

平成 29 年度

文部科学省 国家課題対応型研究開発推進事業
英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業

PNA-FISH 法を用いた
ハイスループット生物学的線量評価法の開発

成果報告書

平成 30 年 3 月
国立大学法人 広島大学

本報告書は、文部科学省の英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業による委託業務として、国立大学法人広島大学が実施した平成 27-29 年度「PNA-FISH 法を用いたハイスループット生物学的線量評価法の開発」の成果を取りまとめたものです。

目次

	頁
概略	v
1. はじめに	1
2. 業務計画	
2.1 全体計画	3
2.2 各年度計画	4
3. 業務の実施内容および成果	
3.1 PNA-FISH 法による二動原体染色体・環状染色体の自動解析システムの開発 (H27~H29)	6
3.1.1 自動解析用染色体標本作成技術の開発 (H27~H28)	6
3.1.2 染色体画像自動解析ソフトウェアの改良 (H27~H29)	12
3.2 蛍光顕微鏡が不要な化学色素標識 PNA プローブの開発 (H27~H29)	24
3.2.1 セントロメアおよびテロメア PNA プローブの開発 (H27~H28)	24
3.2.2 赤色標識された PNA プローブの開発 (H28~H29)	26
3.2.3 緑色標識された PNA プローブの開発 (H28~H29)	28
3.3 臨床検体を用いた二動原体染色体・環状染色体の自動解析システム有用性の 試験的検討 (H27~H29)	29
3.3.1 胸部 CT 撮影患者からの臨床検体を用いた自動解析条件の最適化 (H27~H29)	29
3.4 研究推進 (H27~H29)	33
4. 結言	34
参考文献	36

略語一覧

- CT: コンピュータ断層撮影、英語 Computed Tomography
- DAB: 3,3'-ジアミノベンジジン、英語 3,3'-diaminobenzidine
ペルオキシダーゼにより茶褐色に発色し、不溶化色素として沈着する性質があり、組織免疫化学染色に利用可能である。
- DNA: デオキシリボ核酸、英語 deoxyribonucleic acid
多くの生物において遺伝情報の継承と発現を担う高分子生体物質である。
- FISH: 蛍光 in situ ハイブリダイゼーション、英語 Fluorescence in situ Hybridization
蛍光物質で標識した核酸プローブを用い、目的の遺伝子とハイブリダイゼーションさせ蛍光顕微鏡で検出する手法。
- IAEA: 国際原子力機関、英語 International Atomic Energy Agency
- PBS: リン酸緩衝生理食塩水、英語 Phosphate buffered saline
生物学の研究に一般的に使用される緩衝液。
- PHA: フィトヘマグルチニン、植物性赤血球凝集素、英語 phytohemagglutinin
ヒトリンパ球の幼若化を誘導する性質がある。生物実験では、細胞培養や染色体検査時の血球培養液に添加する。
- PNA: ペプチド核酸、英語 Peptide Nucleic Acid
化学的に合成された主鎖にペプチド構造を保持した、DNA や RNA に似た構造を持つ分子である。
- PNA-FISH 法: ペプチド核酸—蛍光 in situ ハイブリダイゼーション、英語 Peptide Nucleic Acid - Fluorescence in situ Hybridization
蛍光物質で標識したペプチド核酸プローブを用い、目的の遺伝子とハイブリダイゼーションさせ蛍光顕微鏡で検出する手法。
- γ H2AX: リン酸化されたヒストン蛋白質 H2AX、英語 phosphorylated H2AX
DNA 損傷の分子マーカーである。

図一覧

	頁	
図 1-1	ギムザ染色による二動原体染色体（黒矢印）と環状染色体（青矢印） の検出 1	1
図 1-2	PNA-FISH 法による二動原体染色体・環状染色体の検出 2	2
図 2-1	年度別全体計画 3	3
図 2-2	主要業務実施計画 4	4
図 3-1	染色体の重なり合いが少ない染色体標本の作製 6	6
図 3-2	染色体標本の作製プロトコール概要 7	7
図 3-3	Lymphoprep を用いたリンパ球の分離と培養 8	8
図 3-4	HANABI 染色体メタフェーズ標本作製装置 (ADSTEC) 9	9
図 3-5	蛍光画像と通常の顕微鏡画像の取得が可能なキーエンス社顕微鏡 (BZ-X700) 10	10
図 3-6	HANABI 染色体メタフェーズ標本作製装置で作製した染色体標本 11	11
図 3-7	HANABI 染色体メタフェーズ標本作製装置 (ADSTEC 社) で作製した染色体標本 . 12	12
図 3-8	自動解析ソフトウェア Metafer4 のパラメーター値設定画面 13	13
図 3-9	Metafer4 で自動的に認識された染色体 13	13
図 3-10	Metafer4 による 1 細胞単位の染色体自動解析 14	14
図 3-11	Metafer4 による染色体単位の自動解析 14	14
図 3-12	染色体画像からの各領域の座標の抽出 15	15
図 3-13	ランダムウォークシミュレーションの模式図 16	16
図 3-14	粒子の通過領域と構造判定結果の関係 17	17
図 3-15	個々の区別に困難が生じる可能性のある染色体画像の例 18	18
図 3-16	Image J を用いた染色体画像の分割 19	19
図 3-17	Image J を用いた染色体画像の分割における誤処理 20	20
図 3-18	独自の染色体画像の自動解析ソフトウェアの開発 20	20
図 3-19	ゲノム修復関連タンパク質 γ H2AX の蛍光免疫染色プロトコール 21	21
図 3-20	照射前後リンパ球核内の γ H2AX のフォーカス 22	22
図 3-21	自動解析ソフトウェア Metafer4 を用いた γ H2AX フォーカス認識の パラメーター値設定画面 23	23
図 3-22	自動解析ソフトウェア Metafer4 で自動的に認識されたリンパ球の γ H2AX のフォーカス 24	24
図 3-23	化学色素と PNA プローブの化学反応式 25	25
図 3-24	固相担持 PNA の構造 25	25
図 3-25	赤色色素の化学式 26	26
図 3-26	メチルレッドおよびビオチンを導入した PNA プローブの構造 26	26
図 3-27	メチルレッド標識 PNA プローブによるセントロメアの検出 27	27
図 3-28	ビオチン標識セントロメア PNA プローブの DAB による セントロメアシグナル検出 27	27

図 3-29	緑色色素の化学式	28
図 3-30	マラカイトグリーンカルボン酸誘導体の合成	28
図 3-31	広島大学病院の 320 列 CT	29
図 3-32	自動解析とマニュアル解析による染色体異常検出の比較	30
図 3-33	CT 前後リンパ球中の γ H2AX フォーカス数	31
図 3-34	CT 前後二動原体染色体出現頻度	32
図 3-35	肺がん症例の検体を用いた 自動解析とマニュアル解析による染色体異常検出の比較	32
図 3-36	染色体自動解析と手動解析の比較検討	33

概略

平成 23 年の東電福島第一原発事故により、一般社会の放射線被ばくに対する不安が増大した。一般社会の不安に対応するため、福島では、甲状腺超音波検査を含めた福島県県民健康調査が実施されるとともに、フィルムバッジなどの個人線量計やホールボディカウンターを用いた個人を対象とした放射線の物理的被ばく線量評価が行われている。現在の放射線防護基準は、放射線に対する感受性が一律であることを前提に定められているが、放射線被ばくによる人体影響については個人差が存在することが示唆されている。特に、人体影響が非常に軽微である 100 mSv 以下の低線量放射線被ばくについては、感受性の個人差は不明である。さらに、近年は CT（コンピュータ断層撮影、英語 Computed Tomography）などの放射線診断における医療放射線被ばくにより、白血病や悪性腫瘍の発症が上昇することが報告されており、原発事故だけでなく、医療現場においても一般市民の放射線被ばくの影響についての関心が高まっている（Pearce et al. Lancet. 2012）。しかし、放射線被ばく、特に 100 mSv 以下の低線量の放射線被ばくによる人体影響については未だ不明な点が多い。低線量放射線被ばくの合理的な放射線防護基準を策定するためには、正確かつ迅速にその人体影響を評価することが可能な監査法の確立が必須である。

そこで本研究では、低線量放射線被ばくの人体影響を解明するために、PNA-FISH 法（ペプチド核酸-蛍光 in situ ハイブリダイゼーション、英語 Peptide Nucleic Acid - Fluorescence in situ Hybridization. 蛍光物質で標識したペプチド核酸プローブを用い、目的の遺伝子とハイブリダイゼーションさせ蛍光顕微鏡で検出する手法）を基盤技術として、低線量放射線被ばくによる染色体異常についての効率的かつ高感度な定量的自動解析システムを開発し、CT 検査症例の臨床検体を用いた同システムの有用性の検証を行うことで、低線量放射線被ばくの「ハイスループット生物学的線量評価法」を確立することを目的とする。このために、自動解析を実現する技術の開発、蛍光顕微鏡を不要にする染色体解析技術の開発、臨床検体への適用性向上を並行して進め、100 mGy 以下の低線量放射線被ばくの影響を迅速に解析できるシステム確立を目指す。

それぞれの研究項目について、3 年間にわたる研究取り組みと成果は以下のとおりである。

セントロメアおよびテロメア PNA プローブを用いた FISH 法により染色された染色体標本の全自動解析システムの開発では、平成 27 年度は、自動解析に適した、染色体の重なり合いができるだけなくなるような染色体標本を作成する技術開発に取り組み、1 細胞あたり約 2 カ所まで減らすことができた。この染色体標本を用いて既存の染色体画像解析ソフトウェアの改良とともに、新規の染色体画像解析ソフトウェアの開発に取り組んだ。

平成 28 年度は、分裂期細胞単位の染色体全自動画像解析に用いる染色体標本について、染色体の重なり合いを 1 カ所以下にする技術の開発に取り組んだ。また、染色体単位の全自動解析法の開発に用いる染色体の重なりがほぼない染色体標本作製技術の開発にも取り組んだ。さらに、この染色体標本作成技術を用いて、既存のソフトウェアを基盤とした分裂期細胞単位の染色体自動解析ソフトウェアの開発と並行して、新規の染色体画像自動解析ソフトウェアの開発を進めた。

平成 29 年度は、分裂期細胞単位の染色体全自動画像解析に用いる染色体標本は、染色体の重なり合いが 1 細胞あたり約 2 カ所のレベルの標本を用いて、染色体自動解析ソフトウェアの検討を進めた。また、この標本を使用して、Metafer4（MetaSystem 社）を用いた 1 細胞単位の染色体自動解析ソフトウェアとともに、染色体単位での全自動解析ソフトウェアについても改良を進めた。さらに、ImageJ や機械学習などを用いた独自の二動原体染色体判別プログラムの開発

も進め、これらのシステムの有用性を検証した。

3年間にわたる取り組みで、染色体自動解析に適した染色体標本について、既存の自動染色体解析ソフトウェアにおける染色体画像認識のパラメーター値を詳細に検討した結果、1細胞あたり20-30本の染色体を認識することができるようになった。さらに解析のパラメーターを改良することにより、現在は1000細胞の解析を約10分、確認を30分で終了することが可能となっている。今後は、解析時間をさらに短縮するとともに、二動原体染色体、環状染色体の検出条件を改善し、検出効率の向上を目指す予定である。また、機械学習を用いた独自の染色体画像の自動解析ソフトウェアの開発に取り組んだ結果、二動原体・環状染色体を90%以上の正解率で検出することが可能となっている。今後も引き続き自動解析ソフトウェアの開発を進める予定である。

通常の光学顕微鏡による観察が可能な色素標識用のセントロメアおよびテロメア PNA プローブの開発では、平成27年度は、赤色および緑色色素を用いて PNA プローブを標識するための試薬などを購入した。また、秘密保持契約を含めた外注手続きなど開発準備を進めた。平成28年度は、固相担持セントロメア PNA およびテロメア PNA を設計し、作成依頼した。固相合成によってこの固相担持 PNA の Fmoc 基を脱保護した後に色素のカルボン酸誘導体と脱水縮合し、固相から切り離すことによって化学色素標識のための PNA プローブを合成した。既存の赤色色素（アリザリンやキナクリドンなど）あるいは新規に合成した赤色色素を用いて、これを用いる FISH 法によるセントロメアおよびテロメアの可視化技術開発を進めた。また、緑色標識についても既存の緑色色素（ファストグリーンやマラカイトグリーンなど）や新規に合成した緑色色素を用いてこれを用いる FISH 法によるセントロメアおよびテロメアの可視化技術開発を進めた。平成29年度は、赤色 PNA プローブの開発については、ビオチン標識 PNA プローブを用いて、アビチン標識ペルオキシダーゼ、AEC による赤色発色での可視化法の開発を進めた。緑色 PNA プローブの開発についても、ビオチン標識 PNA プローブを用いて、緑色ではないが赤色と明確に区別でき、強いシグナルが期待できるアビチン標識ペルオキシダーゼ、DAB を用いた茶色発色による可視化法の開発を進めた。

セントロメア PNA プローブの末端にビオチンを導入した PNA プローブを合成し DAB によるシグナル検出を行なったところ、褐色のセントロメアシグナルを検出することができた。しかし、緑色、赤色の色素によるセントロメア、テロメアの検出は困難であった。今後も、本事業での成果を生かし、通常の光学顕微鏡によるセントロメアとテロメアの検出方法の開発に取り組む予定である。

