

平成 30 年 8 月 27 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26420879

研究課題名(和文)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方法の開発

研究課題名(英文)Development of biodosimetric method for medical triaging in radiation accident

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・放射線医学総合研究所 計測・線量評価部・チームリーダー(定常)

研究者番号：70313202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：放射線被ばく事故では被ばく線量から急性放射線症候群の重篤度や発症時期を予測する。適切に患者の振り分け(トリアージ)を行うには、被ばく線量を早期に推定することが急務となる。従来の生物学的線量評価法は48時間から72時間の細胞培養を要する。遺伝子発現変動を指標とした新しい評価法には検体採取の適合期間が短く、被ばく事故には必ずしも適さない。本研究では培養時間が不要な未成熟染色体凝縮技術と蛍光in situハイブリダイゼーション法を組み合わせ、血液検体受け入れ後約6時間でトリアージのための線量評価が可能な方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Conventional cytogenetic assays require two- or three-day peripheral blood lymphocyte culture before starting chromosome analyses to estimate biological doses. Therefore, alternative technologies that suit requirements for triage biodosimetry are needed. Radiation-induced DNA double strand breaks in G0 lymphocytes can be detected as interphase chromosome aberrations by the cell fusion-mediated premature chromosome condensation (PCC) method. In the present study, in combination with PCC and fluorescence in situ hybridization using pan-centromeric and telomeric peptide nucleic acid probes, prematurely condensed dicentric chromosome (PCDC) assay was developed, which has the potential for evaluating exposed radiation doses in as short as six hours after the collection of peripheral blood specimens for triage mode biodosimetry.

研究分野：放射線生物学、人類遺伝学

キーワード：生物学的線量評価 緊急被ばく医療 PCC法 PNA-FISH

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線被ばく事故では、被ばく線量から急性放射線症候群の重篤度や発症時期を予測する。適切に患者の振り分け(トリアージ)・治療方針の決定・医療準備を行うには、被ばくが疑われる患者の被ばく線量を早期に推定することが急務となる。生物学的線量評価法としては、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(二動原体染色体分析)が、国際標準化された代表的な方法である。同様な原理で他の染色体異常頻度を指標とした線量評価法として、化学的誘導による未成熟染色体凝縮法(premature chromosome condensation assay, PCC法)や小核法が知られている。どの手法にしても細胞培養48~72時間を要し、線量推定までに3~5日以上かかることが問題となっている。

(2) 本研究では、細胞融合によるPCC法を用いた線量評価に着目した。CHO細胞の分裂中期細胞とヒト末梢血リンパ球(間期核)にポリエチレングリコール(PEG)を加えて融合させると、リンパ球ではG0/G1期でありながら染色体凝縮が生じる。他の生物線量評価法と異なり、血液検体受け入れ後わずか3~5時間のうちに(即日)結果が得られるのである。通常、細胞融合PCC法では染色体断片の頻度が指標とされている。しかし、実用化には困難な点がある。第一に、融合細胞の発生頻度が非常に低い(8%以下)。第二に、ヒト凝縮染色体は細長くコイル様の輪郭を呈するため、従来のギムザ染色法では染色体断片の判別が難しい。したがって有望な手法であるにも関わらず、最初の論文報告から40年を経た現在でも、細胞融合によるPCC法は実際の放射線被ばく事故において線量推定に利用されていない。

2. 研究の目的

本研究では、細胞融合によるPCC法を改良し、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)法を組み合わせることで、染色体異常の検出力を上げることで、緊急時のトリアージのための線量評価に適した検査システムを確立する。

3. 研究の方法

(1) ヒト末梢血リンパ球とChinese Hamster Ovary(CHO)細胞の細胞融合最適条件を決定する。ガンマ線照射ヒト末梢血リンパ球を0~72時間37℃保存後に作製したPCC標本で、動原体周辺アルフォイド配列とテロメア配列をプローブとした2色PNA-FISHによる二動原体染色体および染色体断片の検出を行い、それぞれの指標の線量効果関係や動態を明らかにする。二動原体頻度を指標に、患者のトリアージに必要な観察細胞数と線量効果曲線を決定する。

