

平成24年度
原子力災害影響調査等事業
「低線量被ばくによる生体影響に関する細胞遺伝学
的評価法の開発」

実施報告書

平成25年3月29日

独立行政法人放射線医学総合研究所

本実施報告書は、環境省の原子力災害影響調査等事業による委託業務として、独立行政法人放射線医学総合研究所（以下、放医研と略す）が実施した平成24年度「低線量被ばくによる生体影響に関する細胞遺伝学的評価法の開発」の成果を取りまとめたものです。

目 次

1. 事業の目的.....	1
2. 研究内容と成果.....	3
2-1 試料提供者の選定と試料の収集.....	3
2-2 自動化・高速化した染色体解析システム.....	5
2-3 総合自動高速解析プロトコール.....	15
2-4 標準的日本人の染色体解析の結果.....	16
3. 総合自動高速解析プロトコールのマニュアル化.....	19
4. ホームページを用いた情報発信.....	20
5. 委員会の設置と活動状況.....	25
6. 今後の課題に関する考察.....	27
7. 謝辞.....	28
8. 参考資料・文献.....	29
(別添) 総合自動高速解析プロトコールマニュアル	

1. 事業の目的

東京電力(株)福島第一原子力発電所の事故から2年余りが経過したが、福島県を中心に放射線の健康への影響を心配する一般住民は少なくない。福島県は、県民健康管理調査を実施し、事故から約4ヶ月間の外部被ばく線量を一般住民の行動調査等から推定している。これによれば、放射線業務従事経験者を除く県民の95%が5ミリシーベルト未満、最高値は25ミリシーベルトであり、放射線による健康影響があるとは考えにくいとの見解を述べている¹⁾。しかしながら、放射線の影響の有無を生体試料を用いて直接調べた調査は現時点ではほとんど無い。

ヒト細胞の染色体は、強い放射線を受けると異常な染色体へと変化する可能性があるが、二動原体染色体などの異常な染色体の発生頻度は、放射線の生体影響を反映する指標として、古くから研究されてきている。この染色体を用いた放射線の生体影響調査は、一般住民にも適用可能であると思われるが、実際に調査を行う場合は、大規模かつ長期的な調査になることが想定される。そのため、複数の施設での解析や長期のフォローアップ、別の調査との比較などが必要になることから、世界的に統一化された手法で実施されることが望ましい。染色体の解析手法については、国際標準化機構ISOのスタンダード19238(2004年版)²⁾ および国際原子力機関IAEAのマニュアル(2001年版、2011年改訂版)³⁾ において、ギムザ染色による二動原体の頻度観察の手法が標準化されたが、自動化・高速化に関する手法は確立されていない。

染色体異常の頻度の観察は、従来、プレパラート上に散在する染色体を人が顕微鏡でひとつひとつ観察していくことによって行われてきたが、近年、顕微鏡とコンピュータを組み合わせた染色体画像解析システムが開発され、染色体像の検出や二動原体染色体の判定を自動化・高速化することが可能となってきた。現時点では、誤って判定することが一定の割合であるものの、上記で述べたような大規模な調査を想定した場合、この自動化・高速化されたシステムの有用性は極めて高いと考えられる。

そこで本事業では、将来一般住民を対象とした大規模な染色体調査が実施されることを想定し、現在の国際標準であるISOの基準に則りつつ、試料の取得から結果の判定に至るまでの作業工程を確定する。また、比較的低線量の放射線被ばくを念頭に、自動化・高速化された染色体解析システムの精度を高めるためのプログラム開発を行い、これを上記の作業工程に組み込むことにより、総合自動高速解析プロトコルを確立し、マニュアル化する。さらに、この総合自動高速解析プロトコルを用いて原発事故の影響をほとんど受けていないと考えられる日本人約70名を調査し、日本人の標準的な状況(異常染色体の頻度)を調査する。これにより、各年齢層での一般的なバックグラウ

ンドの値を定量的に求めることができ、染色体調査が実施された場合の影響の有無を判断するための科学的根拠となる。

放射線被ばくによる生体影響については、広島・長崎の原爆被爆者における追跡調査を筆頭とした疫学研究や実験動物を用いた実証的研究、さらには細胞や分子に関する分子生物学的研究など、人類は膨大なデータを集めてきた。これらの知見が極めて重要であることに異論を挟む余地はないが、多くは“平均化された知見”であり、平均値を自分自身に外挿することに、違和感を覚える住民がいるのも事実である。言い換えれば「自分自身への影響を直接知りたい」という事である。染色体異常を調べる事は、個人個人の影響を直接的に調べる事であり、納得感も大きいと思われる。本事業は、今後の住民の健康管理や安心した生活を取り戻すための一助になる事が期待される。

2. 研究内容と成果

2-1 試料提供者の選定と試料の収集

本事業では、ISO 基準に則りつつ染色体観察を自動高速化した総合自動高速解析プロトコルの開発を行うが、このプロトコルを実際に活用するには、予めこのプロトコルに従って日本人一般集団の染色体異常の頻度を取得しておく必要がある。そこで原発事故の物理的影響が非常に小さいと考えられる東京都内またはその以西に在住する一般市民 72 名を被験者とする事とした。実際の被験者の募集や血液試料の収集については、民間の医薬品開発業務受託機関 (contract research organization) と治験業務に精通した医療法人からなる企業グループに外注して行った。

被験者は大きく 2 群に分類される。第 1 群は、10 歳代、20 歳代、30 歳代、40 歳代、50 歳代、60 歳代の男女各 4 名で、喫煙歴、抗がん剤等の薬物投与歴、X 線 CT による放射線診断歴、職業被ばくなど、染色体異常に影響を及ぼすと考えられる事項が無い者である (合計 48 名)。喫煙は広く一般的な習慣であり、染色体異常に影響を与えると考えられていることから、第 2 群は、20 歳代、30 歳代、40 歳代の男女各 4 名で、日常的に喫煙しているが、第 1 群と同様に染色体異常に影響を及ぼすと考えられるその他の事項が無い者とした (合計 24 名)。なお、10 歳代の被験者は、10 歳代の初期と後期では身体的な特徴が大きく異なり、また被験者になるための判断能力を考慮し、全て 16 歳以上とした。

前述の医療法人において、被験者を募集し、インフォームドコンセントを実施した後、医師の問診により、喫煙歴および染色体異常に影響を及ぼすと考えられる事項の有無を確認し、採血を行った。得られた血液試料は、医療法人において約 4℃で保管し、原則として 48 時間以内に放医研に冷蔵輸送することとしたが、実際には採血後少なくとも 12 時間以内に全ての血液試料が放医研に搬入された。試料の到着後は、一時的に鍵の付いた冷蔵庫に保管し、その後速やかに染色体解析に必要な処理を行った。

これらの試料収集に先立ち、本事業では研究倫理と個人情報管理の問題に対しても万全を期した。まず、研究倫理であるが、本事業に係る研究内容について、研究主体である放医研および実際に採血を行う医療法人それぞれの治験審査委員会 (Institutional Review Board) に諮り、承認を得た後に採血等を実施した。また個人情報の管理については、医療法人において連結不可能匿名化を行い、研究上必要な情報のみを放医研に伝達することとした (図表 2-2-1)。なお、医療法人においては個人

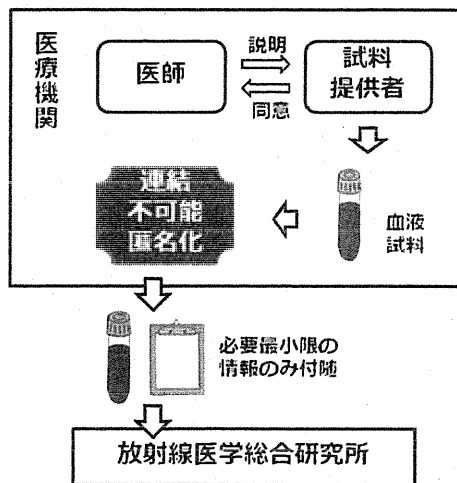
情報管理者を置き、個人情報の取り扱いに十分に注意し、実施した。なお、以下は治験審査委員会に提出された研究計画書における個人情報管理の方法について記述した部分の抜粋である。

6-4 個人情報の取り扱いと管理方法

被験者の個人情報については、以下の方法によって血液試料収集機関の責任において厳重に管理する。

- ① 提供される血液試料は、研究実施機関に渡される段階で識別番号等が付与され連結不可能匿名化されるものとする。また、被験者の個人情報については機密保護に留意する。
- ② 連結不可能匿名化は血液試料収集機関で行なう。
- ③ 研究実施機関が研究結果を公表する場合であっても被験者の秘密を保護する。
- ④ すべての本研究関連者は、職務上知り得た個人情報を正当な理由なく漏らさない。その職を辞した後も、同様である。
- ⑤ すべての本研究関連者は、個人情報の取り扱いに関する苦情等に誠実に対応する。

