

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07023

研究課題名(和文)放射線被ばく事故・テロに備えた染色体解析による被ばく線量評価法の研究開発

研究課題名(英文) Establishment of cytogenetic biodosimetry methods for radiation accidents/incidents

研究代表者

数藤 由美子 (Suto, Yumiko)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・高度被ばく医療センター 計測・線量評価部・グループリーダー (定常)

研究者番号：70313202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではガンマ線照射した末梢血リンパ球を用い、第1、2、4番染色体を検出する3色FISH(蛍光 in situ ハイブリダイゼーション)解析により線量効果曲線式(線量推定式)を作成した。局所被ばくの線量推定も可能であることがわかった。細胞動態解析を用いた染色体異常解析からは、転座の高度な安定性が示され、適及的線量評価が可能であることが確認できた。また、凍結保存末梢血リンパ球が線量推定検査に利用できることがわかった。染色体異常の画像解析自動化に深層学習法が有効であることが示唆された。3色FISHによる線量評価法は被ばく医療支援に有用であることが示され、画像解析自動化の本格研究開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

3色FISH法に基づいた線量評価法では従来のギムザ染色法と異なり技術習得訓練が不要で、明確に画像判定でき、判定に要する時間が1/60以下に縮小できる。局所被ばくの線量評価も可能で、また、安定型染色体異常を指標に含むため被ばく後の経過時間(検体採取タイミング)に影響されず、直近・過去に限らず起こった事故の被ばく線量検査が可能で、長期追跡調査にも有用である。放射線事故における一次対応者・作業従事者の被ばく医療支援や、宇宙飛行士を含む職業的被ばくを受ける人々の健康管理で貢献することが期待できる。また、本評価法は化学物質による染色体異常の検出にも適用できる。

研究成果の概要(英文)：Fluorescence in situ hybridization with three differentially colored chromosome painting probes (3-color FISH) was conducted to efficiently score exchange-type chromosome aberrations (dicentric and translocations) induced in cultured peripheral blood lymphocytes by low-dose ionizing radiation exposure. A dose-response curve was constructed based on a total of about 155 thousand metaphases obtained from eleven dose-points of gamma irradiations (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 750, 1000, 2000 mGy). The dose-response curve provided a good fit to the linear-quadratic model. It may serve as a means to assess the individual differences in cytogenetical radio-sensitivities. Results of cell kinetic analysis showed that translocation could be a useful marker for retrospective dose assessment. It was also inferred that deep learning method could be useful for development of automatic chromosome image analysis.

研究分野：放射線生物学、人類遺伝学、人類細胞遺伝学

キーワード：生物線量評価 二動原体染色体 転座 FISH法

1. 研究開始当初の背景

2011年3月、東日本大震災の影響で東電福島第一原子力発電所事故が発生し、緊急作業における放射線業務従事者の線量限度（実効線量）が100 mSv から 250 mSv に引き上げられた（2011年3月11日～12月16日）。放射線事故における特殊環境下の業務従事者では、予期せぬ放射線被ばくを受ける危険性がある。線量推定方法として物理線量評価と臨床症状・検査値からの推定もあるが、福島原発事故緊急時作業従事者の線量評価では津波と停電を伴う複合被害のため、十分な物理線量情報が得られない可能性があった。生物線量評価による医療支援が重要となる。

生物線量評価法では、放射線により切断され誤って2個の染色体が融合した二動原体染色体の生成頻度を指標とした推定法が、国際標準化された最も信頼される方法となっている（ISO 19238）。あらかじめ健康人末梢血リンパ球の *in vitro* 照射実験によって線量と二動原体生成頻度の検量線を作成し、患者の二動原体生成頻度を当てはめて線量推定する。申請者はこの手法で福島原発事故緊急時作業従事者の線量評価を担い（Suto Y, et al., Health Physics 105: 366-373, 2013）、IAEA、WHO、UNSCEARをはじめとする国際的機関で高い評価を受けている。しかしながらこの方法には以下に示す3つの大きな問題点がある。【課題1】二動原体をギムザ染色で形態的に判定するので、熟練と長時間の解析を要する（熟練者で実質30時間以上/検体）。【課題2】指標とする不安定型染色体異常は時間とともに消失するため、国際標準化機構により被ばく後4週間以内の適用が推奨されている（ISO 19238）。【課題3】末梢血リンパ球の分裂中期染色体を指標とするため、細胞培養48時間を要し、被ばく患者受け入れ即日の診断はできない。