(2) 細胞融合にエレクトロポレーションの

導入を試みる。

(3) 最新型顕微鏡画像解析システムがもつ自動分析機能のテストランを行い、実用性を検討する。

4. 研究成果

(1) PCDC (prematurely condensed dicentric chromosome) 法の確立

細胞融合による未成熟染色体凝縮過程において、従来用いられたウシ胎児血清の代わりにリンパ球分離の過程で生じる自己血漿を添加することで、細胞融合率が2倍程度増加した(12%)。

動原体周辺アルフォイド配列とテロメア配列をプローブとした2色PNA-FISH法[図1]を確立した。図2に示すように、血液検体採取からリンパ球分離、細胞融合、標本作製、PNA-FISH、画像解析開始までの過程を5時間以内に終了することが可能となった。

PCCとPNA-FISH法を組み合わせる二動原体分析法(PCDC法)を世界で初めて提唱した[引用文献1]

PCDC法で検出される染色体異常(染色体断片と二動原体染色体)の時間的経過(生成・修復の動態)を観察した。染色体断片は早期に修復されて減少し安定すること、二動原体染色体は安定して観察されることが明らかとなった[図3]。このことは、患者からの採血タイミングをコントロールすることが困難な緊急被ばく医療において有用な方法であることを示している。

^{60}Co ガンマ線照射した末梢血リンパ球を用いて染色体断片および二動原体染色体異常を指標とした線量効果曲線(検量線)を作製することができた[図4、過剰な染色体断片, $Y = (0.0467 \pm 0.0134) + (1.0410 \pm 0.0315) \times D$, $p > 0.45$, 二動原体染色体, $Y = (0.0000 \pm 0.0000) + (0.0709 \pm 0.0359) \times D + (0.0444 \pm 0.0121) \times D^2$, $p > 0.95$. Y: aberration yield, D: dose (Gy)]。50細胞の観察から1Gyと3Gyの照射が判別され、緊急被ばく医療の初期段階のトリアージに有用であることが示唆された。

PCC標本で各染色体特異的DNAプローブを用いたFISH法(染色体ペインティング法)を行う条件を決定した。ヒト24種類の染色体が異なる色で検出するM-FISHと、3種類の染色体を異なる色で検出する3色FISH[図5]が可能となった。これらにより、二動原体染色体だけでなく転座も検出できるようになった。市販のM-FISHプローブは高価で、画像解析(核型分析)に時間がかかる。3色FISHで迅速にスクリーニングすることが可能である。

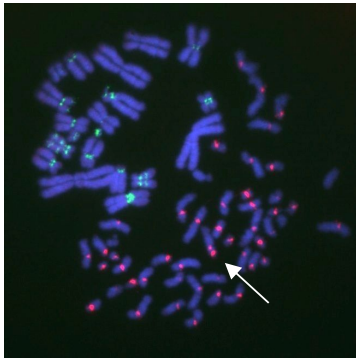


図1 .PCC 標本の PNA-FISH 像¹⁾ (赤色 : Cy-3 標識動原体検出プローブ、緑色 : FAM 標識テロメア検出プローブ、青色 : DAPI 対比染色、矢印 : 二動原体染色体)

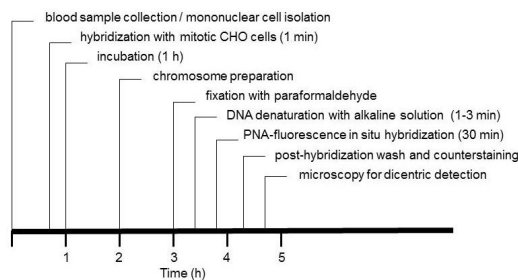


図2 . PCDC 法の概要¹⁾

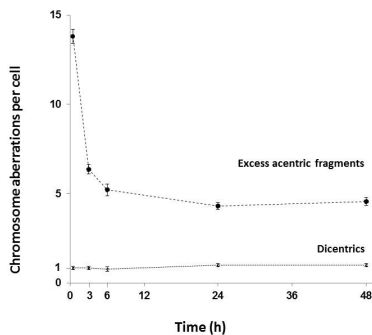


図3 . 染色体異常生成の動態¹⁾

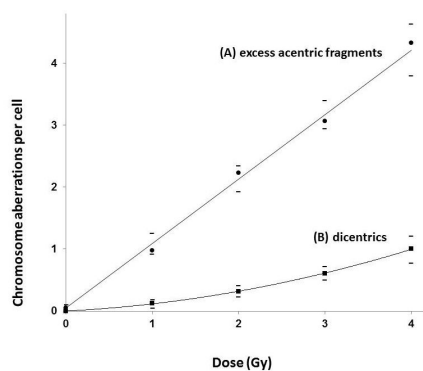


図4 PCDC 法による線量効果曲線¹⁾ [^{60}Co ガンマ線照射、線量率 0.4 Gy/min. パーは 95%CI を示す。過剰な染色体断片(○), 二動原体染色体(□)]

