

NIRS-M-279

平成 26 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 9, August 2015

国立研究開発法人 放射線医学総合研究所

はじめに

主として平成25年から平成26年の成果をまとめた技術報告書9報をお届けします。この報告書には2編の報告書が掲載されています。特徴的なことを紹介し、簡単に各論文の内容について触れます。男女共同参画が唱えられてから相当の年月が過ぎました。この論文を見ていただくと2編で女性技術者がFirst Authorになって書いています。主体的に業務に励み、主導的な立場であったことによりFirst Authorになったわけです。我々の職場は女性比率が高いとは言えませんが、それでもこのような成果を挙げることができることは技術を重んじる職場の技術に対する正当な評価の現われだと言えなくもありません。さて、それぞれの論文を紹介します。最初の論文はマイクロビーム細胞照射に関するものです。これまで装置の紹介や研究成果については報告しましたが、今回はこの特徴ある装置の性能を如何なく享受するための細胞の調整や照射の方法を写真付きで説明し、多くの方にとって使える装置だという印象を持っていただける内容になっています。次の論文は平成25年10月に発見したマウス肝炎ウイルスの感染事故についてであり、衛生検査で最初にこの感染を発見した女性技術者が、その後1年をかけて原因追及、対策立案と推進、マウスユーザの再教育と種々の取り組みを行ったことが述べられています。このように2編とも異なるテキストの内容であり、読者のみなさんの興味を引くものと信じています。

研究基盤技術部は文部科学省先端研究基盤共用・プラットフォーム促進事業を担当する先端研究基盤共用推進室と協同して特徴ある施設・機器を用いて多くの大学・研究機関・企業の方の役に立ちたいと願っています。今後とも皆様のご支援をいただければ幸いです。

平成27年3月

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. 9

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 放医研マイクロビーム細胞照射装置 SPICE 実験における細胞培養・照射 および蛍光免疫染色の手順 p1-p7

Procedures of cell culture, irradiation and immunofluorescent staining for radiobiological studies using NIRS- Single-Particle Irradiation system to CELLS(SPICE).

小林 亜利紗^{1*}、山縣 徳嗣¹、森口 和美¹、ウォーレン圭子²
古澤 佳也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

- 2 実験動物研究棟で発生したマウス肝炎ウイルス汚染への取り組み P8-p12
Approach on Mouse Hepatitis Virus Infection Occurred at Animal Research Building

石田 有香*、鬼頭 靖司、上野 渉、小久保 年章
1) 研究基盤センター 研究基盤技術部 生物研究推進課

投稿規定&投稿サンプル (Author instruction)

P13

放医研マイクロビーム細胞照射装置 SPICE 実験における細胞培養・照射
および蛍光免疫染色の手順

Procedures of cell culture, irradiation and immunofluorescent staining for radiobiological studies using
NIRS- Single-Particle Irradiation system to Cells(SPICE).

小林 亜利紗^{1*}、山縣 徳嗣¹、森口 和美¹、ウォーレン圭子²、古澤 佳也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

Abstract

The microbeam irradiation system is designed to deliver a defined number of charged particles on to a single cell and it has become a powerful tool in radiobiological studies. The SPICE-NIRS microbeam can target cell nuclei, cytoplasm, or both, automatically with a defined number of protons. The approximately 2 μm diameter proton beam is focused with magnetic lenses and traverses the cells in dishes from bottom to top, which has advantages in that a cell dish can be set on the micro-positioning stage in a natural orientation and 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 some different procedures from those of broad beam irradiation and it is important for users to learn the procedures and detection method of the SPICE microbeam. To perform a machine time smoothly, we have presented documentation of how to make a SPICE cell dish and actually it has helped to make the users' experiments more efficient technically. Furthermore, we present the (1) cell culture, (2) irradiation, and (3) γ -H2AX detection procedure using immunofluorescent staining since it is often used to observe the molecular reactions of a single cell by microbeam irradiation. This protocol is written in English for domestic and foreign researchers.

