

高度専門染色体分析研修

標準テキスト

Ver.202203

講義の内容

1) 国際標準化機構 (ISO) の活動

- 標準プロトコール
- 議論中の課題
- 2022年からの課題
- 新名称

2) 生物学的線量評価のソフトウェア

3) Cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay

(注) 本日の講義内容では主として線エネルギー付与が小さい放射線 (Low-LET radiation) 被ばくを取り扱う。

演習の内容

- 1) ギムザ染色法による二動原体分析
- 2) FISH転座分析
- 3) MN分析

染色体検査法①： ギムザ染色法

二動原体染色体法



小核法



(現在ではギムザよりDAPIを用いるラボが多い)

PCC法

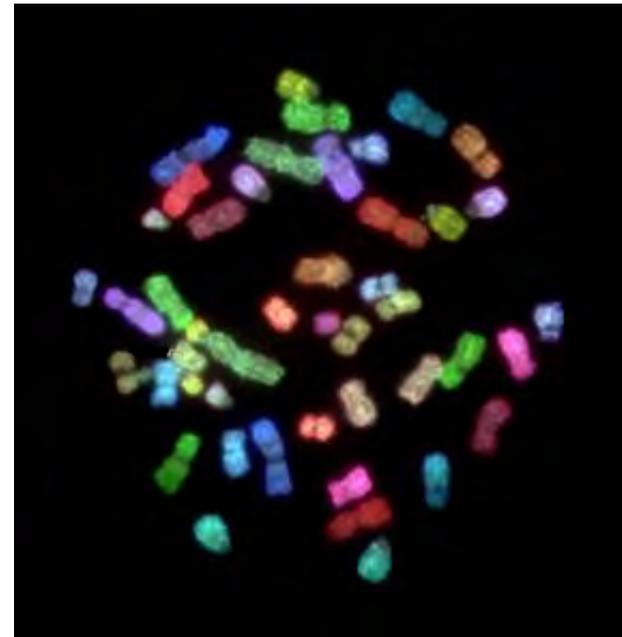
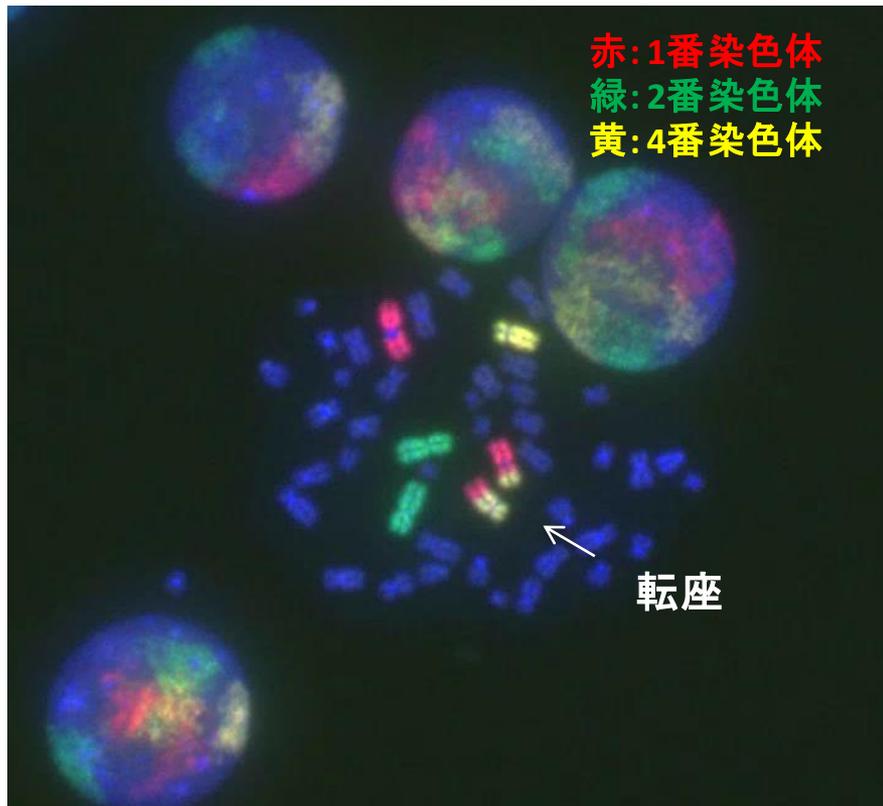


細胞融合による誘導

化学的誘導



染色体検査法②: FISH法



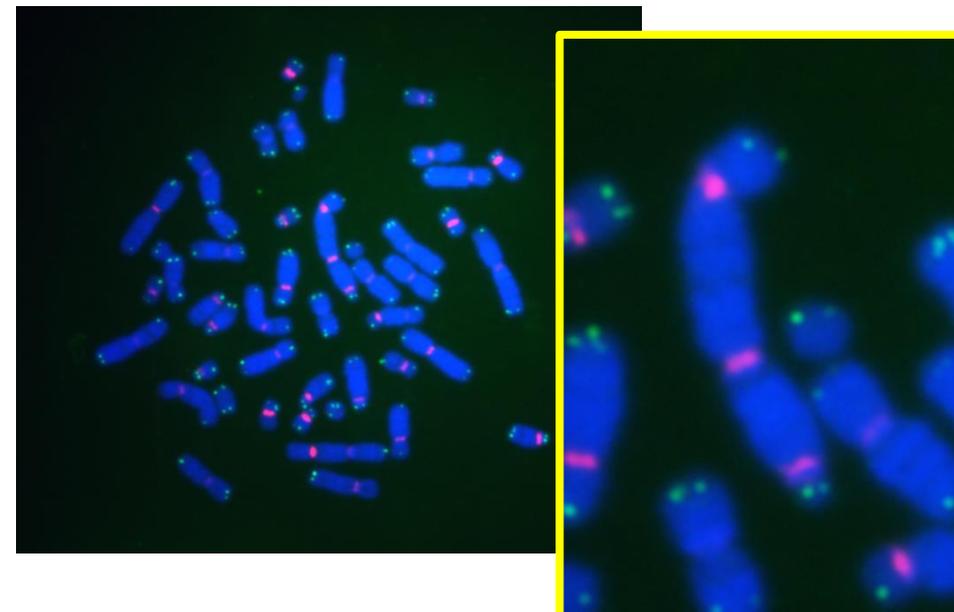
M-FISH法
・核型分析
(長期追跡
調査)

3 color FISH法

- ・二動原体を指標 → 直近の被ばく線量推定
- ・転座を指標 → 過去の被ばく累積線量推定

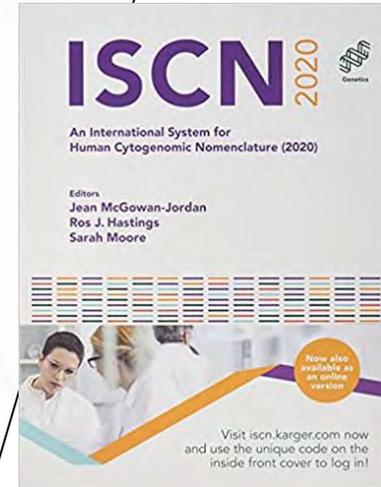
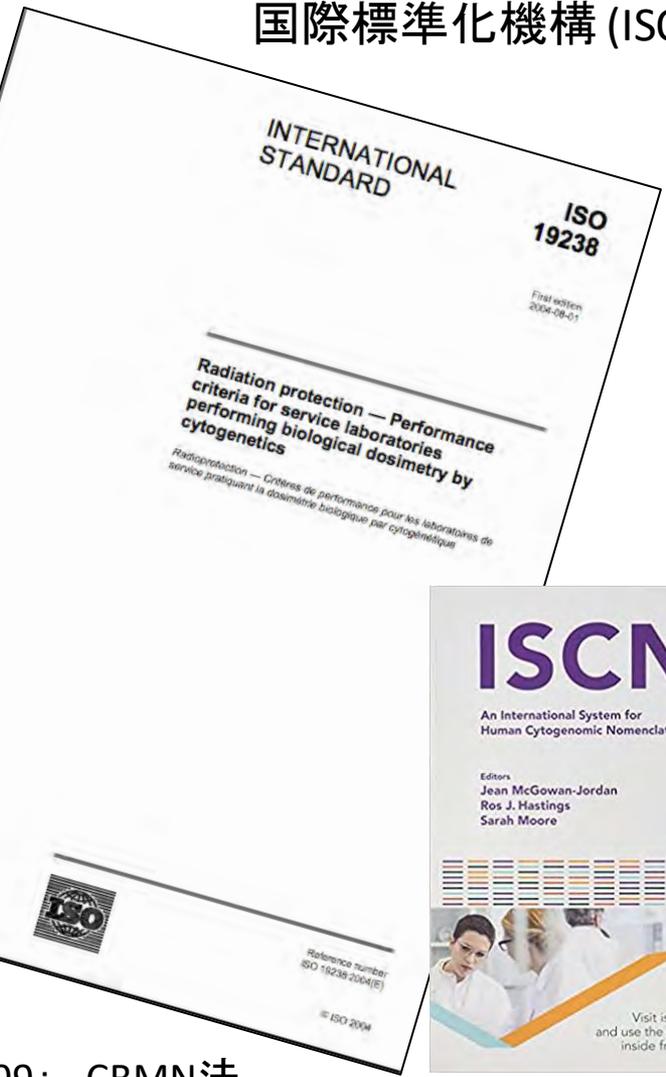
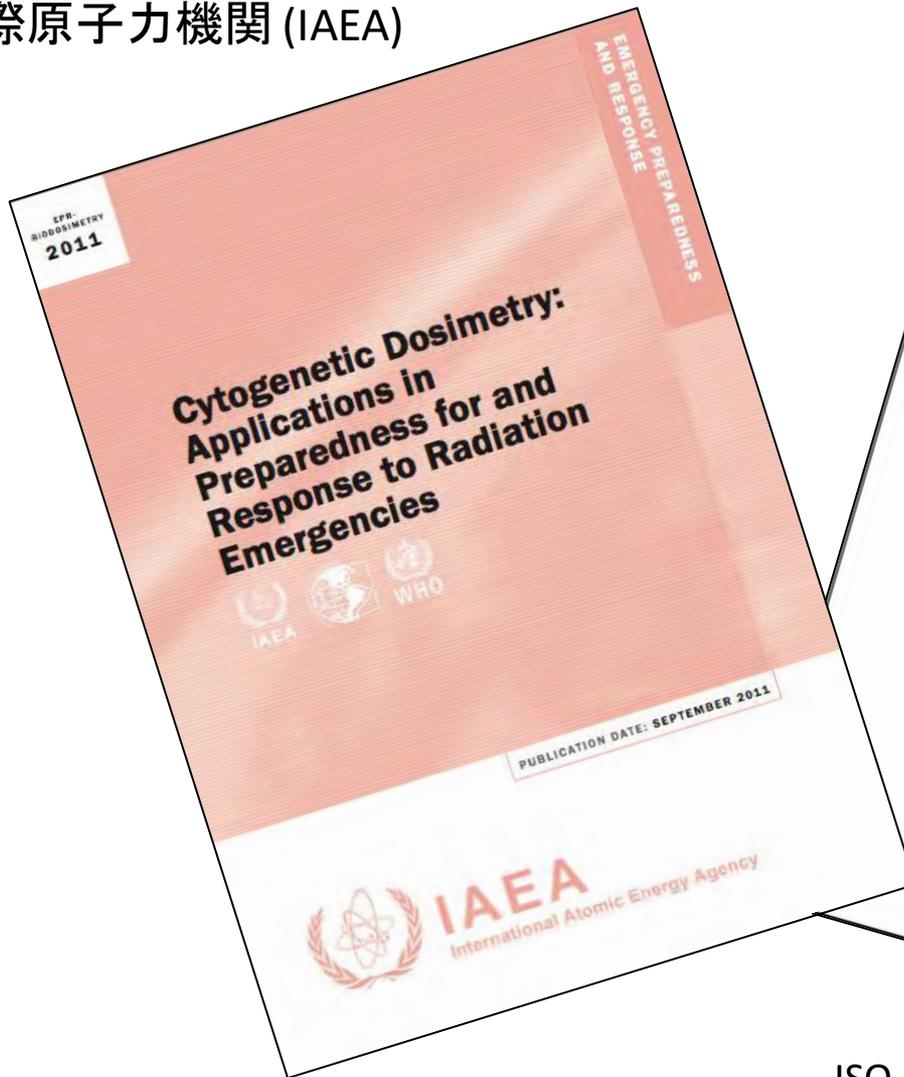
PNA-FISH法

- ・二動原体を指標



国際原子力機関 (IAEA)

国際標準化機構 (ISO)



**染色体分析による線量評価
国際標準プロトコール**

- ISO 17099: CBMN法
- ISO 19238: 二動原体染色体分析
- ISO 21243: 大規模事故における二動原体染色体分析によるトリアージ
- ISO 20046: FISH転座分析による遡及的線量評価

ISO/TC 85/SC 2 (Radiation Protection)

WG-18 → 生物学的線量評価を担当 (cytogenetic dosimetry と EPR の分科会)

2021年10月22日の総会で新名称が承認された:

WG “Biological and physical retrospective dosimetry”

標準手順書の内容

- 1) 目的
- 2) 言葉の定義
- 3) 安全管理
- 4) 検量線作成から分析までの方法 (統計処理を含む)
- 5) 品質管理 (ラボ間比較を含む)
- 6) レポート方法、責任の所在、個人情報管理、データ管理
- 7) レポート、質問票などのサンプルシート
- 8) 参考文献

検量線作成の規定における注意点

1) 正確な照射

→ 校正されトレーサビリティのある電離箱を正しく用いた
実測を含める。保健物理学担当者と組むのがベスト。

2) 線量率 0.3 Gy/min 以上を確保(照射時間30分以内)

3) 1細胞当たりの指標染色体異常数の分布を取る

→ ポアソン分布の確認

4) 必要な線量ポイント数、データ採用細胞数を取る

二動原体分析

- ・ 線量ポイント7個以上(1.0 Gy以下は0 Gyを含む5ポイント以上)。
- ・ 0 Gyでは5000細胞以上スコアリングする。
- ・ 1個の線量ポイント当たり、1.0 Gy以下では3000～5000細胞、1.0 Gy以上では二動原体およそ100個以上検出するまで。
- ・ 検出方法がオートメーションまたはセミオートメーションの場合、1個の線量ポイント当たり5000細胞以上検出する。

FISH転座分析

- 線量ポイント7個以上とる。1.0 Gy以下は0 Gyを含む5ポイント以上。
- 臨床上、主として0.1~3.0 Gyの検査で適用が期待される。
- 1個の線量ポイント当たり、1.0 Gy以下では2000ゲノム相当、1.0 Gy以上では転座およそ500ゲノム相当以上検出するまで。

MN分析

- 線量ポイントは、0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 Gyを含めることが多い。
- 0 Gyは必須。
- 0.5 Gy以下は binucleated cells を 2000 個以上。
- 1個の線量ポイント当たり、0.5 Gy 以上では binucleated cells を 1000 個以上検出するまでスコアリングする。

検量線作成の例 (DCA)

[Y. Suto et al., *Health Physics* 105(4): 366-373, 2013]

Table 2. Dose-response curve data for the dicentric chromosome assay (DCA).

Dose (Gy)	No. of cells	Dicentric equivalent counts ^a	Yield	V/m^b
0	5,000	1	0.0002	1
0.1	5,003	11	0.0022	1.180
0.25	2,606	30	0.0115	0.989
0.5	2,107	68	0.0323	0.968
0.75	1,674	101	0.0603	0.980
1	1,112	102	0.0917	0.968
1.5	720	129	0.1792	0.993
2	415	128	0.3084	0.897
3	277	162	0.5848	0.776
4	117	122	1.0427	0.866
5	245	394	1.6082	0.816

^aThe number of centromeres minus one in a multi-centric chromosome equals dicentric equivalent count.

^bVariance to mean ratio. The p values of goodness of fit test for the Poisson distribution at every dose point where $p > 0.05$, except for 0.1-Gy dose point ($p < 0.05$) at which one cell possessing two dicentrics was unexpectedly observed.

