ISBN 978-4-938987-80-0
NIRS-M-253

平成 24 年度

放射線医学総合研究所　技術報告書
（研究基盤技術）

NIRS Technology
Volume 7, November 2012

独立行政法人　放射線医学総合研究所

放射線医学総合研究所　技術報告書　**Vol. 7**

Contents

はじめに

研究基盤センター研究基盤技術部長
白川　芳幸

1　**赤色蛍光マウスの作出と発現解析**　p1-p6
Development and characterization of red fluorescent transgenic mice

塚本　智史[1]*、諸越　幸恵[2]、長谷川　純崇[2]、季　斌[3]、南久松　丈晴[3]、
樋口　真人[3]、和田　彩子[4]、鼻崎　愛美[4]、鬼頭　靖司[1]、小久保　年章[1]
1) 研究基盤センター　研究基盤技術部　生物研究推進課
2) 分子イメージング研究センター分子病態イメージング研究プログラム
3) 分子イメージング研究センター分子神経イメージング研究プログラム
4) サイエンス・サービス

2　**放医研で維持している近交系メダカ(2) –HNI–**　p7-p10
Inbred strains of medaka in NIRS (2):HNI

丸山　耕一*[1,2]、前田　圭子[2]、長谷川　純崇[3]、石川　裕二[1]、王　冰[1]
1) 放射線防護研究センター　リスク低減化研究プログラム
2) 福島復興支援本部　環境動態・影響プロジェクト
3) 分子イメージング研究センター
　分子病態イメージング研究プログラム

3　**近年のげっ歯類に対する導入使用申請と検疫**　p11-p16
Procedure for the introduction and use of animals from external organizations and their quarantine

石田　有香*、白石　美代子、川原　隼、飯名　瑞希、小久保　年章
研究基盤センター　研究基盤技術部　生物研究推進課

4 **ヒトがん及び正常細胞間におけるバイスタンダー経路に関する定量的解析** p17- p 25
Quantitative analyses of the bystander-effects pathway in cancer cells and normal cells

小林 亜利紗[1]*、塩見 尚子[1]、前田 武[1]、児玉 久美子[1]
鬼頭 靖司[2]、Badri.N.PANDEY[3]、小西 輝昭[1]
1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 放射線発生装置技術開発課
2) 研究基盤センター　研究基盤技術部　生物研究推進課
3) Radiation Biology and Health Sciences Division, Bhabha Atomic Research Centre

5 **放医研サイクロトロン用バイナリフィルターの水等価厚測定** p26-p34
Water-Equivalent Thicknesses of Binary Filters Installed in the NIRS-Cyclotron

北村 尚
研究基盤センター 研究基盤技術部 放射線計測技術開発課

6 **Instruction Manual for 2-way Sorting Using BD FACSAria** p35-p80

前田 武[1]*、高野 裕之[1,2]、小澤ブル 美絵[1]、中村 悦子[3]、
下川 卓志[3]、小西 輝昭[1]
1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 放射線発生装置技術開発課
2) 東京ニュークリア・サービス株式会社
3) 重粒子医科学センター先端粒子生物研究プログラム

投稿規定＆投稿サンプル（**Author instruction**）

始めに

前年に発行した平成 23 年度技術報告書に「静電加速器棟夏季メンテナンスの報告」がありました。この 6 か月後に予想もしなかった東日本大震災が起き静電加速器施設が大きな被害を受けました。イオン源、加速器、ビームライン、分析系装置などに多々不具合が発生しました。職員一丸となって修復に尽力しました。修復には平成 23 年度の 1 年を要しました。すべてのマシンタイム募集を取りやめることとなり多くのユーザの方々にご迷惑をおかけしました。

以上のように静電加速器施設が休止中だったため今回の平成 24 年度技術報告書にはこの施設を利用した研究成果の報告がありません。現在はマシンタイムを提供していますので平成 24 年度の成果を期待しています。さて今回は生物系の報告が充実しています。マウス、メダカ、細胞、そしてげっ歯類を対象にした研究結果、技術検討が掲載されています。それに加え、近年必要性が増している検疫に関する報告、そして iPS 研究で話題となった自動細胞解析分離装置の使用にあたっての詳細なノウハウ、マニュアルも読者の皆様の興味を引くと思います。全体としては生物系 5 件、計測系 1 件の内容です。

今後とも基盤技術を活用した様々な研究課題、技術課題を掲載していきたいと考えておりますので皆様の一層のご支援をお願い申し上げます。

平成 24 年 11 月 1 日

研究基盤センター
研究基盤技術部長
白川　芳幸

放射線医学総合研究所
技術報告書

NIRS

www.nirs.go.jp

NIRS Technology

NIRS Technology, vol. VII (2012) 1 – 6.

赤色蛍光マウスの作出と発現解析

Development and characterization of red fluorescent transgenic mice

塚本　智史[1]*、諸越　幸恵[2]、長谷川　純崇[2]、季　斌[3]、南久松　丈晴[3]、樋口　真人[3]、
和田　彩子[4]、鼻崎　愛美[4]、鬼頭　靖司[1]、小久保　年章[1]

1.研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課
2.分子イメージング研究センター分子病態イメージング研究プログラム
3.分子イメージング研究センター分子神経イメージング研究プログラム
4.サイエンス・サービス

要旨

Green fluorescent protein (GFP) is a well-known fluorescent protein that boasts a wide array of applications in the field of research, from cell biology to the study of animal physiology. GFP transgenic mouse is an animal model in which GFP is ubiquitously expressed in all tissues. This is an attractive model for fluorescence-based monitoring of the animal system. Although GFP transgenic mice are easily available from several commercial mouse breeders in Japan, transgenic mice expressing other fluorescent proteins, such as red fluorescent protein, are not easily obtained. We report here the development and characterization of a red fluorescent protein (DsRedII) transgenic mouse that ubiquitously expresses DsRedII protein in all tissues.

Keywords: GFP*、*DsRed*、*microinjection* 、*transgenic mice*、*cell toxicity

Corresponding Author:
塚本 智史 (Satoshi Tsukamoto)
e-mail: s_tsuka@nirs.go.jp

１．はじめに

緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein, GFP）をはじめとする蛍光タンパク質は現在では様々な研究分野で利用されており、その利用は細胞から個体レベルまで広範囲に及んでいる。マウスにおいては、受精卵（1 細胞）の前核に外来性 DNA を導入することで、染色体上にこれらの DNA を一定の割合で保有すマウス（トランスジェニックマウス）の作出技術が確立されており、全身性に GFP を発現するトランスジェニックマウス[1]や解析対象となる組織特異的に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウス、さらには薬剤によって蛍光タンパク質が発現する薬剤誘導型トランスジェニックマウスなど多くのトランスジェニックマウスが作出され研究者間で利用されている。遺伝子組換えマウスの資源バンクとして世界的に有名なアメリカのジャクソン研究所（http://jaxmice.jax.org/）には、GFP に関連する遺伝子組換えマウスが 100 系統以上登録されていることから（2012 年 9 月現在)、GFP を発現する遺伝子組換えマウスを使った研究の多さを裏付けている。放射線医学総合研究所（以下、放医研という）においても、GFP 関連のトランスジェニックマウスを利用した研究は増加傾向にある。その一方で、放医研では骨髄移植などの個体間での細胞移植も実施されており、この場合には移植する側（ドナー）と移植される側（レシーピエント）の組織を識別するためや、ドナー由来の細胞をレシーピエントの生体内で追跡するためにも、それぞれ異なった蛍光タンパク質を発現するマウスの必要性が高まっている。国内において全身性に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスとしては、上述した Okabe らが開発した GFP トランスジェニックマウス[1]がブリーダー（日本 Slc）から入手可能なものの、その他の蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスについては開発途中であるか、あるいは入手するには時間を要す状況にある。これまで赤色蛍光タンパク質（Red Fluorescent Protein, DsRed）の過剰発現は細胞毒性をもたらすということが知られていたが、最近 Nagy らの研究室から、ES 細胞を介した相同組み換え（ノックイン）によって改良型の赤色蛍光タンパク質 DsRed.T3 を発現するノックインマウスが報告された[2]。実際にこの DsRed.T3 ノックインマウスは他の系統のマウスとの交配によってもその発現が全身性に寄与することが確認されている[3]。そこで、筆者らも放医研の研究者らと共同で、放医研内における放射線影響研究に有効活用できるように、全身性に赤色蛍光タンパク質（DsRedII）を発現するトランスジェニックマウス（DsRedII TG マウス）の開発に着手した。本報告書では、開発した DsRedII TG マウスの発現解析の例について紹介したい。

２．実験方法

全身性に DsRedII タンパク質を発現するようにニワトリ由来のアクチンプロモーター[4]で DsRedII タンパク質の発現が制御されるようプラスミドを構築した。構築したプラスミドから必要部位をトランスジーンとして精製した。マウス受精卵へのトランスジーンの顕微注入から個体作出までの過程は文献[5]に従って実施した。簡単に述べると精製したトランスジーンを TE buffer で 4 ng/μl となるように希釈して、これを C57BL/6J マウス由来の受精卵（1 細胞）の前核内に顕微注入した。翌日、正常に卵割した 2 細胞を偽妊娠状態の ICR(MCH)マウスの輸卵管内へ移植した。移植して 19 日後に帝王切開によって得た産仔を里親によって離乳するまで保育した。離乳後に尻尾の一部からゲノム DNA を抽出し PCR によってトランスジーンを保有するかどうかの判定を行った。PCR の結果、トランスジーンを保有する場合には、トランスジェニックマウスとして野生型マウスと交配させて次世代

のトランスジェニックマウスを作出した。これらのトランスジェニックマウスを解剖して組織や臓器における赤色蛍光タンパク質の発現を蛍光顕微鏡下で観察した。なお、DsRedII TG マウスの作出や飼育は放医研の遺伝子組換え実験計画並びに動物実験計画を遵守して実施した。

３．結果

これまでのところ前核内へトランスジーンを顕微注入した後に正常に卵割した 2 細胞期胚 537 個を移植して 81 匹のマウスが生まれた。そのうち出生直後やその後の成長過程で死亡したマウスを除く 51 匹が生存し、離乳後にこれらの遺伝子型判定を行ったところ、12 匹がトランスジーン陽性の DsRedII TG マウスであることが分かった。この中から特に発現が強いと思われた 1 ラインを解析対象とした。まず、採取した主要臓器のうち、脳の一部（小脳）、肝臓、腎臓、膵臓（図 1）、生殖器、表皮、腹膜、胸腺、肺（未発表データ）には DsRedII タンパク質が高発現していることが分かった。次に、脳内での DsRedII タンパク質の発現を詳細に解析した。その結果、小脳や嗅球領域には DsRedII タンパク質が高発現しており、大脳皮質、線条体、海馬、間脳での発現が低いことが分かった。細胞の種類別に見ると、小脳プルキエン細胞、血管内皮細胞での発現が最も高く、次にグリア細胞の一種であるアストロサイトでも発現が観察された。グリア細胞の亜種ミクログリアにはその発現が確認されなかった。神経細胞の発現に関しては、線条体、海馬、大脳皮質領域では、DsRedII タンパク質陽性細胞は存在するものの全体的に数が少なかった。（図 2）。その後の解析から、骨髄細胞を含む血液系細胞での DsRedII タンパク質の発現は全体の 20 %程度であるここも分かった（未発表データ）。

４．考察

これまでのところ正常に発育した 51 匹のマウスから 12 匹の DsRedIITG マウスが得られている。一般的には出生したマウスの 10~20 %がトランスジェニックマウスであることが多く、今回の DsRedIITG マウスの作出は効率的であった。出生直後やその後の発育段階で死亡したマウスの多くは、皮膚などが顕著に赤く、DsRedII タンパク質が過剰に発現した結果致死に至った可能性があると思われる。実際に、筆者らは DsRedII タンパク質を高発現する TG マウスは出生前後に致死となったり、その後に発育不良に陥るケースを経験している[6]。しかしながら、最近では赤色蛍光タンパク質の変異体 mCherry タンパク質を全身性に発現するトランスジェニックマウス[7]やマウス以外でも赤色蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックドック[8]が報告されている。これらのことから全身性の発現であっても細胞毒性を生じないレベルの発現であれば個体の生存には問題ないのかもしれない。今後は、解析対象となる組織を中心に DsRedII タンパク質を発現するマウスの選抜や他の蛍光タンパク質を使った TG マウスの作出を検討したいと考えている。

５．謝辞

DsRedII TG マウスの作出にあたりニワトリアクチンプロモーターをコードするプラスミドを分与して頂いた大阪大学大学院医学研究科の宮崎純一先生に感謝いたします。また、DsRedTG マウスの飼育を担当した生物研究推進課の林真美さん、矢野浩子さんに感謝いたします。なお、本研究の一部は、科研費（若手（A）No. 22688022）による助成を受けました。

６．参照文献

[1] Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K. et al., 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells, *FEBS Lett*. 407 (1997) 313-9.

[2] Vintersten, K., Monetti, C., Gertsenstein, M. et al., Mouse in red: red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals, *Genesis*. 40 (2004) 241-6.

[3] Yang, M., Reynoso, J., Bouvet, M. et al., A transgenic red fluorescent protein-expressing nude mouse for color-coded imaging of the tumor microenvironment, *J Cell Biochem*. 106 (2009) 279-84.

[4] Niwa, H., Yamamura, K. and Miyazaki, J., Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector, *Gene*. 108 (1991) 193-9.

[5] Ittner, L.M. and Gotz, J., Pronuclear injection for the production of transgenic mice, *Nat Protoc*. 2 (2007) 1206-15.

[6] 塚本智史、太田有紀、和田彩子、他、Genome Walkingによるトランスジェニックマウスの導入遺伝子のゲノタイピング法の確立ー。放射線科学 (Radiological Sciences) 53 (2010) 24 – 27.

[7] Fink, D., Wohrer, S., Pfeffer, M. et al., Ubiquitous expression of the monomeric red fluorescent protein mCherry in transgenic mice, *Genesis*. 48 (2010) 723-9.

[8] Hong, S.G., Kim, M.K., Jang, G. et al., Generation of red fluorescent protein transgenic dogs, *Genesis*. 47 (2009) 314-22.

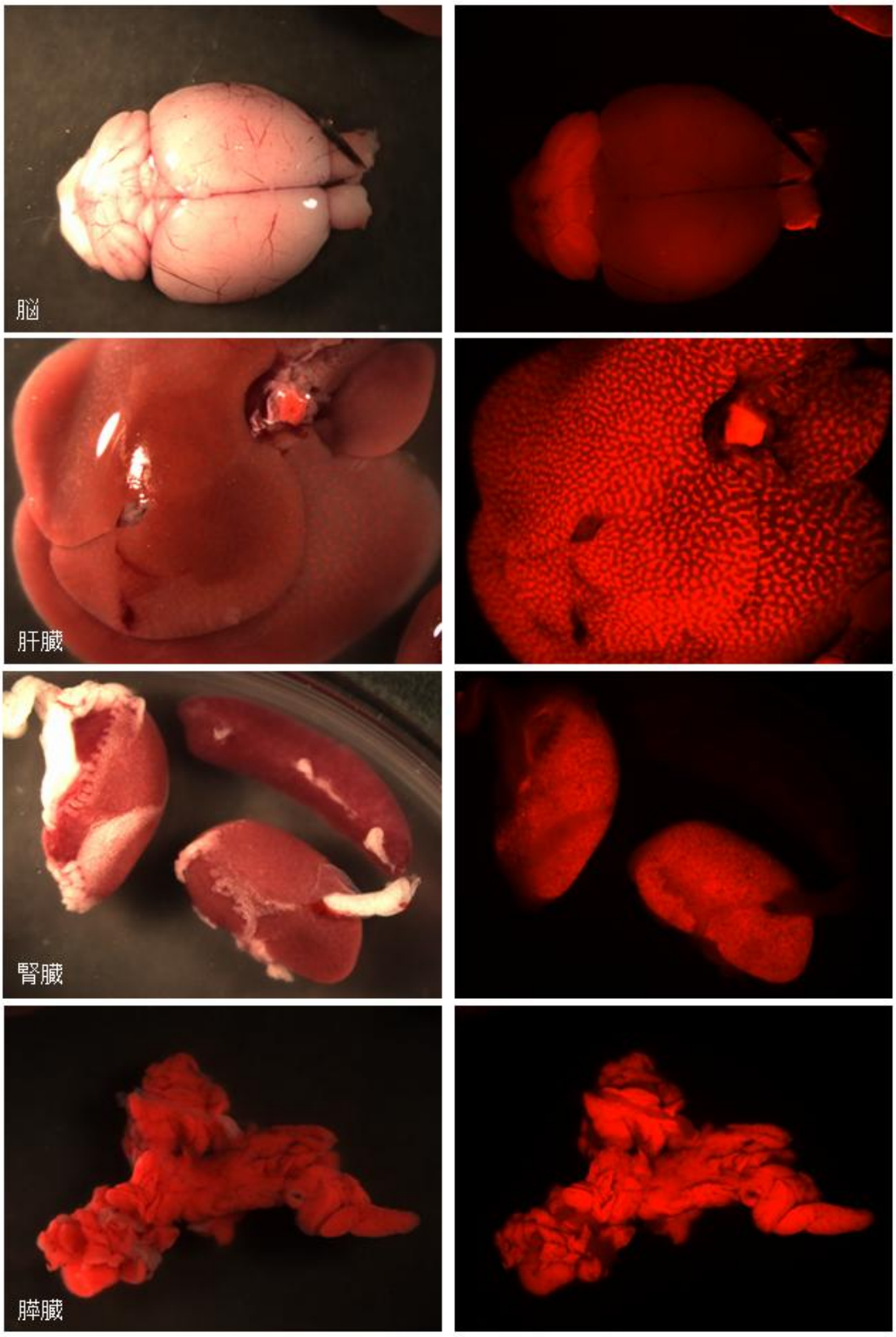


図1 臓器におけるDsRedIIタンパク質の発現の様子。上から脳・肝臓・腎臓・膵臓を示す。

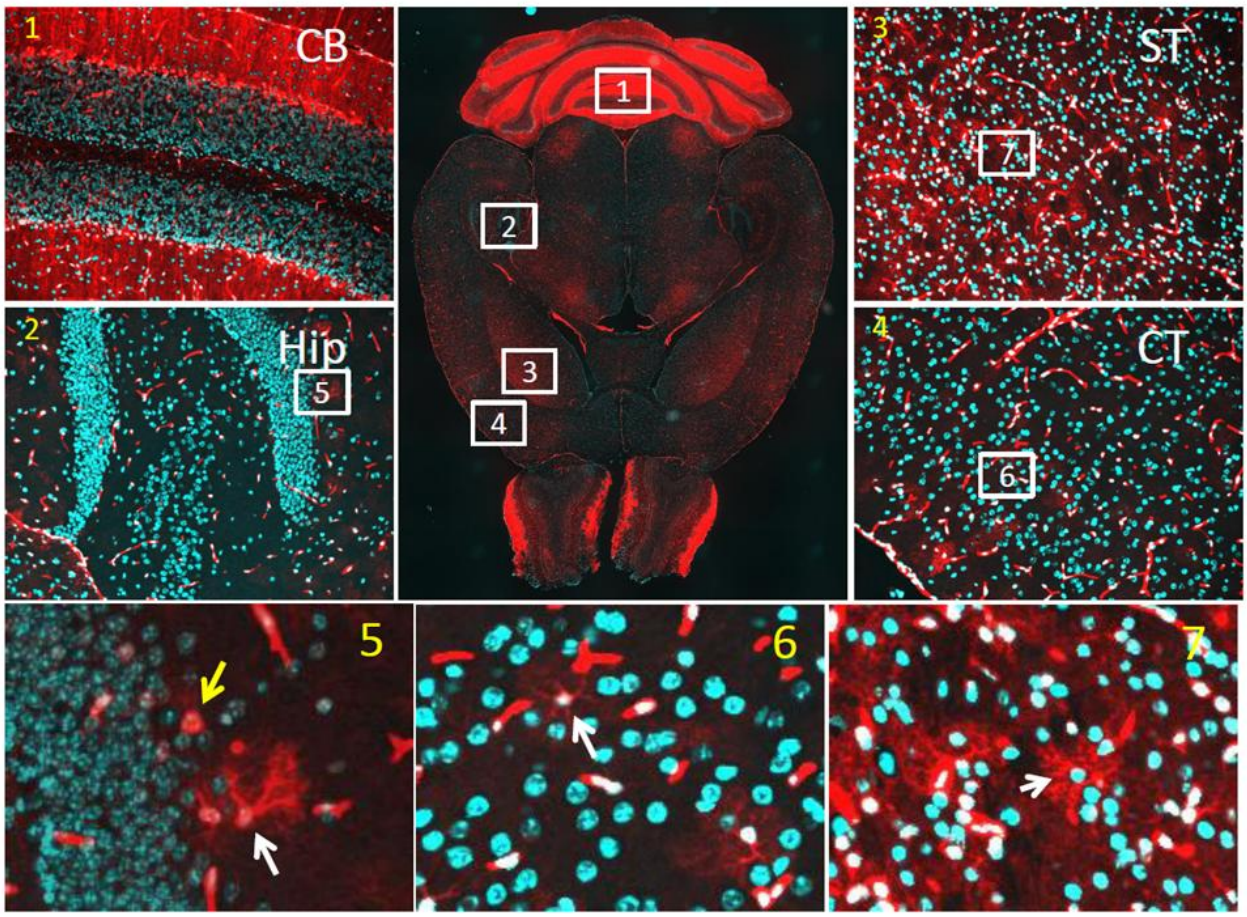


図2 脳内におけるDsRedIIタンパク質の発現の様子。DsRedIIタンパク質（赤色）は主に小脳（CB）と嗅球領域で高発現している（上段、中央パネル）。各領域の拡大図；小脳（CB、パネル1）、海馬（Hip、パネル2）、線条体（ST、パネル3）、大脳皮質（CT、パネル4）領域において、DsRedIIタンパク質が小脳プルキエン細胞と血管内皮に高い発現をしていることが分かる。高倍率（パネル5-7）で観察すると、アストロサイト（パネル5-7の白色矢印）と一部の神経細胞（パネル5の黄色矢印）がDsRedIIタンパク質陽性であることが分かる。細胞核はDAPI染色（シアン色）で示している。

放射線医学総合研究所
技術報告書

NIRS Technology

www.nirs.go.jp

NIRS Technology, vol. VII (2012) 7– 10.

放医研で維持している近交系メダカ(2) –HNI–

Inbred strains of medaka in NIRS (2): HNI

丸山 耕一*[1,2]、前田 圭子[2]、長谷川 純崇[3]、石川 裕二[1]、王 冰[1]

1) 放射線防護研究センター リスク低減化研究プログラム
2) 福島復興支援本部 環境動態・影響プロジェクト
3) 分子イメージング研究センター 分子病態イメージング研究プログラム

要旨

Medaka, a small freshwater fish, has been used as an experimental animal for more than 100 years. One of its advantages is that it is suitable to establish the inbred strains. NIRS is famous for pioneering the establishment of inbred strains. Today, researchers all over the world are using the various medaka inbred strains that were established at NIRS. Among these inbred strains, the Houiken-Niigata (HNI) stain, which was established at NIRS in 1989, is well known, and has been applied to genome research, expressed sequence tag (EST)-analyses and mutagenesis studies. In this report, we present a detailed characterization of the HNI strain, its maintenance records, and we compare the HNI strain with other inbred strains.

Keywords: メダカ、近交系、HNI、medaka, Oryzias latipes, inbred strain

Corresponding Author:
丸山 耕一 (Kouichi Maruyama)
e-mail: k_maruya@nirs.go.jp

１．イントロダクション

メダカは、日本人にはなじみの深い水棲小型魚類であるとともに、実験動物としては、代表的な脊椎動物のモデル生物として世界中に利用されている。メダカが実験動物としての地位を確立した要因のひとつには、近交系が確立出来たことが挙げられる。放射線医学総合研究所（放医研）は、世界で初めて魚類近交系をメダカで確立したことで有名であり、現在 7 系統を維持している。前年度の技術報告書では、放医研で初期に確立、維持されてきた HO 系統、HB 系統について詳述した[1]。本報では、北日本集団から初めて近交化された HNI 系統について、その性格、利用例、放医研での継代記録、南日本集団由来の近交系との遺伝的差異の検出等について報告する。

1-1.　HNI の起源と歴史

HNI 系統は、Houiken-Nigata 系統の略であり、その名の通り新潟県の野生集団を起源としている。文献によると、東京大学で維持されていた新潟由来の野生メダカ系統(NI)を放医研で受入れ、その後、1982 年 8 月 10 日より近交化を開始し、1989 年 10 月に 20 世代に達し、近交系 HNI が成立したとある[2] [3]。HNI の継代は、現在 30 年を超え、飼育管理者も代替わりし、断片的な継代記録しか残されていない。そこで残されている資料を総括し、図 1 にまとめた。HNI 系統には HNI-I 系統と HNI-II 系統の亜系統があるが、同じ NI 集団に由来し、1989 年に共に近交化に成功したが、1996 年の文献によると既に HNI-II 系統に比べ、HNI-I 系統では 3 世代継代が遅れていたようである[2]。その後、HNI-I 系統は発育や受精率などが徐々に悪化し、2009 年には近交系としての継代が途絶えた。HNI-II 系統は、HNI-I 系統の経験も踏まえ、常に複数ラインを確保しながら継代を続け、2012 年 8 月現在で 81 世代目を維持している。

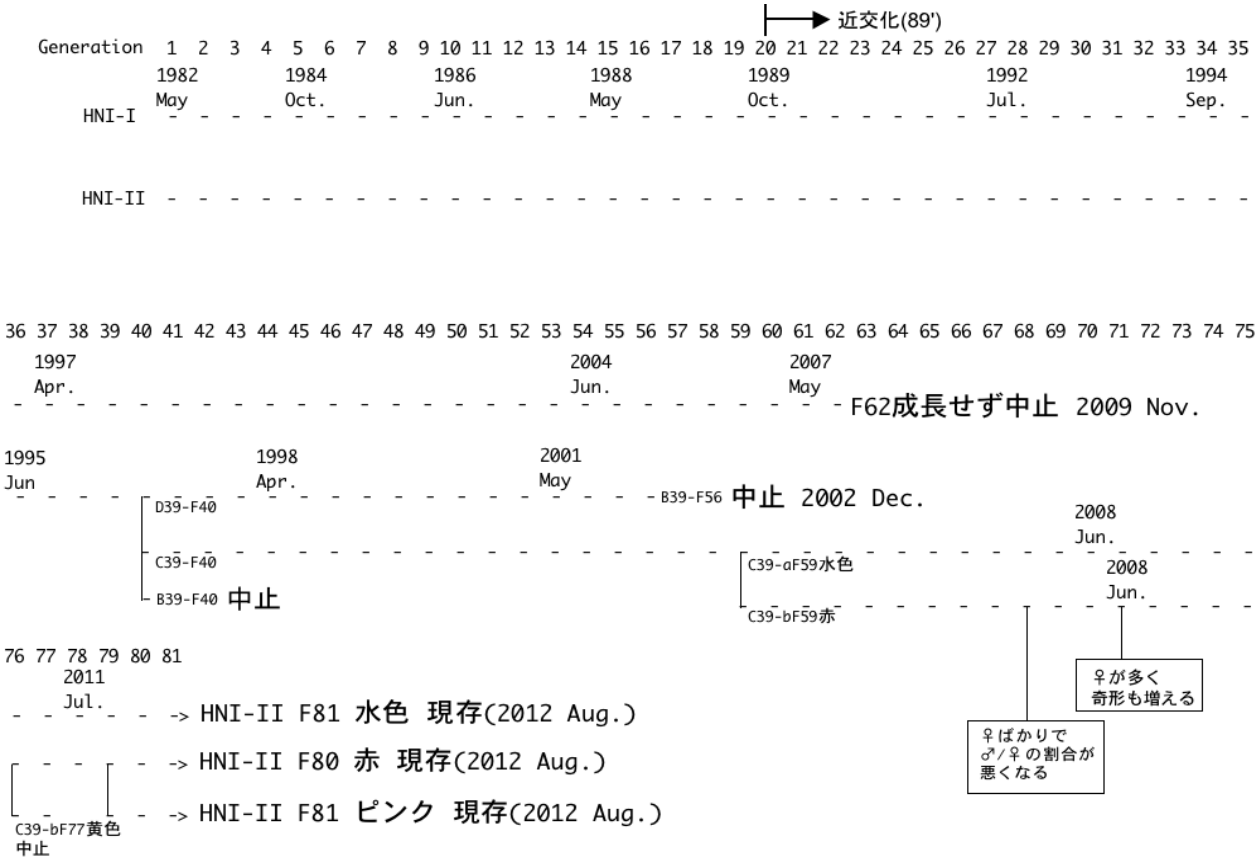


図1　近交系HNI-I, II系統の系統図

1-2.　HNI 系統の性格と利用例

HNI 系統の体色は野生種と同じ黒色で、身体は他の系統に比べると比較的長細く、常時水面近くにおり、あまり物の下へ隠れる行動はとらない[4]。また、他の系統と比較すると産卵数は少ない。HNI 系統は、これまでゲノム解析、expressed sequence tag (EST)解析、linkage group (LG)の決定、ミュータジェネシスでの原因遺伝子の同定等に利用されてきている[5] [6]。以下余談ではあるが、田中真紀子文部科学大臣が、1994 年に科学技術庁長官として放医研へ来所した際には、同じ新潟県出身ということで、巽生物研究部長により HNI 系統が紹介されている。

２．HNI 系統(北日本集団)と Hd-rR 系統(南日本集団)との部分配列での比較

メダカの北日本集団と南日本集団は、日本列島の北半分と南半分が別々に分離し始めた約 1800 万年前に分岐したといわれており、single nucleotide polymorphisms (SNPs)を比較すると、3.42%もの違いがある[7]。ヒトとチンパンジーは、約 600 万年前に分岐し、SNPs 変異は 1.23%であること、また、北−南日本集団は、ヒト−チンパンジーと比べて約 3 倍も昔に分岐していることを鑑みると、北-南日本集団は、別の生物種へと分化し、交雑種が産まれなくとも不思議では無い。しかしながら、北日本集団と南日本集団の間では、交雑第 3 世代（Ｆ３）まで作出可能なことが知られている[4]。このことが、他の生物種にはないアドバンテージとなり、遺伝子配列決定や突然変異誘発の原因遺伝子の探索には非常に有利に機能してきた。筆頭著者は、これまで H-drR 系統(南日本集団)を用いてグロビン遺伝子クラスターを調べてきたが、今回、北日本集団 HNI 系統の相同する部位を解読したので、比較した（図２）。これまでの知見同様、H-drR 系統と HNI 系統では、非翻訳(non-coding)領域に大きな違いがあり、これを利用することで制限酵素を用いて識別が可能であった（図２B, C）。このような違いをもっと詳細に調べ、近交系特異的な多型の知見を数多く蓄積させる事でモニタリングシステムを構築する事が可能となる。著者は、グロビン以外の別の染色体上に存在する遺伝子を比較し、簡便なモニタリングシ

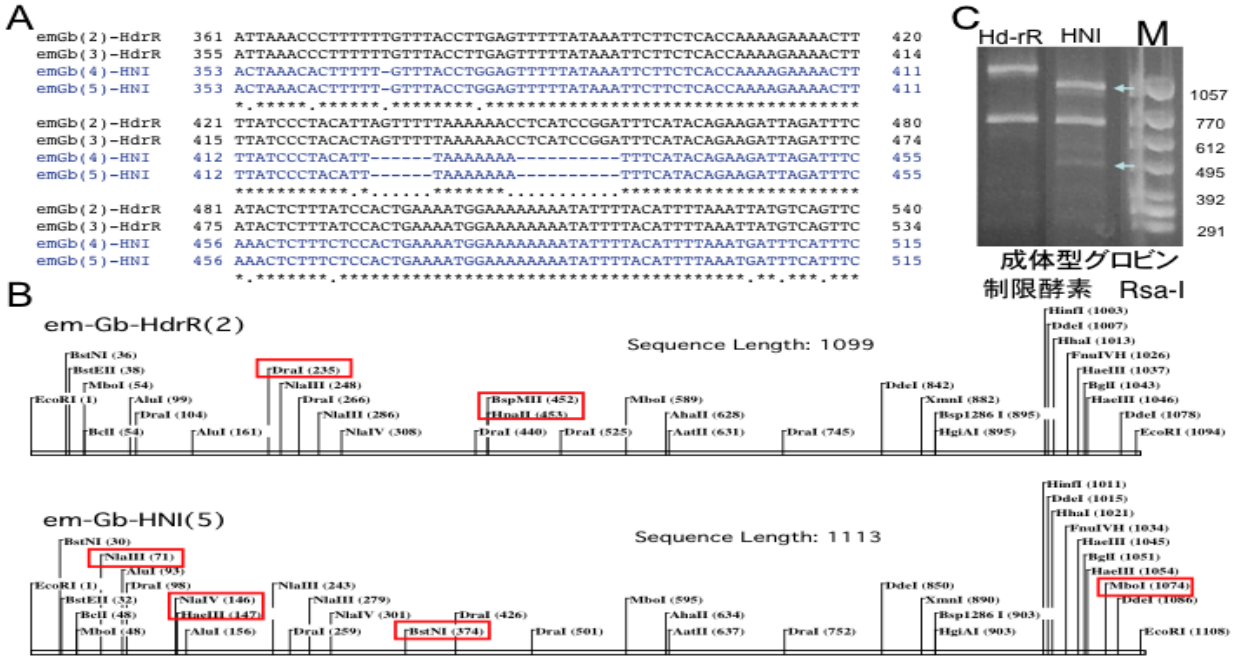


図2　H-drR系統とHNI系統のグロビン遺伝子部分配列の比較と多型検出
A)胚型グロビン遺伝子の非翻訳配列の一部。欠損部位を-で示す。B) 胚型グロビン遺伝子の非翻訳部位の制限酵素認識部位を示したもの。H-drR系統とHNI系統とで異なる部位を赤く囲んだ。C) PCR産物を制限酵素(Rsa-I)で切断し泳動したゲル写真。矢印は切断され検出されたバンドを示す。M: φ 174X*Hinc*-IIマーカー

ステムの構築することを現在目指している。

まとめと今後の課題

HNI 系統は、初めて近交化された北日本集団のメダカであり、南日本集団と遺伝的に大きく異なりながらも交雑が可能であるという利点から世界中の研究者に譲渡され、利用されている。

放医研では、これまでにメダカの近交系の交配を 40 年近く続けてきたが、今後これらを継続していく上で、いくつもの問題を抱えている。まず、継代維持での問題であるが、受精卵の凍結保存技術が確立されていないメダカでは、常に生きたまま掛け合わせ続け、近交系を維持させなければならない。近交系は、代を重ねるごとに遺伝子欠損などが生じて個体維持能力が低下し、また、一度欠失した遺伝子が回復することはない。次に、病気への危惧がある。近交系は病原菌に感染されやすく、尾腐れ病や白雲病などにより一度に大量死することがある。さらに、近交系に特異的な遺伝病もある。2010 年度の技術報告書にも記したが、HNI 系統では、約 70 世代目から、これまでにない骨折が多発している（図３）[8]。この原因は不明であり、遺伝的に何らかの変異が起きている可能性が考えられる。今後、これらの問題に対しても対策を講じていきたい。

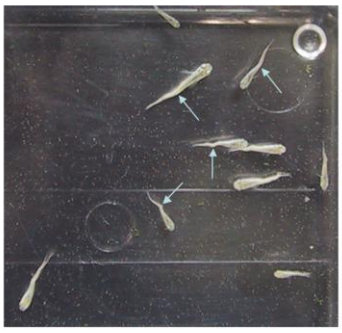


図3 近交系HNI特異的に見られる骨折（矢印）

参照文献

[1] 丸山耕一、前田圭子、長谷川純崇、石川裕二, 放医研で維持している近交系メダカ（１）放射線医学総合研究所技術報告書 (NIRS Technology) 6 (2012) 77 – 82.

