25	28.3 ± 0.3	
			30		26.8 ± 0.1

* ± Standard error of the mean.

出所) 文献 1

表 II - 5 - 4

Effect of UV irradiation on total soluble carbohydrate in *P. notatum* and *A. flavus*, as mg/g dry weight mycelium

Irradiation (min)	NUV irradiation:		Irradiation (min)	FUV irradiation:	
	<i>P. notatum</i>	<i>A. flavus</i>		<i>P. notatum</i>	<i>A. flavus</i>
Dark	65.4 ± 7.3*	55.9 ± 2.1	Dark	65.4 ± 7.3	55.9 ± 2.1
10	44.5 ± 4.2	63.5 ± 5.4	5	59.7 ± 2.3	54.0 ± 1.2
20	44.5 ± 3.2	52.0 ± 1.2	10	93.9 ± 8.3	71.1 ± 6.6
60	52.1 ± 0.2	53.0 ± 2.1	15	74.9 ± 5.2	
120	55.9 ± 0.7	53.9 ± 1.3	20	74.9 ± 2.1	82.5 ± 9.4
240	52.1 ± 0.5	107.2 ± 9.4	25	53.9 ± 1.0	
			30		86.3 ± 5.8

* ± Standard error of the mean.

出所) 文献 1

この実験から彼らは、紫外線照射によって生育曲線はわずかに低下するだけであるが、細胞内の代謝系には大きな変動が起こっていることを十分に表すものであるとしている。

(2) 臓器等における代謝系の変化

Gadhia²⁾らは、ハトの筋肉のコハク酸デヒドロゲナーゼ活性の放射線による変化を報告しており、亜致死線量の(400rad)のγ線全身照射したハトの大胸筋におけるコハク酸デヒドロゲナーゼ活性が低下し(表Ⅱ-5-5)、これは亜致死線量照射によるミトコンドリアの構造的または機能的な障害によるものであるとしている。

表Ⅱ-5-5

Showing the changes in the activity of SDH in muscle after different doses of γ-irradiation.

Post-irradiation time (Hours)	No. of Animals used	SDH activity Unit (μg formazan formed/mg protein/hour)		
		200	300	400
Control	14	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.08
1-h	21	0.97 ± 0.07	0.94 ± 0.04	0.96 ± 0.01
24-h	21	0.95 ± 0.05	0.91 ± 0.07	0.90 ± 0.09
48-h	21	0.93 ± 0.03	0.86 ± 0.09	0.78 ± 0.05 ^b
72-h	21	0.91 ± 0.02	0.81 ± 0.07 ^c	0.70 ± 0.09 ^a

Significant at P < 0.001 - a
P < 0.01 - b
P < 0.02 - c

出所) 文献 2

この他に、ПРОКУДИНАらは、視床下部のカテコールアミン代謝が乱れることに対する薬剤投与による正常化を報告している³⁾。

ТЯЖЕЛОВАは、異なった種の動物における放射線抵抗性と代謝過程の相関について報告しており、種々の動物のLD₅₀の値が基礎代謝値と水の代謝期間の積による全数と高い相関を示すとしている⁴⁾。

Huntらは、高線量の電離放射線照射後の脳におけるサイクリックヌクレオチドの合成と分解について報告している⁵⁾。彼らは、高線量の電離放射線を照射する

と3'、5'-環状GMPと3'、5'-環状AMPが減少するが、この減少が合成及び分解に関連した酵素活性の変化によるものかどうかを調べるため、グアニル酸シクラーゼ、アデニル酸シクラーゼ、cGMPホスホジエステラーゼ、cAMPホスホジエステラーゼの活性を10000rd照射10分後に調べたが変化は認められないと報告している。このため、cGMPとcAMPの減少は放射線の代謝酵素に対する直接の作用ではなく、未知の何かに対する作用の2次的な結果であると推定している。

【参考文献】

- 1) OSMAN M, MOHAMED Y A H, EL-SAYED M A, ABO-ZEID A: Microbios., Vol. 56, no. 227, 79-87(1988)
- 2) GADHIA P K, SHAH V C: J. Radiat. Res., Vol. 24, no. 3, 203-208(1983)
- 3) П Р О К У Д И Н А Е А, et.al., : Radiobiologiya, Vol. 21, no. 3, 417-421(1981)
- 4) Т Я Ж Е Л О В А В Г : Radiobiologiya Vol. 21, no. 3. 444-446(1981)
- 5) HUNT W A. et.al., : Radiat. Res., Vol. 85, no. 3, 604-608(1981)

6. 放射線被曝による細胞レベルでの影響評価

1) 細胞レベルでの放射線影響を評価する意義

(1) 放射線影響評価における単細胞系と多細胞系

細胞は、生物にとっての構造上、機能上の基本単位であり、分子レベルでの反応が統合され、個々の物質代謝の集大成としての自己増殖能と持つ「生命」と呼ぶことができる最小単位でもある。生物に対する放射線の影響を評価するという場合、生命機能としての最小単位である細胞において、はじめて生命活動に対する総合的な影響を評価することが可能となる。単細胞生物においては1個の細胞が1個の生物として環境に適応して生活しており、多細胞生物においては個々の細胞はその個体の一部を構成している。多細胞生物においては、個々の細胞は多段階の分化を経て個体の中で機能分担をしつつ、全体に対して調和を保っている。

単細胞生物に対する放射線影響を評価する場合には、その影響の評価系を確立することは比較的容易であり、生物＝細胞であるが故にその観測系を構築することはこれまでも行われてきた。単細胞生物においては、その単純さ故に放射線影響を評価する場合には、細胞レベルでの影響を評価する材料として適しており、また細胞レベル以下の影響、例えばDNA修復や代謝系への影響等を評価する場合にも多用され、これらの結果は生命活動全般への影響を推定するのに重要な知見を提供してきた。すなわち、単細胞生物は、細胞レベル以下の生命活動を研究する場合に、研究材料として有効であった。

しかしながら、近年では多細胞生物の細胞でも、バイオテクノロジーの発展により、ほぼ全ての細胞を培養系に持ち込むことが可能になり、多細胞生物の細胞を単細胞生物と同じようにシャーレの中で分裂増殖させることが可能になっていく。このことにより、多細胞生物の細胞も単細胞生物と同等の取扱いをすることによって、細胞レベル以下の現象を観測する実験系を構築することが容易となり、生物種によらず動物細胞、植物細胞共にその培養細胞が実験系として各種の実験に使用されるようになった。

一方、多細胞生物の個々の細胞に対する放射線の影響を評価する場合には、常に「個体の中にある細胞」として評価する必要がある。個々の細胞への影響さらに個体全体への影響を評価する場合には、個々の細胞は分化しており、担う機能も異なるため、その評価方法は単細胞生物におけるそれとは違い複雑なものとなる。

したがって、多細胞生物においては、細胞の種類、機能ごとに異なる影響を受

けているため、個々の細胞がどのような影響を受けているか、またその影響が個体の生命活動に対してどのような影響を与えているかという「個（の細胞）への影響」とそれによる「全体への影響」を評価するという2重の評価系を設定することが必要となる。

（2）多細胞系における細胞の分類

個々の細胞に対する放射線影響を評価する場合には、細胞を何らかの基準によって分類した後、細胞の種類ごとにその影響を評価していくことが必要になる。分類の方法としては、その細胞が生命活動に対してどのような機能を分担しているかということが一つの視点になり得るが、多細胞系における個々の細胞を担う機能によって分類していくことは非常に複雑であり、かつ機能分類による影響評価では分類軸が多すぎて放射線影響を評価するための細胞分類としては適切ではない。

したがって、細胞を機能分類して影響を評価するよりも、細胞を「放射線影響の受け易さ」で分類していくことが現実的である。実際、細胞が放射線影響を最も受けやすいのは増殖過程にある場合であり、増殖頻度すなわち、細胞分裂頻度が多い組織にある細胞は、DNA合成及びDNA複製が活発で、放射線照射により発生するラジカルの影響を最も受ける。これは、細胞の放射線感受性はその分裂頻度の程度に比例して高くなり、又低分化能の細胞ほど感受性であるという法則¹⁾としてよく知られている。そのため、多細胞生物系においては細胞をその「増殖性」によってカテゴライズし、その影響を評価するという考え方が放射線影響評価のための細胞分類軸としては優れている。細胞が卵から発生・分化し、最終的に一つの個体になり、成熟して体の成長が止まった生体では、組織を構成する細胞群の数は近似的に一定であり、定常状態にあると見なすことができる。定常状態にある生体の細胞群は以下に挙げるように「増殖性」から3群に分類することができる。

1. 非細胞再生系

末梢及び中枢神経系、卵子、心筋細胞

2. 条件的細胞再生系

肝臓、腎臓、膵臓、唾液腺筋肉等多くの組織の実質と間質の細胞

3. 細胞再生系

造血組織（リンパ系を含む）、消化管上皮、皮膚、口腔粘膜上皮、精上皮等の細胞

第1は、中枢及び末梢の神経細胞のように一度出来上がると生涯を通じて全く増殖しない細胞集団でこれは非細胞再生系と呼ばれる。

第2は、肝臓や膵臓の実質細胞のようにふだんはごく僅かしか増殖しないが組織全体としては生まれた細胞分で微増する細胞集団で、この集団は肝臓の部分切除のようなある条件では組織保全のために盛んに増殖するため、条件的細胞再生系と呼ばれる。

第3は、造血系、皮膚、消化管上皮、精上皮のように活発な細胞分裂により多量な細胞が生産される細胞集団で、細胞再生系と呼ばれている。人体においては第3の細胞再生系は表Ⅱ-6-1²⁾に示されるように死に至るまでに膨大な数量の細胞が生産され、同時に大量の細胞数が破壊されることでバランスが保たれている。このような細胞、組織には、細胞を生産するおおもとの「幹細胞」があり、これが体内において消耗品的な機能細胞集団である赤血球や白血球（造血系）、円柱上皮細胞や粘液細胞等（消化管上皮）を生産し続けている。

表Ⅱ-6-1 人体の細胞再生系の細胞生産

組織又は細胞	細胞生産率		
	細胞数 /日(億)	細胞数 /70年(兆)	kg /70年
皮膚上皮	0.7	1.8	86
消化管上皮	56	143.1	6850
リンパ球	20	51.1	275
赤血球	200	511.0	460
顆粒球	120	306.6	5400
血小板	150	383.3	40

出所) 放射線科学 Vol.30 No.3(1987), 坪内

幹細胞が何らかの原因で異常をきたすことにより、組織の老化やガンを含めた種々の疾病が生じる可能性があると考えられており、緊急時における生体の生命維持機構に幹細胞は深く関与しているものと考えられている。

「増殖性」の最も高い細胞再生系にカテゴライズされる細胞では、放射線影響が懸念されており、実際、致死量ではない程度の放射線を被曝した場合には、放

射線急性障害として末梢血中の血小板と白血球は漸減し、造血機能と免疫機能が障害をうける。これは血液細胞のおおもととなる幹細胞の活動が放射線によってダメージを受けたためである。幹細胞は放射線に弱く、100rad程度でその大部分は細胞再生能力を失う。被曝に伴う生体に対する急性障害の原因は、この幹細胞の死によるものとされている。このことは、マウスに致死線量を照射した後、正常の骨髄細胞を移植することによって証明されている。

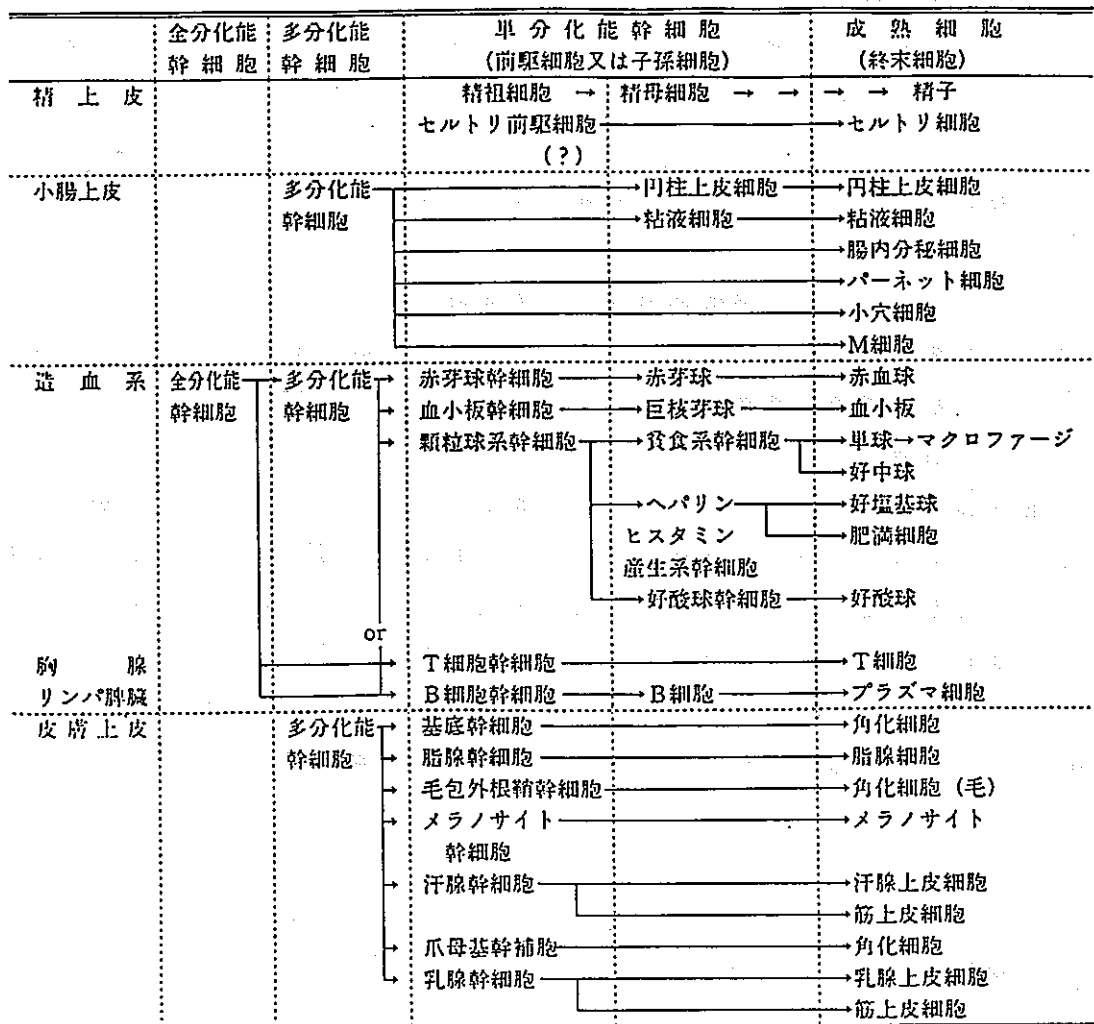
(3) 幹細胞の特徴

細胞再生系における元となる幹細胞のモデル的な概念を表Ⅱ-6-2に示す。
幹細胞は

- ①一つずつの幹細胞に各々の成熟細胞を対応させる多元説で説明される系
- ②一つの全分化能または多分化幹細胞から複数の異なる種類の成熟細胞が生まれるとされる一元説で説明される系

の2つの区分される。多元説で説明されるのは、精上皮であり、一元説で説明されるのは、小腸上皮や造血細胞である。幹細胞は、増殖して一つの自分と同じ分身を残すと同時に増殖能を持つ一つの子孫細胞を生じ、この子孫細胞が数回分裂し増殖能を持たない成熟細胞を生み出す。

表 II - 6 - 2 成体での主たる組織の幹細胞から終末細胞までの簡略図



出所) 放射線科学 Vol. 30 No. 3 (1987), 坪内

増殖能を持たない中枢及び末梢神経細胞にはガンの発生はないが、少しでも増殖能を持つ組織においてはガンが発生する。先の「増殖性」による分類による非細胞再生系以外の細胞には全てガンが発生することが可能性がある。すなわち、条件的細胞再生系や細胞再生系の細胞集団はガンの発生の母集団であり、細胞の増殖性そのものがガン発生に深く関与している。幹細胞の概念は、細胞増殖系においては重要であるが、条件細胞再生系の肝臓、脾臓、腎臓などの多くの臓器においては機能才能の寿命が数年から10年以上の期間にわたると考えられ、個体は成体になるまでに幹細胞から生じた機能発現する子孫細胞が一生涯の期間に数回分裂するのみで組織の機能と細胞集団数を維持することができると考えられることから、増殖度の低い組織の細胞集団においては、幹細胞を想定する意味は低い。

したがって、成体組織の幹細胞の存在は、増殖の盛んな細胞再生系の組織に限定され、多分化能の系では、消化管上皮、皮膚上皮、造血系の3つの細胞集団、単分化系では精上皮に限られる。このため、放射線による急性影響の評価においてもこの4つの細胞集団がそのターゲットとなる。

(4) 細胞レベルにおける放射線影響評価の意義

(1) で述べたように単細胞系及び培養細胞系においては、直接的に細胞として受ける影響の評価および細胞レベル以下の影響を総合評価することに細胞レベルにおける影響評価の意義がある。

一方、多細胞系においては、細胞再生系にカテゴライズされる細胞集団に対する影響評価とそれによる個体に対する影響を評価すること及びその影響の程度により、さらには一歩進んで幹細胞がダメージを受けた場合にその影響を修復するための方法を開発すること（骨髄移植が現在行われているがもっと進化した方法があるはずである）が多細胞系における細胞の影響を評価していく直接的な意義となる。また、条件的細胞再生系や非細胞再生系の細胞集団についても急性障害だけでなく、増殖過程以外の細胞の活動に対する影響を評価していくことも必要と考えられる。

2) 単細胞系における評価

(1) 生存率曲線（増殖死による影響の評価）

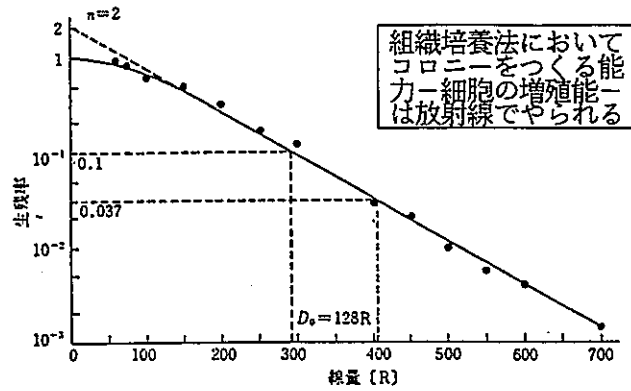
放射線による細胞の死は、2つの過程があることが知られている。一つは増殖死と呼ばれるものであり、1個の細胞が照射の結果として死ぬときにはすぐに死ぬのではなく、その細胞は次に分裂している間に死ぬかまたは分裂の後に死ぬかであり、細胞分裂を介して死に至る。これに対して、間期死は、分裂能力の低い細胞に起こるもので、照射をうけた細胞それ自体が細胞分裂をしないで死に至る場合である。極めて低い線量で死ぬ幹細胞や小リンパ球や胸腺リンパ球を除けば、肝、筋肉、神経細胞などの非再生細胞系や、条件再生細胞系においては、細胞が死に至るまでにはかなりの大線量を必要とする。

単細胞系における放射線影響評価は、極めて単純な方法として生存率によって、その影響を評価することが可能である。微生物、動植物培養細胞のコロニー形成能力によって、放射線の照射線量に対する生存率を測定することが行われる。こ

これらの細胞は増殖能力が強く、通常増殖死のタイプとなる。

図Ⅱ-6-1はヒトがん由来の培養細胞 HeLa S3 株の線量生存率曲線である。

図Ⅱ-6-1 ヒトがん由来の培養細胞 HeLa S3 株の線量生存率曲線



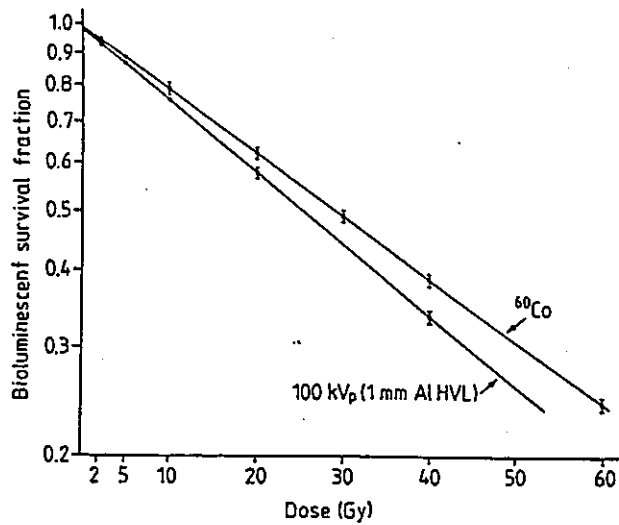
出所) Puck and Marcus 1956

生存曲線は片対数グラフでは線量が低いところを除いては直線関係が成立する。直線を示さない低線量の部分は肩と呼ばれ、肩線量を D_0 で表す。直線部分を延長し縦軸を交差する点を外挿数 (n) と呼び、外挿数は標的理論によると細胞内の標的数に対応する。様々な哺乳動物の細胞について同じ方法で生存曲線を求めると、正常細胞、がん細胞を問わず、胎児の細胞、成人の細胞を問わず、 n はほぼ 2 にあり、 D_0 は 0.8 ~ 2.5 Gy (80 ~ 250 rad) の間にある。

(2) その他の評価パラメーター

細胞死以外の評価パラメーターの特殊な例として、発光細菌を利用した系が報告されている³⁾。発光性細菌 Photobacterium phosphoreum は、海洋性細菌で通常生体発光を行っているが放射線照射によりその発光量が減少し、その減少が線量に逆比例することが知られている。このことを利用し、発光性細菌に放射線照射した場合の発光量の減少を測定することにより、照射された放射線量を求めることができる。図Ⅱ-6-2は、コバルト60及び100kVpのX線照射に対する2時間後の生存曲線を示しており、生存率と発光とをリンクさせることにより簡便な測定法を開発している。またこのような生物発光を利用することにより、通常は困難である異なる放射線の相対的なRBE値を求めることができ、この方法では複雑さを回避し、再現性の高い値を求めることが可能になる等の利点がある。

図 II - 6 - 2 生存・発光低下-線量曲線



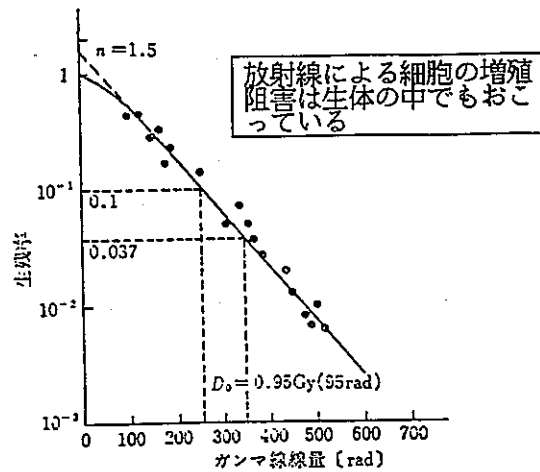
出所) 参考文献3)

3) 多細胞系における評価

(1) 脾臓コロニー形成法

多細胞系での個々の細胞に対する放射線影響を評価するために、細胞の増殖能力を生体内で調べる方法が開発されている。9~10 Gy (900~1000 rad) をマウスに全身照射すると、造血細胞が破壊され、脾臓も萎縮する。この X 線照射マウスに正常な同系マウスの脾臓または骨髄の細胞浮遊液を静脈内に注入すると、脾臓の表面に定着して増殖し、肉眼で数えられるようにコロニーが形成される。形成されるコロニーの数は注入された細胞数に比例するため、形成されたコロニーの数を数えることによって注入された細胞の増殖能力を調べることが可能である。図 II - 6 - 3 は、脾臓コロニー形成法を用いた線量生存曲線の例である。この例では、外挿数 1.5、直線分部で求めた 37% 生存率線量は 0.95 Gy (95 rad) であり、生体外の細胞でえられた値とほぼ同じである。

図 II - 6 - 3 脾臓コロニー形成法による線量と生存率との関係



出所) McClulloch and Till 1962

(2) 放射線照射時における幹細胞の挙動

幹細胞が放射線照射等によって失われた場合には、これを補強するシステムとして本来失われるべき細胞が再び元の幹細胞になりうる細胞があり、potential stem cell と呼ばれている。例えば、小腸腺こう下部にある14個の幹細胞のうち、放射線照射に対して細胞分裂中の5個が感受性であり、さらに細胞サイクルのG1期にある残り9個の細胞も更に線量が高くなると死に至る。この段階に至ると分化した細胞がUターンして幹細胞として増殖し、腺こうの保全に貢献する。このような細胞が potential stem cell である。腸上皮では、整然と層状に組織された幹細胞のヒエラルキーがあり、緊急時に腸上皮を保持する機構が働いている。このような幹細胞と分化した細胞の間の可逆性が生体の障害に対する防衛機構として機能しているため、多細胞系の幹細胞に対する放射線影響の評価は、その個体が生きた状態では困難であり、その動態を観測する系は開発されていない。

しかしながら、幹細胞に対する放射線障害を修復する機能は、細胞レベルでの損傷修復系として重要な研究ターゲットであり、細胞の分化のコントロールとの関連するため、極めて基礎生物学的な課題でもある。

(3) 今後期待される多細胞系における影響評価系

細胞に対する放射線の影響としては以下のような評価系がつくられることが望まれる。

- ・分化の途上にある生体（胎児）に対する影響の評価系
成長途上にある個体は細胞分裂が活発で影響を受け易いが分化の途上にある個体はどのように影響を受けているか？
- ・幹細胞のダメージの緊急評価系
放射線によって生体内の幹細胞がどの程度障害を受けているかを非破壊で観測することができれば、一つの細胞系に対する正味の放射線影響を評価することにつながる。
- ・幹細胞のダメージの回復の評価系
生体内の各種幹細胞は放射線によるダメージをどのように回復しているか？
- ・幹細胞の階層構造を利用した被曝緊急時の再生系細胞の補給と影響の最小化の方法の開発
幹細胞の体外培養と凍結による保存で緊急時に本人の体内に注入し、影響を修復する方法を開発する。これは、現在の骨髄移植という乱暴な方法ではなく、放射線障害を細胞レベルで軽減化する方法を開発することを目指す。
- ・非細胞再生系細胞群に対する放射線影響の評価系
神経系の細胞などが放射線照射を受けた場合にその活動に対してどのような影響がでるのかを観測する系を開発し、細胞再生系細胞群のように幹細胞を持たない細胞群に対する影響を最小化する条件を探索する。
- ・条件細胞再生系細胞群に対する放射線影響の評価系
肝臓、腎臓、膵臓など主要な臓器における条件再生を利用した影響の修復の可能性を探索するため、放射線影響が臓器の機能にどのように影響するか、またその影響は条件再生によって修復可能かを検討するための評価系を開発する。

【参考文献】

- 1) Bergonie, J. & Tribondeau, L.: Interpretation of some results of radiotherapy and an attempt at determining a logical technique of treatment. *Radiat. Res.* 11, 587-588, 1959.
原著は *Comptes rendus des seances de l'academie des sciences* 143, 983-985, 1906.
- 2) Fliedner, T. M. & Nothdurft, W.: Structure and function of stem cell-pools in mammalian cell renewal systems. In : *Proceedings of the 6th International Congress of Radiation Research*, Eds. Okada, S., Imamura, J., Terashima, T. & Yamaguchi, H. Japanese Association for Radiation Research, Tokyo. PP. 640-647, 1979.
- 3) Joseph Mantel et. al., *Phy. Med. Biol.*, Vol. 28, No. 5, 599-602 (1983)

7. 放射線被曝による損傷の修復、放射線耐性機構の解明

1) 損傷修復・耐性機構解明の意義

放射線に対する耐性が強い生物に関してその耐性機構を解明することで、人体に対する放射線の影響を最小化する方法に対する基礎的な知見を得ることが期待できる。現在よく知られている放射線耐性生物は微生物が多く、研究材料としては放射線抵抗性微生物が最も適しており、この実験材料から得られる耐性機構に対する知見は、より高等な生物とのアナロジーは期待できなくても基礎的な意味で放射線耐性機構に対する貴重な知見をもたらすものと考えられる。

2) 放射線耐性生物

(1) 各種生物の放射線耐性

ヒトは、約7 Gyの放射線を全身に浴びると1週間以内に死亡する。(SI単位系への移行により線量単位は、グレイに変更、1 Gy = 100 rad) 30日後のLD₅₀ (50%致死量)は、4 Gyで死なない場合でも発ガンやその他の晩発効果によって寿命が短くなると言われている。生物は一般に放射線に対して弱いとされているが、生物種によってその許容量は異なる。表II-7-1は各種高等動物のX線、γ線による50%致死量をあげたものである。

表II-7-1 各種高等動物のX線、γ線によるLD₅₀の比較

生 物	LD ₅₀ (rad)	文献 ^a	生 物	LD ₅₀ (rad)	文献 ^a
ヒ ト	~400 (推定)	1	野 生 マ ウ ス	1,100~1,200	3
サ ル	520~540	1	ポ ケ ッ ト マ ウ ス	1,300~1,500	3
ロ バ	230~310	1	ニワトリのヒナ	1600	4
ブ タ	190~310	1	ハ ト	3000	4
ヒ ツ ジ	210~350	1, 2	へ ビ	300~400	4
ヤ ギ	240	1	カ メ	850	4
イ ス	250~320	1	ト カ ゲ	1,000~1,200	4
ウ サ ギ	680~910	1	カ エ ル	700	4
モ ル モ ッ ト	280~490	1, 2	イ モ リ	500	4
ハ ム ス タ ー	590~800	1	キ シ ャ	1,500~2,000	4
リ ス	700	1	メ ダ カ	2,000~3,000	4
ラ ッ ト	800	1			
マ ウ ス	520~670	1			

^a : 総説的文献 (原著はこれから求めよ)

1: UNSCEAR 報告 1962. 2: 土屋武彦 1970 (哺乳類の比較に関する名解説).
3: Bond, V.P. 1969. 4: 江藤, 田口, 江上 1968.