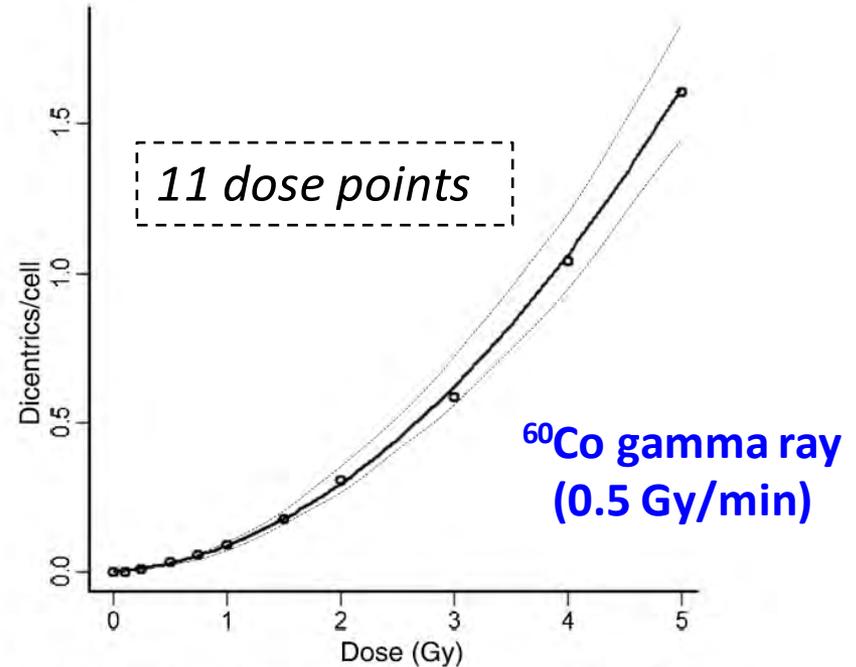


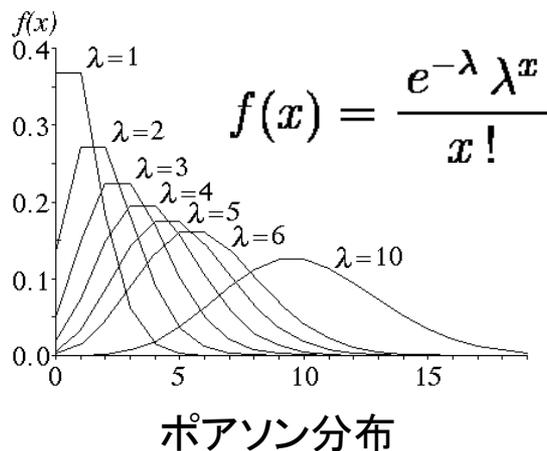
Fig. 1. Dose-response curve for the dicentric chromosome assay (DCA). $Y = (0.00015 \pm 0.00017) + (0.0302 \pm 0.0044) \times D + (0.0588 \pm 0.0028) \times D^2$; Y: dicentric yield, D: dose (Gy); p value of goodness of fit test : $p = 0.73$. Dotted lines denote 95% confidence limits.

Dose-response curve for the dicentric chromosome assay (DCA).

$$Y = (0.00015 \pm 0.00017) + (0.0302 \pm 0.0044) \times D + (0.0588 \pm 0.0028) \times D^2$$

Y: dicentric yield, D: dose (Gy); p value of goodness of fit test : $p = 0.73$.

細胞あたりの染色体異常の頻度はポアソン分布を示す → 局所被ばく線量が推定できる



線量 0 Gy のポアソン分布

被ばくしていない
リンパ球

被ばく
リンパ球

被ばく線量に応じたポアソン分布

- * 局所被ばくの場合、両集団の細胞を観察することになる。
- * 染色体異常の頻度がポアソン分布から逸脱する (Dispersion index または u-value で確認する)。
- * 被ばくした部位の体積 (率) および局所的被ばく線量を計算する。

局所被ばくの実例

Patient #1 (2nd Metaphase Frequency: 4.7%)

Dicentric Chromosome Assay

Aberration data

Dicentrics observed: 19
Cells scored: 1500
Aberrations per cell: 0.0127

Class	No. of cells
0	1482
1	17
2	1
3	0
4	0

Statistics of the observed distribution

Dispersion index: 1.093
u - value: 2.625
Distribution is Poissonian: No

Partial body exposure

Partial body dose [Gy]: 1.1344
Percent of body exposed [%]: 15.23

3-color FISH Assay

Aberration data

Chromosome Exchanges observed: 22
1st Metaphases scored: 1743
Aberrations per cell: 0.0126

Class	No. of cells
0	1722
1	20
2	1
3	0
4	0

Statistics of the observed distribution

Dispersion index: 1.079
u - value: 2.384
Distribution is Poissonian: No

Partial body exposure

Partial body dose [Gy]: 1.0585
Percent of body exposed [%]: 18.06

Cardiac catheterizaion

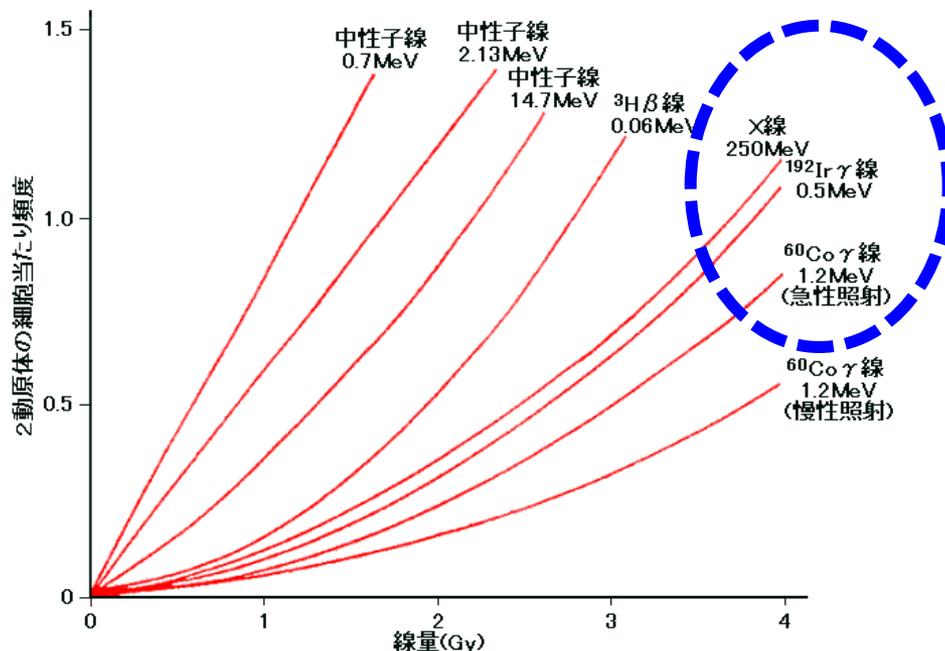
検量線が全部は揃えられていない時

X線 (250 kV peak)

セシウム-137ガンマ線

コバルト-60ガンマ線

イリジウム-192ガンマ線



線質の異なる放射線による二動原体染色体出現頻度

(R. J. Dufrain et al., 1980 を改変)

Low LET . . .

$$\text{aberrations/cell} = aD^2 + bD + c$$

High LET . . .

$$\text{aberrations/cell} = aD + c$$

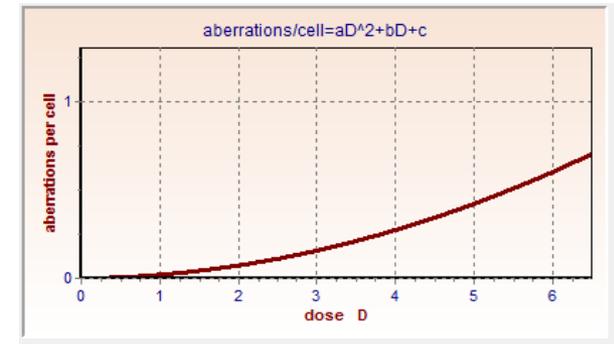
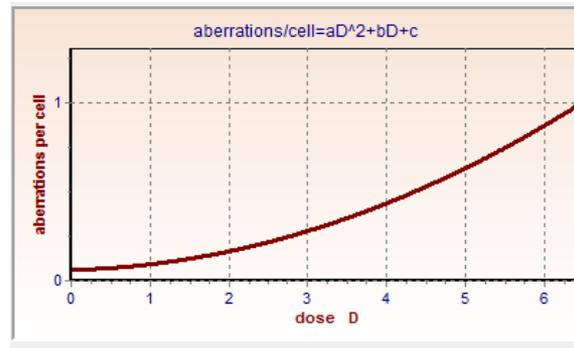
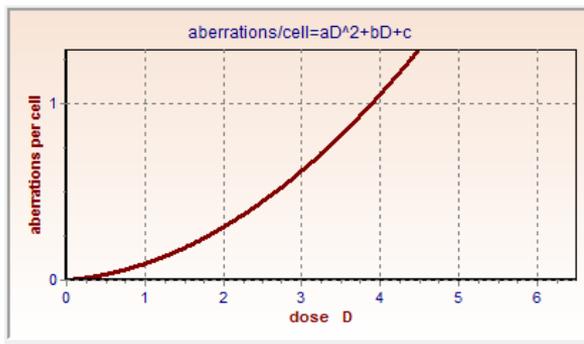
[D: dose (Gy)]

検出の(セミ)オートメーション化



CytoGenetic Scanning System (Zeiss/Meta-Systems)

- Automation of
- 1) image-scanning and detection
 - 2) image-analysis [DCScore]



Dose-response curves of ^{60}Co gamma-ray by

(left) manual scoring

(middle) automated scoring

(right) automated scoring revised by manual scoring

[Y. Suto et al., unpublished data].

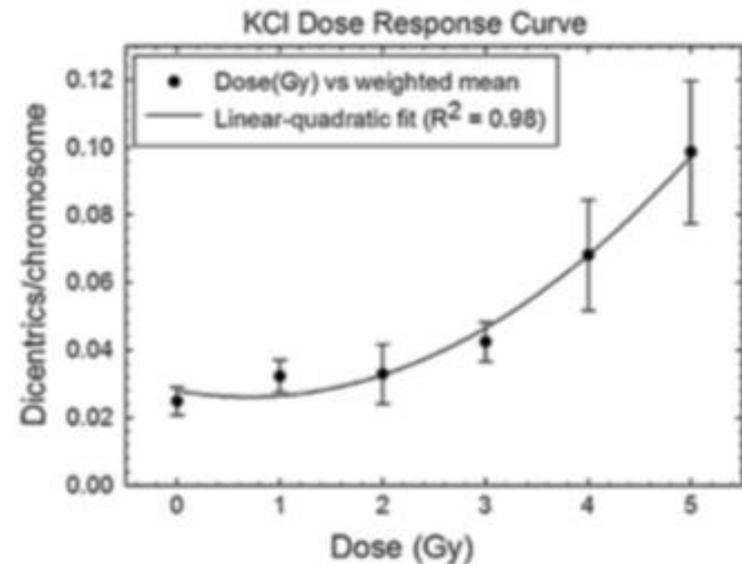
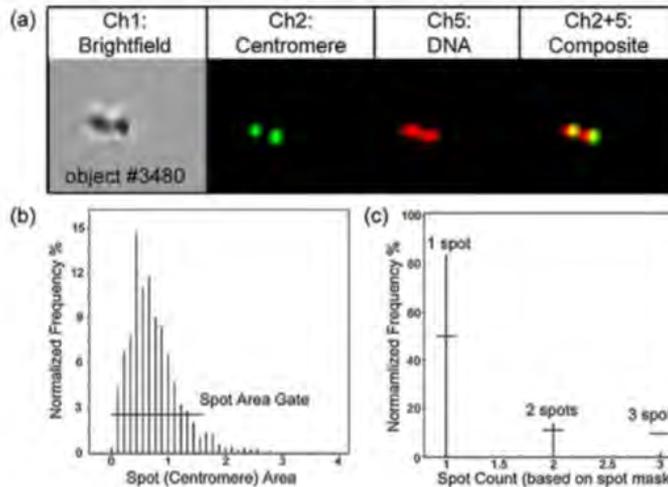
Imaging Flow Cytometry (FCM)

ImageStream^X (IS^X) Mark II (MilliporeSigma)
with Time Delay Integration [see Review by R. C. Wilkins et al., 2017]

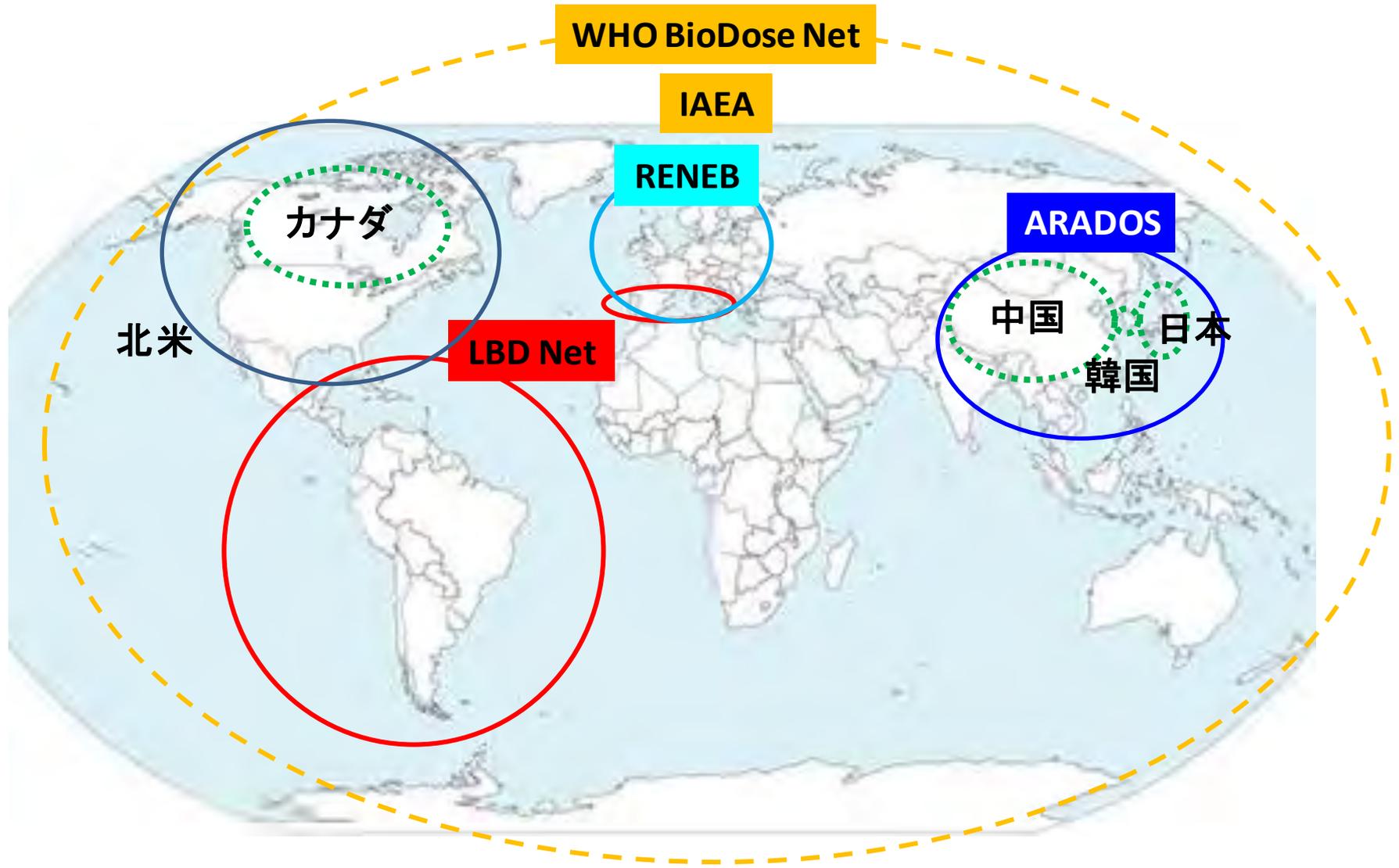


Application to

- Dicentric Chromosome Assay
- CBMN assay
- γ H2AX assay



生物線量評価のネットワーク



ISO の課題

- 5年以内に1回行う改訂作業

完了・発行間近

ISO 19238: 二動原体染色体分析(DCA)

ISO 21243: 大規模事故におけるDCAによるトリアージ

2021年10月から開始

ISO 17099: CBM法 の改訂作業を開始

- 新規課題のpreliminary work が承認された
→ **Automation of biodosimetry techniques**
- WG-18 内での検討課題(次頁へ続く)

WG-18 内での検討課題

1) リンパ球の半減期

2) cryopreservation の適用

Yumiko Suto et al. : Cytogenetic Examination of Human Peripheral Blood Lymphocytes Cryopreserved after Gamma Irradiation: A Pilot Study. *Cytologia* 85(1): 71-77, 2020.

