

厚生労働科学研究費補助金  
萌芽的先端医療技術推進研究事業

細胞内元素アレイ解析の臨床応用に向けた基礎研究

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 志村 まり

平成19（2007）年 3月

## 目 次

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| I. 総括研究報告                             |    |
| 細胞内元素アレイ解析の臨床応用に向けた基礎研究-----          | 1  |
| 志村まり                                  |    |
| II. 分担研究報告-                           |    |
| 1. 疾患モデル動物組織よりの細胞内高分解能元素アレイ解析-----    | 5  |
| 志村まり                                  |    |
| 2. SXFMにおける放射光光学系・計測系の検討に関する研究-----   | 7  |
| 石川哲也                                  |    |
| 3. 走査型蛍光X線顕微鏡 (SXFM) の高分解能化、高能率化----- | 8  |
| 山内和人、三村秀和                             |    |
| 4. 細胞周期における細胞内元素の局在変化に関する研究-----      | 10 |
| 前島一博                                  |    |
| 5. 組織幹細胞の分化に伴う細胞内元素アレイ解析の基礎研究-----    | 12 |
| 大河内仁志                                 |    |
| 6. 多発性骨髄腫の病態解明の可能性-----               | 14 |
| 萩原將太郎                                 |    |
| (資料) 患者検体倫理委員会申請書一式                   |    |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表                   | 26 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷                       | 29 |

## 細胞内元素アレイ解析の臨床応用に向けた基礎研究 主任研究者 志村まり 国立国際医療センター研究所・難治性疾患研究室長

細胞内元素は、細胞機能を維持するために必須であり、細胞機能を理解する上で元素の増減や分布変化を把握することは極めて重要である。しかし、細胞レベルでの元素の可視化はこれまで困難であった。本研究グループが開発した走査型蛍光X線顕微鏡(SXFM)により、細胞内元素変動の可視化に成功し、元素という新しい視点からの難病疾患の病態解明が可能となった。本研究班では、未だ原因が解明されていない難病について、病態と細胞内元素プロファイルとの相関を見だし、病態解明、早期診断へ応用することを目的とする。初年度は、生物医学応用のための技術開発、システム確立に焦点をおいた研究を、物理工学・生物医学の総合技術により展開した。

### 分担研究者

石川哲也 理化学研究所播磨研究所  
放射光科学総合研究センター長  
山内和人 大阪大学大学院工学研究科  
超精密加工 教授  
三村秀和 大阪大学大学院工学研究科  
超精密加工 助手  
前島一博 理化学研究所中央研究所  
今本細胞核研究室 専任研究員  
大河内仁志 国立国際医療センター研究所  
細胞組織再生医学研究部 部長  
萩原将太郎 国立国際医療センター  
血液内科 医長

### A. 研究目的

これまでに大阪大学・山内らと理化学研究所(SPring-8)・石川らが共同で開発した世界最小のX線ナノビームによる走査型蛍光X線顕微鏡(SXFM)を用いて細胞内元素分布の超高分解能イメージングに成功している。本システムは、日本独自の技術で世界に先駆けて開発されたものである。SXFMにより、未知の領域であった細胞内元素動態や、原因・治療法が不明な疾患について解明の糸口が見出されることが期待される。本研究は、難病疾患の病態解明・早期診断の糸口を、元素変動という新しい視点から得ることを目的とする。SXFM自体は様々な分野で応用できる汎用なシステムである。初年度は、生物医学応用のための技術開発、システム確立に焦点をおいた研究を展開した。

① 疾病解明に向けた準備研究（志村、前島、大河内、萩原）

a) 臨床検体でのSXFM解析を可能とする。検体取得前のインフォームドコンセント、取得法、保存、解析法などの具体的なシステムを確立する。

b) 臨床検体取得の困難な様々な難病について、ヒト疾患動物モデルを用いたSXFM高分解測定を可能とする。

c) 細胞基礎研究でのSXFM高分解測定を可能とし、有用性を検討する。

d) 凍結細胞の測定系の必要性；細胞固定によりカルシウム、カリウム元素が喪失し、一方、亜鉛、銅は比較的安定であることがICP-MS解析により判明した。これらから、細胞固定が不要な凍結細胞サンプル測定系の確立が重要であることが示唆された。

e) 基板開発の必要性；これまでのSiN基板を用いたSXFM測定では、基板元素の影響でPなどの低エネルギー元素の測定が困難である。そのため他の素材での基板の検討が必要である。

② 生物医学応用へ向けた技術開発（石川、山内、三村）

現行のSXFMはプロトタイプであり、実用化のための技術構築が期待される。X線ナノプローブの集光径ズーム機能の開発、画像データからの元素量の定量化、SXFM高分解測定、高感度、高速測定を目標とする。

以上、物理工学・生物医学の総合技術により、難病の病態解明のための基盤研究を目的とする。

## B. 研究方法

① ヒト臨床検体でのSXFM解析を可能とするために、国立国際医療センター倫理委員会承認、および理化学研究所播磨研究所のバイオハザード委員会での承認を得る。病棟、外来で採取した髄液の保存管理を行うための環境を整える。

② 難病疾患の動物モデルをもちいた元素アレイによる病態解明をおこなうため、ヒトのWilson病のモデル動物であるLong Evance Cinnamon (LEC)ラットを用いた。協力研究者の岡村匡史（国立国際医療センター研究所ヒト型動物研究室・室長）により、LECラットおよびコントロールラットF344から肝臓、腎臓を摘出し、パラホルムアルデヒド固定後、3ミクロンの切片を作製する。その後、組織さらに細胞レベルでSXFMでの測定をおこない、元素マッピング像を得る。

③ ヒトがん細胞であるHeLa細胞をSiN基板上で培養する。細胞の形態を「生きた」状態にできるだけ保つため、瞬間的に急速凍結および乾燥をおこなう。

④ 実用的な医学応用に向けて、既存のSXFMを改良し、検出器の改善（高感度、高速測定）およびエックス線ナノビームによる高分解、高速計測について、波動光学に基づき集光光学系の設計と開発を行う。また、微分干渉顕微鏡を搭載した試料ステージを導入し、細胞観察に適したSXFMを開発する。

### （倫理面への配慮）

臨床試料をヒトから用いる場合は、インフォームドコンセントなど十分配慮検討する。当該機関の患者検体倫理委員会に諮問し検討してから行う（既に承認、添付資料参照）。一連のマウス実験については、予め当該機関の動物委員会に報告し、必要最低限の実験動物を準備使用し、動物愛護への配慮を欠くことのないよう計画する。組換えDNA実験は、カルタヘナ条約を遵守し実験内容を吟味する。