一方、例外的に放射線に対して強い抵抗性を持つ生物が存在する。現在知られているのは、クマムシ類と微生物である。放射線抵抗性細菌は、ヒトの致死量の約700倍(5 kGy)の線量を照射されても、放射線の影響を全く受けない微生物であり、一方クマムシ類は系統分類上明確な位置を与えられていない緩歩動物の1門をなす生物で、50%致死量はヒトの致死量の1000倍以上あることが知られている。クマムシは環境に対する抵抗性が強く、温度に対する抵抗性は生活時で42℃くらいまでであるが、樽形をした潜伏状態のものでは、150℃で数分、100℃で6時間の処理に耐え、液体窒素で-269℃にしても長時間生命は維持される。また乾燥状態になると酸素消費量を生活時の0.16%にして通常の代謝系から酸素消費の少なくすむ代謝系に変更が可能であり、真空中(100万分の1 mmHg)でも死なないことが知られているがこのような異常環境に対する抵抗性の原因は非常に興味を持たれており、研究の進展が待たれる。

(2) 放射線抵抗性細菌

1956年に初めて放射線抵抗性細菌として分離されたのが、Deinococcus radioduransR1 で、20 kGy以上照射した牛肉の缶詰から赤色色素を有する球菌として発見された。

Deinococcus属には次のような特徴としては次のようなことが知られている。

- ・放射線に対して極めて耐性である
- ・グラム陽性菌には珍しくムコペプチド層の外側にカロチノイドや蛋白質や多糖を含んだ脂質層がある。
- ・細胞壁ジアミノ酸は通常のリジンではなくオルニチンであり細胞膜脂質成分の中では、C₁₅、C_{15:1}、C₁₇が多い。
- ・リゾチームで溶解しにくいがブタノール飽和緩衝液で処理したり、照射によって脂質層を破壊すると溶解するようになる。

主な放射線抵抗性細菌を表II-7-2に示す。

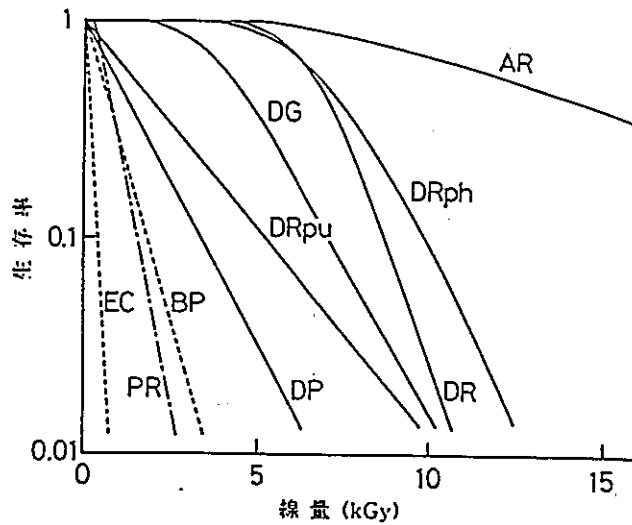
表 II - 7 - 2 主な放射線抵抗性細菌

学 名	起 源	文献
<u>Deinococcus radiodurans R1</u>	放射線照射した牛肉の缶詰	1)
<u>Deinococcus radiodurans Sark</u>	病院での空气中汚染菌として	2)
<u>Deinococcus radiopugnans</u>	放射線照射した鱈の切り身	3)
<u>Deinococcus radiophilus</u>	インド近海産の鰯	4)
<u>Deinococcus pugnans</u>	上野動物公園のラマの糞	5)
<u>Deinococcus proteolyticus</u>	下水汚泥	6)
<u>Pseudomonas radiora O-1</u>	古米から分離、細菌孢子と同じ レベルの耐性を持つ	7)
<u>Deinobacter grandis</u>	象の糞、G陰性細菌の中で最も 抵抗性が強い	8)
<u>Arthrobacter rasiotolerans P1</u>	ラドン温泉から分離、現在知ら れている最も放射線抵抗性の強 い細菌、世代時間9時間。	9)

各種放射線抵抗性細菌の放射線感受性を比較すると図 II - 7 - 1 のようになる。最も抵抗性の強い Arthrobacter rasiotolerans P1 では生存曲線が低下するのが 6 k Gy からであり、曲線の傾きは、Deinococcus radiodurans R1 よりも 5 ~ 7 倍も大きい。Arthrobacter rasiotolerans P1 以外は通常環境から分離された細菌である。

このような放射線抵抗性細菌の抵抗性のメカニズムは、放射線に対する生物の影響を考える場合の格好の研究材料と考えられ、他方面から研究が行われている。

図 II - 7 - 1 各種放射線抵抗性精動の放射線感受性



AR: *Arthrobacter radiotolerans* P-1,
 DRph: *Deinococcus radiophilus*,
 DR: *Deinococcus radiodurans* R1,
 DRpu: *Deinococcus radiopugnans*,
 DP: *Deinococcus proteolyticus*,
 DG: *Deinobacter grandis* KSO460,
 PR: *Pseudomonas radora* 0-1,
 BP: *Bacillus pumilus* E601(spore),
 EC: *Escherichia coli* B/r.

B.pumilus E601 の胞子は放射線滅菌の生物学的指標菌として使用されているものであり、E.coli B/r は大腸菌の中の放射線抵抗性変異株である。

3) 放射線被曝による影響を最小化するメカニズム

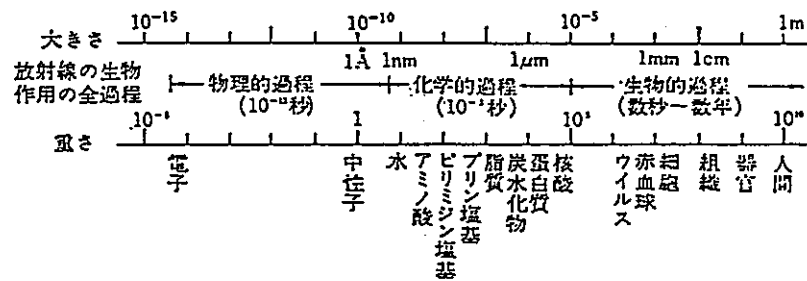
(1) 損傷修復系の研究現状

①放射線の影響

放射線は、その物理的な特性から紫外線や薬剤とは異なり選択性がなく、放射線のエネルギーは原子や分子に直接かつ無差別に与えられる。そのためその1次的な損傷は線量に比例して生体内のあらゆる物質に起こる。図 II - 7 - 2 に示すように物理的過程では、放射線のエネルギーが生物体に吸収されて、生体内の分子に直接無差別に電離と励起分子が生成する (10^{-13} 秒)。化学的過程では、電離や励起に

引き続いた1次生成物（イオン、自由電子、ラジカル）が生じ、イオンやラジカルはすみやかに周囲の分子と2次的に反応して生体分子の不活性化をもたらす（ 10^{-3} 秒）。その生体分子につくられた傷によって細胞の機能が変化し、生物の死や突然変異やガンを引き起こす。晩発効果では放射線を浴びてから生物学的な効果が現れるまでに長い潜伏期間があり、最終的な効果がでるまでに数年から数十年を経ることもある。

図 II - 7 - 2 放射線の生物作用の全過程



出所) 山口、放射線と人間

放射線感受性は、生体内の特定の標的物質の損傷によって決定されている。標的物質はほとんど全ての細胞においてDNAであると考えられているがこれは、標的理論を満たす生体物質がDNAしかないことによる。DNA損傷が多くなれば放射線感受性が高まり、少なくなれば減少する。放射線感受性を決定するのは、DNAの損傷を増減する要因（損傷を与える要因と損傷を修復する要因のバランス）である。DNAの損傷には、DNAは直接放射線を受けて生じる直接作用とDNAの周囲の物質が放射線の作用で変化しそれがDNAに作用する間接作用がある。乾燥状態の純粋な物質に対する放射線の作用は直接作用であり、間接作用は水があるときに主として起こると考えられている。生体分子は水溶液中で照射されると放射線が主成分の水分子に働いてラジカルや分子生成物を生じさせる。これらが標的分子を攻撃して損傷を与えるのが間接作用である。直接作用においても間接作用においても細胞一個あたりのDNA量に比例して増大するから、DNA量の多い生物ほど一般に放射線感受性が高く、このため大腸菌よりもヒト細胞のほうがはるかに感受性が高い。また、酸素が多いと放射線感受性は高くなる。酸素の存在によってDNAに損傷を与えるフリーラジカルが増大して間接効果が高まるためと理解されている。

② 損傷修復系の存在

これに対して放射線被曝によってDNAが損傷を受けるが生物はその損傷を修復する機能を有している。この損傷修復機能の違いによって損傷を受ける程度が同じであっても、損傷を減少させることによって生体へのダメージの程度は異なる。

DNAの損傷修復系は、まず紫外線損傷について大腸菌で発見され後にヒト細胞でも同様の機構の存在が確認された。一方、電離放射線による損傷については、修復能の存在は紫外線よりも以前に知られていたもののそのメカニズムについては未知の点が多い。修復にはいろいろなタイプがあるが、大別して損傷を取り除く方法（除去修復）と損傷のあるDNAから新しいDNAを複製して、新しいDNAを正常にする方法（複製後修復）がある。大腸菌でもヒト細胞でもこの両者が存在するが、除去修復は多くの生物で共通であるのに対し、複製後修復は真核生物と原核生物とで異なっていると考えられている。

③ 電離放射線のDNA損傷とその修復

紫外線に比べて、電離放射線の損傷とその修復についての説明は遅れている。その理由Hは紫外線はDNAに限られた種類の損傷を主に作るのに対し、電離放射線は、そのエネルギーをあらゆる化学結合を破壊する強さであるため、極めて多種多様な型のDNA損傷を生じさせることによる。現在最も重要な損傷と考えられているDNAの2重鎖切断でもフェージの簡単な実験系で致死効果の原因の40%と推定されているに過ぎない。それ以外の損傷としてはDNAの塩基の損傷が重視されているが、紫外線がピリミジンダイマーの生成やピリミジンの付加体のような特異的損傷であるのに対して、複雑でDNAの損傷は修復されないままに崩壊(degradation)は起こる。また複製後修復に関与している組み換えができないことが高感受性の要因となっている。一般に紫外線の場合には長い領域にわたって修復が行われるが電離放射線やアルキル剤による損傷の修復の時には、DNA鎖上の短い部分が切除・再合成される。

放射線の直接・間接作用によってDNAには種々の物理化学的な変化が起こるが水素結合の開裂が最も多く、次いで核酸塩基の変化が多い。塩基の中でもピリジミンのほうがプリンよりも感受性が2倍高い。概算すると塩基損傷が2~3個起こるとき、DNAの1本鎖切断が1個生じ、そのとき14~16の水素結合が開裂する2本鎖の切断の起こる頻度は1本鎖切断の6から8分の1である。

4) 放射線抵抗性細菌の抵抗性の機構

(1) DNA 修復系

放射線抵抗性細菌 Deinococcus radiodurans での放射線による DNA 切断効率は、50 eV で 1 本鎖切断が起こり、520 eV で 2 本鎖の切断が起こることが知られている。この効率は、大腸菌のそれぞれ 80 eV、530 eV とほぼ同じレベルであり、ピリジミン 2 量体の生成についても通常細菌での生成効率と大差はない。これらの事実は、放射線抵抗性細菌であっても他の生物と同じように DNA の損傷が起こり、耐性の原因となるような特別の DNA 保護機構があるわけではないことを意味している。Deinococcus radiodurans は、約 5 kGy までの生存率は変化せずこの範囲では、DNA に生じた損傷はすべて修復されていることになる。北山らは、Deinococcus radiodurans が通常の細菌では致死原因となる DNA の 2 本鎖切断を完全に修復することができることを証明している (S. Kitayama and A. Matuyama : Biochem. Biophys. Res. commun., 33, 418-422 (1968))。このような高い修復能力が耐性の原因である。

Deinococcus radiodurans では、DNA の 70% 以上が膜複合体として存在する (文献 10) が、0.5 kGy 以上照射すると一時的に膜から解離する。照射後の修復過程において DNA 膜複合体が再構成されるがこの過程はリガーゼ活性に依存して DNA 合成が始まる前に完全に終了する (文献 11)。このことから DNA は膜と 1 カ所で安定な結合をしていると同時に、切断された DNA 成分は膜と弱く、解離しやすいように結合することによって修復が起こりやすいように保持されているものと考えられている。損傷修復過程での細胞膜との相互作用の重要性は認識されているものの詳細については明かにされていない。

Deinococcus radiodurans の放射線感受性になった変異株を分離し、これを解析することで修復機構を解明するアプローチが行われているが、この方法によって、組み換え能力を失った変異株では、大腸菌と同程度の感受性を示すことから親株での放射線耐性の機構には組み換え修復が重要な役割を果たしていることが確認されている。しかし、別の変異株では、親株と同程度の修復能を持っているにもかかわらず感受性が高いことから別の未知の損傷修復機構が存在し、組み換え修復と未知の修復機構との相互作用によって耐性機構を作り上げていると推測されている。

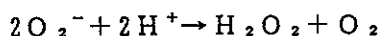
(2) 放射線の酸素効果に対するスーパーオキシドディムスターゼ (SOD) による影響最小化

生物の放射線照射による障害が酸素分圧の高いときに大きくなることは1921年のHolthsenの発見以来広く認知され、「酸素効果」と呼ばれてきている。放射線の酸素による増感はLETの小さなX線、 γ 線で顕著であり、LETの大きい放射線ではあまりみられない。また放射線照射時の酸素分圧が関係し、その前後での酸素分圧には影響されない。これらのことから酸素効果は放射線照射による短寿命の生成物と酸素との反応によることは明かであり、その一つは照射で生じる生体成分ラジカルと O_2 との反応によるヒドロペロキシドなどの形成による障害である。また、生体の大部分を占める水の放射線分解で生じる還元性の e_{aq}^- 、 $H\cdot$ は、 O_2 を O_2^- に還元し、酸素効果は O_2^- によることが多いと考えられている。

一方、空気中で好気性生物は酸素を電子受容体とするエネルギー効率の高い呼吸を行っているが酸素分圧を高めると障害がしばしばみられる。高い酸素分圧などで生ずる酸素毒性による障害が放射線障害に類似している。たとえばムラサキツユクサ花粉を100% O_2 、1時間処理すれば12,000RのX線照射と同程度の染色体異常を生ずる¹²⁾。

酸素分子そのものは酸化力も弱く生体成分を非特異的に酸化して障害をもたらすことはないが、酸素の還元分子種 (O_2^- 、 H_2O_2 、 $HO\cdot$)、励起状酸素分子 (1O_2) — 活性酸素は — その高い反応性のため酸素毒性の原因となり、酸素による障害が活性酸素生成系を加えればとくに顕著にみられる。活性酸素は生体内反応でも生成するが、空気中で好気性生物が生存できるのは21% O_2 中で生ずる程度の活性酸素を消滅させる機構をもつためであり、100% O_2 中ではそれを防ぎきれないために酸素毒性がみられると考えられる。

Superoxide dismutase (SOD) は活性酸素の一つである O_2^- を消滅させ生体を酸素毒性から防いでいる酵素であり、1969年Fridovich¹³⁾らによって発見された。SODはつぎの O_2^- の不均化反応を触媒するが、 O_2^- とSODとの反応速度はパルス放射線照射で求められ、その値 (約 $10^9 M^{-1} S^{-1}$) は水溶液中での拡散速度に近い。



SODは活性に関与する金属の種類によってCu、Zn²⁺、Mn²⁺、Fe-酵素の3種類がある。

酸素毒性は O_2^- とこれに由来する活性酸素によることが多いため、SODは酸素毒性を防ぐことが期待される。実際に細菌の生存^{14)、15)}、培養細胞の分裂¹⁶⁾などでSODによる障害の抑制が確かめられつつある。また、細菌を酸素分圧を高くして培養するとSOD含量が高くなること¹⁴⁾、葉緑体を光照射すると O_2^- が生ずるが

17) ミドリムシを光照射下で培養すると O_2^- SOD含量が高くなること¹⁸⁾なども、生体が酸素毒性をSODによって防いでいることを示唆する。

すでに述べたように水の放射線照射で O_2 があると O_2^- の収率が高くなるためSODは放射線障害をも抑制することが予想される。最近、DNAの放射線分解がカタラーゼとともにSODによっても低くなることが示され¹⁹⁾、またネズミにSODを注射することにより放射線による致死を抑制できることが報告されている²⁰⁾。一方、興味あることに放射線耐性菌のSOD含量は一般に高い値を示す²¹⁾。

以上の結果は酸素毒性と放射線照射の酸素効果をもたらす活性酸素として O_2^- が重要であり、SODはカタラーゼやペロキシダーゼなどとともに酸素による障害を防ぐための生体の持つ保護機構ということができよう。

5) 修復系の人為的な操作による生物の改変

物理化学的、生化学的環境変化の中に置かれている生物細胞は、その変化の状況に応答して適応するための多数の巧妙な防御系を有している。しかし、その適応において細胞が外的、内的変動を許容し、修正・修復できる範囲には、限界があり極大値を越えた「極限環境」への適応は通常の細胞には不可能である。そのため、物理化学的に特殊な「極限環境」に棲息可能な生物の適応機構を解明することは、生物機能をより高度に利用していくためにも重要である。

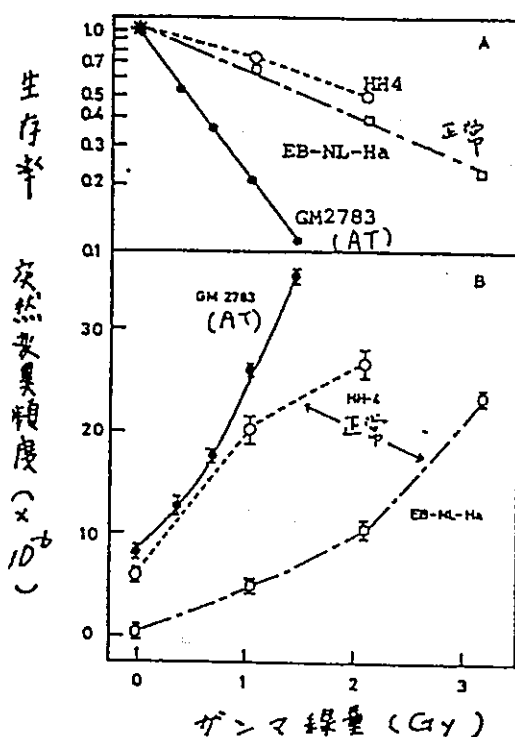
放射線耐性という「極限環境」への適応能力も、放射線耐性微生物が示す態様を生化学的、遺伝子工学的に解析し、細胞が「放射線環境」に適応するために内蔵している潜在的機能因子の特性を細胞機能および細胞形態の両面から解明することが必要である。このためには、異種間生物の比較と機能因子（放射線耐性因子）の同定だけでなく、放射線耐性因子としての修復系を遺伝子工学的に人為操作し、修復系を強化したり、弱体化したり、欠損させることによってその機能を確認することが必要である。また放射線耐性因子を通常環境でしか棲息できない生物に導入することによって、放射線耐性因子の機能を確認することが可能である。

また、既知の放射線耐性因子を除去することによって、未知の放射線耐性因子を探索したり、複数の放射線耐性因子間の相互作用を解明することも、遺伝子工学的には可能である。

一方、放射線に対して高い感受性を示す遺伝病としてアタキシアテランジェクタシア(AT)が知られており、AT患者の細胞は電離放射線に著しく高感受性であ

ることが判明している（図Ⅱ-7-3）。ATがなぜ電離放射線に高感受性であるかについては、DNAの修復除去が一部の患者の細胞で欠けているという報告の他に、放射線によって通常のDNA複製が抑制されるのに対してAT細胞ではそのような抑制が起こりにくいことが知られているがその分子的な機構は解明されていない。AT細胞は、ヒト細胞におけるDNA損傷修復系の研究材料として、高等動物細胞の突然変異誘発や除去修復、放射線の細胞致死効果への知見を提供するものとして期待されている。

図Ⅱ-7-3 正常細胞とAT細胞のガンマ線致死効果（A）と突然変異誘発（B）



6) 研究動向と研究の方向

放射線抵抗性菌の抵抗性の理由を解明するための研究が行われている。放射線抵抗性が獲得される要因として、細胞膜の構造や、大きな代謝系を構成している遺伝子修復系あるいは、ラジカル消去機能のある酵素などの複数の要因が考えられてい

るが、この分離された放射線抵抗性菌がどのようなシステムで耐性を獲得しているのかを解明することは、放射線に耐性でない生物の放射線に対する影響を最小化するシステムを解明することにつながる。

抵抗性の遺伝的な因子を解明するための一つの方法は、放射線抵抗性菌の遺伝因子を非抵抗性の菌に遺伝子導入し、非抵抗性の菌内で発現させることによって、抵抗性を獲得するならば、その導入した遺伝子が抵抗性を決定している因子として同定できることになる。ただし、この方法による放射線抵抗性を付与する遺伝因子の探索において疑問視されていたのは、現在の遺伝子操作技術においては2~3の遺伝因子を導入することは可能であるが、放射線抵抗性が付与されるためには複数の遺伝因子から構成される代謝系全体を遺伝子群として導入する必要があるのではという推定であった。

しかしながら、GlennらとLouisらは、ほぼ同時期に *Deinococcus radiodurans* の遺伝因子を大腸菌に対してショットガンクローニングを行い、大腸菌に対して放射線抵抗性を付与されることに成功している (図II-7-4) (文献22、23)。

図II-7-4 大腸菌への放射線耐性遺伝子の導入

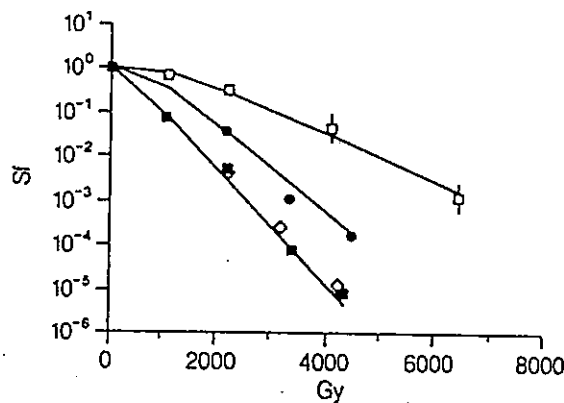


FIG. 1. Radiation survival curves of the form $S_f = 1 - (1 - e^{-D/D_0})^n$ were fitted to the data; S_f is the surviving fraction, D is the radiation dose in Gy, D_0 is the reciprocal of the log-linear segment, and n is the extrapolation number. The following D_0 values were obtained:

Organism	D_0 (Gy)
<i>Deinococcus radiodurans</i> (□)	850
<i>Escherichia coli</i> RR1 + pDR (●)	450
<i>E. coli</i> RR1 + pBR322 (without DR DNA) (■)	340
<i>E. coli</i> RR1 (no plasmid) (◇)	340

The standard deviations of the points are smaller than the symbols except where indicated.

Deinococcus radioduransの遺伝子が導入された大腸菌●は、導入されていない大腸菌□、■に比べて放射線に対する抵抗性が増している。彼らは、この遺伝子が大腸菌の修復系のリプレッサーに対するプロテアーゼであり、DNAの組み換えに関与しているRecA蛋白質をコードしている遺伝子に似ていることを指摘している。

このような方法で、クローニングされることから、放射線抵抗性を決定している要因は、一つの遺伝子だけでもかなりの程度有効であることが証明された。

またMontaudonら（文献24）は、放射線抵抗性菌Deinococcus radioduransの放射線感受性変異株を分離し、この変異株の脂質組成、脂質膜の流動性を解析することによって、感受性屁に株が膜脂質の変異株であることを示し、放射線抵抗性を決定しているのは、一つの遺伝的因子ではなく複数の遺伝的因子からなることを示唆した。

このように、放射線抵抗性の解析には、遺伝子工学的アプローチが有効であり、今後の研究の進展によって放射線抵抗性菌Deinococcus radioduransの抵抗性の原因が解明されていくものと期待される。

【参考文献】

- 1) A. W. Anderson, H. C. Nordan, R. F. Cain, (Parrish and D. Duggan: Food Technol., 10, 575-578(1956)
- 2) R. G. E. Murray and C. F. Robinow : 7th Intern. Congr. Microbiol., Stockholm, p. 427(1958)
- 3) N. S. Davis, G. J. Silverman and E. B. Masurovsky: J. Bacteriol., 86, 294-298(1963)
- 4) N. F. Lewis: J. Gen. Microbiol., 66, 29-35(1971)
- 5) H. Ito, H. Watanabe, M. Takehisa and H. Iizuka: Agric. Biol. Chem., 47, 1239-1247(1983)
- 6) M. Kobatake, S. Tanabe and S. Hasegawa: C. R. Soc. Biol. (Paris), 167, 1506-1510(1973)
- 7) H. Ito and H. Iizuka: Agric. Biol. Chem., 35, 1566-1571(1971)
- 8) H. Oyaizu, E. Stackebrandt, K. H. Schleifer, W. Ludwig, H. Pohla, H. Ito, A. Hirata, Y. Oyaizu and K. Komagata: Int. J. Syst. Bacteriol., 37, 62-67(1987)
- 9) T. Yoshinaka, K. Yano and H. Yamaguchi: Agric. Biol. Chem., 37, 2259-2275(1973)
- 10) A. D. Burrell, P. Feldschreiber and C. J. Dean: Biochim. Biophys. Acta, 247, 38-53(1971)
- 11) M. Dardalhom-Samsonoff and D. Averbek: Int. J. Radiat. Biol., 38, 31-52(1980)
- 12) A. D. Conger and L. M. Fairchild: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 38, 289(1952)
- 13) J. M. McCord and I. Fridovich: J. Biol. Chem., 244, 6049(1969)
- 14) E. M. Gregory and I. Fridovich: J. Bacteriol., 114, 1193(1973)
- 15) F. Lavelle, A. M. Michelson and L. Dimitrijevic: Biochem. Biophys. Res. Commun., 55, 350(1973)
- 16) A. M. Michelson and M. E. Buckingham: ibid., 58, 1079(1974)
- 17) K. Asada, K. Kiso and K. Yoshikawa: J. Biol. Chem., 249, 2175(1974)
- 18) 浅田浩二: 生化学, 48, 226(1976)
- 19) J. J. Van Hemmen and W. J. A. Meuling: Biochim. Biophys. Acta, 402, 133(1975)
- 20) A. Petkau, et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 65, 886; 67, 1167

(1975)

21) T. Yoshinaka, K. Yano and H. Yamaguchi: Agr. Biol. Chem., 40, 227

(1976)

22) Thomas J. Lynch, et. al.,: Radiation Research 120, 532-536 (1989)

23) Louis R. Barrows.: Radiation Research 120, 537-544 (1989)

24) Daniele Montaudon., et. al.,: Biochimie, 69 (1987) 1243-1250

8. 放射線被曝による遺伝情報の発現状態の変化

1) 放射線照射と遺伝情報の発現制御

生体が持っている遺伝情報は、構造遺伝子と制御遺伝子に大別できる。構造遺伝子とは蛋白質をコードしている遺伝子であり、制御遺伝子とは遺伝情報の発現をコントロールしている遺伝子配列を指す。生体は、放射線被曝に対応した変化を起こしており、その変化は遺伝情報の発現状態にも確実に影響しているものと考えられる。例えば、ラジカルを消去する物質を多く生産するようにそれらの代謝系を構成する蛋白質の遺伝子の転写が活発になったり、DNAの損傷修復を活発に行うために、損傷を修復する酵素群を多く発現させたり、DNA損傷を受けた結果、通常の代謝系を停止させたりといったことが起こっているものと考えられる。

究極的には、放射線照射による遺伝情報の発現制御の変化を捉えることによって、放射線照射に伴う遺伝子の発現のオンオフのスイッチングの変化を捉え、生体が遺伝的に持っている放射線照射に対応するためのツールを明かにすることが可能になると考えられる。現在、知られている放射線耐性機構のメカニズムもそれがどのような分子群から構成されているか、またどのような制御を受けているかについてその全容が明かになっている訳ではなく、放射線被曝への生体の対処プロセスを明かにする方法として遺伝情報の発現状態の変化を追跡することは非常に有効な方法である。

遺伝情報の発現状態を検出するには、対象となる遺伝子の状態には2種類がある。

- ①既に知られている遺伝子の発現状態を検出する
- ②未知の遺伝子の発現状態を検出する

①の既知の遺伝子の発現状態を検出することは、現在のバイオテクノロジーの手法で可能な範囲となっており、特定の組織の特定の遺伝子がmRNAへの転写の有無、またその転写量について定量することができる。

一方、未知の遺伝子の発現状態については、正常な細胞では転写されていないmRNAを選び出し、その遺伝子構造を決定することが可能である。原理的には可能であるものの技術的には困難な操作も多い。これらは、構造遺伝子の発現状態を観測するものであるが、構造遺伝子(OPEN READING FRAME)の発現している種

類と量を観測するものである。

これに対して、構造遺伝子の発現を制御している因子を特定することは、放射線照射を受けた生物の受ける影響を遺伝情報レベルで特定する上で、非常に重要である。すなわち、放射線照射を受けた場合にスイッチが入る制御機構によって支配されている遺伝子群は、ダメージを修復するための遺伝子群である可能性が高く、これらの遺伝子群を特定することで生体のダメージ修復系の道具立てを明かにすることが可能になると考えられる。現在知られているようにスーパーオキシドディムスターゼ (SOD) やメタロチオネインなどのような酵素の誘導においても特定のプロモーターやリプレッサーが機能していると考えられるが、放射線などにより受けたダメージに対する損傷修復系が特定のカスケード系を形成しているならば、生体防御機構の全体像を解明することへの第一歩となる。