Pilot study - Cryopreservation of PBMCs -

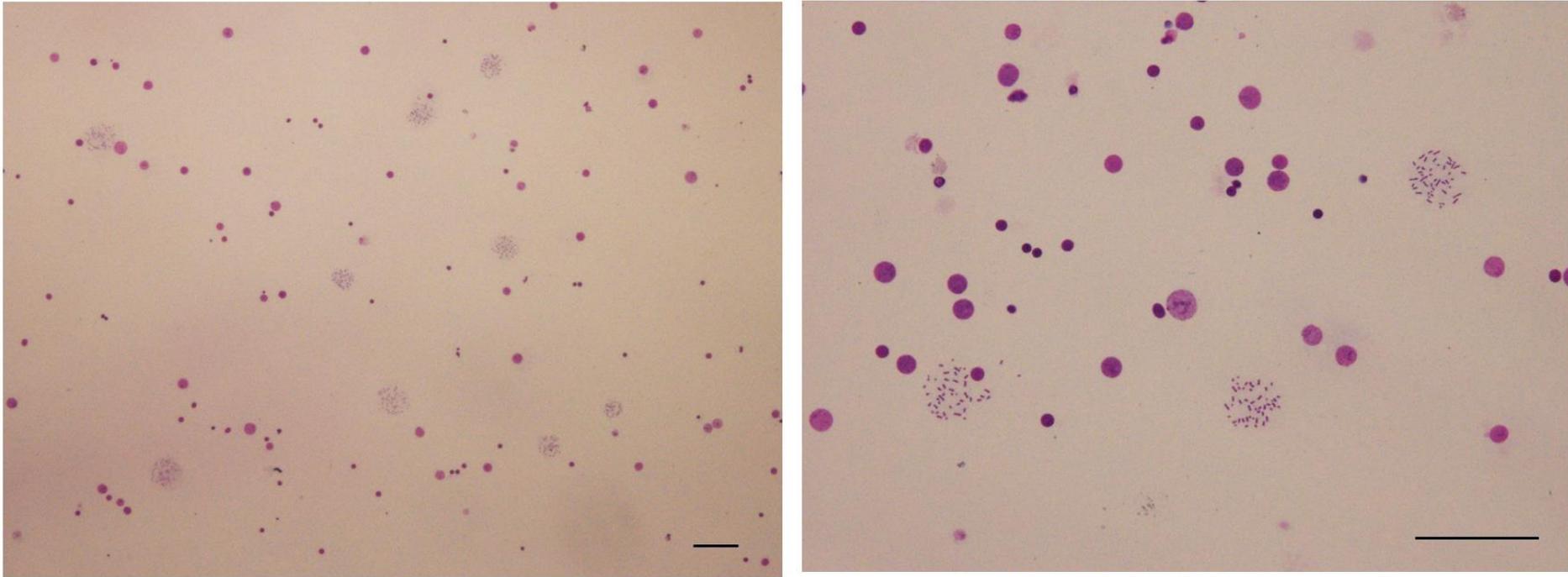
The potential usefulness of lymphocytes cryopreserved for longer than one year was assessed by 3-color FISH.

→ A new strategy of preparedness for triage in mass-casualty radiation incidents/accidents.

Table 1. List of isolated peripheral blood lymphocyte specimens examined in this study. All cryopreserved cells (storage duration: one to 5 years) were successfully cultured and a sufficient number of metaphase cells for the analysis of chromosome damage were obtained.

Lymphocyte culture	Donor	Dose (Gy)	Cryopreservation (Month/Day/Year)	Cell number x10 ⁶	Recovery and culture (Month/Day/Year)	Cell Number x10 ⁶	Storage Duration (Year)
Cryopreserved							
Specimen-1	A	0	5/19/2014	8.0	8/5/2015	1.9	1.2
2	A	2.0	11/18/2014	12.0	6/6/2016	2.8	1.5
3	A	2.0	11/18/2014	16.0	6/6/2016	4.0	1.5
4	A	1.5	10/28/2014	20.0	3/15/2018	4.0	3.4
5	A	1.5	10/28/2014	20.0	9/24/2019	4.5	4.9
6	B	2.0	7/14/2014	9.1	7/21/2015	2.6	1.0
7	B	2.0	7/14/2014	9.1	3/15/2018	1.9	3.7
8	C	0.3	11/17/2014	19.0	3/15/2018	6.4	3.3
Fresh							
Specimen-9	A	2.0	-	9.0	-	-	-

Division activity of human peripheral blood lymphocytes cultured after cryopreservation



Figures 1 (*left*) & 2 (*right*). Microphotographs showing division activity of human peripheral blood lymphocytes cultured after five-year cryopreservation. Scale bar=100 μm .

3-color FISH analysis of PBMCs cultured after cryopreservation

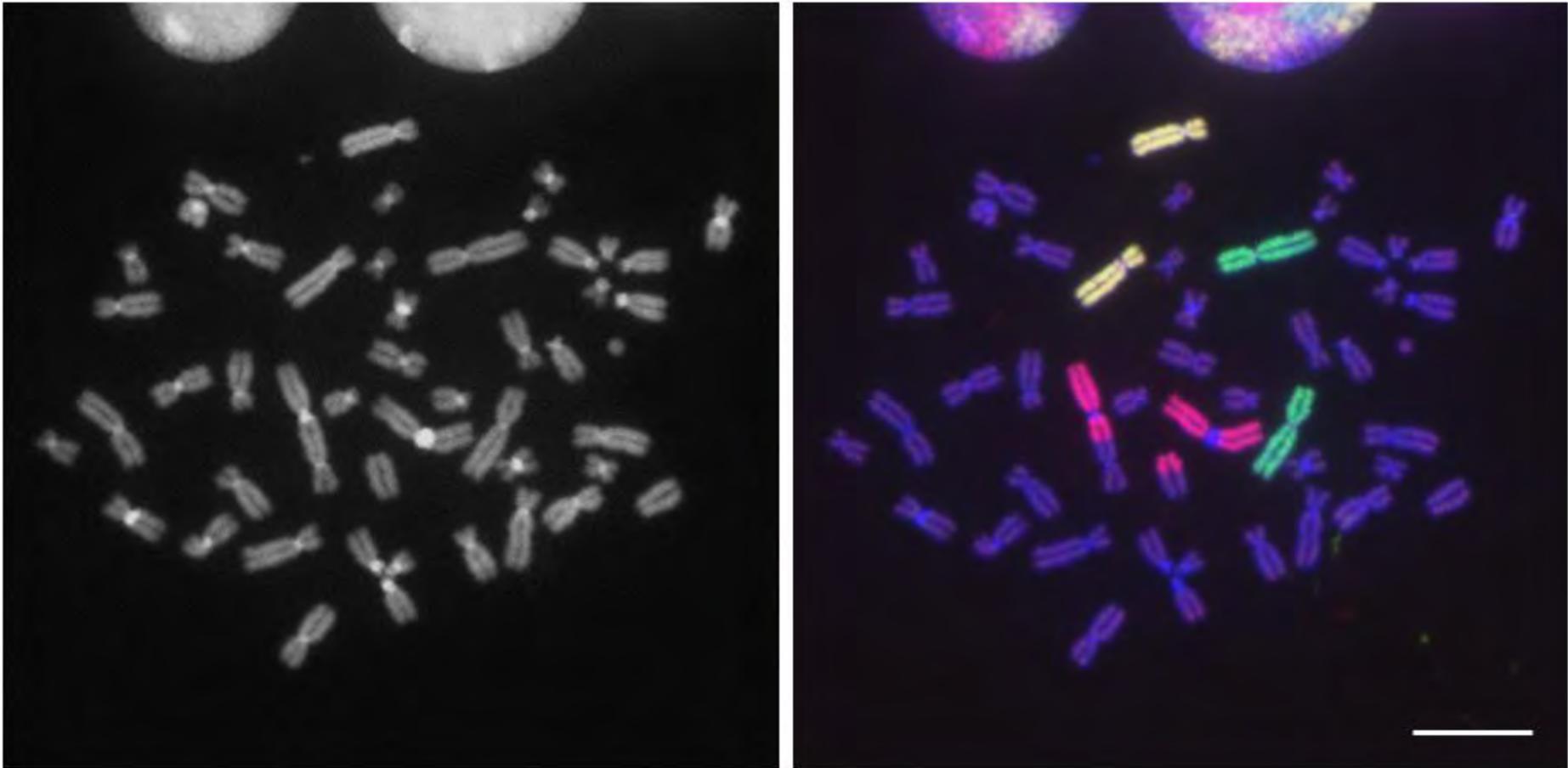


Figure 3. Metaphase cell showing a dicentric chromosome and an associated fragment (red, chromosome 1) observed in culture of peripheral blood lymphocytes cryopreserved for 1.5 years after 2-Gy gamma irradiation in vitro. Scale bar=10 μm .

3-color FISH analysis of PBMCs cultured after cryopreservation

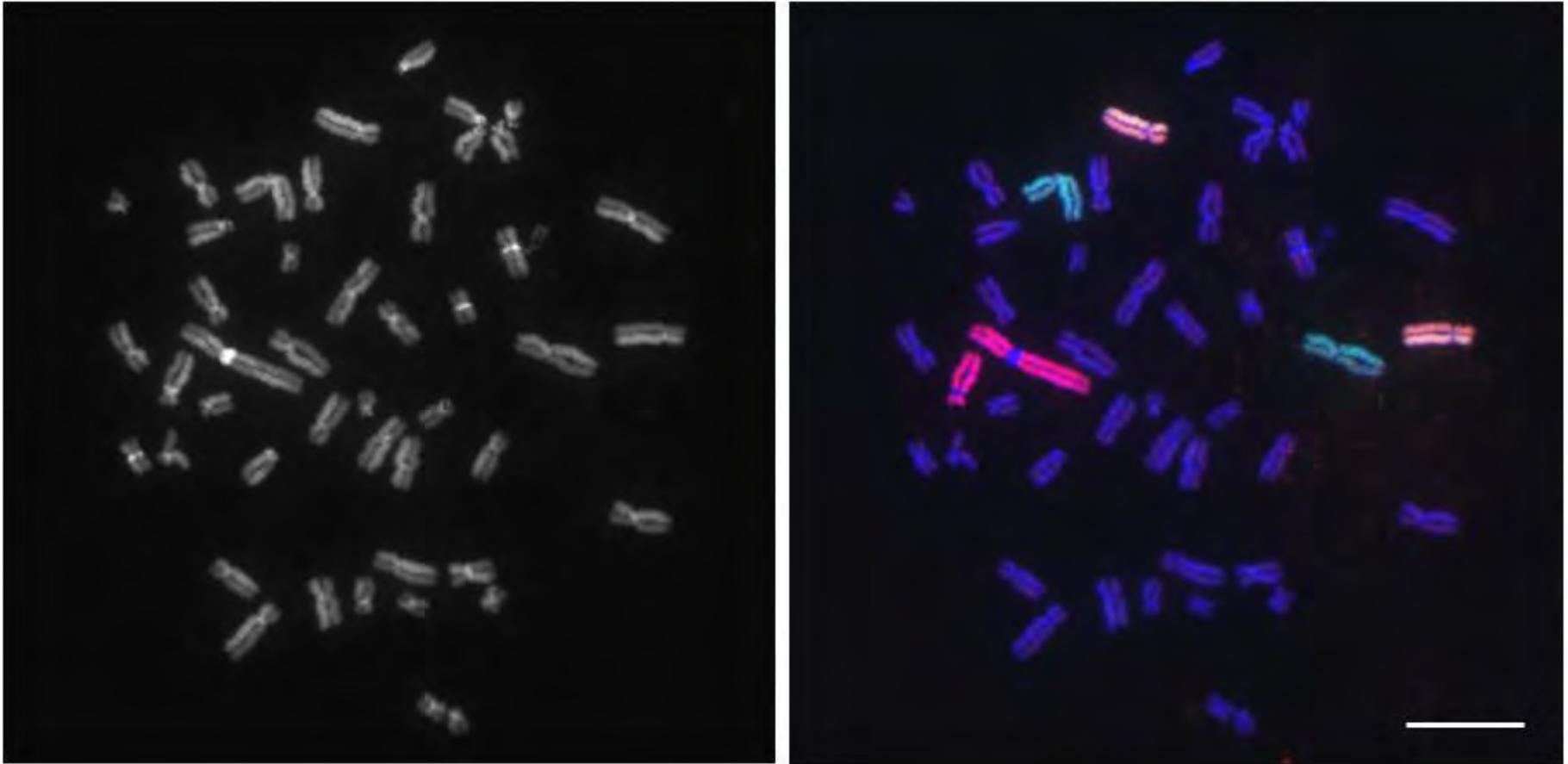


Figure 5. Metaphase II cell observed in cryopreserved lymphocyte culture from specimen 2. The modified FPG method provided differentially stained chromatids. The translocation between chromosome 1 homologs (red) was transmitted to the metaphase II cell. Scale bar=10 μm .

Table 2. Results of cytogenetic examinations of cultures of fresh and cryopreserved peripheral blood lymphocytes.

Lymphocyte culture	Dose (Gy)	Cryopreservation (Year)	Total no. of cells examined	Cells with					M II cells*
				dicentric	centric rings	simple translocations	complex translocations		
				[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	
Cryopreserved									
Specimen-1	0	1.2	1,007	0	0	2	0	20	
				-	-	[0.20]	-	[1.99]	
Specimen-2	2.0	1.5	521	147	17	47	7	11	
				[28.21]	[3.26]	[9.02]	[1.34]	[2.11]	
Fresh									
Specimen-9	2.0	-	393	107	16	44	5	7	
				[27.23]	[4.07]	[11.20]	[1.27]	[1.78]	

* M II cells were not included in the chromosomal aberration scoring.

Table 3. Comparative analysis of the yield of dicentric chromosomes between cultures of fresh lymphocytes and cryopreserved lymphocytes (1.5 years after 2-Gy gamma irradiation).

Lymphocyte culture	Dose (Gy)	Total number of cells examined	Distribution of dicentrics per cell					Goodness of fit to Poisson distribution	Dicentrics	
			0	1	2	3	4		per cell	Var/Mean
Cryopreserved										
Specimen-2	2.0	521	374	127	18	2	0	0.90>p>0.75	0.324	0.961
Fresh										
Specimen-9	2.0	393	286	91	15	1	0	0.90>p>0.75	0.316	0.973

Cytogenetic dosimetry 計算ソフトウェア / アプリケーション

* CABAS, DoseEstimate v.5 を使っていた方には

Biodose Tools

<https://aldomann.shinyapps.io/biodosetools-v3/>

* Rが使えるならこちらでも

Radir

radir package: an R implementation for cytogenetic biodosimetry dose estimation

David Moríña et al.,

J Radiol Prot 35(3):557-69 (2015), doi: 10.1088/0952-4746/35/3/557

Biodose Tools

Dicentrics: Dose-effect fitting

Data input options

Load data from file

Only provide total number of dicentrics

Number of doses

10

Maximum number of dicentrics per cell

5

Generate table

Fitting options

Fitting formula

$Y = C + \alpha D + \beta D^2$

Fitting model

Automatic

Irradiation conditions

Data input

	D (Gy)	N	X	C0	C1	C2	C3	C4	C5	mean	var	DI	u
1	0.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
4	0.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
5	0.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
8	0.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.000	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00

Biodose Tools

Dicentrics: Dose estimation

Curve fitting data options

Load fit data from RDS file

File input

Browse... No file selected

Preview data

Data input options

Load data from file

Maximum number of dicentrics per cell

5

Case description

Short summary of the case

Generate table

Result of curve fit

Summary statistics

Fit formula

Coefficients

Data input

	N	X	C0	C1	C2	C3	C4	C5	y	y_err
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0.00	0.00

Calculate parameters

Dose estimation options

Exposure

Acute

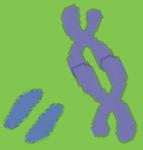
Assessment

Whole-body

Whole-body error method

Merkle's method (83%-83%)

Estimate dose



本日の講義内容

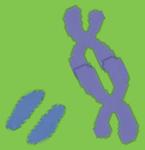
1. CBMN法の背景
2. CBMN法の手法 ～培養・ハーベスト・染色～
3. CBMN法における解析 ～判定基準とMN頻度の計算～
4. 微小核解析の自動化