[2] Hyodo-Taguchi Y., Inbred strains of medaka, *Oryzias latipes*. The Fish Biology Journal MEDAKA 8 (1996) 11 -14.

[3] 江上信雄、山上健次郎、嶋　昭紘（編集）メダカの生物学 東京大学出版会 (1990) 129-142.

[4] Kinoshita M., Murata K., Naruse. and Tanaka M. (Edit) : Medaka Biology; Management and experimental protocols. Wiley-Blackwell, (2009)

[5] Kasahara M., Naruse K., Sasaki S. et al., The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. Nature 447 (2007) 714-719.

[6] Kimura T., Jindo T., Narita T., et al., Large-scale isolation of ESTs from medaka embryos and its application to medaka development genetics. Mech. Dev. 121 (2004) 915-932.

[7] Setiamarga D., Miya M., Yamanoue Y., et al., Divergence time of the two regional medaka populations in Japan as a new time scale for comparative genomics of vertebrates. Biol. Lett. 5 (2009) 812-816.

[8] 丸山耕一、前田圭子、松本由美子、他, 放医研近交系メダカの維持、管理　放射線医学総合研究所技術報告書 (NIRS Technology) 5 (2010) 107 – 111.

放射線医学総合研究所
技術報告書

NIRS

NIRS Technology

www.nirs.go.jp

NIRS Technology, vol. VII (2012)11– 16.

近年のげっ歯類に対する導入使用申請と検疫

Procedure for the introduction and use of animals from external organizations and their quarantine

石田 有香*、白石 美代子、川原 隼、飯名 瑞希、小久保 年章

研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課

要旨

Some guidelines need to be followed while performing animal experiments at NIRS. Researchers using animals from an external organization must submit an application for the introduction and use of such animals. Under some circumstances, it is necessary to quarantine laboratory animals introduced at NIRS from an external organization. A recent inspection on quarantine animals could not confirm that an animal originally at NIRS was infected due to animals that we quarantined. Cooperation of researchers and external organizations is necessary for appropriate management of experimental animals at NIRS, and it's very important for maintaining a high standard for quarantine procedures.

Keywords: quarantine, introduction, external organization, laboratory animal

Corresponding Author:
石田 有香 (Yuka Ishida)
e-mail: ishida@nirs.go.jp

１．はじめに

放医研では、動物実験を用いた研究が毎年200 件前後遂行されている。多種多様な動物実験が適切に遂行されるためには、様々な申請とその承認が必要となる[1,2]。主な申請には、3R（reduce, reduction, refinement）が熟考され、動物福祉に配慮した適切な研究計画が練られているかを主に審査するための「動物実験計画書」（資料 1)、外部機関から実験動物を導入し使用するにあたり、その実験動物が放医研へ持ち込まれても問題のない衛生状態かを確認するための「動物種等導入使用申請書」（資料 2)、解剖やイメージング撮影等の動物実験を実施する実験室が適切な環境、設備を整えているかを審査するための「動物実験室承認申請書」（資料 3）等がある。

その中で、「動物種等導入使用申請」は、申請書の他に、実験動物の供給元である外部機関からの情報が必須であり、動物施設に関する質問票と微生物学モニタリング結果の提出を求めている。それらの書類を総合的に判断した上で、検疫の有無や搬入時の注意事項などを導入使用の許可条件として提示している。

本稿では、動物実験の支援の一環として遂行している検疫について、近年のげっ歯類に関する調査結果を報告する。

２．検疫方法

以下に一般的な検疫方法を述べる。

2－1．検疫対象動物

検疫が必要な動物であるかは、導入使用申請で提出された申請書に基づき、総合的な判断がなされる。

①供給元の所在地（国内、国外）
②放医研での飼育施設（SPF 動物（特に指定された微生物のいない動物（SPF: specific pathogen free））施設 、コンベンショナル動物（通常動物）施設、動物実験室のみの使用）
③導入元の衛生状態（飼育環境、実験動物の微生物学的検査結果）

等により、検疫が必要と判断された場合は、およそ一カ月強の検疫期間が設けられ、放医研において SPF 動物の検査項目となっている微生物[2]をすべて検査する。なお、海外からの導入動物は海外機関で汚染事象が発生している Ectromelia virus（伝染力が強く動物を致死させる恐れがある微生物）及び Lymphocytic choriomeningitis virus（人獣共通感染症の微生物）の検査を追加するが、国内施設で一定の条件を満たしている場合は、搬入時の *Pseudomonas aeruginosa* 検査のみとなることもある。その場合、検査結果が判明するまでに要する期間は 3 日間である。

2－2．検疫方法

最も使用頻度の高い実験動物研究棟の検疫室について述べる。動物は陰圧のカプセルユニットで飼育し（図 1)、作業はすべて安全キャビネット内で行う。飼育器材は搬入出時に滅菌並びに封じ込めをし、病原微生物の持ち込み及び拡散を防止している。検疫対象動物の受入期間が重複してしまった場合には、作業者、作業時間及び飼育器材等を区別し、互いの微生物混入を防止するよう工夫している。検疫期間の終了時には、直ちにカプセルユニットの滅菌や室内のクリーンアップを行い、次回の検疫に備えている。



図 1　カプセルユニットを用いた飼育

また、微生物感染を確認する検査動物は、免疫不全動物を除き、実験に使用しない導入動物が最も適しているが、貴重な動物を検査用に多く入手することは困難なため、通常は２分割ケージを用いて一方におとり動物を同居させる（マウスの場合)。なお、ラットあるいはその後の実験計画により個別飼育が不適である場合は、通常使用しているケージを使用し、同一カプセルユニットにおとり動物を配置する。おとり動物を使用する場合、より微生物感染を容易にするため、ケージ交換時に検疫対象動物の汚れた床敷きをおとり動物のケージに入れることも行っている。

３．検疫の実施結果

遺伝子改変動物の開発が進むに伴い動物作出の委託や共同研究も増加し、外部機関から動物が搬入される例も多くなったため、導入使用申請者や実験動物の供給元施設は多様化されている。導入使用申請は、一度の申請で複数年あるいは複数回にわたる搬入が申請可能なため、申請数及び検疫が許可条件となった数と実際の検疫実施回数は一致しないが、海外からの実験動物導入も研究者の実験計画に合わせて適宜選択されていることが分かった（表 1)。

また、検疫対象動物は主にマウスだが、平成 22 年度､23 年度にはラットの検疫をそれぞれ低線量影響実験棟、実験動物研究棟で実施している。検疫設備の整っているすべての施設で使用実績があり、検疫はいずれの実験動物施設でも問題なく実施可能であることが確認できた。

なお、低線量影響実験棟 2 階、3 階（SPF レベル）及び実験動物研究棟 3 階、4 階（コンベンショナルレベル）のマウス・ラット検疫室が整備されて以降、海外からの導入動物を含め、検疫で微生物感染が発見されたマウス・ラットは見られなかった。

表 1　げっ歯類における導入使用申請件数と検疫の実施状況

	H20	H21	H22	H23	H24
申請数※	24	15	20	23	10
（遺伝子組換え動物）	(18)	(10)	(14)	(13)	(7)
検疫が許可条件となった数※※	4	3	3	3	2
（遺伝子組換え動物）	(3)	(3)	(2)	(2)	(2)
（海外動物）	(3)	(2)	(2)	(3)	(2)
検疫実施回数※※	5	8	6	1	3
（遺伝子組換え動物）	(4)	(8)	(5)	(0)	(3)
（海外動物）	(4)	(7)	(5)	(1)	(3)
（依頼者数）	(4)	(5)	(5)	(1)	(3)
（供給元施設数）	(3)	(4)	(2)	(1)	(2)

（年度で集計、H24 年度は 8 月末まで）

※中期計画の移行に伴う変更や継続（使用期間の延長）の申請は除く。

※※*Pseudomonas aeruginosa* 検査のための隔離飼育及び導入凍結胚移植後の衛生検査は除く。

４．まとめ

これまで、げっ歯類の検疫は適切に機能しており、放医研の動物実験が検疫対象動物により汚染されたことはなかった。しかし、特に海外では日本国内では発生していないような病原性の高い微生物の感染が確認されることがあり、また、国内の実験動物施設でも日和見感染病原体をはじめ病原性微生物が散見されていることより、今後も検疫は基準を落とすことなく適宜実施されるべき管理方法の一つである。

また、書類からでは読み取れない施設の実態もあるため､特に放医研での飼育施設が SPF 施設であり、長期に渡り搬入を継続し、搬入回数や搬入匹数を多く計画しているような導入の場合は、検疫を搬入開始前の 1 回のみとするのではなく、定期的に行い衛生状態を常

に確認することを検討する必要がある。さらに、施設の管理状況（飼育方法）が変化していないとも限らないため、初回申請より時間が経過している場合には書類を再度依頼することも必要である。

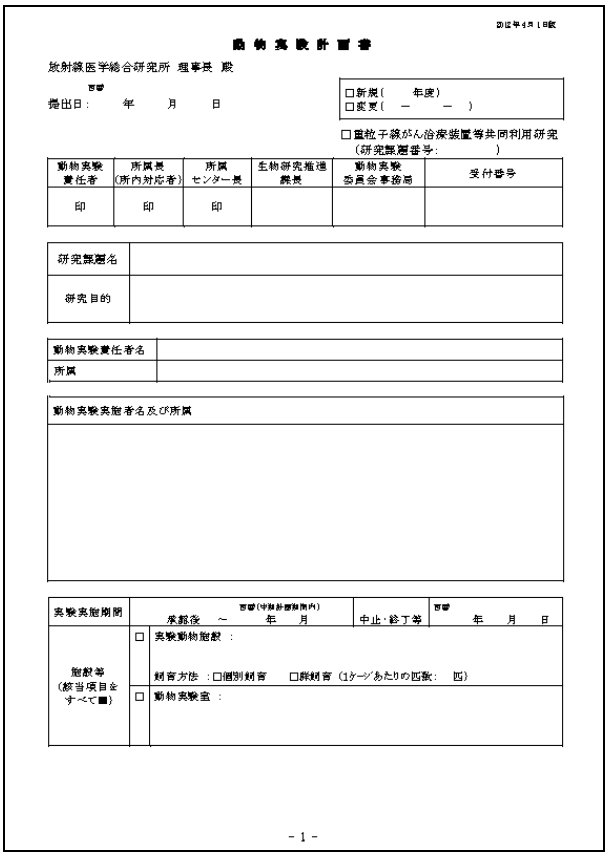
従って、放医研の動物実験が適切に管理されるためには、申請した研究者や外部機関の理解・協力が欠かせないものと考えられる。一方で、今後も積極的に施設見学に出向き、外部機関の施設・設備・管理状態について正しい把握をしておくことも重要である。

動物実験において、遺伝子改変動物の利用が増加している近年では、ますます多種多様な研究が実施され、関係機関も増加傾向にある。しかし、検疫には一定期間を要するため、実験計画へ影響する可能性への懸念もあるが、放医研では、今回述べた方法以外にも、検疫の仕方による実施期間の短縮や検疫中の交配等に対しても適切で柔軟な対応を行っている。検疫は研究を妨げるものではないため、検疫が導入使用許可条件となる場合であっても、外部機関の実験動物を使用することを積極的に選択してもらい、放医研の研究活動が一層活発となることを期待したい。

参照文献

[1] 動物実験等実施に関する規程 （最終改正平成23年6月7日規程第102号）
[2]実験動物の衛生管理等に関する基準（平成23年7月1日研究基盤センター長決定）

資料1　動物実験計画書の様式



動物実験計画書

放射線医学総合研究所 理事長 殿

提出日：　年　月　日

□新規（　年度）
□変更（　－　－　）

□重粒子線がん治療装置等共同利用研究
（研究課題番号：　）

動物実験責任者	所属長（所内対応者）	所属センター長	生物研究推進課長	動物実験委員会事務局	受付番号
印	印	印			

研究課題名	
研究目的	

動物実験責任者名	
所属	

動物実験実施者名及び所属

実験実施期間		承認後　～　年　月	中止・終了等	年　月　日
施設等（該当項目をすべて■）	□	実験動物飼養： 飼育方法：□個別飼育　□群飼育（1ケージあたりの匹数：　匹）		
	□	動物実験室：		

－1－

特殊実験区分（該当項目をすべて■）	□放射性同位元素使用実験 □放射線照射実験 □遺伝子組換え生物等実験*1： □P1A　□P2A（実験計画書承認番号：H　－　） □実験計画書申請中 □毛等発癌・重金属実験・特定有害物質投与実験*2 □感染実験 □麻薬類を用いた実験*1
	＊1 関連資料を添付すること　＊2 安全情報を添付すること
動物実験の種類（該当項目を■）	□試験・研究 □教育・訓練 □その他（具体的に記入：　）

動物実験の代替（該当項目をすべて■）	□動物実験の代替を検討したが、 □替わる手段はなかった。 □代替手段の感度・精度が不十分であった。 □その他（具体的に記入：　） 検討事項： □in silico による解析（コンピュータシミュレーション） □in vitro 実験（例えば培養細胞による実験など） □系統発生的に下位の生物種への置き換え □その他（具体的に記入：　）
使用動物数の削減（該当項目をすべて■）	□動物数削減のため以下の事項について配慮した。 配慮事項： □求める結果を得るために必要かつ不可欠な動物数 （例えば適正な結果を得るために統計処理が必要で、その最小数など） □同一実験の繰り返し数 □その他（具体的に記入：　）
動物に対する苦痛の軽減（該当項目をすべて■）	□動物にほとんど或いは全く不快感を与えないので、苦痛の軽減処置をしない。 □科学上の目的を損なわない苦痛軽減法はなく、処置を講じることができない。 （理由：　） □苦痛軽減のために以下の事項を実験方法の該当欄に記載した。 □麻酔薬・鎮痛薬等を使用、使用薬物名： □その他（具体的に記入：　） □適切な時期に安楽死措置などの人道的エンドポイントが必要なため、実験方法の該当欄に記載した。 □その他（具体的に記入：　）

－2－

実験動物の安楽死方法（該当項目をすべて■）	□麻酔薬等の使用 薬物名：　投与経路： 薬剤濃度：　投与容量： □炭酸ガス吸入 □頸椎脱臼 □麻酔下ないし鎮静下状態で実施、使用薬物名： □実験上必要不可欠で、無麻酔で行う。実施は熟練者が行う。 （理由：　） □断首 □麻酔下ないし鎮静下状態で実施、使用薬物名： □実験上必要不可欠で、無麻酔で行う。実施は熟練者が行う。 （理由：　） □その他 （具体的に記入：　）
	＜人道的エンドポイントを適用した安楽死＞ □上記の方法と同様に行う又は可能性がある □行う又は可能性があるが、上記の方法と異なる （具体的に記入：　） □行わない
動物死体の処理方法（該当項目をすべて■）	□凍結保存後焼却（所内の所定施設にて凍結保存、焼却は外部委託） □ホルマリン液等で固定後標本として保存 □RI廃棄物として処理 □外部業者に依頼 □その他（具体的に記入：　）
導入申請の確認（該当項目を■）	新規・在来動物種等導入使用申請　□あり　□なし □申請中　□申請予定 □承認済み（受付番号：　－A　） □動物の輸送は専門業者に依頼する（予定輸送業者名：　）
その他必要又は参考事項（該当項目を■）	麻薬の使用　□あり（以下に麻薬研究者氏名及び免許証番号を記入）　□なし （氏名：　免許証番号：　） 実験動物の外部機関への搬出　□あり　□なし □動物の輸送は専門業者に依頼する（予定輸送業者名：　） 総合実験計画書　□承認済み*（実験番号：　）　□申請中 ＊承認済み総合実験計画書の写しを添付すること。

実験方法つづき	苦痛のカテゴリー（処置毎）	動物の苦痛軽減・排除方法（人道的エンドポイント）

使用動物	動物種	系統	遺伝子組換え	性別	週(齢)齢	匹数	微生物学的品質 SPF	CV	その他	入手先（導入機関名）
			□				□	□	□（　）	
			□				□	□	□（　）	
			□				□	□	□（　）	
			□				□	□	□（　）	
			□				□	□	□（　）	
			□				□	□	□（　）	
	使用動物数の根拠：									

＜実験方法の概要＞

実験方法（動物への処置、使用動物数は**必ず具体的**かつ簡潔に記入する）		苦痛のカテゴリー（処置毎）	動物の苦痛軽減・排除方法（必要に応じて人道的エンドポイントを記入する）
該当項目を■	□外科処置　□非外科処置		
以下に例示した表を参考に、使用動物数等の内訳表を作成すること。 実験1 動物数（系統）　♂　♀ 対照群 処置群Ⅰ 処置群Ⅱ 実験1における使用匹数：　匹／回　×　回 ＊F1動物を作出して実験に使用する際は、交配する親系統とその数、必要なF1数、淘汰するF1数を本文中に明記すること。			

資料2　動物種等導入使用申請書の様式

平成２４年１０月１日版

所属プログラムリーダー等	所属センター長	動物実験委員会事務局受理	生物研究推進課長受理	受付番号
		受理日：　年　月　日 受理印	受理日：　年　月　日 受理印	

平成　年　月　日

放射線医学総合研究所理事長　殿

（申請者）所属
氏名　印

新規・在来　動物種等導入使用申請書

新規・在来 実験動物種（系統）を導入し使用したいので、動物実験等実施に関する規程第３１条第１項および第２項に基づき、下記のとおり申請します。

動物種	□マウス　□ラット　□ウサギ □霊長類　□メダカ □その他（　）	系統名	
		遺伝子組換え	□ P1A　□ P2A　□非該当
数・性別 ※凍結胚の場合下欄を記載		導入回数	□ １回 □ 分割（　匹／回）
年（週・月）齢 ※凍結胚の場合下欄を記載		導入元の微生物学的品質	□ SPF　□ CV　□ その他
凍結胚 ※凍結胚の場合に記載	胚数（　個）、凍結チューブあるいはストロー数（　本） 個体作出を生物研究推進課に依頼　□する　□しない ※依頼する場合は、導入元より提供される凍結胚の情報を提出すること。		
使用期間（飼育期間）	年　月 ～　年　月	所内飼育予定施設	
導入元	（導入機関（窓口）と導入動物の実際の飼育機関（施設）が異なる場合は併記すること） 機関（会社等）・施設名： 所在地：		
使用目的	動物実験計画書の課題名（承認済みであれば受付番号も記載） 具体的な使用目的（動物の特性を含む）		
その他（特記事項）	（遺伝子組換え生物等実験計画書の課題名・実験計画番号、具体的な動物搬入希望日等）		
本申請に必須の添付書類（申請者確認）	□ 動物施設に関する質問票 □ 微生物検査証明書（書式任意、原則として申請日から3ヵ月以内の検査結果とする。） ※霊長類の場合は上記に加え、次の書類も提出すること。 □ 出自を明らかにする書類（検疫／繁殖証明書）		

資料3　動物実験室設置承認申請書の様式

平成23年8月 22日版

動物実験室（設置）承認申請書

放射線医学総合研究所理事長 殿

申請者（動物実験室管理者）
所属：
氏名：　　印

動物実験等実施に関する規程第１７条に基づき、下記の動物実験室の設置について申請します。

申請日：　　年　　月　　日

受付日：　　年　　月　　日　　受付番号：

１．動物実験室の場所及び名称	場所：　　棟・施設　　階 名称（室名）：
２．動物実験室の概要	１）実験室の面積：（　　㎡） ２）実験で使用する実験動物種： ３）実験設備（特殊装置の有無等） ４）逸走防止策（出入り口の逃亡対策、窓や排水口の封鎖など） ５）臭気、騒音、廃棄物等による周辺への悪影響防止策
３．特記事項（化学的危険物質や病原体等を扱う場合等の設備構造の有無等）	
動物実験委員会事務局記入欄	調査日：　　年　　月　　日 動物実験室の設置要件：（実験動物の衛生管理等に関する基準第３条） □　実験動物が逸走しない構造及び強度を有し、実験動物が室内で逸走しても捕獲しやすい環境が維持されていること。 □　排泄物や血液等による汚染に対して清掃や消毒が容易な構造であること。 □　常に清潔な状態を保ち、動物に適した臭気、騒音、廃棄物等による周辺環境への悪影響を防止する措置がとられていること。 調査結果：□　申請された動物実験室は規程に適合する。 （条件等：□　改善後、使用開始すること。） □　申請された動物実験室は規程に適合しない。 意見等：

注）動物実験室内の平面図を添付すること。

放射線医学総合研究所
技術報告書

www.nirs.go.jp

NIRS Technology

NIRS Technology, vol. VII (2012) 17– 25.

ヒトがん及び正常細胞間におけるバイスタンダー経路に関する定量的解析

Quantitative analyses of the bystander-effects pathway in cancer cells and normal cells

小林 亜利紗[1]*、塩見 尚子[1]、前田 武[1]、児玉 久美子[1]
鬼頭 靖司[2]、Badri.N.PANDEY[3]、小西 輝昭[1]

1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 放射線発生装置技術開発課
2) 研究基盤センター　研究基盤技術部　生物研究推進課
3) Radiation Biology and Health Sciences Division, Bhabha Atomic Research Centre

要旨

Radiation-induced bystander-effects (BEs), which are observed in non-irradiated cells that neighbor the irradiated cells, are known to be significant in living organisms. Radiation-induced BEs are generally classified into two major pathways: the gap-junction intercellular communication (GJIC) pathway and the cell-to-cell non-contact media transfer (MT) pathway. Generally, these two pathways are not investigated independently, but rather are investigated together. This may lead to misunderstandings regarding the mechanism of BEs, particularly in two different cell lines, such as cancer cells and normal cells. In this study, we examined the BEs among three different cell types: the human lung carcinoma cell lines A549 and A549-H2B-GFP, and the normal human lung fibroblast cell line WI-38. We found that, compared to co-culturing with A549 cells, co-culturing with WI38 cells enhanced the repair velocity of A549-H2B-GFP cells targeted with micro-beam irradiation. In addition, the survival of A549-H2B-GFP cells, which were co-cultured with WI-38, was increased by BEs signaling of the MT pathway. However, contrary to these results, measurement of the survival fraction, including the GJIC, showed that A549-H2B-GFP cells that were densely co-cultured with WI-38 cells had a lower survival fraction compared to A549-H2B-GFP cells co-cultured with A549 cells. These results indicate that there may be a “rescue” effect in bystander signals emitted through the MT pathway from the non-irradiated cells.

Keywords: micro-beam, bystander-effects, media-transfer, GJIC, rescue-effects

Corresponding Author:
小林　亜利紗 (Alisa Kobayashi)
e-mail: a_koba@nirs.go.jp

１．はじめに

電離放射線による生物効果を評価するうえで、直接的に照射された細胞のみではなく、隣接した非照射細胞群が受ける影響を加味する必要があることが近年のバイスタンダー効果（Bystander-effects; BE）の研究により明らかにされている[1]。

バイスタンダー効果とは、放射線を照射された細胞が放出する因子の影響で、その近傍にある照射されていない細胞にまで放射線効果が及ぶ現象のことである[2] 。この誘導メカニズムの一つは照射細胞とバイスタンダー細胞同士が密着している場合におきると考えられる管状の膜貫通タンパク質（ギャップジャンクション, Gap-Junction Inter-cellular communication; GJIC）を経由したシグナル伝達の経路、もう一つは照射細胞から何らかの因子が細胞外に放出され、非照射細胞に伝播する細胞間非接触型培地介在性経路（Media-Transfer; MT）である[3]。GJIC 活性剤である 8-Br-cAMP を照射ガン細胞に添加すると、非添加の照射ガン細胞と比較して微小核形成の減少及び生存率の増加[4]、また MT 由来のバイスタンダー効果因子の 1 つと考えられている NO のスカベンジャーである carboxy-PTIO を照射ガン細胞に添加すると微小核及び放射線誘発細胞死の増加が見られた[4,5,6]。このような経路に応じて異なる細胞応答は、マイクロビーム照射実験においても報告されている[5]。

これは、MT 由来の BE と GJIC 由来の BE が相反する効果を示すこと示唆しており、そのため、BE の細胞応答メカニズムを解明するには、MT と GJIC 由来の BE を独立して評価しなければならない。また、非照射の正常細胞を照射がん細胞と共培養することにより、照射がん細胞の微小核形成率を減少させるという報告がある。一般的にバイスタンダー効果は、非照射細胞の細胞応答を研究されていることが多いが、照射された細胞側にも、非照射細胞からの細胞間情報伝達がおこなわれることにより、放射線に対するレスキュー効果（bystander related rescue effect, BRRE）があることが示唆されている[7]。特に、正常細胞とがん細胞のように、異なる細胞種間の BE のメカニズム研究において GJIC の機能が異なることから[8]、上記で述べたように独立した評価方法の確立が必須であると考えた。

本研究では、MT と GJIC を独立して評価するために、3 種類の手法を用いた。まず①1 つ目は、TC プレートとインサートディッシュの組み合わせで、照射細胞と非照射細胞間が非接触な状態で培養液のみが行き来できるような方法による MT 経路による BE の評価を行った。②二つ目は、細胞を疎らに播き、細胞間が非接触な状態でマイクロビーム照射法を応用し、GFP 蛍光を頼りにがん細胞のみに照射、誘発された DNA 二本鎖切断（dsb）を免疫蛍光染色法を用いて dsb の相対量を測定する方法である。③最後に、GFP を発現するがん細胞と正常細胞を高密度で共培養し、GJIC が存在する条件で、X 線を照射後、セルソータを用いて、GFP（+）であるがん細胞のみを回収して、コロニー形成法でその生存率を測定する方法である。このように、最新の技術・手法を取り入れ、応用することで、単純な培養細胞の系でも、GJIC と MT それぞれのバイスタンダー経路を区別して解析することが可能であると考え、その手法を検討したので紹介したい。

方法・材料

１． 細胞株および培養条件

本研究では、3 種類の細胞株を用いた。ヒト胎児肺線維芽胞である WI-38（ATCC: CCL-75）、ヒト肺がん由来の細胞である A549 （ATCC: CCL-185）、A549 細胞を親株として pBOS-H2B-GFP vector （559241, BD Pharmigen）を遺伝子導入し、ヒストンタンパク質 H2B に GFP を安定的に発現させた A549-H2B-GFP 細

胞株である。A549-H2B-GFP 細胞株の樹立については、以前に報告した[9]。これらの 3 種類の細胞株の培養は、D-MEM 培地（0591,ニッスイ）に、10% FBS（Lot: 8M0057,CCB）、L-グルタミン（25030-081, GIBCO）と抗生物質（ストレプトマイシン/ペニシリン;15070-063, GIBCO）を添加したものを使用して、37℃、5%CO_2 95%Air 下で培養した。

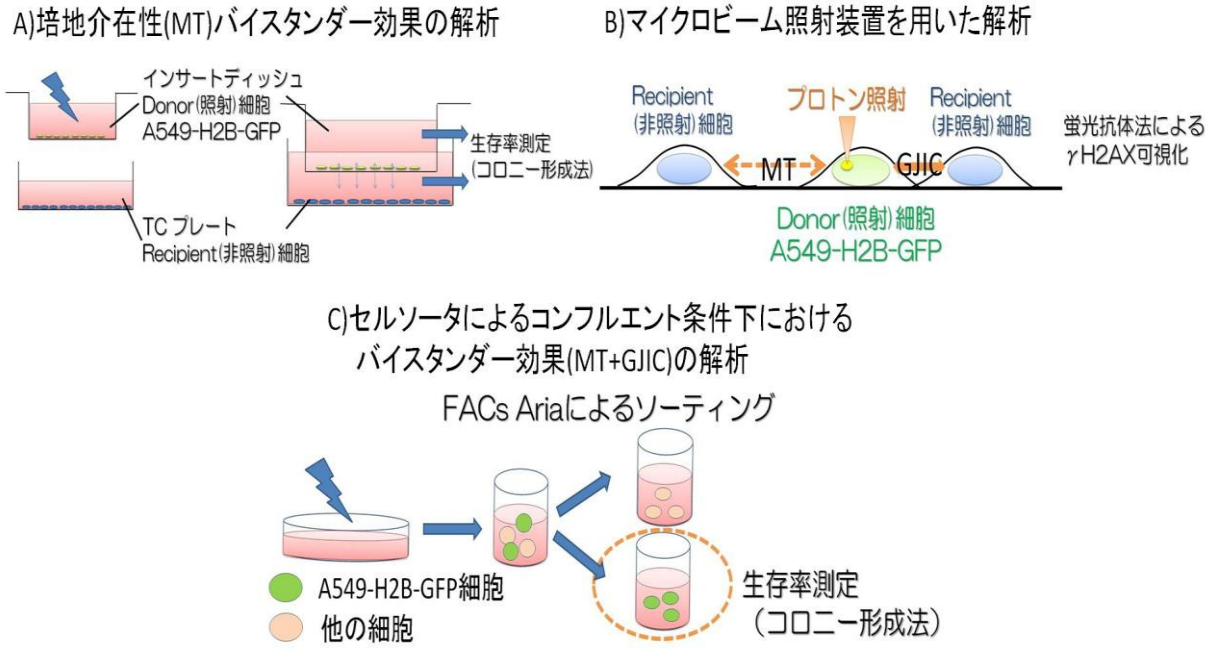


図 1. 本実験で行った 3 種類の実験方法の概念図を示した。A)は、インサートディッシュ（ID）及び TC プレート（TC）を用いた MT 経路による BE 評価方法、B)は、マイクロビーム照射法を用いた MT 経路による BE 評価方法、C)は、セルソーターによるコンフルエント条件下における MT+GJ の和としてのバイスタンダー効果解析方法である。

２．インサートディッシュ（ID）及び TC プレート（TC）を用いた MT 経路による BE 評価

図 1A に概念図を示した。照射の 24 時間前に、インサートディッシュ（ID）（353502, BD Falcon）と TC プレート（TC）（353046, BD Falcon）には、それぞれ 2.0×10^4 個／ウエルの細胞密度で細胞を播き、ID を照射細胞、TC を非照射細胞とした。そのため、ID に播種した細胞はバイスタンダー因子を伝搬するという意味からドナー細胞と呼び、TC に播種した細胞はバイスタンダー因子を受け取るという意味で、レシピエント細胞と呼ぶ。照射後、ID を TC に移し、4 時間通常培養条件下で、共培養した。照射には、硬 X 線（E_{eff} = 84keV: 200 kVp、TITAN-320、島津）を用いた。線量は 2Gy、4Gy の 2 点とし、線量率は、0.9Gy／min とした。

照射後、トリプシン処理を行い、細胞濃度を計数し、見積もりの生存率より A549 細胞及び A549-H2B-GFP 細胞は、10cm シャーレあたり 300 個のコロニーが現れるように、合計 3 枚のシャーレに播いた。WI-38 細胞は、合計 6 枚の 10 cm シャーレ（353003, BD Falcon）に、それぞれ 1000 個／シャーレの細胞濃度で播き、コロニー形成を行った。コロニー形成のための培養期間は A549 細胞と A549-GFP は、11～12 日間とし、WI-38 細胞は、14 日間とした。

３. マイクロビーム照射法を用いた MT 経路による BE 評価

図 1B に概念図を示した。放医研マイクロビーム細胞照射装置 SPICE で照射可能な 3.4MeV プロトンマイクロビームを照射した[10, 11]。試料には、SPICE 専用の φ33 mm の細胞皿に A549-H2B-GFP 細胞と A549 細胞をそれぞれ 1.0×10^4 個細胞を照射の 2 日前に播き共培養した。また A549-H2B-GFP と WI-38 細胞を共培養した試料については、5.0×10^3、1.0×10^4 個で播いたものを使用した。両者ともに、ほとんどの細胞が非接触な低密度な条件とし、GJIC が無いようにした。

マイクロビーム照射、A549-H2B-GFP 細胞の細胞核に確認できる GFP 蛍光を頼りに照準をわせ、狙い撃ち照射を行った。照射粒子数は細胞核あたり 500 個とした。

照射後、通常の培養条件下において 4 時間培養したのちに、細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液にて 15 分以上固定した。その後、膜透過処理（0.5%Triton-X）を室温で 30 分、5%ヤギ血清（143-06561,WAKO）+0.3%Triton-X in PBS 溶液にてブロッキング処理を 1 時間行った後、1%BSA（017-22231,WAKO）+0.3%Triton-X in PBS 抗体溶液で 1/500 希釈した phospho-Histone H2A.X 抗体（#9718,CST ジャパン）を用いて抗体反応を 4℃下で一晩行った。その後 Alexa Fluor®555（#4413,CST ジャパン）にて 1 時間抗体反応させた後、SPICE オンライン顕微鏡システムを用いて細胞蛍光画像を取得した。尚、全ての手順間に PBS を用いて 3 回の洗いを行った。得られた A549-H2B-GFP 細胞核画像から DNA 二本鎖切断のマーカーであるヒストンタンパク質 H2AX のリン酸化（γ-H2AX）[12]の量を蛍光量として計測した。

４. セルソーターによるコンフルエント条件下における MT+GJ の和としてのバイスタンダー効果解析

A549-H2B-GFP と WI-38 または A549 をほぼコンフルエントな状態でかつ等量になるように、照射の 24 時間前に 10 cm シャーレ（合計 3.0×10^6 個）に播いた。照射条件は、「方法・材料　２.」と同様である。照射後、通常の培養条件にて 4 時間培養したのち、トリプシン処理後高速セルソーター（FACsAria, BD）を用いて[13]、A549-H2B-GFP 細胞のみを回収した。回収した細胞数は、コントロール及び各線量それぞれについて、合計 2500 個をあらかじめ 10 ml の培養液を入れておいた 14 ml チューブ（352057, BD Falcon）に回収した。これを合計 5 枚の 10 cm シャーレに分け、コロニー形成法による生存率の測定を行った。 コロニー形成期間は、「方法・材料　２.」と同様である。

結果・考察

インサートディッシュ（ID）及び TC プレート（TC）を用いた MT 経路による BE 評価でえられた結果は、コントロール（ID と TC ともに非照射）によって得られた生存率に対して規格化した。その結果、ID の A549-GFP をドナーとし、TC のレシピエント細胞が A549 細胞の場合、及び WI-38 細胞の場合もコントロールと比較して P=0.39、P=0.21 であり、統計的な有意差は認められなかった。このことから、MT 経路による BE は、細胞致死誘発はほとんどしないのではないかと考えられた。しかし、図 1A)の方法では、ID の照射された細胞である A549-H2B-GFP 細胞に X 線を 2Gy、4Gy 照射して得られた生存率がともに、レシピエント細胞として WI-38 細胞を共培養した試料の方が A549 細胞を共培養した試料に比べて有意に高い生存率を示した。

