

# 人員生物劑量評估研究

## 期末報告

委託單位：行政院原子能委員會

執行單位：核能研究所同位素組生物劑量實驗室

計畫主持人：張志賢博士

共同主持人：陳家杰博士、王重德科長

執行期間：100 年 1 月 1 日～100 年 12 月 31 日



## 中文摘要

目前世界上生物劑量計公認的黃金標準是以染色體雙中節分析法(Dicentric Chromosome Assay)來評估人員所接收到的輻射劑量，核研所已初步建立生物劑量實驗室以及人員生物劑量評估相關技術，同時也與國際的生物劑量實驗室展開聯繫，包括美國田納西橡樹嶺細胞遺傳生物劑量實驗室的 Dr. Livingston、日本弘前大學的 Dr. Yoshida 和加拿大衛生部的 Dr. Wilkins。本年度核研所生物劑量實驗室完成人類血液之合法取得、Giemsa 染色法(雙中節分析法)與相關標準作業程序文件(SOP)的建立、國內生物劑量網路之建構(慈濟大學)、加入國際生物劑量網路組織(DicentricCount.Org)等。透過核研所人員生物劑量實驗室的建立將有助於制定相關意外曝露應變作業程序，並發展出具有國際水準的輻射生物劑量實驗室。

## Abstract

Dicentric chromosome assay has been widely used as a golden standard for evaluation of personal biodosimetry in the world. Institute of Nuclear Energy Research (INER) has established biodosimetry laboratory and related techniques for evaluation of personal biodosimetry. Moreover, we have collaborated with Dr. Livingston (United States REAC/TS cytogenetic biodosimetry laboratory), Dr. Yoshida (Hirosaki University, Japan) and Dr. Wilkins (Health Canada, Canada). This year, we have legally obtained human peripheral blood lymphocyte by approval of protocol by IRB in Tzu-Chi hospital and setup Giemsa stain and finished related SOP documents. We also constructed domestic biodosimetry network with Tzu-Chi University and became the member of DicentriCount.Org (Pilot website of biodosimetry). Through development of biodosimetry laboratory at INER, it would be helpful to set up accidental exposure contingency procedures and develop an international biodosimetry laboratory.

## 目錄

中文摘要	1
英文摘要	2
前言	4
研究目的	5
文獻探討	6
研究方法	9
結果與討論	10
結論	13
參考文獻	14
圖表	16
附件一 期中執行進度	
附件二 輻射效應國際研討會報告內容	
附件三 慈濟大學輔導案結案報告	



## 前言

國內目前與輻射工作相關之人員大約為 4 萬 4 千餘人，涵蓋核能電廠、工業、醫院、研究機構等各類領域。自 2001 年 9 月 11 日美國遭受恐怖攻擊之後，如何防範髒彈 (dirty-bomb) 就成為世界各國所關注及提前預防的演練項目(1-4)。2011 年 3 月 11 日於日本東北福島所發生的複合型災難 (地震加上海嘯) 重創日本，並造成核電廠輻射意外曝露事件。這也是僅次於 1986 年蘇聯車諾比事件後所發生最為嚴重的核電廠輻射意外曝露事故(5)。當緊急輻射意外曝露事故發生時，往往人員並未配帶劑量配章，因此在事故後進行人員生物劑量評估便顯得相當重要。

## 研究目的

人員劑量評估技術，除了採用物理劑量計(熱發光劑量計、光激發發光劑量計)供參考外，建立生物劑量評估為輻射事故發生後必須採取的措施，因為當緊急輻射事故意外發生時以確認人員接受之劑量，採取必要的醫療照護行動，保障工作人員及民眾的健康與安全；目前世界上的生物劑量實驗室多屬國家及實驗室，因此，核能研究所在建立生物劑量實驗室之策略，將先與國內醫學中心合作，包含人員訓練，與參考實驗室進行實驗步驟、染色體分析比對，建立國內分析方式一致性；未來將規劃進一步與亞洲輻射生物劑量實驗室合作(如日本國家輻射科學研究所)，作為亞洲之參考實驗室，建立染色體彼此分析之一致性，以建立與提昇我國生物劑量實驗室而努力，使台灣發展出具有國際水準的輻射生物劑量實驗室，為國內核能安全盡一份心力。

## 文獻探討

生物劑量計是針對人體經游離輻射曝露後，人體淋巴球發生染色體變異，再利用劑量與效應的關係，對應出人體在輻射曝露時所接受的劑量。目前生物劑量使用相當廣泛，而較常應用在較高的輻射曝露意外事件，由於部分受曝者可能沒有佩戴人員劑量計，在此情形下，除現場及輻射源的物理特性評估人員劑量外，亦可使用生物劑量計技術評估。一般而言，生物劑量是最趨近於受曝者真實所接受的劑量。生物體內作為生物劑量計最常使用的方法為染色體變異分析，即由分析染色體變異的程度及數量來對應所接受的劑量。染色體變異經過輻射照射後所產生的變異，依照細胞是否仍有保留分裂的能力，可以分成不穩定變異及穩定變異兩類。不穩定變異方面，有三種以上的型態，如雙中節(dicentrics)、環形(rings)和後期橋(anaphase bridge)，穩定性變異方面則有易位(translocations)和缺失(deletions)。

依據國際原子能總署(IAEA)2001年與2011年所出版的細胞遺傳輻射生物劑量技術文件之內容，列出以人體淋巴球為研究標的之細胞遺傳技術包含黃金標準(gold standard)的雙中節染色體分析法(Dicentric chromosome assay)、染色體轉位法(chromosome translocation)、成熟前染色體濃縮法(premature chromosome condensation assay)以及阻斷細胞分裂微核法(cytokinesis block micronucleus assay)四大類(Radiation measurements, 2011)，而其中以雙中節染色體分析法被應用的最為普遍與廣泛(6-8)。

目前本計畫100年度所建立之技術即為雙中節染色體分析法，雙中節染色體分析法是1962年由美國科學家Bender與Gooch所建立，簡單來說即是以血液淋巴球細胞染色體變異的程度及數量(雙中節的數目)來對應所接受的輻射劑量(9)。淋巴球來作分析有幾個優點：人體組織中以淋巴球對於輻射最為敏感，淋巴球隨血液做全身循環，血液中的淋巴球，有99.9%是處於細胞週期中的G<sub>0</sub>期，對輻射敏感度是一致的；淋巴細胞較其他細胞易於取得，只需簡單的抽血、分離及培養技術，就可得到足夠的細胞以供分析檢查。染色體變異頻率與劑量的關係有二次線性的關係，人體淋巴球細胞經過鈷-60照射後分析其雙中節及環形變異頻率，關係呈現線性平方的關係：在劑量低於1Gy時，通常以單一次碰撞事件為主；至於劑量高於1Gy時，價電子數目增多，使得變異事件快速增加，其速

率通常以二次方上升，因此染色體雙中節評估技術為生物劑量計計劃最基本需建立之技術。以雙中節、環形等不穩定變異推算劑量時，通常使用於急性曝露的情況，且最好是曝露後越早分析愈好，以免受到細胞死亡更新或其它因素干擾。雙中節染色體分析法之優點為專一性強、背景值低、具經濟效益以及穩定與再現性高。但其缺點為所需要花費的時間長以及需要較多專業的人力參與。

為了因應輻射意外曝露事故所造成的大量傷患以及後續之醫療處理，增加生物劑量評估所能承載的能力便很重要。目前是以實驗流程自動化與建置細胞遺傳生物劑量實驗室染色體變異分析合作網絡來達到此一目標。由於日本在 2001 年發生東海村核輻射洩漏事件，因此，2007 年日本以全國九個不同的實驗室(分別為位於北海道的帶廣醫學院、青森縣的環境科學研究所、千葉縣的國家放射科學研究所、東京的東京齒科醫學大學、愛知縣的人類服務中心、京都市的京都大學、大阪市的大阪府立大學、廣島市的輻射效應研究基金會以及廣島市的廣島大學)為基礎建立日本生物劑量染色體網絡組織 (Chromosome Network)，此一組織的目的是為了整合各實驗室以預防大規模輻射事故發生、建立細胞遺傳劑量評估的標準方法 (包含中期細胞的篩選以及雙中節染色體的計數)、建立日本劑量反應曲線、細胞遺傳生物劑量評估的訓練(10)。在 2008 年比較四個國家(美國、日本、加拿大與德國)五個不同實驗室的雙中節染色體分析法文獻中指出各實驗室間所推估的輻射吸收劑量都有很高的一致性 (11)。此外，目前使用 e-mail 與建置網站(例如 DicentriCount.Org)等資訊工程方法也可以大幅度的縮短雙中節染色體分析法所需要的時間並交換各實驗室間染色體分析的資訊。以 2011 年 Dr. Livingston 所發表的文獻中，將 20 張中期細胞的影像以 e-mail 傳送給分布於歐洲、北美以及亞洲的 16 位參與者計數雙中節，使用卡方統計結果顯示有極佳的一致性 ( $p=0.999$ )。同一文獻中將 50 張中期細胞影像存放於 DicentriCount.Org 網站上，由 20 位參與者在網站上計數雙中節染色體，同樣利用卡方統計結果顯示也有極佳的一致性 ( $p=0.999$ )。因此利用以上所述之方法可有效的減少雙中節染色體分析法所需耗費的時間與人力，大幅度的增加面對輻射意外事故處理的能力(12)。

本計畫目的是在核能研究所建立國家生物劑量計參考實驗室，核能研究所早期曾經建立起染色體變異之相關判別方法，但因技術人員陸續退休，使得判別染

色體變異之標準作業流程亟待重新建立，而雙中節目前仍為世界公認的主要分析方式。本計畫 100 年已完成血液的合法取得、人員訓練(細胞遺傳學知識與技術)、染色體製備之標準作業程序、雙中節染色體之辨識與分析、與國內的慈濟大學以及美國、日本和加拿大生物劑量實驗室建立合作管道等。透過核研所國家生物劑量參考實驗室之建立，將有助於國內受意外輻射曝露人員生物劑量評估。

## 研究方法

1. 建立國內生物劑量實驗室組織，建立與醫院合作管道，取得人類血液樣本，並進行人員染色體分析訓練。
2. 血液檢體的運送：由慈濟大學提供去連結剩餘血液檢體，經由快遞送至核研所進行 Co-60 劑量之照射，分別於 100 年 8 月 22 日及 10 月 12 日共進行 2 次。
2. 血球培養：將 1 毫升全血加入含有 20% 胎牛血清，1.25% 的 L-穀胱胺酸溶液，1.2% 的青黴素與鏈黴素混合液的 8 毫升 RPMI-1640 完全培養基，並額外加入 0.2 毫升促進淋巴細胞分裂的 PHA，放入 5% CO<sub>2</sub> 培養箱於 37°C 培養 45 小時。
3. 染色體收取：自培養第 45 小時起加入 0.1 毫升 colcemid，之後放入 37°C 培養箱繼續培養 3 小時。去除上清液，另加 8 毫升 0.54% 的低張氯化鉀溶液，置於 37°C 培養箱作用 28 分鐘。最終以甲醇和冰醋酸為 3:1 比例的固定液加入以固定細胞。用固定液將細胞稀釋到適當的密度，均勻地將細胞分佈在載玻片上。放入 65°C 加熱板上 1 小時後進行染色。
4. 染色實驗流程：用新鮮配製的 Wright stain (Wright : pH7.0 buffer= 1: 5) 染色 60 秒。用自來水退染然後用吹風機吹乾。在顯微鏡下觀察 metaphase 染色體。
5. 顯微鏡觀察和紀錄：先以低倍(100X) 找到細胞染色體，再以(1000X) 油鏡觀察 46 個染色體，計算染色體型變異（包含斷片、環形、雙中節、多中節），多中節染色體記錄為 n-1 個雙中節。

## 結果與討論

1. 建立與醫院合作管道，取得人類血液樣本。本年度已完成與慈濟大學附設醫院建立合作管道。因為目前取得血液樣本進行實驗必須得到受試者的同意並經過醫院的人體試驗倫理委員會的審核通過才能夠進行，因此今年核研所也透過慈濟大學附設醫院人體試驗委員會完成人體試驗研究計畫申請 (IRB100-103) 並得到核准(圖一)。此外，參與此計畫之相關研究人員也已取得聯合人體試驗委員會 (JIRB) 講習班進行人體實驗的資格認證。
2. 血液檢體的運送：取得人血進行實驗為本計畫之關鍵之一，由慈濟大學提供去連結剩餘血液檢體供做教學之用，分別於 100 年 8 月 22 日及 10 月 12 日共進行 2 次，經由快遞送至核研所進行 Co-60 劑量之照射。
3. 輻射照射劑量之確效：Co-60 水中照射設施為核研所知核心設施，亦為此計畫 Co-60 照射設備，我們選用丙胺酸劑量劑(Alanine/EPR dosimeter)與熱發光劑量計(Thermoluminescent Dosimeter)之使用進行輻射照射劑量之確效，首先以丙胺酸劑量劑至於照射盒中不同位置，找到劑量率為 0.633 Gy/min 之照射位置，再以熱發光劑量計進行 0, 1, 3, 5 Gy 四種劑量之照射，之後將熱發光劑量計送至國家游離標準實驗室進行劑讀，分析實際劑量 (圖二)。
4. 人員染色體變異判別訓練。核能研究所早期曾經建立起染色體變異之相關判別方法，但因技術人員陸續退休，使得判別染色體變異之標準作業流程亟待重新建立。目前本年度核研所透過與慈濟大學合作的方式重新建立起染色體變異之標準作業流程(圖三)。自今年八月起分別由劉怡均教授、方菊雄教授及李桂芳小姐來核研所進行人員相關訓練以及以 e-mail 或電話的方式進行相關訓練的指導。訓練範圍包括人員生物劑量實驗室標準操作程序書(SOP)之建立、人類血液淋巴細胞培養、雙中節染色評估技術、數據整理與分析以及人體試驗計畫書申請 (圖四、表一)。
5. 採購觀察染色體變異(雙中節)的顯微鏡。為了得到更好的染色體影像數據品

質以及節省搜尋適當 metaphase 細胞之時間，本年度已完成採購 Zeiss Axio Imager Z2 OEM 顯微鏡一台(包含物鏡、光源、載物台、螢光濾片組以及影像系統)以及所附之系統軟體 (圖五)。

6. 建立淋巴球染色體雙中節評估技術。因為目前染色體雙中節分析法是公認的黃金標準，因此核研所本年度已成功建立 Giemsa 染色技術 (圖六)。淋巴細胞在接收不同的輻射劑量照射後，染色體雙中節數目會隨著接收到的輻射劑量增加而顯著變多(圖七)。
7. 與國際生物劑量實驗室合作。核研所今年成功和美國橡樹嶺科學教育研究所細胞遺傳生物劑量實驗室的 Dr. Livingston、日本弘前大學 Prof.Yoshida 以及加拿大衛生部的 Dr. Wilkins 取得聯繫並互相交流資訊。同時，核研所今年也成為 DicentriCount.Org(由 Dr. Livingston 所發起之一個辨識染色體雙中節之網站)組織之正式成員，透過參與此一組織可以提昇核研所生物劑量實驗室在國際的能見度並可大大的提昇核研所人員辨識染色體雙中節之能力(圖八)。
8. 完成國內生物劑量與國際生物劑量實驗室進行染色體影像電子檔比對分析。為了提昇核研所人員辨識染色體雙中節之能力，核研所生物劑量實驗室在今年度已完成和國際生物劑量實驗室進行染色體影像判讀分析比較。在 20 張的染色體影像方面，核研所 5 位同仁所計數之結果為 36.2 (dicentric equivalent) 無論是和國內的慈濟大學所計數之 40.5 或是和國際生物劑量實驗室所計數之 37.4 都有很高的一致性。同樣的在 48 張染色體影像方面，核研所 4 位同仁所計數之結果為 53.2 (dicentric equivalent)，此一結果與國際生物劑量實驗室所計數之 57.7 也相當接近。從以上兩次的比對分析中顯示核研所同仁辨識雙中節染色體之能力已成功建立 (圖九、十)。
9. 為使原能會輻防處了解計畫執行概況，輻防處保物科王重德科長與許雅娟小姐與 100 年 8 月 17 日至核研所聽取期中執行進度，由張志賢博士進行簡報(附