## C. 研究結果

a) いまだに増加傾向を示す血液がんの早期発見のための有用な早期診断基準を見いだすために、臨床検体を得るためのシステムを確立した。具体的には、患者検体倫理委員会での承認を得たこと、病棟および外来での検体の取得および迅速凍結保存（-140℃の極低温冷蔵設; REVCO, UTL-10140-9JR）を配置した。これにより、迅速な臨床検体の供給が可能となった（萩原）

b) ヒトWilson病の原因遺伝子*atp7b*の変異を伴い、高濃度の肝臓腎臓に銅の蓄積が報告されているLong Evance Cinnamon (LEC)ラットを用いて、ヒト病態モデル動物からの組織および細胞高分解元素分布、元素アレイ解析に成功した（志村、岡村、大河内）。

c) 細胞周期に関わる基礎研究で、分裂期に依存した亜鉛の局在変化を見いだした（前島）。

d) SXFM解析のための細胞固定法の研究では、凍結細胞による測定が検討されている（前島、山内、三村）。

e) SXFM専用基板の検討では、半導体カーボンをベースにした基板作製に成功した（前島）。

f) SXFMの改良；理化学研究所が大型放射光施設SPring-8で整備を進めてきた走査型蛍光X線顕微鏡は、細胞内元素アレイ解析のためのデータ収集に有効であるという結果を得てきている。一方、高分解画像、高速化はさらに期待される点である。理論的検討段階ではあるが、現在のシリコン・ドリフト・検出器（SDD）をベースにした検出器システムから、XPDベースの検出器システムに変更することにより、2-3倍の検出効率の向上の可能性があることが明らかになった（石川）。

g) 細胞内の蛍光X線による元素マッピングにおいて、高感度、高分解能、高能率観察を実現するため、既存の走査型蛍光X線顕微鏡（SXFM）システムの改良を実施した。その結果、標的領域の観察における時間効率性が大幅に向上した。また、金粒子と蛍光色素を導入したテスト細胞を観察し結果、ミトコンドリアの識別が可能であること、2次元テストパターンによる観察で、空間分解能として30nmであることを確認した（山内、三村）。

## D. 考察

本年度の研究成果より、SXFMシステムにおいて高感度、高速測定がさらに改善されたことは、今後の生物医学応用に多大な貢献であることはいまでもない。SXFMの生物医学応用研究では、病態の組織から細胞、そして細胞内小器官での測定観察が可能となり、基礎生物学的にも意義のある研究結果が得られつつある。現在、SXFMの元素動態情報と既存の分子生物学・生化学的手法を組み合わせた多角的な解析手法を確立することで、より詳細な細胞動態を理解することが可能となるであろう。

本年度は、SXFMの生物医学応用のためのシステム確立、技術開発を中心に行ってきたが、来年度よりは本格的に生物や病態の未知

の領域への挑戦がはじまる。血液がんは分化過程の異常といわれているために、元素アレイ解析については特に骨髄細胞での解析が肝心となる。これまでの細胞丸ごと元素分析に加え、色素染色、抗原の免疫染色を多角的に行う方法に移行している。これにより、異なる分化段階および機能の細胞集団からなっている骨髄細胞の個々の詳細の情報を得ることができる。今後の健常人由来検体および臨床検体での解析結果が期待される。ヒト難病疾患モデル動物では特に難病神経疾患であるアルツハイマー、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などに応用を予定している。

#### E. 結論

改良された高分解能走査型蛍光X線顕微鏡シムテム(SXFM)による細胞内元素の情報、および分子生物学、生化学的手法による多角的な解析により、難病疾患の病態解明・早期診断の可能性は大である。

#### F. 健康危険情報 該当無し

#### G. 研究発表

- Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, et al. All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition, *Nucleic Acids Research*, in printing.
- Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura M., Segawa, T., Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S. and \*Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. *AIDS Res. Hum. Retrovir*, in printing.
- Nakai-Murakami C., Shimura M, Takizawa Y, Tokunaga K, Taguchi T, Hoshino S, Miyagawa K, Sata T, Kurumizaka H, You A and Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. *Oncogene* 26, 477-486, 2007.
- Maeshima, K., et al. Cell cycle dependent dynamics of nuclear pores: pore-free island and lamins, *Journal of Cell Science* (2006), 119, 4442-4451.2.
- 前島一博 「染色体の凝縮メカニズム」*細胞工学* (2006), 25, 486-491.
- Matsuyama S, Mimura H, Yamauchi K, et al., X-ray nanofocusing at sub-50 nm level, *Review of Scientific Instruments* 77, 103102, 2006.
- Matsuyama S, Mimura H, Yamauchi K, et al., Development of scanning X-ray fluorescence microscope with spatial resolution of 30nm using K-B mirrors optics, *Review of Scientific Instruments* 77, 093107, 2006.
- Mototani, Y., Miyoshi, I., Okamura, T., Moriya, T., Meng, Y., Pei, X.Y., Kameo, S. and Kasai, N. Phenotypic and genetic characterization of the *Mo<sup>Tohm</sup>* mottled mouse: A new murine model of Menkes disease. *GENOMICS*, 87, 191-199 (2006).
- Maekawa, M., Okamura, T., Kasai, N., Hori, Y., Summer, K.H., and Konno, R. D-Amino-acid Oxidase is Involved in D-Serine-induced Nephrotoxicity. *Chem. Res. Toxicology, Chem. Res. Toxicol.* 18, 1678-1682 (2005).
- Shimura M., Saito, A., Ishizaka, Y. et al. Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after cis-diamminedichloro-platinum (II) treatment. *Life science medical biology, Spring-8 Research frontiers* 2005, 30-32, 2006.
- Tachiwana H, Shimura M., Nakai-Murakami C., Tokunaga K., Takizawa Y., Sata T., Kurumizaka H. and Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. *Cancer Res.* 66, 627-631, 2006.
- Mizoguchi I., Ooe Y., Hoshino S., Shimura M., Kasahara T., Kano S., Ohta T., Takaku F., Nakayama Y. and Ishizaka Y. Improved gene expression in resting macrophage using an oligopeptide derived from Vpr from human immunodeficiency virus type-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1499-1506, 2005.
- Shimura, M., Tokunaga, K., Konishi M., Sato Y., Kobayashi, C., Sata, T. and Ishizaka, Y. Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes. *AIDS*. 19, 1434-1423, 2005.
- Shimura M., Saito, A., Matsuyama, S., Sakuma, T., Terui, Y., Ueno, K., Yumoto, H., Yamauchi, K., Yamamura, K., Mimura, H., Sano, Y., Yabashi, M., Tamasaku, K., Nishio, K., Nishino, Y., Endo, K., Hatake, K., Mori, Y., Ishizaka, Y. and Ishikawa, T. Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after

cis-diamminedichloro-platinum (II)  
treatment. Cancer Res. 65, 4998-5002, 2005.

学会発表

1. Shimura M, Toyoda Y, Kinomoto M, et al. HIV-1 Vpr causes aberrant sister chromatid separation. International Organization of the Nucleus. Awaji, Jan 2007.
2. Shimura M, Toyoda Y, Kinomoto M, et al. HIV-1 Vpr causes aberrant sister chromatid separation. IUBMB, Kyoto, June 2006.
3. Shimura M, Saito, A., Matsuyama, S., et al. Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy. Cell regulations in division and arrest workshop, Okinawa, March 2006.
4. Maeshima K. Mitotic chromosome structure: regular or random? Osaka University COE International Symposium on chromatin signaling (2006), Osaka, Nov. 2-3.
5. Maeshima K, Yahata K., Sasaki Y., Tachibana T., Imamoto F., and Imamoto, N. Cell cycle dependent dynamics of nuclear pores: a regulatory role of laminA/C, EMBO Workshop on Functional Organization of the Cell Nucleus (2006), Prague, Czech, May 5-8.
6. Ishikawa T.: X-Ray Optics for Nanometer-Resolution Imaging, The 9<sup>th</sup> International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI2006), May 2006, Daegu, Korea.
7. Matsuyama S, Mimura H, Shimura M, Yamauchi K, et al., High-spatial-resolution scanning X-ray fluorescence microscope with Kirkpatrick-Baez mirrors, International Society for Optical Engineering, San Diego USA, August 2006.
8. Katagishi K, Matsuyama S, Mimura H, Shimura S, Yamauchi K, et al., Observation of Intracellular Elements by Scanning X-ray Fluorescence Microscopy with Spatial Resolution of 50nm, The 16th International Microscopy Congress, Sapporo Japan, September 2006.
9. Matsuyama S, Mimura M, Shimura M, Yamauchi K, et al., Scanning X-ray Fluorescence Microscope Using Kirkpatrick-Baez Optics with Spatial Resolution Better than 50nm, The 16th

International Microscopy Congress, Sapporo Japan, September 2006.

