

ISBN 978-4-938987-74-9

NIRS-M-247

平成 23 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 6, February 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. 6

## 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 平成 22 年度 静電加速器棟(PASTA&SPICE)利用実績 p1-p5  
  
及川 将一\*、小澤 美絵、石川 剛弘  
共同実験施設運営委員会 静電加速器施設利用部会事務局
  
- 2 TITAN 320 からの 200kV X 線の水中のスペクトルと線量変換係数 p6-p12  
  
平岡 武\*<sup>1)</sup>、加藤 秀起<sup>2)</sup>、石川 剛弘<sup>1)</sup>、酢屋 徳啓<sup>1)</sup>、  
河合 直士<sup>1)</sup>、今関 等<sup>1)</sup>  
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) 藤田保健衛生大学 医療科学部 放射線学科
  
- 3 広域エネルギーの光子に対する筋肉等価ファントムの開発 p13-p17  
ーフラットマッスルー  
  
平岡 武\*<sup>1)</sup>、奈良井 和宏<sup>2)</sup>、濱野 毅<sup>3)</sup>、石川 剛弘<sup>1)</sup>、今関 等<sup>1)</sup>  
1) 研究基盤センター 研究基盤技術部  
2) (株) テクノラド  
3) 緊急被ばく医療研究センター
  
- 4 低線量棟ガンマセル 40 の水吸収線量測定 p18- p 23  
  
萩原 拓也\*<sup>1)</sup>、須田 充<sup>2)</sup>、石川 剛弘<sup>2)</sup>、濱野 毅<sup>3)</sup>、平岡 武<sup>2)</sup>  
1) 株式会社ネオス・テック 研究支援技術部 技術 1 課  
2) 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  
3) 緊急被ばく医療研究センター 運営企画ユニット

- 5 マイクロビーム細胞照射装置 SPICE を用いた細胞核・細胞質への狙い撃ち照射のための開発 (I) - ヒト HCT116 細胞試料の作成法の検討 - p24-p29
- 塩見 尚子<sup>1)</sup>、児玉 久美子<sup>1,2)</sup>、小林 亜利紗<sup>1)</sup>、小西 輝昭\*<sup>1)</sup>
- 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) (株) ネオス・テック
- 6 京大タンデム加速器施設の訪問 p30-p38
- 酢屋 徳啓\*<sup>1)</sup>、磯野 真由<sup>1,2)</sup>、塩見 尚子<sup>1)</sup>、前田 武<sup>1)</sup>、小西 輝昭<sup>1)</sup>
- 1) 研究技術センター 研究基盤技術部 放射線発生装置技術開発課  
2) 首都大学東京大学院 人間健康科学研究科
- 7 FACS Aria を用いた多重蛍光染色試料測定時の蛍光補正法について p39-p50
- 前田 武\*<sup>1)</sup>、小西 輝昭<sup>1)</sup>、塩見 尚子<sup>1)</sup>、高野 裕之<sup>2)</sup>、児玉 久美子<sup>3)</sup>
- 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)  
3) (株) ネオス・テック
- 8 隔離照射容器および搬入出用接続装置を用いた生物隔離照射システムの開発 p51- p 56
- 石田 有香\*、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
- 9 実験動物取扱い者に対する安全実技教育の導入 p57- p 61
- 重兼 弘法\*<sup>1)</sup>、西川 哲<sup>2)</sup>、石田 有香<sup>1)</sup>、小久保 年章<sup>1)</sup>
- 1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課  
2) 研究基盤センター

## 10 新たに開発・確立されたマウス系統の遺伝学的モニタリングシステム p62-p72

西川 哲<sup>\*1)</sup>、上野 渉<sup>2)</sup>、早尾 辰雄<sup>2)</sup>、海野 あゆみ<sup>3)</sup>、飯名 瑞希<sup>3)</sup>、  
大久保 喬司<sup>3)</sup>、新妻 大介<sup>3)</sup>、石原 直樹<sup>3)</sup>、伊藤 正人<sup>3)</sup>、藤井 功輔<sup>3)</sup>、  
伊田 大貴<sup>3)</sup>、宮沢 正光<sup>3)</sup>、武笠 功<sup>4)</sup>

- 1) (独) 放射線医学総合研究所 研究基盤センター
- 2) (独) 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  
生物研究推進課
- 3) サイエンス・サービス (株)
- 4) (株) 島津製作所 分析計測事業部

## 11 SPF 施設を利用した新しい発生工学技術支援の取り組みについて p73- p 76

塚本 智史<sup>\*1)</sup>、和田 彩子<sup>2)</sup>、太田 有紀<sup>2)</sup>、石田 有香<sup>1)</sup>、  
小久保 年章<sup>1)</sup>

- 1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課
- 2) (株) サイエンス・サービス

## 12 放医研で維持している近交系メダカ (1) p77-p82

丸山 耕一<sup>\*1)</sup>、前田 圭子<sup>1)</sup>、長谷川 純崇<sup>2)</sup>、石川 裕二<sup>1)</sup>

- 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 積極的防護  
研究チーム
- 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  
分子病態イメージングチーム

## 13 HiCEP 自動反応装置 (HiCEPer) の開発 p83-p87

安藤 俊輔<sup>\*1)</sup>、荒木 良子<sup>1,2)</sup>、堤 康憲<sup>3)</sup>、藤森 (法喜) ゆう子<sup>1)</sup>、  
安倍 真澄<sup>2)</sup>

- 1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課 遺伝子・細胞  
情報研究室
- 2) 研究基盤センター 先端計測分析事業推進チーム
- 3) 株式会社 アステック

- 14 フルリプログラミングを賦与する iPS 細胞培養条件の探索 p88-p95
- 藤森 (法喜) ゆう子\*、荒木 良子、宇田 昌広、中村 美樹、安倍 真澄  
研究基盤センター 研究基盤技術部  
生物研究推進課遺伝子・細胞情報研究室
- 15 ガラス (石英) チップ電気泳動型分取装置の開発 p96-p99
- 砂山 美里<sup>\*1)</sup>、笠間 康次<sup>1)</sup>、荒木 良子<sup>1)</sup>、安倍 真澄<sup>1)</sup>  
孫 凱<sup>2)</sup>、 Zheyu Li<sup>2)</sup>、上野 貢生<sup>2)</sup>、三澤 弘明<sup>2)</sup>  
1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課  
遺伝子・細胞情報研究室  
2) 北海道大学 電子科学研究所 三澤研究室
- 16 HiCEP 法データ解析の高度化・効率化のための解析ソフトウェア  
HiAL の開発 p100-p106
- 笠間 康次<sup>\*1)</sup>、近藤 一弘<sup>3)</sup>、荒木 良子<sup>1)</sup>、安倍 真澄<sup>2)</sup>  
1) 研究基盤センター 研究基盤部 遺伝子細胞情報研究室  
2) 研究基盤センター 先端計測分析事業推進チーム  
3) 株式会社 メイズ
- 17 ES 細胞・iPS 細胞の多能性の程度を測定する定量的方法の検討 p107-p113  
(体細胞から多能性幹細胞へのリプログラミングの程度を定量的に測定  
する方法の確立)
- 宇田 昌広、荒木 良子、藤森 (法喜) ゆう子、中村 美樹、安藤 俊輔、  
杉浦 真由美、砂山 美里、笠間 康次、安倍 真澄
- 基盤技術センター 研究基盤技術部 生物推進課 遺伝子・細胞情報研究室

## 第4回共用施設 (PASTA & SPICE) 共同研究成果報告書

- 1 はじめに～第4回共用施設 (PASTA & SPICE) 共同研究成果報告書～ s1  
 静電加速器施設利用部会事務局
- 2 第4回共同施設 (PASTA&SPICE) 共同研究成果報告会 s2  
 -第5回静電加速器利用ワークショップ- プログラム
- 3 メダカ腫瘍組織の微量金属元素 PIXE 解析 s3-s4  
 長谷川 純崇<sup>\*1)</sup>、諸越 幸恵<sup>1)</sup>、丸山 耕一<sup>2)</sup>、磯 浩之<sup>3)</sup>、及川 将一<sup>3)</sup>、  
 古川 高子<sup>1)</sup>、佐賀 恒夫<sup>1)</sup>  
 1) 放医研・分子イメージング研究センター、  
 2) 放医研・放射線防護研究センター、  
 3) 放医研・研究基盤技術部
- 4 Micro-PIXE による鱗を用いた回遊履歴の推定に向けた検討 s5-s6  
 -絶滅危惧種イトウを対象に-
- 鈴木 享子<sup>\*1)</sup>、吉富 友恭<sup>2)</sup>、武田 志乃<sup>3)</sup>、市村 政樹<sup>4)</sup>、春本 恵子<sup>5)</sup>、磯 浩之<sup>6)</sup>、  
 樋口 有一<sup>6)</sup>、石川 剛弘<sup>6)</sup>、及川 将一<sup>6)</sup>、大竹 二雄<sup>1)</sup>  
 1) 東京大学大気海洋研究所 国際沿岸海洋研究センター、  
 2) 東京学芸大学環境教育実践施設、  
 3) 放医研 放射線防護研究センター、  
 4) 標津サーモン科学館、  
 5) 東京学芸大学教育学部、  
 6) 放医研 基盤技術センター研究基盤技術部
- 5 ミナミヌマエビ体内における重金属分布の解析に関する研究 s7-s9  
 春本 恵子<sup>\*1)</sup>、吉富 友恭<sup>2)</sup>、鈴木 享子<sup>3)</sup>、武田 志乃<sup>4)</sup>、宮原 信幸<sup>5)</sup>、  
 磯 浩之<sup>5)</sup>、石川 剛弘<sup>5)</sup>、樋口 有一<sup>5)</sup>、及川 将一<sup>5)</sup>  
 1) 東京学芸大学教育学部、  
 2) 東京学芸大学環境教育実践施設、  
 3) 東京大学大気海洋研究所 国際沿岸海洋研究センター、  
 4) 放医研 放射線防護研究センター、  
 5) 放医研 基盤技術センター

- 6 シスプラチンミセルの腫瘍内の分布測定及びシミュレーション  
Measurement and simulation of the distribution of cisplatin micelles inside tumor s10-s11
- 水野 和恵<sup>\*1)</sup>、藤澤 寛<sup>1)</sup>、西島 陽祐<sup>1)</sup>、及川 将一<sup>2)</sup>、小西 輝昭<sup>2)</sup>、石川 剛弘<sup>2)</sup>、  
磯 浩之<sup>2)</sup>、樋口 有一<sup>2)</sup>、伊藤 友紀<sup>3)</sup>、松山 成男<sup>3)</sup>、今関 等<sup>2)</sup>、  
石井 慶三<sup>3)</sup>、上坂 充<sup>1)</sup>
- K. Mizuno, H. Fujisawa, Y. Nishijima, M. Oikawa, T. Konishi, T. Ishikawa, H. Iso, Y. Higuchi,  
Y. Ito, S. Matsuyama, H. Imaseki, K. Ishii and M. Uesaka
- 1) 東京大学大学院工学系研究科  
2) 放医研基盤技術センター  
3) 東北大学大学院工学系研究
- 7 ブナ葉の元素マップ s12-s13
- 齊藤 勝美<sup>\*1)</sup>、石川 剛弘<sup>2)</sup>、磯 浩之<sup>2)</sup>、及川 将一<sup>2)</sup>
- 1) エヌエス環境  
2) 放医研・基盤技術センター
- 8 マイクロビーム細胞照射装置 (SPICE) の開発 s14  
Research and developments (R&D) on single particle irradiation system to cell, SPICE
- 小西 輝昭<sup>\*1)</sup>、及川 将一<sup>1)</sup>、酢屋 徳啓<sup>1)</sup>、石川 剛弘<sup>1)</sup>、磯野 真由<sup>1)</sup>、  
塩見 尚子<sup>1)</sup>
- 1) 放医研 放射線発生装置利用技術開発課
- 9 マイクロビーム細胞照射装置 (SPICE) を用いた神経幹細胞の放射線障害に関する研究 s15-s16
- 磯野 真由<sup>\*1,2)</sup>、小西 輝昭<sup>2)</sup>、塩見 尚子<sup>2)</sup>、及川 将一<sup>2)</sup>、石川 剛弘<sup>2)</sup>、  
磯 浩之<sup>2)</sup>、樋口 有一<sup>2)</sup>、児玉 久美子<sup>2)</sup>、酢屋 徳啓<sup>2)</sup>、井上 順雄<sup>1)</sup>
- 1) 首都大学東京 人間健康科学研究科  
2) 放医研 放射線発生装置利用技術開発課

**10 Studies of non-targeted radiation effects in vivo through microbeam irradiation of embryos of *Danio rerio*** s17-s19

V. W. Y. Choi <sup>1)</sup>, T. Konishi <sup>\*2)</sup>, M. Oikawa <sup>2)</sup>, H. Iso <sup>2)</sup>, S. H. Cheng <sup>3)</sup>, K. N. Yu <sup>1)\*</sup>

1) Department of Physics and Materials Science, City University of Hong Kong, Tat Chee Avenue, Kowloon Tong, Hong Kong.

2) Department of Technical Support and Development, National Institute of Radiological Sciences, Chiba, Japan.

3) Department of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, Tat Chee Avenue, Kowloon Tong, Hong Kong

**11 Bystander effect of proton beam irradiated human lung cancer cells with counterpart normal cells** s20-s21

B. N. Pandey <sup>\*1)</sup>, T. Konishi <sup>2)</sup>, M. Oikawa and N. Yasuda <sup>2)</sup>

1) Radiation Biology & Health Sciences Division, Bhabha Atomic Research Centre, Mumbai, India

2) Department of Technical Support and Development, Fundamental Technology Centre, NIRS, Chiba, Japan

**投稿規定&投稿サンプル (Author instruction)**



## はじめに

第2期中期計画の最終年の平成22年度及び平成23年度の成果をまとめた技術報告書第6報をお届けします。

本報告書を作る準備の過程で大きな変化が起きました。ひとつは東日本大震災と東京電力福島第1原子力発電所の事故です。もう一つは我々の組織が変わったことです。前者の震災によって静電加速器棟のPIXE分析用加速器システムとマイクロビーム細胞照射装置が破損しました。修理には1年がかかりました。今年はマシンタイムが提供できませんでしたが、職員自らが修理と同時に改良を加えましたので次年度はより質の高い支援業務ができると思います。一方、原発事故の対応としては放射線計測や放射線管理の専門性を生かしながらオフサイトセンターやJビレッジへの派遣など多様な応援を業務を調整しながら進めました。後者については基盤技術センターがより広い基盤業務を推進するため研究基盤センターに改組され情報基盤部ができました。研究基盤技術部も遺伝子・細胞を扱う部門が加わりました。今後は更に幅広い技術分野の報告をしていきたいと考えています。

さて第6報に話しを戻しますと第5報より報告案件が増え17件になりました。同時に第4回共用施設（静電加速器棟のPIXE分析用加速器システム）の共同研究案件11件も掲載しました。そのうち2件は国際共同研究案件です。前述の対応で報告書の仕上げが遅れてしまいましたが昨年以上に質の良いものになったと自負しています。経費削減、資源への配慮も含め発行の形式を議論しまして、外部の方へは従来どおりで冊子でお配りします。放医研所内の方にはホームページからダウンロードできるようにしましたことを最後にご報告させていただきます。

平成24年2月5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

---

---



www.nirs.go.jp

---

---

NIRS Technology

---

---

NIRS Technology, vol. 6 (2012) 1 – 5.

## 平成 22 年度 静電加速器棟(PASTA&SPICE)利用実績

及川 将一\*、小澤 美絵、石川 剛弘

共同実験施設運営委員会 静電加速器施設利用部会事務局

---

### 要旨

放射線医学総合研究所静電加速器棟の PIXE 分析用加速器システム(PASTA)およびマイクロビーム細胞照射装置 (Single Particle Irradiation system to Cells : SPICE) は、平成 22 年度において PIXE 分析関連 10 課題で年間利用時間 955.8 時間、SPICE 関連 7 課題で年間利用時間 794.3 時間のマシンタイムを提供し、加速器導入以来 13 年間順調に稼働・運用してきた。しかし、平成 23 年 3 月 11 日の東日本大震災により、各種機器の損傷やビームライン・偏向電磁石のズレが生じて安定的な運転が困難になったことから、それ以降の全マシンタイム利用を停止している状況である。本稿では、平成 22 年度の震災前(3 月 10 日)までの放医研静電加速器施設 PASTA & SPICE の利用状況について報告する。

**Keywords:** PASTA, PIXE, SPICE, Cooperative Research

---

**\*Corresponding Author:**

及川 将一 (Masakazu Oikawa)

e-mail: oikawa@nirs.go.jp

## 1. はじめに

放医研静電加速器棟では、平成 11 年に HVEE 製タンデム型静電加速器 Model 4117MC+ タンデトロンを導入し、平成 12 年から本格稼働を開始した。以降、PIXE 分析用加速器システム (PIXE Analysis System and Tandem Accelerator: 略称 PASTA) として、所内外の多くの研究者に利用されてきた。さらに、低線量放射線影響研究において強力なツールとなる、培養細胞の特定部位を“狙い撃ち”が可能なマイクロビーム細胞照射装置 (Single Particle Irradiation system to Cells: 略称 SPICE) を平成 15 年に導入した。平成 16 年に、PASTA は「共用施設・設備」に指定され、産学官連携や研究交流の積極的な推進を図り、平成 22 年度においては全 17 研究課題に対してマシンタイムを提供した。しかし、平成 23 年 3 月 11 日の東日本大震災により、各種機器の損傷やビームライン・偏向電磁石のズレが生じて安定的な運転が困難になったことから、それ以降の全マシンタイム利用を停止している状況である。

## 2. 研究課題・マシンタイム募集の現状

現在、PASTA & SPICE にて実施されている研究課題・マシンタイムは、共同実験施設運営委員会の下に設置されている静電加速器施設利用部会で審議、採択されている。研究課題・マシンタイムの募集から採択までの流れは、以下のようになっている。

- (1) 研究課題・マシンタイムの公募  
(年半期毎、年 2 回)
- (2) 静電加速器施設利用部会にて、マシンタイムスケジュール案の作成
- (3) 静電加速器施設利用部会にて、各研究課題およびマシンタイムスケジュール案の審議・採択
- (4) 共同実験施設運営委員会にて、マシンタイムスケジュール案の報告・承認
- (5) マシンタイム決定・実験開始

本報告では、平成 22 年度の東日本大震災前までの静電加速器棟 (PASTA & SPICE) の研究課題内訳や利用実績について報告する。

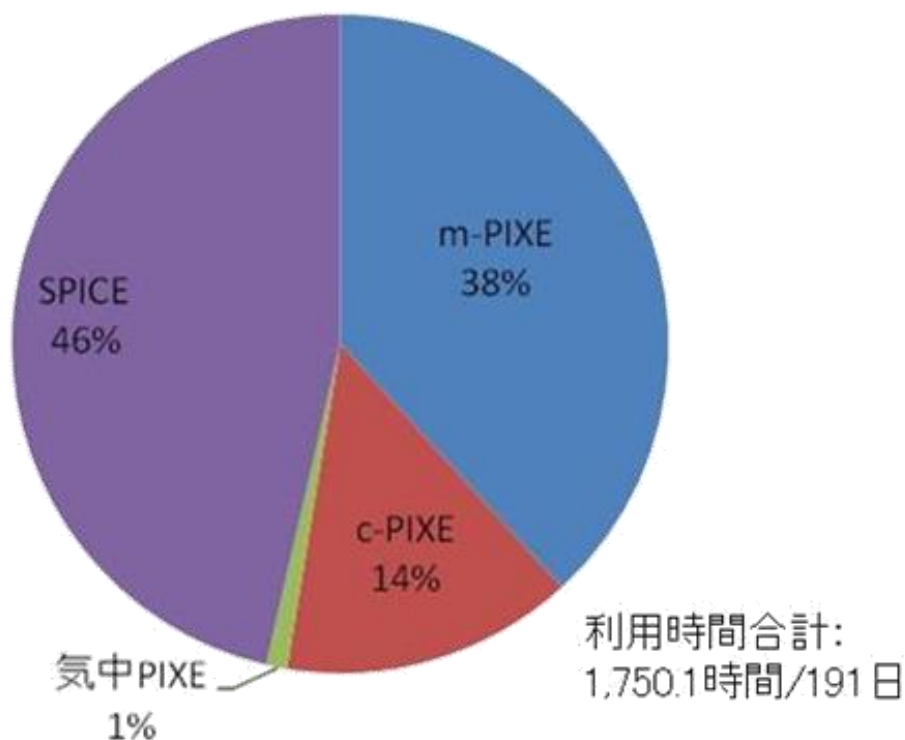


図 1. 平成 21 年度 PASTA & SPICE の利用内訳

研究課題・マシンタイム募集に関する情報は、放射線医学総合研究所外部向けホームページ([http://www.nirs.go.jp/rd/structure/ftc/index.shtml#anchor\\_02](http://www.nirs.go.jp/rd/structure/ftc/index.shtml#anchor_02))から閲覧できるようになっており、応募に必要な書式も入手できるようになっている。

### 3. PASTA&SPICE の利用状況

平成 22 年 4 月～平成 23 年 3 月 10 日において集計された、PASTA & SPICE の利用内訳を図 1 に示す。全稼働日 191 日、全稼働時間 1750.1 h の内、PIXE 分析の利用時間合計が 955.8 h、SPICE の利用時間が 794.3 h であり 54 : 46 の比率であった。図 2 に PIXE 分析関連マシンタイムの研究課題別内訳を示す。全稼働時間 955.8 時間の内、51% (487.5 時間) が内部利用で、その内の 13% (127.5 時間) が

メンテナンスとなっている。残りの 49%、468.3 時間が外部研究機関による研究課題で利用されている。図 3 に、SPICE マシンタイムの研究課題別内訳を示す。全稼働時間 794.3 時間の 53% (421 時間) が内部利用で、その内の 16% (131 時間) がメンテナンスとなっている。残りの 47% (373.3 時間) が外部研究機関による研究課題で利用されている。

表 1 に平成 22 年度マシンタイム申請課題一覧を示す。PIXE 分析に関連する 10 課題の内、6 件が外部研究機関の研究課題であった。SPICE においては、平成 20 年度からマシンタイムの公募を開始したが、合計 7 課題の内、4 件が外部研究機関の研究課題で利用されている。その内の 2 課題は、海外研究機関の研究課題であった。

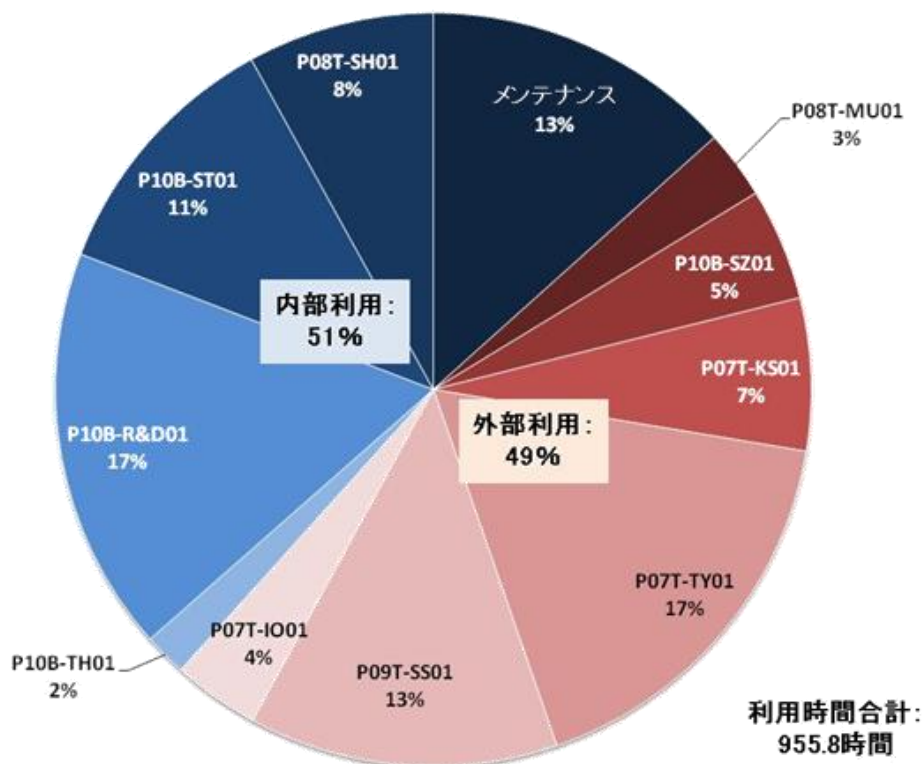


図 2. 平成 22 年度 PIXE 分析関連マシンタイムの研究課題別内訳

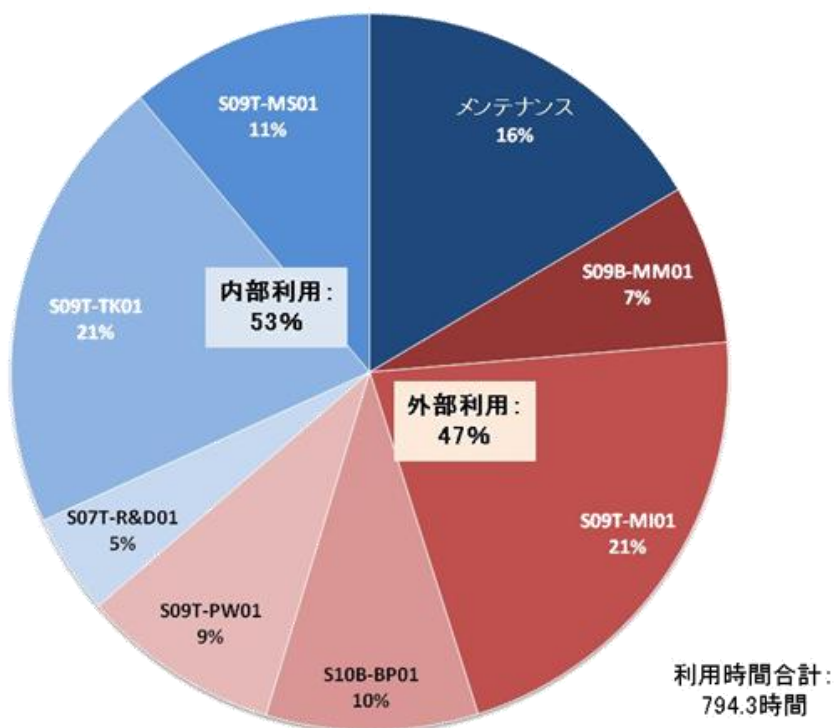


図 3. 平成 22 年度 SPICE マシンの研究課題別内訳

表 1. 平成 22 年度マシンタイム申請課題一覧

種別	課題番号	課題代表者所属	研究課題名
PIXE	P08T-MU01	東京大学大学院	PIXE 分析法による重金属含有 X 線感受型 DDS 化抗がん剤の細胞内分布解析に関する研究
PIXE	P07T-IO01	順天堂大学	頭髪の微量元素定量と異同比較
PIXE	P10B-SZ01	東京大学大学院	鱗の微量元素組成を用いたイトウの回遊生態の解明に関する研究
PIXE	P07T-KS01	エヌエス環境株式会社	大気エアロゾルのコンベンショナル PIXE 法による超微量多元素同時分析の定量化に関する研究
PIXE	P07T-TY01	東京学芸大学	PIXE 分析法による水生生物の体内元素分布の解明に関する研究
PIXE	P09T-SS01	大妻女子大学	PIXE 分析によるサメ脊椎骨の元素マッピング

PIXE	P10B-TH01	放医研 基盤セ	原子力施設周辺採取試料の測定のための液滴 PIXE 分析法の開発
PIXE	P10B-R&D01	放医研 基盤セ	PIXE 分析装置における高度化技術開発(R&D)
PIXE	P10B-ST01	放医研 防護セ	微小ビーム分析による組織中微量元素の局所定量に関する研究
PIXE	P08T-SH01	放医研 分子セ	メダカ腫瘍組織の微量金属元素 PIXE 解析
SPICE	S07T-R&D01	放医研 基盤セ	マイクロビーム細胞照射装置 SPICE の開発
SPICE	S09T-TK01	放医研 基盤セ	哺乳類細胞を用いた低線量特異的な放射線生物効果の解明
SPICE	S09T-MS01	放医研 重粒子セ	プロトン照射が及ぼす生物効果のバイスタンダー効果
SPICE	S09T-MS02	放医研 重粒子セ	低フルエンスプロトン照射によって誘導される生物効果の適応応答とそのメカニズム解明
SPICE	S09T-MI01	首都大学東京大学院	マイクロビーム細胞照射装置(SPICE)を用いた神経幹細胞の放射線障害に関する研究
SPICE	S09T-PW01	香港城市大学	マイクロビーム照射による <i>Danio rerio</i> 胚を用いた <i>in vivo</i> での研究
SPICE	S10B-BP01	BARC, India	Investigation on bystander effect of proton beam irradiated lung cancer cells with counterpart normal cells in terms of magnitude of cellular oxidative damage and apoptotic death
SPICE	S09B-MM01	電力中央研究所	マイクロビームを照射した細胞における遺伝子発現プロファイルの網羅的解析

## TITAN 320 からの 200kV X 線の水中でのスペクトルと線量変換係数

平岡 武\*<sup>1)</sup>、加藤 秀起<sup>2)</sup>、石川 剛弘<sup>1)</sup>、酢屋 徳啓<sup>1)</sup>、河合 直士<sup>1)</sup>、今関 等<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>基盤技術センター 研究基盤技術部 放射線発生装置技術開発課

<sup>2)</sup>藤田保健衛生大学 医療科学部 放射線学科

### 要旨

放射線医学総合研究所（放医研）に設置されている TITAN 320 型 X 線発生装置からの 200kV X 線は様々な照射実験に使われている。X 線の線質はフルーエンスのスペクトルにより最も正確に表現できる。管電圧、管電圧波形、2 次電子のターゲットへの入射角度などにより、発生する X 線の理論的予測が成されている。我々はターゲットがタングステンの場合のスペクトル計算の妥当性については、Birch and Marshall[1]の計算式で求められることを報告[2]しているので、ここでは彼らの計算式により 1 次 X 線スペクトルを計算した。水中でのスペクトルはモンテカルロ計算により算定したが、計算法の詳細は文献[3]に記述してある。水ファントムの表面から 20cm までの深さと、3cm 直径～30cm 直径までの照射野の大きさに対するスペクトルを計算した。計算には一次線スペクトルと散乱線スペクトルを求めた。

X 線の線質を一意的に表すため最も正確な方法はスペクトルを求めることであるが、古くから用いられている間接的に一つの数値で表現する実効エネルギーがある。モンテカルロ計算から得られるスペクトルの実効エネルギーを計算し、ファントム深さと照射野の関数としての値を求めた。また、平均エネルギーの計算法を仮定して、これとも比較した。線量測定におけるファントム中の線量変換係数の観点から、水と空気平均質量エネルギー吸収係数比を深さや照射野の関数として評価した。

**Keywords:** X-ray beam quality, X-ray spectrum calculation, Monte Carlo calculation, Tungsten target, Effective energy, Mean energy, Mean mass energy absorption coefficient ratio, Added filter, Primary spectrum, Scattered spectrum, Target angle, Constant potential wave form

\*Corresponding Author:

平岡 武 (Takeshi Hiraoka)

e-mail: hitak@nirs.go.jp

## 1.はじめに

放射線医学総合研究所における X 線の照射実験の大半は、200 kV (0.5mmCu+0.5mmAl フィルター) で行われているから、この条件での軟組織中でのフルエンススペクトルを計算した。水中のスペクトルを計算したが、筋肉中でもほとんど同じ値である。これは水と筋肉で線量がエネルギーの広い範囲において 1%程度で一致していることから推測できる。

水中でのスペクトルは、深さが表面から 25cm までと、照射野が 3cm~30cm 直径にわたり計算したが、ここでは代表的な条件についてスペクトル図を与える。

線質を従来から広く使用されている、間接的に一つの数値で表現する方法としての実効エネルギーを計算し、水中の深さや照射野の関数として値を算出した。平岡ら[4]は本研究と同じ線質の X 線で、銅の吸収板を用いた半価層の測定から、実効エネルギーを算定し、スペクトルより計算した実効エネルギーとの一致が得られた。また、平均エネルギーも定義し、実効エネルギーとの違いなどを検討した。さらに、水と空気の世界エネルギー吸収係数比の平均値を求め、深さと照射野について議論した。

## 2.一次線の計算

一次線のスペクトルは理論的に計算する方法がいくつか報告[1],[5],[6]されているが、我々は多種類のフィルターを通過後の空気カーマの測定データから、Birch and Marshall[1]による計算法が有効であることを報告した[2]。従って、ここでも彼らの計算法を一次線データの算定に使用した。200kVX 線のフィルター無しと、一般の照射実験に利用している 0.5mmCu+0.5mmAl フィルターの場合のフルエンススペクトルを図 1 にしめす。図は特性 X 線のピーク値を 1 に規格化してある。フィルター無しでは、10keV にピークが見られるが、これはタングステンの L 吸収端による

放射線である。以後の計算には全て 0.5mmCu+0.5mmAl フィルター入りスペクトルを用いているので、低エネルギー成分がカットされている。計算から求めた半価層はフィルター無しで 0.028mmCu(21.6keV)、0.5mmCu+0.5mmAl フィルター入りで 1.187mmCu(85.7keV)である。

ここで計算に使用した X 線の線質条件は、X 線発生装置は TITAN320、タングステターゲット、管電圧 200kV、電子のターゲット角 20 度、整流方式は定電圧、固有フィルター 3mm ベリリウム、付加フィルター 0.5mmCu+0.5mmAl である。

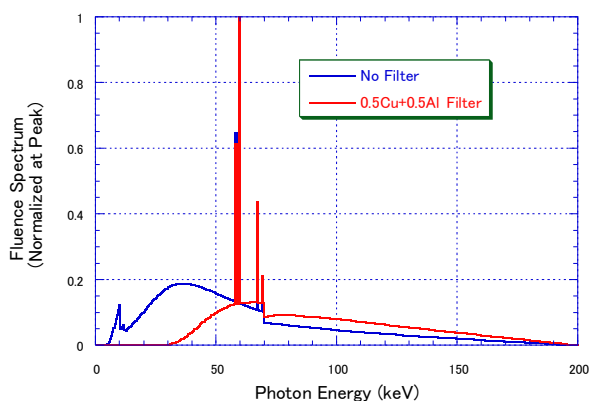


図 1. 200kVX 線のフルエンススペクトル

## 3.モンテカルロ計算

媒質中のスペクトルはモンテカルロ法による計算から求められる。モンテカルロ法の計算手法は加藤[3],[7]が詳しく記述しているのでそちらを参照願いたい。計算は、媒質が水、深さは表面、2、5、10、15、20、25cm で、照射野は 2、3、5、7、12、15、20、25、30cm 直径、についてモンテカルロ計算を行った。それぞれの条件における一次線、散乱線を算定した。

モンテカルロ計算における条件は、水ファントムサイズは 60cm φ x 30cm、線源-表面間距離 (SSD) は 60cm に一定である。単位面積当たりの入射光子数は照射野により異なるが、小照射野では 1000000/cm<sup>2</sup> から大照射野では 1000000/cm<sup>2</sup> である。



#### 4.水中のフルエンススペクトルの比較

##### 4-1.スペクトルと水の深さとの関係

モンテカルロ計算により 200kVX 線の水中のフルエンススペクトルを求めるため、深さを表面、2、5、10、15、20、25cm、照射野を2、3、5、7、12、15、20、25、30cm直径に設定して計算した。図2はファントム表面におけるスペクトルを、散乱線と全光子線（一次線+散乱線）に対して与える。散乱線は位置が表面であるから、後方散乱線と考えられる。縦軸は任意単位をしめし、線色は同じ関係にある。散乱線の最大エネルギーは150keV程度である。全光子線に対して散乱線が少ないかが判る。

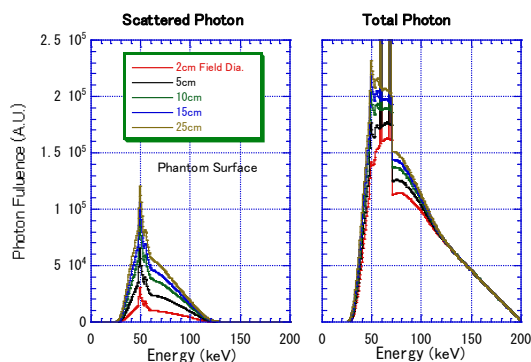


図2.ファントム表面における光子フルエンススペクトル

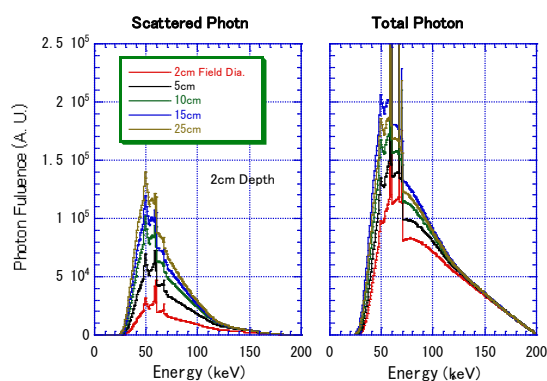


図3. ファントム深さ2cmにおける光子フルエンススペクトル

図3はファントム深さ2cmにおけるスペクトルをしめす。後方散乱線と前方散乱線が

加わるので、散乱線は全光子線に占める割合が急に大きくなる。また散乱線のエネルギーも高いところまでのびている。

図4はファントム深さ10cmにおけるスペクトルをしめす。深部の散乱線は照射野によっては全光子線と近いレベルにある。

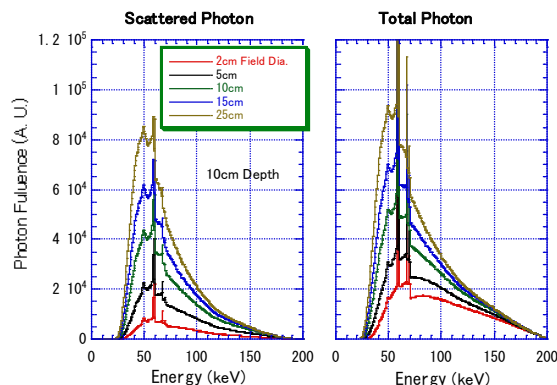


図4. ファントム深さ10cmにおける光子フルエンススペクトル

図5はファントム深さ20cmにおけるスペクトルをしめす。深さが増すと、散乱線は全光子線と同じ値となり、これらの深さでは全て散乱線となる。

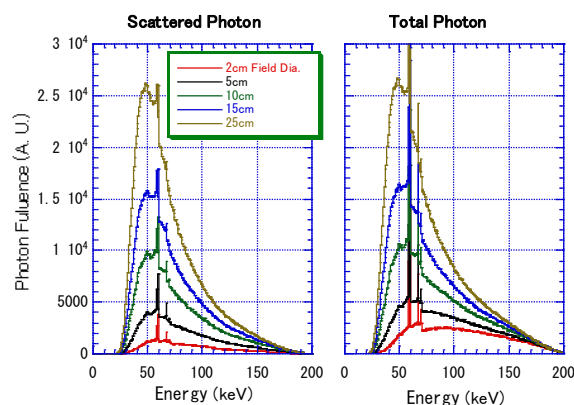


図5. ファントム深さ20cmにおける光子フルエンススペクトル

#### 4-2. スペクトルと照射野の関係

光子フルーエンススペクトルと照射野の関係は、図 6 から図 8 にしめす。値が大きくなるため、縦軸は対数スケールとした。図 6 は照射野直径が 2cm の場合で、表面から深さ 20cm までの光子フルーエンスをしめす。表面の値は後方散乱の値をしめし、散乱線には 150keV 以上のエネルギーは現れない。

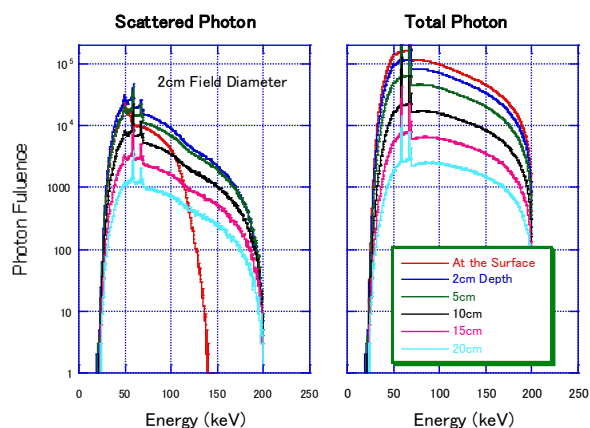


図 6.照射野直径 2cm の光子フルーエンススペクトル

図 7 は照射野直径 10cm の光子フルーエンスをしめす。やはり散乱線は前図と同様な結果をしめす。しかし照射野の拡大と共に、前方散乱の影響が浅い所でも生ずるため、2cm と 5cm の深さでは光子フルーエンスが近い値になる。

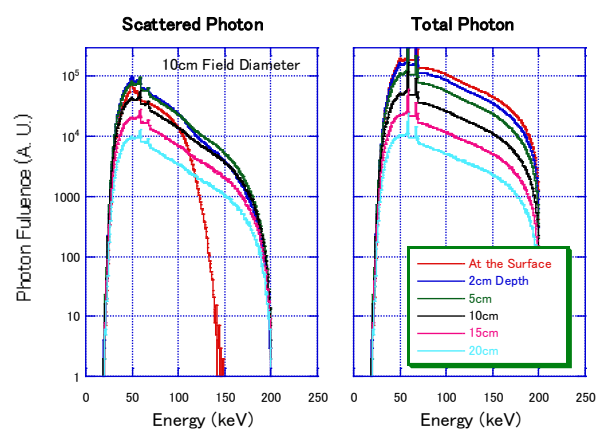


図 7.照射野直径 10cm の光子フルーエンススペクトル

図 8 には照射野直径 25cm の光子フルーエンスを与える。散乱線は対数スケールでは、深さ 2cm と 5cm のフルーエンスはほぼ等しくなる。深さ方向のフルーエンスは、2cm から 20cm までの傾斜が緩やかになり、深部線量が照射野の拡大と共に緩やかになることをしめしている。

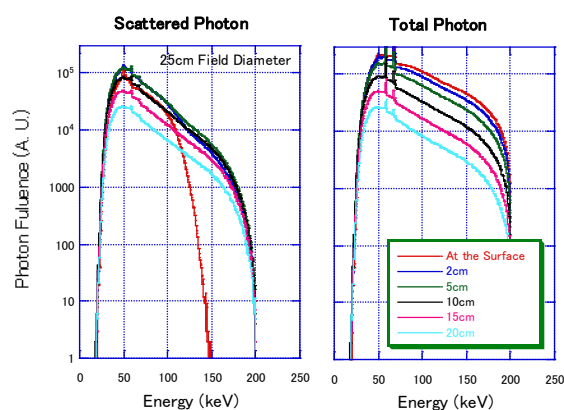


図 8.照射野直径 25cm の光子フルーエンススペクトル

### 5. 線質を間接的に一つの数値で表現

#### 5-1. 実効エネルギーの算定

実効エネルギーは古くから使用されてきたが、いまだ場合によっては有効な方法である。実効エネルギーの算出方法は加藤[8]が詳しく述べてあるので省略する。図 9 に 3~5cm 直径の照射野に対する実効エネルギーとファントム深さとの関係をしめす。深さとの関係は小照射野では直線で近似できる。照射野が小さい場合、表面の値に対して実効エネルギーは散乱線が中心軸から逃げて行く分が大きいいため、深さと共にエネルギーが高くなると考えられる。照射野が 10cm 直径近くになると、中心軸から逃げて行く光子と入って来る光子がつり合い、エネルギー的に一定の値になる。

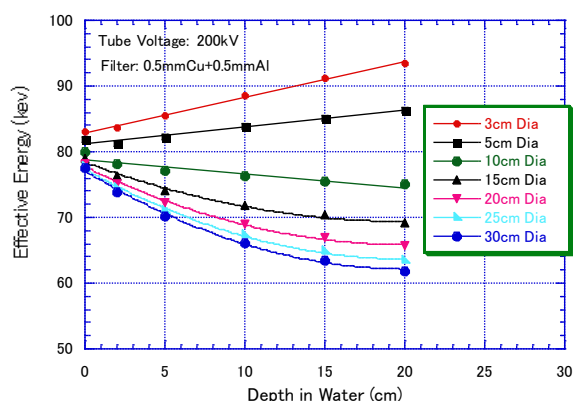


図 9.実効エネルギーとファントム深さの関係

電離箱でファントム中の線量を正確に評価する場合、この照射野と深さによる実効エネルギーの変化を考慮する必要がある。深部における小照射野と大照射野では大きく異なるから、線量評価の場合は極めて大事である。

### 5-2. 平均エネルギーの計算

光子の平均エネルギーを次のように定義して計算した。

$$\bar{E}_{Z=2} \left( \int_0^{E_{\max}} \frac{d\phi}{dE} E dE \right) \left( \int_0^{E_{\max}} \frac{d\phi}{dE} dE \right)^{-1}$$

ここで、 $d\phi/dE$  は X 線の発生電圧が  $E_{\max}$  のとき水中 2cm における光子フルーエンススペクトルである。

実効エネルギーは照射線量に対する値であるが、この場合光子フルーエンスに対しての平均値を求めている。図 10 はファントム深さと平均エネルギーの関係をしめす。平均エネルギーは実効エネルギーに対して、10%程度高い値をしめしている。

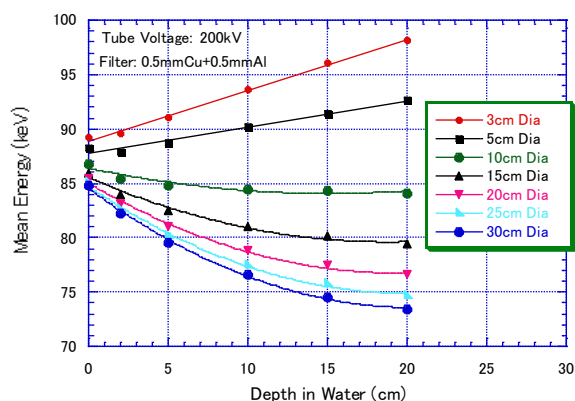


図 10.平均エネルギーとファントム深さとの関係

### 5-3. 質量エネルギー吸収係数の算定

水と空気の前平均質量エネルギー吸収係数の比は次式により計算した。

$$\left[ \left( \frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{water/air} \right]_{Z=2,\phi} = \frac{\int_0^{E_{\max}} \left( \frac{d\phi}{dE} \right) E \left( \frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{water} dE}{\int_0^{E_{\max}} \left( \frac{d\phi}{dE} \right) E \left( \frac{\mu_{en}}{\rho} \right)_{air} dE}$$

ここで、 $d\phi/dE$  は水中 2cm で照射野が  $\phi$  の光子フルーエンススペクトル、 $(\mu_{en}/\rho)_{water}$  はエネルギー  $E$  における水に対する質量エネルギー吸収係数の単一エネルギーの値、 $(\mu_{en}/\rho)_{air}$  はエネルギー  $E$  における空気に対する質量エネルギー吸収係数の単一エネルギーの値である。質量エネルギー吸収係数のデータは文献 [9]を用いた。

図 11 は水と空気の前質量エネルギー吸収係数比とファントム深さの関係をしめす。水と空気の前質量エネルギー吸収係数比が求まることにより、水吸収線量が深さや照射野とどのような関係にあるか求められる。

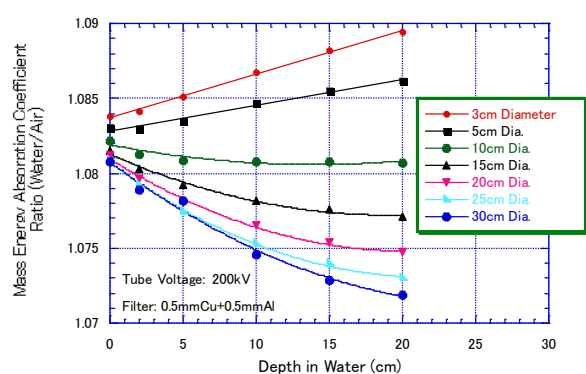


図 11.平均質量エネルギー吸収係数比と照射野との関係

照射野がほぼ 10cm 直径では吸収線量変換係数が、近似的には深さに依存しない。これらの関係から、平均質量エネルギー吸収係数比を照射野の関数として図 12 にしめす。表面の値は、

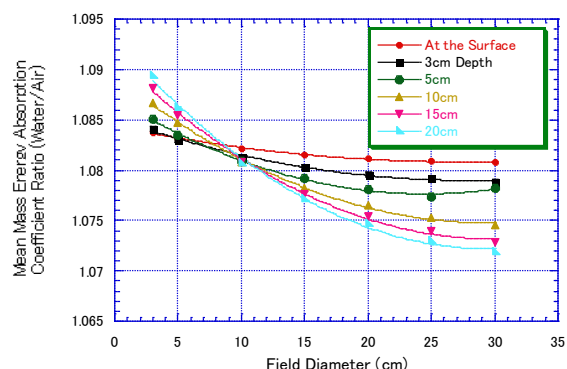


図 12. 平均質量エネルギー吸収係数比と照射野との関係

一次線にわずかの後方散乱線が寄与するから、平均質量エネルギー吸収係数比の深さ方向の傾斜は小さい。

## 6.結論

200keV X 線に対して、モンテカルロ計算により水中でのエネルギースペクトルを算定した。スペクトルと水と空気の平均質量エネルギー吸収係数比から、ファントム中任意の位置と照射野に対して正確な線量を評価でき

た。また別法として、校正された電離箱線量計を使用して、モンテカルロ計算によるスペクトルから実効エネルギーを算出し、吸収線量を評価できた。

## 7.おわりに

現在、中硬 X 線の線量測定における最も重要な問題点の一つは、ファントム中任意の位置での正確な線量を評価することである。我々はモンテカルロ計算と実効エネルギーの概念を導入して、吸収線量変換係数（水と空気の平均質量エネルギー吸収係数比）を算出し、この問題の解決を図った。現在でも電離箱線量計を空気カーマで校正する際、例え一次標準の線量校正機関でも、実効エネルギーに対する校正定数を算出するから、実効エネルギーは必要不可欠な物理定数である。

慣用 X 線では散乱線の影響が大きいから、ファントム深さと照射野で散乱線がどのようになるか理解しておくことが肝要である。ここでは 200kV X 線のスペクトルについて検討したが、他のエネルギーに対しても線質の違いに対する同様な考慮が必要である。

## 参考文献

- [1] R. Birch and M. Marshall, Computation of bremsstrahlung X-ray spectra and comparison with spectra measured with a Ge(Li) detector, Phys Med Biol 24 (1979) 505-517
- [2] 平岡武、石川剛弘、酢屋徳啓、三井大輔、濱野毅、今関等、TITAN320 からの X 線スペクトルの算定、放射線医学総合研究所技術報告書、NIRS Technology, Vol. 5, 1-7, 2010
- [3] 加藤秀起、モンテカルロシミュレーション法による医用放射線のスペクトル分布および吸収線量の評価に関する研究、名古屋工業大学博士論文、(2001) 1-127

- [4] 平岡武、三井大輔、酢屋徳啓、石川剛弘、濱野毅、今関等、200kV X 線の線質と線量の評価、放射線医学総合研究所技術報告書、NIRS Technology, Vol. 5, 8-12, 2010
- [5] H.A. Kramers, On the theory of x-ray absorption and of the continuous spectrum, Phil. Mag. 46 (1923) 836-871
- [6] D. M. Tucker, G. T. Barnes and D. P. Chakraborty, Semiempirical model for generating tungsten target x-ray spectra, Med Phys 18 (1991) 211-218
- [7] 加藤秀起、パソコンによるモンテカルロシミュレーション-パソコン活用術-、日本放射線技術学会誌、第 55 巻、第 2 号 (1999) 190-194
- [8] 加藤秀起、X 線スペクトル、-画像解析の基礎-、日本放射線技術学会誌、第 66 巻、第 3 号 (2010) 238-245
- [9] J. H. Hubbell and S. M. Seltzer, Tables of X-ray Mass Attenuation Coefficients and Mass Energy- Absorption Coefficients 1 keV to 20 MeV for Elements Z=1 to 92 and 48 Additional Substances of Dosimetric Interest , NISTIR 5632, National Institute of Standard and Technology (1995)

---

---

放射線医学総合研究所  
技術報告書



NIRS Technology

---

---

www.nirs.go.jp

NIRS Technology, vol.6 (2012) 13 – 17.

