

造血障害の早期診断への分子遺伝学的アプローチ

A.I. スヴィルノフスキー、S.V. シェレグ、V.A. クフシンニコフ ミンスク

チェルノブイリ原子力発電所事故により、ベラルーシ共和国の領土内では、人口のかなりの部分が多かれ少なかれ高レベルの電離放射線の影響にさらされるという事態が生じている。これは、放射性核種(半減期の短いものを含む)で汚染された地域に現在住んでいる、あるいは過去に住んでいた人々、爆発の影響の除去作業に参加した人々、妊娠中に被曝した母親から生まれた子どもたち、そして受胎前に被曝した両親から生まれた子どもたちに関わる問題である。さらに、放射線の影響を受けた人々は、共和国の領土内に存在する他の有害要因(周囲の環境からの有毒物質、栄養不良、慢性的なストレス状況など)の影響も受ける可能性がある。

このような状況下では、放射線の直接的な影響によって生体に引き起こされる障害の診断が極めて重要である。造血組織の観点からの変化は、臨床的な血球算定に基づく動態として記録されることが知られており、急性被曝においては非常に有用な情報となるため、吸収線量の決定に使用することができる。しかしながら、低線量での長期的な被曝の影響においては、一般に受け入れられている臨床血液学的な指標の逸脱だけでは、個々の具体的な対象者においてその影響が存在するかどうかを判断することすら不可能である。したがって、ゴメリ(レリチツキー地区)、モギリョフ(チェリコフスキー地区およびクラスノポルスキー地区)、ブレスト(ルニネツキー地区)の被災地に住む 2200 人の子どもたちの血液の形態学的変化の分析を、ヴィテブスク州(ブラスラフスキー地区)およびミンスク市の子どもたちの血色素量の類似指標と比較した結果、比較対象となった地域には非放射線由来のいくつかの要因(栄養中のビタミン欠乏、微量元素の欠乏、土壌および大気の汚染、一部の疾患の発生)が作用している可能性があるという結論に至った。これらの要因が血液構造に悪影響を及ぼし、その結果として、放射性核種で汚染された地域における血液学的指標の変化を覆い隠して(カモフラージュして)いるのである。

上述のことは、子どもたちの臨床観察の結果によっても確認されている。特に、1991 年にゴメリ州コルミャンスキー地区の就学前児童 585 人を対象とした医学的観察では、扁桃肥大、アデノイド、局所性頸部リンパ節炎およびリンパ節腫脹が子どもたちの 29.6%に、機能性心疾患が 34.5%に、甲状腺過形成が 42.6%に、う蝕(虫歯)が 28.3%に、アレルギー性素因が 9.2%に、肝腫大(時に脾腫を伴う)が 9.3%に認められた。これらのデータの一部の指標は、放射性核種に汚染されていない地域の類

似データと比較できるものであり、特に疫学的な状況（例えばウイルス性肝炎など）を考慮すると、被災地に住む子どもたちの健康状態の悪化を示している。

しかしながら、上述のように、事故による被災地域に住む人々の健康状態をモニタリングするための一般的に受け入れられた臨床検査は、造血組織のような放射線感受性の高い組織においてさえ、放射線によって誘発された障害の早期診断という観点では効果的ではない。このことに関連して、造血細胞の障害の早期診断に関する問題は、日常的な血液検査に変化が見られない場合でも検出可能な、分子レベルおよび細胞内（亜細胞）レベルで解決されるべきである。ここで注目すべきは、この診断法が生物学的線量評価（バイオドシメトリー）のひとつの方法として重要性を持ち得るということである。さらに、造血障害の分子分析法は、完全な価値を持つ診断にも、白血病やリンパ腫の症例における治療効果のコントロールにも適用可能である。放射線の影響に関連付けられる造血組織やその他の組織の成長におけるユニークなマーカーを明らかにする、このような方法を用いる技術には特別な注意が払われるべきであり、これが分子疫学の目的である。

リンパ球分析の結果から得られる情報は、使用される手法の許容された可能性（核型分析なしで検出される不安定型異常、鑑別染色体染色後の核型分析、特殊なプローブを用いた安定型染色体再構成の分析など）、および放射線被曝後からの経過時間と放射線の線量率に大きく依存する。

骨髄有核細胞における染色体異常の検出は、それが意味するすべての結果を伴う、骨髄異形成の進行の兆候である可能性がある。血液細胞の DNA 分析は、特定の癌遺伝子（オンコジーン）および抗癌遺伝子ファミリーにおける突然変異、増幅、および対立遺伝子の消失の発見にとって非常に重要である。形質転換した細胞が、細胞の成長と分化の正常な調節メカニズムによってコントロールされる能力を失うという事実を考慮すると、その産物が細胞膜から核への成長および分化の刺激の伝達に参与する癌遺伝子は、同様の細胞を明らかにするための唯一のマーカーではないにせよ、適切なマーカーになり得ると想定できる。

子どもと両親の血液細胞における並行した DNA 分析（ゲノム指紋法／DNA フィンガープリント法、ミニサテライト）は、子どもの血液細胞における体細胞突然変異を検出する上で大きな価値を持つ可能性がある。小児白血病と、その父親が原子力発電所での作業中に受けた放射線量との間にある特定の関係性は、子どもの生体に対する電離放射線の追加的な影響を示している可能性がある。父親の細胞が放射線に曝露された後、子孫の細胞に不安定なゲノムが遺伝することに関する実験データは、この事実と符合している。

DNA の変化を明らかにするために、特にポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) の原理に基づく数多くのよく知られた分子生物学的手法を用いることもできる。