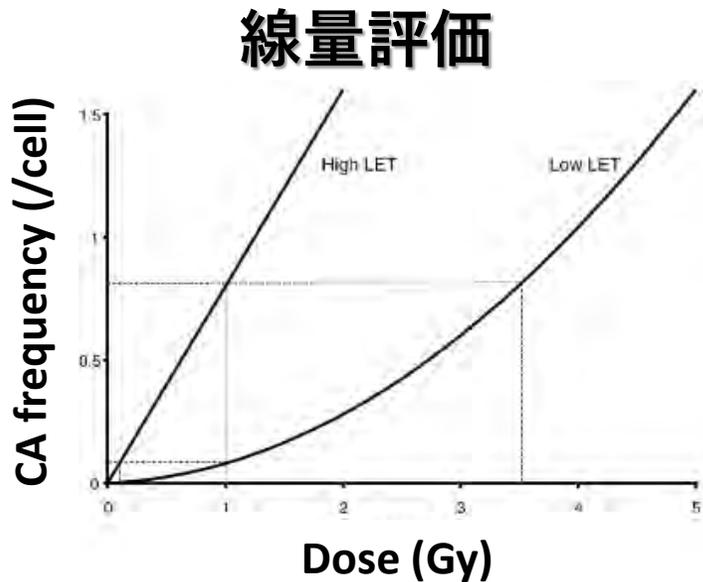
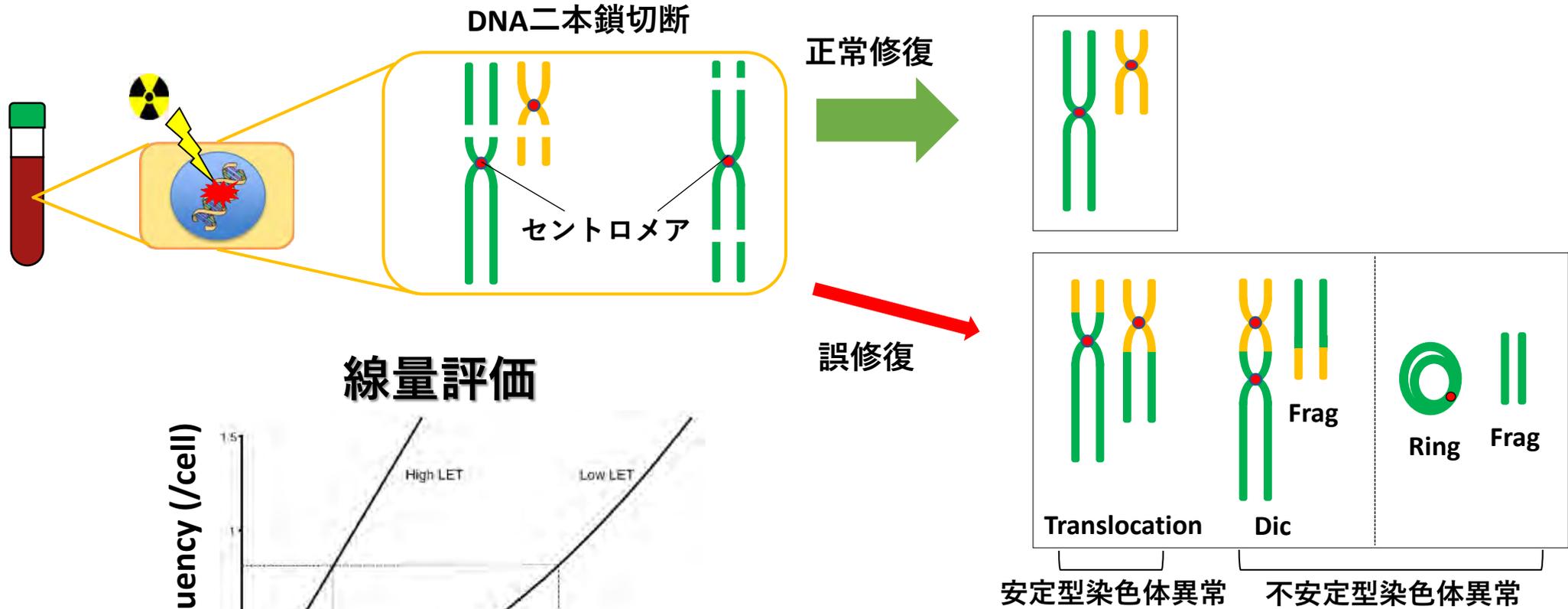


1. CBMN法の背景





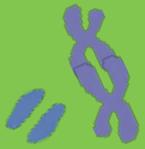
染色体異常と線量評価



IAEA Vienna 2001

染色体異常頻度は被ばく線量に相関する





生物学的線量評価のエンドポイントに必要な3要素

生物学的線量計 Biological dosimeter



1. 特異性 Specificity

- 放射線被ばくで特異的に生じる反応
- 自然発生頻度が低い

2. 安定性 Stability

- 放射線被ばく後一定期間安定して検出できる

3. 線量依存性 Dose-dependency

- 被ばく線量依存性にその頻度が変化する

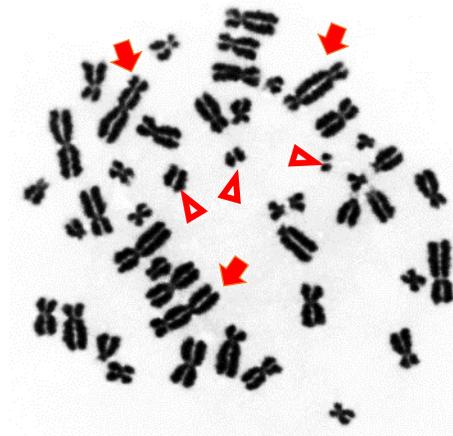


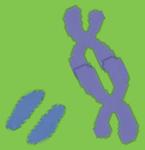
生物学的指標 Biological indicator

バイオマーカー

二動原体染色体法

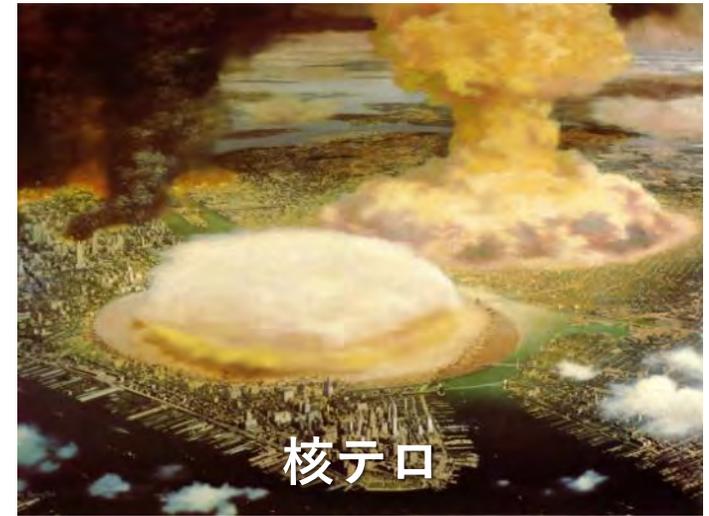
- 特異性 Specificity
- 安定性 Stability
- 線量依存性 Dose-dependency





線量評価シナリオの変化

米国同時多発テロ(2001)



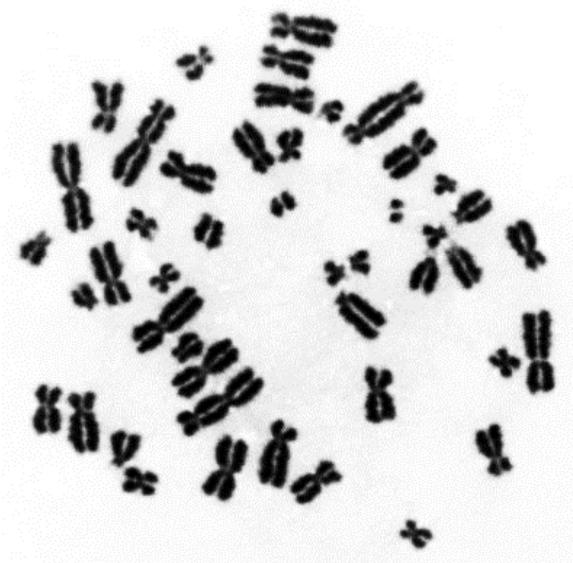
小規模放射線関連災害・事故 → 大規模放射線関連災害・事故





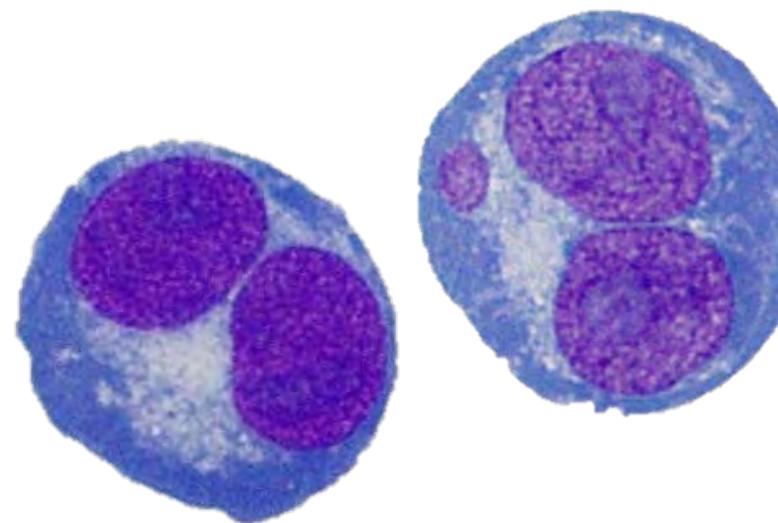
大規模放射線災害への対応

二動原体染色体法 Dic assay



- 染色体解析の経験が必要
- 染色体数のカウントなど、解析に時間を要する
- 自動化が難しい（ギムザ染色）

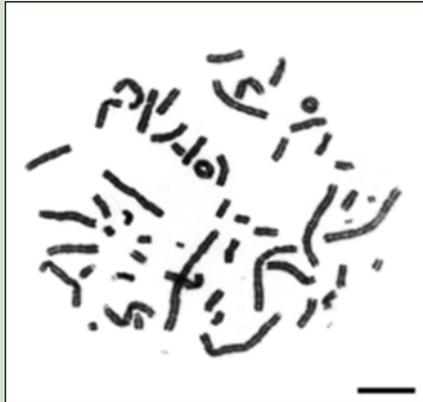
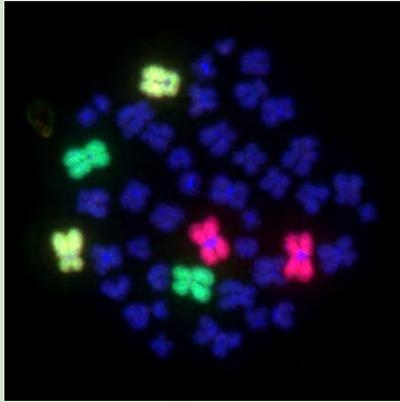
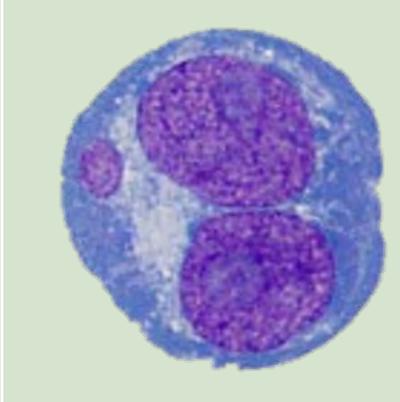
細胞質分裂阻害微小核法 CBNM assay



- 解析が容易
- 染色体の核型分析の経験がなくても実施可能
- 自動化が進んでいる



各細胞遺伝学的線量評価法の特徴

	Dic assay	PCC assay	FISH-Tr assay	CBMN assay
典型画像				
主な解析指標	二動原体染色体	PCC-リング染色体	転座	微小核
適用	急性被ばく 長期被ばく 直近の被ばく	急性被ばく 直近の被ばく	急性被ばく 過去の被ばく	急性被ばく 長期被ばく 直近の被ばく
急性全身被ばくの適用線量範囲	0.1 to 5	5 to 20	0.25 to 4	0.3 to 4
部分被ばく手の適用	可	可	不可	不可
トリージへの適用	可	可	不可	可
国際標準化	済	未	済	済

IAEA EPR-Biodosimetry 2011, modified

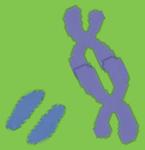


Tomisato MIURA

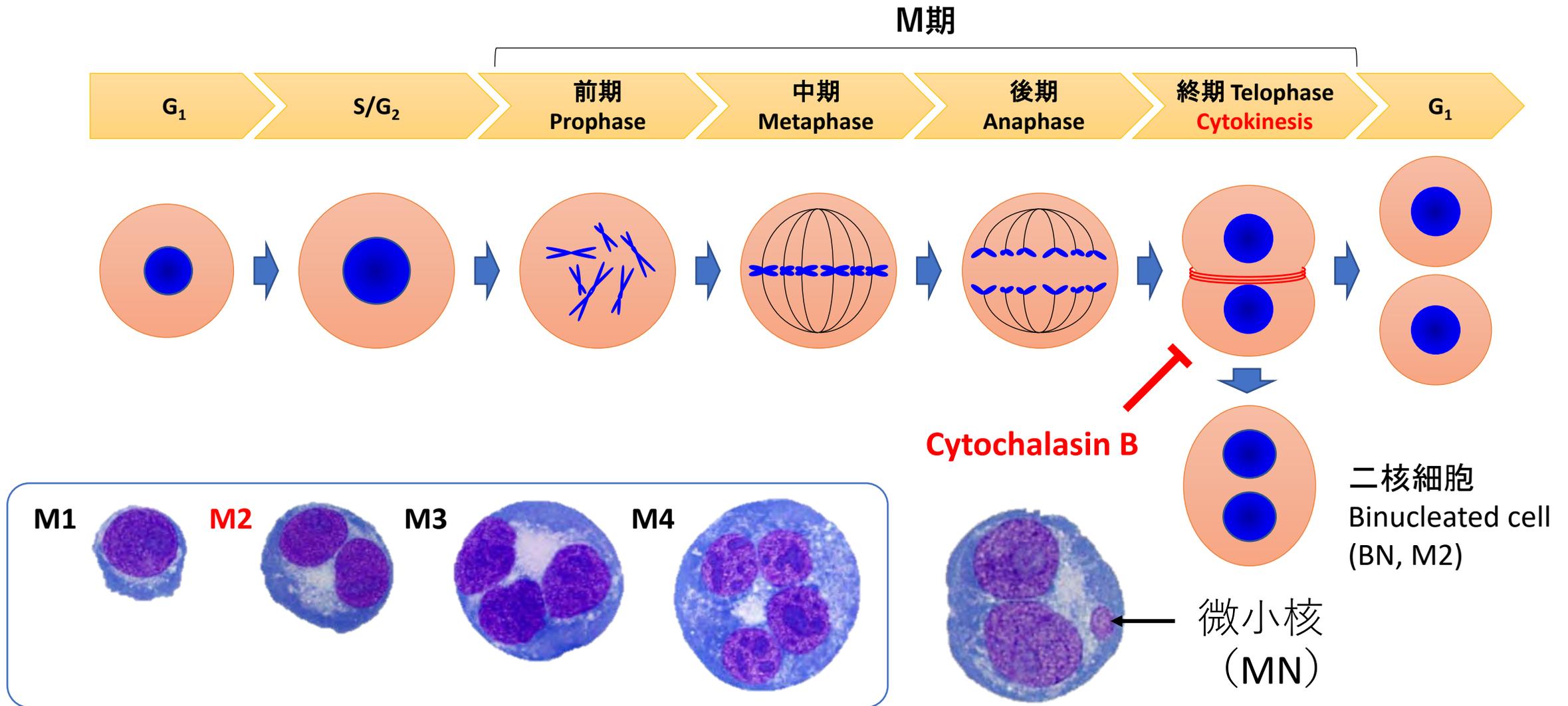


2. CBMN法の手法 ～培養・ハーベスト・染色～



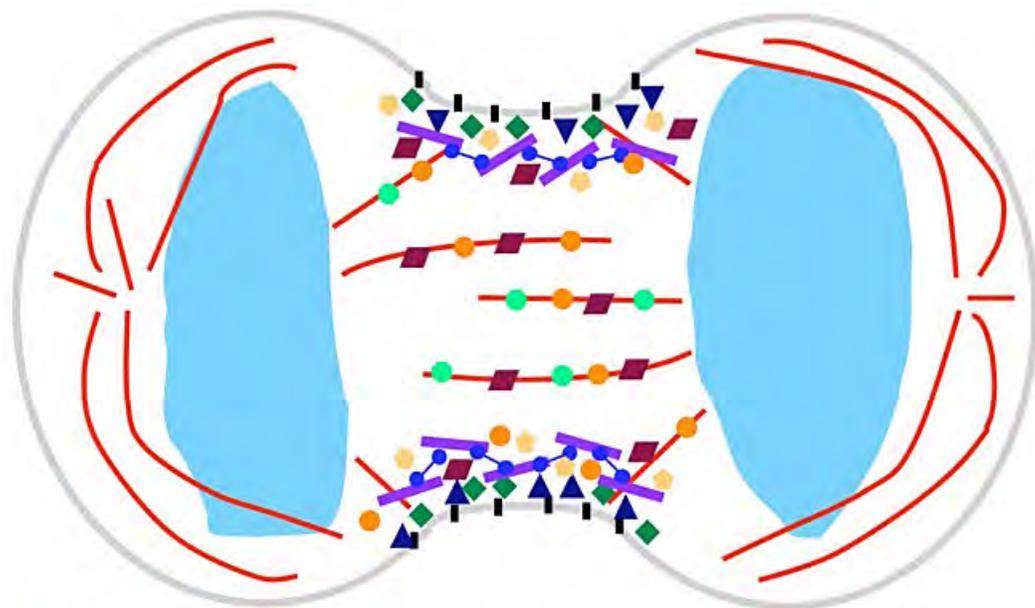


細胞分裂と二核細胞の誘導





サイトカラシンBによる細胞質分裂阻害



● DNA, ■ Lipids, ▲ Anillin, ◆ Septin, — Plasma membrane

- Myosin ⊣ Blebbistatin
- Actin ⊣ Cytochalasin
- ROCK ⊣ Y27632
- MLCK ⊣ ML-7
- Citron kinase
- Aurora B kinase ⊣ Hesperadin VX-680
- Plk1 ⊣ BTO-1, TAL BI-2536
- Calmodulin ⊣ W7
- Microtubules ⊣ Nocodazole Taxol