Keywords: *Microbeam, Radiation biology, Immunofluorescent staining*

***Corresponding Author:**

小林 亜利紗 (Alisa Kobayashi)

e-mail: a_koba@nirs.go.jp

目的

放射線マイクロビーム装置は、狙った細胞に任意の放射線量を照射できる装置であり、一つ一つの細胞に同じ量の放射線を与えられるので、低線量領域などの精密な放射線影響研究が可能である。

放医研陽子線マイクロビーム照射装置 SPICE は、直径 2 μm まで絞った領域に陽子線を細胞質、核、またはその両方に自動で指定数量当てることができる[1]。SPICE は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る。この方式は、培養細胞を一般的な培養状態と同様の向き（水平方向）に設置することができる。また、陽子線はビーム出口から空気中に引き出されてから細胞に到達するまでの過程において、通過する物質は空気層と細胞が接着している細胞皿底面の厚みのみである。本方式とは逆向きの上から下への照射のように残存培地や細胞の凹凸などの影響を受けにくいいため、細胞に均一にエネルギーの陽子線を照射することができる利点がある。

SPICE では、導入可能な放射線種は、3.4 MeV 陽子線のみであり、イオン照射をシミュレートするコード SRIM[2]による計算では水での飛程は 180.44 μm であった。通常の培

養用プラスチックシャーレの底面を陽子が通過することができない。よって、本施設では金属製の枠組みにポリプロピレンなど厚さ数 μm の薄膜を挟み、その薄膜上に細胞を培養する。(SPICE 照射専用細胞培養皿、セクション 1. を参照)。そして、照射の直前に皿から培養液を抜き取り、細胞の乾燥を防ぐために皿の上から薄膜を被せる工夫を行う。これは、皿の上部にある粒子検出器による粒子計測を行うためである[3]。このように、SPICE での照射実験では特殊な作業がある。円滑にマシンタイムを提供するには、各ユーザーが SPICE における作業手順を習得しておく必要がある。

前回の技術報告書では SPICE 照射専用細胞培養皿の組立方法を英文でマニュアル化した[4]。これが一助となり SPICE を利用した論文が数多く発表された[5,6,7]。更なる効率化のため今回は、SPICE 実験のための
1) 細胞培養方法、2) 照射前後の操作、3) 照射した細胞の DNA 二本鎖切断部位のマーカーで知られているヒストンタンパク質のリン酸化 (γ -H2AX) に対する蛍光免疫染色 (Fig.1) 方法を一例としてその手順をマニュアル化したので報告したい。

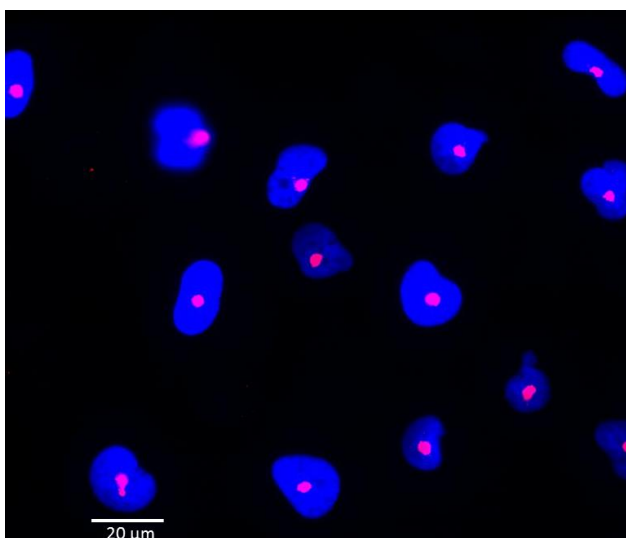


Fig 1. Targeted with 500 protons to each cell nucleus of A549 cells by NIRS-SPICE microbeam.

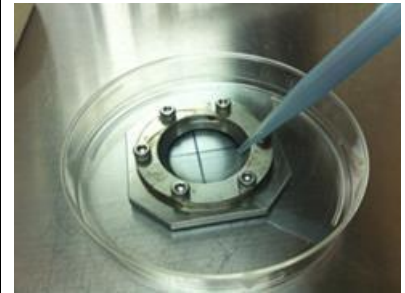
Blue area indicates the cell nucleus and the red spots indicate the foci of γ -H2AX which is the indicator of DNA double strand breaks. This image was produced using the following procedure.

1. The procedure for cell culture

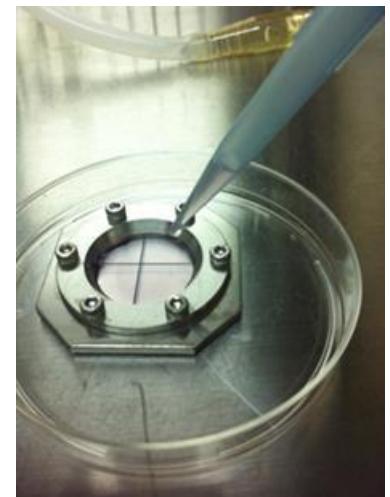
Preparations

- Fibronectin (063-05591, WAKO)
 - ◇ Dilute in D-PBS(-) at 10 µg/mL
- D-PBS(-) (045-29795, WAKO)
- Cells (A549 human lung cancer cell, ATCC:CCL-185)
- Medium ; (suitable medium for the cells can be used. For A549 cells, use following medium.)
 - ◇ D-MEM with 10 % FBS, 20mM L-glutamine, 50 U/mL penicillin and 10 µg/mL streptomycin
- Incubator; (humidified, at 37°C , with 5 % CO₂ in air), Clean hood bench
- SPICE cell culture dish (here in after referred to “SPICE dish”)
- Other equipment
 - Pipet tips (1000 µL), 10 cm petri dish, 14 mL test tube