2) 遺伝情報発現系のエラーとしてのがん

正常な細胞が放射線照射によってがん化することは知られているが、放射線による遺伝的なエラーが蓄積して、通常の生体調節機構からはずれたことによるというエラー蓄積説と潜在性あるいは外部からのウィルスによって引き起こされるウィルス説など細胞のがん化の原因については、様々な原因があることが知られている。がん細胞のもつ特性の一部はがん遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子によって引き起こされることが明かになっている。がん遺伝子と呼ばれる遺伝子の数も最近の研究の進歩によって非常に多くなっている。狭義のガン遺伝子は、動物に腫瘍を作るレトロウィルスのがん遺伝子およびその細胞側の counterpart であったが、その後ウィルス遺伝子でなくとも H I H 3 T 3 細胞をがん化する能力のある遺伝子を広義のがん遺伝子とする傾向にある。ところが代表的な増殖因子として知られる繊維芽細胞増殖因子 (F G F) の遺伝子が H I H 3 T 3 細胞をがん化することがわかり、通常の遺伝子でもがん遺伝子になりうるということが報告された¹⁾。また、mas というがん遺伝子はアンギオテンシンの受容体であることが判明し、血管の収縮・緊張性を制御している内分泌系の要素のがん遺伝子の産物であることも報告され²⁾、がん遺伝子という概念もあいまいなものになりつつある。

多くのがん遺伝子が同定され、その構造と機能が解明されてきた結果明かになったことは、一般にがん遺伝子の作用点は細胞増殖を制御する信号伝達系にあるということであった。信号伝達は、一つの細胞の表面に外部から増殖因子がやってきて、細胞膜上の受容体に結合したときから始まり、さらに信号は、G T P 結合性蛋白質や細胞内の蛋白質リン酸化酵素系、イノシトールリン酸系などの中間の経路を経て、核に伝達され、そこで遺伝子の発現調節や細胞分裂を制御するこ

とになる。そしてほとんどのがん遺伝子は

- ①増殖因子
- ②増殖因子の受容体
- ③GTP結合蛋白質
- ④細胞内蛋白質リン酸化酵素
- ⑤核内蛋白質

に分類される。逆にいうならば、FGFのような信号伝達系の要所にある遺伝子はすべて潜在的にがん遺伝子である可能性があると考えられるようになっている。

このように放射線照射による細胞のがん化も情報伝達系のどこかが正常に機能しなくなったために起こることであると考えられ、エラーの蓄積がこれら情報伝達系に起きた場合にがん化に進展しているものと推定されている。

情報伝達系の異常にも、転写量のみが増す異常であったり、遺伝子の構造に変化が起こり、生じた蛋白質の機能的変化ががん化をもたらす場合とがあるが、放射線の影響によるがん化を研究する場合には、これらを総合的に評価していくことが必要である。

3) 遺伝情報の発現変化の観測対象

遺伝情報の発現変化を観測する場合には、

- ①ある遺伝子の転写量の測定
- ②ある遺伝子のコードされた蛋白質の構造や機能の変化の測定
- ③特性の代謝系の代謝産物の観測
- ④特定遺伝子のDNA配列上の上流または下流にある調節配列の検討
- ⑤特定遺伝子と特定タンパク質の相互作用

の5つのアプローチが有効である。しかしながら、放射線照射の影響を評価していく場合にはどのような遺伝情報発現系を選択するか(どの遺伝子を選択するか)という評価対象の設定と実験系の構築が難しい。しかも放射線によるランダムな変異の影響は、上記のアプローチのいずれにも検出されるため、生体内の情報発現の変化に対するこれらの寄与を特定するためには、それぞれに対して検討を加えていくことが必要となる。

放射線照射による遺伝情報発現の変化を生きのまま観測していくためには、生

体を生かしたままでそのサンプルを摂取することができるような実験系が望ましく、とりわけヒトに対する放射線影響を評価していく場合には、サンプリングしやすい材料を評価対象にして、評価の母集団の拡大が可能であるような評価系の構築が望まれる。

また、モデル系としての実験動物、植物、微生物及びこれらの培養細胞を利用した研究や、遺伝的な疾患を持つヒト由来の細胞などを利用した研究も行われているが放射線防護という意味では、ヒトに対する影響評価系の構築が最も重要であろう。

9. 放射線被曝の影響回避方法の開発

1) 放射線防護剤の開発

放射線被曝による影響を最小限にするための化学的・生物学的な防護方法を開発するニーズは、原子力発電関係者のみならず医療において非常に強く、放射線治療に対する副作用を低減化するためのニーズは非常に強い。

放射線治療効果を上げるためには、腫瘍細胞を消滅させるばかりではなく、重篤な正常組織に障害を起こさせないことが前提となる。この目的を遂行するために、照射野に含まれた健常組織障害の発症を軽減させる薬剤、あるいは放射線治療で生じた各臓器障害を改善させるための薬剤などが利用されている。広い意味では、いずれも放射線防護的作用を持つ薬剤であるが、通常、放射線防護剤と呼ばれるものは、照射されて生じた化学反応を阻止して、引続き起こる生物反応を防護する働きのある物質のことを意味している。その代表的な物質がSH基を持った化学物質である。

SH基以外でも放射線防護的に作用する物質はビタミンE、Cなど種々存在する。まず第一にあげられるものとしては、酸素効果を利用したもので、血管を収縮させて酸素の供給量を減らす薬剤で、アドレナリンがその代表である。腫瘍血管はアドレナリンに反応しないので、正常組織のみの血管が収縮することになり、放射線治療効果を高めることが期待され臨床でも応用されている。その場合、局所への動脈注射がより有効である。一酸化炭素を使用して酸素を奪う方法もあるが、臨床的には問題が多い。第二には、温度効果を利用するもので、皮膚を局所的に冷却する方法もしばしば用いられている。全身的な冷却効果をもたらすものとしては麻酔がある。

現在のところ臨床では、体温低下を期待して麻酔剤を使用することはないが、小児患者や術中照射の患者で麻酔がかけられた場合には、正常組織は低体温となり、結果として防護的效果が生じている可能性がある。

ところで、正常組織に対して放射線の作用を防護したとしても、腫瘍組織に対しても防護的に作用する薬剤では、放射線治療効果を高めることにはならない。ここに放射線防護剤として臨床応用されている薬剤が少ない最大の理由がある。

なお、放射線によって生じた正常組織障害を治療する薬剤は、臨床で応用されているだけでも、利尿剤、消炎剤、ステロイドなど多数あるが、これらの薬剤は、放射線防護剤とはいわずに、放射線障害回復剤とも呼ぶべきものに含まれる。

2) 放射線防護剤の現状

古くからよく知られている放射線防護剤は、SH基化合物（SH化合物）である。薬剤としてはシステイン、シスタミン、グアニン等である。シスタミンは二硫酸塩誘導体であるが、生体内では、SH化合物として作用すると考えられている。SH化合物の作用機序に関しては必ずしも明らかにはされていないが、遊離基掃除人とする説が有力である。生体が照射を受けると遊離基が形成される。この遊離基 $F\cdot$ は反応性が強く、特に酸素が存在すると、 $F\cdot + O_2 \rightarrow FO_2\cdot$ となり、より反応性の強い物質となって、生物効果を発揮する。この反応中にSH化合物が存在するとSH基は酸素と遊離基を奪い合い、遊離基と結合して反応性の弱い物質に変化させるために、遊離基掃除人と呼ばれるわけである。

なお、この反応は一般に放射線治療で使用されているX線、電子線、 γ 線など電子密度の低い放射線では有効であるが、電子密度の高い（高LET放射線）中性子では効果は乏しく、 α 線ではほとんど効果は認められない。なお、遊離基が反応性を失うのはナノ秒といわれているので、照射後にSH化合物を投与しても間に合わない。

放射線治療効果を向上させるための手段として、放射線防護剤を使用する目的は、放射線治療でさけることの出来ない放射線障害を軽減させること、あるいは放射線障害を発症させないで腫瘍組織に大線量を照射して腫瘍の制御率を高めることにある。ところで臨床的にもっとも問題となるのは、腫瘍組織と正常組織とで反応に差異がなくは治療効果の向上を望むことはできないことである。それには腫瘍組織と正常組織との間に薬剤の吸収に差があるか、あるいは同じ程度の薬剤が吸収されたとしても放射線防護効果に差異が生じるか、いずれかの場合のみ臨床的効果が期待できるわけである。一般に腫瘍組織への血流は不良であり、その結果として腫瘍組織の酸素濃度は低いことが多くなる。前述のようにSH化合物は、酸素の存在する場合により効果的に防護効果を発揮するので、腫瘍組織に対するよりも正常組織に対して、より防護効果を発揮する可能性が高い。

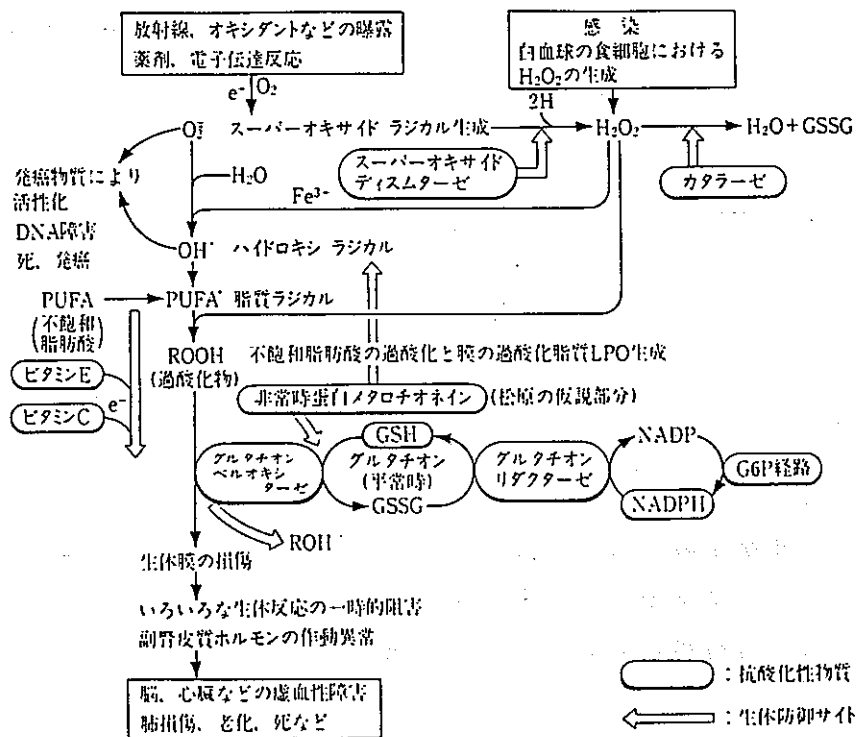
3) 放射線防護剤開発の方法論

(1) 生体内の防護メカニズム

生物は環境からの様々な衝撃の中に曝されている。放射線、化学物質、感染、異物などの日常的な各種の侵襲に生物が打ち勝って生存しているのは、生体が非

常に巧妙で強力な防護機構を備えているからである。放射線、酸素、オゾン、二酸化窒素などのオキシダント、異物やある種の発ガン物質等の生体に対する障害やそれに対する防御のメカニズムは、基本的には共通の部分が多く、その機構は図Ⅱ-9-1のように整理することが出来る。すなわち生体が放射線やオキシダントに曝されると、これらは直接にDNAなど生物学的に重要な物質を傷害する他に、空気中の酸素や細胞中の水と反応してスーパーオキシド・ラジカル $O_2\cdot$ や水酸ラジカル $OH\cdot$ を生成し、反応性の強い $OH\cdot$ は、脂質ラジカルの生成を介して生体膜の成分であるリン脂質に含まれるアラキドン酸などの不飽和脂肪酸の過酸化を起こす。これらの衝撃に対する防御のサイトは、図Ⅱ-9-1に示すように、SOD（スーパーオキシドジスムターゼ）、カタラーゼ、ビタミンE、グルタチオンペルオキシダーゼ系などがある。

図Ⅱ-9-1 生体におけるフリーラジカルの産生と化学的生体防御機構



出所) 松原ら

(2) 放射線防護剤の評価系

防護剤の真の評価は、慢性障害で行われることが望ましい。しかし、慢性障害

を研究することは、動物実験でも困難であり、ヒトではまた種々の要因が関与するため、防護剤の正しい評価をすることは容易ではない。

放射線障害に対する防護効果の検定には、30日後生存率が基本的な方法として採用されている。この方法で再現性のよい結果を得るためには、かなりの数の（1群40～30匹）実験動物と、30日の観察日数を要する。Yonezawaらは、血小板数の回復が30日後生存率とよく対応していることを発見し、これを用いた検定法を提案している。具体的には、ケージあたり10匹のマウスを2ケージ用意し、同一ケージの動物の半数を投与群、半数を対照として、X線照射後14日目の血小板数に差があるかどうかを判別する。必要な動物の数は1/3程度に、また日数も半分に短縮できる。

この他の方法として、照射によって生じる唾液の分泌抑制の程度と、照射された耳下腺へのガリウム-67集積の程度を経時的に追跡することなどが行われている。

SH化合物を用いて放射線障害の軽減の度合を比較する基準としては、線量減少率（dose reduction factor:DRF）が用いられている。これは薬剤を使用した場合と、薬剤を使用しない場合で同じ効果を生じるのに必要な線量の比をくらべるもので、前述のシスタミンでは1.8との値が報告されている。

（3）放射線防護剤の具体例

① SH化合物

Yugas¹⁾らは、シスタミンの誘導体であるアミホスチン（WR-2721）を発見し、腫瘍組織よりも正常組織により防護効果が高いことを見いだした。動物実験でのDRFは2.7程度であったという。その後、多くの研究者によってWR-2721に放射線防護効果が存在することが追認され、広く臨床治験が行われた。しかしその結果は、いずれも期待されたほどの臨床効果は認められず、少なくともわが国においては中断された状態にある。

② メタロチオネイン（metallothionein）

Matsubara²⁾は、照射前に肝臓でMT（metallothionein）を合成するように処置されたマウスは放射線に対してより大きな抵抗力を有することを見いだした。すなわち、Mn、Cd、Znを皮下注射したマウスはLD50

レベル（6～8 Gy）の線量に対し抵抗が増大した。実験結果から、生体の放射線防護機能はMTの生合成と密接な関係を有し、またMTは放射線誘導過酸化物のスカベンジャーとして作用することが分かった。

ただし、この放射線防護効果には、金属負荷自体の生体影響も絡むので今後共多面的な検討が必要である。

③スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）

Peng³⁾らは、ショウジョウバエのスーパーオキシドジスムターゼ（活性の高い方から順にS、F、Nの3つの型を持つ）について、電離放射線放射による自然淘汰の実験により、幼虫の生存能力の計測、世代による酵素型の度数変化を調査した。スーパーオキシドジスムターゼは、ショウジョウバエにおいても放射線防御の酵素として働いていた。実験により、高活性S型遺伝子適応が増加した。よって、野生群中のS/F多形態は適応機能を示していると考察している。

（4）味噌

伊藤⁴⁾は味噌の、放射線障害への効果を調べた。実験はマウスを用いて行った。中性子照射は腎臓と肝臓を肥大させるが、このことは味噌食給餌によりかなり防ぐことが出来た。またアイソトープのヨウ素131とセレン134を投与したもののについて、体内放射能を調べたところ、味噌食給餌により血液、腎臓、筋肉で体内放射能が低下した。また、大量の放射線に対しては味噌食給餌の効果はなかった。

4）今後の課題

放射線防護剤として、日常臨床に確信を持って使用されうる薬剤は未だ開発されていないといっても大きな誤りはないであろう。

放射線防護剤の開発は、動物実験のレベルでDRFが2.0以上であるものが求められている傾向があるが、臨床的な立場からは、治癒するか、再発するか、あるいは放射線障害が発症するかしないかは、わずか10%程度の照射線量の多寡に左右されているので、DRFは1.1でも十分に臨床効果が期待できる。したがって、少々の薬効は劣っても副作用の少ない薬剤の開発が強く望まれる。

その意味では、副作用の多い医薬品には共通の課題である、ドラッグデリバリ

ーシステムが重要となっている。目的とする医薬品を標的とする臓器や体内に必要なだけ供給する投薬方法の開発が重要になっている。

Sodicoff⁵⁾らは、アミホスチン(WR-2721)を用いて放射線防護剤の経皮吸収について調べた。すなわち、ジメチルスルホキシド、ジメチルホルムアミド、プロピレングリコールなどに溶解した14C-WR-2721と14C-システインの吸収を無毛マウス皮膚で水に溶かした場合と比較した。その結果、適当なベシクルを選ぶことにより、水よりも効率よく角質層障壁を破って皮膚全層で放射線防護剤の吸収を高めることが出来たと報告している。

また、放射線防護剤として使用できる化合物の中には、天然物とりわけ食品の中に含まれる成分を探索することが必要であると考えられる。味噌が低線量の放射線障害に有効であることは一つの方向性を示している。日常的に食品として摂取している成分の中に放射線防護にとって有益な物質が含有している可能性があり、食品中のその有効成分を同定・分離することにより、その成分を強化した食品を放射線被曝の危険がある場合にはあらかじめ摂取しておくことで被害を最小限にできるなどの効果を期待できる。

生体内にある防御システムを強化する方法も考えられる。生体内において防御機構を担っている酵素や化合物を体内に投与することにより、ヒトが本来持っている機構を強化することで放射線による障害を低下することも可能性としては検討するべきであろう。これが、生体内物質を生体内で誘導合成させることよりも直接的であり、誘導合成させるために生体に他のストレスを与えるよりも安全に放射線障害を軽減化できる可能性があるため、生体内物質の外部での増殖及び体内への投与という方法も今後開発されてくるものと考えられる。

【参考文献】

- 1) Yuhas, J. M. and Storer, J. B.: Int. J. Radiat. Biol. 66: 233, (1969)
- 2) MATSUBARA J.: Health Phys: Vol. 55, no. 2, 433-436 (1988)
- 3) PENG T X, MOYA A, AYALA F J.: Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 83, no. 3, 684-687 (1986)
- 4) 味噌の科学と技術 Vol. 37 no. 7, 218-222 (1989)
- 5) SODICOFF M, LAMPERTI A, ZISKIN M C.: Radiat Res., Vol. 121, no. 2, 212-219 (1990)
- 6) YONEZAWA M, KATOH N, TAKEDA A.: 放射線生物研究 Vol. 22, no. 2, 173-175 (1987)

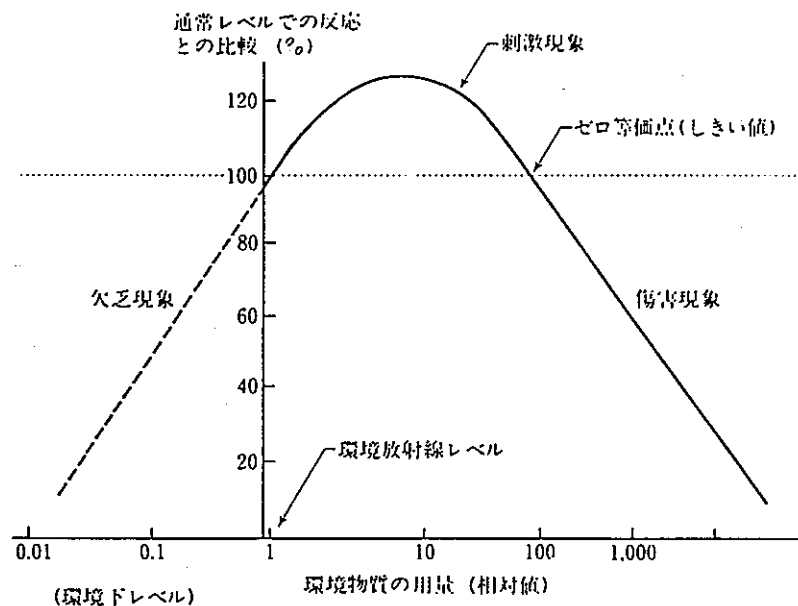
10. 放射線ホルミシス

1) 放射線ホルミシスの概念とその解釈

ホルミシスとは、生体が自身の恒常性を維持する (homeostasis) ために引き起こされた自然的防御反応をいい、高レベルの被曝では重大な障害を与えるような有害要因でも、低レベルの場合は自然な形の刺激として観察される現象と定義される¹⁾。

この場合低レベルとは、生物が何万年にもわたる進化の過程で、自然淘汰のプロセスを経て、適応するに至ったレベルをいう。たとえば、自然の免疫機構は、微生物その他から発生する非常に微量な菌体や毒素からの刺激に反応して活性化されるし、微量放射線によってDNA修復機構が誘発される現象、その他キニーネ、カドミウムなど微量物質による刺激効果など化学的ホルミシスの例などが挙げられる。

T. D. Luckey²⁾ は、「低線量の放射線の存在は生理的に好ましい影響を与える」という推論を示した論文を発表した。彼は約200の文献を検討し、数多くの動物実験研究データをしらべたところ、微量の放射線被曝は、かえって動物の成長、生殖、健康、寿命、感染への抵抗、創傷治癒などに好影響を示しており、ホルミシス (害を与えない程度の薬剤や刺激によって引き起こされる生体への有益効果) という概念を、放射線影響の場合にも持ち込めるとし、図II-10-1に示すような、自然放射線量以下の低線量も加味した「完全型の量-反応曲線」を提唱した。

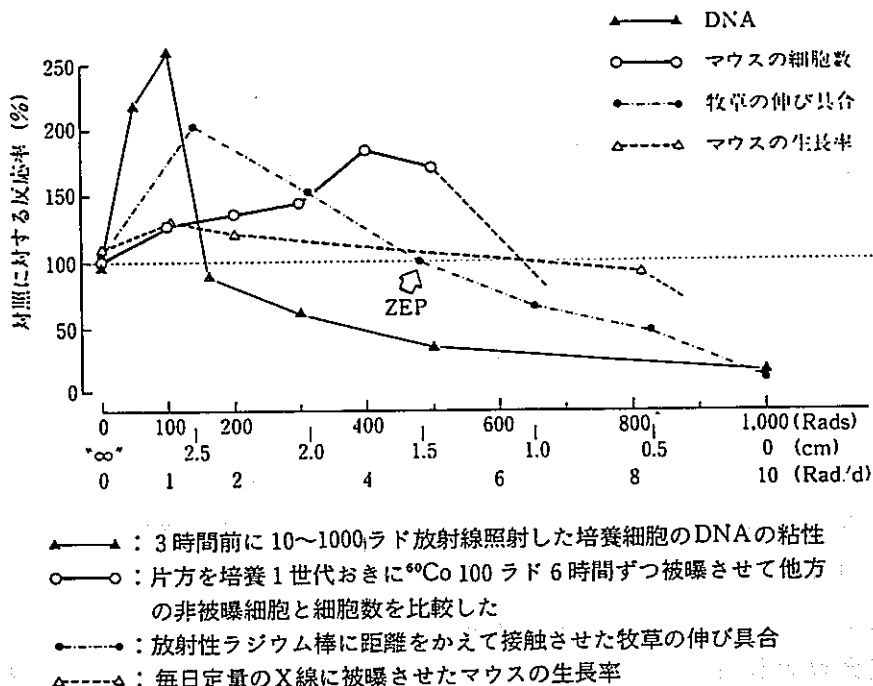


図II-10-1 高等動物への環境要因の慢性被曝における仮想的完全型量-反応曲線

出所) T. D. Luckey

線量効果曲線は、上に凸の曲線で、バックグラウンドの環境放射線のみ存在するときの線量をゼロとすると、生体反応は線量の増加に伴い上昇し、極大に達した後低下する。このとき反応量は線量ゼロのときと同じになる線量をゼロ相当点（ZEP）と呼び、この点と線量ゼロの間では、放射線の間では放射線の効果は、正となるがゼロ以下とZEP以上の線量域では、ともに負となる。これはZEP以上の線量では障害が発生し、環境放射線以下の線量では有効な刺激を与えるのに不十分であるため、反応が低下するというモデルである。ZEPから線量ゼロの点では、生体機能を活性化させることを意味している。すなわち、放射線照射による刺激作用は環境放射線よりかなり高いレベルで認められるということをも主張した。たとえば典型的な放射線ホルミシスとして動植物の成長が低線量の放射線で促進されることが知られている（図Ⅱ-10-2参照）。

図Ⅱ-10-2 低線量域の放射線照射による刺激効果の例



反対に、放射線欠乏症としては、異常な低成長、身体的発達の遅滞、生殖能の低下、免疫力が落ち感染に弱くなる、食欲減退、寿命短縮などが考えられるという。

Luckeyの主張は、

- ・ 低レベル放射線被曝はガンや白血病の発生を抑制する
- ・ 低レベル放射線被曝は動植物の増殖力を増す
- ・ 低レベル放射線被曝は細菌感染症に対する抵抗力を増す
- ・ 低レベル放射線被曝は老化を抑制し、寿命を伸ばす

の4点に集約される。哺乳動物の最適被曝は連続的被曝の場合でも、現在の自然放射線レベル(200mR/年)の約10倍であるとしている。

このような現象が起こる原因を、進化的な過程から獲得された生物の一種の適応の結果と解釈するか、1世代中の馴化と解釈するかで大きく分かれるが、遺伝的に獲得されている現象であると考えられている。突然変異とそれに続く淘汰の結果として、自然放射線に対してその利用系と対応系を具備しており、放射線ホルミシスはその利用系の稼働であるとの解釈もある。

放射線ホルミシスを議論する場合に、その放射線は低線量として議論されているが、自然放射線程度でも人体内の細胞は毎秒200万個以上が放射線の直撃でこわせれ、生きた人体内ではそれが常に修復または細胞交代して全く無害に生き延びていることを考慮すると、生物は放射線によって引き起こされる電離や励起は相当な有効性を持って生体の代謝系との相互作用を行っているものと考えられる。しかしながら、放射線に対する対応系としての影響修復系の能力の範囲内での相互作用においては、現在の観測技術では検出が困難であるという理由で低線量の放射線はその影響力を低く評価されてきた。

微量放射線によって起こる成長促進や細胞増殖が促進された場合には、その現象は多くの代謝系が変動した結果としての総合的な現象である。ある代謝系は阻害され、ある代謝系は活性化されているのであり、放射線に対する感受性が高い系から変動し、変動を受けたものが代謝系において重要な役割を果たしている場合にはその系全体が影響を受けることになる。例えば、放射線によって呼吸系の酵素に対して阻害がかかる場合には、その呼吸系全体が停止し、その補償として発酵系に切り換えが起こり、その結果として発酵産物や化学エネルギーが成長促進などプラスの作用に有効に働くのであれば、ホルミシス効果として観察されることになる。またホルミシス現象を遺伝情報の発現として捉えるならば、放射線照射によって作動する対応系(例えばDNA修復系など)の発現とプラスの作用をする遺伝情報系が連動して発現するように遺伝情報系の階層構造が形成されており、対応系とリンクした遺伝情報発現の制御が行われた結果がホルミシス現象であるという解釈も成立する。しがしながら、これらの解釈は仮設の域をせず、現状の研究レベルはホルミシス現象の観察と確認だけを行っている段階であり、メカニズムの解明なくしてこれらの解釈も意味をなさない。放射線ホルミシスは、環境と生命の相互作用を解明する糸口であり、生物学上の大テーマであると言っても過言ではない。その解明の方法論は、分子生物学的なミクロな視点から疫学的なアプローチまで放射線と生体に対する知見が総動員される総合科学といえる。放射線ホルミシスは、ストレス応答の一種であり、放射線防護や農業利用や健康増進といった放射線の積極的な利用という視点からもそのメカニズム解明のインパクトは大きく、基礎的な研究の進展が望まれている。

2) 放射線ホルミシス現象の実証

(1) ホルミシス解明のアプローチ

放射線ホルミシスを実証しそのメカニズムを解明していくにあたっては基本的に2通りのアプローチがとられている。

- ① 特定の表現形に着目し、微量放射線に対して敏感に反応する実験系を構築し、現象を観察すること
- ② 特定の表現系に着目はするが実験系は構築せず、疫学的なアプローチ等によってその現象を観察すること

前者は、微量の放射線に対する影響の観測という意味でホルミシスのメカニズム解明に対して必要なアプローチであるが、影響を評価する表現型のみを追跡するため、生体に対して実際に起きている現象をトータルに捉えることができず、ホルミシス現象という生体のホメオスタシスの一環を捉えるには部分的過ぎる点に欠点がある。

一方、後者はトータルな現象面を追跡するため生体全体に対する影響は評価できるが、調査した対象の個人差などの統計的なゆらぎによって科学的に影響の有無を判定することは一般的に困難である場合が多いという欠点がある。統計的ゆらぎを小さくするために、母集団を拡大することも困難である。そもそも目に見える現象として影響を捉える場合には微量放射線が生体に対して与える影響を観測してもその変化の感度が良好でないことが多い。

①、②のアプローチは現段階においては別個に行われており、これら2つの観測の相関でホルミシス現象の実証は行われているが、両者をつなぐ観測手段を開発することが必要とされている。

(2) 観測対象となる表現形と生物

ホルミシス研究を行う上で重要であるのは、どのような表現形として観測し、かつ最終的にどのような点に利用可能であるかという点である。放射線防護などを考慮する場合にはヒトが対象となるが、同じ哺乳類でもヒトに対する放射線の影響とマウスに対する影響が異なるため、実験動物だけでなく、ヒトに対する疫学的なデータと比較できるような表現形を選択することが望まれる。またホルミシス現象のメカニズムを解明するためには、より単純な実験系の構築が必要であり、生物全般を観測対象生物として同一の表現形に対する影響を評価する実験系も必要となる。

表現形の選択においては、分子レベルの損傷に対する修復機能の適応反応、酵素活性や代謝系に対する影響、細胞レベルの損傷に対する修復機構の適応反応、および免疫機能に対する影響、発ガン抑制などに対する低線量放射線の影響などがその対象となる。ホルミシスの実証初期においては植物において発芽、成長促進など「結果的な表現形」に対する影響が観測されてきたが、現在では発芽や成長促進においてどのようなファクターに対して影響を与えているために、ホルミシス現象が起きているのかを解明することが求められているため、分子生物学的な観測手段の適用が必要である。また観測対象の設定にあたってはその観測を行うことの目的を明確にしておくことも必要である。放射線ホルミシスにおける観測対象は極めて多岐にわたるがその枠組みを表Ⅱ-10-1に示す。

