

200712018A

厚生労働科学研究費補助金
医療機器推進研究事業

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19年度 総括研究報告書

主任研究者 志村 まり

平成20（2008）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. 元素結合蛋白質の分離同定法の確立と臨床検体での元素アレイ解析-----	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-----	8
石川哲也	
3. クライオ走査型蛍光X線顕微鏡 (SXFM) の開発-----	10
山内和人、三村秀和	
4. 凍結乾燥における細胞内元素局在に関する研究-----	13
前島一博	
5. 難病疾患モデル動物組織の細胞内元素アレイ解析-----	15
岡村匡史	
6. 血液疾患における元素変動解析-----	17
萩原将太郎	
(資料) H19年度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	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷	30

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。本年度は、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 助教
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
岡村匡史 国立国際医療センター研究所
ヒト型動物開発研究室 室長
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。本年度は、生物医学応用のためのSXFM測定技術改良および測定により明らかになった元素(分子)機能の解明に焦点をおいた研究を展開した。

① 疾病解明に向けた細胞内元素動態観察

a) 基板開発：これまでのSiN基板を用いたSXFM測定では、基板元素の影響で細胞機能

に重要な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(前島、志村、山内)。

b) 凍結細胞の測定系並びにクライオ走査型蛍光X線顕微鏡の開発：細胞固定によりカルシウム、カリウム元素が喪失することが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。本年度は、凍結乾燥(前島)およびクライオ走査型蛍光X線顕微鏡(山内)の開発を行う。

c) 着目した元素(分子)機能の解明・元素結合蛋白質の分離同定法の確立：これまで、特定元素が疾患と関与するという報告はあったが、以降、機序解明はされないことが多かった。元素イメージングから元素結合蛋白質の同定までを一連の研究として可能にすることで、分子レベルでの機序解明が可能となる(志村、山内)。

d) 臨床検体でのSXFM解析：昨年度に確立されたインフォームドコンセント、取得法、保存法に基づいて、本年度より臨床検体でのSXFMが開始された。(萩原、志村、山内)。

② 生物医学応用へ向けた技術開発(石川、山内、三村)

生物試料では、同様の測定を繰り返し行い統計学的な確証を得ることが必須である。このため測定時間の短縮化が一連の研究をタイムリーに遂行するための重要な要因である。本年度は特に高速測定の可能性を検討した。

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で、蛋白質の同定項目を加えた承認を得る。病棟、外来で採取した骨髓液、血液より切片の作成を行う。SXFMによる測定は、真空下にてX線集光サイズ600-2000nm, 0.5-60sec/pixelの条件で行った。

② 元素結合蛋白質同定を行うために、難病疾患の動物モデル、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ラットおよびコントロールラットF344から肝臓を摘出し、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。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。画像により、増大元素の細胞内局在を明らかにする。目的の元素を含む組織抽出液作成し、High performance liquid chromatograph (HPLC)-Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)の連続測定を可能にする。後に、得られた蛋白質画分を精製し、MALDI-TOFF-MASでの蛋白質同定を行う。

③ヒトがん細胞であるHeLa細胞およびマウス由来NIH3T3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改良したクライオ走査型蛍光X線顕微鏡を用いて、細胞試料での測定を行う。

⑤実用的な医学応用に向けて、検出器の改善（高感度、高速測定）を行う。

（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（本年度改変後承認、添付資料参照）。一連の動物実験については、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) 基板開発:高分子膜にカーボン蒸着を施した基板は、低エネルギー元素の測定を可能とした(前島、志村、山内)。

b) 元素結合蛋白質の分離同定法の確立: HPLC-ICP-MSの連続測定を可能にした。元素イメージングから元素結合蛋白質の同定までが一連の研究として可能になったことで、分子生物学および生化学的手法とリンクし、多様な実験展開も可能となった。元素を含む生体機能の多角的な情報を得ることで、疾患の解明、創薬に対する貢献が期待される(志村、山内)。

c) 臨床検体でのSXFM解析: 多発性骨髄腫ではニッケルが細胞内および血漿中に増大していることが明らかになった。ニッケル炭坑労働者に同種の癌が多発していることから推測すると、環境因子が血液癌を誘導する可能性を示唆しているのではないだろうか。今後は、環境因子に関わる調査も加え、症例数を増大し、統計学的解析が肝要である(萩原、志村、山内)。

d) 凍結細胞の測定系並びにクライオ走査型蛍光X線顕微鏡の開発と細胞測定に成功した。

e) 高速MCA(multi-channel analyzer)の開発、複数のMCAの並列動作、MCAの通信速度の向上、細胞のないピクセルのスキップという対策を行い、測定時間の数倍の短縮を可能にした。

D. 考察

本年度、細胞測定基板開発、細胞の凍結法確立、クライオSXFMシステムの改良、高感度、高速測定が改善されたことにより、より自然に近い状態での細胞動態評価が可能となった。これらの開発の今後の生物医学応用に対する貢献は大きいと考える。また、元素イメージングのみならず、元素結合蛋白質(分子)の同定を、病態の組織細胞から行えたことは、病態解明、新規治療開発につながる意義のある研究成果が得られたと考える。今後、SXFMよりの元素動態情報と分子生物・生化学的手法を組み合わせた多角的な解析手法に発展することを期待している。

