

第2回「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

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

〒103-0027 東京都中央区日本橋3丁目4番13番

議 事 次 第

1. 第1回委員会の議事録の確認 (資料-1)
2. 事業の進捗状況 (1) 血液の収集、ホームページおよびマニュアルの制作
(資料-2)
3. 事業の進捗状況 (2) 現時点での染色体解析の結果
4. 総合討論 ー今後の展開ー

第1回「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
議事録（案）

○開催日時と場所：

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

〒103-0027 東京都中央区日本橋3丁目4番13番

○議事録：

木南委員が委員長となることが承認され、自己紹介と資料の確認後、議事次第に従って、議論を行った。

1. 委員会の目的（資料-1）

委員会の目的について、事務局より説明を行った。この目的について委員の理解を得た。

2. 環境省委託事業「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」の事業概要（資料-2、3、4）

資料-2は本事業の仕様書、資料-3は放医研が提出した提案書であることを説明した。また本事業が実施される背景や事業の目的をパワーポイントを用いて説明した。特に意見等は無かった。

3. 染色体解析（資料-5）

染色体解析手法について、資料-5および関連するパワーポイントを用いて説明した。以下のような質疑応答が交わされた。

Q1：偽陰性はないのか？

A1：偽陰性はあると考えている。ただし、疑陽性に比較すれば頻度は非常に少ないと思われ、海外の研究機関は、偽陰性は無視し、陽性と判定されたものの中から疑陽性を確実に排除すべきと提唱している。解析システムは現在も調整中で、より精度の高いものにしていく予定である。

Q2：解析の精度に関して、染色体標本を作る過程は影響しないのか？放医研の標本作製能力は問題ないのか？

A2：標本作製技術が未熟な機関の場合は影響する可能性があるが、放医研は十分な技術を持っており影響はしない。

Q3：二動原体染色体に着目したのは、検量線がしっかりと研究されており、また異常の検出がしやすいからなのか？

A3：そのとおりである。また、非被ばく健常人のバックグラウンド値が非常に低いという特徴も挙げられる。

Q4：欠損や欠失については調べないのか？

A4：今回の事業の範囲ではない。もし実行するとすれば来年度以降である。

Q5：二動原体染色体は長期にわたって体内に残るのか？

A5：医療被ばくを受けた方に対する研究では半減期が3～4年程度と言われている。ただし、ビキニ環礁沖水爆実験の被ばくのケースでは、二動原体染色体のような不安定型染色体異常や、転座染色体などの安定型染色体異常も未だに観察されている。

Q6：染色体異常が末梢血に起こっているのか、幹細胞に起こっているのかは重要な問題だと思うが、如何か？

A6：将来の発がん等を考慮すれば、重要な問題である。

4. 日本人における染色体異常に関する疫学調査（資料－6）

資料－6に基づき、標準的な日本人72名の血液の収集と、これらを本事業においてどのように解析していくかについて説明をした。特に質問は無かった。

5. 総合自動高速解析プロトコールのマニュアル化（資料－7）

資料－7に基づき、総合自動高速解析プロトコールの構成とマニュアル化について説明をした。特に質問は無かった。

6. 総合討論

総合討論として以下の質疑応答があった。

Q1：臨床的には、被ばく線量とがん・白血病との関係に興味を持つが、M-F ISH等を用いて調査する予定はあるか？

A1：本事業以外の研究テーマとして様々な研究を進めている。

Q2：某国の報道関係者が事故後の日本を取材した後で受けた検査で染色体異常が見つかったと報道されていると聞いたが、どの程度なのか？

A2：1000個中、5～6個程度と聞いている。ただし、直近で受けたCT検査の影響であると考えられている。

Q3：日本でもCT検査が行われており、ポジティブコントロールとしてCT検査を実施した方等の異常頻度を見ていくことは重要ではないか？例えば、リンパ腫が寛解された患者さんは候補になり得ると思うが、どうか。