件一)。

10. 100 年度之成果。已完成兩篇所內報告之撰寫與發表 (表二)以及參加輻射效應國際研討會進行口頭報告(表二)(附件二)。

11. 為有效及加速本計畫之執行，建立國內生物劑量實驗室組織非常重要，藉此建立與醫院合作管道，合法取得人類血液樣本，並進行人員染色體分析訓練；本年度與花蓮慈濟大學/醫院合作，建立國內生物劑量實驗室組織，藉由輔導之關係及輔導之結案報告(附件三)，雙方能夠進一步將技術提升。

## 總結

日本 2011 年 3 月 11 日所發生的複合式災難重創福島核電廠，產生嚴重的輻射外洩意外事故。同時，與台灣鄰近的中國大陸近年來為了拓展能源正盡全力發展核能，未來也可能會興建更多的核電廠。國內目前與輻射工作相關之人員大約為 4 萬 4 千餘人，涵蓋核能電廠、工業、醫院、研究機構等各類領域。面對這樣的現況，建立起國家型的生物劑量實驗室以及建構一套完整的輻射意外緊急醫療系統更是當務之急。

核能研究所已透過和國內的慈濟大學合作的方式成功建立起人員生物劑量實驗室，目前核能研究所人員生物劑量實驗室已具備基本的染色體變異分析設備與技術，在染色體雙中節的辨識能力方面也已達到國際水準。未來除將繼續添購所需的設備外，也將建立起輻射生物劑量評估曲線並積極的為加入全球生物劑量支援網路而準備。

## 參考文獻

1. 蔡青彥、傅孟鈞、余秉弘、張翠容、張志賢、陳家杰。利用細胞遺傳生物學技術進行人員生物劑量評估研究—以美國陸軍輻射生物學研究所為例。核能研究所。中華民國 100 年 7 月。INER-8222。
2. 余秉弘、蔡青彥、傅孟鈞、張翠容、張志賢、陳家杰。細胞遺傳生物劑量實驗室之發展現況-以美、日兩國為例。核能研究所。中華民國 100 年 9 月。INER-8462。
3. Walchuk M. The return of the ORISE cytogenetic biodosimetry laboratory. *Health Phys News* Oct 2007; 35: 3-5.
4. Walchuk M, Roessler G. Cytogenetic biodosimetry at the armed forces radiobiology research institute. *Health Phys News* Nov 2007; 35: 3-11.
5. Lee JK. Practical application of cytogenetic biodosimetry in radiological emergencies. *The Korean Journal of Hematology* Jun 2011; 46: 62-4.
6. IAEA. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment . A manual , Technical Report Series 405 IAEA Vienna 2001.
7. IAEA. Cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and respond to radiation emergencies. 2011.
8. Fenech M. Current status, new frontiers and challenges in radiation biodosimetry using cytogenetic, transcriptomic and proteomic technologies. *Radiation Measurements* 2011; 30:1-5.
9. Bender MA, Gooch PC. Types and rates of X-ray-induced chromosome aberrations in human blood irradiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1962;48:522-532.
10. Yoshida MA, Hayata I, Tateno H, *et al.* The chromosome network for biodosimetry in Japan. *Radiation measurements* 2007; 42:1125-27.
11. Wilkins RC, Romm H, Kao TC, *et al.* Interlaboratory comparison of the dicentric

chromosome assay for radiation biodosimetry in mass casualty events. *Radiat Res* 2008;169: 551-60.

12. Livingston GK, Wilkins RC, Ainsbury EA. Pilot website to support international collaboration for dose assessments in a radiation emergency. *Radiation measurements* 2011; 30: 1-4.

*Memorandum*

計畫編號：IRB100-103  
 計畫名稱：人員生物劑量評估研究  
 同意函核准日：November/29/2011  
 執行期限：December/31/2012

劉怡均副教授 大鑒：

由您所提出之上述計畫案，經本委員會審查後，決議為：『通過』。計畫執行同意函共一式二份，一份由主持人留存，一份由本委員會留存。

請善盡知情同意保護受試者之責任，並將受試者所簽署之研究計畫同意書副本給予受試者留存，本委員會將不定期進行監測，請務必確實執行。此外，經本委員會核准之計畫案於執行過程中，任何內容之變更須向本委員會申請變更案審查，審查通過才能再度執行。

依照ICH-GCP規定，臨床試驗每屆滿一年，研究倫理委員會必須重新審查試驗是否繼續進行，本委員會計畫執行同意函執行期限為一年，多年期計畫請於執行期限到期日二個月前繳交進度期中報告，以利本會進行審查，審核通過後，委員會會再核發執行同意函繼續執行，試驗完成後，請於結束後三個月內繳交結案報告書。計畫執行過程中若發生任何嚴重不良事件，請依「人體試驗管理辦法」及「藥品優良臨床試驗準則」之規定向中央主管單位和本委員會通報。

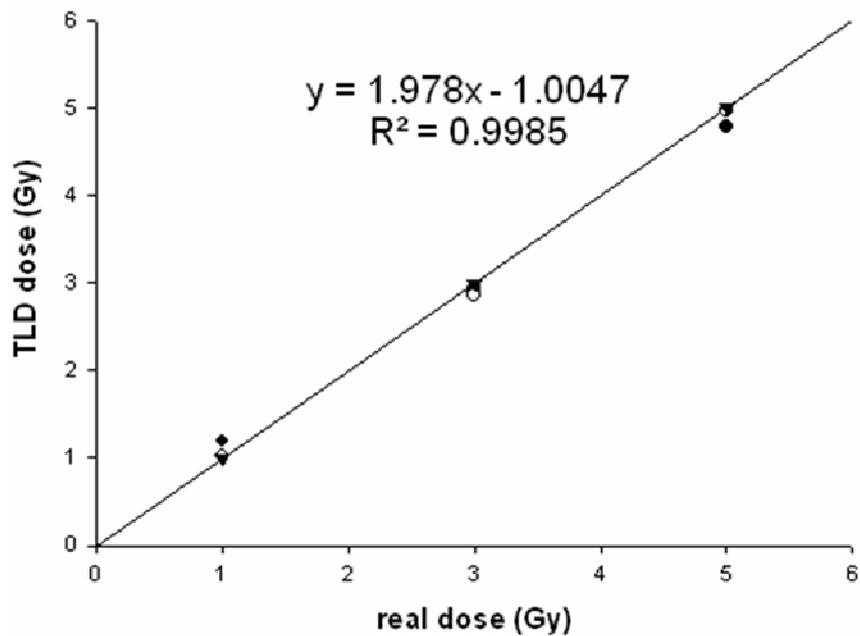
若未遵守以上規定，本委員會將取消本計畫執行同意函之有效性。

敬祝

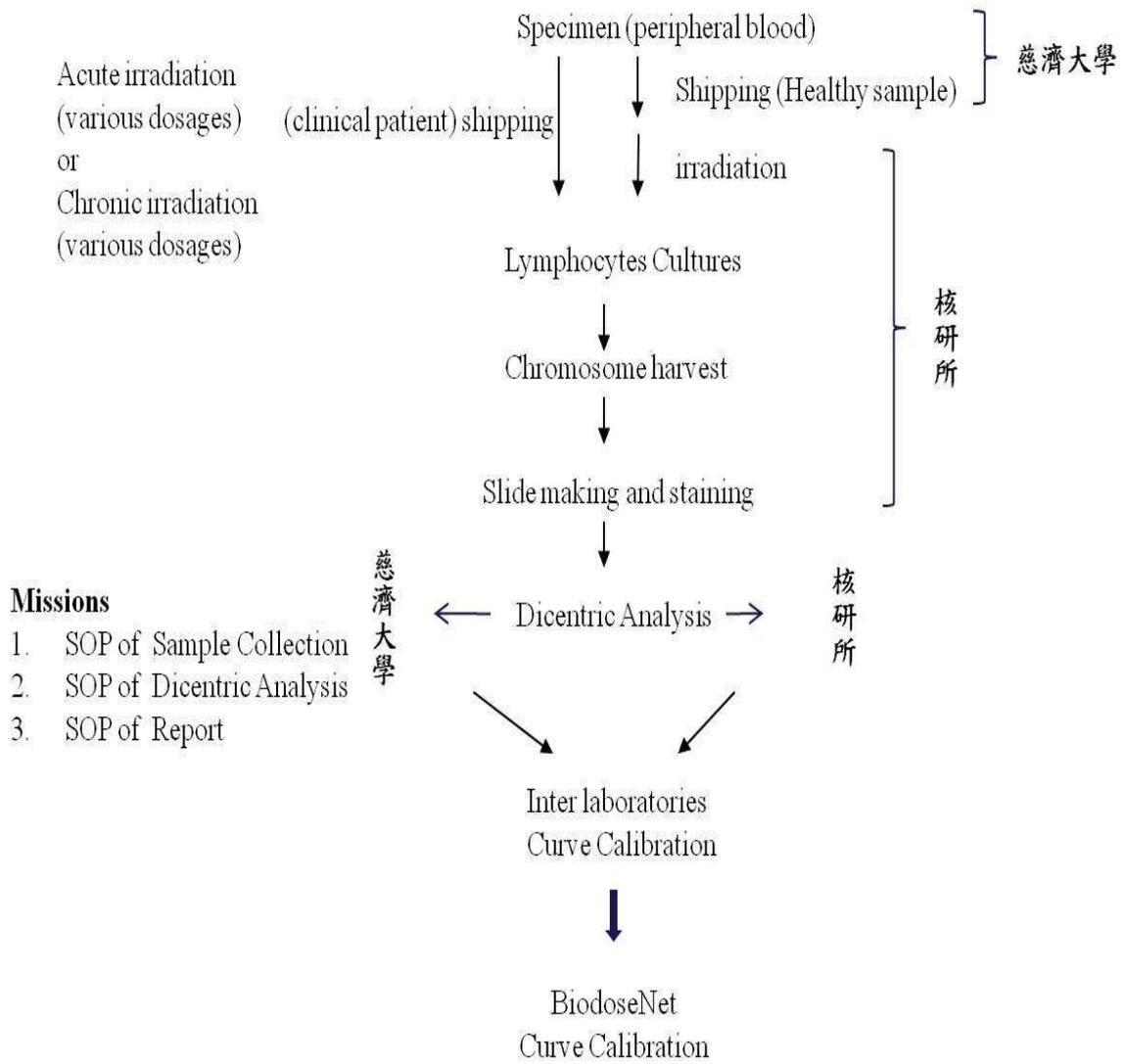
研安

研究倫理委員會 2011/12/2 謹啟

圖一 人員生物劑量評估研究計畫獲得慈濟綜合醫院人體試驗委員會同意函



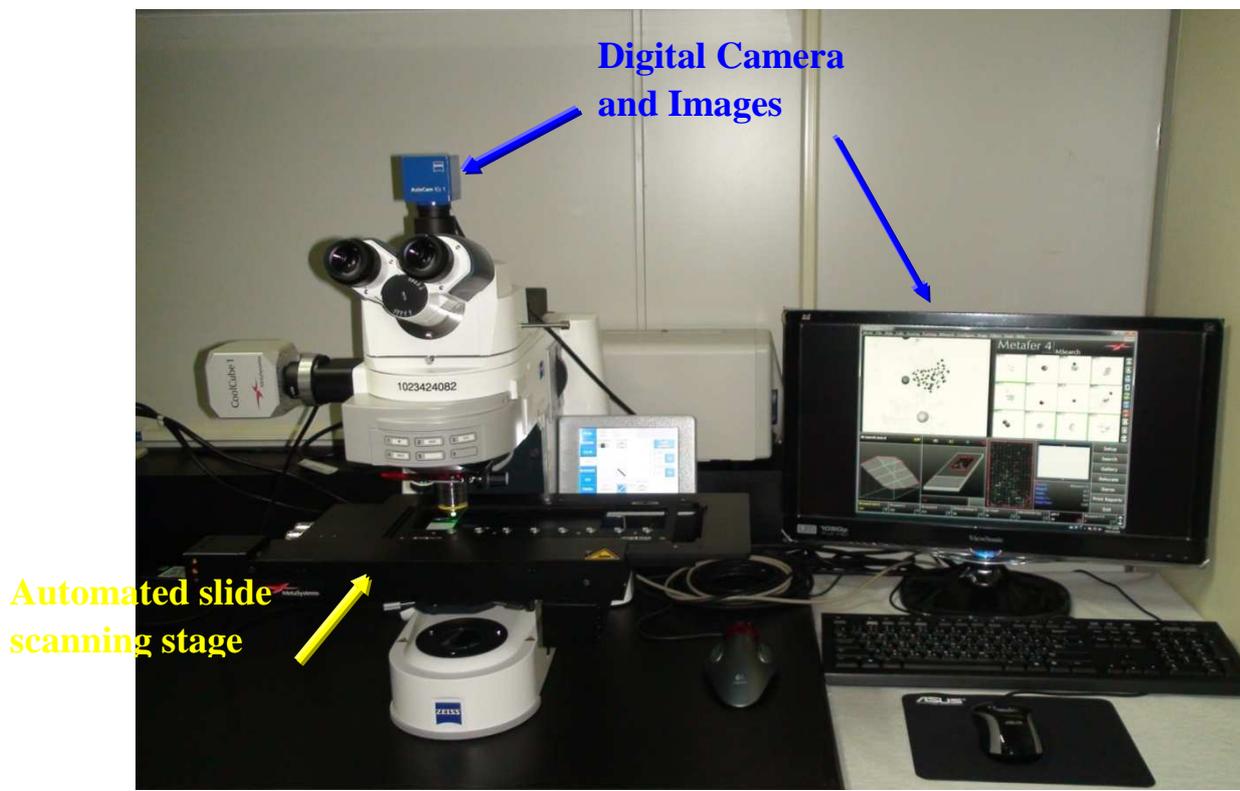
圖二 以丙胺酸劑量劑與熱發光劑量計進行輻射照射劑量之確效。首先以丙胺酸劑量劑至於照射盒中不同位置，找到劑量率為 0.633 Gy/min 之照射位置，再以熱發光劑量計進行 0, 1, 3, 5 Gy 四種劑量之照射，之後將熱發光劑量計送至國家游離標準實驗室進行計讀，分析實際劑量。



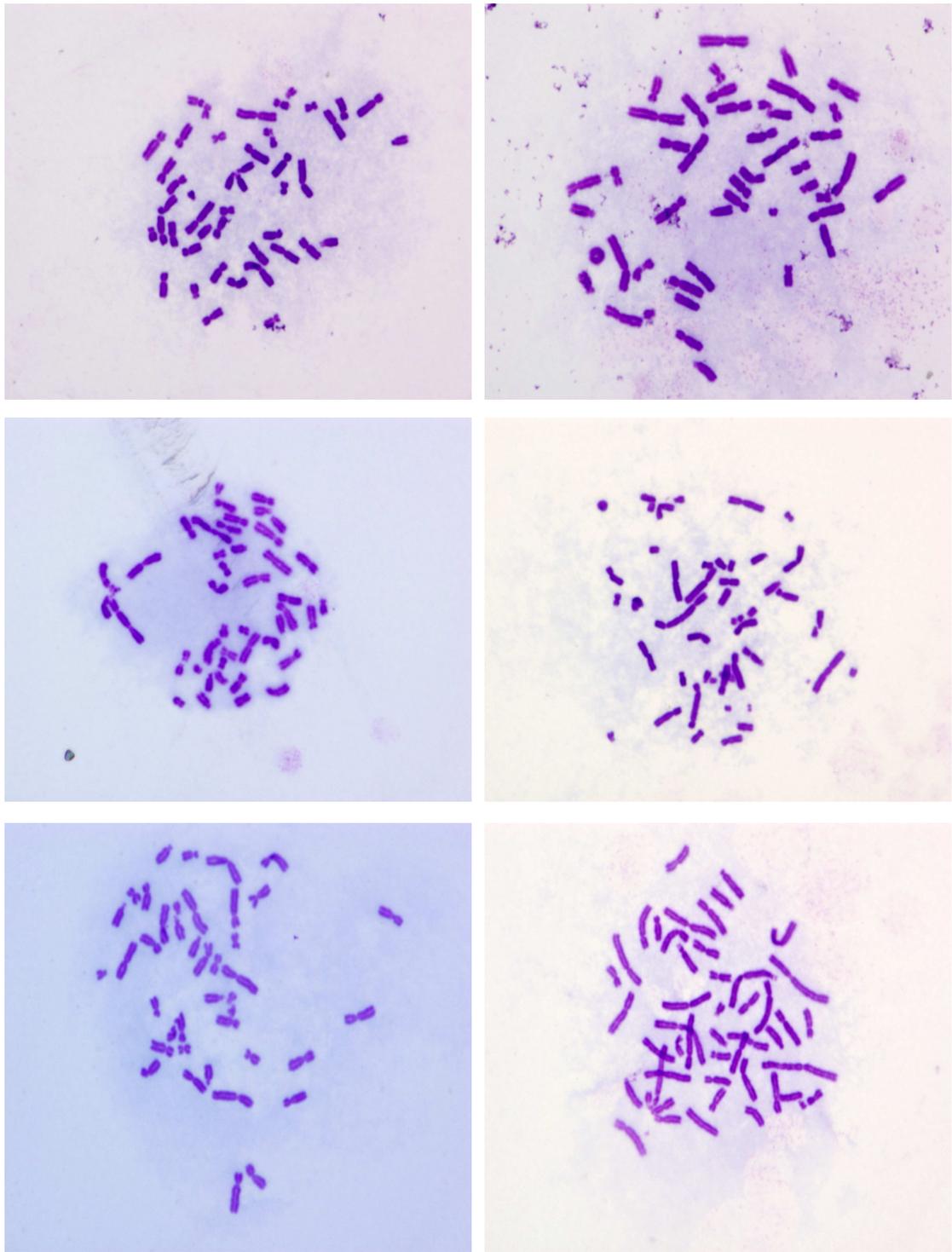
圖三 核研所與慈濟大學合作計畫流程圖。

輔導項目	民國年/月	100/6	100/7	100/8	100/9	100/10	100/11	100/12
人員學理訓練		→						
雙中結染色人員技術訓練與現場輔導			→					
完成臨床試驗計畫設計			→					
最終報告撰寫方式					→			
臨床試驗計畫進行人體試驗委員會 (IRB)送審			→					