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。次年度はこれらの測定系を臨床試料で応用し、医学生物領域での貢献に寄与したい。

E. 結論

改良された高分解能走査型蛍光X線顕微鏡 (SXFМ) システム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

- 1) Suzuki Y, Maeshima K, Matsuyama S, Okamura T, Katagishi K, Nakao A, Yumoto H, Mimura H, Tamasaku K, Nishino Y, Yabashi M, Imamoto N, Yamauchi K, Ishikawa T, Ishizaka Y, Shimura M. Nuclear accumulation of copper binding proteins in the Long Evance Cinnamon Rat, *in preparation*.
- 2) Matsuyama S, Shimura M, Mimura H, Yamauchi K, et al., Element mapping of frozen hydrated cells by cryo-scanning X-ray fluorescence microscope, *in preparation*.
- 3) Matsuyama S, Mimura H, Katagishi K, Yumoto H, Handa S, Fuji M, Sano Y, Shimura M, Yabashi M, Nishio K, Tamasaku K, Ishizaka Y, Yamauchi K. Trace element mapping using a high-resolution scanning X-ray fluorescence microscope equipped with a Kirkpatrick-Baez mirror system. *Surf. Interface Anal*, 2008.
- 4) Maeshima K, and Eltsov M. Packaging the genome: the structure of mitotic chromosomes, *Journal of Biochemistry* 143, 145-153, 2008.
- 5) Ohara-Imaizumi M, Fujiwara T, Nakamichi Y, Okamura T, Akimoto Y, Kawai J, Matsushima S, Kawakami H, Watanabe T, Akagawa K and Nagamatsu S. Imaging analysis reveals mechanistic differences between first and second phase insulin exocytosis. *Journal of Cell Biology* 177, 695-705, 2007.
- 6) Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, Ishizaka Y, Kojima A, Kurata T, Sata T, Tokunaga K. All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. *Nucleic Acids Res.* 35, 2955-64, 2007.
- 7) Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya J, Terunuma H, Kano S, Ishizaka Y. Vpr in plasma of HIV type 1-positive patients is correlated with the HIV type 1 RNA titers. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 23, 391-397, 2007
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 前島一博 「染色体の凝縮メカニズム」 *細胞工学* 25, 486-491, 2006.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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^{Tohm}* mottled mouse: A new murine model of Menkes disease. *GENOMICS*, 87, 191-199, 2006.
- 14) 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.
- 15) 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.

16) Shimura M, Saito A, Matsuyama S, Sakuma T, Terui Y, Ueno K, Yumoto H, Yamauchi K, Yamamura K, Mimura H, Sano Y, Yabashi M, Tamasaki 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) 志村まり, 前島一博, 岩渕万里, 宮澤雅之, 森美貴, 徳永研三, 今本尚子, 佐多徹太郎, 瀧澤俊広, 大隅圭太, 石坂幸人 「VprによるHIV-1感染細胞の核膜異常」 第25回染色体ワークショップ, 湯河原, 2008.

2) 前島一博, 伊藤和輝, Jacques Dubochet, 渡辺愛, 今本尚子, Mikhail Eltsov 「分裂期染色体内のヒトゲノムDNAの高次構造」 第25回染色体ワークショップ, 湯河原, 2008.

3) 藤井正輝, 志村まり, 三村秀和, 山内和人 「クライオ走査型蛍光X線顕微鏡による細胞内元素分布測定」 第20回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 立命館大, 2008.

4) 志村まり, 前島一博, 宮澤雅之, 森美貴, 徳永研三, 今本尚子, 佐多徹太郎, 瀧澤俊広, 石坂幸人 「HIV-1 感染細胞のVprによる核膜異常」 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会, 横浜, 2007.

5) 志村まり, 前島一博, 鈴木美成, 松山智至, 岡村匡史, 片岸恵子, 飯田豊, 宮沢雅之, 玉作賢治, 西野吉則, 矢橋牧名, 湯本博勝, 三村秀和, 今本尚子, 石坂幸人, 山内和人, 石川哲也 「肝癌モデルラットを用いた細胞の元素分析」 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会, 横浜, 2007.

6) Shimura M, Toyoda Y, Kinomoto M, et al. 「HIV-1 Vpr causes aberrant sister chromatid separation. *International Organization of the Nucleus.*」 Awaji, Jan 2007.

7) Matsuyama S, Mimura H, Shimura M, Yamauchi K et al. 「High-resolution and Highly Sensitive Scanning X-ray Fluorescence Microscopy Using Kirkpatrick-Baez Mirror Optics」 *International 21st Century COE Symposium on Atomistic Fabrication Technology 2007*, Osaka Japan, Oct. 2007.

8) Fujii F, Shimura M, Mimura H, Yamauchi K et al., Development of Cryo Scanning X-ray Fluorescent Microscopy to Observe Frozen Hydrated Cells and Tissues, *International 21st Century COE Symposium on Atomistic Fabrication Technology 2007*, Osaka Japan, Oct. 2007.