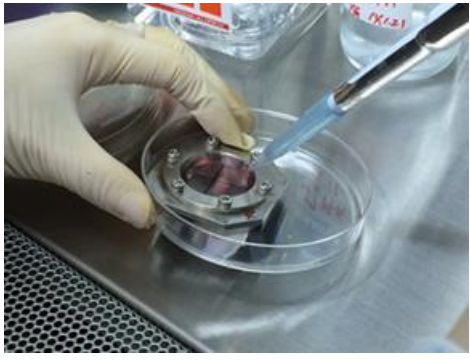
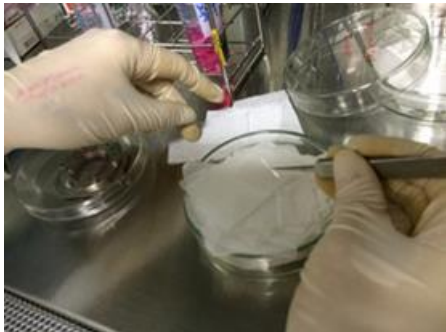
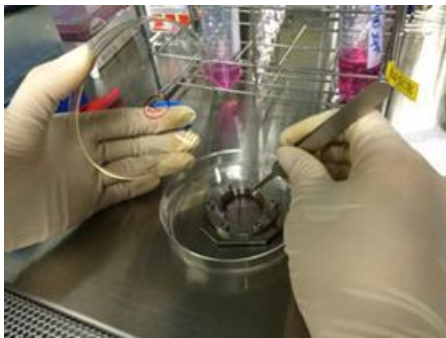
- 1 Put 1 mL of the Fibronectin solution to a SPICE dish in a 10 cm petri dish.
Keep at 37°C for 1 hour for conditioning the surface of the SPICE dish bottom.

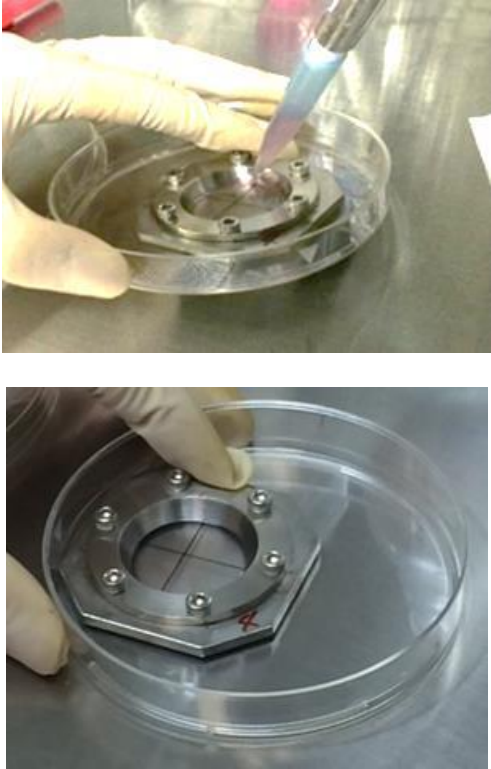




- 2 Adjust A549 cell to 5×10^4 cells/mL in the medium.
Remove the Fibronectin solution from the SPICE dish.
Transfer 1mL of the cell suspension onto the SPICE dish.
Culture for 2 days in the incubator.