## 広域エネルギーの光子に対する筋肉等価ファントムの開発

### —フラットマッスル—

平岡 武<sup>\*1)</sup>、奈良井 和宏<sup>2)</sup>、濱野 毅<sup>3)</sup>、石川 剛弘<sup>1)</sup>、今関 等<sup>1)</sup>

1) 研究基盤センター、2) (株) テクノラド、3) 緊急被ばく医療研究センター

---

#### 要旨

放射線医学ではさまざまな分野でファントムを必要とするが、特に線量測定では欠くことができない道具の一つである。医学利用として光子は低エネルギーの X 線から、治療領域の高エネルギー X 線まで広く用いられている。ファントムとして基準となるのは、人体軟部組織が代表となるのは人体構造の面からも当然である。100keV 以上のエネルギーでは水はほぼ 1%以内で筋肉組織と同じエネルギー吸収特性をしめす。低エネルギー X 線や、中硬エネルギー X 線ははまだ医学・生物学領域で多く利用されている。この領域では水と筋肉とのエネルギー吸収特性は 4~5%異なる。従って、この領域のファントムの基準は筋肉組織とすることが望ましい。

我々は、低エネルギー X 線領域での相互作用が光電効果に大きく影響されることから、各元素の質量エネルギー吸収係数を組み合わせて特性を検討し、10keV から 20MeV の光子に対してのエネルギー吸収特性がほぼ 1%以内で筋肉と等価なファントムを開発した。製品はエネルギー特性がフラットであることから、フラットマッスルと命名した。

**Keywords:** Muscle Equivalent Material, Phantom, Tissue Substitute, Low Energy X-rays, Photon Beams, Dose Measurements, Mass Absorption Coefficient ratio, Energy dependency

---

**\*Corresponding Author:**

平岡 武 (Takeshi Hiraoka)

e-mail: hitak@nirs.go.jp

## 1. はじめに

放射線を医学に利用する時、ファントムは必要不可欠な道具の一つである。X線の発見と同時に水は人体軟部組織を近似したファントムとして利用されてきた。しかし、液体である有利性と同時に不便なことも多く、様々な固形ファントムが開発されてきた。同時に、筋肉組織と水のエネルギー特性は光子の場合 100keV 以上では 1%程度で一致しているが、低エネルギーでは 4~5%の違いを生ずる。従って、低エネルギーX線の場合、筋肉組織を基準にする必要がある。

現在、プラスチックを主剤とした軟組織等価材が開発されているが、放射線治療を対象にしたものがほとんどである。従って、低エネルギーX線（中硬エネルギーX線以下）に対する組織等価特性が十分でない。

我々は、10keV~20MeV まで±1%で筋肉組織とエネルギー特性が一致しているファントムを開発することに成功した。この物質の密度は ICRU-muscle[1]と同じ  $1050\text{kgm}^{-3}$  で、ファントム名を“フラットマッスル”（広いエネルギー領域で特性がフラット）と命名した。

## 2. 基準ファントムの選定

基準ファントムの選定は軟部組織の代表である ICRU-muscle(以下筋肉と略記)とした。水とどの程度エネルギー吸収特性が一致するか図 1 にしめす。図の縦軸は筋肉と水の質量エネルギー吸収係数比を表す。これまで多くの質量エネルギー吸収係数の編集が行われているが、その中からいくつかの代表的な値をしめした。実線は現在最も信頼できるデータとして広く利用されている Hubbell and Seltzer[2]

の値である。その他の評価値も低エネルギーで 2~3%バラツキが見られる。いずれにしても、筋肉と水でのエネルギー特性は 100keV 以下のエネルギーでは 4~5%異なる。高エネルギー領域では 1%程度で水と筋肉のエネルギー特性は等しい。従って特に、100keV 以下の低エネルギー領域の光子に対しては、基準組織は筋肉を取るべきである。

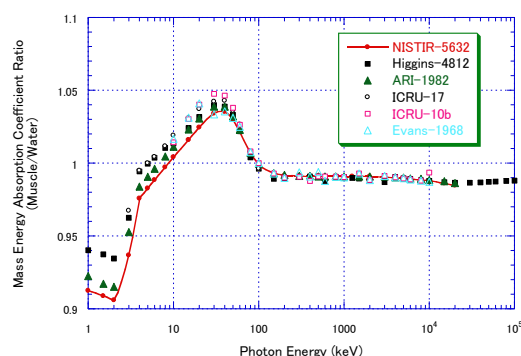


図 1. ICRU 筋肉と水の質量エネルギー吸収係数比

## 3. 市販ファントムのエネルギー吸収特性

現在市販されているファントムの大部分は治療のためのファントム(標準測定法 01[3]から引用)であり、主として高エネルギー光子や電子を対象にしている。これらファントムのいくつかの質量エネルギー吸収係数と筋肉のそれとの比を図 2 にしめす。40keV 近辺に山を呈し、多くのファントムと筋肉では 12~13%異なり、広い領域でのエネルギー特性が悪い。ピークが比較的小さい Mix-DP でも、10keV では 20%程度異なる。従って、これらのファントムを低エネルギー光子の測定に使用した場合、もたらされる誤差が大きい。また、筋肉と水では密度が 5%異なっている。

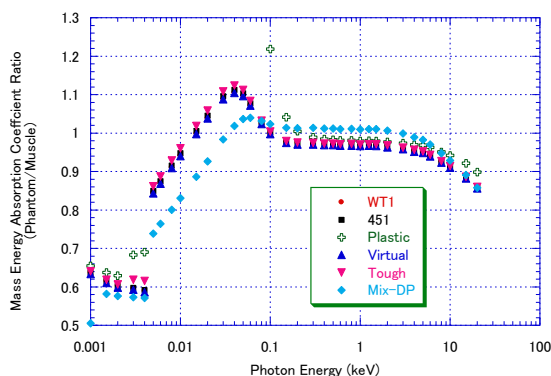


図 2.市販ファントムの質量エネルギー吸収係数比

#### 4.フラットマッスルの混練材

一般に、ファントムは主成分となる材料を何に選ぶかが重要になる。多くは安定性の面から、簡単に入手できる CH（炭素と水素）系の化合物が多く使われる。これに光電効果の影響を補正するため、原子番号が酸素より大きな材料を混入して、エネルギー吸収特性を良くする努力を払っている。

我々は主成分にエポキシ系樹脂を選ぶことにより、長期間の安定した物理特性と加工に優れた製品の試作を試みた。特に、エネルギー特性に影響する塩素含有量が少ないことから、材料にはビスフェノール F 型エポキシ樹脂（エポトート YDF-170）を選択した。エポキシ樹脂の硬化剤にはポリオキシプロキシンジアミン（ジェファーミン D-230）を用いた。光電効果領域でのエネルギー特性の違いを補正するために、エネルギー特性改善剤（以下改善剤と略記）を添加した。改善剤の種類、量、配合割合の組み合わせを変えて、筋肉と試作ファントムの質量エネルギー吸収係数比を計算し、エネルギー特性が最も小さい組み合わせを検討した。その結果数種類の特性の優れた元素が見られた。しかし、混入する材料の安定性

や価格などの問題で、単独の改善剤の添加にもかかわらず、酸化マグネシウムが最良であることが判明した。しかし、純度がエネルギー特性に大きく影響するので、特別高純度の材料を用いた。用いた酸化マグネシウム（パイロキスマ 5Q-S）は MgO 含有量が 99.98%、平均粒子径は  $1.81 \mu\text{m}$  である。フラットマッスルの元素組成で水素含有量が筋肉の半分程度なので、質量エネルギー吸収係数は筋肉に比べてエネルギー全体にわたり小さくなる。エポキシ樹脂と酸化マグネシウムとの混合物は、密度が筋肉にくらべて大きい。ICRU は筋肉の密度を  $1050\text{kg/m}^3$  と評価しているので、マイクロバルーンと言った発泡剤を混練することにより密度の調節ができる。

#### 5.密度の調節とファントムの元素組成

試作ファントムの密度はマイクロバルーンで調節したが、この材質はフェノール樹脂でできた小さな独立した中空の球である。外観は赤褐色で、直径の範囲は  $5 \sim 127 \mu\text{m}$ 、代表径は  $43 \mu\text{m}$  である。化学的に不活性であり、機械的には頑強である。アジアパシフィックマイクロバルーンズ社の（フェノリックマイクロバルーン BJO-0930）を用い、密度は液体置換の状態では  $120 \sim 250\text{kg/m}^3$  である。このバルーンの重さを 5 種類変えて重さと密度の関係を求め、図 3 にしめす。ファントム密度の設計値は  $1050\text{kg/m}^3$  である。

メーカーの技術データから評価したフラットマッスルの元素組成を表 1 に与える。軟組織ファントムとしては、炭素量に対して酸素量が比較的多いのがわかる。



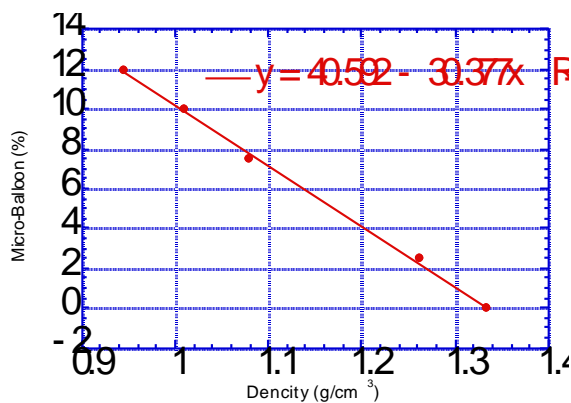


図 3.マイクロバルーンの量と密度の関係

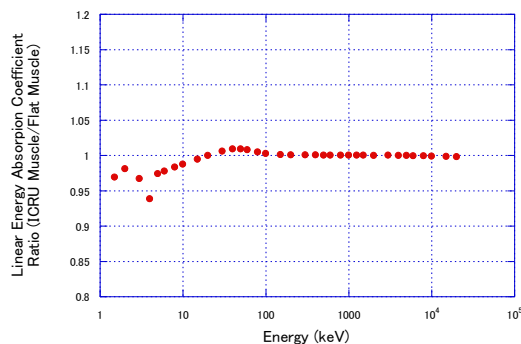


図 4.フラットマッスルのエネルギー吸収特性

表 1.評価したフラットマッスルの元素組成

Element	Weight Percent (w%)
Hydrogen	5.99
Carbon	55.17
Nitrogen	2.31
Oxygen	27.93
Magnesium	8.22
Chlorine	0.09
Calcium	0.29



写真 1.板状フラットマッスルファントム

### 6.フラットマッスルの特性

試作したフラットマッスルを写真 1 にしめす。板状ファントムの大きさは、30cmx30cm で、厚さは 1cm、2cm、5cm をしめすが、これ以外の厚さや形状のファントムも製作可能である。筋肉とフラットマッスル（密度 1050kgm<sup>3</sup>）の線エネルギー吸収係数比を図 4 に与える。10keV のエネルギー以上では± 1% 以内と言う極めて筋肉に等価なファントムである。この特性は 20MeV までは確認されているから、放射線医学領域で使用される光子に対しては筋肉と等価のファントムと言うことができる。100keV 以下でみられるエネルギー特性の悪化の原因は、塩素やカルシウムと言った不純物の影響である。

### 7.電子に対するエネルギー吸収特性

一般的に放射線治療では光子用ファントムを電子にも使用する場合が多い。電子に対してのエネルギー吸収特性は、筋肉との質量衝突阻止能比から判明する。比較のため水との比も計算して、図 3 に与えてある。水は全てのエネルギーにおいて 1% 程度で筋肉と一致している。フラットマッスルは筋肉と 4~5% 異なるが、エネルギー特性は 1% 以内である。従って、十分電子線用ファントムとしても利用できる。但し、厚さを 4% 程厚く取る必要がある。阻止能の計算には NIST の公表プログラム [estar\[4\]](#) を使用した。

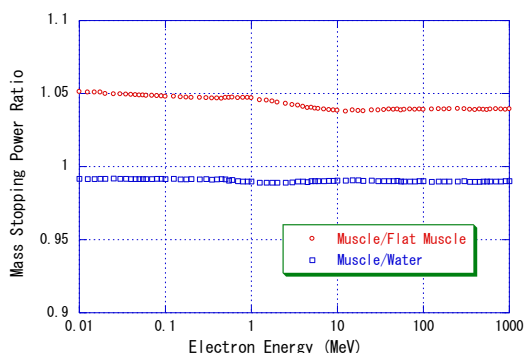


図 5.フラットマッスルの筋肉に対する質量衝突阻止能比

## 8.結論

光子に対して±1%以内で筋肉と等価なエネルギー吸収特性を有するファントムを開発し、フラットマッスル (FM-146) と命名した。この物質は電子に対してもフラットなレスポンスを有し、有効なファントムとして利用できる。

## 9.おわりに

フラットマッスルはエネルギー特性が際立って優れているから、一次線に散乱線が多く混在する光子線場を使用するファントムとして威力を発揮する。

国際機関として編集されているIAEAの吸収線量の標準測定法[5]では、全てのエネルギーの光子に対して水を基準に取っている。しかし、100keV以下の低エネルギー光子に対しては筋肉を基準に取るべきである。

開発したフラットマッスルは (株) テクノラド (0774-29-2209) で販売している。

## 参考文献

[1]ICRU Report 44, Tissue Substitutes in Radiation Dosimetry and Measurement,

ICRU, 7910 Woodmont Ave. Bethesda, Maryland 20814 U.S.A., 1989

[2] J H Hubbell and S M Seltzer, Tables of X-ray Mass Attenuation Coefficients and Mass Energy-Absorption Coefficients 1 keV to 20 MeV for Elements Z=1 to 92 and 48 Additional Substances of Dosimetric Interest, NISTIR-5632, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD 20899 U.S.A., 1995

[3]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)、日本医学物理学会編、通商産業研究社、2002

[4] M J Berger, J S Coursey, M A Zucker and J Chang, Stopping-Power and Range Tables for Electrons, Protons, and Helium Ions, NISTIR-4999, National Institute of Standards and Technology, 2005Version

[5]IAEA, Absorbed Dose Determination in External Beam Radiotherapy : An International Code of Practice for Dosimetry based on Standards of Absorbed Dose to Water, TRS 398, IAEA Vienna, 2001

---

---

放射線医学総合研究所  
技術報告書



---

---

NIRS Technology

---

---

www.nirs.go.jp

NIRS Technology, vol.6 (2012) 18 – 23.

## 低線量棟ガンマセル40の水吸収線量測定

萩原 拓也\*<sup>1</sup>、須田 充<sup>2</sup>、石川 剛弘<sup>2</sup>、濱野 毅<sup>3</sup>、平岡 武<sup>2</sup>

<sup>1</sup>株式会社ネオス・テック 研究支援技術部 技術1課

<sup>2</sup>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

<sup>3</sup>独立行政法人 放射線医学総合研究所 緊急被ばく医療研究センター 運営企画ユニット

---

### 要旨

ガンマセル40は、昭和53年2月に実験動物棟（旧称晩発影響実験棟）に取得され、平成16年3月から低線量影響実験棟地下1階に移動、同時に装置の管理も放射線発生装置技術開発課へ移された。線源核種は、<sup>137</sup>Csを上下に一对用いており、放射能は取得当時に仕様書上から合計57.350 TBqを有している。現在取得より33年が過ぎ、<sup>137</sup>Csの半減期が約1回過ぎた状態である。

今回、低線量棟SPFエリア1階に設置されたガンマセル40にて、マウス、ラット、マウス新生児（以降新生児）の3種類の照射を行うこととなり、それぞれの水吸収線量測定を行った。産業総合研究所で校正された電離箱を基準に、Coガンマ線照射装置を用いてガラス線量計の校正乗数を求めた。ガンマセル40内およびマウス、ラット、新生児ファントム中での照射時間に対する照射時間に対する水吸収線量の関係を提示した。

---

**Keywords:** ガンマセル、Cs ガンマ線の水吸収線量、線量測定

**\*Corresponding Author:**

萩原 拓也 (Takuya Hagihara)

e-mail: t\_hagi@nirs.go.jp

## 1. はじめに

低線量棟 SPF エリア 1 階に設置されたガンマセル 40 にて、マウス、ラット、新生児の照射実験を計画している。これらの照射実験を行うために、それぞれの水吸収線量を測定した。

水吸収線量の測定には照射体が小さく、またガンマセル 40 は、密閉された照射装置であるためケーブルのある電離箱を入れることができない。そのためガラス線量計を用いて水吸収線量の測定を行なった。ガラス線量計は、産業技術総合研究所にて、空気カーマで校正された電離箱に対して校正した。

動物照射胎内の吸収線量評価のため、ラット、マウス、新生児ファントムを作成した。

## 2. 線量測定器

電離箱線量計には、応用技研製電離箱 C-110、線量計として応用技研製 AE-132S、横河デジボル 756101 を用いた。ガラス線量計には、旭テクノグラス株式会社 FGD-1000、ガラス素子は AGC テクノグラス株式会社製 GD-302M を用いた。

## 3. ファントムとその照射方法

ラット、マウス、新生児の3種類の亚克力樹脂製ファントムを作成し、それぞれの照射ケージに入れて測定する。マウスファントムの写真を図 1 に示す。マウスファントムの大きさは、縦 7 cm 直径 3 cm である図 2 に示す。ラットファントムの場合形は同じだが、大きさは縦 9 cm 直径 4 cm である図 3 に示す。また新生児ファントムは、長さ 4 cm 直径 1 cm の円柱形である図 4 に示す。全てのファントムにおいて、ガラス素子は中心部に挿入

する構造である。

照射ケージは、マウス用は直径 23 cm 高さ 4.5 cm、ラット用は直径 30 cm 高さ 7 cm の円柱形である。

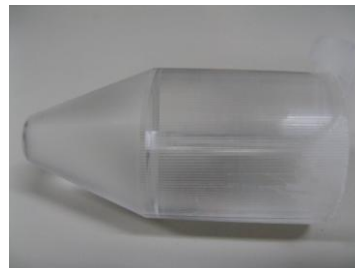


図 1. マウス用ファントム

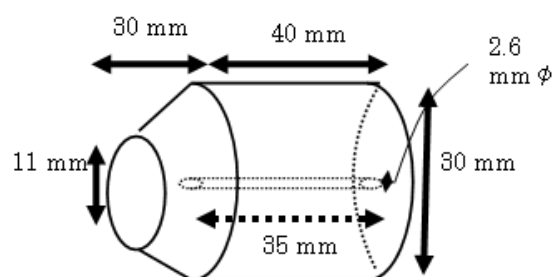


図 2. マウスファントム

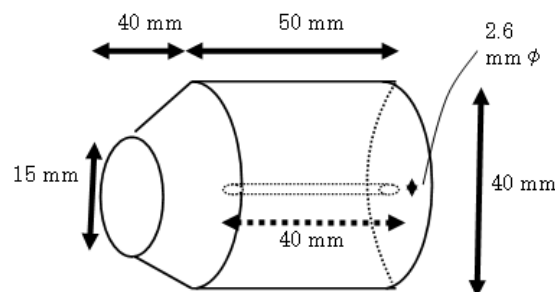


図 3. ラットファントム

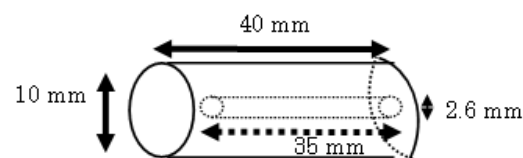


図 4. 新生児ファントム

照射ケージへのマウスファントムの設置については図 5、マウス用ケージへのマウスと新生児ファントムの設置は図 6、ラット用

ケージとラットファントムの設置については図7に示す。

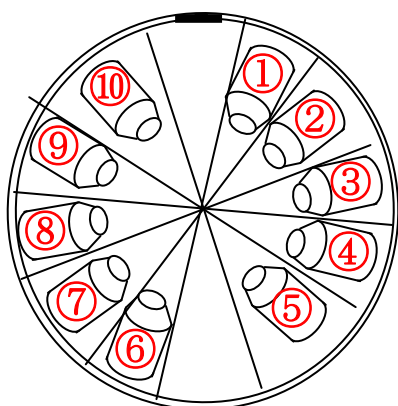


図5. マウス用ケージとマウスファントムの位置関係

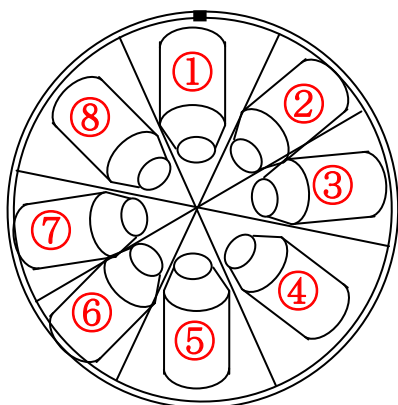


図6. マウス用ケージと新生児ファントムとマウスファントムの位置関係

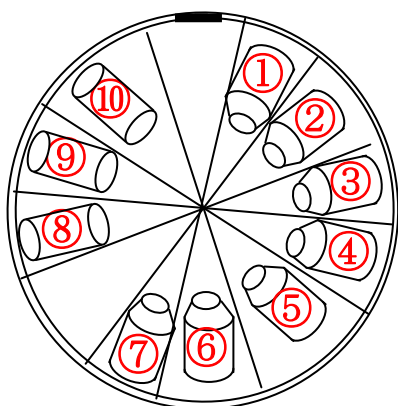


図7. ラット用ケージとラットファントムの位置関係

#### 4. 線量評価法

光子のエネルギーフルエンス  $\psi$  と空気カーマ  $K_{air}$  との関係は

$$K_{air} = \psi(\mu_{tr}/\rho)_{air}$$

ここで  $(\mu_{tr}/\rho)_{air}$  は空気の質量エネルギー転移係数である。水の吸収線量  $D_w$  と空気カーマとの関係は

$$\begin{aligned} D_w &= K_{air} * ((\mu_{en}/\rho)_w / (\mu_{tr}/\rho)_{air}) \\ &= K_{air} * ((\mu_{en}/\rho)_w / (\mu_{en}/\rho)_{air}) * (1-g) \end{aligned}$$

と表わされる。ここで  $(\mu_{en}/\rho)_w$  は水の質量エネルギー吸収係数、 $(\mu_{en}/\rho)_{air}$  は空気の質量エネルギー吸収係数、 $(\mu_{tr}/\rho)_{air}$  は空気の質量エネルギー転移係数、 $W_{air}$  はイオン対を作る平均エネルギー、 $g$  は制動放射線が発生するために失った電子エネルギーの割合である。

$^{137}\text{Cs}$  ガンマ線に対する空気の場合  $(1-g)$  は 0.9984 の値が BIPM (国際度量衡局: <http://www.bipm.org/>) で推奨されている。

線量計の指示値を  $M$ 、セシウムガンマ線での校正定数を  $N_c$  とすれば、 $N_c = K_{air}/M$  であるから

$$N_k = N_x * (W_{air}/e)_c * (1-g)^{-1}$$

$$D_w = M * N_c * ((\mu_{en}/\rho)_w / (\mu_{en}/\rho)_{air}) * (1-g)$$

となり、線量計の指示値から吸収線量が算定できる。

エネルギー660 keV の  $^{137}\text{Cs}$  ガンマ線の空気に対する  $(1-g)$  は 0.9984 であり、 $(\mu_{en}/\rho)_w$  は  $3.258 \times 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{g}$  であり、 $(\mu_{en}/\rho)_{air}$  は  $2.929 \times 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{g}$  である[1]。]従って、 $^{137}\text{Cs}$  ガンマ線に対する水吸収線量は空気カーマで校正された電離箱から

$$D_w = M * N_c * 1.1105$$

となる。

上式により電離箱式線量計の測定値と水吸収線量の関係が求められる。

## 5. 電離箱とガラス素子による測定結果

### 5-1. 電離箱による空気カーマ

ガラス素子の照射条件は、線源から線量計までの距離は 80 cm、照射野は 15 cmφ、照射時間は 30、60、90、120、150 の 5 種類である。

産業技術総合研究所で校正された  $^{60}\text{Co}$  照射装置(111TBq)空気カーマと照射時間の関係を図 8 に示す。今回の測定は 2011 年 5 月 11 日の値であるが、2010 年 3 月 29 日に測定した結果についても減衰補正を加えて比較の為プロットしてある。

両者の回帰曲線は、実線で示してあるが、ほとんど重なっている。日にちの違いによる空気カーマの値は、線源の減衰補正を行えばきわめて良く一致している。

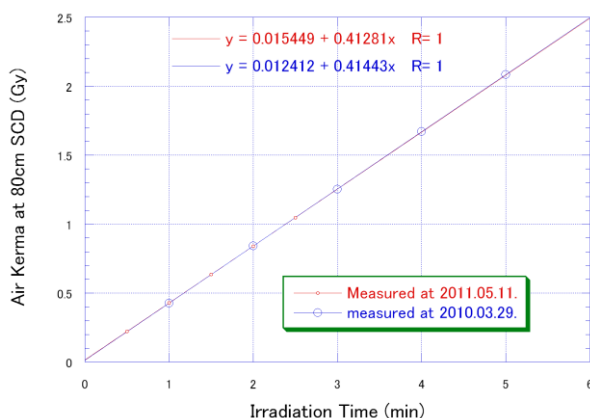


図8. 電離箱による空気カーマと照射時間の関係

### 5-2. ガラス線量計による空気カーマ

ガラス線量計による校正用線源である  $^{60}\text{Co}$  ガンマ線の照射時間と空気カーマの関係を図 9 にしめす。各プロット点はガラス素子 9 本の平均値を示している。図の縦軸は空気カーマの平均値と標準偏差を示している。ガラス素子を 9 本用いても標準偏差は 2%程度以上にはならない。図中に示してある Calibration Factor は (比較的新しい 2011. 5. 18. ~2011. 6. 2. の 6 回の測定値を与えてある) 測定器自身の校正定数で、この係数を乗ずると空気カーマが  $\mu\text{Gy}$  で表示され

る。今回 2011. 5. 11. の測定は 1.045 であるから、日にちの違いにより大きな変化はなかった。

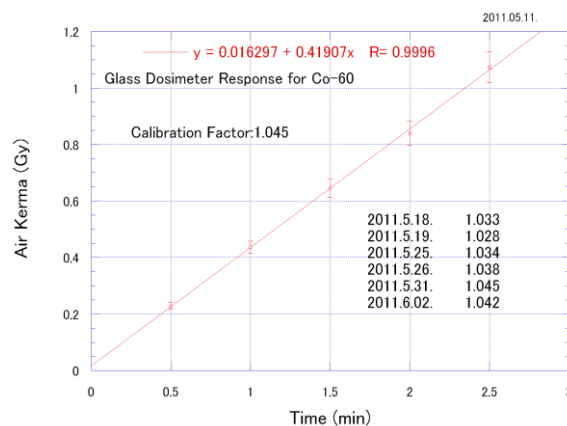


図9. ガラス線量計による空気カーマと照射時間の関係

## 6. 水吸収線量の算定

電離箱とガラス線量計で求めた水吸収線量の比較を図 10 にしめす。両者の比は 0.982 であり、今回のガラス線量計の校正定数として用いた。図 11 にガラス線量計で測定したマウスファントム中の水吸収線量と照射時間の関係を与える。測定値のバラツキは多少あるが、相関係数は非常に良い。

同様に、ラットファントムと新生児ファントムを使用して、水吸収線量と照射時間の関係を測定し、マウスファントムの値も含めて図 12 に示す。ラットファントムと新生児ファントムの回帰曲線の時間軸切片はほぼ同じ値である。しかし、マウスファントムは回帰曲線の時間軸切片はこれらより僅かに小さい。論理的には 3 者は同じ値になると考えられる。そこでマウスファントムの回帰曲線に僅かの補正を加えて、3 者が同じ値になる回帰曲線を図 13 にしめす。これらの回帰曲線から水吸収線量と照射時間の関係を決定した。

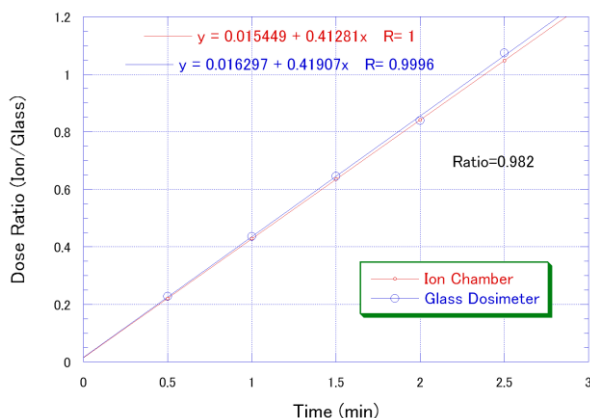


図 10. 電離箱とガラス線量計による水吸収線量の評価値

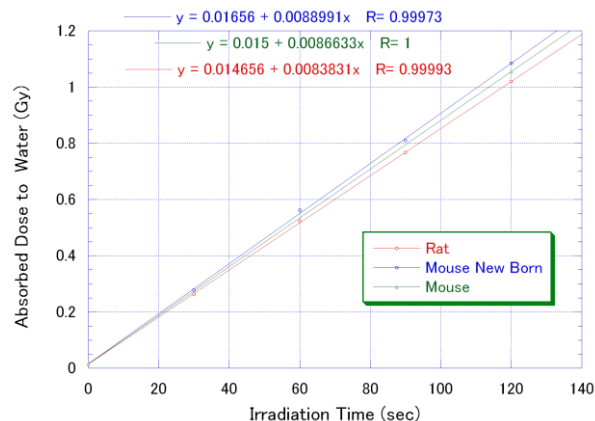


図 13. 最終的に決定したラット、マウス、新生児ファントム中の照射時間と水吸収線量の関係

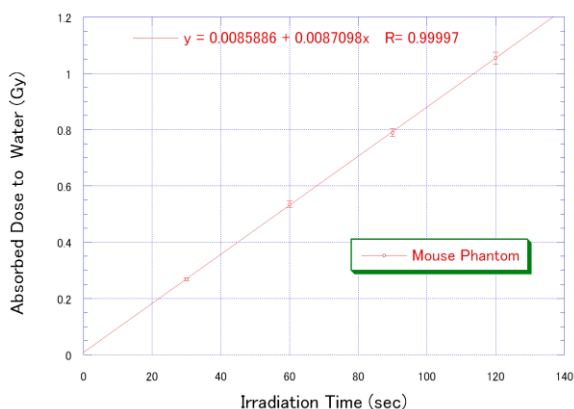


図 11. 測定したガラス線量計によるマウスファントムの水吸収線量と照射時間の関係

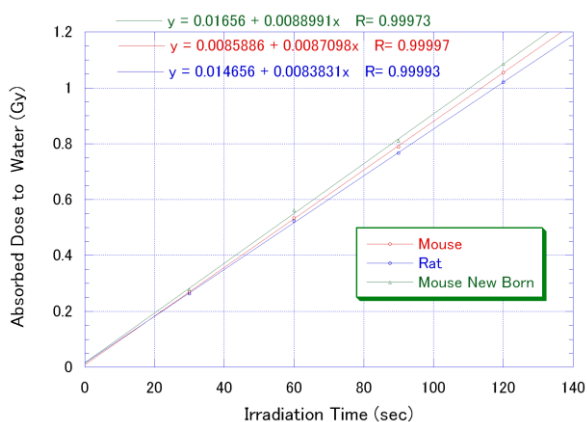


図 12. ガラス線量計で測定したラットファントム、マウスファントム、新生児ファントム中の照射時間と水吸収線量の関係

## 7. 照射平面内の線量分布

照射野平面内の線量分布は線源が設計資料と異ならなければ悪くはないと思うが、ガラス線量計で確かめた。図 2 に示したマウスケージでの測定に於いて、マウスファントムの ID 番号と空気カーマの関係を図 14 にしめす。測定は 30、60、90、120 秒照射で行ない、測定値のバラツキは大きい、空気カーマの傾向としては似ている。ガラス素子の測定誤差があるから正確には判断できないが、数%以内では一致していると考えるのが妥当であろう。

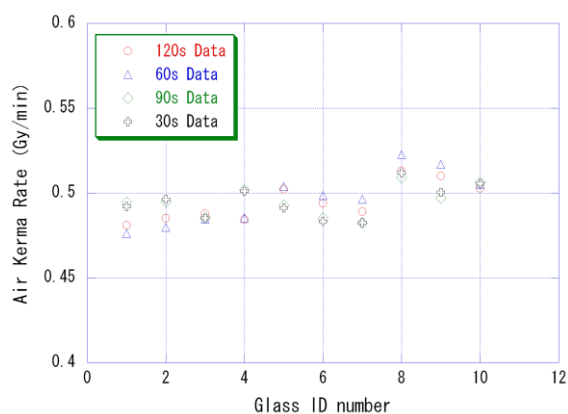


図 14. ガラス線量計で測定した角度方向の線量分布の均一度

深さ方向の線量均一度は対向 2 線源方式であるため、平岡らは線量を計算により求め

ている[2]。それによれば、ラット程度の大きさの動物であれば表面と中心での誤差は2%以内である

## 8. まとめ

電離箱で校正したガラス線量計によりガンマセル 40 の水吸収線量を次の如く算定した。

マウス、ラット、新生児の水吸収線量と照射時間の関係は以下の式により導き出せる。

◎マウス新生児

$$D_w=0.016560+0.0088991x$$

◎マウス

$$D_w=0.015000+0.0086633x$$

◎ラット

$$D_w=0.014656+0.0083831x$$

ここで、 $D_w$  は水吸収線量 (Gy)、 $x$  は照射時間 (sec) である。但し、線量は 2011 年 6 月 1 日の値であり、以降は半減期を考慮した計算で求められる。

## 参考文献

[1] J. H. Hubbell and S. M. Seltzer, Tables of X-ray Mass Attenuation Coefficients and Mass Energy- Absorption Coefficients 1 keV to 20 MeV for Elements Z=1 to 92 and 48 Additional Substances of Dosimetric Interest, NISTIR 5632, National Institute of Standard and Technology. (1995)

[2] 平岡 武、西沢かな枝、赤羽恵一、大町康、荻生俊昭, ガラス線量計によるガンマセル 40 の線量測定. 医用標準線量第 9 巻第 2 号(2004)1-7.



## マイクロビーム細胞照射装置 SPICE を用いた

### 細胞核・細胞質への狙い撃ち照射のための開発 (I)

#### - ヒト HCT116 細胞試料の作成法の検討 -

塩見 尚子<sup>1</sup>、児玉 久美子<sup>1,2</sup>、小林 亜利紗<sup>1</sup>、小西 輝昭<sup>\*1</sup>

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) (株)ネオス・テック

#### 要旨

マイクロビーム細胞照射装置SPICEは3.4 MeVプロトンビームをおよそ直径2  $\mu\text{m}$ まで集束し、哺乳類培養細胞の細胞核を狙い撃ちすることが可能な装置である。細胞核への照準はほぼ自動化されており、毎分400個程度の細胞核を狙い撃ちすることが可能になっている。しかし、放射線に対する細胞の応答を単一細胞レベルで解析するためには、細胞核だけでなく、細胞質への影響について明らかにする必要がある。培養細胞といっても、その細胞種によってその大きさ、形状が大きく異なり、これらに対応する照射・照準システムを開発していくことが必要である。また、我々は、ヒトHCT116細胞を例として、SPICE照射システムの改良を検討することにした。HCT116はヒト大腸がん由来の細胞株であるが、そのカリオタイプが正常であり、またはガン抑制遺伝子で知られるp53についても正常であることから、放射線への細胞応答を研究するにあたって大きなアドバンテージを有している。しかし、この細胞の幾何学的な形状は、小さく、また統一性がないだけでなく、細胞質領域が非常に狭いなど、マイクロビームでの細胞質の狙い撃ちを行う照射実験には、不向きな点が多い。そこで、細胞質照射を実現するための照準プログラムの改良のコンセプト案を示すとともに、HCT116細胞を例にして、細胞質照射を実現するためにDibutyl cAMPを添加して細胞質領域を拡張する培養法を行なったので報告する。

**Keywords:** マイクロビーム、SPICE、HCT116、dibutyl-cAMP、細胞核、細胞質

*\*Corresponding Author:*

小西 輝昭 (Teruaki Konishi)

e-mail: tkonishi@nirs.go.jp

## 1. はじめに

古典的な放射線生物学において、細胞レベルでの放射線に対する応用は、大雑把にいて、放射線誘発 DNA 損傷を起因としている[1]。しかし、細胞質へのみ放射線による線量付与があった場合でも、突然変異などを誘発するという報告がある[2]。また、直接照射されていないが、照射された細胞の近傍にいる細胞集団にもその放射線による影響が現れるというバイスタンダー効果の存在も報告されている[3]。このような現象は、単一細胞レベルでの経時的な変化の解析が必要であると考えている。そのためには、細胞または細胞の特定の領域のみを狙い撃ちすることできるマイクロビーム照射法は、最も有効である。マイクロビーム細胞照射装置は、単一細胞レベルでの狙い撃ち(照射)、観察、追跡を可能にする放射線発生装置である[4-6]。

放医研マイクロビーム装置 SPICE は、3.4MeV プロトン(陽子線)を目的の細胞に対してプロトンを1個から任意の粒子数を照射することができる。ビームサイズも直径2 $\mu\text{m}$ であり、哺乳類培養細胞の細胞核のみを狙い撃つには、十分に集束したビームを形成することができている。照射速度は、毎分約400個程度の細胞核を照射する高速性を実現した。照射可能な細胞培養面積も5mm $\times$ 5mm程度であり、細胞皿あたりおよそ数千個の細胞を照射することが可能である。1細胞皿(試料)を照射するために必要な1)細胞画像の取得、2)細胞核の位置座標の計算・出力、そして3)照射をおよそ15~20分程度で完了するように、システムの照射プログラムの改良を進めた[3-5]。

現状の SPICE では、細胞核の狙い撃ちのための細胞核位置情報の決定は、ほぼ自動化されている。しかし、細胞質への狙い撃ちは、まだ自動化されていない。そこで、SPICE を用いて細胞質への狙い撃ち照射を実現するために、ハードウェア・制御システムの改良と細胞試料作成法の両方から新規開発、改良を行うことを進める必要がある。

## 2. 細胞核・細胞質への照準法の改良

細胞核への照準は、以前に記述した[6,7]。ここでごく簡単に説明する。まず、1 $\mu\text{M}$  Hoechst33342 (H-3570, Molecular Probes, OR, USA) を添加した培養液で1時間ほど細胞を培養し、照射直前に培養液を抜き取り、PBS で洗う。その後、細胞の乾燥を防止するために6 $\mu\text{m}$ 厚のポリプロピレン膜で覆う。細胞皿をステージに設置し、中央およそ5mm $\times$ 5mmの領域に細胞核のヘキスト蛍光画像を取得する。蛍光核染色液 Hoechst 33342 の蛍光を頼りに、各細胞核を楕円フィットし、その中心座標を計算する。楕円フィットによる中心位置座標の決定は、SPICE の細胞位置決定プログラムを用いることによってほぼ自動で計算・出力され、この座標に対応して任意に照射粒子数を設定できる。

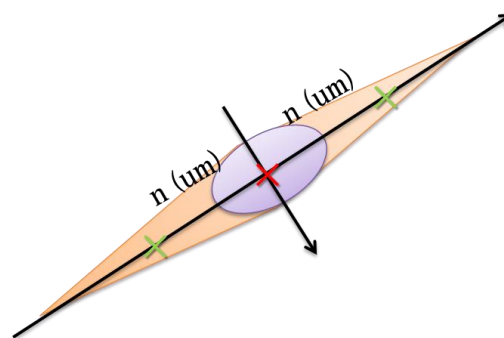


図1. 細胞核及び細胞質を狙い撃ち。細胞核を楕円フィットし、その長径方向にn( $\mu\text{m}$ )離れた任意の位置を細胞質として照射する。

しかし、細胞質照射では、細胞核を示す Hoechst 33342 の蛍光を頼りに細胞質の位置座標を決定することはできない。また、細胞質を蛍光染色し、その蛍光を頼りに座標位置を決定する細胞位置座標になるように培養液に Hoechst 33342 を加えて、細胞皿の中心部分にいる細胞核を Hoechst 33342 蛍光染色液で染色後、細胞核蛍光画像を取得する。その画像中のヘキスト蛍光部分を楕円近似し、その中心座標を細胞核の位置として出力している。

現在は、細胞核を Hoechst 33342 で染色するとともに、細胞質を Cell Tracker Orange (CTO) または Cyto-Redなどで染色する方法を報告した[8]。

細胞質を蛍光染色し、細胞核の狙い撃ちの際と同様に、細胞蛍光画像を取得する。得られた細胞蛍光画像中のヘキスト無し、CTO 有り部分（つまり細胞質部分）を手動で選択し、その部分を照射する。このように、画像の撮像以外は、ほぼ完全に手動であり、そのため、照射可能な細胞数は多くても1細胞皿あたり20個程度であり、大量の細胞数を照射することはできない。

数多くの細胞を照射するためには、蛍光画像から1) 細胞核の抽出、2) 細胞質領域の判別、3) 照射（照準）位置の決定という工程をすべて自動化するためには、細胞への照準を決めるプログラムの改良が必要であり、以下のようなフローを考えている。

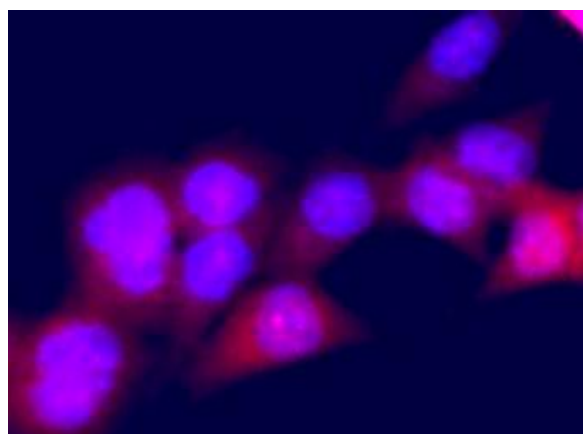


図2. HCT116細胞の蛍光染色画像。赤：細胞質を CytoRed で染色、紫：細胞核を Hoechst33342 で染色した。

まず、図1のような細胞を想定し、1) 細胞核を示す領域を楕円フィットし、その長径と短径方向を計算する。2) その長径と短径方向から細胞核の中心座標を計算する。3) この中心座標から長径方向に、任意の距離 ( $n \mu\text{m}$ ) 離れた位置を細胞質への照準座標とする。このようなフローで細胞照準プログラムを改良する予定である。

しかし、すべての細胞がこのように一方向に伸びた形状をしているわけではない。また、細胞核が細胞面積の大部分を占めている場合もあり、可能な限り細胞核以外で照準可能な細胞質領域を増やすための細胞試料側での工夫も必要となる。

### 3. ヒト HCT116 細胞を細胞試料とした細胞質照射のための試料作成法の確立に向けて

HCT116 細胞 (ATCC: CCL-247) の特徴としては、p53 が正常であり、そのカリオタイプが揃っていることなどが挙げられる。また、この細胞を親株として、DNA 二本鎖切断修復に関わる遺伝子である XRCC4 をノックアウトした HCT116(XRCC4<sup>-/-</sup>) 株[9]、または DNA ミスマッチ修復に関わる Rad18 遺伝子をノックアウトした HCT116(Rad18<sup>-/-</sup>) 株[10]など放射線に対する細胞応答に関わる重要な遺伝子のノックアウト株が既に開発されている。そのため、今後のマイクロビームを応用した放射線生物学研究において、この細胞株を軸に進めていこうと考えている。

HCT116 細胞の細胞核と細胞質を蛍光染色した画像を図2に示した。このように、顕微鏡画像では、細胞全体の面積に対して細胞核が占める面積の割合が非常に大きい。手動での照準でも細胞質へのみ狙い撃ちは難しい。そこで、Puck らの報告をもとに、細胞形状を伸長させるような培養条件を検討した。

Puck らは、Dibutyl Adenosine 3':5' -Cyclic monophosphate (Dibutyl cAMP) と Testosterone を添加した培養液にて、CHO-K1 細胞と V79 細胞(ともにハムスター由来の細胞) を培養し、その細胞質の伸長を確認した[11]。また、Wu らは、この方法を応用して、コロンビア大学マイクロビーム細胞照射装置[12,13]を用いてアルファ線を CHO-K1 細胞の細胞質に狙い撃ちをし、細胞質への照射粒子数に対する突然変異体頻度を測定した結果を報告している[1]。

同様に、HCT116 細胞を SPICE 細胞皿にて培養し、1 mM Dibutyl cAMP の有無でその細胞核面積及び細胞面積を測定し、評価した。

### 4. Dibutyl cAMP 添加培地による HCT116 細胞の核及び細胞面積への影響

SPICE 用細胞皿には、二種類あり、それぞれ細胞

接着可能面積が異なる。一つは、主に大量に細胞を回収する必要がある場合や照射可能な面積を最大の5 mm×5 mmにまで必要な場合に使用する直径33mmの細胞皿である[6,7]。二つ目は、大量に細胞を照射する必要がなく、狙った細胞の経時変化を解析する場合や特に免疫蛍光染色法などで細胞核内DNA損傷を可視化するために貴重な抗体を節約したい場合などは、直径24mmの細胞皿を用いる(図3)。

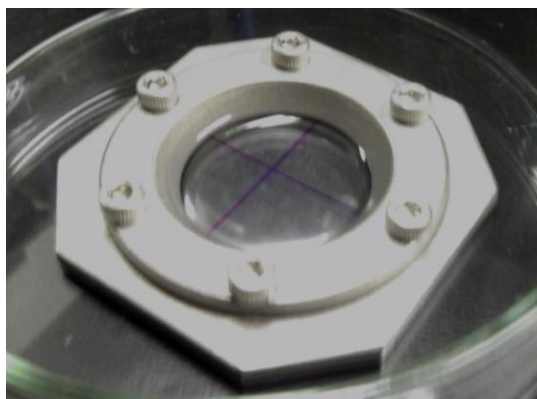


図3. SPICE用細胞皿。細胞が培養できる面積が24mmφである。底面2.5µm厚のマイラーフィルムである。

本実験は、後者のSPICE用細胞皿を用いた。細胞皿に1mlのフィブロネクチン溶液(100ng/mlin PBS)を細胞皿に入れ、室温で1時間静置して細胞皿のマイラー膜表面をコートした。使用前にPBSで1回洗浄したものを使用した。HCT116細胞の培養には、D-MEM”Nissui”②(日水製薬株式会社)に10%FBS、ペニシリン・ストレプトマイシン(100 Unit/ml・100 µg/ml)(15070, GIBCO)、2mM-Glutamine(25030, GIBCO)を添加したものを、培養条件は、37°C、5%CO<sub>2</sub>/airとした。細胞皿あたり1.0×10<sup>5</sup>個の細胞を1mM Dibutyl cAMP(512-81353, BML-CN125-0100、和光純薬工業)含有の培養液で回収し、総量を1mlとして細胞皿に塗いた。その後、24時間培養し、4%パラホルムアルデヒドにて固定し、細胞核と細胞質のそれぞれを2µM Hoechst33342と2µM Cyto-red(C410, Dojin Laboratories)をPBSに混合した蛍光染色液にて、室温で1時間染色した。取得した蛍光画像の一例を図4に示した。

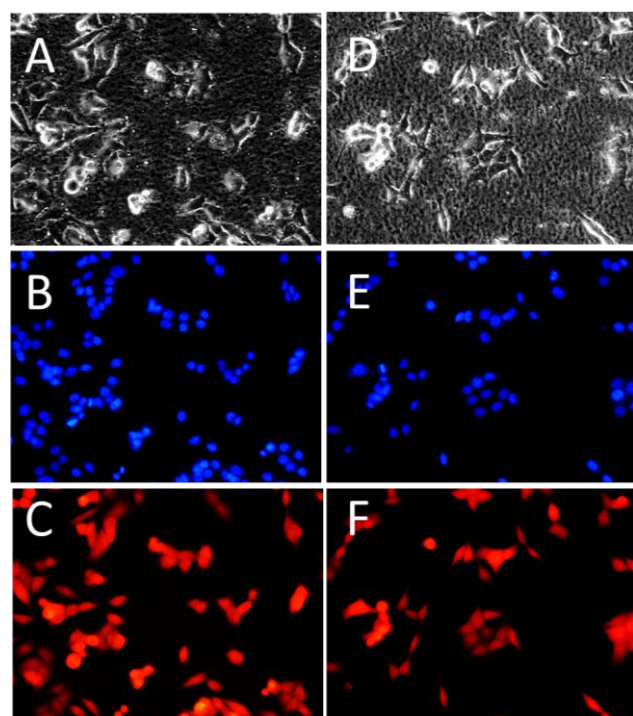


図4. Dibutyl cAMP有(D, E, F)と無し(A, B, C)で培養したHCT116細胞画像。A, B, CA, Dは位相差像、B, EはHoechst33342蛍光染色した細胞核画像、C, FはCyto-Red染色した細胞質像。

表1. 細胞核及び細胞面積の測定値

dibutyl cAMP (1mM)	Area (µm <sup>2</sup> ) ± SD		N
	nucleus (hoechst)	cell (Cyto-red)	
-	130 ± 53	305 ± 116	370
+	154 ± 60	409 ± 188	192

\*N: 計測した細胞数の合計, SD: 標準偏差

画像の取得には、倒立蛍光顕微鏡IX71 (CCDカメラ: MoticamPro 282B, Shimazu)を用い、20X対物レンズ(LUCPlan FLN, Olympus)で1視野を1280 X960 pixel (pixel直径: 0.31µm)の解像度で撮像した。画像からは一見して、細胞核及び細胞の面積が増大したかどうかは、わからなかった。そのため、画像中のHoechst33342及びCyto Redの蛍光を頼りに、画像解析ソフトウェアImage J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)を用いて、その面積を算出した。結果を表1. また、それぞれの面積の分布を図5に示した。このように、平均の細胞核面積及び細胞面積は増大していることがわかった。

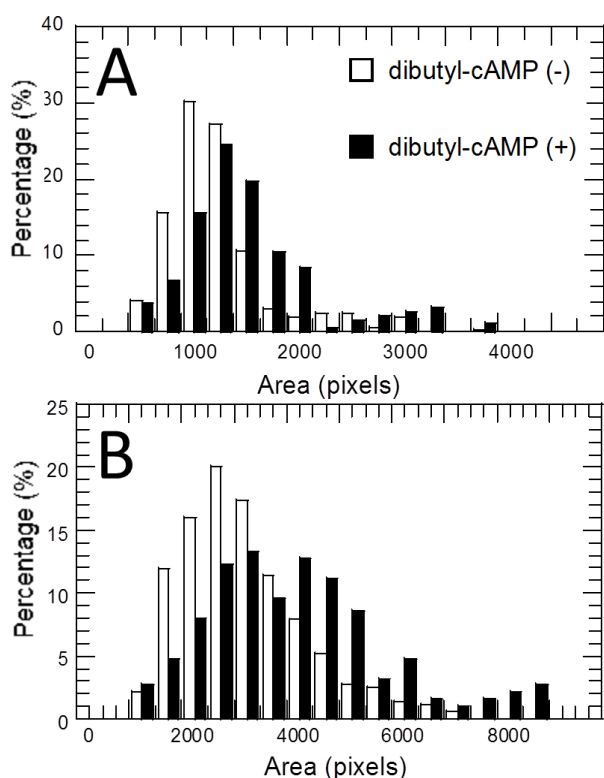


図 5. Dibutyl-cAMP 添加の有無での細胞核及び細胞面積の測定 : A : Hoechst33342 による細胞核の蛍光染色によって算出した細胞核面積分布。B: Cyto-red による細胞質の蛍光染色のよって算出した細胞面積分布。

### 5. 増殖曲線の取得

Dibutyl cAMP の毒性についても、検討した。まず、SPICE 細胞皿に 1ml のフィブロネクチン溶液 (10 ng/mlin PBS) を細胞皿に入れ、室温でおよそ 1 時間程静置することで細胞皿のマイラー膜表面をコートした。細胞を捲く前に PBS で 1 回洗った。次に、培養液に 1 mM Dibutyl cAMP を添加した状態で、細胞を 24 時間培養すると、図 4 に示したように、細胞面積が大きくなった。マイクロビーム照射実験は、この Dibutyl cAMP 添加培地で 24 時間培養後に行うのが有効と考えられた。しかし、もし細胞に対して毒性があるならば、照射が可能であっても研究には使えないことになる。そこで、添加した状態のまま 24 時間以降について増殖曲線に影響があるかについて、検討した。

まず、SPICE 用細胞皿あたり  $5.0 \times 10^4$  個の細胞を 1mM Dibutyl cAMP 含有の培地で捲き、24 時間後に 0.5% Trypsin-EDTA (25200, GIBCO) を用

いて回収し、コールターカウンター (Z1 coulter Particle Counter, Beckman Coulter) を用いて細胞数を計数した。得られた増殖曲線を図 6 に示した。まず、細胞を巻いてからの 24 時間後の細胞数から Dibutyl cAMP を添加すると細胞の増殖が一時的に停止するように見えた。そのため、図 5 に示したように Dibutyl cAMP 有りの細胞数の方が、無しの細胞数より低い値を示した。しかし、倍加時間は Dibutyl cAMP を添加した場合としなかった場合では有意な違いはみられなかった。このことから、Dibutyl cAMP を添加しても、その後、細胞の増殖能は回復していると考えられた。

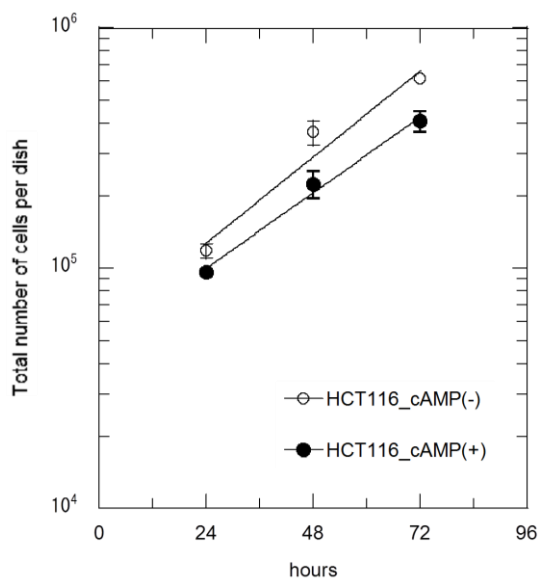


図 6. 増殖曲線による倍加時間の測定。Dibutyl cAMP を添加後、培地を交換し増殖曲線取得した。有・無での倍加時間は、それぞれ 20.1 [h] と 22.9 [h] であった。

### 6. まとめ

マイクロビーム細胞照射装置 SPICE での細胞質照射を実現するために、、、だけでなく、何かしら装置の高度化・開発という場合、いつもハード側 (ソフトウェア) の開発に目がいってしまう。またはハード側にのみ開発を要求されてしまうのが今までの経験である。しかし、これは少々理不尽なことであり、最先端の技術の応用は、ハード側だけの開発・歩み寄りだけでは、全く無意味なことが多々で、大抵無駄に終わる。

そのために、装置側での開発限界とウェット側での限界がなにかしら見えるような形で、まずは、手始めに、SPICE 制御用プログラム側改良案と細胞(ウェット)側での試策例を示すことが出来た。

## 引用文献

- [1] L.J. Wu, G. Randers-Pehrson, A. Xu, C.A. Waldren, C. R. Geard, Z.L. Yu, T. K. Hei, Targeted cytoplasmic irradiation with alpha particles induces mutations in mammalian cells 96(1999) 4959-4964.
- [2] Eric J. Hall and Amato J. Giaccia, Radiobiology for the Radiologist, Sixth Edition, Lippincott Williams & Wilkins.
- [3] H. Nagasawa, and J. B. Little, Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles. *Cancer Res.* 52 (1992) 6394–6396.
- [4] Y. Kobayashi, T. Funayama, N. Hamada, T. Sakashita, T. Konishi, H. Imaseki, K. Yasuda, M. Hatashita, K. Takagi, et al., Microbeam Irradiation Facilities for Radiobiology in Japan and China. *J. Radiat. Res.* 50, A29-A47 (2009).
- [5] T. Konishi, T. Ishikawa, H. Iso, N. Yasuda, M. Oikawa, Y. Higuchi, T. Kato, K. Hafer, 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.
- [6] 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] 小西輝昭、児玉久美子、大熊俊介、磯浩之、石川剛弘、安田仲宏、檜枝光太郎、今関等、SPICE マイクロビーム照射装置を用いた生物実験のための細胞試料作成法。放射線医学総合研究所技術報告書(NIRS Technology) 1 (2007) 24 - 32.
- [8] 磯野 真由、小西 輝昭、SPICE を用いた増殖・分化過程における放射線障害研究のための細胞試料作製法の検討 (2) 放射線医学総合研究所技術報告書 (NIRS Technology) 5(2010)83 - 93.
- [9] T. Katsube, M. Mori, H. Tsuji, T. Shiomi, N. Shiomi, and M. Onoda, Differences in Sensitivity to DNA-damaging Agents between XRCC4- and Artemis-deficient Human Cells., *J. Radiat. Res.* 52 (2011) 415-424.
- [10] N. Shiomi, M. Mori, H. Tsuji, T. Imai, H. Inoue, S. Tateishi, M. Yamaizumi, and T. Shiomi, Human RAD18 is involved in S phase-specific single-strand break repair without PCNA monoubiquitination. *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) e9.
- [11] T.T Puck, C.A. Waldren, A. W. Hsie, Membrane dynamics in the action of dibutyryl adenosine 3':5'-cyclic monophosphate and testosterone on mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 69 (1972) 1943-1947.
- [12] A. W. Bigelow, C. R. Geard, G. Randers-Pehrson, D. J. Brenner, Microbeam-integrated multiphoton imaging system. *Rev. Sci. Instrum.* 79 (2008) 123707
- [13] <http://www.raraf.org/>

---

---

放射線医学総合研究所  
技術報告書

---

---



---

---

NIRS Technology

---

---

www.nirs.go.jp

NIRS Technology, vol. 6 (2012) 30 – 38.