サイトカラシンBによる
アクチン分子の重合阻害

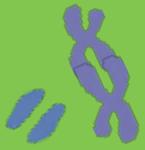
収縮環の形成阻害

二核細胞の誘導

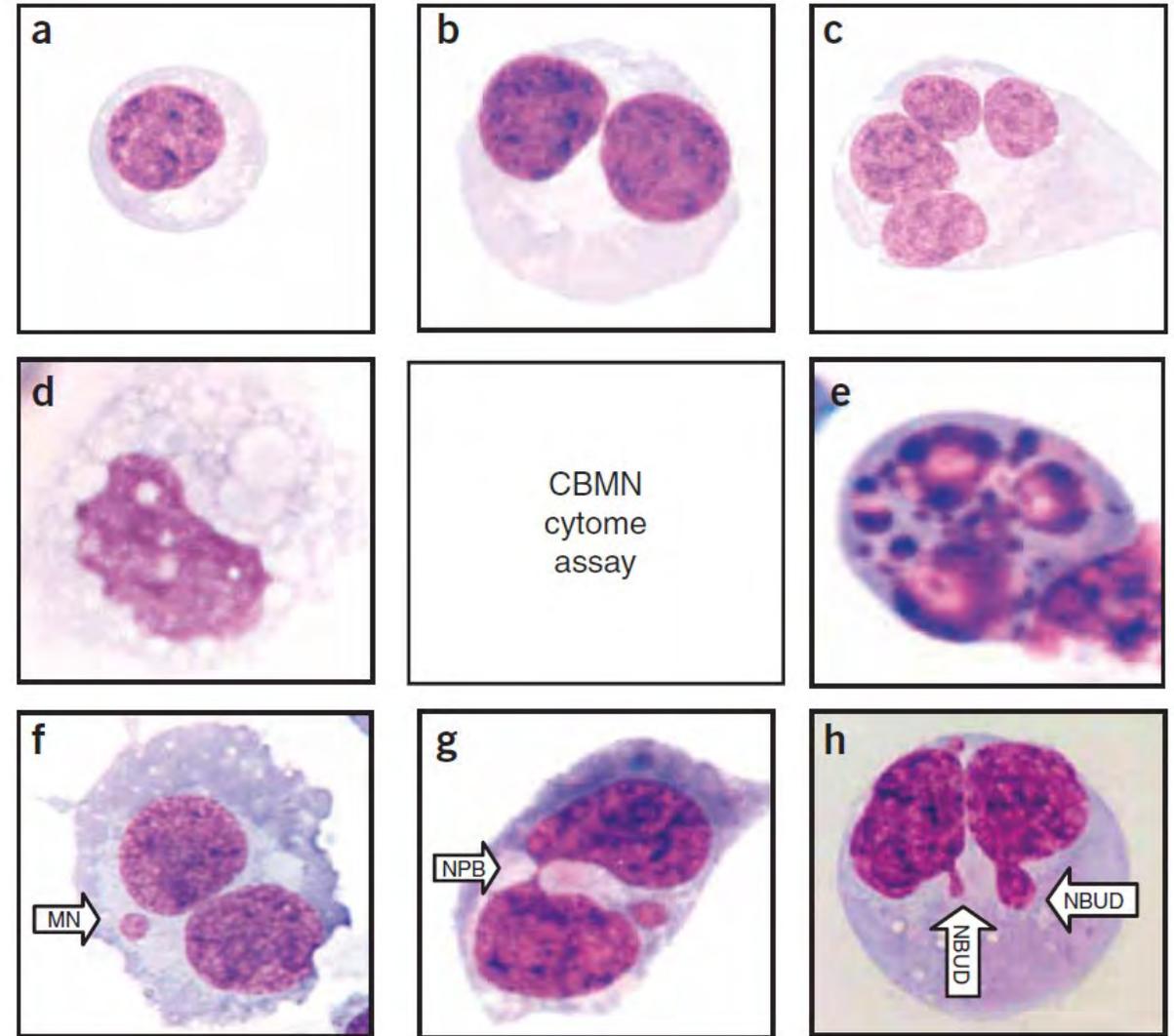
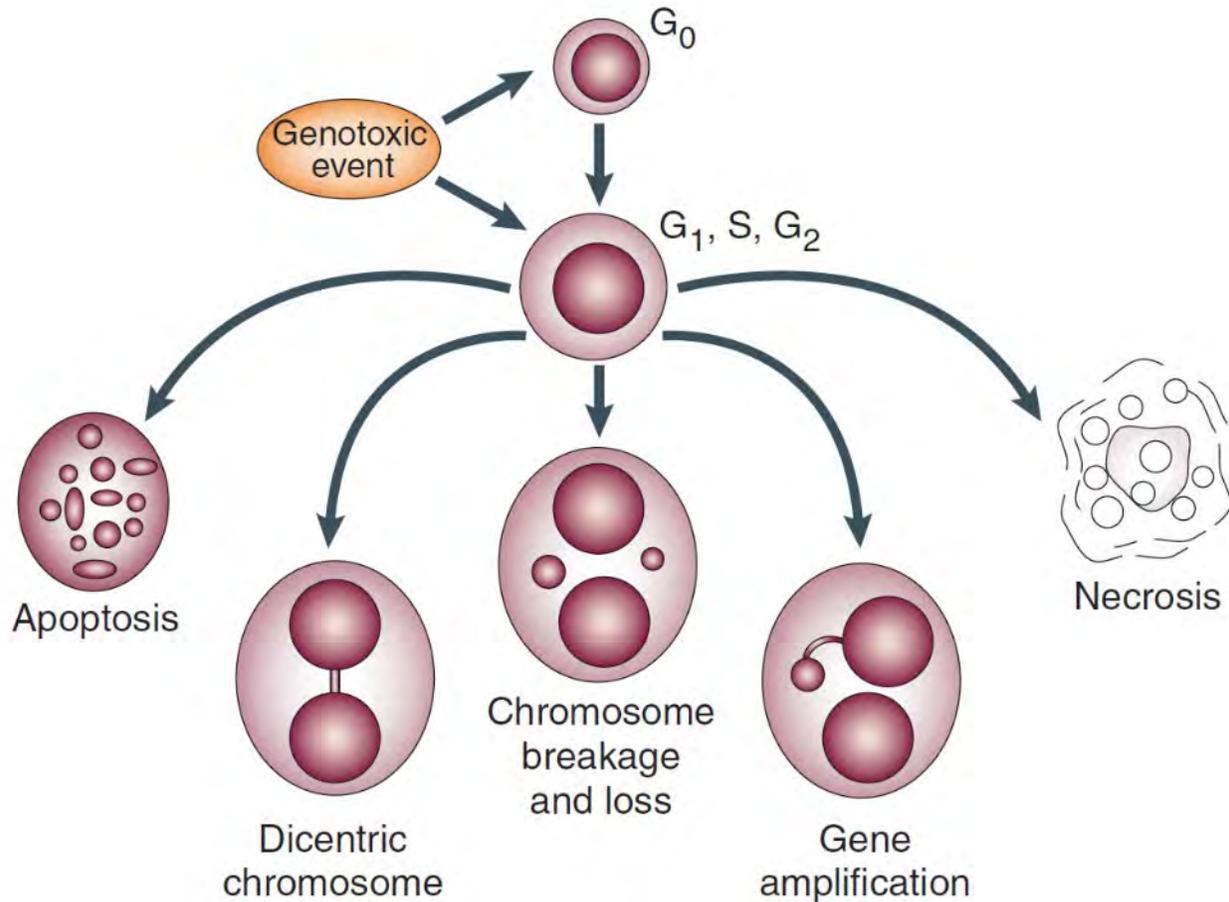
Figure 1. Cartoon of a cell during early stages of cytokinesis

Atilla-Gokcumen GE, ACS Chem Biol (2010)



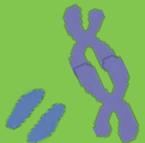


CBMN “cytome” assay

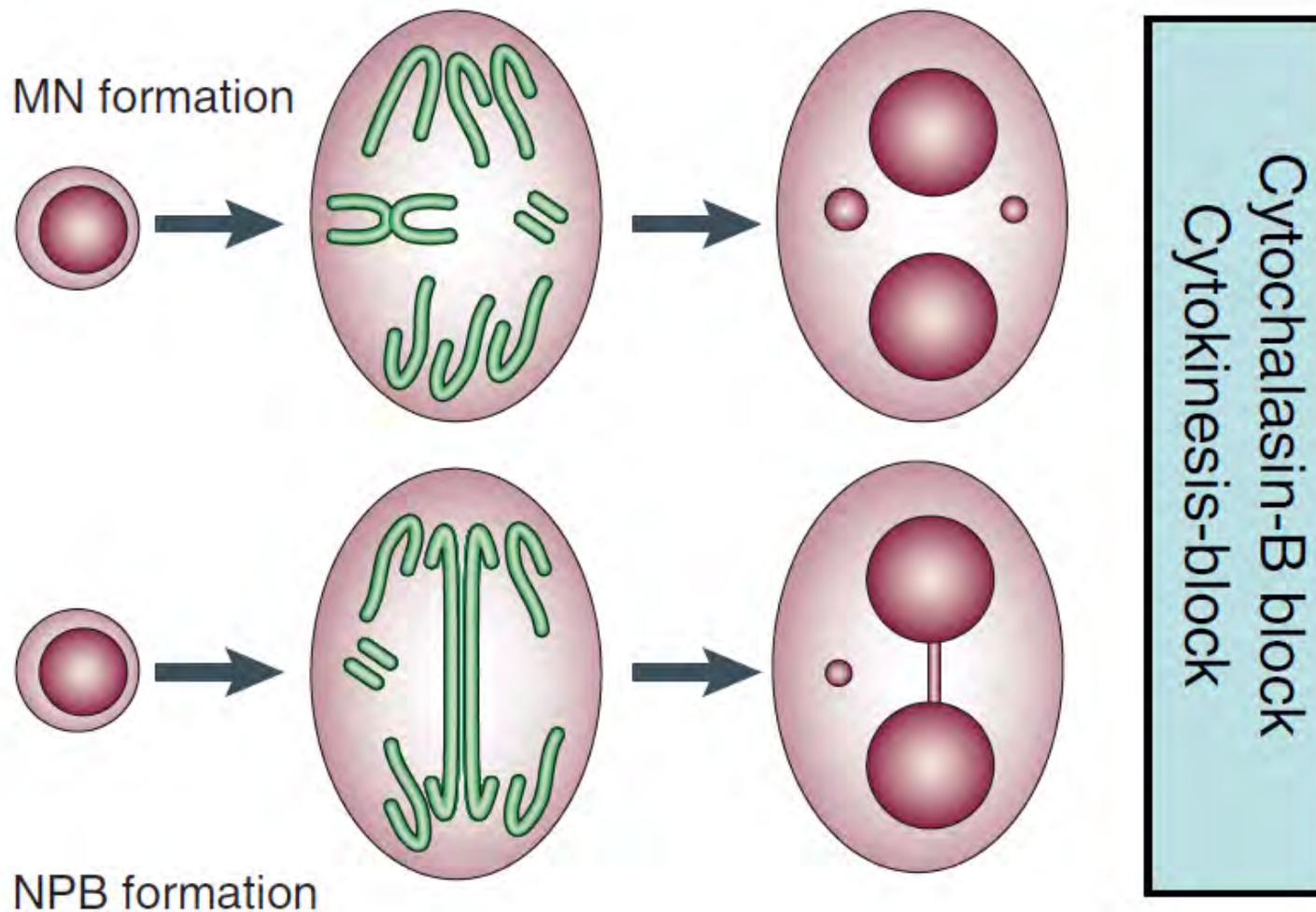


Fenech M, Nat Protoc (2007)





核分裂中の細胞におけるMNおよびNPBの形成



Fenech M, Nat Protoc (2007)



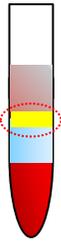


CBMN assayの作業工程

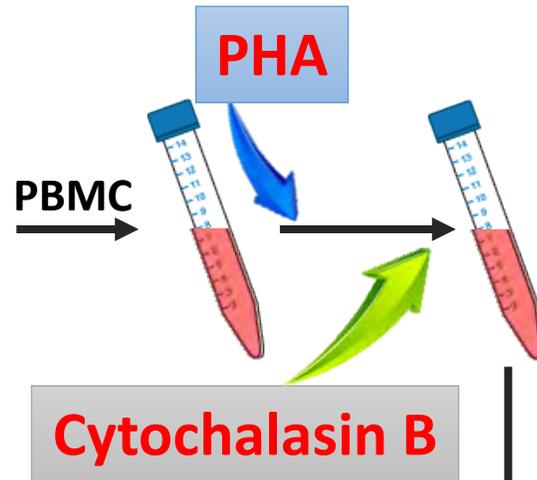
Blood collection



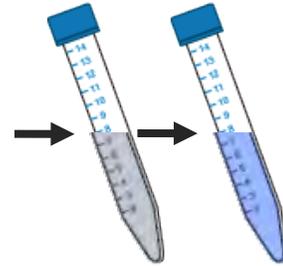
PBMC isolation



Blood culture



Hypotonic treatment/
Fixation



Slide preparation



Spreading



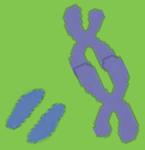
Cytocentrifugation

Staining



Scoring

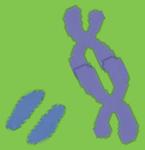




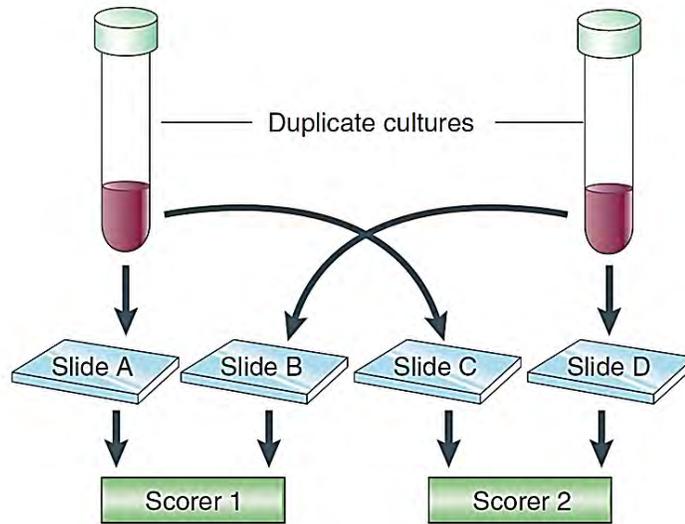
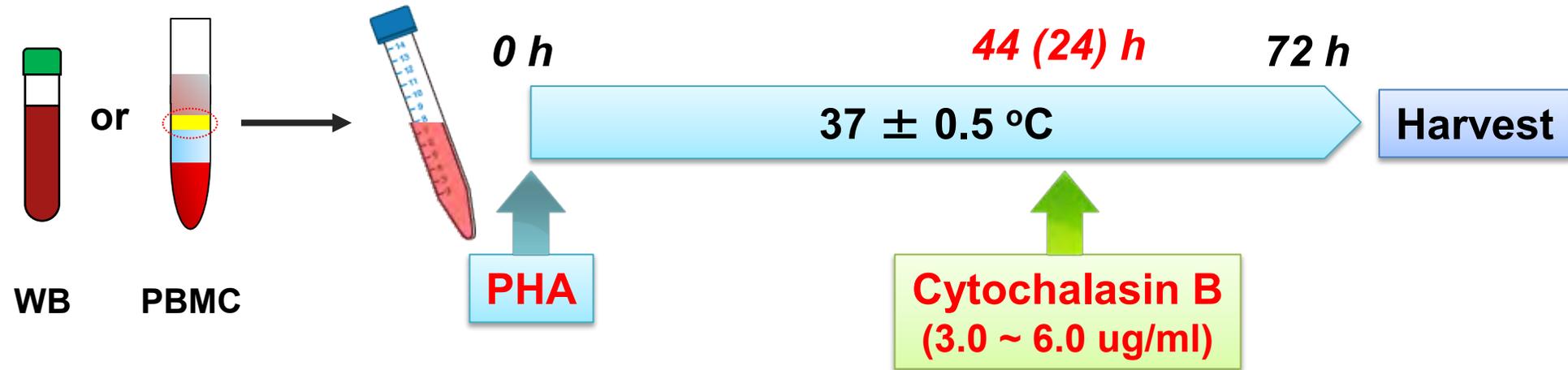
採血と血液輸送における注意事項

- 採血は、抗凝固剤としてリチウムヘパリンまたはナトリウムヘパリンを含む採血管を使用する。
- 血液を採取し（少なくとも5 ml）、約20°C（18-22°C）に維持し、採取後72時間以内にできるだけ早くバイオドシメトリーラボへ送付する。
- 容器の完全性を確保し、輸送中の漏れを防ぐための予防措置を遵守する必要がある（バイオハザード対策）。
- 輸送中の温度が管理されていることを確認するために、温度ロガーを入れる。





