

# 放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和5年度研究報告書

研究課題名	FISH 解析法による低線量被ばく評価に向けた基盤構築
令和5年度研究期間	令和5年4月3日～令和6年2月29日
研究期間	令和4年度 ～ 令和6年度（2年目）

	氏名	所属機関・職名
主任研究者	数藤 由美子	量子科学技術研究開発機構・グループリーダー
分担研究者		
若手研究者		

キーワード	低線量被ばく、FISH 法、人工知能、画像解析、染色体
-------	-----------------------------

本年度研究成果
<p><b>I 研究背景</b></p> <p>交換型染色体異常は放射線被ばく後の線量評価や長期フォローアップ調査研究に利用可能である。低線量被ばく影響研究のためには課題が2つある。</p> <p>1) 健常人バックグラウンド・データは不十分である。従来の調査は観察数・基準がまちまちで、また、検査者の熟練度により画像判定基準が変動する（再現性の問題）。</p> <p>2) FISH 画像による染色体異常判定は未だ自動化されていない。低線量被ばく調査に必要な観察細胞数は1検体当たり目視観察で1000ゲノム以上<sup>1)</sup>であり、時間と労力を要する。人工知能（AI）技術による支援が有望である。</p> <p><b>II 目的</b></p> <p>本研究では、ヒト1、2、4番染色体ペインティングプローブによるFISH解析法を用い、低線量被ばく評価に向けた基盤構築を行う。より具体的には、健常人の染色体異常頻度バックグラウンド値の高精度レファレンス・データを作成する。また、深層学習法を用いて交換型染色体異常のFISH画像自動判定技術を開発し、判定の標準化・迅速化を達成する。</p> <p><b>III 研究方法</b></p> <p>量子科学技術研究開発機構・臨床研究審査委員会承認済みのプロトコール（ID: 08-016、17-018、18-023）に従い実施した。</p> <p><b>【調査研究1】 染色体異常バックグラウンドのレファレンス・データ作成</b></p> <p>健常人ボランティア7名（非喫煙者）の末梢血試料よりリンパ球細胞48時間培養を行って染色体標本を作製し、ヒト1、2、4番染色体ペインティングプローブ（Zeiss/Metasystems社）を用いた3色FISH<sup>1,2)</sup>を行った。細胞分裂回数確認のため、プロモデオキシウリジン添加によるFPG法を応用した<sup>1,2)</sup>。自動画像スキャニング顕微鏡システムMetafer4（Zeiss/Metasystems社）を用いて画像データを</p>

取得し、ソフトウェア MetaClient・ISIS (Zeiss/Metastystems 社) を用い、熟練観察者による目視観察を行い、1 検体につき 2500 メタフェーズ (1000 ゲノム相当数) 以上<sup>1)</sup>の染色体異常解析を行い、その中から 1 回目分裂細胞のデータを取得した。

#### 【調査研究 2】 人工知能技術による染色体画像自動判別技術開発

健康人ボランティアの末梢血試料由来の<sup>60</sup>Co-ガンマ線 2.0 Gy 照射標本 (線量率 0.5 Gy/min) を用いた 3 色 FISH<sup>1),2)</sup> により、1) と同様に画像データを取得した。一部の画像につき熟練観察者によりアノテーションを行った。本研究・令和 4 年度、人工知能技術 (深層学習法等) を基盤とし、原子力規制庁令和 3 年度放射線安全規制研究戦略的推進事業費「染色体線量評価のための AI 自動画像判定アルゴリズム (基本モデル) の開発」<sup>3)</sup> において開発した QST モデルをもとに、自動染色体画像判別モデルのプロトタイプ<sup>4)</sup>を作成した。令和 5 年度は画像を増やすなどにより、性能向上を試みた。