また、マイクロビーム照射によって誘発された dsb を γ-H2AX 蛍光抗体を用いて可視化した（図 3)。照射後、通常の培養条件に戻して 4 時間培養し、その後細胞を固定し、残存する γ-H2AX 量を測定した結果を表 2 に示した。WI-38 細胞を共培養した方が、dsb 残存量が少

ないという結果が得られた。このことから、WI-38 存在下では、BE シグナルが MT 経路を経由し、照射された細胞に伝達、DNA 損傷修復を促進したことで生存率の上昇がみられたと考えた。しかし、照射細胞数が 20 個程度であり統計的有意差を議論するに至っていないことから、マイクロビーム細胞照射実験によるデータの蓄積が必要である。また、上記に示した γ-H2AX の結果は、GJIC が殆ど無いように細胞密度が低い条件で MT 経路の BE シグナルの寄与を測定した結果であり、同様に低密度に細胞培養した条件下で、MT 経路の BE シグナルの主因であると考えられている窒素酸化物ラジカルの捕獲（消去）剤の carboxy-PTIO[4, 6] を添加した条件の実験を行う必要がある。またコンフルエントの細胞にて、A549-H2B-GFP へのマイクロビーム照射実験及び GJIC 活性剤である 8-Br-cAMP や阻害剤である lindane を用い、GJIC 寄与による照射細胞へのレスキュー効果の有無について検証する必要がある。

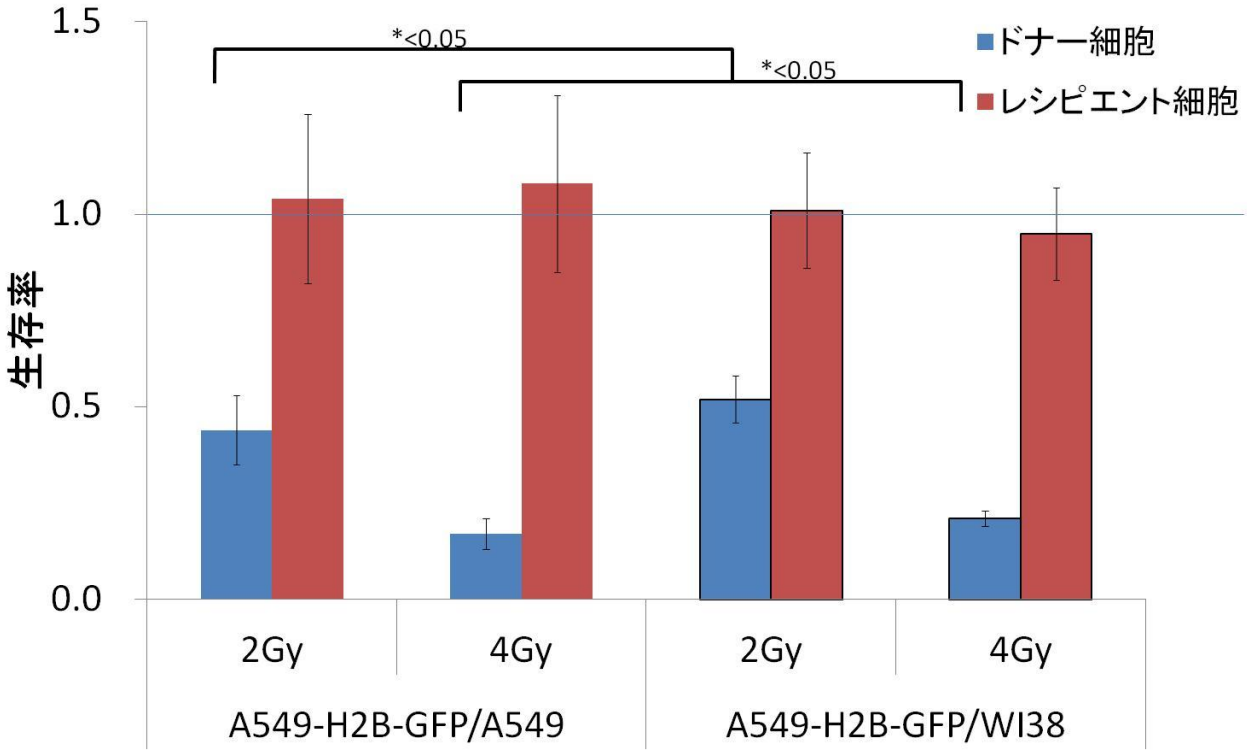


図 2. インサートディッシュ（ID）のドナーA549-H2B-GFP 及び TC プレート（TC）の A549 細胞または WI38 細胞の生存率を示した。（p.8 表 1）

次に A549-H2B-GFP 細胞と A549 細胞または WI-38 細胞を高密度に同一の細胞皿に共培養し、両方の細胞種を同時に X 線照射した。その後、通常の培養条件化において 4 時間培養し、その後 A549-H2B-GFP 細胞のみをセルソータで回収した。この実験では、二種類の細胞の両方が X 線によって照射されたことになり、照射された細胞同士のバイスタンダー効果を解析した。つまり、照射細胞間における MT 経路+GJ 経路におけるバイスタンダー効果の和としての解析した結果を表 3 にまとめた。A549-GFP の生存率は、WI-38 との共培養によって低下が見られることを 2Gy、4Gy の両方の線量で確認した（図 2）。これは、ID・TC プレート用いた MT 経路の実験で得られた照射細胞の生存率結果と逆であった。また、マイクロビーム細胞照射実験による dsb 残存量に関する結果とも逆であった。

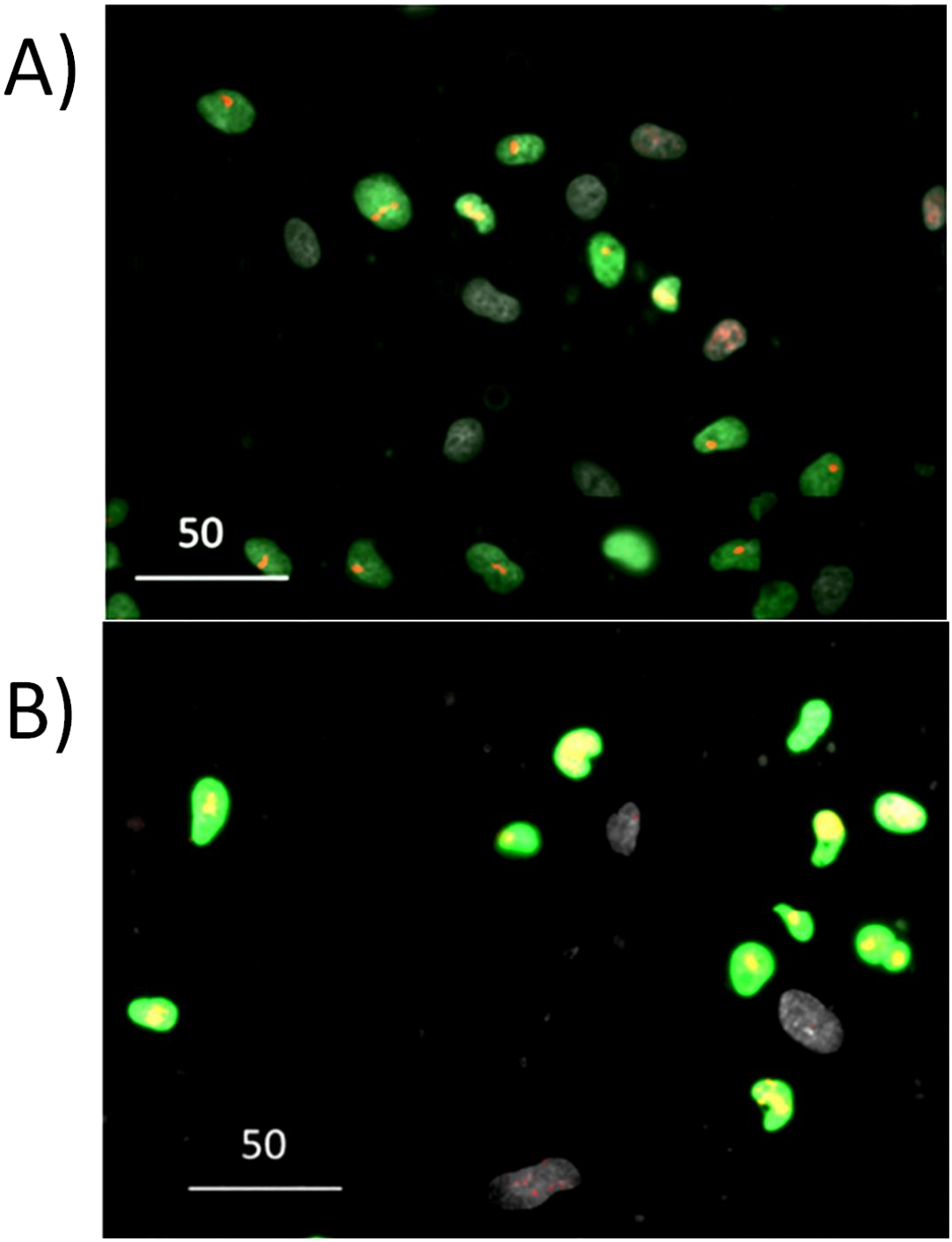


図3.A549-H2B-GFP細胞のみをマイクロビーム照射し、その4時間後にγ-H2AXに対して免疫蛍光染色した。A)は、A549-H2B-GFP細胞（緑）とA549細胞（白）、B)は、A549-H2B-GFP細胞（緑）とWI-38細胞（白）で示した。DNA二本鎖切断部位でγ-H2AX部位を（赤）で示した。スケールバー：50μm

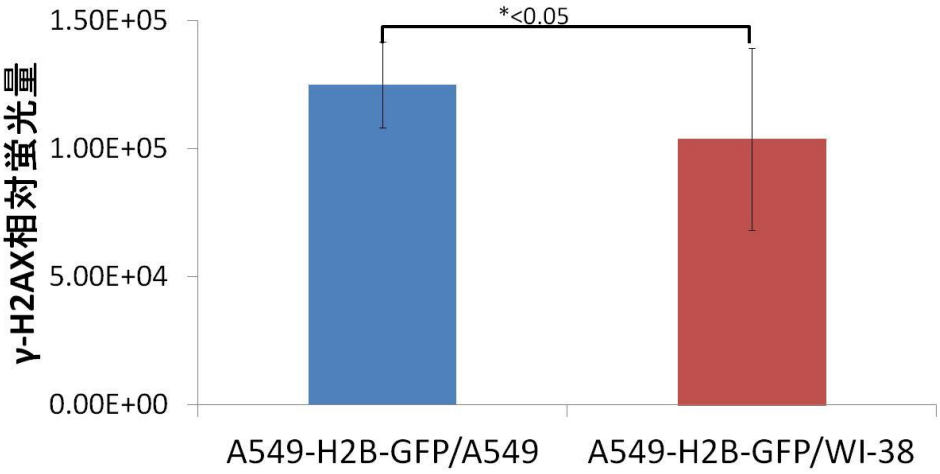


図 4.マイクロビーム装置 SPICE を用いて、共培養を行ったドナー細胞 A549-H2B-GFP およびレシピエント細胞 A549 または WI-38 のうちドナー細胞のみを狙い撃ち照射し、ドナー細胞の γ-H2AX 蛍光量を示した。（p.8 表 2）

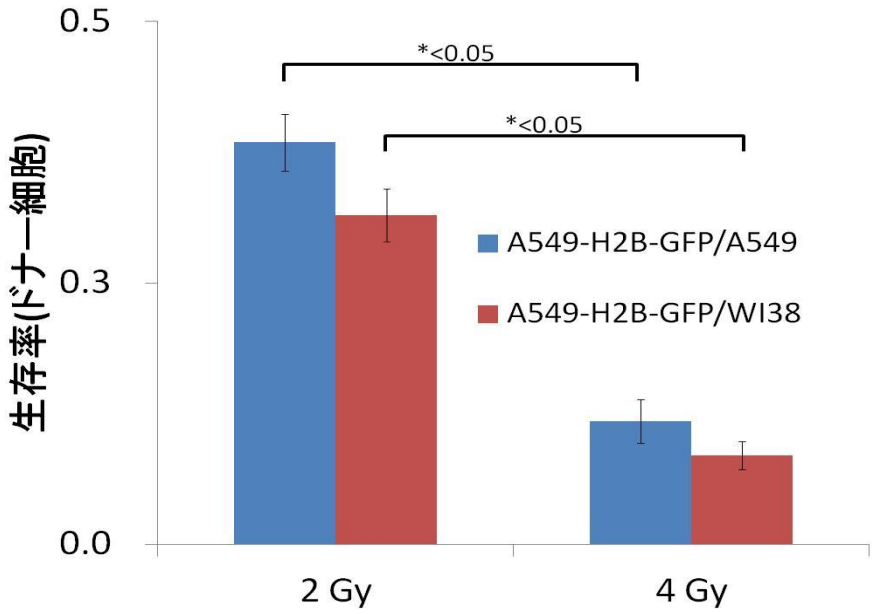


図5.フローサイトメータを用い分取したドナー細胞（A549-H2B-GFP）の生存率を示した。（p.8 表3）

通常、バイスタンダー効果の測定では、MTとGJICの2経路によるバイスタンダー効果が相殺されることもあり、見かけ上その効果を低く表れることがある。また、照射細胞への影響も明らかにされにくい。このことから、これらの2経路を独立して評価することで、新しい知見が得られると考えた。今後マイクロビーム照射実験サンプルを増やし、更に再現性のあるデータの取得及びギャップジャンクション経路側の評価手法を検討したい。

照射されたがん細胞と正常細胞間におけるバイスタンダー効果の報告はいまだ少ない。またこれらの異種細胞間におけるバイスタンダー効果の研究は、局所線量付与での放射線がん治療におけるがん細胞周囲の正常細胞への影響を知るうえでも重要と考えられることより[14]、詳細なメカニズムに関する研究が必須であると考えている。

表 1. インサートディッシュ（ID）及び TC プレート（TC）を用いた BE 評価で得られた各細胞種の生存率

照射線量（Gy） ドナー細胞	ドナー細胞種	ドナー生存率	レシピエント細胞種	レシピエント生存率
2 Gy	A549-H2B-GFP	0.44±0.09	A549	1.04±0.22
4 Gy		0.17±0.04		1.08±0.23
2 Gy		0.52±0.06	WI-38	1.01±0.15
4 Gy		0.21±0.02		0.95±0.12

表 2.マイクロビーム照射装置 SPICE を用い、ドナー細胞のみ狙い撃ち照射した際のドナー細胞の蛍光量

ドナー細胞種 （レシピエント細胞種）	γ -H2AX相対蛍光量	数
A549-H2B-GFP(A549)	124856±16792	13
A549-H2B-GFP(WI-38)	103787±35461	20

表3. フローサイトメータを用いて分取したドナー細胞の生存率

照射線量（Gy） ドナー細胞	ドナー細胞種	ドナー生存率	レシピエント細胞種
2 Gy	A549-H2B-GFP	0.38±0.03	A549
4 Gy		0.12±0.02	
2 Gy		0.31±0.03	WI-38
4 Gy		0.08±0.01	

謝辞

マイクロビーム細胞照射装置SPICEを用いた照射実験において放射線発生装置技術開発課の及川将一主任技術員、㈱ネオス・テックの磯浩之さん、樋口有一さん、松田拓也さんにご協力賜りました。放医研共同実験機器FACs Ariaを用いた実験において東京ニュークリア・サービス㈱の高野裕之さんにご支援頂きました。以上の方々に感謝申し上げます。

本実験はマイクロビーム照射装置SPICEを用いた結果は静電加速器施設（共用施設）利用課題である「マイクロビーム細胞照射装置SPICEの高度化に関する研究開発」（課題番号：S12-R&D01）の一部である。

引用文献

[1] Leonard, B. E., A review: Development of a microdose model for analysis of adaptive response and bystander dose response behavior., *Dose Response*. 6(2008) 113-83.

[2] Nagasawa, H., Little, J. B., Induction of Sister Chromatid Exchanges by Extremely Low Doses of α-Particles1., *Cancer Res.* 52 (1992) 6394-6396.

[3] Hamada, N., Matsumoto, H., Hara, T., et al., Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects., *J. Radiat. Res.*, 48(2)2007 :87-95.

[4] Shao, C., Furusawa, Y., Matsumoto, Y., et al., Effect of gap junctional intercellular communication on radiation responses in neoplastic human cells., *Radiat. Res.*167(3) 2007 : 283-8.

[5] Harada, K., Nonaka, T., Hamada, N., Heavy-ion-induced bystander killing of human lung cancer cells: Role of gap junctional intercellular communication., *J. Radiat. Res.*,48 (2007) 87-95.

[6] Matsumoto, H., Ohnishi, T., Contribution of radiation-induced, nitric oxide-mediated bystander effect to radiation-induced adaptive response., *Biol. Sci. Space.*, 3. (2004) 108-9.

[7] Chen, S., Zhao, Y., Han, W., et al., Rescue effects in radiobiology: unirradiated bystander cells assist irradiated cells through intercellular signal feedback., *Mutat. Res.Fund.Mol.M.*706(1-2) 2011:59-64.

[8] Hao, J, L., K, Suzuki., Lu, Y., Inhibition of Gap Junction–Mediated Intercellular Communication by TNF-in Cultured Human Corneal Fibroblasts., *Invest. Ophth. Vis. Sci*., 46(2005) 1195-2000.

[9] 酢屋徳啓、磯野真由、塩見尚子、他、タンデム加速器施設の訪問, 放射線医学総合研究所技術報告(NIRSTechnology)6(2012)30-38.

[10] Konishi, T., Ishikawa, T., Iso, H., et al., Biological studies using mammalian cell lines and the current status of the microbeam irradiation system, SPICE., *Nucl. Instrum. & Meth. B.* 267 (2009) 2171-2175.

[11] 小西輝昭、及川将一、磯浩之、他、放医研マイクロビーム細胞照射装置SPICEの開発と現状―プロトンビームで細胞を狙い撃ち―, 放射線医学総合研究所 技術報告書 (NIRS Technology) 5 (2010) 83-93.

[12] Sokolov, M, V., Dickey, J. S., Bonner,W.M., γ-H2AX in Bystander Cells Not Just a Radiation-Triggered Event, a Cellular Response to Stress Mediated by Intercellular Communication., *Cell Cycle*. 6:18 (2007) 2210-2212.

[13] 前田武、小西輝昭、塩見尚子、他、FACs Ariaを用いた多重蛍光染色試料測定時の蛍光補正について, 放射線医学総合研究所 技術報告書(NIRS Technology)6(2012)30-38.

[14] Prise, K. M., Sullivan, J. M., Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*. 9(5): (2009) 351–360.

放射線医学総合研究所
技術報告書

NIRS Technology

www.nirs.go.jp

NIRS Technology, vol. VII (2012) 26 – 34.

放医研サイクロトロン用バイナリフィルターの水等価厚測定

Water-Equivalent Thicknesses of the Binary Filters Installed in the NIRS-Cyclotron

北村 尚

研究基盤センター 研究基盤技術部
放射線計測技術開発課

要旨

The binary filter system to change beam properties was installed on the C-8 beam line in the general purpose exposure room of the NIRS-Cyclotron facility in order to alter beam properties. The plates in the binary filter system are made of poly (methyl methacrylate) (PMMA), which acts as a water-equivalent material. To evaluate the water-equivalent thicknesses of the PMMA plates, Bragg curves of an 80 MeV proton beam in a water phantom were measured with each PMMA plate or without any plates. The water-equivalent thicknesses of the filters were derived as displacements of Bragg peak with an accuracy of 10μm. The mean ratio between real and water-equivalent thicknesses of the plates was calculated to be about 1.16.

Keywords: *陽子線、放医研サイクロトロン、バイナリフィルター、PMMA、水等価、水ファントム、ブラッグ曲線、ブラッグピーク、飛程、補間関数、数値フィッティング*

Corresponding Author:
北村 尚 (Hisashi Kitamura)
e-mail: kitamura@nirs.go.jp

１．はじめに

放射線発生装置を用いる実験で生体内における細胞などの放射線影響の評価実験や検出器の校正のための実験においては、生体内での異なった部分での照射条件を再現するためにファントムと呼ばれる生体を模擬した物質を放射線源と照射対象物の間に挿入する。一般的に、放射線治療の分野では病巣の照射線量は水における吸収線量が用いられており、ファントムの基準物質も水を用いることが推奨されている。実際には、取り扱いの容易さや品質保証 (Quality Assurance) の点から、水等価物質としてプラスチック板が使用されることも多い[1], [2]。

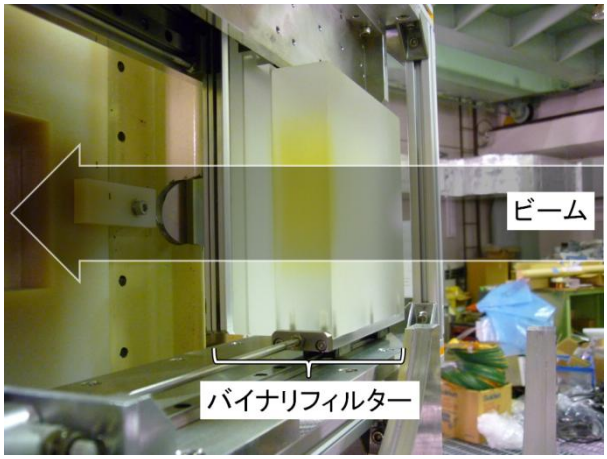


図 1 C-8 コースに設置されたバイナリフィルター。写真中央の 7 枚のプラスチック板がバイナリフィルターで、それぞれの板は外部から空気弁を操作することで、圧縮空気によって移動する。写真の状態は全板がビーム上から抜けている状態である。ビームは右方向から入射し、左のほうに抜けていく。最も厚い 32mm 厚の板が最上流にあり、板が薄くなるに連れて下流側になるように並んでいる。

放医研サイクロトロンの C-8 コースでは、主に 30 から 80 MeV の陽子線ビームを用いた線量計の校正や細胞照射用を行なうための照射場を構築している[3]。ここではファントムとしてプラスチック板を組み合わせたバイナリフィルター(Binary Filter, BF)を使用している。これは、厚さが 2 倍ずつ異なった厚さの板(フィルター)を組み合わせることで､｢2 の枚数乗」通りの厚さを作成することが可能としたものである。C-8 コースに設置したバイナリフィルターの場合、材質が PMMA(Poly Methyl Methacrylate) 製で、0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 mm の厚さの 7 枚の板があり、これらの組み合わせによって 0.5 mm から 63.5 mm まで、0.5 mm 間隔での厚さの調節が可能である（図 1)。以下､これら 7 枚を､薄いものから順に､BF1, BF2, …, BF7 と記述する。

PMMA は、水と比較的近い特性を持っているものの、元素構成や質量密度などが異なっているので、ファントムとして使用する際には水をどの程度シミュレートしているかを考察しておくことが重要である。今回の用途においては、一次ビームが高エネルギーの陽子線（または α 線）であり、ガンマ線や電子線とは異なり照射対象物の吸収線量に寄与するのは、ほとんどが電磁相互作用による一次ビーム粒子の電離損失なので、PMMA の厚さをビームが通過した後の平均エネルギーと水中を通過した後の平均エネルギーが等しくなる時に、その水の深さを PMMA の水等価厚とすることで評価を行なった。

表 1 PSTAR による陽子線ビームの電離損失と飛程。

	水		PMMA		
energy	-dE/dx	飛程	-dE/dx	飛程	dE/dx
MeV	MeV/g/cm^2	g/cm^2	MeV/g/cm^2	g/cm^2	比
1	260.8	0.0024	253.2	0.0024	1.03
3	117.2	0.0149	114.3	0.0153	1.03
10	45.67	0.1228	44.52	0.1258	1.03
30	18.76	0.8839	18.27	0.9072	1.03
80	8.625	5.176	8.397	5.317	1.03
100	7.289	7.707	7.095	7.917	1.03

陽子線が PMMA および水中を通過する際の電離損失$-dE/dx$を、アメリカ国立標準技術研究所(NIST)で開発された PSTAR プログラム[4]で計算すると(表 1)、1 - 100 MeV のエネルギー領域では、それらの比は

$$\left(-\frac{dE}{dx}\right)_{water} \Big/ \left(-\frac{dE}{dx}\right)_{PMMA} \cong 1.03 \quad (1)$$

となる。ここでxは物質量であり、式(1)は同じ物質量を通過した場合、水は PMMA に比べて 1.03 倍電離損失が大きくなるということを示している。物質量には PMMA の厚さl_{PMMA}と密度$\rho_{PMMA} = 1.19$ g/cm^{3}を用いて

$$dx_{PMMA} = \rho_{PMMA} \cdot dl_{PMMA} \quad (2)$$

という関係がある。本実験で求めたい水等価厚l_{water}は、(1)および(2)式から理想的に、

$$l_{water} \cong 1.19\, l_{PMMA} \,/\, 1.03 = 1.16\, l_{PMMA} \quad (3)$$

と計算することができ、PMMA 厚から水等価厚への変換係数は 1.16 となる。

しかしながら、実際には、PMMA の様なプラスチックは、製品やロットにより密度や成分もまちまちであり、工作精度によるずれもあることから、水等価厚を実測しておく必要がある。本研究では、以下に記述するように、水ファントム中でのブラッグ曲線を測定し、その変移から水等価厚を求めた。

1-1. ブラッグ曲線の測定

物質内での荷電粒子のエネルギー損失は、運動エネルギーが小さくなるにつれて大きくなる。そのため、荷電粒子が物質中で停止する際に、大きなエネルギーが物質中に付与されることになる。エネルギーと運動方向が揃っている粒子線ビームが物質に入射されると、荷電粒子が停止するあたりでエネルギー付与が大きくなるので、ビームの入射深さとその場所での線量をプロットすると、局所的に線量が増大して極大となり、そのピーク以降は急激に減少し、0（ゼロ）となる形状の曲線になる。この曲線は発見者の名前をとって「ブラッグ曲線」と、また、極大になる部分は「ブラッグピーク」と呼ばれている。ブラッグピークとなる深さはビーム中の粒子が最も多く停止する深さであり、ビームの平均エネルギーを求める際のパラメータとなっている。

1－2. 水等価厚の測定

ある陽子線ビームの水ファントム内のブラッグ曲線を水の深さxで表される関数として$f(x)$と記述したとして、この PMMA 板を水ファントムの上流に入れたとすると、ブラッグ曲線は、PMMA 板の幾何学的な位置や形状、物理的性質の違いなどを補正する係数Aを用いて$A\ f(x + x_{PMMA})$という形で近似が可能で、この場合はx_{PMMA} が PMMA 板の水等価厚ということになる。係数Aは実際には定数ではないので定数として近似することが困難な場合があるが、実際上

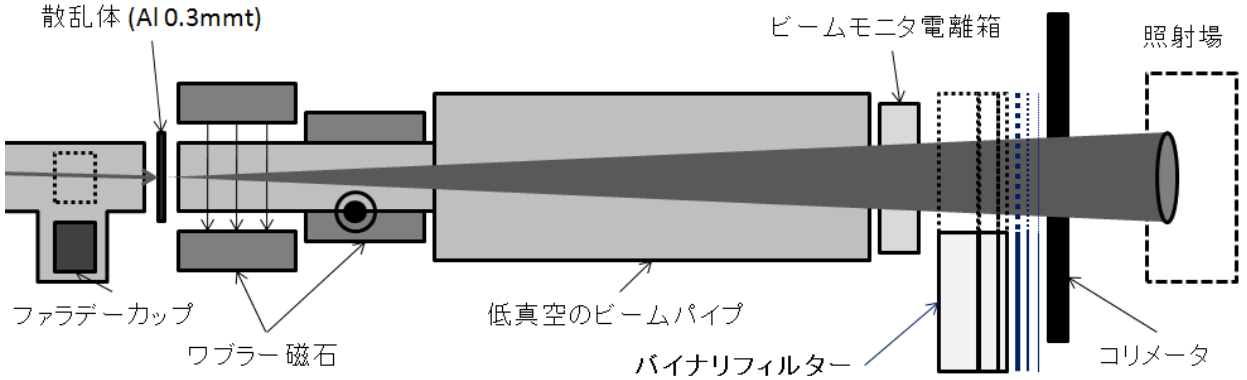


図 2 汎用照射室の C-8 コースの概略図。ビームは図中左側から入射し、散乱体・ワブラー磁石で平坦になるように広げられて、照射場に輸送される。ファラデーカップはビーム調整時にビームライン上に入っているが、照射実験時には抜かれている。一方、ビームモニタ電離箱は常に入っており、これを校正することで照射線量を得ている。

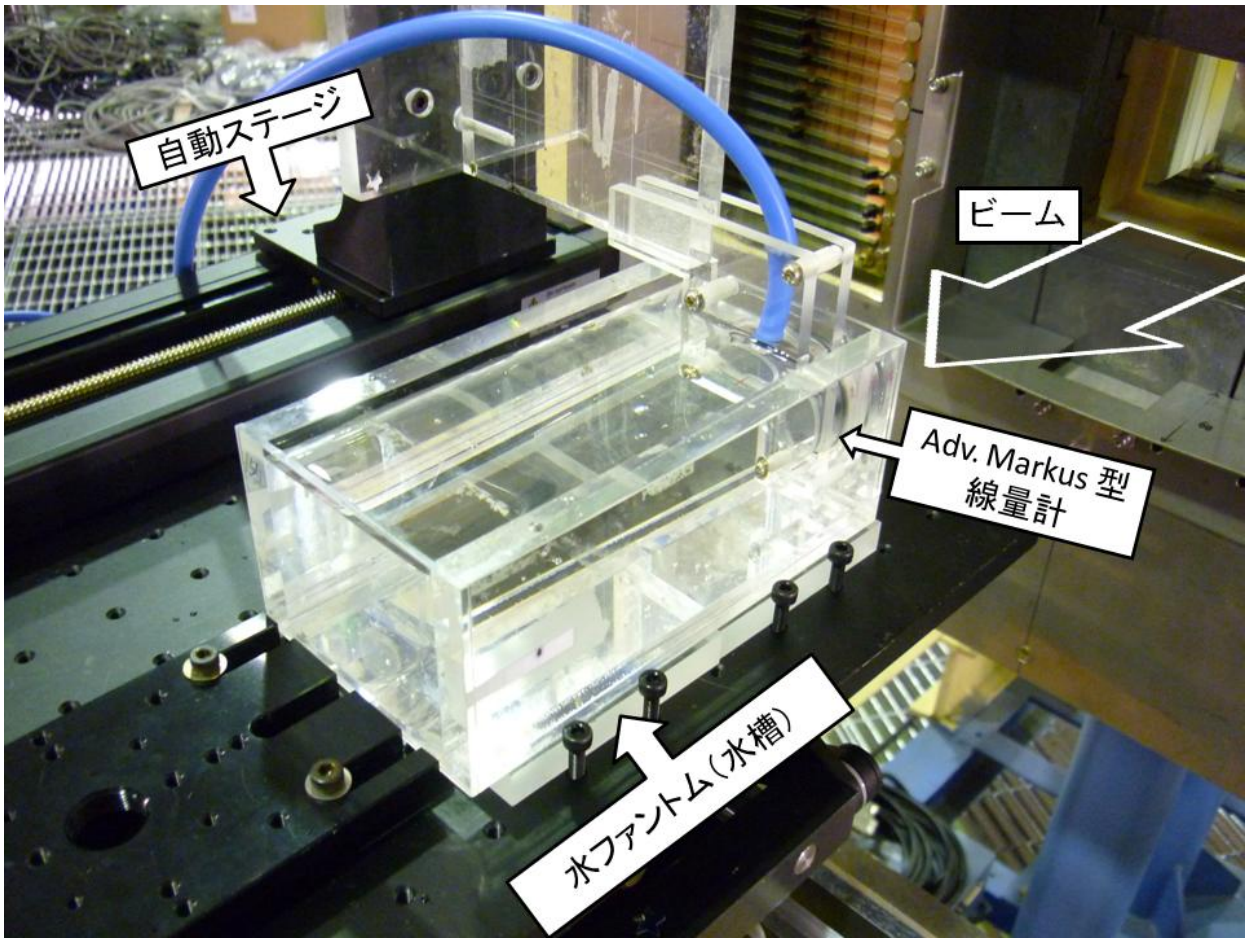


図 3　ブラッグ曲線測定用の水ファントムと線量計のセットアップの写真。写真中央のアクリル製の透明容器に純水を満たしたものが水ファントムで、青いケーブルの先端についた Advanced Markus 型線量計を写真左奥の自動ステージによって水ファントム内で移動させた。ビームは右奥から左手前に入射。

は、ビーム粒子の水中でのブラッグピークの深さをx_0とし、ビーム上流に PMMA 板を入れて、エネルギーを減少させたときのブラッグピーク深さをx_pとすれば、その PMMA 板の水等価厚は$x_{PMMA} = x_0 - x_p$として求めることができる。

２．実験

2－1. 実験のセットアップ

バイナリフィルターの水等価厚の測定には、サイクロトロンの C-8 コースにおいて、エネルギーが 80 MeV の陽子線ビームで、直径約 6 cm が平坦な領域となるビームを用いた。図 2 に C-8 コース上に設置されている主な機器を示す。ビーム電流は、図 2 で示されたファラデーカップで測定し、約 1 nA であった。ビーム強度のモニターは、低真空槽の下流側のビーム取り出し窓のすぐ下流に設置したモニター用電離箱で行った。照射場の照射線量の校正には Markus 型線量計を用いた。測定の結果、1nA のビーム電流では線量率として約 4 Gy/分となり、この値を使って、モニター用電離箱の校正を行った。

レンジの測定は、照射場に設置した水ファントム内を自動ステージに載せた線量計をビーム軸上で動かすことで測定した (図 3)。使用した水層は、ビームに対して窓の大きさが縦 5 cm、横 6 cm で、奥行きが 14.5 cm の水槽で、ビーム窓が 0.2 cm 厚、側面が 1 cm 厚の PMMA から出来ており、その中に純水を満た