A3：今年度の事業では行えないが、今後の重要な課題である。

Q4：標本作製は、ISOの手順に則って行うのか？

A4：そうである。

Q5：二動原体染色体でも長期間残る場合があり、発がんとの関係において、染色体異常を長期にわたって観察することは意味があると思うが、如何か？

A5：重要な課題である。

Q6：内部被ばくとリンパ球の染色体異常との関係について、研究することは可能か？

A6：難しいが、可能ではある。

事業の推進方法について特に指摘された問題事項はなかった。しかしながら、異常染色体を持つ末梢リンパ球の残存等については、更に深く生物学的議論をすべきとの意見もあり、第2回目を開催することとし、終了した。

以上

二動原体染色体異常頻度による低線量
被ばく時の生物学的影響評価

～総合自動高速解析プロトコール～

Ver. 1.0 (2013/3/28)

独立行政法人
放射線医学総合研究所

Ver. 0304

目次

はじめに

- ・ 染色体とは
- ・ 放射線と染色体異常

第一章 実施上の安全管理

第二章 問診票

第三章 血液の採取と保管

第四章 培養と染色体顕微鏡標本の作成

第五章 染色体標本の自動高速解析

第六章 二動原体の発生頻度

第七章 解析結果の解釈

第八章 従来法による染色体解析

補遺

参考文献

はじめに

人類が染色体の存在を知ったのは 19 世紀の末のことであるが、細胞の核内に存在する不思議な物体に興味をひかれた科学者たちが、その後もこぞって研究を行った。米国の遺伝学者ハーマン J. マラーが、ショウジョウバエに X 線を照射することで異常な染色体が生ずることを発見し、染色体異常と放射線の関係についても多くの研究がなされるようになった。さらに染色体異常と被ばくした放射線の量に一定の相関関係が見いだされ、1960 年代の中頃には、二動原体を持つ染色体の頻度が被ばく線量の推定に使われるようになった。その後も様々な改良が加えられているが、二動原体染色体は被ばくの影響を知る最も信頼のおける指標のひとつと考えられており、放射線の被ばく事故における被ばく線量評価においては重要な役割を担っている。

このように二動原体染色体の発生頻度を解析することは、特定の個人における放射線被ばくの影響を推定する洗練された方法であり、国際原子力機関 (IAEA) や国際標準化機構 (ISO) によって標準化されている。しかしながら、解析そのものは決して容易ではない。被験者からの採血から始まり、リンパ球の分取、細胞培養、染色体プレパラートの作製、染色、顕微鏡による観察など、多くのステップを着実に実施していく必要がある。特に最後に行う顕微鏡による観察では、1000 細胞或いはそれ以上の細胞を観察し、ひとつひとつ異常の有無を判定していく必要がある。これには染色体観察に習熟した研究者や技術者であっても数時間から 1 日程度の時間を要し、また観察による疲労も大きい。また、観察する染色体像は必ずしも教科書的な美しい像ではなく、微妙な判定を強いる場面がしばしば見受けられる。

そこで我々は国際原子力機関や国際標準化機構によって標準化されている解析手法に、染色体の観察を自動化したシステムを追加した総合自動高速解析プロトコールの開発を試みた。本書は、そのプロトコールをマニュアル化したものである。本書が低線量被ばくの実態調査など、様々な場面で活用されれば幸いである。

放射線医学総合研究所 福島復興支援本部

被災者健康管理・調査プロジェクト室

染色体とは

生物の遺伝情報が記録された DNA は通常、鎖状の DNA がタンパク質に巻き付いたクロマチンと呼ばれる構造を取り、細胞の核内に収納されています。しかし細胞分裂時にはこのクロマチンが凝集してひも状になり、顕微鏡で観察可能となります。このひも状の構造を染色体といいます。塩素性色素に染まり易いためこの名前がついたと言われていています。

ヒト染色体は、22 組の常染色体と 1 組の性染色体 (X 染色体及び Y 染色体) の計 46 本から構成されています。男性は XY、女性は XX の性染色体の組み合わせを持っています。染色体には、細胞分裂の際に重要な動原体や、末端を保護するテロメア配列などの特殊な構造が存在します。染色体が正常な構造及び機能を保つことは、細胞分裂を正常に行い、生物が生存していく上で非常に重要です。