10. 前島一博, 「ヒトゲノムをX線で見ると」日本分子生物学会・分子フォーラム2006(分子生物学の未来) シンポジウム「染色体・核のダイナミックな機能と構造」2006年12月、名古屋
11. 志村まり, HIV-1Vprによる姉妹染色分体の分離異常、日本分子生物学会・分子フォーラム2006(分子生物学の未来) シンポジウム「染色体・核のダイナミックな機能と構造」2006年12月、名古屋

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他  
出願番号 特願2001-205800  
発明者 石坂幸人、志村まり  
発明の名称 レセプター型チロンシンキナーゼRETに結合するペプチド系化合物  
出願人 日本化薬株式会社  
出願年月日 2001年7月6日

## 疾患モデル動物組織よりの細胞内高分解能元素アレイ解析

分担研究者 志村まり 国立国際医療センター研究所難治性疾患研究室・研究室長

本年度は、申請者グループが開発した走査型蛍光X線顕微鏡(SXFM)により、臨床検体取得の困難な様々な難病について、ヒト疾患モデル動物を用いた、組織レベル、細胞レベルそして細胞内小器官での元素分布、アレイ解析を可能とすることを目的とした。

### A. 研究目的

走査型蛍光X線顕微鏡(SXFM)により、組織レベル、細胞レベルそして細胞内小器官での高分解能元素分布、アレイ解析を可能とすることを目的とした。

### B. 研究方法

ヒト病態モデルラットからの組織および細胞高分解能元素分布、元素アレイをおこなうために、ヒトのWilson病のモデル動物であるLong Evance Cinnamon (LEC)ラットを用いた。LECラットラットはヒトWilson病の原因遺伝子ATB7Bの変異を伴い、高濃度の肝臓腎臓に銅の蓄積が報告されている。放置することで、肝炎から肝硬変、肝癌へ移行する。協力研究者の岡村匡史（国立国際医療センター研究所ヒト型動物研究室・室長）により、LECラットおよびコントロールラットF344から肝臓、腎臓を摘出し、パラホルムアルデヒド固定後、3ミクロンの切片を作製する。その後、組織ではSpring-8BL29XULにてSXFM像を5 $\mu$ m/pixel、さらに細胞レベルでは600nm/pixelで測定し、各元素での元素マッピング像を得る。

### C. (倫理面への配慮)

動物実験を行う際には、動物実験計画書を国立国際医療センター動物実験委員会に提出し、承認を受けた後実施した。動物実験の実施に当たっては、「国立国際医療センターにおける動物実験に関する指針」を遵守し、実験動物に無用な苦痛を与えないよう麻酔薬の投与、保安等に留意するとともに、実験動物の状態を定期的に観察し、必要に応じ適切な処置を講じた。

### D. 研究結果

8週零、13週零LECラットおよびコ

ントロールラットF344での肝臓腎臓よりの組織切片から、良好な元素アレイ解析、元素マッピング像が得られた。元素アレイ解析では、これまでの報告されていたように、F344と比較して8週零LECラット肝臓組織において高濃度の銅の蓄積が認められた。13週零ではさらに銅の蓄積が認められた。その他、銅、鉄の蓄積も認められた。一方、腎臓では報告のような銅の蓄積は著名ではなかった。さらに、高分解測定では、各元素の細胞レベルでのマッピングに成功した（下図；Fe画像）。

### E. 考察

本研究において、動物組織レベルから細胞レベルでの元素解析が可能となった。さらに、分担研究者である阪大工学部精密科学専攻の山内、三村らが開発したX線ナノプローブのズーム機能により、測定時間に大幅な短縮が可能となった。今回の結果を経て、今後の難病疾患モデル、例えばアルツハイマー、パーキンソン病モデル動物での元素解析を高分解で行い、難病の原因、治療法の開発に貢献する。

### F. 結論

本研究において、組織から細胞レベルまでの高分解元素解析が可能となった。

### G. 健康危険情報 該当無し

### H. 研究発表

#### 1. 論文発表

- ① Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, et al. All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition, Nucleic Acids Research, in printing.

- ②. Hoshino, S., Sun, B., Konishi, M., Shimura M., Segawa, T., Hagiwara, Y., Koyanagi, Y., Iwamoto, A., Mimaya, J., Terunuma, H., Kano, S. and \*Ishizaka, Y. Vpr in plasma of HIV-1-positive patients is correlated with the HIV-1 RNA titers. AIDS Res. Hum. Retrovir, in printing.
- ③. Nakai-Murakami C., Shimura M., Takizawa Y, Tokunaga K, Taguchi T, Hoshino S, Miyagawa K, Sata T, Kurumizaka H, You A and Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces ATM-dependent cellular signal with enhanced homologous recombination. Oncogene 26, 477-486, 2007.
- ④. Shimura M., Saito, A., Ishizaka, Y. et al. Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after cis-diamminedichloro-platinum (II) treatment. Life science medical biology, Spring-8 Research frontiers 2005, 30-32, 2006.
- ⑤. Tachiwana H, Shimura M., Nakai-Murakami C., Tokunaga K., Takizawa Y., Sata T., Kurumizaka H. and Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces DNA double-strand breaks. Cancer Res. 66, 627-631, 2006.
- ⑥. Mizoguchi I., Ooe Y., Hoshino S., Shimura M., Kasahara T., Kano S., Ohta T., Takaku F., Nakayama Y. and Ishizaka Y. Improved gene expression in resting macrophage using an oligopeptide derived from Vpr from human immunodeficiency virus type-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 338, 1499-1506, 2005.
- ⑦. Shimura M., Tokunaga, K., Konishi M., Sato Y., Kobayashi, C., Sata, T. and Ishizaka, Y. Premature sister chromatid separation in HIV-1-infected peripheral blood lymphocytes. AIDS. 19, 1434-1423, 2005.
- ⑧. Shimura M., Saito, A., Matsuyama, S., Sakuma, T., Terui, Y., Ueno, K., Yumoto, H., Yamauchi, K., Yamamura, K., Mimura, H., Sano, Y., Yabashi, M., Tamasaku, K., Nishio K., Nishino, Y., Endo, K., Hatake, K., Mori, Y., Ishizaka, Y. and Ishikawa, T. Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy after cis-diamminedichloro-platinum (II) treatment. Cancer Res. 65, 4998-5002, 2005.
- separation. International Organization of the Nucleus. Awaji, Jan 2007.
- ②. Shimura M., Toyoda Y, Kinomoto M, et al. HIV-1 Vpr causes aberrant sister chromatid separation. IUBMB, Kyoto, June 2006.
- ③. Shimura M., Saito, A., Matsuyama, S., et al. Element array by scanning X-ray fluorescence microscopy. Cell regulations in division and arrest workshop, Okinawa, March 2006.
- ④. 志村まり, 豊田雄介, 木ノ本正信, その他, HIV-1Vprによる姉妹染色分体の分離異常, 分子フォーラムシンポジウム, 名古屋, 12月2006.

