

ISBN 978-4-938987-89-3

NIRS-M-268

平成 25 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 8, March 2014

独立行政法人 放射線医学総合研究所

はじめに

主として平成 24 年度の成果をまとめた技術報告書第 8 報をお届けします。簡単に報告書の内容について触れます。平成 23 年度は東日本大震災によって大きな被害を受けた静電加速器施設と中性子照射施設の修理を行いました。1 年をかけた修理が無事完了し、平成 24 年度から多くの研究者、技術者の方々の使用が可能になりました。それを受けて本報告書では両施設の現状をまとめ、皆様に情報を提供します。また静電加速器を利用したマイクロビーム細胞照射関連では試料調整方法の紹介があります。共同実験機器については多くのユーザの方に利用いただいているフローサイトメトリー装置を活用した SP 細胞（天然の幹細胞的性質を持った細胞）について報告をします。実験動物系では 2 件の報告があります。受精卵に関する研究成果とサルの 30 年間に及ぶ検疫のデータについてです。計 6 件のテーマをビジュアルに提供しますのでご一読ください。

平成 25 年度は文部科学省の「先端研究基盤共用・プラットフォーム促進事業」に採択されました。産学連携を主軸に静電加速器施設、中性子照射施設、放射線照射装置群の共用化を一層進めてまいります。その成果を本報告書で紹介できることを願っています。今後とも皆様のご支援をお願い申し上げます。

平成 25 年 11 月 1 日

研究基盤センター
研究基盤技術部長

白川 芳幸

放射線医学総合研究所 技術報告書 Vol. 8

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 **FACSAria 搭載 405nm 半導体レーザーを用いた SP 細胞確認法について** p1-p13
**Optimization of FACS Aria for Side Population cells analysis using the
405 nm Violet semiconductor laser**

前田 武^{1)*}、塩見 尚子¹⁾、高野 裕之^{1,2)}、児玉 久美子¹⁾、
高萩 真彦³⁾、中村 悦子⁴⁾、下川 卓志⁴⁾、小西 輝昭¹⁾

- 1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 放射線発生装置技術開発課
- 2) 東京ニュークリア・サービス(株)
- 3) 福島復興支援本部環境動態・影響プロジェクト
- 4) 重粒子医科学センター先端粒子線生物研究プログラム転移機構解析研究チーム

- 2 **性成熟前から性成熟の期間における C57BL/6J 卵子の受精・発生能の比較** p14-p23
**Comparison of Developmental Competence of *In Vitro* Fertilized Embryos
Obtained from Prepubertal to Pubertal C57BL/6J mice of Various Ages**

鬼頭 靖司^{1)*}、太田 有紀²⁾、和田 彩子²⁾、伊林 恵美²⁾、
林 真美¹⁾、矢野 浩子¹⁾、塚本 智史¹⁾

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

- 3 放医研マイクロビーム細胞照射装置 SPICE 専用細胞皿の作成方法 p24-p33
Preparation of cell dishes for studies using a Single-Particle Irradiation system to CElls(SPICE).

小林 亜利紗^{1)*}、山縣 徳嗣¹⁾、須藤 和美¹⁾、ウォーレン 圭子²⁾、
小西 輝昭^{1,2)}

- 1) 研究基盤センター先端研究基盤共用推進室
- 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

- 4 放医研に導入されたマカク属サルの 30 年間の検疫データについて p34- p42
—血液・血清生化学データを中心に—
Quarantine inspection Data of Macaque monkeys introduced for over 33 years in NIRS
-Blood and Serum Chemistry Data-

重兼 弘法^{1)*}、小久保 年章¹⁾、松下 悟²⁾

- 1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課
- 2) 人材育成センター 教務室

- 5 中性子線照射装置(NASBEE)の現状 2013 P43- p49
Present status of the neutron exposure accelerator for biological effects experiments at NIRS 2013

酢屋 徳啓^{1)*}、須田 充¹⁾、萩原 拓也²⁾、白川 芳幸¹⁾

- 1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 放射線発生装置技術開発課
- 2) 株式会社ネオス・テック

- 6 平成 24 年度 静電加速器棟 (PASTA&SPICE) の現状報告 P50-p54
**Progress report of NIRS electrostatic accelerator facility (PASTA & SPICE)
at FY2012**

及川 将一*、酢屋 徳啓、石川 剛弘、小西 輝昭、
磯 浩之、樋口 有一、松田 拓也、白川 芳幸

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

投稿規定&投稿サンプル (Author instruction)

FACSAria 搭載 405nm 半導体レーザーを用いた SP 細胞確認法について
Optimization of FACS Aria for Side Population cells analysis using the 405 nm Violet semiconductor laser

前田 武^{*1}、塩見 尚子¹、高野 裕之²、児玉 久美子¹、
高萩 真彦³、中村 悦子⁴、下川 卓志⁴、小西 輝昭¹

Takeshi Maeda^{1*}, Naoko Shiomi¹, Hiroyuki Takano^{1,2}, Kumiko Kodama¹,
Masahiko Takahagi³, Etsuko Nakamura⁴, Takashi Shimokawa⁴, Teruaki Konishi¹

- 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 福島復興支援本部環境動態・影響プロジェクト
- 4 重粒子医科学センター先端粒子線生物研究プログラム転移機構解析研究チーム

Abstract

Side population (SP) analysis has become an important method for defining the stem cell-related studies. Particularly, this method has a unique advantage in the detection of stem cells and in their physical isolation by fluorescence-activated cell sorting (FACS). SP cells are generally detected using ultraviolet excitation based on the fluorescence of Hoechst 33342. However, the protocol is difficult for most investigators to perform because the steps for setting the right experimental and acquisition conditions are complex and multiple and extensive expertise is required in flow cytometry for the accurate detection of SP events.

In this study, we described a technical parameter for the detection of SP cells using FACS Aria, which is a Joint Use facility and an equipment of NIRS. This FACS Aria is not equipped with a UV laser unit, instead a semiconductor violet laser unit is available for Hoechst 33342 and other fluorescence used for live cell staining. Details regarding optimization of parameter setting and analysis are shown.

Keywords: FACS、フローサイトメトリー、SP、Side Population Cells、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

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傾向試薬である Hoechst を用いたソーティングについて検討を行った。更に、同技法 Vol.6 (2012) P39- P50 で試料を多重蛍光染色時に蛍光補正を行う方法について紹介した。

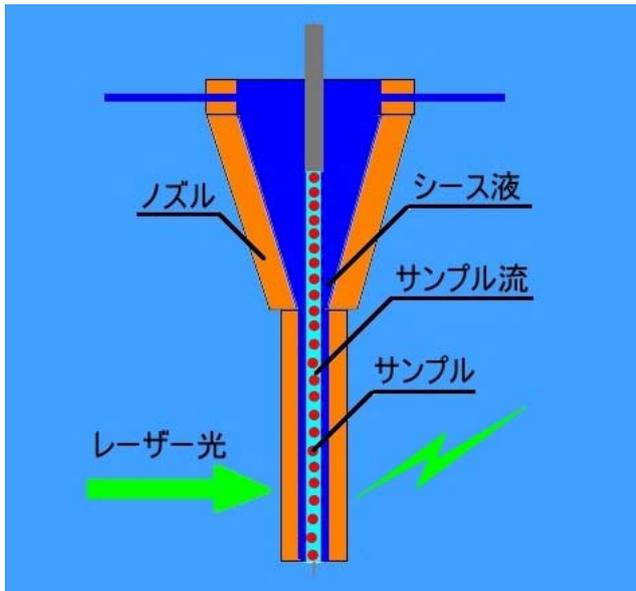


図 1 シース液と共に流れてきたサンプルにレーザーを直交させ、それにより励起された蛍光を検出器で検出する。(文献[5]より改変)

それらの中で、「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の取得(図 2)はもとより、レーザーにより励起された蛍光波長が BPF(Band Pass Filter)を通し検出器で検出され(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。

つまり、搭載レーザーで励起可能であり、蛍光波長が搭載フィルタで検出できる範囲であれば、ソーティング等を行う事が出来る事になる。

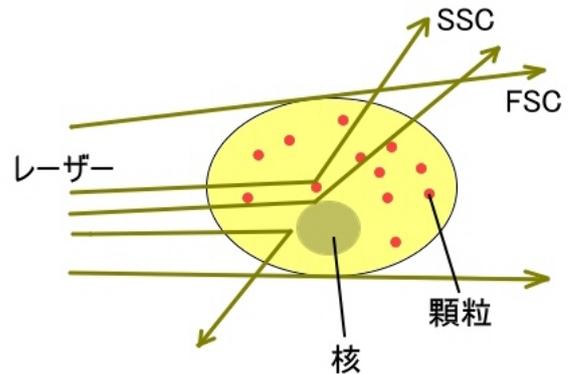


図 2 レーザー光が細胞を通過したときに発生する散乱光の経路(文献[5]より改変)

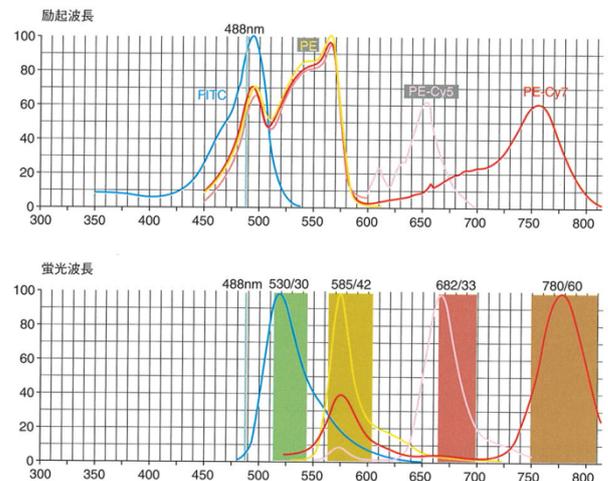


図 3 蛍光・励起波長の特徴(文献[5]より)

そこで、今回は通常 UV レーザーと Hoechst 染色した細胞試料を用いて行う SP 細胞(Side Population Cells)の検出を、搭載されている 405 nm Violet 半導体レーザー(図 4)と蛍光試薬の DyeCycle Violet を用いて SP 細胞検出を試みた。

SP 細胞は、Hoechst Red と Hoechst Blue を縦軸と横軸に取ってドットプロットとして表現するが、この Hoechst Red は Violet の検出器 A(530/30BPF 502LPF (LPF: Long Pass Filter))に該当し、Hoechst Blue は Violet の検出器 B(450/40 BPF)に該当する。この、Hoechst Red と Hoechst Blue は DCV Red と DCV Blue に相当する。

ソーティングに先立ち、全体の 0.1%~0.4% 程度しか含まれていない SP 細胞を高速かつ正確に回収するにあたり必要となる、Flow Rate を変化させたときのダメージや時間経過によるダメージ等の確認を行った。

なお、DyeCycle Violet を用いた理由は 405nm の Violet Laser で、Hoechst よりも明るく見えるが、試料に対する挙動は類似しているためである。(図 5)

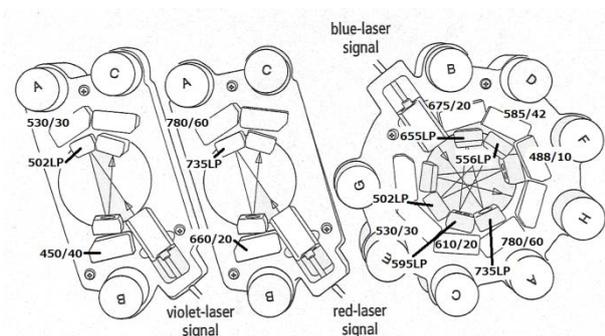


図 4 放医研 FACS Aria Default Filter Position
左から、Violet(405 nm 半導体レーザー)、Red(633 nm HeNe レーザー)、Blue(488 nm 半導体レーザー)が入射され、BPF で絞られる。

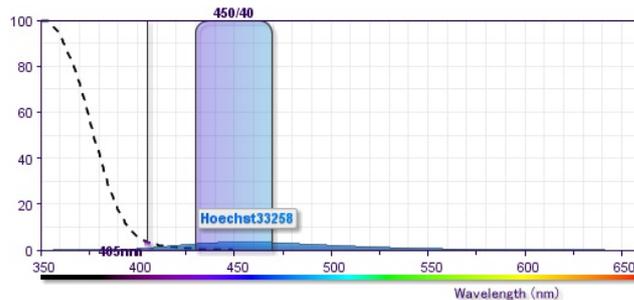
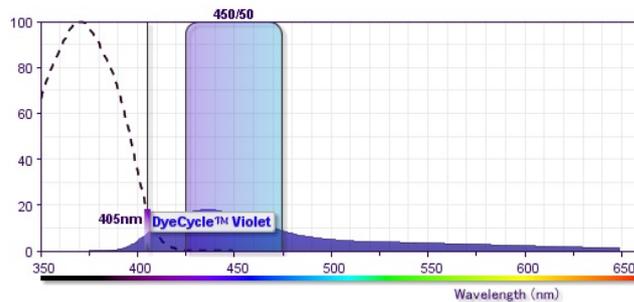


図 5 405nm レーザーで励起させたとき DyeCycle Violet の方が Hoechst より明るく検出される。

2. 実験手順

- (1) 微量の SP 細胞(Side Population Cells)を分取するにあたり、Flow Rate の変化が回収に与える時間的影響。
- (2) Flow Rate を 1~11 の範囲で変化させることによる、細胞への影響。
- (3) Flow Rate を変えることによる、精度への影響。
- (4) Hoechst 試薬と DyeCycle Violet 試薬との比較。
- (5) 構成フィルタの組み合わせについて。

2.1 実験準備

- ① 70 μ Nozzle と 100 μ Nozzle を用いる。それらの組み合わせは以下の通りとした。
 - a. 70 μ Nozzle High
 - b. 70 μ Nozzle Medium
 - c. 100 μ Nozzle Low
- ② 細胞サンプルに DyeCycle Violet を最終濃度が 5 μ M になるよう 1×10^6 cells/mL に対し添加し、40-50 分

間 37°Cでインキュベーションして染色。

- ③ ②のサンプルに Verapamil を最終濃度が 25-30 μ M になるよう 1×10^6 cells/mL に対し添加し、50-60 分間 37°Cでインキュベーション。
- ④ ③のサンプルに PI (Propidium Iodide) を最終濃度が 1.5 μ M になるよう 1×10^6 cells/mL に対し測定直前に添加。
- ⑤ フィルタの組み合わせについては、表 1 の様に行い変化を観察した。

表 1 適正なフィルタ組合せの観察

検出器 A (Hoechst Red / DCV Red)		
	Band Pass Filter	Long Pass Filter
(1)	530/30	502
(2)	585/42	580
(3)	610/20	580
(4)	675/20	502
(5)	675/20	580
(6)	695/40	580

2.1.1 器具・装置

- ・ BD Falcon REF 353003 細胞培養ディッシュ
- ・ BD Falcon 2070 50mL ポリエチレン・コンニカル・チューブ
- ・ BD Falcon REF 352095 15mL ポリエチレン・コンニカル・チューブ
- ・ BD 社 FACS Aria

2.1.2 試薬・サンプル

- ・ PI (Propidium Iodide) : Molecular Probes
- ・ Hoechst33342 : Molecular Probes
- ・ Hoechst33258 : Dojindo
- ・ Hoechst34580 : invitrogen+ DMSO : 和光
- ・ DyeCycle Violet : invitrogen
- ・ PHOSPHATE BUFFERED SALINE D8537 : SIGMA
- ・ MEDIUM D8062 : SIGMA+ penicillin 11ml+ FBS 55ml
- ・ 0.05% Trypsin-EDTA : invitrogen
- ・ Verapamil hydrochloride :
- ・ Fumitremorgin C
- ・ MCF7(ATCC-HTB-22)
- ・ HeLa(ATCC-CCL-2)

2.1.3 設定

- ・ Nozzle : 100 μ
- ・ Stream Speed : Low
- ・ Flow Rate : 1.0
- ・ FSC ND Filter Assembly : 2.0

2.2 レーザーとフィルタの組み合わせ

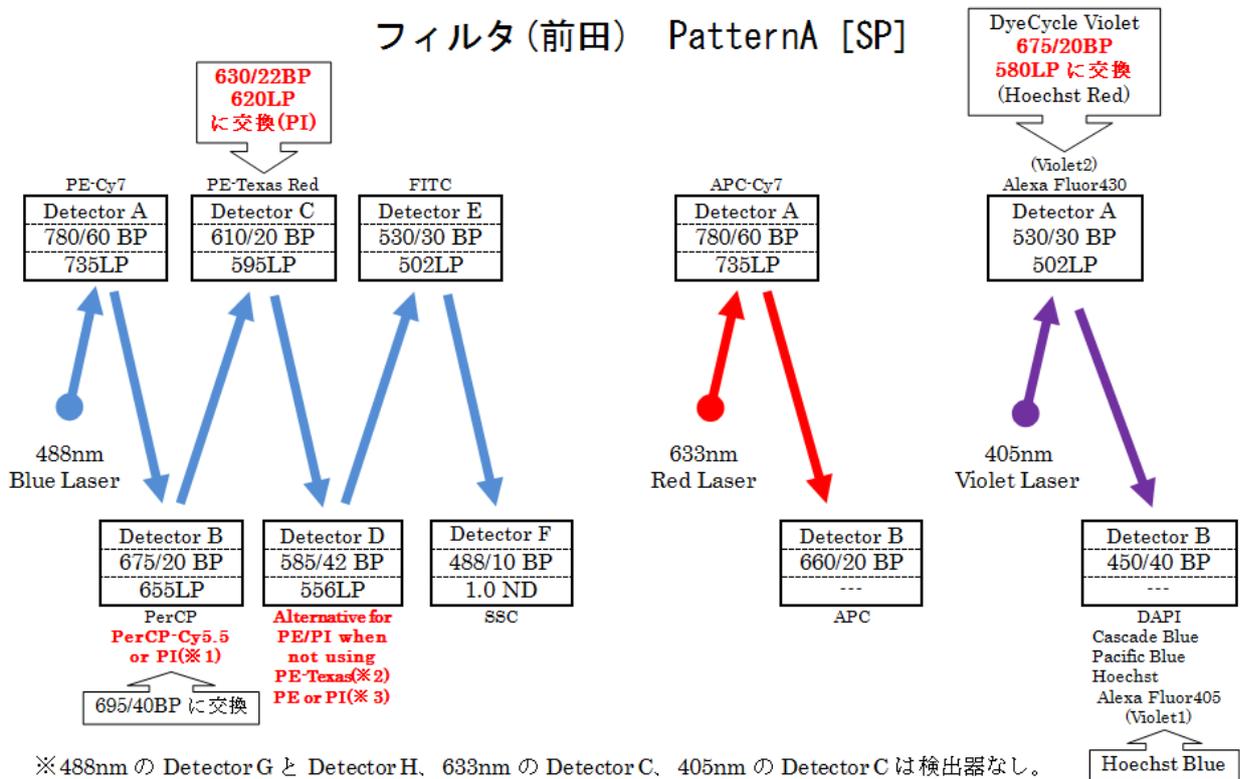


図6 レーザーとフィルタの組み合わせ。 Violetは何パターンか行った

2.3 蛍光試薬の蛍光・励起波長

A) Propidium iodide (PI)

励起波長：536nm

蛍光波長：617nm

B) Hoechst 33342

励起波長：350nm

蛍光波長：461nm

C) Hoechst33258

励起波長：352nm

蛍光波長：461nm

D) Hoechst34580

励起波長：392nm

蛍光波長：440nm

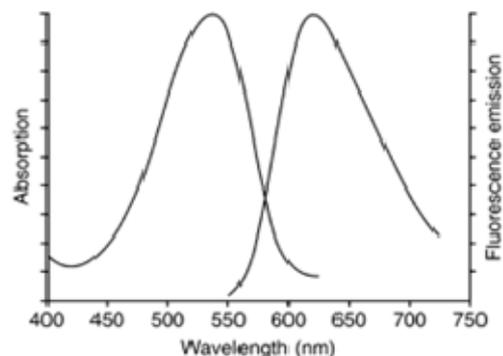


図5-1 Propidium iodide (PI)の励起波長と蛍光波長(文献[15]より引用)

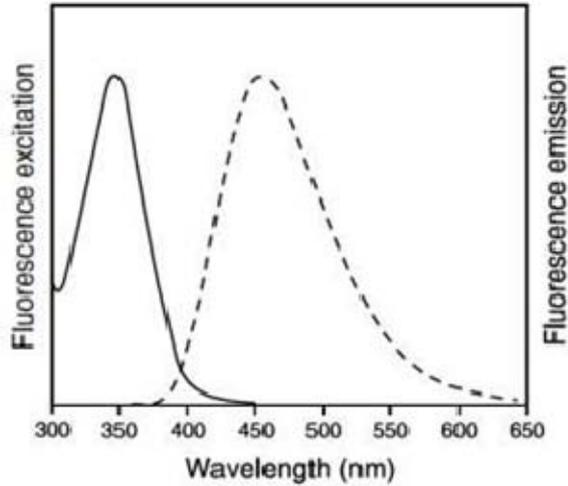


図5-2 Hoechst33258 の励起波長と蛍光波長
(文献[16]より引用)

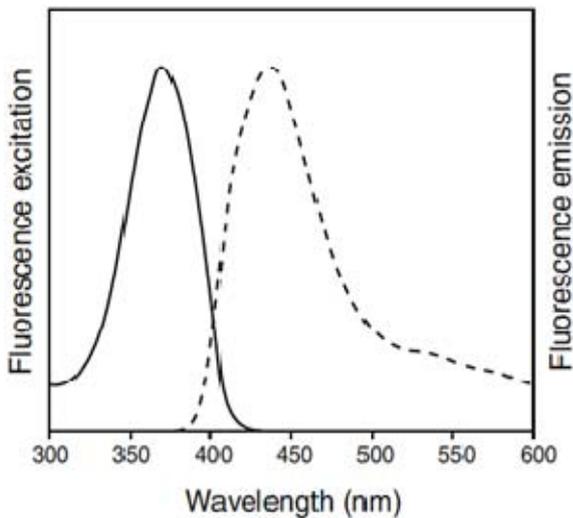


図 5-3 Hoechst34580 の励起波長と蛍光波長
(文献[16]より引用)

