

2008/2002A
2008/2002B

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20年度 総括研究報告書
平成18年度～平成20年度 総合研究報告書

研究代表者 志村 まり

平成21(2009)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に関する研究----- | 1 |
| 志村まり | |
| II. 分担研究報告- | |
| 1. SXFMにおける放射光光学系・計測系の検討に関する研究----- | 5 |
| 石川哲也 | |
| 2. 高速走査型蛍光X線顕微鏡の開発----- | 7 |
| 山内和人、松山智至 | |
| 3. 蛋白質結合元素の電気泳動による可視化----- | 9 |
| 志村まり | |
| 4. 細胞の中を3次元観察できる新タイプのX線顕微鏡を開発----- | 11 |
| 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----- | 14 |
| 岡村匡史 | |
| 6. 誘導結合プラズマ質量分析装置を用いた血液疾患患者検体における微量元素 分析に関する研究----- | 17 |
| 萩原將太郎 (資料) H20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 ----- | 33 |

細胞内元素アレイ解析の臨床応用に向けた基礎研究に関する研究

研究代表者 志村まり 国立国際医療センター研究所
難治性疾患研究部難治性疾患研究室長

研究要旨

本研究では、未だ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、早期診断へ応用することを目的とする。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。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、原因や治療法が不明であった疾患についても、解明の糸口が得られることが期待される。本年度は特に、SXFM測定の高速度化と医学生物学応用、そして、次世代放射光源を用いた場合の当該手法の拡張性の検討を行った。

研究分担者氏名・所属機関名・役職

石川 哲也・理化学研究所播磨研究所・
大型放射光施設 SPring-8・放射光科学総
合研究センター
山内 和人・大阪大学大学院工学研究科
精密科学加工・教授
松山 智至・大阪大学大学院工学研究科
精密科学加工・助教
前島 一博・理化学研究所・中央研究所今
本核研究室・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

細胞内元素を可視化する方法として、色素染色や組織レベルでのX線顕微鏡観察はこれまでも報告されているが、細胞レベルで直接元素分布を解析した報告は少ない。細胞レベルで網羅的に元素分布を可視化することで、初めて元素変動と蛋白質や遺伝子発現との対応も可能となり、より多角的な視点での細胞機能や病態への理解が可能となることが期待される。本研究グループによるSXFMを用いた細胞内元素分布観察の成功は、生物分野へのSXFMの広範な応用の可能性を示してきた。本年度はこれまで行ってきた細胞観察に適した走査型蛍光X線顕微鏡(SXFM)の開発に加えて、高速測定、医学生物学応用、そして、次世代放射光源を用いた場合の当該手法の拡張

性の検討を目的とする。

B. 研究方法

- a. 細胞観察用SXFMシステムの開発
 - 1) 高速測定システム
 - 2) ユーザーフレンドリー化
- b. SXFMの生物・医学応用
 - 1) ATP7b トランスジェニックラットの作成とエレメントアレイ解析
 - 2) 蛋白質結合元素の電気泳動による可視化
 - 3) 血漿中23元素のICP-MS同時解析
 - 4) 次世代放射光源を用いた場合の当該手法の拡張性の検討-X線ナノCTによる染色体構造3次元解析-

(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（既に国立国際医療センター倫理委員会承認済み；添付資料参照）。再生医療の幹細胞ソースに関わる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. 細胞観察用SXFMシステムの開発

1) 高速測定システム；複数試料測定を行い、統計学的評価が必要な生物医学分野において、現行のSXFMの測定時間は、5個の細胞当たりおおよそ4-6時間必要とする。これを1/17までに短縮することを目的にいくつかの改良を行った。測定領域の網羅的な蛍光X線エネルギー情報を高速通信可能なMCA(multi-channel analyzer)を新規に開発した。その結果、現在の設定に比べて2倍以上短く、少なくとも2倍以上の蛍光X線を処理できた。さらに、大面積の半導体検出器を用意した。これによって試料周りの空間が開放され、多数の試料を測定チェンバー内に予め入れておくことが可能となり、試料交換時に生じる作業時間を最小限にすることが可能である(石川、玉作)。

2) ユーザーフレンドリー化；新SXFMシステムでは、システムに備え付けられている試料位置観察用顕微鏡の画像を見ながら、測定場所や測定したい場所を示し、SXFM観察ができる。システム全体の処理を2台のPCと3つのプログラムに分散することで、処理の高速化と高信頼性を実現している(松山、山内)。これらにより、限られたマシンタイムを有効に活用できると考える。

b. SXFMの生物・医学応用

1) *ATP7b* トランスジェニックラットの作成とエレメントアレイ解析；これまでに研究グループでは、銅代謝異常で知られているLECラットでのSXFM解析を行い、既知の情報に加えて、肝炎や肝がんの発症原因を示唆する結果を得ている(投稿準備中)。今回、LECラットの銅代謝異常の原因遺伝子とされる*ATP7b*のトランスジェニックラット(TG)を作成し、LECラットとの比較検討について、SXFM解析を用いた。*ATP7bTG*においては、肝炎・肝がんなどの発症は32週までにおいても認められず、これまでの報告(Kasai et al, Editorial Review, Journal of Gastroenterology and Hepatology, 2007)と同様の結果を得ている。同様に*ATP7bTG*肝臓組織での銅蓄積の著し

い改善は認められなかった。SXFMによる元素局在を明らかにしたところ、LECでは細胞質および核内にdiffuseな蓄積が認められたのに対して、*ATP7bTG*では細胞膜直下でのaggregativeな局在がSXFMで初めて明らかになった。これらの結果は、銅の局在変動と肝炎・肝がんの病態との関連を明らかに示唆している(岡村、志村、松山)。