## 京大タンデム加速器施設の訪問

酢屋 徳啓<sup>1\*</sup>、磯野 真由<sup>1,2</sup>、塩見 尚子<sup>1</sup>、前田 武<sup>1</sup>、小西 輝昭<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 首都大学東京大学院人間健康科学研究科

---

### 要旨

2011年7月20日から3日間、放射線医学総合研究所（以下放医研）のマイクロビーム細胞照射スタッフ3名（酢屋、磯野、小西）で、京都大学理学部物理学第二教室に設置されたタンデム型静電加速器の細胞照射実験を兼ねて訪問した。この照射実験の直後、加速器は九州大学へ移設することが決まっており、今回の訪問が最後の機会となった。この加速器は米国 NEC(National Electrostatics Corp.)社製の8MV（8UDHペレトロン）加速器で、このサイズの静電加速器としては珍しく横置き（縦置きタイプは加速管の重量を支えやすいメリットがある）である。そのため加速管はタンク内部においてアクリルのロッドで支えられている。震災の影響もあり全国の大型静電加速器が少なくなる中、京大の8MV加速器が姿を消すのは残念な事である。ペレトロン加速器は専門外であるが、資料を調べながらまとめた京大加速器施設の紹介と最後に行った細胞照射実験についてここに記す。

**Keywords:** 静電加速器、ペレトロン、京都大学、セシウムスパッターイオン源、重イオンマイクロビーム

---

**\*Corresponding Author:**

酢屋 徳啓 (Noriyoshi Suya)

e:mail nsuya@nirs.go.jp

## 1.はじめに

京大理学部タンデム型静電加速器は米国 NEC 社製 8UDH ペレトロンという型式のペレットチェーンによる発電方式をとる加速器である。1987 年度から更新プロジェクトが始まり、米国 NEC 社のエンジニアにより建設、組み立て調整が行われ、1990 年に完成した。この加速器が導入される以前は、三菱のバンデグラフ加速器があった。その加速器タンクを残し加速管を入れ替えたようである。マシンタイムは低エネルギー核物理、地球物理、生物学、考古学、環境科学等の研究に利用されていた。[1]

京大重イオンマイクロビーム細胞照射装置の開発は、中村正信先生らによって、京大タンデム加速器施設を用いてすすめられてきた。[2] しかし、2011 年 7 月をもって施設が閉鎖されることが決定したため、重イオンマイクロビーム細胞照射装置の稼働も終わってしまう。そのため、最後のマシンタイムにおいて、細胞照射実験を実施するための協力依頼があった。

京大重イオンマイクロビーム細胞照射装置は、直径  $1\mu\text{m}$  の細かいアパーチャーを通してマイクロビームを形成をしている。同様の方式でマイクロビームを提供している施設には、原子力開発研究機構 (TIARA) がある。[3] しかし、京大タンデムの重イオンマイクロビームは、イオンエネルギーが  $10\text{ MeV/n}$  以下というブラッグピーク近傍の重粒子イオンのマイクロビームという特徴がある。この領域における重イオン線は、X、 $\gamma$  線などの光子放射線及び高エネルギー重イオンビームに比べて非常に特異的な生物効果を示すことが報告されている。[4,5] また、このようなビーム性質を有し、照射時の利便性でアドバンテージがある細胞の下部から上部へと照射可能な垂直ビームラインを有する施設は、世界的に見ても他

にない。

放医研 SPICE 側としても、SPICE が軽イオンであるプロトンのみマイクロビーム照射装置であることから[6, 7]、今後異なるイオン種での生物効果の検討が必要であることや、SPICE との他施設の性能との相互比較などの課題があった。さらに、2011 年 3 月 11 日の大震災の影響で、SPICE の運転は復旧のため停止していたことから、京大マイクロビーム装置を用いて、新規に樹立した細胞株のテストを行いたい希望もあった。そこで、照射実験への参加となった。

## 2.施設の概要

図 1 に示す通り、まず建屋の前に立つと屋上に大きなタンクが目に入るが、これは加速管と加速器タンク間の絶縁を保つための  $\text{SF}_6$  ガス (6 フッ化硫黄) を回収する際、貯蔵するタンクである。建屋内部の加速器本体の横にはガスドライヤーがあり、加速器運転中は常時  $\text{SF}_6$  ガスを循環して水分や分解生成物を除去している。 $\text{SF}_6$  ガス回収時は加速器タンク内の残圧を数トールまで下げることができ、屋上の回収用タンクへガスを回収する。[9]



図 1.京大理学部物理学第二教室正面

図 2 に示すように、入口を入って正面の扉を



開けると加速器の制御計測室になっている。向かって右側に NEC 社製の加速器制御システムと自家製のトランスポート制御システムが並び、左側にはデータ処理用計算機システムがある。その横の入口を抜けると管理区域入口がある。靴を履き替え次にあるのが加速器本体室のドアと照射室の迷路である。加速器本体室の奥にはイオン源室がある。迷路を抜けると照射室には当初 8 本のビームラインが計画されていた。そのうち 1 本は AMS (加速器質量分析計) として利用されていた。その他のラインは、反応粒子分析電磁石、大型散乱槽、PIXE 等がある。今回の細胞照射実験で使用するのは、重イオンマイクロビーム細胞照射ラインである。[9]

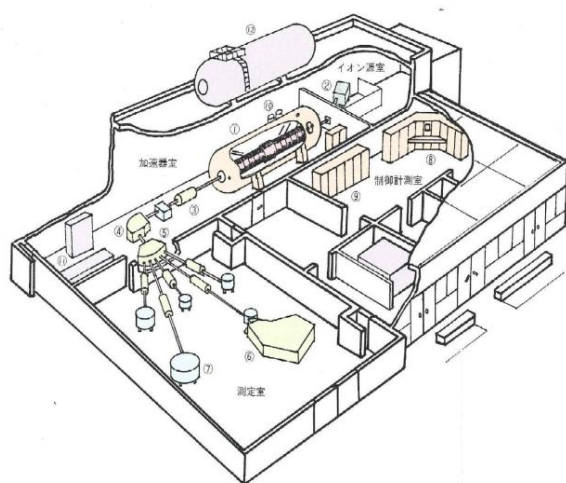


図 2. タンデム加速器実験室配置図

### 3. タンデム加速器

1962 年に国産のバンデグラーフ加速器が建設された。その加速器容器を残し 1989 年に NEC 社製加速器 (8UDH ペレットロン) が納入された。(図 3) 加速器容器の大きさは、直径 3m、長さ 13.6m、絶縁ガスは  $6\text{kg}/\text{cm}^2$  まで充填している。[1]

加速管はアルミナセラミックとチタンをメタルボンンドで接合した積層構造で出来ている。熱ショックにも強い特徴を持っている。[10] 1 本の長さは 305mm で 2 本 1 ユニット構成になっており 1 ユニットあたり 1MV 耐圧である。ターミナル部 (高電圧部) を挟んで High energy side (HE 側) と Low energy side (LE 側) のそれぞれ 8 ユニットずつ接続されている。高電圧部を支える絶縁カラムは直径約 1m のドーナツ形状で中心を加速管が通る。加速管と同じく 1MV 単位で分割され、両サイドにそれぞれ 8 個連結している。



図 3. 加速器本体

加速器は横型のため絶縁カラムの垂直加重を支えなければならない。そのため図 4 で示すように、直径 38 mm のアクリルロッドで絶縁カラムを引っ張り上げている。(550kgf の耐加重) アクリルロッドは 2 本対で加速器の両サイド 3 組ずつ斜め方向に取り付けられている。アクリルロッドは放電により運転開始当初は何度か破損したようだが、メーカーの改造によりアクリルロッドの破損は起きなくなった。[1]

加速電圧の発電方法は金属製のペレットチェーンを従来バンデグラーフ加速器に使われていた平ベルトの代わりに使用し、電荷を高

電圧ターミナル部へ運搬する方式である。

[10]

ペレットチェーンは独立な 2 系統のシステムからなり、合計 300  $\mu\text{A}$  の電流を高電圧部へ運ぶことが出来る。加速器に取り付けてあるキャパシティブピックオフ (CPO: 容量結合式電圧計) での測定は 500Vp-p であった。[9]

図 5 に示すように負イオン源は、1997 年に AMS 利用の為 NEC 社製イオン源からサンプルを 59 個装着可能な HVEE 社製セシウムスパッター負イオン源に更新された。[12] しかし、イオン源のコントロールに問題が発生した。イオン源は最大-200KV のエクストラクション電源上にあり、スパーク等によりサンプルローディング装置を駆動させるための電源電圧 (115VAC) が不安定になった。その結果、入力した各パラメーターがリセットされ、サンプルローディング装置がうまくコントロール出来なくなった。改善策として、自作のプログラムからイオン源をコントロールするための改造を施した。その結果、カメラで監視しながら、コマンドを打ち込んでサンプルローディングのコントロールができるようになった。今回の実験では、このイオン源を使いターゲットにカーボンを入れてビームを出した。

は大きく制御が変更されている。当初、加速器本体とイオン源はミニコンピューター PDP11/73 (リアルタイム OS-RT11) を主制御とする CAMAC システムであった。しかし平成 14 年 12 月に PDP11 が故障し、全ての機器の制御が出来なくなった。様々な理由により修理が困難になり、数ヶ月後の学生実験に間に合わせるため、約 1 ヶ月でハードワイヤリモコンによる制御システムを作り上げた [11]。数百本のワイヤーを繋ぎ込むだけでも相当の労力を要した事が伺える。放医研の静電加速器もシステムがそろそろ老朽化してきたので、制御システムの見直しをする上で今後の参考にしたい。

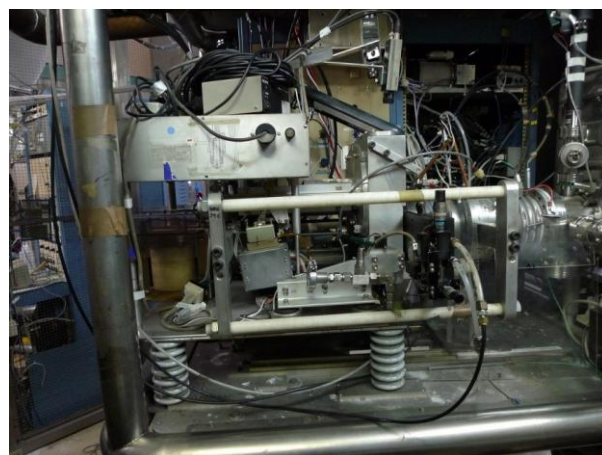


図 5.HVEE 社製セシウムスパッター負イオン源

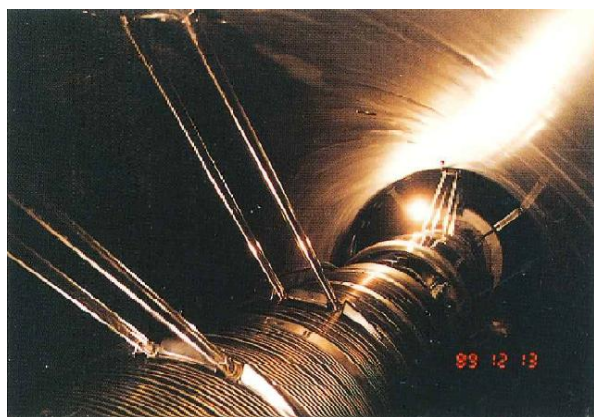


図 4.絶縁カラムを吊っているアクリルロッド



図 6.加速器の制御システム

図 6 に示す加速器制御システムは納入時と

#### 4.垂直照射システム

細胞照射を行うために 2003 年からマイクロビーム専用照射ビームラインを建設した。ビームラインを図 7 に示す。90° 垂直マグネットは NEC トーキン製である。ビーム取り出し部のコリメーターは 5  $\mu\text{m}$  で厚さ 10  $\mu\text{m}$  の Mo 板を使っている。22.85MeV の炭素ビーム ( $^{12}\text{C}^{3+}$ ) を使い、シングルアパチャーの照射テストを行った時には散乱ビームの影響が少なくない事が判明した。実用エネルギーの 42MeV では、散乱の影響はさらに大きくなるため、5  $\mu\text{m}$  と 6  $\mu\text{m}$  300  $\mu\text{m}$  の間隔で取り付けた。(後に 2000  $\mu\text{m}$  に変更) [13,16] 1つ1つのイオンを個々の細胞を狙って照射するためのシングルヒット制御は、厚さ 10  $\mu\text{m}$  極薄プラスチックシンチレーターと光電子増倍管を検出器とし、入射側の静電偏向板とスリットの組み合わせをビームストッパーとしている。静電偏向板用高速アンプは松定プレジジョン製を使用している。[14]



図 7. マイクロビーム専用照射ビームライン。細胞を照射する XY ステージはマイクロメーターを手動で操作していたが、いろいろな制限が大きいため 2009 年に電動化した。電動化後の XY ステージは図 9 に示した。



図 8. マイクロビーム細胞照射垂直ビームライン。顕微鏡の調整を行っている様子。

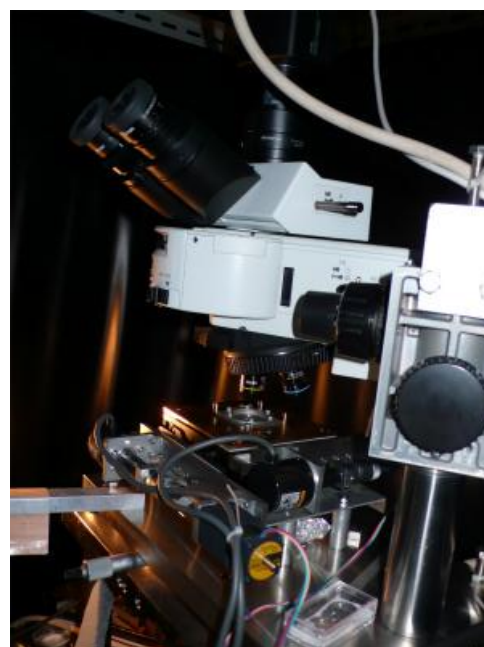


図 9. マイクロビームライン上の顕微鏡と XY ステージ

## 5. マイクロビーム細胞照射実験の紹介

ビームタイムでの細胞への照射実験の目的は、ヒト哺乳類培養細胞を用いて、1) 細胞への狙い撃ち照射が可能であること。2) 照射重イオンの粒子数制御の確認。3) 照準した細胞のDNA二本鎖切断部位の可視化及びその修復過程の追跡、であった。

加速器のターミナル電圧を 6.114MV とし、イオン源には、セシウムスパッター負イオン源を用い、ソースにはカーボン（粉末）を使用した。また  $C^{6+}$  ビームの加速エネルギーは 42 MeV とした。細胞への照射実験に際して、フォトダイオードによるビームエネルギー測定、照射粒子数制御について、事前に制度確認を行なった。

京大タンデム加速器施設が閉鎖する直前ということもあり、生物実験に必須なインキュベータや無菌操作に必要な設備はほとんどなかった。そのため、簡易型クリーンブース、小型  $CO_2$  インキュベータ、恒温槽のほか、ピペット、チップなどの細胞培養プラスチック消耗品も持参した。細胞試料の準備及び照射後の処理は、すべて加速器制御システム室内のテーブル上で行なった（図 10）。



図 10. 簡易型クリーンブースで細胞試料の準備と照射後処理を行った。

このように無菌操作環境が不十分という諸事情のため、可能な限り細胞を扱う作業を減らすことにした。例えば、SPICE 用培養皿は事前に作成し、滅菌済みの状態で密閉して持参した。また、細胞へビーム照準する際に行う細胞核蛍光染色を必要としない GFP タンパク質発現する細胞株を事前に作成し、持参するなどした。ビームタイムにて用いた細胞株はヒト肺由来ガン細胞である A549 細胞に、pBOS-H2B-GFP vector を導入したヒストンタンパク質 H2B と GFP 蛍光タンパク質の複合タンパク質を安定的に発現する A549-H2B-GFP 細胞株を樹立した。株樹立には、この pBOS vector をトランスフェクション後、抗生物質によるセレクション及び GFP 蛍光を頼りにフローサイトメーター (FACsAria, BD) [15] による細胞分取を繰り返すことで細胞を樹立した。

照射用の細胞皿は、SPICE で用いるものに、2.5  $\mu m$  厚マイラーを張ったものを使用した。[6] 京大マイクロビーム装置の試料用ステージに SPICE 細胞皿を設置できるように、図 11 に示した細胞皿固定治具を作成した。また撮像には、正立型顕微鏡 (BXFM, オリンパス) にキセノン光源、ダイクロイックミラーユニット、40X 対物レンズ及び CCD カメラ (FX380, オリンパス) を装備した仕様であった。

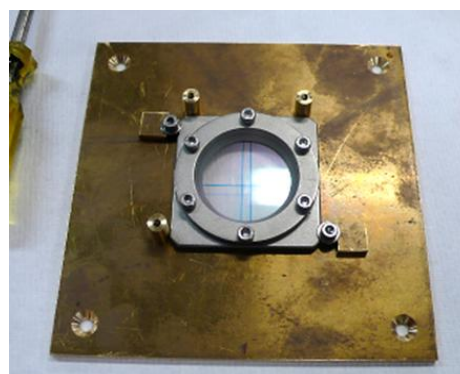


図 11. SPICE 用細胞皿を照射用電動ステージに設置するための固定治具。

細胞座標位置を自動決定する画像解析プログラムではなく、CCD 画像を出力しているモニターに現れる細胞蛍光画像を頼りに、電動ステージを用いて、照射したい細胞をビーム位置に移動させて行なった。図 11A には、A549 細胞の細胞核が緑色の GFP 蛍光を示していることがはっきりと確認できる。このような画像中の緑色の蛍光で確認できるヒストンタンパク H2B-GFP を頼りに細胞の狙い撃ちを行なった。

図 12 に照射実験結果の一例を示した。図 12A の○（サイズ直径 50  $\mu\text{m}$ ）で囲った細胞に照準を合せ、C イオンを 100 個照射した。照射後 30 分間 37°C の 5%CO<sub>2</sub> インキュベータに戻した。その後、4%パラホルムアルデヒドにて 15 分間固定後、PBS に入れ替えて、冷蔵庫（4°C）に保管した。その後、放医研まで持ち帰って免疫蛍光染色処理を行なった。

C イオンが細胞核を通過するとその飛跡に沿って DNA 二本鎖切断 (DSB) が誘発されるが、DSB が起きると DNA が巻きついているヒストンタンパク質の一種である H2AX がリン酸化し、 $\gamma$ -H2AX となる。この  $\gamma$ -H2AX に対する anti- $\gamma$ -H2AX-mouse 抗体及び anti-mouse Alexa555 蛍光二次抗体を用いて免疫蛍光抗体処理をし、画像化したのが図 12C である。図 12B は、試料を放医研に持ち帰ってからの H2B-GFP 蛍光画像であり、細胞核を示す蛍光が長時間確認できることを示している。このように、照準を合わせた細胞には、DNA 二本鎖切断が確認できたことから、重イオンマイクロビームによる細胞の狙い撃ち実験が可能であることを証明することが出来た。

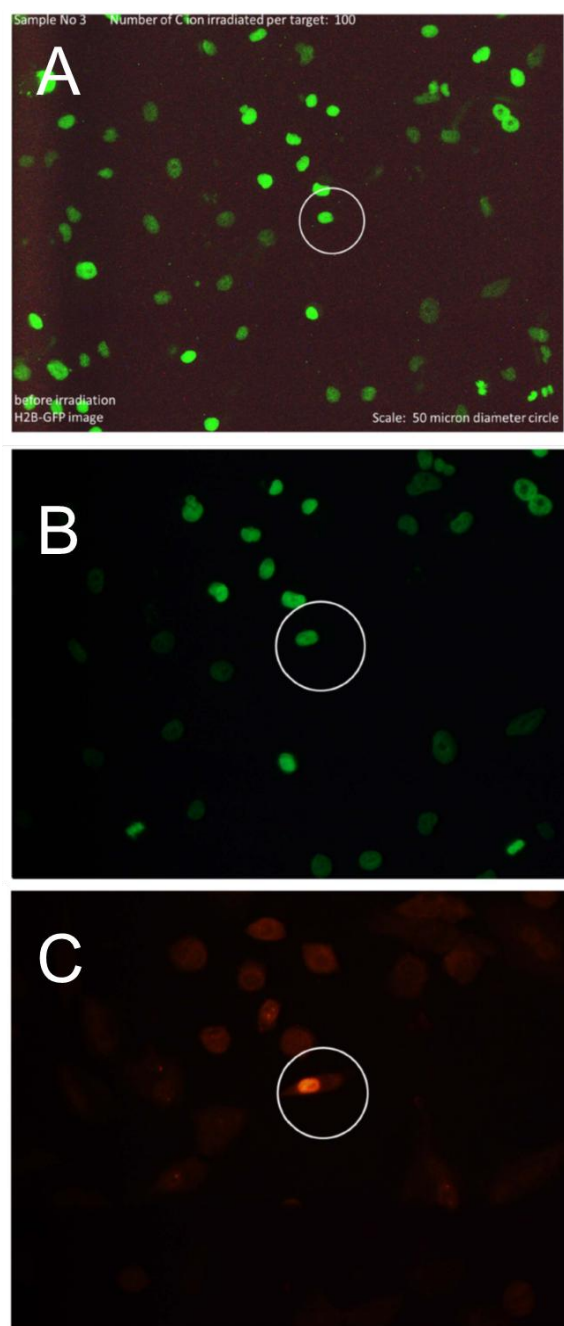


図 12 A549-H2B-GFP 細胞への照準と照射後の DNA 二本切断部位の可視化画像。A:照準時、B、C は免疫抗体処理後の画像、A,B は GFP 蛍光 (緑)、C は、 $\gamma$ H2AX 部位を Alexa555 蛍光抗体 (赤) で可視化した画像。

## 6.まとめ

放医研の加速器は HVEE (High Voltage Engineering Europa) 社製の Cockcroft ウ

オルトン型であるが[10]、京大はペレットチェーン型の発電方式の加速器で、個人的にあまり馴染みが無い装置である。実験記録ないし訪問時の印象記として、ここに記したので、京大タンデム加速器及び施設に関する詳細な事項について誤解があるかもしれない。その点をご容赦をお願いしたい。放医研の加速器は最大電圧 1.7MV で主にプロトンで細胞照射を行っているのに対し、京大は最大 8MV の加速器を有し、細胞に対し重イオン照射が出来る装置である。もっと以前から取り組んでいけば、さらに良い実験結果が得られたかもしれない。そういう意味では今回が最後の照射になることが残念である。今後も重イオン照射ができるビームラインを持つ加速器が増えることを願っている。

## 謝辞

今回、加速器施設を使わせていただき、本実験のご指導並びにご協力をしていただいた和歌山県立医科大学の中村正信先生と最後のマイクロビーム細胞照射の加速器運転と照射のお手伝いをしていただいた、京都大学理学研究科の廣瀬昌憲さんに深く感謝いたします。

## 引用文献

- [1] 松本博、京大理タンデム型静電加速器における本体部分の紹介及び故障について (H15.2.5), <http://www.ne.jp/asahi/hmatumot/giyuukobo/ps14.htm>, 最終アクセス 2012.2.2
- [2] M. Nakamura, K. Imai, M. Hirose, H. Matsumoto, M. Tosaki, D. Ohsawa, and S. Makino, Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B 269 (2011) 3153-3157
- [3] Y. Kobayashi, T. Funayama, N. Hamada, T. Sakashita, T. Konishi, H. Imaseki, K. Yasuda, M.

Hatashita, K. Takagi, et al., Microbeam Irradiation Facilities for Radiobiology in Japan and China. *J. Radiat. Res.* 50, A29-A47 (2009).

[4] T. Konishi, N. Yasuda, A. Takeyasu, S. Ishizawa, T. Fujisaki, K. Matsumoto, Y. Furusawa, Y. Sato and K. Hieda, Irradiation system of ions (H-Xe) for biological studies near the Bragg peak. *Review of Scientific Instruments* 76 (2005) 114302.

[5] 小西輝昭, 竹安明浩, 雨宮邦招, 夏目敏之, 安田仲宏, 檜枝光太郎, 細胞核内 DNA 二本鎖切断部位の蛍光標識によるイオントラックの可視化, *放射線*, 33 (2007)201-210

[6] T. Konishi, T. Ishikawa, H. Iso, N. Yasuda, M. Oikawa, Y. Higuchi, T. Kato, K. Hafer, et al., Biological studies using mammalian cell lines and the current status of the microbeam irradiation system, SPICE. Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B., 267(2009) 2171-2175.

[7] 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 の開発と現状ープロトンビームで細胞を狙い撃ちー放射線医学総合研究所技術報告書 (NIRS Technology) 5 (2010) 83 – 93.

[8] 中村正信、今井憲一、松本博 et al., 第 18 回タンデム加速器及びその周辺技術の研究会報告集 (2005) 50-53

[9] パンフレット タンデム加速器実験棟 1990 (京都大学理学部物理学第二教室)

[10] 加速器実験物理学講座 28 加速器(1975)共立出版

[11] 松本博、京大理タンデム型静電加速器の新制御システム開発 H15.9, <http://www.ne.jp/asahi/hmatumot/giyuukobo/ps15.htm>, 最終アクセス 2012.2.2

[12] 松本博、京大理タンデム加速器を用いた質

量分析法による炭素年代測定、

<http://www.ne.jp/asahi/hmatumot/giyuukobo/ps16.htm> 最終アクセス 2012.2.2

[13]中村正信、今井憲一、松本博 et al.,第 16 回  
タンデム加速器及びその周辺技術の研究会報  
告集 (2003) 54-57

[14]中村正信、今井憲一、松本博 et al.,第 18 回  
タンデム加速器及びその周辺技術の研究会報  
告集 (2005) 50-53

[15] 前田 武、小西 輝昭、高野 裕之、児玉 久  
美子、Kurt Hafer, FACS Aria による精度管理及び  
ソーティング精度の検証,放射線医学総合研究所  
技術報告書 (NIRS Technology) 5 (2010) 28-53.  
ISBN 978-4- 938987-67-1

[16] 中村正信、今井憲一、廣瀬昌憲 et al.,第 23  
回タンデム加速器及びその周辺技術の研究会  
報告集 (2010) 69-72

---

---

放射線医学総合研究所  
技術報告書



NIRS Technology

---

---

www.nirs.go.jp

NIRS Technology, vol. 6 (2012) 39 – 50.

## FACSAria を用いた多重蛍光染色試料測定時の蛍光補正法について

前田 武<sup>\*1</sup>、小西 輝昭<sup>1</sup>、塩見 尚子<sup>1</sup>、高野 裕之<sup>2</sup>、児玉 久美子<sup>3</sup>

- 1) 研究基盤センター研究基盤技術部
- 2) 東京ニュークリア・サービス㈱
- 3) ㈱ネオス・テック

---

### 要旨

放射線医学総合研究所(以下「放医研」という)には、共同実験機器<sup>1</sup>として「細胞分取装置」という名称で日本BD(Becton, Dickinson and Company)社のFACSAriaが導入されている。FACSAria はフローサイトメトリー(Flow Cytometry)<sup>2</sup>の一種で、血球細胞、動物細胞、植物細胞、酵母、バクテリア、プランクトン、核などの0.5 μm~100 μm程度の大きさの単離状態の細胞浮遊液のサンプル1つ1つにレーザー光を当てて、出てきた散乱光や蛍光を検出し、それらの光を電気信号に変えて検出し測定する装置である。

前回までに、本装置に対する精度を維持するためのメンテナンス等及びソーティング精度について検討を行った。

今回は、搭載している3本のレーザー(青色波長:488 nm 半導体レーザー、赤色波長:633 nm HeNeレーザー、紫色波長:407 nm 半導体レーザー)を用いて試料を解析するときにかかる蛍光の漏れ込みとその補正について検討を行った。

**Keywords:** FACS、フローサイトメトリー、漏れ込み補正、コンペンセーション、Compensation、精度管理、細胞分取、ソーティング、共同実験機器

---

**\*Corresponding Author:**

前田 武 (Takeshi Maeda)

e-mail:ta\_maeda@nirs.go.jp

---

<sup>1</sup> 放射線医学総合研究所が設立した1957年(昭和32年)から、研究施設や機器等の資源の効率的な運用と部門間の利用の公平を担保するため、「共同実験施設運営委員会」を設け、共同で利用すべき実験機器及び施設として指定された機器及び施設のこと。

<sup>2</sup> 懸濁させた細胞を、シース流を用いて、1個ずつセンシングゾーンに細胞を導き、高速で散乱光と蛍光などを測定する装置のこと。



## 1 はじめに

放射線医学総合研究所技術報告書 Vol. 5 (2010) P28-44 及び P45-53 で「FACSAria」の精度管理及びソーティング精度についてと Hoechst 蛍光試薬を用いたソーティングについて検討を行った。その中で、「FACSAria」の「FACS」とは、fluorescence-activated cell sorter (蛍光標示式細胞分取器) の意味で、蛍光試薬などで染色するなどの前処理を行ったサンプルを含んだストリームにレーザー光を当てて蛍光を発生させる(図1)ことで、前方散乱 FSC (Forward Scatter)、光線と直角の方向の側方散乱 SSC (Side Scatter)で細胞の大きさ、細胞の形態や核、顆粒などの細胞内部構造の情報を取得(図2)したり、蛍光を BPF(Band Pass Filter)で検出して(図3)細胞等の状態を解析する仕組みであることを述べた。

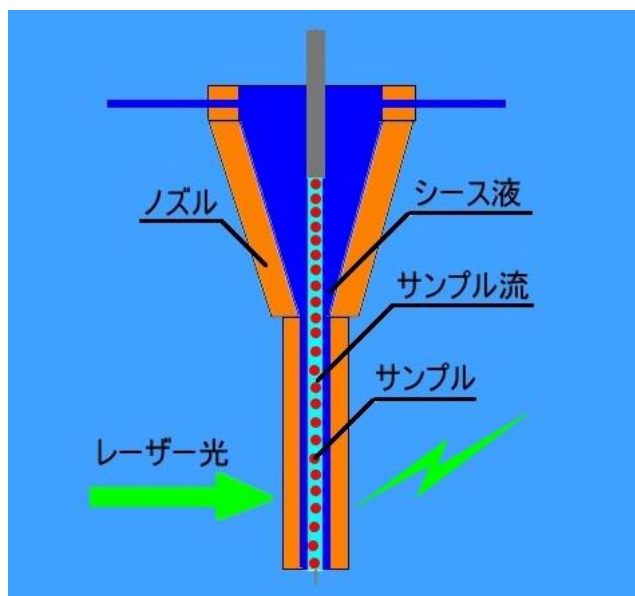


図1 シース液と共に流れてきたサンプルにレーザーを直交させ、それにより励起された蛍光を検出器で検出する。(文献[5]より改変)

図3を見ると分かるが、例えば FITC の蛍光波長については、530/30 と 585/42 の BPF で検出出来ることが分かる。しかし、585/42 は PE または PI

を検出するために用いる BPF である(表1)ことから、FITC と PE のダブル染色をしたサンプルの場合、解析に問題が生じる。この、585/42 で検出されてしまう FITC の蛍光波長を漏れ込みとして取り扱い、適正に処理をしなければならない。

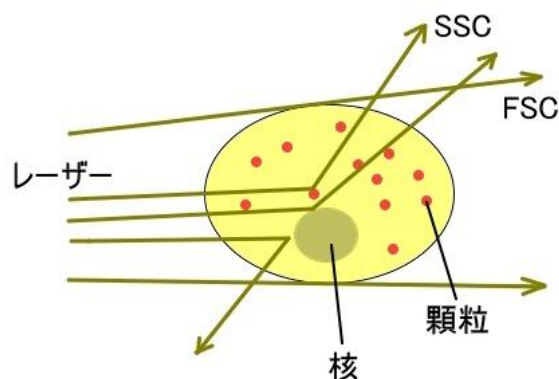


図2 レーザー光が細胞を通過したときに発生する散乱光の経路(文献[5]より改変)

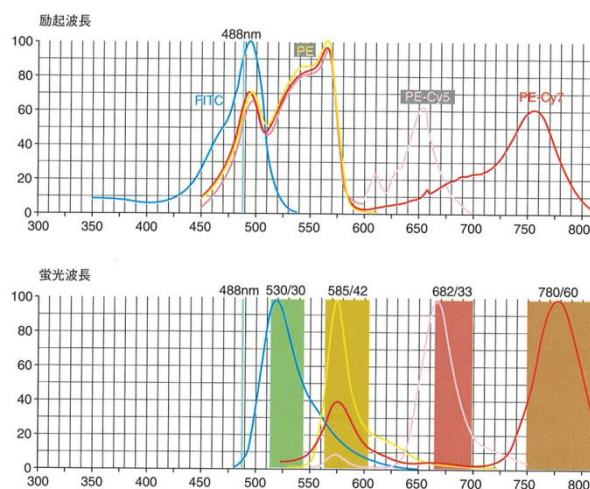


図3 蛍光・励起波長の特性(文献[5]より)

この状態を、処理する方法を漏れ込み補正(コンペンセーション: Compensation)といい、今回、この手法について検証を行った。

## 2 実験手順

### 2.1 準備

#### 2.1.1 試薬・サンプル

- ・ BD CaliBRITE 3 : Becton, Dickinson and Company
- ・ BD CaliBRITE APC : Becton, Dickinson and Company

#### 2.1.2 設定

- ・ Nozzle : 70  $\mu$
- ・ Stream Speed : High
- ・ Flow Rate : 1.0
- ・ FSC ND Filter Assembly : 1.0
- ・ Filters Position : Normal (NIRS)
- ・ Filters Position : Change (Three Laser SYSTEM)
- ・ Beads : FITC / PE / PerCP (BD CaliBRITE 3)
- ・ Beads : APC (BD CaliBRITE APC)
- ・ Beads : Unlabeled (BD CaliBRITE 3)

### 2.2 レーザーとフィルタの組合せ

FACSAria は搭載するレーザー数にあわせてその設定を変更し、検出できる蛍光数が変わる。それらについて表 1 にまとめた。放医研の FACSAria のフィルタの組合せ (図 4) はマニュアルに示されているものとは太赤字下線部が異なっている。

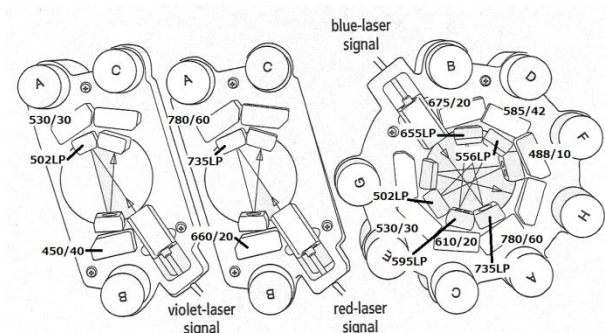


図 4 放医研 FACSAria Default Filter Position

左から、Violet(407 nm 半導体レーザー)、Red(633 nm HeNe レーザー)、Blue(488 nm 半導体レーザー)が入射され、BPF で絞られる。(文献[6]より)

### 2.3 蛍光試薬の蛍光・励起波長

#### A) FITC

励起波長 : 488 nm

蛍光波長 : 520 nm

#### B) PE

励起波長 : 488 nm

蛍光波長 : 575 nm

#### C) PerCP

励起波長 : 490 nm

蛍光波長 : 675 nm

#### D) APC

励起波長 : 633 nm

蛍光波長 : 660 nm

## 3 実験準備

サンプルの測定範囲適正化を実施するため、Area Scaling Factor の調整を行う。Area と Height を用いてデジタルパルス処理を行い計算する (図 5)。両者のプロット表示上の位置は異なるため、表示上の比率を調整するための係数が、Area Scaling Factor でこれを調整することで Area と Height の表示位置を揃える。これは両者の測定範囲の適正化と共にタブレットの除去を行う上でも非常に重要である。

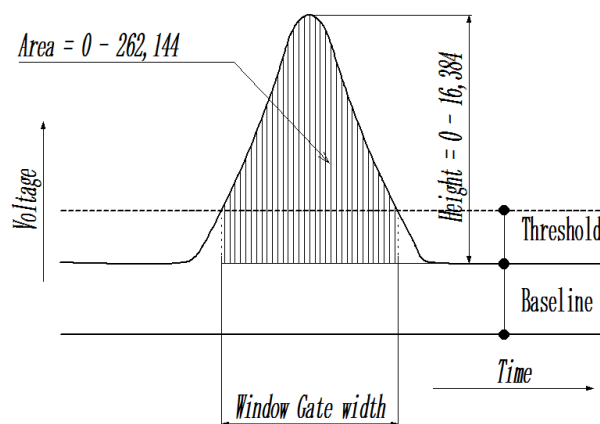


図 5 for Height : Maximum digitized value (x16)  
for Area : Sum of all height values (0.1  $\mu$ sec / Sampling) for Width : Area / Height x 64 k Digital data is displayed on 262, 144 scales (文献[6]より)

もし、両者の測定範囲が揃っていない場合シグナル強度の検出において飽和(Saturation)を起こしている場合がある (図 6)。

表 1 BD が公表しているレーザーとフィルタの組合せ。放医研のとは太赤字下線部が異なる。

Two Laser SYSTEM (7 color)			Three Laser SYSTEM (9 color)		NIRS FACS Aria	
<b>633 nm HeNe レーザー (Red)</b>						
A	780/60	APC-Cy7	780/60	APC-Cy7	780/60	APC-Cy7
	735		735		735	
B	660/20	APC	660/20	APC	660/20	APC
<b>488 nm 半導体レーザー (Blue)</b>						
A	780/60	PE-Cy7	780/60	PE-Cy7	780/60	PE-Cy7
	735		735		735	
B	695/40	PerCP-Cy5.5 or PI	<u>695/40</u>	<u>PerCP-Cy5.5 or PI</u>	<u>675/20</u>	<u>PerCP</u>
	655		655		655	
C	610/20	PE-Texas Red	610/20	PE-Texas Red	610/20	PE-Texas Red
	595		595		595	
D	572/26	PE or PI	<u>572/26</u>	<u>PE or PI</u>	<u>585/42</u>	<u>Alternative for PE/ PI when not using PE-Texas Red</u>
	556		556		556	
E	530/30	FITC	530/30	FITC	530/30	FITC
	502		502		502	
F	488/10	SSC	488/10	SSC	488/10	SSC
	1.0 ND Filter		1.0 ND Filter		1.0 ND Filter	
<b>407 nm 半導体レーザー (Violet)</b>						
A	530/30	(Violet2) Alexa Fluor 430	530/30	(Violet2) Alexa Fluor 430	530/30	(Violet2) Alexa Fluor 430
	502		502		502	
B	450/40	(Violet1) Cascade Blue Pacific Blue Hoechst DAPI Alexa Fluor 405	450/40	(Violet1) Cascade Blue Pacific Blue Hoechst DAPI Alexa Fluor 405	450/40	(Violet1) Cascade Blue Pacific Blue Hoechst DAPI Alexa Fluor 405

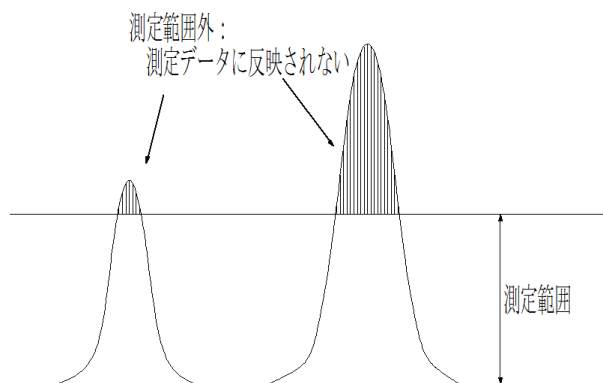


図6 Areaが測定範囲に入っていたとしても、Heightが測定範囲外にはみ出している場合は、検出器強度が Saturation している状態であり、パルス検出が頭打ちとなり正確な測定結果を得ることが出来ない。(文献[6]より)

Area Scaling Factor の調整はレーザー毎に行う必要がある。FSC (photo diode)はほかの蛍光パラメータ(PMT)とは検出器が異なるため、Blue レーザーの調整とは別に行うことが必要である(図7)。

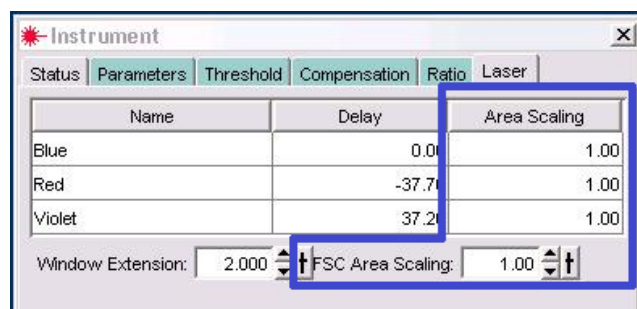


図7 FSC と Laser 毎に Area Scaling が調整する。

Area Scaling Factor 調整の仕方はマニュアルに詳しく書かれているので割愛するが、図8に示すように無蛍光サンプルと蛍光サンプル共に Area と Height のドットプロットが対角線上に乗るように調整する。この時、PMT の Voltage と Gate も影響を受けるので、微調整を行う必要がある。

この時、Window Extension の値に注意する(図9)。パルスの検出範囲は、Threshold の設定により閾値が規定されるが、Window Extension は Threshold で切られるパルスの両端を検出するために設定する(図10)。

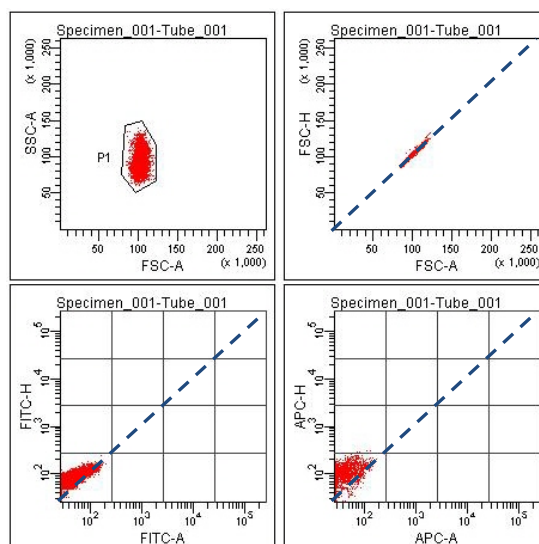


図8 Area Scaling Factor を調整して対策線上にサンプルの集団が来るようにする。

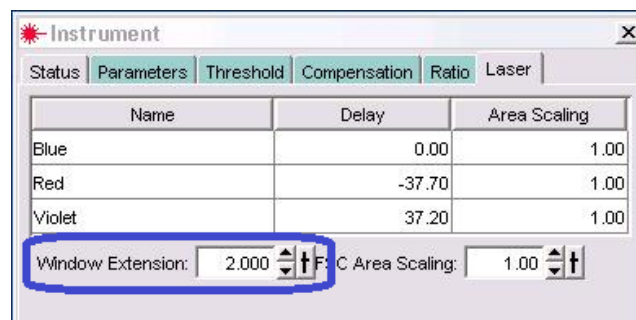


図9 必要に応じて Window Extension を変更する。

Window Extension が2に設定されている場合、Threshold で規定されたパルスの検出範囲に対して、 $\pm 1 \mu\text{sec}$  の範囲のパルスデータを拡張して取得する。

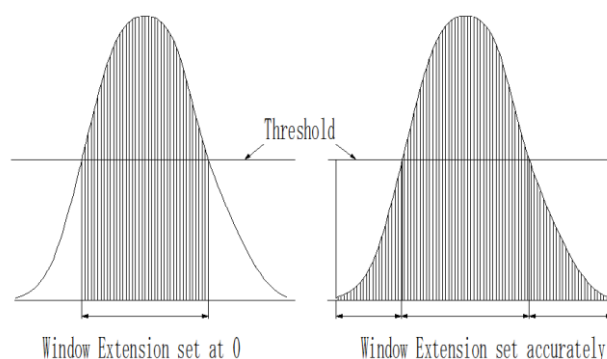


図10 Window Extension のイメージ(文献[6]より)

通常の細胞では、標準値の Window Extension = 2 で問題ない。なお、細胞が大きい場合には、パルスの裾野が広い場合があるので、プロットの表示位置が動かなくなる範囲に Window Extension の値を上げる。ただし、ソーティングにおいては必要以上に長い Window Extension は処理における Electronic Abort を上昇させるので注意する。

#### 4 実験・検証

Work Sheet に FITC-A、PE-A、PerCP-A を横軸に、縦軸に Count(%) を取ったヒスト・グラフを作成する。

FITC の Beads を FACS Aria に取り込みデータを記録する。同様に、PE、PerCP についても行う。全てが終わった後、BPF を入れ替えて同じ事を繰

り返した。

その結果、FITC の蛍光波長については、530/30 と 585/42 (576/26) の BPF で検出され(図 11-1)、PE の蛍光波長については、585/42(or 576/26)と 530/30, 675/20 (又は 695/40) の BPF で検出され(図 11-2)、PerCP の蛍光波長については、675/20(or 695/40)のみで検出される(図 11-3) ことが分かる。

これは、FITC、PE、PerCP が同じアルゴンレーザー(488 nm)で励起し異なった波長の蛍光を発しているのであるが、蛍光色素が長波長方向に裾をひく形で広く分布するため互いに重なり合う領域が出来てしまうためだ。このため、光学系フィルタやミラーを用いて波長域を分離しても、別の蛍光が検出器に漏れ込んでしまい、蛍光が観察されないサンプルにでも蛍光が観察されてしまうことを示している。

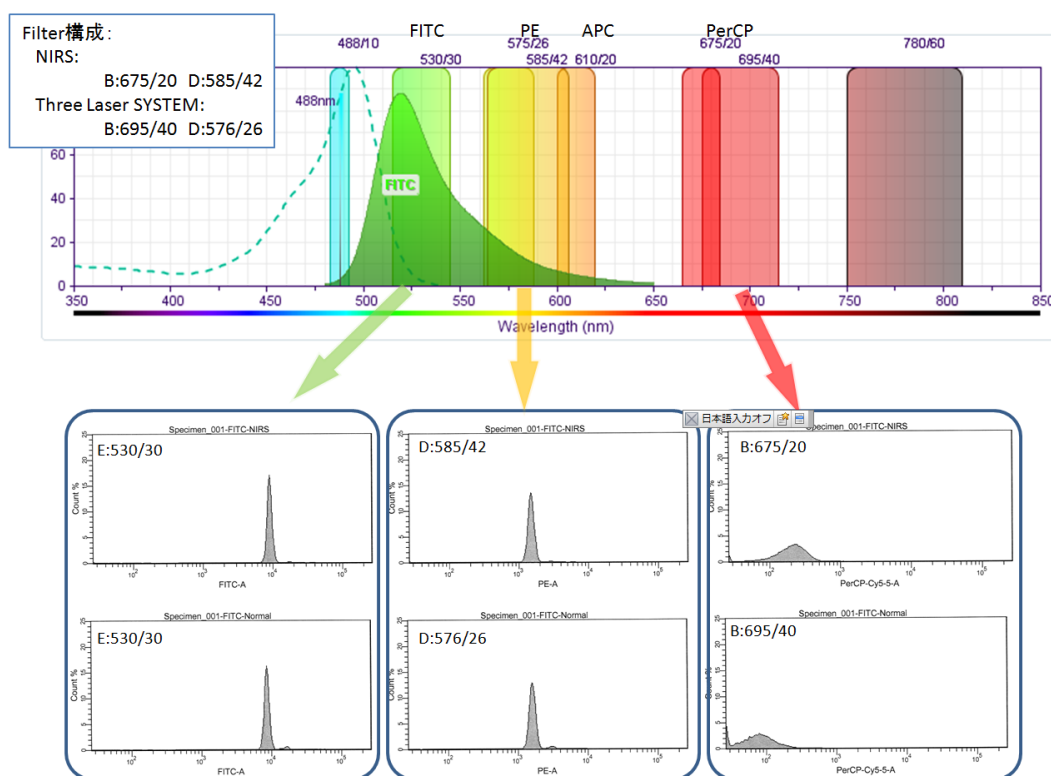


図 11-1 488 nm Laser で FITC を励起すると、蛍光波長は搭載フィルタのうち、530/30 で最も明るく検出し、585/42(又は 576/26)で検出される。(文献[7]より改変)

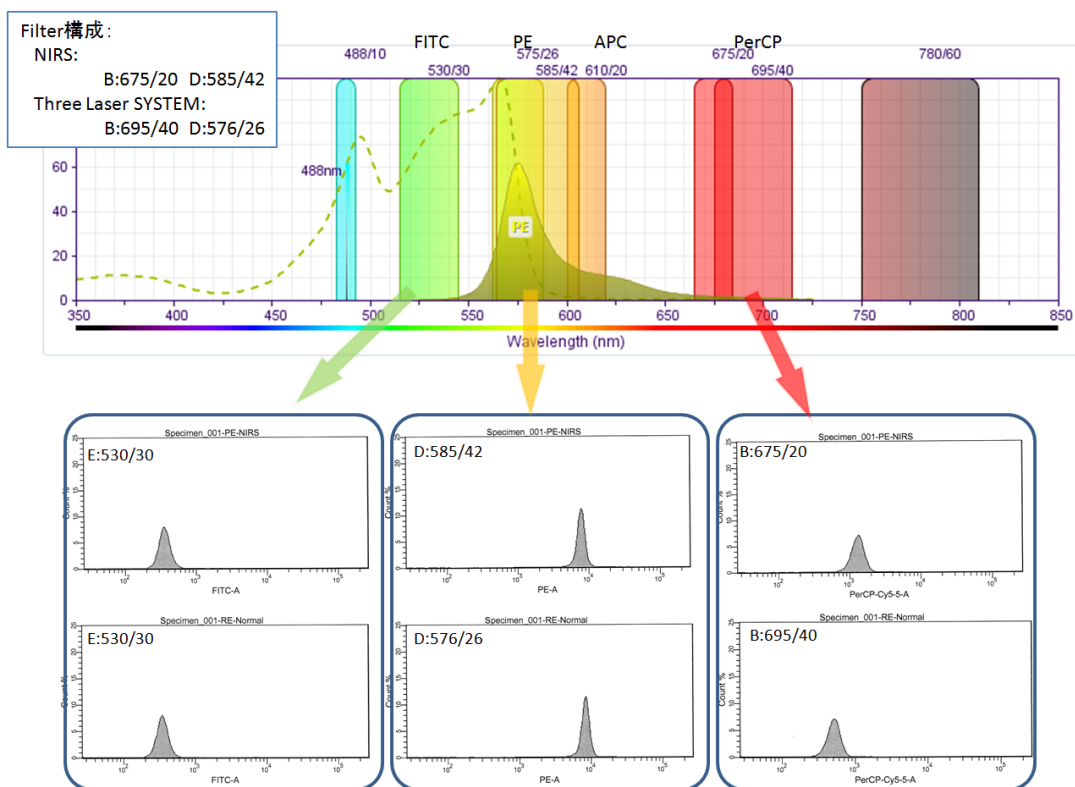


図 11-2 488 nm Laser で PE を励起すると、蛍光波長は搭載フィルタのうち、585/42(or 576/26)で最も明るく検出し、530/30, 675/20 (又は 695/40)で検出される (文献[7]より改変)