表Ⅱ-10-1 放射線ホルミシスの観測対象の枠組み

生物種\表現形レベル	分子	高分子	酵素	細胞	……	個体	測定目的
微生物							
原生動物							
藻類							
植物							
動物			★				
ヒト							
測定目的							-----

マトリックスの中には観察する表現形が入る。例えば動物細胞のチミジンキナーゼの酵素活性という表現形を測定する場合には、表現形レベル「酵素」の列に入り、それが生物種「動物」の行に入る（★印）。また今後の放射線ホルミシス研究にあたってこの中の一つのマトリックスを選択する場合には、特定の生物種を選択した目的（動機あるいは根拠）と特定の表現形レベルを選択している目的（動機あるいは根拠）が明確であることが必要である（ある現象を観測してホルミシスであるというだけでは、メカニズムの解明にはならない）。

表現系レベルが個体の場合が最も観察しやすいという理由によってよく研究されており、観察する表現形の内容も増殖速度や発芽率、成長速度などが多い。個体の場合の例を表Ⅱ-10-2、個体未満のレベル場合の例を表Ⅱ-10-3にあげる。

表Ⅱ-10-2 個体レベルにおける表現形観測の例

生物種\表現形レベル	個体
微生物	増殖速度
植物	放射線耐性
動物(細胞)	発芽率
	生長
	収量
	寿命
	放射線耐性の誘導

表Ⅱ-10-3 個体未満のレベルにおける表現形観測の例

生物種\表現形レベル	高次機能
動物(細胞)	免疫機能
	抗ガン機能

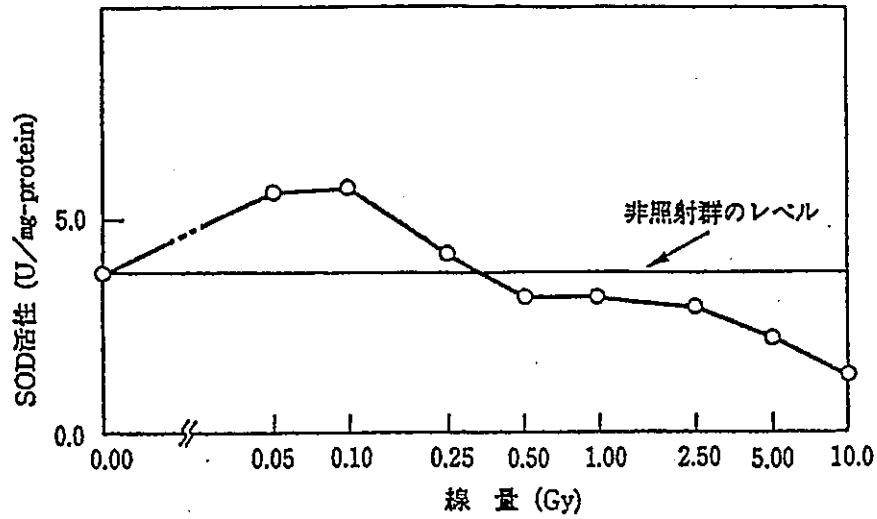
これらは、実験系としては単純でホルミシス現象の実証は可能であるが、そのメカニズムの解明には意味をなさない。低線量放射線の生体に対する作用は、照射によって細胞内外に生じた活性酸素などのラジカルによる間接作用が主体であると考えられており、その初期作用とホルミシス現象との因果関係を解明することがメカニズム解明の糸口となる。そのため、ラジカルの影響が直接観測できる実験系においてホルミシス現象を解析することが必要となっている。例えば、生じたラジカルの毒性を弱める反応系や、ラジカルの影響を直接観測する系、ラジカルの影響を修復する系などをホルミシス解析の表現形レベルとして選択することが必要である。

現段階では、どのような表現形のレベルとその内容を選択するかというパラメーターサーベイの段階にとどまっているが放射線ホルミシスの実証を酵素レベルで観測する実験も行われはじめています。

Feinendenらは、チミジンキナーゼ活性の変化を指標として低線量照射により一時的に耐性誘導が起こることを報告している³⁾。

山岡らは、ラジカルを除去する反応系であるスーパーオキシドディムスターゼ(SOD)活性を測定している^{4), 5), 6), 7)}。低線量照射により、生じるO₂⁻の毒性を弱めるSODの活性レベルをX線全身照射後の各種臓器において測定している

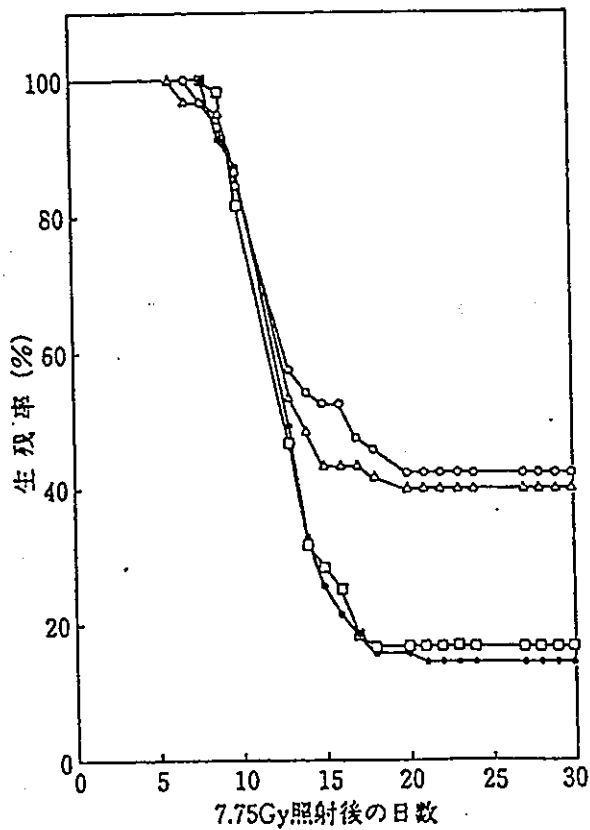
図Ⅱ-10-3 全身照射の線量と脾臓のSOD活性との関係



出所) 米沢ら(1990)

図Ⅱ-10-3に示すように低線量域においてSOD活性のこう進がみられ、これと同時に過酸化脂質の傾向も見いだしている。

事前に放射線で照射された生物が事後の放射線照射に対して抵抗性となる例は知られているが^{8)・9)・10)}、米沢らは、マウスの個体に対して0.025~0.15 GyのX線で全身照射し、その2カ月後に7.75 Gyを照射して、30日後の生存率を比較し、放射線抵抗性の誘導の再現性を確認している(図Ⅱ-10-4)¹¹⁾。



出所) 米沢ら(1990)

予照射の線量: ● 0 Gy (対照), □ 0.025 Gy,
○ 0.05 Gy, △ 0.1 Gy

このことから、放射線抵抗性の誘導という現象が解析する現象としての価値が再認識され、放射線抵抗性がどのような状態で誘導され、3カ月後の照射に対して有効であったのかの分子レベルで解析することに期待が持たれている。

以下の表に現在までに知られている主な放射線ホルミシスの例をあげておく。

図Ⅱ-10-5 放射線ホルミシスの事例(1)

内 容		研 究 者	文 献
寿命延長	低線量率で長時間照射されたマウスの寿命が非照射の対照群より延長した。	LORENZ, E., et al.	•Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med., 63, 176 (1950) •"Biological Effects of External X and Gamma Radiation", Part 1, (Zirkle, R. E. ed.), 24 (1954) McGraw-Hill, New York
寿命延長	Lorenzの観察した低線量率で長時間照射されたマウスの寿命が非照射の対照群より延長した現象など、1940年代後半から行われてきた動物実験についてレビューした。	CONGDON, C. C.	ibid., 52, 593
細胞の利他的自殺	• ラット胸腺細胞の放射線による自爆死が観察されている。放射線で傷ついた細胞が自らの遺伝子を活性化して自殺することができれば、傷は完全に消失し、他を守ることになる。	T. Yamada	Int. J. Radiat. Biol, 53, 65-75 (1988)
放射線遮蔽による生育の遅延(自然放射線への適応)	• 藍藻を自然放射線遮蔽用の鉛で囲んだ環境で培養すると、自然放射線のある環境で培養するより成長が遅くなる。 • 原虫を鉛の箱で囲って培養した時と、同じく鉛の箱中で放射線トリウム照射を加えて培養した時は、後者の方が原虫の数が増えた。 • Synechococcus Lividusを39°C、明所培養、コントロールは1.49mGy/yの線量率で、一方鉛遮蔽して0.27mGy/yで、ともに35日間培養した結果、鉛シールドした方の細胞数はコントロールの増殖に比べ、約10~15%減少した。(すなわち、細胞増殖については、高線量率区の方が効果大である結果となり、明らかに放射線ホルミシスを示し生物が現在の自然放射線に適応していることをあらためて証明した)	PLANEL, H., et al.	Health Phys., 52, 571 (1987)

図Ⅱ-10-5 放射線ホルミシスの事例(2)

内 容		研 究 者	文 献
免疫機能のこう進 (マウス)	低線量のX線でマウスを1回ないし連続照射すると、免疫機能が昂進される。	LIU, S. Z., et al.	ibid., 52, 571(1987)
免疫機能のこう進 (ヒト)	米国に在住する原爆被曝者の免疫機能を調べ、線量がゼロの被曝者より0.50Gy(50rad)以下の被曝をした人達の方で高いことを見出した。	BLOOM, E. T., et al.	Health Phys., 52, 585 (1987)
免疫機能のこう進 (マウス)	低線量率の連続照射により免疫機能の昂進が見られ、免疫不全系統のマウスを用いた場合に、この効果は顕著である。	JAMES, S. J., MAKINODAN, T.	ibid., 53, 137(1988)
免疫機能のこう進 (ヒト)	Pu工場の作業者では、リンパ細胞中のT細胞のヘルパー細胞とサプレッサー細胞の存在比が通常と異なり、ヘルパー細胞が多くなる傾向がある。	STEWART, C. C.	Abstracts of Workshop on "Low Dose Radiation and Immune System" Frankfurt, 5-8 May, 1987
ガンの増殖遅延	・固形腫瘍を同じ系統のマウスに移植する時、その直前から5日前以内に0.1Gy前後の全身照射を宿主マウスに行うと、ガンの増殖が遅くなった。	Tokuda & Anderson	
抗ガン効果	・マウスの皮膚ガンに対して低線量の放射線全身照射が抗ガン効果を示す。	宮本	癌の臨床, 33, 1211-1220(1987)
抗ガン効果	・長崎の原爆被曝者の被曝線量別白血病死亡率データを見ると、低線量域では線量が増えると逆にガン死亡が減っている部分がある。		
α 線の抗ガン効果(無)	α 核種をビーグル犬に取り込ませると、核種によって線量効果反応の形に幾分の違いは見られるものの、骨肉種の増加が認められた。また、寿命は対照の97%で差がなかったことから、 α 線によってはホルミシス効果は生じないとした。	MAYS, C. W., et al.	Health Phys., 52, 617 (1987)
抗ガン効果	Puを吸入させたラットの肺癌発生を調べた実験で、発癌の相対リスクには実質的な閾値が認められた。	SANDERS, C. L., McDONALD, K. E., MAHAFFEY, J. A.	ibid, 55, 455(1988)
抗ガン効果	Rn濃度が高い場所で、むしろ肺癌の頻度が低い傾向があり、両者の間に直線的な線量効果関係は認められないとした。	COHEN, B. L.	ibid., 52, 629

図Ⅱ-10-5 放射線ホルミシスの事例(3)

内 容		研 究 者	文 献
抗ガン効果 (マウス)	固形腫瘍を同系マウスに移植する際、事前にマウスを照射しておくこと、癌の増殖が遅くなる。	ANDERSON, R. E., WILLIAMS, W. L., TOKUDA, S.	ibid., 53, 103
抗ガン効果	皮膚癌の移植実験において、0.1Gy (10rad) の全身照射により、半数のマウスに癌を生じさせるに必要な放射線量 (TD50) が2~3倍になる。	宮本美弥子 坂本澄彦	癌の臨床, 33, 1211 (1987)
抗ガン効果 (白血病) (ヒト)	1958~82年間の原爆被曝者の白血病を含む癌死亡率は、推定被曝線量が0.005~0.05Gy (0.5~5rad) の人々では、調査人数と年齢を補正して求めた予想値より小さい。	FREMLIN, J. H.	Atom, 390, 4 (1989)
抗ガン効果 (ヒト)	新線量推定法 (DS86) に基づいて推定された被曝線量と癌死亡率の関係。	清水由紀子、他	放射線影響研業績報告 TR12-87, 広島, (1987)
抗ガン効果 (ヒト)	高バックグラウンド地域住民の総死亡率は通常環境の対照住民とほとんど変わらないが、癌による死亡率は、子宮頸部癌を除いて、高自然放射線地域住民の方が有意に低い。	・High Background Radiat. Res. Group, China ・WEI, L., et al.	Science, 209, 877 (1980) J. Radiat. Res., 31, 119 (1990)
DNA修復機能の誘導	ヒトのリンパ球を低線量で照射しておくこと、事後の高線量照射、あるいはプレオマイシン・マイトマイシンCなどの薬剤による染色体異常生成に対して抵抗性となることを報告し、低線量照射により損傷の適応修復が誘導されることを示唆。	WOLFF, S., et al.	Int. J. Radiat. Biol., 53, 39 (1988)
放射線抵抗性の誘導	・マウスに0.01~0.1Gy照射し、経時的に骨髓細胞をとりだし、 ①DNA合成系の酵素チミジンキナーゼの活性 ② ³ H-チミジンのとりこみ ③血清中の ³ H-チミジン濃度を調べた。照射から4時間後に①が極小値を示し、その結果として②の極小と③の極大が見られた。この時期に低線量を再度照射しても反応①②③の値に追加効果がみられず最初の照射によって細胞に放射線抵抗性が誘導されたことが推測された。	FEINENDEGEN, L. E., et al.	ibid., 52, 663

図Ⅱ-10-5 放射線ホルミシスの事例(4)

	内 容	研 究 者	文 献
植物の発芽、生育、成長の促進	・穀物の収穫量が放射線の慢性照射によって増加。	Lorentz	
種子の初期生育	植物のホルミシス効果については、多くの種で種子に対する照射が初期生育に効果が認められる。	SHEPPARD, S. C., REGITNIG, P. J. MILLER, M. W., MILLER, W. M.	ibid., 52, 599 ibid., 52, 607
コムギ種子の生長・収量	春まきコムギの3品種を用いて、1969~1971年の3年間にわたる実験を行った。 放射線は ⁶⁰ Coγ線を用い、100~1500radまで(100rad/min)を種子に照射して、ha当り収量、タンパク質量、1000粒重、植物体長、熟期などについての影響を調査した結果、植物体長、熟期、種子収量、1000粒重、タンパク質含量に変化が認められなかった。 わずかに1970年での収量で増加がみられたが、環境変異が大きいことが示唆されることから、小規模な実験ではなく、大規模な実験の結果をみなければ、収量増加の可能性について正確な情報が得られないと結論。	FOWLER, D. B., MACQUEEN, K. F.	Radiation Botany, 12: 349-353, 1972
コムギ種子の生長・収量	3品種のコムギと草丈の異なっている3品種のソルガムを材料として、 ⁶⁰ Coγ線を、コムギでは0.5~7krad、ソルガムでは1.0~10.0krad照射した。照射は種子発芽後の第一葉期、出穂期、開花期に行い、成熟期における個体の生残率、稈長、全分けつ数、植物体当りの稔実穂数、平均種子重、100粒重などを測定した。その結果、 成熟期の生残率・・・線量の増加に従って減少、品種間差がある。 稈長・・・コムギでは第一葉期照射、ソルガムでは第一葉期および出穂期照射でホルミシス効果を認めた。 品種間差も大きい。 総分けつ数・・・コムギ、ソルガムともに第一葉期照射。ホルミシス効果と品種間差を認めた。 稔実穂の平均数・・・両種ともに第一葉期照射で、無照射のものよりも多くなった。 収量および100粒重・・・両種で増加。 全体として第一葉期照射の場合にホルミシス効果を認めており、その線量範囲はコムギで0.5~1.25krad、ソルガムでは1~2kradとしている。	IQBAL, J.	Environ, Expt. Botany, 20:219-232, 1980

図 II - 10 - 5 放射線ホルミシスの事例 (5)

	内 容	研 究 者	文 献
<p>トマト種子の生長・収量</p>	<p>トマトの草丈について高性とわい性の2品種の発芽種子に¹³⁷Csλ線を250~2000R照射して、発芽後6週目の幼植物の乾燥重、種子発芽後の酸素吸収量、種子照射や幼植物照射後120日目の果実収量、相対的熟度などに対する影響を調べた。果実収量は500~1000R照射をした場合に増加がみられ、高性の品種では250~1000Rの照射で早熟になった。品種間差異は大きかったが、ここでみられたホルミシス効果のおきた原因として考えられたことは、頂芽の分裂組織が放射線によって障害を受けたために、分裂伸長した腋芽の数が増加した可能性である。発芽後6週目の植物体乾燥重と発芽種子による酸素の吸収量とは、照射種子からの植物体の果実収量反応と類似していた。</p>	<p>SIDRAK, G. H. Suess, A.</p>	<p>Radiation Botany, 13:309-314, 1973</p>
<p>エンドウマメ種子の生長</p>	<p>エンドウマメの種子および発芽種子に対して⁶⁰Coγ線、14MeV中性子核分裂中性子など種々のエネルギーの放射線を用いて実験を行った。γ線は最高300Gyまで、中性子は30Gyまでで、調査項目は幼植物長、RNase活性、peroxidase活性、polyribosomeの変化などである。幼植物長は種子または発芽種子の照射でいずれも線量の増加につれて減少した。種子と幼植物とはCongerら(1970)およびCercekら(1971)の結果と一致する。線量-効果関係は放射線の種類によって異なっていた。RNaseはRNA代謝に関係し、線量の増加とともに増加することが認められたが、線量-効果関係は放射線の種類および試料の状態により異なっていた。またperoxiradicalの除去を含む植物体の防護機構と関係があり、種々のストレスによって変化するperoxidaseの活性は、RNase活性の変化と同様の傾向を示した。また幼植物長と幼植物のRNase活性の照射線量に対する反応は逆な関係を示した。</p>	<p>BAGI, G., Bornemisza- Pauspertl, P. Hidvegi, E. J.</p>	<p>Int. J. Radiat. Biol., 53:507-519, 1988</p>

3) 放射線ホルミシスと放射線防護

低線量の放射線影響をどのように量的に評価するかは、主要な研究課題であるが、低線量・低線量率の職業被ばくの疫学調査で、がんが増加したというはっきりした証拠もない現状にあって、しきい値のない線量反応関係を放射線防護の基本的な仮定とすることには、自然科学的には説得力に欠けるといふ批判がある。この批判は、放射線利用する立場からは放射線防護のやり方・考え方に対する批判の根拠となっている。

放射線防護の基本的な考え方は、しきい値の存在する非確率的影響（決定論的影響）を防止し、確率的影響を容認できるレベルにまで制限することにある。確率的影響とは発ガンおよび遺伝的影響を指し、確率的影響と呼ぶことからわかるように、しきい値がないことを前提にしている。発ガンにしきい値があるかどうかは医学・生物学的な問題として長く議論されているが、決定的な結論を出すだけの科学的な実証性に欠けている。

たとえば、疫学調査や動物実験データから結論を出そうとすると、統計では確率的な判断しかできないため、対照群と被ばく群との比較からは決定的な結論を導くことができない。したがって、発ガンのメカニズムの解明によってしか決定的な証拠は与えることはできないと考えられてきた。

放射線ホルミシスは、生物学的な視点からしきい値の問題に決定的な証拠を与えるものと考えられている。これは、低線量・低線量率の放射線が生物に有益な影響を与えるとすれば、大線量で示されている有害な影響が現れることが明らかにされている線量との間に生物の生存にとって質的な影響の変化があることになり、その結果、有害な影響のしきい値の存在を意味することになるという推論である。したがって、放射線ホルミシスがしきい値の存在を示唆するならば、放射線ホルミシスの研究によって放射線防護の考え方が変更される可能性を秘めている。

4) 放射線ホルミシスの積極利用の可能性

放射線ホルミシス現象の解明が分子レベルで進展し、閾値の存在が証明されるとホルミシスを医学的、農業的に利用する可能性も考えられる。ガンにかかった場合にその患者の免疫機能を強化するために低線量の放射線を照射したり、体全体の代謝促進、老化防止・健康増進のために医師の指導のもとで低線量放射線療法として一定の放射線を定期的に浴びるといったことも現実化しよう。また食糧植物の種子に対して、低線量放射線を照射して農業用に出荷されるといったことも予想される。

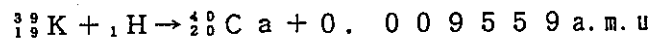
【参考文献】

- 1) R. J. Hickey, E. J. Bowers and R. C. Clelland: Radiation hormesis, public health and public policy-A Commentary. *Health Physics*, 43, (1983)
- 2) T. D. Luckey: Physiological benefits from low-level ionizing radiation *Health Physics*, 43, 771-789 (1982)
- 3) Feinendegen, L. E., et al.: *Int. J. Radiat. Biol.*, 53, 23 (1988)
- 4) 山岡聖典、他: 電中研報、T89002, (1989)
- 5) Yamaoka, K., et al.: *J. Radiat. Res.*, 30, 85 (1989)
- 6) Yamaoka, K., Edamatsu, R., Mori, A.: *ibid.*, 31, 67 (1990)
- 7) 山岡聖典、他: 電中研報、T89063, (1990)
- 8) Betz, H.: *C. R. Soc. Biol.*, 144, 1439 (1950)
- 9) Cronkaite, E. P., et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 73, 184 (1950)
- 10) Dacquist, M.: *Radiat. Res.*, 10, 118 (1959)
- 11) Yonezawa, M., Takeda, A., Misonoo, J.: *J. Radiat. Res.*, 31, 65 (1990)

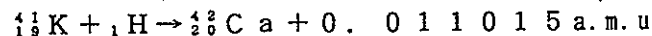
1.1. 生物元素変換

1) 生体内元素変換の可能性

生体中において、通常の物理学におけるメカニズムとは全く異なったメカニズムによる元素変換が行われているのではないかという予想に対して、これを確認する実験が、フランス、Ecole Polytechnique の Pierre Baranger¹⁾、ソルボンヌの C. Louis Kervran^{2, 3)}、日本の小牧らによって行われている。生体内元素変換の可能性は、フランスのブリュターニュ地方の土壤はカルシウムが極端に不足しているが、ニワトリはカルシウムの殻を持つ完全な卵を生むことから検討され始めた。ニワトリからカルシウムとカリウムを奪うと軟らかい殻の卵を生むが雲母を与えると再び正常な殻の卵を生み始める。このような事実に対して C. Louis Kervran は、ニワトリの体内で次のようなカリウムからカルシウムへの元素変換の可能性を示唆するとしている。



あるいは



ここで a.m.u とは、原子質量単位のことであって、質量数 12 の炭素の同位体 ${}^{12}\text{C}$ の原子の質量の $1/12$ に相当し、 $1.6605655 \times 10^{-24} \text{ g}$ に等しい。

C. Louis Kervran によるならば、上式の逆過程を行う微生物も存在するという。この元素変換は 2 つの特徴があるとされる。

1. 最初の核と最終の核とは、以下のような物質が付け加わったり、差し引かれたりする。その物質とは、陽子、 α 粒子、酸素の核とその同位体、その他のありふれた核などである。
2. 0.01 原子質量単位 (a.m.u) のオーダーの質量の過不足、あるいは、 $E = Mc^2$ から計算されるそれに相当するエネルギーの過不足がある。

常識的な物理学からすれば、2 点めのエネルギーギャップが問題となり、0.01 a.m.u は 20 電子質量、10 MeV、あるいは、 $1.6 \times 10^{-12} \text{ J}$ に相当する。ニワトリがその体内でカリウムをカルシウムに変換する場合、それは発熱反応であり、そのエネルギーは莫大であってニワトリだけでなく、その周囲の

ものを焼き尽くすほどのエネルギーに相当すると計算されるが実際にはそのようなことは起こっておらず、この点が反論者の根拠になっている。

厳密な生体内元素変換の検証の試みは、日本の小牧によってもなされている^{5,6)}。小牧は、検証の行いにくい高等動植物を使用することを避け、発酵微生物を使用して厳密な検証を行っている。小牧は、カリウム、マグネシウム、鉄、カルシウムを全く添加しない（特級試薬と純水のみを使用）した培地で微生物、カビを培養すると添加していない元素が微生物によって産出されている実験結果を報告している。また、無添加の元素が微量に培養液中に含まれているものが生物濃縮により、検出されている可能性を否定するため培養する前の培養液の元素の濃度を測定し、培養液中に無添加と想定している元素の全量を差し引くことも行っており、これらを差し引いても微生物によって変換されたと考えられる量の元素があることを示している（表Ⅱ-11-1）。

表Ⅱ-11-1 正常細胞及び欠乏培養（各200ml、72時間）により取得された乾燥菌体全量中及び1g中K、Mg、Fe、Ca含有量

菌種名	正常培養				K欠培養	Mg欠培養	Fe欠培養	Ca欠培養
	K	Mg	Fe	Ca	K	Mg	Fe	Ca
Aspergillus niger	5,280	1,110	390	260	940 (540)	240	60	70
	9,190	1,940	680	450	5,460 (3,140)	1,120	330	210
Penicillium chrysogenum	10,100	1,910	570	390	1,120 (720)	290	70	120
	11,050	2,160	630	440	5,630 (3,660)	1,250	320	190
Saccharomyces cerevisiae	16,300	2,820	1,180	720	1,750 (1,350)	340	130	210
	10,900	1,880	790	480	5,520 (4,270)	980	390	230
Torulopsis utilis	23,900	4,750	2,050	1,380	2,150 (1,750)	380	140	310
	8,800	1,760	760	510	3,970 (3,240)	940	380	240

（上段：乾燥菌体全量中，下段：1g中）

（単位：μg）

括弧内は、カリウム無添加培地において含有するカリウム濃度（20ppm以下）分、すなわち培養液200ml中に含まれる400μg以下程度のカリウムを差し引いたもので生体元素変換により生成したと考えられる値を示したもの。

出所）小牧ら

しかしながら、小牧の実験は厳密性を重視したものであったが、従来の物理学的な常識をくつがえす内容であるため、国内においては、同種の実験を追試する研究者が現れず、検証の妥当性を証明することが行われていない。

海外においては、米国国防総省の Solomon Goldfein らが小牧の実験を追試し、その結果を支持する報告を提出している⁷⁾。Solomon Goldfein らは、小牧の実験結果を支持しつつ、作業仮説として細胞のcytochrome中のMg ATP (Adenosine TriphosphateのMg キーレート連鎖) が粒子加速器として機能しているのではないかという作業仮説を発表していることは注目される。

一方、1989年3月に、英国Southampton大学の Martin Fleischmann、米国のUtah大学のStanley Pons らによって「室温核融合」が報告されるにおよび、少なくとも室温、低電位差での生体内元素変換は有り得ないという認識そのものは否定されつつあるのが現状である。

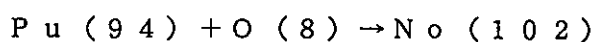
2) 今後の研究方向

現状では、生体元素変換を追試することは物理学的な常識に対抗するパラダイム破壊者として学会から抹殺される危険があるため、アカデミックポストにある研究者はこの種の研究を発表することは不可能に近い。しかしながら、科学的事実であるならば、そのインパクトには計り知れないものがあり、検証する価値はあるものと考えられる。

検証のプロセスとしては、外部からある元素を全く与えないにもかかわらず、生物体内にその元素が生成されていることを厳密に確認することが必要である。近年は、微量元素を測定する技術が向上しており、極めて精密に元素の量を測定することが可能になっており、元素量測定のための厳密な実験系を構築し、生物元素変換の検証を行うことは技術的には容易である。

生物元素変換の事実が確認されれば、さらにそのような元素変換が生体内のどの細胞やオルガネラで起きているかあるいは、分子レベルではどのような装置が関与しているかを特定していく研究が進展する可能性も考えられ、生体内における元素の挙動について重要な知見をもたらすものと予想される。

生体内元素変換が証明された場合には、人類に与えるインパクトは極めて甚大であり、エネルギー問題の解決に一つの方向を与えるものとなる。例えば、放射性廃棄物であるプルトニウムは半減期2万4360年であるが、生体元素変換のメカニズムが解明され利用できるならば、短時間に常温常圧下で処理できることになる。



上式の反応を行う生物をスクリーニングするか、人工的につくることにより、プルトニウムは半減期55秒のノーベリウム(No)に変換可能となり、放射性廃棄物問題は解決を見ることになる。これらは可能性として考えられるにとどまるが生体元素変換の検証されることによる科学へのインパクトは非常に大きいと考えられ、また実験系の構築が容易であることもあり、研究の進展が期待される。

【参考文献】

- 1) P. Baranger: Journal of Biological Sciences, Vol. 3, no. 2, (1960)
- 2) L. Kervran: Bilans métaboliques anormaux et transmutations biologiques, Revue Générale des Sciences, Paris, juillet(1960)
- 3) C. Louis Kervran: Biological Transmutations, English Version (Swan House Publishing Co., 1972)
- 4) 小牧久時、藤本多貴子: 食品微生物の無機栄養要求に関する研究(第3報) 石油微生物及び尿素微生物の生育増殖及び代謝に及ぼすカリウム欠乏の影響について、武庫川女子大学紀要、自然化学編、第14集 p. 67~80(1966)
- 5) 小牧久時: 生体内元素変換と室温核融合の評価、化学と工業(日本化学会) 1989年11月
- 6) 小牧久時、他: 生物による元素変換の立証、第35回栄養改善学会大会講演集(1988)
- 7) Solomon Goldfein: Energy Development from Elemental Transmutations in Biological Systems, U.S. Army Official Report, MERADCOM, No. 2247 (May, 1978)