臨床検体を用いた二動原体染色体・環状染色体の自動解析システム有用性の試験的検討では、平成27年度は、肺がん症例の CT 検査前後の臨床検体を用いた染色体自動解析システム有用性の試験的検討を行うために倫理委員会への申請を行い、検体の収集を開始した。平成28年度は、広島大学病院腫瘍外科を受診する肺がん症例49例について、CT検査による放射線照射の前後の採血サンプルから末梢血リンパ球を分離培養し、PNA-FISH法による染色体標本を作成した。その標本について、放射線被ばくによる二動原体染色体・環状染色体の自動解析を行い、従来のマニュアル解析結果と対比して自動解析条件の最適化を進めた。平成29年度は、50症例以上を目標に肺がん症例の CT 検査前後の検体収集を行い、これらの検体について二動原体染色体・環状染色体のマニュアル解析結果と自動解析システムにより得られた結果を対比して、自動解析シス

テムの有用性を検証した。さらに、これらの検体を用いた化学色素標識 PNA プローブによる二動原体染色体・環状染色体解析システムの有用性の検証を行った。

これまでに、広島大学病院腫瘍外科を受診する肺がん症例 162 例について、CT 検査による放射線照射の前後の採血サンプルから末梢血リンパ球を分離培養し、PNA-FISH 法による染色体標本を作成し、自動解析とマニュアル解析により得られた結果の比較検討を行い、非常に良い相関（相関係数 0.78）が得られている。今後は、この手法を用いてさらに臨床検体の解析を進める予定である。

1. はじめに

平成 23 年の東電福島第一原発事故により、一般社会の放射線被ばくに対する不安が増大した。しかし、放射線被ばく、特に 100 mSv 以下の低線量の放射線被ばくによる人体影響については未だ不明な点が多く、このことが一般市民の不安を増強している。さらに、近年は CT などの放射線診断における医療放射線被ばくにより、白血病や悪性腫瘍の発症が上昇することが報告されており、原発事故だけでなく、医療現場においても一般市民の放射線被ばくの影響についての関心が高まっている (Pearce et al. Lancet. 2012)。そこで本研究では、低線量放射線被ばくの人体影響を解明するために、

1) 我々が高線量被ばく検体用に開発した新しい染色体解析法である PNA-FISH 法を基盤技術として、低線量被ばくの影響を効率的かつ高感度に定量的自動解析を行うことが可能なシステムの開発、

2) 臨床検体を用いた、同システムの低線量放射線被ばく影響検出における有用性の検証、に取り組む。

放射線被ばくによる DNA 二本鎖切断などのゲノム損傷は、ゲノム修復機構により修復される。しかし、DNA 二本鎖切断の断端が、本来結合されなければならない染色体とは異なる染色体に誤って結合されてしまった場合には、染色体異常が形成される。このような染色体異常の発生頻度は、放射線被ばく線量と強く相関することが知られている。染色体異常の解析の中でも、ギムザ染色による二動原体染色体と環状染色体の検出は、生物学的線量評価法のゴールドスタンダードとして確立されている (図 1-1) (IAEA, 2011)。

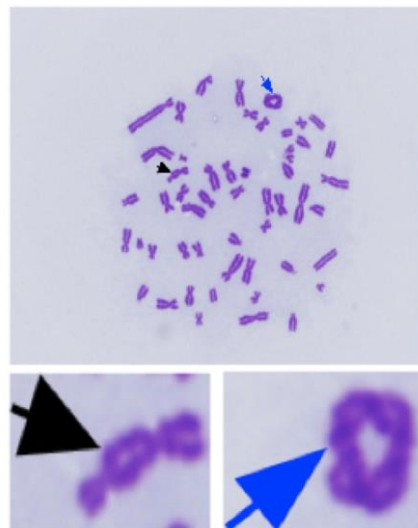


図 1-1 ギムザ染色による二動原体染色体 (黒矢印) と環状染色体 (青矢印) の検出

ギムザ法による染色体解析は、安価であり、かつ迅速に標本を作製することができ、さらに 100 mGy 程度の被ばく線量の推定も可能とされている。しかし、高線量被ばく症例のギムザ染色標本では、多数の複雑な染色体異常を正確に同定するには、非常に高度な技術を要し、また熟練した技師にとっても時間と労力を要する作業となるため、多数の検体を短時間に処理することは困難である。これらの欠点を補うために、染色体全体や一部を蛍光標識して色分けし、染色体の同定を容易にする技術である Fluorescence in situ Hybridization (FISH) 法を用いた染色体解

析が行われている。しかし、通常の FISH 法では、蛍光 DNA プローブが 1 検体分で数万円と非常に高価であり、またハイブリダイゼーションの時間も 15 時間以上かかるという欠点がある。そこで我々は、安価で（1 検体分数十円）かつ DNA プローブより特異性と反応性が高い蛍光標識ペプチド核酸（PNA）プローブを用いた FISH 法により、末梢血リンパ球における二動原体染色体と環状染色体の検出を容易にする染色体解析法を開発した（PNA-FISH 法）（図 1-2）（Shi et al. Radiat Res. 2012）。この手法では、蛍光標識 PNA プローブを用いて動原体と染色体末端（テロメア）を同時に異なる色で可視化することにより、容易に二動原体染色体と環状染色体を同定することが可能となった。

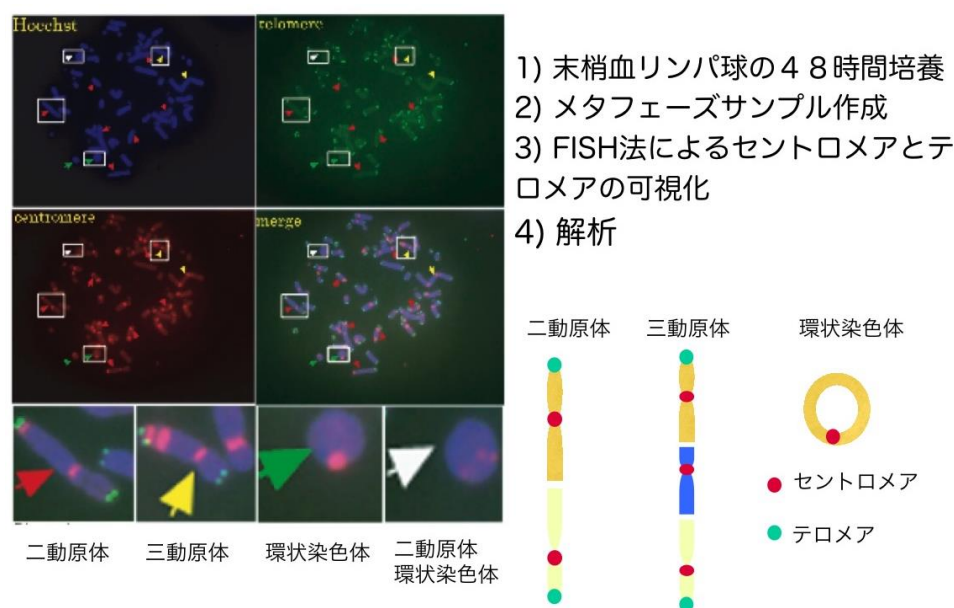


図 1-2 PNA-FISH 法による二動原体染色体・環状染色体の検出

本研究では、PNA-FISH 法により蛍光標識されたサンプルの画像取得と画像解析を自動化することで、多数の検体について 1,000 細胞以上での二動原体染色体・環状染色体の検出を迅速に行うことが可能な染色体解析法を開発し、低線量放射線被ばくの人体影響評価に応用可能な高効率、高感度なシステムの確立を目指す。このために、染色体画像解析の効率化を図るための新たなソフトウェアを開発するとともに、画像解析の自動化に適した染色体標本の作製法を確立する。蛍光標識された PNA プローブを用いる PNA-FISH 法では、染色体画像を取得するために蛍光顕微鏡を使用する必要がある。蛍光標識による画像は、シグナル・ノイズ比が高いためシグナルを鮮明に検出することが可能であるが、蛍光顕微鏡は通常の光学顕微鏡と比較すると非常に高額である。そこで本研究では、蛍光ではない通常の化学色素を用いた PNA プローブの標識法の開発にも取り組む。化学色素標識 PNA プローブを用いることで、安価な通常の光学顕微鏡を用いた明視野での染色体解析が可能となるため、次世代の染色体全自動解析システムの確立に繋がると考えている。さらに、これらの技術を用いて、代表的な低線量被ばくであり被ばく線量が明らかな CT 撮影による医療被ばくが、二動原体染色体・環状染色体の形成にどのような影響を与えるかについての予備的な検討も併せて行う。

2. 業務計画

2.1 全体計画

本業務の全体計画図を図 2-1 に示す。

図 2-1 「PNA-FISH 法を用いたハイスループット生物学的線量評価法の開発」年度別全体計画

項目 \ 年度	平成 27 年度	平成 28 年度	平成 29 年度
(1) PNA-FISH 法による二動原体染色体・環状染色体の自動解析システムの開発	準備・検討	検討	検討・検証 (制御効果、適用性評価)
①自動解析用染色体標本作成技術の開発 (広島大学)	準備・検討	検討	条件検討・確定
②染色体画像自動解析ソフトウェアの改良 (広島大学)	準備・検討	検討	評価・検証
(2) 蛍光顕微鏡が不要な化学色素標識 PNA プローブの開発	準備・予備試験	試験・評価	検証
①セントロメアおよびテロメア PNA プローブの開発 (広島大学)	準備・予備試験	試験・評価	検証
②赤色標識された PNA プローブの開発 (広島大学)	準備・予備試験	試験・評価	検証
③緑色標識された PNA プローブの開発 (広島大学)	準備・予備試験	試験・評価	検証

年度 項目	平成 27 年度	平成 28 年度	平成 29 年度
(3) 臨床検体を用いた二動原体染色体・環状染色体の自動解析システム有用性の試験的検討	予備検討 ←→	収集・解析 ←→	収集・解析・評価 ←→
①胸部 CT 撮影患者からの臨床検体を用いた自動解析条件の最適化 (広島大学)	予備検討 ←→	収集・解析 ←→	収集・解析・評価 ←→
(4) 研究推進	委員会の開催 ←→	委員会の開催 ←→	委員会の開催 ←→

2.2 各年度計画

主要業務は、次の 3 研究項目から構成されている。

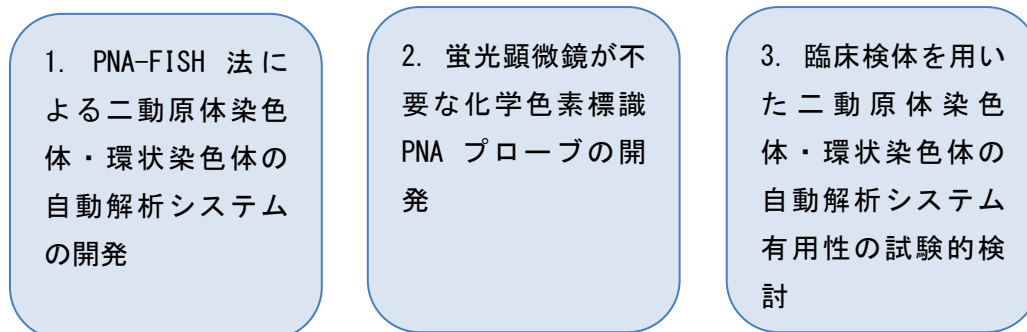


図 2-2 主要業務実施計画

各年度の計画の概要は以下の通りである。

平成 27 年度

- [研究項目 1] PNA-FISH 法による二動原体染色体・環状染色体の自動解析システムの開発
- ・蛍光画像解析ソフトの導入
 - ・導入した画像解析ソフトを用いた解析に適した、染色体の重なり合いが少ない染色体標本を作製する条件の検討
 - ・ γ H2AX などのゲノム修復タンパク質についての免疫蛍光抗体法を用いた解析の準備

[研究項目 2] 化学色素標識 PNA プローブの開発

- ・セントロメアおよびテロメア PNA プローブ合成法の検討

[研究項目 3] 臨床検体を用いた二動原体染色体・環状染色体の自動解析システム有用性の試験的検討

- ・肺がん症例の CT 検査の前後での血液検体の採取の開始
- ・従来のマニュアルによる二動原体染色体・環状染色体の解析

平成 28 年度

[研究項目 1] PNA-FISH 法による二動原体染色体・環状染色体の自動解析システムの開発

- ・多数検体を用いた学習による染色体認識率の向上を図り、全自動画像解析ソフトを改良
- ・全自動画像解析ソフトによる解析に適した染色体標本を作製する技術の確立
- ・ γ H2AX などのゲノム修復タンパク質についての免疫蛍光抗体法による解析

[研究項目 2] 化学色素標識 PNA プローブの開発

- ・赤色色素アリザリンやキナクリドン、緑色色素ファストグリーンやマラカイトグリーンなどを用いてセントロメアおよびテロメア PNA プローブを標識し、セントロメアおよびテロメアを可視化する技術の開発

[研究項目 3] 臨床検体を用いた二動原体染色体・環状染色体の自動解析システム有用性の試験的検討

- ・肺がん症例の CT 検査の前後での血液検体の蓄積
- ・PNA-FISH 法により可視化された二動原体染色体・環状染色体の従来の解析法と自動解析システムによる解析結果の比較検討による画像解析ソフトの改善

平成 29 年度

[研究項目 1] PNA-FISH 法による二動原体染色体・環状染色体の自動解析システムの開発

- ・PNA-FISH 法により可視化された二動原体染色体・環状染色体の自動解析システムの完成
- ・化学色素標識 PNA プローブにより可視化される二動原体染色体・環状染色体の自動解析システムの開発

[研究項目 2] 化学色素標識 PNA プローブの開発

- ・赤色および緑色色素によるセントロメアおよびテロメア PNA プローブ標識法の確立

[研究項目 3] 臨床検体を用いた二動原体染色体・環状染色体の自動解析システム有用性の試験的検討

- ・肺がん症例の CT 検査の前後での血液検体の蓄積と解析
- ・臨床検体を用いた化学色素標識 PNA プローブによる二動原体染色体・環状染色体解析システムの有用性についての検証
- ・臨床検体を用いた二動原体染色体・環状染色体の自動解析システムの生物学的線量評価法としての有用性の検証