2) 蛋白質結合元素の電気泳動による可視化；H19年度は、SXFMによるイメージングで局在が明らかになった元素結合蛋白質の分離精製方法を確立した。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行うことで、生体機能や病理の多角的な情報を得ることが期待される。本年度は、既存の電気泳動法で蛋白質結合元素の可視化を試みた。生化学的手法では良く用いられる電気泳動法では、蛋白質の電気的な性質や大きさを分離するために簡便な方法である。等電点電気泳動法は、蛋白質をnativeな状態で泳動可能であることから、蛋白質に結合している元素の検出も可能と考え、SXFMでのイメージングを行い成功した(志村、松山)。

3) 血漿中23元素のICP-MS検査法；H19年度には、院内での臨床検体採得から超低温保存ルートを確認し、SXFM解析の院内での普及を図っている。予備的試験として、多発性骨髄腫では、亜鉛、銅、特にニッケルの細胞内局在が著しかったことから、血液癌細胞試料には、健康人試料には認められない元素変動があることが示唆される。本年度は、細胞外成分である血漿での元素変動について、血液癌と健康人試料を用いて、ICP-MSでの比較検討を試みた。東レリサーチセンターの無機分析部との共同研究で、500 μ Lの血漿から23元素のpptレベルでの解析が可能となった。健康人ボランティア50例、血液癌患者30例の測定を行い、統計学的な比較検討を行なったところ、有為に高い或いは低い元素含有が血液癌患者には認められた。(萩原、志村)。これらより、細胞内外の元素変動が、血液癌症例に認められ、また将来の元素によ

る病理診断の可能性を示唆している。

4) 次世代放射光源を用いた場合の当該手法の拡張性の検討-CXDM による染色体構造 3 次元解析-; 光の波がそろったコヒーレントな X 線を活用した新しいタイプの X 線顕微鏡 (X 線ナノ CT) を開発し、ヒト染色体の内部構造の可視化に成功している (前島、文献 1)。X 線ナノ CT は、次世代の放射光源 (XFEL) でも、実現可能な有用な方法として発展すると考える。次世代光源により得られる蛍光 X 線、回折や散乱で得られる情報は、本研究班で得られた情報のように、多角的に生体を理解する上で、大きな発展を導くと考える。

D. 考察

本年度の試料測定結果から、細胞内網羅的要素の測定は、細胞機構や病態を理解する上で有用と考える。生物試料の効率の良い測定やユーザーズフレンドリー化を今後完成することで、統計学的なデータに基づいた測定が簡便になり、より積極的な生物医学情報を発信できるシステムに発展したと考える。将来の SPring-8 における SXFM 専用ビームラインでの貢献が期待できる。

E. 結論

細胞内外の微量元素の分布や量を網羅的に調べることは、正常な生体や病態を理解するために有用な方法である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Nishino, Y., Takahashi, Y., Imamoto, N., Ishikawa, T., and Maeshima, K. Three-Dimensional Visualization of a Human Chromosome Using Coherent X-ray Diffraction Physical Review Letters (2009), 102, 18101-18104.
- 2 Matsuyama S., Shimura M. Mimura H., Fujii M., Yumoto H., Sano Y., Yabashi M., Nishino Y., Tamasaku K., Ishikawa T. and Yamauchi K., Trace element mapping of a single cell using a hard x-ray nanobeam

focused by a Kirkpatrick-Baez mirror system, X-ray Spectrometry 38, 89-94, 2009.

- 3 Eltsov, M., MacLellan, K.M., Maeshima, K., Frangakis, A.S., and Dubochet, J. (Three authors have equal contribution) Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2008) 105, 19732-7.
- 4 Maeshima, K., and Eltsov, M. Packaging the genome: the structure of mitotic chromosomes, Journal of Biochemistry (2008) 143, 145-153.
- 5 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).
- 6 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.
- 7 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.
- 8 Yamagishi Y, Sakuno T, Shimura M and Watanabe Y. Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* 455, 251-255, 2008.
- 9 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. 40, 1042-1045, 2008.
- 10 前島一博 「染色体の内部構造を見る」細胞工学別冊「電子顕微鏡で読み解く生命のなぞ (ナノワールドに迫るパワフル技術入門) (2008) 121-12

- 11 石坂幸人、志村まり、HIV-1感染に伴う非エイズ型悪性腫瘍の発症機序の解明、癌研急進行財団いぶきvol7, 2008.
- 12 前島一博、吉田圭介、白髭克彦「姉妹染色体間の接着因子、コヒーシンの新たな機能」蛋白質核酸酵素 (2008), 53, 1337-1344
- 13 前島一博、今本尚子「細胞周期における核膜孔のダイナミクス」生化学 (2008) 2月号, 118-124

2. 口頭発表

1. Fujii M., Matsuyama S., Wakioka T., Mimura H., Sano Y. and Yamauchi K., Development of Advanced Kirkpatrick Baez System for X-ray Nano-Imaging, First international symposium on Atomically Controlled Fabrication Technology, Osaka Japan, Feb. 2009.
2. Maeshima, K. How is genome DNA compacted into a mitotic chromosome? The 1275th Biological Symposium, National Institute of Genetics (Ikenken), Dec 24, 2008, Mishima
3. Maeshima, K. Mitotic chromosome structure: Irregular folding of nucleosome fibers. 日本分子生物学会・生化学会合同年会 (BMB2008) シンポジウム 転写シグナリングと複合体ダイナミクスの新展開、2008年12月11日、神戸
4. 志村まり、豊田祐介、他、HIV-1 Vpr による姉妹染色分体の早期分離異常第31回分子生物学会総会、2008年12月、神戸 2008
5. Maeshima, K. Mitotic chromosome structure: Irregular folding of nucleosome fibers. Symposium, "molecular regulation of Chromosome assembly and Segregation", The 3rd Asian Chromosome Colloquium, Dec 1-4, 2008, Osaka
6. 前島一博、「分裂期染色体の構造」大阪大学・蛋白質研究所セミナー「クロマチン構造とダイナミクス」、2008年10月30-31日、大阪
7. 前島一博、「分裂期染色体内のヒトゲノム DNA の高次構造」九州工業大学情報工学部生命情報工学科講演会、2008年8月5日、福岡県飯塚
8. 前島一博、「分裂期染色体の構造」日本細胞生物学会年会ミニシンポジウム「細胞機能の3次元ナノイメージング」、2008年6月29日、横浜
9. Matsuyama S., Shimura M., Mimura H., Fujii F., Yumoto H., Handa S., Kimura T., Sano Y., Yabashi M., Nishino Y., Tamasaku K., Ishikawa T. and Yamauchi K., Trace element mapping using hard X-ray nanobeam focused by a Kirkpatrick Baez mirror system, EXRS 2008, Dubrovnik Croatia, June 2008.
10. Yamauchi K. Synchrotron-radiation-based hard X-ray nanobeam by Kirkpatrick-Baez mirrors, EXRS 2008, Dubrovnik Croatia, June 2008.
11. Maeshima, K., Ito, K., Eltsov, M., Watanabe, A., Hihara, S., Dubochet, J., and Imamoto, N., Mitotic chromosome structure: irregular folding of nucleosome fiber. International Symposium on Chromosome Dynamics (2008), Ise, May 28-30