H. 知的財産権の出願・登録状況  
 特許取得 なし  
 実用新案登録 なし  
 その他 なし

#### 学会発表

- ①. Shimura M., Toyoda Y, Kinomoto M, et al. HIV-1 Vpr causes aberrant sister chromatid



## SXFMにおける放射光光学系・計測系の検討に関する研究

分担研究者 石川哲也 理化学研究所播磨研究所放射光センター長

研究要旨：細胞内元素アレイ解析を行うための放射光光学系の整備を行うとともに、より効率の高い蛍光X線検出の開発検討を実施し、試作機的设计開発に着手した。

### A. 研究目的

全体計画の中での分担者の役割は、放射光光学系・計測系の検討である。これらは、本研究課題のみならずより広範な放射光ナノビーム利用研究に役立つものである。本研究課題の実施に先立ち、理化学研究所播磨研究所では、走査型蛍光X線顕微鏡に最適化された実験ステーションを大型放射光施設SPring-8の理化学研究所ビームラインに整備し、大阪大学と共同で装置開発を行ってきた。施設者側分担者としての最大の研究目的は、このように開発が進められてきた手法・装置の医学分野での有効性が示されることである。一方で、本研究課題の実施により、光学系や計測系の残った問題点を見つけ出し、より高度化された計測手法に発展させることも目的とする。

### B. 研究方法

大型放射光施設SPring-8に整備した走査型蛍光X線顕微鏡を、本研究課題チームに開放し、細胞内元素アレイ解析のためのデータ収集に利用した。この結果、高空間分解能での元素分布分析が可能であることが実証され、データ取得という意味での有効性は示された。一方で、データ取得に要する時間の短縮が次の課題として浮かび上がり、その解決法として検出器の計数効率の改善が検討された。様々な既存検出器のサーベイが行われ、X線フォトダイオード(XPD)をベースとした検出器システムの設計が進められている。

(倫理面への配慮) なし

### C. 研究結果

理化学研究所が大型放射光施設SPring-8で整備を進めてきた走査型蛍光X線顕微鏡は、細胞内元素アレイ解析のためのデータ収集に有効であるという結果を得た。また、理論的検討段階ではあるが、現在のシリコン・ドリフト・検出器(SDD)をベースにした検出器シス

テムから、XPDベースの検出器システムに変更することにより、2-3倍の検出効率の向上の可能性があることがわかった。

### D. 考察

検出器システムの性能向上は本研究課題のみならず、同じ顕微鏡を利用するあらゆる研究にとって重要であるため、ここでの研究結果に基く検出器改良試作を、本研究課題外の研究資金で実施し、本研究課題グループにも利用していただくように準備が進んでいる。また、現在国家基幹技術として開発が進められているX線自由電子レーザーを用いて、本研究課題を発展させる可能性に関する検討も進められている。

### E. 結論

大型放射光施設SPring-8での走査型蛍光X線顕微鏡は、細胞内元素アレイ解析のためのデータ収集に有効である。しかし、データ収集速度の向上が望ましく、そのために高効率検出器システムの開発を進めている。

### F. 健康危険情報

分担研究報告書につき省略

### G. 研究発表

本研究課題を含むより広い放射光光学系・計測系に関して下記の国際会議招待講演を行った。

Tetsuya Ishikawa: "X-Ray Optics for Nanometer-Resolution Imaging", The 9<sup>th</sup> International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation (SRI2006), May 2006, Daegu, Korea

### H. 知的財産権の出願・登録状況

本研究課題に関する特許、実用新案登録は無い。

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）  
分担研究報告書

走査型蛍光X線顕微鏡（SXFМ）の高分解能化、高能率化

分担研究者 山内和人 大阪大学大学院工学研究科 教授

分担研究者 三村秀和 大阪大学大学院工学研究科 助手

細胞内の蛍光X線による元素マッピングにおいて、高感度、高分解能、高能率観察を実現するため、既存の走査型蛍光X線顕微鏡（SXFМ）システムの改良を実施した。その結果、標的領域の観察における時間効率性が大幅に向上した。また、金粒子と蛍光色素を導入したテスト細胞を観察し、ミトコンドリアの識別が可能であること、2次元テストパターンによる観察では、達成した空間分解能は30nmであることを確認した。

A. 研究目的

細胞内オルガネラ解像、高能率観察を目的とし、トレードオフの関係である、硬X線ナノプローブのビームサイズと総光子量を制御可能なSXFМシステムの構築を目指した。

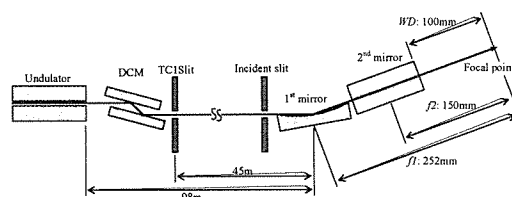


図1 SXFMのミラー集光光学系

B. 研究方法

波動光学に基づき集光光学系の設計と開発を行った。また、微分干渉顕微鏡を搭載した試料ステージを導入し、細胞観察に適したSXFМを完成した。既知のテストパターンと、金粒子、蛍光色素が導入された細胞を観察し、システムの総合評価を実施した。

C. 研究結果

本プロジェクトで改良したSXFМの集光光学系を図1に示す。波動光学シミュレーターによる詳細な解析に基づき設計した。本システムでは、光源サイズの調整により、回折限界集光である30nm×50nmの微小線プローブと、1μmサイズであるが総光子量が10<sup>12</sup> Photons/sの高強度X線プローブを任意に選択することが可能である。

集束イオンビーム加工装置で作製した1文字約500nmサイズの「SPring-8」の観察を行った。図2のように、数10μmの領域から標的領域へと、絞りこんで行く様子がわかる。その際、X線ナノプローブは、1μmから30nmサイズへと変化しており、目的とする分解能に応じて、任意のプローブを選択することで、大幅な観察時間の短縮を図っている。最終分解能として、ビームサイズ径と同等の30nmであることを確認した。

また、直径5nmの金粒子と蛍光色素であるFITCを選択的にミトコンドリアに結合させたNIH/3T3細胞を観察した結果、細胞内元素分布とオルガネラの同時分析に成功した。

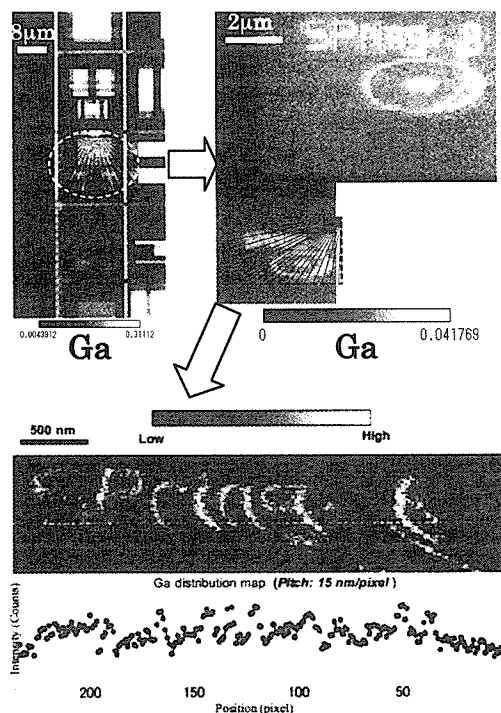


図2 テストチャート内のガリウム分布。テストチャート全体を測定した後に、“SPring-8”の文字の拡大観察を実施。ビームサイズは30×50nm<sup>2</sup>であり、走査ステップは15nmである。