放射線と染色体異常

染色体は DNA 分子によって構成されています。細胞が放射線などの変異原にさらされると DNA の切断が起こります。切断された DNA は修復により再結合されるが、その際に元とは異なる部位に結合され、染色体の構造に異常を生じることがあります。放射線によって被ばく者の細胞に遺伝子の突然変異や染色体異常が生じると、癌や白血病などの疾病を発症する確率が上昇すると考えられています。

染色体異常の頻度は細胞が受けた放射線の量に依存して増加するため、どの程度被ばくしたか、どの程度生物学的影響があるか等の指標として用いることが可能です。

血液中のリンパ球は取り出すことが容易であり、比較的寿命も長く、培養によって細胞分裂の誘起が可能なことから染色体観察に適した試料です。さらに様々な染色体異常のなかでも、二動原体染色体は識別し易く、二動原体染色体を用いた染色体異常分析法は” gold standard” として ISO や IAEA 等でも広く採用されています。

ご注意

本書の染色体の解析手法は研究途上のものであり、医療における診断法ではありません。したがって、本書の方法によっていかなる結果が出ても、臨床情報を提供するものではなく、被験者の健康を保障するものではありません。

第一章 実施上の安全管理

本分析を実施するに当たり、法律または省庁の定めた指針に従い研究室の安全管理が適切に行われる必要があります。以下、実験研究施設における感染性及び化学的、光学的な安全管理面で重要となるいくつかの項目を示します。

1-1) 感染性試料取り扱いに関する安全管理

ヒト血液を試料として扱う際には、血液由来の感染症に感染するリスクを伴います。例えその血液試料が健康な被験者由来のものであることが明白な場合でも、全ての血液試料を感染するおそれのあるものとして取り扱う事が必須となります。血液試料は密閉容器で保存され、バイオセーフティレベル2の安全キャビネット内にて取り扱う必要があります。リンパ球の培養に関しても安全キャビネット内にて行うことにより、コンタミネーションの防止にも繋がります。皮下注射器等の鋭利な針を扱う際には針刺し等の受傷事故のリスクを最小限にする努力をしなければなりません。試料が溢流した際には非感染性にするための適切な滅菌方法をとる必要があります。全ての医療廃棄物、感染性廃棄物は最終処分する前に、オートクレーブや焼却等により感染性を不活化することが不可欠です。

血液試料取扱いは入手可能な限りの血液を介した感染症に関するワクチンの接種を行うことが推奨されます。国家間または研究者間での血液試料譲渡の際の HIV ウイルス検査結果の必要性に関する法的あるいは倫理的位置づけについては、各国における指針に従うものとします。海外からの血液試料を受領する際には、試料を提供してくれる国または航空会社によっては、その血液試料が HIV ウイルス検査が終了しており、かつ非感染性試料である証明書を要する必要があることに留意する必要性があります。

1-2) 化学的試料取り扱いに関する安全管理

ある種の化学物質及び医薬品は国際基準に則り、研究機関で日常的に使用されています。培養や染色に用いる際には、主に微量もしくは希釈して使用するため、一般的に健康被害を及ぼすことはありません。しかし、調整及び保存の際には濃縮されたストック溶液の状態であり取扱いには注意が必要です。留意する必要がある主な試薬とその国際基準での危険警告句を以下に示します。

ベンジルペニシリン	R 42; 43;
ブロモデオキシウリジン	R 20; 21; 22; 46; 61;
コルセミド	R 25; 63;
サイトカラシン B	R 26; 27; 28; 63;
ギムザ染色	R 20; 21; 22; 40; 41;
ヘパリン	R 36; 37; 38;
Hoechst 染色	R 23; 24; 25; 36; 37; 38;
フィトヘマグルチニン (PHA)	R 20; 21; 22; 43;
硫酸ストレプトマイシン	R 20; 21; 61;

危険な物質の分類、包装及び表示に関する法律、規則及び行政規定の摺り合わせに係る 1967 年 6 月 27 日付け理事会指令 67/548/EEC annex III : 危険警告句 (Risk Phrases) に基づき分類