なお、血液試料収集機関の個人情報管理者は、研究実施機関に対して、研究上必要な情報（5-3 参照）のみを伝達し、被験者の個人を特定し得る情報（氏名、住所など）を特定できないように連結不可能匿名化する。個人情報管理者は、被験者の個人情報が含まれている情報を厳重に管理する。



図表 2-1-1 血液試料の流れと個人情報の匿名化

2-2 自動化・高速化した染色体解析システム

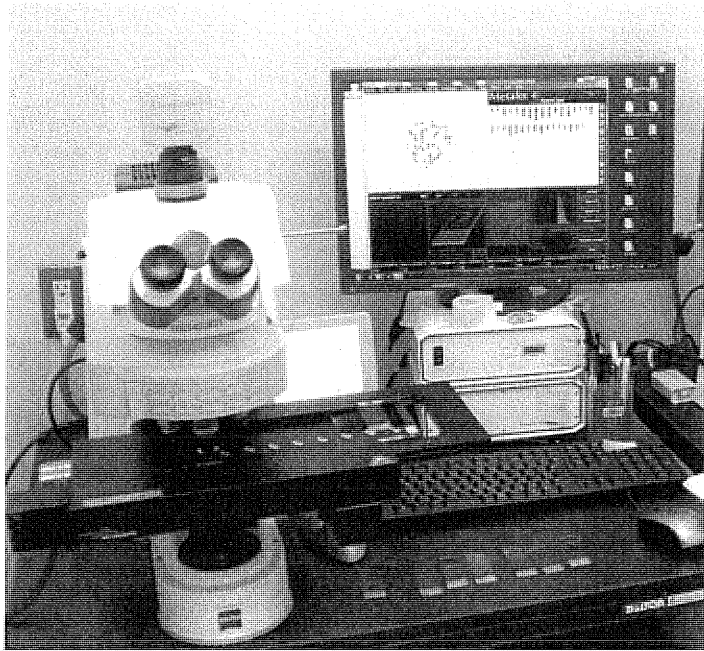
2-2-1 染色体解析システムの選定

染色体は100年以上前に発見され、その解析は顕微鏡を用いて観察することによって行われてきた。しかしながら、人が顕微鏡を覗き染色体像をひとつひとつ観察していくことは非常に労力を必要とするものであり、数百人から数千人規模の大規模な調査には適用できない。そこで本事業では、この染色体解析を自動化・高速化する手段として、顕微鏡にCCDカメラを装着し、取り込んだ画像をコンピュータで解析するシステムを用いる事にした。このようなシステムは数社のメーカーから販売されているが、世界の主要な生物線量評価研究グループが使用し、事実上世界標準となっているZEISS社/ MetaSystems社のサイトジェネティック スキャニングシステムを使用することとした。現在、国際標準化機構（ISO）のワーキング・グループ18（生物線量評価グループ）等において標準化を進めるための協議が進んでいる^{4),5)}。

本システムは、以下のものから構成されている。なお、本事業で使用したシステムは既に放医研に導入されていたものを活用した。

MetaSystems 社製	サイトジェネティック スキャニングシステム
ソフトウェア	メタフェーズ自動検索 MSearch ダイセントリック解析
制御装置	ホストコンピュータ PCワークステーション (DELL) ステージコントローラ トラックボール 22型液晶モニター FlexScan S2243W-HXBK (NANA0)
入力装置	高性能モノクロカメラ Cool Cube 1m ※1360 x 1024, USB2.0接続
電動ステージ	Stage8 (8枚スライドスキャニングステージ)
電動顕微鏡	Axio Imager .Z2 (電動鏡基、蛍光: Metafer 蛍光用) ・対物レンズ PlanApochromat10x, 63xOil, 100xOil, EC Plan-Neofluar 40x
アダプタ	Cマウントアダプタ 60N-C 1" 1.0x (Camera)
MetaSystems 社製	Metafer 解析端末システム
ソフトウェア	Metafer 解析 ソフトウェア MSearch ダイセントリック解析
ハードウェア	ホストコンピュータ PC WorkStation (DELL) 22型液晶モニター FlexScan S2243W-HXBK (NANA0)

図表2-2-1 本事業で使用した染色体解析システムの構成

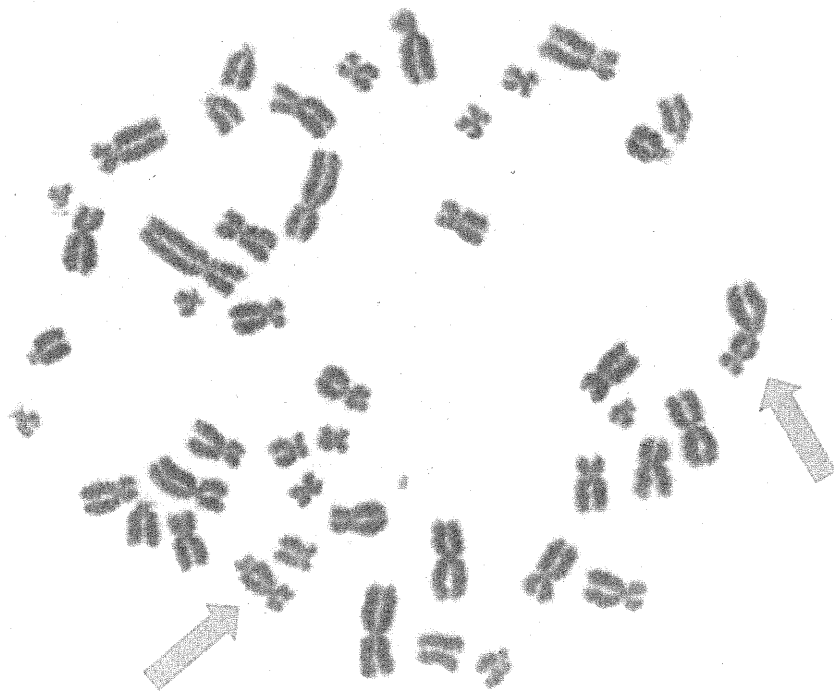
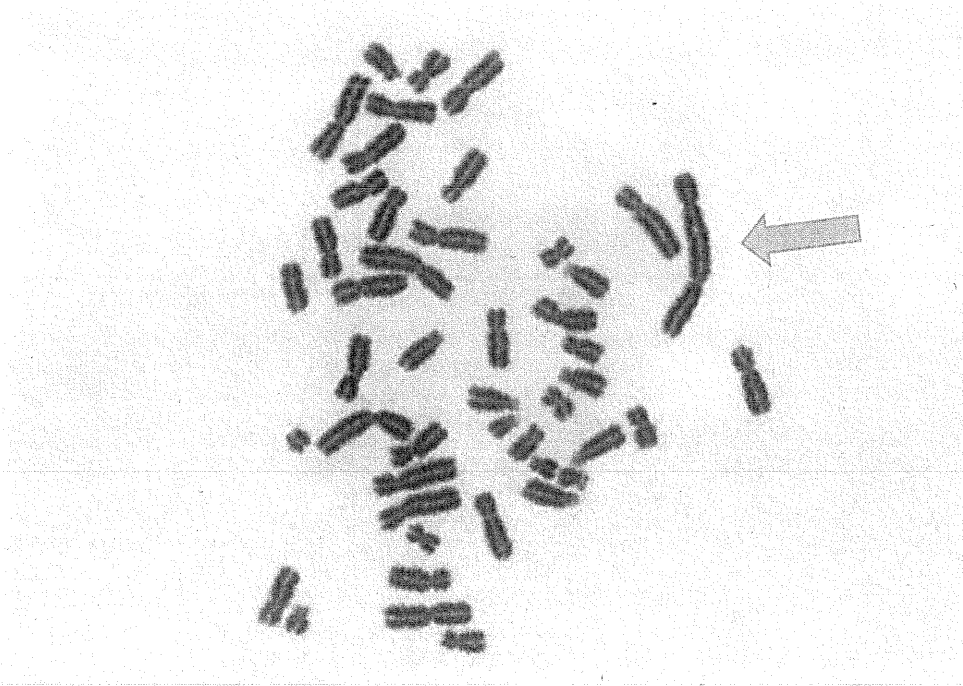