申請者は【課題3】について既に「放射線被ばく事故における迅速なトリアージのための生物線量評価法の開発」[科研費・基盤(C)2014～2016年度、研究代表者]の研究により、培養時間を要しない細胞融合による未成熟染色体凝縮現象を利用し、FISH法を組み合わせることで被ばく患者受け入れ6時間で可能な線量評価法を開発した。本研究は、残る【課題1・2】に挑戦するものである。

本研究では、ヒト各染色体に特異的にハイブリダイズする蛍光標識 DNA プローブを用いた FISH 法を用いることとした。現在、ヒト 24 種の染色体を同時に染め分けるマルチカラー FISH が可能である。しかしながらこの方法では、得られる情報量が過剰で、染色体異常の診断に数週間を要する。プローブは高価でもある（標本1枚につき約3万円。通常、被験者1名につき標本5枚以上用いる）。そこで染色体を限定して解析をスピードアップし、スクリーニング結果で必要と判断されればマルチカラー FISH を行うのが現実的である。本研究においては3色 FISH を採用した。二動原体染色体や転座染色体といった交換型の染色体異常は、2つの異なる色の隣接として明確に検出されるので、1個のメタフェーズにかかる観察時間がギムザ法の1/30以下で、訓練なく正確・迅速に判定できる。

2. 研究の目的

本研究では、従来測定が困難であった低線量域を含む放射線被ばく線量を評価するために、末梢血リンパ球の交換型染色体異常を指標とした3色 FISH（蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション）法による線量評価法を開発する。

この方法は、被災者だけでなく、原子力災害・放射線被ばく事故/テロにおける一次対応者・

緊急復旧作業従事者、宇宙飛行士のような特殊環境下での放射線業務従事者の特定線量限度を超える被ばくの有無の判断に有用な情報を与え、人々の健康管理、安心・安全の提供に資する。指標として30年経ても安定して検出される染色体転座を含むため、過去の放射線被ばく事故の線量評価や長期追跡調査にも適用できる。本染色体分析法は、放射線や化学物質汚染の高バックグラウンド地域住民の健康影響調査にも応用することができる。

3. 研究の方法

3色FISH法により、ヒト第1番、2番、4番染色体をそれぞれ赤色（Texas Red 標識）、緑色（FITC 標識）、黄色（Texas Red 標識とFITC 標識の混合）で検出する（手法については Suto Y, et al. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 794: 32-38, 2015 参照）。

(1) 5個体のヒト末梢血リンパ球についてコバルト-60 ガンマ線0~2 Gy（線量率0.4 Gy/分）を照射して培養し、得られた染色体標本を用いて3色FISHを行う。観察された細胞数、染色体異常の種類・数を記録し、線量効果曲線を得る。

(2) バックグラウンド値（線量0 Gyにおける染色体異常頻度）の個体差を検討する。

(3) 過去に受け入れた被ばく検体の3色FISH解析検査から線量評価を試みる。

(4) 3色FISHデータから細胞動態と染色体異常の関連を解析する（細胞動態の検出手法については、Suto Y, et al., *Health Physics* 105: 366-373, 2013 参照）。

(5) 染色体画像解析の自動化（ソフトウェアの開発）に向けた検討を行う。

4. 研究成果

同意を取得した健常人検体および被ばく医療受け入れ検体の過去の検査データを使用して、以下の結果を得た。

(1) 低線量域線量効果曲線

健常人5個体由来末梢血について、0, 50, 100, 150, 200, 250, 300 mGy 照射を行って得られた染色体標本を用いて3色FISH解析を行い、線量効果曲線を作成した。1個体については500, 750, 1000, 2000 mGy 照射標本で追加解析を行った。合計487,000メタフェーズの交換型染色体異常（二動原体染色体および転座染色体）の解析から、次の線量効果曲線が得られた。線形2次曲線への適合度検定ではいずれも高いp値が得られた。