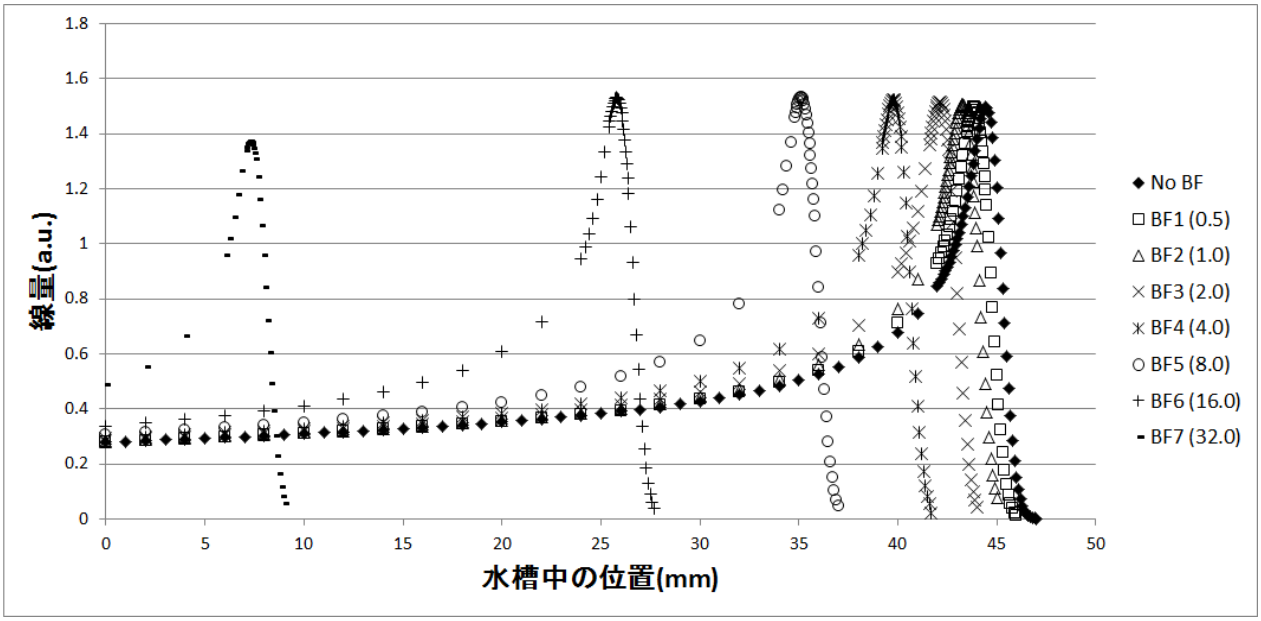


図 4　ブラッグ曲線の測定結果。黒丸で表されているものはバイナリフィルターが挿入されていない状態のもの。他の７つの曲線は、各７枚を１枚ずつ挿入して測定した。水平軸は水の厚さであるが、水槽の壁厚は考慮していないので、そのまま飛程などには変換できないことに注意が必要である。

し水ファントムとした。水槽中で測定する線量計は Advanced Markus 型電離箱を用い、その際、窓には防水用兼ビルドアップ用のキャップ(0.88 mm PMMA)をつけた。自動ステージにはシグマ光機製 SGSP26-200 を用いた。メーカーの仕様によると、このステージの位置決め精度は最小移動ステップが 4 μm、繰り返し位置決め精度が 6 μm とされていることから、本実験では 10 μm を位置精度とし、最小桁として表すこととした。

2−2. ブラッグ曲線の測定

バイナリフィルターの各 PMMA 板の水等価厚を測定するために、7 枚の PMMA 板をそれぞれ一枚だけ挿入した場合と、フィルターを入れない場合のブラッグ曲線の合計 8 通りの測定を行なった。ブラッグ曲線測定では、Adv. Markus 型線量計を水槽内で移動させて、線量を測定した、測定点ごとの移動量は、ブラッグ曲線が平坦な場所では 1 mm 間隔、上昇を始める点でから 0.2 mm 間隔、ブラッグピーク周辺で 0.1 mm 間隔としてデータ収集を行った。各測定点では、バイナリフィルターを入れない場合に、照射位置で、1 Gy の照射線量となるように照射し、それぞれの測定には 15-20 秒程度要した。さらに、ステージ移動時間を含めると一点の測定に必要な時間は約 30 秒程度で、一つのブラッグ曲線を得るのに最大約 45 分必要とした。

図 4 は、バイナリフィルター無しの状態（黒丸）と、全 7 枚の PMMA 板を一枚ずつ挿入して測定したブラッグ曲線である。横軸は、水槽中での位置（絶対的な水深さでないことに注意）を、縦軸はその位置での相対的な線量を表している。ブラッグピーク位置での線量が、薄いフィルターから厚いフィルターを入れていくにつれて増加し、BF5 (8.0 mm) を入れたところで極大になり、さらに厚い BF を入れると減少する傾向が見られる。これは、C-8 での平坦な照射場を作る際に、散乱体-シングルワブリング法を使っているために、ビームの横方向の強度分布がビーム軸を中心とした点対称形で、ビーム軸中心の強度が弱くなっているが[5]、ビームがバイナリフィルターで散乱されることにより、横方向の強度分布がなだらかになり、中心部の強度が増加したた

めだと考えられる。また、BF6 (16.0 mm)、BF7 (32.0 mm) を入れるにしたがって減少するのは、ビーム全体での散乱が大きくなるためであると考えられる。

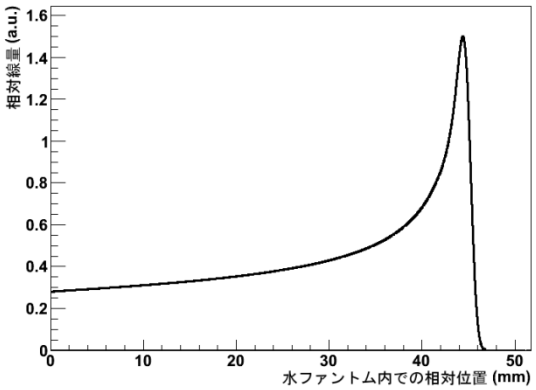


図 5　測定から求めたブラッグ曲線の数値関数。

2−3. データ解析

バイナリフィルターの PMMA 板の水等価厚を測定する際には、水槽中で測定したブラッグ曲線が、PMMA 板を入れることでどれだけずれたかで評価した。ブラッグ曲線を表す関数を$f(x)$ (xは深さ)と記述すると、バイナリフィルター内の各フィルターを入れた際のブラッグ曲線の形状は、散乱などによる係数Aと BF を入れることによってレンジが短くなる量Xの二つのパラメータを用いて、$A\,f(x-X)$という形で近似したできる仮定すれば、シフトの成分Xがそのフィルターの水等価厚となる。しかしながら、ブラッグ曲線を表す$f(x)$は解析的に導出することが事実上不可能なため、実測値をもとにして数値的に導出する関数を作成し、それを用いて PMMA 板を入れた際のブラッグ曲線をフィッティングすることとした。

数値関数は、実測値間を二次関数で補間したものを使用したが、測定誤差による揺らぎの影響を小さくするために、実測点間の補間関数を求めるのに両端の点だけではなく、周囲の数点の実測点を用いた。以下にその方法について記述する。

まず、n番目の測定深さx_nでの測定値をy_nとし、$n-1$からnの測定値間の補間関数を$f_{n-1}(x)$と表すことにし、次の区間nから$n+1$での補間関数$f_n(x)$に、x_nにおいて連続的に接続されるようにnについて再帰的に求めることとした。境界条件から

$$\begin{cases} f_{n-1}(x_n) = f_n(x_n) \\ \left.\dfrac{df_{n-1}}{dx}\right|_{x=x_n} = \left.\dfrac{df_n}{dx}\right|_{x=x_n} \end{cases} \qquad (4)$$

補間関数を二次関数として$f_n(x) = a_n x^2 + b_n x + c_n$と、記述すると、(4)から

$$\begin{cases} b_n = b_{n-1} + 2(a_{n-1} - a_n)x_n \\ c_n = a_n {x_n}^2 - a_{n-1} {x_n}^2 + c_{n-1} \end{cases} \qquad (5)$$

となる、a_nの一パラメータを決めればb_n、c_nも決めることが出来る。a_nを決めるために、測定点 nから$n+m$ までの点を使い、最小二乗法を用いて、

$$ {\chi_n}^2 = \sum_{i=n}^{n+m} (f_n(x_i) - y_i)^2$$

$$\frac{\partial {\chi_n}^2}{\partial a_n} = 2\sum_{i=n}^{n+m}\left((f_n(x_i) - y_i)\left.\frac{\partial f_n}{\partial a_n}\right|_{x=x_n}\right) = 0 \qquad (6)$$

$\sum_{i=n}^{n-m} x_i = \langle x \rangle$という様に記述して、(6)を整理すると、

$$a_n = \frac{\left\{\begin{array}{c} \langle x^2 y\rangle - 2x_n\langle xy\rangle + {x_n}^2\langle y\rangle \\ -(2x_n a_{n-1} + b_{n-1})\langle x^3\rangle \\ +(5{x_n}^2 a_{n-1} + 2x_n b_{n-1} - c_{n-1})\langle x^2\rangle \\ -(4{x_n}^3 a_{n-1} + {x_n}^2 b_{n-1} - 2x_n c_{n-1})\langle x\rangle \\ ({x_n}^4 a_{n-1} - {x_n}^2 c_{n-1})m \end{array}\right\}}{\langle x^4\rangle - 4\langle x^3\rangle + 6\langle x^2\rangle - 4\langle x\rangle + m}$$

となる。

図 5 は、このようにして求めたブラッグ曲線を表す関数である。ここでは、一連の補間関数の初期関数$f_0(x)$を(x_0, y_0)から(x_4, y_4)の 5 点から最小二乗法によって求めた二次関数をとし、再帰的に求める各補間関数の係数を求めるための範囲を$m = 3$として導出した。

この様にして求めたブラッグ曲線を、PMMA 板を入れた際の曲線として$A\,f(x-X)$の形でフィッティングするために、素粒子実験分野で広

く使われているオブジェクト指向型の解析フレームワークである ROOT [6]を使用した。ROOT では、繰り返し最小化用のルーチンとして MINUIT [7] が使われており、これは ROOT のベースとなった CERNLIB (CERN の計算用ライブラリ)から継続して使われているものである。MINUITE は数値計算による最小化が可能であるので、今回使用するような、区間ごとに数学的な関数が変わる場合でもフィッティングすることが可能である。

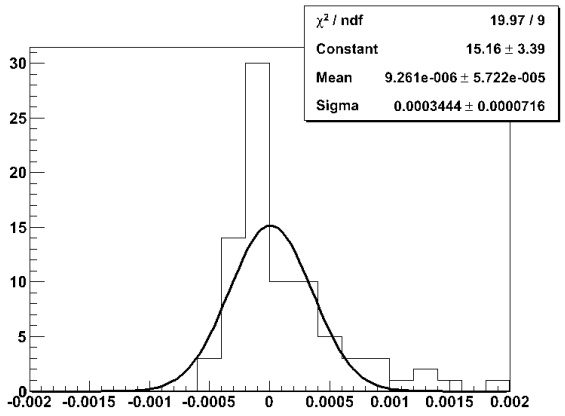


図 6　ブラッグ曲線の補間関数と実測値の差をその補間関数で規格化した値の分布。曲線はガウス分布でフィッティングしたもの。$\sigma \cong 0.00034$となった。

ROOT によるχ^2フィッティングでは、測定誤差が必要であるが、今回は各測定点について一回のみの測定となっており、測定誤差を求めることができないので、ブラッグ曲線の測定値y_iと補間関数$f(x_i)$との差から誤差を導出することとした。図 6 は $\left(y_i - f(x_i)\right)/f(x_i)$ の分布を取ったもので、誤差がガウス型の分布をしているものとしてガウス分布でフィッティングを行っている。フィッティングの結果$\sigma = 0.00034$になる。この結果から、測定値の誤差は $\Delta y_i = \sigma f(x_i)$ となるが、実際には補間関数は測定値から最小二乗法で求めたので、関数値自体にも同様の測定値の誤差が考えられるので、補間関数へのフィッティングに用いる誤差としては、

$$\Delta f_{fit}(x) = \sqrt{(\Delta y)^2 + \left(\sigma f(x)\right)^2} \cong \sqrt{2}\sigma f(x) \fallingdotseq 0.00047 f(x) \quad (7)$$

とした。

表 2　C-8 コースに設置したバイナリフィルターで使用した各フィルターの水等価厚

	製品名	設計上の厚さ(mm)	**測定した水等価厚(mm)**	比
BF1	クラレックス	0.5	**0.56**	1.12
BF2	カナセライト	1	**1.18**	1.18
BF3	アクリライト L	2	**2.32**	1.16
BF4	アクリライト L	4	**4.67**	1.17
BF5	アクリライト L	8	**9.31**	1.16
BF6	アクリライト S	16	**18.64**	1.17
BF7	アクリライト S	32	**37.22**	1.16

３．結果

前項で導出したブラッグ曲線の数値関数と誤差関数(7)を用いて、バイナリフィルターの各板通過後の測定についてフィッティングを行なった。フィッティングの結果を reduced χ^2 検定で評価すると、板が厚くなるほど精度が悪くなった。図 7 は、水ファントム中でのブラッグピークの形状と、BF1 および BF7 を挿入した際に得られたブラッグ曲線の形状を比較するために、ブラッグピーク位置を合わせるようにプロットしたものである。BF1 に関しては図中でも見られるように、良い精度で一致しており、$\chi^2/n_{df} \cong 1.4$と妥当な値を示したが、BF7 通過後に関しては、水ファントムのブラッグ曲線から明らかに外れている。これは、バイナリフィルターから水ファントムを設置した場所までの距離が約 0.7 m ほどあるので、BF7 において大角度散乱を受けたものは水ファントム内の線量計に入射しにくいが、一方、水ファントムで同様の深さで起こった大角度散乱は線量計までの距離が短いので入射する可能性が高くなるので、見かけのブラッグピーク到達前に止まってしまう粒子

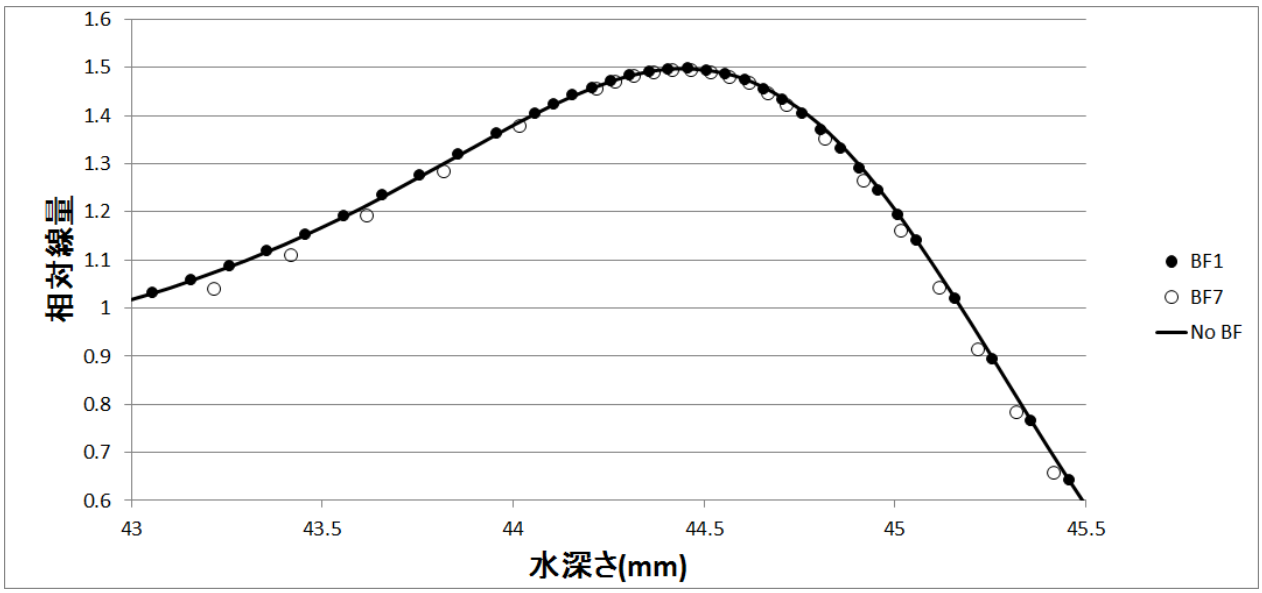


図 7　バイナリフィルターを用いた際のブラッグピーク近傍での形状の違い。曲線はフィルター無しの場合で、BF1 および BF7 を挿入した場合のブラッグ曲線を、フィルターが無い曲線のピークに合わせるようにして、それぞれ黒丸と白丸でプロットしている。BF1 を挿入したものはほぼフィルター無しの場合と一致しているが、BF7 を挿入したものは特にピーク前方でのずれが大きい。

が多いためであろうと思われる。実際上は、ブラッグピーク周辺でとまる粒子が多く、ブラッグピーク周辺は同じような曲線となることが予想されるので、ブラックピーク近傍のみでフィッティングを行なった。

フィッティングによって得られた水等価厚の統計誤差は、約 0.1 ～ 2.5 μm で、また、系統誤差について考察すると、最大の要因となるのは自動ステージの精度であるが、前述したように約 10 μm であり、測定による統計誤差より十分大きいので、今回の測定では、10 μm を最小桁とすることとした。

表 2 に、測定結果として、7 枚のフィルターの素材名と厚さ、測定した水等価厚、そして、水等価厚と実厚の比をまとめた。水等価厚との比に注目すると、ほぼ理論値と一致しているが、BF1、BF2 といった薄い PMMA 板では理論値より厚めになっている。しかしながら、薄い PMMA 板での測定は高いフィッティングの精度があり、測定上の誤りとは考えにくく、実際に水等価厚が厚いとしたほうが現実的であろう。原因としては、薄い板では、薄く加工する困難さのために設計より厚めに作成された可能性などが考えられる。

４．まとめ

サイクロトロン C-8 コースに導入したバイナリフィルターの各 PMMA 板の水等価厚の測定を高い精度(0.01 mm)で行なうことが出来た。厚いフィルターでは、ほぼ理論通りの結果となったが、薄いフィルターは設計より厚いことが確認できた。

実験に実際の実験で使用するときには、数枚の板を組み合わせることが必要なので、水等価厚の精度Δxは板の枚数をnとして、$\Delta x = 0.01\sqrt{n}$ (mm) となる。放医研のサイクロトロンでは、最大飛程となるのは 80 MeV の陽子線で、その飛程は 51.03 mm であり、実際、7 枚の PMMA 板を全部用いることは無く、最大で $n = 6$であり、精度は$\Delta x < 0.024$ (mm) となる。この値は、例えば、最も使用頻度の高い 70 MeV の陽子線では、エネルギー損失が水中で約 0.98 keV/μm なので、そのエネルギーの不確かさは約 0.024 MeV ということとなる。

このように、実用上では精度はまったく問題ないと言えよう。

また、今回得られた、水中でのブラッグ曲線の数値関数は、バイナリフィルターを用いたブラッグ曲線の測定結果にも適用できる。測定では、ブラッグピーク周辺で測定点として５点以上取れることから、2 パラメータのフィッティングは可能である。これによって、高い精度で飛程、そして、そこからエネルギーの決定、精度の評価も可能となるであろう。今後、シミュレーションによるエネルギー損失や散乱角の計算を進めて、照射場の特性を高い精度で評価していく予定である。

最後に、本研究のために、ビームの提供をしていただき、実験の遂行に大きく協力していただいた、放医研・サイクロトロン運転課の皆様に感謝の意を表したい。

参考文献

[1] 日本医学物理学会編, *外部放射線治療における吸収線量の標準測定法(標準測定法01)*. 通商産業研究社, 2002.

[2] IAEA, “Absorbed Dose Determination in External Beam Radiotherapy,” *TECHNICAL REPORTS SERIES*, vol. 398, 2001.

[3] 北村尚 他, “汎用照射室 C-8 コースにおけるビーム制御,” *平成 21 年度サイクロトロン利用報告書*, pp. 46–49, 2010.

[4] NIST, “PSTAR.” [Online]. Available: http://physics.nist.gov/PhysRefData/Star/Text/PSTAR.html.

[5] 北村尚, 内堀幸夫, “放医研サイクロトロンの広範囲照射場のプロファイル測定とモデル化,” *放射線医学総合研究所技術報告書*, vol. 5, pp. 20–27, 2010.

[6] I. Antcheva, et al., “ROOT — A C++ framework for petabyte data storage, statistical analysis and visualization,” *Comput. Phys. Commun.*, vol. 180, no. 12, pp. 2499–2512, Dec. 2009.

[7] F. James, “Minuit Tutorial,” 2004. [Online]. Available: http://seal.web.cern.ch/seal/work-packages/mathlibs/minuit/home.html.

放射線医学総合研究所
技術報告書

NIRS

www.nirs.go.jp

NIRS Technology

NIRS Technology, vol. VII (2012) 35 – 80.

Instruction Manual for 2-Way Sorting Using BD FACSAria

前田 武[1]*、高野 裕之[1,2]、小澤ブル 美絵[1]、中村 悦子[3]、
下川 卓志[3]、小西 輝昭[1]
Takeshi Maeda[1]*, Hiroyuki Takano[1,2], Mie Ozawa Bull[1], Etsuko Nakamura[3],
Takashi Shimomura[3], Teruaki Konishi[1]

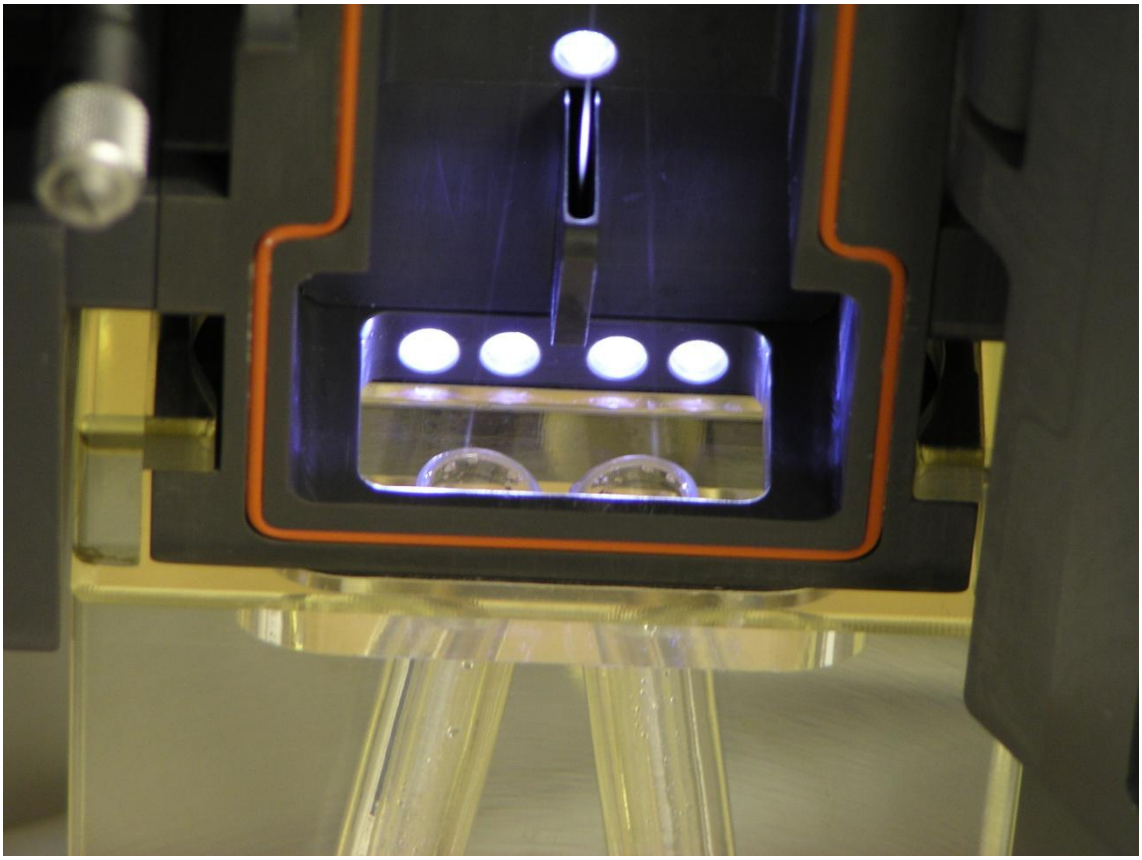
[1] 研究基盤センター 研究基盤技術部 放射線発生装置技術開発課
[2] 東京ニュークリア・サービス株式会社
[3] 重粒子医科学センター先端粒子生物研究プログラム
[1]Radiation Engineering and Technical Support section Department of Technical Support and Development Research Development and Support Center
[2]Tokyo Nuclear Service Company
[3]Cancer Metastasis Research Team Advanced Radiation Biology Research Program Research Center for Charged Particle Therapy

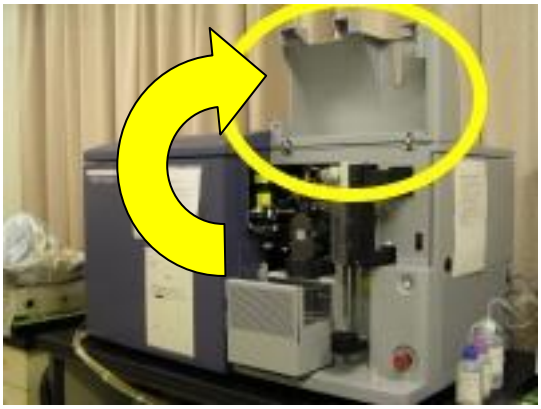
要旨

FACSAria, manufactured by Becton Dickinson (BD Biosciences, San Jose, USA), is a high-speed cell sorter for counting and sorting fluorescently labeled cells. This instrument was purchased in 2005 for use in radiobiological studies conducted at NIRS and was managed as “Joint Use Facilities and Equipments” for collaborative research. Compared to previous commercial instruments, this version of the instrument was designed to be easier to use. However, multiple steps and careful guidance were still necessary in order to adhere to the high specifications for the instrument. Therefore, in 2006, an unofficial team called “Team FACs” was formed to develop knowledge on using FACSAria so that this team could offer technical assistance and biological and mechanical advice for using this instrument. Along with this team, we prepared an instruction manual for sorting cells into 2 tubes, which is called 2-way sorting. The latest version of this instruction manual is now complete, and we hope that this manual would provide technical guidance to users of FACSAria.

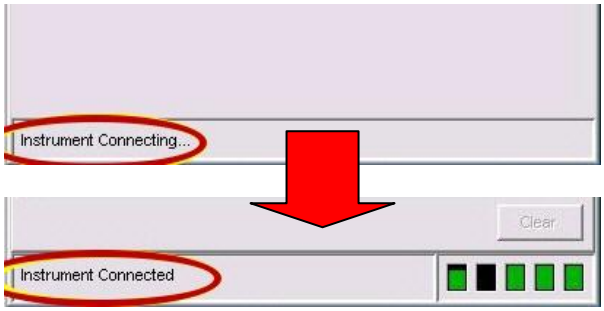
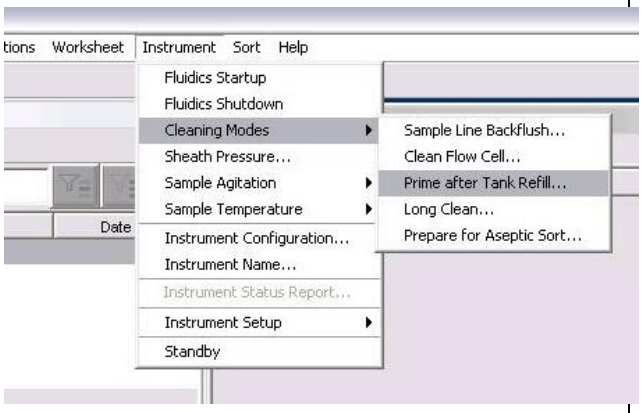
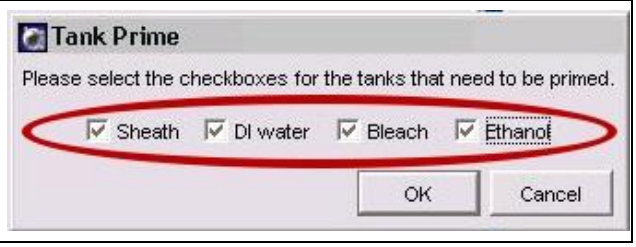
Corresponding Author:
(Takeshi Maeda)
e-mail: ta_maeda@nirs.go.jp

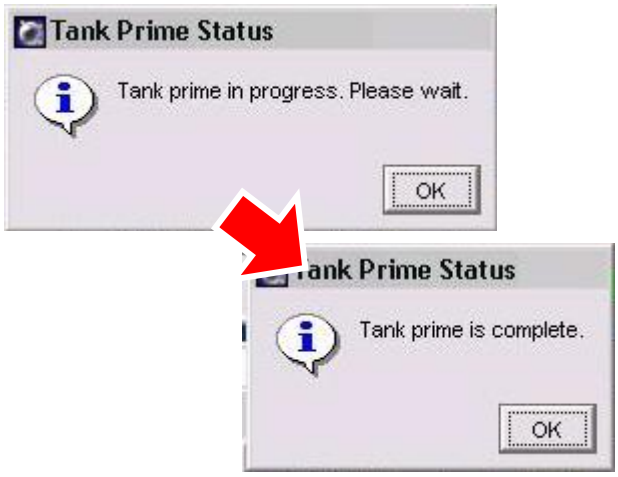
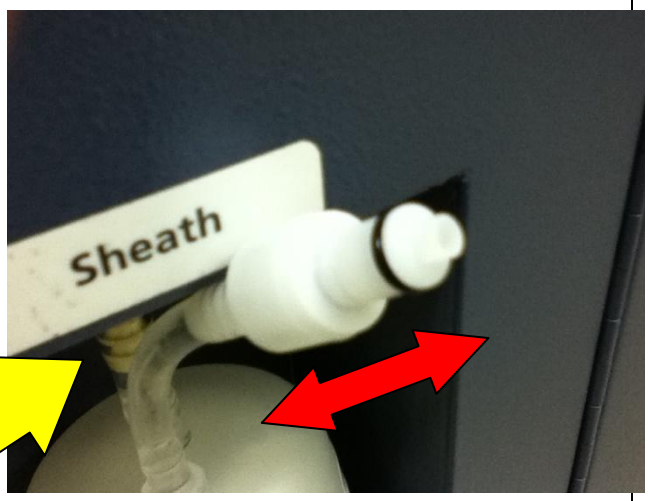
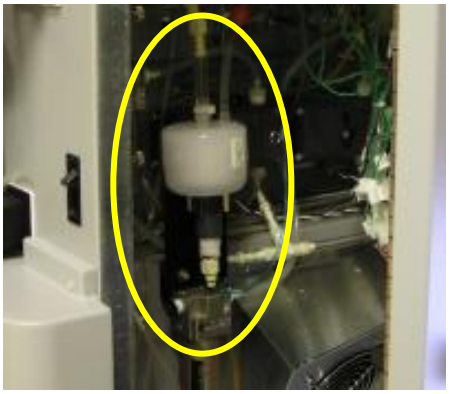
BD FACSAria Sorting Manual
(Tube Type) Ver.4.0.5

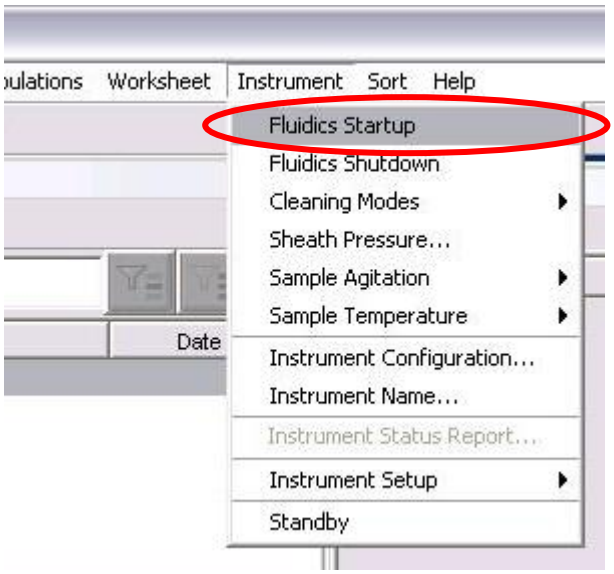
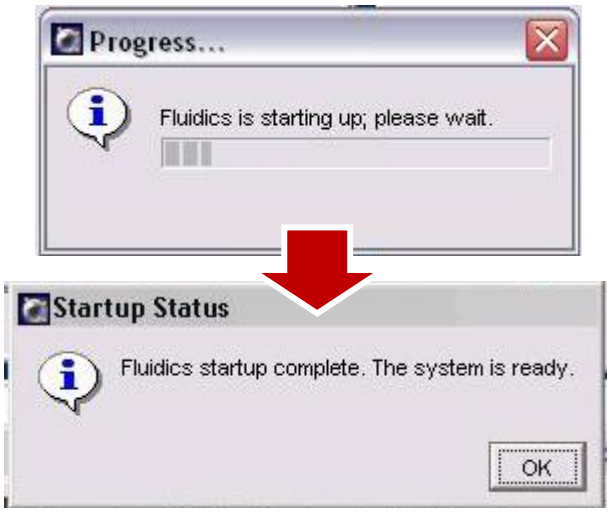
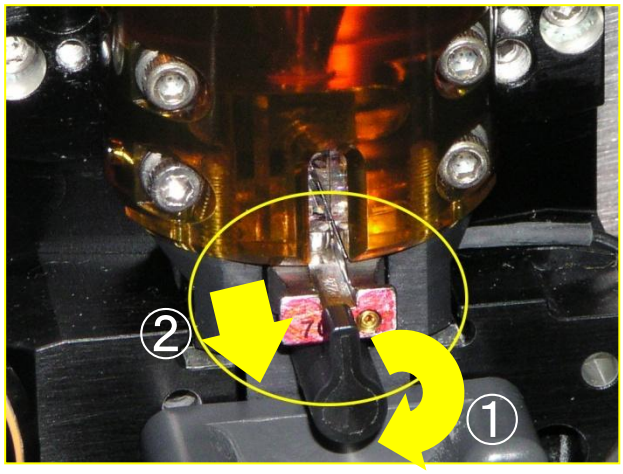


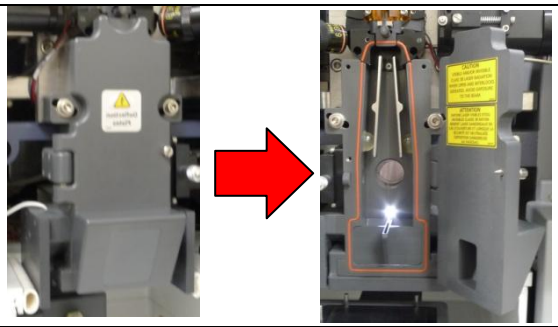
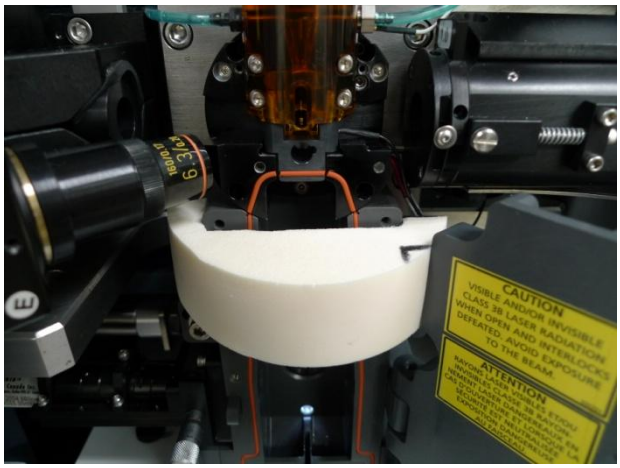
1.	Flow cell access door を開ける。 Open the Flow cell access door.	
2.	レーザー電源を入れる。 Turn on the Laser Power.	
3.	主電源を入れる。 Turn on the Main Power.	