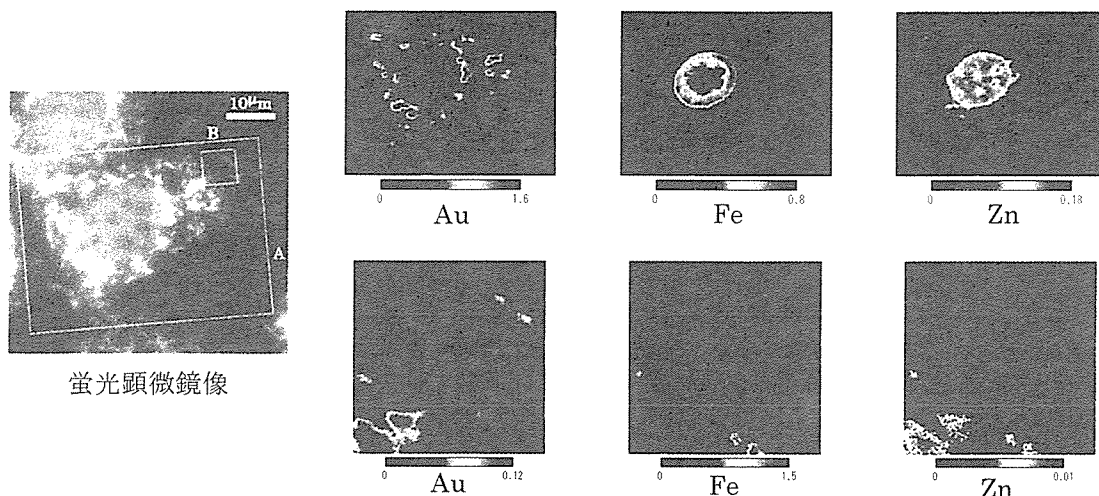


図 3 測定した細胞内元素分布。上段が領域 A を、下段が領域 B の元素分布を可視化した結果である。カラーバーは元素含有量(fg)を示している。

#### D. 考察

本開発により、蛍光X線画像による標的領域の効率的な探索、観察が可能となった。そして、オルガネラと細胞内元素分布の同時観察が可能である本分析法は、今後の細胞分析において、新分野開拓につながる。

現在、細胞の固定処理などの影響により、細胞内元素の増減が確認されている。今後、この影響を排除可能な、凍結細胞の観察を目的とした、更なるステージ系の改造を実施する。

#### E. 結論

本研究によって、高い空間分解能だけでなく、高能率観察が可能な、ズーミング機能をもつSXFPMを開発した。

#### F. 健康危険情報 該当無し

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- ①. Matsuyama S, Mimura H, Yamauchi K, et al., Development of mirror manipulator for hard X-ray nanofocusing at sub-50 nm level, Review of Scientific Instruments 77, 103102, 2006.
- ②. Matsuyama S, Mimura H, Yamauchi K, et al., Development of scanning X-ray fluorescence microscope with spatial resolution of 30nm using K-B mirrors optics, Review of Scientific Instruments 77, 093107, 2006.

##### 学会発表

- ①. Matsuyama S, Mimura H, Yamauchi K, et al., Development of a Scanning X-ray Fluorescence Microscope Using Size-Controllable Focused X-ray Beam from 50 to 1500nm, The 9th International Conference on Synchrotron Radiation Instrumentation, Deagu Korea, May 2006.
- ②. Matsuyama S, Mimura H, Shimura M, Yamauchi K, et al., High-spatial-resolution scanning X-ray fluorescence microscope with Kirkpatrick-Baez mirrors, International Society for Optical Engineering, San Diego USA, August 2006.
- ③. Katagishi K, Matsuyama S, Mimura H, Shimura S, Yamauchi K, et al., Observation of Intracellular Elements by Scanning X-ray Fluorescence Microscopy with Spatial Resolution of 50nm, The 16th International Microscopy Congress, Sapporo Japan, September 2006.
- ④. Matsuyama S, Mimura M, Shimura M, Yamauchi K, et al., Scanning X-ray Fluorescence Microscope Using Kirkpatrick-Baez Optics with Spatial Resolution Better than 50nm, The 16th International Microscopy Congress, Sapporo Japan, September 2006.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

本研究課題に関する特許、実用新案登録は無い。

## 細胞周期における細胞内元素の局在変化に関する研究

分担研究者 前島一博 独立行政法人理化学研究所・専任研究員

細胞内金属元素は、細胞を正常に維持するために必須であり、元素の増減や分布を把握することは細胞の機能を理解するためにも重要である。本研究はSXF<sub>M</sub>による細胞内元素変動の可視化という新しい視点から細胞周期を理解することを目的とする。

### A. 研究目的

細胞内金属微量元素は細胞機能のために必須である。このため、元素の増減や分布変化を把握することは細胞の機能を理解するためにも重要である。本研究は世界最小のナノX線によるSXF<sub>M</sub>を用いて細胞周期における細胞内元素変動の可視化をおこなうことを目的とする。

### B. 研究方法

ヒトガン細胞であるHeLa細胞をSiN基板上で培養する。細胞の形態を「生きた」状態にできるだけ保つため、基板を液体プロパン中に入れ、瞬間的に急速凍結をおこなった。凍結した細胞は液体窒素温度を保ったまま真空槽に入れ、極低温のまま水分子を昇華させ乾燥させた。凍結乾燥した細胞は、大阪大学・山内らと理化学研究所（SPring-8）・石川らが共同で開発した世界最小のX線ナノビームによる走査型蛍光X線顕微鏡（SXF<sub>M</sub>）で観察した。

（倫理面への配慮）  
該当無し

### C. 研究結果

本年度は、ヒトHeLa細胞の細胞周期における高解像度の元素分布変化を調べた。その結果、Znの細胞周期における興味深い局在変化が得られた。ゲノムDNAが高度に凝縮した分裂期細胞では染色体（DNA）と思われる部分にZnの局在が抜けていた。そして分裂直後のG1期と思われる細胞においては、核内に明らかなZnの局在が見られた。このZnの核内局在は間期を通して保持されていた。

### D. 考察

Znが細胞分裂期のみ、染色体（DNA）と結合していないことを示唆する。ZnはZn-fingerと呼ばれる転写因子のDNA結合部位を構成しているが、これらの転写因子の細胞分裂期における挙動は明らかではない。

### E. 結論

Zn<sup>2+</sup>はDNAにkink構造をつくるなど、DNA構造に対する影響がMg<sup>2+</sup>とは全く異なることが報告されている。このため、得られた結果は、ZnのDNAに対する機能を知る上で非常に興味深いものである。

### F. 健康危険情報 該当無し

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

①. Maeshima, K., et al. Cell cycle dependent dynamics of nuclear pores: pore-free island and lamins, *Journal of Cell Science* (2006), 119, 4442-4451. 2.