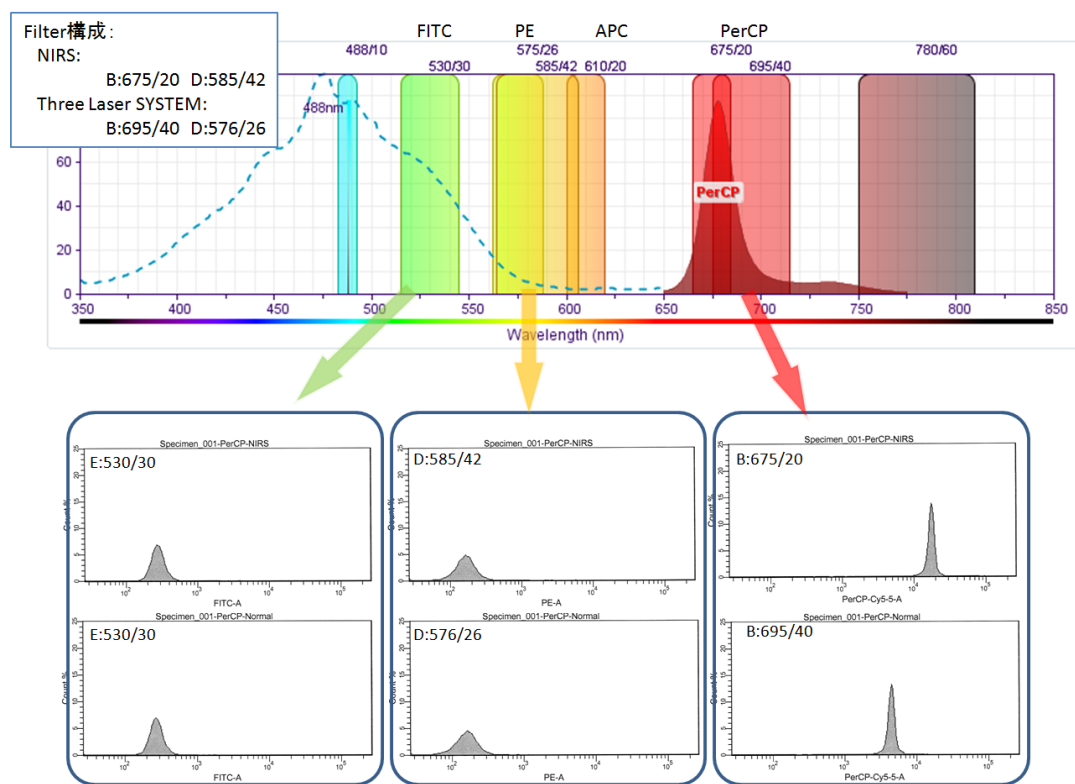


図 11-3 488 nm Laser で PerCP を励起すると、蛍光波長は搭載フィルタのうち、675/20(or 695/40)で最も明るくされる。今回 FACSDiva に PerPC が無かったので近似の PerCP-Cy-5.5(最大蛍光波長 695 付近)で測定した。(文献[7]より改変)

この様に、複数の蛍光色素で染色したサンプルを用いた解析を実施するときには、重なり合った干渉領域を電氣的に補正(蛍光補正:コンペンセーション: Compensation)する必要がある。

コンペンセーションの方法は以下の(1)自動と(2)手動の2通りある。手順の詳細は文献[6]を参照願いたい、重要な部分であるので検証のため文献[6]にビーズを1種類加えた条件で引用する。

(1)自動コンペンセーション(Auto Compensation)

- ① サンプルを準備する。
  - a. Unlabeled
  - b. Unlabeled + FITC
  - c. Unlabeled + PE
  - d. Unlabeled + PerCP-Cy5.5
  - e. Unlabeled + APC
- ② 蛍光補正用チューブを作成する。
- ③ aのサンプルをロードし、FSC, SSCのVoltageを調整する。
- ④ Threshold値を設定しノイズとなる集団を除去する。
- ⑤ 蛍光パラメータのVoltageを調整して展開されているドットプロット及びヒストグラムの中心をプロット軸の $10^2$ 付近にし、他のSheetに設定したポピュレーションを展開してデータを保存する。
- ⑥ bのサンプルをロードし、データを読み込み保存する。保存後、Stained Controlのポジティブゲートを必要に応じてポジティブな領域を設定する。
- ⑦ 同様にc, d, eのサンプルについても実施する。
- ⑧ 全てのサンプルを記録し終えたら、測定されたコントロールサンプルから蛍光補正値を計算する。
- ⑨ 以降、Global Sheetにプロットを作成し測定を行うと蛍光補正がされたデータを得ることが出来る。

コンペンセーションの前後でどのようになるか比較するため、①で作成したサンプルを Global

Sheetに展開した(図12-1~図12-5)。

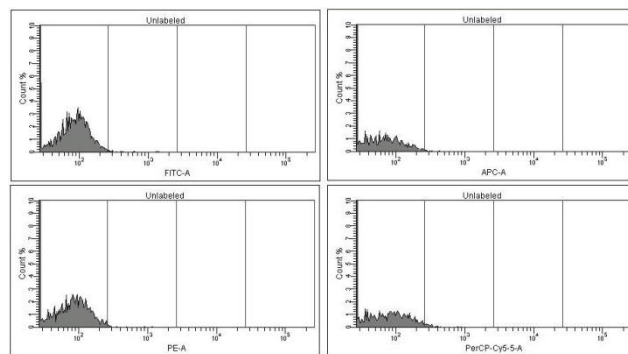


図12-1 Unlabeled Beadsをヒストグラムに展開する。

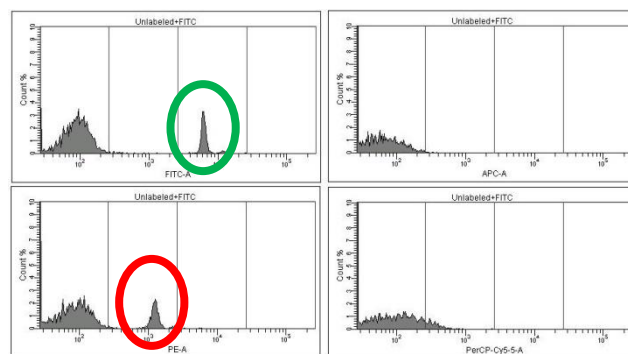


図12-2 Unlabeled + FITC Beadsをヒストグラムに展開する。FITCとPEのヒストグラムにピークがあることから漏れ込みが分かる。

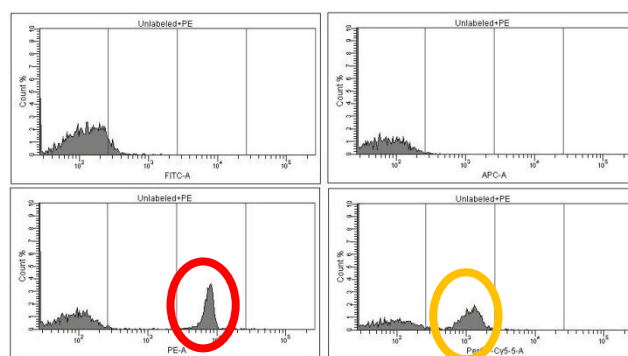


図12-3 Unlabeled + PE Beadsをヒストグラムに展開する。PEとPerCP-Cy5.5のヒストグラムにピークがあることから漏れ込みが分かる。

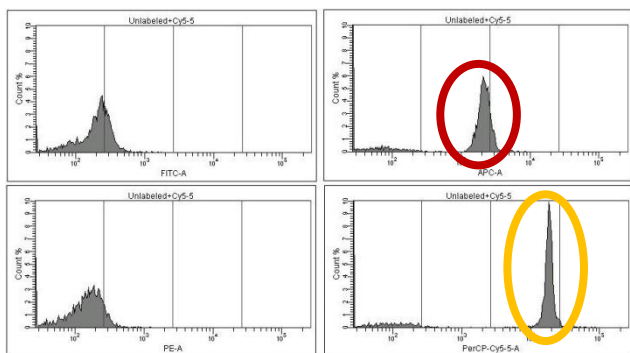


図 12-4 Unlabeled + PerCP-Cy5.5 Beads をヒストグラムに展開する。PerCP-Cy5 と APC のヒストグラムにピークがあることから異なるレーザーでも漏れ込みがあることが分かる。

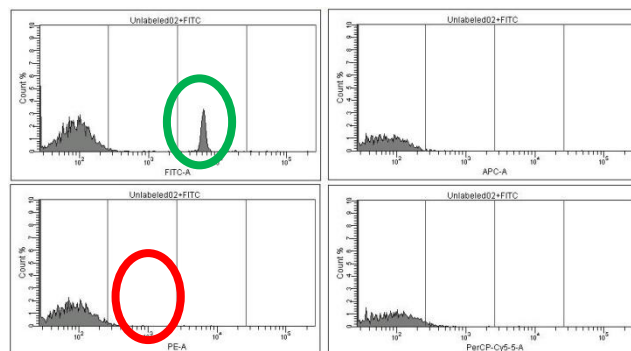


図 13-2 Unlabeled + FITC Beads をヒストグラムに展開する。図 12-2 と比較して漏れ込みが解消されたことが分かる。

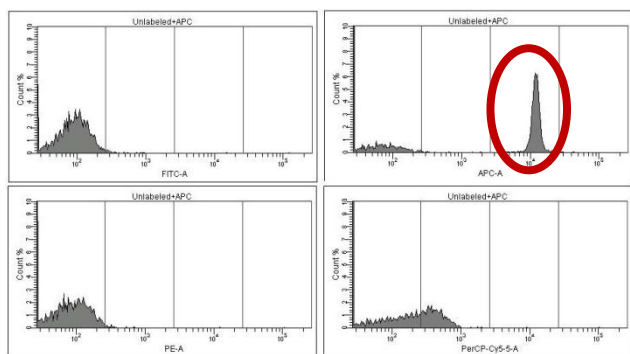


図 12-5 Unlabeled + APC Beads をヒストグラムに展開する。ほぼ漏れ込みが無いことが分かる。

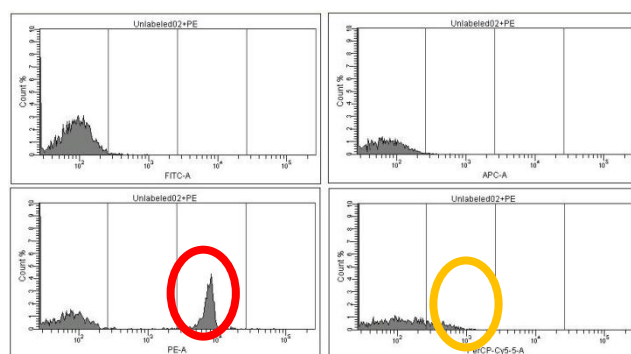


図 13-3 Unlabeled + PE Beads をヒストグラムに展開する。図 12-3 と比較して漏れ込みが解消されたことが分かる。

次に②～⑦までを行い、⑧で計算させるとコンペンセーションが行われ先ほどの Global Sheet で同じサンプルを読み込ませると漏れ込みが補正されていることが分かる(図 13-1～図 13-5)。

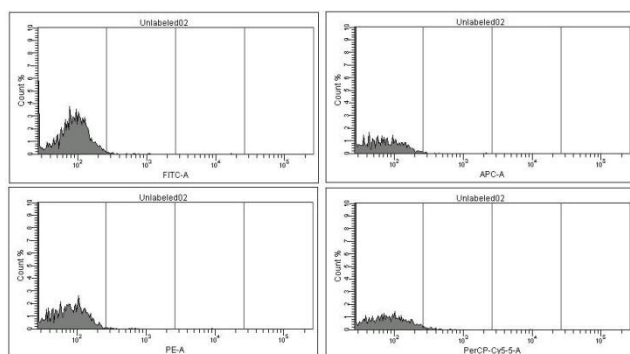


図 13-1 Unlabeled をヒストグラムに展開する。

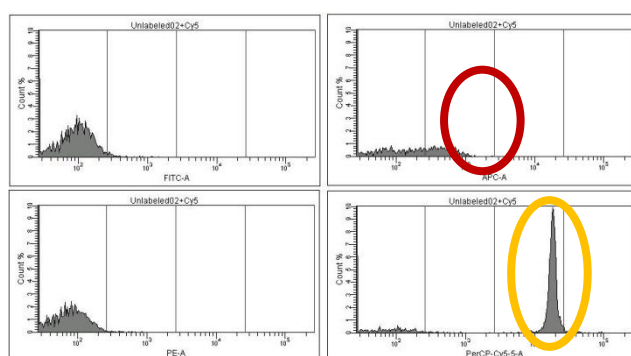


図 13-4 Unlabeled + PerCP-Cy5.5 Beads をヒストグラムに展開する。図 12-4 と比較して漏れ込みが解消されたことが分かる。



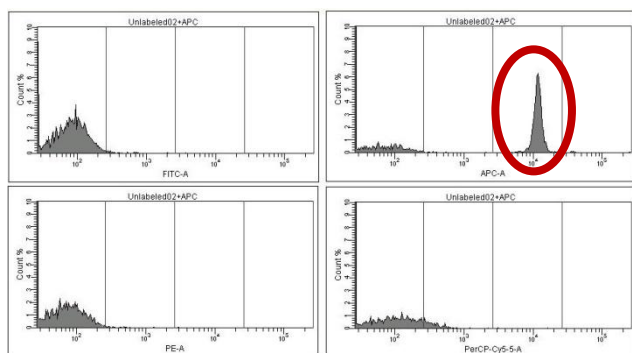


図 13-5 Unlabeled + APC Beads をヒストグラムに展開する。図 12-5 と比較しても漏れ込みが無かったため、殆ど変化がない。

(2) 手動コンペンセーション

(Manual Compensation)

① サンプルを準備する。

- a. Unlabeled
- b. Unlabeled + FITC
- c. Unlabeled + PE
- d. Unlabeled + PerCP-Cy5.5
- e. Unlabeled + APC

② Global Sheet にコンペンセーションが必要なドットプロットを展開する。この例では 4 色

なので、

- i . FITC vs PE
- ii . FITC vs PerCP-Cy5.5
- iii . FITC vs APC
- iv . PE vs PerCP-Cy5.5
- v . PE vs APC
- vi . APC vs PerCP-Cy5.5

となる。

- ③ a のサンプルをロードし、FSC vs SSC の Voltage を調整し中心をプロット軸の  $10^2$  付近にした後、FSC vs SSC で目的集団を選択し他のドットプロットでその集団のみを表示するよう調整する。
- ④ Threshold 値を設定しノイズとなる集団を除去する。
- ⑤ FSC vs SSC に[Show Population Hierarchy]を表示し、他は[Create Statistics View]を表示する(図 14)。
- ⑥ b のサンプルをロードし、データを読み込み保存する。保存後、Stained Control のポジティブゲートを必要に応じてポジティブな領域を設定する(図 15)。

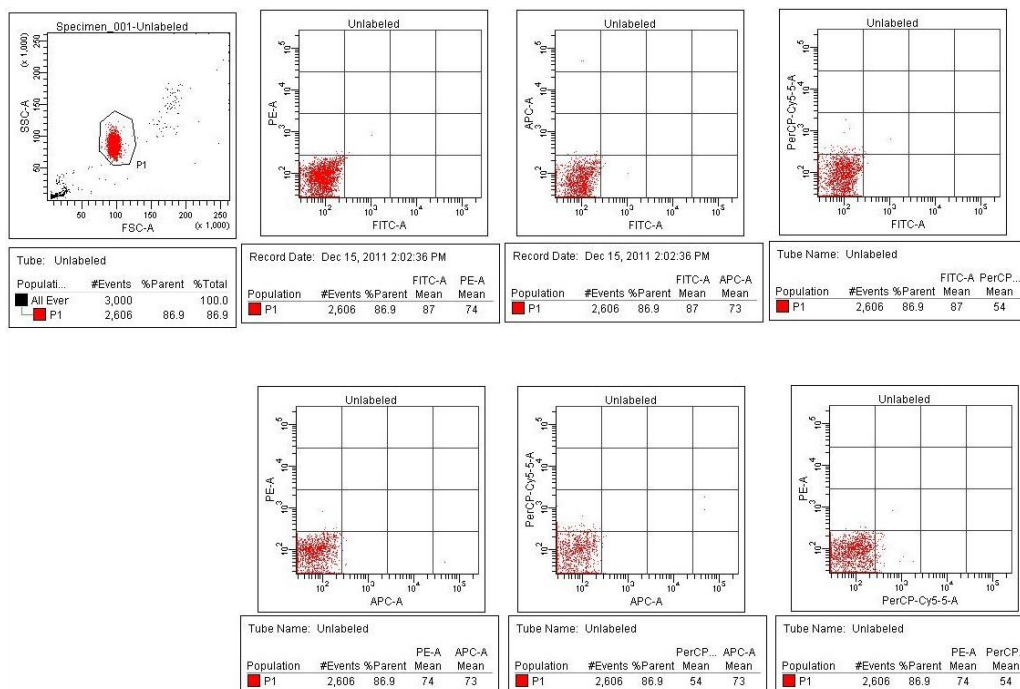


図 14 ①～⑤まで行いネガティブ領域を決定する。

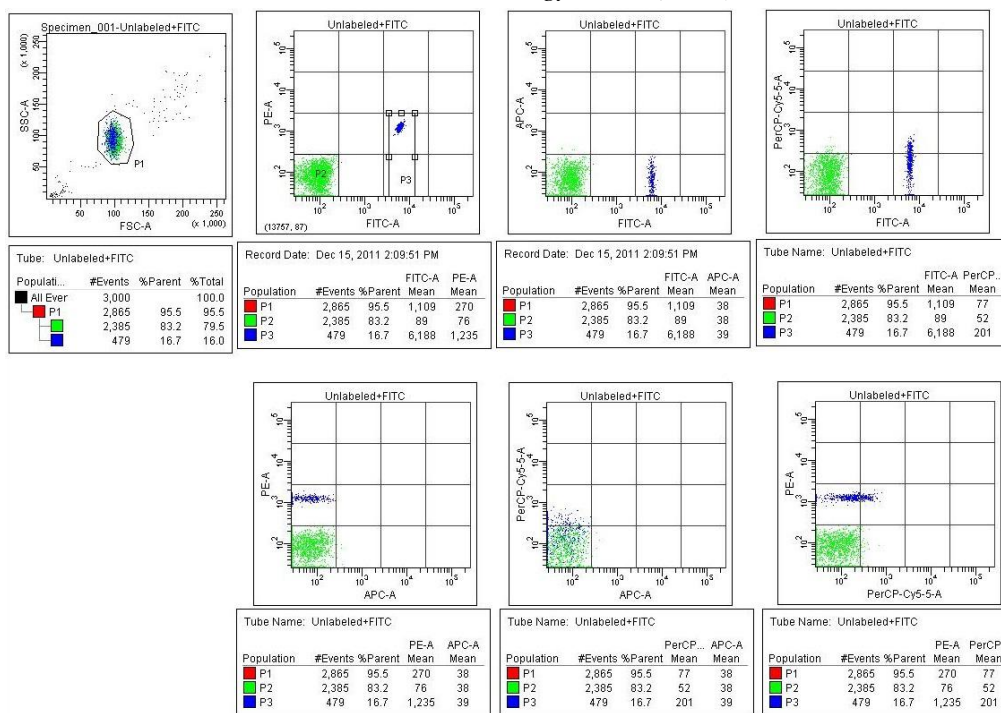


図 15 各ドットプロットに FITC が表示され、代表して 1 カ所領域を設定する。

⑦ Instrument Window で PE-FITC、PerCP-Cy5.5-FITC、APC-FITC の Spectral Overlap を調整する (図 16)。

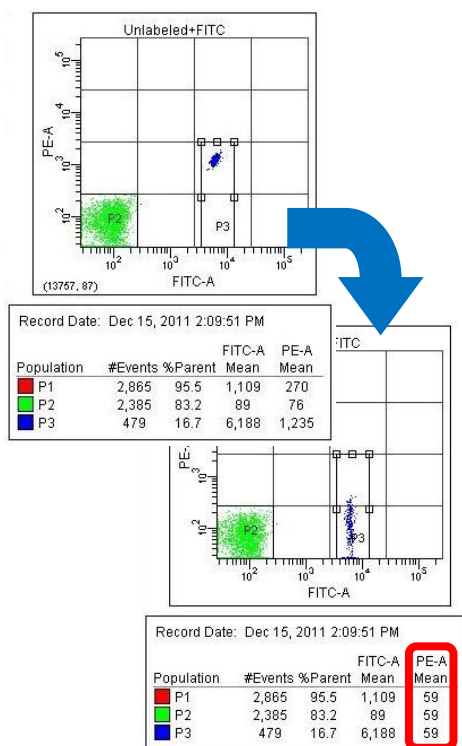


図 16 FITC vs PE において、PE-FITC の Spectral Overlap を調整した。PE の漏れ込みが排除され図中 P3 の形が変化した。

⑧ 同様に c, d, e のサンプルについても実施する。  
 ⑨ 以降、Global Sheet にプロットを作成し測定を行うと蛍光補正がされたデータを得ることが出来る。

## 5 まとめ

FACSAria は細胞実験でとても有用な装置であり、特定の色で蛍光を示すサンプルをマルチカラーで解析しソーティングすることが出来る。しかしながら、ここで紹介した事例のように複数の蛍光発色をしているサンプルの場合、1 つの蛍光波長が複数の BPF に検知されあたかも複数の蛍光発色を行っているように認識され、誤分取される可能性がある。特に、波長に重なり合いがある蛍光色素の場合、目的集団ではないサンプルを分取し実験結果が意図しないものとなる可能性がある。

このことから、自分が使用するサンプルの蛍光波長を予め調べておくことも重要であるが、蛍光波長同士の干渉はないかなどを正確に把握し、干渉があった場合はコンペーンションを実施しその干渉を排除する必要がある。

前回までは装置そのものの精度について報告してきたが、今回はサンプルを交えての装置の精度

出しについて報告した。

今回の検証では、4種類の蛍光 Beads を用いて試験を行った。蛍光色素が多い場合は Auto コンペーションが素早く計算をしてくれるが、無染色のサンプルに加え、その蛍光色素の数だけ単染色されているサンプルが必要となる。手動コンペーションの場合も出来れば無染色のサンプルに加え、その蛍光色素の数だけ単染色されているサンプルがあることが好ましいが、[Create Statistics View]でそれぞれの蛍光色素の Mean 値を比較しながら調整を行うため、ドットプロット上で明確に表示が異なればなんとか調整ができる。ただ、蛍光色素の種類が増えるとその組み合わせ分だけ調整する時間と手間がかかるので、用途に合わせてどちらで行うかを決定すべきであろう。

3 回にわたり実験をより正確に行えるよう報告を重ねてきた。今後これら報告を参考にして頂き FACS Aria を用いた活発な実験及び多くの成果が出ることを期待したい。

## 6 参考文献

- [1] 前田 武、小西 輝昭、高野 裕之、児玉 久美子、Kurt Hafer, FACS Aria による精度管理及びソーティング精度の検証,放射線医学総合研究所技術報告書 (NIRS Technology) 5 (2010) 28-53. ISBN 978-4-938987-67-1
- [2] 前田 武、高野 裕之、小西 輝昭,共実機器のメンテナンス,平成 18 年度第 2 回技術と安全の報告会(2006) 77. ISBN 978-4-938987-43-5
- [3] 前田 武、小西 輝昭、高野 裕之、児玉 久美子、Kurt Hafer, 高感度・高速細胞分取装置 FACS Aria の精度維持管理法の確立,平成 19 年度第 3 回技術と安全の報告会(2007) 58-61, ISBN978-4-938987-53-4
- [4] 前田 武、小西 輝昭、高野 裕之、潮見 聡、児玉 久美子, 高感度・高速細胞分取装置 FACS Aria の Sorting 精度検証,放射線科学第 53 巻 第 07 号(2010) 34-39, ISSN 0441-2540

[5] 中内啓光著, 新版フローサイトメトリー自由自在, ”秀潤社”,2006 年

[6] BD, ”日本ベクトン・デッキンソン株式会社”, BD FACS Aria Training Manual

[7] BD, ”日本ベクトン・デッキンソン株式会社”, BD Fluorescence Spectrum Viewer A Multicolor Tool, [http://wwwbdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum\\_viewer/index.jsp](http://wwwbdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp)

---

---

放射線医学総合研究所  
技術報告書



---

---

NIRS Technology

---

---

www.nirs.go.jp

---

---

NIRS Technology, vol.6 (2012) 51 – 56.

## 隔離照射容器および搬入出用接続装置を用いた

### 生物隔離照射システムの開発

石田 有香\*、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

放射線被ばくは体内の微生物環境を乱すと考えられているが、特定の微生物を定着させた動物に、隔離した状態で放射線照射が可能なシステムがなく、感染マウスでの放射線影響研究は殆ど行われていない。そこで、放射線被ばくと体内微生物の関係を明らかにするため、マウスを隔離状態で照射可能なシステムを開発した。本システムは隔離照射容器、清浄空気供給装置、アイソレータ接続装置からなり、隔離照射容器：密閉でき、感染マウスの照射が可能。空気を供給でき動物は酸欠とならないが、高圧な空気が直接動物へ触れないよう2層式。清浄空気供給装置：隔離照射容器へフィルターを通した清浄度の高い空気を供給する。アイソレータ接続装置：アイソレータに接続する3連のボックスであり、これによりアイソレータ内の衛生状態は保持され、かつ簡便な搬入出操作が可能、という特徴を有する。各装置は反復操作でも無菌状態が維持されていたが、今後、更なる操作性向上のため、小型化、軽量化を目指す予定である。

**Keywords:** 放射線被ばく、微生物環境、感染動物、ビニールアイソレータ、隔離照射、照射容器、HEPA フィルター

---

**\*Corresponding Author:**

石田 有香 (Yuka Ishida)

e-mail: ishida@nirs.go.jp

## 1. はじめに

福島原発事故により、これまで意識されていなかった日常生活における放射線被ばくへの関心が非常に高まっている。日常生活でもとりわけ食生活はがん等の重要疾患の要因となり、日本人が欧米に移住すると、発生する腫瘍が胃がんから大腸がんに変化するという報告などが以前より知られている。また最近の報告では、食生活がヒトの腸内細菌叢に影響を与え、その多様性を生み出した証拠として、多種の海藻類を良く摂取する日本人と海藻類を摂取する食環境にない北米人とでは食物（海藻）から獲得した腸内細菌が異なっていることも明らかになっている。

一方で、無菌マウスが SPF（特定の病原体がない）やコンベンショナル（CV）のマウスに比較して長寿命で慢性病を発症しないと考えられるという研究報告もあり、体内の微生物の存在が生体に大きな影響を及ぼすことが分かっている。また、ヘリコバクターピロリ（胃がんの原因の一つ）やヒトパピローマウイルス（子宮頸がんの原因の一つ）など、ヒトの発がんに関与する微生物があることはよく知られている（表 1）。さらに、放射線分野では緑膿菌の有無が放射線感受性に関係することもよく知られており、特定の微生物の存在が放射線の生体影響に関与することは十分に想定される。

表 1. 微生物と疾患

原因となりうる微生物*	疾患
B 型肝炎ウイルス C 型肝炎ウイルス	肝がん
ヒトパピローマウイルス	子宮頸がん
ヒト T 細胞好性ウイルス	成人 T 細胞白血病
ヘリコバクターピロリ	胃がん

\*: 予防ワクチンの接種や除菌により発生率が低下する疾患もある。

しかし、食生活にも密接に関係する腸内細菌叢が、放射線被ばく前後で変化することの想定はされつつも、無菌マウスに特定の微生物を感染させたノトバイオートマウスを用いた放射線影響研究や腸内細菌叢に対する網羅的解析は、これまで殆ど行われていなかった。その原因の一つに、無菌マウスやノトバイオートマウスを厳密に隔離した状態で、放射線照射を行うことのできるシステムがなかったことが挙げられる。そこで、放射線被ばくと体内微生物の関係を調べるため、実験小動物の衛生レベルを厳密に保持したまま放射線照射が可能なシステムを開発した。

## 2. 開発システム

無菌マウスやノトバイオートマウスの飼育装置としては、チャンバー内の圧が常時調整され、グローブ越しに操作を行うビニールアイソレータを使用することになるが、この装置は、物品の正確な搬入出操作に経験を要するため、実験動物や試料等の搬入出を頻繁に行う実験で使用する場合には、簡便な搬入出方法を検討する必要がある。

従来の装置や照射容器では、無菌を保持した放射線照射実験やノトバイオートマウスを用いた動物実験（微生物感染実験）は、動物あるいは環境への微生物汚染のリスクがあり、バイオセーフティの観点からも管理された区域からの持出しは困難だった。我々が開発した、A 隔離照射容器、B 隔離照射容器への清浄空気供給装置、C ビニールアイソレータから物品等の搬入出を簡便にする接続装置、の 3 種類の装置は、それらの実験操作を可能にするものである。

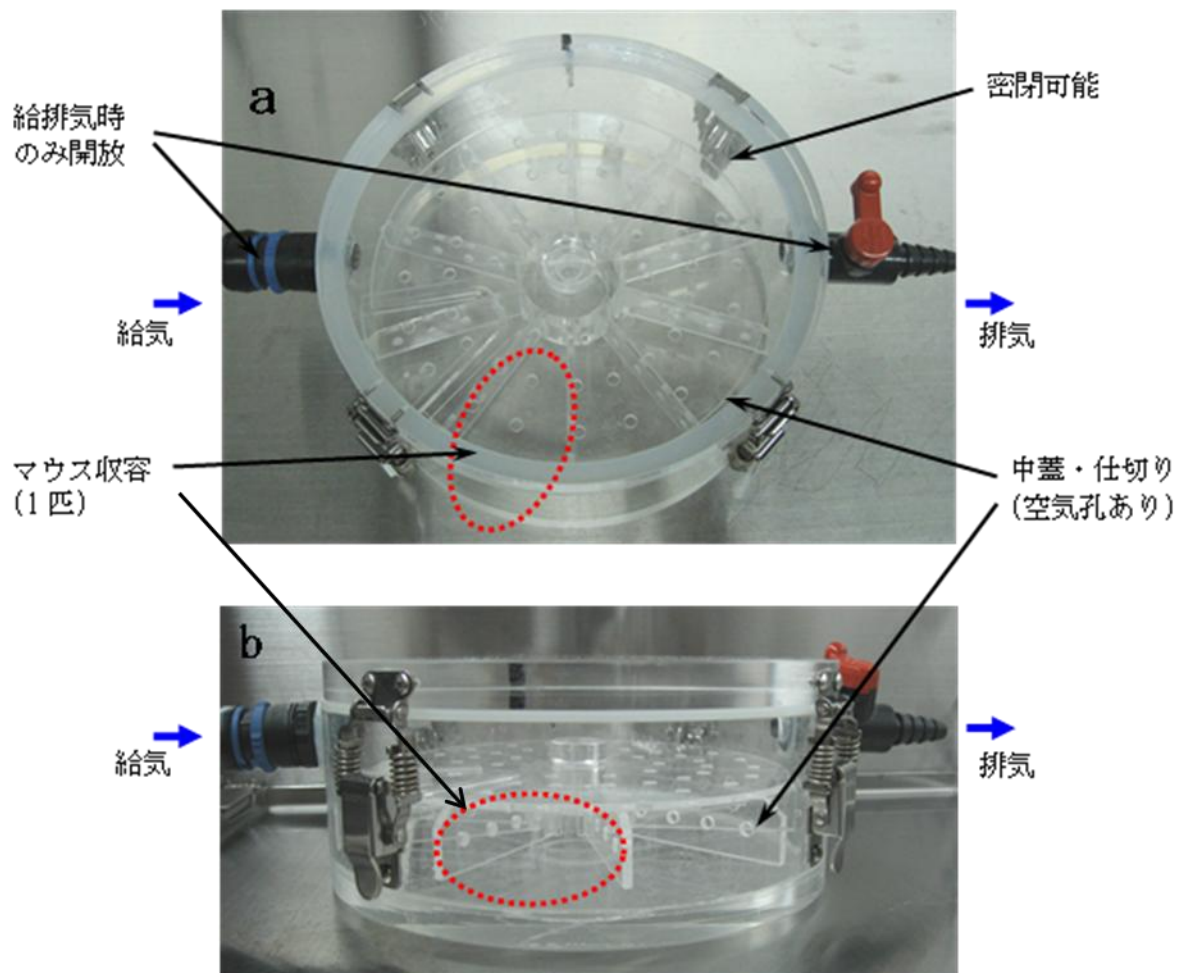


図1 隔離照射容器 (a:上から、b:横から)

密閉、二層式。中蓋・仕切りには空気孔や間隙があり、吸入された空気が容器内を循環しやすい構造になっている。

A. 隔離照射容器 (図 1) : 密閉式のため、動物の収容をビニールアイソレータ内で行うことにより、無菌動物やノトバイオトマウスを共同エリアへ持ち出すことができる。給気口から B の装置で清浄な空気を容器内へ供給できる構造となっており、動物は酸欠になることはない。また、圧のかかった空気が直接容器内の動物へ当たらないよう、容器内は二層式になっているが、中蓋や仕切りには多数の空気穴があり壁面との間に間隙もあるため、吸入された空気は容器内を循環しやすい構造となっている。さらに、給排気口は給気時にのみ開放する構造となっており、それ以外では密閉を保つことができる。

B. 清浄空気供給装置 (図 2) : HEPA フィルターを通した清浄度の高い空気を、隔離照射容器へ適宜供給することができる。

C. ビニールアイソレータ接続装置 (図 3) : 前後室を含む 3 連のグローブボックスであり、動物の飼育装置であるアイソレータに接続し、これらを通して物品を搬入出する。消毒効果の高い消毒薬によりボックス内と物品表面の消毒を繰り返すことで、アイソレータは衛生状態が保持でき、かつ

物品搬入出操作を簡便に行うことができる。グローブボックスには、搬入出中にも隔離照射容器へ清浄空気を供給できるように給気口が整備されている。また、ボックス内本体も HEPA フィルターを通した清浄空気が循環し、陽圧に保つことで外気の進入を防ぐ構造となっている (圧力調節も可能)。

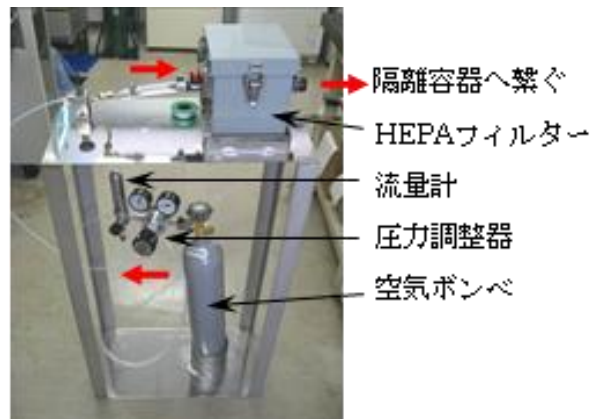


図 2. 清浄空気供給装置

HEPA フィルターを通した清浄空気を、必要に応じて隔離照射容器へ供給できる。

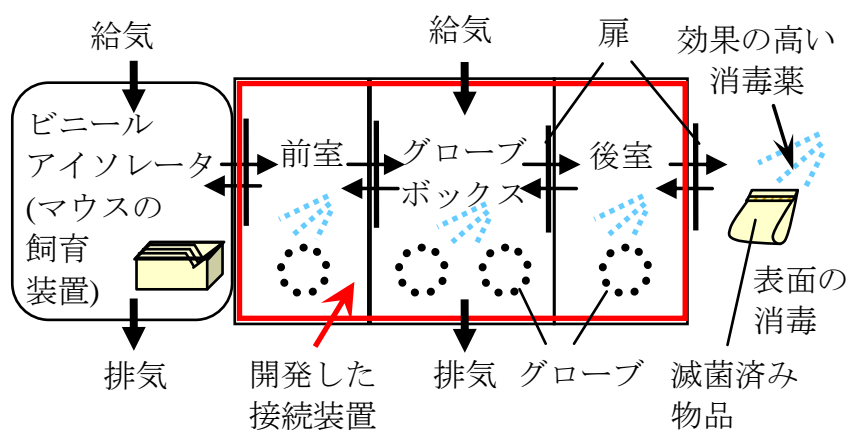


図 3. ビニールアイソレータ接続装置の概要とその使用方法

噴霧消毒を繰り返すことで、熟練者でなくても簡便に物品の搬入出が可能となる。

### 3. 装置の微生物学的状況

開発した接続装置および隔離照射容器について、稼働後の無菌状態を確認するため、微生物学的検査(無菌検査)を実施した。

1) 消毒薬効果の比較：エクスポアー（二酸化塩素系消毒薬、従来アイソレータ操作で使用されている）及びハイクロソフト水（次亜塩素酸系消毒薬）を用いて、各消毒薬の単独効果をみるために、接続装置の各ボックス内を噴霧あるいは清拭で消毒した後、綿棒拭き取り検査にてボックス内壁面やグローブ等の菌の有無を調べた。その結果、すべてのふき取り箇所から菌は検出されず、いずれの消毒薬を使用した場合でもボックス内は確実に消毒できることが分かった。

無菌検査において消毒効果に違いがなかったことから、操作時の利便性（1週間の作り置きが可能、粘着性がない等）と作業員および動物へのより高い安全性を考慮し、以後の消毒操作はハイクロソフト水を使用することとした。

2) 物品搬入出後の無菌検査：各ボックス内の無菌確認後、滅菌済みの飼育器材（ケージ、タオル、滅菌水等）を、表面消毒を行いながらアイソレータまで持ち込み、アイソレータ内で偽操作を行った後、搬入とは逆の手順で搬出した（1日に2回、3日間連続）。その後、1)と同様に綿棒拭き取り検査にてボックス内の菌の有無を調べた。その結果、すべてのふき取り箇所からも菌は検出されず、物品の搬入出を繰り返してもボックス内は無菌状態を保持できた（図4）。従って、開発した接続装置は、衛生レベル（無菌）を保持したまま、滅菌缶を用いた通常の方法より簡便に搬入出を行うことができると分かった。

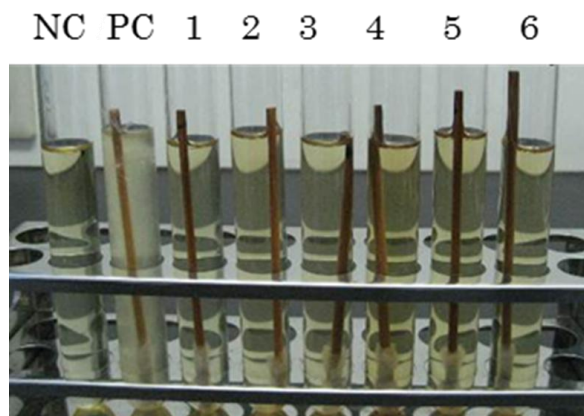


図4. 搬入出操作後の装置の無菌検査  
拭き取り綿棒の培養後。NC; 陰性コントロール、PC; 陽性コントロール、1-6; ボックス内の拭き取り検体。PC 以外は菌の増殖が見られなかった。

3) 供給空気の清浄度検査：HEPA フィルターを通した、a; フィルター通過直後、b; チューブ通過後、c; 照射容器通過後の3箇所（図5）の空気を培地に吹き付け、空気中の菌の有無を調べた。その結果、すべての箇所から菌は検出されなかった。従って、空気は無菌的に供給可能であり、照射容器内のマウスの衛生レベルは保持できることが分かった。

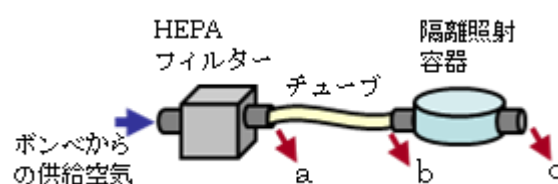


図5. 供給空気の清浄度検査  
装置通過後の各箇所の空気を調べたところ、いずれからも菌は検出されなかった。

### 4. まとめ

各装置は稼働後も無菌が保持できており、目的とする操作が可能であることが確認で



きた。本システムを利用してノトバイオマウスの放射線照射実験が可能となれば、特定の微生物存在下での放射線障害についての基礎的データを得ることができる。今後は、本システムでマウスの X 線照射実験を実施して基礎データを蓄積するとともに、各装置の操作性及び実用性をより向上させるために、小型化、軽量化をめざして改良を加えていく予定である。

## 実験動物取り扱い者に対する安全実技教育の導入

重兼 弘法<sup>1)\*</sup>、西川 哲<sup>2)</sup>、石田 有香<sup>1)</sup>、小久保 年章<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課

<sup>2)</sup>研究基盤センター

---

### 要旨

放射線医学総合研究所では、平成 18 年度より覚醒サル取り扱い者に対する技術認定制度を導入している。一方、げっ歯類（マウス、ラット）の取り扱い者に対しては、主に所属研究部門で On the job training (OJT) により取り扱い技能の習得を行っている。しかしながら、動物取り扱い時の咬傷事故及び針刺し事故が散発していたことを受け、平成 21 年 3 月より実験動物開発・管理課でマウス及びラット取り扱い者のうち初級～中級者を対象とした安全実技教育を半年に 1 回の頻度で実施している。平成 22 年度からは動物管理区域へ立入る為の教育訓練実施時に希望者に対して月 1 回程度の頻度で実施できる体制としている。平成 23 年度は独自の安全実技教育用テキストを作成し、安全実技講習の充実を図った。今後は本制度の見直しや変更を行い、動物取り扱い時における更なるリスク軽減に努めていく。

---

**Keywords :** 実験動物、げっ歯類、取り扱い、安全、実技

**\*Corresponding Author:**

重兼 弘法 (Hironori Shigekane)

e-mail: h\_shige@nirs.go.jp

## 1. 緒言

放射線医学総合研究所（以下、放医研）では研究に、マウス、ラット等のげっ歯類が幅広く使用されている他、脳機能研究の目的で霊長類が飼育されている。

実験動物は研究目的に応じた保定、処置などをするため、取り扱い中の事故のリスクがある。そこで、リスク軽減と適正な動物実験遂行のために、覚醒下で取り扱うことが多いマカク属サル取り扱い者に対して、「覚醒サル取扱技術認定制度」を設け、技能検定を合格した者のみが覚醒サルの取り扱いを可能とするシステムを平成 18 年度から導入している。げっ歯類に関しては、研究部門毎の OJT により、必要な取り扱い技能の教育を行ってきた。しかし、平成 17 年度以降、咬傷事故や針刺し事故が増加した為（図 1、表 1）、平成 21 年 3 月より当課主催の「安全実技講習」を開始した。この結果、平成 21 年度以降は事故発生件数が減少するようになった。

本稿では、現在実施している安全実技講習について紹介するとともに、今後の展開について述べる。

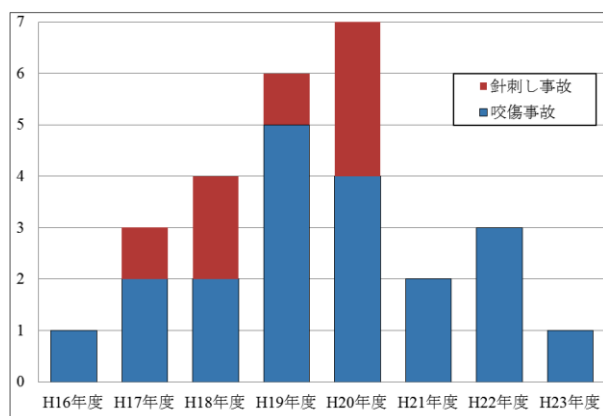


図 1 げっ歯類取り扱い中の事故件数  
(H23 年度は H24 年 1 月末日迄の集計)

表 1 げっ歯類取り扱い中における事故の内訳

	動物取り出し・収容時	逃亡時	実験・検査時
咬傷事故	10件 (マウス4件、ラット6件)	2件 (ラット2件)	8件 (マウス4件、ラット4件)
針刺し事故	0件	0件	7件 (マウス7件)

## 2. 安全実技講習の現状

### 2-1. 受講対象者及び実施規模

安全実技講習における対象動物は、放医研で最も取り扱いの多いマウス及びラットとした。また対象者は、事故に対するリスクが高い初心者とした。即ち、「放医研で初めて動物を取り扱う者」について動物管理区域への立入教育訓練時に、希望者に対して講習を実施しており、実施頻度は月に 1 回、1 回あたりは 3 名程度としている。

平成 16 年 3 月から平成 24 年 1 月末日迄に 52 名に対して講習会を実施している。

### 2-2. 講習内容

講習は安全に関する講義及び手技に関する実習を行っている。

安全に関する講義では、以下の 1)~7) の項目に関する講義を行っており、その特徴としては、動物取り扱い上の注意だけではなく、針刺し事故に対する内容やアレルギーに関する内容を含んでいる。

- 1) 所内で発生している事故について
- 2) 動物へ接する際の注意
- 3) 投与・採血時の基本的な注意点
- 4) 実験時の注意
- 5) 注射器等の取り扱いについて
- 6) 事故時の対応
- 7) アレルギーの対応

手技に対する実習については、以下の①~⑧の項目について実習を行っている。

- ① 麻酔方法
- ② 基本的な保定方法
- ③ 動物の識別方法
- ④ 基本的な注射器の取り扱い方
- ⑤ 投与及び採血方法
- ⑥ 基本的な解剖方法
- ⑦ 安楽死法
- ⑧ 動物死体の処理

実習では、動物取り扱いの第一歩となる「正しく動物を保定できるようにする」ことに重点を置いており、実習時間の多くをこれに費やしている。これは実験手技の殆どは「正しく動物を保定できている」ことが前提となっており、事故のリスクを減らす為には欠かせない重要なプロセスと考えているからである。特に実験動物に全く触れたことのない者に対しては、軽麻酔状態の動物の使用や咬傷が軽

減できる素材を用いた手袋を着用してもらうことで、あまり抵抗なく動物に触れられ、手技の練習が行えるように配慮している。

### 2-3. 講習用テキスト

安全実技講習会を開始した平成 21 年度は既存のテキストを参考に実習を行っていたが、注射器取り扱いや事故時の対応について十分な内容が記載せられていなかったため、独自のテキストを作成し（図 2）、平成 23 年 7 月より使用している。

このテキストの特徴として、手技をなるべく分かり易くするために写真を多く取り入れた。また、安全器具の使用方法や所内での動物事故のデータや事故時の対処方法についても掲載した（図 3）。



図 2 講習で使用しているテキスト

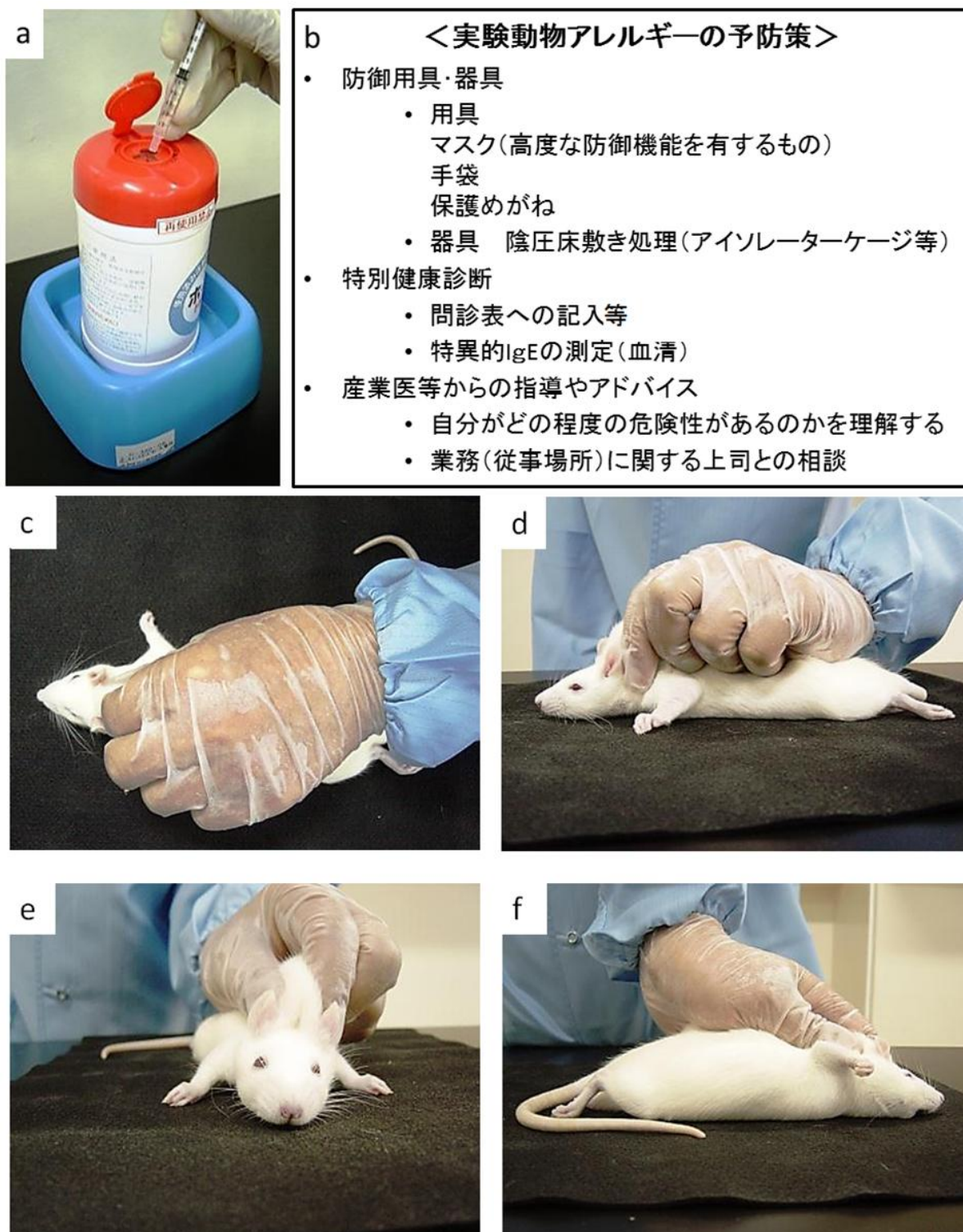


図3 講習用テキストに掲載している写真

a : 注射針廃棄用ボックス。溝に針をひっかけることで安全に針を廃棄できる。

b : 「実験動物アレルギーの予防策」について。

c~f : ラットの保定方法を説明した写真。軽麻酔下のラットを用いて同一操作に対して複数の方向から確認することができるようにしている。

### 3. 今後の展開

放医研では、所内事故の増加や所内全体の危機意識が高まったことから、平成 21 年 3 月より当課で動物管理区域への立入教育に加えてげっ歯類安全実技教育を主催することとなった。テキストとして、「安全に関する基本編」、「マウス編」及び「ラット編」を独自に作成しており、当課の所内ホームページより閲覧及びダウンロードを可能とする予定である。また、テキスト内容については初心者に重点を置いた基本的かつ一般の動物実験において頻度が高い手技を中心に掲載しているが、所内で高度な手技による実験が多く行われていることから、今後、本講習の内容をこれらの技術に対応して行く必要がある。更に、初心者に対して立入教育とセットで受講してもらおう教育体制作りを目指して、検討・改良を加える予定である。

マウス、ラット以外の実験動物のうち、比較的多く用いられるハムスター、スナネズミ、モルモット及びウサギについてもテキストの作成に着手しており、講習での取り扱い動物種に追加すべく準備を行っているところである。

---

---

放射線医学総合研究所  
技術報告書

---

---



www.nirs.go.jp

---

---

NIRS Technology

---

---

NIRS Technology, vol.6 (2012) 62 –72.