2. Procedures for pre and post SPICE irradiation

Preparations	
	<ul style="list-style-type: none">• Hoechst-medium<ul style="list-style-type: none">✧ Add 1/2000 Hoechst33342 (346-07951, DOJINDO) in the medium• Normal-medium• Polypropylene film (6 μm thickness) (425, Chemplex)<ul style="list-style-type: none">✧ Cut out to be 23 mm$^{\circ}$, and sterilized.• Incubator; (humidified, at 37°C, with 5 % CO₂ in air), Clean hood bench• Other equipment<ul style="list-style-type: none">Tweezers, Pipet tips (1000 μL), 14 mL test tube
1	<p>Remove the medium from the SPICE dish. Put 1mL of the Hoechst-medium to the SPICE dish. Incubate for 1 hour in the incubator.</p> 
3	<p>Put 23 mm$^{\circ}$ Polypropylene film on the medium in the SPICE dish with tweezers to protect against desiccation.</p>  

<p>4</p>	<p>Remove the medium under the film with a pipette.</p> <p>! Attention Cover the cell area in the SPICE dish, do not crease the film.</p>	
<p>5</p>	<p>Microbeam Irradiation.</p>	
<p>6</p>	<p>Add 1 mL Normal medium into the SPICE dish to float the film.</p> <p>Remove the floating film with tweezers.</p> <p>Culture the cells for 1 hour in the incubator.</p>	

3. The procedure for Immunofluorescent staining

The procedure describes below was used with the cell culture shown in Fig.1 on page 2. For different types of samples, researchers will need to estimate optimal conditions for the experiments.

<p>Preparations</p> <ul style="list-style-type: none"> • D-PBS(-) (045-29795, WAKO) • 4% paraformaldehyde solution (162-16065, WAKO) , D-PBS(-) for the solvent • Perm / Wash Buffer (554723, BD), to be diluted with D-PBS(-) to 1/10 • Blocking buffer (Components are below) <ul style="list-style-type: none"> ✧ 1% bovine serum albumin (017-22231, WAKO) ✧ 5% goat serum (143-06561, WAKO) ✧ 0.1% Tween20 (161-24801, WAKO) ✧ D-PBS(-) for the solvent • Antibody buffer (Components are below) <ul style="list-style-type: none"> ✧ 0.1% bovine serum albumin (017-22231, WAKO) ✧ 0.3% Triton × 100 (160-24751, WAKO) ✧ D-PBS(-) for the solvent • Antibody ; Primary (γ-H2AX, 05-636, Millipore), Secondary (Alexa555, A21422, Invitrogen) • Hoechst33342 (346-07951, DOJINDO) 	
1	Remove the medium from the SPICE dish, then wash the surface of the cell culture once by adding 1 mL D-PBS(-).
2	Add 1 mL 4 % paraformaldehyde solution, and keep the SPICE dish in room temperature for 5 minutes.
3	Remove the solution, and wash the SPICE dish once with D-PBS(-).
4	Add 1 mL Perm / Wash Buffer, and keep the SPICE dish at 37°C for 30 minutes.
5	Remove the Perm / Wash Buffer, and wash the SPICE dish once with D-PBS(-).
6	Add 1 mL blocking buffer, and keep the SPICE dish at 37°C for 1 hour.
7	Remove the blocking buffer, and wash the SPICE dish once with D-PBS(-).
8	Add adequately concentrated primary antibody (1/500) to antibody buffer, then add 300 μL antibody solution and keep the SPICE dish at 37°C for 1 hour.
9	Remove the solution, and wash the SPICE dish once with D-PBS(-).
10	Add adequately concentrated Secondary antibody (1/1000) to antibody buffer, then add 300 μL antibody solution and keep the SPICE dish at 37°C for 1 hour.
11	Remove the solution, and wash the SPICE dish once with D-PBS(-).
12	Add 1 mL D-PBS(-) including Hoechst (1/2000 dilution), and keep the SPICE dish at 37°C for 30 minutes.
13	Remove the Hoechst solution, and wash the SPICE dish twice with D-PBS(-).
14	Add 2 mL D-PBS(-) to the SPICE dish.
15	<p>Imaging.</p> <p>The Image in Fig.1 on page2 was obtained using The microscope, lens, and software as followed.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Microscope system: fluorescent microscope (BX51, Olympus) equipped with a CCD camera (ORCA-ER, Hamamatsu Photonics). • Lens: 40 × /0.80 W (LUMplanFI, Olympus) • Software: MicroBeam Ver.3.0.1 (In-house development, manufactured by Seiko Precision)

