

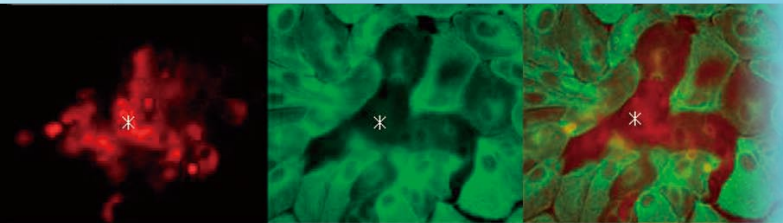
Radiological Sciences

# 放射線科学

2007.05

Vol.50

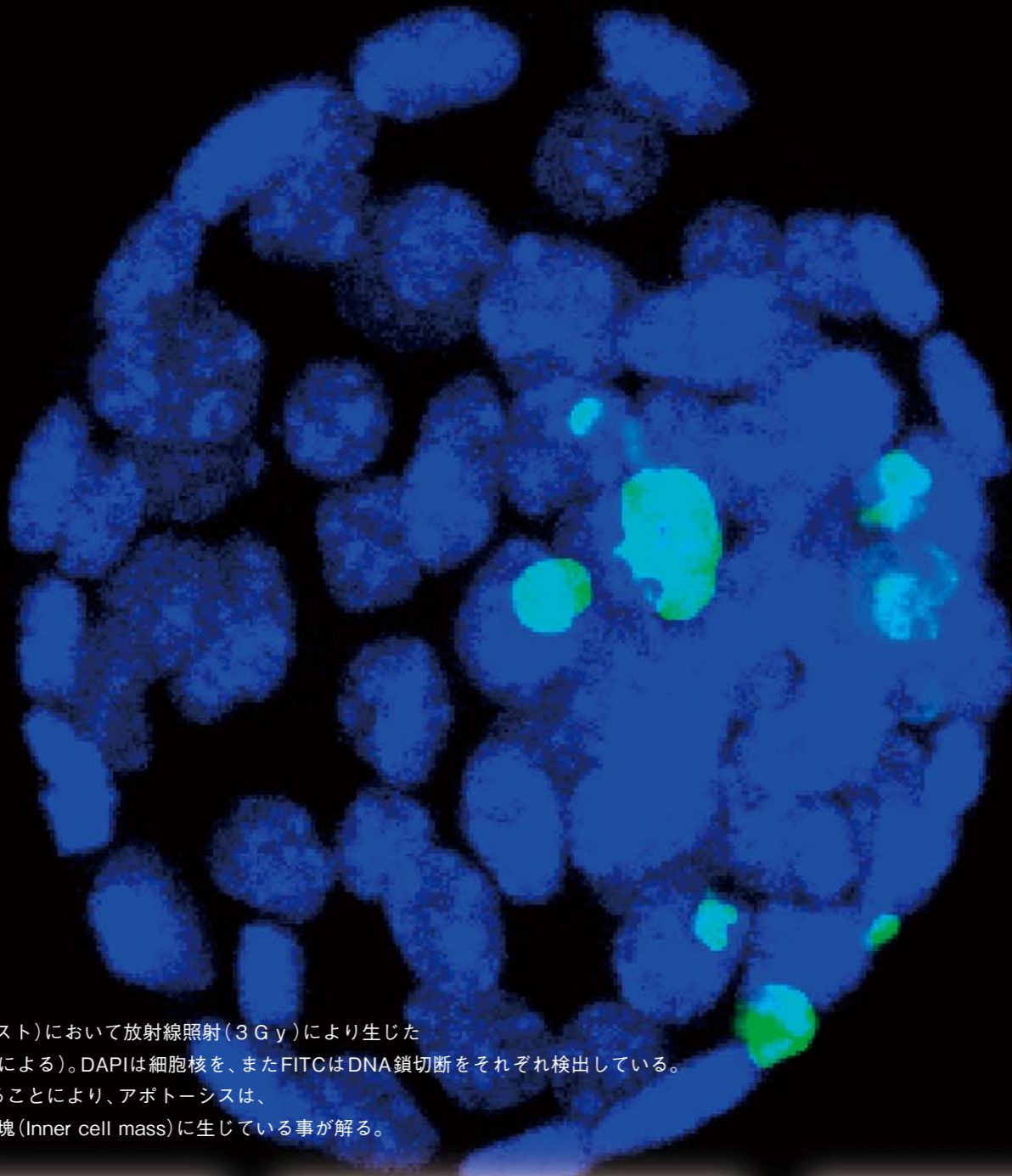
第50卷 第5号



特集

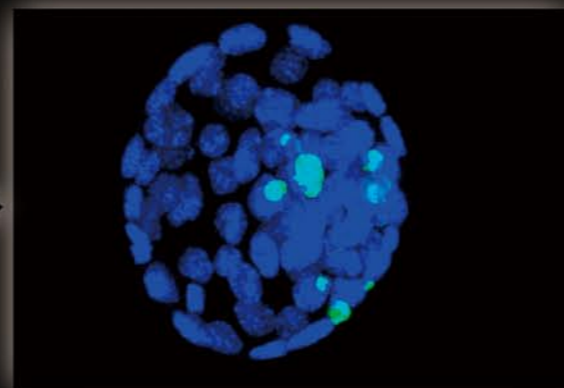
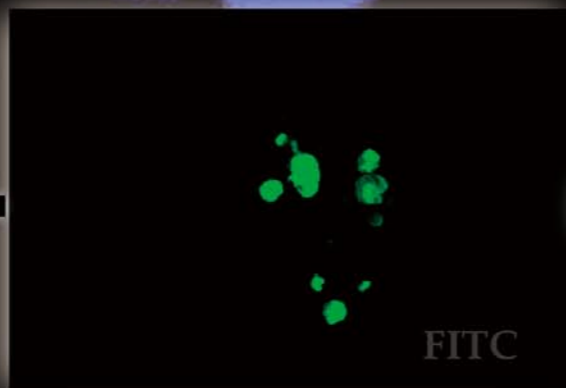
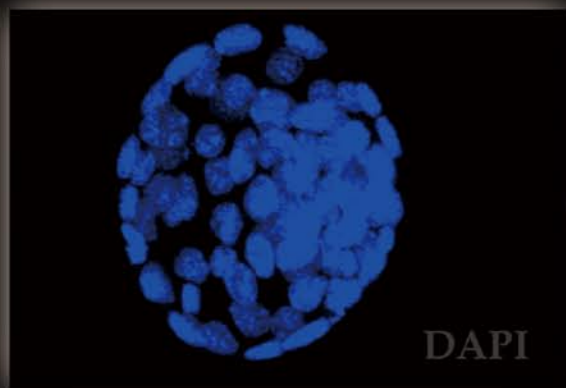
## 「幹細胞」

ISSN 0441-2540



写真説明

初期胚(胚盤胞:プラストシスト)において放射線照射(3 Gy)により生じたアポトーシス(TUNEL法による)。DAPIは細胞核を、またFITCはDNA鎖切断をそれぞれ検出している。二つのデータを重ね合わせることで、アポトーシスは、ES細胞の存在する内部細胞塊(Inner cell mass)に生じている事が解る。



Contents

04 特集「幹細胞」

- 04 1. 放射線影響研究のブレークスルー:幹細胞研究  
／放射線医学総合研究所理事 高橋 千太郎
- 07 2. ヒト肝前駆細胞の分離および培養  
／株式会社フェニックスバイオ 山崎 ちひろ・立野 知世
- 12 3. 幹細胞機能の分子メカニズムへのアプローチ法:HiCEP  
／先端遺伝子発現研究グループ 安倍 真澄
- 16 4. ヒト細胞における効率的遺伝子破壊をめざして  
／生体影響機構研究グループ 森 雅彦

22 最近の成果  
「放医研で繁殖している  
SPF近交系マウスの解剖学的特性」  
研究基盤技術部 上野 渉

36 印象記  
「米国・放射線医学物理センター訪問と  
放射線治療品質管理および  
先進技術への挑戦シンポジウム参加報告」  
重粒子医科学センター 水野 秀之

38 随想  
市川 龍資

39 編集後記

# 特集 「幹細胞」

## 1. 放射線影響研究のブレークスルー：幹細胞研究

放射線医学総合研究所理事  
高橋 千太郎

### 1. はじめに

1975年、私は生まれて初めて学会発表なるものを経験し、その時の演題は「ラット初期胚の試験管壁着床に及ぼすCaイオンの影響」であった。指導教官の西川義正教授（日本での精子凍結研究の先駆者、後の帯広畜産大学長）や入谷明助教授（現近畿大学理事、卵子凍結や生殖工学の大家、マンモス復活計画やほうれん草豚“オリーブ”でも有名）から、結果のまとめ方や写真がよく出来ていると褒めていただいたのが、現在まで研究者としてやってくることができた原動力の一つとなっている。

その当時、ゲッ菌類の初期胚を適当な培養液中で維持すると卵子はそれを取り巻いている透明体から脱離し、あたかも子宮壁に着床した状態で培養皿に付着することが見出されていた。私の学会発表は、培養液中のCaイオンがこのような現象に関わっていることを示したプリミティブなものであったが、着床した細胞群を損傷しないように固定染色し、きれいな写真を撮るために何日か徹夜したことが思い出深い（巻頭カラー図1-1）。

その後、私はこの着床胚の栄養膜細胞に興味を覚え、胎盤の発生や機能について研究を続けることになる。残念なことに、私は栄養膜細胞に付着していた十数個の小細胞のかたまり（内部細胞塊）の方には注意を払わなかった。エヴァンスらが内部細胞塊の継代培養に成功し、初めてES細胞を確立したのは、それから6年後の1981年である。

### 2. 幹細胞というもの

動物個体の細胞は、もともと1つの受精卵から発生し分化成長したものである。受精卵は卵割を繰り返し、マウスの場合は3～4日で胚盤胞になる。胚盤胞は外側を取り巻く栄養外胚葉と内部細胞塊から構成されている（巻頭カラー図1-1a）。栄養外胚葉は栄養膜細胞とも