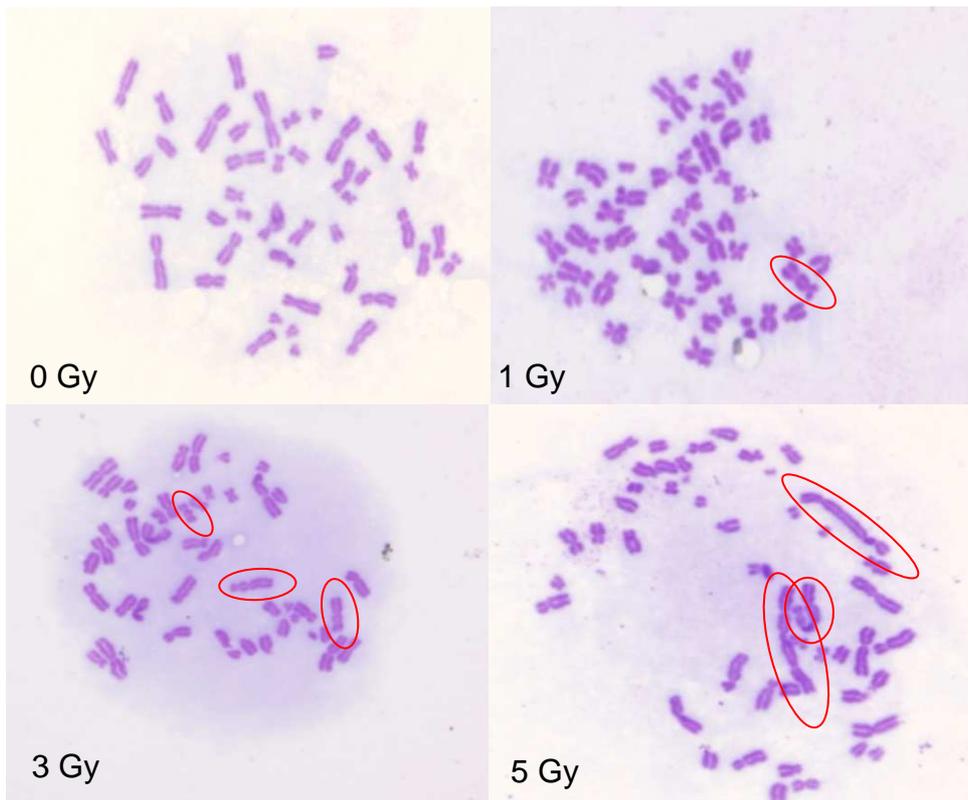
圖四 慈濟大學對核研所進行人員訓練進度表。



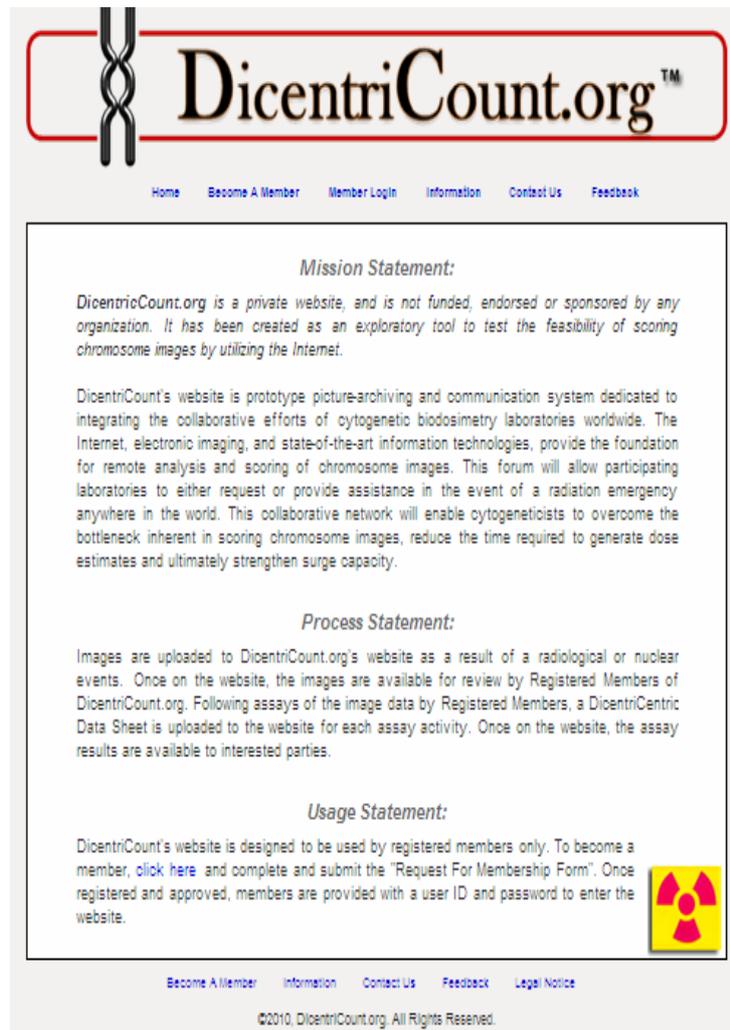
圖五 核研所生物劑量實驗室軟硬體設備之建置。包含 Zeiss Axio Imager Z2 OEM 顯微鏡一台(包含物鏡、光源、載物台、螢光濾片組以及影像系統)以及所附之系統軟體。



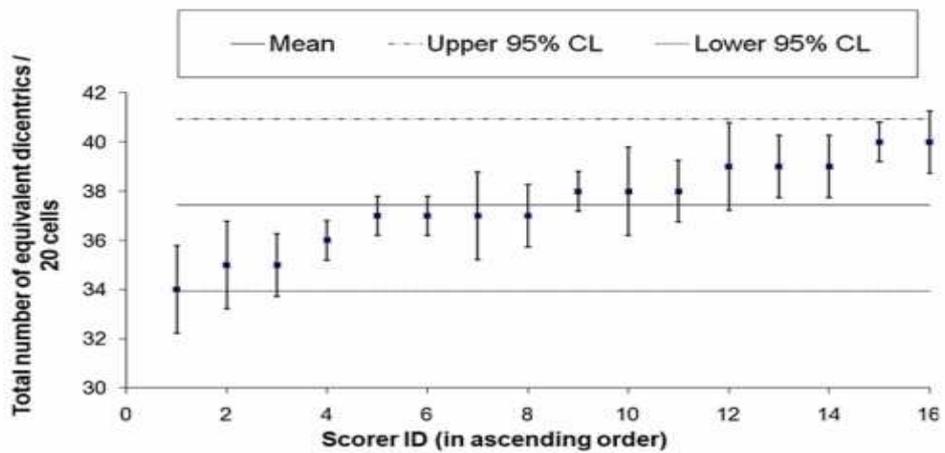
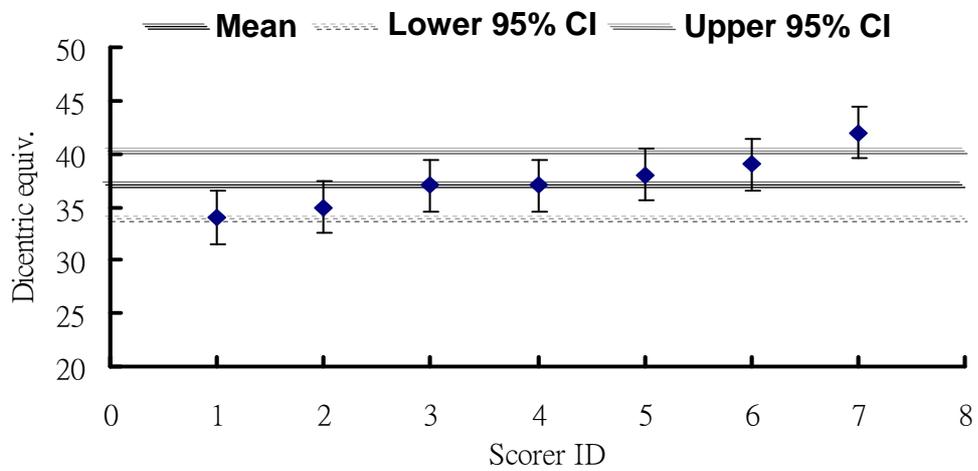
圖六 Giemsa 染色法之建立。



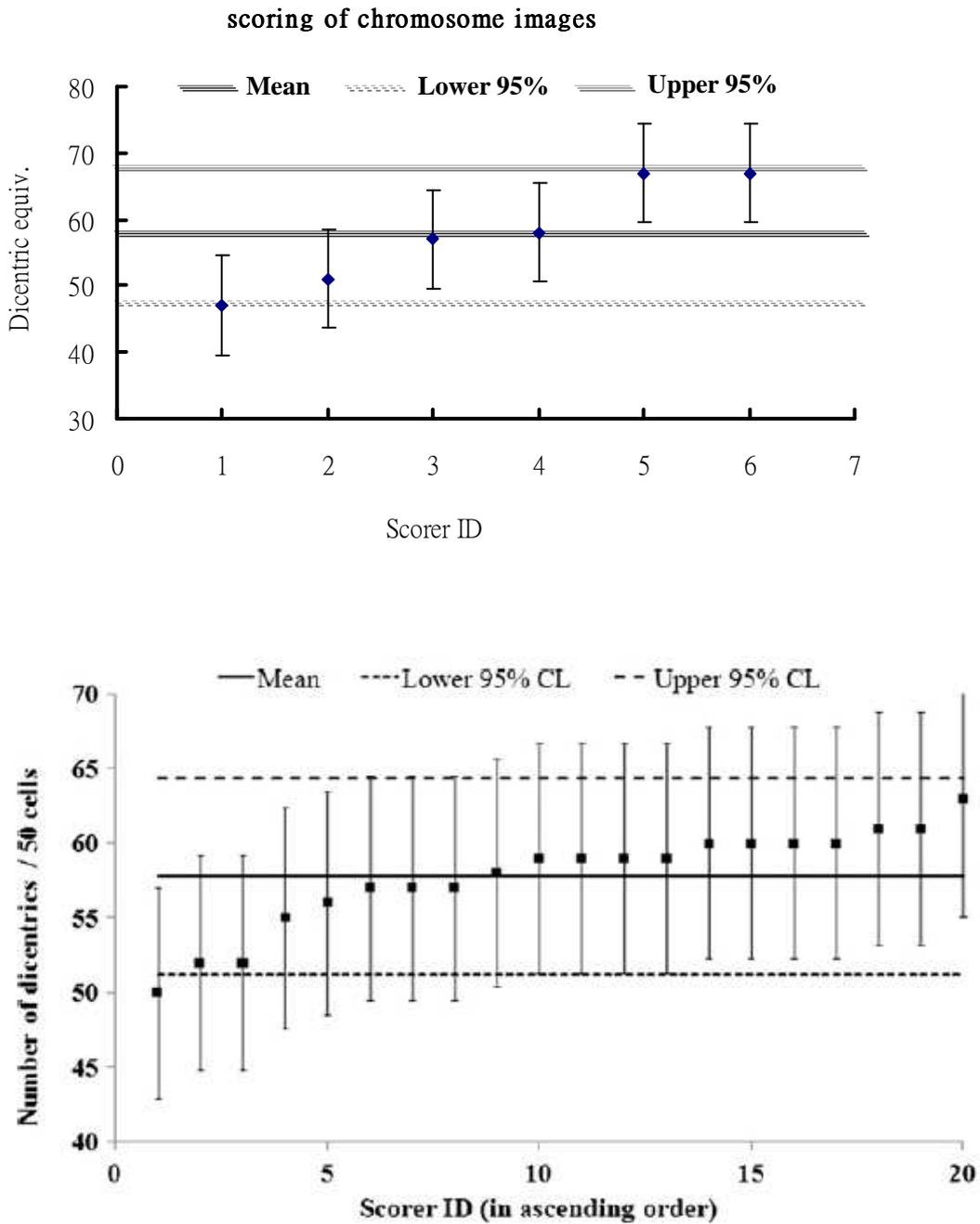
圖七 雙中節染色體分析法之建立。將接收不同輻射劑量之血液淋巴細胞利用 Giemsa 染色法進行染色體雙中節評估分析。與 0 Gy 比較，接受 1, 3, 5 Gy 輻射劑量的染色體雙中節之數目顯著增加 (如紅圈所示)。



圖八 The pilot website: DicentriCount.Org (12)。DicentriCount.Org <https://www.dicentricount.org/> 是由美國橡樹嶺科學教育研究所細胞遺傳實驗室的 Dr. Livingston 所設置之網站，此網站可上傳並存放大量的染色體影像圖片，透過加入此網站成為正式成員可訓練實驗室人員進行染色體雙中節辨識並能夠與國際生物劑量實驗室成員進行交流分享資訊。核研所已於 2011 年成為 DicentriCount.Org 之成員。



圖九 國內(核研所、慈濟大學)與歐洲、北美及亞洲生物劑量實驗室進行影像電子檔比對分析。上圖：核研所 5 位與慈濟大學 2 位共 7 位成員對 20 張染色體影像進行雙中節統計分析之結果。下圖：歐洲、北美及亞洲生物劑量實驗室共 16 位成員對 20 張染色體影像進行雙中節統計分析之結果(12)。



圖十 國內(核研所、慈濟大學)與國際生物劑量實驗室在 DicentriCount.Org 網站上進行染色體影像電子檔比對分析。上圖：核研所 4 位與慈濟大學 2 位共 6 位成員對 48 張染色體影像進行雙中節統計分析之結果。下圖：國際生物劑量實驗室共 20 位成員對 48 張染色體影像進行雙中節統計分析之結果(12)。

視訊課程：（小時）

4	人類染色體之構造及變異
4	染色體變異與輻射之關係
4	檢驗流程，細胞培養及報告
12	諮詢服務

實地輔導：（小時）

5	Blood culture
6	48 h - Lymphocyte metaphases harvesting
6	72 h - Lymphocyte metaphases harvesting
6	Staining and C-banding
4	Dicentric analysis I
3	Dicentric analysis II
8	Chromosomal analysis under microscope
4	Cytogenetic Nomenclature (ISCN) I
4	Cytogenetic Nomenclature (ISCN) II
8	實驗室硬體之規劃，SOP 建立

表一 慈濟大學對核研所人員進行視訊課程與實地輔導之內容與時間。

表二 100 年度所內報告與會議發表

1. 蔡青彥、傅孟鈞、余秉弘、張翠容、張志賢、陳家杰。利用細胞遺傳生物學技術進行人員生物劑量評估研究—以美國陸軍輻射生物學研究所為例。核能研究所。中華民國100年7月。INER-8222。