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. 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、高効率計測のための周辺機器開発の検討を実施し、高速な信号処理系の試作機を開発した。

A. 研究目的

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（SXFM）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。最近のSXFMを用いた細胞内元素分布観察の成功は、生物分野へのSXFMの広範な応用の可能性を示している。一方で生物分野への応用には、SXFMの手法にこれまでと異なる問題点があることが判明した。それはある意味で決定論的な物理・化学分野と異なり、生物試料の場合統計的にしか物事を判断出来ないという事に起因する。すなわち同様の測定を繰り返した上でなければ確証を得られないという点である。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となってきた。本研究では、第一にSXFM高速測定を、そしてより高度化された計測手法に発展させることを目的とする。

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、測定の効率化による統計精度の向上が必要不可欠であることが判明した。そこで試料準備から測定までの全課程での時間短縮について検討し、それぞれについて対策を講じた。

（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(1)試料を選別し準備を行うクリーンブースを建設して、測定前の作業の効率化を行った。また(2)測定そのものを律速していた MCA(multi-channel analyzer)を新規に開発した。その結果、0.25 μ sec のシェーピング時間が達成された。これは現在の設定に比べて2倍以上短く、少なくとも2倍以上の蛍光 X 線を処理できると期待される。これによって計数率の高い測定においても、数え落とすことなく高効率で計測が可能となった。新型の MCA は制御コンピューターとの通信速度が極めて高速であり、データ転送による測定時間の遅延を最小にすることが可能となった。さらに(3)試料から全方位に散乱される蛍光 X 線を効率よく収集するために、大面積の半導体検出器を用意した。大面積化により検出器と試料を離すことが可能になり、試料周りの空間的な制限が緩和された。これによって試料の取付が容易になると共に、多数の試料を測定チャンバー内に予め入れておくことが可能となり、試料交換による測定の中断を最小限にすることが出来た。

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、本研究による様々な装置改良によって高い効率と作業性を持った完成度の高いシステムとなった。これによって細胞内元素アレイ解析の生物学・医学分野への広範な応用への基盤が確立された。

F. 健康危険情報

分担研究報告書につき省略

G. 研究発表

無し。

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。

高速走査型蛍光X線顕微鏡の開発

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 松山智至 大阪大学大学院工学研究科 助教

走査型蛍光X線顕微鏡の医学利用を推し進めるために、顕微鏡システムの高速度化とユーザーフレンドリー化を目標として改造を行った。この結果、従来より最大で17倍高速化され、さらにユーザーフレンドリーなシステムとなることで与えられたマシンタイムを有効に利用することができるようになり、より多くの試料を短時間で観察することが可能となった。

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(SXFM)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、測定時間は数時間を要し、かつ、顕微鏡システムが複雑で測定を熟知した者しか操作できないという問題を抱えていた。測定時間が長くなる要因は、検出器と取得データを処理する過程に課題あるためである。また、システムが複雑な理由として、当初のシステム開発のコンセプトが開発者=観察者となっているため、操作性は全く配慮されていなかったからである。SPRING-8のような大型施設では、限られた時間内では多くの試料を観察するかは重要なポイントであり、そのためには測定の高速度化と効率化が必要不可欠である。

そこで本年度は、システムの高速度化と顕微鏡システムのユーザーフレンドリー化を図ることで、少ないマシンタイム内でより多くの試料を観察できる実用的なシステムの開発を目指した。

B. 研究方法

SXFMを高速化するために、システムの設計と再構築を行った。またユーザーフレンドリー化のために測定システムを再構築した。

C. 研究結果

SXFMを高速化するに当たり、まず現在の測定時間はどのような要因によって律速されているかを調べた。もっとも律速しているものは検出器であった。現在使用しているSDD(Silicon Drift Detector)は受光面積が 5mm^2 である。大面積の受光素子(面積: 50mm^2)を導入することで最大10倍の高速化が期待できる。また、例えば、 $60\text{pix.} \times 60\text{pix.}$ の領域を 1s/pix. で測定する場合、測定完了にはおよそ1.7時間を要している。これはSDDからのシグナル

をMCA(MultiChannel Analyzer)で解析し、PCに出力する際に 0.7s/pix. 余分に掛かっているためである。この処理に掛かる時間を短縮することで、1.7倍の速度向上が期待できる。このため本年度から新しい検出器(マルチチャンネルX線検出器: Vortex-EX)と高速MCAを導入した。新しく開発した高速MCAは2つのバッファメモリを備えているため、処理中にも別メモリにデータを蓄えられるため処理時間を実質0sにできる。性能テストをした結果、処理に掛かる時間がほとんど無視できるまで低減できた(0s)。これらによって最大17倍の高速化が達成できた(ただし、試料によってはMCAの計数限界のため性能が最大限発揮できない場合がある)。