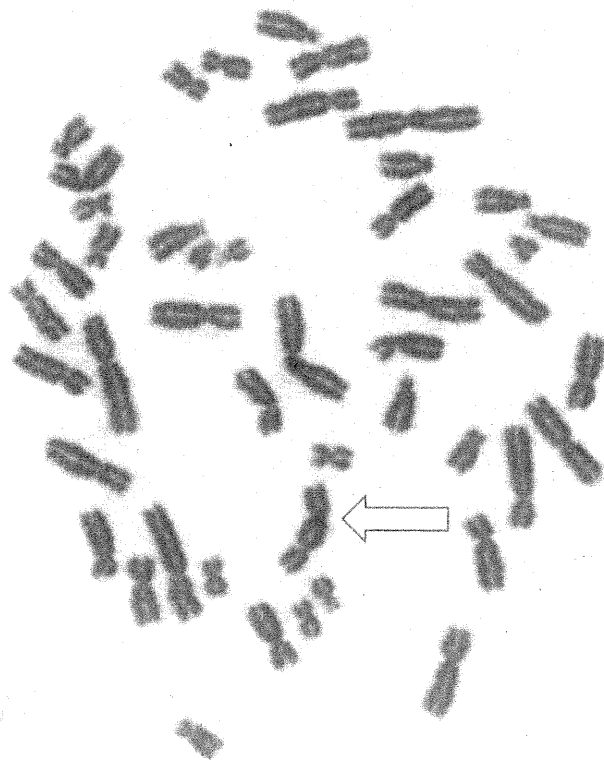
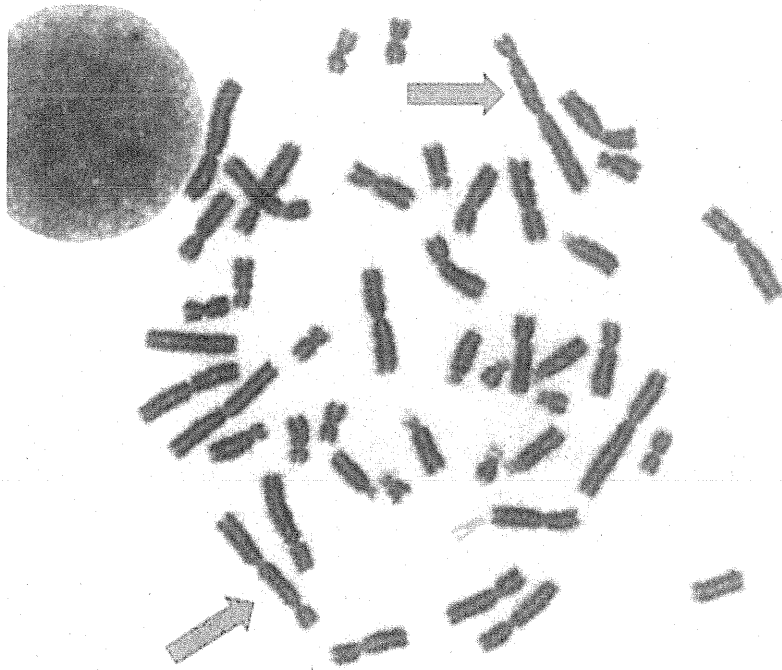
図表 2-2-2 本事業で使用した染色体解析システムの外観

2-2-2 解析プログラムの修正とトレーニング

染色体標本の品質には研究室間での格差があり、染色体の形態や染色濃度、広がり面積が異なる。また、末梢血リンパ球の性質上、完全同調培養は困難であり、メタフェーズ（分裂中期）といっても中期における前期から後期まで、様々なフェーズの細胞が混在し、細胞によって染色体の凝集度合や長さが異なる。そこで、本研究事業の開始に当たって、ZEISS 社へ目視による判定が確定しているメタフェーズ画像 100 枚を提供し、メタフェーズ検出プログラムおよび二動原体染色体判定プログラムのパラメータ修正とトレーニングを行い、可能な限り最適化した。

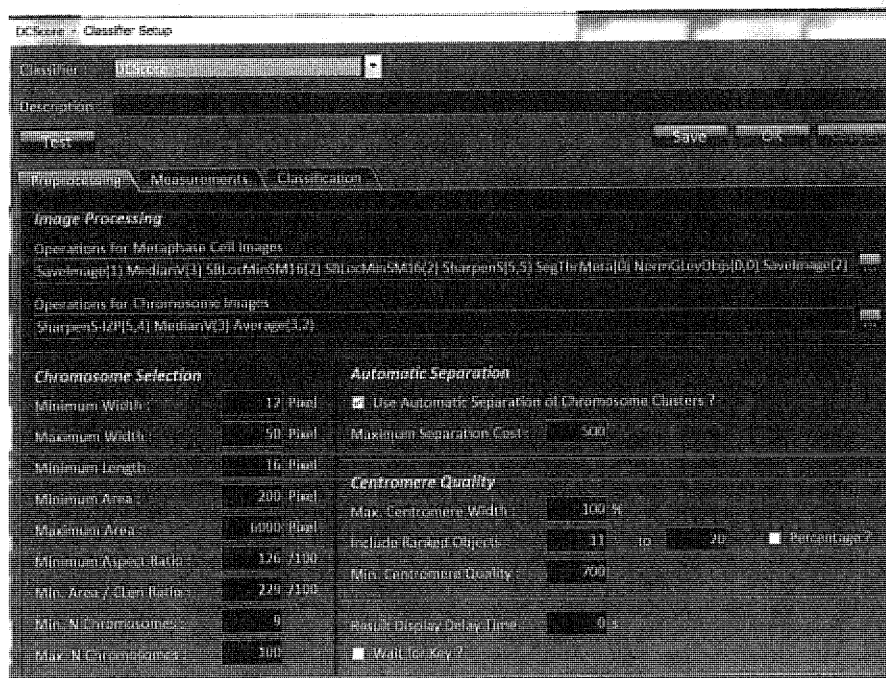
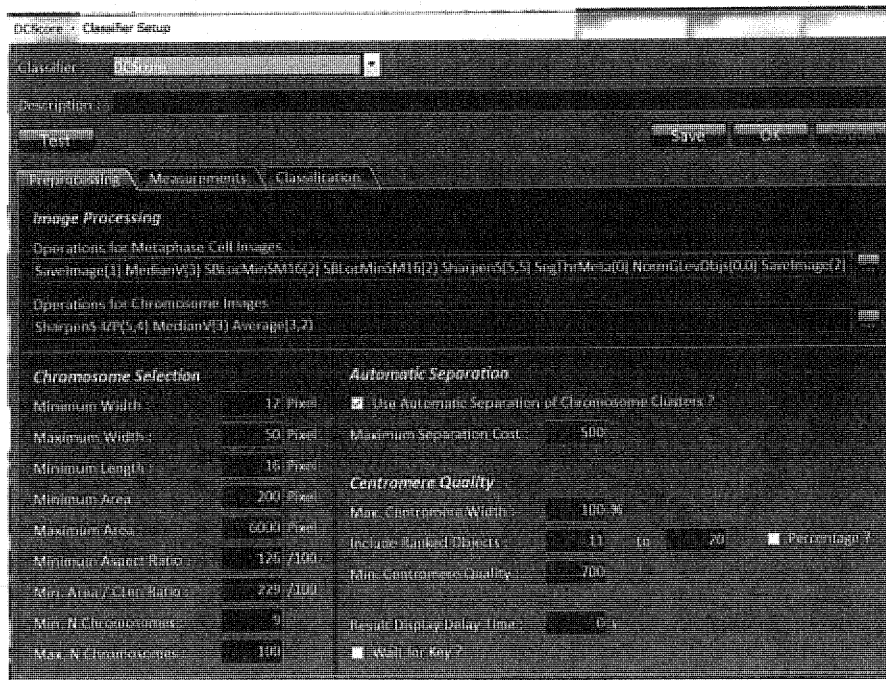
以下に 4 枚の染色体画像を示す。3 枚は二動原体染色体を 1 個ないし 2 個含むメタフェーズ画像で、青い矢印で指したものが二動原体染色体である。1 枚は、二動原体染色体を含むメタフェーズ画像ではなく、黄色の矢印で指したものは、“ねじれ”を起こした正常な染色体である。