References

- [1] 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.
- [2] Ziegler, JF., Ziegler, MD., Biersack, JP., SRIM – the stopping and range of ions in matter. *Nucl Instrum Methods Phys Res, Sect B* (2010) 1818-23
- [3] 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.
- [4] 小林亜利紗、山縣徳嗣、須藤和美、他、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, 放射線医学総合研究所技術報告書 (NIRS Technology) 8 (2014) 24-33.
- [5] Desai, S., Kobayashi, A., Konishi, T., et al., Damaging and protective bystander cross-talk between human lung cancer and normal cells after proton microbeam irradiation., *Mutat. Res. -Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 763/764C (2014) 39-44.
- [6] Liu, Y., Kobayashi, A., Maeda, T., et al., Targeted irradiation induced bystander effects between stem-like and non-stem cancer cells., *Mutat. Res. -Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, (2015)43-47.
- [7] Autsavapromporn, N., Plante, L., Liu, C., et al., Genetic changes in progeny of bystander human fibroblasts after microbeam irradiation with X-rays, protons or carbon ions: The relevance to cancer risk. *Int. J. Radiat. Biol.*,(2015) 91: 62-70

実験動物研究棟で発生したマウス肝炎ウイルス汚染への取り組み

**Approach on Mouse Hepatitis Virus Infection Occurred
at Animal Research Building**

石田 有香*、鬼頭 靖司、上野 渉、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

Animal Research Building which is one of the laboratory animal facilities in National Institute of Radiological Sciences is equipped with semi-barrier system. The frequency of microbiological monitoring tests in this facility is quarterly. We recognized a Mouse hepatitis virus (MHV) infection in 6 of 12 mouse breeding rooms in October, 2013. We carried out cleaning of this facility and preventing the spread of infection as follows. I. The cleanings of the facility were carried out in the every each breeding areas. II. We put breeding mice into the two infected mice breeding rooms or the three non-infected mice breeding rooms. Then researchers ended their experiments by March, 2014. In consequence, the facility was able to resume animal experiments sequentially from April, 2014, on schedule.

Keywords: Mouse hepatitis virus, MHV, infection, laboratory animal facility

***Corresponding Author:**

石田 有香 (Yuka Ishida)

e-mail: ishida@nirs.go.jp

1. はじめに

放射線医学総合研究所には、それぞれに特色のある実験動物施設が多数配置されている。実験動物研究棟は、2つの SPF (Specific Pathogen Free, 特定の病原微生物が存在しないことが保証されている) 施設とともに、研究所で行われている動物実験の中核を成す実験動物施設である。本施設はバリア方式に準じた設備を整えており、囲動物による微生物モニタリング検査を SPF 施設と同項目で年 4 回実施している。2013 年 10 月の検査にて、複数の飼育室でマウスからマウス肝炎ウイルス (Mouse hepatitis virus: MHV) の血清抗体陽性が確認された。直ちに MHV の確認検査を実施した結果、MHV の汚染があると判断し、早急に施設使用者へ状況報告及び今後の対応についての協議を開始した。

2. MHV 汚染の概要

2-1. MHV とは

MHV はコロナウイルス科に属する RNA ウイルスである[1, 2] (図 1)。自然宿主はマウスのみだが、感受性はマウスの系統や週齢、免疫状態によって異なる。また、MHV には多数の株が存在しており、肝炎・脳炎等の全身性に感染を起こす株と腸炎を主病変とする株が知られている。株により病原性は異なるが、免疫系が正常なマウスでは多くが不顕性感染である。但し、弱毒株であっても、免疫不全マウスでは持続感染を起こし衰弱して死に至る。

感染経路は、感染マウスとの直接接触、あるいは汚染した糞便や床敷を介した経口あるいは経鼻感染である。

また、血清抗体検査の他、糞便からのウイルス分離や遺伝子検出が可能な診断には PCR (Polymerase Chain Reaction) 法がある。現在も感染がみられる株の多くは弱毒株 (腸炎型) であるため、ほとんどの事例で飼育中のマウスに異常は認められず、抗体検査の陽性結果

で初めて汚染に気付くことが多いとされている。

なお、MHV はエンベロープを有するため、消毒用アルコールや次亜塩素酸ナトリウム等の消毒薬が有効である。

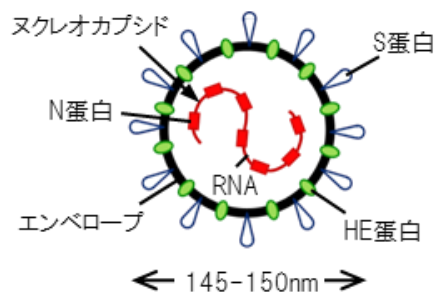


図 1 MHV の構造

2-2. MHV 汚染以前の施設の使用状況

本施設は汚染以前、マウス 4000 ケージ、ラット 400 ケージ程度の収容数を備えており、研究所で動物実験を行っている研究グループの殆どが使用していた。従って実験内容は多岐にわたり、飼育期間が 1 週間程度の短期実験から終生飼育を含む長期実験、遺伝子改変動物の作出等も行われていた。また、研究所では放射線照射実験や MRI, PET, CT 等のイメージング撮影実験が盛んに行われているが、本施設には X 線照射装置 1 台があるのみで、他の線種の照射やイメージング撮影を行うには動物を放医研内の他施設へ搬出する必要があったため、実験処置の目的で飼育室外へ搬出した動物の再搬入を許可しており、再搬入も頻繁に行われていた。