呼ばれ、着床後は子宮壁に付着・浸潤して、胎盤や胎膜などに分化する大型の細胞である。一方、内部細胞塊はさまざまな細胞へと分化する多能性を有した細胞群で、内、外、中胚葉となり、個体のすべての細胞へ発生分化していく。胚性幹細胞（embryonic stem cell, ES cell）は、内部細胞塊を試験管内で培養し、分化多能性を保持したまま継代培養を可能にしたものであり、上述のように1981年に英国のエヴァンス、カウフマンがマウス胚から初めて樹立に成功した。

このような胚性幹細胞（ES細胞）に対して、胎児や成体の組織にも、ある程度の分化能をもつ細胞があり、組織幹細胞（あるいは体性幹細胞）と呼ばれている。組織幹細胞としては、造血系や皮膚の幹細胞が古くから知られていて、その増殖分化のメカニズムが研究されてきた。最近ではさまざまな組織で多様な分化能を持つ組織幹細胞が存在していることが分かり、活発な研究が行わ

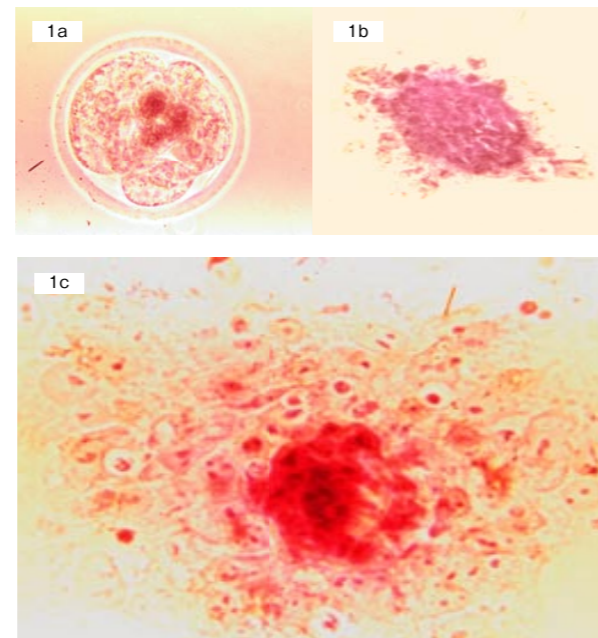


図1-1：ラットの胚盤胞と試験管壁への着床。1a透明体の中に比較的大きな栄養膜細胞と、内部細胞塊、胚盤胞腔が見える。1b培養容器壁に付着した初期胚。栄養膜細胞がガラス壁に付着し、子宮壁への着床に近似した状態が見られる。1c培養後、2、3日を経ると栄養膜細胞は培養容器に付着進展し増殖する。中央に内部細胞塊が認められる。

れている。組織幹細胞はさらに分化すると、単一の細胞群を作る増殖性の細胞となり、これらは一般に前駆細胞と呼ばれている。

### 3. 放射線影響研究と幹細胞

放射線による人体の急性障害の重要なものは造血器障害と消化管障害である。比較的高い線量の放射線に被ばくした後の線量と生存日数を模式的に表すと図1-2のようになる。マウスなどでは一般に5～10Gy程度までは造血機能の障害による死亡（いわゆる骨髄死）が顕著であり生存日数は線量に依存する。一方、そのような線量域を超えると線量の多寡に関わらず3～5日程度で死亡する現象が見られ、主たる死因は小腸上皮の損傷である（いわゆる腸死）。これらのことから、造血幹細胞と腸の上皮幹細胞は放射線影響研究の重要なターゲットであっ

た。造血細胞がその分化に伴って形態や染色特性を変化させることは、研究を進める上で好都合であった。また、腸上皮細胞では分化に伴ってその細胞の位置が変化するため、放射線による障害のターゲットが比較的未分化な幹細胞であることの証明として古くから研究の対象とされてきた。最近では、サイトカイン、特異的転写因子、Notchシグナルなどを中心に、これらの組織での分化と増殖の分子機構が次々と明らかにされてきている。

放射線による不妊もよく知られた急性の放射線障害である。男性生殖器の放射線障害は精子の分化・発生を反映する。すなわち、精子自体は比較的放射線感受性が低く、これに対して幹細胞もしくは前駆細胞である精祖細胞や精母細胞は放射線感受性が高いので、放射線被ばく後、直ちに精子数は減少せず、ある時間を経て精子減少症が発症するのである。また、低線量被ばくにおいて問題となる遺伝的影響は、雄親の生殖腺被ばくによる子供

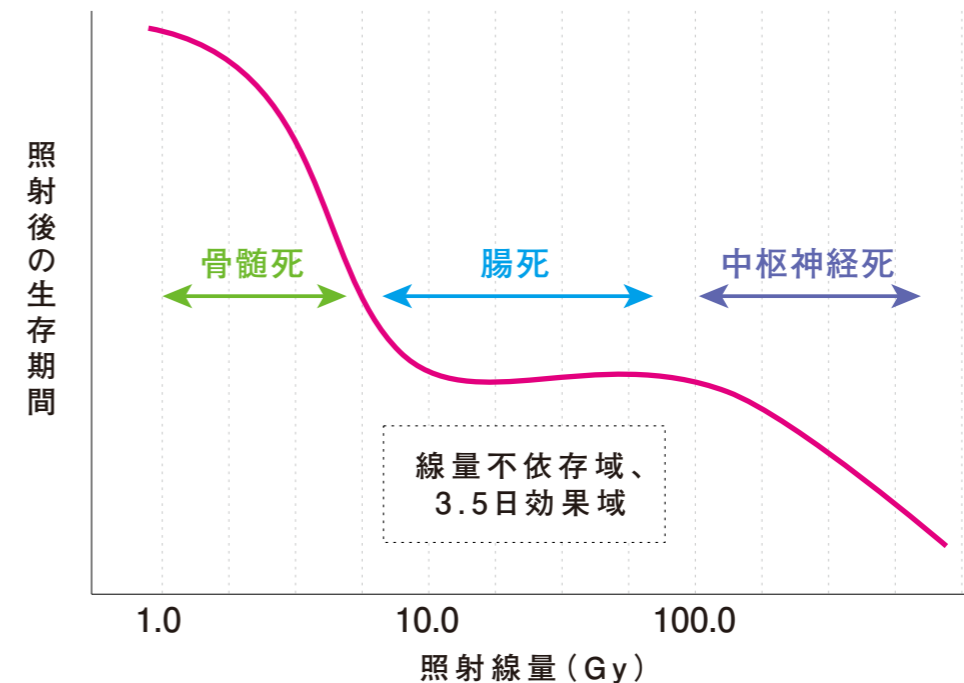


図1-2：実験動物の放射線全身照射後における生存期間と照射線量を模式的に表したもの。数Gyを越えると線量にかかわらず、一定時間後に動物が死亡する現象が認められる。死因は小腸の機能障害であり、腸死と俗称される。

での突然変異の誘発で実証されているが、この場合も、被ばく後ある一定の時期に交配した子供で突然変異の誘発率が高くなる。このように、不妊や遺伝的影響は、発生分化の時期にもなって細胞の放射線感受性が変化することの例としてよく取り上げられてきた。

高線量被ばく時の急性障害と並んで、中・低線量被ばくによる晩発影響、特に発がん影響も深く幹細胞と関わっている。放射線腫瘍の発生が長期の潜伏期をもつことから、標的となる細胞が幹細胞、あるいはそれに近い未分化で増殖能の高い細胞であろうと推察されてきた。十分に分化した組織細胞であれば、仮にがん化を誘導するような遺伝子突然変異が細胞に生じたとしても寿命とともにそれらの変異細胞は脱落してしまい発がんには至らないであろう。最近では、発がんが多段階の遺伝子突然変異の蓄積であるとする多段階発がん説が有力であり、放射線発がんの標的となる細胞が自己複製能を有する幹細胞、もしくはやや分化した前駆細胞であるとする考え方と整合している。また、持続する炎症とそれに伴う組織再生が幹細胞の異常な活性化をもたらし、がんを誘発している事例（例えば慢性肝炎と肝臓がん）も、幹細胞や前駆細胞が発がんの標的細胞であるという考え方と合致している。

発がん幹細胞を考えると最近の話題はがん幹細胞 (cancer stem cells) という新しい概念であろう。ある数、例えば 100 万個のがん細胞をヌードマウスに移植してもすべての細胞が腫瘍を形成するわけではない。もし、植えたがん細胞が均一な細胞集団であるとする、なぜ、このような選択が生じるのか？この現象は、移植したがん細胞がヌードマウスで腫瘍を形成するには付加的な突然変異による性質の変化や、発がんに適した環境が必要なためと説明されてきた。一方、移植した細胞が均一な集団でなく、幹細胞から前駆細胞、分化した細胞を含む階層性のある集団であったと説明することも可能である。最近の分子生物学的な技術の発展にもない、

固形癌の集団が細胞表面分子や遺伝子発現などの点で不均一であり、階層性をもっていると考えるのが妥当な知見が集積されてきており、がん幹細胞に興味が高まっている。

#### 4. 線量評価と幹細胞

幹細胞は線量評価、特に、内部被ばくにおける線量の推定と影響評価に重要である。放射性物質の体内摂取にともなう内部被ばくにおいて、放射線影響、特に発がんを考慮した場合、その標的となる細胞は幹細胞もしくは前駆細胞である。吸入内部被ばくを例にとると、気管支部位に沈着した放射性粒子は粘液繊毛運動により大部分は向上性に排除され、一部は気管壁に取り込まれるが、その過程においてどの程度の線量を標的細胞に付与するかを推定しなければならない。図 1-3 は国際放射線防護委員会 (ICRP) の呼吸器モデルを元に、気管支部位へ沈着した吸入放射性粒子の様態を模式的に示したものである。ICRP では発がんのリスクにつながる標的細胞として気管・気管支部位では基底細胞を線量評価の対象としている。しかしながら、基底細胞と総称される細胞群