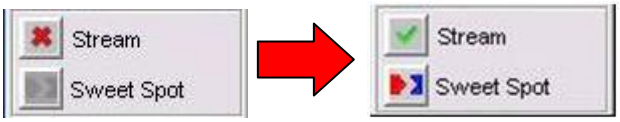
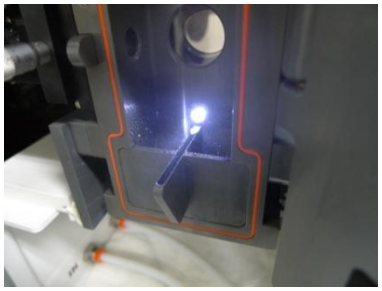
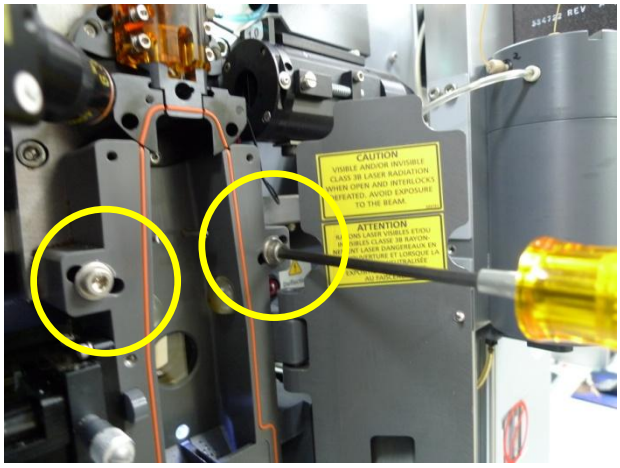
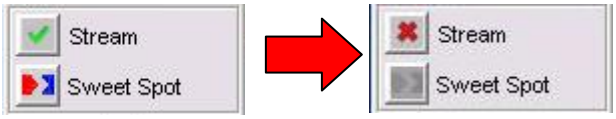
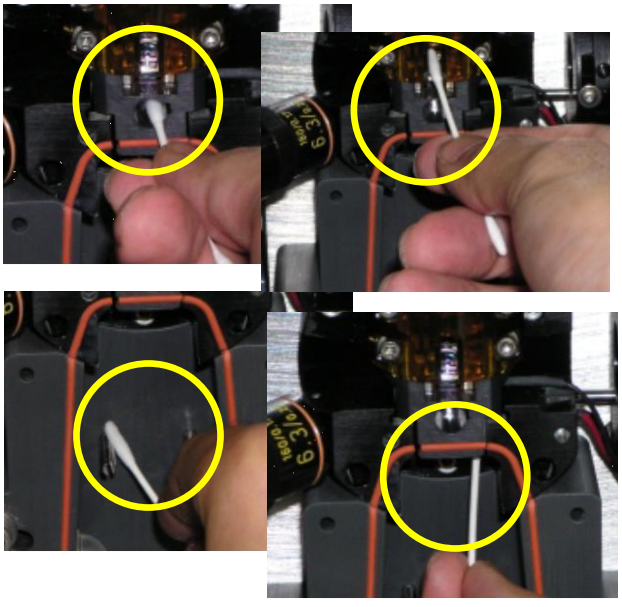
4.	3 分経過後に制御 PC の電源を入れる。 --- Wait for 3 minutes and turn on the computer.	
5.	Windows XP に右のパスワードを入力する。 --- Input password.	User name: Administrator Password : **BDIS**
6.	BD FACSDiva Software Icon 上で「右クリック」をし、[Open]で起動する。 --- Right click BD FACSDiva Software icon and Select [Open].	
7.	LOGIN 画面が立ち上がったら、自分のグループを選んで、Password を入力し[OK]をクリック。 --- Select your GROUP and input your group Password. Click OK.	

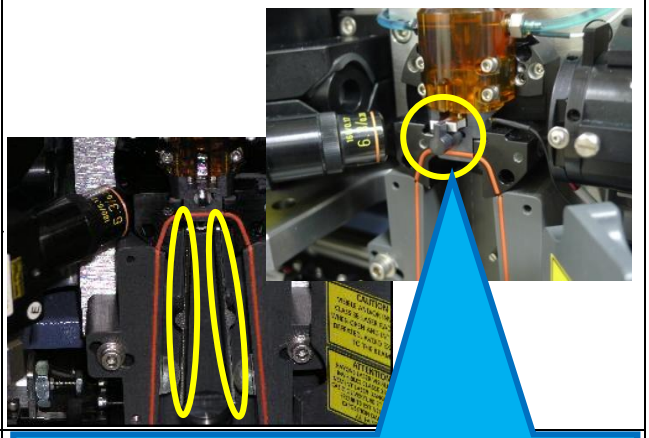
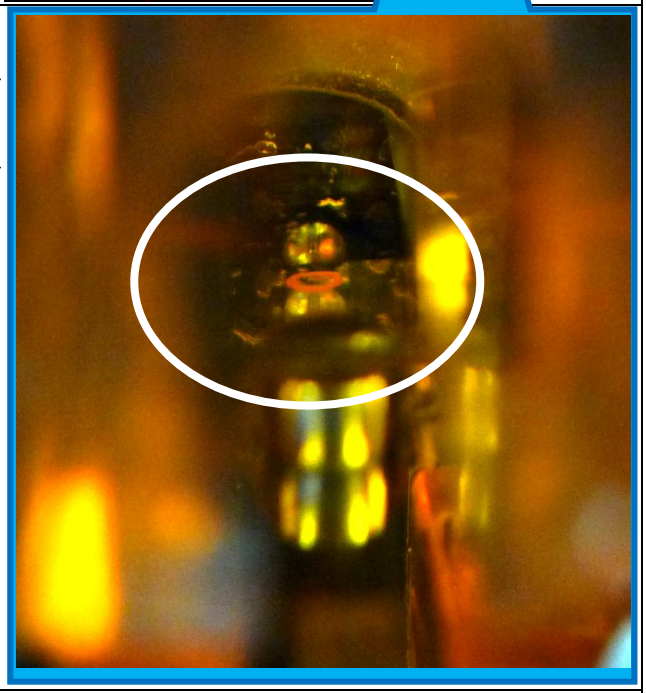
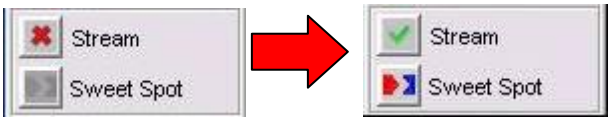
8.	[Instrument Window]の Status Bar の表示が Instrument connecting →Instrument connected になったことを確認。 --- Check the Status Bar of [Instrument Window]. Instrument connecting → Instrument connected	
9.	Fluidics において各液量を確認。 --- Check the Fluidics indicators. From left, Sheath solution, waste fluid, Ethanol, DI water, and Clean solution tank. Fluidics indicators (other than waste) will be indicated in Green, if it is shown in red, needs to be refilled. Waste fluid should be black, or else, empty the waste fluid tank.	 Sheath、Ethanol、DI Water、Clean は緑、Waste は黒で表示される。 Sheath、Ethanol、DI Water、Clean が赤い表示は空なので補充。Waste がある時は廃液処分。
10.	Instrument Menu →Cleaning Modes →Prime after Tank Refill を実行。 --- Start Prime after Tank Refill. Instrument Menu →Cleaning Modes →Prime after Tank Refill	
11.	全ての項目に check を入れ、[OK]をし、気泡除去を行う。 --- Check all check box and click OK.	

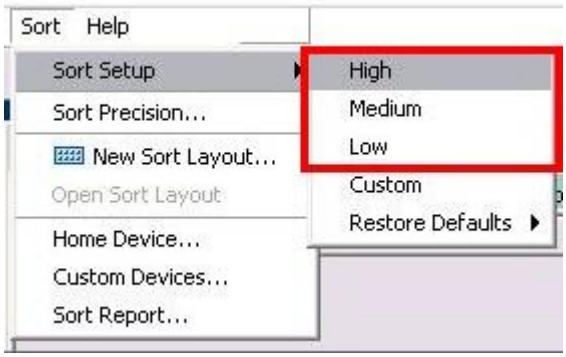
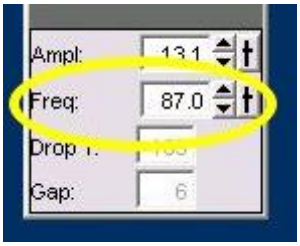
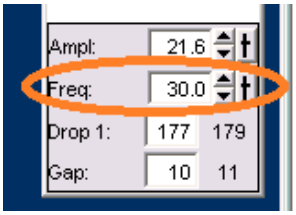
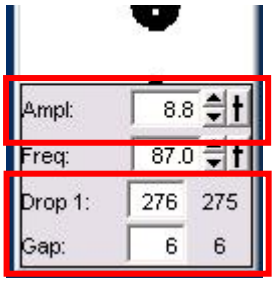
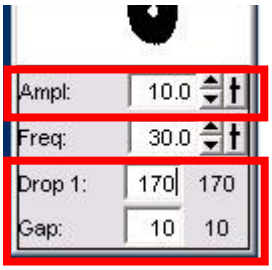
12.	[Tank Prime Status] Dialog の message が変わるまで待つ。 Wait until the Tank prime status to be "complete."	
13.	Micro-bubble 除去 filter 及び Fluidicecart の filter の気泡を確認し、気泡があったら、エア抜き弁を押して抜く。 Check the Micro bubble removal filter and filters on the Fluidice cart. When you see the bubble, push the air vent valve and remove it. **※ Micro-bubble 除去 filter の気泡除去をする場合は、内線 6729/248 へ連絡すること。** **※ When you see the bubble in the Micro bubble removal filter, please call ext. 6729 or 248.**	  Micro-bubble 除去 filter Micro bubble removal filter

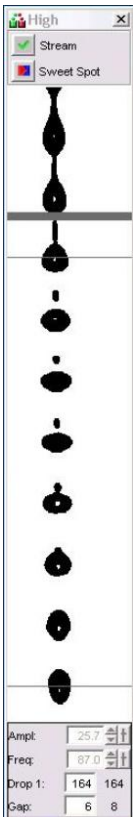
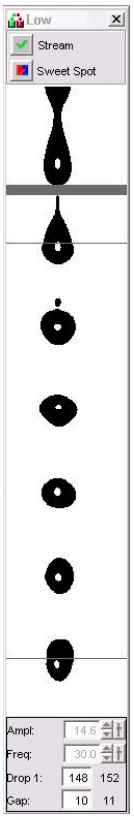
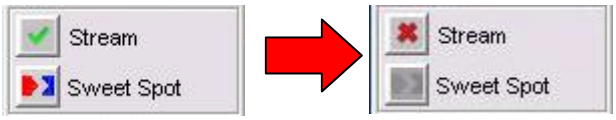
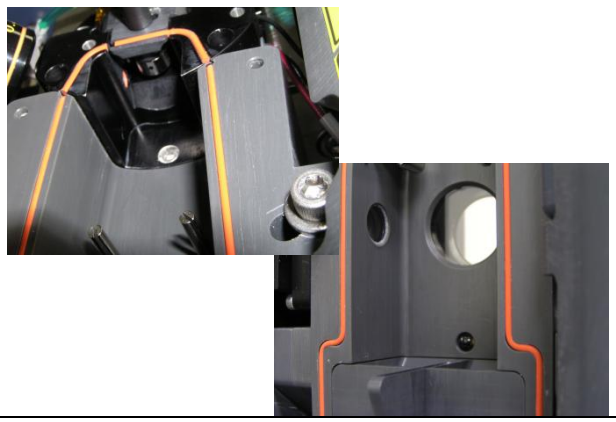
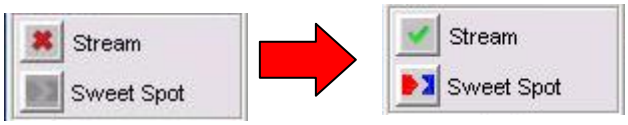
14.	Instrument → Fluidics Startup を実行。 --- Select Instrument → Fluidics Startup	
15.	完了するまで待つ。 --- Please wait a few minutes till ready.	
16.	Dummy Nozzle と stopper を外す。 --- Take off the Dummy Nozzle and stopper.	

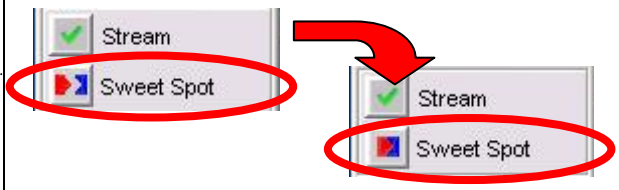
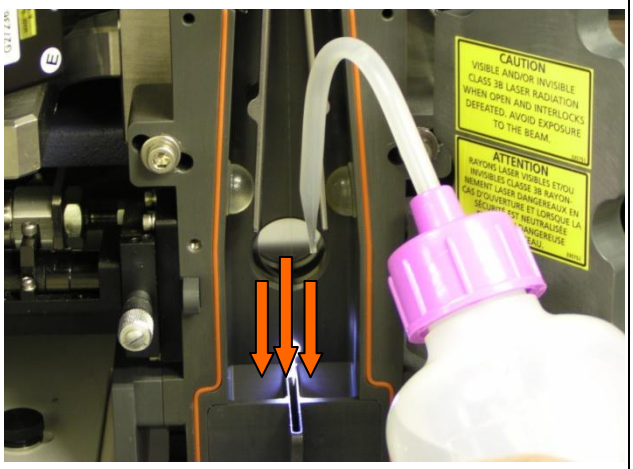
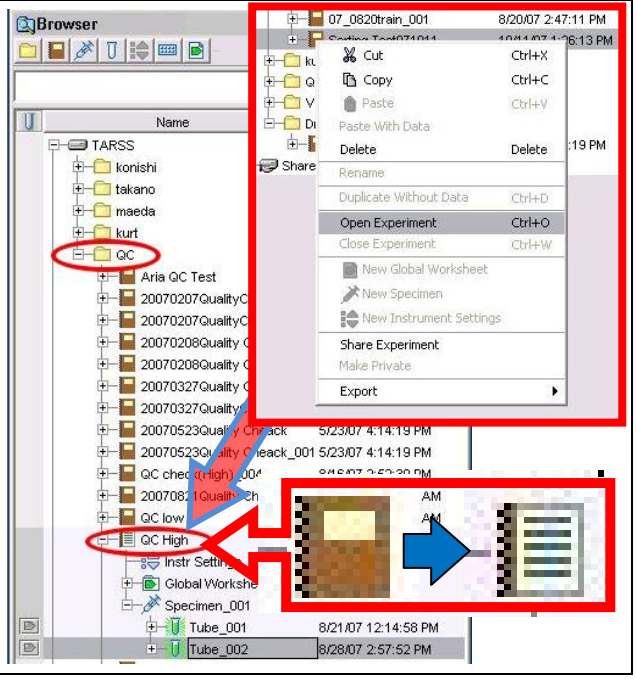
17.	Sort block を開く Open the Sort block.	
18.	電極板を外す。 ※電極版を素手で触らない Take off the Electrode plate. ※Don't touch the Electrode plate by your hand.	
19.	ミスト防止具を Sort Block Door に挟むようにして取り付ける。 Attach mist guard between Sort Block Door.	

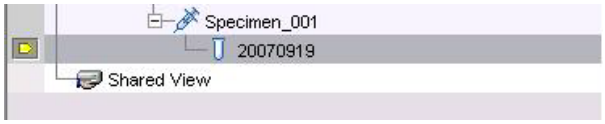
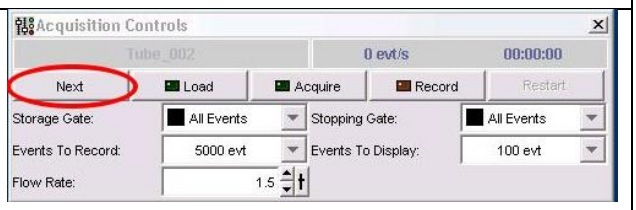
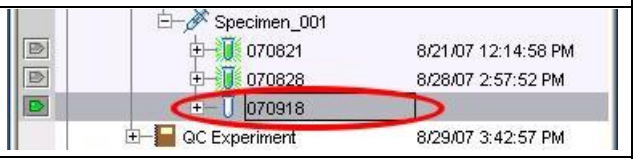
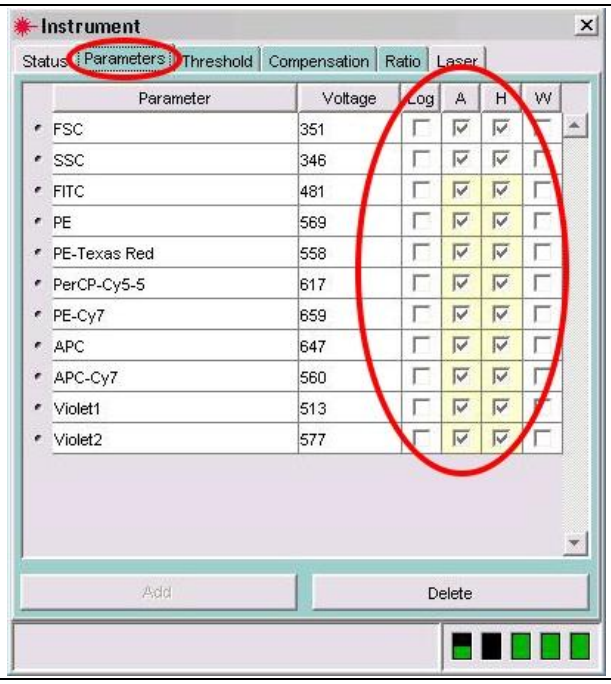
20.	Fluidics control window の[Stream]を click し送液を開始する。 Click [Stream] on Fluidics control window. And start solution sending.	 
21.	アスピレーターに Stream が当たってミストが発生している時は、サイドのねじを緩めて調整する。 If the stream is disturbed by the sides of aspirator and producing a mist, loosing two screws of aspirator compartment and adjust the aspirator position.	
22.	Stream を止める。 Stop the stream	
23.	Nozzle 穴、Stopper 穴、電極周辺及び Camera Window を Cleaning する。 (濡れた綿棒→乾いた綿棒) Clean Nozzle hole, Stopper hole, Electrode ports, and camera window with wet swab. Then dry them with new dry swab.	

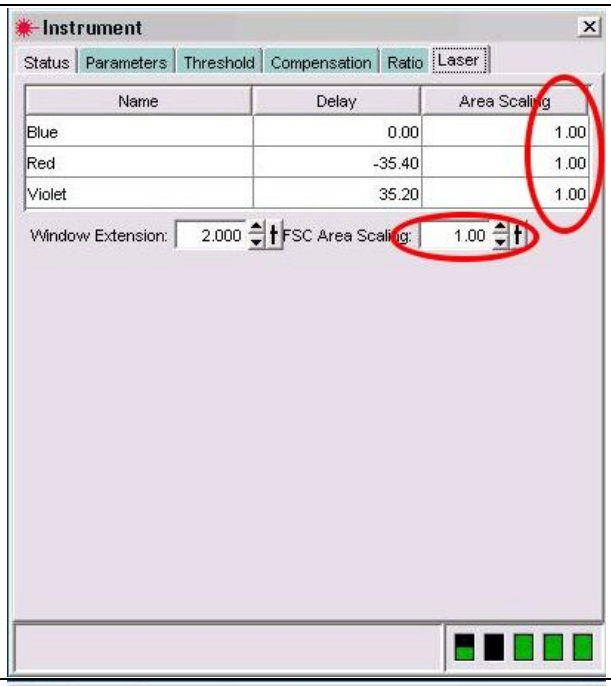
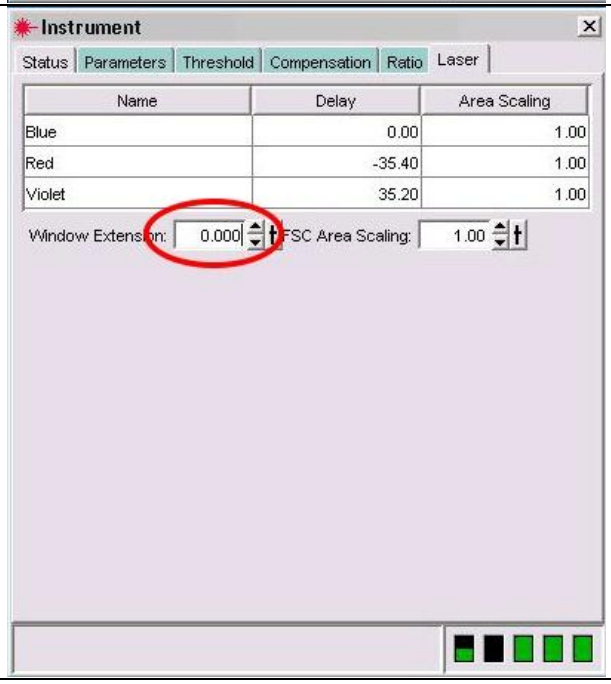
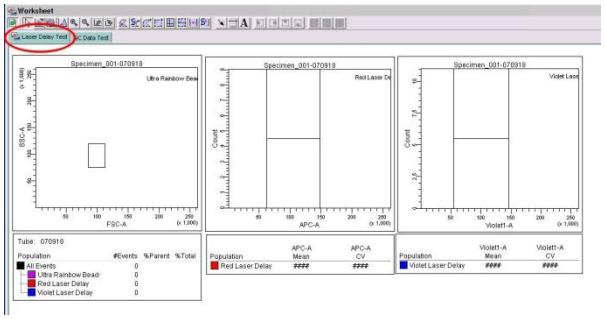
24.	Stopper、Nozzle、電極板を Cleaning する。 (濡れた綿棒→乾いた綿棒) Use wet swab to clean, Stopper, Nozzle, and electrode plates. Then dry them with new dry swab.	
25.	Nozzle に O-ring を取り付け、電極板などと戻す。 ※濡れた綿棒に O-ring を付着させ、Nozzle に乗せて、乾いた綿棒で溝に押し込む。 Put the O-ring on the Nozzle. Set the Electrode plate. ※Attach O-ring to wet swab and put on the Nozzle. Then push into groove with dry swab.	
26.	O-ring の状態を確認する。 Check the O-ring shape. [Memo]  great  good	
27.	Fluidics control window の[Stream]を click し送液を開始する。 Click [Stream] on Fluidics control window. And start solution sending.	

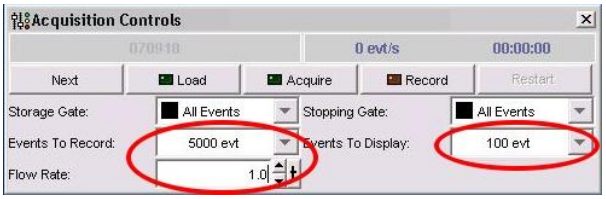
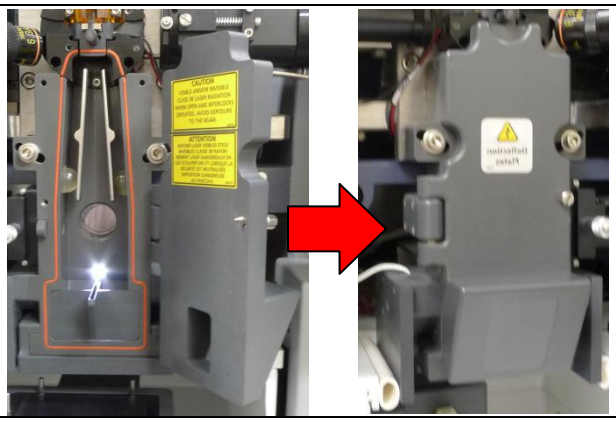
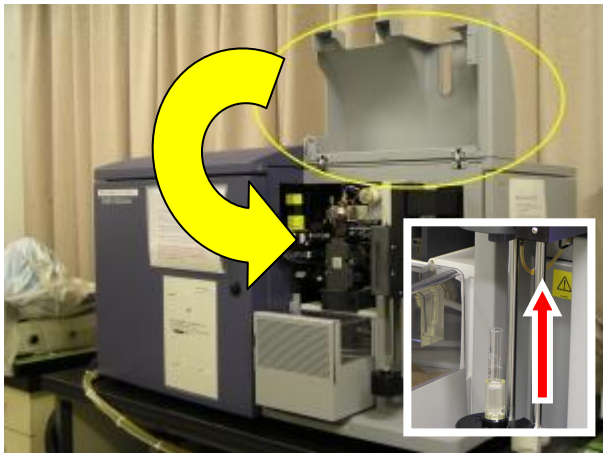
28.	Height/Medium/Low の切り替えをする。 Sort Menu →Sort Speed --- Change speed, Height or Medium or Low. Sort Menu → Sort Speed	
29.	Fluidics control window の Freq を確認する。 --- See “Freq” of Fluidics control window. [Default Setting] High : 70µm Nozzle---87kHz Medium: 70µm Nozzle---60kHz Low :100µm Nozzle---30kHz	 70µNozzle High  100µNozzle Low
30.	70µ Nozzle: Gap を 6±3 の範囲、 100µ Nozzle: Gap を 10±3 の範囲 になるよう、[Ampl]の値を調整する。このとき、[Drip1]の値が 100-350 の範囲に入るよう気をつける。[Freq]の値は触らない。 --- Adjust “Ampl”. When you use 70µ Nozzle, Gap is 6±3. When you use 100µ Nozzle, Gap is10±3. In this case, [Drip1] parameter is 100-350. Don’t touch [Freq] parameter.	 70µNozzle  100µNozzle

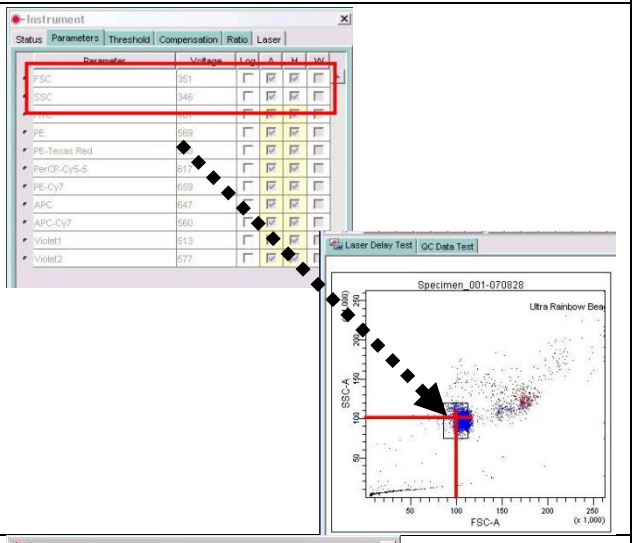
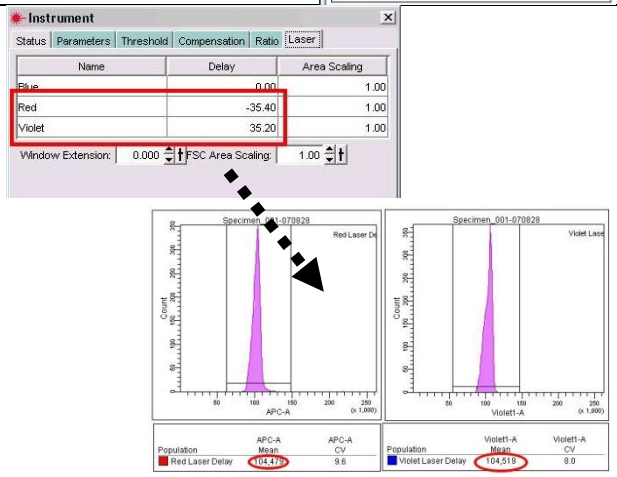
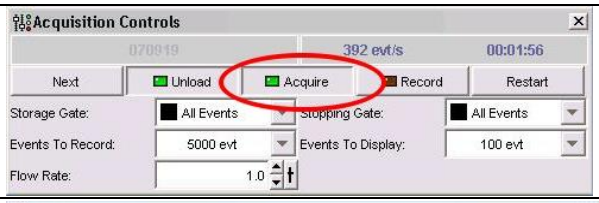
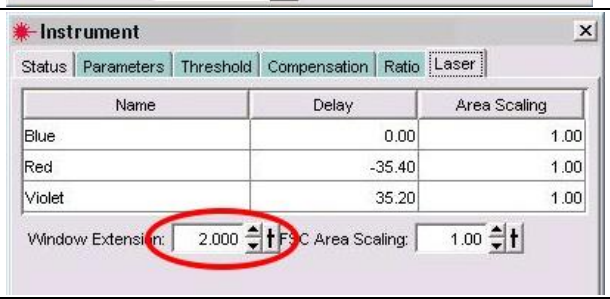
31.	Fluidics control window の[Stream]を click し、カメラの汚れ、Stream の状態を確認する。 ※70µNozzle Height 使用時に、satellite drop が 6 個以上、100µNozzle Low 使用時に satellite drop が 3 個以上有る場合は、Nozzle の付け直し、洗浄を行う。 それでもダメなら、Nozzle の調整を実施。 --- When you see more than three satellite drops, remove the nozzle and clean it. If the problem does not solve, then adjust the nozzle. 70µNozzle Height: When you see 6 or more satellite drop, you should set Nozzle again and clean it. 100µNozzle Low: When you see 3 or more satellite drop, you should set Nozzle again and clean it. If you cannot fix it, adjust Nozzle.	 70µNozzle High  100µNozzle Low
32.	Stream を止める。 --- Stop the stream	
33.	濡れているところがないか再度確認し、濡れていたら拭き取る。 --- Check inside of the sort block again. When inside is wet, wipe.	
34.	Fluidics control window の[Stream]を click し送液を開始する。 --- Click [Stream] on Fluidics control window. And start solution sending.	

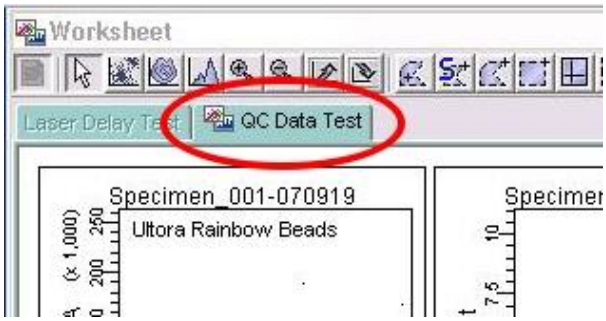
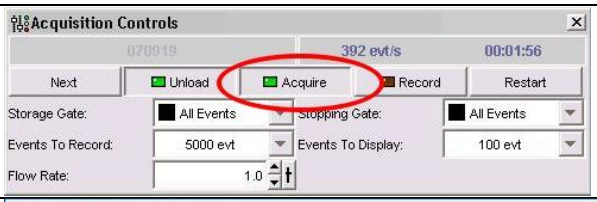
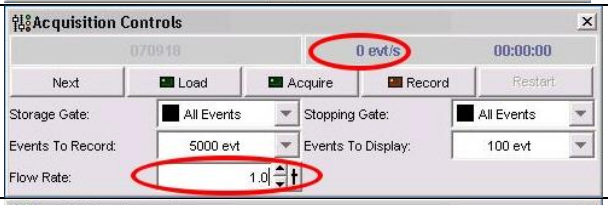
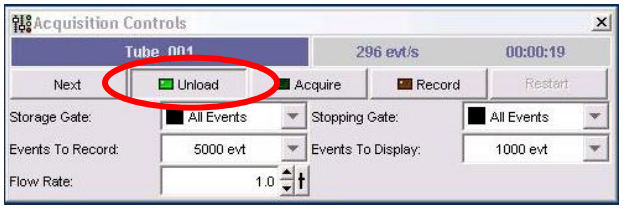
35.	Drop が安定するまで 30 分くらい放置する。 安定したら、Sweet Spot を ON にする。 --- Wait for at least 30 minutes for the stream to be stable to produce the drops. Then turn on the Sweet spot.	
36.	アスピレーターを Cleaning する。 ① FACSRinse---10ml ② DI----------10ml --- Clean the aspirator. ① FACSRinse---10ml ② DI----------10ml	
37.	Start Up & Cleaning 完了。 --- Complete Start Up and Cleaning.	
38.	精度管理用 QC folder → QC Experiment (右クリック)→ Specimen の順に開く。 ※予め QC の Sheet 等を作成してあるものとして説明しています。 --- Open QC folder. → Open QC Experiment and Specimen ※Describe as QC Sheet is already made.	

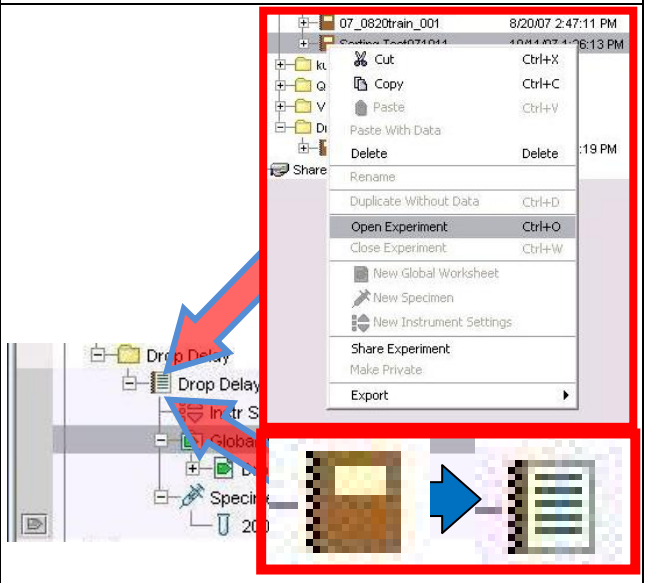
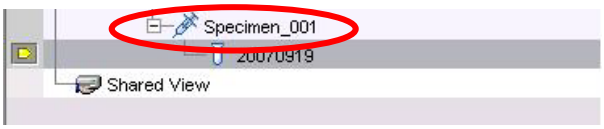
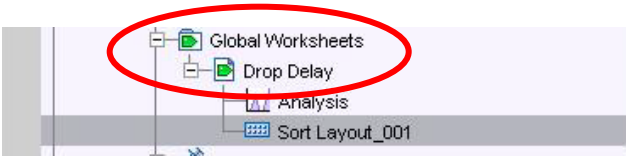
39.	Specimen の[＋]をクリックし Tube を表示し、 をクリックし にする。 Click [＋] at Specimen and display Tube. Then click and change to .	
40.	Acquisition Controls window の[Next]で新しい Tube を作成する。 Make new Tube. Click [Next] at Acquisition Controls window.	
41.	精度管理実施日に名前を変更する。 Change the tube name to exp date of the accuracy date. (Option)	
42.	Instrument window の Parameters より、Log のチェックが外れているか、A 及び H にチェックが入っているか確認する。 Select Parameters tab of Instrument window. Check the “Log”, “A” and “H”. ・”Log” is unselected. ・”A” and “H” are selected.	