血液の培養

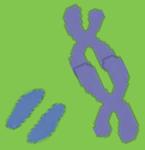


二重培養が推奨される

スライドバイアス: A + C vs. B + D
スコアラーバイアス: A + B vs. C + D

Fenech M, Nat Protoc (2007)





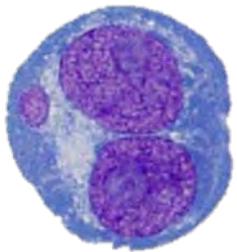
サイトスピン法とエアードライ法

サイトスピン法

Fenech Mらが推奨する標本作製法では、低張処理を行わない未固定細胞を遠心力によりスライドガラス上に展開する。

利点：
・細胞質の保存性が高い。
・DIFF Quick染色が有効である。
・免疫染色等が可能

欠点：
・細胞質面積が小さい
・Cytocentrifugation用の機器が必要



DIFF Quick染色



Cytocentrifugation

エアードライ法

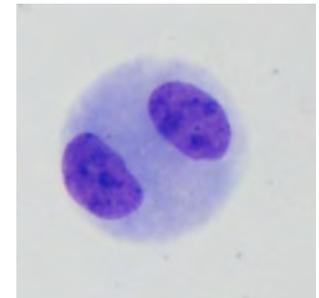
通常の染色体標本作製する方法に類似している。マイルドな低張処理の後、固定する。細胞の展開はエアードライ法を用いる。

利点：
・一般的染色体解析用機器のみで実施可能
・余剰細胞の保存が容易
・細胞が伸展しているため、解析しやすい。

欠点：細胞質が破損しやすい。
DIFF Quick染色での染色性が不良

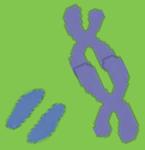


Metaphase spreader



ギムザ染色



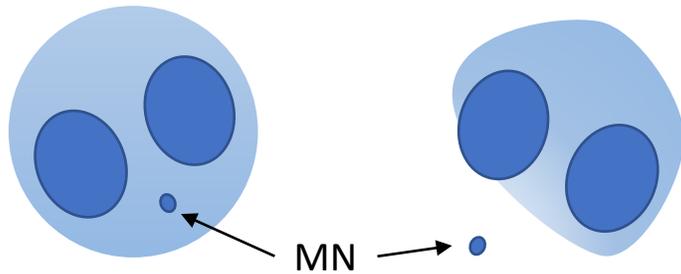


CBMN法の課題

課題 1. 細胞質の状態

CBMN法では、無傷の細胞質を持つ二核細胞の小核（MN）を解析する。したがって、細胞調製中に細胞質を維持することが不可欠であるが、従来の方は細胞質を破壊する傾向がある。

Intact cytoplasm Ruptured cytoplasm



Scorable

Out of criteria

課題 2. 部分被ばくへの適用

CBMN法は、部分体照射（PBI）の線量評価には使用できない。

TBI



PBI



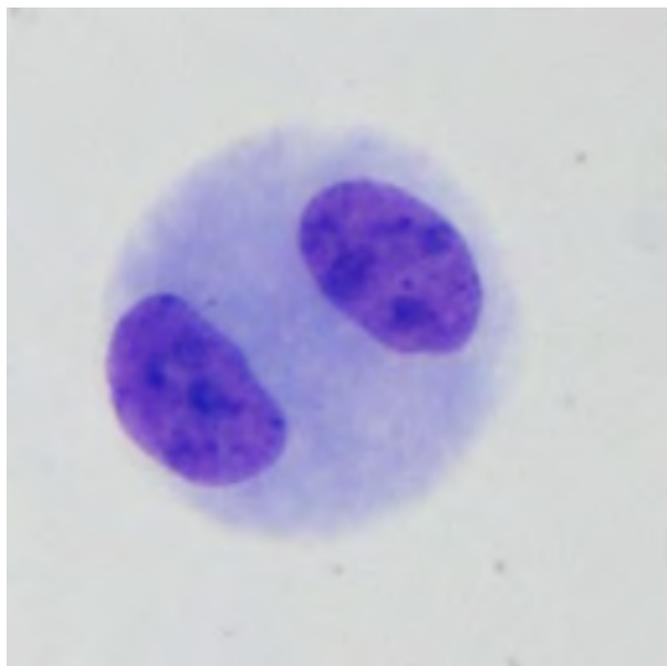
Not applicable





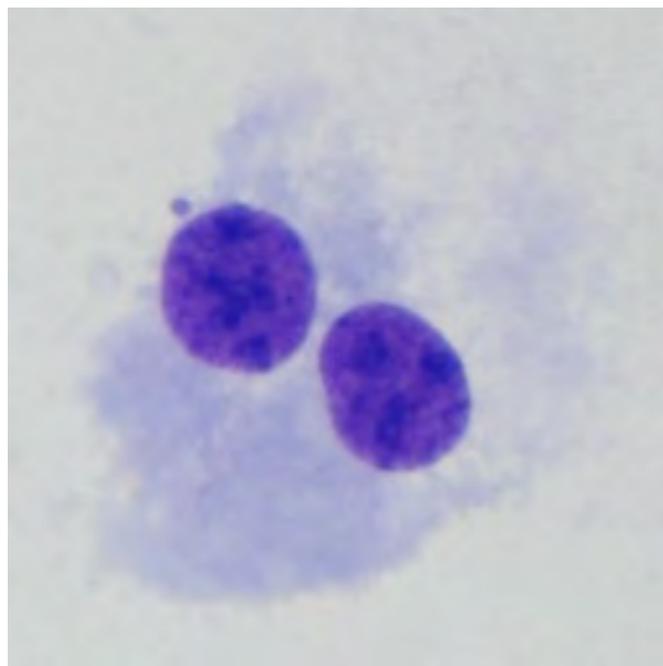
CBMN法では、細胞質の保存が求められる

細胞質が保存された
二核細胞



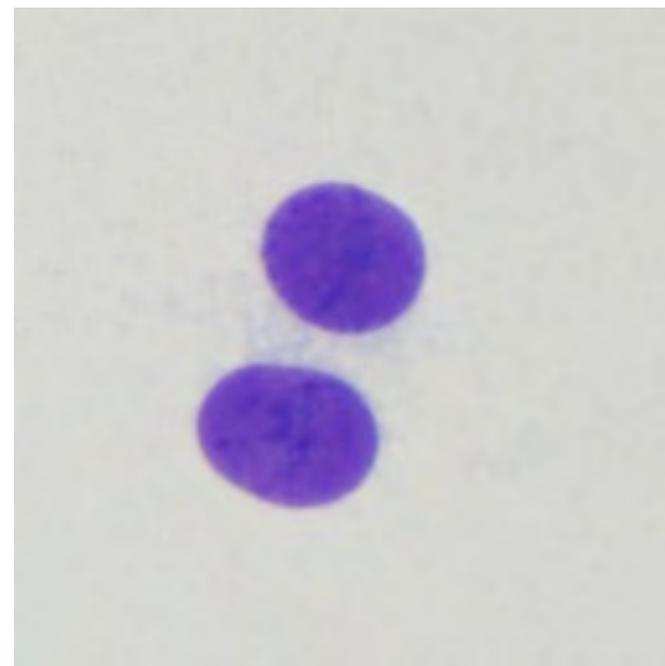
解析可能

細胞質が破損した
二核細胞



破裂

細胞質を失った二核細胞



欠損

解析対象外



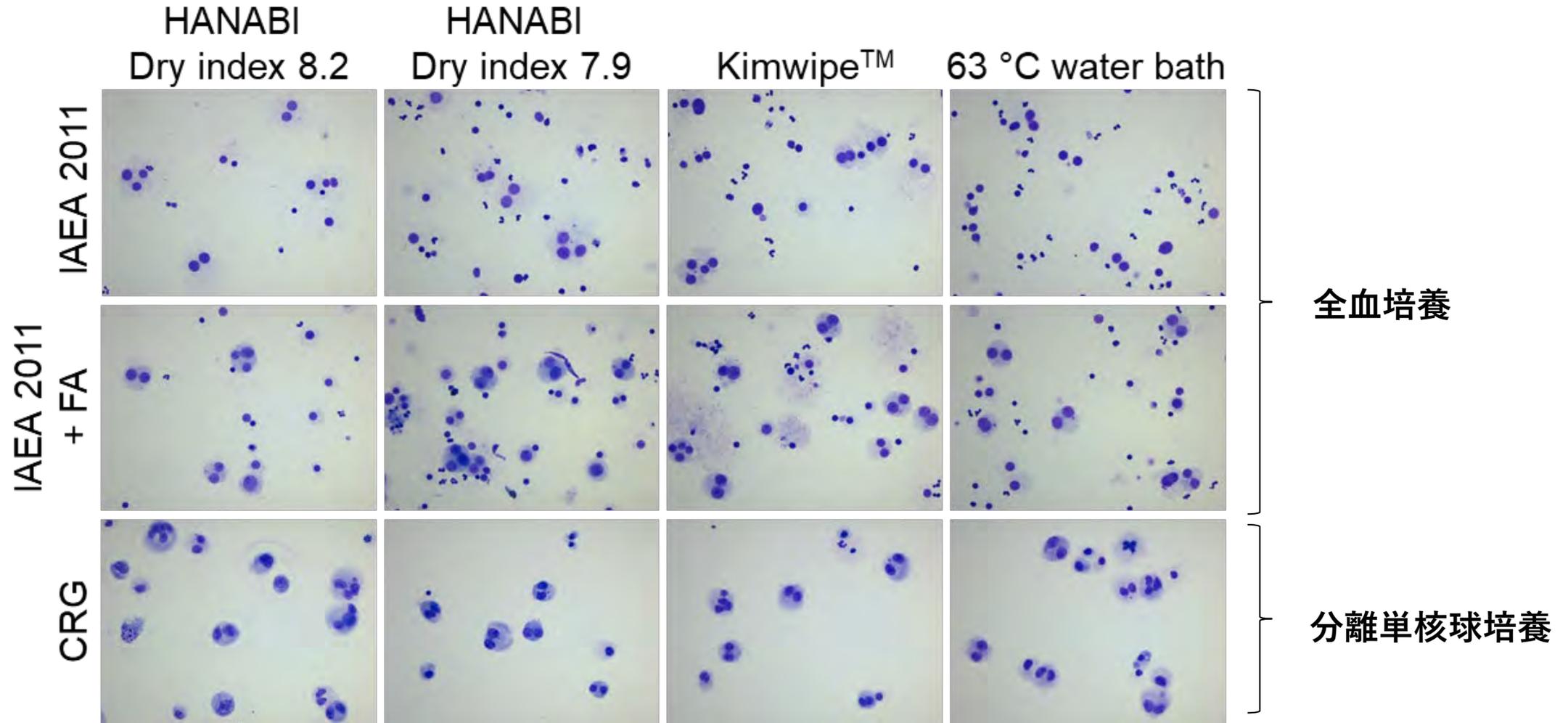


CBMN法におけるハーベストプロトコルの比較

	Goh et al. 2021 (CRG)	IAEA 2001	IAEA 2011	IAEA 2011 + FA
血液培養	分離単核球	全血	全血	全血
遠心条件	800 g, 25 s (35 s, ブレーキなし)	800 rpm, 5 min 800 rpm, 8 min 600 rpm, 8 min	180 g, 10 min	180 g, 10 min
低張処理	冷 125 mM KCl	冷75 mM KCl	冷75 mM KCl	冷75 mM KCl
低張処理時間	6 min, 氷上	8 min	10 min	10 min
ホルムアルデヒド 添加タイミング	低張処理後	初回固定の間	添加しない	初回固定の間
ホルムアルデヒド 処理時間	< 1 min	8 min	添加しない	10 min
冷固定液 I	13:12:6 生理食塩水: メタノール: 酢酸	3:1 メタノール: 酢酸, FA(+)	1:1 of リンゲル液 : 10:1メ タノール-酢酸, FA(-)	1:1リンゲル液 : 10:1 メタノール-酢酸, FA(+)
冷固定液 II	4:1 メタノール : 酢酸	3:1 メタノール : 酢酸	10:1 メタノール : 酢酸	10:1 メタノール : 酢酸
ハーベスト所要時間	< 25 min	< 50 min	< 1 h	< 1 h

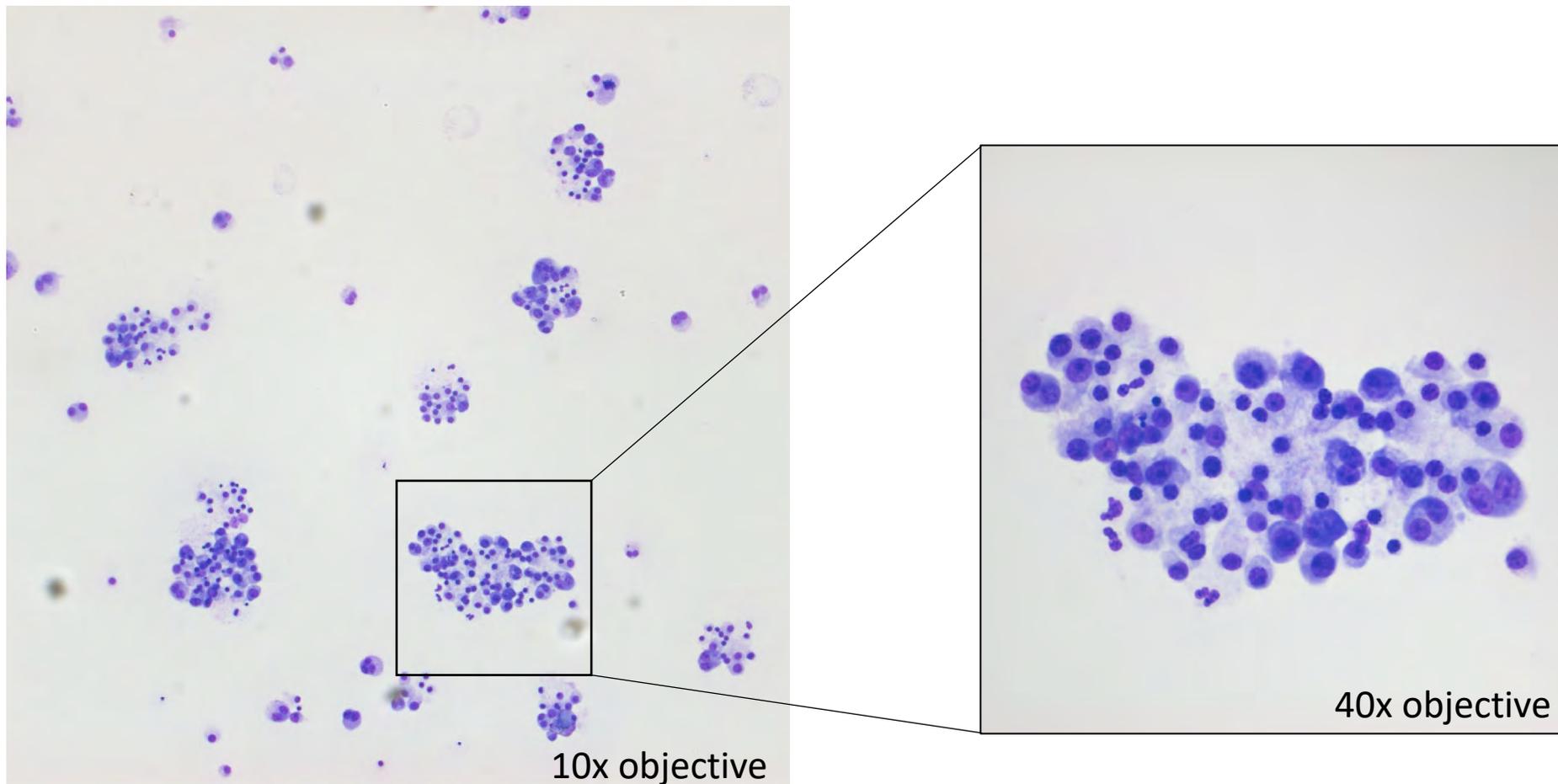


得られる細胞像の比較





ハーベスト・spreadingの注意事項



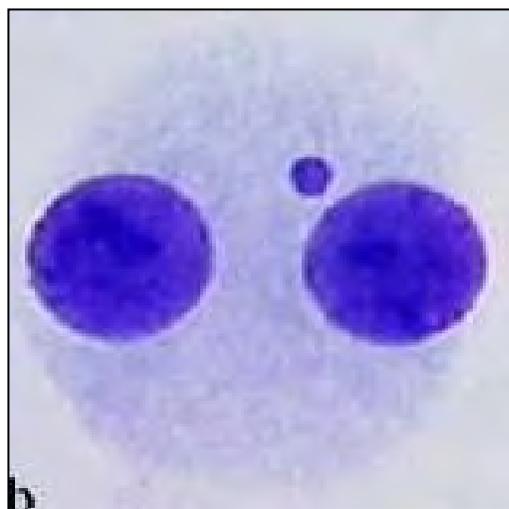
細胞質を保存するためにホルムアルデヒド（FA）を使用する際は、細胞集塊が生じやすいので注意する