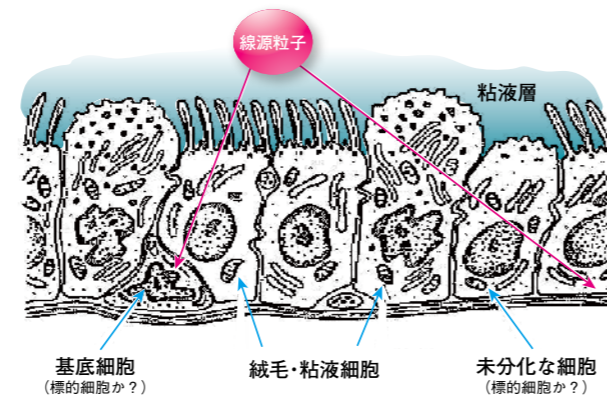


図1-3: 上部気道における上皮細胞、粘液、吸入放射性粒子の関係を模式的に表したもの。国際放射線防護委員会 (ICRP) の呼吸器モデルでは、発がんに関与しているのは基底細胞であるとされている。各細胞の分化の程度を定量的に推定でき、発がんへの関与の程度を知ることができるようになれば、微細線量評価の精度の向上とリスク評価への反映が期待できよう。

の明確な同定、すなわち放射線発がんの標的細胞となりうる組織幹細胞の同定はこれまで困難であった。今後、細胞表面分子マーカー等を用いてがん化に関与している幹細胞の同定を的確に行えるようになれば、より精度の高い微細線量評価が可能となるであろう。

#### 5. 幹細胞研究と放射線影響研究の今後

胎児のある時期に放射線を受けると大脳の形成が異常となり、知能の発達障害が誘発される。このような影響は広島・長崎の胎児被爆者にも見られ、一般に閾値を持つ確定的影響と考えられている。我々のグループはゲッ菌類のモデルを用いて、放射線による大脳の形成阻害が分化発達中の神経細胞を支持し、神経ネットワークを形成するガイド役を果たしているラジアルグリア細胞の発生異常によることを報告した。すなわち、胎児期の放射線による大脳形成異常は、神経細胞への直接的な影響というよりは、神経細胞の支持細胞であるラジアルグリア細胞への影響を介した間接的なものであると理解した。しかし、最近になって神経幹細胞に関わる研究が急速に進展し、ラジアルグリア細胞は細胞表面にグリアと同様の因子を発現しているためグリア細胞の一種とされてきたが、神経幹細胞そのものであることが明らかとなってきた。放射線による胎児の脳への影響は、グリア細胞を介した間接影響ではなく、実は神経幹細胞の一種であるラジアルグリア細胞への直接的な影響であったのである。この一例からもわかるように、幹細胞研究は、従来の放射線の生物影響に関わる研究の多くの分野で新しい知見をもたらすものと思われる。

現在の幹細胞研究は再生医療の基礎として注目され、医療への応用という旗印を原動力にしている。すでに述べてきたように、放射線障害の多くが幹細胞と関連しており、放射線という物理的な要因による幹細胞の損傷であるから、緊急被ばく医療において幹細胞の移植や組織

移植といった再生医療が重要な役割を果たしていくことは明らかである。

さらに幹細胞研究の成果を放射線のがん治療に積極的に取り入れる戦略を提案したい。固形がんの放射線治療において治療線量を制限している要因は、正常組織の障害である。肺がんの治療でも、脳腫瘍の治療でも、腫瘍での線量を高くすれば腫瘍の制御率は高くなるが、周辺の正常組織が受ける線量も高くなり、組織障害 (有害事象) の発生が懸念される。しかしながら、正常組織に組織障害が誘発されるのは治療から一定の時間の経過後である。したがって、治療後に正常組織の障害を防止するか、あるいは、その組織の障害を再生医療のような方法で補完できれば、従来より高い線量でがんの治療が出来ることとなる。このような考え方は、目新しいものではなく現実に、白血病の治療のための骨髄移植として確立されている。すなわち、白血病の骨髄移植は、薬剤や放射線で正常な骨髄細胞もがん細胞もまとめて殺傷してしまい、その後、正常な骨髄を移植することにより (再生医療)、患者を助けるのである。幹細胞に関わる研究が進めば、固形がんの治療においても、正常組織の幹細胞の保護や、あるいは再生を活用した新たな治療プロトコルが確立されることが期待できる。

放射線影響研究と幹細胞研究は従来から非常に関連が深かった。放射線は他の化学物質や薬剤と異なり、代謝や動態を考慮しないで直接的に幹細胞に損傷を与えることができる特徴を有している。今後も両者が呼応して研究が進展することを期待したい。また、そのような基礎研究から、新たな放射線障害の治療法や、高度ながんの放射線治療法が生まれてくることを期待したい。

## 2. ヒト肝前駆細胞の分離および培養

株式会社フェニックスバイオ  
山崎 ちひろ・立野 知世

### 1. はじめに

肝臓は、様々な物質の代謝、排泄、解毒など生命の維持に必要な多くの機能を持つ臓器で、人体における「化学工場」と例えられる。また、予備能力が大きく、全体の80%が障害を受けて初めて機能不全となることから、「沈黙の臓器」とも呼ばれている。さらに、肝臓は優れた再生能力を持ち、正常な肝臓であれば成人であっても70%を切除しても残存している肝細胞が増殖し元の大きさまで回復できる。生体内では優れた再生能力を持つものの、肝臓から分離した肝細胞を培養皿内 (in vitro) で増やすことはこれまで困難とされてきた。

私達は、これまでにラット肝臓から分離した肝細胞を牛胎児血清 (FBS)、インシュリン、プロリン、活性持続型ビタミン C (Asc-2P)、ニコチンアミド、EGF を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 培地 (HCGM 培地) で非実質細胞やマウス胎児由来間葉系細胞である Swiss 3T3 細胞と混合培養することにより、肝細胞が in vitro で増殖することを示した<sup>1), 2)</sup>。さらに、この培養系において、高い増殖能を持つ肝細胞集団の存在を見出した<sup>3), 4)</sup>。肝細胞は、その大きさやタンパク質発現に不均一性が見られることが知られているが、このような高い増殖能を持つ肝細胞は、細胞直径が小さいため 50G、1 分の低速遠心分離の上清画分に多く含まれる。この画分は通常非実質細胞画分と呼ばれ、小型の肝細胞以外に多くの肝非実質細胞 (類洞内皮細胞、クッパー細胞、星細胞など) を含む。この上清画分からエルトリエーターや FACS (fluorescence-activated cell sorter) を用いて、小型の肝細胞 (R3 細胞) のみを分離した。R3 細胞は、平均直径が約 17  $\mu\text{m}$  と大部分の肝細胞 (R2 細胞, 平均直径約 23  $\mu\text{m}$ ) に比べて小型であり、自家蛍光と細胞内顆粒密度が低かった<sup>4)</sup>。私達は、R3 細胞と R2 細胞を HCGM 培地を用いて肝非実質細胞と混合培養すると、R3 細胞が R2 細胞に比べて約 4 倍高い増殖能を示すこ

とを明らかにした<sup>4)</sup>。次に、R3 細胞と R2 細胞を肝障害を与えたラット肝臓に移植したところ、移植した細胞は障害肝に生着しコロニーを形成しながら増殖した。移植後 3 週目のコロニーの大きさを比較することにより、R3 細胞の方が R2 細胞に比べて in vivo において 3-4 倍高い増殖能を持つことを示した<sup>5)</sup>。さらに、この R3 細胞と R2 細胞の遺伝子発現の違いを cDNA representational difference analysis (RDA) 法および DNA マイクロアレイ法により調べた。その結果、R3 細胞には、cdc2 や p55cdc などの S、G2、M 期において高い発現が見られる mRNA の発現が高かったことから、R3 細胞は、成体肝における前駆細胞のような役割を果たしていると考えている<sup>6)</sup>。

一方、私達は、ヒト肝臓においても、ラット同様に高い増殖能を示す小型の肝細胞が存在することを示してきた。ヒト肝臓組織から分離した肝細胞を、ヒト血清 (HS) と Swiss3T3 細胞の培養上清を添加した HCGM 培地を用いて培養したところ、ラットの場合と同様に小型肝細胞のコロニーが観察された<sup>7)</sup>。私達は、この増殖性肝細胞を継代培養する方法を確立し、その形質発現や機能発現について詳細に調べた<sup>8)</sup>。本稿では、ヒト肝前駆細胞と考えられるヒト増殖性肝細胞の分離・培養方法および性質について述べる。

### 2. ヒト肝組織からの肝細胞分離、培養

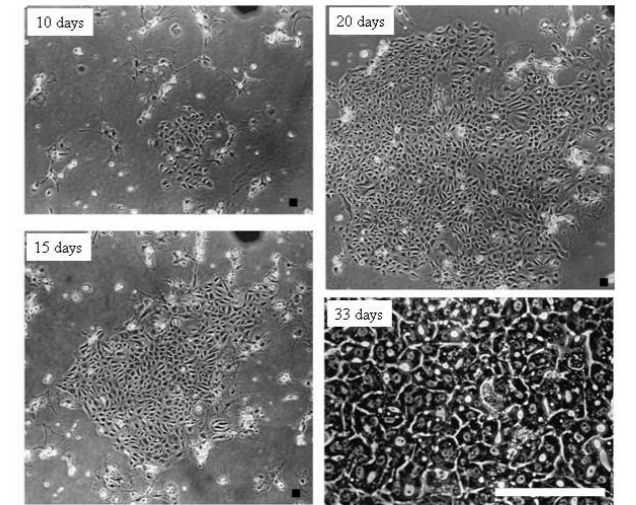
転移性肝腫瘍等の切除時に得られる正常部位を、倫理委員会の承認後、インフォームドコンセントにより患者 (組織提供者) の同意を得た上で入手した。このヒト肝組織から二段階コラゲナーゼ灌流法により肝細胞分離を行った。摘出した肝組織を University of Wisconsin (UW) solution で脱血し、0.5 mM EGTA を含む Hank's 液 (EGTA-Hank's 液) および 1000 IU/ml dispense、0.05% collagenase、6 mg/

ml  $\text{CaCl}_2$  を含む Hank's 液 (dispense-collagenase-Hank's 液) で肝組織を消化した後、さらに、0.05% collagenase、6 mg/ml  $\text{CaCl}_2$  を含む -Hank's 液 (collagenase-Hank's 液) を用いて肝組織の消化を行った。ドナー年齢が若い組織の場合は、collagenase-Hank's 液のみでも十分に消化されたので、dispense は用いなかった。消化後は、膨化した組織の被膜にメスで切込みを入れ、ピンセットを用いて 10% bovine serum albumin (BSA)、0.4 IU/ml DNase を含む Hank's 液 (BSA-Hank's 液) 中でほぐして細胞を回収した。回収した細胞懸濁液を 75  $\mu\text{m}$  径のナイロンメッシュでろ過し未消化の組織塊を除去した。この濾過液を低速遠心分離 (50G、2 分) し、沈殿 (PH) を得た。これを、4 または  $8 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> で播種し、5% FBS、10% HS、5 ng/ml 表皮成長因子 (EGF)、10 mM ニコチンアミド、0.1 mM Asc-2P を添加した DMEM 培地 (h-HCGM) を用い、マイトマイシン C 処理により増殖を抑制した Swiss 3T3 細胞と混合培養し、3~4 日毎に培地交換を行った。Swiss 3T3 細胞は、肝細胞播種後翌日とその後は 10 日毎に添加した<sup>8)</sup>。