Ⅲ． 生体分析のための

バイオテクノロジー

Ⅲ章 生体分析のためのバイオテクノロジー

1. 生体解析方法の進展

(1) 分離精製技術

生体の解析を行う場合には、生体は極めて複雑な構成物からなる系であるため、その現象を解明していくためには、観測する対象のみを抽出して単純化して分析する必要がある。そのため、混合物である生体から単一の化合物を分離精製することが必要であり、分離精製技術は生体解析技術の中核的な部分を占めている。本章においてもバイオテクノロジー分野において、分離精製技術がどのようなものであり、現在、行われている手法についてレビューを試みた。

(2) 計測技術

生体分析の手法は、計測という観点でみるならば、化学的計測、物理的計測、生物計測の3種に分類することができるが、近年はその融合領域での計測技術の発展が著しく、非破壊的に測定することが重視されている。機器分析の手法も非常に発達し生体計測装置としてのその非破壊でかつ得られる情報の多さから、インビボNMRが脚光を浴びている。本章では、特にこのインビボNMRを生体非破壊計測技術としての有効性に着目してとりあげる。

(3) 遺伝情報解析技術

生体の基本的な設計図であるDNAの塩基配列の解析手法は、1970年代初頭KRから発展してきたが、近年その進歩は著しく、超微量な生体サンプルからもそこから遺伝情報の解析を、DNAの塩基レベルで行う場合に、画期的な進歩をもたらしたPCRという手法についてふれる。

(4) 遺伝情報改変技術

遺伝情報の解析技術の進展に伴い、生体内の遺伝情報に改変を加え、その影響を評価したり、異なる生物種に対してDNAを導入する方法が開発されてきた。このため、生物を自由に改変できる手法は、生物種によらず、特定の遺伝子の導入、欠失、変異などを自由にかげられるようになってきている。本章でも生物種を超える遺伝子情報の操作を可能にしている手法について紹介する。

2. バイオテクノロジー分野における分離精製技術

1) 分離精製技術の重要性

バイオテクノロジーを用いた有用物質の生産性の向上は大まかにいって、

- ①組換えDNA技術による生産細胞および酵素系の改良
- ②生産物の新しい分離精製技術の開発

によりその目的が果たされる。①の問題は、遺伝子組換えによる目的物質の遺伝子発現調節に負うところが大きいのが、蛋白質の培養液中への分泌、蛋白質分解酵素の分泌の減少などの改良により最近は著しい発展が認められた。②の回収率の向上も新しい精製技術の向上により大きな成果が上がっている。とくに、バイオリクター、センサー、分離膜に関する新技術の開発に伴って、栄養基質の添加、有害物質の除去、生産物の連続分離などが培養工学上の発展により新しい工業技術体系として確立されている。他方、②の回収の問題については、分離膜や分離素材、高速液体クロマトグラフィー、モノクローナル抗体を用いるアフィニティクロマトグラフィー、無担体連続泳動など、新しい分離技術の開発がめざましく進歩している。

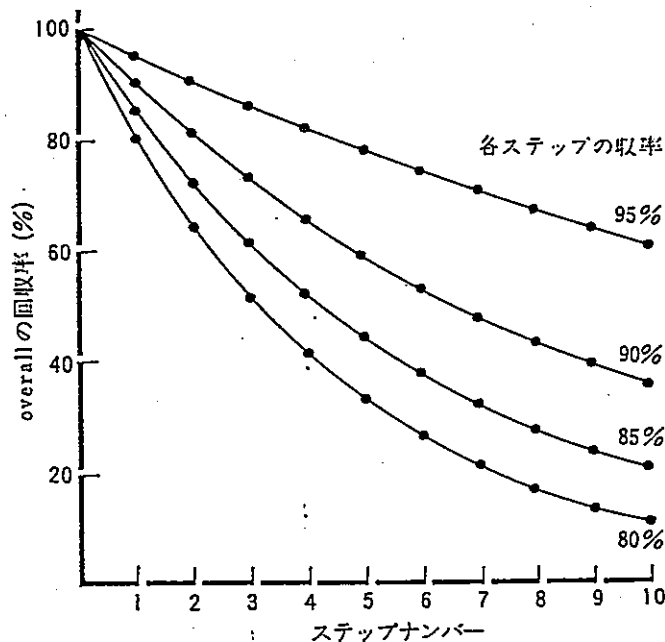
新しいバイオプロセスを使った有用物質の生産が新しい工業技術体系として、幅広い展開を見せようとしているが、その重要な一端は分離精製技術の発展に負っている。

蛋白質などの生産物の生物学的活性を保持しながら、選択性の高い分離精製をいかに効率的に行なうかは研究レベルにおいても工業レベルにおいても重要な問題である。生産プロセスでの回収工程に要する労働力の多い例として、DNA組換えによるヒトインシュリン製造工業では220人の作業員のうち90%が回収工程に携わっているといわれる。また、組換え体産物の製造における設備、操作コストのうち、製品回収工程が45%を占めるのに比べて、発酵工程は14%という報告もある。この試算によると回収工程の発酵工程に対するコスト比は、酵素生産の場合2.0、ペニシリン生産では1.0、エタノール生産では0.16である。医薬品として高純度を要求されるL-アスパラギナーゼの場合、この比は3以上と考えられている。回収プロセスでの各ステップの収率の重要性を理解するために、ステップの収率とその回数のoverallの回収率に及ぼす影響に関する模式図を図Ⅲ-2-1に示す。たとえば、L-アスパラギナーゼ生産の場合、個々のステップの平均収率は91%であるが、13ステップ後の最終回収率は30%である。ペニシリンアシラーゼの場合、平均収率94%のス

テップを12回経ることにより製品回収率52%が得られている。このように、大規模スケールに伴う困難点を考え併せると、生産物の分離精製の技術がバイオプロセスにおいてきわめて重要であることがわかる。

実際に、バイオプロセスにおける物質生産は多岐にわたっており、生産物の性状も著しく多様で低分子から高分子の化合物に及んでいる。また、きわめて安定な化合物から不安定なものまであり、これに伴って分離精製の技術も種々改良され、とくに蛋白質高分子化合物についてはその進歩は著しい。

図Ⅲ-2-1 単位操作の収率と全収率の関係



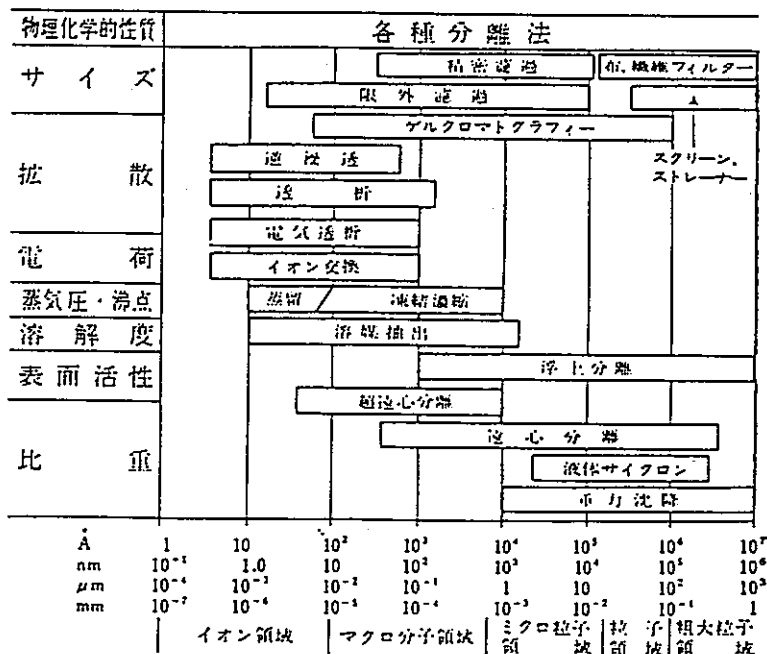
出所) Biotechnology, 2, 642(1984)

2) 主要な分離精製法概論

対象とする化合物の物理化学的性状とその適応する分離精製法の関係は、図Ⅲ-2-2に示す通りである。すなわち、物質の荷電や解離性、分子の大小およびイオン半径の大小、蒸気圧、沸点、溶剤転溶性、表面活性、比重などにより、もっとも好適な抽出法が選ばれるわけであるが、基本的には濾過、ゲル濾過、分離沈澱、溶媒抽出(分配)、遠心分離、イオン交換、膜分離、吸着などの単位操作に分けられる。

バイオプロセスの生産物は、一般に複雑な混合物であるので個々の単位操作を組み合わせた分離法によって精製をする必要がある。最近の発展の著しいものについて以下に説明する。

図Ⅲ-2-2 物質の性状と分離方法の関係

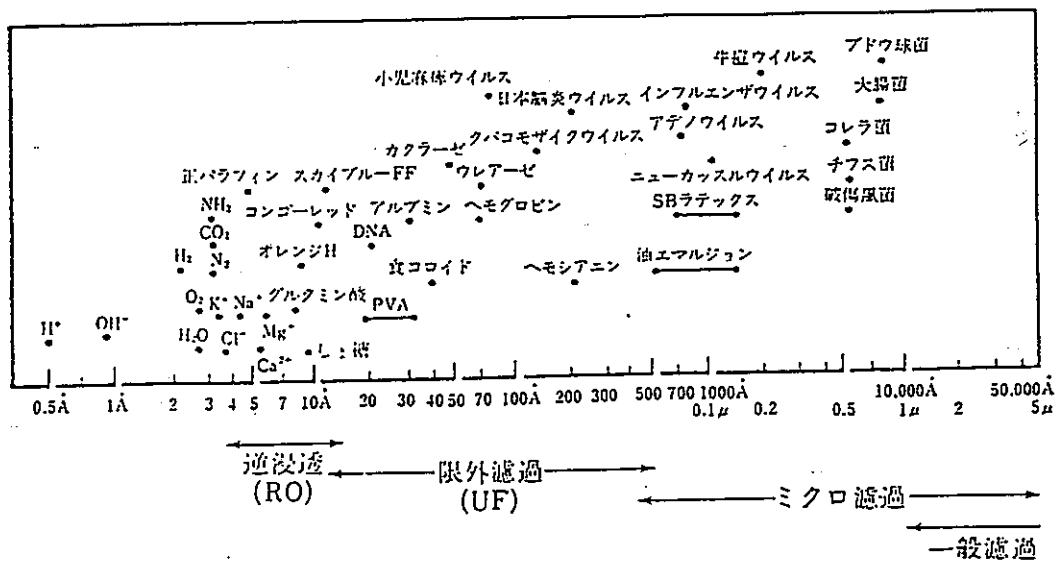


①膜分離

物質の大小と分離法を関係を図Ⅲ-2-3に示した。工業的スケールで一般に使われる方法には既存の物理的膜分離法のほかに、精密濾過法 (microfiltration)、限外濾過法 (ultrafiltration)、逆浸透法 (reverse osmosis)、電気透析法 (electro-dialysis)、イオン交換膜 (ion exchange membrane)、透過気化法 (pervaporation)、モザイク荷電膜による圧透析法がある。

なお、これらの濾過法でcross-flow 濾過は膜面に沿って処理液を流しながら分離する十字流濾過法であり効率がよい。また、急速に発達している透過気化法 (pervaporation) は、アルコールの濃縮はじめ多くの化学物質に適用されており、最近では選択透過性の高い膜が数多く開発されている。

図Ⅲ-2-3 核種濾過法と物質の大きさの関係



②溶解性に基づく分離法

物質の溶解性を利用した分離法として、分別沈澱、塩析、異相分離などがある。この中で最近著しい発展を遂げている超臨界ガス抽出法が工業的重要性を増している。

③クロマトグラフィー

クロマトグラフィーとは、固定相と移動相の間の物質の分配の差を利用した分離法であり、移動相の種類、固定相の形状、分配機構などによりいろいろに分類される。固定相の形状で分類した場合、ガスクロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィーなどの種類がある。

これらの中で、液相間の分配を利用した液体クロマトグラフィーは、低分子化合物から高分子の蛋白質、核酸などの分離に威力を発揮する。液体クロマトグラフィーの種類は、その原理と分配の機構に従って表Ⅲ-2-1のように分類されている。これらの手法の特徴を以下に簡単に要約する。なお、1970年頃から急速に発展した高速液体クロマトグラフィー (HPLC) については後述する。

表Ⅲ-2-1 液体クロマトグラフィーと分配機構

分配の生じる機構	液体クロマトグラフィー
分子ふるい (大きさ, 形状)	ゲル濾過クロマトグラフィー
静電力	イオン交換クロマトグラフィー クロマトフォーカシング
吸着	吸着クロマトグラフィー
水素結合 (疎水力)	分配(順相, 逆相)クロマトグラフィー
疎水力	疎水性クロマトグラフィー
共有結合	コバレントクロマトグラフィー
生物学的親和力	アフィニティクロマトグラフィー

a) ゲル濾過クロマトグラフィー

溶質分子の形状とサイズの違いによる分子ふるい分け現象を利用する分離法で、種々の大きさの網目構造をもつアガロース、デキストラン、セファデックス (Sephadex) やポリアクリルアミド (Bio-Gel) などのゲルが用いられる。ちなみに、蛋白質などの高分子化合物の分離に多用されるセファデックスは、デキストランにエピクロルヒドリンを反応させて三次元架橋を作ったもので、G-10からG-200まで10種類があり、それぞれ分離可能な分子量が異なる。

b) 吸着クロマトグラフィー

シリカ、アルミナ、ヒドロキシアパタイトなどの固定相への吸着を利用する分離法、脂溶性物質の分離に使われる。

c) イオン交換クロマトグラフィー

イオン結合による相互作用を利用して分離を行うもので、セルロース、デキストランなどの担体に陰イオン交換体 (DEAE、QAE)、陽イオン交換体 (CM、P、SP) などのイオン交換基を導入したものがある。主として荷電した化合物の分離や濃縮に適する。

d) クロマトフォーカシング

溶質の等電点の差に基づく分離法、イオン交換体をカラムに充填し、両性緩衝液 (ampholine、poly buffer) を流すことにより連続的なpH勾配を形成させる。溶質は等電点の順に濃縮、溶出され、分離能は非常によい。

e) アフィニティクロマトグラフィー

特定の物質間の生物学的または化学的親和性を利用して分離を行なう方法である。目的物質に対して特異的結合性をもつ物質 (リガンド) を固定相にする。

④高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

物質の分離・分析をより効率よく機器としてまとめ上げたのがHPLCであり、1970年代初めから使われだした。その特長は、充填剤の粒子径を小さくかつ多孔質にし、乱流拡散を防ぐことによって分離能を高め、加圧ポンプによって移動相の均一移動を進めるとともに、検出装置を具えた分離・分析機器となっている点にある。とくに最近では、充填剤の著しい改良によって応用範囲が飛躍的に拡がり、各種低分子化合物はもちろんのこと、蛋白質、核酸などの高分子化合物の分離・分析にも欠くことのできない重要な機器として広く使用されるに至っている。

HPLCは分離様式により、以下に述べる種類があり、それぞれに適したカラムが市販されている。また、新しい充填剤の開発が精力的に進められており、高分子で不安定な蛋白質の分離・分析に有力な武器として発展を続けている。HPLCに関しては、すでに多くの成書があり、とくに充填剤の開発は膨大な資料があるので、ここでは蛋白質の精製に重点をおいて述べる。

a) サイズ排除クロマトグラフィー

分子ふるい分け効果による溶質分子のサイズ差を利用する分離法で、水系の移動相を用いる場合をgel filtration、非水系の移動相を用いる場合をgel permeation と呼ぶ。蛋白質、ペプチド、核酸オリゴマーなどの分画に有効であり、最近はりポ蛋白質の分離にも優れていることが報告されている。

b) イオン交換クロマトグラフィー

溶質の固定相へのイオン結合による吸脱着を利用して分離を行なう。充填剤として大きな孔径をもつシリカ球にイオン交換体を被覆結合したペリキュラ型のもの、多孔性シリカにイオン交換基を導入したもの、多孔性合成高分子に交換基を結合したものが市販されている。

c) 等電点クロマトグラフィー

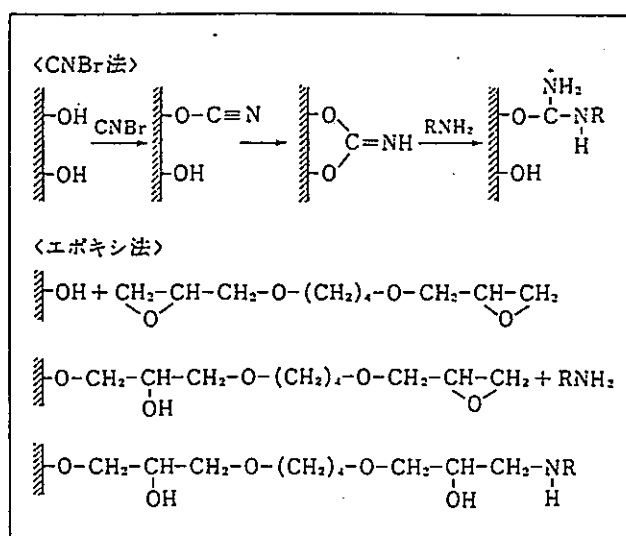
DEAE基、CM基などの交換基をもつイオン交換体 (TSK gel CM-3S W、TSK gel DEAE-5PW、Syn Chropak AX-300) に電解緩衝液を流すことにより自動的にpH勾配を形成させる。蛋白質は等電点の順に濃縮されながら溶出される利点がある。

d) 逆相クロマトグラフィー

従来の吸着、分配クロマトグラフィーでは、固定相に極性物質、移動相に非極性物質を使用するが、これとは逆に、非極性の固定相に、極性の高い移動相を用いるクロマトグラフィーを逆相クロマトグラフィーと呼ぶ。国内で市販されている主な充填剤はカタログなどに記載されているので省略する。展開溶媒として、アセトニトリルなどの有機溶媒と水の混合溶媒が用いられているが、塩を添加して、

また、固定担体をリガンドの間にスペーサを導入することで、リガンドと目的物質の効果的相互作用を促進する工夫もなされている（図Ⅲ-2-5）。特異的リガンドを結合させた吸着体を用いるクロマトグラフィーの他に、関連する一連の物質に対して親和性をもつ吸着体を用いる群特異的アフィニティクロマトグラフィーがある。たとえば、ヌクレオチド補酵素（ NAD^+ 、 NADP^+ ）や核酸塩基（poly A、poly U）を固定化した吸着体を用いる方法、金属キレートアフィニティクロマトグラフィー、疎水的クロマトグラフィーなどである。

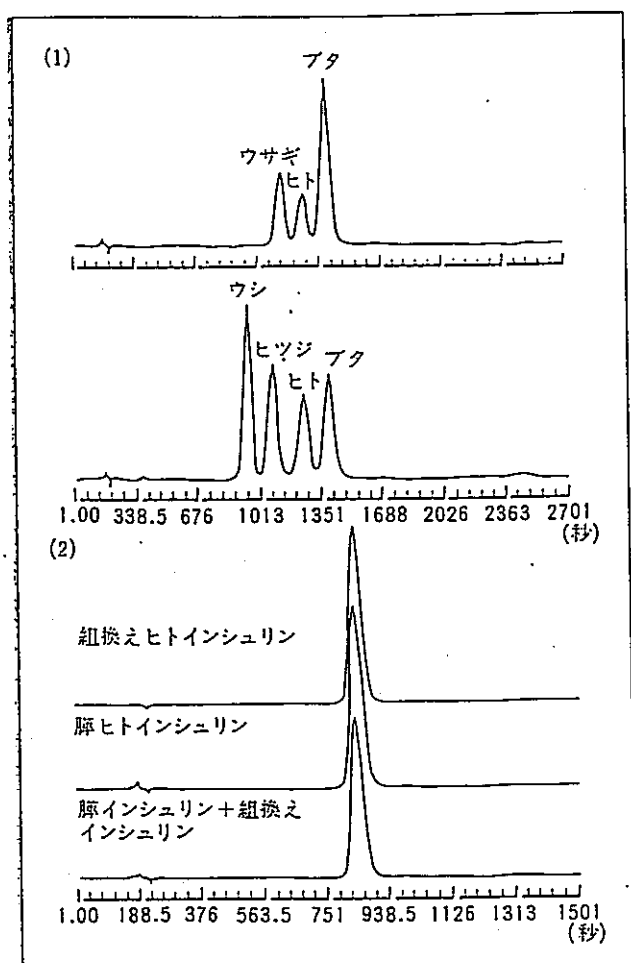
図Ⅲ-2-5 リガンド結合法



ハイブリドーマ技術を用いてクローン化抗体生産細胞より調製されたモノクローナル抗体をリガンドとして固定したアフィニティクロマトグラフィーは、ペプチドホルモンなどの組換え体産物の高純度精製に不可欠の分離法である。一例として大腸菌生産の組換えヒトインターフェロンの精製結果を表Ⅲ-2-2に示す。一回のクロマトグラフィーで、1,000倍以上の比活性の上昇がみられ、ほぼ純粋のインターフェロンが得られている。この他にたとえば、オリゴ(dT)セルロースは3'末端にポリA構造をもつmRNAの分離に繁用される。モノクローナル抗体を用いるアフィニティクロマトグラフィーは微量の生体抗原成分の検索分離や疾病の診断法などに広く応用されている。

溶質分子の官能基とイオン対を形成させ、シリカ表面の未反応シラノール基との相互作用を減少させる方法（イオン対クロマトグラフィー）、シリカ表面の修飾を行なう方法（ソープクロマトグラフィー）がよく用いられている。逆相クロマトグラフィーにより、アミノ酸のOPA誘導体、ダンシル誘導体、PTH誘導体を作製し、蛍光発色により検出を行なう方法はペプチドマッピングなどアミノ酸分析において非常に有効である。その他、蛋白質、ペプチド、アミノ酸、核酸などの広範囲の物質の分離・分析に優れており、最もよく用いられる分離法である。分析例として、組換えヒトインシュリンの分析結果を図Ⅲ-2-4に示す。ヒトインシュリンは、ブタ、ウシ、ヒツジインシュリンとアミノ酸をそれぞれ1個、2個、4個異にするが、これらのインシュリンは、図Ⅲ-2-4のようにそれぞれ異なるピークとして分離される。プロテアーゼ処理断片ペプチドの分析は、組換えインシュリンのパターンは半合成インシュリンのそれとまったく同一であることを示している。これらの結果は、組換えインシュリンのA、B鎖間のジルスフィド結合が正しい位置で起きていることを示すものであり、豚インシュリンとの同一性を証明する根拠となっている。

図Ⅲ-2-4 ヒトインシュリンのHPLCによる分離と同定



- (1) 1個或いは数個のアミノ酸を異にするインシュリンのHPLCクロマトグラム
(2) 組換えヒトインシュリン、ヒト豚インシュリン及びそれらをミックスしたもののHPLCクロマトグラム。

出所) J. Biol. Chem., 219, 633 (1983)

表Ⅲ-2-2 組換えヒトインターフェロンの精製

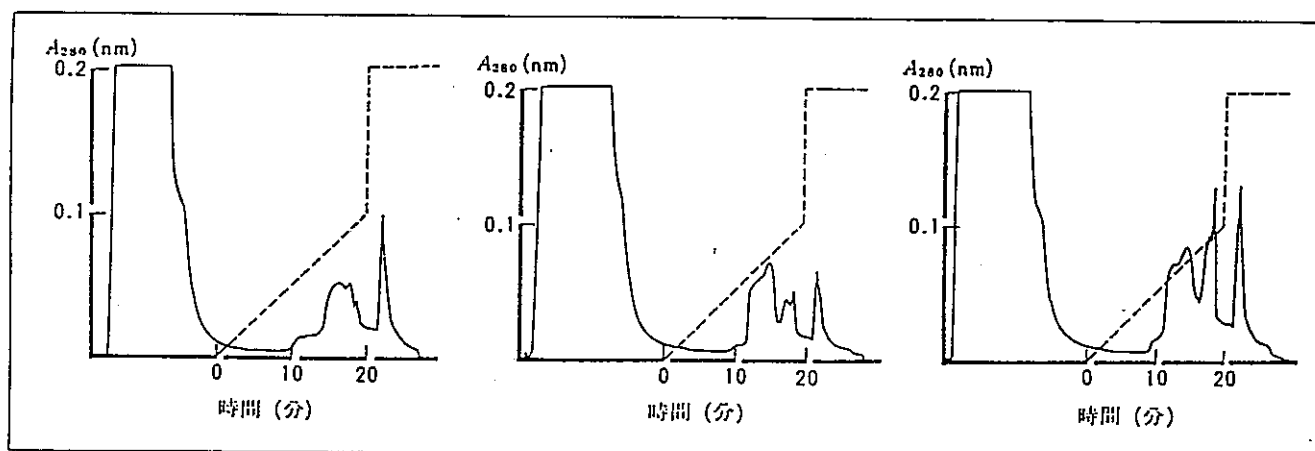
ステップ	総量 (ml)	全タンパク 質量 (mg)	全活性 (units)	比活性 (units/mg)	精製因子	回収率
硫酸アンモニウム画分	700	37,100	7.4×10^9	2.0×10^5	1.0	100
抗体カラムプール	27	30	7.0×10^9	2.3×10^8	1,150	95
CM52	30	20	6.0×10^9	3.0×10^8	1,500	81

f) Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

FPLCシステム (Pharmacia 社) 用のゲル担体は3種類あり、それぞれのプレバックカラムが市販されている。第1に、MonoBeads と呼ばれる親水性ポリエーテルビーズを担体とするものに、陰イオン交換体Mono Q、陽イオン交換体Mono S、クロマトフォーカシング用Mono P がある。第2に、シリカを素材とする陰イオン交換体としてはPolyanion SI がある。第3に、シリカベースの逆相クロマトグラフィー用カラムでPep RPC、Pro RPCがある。これらのFPLCは、蛋白質、核酸など生体成分の分離・分析に広く用いられている。高分離能を利用して培養中の生産物のモニタリングに応用する試みを以下に述べる。

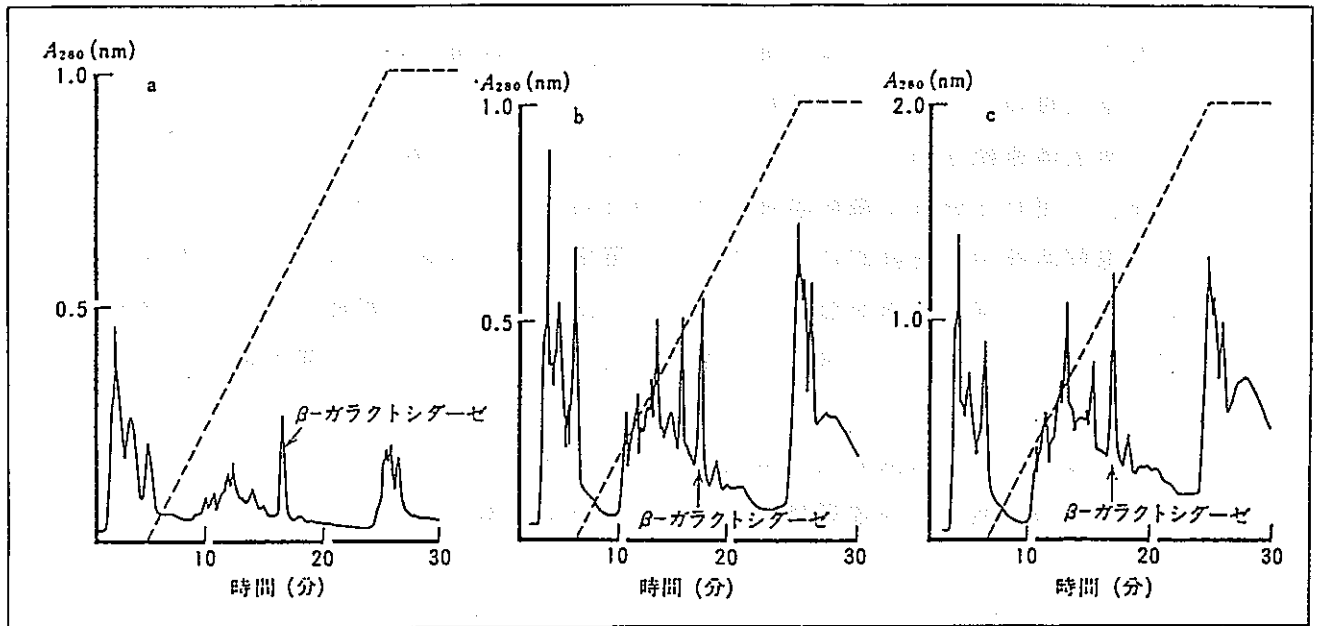
モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの培養において、培養上清を分析すると図Ⅲ-2-6 に示すようにモノクローナル抗体の特異的ピークを分離することができる。また、大腸菌によるβ-ガラクトシダーゼ生産の場合、菌の超音波破碎抽出液をFPLCにかけると図Ⅲ-2-7 に示すように酵素は単一ピークとして溶出し、容易に検出することが可能である。このように、培養中の生産物モニタリングHPLCは非常に有効な測定法であり、培養の制御や回収時期の決定などに有用である。

図Ⅲ-2-6 FPLCを使ったモノクローナル抗体産生の追跡



出所) Biotechnology, 2, 778(1984)

図Ⅲ-2-7 FPLCを使ったβ-ガラクトシダーゼ生産の追跡



Mono Qによる大腸菌細胞上清のクロマトグラフィー。溶媒:50mM BisTris勾配下0~0.6 M塩化ナトリウム、pH5.8.

a:培養初期、b:培養3時間後、c:培養6時間後

出所) Biotechnology, 2, 778(1984)

