

放射線の健康影響に係る研究調査事業 令和 4 年度～令和 6 年度実施総括報告書

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
研究期間	令和 4 年度～令和 6 年度（3 年間）

	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		

1. 研究の概要

染色体ごとに異なる蛍光標識をした染色体ペインティングプローブを用いる FISH 法により、2 個以上の染色体間で生じた交換型染色体異常が検出される。放射線によって生じる染色体異常の生成頻度と線量から検量線を作成し、被ばく患者の末梢血リンパ球の染色体異常頻度から線量評価が可能である。また、被ばく影響の調査で迅速な染色体異常スクリーニングや長期フォローアップでのモニタリングに有用である。

低線量被ばくの線量評価や人体影響研究を行う上で必要な観察細胞数は 1 検体当たり 1000～5000 個とされている。従来の報告は染色体分析精度が現在より低く、加齢とともに上昇することを示している年齢別染色体異常頻度や補正計算方法は、2008 年に公開されたものが利用されている。今後低線量被ばくの研究や検査を遂行するには、精度の高い基本データの存在と染色体判定の標準化、迅速化が重要な鍵となる。

本研究では、高精度 3 色 FISH 法を用いて、健常人 15 名（非喫煙・非職業被ばく、19～71 歳）の末梢血リンパ球染色体解析を行い、高品質な染色体異常バックグラウンドレファレンスデータを作成した。これにより、加齢による染色体異常増加は必ずしも年齢（物理的年数）と相関せず、今後の個体差要因研究が俟たれることを示した。

また、低線量被ばくにおいて膨大な画像枚数となる染色体解析を支える手法の開発として、深層学習法を適用した画像判定技術を導入し、ヒト末梢血リンパ球における交換型染色体異常の FISH 画像自動判定の基本モデルを開発した。基本モデルでは判定の再現性 100%、画像 1000 枚当たりの分析速度 4.5 分で（熟練検査者で 15 時間以上を要する）、染色体検出ほぼ 100%、正常染色体の判別は 97%以上と良好な成果を得ている。各種染色体異常の分類性能は現状目標値 85%未満で、今後追加学習や 2 段階モデルの導入などを試みていく。

2. 研究期間内に実施した内容

年目／実施年度	実施した内容
1 年目	3 か年を通じて血液試料はインフォームドコンセントが得られた被検者から採取し、プロトコールに従って利用した（研究倫理承認済みプロトコール 08-016、
令和 4 年度	

	17-018、18-023：量子科学技術研究開発機構）。 【調査研究 1】染色体異常バックグラウンドレファレンスデータ作成 健康人ボランティア 1 名（30 歳、男性）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^{1),2)} を行った。細胞分裂回数の確認のため、ブロモデオキシウリジン添加による FPG 法を応用した^{1),2)}。自動画像スキャニング顕微鏡システム Metafer 4（Zeiss/Metasystems 社）を用いて画像データを取得し、ソフトウェア MetaClient・ISIS（Zeiss/Metasystems 社）を用い、熟練観察者による目視観察を行い、25,594 メタフェーズ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 1 名（48 歳、女性）の末梢血試料由来の⁶⁰Co-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^{1),2)} により、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。人工知能技術（深層学習法等）を導入。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）³⁾ において開発した QST モデルをもとに、教師データ画像 505 枚（染色体 23,006 個）を用いて自動染色体画像判別モデルのプロトタイプを開発した。
2 年目	【調査研究 1】染色体異常バックグラウンドレファレンスデータ作成 研究外部評価委員のコメントにしたがい、当初計画（1～2 名）より多い、健康人ボランティア 7 名（非喫煙者 20～71 歳）の末梢血試料を得て、リンパ球細胞 48 時間培養を行って染色体標本作製し、3 色 FISH^{1),2)} を行った。細胞分裂回数の確認のため、FPG 法を応用した^{1),2)}。自動画像スキャニング顕微鏡システム Metafer 4 を用いて画像データを取得し、ソフトウェア MetaClient・ISIS を用い、熟練観察者による目視観察を行い、最大 12,663 メタフェーズ／検体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。同じ手法により、 翌年度研究の準備として、長期凍結保存標本の FISH 法を確立した。 【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 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。 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）。 Web ベースのアプリケーションを試作した。
3 年目	【調査研究 1】染色体異常バックグラウンドレファレンスデータ作成 研究外部評価委員のコメントにしたがい、当初計画（1 名）より多い、健康人ボランティア 6 名（非喫煙）の末梢血試料を得た。前年度の若年層分析に基づき、対象を 19～20 歳に絞った。リンパ球 48 時間培養を行って染色体標本作製し、
令和 5 年度	
令和 6 年度	