計測システムの高速度化に加え、システムのユーザーフレンドリー化を行うことで、限られたマシンタイムを有効に活用できる。計測システムを再構築することで、試料を持ち込むユーザーがラボベースの顕微鏡を扱うように操作できるシステムの開発を行った。そのために、システムはユーザーが直観的に扱えるように最大減配慮した。新しいSXFMシステムでは、システムに備え付けられている試料位置観察用顕微鏡の画像を見ながら測定したい場所をプログラム上で示すだけでSXFM観察ができる。また、Off-Line顕微鏡(ラボベースの蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡など)のデータと比較できるように別画面にその観察データを表示でき、かつ、位置座標によって現在SXFMで測定している場所がそのデータのどこに相当するのか知ることがができる。さらに、システム全体の処理を2台のPCと3つのプログラムに分散することで、処理の高速度化と高信頼性を実現した。試料ユニットに各種センサーを配置し、モニターすることで高速化に伴う不安定性を排除した。

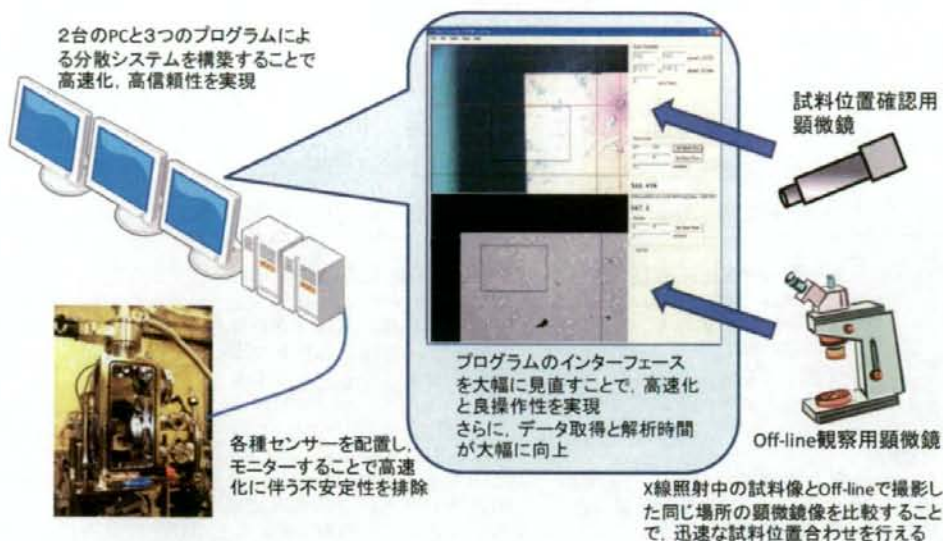


図1 ユーザーフレンドリーシステムの概要。可視顕微鏡とSXFMシステムをリンクさせることで、SXFMでの観察領域を直接的に確認できるようになった。このため、これまで一度大まかに測定領域の候補をスキャンし、細胞があるかどうかを確認していたが、そのような操作を省略することができるようになった。

D. 考察

新しいSDDとMCAの導入によって、大幅な高速化を図ることができた。また、ユーザーフレンドリー化によって試料の観察効率は大いに改善できた。これらの結果は、多くのデータを統計的に処理しなくてはならない臨床応用において、データ収集時の効率を飛躍的に改善できるものと思われる。

E. 結論

本研究開発によって、SXFM測定の高速度とユーザーフレンドリー化を実現した。高速化によって最大17倍の高速化が図れるシステムを構築した。またユーザーフレンドリーシステムによってユーザーが直観的に操作可能なシステムの構築を行った。

F. 健康危険情報 該当無し

G. 研究発表

論文発表

- ①. Matsuyama S., Shimura M. Mimura H., Fujii M., Yumoto H., Sano Y., Yabashi M., Nishino Y., Tamasaku K., Ishikawa T. and Yamauchi K., Trace element mapping of a single cell using a hard x-ray nanobeam focused by a Kirkpatrick-Baez mirror system, X-ray Spectrometry 38, 89-94, 2009.

- ②. 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. 40, 1042-1045, 2008.

学会発表

- ①. Matsuyama S., Shimura M., Mimura H., Fujii F., Yumoto H., Handa S., Kimura T., Sano Y., Yabashi M., Nishino Y., Tamasaku K., Ishikawa T. and Yamauchi K., Trace element mapping using hard X-ray nanobeam focused by a Kirkpatrick Baez mirror system, EXRS 2008, Dubrovnik Croatia, June 2008.
- ②. Yamauchi K., Synchrotron-radiation-based hard X-ray nanobeam by Kirkpatrick-Baez mirrors, EXRS 2008, Dubrovnik Croatia, June 2008.
- ③. Fujii M., Matsuyama S., Wakioka T., Mimura H., Sano Y. and Yamauchi K., Development of Advanced Kirkpatrick-Baez System for X-ray Nano-Imaging, First international symposium on Atomically Controlled Fabrication Technology, Osaka Japan, Feb. 2009.