- R20: 吸入すると有害性がある
- R21: 皮膚に接触すると有害性がある
- R22: 飲み下すと有害性がある
- R23: 吸入すると毒性がある
- R24: 皮膚に接触すると毒性がある
- R25: 飲み下すと毒性がある
- R26: 吸入すると強い毒性がある
- R27: 皮膚に接触すると強い毒性がある
- R28: 飲み下すと強い毒性がある
- R36: 眼に刺激性がある

- R37: 呼吸器系に刺激性がある
- R38: 皮膚に刺激性がある
- R40: 発がん性影響の限られた証拠がある
- R41: 眼に重度な損傷のリスクがある
- R42: 吸入により感作性を引き起こすおそれがある
- R43: 皮膚接触により感作性を引き起こすおそれがある
- R46: 遺伝性の遺伝子損傷を引き起こすおそれがある
- R61: 胎児に危害を引き起こすおそれがある
- R63: 胎児への危害のリスクの可能性がある

1-3) 光化学的安全管理

安全キャビネット内の滅菌や FPG 染色時のスライドガラスへの照射等に紫外線を用いる場合には、肌や眼等に直接照射することがないように、保護する必要があります。

(ISO 19238 を参照)

その他安全性の確保及び管理については、各研究機関におけるバイオセーフティ指針に従って下さい。

第二章 問診票

試料の採取に際しては、試料提供者に対してインフォームドコンセントを実施した後、医師の問診を行い、必要確認事項を記載した後、採血を行います。

医療被ばくや職業被ばく、抗がん剤等の薬物投与や喫煙などは、染色体異常頻度に影響する場合があります。被験者についてこれらの情報を正確に把握することは、解析結果の解釈を行う上で非常に重要です。

問診票フォーマットを次ページに附します。

問診票 (染色体検査用)

1. カルテ ID/氏名 (ふりがな)

2. 生年月日 年齢

3. 性別 男 ・ 女

4. 医療被ばくの有無 有 ・ 無

* 放射線治療 : 期間 年 月 日 ~ 年 月 日

* X線検査 : 実施日 年 月 日

* IVR 検査・治療 : 実施日 年 月 日

* 核医学検査・治療 : 実施日 年 月 日

検査項目

5. 既往歴 (採血前の4週間以内)

6. 服薬歴

7. 喫煙歴 無 ・ 有 (本/日)

8. 飲酒歴 無 ・ 有 (ml/日、その他)

9. 過去15年間のX線検査歴

毎年の健康診断でのX線検査: 有 ・ 無

その他 ()

10. 放射線関連作業従事歴

* 労働年数: 年

* 作業時間: 時間/週 または 時間/月

* 被ばく線量:

* 放射線業務従事者の被ばく線量限度を超えたことがあるか。

無 ・ 有 (被ばく線量 mSv)

11. その他の疾患

(ア) HIV ()

(イ) 肝炎 ()

第三章 血液の採取と保管

染色体分析用の血液試料採取にあたっての要点を以下に示します。

3-1) 準備資機材

資機材	品番
駆血帯	アズワン SM-8010A
採血枕	ナビス 0-7940-04
消毒用品 (アルコール綿等)	ワンショットプラスP EL-II, 白十字 TH9420567
止血用品 (絆創膏等)	
使用済み採血針を入れる容器	(以上に関しては同等品にて代替可)

さらに

- (A) ヘパリン真空採血管 (ベノジェクトII真空採血管, テルモ: VP-H050K)、真空採血管ホルダ、翼状針等採血針 (BD セーフティロック T M ブラッドコレクションセット (ホルダー付), 日本ベクトン・ディッキンソン: No. 368652)
- (B) BD バキュエティナ CPT ヘパリン Na (日本ベクトン・ディッキンソン: No. 362753)、真空採血管ホルダ、翼状針等採血針
- (C) ディスポーサブルな注射筒・採血針、ヘパリン、15 ml 滅菌済みディスポーサブル遠心管 (ファルコンチューブ等)

3-2) 採取方法

ヘパリン採血を行います。採血量は7~10 ml (真空採血管1本分)