②. 前島一博 「染色体の凝縮メカニズム」*細胞工学* (2006), 25, 486-491. 学会発表

①. 前島一博、「ヒトゲノムをX線で見る」日本分子生物学会・分子フォーラム2006  
②. (分子生物学の未来) シンポジウム「染色体・核のダイナミックな機能と構造」2006年12月、名古屋

③. Maeshima, K. Mitotic chromosome structure: regular or random? *Osaka University COE International Symposium on chromatin signaling* (2006), Osaka, Nov. 2-3.

④. Maeshima K., Yahata K., Sasaki Y., Tachibana T., Imamoto F., and

Imamoto, N. Cell cycle dependent dynamics of nuclear pores: a regulatory role of laminA/C, EMBO Workshop on Functional Organization of the Cell Nucleus (2006), Prague, Czech, May 5-8.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

## 組織幹細胞の分化に伴う細胞内元素アレイ解析の基礎研究

分担研究者 大河内仁志 国立国際医療センター研究所・部長

幹細胞の分化機序解明は、再生医療の観点から近年注目されている研究分野である。本研究では、当研究代表らの開発した SXFM を用いた微量元素の変動と分化機序との関連を調べることで、蛋白とは異なる視点からの分化機序解明が可能となることが期待される。これまでに、マウスの皮膚から多能性幹細胞を分離培養に成功した。さらに、本年度はヒト難病疾患モデル動物での元素解析の可能性の探索も行った。

### A. 研究目的

再生医療が注目されている近年、信頼できる分化能を有する幹細胞ソースの供給は重要である。これまでの遺伝子およびタンパク質抗原による指標に加えて、元素アレイによる多角的な分化基準マーカーの有用性を検討する。今年度は、マウスの皮膚から多能性幹細胞を分離し、培養法を検討すると共に、細胞内元素プロファイル解析が生体組織で可能かどうかを検証するため、まず代表的な元素代謝異常モデル動物である Long-Evans-Cinnamon (LEC) ラットを用いて、肝臓を中心に各種元素を SXFM にて網羅的に解析する。

### B. 研究方法

マウスの皮膚から多能性幹細胞を分離し、各種刺激試薬培養法により元素分析可能な細胞数を得るための条件を検討する。協力研究者である岡村匡史（国立国際医療センター研究所、ヒト型動物実験研究部・室長）により、LEC ラットおよびコントロール系統の F344 ラットをセボフレン麻酔下で放血し、左心室から 1xHanks' balanced Salt Solution を 30ml 注入し、血液を洗い流した。さらに 4% パラホルムアルデヒド溶液を左心室から注入し、還流固定した。各組織を 4% パラホルムアルデヒド溶液で後固定し、30% 蔗糖溶液に浸漬した。OCT Compound で包埋し、クライオスタットにて薄切（切片厚 3 $\mu$ m）後、1cm x 1cm プロレンフィルムに上層した。さらに、サイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリ $\beta$ アクチンプロモーター制御下にウイルソン病の原因遺伝子であるヒト ATP7B を全身性に発現する

トランスジェニックラットを作成した。

### （倫理面への配慮）

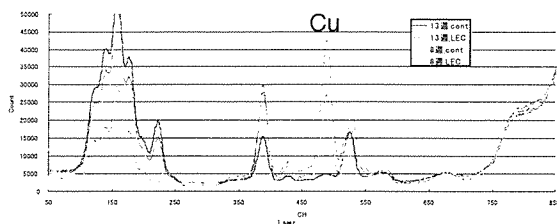
動物実験を行う際には、動物実験計画書を国立国際医療センター動物実験委員会に提出し、承認を受けた後実施した。動物実験の実施に当たっては、「国立国際医療センターにおける動物実験に関する指針」を遵守し、実験動物に無用な苦痛を与えないよう麻酔薬の投与、保安等に留意するとともに、実験動物の状態を定期的に観察し、必要に応じ適切な処置を講じた。

### C. 研究結果

マウスの皮膚から多能性幹細胞を分離し、元素分析可能な十分な細胞数をえる為の条件を検討中である。

細胞内元素プロファイル解析が、組織切片でも可能かどうかを検討するため、LEC ラット肝臓の切片を用いて、条件検討を行った。LEC ラットおよびコントロール系統の F344 ラット肝臓を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定後、3 $\mu$ m 厚の切片を作成し、SXFM で網羅的な元素解析を行った。SXFM の測定は、分担研究者の志村、前島、三村、山内、石川らの協力で行った結果良好な測定が可能であった（図）。本研究により、動物の組織切片においても、SXFM による網羅的な元素解析が可能であり、細胞内の局在も検出できる可能性が示された。

トランスジェニックラットは LEC ラットで作成する事は困難であったため、SD ラット受精卵前核に導入遺伝子を注入後、LEC ラットに戻し交配して、導入遺伝子を持つ Atp7b 変異のホモ接合体を作成した。



肝臓の元素スペクトラム

#### D. 考察

SXFM を用いて、組織切片で網羅的元素プロファイル解析を行えば、より詳細に責任元素を明らかにすることができ、責任元素が病態を引き起こす際の標的細胞内小器官を同定し、病態の本質を明らかにすることも可能である。今後さらに検討を加え、SXFM の応用範囲を広げていく予定である

#### E. 結論

SXFMによる細胞内元素プロファイル解析が、培養細胞のみでなく、動物組織切片でも可能であることが示された。このことにより、疾患モデル動物あるいは、臨床検体を用いた解析も可能となった。SXFMは新しい切り口で疾患の原因究明・診断および治療法の開発をするための基盤研究に大いに役立つ技術であり、さらに応用範囲が広がる事が予想される。

#### F. 健康危険情報 該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ①. Yanagi Y, Inoue Y, Kawase Y, Uchida S, Tamaki Y, Araie M, Okochi H. Properties of growth and molecular profiles of rat progenitor cells from ciliary epithelium., *Exp Eye Res.* 82, 471-478, 2006.
- ②. Inoue Y, Yanagi Y, Uchida S, Kawase Y, Araie M, Okochi H. Clonogenic analysis of ciliary epithelial derived retinal progenitor cells in rabbits. *Exp Eye Res.* 81, 437-445, 2005.
- ③. Yano S, Ito Y, Fujimoto M, Hanaszaki TS, Okochi H. Characterization and localization of side population cells in mouse skin. *Stem Cells.* 23, 834-841, 2005.
- ④. Mototani, Y., Miyoshi, I., Okamura, T., Moriya, T., Meng, Y., Pei, X. Y., Kameo, S. and Kasai, N. Phenotypic and genetic characterization of the *Mo<sup>Tohm</sup>* mottled mouse: A new murine model of Menkes disease. *GENOMICS*, 87, 191-199 (2006)
- ⑤. Maekawa, M., Okamura, T., Kasai, N., Hori,

Y., Summer, K.H., and Konno, R. D-Amino-acid Oxidase is Involved in D-Serine-induced Nephrotoxicity. *Chem. Res. Toxicology, Chem. Res. Toxicol.* 18, 1678-1682 (2005)

学会発表 なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

## 多発性骨髄腫の病態解明の可能性

分担研究者 萩原将太郎 国立国際医療センター・血液内科医長

多発性骨髄腫は、比較的高齢者に発症する血液悪性腫瘍である。発症頻度は年間10万人あたり約2人と少ないものの、社会の高齢化に伴い、骨髄腫による死亡数は年々増加している。確立された治療法はなく、また発症のメカニズムも十分に解明されていない。有効な治療法の確立と、癌化機序の解明が待たれている。本研究ではこれまでにないユニークな方法として、走査型蛍光X線顕微鏡〔SXFM〕を用いた細胞内の元素分析（エレメントアレイ解析）を行い、多発性骨髄腫発症のメカニズムを探索する。