1. 余秉弘、蔡青彥、傅孟鈞、張翠容、張志賢、陳家杰。細胞遺傳生物劑量實驗室之發展現況-以美、日兩國為例。核能研究所。中華民國100年9月。INER-8462。

3. 張志賢。Biodosimetry Development at Institute of Nuclear Energy Research in Taiwan。輻射效應國際研討會oral presentation。中華民國100年12月。

## 附件一 期中執行進度

## 附件二 輻射效應國際研討會報告內容

## 附件三 慈濟大學輔導案結案報告

# 附件一 期中執行進度



## 人員生物劑量評估研究 期中執行報告

張志賢  
 中華民國100年8月18日

行政院原子能委員會  
 核能研究所

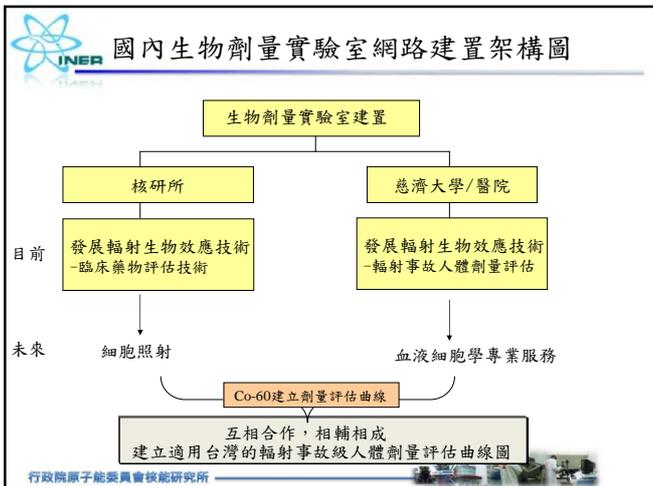




### 預定進度規劃

工作項目	年月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	備註
計劃書撰寫與簽約		=====												
文獻收集與醫院討論		=====												
標準操作程序書建立		=====												
試驗人員訓練						=====								
血液培養技術建立									=====					
染色體分析技術建立									=====					
人體試驗計劃書送審									=====					
顯微鏡設備採購/驗收						=====								
取得人血											=====			
資料整理及期末發表													=====	
工作進度估計百分比 (累積數%)		5	10	15	20	30	50	60	70	80	85	90	100	
預定查核點		第1季：計劃書完成簽約作業 第2季：試驗人員訓練 第3季：人體試驗計劃書送審 第4季：資料整理及期末報告												

行政院原子能委員會核能研究所





### 原能會「人員生物劑量評估研究」分項計畫

- 將建立生物劑量計參考實驗室，供受意外輻射曝露人員生物劑量評估，並可作為核醫藥物劑量評估應用。
- 第1年主要是建立與醫院合作管道，合法取得人類血液，辦理人體試驗委員會之申請，並建立相關國內技術合作平台。
- 第2年將就預算及時程考量，藉由人體試驗委員會通過，取得人類血液樣本，以建立標準曲線。
- 另就長期發展之考量，再建立FISH技術方面，規劃加入國際劑量支援網路及國際標準認證 ISO 21243，與國際接軌。

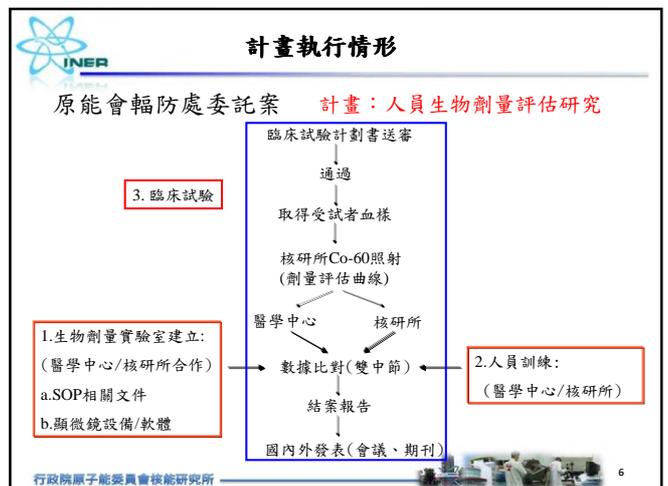
行政院原子能委員會核能研究所



### 「人員生物劑量評估研究」分項計畫

工作內容	績效目標	100年	101年
建立染色體雙中節評估技術及重建劑量反應曲線。	建立染色體雙中節評估技術及方法，作為人員意外輻射曝露早期曝露之劑量評估及劑量重建之用。	1. 建立與國內醫學中心聯繫管道，取得人血樣本。 2. 建立人員意外輻射曝露劑量評估技術及劑量重建技術。 3. 建置染色體雙中節評估技術。	1. 建立劑量反應曲線。
建立螢光原位雜交技術。	建立螢光原位雜交技術，作為人員意外輻射曝露之終身劑量評估之用。	瞭解螢光原位雜交技術(FISH)。	1. 建置螢光原位雜交技術(FISH)。 2. 建立人員意外輻射曝露劑量評估技術。 3. 建立劑量反應曲線。

行政院原子能委員會核能研究所



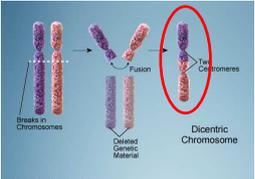
## 計畫執行情形

### 日本福島核事故 (Fukushima Daiichi nuclear disaster)



**REMPAN e-NEWSLET**  
World Health Organization  
Issue 3 July 2011

Editorial: WHO role in response to the Fukushima nuclear accident  
In this issue: Radiation Emergency Medical Preparedness for Accidents Network (REMPAN) 緊急輻射意外醫療預備網



Breaks in Chromosomes → Fusion → Dicentric Chromosome

**NIRS** National Institute of Radiological Sciences  
Institute of Radiological Sciences

The National Institute of Radiological Sciences (NIRS) is the national center for radiological emergency medical preparedness in the nuclear disaster prevention system of Japan. Since the Fukushima Nuclear Power Station accident on March 11, 2011, NIRS has received many requests by e-mail and phone from colleagues throughout the world including those of WHO BioDoseNet.

For three months, we received nine blood samples from workers for Dicentric Analysis. Fortunately their doses of external exposure were relatively low, and thus we scored 100 cells / donor for triage and 1,000 cells / donor for dose estimation.



Dicentric Analysis - NIRS, Chiba, Japan

行政院原子能委員會核能研究所 7

## 計畫執行情形

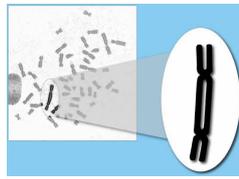
- 與慈濟大學完成人員生物劑量實驗室輔導案開標及合約簽定
- 完成人員生物劑量實驗室輔導案計畫書
- 完成國際標準化實驗室所需之顯微鏡開標
- 進行人員生物劑量實驗室人體試驗委員會之主持人會議(視訊)
- 進行人員教育訓練(人類染色體之構造及變異-1、2)
- 送審人員生物劑量實驗室之人體試驗計畫書 (IRB)(8/4)
- 與 USA ORISE 及 Japan NIRS Biodosimetry Lab 建立合作關係, 取得訓練教材



Cytogenetic Biodosimetry Laboratory

Related Links:

- Cytogenetic Biodosimetry: The Project
- Cytogenetic Biodosimetry Laboratory Help-Desk/Interactive Web-Bases
- Chromosome Scoring Manual
- Histamine Palmito Expert Users Cytogenetic Biodosimetry Lab
- Cytogenetic Biodosimetry Laboratory Manual in Health Physics Society Newsletter



Featured Video: Hist-Chi: Cytogenetic Biodosimetry Laboratory (3:00)

行政院原子能委員會核能研究所 8

## 送審人員生物劑量實驗室之人體試驗計畫書 (IRB)

華僑及海外僑胞研究倫理委員會  
人體試驗計畫書審查委員會

計畫名稱:	中文: 人員生物劑量實驗室研究 英文: Evaluation of Human Biodosimetry		
計畫執行地點:	<input type="checkbox"/> 花蓮市醫院 <input type="checkbox"/> 屏東市醫院 <input type="checkbox"/> 台中慈濟醫院 <input type="checkbox"/> 六甲慈濟醫院 <input type="checkbox"/> 鹿港大醫院 <input type="checkbox"/> 亞答街診所 <input type="checkbox"/> 新竹、桃園醫院		
計畫執行時間:	民國九十八年八月 - 民國九十九年八月		
計畫執行地點:	100 年 08 月 03 日 ~ 100 年 12 月 31 日		
計畫主持人:	中文編者: 劉怡均	英文編者: Lin YC@pcc.gov.tw	
	審查單位: 中華醫學會醫學倫理委員會	審查單位: Department of Molecular Biology and Human Genetics	
	聯絡電話: 02-25925004x207	聯絡電話: +86-10-63026000	
	人體試驗性質說明書: <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	研究計畫: 倫理委員會、研究倫理、動物倫理、醫學倫理、其他研究倫理		
計畫主持人:	姓名:	職別:	聯絡資訊:
協理主持人:	姓名:	職別:	<input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否
協理主持人:	姓名:	職別:	<input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否

行政院原子能委員會核能研究所 9

## 慈濟委託案 上課時程

7/5(二)	13:30-15:30 IRB 計劃主持人會議(視訊)	
原理		
7/7(四)	10:00-12:00 人類染色體之構造及變異-1(現場) 劉怡均 13:30-15:30 人類染色體之構造及變異-2(現場) 劉怡均	
8/4(四)	10:00-12:00 染色體變異與輻射之關係-1(視訊) 劉怡均 13:30-15:30 染色體變異與輻射之關係-2(視訊) 劉怡均	
8/11(四)	10:00-12:00 檢驗流程, 細胞培養及報告-1(視訊) 劉怡均 13:30-15:30 檢驗流程, 細胞培養及報告-2(視訊) 劉怡均	
現場實驗		
8/22(一)	Blood culture (含照射時間在內)	
8/24-26(三-五)	Lymphocyte metaphases harvesting and taining and C-banding	
9月份課程 (需確認)		

行政院原子能委員會核能研究所 10

發件者: Mitsuaki Yoshida [yoshida@cc.hiroshima-u.ac.jp] 發件日期: 2011/7/11 (星期一) 上午 07:41

收件者: 張冠賢

副本: RE: About biodosimetry lab

Dear Dr. Chang,

Thank you very much for your e-mail and I am very sorry for late replying. Now, we are contributing to the screening of surface contamination of the peoples living in Fukushima Prefecture. We did not have any peoples who must receive the dicentric assay. If you want to have a cooperation with me and our laboratory, we will introduce our techniques for dicentric assay, translocation assay, FCC assay and so on. Do you have any standard curve to estimate the radiation dose?

After I moved to the Hiroasaki University, I established new biodosimetry lab. Our lab has some automation system to process a lot of specimen, automated harvester, automated slide preparation, automated metaphase finder and automated dicentric assay system.

I am not charged in the NIRS lab, which accepted new laboratory head. I am doing independently.

The establishment of biodosimetry system is very, very important issue. If you want me to have a cooperation, I agree with it anytime. Now, I am supporting the establishment of biodosimetry system for Thailand and South Korea. Last year, we accepted the researcher from South Korea for a training of cytogenetic biodosimetry for three month.

Thank you very much again.

Best regards,

行政院原子能委員會核能研究所 11

發件者: Livingston, Gordon [Gordon.Livingston@orise.ornl.gov] 發件日期: 2011/7/6 (星期四) 下午 11:32

收件者: 張冠賢

副本: RE: About biodosimetry lab

檔案: AFRRI Study.doc.pdf (140 KB) AFRRI Triage Study 2011.pdf (399 KB)  
Livingston webbased scoring.pdf (239 KB) ROMM Dic Photo.TIF (890 KB)

Dear Dr. Chang,

It is a pleasure to hear from you regarding your efforts to build and operate a biodosimetry laboratory. I will be happy to collaborate with you and help you in whatever way I can. We can start right now with three reprints which I have attached to this e-mail. The two AFRRI studies have some important content relative to inter-laboratory comparison studies that will be very helpful for you. Also, the preprint entitled "Pilot Website to Support International Collaboration 1 for Dose Assessments in a Radiation Emergency" represents a major effort of ours to utilize the Internet to facilitate network scoring of chromosomal aberrations.

To put it another way, the dicentric chromosome aberration assay as you know has five major steps, 1) cell culture, 2) cell harvest, 3) staining of chromosomes, 4) image acquisition, and 5) image analysis. We have shown that the scoring of metaphase spreads using electronic images (see attached image) is as accurate as using "live" images in the microscope. This means that the scoring can be conducting on the Internet thereby linking labs all around the world to assist one another with the scoring. This is especially important for us in our laboratory since we have only two persons qualified to read the metaphase images.

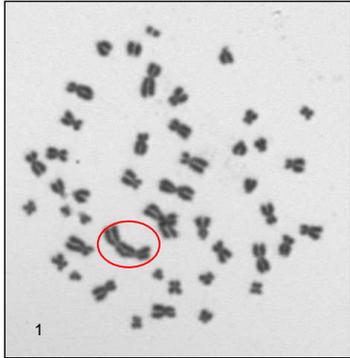
Finally, thank you for the invitation to visit Taiwan which I am happy to accept. I would be happy to be a speaker at the symposium you are planning in December of this year. My laboratory assistant is on vacation this week but when she returns I will have her send you some materials related to protocols and operating procedures.

Thank you for the contact and again we will do whatever we can to assist you in your work in Taiwan.

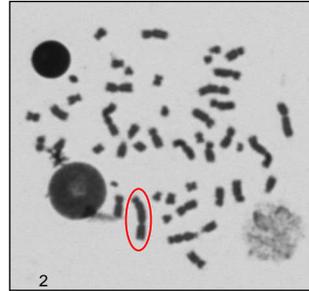
行政院原子能委員會核能研究所 12



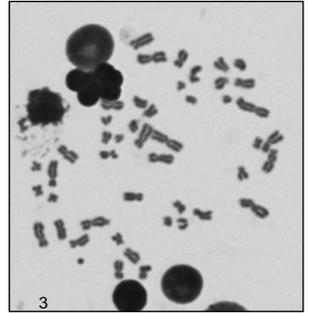
Dr. Livingston 提供影像訓練



1



2



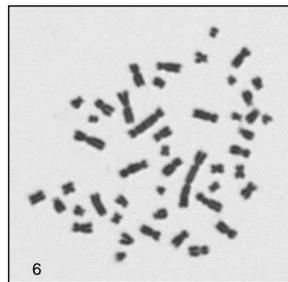
3



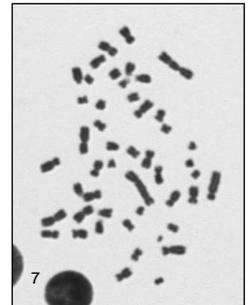
4



5



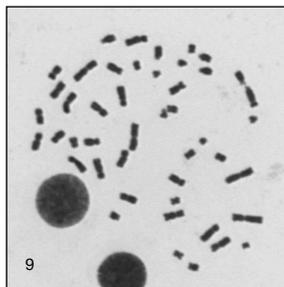
6



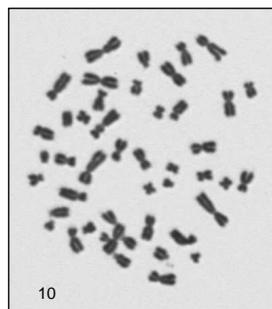
7



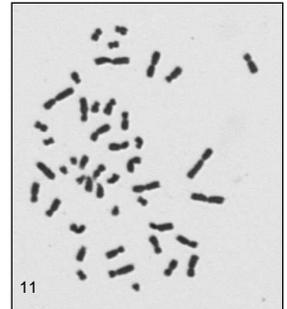
8



9



10



11





## 附件二 輻射效應國際研討會報告內容



## Biodosimetry Development at Institute of Nuclear Energy Research in Taiwan

Chih-Hsien Chang, Ph.D.  
Isotope Application Division,  
Institute of Nuclear Energy Research (INER),  
Atomic Council  
2011.12.14

Institute of Nuclear Energy Research Biodosimetry Laboratory

## Outline

- Introduction
- Establishment of Biodosimetry at INER
- BioDoseNet in Taiwan- INER and TZU
- International cooperation
- Summary

Institute of Nuclear Energy Research Biodosimetry Laboratory

## Government Requirement

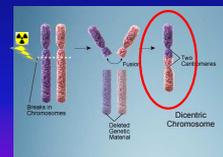
- **Nuclear power plants**  
4 (3+1) Nuclear power plants in Taiwan
- **Radiation workers (44,000)**  
Nuclear power plants  
Medical and research use  
Industrial use  
Natural radioactive sources



Institute of Nuclear Energy Research Biodosimetry Laboratory

## Biodosimetry

- Biodosimetry is the use of a biological response to help determine the radiation dose received by an individual when physical dosimetry is not available.
- Biodosimetry estimates dose on the basis of **radiation-induced chromosome aberrations** in circulating lymphocytes.
- **Dicentric chromosome assay (DCA)** is based on the frequency of radiation specific aberrant chromosomes with two centromeres (dicentrics) in an irradiated individual's peripheral blood lymphocytes.