	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^{1),2)} を行った。細胞分裂回数の確認のため、FPG 法を応用した²⁾。熟練観察者による目視観察を行い、染色体異常解析を行った。一部の末梢血につき、⁶⁰Co-ガンマ線照射 (線量率 0.4 Gy/min, 1.0 Gy, 2.0 Gy) を行い²⁾、被ばくによる細胞周期遅延の有無を確認した。 長期内部被ばく症例 4 名 (造影剤インジェクション後 35~42 年目に検体採取、50 年凍結保存標本) で M-FISH 解析と 3 色 FISH 解析を行い、1,2,4 番染色体異常検出データ比較および遡及的線量評価を試みた。 研究期間 3 か年で得た染色体異常および細胞分裂回数のデータと過去データ (48 歳、1 名)²⁾ を併せて比較解析した。一般健常人における加齢・喫煙効果、放射線作業従事者との比較を試みた。 【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 令和 6 年度は実験的照射血ではなく、実際の被ばく症例の検体 (調査研究 1 参照) で性能テストを行った。
--	--

3. 研究終了時に得られた結果・結論

① 研究結果・結論 (総括)・成果など

【調査研究 1】 染色体異常バックグラウンドレファレンスデータ作成

最大 25,594 メタフェーズ/検体の高精度 3 色 FISH 解析データを、健常人 14 名 (19~71 歳、男女各 7 名)、内部被ばく患者 4 名 (採血時 59~64 歳、²³²Th 内部被ばく 35~42 年、45~47 年間凍結保存標本) から得た。内部被ばく患者からは M-FISH (24 色 FISH) データも得た。分析では我々が過去に取得した FISH データ (48 歳、女性 1 名)²⁾、未公開データ (放射線作業従事者 5 名の FISH データ、健常人 72 名の細胞動態データ) を参考値として利用した。

1) 3 色 FISH 解析の 1,2,4 番染色体異常検出力

染色体異常の理論的検出率 39%²⁾ に対して実測値は 42.6%とやや高かった。M-FISH より切断点が明瞭に検出された。3 色 FISH は高速スクリーニングに有用であると言える。

2) 細胞動態解析

0, 1.0, 2.0 Gy 照射血で細胞周期の遅延は見られなかった。

若年層に 2 回目分裂以上の細胞が比較的高頻度で観察される個体があった (図 1)。若年層の追加調査や個体差の要因解明が俟たれる。(報告書 3③参照)

3) 高精度な染色体異常頻度バックグラウンドデータ取得

文献 2 のデータを加えた 15 名のデータ分析で、有意な性差は見られなかった。自然発生が加齢により増大するとされる染色体転座に関し、従来の報告^{1,4)} (参考図) と異なり、加齢効果が見出されなかった (図 2)。遡及的線量評価や長期フォローアップ調査にあたり、被検者の染色体異常頻度から年齢別ベースライン平均値を差し引くより、個体差の最大幅を考慮して安全管理を行うことが現実的である。

