

論文の内容の要旨

論文題目 放射線により染色体に生成する損傷の視覚的評価に関する研究

氏名 古川 章

1-1 本研究の目的

放射線による生体への影響として現れる種々の現象は、細胞中に存在して遺伝情報を保持しているDNA分子、およびその集合体である染色体に対する損傷に本質的に起因すると考えられる。したがって、これらの損傷を視覚的に観測し評価する技術を開発することは、放射線被曝事故発生時の被曝線量推定などの実用的応用から放射線影響の生物学的機構を解明するための学術的研究への応用に至るまで、放射線防護に関わるあらゆる領域において不可欠な重要性を持つものである。本研究では、こうした損傷の視覚的評価法の一つである、放射線により発生する二動原体型異常染色体の光学顕微鏡画像解析による自動検出システムを開発した。

1-2 本論文の構成

本論文の第一章では、「総説」として放射線による染色体の損傷、被曝線量推定への応用、およびその自動化の動向について概説したのち、本論文の目的と構成を述べる。

第二章では、「二動原体型異常染色体の自動検出装置の開発」について、装置およびソフトウェアの構成、本研究で開発した画像処理の手法である、モルフォロジー演算を用いた分裂中期細胞の抽出、教師画像データからのメンバシップ関数の作製による染色体の分類、染色体像の形状からの動原体位置の検出、のそれぞれについて詳述し、また、染色体標本作製技術の改良および自動化、そして開発した自動検出装置を実際に使用して性能を評価し人間の目視による検出と比較した結果について記述する。

第三章では、最近の計算機の高性能化および低価格化によって可能になった、実用機の製作について述べる。

第四章では、以上を総括して「結論」とする。

1-3 二動原体型異常染色体による被曝線量推定

ヒト末梢血液中のリンパ球を培養してスライドガラスに塗布し、染色をほどこしたものを顕微鏡で見ると、リンパ球のなかには細胞分裂の中期にあつて染色体(chromosome)が観察できる状態になっているものが含まれている。これを分裂中期細胞 (metaphase) とい

う。染色体は正常なヒトの細胞では46本あり、各々の染色体は、2本の染色分体(chromatids)が、動原体(centromere)とよばれる部分でくびれて接合している形状をしている。

動原体は、染色体1本に1つあるのが通常であるが、まれに動原体が2つある異常な染色体がみられることがある。これを二動原体(dicentric)という。これは、2本の染色体がそれぞれ切断・再結合し、動原体を含む断片同士が結合したことによって発生したものである。この二動原体は自然発生頻度が低く、形態的にも識別しやすいので、放射線被曝のもっとも鋭敏で正確な生物学的指標とされている。

放射線に被曝した細胞ではこの二動原体および環状染色体の出現率が線量に応じて増加するため、この出現率を調べることにより被曝線量を推定することができる。この二動原体染色体の出現率による線量推定法は、線量が低い場合には多数の細胞を顕微鏡で観察する必要があり、自動化による作業の支援が求められていた。

2-1 自動解析システムの構成と機能

試作した自動解析システムは、ステッピングモータにより駆動されるXYステージと自動焦点装置を持つ自動光学顕微鏡、画像入力装置および制御と画像処理を行う計算機から構成されている。

また、本システムのソフトウェアは、以下の1)~4)の処理を行うモジュール群と、その操作をするためのGUI(グラフィックユーザインターフェース)から構成されている。

- 1)スライドガラス上の分裂中期細胞を検出し、その位置を記録する。
- 2)分裂中期細胞の拡大像を撮像し、以後の画像処理に適したものを選別する。
- 3)細胞中の個々の染色体を切り離し、染色体上の動原体の位置を検出する。
- 4)異常染色体の候補を画面に表示し、必要により人間が見て修正する。
- 5)結果を集計し異常染色体の発生率を求める。

2-2 分裂中期細胞の検出

スライドガラス上の分裂中期細胞の検出は、二値化した入力画像に対し、数理形態学(Mathematical Morphology)的演算、あるいはモルフォロジー演算と呼ばれる手法による基本的処理である膨張(Dilation)、収縮(Erosion)、およびこれらを組み合わせて行う開放(Opening)や閉鎖(Closing)などの処理を施すことにより、染色体に相当する大きさの小粒子が集合して形成された分裂中期細胞に相当する大きさおよび形状の集合体を抽出することによって行った。