### A. 研究目的

急性白血病、骨髄異形成症候群や再生不良性貧血など難治性血液疾患は、確実な治療法の研究が日々行われ、生存率が徐々に向上しているものの、依然、完治は困難であり、また発症のメカニズムも十分に解明されていない。さらなる有効な治療法の確立と、癌化機序の解明が待たれている。これらの病態解明の糸口を得るため、造血器腫瘍の一部に対してDNAマイクロアレイ等の解析が行われている。本研究ではこれまでにないユニークな方法として、走査型蛍光X線顕微鏡〔SXFM〕を用いた細胞内のエレメントアレイ解析を行う。元素は、細胞内酵素、転写活性および膜チャネル機構など細胞代謝に必須な物質である。本研究では正常骨髄・末梢血液細胞と血液疾患患者骨髄・末梢血液細胞の比較においてに特異な元素変動を見出し、疾患発症の機序解明やあらたな診断および治療法の端緒を探索する。

### B. 研究方法

**研究の対象**；多発性骨髄腫患者の骨髄細胞（当センターに外来通院中あるいは入院中の多発性骨髄腫患者を対象とする）骨髄細胞は初診診断あるいは治療上必要な場合に施行される骨髄穿刺検査の余剰骨髄液約0.5-1mlを採取し、単核球分離を行い、即座に凍結保存をおこなう。）  
**実施場所**；患者検体の収集：国立国際医療センター病院、解析準備のための細胞処理：国立国際医療センター研究所、元素分析（エレメントアレイ解析）：理化学研究所播磨研究所 SPring-8で行う。  
**実施（予定）期間**；国立国際医療センタ

一倫理委員会での承認後に行う。

（倫理面への配慮）

全ての研究の段階で最大限の倫理的配慮を行っている。

①研究の対象とする個人の人権の擁護

研究への協力はあくまで自由意志で有ることを前提にしており、患者は試料採取を拒否した場合でも、何ら臨床上の不利益を受けない。採取されたサンプルはすべて当センターの研究責任者（研究代表者）により連結可能匿名化を行い、解析を担当する研究者にそのサンプルが誰の物であるかがわからない方式をとる。

②被験者に理解を求め同意を得る方法

主治医から患者に対して、説明文書（別添）および同意書（別添）を用いて、分かり易い言葉で適切かつ十分な説明を行う。同意への能力を欠く者または有効なインフォームドコンセントを与えることが出来ないと客観的に判断された場合あるいは未成年（20歳未満）の場合には保護者などの代諾者の同意を得るものとする。研究によって生じる個人の不利益と医学上の利益または貢献度の予測研究に用いるサンプルは初診時あるいは病状評価際など診療に必要な検査として施行する骨髄穿刺の際の骨髄液余剰分であり特に患者に不利益を与えない。研究成果とその臨床応用には一定の時間が必要であり、試料提供者に直ちに有益な情報をもたらされる可能性は高くはないが、将来的には多発性骨髄腫における癌化の病態解明、新たな治療法の開発に貢献すると予想される。

④その他；疾患名、年齢、性別以外の個人情報は一切秘匿とし、論文発表などにおいても公開しない。



(詳細の倫理委員会承認資料は添付。)

### C. 研究結果

本年度は、多発性骨髄腫患者を対象とする、病棟および外来での検体の取得および迅速凍結保存(-140℃の極低温冷蔵設備; REVCO UTL-10140-9JR)システムを確立した。現在までに検体数は18件に及んでいる。予備的知見では、多発性骨髄腫での骨髄細胞では、健康人由来のものとは比べて亜鉛が高い値を示している細胞が多く認められている。しかし、骨髄細胞は分化段階の異なる細胞集団からなっている為に、亜鉛が高い値を示している細胞はどんな細胞なのかを明らかにする必要がある。

### D. 考察

これまでの骨髄細胞の解析は、パラホルムアルデヒド固定した細胞を基板にサイトスピンで上層し、丸ごと元素分析に使用していた。単一種の培養細胞とは異なり、骨髄細胞は異なる分化段階や機能の細胞集団からなっているため、SXFМで観察している細胞の個々の詳細の情報を他の染色法でも行う必要がある。そこで、現在一つの細胞のセクションニングを行い、色素染色、抗原の免疫染色を多角的に行う方法に移行している。臨床検体での解析結果が期待される。

### E. 結論

多発性骨髄腫患者を対象とする、倫理委員会承認を獲得し、病棟および外来での検体の取得および迅速凍結保存(-80℃)システムを確立した。

### F. 健康危険情報 該当無し

### G. 研究発表

#### 論文発表

- ①. Hagiwara, S., Yagisawa, M., Iki, S., Urabe, A., Mimura, T., Miwa, A., Togawa, A., Higashihara, M., Takaku, F., You, A.: Tyrosine phosphorylation of proteins in primary human myeloid leukemic cells stimulated by macrophage colony-stimulating factor: analysis by disease types and comparison with normal human hematopoietic cells. *Int J Hematol* 73, 100-107, 2001.
- ②. 萩原将太郎: がんと感染症、緩和ケアのための臨床腫瘍学、ターミナルケア10月増刊号、13巻、226-232、2003.

- ③. 萩原将太郎: 白血病における造血幹細胞移植 conventional transplant から non-myeloablative transplant へ、今日の移植16 (2) 155-162、2003.

#### 著書

- ①. 萩原将太郎: 慢性骨髄性白血病. 血液内科クリニカルスタンダード、文光堂、東京 2003、123-131 頁.
- ②. 萩原将太郎: 腸管滅菌と予防的抗生物質投与. 血液内科クリニカルスタンダード、文光堂、東京 2003、312-314 頁.
- ③. 萩原将太郎: 無菌管理. 血液内科クリニカルスタンダード、文光堂、東京 2003、315-321 頁.
- ④. 萩原将太郎: 慢性骨髄性白血病の治療成績. 血液内科クリニカルスタンダード、文光堂、東京、2003、380-384 頁.
- ⑤. 萩原将太郎: 慢性骨髄性白血病. 血液内科クリニカルスタンダード、文光堂、東京 2003、123-131 頁.
- ⑥. 萩原将太郎: 第1章感染症学概論3 免疫学. わかりやすい微生物学・感染症学、ヌーベルヒロカワ、東京、2003. 萩原将太郎: 第3章感染症治療薬5 ニューキノロン系. わかりやすい微生物学・感染症学、ヌーベルヒロカワ、東京、2003.