当時、マウスは約 2300 ケージ飼育されていたが、その際、希望する使用棚数により使用者に飼育室及び飼育棚を配分しており、飼育期間、系統維持及び作出の有無、再搬入の有無等の実験内容で飼育区域を区別することはしていなかった。

2-3. MHV 汚染の発覚

本施設で微生物モニタリング検査を開始した 2007 年 10 月から 2013 年 7 月まで、検査結

果に異常は認められなかった。しかし、2013年10月の検査において、3階及び4階の2区域12飼育室のうち4飼育室の囲マウス（8例中7例）からMHV血清抗体陽性が検出された。直ちに実施した別の検査試薬での追加検査も陽性判定であったため、公益財団法人実験動物中央研究所に確認検査を依頼したところ、MHV陽性が確定した。なお、血清抗体陽性の1例からはPCR法によるウイルスの遺伝子断片も検出された。

2-4. 緊急対応

MHV汚染の発覚後、早急に施設使用者へ状況報告及び今後の対応についての協議を開始した。

管理部門から施設使用者には、作業動線の遵守、飼育器材の消毒及び滅菌処理、作業着・手袋・長靴の衛生管理を徹底し汚染拡大をしないよう努めること、今後の対応を決定するためには囲マウス以外の飼育マウスに対してもできる限りMHVの検査を行い、汚染マップを作成してウイルスの感染状況を把握する必要があることを伝え、協力を依頼した。

使用者からのマウス提供を受けて実施した追加検査の結果、新たに2飼育室がMHV汚染しており、汚染範囲は3、4階マウス飼育室の半数である計6飼育室となっていたことが判明した。

3. MHV排除の対応

3-1. 全体の流れ

作成したMHVの汚染マップ（図2）を踏まえ、排除に向けた協議を施設使用者及び関係者で行った。その結果、本施設の清浄化及び汚染対策に関しては、施設の完全閉鎖は行わずに実施することで合議した。具体的には、1) 施設の清浄化は4つの飼育区域別に実施する、2) 直ちに実験が中止できない動物は汚染飼育室、非汚染飼育室ごとに集約した上で、2014年3月までに実験を終了させる、という

基本方針を決定した。この基本方針に従い、まずは3階で飼育していたマウスを汚染飼育室と非汚染飼育室で区別し、4階の2つの飼育区域に移動させて、3階の全飼育室の消毒を完了させた。即ち、汚染マウスは全て4階P2Aマウス飼育室（1）及び（2）に收容してこれら2室を汚染飼育室、残りの非汚染マウスは4階ラット飼育室（1）～（3）に收容してこれら3室を非汚染飼育室として管理を行い、その間に、動物不在となった3階飼育区域の消毒を行った。次に、4階で飼育を継続していたマウスは予定通りに期間内に実験を終了させ、同年4月より残りの飼育区域の消毒を実施した。その結果、3階は2014年4月より、1階及び4階は同年6月より動物飼育が可能となり、動物の搬入を再開するに至った。