## 新たに開発・確立されたマウス系統の遺伝学的モニタリングシステム

西川 哲<sup>\*1)</sup>、上野 渉<sup>2)</sup>、早尾 辰雄<sup>2)</sup>、海野 あゆみ<sup>3)</sup>、飯名 瑞希<sup>3)</sup>、大久保 喬司<sup>3)</sup>、  
新妻 大介<sup>3)</sup>、石原 直樹<sup>3)</sup>、伊藤 正人<sup>3)</sup>、藤井 功輔<sup>3)</sup>、伊田 大貴<sup>3)</sup>、宮沢 正光<sup>3)</sup>、  
武笠 功<sup>4)</sup>

- 1) (独) 放射線医学総合研究所 研究基盤センター
- 2) (独) 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 生物研究推進課
- 3) サイエンス・サービス (株)
- 4) (株)島津製作所 分析計測事業部

---

### 要旨

実験動物の管理の 3 大要諦である (病原) 微生物学的管理、遺伝学的管理、施設 (環境) 管理のうち、遺伝学的管理について従来多用されていた生化学的、免疫学的標識遺伝子に代えてマイクロサテライトマーカー(MSMs)による遺伝学的モニタリングの可否を検討した。

MSMs については 37 座位を選定し、電気泳動は全自動泳動装置: (株) 島津製作所 MultiNA を用いることによって従来用いられてきたアガロースゲルによる電気泳動よりも効率良く作業を行い、結果を得ることができるようになった。また、泳動結果は波形、数値、泳動像の 3 通りが得られ、客観的かつ正確、精緻に遺伝子型の判定を行えるようになった。

このシステムを用いることにより近交系は勿論のこと、交雑群、コンジェニック系、アウトブリード系についてもモニタリングを行えることが分かった。また、今回のシステムは特定の遺伝子のマッピング、スピードコンジェニック系統の作成時に威力を発揮できると考察した。

**Keywords:** マウス、PCR、遺伝学的モニタリング、mouse micro satellite markers(MSMs)

**\*Corresponding Author:**

西川 哲 (Tetsu NISHIKAWA)

e-mail:tnishika@nirs.go.jp

### 1. 序論

放射線医学総合研究所（放医研）では標準的なマウス系統である C3H/He、C57BL/6(B6)、C57BL/10(B10)、それらのコンジュニック系統の B10.BR や C3H-scld、また国内では放医研のみで維持されている RFM、STS などの近交系マウスを最盛期には 45 系統を維持、生産していたが諸般の事情により、維持系統数を減少させ、2007 年時点では表 1 に示した如くの系統を維持していた。現在、これらの 15 系統はすべて凍結胚での維持に切り換えて維持されている<sup>1)2)</sup>。

複数の系統を維持していく上で注意しなければならないことは、同一毛色の異系統マウス間でのケージラベル差し違えなどによる、誤った交配が原因で起こる遺伝学的汚染、つまり遺伝的コンタミネーションであり、放医研でも C57BL/6、C57BL/10 のように毛色

が BB（黒）の系統、C.B.17、RFM、STS のように毛色が cc（アルビノ）の系統があり、

これらを見ただ目で区別することは困難である。そこで遺伝的コンタミネーションが起きていないか、またそれが目的とする系統であるかの系統の同定、同一系統間での遺伝子型の斉一性を定期的に検査することにより確認しなくてはならない<sup>3)</sup>。

そこで生化学的・免疫学的遺伝子同様にリンケージマーカーとして用いられ、かつ、それらに比べて操作が煩雑でなく、検査手法が簡単な、多くの遺伝子座のあるマイクロサテライトマーカー(Micro Satellite Markers; MSMs)を用いた PCR 法によるモニタリングの可否を検討した（表 2）。

表 1. 放医研で維持されているマウス系統

系統	放医研での世代数	由来	特徴
AJ	111	Jax1964—京大1971—放医研	乳がん発生率が経産に高く未経産には低い、肺腫瘍は経産で高い。老令のものは腎臓がんの発生率が高い。仔の5~10%に口蓋腫瘍が生ずる。
BALB/c-nu/nu	36 SPF化(1990)後の世代数	実中研1982—放医研	胸腺欠損による免疫機能不全。人がんの移植可能。
B10.BR/Sn	44 SPF化(1991)後の世代数	Jax1973—放医研	組織適合性遺伝子のうちH-2が異なる以外はすべてB10に同じ。Haa遺伝子を有す。
B10.D2/new-Sn	48 SPF化(1990)後の世代数	Jax1973—放医研	水腫症多発。Hae遺伝子を有す。
B10.Thy1.1/Nrs	38 SPF化(1993)後の世代数	1976年から放医研で作成。 Sib1979年。	胸腺由来リンパ球(T細胞)にThy1.1抗原を表現している。他はB10系と同じ。HRH系のThy1.1を導入、11代反し交配し育成。
C3H/HeNrs	133	Heston—阪大医病理1952—遺伝系 1963—放医研	赤血球が少ない。血中カタラーゼ活性が低い。腫瘍数6が主。照射後悪性肝腫(Hepatoma)発生。♂で85%。照射により骨髄性白血病を多発。C3H/HeMdlrsと同一。
C3H/HeNrs-TgH(Atmzm1Awblm) fnt	13 兄妹交配(2001, SPF条件下)後の世代数	1997年にHRHより29/SvEv-Arm/フアウトマウスを放医研に導入し、C3H/HeNrsに戻し交配。2001年にH15より兄妹交配を開始して育成。	使用に際して条件あり。ホモ接合体は放射線高感受性。ホモ接合体は胸腺リンパ腫の発生率が高い。
C3H-scld	29 SPF化(1997)後の世代数	JAX—日本クレア1997—放医研	胸腺リンパ腫の発生率が高い。
C57BL/6JNrs	121	Jax1964—京大1965—放医研	乳がん発生1%。眼の異常が多く。放射線に抵抗性。照射後胸腺リンパ腫とHepatoma多発。
C57BL/6J-bg-nu/nu	39	愛知がんセンター1976—医科研1981—金沢大学1985—放医研	T細胞及びNK細胞機能不全。
C57BL/10	31 SPF化(1994)後の世代数	Jax1973—放医研	B10系コンジュニックマウスの基本系統。1937年以前にC57BL/6から分離した系統。
C.B-17/lcr-+/+	39 SPF化(1992)後の世代数	FOXCHASEがんセンター—日本クレア—1993放医研	Igh遺伝子座が異なる6ALB/cAnのJ39/Jc系である。
C.B-17/lcr-scld	36 SPF化(1993)後の世代数	FOXCHASEがんセンター—日本クレア—1993—放医研	ホモ接合体がcid/cidは機能的なT細胞。B細胞が欠如しているため、細胞免疫に加えて免疫グロブリンもほとんど産生されず、H-2の重症複合型免疫不全症と類似した症状を呈す。
RFM/Ms	47 SPF化(1990)後の世代数	徳園1958—日赤1958—遺伝系1960—放医研—遺伝系1968—放医研	骨髄性白血病発症だが放射線により抑制。Q5%/30Rad。生殖器官の異常多発。
STS/A	48 SPF化(1990)後の世代数	チャールスリバー1989—放医研	胸腺リンパ腫の発生率が低い。



## 2. 材料・方法

最初に遺伝学的モニタリングに用いた MSMs は生化学的・免疫学的標識遺伝子座位の近傍にある 18 座位であり PCR の条件、遺伝子型の判定方法をそれぞれ図 1 および図 2 に示した<sup>4)</sup>。

遺伝学的モニタリングにより適した標準マーカーとなる MSMs は Mouse Genome Informatics のデータベースより B6、C3H、BALB/c の 3 系統間で PCR プロダクトサイズの差が 20 bp 以上あるものを性染色体を除く各染色体より 2~9 座位、総計 101 座位選択した。PCR にて増幅した PCR を MultiNA にて分析し、遺伝子型判定を行い、各遺伝子型間で 10 bp 程度の PCR プロダクトサイズの差マーカーの候補とした(図 3)。

があり、かつ非特異的なバンドが目的のバンドに影響しない MSMs を 60 座位選び、標準さらに B6、C3H、BALB/c、3 系統それぞれの F1 系統について遺伝子型判定を行い、最終的に共優生的な PCR プロダクトが得られた 37 座位の MSMs を各染色体で 2 座位程度になるように選んだ (図 4)。

コンジュニック系については図 7 に示した系統を用いた。

アウトブリード系については CF1 系の雄 30 匹、ddY 系の雄 6 匹の 37 座位の遺伝子型を 37 座位について調べた。泳動条件、遺伝子型の判定方法は近交系等と同様に行った。

表 2. 従来の遺伝学的モニタリング方法と MSMs 法の比較

	生化学的標識遺伝子による検査	免疫学的標識遺伝子による検査
検査試料	血液(血漿・血球)、腎臓、尿	リンパ球、胸腺
標識遺伝子	Alkaline phosphatase 1 (Akp1) Carbonic anhydrase 2 (Car2) Major urinary protein 1 (Mup1) など全部で15遺伝子座	Histocompatibility 2 (H2) Hemolytic complement (Hc) Thymus cell antigen 1, theta (Thy1) など全部で4遺伝子座
検出方法	セルロースアセテート膜を用いた電気泳動法 ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動法 (銀染色法の併用) Tris-Citrate(pH8.2)	寒天ゲル2重塩散法 細胞障害性試験
緩衝液・培養液	Sodium-Acetate-EDTA(pH5.6) Tris-Glycine(pH8.8) など全部で11種類	アガロースゲル RPMIメディアム
染色液	Car2などの蛋白は0.3%ponceau S Akp1などの酵素は緩衝液・液体試薬・粉末試薬を変えて 全部で10種類  (その他にゲル作製用液・脱色液・固定液が必要)	寒天ゲル2重塩散法でCoomassie brilliant blue R-250 細胞障害性試験ではなし  (その他に固定液と抗原ごとの抗血清が必要)

(生化学的・免疫学的方法)

- ①検査に適した標識遺伝子が染色体ごとになし。
- ②各遺伝子座ごとに試料採取組織、検出方法、緩衝液、染色液が異なる。
- ③試料採取組織の劣化が早い。
- ④遺伝的コンタミネーションが起きた時の共優生となるマーカーがある。

➡➡➡

(マイクロサテライトマーカー(MSMs))

- ①19染色体全てに多数のMSMsがある。
- ②どのMSMsでも試料採取組織、検出方法、緩衝液、染色液が同じ。
- ③試料採取組織は-20℃で長期保存可能。

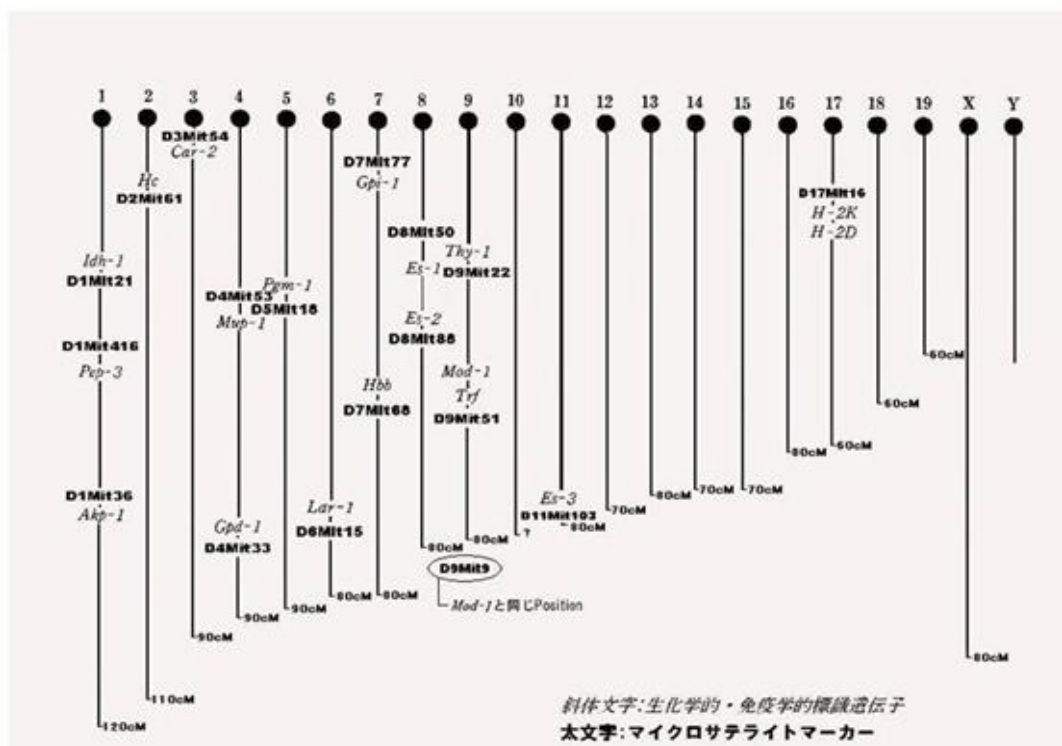


図1. モニタリングに用いた MSMs の位置

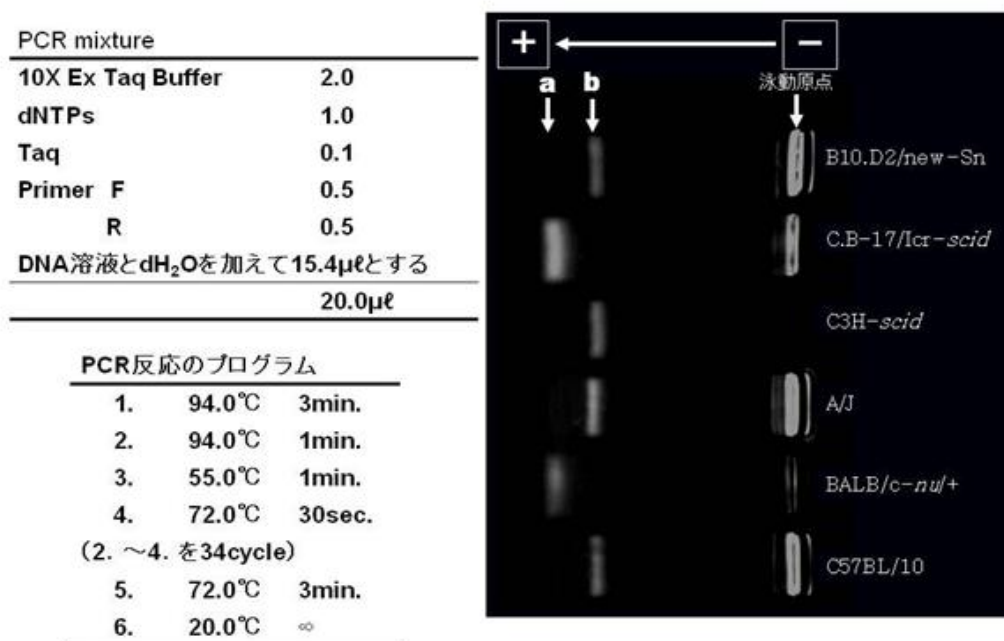


図2. PCR の条件と判定方法 (MSMs : D7Mit68)



### 3. 結果

今回検査対象とした MSMs18 座位全てにおいて泳動像が観察でき、MSMs を用いた遺伝学的モニタリングシステムのためのスタンダードチャートを作製することができたが遺伝子型の判定が簡単なものと、PCR プロダクトサイズの小さな差により難しいものがあった。その問題を改善するため、島津製作所製 DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA (以後 MultiNA と略) を用いた。MultiNA での泳動結果は電気泳動像だけでなくプロダクトサイズが数値で表せるため、客観的かつ簡単に遺伝子型を判別できる利点がある<sup>5)</sup>。

図 3 に示した如く、アガロースゲル電気泳動で判定した遺伝子型と MultiNA による遺伝子型を比較した結果では 18 座位中 10 座位で、アガロースゲル電気泳動法での結果と異なった結果が得られた。この結果から MultiNA を用いることでより正確に遺伝子

型を精査でき、遺伝子型をさらに細分化できることがわかった<sup>5)</sup>。

次に、放医研で維持している 15 マウス系統における 37 座位での遺伝子型の判定結果を表 3 に示した<sup>6)</sup>。

なお、図 5 に示したように 37 座位すべてを調べずとも 6 座位で 15 系統を 7 つのクラ

スターに分類できる方法もある。各機関で保有している系統によって MSMs を選定していけば良いと考えられた。

次に B10 コンジェニックマウス系統の MSMs を用いた遺伝学的モニタリングの可否を検討したが H2 遺伝子のある 17 番染色体を網羅するよう、特に H2 遺伝子の座位である 23cM 付近をより詳細に検査できるよう、24 座位の MSMs を Mouse Genome Informatics より選択した (図 6)。

その結果を図 7 に示したが B10 系統と B10 コンジェニック系統の染色体地図の黒い部分は、放医研の B10 と比較して遺伝子型に違いがみられたおおよその位置を示した。

本方法は H2 抗体を用いた補体依存性細胞障害性試験とは異なるが、この黒い部分の 8 座位の MSMs は B10 コンジェニック系統の遺伝的背景に置き換わっていない部分であり、遺伝学的モニタリングに有用であると同時に本法は他のコンジェニック系統でも応用可能であると思われた<sup>7)</sup>。

表 3. 15 系統マウスの 37 座位における遺伝子型

	D1Mit		D2Mit		D3Mit		D4Mit		D5Mit		D6Mit		D7Mit		D8Mit		D9Mit		D10Mit	
	415	267	61	226	40	319	286	54	145	213	9	15	77	88	280	269	51	10	180	
A/J	a	a	a	b	a	b	a	c	c	b	a	b	a	a	b	a	b	a	c	
BALB/c-nu/+	b	a	a	b	a	b	a	c	a	b	b	b	a	a	b	a	b	a	c	
B10.BR/Sn	b	b	a	b	b	a	b	a	c	a	b	c	b	b	a	b	a	b	a	
B10.D2/new-Sn	b	b	a	b	b	a	b	a	c	a	b	c	b	b	a	b	a	b	a	
B10.Thy1.1/Nrs	b	b	a	b	b	a	b	a	c	a	b	c	b	b	a	b	a	c	a	
C3H/HeNrs	a	a	a	b	a	b	a	b	c	b	a	b	b	b	b	a	b	a	d	
C3H-Atm	a	a	a	b	a	b	a	b	c	b	a	b	b	b	b	a	b	a	d	
C3H-scld	a	a	a	b	a	b	a	b	c	b	a	b	b	b	b	a	b	a	d	
C57BL/6JNrs	b	b	a	a	b	a	b	a	c	a	b	c	b	a	a	b	a	b	a	
C57BL6J-bg-nu/+	b	b	a	a	b	a	b	a	c	a	b	c	b	a	a	b	a	b	a	
C57BL/10	b	b	a	b	b	a	b	a	c	a	b	c	b	b	a	b	a	b	a	
C.B-17/lcr-+/+	b	a	a	b	a	b	a	c	a	b	b	b	a	a	b	a	b	a	c	
C.B-17/lcr-scld	b	a	a	b	a	b	a	c	a	b	b	b	a	a	b	a	b	a	c	
RFM/Ms	b	a	a	a	a	a	a	c	b	b	a	b	a	a	a	a	b	a	b	
STS/A	a	b	b	a	a	b	a	c	a	b	a	a	b	a	a	a	b	a	b	

	D11Mit		D12Mit		D13Mit		D14Mit		D15Mit		D16Mit		D17Mit		D18Mit		D19Mit		
	20	38	105	270	254	148	60	266	156	161	182	152	16	142	116	119	59	1	
A/J	c	b	a	a	a	a	a	b	a	a	b	a	a	a	b	b	a	a	b
BALB/c-nu/+	c	b	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	b	b	c	b	c	b	a
B10.BR/Sn	b	a	b	b	b	b	b	a	a	a	b	b	c	b	c	b	b	b	a
B10.D2/new-Sn	b	a	b	b	b	b	b	a	a	a	b	b	b	b	c	b	b	b	a
B10.Thy1.1/Nrs	b	a	b	b	b	b	b	a	a	a	b	b	c	b	c	b	b	b	a
C3H/HeNrs	c	b	a	a	a	a	a	b	a	b	a	a	a	a	c	a	a	b	
C3H-Atm	c	b	a	a	a	a	a	b	a	b	a	a	a	a	c	a	a	b	
C3H-scld	c	b	a	a	a	a	a	b	a	b	a	a	a	a	c	a	a	b	
C57BL/6JNrs	a	a	b	b	b	b	b	a	b	a	b	b	c	b	c	b	b	a	
C57BL6J-bg-nu/+	a	a	b	b	b	b	b	a	b	a	b	b	c	b	c	b	b	a	
C57BL/10	b	a	b	b	b	b	b	a	a	a	b	b	c	b	c	b	b	a	
C.B-17/lcr-+/+	c	b	a	a	a	a	a	b	a	a	a	b	b	a	c	a	a	b	
C.B-17/lcr-scld	c	b	a	a	a	a	a	b	a	a	a	b	b	a	c	a	a	b	
RFM/Ms	b	b	a	a	a	a	a	b	a	a	a	a	a	a	a	a	a	b	
STS/A	b	b	a	b	a	a	a	a	a	b	a	a	c	a	a	b	a	b	

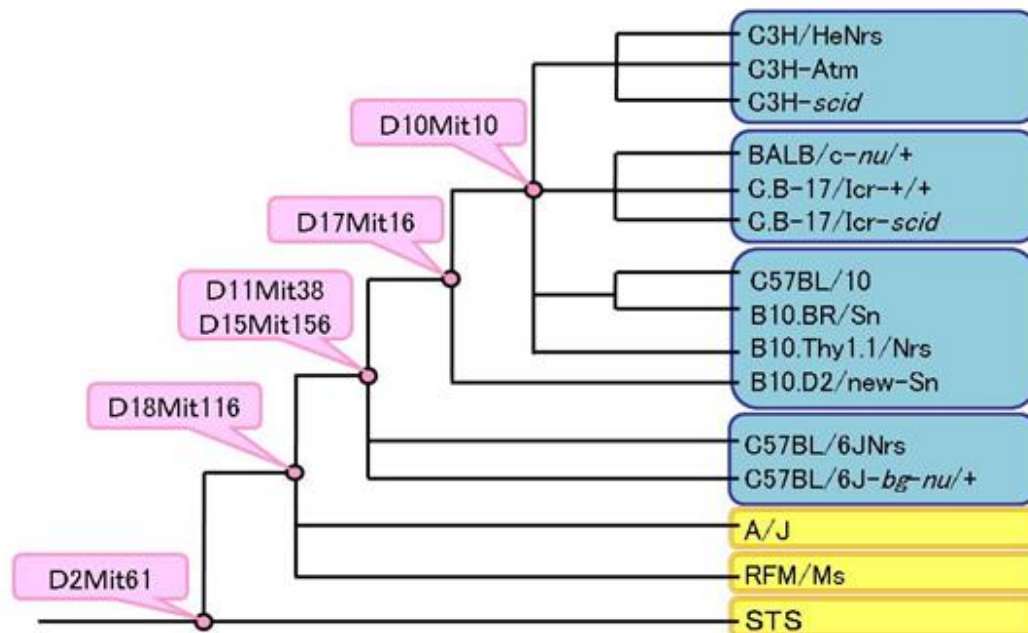


図 5. 6MSMs による効率的な遺伝学的モニタリング

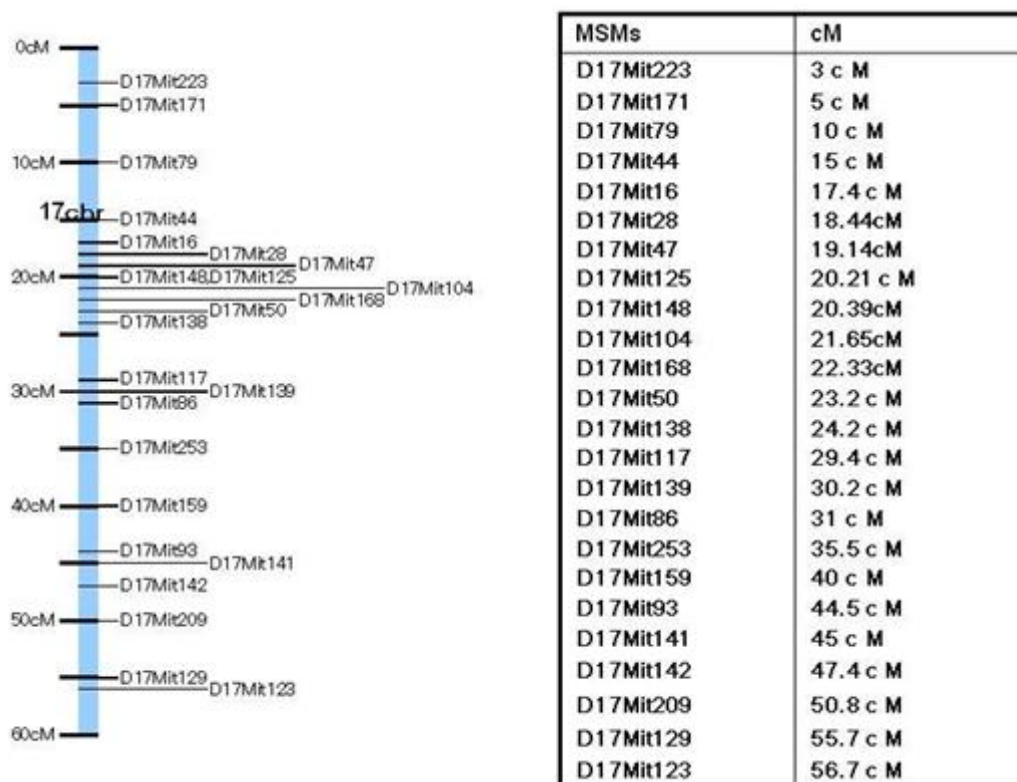


図 6. 今回検索したマウス第 17 染色体の MSMs

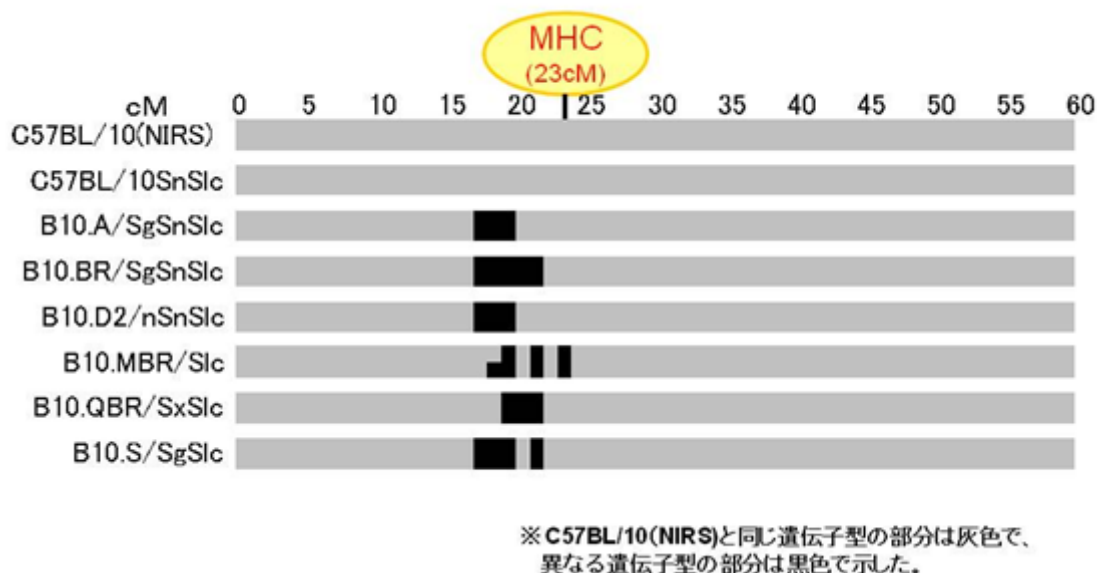


図 7. B10 系統と各 B10 コンジェニック系統の No.Chr.17 遺伝子型の比較

#### 4. 考察

近交系マウスの遺伝学的モニタリングの目的は、

- ①同一毛色で異系統間の不測の交雑の有無の監視
- ②同一系統の斉一性の確認
- ③その系統を特徴づける特定の遺伝子の検査の 3 大要諦を満たすものでなければならない。

放医研では年一度、生化学的・免疫学的標識遺伝子による方法でモニタリングを行ってきたがこの方法では、

- ①検査に適した標識遺伝子が染色体ごとになく、
- ②各遺伝子座ごとに試料採取組織、検査方法、緩衝液、染色方法が異なり、
- ③試料採取組織の劣化も 1 週間と早いものがあったり、
- ④非常に煩雑な操作を必要としたり、
- ⑤遺伝的コンタミネーションが起きた時の判定に有効な共優性の遺伝子型とならないマーカーがあったりと作業効率上不利な点があった。

今回検討した MSMs による遺伝学的モニタリングは、

- ①標識遺伝子として用いられる候補が各染色体に多数ある
- ②用いる試料は DNA であり、耳、尾、血液、肝臓、脾臓等何れの組織からでも採取可能であり、PCR の条件も統一化できる
- ③-20℃で凍結保存すれば長期間試料として使用できる
- ④DNA の採取、泳動装置の操作ともに煩雑な操作を必要としない
- ⑤異系統間で対立する遺伝子型の場合は交雑 F1 は共優性型となる MSMs を選択できることから MSMs による近交系マウス系統の遺伝学的モニタリングは実用的であると結

論した。さらに、近交系マウス系統間の交雑 F1 マウス系統では異なった遺伝子型の座位の遺伝子型がすべてヘテロ型となるので、これらの座位についてのみ調べれば遺伝学的モニタリングを行うことができる。すなわち、表 3 に示した一覧のうち、C3H 系と C57BL/6 系では D1Mit415、D3Mit319 等がこの 2 系統間では異なった遺伝子型を示しているので交雑 F1 ではすべてヘテロ型となる。したがってヘテロ型となる MSMs の座位のみを調べることによって系統の同定が可能になる。

また、特定の遺伝子を他の系統に導入したコンジュニック系統では目的とする遺伝子以外の近傍の遺伝子も同時にレシピエント系統に導入されている。したがって、これら、ドナー系統の遺伝子型を調べることにより目的とする主要組織適合抗原遺伝子(Major Histo Compatibility antigen gene; MHC)そのものではないが、補足的に遺伝学的モニタリングを行えると考えた。当所ではコンジュニック系統として、C57BL/10 系統に C57Br、DBA/2 の MHC 遺伝子を導入したコンジュニック系統として、B10.BR、B10.D2 等を維持している。また、C3H/He 系に Atm の遺伝子を導入した C3H-Atm 系のようなコンジュニック系統を維持しているが C3H/Atm については PCR-法で Atm、野生型ホモ、ヘテロの遺伝子型の判定は可能であるが前 2 系統については補体依存性細胞障害試験によってしか遺伝子型の判定はできない<sup>8)</sup>。しかし、近年、抗血清の入手が困難になり、この試験自体を実施することが困難な状況となってきた。したがって、MSMs による B10 コンジュニック系統の遺伝学的モニタリングはこれに変わり得る方法として有効であると考えた。

アウトブレッッド系は近交系と異なり、循環交配によって極力近交化を避ける方法で生

産されている。したがって、近交系のようにすべての遺伝子がホモ型に固定しているということはあり得ないはずである。実際、CF1系についてこの37座位の遺伝子型を調べた結果、12座位でヘテロ型を示す遺伝子型が認められた。したがって、以降、この12座位のMSMsについてその遺伝子頻度を調べることによって生産方法の適否を判断することができる。また、同じくddY系統についても同様に調べた結果、17座位でヘテロ型の遺伝子型があることがわかった。このうち、CF1ではホモ型に固定していてもddYではヘテロ型の遺伝子を保有している座位としてD1Mit415、D4Mit286等の10座位があった。これらを比較することによってアウトブリード系統相互間の関連を調べることが可能である<sup>9) 10) 11) 12)</sup>。

本法の今後の展開として凍結した卵子、精子よりDNAを抽出してPCR法にて増幅しモニタリングを行ったり、融解、移植した蘇生子のDNAで同様にモニタリングを行う他、これらの情報、技術を基に遺伝子のマッピング、スピードコンジェニック系統の作製の際に活用していくことも可能である。

## 5. まとめ

今回の結果をまとめると、

- 15系統マウスの維持を凍結胚による方法に換え何時でも蘇生可能である
- MSMsを用いた遺伝学的モニタリングは実用的である
- MultiNAを用いることでアガロースゲルを用いた電気泳動法より簡単に客観的に遺伝子型を精査できる
- 本系で選んだ37座位は、
  - ①同一の条件でPCR産物を得られる
  - ②アガロースゲルを用いた場合、目視でも遺伝子型の判定ができる

③ヘテロ系(F1)の判定ができる

- MSMsを換えることで他の機関でも近交系、交雑群、コンジェニック系統、アウトブリード系統の遺伝学的モニタリングができることがわかった。

## 引用文献(引用順)

- 1 上野 渉、和田 彩子、太田 有紀、海野 あゆみ、飯名 瑞希、早尾 辰雄、塚本 智史、鬼頭 靖司、西川 哲  
放医研におけるマウス系統の維持および遺伝学的モニタリングについて  
静岡実験動物研究会会報、第36巻、1号、(2012)、(投稿中)
- 2 早尾 辰雄、上野 渉、海野 あゆみ、伊藤 正人、飯名 瑞希、大久保 喬司、藤井 功輔、和田 彩子、新妻 大介、石原 直樹、川原 隼、石田 有香、小久保 年章、塚本 智史、太田 有紀、鬼頭 靖司、岩元 竹一、淵上 文彦、甲田 誠二、西川 哲  
放射線医学総合研究所におけるマウス生産の過去・現在・未来  
放射線科学、第53巻、7号、16-20、(2010)
- 3 L. J. Fox, Scientist sues over genetically impure mice.  
Science, 221, 12, 625-628, (1983).
- 4 海野 あゆみ、上野 渉、飯名 瑞希、新妻 大介、伊田 大貴、宮沢 正光、早尾 辰雄、西川 哲  
マイクロサテライトマーカーを用いたマウス系統の遺伝学的モニタリングシステムの確立、実験動物技術、第43巻2号、47-52、(2008)
- 5 海野 あゆみ、飯名 瑞希、大久保 喬司、新妻 大介、石原 直樹、伊藤 正人、藤井 功輔、武笠 功、上野 渉、早尾 辰雄、西川 哲  
MultiNAを用いたマイクロサテライトマーカーによるマウス系統の遺伝学的モニタ



リングの試み

実験動物技術、第 45 巻 1 号、9-14、(2010)

- 6 飯名 瑞希、海野 あゆみ、大久保 喬司、  
上野 渉、早尾 辰雄、西川 哲

放医研におけるマイクロサテライトマーカーを用いたマウスの遺伝学的モニタリングシステムとその応用、実験動物技術、第 45 巻 2 号、65-72、(2010)

- 7 飯名 瑞希、海野 あゆみ、大久保 喬司、  
上野 渉、早尾 辰雄、西川 哲

マイクロサテライトマーカーを用いた B10  
コンジェニック系マウスの遺伝学的モニタ  
リングの試み、実験動物技術、第 46 巻 1  
号、23-26、(2011)

- 8 大久保 喬司、新妻 大介、伊藤 正人、石  
原 直樹、藤井 功輔、塚本 智史、上野 渉、  
早尾 辰雄、西川 哲 (2010)

SPF 動物生産実験棟で維持を継続するマウ  
ス系統の交配方法について

第 5 回放射線医学総合研究所 技術と安全  
の報告会 要旨

- 9 上野 渉、飯名 瑞希、海野 あゆみ、早尾 辰  
雄、西川 哲

マイクロサテライトマーカーを用いたマウ  
スの遺伝学的モニタリングの試み～アウト  
ブリードマウス系統の場合～、実験動物技  
術、第 46 巻 2 号、61-65、(2011)

- 10 A. Groen, A. J. Lagerwert, (1979)

Genetic heterogeneity and genetic monitoring  
of mouse outbred stocks.

Lab. Anim., 13, 81-85.

- 11 J. Yamada, H. Nikaido, S. Matsumoto, (1979)

Genetic variability within and between outbred  
Wistar strains of rats.

Exp. Anim., 28, 259-265.

- 12 上野 渉(2011) 未発表データ

---

---

放射線医学総合研究所  
技術報告書



---

---

NIRS Technology

---

---

www.nirs.go.jp

NIRS Technology, vol. 6 (2012) 73 – 76.

## SPF 施設を利用した新しい発生工学技術支援の取り組みについて

塚本 智史\*<sup>1)</sup>、和田 彩子<sup>2)</sup>、太田 有紀<sup>2)</sup>、石田 有香<sup>1)</sup>、小久保 年章<sup>1)</sup>

1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課

2) (株) サイエンス・サービス

---

### 要旨

卵と精子を人工的に操作して個体を作成する発生工学技術の進歩によって、近年では遺伝子組換え動物が世界中で開発され様々なバイオサイエンス研究分野で活躍している。開発された組換え動物は生きた個体や凍結卵・精子として国内外を問わず流通するのが一般的になっている。所内においても、ここ数年で遺伝子組換え動物（特に遺伝子組換えマウス）を利用した放射線影響研究が増加している。それに伴い所内研究者（ユーザー）からのリクエストは多様化の傾向にあり、これに併せた技術支援の構築が必要となっている。今年度から当課では SPF 施設を利用した発生工学技術支援を実施している。これによって従来よりもマウスの個体作出までの時間を大幅に短縮しただけでなく、個体作出までの一連の操作すべてを SPF 環境下で実施することで SPF グレードのマウスが提供可能となった。本報告では、実際の支援例を元に SPF 施設を利用した新しい発生工学技術支援について概説する。

**Keywords:** 発生工学技術、マウス、卵・精子、SPF、動物施設、衛生検査

---

**\*Corresponding Author:**

塚本 智史 (Satoshi Tsukamoto)

e-mail: s\_tsuka@nirs.go.jp

## 1. はじめに

当課では、今年度より従来通り実施している発生工学技術支援に加えて SPF 施設を利用した SPF レベルの発生工学技術支援も実施している。なぜ SPF レベルの発生工学技術支援が必要なのか、この点について最初に言及する。

所内に存在する動物施設は大きく3つの衛生レベルに区別することができる。一つ目は定期的な衛生検査を実施しない最も衛生レベルが低い動物施設で、短期間の動物実験のために使用されることが多い。二つ目は定期的に衛生検査を実施している動物施設で、コンベンショナル動物施設と呼ばれる。三つ目は最も衛生レベルが高く、定期的な衛生検査で特定の病原微生物が検出されないことを前提に SPF (Specific Pathogen Free) 動物施設と呼ばれる。最近では、SPF レベルの動物施設を設置している大学・研究機関が多いが、動物施設の運用や入室方法などが異なっていることが多く、それ故に施設間のマウスの移動には細心の注意が必要となる。例えば SPF レベルだと判断されて施設に導入されたマウスが何らかの病原微生物に感染していたケースでは、導入後に施設内のマウスに爆発的に感染を広げてしまうことさえある。しかし、最近では研究者（施設）間での遺伝子組換えマウスのやりとりが頻繁に行われるようになっており、品質の保証されたマウスを効率的にユーザーへ提供するための技術支援の整備が必要であった。そこで当課では、平成22年度に SPF 動物生産実験棟1階の改修に着手し、卵や精子といった細胞から個体作出までのすべての操作を SPF 施設内で実施するための整備を進めた。そして平成23年度よりこの施設を利用した発生工学技術支援を開始した。

本項で紹介する技術支援例は、衛生検査を実施していない最も衛生レベルの低い動物施設で飼育されていた遺伝子組換えマウス（病原微生物の感染疑いあり）を SPF レベルの動

物施設へ導入するケースである。このような場合には、通常は病原微生物を除去するための清浄化を実施することが一般的である。清浄化とは、病原微生物を保有する（疑いのある）マウスから精子あるいは卵を採取して体外受精を行う。次に受精卵を仮親へ移植し、その後に無菌的に帝王切開を行い同じく無菌状態の里親にその産仔を哺育させる一連の作業である。仔マウスが離乳して一定期間が経過した後に、里親も含めて衛生検査を実施してここで病原微生物の除去が証明できれば清浄化が成功したことになる。

## 方法

病原微生物の感染の疑いがある遺伝子組換えマウスを扱うことになるため、そのマウスの個体や組織を直接 SPF 施設へ持ち込むことはリスクが高い（図1参照）。そこで衛生レベルの異なる二つの施設を利用して清浄化を実施したので、ここでは施設ごとに分けてその方法を述べる。

### ・コンベンショナル施設（実験動物研究棟）での作業

ユーザーから病原微生物の感染が疑われる遺伝子組換え雄マウスの提供を受けて、陰圧下にて精巣上体尾部から精子を採取した。次にブリーダーから購入し過排卵処理をした野生型雌マウスから卵子を回収した。これらの精子と卵子を使って体外受精を行った。翌日に正常に発生した2細胞期胚を回収して急速ガラス化法にて凍結保存した。

### ・SPF 施設（SPF 動物生産実験棟）での作業

コンベンショナル施設にて作成した凍結胚を専用の運搬容器に入れてパスボックスを介して SPF 施設1階へ搬入した。生産室1（SPF 発生工学室、図1左下）にて凍結胚の融解を行いその後しばらく培養した。次に胚だけを隣の生産室2（SPF 手術・隔離室、図1中央下）へ移動させて、あらかじめ準備した仮親

マウスの輸卵管へ移植した。その後、仮親マウスは陰圧カプセル内にて飼育した (SPF 施設内にさらに陰圧状態の隔離スペースを配置することで、仮に微生物が検出されたとしても他のマウスに感染しないようにしている)。妊娠 19 日目にルテウムを皮下注射して翌日に帝王切開を実施した。帝王切開によって得た産仔は里親につけて離乳するまでさらに陰圧カプセル内にて飼育した。離乳後の仔マウスを 6 週間程度飼育し、無作為に選んだマウスと里親、里親由来の実仔の衛生検査を実施した。

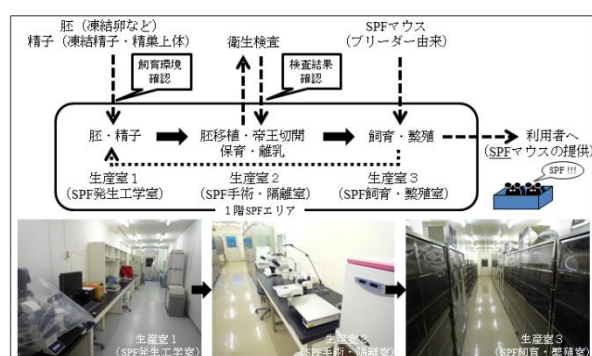


図 1 SPF 施設を利用した発生工学技術支援のフロー。凍結卵 (胚)・精子の SPF 施設内への導入から個体作出までの一連の流れを示す。導入した胚・精子は生産室 1 (SPF 発生工学室) 内にて取り扱い、その後の仮親への移植は生産室 2 (SPF 手術隔離室) にて実施する。移植後の仮親は陰圧カプセル内で飼育し、妊娠 20 日目に無菌的に帝王切開を実施して里親に仔マウスを哺育させる。衛生検査を実施するまで仔マウスと里親を陰圧カプセル内で飼育する。衛生検査の結果、病原微生物が検出されなかったマウスは生産室 3 (SPF 飼育・繁殖室) で飼育する。

### 結果

提供された雄マウスと野生型雌マウス 20 匹を使った体外受精によって 372 個の凍結卵を確保した。清浄化にはこれらの凍結卵の中から 89 個を使い、5 匹の仮親マウスの輸

卵管へ移植した。移植したすべての仮親が妊娠し、帝王切開によって得た 39 匹の仔マウスを里親に哺育させた。その後、離乳後にしばらく飼育した仔マウス 9 匹と里親 6 匹さらに里親由来の実仔 2 匹 (計 17 匹) の病原微生物の検査を実施したところ、検査対象となった病原微生物は全く検出されなかった (図 2)。これらの結果から、病原微生物の除去 (清浄化) に成功し、SPF グレードのマウスとしての品質が証明された。清浄化後のマウスは生産室 3 (SPF 飼育・繁殖室、図 1 右下) で飼育し、その後にユーザーへ提供した。

平成 24 年 1 月 5 日

微生物検査結果報告書

SPF 動物生産・実験棟 1 階 2 号室において、帝王切開による清浄化を依頼されていたマウス (1 系統、TG) に対する微生物検査の結果をご報告致します。微生物検査は、同陰圧カプセルユニット内で飼育し、里親および里子として使用したマウスならびに不要となった産仔を用いて実施致しました。検査の結果、すべての検査項目で陰性と判別致しました。当該マウスの他飼育室への搬出が可能となりましたので、お知らせ致します。

生物研究推進課  
実験動物衛生係  
生物研究推進課長

検査結果

検査対象のマウス系統	██████ TG
検査月日 (解剖検査日): 2011 年 12 月 21 日 検査対象: 12 カプセルユニット	里親: 1CR, ♀, 6 匹 里子: 1CR, ♀, 1 匹, ♂, 1 匹 産仔: C57BL/6, ██████, ♀, 4 匹, ♂, 5 匹
病原体	
培養検査	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 / 17
<i>Salmonella</i> spp.	0 / 17
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	0 / 17
<i>Citrobacter rodentium</i>	0 / 17
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	0 / 17
<i>Mycoplasma</i> spp.	0 / 17
血液検査	
Sendai virus <sup>a</sup>	0 / 17
Mouse hepatitis virus <sup>a</sup>	0 / 17
Tyzer's organism <sup>a</sup>	0 / 17
<i>Mycoplasma pulmonis</i> <sup>a</sup>	0 / 17
<i>Corynebacterium kutscheri</i> <sup>b</sup>	0 / 17
CAR bacillus <sup>c</sup>	0 / 17
Lymphocytic choriomeningitis virus <sup>a</sup>	-
Ectromelia virus <sup>a</sup>	-
顕微鏡検査	
<i>Spirochaeta muris</i>	0 / 17
<i>Giardia muris</i>	0 / 17
肉眼肉変	0 / 17

a: ELISA 法 b: 凝集法 c: IFA 法

図 2 SPF 施設を使って清浄化したマウスの衛生検査の結果例。検査対象となった仔マウス、里親、里子のすべてにおいて病原微生物は検出されず、清浄化されたことを示す。

## まとめ

最近では開発されたマウスの研究者（施設）間でのやりとりが頻繁に行われるようになってきているが、施設間の衛生レベルの差を考慮すると今後は凍結卵の利用が増加するように思われる。また、放射線影響研究に関わる動物実験は厳密な衛生管理の下で長期にわたって実施されることが多く、研究に使用する動物個体の準備をいかにスピーディーに行うかがその後の研究計画に大きく影響を与えてしまいかねない。したがって、律速段階とも言える個体作出までの期間を短縮して高品質のマウスをユーザーへ提供する技術支援の構築はきわめて重要であると考えられる。

今回紹介した SPF レベルの発生工学技術支援が大きな意味を持つのは、精子や受精卵の状態から最短で SPF グレードのマウスが作出できるだけでなく、個体作出そしてその後の飼育や繁殖のすべてが SPF エリア内で実施できることである。このような細胞から個体レベルまでのすべての作業を SPF 環境下で実施できる施設は所内にはこれまでなかった。今後の放射線影響研究に関わる動物実験を円滑に進める上での基盤施設でもあり、本施設を利用した発生工学技術支援の積極的な利用を期待したい。

## 謝辞

所内における SPF 発生工学技術支援のために様々な技術的な意見を頂戴した鬼頭靖司博士と西川哲博士に深謝いたします。また、SPF 施設の改修にあたり施設の運用方法など貴重なご意見を頂いた東京都医学研究機構の多屋長治博士にも感謝いたします。最後に、SPF 発生工学技術支援に関わるすべての現場スタッフならびに生物研究推進課の関係者の皆様にも感謝いたします。

## 放医研で維持している近交系メダカ（1）

丸山 耕一<sup>\*1</sup>、前田 圭子<sup>1</sup>、長谷川 純崇<sup>2</sup>、石川 裕二<sup>1</sup>

- 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積極的防護研究チーム
- 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分子病態イメージングチーム

---

### 要旨

メダカは、代表的な小型魚類の一つであり、今日では日本をはじめ世界中で実験動物として使用されているが、ひとえには、放医研兵藤（田口）泰子博士によって作出された世界初の魚類近交系が多いに貢献している。1974年より放医研で始められたメダカの兄妹交配は、絶滅などの様々な試練を乗り越えながら、辛うじて維持されている。今回、世代を超えて受け継がれている近交系の記録を総編集し、一番初期に作出に成功した近交系 HB(Houiken Black)系統と HO(Houiken Orange)系統の性格、由来、掛け合わせの歴史について解説する。また、その特性や研究での成功例についてもあわせて紹介する。

**Keywords:** メダカ, medaka, *Oryzias latipes*, 近交系, inbred strain, HB11A, HB32D

---

**\*Corresponding Author:**

丸山 耕一 (Kouichi Maruyama)

e-mail: k\_maruya@nirs.go.jp

## 1. はじめに

### 1-1. 近交系メダカの意義とその歴史

実験動物の放射線の致死線量や毒薬物の耐性を調べる際に個体差があると、値にばらつきが出て、正確な値を算出することが難しくなる。そこで考えられたのが、兄妹交配を繰り返すことにより、遺伝的な個体差をほぼ均一にした近交系である。マウスなどの実験動物では近交系を「20代以上の兄妹交配をつづけたもの」としているが、メダカでもそれに準じた方法で定義している。放医研では兵藤（田口）博士により、1974年よりメダカの近交化を始め、1980年に魚類では世界で初めてのメダカ近交系作出を成功させた<sup>[1]</sup>。

### 1-2. 放医研メダカの提供実績

放医研の近交系メダカは様々な研究機関に譲渡されており、放射線影響研究、毒性評価、EST解析、ゲノム解読、QTL解析、がん研究、宇宙での行動研究など様々な用途に使用されている。2012年現在、論文検索サイト(Pub-Med)で、放医研由来である近交系名で検索をかけると、Hd-rR 32件、HNI 18件、HO5 5件、HO4C 4件などの結果であり、放医研の近交系が科学に多大に貢献してきた事が示される（実際には論文検索サイトが整備される以前の論文や、Abstractに系統名まで記さない論文の方が多いので、これよりはるかに多い）。しかし残念な事に、譲渡を最もおこなっていたと思われる時期はMTAなどの法が整備されておらず、メダカ系統の譲渡は研究者間の個人的なつながりで行われており、どの系統がどこに譲渡されたかについての正確な情報は残されていない。また、譲渡された機関からさらに別の機関への譲渡も数多く行われていた様である。これらの問題を背景に日本では2001年頃からナショナルバイオリソースプロジェクトが発足し、法整備等が始まり、メダカもその一つとして、様々なメダカの収集・継代・提供が行われている。現在で

は、愛知県岡崎市にある基礎生物学研究所が中心になり、日本のメダカを統括している。ただ、放医研にも他研究機関からの提供依頼は頻繁に来ており、提供先とMTAを交わす事で依頼に応じている。表1に、放医研・第2期中期計画（2006-2010）に提供されたメダカ系統と提供先を示す。

表1. 放医研・第2期中期計画（2006-2010）に提供されたメダカ系統

年度	所属	代表者	系統名	匹数	備考
2007	広島大学・理工学部	中坪敬子	Hd-rR	20	
2008	広島大学・歯学部	沢尻昌彦	HO4C	120	Himac照射
2008	千葉市科学館	大高一雄	HB32D	6	展示用
2009	慶應大学・医学部	松崎ゆり子	HB32D	10	
2009	JAXA	内田智子	QL-HS-40-00(up-2)GFP		
2009	広島大学・歯学部	沢尻昌彦	HO4C	120	Himac照射
2010	東工大・生命理工	工藤 明	HB32D	20	
2010	国立環境研究所	田中嘉成	HNI-Hd-rR,HO4C HB32D,NCMH2	各6	
2010	広島大学・歯学部	沢尻昌彦	HO4C	120	Himac照射

## 2. 近交系の作出と維持方法

放医研の近交系メダカは、水生動物舎の温度一定の環境下（室温29℃、水温26℃）で飼育され、井戸水を用いて週3回の割合で水換えを行い、明暗サイクルをメダカが最も活動する夏季時間の明14-暗10時間に設定して維持している。エサは成魚には熱帯魚のエサ、テトラミン（Tetra）をミキサーで粉末状にして、メダカの口に合う大きさに砕いて与え、稚魚にはさらに目の細かい鮎の稚魚用エサ（スーパーゴールド0、オリエンタル酵母工業）を与えている、その他、サプリメントとしてブラインシュリンプも日々培養し与えている。給餌の頻度は平日1日2回、週末は土曜又は日曜に一度の以上の割合で行っている。その他、近交系だけに、エアポンプでエアレーションを行い、また柄杓を使用して飼育水を交換している。継代は基本的には雌雄1ペアにつき3ペア以上を基本に行い、成育してから良いものを残す方法を採用している。そ

の理由は、発生異常、生殖能力の低下、雌雄の割合などは、一定の飼育期間をおかないと判別が出来ないからであり、これが近交系維持の手間を煩雑にしている一因である。

### 3. 近交系維持の現状

放医研・水生動物舎では1974年から近交系の継代を始め、現在でもほぼ同じ手法で続けている。近交系維持は、田口-石川（松本）-丸山（前田）と代替わりしながら続けられており、初代からの引き継ぎしたノートや文献資料などは残ってはいるが、どのような経路で現存しているメダカ近交系に引き継がれてきたかについての全容は把握出来ていなかった。そこで現在、どの様に継代が行われてきたかについて編集をおこなっている。今回は

最も初期から継代され、一番はじめに近交化に成功したHB系統とHO系統について報告する。

#### 3-1. HB 系統

HB系統は、千葉大学で飼育されていた千葉市内の野生メダカを起源にもつ系統であり、体色は野生種同様の黒である（表2）。この当時の系統への命名は、まず始めに放医研の頭文字のH、次に体色Blackを表すB、次に番号が適用されている。1974年秋に3ペアから始められた兄妹交配は、様々な枝分かれが行われ、1979年には20代目をむかえ、亜系統を含む10系統の近交系(HB11A、HB11B、HB11C、HB12A、HB12B、HB12C、HB32A、HB32C、HB32D、HB32F)が確立されている（図1）。

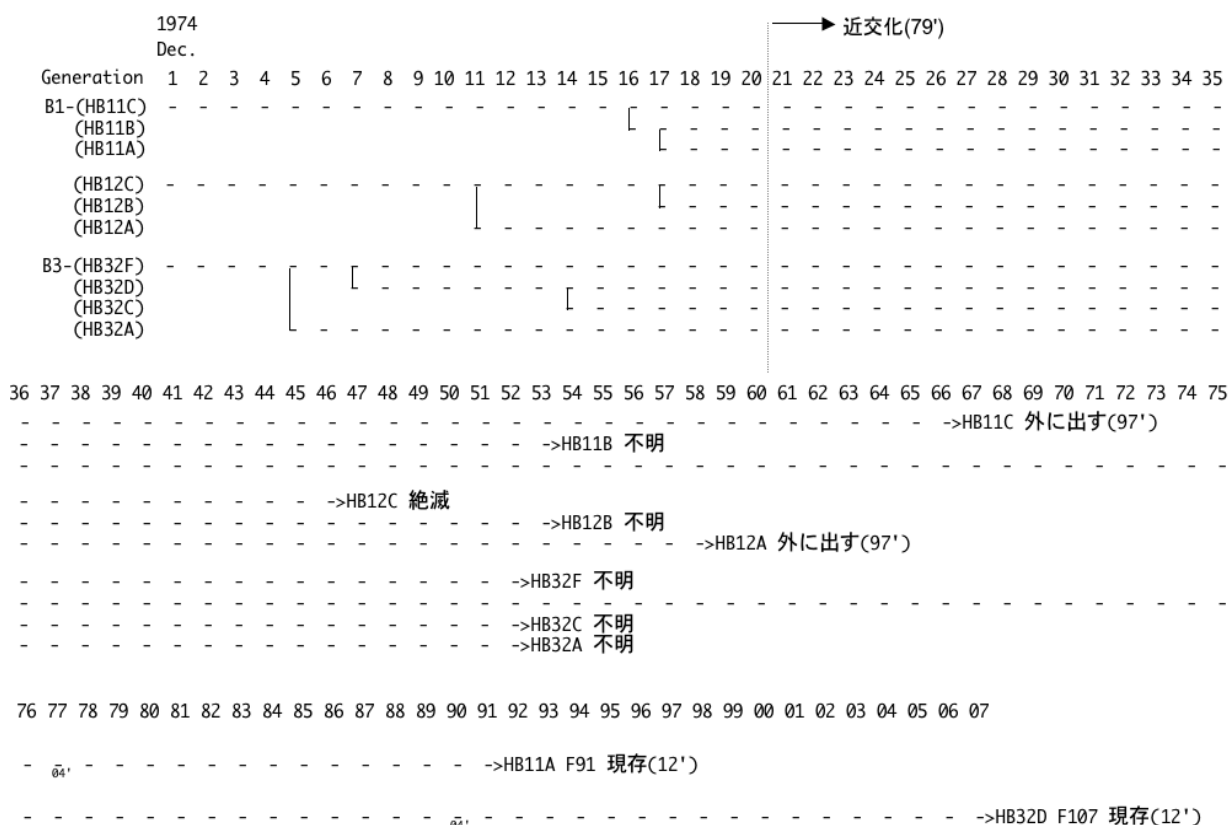


図1. 近交系HB系統の系統図。現存する文献<sup>[1] [3]</sup>、ノート等を元に編集した。52-53代目に不明が多いのは、維持する人員の代替わりがあり、正確な記録が残っていないため。