次に Sheath Pressure を Medium に変更し、同様にサンプルの回収時間を計測。最後に、Nozzle を 100 μ に取り替えて Sheath Pressure を Low に設定し、同様にサンプルを回収して時間を計測した。



図6 FACS Aria に搭載されているFilter。左から、Violet、Red、Blue レーザーが入射される。表1 から、A)は488nm 半導体レーザーの585/42 フィルタ、B) C) D)は407nm 半導体レーザーの450/40フィルタ(Violet1)で観察する。

3. 実験・検証

実験(1) - 微量の SP 細胞(Side Population Cells)を分取するにあたり、Flow Rate の変化が回収に与える時間的影響-

準備した PI のみで染色された 1.2×10^6 個/mL の細胞サンプルを用いて、70 μ Nozzle で Sheath Pressure を High に設定し、Flow Rate を 1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 と変化させ、 1.2×10^5 個をソーティングしチューブに回収する時間を計測した。

その結果、図7の様な傾向が見られた。このことから、Flow Rate を 5 以上に設定しても顕著な時間変化は見られないことが分かった。

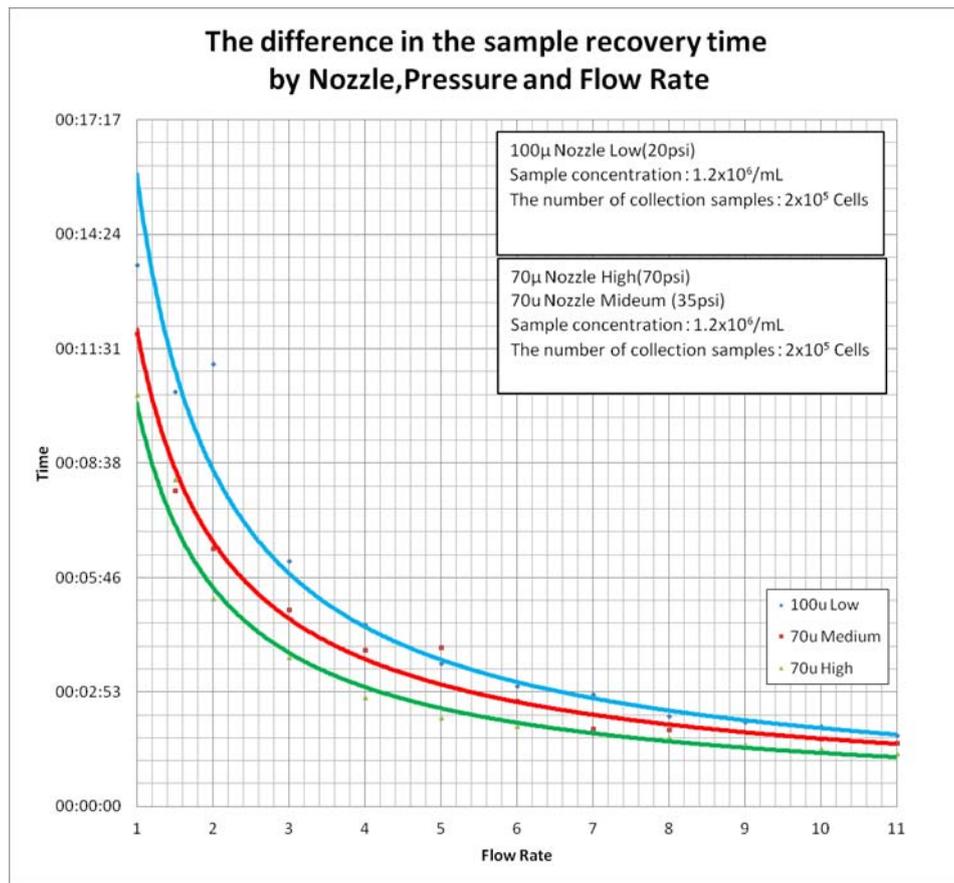


図7 70µ、100µのNozzleを用いてそれぞれの条件の時にソーティングに要した時間変化。Flow Rate1~5の間の時間変化は大きいですが、それ以降は余り変わらない。

実験(2) -Flow Rateを1~11の範囲で変化させることによる、細胞への影響-

実験(1)で回収した細胞をFACSAriaに取り込みその生存率を調べた。

結果、Flow Rateが上がるほど細胞へのダメージがある傾向が見られた。

100µ Lowでの場合、Flow Rate値が最大の11の場合、20%程度Sorting前のサンプルより生存率が悪かった。また、この結果は回収後コロニーをカウントした値とほぼ同程度であった。

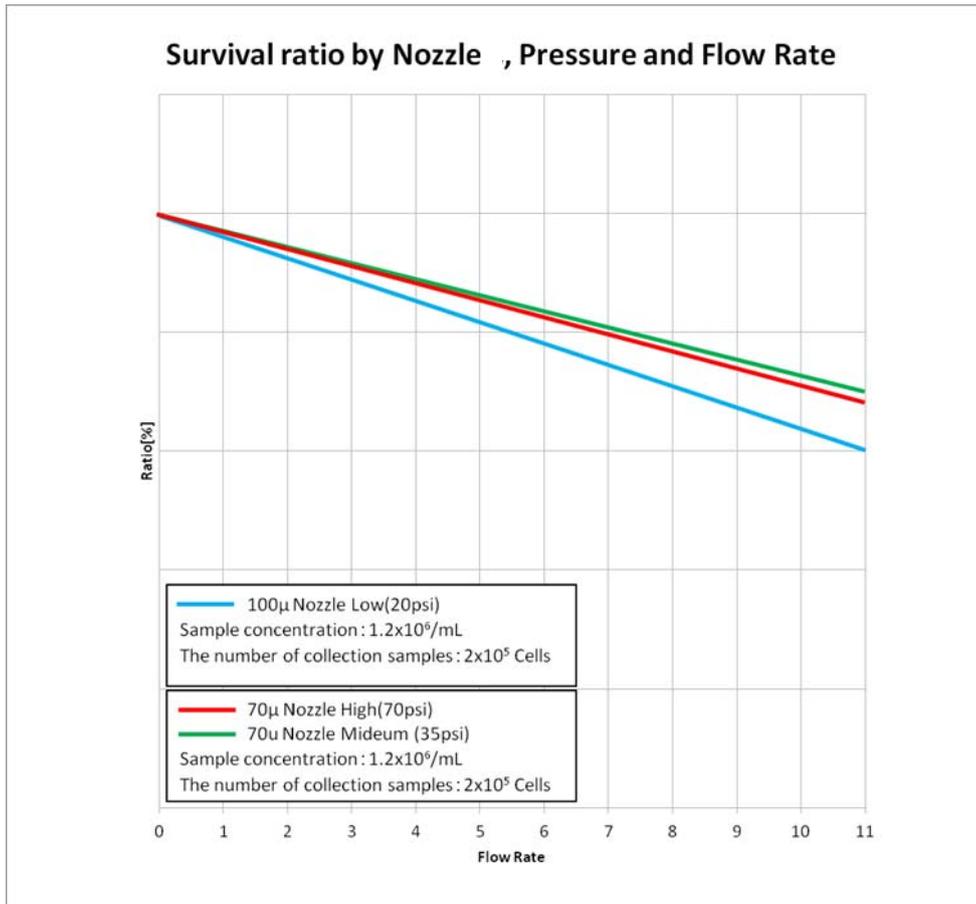


図8 Flow Rate の変化と細胞生存率の関係。Flow Rate が高くなると生存率は悪くなる傾向が見られる。

実験(3) –Flow Rate を変えることによる、精度への影響–

次に Flow Rate を変化させた場合、精度に対してどのような影響があるかを確認した。

FACSAria の User's Guide P49 には Flow Rate が大きくなるとサンプルが通過する経路が太くなり、サンプルの整列状態が崩れることが書かれている(図9)。

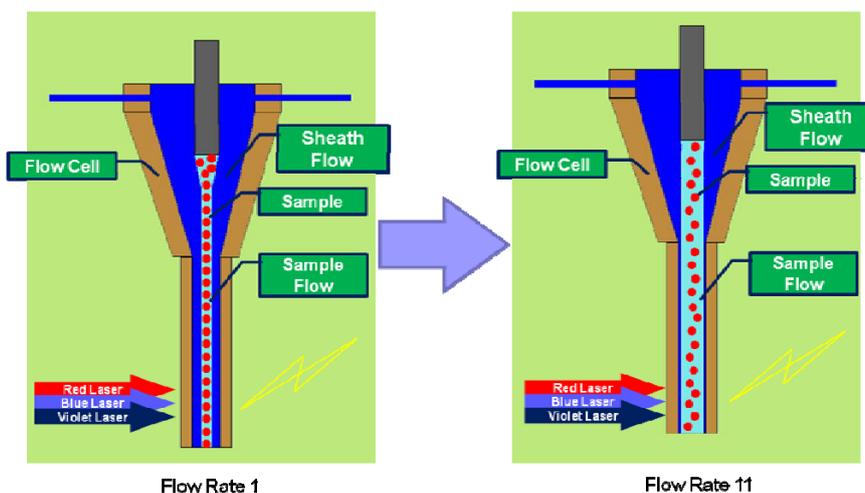


図9 Flow Rate を上げると経路が太くなる。

校正用の Beads を用いてデータを取ったところ、図 10 のように CV 値が大きくなり、ピークにばらつきが生じた。

各 Flow Rate で CV 値を取ってみると図 11 の様になり、Flow Rate が大きくなると、サ

ンプルの整列状態が崩れ CV 値が大きくなる。即ち、精度が悪くなっていることを意味している。

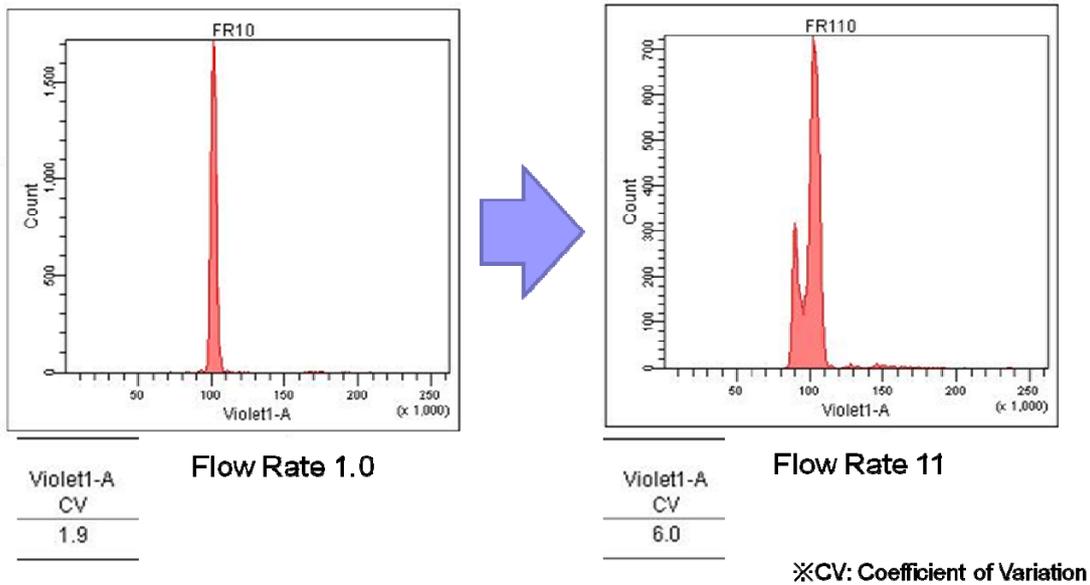


図 10 QC 用の Rainbow Beads を用いて Flow Rate の変化による CV 値を比較した。Flow Rate が大きくなると CV 値が悪くなり精度が落ちている事が分かる。

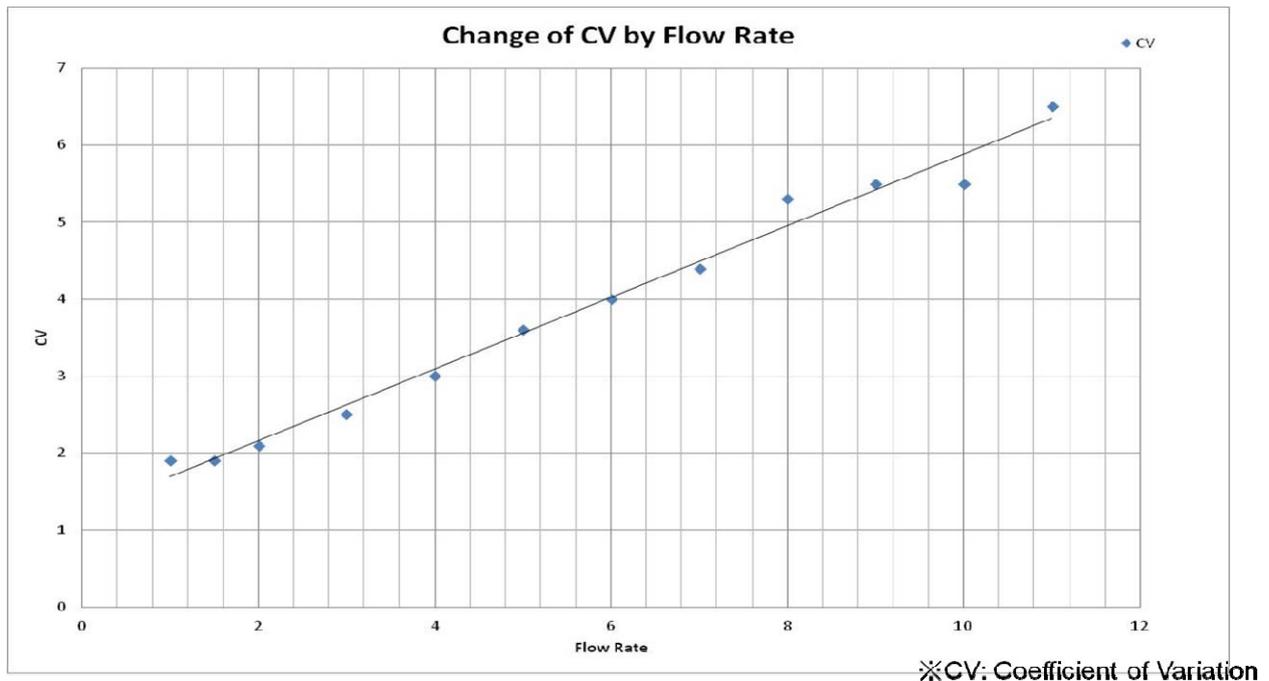


図 11 精度を示す CV 値(Coefficient of Variation/変動係数)が Flow Rate を大きくすると悪くなる。結果として、Flow Rate1-3 の範囲で用いるのが細胞へのダメージ等を考慮しても良さそうである。

実験(4) - Hoechst 試薬と DyeCycle Violet 試薬との比較 -

Violet Laser を用いた Hoechst 検出については、『平成 23 年度第 6 回技術と安全の報告会』で報告した。ここでは、Hoechst とほ

ぼ同程度の性能を有する DyeCycle Violet を比較してみた。ヒストグラムを並べてみると DyeCycle Violet が最も明るく見えている事が分かる。

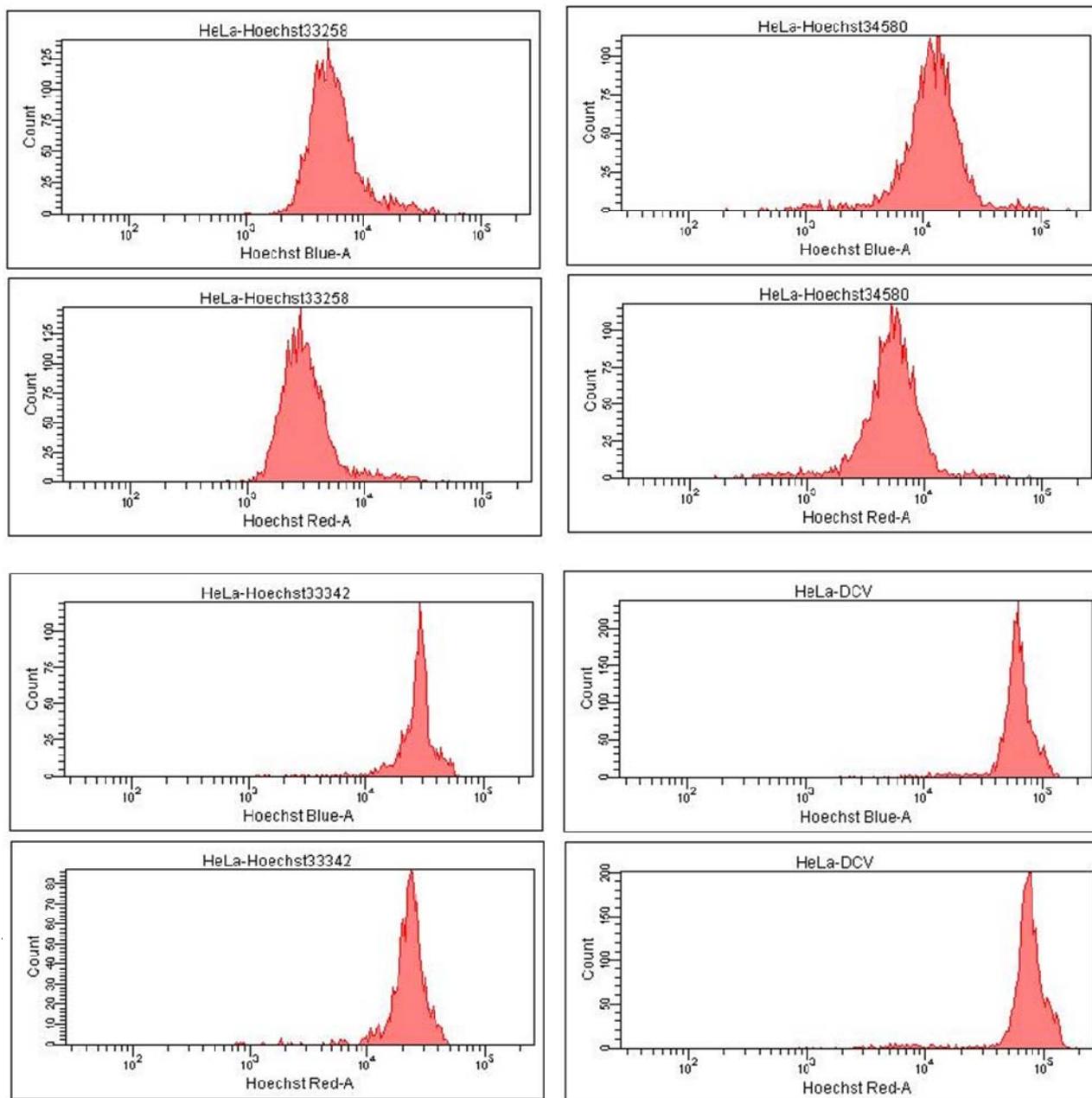


図 12 Hoechst と DyeCycle Violet とのヒストグラム。上段左が Hoechst33258、右が Hoechst34580、下段左が Hoechst33342、右が DyeCycle Violet

実験(5) –構成フィルタの組み合わせについて–

405nm Violet Laser は2つの検出器で蛍光波長を検出出来るようになっている。標準では、Violet1(B 検出器)には 450/40 の BPF が、Violet2(A 検出器)には 530/30 の BPF と 502 の LPF が装着されている。

SP細胞をドットプロットに展開する場合、横軸に Hoechst Red、縦軸に Hoechst Blue をとるのが一般的である。

Hoechst Blue は UV での励起波長が 450nm 程度であるので B 検出器の 450/40BPF を用いるが、Hoechst Red については標準で挿入されている BPF および LPF では検出が困難であるため、入れ替える。表 1 に従って入れ替え、最も観察しやすい組合せを確認した。