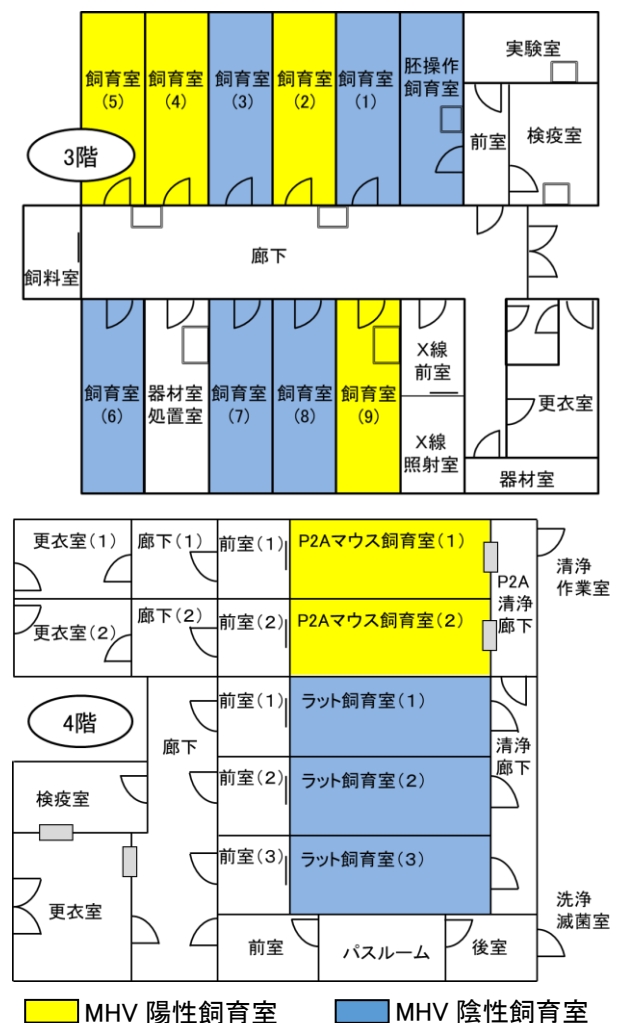


図2 実験動物研究棟3・4階 MHV汚染マップ

3-2. 飼育室の清浄化

飼育室の最終的な清浄化には過酢酸系消毒薬を使用した。これを10μm以下の微細なミストとして目張りをしたエリア内に噴霧し、約4時間放置することで消毒を行った。消毒効果はバイオロジカルインジケーター、落下細菌及び付着菌検査にて確認し、いずれの結果からも有効であったことを確認できた。また飼育室の清浄化後には、囿マウスを一定期間飼育し、微生物モニタリングを実施することで全飼育室の安全を確認した。

3-3. マウスの微生物クリーニング

動物実験を再開するためには、マウスの微生物クリーニングが必須であるが、一旦は飼育を終了させる必要があること、対象とするマウス系統が多く計画的に行う必要があることから、まずはマウスの精子凍結あるいは体外受精、初期胚凍結を行った。その後、飼育室の再開に合わせて微生物クリーニング（動物の清浄化）を進めた。汚染マウスの清浄化（SPF化）は、清浄エリアにて胚の融解、培養を行い、受容雌へ胚移植、その後帝王切開術により得られた仔マウスをSPFの里親マウスに哺育させることで実施した。離乳後に里親マウス及び微生物検査に適した週齢に達した仔マウス（里親の実仔含む）を検査に供し、SPF化を確認して使用者へ提供した。

4. 施設の再開にむけて

4-1. 作業動線の見直しと入退管理システムの機能追加

施設を再開するにあたり、微生物の汚染リスクの違い、また万が一微生物汚染が起こった際の汚染拡大防止のため、実験内容を踏まえて飼育区域を明確に分けることとし（図3）、本施設内あるいは研究所全体におけるげっ歯類取扱者の作業動線の見直しを行った。それに合わせ、動物管理区域の入域順厳守のために、それまでの入退管理システムに逆行防止