その後、生殖能力の低下、雌雄の不均一化、奇形の発生、継代労力の低減化などを背景に、ほとんどの近交系種は淘汰され、現在、放医研で維持されているのは、HB11A (91 代目) と HB32D (107 代目) のみである。

### 3-1-1. HB32 系統を使った成功例

筆頭著者が放医研に出入りを始めた 2002 年当時、研究に使用される近交系メダカの主流は Hd-rR 系統や HNI 系統に移行しており、HB 系統は何年もの間、特に利用されることもなく、潰れてしまうとこの世から消えてしまうという理由から細々と繋いでいた系統であり、言わば「お荷物」の系統であった。2006 年に分子イメージング長谷川純崇先生から「メダカを用いた担がんモデル研究」についての相談を受け、いろいろ調べていくと放医研江藤久美先生により HB32C 系統で作製され

たメラノーマ細胞株が、理研に譲渡されている情報を得た。放医研では HB32C 系統はすでに絶えていたが、図 1 に示すように HB32C と HB32D は 14 代目に枝分かれしていることから、移植は可能であると判断し、GFP で可視化したメラノーマ細胞を HB32D 系統への移植を行い、最終的に研究は成功し、PNAS に一本の論文として発表する事が出来た<sup>[2]</sup>。その後、この論文に興味を持った研究機関から HB32D 系統の提供依頼を受け譲渡することとなった (表 1)。

このような成功例もあり、今まで必要無いと判断されていた系統が突如脚光を浴びる事もあることから、近交系継代維持の判断を難しくしている。

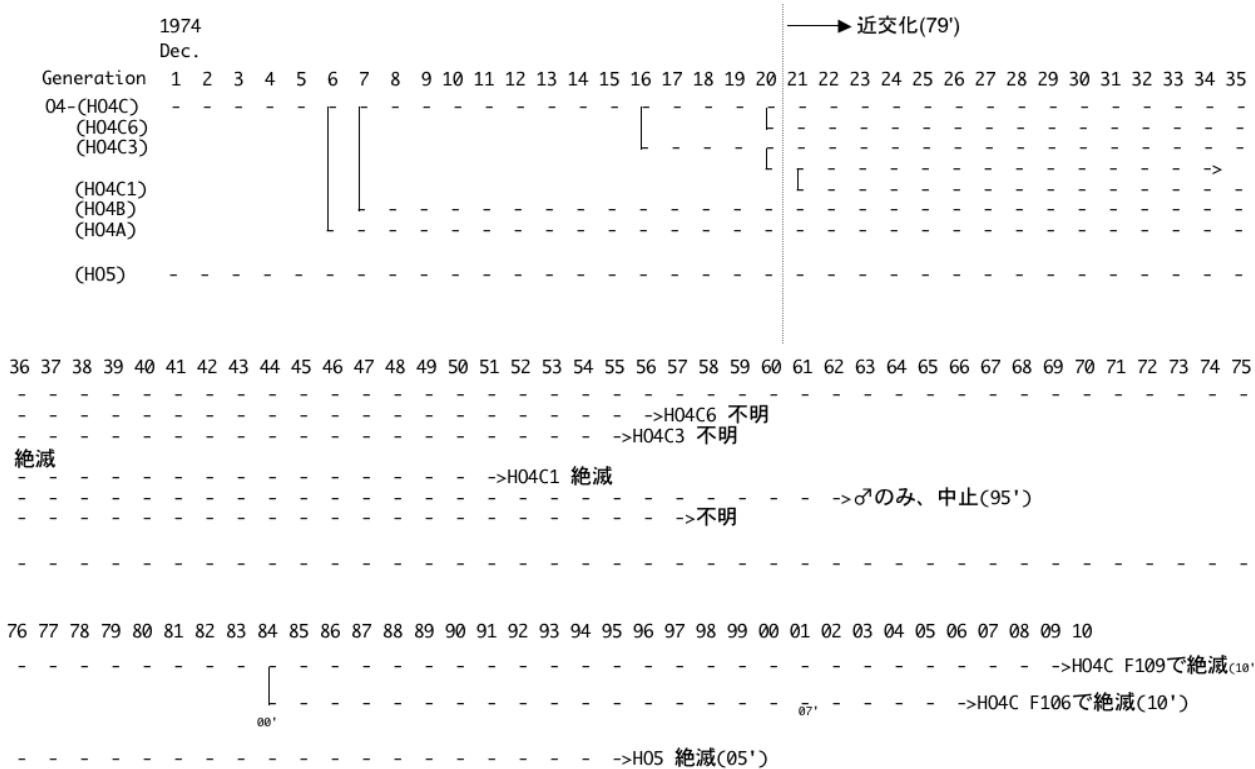


図 2. 近交系 HO 系統の系統図。現存する文献<sup>[1][3]</sup>、ノート等を元に編集した HO 系統の系統図。

### 3-2. HO 系統

HO 系統は、一般に市販されているヒメダカを起源に持つ系統であり、体色はオレンジ、命名方法は HB 系統同様、放医研と体色オレンジの頭文字が由来である。1974 年に 3 ペアから始められた兄妹交配は、1979 年秋には亜系統を含め 7 系統の近交系(HO4A、HO4B、HO4C、HO4C1、HO4C3、HO4C6)が確立している (図 2)。その後、淘汰されながら継代は引き継がれていくが、HO5 は 2005 年に 95 世代目で、HO4C は 2010 年 9 月に 109 代目から継代する事が出来ず、室内での兄妹交配は絶滅した。ただ、野外池で飼育している HO4C 系統については現在でも維持され、照射などに利用されている (表 1)。

### 4. HB、HO 系統の特性、性格

メダカ近交系が確立した 1980 年代には、放射線感受性や、ガンの発症など様々な角度から近交系の性質を検証している<sup>[3]</sup>。また、江上信雄著の「メダカに学ぶ生物学」には、科学的な証明には至っていないものの、主観から見た近交系の性格までが記載されており大変興味深い<sup>[4]</sup>。すでに絶滅している系統も多く、これらの検証をするのは不可能であるが、まとめられたものの一部を表 2 に示す。

表 2. 代表的な HB、HO 系統の特徴など<sup>[3][4]</sup>

系統名	体色	特徴	性格	現状
HB11A	黒	卵小油球融合遅延 MAM-アセテートに対する 肝腫瘍の発生率が低い	著しく人見知り	兄妹交配F91
HB32D	黒	放射線や化学物質に やや低感受性	人見知り 野外では物の 下に隠れる	兄妹交配F107
HO4C	橙	放射線高感受性 MAM-アセテートに対する 肝腫瘍の発生率が高い		放医研の兄妹交配は 絶え、野外集団飼育のみ
HO5	橙	体形がやや丸い 未受精卵が多い	人に慣れやすい	放医研では絶滅 基生研で提供可能

### まとめ

1974 年から放医研で始められた近交系-兄妹交配は今年で 38 年目を迎える。最も代数を重ねているものは HB32D の 107 代目で、これは世界で最も遺伝的に純化された魚であると思われる。この様な世界に誇れる「放医研の伝統」<sup>[5]</sup>は後世に引き継がれていかななくてはいけないものと思われるが、放医研生物研究推進課の支援は、近年非常に厳しく、今期中期計画からは実質 0 となり、近交系の維持管理は研究者に丸投げの状態である。今後、近交系の系統維持は益々厳しくなると予想されるが、しっかりと記録を残し、次世代に引き継がせる事が出来ればと考えている。

最後に、最近少し驚くメールが日本の某大学教授から来たので紹介する。内容を要約すると、「メダカの iPS 細胞を作るのにメダカ近交系 HXXXX 系統 (あえて名は伏せる) が必要なのであるが、残念なことに日本では手に入らない様である。調べると、シンガポールの某研究室で放医研田口先生から譲渡された HXXXX が、現在でも存続している。提供を依頼したのだが、『放医研田口先生の許可がないので譲渡することは出来ない』との返答だった。ついては田口先生に許可を取ってこないか?」というものであった。すぐに仲介をし、問題は解決したのであるが、放医研で作られた系統が放医研では絶え、異国の地で細々と継代され、最先端医学研究に貢献する可能性を持っているという事は大変素晴らしい事なのであるが、そこに加担できない労力の無さと放医研の管理体制の無さに無常感を感じずにはいられなかった。

### 参考文献

- [1] Hyodo-Taguchi Y., メダカ近交系の作出 動物学雑誌 89 (1980) 283-301.
- [2] Hasegawa S., Maruyama K., Takenaka H., Furukawa T., Saga T., A medaka model of cancer:

Direct observation of transplanted tumor cell in vivo at a cellular-level resolution., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106(33)** (2009) 13832-13837.

[3] 江上信雄、山上健次郎、嶋 昭紘 編「メダカの生物学」東京大学出版 第9章「近交系とその特性」(1990)

[4] 江上信雄著, メダカに学ぶ生物学 中公新書, (1989)

[5] 長谷川純崇, メダカでがんを視る：がんの新しい動物モデル-先人たちが残してくれたもの- 放射線科学, (2009年10月号) 4-7.

---

---

放射線医学総合研究所  
技術報告書



---

---

NIRS Technology

---

---

www.nirs.go.jp

NIRS Technology, vol.6 (2012) 83–87.

## HiCEP 自動反応装置 (HiCEPer) の開発

安藤 俊輔<sup>1\*</sup>、荒木 良子<sup>1,2</sup>、堤 康憲<sup>3</sup>、藤森 (法喜) ゆう子<sup>1</sup>、安倍 真澄<sup>2</sup>

- 1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課 遺伝子・細胞情報研究室
- 2) 研究基盤センター 先端計測分析事業推進チーム
- 3) 株式会社 アステック

---

### 要旨

HiCEP (High Coverage Expression Profiling)法[1-2]は、解析前にシーケンス情報を必要としないため全生物の解析が可能な遺伝子発現プロファイル解析法である。マウスでは全転写産物の約70%を網羅し、各ピークはそれぞれの遺伝子とほぼ1:1に対応する。また、1コピー/細胞の転写物、1.5倍以下の発現変動を検出する感度を有している。HiCEP法をライフサイエンスにおける標準的な解析法に発展させるためには、「誰にでもできる」仕掛けが必要であり、さらに原因遺伝子探索に加えて診断などモニタリングに用いるためには、「ハイスループット」でなければならない。そこで、我々は、cDNA合成からアダプター結合までの反応を行なう自動反応装置(以下HiCEPer)を作製し、その評価を行なった。

**Keywords:** HiCEP、ハイスループット化、多サンプル処理

---

**\*Corresponding Author :**

安藤 俊輔 (Shunsuke ANDO)

e-mail : s\_ando@fml.nirs.go.jp

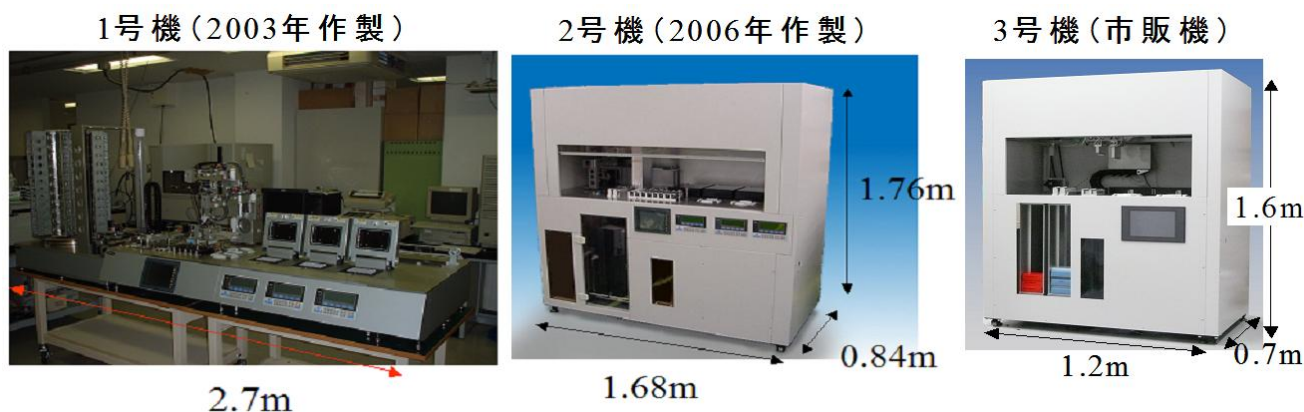


図 1. これまでに開発された HiCEPer

### 1. はじめに

HiCEP 解析法は、これまで所内外の研究者から多くのサンプルの解析を依頼されてきた。しかしながら、本法は、実験ステップ数が多く、一定レベル以上の質のデータを取得するためには、専門職の育成が必要であり、一般的な技術として普及させるためには、誰もが同程度の結果を出せる事が必須である。そのため、ロボット化、即ち自動反応装置の開発が必要であると考えた。通常、HiCEP 解析法を手作業で行なう場合、16 サンプル程度が上限であるが、アプリケーション（同一個体の経時変化、異なる個体での比較、患者さん由来血液、組織サンプルなど）によっては、さらに大量のサンプルを同時に解析する必要があるため、96 ウェルプレートに対応している。

自動反応装置（HiCEPer）は、2003年に文部科学省、高度先端解析技術開発プログラムの新規高精度遺伝子発現プロフィール（HiCEP）法の開発の一環として1号機の開発が始まり、各装置の高度化や技術開発を行い、現在では、3号機まで開発が進んでいる（図1）。今回は、株式会社アステックより受注販売が行なわれているHiCEPer 3号機で行なった解析の報告を行なう。

### 2. 装置

HiCEP 解析法は、制限酵素反応、ライゲーション反応、マグネットビーズ洗浄などから構成されているため、HiCEPer は、「分注など微量液体ハンドリング」、「インキュベーション」、「磁気ビーズによる核酸精製」の3つのモジュールから成り、その他に酵素などの「試薬槽」、「(チップの) ラック移動システム」なども構成ユニットとなっている。（図2-4）

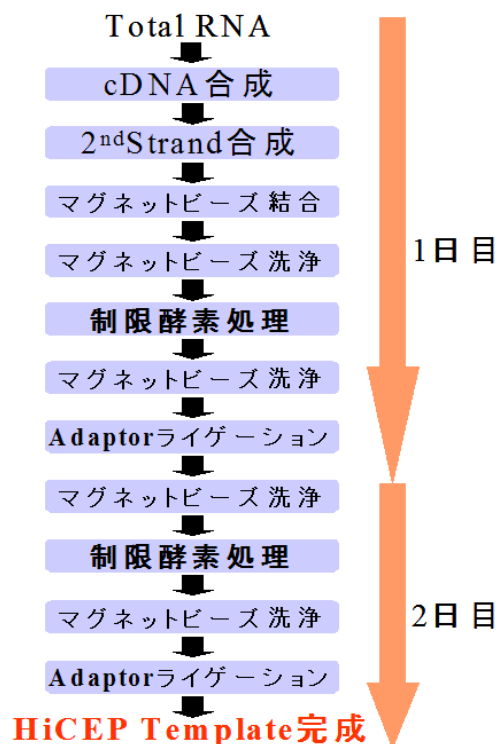


図 2. HiCEPer 反応行程

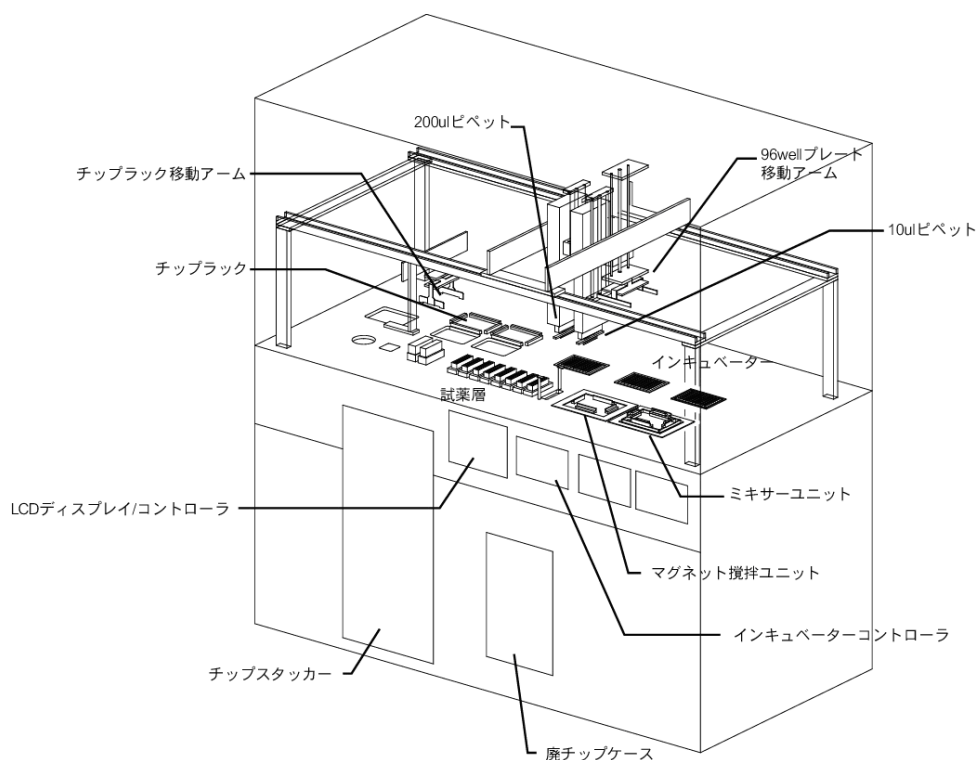


図 3. HiCEPer 構成ユニット

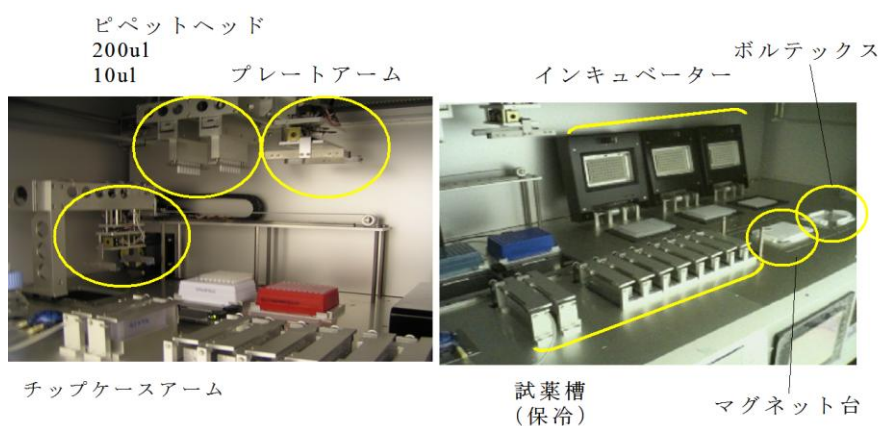


図 4. HiCEPer 内部構造

### 3. 結果/考察

チップの装着、取り外し、チップラックの移動、ビーズ吸引などの動作性能の諸問題を洗い出し、改良を行なった後、一度に 96 サンプルの HiCEP Template 作製が繰り返し可能な事を耐久テストにより確認した。また、この機器の開発によって実験者による実験では、3 日間かかる反応が 2 日間に短縮が可能となった。最初に解析サンプル (Total RNA) と酵素、チップ等をセットしておけば、2 日間放置できるわけではなく、適切なタイ

ミングでの試薬の投入など実験者のケアが必要ではあるが、実験における労働力が劇的に軽減され、何よりこれまで現実的には不可能であったサンプル数 (20 サンプル以上) の解析が可能となった。

さらに、解析に用いる Total RNA 量を 10 ng (1,000 細胞相当) まで下げても反応が達成される事も確認した (図 5)。反応成功率はほぼ 100% (96well 中 96well) と高いので、現在では、研究室の HiCEP 解析法のほとんど

どが HiCEPer で行なわれるようになっており、その結果、処理サンプル数が飛躍的に増加した。この事により、「効率性」に加え、解析に「質」の向上がもたらされた。

また、市販が可能なダウンサイジングにも成功した。横幅が1号機の約1/3となり、研究室への搬入において分解を要さない。即ち研究室に完成品をそのまま搬入できる大きさに仕上げた。最新機は販売を考え、HiCEP 反応以外にも、網羅的ゲノムメチル化解析、シーケンシング反応なども行なえるように、解析プログラムを3つまで登録が可能な仕様に改良した。

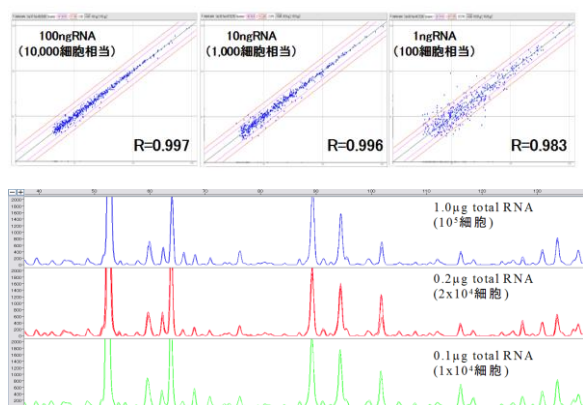


図 5. Total RNA10ng での HiCEP 解析法

HiCEPer によって可能になった実際の解析例を最後に示す。本システムを用いて iPS 細胞の出現に関与する遺伝子同定を試みた。iPS 細胞は胚性幹細胞 (ES 細胞) と酷似し、同様の多能性を有する幹細胞であり、体細胞に4種類の遺伝子を導入する事で得られるものである。しかしながら、その体細胞からの転換頻度は約 1/1,000 と極めて低く、このレベルの頻度で出現する細胞における遺伝子発現変化を捉える事は、マイクロアレイ法など従来法においては非現実的なものであった。このような解析には、低発現遺伝子を効率的に捉える事のできる能力に加え、十分な量のネガティブコントロールと密な時間間隔での極めて詳細な観察が求められる[3,

4]。今回、一日間隔で調整した12サンプルに加え、12のコントロールサンプルの計24サンプルを、再現性を確保する為に2度ずつ、総計48サンプルの解析を HiCEPer にて(1枚の96well プレートで)一度に行なった。その結果、初めて、出現時の iPS 細胞にのみ誘導される遺伝子の同定に成功した(図6)。更に、機能解析実験によってこれらの候補遺伝子には iPS 出現を抑制するもの、促進するものが含まれている事が示された。低発現転写物も高精度に検出可能な解析法で、大量サンプルの遺伝子発現プロファイルを得る事で、これまで現実的には不可能だった遺伝子探索が可能となる。

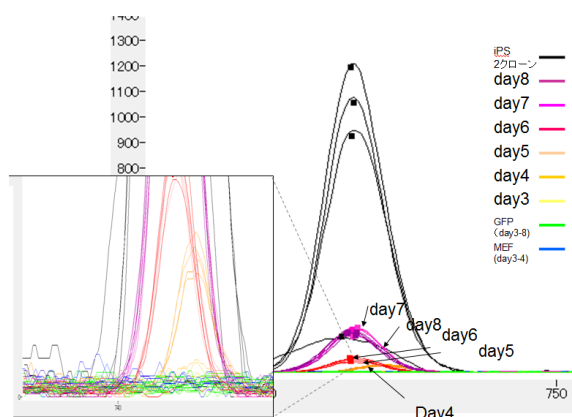


図 6. HiCEP 解析法により同定できた誘導遺伝子

#### 4. まとめ

HiCEP 解析法を誰にでも安定して行なえるように、HiCEP 自動反応装置の開発を行なった。HiCEPer は、最大で96サンプルまで HiCEP Template の作製を可能とし、解析に用いる Total RNA 量を 10 ng (1,000 細胞相当) まで減少させても再現性のある安定した結果が得られる事を確認した。

HiCEP 反応時間の約半分は、制限酵素処理と Adaptor ライゲーションによるものである。今後は、これらの反応時間を検討する事により、さらなる反応時間の短縮が期待される。

## 5. 謝辞

本開発は、文部科学省高度先端解析技術開発プログラム「新規高精度遺伝子発現プロフィール (HiCEP) 法の開発」、JST 先端計測分析技術・機器開発プログラムの一部として実施した。

## 6. 引用文献

[1] R. Fukumura *et al.* A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts. *Nucleic Acids Res.* (2003) Aug 15;31(16):e94

[2] K. Kadota *et al.* A normalization strategy applied to HiCEP (an AFLP-based expression profiling) analysis : toward the strict alignment of valid fragments across electrophoretic patterns. *BMC Bioinformatics.* (2005) Mar 6;6:43

[3] R. Araki *et al.* Crucial Role of c-Myc in the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells.* (2011) Sep;29(9):1362-70

[4] R. Araki *et al.* Conversion of Ancestral Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells.* (2010) Feb;28(2):213-20



---

---

放射線医学総合研究所  
技術報告書

---

---



www.nirs.go.jp

---

---

NIRS Technology

---

---

NIRS Technology, vol. 6 (2012) 88–95.

## フルリプログラミングを賦与する iPS 細胞培養条件の探索

藤森 (法喜) ゆう子\*、荒木 良子、宇田 昌広、中村 美樹、安倍 真澄

研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課 遺伝子・細胞情報研究室

---

### 要旨

これまで当研究室では、体細胞初期化メカニズム解明のため多くの人工多能性幹細胞 (iPSCs) を作出してきた。特に作出頻度が低い、ガン遺伝子(c-Myc)を含まない初期化3因子(Oct4, Sox2, Klf4)のみの iPSCs (3FiPSCs) 作製についても多数樹立に成功してきた。しかしながら 3FiPSCs では細胞レベルで調べる限りにおいては c-myc を含む初期化4因子から得られた iPSCs (4FiPSCs) と同様の性質を有しているものの、キメラ動物作製においては 4FiPSCs と異なり、高率キメラの頻度が極端に低下することを明らかにした。今回報告者は、このような不完全なリプログラミング状態の iPS 細胞に完全な多能性を獲得させる培養条件の探索を試み、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC inhibitor) の一つである TSA を用いた培養法の確立に成功したので報告する。

**Keywords:** iPS 細胞、リプログラミング、エピジェネティクス、HDAC inhibitor

---

**\*Corresponding Author:**

藤森 (法喜) ゆう子 (Yuko Hoki-Fujimori)

e-mail address:hokiy@nirs.go.jp

## 1. 序論

2006年山中教授らのグループは、体細胞に特定のリプログラミング4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)をレトロウイルスにより導入し人工多能性幹細胞(iPSCs)を作出することに成功した[1]。2007年にはヒトiPSCs作製成功の報がなされ、これまでにヒトiPS細胞クローンが、皮膚線維芽細胞、骨髄細胞、ケラチノ細胞、神経幹細胞、末梢血液細胞、脂肪細胞といった、様々な細胞から作り出されてきている。ヒトiPSCsが由来する起源ごとに、その特性と安全性を解析し評価することは、重要な課題である。

体細胞から幹細胞へのリプログラミング機構の解明は、上記課題克服に大きく寄与することはいうまでもない。リプログラミングの障害となる経路として、p53経路や、至適な酸素分圧や培地成分を欠く不十分な増殖環境、多分化能を規定するDNAメチロームやヒストン修飾などエピジェネティックな遺伝子修飾の障害がとりざたされている。

当室では、これらのうち後天的に調節可能なDNAメチロームやヒストン修飾に着目し、完全なリプログラミング状態(すべての体細胞に分化できる、以下フルリプログラミング)を定義可能な唯一の生物であるマウスを用いてiPS細胞を作出し、その培養条件を検討した。

## 2. 方法・材料

### 2-1 材料

iPS細胞の樹立は次の通りに行なった。C57BL/6系統のマウス胎令13.5日胚よりマウス胚性線維芽細胞(MEF)を樹立後、2Aプラスミド法により初期化因子を4回にわたりMEFに導入、ES様細胞コロニーを拾い、生育させ樹立した[2]。樹立したiPSCs株については、初期化因子のゲノムへの挿入がないことを確認済みである。培養には、MMC処理フィーダー下、

KSR-ESM培地[85%DMEM, 15%KSR, non-essential amino acids, penicillin-streptomycin(いずれもInvitrogen), 2-mercaptoethanol(Daiichi-kagaku) and 1000 units/ml LIF(Millipore)]を使用した。本研究には100%キメラマウスは誕生するが離乳以前に死亡してしまうiPS細胞株(2A-EGFPtg-3F-04)を用いた。

### 2-2 使用薬剤

ES細胞の未分化能と自己増殖能を効率よく維持することが報告されている通称2i試薬(GSK阻害剤CHIR99021とMAPK阻害剤PD0325901)[3]、エピジェネティクス効果にて遺伝子発現を調節させるDNAメチル化阻害剤(5-アザデオキシシチジン、5AdC, Sigma-Aldrich)、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(トリコスタチンA、TSA, Sigma-Aldrich)を使用した。薬剤濃度についてはMeltonらの報告を参考にした[4]。

実際には、薬剤処理時の細胞播種密度、薬剤添加のタイミング、薬剤処理時間について表1のように種々の条件を試した。

### 2-3 キメラ作製および germline transmission 確認実験法

表1の組み合わせにてiPS細胞を培養し、生存し形態が良好になったものについて、アグリゲーション法によりキメラマウス作製を行なった。アグリゲーション法では、iPS細胞がC57BL/6系統由来のため、宿主胚にはICR系統を用い、誕生したキメラマウスのキメラ率を眼の色(eye color)と毛色(coat color)にて容易に判定できるようにした。

誕生したキメラマウスについて、そのキメラ率、生存曲線、germline transmission確認交配を行い、薬剤の効果を検証した。

Germline transmission確認交配実験には、100%♂キメラマウスとBalb/c♀との組み合わせにてF1を得、そのeye colorとcoat color

にて判定を行なった。

### 3. 結果

#### 3-1 培養条件の探索

5AdC を用いた場合、細胞の播種密度、薬剤添加のタイミング、処理時間や薬剤濃度の高低に関わらずほとんどの細胞が死滅してしまい、使用できないことが分かった。(図 2)

一方 TSA を処理した場合には、細胞播種密度と薬剤添加のタイミング、処理方法の最適化をはかることにより、良好な細胞形態をよりよく保ちながら(図 1)、アグリゲーション実験に供することができた。実際には、細

胞密度の高い状態 ( $1.5 \times 10^6$  cells / 6 cm dish) に播種と同時に TSA (20 nM) 24 時間処理を行い、薬剤を除去後 24 時間培養した。生育した細胞を継代し、更に TSA 処理を 24 時間おこなった後、アグリゲーションに供した。この条件でのみ、TSA 処理した細胞集団は分化することなく、未分化な形態を保っていた。(図 1)

また、ES 細胞培養で効果のある 2i を定法通りに連続的に添加し [2]、8 日間で 4 回継代を続けると iPS 細胞は非常に良好な形態を維持した(図 3)。これらを用いてアグリゲーション実験を行なった。

表 1. 培養条件の組み合わせ表

細胞播種密度 (cells/6cm dish)	使用薬剤名	濃度	添加のタイミング	処理時間	結果
$7.5 \times 10^5$ フィーダー使用	TSA	20 nM	播種と同時に添加	連続 4 8 時間	分化様形態に変化
//	TSA	20 nM	播種翌日に添加	2 4 時間処理	分化様形態に変化
$1.5 \times 10^6$ フィーダー使用	TSA	20 nM	播種と同時に添加	2 4 時間処理を 2 回 (継代を挟む)	ES様形態維持 GFP強度上昇
$7.5 \times 10^5$ フィーダー使用	5AdC	2 $\mu$ M	播種と同時に添加	連続 4 8 時間	死滅
//	5AdC	1 $\mu$ M	播種翌日に添加	2 4 時間処理	ほぼ死滅
$1.5 \times 10^6$ フィーダー使用	5AdC	1 $\mu$ M	播種と同時に添加	2 4 時間処理	ほぼ死滅
$7.5 \times 10^5$ フィーダー不使用 ゼラチンコートディッシュ	2i (CHIR99021 PD0325901)	1 $\mu$ M 3 $\mu$ M	播種と同時に添加	8日間連続添加 4回継代実施	ES様形態維持 GFP強度上昇

### TSA処理

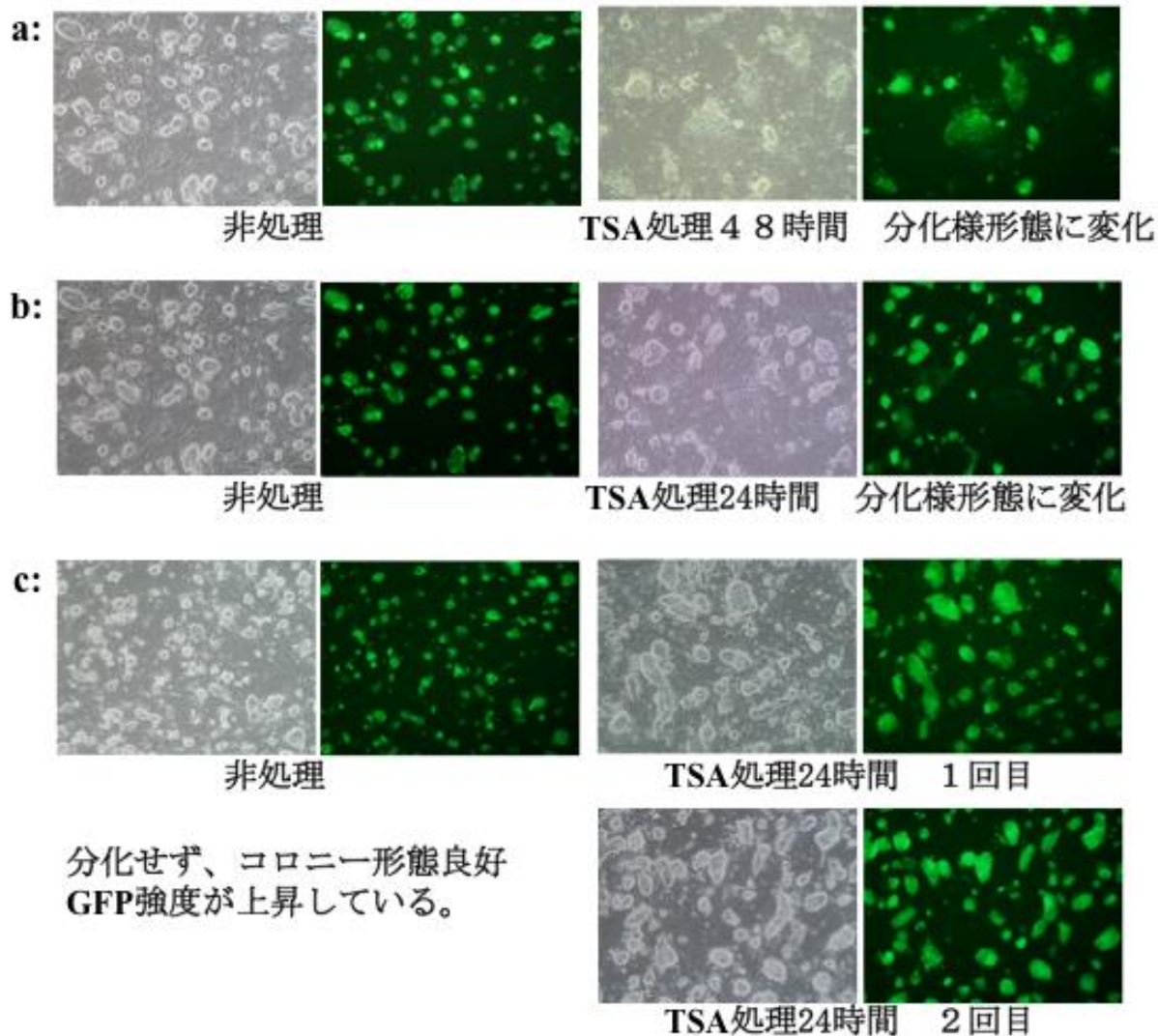
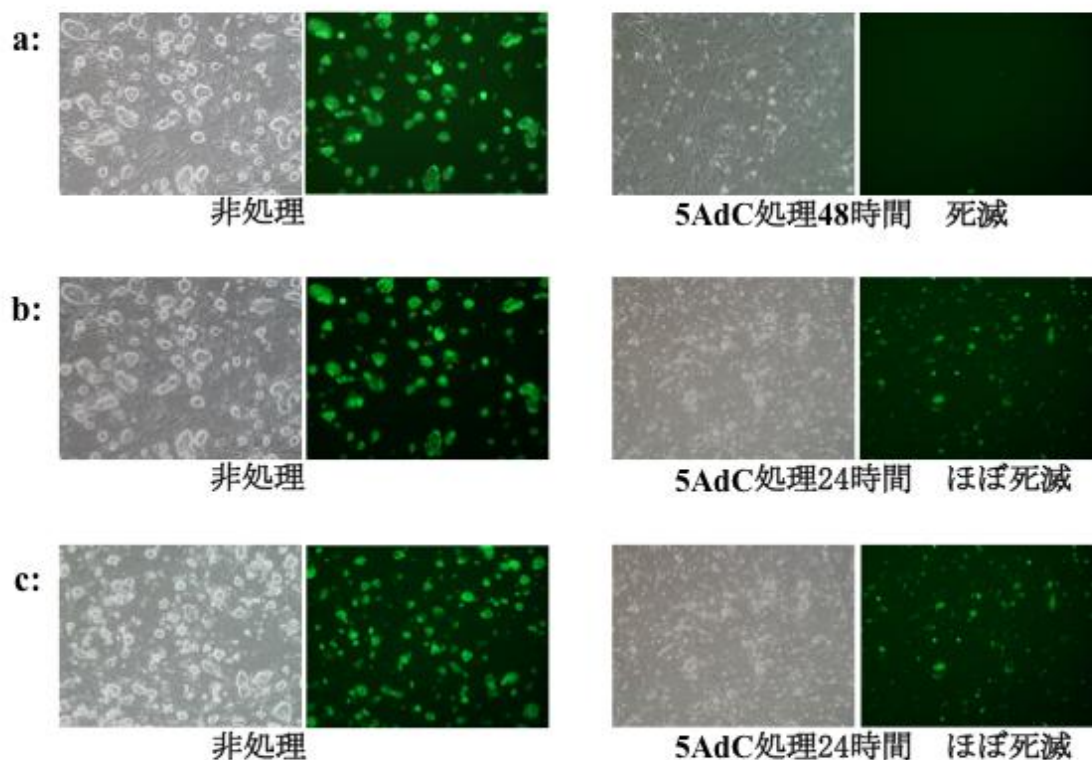


図 1. TSA 処理後の倒立顕微鏡下観察。a:  $7.5 \times 10^5$  cells / 6cm dish にて細胞播種、同時に TSA 添加し、48 時間連続処理させたもの。b:  $7.5 \times 10^5$  cells / 6cm dish にて細胞播種、翌日に TSA 添加し、24 時間処理させたもの。c:  $1.5 \times 10^6$  cells / 6cm dish にて細胞播種、同時に TSA 添加し、24 時間処理し、その後継代を挟んでさらに 24 時間処理させたもの。

### 5AdC 処理



### 5AdCは増殖不能となり使用できない

図 2. 5AdC 処理後の倒立顕微鏡下観察。a:  $7.5 \times 10^5$  cells / 6cm dish にて細胞播種、同時に 5AdC 添加し、48 時間連続処理させたもの。b:  $7.5 \times 10^5$  cells / 6cm dish にて細胞播種、翌日に 5AdC 添加し、24 時間処理させたもの。c:  $1.5 \times 10^6$  cells / 6cm dish にて細胞播種、同時に 5AdC 添加し、24 時間処理させたもの。

### 2i 処理

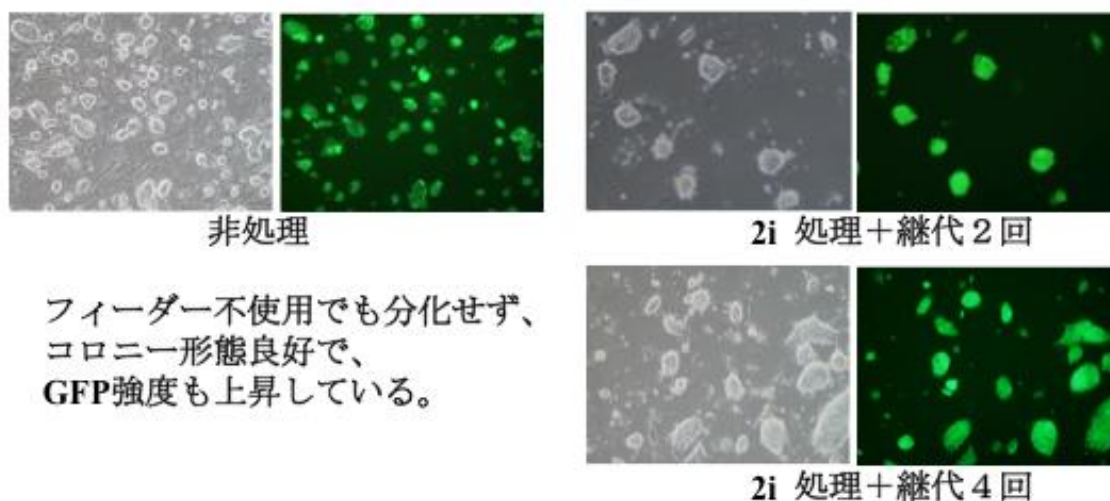


図 3. 2i 処理後の倒立顕微鏡下観察。ゼラチンコートディッシュ上（フィーダー不使用）に  $7.5 \times 10^5$  cells / 6cm dish にて細胞播種、同時に 2i を添加、48 時間連続処理後継代した。これを 4 回繰り返し、計 8 日間培養した。

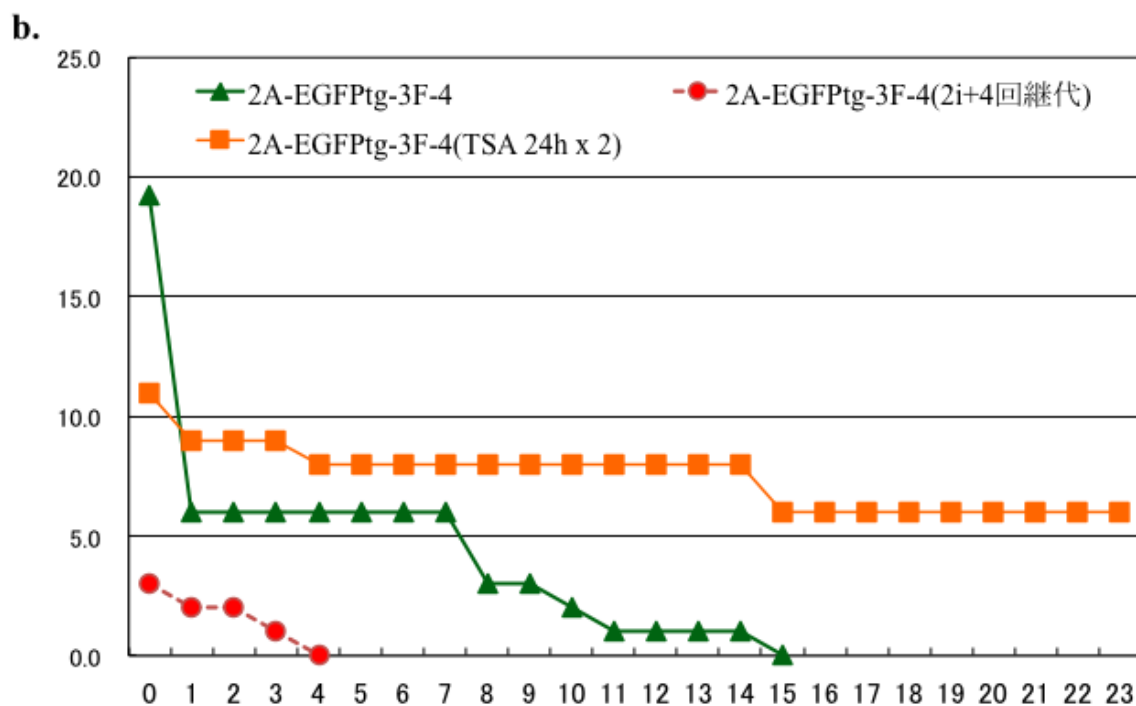
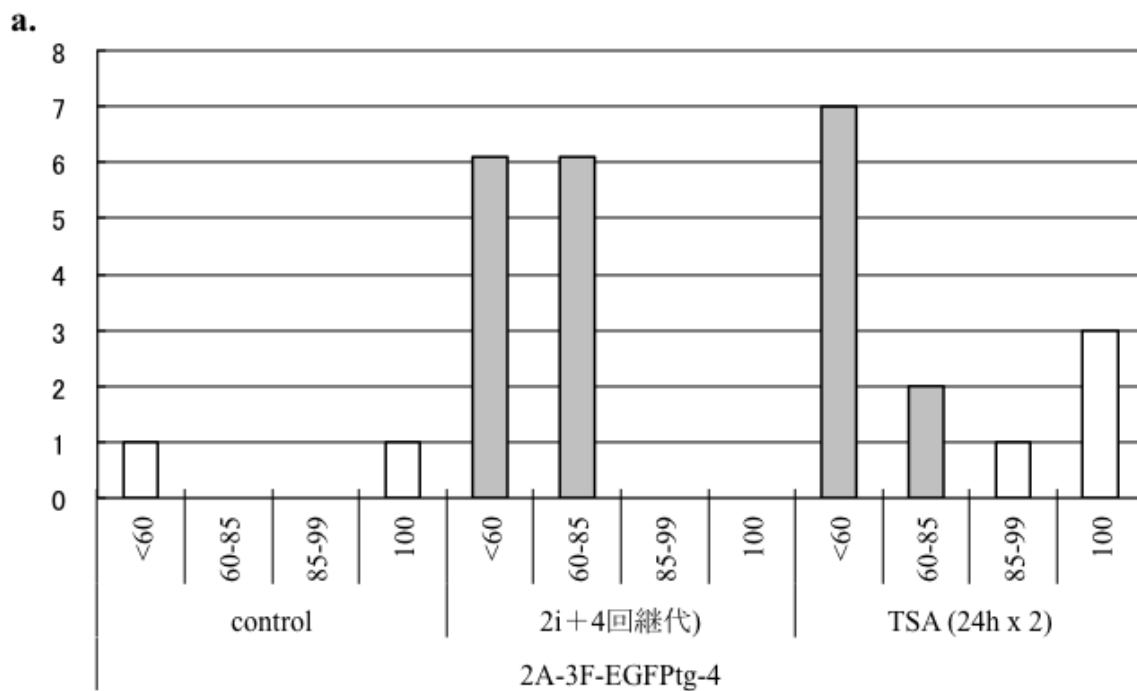


図 4. a: iPS 細胞への薬剤処理別の産仔におけるキメリズムの比較 b: キメラマウス出生後の生存曲線の比較

### 3-2 キメラマウスの性状

薬剤非処理、TSA 処理（継代を挟んだ 24 時間処理を 2 回）および 2i 処理（8 日間で 4 回継代）した iPS 細胞についてそれぞれアグリゲーション法によりキメラマウス作出をおこない、誕生した産仔についてその数とキメラ率の判定及び生存率を比較した。

薬剤非処理の iPS 細胞では、キメラマウスの産仔率が数パーセント程度であったのに対し、2i 添加で 4 回継代するとそれが十数パーセントにまで上昇した。また TSA 処理においても同様に十数パーセントにまで上昇した。（図 4a.）

次にこれらの誕生したキメラマウスの生存率に着目した。非処理群では産後 1 日で産仔の 3 分の 2 が死亡し、生後 2 週間以内に全て死亡した。2i 処理した iPS 由来のキメラマウ

スでは、そのほとんどが出産後数時間で死亡し、さらにその後 4 日以内に全て死亡した。一方 TSA 処理群では、出産翌日には若干の死亡による減少は認められたが、離乳時まで約半数のキメラマウスが生存し、交配実験にまで（生後 8 週令以上）正常に生育できた。（図 4b.）

### 3-3 Germline Transmission 確認

8 週令以上生存できた 100%キメラマウスについて、iPS 細胞が生殖系列への伝播に寄与したかを確認するために、Balb/c との交配をおこなった。誕生した F1 マウスはアグーチ色を示し眼も黒色であったことから、TSA 処理した iPS 細胞が、生殖系列への伝播へ寄与したことが分かった。（図 5）

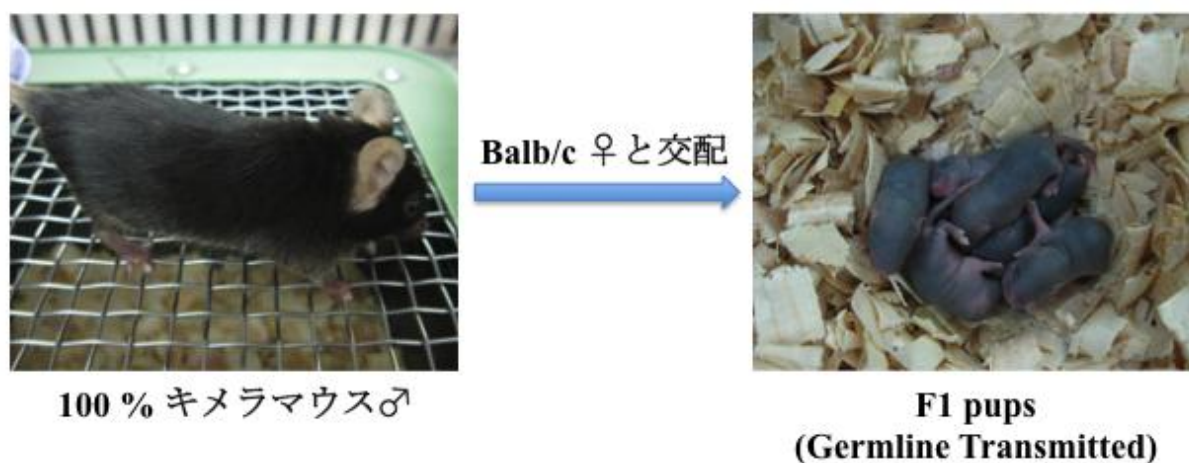


図 5 .Germline transmission 確認交配実験にて誕生した F1 個体と、使用した 100 % ♂キメラマウス。

### 考察

5AdC 処理では、今回試した条件ではすべてで死滅かあるいはほぼ生存できない結果となった。5AdC を使用するには、更なる培養条件の探索が必要となる。たとえば、処理時間を更に短縮する等が考えられる。

一方 TSA 処理では、連続 48 時間処理や細

胞密度の低い状態での薬剤添加では、分化の方向へ引き金が引かれてしまう結果となった。薬剤処理によるエピジェネティックな遺伝子発現調節が非常にデリケートな事象であることが示唆される。

ES 細胞では未分化能維持に働くといわれる 2i 処理であるが、iPS 細胞においては形

態維持には効果を発揮するものの産仔の生存率の向上は全く認められなかった。

不完全リプログラミング状態の iPS 細胞はエピジェネティックな遺伝子発現調節機構に何らかの不具合があったことを示唆し、作出時 c-Myc も同時に導入した 4FiPSCs (ゲノムへの挿入は無し) では高率キメラがほぼ正常に誕生・生育することから、c-Myc のポジティブな機能を見いだすことにもつながった [5]。

### まとめ

エピジェネティックな遺伝子発現調節を理解することは、体細胞初期化機構解明につながると思われる。今回の探索で、c-Myc が遺伝子発現のエピジェネティックコントロールに確実に相関を持つことが示唆された。

### 謝辞

iPS 細胞樹立にあたり同室技術員・渡辺亮子氏、アグリゲーション実施にあたり同室業務補助員・吉田華氏の協力により遂行できました。ここに感謝申し上げます。

### 引用文献

[1] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. **126** (2006) 663-676.

[2] Y. Jincho, R. Araki, Y. Hoki-Fujimori, C. Tamura, M. Nakamura, S. Ando, Y. Kasama, and M. Abe, Generation of genome integration-free induced pluripotent stem cells from fibroblasts of C57BL/6 mice without c-Myc transduction. *J Biol Chem*. **285** (2010) 26384-26389.

[3] Q. Ying, J. Wray, J. Nichols, L. Battle-Morera, B. Doble, J. Woodgett, P. Cohen and A. Smith,

The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. **453** (2008) 519-523.

[4] D. Huangfu, R. Maehr, W. Guo, A. Eijkelenboom, M. Snitow, AE. Chen, and DA. Melton, Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*. **26** (2008) 795-797.

[5] R. Araki, Y. Hoki-Fujimori, M. Uda, M. Nakamura, Y. Jincho, C. Tamura, M. Sunayama, S. Ando, M. Sugiura, MA. Yoshida, Y. Kasama, and M. Abe, Crucial Role of C-Myc in the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem cells*. Sep; **29(9)** (2011) 1362-1370.