• Donor 1 (30 yr): $Y=(0.0027\pm 0.0005)+(0.011\pm 0.012)D+(0.041\pm 0.049)D^2$, $p=0.51$

• Donor 2 (40 yr): $Y=(0.0026\pm 0.0006)+(0.025\pm 0.012)D+(0.0095\pm 0.047)D^2$, $p=0.57$

• Donor 3 (40 yr): $Y=(0.0033\pm 0.0006)+(0.014\pm 0.016)D+(0.038\pm 0.06)D^2$, $p=0.52$

• Donor 4 (50 yr): $Y=(0.0021\pm 0.0003)+(0.0041\pm 0.0057)D+(0.074\pm 0.022)D^2$, $p=0.8675$

• Donor 5 (70 yr): $Y=(0.0029\pm 0.0005)+(0.0272\pm 0.0095)D+(0.0140\pm 0.0347)D^2$, $p=0.70$

[Y: 染色体異常生成頻度, D: 線量(Gy)]

なお、遡及的線量評価のためには安定型染色体異常のみを指標とするので、別途転座染色体のみの線量効果曲線を作成した（省略）。

(2) バックグラウンド値

Donor 1 の線量効果曲線を標準曲線として用い、国際標準法 (ISO 20046) で推奨されている年齢補正計算式、

$$\cdot \text{TR}(\text{age})=100(\exp(-7.925)+\exp(-9.284) \times (\text{age} \times \exp 0.01062 \times \text{age}))$$

[TR: 転座, age: 年齢(歳)]

の適用を試みた。Donor 2~5 について、必ずしも年齢補正計算式は適合せず、年齢が高くてもバックグラウンド値が低い例や年齢が低くてもバックグラウンド値が高い例がみられた。同様に、過去の被ばく医療受け入れ検査データ (ギムザ法による二動原体分析結果および 3 色 FISH 解析結果) を用い、線量推定方法を比較したところ、標準曲線式 (Donor 1) と年齢補正計算式を用いた場合、バックグラウンド値がマイナスになるため線量推定ができない例がみられた (投稿論文準備中)。年齢が適合した Donor の線量効果曲線式を用いた方が、標準曲線式 (Donor 1) に年齢補正計算式を用いた場合より二動原体分析による推定線量結果と適合した。5 個体のデータに基づく検討のためまだ不十分であるが、年齢差より個体差 (生物学的年齢差) の方が大きい可能性がある。

国際標準法 (ISO 20046) では複数の年齢層ごとの線量効果曲線を、各層 5 名以上の個体を用いて作成することも推奨している。線量推定の精度を上げるには、年齢補正計算式を用いるより、複数個体を用いた実データからの推定式を用いる方が良いことが示唆された。実際の事故対応では、後者を直ちに準備することは困難なので、検査において以上のことを考慮して線量推定する必要がある。

なお、バックグラウンド値が高く逸脱した個体が 1 例みられた。原因の一つとして、喫煙習慣の影響 (1 日 40 本のタバコを喫煙) が考えられる。実際の被ばく事故での検査では喫煙習慣の確認をする必要がある。

(3) 被ばく検体データ解析

局所被ばくの線量推定について検討した。過去 4 週間以内に心臓カテーテルを受けた被験者およびコントロール各 1 検体の末梢血を用い、ギムザ染色による二動原体分析と 3 色 FISH 解析を行った (各 1500 メタフェーズを解析)。医療被ばく被験者で、両手法で u 値が 1.79 を超えてポアソン分布の逸脱がみられ、局所被ばくであることが示された (局所被ばく推定線量、推定局所率に有意差無し)。3 色 FISH 法でもギムザ染色による二動原体分析法と同様に局所被ばくが検出できることが確認できた。