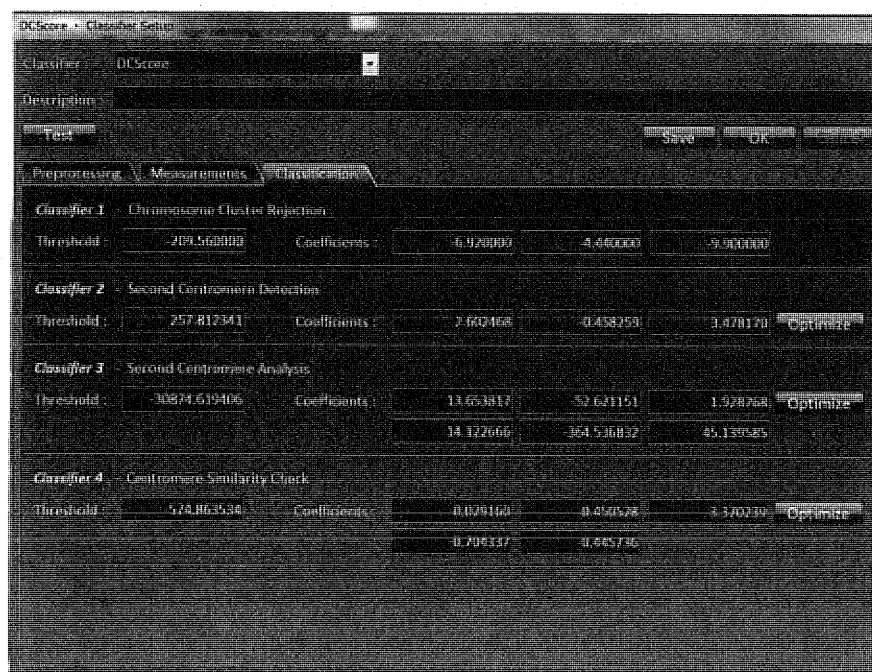
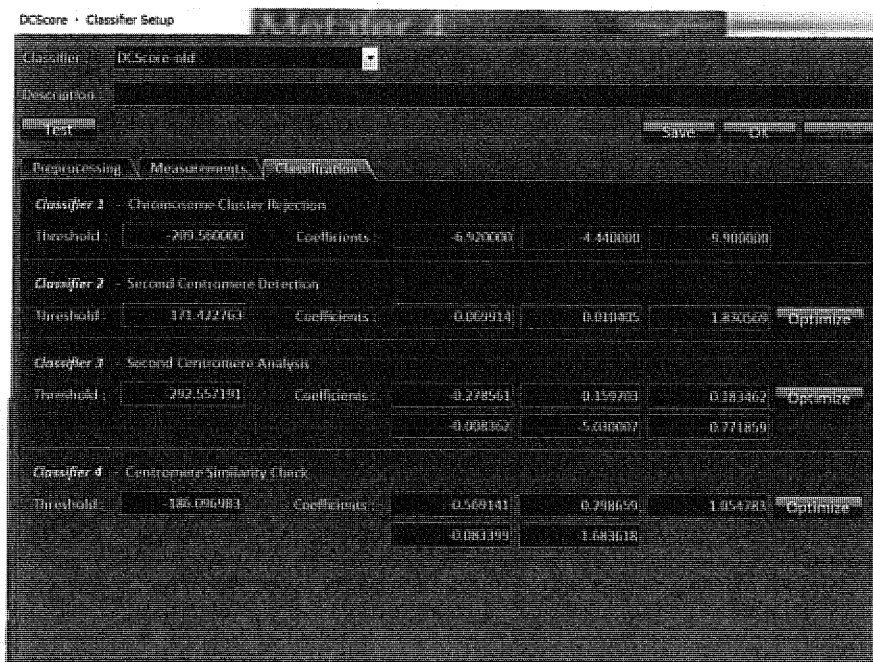


図表 2-2-3 染色体画像。青い矢印で指したものが二動原体染色体。黄色の矢印で指したものはねじれを起こした正常な染色体である

次に、パラメータセッティングの例を2例示す。上段がセッティング前、下段がセッティング後の値である。



図表 2-2-4 パラメータセッティングの例 (1) 上段がセッティング前、下段がセッティング後の値



図表 2-2-5 パラメータセッティングの例 (2) 上段がセッティング前、下段がセッティング後の値

以上のようなパラメータセッティングを行い、その前後で二動原体染色体の認識率が向上した。

	パラメータ修正前	パラメータ修正後
誤って選択した細胞数	29	25
全細胞 (252 個) に対する%	11.5	9.9

図表 2-2-6 パラメータの修正前と修正後における認識率の変化。修正後に向上している

2-2-3 再現性の検討

染色体解析システムの再現性を確認するため、実験的に放射線照射 (1 グレイ、以下グレイを Gy と表記する) を行ったリンパ球を用いて作製した染色体標本 4 枚を用いて、自動で二動原体数を計測した。slide-1 と slide-2 はそれぞれ 3 回、slide-3 と slide-4 はそれぞれ 2 回自動解析を行った。いずれも、二動原体数等に統計学的に有意な差は見られなかった。

二動原体計測 1 回目

Name	Dose(Gy)	Eval	Reject	No. of DIC/cell						DIC	
				0	1	2	3	4	>4		total
slide-1	1	243	77	209	32	2	0	0	0	243	36
slide-2	1	384	101	343	39	2	0	0	0	384	43
slide-3	1	267	63	229	31	7	0	0	0	267	45
slide-4	1	291	88	251	37	2	1	0	0	291	44
total				1032	139	13	1	0	0	1185	168

二動原体計測 2 回目

Name	Dose(Gy)	Eval	Reject	No. of DIC/cell						DIC	
				0	1	2	3	4	>4		total
slide-1	1	208	56	168	38	2	0	0	0	208	42
slide-2	1	367	83	321	39	6	1	0	0	367	54
slide-3	1	261	70	216	38	5	2	0	0	261	54
slide-4	1	342	111	302	36	4	0	0	0	342	44
total				1007	151	17	3	0	0	1178	194

二動原体計測 3 回目

Name	Dose(Gy)	Eval	Reject	No. of DIC/cell						DIC	
				0	1	2	3	4	>4		total
slide-1	1	215	57	176	38	1	0	0	0	215	40
slide-2	1	393	75	349	40	4	0	0	0	393	48
total				525	78	5	0	0	0	608	88

図表 2-2-7 同一試料を用いた場合の自動計測による二動原体の計測結果。表中の主な英語表記は以下の意味である；Eval:システムがメタフェーズと認識した細胞数、Reject:システムがメタフェーズではないと認識した細胞数、DIC:二動原体染色体

2-2-4 偽陽性および偽陰性の検討

本事業で用いている染色体解析システムは、コンピュータによる画像解析に基づいて、正常な染色体と二動原体とを区別しているが、現時点では完全に区別することはできないと考えられる。そこで、その精度を測るため、1個体に由来し、実験的に放射線照射を行ったリンパ球を用いて作製した3種類の染色体標本（0 Gy, 941 メタフェーズ; 0.1 Gy, 633 メタフェーズ; 1 Gy, 865 メタフェーズ）を用いて自動で計測し、その後それぞれのメタフェーズ画像を人がひとつひとつ判定し、偽陽性および偽陰性を調べた。なお、ここでは偽陽性および偽陰性を以下のように定義する。

疑陽性：正常な染色体を持つ細胞だが、システムが二動原体を持つと判定した細胞

偽陰性：二動原体を持つ細胞だが、システムが正常な染色体と判定した細胞

	(a) Dic(+)正解	(b) false positive	(c) false negative	(d) Dic(-)正解	(e) 計
0 Gy	0	174	0	767	941
0.1 Gy	1	97	0	535	633
1 Gy	23	51	28	763	865

図表 2-2-8 自動解析システムによる判定結果。英語表記等は以下の意味である；Dic(+)正解:システムが二動原体染色体を含む細胞であると正しく判定した細胞、false positive:偽陽性細胞、false negative:偽陰性細胞、Dic(-)正解: システムが正常な細胞であると正しく判定した細胞

これらの結果は、あくまでも実験的な照射を行ったリンパ球によるものである。結果は、0 Gy、0.1 Gy、1 Gy の照射線量に対して、疑陽性の割合 (b/e) は、それぞれ 18.5%、15.35%、5.9%であり、偽陰性の割合 (c/e) は、それぞれ 0%、0%、2.9%である。また、全体の判定正答率、すなわち全体から偽陽性及び偽陰性を除いた細胞数の率 ((a+d)/e) は、それぞれ 81.5%、84.7%、90.9%、であった。

二動原体細胞であるのに、システムが取り逃した率 (c/(a+c)) は 0G 及び 0.1Gy ではそもそも二動原体数が少なく判定できなかった。1Gy では 54.9%と計算される。

二動原体染色体ポジティブと自動判定された画像の目視確認を加えると、正答率は 100%、100%、96.8%に改善された。0.1 Gy 以下の試料に対しては、全検出メタフェーズの約 15~18% (1000 細胞につき 150~180 個) を目視確認する必要があると思われる。

2-2-5 染色体解析システムとその運用に関する考察

従来、二動原体染色体分析による放射線被ばく影響の検査は、検出限界が 200 mGy 程度とされている。現在、放医研生物線量評価室は、検出限界 100 mGy の線量効果曲線を有し、独自の研究により、200mSv 程度の被ばくでも二動原体染色体が有意に増加している事が判明している（非公開データ）。また二動原体染色体の半減期は 3~4 年とされているが⁶⁾、放医研生物線量評価室における低線量被ばく事故調査および年次検診調査から、被ばく後数年を経ても検査が可能であることが示唆されている。さらに、二動原体の頻度のバックグラウンド値（通常の地域に住み、自然放射線以外に特に放射線被ばくを受けていない人での値）は 1000 細胞に 0.5 個程度と言われている^{2), 6)}。一方、100 mSv 浴びた人の二動原体数は 1000 細胞中の 2~3 個と言われている。以上を考慮すれば、100mSv 以下の放射線被ばく（自然放射線を除く）でも二動原体数が 1000 細胞中 2 個以上ある被験者をスクリーニングしてくることが重要であると考えられる。