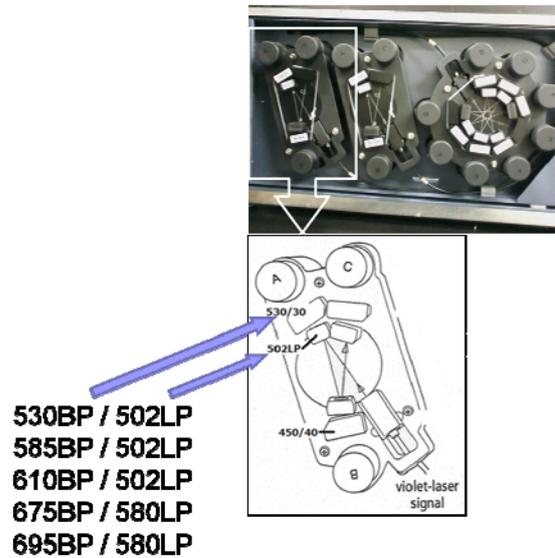


図 13 Violet Laser フィルタ交換位置

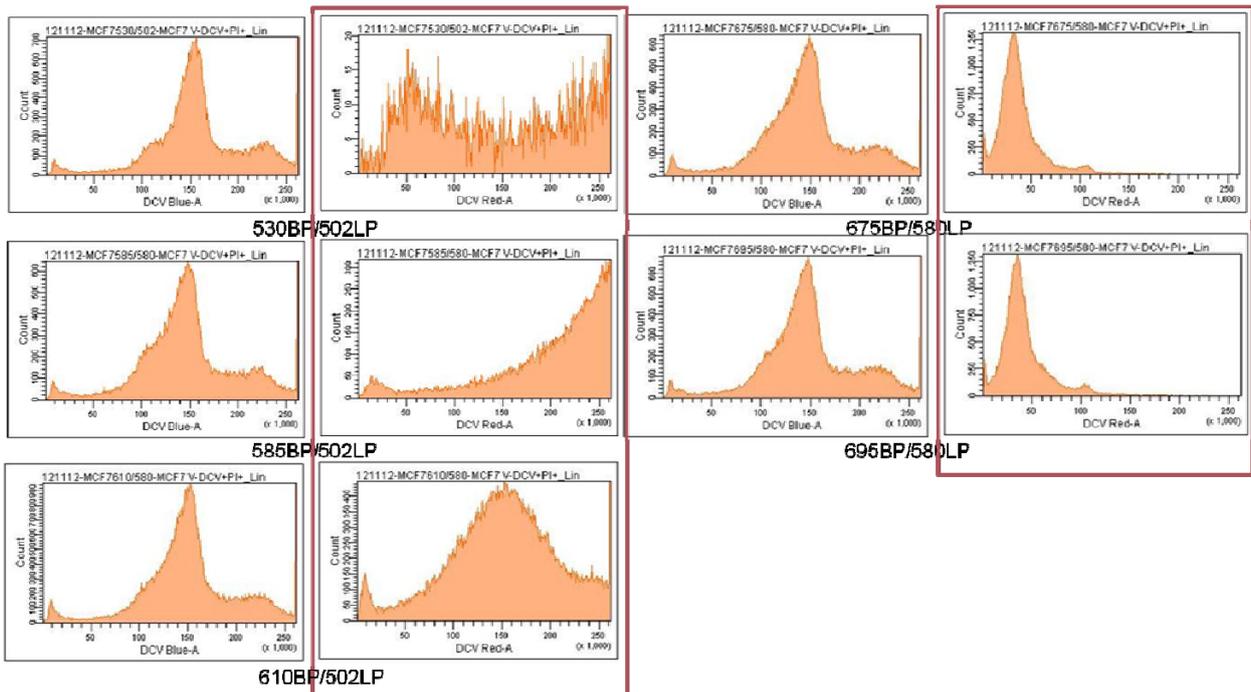


図 14 フィルタを組み替えた後のヒストグラム。675BPF/580LPF と 695BPF/580LPF の組合せでピークが観察出来た。

5. まとめ

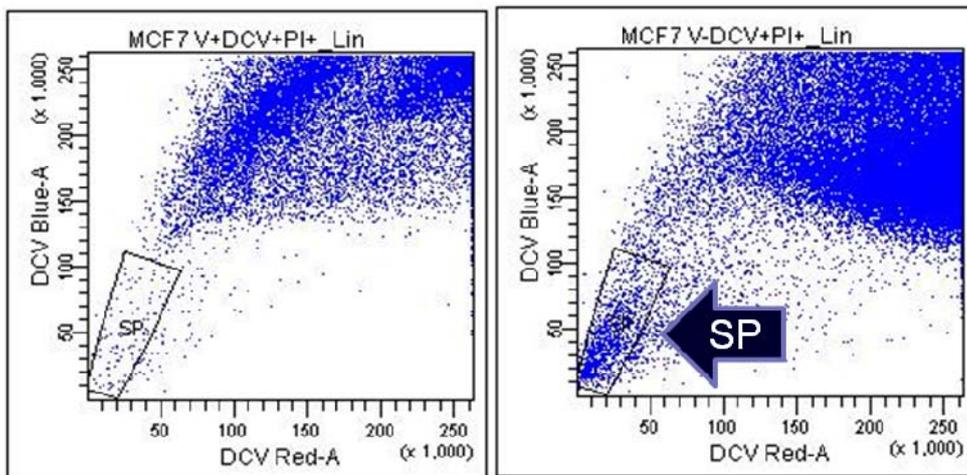
検討の結果、Flow Rate を上げることにより、サンプルが流れる量は増え、ソーティング時の分取細胞数は一見増えるように見えるが、上げすぎる事により、サンプルにダメージな

どの悪影響を与えるため、回収後の培養等に支障が出るだけでなく、Sorting の精度にも影響を与えるため、回収されたサンプルに目的以外の細胞などが混ざり込む可能性がある。よって、Flow Rate 1-3 の範囲で用いるのが

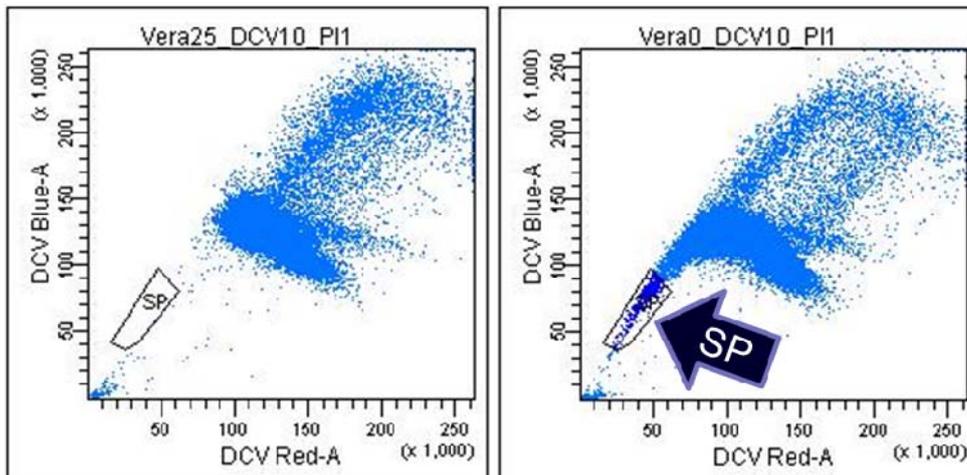
ダメージや精度を考慮すると良さそうである。

FACSAria で UV レーザーを使用せず、405nm Violet Laser を用いて観察するためには、Hoechst よりも明るい DyeCycle Violet で細胞を染色すれば可能であり、Hoechst Red を検出するため、BPF 及び LPF を適切な組合せに入れ換えた。その結果、サンプルを Hoechst Blue vs Hoechst Red のドットプロットに展開したところ、UV を用いることなく、波長域

の異なる Violet Laser でも SP 細胞を観察できることが確認できた(図 15)。



MCF7 cellsを用いたSPの観察



Mouse Bone Marrow cellsを用いたSPの観察

図 15 Violet Laser と DyeCycle Violet を用いて行った SP 観察

6. 謝辞

実際の細胞で SP 細胞を BD FACSAria で確認できるかを試すにあたり、貴重な試料である細胞を分けて頂いた、放射線防護研究センターリスク低減化研究プログラムの根井充プログラムリーダー並びに放射線防護研究センターリスク低減化研究プログラムリスク修飾要因研究チームの Guillaume Vares 研究員にこの場を借りてお礼を申し上げます。

7. 参考文献

- [1] 前田 武、小西 輝昭、高野 裕之、児玉 久美子、Kurt Hafer, FACSAria 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 FACSAria 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 FACSAria 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・ディッキンソン株式会社”,BD FACSAria Training Manual
- [7] BD, ”日本ベクトン・ディッキンソン株式会社”,BD Fluorescence Spectrum

Viewer A Multicolor Tool,

http://www.bdbiosciences.com/research/multicolor/spectrum_viewer/index.jsp

- [8] 前田 武、小西 輝昭、塩見 尚子、高野 裕之、児玉 久美子, 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,放射線医学総合研究所技術報告書 (NIRS Technology) 6 (2012) 39-50. ISBN 978-4-938987-74-9
- [14] 原孝彦、岡本土毅,”日本ベクトン・ディッキンソン株式会社”,BD FACSTM Review Vo1.1, 「BD FACSAria における細胞分離：マウス造血幹細胞の SP 分離への応用」
- [15] invitrogen,”Propidium Iodide Nucleic Acid S”
- [16] invitrogen “Hoechst Stains”
- [17]William G. Telford,”Stem Cell Side Population Analysis and Sorting Using DyeCycle Violet”,Current Protocols in Cytometry 9.30.1-9.30.9,January 2010

性成熟前から性成熟の期間における C57BL/6J 卵子の受精・発生能の比較

Comparison of Developmental Competence of *In Vitro* Fertilized Embryos Obtained from Prepubertal to Pubertal C57BL/6J mice of Various Ages

鬼頭 靖司^{1*}、太田 有紀²、和田 彩子²、伊林 恵美²、
林 真美¹、矢野 浩子¹、塚本 智史¹

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

要旨

Prepubertal females have often been preferred for procuring oocytes in laboratory and domestic animals. However, oocytes from prepubertal animals are less competent to develop into fetuses than those from mature animals. In this study, we compared the developmental competence of oocytes from animals of various ages (3–6, 8, and 10 weeks old) to examine the efficiency of using prepubertal animals as oocyte donors for *in vitro* animal production, and to elucidate the age at which animals acquire full developmental competence. Oocytes from superovulated C57BL/6J females at various ages were collected and fertilized *in vitro*, and subsequent development was examined by *in vitro* culture and embryo transfer. Total numbers of ovulated oocytes reduced with age and a significantly higher percentage of morphologically normal oocytes were obtained from 3-week-olds animals (99%) than from animals of other ages ($\leq 86\%$, $P < 0.05$). No significant differences were observed in percentages of fertilization ($\geq 97\%$). Development to 2-cell and blastocyst stages *in vitro*, nuclear numbers in blastocysts and fetus development after embryo transfer on day 19 of gestation were lowest in embryos from 3-week-old animals than those from older animals. These results indicate that the quality of oocytes from juvenile mice was different and that oocytes acquired full developmental competence from 4-week-old or later.

Keywords: Juvenile mice, *in vitro* fertilization, *in vitro* development, fetus development

***Corresponding Author:**

鬼頭 靖司 (Seiji Kito)

E-mail: sk126@nirs.go.jp

1. はじめに

生殖工学及び繁殖生理学の研究においては発生能を有する正常な卵子を採取することが研究や技術開発を行う上で律速段階となっている。雄は1匹から多数 ($>1.0 \times 10^8$) の配偶子が得られるのに対して、雌からは性腺刺激ホルモンにより過排卵処理した場合でも数十個の卵子しか得ることが出来ない。また、配偶子や胚を採取するためには、動物個体が性成熟に達するまで飼育する必要があり、繁殖する上では、時間、コストおよび労力が必要となる。特に家畜を用いる場合には、実験動物として用いる齧歯類に比べ、性成熟に達するためには半年から1年待たなければならないので、育種学的な遺伝的品種改良を促進していく上で幼若個体から正常な卵子を得て世代間隔を狭めて行くことが出来ればその経済価値は大きい。一方、ヒトの臨床では、小児がんの放射線治療や薬物治療によりホルモンバランスが崩れ、卵巣内の原始卵胞が枯渇あるいは大幅に減少してしまうため、事前に卵子あるいは卵巣組織を凍結保存し、繁殖能力を維持しておく選択肢も提案されているが[1, 2]、性成熟以前のヒト由来の卵子にどれだけの発生能があるかは、倫理的な問題もあり結論が得られていない。

マウスやラットなどの実験動物齧歯類においては、繁殖世代の短縮や計画的に実験を進めるために幼若個体を用いた生殖工学技術は広範に用いられている[3]。しかし、マウスを含む哺乳類では、性成熟前の幼若個体由来の胚では染色体異常が多発すること[4-7]、卵胞発育時の卵子細胞内に形態学的な違いが見られること[8]、遺伝子の発現やメチレーション等の卵子の質の違いが見られることが知られ[8, 9]、様々な動物種において性成熟前個体由来胚の発生が有意に低い、あるいは遅延することが示されている[10, 11]。しかしながら、生殖工学の実用化に必要な週齢毎の排卵数、受精能及び発生能の比較については系統立てた報告はない。

性成熟前個体を用いて次世代の産仔が得られれば、コスト、労力及び世代間隔を抑え、効

率的な動物供給が可能となる。そのため本研究では、放射線影響研究にて最も使用されている近交系である C57BL/6J マウスを用い、受精能及び発生能を若齢 (3-6 週齢) から成熟 (8 および 10 週齢) マウスの間で比較し、性成熟前個体から得られる排卵卵子を生殖工学的手法の現場においてに実用可能かどうかを調べた。さらに性成熟前マウス由来卵子から得られた体外受精胚を凍結保存に用いることが出来るかどうかを判断するために凍結保存後の発生能についても比較した。

2. 実験方法

本研究は、放射線医学総合研究所実験動物委員会にて承認を受けて行った。

生後 3, 4, 5, 6 (性成熟前), 8 および 10 (成熟) 週齢の C57BL/6J マウス (Jax マウス) に 5 IU PMSG および 5 IU hCG を腹腔内投与し、過半卵誘起後に採卵した。また、12 週齢以上の成熟雄より精巣上体精子を採取し、1.5 時間前培養後に媒精した。体外受精は、Kito ら[12]の方法に従って行った。

媒精 6 時間後 (6hr post-insemination (PI)) に卵子を体外受精培地より回収し、総卵子数、異常卵子数、正常受精卵数 (雌雄前核及び第二極体の有無) を実体顕微鏡下で調べた。正常受精卵胚は、KSOM-AA 培地[13]に移し、16 時間培養後に 2 細胞期への発生を確認した。その後、一部の 2 細胞期胚は、媒精後 96 時間まで KSOM-AA にて体外培養し、胚盤胞期胚への発生および核数を調べ、一部は個体発生能を調べるために偽妊娠 1 日目 (膣栓形成日) の受容雌 (Jcl:MCH(ICR)) の卵管に移植し、妊娠 19 日目に帝王切開により、着床胚数及び胎仔数を数えた。

2 細胞期胚の凍結は、急速凍結法 (EFS 法[14]) を用いて行い、融解後の生存率および卵管移植後の個体発生能について調べた。

正常受精卵の率や発生率等の%で示されるデータについては、アークサイン変換 (Tukey-Freeman transformation) 後に統計解析

に供した。統計解析は、分散分析法を用いて行い、週齢間等に有意差 ($P < 0.05$) が見られた場合には、Fisher's Least Significant Difference test を用いて実験区間の比較を行った。

3. 結果

週齢毎の総排卵数、形態的な分類に基づく正常受精卵数及び異常卵子数は Table 1 に示した。正常受精卵及び形態異常卵子の例を Figure 1 に

示した。形態異常卵子は、正常受精卵 (Figure 1A) に比べて細胞の小さい卵子 (Figure 1B) と fragmentation と呼ばれる細胞質が分断した卵子 (Figure 1C) が見られた。マウス 1 匹当たりの排卵卵子数は、4 週齢雌で最も多く ($P < 0.05$)、その後 8 週齢まで有意に減少した。形態的に正常な受精卵数は 3 週齢由来卵子で最も多く、週齢が上がるにつれ形態異常卵子数が増加した。

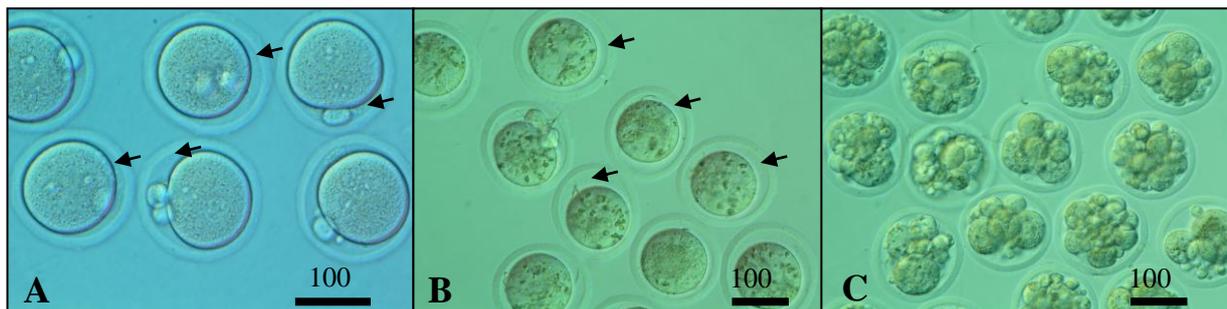


Figure 1. Representative pictures of normal ova (A), small blastomere (B) and fragmented ova (C). Note the larger peri-vitelline spaces (arrows) in ova in (B) than those of in (A).

Table 1. The numbers of ovulated ova from various ages of C57BL/6J mice and their morphological classification^a.

Age (weeks)	No. females	No. ovulated females	Total no. ova (Mean \pm MSE)	No. (% ^b \pm MSE) normal ova at 6 h PI	Abnormal ova		
					Total	Fragmentation (% ^c)	Small size (% ^c)
3	15	12	358 (30 ^{de} \pm 6)	353 (99 ^d \pm 1)	5	1 (20)	3 (60)
4	15	13	403 (31 ^d \pm 3)	324 (82 ^e \pm 5)	79	63 (80)	16 (20)
5	15	13	285 (22 ^{ef} \pm 2)	207 (76 ^{ef} \pm 5)	78	55 (71)	23 (29)
6	15	15	301 (20 ^f \pm 2)	207 (72 ^f \pm 4)	94	45 (51)	38 (40)
8	15	15	317 (21 ^{ef} \pm 2)	221 (70 ^f \pm 4)	97	77 (79)	20 (21)
10	15	14	337 (24 ^{def} \pm 3)	292 (86 ^e \pm 2)	45	14 (31)	31 (69)

^a Mice were injected with 5 iu PMSG and hCG 48h apart.

^b Percentages of total ova ovulated. Percentage data were transformed by arcsin transformation and analyzed by ANOVA.

^c Percentages of total abnormal ova.

^{d-g} Significantly different in the same column ($P < 0.05$).

媒精後 6 時間における受精及び 2 細胞期への発生を、Table 2 に示した。全ての週齢において 95% 以上の高い受精率が得られ、週齢間で有意差は見られなかった。2 細胞期への発生は、全ての週齢で 90% 以上見られたが、3 および 5 週

齢雌由来胚にて、4、6 及び 10 週齢雌由来胚より有意に低かった。

体外にて 96 時間培養した後の発生及び胚盤胞期胚の核数については、それぞれ Table 3 及び 4 に示した。桑実期 (Morulae)、胚盤胞期

(Blastocyst)、拡張胚盤胞期 (Expanded blastocyst) および脱殻中の胚盤胞期 (Hatching blastocyst) への発生は、いずれも 3 週齢雌由来

胚で有意に低かった。胚盤胞期胚の核数は、3 週齢雌由来胚で、成熟マウス (8 および 10 週齢) 由来胚より有意に低かった。

Table 2. Fertilization and first cleavage division of ova from various ages of C57BL/6J mice^a.

Age (weeks)	Total no. of normal ova at 6 h PI	No. (% ^b ± MSE) ova with pronuclei at 6 h PI	No. (% ^b ± MSE) 2-cell at 24 h PI
3	353	346 (97 ± 2)	323 (92 ^c ± 2)
4	324	315 (98 ± 1)	312 (97 ^d ± 1)
5	207	201 (98 ± 1)	192 (92 ^c ± 3)
6	207	206 (99 ± 1)	206 (99 ^d ± 1)
8	221	215 (97 ± 2)	213 (99 ^{cd} ± 1)
10	292	289 (99 ± 1)	288 (99 ^d ± 1)

^a At 6 h post-insemination (PI), ova with normal morphology were removed of cumulus cells and examined for pronuclear formation under dissecting microscope and cultured in KSOM with amino acids under 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂.

^b Percentages of normal ova at 6h post-insemination. Percentage data were transformed by arcsin transformation and analyzed by ANOVA.

^{c-d} Significantly different in the same column (P < 0.05).

Table 3. *In vitro* development of IVF 2-cell embryos from various ages of C57BL/6J mice at 96 h PI^a.

Age (weeks)	No. 2-cell cultured	No. (% ^b ± MSE) of embryos at 96 h PI			
		Morulae and blastocysts	Blastocysts	Expanded blastocysts	Hatching blastocysts
3	94	75 (81 ^c ± 3)	65 (69 ^c ± 3)	60 (64 ^c ± 4)	58 (62 ^c ± 1)
4	96	92 (96 ^d ± 2)	89 (93 ^d ± 1)	88 (92 ^d ± 1)	88 (92 ^d ± 1)
5	36	35 (97 ^d ± 3)	35 (97 ^d ± 3)	34 (95 ^d ± 5)	34 (95 ^d ± 5)
6	36	36 (100 ^d ± 0)	35 (97 ^d ± 3)	35 (97 ^d ± 3)	35 (97 ^d ± 3)
8	107	103 (97 ^d ± 3)	103 (96 ^d ± 1)	103 (96 ^d ± 1)	101 (94 ^d ± 2)
10	125	122 (98 ^d ± 1)	121 (98 ^d ± 1)	121 (97 ^d ± 1)	121 (97 ^d ± 1)

^a IVF embryos were cultured in KSOM with amino acids for 96h in KSOM with amino acids under 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂.

^b Percentage data were transformed by arcsin transformation and analyzed by ANOVA.

^{cd} Different superscripts indicate significant differences in the same column (P < 0.05).

胚移植の結果については、Table 5 に示した。着床率は、3 週齢雌由来胚 (74%) で他の週齢 (≥89%) より有意に低かった。胎仔発生率は、3 週齢雌由来胚 (47%) において 5 週齢雌由来胚を除く他の週齢雌由来胚 (≥68%) に比べ有意に低かった。

ここまでのデータを元に、排卵卵子 100 個あたりから得られる胎仔数および週齢毎の 1 匹あたりから得られる産仔の推定値 (産仔効率) について Table 6 に示した。性成熟前の雌では 4 週齢マウスでの産仔効率 14.1 匹と最も高く、5 週齢マウスでの産仔効率が 8.7 匹と最も低かつ

た。1匹当たりから得られる胎仔推定数の最も高かったのは10週齢の成熟雌だった。

Table 4. The numbers of nuclei (mean \pm MSE) of blastocyst at 96hr PI^a

Age (weeks)	No. of nuclei ^b (n)
3	58.2 ^c \pm 3.1 (27)
4	62.1 ^{cd} \pm 3.7 (15)
5	63.5 ^{cd} \pm 5.0 (11)
6	64.2 ^{cd} \pm 4.0 (13)
8	66.7 ^d \pm 1.7 (40)
10	65.1 ^d \pm 1.5 (60)

^a Blastocyst were fixed and stained by Hoechst 33542 for counting nuclei.

^b Data were analyzed by ANOVA.

^{cd} Different superscripts indicate significant differences in the same column ($P < 0.05$).

Table 5. Development to fetus after ET of IVF embryos from various ages of C57BL/6J mice^a.

Age (weeks)	No. recipient	No. pregnant	No. embryos transferred	No. (% ^b \pm MSE)	
				Implantation site	Fetus
3	6	6	96	71 (74 ^c \pm 7)	45 (47 ^c \pm 9)
4	6	6	87	80 (90 ^d \pm 5)	61 (68 ^d \pm 8)
5	6	5	62	56 (90 ^d \pm 5)	42 (68 ^{cd} \pm 4)
6	6	5	64	61 (96 ^d \pm 3)	46 (75 ^d \pm 7)
8	6	6	84	74 (89 ^d \pm 5)	64 (77 ^d \pm 6)
10	6	6	88	81 (92 ^d \pm 2)	65 (74 ^d \pm 6)

^a 2-cell embryos at 24 h PI were transferred into the oviducts of Day 1 (the day of copulation plug formation) of pseudopregnancy. All recipient mice were Jcl:ICR(MCH). On day 19 of gestation implantation and fetus development were examined.