3. 業務の実施内容および成果

3.1 PNA-FISH 法による二動原体染色体・環状染色体の自動解析システムの開発 (H27~H29)

3.1.1 自動解析用染色体標本作成技術の開発 (H27~H28)

(1) 研究の目的

本研究では、PNA-FISH 法により蛍光標識されたサンプルの画像取得と画像解析を自動化することで、多数の検体について 1,000 細胞以上での二動原体染色体・環状染色体の検出を迅速に行うことが可能な染色体自動解析システムの開発を目指す。これまでの染色体標本では、染色体の重なり合いが多いため、自動解析システムの染色体認識率が低い。そこで、自動解析システムでより正確に染色体異常染色体を検出するために、染色体の重なり合いが少ない自動解析に適した染色体標本を作製する条件について検討した (図 3-1)。

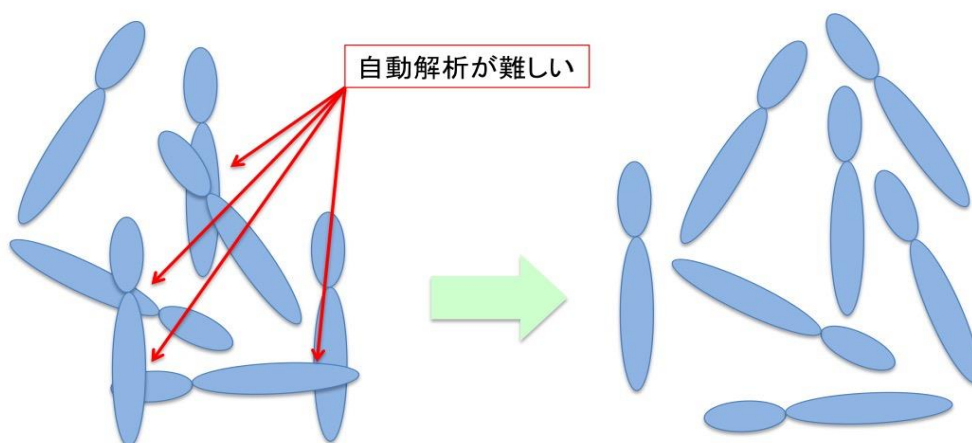


図 3-1 染色体の重なり合いが少ない染色体標本の作製

(2) 研究の方法

健常者の末梢血 3 ml を採血し、それを使って以下のようなプロトコールで染色体標本の作製研究を行う（図 3-2）。

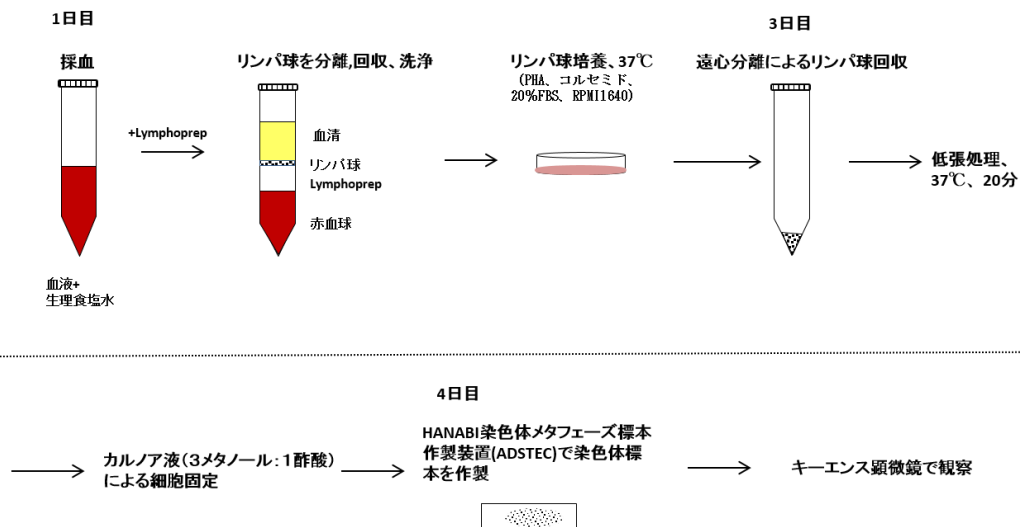


図 3-2 染色体標本の作製プロトコール概要

① 末梢血リンパ球の培養

染色体標本を作製するために、健常者の末梢血 3 ml を採血し、等量の生理食塩水を加え、ガラスピペットを用いて希釈する。希釈した血液を 3 ml の Lymphoprep (Axis-shield PoC AS) に静かに重層する。テーブルトップ冷却遠心機 (2800、久保田商事製) を使って 800 g、20 分間の遠心分離を行い、リンパ球を分離させる (図 3-3)。ガラスピペットを用いてリンパ球を回収し、2 ml の PBS (リン酸緩衝生理食塩水) で洗浄、PHA とコルセミドを添加して 10 %FBS 添加 RPMI1640 培地で 48 時間培養する。

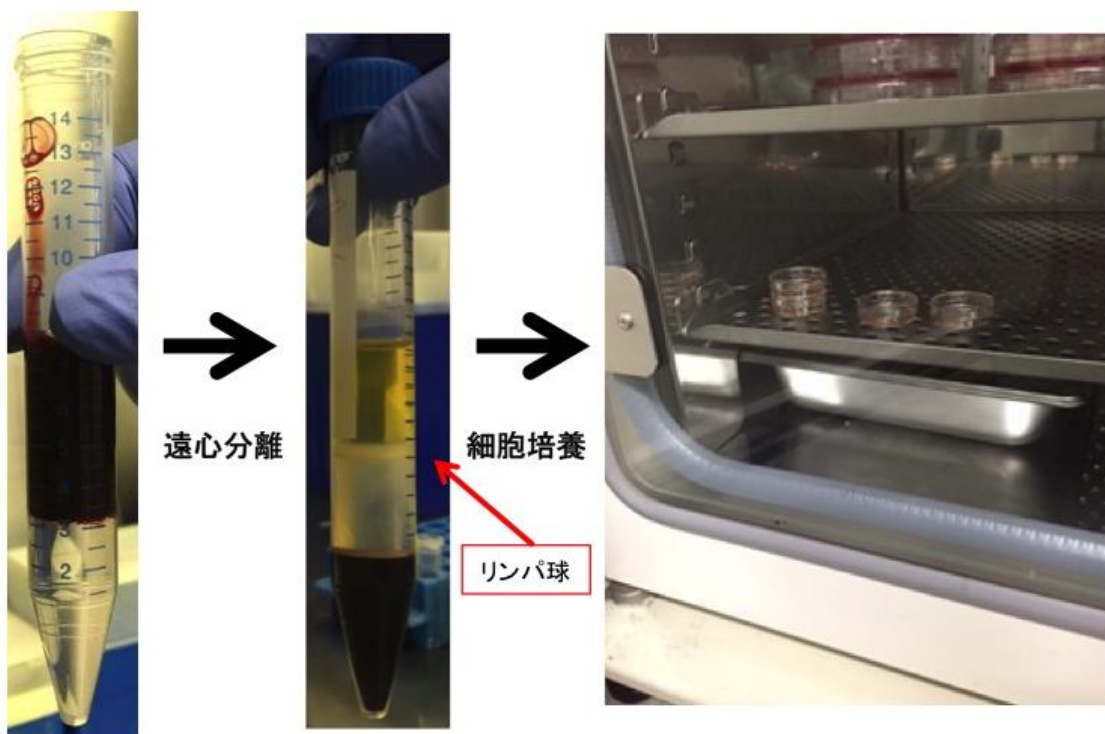


図 3-3 Lymphoprep を用いたリンパ球の分離と培養

② 細胞の固定と保存

細胞を回収し、2 ml の低張液に再懸濁する。37 °C に設定したユニット恒温槽 (SH-10N、タイテック製) に入れる。20 分後にユニット恒温槽から取り出し、0.5 ml のカルノア液 (酢酸 : メタノール = 1 : 3) を加えて室温で 5 分間静置する。テーブルトップ冷却遠心機を使って 1000 rpm、5 分間遠心し、上清をすて、新たなカルノア液で 3 回洗浄したのち完全に固定し、-20 °C のフリーザーで保存する。

③ スライドガラス上への細胞の展開

カルノア固定したサンプルは、さらに新たなカルノア液で 3 回洗浄したのち、HANABI 染色体メタフェーズ標本作製装置 (ADSTEC 社) (図 3-4) を用いてスライドガラス上に細胞を展開し、染色体標本作製する。



図 3-4 HANABI 染色体メタフェーズ標本作製装置 (ADSTEC)

④ 染色体の重なり合いの評価

作製した標本は、モノクロとカラーCCD カメラを搭載し蛍光画像と通常の顕微鏡画像の取得が可能なキーエンス社顕微鏡 (BZ-X700) (図 3-5) を使用して標本の染色体の重なり合いを評価することで、染色体の重なり合いが少ない標本を得るための HANABI 染色体メタフェーズ標本作製装置 (ADSTEC 社) の乾燥度値などの様々なパラメーターを検討する。



図 3-5 蛍光画像と通常の顕微鏡画像の取得が可能なキーエンス社顕微鏡 (BZ-X700)

(3) 研究の結果

HANABI 染色体メタフェーズ標本作製装置 (ADSTEC 社) では、ベースブロック、壁面、加湿水槽の制御温度値を調整することにより乾燥度値を設定する。一般的には、乾燥度値が高いと染色体があまり広がらない標本が得られ、乾燥度値が低いと染色体が広がった標本が得られるとされている。

平成 27 年度は、乾燥度値 #1、#2、#3、#4 で染色体標本作製した。乾燥度値が #1 の時には、染色体の重なりが 1 細胞あたり 5~6 カ所であった。一方、乾燥度値が #4 の時には、染色体の重なりは 1 細胞あたり 2 カ所にまで減少した (図 3-6)。

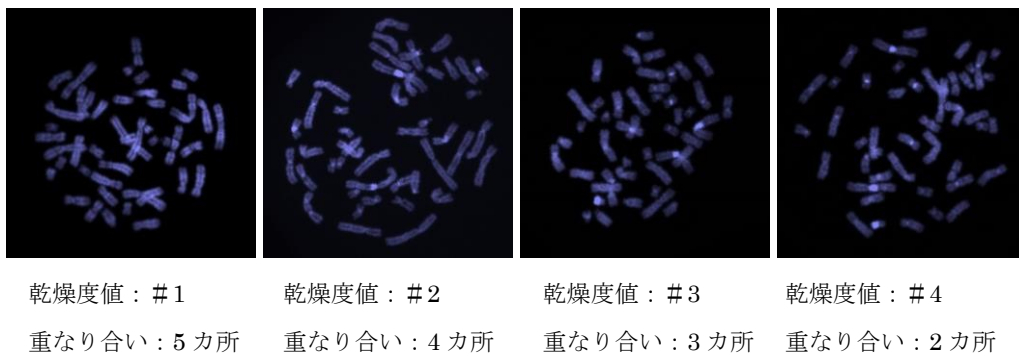
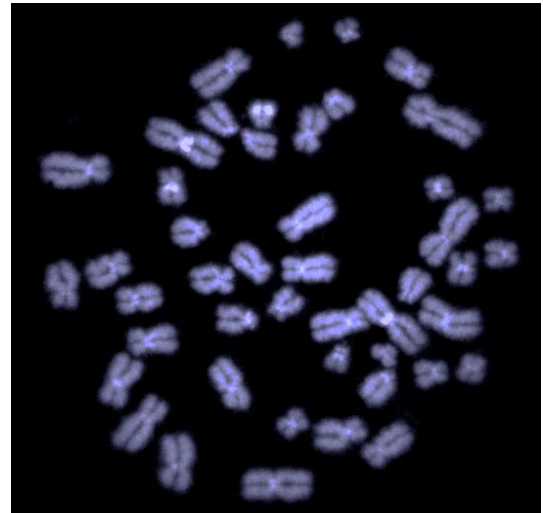


図 3-6 HANABI 染色体メタフェーズ標本作製装置で作製した染色体標本

平成 28 年度は、平成 27 年度に確立した乾燥値より低い乾燥値で染色体標本作製した結果、染色体の重なり合いは 1 カ所以下になった (図 3-7)。しかし、この条件で染色体の分散を行うと 1 細胞単位の解析が困難になることが明らかになった。その一方、平成 27 年度に確立した手法で作製した標本で、1 細胞あたり 20 本以上の染色体解析が可能であることが明らかになった。そのため、平成 27 年度に確立した手法を用いて染色体自動解析法を確立することとした。



平成 27 年度に確立した手法で作製した染色体標本
染色体重なり合い：2カ所



平成 28 年度に確立した手法で作製した染色体標本
染色体重なり合い：なし

図 3-7 HANABI 染色体メタフェーズ標本作製装置 (ADSTEC 社) で作製した染色体標本

3.1.2 染色体画像自動解析ソフトウェアの改良 (H27~H29)

3.1.1 で作製した、染色体自動解析ソフトウェアによる解析に適した染色体の重なり合いが少ない染色体標本を用いて、既存の染色体画像解析ソフト Metafer4 (MetaSystem 社) の染色体画像認識率を向上させるため様々なパラメーター値を詳細に検討した。これと並行して、全く新しい染色体の自動解析ソフトウェアの開発にも取り組んだ。また、自動解析ソフト Metafer4 (MetaSystem 社) を用いて、ゲノム修復関連タンパク質 γ H2AX フォーカス認識のパラメーター値を詳細に検討した。