⑤電気泳動

荷電した溶質が電場の下で溶媒中を移動する現象を利用して分離する方法で、支持体を用いる方法と用いない方法がある。

a) 支持体を用いる電気泳動

支持担体として、セルロース、デンプン、アガロース、ポリアクリルアミドゲル、濾紙、セルロース膜などが用いられる。生体成分の分離・分析法として優れており、広く応用される。ポリアクリルアミドゲルを用いる密度勾配電気泳動、等電点電気泳動は、蛋白質、核酸などの分析に不可欠のもので、同定や分子量の測定に繁用される。たとえばDNA塩基を1ヌクレオチドの差で分離できることを利用して、Maxam-Gilbert法、Sangerのジデオキシ法などによるDNA塩基配列の決定に用いて

いる。DNA、RNAをアガロースゲル電気泳動で分画後、密着させたニトロセルロース膜に電気泳動的にトランスファーする方法（Southern blotting、Northern blotting）は、DNAプローブとのハイブリッド形成による相補的塩基配列の同定に繁用される。この他、蛋白質をニトロセルロース膜にblotするWestern blottingも蛋白質の同定法として優れている。

b) 無担体連続泳動（free flow electrophoresis）分離チャンバー内を一定の流速で層状に流れる分離用電解溶液の流れの方向に対し、直角の方向に電場をかけ、試料を電解溶液中に連続的に注入すると、電場の下で溶質はそれぞれの移動度で泳動し、シャープな分離帯を形成する。この方法は、その高分離能とともに、連続運転が可能であることから、試料の大量処理能力に優れており、工業的応用が注目される。

無担体ゾーン電気泳動法、無担体フィールドステップ電気泳動法、無担体等電点電気泳動法、無担体等速電気泳動法などの電気泳動法が開発されている。

3. 遺伝情報改変の方法

1) 生物の遺伝情報改変法の進展

分子生物学の発展によって、生物の遺伝子を単離しその構造を解析することが一般化した。さらに最近では、その遺伝子を改変し、生物のもとの遺伝子と交換することが可能になっている。この一連の操作によれば生物の遺伝子を染色体上で自由に改変することができる。

この方法は、ある種の細菌や酵母の研究では一般化しており、動物細胞では、導入した遺伝子がほとんどの場合もとは別の位置に組み込まれるという困難があったが、ここ数年の間に培養細胞での遺伝情報改変の研究が急速に進展した。1984年には培養細胞内のヒト染色体上のグロビン遺伝子の改変が報告された。この発展が発生工学的技術と結び付いて、ついに1989年には遺伝子を改変した動物個体（マウス）の作成が報告された。動物の場合のこの技術は、ねらった所に遺伝子を組み込むことを強調して、「遺伝子ターゲティング」と呼ばれている。

この技術が遺伝子機能の解析に有力であることは、すでに大腸菌と酵母の分子遺伝学的研究で実証済みである。特にベクターからの発現という粗い解析法では十分に理解できなかった遺伝子機能と遺伝子機能間のネットワークの精密な解析には有力な方法であり、個体発生、がん、免疫、神経での遺伝子群の果たす役割とそれらの関連がこの方法で解明されていくものと期待されている。

この技術のもう一つの意義は遺伝病の遺伝子治療である。分子生物学の発展によって、病気が特定の遺伝子構造に帰着される例が増えている。その治療のために、欠けている遺伝子を染色体内のどこかあるいは染色体外で発現させる研究が行われてきた。しかし、このアプローチでは、発現の適正な制御が困難であるなどの問題が明らかになっている。また外来DNAの挿入位置が予想できないことから、挿入による突然変異生成の危険性が高かったが、最近になり、遺伝子交換技術によって遺伝病の原因になっている遺伝子構造を直接改変するという、より根源的なアプローチが可能になってきた。実際培養細胞レベルではhprt遺伝子とaprt遺伝子の欠失をこの方法で直すことに成功している^{1)、2)}。

同様に有用生物の作成に当たっても、この技術は従来のトランスジェニック法に比べて非常に微細な改変を可能にするであろう。

これらの手法を用いることによって、放射線の影響を評価するにあたってモデル実験動物の作成においても、特定の代謝機能を強化したり、遺伝子の修復系を操作した動物を作成することが理論的には可能である。

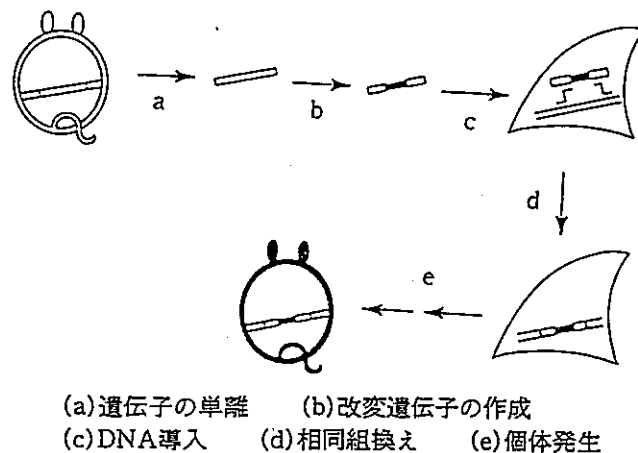
2) 遺伝子交換のプロセス

図Ⅲ-3-1に遺伝子交換の各段階を動物の場合について示す。改変した遺伝子は、微量注入法（マイクロインジェクション）、エレクトロポレーション、化学的方法、形質導入（ウイルス粒子に包み込まれた形での導入）などによって、培養細胞に導入される。

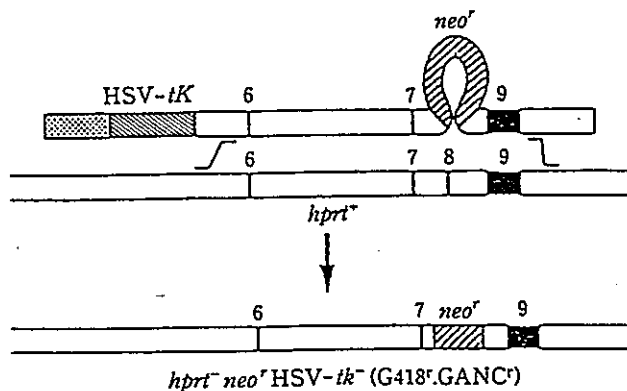
動物個体の作成を目標とする場合には、細胞として発生能を持つES細胞（embryonic stem cell、胚性幹細胞）が使われる。遺伝子を交換した細胞は、胚に戻され、これが養母の胎内でキメラ個体へと発生する。そのキメラ個体内で遺伝子交換細胞が生殖系列に入った時、次の世代で遺伝子交換個体（今のところマウス）となる。

導入された遺伝子は、相同組換えというメカニズムによって元の遺伝子と交換される（図Ⅲ-3-2）。また相同組換えによって元の遺伝子に挿入されることもある。相同組換えとは、よく似た遺伝情報を持ち、したがってよく似た配列を持つ遺伝子どうしを捜し出し、さらにその間でつなぎ換えを行わせる反応系である。すべての細胞が備えているこの相同組換え機構をうまく利用することが、遺伝子交換技術の一つのポイントになる。

図Ⅲ-3-1 遺伝子交換のステップ



図Ⅲ-3-2 相同組換えによる染色体上の遺伝子の人工変異遺伝子との交換



6, 7, 8, 9は*hprt*遺伝子のエクソン。ベクター上の*hprt*遺伝子の8番目のエクソンは、*neo*遺伝子によって分断されている。これにヘルペスウイルス(HSV)の*tk*遺伝子が結合されている。このベクターと染色体上の*hprt*遺伝子間に相同組換えが起こり、内在*hprt*配列が*neo*挿入を持つ配列と交換される。*tk*遺伝子は、ゲノムに入らない。できる細胞ラインは、*hprt^-*である他に、*neo^r* HSV-*tk^-*であり、したがってG418耐性かつGANC(抗ヘルペス剤)耐性となる。(Mansour, Thomas & Capecchi (1989)¹⁶⁾によるものを改変。)

3) 相同組換えのステップ

相同組換えの機構の解明は、微生物特に大腸菌とそれを宿主とするウイルスとプラスミドを材料として進んでいる。東京大学医科学研究所の小林らは、DNAの両鎖(二重鎖)切断の役割に基づいて三つの機構を区別している(図Ⅲ-3-3)。RecBC経路では、DNAの切断箇所が組換え酵素の入口となる。RecE経路では、切断は、相同なDNAを鋳型とする合成によって修復される。この遺伝情報のコピー(遺伝子交換gene conversion)にその両側の組換え(交叉crossing-over)が伴う(「二重鎖切断修復」モデル)。RecF経路では、二つのDNA分子から組換えDNA分子が一つだけ作られ、断端が取り残される(「半分の組換え」モデル)。

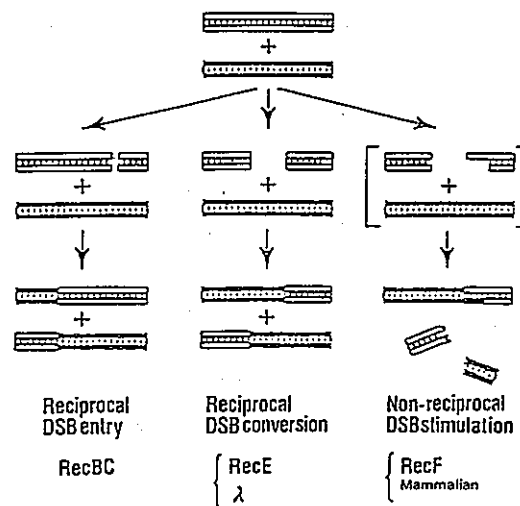
哺乳動物細胞に導入したDNAの組換えの特徴として2点あげる。第一の特徴は、導入DNAと染色体DNAの組換え能の大きな違いである。導入直後のDNAは、高い頻度で互いに相同組換えを起こす(遺伝子当たり 10^{-2} 程度)。ところが、染色体にいったん組み込まれたDNAの組換え頻度ははるかに低くなる(世代当たり遺伝子当たり 10^{-6} 程度)。遺伝子交換で問題になる、導入遺伝子と染色体遺伝子の相同組換えの頻度も、多くの実験では非常に低い。

第二の特徴は非相同組換えの活性が非常に高いことである。導入遺伝子の大部分は非相同組換えによって、染色体上の元とは異なる場所に組み込まれてしまう。

導入直後に起きる相同組換えの機構の研究は比較的進んでおり、図Ⅲ-3-2右の「半分の組換え」モデルに類似した機構が提案されている³⁾。染色体の関与する相同組換えの機構については、全く分かっていないといってよく、遺伝子改変を成功させるためのスタンダードの方法は、まだ確立していない。これは遺伝子改変の成功率が論文によって大きく違うことから見て取れる。処理した細胞当たりの遺伝子改変が起きた細胞の割合は、 10^{-5} から 10^{-2} にわたっている。

組換えの頻度が導入遺伝子と染色体遺伝子の間の相同部分の長さに著しく依存することは分かっている。相同組換えの産物には期待する遺伝子改変タイプのものでなく、染色体側の情報が導入遺伝子に移り（見かけ上の遺伝子変換）、それがさらに別の所に組み込まれる場合がある。また組換えに伴って突然変異が起きる事もある。これらの点については解明されていない。

図Ⅲ-3-3 相同組換えの諸機構



DNAの両鎖切断（二重鎖切断）との関係によって相同組換え機構を分類した。

（左）DNA両鎖切断から組換え酵素がDNA上に入り、DNA上を移動し、特定の塩基配列を認識して組換えを促進する。

（中）DNAの両鎖切断が相同なDNAの配列を鋳型とする合成によって修復される。この遺伝子交換に両側の組換え（交叉）が伴う。

（右）非相互的組換え。二つのDNA分子から、一つのDNA分子が作られ、二つの断端が取り残される。

DSB：二重鎖（両鎖）切断。

RecBC, RecE, RecF：大腸菌での組換え経路。

Reciprocal：相互的。2分子のDNAから2分子の組換え型DNAが作られる。

Non-reciprocal：非相互的。2分子のDNAから1分子の組換え型DNAが作られる。

4) 遺伝子改変細胞の単離法

まれな遺伝子改変細胞を単離するために、さまざまな選択 (selection) 法あるいは濃縮 (enrichment) 法が採用されている。例として、マウスの *hprt* 遺伝子の一部を *neo* 遺伝子で交換したケースを取り上げる。(図Ⅲ-3-2)

第一に、標的遺伝子の変化に基づく選択濃縮法がある。この場合、*hprt*⁻ となった細胞だけが特定の培地で生きられる。この原理は、*hprt*⁻ から *hprt*⁺ となった細胞にも使える。*hprt* だけでなく、*aprt* でも同様な培地による選択が可能である。標的遺伝子の産物が細胞表面に出る時は、免疫学的方法によって改変細胞を選択することもできるだろう。これらの方法では染色体の倍数性 (ploidy) が当然問題になる。

第二に、選択マーカー、この場合には、*neo* 遺伝子の使用である。これを組み込んで発現した細胞だけがある薬剤に耐性になり、生きられる。遺伝子交換細胞だけでなく、外来遺伝子が非同組換えによって別の所に組み込まれた細胞も生き残る。ただし、選択マーカー遺伝子からプロモーターなど発現に (シスで) 必要な配列を外しておいて、非同組換えによってそれらに結合できるようにすれば、非同組換え事象を相当濃縮することができる。

第三は、逆選択法である。図Ⅲ-3-2でのヘルペスウイルス *tk* 遺伝子はこのためである。非同組換えによって、染色体の別の場所に図Ⅲ-3-3の導入 DNA がまるごと組み込まれて *tk* 遺伝子が発現すれば、細胞は *tk* 遺伝子産物をターゲットとする抗ヘルペス剤で死滅する。非同組換えが起きれば、この *tk* 遺伝子は切り離され、発現しなくなる。こうして非同組換えによる改変細胞はこの薬剤のある培地では濃縮される。他の毒性を発現する遺伝子も使えるはずである。

これらの選抜濃縮法は遺伝子の発現に依存している。発現していない遺伝子の場合でも、PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) を使えば非同組換えの起こった細胞を感度よく捜すことができる。

5) 遺伝子改変の現状と課題

遺伝子交換研究の初期には、あらかじめ染色体に導入しておいた遺伝子と後から導入する遺伝子の間の組換えが研究され^{4)、5)、6)}、遺伝子としては、*neo* と *tk* が使われた。続いて染色体にもともとある遺伝子であるヒトのグロビン遺伝子の改変が行われた。次に選択の容易なマウスの *hprt* 遺伝子とハムスターの *aprt* 遺伝子で技術が進んだ。*hprt* 遺伝子での研究は個体レベルでの遺伝子改変に発展した。

現在この方法による様々な遺伝子の改変が多くの研究室で進行中である。原がん

遺伝子（プロトオンコジーン）であるマウスのint-2 とc-abl について、ES細胞での改変が報告された。c-abl では生殖系列に改変細胞が入って次の世代に伝えられている。発生に関与するhomeo ボックスを持った二つの遺伝子がES細胞で改変されている。免疫関連ではハイブリドーマ細胞でマウスとヒトのハイブリッドの免疫グロブリンが作られた。またマウス授精卵への注射によって主要組織適合複合体の遺伝子が修正されている⁷⁾。この場合改変は次の世代に伝えられた。エイズウイルスのハイブリッドもこの方法で作られた。

今後の課題としては、遺伝子導入、選抜、濃縮、スクリーニング、個体形成の各段階での新たな手段の開発と並んで、適切なモデル系での相同組換え機構の解明が挙げられる。これらの研究からの総合が、点突然変異など微細な改変を含む任意の変異を、任意の細胞の、任意の遺伝子に導入できる一般性を持った方法の確立への道を開くものと期待されている。

(6) 放射線影響解明の応用

放射線による影響を解明する場合には、特定の酵素や代謝系を強化したり、欠失させたりすることが可能であれば、生体に対する放射線の影響をモデル的に捉えることが可能になる。大腸菌のような微生物においては、このようなことは非常に簡単に実験可能であるが、これが哺乳類にいたるまで可能になったことは、マウスなどで実験することにより、ヒトに対する影響を推定することができ、高度な実験系を構築することが可能性が開けるという意味で非常に意義がある。

【参考文献】

- 1) T. Doetschman, R. G. Gregg, N. Maeda, M. L. Hooper, D. W. Melton, S. Thompson and O. Smithies: *Nature*, 330, 576~578 (1987)
- 2) G. M. Adair, R. S. Nirn, J. H. Wilson, M. M. Seidman, K. A. Brotheman, C. Mackinnon and J. B. Scheerer: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 4574~4578 (1989)
- 3) F-L. Lin, K. Sperle and N. Sternberg: *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1020~1034 (1984)
- 4) K. R. Thomas, K. R. Folger and M. R. Capecchi: *Cell*, 44, 419~428 (1986)
- 5) F-L. Lin, K. Sperle and N. Sternberg: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1391~1395 (1985)
- 6) A. J. H. Smith and P. Berg: *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 49, 171~181 (1984)
- 7) R. L. Brinster, R. E. Braun, D. Lo, M. R. Avarbock, F. Oram and R. D. Palmiter: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7087~7091 (1989)
- 8) A. Srinivasan, O. York, R. Jannoun-Nasr, S. Kalyanaraman, D. Swan, J. Besson, C. Bohan, P. A. Luciw, S. Schnoll, R. A. Robinson, S. M. Desai, and S. G. Devare: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6388~6392 (1989)

4. PCR法

1) PCR法の開発の歩みとその利用

PCR法は、遺伝子の構造・機能の研究と遺伝子診断には特に威力を発揮する。PCR法はきわめて微量にしか入手し得ない遺伝子DNA (or RNA) を *in vitro* で増幅し、構造を同定することが可能な方法である。そのため、遺伝病やウイルス感染症の診断、法医学的調査や考古学にも応用され始め、その発展は広範に及び、しかもこれまでの技術では考えられないほど速い速度での解析が可能となりつつある。遺伝子増幅法について、PCR法の開発の歩みとその利用、PCR法の応用によるクローニング法とシーケンス法の技術開発の2点から紹介する。

PCR法は1985年、R. K. Saikiらにより染色体DNAの β -グロビン遺伝子の標的配列をプライマーとして用い、特定の領域を酵素的に増幅し、遺伝病である鎌型赤血球を診断する新しい方法として報告された⁽¹⁾。当初の方法では、 β -グロビンの標的配列(110bp)の両端の(+)鎖および(-)鎖に相補的な20-merのオリゴヌクレオチドを合成し、それをプライマーとし、Klenow酵素を用いて標的配列を増幅した。その手順のあらまはは次の通りである。

1. 染色体DNAの熱変性: 95°C、5 min.
2. 遠心による凝集物の除去: 10 sec.
3. プライマーとのアニーリング: 30°C、2 min.
4. Klenow 酵素を加えて鎖の伸長: 30°C、2 min.

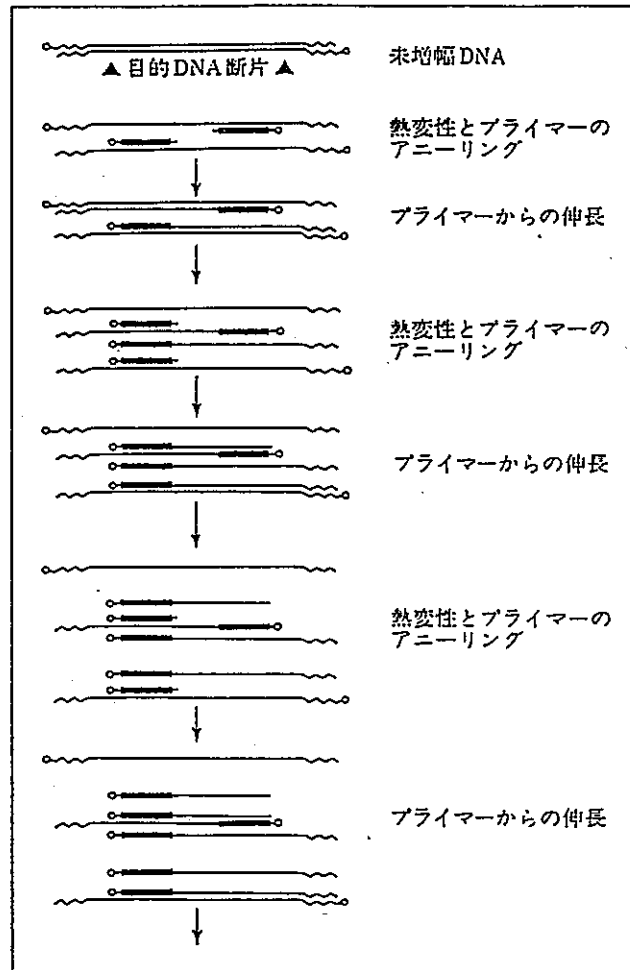
この1~4のステップを20回繰り返した。

上記の方法では、4→1のステップに移る時に、Klenow 酵素の失活が生ずるため、各サイクルで酵素を付け足していく必要があり、操作が煩雑で自動化が困難であった。この難点を解決したのが好熱性細菌 *Thermus aquaticus* (Taq) から単離された耐熱性DNAポリメラーゼの使用である⁽²⁾。この酵素は95°Cで失活せず、72°Cで反応させることができる。それゆえ、変性-アニーリング-伸長を温度を変えるだけで、酵素を付け足すことなく50サイクルでも行なえるようになった。この方法の概要を図III-4-1に示す。また、Klenow 酵素からTaq 酵素に変えることにより、アニーリング温度と反応温度を高く保てるようになり、非特異的な遺伝子の増幅なしにPCRを行なえるようになった⁽²⁾。理論的には、操作をn回繰り返すと遺伝子は 2^n 倍に増幅されることになる。実際には、反応効率が100%となることはなく、サイクルのそれぞれの反応効率が85%であった場合、20回反応させると $1.85^{20} = 220,000$ 倍に増幅されることになる。また、Taq 酵素を用いたPCRによって、1コピー

の遺伝子配列を 10^7 以上に増幅することができる。ちなみに標的配列の長さは数百～3千bpである。

遺伝子診断とは元来、染色体以上や酵素活性の有無を調べることであったが、最近ではDNAレベルで行なわれるようになってきた。DNA (or RNA) 診断は検体中に特定のDNA (or RNA) 配列が存在するかどうかの検出か、あるいは遺伝子の構造上の変化の検出かのどちらかである。DNA (or RNA) 診断には、サザンブロッティング (or ノザンブロッティング) で直接的に検出する方法と、PCRでいったん特定の遺伝子を増幅させてから検出する方法の2通りがある。サザンブロッティングの場合は、①検体DNAの制限酵素による切断、②ゲル電気泳動による分画、③ブロッティングによるDNAの結合したフィルターの作製、④プローブの標識化、⑤ハイブリダイゼーション、⑥オートラジオグラフィーの6段階の操作過程を必要とする。これは方法論として非常に煩雑な上、信頼すべき結果を得るためにはかなりの熟練を要する。それと比較してPCRの場合は、再現性がよく、サザンブロッティングに比べ 10^4 ～ 10^5 倍高感度に、しかも短時間に結果を得ることができる。

図Ⅲ-4-1 PCR法の原理



目的の DNA 配列を挟んで、2本鎖にそれぞれ相補的なプライマー2つとサンプル DNA を混合し、基質の dNTP と Taq DNA ポリメラーゼを加える。以後は温度変化をさせるだけで、熱変性により2本鎖 DNA を1本鎖とし、各1本鎖 DNA にプライマーをアニーリングして、次に DNA 複製を行なう。この一連の反応を1サイクルとして、1サイクル毎におよそ2倍に DNA 断片が増幅され、25サイクルも繰り返せば目的の DNA 断片は少なくとも10万倍に増幅する。

PCRはもともと遺伝病の診断のために開発されたこともあって、これまでに様々な遺伝病の診断に応用する試みがなされている。遺伝子変異は、1塩基置換であったり、欠失であったり、染色体転座であったりする。遺伝子の標的配列がPCRによって増幅できるようになってから、後述のような方法で異変の診断が行なわれている。一方、感染症、特にウイルス病の場合は極微量の感染ウイルスゲノムをPCRを用いて検出する。従来、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)の検出は血

清学的にあるいはウイルス分離によって行われているが、精度に欠けたり、長時間（培養には3～4週間かかる）が必要であった。PCRによる検出は特異性が高く、しかも短時間で行うことができる。遺伝病の診断に比べ、感染症のほうは“あるかないか”の判定となるために、方法的にはより簡単である。そこで、以下にPCRによる遺伝病とウイルス診断の例をいくつか挙げつつ、診断方法についてまとめてみた。

a) 増幅遺伝子の電気泳動により確認する方法： 目的とする遺伝子配列をPCRを用いて増幅し、電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により確認できる。この方法では遺伝子の有無を診断することから、感染症の診断には適している^(3,4)。さらに増幅された遺伝子の長さを比較することによってDNAの欠失による異変の判断も可能である⁽⁵⁾。もしもDNA異変部位が制限酵素の切断部位にかかっている場合は、PCRで目的の遺伝子を増幅後、制限酵素で切断して上述と同様の確認操作をするだけで簡単に異変を確認できる。

b) オリゴヌクレオチドをプローブとしてハイブリダイゼーションを行う方法： PCRで目的とする遺伝子の増幅を行なった後、増幅を行ったプライマーとは別のしかも両プライマーの間の遺伝子配列のプローブを用いて、ハイブリダイゼーションにより検出するものである。この方法は感染症の検査に適しているが⁽⁶⁾、染色体の転座の検出にも利用されている⁽⁷⁾。また、PCRにより感度も特異性も飛躍的に向上しているため、サザンブロット法を用いなくても、ドットブロット法で十分な結果を得ることができる。

c) オリゴヌクレオチドをプローブとして、ハイブリダイゼーションの条件を厳密にしてミスマッチを検出する方法： b)と同様に検出する方法であるが、オリゴヌクレオチドとして19-mer ぐらいのものをプローブとして用いる。遺伝子配列により異なるが、通常45～55℃でプローブは相補的なDNAとはハイブリダイズするのに対して、ミスマッチを持つDNAとはハイブリダイズしない。このようにして1塩基のみの区別が容易に行なえる^(8,9,10,11)。

RNAプローブとPCRにより増幅した目的の遺伝子をハイブリダイズさせ、ミスマッチ部位をRNase Aで切断し、電気泳動により長さを確認し、診断する⁽¹²⁾。

d) オリゴヌクレオチドをハイブリダイズ後、制限酵素で切断する方法： 特異的制限酵素切断部位が再生するようなプローブ（末端は³²Pで標識）を溶液中でハイブリダイズさせた後、制限酵素で切断し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、オートラジオグラフィーで制限酵素で切断されたかどうかを検出する^(1,13,14)。

e) 直接遺伝子配列を決める方法： 増幅したDNAの塩基配列を後述するようにジデオキシ法により直接に決定する。

なおサンプルとしては、うがい液⁽¹⁵⁾ やパラフィン包埋切片でもPCRにより標的遺伝子が検出された^(6,12)。また、DNAを抽出せずに細胞そのままでもPCRを行なうことができる。

2) PCR法の応用によるクローニング法とシーケンス法の技術開発

これまでのクローニング法は標的となる遺伝子の量を予め増やしておくとか、精製しておく必要があり、野外から採取したような微量の試料そのものを調べるには適していない。また、プラークやコロニーを拾うのも確率論に従い、多大なる時間と労力を必要とする。しかも、常にドミナントなものを拾うとは限らない。これらの問題点を解決するクローニング法がPCRを利用することにより開発された。このクローニング法に適したシーケンス法も確立されたので、この2点を紹介する。

(1) シーケンス法

PCRで増幅したDNAの遺伝子配列は、ジデオキシ法により直接的に決定することができる (direct sequencing, DS)。また、PCRで増幅したDNAをサブクローン化して遺伝子配列の決定を行なうよりも、直接的に行なったほうが簡単に行なえる上、Taq DNAポリメラーゼの鋳型に対する忠実度が他の酵素に比べて低いことから直接行なったほうが良い結果が得られる。もし、サブクローン化を行なう場合は少なくとも5個以上のサブクローンを混ぜて遺伝子配列の決定を行なうことをお勧めする。DSについてはこれまでにいろいろの報告がある^(16,17,18,19)。

ジデオキシ法で遺伝子配列を決定する際に標的配列が1本鎖であると有利である。そのため、PCRプライマーの一端T7プロモーターを結合させてDNAを増幅し、その後、T7 RNAポリメラーゼで相当するRNAを合成し、そのRNAについて逆転写酵素を用いて遺伝子配列を決定する方法も考案されている⁽²⁰⁾。しかし、筆者らは以下に述べるような非対称PCR法 (asymmetric PCR)⁽¹⁸⁾ で1本鎖DNAを増幅し、遺伝子配列の決定を行ない、簡単にしかもM13ファージやプラスミドを使用する他の方法と遜色のない結果を得ている。

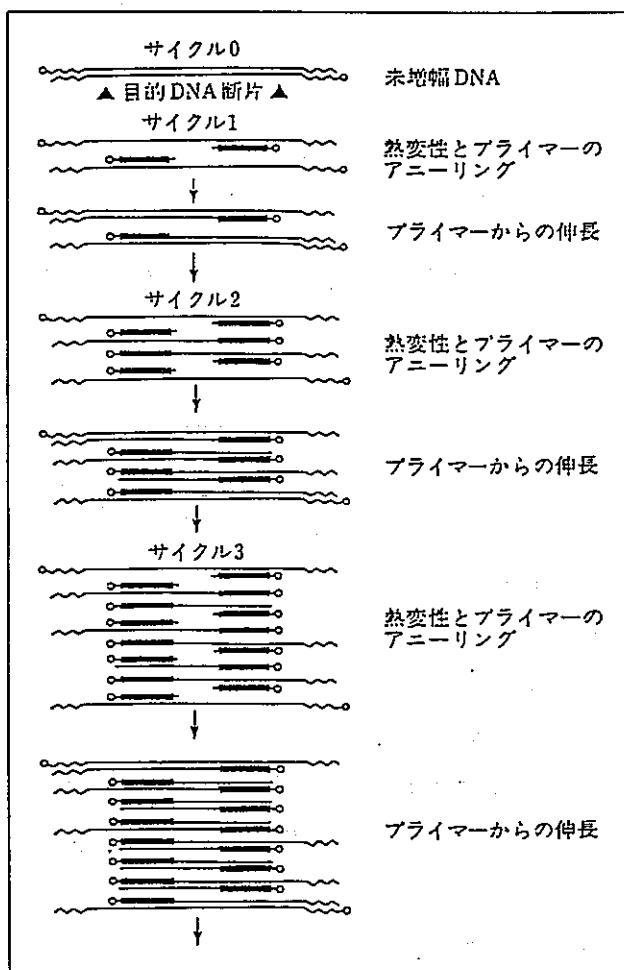
非対称PCR法は標的配列の両端のプライマーの一方を少なくしてPCRを行なうもので、通常1/20~1/200の量比でプライマーを添加する。反応中に一方のプライマーは消費し尽くし、片方のDNA鎖の増幅は停止するが、他方のDNA鎖はプライマーが過剰なために増幅し続け、1本鎖DNAを多量に合成する (図III-4-2)。筆者らは通常、一方のプライマーを0.4 μ Mとし、もう一方を10と2nMとし、