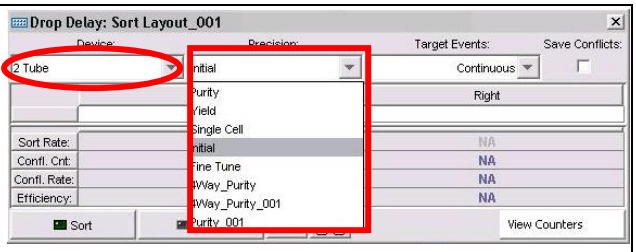
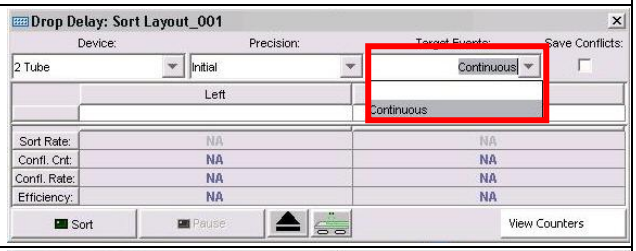
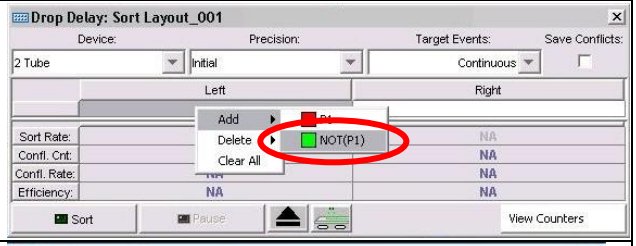
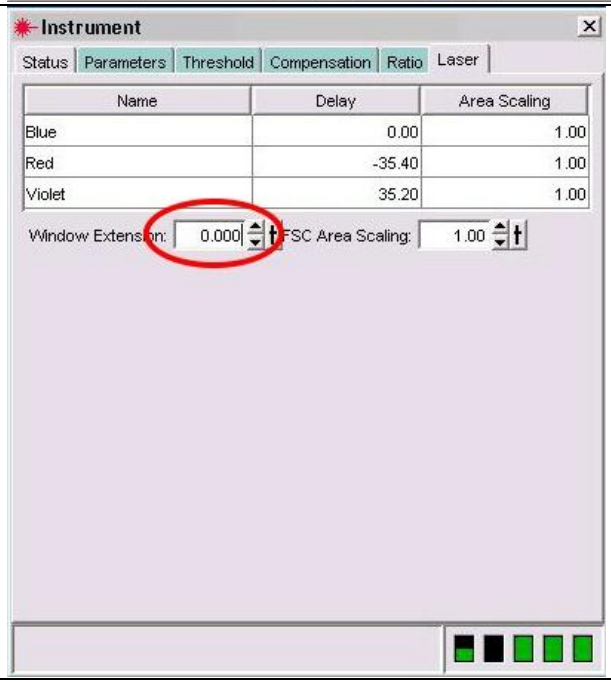
43.	Instrument window の Laser Tab を選択し、FSC Area Scaling 及び各 Laser の Area Scaling が 1.0 か確認する。 **※Aria Scaling は通常細胞毎に設定する。ここでは、標準粒子の測定条件を一定とするため「1.0」とする。** Select Laser tab of Instrument window. Check the “Area Scaling” and “FSC Area Scaling”. ・“Area Scaling” and “FSC Area Scaling” parameter are 1.0. **※Usually set for each cell at Aria Scaling. Set 1.0 for fixed condition of measurement the normal particle.**	
44.	Instrument window の Window Extension を 0 にする。 **※Windows Extension を 0 にすることで、パルスの起点を正確に判断させる。** Change the Window Extension parameter of Instrument window from “2.000” to “0.000” **※When the Windows Extension parameter is 0, instrument adjust correct position of the pulse origin .**	
45.	Worksheet の Leaser Delay Test Tab を開く。 Select Leaser Delay Test tab of Worksheet.	

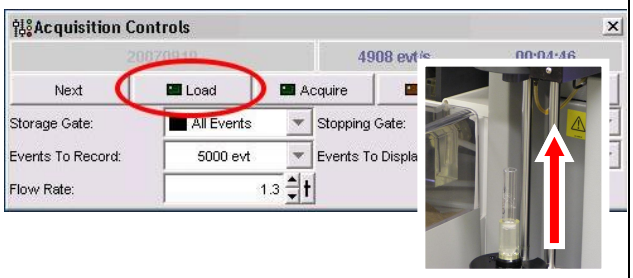
46.	Acquisition Control window の値を以下の通りにする。 Set the Acquisition Control window's parameters as follows. Events To Display : 100 Events To Record : 5000 Flow Rate : 1	
47.	FACSFlow 0.5ml を tube に取り、Ultra Rainbow beads を 1 滴入れ攪拌する。 Take FACSFlow about 0.5ml to Tube. And adds one drop the "Ultra Rainbow beads" and stir.	
48.	Sort Block Door を閉じる。 Close the Sort Block Door.	
49.	Flow cell access door を閉じ、Ultra Rainbow beads を Load する。 Close Flow cell access door and load the "Ultra Rainbow beads".	

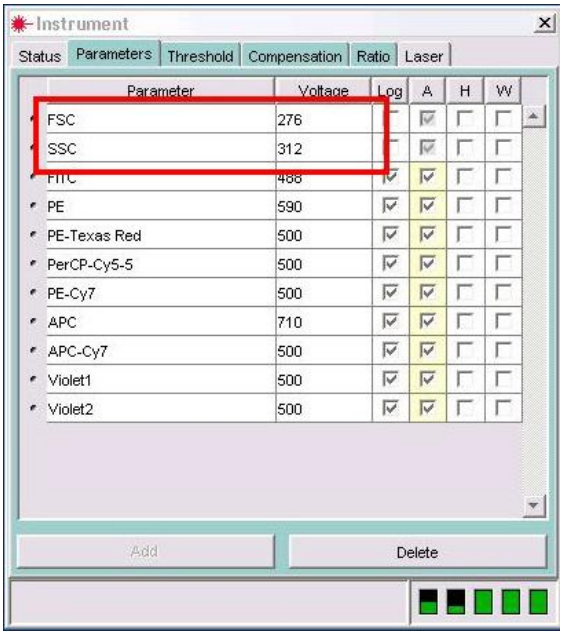
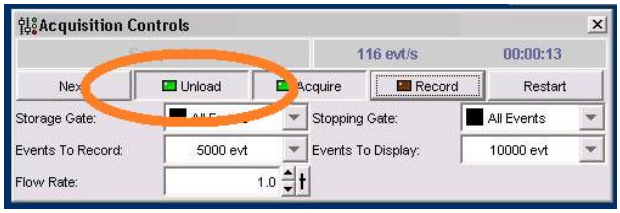
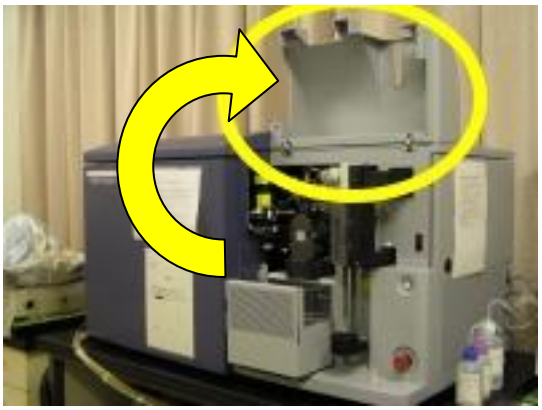
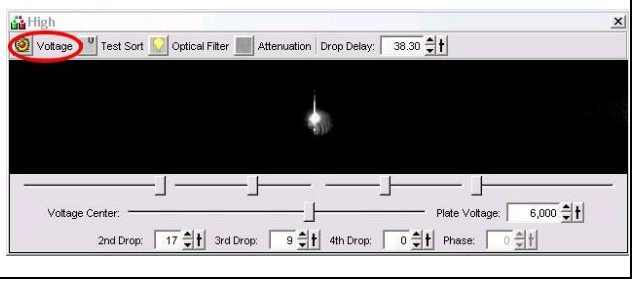
50.	Flow Rate を 1.0～1.5 の間で調整し、Event Rate を 100 近辺にする。 Adjust Flow Rate between 1.0 and 1.5, set Event Rate around 100.	
51.	Worksheet の Leaser Delay test の FSC-A vs SSC-A プロットで、beads 集団が 100×10^3 付近に来るよう、Instrument window の Parameters Tab の voltage の値を調整する。 See “FSC-A vs SSC-A” plot at Leaser Delay test of Worksheet. When the beads group position is not around 100×10^3, adjust voltage of Parameters tab of Instrument windows.	
52.	Instrument window の Laser Tab で Mean が Max となるよう Delay の値を調整する。 Adjust Delay at Laser tab of Instrument windows, change Mean to Max. [Default Setting Table] Setting / High / Medium / Low Blue / 0.00 / 0.00 / 0.00 Red / -36.00 / -54.00 / -40.00 Violet / 36.00 / 54.0 / 40.0	
53.	調整が済んだら、Acquisition Control window の[Acquire]を Click する。 After adjusted, click [Acquire] at Acquisition Control window.	
54.	Laser Delay を設定後、Instrument window の Window Extension を 2 にする。 Change the Window Extension parameter of Instrument window from “0.000” to “2.000”	

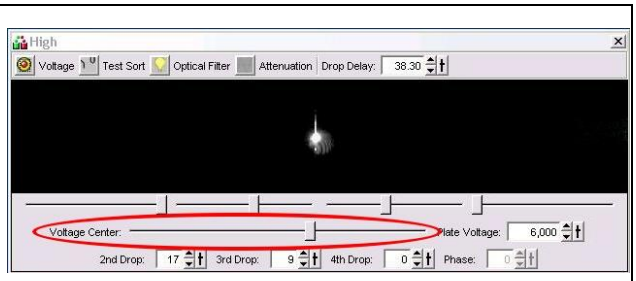
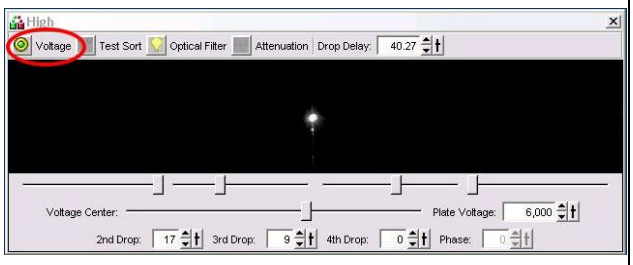
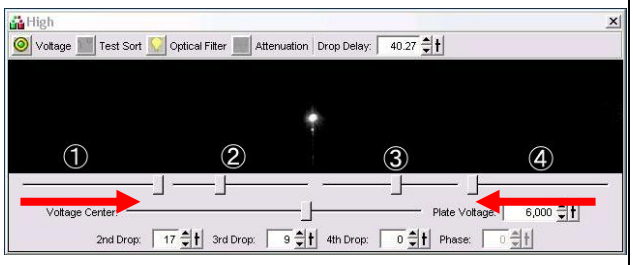
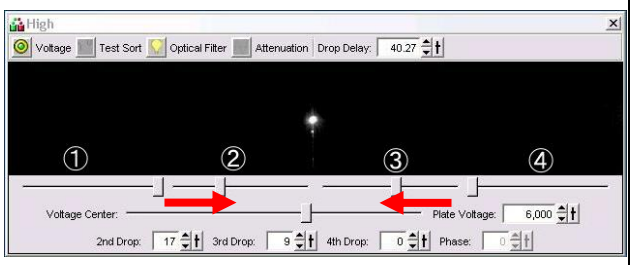
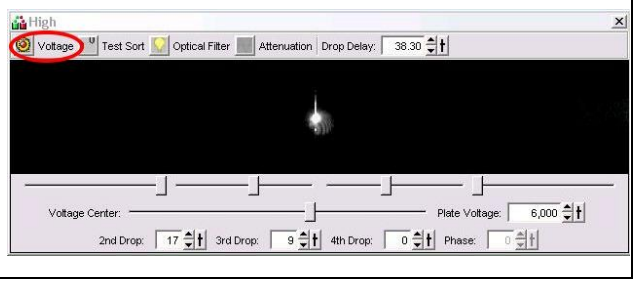
55.	Worksheet の QC Data Test Tab を選択する。 Select QC Data Test tab of Worksheet.	
56.	Acquisition Control window の値を以下の通りにする。 Change the Acquisition Control window's parameters as follows. Events To Display : 100 Events To Record : 5000 Flow Rate : Please do not touch.	
57.	[Acquire]を Click する。 Click [Acquire].	
58.	Flow Rate を 1.0～1.5 の間で調整し、Event Rate を 100 近辺にする。 Adjust Flow Rate between 1.0 and 1.5, set Event Rate around 100.	
59.	標準粒子の 5000 Event data を Record する。 Record 5000 Event data of standard particle.	
60.	Tube を Unload する。 Unload of the Tube.	

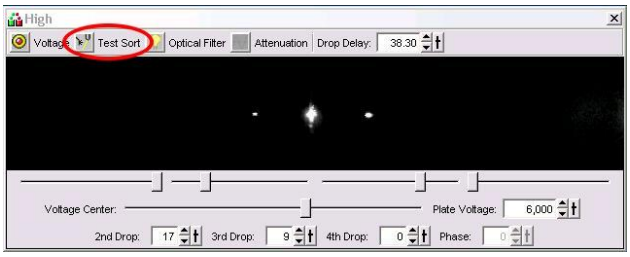
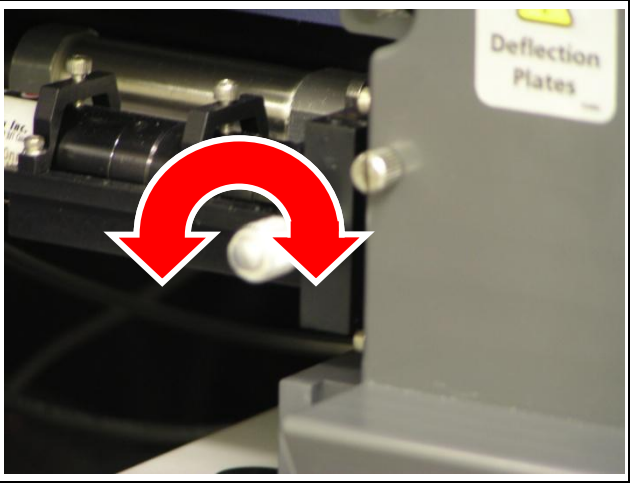
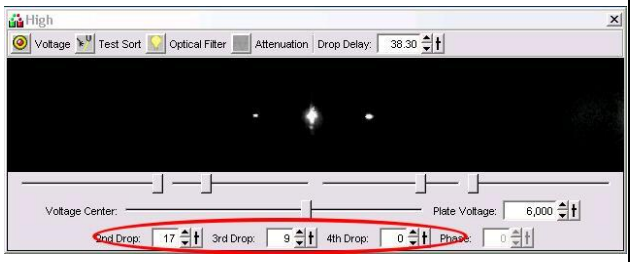
61.	データを印刷する。 Print out the data.	
62.	Drop Delay folder→Drop Delay Experiment → Specimen の順に開く。 ※予め Drop Delay の Sheet 等は作成してあるものとして説明しています。 Open “Drop Delay folder”→ “Drop Delay Experiment” → “Specimen” ※Describe as Drop Delay Sheet is already made.	
63.	Specimen の[＋]をクリックし Tube を表示し、 をクリックし にする。 Click [＋] at Specimen and display Tube. Then click and change to .	
64.	Global Worksheets の[＋]をクリック。 Drop Delay の[＋]をクリック。 Sort Layout をダブルクリックする。 Click [＋] of the Global Worksheets, and click [＋] of the Drop Delay. Then double-click the Sort Layout.	

65.	表示された Sort Layout の Device が[2 Tube]であることを確認し、Precision の Pull down Menu より Initial を選択する。 Select “2 Tube” from Device type. Select “Initial” from Precision.	
66.	Target Events の Pull down Menu より Continuous を選択する。 Select “Continuous” from Target Events.	
67.	Left sort window に右 click し[Add]で NOT (P1)を選択する。 Right click on Left sort window and select NOT (P1) of “Add”.	
68.	Instrument window より、Laser Tab を選択し、Window Extension の設定値を 0.000 に変更する。 Select Laser tab of Instrument window. Change the Window Extension parameter of Instrument window from “2.000” to “0.000”	

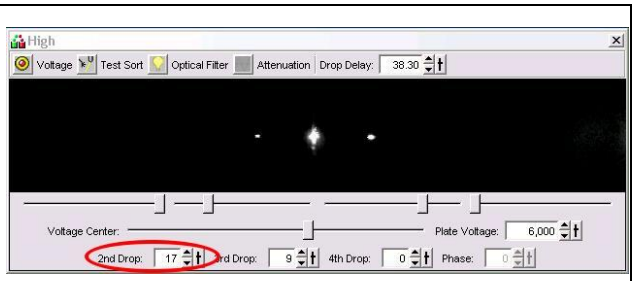
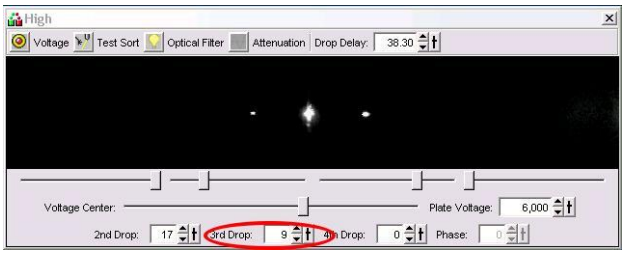
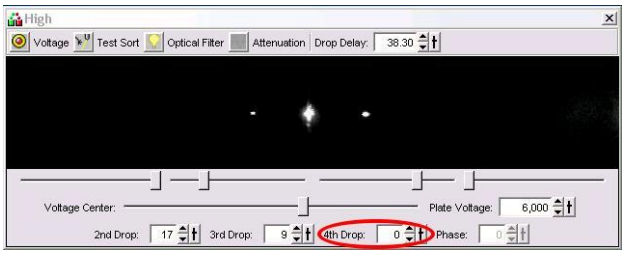
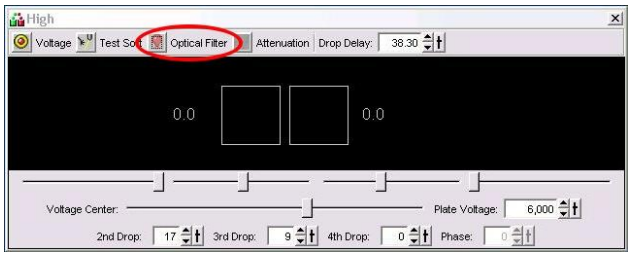
69.	Tube に FACSFlow を 0.5ml 取り、Accudrop beads を 1 滴入れ攪拌する。 Take the FACSFlow about 0.5ml to Tube. And adds one drop the “Accudrop beads” and stir.	
70.	Tube を Tube holder に Set し、Load button を押し測定を開始する。 Set the Tube on the Tube holder. Then press the Load button and start measurement.	
71.	流速が 5,000/events/sec 前後になるよう Acquisition Controls window の Flow Rate を 1.0～5.0 の範囲で調整する。 Flow speed is around 5,000 [events/sec]. Adjust Flow Rate of Acquisition Controls window between 1.0 and 5.0.	

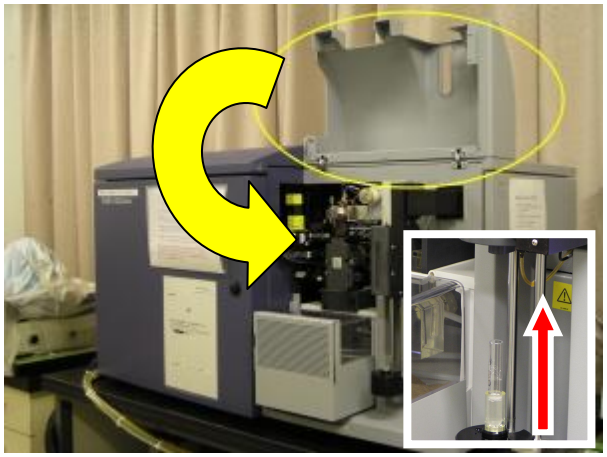
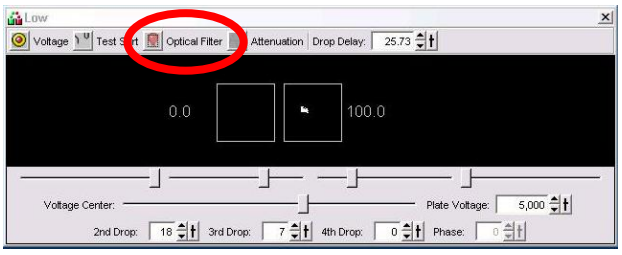
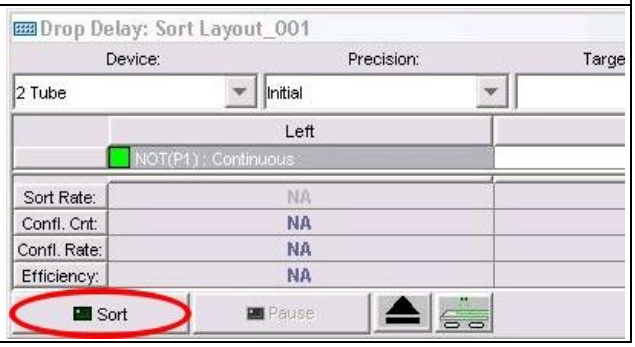
72.	Instrument window の Parameter Tab を選択し、Beads が plot 上に作成した population に入らないよう FSC と SSC の検出器電圧を調整する。 See dot plot data. When population area has beads data, adjust detector voltage of FSC and SSC. If population area does not have beads data, it is OK.	
73.	Beads Tube を Unload する。 Unload the Beads Tube.	
74.	Flow cell access door を開ける。 Open the Flow cell access door.	
75.	Sort Control window にある Voltage button を on にして偏向板に電圧をかける。 Turn on the Voltage.	

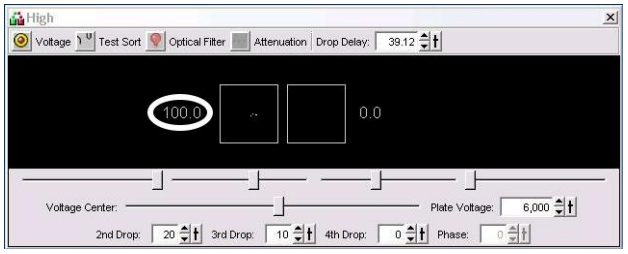
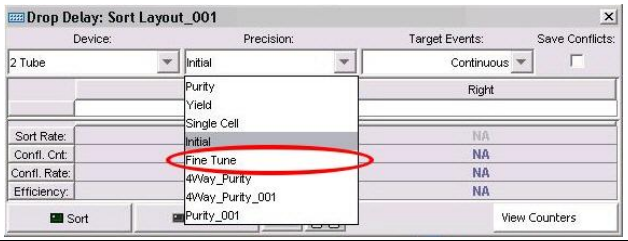
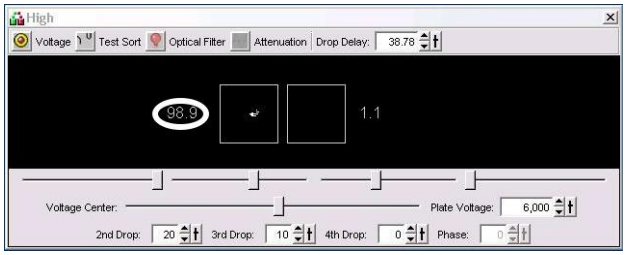
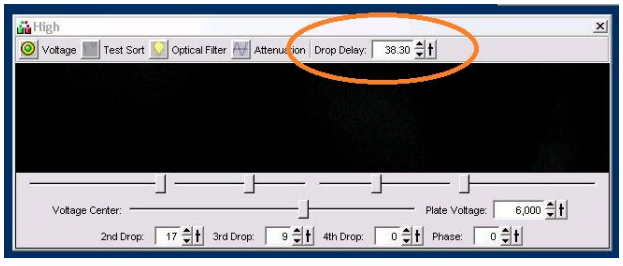
76.	Center Stream が左右に変動する場合は Voltage Center の slider で Center Stream の位置調整を行う。 When the position of "center stream" moves, it adjusts right position by using "Voltage Center slider".	
77.	Sort Control window にある Voltage button を off にして偏向板の電圧を切る。 Turn off Voltage.	
78.	Side Stream の 4 つある slider のうち、①と④の slider は中心に寄せ、外側の Side Stream を切る。 No.1 and No.4 slider move to the center. (Cut the outside of Side Stream.)	
79.	②と③の slider は、中心から 1/3 程度に調整する。 No.2 and No.3 slider set around 1/3 from the center.	
80.	Sort Control window にある Voltage button を on にして偏向板に電圧をかける。 Turn on Voltage.	

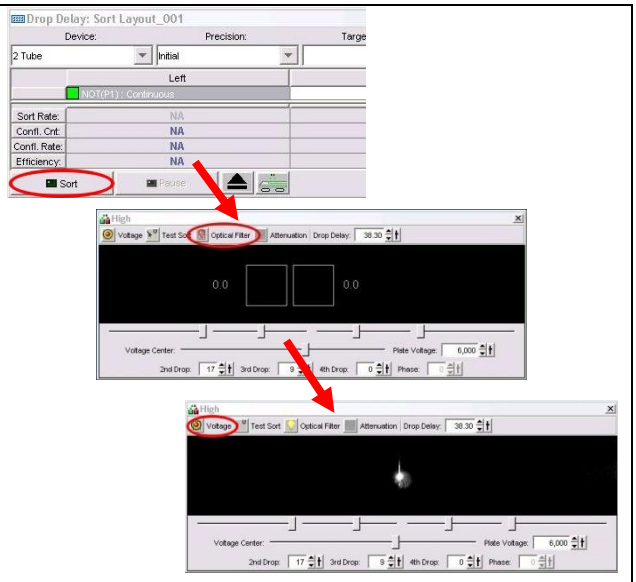
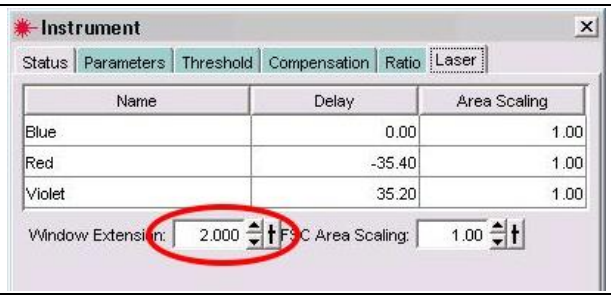
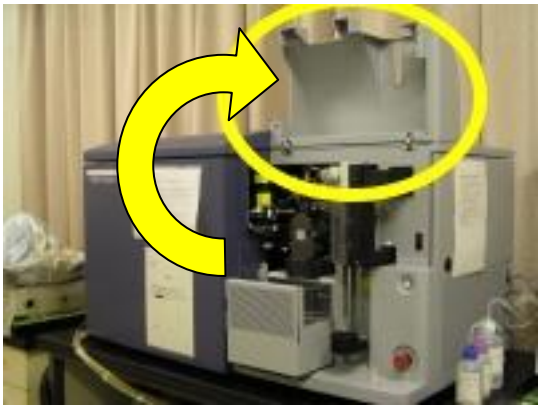
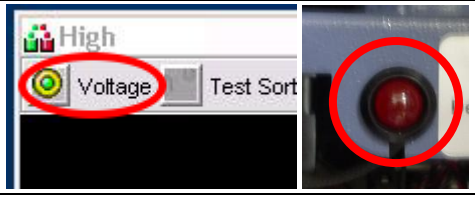
81.	Test Sort Button を on にし、Side Stream を生成する。Sort Block Door を開け、Side Stream が壁面等に当たっていないか確認し、Sort Block Door を閉める。 ※Side Stream が乱れている時は、Manual を参照のこと。 --- Turn on the test sort, and make two Side Stream.Open the Sort Block Door, and check Side Stream is not touch to inside of Sort Block.Then close Sort Block Door. ※Refer to the Manual, when Side Stream is disarray.	
82.	Monitor の Stream が暗い場合は、Diode Laser を微調整する。 --- When Monitor picture is dark, adjust Diode Laser.	
83.	Center Stream に広がりがある場合は、2nd、3rd、4th Drop を初期値に戻す。 --- When Center Stream has spread, 2nd, 3rd and 4th Drop restores to default. [Default Setting]	

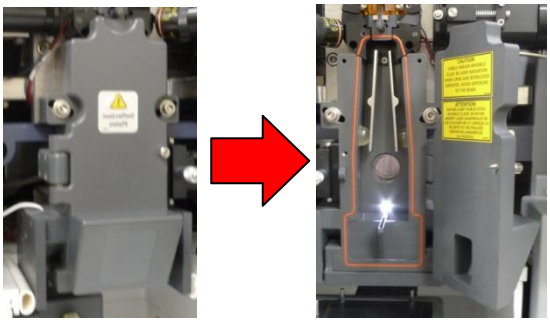
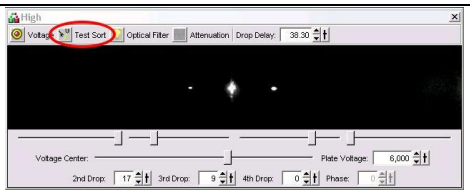
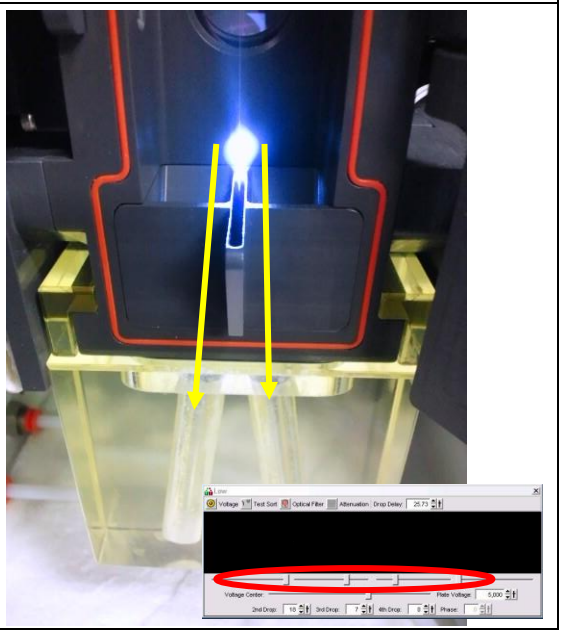
Setting	High	Medium	Low
2nd Drop	20	20	10
3rd Drop	10	10	5
4th Drop	0	0	0

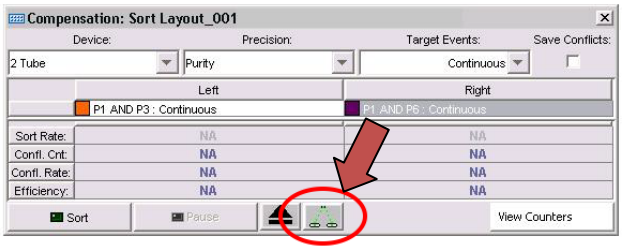
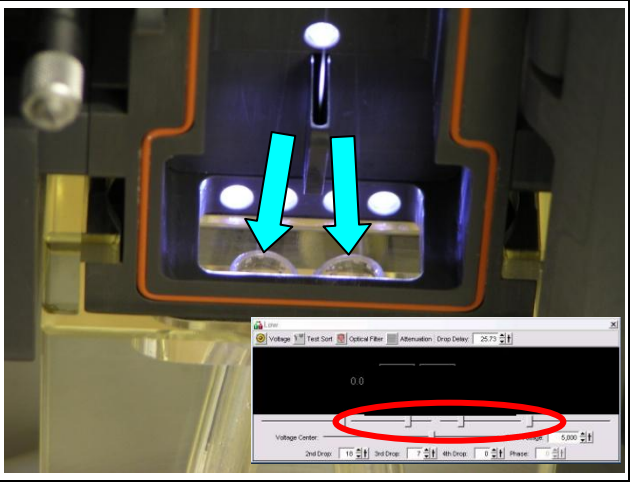
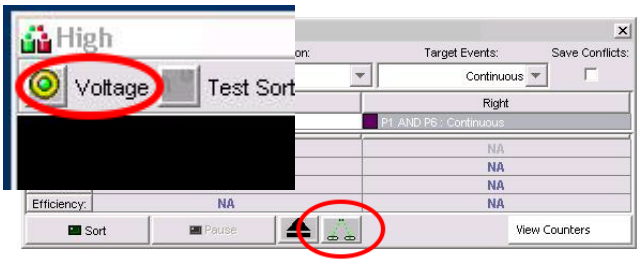
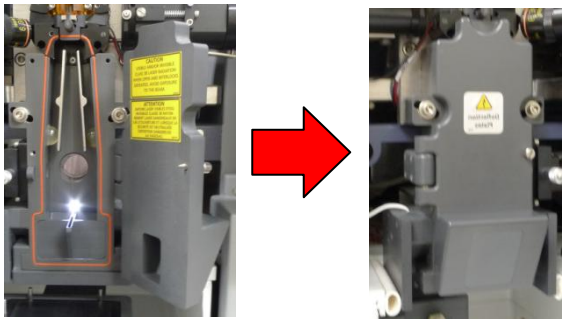
84.	2nd Drop の値を初期値から 10 前後の幅で動かし、Center Stream が最も細くなる位置に設定する。 Adjust 2nd Drop parameter from between default to around 10, and find Center stream become the sharp position.	
85.	3rd Drop の値を初期値から 10 前後の幅で動かし設定する。 Adjust 3rd Drop parameter from between default to around 10, and find Center stream become the sharp position.	
86.	必要に応じ、4th Drop の値を初期値から 10 前後の幅で動かし設定する。 As necessary, Adjust 4th Drop parameter from between default to around 10, and find Center stream become the sharp position.	
87.	Center と left Stream が均等な明るさになったら、Optical Filter を On にし、散乱光が入らない(0.0 になる)ことを確認する。 Optical Filter を off にする。Test Sort を off にする。 When center stream and left stream become same luminance, switch on Optical Filter. And Check the number on both sides becomes (0.0).Switch off Optical Filter and Test Sort.	