### 3. ヒト増殖性肝細胞の in vitro における性質

#### 3.1 in vitro における増殖および形態

ヒト正常肝組織より得られた肝細胞を上記に示す方法で培養すると、ほとんどの細胞は分裂しない。播種した細胞の 0.01-0.1% のわずかな細胞が、培養 5 日目頃より分裂を開始し、培養日数の経過に伴いコロニーを形成しながら増殖した。このコロニー増殖の様子を経時的に位相差顕微鏡で観察すると、その面積は、培養 10 日目に比べ、培養 15、20、30 日目にはそれぞれ 6 倍、15 倍、240 倍と増していった (図 2-1)。またこのような増殖性肝細胞は、増殖期においては肝上皮細胞様の形態を示しながら増殖するが、さらにコンフルエントの状態になる



Bars, 100  $\mu\text{m}$

図2-1: ヒト増殖性肝細胞の位相差顕微鏡写真。16才、女性のドナー肝臓から肝細胞を分離、培養すると、一部の細胞がコロニーを形成しながら増殖した。コロニーを形成する細胞は、肝上皮細胞様の形態を示しているが、コンフルエントの状態になると、細胞密度の高くなった部分の細胞は、成熟肝細胞様の形態を示すようになった。

と、細胞密度の高くなった一部の細胞は、肝細胞様の形態を示した (図 2-1)。このような高い増殖能を持つ肝細胞が含まれる割合は、前述のように 0.01~0.1% と非常に低く、そのコロニー形成率は、ドナー年齢の増加に伴い低くなる傾向を示した<sup>8)</sup>。

#### 3.2 ヒト増殖性肝細胞の継代培養

コロニー形成率は低いものの、この増殖性肝細胞は、EDTA/トリプシン処理により剥がして継代培養することが可能であった。播種後 30~40 日目、培養皿上でコンフルエント近くなるまで増殖した増殖性肝細胞を 1 mM EDTA/0.25% トリプシンで処理することにより培養皿から剥がし、 $4 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、初代培養の場合と同様に h-HCGM 培地中で Swiss 3T3 細胞と混合培養した。継代した増殖性肝細胞は初代培養の場合と同様にコロニーを形成しながら増殖した。年齢の若いドナー (3 才、12 才、16 才) の肝細胞は、最大 7 回、高齢のドナー (63 才、72 才) においても 4~5 回継代す

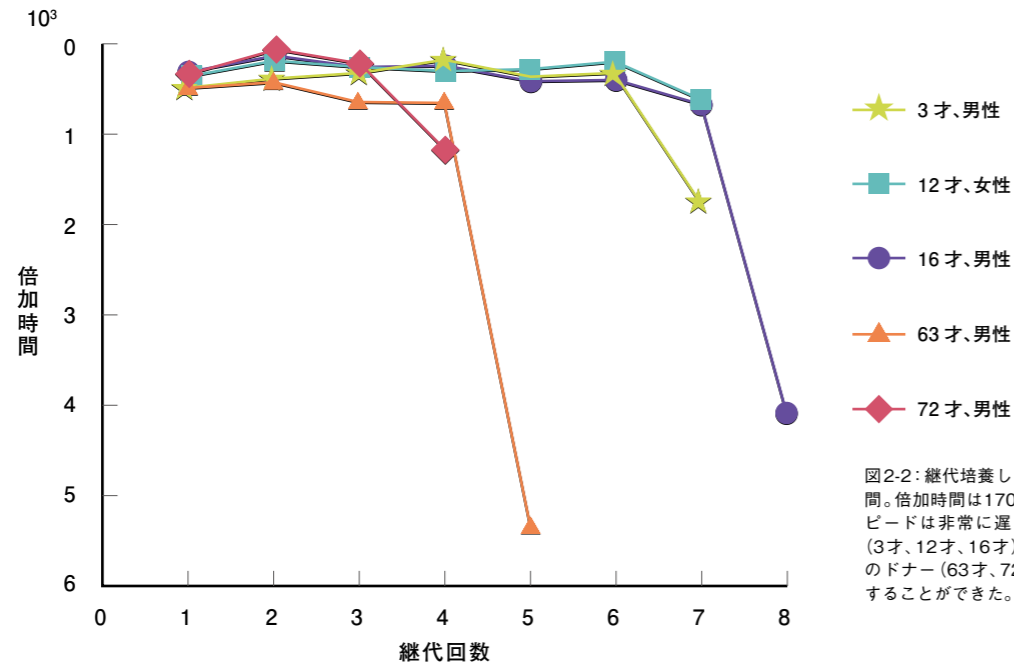


図2-2: 継代培養したヒト増殖性肝細胞の倍加時間。倍加時間は170～1000時間と長く、増殖スピードは非常に遅いものの、年齢の若いドナー(3才、12才、16才)の肝細胞は、最大7回、高齢のドナー(63才、72才)においても4～5回継代することができた。

ことができ、培養200日で約2000～10,000,000倍の増殖を示した。増殖スピードは非常に遅く、4継代目での倍加時間は170時間～1000時間であった<sup>8)</sup>(図2-2)。

### 3.3 ヒト増殖性肝細胞の機能発現

継代培養したヒト増殖性肝細胞の形質発現を免疫染色により調べた結果、増殖期においては肝細胞のマーカーであるアルブミン、肝細胞および胆管上皮細胞のマーカーであるCK8やCK18、胆管上皮細胞のマーカーであるCK7やCK19を発現していた。しかし、肝細胞がコンフルエントの状態になると、細胞密度の高くなった部分の細胞の一部は、分化した肝細胞のマーカーである $\alpha_1$ -アンチトリプシンを発現し、CK7、19の発現は消失した(図2-3)。

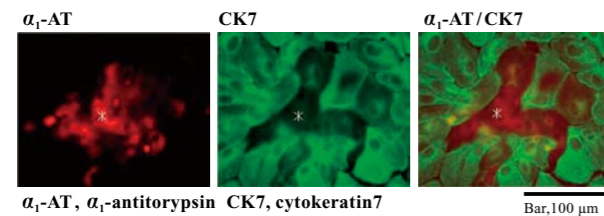


図2-3: 継代培養したヒト増殖性肝細胞の形質発現。継代培養した増殖性肝細胞は、増殖期においては、肝細胞と胆管上皮細胞のマーカーを発現するが、コンフルエントの状態になると、細胞密度の高くなった部分の細胞(写真中の\*で示した部分)においては、分化した肝細胞のマーカーである $\alpha_1$ -アンチトリプシンが発現し、CK7の発現は消失した

肝細胞をマトリゲル上で培養すると、スフェロイドを形成し、肝細胞特異機構が維持されることが知られている<sup>9)、10)</sup>。そこで、継代培養したヒト増殖性肝細胞をマ

トリゲル上で培養した。その結果、増殖性肝細胞はマトリゲル上でスフェロイドを形成した(図2-4)。継代培養したヒト増殖性肝細胞とスフェロイドを形成した増殖性肝細胞のアルブミンや薬物代謝酵素であるチトクロームP450(CYP)のmRNAレベルをリアルタイム定量PCRにより測定し、分離直後の肝細胞と比較した。また、肝細胞癌由来細胞株であるHepG2細胞も同様にマトリゲル上で培養しmRNAレベルを測定した。その結果、継代培養したヒト増殖性肝細胞は、分離直後の肝細胞に比べ低いアルブミンおよびCYPの発現レベルを示したが、マトリゲル上でスフェロイド形成させることにより、その発現レベルは分離直後の肝細胞に近い値を示すようになった。(図2-4)これらの結果から、ヒト増殖性肝細胞は、シャーレで継代培養することにより、肝臓特異機能が一旦低下するが、スフェロイドのような3次元培養を行うことにより、分化機能が誘導され、成熟した肝細胞と同程度の機能を回復することが示された。

### 4. おわりに

最近では、神経や表皮細胞などの組織幹細胞の存在が明らかとなり、再生医療への応用が検討されている。しかし、肝臓の幹細胞の存在は未だ明らかとなっていない。これまでの私達の研究から、ヒト肝臓にはラット肝臓と同様に高い増殖能を有する肝前駆細胞がわずかな割合で