PCR後、電気泳動で確認し、1本鎖DNAの多いほうをシーケンスに用いている。

このシーケンス法では必ずプライマーにラベルしたものを用いなければならない。その理由は、①Taqポリメラーゼはヌクレオチド濃度を高く保たなければ誤読が多くなるため、アイソトープでラベルしたヌクレオチドを用いることはできない、②混在のプライマーの影響がでないようにするため、である。またラベルするプライマーはPCRに用いたものでも、内側のものでもどちらでも差し支えない。

シーケンスの反応は、ジデオキシヌクレオチドの違いによる4種類のターミネーション緩衝液を用いて、ラベルしたプライマーと非対称PCRにより得られた1本鎖DNAでPCRを10サイクル行ない、常法で電気泳動を行なう。ターミネーション緩衝液はTaqポリメラーゼの特性に基づき作られているので、ヌクレオチド濃度は十分に高くチェイスを行なう必要はない。

図III-4-2 1本鎖DNA作製の原理



目的の DNA 配列を挟んで、2本鎖にそれぞれ相補的なプライマー2つのうち、一方を少なくして行なう非対称PCR法である。これは一方のプライマーが他方に比べ過剰なため、PCRを行なっている途中で、少ないほうのプライマーは消費されるが、過剰なプライマーによる増幅だけが進行し、結果として1本鎖DNAを作製することができる。

(2) クローニング法

遺伝子クローニングには遺伝子の増幅が必須である。現在、プラスミドあるいはファージのベクターに組み込まれたDNAは大腸菌内で増幅されている。PCRを用いれば、細胞を使わずにin vitroでDNA断片を増幅できる。C. Leeらは、ブタ尿酸酸化酵素のアミノ酸末端の32個のアミノ酸配列を決定し、その両端に相当する混合プライマーを合成した。これを用いてPCRによってcDNAを増幅し、さらに別に合成したプローブによって求められるcDNAをクローニングした⁽²¹⁾。

PCRでは両端2本のプライマーが要求されるが、標的配列の3' 端末しかわからなくても、5' 端末に適当なアンカーを結合させればPCRを行なうことができる。C. Wongらは、このような方法でT細胞レセプターの新しいV δ 遺伝子セグメント(V δ_3)をクローニングした⁽²²⁾。

遺伝子制御タンパク質の結合するシーケンスの同定も全ゲノムのPCRによって行なわれた。まず、ゲノムDNAを適当な制限酵素で切断後、プラントエンドにし、20bpからなるcatch linkerと結合させる。なお、catch linker どちらの結合は制限酵素を作用させることにより除かれる。次に、linkerの結合したDNA断片に遺伝子制御タンパク質を結合させ、欲しいDNA断片のみを免疫沈澱により選択する。こうして得られたDNA断片を、linkerをプライマーとしてPCRで増幅させ、ファージやプラスミドを用いて目的の遺伝子がクローニングされた⁽²³⁾。

既知の遺伝子の両側の未知の遺伝子配列を増幅させる方法としてinverse PCRが考案された^(24, 25)。染色体DNAを適当な制限酵素で切断後、断片をself ligationさせ、環状の遺伝子に変える。既知の部分の遺伝子に対する逆方向の2つのプライマーを用いて図III-4-3のようにPCRを行なう。このようにして、H. Ochmanらは大腸菌のIS1の回りの遺伝子配列の増幅を行なった。

これらの方法はいずれも操作上煩雑であるか、あるいは成功する確率が低かったりする。次に紹介する藤原を中心とする筆者らのグループで開発した方法は、非常に簡単にしかも短時間で結果が得られる^(26, 27, 28)。マウスのゲノムDNAからH-2 class I 抗原の発現に関与するH-2 RIIBP 遺伝子の5' 上流域のクローニングに用いた方法の概要を図III-4-4に示す。PCRには必ず2つのプライマーが必要であり、一方の端の遺伝子配列しか明らかになっていない場合、PCRは行なえなくなる。したがって、他端に既知の遺伝子配列を付加するのがこの方法である。

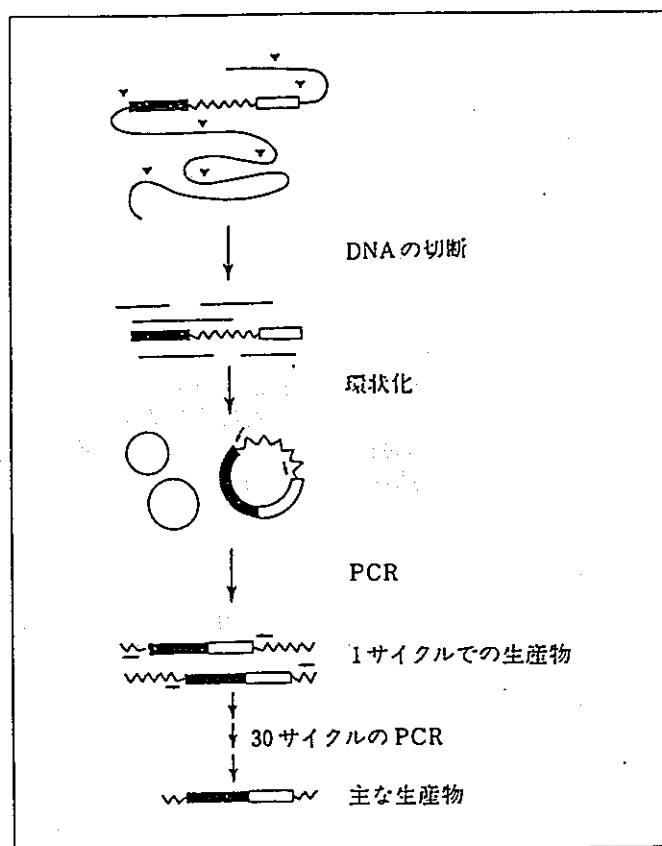
まず、ゲノムDNAをある制限酵素で切断する。付加する遺伝子として50bpの合成DNAからなるカセットを用い、切断するサンプルと連結し、サンプルに特異的なプライマーとカセットに特異的なプライマーによってPCRを行なった。さらに、上述したDSを併用し、遺伝子配列を決定した⁽²⁶⁾。

また、腎症候性出血熱ウイルスのB-1株のエンベロープタンパク質をコードして

いるMセグメントも同様の方法でクローニングした。腎症候性出血熱ウイルスはRNAウイルスなので、最初に特異的プライマーでcDNAを結合し、2本鎖にした後、制限酵素により切断する。後はゲノムDNAと同様にして遺伝子配列を決定する。このことを繰り返すことによって遺伝子上を歩行することができ、Mセグメントの全遺伝子配列を決定した⁽²⁸⁾。また現在、ヒトゲノムの遺伝子ライブラリーを作成し、いくつかの遺伝子のクローニングも行なっている。

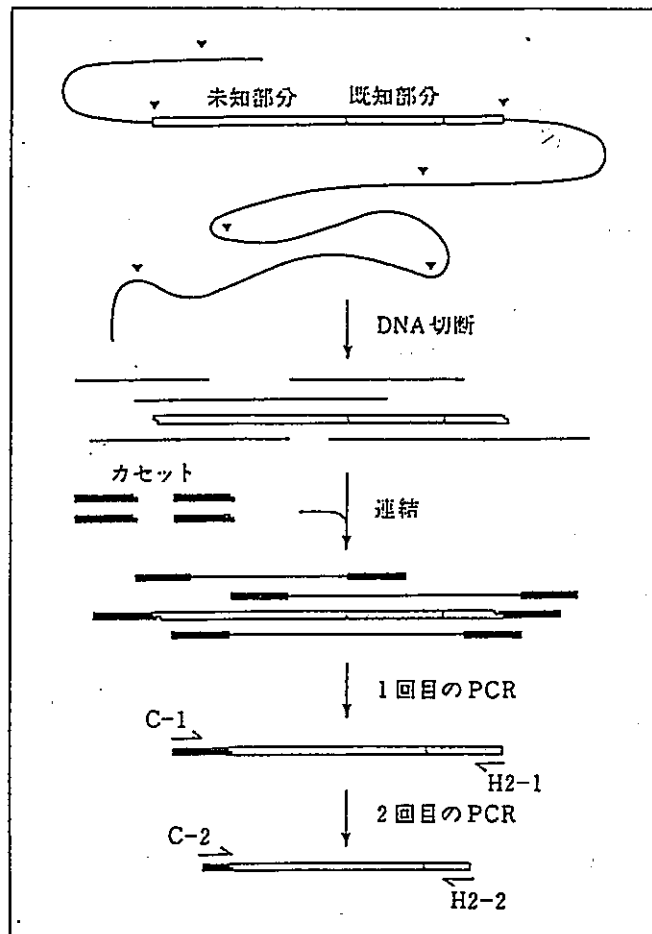
このクローニング法と上述のDSを組み合わせることによって現在、大腸菌に頼らない完全なin vitroの系で実験を行なえるようになった。この系の特徴はもとのDNAあるいはRNA中の標的遺伝子の量が非常に微量でも可能であり、しかも遺伝子配列の決定までの時間が短いことである。さらに、この方法を繰り返すことにより、遺伝子上の歩行が可能となり、ヒトゲノムのような巨大遺伝子の解析にも利用できる。

図III-4-3 Inverse PCR法の原



目的のDNAを制限酵素で切断後、断片をself ligationさせ、環状の遺伝子に変える。ぎざ線の既知の部分の遺伝子に対し、上流向きと下流向きの通常とは逆方向の2つのプライマーを用いてPCRを行なう。

図Ⅲ-4-4 カセット法の原理



目的の DNA を制限酵素で切断後、その制限酵素と見合ったカセットと ligation させる。斜線の既知の部分のプライマー (H2-1) とカセットのプライマー (C-1) を用いて PCR を行なう。ヒトゲノムのような巨大遺伝子の場合、さらに内側のプライマー H2-2 と C-2 を用いて PCR を行なう。

1988年に確立されたPCR法⁽²⁾は、これまで築かれてきた遺伝子工学を根底から覆すような革命的技術である。髪の毛一本⁽²⁹⁾やうがい液⁽¹⁵⁾からDNAが増幅されるという例にみられるように、非常に微量な試料から、しかも非常に短時間でDNAが増幅が可能になったためである。また、PCRを応用することによって、大腸菌に頼らないクローニング法^(24、25、26、27、28)とシーケンシング法^(16、17、18、19)が確立された。これらの方法はやがて、これまでの方法にとって変わり、遺伝子クローニングが機械化され、非常に短時間で遺伝子配列を読むことができるようになり、これまで人的労力と多大に費やしていたDNAレベルでの生物の解析が手軽に誰にでもできるようになってきている。

【参考文献】

- 1) R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich & N. Arnheim: *Science*, 230, 1350 (1985).
- 2) R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. Scharf, R. Higuchi, G. Horn, K. B. Mullis & H. A. Erlich: *Science*, 239, 487 (1988).
- 3) S. Kaneko, R. H. Miller, S. M. Feinstone, M. Unoura, K. Kobayashi, N. Hattori & R. H. Purcell: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 312 (1989).
- 4) Y. Isegawa, A. Oshima, H. Murakami & Y. Sokawa: in preparation.
- 5) H. Endo, K. Hasegawa, K. Narisawa, K. Tada, Y. Kagawa & S. Ohta: *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 358 (1989).
- 6) D. K. Shibata, N. Arnheim & W. J. Martin: *J. Exp. Med.*, 167, 225 (1988).
- 7) E. S. Kawasaki, S. S. Clark, M. Y. Coyne, S. D. Smith, R. Champlin, O. N. Witte & F. P. McCormick: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5698 (1988).
- 8) U. Landegren, R. Kaiser, C. T. Casky & L. Hood: *Science*, 242, 229 (1988).
- 9) R. K. Saiki, T. L. Bugawan, G. T. Horn, K. B. Mullis & H. A. Erlich: *Nature*, 324, 163 (1986).
- 10) J. A. Todd, J. I. Bell & H. O. McDevitt: *Nature*, 329, 599 (1987).
- 11) C. J. Farr, R. K. Saiki, H. A. Erlich, F. McCormick & C. J. Marshall: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 1629 (1988).
- 12) C. Almoguera, D. Shibata, K. Forrester, J. Martin, N. Arnheim & M. Perucho: *Cell*, 53, 549 (1988).
- 13) S. Kwok, D. H. Mack, K. B. Mullis, B. Poiesz, G. Ehrlich, D. Blair, A. Frieman-kien & J. J. Sninsky: *J. Virol.*, 61, 1690 (1987).
- 14) C. Ou, S. Kwok, S. W. Mitchell, D. H. Mark, J. J. Sninsky, J. W. Krebs, P. Feorino, D. Warfield & G. Schochetman: *Science*, 239, 295 (1988).
- 15) N. Lench, P. Stanier & R. Williamson: *Lancet*, i, 1356 (1988).
- 16) C. Wong, C. E. Dowling, R. K. Saiki, R. G. Higuchi, H. A. Erlich & H. H. Kazazian: *Nature*, 330, 384 (1987).
- 17) D. R. Engelke, P. A. Hoener & F. S. Collins: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 544 (1988).
- 18) U. B. Gyllensten & H. A. Erlich: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 7652 (1988).
- 19) M. A. Innis, K. B. Myambo, D. H. Gelfand & M. A. D. Brow: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 9436 (1988).

- 20) E. S. Stoflet, D. D. Koeberl, G. Sarkar & S. S. Sommer: *Science*, 239, 491 (1988).
- 21) C. C. Lee, X. Wu, R. A. Gibbs, R. G. Cook, D. M. Muzny & C. T. Caskey: *Science*, 239, 1288 (1988).
- 22) E. Y. Loh, J. F. Elliott, S. Cwirla, L. L. Lanier & M. M. Davis: *Science*, 243, 217 (1989).
- 23) K. W. Kinzier & B. Vogelstein: *Nucl. Acids Res.*, 17, 3654 (1989).
- 24) H. Ochman, A. S. Gerber & D. L. Hartl: *Genetics*, 120, 621 (1988).
- 25) T. Triglia, M. G. Peterson & D. J. Kemp: *Nucl. Acids Res.*, 16, 8186 (1988).
- 26) Y. Fujiwara, Y. Isegawa, K. Hamada & Y. Sokawa: in preparation.
- 27) Y. Fujiwara, Y. Isegawa, H. Murakami, K. Yamanishi & Y. Sokawa: in preparation.
- 28) Y. Isegawa, Y. Fujiwara, A. Ohshima, R. Fukunaga, H. Murakami, K. Yamanishi & Y. Sokawa: *Nucl. Acids Res.*, 18, 4936 (1990).
- 29) R. Higuchi, C. H. von Beroldingen, G. F. Sensabaugh & H. A. Erlich: *Nature*, 332, 543 (1988).

5. 生体の非破壊計測におけるNMRの利用

1) IN VIVO NMRの利点

核磁気共鳴法は、生物を生きた状態のまま、その生命過程を観測することができる。非破壊非侵襲計測で使用する電磁波のうち、X線からラジオ波までの内、最もエネルギーの低いラジオ波を用いるNMRは、非測定系に対する影響が最も少なく、生体計測に適している。NMRは、非常に多くの生体の分子レベルの情報を解析することが可能で、IN VIVO NMR法により生化学情報を得ることが可能である。放射線の生物に対する影響を観測する場合においても、その影響を非破壊で測定することによって分子レベルの観測と個体レベルの観測の両方を可能にするため、IN VIVO NMRによる測定は今後の研究に有用であると考えられる。

2) IN VIVO NMR測定の概要

IN VIVO NMRの測定を行うための装置は、基本的には分析用の高分析能NMRと変わることなく、超伝導磁石、核スピンの励起のためのラジオ波送信機、信号受信機、分光計全体を管理しデータ処理を行うためのコンピュータよりなる。細胞懸濁液や切り出した組織の測定には、高分解能分光計をそのまま使用できる。しかし、生体の生理状態を維持するための灌流装置や、植物を対象とする場合の光照射装置などは自作する必要がある。実験動物の測定用には、2～7 Teslaの磁場強度で、動物を水平に収容できる大口径（20～40 cm）の横置き型磁石を備えた専用機が開発されている。この装置は、イメージ測定や局在化測定（後述）のために勾配磁場を駆動するユニットを備えている。また、大口径の検出器用に高出力のラジオ波送信系を有する（通常の高分解能分光計は50～100 Wの出力であるのに対し、1～数kW）。人体測定用には、1.5～2 Tesla、口径60～100 cmの磁石を備えた分光計が用いられるが、分光測定のための機能は必ずしも充分でないといわれる。

表Ⅲ-5-1に、IN VIVO NMRの測定の対象となる核種をあげる。これまで³¹P核が最も多く利用されてきた。³¹Pは解糖系の中間体や、ATPなど比較的限られた代謝物に含まれるため、共鳴線の分離がよく、エネルギー代謝に関する情報を得られるためである。¹H核は検出感度も高く、ほとんどすべての有機代謝物に含まれるが、逆にこの遍在性がスペクトルの分離を阻害し、生体内に多量に存在する水の巨大な信号が他の微量代謝物の観測の妨害となるため、単純測定では有意の情報を得られない。¹³C、¹⁵N、²Hは天然存在比が小さいため、検出感度の低さを克服できれば、有効な安定同位体標識として有望である。¹⁹Fは本来生体内に存在しな

いが、検出感度が高く、バックグラウンド信号がないので一種の標識として応用が増加しつつある。 ^{23}Na は陰イオン性の化学シフト試薬の開発により、細胞内外のナトリウムイオンを識別できるようになったために、イオン分布やイオン輸送の研究への道が開けた。

表Ⅲ-5-1 In vivo NMRの測定に用いられる主な核種の性質

核種	共鳴周波数 (MHz) ^{*1}	天然存在比 (%)	相対感度 ^{**}	スピン
^1H	100.000	99.985	1	1/2
^2H	15.351	1.5×10^{-2}	9.65×10^{-3}	1
^{13}C	25.144	1.108	1.59×10^{-2}	1/2
^{14}N	7.225	99.63	1.01×10^{-3}	1
^{15}N	10.133	0.37	1.04×10^{-3}	1/2
^{17}O	13.557	3.7×10^{-2}	2.91×10^{-2}	5/2
^{19}F	94.077	100	0.833	1/2
^{23}Na	26.451	100	9.27×10^{-2}	3/2
^{31}P	40.481	100	6.63×10^{-2}	1/2
^{35}Cl	9.799	75.53	4.71×10^{-3}	3/2

*1 磁場強度 23.487 G の場合

** ^1H の感度を1とした時の相対値.

出所) 化学と生物 Vol.28 No.10

一方、ダブルチューン、トリプルチューン信号検出器の作製や、複数の検出コイルを同時に使用することによって、2つないし3つの核種を同時測定することも可能になってきた。

このようにして測定されたスペクトルからは、代謝物の化学シフト、スピン結合、緩和時間、共鳴線強度という4種類の独立したパラメータが得られる。

化学シフトは、第1次的には化合物内の電子による外部磁場の遮蔽によって生ずるため、その値は代謝物の構造に対応している(スペクトルでは横軸に展開される)。化学シフトの存在こそが、生体のような不均一混合系で、様々な代謝物を非分離で識別することを可能にしている。化学シフト値はまた、代謝物どうし、あるいは金属イオン、水素イオンとの相互作用によっても変化するため、これを用いて細胞内 pH の推定や、相互作用の解析を行うことができる。

スピン結合は2つ以上の核スピンの構造上近い位置に存在する時に現われるスピンの相互作用である。この相互作用は結合電子を媒介とするため、代謝物の局所構造を反映する。IN VIVO NMR測定では、スピン結合(通常 Hz 単位で表示され、J で表わされる)自体が解析に用いられるよりは、重なりあった共鳴線の中から目的とする代謝物の共鳴線を選択するための手がかりの一つとして意味が大きい。

緩和時間は、スピン系が観測によって平衡状態からずらされた時、元の状態に復帰する速さの時定数で、分子運動の大きさに関連している。 T_1 、 T_2 と2種類の異なる時定数があり、 T_2 はスペクトルの線形を規定する。生体内の小分子の代謝物で

は、 T_1 、 T_2 は概ね数十ミリ秒～数秒の範囲にある。NMRスペクトルの中にこのような時間因子が入っていることは、この時間範囲内に起こる代謝反応などの動的過程を解析するための手段を提供する。また、代謝物間での緩和時間の違いは、スピン結合の場合と同様にスペクトル編集の手がかりとなる。

共鳴強度はスピン濃度、したがって代謝物の濃度に対応する。通常、ピーク面積としてとらえられるが、測定条件によっては共鳴線強度は代謝物濃度を正しく反映しないこともある。

3) IN VIVO NMRの使用例

(1) IN VIVO NMRで得られる情報

これまでにIN VIVO NMR法を用いて得られた生化学情報、およびその解析法を表Ⅲ-5-2にあげる。表より明らかなように、細胞内pHや代謝物の存在状態といった細胞内環境から、生体内の特定の酵素の反応速度、熱力学パラメータまで一つの方法によるとは思えないほどの多彩な情報が得られている。さらに、これらを組み合わせて、生体の機能診断、病態の解析などが行われる。以下に、いくつかの例について詳細に記す。

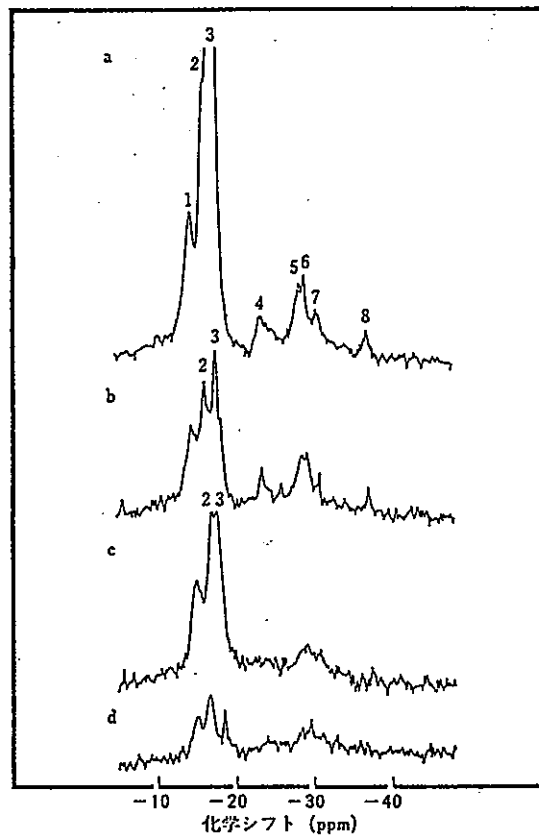
表Ⅲ-5-2 In vivo NMRにより得られる生化学情報とその解析法

生化学情報	解析法
代謝物の同定	代謝物に固有の化学シフト値，スピン結合，緩和を含めたスペクトルパターンを標準物質と比較することにより行われる。
代謝物の定量	スペクトルの共鳴線強度の算定により行う。同一試料中の同一物質の相対値変化を得ることは比較的容易であるが，絶対値の定量には，NOE，緩和時間の考慮など注意を要する。検出限界は核種，生体の状態，使用機器により大きく変わるが， ^{31}P 核で条件のよい場合で，mM～サブmM。
細胞内pH，及びコンパートメンテーション	細胞内の酸解離物質の化学シフト値，または共鳴線強度がpK _a 付近でpHに対応して変化することを利用する。細胞内にpHの異なるコンパートメントが存在する場合には，上記の代謝物はコンパートメントごとに個別に観測されるので，非分離でコンパートメンテーションを観測できる。
細胞内pCa	カルシウムイオンに選択的なキレート剤を“指示薬”として細胞内に導入し，その共鳴線強度，または化学シフト値がキレーションの割合によって変化することを利用する。
イオン分布	シフト試薬を用い，細胞外のナトリウム，カリウム，リチウムなどのイオンを選択的にシフトさせ，細胞内外の共鳴線を個別に観測する。細胞内のアルカリ金属イオンは必ずしも100%検出可能ではないので注意を要する。
代謝反応速度	代謝反応が定常状態にない場合は，代謝物の共鳴線強度の時間変化から代謝速度が得られる。安定同位体標識化合物をトレーサーとして用いる場合にも同様の手法が用いられる。代謝が定常状態にあり，共鳴線強度が変化しない場合には磁化移動法，線形解析が用いられる。
代謝経路	安定同位体標識の，代謝に伴う移動の追跡。放射性同位体標識の場合と異なり，非分離で標識位置に関する情報が得られる。
代謝反応の熱力学的パラメータ	上記の反応速度定数の温度変化の解析など。
代謝物の存在状態	緩和時間の解析より得られる代謝物の運動状態，化学シフトやスピン結合より得られる代謝物相互，あるいは膜，金属イオンなどとの相互作用など。
代謝物の構造	不安定で分離操作により分解してしまう代謝物の構造に関しては， <i>in vivo</i> で通常のNMRの構造解析法を適用する。酵素など高分子物質の高次構造の解析は，現在のところ実現できていないが，赤血球中のヘモグロビンのように多量に存在する物質では，化学シフト値，緩和情報を用いて，例外的に高次構造に関する知見が得られる。

(2) 共鳴線強度による代謝物濃度の変化の測定

水耕法により得たダイズ根粒の ^{31}P NMRスペクトルを、図Ⅲ-5-1に示す¹⁾。クロレラ細胞の場合とは異なり、細胞質と液胞に由来する2本の P_i が観測される。リン酸欠乏で水耕を行うと、液胞内の P_i が選択的に減少するのがみられる(図Ⅲ-5-1-b)。また、根粒の窒素固定サイトであるバクテロイドを単離してやると、液胞に由来する P_i は消失し、根粒全体とは明らかに異なるスペクトルが得られる(図Ⅲ-5-1-d)。逆に、貧栄養環境で生育している蘚苔類の茎葉体では、培地に P_i を加えると、液胞内に急速に P_i を取り込む様子が見られた。液胞内の P_i の共鳴線強度の経時変化を追跡することにより液胞への P_i の取り込み速度が求められた¹²⁾。この方法の利点は、同一個体で継続して変化を追跡できるので、個体差による測定値のばらつきを回避できることである。

図Ⅲ-5-1 ダイズ根粒の ^{31}P NMRスペクトル



a) 正常の根粒, b) リン酸欠乏の水耕液で2週間栽培したダイズの根粒, c) b) の CCCP 処理, d) 根粒より単離したバクテロイド
 1: 糖リン酸, 2: 細胞質 P_i , 3: 液胞 P_i , 4: ATP_γ , 5: ATP_α , 6: $\text{NAD}^+ + \text{UDP-グルコース}$, 7: UDP-グルコース , 8: ATP_β

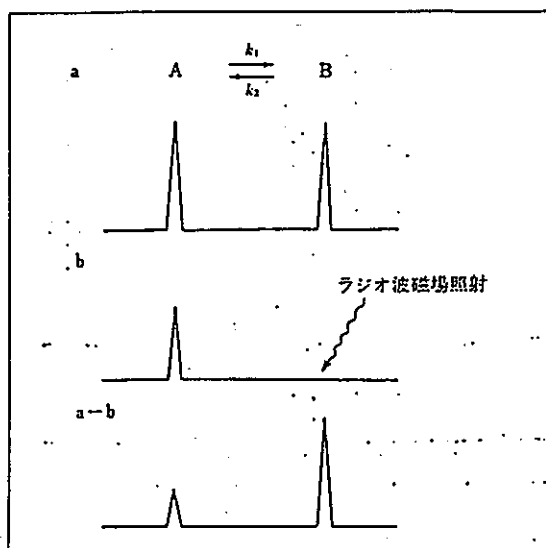
出所) F. Mitsumori, T. Yoneyama & O. Ito: Plant Sci., 38, 87(1985)

(3) 磁化移動法による代謝速度の測定

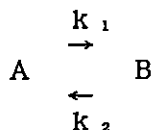
通常の方法としてはNMRで代謝を解析する場合には、共鳴線強度より代謝物濃度さらにはその経時変化から代謝反応の動態を解析する基本的な方法があるが、代謝が定常状態にあり安定同位体標識も用いられないような場合には、共鳴線強度は変化しないため、解析手段とならない。たとえば、細胞内のATPは通常、生成と分解の反応がバランスして定常レベルに保たれている。このような場合には、磁化移動法が代謝速度に関する情報を与える。磁化移動法は、代謝物の特定の核の磁化に、選択的に飽和や反転を導入し、この導入磁化の代謝反応による変化を追跡する手法である^{14, 15)}。同位体標識法に対比して、一種の磁氣的な標識法と考えることができる。

飽和移動法の場合を図III-5-2に示す。最も簡単なA、B、2者の間の交換反応を考えよう。

図III-5-2 飽和移動法の概念図



出所) 化学と生物 Vol. 28 No. 10



A、BはともにNMRスペクトル上で個別に観測されているものとする（図III-5-2-a）。ここでBの共鳴周波数に一致したラジオ波磁場を照射すると、Bの磁化には飽和と呼ばれる現象が起こり、磁化がゼロになる。このような飽和磁化はスペクトル上では観測されないので、ネガティブな標識として利用できる。もし交換反応がなければ、Bへの飽和磁化の導入は、Aの共鳴線に何の影響も及ぼさない。しかし交換反応があると、飽和磁化はB→Aの反応でAに流入する。Aに流入した飽和磁化は、Aの緩和過程に従って回復するが、同時にA→Bの反応によってBに戻り再び飽和されるという過程を繰り返す。