9) 片岸恵子, 志村まり, 三村秀和, 山内和人 他, クライオ走査型蛍光X線顕微鏡による急速凍結された細胞の元素分布測定, 2007年秋季 第68回応用物理学会学術講演会, 北海道工大, 2007.

10) 藤井正輝, 志村まり, 三村秀和, 山内和人 他, 走査型蛍光X線顕微鏡による細胞内元素分布の測定, 第9回X線結像光学シンポジウム, 中部大学, 2007.

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 なし

元素結合蛋白質の分離同定法の確立と臨床検体での元素アレイ解析 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

申請者グループが開発した走査型蛍光X線顕微鏡(SXFM)の臨床応用として、基板開発、元素結合蛋白質の分離同定法の確立、臨床検体での元素分布、アレイ解析を可能とすることを目的とした。

A. 研究目的

①基板開発；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(前島、志村、山内)。

②元素結合蛋白質の分離同定法の確立：これまで、特定元素が疾患と関与するという報告はあったが、以降、機序解明はされないことが多かった。元素イメージングから元素結合蛋白質の同定までを一連の研究とすることで、分子レベルでの元素機能の機序解明が可能となる(志村、山内)。

③臨床検体でのSXFM解析：昨年度に確立されたインフォームドコンセント、取得法、保存法に基づいて、臨床検体でのSXFM測定を行う(萩原、志村、山内)。

B. 研究方法

①細胞は肺小細胞癌由来細胞株PC9を用いた。SiN(NTT Advanced Tech)、高分子膜にカーボン蒸着を施した膜はそれぞれ乾熱滅菌およびEtOH消毒を行った。PC9を24h前に基板に播種し、白金製剤CRBP 1 μ M添加48h後4%パラホルムアルデヒド固定、80%EtOHで洗浄後自然乾燥を施した。SXFMによる測定は、真空環境にて、600-2000nm X線集光, 0.5-60sec/pixelの条件で行った。

②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(添付参照)で、蛋白質の同定項目を加えた承認を得る。病棟、外来で採取した骨髓液、血液より切片の作成を行う。SXFMによる測定は、真空下にてX線集光サイズ600-2000 nm, 0.5-60sec/pixelの条件で行った。

③元素結合蛋白質同定を行うために、難病疾患の動物モデル、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(岡村)。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。画像により、増大元素の細胞内局在を明らかにする。目的の元素を含む組織抽出液作成し、High performance liquid chromatograph (HPLC)-Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)の連続測定を可能にする。後に、得られた蛋白質画分を精製し、MALDI-TOFF-MASでの蛋白質同定を行う。

(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。

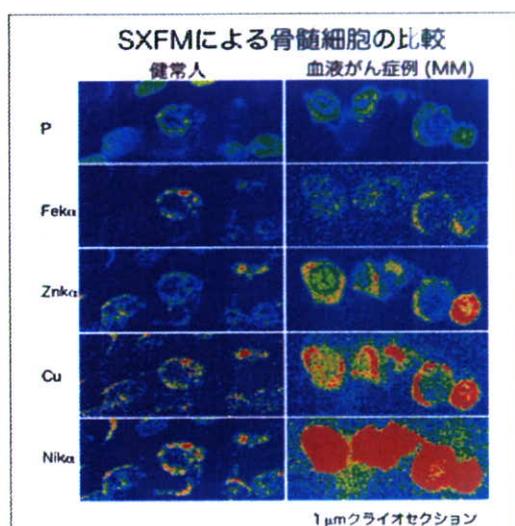
C. 研究結果

①基板開発:高分子膜にカーボン蒸着を施した新規基板は、細胞機能に必要なPなどの低エネルギー元素の測定を可能とした(前島、志村、山内)。

②元素結合蛋白質の分離同定法の確立：HPLC-ICP-MSの連続測定を可能にした。本研究において、元素イメージングから元素結合蛋白質の同定までが一連の研究として可能になったことで、分子生物学および生化学的手法とリンクし、多様な実験展開も可能となった。元素を含む生体機能の多角的

な情報を得ることで、疾患の解明、新規治療法に対する貢献が期待される（志村、山内）。

③臨床検体でのSXFМ解析：多発性骨髄腫ではニッケルが細胞内および血漿中に増大していることが明らかになった(下図)。ニッケル炭坑労働者に同種の癌が多発していることから、環境因子が血液癌を誘導する可能性を示唆しているのではないだろうか。今後は、環境因子に関わる調査も加え、さらに症例数を増大し、統計学的解析を行うことが肝要である（萩原、志村、山内）。



D. 考察

基板開発により、低エネルギー元素も含む元素イメージングが可能となったのみならず、元素結合蛋白質の同定を、病態の組織細胞から行えることは、基礎生物学、病態解明および新規治療法開発において意義のある研究成果が得られたと考える。さらに、次年度は臨床検体でのデータを蓄積し、これまでの開発技術による医学貢献が期待される。

E. 結論

SXFМシステムの改良と応用により、元素を視点に置いた質の高い生物研究が可能となった。

F. 健康危険情報 該当無し

G. 研究発表

論文発表

1. Suzuki Y, Maeshima K, Matsuyama S, Okamura T, Katagishi K, Nakao A, Yumoto H, Mimura H, Tamasaku K, Nishino Y, Yabashi M, Imamoto N, Yamauchi K, Ishikawa T, Ishizaka Y, Shimura M. Nuclear accumulation of copper binding proteins in the Long Evance Cinnamon Rat, in preparation.