2-3 分裂中期細胞像の拡大像の撮像と選別

二動原体染色体の有無を判定するために、上述の処理により検出された個々の分裂中期細胞を拡大して撮像する必要がある。対物レンズを100倍のものに切り替え、検出された

分裂中期細胞の位置にXYステージを駆動してスライドグラスを移動し、1024×1024画素の解像度で撮影する。このとき、自動的に位置を修正して分裂中期細胞が視野の中心に入るようにし、細胞像が画面枠全体に入る大きさになるようにズームレンズにより拡大する動作を行う。

2-4 二動原体染色体の検出

染色体上の動原体の位置の検出は、まず分裂中期細胞像から個々の染色体を切り出すセグメンテーション処理を行い、切り出された画像を分類して染色体のみを取り出し、その主軸を求め、主軸に直交した方向の濃度分布から動原体の位置を判定するための特徴量のグラフを作成する。それらを得点化して掛け合わせて得られたグラフから動原体の位置を判定する。

切り出された染色体を分類するときに、あらかじめ正しく分類された画像データ（教師データ）より抽出した特徴量のヒストグラムを各分類別に求めて、それを基にメンバシップ関数を自動生成し、これを用いて分類を行うという独自の手法を使用している。

また、セグメンテーション処理および動原体検出処理を行うときに取得した特徴量を用いて分裂中期細胞の格付けを行う。

2-5 レビューおよび集計結果表示

複数の動原体が検出された染色体、すなわち異常染色体の候補を画面に表示し、人間がその正誤を判定して検出結果の修正を行う。全て検査し終わったら、異常染色体数、異常染色体を含む分裂中期細胞数、異常発生率などを集計した結果を表示する。

2-6 自動化のための標本作成法

染色体異常の自動解析を行うためには、画像処理システムを開発するのみでは不十分であり、自動解析に用いる標本の作製法に関しても改良または新規開発が必要である。このために行われた以下の事項について述べる。

- 1) 培養法の改良とバックグラウンド除去法の開発。
- 2) 染色体標本の自動作成装置の開発。
- 3) 自動培養ロボットの開発。
- 4) 標本作製に適した自動焦点用スライドグラスの評価。

2-7 評価実験

本システムの性能を評価するため、同一試料を本システムと専門家が観察し、二動原体型異常染色体の発生率の線量効果曲線を求める実験を行った。健常な成人男性の末梢血を採取し、X線を照射した後スライドグラス上に染色体標本を作成した。試行は高線量領域を用いた試行1と、低線量領域を用いた試行2の2回に分けて行った。X線照射量は試行

1で0、94.5、189.0、および283.5 cGy、試行2では11.3、23.6、47.3 および94.5 cGy であった。両試行とも各線量について1枚のスライドガラスを使用した。

試行1の結果では、本システムによって求められた線量効果曲線は人間の専門家による結果よりも低い値を示したが、両者は良好な比例関係にあるため、本システムで得られた異常発生率に一定の係数を乗ずることにより人間による結果に一致する。試行2では分裂中期細胞の選別を試行1よりも厳しく行ったため、自動装置による結果は人間による結果と同様ものとなっている。

2-8 実用機の製作

上述の自動システムを開発した後、このシステムを更に発展させることを必要とさせるような以下のような状況の変化があった。

- 1) 計算機の高性能化・低価格化
- 2) 全自動顕微鏡の市販開始
- 3) 自動化に適する新しい染色法が開発された
- 4) 被曝事故が各地で頻発したことから、高速・大量処理への需要が高まった

このような状況の変化に対応すべく、これまでの成果を活用しつつ、市販の部品を使用することにより低価格化を図った普及機を製作し、6台を国内各地の研究機関に設置した。

3-1 結論

本研究において、放射線被曝時の線量推定のための二動原体型異常染色体の自動検出装置、およびこれに用いるための染色体試料作製に関連した技術を開発し、実用可能な性能を有するシステムを実現することができた。染色体試料作成法の改良およびその自動化といった周辺技術の開発までも含めた、総合的な線量評価自動化システムの開発に成功したのは、世界的にも類をみないものである。性能向上と普及化の両面における今後の発展が望まれる。