- (A) 及び (B) を用いて採血を行った場合には真空採血管が血液保存容器となります。
- (B) の場合、以下の方法に従って下さい。

注射筒から採血針を外し、適量のヘパリンを入れた 15 ml 滅菌済みディスポーサブル遠心管に血液を分注し、転倒攪拌します。

血液保存容器に被験者名を記し、さらに必要情報を記載したラベルを貼付します。

試料名	血液
被験者名	○○ ○○
試料採取日時	20**年**月**日**時
抗凝固剤	※※※※
試料採取機関	△△県□□病院
採取担当者	●● ●●
TEL	***-***-****
FAX	***-***-****

試料容器貼付ラベル記載例 ← 番号だけで良いですか？

注意点

【抗凝固剤】

- ・染色体分析に適した抗凝固剤はヘパリンです。

【採血量】

- ・必要量は7～10 ml ですが、採血が困難な場合、可能であれば少量 (2～0.5 ml) であっても確保します。

3-3) 保管・輸送方法

血液は凍結させないように注意して下さい。室温 (18～24 °Cが最適) で輸送します。その際、血液が泡立ったり、漏れたり、容器が破損しないように注意して下さい。

注意点

- ・輸送に4日以上かかることが予想される場合、室温が38 °Cを超えることが予想される場合、空輸等のため輸送途中での温度が不明である場合には、検体チューブをペーパータオル等で包んだ後、保冷剤を添えて輸送します。
- ・空輸の場合、空港セキュリティで試料がX線照射されないように、「X線照射禁止」と明記して下さい。

第四章 培養と染色体顕微鏡標本の作成

採取した試料は分析実施機関に早急に輸送し、ヒト末梢血リンパ球を分離、培養し、第一分裂期メタフェーズへの調整を行います。調整したメタフェーズを用いてギムザ染色により、顕微鏡標本を作製します。

4-1) 準備資機材

資機材	品番
BD VACUTAINER CPT 採血管 (ヘパリン NA)	日本ベクトン・ディッキンソン BD 362753
滅菌スポイト 4号 CD2000	栄研 36-3480
エコカルチューブ 15mL ホリプロビレン	Falcon 352196
エコカルチューブ 50mL ホリプロビレン	Falcon 352070
ビベット 10mL エクスプレス ホータブル	Falcon 357590
ビベット 10mL 0.1mL 目盛 綿栓付	Falcon 357551
ビベット 5mL 0.1mL 目盛 綿栓付	Falcon 357543
ビベット 3mL 用トランスファー 1mL, 2mL 目盛	Falcon 357575
遠沈管 100ml レーザーマーカ目盛	IWAKI 2355-100
RPMI1640 (+L-Glutamin, +25 mM HEPES)	Life Technologies 22400-089
Kanamycin Sulfate (100×)	Life Technologies 15160
Fetal Bovine Serum (FBS)	Thermo Scientific SH30070.03
Phytohaemagglutinin (PHA) HA 15	Thermo Scientific R30852801
Karyo MAX Colcemid Solution (10 μg / mL)	Life Technologies 15210-040
0.075 M Potassium Chloride 100 mL×4 本入り	Life Technologies 10575-090
メタノール 500 mL	和光 130-16585
酢酸 500 mL	和光 012-23325
ギムザ染色液 100 mL	メルク 1.09204.0100
Buffer Tablet "GURR" Powder pH~6.8	Life Technologies 10582-013
スライドガラス	松波 S2112、白緑磨フロスト NO.2
カバーガラス	松波 24×60 Thickness NO.1, 0.12~0.17 mm
オイキット液 100 mL	アズワン 2-174-01