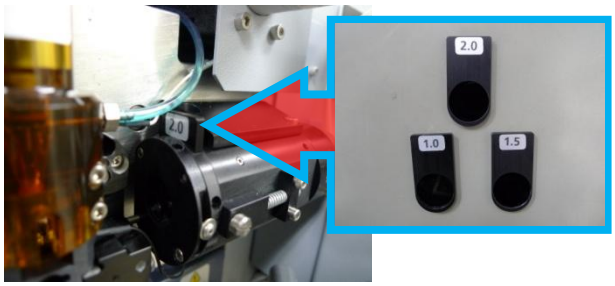
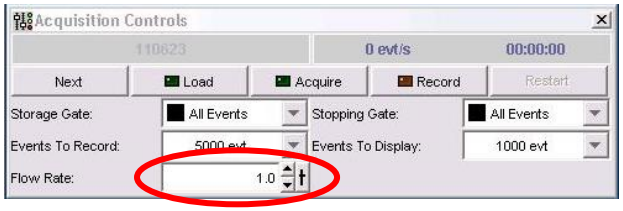
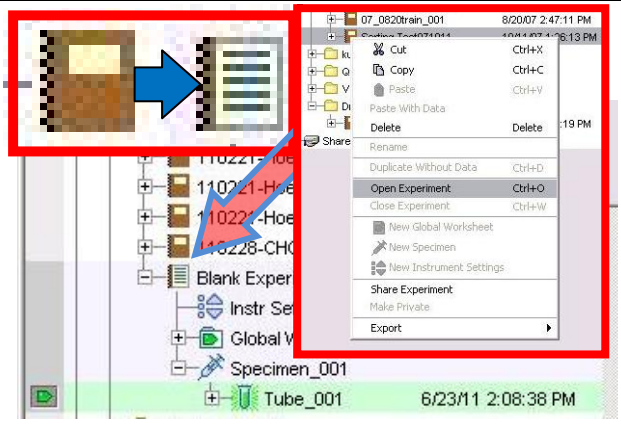
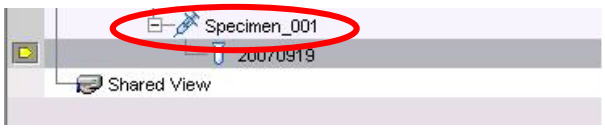
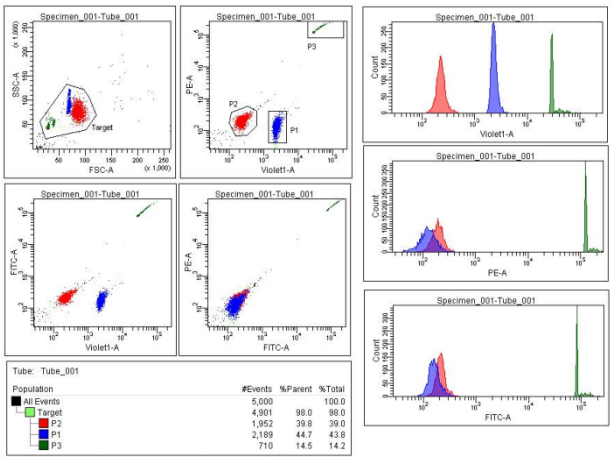
88.	Flow cell access door を閉じ、Accudrop Beads を Load する。 Close Flow cell access door and load Accudrop Beads.	
89.	流速が 5,000 events/sec 前後になるよう Acquisition Controls window の Flow Rate を 1.0～5.0 の範囲で調整する。 Flow speed is around 5,000 [events/sec]. Adjust Flow Rate of Acquisition Controls window between 1.0 and 5.0.	
90.	Optical Filter を On にし、Accudrop 用の蛍光 filter に切り替える。 Switch on Optical Filter. Change to fluorescence filter for AccuDrop.	
91.	Sort Layout の Sort Button を Click すると、目的集団の Sorting が開始される。 Click Sort Button of Sort Layout. Sorting of purpose group is started.	

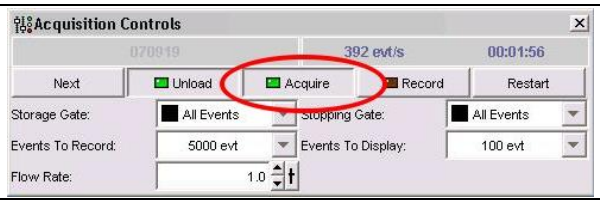
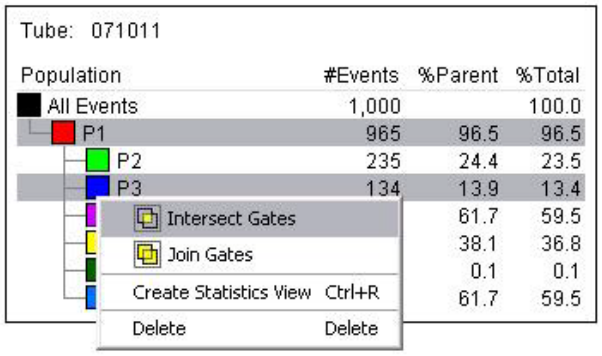
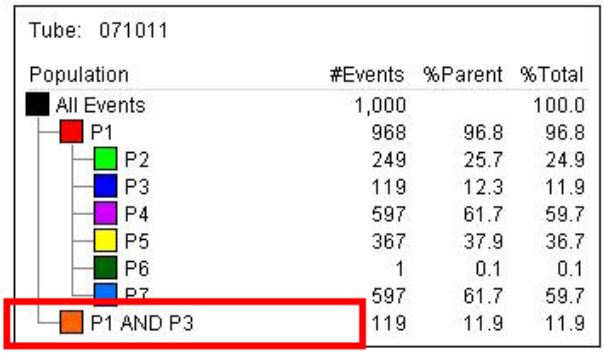
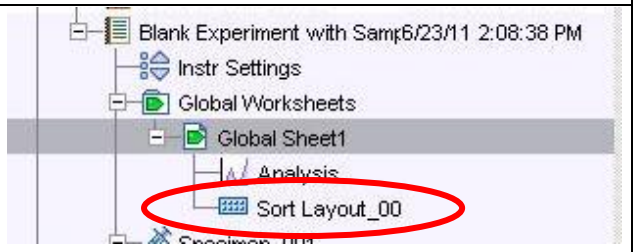
<table>
<tr>
<td>92.</td>
<td>ソートチャンバーの Shutter を開くか確認 Dialog が表示されるので、[Cancel]を click する。
Message dialog ask “Open shutter of sort chamber”. Click [Cancel].</td>
<td>
</td>
</tr>
<tr>
<td>93.</td>
<td>Sort Control Window を確認しながら、左側の Sort Gate の%が 100%になるように、Drop Delay の値を調整する。
Adjust the Drop Delay parameter and the number on left sides becomes 100.
[Defaults Setting]
<table>
<tr><th>Setting</th><th>High</th><th>Medium</th><th>Low</th></tr>
<tr><td>Drop Delay</td><td>44.00</td><td>45.00</td><td>29.00</td></tr>
</table></td>
<td>
</td>
</tr>
<tr>
<td>94.</td>
<td>Initial Mode での設定終了後、Sort Layout の Precision を Fine Tune に切り替える。
Change mode from Initial to Fine Tune.</td>
<td>
</td>
</tr>
<tr>
<td>95.</td>
<td>Fine Tune Mode において、Left Sort の Spot が 90%以上で最大になるよう Drop Delay を調整する。
Adjust the Drop Delay parameter and the number on left sides becomes 90 over.</td>
<td>
</td>
</tr>
<tr>
<td>96.</td>
<td>Drop Delay を設定値の前後 5click 分位の幅で動かし、設定値の変動を確認する。
Check the moving of parameter.
(Around up and down 5 click of Drop Delay parameter.)</td>
<td>
</td>
</tr>
</table>

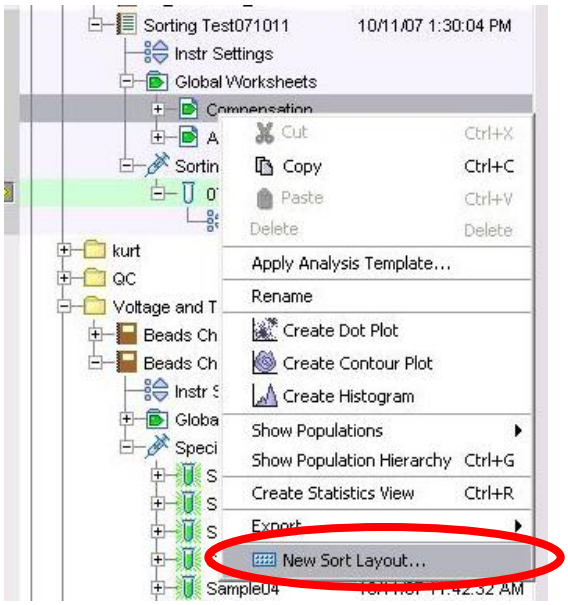
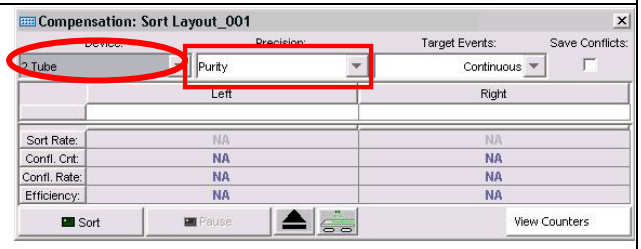
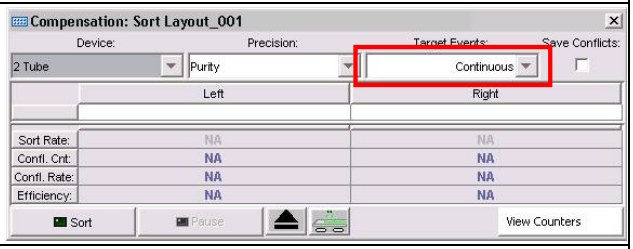
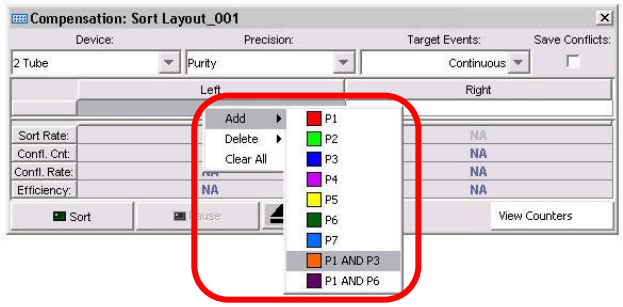
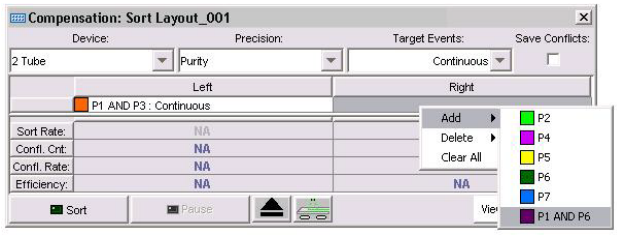
97.	Sort を停止し、Optical Filter、Voltage を off にし、Tube を Unload する。 --- Stop the Test Sort, and turn off Optical Filter and Voltage. Then Unload Tube.	
98.	Instrument window の Laser Tab を Click し Window Extension を初期値の 2.000 に戻す。 --- Select Laser tab of Instrument window. Change the Window Extension parameter of Instrument window from “0.000” to “2.000”	
99.	Flow cell access door を開ける。 --- Open the Flow cell access door.	
100.	Sort Control Window の Voltage Button が **<u>off であること</u>**を確認する。 --- Check the Voltage off.	

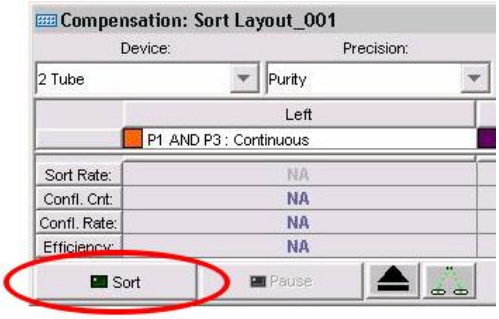
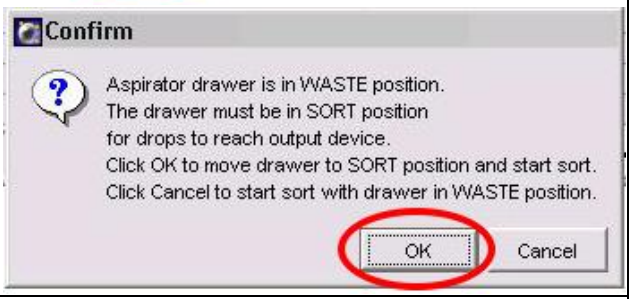
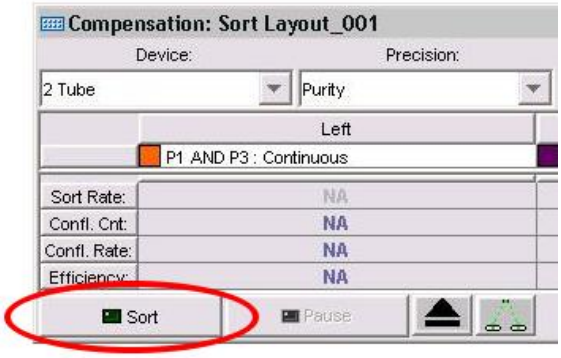
101.	Sort Collection Device に Tube をセットし、Sort block に取り付ける。 Tube is set in the Sort Collection Device, and it inserts it in the Sort block.	
102.	Sort block を開き、Center Stream の位置を再確認する。 Open the Sort block, and check position of the Center Stream again.	
103.	Voltage を on にする。 Turn on Voltage.	
104.	Test Sort Button を click し、Side stream を出す。 Click the Test Sort Button and take side stream.	
105.	Sample Tube に Stream が入るよう slider を調整する。 Adjust slider for Stream get into the Sample Tube.	

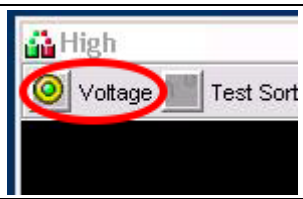
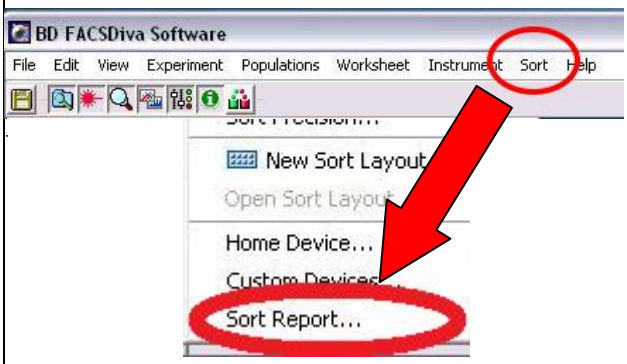
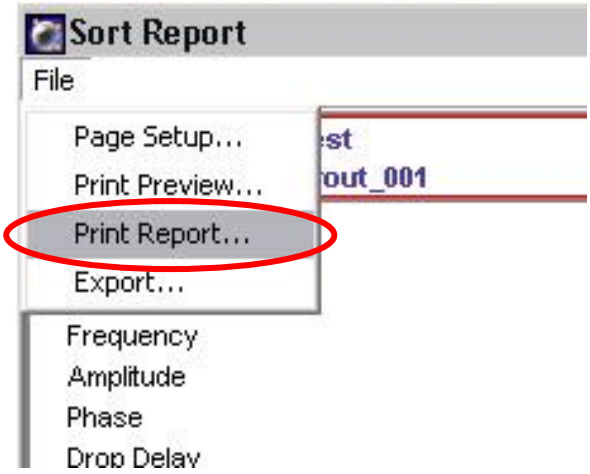
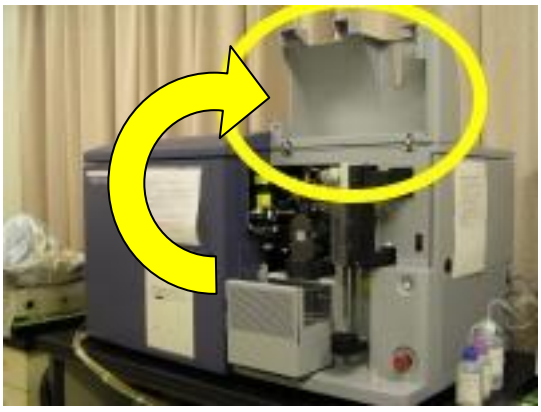
106.	Sort Layout より、Aspirator Drawer button を click して Drawer を開く。 Click the Aspirator Drawer button and open the Drawer of the Sort Layout.	
107.	Sample Tube に Stream が入るよう slider を微調整する。 Fine tuning of slider for Stream get into the Sample Tube.	
108.	調整後、Test Sort と Voltage を OFF にしてソートチャンバーを閉じる。 After adjustment, turn off the Test Sort and Voltage. Then close sort chamber.	
109.	Sort Block Door を閉じる。 Close the Sort Block.	
110.	QC and Drop Delay Set Up 終了。 Complete QC and Drop Delay Set Up.	

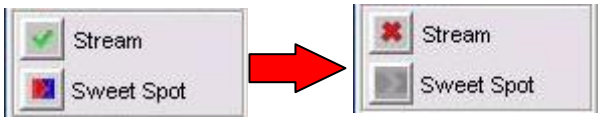
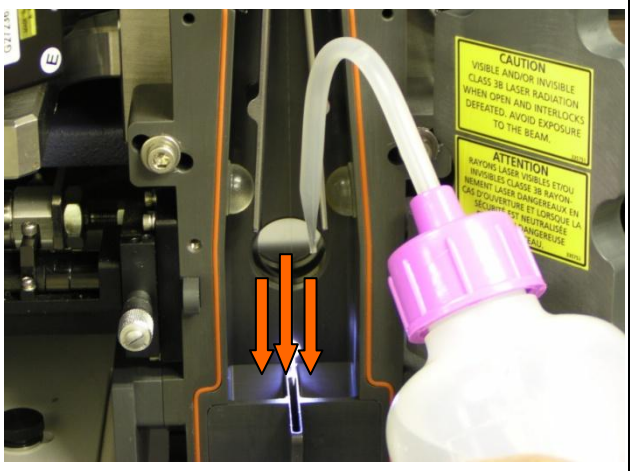
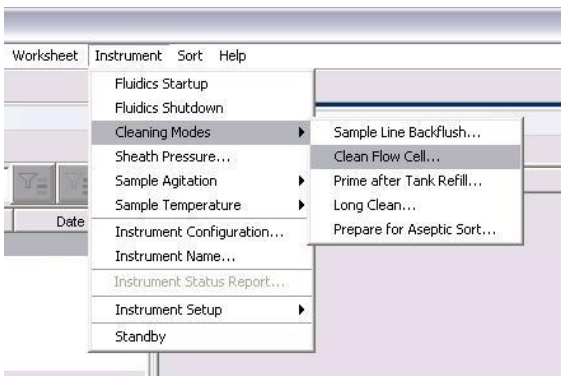
111.	測定する細胞のサイズにあわせて filter を交換する。 Exchanges the filter for a suitable the best filter for the cell.	
112.	Flow Rate が 1.0 であることを確認する。 Check the Flow Rate is 1.0.	
113.	Browser Menu より目的の Experiment を選択し、右 Click で Menu を開き、Open Experiment を選択する。 Select use Experiment, and open menu with right click. Then select Open Experiment.	
114.	Specimen の[＋]をクリックし Tube を表示し、 をクリックし にする。 Click [＋] of Specimen and display Tube. Then click and change to .	
115.	Sample を Load し解析 pattern を確認する。 ※Sorting の例を示す。Gate 等は Sample に合わせて掛けること。 Load Sample and check analysis pattern. ※This is example. Make the gate according to your purpose.	

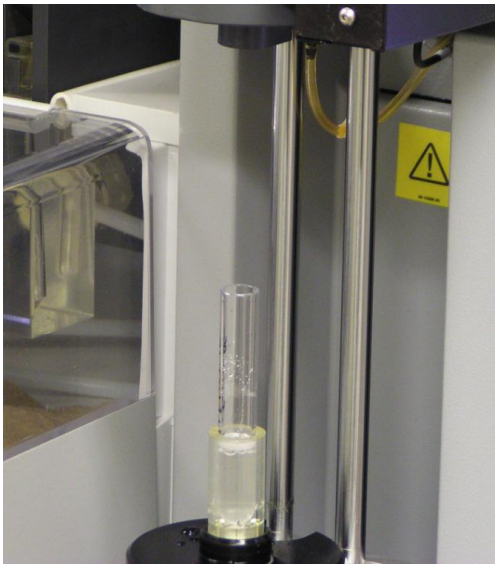
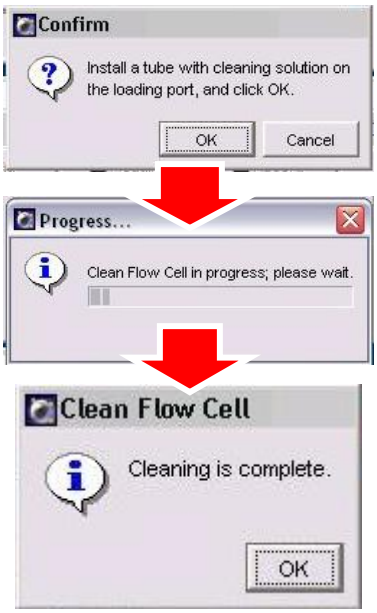
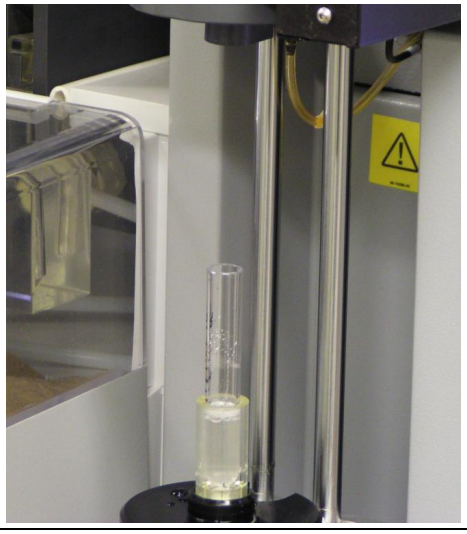
116.	Sample の吸引を[Acquire]で停止。 Taking of sample is stopped temporarily by “Acquire”.	
※	[AND Gate の作り方] Population Hierarchy より P1 を選択後、Ctrl Key を押しながら P3 を選択する。 Menu が表示されるので、Intersect gates を選択すると、P1 AND P3 の Gate が設定される。 [How to make AND GATE] Select P1 from Population Hierarchy, hold Ctrl Key and select P3. Select Intersect gates, P1 AND P3 Gate are set.	 
117.	Global Worksheets の[＋]をクリック。 Drop Delay の[＋]をクリック。 Sort Layout をダブルクリックする。 Click [＋] of the Global Worksheets, and click [＋] of the Drop Delay. Then double-click the Sort Layout.	

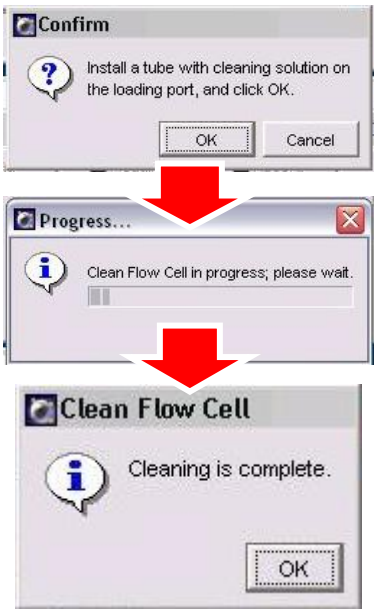
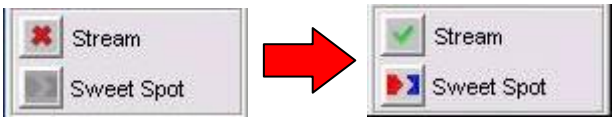
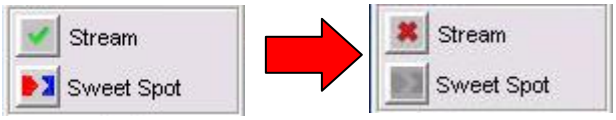
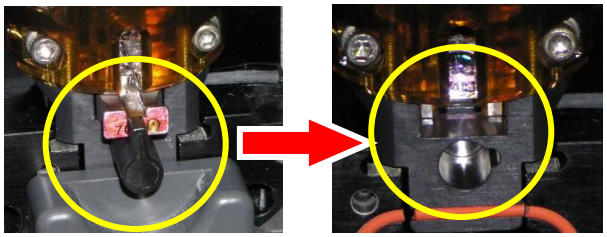
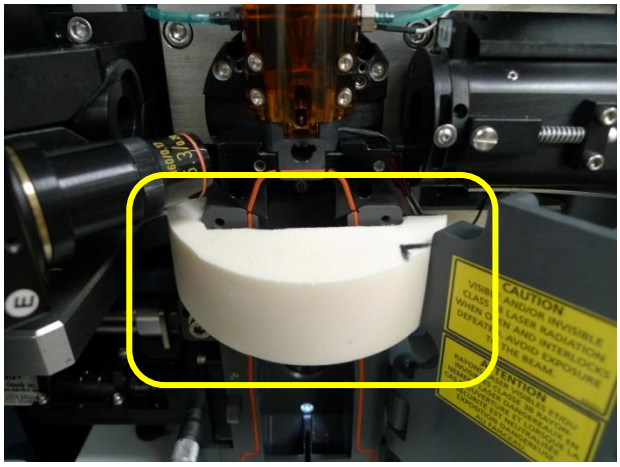
※	[Sort Layout の作り方] Menu より New Sort Layout を選択する。 --- [How to make Sort Layout] Select New Sort Layout from Menu, if Sort Layout is not made.	
118.	表示された Sort Layout の Device が[2 Tube]であることを確認し、Sort Layout の Precision Menu より Purity を選択する。 --- Check the Device of parameter. Select Purity from Precision Menu at Sort Layout.	
119.	Target Events から、Continuous または分取したい数を設定する。 --- Select parameter of the Target Events. Continuous or input events.	
120.	Sort Window を click し、Add で Sorting をしたい gate を設定する。 --- Right click on Left and Right sort window and select the Target Gate of “Add”.	 

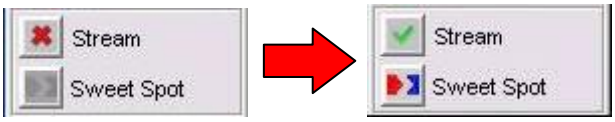
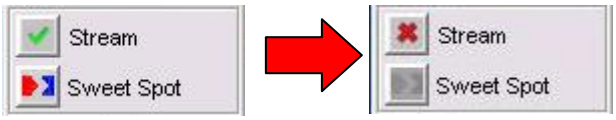
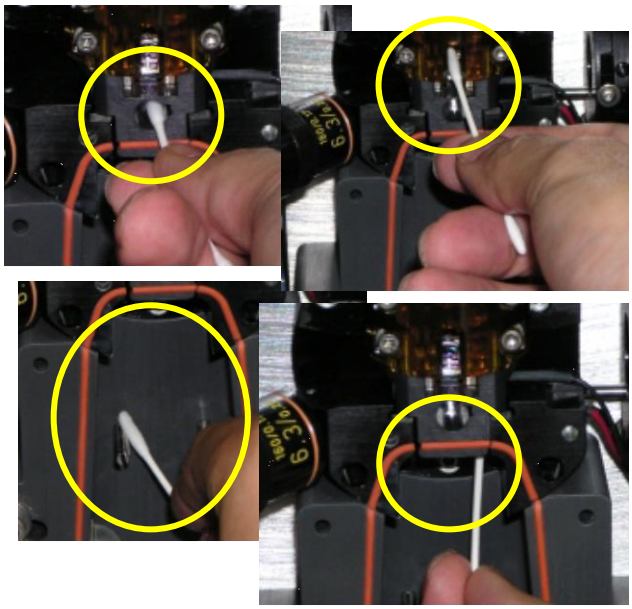
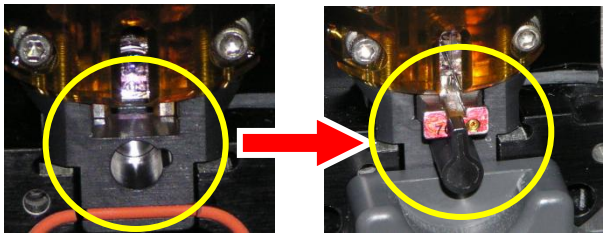
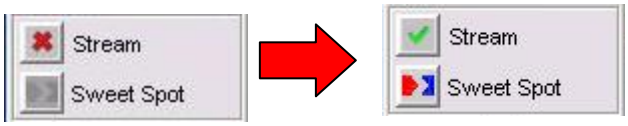
121.	Sort Device の Tube を回収用のに交換する。 Change Sort Device Tube with recovery one.	
122.	Sample を Load し、Voltage を on にする。 Load Sample, and turn on Voltage.	
123.	Sort Layout より Sort Button を Click し、Drawer の開閉確認 Dialog が表示されたら OK を選択する。 Click Sort button at Sort Layout. Then display Confirm Dialog of Drawer, click OK.	 
124.	目的の beads(細胞)個数まで Sorting を行う。 Sort beads up to desired number.	
125.	Sort Button を Click し Sort を終了する。 ※回収する細胞数を指定してある場合は自動で止まる。 Click Sort button, and quit. ※ When Target Events is seated number, automatic stop.	

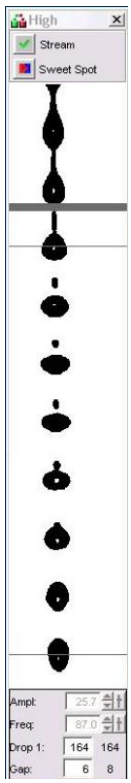
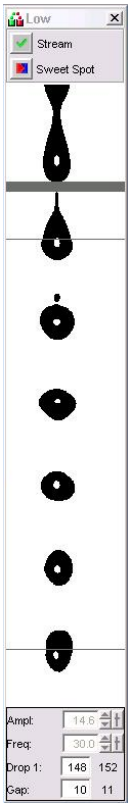
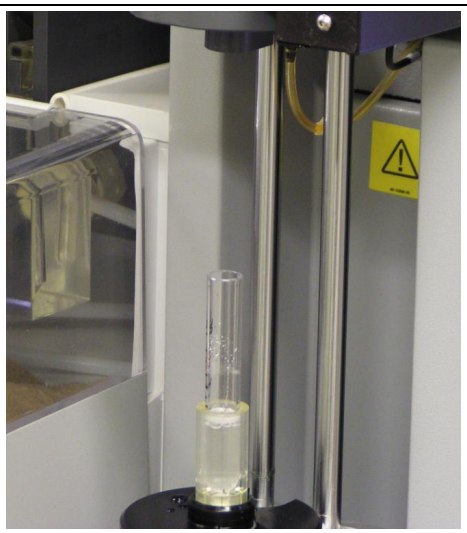
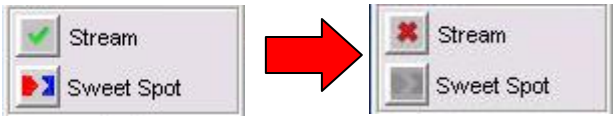
126.	Voltage を off にして、Tube を Unload する。 Turn off Voltage, and Unload Tube.	
127.	Sort Menu より、Sort Report を選択し Report を表示する。 Select Sort Report from Sort menu, and display Report Window.	
128.	Sort report の File Menu より Print Report を選択し、Sorting の結果を印刷する。 Print out the Sorting data.	
129.	実験が終わるまで繰り返す。(121-128) Repeat till end of the experiment.(121-128)	
130.	Flow cell access door を開ける。 Open the Flow cell access door.	

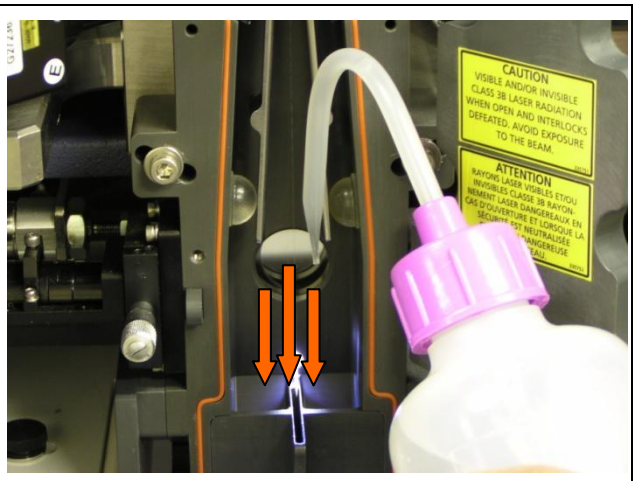
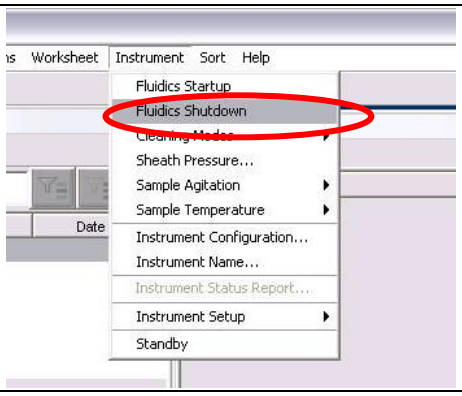
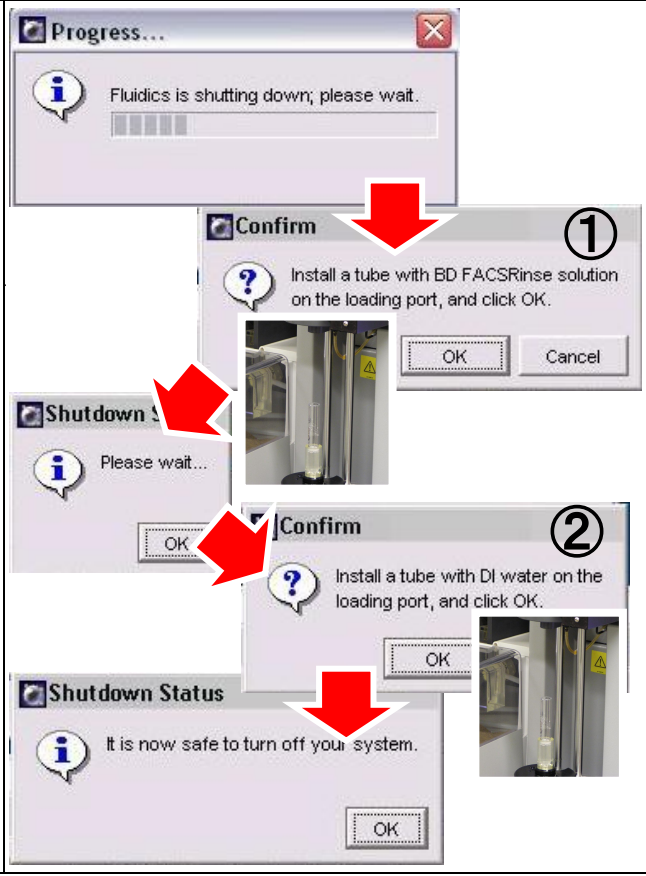
131.	レーザー電源を切る。 --- Turn off the Laser Power.	
132.	Fluidics control window の[Stream]を click し送液を停止する。 --- Click [Stream] on Fluidics control window. And stop solution sending.	
133.	Sort Block Door を開き、FACSRince を 10ml、DI を 10ml 吸引させ、アスピレーターを Cleaning する。 --- Open the Sort Block Door. Then take the FACSRince 10ml and DI water 10ml. And clean the aspirator.	
134.	[Instrument]→[Cleaning Modes]→[Clean Flow cell]を選択する。 --- Select [Instrument]→[Cleaning Modes] → [Clean Flow cell].	