^b Percentage data were transformed by arcsin transformation and analyzed by ANOVA.

^{cd} Different superscripts indicate significant differences in the same column ($P < 0.05$).

Table 6. Efficiency of fetus production from ova of various ages of female mice. ^a

Age (week)	Estimate no. fetus obtained from 100 ovulated oocytes	Estimate no. fetus obtained from individual animals
3	42.8	10.1
4	54.1	14.1
5	47.5	8.7
6	53.5	10.3
8	53.4	11.2
10	63.0	15.1

^a Numbers are calculated from the average number of normal ova ovulated from each animal (Table 1) \times % of 2-cell embryos (Table 2) \times % of fetus developed after embryo transfer (Table 5).

次に、各週齢由来の体外受精2細胞期胚における凍結融解後の生存率および移植後の胎仔発生について調べ、その結果をそれぞれ Table 7 および 8 に示した。融解後の生存率については週齢間に有意差は見られなかった。融解後の胎仔発生については、10 週齢雌由来胚以外で凍結

胚の個体発生能が凍結していない新鮮胚の個体発生率より有意に低かった。週齢毎の比較では3 週齢雌由来の凍結胚が、16%の胎仔発生率と最も低く、これは他の週齢由来胚より有意に低かった。

Table 7. Survival of frozen-thawed IVF 2-cell embryos from various ages of C57BL/6J mice^a.

Age (weeks)	Total no. of frozen embryos (n)	Recovered	No. embryos with normal morphology after thawing (% ± MSE)
3	318 (12)	317	288 (92 ± 3)
4	279 (10)	275	268 (96 ± 1)
5	131 (9)	129	126 (96 ± 2)
6	71 (4)	69	63 (88 ± 5)
8	113 (6)	110	108 (95 ± 2)
10	166 (9)	165	160 (97 ± 2)

^a Embryo were vitrified by EFS method approximately 24 h post-insemination at 2-cell stage.

Table 8. Development to fetus after ET of frozen-thawed IVF embryos from various ages of C57BL/6J mice^a.

Age (weeks)	Treatment	No. pregnant females	No. embryos transferred	No. (% ^b ± MSE)	
				Implantation site	Fetus
3	Unfrozen	5	78	55 (71 ^c ± 9)	27 (35 ^c ± 10)
	Frozen	16	288	197 (69 ^c ± 4)	46 (16 ^{*c} ± 2)
4	Unfrozen	5	70	67 (94 ^d ± 5)	54 (74 ^d ± 7)
	Frozen	13	249	218 (87 ^d ± 3)	122 (49 ^{*d} ± 4)
5	Unfrozen	3	32	29 (93 ^d ± 7)	23 (76 ^d ± 14)
	Frozen	9	126	111 (88 ^d ± 4)	63 (50 ^{*d} ± 7)
6	Unfrozen	3	36	34 (94 ^d ± 3)	30 (83 ^d ± 5)
	Frozen	5	76	64 (83 ^{cd} ± 4)	42 (54 ^{*d} ± 6)
8	Unfrozen	5	60	56 (93 ^d ± 4)	50 (83 ^d ± 6)
	Frozen	6	98	77 (75 ^{*cd} ± 9)	46 (47 ^{*d} ± 4)
10	Unfrozen	5	72	64 (89 ^d ± 3)	51 (71 ^d ± 4)
	Frozen	9	160	133 (84 ^d ± 5)	89 (55 ^d ± 4)

^a Embryo were vitrified by EFS method approximately 24 h post-insemination at 2-cell stage. Thawed embryos were transferred to ICR (MCH) recipient mice on day 1 of pseudopregnancy. On day 19 of gestation implantation and fetus development were examined.

^b Percentage data were transformed by arcsin transformation and analyzed by ANOVA.

^{cd} Percentages with different superscript among the same treatment (frozen and unfrozen) were significantly different (P<0.05).

* Significantly different from unfrozen control in the same age group (P<0.05)

4. 考察

性成熟前動物において自然交配による受精や妊娠維持ができない理由としては大きく二つに分かれる。一つは動物個体の生殖器が未成熟なために妊娠維持できないことに起因する。性成熟前は膣開口してないこと、性周期に伴うホルモンの分泌が行われていないために卵管や子宮などの生殖器が発達していないことや妊娠維持に必要なプロゲステロンを分泌する卵巣内の黄体が維持できないことから、自然交配による受精や妊娠維持ができない[15]。もう一つの理由としては、性成熟前雌由来の卵子自体の発生能が不完全であることが挙げられる[10]。成熟雌由来卵子と性成熟前雌由来卵子では、動物種によっても多少の違いは見られるものの、染色体の形態的な差に加え、タンパク質合成、卵子表層粒の分布、細胞骨格の動態、精子侵入時のカルシウム濃度の変動、エネルギー代謝能力および転写活性などが成熟雌由来卵子とは質量ともに異なっているとの報告がなされている[4-10, 16-18]。家畜などではこれらの発生能は、体外培養環境の改善により向上するとの報告もある[10]。また、代謝能力を染色により比較して、高い発生能有する性成熟前雌由来胚を選別する方法についても研究が進められている[19, 20]。

雌マウスの性成熟は、系統により大幅に異なり、膣開口を指標とした場合には 3.5-7 週齢の差が見られ、本研究で用いた C57BL/6J では早い個体で 24 日目に観察されるとの報告がある[15]。ホルモン投与による排卵誘起は、排卵数は少ないものの 2 週齢で可能であり、3-4 週齢で最も排卵数が多くなり、その後は週齢が進むにつれ減少し、一定数の排卵となる[21]。本研究に用いた C57BL/6J でも同様の傾向が見られ (Table 1)、3 および 4 週齢では 1 匹あたりの排卵卵子数は 30 前後と多いが、その後は 20 前後と、成熟雌の排卵卵子数と同程度であり、多数の排卵卵子を得るには性成熟前の 3-4 週齢が適していることが示さ

れた。

形態的に正常な卵子数は、3 週齢で最も高率 (99%, Table 1) に見られ、その後の週齢では形態的に正常な胚は 70-80% 前後と減少した。成熟雌マウスの卵巣では常に新たな卵胞が発育しており、ほとんどが死滅卵胞 (atretic follicle) となり排卵するのは一部の卵子でしか無い[15]。性成熟前のマウスにおける性腺刺激ホルモンの血中濃度は、不安定ではあるが 4 週齢前後より増減を繰り返し、それに伴い卵巣内で発育している胞状卵胞 (antral follicle) は排卵されることなく死滅卵胞となるものも多く含まれる[15]。そのため 4 週齢以降の雌への過排卵誘起の際のホルモン投与は、死滅するあるいは死滅した卵子を有する卵胞内にある卵子の排卵も誘起し、これらが fragmentation や小割球などの異常の原因となると考えられる。一方、3 週齢のマウスでは、未だ排卵を促す性腺刺激ホルモンの分泌も始まっていないが、外来性ホルモンに反応できる死滅前の胞状卵胞が卵胞内に存在しているので、死滅卵胞に由来する卵子が少なく、ほとんどの排卵卵子が形態的に正常であると考えられる。

性成熟前雌マウスから得られる卵子の受精能は、成熟卵子と有意な差が無いことはマウスを始め、ブタおよびウシでも示されている[4, 5, 10, 22]。本研究に用いた C57BL/6J マウスにおいても同様で、全週齢から得られた卵子において 97% 以上の受精率が得られており、性成熟前雌マウス由来卵子の受精能は成熟マウスと変わらないことが示された。

性成熟前雌由来卵子を用いる際に最も問題となるのが受精後の発生能である。本研究においても、3 週齢のマウス由来受精卵では、体外培養における胚盤胞への発生率、胚盤胞内の核数および偽妊娠雌への移植後の胎仔への発生率 (Table 3-5) において、それ以降の週齢のマウスから得られた受精卵に比べ有意に低かったことから、3 週齢雌由来卵子は、個体発生能は有しているが、卵子の発生能の

獲得が完全ではないことが示唆される。性腺刺激ホルモン投与により、家畜などでは卵子の受精後の発生能が向上することが知られているが[10, 23]、本実験で用いたマウス系統では卵胞内での卵子発育には、性腺刺激ホルモンの投与だけでは十分な発生能を付与することが出来ないと考えられる。

本研究に用いられた C57BL/6J マウスにおける産仔効率について、Table 1, 2 および 5 に示された結果に基づき、排卵卵子 100 個当たりから得られる胎仔数およびマウス 1 匹当たりから得られる胎仔数について試算したところ (Table 6)、10 週齢雌が最も繁殖効率が良く、次に 4 週齢雌が良好であった。性成熟前の雌マウスを使用する場合には 4 週齢、その後は 10 週齢での動物を用いると効率がいいことが示された。

哺乳類の初期胚の凍結保存は、今や実験動物のみならず、受容雌の性周期と胚の発生とを同調させることが困難な家畜などの大動物やヒトの不妊治療の分野において必須の技術である。性成熟前個体由来の初期胚の凍結については、家畜などの中大動物ではその有用性が非常に高く、凍結卵子由来の産仔の出産報告はなされているものの、成功率は低い [23]。ヒトでは小児のがん治療前に卵子を保存することも患者の不妊治療対策として提案されているが、卵子採取のためにはホルモン投与が必要となり、治療を遅らせることになりかねないので実施するには倫理面での問題を解決する必要がある [1,2]。実験動物の分野では、新たな遺伝子改変動物の開発が急速に進み、それに伴い系統数が劇的に増加しているため、凍結保存技術は系統維持の中心技術として不可欠となっている。マウスにおいては、性成熟前の個体を用いた凍結保存は、一般的に行われているが、週齢毎に凍結してない新鮮卵子と比較した報告はなされていないので、本研究では週齢毎に凍結融解後の発生率を比較した。

本実験では凍結融解後の生存率については、

週齢による違いは見られなかったものの (Table 7)、移植後の胎仔発生率については、3 週齢で非常に低く、凍結による影響により、その後の発生能がさらに低下することが示された。本研究で採用している急速凍結法では、初期胚を 40%のエチレングリコールを含む非常に高張な液 (30% Ficoll 70 + 0.5M Sucrose) に浸して瞬時に脱水し、直接液体窒素にチューブを浸す [14]。3 週齢雌由来胚では、他の週齢と異なり、細胞質の成熟が不十分であるため、脱水あるいはエチレングリコールの影響を受けて細胞質に何らかのダメージを受けやすく、融解後も凍結時の障害から回復する機能も不完全であるために発生率が低下したと考えられる。

本研究では、性成熟前の若齢から性成熟後のマウスを過排卵処理により得られた卵子の発生能を系統立てて調べ、性成熟前の 8 週齢以前では 4 週齢のマウスで最も効率的に産仔が得られることを示した。これらの結果から、性成熟前の雌マウスを用いる場合には 4 週齢マウスを用いることが望ましく、その後は排卵卵子数などが一時的に減少することから成熟した 10 週齢マウスを用いることが望ましいことも示した。3 週齢マウスから胎仔を得ることも可能ではあるが、効率の点で落ちることから、系統が途絶えるなどの非常時以外での使用は避けた方が無難であろう。

近年、動物愛護管理法の改正により、実験動物の 3R (Replacement, Reduction, Refinement) の実践がとくに望まれており、動物の繁殖を人為的にコントロールできる生殖工学的な手法を用いた体外受精や凍結保存技術などは動物の維持管理の中ですでに大きな役割を果たしている。今後も、3R の促進のための研究開発を推進していくことが必要である。

5. 参考文献

[1] Anderson, R. and Wallace W., Fertility preservation in girls and young women. *Clin.*

- Endocrinol.*, 75 (2011) 409-419.
- [2] Blumenfeld, Z., How to preserve fertility in young women exposed to chemotherapy? The role of GnRH agonist cotreatment in addition to cryopreservation of embryos, oocytes, or ovaries. *The Oncologist*, 12 (2007) 1044-1054.
- [3] Byers, S.L., Payson, S.J. and Taft, R.A., Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). *Theriogenology*, 65 (2006) 1716-1726.
- [4] Mitsui, A., and Yoshizawa, M., Evaluation of Pre-maturity of mouse oocytes ovulated from prepubertal females using an in vitro fertilization technique. *J. Mamm. Ova. Res.*, 23 (2006) 114-121.
- [5] Catala, V., Estop, A., Santalo, J. and Egozcue, J., Sexual immaturity and maternal age: incidence of aneuploidy and polyploidy in first-cleavage mouse embryos. *Cytogenet. Cell Genet.*, 48 (1988) 233-237.
- [6] Golbus, M.S., The influence of strain, maternal age, and method of maturation on mouse oocyte aneuploidy. *Cytogenet. Cell Genet.*, 31 (1981) 84-90
- [7] Santaló, J., Badenas, J., Calafell, J.M. et al., The genetic risks of in vitro fertilization techniques: the use of an animal model. *J. Assist. Reprod. Genet.* 9 (1992) 462-474.
- [8] Ptak, G., Matsukawa, K., Palmieri, C. et al., Developmental and functional evidence of nuclear immaturity in prepubertal oocytes. *Hum. Reprod.*, 21 (2006) 2228-2237.
- [9] Bao, S., Obata, Y., Carroll, J. et al., Epigenetic modifications necessary for normal development are wstablished during oocyte growth in mice. *Biol. Reprod.*, 62 (2000) 616-621.
- [10] Armstrong, D.T., Effects of maternal age on oocyte development competence. *Theriogenology*, 55 (2001) 1303-1322.
- [11] Leoni, G.G., Succu, S., Berlinguer, F. et al., Delay on the in vitro kinetic development of prepubertal ovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 92 (2006) 373-383.
- [12] Kito, S., Hayao, T., Noguchi, Y. et al., Improved *in vitro* fertilization and development by use of modified Human Tubal Fluid and applicability of pronucleate embryos for cryopreservation by rapid freezing in inbred mice. *Comp. Med.*, 54 (2004) 564-570.
- [13] Lawitts, J.A. and Biggers, J.D., Culture of preimplantation embryos. *Meth. Enzymol.* 225 (1993) 153-164.
- [14] Kasai, M., 'Cryopreservation of mammalian embryos, *Methods in Mole Biol.*, 38 (1995) 211-219.
- [15] Bronson, F.H., Dagg, C.P. and Snell, G.D., In "*Biology of the laboratory mouse, 2nd edition*", Green, E.L. (eds) (1966) 187-204, McGraw-Hill Book Company.
- [16] Velilla, E., Rodríguez-Gonzalez, E., Vidal, F/ et al., Microtubule and microfilament organization in immature, in vitro matured and in vitro fertilized prepubertal goat oocytes. *Zygote*, 13 (2005) 155-165.
- [17] Velilla, E., Izquierdo, D., Rodríguez-González, E. et al., Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilisation: ultrastructural and cytochemical study. *Mol. Reprod. Dev.*, 68 (2004) 507-514.
- [18] Salamone, D.F., Damiani, P., Duby R.T. et al., Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol. Reprod.*, 64 (2001) 1761-1768.
- [19] Catalá, M.G., Izquierdo, D., Uzbekova, S, et al., Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction*, 142 (2011) 517-527.
- [20] Wu, Y.G., Liu, Y., Zhou, P. et al., Selection

of oocytes for in vitro maturation by Brilliant Cresyl Blue staining: a study using the mouse model. *Cell Res.*, 17 (2007) 722-731.

[21] Zarrow, M.X. and WILSON, E.D. The influence of age on superovulation in the immature rat and mouse. *Endocrinology*, 69 (1961) 851-855.

[22] Sherrer, E.S., Rathbun, T.J. and Davis, D.L., Fertilization and blastocyst development in oocytes obtained from prepubertal and adult pigs. *J. Anim. Sci.* 82 (2004) 102-108.

[23] Ptak, G., Loi, P., Dattena, M. et al., Offspring from one-month-old lambs: Studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol. Reprod.*, 61 (1999) 1568-7.

放医研マイクロビーム細胞照射装置 SPICE 専用細胞皿の作成方法
Preparation of cell dishes for studies using a Single-Particle Irradiation system to
Cells(SPICE).

小林 亜利紗^{1*}、山縣 徳嗣¹、須藤 和美¹、ウォーレン 圭子²、小西 輝昭^{1,2}

- 1) 研究基盤センター先端研究基盤共用推進室
- 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

要旨

The micro-beam irradiation technique has become a powerful method in radiation biological studies. In brief, the SPICE-NIRS microbeam can target cell nuclei, cytoplasm, or both automatically with a defined number of protons. For example, a cell sample with 3000 cells per dish can be irradiated within 15 minutes including all the necessary procedures such as image capturing and cell recognition analysis. However, there are several limitations in both machinery components such as microscopes, beam lines, sample stages, biological aspects, cell lines, and cell dishes and in fluorescence staining, which is necessary for targeting; these limitations needs to be overcome for accomplishing this performance.

In this study, we present a protocol for constructing the cell dish that was specially designed for the SPICE-NIRS microbeam. The dish consists of four components as follows: (1) ring, (2) base (both assists to sandwich thin film and screws), (3) thin film (for attachment of the cells), and (4) screws (for fixing the other components). The dishes are not disposable and may be sterilized and reused for each beam time by researchers. This protocol is written in both Japanese and English for domestic and foreign researchers.

Keywords: Microbeam, Low dose radiation, Radiation biology

***Corresponding Author:**

小林 亜利紗 (Alisa Kobayashi)

e-mail: a_koba@nirs.go.jp

1. はじめに

マイクロビーム細胞照射装置は、直径数マイクロメートルに絞ったビームを用いて狙った細胞に任意の放射線量を照射できる装置である。つまり、すべての細胞に同じ線量を与えることができることから、ポアソン分布に従った確率的影響評価を打破し、絶対的な評価を可能にしている [1]。放医研マイクロビーム照射装置 SPICE は細胞核、細胞質、またはその両方に自動でプロトンを指定数量当てることができる。これまでに培養細胞における照射 [2] のみならずゼブラフィッシュの受精卵への低線量放射線応答研究 [3] にも応用されており、高度な性能はそのままに汎用性を持つことから、国内外から多くの研究者が利用に訪れている。SPICE の最大の特徴は、垂直ビームラインであり、細胞の下から上へビームが通過する打ち上げ方式のマイクロビームであり、このようなビームラインは世界で他にはコロムビア大学のマイクロビーム施設しかない。この方式は、培養細胞を一般的な培養状態と同様の向きに設置することができるという利便性だけでなく、細胞皿を設置する電動駆動ステージの高速性および分解能などを高精度に制御できるというアドバンテージもある。しかしその反面、SPICE で導入可能な放射線種は、3.4MeV 陽子線のみであり、水での飛程はおよそ 200 μm 程度であるため、通常の培養用のプラスチックシャーレの底面をプロトン

が通過することができない。よって、その準備方法には工夫が必要となる。

例えば、細胞下部から入射される陽子線は細胞を通過後、細胞皿上部に設置してある粒子線検出器にて照射粒子数を計数できなければならない。つまり、粒子線検出器とビーム出口との間に設置する細胞皿は、十分に薄く、可能な限り 3.4MeV 陽子線のエネルギーを減速させない材料である必要がある。

本施設における照射用細胞皿は、金属製の枠組みにポリプロピレンなどの薄膜を挟んだものを使用し、薄膜上に細胞を培養することでマイクロビーム細胞照射を可能にしている。陽子線は、薄膜、細胞および乾燥防止用薄膜の三つの層を通過して、細胞皿上部に設置してある粒子線検出器に入り、粒子数を計数することができる。また、皿は、培養細胞を用いた実験において、必要な滅菌が可能であり実験者は照射実験の度に制作する。ただし、使用する細胞株や照射後の細胞解析方法などによって、細胞皿に使用する薄膜の種類と厚みを検討する必要がある、ユーザーはマシンタイムの前に十分な条件の検討を行わなければならない。そのため、ユーザー自身がマイクロビーム照射用皿の作成方法を会得することが肝要である。そこで本技術報告書ではマイクロビーム照射用細胞皿の作成方法を公開したい。

2. SPICE 照射用細胞皿の仕様／The specification of SPICE dish

SPICE 照射用細胞皿の骨組み部分（リング・ベース・ネジ）は、下記の仕様・図面(図 1)にて設計されたものを使用している。

The frame parts (ring, base and screws) of the SPICE dish are designed according to the specifications below.

【仕様／The specifications】

①材料はステンレス鋼である事／The material should be stainless steel.

②寸法は、50 mm×50 mm×5.6 mm／Dimensions : 50 mm×50 mm×5.6 mm

③下面はガラスビーズブラスト処理を施す事／

The under surface should be treated with bead blasting.

④枠体とリングをとめるネジには、六角キャップボルトを用いる事／

The hexagonal screws should be used for tightening up the ring and base.