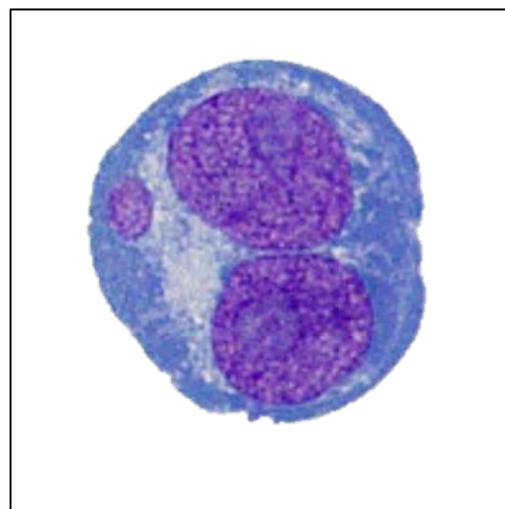


染色と顕微鏡

明視野正立顕微鏡 Bright field microscopy



Giemsa

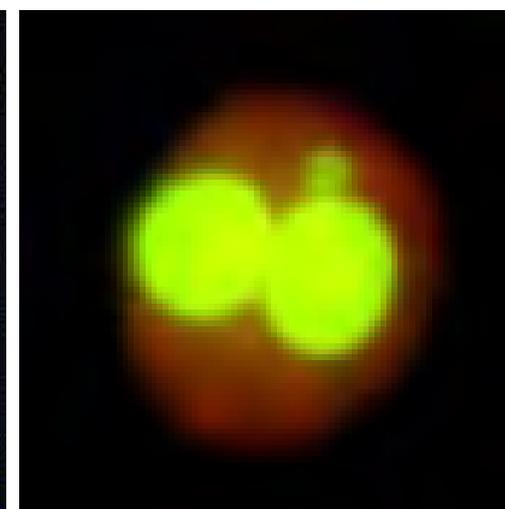


DIFF Quick

蛍光顕微鏡 Fluorescence microscopy



DAPI



Acridine Orange

核と小核を明確に視覚化できるように、細胞を適切に染色する

細胞と小核のスコアリングには、少なくとも400倍の倍率で細胞を観察する





アクリジンオレンジ (AO) 染色の注意事項

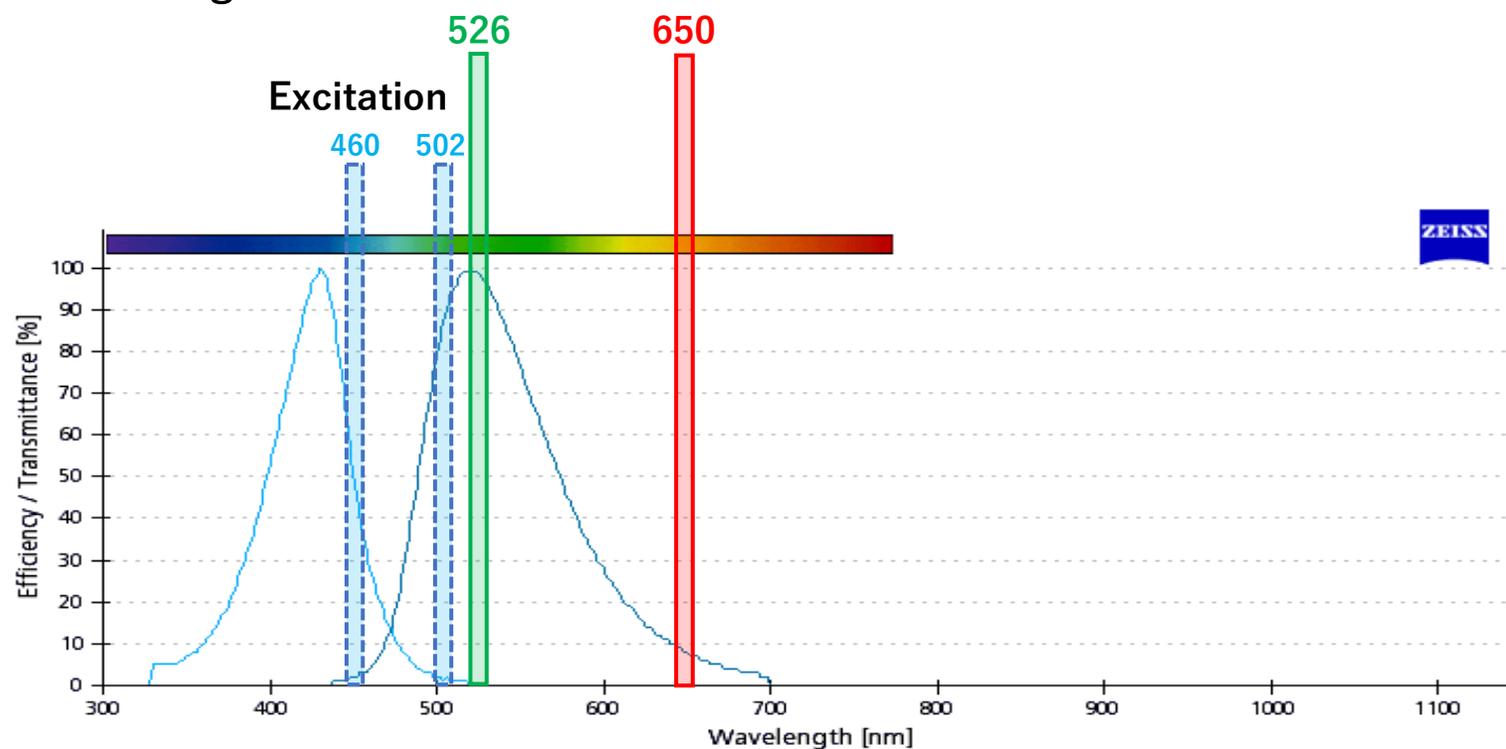
dsDNA の塩基対間に挿入し 526 nm の緑色の蛍光 (励起波長 502 nm)
ssDNA や RNA に結合して 650 nm の赤色の蛍光 (励起波長 460 nm)

シングルフィルターセットを用い、カラーCCDで撮影

適したフィルターセットは限定的
Zeissのラインナップにはない

Acridine Orange

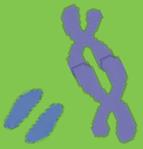
Emission





3. CBMN法における解析 ～判定基準とMN頻度の計算～





スコアリングの基準

MN頻度をスコアリングする際、以下の特徴を有する細胞を解析対象とする。

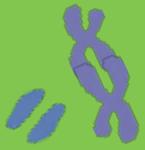
- (a)細胞は二核（BN）である。
- (b)二核細胞の2つの核は無傷の核膜を持ち、同じ細胞質境界内に位置するものとする。
- (c)二核細胞の2つの核は、サイズ、染色パターン、および染色強度がほぼ等しくなければならない。
- (d)二核細胞の2つの核は、離れている場合もあれば、核の直径の1/4以下の1つまたは複数の微細なnucleoplasmic bridges（NPB）によって接続されている場合もある。
- (e)二核細胞の2つの主核は、互いに離れているのが望ましいが、2つの核が重なっている場合は、いずれかの核の核境界が識別可能である場合にのみスコアリング対象細胞とする。
- (f)二核細胞の細胞質境界または膜は無傷であり、隣接する細胞の細胞質境界と明確に区別できるものでなければならない。



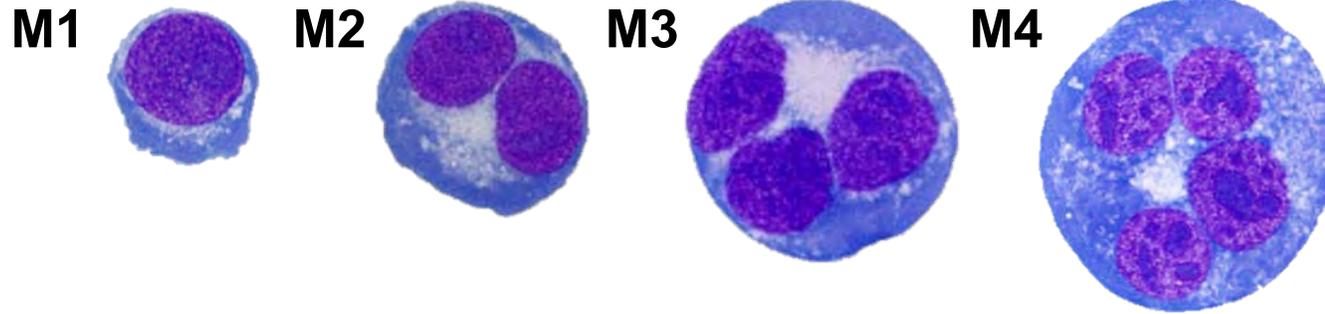
微小核の判定基準

MNは形態学的に同一であるが、主核よりも小さい。また、MNは以下の特徴を示す。

- (a) ヒトリンパ球のMNの直径は通常、主核の平均直径の $1/16$ から $1/3$ の間で変化する。
- (b) これは、二核細胞の主核の1つの面積の $1/256$ から $1/9$ に相当する。
- (c) MNは非屈折性であるため、染色粒子などのアーティファクトと容易に区別できる（顕微鏡下では可能であるが、画像においては屈折性を確認できないことがある）。
- (d) MNは主核に結合または接触していない。
- (e) MNは主核に接触する可能性があるが、重なることはなく、小核境界は核境界と区別できなければならない。
- (f) MNは通常主核と同じ染色性を示す。



核分裂指数 Nuclear division index (NDI)

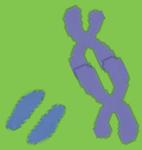


$$NDI = \frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4}{N}$$

(N = 500)

- 一核、二核、多核細胞のうち、細胞質が保存され、正常な核形態を示す生細胞
- それらは、1つまたは複数のMNまたは核芽 (NBUD) を含む場合と含まない場合があり、二核および多核細胞の場合、1つまたは複数のNPBを含む場合と含まない場合がある。
- 壊死 (ネクローシス) 細胞およびアポトーシス細胞は、スコアリングから除外する。

※ NDI自体は、生体線量計として直接適用するには十分ではないが、NDIは、マイトジェン刺激後のリンパ球の細胞周期進行を評価するために使用できる。NDIは、細胞循環動態を理解するための有用な研究ツールとして頻繁に使用される。



スコアリングシート

TABLE 15. LAYOUT OF A MICRONUCLEUS SCORING RESULTS SHEET FOR DUPLICATE CULTURES (1 & 2) FROM A SINGLE BLOOD SAMPLE

Sample No:

Scorer:

Date:

Slide No.	Micronucleus distribution in BN cells							Total No. of BN cells	Total No. of Micronuclei
	0 MN	1 MN	2 MN	3 MN	4 MN	5 MN	> 5 MN		
1								500	
2								500	
1 + 2								1000	
Remarks:									

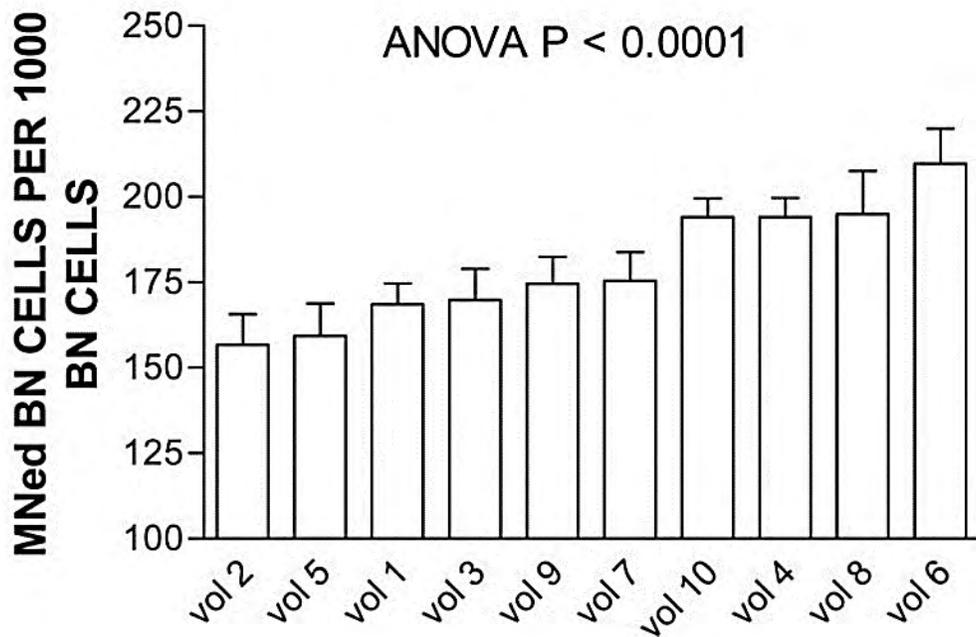
< 0.5 Gy: 2000以上の二核細胞を解析
> 0.5 Gy: 1000以上の二核細胞を解析

IAEA, EPR-Biodosimetry 2011



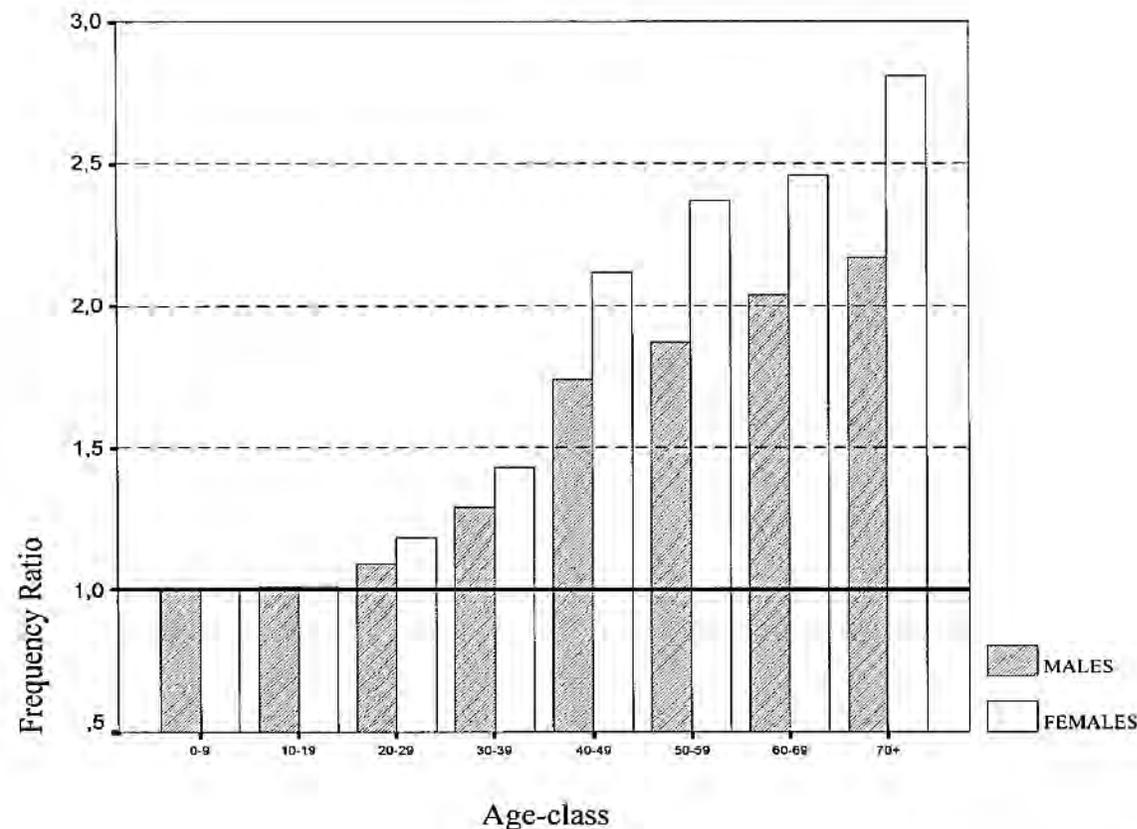


微小核頻度の個人差と性差



10 healthy females aged 20–45 y
1.5 Gy (dose rate 5 Gy min⁻¹)

Fenech M, Health Phys (2010)

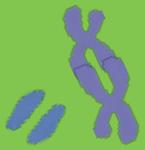


IAEA, EPR-Biodosimetry 2011
Bonassi S, Environ Mol Mutagen 2001

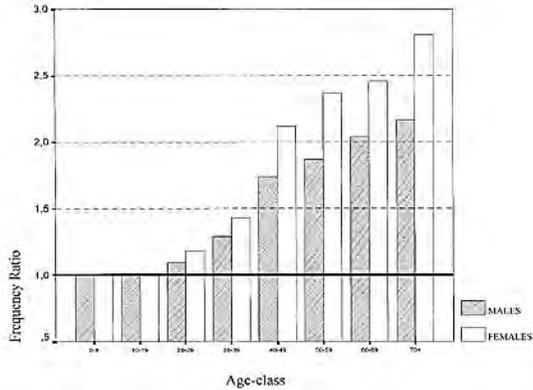
Dic法とは異なり、個人差が認められる

MN頻度には性差・年齢差がある





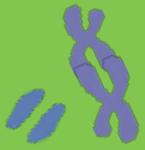
誘導されたMN頻度の算出法



NM頻度は性差に加え、年齢依存性の増加が認められる。したがって、実際に放射線被ばくによって誘導されたMN頻度は、観察されたMN頻度から自然発生頻度をさし去る必要がある。