4-2) 採血前準備

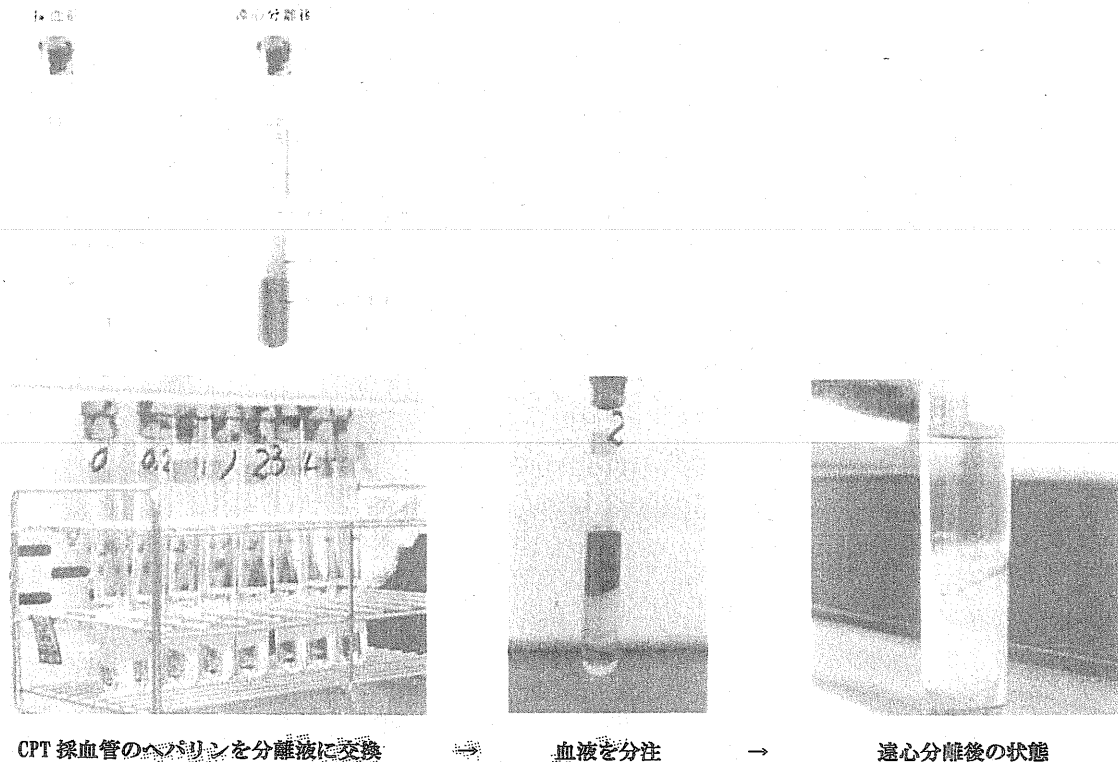
洗浄液、分離液、培養液を調整します。以下にその組成を示します。

	RPMI1640	FBS	PHA	
分離液 (20%FBS)	8 mL	2 mL	0	→ (50 mL tube に全量を分注)
洗浄液 (2%FBS)	98 mL	2 mL	0	→ (15 mL tube に 10 mL 分注)
培養液 (20%FBS+PHA)	80 mL	20 mL	2 mL	→ (15 mL tube に 6 mL 分注)

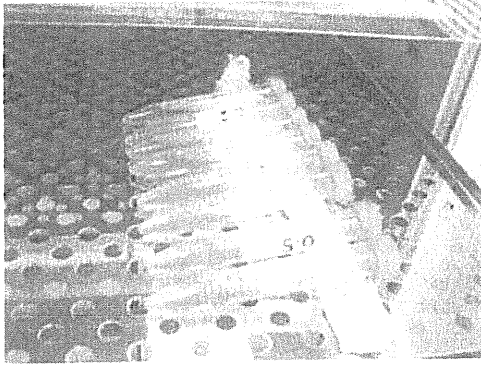
洗浄液は室温、分離液及び培養液は氷中に置きます。

4-3) 培養方法

- ① VACUTAINER CPT 採血管の上層にあるヘパリン液を除き、1 mL の分離液に置換します。
- ② 真空採血管中の血液を 3 mL 分注し、20°C、3,300 rpm、15 分間遠心します (スイングローターを使用)。



- ③ 血漿層をアスピレータで吸引除去します。
- ④ 単核球層を 10 mL 洗浄液に懸濁します。固層に付着した血球もピペッティングにより懸濁させます。
- ⑤ 4°C、1,500 rpm で 15 分間遠心します。
- ⑥ 上清を除き、6 mL の培養液に懸濁し、浮遊させます。
- ⑦ コルセミド液を 30 μ L 添加します。(最終濃度 0.05 μ g / mL)
- ⑧ キャップを緩めて 37°C の CO₂ インキュベータ内に寝かせて置き、48 時間培養します。