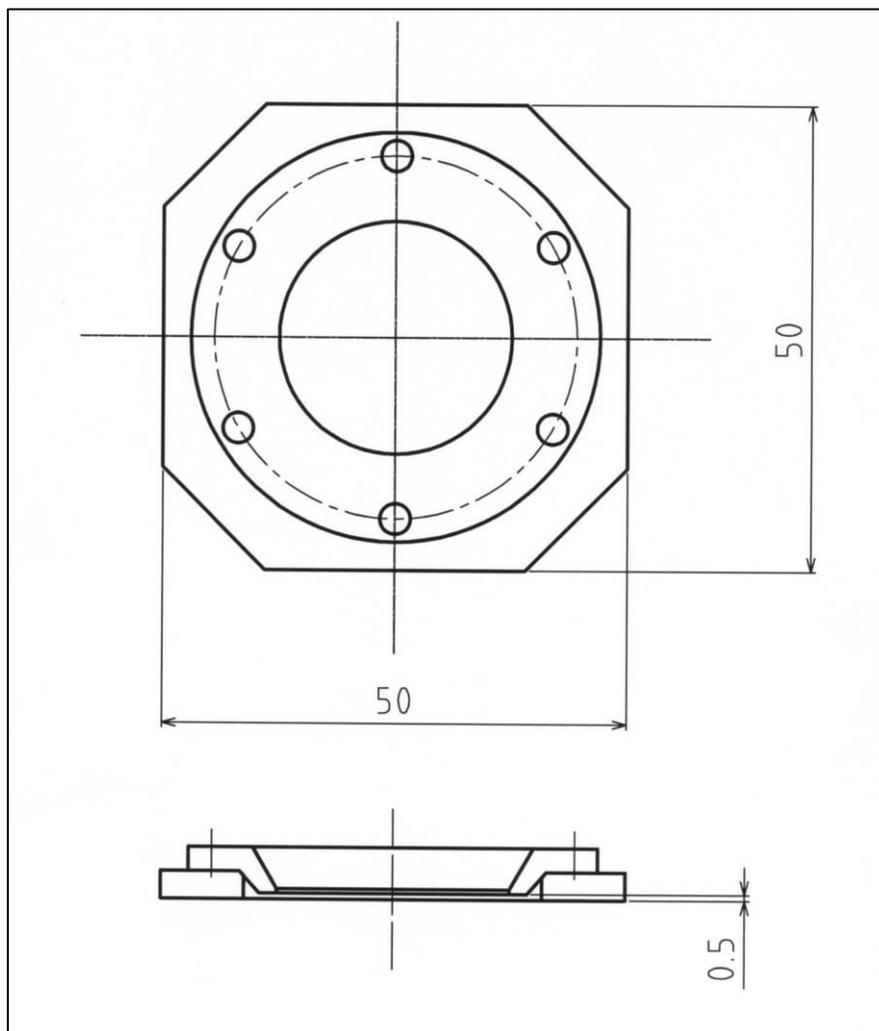


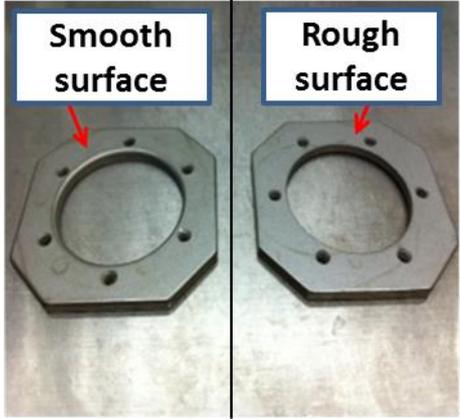
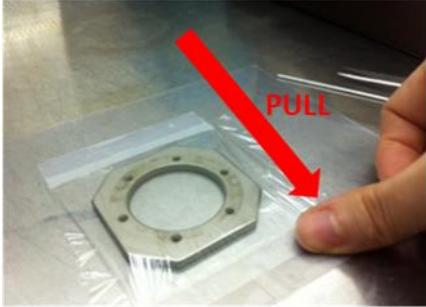
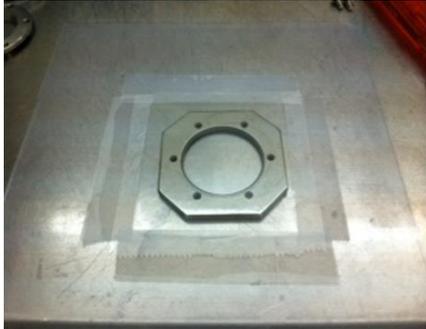
図 1. SPICE 照射用細胞皿の図面／ Diagram of SPICE dish. (All lengths in mm)

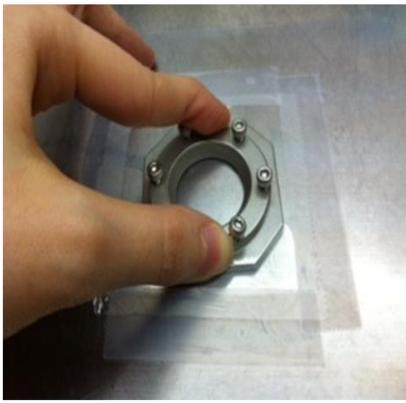
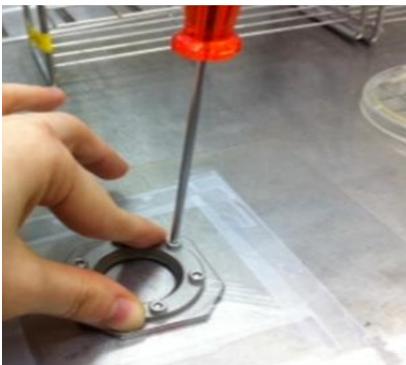
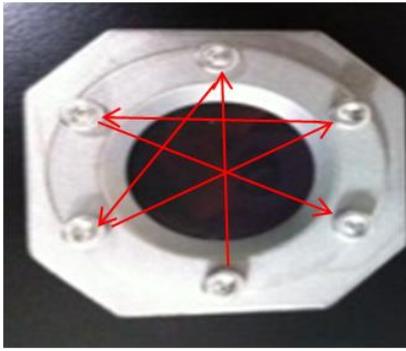
3. 皿の製作に必要な道具／Tools needed to make the dish

<p>青：ポリエチレンテレフタレート膜(マイラー™膜, Chemplex, 100) もしくは 紫：ポリプロピレン膜(Chemplex, 425)</p>	
<p>Blue: Polyethylene terephthalate film (Mylar® film) or Violet: Polypropylene film</p>	
<p>上から ・リング ・ベース ・ネジ(1枚の皿に対して6本)</p>	
<p>・ Ring ・ Base ・ Screws (6 screws for 1 dish)</p>	

<ul style="list-style-type: none"> ・ スクリュードライバー(型 : 六角, 2.5 mm) ・ ナイフ ・ 黒の油性マジックペン 	
<ul style="list-style-type: none"> ・ Screwdriver (Type : Hexagonal, 2.5 mm) ・ Utility knife ・ Black oily felt pen 	
<ul style="list-style-type: none"> ・ スライドガラス (75 mm × 25 mm) 	
<ul style="list-style-type: none"> ・ Glass slide (75 mm × 25 mm) 	
<ul style="list-style-type: none"> ・ テープ (メンディングテープ™, 3M, 12 mm × 50 m) 	
<ul style="list-style-type: none"> ・ Tape (Mending tape®) 	

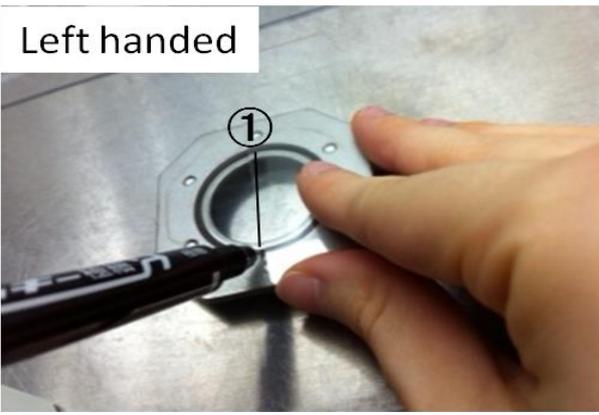
4. SPICE 用細胞皿の組み立て方 / How to assemble the SPICE dish

<p>リング、ベース、ネジは細胞皿組立の前日に乾熱滅菌器で滅菌しておく(140°C/20分)。</p>		
<p>The ring, the base and the screws should be sterilized (140°C/20 minutes) in a dry heat sterilizer from the day before.</p>		
<p>1 <u>組立作業はすべてクリーンベンチの中で行う</u> 消毒用 70 % エタノールをリング、ベース、ネジに吹きかけバーナーで軽くあぶる。 乾燥後ベースの表側(滑らかな方)を上にし、膜をベース全体が覆われるようにのせる。</p> <hr/> <p>The Procedure must be done on a clean bench Spray 70 % ethanol on the base, the ring, and the screws and then apply heat from a burner to evaporate the ethanol. After it has dried, place the base on the bench with the upper side face up. Then, cover the base with film.</p>	<p>Upper side (表)</p>	<p>Bottom side (裏)</p>
		
<p>2</p>	<p>皿に被せた膜の上下・左右にメンディングテープを貼り、膜全体が張るようにする。</p> <hr/> <p>Fix the film with the tape. First, tape the upper edge of the film. 2nd, pull the opposite edge and tape it to keep it tight. Then, tape the left and right sides.</p>	
		
		
<p>3</p>	<p>ベースの上にリングを乗せる。このとき、それぞれのネジ穴の位置を合わせる。</p> <hr/> <p>Put the ring on the base and line up the screw holes.</p>	
		

<p>4</p> <p>ネジを穴に入れ、リングを押す。 一度押したら離さない。</p> <hr/> <p>Put the screws into the holes, but do not turn the screws yet. Push down on the ring hard without pressing directly on the screws.</p>	
<p>5</p> <p>対角線にネジを締める。すぐにきつく締めず、徐々に締めていく。</p> <hr/> <p>Now tighten the screws. Firstly, tighten each screw gradually until there is a firm contact. Do this with all 6 screws. Then tighten strongly. Best results are achieved by tightening the screws in the order shown below.</p>	 
<p>6</p> <p>余分の膜をリングの縁に沿って切り離す。</p> <hr/> <p>Cut off the rest of the film along the edge of the ring using a knife.</p>	

<p>7</p>	<p>表側にピペットマンで 70 %エタノール(87261,吉田製薬)を 1 ml 加え、液漏れしていないかを確認した後にピペットマンで抜き取る。</p> <hr/> <p>Pour 1 ml of 70 % ethanol into the well of the dish and check for leaks. Then remove the ethanol with a pipette.</p>	
<p>8</p>	<p>UV ライトを点けたクリーンベンチ内で 15 分間乾燥させる。 (長時間置くと膜が劣化するので注意)</p> <hr/> <p>The remaining 70 % ethanol should evaporate in about 15minutes.While waiting for the ethanol to evaporate, sterilize the dish using UV light.</p> <p>Attention! Do not to use UV for more than 15 minutes as the film will be damaged.</p>	

5. 罫書きの書き方 / How to draw the line

<p>1</p>	<p>右利き： 皿を裏に返し、*左縁にスライドガラスを合わせる。このとき垂直位置にネジがあることを確認し、線①を引く。(力を入れすぎると膜が破けるので注意) 左利き：*右縁</p> <hr/> <p>Right handed： Put the dish on the bench with the base facing up. Draw the targeting lines on the film using the slide glass and a black magic marker. Place the slide glass on the *left side of the dish and draw a vertical line from the upper screw to the lower screw. (Do not break the film.) Left handed： *right</p>	<p>Right handed</p>  <p>Left handed</p> 
<p>2</p>	<p>線①を引いたら皿を 90°C反時計回りに回し、縁にスライドガラスを合わせ、線②を引く。</p> <hr/> <p>Rotate the dish 90°C, anticlockwise. Now draw the second line to divide the aperture into 4 sections.</p>	<p>Right handed</p>  <p>Left handed</p> 
<p>3</p>	<p>完成。</p> <hr/> <p>Finish. The dish should be in this position when operating the SPICE.</p>	 

引用文献

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

[2] Konishi, T., Oikawa, M., Suya, N., et al., SPICE-NIRS Microbeam: a focused vertical system for proton irradiation of a single cell for radiobiological research., *J. Radiat. Res.*, 54(2013)736-747.

[3] Choi, VWY., Yum, EHW., Konishi, T., et al., Triphasic low-dose response in zebrafish embryos irradiated by microbeam protons., *J. Radiat. Res.*, 53(2012)475–81

放医研に導入されたマカク属サル の 30 年間の検疫データについて

－血液・血清生化学データを中心に－

**Quarantine inspection Data of Macaque monkeys introduced for over 30 years in
NIRS
-Blood and Serum Chemistry Data-**

重兼 弘法^{1)*}、小久保 年章¹⁾、松下 悟²⁾

¹⁾研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課

²⁾人材育成センター 教務室

Abstract

Non-human primates (macaque monkeys and common marmosets) have been used for studies on the genetic risks of radiation and brain function, since crab-eating macaques were first introduced in National Institute of Radiological Sciences (NIRS) in 1972. In order to control the hygiene and health conditions of non-human primates, we developed a primate health database system in 2006. We then developed a new database system with enhanced functions for animal searches and extraction to support both animal health management and legal document preparation in 2011. Using this database system, we analyzed blood and serum biochemical values from the results of quarantine inspection of 173 macaque monkeys introduced in NIRS since 1979.

Keywords : *laboratory animals, non-human primates, quarantine, blood test*

***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（放医研）では、放射線による遺伝的リスク評価に関する研究のため[1]、霊長類を使用した実験は1972年にカニクイザルが初めて導入されて以降開始された[2]。その後、1990年代よりアカゲザルを利用したPETの開発研究が盛んになり [3]、1998年からはニホンザルの導入・使用も始まった。

放射線に関する研究では照射実験による免疫力が低下することを想定して、霊長類の検疫検査や定期検査は（独）医薬基盤研究所霊長類医科学センター[4]で実施されている例を参考にして厳重に行われた。また、脳機能に関する研究においても、覚醒下の動物実験が多いことからこれらの検査は重要と判断され、現在においても引き続き血液検査や病原体（細菌、ウイルス及び内部寄生虫）検査が実施されている。近年、霊長類の飼養保管や動物実験に対する法的規制が強化されたため、我々は霊長類の健康・衛生管理とともに各種法的書類作成を支援するサルデータベースシステムを開発し、運用している[5]。

本稿では、1979年11月から2013年3月までの33年4ヶ月間に導入され、このデータベースシステムに蓄積されたカニクイザル、アカゲザル及びニホンザル合計173頭に対する検疫検査時の一般状態、血液検査（一般血液検査及び血清生化学検査）の結果について報告する。

2. 動物及び検査項目

2-1. 動物

材料とした173頭のマカク属サルの内訳は、カニクイザル84頭（♂76頭、♀8頭）、アカゲザル67頭（♂67頭）及びニホンザル22頭（♂19頭、♀3頭）である。表1

に各種サルの原産国、導入時期、および年齢等を示す。なお、動物は搬入後、検疫室の検疫用個別ケージに収容した。

表1 検疫検査対象となった動物の内訳

動物種 (頭数)	カニクイザル(84頭)				
性別 (頭数)	♂(76頭)				
出生国 (頭数)	日本 (6頭)	インドネシア (4頭)	マレーシア (19頭)	フィリピン (33頭)	中国 (14頭)
導入時期	1979.11.20~ 2001.11.19	1980.11.12	1981.1.28~ 1983.11.10	1984.5.25~ 1987.2.25	2003.5.6~ 2008.2.6
導入時年齢	4歳3ヶ月~ 8歳2ヶ月	推定3歳~ 推定6歳以上	推定4歳~ 推定8歳以上	推定3歳~ 推定6歳以上	3歳1ヶ月~ 10歳2ヶ月

動物種 (頭数)	カニクイザル(84頭)		
性別 (頭数)	♀(8頭)		
出生国 (頭数)	日本 (5頭)	インドネシア (2頭)	マレーシア (1頭)
導入時期	1979.11.20~ 2003.12.24	1980.11.12	1982.11.24
導入時年齢	1歳10ヶ月~ 推定10歳	推定5歳~ 推定6歳以上	推定5歳~ 6歳

動物種 (頭数)	アカゲザル(67頭)		ニホンザル(22頭)	
性別 (頭数)	♂(67頭)		♂(19頭)	♀(3頭)
出生国 (頭数)	中国 (49頭)	日本 (18頭)	日本(19頭)	日本(3頭)
導入時期	1981.8.31~ 2013.3.27	1999/2/3~ 2012/8/17	1998.11.11~ 2009.2.23	2002.6.10~ 2009.2.23
導入時年齢	2歳8ヶ月~7年 4ヶ月	2歳1ヶ月~7歳 1ヶ月	1歳3ヶ月~ 4歳8ヶ月	1歳11ヶ月~ 3歳0ヶ月

2-2. 検査方法

放医研へ導入するサル類は、全て30日間の検疫を実施しており、検疫期間中に各種検査を行った。また、検疫時の一般検査及び採血は麻酔下で実施した。一般検査項目、血液検査項目、検査実施時期及び検査実施機関については、表2~4に示す。なお、血清生化学検査のC反応性蛋白（CRP）のスコアは、蛋白量に基づき以下の通りとした。（-）：~0.30 mg/dL、（+）：0.31~1.00 mg/dL、（2+）：1.01~3.00 mg/dL、（3+）：3.01~6.00 mg/dL、（4+）：6.01~10.00mg/dL、（5+）：10.01~18.00mg/dL、（6+）：18.01mg/dL~。

表2 一般検査

項目	実施時期
体温測定	1979年11月 ~2013年3月
口腔検査	
触診	
聴診	
体重測定	
視診（排泄物, 栄養状態, 外傷, 顔貌）	

表3 一般血液検査

検査項目	検査実施時期	単位
赤血球数	1980年11月～2013年3月	$\times 10^4/\mu\text{L}$
白血球数	1980年11月～2013年3月	$/\mu\text{L}$
ヘマトクリット	1980年11月～2013年3月	%
血色素量	1995年2月～2013年3月	g/dL
平均赤血球容量	1995年2月～2013年3月	fL
平均赤血球色素量	1995年2月～2013年3月	pg
平均赤血球色素濃度	1995年2月～2013年3月	g/dL
血小板数	1995年2月～2013年3月	$\times 10^4/\mu\text{L}$
血液像(白血球分画)	2007年7月～2013年3月	%

検査機関：株式会社江東微生物研究所

表4 血清生化学検査

検査項目	検査実施時期	単位
血糖	1980年11月～2013年3月	mg/dL
総蛋白	1980年11月～2013年3月	g/dL
アルブミン	1980年11月～2013年3月	g/dL
グロブリン	1980年11月～1981年1月	g/dL
A/G比	1980年11月～2013年3月	-
尿素窒素	1980年11月～2013年3月	mg/dL
AST(GOT)	1980年11月～2013年3月	U/L
ALT(GPT)	1980年11月～2013年3月	U/L
クレアチニン	1998年11月～2007年2月	mg/dL
総コレステロール	2008年2月～2013年3月	mg/dL
中性脂肪	2008年2月～2013年3月	mg/dL
無機リン	2008年2月～2013年3月	mg/dL
カルシウム	2008年2月～2013年3月	mg/dL
アルカリホスファターゼ	2008年2月～2013年3月	U/L
CRP(定性)	2008年2月～2013年3月	蛋白量に基づくスコア

検査機関：株式会社江東微生物研究所

2-3. 検査結果の集計

サルデータシステムにより動物種別、原産国別及び導入時年齢(1979年～2000年代初頭迄に導入した個体の一部は歯牙の状態による推定年齢)別に抽出を行い、個体数、平均、標準偏差を求めた。これらの結果より、検査項目毎の傾向についての解析を行った。

2. 結果と考察

3-1. 一般状態(外観および体重)

体重測定値については、結果を表5に示した。カニクイザル及びニホンザルの大部分の動物は、年齢を考慮すると文献値の範囲内にあった。但し、アカゲザルについては、若齢動物を導入したため、文献値で示している成獣の体重範囲よりも体重が軽い個体が存在した他、1頭に代謝機能異常と思われる削瘦が見られたが、病原体の感染はなく、注意して経過観察を行った。

外観及び触診所見に関して、すべてのサル種の3割程度に四肢の脱毛や指趾・目周囲に軽度の外傷が認められ、導入元や輸送中の影響によるものと考えられた。なお、口腔内検査や聴診については、特に異常は観察されなかった。

3-2. 一般血液検査

原産国による検査値に差がなかったため、サル種ごとに表6に結果を示した。白血球数で高値を示す個体が散在しているが、外観所見に特に異常はなかった。

3-3. 血清生化学検査

原産国による検査値の差がなかったためサル種別に表7に一括して示した。カニクイザルにALT(GOT)とAST(GPT)の高値を示す例が散見され、アカゲザルとニホンザルのみにALTの高値を示す例が散見されたが、外観所見に異常はなかった。それ以外の検査項目に特に異常は認められなかった。

表5 体重測定結果

動物種	カニクイザル				
♂/♀	♂		♀		参考値
年齢	3歳1ヶ月～5歳未満:7頭(成長期) 5歳～10歳2ヶ月(推定6歳以上を含む) :69頭(成熟期)		1歳10ヶ月～4歳未満:3頭(成長期) 4歳～6歳7ヶ月(推定10才を含む) :5頭(成熟期)		参考文献[6] ♂:2歳～10歳 2～6.5kg ♀:2歳～10歳 2～3.5kg 参考文献[7](産地:ベトナム) ♂:3歳～5歳 2～7kg ♀:3歳～5歳 2～5kg 参考文献[8](産地:フィリピン、 ベトナム、中国、インドネシア) ♂:3歳～6歳以上 3～5kg以上 ♀:3歳～6歳以上 3～3.5kg以上
産地	インドネシア:4頭 マレーシア:19頭 フィリピン:33頭 日本:6頭 中国:14頭		インドネシア:2頭 マレーシア:1頭 日本:5頭		
個体数	76		8		
導入年月日	1979.11.20～2008.2.6		1979.11.20～2003.12.24		
検査年月日	1979.11～2008.2		1979.11～2003.12		
	検体数	平均値±標準偏差 (最小値～最大値)	検体数	平均値±標準偏差 (最小値～最大値)	
体重(kg)	71	42±0.89 (2.35～6.75)	3	3.45±0.15 (3.25～4.20)	

動物種	アカゲザル		
♂/♀	♂	参考値	
年齢	2歳1ヶ月～5歳未満:28頭(成長期) 5歳～7歳4ヶ月:39頭(成熟期)	参考文献[9] ♂♀:4～12kg(成獣)	
産地	中国:49頭 日本:18頭		
個体数	67		
導入年月日	1991.8.31～2013.3.27		
検査年月日	1991.8～2013.3		
	検体数		平均値±標準偏差 (最小値～最大値)
体重(kg)	67		4.63±1.38 (2.02～8.00)

動物種	ニホンザル				
♂/♀	♂		♀		参考値
年齢	1歳8ヶ月～4歳8ヶ月:19頭(成長期)		1歳11ヶ月～3歳:3頭(成長期)		参考文献[10] ♂:1歳～25歳 2.3±0.55～12.2±1.74kg ♀:1歳～25歳 2.2±0.49～9.0±2.4kg
産地	日本:19頭		日本:19頭		
個体数	19		3		
導入年月日	1998.11.11～2009.2.23		2002.6.10～2009.2.23		
検査年月日	1998.11～2009.2		2002.6～2009.2		
	検体数	平均値±標準偏差 (最小値～最大値)	検体数	平均値±標準偏差 (最小値～最大値)	
体重(kg)	19	4.98±1.42 (2.85～7.66)	3	3.62±0.67 (2.85～4.02)	