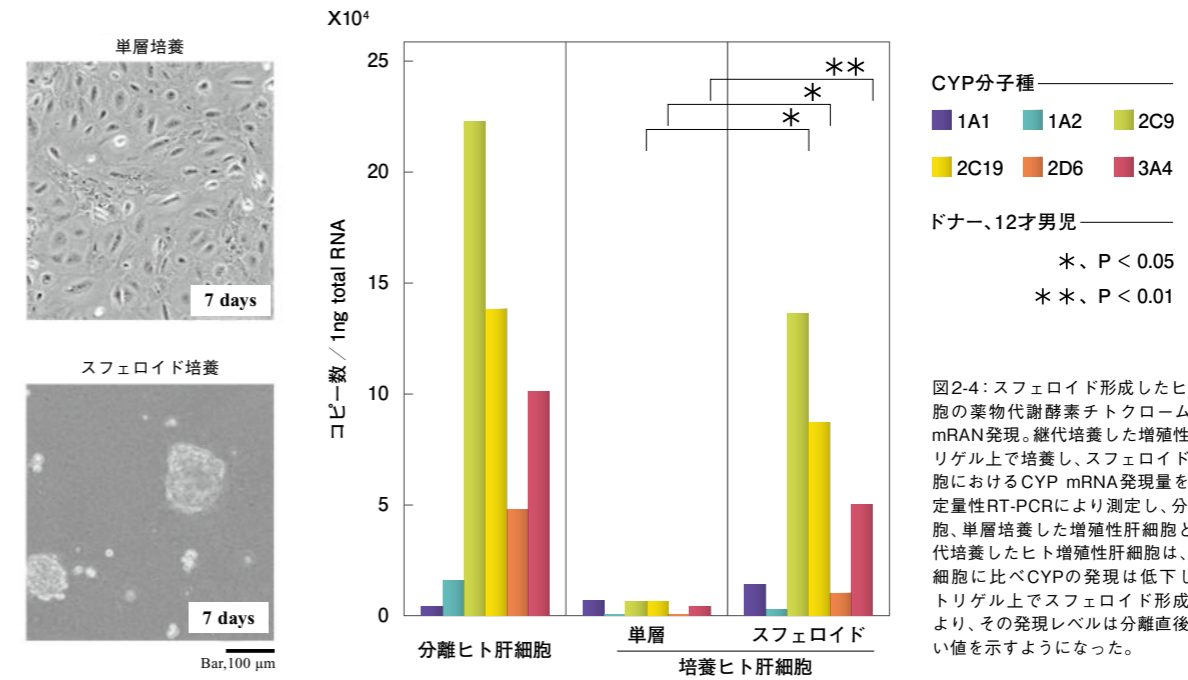


図2-4: スフェロイド形成したヒト増殖性肝細胞の薬物代謝酵素チトクロームP450(CYP)mRNA発現。継代培養した増殖性肝細胞をマトリゲル上で培養し、スフェロイド形成させた細胞におけるCYP mRNA発現量をリアルタイム定量PCRにより測定し、分離直後の肝細胞、単層培養した増殖性肝細胞と比較した。継代培養したヒト増殖性肝細胞は、分離直後の肝細胞に比べCYPの発現は低下していたが、マトリゲル上でスフェロイド形成させることにより、その発現レベルは分離直後の肝細胞に近い値を示すようになった。

存在することが明らかとなった。このような細胞は、肝臓が何らかの障害を受けたときに増殖・分化し、肝臓の再生に重要な役割を果たしているのではないかと考えている。今後、この細胞が、肝臓における幹細胞として機能しているのかどうか、あるいは肝臓の幹細胞は他に存在しているのかどうか研究をさらに進める必要がある。

私達は、成人のヒト肝組織から肝臓の前駆細胞と思われる増殖性肝細胞を分離し、in vitroで大量に増やす方法を確立した。このような細胞は、肝細胞の増殖や分化、肝再生のメカニズム解明のための有用なツールとなり得るのではないかと考えられる。また、肝細胞は薬物代謝機能において中心的な役割を果たすことから、近年、医薬品の開発において、高い機能を持つヒト肝細胞のニーズが高まっている。この増殖性肝細胞は、3次元培養することにより高い薬物代謝酵素遺伝子の発現を示すことから、医薬品開発におけるin vitroの薬物代謝試験キットとして利用できる可能性が高いと考えている。さらに、肝不全患者の治療のためのハイブリッド型人工肝臓の材料や、肝細胞移植の材料としての利用の可能性も検討している。

### 文献

- 1) H. Sato, M. Funahashi, D.B. Kristensen, C. Tateno and K. Yoshizato: *Exp. Cell Res.*, 246, 152-164 (1999) .
- 2) K. Asahina, H. Sato, C. Yamasaki, M. Kataoka, M. Shiokawa, S. Katayama, C. Tateno and K. Yoshizato: *Am.*

- 3) C. Tateno and K. Yoshizato: *Am. J. Pathol.*, 149, 1593-1605 (1996) .
- 4) C. Tateno, K. Takai-Kajihara, C. Yamasaki, H. Sato and K. Yoshizato: *Hepatology*, 31, 65-74 (2000) .
- 5) S. Katayama, C. Tateno, T. Asahara and K. Yoshizato: *Am. J. Pathol.*, 158, 97-105 (2001) .
- 6) K. Asahina, M. Shiokawa, T. Ueki, C. Yamasaki, A. Aratani, C. Tateno and K. Yoshizato: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342, 1160-1167 (2006) .
- 7) H. Hino, C. Tateno, H. Sato, C. Yamasaki, S. Katayama, T. Kohashi, A. Aratani, T. Asahara, K. Dohi and K. Yoshizato: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 256, 184-191 (1999) .
- 8) C. Yamasaki, C. Tateno, A. Aratani, C. Onishi, S. Katayama, T. Kohashi, H. Hino, H. Marusawa, T. Asahara and K. Yoshizato: *J. Hepatol.*, 44, 749-757 (2006) .
- 9) R. Hamamoto, K. Yamada, M. Kamihira and S. Iijima: *J. Biochem.*, 124, 972-979 (1998) .
- 10) C. E. Semino, J. R. Merok, G. G. Crane, G. Panagiotakos and S. Zhang: *Differentiation*. 262-270 (2003) .

### 3. 幹細胞機能の分子メカニズムへのアプローチ法:HiCEP

先端遺伝子発現研究グループ・  
グループリーダー  
安倍 真澄

#### イントロダクション

長い間、間接的なデータによる、むしろ理論的議論にとどまっていた幹細胞研究だが、近年、ES細胞、組織幹細胞と多能性幹細胞が、次々に「この細胞!」と、実際に「もの」として同定され始め、その状況は一変した。そもそも「幹細胞」の出生地は放射線研究である。そして実際に幹細胞の観察とハンドリングが可能となれば、長期影響の核である癌、将来の被ばく治療の核となるであろう再生医学と、影響、治療の両面で放射線科学の中心的テーマになることは間違いない。

幹細胞研究で現在進んでいるのが細胞レベルの研究である。何故か、癌化せずに株化されるES細胞はともかく、他の組織幹細胞同定において決定的な役割を果たしたのは、セルソーティング技術と生細胞染色技術、そして機能アッセイ法（移植法）である。その結果、「同定」「純化」が進み、幹細胞そのものの動態と、その幹細胞状態をサポートする生体内微小環境の観察が始まった。一方、胚性幹細胞（ES細胞）の多様な組織への分化の可能性も示され、科学的視点にもまして、再生医学応用への期待が寄せられている。

このような細胞レベルの研究に対して、意外にも分子メカニズム研究は始まったばかりである。総合的な推論からある程度有効な表面マーカーが見つかったものもある。またノックアウトマウスにおいてその幹細胞に異常を呈する事から、幹細胞機能との関係が偶然示された遺伝子もいくつかある。しかしながら、システムティックな攻め方は存在しない。ミュータントはメカニズム研究の偉大な入り口だったが、幹細胞研究では多くの場合「致死」という扉で閉ざされる事になる。最新技術のマイクロアレイ法で、幹細胞機能を司る共通のメカニズム「stemness」を構成する分子群が存在すると想定し、その探索が行われたが、報告された研究グループごとに結果が異なるという悲惨な話に落ち着いた衝撃は大きかった。

た。

数の少なさと、その不安定さ故に（細胞株であるES細胞ですら、培養細胞集団がひどく不均一である事が示されている）、多くの場合、従来の分子生物学的手法では太刀打ちできない。数が少なく不安定な細胞の解析には、当然、「単一細胞」～10細胞という少数細胞の解析が求められる。更に、分子レベルでは、今のところほとんどが未知の「幹細胞」においては、未知転写物が多数発現している可能性がある。ミュータントスクリーニングは網羅的である（機知のシグナルパスウェイからの切り込みも重要で現実的だが、大きな流れのいくつかを見逃す可能性が残る）。しかし、それが通用しないなら、やはり網羅的な分子レベル解析が必要になる。私の知る限り、プロテオーム解析では今後しばらくの間このオーダーは不可能にみえる。ここでは現在のところ唯一の可能性であるトランスクリプトーム解析について、我々の開発した High Coverage gene Expression Profiling (HiCEP) 法を中心に、今後解決すべき問題点も含め、報告したい。

#### 幹細胞トランスクリプトーム解析研究に求められる解析能力

転写物の総体（トランスクリプトーム）は、細胞あたり4～5万種類の転写物を識別し、それら各々の量を定量的に測ることで把握出来る。如何に正確に、大量に、スピーディーにそして現実的なコストで行えるかがポイントである。従来技術は、「正確」、「大量処理」を同時に達成できないことから、いきおいその用途が二つに大別されてきた。一つが「遺伝子探索」、もうひとつが「発現モニタリング」である。両方の目的に用いる事が可能だが、両方ともいまひとつの能力なのがマイクロアレイ法である。その結果、変動が検出される代表的な遺伝子のみで、ストーリーを作る科学の出版の世界では今のと

ころ意味を持っているが、実際の医療その他、実際の問題を解決する能力に乏しい。

再現性、それが生み出す正確性が極めて重要である。そして、その低さは、その後の検証実験を極度に肥大化させるだけに、ときに挙げられた候補遺伝子のうち確認できる変動が30%という低さに至るマイクロアレイ実験では、モチベーションの維持が極めて困難である。候補一個一個を再検証することが現実的には不可能な膨大な種類を相手にする「オーム」の世界では、この不正確さは致命的になる。セカンドスクリーニングの難しさと対をなす「行き詰まり」の主な原因のひとつでもある。一方、その正確さではPCR法が抜きん出ている。しかし、こちらはスループットの低さが問題である。現在でも、「ひとつひとつPCRする」という状態からあまり変わってはいない。もちろん、膨大な労力、時間、費用を惜しまなければスループットをあげることは可能なのだが、非現実的である。そしてなにより、独立の複数の反応が必要となれば、解析に必要なRNA量を「単一細胞」にまで下げることは不可能である。この発展系として、単一チューブ内で複数の転写物を増幅させるマルチプレックスPCRの開発・効率化が試みられているが、投入する複数のプライマー同士の相互作用の為、今のところ20転写物/反応程度が限界である。そうすると単純すぎるかもしれないが、40,000転写物の観察には2,000反応が必要である。プライマーを含む試薬、そしてなによりこの量に対応できる出発材料が求められる。ただいつも確信を維持しつつ研究を進められるPCRをベースにした方法は現場の研究者にとってはかけがえの無いものである。