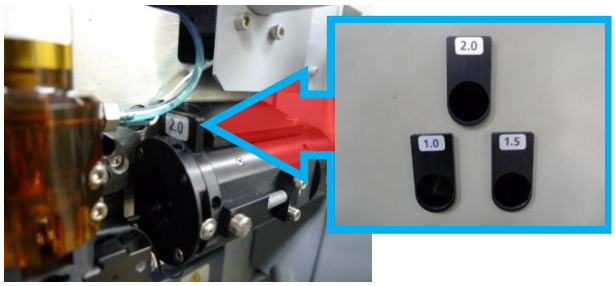
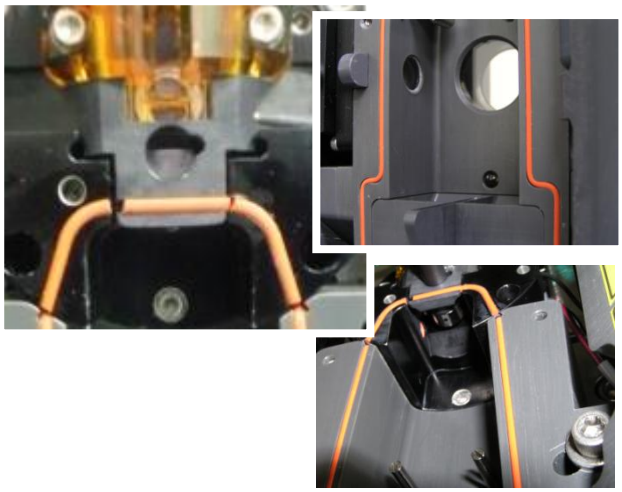
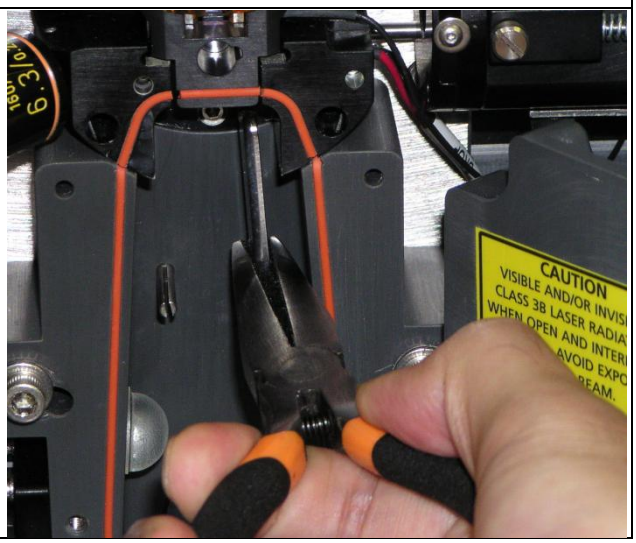
135.	FACSRince(1ml 程度)を Set する。 FACSRince(about 1mL) tube set on the Tube holder.	
136.	FACSRince(1ml 程度)を 3 回行い、5～10 分待つ。 Clean with FACSRince (about 1ml) 3 times, and wait for 5 to 10 minutes.	
137.	DI Water (1ml 程度)を Set する。 DI Water(about 1mL) tube set on the Tube holder.	

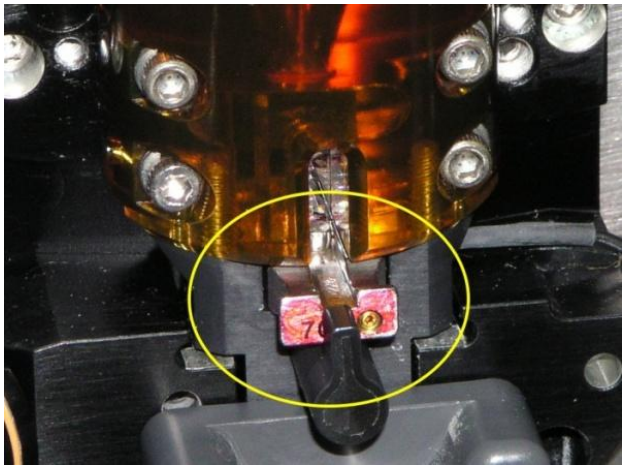
138.	DI を 3 回行う。 Clean with DI water 3 times.	
139.	Fluidics control window の stream を click し、送液を約 1 分行う。 Click [Stream] on Fluidics control window. And run solution sending about 1 minute.	
140.	Stream を止める。 Stop the stream	
141.	Nozzle、stopper、電極板を外す。 Remove the Nozzle, Stopper and Electrode board.	
142.	ミスト防止具を Sort Block Door に挟むようにして取り付ける。 Attach mist guard between Sort Block Door.	

143.	Nozzle を外した状態で再度送液を 30sec 行う。 And run solution sending again for 30 seconds with Nozzle removed.	
144.	Stream を止める。 Stop the stream	
145.	Nozzle 穴、Stopper 穴、電極周辺及び Camera Window を Cleaning する。 (濡れた綿棒→乾いた綿棒) Clean Nozzle hole, Stopper hole, Electrode ports, and camera window with wet swab. Then dry them with new dry swab.	
146.	Nozzle, stopper を取り付ける。 Set the Nozzle and stopper.	
147.	Fluidics control window の[Stream]を click し送液を開始する。 Click [Stream] on Fluidics control window. And start solution sending.	

148.	Nozzle を取り付け Stream の状態を確認し、正常にドロップが作成されたら正常に Cleaning された。 Attach Nozzle and check Stream condition. If the drop is made normally, cleaning is finished the right way.	 70μNozzle Height  100μNozzle Low
149.	DI 4ml を Set し、Acquisition control の Load を実施し、1min 程 sample line を Cleaning した後、Unload する。 Load 4ml DI water. Clean sample line about 1 minute and unload.	
150.	Stream を止める。 Stop the stream	

151.	アスピレーターに DI を 10ml 吸引させ、Cleaning する。 Take DI water 10ml to the aspirator and clean it.	
152.	[Instrument]→[Fluidics Shutdown]を選択する。 Select [Instrument]→[Fluidics Shutdown].	
153.	表示される指示に従い、Shutdown 処理が終わるまで待つ。 ① FACSRinse を folder に set し[OK]を click ② DI water Please wait until Shutdown Status is terminated. ① Install a tube with BD FACSRince solution on the loading port. ② Install a tube with DI water solution on the loading port.	

154.	filter を 1.0 に戻す。 --- 1.5 or 2.0 Filter is returned to 1.0 Filter.	
155.	濡れているところがないか再度確認し、濡れていたら拭き取る。 --- Check inside of the sort block again. When inside is wet, wipe.	
156.	電極板などを戻す。 --- Return to the Electrode plate.	

157.	Nozzle を Dummy Nozzle に交換する。 Change to Dummy Nozzle.	
158.	FACSDiva Software を終了する。 Exit FACSDiva Software.	
159.	Windows XP を終了する。 Exit Windows XP and shut down the computer.	
160.	FACSAria の電源を切る。 Turn off the FACSAria System.	

※次に使うユーザーのために、必ず廃液を処分し、廃液タンクを空

にしてください。

※Please make sure to treat waste liquid.

And empty the waste tank for the next user.

著　　者：研究基盤センター研究基盤技術部放射線発生装置技術開発課
前田　武、高野　裕之
英　　訳：研究基盤センター研究基盤技術部放射線発生装置技術開発課
小澤　美絵
英文監修：研究基盤センター研究基盤技術部放射線発生装置技術開発課
小西　輝昭

2007/09/18 作成
2010/06/10 一訂
2010/07/07 二訂
2011/07/01 三訂
2012/01/24 四訂

作成協力：重粒子医科学センター先端粒子線生物研究プログラム
転移機構解析研究チーム
中村　悦子、下川　卓志

著作権：独立行政法人放射線医学総合研究所
研究基盤センター研究基盤技術部放射線発生装置技術開発課
Team FACS (E-Mai: team-facs@nirs.go.jp)

[Writer]
Radiation Engineering and Technical Support section
Department of Technical Support and Development Research
Development and Support Center
Takeshi Maeda, Hiroyuki Takano
[English translation]
Radiation Engineering and Technical Support section
Department of Technical Support and Development Research
Development and Support Center
Mie Ozawa
[English supervision]
Radiation Engineering and Technical Support section
Department of Technical Support and Development Research
Development and Support Center
Teruaki Konishi

Alpha Edition 18.Sep.2007
Beta Revision 10.Jun.2010
RC Revision 07.Jul.2010
Fast Revision 01.Jul.2011

[Special Thanks]
Cancer Metastasis Research Team
Advanced Radiation Biology Research Program
Research Center for Charged Particle Therapy
Etsuko Nakamura
Takashi Shimokawa

[Copy Right]
Radiation Engineering and Technical Support section
Department of Technical Support and Development Research
Development and Support Center
National Institute of Radiological Sciences
Team FACS
(E-Mail: team-facs@nirs.go.jp)

～平成 23 年度　共用施設（PASTA&SPICE, NASBEE）共同研究成果報告会の開催及び成果報告書の掲載の中止について～

独立行政法人 放射線医学総合研究所が所有する静電加速器施設として、静電加速器棟及び低線量影響実験棟に設置されている、PASTA（PIXE 分析装置：PIXE Analysis system and Tandem Accelerator facility）、SPICE（マイクロビーム細胞照射装置：Single Particle Irradiation system to Cell）（図 1）及び NASBEE（中性子線発生用加速器システム：Neutron Exposure Accelerator System for Biological Effect Experiment）がある。これら施設は、ユニークな加速器装置を有する施設であり、共用施設として日本国内だけではなく、海外の研究機関からも利用されている。そのため、平成 23 年度技術報告書より、共用施設として運営を開始して静電加速器棟の PASTA と低線量棟の NASBEE、また共用施設に準じて運営を開始しているマイクロビーム細胞照射装置 SPICE について、課題募集・採択・マシンタイムの提供といった施設運営を本格的に開始した。しかしながら、平成 22 年度末（2011 年 3 月 11 日）に発生した、東日本大震災にて多大な被害を受けた。その為、PASTA 及び SPICE においては 2011 年度のマシンタイム全てが提供できなくなり、NASBEE においては上半期のマシンタイム提供が出来無い状況に陥った。

これらの理由により、共用施設（PASTA&SPICE, NASBEE）共同研究成果報告会の開催及び成果報告書の掲載の中止としたため、今年度技術報告書への掲載を取りやめることとした。以下に被害状況及び復旧工程について簡単に図 1、図 2 及び表 1 にまとめた。また、これら施設の復旧の工程は図 2 に工程表を記載した。今回発生した、東日本大震災は M9.0（マグニチュード）という、日本観測史上最大の地震であり、長時間の揺れが続いた。その為、通常では耐えられる筈の、様々な機構が損害を受けた。今回のような地震による震災は滅多に起こり得るものではないが、万が一、同等程度の地震があっても、同様の損害を蒙らないよう、装置の固定や強度の増強などを最良と思われる方法で工夫を行いつつ、且つ、短時間で実施した。これらの詳細については、別途、技術報告書として報告する。

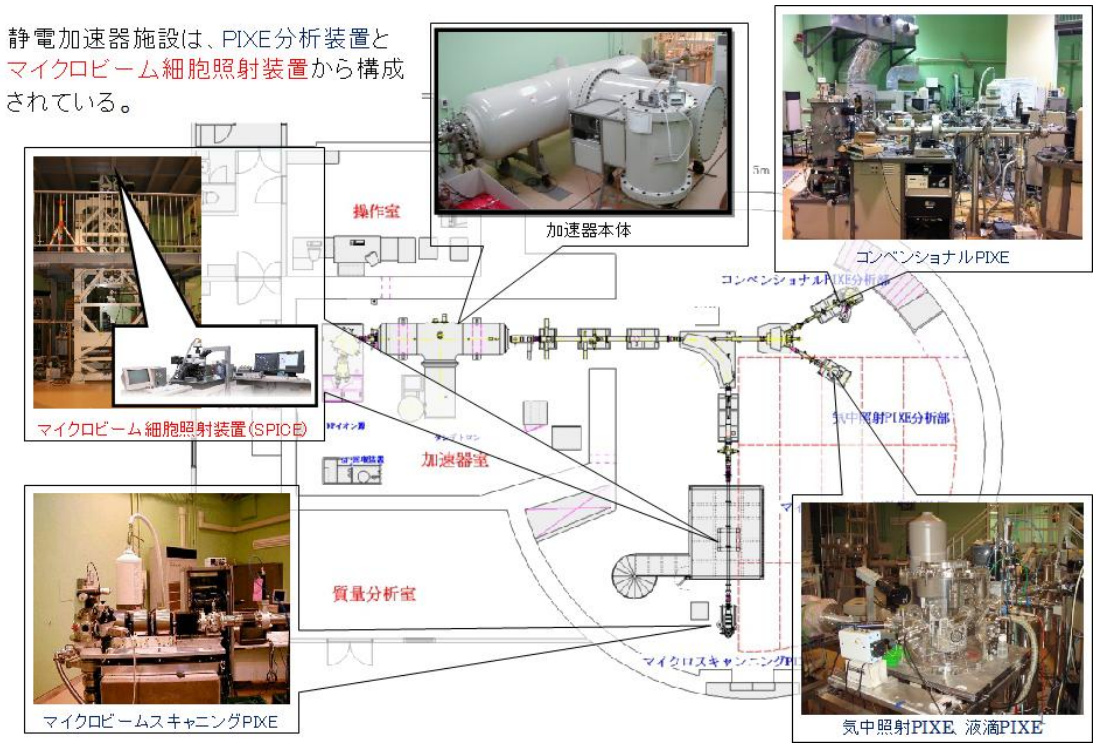


図 1 静電加速器棟 PASTA&SPICE における被害状況の概要。すべてのビームに被害が生じた。

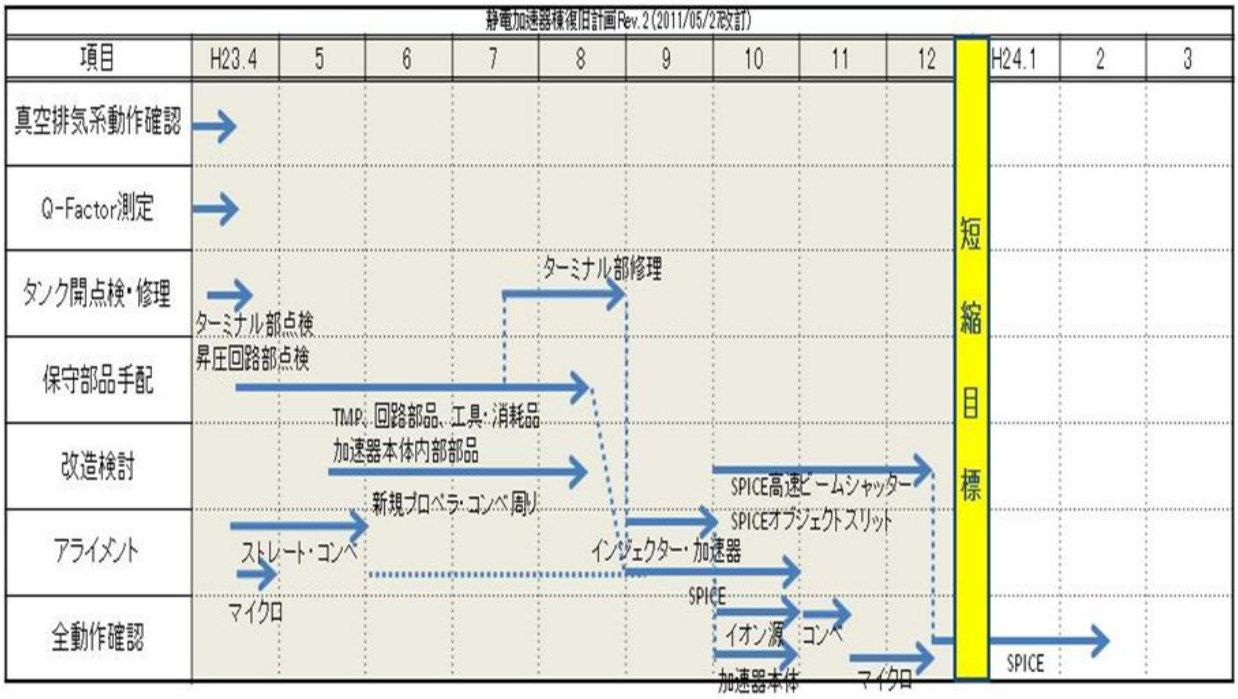


図 2　復旧の工程表

表 1 主要部分の破損状況

対象	基準	ズレの場所及び大きさ
加速器本体	0° ビームラインに設置したトランシットを用いて変位を確認。	・加速管上流部：垂直及び水平方向共に 0.5mm ・加速管下流部 : 垂直方向 2.5mm、水平方向 3.0mm
コンベンショナルビームライン	0° ビームラインに設置したトランシットを用いて変位を確認。	・スイッチングマグネット[1]：水平方向 8mm(Max)
マイクロ PIXE ビームライン	90° ビームラインに設置したトランシットを用いて変位を確認。	・90° 分析電磁石及びエネルギー分析スリット部：垂直方向 0.5～2.5mm ・マイクロ PIXE チェンバ(OM-2000 Unit)端末部：2.5mm
マイクロビーム細胞照射装置 SPICE	90° ビームラインに設置したトランシットを用いて変位を確認。	90° 垂直マグネット内のフライトチューブが破損、またマグネットとビームラインの接続部フランジが破損。垂直ビームラインは 90° マグネットに引っ張られたため大きく傾き、ビームラインを支えていた、除振機構の防振ゴムが変形およびビームライン支持体が大きく傾いていた。また、集束マグネット内も大きな力で引っ張られたために破損した。
NASBEE		チラー(chiller)が軸ズレを生じて破損したが、幸いにも加速器本体、加速管等については多大な影響は受けなかった。

編集後記

小西　輝昭
研究基盤センター研究基盤技術部
放射線発生装置技術開発課　研究員
平成 24 年度技術報告書　編集事務局

放射線医学総合研究所 - 技術報告書 -（NIRS Technology）は、1）研究基盤及びそれに関する技術（研究基盤技術）に関わる人たちの技術的活動及び成果を次世代へ正しく伝えるため、2）学術論文等の作成時に有用な技術資料として提供することを第一の目的としました。さらには、3）技術報告書を学術論文等の引用文献として応え得る技術報告書とすることを目標に掲げて創刊されました。（平成 19 年度技術報告書「はじめに」研究基盤技術部長　今関等　記）創刊から今年度技術報告書には、合計 67 報の報告書が投稿・掲載されました。毎年投稿される原稿数に変動があったものの、年 1 回の刊行を実現してきました。投稿原稿の執筆者の方々の職種も様々でした。外部研究機関からの受入研究員の方々からの投稿も多数ありました。他の研究機関を視察した際の報告といったような貴重な資料もありました。また平成 23 年度技術報告書より、共用施設として運営をしている静電加速器利用施設である PIXE、SPICE、NASBEE で採択・マシンタイム配分された利用課題の成果報告書も同報告書にて掲載することになりました。平成 24 年度までの投稿原稿数について職種別、または、課・室・研究基盤センター外で集計し、資料 1 に記載いたしました。

平成 24 年度技術報告書は、今年度で第 7 巻になり、所内だけでなく所外の方々にも閲覧される機会が増えてきました。また放医研の所外ホームページの不定期刊行物一覧から閲覧できるようになりました。そのため、前述した 1）2）の主旨を継続し、3）の目標をより現実にするために、今年度よりアブストラクトを英語にし、学術論文等に引用できるようにしました。または、より多くの方々に技術報告書の主旨をご理解いただくために、投稿原稿に対して査読を 2 名の方に行っていただくこととしました。査読方法については、研究基盤技術部内の技術職であり、投稿者以外の方に優先的に依頼しました。また、研究基盤技術部員からの投稿原稿については、その内容が部内

で行われている開発業務・支援業務であるため、原稿及び査読者の専門性如何に問わずに、前述した方法で依頼いたしました。そのため、査読者の方々より、専門分野外であるため査読が非常に難しい等のご意見をいただきました。しかし、研究基盤技術部は専門性の異なる 3 課 1 室（放射線発生装置技術開発課・放射線計測技術開発課・生物研究推進課・遺伝子細胞情報研究室）から構成されているため、それぞれの課室における研究基盤技術に関して情報共有を図ることができればと思い、査読者 2 名のうち 1 名は、必ず投稿者の所属する課・室以外の方かつ課・室長以外の方に優先的に依頼いたしました。ただし、部外からの投稿原稿については、原稿の内容に可能な限り専門性の近い方に依頼をいたしました。

研究基盤技術を如何に正しく伝えるか、残すか、というのは非常に難しい課題であると実感しております。さらに、これまでに、放射線関連分野にとって重要な「技術」とはなにか？どのような「技術」を継承すべきか？という議論の中で、技術報告書の存続自体を疑問視する問題定義もありました。そのような流れの中でも、研究・技術開発業務に従事する方々、技術を要する業務に関わる方々とともに、技術報告書は、今年度も継続できているということが最も大きな成果ではないかと考えております。

最後に、個人的な意見ですが、先人の技術・経験で消し去って良いものは何一つもなく、我々の後輩がその必要性の有無を判断できるような資料をどのように現在の我々が残すかが最も重要な課題ではないでしょうか。今後も皆様と技術報告書のあり方について考えていきたいと思っております。

資料１

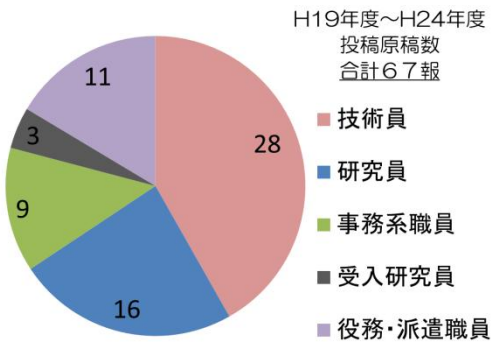


図 1.　職種に対する投稿原稿数

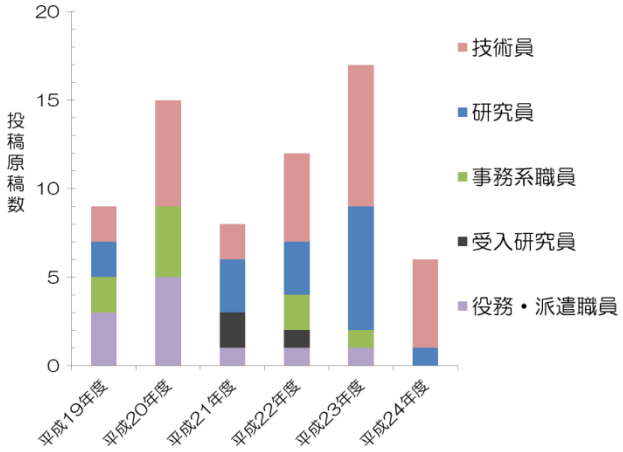


図 2.　年度ごとの投稿原稿数（職種別）

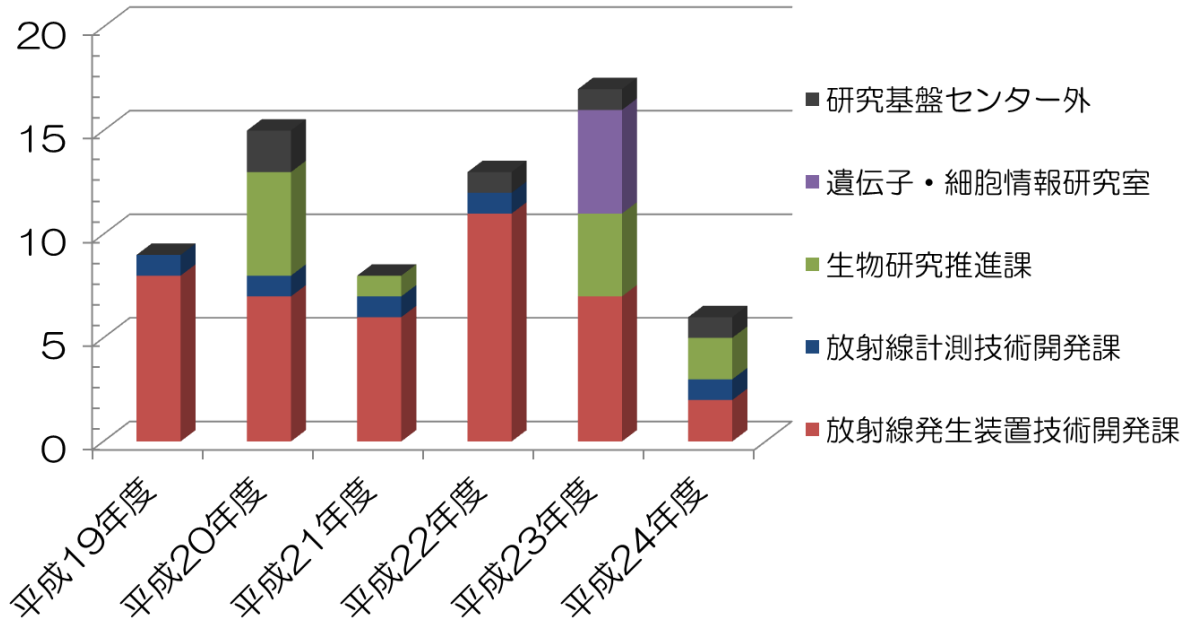


図 3.　年度ごとの投稿原稿数（課・室別）。平成 23 年度より組織改編（第三期中期計画）し、研究基盤技術部に新たに遺伝子・細胞情報研究室が加わった。

放射線医学総合研究所 技術報告書　NIRS Technology　　投稿規定

1. 技術報告書の趣旨

研究開発、研究支援の活動における研究基盤技術（研究の基盤を技術で支える）を 1) 成果をまとめ次世代に正しく伝える、2) 研究論文作成時等に有用な技術的資料として残す。3) 引用文献として応え得る報告書とする、を趣旨としています。(技術報告書 Vol.1 はじめに。より)。

投稿原稿例：
放射線発生・計測機器・分析技術・実験動物飼育、細胞及び動物などを用いた生物学的研究等に関する技術的レポート、施設・装置等の稼働・運営報告、所内と所外施設の比較、所外施設・装置などの視察報告、放射線科学関連分野における動向、など。

2. 体裁

原則 Print-Ready の状態での投稿をお願いしております。

A4 版用紙に Microsoft Word を用いて作成してください。用紙の上下左右には 25 mm の余白を指定し、1 ページあたり 40 行としてください。1 ページ目には、題目、著者、所属、投稿日、要旨、論文の執筆者名 (Corresponding Author) と e-mail address を記載してください。2 ページ目以降から本文を書いて下さい。要旨（Abstract）は原則**英語**です。項目名は自由ですが、可能な限り、序論（はじめに）、方法・材料、結果、考察、まとめ、謝辞、引用文献、のような一般的な形式に則って書いて下さい。　（投稿原稿サンプルをご参照ください。）

3. 使用言語

日本語または英語を使用してください。フォントは、「MS 明朝」または「Times New Roman」を使用し、サイズは 11 pt で原稿を作成してください。

4. 数字と単位

数字と単位には Times New Roman とし、単位は SI 単位系で数字と単位は半角英数文字を使用してください。数字と単位の間は、半角スペースで 1 文字開けてください。単位として μ、α、β、γ などとギリシャ文字は、特殊文字を挿入して、使用してください。全角文字の μ、α、β、γ、や symbol などは使用しないでください。

5. 図、表

図・表はすべて TIFF、JPEG にしてください。Microsoft Word のオブジェクト（図形）などで作成したものをそのまま使用しないでください。必ず TIFF 画像に変換してください。図は、位置は“行内”に挿入するようにしてください。本文は 2 段組みになりますので、原則として図表は 2 段組みのうち 1 段に入るサイズに縮小されます。図表中の文字が十分見えるフォントサイズで作成してください。図・表のキャプション（説明）は画像内に記載せず、行内に記載してください。

6. 引用文献

本文中に[1]、[1-3]、[1-3, 5] のように通し番号をつけて、原則、文末にまとめてください。著者が 3 名以上の場合は省略して、et al. で構いません。引用文献には、

（例）

[1] Konishi, T., Ishikawa, T., Iso, H., et al., Biological studies using mammalian cell lines and the current status of the microbeam irradiation system, SPICE. *Nucl. Instrum. & Meth. B.* 267(2009) 2171-2175.

[2] 小西輝昭、及川将一、磯浩之、樋口有一、石川剛弘、酢屋徳啓、児玉久美子、磯野真由、塩見尚子、前田武、安田仲宏、 放医研マイクロビーム細胞照射装置 SPICE の開発と現状－プロトンビームで細胞を狙い撃ち－。放射線医学総合研究所技術報告書 (NIRS Technology) 5 (2010) 83 – 93.

7. 校正

原則として、文章校正はいたしません。

8. 査読

以下の要件 1) - 5) を満たさない場合、またはその可能性について、査読を 2 名の方に依頼いたします。査読結果によっては、執筆者に原稿の訂正、または取り下げをお願いすることがあります。事前に執筆者および共著者の責任で十分にご検討ください。

1) 放射線医学総合研究所の不定期刊行物刊行手続き要領の不定期刊行物発行方針に沿うものであること。
2) 個人情報、個人情報の保護に関する法律や研究所の個人情報保護規程等に抵触する個人情報を掲載していないこと。
3) 一般市民に無用な誤解を与える内容、表現、写真等がないこと。
4) 引用許可等が必要なデータ、図表、写真等について、全てが許可されていること。
5) その他、法的、倫理・コンプライアンス的に問題となる事項がないこと。

上記以外にも、明らかなミスやフォーマット上の不具合、図の解像度の不足は、査読者および編集担当から訂正のお願いがあることがあります。本報告書は技術資料・報告書であり、学術的新規性を追求するものではありませんので、一般的な査読付き論文とは異なります。査読の趣旨は、「1. 技術報告書の趣旨」および上記 1) - 5) 項目にのみ行うものです。

8. 投稿先（問い合わせ先）

研究基盤センター　研究基盤技術部　技術報告書編集事務局
編集担当：　小西　輝昭、酢屋　徳啓、前田 武、小澤ブル 美絵
nirstech@nirs.go.jp

25mm

放射線医学総合研究所
技術報告書

NIRS Technology

www.nirs.go.jp

NIRS Technology, vol. VII (2012) XX – XX.　（イタリック　11pt）

（11pt 2 行あける）

表題○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○ **(14 pt ボールド)**

title○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○（**title: 英語表記　12pt**）

（11pt　２行空ける）

25mm　　25mm

酢屋 徳啓*、氏（半角スペース）名　12pt（投稿者に半角*をふる）

研究基盤センター 研究基盤技術部 放射線発生装置技術開発課 (所属　11pt)

（11pt　2 行）

線（太さ 1.0 pt）

要旨　（ボールド）11pt

要旨は原則、英語です。（日本語でも可ですが、）英数字は Times New Roman を指定する。タイトル、著者名を 14pt、所属、以降の文章は 11pt とする。要旨は、全体の内容のまとめを記入することとし、5 行以上 10 行以内とする。

Keywords:(太字イタリック)　(この報告に関連する用語を 10 語程度挙げる)

---

*（太字イタリック Times new Roman）10pt**Corresponding Author:***

10pt *酢屋 徳啓 (Noriyasu Suya)*

e-mail: XXXX

最後の行に　（改ページ）挿入

ページ番号真ん中寄せ10
用紙の端からの距離ヘッダー15mm フッター8mm

25mm

１．はじめに/イントロダクション/緒言（11pt ボールド）

見出しは、これらのうち適当と思われるものを選択するか、これらに相当するものを用いることとする。また、全体の体裁をそろえるために「はじめに」「実験」「結果」「まとめ」の 4 つの区切り(文言は変わっても)を遵守することとする。

この部分には、技術開発のバックグラウンドとなっている事項について述べる。

、、、、、、、、、、、、、、、、

1－1. ○○○○○○　（小項目はボールドにしない！）

各線源について線量率を 1/100,1/30,1/10,1/3

、、、、、、、、

1－2. ○○○○○○

実験/手法/装置/方法

実験装置やその手法についてまとめる部分。

図表について

図のサイズは、原則、この 2 段組の 1 段の幅に収まるようにする。どうしても必要な場合には 1 段組としたときの最大サイズを用いる。図は 1 からナンバリングして、図の**直下**に説明書きを入れる。

表のサイズも原則、図を同じとする。図の**直上**に表 1 などというようにナンバリングをして、表の説明書きを入れる。

本文中で図表を説明しているその近くに図表があることが望ましいが、それらの数が大量になる場合は、参考文献までの文章を図表無しに記入して、最後にナンバリングした、表、図の順番でまとめて掲載して構わない。

表 1　2006 年日本シリーズ　第 2 戦のスコア。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	計
B	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
A	0	2	1	0	0	0	0	1	0	4

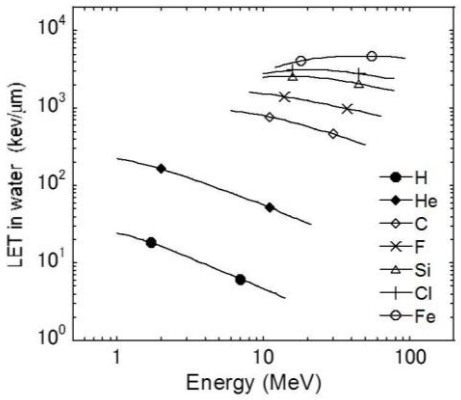


図 1 イオン種およびエネルギーに対する LET（図は TIFF）

結果

実験の結果および考察(などがあれば)、ここにまとめる。図表を含めた報告全体は、1 ページ以上であれば、多い分には制限しない。

まとめ

全体の総括と今後の方針などを書く。

参照文献　（ボールド 11pt）

[1] Konishi, T., Ishikawa, T., Iso, H., et al., Biological studies using mammalian cell lines and the current status of the microbeam irradiation system, SPICE. *Nucl. Instrum. & Meth. B.* 267(2009) 2171-2175.

[2] 小西輝昭、及川将一、磯浩之、他、 放医研マイクロビーム細胞照射装置SPICE の開発と現状－プロトンビームで細胞を狙い撃ち－。放射線医学総合研究所技術報告書 (NIRS Technology) 5 (2010) 83 – 93.

≪平成 24 年度技術報告書　編集事務局≫
独立行政法人 放射線医学総合研究所
研究基盤センター研究基盤技術部
放射線発生装置技術開発課
小西 輝昭、酢屋 徳啓、前田　武、小澤ブル 美絵
事務局連絡先　e-mail: nirstech@nirs.go.jp
ホームページ　http://www.nirs.go.jp

≪編集発行≫
独立行政法人　放射線医学総合研究所
研究基盤センター研究基盤技術部
〒263-8555　千葉県千葉市稲毛区穴川 4-9-1
TEL: 043-206-4695　FAX: 043-206-3514

平成 24 年度　放射線医学総合研究所　技術報告書（研究基盤技術部）
NIRS Technology, Vol. 7　2012 年 11 月発行

印刷　有限会社　Ｂ．Ｄ．Ｓ
©2012 独立行政法人　放射線医学総合研究所

Printed in Japan
ISBN 978-4-938987-80-0
NIRS-M-253



http://www.nirs.go.jp