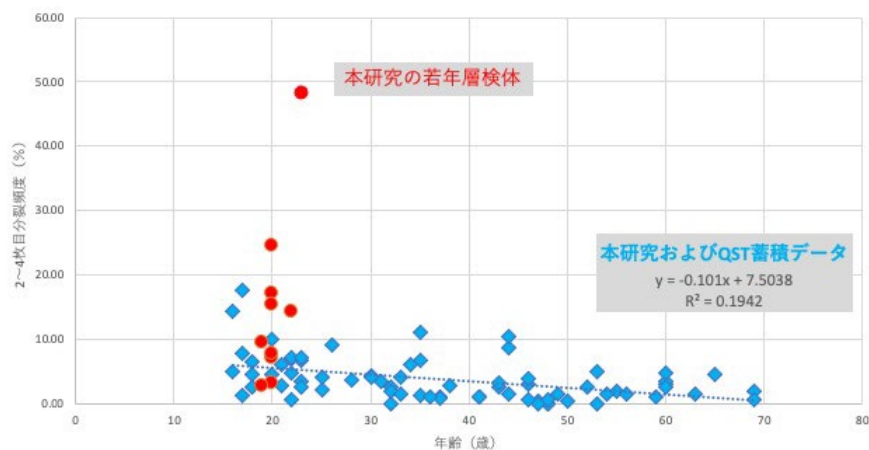


図1. 2～4回目分裂細胞の頻度と年齢の関係 [unpublished data を含む]

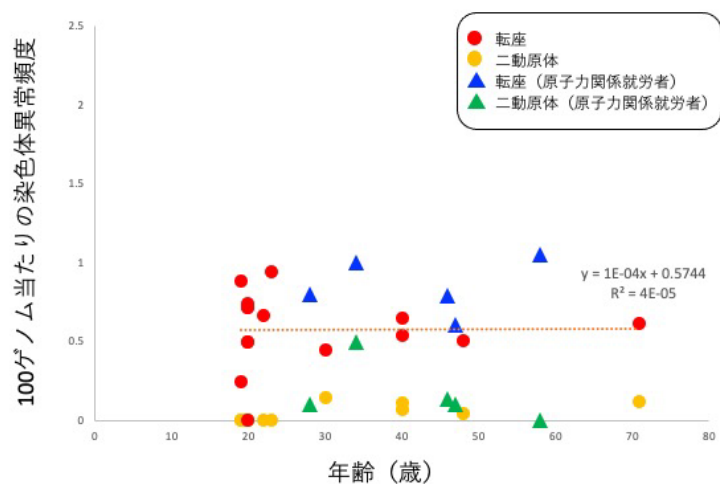
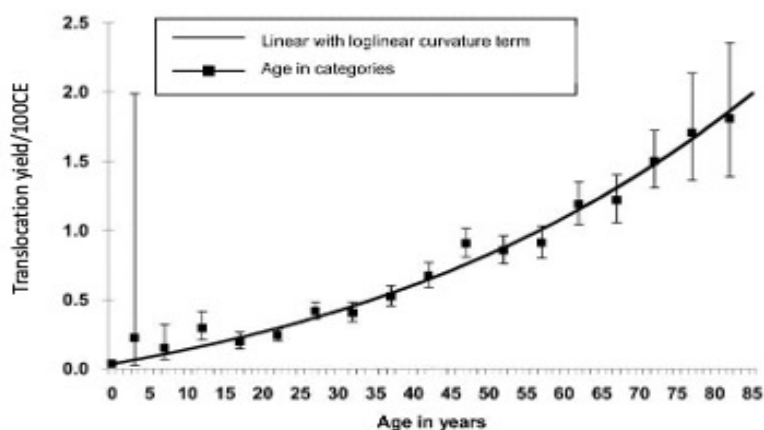


図2. 健常人（非喫煙・非放射線作業従事者）の年齢と染色体異常頻度の関係



参考図. 年齢と染色体転座頻度の関係

引用文献4より（改編）。図2の転座（赤丸）と比較可能。

$$\text{Translocation Rate (age)} = 100 \times [\exp(-7.925) + \exp(-9.284) \times (\text{age} \times \exp 0.01062 \times \text{age})]$$