2. Matsuyama S, Shimura M, Mimura H, Yamauchi K, et al., Element mapping of frozen hydrated cells by cryo-scanning X-ray fluorescence microscope, in preparation.

3. Matsuyama S, Mimura H, Katagishi K, Yumoto H, Handa S, Fuji M, Sano Y, Shimura M, Yabashi M, Nishio, K, Tamasaku K, Ishizaka Y, Yamauchi K. Trace element mapping using a high-resolution scanning X-ray fluorescence microscope equipped with a Kirkpatrick-Baez mirror system. Surf. Interface Anal, 2008.

4. Kinomoto M, Kanno T, Shimura M, Ishizaka Y, Kojima A, Kurata T, Sata T, Tokunaga K. All APOBEC3 family proteins differentially inhibit LINE-1 retrotransposition. Nucleic Acids Res. 35, 2955-64, 2007.

5. Hoshino S, Sun B, Konishi M, Shimura M, Segawa T, Hagiwara Y, Koyanagi Y, Iwamoto A, Mimaya J, Terunuma H, Kano S, Ishizaka Y. Vpr in plasma of HIV type 1-positive patients is correlated with the HIV type 1 RNA titers. AIDS Res Hum Retroviruses. 23, 391-397, 2007

6. 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.

7. 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.

8. 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.

9. 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. 志村まり, 前島一博, 岩渕万里, 宮澤雅之, 森美貴, 徳永研三, 今本尚子, 佐多徹太郎, 瀧澤俊広, 大隅圭太, 石坂幸人 「VprによるHIV-1 感染細胞の核膜異常」 第25回染色体ワークショップ, 湯河原, 2008.

2. 藤井正輝, 志村まり, 三村秀和, 山内和人 「クライオ走査型蛍光X線顕微鏡による細胞内元素分布測定」 第20回日本放射光学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 立命館大, 2008.

3. 志村まり, 前島一博, 宮澤雅之, 森美貴, 徳永研三, 今本尚子, 佐多徹太郎, 瀧澤俊広, 石坂幸人 「HIV-1 感染細胞のVprによる核膜異常」第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会, 横浜, 2007.

4. 志村まり, 前島一博, 鈴木美成, 松山智至, 岡村匡史, 片岸恵子, 飯田豊, 宮沢雅之, 玉作賢治, 西野吉則, 矢橋牧名, 湯本博勝, 三村秀和, 今本尚子, 石坂幸人, 山内和人, 石川哲也 「肝癌モデルラットを用いた細胞の元素分析」 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会, 横浜, 2007.

5. Shimura M, Toyoda Y, Kinomoto M, et al. 「HIV-1 Vpr causes aberrant sister chromatid separation. International Organization of the Nucleus.」 Awaji, Jan 2007.

6. Matsuyama S, Mimura H, Shimura M, Yamauchi K et al. 「 High-resolution and Highly Sensitive Scanning X-ray Fluorescence Microscopy Using Kirkpatrick-Baez Mirror Optics 」 International 21st Century COE Symposium on Atomistic Fabrication Technology 2007, Osaka Japan, Oct. 2007.

7. Fujii F, Shimura M, Mimura H, Yamauchi K et al., Development of Cryo Scanning X-ray Fluorescent Microscopy to Observe Frozen Hydrated Cells and Tissues, International 21st Century COE Symposium on Atomistic Fabrication Technology 2007, Osaka Japan, Oct. 2007.

8. 片岸恵子, 志村まり, 三村秀和, 山内和人 他, クライオ走査型蛍光X線顕微鏡による急

速凍結された細胞の元素分布測定, 2007年秋季 第68回応用物理学会学術講演会, 北海道工大, 2007.

9. 藤井正輝, 志村まり, 三村秀和, 山内和人 他, 走査型蛍光X線顕微鏡による細胞内元素分布の測定, 第9回X線結像光学シンポジウム, 中部大学, 2007.

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

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、検出器システムの設計を進めた。

(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。この計測手法をより広範な応用に付するためには、測定効率の向上が不可欠である。このために効率を決める要因を整理し、A-1: 分光器の振動抑制、A-2: ミラーの反射率向上、B-1: 検出器の大面积化、B-2: 複数の検出器による実効面積増大、C-1: 高速MCA (multi-channel analyzer) の開発、C-2: 複数のMCAの並列動作、C-3: MCAの通信速度の向上、D-1: 細胞のないピクセルのスキップ、という対策を検討した。本年度は、A-1, C-2に取り組み、現存の測定系で最大限の高効率化を達成した。D-1については、細胞を遠心回転により、高密度に集めた細胞塊からの試料作成法により、効率のよい測定が可能となっている。これらの改善と平行して、現在ボトルネックとなっているMCAの問題を根本的に解決するために、これまでより格段に高速なMCAを開発した(C-1, 3)。