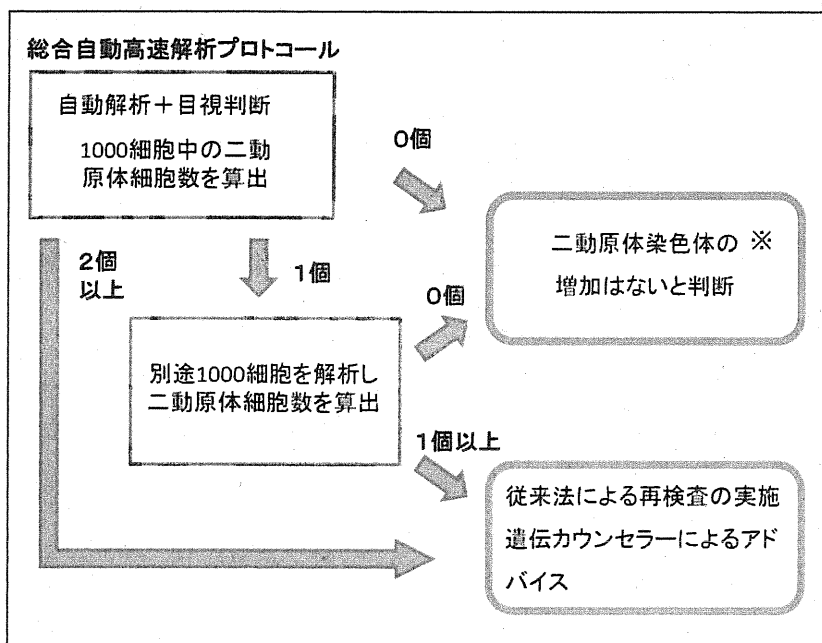
本事業で使用・改良した染色体解析システムでは、現段階で 20%程度の疑陽性が出ており、これらについては人が画像を再判定することによって、ほぼ取りこぼすことなく検出されると考えられる。一方、二動原体細胞であるのにシステムが取り逃す率は約 55%と高い。しかしながら 1000 細胞中 2 個以上の二動原体細胞を持つ試料を二動原体無しと判定する確率は約 3 割 ($0.55 \times 0.55 = 0.3025$) であり、逆に言えば約 7 割の確率で検出可能であると考えられる。実際の運用では、まず 1000 細胞について解析システムと疑陽性の再検査を行い、1 個の二動原体が検出された場合、さらに 1000 細胞以上の検査をする。それでも 1 個以上の二動原体が観察された場合は、従来法により再調査を行うなどの方策が必要であろう（具体的には、図表 2-2-5 参照のこと）。今後、パラメータ修正やトレーニング数増加により、さらなる改善が見込まれ、仮に取り逃す率を 2 割まで減ずることができれば、1000 細胞中 2 個以上の二動原体細胞を持つ試料（被験者）を 95%以上の確率で検出可能である。

一般住民を対象とした調査においては、重要なのは迅速性である。染色体解析で最も時間を必要とするのは“観察”の部分であり、本事業で使用・改良した染色体解析システムを用いる事により、飛躍的な観察所要時間の短縮が可能である。

具体的には、まず手動による染色体像の撮影では、メタフェーズを探索し、顕微鏡のピント調整を経て、撮影に至るものであり、1 細胞について平均 15 分必要である（放医研の実測値）。よって、1000 細胞では 1 日 8 時間作業して 1 ヶ月以上必要である。また、これら取得した画像に対する二動原体の判定には、極めて熟練した研究者でも 16~17 時間程度が必要である。これに対し、解析システムを用いれば、1000 細胞の画像

取得に平均 1.5 時間、二動原体の判定は 2~3 分程度である。単純に計算すれば解析システムは手動の 170 倍以上の能力を有する。実際の運用では、200 細胞程度について人による疑陽性の再判定が必要になるので、若干両者の差が縮まるが、手動による観察に比べ解析システムは比較にならないほど効率的である。なお、これまで人による誤判定は無いものとして扱ってきたが、実際の調査を行う場合、疲労やそれによる誤判定も考慮しなければならない。また、人材の確保と育成も必須である。染色体の調査では、“観察”に最も多くの労力を必要とするが、ひとりの技術者が 1 日中観察のみを実行することは現実的にはほぼ不可能で、血液試料の調整やプレパラートの製作などの作業をバランス良く実行する方が、疲労感は小さいと思われる。解析システムの導入は、観察部分を大幅に簡略化するものであり、総合的な効率化と信頼性の向上において有効であると考えられる。以上のことから、染色体調査に本手法を適用することには十分な意義があると言える。

実際に調査が行われることを想定し、以下に運用方法の案を図示する。



図表 2-2-9 二動原体頻度算出後の運用方法案。※断定するものではなく、本手法が内包する不確実性を十分に考慮する必要がある

2-3 総合自動高速解析プロトコール

2-3-1 総合自動高速解析プロトコールの開発とその考え方

本事業では、国際標準化機構 ISO のスタンダード 19238 (2004 年版) をベースとし、これに 2-2 で述べた自動化・高速化した染色体解析システムを追加・活用した染色体解析手法である「総合自動高速解析プロトコール」の開発を試みた。これは、将来において一般市民の調査が行われることを念頭においたものであり、多くの試料を迅速に解析可能な方法であることが求められる。

総合自動高速解析プロトコールでは、実際に用いられることを想定し、安全管理や採血の際に使用する問診票などについても規定したほか、血液の採取や運搬・保存、培養や染色体標本の作製等については、国際標準化機構 ISO のスタンダード 19238 に準じた方法を踏襲している。なお、本プロトコールでは自動化・高速化した染色体解析システムを使用することを前提としているが、二動原体の判定精度の限界や調査資料などの問題から、以下の考え方に基づいて開発されていることに留意されたい。

- ・職業被ばくや CT 検査や放射線治療等の医療被ばく等が無く、抗がん剤などの薬物投与がない一般市民を対象としたものであること
 - ・現段階では技術的な限界もあり、一定の頻度（二動原体染色体が 1000 細胞中 0.5 個）を上回る傾向にある者を大まかにスクリーニングするものであること
- なお、本プロトコールは臨床研究を経たものではなく、医学上の診断を与えるものではない。

2-3-2 総合自動高速解析プロトコール

本報告書の巻末に、総合自動高速解析プロトコールを掲載する。

2-4 標準的日本人の染色体解析の結果

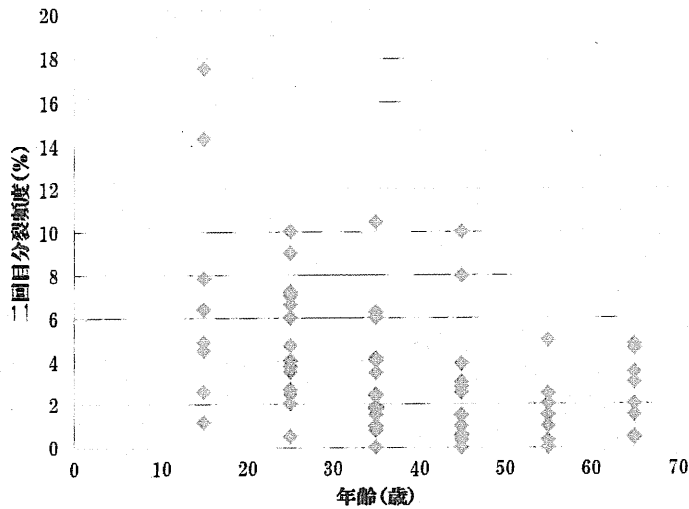
本事業では、実験的に放射線照射を行った細胞を用いて 2-3 で述べた総合自動高速解析プロトコールの開発を行ったが、これは新しい解析手法であり、実際のヒト血液に適用した場合に、どのような結果が出るのかについては、明らかになっていない。そこで、本事業では 2-1 で述べた被験者の試料を総合自動高速解析プロトコールを用いて解析し、標準的日本人の試料においてどの程度の数値が算出されるかについて調査した。なお、本書で言う“標準的”とは、2-1 でも述べたように、職業被ばくや医療被ばく、抗がん剤投与など、二動原体発生頻度に影響する事象が無い、あるいは極めて小さいと考えられる者であり、いわゆるバックグラウンドレベルを指していることに留意いただきたい。

2-4-1 細胞動態の解析

線量評価のための末梢血リンパ球細胞培養では、培養時間が 48 時間として標準化されている。48 時間培養ではほとんどのメタフェーズが 1 回目分裂を示し、体内の放射線被ばく影響を反映し、培養中の人工産物（実験中に生じる染色体異常）の発生は抑えられている。しかしながら、ひとつの研究機関が 10 代から 60 代までの一般人末梢血で細胞周期を調べた報告はみられない。若年層では若干細胞周期が早いことが予想され、2 回目分裂以降のフェーズを含む可能性がある。線量評価で指標とする二動原体染色体は不安定型染色体であり、次の細胞分裂において理論上 1/2 の確率で消失する。正確な線量評価のためには、過小評価を生じない限度まで 2 回目分裂細胞の頻度を抑える必要がある。