チェルノブイリ事故の結果として被害を受けた人々の造血の調査を目的とした複合的なプログラムが、絶えず改良されている技術に基づいて開発されている。それは、放射線被曝と造血細胞へのダメージとの相関関係を確立するだけでなく、血液学的なハイリスク群の早期発見を促進し、専門家が低線量被曝の危険性を評価することを可能にするだろう。

MOLECULAR-GENETIC APPROACHES TO EARLY DIAGNOSTICS OF HEMOPOIESIS DISORDERS A.I.Svirnovsky, S.V.Sheleg, V.A.Kuvshinnikov Minsk

There is such a situation on the territory of the Republic of Belarus due to the Accident of Chernobyl NPP in which a considerable part of the population to greater or lesser extent has been exposed to higher effect of ionizing radiation. It concerns the people living or having lived in the areas contaminated by radionuclides (short lived including); people taking part in the liquidation of the effects of the explosion; children born by the mothers being irradiated during their pregnancy; children born by their parents being irradiated even before conception. Moreover, the population exposed to radiation effect can also be influenced by some other harmful factors existing on the territory of the Republic (toxic substances from surrounding environment, imperfect nutrition, chronic stress situation etc.).

Under such conditions diagnostics of disorders caused in the organism by the direct effect of radiation is of paramount importance. The changes from the aspect of hematopoietic tissue are known to be registered in dynamics on the basis of clinical blood count and they are so informative in acute irradiation that they can be used to determine the dose absorbed. However, in long termed irradiation effect in low doses the deviation in generally-accepted clinico-hematological indices do not give the possibility to determine even the presence of this effect in every concrete individual. Thus, the analysis of morphological changed in blood of 2200 children living in affected areas of Gomel (Lelchitsky region), Mogilev (Cherikovskiy and Krasnopolsky regions) and Brest (Luninetsky region) compared with the analogous indices of

hemograms in children of Vitebsk province (Braslavsky region) and Minsk city permitted us to come to the conclusion that some factors of non-irradiation origin can act on the territories compared (vitamin deficiency in nutrition, deficiency of microelements, soil and air pollution, occurrence of some diseases) which produce their negative effect on blood structure and due to this camouflage the changes of hematological indices in the areas contaminated by radionuclides.

The above said is confirmed by the results of clinical observation of children. In particular on medical observation of 585 preschoolers in Kormyansky region of Gomel province in 1991 hypertrophy of tonsils, adenoids, regional cervical lymphadenitis and lymphadenopathy were noted in 29.6% of children, functional cardiopathy in 34.5%, hyperplasia of thyroid gland in 42.6%, caries in 28.3%, allergic diathesis in 9.2%, hepatomegalia (sometimes with the spleen enlargement) in 9.3% of children. These data in some indices are comparable with the analogous ones for non-contaminated with radio-nuclides areas, particularly taking into account the epidemiological situation, for example according to virus hepatitis they show the exacerbation of state of health of children living in the affected areas. However, as it has been noted above, the generally accepted clinico-laboratory examination for monitoring the state of health of population living in the areas affected due to the accident is not effective in the aspect of early diagnostics of disorders induced by radiation even in such radiosensitive tissue as hematopoietic one.

In this connection the problem of early diagnostics of disorders of hemopoiesis cells should be solved on the molecular and subcellular levels which can be detected in the absence of changes in routine blood analysis. It should be noted here that this diagnostics can be of some importance as one of the methods of biological dosimetry. Moreover, the methods of molecular analyses of disorders of hemopoiesis are applicable both for full value diagnostics and control therapy efficacy in leukemia and of lymphoma cases. Special attention should be paid to the technique of using such methods revealing unique markers in the growth of hematopoietic and other tissues which can be associated with the radiation effect and this is the objective of molecular epidemiology.

The information of the results of lymphocytes analyses significantly depends on the permitted possibility of the methods used (unstable aberration, detected without karyotyping, karyotyping after differential chromosomes staining, analysis of stable

chromosomes reorganization using special probes) and on the time passed after the radiation and the dose rate of this radiation.

The detection of chromosomal aberrations in myelocaryocytes may be a sign of developing myelodysplasia with all that this implies (with all its consequences). DNK analysis of the blood cells is of great importance for the discovery of mutations, amplifications and alleles loss in certain oncogenes and antioncogenes families. Taking into consideration the fact that the transformed cells lose their ability to be controlled by normal regulation mechanisms of cellular growth and differentiation, we can suppose that oncogenes the products of which are involved in the transfer of growth and differentiation stimuli from cytoplasmatic membrane to the nucleus can be suitable though not the only markers to reveal similar cells in leukemia.

Parallel DNK analysis in the blood cells of children and parents (genome dactyloscopy, minisatellites) may be of great value for detecting somatic mutations in children's blood cells. A certain relationship between leukemia in children and radiation doses which their fathers got during their work at some nuclear power plants may indicate additional effects of ionizing radiation on a child's organism. Experimental data on the inheritance of unstable genome by filial cells after the paternal cells have been exposed to radiation correspond to this fact.

To reveal changes in DNK one can also use a number of well-known molecular methods particularly based on the principles of biological polymerase chain reaction.

A complex programme aimed at the investigation of hemogenesis in persons who have suffered as a result of the Chernobyl accident is developed on the basis of techniques being constantly improved. It will not only establish the correlation between radiation exposure and damage to hemogenetic cells, but will also promote early detection of hematologic risk groups and enable the experts to estimate the danger of low dose radiation.

DNK→DNA