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

Tetsuya Ishikawa: “X-Ray Optics for Nanometer-Resolution Imaging”, The 9th 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。

クライオ走査型蛍光X線顕微鏡（SXFМ）の開発

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 助教

急速凍結された細胞内の元素分布を高分解能かつ高感度で測定するために、クライオ走査型蛍光X線顕微鏡の開発を行った。システムは振動、温度安定性に優れ、かつ、120Kまで冷却させることが可能であることを確認した。急速凍結された細胞内の元素分布を測定した結果、洗浄、化学固定処理によって容易に漏洩する元素において、元素分布の可視化に成功した。

A. 研究目的

これまでの研究で開発された走査型蛍光X線顕微鏡（SXFМ）によって細胞内の元素分布をサブ100nmの分解能で可視化することが可能となった。しかし、ICP-MSの実験において、試料作製時の前処理等のわずかな影響で細胞内の元素量は減少することが確認された。このため、細胞内元素分布を“生きた状態”のまま測定するためには、“生きた状態”の構造を長時間維持することができる試料作製方法が必要である。電子顕微鏡の分野では、急速凍結技術と極低温での観察によってこの問題を解決している。10⁴°C/sec以上の冷却速度で急速凍結された水は細胞内の微細構造を破壊するような大きな結晶（氷晶）には成長せず、かつ、細胞内の元素分布を生きた状態に非常に近い状態で維持できる。そのため、この技術はSXFМに対しても有効であると思われる。

本研究では凍結された試料を極低温に維持しながら元素分布を測定することが可能なクライオSXFМの開発とクライオSXFМのための急速凍結試料作製方法の確立を行った。

B. 研究方法

クライオSXFМの設計と開発を行い、完成したシステムの性能を評価した。また、クライオSXFМのための急速凍結試料作製方法を確立させ、実際に急速凍結された細胞内の元素分布の測定を行った。

C. 研究結果

高分解能クライオSXFМを開発するに当たり、冷却システムには①振動レベルが1nm、②±0.1°Cの温度安定性、③集光システムに熱的な影響を与えないことが求められた。そのために、断熱自由膨張を利用した小型冷却器を用いた。これはガスボンベ内の常温のアルゴンガスのみによって冷却することが可能であり、稼動

部がないため振動がない点、冷媒を用いない点、0.1°C以下で温度コントロールが可能な点で先ほどの条件を満たしている。また、冷却ヘッドと試料マウント部を真空中に置くことで真空断熱し外部への熱的影響を遮断した。開発したクライオSXFМの冷却ヘッド近傍の写真を図1に示す。

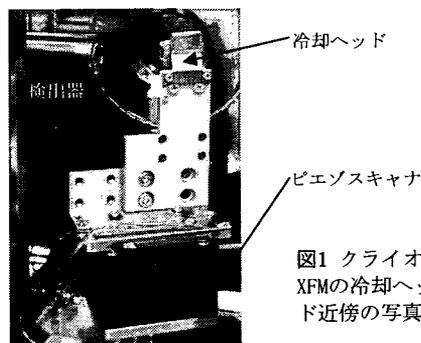


図1 クライオSXFМの冷却ヘッド近傍の写真

SXFМで測定するためには試料を厚さ10 μm以下にする必要がある。急速凍結した試料には余分な緩衝液の氷層が細胞上に付着している。この氷層を取り除くために、試料を真空中に置き、温度を120～180Kにわたってコントロールしながら最上部の氷層のみを昇華させるという新しい試料作製方法を確立し、厚さ10 μm以下の薄い凍結試料を作製した。

作製した凍結試料を極低温を維持しながらクライオSXFМに導入し、細胞内の元素分布の測定を150Kの温度に保って行った。測定の結果、これまで可視化ができていなかったKや化学固定の影響が出やすいFeの可視化に成功した（図2）。またこの元素分布は急速凍結されているため生きた状態とほぼ同等であると言える。Feについてはミトコンドリア内に多く分布していることが報告されており、本実験の