【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

緊急時線量評価のために開発した二動原体検出用の基本モデル4)をもとに、交換型染色体異常の自動判別モデルの開発を進めた。その結果、分析の再現性%、速度は画像枚当たり.分、染色体の検出はほぼ%という好成績を得た(図3)。染色体異常の分類の性能については、正常染色体で~%と好成績を得た。実際の患者検体(内部被ばく)での試用でも、正常染色体の検出率は同率であった。転座や二動原体では%を超えない状況に留まっている。AIの挙動の可視化試験から、染色体の物体検出方法として現行法は適していることを確認した。放射線被ばくによる染色体異常の特徴として、生成頻度が低いこと、ランダムにゲノムを切断することから、用意した学習用画像データの%以上が正常染色体で、学習に偏りがある。最新情報に基づき、分類段階で別のアルゴリズムを導入することと発想の転換を検討して本研究を終了した。

ユーザーフレンドリーなベースのアプリケーションを試作した。

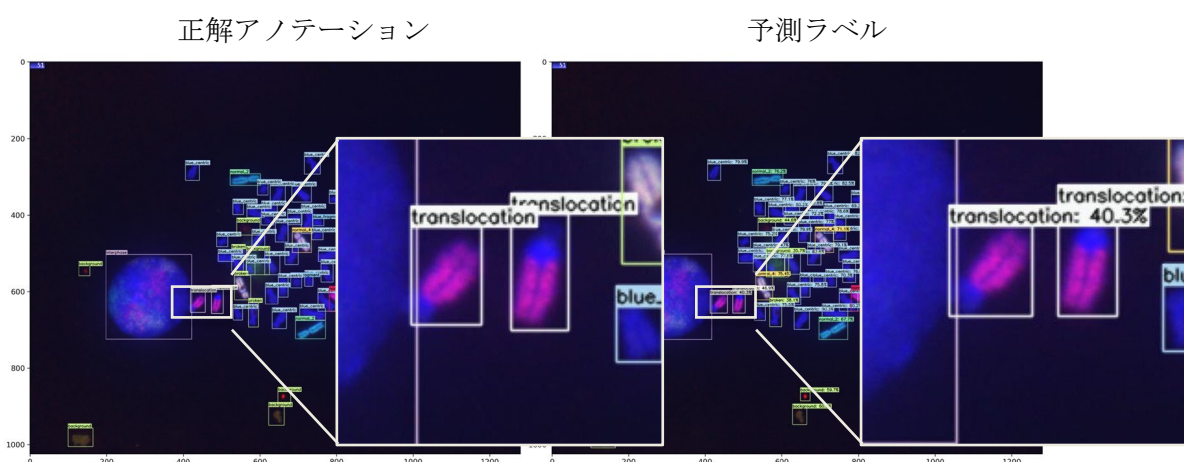


図3. 正解ラベルとモデルによる予測ラベルの比較例

染色体異常の分類は確度で表される。

② 計画・目標通り実施できなかった事項とその理由

アルゴリズム開発では、緊急時トリージ線量評価のための二動原体分析用に開発したモデルをもとに行った。しなしながら、二動原体の検出(-による動原体領域の染め分け。染色体上の動原体蛍光スポットを検出)と異なり、本研究対象(各染色体特異的ペイントプローブによる染め分け)では、パターンの種類が多く、学習データを増やすだけでは性能が大きくは上がらない可能性が見えてきた。放射線被ばくによる染色体異常をもつメタフェーズでは、一般に染色体異常の生成頻度は低く、染色体の切断と誤った修復は細胞ごとにゲノム上の位置が異なるため、深層学習のためのデータに大きな偏りが生じる(%以上が正常染色体。正常パターンのみ過剰学習となる)。今後、染色体の検出と染色体異常の分類で別々のアルゴリズムを導入することを検討する必要性が生じた。緊急時トリージ線量評価のための二動原体分析用のモデル開発は比較的容易で成功したが、染色体ペイントでは考え方を転換すべく検討した。残念ながら昨年度月以降(年月現在でも依然)、のリモートアクセスシステムが不正アクセス障害によって停止され、外部協力機関との間のアクセス(データやアルゴリズムの授受、試験運用)が不可能な状態が続いている。本研究事業は終了したものの、令和年度からは、昨