蛋白質結合元素の電気泳動による可視化

分担研究者 志村まり 国立国際医療センター研究所
難治性疾患研究部難治性疾患研究室長

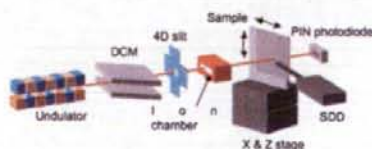
研究要旨：生化学的手法では頻用されている電気泳動法では、蛋白質の電気的な性質や大きさを分離するために簡便な方法である。等電点電気泳動は、蛋白質をnativeな状態で泳動可能であることから、泳動ゲル上で蛋白質に結合している元素の検出を、SXFMを用いて可能とした。蛋白質の定性法のひとつに元素含有状態を加えることで、多角的な蛋白質機能解析に発展すると考える。

A. 研究目的

最近の走査型蛍光X線顕微鏡(SXFM)を用いた細胞内元素分布観察の成功は、生物分野へのSXFMの広範な応用の可能性を示している。さらに昨年は、可視化した元素に結合する蛋白質の分離同定を、元素分析法と生化学的手法を駆使することで可能となった。これにより、単に細胞内元素分布を可視化するのみでなく、関連する蛋白質を同定することで、より生体での機能や役割が明らかになると考えている。生化学的手法で頻用されている電気泳動法は、蛋白質の電気的な性質や大きさを分離するために簡便な方法である。等電点電気泳動法は、蛋白質をnativeな状態で泳動可能であることから、本研究では等電点電気泳動での蛋白質含有元素の可視化を試みた。

B. 研究方法

1) 大型放射光施設SPring-8, BL29 第1ハッチに新規に走査型蛍光X線顕微鏡(SXFM)を下図のように作製・設置した。



2) 等電点電気泳動で使用する泳動bufferのキレート処置を行った。

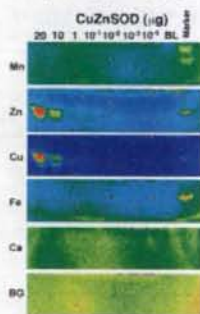
3) 市販の泳動ゲルの凍結乾燥を、マイナス80度0/N後、マイナス20度15Pa、2時間以

上の条件で行った(協力：関西保存科学工業株式会社)。

4) 乾燥ゲルは、プロレン膜および専用のアクリルプレートにマウントし、Energy: 15keV, 600 μ m/pix, Exposure Time: 6sec/pix, Scan Area: 64pix \times 64pix, Shift=1の条件で、SXFMで測定を行った。

(倫理面への配慮)

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

1) 既知の元素結合精製蛋白質の元素が蛋白質のバンド位置に確認された(左図)。

2) ゲル自体のバックグラウンドが高く、検出感度に影響してい

る。
3) ラット肝臓からHPLC-ICP-MSにより抽出されたCu含有画分でのCuのバンドが確認できた(右図、lane1, 2)。



D. 考察

等電点電気泳動法において、蛋白質結合元素の蛍光X線解析による可視化が可能となった。市販ゲルを用いても、

ラット肝臓組織に存在するCu結合蛋白質を可視化することができたことから、生物医学領域での応用が可能である。測定条件でいくつかの改善が行われた。既存の方法では、ゲルの固定・染色を行うことで、結合元素の蛋白質からの解離や元素の汚染が生じてしまう難しさが伴う。従って、ゲルの無固定無染色が望ましい。さらに、ゲル中に含まれる水分に対する散乱線はおおよそ7倍近くS/N比を悪化させていた。本研究では、無固定無染色ゲルの凍結乾燥を行って、これらを回避した。しかし、尚、泳動ゲルに含まれるバックグラウンドは高く、バックグラウンドより高いシグナル値を示す試算値（タンパク量）と、今回の実験結果は一致している。つまり、律速段階はゲルのバックグラウンドであることが示唆される。これまでレーザーアブレーションによる蛋白質結合元素の同様な試みがされてきたが、ゲルの染色後の色素（汚染）の検出が可能になった報告があるのみである。さらに検出感度は悪い。一見単純に見えるこの試みは、意外と困難であり、既存の泳動法での限界も見えてくる。さらに、検出感度を増大するためには、泳動システム全体の改良が必要である。今後の検出感度の増大に伴い、蛋白質の定性法のひとつに元素含有状態を加えることで、多角的な蛋白質機能解析に発展すると考える。

E. 結論

既存の等電点電気泳動法での蛋白質結合元素の可視化が可能となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- 1) Matsuyama S., Shimura M., Mimura H., Fujii M., Yumoto H., Sano Y., Yabashi M., Nishino Y., Tamasaku K., Ishikawa T. and Yamauchi K., Trace element mapping of a single cell using a hard x-ray nanobeam focused by a Kirkpatrick-Baez mirror system, *X-ray Spectrometry* 38, 89-94, 2009

- 2) Yamagishi Y., Sakuno T., Shimura M. and Watanabe Y. Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* 455, 251-255, 2008.
- 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.* 40, 1042-1045, 2008.
- 4) 石坂幸人, 志村まり・他、HIV-1感染に伴う非エイズ型悪性腫瘍の発症機序の解明、癌研急進行財団いぶきvol17, 2008.

学会発表

- 5) Matsuyama S., Shimura M., Mimura H., Fujii F., Yumoto H., Handa S., Kimura T., Sano Y., Yabashi M., Nishino Y., Tamasaku K., Ishikawa T. and Yamauchi K., Trace element mapping using hard X-ray nanobeam focused by a Kirkpatrick Baez mirror system, EXRS 2008, Dubrovnik Croatia, June 2008.
- 6) 志村まり, 豊田祐介, 他、HIV-1 Vprによる姉妹染色分体の早期分離異常第31回分子生物学会総会、神戸 2008

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。

細胞の中を3次元観察できる新タイプのX線顕微鏡を開発

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

細胞内のさまざまな構造を高解像度で調べるためには、標識や染色処理なしに、細胞の内部構造を丸ごと観察する必要がある。今回、光の波がそろったコヒーレントなX線を活用した新しいタイプのX線顕微鏡（X線ナノCT）を開発し、ヒト染色体の内部構造の可視化に成功した。

A. 研究目的

これまでの顕微鏡技術では、細胞や細胞小器官の内部構造を丸ごと観察することは非常に困難であった。電子を用いる透過電子顕微鏡では、厚さ1 μm を超える細胞や細胞小器官は厚すぎて観察できない。また、X線は透過性に優れ、厚い物体の内部観察に適しているが、細胞や細胞小器官は薄すぎて、X線がほとんどそのまま透過してしまい、内部構造を詳細に観察することは難しいとされてきた。