#### 学会発表

### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

様式1)

国立国際医療センター倫理審査申請書

平成18年 4月3日

国立国際医療センター総長 殿

申請者 所属 病院 血液内科  
職名 5階北病棟医長  
氏名 萩原将太郎 印

1. 審査対象 研究計画 出版公表原稿 報告書  
(迅速審査に相当する場合には、その理由)  
研究計画の軽微な変更 主たる研究機関で承認済みの共同研究  
その他 ( )

2. 課題名 走査型蛍光 X 線顕微鏡を用いた血液疾患患者血液・骨髄細胞に  
おける細胞内元素変動解析

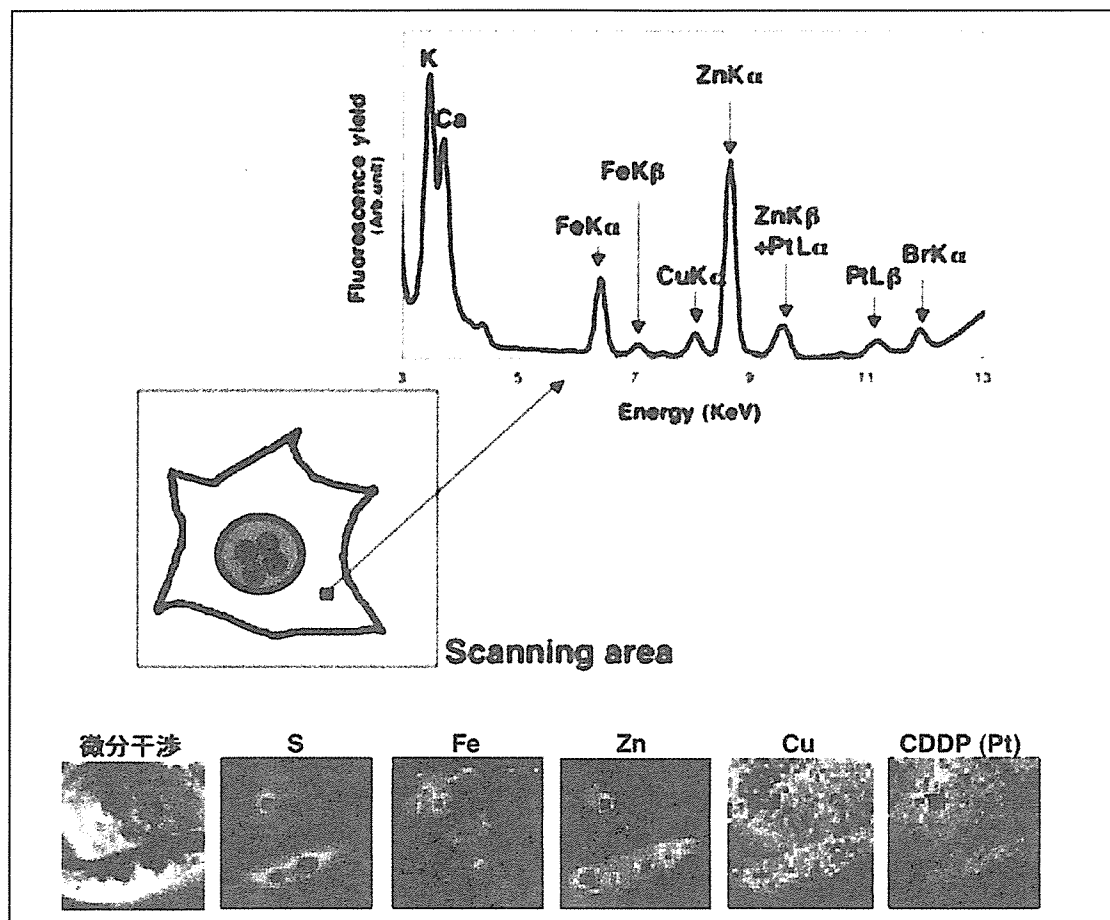
3. 当センターの研究代表者  
所属、職名、氏名 病院 血液内科 5階北病棟医長 萩原将太郎

4. 当センターの研究協力者  
所属、職名、氏名 研究所 難治性疾患研究部長 石坂幸人  
難治性疾患研究室長 志村まり  
病院 第1内科(血液内科)医長 三輪哲義  
共同研究施設  
所属、職名、氏名 理化学研究所播磨研究所 (SPring-8)  
X線干渉光学研究室 主任研究員 石川哲也  
大阪大学大学院工学研究科  
精密科学専攻教授 山内和人

5. 研究の概要  
急性白血病、骨髄異形成症候群や再生不良性貧血など難治性血液疾患は、確実な治療法の研究が日々行われ、生存率が徐々に向上しているものの、依然、完治は困難であり、また発症のメカニズムも十分に解明されていない。さらなる有効な治療法の確立と、癌化機序の解明が待たれている。

これらの病態解明の糸口を得るため、造血器腫瘍の一部に対して DNA マイクロアレイ等の解析が行われている〔文献1〕。本研究ではこれまでにないユニークな方法として、走査型蛍光 X 線顕微鏡〔SXFМ; 文献2〕を用いた細胞内の元素分析(エレメントアレイ解析; 図参照)を行う。元素は、細胞内酵素、転写活性および膜チャネル機構など細胞代謝に必須な物質である。本研究では正常骨髄・末梢血液細胞と血液疾患患者骨髄・末梢血液細胞の比較においてに特異な元素変動を見出し、疾患発症の機序

解明やあらたな診断および治療法の端緒を探索する。



参照図 1 走査型蛍光 X 線顕微鏡 (SXFM) を用いた細胞内の元素分析  
細胞内の 1 区画当たりの元素分析スペクトルを示す。細胞全領域のスキューニングにより、下段写真のように、細胞内元素マッピングが可能となる。写真は Pt 製剤であるシスプラチンを細胞投与後 4 8 時間後の各元素の細胞内分布を示す (文献 2 より引用)。

## 6. 研究の対象等

### 研究の対象

文書で同意を得た血液疾患 (急性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、骨髄繊維症、真性多血症、再生不良性貧血、多発性骨髄腫、原発性マクログロブリン血症、発作性夜間血色素尿症) 患者の末梢血および骨髄細胞 (末梢血液あるいは骨髄細胞の片方の提供の可とする)

\*末梢血は約 10ml、骨髄細胞は初診診断あるいは治療上必要な場合に施行される骨髄穿刺検査の余剰骨髄液約 0.5- 1 ml

## 実施場所

患者検体の収集：国立国際医療センター病院

解析準備のための細胞処理：国立国際医療センター研究所

元素分析（エレメントアレイ解析）：理化学研究所播磨研究所 SPring-8

実施（予定）期間 承認後 ～ 平成 22 年 3 月

## 7. 研究における倫理的配慮

全ての研究の段階で最大限の倫理的配慮を行っている。

### ①研究の対象とする個人の人権の擁護

研究への協力はあくまで自由意志で有ることを前提にしており、患者は試料採取を拒否した場合でも、何ら临床上の不利益を受けない。採取されたサンプルはすべて当センターの研究責任者（研究代表者）により連結可能匿名化を行い、解析を担当する研究者にそのサンプルが誰の物であるかがわからない方式をとる。

### ②被験者に理解を求め同意を得る方法

主治医から患者に対して、説明文書（別添）および同意書（別添）を用いて、分かり易い言葉で適切かつ十分な説明を行う。同意への能力を欠く者または有効なインフォームドコンセントを与えることが出来ないと客観的に判断された場合あるいは未成年（20歳未満）の場合には保護者などの代諾者の同意を得るものとする。

### ③研究によって生じる個人の不利益と医学上の利益または貢献度の予測

研究に用いるサンプルは初診時あるいは病状評価際など診療に必要な検査として施行する採血の際に追加採取される末梢血液約 10ml および骨髄穿刺の際の骨髄液余剰分であり特に患者に不利益を与えない。研究成果とその臨床応用には一定の時間が必要であり、試料提供者に直ちに有益な情報がもたらされる可能性は高くはないが、将来的には多発性骨髄腫における癌化の病態解明、新たな治療法の開発に貢献すると予想される。

### ④その他

疾患名、年齢、性別以外の個人情報は一切秘匿とし、論文発表などにおいても公開しない。