Institute of Nuclear Energy Research Biodosimetry Laboratory

## Biodosimetry

- DCA is widely accepted as a diagnostic test for radiation exposure and is considered the **"gold standard"** in radiation protection.
- However, the assay is **labor-intensive** and **time-consuming**, strategies are needed to increase throughput for use in radiation mass casualty incidents.
- Using the Internet to share images between laboratories has the potential to overcome this limitation.

Institute of Nuclear Energy Research Biodosimetry Laboratory

## Establishment of Biodosimetry at INER

Institute of Nuclear Energy Research Biodosimetry Laboratory

## Biodosimetry Lab in Taiwan

- ✦ **Government stage:** 1970-2006
  - Institute of Nuclear Energy Research (INER)
  - INER closed biodosimetry lab in 2006
- ✦ **Semi-Government stage:** 2009-present
  - Biodosimetry lab in Tzu-Chi Univ was funded from AEC (2009) and Taipower company (2009-2010)
- ✦ **BioDose network stage** in Taiwan: 2011
  - INER established the Biodosimetry lab in 2011, supported by AEC
  - INER cooperates with Tzu-Chi Univ to setup the Biodose network in Taiwan

Institute of Nuclear Energy Research Biodosimetry Laboratory

## Biodosimetry Lab at INER (2011.6-)

1. **Dicentric Chromosome Analysis (DCA)** should be established as a golden standard for radiation emergency.
2. **Cooperation** with domestic and international laboratory.
3. **Joining international network** for dose assessment /validation.

Institute of Nuclear Energy Research Biodosimetry Laboratory

## Recent vs. Retrospective Exposures

- **Recent exposure (acute)**  
 Dicentric chromosome assay (Giemsa stain) for unstable aberrations
- **Retrospective exposure (chronic) - Future**  
 Translocation (FISH) for stable aberrations

FISH : fluorescence in situ hybridization

Institute of Nuclear Energy Research Biodosimetry Laboratory

## BioDoseNet in Taiwan- INER and TZU

Institute of Nuclear Energy Research Biodosimetry Laboratory

## Biodosimetry Lab Network (2011)

INER

TZU/Hospital

Irradiation of cells

Collect & providing blood samples

Memorandum

DCA analysis

Establishment of <sup>60</sup>Co gamma ray calibration curve for Taiwan

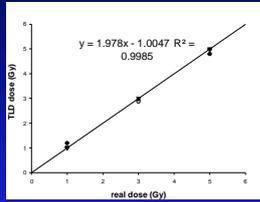
Radiation Emergency Assessment

Energy Research Biodosimetry Laboratory

## Co-60 irradiation in water

Institute of Nuclear Energy Research Biodosimetry Laboratory

## Validation of radiation dose



- ◆ Real dose was calculated using Alanine/EPR dosimeters.
- ◆ **Average dose rate** to water in the target zone on the day of field mapping was 0.633 Gy/min
- ◆ Thermo Luminescent Dosimeters (TLD) were used to validate the doses.
- ◆ TLD were irradiated with 1, 3 and 5 Gy <sup>60</sup>Co rays at room temperature, respectively.

## Dicentric Assay



- ◆ blood sample are collected and shipped at room temperature to INER
- ◆ Blood samples were irradiated with Co-60 in water



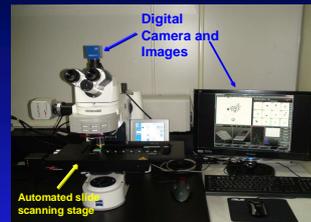
- ◆ Packing of whole blood samples were cultured in flasks



- ◆ whole blood cells were cultured with PHA under sterile condition in an incubator for 48 hr

- ◆ Culture samples are centrifuged and cells are resuspended in hypotonic solution.
- ◆ Further centrifugations and resuspension of the cells in fix solution
- ◆ The fixed cell suspension is then dispensed on slides and stain
- ◆ Chromosomes were observed under the microscope

## Automated Cytogenetic Workstation



- Specification:**
- ◆ ZEISS Axio Imager Z2 OEM microscope:
    1. Eyepiece PL 10x/23 Br. foc.
    2. Objective EC Plan-Neofluar 10x/0.3 M27 & 100x/1.30 Oil M27
  - ◆ Automated slide scanning stage (8 slides)
  - ◆ Metafer 4 system software:
    1. M search
    2. Auto capture
    3. DC scoring

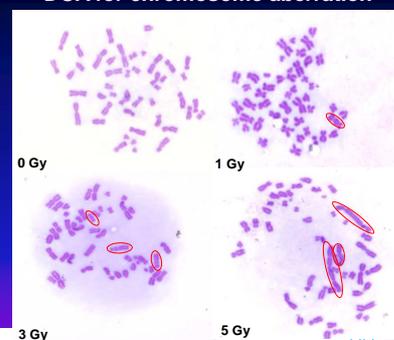
A digital photo of the metaphase spread is taken at 100x magnification. The capture of the images can also be performed automatically by the automated cytogenetic workstation.

## Criteria for DC Scoring

- Mid-metaphase morphology
- Intact spread indicated by 46 centromeres
- Distinct chromatids & centromeres
- Minimal overlapping of chromosomes
- Uniform staining
- Missing acentric does not disqualify a dicentric

From Dr. Livingston, USA

## DCA for chromosome aberration



# International cooperation



Institute of Nuclear Energy Research Biosdosimetry Laboratory



# International cooperation

Interlaboratory Comparison of the Dicentric Chromosome Assay for Radiation Biodosimetry in Mass Casualty Events

Ruth C. Wilkins<sup>a</sup>, Hest Romm<sup>b</sup>, Tri-Cheng Kao<sup>c</sup>, Akio A. Awa<sup>d</sup>, Mitsuaki A. Yoshida<sup>e</sup>, Gordon K. Livingston<sup>f</sup>, Mark S. Jenkins<sup>g</sup>, Ursula Oestreicher<sup>h</sup>, Terry C. Pellmar<sup>i</sup> and Pataje G. S. Prasanna<sup>j</sup>

<sup>a</sup> Health Canada, Consumer and Clinical Radiation Protection Bureau, Ottawa, ON K1A 1C1, Canada; <sup>b</sup> Bundesamt für Strahlenschutz, 38276 Salzgitter, Germany; <sup>c</sup> Uniformed Services University of the Health Sciences, Department of Preventive Medicine and Biometrics, Division of Epidemiology and Biostatistics, Bethesda, Maryland 20814-4790; <sup>d</sup> Oak Ridge Associated Universities, REACTS, Oak Ridge, Tennessee 37831; <sup>e</sup> National Institute of Radiological Sciences, Research Center for Radiation Emergency Medicine, 4-9-1 Inuyama, Inuyama-City, Chiba, Japan 263-8555; and <sup>f</sup> Uniformed Services University of the Health Sciences, Armed Forces Radiobiology Research Institute, Bethesda, Maryland 20889-5603

Radiation Research 169, 551–560 (2008)

**Biodosimetry labs collaborating with INER:**

- Dr. Livingston (United States)
- Dr. Yoshida (Japan)
- Dr. Wilkins (Canada)

Pilot website to support international collaboration for dose assessments in a radiation emergency?<sup>1</sup>

G.K. Livingston<sup>1</sup>, R.C. Wilkins<sup>2</sup>, E.A. Ausberg<sup>3</sup>

Radiation Research 175, 397–404 (2011)  
Radiation Measurements xxx (2011) 1–4 19



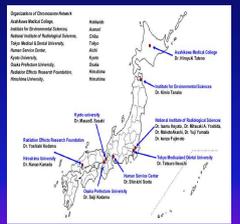
Institute of Nuclear Energy Research Biosdosimetry Laboratory



# International cooperation



- **Japan:** Hiroasaki University
- **Dr. Yoshida**
- **Chromosome Network**
  - SOPs
  - Training for techniques and analysis
  - Validation and certification
  - Join international network



Radiation Measurements 42 (2007) 1125-1127 20



Institute of Nuclear Energy Research Biosdosimetry Laboratory

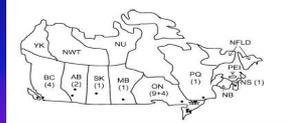


# International cooperation



- **Canada:** Health Canada; Carleton University
- **Dr. Wilkins**
- **Canadian Cytogenetic Emergency Network (CEN)**
- **Chromosome Network**

Training for techniques DC analysis



http://vill.physics.carleton.ca/  
Int. J. Radiat. Biol., vol. 83, 2007, p471-477

21



Institute of Nuclear Energy Research Biosdosimetry Laboratory



# International cooperation



- **United States:** REACTS (CBL), DOE
- **Dr. Livingston**
- **Sharing experiences**
  - Lymphocyte cell culturing
  - Preparing cell culture reagents
  - Scoring metaphase cells for dicentric
- **DicentriCount.Org**
  - (INER has become a member in 2011)
  - Obtain 20 (by e-mail)/48 (by website) images files from DicentriCount.Org



REACTS : Radiation Emergency Assistance

22



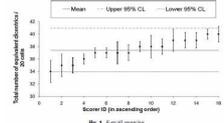
Institute of Nuclear Energy Research Biosdosimetry Laboratory



# E-mail scoring of chromosome images (20)

**A. Radiation Measurements 2011**

Dicentric	26	26	26	26	25	27	25	23	26	27	26	26	25
Tricentric	6	5	7	6	6	6	6	6	6	5	4	6	5
Quadracentric					1	1							
Dicentric equiv.	38	36	37	40	37	39	39	37	35	39	40	34	38



**B. Taiwan (5 at INER, 2 at TZU)**

Scorer ID	1	2	3	4	5	6	7
Dicentric	24	21	23	23	24	25	25
Tricentric	5	7	7	7	7	7	7
Quadracentric							1
Dicentric equiv.	34	35	37	37	38	39	42

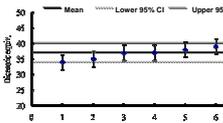


Fig. 8. E-mail exercise.

**A:** The total dicentric equivalent counts were summarized for each scorer and ranged 34 to 40 with an average of 37.4 for the 16 scorers (Radiation Measurements xxx, 2011, 1-4)

**B:** The total dicentric equivalent counts were summarized for each scorer and ranged 34 to 42 with an average of 37.4 for the 7 scorers (Taiwan)

23

## Internet scoring of chromosome images (48)

### A. Radiation Measurements 2011

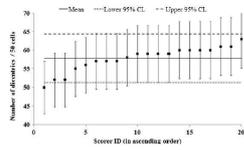
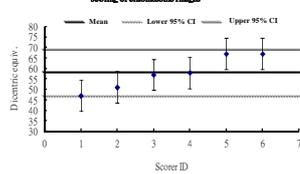


Fig. 2. Internet exercise.

- The total dicentric equivalent count ranged from 50 to 63 with an average of  $57.7 \pm 3.35$  for 20 scorers. (Radiation Measurements xxx, 2011, 1-4)

### B. Taiwan (4 by INER, 2 by TZU)



- The total dicentric equivalent counts were summarized for each scorer and ranged 47 to 67 with an average of 58.3 for the 6 scorers (Taiwan)

## Summary

### INER Biosimetry Laboratory (2011)

1. Establishment of Co-60 irradiation protocols and relative SOPs for DCA
2. Cooperation with Tzu-Chi University
3. IRB submitting and approval for blood samples
4. Inter-laboratory comparison and cooperation with Tzu-Chi University
5. International cooperation with United States, Japan and Canada

## Further Works

- Establishment of a **dose-effect calibration curve** for the yield of dicentric for  $^{60}\text{Co}$  rays
- Advance training for chromosome analysis
- QC and QA compliance
- Cooperation with international reference labs
  - Validation and certification
  - Joining international network

## Acknowledgements

### International cooperators:

Dr. Gordon K. Livingston  
Radiation Emergency Assistance  
Center / Training Site (REACTS), USA

Dr. Mitsuaki Yoshida  
Hirosaki University, Japan  
Dr. Ruth C. Wilkins  
Health Canada, Canada

### Domestic cooperators

Dr. Jye-Siung Fang  
Dr. Ingrid YC Liu  
Ms. Kuei-Fang Lee  
Tzu Chi University, Taiwan

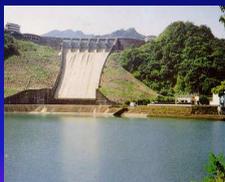
### Department of Radiation Protection, AEC

Director: Dr. Ruoh-Tsann Lee  
Section Chief: Mr. Chung-Der Wang

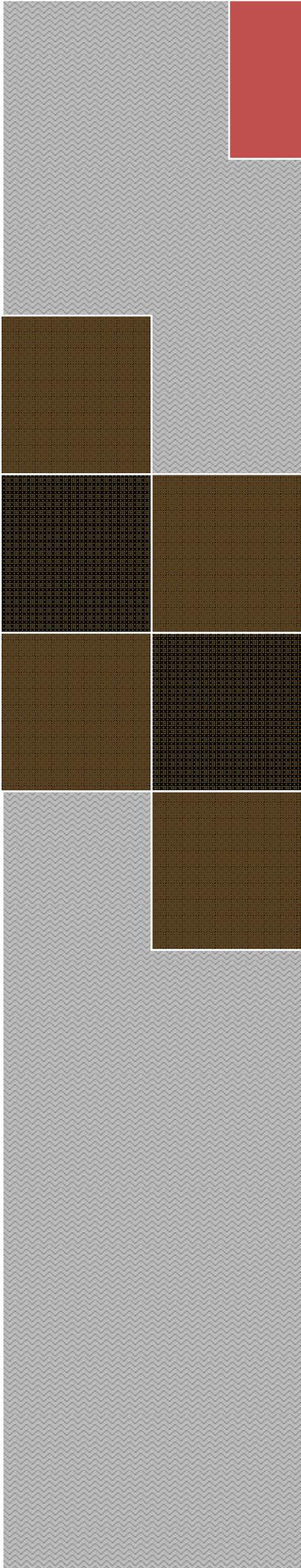
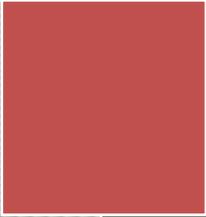
### Biosimetry Lab, INER

Dr. Chia-Chieh Chen  
Mr. Bin Lin  
Mr. Wan-Chung Hsu  
Ms. Tsui-Jung Chang  
Mr. Ping-Hung Yu  
Mr. Chin-Yan Tsai

Thanks for your attention!