(1) 既存の自動解析ソフトウェアを用いた染色体画像自動解析の検討

既存の自動解析ソフトウェア Metafer4 (MetaSystem 社) を用いて、染色体画像認識のパラメーター値を詳細に検討 (図 3-8) した結果、平成 27 年度には 1 細胞あたり 20-30 本の染色体を認識することができるようになった (図 3-9)。



図 3-8 自動解析ソフトウェア Metafer4 のパラメーター値設定画面

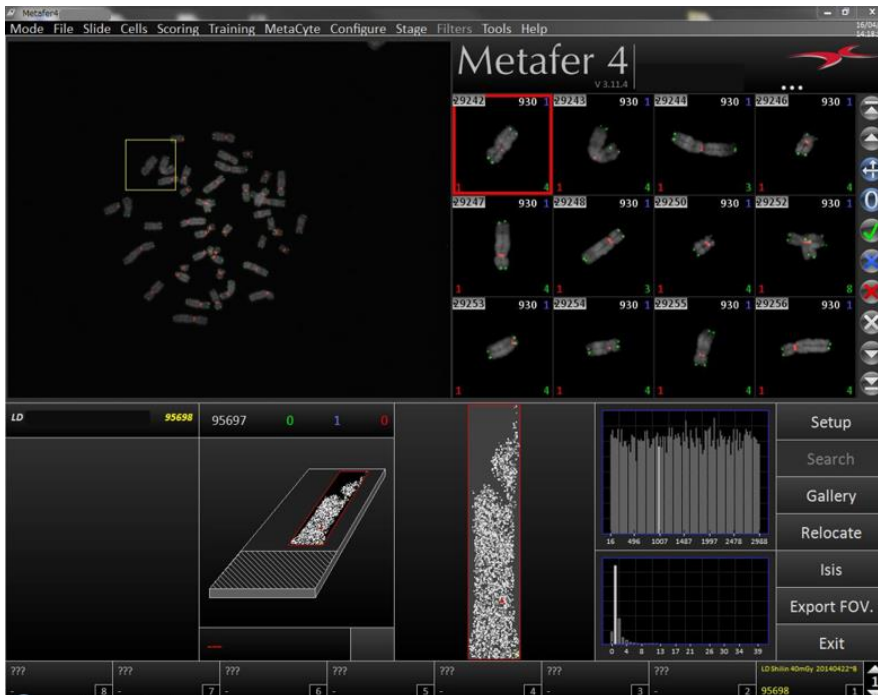


図 3-9 Metafer4 で自動的に認識された染色体

平成 28 年度は、Metafer4 (MetaSystem 社) を用いて 1 細胞単位の染色体自動解析法の開発を行ったが (図 3-10)、より効率的に染色体解析を行うため、染色体単位での全自動解析 (図 3-11) についても Metafer4 を用いて検討した。その結果、これまで 3 時間かかっていた 1000 細胞の解析時間を約 30 分で行うことが可能となり、二動原体染色体の認識についても正確性が向上した。

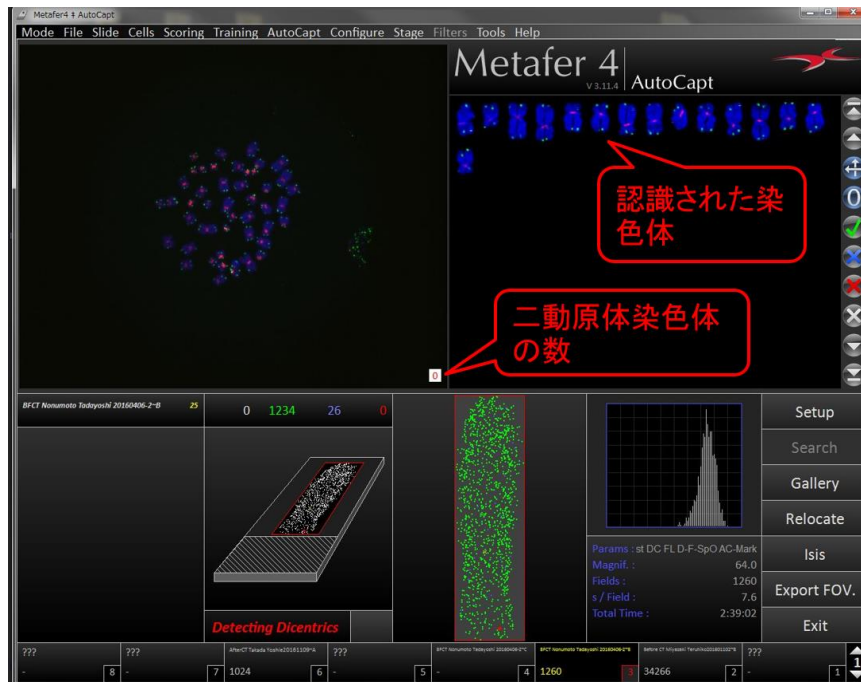
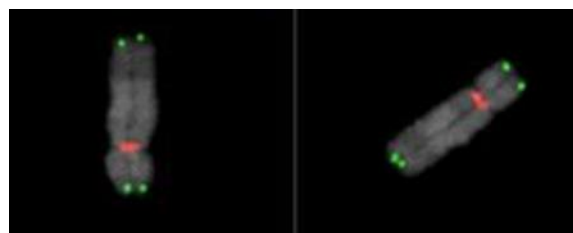
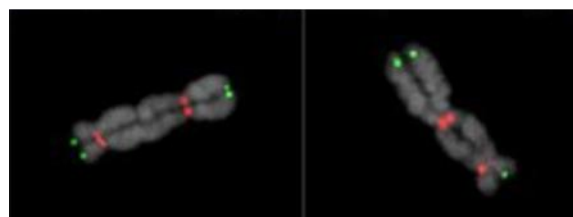


図 3-10 Metafer4 による 1 細胞単位の染色体自動解析



正常染色体



二動原体染色体

図 3-11 Metafer4 による染色体単位の自動解析

平成 29 年度も 3.1.1 で作製した標本を使用して、Metafer4 (MetaSystem 社) を用いた 1 細胞単位の染色体自動解析ソフトウェアとともに、染色体単位での全自動解析ソフトウェアについてもさらに改良を進めた。その結果、最短で 1000 細胞の解析を約 15 分で行うことが可能となった。

(2) 染色体の自動解析ソフトウェアの開発

平成 27 年には、ランダムウォーカーを使って、以下のような行程で FISH 画像から染色体異常の有無の判定をする研究を行った。

① 研究の方法

- 1) 全染色体画像から (A) 個々の染色体が占める領域 (ピクセル) の座標、 (B) 個々のセントロメア領域が占める領域 (ピクセル) の座標、 (C) 個々のテロメア領域の占める領域 (ピクセル) の座標を取得する (図 3-12)。(A) は (B) (C) を含んでいる。
- 2) 個々のセントロメア領域に番号を付ける。
- 3) 個々のセントロメア領域の重心のピクセルに、そのセントロメア領域の番号と同じ番号を持つ粒子 (ランダムウォーカー) を置く。粒子は染色体が占める領域 (ピクセル) 上 ((A) 領域上) のみを移動できるものとする。
- 4) 各粒子を N ステップ、(A) ランダムウォークさせる (図 3-13)。

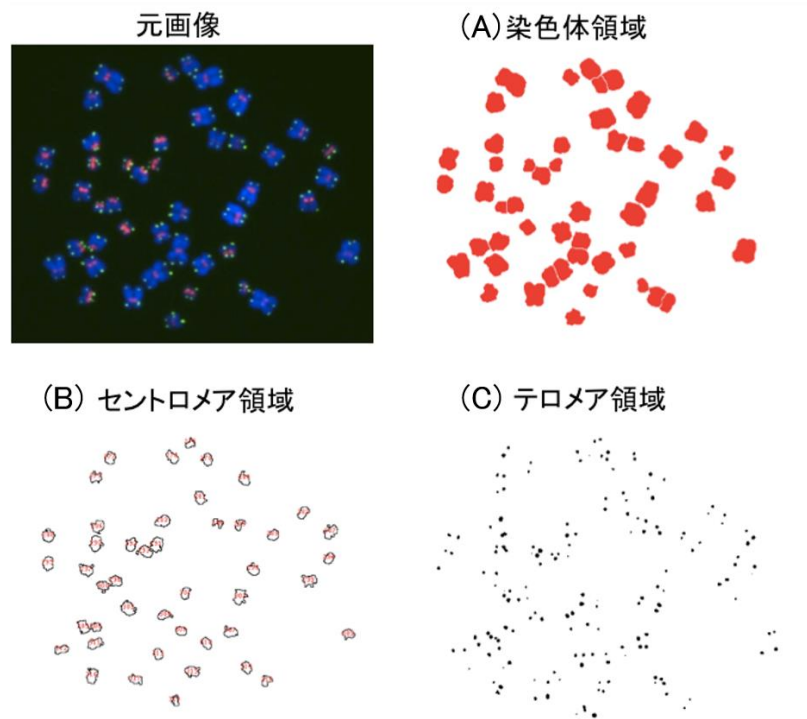


図 3-12 染色体画像からの各領域の座標の抽出

染色体領域
 セントロメア領域
 テロメア領域
 粒子(ランダムウォーカー)

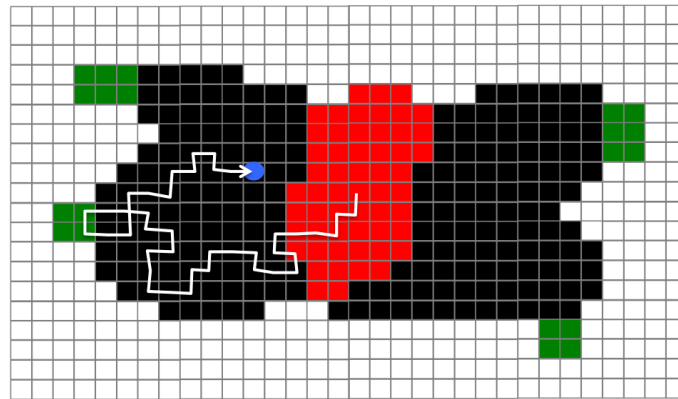
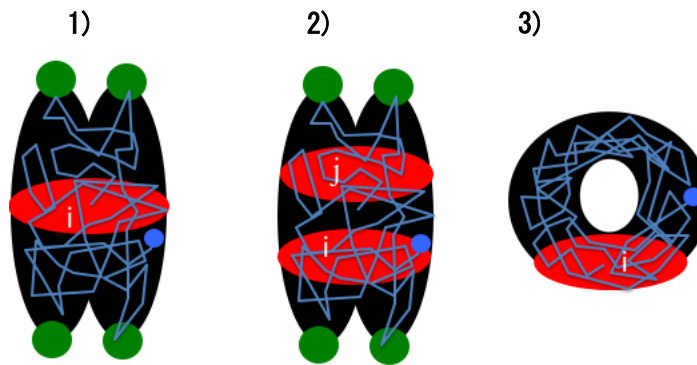


図 3-13 ランダムウォークシミュレーションの模式図

5) 各粒子をランダムウォークさせたのちに、i) テロメアの通過、ii) 粒子番号と異なるセントロメア領域の通過の有無を判定する。このとき i 番目の粒子について下記のようなことがいえる。(図 3-14)

- a) i) 有り かつ ii) 無し のとき、 i 番目のセントロメアを含む染色体は正常である。
- b) ii) 有り (j 番目のセントロメアも通過) のとき、セントロメア i と j が同一染色体に存在する (Dicentric 染色体)。
- c) i) も ii) も無し のとき、セントロメア i を含む染色体はリング状 (Ring 染色体) と判定される。



- 1) 粒子 i はセントロメア i とテロメアを通過
- 2) 粒子 i はセントロメア i とセントロメア j を通過
- 3) 粒子 i はセントロメア i のみ通過

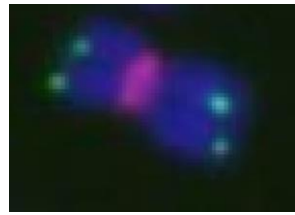
図 3-14：粒子の通過領域と構造判定結果の関係

- 1) 正常
- 2) Dicentric
- 3) Ring

② 研究の結果

この研究の結果、以下のようなことが分かった。行程①②の行程は、汎用の画像解析ソフト（ImageJ 等）で可能であり、扱う画像の性質上、自動化もそれほど困難なくできると考えられる。行程④⑤については、今回の画像では、解像度を 8 bit と下げても各領域は十分判別できた。この解像度では、個々の染色体の占めるピクセル数は 2~3 千程度であった。2~3 千セル程度の 2 次元空間であれば、粒子は $N = 100$ 万ステップ程度のランダムウォークでその領域の大半の部分を通過する事ができ、十分に判定が可能であると考えられる。この計算は一般的な PC においても、粒子 100 個に対し数十秒程度で可能である。また N をさらに大きくすれば、より判定の精度が高くなる。

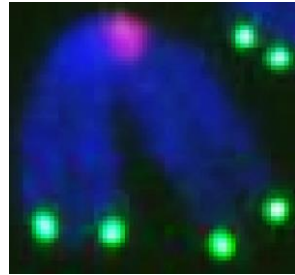
平成 27 年度の成果より、1 本 1 本が明確に分離され蛍光シグナルの強度が十分で背景と明確に区別される染色体に関しては、染色体の正常・異常を判別するアルゴリズムが提案されている。また、フリーソフト ImageJ 等で実装されているエッジ抽出も併用する事で、さらに効率の良い染色体異常の判定が可能になると考えられる。しかし実際に取得される画像では様々な技術的事情により、個々の染色体が明確に区別できるものになるとは限らない（図 3-15）。