機能を追加した。

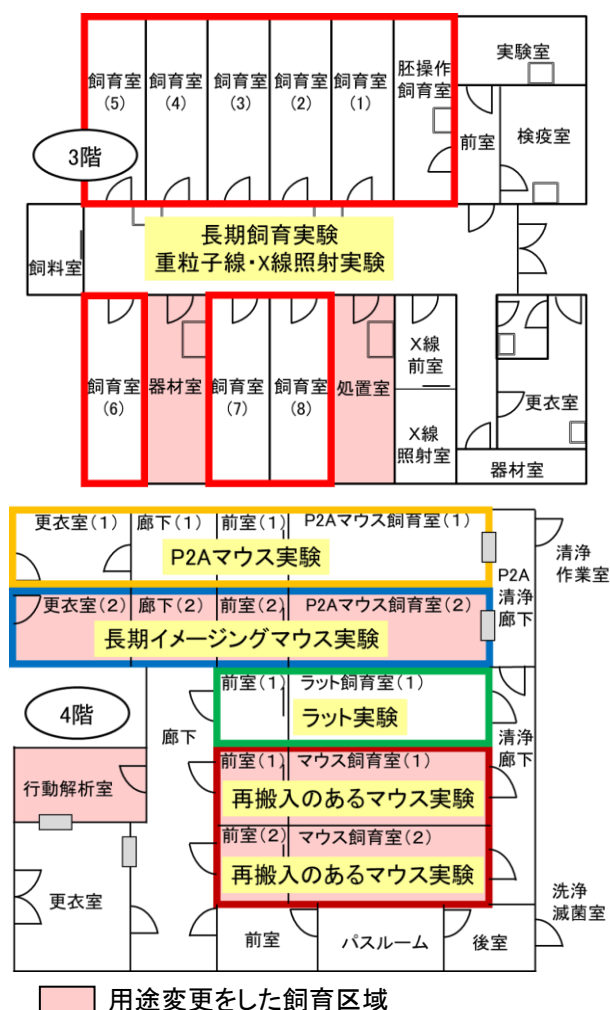


図3 実験動物研究棟3・4階 現在の区域分け

4-2. 施設の改善

3階飼育区域においては、処置室と器材室の分離、動物・器材搬入扉へのエアカーテンの設置を行い、4階洗浄滅菌室は微酸性次亜塩素酸水の噴霧システムを導入し、MHV汚染以前より衛生管理の設備強化を行った。

4-3. 再教育訓練

放医研実験動物施設の標準作業手順書である実験動物取扱マニュアルについては、4つの飼育区域すべてで衛生的配慮を重視した変更があり、動物の搬入前あるいは作業前に、各現場にて入域希望者の再教育訓練を実施した。以前より未受講者は入域不可だったが、動物実験責任者あるいは飼育棚使用責任者が未受

講の場合は、同チームの動物実験実施者及び従事者が受講を終えていた場合でも、当該区域へ入域は許可しないこととし、動物実験責任者等の現場管理に対する意識向上を図った。

5. まとめ

今回の MHV 汚染に対する諸対応にあたっては、生物研究推進課の職員を中心に実験動物及び動物施設管理に携わった方々、動物実験責任者並びに飼育担当者に大きな負担と労力を強いることとなった。また病原微生物による感染症が、研究やその支援業務に多大な影響を与えることも、関係者全員が実感できたと思われる。さらには動物福祉の面からも避けるべき事象であることは間違いない。今後、このような大規模な微生物汚染を起こさないためにも、使用者間と管理部門の協力体制をこれまで以上のものとし、適正な動物実験の遂行を目指していきたい。

参考文献

- [1] 山田靖子、実験動物ニュース、実験動物感染症の現状－マウス肝炎ウイルス－。日本実験動物学会60(2)(2011)17-19.
- [2] 社団法人日本実験動物協会編、2. マウス肝炎ウイルス (Mouse hepatitis virus: MHVあるいはmurine coronavirus)。実験動物の微生物モニタリングマニュアル28-29.

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 などを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： 酢屋 徳啓、石川 剛弘

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)

←25mm→

←25mm→

酢屋 徳啓*、氏 (半角スペース) 名 12pt (投稿者に半角*をふる)

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

(11pt 2行)

線 (太さ 1.0 pt)

要旨 (ボールド) 11pt

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

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

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

10pt 酢屋 徳啓 (Noriyasu Suya)

e-mail: XXXX

最後の行に (改ページ) 挿入

ページ番号真ん中寄せ10

用紙の端からの距離ヘッダー15mm フッター8mm

↑
25mm
↓

1. はじめに/イントロダクション/緒言
(11pt ボールド)

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

この部分には、技術開発のバックグラウンドとなっている事項について述べる。

.....

1-1. ○○○○○○ (小項目はボールドにしない!)

各線源について線量率を 1/100,1/30,1/10,1/3

.....

1-2. ○○○○○○

実験/手法/装置/方法

実験装置やその手法についてまとめる部分。

図表について

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

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

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

表1 2006年日本シリーズ 第2戦のスコア。

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

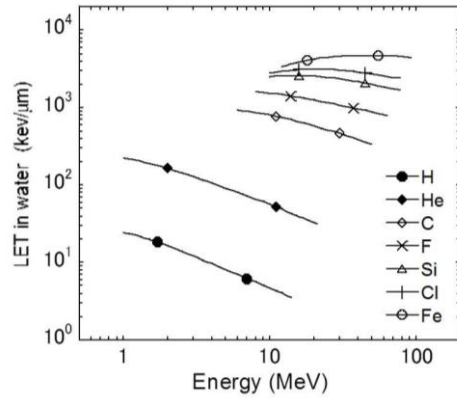


図1 イオン種およびエネルギーに対する LET (図は TIFF)

結果

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

まとめ

全体の総括と今後の方針などを書く。

参考文献 (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 26 年度技術報告書 編集事務局》

国立研究開発法人 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

酢屋 徳啓、石川 剛弘

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》

国立研究開発法人 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: 043-206-3031 FAX: 043-255-3192

平成 26 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. 9 2015 年 8 月発行

印刷 有限会社 B. D. S

©2015 国立研究開発法人 放射線医学総合研究所

Printed in Japan

NIRS-M-279



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