### IV 研究結果、考察及び今後の研究方針

#### 【調査研究 1】 染色体異常バックグラウンドのレファレンス・データ作成

令和 4 年度、非喫煙・健康人ボランティア 30 代 1 名について調査し、基本データ (40 代 1 名)<sup>2)</sup>と比較した。令和 5 年度、当初計画では追加 1 名の調査予定であったが、より多くの被検者からデータを取得した。具体的には、20 代 4 名 (2024 年 1 月 30 日採血実施。分析中)、40 代 2 名、70 代 1 名の染色体解析を行った。低線量被ばくの検出力を検討するため、対照実験として、放射線業務従事者健康人 5 名について調べた。結果を表 1 にまとめた。20 代前半の調査を優先したのは、20 歳以降の世代で最も加齢・生活習慣による染色体異常頻度上昇が少なく、個体差を確認するためである。20 代について現在染色体解析中で、特筆すべきは 2 回目分裂細胞、3 回目分裂細胞の頻度で、本研究で 20~23 歳 4 名につき 5~40%を得ている。これまでの観察最高値は福島原発事故緊急作業被ばく者の 15% である<sup>6,7)</sup>。従来多くのラボでは血液採取しやすい 28 歳以上からのデータ取得が多く、また分裂回数が調べられていないため評価が正確では無かった可能性がある。若い世代のバックグラウンド調査を行う重要性が明らかになった。

さらに、長期低線量被ばく (内部被ばくによるリンパ球外部被ばく) の 5 症例について調べた。被ばく歴 35~42 年の症例で、血液採取年 1977~1979 年、採血時の年齢 59~66 歳である。安定型染色体異常の頻度は 6~14%で、不安定型染色体異常も存在した (頻度 3~5%)。本研究や継続研究でのバックグラウンド調査で加齢効果が明らかになれば、累積線量の推定が可能となる。また他の採血年の試料も調査することで個体ごとの加齢影響の観察も可能になる。なお、検体の詳細および結果については 2024 年 5 月論文投稿予定のため、ここでは非公開とする。

令和 6 年度は今後もより多くの検体数、観察細胞数を目指す。さらに、【調査研究 2】で開発する自動判定アルゴリズムを実際に用いて解析効率アップしたい。また、将来の長期フォローアップでの利用に備えて、一部の検体につき M-FISH 解析を行い、1、2、4 番染色体の検出力を 3 色 FISH と比較し、スクリーニング精度を確認する。

#### 【調査研究 2】 人工知能技術による染色体画像自動判別技術開発

令和 4 年度に作成したプロトタイプをもとに、追加学習を試みるため、9,179 枚 (染色体約 42 万個) の画像データを追加した。現在のモデルでは、染色体画像判定速度は画像 1000 枚 (約 1000 メタフェーズ) 当たり 1 分未満を達成した。熟練者目視観察では 17 時間を要した。

目視観察ならば明らかに誤判定とわかる例があるために、正確さ向上のため、AI の挙動の可視化を

試みた。EigenCam によりインプット画像のどの領域の情報をより強く利用しているのかを AI 内部のレイヤーの活性化状態を利用して可視化させたところ、作成した AI モデルは染色体が存在する領域全体の情報を集中して利用していることがわかった。このことは、染色体を切り取るのではなく、全体を掌握させる（現モデルの開発方法）ことが適切であることを意味する。また、【調査研究 1】で用いた長期凍結保存標本の利用や、他機関で異なるプロトコールにて作製される標本への適用、すなわち染色体の凝縮度が高い染色体画像への対応（汎用性を高める）のためには、個別のアルゴリズムを作成する（ファイン・チューニングを行う）のではなく、追加学習でより多様な画像を学習させることで達成可能である感触を得た。以上に基づき、令和 6 年度は引き続き現モデルの開発方法を続行し、いっそうの追加学習をさせていく。余力があれば他の環境変異原への試験適用を行う。