年度後半以降にみられる新たな手法を導入し、開発を続ける。

③ 当初の計画で予定した成果以外（以上）に得られた事項

（１）染色体異常バックグラウンドレファレンスデータ

- 当初計画（４名）を上回るデータ取得（１４名）を果たした。
- 累積線量や他の変異原の影響として年齢差より個体差の方が大きい可能性がある。遡及的線量評価や長期フォローアップ調査にあたり、被検者の染色体異常頻度から年齢別バックグラウンド平均値を差し引くより、個体差の最大幅を考慮して安全管理を行うことが現実的である。今後、より大規模な健常人および放射線作業従事者の調査でのデータ蓄積が必要である。一部の検体（４名）に関しては 5000 メタフェーズ以上（最大 25,594 メタフェーズ）のデータを取得し、2.0 Gy 以下の検量線も作成した（論文化予定）。本研究で内部被ばく症例に関して累積線量推定²⁾を試みたものの、まだ不確定要素が多い。過去の被ばく事故や累積線量の遡及的線量評価には、今後、喫煙他様々な因子を含めた各集団データ収集が必須である。本研究データはその礎となる。
- これまで高精度で研究されていなかった 19～23 歳、10 名のデータを解析できたことで、細胞分裂の個体差が観察され、放射線被ばくの患者・住民調査における多検体細胞培養法の課題が明らかになった。

（２）細胞動態解析

- 0, 1.0, 2.0 Gy 照射血で、細胞分裂回数ごとの細胞頻度に変化はなく、細胞周期の遅延も見られなかった。
- 本研究で、若年層に 2 回目分裂以上の細胞が比較的高頻度で観察される個体を見出した（図 1）。頻度 10%以下であれば 2.0 Gy 以上の被ばく事故における線量の過小評価（患者の見逃し）は理論計算上起きないため、FPG 法による細胞分裂回数検出をしないラボは多い。従来の研究報告では検体取得にバイアスがかかっていた可能性がある（血液提供者の年齢層＝ラボの学生・研究者への偏り）（図 1、25 歳以上）。若年層の追加調査や個体差の原因解明が俟たれるが、実践的には、1 回目分裂細胞のみとらえる、より簡便な培養法の開発を行うのが有効である。
- 1 回の分裂で二動原体は半減し、転座は減少しない安定型染色体異常と考えられてきた。本研究で、2.0 Gy 照射血 48 時間培養の分析（20 歳、1 名）から、1 回の分裂で二動原体染色体は半減、転座染色体もやや減少することが示唆された（図）。転座をもつ細胞の一部は二動原体などの不安定型染色体異常ももつため、転座をもつ細胞が 100%維持されるわけではないと考えられる。今後は、長期フォローアップ被ばく者検体を用いて、同様の追跡調査を行う予定である。