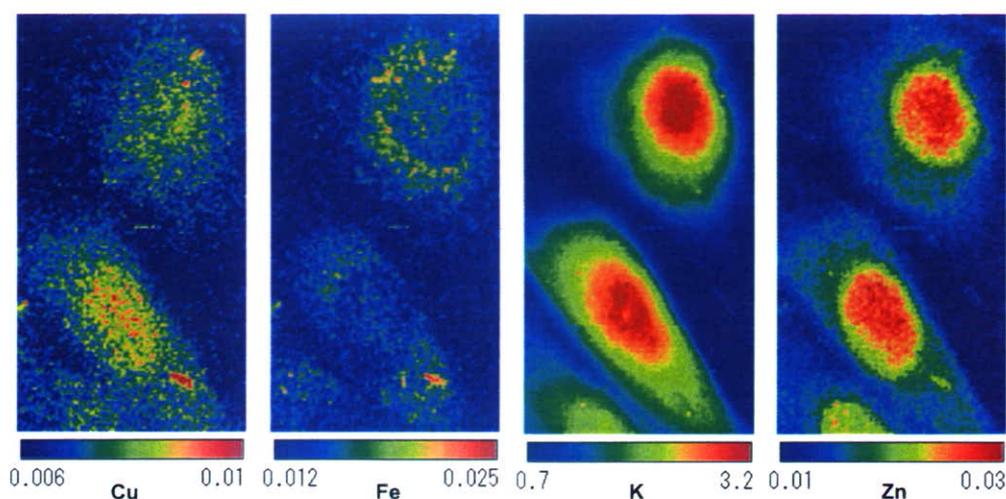


図2 急速凍結された NIH/3T3 の細胞内元素分布. 下段のカラーバーは標準試料によって定量した値で単位は fg/pixel. Area: 75 x 41 μm^2 , Exposure: 1sec/pixel, X-ray energy: 11.5keV, Temperature: 150K.

結果はその報告とは矛盾していない. 今後はより集光されたX線を用いて, オルガネラレベルの解像度で凍結試料内の元素の可視化を行う予定である.

D. 考察

本開発により, 凍結状態の試料を極低温で測定することが可能となった. また, これによって生きた状態と同等の元素分布を測定できる装置環境が整った. これまでは同一の元素分布と思われてきた細胞の状態であっても急速凍結した試料では異なった元素分布を得られる可能性があり, より詳細な細胞内の元素分布を測定することで, 病気メカニズムの解明や治療への足がかりになるものと期待される.

E. 結論

本研究によって, 凍結された試料内の元素分布を極低温で観察することが可能なクライオ走査型蛍光X線顕微鏡の開発を行った. これによって, 生きた細胞と同等の状態で細胞内元素分布を測定することが可能となった.

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, Shimura M, Yamauchi K, et al., Trace element mapping using a high-resolution scanning X-ray fluorescence microscope equipped with a

Kirkpatrick-Baez mirror system, Surf. Interface Anal. Accepted, 2008.

- ②. Matsuyama S, Shimura M, Mimura H, Yamauchi K, et al., Element mapping of frozen hydrated cells by cryo-scanning X-ray fluorescence microscope, in preparation.

学会発表

- ①. Matsuyama S, Mimura H, Shimura M, Yamauchi K et al., High-resolution and Highly Sensitive Scanning X-ray Fluorescence Microscopy Using Kirkpatrick-Baez Mirror Optics, International 21st Century COE Symposium on Atomistic Fabrication Technology 2007, Osaka Japan, Oct. 2007.
- ②. Fujii F, Shimura M, Mimura H, Yamauchi K et al., Development of Cryo Scanning X-ray Fluorescent Microscopy to Observe Frozen Hydrated Cells and Tissues, International 21st Century COE Symposium on Atomistic Fabrication Technology 2007, Osaka Japan, Oct. 2007.
- ③. 片岸恵子, 志村まり, 三村秀和, 山内和人 他, クライオ走査型蛍光X線顕微鏡による急速凍結された細胞の元素分布測定, 2007年秋季 第68回応用物理学会学術講演会, 北海道工大, 2007.
- ④. 藤井正輝, 志村まり, 三村秀和, 山内和人 他, 走査型蛍光X線顕微鏡による細胞

- 内元素分布の測定, 第9回X線結像光学シンポジウム, 中部大学, 2007.
- 学会年会・放射光科学合同シンポジウム, 立命館大, 2008.
- ⑤. 藤井正輝, 志村まり, 三村秀和, 山内和人, クライオ走査型蛍光X線顕微鏡による細胞内元素分布測定, 第20回日本放射光
- 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。

凍結乾燥における細胞内元素局在に関する研究

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正確に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、瞬間凍結から乾燥処置を施した細胞での走査型蛍光X線顕微鏡（SXFM）測定を行った。

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。これまでの研究班での研究では、細胞固定を行うことでカリウムやカルシウムが喪失することが明らかになっている。生体を理解するためには、できるだけ自然のままでの観測が望ましい。そこで、本研究は瞬間凍結から乾燥処置を施した細胞での走査型蛍光X線顕微鏡（SXFM）測定を行い、適切な細胞処置についての議論を展開する。

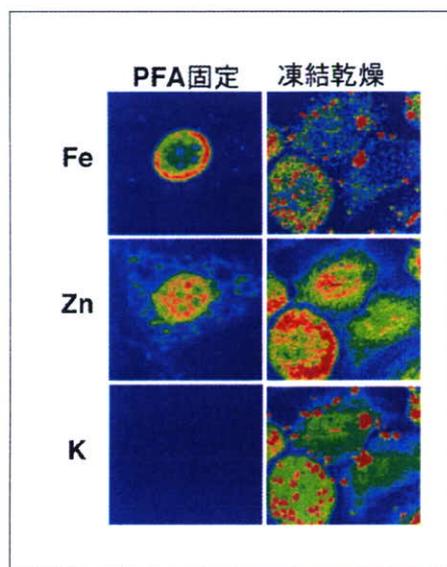
B. 研究方法

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（SXFM）で観察した。

（倫理面への配慮）
該当無し

C. 研究結果

右図に示すように、これまで行ってきた固定法と比べて、凍結乾燥法によりカリウムや細胞質の鉄の検出が可能となった。一方、細胞内に相当量存在するKClのために、近接するエネルギーをもつ微量元素の検出は困難となった。細胞周囲の培養液が細胞上で析出し、同領域での測定も困難になった。