---

---

放射線医学総合研究所  
技術報告書

---

---



www.nirs.go.jp

---

---

NIRS Technology

---

---

NIRS Technology, vol. 6 (2012) 96–99.

## ガラス（石英）チップ電気泳動型分取装置の開発

砂山 美里\*<sup>1</sup>、笠間 康次<sup>1</sup>、荒木 良子<sup>1</sup>、安倍 真澄<sup>1</sup>  
孫 凱<sup>2</sup>、 Zheyu Li<sup>2</sup>、上野 貢生<sup>2</sup>、三澤 弘明<sup>2</sup>

- 1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課 遺伝子・細胞情報研究室
- 2) 北海道大学 電子科学研究所 三澤研究室

---

### 要旨

我々が開発した高精度遺伝子発現プロファイル解析法（HiCEP 法）においては、ピークの塩基配列を同定するには、アクリルアミドゲル電気泳動によって、ピークを分離し、分取を行う必要があった。そこで、我々はこの工程をより効率よく、高い精度で目的のピークを分取する方法の開発を行ってきた。今回、ガラスチップを使用した分取装置を開発することにより、従来法であるアクリルアミドゲル電気泳動では分取不可能であったピークも、高い精度で分取することが可能となった。

**Keywords :** HiCEP 遺伝子発現 ガラスチップ DNA 分取 分取装置

---

**Corresponding Author :**

砂山 美里 (Misato Sunayama)

e-mail : m\_suna@fml.nirs.go.jp

## はじめに

我々が開発した高精度遺伝子発現プロフィール解析法 (HiCEP 法) [1]においては、あらかじめ転写物のシーケンスが明らかでなくても実験可能という利点と裏腹に、ピークに転写物名が対応づけられていないという欠点がある。従って、ピークの塩基配列を同定するには、アクリルアミドゲル電気泳動 (図 1) によってピークを分離し、分取する必要がある。しかし、この工程は、煩雑であることや、泳動の分離能の限界により複雑なピークの分取が厳しいことから、HiCEP 法の普及を妨げる原因の 1 つとなっていた。それらを解決するため、我々は、①データベース開発、②高い精度で目的のピークを分取する方法の開発を行ってきた。今回北海道大学と共同で開発を行った②について報告する。

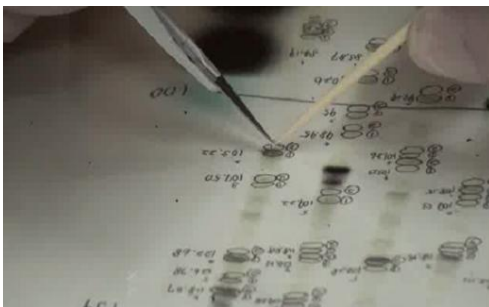


図 1 従来のアクリルアミドゲル電気泳動による分取操作

## 方法・材料

### 1. ガラスチップ

大型のアクリルアミドゲルの泳動板は、1枚でいくつものサンプルを泳動することが出来るが、キャピラリーに比べ分離能は劣り、さらには大きく場所も必要である。ゲルを作成し、泳動終了するまでに 2 日という時間も必要である。そこで、この泳動システムの小型化、時間の短縮、自動化を目指し検討を行った結果、ガラスチップを使用した電気泳動

による自動分取装置の開発を目指すことに決定した。

意外にも、DNA の分離と分取を同時に行う装置は全く市販されていない。

我々はまず、ガラスチップについて、材質、流路サイズ、流路作製法、及び、ガラス接合法の検討を行い、その検討を反映した 2 種類の石英ガラスのチップを作製した。2 種類のチップは、ターゲットとなるピークの状態によって使い分けられるようにした。[2] (図 2.3)

## Chip fabrication

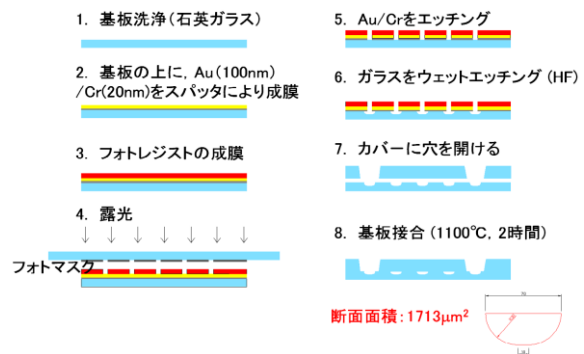


図 2 ガラスチップ作製法

## Microelectrophoretic chip

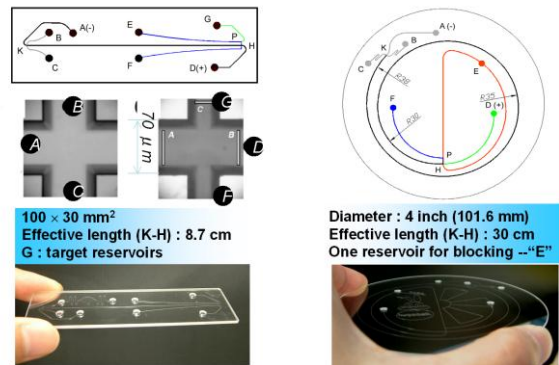


図 3 ストレートチップとスパイラルチップ

### <ストレートチップ>

流路が短く、分離時間も短く、簡単に分離出来るが、アクリルアミドゲル電気泳動と同様の分離能しか持たない。

<スパイラルチップ>

流路が長いことから、分離時間がかかり、効率は悪いが、アクリルアミドゲル電気泳動では分離できないようなピークも、高い分離能で分取することが可能である。

2. 分取原理及び分取法 [2]

分離流路にサンプルを送り込み、5000V 程度の高電圧で泳動を行う。泳動されてくるピークの蛍光強度を測定しながら、分取したいピークが到達するのを待つ。(Separation) ピークが流れている間、ピークを分取する流路には電圧を掛けておき、通過するピークが流れ込まないようにしておく。(Blocking) ターゲットのピークが現れたところで、泳動を止め、分取流路方向に電圧を掛けてピークを引き抜く。(Transfer) 分取されたピークは、回収ウェルに移動させ、回収する。(Collection) (図 4)

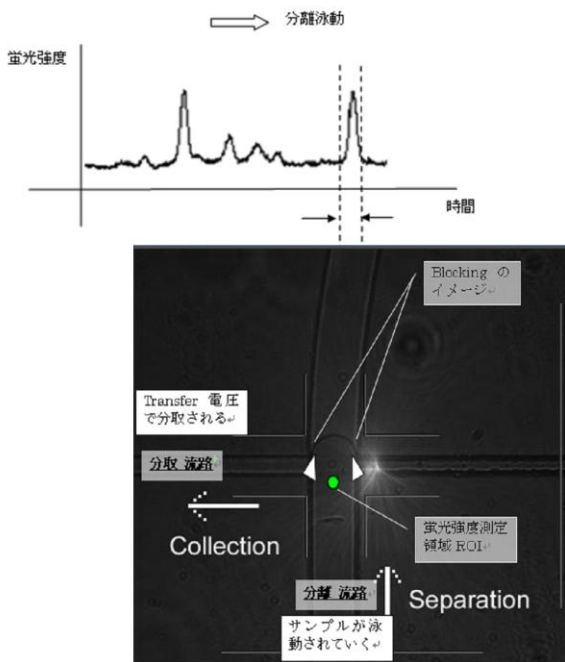


図 4 分取原理

3. プロトタイプ機

プロトタイプ機は、チップホルダー、電極、電源、電圧切り替え機、蛍光観察用レーザー、

流路観察用レンズ、CCD カメラ、コンピューター、ソフトウェア部より構成される。(図 5. 6)

素過程での検討を行った後、北海道大学にてプロトタイプ機を作製し、放医研で、実際に分取操作を行い、評価を行った。



図 5 プロトタイプ機の外観

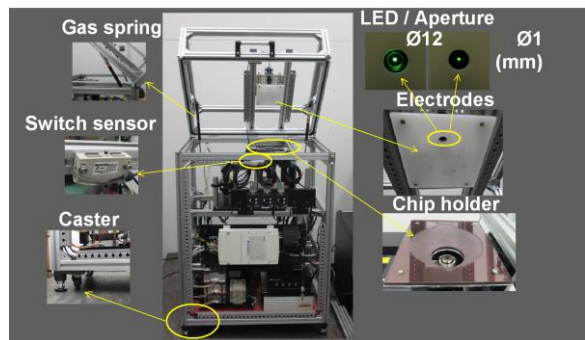


図 6 プロトタイプ機の構成

結果

1. ガラスチップ

スパイラルチップでキャピラリー電気泳動と同等の分離能に成功した。

2. 分取原理及び分取法

分取のための電圧、時間等、プロトコルを確立した。

3. プロトタイプ機

チップを用い、分取条件（分取時の電圧お

よびその時間)を最適化し、わずか1塩基長の違いのピークの単離(他のピークの混入がない)を可能とした(3連続ピークの分取例を図7に示す)。これらのピークの単離は、従来法では不可能であった。

さらに、従来法であるアクリルアミドゲル切り出しでは不可能な75bp以下のピークに関しても、分取に成功した。従来法では、ターゲットとなるピークの短鎖側に大きなピークがある場合、その大きなピークが混入してしまうが、本法により、その問題が大きく改善されることも明らかになった。検討の結果、本試作機により、チップ型DNA断片自動分取装置の装置化が可能であり、従来法では分取が不可能であったピークに対しても極めて有効であることが証明された。

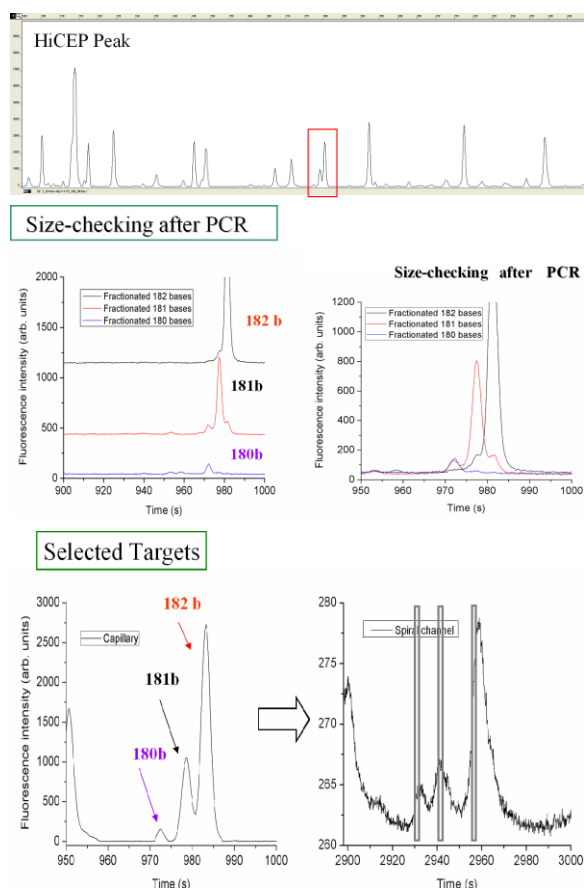


図7 分取 Size Check 結果

## 考察

本システムにより、従来のアクリルアミドゲル電気泳動では、分取不可能だったピークも、高い精度で分取することが可能になった。ただし、チップの洗浄・ゲルの充填に多くの時間がかかるため、石英ガラスのチップをディスプレイチップにする等、改良する必要がある。

さらに、密集したピーク分取に関しては、操作や分取するタイミングの決定が難しい。この操作を誰でも簡単に操作できるようなソフトウェアの改良も今後必要と考えられた。[3]

## 謝辞

本開発は、JST 先端計測分析技術・機器開発事業 機器開発プロジェクト 『単一細胞内遺伝子発現プロファイル解析システム』の一部として実施されました。

## 引用文献

- [1] R. Fukumura, H. Takahashi, T. Saito, Y. Tsutsumi, A. Fujimori, S. Sato, K. Tatsumi, R. Araki, M. Abe. A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts. *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) e94.
- [2] Z. Li, K. Sun, M. Sunayama, R. Araki, K. Ueno, M. Abe, H. Misawa. On-chip fraction collection for multiple selected ssDNA fragments using isolated extraction channels. *Chromatography A.* 1218 (2011) 97-1003 .
- [3] Z. Li, K. Sun, M. Sunayama, R. Araki, K. Ueno, M. Abe, H. Misawa. A simultaneous space-sampling method for DNA fraction collection using a comb structure in microfluidic devices. *Electrophoresis.* 32 (2011)3392-8.

---

---

放射線医学総合研究所  
技術報告書



---

---

NIRS Technology

---

---

www.nirs.go.jp

NIRS Technology, vol.6 (2012) 100 – 106.

## HiCEP 法データ解析の高度化・効率化のための 解析ソフトウェア HiAL の開発

笠間 康次\*<sup>1</sup>、近藤 一弘<sup>3</sup>、荒木 良子<sup>1</sup>、安倍 真澄<sup>2</sup>

- 1) 研究基盤センター 研究基盤部 遺伝子細胞情報研究室
- 2) 研究基盤センター 先端計測分析事業推進チーム
- 3) 株式会社 メイズ

---

### 要旨

我々は高精度で網羅性の高い遺伝子発現法である包括的転写産物プロファイリング技術 HiCEP (High Coverage Expression Profiling) 法を開発した。その改良と普及に努める一方、データ解析ツール：HiAL(HiCEP Analysis Limb)の開発にも取り組んできた。このソフトウェアは HiCEPデータの解析ツールであると同時に、HiCEP実験のサポートツールでもある。この開発によりHiCEPデータの解析は格段に容易なものとなった。

**Keywords:** HiCEP, 発現解析, 解析ツール, ソフトウェア開発

---

**\*Corresponding Author:**  
笠間 康次 (Yasuji Kasama)  
e-mail: y\_kasama@nirs.go.jp

## はじめに

1-1. 包括的転写産物プロファイリング技術 HiCEP (High Coverage Expression Profiling)について[1]

AFLP 法の原理を応用した遺伝子転写産物：mRNA のディファレンシャル・ディスプレイ法であり、転写産物の質と量を反映する蛍光ラベルされたDNAフラグメント集団を作成し、キャピラリーシーケンサを用いて電気泳動プロファイルデータ（横軸は移動度＝分子量、縦軸は蛍光強度＝発現量）として測定する。電気泳動データを取得するに際してセレクトティブ PCR を行い、256 枚の電気泳動データに展開することでピークを分離する点に HiCEP 法の特徴がある（図 1）。高精度で網羅的な遺伝子発現解析を実現した手法である。HiCEP 法は配列情報が無い生物種であっても、試料間で転写発現レベルに差異のある遺伝子を高い再現性と感度で網羅的に比較解析することが可能である。また幅広い発現レンジで正確な測定が出来るため、比較的少ない細胞数でも確実に結果が得られる。

## 1-2. データ解析の特徴と課題

状態比較や時系列の解析を想定するまでもなく、HiCEP 法 1 測定で 256 枚の電気泳動データが得られることから、多くの波形データを比較し、数万ピークの蛍光強度（遺伝子発現レベル）変化を解析する必要がある。電気泳動による測定波形自体の検証や、測定データの補正も必要な場合も存在する。また、自動化処理の限界もあり、研究者が簡便にデータを確認検証できることも重要である。そのため、使い勝手の良い解析ツールは必須であり、本稿でこれまでの取り組みの成果を報告する。開発した HiAL システムの GUI を図 2 に示す。

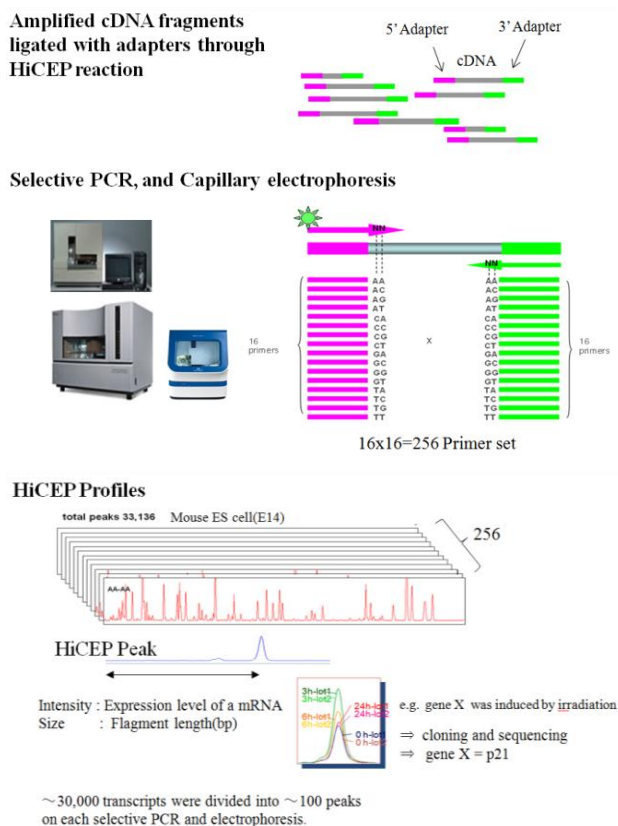


図1. HiCEP 法の原理と電気泳動プロファイルデータ



図2. HiAL 画面の実例

## 2. 方法と成果

我々はこれまで、解析ツールの開発と改良を進めてきた。以下に、実装が完了した主要な機能についてまとめる。

### 2-1. 蛍光強度低下の検証機能

電気泳動での測定は、キャピラリの劣化や、環境の温度変化、バッファ中の不純物等の影響など多彩な外乱要因により、取得した電気泳動データに局所的な蛍光強度低下(図3)や、

サイズ依存的な強度低下(図4)が発生することがある。これらの状況を、繰り返し測定とのデータ間の比較や分子量マーカの情報を確認することで検出し、再測定が必要な泳動不良のデータを特定することが出来る(図5)。電気泳動データの縦軸方向の異常を検出する機能である。

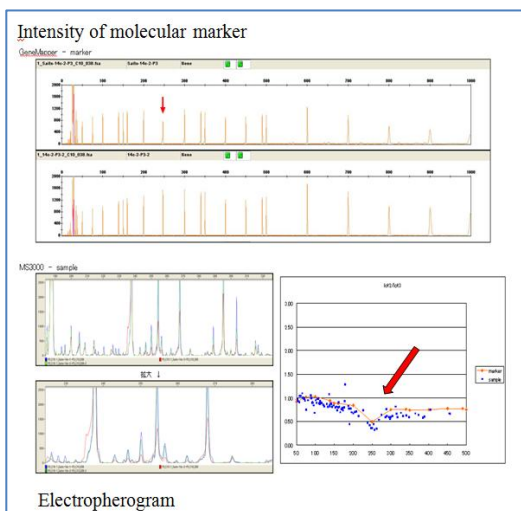


図3. 局所的な蛍光強度低下  
赤い矢印で示す領域近辺で局所的に蛍光強度が低下している。

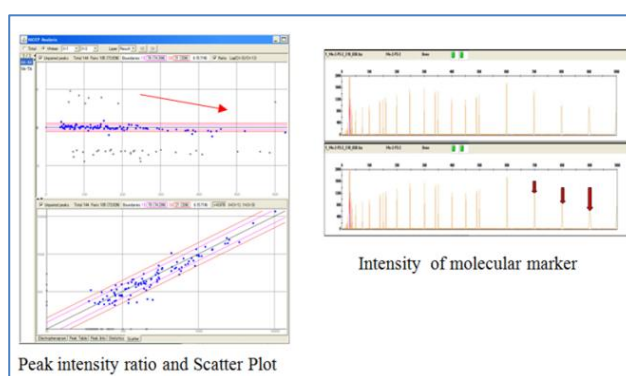


図4. サイズ依存性のある蛍光強度低下  
赤い矢印で示すように、電気泳動プロファイルの後半がサイズ依存的に蛍光強度の低下をきたしている。

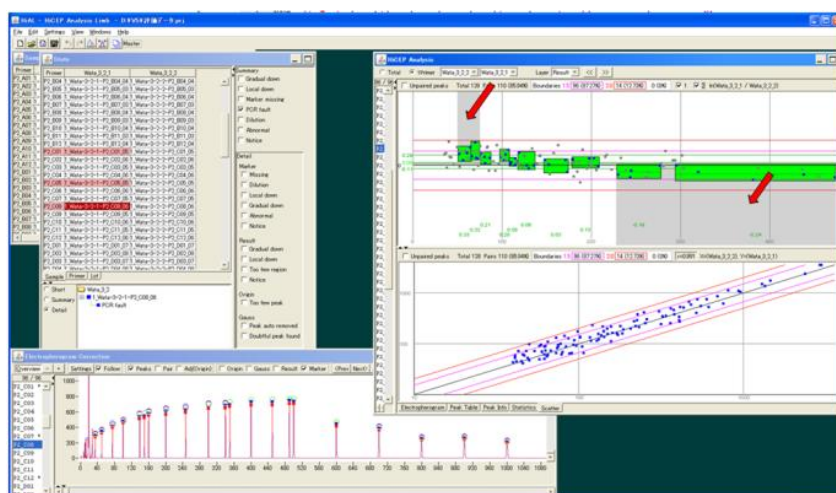


図5. 繰り返し測定による泳動不良の判定  
繰り返し測定との電気泳動プロファイルデータで、蛍光強度の偏りをグラフィカルに提示している。

## 2-2. ピーク情報の同定と波形補正機能

電気泳動のピークは、外乱要因や複数ピークの重なり合いによりピーク形状に歪みを生じることがある。我々は、波形自体に Gaussian 近似を適用して個別ピークのパラメータを同定し、重なり合うピークの検出分離、そしてピーク変動（遺伝子発現の変化）の解析のために電気泳動データ間でピーク対応付けを容易なものにするシステムをデザインした。

また極めて発現量が多い転写産物がある場合、その測定ピークはきわめて大きなものとなり、蛍光強度を測定する CCD センサ系の感度上限を超えると、ピークの先端が歪み潰れた形状となる。これは時には複数のピークを誤認されることもある。このようなピークに対しては、ピークの裾野部分から外挿補間をすることで本来のピークを推定する機能を実現した（図6）。

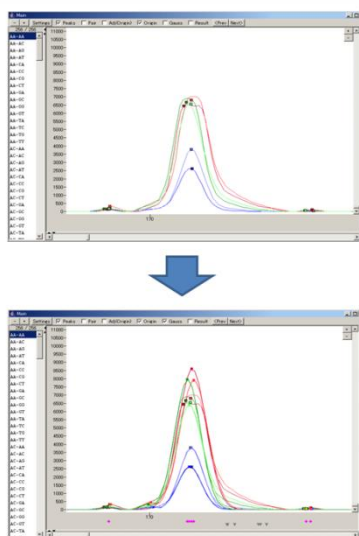


図6 飽和ピークの外挿

先端が潰れてピークを補正した例

更に電気泳動での測定は、分子量方向（横軸方向）に歪み（ズレ）を生じることがある。転写産物の発現変動を解析するためには、電気泳動データ間で正確なピークの対応付けが必要であるため、分子量方向に波形を補正し高精度の対応付けを行える波形補正アルゴリズム[3]を考案し実装した（図7）。また電気泳動データの強度方向に、遺伝

子発現総量（蛍光強度の総和）が保存する前提の global normalization を行うかどうかの選択も可能とした。

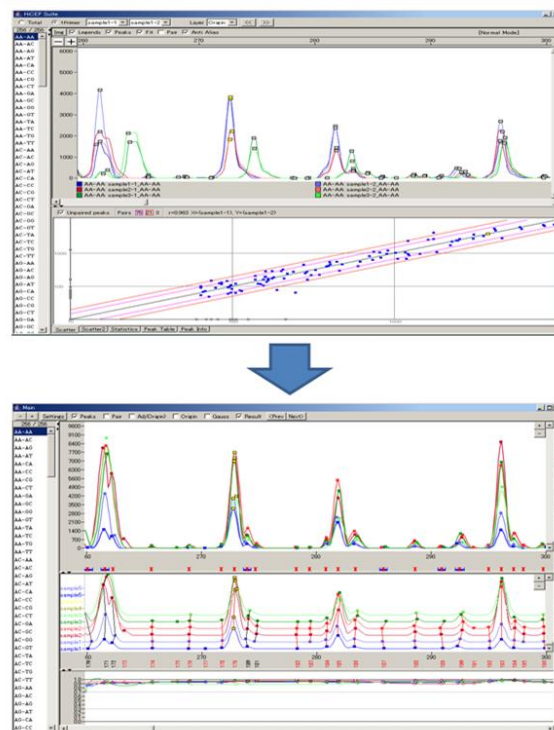


図7. 横軸補正

横軸方向にずれた測定データを、補正処理により他のデータに合わせ込んだ例

## 2-3. 発現変動の解析と外部ソフトウェアとのデータ連携

HiALシステム読み込んだ解析対象のデータの内、任意のデータ（または全て）を選択してデータセットを定義し、その中でのピーク変動（転写産物の発現量変化）を解析可能としている。更に、複数のデータセット情報を保持できるデータ構造（プロジェクトと呼称）も実現している。

ピーク変動（遺伝子発現変動）の解析自体は、データ間で対応する各ピークの強度情報を1行に列挙し、各ピークについて、それぞれの変化状況としてフォールドチェンジとP-Valueを算出したピークリストを自動作成している。このデータ表は、マイクロアレイの測定データをサマライズした各スポット強度による発現マトリックス



ストと同じ形式である。従って、それ以上の解析が必要な場合には、発現マトリックスとしてピークリストをExportし、マイクロレイ解析用のツールやRスクリプト、Excelなどの外部ソフトウェアを利用することが可能である(図8)。このような外部で

の解析結果は、HiALシステムの発現マトリックスに追加する形でImport可能で、波形データまで容易に遡って確認することが出来る。

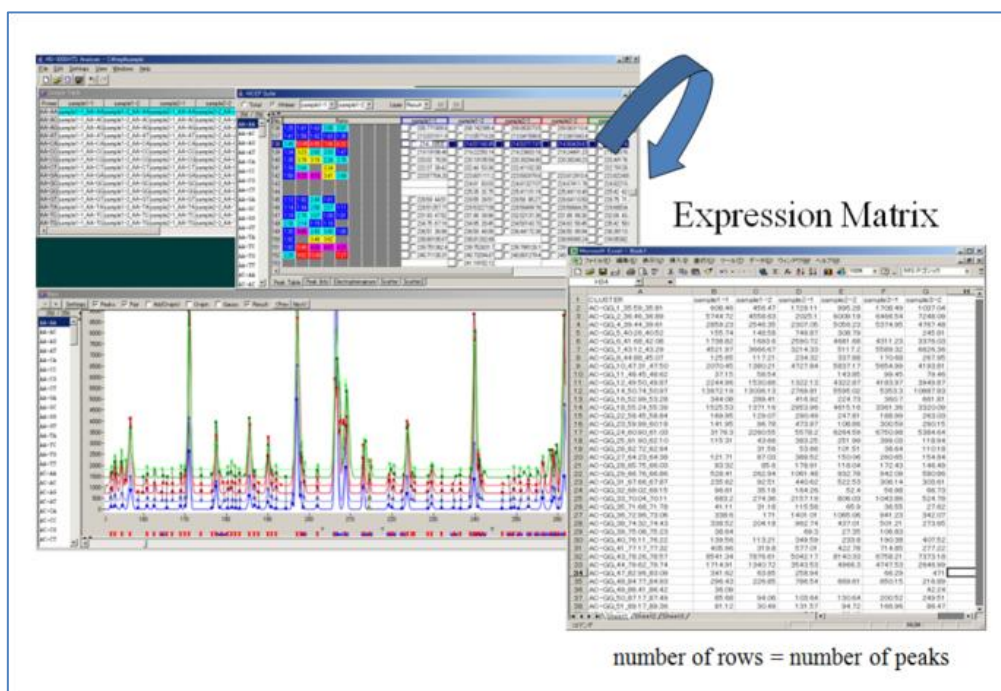


図8. 発現マトリックス

#### 2-4. 動作プラットフォーム

基本システムは JAVA で作成されており OS の依存性も少なく、多くのプラットフォームをサポートしている。ピーク同定と波形補正アルゴリズムに関しては、今後、別のアルゴリズムへの交換や、改良を考慮して、外部プログラムとしてモジュール化している。現状のアルゴリズムは、開発の経緯や動作速度の点などから、C 言語で実装している。プラットフォームとしては Windows2000/XP/VISTA/7 を正式サポートするとともに、Mac OSX、Linux での動作を確認している。ワイドモニタや Dual モニタの環境を推奨している。我々が解析に利用している状況を図9に示す

#### 2-5. 特許

HiALシステムは、解析方法とプログラムシステムとして特許を出願している[4]。



図9. 解析風景

### 3. 考察とまとめ

HiALデータ解析システムはHiCEP実験を強力にサポートし、そのデータ解析に大いに威力を発揮することが出来た。

しかし一方、HiALで特定することのできた発現量に変化したピークに関して、由来する転写産物、及びその遺伝子を同定するためには、別途、電気泳動プロファイルデータ中のピークを分取してシーケンシング作業により塩基配列を決定する必要がある。我々は、先にマウス幹細胞(E14)についてのHiCEPプロファイル(約3万3千ピーク)の約1万5千ピークについて配列を決定し、データベースを公開した[2]。この作業には多大の労力と時間、そして費用を要した。

現在、我々は、この分取・シーケンシング作業というボトルネックを低減すべく、JST(独立行政法人 科学技術振興機構)の助成を受けソフトウェアシステムの開発を行っている(産学イノベーション加速事業【先端計測分析技術・機器開発】開発課題名「HiCEPピークデータベースの開発」平成21～23年度)[5-7]。HiCEP法による測定であ

る定量性に優れたキャピラリーシーケンサを用いた電気泳動を行うのと同時に、そのサンプルの一部を配列決定能力に優れた高スループットマシンである、所謂、次世代シーケンサを用いて塩基配列を決定し、HiCEPプロファイル上の6～7割に及ぶピークの塩基配列を一気に推定して、由来遺伝子情報を特定しようという試みである(図10)。このアプローチは、双方のプラットフォームの特徴を生かすものである。このプロジェクトの成果としては開発したソフトウェアとともに、マウス幹細胞(E14)、ムレミカツキモ、ヒト末梢血サンプルのデータベースを公開する予定である。今後、HiALシステムには、このデータベースとの連携機能を実装し、より強力な解析ツールとして行きたいと考えている。その実装に関しては、データベースを公開するWebサイト(<http://hicepweb.nirs.go.jp/>)との連携も考慮し、データベース側の各種APIの整備も含めて行きたいと考えている。

また今後は、HiCEP法のユーザが増える中、HiALシステムのライセンス提供やビジネス化なども含めて検討する必要があると思われる。

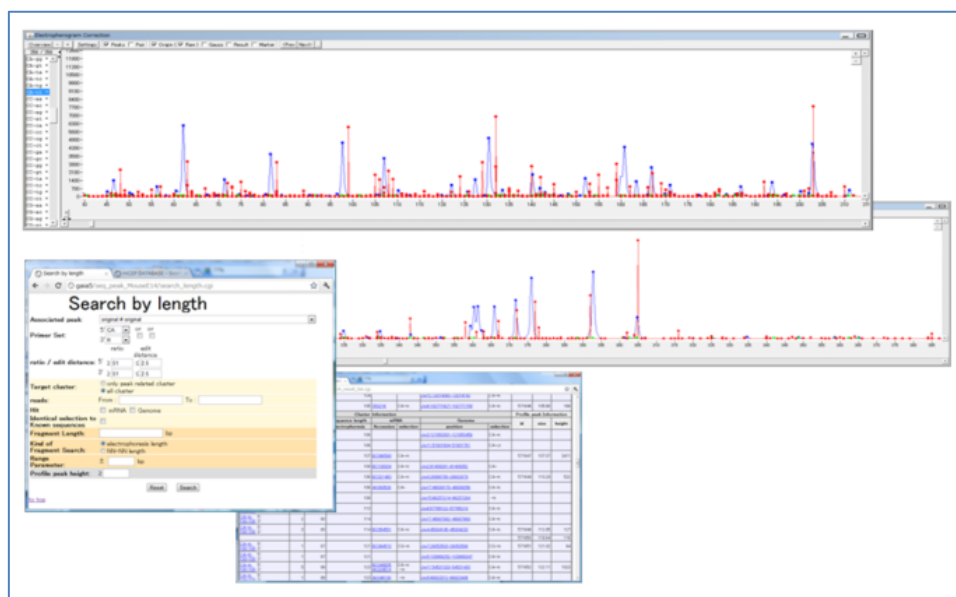


図 10. ピークデータベースの概要

HiCEP プロファイル(電気泳動での蛍光強度: 青い波形)と次世代シーケンサ Read 数(赤いグラフ: ただし一定の係数を乗じている)を対応付けることが出来る。

## 謝辞

泳動不良データは、研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課 遺伝子・細胞情報研究室 安藤氏、重粒子医科学センター 融合治療診断研究プログラム 林氏より提供を受けました。また兩名に加えて、重粒子医科学センター 国際重粒子医科学研究プログラム 藤森チームリーダーには、開発・試験用に多くのサンプルデータを提供いただき、また実際のデータ解析作業からの多大なるフィードバックをいただきました。(所属は投稿時点)

## 参考文献

[1] Fukumura R, Takahashi H, Saito T, Tsutsumi Y, Fujimori A, Sato S, Tatsumi K, Araki R, Abe M., A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts. *Nucleic Acids Res* 2003; 31:e94.

[2] Araki R, Fukumura R, Sasaki N, Kasama Y, Suzuki N, Takahashi H, Tabata Y, Saito T, Abe M, More than 40,000 transcripts, including novel and noncoding transcripts, in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006 Nov;24(11):2522-8. Epub 2006 Jul 6.

[3] Kadota K, Fukumura R, Rodrigue JJ, Araki R, Abe M. A normalization strategy applied to HiCEP (an AFLP-based expression profiling) analysis: Toward the strict alignment of valid fragments across electrophoretic patterns. *BMC Bioinformatics* 2005, 6:43

[4]特開2008-226095 発明者 笠間康次、門田幸二、安倍真澄  
遺伝子発現変動解析方法及びシステム、並びにプログラム

[5] 平成22年度 第33回日本分子生物学会年会 ポスター発表

HiCEP法で得られる網羅的転写産物断片配列の次世代シーケンサによるデータベース化  
湯野川春信、佐藤伸司、近藤一弘、日永田隆志、鈴木耕史、砂山美里、笠間康次、荒木良子、安倍真澄

[6] 平成22年度 第33回日本分子生物学会年会 ポスター発表

HiCEP法で得られる網羅的転写産物断片配列の次世代シーケンサによるクラスタリング  
佐藤伸司、鈴木耕史、湯野川春信、近藤一弘、日永田隆志、砂山美里、笠間康次、荒木良子、安倍真澄

[7]平成23年度 第34回日本分子生物学会年会 ポスター発表

HiCEPピークデータベース構築のためのシステム開発

笠間康次、砂山美里、安藤俊輔、府馬正一、湯野川春信、荒木良子、安倍真澄

---

---

放射線医学総合研究所  
技術報告書



---

---

NIRS Technology

---

---

www.nirs.go.jp

NIRS Technology, vol.6 (2012) 107-113.

## ES 細胞・iPS 細胞の多能性の程度を測定する定量的方法の検討

(体細胞から多能性幹細胞へのリプログラミングの程度を

定量的に測定する方法の確立)

宇田 昌広、荒木 良子、藤森 (法喜) ゆう子、中村 美樹、安藤 俊輔、杉浦 真由美、  
砂山 美里、笠間 康次、安倍 真澄

基盤技術センター 研究基盤技術部 生物推進課 遺伝子・細胞情報研究室

---

### 要旨

iPS 細胞は特定の遺伝子を体細胞に導入することにより樹立される多能性幹細胞である。この発見は脊髄損傷や遺伝子疾患などこれまでその治療が極めて困難だった疾病の治療の飛躍的な進歩につながると期待され、これまで種々の樹立法が開発されてきた。しかしながら現状では、樹立したクローンのうち臨床へ用いることの出来る iPS 細胞を如何にして見極めるかが最重要課題として認識されているほど、その評価は容易ではない。特に、ヒト iPS 細胞では倫理的な立場から分化能の検定には制限がある。

そこで我々はマウス iPS 細胞を用いて厳密な分化能の検定法を確立することを試みた。

さらに、これらの方法を用いて当研究にて樹立した ES、iPS 細胞について検討を行った。

---

**Keywords :** ES 細胞、iPS 細胞、4 倍体補完法、アグリゲーション、キメラマウス、Germline Transmission、リプログラミング

---

**Corresponding Author :**

宇田 昌広 (Masahiro Uda)

e-mail: u-da@fml.nirs.go.jp

## 序論

2006年京都大学再生医科学研究所の山中伸弥教授らによる論文において、マウスの胚性繊維芽細胞に4つの因子(Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4)を導入することで分化多能性を持つマウス多能性幹細胞(iPS: induced pluripotent stem cell)の確立に成功したと発表された[1-2]。また同グループは2007年、がん遺伝子であるc-Mycを除く3遺伝子を用いてもiPSクローンが樹立できることを示した[3-4]。

当初、iPS細胞とES細胞では違いが見つからないという報告のみであったが、最近は様々な方法で作製されたiPSクローン間に違いがあること、ES細胞とは異なり、体細胞の性質が残っているなど、リプログラミングの不完全性を示唆する結果も報告され、臨床利用に向けてより良いiPSクローンの見極めが必須となっている。

通常ES、iPS細胞の多能性検定には、injection法によりキメラマウスを作製し、そのマウスを交配させ、子孫にそのES、iPS由来細胞が伝達されるかという方法が用いられる。

しかし、この方法では最低でも4ヶ月という長い期間を要する上に、その結果はall or noneとなり、情報に乏しい。

そこで我々は、種々の方法を用いて、より短い期間で多能性を定量的に検定できる方法を検討した。

まず、4倍体胚補完法を用い検定した。この方法は4倍体初期胚が胚胎に寄与しない為、100%ES、iPS細胞由来のキメラマウスを作製することが出来るという原理に基づき、質の悪いES、iPS細胞では初期発生を停止する為、迅速な判定(20日間)が可能となる。

ただし、4倍体胚補完法では定量的な判定が難しい為、次にアグリゲーション法を用いてキメラマウスを作製し、毛色評価による定量

的判定を行った。

またアグリゲーション法により、低品質と判定された細胞において、より詳しく検証する為に、胚盤胞期胚段階において蛍光観察を行い、クローン間に差が認められるか検証した。細胞はGFP標識したiPS細胞を用い、8細胞期胚とアグリゲーションを行った。

尚、我々は、遺伝子バックグラウンドの差や外因性遺伝子のゲノムへの挿入の影響を排除する為にC57BL/6J近交系マウスからgenome integration-free iPS細胞株を作製し、iPSクローンの比較・検討を行った[5]。

## 方法

ES、iPSクローンは、aggregationを行う3または4日前に解凍し、aggregation当日までゼラチンコートしたフィーダー(-)組織培養用ディッシュで継代・まき分けを行った。

① 4n初期胚を用いたキメラマウス作製  
過排卵処理した雌マウスと雄マウスを交配させ、交尾後1.5日後に卵管から2細胞期胚を回収した(宿主胚はSlc:ICRを用いた)。細胞融合装置(ネッパジーン株式会社LF201)を用いて2細胞期胚へ電気パルス刺激を与え細胞融合させた。5%CO<sub>2</sub>、37°C、湿度飽和のインキュベーター内で一晚培養し、酸性タイロイド液を用いて4倍体胚の透明帯を除去した。これにES、iPS細胞(約20個)と凝集させ、さらに一晚培養した。形成した桑実胚を2.5日偽妊娠マウスの子宮へ移植した。移植17日後、自然分娩および帝王切開によって4倍体キメラマウスを得た[7-9]。

② アグリゲーション法によるキメラマウス作製およびGermline Transmission  
過排卵処理した雌マウスと雄マウスを交配させ、交尾後2.5日後に卵管から8細胞期胚を回収した(宿主胚はSlc:ICRを用いた)。

酸性タイロド液を用いて胚の透明帯を除去した後、1つの胚に対し ES、iPS 細胞約 20 個を凝集(aggregation)した。5%CO<sub>2</sub>、37°C、湿度飽和のインキュベーター内で一晚培養し、形成した後期桑実胚または胚盤胞期胚を 2.5 日偽妊娠マウスの子宮へ移植した。移植 17 日後、自然分娩および帝王切開によってキメラマウスを得た。キメラマウスが 8 週齢に発育した後、交配を行い Germline Transmission を確認した。

### ③胚盤胞期胚段階での観察

GFP 標識した iPS クローン(2A-4F-EGFPtg-1、2A-3F-EGFPtg-4、2A-3F-EGFPtg-15)を用いて [6]、胚盤胞形成および iPS 細胞の胚への取り込みを蛍光観察した。キメラマウス初期胚の作製方法は②と同様である。Aggregation し、培養 24 時間、48 時間後において蛍光観察を行った。

### 結果

ES、iPS それぞれ 4 クローンにおいて 4 倍体胚キメラマウスの作製を試みた結果、ES3 クローン、iPS2 クローンで産児を得た。またそのうち、ES2 クローン、iPS1 クローンの産児は adult(7 週齢以上)まで発育した。

表 1. ES、iPS クローンから 4 倍体胚補完法により作製したキメラマウスの匹数と割合

	clone No.	pups	% (pups/blastocysts transplanted)	備考
ES	B6ES②-2	2	1.25	
	B6ES②-9	3	1.88	♂1匹 adultまで発育
	B6ES⑤-1	4	5	♂2匹 adultまで発育
	B6ES⑦-17	0	0	
iPS	2A-4F-1	3	2.5	
	2A-4F-33	8	3.6	♂5匹 adultまで発育
	2A-4F-118	0	0	
	2A-4F-136	0	0	

※ adult:7週齢以上

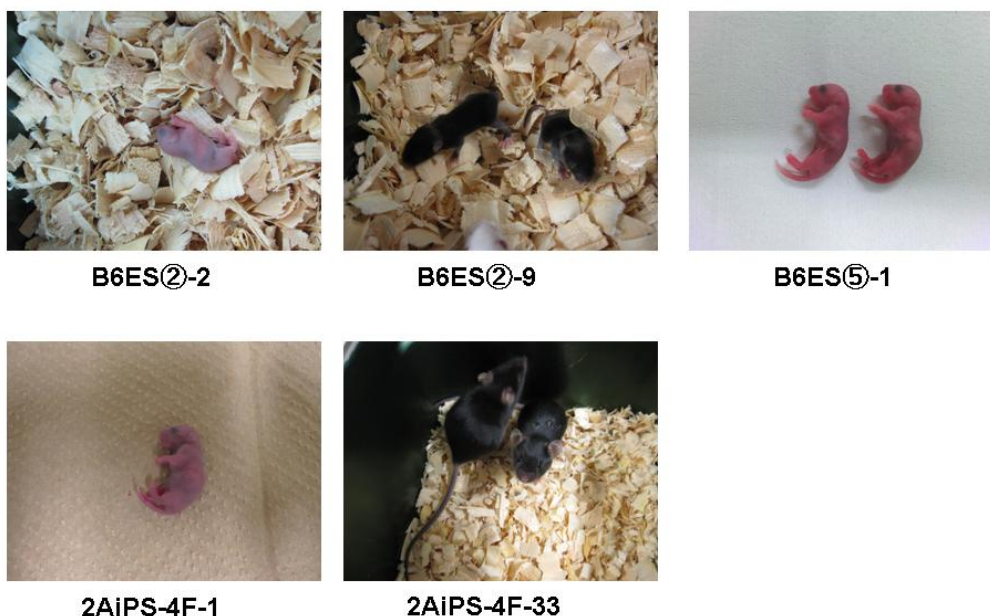


図 1. 4 倍体胚補完法により作製したキメラマウス

次に、定量的に測定する為にアグリゲーション法を用いてキメラマウスを作製し、毛色判定を行った結果、ES および iPS クローンによってキメラ率の割合に違いがみられた。しかしながら、全てのクローンにおいて 100% キメラマウスが生まれ、そのマウスによって

Germline Transmission が確認出来た。さらに、c-Myc を含む 4 因子(4F-) を導入した iPS 細胞と c-Myc を除いた 3F-で樹立した iPS 細胞では、多分化能に明らかな差があることがキメラマウス形成解析で明らかになった。

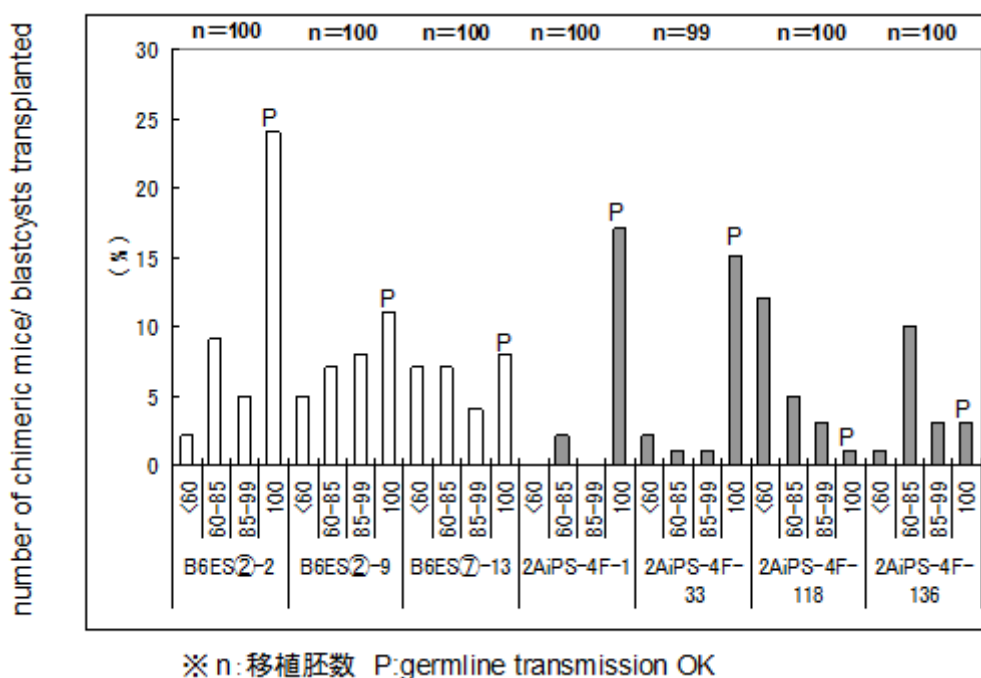


図 2. B6ES および 2AiPS-4F におけるキメラマウス率の割合

4FiPS 細胞では、効率的に高キメラマウスが生まれ、解析した全てのクローンにおいて Germline Transmission が確認された。一方、3FiPS 細胞ではほとんどが低率キメラで gt まで確認できたものはなかった。また、3FiPS において高率キメラマウスがわずかに生まれたラインもあったが、そのほとんどが出生直後に死亡した。GFP 標識した iPS 細胞によるキメラマウス初期発生段階においても、3FiPS 細胞では胚盤胞形成で異常がみられた。

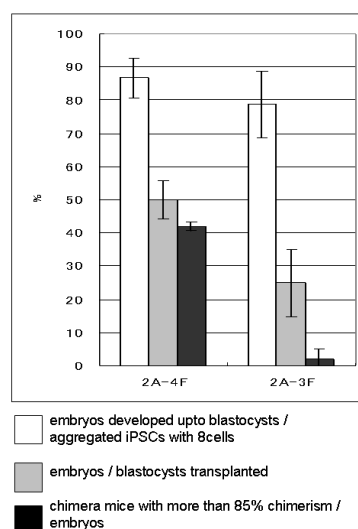
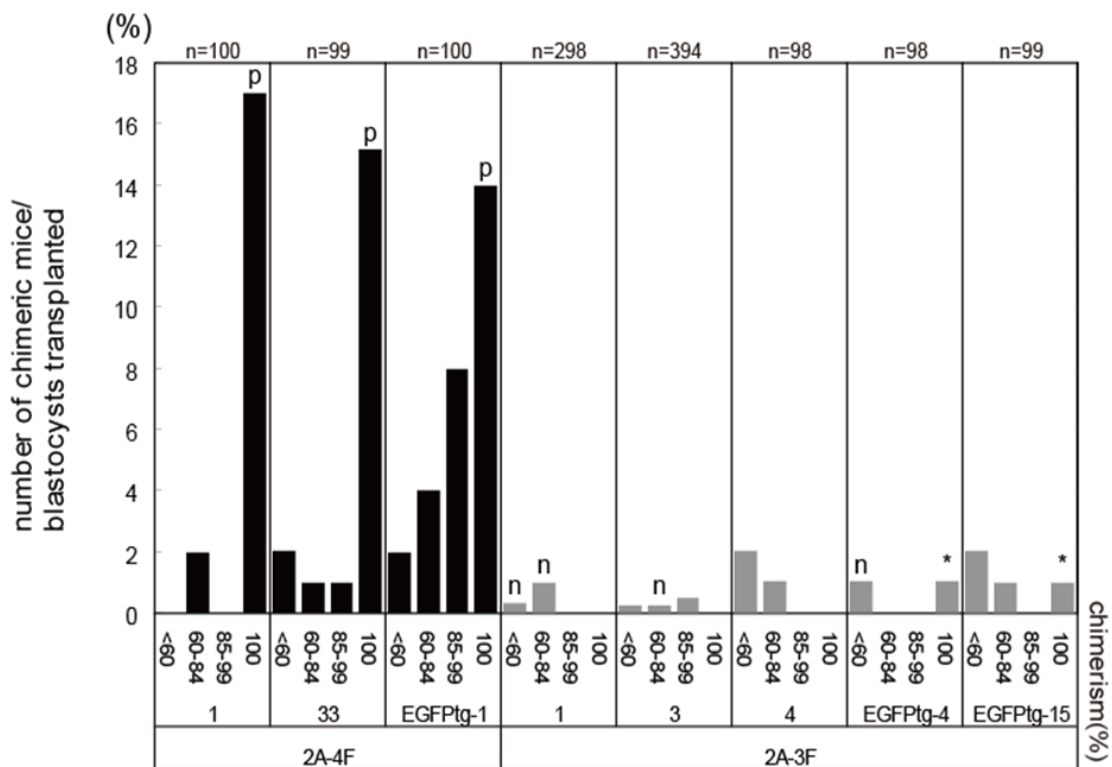


図 3. 胚盤胞形成の割合、分娩匹数の割合および 85%以上のキメラマウスの割合



参考:アグリゲーション法における毛色によるキメラ率の判定  
 [ICR(白)胚: B6(黒) ES、iPS]

図 4. 2A プラスミドを用いて樹立した 4F-、3F-iPS におけるマウスキメラ率の割合 (2 週齢で coat color を判定) \* EGFPtg-4 は 4 週齢で、EGFPtg-15 は 9 週齢で死亡。Germline 交配は出来ず。



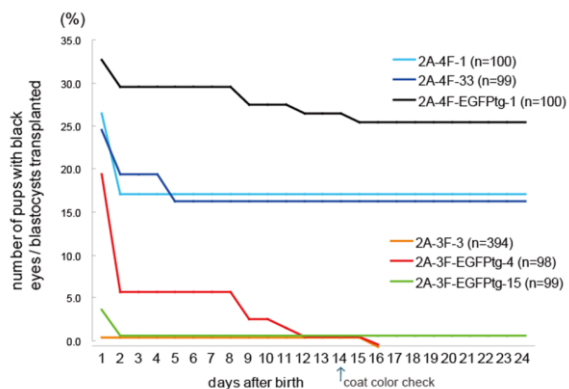
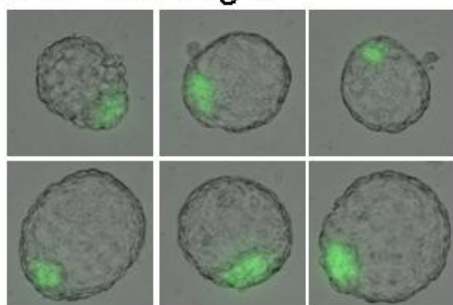
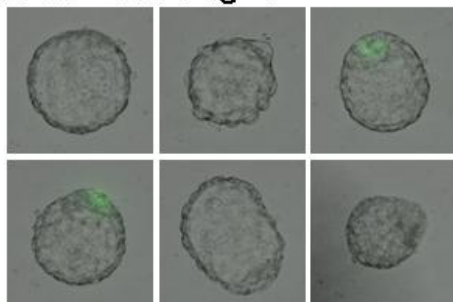


図 5. キメラマウスの生存曲線  
黒目マウスの生存を示している(黒目は高いキメラ率の指標となると考えられる)

### 2A-4F-EGFPtg-1



### 2A-3F-EGFPtg-4



### 2A-3F-EGFPtg-15

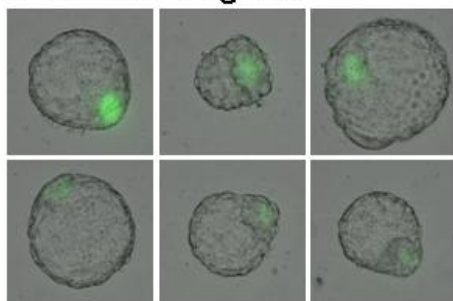


図 6. aggregation48 時間後の Blastocyst

### 考察

これらの技術によって、今までよりも詳細な解析が可能になることからこれまで明らかにされていないiPSクローン間の違いを明らかにすることが出来る可能性が高い。また、この解析によって差が見られたiPSクローン間において遺伝子発現解析などを行うことで、指標となる分子を発見できるなどのES、iPS細胞の簡単な判別技術へとつなげることができる。

### 引用文献

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663–676.
- [2] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;448:313–317.
- [3] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008;26:101–106.
- [4] Wernig M, Meissner A, Cassady JP et al. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008;2:10–12.
- [5] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008;322:949–953.
- [6] Jincho Y, Araki R, Hoki Y et al. Generation of genome integrationfree induced pluripotent stem cells from fibroblasts of C57BL/6 mice without c-Myc transduction. *J Biol Chem*

2010;285:26384–26389.