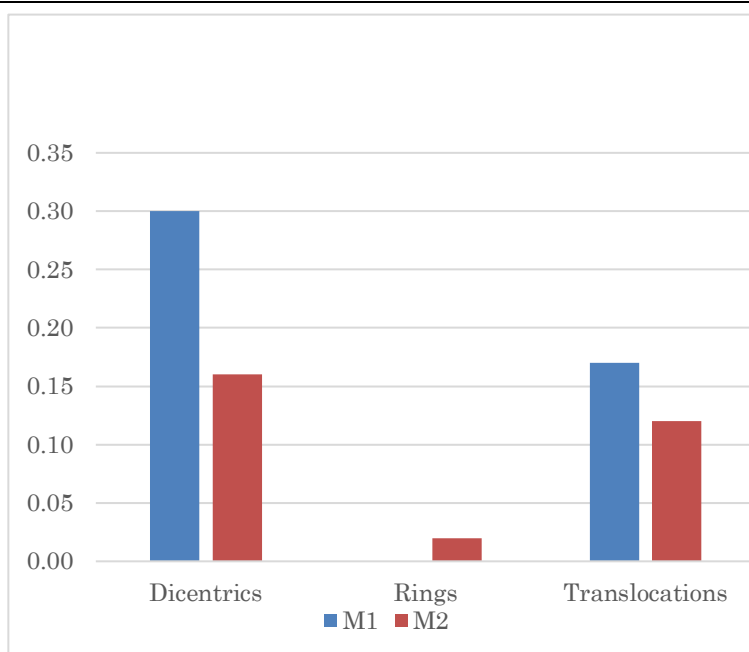


図2. 1回目分裂(M1)細胞と2回目分裂細胞(M2)における染色体異常頻度

末梢血（20歳1名）に2.0 Gy ガンマ線照射後48時間培養した。

4. 研究成果の活用方策の提案

本研究をさらに発展させる新たな研究や事業化の提案

（1）細胞培養法の開発

本研究で見出されたように、若年層の追加調査や個体差の原因解明が俟たれるが、実践的には、1回目分裂細胞のみとらえる、より簡便な培養法の開発を行うのが有効である。FPG法はISO標準プロトコールで推奨されているにも関わらず、国内外の（QST以外の）線量評価担当機関で実施されないで居る。ひとつには手法に技術力を要するためである。細胞培養後に回収して得たメタフェーズが100%1回目分裂であり、かつ多検体対応でコンタミネーションを起こさないような簡便な培養法の確率を今後行うことは、放射線被ばくの住民・作業員調査、長期追跡調査に有用である。

（2）アルゴリズム開発の継続

現在、ISO TC85 SC2のWG18では、染色体画像判定の自動化に関して調査を進めているところである⁵⁾。緊急時トリアージ線量評価のための二動原体分析および小核分析のためのアルゴリズムは諸機関で開発競争が進められているが、現状、色や-のアルゴリズム解析の報告は見られない。本研究では基本モデルの開発に留まったが、今後いっそうの性能向上を進め、標準プロトコールでの引用（推奨）や特許取得を目指す。さらに、利用者に使いやすいアプリケーション開発も有用である。この手法は、染色体ペイントプローブを交換することで、放射線被ばくだけでなく様々な染色体異常を伴う疾患の臨床染色体検査に適用できる。

（3）バックグラウンドデータの更新と公開

本研究で得られたレファレンスデータや実験解析法をもとに、今後も様々な染色体異常頻度に影響する因子を考慮した集団染色体調査（特に若年層の調査と、各種の放射線作業従事者や医療被ばくといった計画された被ばくの対象者）を行い公開していく。

（４）様々な対象の調査への適用

３色 FISH 法および本研究で得られたバックグラウンドレファレンスデーは、医療上の事故被ばく・計画被ばく、多用な被ばく・曝露を受ける宇宙飛行士や自衛隊員のフォローアップ、放射線以外の変異原（有機フッ素化合物、排気ガス、薬物など）の定性的・定量的調査に利用できる。また、現在厚労省により進められている東電原発事故緊急時作業員 2 万人の遡及的線量評価および長期フォローアップのスクリーニングにも活用できる。

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) Sigurdson AJ, et al., International study of factors affecting human chromosome translocations, *Mutat Res.* 652(2):112-121, 2008.
- 5) Wilkins R et al. (Suto Y 含む), Activities of ISO Working Group 18: Biological and Physical Retrospective Dosimetry, *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, 2025, in press.