(4) 細胞動態解析

実験的に 2 Gy 照射した末梢血を用いた 3 色 FISH で 1 回目分裂、2 回目分裂、3 回目分裂の細胞間染色体異常生成頻度比較を行った。その結果、分裂回数にしたがって二動原体 (不安定型染色体異常) は減少し、転座 (安定型染色体異常) は維持されることが確認された (投稿論文準備中)。当研究機構で実施している被ばく事故後の年定期健診における染色体検査データを用いて、安定型染色体異常 (転座、染色体断片挿入)、不安定型染色体異常 (二動原体、環状染色体、染色体断片など) および安定型細胞、不安定型細胞の頻度の経年変化を調べたところ、不安定型細胞は減少し、安定型細胞は維持される傾向にあることがわかった (投稿論文準備中)。

さらに、採取・照射後分離し 1 年以上凍結保存した末梢血リンパ球について細胞培養し 3 色

FISH 解析を行い、データ比較をした。同一個体由来の新鮮血 2 Gy 照射検体、非照射 1.2 年凍結保存検体、2 Gy 照射 1.5 年凍結保存検体を用いたところ、2 回目分裂細胞頻度に変化は無く、1 回目分裂細胞の比較で各種染色体異常の生成頻度に差がみられなかった（詳細は Suto Y, et al., Cytologia 85: 71-77, 2020, Table 2 参照）。凍結保存リンパ球を用いた FISH 解析法は、原発事故作業員の健康管理等において初期値の確保が可能になるなど有用性が高い。

(5) 染色体画像解析の自動化の検討

3色FISHの染色体画像では、異なる2色の隣接が交換型染色体異常を示す。機械学習による染色体異常検出はFISH画像であれば比較的容易であることが予想された。0～3 Gy照射3色FISHメタフェーズ画像を用いて機械学習の導入を検討した。

FAST Visionソフトウェアを用いて人間によるパラメータ設定（特徴付け）を行い、画像700枚について自動検出を試験したところ、染色体検出力も染色体異常分類能も精度が低く、誤検知が多くみられた。試みに、少数ではあるが120枚の画像を用いて人間によるパラメータ設定によらない深層学習法（畳み込みニューラルネットワーク）を用いたところ、染色体検出性能はまだ不十分であるが、検出できた染色体については、交換型染色体異常の検出の精度は86%、感度は99%で、深層学習法が有用であることが示唆された。3色FISH解析は被ばく医療における染色体検査のほかにも臨床上の汎用性が高い。今後の本格的な研究開発がまたれる。