4-4) ハーベスティング

- ① 培養後のチューブを1,200 rpmで5分間遠心し、上清を除きます。
- ② 低張処理を行います。低張液0.075 M KCl 2~5 mLに懸濁し、37℃、25分間インキュベートします。
- ③ 固定液カルノア（メタノール：酢酸 = 3：1）を5滴加えて混和します。
- ④ 1,200 rpmで5分間遠心し、上清を除きます。
- ⑤ カルノア5 mL加えて1,300 rpmで7分間遠心し、上清を除きます。
- ⑥ 5)のステップを沈渣が白くなるまで繰り返します。

4-5) 顕微鏡標本の作製

- ① エア・ドライ法、HANABI Metaphase Spreader (ADStec, Japan)使用等により、染色体標本作製します。
標本は必要に応じて-20℃保存します。



HANABI Metaphase Spreader

- ② 3%ギムザ染色液/ pH 6.8 緩衝液で染色した後、水洗し風乾します。
- ③ オイキットで封入します。

補足

・残余血の保存

培養開始後、残った血液は万一の培養のやり直しに備えて冷蔵保存します。またインフォームドコンセントを得ている場合には、残りの血液を試料として保管します。

・リンパ球の分離

採血量が少ない場合、ヒト末梢血単核細胞の分離は中止し、全血培養を行います。

・コルセミドの添加条件

上述のコルセミド処理条件によって、第一次分裂期が100%となるメタフェーズが得られます。その代り、染色体の形状が判定困難なものが多く出てきます。

現在、放医研では一般的な条件と同様に、培養停止の2.5時間前に最終濃度0.5 μ g/mlとなるようコルセミドを添加することで、画像判定の容易なメタフェーズを得ています。

これにより判定速度が上がり、必要な標本枚数が減ります。ただし第二次分裂期以降のメタフェーズが含まれるため、IAEAのプロトコール(参考文献)ではプロモデオキシウリジンを添加して培養する fluorescence plus Giemsa (FPG) 染色法の併用が推奨され、放医研もそれに従っています。

第五章 染色体標本の自動高速解析

第六章 二動原体染色体の発生頻度

放射線医学総合研究所では、平成 25 年 2 月から 3 月において、第五章「染色体の自動高速解析」で解説した方法を用いて、日本人における二動原体染色体の発生頻度を計測しました。

対象集団（被験者）は、東京都内またはその以西に在住する 16 歳以上、69 歳以下の日本人健康志願者男女 72 名でした。ただし、喫煙習慣の有無により、大きく 2 群に大別しました。具体的には、以下のとおりです。

第 1 群：

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（合計 48 名）。

第 2 群：

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（合計 24 名）。

第七章 解析結果の解釈

第八章 従来法による染色体解析

染色体顕微鏡標本の作製までの過程は第五章までと同様です。その後、検鏡により実際に人の目で異常染色体を観察します。

8-1) 準備資機材



正立顕微鏡

8-2) 異常染色体の画像判定 (スコアリング)

検鏡により判定可能なメタフェーズを選抜し、二動原体染色体の個数等を記録用紙に記入します。

① 判定するメタフェーズ数の原則

低線量の場合、判定可能な細胞の総数が 1000 個に達するまでスコアリングを行います。

② 染色後の標本を、まず×100、×200等の低倍率で観察します。染色体の拡がりや個数、分析可能なメタフェーズの存在を確認したら、×1000～×2000の高倍率での計測を開始します。

③ スコアリング可能なメタフェーズを選別します

《メタフェーズの選択基準》

- ・染色体が比較的まるく広がっているもの。
- ・独立した一つの細胞のメタフェーズとして判別可能であるか、または、細胞周期（凝集度）の違いから形態的に区別がつくもの。
- ・セントロメア（くびれ）がはっきりしているもの。
- ・セントロメアの数 が 45 個以上あるもの。
- ・染色体の重なりが 3 個以上あれば、原則として除外します。
- ・判断に迷った場合は除きます。