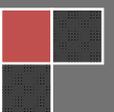


# 附件三 慈濟大學輔導案結案報告



# 核能研究所人員生物劑 量實驗室輔導案 結案報告

慈濟大學  
2011/11/15



# 核能研究所同位素應用組人員生物劑量實驗室輔導案

## 結案報告

計畫類別：■個別型輔導計畫

執行期間： 100 年 6 月 1日至 100 年 11 月 15 日

### 輔導團隊

整體規劃：劉怡均副教授【分子生物暨人類遺傳學系（所）】

人員之學理方面教育訓練：方菊雄教授【分子生物暨人類遺傳學系（所），細胞遺傳實驗室】

人員之技術建立教育訓練：李桂芳【細胞遺傳實驗室】

本結案報告包括以下繳交之附件：

- ISO19238與ISO21243中文翻譯版(附件1，附件2)
- 慈濟大學ISO表單(附件3)
- 硬體設施建議(附件4)
- 輻射與細胞遺傳學理訓練課程(附件5-8)
- 慈濟大學生物劑量實驗室雙中節分析標準及評估標準操作程序書(附件9)
- 報告撰寫格式(附件10-12)
- 研究用人體檢體採集與使用注意事項(附件13)
- 人體試驗計劃申請書(附件14-19)

執行單位：慈濟大學分子生物暨人類遺傳學系（所）

中 華 民 國 100 年 11 月 7 日

## 目錄

輔導計畫書	3
最終報告撰寫	7
計畫目標	7
輔導方式、成果與建議	9
圖表	15
參考文獻	28
附件	

# 核能研究所同位素應用組

## 人員生物劑量實驗室建立輔導計畫書

### 1. 目的

輔導行政院原子能委員會核能研究所同位素應用組人員生物劑量實驗室之建構，以期與國際輻射生物劑量推估實驗室接軌。

### 2. 依據標準

依據國際原子能委員會 (International Atomic Energy Agency: IAEA) 及國際 ISO19238 與 ISO21243 規範

### 3. 輔導單位

3.1 名稱：慈濟大學分子生物暨人類遺傳學系 (所)

3.2 地址：970 花蓮市中央路三段 701 號

### 4. 輔導團隊

4.1 整體規劃：劉怡均副教授【分子生物暨人類遺傳學系 (所)】

4.2 人員之學理方面教育訓練：方菊雄教授 (細胞遺傳實驗室)、謝婉華副教授 (公共衛生學系)

4.3 人員之技術建立教育訓練：李桂芳 (細胞遺傳實驗室)

### 5. 受輔導單位

5.1 名稱：行政院原子能委員會核能研究所同位素應用組

5.2 地址：32546 桃園縣龍潭鄉佳安村文化路 1000 號

5.3 單位代表：張志賢博士

5.4 聯絡窗口：張翠容小姐

### 6. 輔導範圍

6.1 人員生物劑量實驗室硬體之規劃建議。

6.2 人員生物劑量實驗室檢驗系統的建立及人員訓練。

6.3 結案後持續提供相關諮詢服務。

### 7. 輔導期間

自 100 年 6 月 1 日起，至 100 年 11 月 15 日止。

### 8. 輔導策略

8.1 配合受輔導單位現有制度、人員及設備，建立人員生物劑量實驗室之組織架構。

8.2 提供硬體設施規劃之諮詢及觀摩。

8.3 輔導單位提供作業程序電子檔供受輔導單位參考。

8.4 輔導團隊依需求，實地至受輔導單位並由輔導團隊成員依據輔導程序提供實際輔導內容。

8.5 提供電話、網路會議與 e-mail 溝通的管道，以補現場輔導之不足。

### 9. 輔導程序

- 9.1 人員訓練：輻射與細胞遺傳方面學理訓練、協助雙中節分析技術建立、雙中節分析標準及評估，以及協助實驗過程中之建立困難排除方案。
- 9.2 硬體設施建議：提供硬體設施建置與管理的建議。
- 9.3 作業流程/程序制修訂：輔導單位提供作業程序電子檔供受輔導單位參考。
- 9.4 現場輔導與座談：現場直接輔導各作業程序之執行。針對現場輔導的情形進行座談討論，並提出相關缺失之改善措施。
- 9.5 持續改進：系統持續運作改進，輔導單位提供後續諮詢服務。

## 10. 輔導方法

10.1 人員訓練：對受輔導單位相關人員進行相關訓練，訓練之形式不拘，但涵蓋以下範圍：

- 10.1.1 人員生物劑量實驗室標準操作程序書(SOP)之建立
- 10.1.2 人類血液淋巴細胞培養
- 10.1.3 雙中節染色評估技術
- 10.1.4 建立劑量反應曲線
- 10.1.5 數據整理與分析
- 10.1.6 人體試驗計畫書申請

10.2 硬體設施建議：提供硬體設施建置與管理的建議。

- 10.2.1 相關儀器設備的建議
- 10.2.2 提供建置與管理的建議

10.3 臨床試驗計畫書：IRB 計畫書申請

10.4 作業流程/程序制修訂：輔導單位提供作業程序電子檔供受輔導單位參考。

10.5 現場輔導與座談：現場直接輔導各作業程序之執行。針對現場輔導的情形進行座談討論，並提出相關缺失之改善措施。

10.5.1 針對相關作業程序於執行或操作現場直接進行輔導。

10.5.2 以座談方式檢討現場輔導發現的缺失，並與受輔導單位討論提具可行的改善措施。

10.6 持續改進：系統持續運作改進，輔導單位提供後續諮詢服務。

## 11. 預定進度

輔導項目	民國年/月	100/6	100/7	100/8	100/9	100/10	100/11	100/12
人員學理訓練		—————▶						
雙中結染色人員技術訓練與現場輔導		—————▶						
完成臨床試驗計畫設計		—————▶						
最終報告撰寫方式					—————▶			
臨床試驗計畫進行人體試驗委員會(IRB)送審			—————▶					

## 12. 預算規劃

科目名稱	用 途 及 說 明	數量	單位	金額(元)
人 事 費	主持人 10000x6 月			60,000
	協同主持人 5000x6 月			30,000
	兼任研究助理(博士級)5000x6 月			30,000
	講師鐘點費【講座鐘點費依教育部補助及委辦計畫經費編列基準表：800 元/小時x70 小時】			56,000
檢 體 費	用 途 及 說 明	金額(元)		
	兩位核醫藥物或放射治療病人採檢補助			5,000
	兩位健康受試者採檢補助			5,000
試劑、耗材	用 途 及 說 明	金額(元)		
	15 ml PP tube 無菌離心管	1	箱	2400
	T25 無菌 filter flask	1	箱	4300
	Methanol	1	瓶	720
	Acetic acid	1	瓶	1280
	Wright stain	1	瓶	8000
	Trypsin (1:250) powder	1	瓶	6460
	RPMI-1640 medium	4	瓶	6000
	Fetal bovin serum	2	瓶	8000
	PHA	2	瓶	2800
	EtBr	1	瓶	1800
	Colcemid	2	瓶	3000
	玻片盒 25 片裝	8	個	480
	玻片盒 100 片裝	1	個	160
	玻璃滴管	2	盒	2400
	KCl	1	瓶	500
	Penicillin/streptomycin 100X	1	瓶	500
	L-glutamine	1	瓶	2500
	PH7.0 buffer tablet	1	瓶	1428
	5 ml pipet	1	箱	1200
	10 ml pipet	1	箱	1329
	1 cc 無菌 Syringe	20	支	32
	5 cc 無菌 Syringe	20	支	75
	3 cc drop	1	盒	3383
	玻片	15	盒	3150
	95%酒精	1	桶	1429
業 務 費	用 途 及 說 明	金額(元)		
	試驗計畫書撰寫			15,000
	報告撰寫			15,000
	人體試驗委員會(IRB)送審			10,000
	SOPs			35,000
	印刷費、報告影印費			20,424
旅 運 費	用 途 及 說 明	金額(元)		

	人員技術訓練與現場輔導 2500×1 人×6 次	15,000
	收集資料及檢體，開會 2500×2 人×5 次	25,000
管 理 費		42,750
總計		427,500

### 13. 輔導課程時數

視訊課程：（小時）

4	人類染色體之構造及變異
4	染色體變異與輻射之關係
4	檢驗流程，細胞培養及報告
12	諮詢服務

實地輔導：（小時）

5	Blood culture
6	48 h - Lymphocyte metaphases harvesting
6	72 h - Lymphocyte metaphases harvesting
6	Staining and C-banding
4	Dicentric analysis I
3	Dicentric analysis II
8	Chromosomal analysis under microscope
4	Cytogenetic Nomenclature (ISCN) I
4	Cytogenetic Nomenclature (ISCN) II
8	實驗室硬體之規劃，SOP 建立

參考書目

1. The ACT Cytogenetics Laboratory Manual (3rd Edition) by M.J. Barch et al. Raven Press. 1997
2. Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling (2 Edition) by Gardner and Sutherland. Oxford University Press. 1996
3. Cancer cytogenetics (2 Edition) by Heim and Mitelman. Wiley-Liss, Inc. 1995
4. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009): ISCN 2009. by Lisa G. Shaffer, Marilyn L. Slovak, Lynda J. Campbell. S. Karger Publishers, inc.

## 輔導計劃目標及緣起

### 計劃目標：

本輔導計劃旨在協助核能研究所建立人員生物劑量實驗室及符合國際標準之操作技術，規劃在 5 個月間，達成下列目標：

- (1) 依據符合 WHO BiodoseNet 國際標準之染色體變異檢驗標準操作程序，輔導核研所建立生物劑量實驗操作技術，作為輻射生物效應之研究與分析平台。
- (2) 輔導核能研究所建構人員生物劑量實驗室，使能與國際輻射生物劑量推估實驗室接軌。
- (3) 輔導核研所人員辨識雙中節染色體變異之能力，做為日後建立輻射生物劑量評估曲線之基礎。
- (4) 與核研所人員合作，進行國內及國際間雙中節染色體變異之辨識，為加入全球的生物劑量支援網路而準備。
- (5) 協助核研所取得人體試驗同意書，取得血液檢體，以進行染色體製備，做為人員訓練之用。

### 計劃緣起：

核能研究所因負有建立生物劑量實驗室之使命，除原有已成熟之輻射照射及細胞培養技術之外，亟需細胞遺傳學之訓練，特別是染色體製備，雙中節變異之辨識、分析，及儀器之最佳使用方式。因慈濟大學細胞遺傳實驗室具備以染色體變異進行生物劑量分析之經驗，故參與輔導案之投標，進行同仁之細胞遺傳學理論、技術之訓練及經驗分享，預計在核研所原有的完善基礎上，快速輔導其人員生物劑量分析核心能力之建立，並以上述 5 項為目標。

生物劑量之定義為針對生物體曝露於游離輻射後，分析其體內隨輻射劑量而改變之分子，以其變化之程度對應出生物體內所吸收之劑量謂之。人體之生物劑量測定方式，國際生物劑量網(Biodosenet)一致以人體淋巴球內之發生染色體變異推估之，再利用劑量與效應的關係，對應出人體於在輻射曝露時所吸收的劑量(1-3)。人員生物劑量的應用相當廣泛，輻射意外、輻射醫療人員及一般輻射相關工作者之防護均適用之，特別是應用在較高劑量的輻射曝露意外事件，由於部分受曝者可能未佩戴人員劑量計，在此情形下，除了現場以輻射源的物理特性評估人員劑量外，生物劑量計評估便成利器，而生物劑量推估的結果也最趨近於受曝者真實所接受之的劑量(5)。人體內作為生物劑量計最常使用的方法為染色體變異分析，即由分析染色體變異的程度及數量對應所接受的劑量。染色體變異經過輻射照射後所產生的變異，依照細胞是否仍有保留分裂的能力，可以分成不穩定變異及穩定變異兩類。不穩定變異之染色體，有三種常見的型態：雙中節(dicentric)、環形(rings)和後期橋(anaphase bridge)。其中雙中節和環形變異發生在染色體尚未複製之前，而後期橋則發生

在染色體複製之後。這三種變異通常都會伴隨著無中節的染色體片段產生，且由於此三種變異的發生會造成細胞分裂失敗，使細胞無法繼續存活，故稱之為不穩定性變異。穩定性變異則有易位(translocations)和缺失(deletions)。易位是指不同染色體片段互相交換，而缺失則是染色體某一小片段的遺失，這兩種變異不影響細胞分裂，故細胞仍可存活下來。

國際生物劑量網一致以抽取人體週邊循環血液中的淋巴球染色體進行分析。以淋巴球內染色體進行分析具備有以下幾個優點：1)人體組織中以淋巴球對於輻射最為敏感，淋巴球隨血液做全身循環，血液中的淋巴球，有 99.9%是處於細胞週期中的 G<sub>0</sub> 期，對輻射敏感度是一致的；2) 淋巴細胞較其他細胞易於取得，只需簡單的抽血、分離及培養技術，就可得到足夠的細胞以供分析檢查。染色體變異頻率與劑量的關係具有二次線性的關係，人體淋巴球細胞經過鈷-60 照射後分析其雙中節及環形變異頻率，關係呈線性平方的關係(IAEA)：在劑量低於 1Gy 時，通常以單一次碰撞事件為主；至於劑量高於 1Gy 時，價電子數目增多，使得變異事件快速增加，其速率通常以二次方上升，因此染色體雙中節評估技術為生物劑量分析之核心技術。以雙中節、環形等不穩定變異推算劑量時，通常使用於急性曝露的情況，且應於曝露後即早分析，以免受到細胞死亡更新或其它因素干擾。

世界衛生組織 (WHO) 於 2007 年 12 月在瑞士日內瓦舉辦了諮詢會議商討建立全球的生物劑量支援網路 ( framework for a global biodosimetry network–BioDoseNet)，此支援網路聚焦在細胞學的生物劑量技術 (cytogenetic biodosimetry)，相關的合作活動以及如何運作此支援網絡。因此在策略上，我國可朝向建立 Biodosenet 認可之參考實驗室 (Reference Lab) 的中程目標努力，逐步培植及訓練專業人力，建立劑量校正曲線，品質保證計畫及程序書，維持符合參考實驗室所需之分析頻率樣品數量、設備，以及細部與劑量分析所需之臨床管理能力，並與其他國家的實驗室互相比對，發表成果。目前世界各國已有許多輻射生物劑量實驗室建立，在歐美具代表性的實驗室為美國能源部 (U.S. Energy Department) 的橡樹嶺科學與教育研究所 (Oak Ridge Institute for Science and Education)、美國陸軍輻射生物學研究所 (Armed Forces Radiobiology Research Institute)、英國國家健康保護局 (Health Protection Agency; HPA) 的輻射防護部門，在亞洲方面為鄰近的日本科技部國家輻射科學研究所 (National Institute of Radiological Sciences, Chiba, Japan) 輻射劑量部；在國內為慈濟醫學中心/慈濟大學遺傳中心的生物劑量實驗室。核研所肩負成立國家生物劑量實驗室之任務，其原有之硬體設施完善，人員素質精良，獨需細胞遺傳學之訓練，故本計劃旨在以慈濟大學發展生物劑量實驗室之經驗，輔導核研所建立細胞遺傳學核心知識及技術，包含人員學理訓練，染色體製備之標準操作步驟、雙中節染色體辨識及分析。以上能力之建立，有助於核研所之人員生物劑量實驗室與國際生物劑量網內實驗室接軌，成為亞洲區之重要轉介實驗室。

## 輔導方式、成果與建議

本輔導計劃經由實地訪視及視訊討論方式與核研所進行溝通後，對計畫執行政序及方向達成共識(表 1，圖 1、2)。依據輔導計劃擬定目標，分別進行實驗室設備、學理講授、技術輔導及困難解決方案之提供及建議，依計劃目標分項說明輔導過程及結果如下：

(1) 依據符合 WHO BiodoseNet 國際標準之染色體變異檢驗標準操作程序，輔導核研所建立人員生物劑量實驗操作技術，作為輻射生物效應之研究與分析平台。

(1)-1 執行方式：

(1)-1-1 由核研所提供英文版本 WHO Biodosenet 國際標準操作(ISO19238, ISO21243) 書，本計劃將其標準翻譯為中文（附件 1,附件 2），以利未來參與檢驗人員遵從，並於訓練課程時就技術部份逐項檢視，做為輔導依據(附件 1-2)。

(1)-1-2 由慈濟大學細胞遺傳室提供經 ISO9001:2008 認證之淋巴球細胞培養、染色體製備及染色之實驗步驟。

(1)-2 輔導成果：

(1)-2-1 ISO 已翻譯成中文，並與核研所同仁就雙中節染色體製備部份於 8 月 11 日上課時逐條檢視標準。

(1)-2-2 附上慈濟大學細胞遺傳室所提供之 ISO 實驗步驟文件(附件 3)

(2) 輔導行政院原子能委員會核能研究所人員生物劑量實驗室之建構，以期與國際輻射生物劑量推估實驗室接軌。

(2)-1 執行方式：

(2)-1-1 協助核研所規劃符合 ISO 標準之實驗室動線

(2)-1-2 依據實驗標準所需，建議輔導實驗室增購必需之設備，並由慈濟大學細胞遺傳實驗室資深技術員至核研所實際進行儀器操作之教學。

(2)-2 執行成果：

(2)-2-1 空間規劃及設備採購：

(2)-2-1.1 空間規劃依據核研所給與的實驗室空間資料，實際評估坪數規劃較佳的實驗室動線，預計以收受檢體的工作台為入口位置，當檢體送入人員輻射生

物劑量實驗室時，將所有檢體應填寫的表單及造冊皆於入口處工作檯上完成，再將檢體送至細胞培養室進行無菌操作。

(2)-2-1.2 收取檢體的工作檯面上方建議架設(慈濟劑大學現用茵格蘭 R886 型之排油煙機)。進行噴片作業時，固定液是甲醇與冰醋酸的 3 比 1 混合液，揮發性化學藥品依規定須在化學抽風櫃內進行，但是進行噴片作業時無法在化學抽風櫃操作，因此為防止化學藥品對人體的危害，建議於噴片作業區上方裝設抽風櫃，防止揮發性化學物質危害(附件 4)。

(2)-2-1.3 經由現場及後續 email、電話溝通後，建議同位素應用組增購：1. Zeiss microscope 1 台 2. MetaSystem 3. Autoscanner

(2)-2-1.3 設備採購

問題：

1. 如何在預算內採購鏡頭，使能符合最大效益？
2. 需不需要採購 Autoscanner?