D. 考察

凍結乾燥法により可溶化あるいはイオン状態であるカリウムや細胞質の鉄の検出が可能となった。凍結乾燥法で処置した細胞試料は、常温大気中（プロトタイプSXFM）でも測定可能な利点がある。一方、カリウムや塩素の近接するエネルギーをもつ微量元素の検出は困難となったことに対しては、今のところ解決策はない。瞬間凍結細胞での観察は電子顕微鏡で行われている技術であるが、この問題は元素顕微鏡特有である。現時点では、目的の元素に依り、洗浄などで塩を取り除く必要がある。元素の多少に関わらず、すべての元素が検出できるシステムが理想であるが、今後議論が必要である。

E. 結論

凍結乾燥法により細胞固定法により検出できなかったカリウムや細胞質の鉄の検出が可能となった。凍結乾燥法は、常温大気中でも測定できる優れた

手法である。

F. 健康危険情報 該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- ①. Iwai Y, Ikeda T, Kojima T-M, Yamazaki Y, Maeshima K, Imamoto N, Kobayashi, T., Nebiki, T., Narusawa T, Pokhil G-P Ion irradiation in liquid of μm^3 region for cell surgery. Applied Physics Letters (2008), 92, 23509 (3 pages).
- ②. Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, Tsutsumi S, Nagae G, Ishihara Ko, Mishiro T, Yahata K, Imamoto F, Aburatani H, Nakao M, Imamoto N, Maeshima K, Shirahige K, and Peters J-M. Cohesin is required for the transcriptional insulator function of CTCF binding sites. Nature (Article) (2008), 451, 796-801.
- ③. Tahara K, Takagi M, Ohsugi M, Sone T, Nishiumi F, Maeshima K, Horiuchi Y, Tokai-Nishizumi N, Imamoto F, Yamamoto T, Kose S and Imamoto N. Importin-beta ?and small GTPase Ran mediate chromosome loading of human chromokinesin Kid, Journal of Cell Biology (2008), 180, 493-596.
- ④. Maeshima K and Eltsov M. Packaging the genome: the structure of mitotic chromosomes, Journal of Biochemistry (2008) 143, 145-153.
- ⑤. Yahata K, Maeshima K, Sone T, Ando T, Okabe M, Imamoto N and Imamoto F. cHS4 insulator-mediated alleviation of promoter interference during cell based expression of tandemly associated transgenes, Journal of Molecular Biology (2007), 374, 580-90.
- ⑥. Funakoshi T, Maeshima K, Yahata K, Sugano S, Imamoto F, and Imamoto N. TWO DISTINCT HUMAN POM121 GENES: Requirement for the Formation of Nuclear Pore Complexes, FEBS Letters (2007), 581, 4910-6.

口頭発表

Maeshima K. Mitotic chromosome structure: regular or random? International Symposium Functional Organization of the Nucleus (2007), Awaji-shima, Jan9-12.

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

厚生労働科学研究費補助金（医療機器推進研究事業）
分担研究報告書

難病疾患モデル動物組織の細胞内元素アレイ解析

分担研究者 岡村 匡史 国立国際医療センター研究所・室長

2型糖尿病は、インスリン分泌能低下やインスリン抵抗性をきたす素因を含む複数の遺伝子（体質）に、過食、肥満及びストレスなどの環境因子が加わることにより、発症する多因子疾患である。日本人の主な病態であるインスリン分泌不全については、未だ不明な点が多く新技術による機序の解明が期待される。本研究ではインスリン分泌不全型糖尿病モデルラットでの、元素解析の可能性を探索した。

A. 研究目的

インスリン分泌不全とインスリン抵抗性は、糖尿病発症の2大病因であるが、日本人2型糖尿病の70-80%が遺伝的・体質的素因によるインスリン分泌不全から糖尿病を発症すると言われている。膵島からのインスリン分泌機構に関しては、数多くの研究がなされているが、未だ不明な点が多く新技術による機序の解明が期待される。

先天的に雌雄とも若齢からインスリン分泌不全病態を有する LEA/Sendai ラットは、日本人に特徴的な2型糖尿病に類似した非常にユニークなモデルラットである。若齢から観察される耐糖能およびインスリン分泌能低下は、膵島の量やインスリン含有量ではなく、膵β細胞の質的機能が低下している事がわかっている。

本研究では、走査型蛍光 X 線顕微鏡（SXFM）を用いて、膵島における元素分布を測定し、細胞内元素変動と糖尿病病態との関連性を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

正常ラットおよびLEA/Sendaiラットの膵島の細胞内元素プロファイルを調べるために、ラットを一晩絶食後、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。膵臓を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3μm）後、1cm x 1cmプロレンフィルムに上層した。次に糖負荷後のプロファイルの変化を観察するために、正常及びLEA/Sendaiラットを一晩絶食後、体重1Kgあたり2gとなるようグルコースを経口投与し、インスリン分泌が促された15および30分後安楽死させた。直ちに4%パラホルムアルデヒドで還流固定し、上記方法と同様に薄切切片を作製した。