染色体の重なり(数え方)



- ④ 各メタフェーズ毎の二動原体染色体の個数を記録用紙に記入します。
一標本当たり 1000 細胞のスコアリングを行います。

補足

低線量被ばくが前提である場合には《クイック・スキャン法》を採用することがあります。クイック・スキャン法でのメタフェーズの選択及び異常染色体計測は以下の基準で行います。

- メタフェーズがおおよそ丸く、他のメタフェーズとの重なりがないもの
- 染色体数の明らかな不足がないもの
- 二動原体染色体の存在のみに注目してチェックし、二動原体染色体がなければ「正常」と判断します。

⑤ 染色体異常の判断と記載

本解析で用いるのは二動原体染色体の頻度ですが、その他に現れる染色体異常も被ばく状況（線量や線源）や被験者の状態を推定するための参考となるので、原則として記録します。

二動原体染色体 (dicentric) の他には

- ・環状染色体 (ring) : セントロメアあり (centric ring)
- ・環状染色体 (ring) : セントロメアなし (acentric ring)
- ・染色体断片 (fragment)
- ・ギャップ (染色分体型、染色体型)
- ・切断 (染色分体型)

- ・微小染色体 (minute chromosome)

- ・マーカー染色体 (marker)

などがあります。また、ギムザ染色でも明らかに転座染色体 (translocation) と判定出来るものについても記録します。

判断に苦慮する場合には「不明」と記録します。

最終チェックは二名以上のスタッフで行います。

補足

- ・n動原体染色体1個は二動原体 (n-1) 個分として数えます。

- ・理論的には1個の二動原体は1個の断片を伴い、染色体数46、セントロメア数46であり、n動原体染色体1個は理論的には (n-1) の断片を伴います。高線量の場合には異常が複雑になり、染色体数、動原体数、異常の数が必ずしも一致しないことがあります。

- ・二動原体か、染色体のねじれ (姉妹染色分体がねじれて重なっているもの) か迷った場合、染色体断片があれば二動原体であると判断できることがあります。染色分体が交差している部分の染色性が濃い場合は、ねじれである場合が多いです。他の染色体のくびれ具合も参照します。

- ・D群、G群、Y染色体が二動原体染色体に関与している場合、D群、G群、Yの染色体を確認することで判定精度が上がります。

以下、そのほかの染色体異常についての判別の参考基準を示します。

*環状染色体

環状染色体1個では染色体断片が1個形成され、染色体数は47で動原体数は46となります。環状染色体がセントロメアを持つか持たないかの判別は難しい場合があります。1個の環状染色体があつてセントロメアの有無が不明の場合は、cRまたはaRの欄に「1?」と記録します。

*染色体断片、微小染色体、環状染色体 (動原体なし) の区別

微小染色体については、その長さ及び幅が染色分体の幅よりも小さい場合に微小染色体として判定します。

染色体断片が他の染色体よりも明らかに濃染されている場合には、動原体を持たない環状染色体と判定します。たとえ染色性が濃い場合でも、染色体数、二動原体やセントロメアを持つ環状染色体の数、染色体断片数に整合性がある場合は染色体断片として判定します。

⑥ 標本の管理

染色体標本は木製マップに収納し、乾燥状態で室温保存します。

補遺

参考文献

International Organization for Standardization : (ISO) 19238 : 2004
“Radiation protection – Performance criteria for service laboratories
performing biological dosimetry by cytogenetics”

(http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=33759)

Technical Reports Series No.405 “Cytogenetic Dosimetry : Applications in
Preparedness for and Response to Radiation Emergencies” (International
Atomic Energy Agency, Vienna, 2011)

([http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/EPR-
Biodosimetry%202011_web.pdf](http://www-pub.iaea.org/MTCD/Publications/PDF/EPR-Biodosimetry%202011_web.pdf))

Flegal, F.N. et al. : Quicksan dicentric chromosome analysis for radiation
biodosimetry. *Health Phys.* 98 (2) :276-81, 2010

Memo