線量反応曲線からの放射線被ばく線量の推定



線量反応曲線 (dose-response curve)

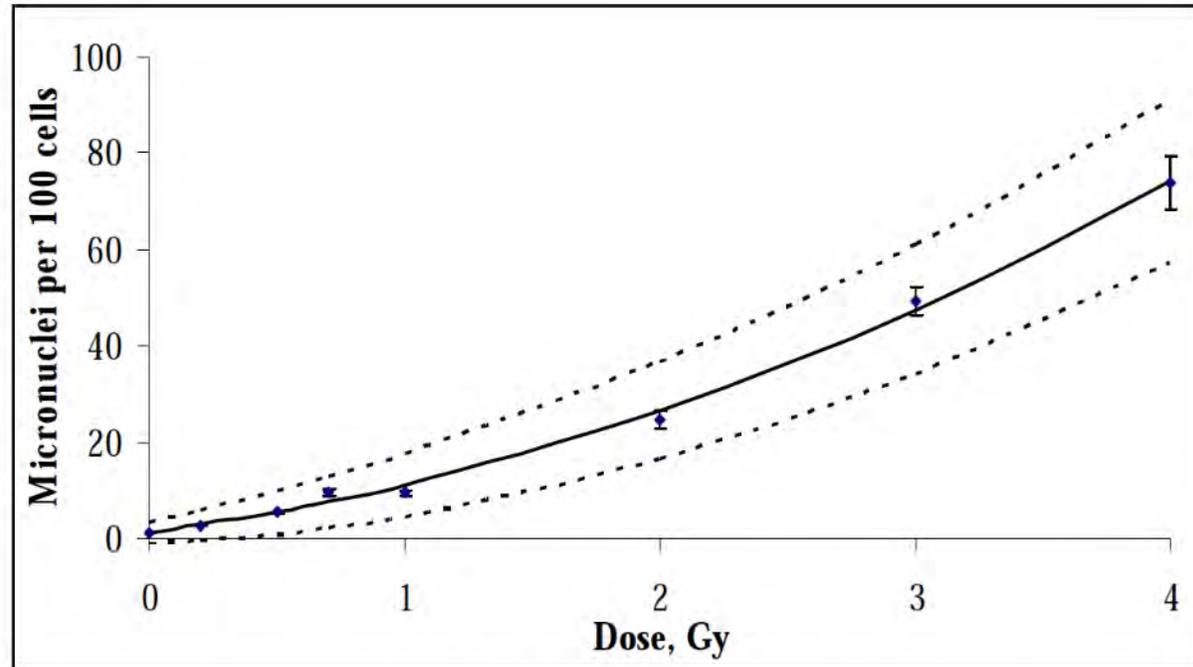


FIG. 40. Typical linear-quadratic MN dose response curve for ^{60}Co γ -rays. Solid curve: pooled data from 47 donors; broken curves: the upper and lower 95% confidence intervals.

IAEA, EPR-Biodosimetry 2011





標準モードとトリアージモード

	標準モード	トリアージモード (大規模放射線災害)
解析に必要な二核細胞数	1000 (500 + 500) 個	200個 ※MN頻度が高いサンプルでは、 例外的に100個でも可能である。
自然発生頻度の取扱い (バックグラウンド値)	生物学的性別、年齢層が一 致する平均バックグラウン ドレベルを差し引く。	平均バックグラウンドレベルを コントロールとして使用する。 年齢一致バックグラウンド値は 不要。

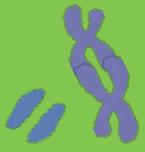
ISO 17099:2014. Radiological protection — Performance criteria for laboratories using the cytokinesis block micronucleus (CBMN) assay in peripheral blood lymphocytes for biological dosimetry より



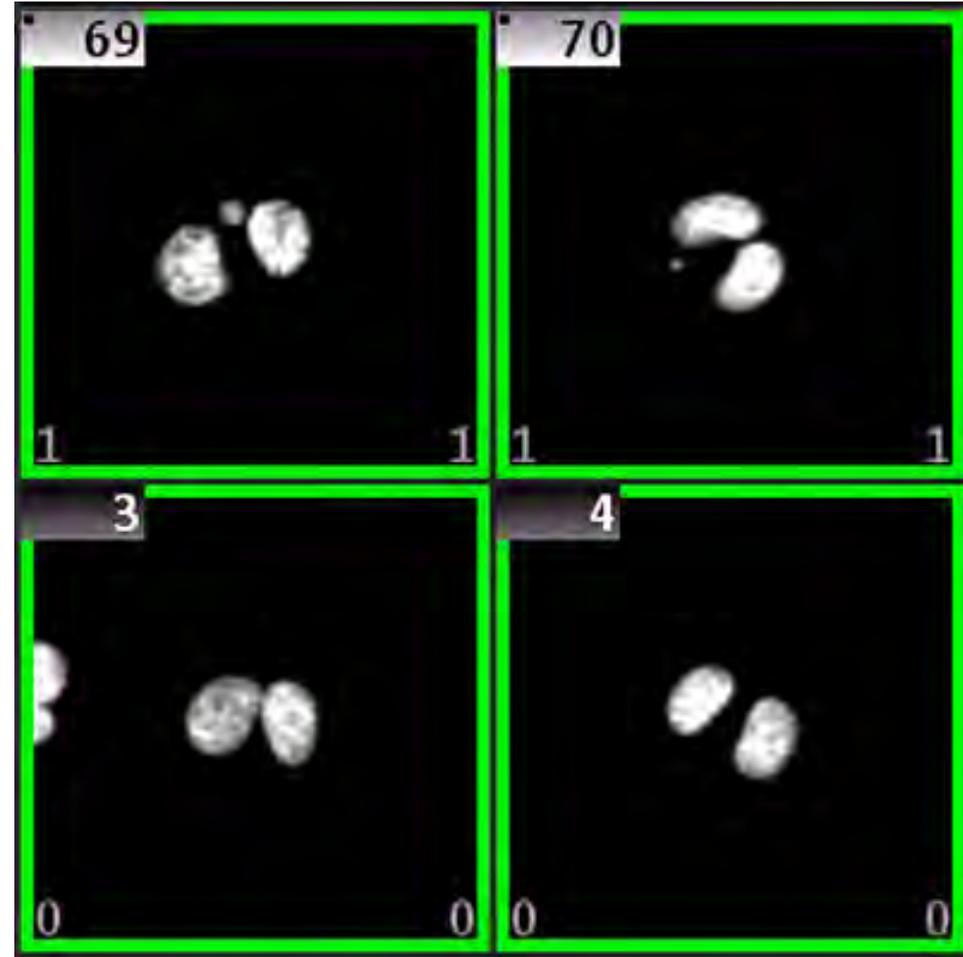
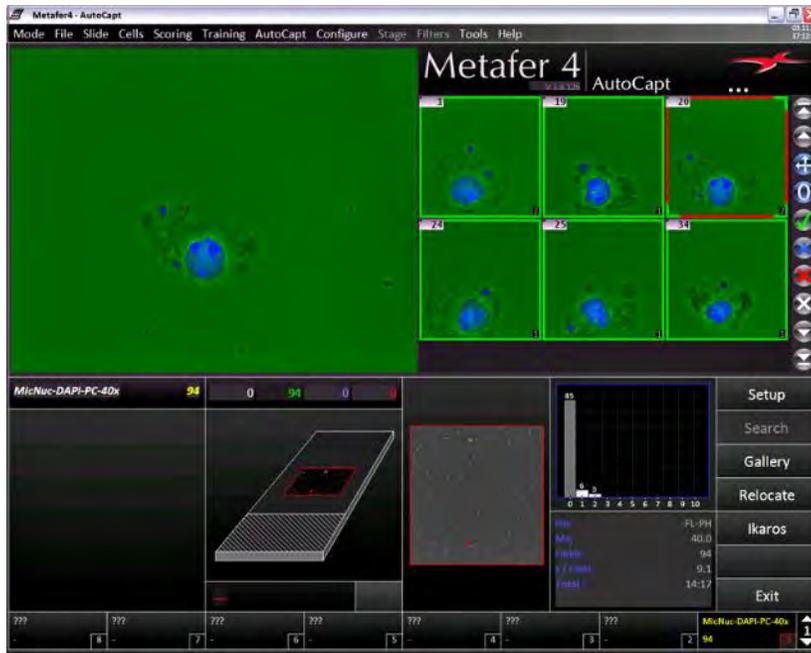


4. CBMN法の自動化技術





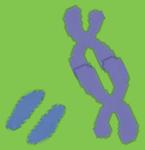
自動化システムの開発 (1)



Zeiss/MetaSystems



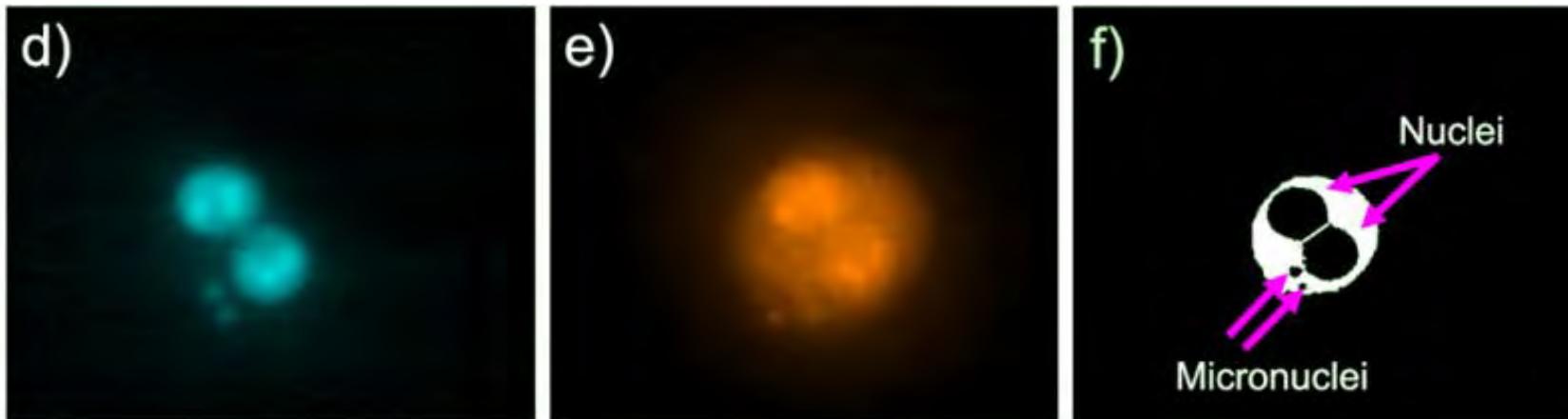
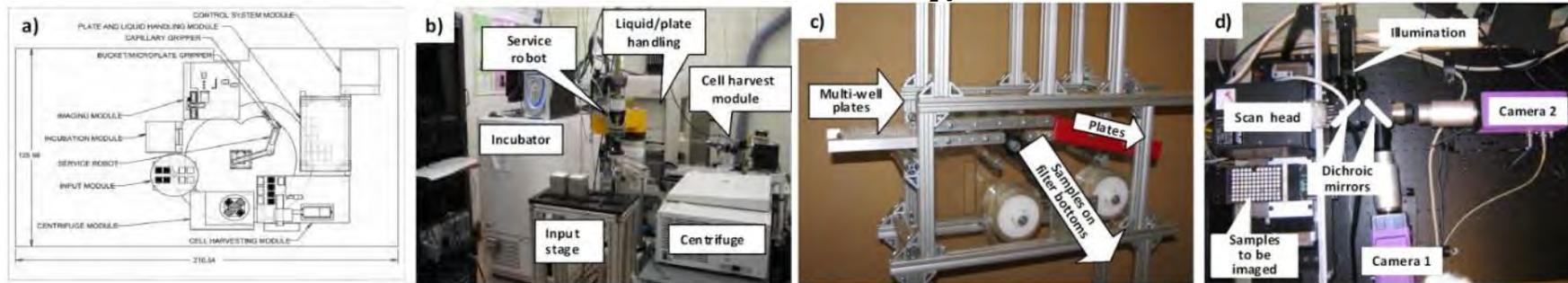
Tomisato MIURA



自動化システムの開発 (2)

The RABiT Rapid Automated Biodosimetry Tool

Center for High-Throughput Minimally-Invasive Radiation Biodosimetry,
Columbia University, U.S.A.



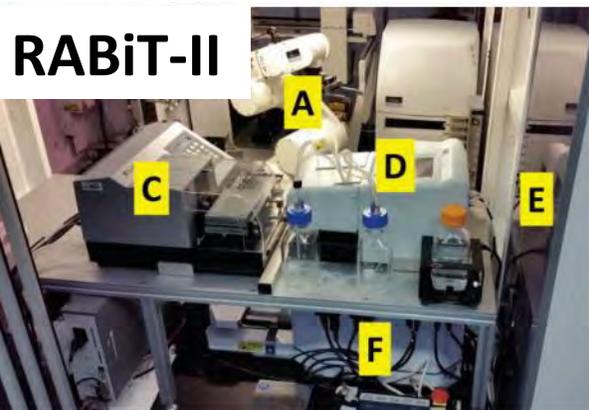
Garty G, Health Phys (2010)



Tomisato MIURA



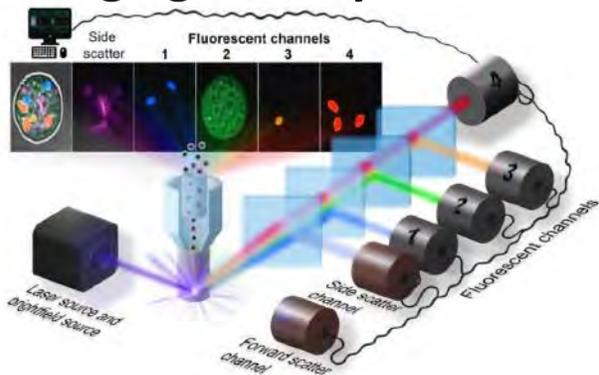
自動化システムの開発 (3)



Repin M. Radiat Res. 187(4): 492-498 (2017)



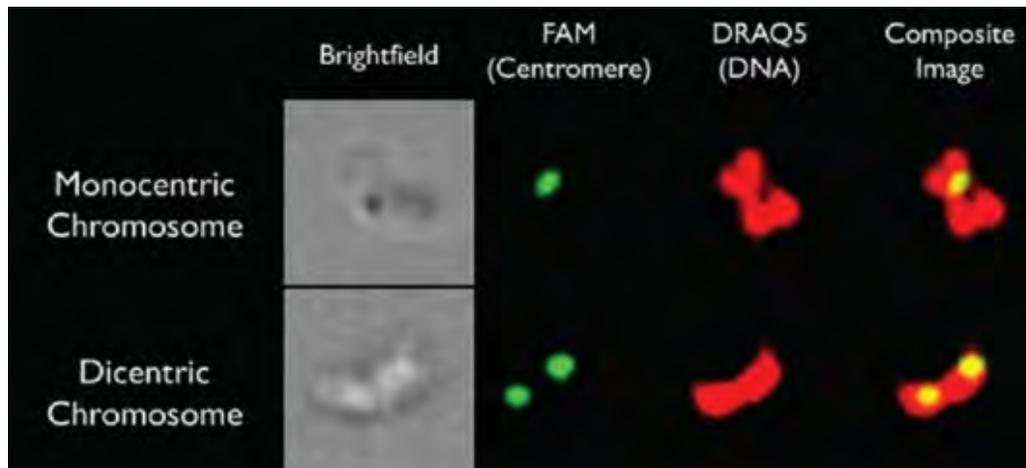
Imaging Flow Cytometer



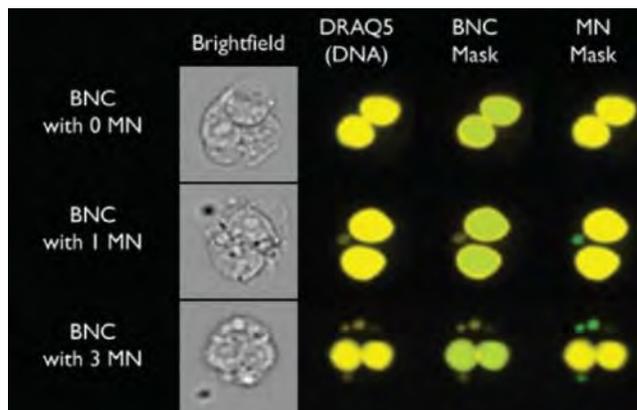
Voronin DV. Int J Mol Sci. 21(7):2323 (2020)



Dic assay

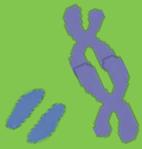


CBMN assay



Wilkins RC. Genome Integr. 8:7 (2017)





テキスト等