そこで、本研究事業では、被験者全員の 2 回目分裂細胞頻度を測定した。その結果、図表 2-4-1 に示すように、加齢と 2 回目分裂細胞頻度との間に緩やかな相関が見られることが分かった。性差はみられなかった。

この解析をふまえ、本研究事業では、2 回目分裂細胞の頻度が 10%以上の被験者については、コルセミド混合培養液を用いて 2 回目分裂頻度がゼロとなるようにした培養法による標本を解析に使用することとした。



図表 2-4-1 年齢と2回目以上の分裂回数の細胞頻度

2-4-1 染色体解析の結果

2-1 で述べた被験者 72 名 (16 歳から 69 歳までの男女) について、二動原体染色体分析を行った。被験者 72 名全員について、総合自動高速解析プロトコールに従い原則として、1 検体につき 1000 細胞 (メタフェーズ) を自動システムによって検出・画像取得し、自動スコアリングシステムによって二動原体染色体異常の判定をした。二動原体染色体ポジティブと判定されたメタフェーズについて、人の目による確認を行った。その結果、二動原体染色体が検出されたのは 72 名中 1 名であった。

JPN-007 (20 代、非喫煙、男性) 1/1206 (頻度 0.0014)

さらに、下記 6 名については、原則として 1000 細胞/検体すべての、目視により染色体解析を実施した。

20 代・喫煙・男性 1 名 (ID: JPN-024)

20 代・非喫煙・男性 1 名 (ID: JPN-007)

40 代・喫煙・男性 2 名 (ID: JPN-003, -040)

40 代・非喫煙・男性 2 名 (ID: JPN-028, -072)

その結果、二動原体染色体が検出されたのは 6 名中 2 名であった。

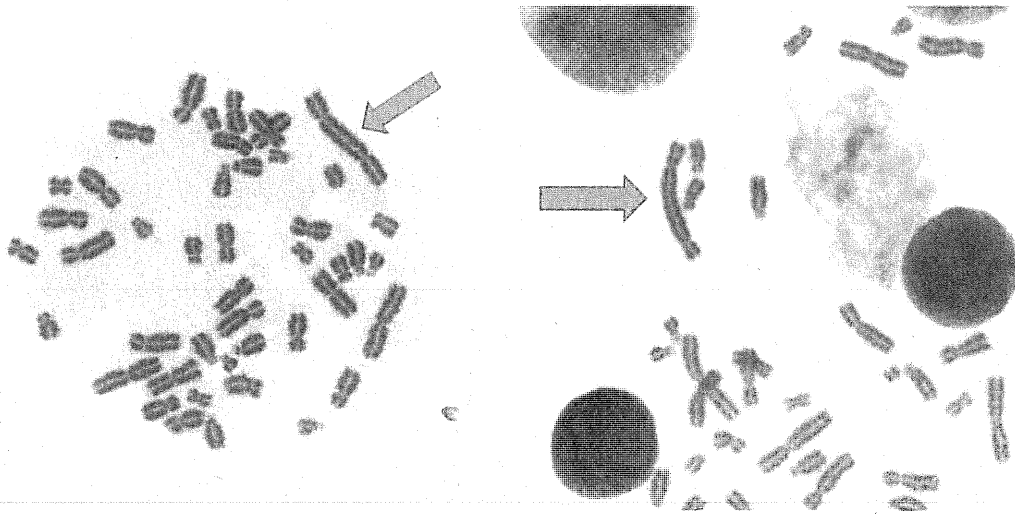
JPN-003 (40 代、喫煙、男性) 二動原体染色体数 1 個/1292 細胞 (頻度 0.001)

JPN-028 (40 代、非喫煙、男性) 1/1125 (頻度 0.0009)

統計学的に性差、年齢差、喫煙・非喫煙差に関する有意な差は見られなかった。また自動解析+目視の検査と、目視のみの検査の結果に有意な差は見られなかった。

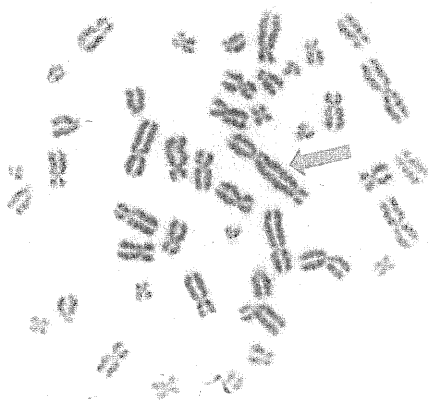
なお、本事業期間内では全ての試料について、目視による解析は行えなかったが、今後も引き続き解析を進め、その結果をホームページ等で公表する予定である。

以下に、これまでに検出された二動原体染色体像を示す。



JPN-007

JPN-003

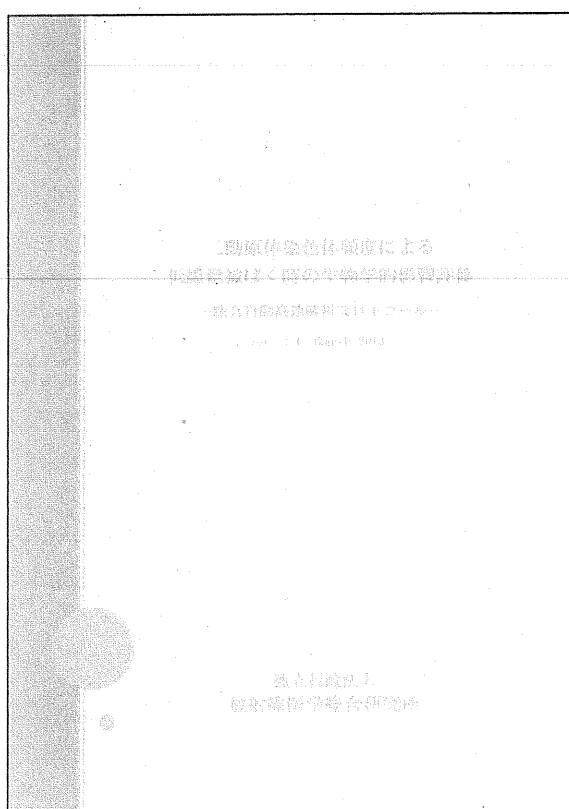


JPN-028

図表 2-4-2 本事業内の被験者から観察された二動原体染色体像

3. 総合自動高速解析プロトコルのマニュアル化

総合自動高速解析プロトコルについては、既に2-3で述べた。また、これをマニュアル化したものを本報告書の巻末に掲載した。総合自動高速解析プロトコルをマニュアル化するにあたっては、国際標準化機構のプロトコルを原則としながら、放医研がこれまで行ってきた線量評価研究における知見を加え、機材や薬品等の型番、実験方法についても可能な限り詳細に記載することに務めた。なお、マニュアルは必要な場合に使えるよう、20部程度を製本し、本報告書と共に委託元に納品する予定である。



図表 3-1 総合自動高速解析プロトコルマニュアルの表紙

4. ホームページを用いた情報発信

研究成果を広く一般市民に公開することは非常に重要なことである。本事業においてもその考えに則り、専用のホームページを開設した。本ホームページでは可能な限り平易な文章を用いると共に、ビジュアル的にも興味をもってもらえるよう工夫した。

トップページの下に3つのページを設け、それぞれ「染色体の基礎知識」「プロジェクトの紹介」「プロジェクトの成果」を掲載している。なお、標準的日本人の染色体異常頻度解析など、今後データ等が追加されていく予定であり、その都度、本ホームページを更新していく予定である。なお、本事業は、いわゆる臨床検査としての染色体検査とは異り、一般市民の方がこれらと混同することを避けるため、提案書にあった「染色体検査の手法」、「染色体検査法の活用」、「染色体検査 Q&A」は掲載しない事とした。ただし、総合自動高速解析プロトコルの手法、活用については、掲載した内容に含まれている。本ホームページの URL は、以下のとおり。

<http://www.nirs.go.jp/information/moe/index.html>

以下に、本ホームページの掲載内容を示す。なお、内容は本報告書作成時点のものであり、変更される可能性がある。

● トップページ

染色体の基礎知識 プロジェクトの紹介 プロジェクトの成果

Chromosomes

低線量被ばくによる生体に関する細胞遺伝学的評価の開発

染色体は、放射線による生体への影響の度合いを調べる指標として古くから研究が行われてきました。近年「低線量の放射線被ばくが人体にどのような影響を及ぼすのか」という課題に大きな関心が寄せられ、改めて染色体を使った調査の重要性が叫ばれています。しかしながら、ひとりの人の染色体を調べるにも手間と時間が必要で、100人あるいはそれ以上の規模の調査を行うことは容易ではありません。そこで放射線医学総合研究所では、環境省の委託を受け、大規模な調査も可能とする染色体調査方法の開発に取り組んでいます。