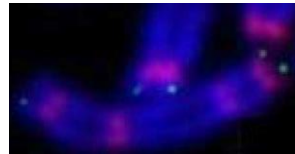
理想的な画像の例



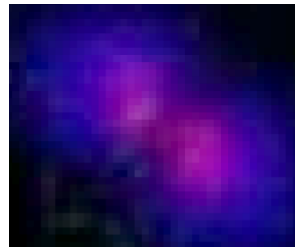
蛍光の輝度が弱い（背景との差が小さい）画像の例



染色体が大きく変形している例



染色体間が接近しすぎている例



1つの染色体が2つに見えてしまう例

図 3-15 個々の区別に困難が生じる可能性のある染色体画像の例

平成 28 年度は多数の染色体が撮影された蛍光顕微鏡画像から、個々の染色体を峻別するアルゴリズムの開発を進めた。

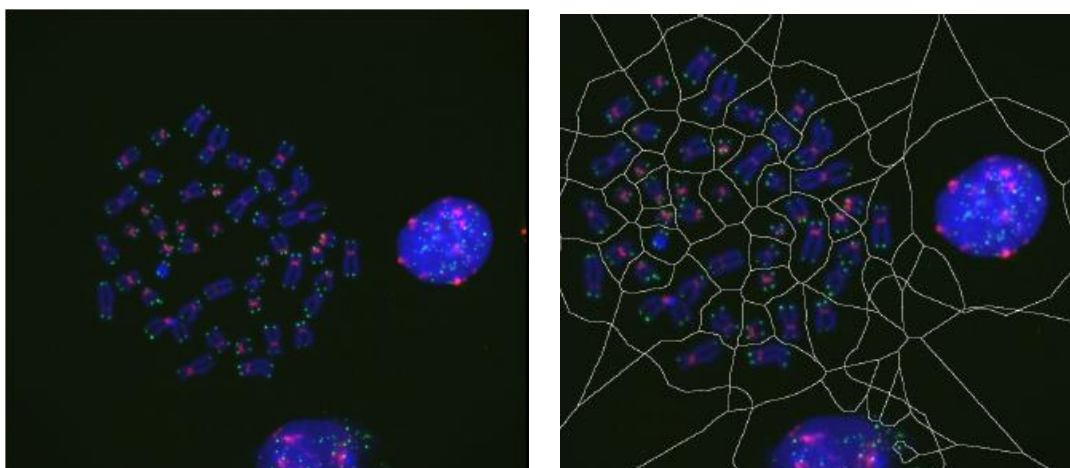
① 研究の方法

まず画像解析フリーソフト ImageJ で実装されている各種処理コマンド群に対し適切なパラメーター群をサーチし、その後にそれらの処理を自動的に実行するマクロを構築した。具体的な処理は、大まかに以下の通りである。

- 1) 同一の画像においても染色体毎に輝度が異なるため、染色体が存在するのに認識されない可能性が生じる。そこでまず、画像処理と判定する範囲を局所毎に制限することで、上記の問題を回避する。
- 2) 画像中の色の境界の先鋭化により、染色体の境界を強調する。
- 3) ボロノイ分割により画像を領域分けし、ひとつの領域に 1 本以下の染色体が入るように分割する。

② 研究の結果

上記の処理によって図 3-16 のような分割が可能となった。

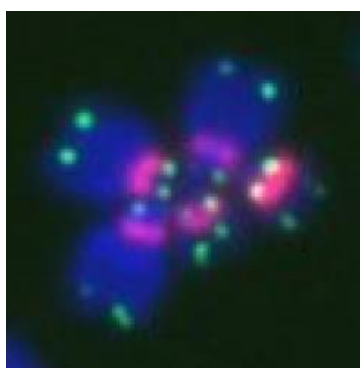


(左) 取得された蛍光顕微鏡画像

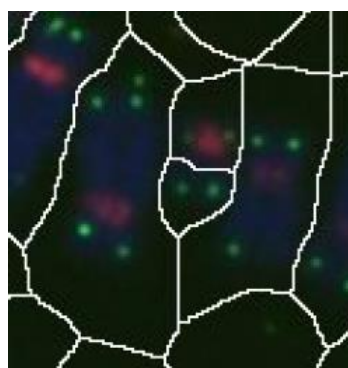
(右) 染色体毎への分割結果

図 3-16 Image J を用いた染色体画像の分割

このような処理を 37 枚の画像に対して行った結果、分裂期細胞で 90 %程度の染色体が、ひとつの領域に 1 本ずつ納められるような結果が得られた。しかし染色体の密集する領域では分割が困難であること、また蛍光が弱い染色体に関しては図 3-17 のような誤処理がされてしまうことが明らかになった。



(左) 今回の方法で染色体の区別ができなかった染色体の密集の例



(右) 蛍光が弱い染色体に対する区別の誤処理の例

図 3-17 Image J を用いた染色体画像の分割における誤処理

平成 29 年度は、このような誤処理を回避するために、画像毎機械学習等で局所的なパラメーター群の決定や分割基準を決定することで領域分けおよび染色体異常判定を行うアルゴリズムの開発を進めた結果、二動原体・環状染色体を 90 %以上の正解率で検出することが可能となった (図 3-18)。

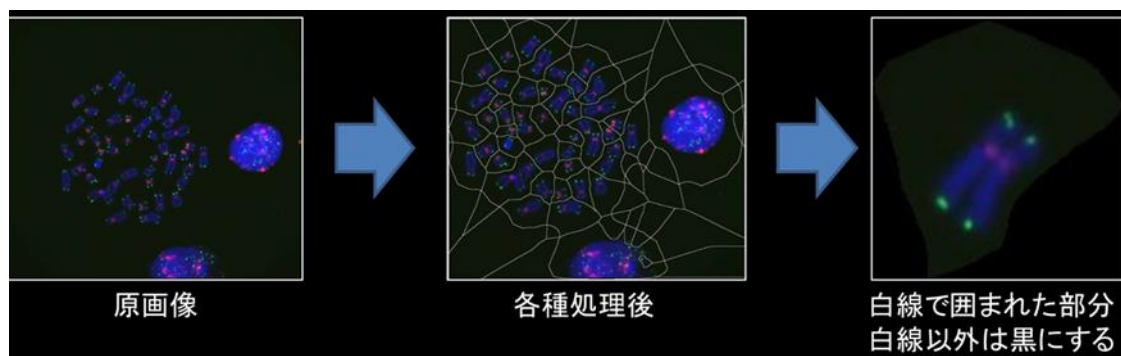


図 3-18 独自の染色体画像の自動解析ソフトウェアの開発

(3) 自動解析ソフトウェア Metafer4 (MetaSystem 社) を用いたゲノム修復関連タンパク質 γ H2AX フォーカス画像取得条件の検討

平成 27 年度は、下記のような方法で、ゲノム修復関連タンパク質 γ H2AX の蛍光免疫染色を行った。健常者ボランティアの末梢血にガンマ線 100 mGy を照射し、等量の生理食塩水を加え、ガラスピペットを用いて希釈する。希釈した血液を等量の Lymphoprep (Axis-shield PoC AS) に静かに重層する。800 g、20 分間遠心分離させてリンパ球を分離する。ガラスピペットを用いてリンパ球を回収し、PBS (リン酸緩衝生理食塩水) で洗浄、サイトスピンで細胞をスライドグラスに貼り付け後、4 %パラホルムアルデヒドで固定する。抗 γ H2AX の一次抗体と蛍光色素で標識した二次抗体を用いて間接蛍光抗体法による γ H2AX フォーカスの検出を行う。蛍光顕微鏡観察には、キーエンス社の顕微鏡 BZ-X700 を用いる (図 3-19)。

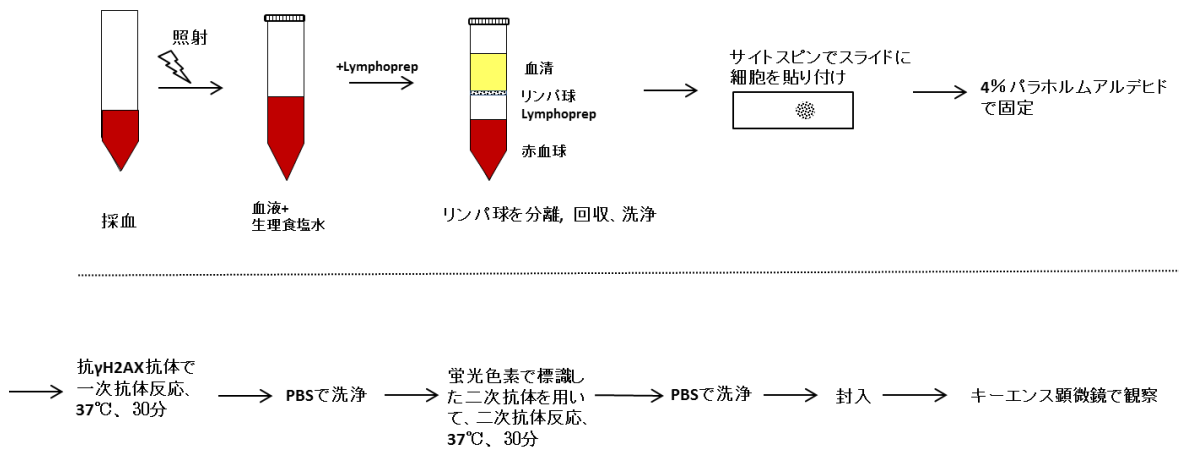


図 3-19 ゲノム修復関連タンパク質 γ H2AX の蛍光免疫染色プロトコール

この研究により、100 mGy 照射後のリンパ球では、 γ H2AX フォーカスの形成が観察された。同標本では、ソフトウェア Metafer4 を使うことで自動的に γ H2AX のフォーカスを認識できるようになった（図 3-20）。

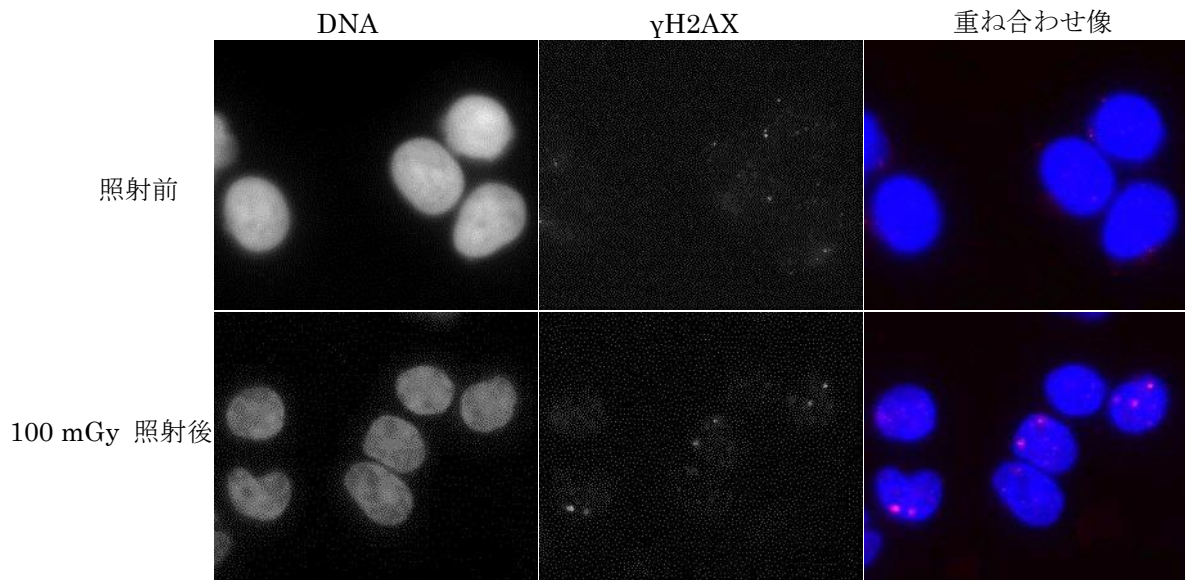


図 3-20 照射前後リンパ球核内の γ H2AX のフォーカス

平成 28 年度は、 γ H2AX 蛍光免疫染色した標本を使用し、自動解析ソフトウェア Metafer4 (MetaSystem 社) を用いて γ H2AX フォーカス認識のパラメーター値を詳細に検討 (図 3-21) することにより、リンパ球の γ H2AX フォーカスを認識することができるようになった (図 3-22)。