[7] Nagy, A. *et al.* Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 1990;110:815–821

[8] Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W. & Roder, J.C. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90:8424–8428

[9] Kaufman MH, Webb S Postimplantation development of tetraploid mouse embryos produced by electrofusion. *Development* 1990; 110: 1121 1132.

はじめに  
～第4回共用施設（PASTA & SPICE）共同研究成果報告書～

放射線医学総合研究所の静電加速器施設「PASTA & SPICE」は、平成16年3月に共用施設として指定されて以来、所内外の研究者に広く利用されてきました。平成22年度においては、9件の外部利用研究と7件の所内利用研究にマシンタイムを提供しており、その研究成果を報告する機会として、「第4回共用施設（PASTA & SPICE）共同研究成果報告会」を平成23年3月25日に開催する予定でした。しかし、その2週間前に東日本を襲った大震災と、それに付随した様々な事象を受けて開催中止になったことから、発表予定者から募った講演要旨を取りまとめ、この度、技術報告書として発行する運びとなりました。

PASTA & SPICEも少なからず震災の被害を受け、本年度のマシンタイムを停止している状況ですが、1日でも早くマシンタイム提供ができるよう復旧作業を進めておりますので、今後とも皆様の御協力・御支援をお願い申し上げます。

平成23年4月1日

静電加速器施設利用部会事務局

第4回共用施設 (PASTA&SPICE) 共同研究成果報告会  
-第5回静電加速器利用ワークショップ-

プログラム

平成23年3月25日 (木) 放射線医学総合研究所重粒子治療推進棟2階 大会議室 13:30~

(口頭発表は12分、質疑応答3分)

開会の挨拶	13:30~13:40	基盤技術センター長 日下部 正志	
セッション1 (座長: 長谷川純崇)	13:40~13:55	0-1 PASTA・SPICEの利用状況、Micro-PIXE開発	及川将一 放医研・研究基盤技術部
	13:55~14:10	0-2 C-PIXE	石川剛弘 放医研・研究基盤技術部
	14:10~14:25	0-3 微小ビーム分析による組織中微量元素の局所定量に関する研究 ~マイクロPIXEのウラン毒性研究への利用に向けて~	武田志乃 <sup>1</sup> 、鈴木享子 <sup>2</sup> 、春本恵子 <sup>3</sup> 、吉富友恭 <sup>3</sup> 、磯浩之 <sup>4</sup> 、樋口有一 <sup>4</sup> 、石川剛弘 <sup>4</sup> 、小西輝昭 <sup>4</sup> 、及川将一 <sup>4</sup> 、島田義也 <sup>1</sup> 1放医研・放射線防護研究センター、2東京大学、3東京学芸大学、4放医研・研究基盤技術部
	14:25~14:40	0-4 メダカ腫瘍組織の微量金属元素PIXE解析	長谷川純崇 <sup>1</sup> 、諸越幸恵 <sup>1</sup> 、丸山耕一 <sup>2</sup> 、磯浩之 <sup>3</sup> 、及川将一 <sup>3</sup> 、古川高子 <sup>1</sup> 、佐賀恒夫 <sup>1</sup> 1放医研・分子イメージング研究センター、2放医研・放射線防護研究センター、3放医研・研究基盤技術部
	14:40~14:55	0-5 Micro-PIXEによる鱗を用いた回遊履歴の推定に向けた検討 -絶滅危惧種イトウを対象に-	鈴木享子 <sup>1</sup> 、吉富友恭 <sup>2</sup> 、武田志乃 <sup>3</sup> 、市村政樹 <sup>4</sup> 、春本恵子 <sup>2</sup> 、磯浩之 <sup>3</sup> 、樋口有一 <sup>5</sup> 、石川剛弘 <sup>5</sup> 、及川将一 <sup>5</sup> 、大竹二雄 <sup>1</sup> 1東京大学、2東京学芸大学、3放医研・放射線防護研究センター、4標津サーモン科学館、5放医研・研究基盤技術部
	14:55~15:10	0-6 ミナミヌマエビ体内における重金属分布の解析に関する研究	春本恵子 <sup>1</sup> 、吉富友恭 <sup>1</sup> 、鈴木享子 <sup>2</sup> 、武田志乃 <sup>3</sup> 、宮原信幸 <sup>4</sup> 、磯浩之 <sup>4</sup> 、石川剛弘 <sup>4</sup> 、樋口有一 <sup>4</sup> 、及川将一 <sup>4</sup> 1東京学芸大学、2東京大学、3放医研・放射線防護研究センター、4放医研・研究基盤技術部
15:10~15:30		コーヒーブレイク	
セッション2 (座長: 武田志乃)	15:30~15:45	0-7 シスプラチンミセルの腫瘍内の分布測定及びシミュレーション	水野和恵 <sup>1</sup> 、藤澤寛 <sup>1</sup> 、西島陽祐 <sup>1</sup> 、及川将一 <sup>2</sup> 、小西輝昭 <sup>2</sup> 、石川剛弘 <sup>2</sup> 、磯浩之 <sup>2</sup> 、樋口有一 <sup>2</sup> 、伊藤友紀 <sup>3</sup> 、松山成男 <sup>3</sup> 、今関等 <sup>2</sup> 、石井慶三 <sup>3</sup> 、上坂充 <sup>1</sup> 1東京大学大学院、2放医研・研究基盤技術部、3東北大学大学院
	15:45~16:00	0-8 プナ葉の元素マップ	齊藤勝美 <sup>1</sup> 、石川剛弘 <sup>2</sup> 、磯浩之 <sup>2</sup> 、及川将一 <sup>2</sup> 1エヌエス環境株式会社、2放医研・研究基盤技術部
	16:00~16:15	0-9 SPICEの開発、低線量~SPICE	小西輝昭、及川将一、石川剛弘、磯浩之、樋口有一、児玉久美子、安田仲宏、酢屋徳啓、今関等 放医研・研究基盤技術部
	16:15~16:30	0-10 マイクロビーム細胞照射装置 (SPICE) を用いた神経幹細胞の放射線障害に関する研究	磯野真由 <sup>1,2</sup> 、小西輝昭 <sup>2</sup> 、塩見尚子 <sup>2</sup> 、及川将一 <sup>2</sup> 、石川剛弘 <sup>2</sup> 、磯浩之 <sup>2</sup> 、樋口有一 <sup>2</sup> 、児玉久美子 <sup>2</sup> 、酢屋徳啓 <sup>2</sup> 、井上順雄 <sup>1</sup> 1首都大学東京、2放医研・研究基盤技術部
	16:30~16:45	0-11 NASBEE	須田充 放医研・研究基盤技術部
	16:45~17:00	0-12 Studies of non-targeted radiation effects in vivo through microbeam irradiation (K.N.Yu) Bystander effect of proton beam irradiated human lung cancer cells with counterpart normal cells (Badri N.Pandey)	小西輝昭 (代理発表) 放医研・研究基盤技術部
開会の挨拶	17:00~17:10	研究基盤技術部長 白川 芳幸	

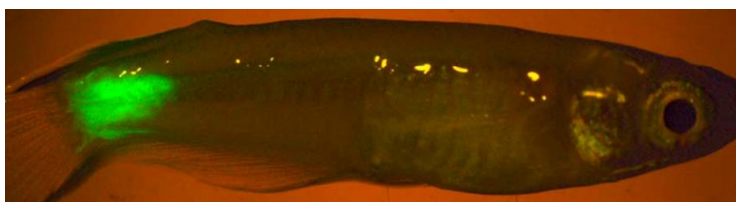
17:30~19:30	懇親会	重粒子治療推進棟1階喫茶室
-------------	-----	---------------

## メダカ腫瘍組織の微量金属元素 PIXE 解析

長谷川純崇<sup>1)</sup>、諸越幸恵<sup>1)</sup>、丸山耕一<sup>2)</sup>、磯浩之<sup>3)</sup>、及川将一<sup>3)</sup>、古川高子<sup>1)</sup>、佐賀恒夫<sup>1)</sup>

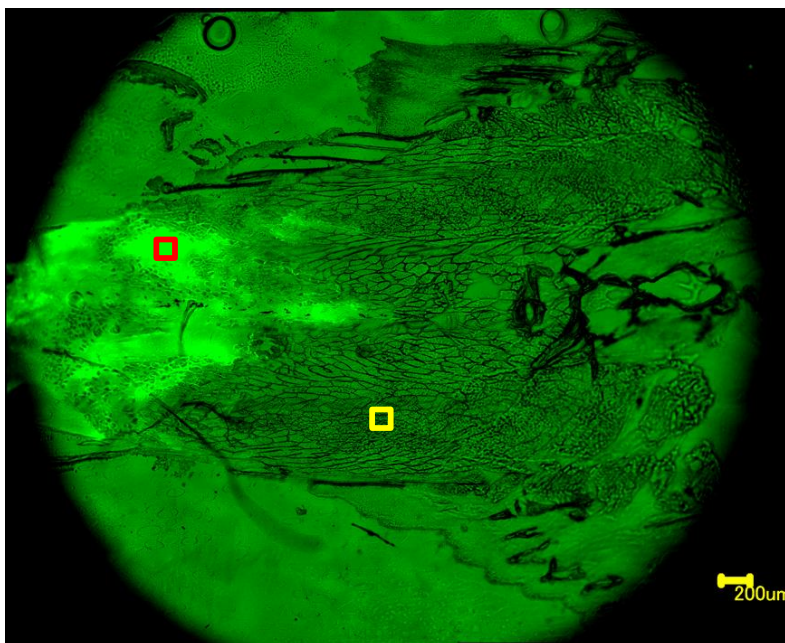
1)放医研・分子イメージング研究センター、2)放医研・放射線防護研究センター、3)放医研・研究基盤技術部

我々が作製に成功したメダカ移植腫瘍モデルを用いて、がん組織および周辺正常組織における微量金属元素の PIXE 解析を行っている。当初、比較的広い範囲で元素のマッピングを行っていたが、がん組織および周辺正常組織での特徴的な分布が認められなかったため、現在、がん組織と周辺正常組織に ROI (Region of interest) を置いて半定量的解析を行っている。今回の報告会ではその現状を報告する。



(上図) メダカ腫瘍モデル

緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現しているメダカ悪性黒色腫細胞 (約 100 個) を尾ひれ近くに移植した。緑の蛍光が増殖しているがん組織である。



(上図) PIXE 用サンプル

がん組織 (赤) と周辺正常組織 (黄) に ROI を置いて解析する。

～報告書（課題番号：P08T-SH01）～

参考文献： Hasegawa S et al. PNAS 106 (33), 13832-13837, 2009.

# Micro-PIXE による鱗を用いた回遊履歴の推定に向けた検討

## —絶滅危惧種イトウを対象に—

鈴木享子<sup>1)</sup>、吉富友恭<sup>2)</sup>、武田志乃<sup>3)</sup>、市村政樹<sup>4)</sup>、春本恵子<sup>5)</sup>、磯浩之<sup>6)</sup>、  
樋口有一<sup>6)</sup>、石川剛弘<sup>6)</sup>、及川将一<sup>6)</sup>、大竹二雄<sup>1)</sup>

1) 東京大学大気海洋研究所 国際沿岸海洋研究センター、2) 東京学芸大学環境教育実践施設、3) 放射線医学総合研究所 放射線防護研究センター、4) 標津サーモン科学館、5) 東京学芸大学教育学部、6) 放射線医学総合研究所 基盤技術センター研究基盤技術部

### 1. はじめに

サケ科イトウ属に属するイトウ (*Hucho perryi*) は、河川改修による生息地の破壊や河川構造物による生息域の分断により、著しく個体数が減少し絶滅危惧種に指定されている（‘Critically Endangered’ in the IUCN red list, IUCN 2006）。イトウの生態については、生息環境や産卵生態など淡水生活期についての知見がほとんどである。しかし、日本に生息するイトウには生活史の大部分を沿岸域や汽水域に依存している個体群が存在していることが明らかになったため（Suzuki *et al.* *in press*）、イトウの効果的な保全策を立案するためには、降海性や回遊生態を含めた生活史全体の把握が重要であると考えられる。

近年、耳石中のストロンチウム（Sr）が魚類の生息環境中のSr濃度に応じて変化する性質を利用し、生息環境の履歴を再構築する研究が行われている。しかし、耳石は個体を殺さずに摘出することはできないため、イトウのような希少種ではその代替法の検討が望まれる。そこで本研究では、魚を殺さずに摘出できる鱗に着目し、鱗を用いて生息環境を推定できるか、その可能性について検討した。そのために、まずイトウの淡水・海水飼育実験を行い、飼育環境と鱗の成長線である隆起線におけるSr量との関係について調べた。本年度は、隆起線単位でのSr分析を行うとともに、隆起線の中心部分の局所定量を試みた。

### 2. 材料及び方法

飼育実験には、標津サーモン科学館より提供されたイトウ 12 尾を用いた。淡水（0psu）・海水（30psu）でそれぞれ約 6 ヶ月間飼育し、麻酔施行後に鱗を摘出して実験に供した。鱗はOCT コンパウンドで封入後、凍結マイクロトームを用いて厚さ 10  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。鱗の隆起線断面は、飼育期間に形成された縁辺部を対象に micro-PIXE を用いて、隆起線中心部の

Sr カウントを測定した。さらに、Homma-Takeda *et al.* (2009, 2010)の方法に基づき、Sr の薄切標準試料を 0, 250, 500 ppm で作製し、検量線をひくことで分析部位（5 $\mu$ m $\times$ 5 $\mu$ m）の局所定量も併せて行った。

### 3. 結果及び考察

飼育期間における鱗縁辺部の隆起線の Sr 量は、淡水飼育個体に比べ海水飼育個体の方が有意に高く、鱗の隆起線の Sr 量がそれぞれの飼育環境を反映している可能性が示唆された。また、薄切標準試料の分析については、0-500 ppm の濃度範囲で良好な検量線が得られ、淡水・海水飼育個体における隆起線の Sr 濃度を明らかにすることができた。今後、鱗を用いてどの程度生息環境を推定できるのか、個体数を増やして分析するとともに、タイムラグを含めて解析する必要があるだろう。さらに、実際にフィールドの個体から採取した鱗を用いて、淡水のみで過ごした陸封型個体と降海を経験した降海型個体を簡便に判別する方法について、今後検討していく予定である。

### 4. 参考文献

- IUCN (2006) The IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resource) red list of threatened species. Available at: <http://www.iucnredlist.org/>. “Accessed 22 July 2010”
- K. Suzuki, T. Yoshitomi, Y. Kawaguchi, M. Ichimura, K. Edo, T. Otake. Migration history of Sakhalin taimen *Hucho perryi* captured in the Sea of Okhotsk, northern Japan using otolith Sr:Ca ratios. *Fish. Sci.* (in press)
- S. Homma-Takeda, Y. Nishimura, H. Iso, T. Ishikawa, H. Imaseki, M. Yukawa (2009) A new approach for standard preparation in microbeam analysis: Development and validation. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 279: 627–631.
- S. Homma-Takeda, H. Iso, M. Ito, K. Suzuki, K. Harumoto, T. Yoshitomi, T. Ishikawa, M. Oikawa, N. Suya, T. Konishi, H. Imaseki (2010) Evaluation of pressed powders and thin section standards for multi-elemental analysis by conventional and micro-PIXE analysis. *Int. J. PIXE.* 20: 21-28.



## ミナミヌマエビ体内における重金属分布の解析に関する研究

春本恵子<sup>1)</sup>、吉富友恭<sup>2)</sup>、鈴木享子<sup>3)</sup>、武田志乃<sup>4)</sup>、宮原信幸<sup>5)</sup>  
磯浩之<sup>5)</sup>、石川剛弘<sup>5)</sup>、樋口有一<sup>5)</sup>、及川将一<sup>5)</sup>

1)東京学芸大学教育学部、2)東京学芸大学環境教育実践施設、3)東京大学大気海洋研究所 国際沿岸海洋研究センター、4)放射線医学総合研究所 放射線防護研究センター、5)放射線医学総合研究所 基盤技術センター

### 1. はじめに

近年、水生生物の保全や水産動植物への汚染物質の影響に対する関心が高まり、Znの排水基準値の強化や農薬登録保留基準の改正などが行われている。ヌマエビ科の（ミナミ）ヌマエビ、ヌカエビは農薬登録保留基準の改正により追加生物種として新たに登録された。汚染物質の水生生物への影響評価については課題も多く、生物における物質の取り込みや排泄のメカニズムについては不明な点が多い。それゆえ、形態と合わせて生物体内の元素分布を把握することにより、汚染物質の水生生物への影響を評価する上での重要な知見が得られると考えられる。

そこで本研究では、生物の体内構造の詳細把握に有効な3DマイクロX線CTおよび高感度非破壊元素分析手法であるマイクロPIXE法を導入し、ミナミヌマエビ（*Neocaridina denticulata*）体内における重金属の分布を明らかにすることを目的に実験を行った。

### 2. 材料及び方法

実験にはミナミヌマエビを供した。ミナミヌマエビは十脚目コエビ下目ヌマエビ科カワリヌマエビ属であり、カワリヌマエビ属はすべて陸封型で、主として河川の上流部などに生息している。本研究では、多摩川及び野川において採集した個体を実験に供した。

はじめに、3DマイクロX線CTにより、ミナミヌマエビの体内構造の把握を行った。前処理として、撮影の約24時間前に飼育水に造影剤（イオパミン注300、日本シエーリング株式会社）を1%となるように添加した。3DマイクロX線CTは、実験動物用3DマイクロX線CT（R\_mCT、株式会社リガク）を使用した。麻酔が効いた後、ミナミヌマエビを蒸留水で洗浄し、試料ステージにセットした。撮影は電圧90 kV、電流200  $\mu$ A、25秒間の条件で行った。その後再構成ソフトi-VIEW-R（株式会社モリタ製作所）により画像の確認を行った。

次に、Zn および Pb による曝露実験を行い、終了後ミナミヌマエビを OCT コンパウンドで封入後、凍結マイクロトームを用いて、20  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。曝露実験は濃度 1.0 mg/L、96 時間に設定して行った。直接外界水に接する鰓および腸を主な対象部位として、マイクロ PIXE 法を用いて Zn、Pb の検出と分布の検索を試みた。マイクロ PIXE 法は、積算電荷量、0.5  $\mu\text{C}$  または 0.3  $\mu\text{C}$ 、空間分解能（ビームサイズ）、約 2  $\mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$  以下、スキャンサイズ、750  $\mu\text{m} \times 750 \mu\text{m}$  または 500  $\mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$  または 200  $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$  の条件で行った。

さらに、薄切標準試料の測定により得られた検量線から、鰓における Zn および Pb の濃度の算出を行った。Zn、Pb の濃度が共に 50、100、250  $\mu\text{g/g}$  の薄切分析標準を作製した。薄切標準作製方法は Homma-Takeda *et al.* (2009) の方法に基づき行った。

### 3. 結果及び考察

3D マイクロ X 線 CT により、体内における鰓および消化管の配置とそれぞれの形態的特徴を把握することができた。鰓は頭胸甲両側に並んで存在すること、腸は頭胸甲後方の胃に続き一本直走し肛門へ通じていることが確認された。

また、Zn、Pb 曝露実験により、ミナミヌマエビの鰓および腸に Zn、Pb が蓄積することが明らかとなり、それぞれの分布像を得ることができた。対照区個体の鰓から得られたスペクトルでは Ca、Fe、Cu、Zn のピークが確認された。一方、Zn 曝露個体の鰓では対照区と比べて Zn のピークは増大していた。また、Pb 曝露個体の鰓では対照区個体からは確認できなかった Pb のピークが確認できた。腸においては、Zn、Pb の蓄積が認められた個体と認められなかった個体が確認された。

薄切標準試料の測定により、Zn 曝露個体の鰓の Zn 濃度は  $36.4 \pm 2.3 \mu\text{g/g}$  であり、Pb 曝露個体の鰓の Pb 濃度は  $77.7 \pm 51.1 \mu\text{g/g}$  であることが示された。

### 4. 参考文献

Hatakeyama, S., and Y. Sugaya, 1989 : A Freshwater Shrimp(*Paratya compressa improvisa*) as a Sensitive Test Organism to Pesticides, Environmental Pollution,59,325-336

林健一,2007 : 日本産エビ類の分類と生態Ⅱ. コエビ下目(1),東京,p292

Homma-Takeda, S., Y. Nishimura, H. Iso, T. Ishikawa, H. Imaseki and M. Yukawa,2009 : A new approach for standard preparation in microbeam analysis: Development and validation, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 279(2), 627-631

～報告書（課題番号：P07T-TY01）～

内田亨,1964：動物系統分類学第7卷（上）節足動物 I,中山書店,東京,p132

## シスプラチンミセルの腫瘍内の分布測定及びシミュレーション

### Measurement and simulation of the distribution of cisplatin micelles inside tumor

○水野和恵<sup>1)</sup>、藤澤寛<sup>1)</sup>、西島陽祐<sup>1)</sup>、及川将一<sup>2)</sup>、小西輝昭<sup>2)</sup>、石川剛弘<sup>2)</sup>、磯浩之<sup>2)</sup>、樋口有一<sup>2)</sup>、伊藤友紀<sup>3)</sup>、松山成男<sup>3)</sup>、今関等<sup>2)</sup>、石井慶三<sup>3)</sup>、上坂充<sup>1)</sup>  
Kazue Mizuno, Hiroshi Fujisawa, Yosuke Nishijima, Masakazu Oikawa, Teruaki Konishi, Takahiro Ishikawa, Hiroyuki Iso, Yuichi Higuchi, Yuki Ito, Shigeo Matsuyama, Hitoshi Imaseki, Keizo Ishii and Mitsuru Uesaka

1) 東京大学大学院工学系研究科、2) 放射線医学総合研究所基盤技術センター、3) 東北大学大学院工学系研究科

悪性腫瘍に対する抗癌剤と放射線を組み合わせた治療（化学放射線療法）は、高い治療効果が期待できる一方で副作用も増大してしまう。そこで、ドラッグデリバリー（DDS）技術を活用して腫瘍のみに選択的に薬剤を送達し、更にピンポイント X 線を用いて線量を集中させることで、副作用を抑えたまま、ピンポイントでの治療を行う X 線 DDS が提案されている。薬剤の候補として、放射線増感作用をもつシスプラチンを、両親媒性のポリマーに内包し、腫瘍集積性を高めたシスプラチンミセル（ナノキャリア株式会社）が有望であると考えられる。放射線との併用で治療効果の最大化を図るには、シスプラチンミセルの体内挙動、特に腫瘍内の細胞への集積メカニズムを明らかにする必要がある。しかし、シスプラチンは分子量が小さく、蛍光色素で標識すると挙動が変化する可能性があるため、これまでミクロンサイズでの生体内分布は定量的に評価されていなかった。そこで、蛍光 X 線分析を用いて元素マッピングを行い、薬剤投与後の腫瘍内および癌細胞内における白金の分布を測定した。CDF-1 マウスに癌細胞 (B16 and C26) を皮下移植し、シスプラチンミセルを投与して一定時間後の腫瘍の切片を放射光蛍光 X 線分析 (SR-XRF) により測定した。血管周囲の白金分布画像から、シスプラチンミセルが血管から腫瘍組織内に時間と共に浸透していく様子を確認した。また、コンベンショナル PIXE とマイクロビームスキヤニング PIXE ( $\mu$ -PIXE) (放医研、東北大) を用いて、ヒト癌細胞 (PK-1 and HT29) 内への白金の取込み量の時間的な変化を測定した。その結果、高分子ミセルから放出されたシスプラチンが主に細胞内に取り込まれており、細胞内に均一に分布している様子が観察された<sup>1)</sup> (図)。

これらの情報を元に、シスプラチンミセルの腫瘍内における挙動のモデル化を試みた。腫瘍内の血管から離れたある位置の癌細胞内へのシスプラチンの取込み量を、腫瘍組織内で高分子ミセルが拡散により浸透していくと仮定して、血液中の白金濃度の減衰や拡散係数、高分子ミセルの崩壊定数等の実測値を用いて数値計算により見積もった。その結果、血管から近い ( $\sim 50\mu\text{m}$ ) ところでは 1 回の注射で十分なシスプラチンが癌細胞に取り込まれるのに対し、

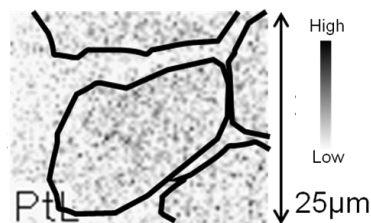


図 2 mM のシスプラチンミセルで 6 時間処理した PK-1 細胞内の白金分布.

～報告書（課題番号：P08T-MU01）～

遠い（150 $\mu\text{m}$ ～）場所にある癌細胞への集積は致死量に達しない可能性が示唆された。このような薬剤挙動の解明は、治療効果を見積もるのに大変有用であると考えられる。今後、細胞毒性や動物実験における治療効果の測定と組み合わせることで、放射線との併用方法を最適化していく予定である。

1) K. Mizuno, *et al*, IJPIXE, Vol 20, 1-2, pp37-43 (2010).

## ブナ葉の元素マップ

齊藤勝美<sup>1)</sup>、石川剛弘<sup>2)</sup>、磯 浩之<sup>2)</sup>、及川将一<sup>2)</sup>

1) エヌエス環境、2) 放射線医学総合研究所

### 1. はじめに

植物は環境中の汚染物質を体内に吸収して蓄積することが知られており、また酸性および酸性化の汚染物質は植物の元素吸収・代謝機構に影響を与え、その影響は植物の含有元素濃度にも反映されることが知られている。こうしたことから、ブナ林に対する大気環境の影響やブナ枯れの要因を検討する一つの手段として、ブナ葉の元素マップを測定した。

### 2. 採取地点と採取法

ブナ葉の採取地点は、北海道の歌オブナ林、添別ブナ林、ガルドネルブナ林である。ブナ葉は各地点とも6本の樹木から5枚ずつ葉を採取し、アルミラミジップに入れて-30℃以下で冷凍保存した。

### 3. 元素マップの測定法

照射試料は凍結乾燥されたブナ葉で、1枚の葉に対して3ヵ所（葉の中心、中心と縁の間、縁）を10×10 mmに切り取り、それらを試料ホルダーにカーボンテープで貼り付けて作成した。葉内元素マップとイオンビームのエネルギー損失を測定しての画像化（Scanning Transmission Ion Microscopy: STIM）は（独）放射線医学総合研究所のMicro-PIXE装置で行い、プロトンビームの走査範囲は2.5×2.5 mm、プロトンビームの径は1 μm又はそれ以下である。プロトンビームのエネルギーは2.6MeV、電荷量の合計値は100 nCで、特性X線スペクトルの解析にはOM\_DAQデータ取得システムを用いた。測定対象とした元素は、Na, Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Rb, Sr, Pbの19元素である。

### 4. ブナ葉の元素マップ

図1に歌オブナ林のブナ葉のSTIMイメージを示す。ブナ葉の場合には、主脈と側脈は葉の背軸側に膨らんだ肋となって厚みがあるために、イオンビームは透過せず、相対濃度はゼロの黒色になって、葉肉部分と著しく色合いが異なり、際立ってイメージ化されている。

図2にはSiのマップを示す（歌オブナ林のブナ葉）。パッチ状にみられるSiは葉の表面に付着したSi主体の小球体（fly ash）の集まりであると推察される。Siと同様にパッチ状がみられる元素はPである。なお、添別ブナ林およびガルドネルブナ林のブナ葉も同じである

図3（歌オブナ林のブナ葉）と図4（添別林のブナ葉）にはクロロフィルの生成に関与しているMgと植物生態に有毒なMnのマップを示す。歌オブナ林のブナ葉ではMgは一様に分布しているが、添別林のブナ葉では葉の縁の部分で密度の低下がみられる。Mnマップでは、Mgの密度が低下していた添別林のブナ葉の縁で密度が高い。このことは、クロロフィルの生成阻害にMnが関与している可能性を示唆すると推察される。

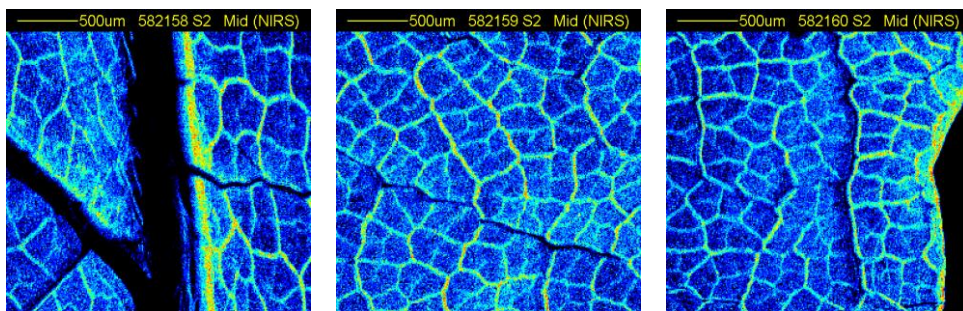


図1 STIM イメージ（歌オブナ林のブナ葉）

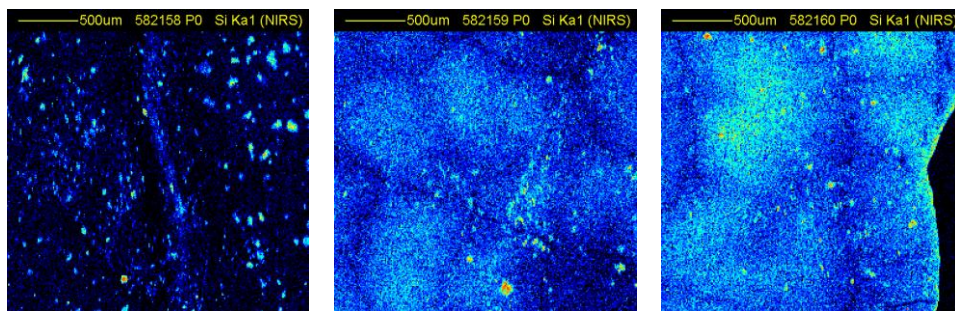


図2 Si マップ（歌オブナ林のブナ葉）

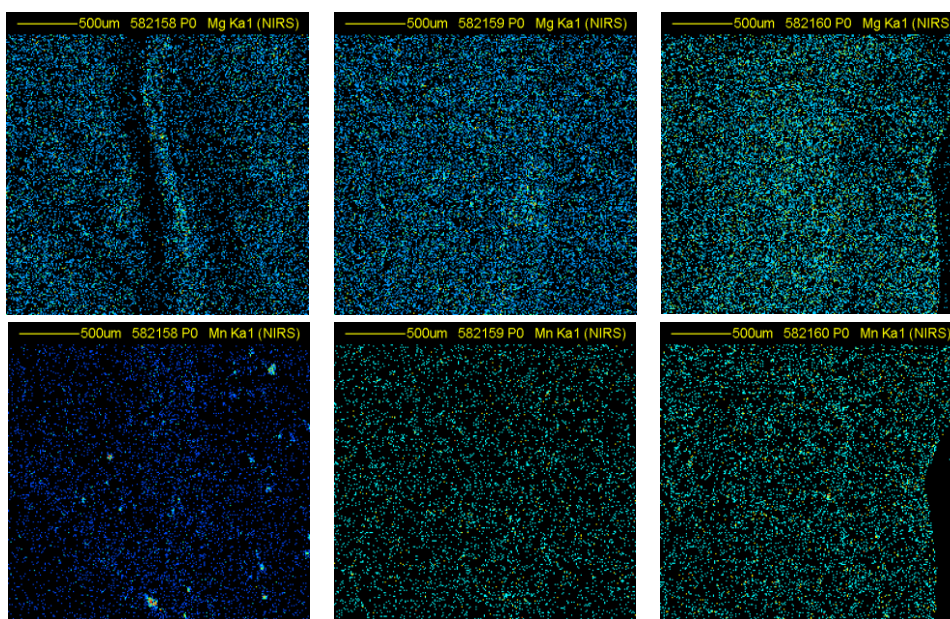


図3 Mg と Mn のマップ（歌オブナ林のブナ葉）

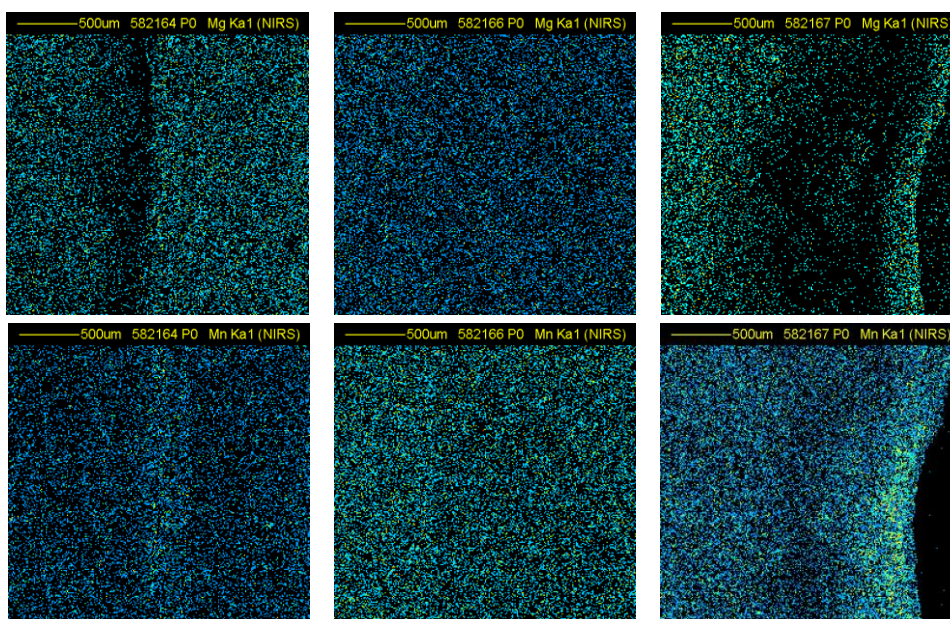


図4 Mg と Mn のマップ（添別ブナ林のブナ葉）

## マイクロビーム細胞照射装置（SPICE）の開発 Research and developments (R&D) on single particle irradiation system to cell, SPICE

小西輝昭<sup>1)</sup>、及川将一<sup>1)</sup>、酢屋徳啓<sup>1)</sup>、石川剛弘<sup>1)</sup>、磯野真由<sup>1)</sup>、塩見尚子<sup>1)</sup>

### 1) 放医研 放射線発生装置利用技術開発課

マイクロビーム照射法は、放射線生物学において現在までに得ることが不可能であった放射線に対する細胞レベルでの応用を解析するために、最も有効な方法・装置であると言える。放医研マイクロビーム装置 SPICE は、3.4MeV プロトン（陽子線）を目的の細胞に対してプロトンを 1 個から任意の粒子数を照射することができる。ビームサイズも直径 2  $\mu\text{m}$  であり、哺乳類培養細胞の細胞核のみを狙い撃つには、十分に集束したビームを形成することを可能にした。照射速度は、毎分約 400 個程度の細胞核を照射する高速性を実現した。照射可能な細胞培養面積も 5mm $\times$ 5mm 程度であり、細胞皿あたりおよそ数千個の細胞を照射することが可能である。1 細胞皿（試料）を照射するために必要な 1) 細胞画像の取得、2) 細胞の位置座標の計算・出力、そして 3) 照射をおよそ 15～20 分程度で完了するように、システムの照射プログラムの改良を進めた。2010 年度においては、ゼブラフィッシュ胚への照射を可能にするための照射システムの改良も進め、照射実験も開始した。細胞レベルだけでなく、in vivo におけるバイスタンダー効果または放射線適応応答に関する基礎研究を開始した。ミクロンオーダーでの照射を実現しているだけでなく、その照射方法にもバリエーションを備えた照射装置へと開発を進めた。

SPICE の共用施設としての運営を試験的に開始しており、マシンタイム課題申請等の受付も行っている。しかし、マイクロビーム照射技術のような高度な照射法を用いた研究は、まだ一般的ではない。新規に課題申請を希望するユーザーへの対応も必須となり、見学または試験的な照射実験のデモなどを行う対応を本課題で行った。

### 参考文献：

- 1) T. Konishi, T. Ishikawa, H. Iso, et al., Biological studies using mammalian cell lines and the current status of the microbeam irradiation system, SPICE. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms* **267**, 2171-2175 (2009).
- 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）、Vol.5（2010）83-93
- 3) 及川将一、小澤美絵、石川剛弘、平成 21 年度 静電加速器棟（PASTA&SPICE）利用実績、放射線医学総合研究所技術報告書（NIRS Technology）、Vol.5（2010）54-64



## マイクロビーム細胞照射装置（SPICE）を用いた神経幹細胞の放射線障害に関する研究

磯野真由<sup>1, 2)</sup>、小西輝昭<sup>2)</sup>、塩見尚子<sup>2)</sup>、及川将一<sup>2)</sup>、石川剛弘<sup>2)</sup>、磯浩之<sup>2)</sup>、樋口有一<sup>2)</sup>、児玉久美子<sup>2)</sup>、酢屋徳啓<sup>2)</sup>、井上順雄<sup>1)</sup>

- 1) 首都大学東京 人間健康科学研究科
- 2) 放医研 放射線発生装置利用技術開発課

発達途中の胎生期の放射線被ばくにより、神経機能不全や小頭症、発達遅滞のような神経系障害が引き起こされる。<sup>1-3)</sup> これは、この時期の脳内において、中枢神経系を構成しているニューロンやアストロサイト、オリゴデンドロサイトへと分化する神経幹細胞に対する影響が主因であると考えられている。この神経幹細胞は、自己増殖能と分化能を有する特徴をもち、さらに、胎生期だけでなく成体の脳にも存在することが近年報告されている。<sup>4)</sup> そのため、放射線影響リスクの観点からも神経幹細胞の放射線感受性を細胞レベルで評価することが重要であると考えた。

本研究の目的は、神経幹細胞の持つ自己増殖能に注目し、その過程における細胞核照射に対する細胞応答を解析することにある。放射線障害は、主に放射線によって誘発される DNA 損傷に起因すると考えられている。<sup>5)</sup> そのため、照射粒子数がポアソン分布に従ってしまう一般的なブロードビーム照射ではなく、細胞核の狙い撃ちが可能であり、そして照射粒子数を正確に決定することが可能なマイクロビーム照射装置 SPICE を用いた。<sup>6)</sup> また、細胞はマウス ES 細胞（HK 株）を NSS 法による分化誘導から調製した神経幹細胞を用いることにより、細胞レベルでの解析を可能にした。<sup>7)</sup>

平成 22 年度 SPICE マシントイムにおいては、神経幹細胞の自己増殖能に注目し、最も基本的な情報といえる、細胞核への照射粒子数に対する生存曲線の取得を行った。一般的にマイクロビーム照射法で用いるヘキストでの細胞核染色は、その細胞毒性から行うことができない。そのため、照射 3 時間前に細胞核の狙い撃ちをするために細胞（質）全体を CellTracker Orange で染色した。一試料につき約 1.3 mm 角に存在する約 200 個の細胞に対して、マイクロビーム照射を行った。照射粒子数は、50、100、200、500 個とした。照射後は、通常の培養条件に戻し、その照射の 48 時間後に細胞固定を行った。ヘキスト 33342 と CellTracker Orange による染色をし、SPICE オンライン顕微鏡を用いて細胞画像を取得後、照射範囲内すべての細胞数をその蛍光を頼りに計数することで、生存曲線を取得した。

照射粒子数 50 発および 500 発の照射で、細胞数は非照射試料に比べ有意な減少が見られた。また、照射された細胞の数は撒いた時の細胞数とほとんどかわらなかった。したがって、プロトン 50 発の細胞核照射によって、増殖している神経幹細胞は細胞周期の停止あるいはアポトーシスを引き起こすことが示唆された。今後は、自己増殖能に着目し、その過程における DNA 損傷修復経路および細胞死誘発へのメカニズムについて解析を継続する。さらに、DNA 損傷誘発または細胞質照射による酸化ストレスに対する分化誘導過程との関係を明らかにして行く必要がある。

引用文献：

- 1) M. Otake, W.J. Schull, Review: Radiation-related brain damage and growth retardation among the prenatally exposed atomic bomb survivors, *Int. J. Radiat. Biol.* **74** (1998) 159-171.
- 2) J. Raber, et al., Radiation-induced cognitive impairments are associated with changes in indicators of hippocampal neurogenesis. *Radiat. Res.* **162** (2004) 39-47.
- 3) K. Nakanishi, et al., Altered synaptic activities in cultures of neocortical neurons from prenatally X-irradiated rats, *Neurosci. Lett.* **355** (2004) 61-64.
- 4) S. Temple, The development of neural stem cells, *Nature.* **414**, (2001) 112-117.
- 5) P.L. Olive, et al., Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “Comet” assay, *Radiat. Res.* **122** (1990) 86-94.
- 6) T. Konishi, et al., Biological studies using mammalian cell lines and the current status of the microbeam irradiation system, SPICE, *Nucl.Inst. and Method B.* **267** (2009) 2071-2075.
- 7) M. Otsu, et al., Uni-directional differentiation of mouse embryonic stem cells into neurons by the neural stem sphere method, *Neurosci. Res.* **69** (2011) 314-321.

# **Studies of non-targeted radiation effects *in vivo* through microbeam irradiation of embryos of *Danio rerio***

**Subtitle:**

**Adaptive response in zebrafish embryos induced using microbeam protons as priming dose and X-ray photons as challenging dose**

V.W.Y. Choi<sup>1</sup>, T. Konishi<sup>2</sup>, M. Oikawa<sup>2</sup>, H. Iso<sup>2</sup>, S.H. Cheng<sup>3</sup>, K.N. Yu<sup>1\*</sup>

1) Department of Physics and Materials Science, City University of Hong Kong, Tat Chee Avenue, Kowloon Tong, Hong Kong.

2) Department of Technical Support and Development, National Institute of Radiological Sciences, Chiba, Japan.

3) Department of Biology and Chemistry, City University of Hong Kong, Tat Chee Avenue, Kowloon Tong, Hong Kong.

## **Abstract**

The present work was devoted to studying the high-LET-radiation dose needed to induce adaptive response in zebrafish embryos *in vivo* using microbeam protons as the priming dose and X-ray photons as the challenging dose. The microbeam irradiation system (Single-Particle Irradiation System to Cell, acronym as SPICE) at the National Institute of Radiological Sciences (NIRS), Japan, was employed to control and accurately quantify the number of protons at very low doses, viz., about 100  $\mu$ Gy. The results revealed that 5 to 20 protons, or equivalently 110 to 430  $\mu$ Gy, could induce radioadaptive response in zebrafish embryos *in vivo*.

## **1. Introduction**

For radiation protection purposes, prediction of risk from an ionizing-radiation exposure is enabled by adopting the linear no-threshold (LNT) hypothesis which states that the risk is linearly proportional to the dose normalized by the radiation weighting factor, and which assumes no threshold dose value below which no radiation risk is expected. Moreover, as data in the low-dose regime are relatively scarce, the detrimental effect from exposure to low-dose radiation is commonly extrapolated from data obtained in the high-dose regime by using the LNT model (e.g., ref. [1]).

Although this model is commonly adopted for radiation protection purposes, there is a considerable amount of evidence showing that organisms may exhibit different responses at low and high radiation dose exposures. Radioadaptive response is one of the non-targeted radiation effects that challenged the LNT model. Radiation-induced adaptive response in cells can be described as a self-protection mechanism when a cell is exposed to a low “priming” dose of radiation, which provides protection against subsequent higher “challenging” dose.

The main objectives of the present study were two fold, namely, (1) to design the experimental setup

for the *in vivo* irradiation of zebrafish embryos by using SPICE microbeam; and (2) to study the small number of protons or equivalently the high-LET-radiation dose required to induce a radioadaptive response.

## 2. Methodology

The zebrafish embryos were dechorionated at 4 h post fertilization (hpf) and irradiated at 5 hpf by microbeam protons. For each embryo, ten irradiation points were arbitrary chosen without overlapping with one another. To each irradiation point, 5, 10 or 20 protons each with energy of 3.4 MeV were delivered. The embryos were returned back to the incubator until 10 hpf to further receive the challenging exposure, which was achieved using 2 Gy of X-ray irradiation, and then again returned to the incubator until 24 hpf for analyses. The levels of apoptosis in zebrafish embryos at 25 hpf were quantified through TUNEL assay, with the apoptotic signals captured by a confocal microscope.

## 3. Results

Seven sets of experiments were conducted by delivering 5, 10 and 20 protons at the chosen spots on the zebrafish embryos as the priming exposure. All the embryos in these seven sets of experiments received the same dose for the challenging exposure (2 Gy) delivered by X-ray photons. The results were tabulated in Table 1. Radioadaptive response was found to be induced by 5, 10 and 20 protons as the priming exposure irradiated at 10 positions each followed by a 2 Gy X-ray challenging exposure. For experiments involving 5 and 20 protons, the adapted embryos showed decreased number of apoptotic signals with statistical significance ( $p < 0.05$ ), ranging from 13.7 to 21.0 %.

**Table 1. The average number of apoptotic signals ( $N$ ) from the samples (which had received both priming and challenging exposures) and the average number of apoptotic signals ( $n$ ) from the controls (which received only the challenging exposure) on 25 hpf zebrafish embryos exposed to various priming doses followed by a 2 Gy X-ray with a 5 h interval time. The  $p$  values are obtained using t-tests.**

Priming exposure	$N$	$n$	Magnitude of daptation (%)	$p$ value
5 p	397	460	13.7	0.050*
	245	310	21.0	0.000903*
10 p	373	410	9.02	0.0305*
	381	435	12.4	0.0709
	464	504	7.74	0.177
20 p	284	341	16.7	0.0350*
	260	310	16.5	0.00807*

\*cases with  $p \leq 0.05$ , which are considered statistically significant.

#### 4. Suggestions on further investigation

The induction of radioadaptive response depends on the magnitude of priming dose. Matsumoto et al. [2] reported that the priming dose range should be around 0.01-0.2 Gy using low-LET radiation, while Sorensen et al. [3] and Sasaki et al [4] suggested the priming dose limit to be usually less than 0.1 Gy in mammalian cells. As such, to find out the priming dose window that could efficiently induced the radioadaptive response by using proton as priming exposure would be of great interest.

#### Reference

- [1] Ito M, *et al* (2007) Low dose whole body irradiation induced radioadaptive response in C57BL/6 mice. J Radiat Res 48: 455-460.
- [2] Matsumoto H, *et al* (2007) Vanguard of paradigm shift in radiation biology: radiation-induced adaptive and bystander responses. J Radiat Res 48: 97-106.
- [3] Sorensen K.J., *et al* (2002) Adaptive response induction and variation in human lymphoblastoid cell lines. Mutation Res 510: 15-24.
- [4] Sasaki M.S., *et al* (2002) DNA damage response pathway in radioadaptive response. Mutation Res 504: 101-118.

## **Bystander effect of proton beam irradiated human lung cancer cells with counterpart normal cells**

**Badri N. Pandey**<sup>1</sup>, **Teruaki Konishi**<sup>2</sup>, **Masakazu Oikawa** and **N. Yasuda**<sup>2</sup>

1)Radiation Biology & Health Sciences Division, Bhabha Atomic Research Centre, Mumbai, India, 2)Department of Technical Support & Development, Fundamental Technology Centre, NIRS, Chiba, Japan

### **INTRODUCTION**

Particle therapy is an emerging and promising mode for cancer radiotherapy due to their superb biological effectiveness and dose controllability compared to photon beams. Application of proton and carbon ions based radiotherapy has been in practice for clinical application for many of cancer types including lung carcinoma [1]. However, limited knowledge exists in literature about side effects and radiation risk associated with charged particle therapy [2].

Radiation induced bystander effect, which shows manifestation of radiation effects in cells not directly hit by radiation, is one of the frontier research areas in radiation biology. Studies have shown that irradiation of tumor cells result in release/generation of interleukins (IL-6, IL-8), transforming growth factor- $\beta$ 1, tumor necrosis factor alpha, reactive oxygen/nitrogen species etc [3], which may result in bystander response to neighboring cells. Bystander effect from irradiated tumor cells to non-irradiated neighboring (bystander) normal cells at tissue/organ level may contribute significantly in acute and long term adverse health effects of radiation, and, hence, might have significant relevance in clinical outcome of cancer radiotherapy.

Hence, this research project was aimed to investigate bystander effect of proton beam irradiated lung cancer cells with normal cells using suitable biological endpoints.

### **MATERIALS AND METHODS**

Human Lung Carcinoma (A549) and Normal Human Lung Fibroblasts (WI38) cell lines were cultured in Dulbacco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture (F-12 HAM) supplemented with 10 % fetal calf serum and antibiotics. Cells were cultured overnight at required density over specially designed irradiation dishes with mylar film (2.5  $\mu$ m) at bottom [4]. Before irradiation, cells were labeled with Hoechst 33342 (2.5  $\mu$ g/ml). Cells were subjected to Proton Microbeam Irradiation (3.4 MeV; 3.37 MeV at target; 10-500 protons/cell) using SPICE at NIRS. Respective sham-irradiated controls were kept for A549 and WI38 cells labeled with Hoechst 33258. Control and irradiated cells were subjected to estimation of (a) DNA double strand breaks (DSBs) by  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX foci immunocytochemistry method [4]. Experiments were designed to evaluate effects in directly or bystander cells after proton irradiation. Whenever required, intensity/area of images was analyzed using Image J software (version 1.42I, National Institutes of Health, USA).

### **RESULTS**

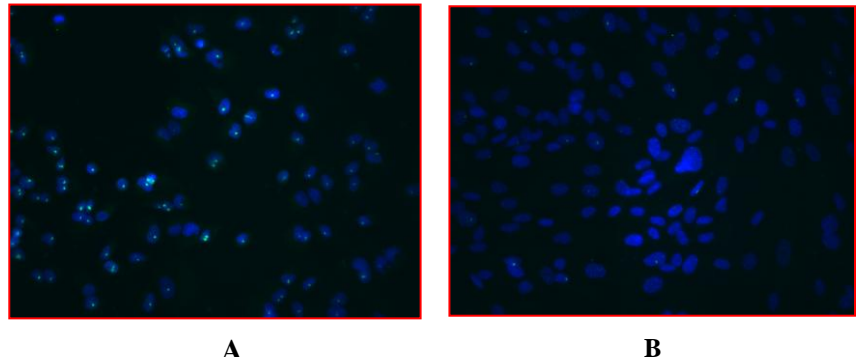
**DNA damage in A549 and WI38 cells after different number of proton:** A549 or WI38 cells were irradiated with increasing number of protons (10-200 protons/cell) followed by measurement of  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX foci after 30 min. In A549  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX foci were observed in cells irradiated  $\geq$ 50 protons/cell. However, in WI38 cells  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX foci were observed after 200 protons/cell irradiation (Fig. 1). These results suggest that compared to A549 higher number of protons are required to detect proton microbeam induced DSBs by  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX foci in WI38.

**Repair kinetics in proton microbeam irradiated A549 and WI38 Cells:** Repair kinetics of proton microbeam (200 protons/cell) induced DSBs was evaluated in human normal lung and tumor cells by measurement of  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX foci after 30 min, 3, 8 and 24 h after irradiation. A549 cells showed very slow repair kinetics up to 3 h, however, the DSBs was significantly repaired at 8 h. However, it was interesting to observe that cells incubated for 24 h showed higher  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX foci. Repair kinetics of DSBs induced by proton microbeam was faster in WI38 than A549 cells and a significant repair was

observed at period longer than 1 h. A similar pattern of repair kinetics was observed when images were analyzed for  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX intensity.

**Bystander effect in proton microbeam irradiated A549 Cells:** To evaluate the bystander effect in proton irradiated A549,  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX foci were analyzed in cells from irradiated as well as non-irradiated areas of irradiation dish. Hence, in addition to acquisition of individual images for  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX foci, intensity of  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX in non-irradiated (bystander) areas was also compared with irradiated areas. No significant  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX foci was observed in bystander cells at 30 min, however, when the results were analyzed for 24 h, foci was also observed in bystander cells. When images were analyzed for  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX intensity, a pattern was observed in irradiated and bystander areas similar to foci.

**Fig. 1:** Magnitude of DNA damage in A549 (A) and WI38 (B) cells after irradiation with proton microbeam (200 protons/cell) using  $\gamma$ H<sub>2</sub>AX method. The green foci in nuclei show sites/magnitude of DSBs. These results show that magnitude of DSBs is higher in A549 cells than WI38, which may be associated with repair kinetics of cells or geometry of nucleus.



## CONCLUSIONS

The project provided many novel and exciting observations, which in future need to be substantiated at basic understanding and mechanism level. Moreover, the project opens new avenues for conducting bystander experiments using microbeam irradiation relevant to cancer radiotherapy.

## REFERENCES

1. Durante, M., Loeffler, J.S., Charged particles in radiation oncology. Nature Reviews Clinical Oncology, 7, 37- 43 (2010).
2. Fokas, E., Kraft, G., An, H., and Engenhardt-Cabillic, R., Ion beam radiobiology and cancer: time to update ourselves. Biochimica Biophysica Acta, 1796, 216-229 (2009).
3. Shareef, M.M., Cui, N., Burikhanov, R., Gupta, S., Satishkumar, S., Shajahan, S., Mohiuddin, M., Rangnekar, V.M., and Ahmed, M.M., Role of tumor necrosis factor-alpha and TRAIL in high-dose radiation-induced bystander signaling in lung adenocarcinoma. Cancer Research, 67: 11811-11820 (2007).
4. Konishi, T., Ishikawa, T., Iso, H., Yasuda, N., Oikawa, M., Higuchi, Y., Kato, T., Hafer, K., Kodama, K., Hamano, T., Suya, N. and Imaseki H. , Biological studies using mammalian cell lines and the current status of the microbeam irradiation system, SPICE. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 267, 2171-2175 (2009).

《平成 23 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](mailto: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 23 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. 6** 2012 年 2 月発行

---

印刷 株式会社 エイ・エフ・エイ

©2011 独立行政法人 放射線医学総合研究所

Printed in Japan

ISBN 978-4-938987-74-9

NIRS-M-247





<http://www.nirs.go.jp>