建議：

1. 配置 10X 乾式及 phase 鏡頭，及 100X 乾式鏡頭，可符合染色體分析所需，達到最大效益，乾式 100X 鏡頭於顯微鏡底下分析時可保持片子的完整性，使染劑不易褪色。
2. AutoScanner 於檢體量大時用以快速掃描中期細胞用。
3. 後續進行 FISH 的實驗時需要使用 Isis system，Isis system 可將微弱的螢光訊號放大有利於判讀。
4. Ikaro system 可做染色體分析，當進行試驗室間影像分析時，可加強 metaphase cell 的影像品質，提供精確的判讀。

(3) 輔導核研所人員辨視雙中節染色體變異之能力，做為日後建立輻射生物劑量評估曲線之基礎

(3)-1 執行方式：分別由劉怡均副教授及方菊雄教授至同位素應用組進行現場教學及視訊授課，講述細胞遺傳學原理、染色技術學理、染色體命名法及雙中節辨識法。

(3)-2 執行成果：分別於 7 月 7 日(圖 3)現場教學，8 月 4 日(圖 4)、8 月 11 日(圖 5)、由劉怡均副教授以視訊方式進行檢驗流程、細胞培養、染色體變異分析與輻射相關性等議題目進行學理講授上交流以及 10 月 4 日(圖 6)方菊雄教授至核研所進行染色體命名法的學理課程(附件 5-8)。另派資深技術員人至核能研究所協助建立細胞培養、G-staining 和 C-banding 之染色技術以及相關檢驗收受表單建立(附件 9-12)。

(3)-3 建議：

問題 1: 染色體中節辨識不易，如何正確辨識中節位置？

建議 1: 可將染色時間縮短，即可突顯雙中節，易於辨認。

問題 2: 雙中節分析結果報告，是否需要臨床醫師簽名？

建議 2: 國際生物劑量網並未規範需要臨床醫師簽名，由實驗室主持人簽名即可。

- (4) 與核研所人員合作，進行國內及國際間雙中節染色體變異之辨識，為加入全球的生物劑量支援網路而準備。

(4)-1 執行方式

(4)-1-1 慈濟大學與核研所間實驗室染色體分析比對：由慈濟大學提供去連結剩餘血液檢體，送至核研所進行 Co-60 劑量之照射，再由核研所同仁依據(3)中所講授之方法進行染色體製備，雙中節分析，分別於 8 月 22 日(圖 7)及 10 月 12 日共進行 2 次(表 2)。

(4)-1-2 抽取受試者之周邊血液檢體約 5c.c.到 10c.c.進行雙中節染色體製備。

**血球培養：**將 1 毫升全血加入含有 20%胎牛血清，1.25%的 L-穀胱胺酸溶液，1.2%的青黴素與鏈黴素混合液的 8 毫升 RPMI-1640 完全培養基，並額外加入 0.2 毫升促進淋巴細胞分裂的 PHA，放入 5% CO<sub>2</sub> 培養箱於 37°C 培養 48 小時。

**染色體收取：**達最終培養時間達 48 小時前 3 小時，加入 0.1 毫升 colcemid 後放入 37°C 培養箱繼續培養。去除上清液，另加 8 毫升 0.54%的低張氯化鉀溶液，置於 37°C 培養箱作用 28 分鐘。最終以甲醇和冰醋酸為 3:1 比例的固定液加入以固定細胞。用固定液將細胞稀釋到適當的密度，均勻地將細胞分佈在載玻片上。放入 95°C 烘箱 1 小時進行染色。

**G 染色：**將適當數量中期細胞樣本噴散在載玻片用 Wrights 染劑染色。

**C 帶染色：**另將載玻片乾燥 95°C 後，放置在 0.2 N 鹽酸 1 小時，再置在 50°C，5 % Ba(OH)<sub>2</sub> 為 15 秒處理，反覆經水沖洗後放置在 2 倍 SSC 溶液 5 分鐘，反覆水洗後用 Wrights 染劑染色。

(4)-1-3 G-staining 以及 C-banding 之染色技術：

8 月 22 日至核研所，以用臨床剩餘檢體去連結後進行實際操作(附件 13)，使用核研所之 Co-60 水中照射器進行照射，剩餘的周邊血液快速的被收集在 10 毫升真空管中，在室溫下分別以 0 Gy, 1 Gy (2m4s), 3 Gy (6m12s), 和 5 Gy (10m20s)的 Co-60

照射(劑量率: 0.487 Gy/min), 每一個 flask 加入 0.2 毫升 PHA、1 毫升全血及 8 毫升培養液 (500ml RPMI-1640+1.25% L-glutamine+1.2% Penicillin and streptomycin+10-20% FBS)進行培養, 每一培養瓶中使用 0.1 毫升(10 $\mu$ g/ml)的秋水仙素, 8 月 24 日(圖 8)分別以; 條件 1: 加 colcemid 後培養 3 小時, 最終培養時間達 48 小時; 條件 2: 加 colcemid 後培養 3 小時, 最終培養時間達 72 小時模擬 Dr. Livingston (ORISE, USA)及 Dr. Yoshida (NIRS, Japan)等人於 2008 發表在 Radiation Research 的文章: Interlaboratory comparison of the dicentric chromosome assay for radiation biodosimetry in mass casualty events, 以文內的條件製備雙中節染色體。

(4)-1-4 10 月 12 日(周三)早上約 9:30 核研所收到第二次由慈濟寄出之檢體, 分別編號 20111012A(case 1, 約 4.5 c.c.)及 20111012B(case 2, 約 7.5c.c.)照射劑量分別與 8 月 22 日照射條件一致 [ 0 Gy, A1 Gy (2m4s), A3 Gy (6m12s), 和 5 Gy (10m20s) 的 Co-60 照射(劑量率:0.487 Gy/min) ], 檢體於(10/12)11:44 加完 PHA 培養於 37°C 之培養箱, 週五(10/14)早上 8:44 分, 加入 colcemid, 11:44 分 0.54% KCl, 37°C, 30min, fix buffer 進行 fix 及 wash 流程, 約 15:00 結束。10 月 17 日(周一)噴片及染色(表 2, 圖 9)。

(4)-1-5 國內生物劑量與美國橡樹嶺生物劑量實驗室進行影像電子檔比對分析: 由核研所向美國橡樹嶺生物劑量實驗室取得染色體玻片, 由核研所同仁及慈濟細胞遺傳室技術員分別進行判讀後比對結果。

(4)-2 執行成果: 核研所與慈濟大學細胞遺傳室之技術員辨識雙中節結果相近, 顯示核研所同仁辨識雙中節染色體之能力已成功建立(表三)。

#### (4)-3 建議

##### (4)-3-1 問題諮詢:

問題 1 除之前提到未染色前, pellet 雖多但噴片後, 使用相位差顯微鏡(細胞實驗用)觀察卻少?

問題 2 經染 Wright's stain 後亦得到相同結果, 且我們除一開始抓條件(1-3 片)使用單片染之外, 後續近 70 片以染缸進行, 後發現似乎後續洗片時間太長導致顏色太淺, 所以我又重覆染一次, 但發現顏色不若以往紫色而是成現偏藍紫色?

問題 3 另外，此次同一片子中，有些染色體有分開，但是絕多數是沒分開像細胞核沒破裂，請問這是噴片不好嗎？如何改善呢？

問題 4 還有，此次染色體較 8 月份觀察，似乎長度都較短，請問在沒加 EtBr 情形下，我們如何從細胞培養或處理其他方式改善？

(4)-3-2 諮詢回覆：

問題 1. 在顯微鏡底下確認是不分裂的細胞數多染色體少，還是細胞少染色體少。

4-3-2.1 若是不分裂細胞多，染色體少，可能與照射劑量有關，5Gy 以上不分裂細胞多，染色體自然變少，需大量製備才能符合觀察所需之量。

4-3-2.2 若是細胞少，染色體也少，表示細胞培養條件需控制至最適狀況或增加 PHA 至 0.2 毫升促進細胞分裂，以增加中期染色體之收穫量。

問題 2. 染色的時間不夠久，如果一次需大量染色，時間要重新評估，延長染色時間或增加染劑濃度，進行補染即可。

細胞核沒破，是噴片高度問題，延遲 slide 上的 fix 乾掉的時間，或者延長 KCl 的時間，視結果修正，也不能太久，否則以實驗室過去經驗發現超過 50 分鐘 metaphase 的染色體將縮短，且有較多呈現染色分體狀況，機制尚未清楚。

可以縮短 colcemid 時間，但是 metaphase 的細胞就會變少，或者加長 EtBr 作用時間至 1.5 小時。

(5) 協助核研所取得人體試驗同意書，取得血液檢體，以進行染色體製備，做為人員訓練之用。

(5)-1 執行方式：由慈濟大學細胞遺傳室向慈濟醫院提出人體試驗同意之申請，以使未來需要製備雙中節染色體時可合乎規範進行檢體收集。

(5)-2 執行成果

(5)-2-1 於 8 月 15 日提出申請，審查委員於 9 月 30 日答覆意見。

(5)-2-2 依據委員意見修改後，於 10 月 14 日送出回覆。

(5)-3 建議

人體試驗同意書預計於 12 月底前通過（見附件 19），可用於後續收受檢體，進行染色體製備之用。

## 總結

核研所已具備完善設備及素質精良之同仁，本輔導案因此得以順利進行，達成預定目標：

- (1)已依據 WHO BiodoseNet 國際標準之染色體變異檢驗標準操作程序，輔導核研所建立人員生物劑量實驗操作技術，作為輻射生物效應之研究與分析平台。
- (2)已輔導核能研究所建構人員生物劑量實驗室，建議設備之添購及實驗室空間規劃，使能與國際輻射生物劑量推估實驗室接軌。
- (3)已建立核研所人員辨識雙中節染色體之能力，做為日後建立輻射生物劑量評估曲線之基礎。
- (4)已與核研所人員合作，進行國內及國際間雙中節染色體變異之辨識，為加入全球的生物劑量支援網路而準備。
- (5)已協助核研所申請人體試驗同意書，預計於 12 月底通過，使日後血液檢體之取得可合乎規範，以進行染色體製備，做為人員訓練及曲線建立之用。

總結此輔導計劃，已成功轉移慈濟大學細胞遺傳實驗室現有之雙中節染色體製備、染色、判讀之知識及經驗予核研所，使其具備建立人員生物劑量實驗室之核心能力。除輔導計劃書規劃之項目外，慈濟大學細胞遺傳實驗室亦提供核研所所需求之 C-banding 及 G-banding 之實驗步驟及技術教學，結案後核研所在雙中節製備及實驗技術上若有任何問題，慈濟大學細胞遺傳實驗室將持續提供諮詢服務。

表1. 2011年5月5日核研所同位素組生物劑量實驗室至慈濟大學分子生物暨人類遺傳學系參訪及討論雙方合作事宜之會議流程

時間	五月五日	座談與會者
9:00 AM	Opening remark	方菊雄教授
9:20 AM	會議議題 研究計畫申請說明 1. 硬體設備需求評估 2. 臨床試驗申請評估 3. 血液檢體操作流程 4. 雙方交流模式商討	方菊雄教授 張志賢博士 劉怡均副教授 謝婉華助理教授 余秉弘先生 傅孟鈞先生 蔡青彥先生 李桂芳小姐
12:00 PM	餐敘	與會者
2:00 PM	實驗室參訪	方菊雄教授 李桂芳小姐
	<b>E409</b> 實驗空間介紹 染色體製備及染色過程介紹 培養室 顯微鏡室與MetaSystem解說	
	<b>E415</b> 實驗空間介紹 分子檢驗設備解說 分子檢驗規劃	方菊雄教授 李桂芳小姐
4:30 PM	會議結束	

圖1. 2011年7月5日視訊會議



慈濟大學分子生物暨人類遺傳學系所  
100年人員生物劑量實驗室輔導案主持人會議  
視訊會議議程

時間：100年7月5日（週二）中午 13:30

地點：第二教學研討室

主席：張志賢博士

出席人員：劉怡均副教授、傅孟鈞先生、余秉弘先生、蔡青彥先生、張翠容小姐、李桂芳小姐

請假人員：劉鴻文副院長

**壹、張志賢博士報告：**

為因應相關意外曝露事件原能會委託核研所建立人員生物劑量(Biodosimetry)評估相關技術，將有助於制定相關應變作業程序，設置具有國際水準的輻射生物劑量實驗室，此外可藉此技術協助建立國內核醫藥物劑量評估能力。

(一) 確認參與投標廠商資格（需檢附證明文件）：

- 1 醫學中心或有醫學中心之大學。
- 2 曾執行台電或原能會染色體變異分析相關計劃，能如期結案達成試驗目標者。
- 3 具染色體變異分析核心實驗室。
- 4 實驗室具 ISO 或 TAF 認證。

(二) 確認臨床試驗計畫設計，內容包括：試驗計畫書撰寫、受試者至少含兩位放射治療病人、兩位健康受試者、受試者同意書、最終報告撰寫等。

(三) 臨床試驗計畫進行人體試驗委員會(IRB)送審

(四) 試驗計劃書、最終報告撰寫方式等文件均需交付本所完整 Microsoft word 及可供編輯之電腦檔案及紙本。

(五) 雙中結染色人員技術訓練與現場輔導（至受託單位與核研所）：至核研所現場輔導、提供染色體分析實驗室運作及分析變異所需的相關 protocols (SOPs)、實驗室所需的相關資源與設備清單、最終報告撰寫格式。

貳、會議結論：

提案	內容	會議決議
1. 確認參與投標廠商資格	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 實驗室具有 ISO 認證，以及衛生署</li> <li>2. 有醫學中心之大學。</li> <li>3. 曾執行台電或原能會染色體變異分析相關計劃，並如期結案達成目標。</li> <li>4. 具染色體變異分析核心實驗室。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. ISO 認證證書及衛生署認證證書</li> <li>2. 97 年曾執行台電或原能會染色體變異分析相關計劃，並如期結案達成目標。</li> </ol>
2. 確認臨床試驗計畫設計	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 臨床檢體收取流程為慈濟大學取得臨床未接受放射線照射之檢體寄送至核研所進行不同劑量之 Co-60 照射後培養，並於細胞收取與玻片製作後取得之染色體影像進行實驗室間分析作業。</li> <li>2. 預計取得 2 位接受放射線治療之病患並願意簽署同意書以及未接受放射線並願意簽署同意書之正常受試者之血液檢體。</li> <li>3. 人體試驗計畫書內之受試者是否增加樣本數</li> <li>4. 人體試驗計畫書中提到，檢體或其衍生物是否提供、讓與或授權慈濟醫院以外之他人使用。</li> <li>5. 研究用人體檢體採集受試者同意書中第八項，檢體是否提供、讓與或授權本院以外之他人使用。</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 第 3 點將受試者與健康受試者各增加為 50 人，男女不限，年齡的範圍由 0 至 50 歲，為排除因年齡影響的染色體變異</li> <li>2. 第 4 點於計畫書中將註明 <input checked="" type="checkbox"/> 是，可能 <input checked="" type="checkbox"/> 提供 <input type="checkbox"/> 讓與 <input type="checkbox"/> 授權 (<input checked="" type="checkbox"/> 國內，機構名稱：龍潭核能研究所。</li> <li>3. 第 5 點將修正為，您的檢體【將提供給本院以外之龍潭核研所使用】</li> </ol>
3. 臨床試驗計畫進行人體試驗委員會 (IRB) 送審	由輔導計畫書內容提到須於 11 底完成人體試驗計畫申請程序	將盡快進行人體試驗計畫撰寫及修正
4. 試驗計畫書、最終報告撰寫方式	文件均需交付本所完整 Microsoft word 及可供編輯之電腦檔案及紙本	最終將提供 word 檔給核研所涵蓋相關的 protocol
5. 雙中結染色人員技術訓練與現場輔導（至受託單位與核研所）	須派員至核研所進行現場輔導、提供染色體分析實驗室運作及分析變異所需的相關 protocols (SOPs)、實驗室所需的相關資源與設備清單、最終報告撰寫格式。	預計 7 月初為相關人員進行染色體變異學理課程之第一次實地輔導，以及預計八月底將進行第一次實地演練
6. 後續之諮詢服務	實地輔導之後續相關諮詢	可用視訊、郵件或是電話進行相關諮詢及討論