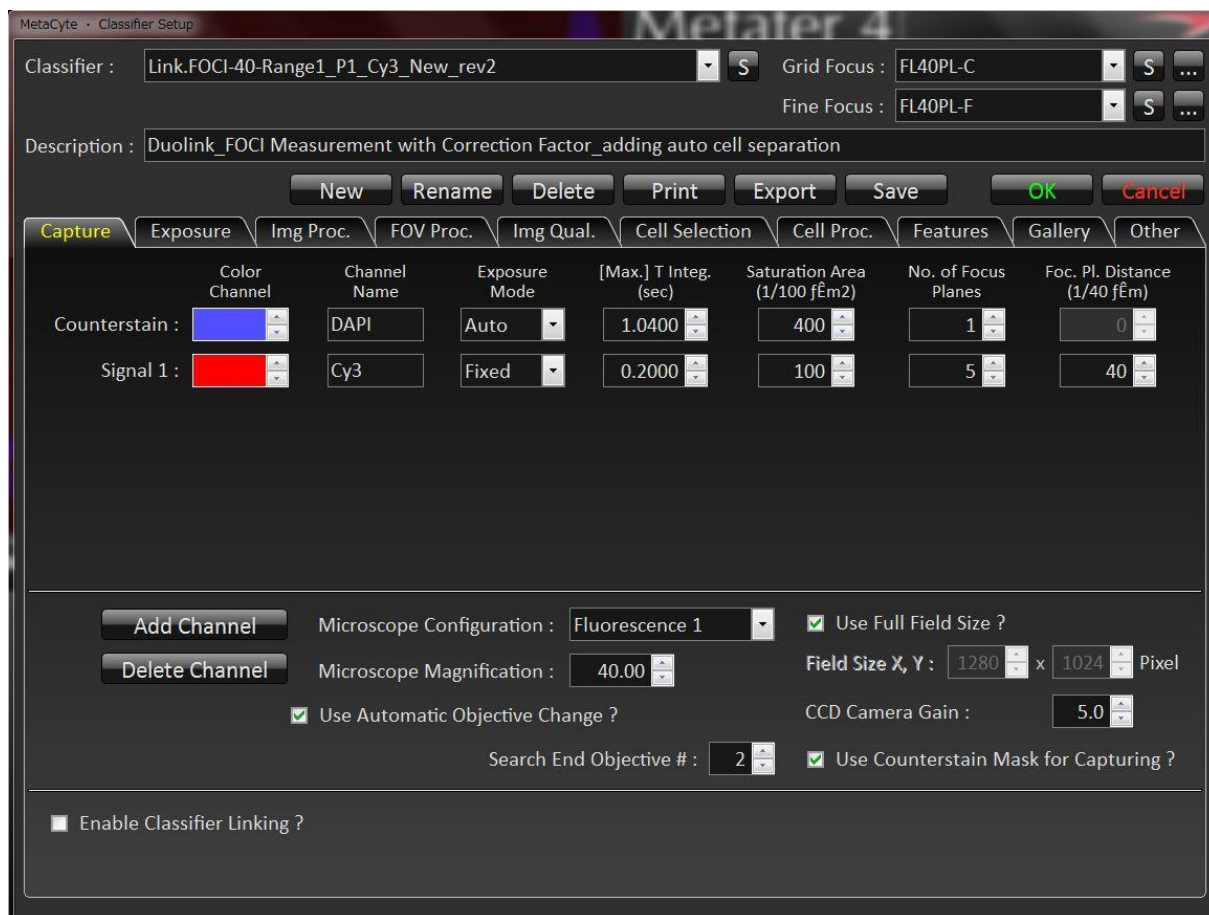


図 3-21 自動解析ソフトウェア Metafer4 を用いた γ H2AX フォーカス認識のパラメーター値設定画面

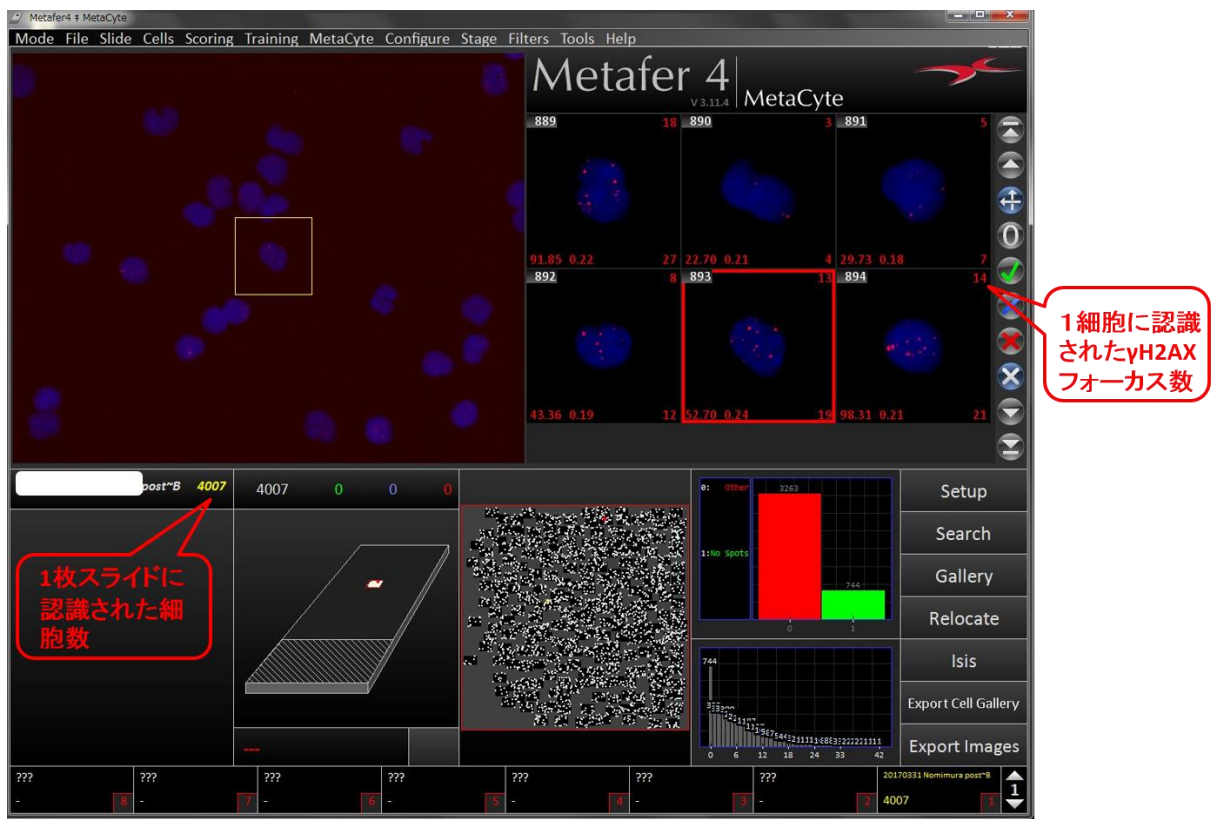


図 3-22 自動解析ソフトウェア Metafer4 で自動的に認識されたリンパ球の γ H2AX フォーカス

3.2 蛍光顕微鏡が不要な化学色素標識 PNA プローブの開発 (H27~H29)

3.2.1 セントロメアおよびテロメア PNA プローブの開発 (H27~H28)

蛍光標識された PNA プローブを用いる PNA-FISH 法では、染色体画像を取得するために蛍光顕微鏡を使用する必要がある。蛍光標識による画像は、シグナル・ノイズ比が高いためシグナルを鮮明に検出することが可能であるが、蛍光顕微鏡は通常の光学顕微鏡と比較すると非常に高額である。そこで本研究では、蛍光ではない通常の化学色素を用いた PNA プローブの標識法の開発にも取り組んだ。

PNA プローブの末端に固相合成によって化学色素を導入するために、カルボン酸やスルホン酸といったアミノ基と脱水縮合が可能な化学色素を合成する。固相担持された PNA 多量体の末端アミノ基とカルボン酸をもった化学色素の脱水縮合によってアミド結合による化学色素の導入を行う。また、スルホン酸をもった化学色素との脱水縮合によって、スルホンアミド結合による化学色素の導入を行う。最後に固相から PNA 多量体を取り外すことで目的の化学色素によって標識された PNA プローブを得る (図 3-23)。

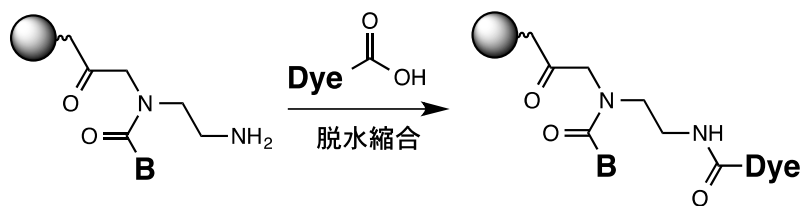


図 3-23 化学色素と PNA プローブの化学反応式

化学色素標識を行うための PNA プローブの開発については、研究開発の効率化を図るために、色素を付加させやすい化学修飾構造を広島大学で設計したのち外注して合成することとし、外注先と秘密保持契約を締結した。図 3-24 に示す固相担持セントロメア PNA およびテロメア PNA を設計し、作成依頼した。固相合成によってこの固相担持 PNA の Fmoc 基を脱保護した後に色素のカルボン酸誘導体と脱水縮合し、固相から切り離すことによって化学色素標識のための PNA プローブを合成した。

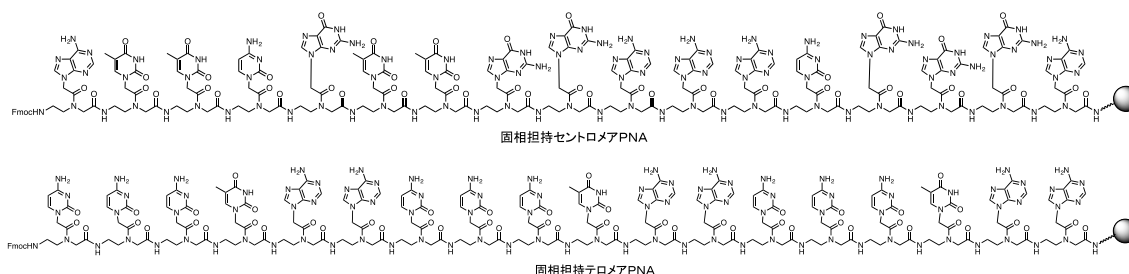


図 3-24 固相担持 PNA の構造
(上：セントロメアプローブ 下：テロメアプローブ)

3.2.2 赤色標識された PNA プローブの開発 (H28~H29)

セントロメアおよびテロメアに特異的に付加する PNA 配列と赤色色素を用いて、セントロメアおよびテロメアを検出する PNA プローブを開発し、FISH 法によるセントロメアおよびテロメアの検出効率向上を検討した。赤色色素として、PNA 末端のアミノ基との脱水縮合が可能なカルボン酸をもったメチルレッドを用い、PNA プローブへ導入する (図 3-25)。

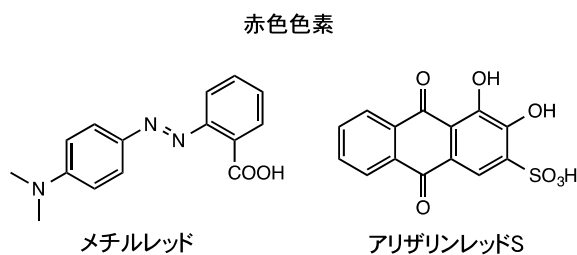


図 3-25 赤色色素の化学式

外注して合成したセントロメアおよびテロメア PNA プローブの末端にメチルレッドを脱水縮合した赤色 PNA プローブを合成した (図 3-26)。この赤色 PNA プローブで赤色に標識して染色体セントロメアの検出を行なったが、シグナルを検出することができなかった (図 3-27)。このため、まずセントロメア PNA プローブの末端にビオチンを導入した PNA プローブを合成し、染色体セントロメアをビオチン標識してから DAB によるシグナル検出を行なったところ、褐色のセントロメアシグナルを検出することができた (図 3-28)。