● 染色体の基礎知識 ● プロジェクトの紹介 ● プロジェクトの成果

●染色体の基礎知識

書

染色体の基礎知識

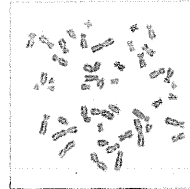
プロジェクトの紹介

プロジェクトの成果

染色体の基礎知識

染色体とは

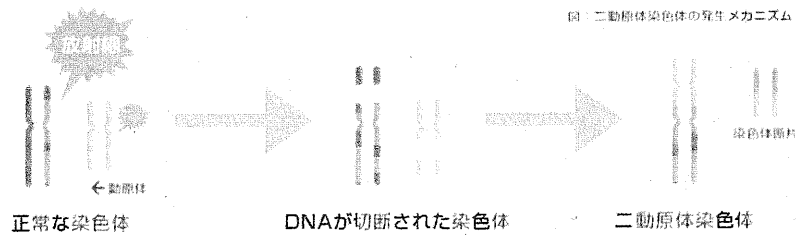
人間を含む様々な生物の体は、たくさんの細胞からできています。細胞のひとつひとつには核（細胞核）という部分があり、核の中にはその生物を形作り生きていくために必要な情報が入っています。その情報を担っているのがDNA（ディーエヌエー）です。DNAはとても長いので、小さな核の中に納めるには、特殊なタンパク質と一緒に折りたたむ必要があります。折りたたまれたものは普段見る事が出来ないのですが、細胞が分裂して新しい細胞が生まれる際に凝縮してX型の紐のような形になり、特殊な薬品で染めると顕微鏡で観察することができます。これを染色体と言います。



染色体は核の中に複数個ありますが、普通2本で1組となり、またその数は生物種毎に決まっています。ヒトの細胞の核には、23組、46本の染色体があります。そのうちの1組、2本の染色体を性染色体と言います。その人が女性になるか男性になるかを決めています。図に女性はXX、男性はXYと表現されます。

染色体異常

何らかの原因によって、染色体の数や形が変わってしまうことを染色体異常と言います。染色体異常には、生まれつき染色体に異常を持つ場合と後天的に染色体異常が発生する場合があります。後天的に染色体異常を引き起こす原因には、放射線や化学物質、活性酸素や酸化など様々な要因が考えられています。



放射線は染色体を切断する性質があります。しかし細胞には切れた染色体を修復する働きが備わっていて、切れた染色体のほとんどは元の正常な形になり返直されます。ところが、稀に間違った場所になり返直されてしまう場合があり、結果として異常な染色体を生ずることになります。

(染色体基礎知識の続き)

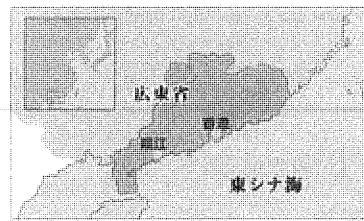
染色体異常のなかでも特に放射線の影響を受けて生じやすいものに二動原体染色体があります。細胞分裂のとき、染色体はくみれを持ったX型の紐状の形態をとります。このくみれの部分を動原体と呼び、ひとつの染色体に1箇所あります。図のように、放射線によって切断されたDNAが間違った場所につなぎ直されてしまうと、二つの動原体をもった異常な染色体と動原体を持たない染色体断片が生じてしまいます。

二動原体染色体が発生する頻度は、放射線をどのくらい浴びたかという被ばく量に伴って増加し、二動原体染色体の発生頻度と被ばく量には一定の相関関係がある事が知られています。そのため、人の体に強い放射線が当たってしまったような被ばく事故があった際に、白血球を調べ、二動原体染色体の発生頻度から逆に被ばくした放射線の量を推定することが行われています。

低線量放射線と染色体

私たちは、普段の生活の中でも様々な放射線にさらされています。宇宙からは宇宙線と呼ばれる放射線が常に降り注いでいますし、大地からも放射線を受けています。また食品の中にも放射性物質は含まれており、私たちは食事をするたびに放射性物質を体内に取り込んでいます。このような日常的に身の周りに存在する放射線を自然放射線と呼んでいます。

自然放射線の量は、土壌の成分や高度などによって違ってきます。その量の世界平均は年間2.4ミリシーベルト程度ですが、世界には自然放射線が非常に高い「高自然放射線地域」が存在します。例えば、中国広東省の陽江地域には、自然放射線の量がその他の地域よりも3～5倍も高い地域があります。これまでに様々な研究機関がその影響を調査しましたが、この高い自然放射線が健康に影響するという証拠は得られていません。染色体の異常頻度についても調査を行ったところ、二動原体染色体と環状染色体（異常染色体）が高自然放射線地域ではその他の地域に比べて多く検出されました。



ただし、放射線や化学物質、活性酸素や喫煙など、ほとんど全ての要因でおこるとされる別の染色体異常（転座）を調べたところ、二動原体染色体よりもはるかに多くの染色体異常が見つかり、また個人差も非常に大きいことが判りました。よって、高い自然放射線による二動原体染色体の増加は、別の染色体異常（転座）の個人差の範囲内であると考えられています。

【参考論文】

Tao, Z., et al. Cancer and non-cancer mortality among inhabitants in the high background radiation area of Yangjiang, China (1979-1996). *Health Phys.* 102(2): 173-81 (2012)

Jiang, T., et al. Dose-effect Relationship of Dicentric and Ring Chromosomes in Lymphocytes of Individuals Living in the High Background Radiation Areas in China. *J. Radiat. Res.* 41: suppl.63-68 (2000)

Zhang, W., et al. Effect of smoking on chromosomes compared with that of radiation in the residents of a high-background radiation area in China. *J. Radiat. Res.* 45(3): 441-6 (2004)

●プロジェクトの紹介

各

染色体の基礎知識

プロジェクトの紹介

プロジェクトの成果

プロジェクトの紹介

概要

染色体は放射線による生体への影響を調べる指標として古くから研究が行われてきました。中でも二動原体染色体異常頻度を用いた調査方法は、放射線との関係がよく研究されており、ISO（国際標準化機構）やIAEA（国際原子力機関）においても採用され、国際的に標準化されている方法です。

近年「低線量放射線による抑はくが人体にどのような影響を及ぼすのか」という課題に関心が寄せられています。低線量の放射線被ばくは多くの生体への影響を考察する上で、染色体は有効な指標となります。しかし染色体を観察するには熟練した技術と時間が必要で、たくさんの試料を調べることは現実的には難しいという現状があります。染色体の観察行程を自動化すれば、大幅な時間短縮が可能で、規模の大きい調査も実現性をおこなえます。

そこで放射線医学総合研究所では、ISOやIAEAが採用している手法に染色体の自動解析を追加し全体の調査時間の大幅な短縮を可能とする手法、「統合自動高速解析プロトコール」の研究開発を進めています。

メンバー

研究責任者

原田 良徳

研究員

動藤 由美子、柳山 美穂、齋藤 俊行、米原 英典

●プロジェクトの成果

骨

染色体の基礎知識

プロジェクトの紹介

プロジェクトの成果

プロジェクトの成果

染色体の総合自動高速解析プロトコール

本事業では、ISOやIAEAが採用している手法に染色体の自動解析を追加し全体の調査時間の大幅な短縮を可能とする手法、「総合自動高速解析プロトコール」の研究開発を進めています。染色体の調査は大きく2つの行程に分けることが出来ます。ひとつは、血液を処理し、リンパ球を培養して染色体標本を作る工程です。もうひとつは、作られた染色体標本を顕微鏡などで観察する行程です。

染色体標本を作る工程では、原則的にISOやIAEAが採用している手法に則ると共に、これまで放医研が培ってきた標本作製に関する知識を投入して、より詳しいプロトコールとしました。

染色体標本を観察する行程では、1試料あたり1000個程度（あるいはそれ以上）の細胞を見て、二動原体などの異常な染色体をもつ細胞の割合を求めます。この行程は、従来、検鏡（けんきょう）と言って顕微鏡を使って人の目で細胞ひとつひとつの染色体の状態を観察してきました。しかし、この方法では非常に多くの時間が必要です。総合自動高速解析プロトコールでは、この行程に顕微鏡とCCDカメラ、コンピュータなどで構成される自動解析システムを追加し、スピードアップを図っています。放医研の試算によれば、すべて手作業で観察する場合に比べ、最大で170倍程度のスピードアップが可能です。しかしながら、この自動解析システムの精度はまだそれほど高くありません。自動解析システムは市販品で、放医研が持つ既存の染色体画像を用いてトレーニングしたり、様々な設定（パラメータ）を調整することによって精度の向上を図っていますが、現時点では1000細胞中に2個以上の二動原体細胞がある試料を発見する確率は7割程度と見込んでいます。今後も、精度向上に向けた研究開発を継続していく予定です。