従来法では「どの方法も」「なにか」が足りない。今、「再現性・正確性」「ハイスループット（大量処理能力）」「未知転写物の検出能力」「高いコストパフォーマンス」を有する技術が求められている。そして、HiCEP法は基本的にこの諸条件を満たしている。HiCEP法は言わば「an ideal high-throughput quantitative PCR」であり、40,000

転写物を一本のチューブ内で定量的に増幅する、そんな技術である。

解析に必要な出発材料を限りなく「単一細胞」に近づけなければならない、それが、幹細胞研究において、生命線でもある。現在、10ピコグラム（ひとつの細胞由来のトータルRNA）での解析技術の開発が世界中で行われている（一般的なトランスクリプトーム解析ではその百万倍程度必要）。幹細胞は非常に数少ないし、直ぐに分化するという意味で不安定である。vivoから直接ひとつ、もしそれが不可能ならば10細胞程度を切り出し、解析に供する事ではじめて自然な幹細胞のトランスクリプトームを知る事が出来るはずである（これとて、切り出して変性剤を加えるまでに誘導された変化を検出してしまうことになるのだが）。出発材料の量を下げることは、一方でどうしてもデータ精度の低下を招く。この問題を補うためには独立の複数の「単一細胞」解析が必要となり、必然、ハイスループットシステムが求められることとなる。

#### HiCEP法

HiCEP法は、「選択PCR」とよばれるステップ以外には Amplified-Fragment Length Polymorphism (AFLP) 法と大きな違いは無い（図3-1）。転写物を見分けるために、正確に特定の塩基配列を認識し、切断する制限酵素を用いる。結果、各転写物固有の長さの断片が生じる（もちろん認識サイトを有さない転写物は検出されない。これが網羅率を決める）。制限酵素は、4、6もしくは8塩基を認識するものに大別できるが、網羅率をより100%に近づける為に、一般には、存在確率の高い4塩基認識酵素を用いる（因みに6塩基認識だと平均20-30%程度となる）。当然なことながら、存在確率が高い酵素を用いると、それだけ消化断片の長さも短くなる。実際我々は、膨大な数の機知転写物の情報を用いたシミュレーションから、4塩基認識酵素の中でもより遺伝子上流に

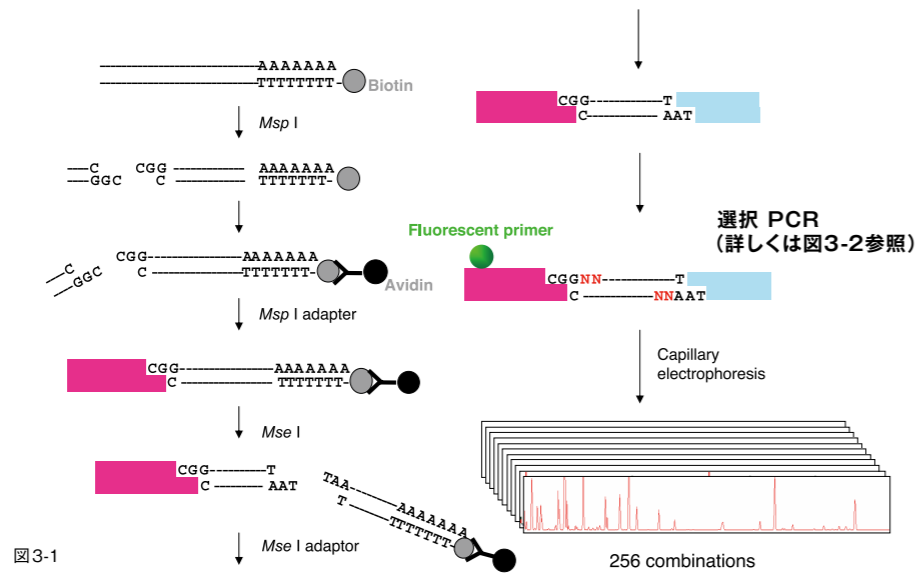


図3-1

高頻度に位置する MspI と下流にほぼ存在する MseI を用いることとした。その結果、断片の平均鎖長は 151 塩基対 (マウス ES 細胞) となり、遺伝子領域を特定するのに十分な情報を得ることができた。

次に、このようにして得られる 40,000 種類にもなる断片を識別しなければならないが、断片は 151 ベースを中心に分布し、同じ長さ (ベース) のものが多く存在する。そこで考えられたのが「選択 PCR」である (図 3-2)。この技術によって 40,000 種にも及ぶ断片は 512 のグループに分けられ (はずで)、その結果、グループあたり平均 100 種類程の断片が増幅される (はずであり)、その後 1 ベースの分解能を有するキャピラリーシーケンサーで分離・解析できることになる。各シグナル強度は、その断片の量、即ち、発現量に相当する。

「アニーリングを正確にコントロールする事は不可能である、でもそれでも限られた用途には使用できる」というのが HiCEP 前の AFLP 法の一般的な捉え方だった。もしも膨大なフラグメントをシーケンス情報なしに正確に分けられれば、トランスクリプトーム解析のみならず、多くの従来技術が一変する。「そんなことが動いたら誰かやってくれるよ！」と。では「選択 PCR」は本当に動かないのか？ 酵素消化後生じた断片の両端に合成 DNA アダプターを結合させ、それぞれのアダプターにアニールする PCR 用プライマーを作成する (図 3-2)。但し、それぞれのプライマーの 3' 端 2 塩基だけはアダプターではなく cDNA 由来、酵素の認識配列に続く 2 塩基とアニールできるように設計されている (以下、この 2 塩基を「NN 配列」と記す。(図 3-1) では赤で示している)。この NN の塩基の組み合わせは 16 となる。それぞれの N に A,T,G,C の 4 種類が入り得るからである。そして、両端の計二つの NN で特異的ア

ニーリングを行い cDNA 断片を 16 × 16=256 のグループに分けようというものである (上述のように最終的に 512 サブグループかは論文参考)。

HiCEP 法がブレイクした点は、このステップ、「選択 PCR」が、本当に動くこと、そしてその反応条件を見つけた、という点である。アニーリングの正確さのもっとも大きなファクターはもちろん温度である (反応液の塩濃度などの諸条件の詳細にはここでは触れない)。「何故、選択 PCR は動かないのか？」という疑問を持って実験を行った、そしてその結果は実に驚くべきものだった。(図 3-3) にアニーリング温度を小刻みに振った結果を示す。従来法が用いている温度帯 55-65℃ とそれ以上の温度帯でピークパターンが大きく異なったのである。同様の結果は、調べた 130 以上のプライマーセット全てにおいて確認された (予想通り NN 配列が GC か AT かでパターンが変化する温度に多少の違いは見られたものの)。その後、ランダムにピークを抽出し、そのシーケンスを決定する事で 65℃ 以下のアニーリングで生じるほとんどの断片がミスアニールを起こしている事、一方、71℃ 以上で見られるピークのほとんどはミスアニールを起こしていない事が確認された。ある温度以上ではミスアニールが生じない事は理解しやすい、でも何故 65℃ 以下で正確なアニールが起きないのか？ 我々はこの温度帯では、実は両方起きていると考えている、ただ圧倒的に量の多い転写物がプライマーをミスアニールで食ってしまっているのではないかと考えている。即ち、正確なアニーリングのみが起こる高温の反応条件ならプライマーが見向きもしないような、多量発現転写物が、ミスアニーリングを起こしてしまうようである。事実 65℃ 以下では、複数のプライマーセット (本来アニールしないはずのプライ

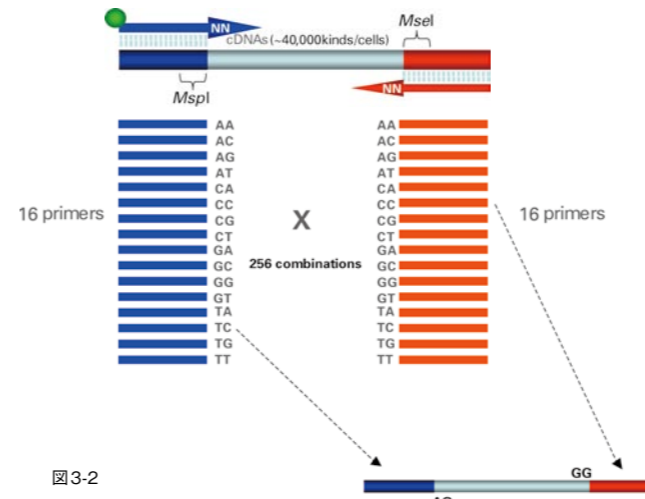


図3-2

マーセットを多く含む) にわたって検出される同一転写物由来の大きなシグナルが多数検出された。

次にこの現象「71℃ 以上ではミスアニーリングは起こらない」の確認を他のアプローチでも試みた。71.5℃ のアニーリング温度で「選択 PCR」を行い、全てのプライマーセットの増幅産物、総数 2 万ピーク以上をクローニングしそのシーケンスを決定した。その結果、ミスアニーリングは 4% 以下のピークにのみ見られたのである。また、実に興味深い事に、これらのミスアニーリングは特定のプライマーによって生じている事も示された。

このようにして、我々は 100% に近い正確さで「選択 PCR」が動く反応条件を見つけた。しかし、このような非常識なアニーリング温度の使用は正しい NN を持つ cDNA 断片さえも見失わせるのではないかとというもうひとつの深刻な懸念を生む。紙面の都合でここでは議論しないが、このような高い温度でも、選択されるべき断片が全て見逃されない事も確認できた。