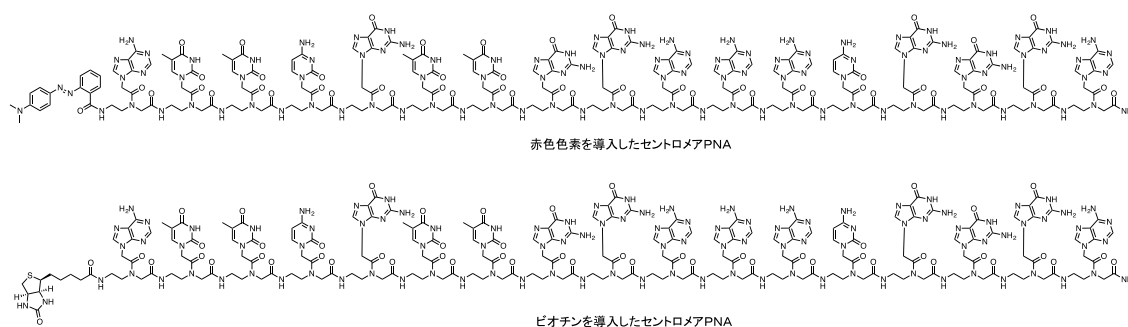


図 3-26 メチルレッドおよびビオチンを導入した PNA プローブの構造

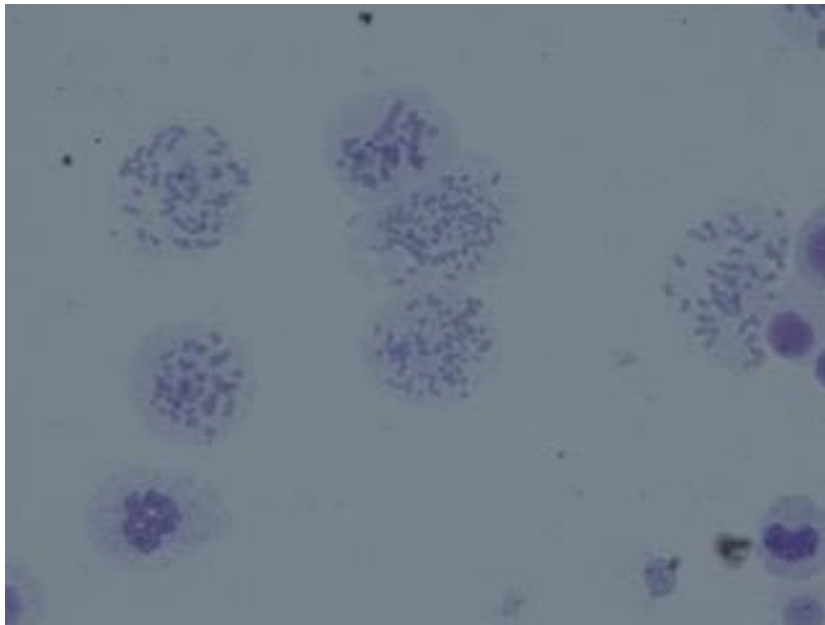


図 3-27 メチルレッド標識 PNA プローブによるセントロメアの検出

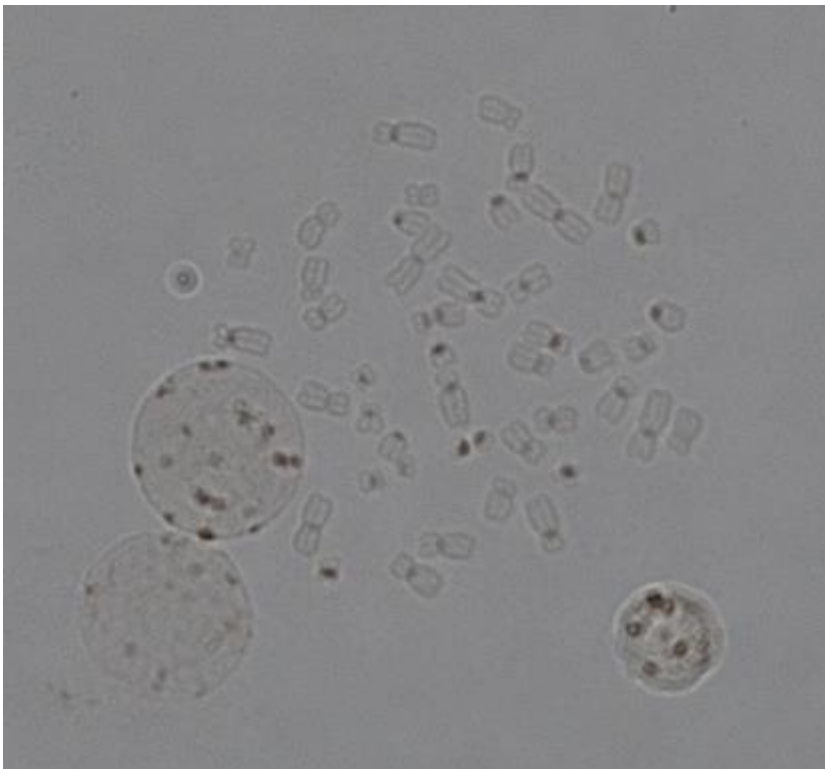


図 3-28 ビオチン標識セントロメア PNA プローブの DAB による
セントロメアシグナル検出

3.2.3 緑色標識された PNA プローブの開発 (H28~H29)

セントロメアおよびテロメアに特異的に付加する PNA 配列と緑色色素を用いて、セントロメアおよびテロメアを検出する PNA プローブを開発し、FISH 法によるセントロメアおよびテロメアの検出効率向上を検討した。緑色色素として、PNA 末端のアミノ基との脱水縮合が可能なカルボン酸をもったマラカイトグリーン誘導体の合成を行い、PNA プローブへ導入する (図 3-29)。

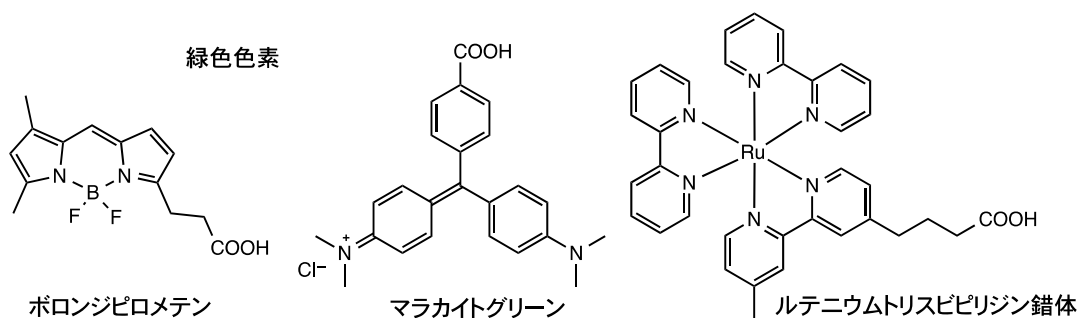


図 3-29 緑色色素の化学式

マラカイトグリーンのカルボン酸誘導体を合成した (図 3-30)。外注して合成したセントロメアおよびテロメア PNA プローブにマラカイトグリーンを導入した緑色 PNA プローブを合成し、これを用いて緑色に標識した染色体セントロメアの検出を行なったが、シグナルを検出することができなかった。そこで、PNA プローブのビオチン標識を行い、DAB 以外の色素による PNA プローブの検出手法の開発に取り組むこととした。

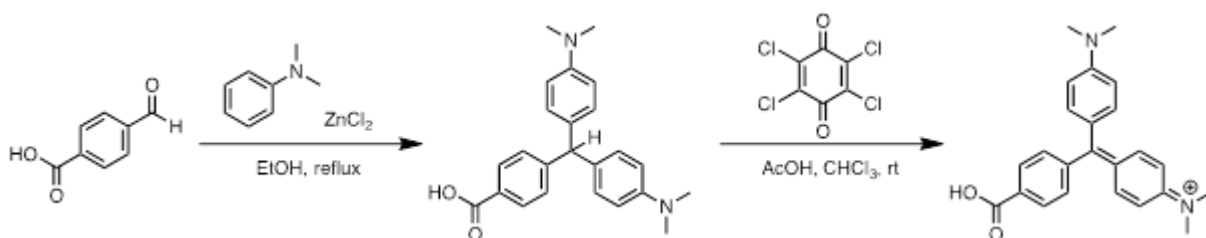


図 3-30 マラカイトグリーンカルボン酸誘導体の合成

セントロメア PNA プローブの末端にビオチンを導入した PNA プローブを合成し DAB によるシグナル検出を行なったところ、褐色のセントロメアシグナルを検出することができた。しかし、緑色、赤色の色素によるセントロメア、テロメアの検出は困難であった。この結果をふまえ、ビオチン標識 PNA プローブと C バンディング法を組み合わせたセントロメアとテロメアの検出法の開発を進めている。

3.3 臨床検体を用いた二動原体染色体・環状染色体の自動解析システム有用性の試験的検 (H27~H29)

3.3.1 胸部 CT 撮影患者からの臨床検体を用いた自動解析条件の最適化 (H27~H29)

平成 27 年度は、広島大学病院腫瘍外科を受診する肺がん症例について、CT 検査による放射線照射 (図 3-31) の前後の採血サンプルから末梢血リンパ球を分離培養し、PNA-FISH 法による染色体標本を作成するための準備を開始した。標本について、放射線被ばくによる不安定染色体異常である二動原体染色体・環状染色体の自動解析を行い、結果をマニュアル解析結果と対比して自動解析条件の最適化を図る検討を開始した。



図 3-31 広島大学病院の 320 列 CT

肺がん症例の臨床検体を収集するために広島大学疫学倫理委員会に申請を行い、承認され、検体の収集を開始した。検体採取の手順について、腫瘍外科、放射線科のスタッフと打ち合わせを行い、インフォームドコンセントの取得、採血、検体輸送などについての手順を決定した。さらに、申請の承認が得られるまでの間、肺がん症例の検体の代わりに、これまでに健常人ボランティアから採取した染色体標本を用いて染色体異常の自動解析を行い、マニュアル解析により得られた結果との比較検討を行った（図 3-32）。

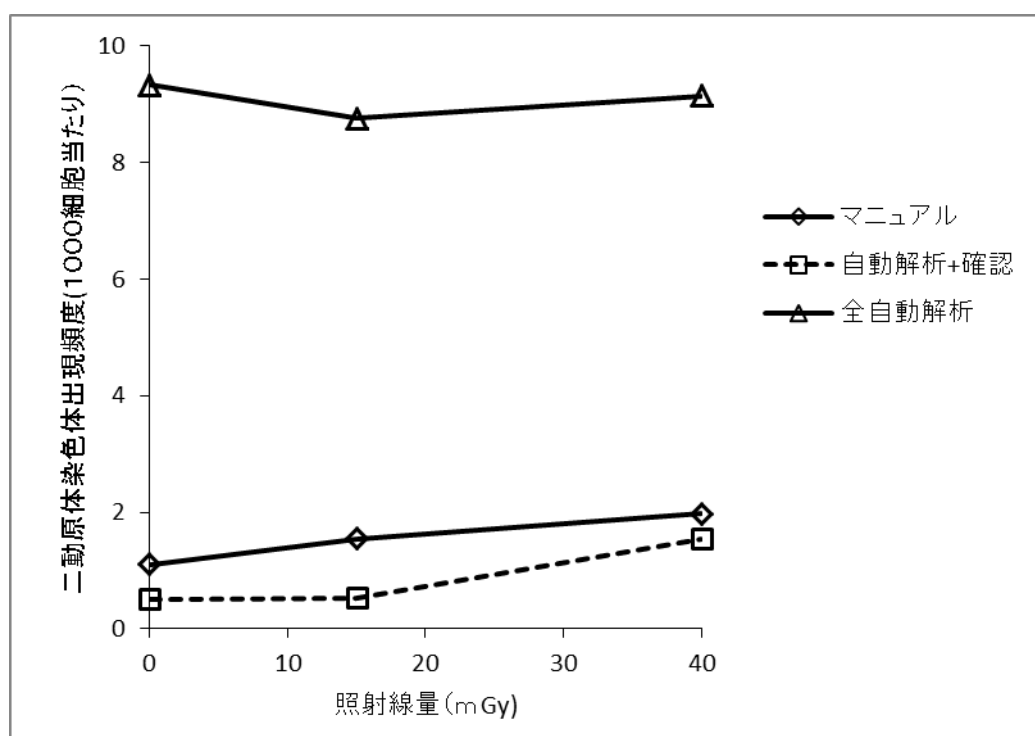


図 3-32 自動解析とマニュアル解析による染色体異常検出の比較

平成 28 年度は、広島大学疫学倫理委員会から研究が承認されたのち、広島大学病院腫瘍外科を受診する肺がん症例について 100 症例の検体収集を行った。そのうち、49 症例の検体について、CT 検査による放射線照射の前後の採血サンプルから末梢血リンパ球を分離培養し、PNA-FISH 法による染色体標本を作成した。その標本について、ゲノム修復関連タンパク質 γ H2AX の解析 (図 3-33) と染色体異常のマニュアル解析 (図 3-34) を行った。また、5 症例の染色体異常の自動解析を行い、マニュアル解析との比較検討を行った (図 3-35)。自動解析について様々な条件を検討して最適条件を得るべく検討を進めた。

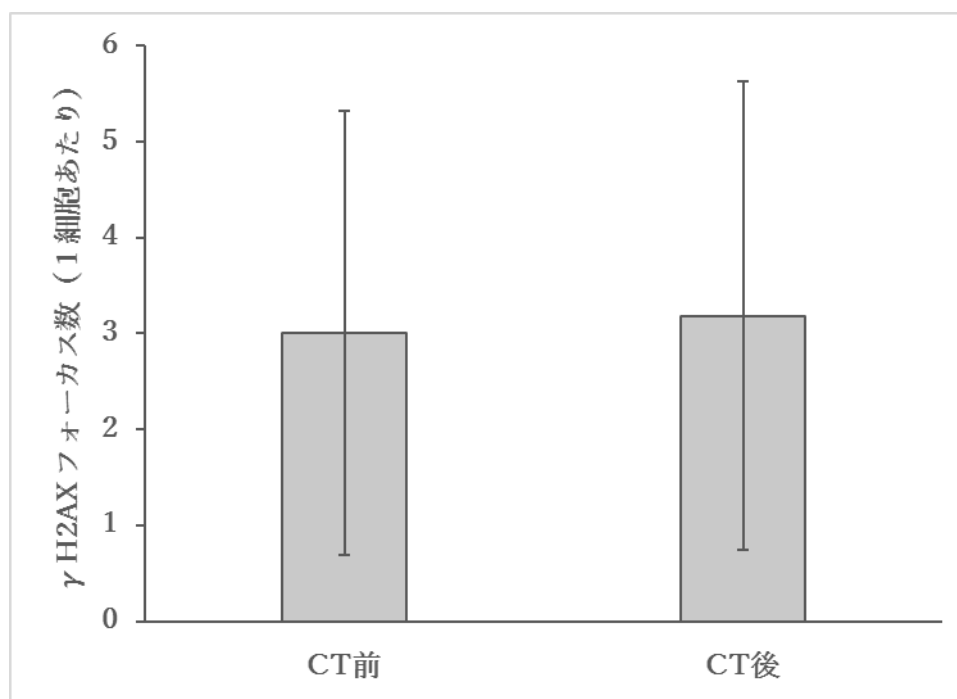


図 3-33 CT 前後リンパ球中の γ H2AX フォーカス数

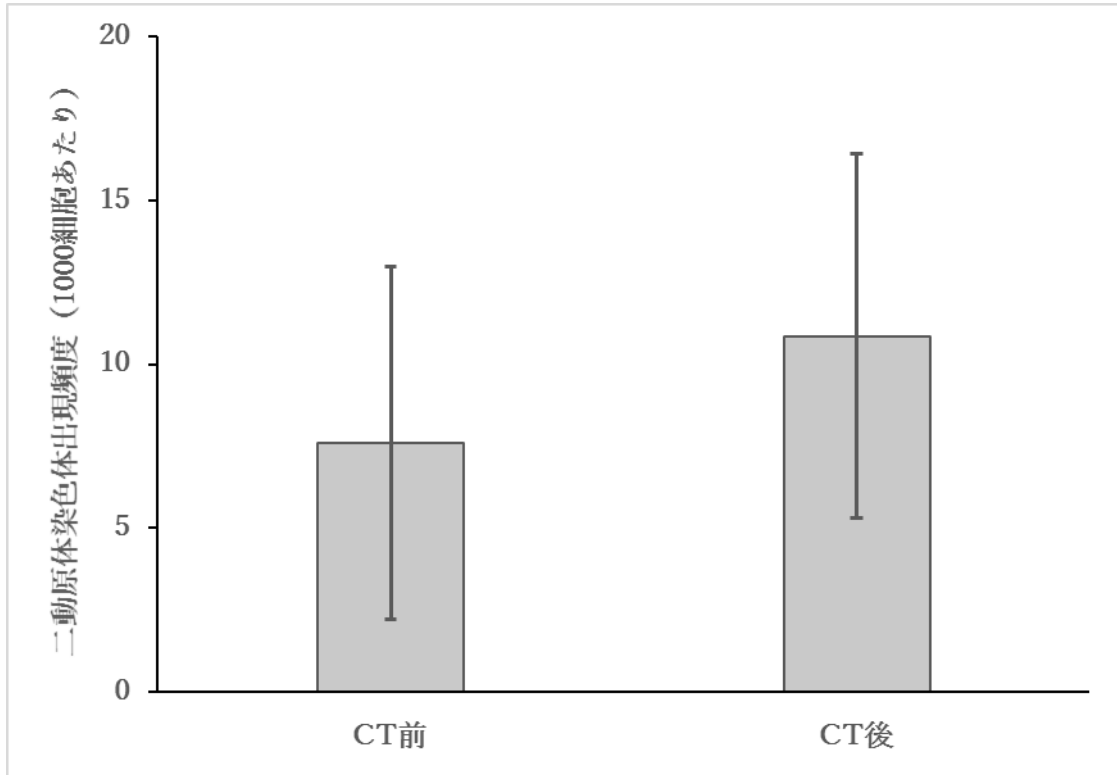


図 3-34 CT 前後二動原体染色体出現頻度

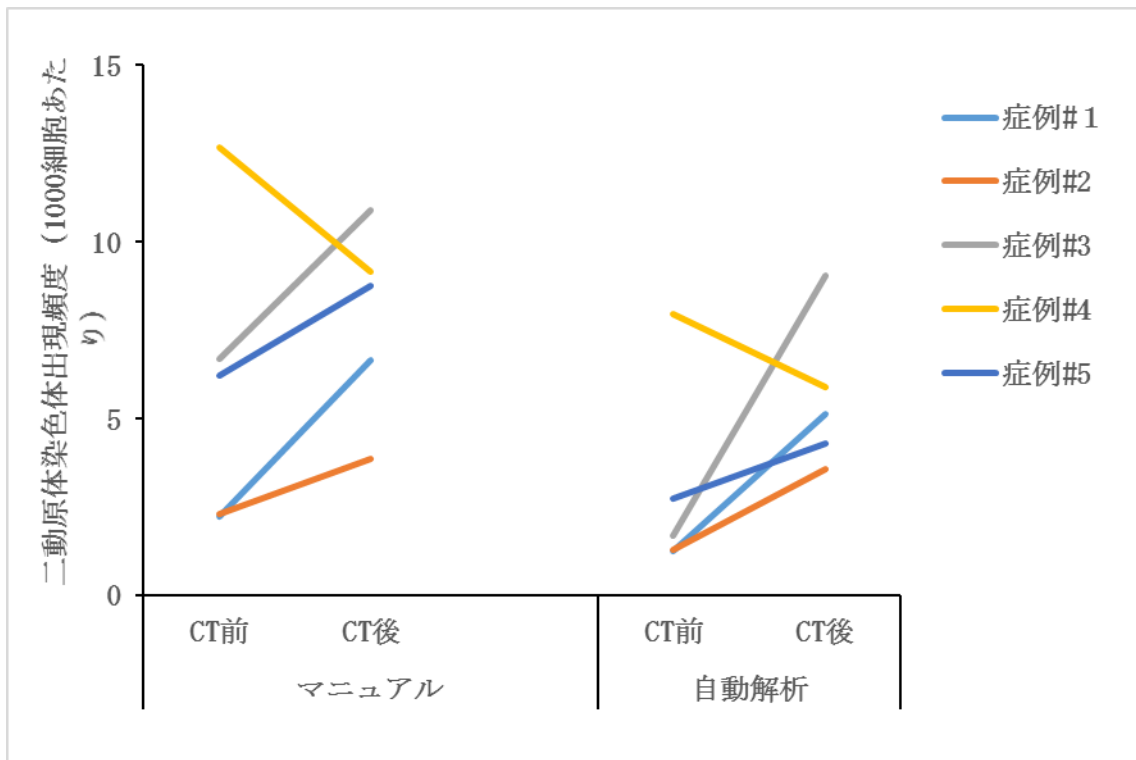


図 3-35 肺がん症例の検体を用いた
自動解析とマニュアル解析による染色体異常検出の比較

平成 29 年度も引き続き広島大学病院腫瘍外科を受診する肺がん症例について、CT 検査による放射線照射の前後の採血サンプルから末梢血リンパ球を分離培養し、PNA-FISH 法による染色体標本を作成した。これまでに、肺がん症例 162 例について、CT 検査による放射線照射の前後の採血サンプルから末梢血リンパ球を分離培養し、PNA-FISH 法による染色体標本を作成し、自動解析とマニュアル解析により得られた結果の比較検討を行い、非常に良い相関（相関係数 0.78）が得られている（図 3-36）。

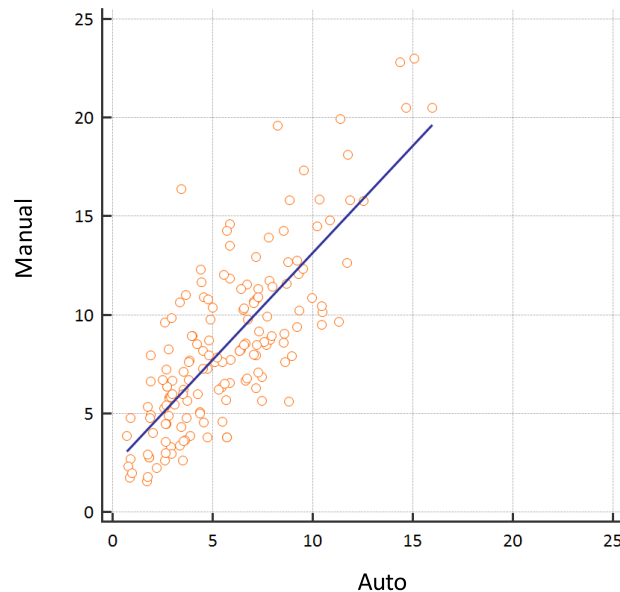


図 3-36 染色体自動解析と手動解析の比較検討

3.4 研究推進 (H27~H29)

研究代表者の下で各研究項目間における連携を密にして研究を進めるとともに、広く意見を聴きながら研究を進めるために、毎年一回、広島大学原爆放射線医科学研究所において、放射線影響研究所丹羽太貫理事長および東京大学宮川清教授を委員とする研究推進委員会を開催した。平成 28 年 2 月 5 日の委員会では、田代が事業の進捗状況を報告し、染色体異常の自動解析システム構築の重要性の確認と低線量照射による染色体異常形成の分子機構についての討論が行われた。平成 29 年 1 月 27 日の委員会では、田代が事業の進捗状況を報告し、染色体異常の自動解析システム構築の進め方について、および低線量照射による染色体異常形成の健康影響との関連についての討論が行われた。さらに、画像解析自動化等の研究加速のため外部活用の可能性についても検討した。平成 30 年 2 月 20 日の委員会では田代が事業の進捗状況を報告し、委員からは今後は自動化された染色体解析を用いて、これまでの研究では不明な点が多かった低線量放射線被ばくの人体影響、特に CT 検査などの医療放射線被ばくの人体影響について、検討を進めることが提案された。

4. 結言

この研究では、我々が高線量被ばく検体用に開発した新しい染色体解析法である PNA-FISH 法を基盤技術として、低線量被ばくの影響を効率的かつ高感度に定量的自動解析を行うことが可能なシステムの開発と実際の臨床検体を用いてその有用性を検証することを目的としている。3年間の研究で以下の成果を得た。

1) PNA-FISH 法による二動原体染色体・環状染色体の自動解析システムの開発

二動原体染色体・環状染色体の検出を迅速に行うことが可能な染色体自動解析システムの開発を進めた。これまでの染色体標本では、染色体の重なり合いが多いため、自動解析システムの染色体認識率が低かったが、平成 27 年度に確立した手法により染色体の重なり合いを 1 細胞あたり約 2 カ所まで減らすことができた。平成 28 年度には、染色体の重なり合いを 1 カ所以下にまで減らすことができたが、この条件で染色体の分散を行うと 1 細胞単位の解析が困難になることが明らかになった。一方、平成 27 年度に確立した手法で作製した標本で、1 細胞あたり 20 本以上の染色体解析が可能であることが明らかになったため、平成 27 年度に確立した手法を用いて染色体自動解析法を確立することとした。

この手法で作成した染色体自動解析に適した染色体標本用いて、既存の自動解析ソフトウェア Metafer4 (MetaSystem 社) における染色体画像認識のパラメーター値を詳細に検討した結果、1 細胞あたり 20-30 本の染色体を認識することができるようになった。さらに、より効率的に染色体解析を行うため、染色体単位での全自動解析についても Metafer4 を用いた検討を進めた。その結果、従来は 3 時間かかっていた 1000 細胞の解析時間を約 30 分で行うことが可能となり、二動原体染色体の認識についても正確性が向上した。今後は、解析時間をさらに短縮するとともに、二動原体染色体、環状染色体の検出条件を改善し、検出効率の向上を目指す予定である。

既存の自動解析ソフトウェア Metafer4 を用いた検討とともに、染色体単位の全自動解析ソフトウェアの開発を進めた。独自のアルゴリズムによる新しい染色体自動解析ソフトウェアの開発では、分裂期細胞での染色体の分離が可能となった。染色体画像自動解析ソフトウェアの開発では、平成 28 年度の中間フォローでの岩田 P0 のアドバイスに従い機械学習を取り入れた新しい手法の開発を推進する準備を始め、現在は、二動原体・環状染色体を 90 % 以上の正解率で検出することが可能となっている。今後も引き続き自動解析ソフトウェアの開発を進める予定である。

2) 蛍光顕微鏡が不要な化学色素標識 PNA-プローブの開発

高額な蛍光顕微鏡を使用する必要がない PNA-FISH 法の開発に取り組むため、通常の化学色素を用いた PNA プローブの標識法の開発を進めた。化学色素標識を行うための PNA プローブの開発については、研究開発の効率化を図るために、広島大学で設計したのち外注して作成することとし、外注先と秘密保持契約を締結した。

外注して合成したセントロメアおよびテロメア PNA プローブをメチルレッドで赤色に標識して染色体セントロメアの検出を行なったが、シグナルを検出することができなかった。さらに、緑色蛍光色素であるマカライトグリーンによるセントロメア PNA プローブの標識も行

ったが、残念ながら緑色シグナルを検出することができなかった。このため、セントロメア PNA プローブをビオチン標識し、DAB によるシグナル検出を行なったところ、セントロメアのシグナルを検出することができた。しかし、緑色、赤色の色素によるセントロメア、テロメアの検出は困難であった。今後も、本事業での成果を生かし、通常の光学顕微鏡によるセントロメアとテロメアの検出方法の開発に取り組む予定である。

3) 臨床検体を用いた二動原体染色体・環状染色体の自動解析システム有用性の試験的検討

平成 28 年度に広島大学疫学倫理委員会から研究が承認されたのち、広島大学病院腫瘍外科を受診する肺がん症例について、CT 検査による放射線照射の前後の採血サンプルから末梢血リンパ球を分離培養し、PNA-FISH 法による染色体標本を作成した。その標本について、放射線被ばくによる二動原体染色体・環状染色体の自動解析を行い、従来のマニュアル解析結果と対比して自動解析条件の最適化を進めた。これまでに、肺がん症例 162 例について、CT 検査による放射線照射の前後の採血サンプルから末梢血リンパ球を分離培養し、PNA-FISH 法による染色体標本を作成し、自動解析とマニュアル解析により得られた結果の比較検討を行い、非常に良い相関（相関係数 0.78）が得られている。今後は、この手法を用いてさらに臨床検体の解析を進める予定である（Livingston et al. Radiat Environ Biophys. 2016）（Fukumoto et al. Eur Radiol. 2017）。

参考文献

- (1) Pearce MS, Salotti JA, Little MP, et al, “Radiation exposure from CT scans in childhood and subsequent risk of leukaemia and brain tumours: a retrospective cohort study,” *Lancet*. 2012; 380(9840): 499–505.
- (2) IAEA, “Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Response to Radiation Emergencies,” International Atomic Energy Agency, Vienna,. 2011.
- (3) Shi L, Fujioka K, Sun J, Kinomura A, Inaba T, Ikura T, Ohtaki M, Yoshida M, Kodama Y, Livingston GK, Kamiya K, Tashiro S, “A modified system for analyzing ionizing radiation-induced chromosome abnormalities,” *Radiat Res*. 2012; 177(5): 533–538.
- (4) Livingston GK, Khvostunov IK, Gregoire E, Barquinero JF, Shi L, Tashiro S, “Cytogenetic effects of radioiodine therapy: a 20-year follow-up study. “*Radiat Environ Biophys*. 2016; 55(2):203–13.
- (5) Fukumoto W, Ishida M, Sakai C, Tashiro S, Ishida T, Nakano Y, Tatsugami F, Awai K, “DNA damage in lymphocytes induced by cardiac CT and comparison with physical exposure parameters.” *Eur Radiol*. 2017 Apr;27(4):1660–1666.