日本人の染色体異常頻度に関する調査

上記の総合自動高速解析プロトコールは、新しく開発された手法で、実際のヒトの血液を用いた場合にどの程度の数値が算出されるかが不明です。そこで本事業では、二動原体染色体を持つ頻度について、日本人72名について調査しました。この72名の方は、職業被ばくや放射線治療、抗がん剤の投与など、二動原体の発生頻度に影響すると考えられる曝露の無い方々です。プロトコールに従って調査したところ、1名の方に二動原体を持つ細胞1個が発見されました。また、本事業では自動解析システムを用いず、目視による観察も平行して行っていますが、現在までに6名中2名の方に二動原体を持つ細胞がそれぞれ1個が発見されました。なお、IAEA等の発表によれば、通常の人の二動原体の派生頻度は1000細胞中0.5個程度であるとされています。よって、上記3名の方は特別に多いわけではなく、通常の範囲内であると考えられます。放医研では、今後もこの72名の方の試料について、くわしく調査していく予定です。未尾になりますが、被験者として本事業に参加いただいた72名の皆様には、心より感謝申し上げます。

マニュアル

放医研では、総合自動高速解析プロトコールを理解して頂くため、マニュアルを制作しました。これは染色体調査のそれぞれの行程を、判りやすく解説したものです。本マニュアルは、今後公開される予定です。

5. 委員会の設置と活動状況

本事業においては、外部の専門家の意見を取り入れながら推進することが重要であることから、「低線量被ばくによる生体影響に関する細胞遺伝学的評価手法の開発」に関する検討委員会を設置し、都合2回の委員会を開催した。本検討委員会の目的、所掌業務、委員、開催日時・場所は以下のとおりである。

・目的

環境省の委託事業「平成24年度原子力災害影響調査等事業（低線量被ばくによる生体影響に関する細胞遺伝学的評価手法の開発）」（以下「委託業務」という。）において、委託業務の円滑な実施を図るため、検討委員会（以下「委員会」という。）を設置する。

・所掌業務

委員会は、次の各号に掲げる事項について審議する。

- (1) 委託業務の研究推進方法に関すること
- (2) 研究結果の取り纏め方法に関すること
- (3) その他、委託事業の効果的な推進に関し、委員長が必要と認めたこと

・委員

木南 凌 新潟大学大学院医歯学総合研究科 客員教授 (委員長)
猪口 孝一 日本医科大学千葉北総病院血液内科 教授
岸 邦和 杏林大学大学院保健学研究科 客員教授

なお、放射線被ばくやリスクコミュニケーションの専門家を含む研究担当者はオブザーバーとして出席した。

・開催日時と場所

第1回委員会

日 時： 平成25年2月14日（木）16:30～18:00

場 所： 東京八重洲ホール 4F 414 会議室

第2回委員会

日 時： 平成25年3月11日（木）16:30～18:00

場 所： 東京八重洲ホール 4F 414 会議室

本委員会における、委員からの主な指摘事項は以下のとおりである。

- ・今年度の事業では、医療被ばく等のない者、いわゆる非被ばく健常人のバックグラウンドについて調査しているが、職業被ばくや医療被ばくを受けている者、抗がん剤治療を受けている者は少なくない。ポジティブコントロールの試料についても今後調査すべきである。
- ・二動原体染色体だけでなく、染色体の欠失や転座等についても調査すべきではないか。また手法についても M-FISH 等を取り入れてはどうか。
- ・二動原体染色体が体内に残る期間と、そのメカニズムについて研究をしてはどうか。幹細胞における染色体異常や発がんとの関係についても研究すべきではないか。
- ・内部被ばくと染色体異常との関係についても研究すべきではないか。
- ・偽陽性率、偽陰性率について更に詳しい調査を行うべきである。
- ・二動原体の発生頻度は非常に低いと考えられていることから、1000 個ではなく、より多くの細胞を調査すべきではないか。
- ・解析のソフトウェアを更に改善すべきではないか。

また、第2回の委員会において、以下のような総評を得ている。

今年度における本事業は時間的制約も大きく、研究成果は限定的にならざるを得ないと思われる。しかし、示唆に富む重要な結果が得られている。すなわち、低線量被ばくの影響を知るといって、染色体異常を指標とした放射線被ばくの影響を明らかにしておくことの重要性が明らかになった。この研究の進展には、大規模に解析するシステムの実用化と実施プロトコルの作成、客観的な結果の評価が欠かせない。今後は精度の向上や様々な状態の被験者からのデータ取得、染色体異常と疾患の関係性を明らかにして行くことを期待する。

6. 今後の課題に関する考察

本事業は、総合自動高速解析プロトコールの開発とこれを用いた日本人 72 名の二動原体染色体頻度の調査が主な目的である。限られた実施期間を考えれば極めてチャレンジングな事業内容であったが、必要な成果は得たと考える。バックグラウンドレベルの二動原体の発生頻度は 1000 細胞中 0.5 個程度と言われており、これと 1000 細胞中 3 個程度の試料を比較分離することは、従来法、すなわち熟練した研究者が目視によって観察したとしても容易な事ではないと思われる。このレベルの精度を達成するには、ギムザ染色にこだわらず染色体のカラーリング等を応用したり、ソフトウェアそのものの画像解析ロジックを根本的に構築し直す必要性も考えられる。

今回の事業では、委員会の指摘にもあったように、いわゆるポジティブコントロールの調査は行えなかった。職業被ばくを受けている者、CT 検査や放射線治療を受けた者、ブレオマイシン等の薬物投与を受けた者などの調査は、非常に重要である。これら該当者の血液試料において、どの程度の二動原体染色体が発生しているのか、そしてそれがどの程度の期間観察されるのかなどを把握しておくことは、科学的な染色体調査には必要不可欠である。東日本大震災に伴って発生した原子力発電所の事故を取材した者に二動原体染色体が発見され大きく報道された事例があったが、その後この取材者は事前に CT 検査を受けていたことが判明している⁷⁾。その頻度と、例えば年間 10mSv の被ばくを受けた住民における頻度には、どの程度の違いがあるのか。これは 1 つの例に過ぎないが、広汎な調査データに照らし合わせて、評価することが住民の調査を実施する上で重要であると考えられ、今後そのための調査研究が行われることに期待したい。

7. 謝辞

本事業を推進するにあたり、極めてご多忙の中、検討委員会の委員にご就任頂き、様々なご助言をいただいた木南凌先生、猪口孝一先生、岸邦和先生に心より深謝の意を表します。また、被験者として血液をご提供頂いた72名の皆様と、試料収集においてご協力頂いた医療法人相生会墨田病院の生島一平先生、平塚磁郎先生をはじめスタッフの皆様に心から謝意を表します。さらに、委員会の開催や様々な事務処理をこなし事業を支え続けてくださった伊藤名都美さん、菅原里奈さんに厚く御礼申し上げます。

研究担当者

原田 良信

数藤 由美子

穂山 美穂

齋藤 俊行

米原 英典

植田 未来

近藤 直子

8. 参考資料・文献

- 1) 第10回福島県「県民健康管理調査」検討委員会（平成25年2月13日開催）資料
<http://www.pref.fukushima.jp/imu/kenkoukanri/20130131senryousuikei.pdf>
- 2) International Organization for Standardization (ISO) 19238: Radiation protection -- Performance criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics. ISO, 2004.
[http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=33759]
- 3) Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. International Atomic Energy Agency (IAEA) Publications, 2011.
[<http://www-pub.iaea.org/books/IAEABooks/8735/Cytogenetic-Dosimetry-Applications-in-Preparedness-for-and-Response-to-Radiation-Emergencies>]
- 4) Detection of partial-body exposure to ionizing radiation by the automatic detection of dicentrics. Vaurijoux A, Gregoire E, Roch-Lefevre S, Voisin P, Martin C, Voisin P, Roy L, Gruel G. *Radiat Res.* 2012 Oct;178(4):357-64.
- 5) Strategy for population triage based on **dicentric** analysis.
Vaurijoux A, Gruel G, Pouzoulet F, Grégoire E, Martin C, Roch-Lefèvre S, Voisin P, Voisin P, Roy L. *Radiat Res.* 2009 May;171(5):541-8.
- 6) *Radiat Prot Dosimetry.* 2011 Nov;147(4):573-92. doi: 10.1093/rpd/ncq499. Epub 2010 Dec 23. Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures. Ainsbury EA, Bakhanova E, Barquinero JF, Brai M, Chumak V, Correcher V, Darroudi F, Fattibene P, Gruel G, Guclu I, Horn S, Jaworska A, Kulka U, Lindholm C, Lloyd D, Longo A, Marrale M, Monteiro Gil O, Oestreicher U, Pajic J, Rakic B, Romm H, Trompier F, Veronese I, Voisin P, Vral A, Whitehouse CA, Wieser A, Woda C, Wojcik A, Rothkamm K.
- 7) Cytogenetic biodosimetry for Fukushima travelers after the nuclear power plant accident: no evidence of enhanced yield of dicentrics.
Lee JK, Han EA, Lee SS, Ha WH, Barquinero JF, Lee HR, Cho MS. *J Radiat*

Res. 2012 Nov 1:53(6):876-81.

(別添) 総合自動高速解析プロトコルマニュアル