（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、必要に応じて適切な処置を講じた。

C. 研究結果

代表的な元素代謝異常モデル動物である Long-Evans-Cinnamon (LEC)ラットを用いた解析により、組織切片においても細胞内元素プロファイル解析が可能であることがわかっている。本分担研究では、LECラットの肝臓組織と同様に、正常および糖尿病モデルラットの膵臓切片でも同様な解析が可能かどうかを検討した。

LEA/Sendaiラットおよび正常ラットの膵臓を4%パラホルムアルデヒド溶液で固定後、3µm厚の切片を作成することができた。膵臓組織切片の作成法を検討することで、動物の膵臓組織切片においても、SXFMによる網羅的要素解析が可能となった。

D. 考察

亜鉛は膵β細胞の分泌顆粒中に存在し、その分泌顆粒はインスリン結集を含み、インスリンの結晶化は亜鉛で促進される。亜鉛欠乏で糖尿病が発生することから、亜鉛と糖尿病発症には重大な関係があると考えられている。また、クロム欠乏動物で耐糖能異常が見られ、マグネシウムの慢性的な不足が2型糖尿病増加の一因とも考えられている。その他、バナジウム、マンガンおよびセレンと糖尿病の関連性についても指摘されているが、詳細なメカニズムについては、明らかになってい

ない。

遺伝的コントロールおよび環境因子の負荷など、ヒトを対象にした研究で受ける制約を、モデル動物ではほとんど受けず、多様な病態を示すヒト糖尿病研究における有力なツールとなる。SXFMを用いた解析により、これまで観察できなかった、組織切片上での網羅的要素プロファイル解析が可能になり、複雑な糖尿病病態と微量元素との関連を明らかにできる。

E. 結論

LEA/Sendaiラットという非常にユニークなモデル動物とSXFMによる細胞内元素イメージングにより、糖尿病病態と元素変動という新しい視点から病態の解明の可能性が示された。

F. 健康危険情報 該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohara-Imaizumi, M., Fujiwara, T., Nakamichi, Y., Okamura, T., Akimoto, Y., Kawai, J., Matsushima, S., Kawakami, H., Watanabe, T., Akagawa, K. and Nagamatsu, S.: Imaging analysis reveals mechanistic differences between first and second phase insulin exocytosis. *J. Cell. Biol.*, 177, 695-705 (2007).

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

血液疾患における元素変動解析

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

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。

A. 研究目的

難治性血液疾患患者の末梢血液あるいは骨髄細胞について走査型蛍光X線顕微鏡を用いて、細胞内微細構造における元素分析（エレメントアレイ解析）を行い、難治性の血液疾患患者末梢血液・骨髄細胞に特異な元素変動を見出し、疾患発症の機序解明、新たな診断および治療法の端緒を探索する。

B. 研究方法

患者末梢血と骨髄液を採取（どちらか一方でも可）。蛍光X線専用基板に細胞を接着後固定する。試料は理化学研究所播磨研究所SPring-8に搬送。細胞の形態学的分類を施行した後走査型蛍光X線顕微鏡による元素分析を行う。さらに、変動している特異元素に結合している蛋白質の解析を行うために、High performance liquid chromatograph (HPLC)-Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)の連続測定による解析を行う。必要であれば、Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization(マトリックス支援レーザー脱離イオン化法) - Time of Flight Mass Spectrometry (飛行時間型質量分析法) (MAIDI-TOFMS)での蛋白質同定を行い、難治性の血液疾患発症の機序解明、新たな診断および治療法の端緒を探索する

研究の対象；血液疾患患者の骨髄細胞あるいは末梢血液細胞（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）骨髄あるいは血液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分あるいは末梢血液を採取し、単核球分離を行い、即座に凍結保存をおこなう。また血清成分についても保存を行う。

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ー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としており、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あるいは末梢血液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。

(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はじめ急性骨髄性白血病患者、急性リンパ性白血病、悪性リンパ腫患者などの血液細胞を採取。30検体を採取保存している。予備的試験として、1例ずつの慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病、多発性骨髄腫患者血漿中の元素解析を行い健康人由来血漿との比較を行った。その結果、マンガン、ニッケル、ヒ素、バリウムなどが患者血漿で有意に高いことが示された。

D. 考察

ニッケル、ヒ素などは発癌に関与する元素であることが知られている。ニッケルに関してはアルバータ(カナダ)のニッケル精錬所にて多発性骨髄腫や他のリンパ性悪性腫瘍の罹患率が高いことが報告されており、リンパ性腫瘍発生に元素が関与している可能性が示唆される。ヒ素についても細胞毒性、遺伝子毒性が知られており、血液悪性腫瘍の発症に関与している可能性が示唆される。今後、蓄積した多数の臨床検体を用いた解析により統計的に精度の高い検証が必要である。

E. 結論

患者臨床検体を用いて血液疾患患者における元素解析を行うため、検体収集を進めている。予備的解析では血液疾患患者検体において複数の元素変動が見られ、今後、多数例での解析が必要である。

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., Tagawa, 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