開発当初 1-2 マイクログラムの mRNA (トータル RNA50-100 マイクログラム、1 千万細胞程度に相当) を解析に必要としたが、現在では、その 1/1,000、トータル RNA100 ナノグラム (~10,000 細胞相当) が我々のスタンダードプロトコールである。また 500pg - 1ng (50-100 細胞相当) での解析も可能になりつつある。とは云うものの、微量サンプルを用いた場合、どんな方法でも精度・感度の低下は避けられない。この為、従来法では、特に低発現転写物の観察が犠牲になっていた。この中には生物学上重要な転写制御因子などが多く含まれていると考えられる。我々はこの点に特に留意しながら開発を進めている。その結果、現在では、20 ~ 50 細胞を出発材料として用いた解析においても、4 コピー以上

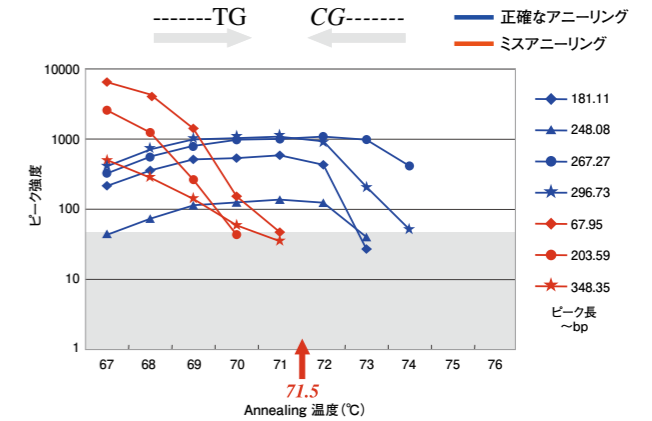


図3-3

発現していれば検出は可能である。

### HiCEP 法の問題点と可能性

HiCEP 法の問題点は、なんといっても発現変動ピークから「そのピークがどういう遺伝子由来か？」ということ、マイクロアレー法のように直ぐには知る事ができない事である。未知転写物も検出可能ということは、必然的に解析後の構造決定は必要なのだが、候補遺伝子が数百に上ることも多い「オーム」解析では、悲しいほど面倒な問題となる。予測、データの登録 (ピークデータベース) そして迅速クローニングが考えられる克服法に見える。しかしながら、我々の解析では、近年、数多く見つかった注目をあつめている蛋白をコードしない転写物の数も、想像よりはるかに多いことが示されている。そしてその大部分が、既知の遺伝子座位から転写されているにもかかわらず、報告されていない新規の形状のものであり、ゲノム遺伝子情報からの構造予測は原則、不可能である。このような理由から、エクソンイントロン構造を持たない生物など予測が可能な例外的な生物を除いては迅速クローニングがやはり最も現実的である。現在、このシステム開発が進んでおり、2 年以内には 1,000 ピーク/日の分取も可能になる。

HiCEP 法を用いる事で、幹細胞分子メカニズムの網羅的解析が可能になりつつある。また、膨大な数の DNA 断片をシーケンス情報なしに正確に識別できる HiCEP のコア・テクノロジーは、他にも多くの技術に貢献できる。例えば、エピジェネティック制御の中心であるチル化の網羅的な解析レベルなどを格段に進化させている。幹細胞遺伝子発現制御ネットワークが観えるのもうすぐである。



## 4. ヒト細胞における効率的遺伝子破壊をめざして

生体影響機構研究グループ  
森 雅彦

### はじめに

細胞内 DNA は、紫外線、電離放射線などの環境因子や、代謝産物などの内的要因によって多種多様な損傷が起こる。これらの DNA 損傷は、チェックポイントとよばれるシグナル伝達機構と様々な DNA 修復機構とが協調して DNA を修復する。チェックポイントおよび DNA 修復経路において、それらに関与するタンパク質の一次構造は、酵母からヒトまで保存されていることが明らかになってきた。一方、DNA 損傷修復システムの働き、あるいは DNA 損傷修復システムが関係する寿命や発がん性といった現象は、種間で明らかに異なっている。したがって、ヒトでの放射線に対する応答を知るためには、遺伝的背景のそろった突然変異ヒト細胞を用いた DNA 損傷修復システムの研究が必要不可欠である。本研究では、ヒトゲノム情報を利用してジーンターゲティングベクターを作

製し、ヒト細胞の DNA 損傷修復に関与する遺伝子を破壊することを試み、さらに、これら遺伝子破壊細胞を用いた DNA 修復経路解析の成果の一部を紹介する。

### ジーンターゲティングについて

ジーンターゲティングとは、特定の遺伝子を細胞の染色体上の標的位置に入れることであり、設計通りの遺伝子突然変異をおこさせる技術である（図 4-1）。特定の外来遺伝子を望みの位置に入れるためには相同組み換えという現象を利用する。マウス ES 細胞（胚性幹細胞）を用いたノックアウトマウス（特定の遺伝子を破壊したマウス）の作製、ニワトリ DT40 細胞を用いたノックアウト細胞（特定の遺伝子を破壊した細胞）作製は、それらの細胞の相同組換え頻度が高いことから遺伝子機能解析研究において盛んにおこなわれている。一方、ヒト細

胞の多くは相同組換え頻度が低いことが障害となりノックアウト細胞作製をすることが困難であった。近年、ヒト大腸ガン由来 HCT116 細胞（1）あるいは PreB 細胞由来の Nalm6 細胞などが、正常型 p53 を有し、近二倍体で核型が安定という性質を持つことからヒトノックアウト細胞作製に用いられるようになってきた。我々は、HCT116 細胞を用いて標準化したプロトコルにより系統的なジーンターゲティングをおこない、それらの細胞について解析を加えつつある。

### ターゲティングベクターの設計

我々は、ジーンターゲティングをおこなうにあたり、一連の作業を標準化することにより、ターゲティングベクター構築を簡単に進めることができるようにしている。まず、標的となる遺伝子の情報（塩基配列、エクソ

ン/イントロンの位置、翻訳開始点などの構造の情報）を EMBL, GenBank, DDBJ などのゲノムデータベースより入手し、反復配列領域の分布を特定（反復配列などを検出するツールのサイトなどを使用している）し、制限酵素地図を作成する。それらの情報を元に、薬剤耐性マーカーを挿入する位置の決定、ホモロジーアーム（相同組換えを起こさせるために必要な部分）の長さの決定およびアーム合成のための PCR プライマーの設計を遺伝子解析サイトおよびパソコンの遺伝子解析ソフト上で行っている。ここまでの作業は全てパソコン上でおこなうことが可能であり、以前のようにゲノムライブラリーを用いたスクリーニングし、制限酵素を用いて制限酵素地図を作成、サブクローニングをおこなってホモロジーアームを作製するといった一連の遺伝子組換え実験作業を省略することが可能となった。

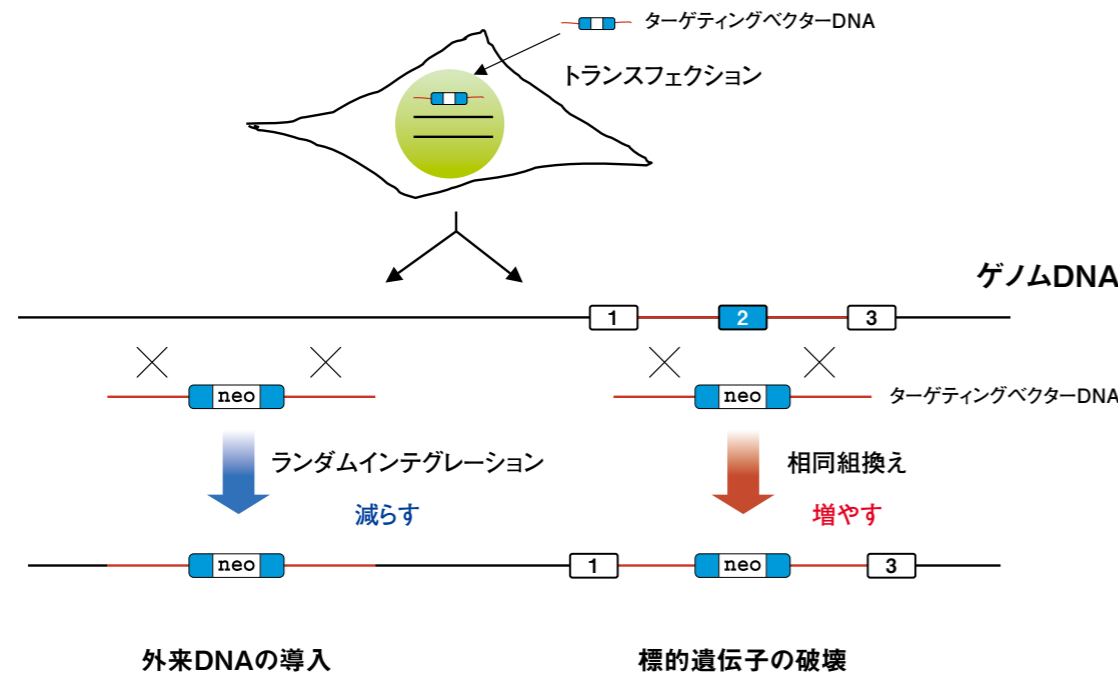


図 4-1: 相同組換えを利用したジーンターゲティング: 細胞にターゲティングベクターを導入し、相同組換えにより標的遺伝子の破壊をおこなう。多くの場合は、ランダムに染色体に取り込まれてしまうが、低い頻度ではあるが相同組換えにより標的遺伝子を破壊することができる。