表6 一般血液検査結果

動物種 ♂/♀	カニクイザル				参考値
	♂		♀		
年齢	3歳1ヶ月～5歳未満:7頭(成長期) 5歳～10歳2ヶ月(推定6歳以上を含む) :69頭(成熟期)		1歳10ヶ月～4歳未満:3頭(成長期) 4歳～6歳7ヶ月(推定10才を含む) :5頭(成熟期)		参考文献[6] コロニーの成熟♂♀ 参考文献[7](産地:ベトナム) ♂♀:3～5歳 文献[6]/[7]の順に記載
産地	インドネシア:4頭 マレーシア:19頭 フィリピン:33頭 日本:6頭 中国:14頭		インドネシア:2頭 マレーシア:1頭 日本:5頭		
個体数	76		8		
導入年月日	1979.11.20～2008.2.6		1979.11.20～2003.12.24		
検査年月日	1979.11～2008.2		1979.11～2003.12		
	検体数	平均値±標準偏差 (最小値～最大値)	検体数	平均値±標準偏差 (最小値～最大値)	
白血球数(/μL)	23	10030±3648(3500～17100)	2	8550±50(8500～8600)	♂:5800/9570±2960 ♀:7200/10600±3600
赤血球数(×10 ⁴ /μL)	23	548±66(398～591)	2	662±72(590～734)	♂:590/641±38 ♀:604/532±38
血色素量(g/dL)	16	13.1±1.0(11.0～14.8)	1	11.2	♂:11.5/13.6±0.8 ♀:11.5/13.2±0.8
ヘマトクリット値(%)	23	40.9±3.1(33.7～46.0)	2	40.4±2.6(37.8～43.0)	♂:37.7/43.7±2.8 ♀:38.4/42.7±2.8
MCV(fl)	16	77±3(72～84)	1	64	♂:64.1/80.4±4.1 ♀:63.7/80.4±3.7
MCH(pg)	16	24.2±1.0(21.8～26.2)	1	19.0	♂:19.7/25.0±1.1 ♀:19.1/24.9±1.1
MCHC(g/dL)	16	31.4±1.2(29.7～33.9)	1	29.6	♂:30.6/31.1±1.2 ♀:29.9/31.0±1.1
血小板数(×10 ⁴ /μL)	16	37.3±10.6(135～58.1)	1	36.7	♂:26.8/37.8±0.85 ♀:31.7/39.3±0.91
血液像(%)					
Baso	2	0.0±0.0	0		-/♂:0.3±0.6 ♀:0.4±0.7
Mono	2	3.0±1.0(2.0～4.0)	0		-/♂:2.9±1.8 ♀:3.1±2.1
Eosino	2	1.5±0.5(1.0～2.0)	0		-/♂:1.1±1.5 ♀:1.2±1.5
Lympho	2	52.0±11.0(41.0～63.0)	0		-/♂:37.8±0.85 ♀:39.3±0.91
Neutro	2	43.5±9.5(37.0～53.0)	0		-/♂:67.3±14.8 ♀:64.1±15.2
Stab	2	4.0±0.0	0		
Seg	2	39.5±9.5(30～49)	0		-/♂:28.0±14.9 ♀:31.1±15.4

動物種 ♂/♀	アカゲザル		参考値
	♂		
年齢	2歳1ヶ月～5歳未満:28頭(成長期) 5歳～7歳4ヶ月:39頭(成熟期)		参考文献[11] ♂♀白血球数、血色素量、ヘマトクリット。 参考文献[12] ♂♀:0.05歳～10歳以上 文献[11]/[12]の順に記載 上記以外は、文献[12]のみ記載
産地	中国:49頭 日本:18頭		
個体数	67		
導入年月日	1991.8.31～2013.3.27		
検査年月日	1991.8～2013.3		
	検体数	平均値±標準偏差 (最小値～最大値)	
白血球数(/μL)	55	7644±3070(2800～17900)	7000～13000/ ♂:8900±2100～11800±2900 ♀:8600±1200～11600±3100
赤血球数(×10 ⁴ /μL)	55	565±45(415～668)	♂:571±31～690±34 ♀:549±41～681±55
血色素量(g/dL)	55	13.1±1.3(10.8～15.6)	11～12.5/ ♂:12.8±0.7～13.6±0.7 ♀:12.5±0.7～13.6±0.9
ヘマトクリット値(%)	55	41.8±4.0(24.2～51.0)	39～43/ ♂:39.7±2.0～42.4±2.5 ♀:38.6±2.3～42.1±3.1
MCV(fl)	55	74±4(58～81)	♂:67.1±3.0～70.7±2.2 ♀:84±4.2～91±12.0
MCH(pg)	55	23.2±1.5(15.9～26.0)	♂:21.3±1.1～22.8±0.9 ♀:21.3±1.4～23.7±1.1
MCHC(g/dL)	55	31.4±1.2(27.3～34.7)	♂:31.7±0.8～32.7±0.6 ♀:31.6±0.7～32.4±1.0
血小板数(×10 ⁴ /μL)	55	34.8±10.0(12.8～74.6)	
血液像(%)			
Baso	33	0.1±0.2(0.0～1.0)	
Mono	33	2.7±1.4(0.7～7.0)	
Eosino	33	1.4±2.1(0.0～12.0)	
Lympho	32	45.6±16.1(19.0～84.0)	
Neutro	33	49.7±16.2(14.0～75.0)	
Stab	24	3.3±1.2(1.0～5.0)	
Seg	24	44.5±17.4(14.0～75.0)	

表6 (続き)

動物種 ♂/♀	ニホンザル				参考値
	♂		♀		
年齢	1歳8ヶ月～4歳9ヶ月:19頭(成長期)		1歳11ヶ月～3歳:3頭(成長期)		参考文献[10] ♂:1歳～25歳 ♀:1歳～25歳
産地	日本:19頭		日本:19頭		
個体数	19		3		
導入年月日	1998.11.11～2009.2.23		2002.6.10～2009.2.23		
検査年月日	1998.11～2009.2		2002.6～2009.2		
	検体数	平均値±標準偏差 (最小値～最大値)	検体数	平均値±標準偏差 (最小値～最大値)	
白血球数(/ μ L)	19	8647±2728(2900～14000)	3	7667±2237(4700～10100)	♂:8900±2830～10700±2900 ♀:9200±2230～12000±2930
赤血球数($\times 10^4$ / μ L)	19	537±43(464～606)	3	518±26(483～545)	♂:498±59.6～584±32.7 ♀:498±49.5～573±30.1
血色素量(g/dL)	19	14.4±0.9(13.0～15.9)	3	13.7±0.5(13.0～14.0)	♂:13.8±1.11～16.0±1.25 ♀:13.3±2.71～15.5±1.14
ヘマトクリット値(%)	19	43.5±2.5(38.0～47.5)	3	41.9±1.6(40.0～44.0)	♂:41.8±3.11～50.8±4.39 ♀:42.5±3.21～48.7±2.66
MCV(fl)	19	81±3(75～87)	3	81±1(80～82)	♂:82±2.4～90±11.0 ♀:84±4.2～91±12.0
MCH(pg)	19	26.8±1.0(25.1～28.4)	3	26.5±0.6(26.0～27.0)	♂:26.7±1.40～29.3±2.68 ♀:27.0±1.22～29.7±3.47
MCHC(g/dL)	19	33.0±0.9(31.1～34.5)	3	32.8±0.4(32.0～33.0)	♂:31.5±1.26～34.1±1.91 ♀:31.8±1.09～33.7±1.49
血小板数($\times 10^4$ / μ L)	19	31.7±8.0(6.8～47.7)	3	28.8±8.4(17.0～36.0)	
血液像(%)					
Baso	14	0.2±0.3(0.0～1.0)	2	0.0±0.0	
Mono	14	4.9±1.8(1.0～8.0)	2	4.5±2.2(4.0～5.0)	
Eosino	14	1.1±0.5(0.0～2.0)	2	1.0±0.0	
Lympho	14	51.6±13.7(26.0～72.0)	2	66.0±32.0(57.0～75.0)	
Neutro	14	42.0±13.4(22.0～68.0)	2	28.5±15.1(20.0～37.0)	
Stab	12	3.6±1.8(2.0～8.0)	2	3.0±0.0	
Seg	12	38.2±12.9(20.0～61.0)	2	25.5±13.9(17.0～34.0)	

表7 血清生化学検査結果

動物種 ♂/♀	カニクイザル				参考値
	♂		♀		
年齢	3歳1ヶ月～5歳未満:7頭(成長期) 5歳～10歳2ヶ月(推定6歳以上を含む): :69頭(成熟期)		1歳10ヶ月～4歳未満:3頭(成長期) 4歳～6歳7ヶ月(推定10才を含む): :5頭(成熟期)		参考文献[6] コロニーの成熟♂♀ 参考文献[7](産地:ベトナム) ♂♀:3～5歳 文献[6]/[7]の順に記載
産地	インドネシア:4頭 マレーシア:19頭 フィリピン:33頭 日本:6頭 中国:14頭		インドネシア:2頭 マレーシア:1頭 日本:5頭		
個体数	76		8		
導入年月日	1979.11.20～2008.2.6		1979.11.20～2003.12.24		
検査年月日	1979.11～2008.2		1979.11～2003.12		
	検体数	平均値±標準偏差 (最小値～最大値)	検体数	平均値±標準偏差 (最小値～最大値)	
総蛋白(g/dL)	23	7.1±0.8(4.2～8.3)	2	7.8±0.3(7.4～8.1)	♂:7.2/7.8±0.7 ♀:7.4/7.9±0.5
アルブミン(g/dL)	23	3.8±0.6(2.1～4.7)	2	3.5±0.4(3.1～3.9)	♂:4.0/4.9±0.5 ♀:4.0/4.9±0.3
グロブリン(g/dL)	23	3.3±0.5(2.1～5.0)	2	4.3±0.1(4.2～4.3)	♂:3.2/- ♀:3.4/-
A/G比	23	1.15±0.23(0.63～1.52)	2	0.83±0.11(0.72～0.93)	♂:1.25/1.77±0.24 ♀:1.18/1.66±0.25
AST(GOT)(U/L)	23	69±41(24～215)	2	63±1(62～64)	♂:46/31±9 ♀:43/32±12
ALT(GPT)(U/L)	23	32±19(5～89)	2	160±40(120～200)	♂:49/32±13 ♀:47/39±15
ALP(U/L)	2	1679±279(140～1957)	0		♂:459/2064±770 ♀:490/1308±531
総コレステロール(mg/dL)	2	119±20(99～139)	0		♂:136/107±22 ♀:166/125±24
中性脂肪(mg/dL)	2	16±7(9～23)	0		♂:18/33±14 ♀:29/38±17
尿素窒素(mg/dL)	23	18.9±7.2(8.0～38.6)	2	29.8±13.8(16.0～43.6)	♂:20.2/17.2±2.8 ♀:16.2/17.6±3.1
カルシウム(mg/dL)	2	9.4±0.2(9.1～9.6)	0		♂:8.7/10.2±0.5 ♀:8.8/10.2±0.5
無機リン(mg/dL)	2	5.2±1.4(3.8～6.5)	0		♂:5.0/6.1±0.9 ♀:4.0/6.2±1.0
血清中血糖(mg/dL)	23	60±18(24～93)	2	63±4(59～66)	♂:50/80±17 ♀:49/76±12
CRP定性	2	(-)	0		
クレアチニン(mg/dL)	11	0.77±0.14(0.55～0.96)	1	1.06	♂:1.1/0.7±0.1 ♀:0.8/0.6±0.1

表7 (続き)

動物種 ♂/♀	アカゲザル		
	♂		参考値
年齢	2歳1ヶ月～5歳未満:28頭(成長期) 5歳～7歳4ヶ月:39頭(成熟期)		参考文献[11] ♂♀血糖値
産地	中国:49頭 日本:18頭		参考文献[12] ♂♀:0.05歳～10歳以上
個体数	67		
導入年月日	1991.8.31～2013.3.27		
検査年月日	1991.8～2013.3		
	検体数	平均値±標準偏差 (最小値～最大値)	
総蛋白(g/dL)	55	7.1±0.8(4.3～8.8)	♂:7.0±0.6～7.8±0.5 ♀:6.9±0.4～7.8±0.4
アルブミン(g/dL)	55	4.3±0.50(2.2～5.1)	♂:4.5±0.4～4.7±0.4 ♀:3.3±0.4～4.6±0.4
グロブリン(g/dL)	55	2.8±0.4(2.1～4.3)	♂:2.2±0.5～3.3±0.5 ♀:2.6±0.3～4.1±0.4
A/G比	55	1.53±0.22(1.00～1.96)	
AST(GOT)(U/L)	55	54±30(22～199)	♂:33±8～42±9 ♀:28±13～40±12
ALT(GPT)(U/L)	55	49±27(10～140)	♂:38±10～51±13 ♀:29±10～48±11
ALP(U/L)	29	1193±514(405～2331)	♂:203±84～727±148 ♀:85±58～646±136
総コレステロール(mg/dL)	29	138±25(56～176)	♂:138±20～179±29 ♀:73±35～180±42
中性脂肪(mg/dL)	29	29±20(7～86)	♂:41±14～50±16 ♀:44±16～55±23
尿素窒素(mg/dL)	54	19.5±5.1(11.4～34.1)	♂:18±3～24±5 ♀:12±2～21±6
カルシウム(mg/dL)	30	10.0±2.8(7.7～24.5)	♂:9.7±0.7～10.8±0.8 ♀:8.8±0.8～10.7±0.9
無機リン(mg/dL)	29	4.6±1.5(1.5～7.6)	♂:3.6±0.9～6.4±1.1 ♀:3.0±1.4～5.6±1.0
血清中血糖(mg/dL)	55	84±25(48～180)	60～160/ ♂:60±10～88±20 ♀:56±18～82±16
CRP定性	29	(-)	
クレアチニン(mg/dL)	18	0.65±0.15(0.40～0.94)	♂:0.7±0.2～1.1±0.1 ♀:0.6±0.2～0.9±0.3

動物種 ♂/♀	ニホンザル				
	♂		♀		参考値
年齢	1歳8ヶ月～4歳8ヶ月:19頭(成長期)		1歳11ヶ月～3歳:3頭(成長期)		参考文献[10] ♂:1歳～25歳 ♀:1歳～25歳
産地	日本:19頭		日本:19頭		
個体数	19		3		
導入年月日	1998.11.11～2009.2.23		2002.6.10～2009.2.23		
検査年月日	1998.11～2009.2		2002.6～2009.2		
	検体数	平均値±標準偏差 (最小値～最大値)	検体数	平均値±標準偏差 (最小値～最大値)	
総蛋白(g/dL)	19	7.1±0.4(6.3～7.8)	3	6.8±0.4(6.3～7.2)	♂:7.5±0.44～8.2±0.66 ♀:7.5±0.52～8.2±0.66
アルブミン(g/dL)	19	4.1±0.2(3.6～4.5)	3	3.9±0.2(3.6～4.1)	
グロブリン(g/dL)	19	3.0±0.3(2.4～3.6)	3	2.9±0.6(2.2～3.6)	
A/G比	19	1.36±0.18(1.16～1.83)	3	1.40±0.35(1.00～1.86)	♂:1.40±0.17～2.31±0.29 ♀:1.41±0.11～2.21±0.29
AST(GOT)(U/L)	19	58±68(25～343)	3	53±20(38～81)	♂:22±6.4～37±7.0 ♀:22±7.8～36±8.4
ALT(GPT)(U/L)	19	47±29(20～115)	3	32±8(22～41)	♂:22±10.6～29±10.7 ♀:22±8.9～29±10.5
ALP(U/L)	14	1097±206(732～1483)	2	1270±257(1013～1527)	
総コレステロール(mg/dL)	14	125±23(89～169)	2	154±6(148～160)	♂:126±29.2～174±53.4 ♀:133±25.4～169±35.5
中性脂肪(mg/dL)	14	61±33(20～132)	2	51±9(42～59)	♂:44±16.2～82±32.7 ♀:50±21.4～94±26.1
尿素窒素(mg/dL)	19	16.9±3.1(11.7～24.6)	3	16.4±4.5(12.1～22.6)	♂:17.6±3.12～23.7±6.01 ♀:15.7±4.51～22.1±4.88
カルシウム(mg/dL)	14	9.4±0.3(8.9～9.9)	2	9.5±0.6(8.9～10.1)	♂:9.3±1.38～10.0±1.07 ♀:9.3±0.86～10.1±1.11
無機リン(mg/dL)	14	4.5±0.6(3.4～5.8)	2	5.05±0.25(4.8～5.3)	♂:3.6±0.68～5.3±1.08 ♀:3.2±0.63～4.9±0.66
血清中血糖(mg/dL)	19	75±15(16～100)	3	79.3±11.9(63.0～91.0)	♂:65±9.1～78±20.9 ♀:61±9.5～90±17.6
CRP定性	14	(-)	2	(-)	
クレアチニン(mg/dL)	2	0.7±0.1(0.6～0.7)	1	0.75	♂:0.79±0.12～1.08±0.13 ♀:0.75±0.12～0.90±0.09

4. まとめ

動物実験における、霊長類は人間のモデルとして貴重な実験動物である。その一方で、重篤な人獣共通感染症を有している可能性がある為、外部から霊長類を動物施設に導入する際には、検疫は必須である。今回、過去33年余りにわたって放医研に導入したマカク属サル173頭の検疫検査結果をまとめ、体重、血液検査及び生化学的検査の結果について、成書や文献で報告されたものとの比較を行った。3種のマカク属サルにおいて、検疫時の年齢（推定年齢を含む）と体重との関係は、特に過去の報告と異なるものはなかった。また、血液検査結果についてもほとんど文献値と同様の値を示していた。一方、血清生化学検査においては、ASTとALTがまれに高い値を示す例が存在し、注意して経過観察を行ったが原因は不明であった。

放医研では、マカク属サルを複数種導入しており、動物の供給元施設も海外を含む複数の施設からである為、導入動物の検疫時における背景データを作成し、傾向を分析すると共に、公表されている文献等の結果と比較することは大変重要なことである。また、麻酔下での全身検査が実施できることから、脱毛や外傷を正確に観察できるなど、導入後のサル個体の健康管理の観点からも検疫検査は重要である。更に、検疫時の検査だけでなく、定期的実施している検査結果と併せて研究者へ情報を提供することで、安全にかつ有効に動物を利用するためにも役立っている。

本稿では一般状態及び血液検査結果について報告したが、細菌、ウイルス、内部寄生の検査結果についての解析を進めており、まとめ次第、報告する予定である。

参考文献

[1] 中井斌、岡本正則、戸張巖夫、平井百樹、高橋永一、辻秀雄、霊長類実験棟と放射線による遺伝的リスクの研究。放射線科学

23-2(1980) 32-35.

[2] 中井斌、松岡理、中型動物（ビーグル犬・サル）の導入に関する研究。放射線医学総合研究所年報 昭和48年度(1973) 18.

[3] 技術部動植物管理課、4. 実験動物管理業務。放射線医学総合研究所年報 平成元年度(1990) 145-150.

[4] 吉田高志、藤本浩二編、第3章 検疫。医科学研究資源としてのカニクイザル (2006) 21-30.

[5] 重兼弘法、小久保年章、松下悟、西川哲、放医研で運用しているサルデータベースシステムについて。実験動物技術 48-1(2013)9-16.

[6] 吉田高志、藤本浩二編、第7章 コロニーのモニタリング。医科学研究資源としてのカニクイザル (2006)117-137.

[7] 安全性評価研究会編集委員会編、3.「カニクイザル及びアカゲザル(*Cynomolgus*, *Rhesus macaque*)」 3.6 各施設におけるカニクイザルの背景データ 3.61 カニクイザルの背景データ・1 (株)三菱化学安全科学研究所。谷本学校毒性質問箱 医薬品副作用予測の最前線 8 (2005)16-22.

[8] 安全性評価研究会編集委員会編、3.「カニクイザル及びアカゲザル(*Cynomolgus*, *Rhesus macaque*)」 3.6 各施設におけるカニクイザルの背景データ 3.62 カニクイザルの背景データ・2 (株)イナリサーチ。谷本学校毒性質問箱 医薬品副作用予測の最前線 8 (2005)23-28.

[9] 笠井憲雪、吉川泰弘、安居院高志編、7. 比較実験動物学 7.3 各種実験動物学の特性 (実験動物の種と系統) o.サル。現代実験動物学(2009)147-151.

[10] 京都大学霊長類研究所人類進化モデル研究センター編、屋内飼育ニホンザルの血液及び血清生化学生理値加齢変化。新しいサル像をめざして(2002)69-76.

[11] 笠井憲雪、二宮博義、安居院高志、黒澤努監訳、3.実験動物の生理学と飼育管理 哺乳類 サル。実験動物学の原理(2011)42-45.

[12] Editors: James G. Fox, Lynn C. Anderson,
Franklin M. Loew, Fred W. Quimby , Chapter 16.

*Nonhuman Primates, Laboratory Animal
Medicine. 2nd Edition(2002) 675-791.*

中性子線照射装置(NASBEE)の現状 2013

Present status of the neutron exposure accelerator system for biological effect experiments at NIRS 2013

酢屋 徳啓^{1*}、須田 充¹、萩原 拓也²、白川 芳幸¹

¹ 研究基盤センター 研究基盤技術部 放射線発生装置技術開発課

² 株式会社ネオス・テック

要旨

The neutron exposure accelerator system for biological effect experiments (NASBEE)[1] installed in the low dose radiation effects research building of the National Institute of Radiological Sciences (NIRS) in Japan generates neutrons from a beryllium target by deuterium beam irradiation from a predominantly 2 MV tandem accelerator. There are two separate irradiation rooms, one being a conventional room for studies in biology and physics, another for the irradiation of mice, rats, etc., in a Specific Pathogen Free (SPF) environment. Since the open for research use in 2003, the system has been used by many researchers both from within and outside of the institute. The ion source is a multicusp ion source, using deuterium and hydrogen gas, it can output 500 μ A deuteron beams and 1mA proton beams respectively from the ion source outlet. In this report, we introduce the features of this equipment, as well as explain some of the troubles that have occurred around the ion source.

Keywords: NASBEE; 中性子線照射; 大電流; 放医研; マルチカスプ

***Corresponding Author:**

酢屋 徳啓 (Noriyasu Suya)

e-mail: nsuya@nirs.go.jp

1. はじめに

放医研に 2003 年から導入された、中性子線照射装置 (NASBEE : Neutron exposure Accelerator System for Biological Effect Experiments) (図 1) は 1 台の水素と重水素用のマルチカスプイオン源を備え、コンパクトな 15°分析マグネットで求めるビームを 2 MV のタンデム型静電加速器に通すことが出来る。イオン源ブロックには 1 kl/s のターボモレキュラーポンプがあり、ビームは 30 KV で引き出される。加速器はインラインタイプ[1]で加速管の周りに同軸上に加速電源が取り付けられている。従来型は T 字型の加速器形状であったため、加速器を開ける際に余分なスペースをとっていた。インラインタイプでは、加速器本体を開けるために、インジェクターキャビネットごと手前に引いて開けることによって、確保すべきスペースが少なくて済むようになっている。今回は、NASBEE システムの概略と、今までにイオン源周辺で起きたトラブル事例とその解決方法について報告す

る。

2. 装置の紹介

2-1.NASBEE のスペック

インライン型タンデム静電加速器
最大加速電圧:2 MV
イオン源 : マルチカスプ Model SO-120
ビーム電流 : 1 mA
ターゲットビーム電流:H 800 μ A、D 500 μ A
ターミナル電圧リップル (2 MV) :385 V_{pp}
ビームライン : 2 本 (1 つは SPF)
照射用ターゲット : ベリリウム、リチウム

ベリリウムと重水素との反応 : ${}^9_4\text{Be} + {}^2_1\text{D}$
(4 MeV) \rightarrow ${}^{10}_5\text{B} + {}^1_0\text{n}$ (約 2 MeV)
リチウムと水素との反応 : ${}^7_3\text{Li} + {}^1_1\text{p}$ (4 MeV)
 \rightarrow ${}^7_4\text{Be} + {}^1_0\text{n}$ (約 2 MeV) を
利用しターゲットとイオン種を変えることにより中性子を発生させている。

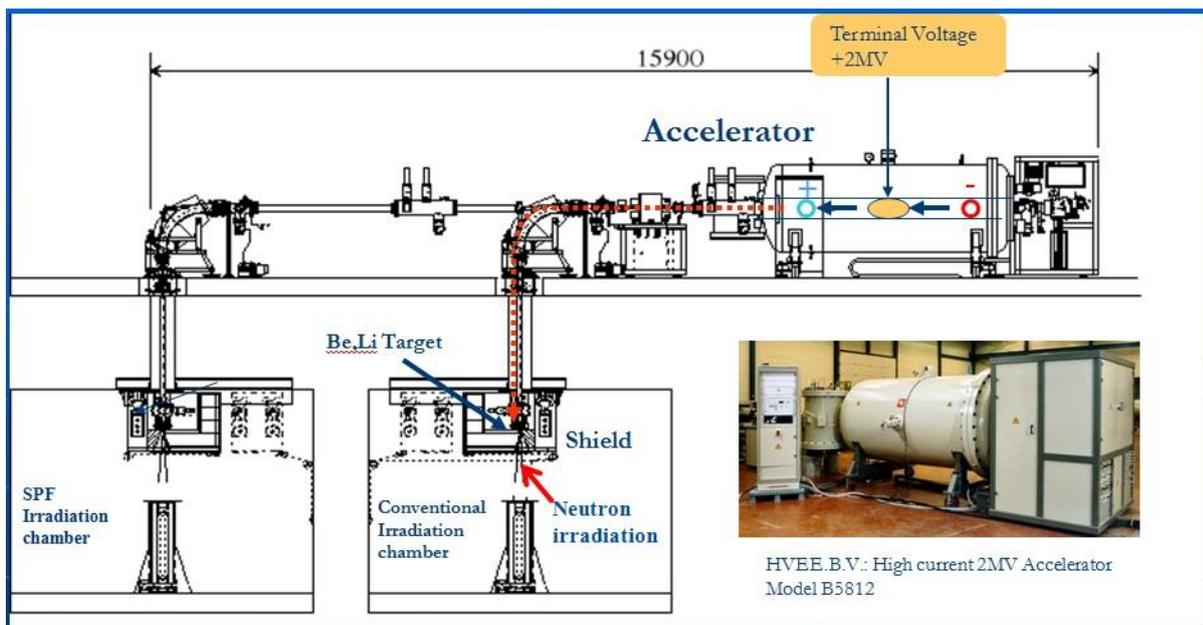


図 1. NASBEE の構成

2-2. イオン源

イオン源は Model SO-120Multicusp ネガティブイオン源である。原理図を図 2 に示す。外観は図 3 に示す。イオン源直後で約 1 mA の H と D ビームを引き出すことが出来る。イオン源の構成は、2 本のタングステンフィラメント、プラズマ電極、エクストラクション電極、加速電極、ガスインレットを備え、プラズマを封じ込める磁場を形成する為の永久磁石がソース本体を取り囲むように内蔵されている。イオン源の冷却には 5 KW の冷却能力が必要である。尚かつイオン源は 30 KV の引き出し電圧上にあるため、冷却水は最大伝導率 10 μ S のイオン交換水を使用する。イオン源専用のチラー(冷却水循環装置)を装備している。イオン源に供給される水素又は重水素ガスは、サーマルリークバルブで調整されてガスインレットからイオン源へ導入される。サーマルリークバルブの切り替えでガスの種類を選択出来る。15°分析マグネットの後にあるイオン源出口のレンズ系は 30 KV のアインツェルレンズ、電磁石式のステアラーがある。そして加速器入り口には HVEE 社特許の Qsnout レンズがあり、ビームを加速電圧に連動して収束出来るシステムになっている。

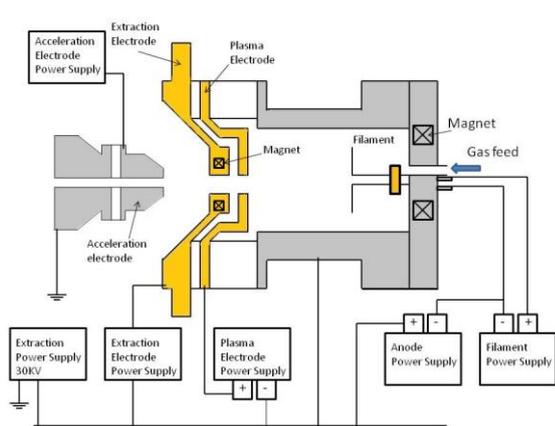


図 2. マルチカスプイオン源原理図

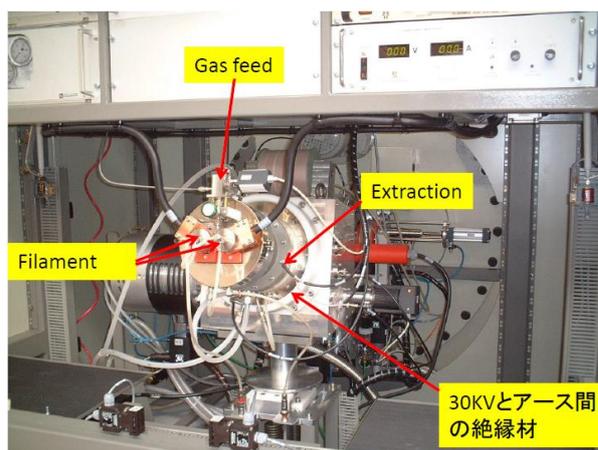


図 3. マルチカスプイオン源

2-3. 運転状況

2012 年度の加速器運転状況をグラフとして図 4 に示す。総運転時間:2008 時間、利用運転時間は 840 時間であった。ユーザー別では、内部ユーザー35日、外部ユーザー70日で、外部の研究機関、民間企業の利用の方が 2 倍多かった。夏に加速器が故障し、大がかりな修理になったため、修理後の調整を含め 55 日の日数が必要だった。加速器利用目的としては、主にマウス・ラットを使った発達期被爆影響の研究や BNCT の照射技術に関する研究等に使われている。

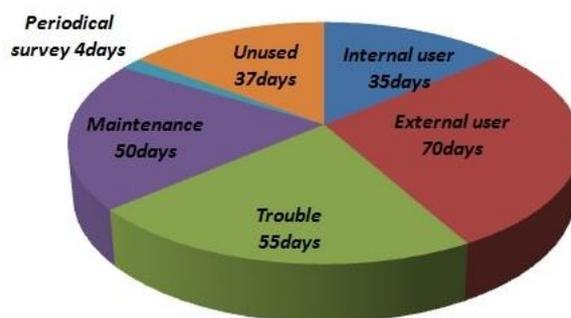


図 4. 加速器利用目的別の運転時間

3.イオン源周辺のトラブルと開発等について

3-1. ターゲットの開発

重水素をベリリウムターゲットに照射し、Be(d,n)反応を利用して中性子線を発生させているが、冷却効率が悪く長時間の照射を行う

と表面剥離が起きる。そのため、長期間の安定照射とエネルギー分布改善のためターゲットの改良を行った。改良前は2枚の仕切り板で水流を作る方式だったが、水流の流れがランダムで熱交換効率があまり良くない事がベリリウムの剥離状況から懸念された。また、冷却水層が厚く中性子のエネルギー分布に影響があった。パイプをターゲット面全体に密着させて冷却する方式に変更し、冷却水層の厚みを25 mmから5 mmに変更することで流速が早くなり冷却効率が向上した。そして中性子のエネルギー分布が改善した。その改良前と改良後のターゲットを図5に示す。

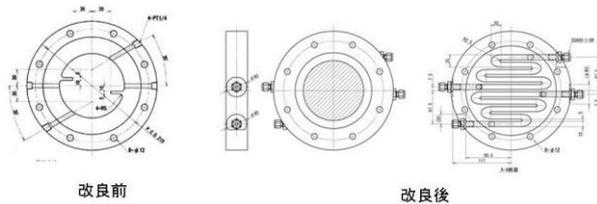


図5. ターゲット平面図

3-2.イオン源フィラメントホルダーの改良

図6に示すように、納入当初からビームを出して数ヶ月経つとビームが出なくなり、イオン源内のフィラメントホルダーが溶けるという事例が起きていた。フィラメントは水冷のフィードスルーに固定されている。オリジナルは銅とステンレスの筒状のねじ受けで出来ており、ビームが出ている時と消えている時の温度差による熱膨張率の違いで次第に緩んできたものと考えられる。まず、水冷フィードスルーを両サイドから止め、フィラメントを銅の板で2カ所から挟む構造にした。しかしフィラメントを挟むブロック間にできる隙間による熱伝導の改善のために銅板を挟む方法を採用したが、ホルダーが溶ける事例が生じた。そこで、本体をほとんど銅だけで作成し、フィラメントを両サイドからねじで押し込むことにより挟む構造にした。これにより、ホルダーが溶けることがなくなった。



図6. フィラメントホルダー

3-3.フィラメント使用による抵抗値の変動

図7に示すとおり、イオン源フィラメントの交換時期をその抵抗値から算出した。グラフは9本のフィラメントの抵抗値の変化を表している。1本目の急激に低下している所はフィラメントが切れた時であり、およそ70日を過ぎると限界のようである。通常、安全を見て抵抗値を監視しながら使用日数50日を目処に交換している。

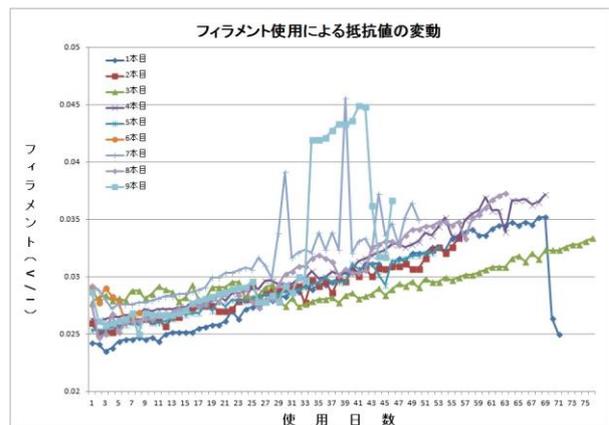


図7. フィラメントの抵抗値の変動

3-4.イオン源冷却水循環装置の不具合

ビームウィザード[2]が立ち上がりずビームが加速器を通らなくなった。原因を調べると、エクストラクションカレントが高すぎて計算上ビームパワーが高くなりすぎビームシャッター代わりにファラデーカップが開かないことが分かった。

ビームウィザードとは、大電流ビームが装置にダメージを与えないようにビーム軌道をコントロールする機構である。具体的には各パラメーターに調整幅のリミットを設定してビーム軌道を確保出来るシステムになってい

る。エクストラクション電流、ターミナル電圧、電荷、エクストラクション電圧を基に計算されたビームパワーと呼ばれる表示が、ある設定値を越えるとビームウィザードを発生させる。その時各パラメーターが規定範囲を超えると、直ちにインジェクターのファラデーカップが閉まるようになっている。今回のトラブルは、ビームシャッター代わりのファラデーカップが閉まっている状態で既にリミッターを超えるビームパワー値であったため、ファラデーカップが開かない現象が起きた。

エクストラクション電流が高くなる原因を調べていくと、イオン源を冷却している純水の電気伝導率が低くなっていることが分かった。イオン源には専用のチラーがあり、そのリアパネルに小型のイオン交換樹脂が付いている。その中を開けてみると黒く変色して、機能を果たしていないように見えた。その小型のイオン交換樹脂を取りはずし、代わりに外付けの大型のイオン交換樹脂と冷却水用フィルター（図8）を取り付けると、冷却水の絶縁が高くなった。結果としてエクストラクション電流が低くなり、正常にビームウィザードが働くようになった。



図8. イオン交換樹脂(中央)

3-5.イオン源チラーの更新

イオン源用チラーには、コンプレッサーがない。1次側の冷却水で2次側の冷却水を熱交換器で冷やすタイプのコンパクトな設計であ

るが、内部の配管がすべて樹脂製で振動によりシール部が緩み、頻繁に水漏れを起こしていた。図9に示すように熱交換器をチラーの外に出してコネクターを金属製に交換して、やっと水漏れが止まったが、メンテナンス性が非常に悪いため、日本製のチラーに更新した（図10）。イオン交換樹脂も大型の物をセットで更新し、以前より容量の大きな物にしたため、安定して稼働している。



図9. 冷却水循環装置の熱交換器



図10. イオン源用の新しい冷却水循環装置

3-6.イオン源絶縁トランスの故障

イオン源はメインランドに対し30KVに浮いている。そのため、イオン源関連の装置に電力を供給するためには30KVに耐えられる絶縁性能を持ったトランスが必要である。図11のようにイオン源キャビネットに吊された絶縁トランスによって電源のAC230Vはイオン源側へ電力を供給されている。イオン源キャビネットが密閉された環境にあり、この

時期湿度も高かったために絶縁トランスの内部で電氣的にショートして電圧が掛からなくなった。メーカーに注文すると納期が6ヶ月程度掛かるので、速やかに代替品のトランスを製造してくれる会社にオーダーした。図12に示すように、オリジナルのトランスより重量が軽く、より耐圧の高い(40KV以上)仕様にした。



図 11. 交換前の絶縁トランス



図 12. 交換後の絶縁トランス

3-7. ガスポンベの大型化

イオン源の重水素の減りが早いためポンベを0.4Lから3.4Lへ容量を増やした。専用ホルダーを増設し(図13)、配管を延長した。30KVに浮いているためグラウンドに接触しないよう注意を払った。この結果、4日しか使用出来なかったガスが10倍以上持つようになった。

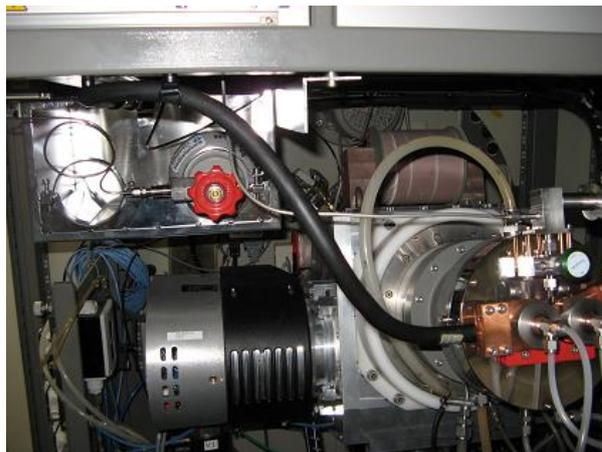


図 13. ガスポンベホルダー：左上のステンレス製ホルダーに4.7Lガスポンベが2本入る。ホルダーは絶縁されている。

3-8. エレクトロードプレートとビーム電流の限界

400 μA 以上のビームを6ヶ月くらい出し続けた後にイオン源を開けてみると、図14のようにセカンドエレクトロードの上のボルトだけスパッターされてボルトの頭が溶けていた(図15)。現状では原因は明らかとなっていないが、ビームが局所的に照射されているためであると推察される。セカンドエレクトロードの引き出し電流が400 μA 以上のビームを出したとき、最大値を超える飽和状態になると同時に、ビーム電流もそれ以上出なくなる。この現象との因果関係について今後検証する予定である。

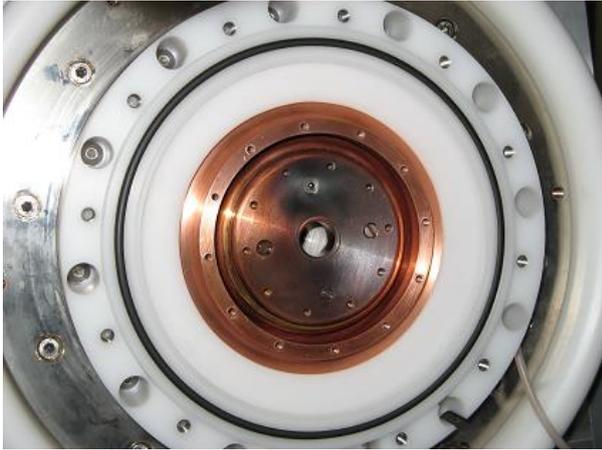


図 14. セカンドエレクトロードプレート



図 15. セカンドエレクトロードから取り外したボルト

4. まとめ

NASBEE はマルチカスプイオン源で発生させた $400 \mu\text{A}/4 \text{ MeV}$ 以上の大電流の水素及び重水素ビームを用いて中性子を照射出来る数少ない静電加速器施設である。2004 年の装置導入以来イオン源周辺におけるいくつかのトラブルを経験してきた。初期段階のトラブルは解消され、現在は定常的に運転できる安定期に入ってきた。この装置の大きな特徴としては、ビームウィザードという大電流を制御するためのプログラムがある。このビームウィザードの保護機構のおかげで安定してビームをターゲットまで搬送できる事が 9 年間の運転で証明された。懸念される問題点としては、

クーリングシステムの故障があげられる。クーリングの不具合はイオン源にとっても深刻な問題であり、安定的な運転と稼働率をあげるためにも今後、改良を加えていきたい。

5. 参考文献

- [1] Mitsuru Suda, Takuya Hagihara, Noriyoshi Suya, Tsuyoshi Hamano, Masashi Takada, Teruaki Konishi, *et.al.* Radiation Physics and Chemistry. **78** (2009) 1216–1219
- [2] M.G.Klein, A.Gott dang, R.G.Haitsma, D.J.W.Mous, Application of Accelerations in Research and Industry 20th, 31-34(2008)

平成 24 年度 静電加速器棟 (PASTA&SPICE) の現状報告

Progress report of NIRS electrostatic accelerator facility (PASTA & SPICE) at FY2012

及川 将一*, 酢屋 徳啓, 石川 剛弘, 小西 輝昭,
磯 浩之, 樋口 有一, 松田 拓也, 白川 芳幸

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

要旨

The electrostatic accelerator facility (PASTA & SPICE) of the National Institute of Radiological Sciences (NIRS), Japan, has been working and operating smoothly for 13 years, since the introduction of an HVEE Tandetron (Model4117MC+) in March of 1998. However, the 2011 earthquake off the Pacific coast of Tohoku caused damage to various apparatuses, and displacement of the beam line and bending magnet. This made the stable operation and provision of machine time difficult. All machine time was halted in 2011. Restoration and repair work was conducted, and starting in 2012, we reached a point where machine time could be provided as normal. In this paper, we report on the state of use and the stage of technological development of the electrostatic accelerator facility (PASTA & SPICE) for the year 2012.

Keywords PASTA; SPICE; Tandetron accelerator; Ion beam analysis; Microbeam; PIXE

****Corresponding Author:***

及川 将一 (Masakazu Oikawa)

e-mail: oikawa@nirs.go.jp

1. はじめに

放射線医学総合研究所（以下、放医研）静電加速器施設には、最大ターミナル電圧 1.7 MV の HVVEE 製タンデトロン（Model 4117MC+）が設置されており、PIXE（Particle Induced X-ray Emission）分析を始めとして 3 MeV 程度の軽イオン照射に利用されている。イオン源としては、 $^1\text{H}^+$ 用 1 基と Li オープンを備えた $^4\text{He}^{2+}$ 用 1 基の、合計 2 基のデュオプラズマトロン型負イオン源（Model 358）を設置している。ビームラインは、分析対象の性状に応じて「コンベンショナル PIXE 分析装置」、「液滴 PIXE 分析装置」、「マイクロ PIXE 分析装置」の 3 本の PIXE 分析用ビームラインが設置されており、マイクロ PIXE 分析装置には英国 Oxford Microbeams Ltd.製の三連四重極レンズシステム OM-2000 とデータ収集システム OM-DAQ2007 が導入されており、環境科学や生命科学等の幅広い研究分野に利用されてきた[1-3]。更に、マイクロ PIXE ビームラインの途中から垂直に打ち上げる方向で、マイクロビーム細胞照射装置（Single Particle Irradiation System to Cells : SPICE）のビームラインが設置

されており、低線量・低線量率放射線影響研究の強力なツールとして利用されている[4-7]。

2. 平成 24 年度の利用状況

対象期間（平成 24 年 4 月～平成 25 年 3 月）において集計された、PIXE 分析と SPICE のマシンタイム利用の内訳を図 1 に示す。全稼働時間は 1753 h（197 日）であり、その内訳は、PIXE 分析の利用時間合計が 935 h、SPICE の利用時間が 818 h であり 53:47 の比率であった。PIXE 分析に関する課題は全 8 課題で利用され、5 件が外部研究機関の研究課題（全て国内）に利用された。一方、SPICE は、全 5 課題で利用され、3 件が外部研究機関の研究課題（海外 2 件、国内 1 件）であった。また、当該年度の外部利用率は PIXE : 35 %、SPICE : 25 %に留まった。これは、東日本大震災の被害からの復旧の一環として、各種ハードウェアの条件出しを含む R&D 課題を多く組み入れたため、内部利用の割合を大きくせざるを得なかったためである。

図 2 に、研究課題件数の年度別推移を示す（平成 23 年度は東日本大震災の影響により

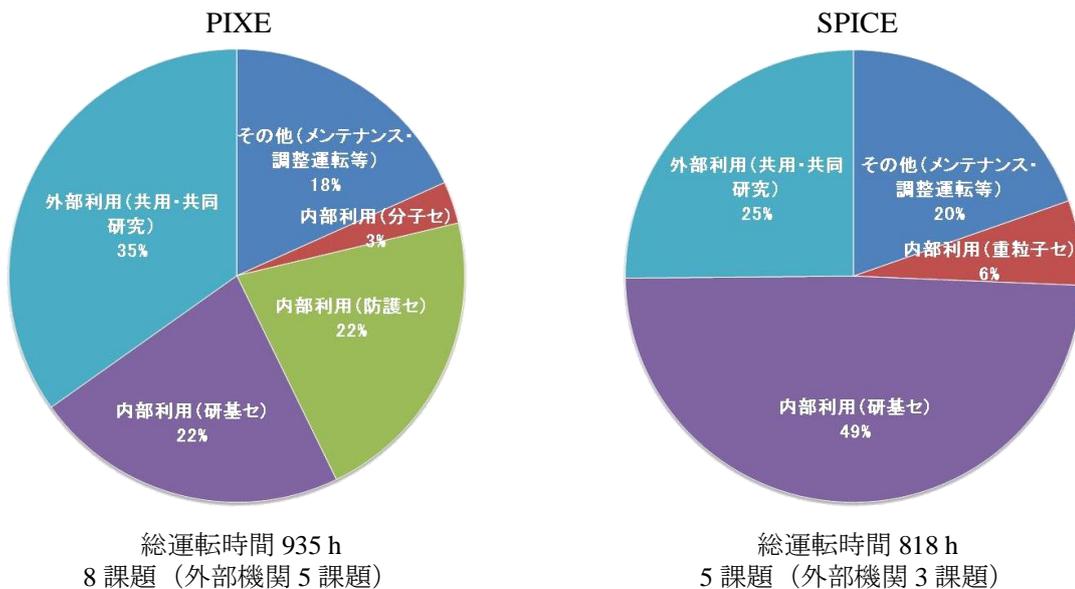


図 1. 平成 24 年度 PASTA&SPICE の利用内訳
集計期間：平成 24 年 4 月 1 日～平成 25 年 3 月 31 日

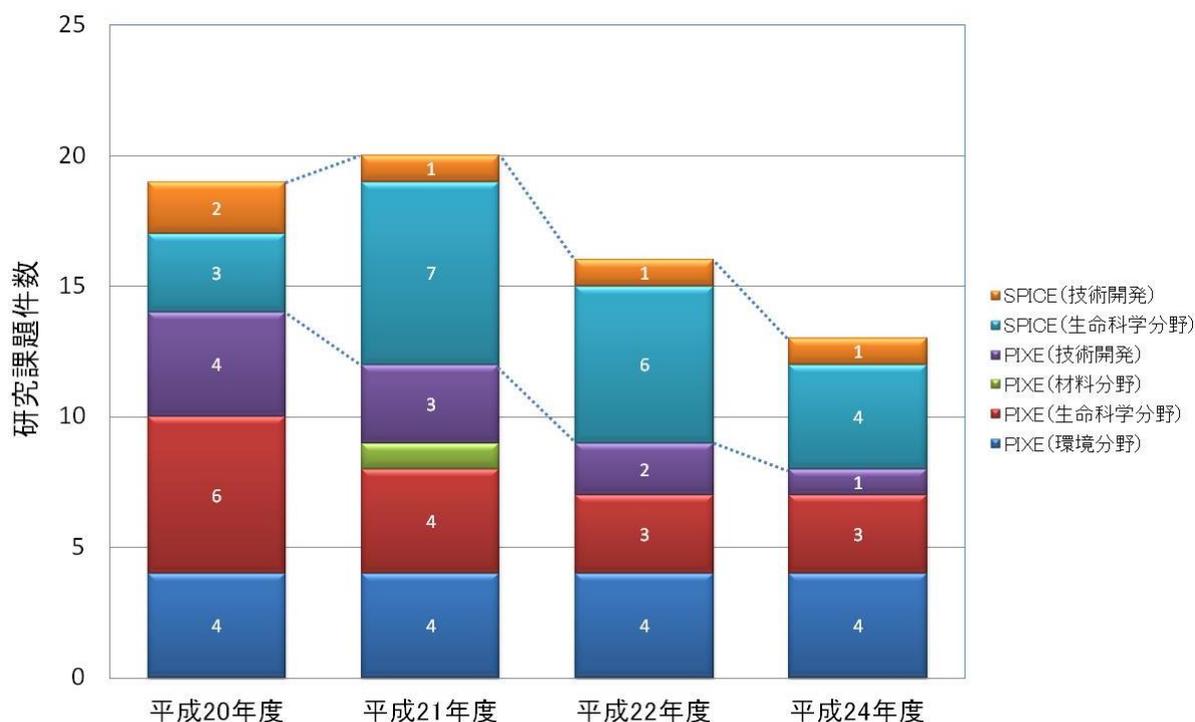


図2. 平成20年度～平成24年度における年度別研究課題の推移
平成20年度～平成24年度（震災影響により平成23年度を除く）

装置の稼働が困難であったため除外した)。平成24年度は震災復旧後の装置利用再開初年度であることから、研究課題件数が前年度比81%に減少した。しかし、平成25年度は、研究課題件数が震災前の水準に戻りつつある。

3. 各ビームラインの技術開発の現状

3-1. コンベンショナル PIXE 分析装置

当施設では、PIXE、PIGE、RBS、ERDA等のイオンビーム分析を相補的に組み合わせることで全元素の分析を実現し、元素含有比から化学状態の推定まで可能にする全元素分析技術の開発に着手している。コンベンショナル PIXE 分析装置では、環境試料中のマグネシウムや歯科材料中のフッ素等、従来の半導体検出器では苦手としている低エネルギー領域の分析に関して要望があり、新規 HP-Ge 検出器 (CANBERRA 製 GUL0110) を導入したことを契機に、軽元素領域における

PIXE 分析の適用元素拡大について検討を行った。新規 HP-Ge 検出器は、有感面積 100 mm^2 、結晶厚さ 10.2 mm という重元素分析に有利な結晶サイズを有している。更に、窓材として低エネルギー X 線の透過性に優れた 400 nm 厚のポリマー (ポリイミド) を採用した上で、 $\text{FWHM}=121 \text{ eV}$ (@ 5.9 keV) という優れたエネルギー分解能を有しており、軽元素分析に適した性能も併せ持っている。

図3に当該検出器を使用して、ポリカーボネートフィルタ上に捕集された PM2.5 相当の大気浮遊塵標準試料 (NIST SRM2783) の分析を行った結果について示す。検出器の窓材前面に、可視光と反跳陽子対策として黒色油性インクで着色した $\phi 1 \text{ mm}$ 穴開き PET フィルム ($100 \mu\text{m}$ 厚) をアブソーバとして設置した上で、入射陽子エネルギー 3.0 MeV 、積算電荷量 $10 \mu\text{C}$ の条件にて PIXE 分析を行った。その結果、ポリカーボネートに由来する酸素の K-X 線まで検出でき、マグネシウムよりも軽い元素の分析へ十分に適用可能で

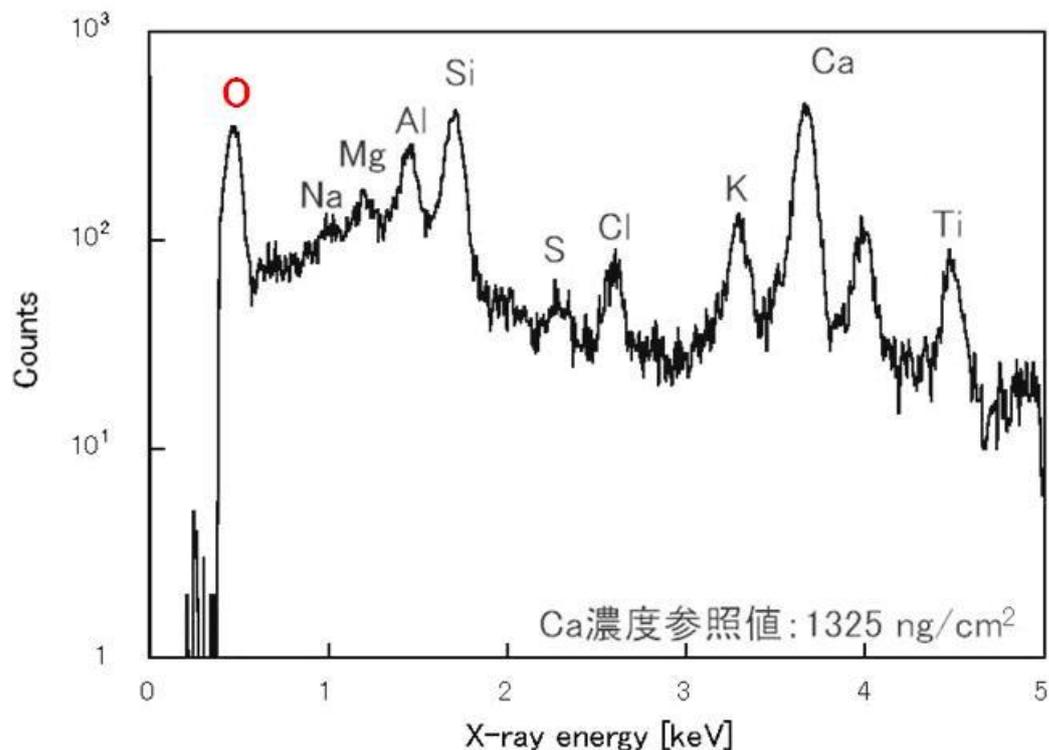


図 3. PM2.5 模擬標準試料 (NIST SRM2783) の PIXE スペクトル
入射陽子エネルギー3.0 MeV、積算電荷量 10 μ C

あることが確認された。ただし当該検出器は、ポリマー窓を採用していることから可視光に対して有感であり、ビーム入射によりサンプル自体が発光する場合は、そのノイズによりエネルギー分解能が劣化する問題があった。今後は、遮光対策も含めたアブソーバ材料の検討と計測回路系の調整を進めていく予定である。

3-2. マイクロ PIXE 分析装置

静電加速器施設では、平成 24 年度に重金属元素の生体毒性に関する研究課題において、マイクロ PIXE 分析装置にてウランやタリウム等の L-X 線で 10 keV 以上を対象とする重元素分析の要望があった。本課題の実施に伴い、本施設内の放射線管理区域を核燃料物質取扱施設 (令 41 条非該当施設) としての指定を受け、同年 9 月からは天然ウランを含有した試料の分析を可能とした。また、これらの元素分析のために CdTe ダイオード検出器 (Amptek 製 XR-100T-CdTe) を導入して

重元素高効率検出システムを構築した[8]。

図 4 に、ポリビニルアルコールに既知濃度のウランを混練した薄切標準試料 (500 ppm) の PIXE スペクトルを示す。入射陽子エネルギーは 3.0 MeV、積算電荷量は 200 nC で走査領域は 100 μ m \times 100 μ m の測定条件となっている。ウラン L α 線において、CdTe ダイオード検出器のピーク面積 (図 4 青線) は、Si(Li) 検出器 (図 4 赤線) と比べ 10 倍以上あることから、特性 X 線のエネルギーが 10 keV 以上の重元素領域において、十分に高い感度を有していることが確認できた。しかし、図 4 中に示すように、ウラン L β 線と重なり合う形でジルコニウム K-X 線が検出されている。これは、ビームダンプとして CdTe ダイオード検出器前面に設置している 200 μ m 厚のグラッシーカーボン (東海カーボン株式会社製) に由来しており、研磨過程で酸化ジルコニウム (ジルコニア) が混入したものと考えられる。今後は、当該検出システムの応用を進める一

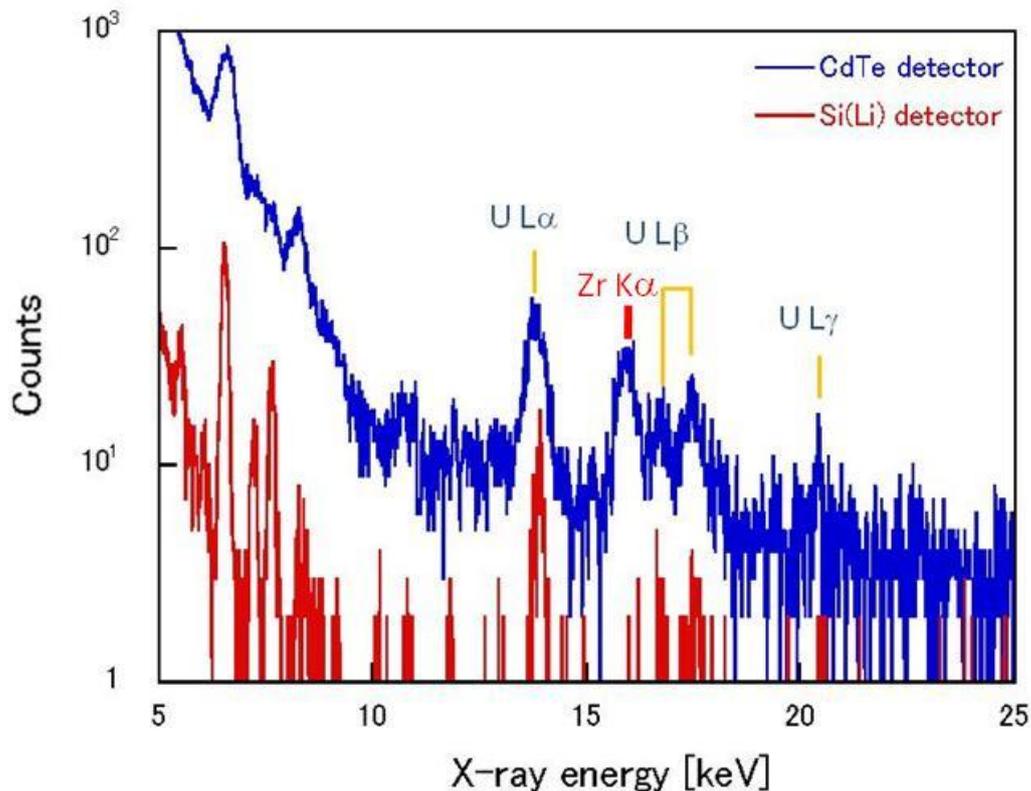


図4. ウラン薄切標準試料 (500 ppm) のPIXE スペクトル
入射陽子エネルギー3.0 MeV、積算電荷量 200 nC、
走査領域 100 μm \times 100 μm にて測定を実施。

方で、新たなビームダンプ材料を探索するな
どシステムの最適化を図る予定である。

参考文献

- [1] H. Imaseki, M. Yukawa, F. Watt, T. Ishikawa, H. Iso, T. Hamano, K. Matsumoto, N. Yasuda, Nucl. Inst. Meth. B210 (2003) 42-47.
- [2] K. Saitoh, T. Ishikawa, H. Iso, T. Konishi, H. Imaseki, S. Hasegawa, A. Fushimi, S. Kobayashi, K. Tanabe, Int. J. PIXE 18 (2008), 47-52.
- [3] S. H. Takeda, Y. Terada, H. Iso, T. Ishikawa, M. Oikawa, T. Konishi, H. Imaseki, Y. Shimada, Int. J. PIXE 19 (2009), 39-45.
- [4] H. Yamaguchi, Y. Sato, H. Imaseki, N. Yasuda, T. Hamano, Y. Furusawa, M. Suzuki, T. Ishikawa, T. Mori, K. Matsumoto, T. Konishi, M. Yukawa, F. Soga, Nucl. Inst. Meth. B210 (2003) 292-295.
- [5] H. Imaseki, T. Ishikawa, H. Iso, T. Konishi,

- N. Suya, T. Hamano, X. Wang, N. Yasuda, M. Yukawa, Nucl. Inst. Meth. B260 (2007) 81-84.
- [6] T. Konishi, T. Ishikawa, H. Iso, N. Yasuda, M. Oikawa, Y. Higuchi, T. Kato, K. Hafer, K. Kodama, T. Hamano, N. Suya, H. Imaseki, Nucl. Inst. Meth. B267 (2009) 2171-2175.
- [7] 及川将一, 酢屋徳啓, 石川剛弘, 小西輝昭, 磯浩之, 樋口有一, 松田拓也, 白川芳幸, 第24回タンデム加速器およびその周辺技術の研究会報告集 (2011) p37-42.
- [8] 及川将一, 酢屋徳啓, 石川剛弘, 小西輝昭, 磯浩之, 樋口有一, 第23回タンデム加速器およびその周辺技術の研究会報告集 (2010) p131-134.

編集後記

小西 輝昭

研究基盤センター研究基盤技術部
放射線発生装置技術開発課 研究員
平成 25 年度技術報告書 編集事務局

放射線医学総合研究所 - 技術報告書 - (NIRS Technology) は、1) 研究基盤及びそれに関する技術（研究基盤技術）に関わる人たちの技術的活動及び成果を次世代へ正しく伝えるため、2) 学術論文等の作成時に有用な技術資料として提供することを第一の目的としました。さらには、3) 技術報告書を学術論文等の引用文献として応え得る技術報告書とすることを目標に掲げて創刊されました。昨年度より、放医研の所外ホームページの不定期刊行物一覧から閲覧できるようになったこともあり、所内だけでなく所外の方々にも閲覧される機会が増えたのではないのでしょうか。1) 2) の主旨を継続していることで、少しずつではありますが当初の 3) の目標に近づきつつあると実感しております。

昨年度の編集後記に記載いたしました、研究基盤技術を如何に正しく伝えるか、残すか、放射線関連分野にとって重要な「技術」とはなにか？どのような「技術」を継承すべきか？などなど、いろいろな場で議論がされているかと思えます。

個人的な意見ですが、どの「技術」が重要か否かは我々が判断するのではなく、次世代の技術者・研究者が必要に応じて選択できるようにしておくことが最も重要であり、これが先人としての役割ではないのでしょうか。こういった意味から、技術報告書を今年度も継続して発行できているということで少しは次世代に対する責務を果たしている？と思っております。

今後も、技術開発・研究活動に従事する皆様方と一緒に、技術報告書を後世にとってより良い資料であるようにしていきたいと思っております。

1. 技術報告書の趣旨

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

投稿原稿例：

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

2. 体裁

原則 Print-Ready の状態での投稿をお願いしております。

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

3. 使用言語

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

4. 数字と単位

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

5. 図、表

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

6. 引用文献

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

(例)

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

[2] 小西輝昭、及川将一、磯浩之、樋口有一、石川剛弘、酢屋徳啓、児玉久美子、磯野真由、塩見尚子、前田武、安田仲宏、放医研マイクロビーム細胞照射装置 SPICE の開発と現状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.

7. 校正

原則として、文章校正はいたしません。

8. 査読

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

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

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

8. 投稿先 (問い合わせ先)

研究基盤センター 研究基盤技術部 技術報告書編集事務局

編集担当： 小西 輝昭、酢屋 徳啓、小澤ブル 美絵

nirstech@nirs.go.jp

25mm

放射線医学総合研究所
技術報告書



NIRS Technology

www.nirs.go.jp

NIRS Technology, vol. VIII (2013) XX-XX. (イタリック 11pt)

(11pt 2行あける)

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

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

(11pt 2行空ける)

酢屋 徳啓*、氏 (半角スペース) 名 12pt (投稿者に半角*をふる)

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

(11pt 2行)

線 (太さ 1.0 pt)

要旨 (ボールド) 11pt

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

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

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

10pt 酢屋 徳啓 (Noriyasu Suya)

e-mail: XXXX

最後の行に (改ページ) 挿入

ページ番号真ん中寄せ10

用紙の端からの距離ヘッダー15mm フッター8mm

25mm

1. はじめに/イントロダクション/緒言
(11pt ボールド)

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

この部分には、技術開発のバックグラウンドとなっている事項について述べる。

.....

1-1. ○○○○○○ (小項目はボールドにしない！)

各線源について線量率を 1/100,1/30,1/10,1/3

.....

1-2. ○○○○○○

実験/手法/装置/方法

実験装置やその手法についてまとめる部分。

図表について

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

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

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

表1 2006年日本シリーズ 第2戦のスコア。

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

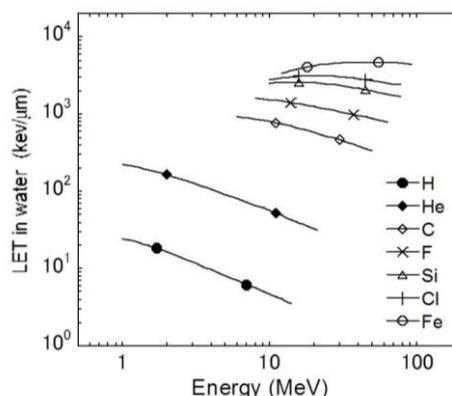


図1 イオン種およびエネルギーに対する LET (図は TIFF)

結果

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

まとめ

全体の総括と今後の方針などを書く。

参考文献 (ボールド 11pt)

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

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

《平成 25 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、小澤ブル 美絵

事務局連絡先 e-mail: nirstech@nirs.go.jp

ホームページ <http://www.nirs.go.jp>

《編集発行》

独立行政法人 放射線医学総合研究所

研究基盤センター研究基盤技術部

〒263-8555 千葉県千葉市稲毛区穴川 4-9-1

TEL: 043-206-4695 FAX: 043-206-3514

平成 25 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. 8 2014 年 3 月発行

印刷 有限会社 B.D.S

©2013 独立行政法人 放射線医学総合研究所

Printed in Japan

ISBN 978-4-938987-89-3

NIRS-M-268



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