(6) まとめ

本研究では、ガンマ線照射した末梢血リンパ球を用いた第1、2、4番染色体を検出する3色FISH解析により、

- ①線量効果曲線式（線量推定式）を作成した。
- ②バックグラウンド値については、年齢差よりも個体差の方が大きい可能性が示唆された。
- ③局所被ばくの線量および局所率（体積比）の推定が可能であることが示された。
- ④細胞動態解析を用いた染色体異常解析から、転座染色体の安定性が高く遡及的線量評価が可能であること、受け入れ患者の分離リンパ球の凍結保存後の調査が可能であることを示された。
- ⑤染色体異常解析の自動化に深層学習法が有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yumiko Suto, Takako Tominaga, Miho Akiyama, Momoki Hirai	4. 巻 85
2. 論文標題 Cytogenetic Examination of Human Peripheral Blood Lymphocytes Cryopreserved after Gamma Irradiation: A Pilot Study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cytologia	6. 最初と最後の頁 71-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1508/cytologia.85.71	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 S Jang, Y Suto, J Liu, Q Liu, Y Zuo, P N Duy, T Miura, Y Abe, K Hamasaki, K Suzuki, S Kodama	4. 巻 186
2. 論文標題 Capability of the ARADOS-WG-03 regional network for large-scale radiological and nuclear emergency situations in Asia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Radiat Prot Dosimetry	6. 最初と最後の頁 139-142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rpd/ncy279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kulka U, Wojcik A, Di Giorgio M, Wilkins R, Suto Y, Jang S, Quing-Jie L, Jiexiang L, Ainsbury E, Woda C, Roy L, Li C, Lloyd D, Carr Z	4. 巻 182
2. 論文標題 Biodosimetry and biodosimetry networks for managing radiation emergency	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiat Prot Dosimetry	6. 最初と最後の頁 128-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rpd/ncy137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ursula Oestreicher et al., including Yumiko Suto	4. 巻 93
2. 論文標題 RENEB Intercomparisons applying the conventional Dicentric Chromosome Assay (DCA)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Radiat Biol	6. 最初と最後の頁 20-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09553002.2016.1233370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Beata Brzozowska et al., including Yumiko Suto	4. 巻 93
2. 論文標題 RENEB accident simulation exercise	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Radiat Biol	6. 最初と最後の頁 75-80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09553002.2016.1206230	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Yumiko Suto
2. 発表標題 Radiation cytogenetics in Japan: current state and perspectives
3. 学会等名 ICRR 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 弓至, 数藤由美子, 遠藤俊徳, 長田直樹
2. 発表標題 Abnormal chromosome detection by image recognition AI using deep learning
3. 学会等名 日本バイオインフォマティクス学会2019年年会・第8回生命医薬情報学連合大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yumiko Suto, Takako Tominaga, Miho Akiyama, Yoshio Takashima, Kumiko Fukutsu, Momoki Hirai, Osamu Kurihara, Hideo Tatsuzaki, Makoto Akashi
2. 発表標題 Cytogenetic biodosimetry of plutonium radiation-exposed workers
3. 学会等名 EPR BioDose 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jang, Y. Suto, J. Liu, Q-J. Liu, Y. Zuo, P. N. Duy, T. Miura, Y. Abe, K. Hamasaki, K. Suzuki, S. Kodama
2. 発表標題 Capabilities of ARADOS-WG03 Network for Large Scale Radiological and Nuclear Emergency Situations
3. 学会等名 EPR BioDose 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumiko Suto
2. 発表標題 Individual difference of chromosome aberration in accidentally exposed workers
3. 学会等名 ICRP-QST-RERE Workshop on Individual Response to Ionising Radiation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumiko Suto
2. 発表標題 Case report and network activity in Japan
3. 学会等名 The 5th Coordination Meeting of the WHO BioDoseNet (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yumiko Suto
2. 発表標題 Biodosimetric Strategy for Radiation Emergency Medicine in Japan
3. 学会等名 NCT CBRNE Asia pacific (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 数藤由美子
2. 発表標題 細胞遺伝学的線量評価法
3. 学会等名 平成29年度労災疾病臨床研究事業「緊急被ばく医療が必要とされるような事故発生時におけるトリアージのための線量評価手法の確立に関する研究」成果発表会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 数藤由美子
2. 発表標題 染色体異常を指標とした線量評価法の運用と国際的な動向
3. 学会等名 日本放射線影響学会第60回大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 数藤由美子
2. 発表標題 放射線と染色体異常
3. 学会等名 日本環境変異学会分科会 第70回MMS定例会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 数藤由美子
2. 発表標題 Three-color FISH analysis using human peripheral blood lymphocytes for cytogenetic dose assessment
3. 学会等名 Global Conference on Radiation Topics (ConRad) 2017 / 22nd Nuclear Medical Defence Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 International Organization for Standardization (Working Group 18), including Suto Y	4. 発行年 2019年
2. 出版社 International Organization for Standardization	5. 総ページ数 41
3. 書名 ISO 20046: Radiological protection - Performance criteria for laboratories using Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) translocation assay for assessment of exposure to ionizing radiation	

〔産業財産権〕

〔その他〕

教科書への図説提供 (計 2件) 1) Yumiko Suto, Momoki Hirai: Reference dose-response relationship of exchange-type chromosome aberrations (dicentric plus translocations) examined by 3-color FISH in gamma-irradiated cultured peripheral blood lymphocytes in "Genetik"(7th Edition), Springer-Verlag GmbH, in press (planned publication date, September 2020) 2) Yumiko Suto, Momoki Hirai: Normal human karyotypes, in "New Mastering Science", Oxford University Press, 2017.

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	平井 百樹 (Hirai Momoki)		東京大学名誉教授