## V 結論

- 1) 今後より多くの血液提供ボランティアを募り、レファレンス・データを充実させ、公開していく。
- 2) 深層学習法を基盤としたアルゴリズムにより、3 色 FISH による染色体画像の自動判別が実現可能で、解析速度は画像 1000 枚当たり 1 分未満となった。今後画像データを増やし、より性能の高いアルゴリズムを開発する

表 1 1 番、2 番、4 番染色体 3 色 FISH 法による健常人末梢血リンパ球 1 回目分裂細胞の交換型染色体異常解析

Donor	Cells selected	TL	Dic	Ins	cR	aR	exFrg	Del	Complex	Others	TL Freq	Dic Freq	TL+Dic Freq
48, F*	23826	48	4	4	0	0	11	0	7	0	0.0020	0.0002	0.0022
30, M**	25594	46	15	0	0	0	7	2	0	0	0.0018	0.0006	0.0024
40, F	7738	20	2	0	0	0	5	0	5	0	0.0026	0.0003	0.0028
40, F	4666	10	2	1	1	1	8	0	0	0	0.0021	0.0004	0.0026
71, M	12663	31	6	1	1	0	15	0	0	0	0.0024	0.0005	0.0029
20, F	分析中												
20, F	分析中												
22, M	分析中												
23, M	分析中												
28, M	2497	8	1	0	0	0	3	0	0	0	0.0032	0.0004	0.0036
34, M	2499	10	5	0	0	0	3	0	0	0	0.0040	0.0020	0.0060
46, M	1906	6	1	0	0	0	2	0	0	0	0.0031	0.0005	0.0037
47, M	2481	6	1	0	0	0	1	0	0	0	0.0024	0.0004	0.0028
58, M	2623	11	0	1	1	0	1	0	0	0	0.0042	0.0000	0.0042

Donor (被検者) 情報として年齢 (数字)、性別 (M: 男性、F: 女性) を示した。

Cells selected: 全観察細胞中データ採択された 1 回目分裂の細胞数、TL: 転座、Dic: 二動原体、Ins: 挿入、cR: セントリックリング、aR: アセントリックリング、exFrg: 過剰断片、Del: 欠失、Complex: 複雑な異常、Freq: 頻度。橙色: 職業被ばく無しの健常人、緑色: 対照群 (放射線業務従事者)。

\*過去に取得した詳細な QST レファレンス・データ (引用文献 2)。\*\*本研究、令和 4 年度報告。

## 引用文献

1. 国際標準化機構. ISO 20046, Radiological protection – Performance criteria for laboratories using Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) translocation assay for assessment of exposure to ionizing radiation, 2019.
2. Suto Y, Akiyama M, et al., Construction of a cytogenetic dose-response curve for low-dose range gamma-irradiation in human peripheral blood lymphocytes using three-color FISH, *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 794: 32-38, 2015
3. 原子力規制庁令和3年度放射線安全規制研究戦略的推進事業費「染色体線量評価のためのAI自動画像判定アルゴリズム（基本モデル）の開発」（研究代表者 数藤由美子），年度末報告書, 2022.
4. Ishii K, Akiyama M, Kamimoto K, Kawai H, Suto Y, Application of automated scoring system of dicentric chromosome for biodosimetry, *Cytologia* 88(4): 281-282, 2023.
5. Akiyama M, Tominaga T, Takashima Y, Ishii K, Suto Y, Assessing the applicability of a modified replication banding protocol for the analysis of radiation-induced chromosomal aberrations in cultured human lymphocytes. *Cytologia* 89(1): 39-46, 2024.
6. Suto Y et al., Biodosimetry of restoration workers for Tokyo Electric Power Company (TEPCO) Fukushima Daiichi Nuclear Power Station accident, *Health Physics* 105(4): 366-373, 2013.
7. Suto Y, Review of cytogenetic analysis of restoration workers for Fukushima Daiichi nuclear power station accident, *Radiat Protect Dos* 171(1): 61-63, 2016.