參、提案討論：

案由一

說明：預計 2011 年原能會將邀請國際輻射相關研究專家來台進行交流及學術演講暫定時間為 12 月 13 至 14 日，歡迎慈濟大學參加，詳細的時間跟地點將在日後確認時會再通知，預計將邀請日本的 Dr. Mitsuaki Yoshida 以及美國的 Dr. Livinston 來台。

伍、散會

出席人員簽到：

慈濟大學

李松芳 劉怡均

核研所

張志賢博士、傅孟鈞先生、余秉弘先生、蔡青彥先生、張翠容小姐

圖2 計畫流程

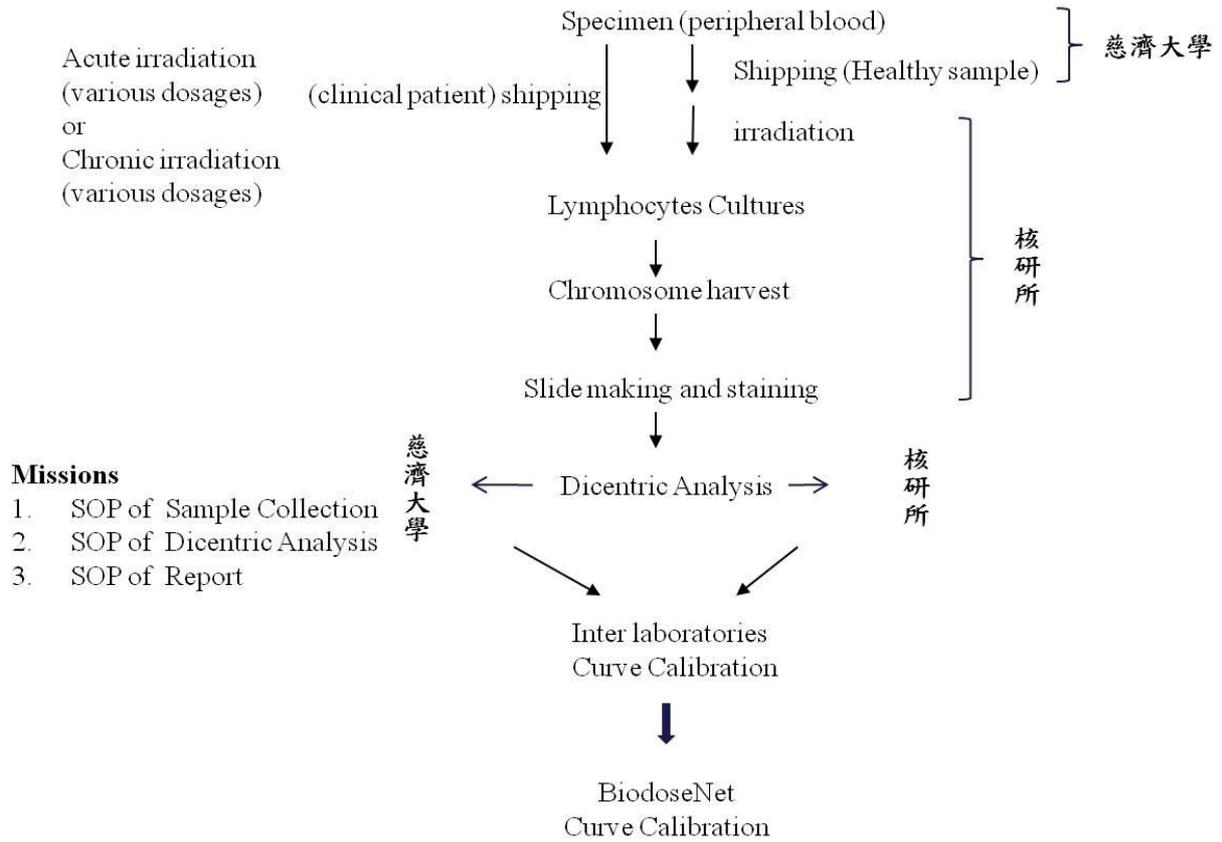


圖 3 7月7細胞遺傳學理課程-人類染色體之構造及變異

核能研究所生物劑量實驗室  
人員訓練出席記錄表

核能研究所生物劑量實驗室訓練研習學員登載名冊						
班別名稱	人類染色體之構造及變異-1					
上課地點	060 館 309 室					
上課日期	100 年 7 月 7 日 10:00-12:00					
上課講師	劉怡均老師					
訓練時數	<input checked="" type="checkbox"/> 小時 (共 2 小時)			<input type="checkbox"/> 天 (共 ____ 天)		
登 載 名 冊						
姓 名	身分證字號	備 註	姓 名	身分證字號	備 註	
劉怡均	E220457226					
傅金鈞	K12187122					
余秉弘	K121621910					
張明宏	P222200036					
蔣青宏	D121799506					
張志賢	O100148152					

RT-QA-QP-04-05

核能研究所生物劑量實驗室  
人員訓練出席記錄表

核能研究所生物劑量實驗室訓練研習學員登載名冊						
班別名稱	人類染色體之構造及變異-2					
上課地點	060 館 309 室					
上課日期	100 年 7 月 7 日 13:30-15:30					
上課講師	劉怡均老師					
訓練時數	<input checked="" type="checkbox"/> 小時 (共 2 小時)			<input type="checkbox"/> 天 (共 ____ 天)		
登 載 名 冊						
姓 名	身分證字號	備 註	姓 名	身分證字號	備 註	
劉怡均	E220457226					
張明宏	P222200036					
張志賢	O100148152					
傅金鈞	K12187122					
余秉弘	K121621910					
蔣青宏	D121799506					

RT-QA-QP-04-05-4

圖 4 8月4日視訊細胞遺傳學理課程

核能研究所生物劑量實驗室會議簽到表

教育訓練

會議事由：生物劑量實驗室人體試驗委員會主持人會議(視訊)

開會時間地點：100年8月4日060館視訊室 10:00

參加人員：

慈濟：劉怡均 老師

核研所：

張翠君  
張志青  
蔣傳余  
孟鉤  
余秉弘



核能研究所生物劑量實驗室會議簽到表

教育訓練

會議事由：生物劑量實驗室人體試驗委員會主持人會議(視訊)

開會時間地點：100年8月4日060館視訊室 13:30

參加人員：

慈濟：劉怡均 老師

核研所：

張翠君  
張志青  
蔣傳子  
傅孟鉤  
余秉弘



圖 5 8月22日血液細胞培養實地演練

核能研究所生物劑量實驗室會議簽到表

會議事由：生物劑量實驗室人體-人血細胞培養實習

開會時間地點：100年8月22日069館實驗室

參加人員：

總濟：李程芳

核研所：



張明宏

李程芳筆誤

余秉弘

張志賢

蔣青秀

圖 6 8 月 24-26 日血液淋巴球細胞收取及 G-stain、C-banding 及 G-banding 染色

核能研究所生物劑量實驗室會議簽到表

會議事由：生物劑量實驗-現場實際操作

開會時間地點：100 年 8 月 24 日 069 館 205 室

參加人員：

講(師)員：李榕芳

核研所：



張翠芬 蔣青秀 余季弘

核能研究所生物劑量實驗室會議簽到表

會議事由：生物劑量實驗-現場實際操作

開會時間地點：100 年 8 月 25 日 069 館 205 室

參加人員：

講(師)員：李榕芳

核研所：



張翠芬 蔣青秀 余季弘

核能研究所生物劑量實驗室會議簽到表

會議事由：生物劑量實驗-現場實際操作

開會時間地點：100 年 8 月 26 日 069 館 205 室

參加人員：

講(師)員：李榕芳

核研所：



張翠芬 蔣青秀 余季弘

圖 7 10 月 4 日細胞遺傳學理課程-ISCN 書寫格式

### 核能研究所生物劑量實驗室會議簽到表

會議事由：生物劑量實驗-現場實際操作

開會時間地點：100 年 10 月 4 日 069 館 會議室

參加人員：

講(師)員：

方育雄

核研所：



張羽

林青

余承弘

圖 8 8月22日 G-staining 結果影像

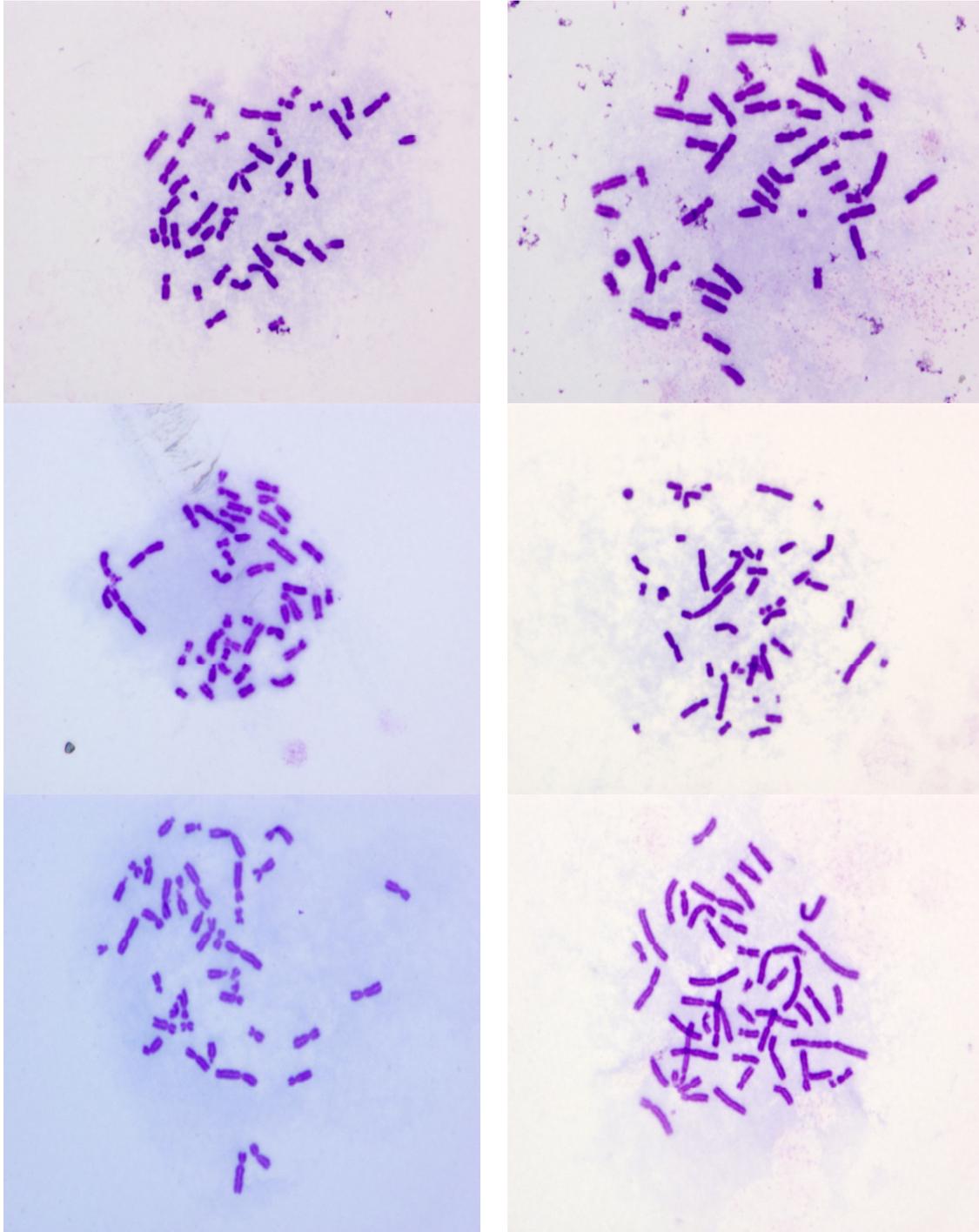


表2 2011年10月12日核研所進行第二次血液檢體之 Co-60 照射條件及結果

檢體編號	劑量(Gy)	劑量率(Gy/min)	照射時間	血量(ml)	結果討論
20111012A (血色較鮮紅)	0	0.487	-	1	OK
	1	0.487	2m4s	1	OK
	3	0.487	6m12s	1	OK
	5	0.487	10m20s	1.5	與20111012B 5 Gy相同，只是pellet白色且量較少。
20111012B (血色較暗紅)	0	0.487	-	1	
	1	0.487	2m4s	1	
	3	0.487	6m12s	2	Wash 後，pellet 呈淺白褐色量多，於 15ml 離心管中約 0.15-0.2 cm。經噴片仍可見少數 chromosome，量需進一步分析確認。
	5	0.487	10m20s	3.5	Wash後，pellet呈淺褐色量多，於15ml離心管中約0.3 cm。但經噴片及染色後，初步快速無觀察到 chromosome，顯示樣品數極少。另噴片後明顯可見玻片上有沙沙感覺，經染色後，原本乾淨玻片可見許多雜質。  討論：1.高劑量組本來就會造成細胞死亡。2.此次是將 3.5ml 檢體，直接於 1 培養皿中，是否因培養液及空間較不足，下次進行實驗應會分多個培養皿。

表3 核研所與慈濟生物劑量實驗室雙中結變異分析比對結果

Chr. variation	INER 1	INER 2	INER 3	INER 4	INER 5	Tzu 1	Tzu 2	Tzu 3	Tzu 4	Tzu 5
Dicentrics	23	23	24	21	24	25	25	22	20	15
Tricentrics	7	7	5	7	7	7	7	6	7	4
Quadracentrics							1	1		
Dicentrics Equiv	37	37	34	35	38	39	42	37	34	23

## 參考文獻

1. 馬張明霞，陳敏達，陳麗香，幅射建物居民的微核和雙中節兩種生物劑量評估方法對照分析，1999。
2. 馬張明霞，陳麗香，螢光原位雜交法觀察易位染色體評估生物劑量初步研究報告，2003
3. 馬張明霞，陳麗香，人員淋巴球 1、2、4 染色體的螢光原位雜交技術觀察易位率評估 x 射線生物劑量 (INER-2668)，2004。
4. 馬張明霞，核能研究所生物劑量實驗室意外曝露之生物劑量評估作業說明與回顧 (INER-4293R)，2006。
5. 陳家鈺，化學及生物劑量計，游離輻射防護彙萃，1996。
6. 許彬杰、翁寶山，實用固體熱發光劑量測定術。2002。
7. International Commission on Radiological Protection, 1990 Recommendations of the ICRP, ICRP Publication 60, 1991.
8. International Commission on Radiological Protection, Protecting People against Radiation Exposure in the Event of a Radiological Attack, ICRP Publication 96, 2005.
9. International Commission on Radiological Protection, The 2007 Recommendations of the ICRP, ICRP Publication 103, 2007.
10. Kanda, R., Improvement of accuracy of chromosome aberration analysis for biological radiation dosimetry. J Radiat Res (Tokyo), 2000. 41(1): p. 1-8.
11. Natarajan, A.T, and P.C. Kesavan, Cytogenetics for Dosimetry in Cases of Radiation Accident and Assessing the Safety of Irradiation Food Material. Current Science, 2005. 89(2): p. 361-65.
12. Blakely, W.F., et al., WHO 1st consultation on the development of a global biodosimetry laboratories network for radiation emergencies (BioDoseNet). Radiat Res, 2009. 171(1): p. 127-39.
13. Romm, H., U. Oestreicher, and U. Kulka, Cytogenetic damage analysed by the dicentric assay. Ann Ist Super Sanita, 2009. 45(3): p. 251-9.
14. Wilkins, R.C., et al., Interlaboratory comparison of the dicentric chromosome assay for radiation biodosimetry in mass casualty events. Radiat Res, 2008. 169(5): p. 551-60.