今回、分担者達はコヒーレントX線回折を利用した斬新なX線顕微鏡（X線ナノCT）を開発し、ヒト染色体の内部構造を3次元で観察することにした。

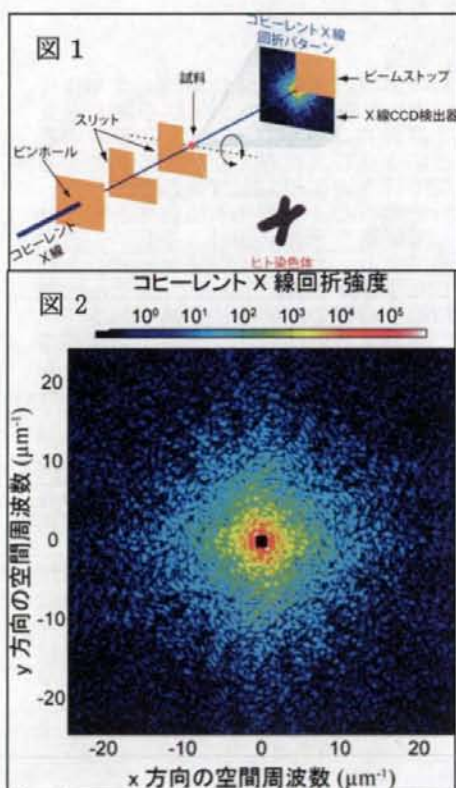
B. 研究方法

ターゲットとする細胞小器官として、ヒト分裂期染色体を選んだ。分裂期染色体をヒト分裂期細胞から単離精製し、適当な濃度に薄めて、SiNでできた厚さ50nmの基板の上に設置する（図1）。そして、コヒーレントX線を一個の分裂期染色体に照射し、回折パターンを得る。その回折パターンを計算機で処理することにより、染色体像の再構成をおこなう。この際、西野と石川らがこれまでに開発していた「反復的位相回復法（波の山や谷の位置を決定する方法）」を用いる。1つの入射角度で測定したコヒーレントX線回折パターンからは、試料の2次元の投影画像が得られる。このため、さまざまな入射角度で測定した多数のコヒーレントX線回折パターンを用いることにより、試料の3次元画像を得る。

（倫理面への配慮）
該当無し

C. 研究結果

ヒト染色体に対してコヒーレントX線を照射し、散乱強度を増強するための染色処理をすることなく、コヒーレントX



線回折パターンを高精度で測定することに成功した（図2）。この方法により、ヒト染色体試料の2次元投影像のみならず（図3）、3次元画像の再構成にも成功した（図4）。

D. 考察

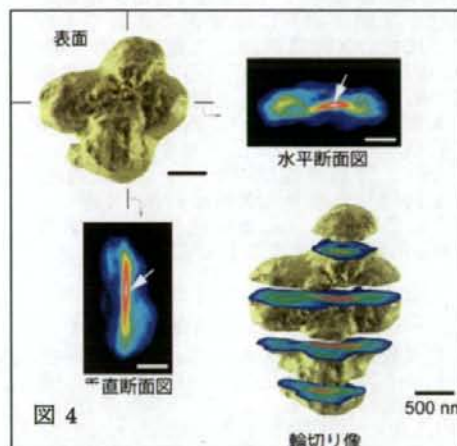
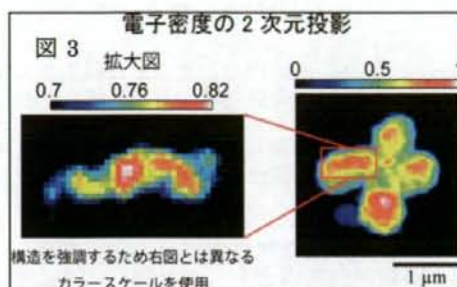
本研究によって得たヒト染色体像からは、興味深い内部構造が分かった。染色体は、2つの染色分体から構成されるが、染色分体どうしが接合するセントロメア

と呼ばれる領域でもっとも電子密度が高いことを見いだした(図4)。また、染色体の軸付近に電子密度の高い構造が広がっていることが分かった(図3、4)。このような軸状構造は、これまで、特定のタンパク質を標識し、蛍光顕微鏡や電子顕微鏡を用いて観察されてきたが、標識せずに観察したのは今回が初めてである。さらに、理研が現在、財団法人高輝度光科学研究センターと協力して開発・建設を進めている次世代X線源のX線自由電子レーザーを利用することにより、飛躍的な発展が期待できるだろう。これにより、創薬の鍵を握る膜タンパク質の構造解析など、医学上重要な応用への道も開かれると考えられる。

E. 結論

今回の実験成果は、波長が短くエネルギーの高いX線を用いて、細胞小器官を丸ごと高いコントラストで3次元観察することに成功した世界で初めての例である。病院で行う人体のX線CT撮影のように、試料を切ることなくヒト染色体を輪切りにして観察できた(図4)。そして、この研究により、コヒーレントX線回折を利用した手法が、X線にとって透明な細胞や細胞小器官の内部構造を高コントラストで観察するのに優れ、従来の顕微鏡では見ることができなかった構造を明らかにすることを実験的に示された。コヒーレントX線回折による丸ごと観察で3次元可視化した情報は、電子密度マップである。これは、生物体を構成するタンパク質の原子レベルの構造決定に用いられるX線結晶構造解析で得られる情報とまったく同じである。このため、将来的に、コヒーレントX線回折とX線結晶構造解析で得られる情報を継ぎ目なくつなぎ合わせることができると、細胞を原子レベルから理解が可能となる。本計画の装置はX線ナノCTと呼べるものである。いかなる疾病も細胞レベルの変化によってもたらされることを考えると、このX線ナノCTが様々な疾病の原因究明に役立つだろう。

F. 健康危険情報 該当無し



G. 研究発表

1. 論文発表

Nishino, Y., Takahashi, Y., Imamoto, N., Ishikawa, T., and Maeshima, K.
Three-Dimensional Visualization of a Human Chromosome Using Coherent X-ray Diffraction
Physical Review Letters (2009), 102, 18101 (4 pages)

Eltsov, M., MacLellan, K.M., Maeshima, K., Frangakis, A.S., and Dubochet, J.
(Three authors have equal contribution)
Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. Proc. Natl. Acad.