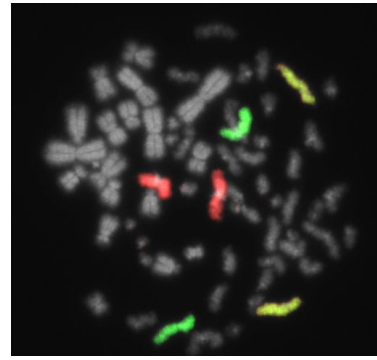


図5 .PCC 標本の 3 色 FISH 像 (赤色 : 1 番染色体、緑色 : 2 番染色体、黄色 : 4 番染色体)

(2) ヒト末梢血リンパ球と CHO 細胞の細胞融合において、エレクトロポレーション装置 (ECFG21, ネットパージン社) が利用可能であることが確認された。今後、大規模事故時に起こり得る検体の多様性に対応できるよう、条件の異なる検体 (個体差、採血後の保存時間・温度など) を用いた検証が必要である。

(3) 現有の顕微鏡システムに適した最新型顕微鏡画像解析ソフトウェア (メタシステムズ社) の開発・導入の遅れにより、研究期間内にテストを実施できず、情報収集に留まった。2018 年度中に導入する予定である。

< 引用文献 >

1) Yumiko Suto, Takaya Gotoh, Takashi Noda, Miho Akiyama, Makiko Owaki, Firouz Darroudi, Momoki Hirai: Assessing the applicability of FISH-based prematurely condensed dicentric chromosome assay in triage biodosimetry. *Health Physics* 108(3): 371-376, 2015.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Beata Brzozowska, Yumiko Suto, 他: RENE accident simulation exercise. *Int J Radiat Biol* 93(1): 75-80, 2017. 査読有

Yumiko Suto: Review of cytogenetic analysis of restoration workers for Fukushima Daiichi nuclear power station accident. *Radiat Protect Dos* 171(1): 61-63, 2016. 査読有

Yumiko Suto, Takaya Gotoh, Takashi Noda, Miho Akiyama, Makiko Owaki, Firouz Darroudi, Momoki Hirai: Assessing the applicability of FISH-based prematurely condensed dicentric chromosome assay in triage biodosimetry. *Health Physics* 108(3): 371-376, 2015. 査読有

Yumiko Suto, Miho Akiyama, Takaya Gotoh and Momoki Hirai: A modified protocol for accurate detection of cell fusion-mediated premature chromosome condensation in human peripheral blood lymphocytes. *Cytologia* 78: 97-103, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

Yumiko Suto: Biodosimetric Strategy for Radiation Emergency Medicine in Japan. NCT Asia Pacific (2018-05-29, Tokyo).

数藤由美子: 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. 日本放射線影響学会第60回大会シンポジウム(2017年10月28日、千葉市).

Yumiko Suto: Biological dosimetry during and after Fukushima. 14th International Workshop on Radiation Damage to DNA (2016-03-20 ~ 24, Melbourne, Australia).

Yumiko Suto: NIRS biological dosimetry after Fukushima. 3rd Research Coordination Meeting of Coordinated Research Programme, E35008 (2016-03-07 ~ 11, IAEA Headquarters, Vienna, Austria).

Yumiko Suto: A methodological overview of radiation cytogenetic research at NIRS after Fukushima. NIRS - CEA/DSV Workshop on decorporation (2015-06-30, CEA, France).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.nirs.qst.go.jp/ENG/core/rmd/05.html>

6. 研究組織

(1) 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・放射線医学総合研究所 計測・線量評価部・チームリーダー(定常)

研究者番号: 70313202

(2) 研究分担者

穂山 美穂 (AKIYAMA, Miho)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 計測・線量

評価部・技術員(定常)

研究者番号: 70415404

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし