

# 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

(受託者) 国立大学法人広島大学

(研究代表者) 田代 聡 原爆放射線医科学研究所 教授

(研究期間) 平成 27 年度～29 年度

## 1. 研究の背景とねらい

2011 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。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)。一方、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。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) 高線量被ばく検体用に我々が開発した新しい染色体解析法である PNA-FISH 法を基盤技術とした、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) 臨床検体を用いて、低線量放射線被ばく影響検出における同システムの有用性の検証、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、誤って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) (IAEA, 2011)。しかし、高線量被ばく症例のギムザ染色標本で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必要とし、また熟練した技師でも時間と労力を要するため、多数の検体を短時間で処理することは困難である。こうした欠点を補うために、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 2) (Shi et al. *Radiat Res* 2012)。この手法により、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。

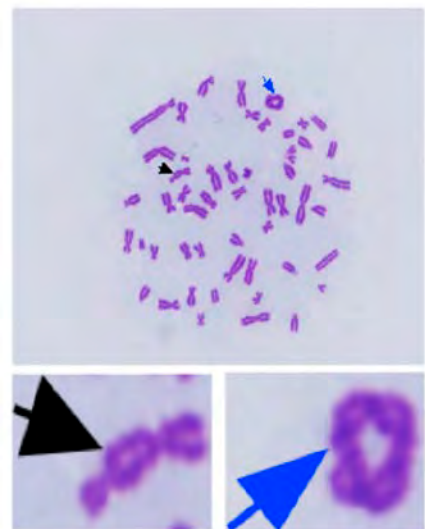


図 1 ギムザ染色による二動原体染色体 (黒矢印) と環状染色体 (青矢印) の検出

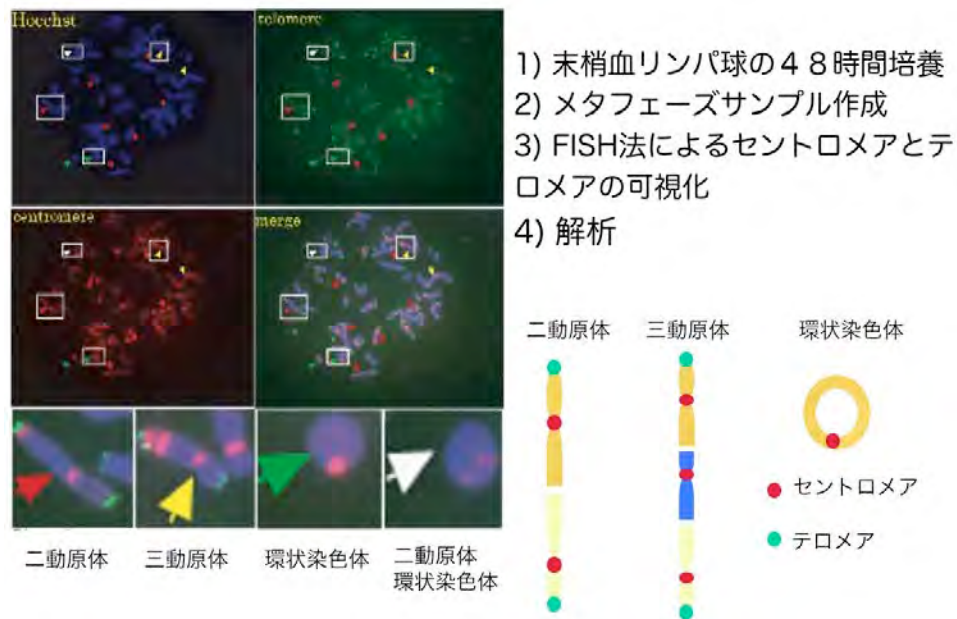


図2 PNA-FISH 法による二動原体染色体・環状染色体の検出

本研究では、PNA-FISH 法で蛍光標識されたサンプルの画像取得と画像解析の自動化により、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。そのために、染色体画像解析の効率化を図る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ものの、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、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り、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. これまでの研究成果

本研究の主要業務は、次の 3 研究項目から構成されている（図 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

2. 蛍光顕微鏡が不要な化学色素標識 PNA プローブの開発

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

図3 主要業務実施計画

## 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く、1細胞あたり数本の染色体のみが解析可能であった。そこでまず染色体の重なり合いを少なくするために、自動解析に適した染色体標本作製する条件について染色体メタフェーズ標本作製装置で検討した。その結果、1細胞あたり5~6カ所あった染色体の重なり合いを、1細胞あたり2カ所にまで減少させることができた。(図4)

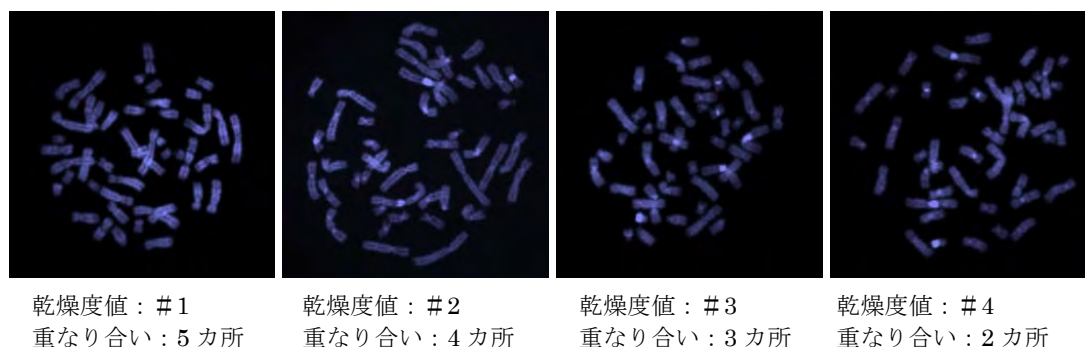


図4 染色体メタフェーズ標本作製装置で作製した染色体標本

また、この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。

現在、前述の染色体自動解析ソフトウェアとは異なる原理に基づいてFISH画像から染色体異常の有無の判定をするソフトウェアの開発を進めている。

## 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ている(図5)。

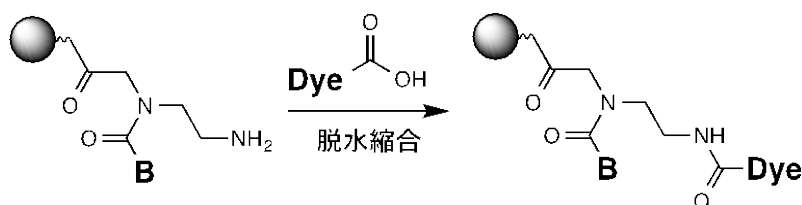


図5 化学色素とPNAプローブの化学反応式

赤色色素としてメチルレッド、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などを用いてPNAプローブを標識し、セントロメア、テロメアの検出の検討を進めている。

### **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**

実際の臨床検体の染色体解析における自動解析システムの有用性を検討するために、臨床検体の収集を進めている。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 10 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するための準備を開始した。これらの肺がん症例の検体とともに、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ている。

### **3. 今後の展望**

#### **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**

現在、染色体標本の染色体の重なり合いを 1 カ所以下にし、染色体の重なりがほぼ無い染色体標本作製技術の開発に取り組んでいる。染色体の全自動解析ソフトウェアの開発も引き続き進める。

#### **2) 蛍光顕微鏡が不要な化学色素標識 PNA-プローブの開発**

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 プローブの開発を効率的に進めるため、色素を付加させやすい化学修飾構造を設計し合成する。さらに、ビオチンなどで標識し、色素による染色強度を増強することができる PNA プローブを開発し、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**

広島大学病院腫瘍外科を受診する肺がん症例約 20 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する。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る。

### **4. 参考文献**

- (1) Pearce MS., 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., et al., “A modified system for analyzing ionizing radiation-induced chromosome abnormalities, Radiat Res. 2012, 177(5), 533-538