Sci. USA (2008) 105, 19732-7.

Maeshima, K., and Eltsov, M.
Packaging the genome: the structure of mitotic chromosomes. *Journal of Biochemistry* (2008) 143, 145-153.

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 μ m 3 region for cell surgery. *Applied Physics Letters* (2008), 92, 23509 (3 pages).

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.

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.

前島一博 「染色体の内部構造を見る」細胞工学別冊「電子顕微鏡で読み解く生命のなぞ(ナノワールドに迫る) パワフル技術入門」(2008) 121-129

前島一博、吉田圭介、白髭克彦「姉妹染色体間の接着因子、コヒーシンの新たな機能」蛋白質核酸酵素(2008), 53, 1337-1344

前島一博、今本尚子「細胞周期における核膜孔のダイナミクス」生化学(2008) 2月号, 118-124

2. 口頭発表

Maeshima, K. How is genome DNA compacted into a mitotic chromosome? The 1275th Biological Symposium, National Institute of Genetics (Idenken), Dec 24, 2008, Mishima

Maeshima, K. mitotic chromosome structure: Irregular folding of nucleosome fibers. 日本分子生物学会・生化学会合同年会 (BMB2008) シンポジウム 転写シグナリングと複合体ダイナミクスの新展開、2008年12月11日、神戸

Maeshima, K. mitotic chromosome structure: Irregular folding of nucleosome fibers. Symposium, "molecular regulation of Chromosome assembly and Segregation", The 3rd Asian Chromosome Colloquium, Dec 1-4, 2008, Osaka

前島一博、「分裂期染色体の構造」大阪大学・蛋白質研究所セミナー「クロマチン構造とダイナミクス」、2008年10月30-31日、大阪

前島一博、「分裂期染色体内のヒトゲノム DNA の高次構造」九州工業大学情報工学部生命情報工学科講演会、2008年8月5日、福岡県飯塚

前島一博、「分裂期染色体の構造」日本細胞生物学会年会ミニシンポジウム「細胞機能の3次元ナノイメージング」、2008年6月29日、横浜

Maeshima, K., Ito, K., Eltsov, M., Watanabe, A., Hihara, S., Dubochet, J., and Imamoto, N., Mitotic chromosome structure: irregular folding of nucleosome fiber. *International Symposium on Chromosome Dynamics* (2008), Ise, May 28-30

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

疾患モデル動物組織における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

これまで様々な疾病の発症と元素代謝異常との関連性が示唆されている。しかし、どのように元素が細胞障害を誘導しているかについては必ずしも明らかになっていない。そこで、代表的な銅代謝異常モデルであるLECラットを用いて、生体組織切片上での微量元素検出系を確立する。元素の細胞内局在を詳細に解析することで標的細胞内小器官を同定し、難病発症における元素の役割を明らかにすることを目的とする。

A. 研究目的

ヒトの体は全て元素で構成され、それらの元素は大きく多量元素と微量元素に分けられる。多量元素は、体を構築する主要元素（全重量の96-97%）と生体内で浸透圧や膜電位の維持に関与している準主要元素（3-4%）がある。一方、含有量が鉄より少ない元素は微量元素（全重量の0.02%）と呼ばれ、生体内では酵素や生理活性物質の活性中心として働いていると考えられている。近年、糖尿病、動脈硬化、心筋梗塞、高血圧などの生活習慣病と微量元素欠乏との関連が指摘されており、これらの疾患については多くの有用なモデル動物が利用可能である。

本研究では、銅代謝異常として知られている Long-Evans Cinnamon(LEC)ラットおよび LEC Tg ラットを用いて、細胞内元素の局在を明らかにし、SXFМ解析が他の疾患にも応用可能かどうかを検証することを目的とする。

B. 研究方法

動物は、F344、LECラット（日本チャール

リバー）およびサイトメガロウイルスエンハンサー/ニワトリBアクチンプロモーター制御下にヒトATP7Bを発現するトランスジェニックラット(LEC Tgラット)を使用した。LEC Tgラットは、LECラットに戻し交配しているため、内在性Atp7b遺伝子を欠損している。LEC Tgラットは、ナショナルバイオリソース「ラット」から提供された。

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3μm）後、1cm x 1cmプロレンフィルムに上層した。

組織切片を用いたSXFМ解析により、細胞内の元素マッピングを行った。元素マッピング像から、細胞内の元素を網羅的に定量化し、細胞内局在を明らかにした。

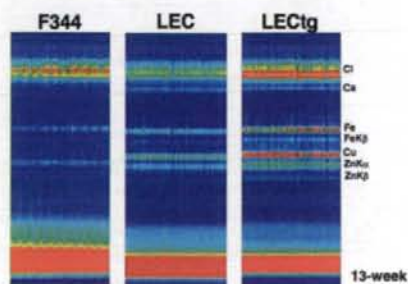
（倫理面への配慮）

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

既存のSXFMSシステムの改良により、標的領域観察における時間効率性が大幅に向上し、培養細胞ではオルガネラにおける細胞内元素分布の解析も可能であることが、志村らにより示されている。そこで、組織切片においても同様の解析を行った結果、LECラットおよびLEC Tgラット共に、肝臓において銅、鉄および亜鉛の蓄積が観察された（下図）。さらに細胞内における元素の局在を詳細に調べたところ、LECラットでは銅が核に局在するのに対し、LEC Tgラットでは、核にはほとんど存在せず、細胞膜直下に局在していた。