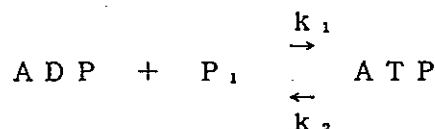
したがって、Aの共鳴線強度はAの縦緩和時間（ T_1 ）および k_1 の関数として度が減少することになる（図III-5-2-b）。この強度の減少分 ΔM_A は次式で表わされる。

$$\frac{\Delta M_A}{M_{0A}} = \frac{k_1}{1/T_1 + k_1}$$

$$\frac{1}{T_1^*} = \frac{1}{T_1} + k_1$$

ただし、 M_{0A} は A の平衡磁化、 T_1 は A の本来の緩和時間、 T_1^* は B サイトを飽和した時の A の緩和時間である。

細胞内の炭素基質を消費して好氣的代謝を行っている大腸菌細胞で、ATP の代謝速度の測定に本法を適用した例を図 6 に示す¹⁶⁾。

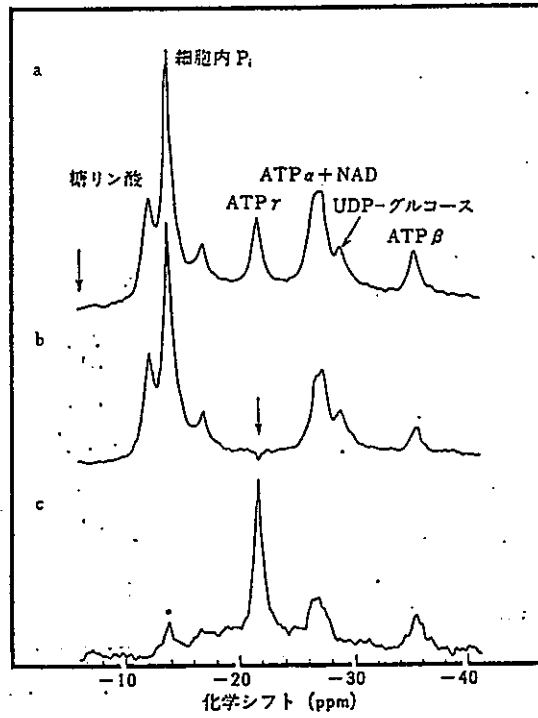


ここでは、 $[\text{ADP}]$ を k_1 のなかに繰り込み、 P_i と ATP の γ 位のリン酸基との間の交換反応としてこの反応をとらえる。ATP γ を飽和すると (図 III-5-3-b) 細胞内 P_i がわずかに減少する。この減少分は対象位置照射スペクトル (図 III-5-3-a) との差スペクトル (図 III-5-3-c) より読み取れる。これより、 $k_1 = 0.16 \text{ s}^{-1}$ 、 $\text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$ のフラックスは $1.1 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1}$ (ml packed cell)⁻¹ と算出された。

この方法で測定される代謝速度は、可逆反応の順、逆方向の差による純生成速度ではなく、順、または逆方向の単方向速度であることを強調しておく必要がある。この大腸菌で測定された $\text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$ のフラックスは、ATP 合成酵素に由来するものではなく、解糖系のグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) およびホスホグリセレートキナーゼ (PGK) 部位での平衡反応の P_i と ATP の交換反応に由来することが明らかにされた。

磁化移動法にはこのほか、飽和の代わりに磁化の反転を導入する反転移動法や、交換反応による磁化の移動を交差緩和項として二次元 NOE 法で観測する方法がある¹⁷⁾。

図 III - 5 - 3 大腸菌細胞の飽和移動³¹P NMR スペクトル



↓は飽和の導入位置を示す。細胞内 P_i (*) に飽和移動がみられる。

出所) F. Mitsumori, D. Rees, K. M. Brindle, G. K. Radda & I. D. Campbell: Biochim. Biophys. Acta, 969, 185 (1988)

【参考文献】

- 1) F. Mitsumori, T. Yoneyama & O. Ito : Plant Sci., 38, 87(1985)
- 2) F. Mitsumori & K. Satake : to be published.
- 3) O. Ito, F. Mitsumori & T. Totsuka : J. Exp. Bot., 36, 281(1985)
- 4) S. Forsen & R. A. Hoffman : J. Chem. Phys., 39, 2892(1963)
- 5) J. R. Alger & R. G. Shulman : Q. Rev. Biophys., 17, 83(1984)
- 6) F. Mitsumori, D. Röss, K. M. Brindle, G. K. Radda & I. D. Campbell :
Biochim. Biophys. Acta, 969, 185(1988)
- 7) J. Jeener, B. H. Meier, P. Bachmann & R. R. Ernst : J. Chem. Phys., 71, 4546
(1979)

IV. 放射線防護からみた研究分野

IV 放射線防護から見た研究分野

1. 放射線防護とバイオテクノロジー

放射線防護は、放射線利用に伴う被曝によって生じる可能性のある影響をできるだけ少なくする（しきい値がないと仮定するため）ための防護計画を作成することが目的であり、現在の最新の知見をもとに、防護基準を組み立てている。

現在の放射線防護のやり方は、リスク評価結果に依存して防護策を選択しているわけではなく、線量制限体系に従って合理的に達成できる限り線量を低減する方法をとっている。そして、リスクからだけでなく、管理方法の観点から決められた調査レベル及び介入レベルなどの参考レベルによって、より安全裕度の高い防護が実施されることが重要であるとしている。

このようなリスク管理とリスク評価との違いを考える場合に、バイオテクノロジーは、リスク評価に対してだけ有効に利用されるという立場をとるのではなく、積極的にリスク管理に対しても使用できるテクノロジーである可能性を認識することが必要である。この認識のもとにリスク管理とリスク評価を行っていく新しい方法を模索することは、今後の放射線防護の考え方を進展させ、従来の害としての放射線に対する考え方から一步前進することとなろう。例えば、染色体に対する損傷を考える場合には、リスク評価としてもリスク管理としても重要である。放射線ホルミシスの概念は、従来のリスク評価の考え方を一変させるだけのインパクトを持つものである。

放射線照射によって、生物が被る影響を生物が生きたままの状態、非破壊的に観測することは、リアルタイムにリスク管理とリスク評価を同時に行うことにつながる。生体が放射線被曝によって受けている影響は、常に受けたダメージとそれに対する修復とのバランスの結果が観測されているのであり、バランスが取られる状態そのものを観測対象としていくことを可能にするのが従来のマクロな観測を主とする生物学とは一線を画したバイオテクノロジーであるといえよう。

放射線ホルミシスは、このようなバランスの取られた結果としてのしきい値の可能性を強調するものであるが、ホルミシス現象の解明において重要である観測系の開発こそが1章で論じたように生物モニタリングにおける「生きた状態としての生物」に対する影響評価に大切なのであり、観測の様々のレベルと考え方が2章において言及した、分子、代謝、細胞の各レベルでの変化や、遺伝情報発現の変化に着目してより有効な観測系を開発するということにつながるのである。

2. 緊急被曝医療とバイオテクノロジー

緊急被曝医療における車輪の両輪は、汚染物質除去と放射線防護剤であるが、これらは、異なるものであり、放射線障害の「原因に対する対応」と「結果に対する対応」の関係にある。前者は、生体内における金属代謝についての総合的な知見が必要であり、後者は、ラジカルと生体についての総合的な知見が必要となる。急性障害に対する治療では、汚染物質の除去と放射線防護剤が同時に速やかに使用される必要があるが、治療としての緊急医療だけでなく、今後は予防被曝医療とでもいうべき、予め放射線被曝すると予測される場合への対処方法の開発が望まれる。放射線治療においては、放射線被曝は前もって予想されているがこのようなケースですら現状では対処しきれず、予測されている危険に対する対処すらできていない現状では予防被曝医療には程遠いものの、放射線による影響のメカニズムの研究の進展によって、予防的な処置も進歩していくものと考えられる。予防的な処置や、緊急時における処置方法においても有効な手段の開発のためには、従来の方法では考えられなかったほど精密でかつ迅速な検査方法などの開発が必要となってくる。

損傷修復系に対する研究と被曝の影響回避の方法に対する研究は、基礎と応用の関係にあり、前者が生体の損傷メカニズムに対する基礎的な知見を提供するのに対して、後者はその知見を利用して放射線を被曝した人体に対してどのような方法でもって対処可能であるかということの研究するものである。

従来から行われてきた放射線防護という概念は、物理的な対応策のことを指すことが多いが、バイオテクノロジーを適用する放射線防護においては、生物学的な対処（生物が持っている能力を生かす、利用する）による放射線防護であり、生物特有の環境からのダメージからの回復という機能を積極的に利用していくことになろう。

V. 研究テーマの提案と分析

V章 研究テーマの提案と分析

1. 研究テーマの分析フォーマット

研究テーマの分析に際しては、一つのテーマ設定において検討されるべきものとして以下の点に留意している。すなわち、ある問題意識に対して取り扱う研究材料の違いによっては全く異なるケースと、研究材料によらずに共通の事象を観察できる場合とがある。したがってこれらの要因によって問題意識を明確にし、研究テーマに幅を持たせつつ収束させることができるようにテーマについては主要テーマと一般化テーマと派生テーマの3種類を設定して、各研究テーマについて分析を行う。

①対象とする生物レベルの問題

分子を対象とするのか、代謝系を対象するのか、個体を対象としているのかなどの生物レベルの設定によって同じ問題意識であっても実験系を構築する内容が今般的に異なってくる。また同じ生物レベルであっても生物種を変えることで実験系も異なってくる場合と共通で行える場合とがある。生物レベルが低いほど生物種によらず共通の事象であることが多い。

②対象とする生物種の問題

同じ問題意識で同じ生物レベルを扱う場合においても、生物種固有の特性を無視できない場合があり、その生物種特有の性質もテーマ設定の問題意識としている場合や生物種によって特性が予期せずに全く異なる場合には生物種の選択は非常に重要なファクターとなる。

③研究テーマの一般化

ある研究テーマを設定した場合に、そのテーマを一般化することによって大きな枠組みから見たテーマ設定が可能になり、一般化した後再び個別化することによって少しもとのテーマと関連があるものもとのテーマとは異なるテーマになる場合がある。これを派生テーマとここでも名付ける。個別化→一般化→再個別化を素繰り返すことにより、より最初の問題意識に対して解決可能な研究テーマが想定できることを狙って行った作業である。

④ 実用面でのインパクト

研究テーマが実現化した場合に、それがもたらす効果について可能な範囲で述べている。基礎的な研究を行うだけでなく実用上のインパクトについてふれる。

⑤ 研究目的の達成難易度

抽象的な表現をするしかないが、研究目的がそもそも達成できるかどうかについて検討する

⑥ バイオテクノロジーとの関連について

バイオテクノロジーとしてどのような技術的な要素を使用するかについてふれる。

2. 研究テーマの提案

Ⅱ章において各研究分野の概説を行ったが、これらの分野において今後の研究課題としてあげたものやそれに関連する研究内容の中から、今後将来的に重要であると考えられるテーマを抽出した。

分析フォーマットのうち、主要、一般化、派生の3テーマとも設定できるテーマは少ないが可能な限り一般化して提案するようにした。

ジャンル	主要テーマ
放射性核種を集積する生物	放射性核種を高濃度に濃縮する生物を探索する。特に、シダ植物、ワラビ、ゼンマイの類を探索する。
放射性核種を集積する生物	褐藻の品種改良による濃縮比の高い株の育成
放射性核種を集積する生物	マタゴをはじめとする元素の局在傾向が強い生物の探索
放射線耐性機構の解明	放射線抵抗細菌のスクリーニング、形態的生理的研究
放射線耐性	放射線抵抗性遺伝子のクローニング 放射線抵抗性遺伝子の機能の解析
バクテリアリーチング	バクテリアリーチングのための高効率の菌株の育種
バイオソープション	海藻の品種改良による高効率ウラン回収用海藻の開発
バイオソープション	生体由来成分のうち、ウランや放射線核種を吸着する物質をスクリーニングする。また吸着特性を向上させるように分子を改変する。
集積解除	キレート剤のためのドラッグデリバリーシステムの研究
集積解除（キレート剤）	生体成分中に含まれているキレート効果のある成分を探索する
集積解除	食品中に含有している放射線核種の体外排除を促進する成分を探索し、その成分を強化した機能性食品を開発する

ジャンル	主要テーマ
集積解除	さらに食事療法としての有効な使用方法も開発する。
異常分子の観測	金属を濃縮する微生物の産生するキレートスクリーニングする。
損傷修復・耐性機構	生体内において放射線照射を受けた場合に生成されるDNA関連物質に関してモノクローナル抗体を作成し、その異常分子の検出を迅速かつ安易に行なう方法を開発する。
放射線防護剤	タマムシの放射線耐性機構の解析
放射線防護物質	細胞内の放射線防護剤のスクリーニング
放射線ホルミシス	生体内の特定の放射線防護物質をコードする遺伝子の発現制御系の研究
放射線ホルミシス	放射線ホルミシスを応用した種子加工法の開発
放射線ホルミシス× 遺伝情報発現の変化	分子レベルの変化測定系を用いた放射線影響の解明
生物元素変換	微生物における低線量照射下における遺伝情報発現の非照射下との比較及び両者のmRNA比較
	微生物による生物元素変換の是非の確認

<p><主要テーマ> ジャンル：放射性核種を集積する生物</p> <p>放射性各種を高濃度に濃縮する生物を探索する 特に、シダ植物、ワラビ、ゼンマイの類を探索する</p>	<p><一般化したテーマ></p> <p>生物による放射性核種の濃縮の利用を目的とした対象生物の探索</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境ヒリガとの関連など)</p> <p>放射性核種の植物による回収法の開発、汚染地域に植えて刈り取りを行い、汚染土壌の浄化を目指す</p>	<p><派生するテーマ></p> <p>ウラン鉱山周辺における濃縮植物の探索</p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>このような目的に利用できる植物がなければ、成果を期待できない</p>	<p><着手の容易さ></p> <p>探索に費用はかかるが、方法論上の困難さはなく、容易に着手可能</p>
<p><研究上の問題点></p> <p>濃縮メカニズムを解明なき場合に、突然変異誘発による育種方法に頼る必要がある。</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>先端的なテクノロジーよりも、生物学的な知見が必要である</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：放射性核種を集積する生物</p> <p>褐藻の品種改良による濃縮比の高い株の育種</p>	<p><一般化したテーマ></p> <p>高濃縮生物の品種改良によるさらなる高濃縮生物の作出</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境モニタリングとの関連など)</p> <p>バイオロジカルリーチングに利用可能性有り</p>	<p><派生するテーマ></p>
<p><研究目的の達成難易度></p>	<p><着手の容易さ></p>
<p><研究上の問題点></p> <p>品種改良手段の開発が必要</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル <p>高濃縮変異株の分離から濃縮機構の解明につながることもある</p>
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>藻類の遺伝子操作方法の開発と利用</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：放射性核種を集積する生物</p> <p>マダコをはじめとする元素の局在傾向が強い生物の探索</p>	<p><一般化したテーマ></p> <p>高濃縮生物の元素局在性の検討 濃縮係数が極端に高くなくても、臓器特異的に濃縮する生物の集積機構には、集積機構解明の糸口が隠されている</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境モニタリングとの関連など)</p> <p>高濃縮生物のカタログの項目を増やし、濃縮機構を解明する対象生物の選定の一助とする</p>	<p><派生するテーマ></p> <p>生物種の拡大 微生物、藻類、植物、軟体動物</p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>濃縮の局在性を検討することは容易である</p>	<p><着手の容易さ></p> <p>海洋生物を対象とする場合には、その採集にコストがかかる</p>
<p><研究上の問題点></p> <p>基本的には、単純作業であるため、探索することはできるが時間がかかる</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>より迅速な方法を検討する</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：放射線耐性機構の解明 放射線抵抗性細菌のスクリーニング、形態的生理的研究</p>	<p><一般化したテーマ></p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境モニタリングとの関連など) 放射線耐性の研究材料として有効なもののカタログを増やす。</p>	<p><派生するテーマ></p>
<p><研究目的の達成難易度> 菌株のスクリーニングは必要とする</p>	<p><着手の容易さ></p>
<p><研究上の問題点></p>	<p>その他 <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル </p>
<p><バイオテクノロジーとの関連></p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：放射線耐性</p> <p>放射線抵抗性遺伝子のクローニング 放射線抵抗性遺伝子の機能の解析</p>	<p><一般化したテーマ></p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境モニタリングとの関連など)</p> <p>放射線耐性機構の解明に貢献する。</p>	<p><派生するテーマ></p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>実験系としては単純な系が構築できる</p>	<p><着手の容易さ></p>
<p><研究上の問題点></p> <p>遺伝子のクローニングはできても、機能の解析は困難な場合が多い。</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>遺伝子工学的な手法を用いることが多い。</p>	

<p><主要テーマ> ジェンル：バクテリアリーチング バクテリアリーチングのための高効率の菌株の育種</p>	<p><一般化したテーマ> バクテリアリーチングの高効率化の研究</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境モニタリングとの関連など) 資源問題の解決</p>	<p><派生するテーマ> バクテリアリーチングのプロセス改善の研究</p>
<p><研究目的の達成難易度> 基本的にはバクテリアの育種であり、変異株の分離と解析であるため、容易</p>	<p><着手の容易さ> 既に行われていることであるので、着手は容易だが、場所の制約がある</p>
<p><研究上の問題点> 高効率にリーチングすることができる変異株をスクリーニングする系をつくるのが難しい。</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル
<p><バイオテクノロジーとの関連> 高効率な変異株の変異部位の解析、あるいは、変異株の遺伝子を野生株にショットガンクローニングして高効率になる変異の確定が可能。</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：バイオソープション</p> <p>海藻の品種改良による高効率ウラン回収用海藻の開発</p>	<p><一般化したテーマ></p> <p>海藻がウランを吸着させるメカニズムの研究</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境モニタリングとの関連など)</p> <p>資源問題の解決</p>	<p><派生するテーマ></p> <p>ウランを吸着している化合物の化学合成による人工吸着膜の作成</p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>海藻に品種改良の方法を開発する必要がある。</p>	<p><着手の容易さ></p>
<p><研究上の問題点></p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>高吸着海藻の遺伝子工学的な育種 (可能であれば)</p>	

V-11

<p><主要テーマ> ジャンル：バイオソープション</p> <p>生体由来成分のうち、ウランや放射性各種を吸着する物質をスクリーニングする また吸着特性を向上させるように分子を改変する</p>	<p><一般化したテーマ></p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境エンリッチとの関連など)</p> <p>有害金属の回収や放射性廃棄物の回収など実用上メリットは大きい</p>	<p><派生するテーマ></p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>コストの問題をクリアしないと実用には共しない</p>	<p><着手の容易さ></p>
<p><研究上の問題点></p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>吸着能力を向上させるための改変を遺伝子工学やタンパク質工学などにより行う。</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：集積解除</p> <p>キレート剤のためのドラッグデリバリーシステムの研究</p>	<p><一般化したテーマ></p> <p>これ以上は一般化できない</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境ヒューグとの関連など)</p> <p>既存のキレート剤の効果を上げ、副作用を低減することが可能 従来は使用できなかった薬剤も使用できる可能性がある</p>	<p><派生するテーマ></p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>DDSの標的志向性をどのように出すかが問題。</p>	<p><着手の容易さ></p>
<p><研究上の問題点></p> <p>キレート剤の種類と物性が限られているため、これに適したDDSの開発には、 医薬品メーカー等の協力が必要になるケースも考えれる。</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル <p>完全なる医薬品開発におけるテーマ</p>
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>標的志向性を出すために、モノクローナル抗体を使用することも考えれる。</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：集積解除（キレート剤）</p> <p>生体成分中に含まれているキレート効果のある成分を探索する</p>	<p><一般化したテーマ></p>
<p><実用面でのインパクト>（放射線防護、環境モニタリングとの関連など）</p> <p>もともと生体成分中にある化合物であるため、副作用が少なくてすみ必要な時に大量投与が可能である。</p>	<p><派生するテーマ></p> <p>スクリーニングして得られた化合物に対して、より機能的な分子を求めて誘導体を合成し、よりキレートとして有効でかつ副作用の少ない化合物を求める。</p>
<p><研究目的の達成難易度></p>	<p><着手の容易さ></p>
<p><研究上の問題点></p> <p>放射性核種に対するキレーターを探索する必要がある。</p> <p>キレート能で物質を分離することができるかどうか問題。</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>目的とする物質が見つかった場合にその物質の大量生産系を構築することが必要である。</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：集積解除</p> <p>食品中に含有している放射性核種の体外排除を促進する成分を探索し、その成分を強化した機能性食品を開発する。さらに食事療法としての有効な使用法も開発する。</p>	<p><一般化したテーマ></p> <p>食品成分中の放射線に対して抵抗性強化する食品の開発。</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境トリガ'との関連など)</p> <p>放射性核種の体内蓄積の可能性がある場合に即座に副作用の心配をすることなく大量に服用ができる。</p>	<p><派生するテーマ></p> <p>食品成分中の放射線防護剤になる成分の探索</p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>比較的困難である</p>	<p><着手の容易さ></p>
<p><研究上の問題点></p> <p>ピボでのアッセイ系を構築する必要がある、膨大なスクリーニングを行う必要がある。</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>分離精製技術</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：集積解除</p> <p>金属を濃縮する微生物の産生するキレートをスクリーニングする</p>	<p><一般化したテーマ></p> <p>生物の産生するキレート剤の探索</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境エネルギーとの関連など)</p> <p>金属濃縮に微生物のキレートを利用する。低コストである。</p>	<p><派生するテーマ></p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>微生物の</p>	<p><着手の容易さ></p>
<p><研究上の問題点></p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル
<p><バイオテクノロジーとの関連></p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：異常分子の観測</p> <p>生体内において放射線照射を受けた場合に生成されるDNA関連物質に対してモノクローナル抗体を作成し、その異常分子の検出を迅速にかつ安易に行う方法を開発する。</p>	<p><一般化したテーマ></p> <p>生体関連物質のうち、異常な架橋や切断が起きているものの検出に対してモノクローナル抗体を用いたアッセイを行うことで、生体が放射線影響を受けていることの判定を複数のパラメーターに対して容易に行える</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境に起因との関連など)</p> <p>低線量放射線の被曝効果を分子レベルで判定することができるため、放射線防護をという観点から体内に起きている変化の追跡は意義深いことである</p>	<p><派生するテーマ></p> <p>膜の異常に対するモノクローナル抗体による検出</p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>既に、DNA関連物質に対する抗体は取られているため、構築できる実験系である</p>	<p><着手の容易さ></p>
<p><研究上の問題点></p> <p>抗原として何を使用するかによって研究内容はかなり異なる。</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>モノクローナル抗体の利用</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：損傷修復・耐性機構</p> <p>クマムシの放射線耐性機構の解析</p>	<p><一般化したテーマ></p> <p>クマムシの異常環境抵抗性の研究</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境エネルギーとの関連など)</p> <p>放射線に対して異常に耐性である生物の耐性メカニズムを解明することで、他の生物における耐性のメカニズムの解明に貢献する可能性がある。</p>	<p><派生するテーマ></p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>分子生物学的な知見が本ほとんどないため、研究の立ち上がりが遅い。</p>	<p><着手の容易さ></p>
<p><研究上の問題点></p> <p>クマムシの耐環境性は、異常であるため</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>分子生物学的な手法、遺伝学的な手法が使用できないため、比較的バイオテクノロジーが適用しにくい側面がある。</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：放射線防護剤</p> <p>細胞内の放射線防護剤のスクリーニング</p>	<p><一般化したテーマ></p> <p>生体内の放射線防護剤のスクリーニング</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境ヒトリスクとの関連など)</p> <p>生体内の放射線防護システムの全容解明に一步近づく</p>	<p><派生するテーマ></p> <p>放射線耐性細菌における放射線防護機構を担う物質のスクリーニング</p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>防護物質をどのような系でスクリーニングするかがキーポイントだが難易度高</p>	<p><着手の容易さ></p>
<p><研究上の問題点></p> <p>防護効果の測定をインビトロで行う実験系の構築が必要。</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル <p>生物種の実験系が重要で、放射線非耐性生物と放射線耐性生物の両方で試みることや片方からもう片方へのトランスジェニックな方法が有効である可能性がある。</p>
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>インビトロ再構成系のような実験系を構築する場合には、構成する物質自体を大量生産する必要がある。</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：放射線防護物質</p> <p>生体内の特定の放射線防護物質をコードする遺伝子の発現制御系の研究</p>	<p><一般化したテーマ></p> <p>生体内の放射線防護物質をコードする遺伝子の発現制御系の研究</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境ヒカリガとの関連など)</p> <p>生体内における放射線防護物質はいかなる遺伝情報階層の中でその発現を制御されているのかが明らかになるとその誘導方法も開発可能になる。</p>	<p><派生するテーマ></p> <p>防護物質のスイッチングの分子論的な研究</p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>これは、プロモーター検索の実験系であり、既存の方法が適用できるがレベルの高い実験である。</p>	<p><着手の容易さ></p> <p>実験系を構築することはかなり高度な作業</p>
<p><研究上の問題点></p> <p>生体内の放射線防護物質にどのようなものがあるかも不明な段階であるが、プロモーターの支配構造が共通である可能性だけをたよりにしているため、仮設にすぎない。</p> <p>既に判明している防護物質に関してだけの発現制御のシステムを解明するにしても高等動物では複雑な部分は多いため、酵母などの比較的扱いやすい生物を扱うことがポイントである。</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>遺伝情報の発現制御という意味では、蛋白-DNA相互作用の解析が必要である。</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：放射線ホルミシス 放射線ホルミシスを応用した種子加工法の開発</p>	<p><一般化したテーマ> 放射線ホルミシスを利用した生物生産高効率化への応用</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境モニタリングとの関連など) 農業の効率化、高生産性化</p>	<p><派生するテーマ> ホルミシスを利用した漁業への応用</p>
<p><研究目的の達成難易度> 再現性のあるデータの裏づけがまず必要である</p>	<p><着手の容易さ> 実験系の構築は簡単である</p>
<p><研究上の問題点> 植物の発芽率が向上し、農業上の利用が一般化するためには、ホルミシス用の照射に対する一定の安全基準が必要である。</p>	<p>その他 ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル</p> <p>ホルミシスを研究する場合には、対象とする生物を何にするかが研究ストラテジー上重要である。</p>
<p><バイオテクノロジーとの関連> 放射線によって何が種子の中で起こっているのかを同定するために、ノーザンブロットィングを行い、非照射種子と比較することによって、発芽に対する影響を遺伝子レベルで評価できる。</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：放射線ホルミシス</p> <p>分子レベルの変化測定系を用いた放射線影響の解明</p>	<p><一般化したテーマ></p> <p>放射線ホルミシス現象解明のための分子レベル酵素レベルでの観測パラメータの探索</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境モニタリングとの関連など)</p> <p>分子レベルでのホルミシスの研究は少ないため、遺伝情報発現系に対する研究のインパクトは強い。とりわけ、放射線防護においてにリスク評価に対してしきい値の存在を分子レベルで検証できるならば、意義は大きい。</p>	<p><派生するテーマ></p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>生体が生きた状態での分子レベルの変動を追跡する系を構築することは非常に困難</p>	<p><着手の容易さ></p> <p>分子生物学的な手法に精通していることが必要。</p>
<p><研究上の問題点></p> <p>パラメータ設定の妥当性と各種パラメータの同時測定が必要である。</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>異常分子の出現を観測する系の開発ができていれば、その観測系でホルミシス現象が起きているかどうかの解明に役立つ。観測方法としては、NMR、PCR、モノクローナル抗体などを使用した系が感度もよく、低線量放射線の影響を観測するには適している。</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：放射線ホルミシス×遺伝情報発現の変化</p> <p>微生物における低線量照射下における遺伝情報発現の非照射下との比較及び両者のmRNA比較</p>	<p><一般化したテーマ></p> <p>低線量照射下における遺伝情報発現の非照射下との比較及び両者のmRNA比較</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境モニタリングとの関連など)</p> <p>低線量照射下における遺伝情報発現の変化を遺伝子レベルで確証を得る。</p>	<p><派生するテーマ></p> <p>放射線耐性菌における同様の比較</p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>技術的には容易。</p>	<p><着手の容易さ></p>
<p><研究上の問題点></p> <p>対象とする遺伝子の設定</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>遺伝子工学的な手法を用いる (RNAの検出など)</p>	

<p><主要テーマ> ジャンル：生物元素変換</p> <p>微生物による生物元素変換の是非の確認</p>	<p><一般化したテーマ></p> <p>生物元素変換の是非の確認</p>
<p><実用面でのインパクト> (放射線防護、環境モニタリングとの関連など)</p> <p>現代の物理学に大きなインパクトを与える。</p>	<p><派生するテーマ></p> <p>植物による元素変換、海洋生物による元素変換等</p>
<p><研究目的の達成難易度></p> <p>超微量な元素分析の技術自体はあるため、是非の確認だけであるならば容易。</p>	<p><着手の容易さ></p>
<p><研究上の問題点></p> <p>実験材料となる生物の選択 超微量な分析技術が必要でありかつ厳密な実験条件が必要である。</p>	<p>その他</p> <ul style="list-style-type: none"> ・モデル系 ・生物種選択 ・観測レベル <p>正確に事実を把握すること自体に意味がある。 米国国防総省は肯定している。</p>
<p><バイオテクノロジーとの関連></p> <p>元素変換が起きていた場合には、どの部位で起きているのかを特定することが必要になるが、元素変換が起らない変異株を分離して、遺伝的にそのツールを解明することもできよう。</p>	