ATP7B tgのエレメントアレイ解析



D. 考察

代表的な元素代謝異常として知られているLECラットは肝炎・肝癌を自然発症するモデル動物として発見され、肝炎の原因は肝臓における銅の異常蓄積が原因であることが報告されている (Li, Y., et al, J. Clin. Invest., 1991)。LECラットはヒトの遺伝病であるWilson病のモデル動物であり、その原因遺伝子は銅のトランスポーターをコードするATP7Bである (Wu, J. et al., Nat. Genet., 1994)。

ヒトATP7B遺伝子を発現しているLEC Tgラットでは、急性肝炎、肝細胞癌発症頻度および生存率がLECラットの比で著しく改善された (Meng, Y. et al, BBA, 2004)。しかしながら、Atp7b欠損ラットとLEC Tgラットでは、肝臓における銅の含有量には、有意な差がなかった。SXFMS解析においても、LECラットおよびLEC Tgラット共に、肝臓において銅の蓄積が観察された。そのため、元素の細胞内局在を詳細に調べた結果、LECラットでは銅が核に局在するのに対し、LEC Tgラットでは、核にはほとんど存在せず、細胞膜直下に局在していた。ATP7Bは肝臓に発現し、肝細胞内の銅をトランスゴルジネットワークを介して胆汁へ排出する機能を有しており、肝細胞内の銅の局在の変化が、LEC Tgラットにおける臨床症状の回復を引き起こした可能性が高い。

一方、LEC Tgラット肝臓では、鉄の量が3分の1程度に減少しており (Meng, Y. et al, BBA, 2004)、肝臓の鉄含有量を減らすことで、LECラットの急性肝炎および肝細胞癌の発症を抑えることが報告されている (Kato, J.

et al, J. Clin. Invest, 2006)。

従って、LECラットの病態を説明するためには、銅、鉄および亜鉛を含めた元素を、含有量だけでなくその局在についても網羅的に解析し、判断することが必要である。

E. 結論

従来の原子吸光分析装置では、組織全体の元素の量を定量化するのみで、細胞内の局在を解析することができなかった。本研究により、動物の組織切片においても、SXFМによる網羅的元素解析が可能であり、細胞内の局在も検出できることが示された。疾患の発症メカニズムを理解する上で、細胞内の局在は非常に重要な情報であり、今後は、神経変性疾患であるアルツハイマー氏病や筋萎縮性側索硬化症など、難病として知られているモデル動物の解析も進めていく予定である。SXFМは新しい切り口で疾患の原因究明・診断および治療法開発をするための基盤研究に役立つ技術であり、さらに医学分野での応用範囲が広がることが予想される。

F. 健康危険情報 該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Konno, R., Okamura, T., Kasai, N., Summer, K.H., and Niwa, A. Mutant rat strain lacking D: -amino-acid oxidase. *Amino acids*. in press.

2. Kawai, J., Ohara-Imaizumi, M., Nakamichi, Y., Okamura, T., Akimoto, Y., Matsushima, S., Aoyagi, K., Kawakami, H., Watanabe, T., Watada, H., Kawamori, R. and Nagamatsu, S.: Insulin exocytosis in Goto-Kakizaki rat beta-cells subjected to long-term glinide or sulfonylurea treatment. *Biochem. J.*, 412, 93-101(2008).

学会発表

清水有紀子、矢延理絵子、岡村匡史、笠井憲雪：非肥満型糖尿病モデルLEA/Sendaiラットにおける耐糖能異常関連遺伝子座のQTL解析、第55回日本実験動物学会総会、仙台、2008年5月

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開発推進研究事業
「細胞内元素アレイ解析の臨床応用に向けた基礎研究班」

分担研究報告書

誘導結合プラズマ質量分析装置を用いた血液疾患患者検体における
微量元素分析に関する研究

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・末梢血液と血液疾患患者骨髄・末梢血液の比較において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中における血漿の微量元素について誘導結合プラズマ質量分析装置を用いて分析する。

B. 研究方法

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など）患者の末梢血患者末梢血を採取（どちらか一方でも可）。また、正常コントロールとして健康成人ボランティアを募り末梢血を採取する。

研究の方法：

末梢血は、クエン酸入り採血管で採取し、血漿を遠心分離後に凍結保存する。
血漿および骨髄単核球は当センターで滅菌処理したのちに株式会社東レリサーチセン

ターへ搬送され、誘導結合プラズマ質量分析装置を用いて、血漿の微量元素を解析する。

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：東レリサーチセンター

（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

急性骨髄性白血病15例、急性リンパ性白血病7例、悪性リンパ腫7例、多発性骨髄腫6例、慢性骨髄性白血病1例の血液細胞を採取。合計36検体を採取保存している。保存した検体のうち、28例について元素解析を実施した。また、健康成人52例についても同様に解析を行った。

血液疾患患者群と健康成人との比較では、Cd, Pb, Cr, Mn, Fe, Cu, Sbなどにおいて有意な差異が認められた。

D. 考察

カドミウム、鉛、クロム、マンガニ鉄、銅などは細胞毒性、遺伝子毒性が知られており、発がんメカニズムの一部を担っている可能性がある。今回検討した血液悪性疾患患者血漿においてこれら金属が有意に高値を示しており、血液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より精度の高い検証が必要である。

E. 結論

血液疾患患者における元素解析を行うため、患者臨床検体および健康人ボランティアからの検体採取を行い、解析を試みた。血液疾患患者では数種の金属が有意に高値を示しており、今後さらなる検討が必要である。幅広い年齢層の検体を解析することで統計的精度を向上させる必要がある。

F. 健康危険情報 該当無し

G. 研究発表

論文発表

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