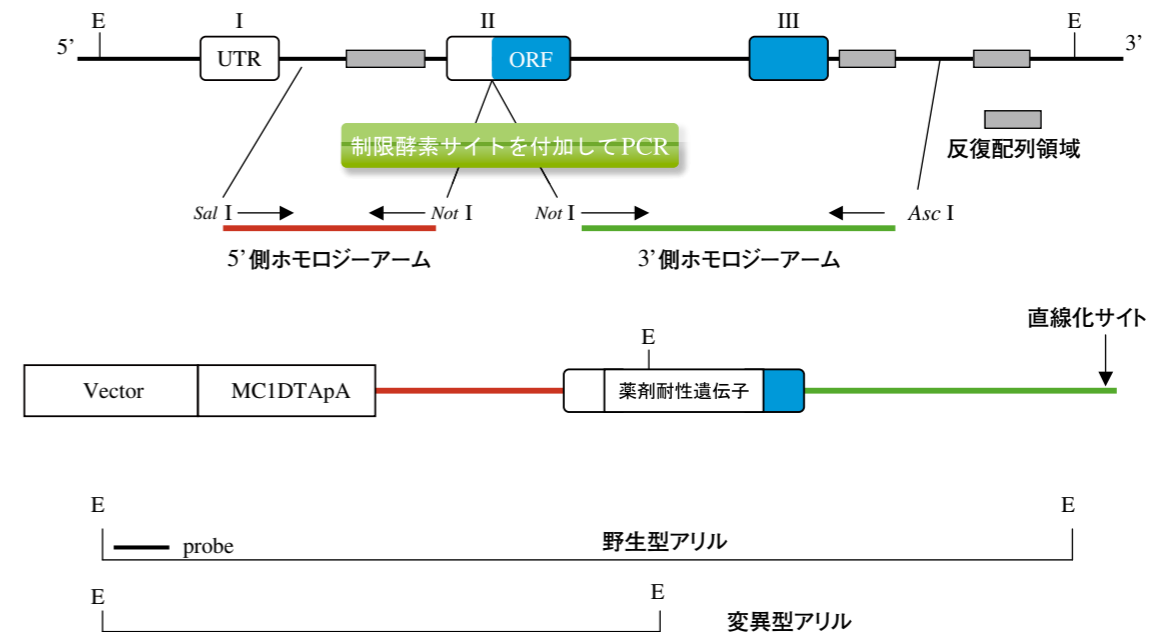


図 4-2: ターゲティングベクターのデザイン例  
E, Sal I, Not I, Asc I: 制限酵素サイト、MC1DTApA: ジフテリア毒素A断片発現カセット、UTR: 非翻訳領域、ORF: 翻訳領域、I, II, III: エクソン

## ターゲティングベクターの構築

ホモロジーアームは、HCT116 細胞から抽出したゲノム DNA を鋳型にして高い正確性をもつ PCR 用 DNA polymerase を用い、増幅回数 30 回以内でおこなっている。増幅されたアームはいったんサブクローニング用ベクターにクローニングをおこないシークエンスにより目的の塩基配列であることを確認する。ホモロジーアームにはヒトのゲノム上において出現頻度低い制限酵素サイト (Sal I, Not I, Asc I) をクローニングサイトとして付加してある。そのことにより数段階のサブクローニング作業を経てターゲティングベクターを構築することが可能になった。構築したベクターの Not I サイトは、薬剤耐性マーカーカセットを挿入するサイトとして使用し、プロモーター選択ベクターでは、Asc I サイトが、ポリ A 選択ベクターでは、Sal I サイトがベクターの直線化サイトとして使用することができるようになっている (図 4-2)。我々は、各遺伝子の性質によりスクリーニング方法において予想外の向き不向きが起こる可能性も考えられるので、プロモーター選択用ベクター、ポリ A 選択用

ベクターの 2 種類のベクターを準備しておき、スクリーニングの進行状況により用いるベクターの変更にもすぐに対処できるようにしてある (図 4-3)。また、我々は、相同組換えが起こる外側にネガティブ選択用遺伝子として DT-A (ジフテリア毒素 A 断片) 遺伝子発現カセットを用いている。非相同組換えでこの DT-A 遺伝子が染色体に組み込まれた場合は、ジフテリア毒素の発現により細胞は死滅すると期待される。よって薬剤耐性でありかつ DT-A ネガティブな細胞は、相同組換えを起こした細胞である確率が高くなる。

## PCR による相同組換え細胞のスクリーニング

直線化用サイトである Asc I あるいは Sal I サイトを制限酵素切断により線状化したターゲティングベクター DNA をエレクトロポレーション法で HCT116 細胞に導入し、ベクター DNA が細胞ゲノムに組み込まれて薬剤 G418 あるいは puromycin 耐性になった細胞を選択する。薬剤耐性細胞クローンは 1 つずつあるいは数 10 個ずつプールし、DNA 自動抽出機により抽出している。

ターゲティングの有無を PCR 法で調べ、さらにサザンブロットングで相同組換えが確実に起っていることの確認をおこなう。遺伝子破壊頻度の測定は PCR によりおこなっている。ゲノムレベルでターゲティングが確認された遺伝子破壊変異体細胞株については、ウエスタンブロットングを行いタンパク質レベルでの遺伝子破壊確認をおこなう。

さらに遺伝子破壊が確認された変異体細胞株については、増殖曲線、種々薬剤や放射線に対する感受性等の諸性質を調べる。

## 種々の遺伝子座におけるジーンターゲティングの頻度

個々の遺伝子あるいは用いる DNA 領域に固有の事情により、どの場合にも当てはまるターゲティングベクターを構築することは難しいが、我々は、プロモーター選択、ポリ A 選択ベクターを同時に構築し、まず、プロモーター選択ベクターによるスクリーニングをおこない、思わしくないと判断した場合は、ポリ A 選択ベクターに変えて再度スクリーニングを行ってみるという方法をとっている。ポリ A 選択ベクターを用いることにより頻度としては低いものの一定の範囲の頻度で遺伝子破壊細胞を得ること可能であることが明らかになってきた (表 1)。

## XRCC4 欠損細胞の作製と性質

ジーンターゲティングの実例の一つとして XRCC4 遺伝子破壊を紹介する。XRCC4 遺伝子は、DNA 損傷の中でも最も重篤な損傷である DNA 二本鎖切断損傷における DNA 修復、二本鎖切断非相同末端連結 (NHEJ) とよばれる DNA 修復経路において DNA ligase IV と複合体を形成して、最終段階の DNA 二本鎖切断端の連結時に必須の因子である。我々は、この XRCC4 遺伝子の第 2 エクソンにある翻訳開始点直後に薬剤耐性遺伝子を挿入することによって XRCC4 遺伝子の機能を破壊するタイプのプロモーター選択法を試みた (図 4-3)。まず、ピューロマイシン耐性マーカーを持つターゲティングベクターを用いて一方の遺伝子座を破壊した。引き続きもう一方の遺伝子座をネオマイシン耐性マーカーのターゲティングベクターで破壊することによって、XRCC4 欠損細胞を樹立した。XRCC4 欠損細胞は、親株である HCT116 細胞よりも細胞増殖能が低下しており、X 線に対して高感受性を示し、染色体の異常も高頻度で起こることが明らかになった (図 4-5、4-6)。また、DNA 二本鎖切断に伴うヒストン H2AX のリン酸化 ( $\gamma$ -H2AX) によるフォーカス形成と修復によるそれらの消失を指標にして経時変化を調べてみると、HCT116 細胞では X 線 3Gy 照射後、4 時間後においてフォーカス数が元のレベルまで低下する、すなわち DNA 修復がおこなわれていることが示された。一方、XRCC4 欠損細胞では 4 時間後においてもフォーカスが多数残存していた。つまり DNA 二本鎖切断が修復されていないことが示された (図 4-7)。

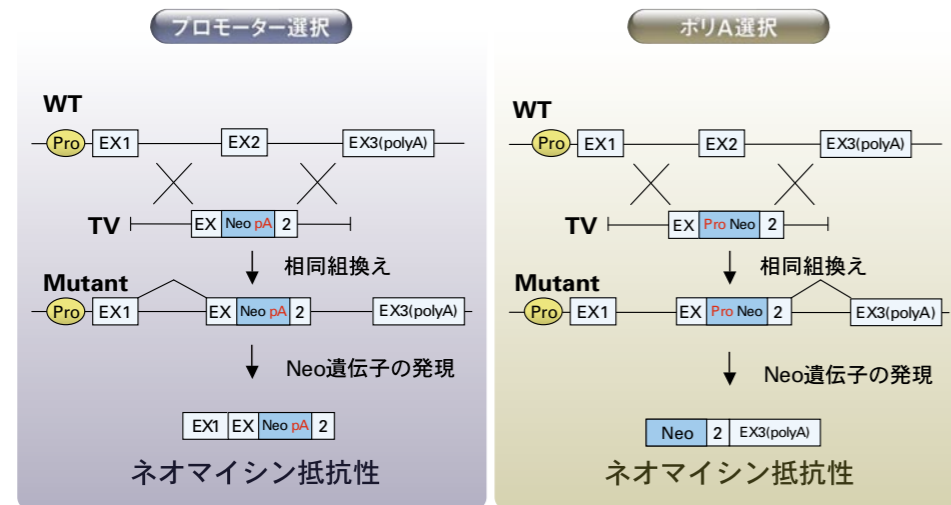


図 4-3 : 選択方法について  
プロモーター選択:ゲノム上の内在プロモーターによって薬剤耐性遺伝子を発現させる方法で、プロモーター活性のあるサイトに挿入されたクローンをみを濃縮する方法  
ポリ A 選択:選択薬剤耐性遺伝子の3'側にポリ A シグナル配列を付けないことで、スプライシングの結果ポリ A 配列をもつサイトに挿入されたクローンを選択でき、バックグラウンドを減らすことができる方法

遺伝子	選択方法	選択薬剤 (0.3µg/ml)	調べた薬剤耐性細胞数	遺伝子破壊細胞数	遺伝子破壊頻度 (%)
XRCC4	—	—	—	—	—
Ku70	ポリ A	puromycin	4968	0	<0.02
	プロモーター	neomycin	624	2	0.3
Artemis	ポリ A	puromycin	4128	10	0.24
Poi mu	ポリ A	puromycin	6000	8	0.13
Ligase IV	ポリ A	puromycin	5256	8	0.15
Ligase III	ポリ A	puromycin	5424	10	0.18
Rad18	ポリ A	puromycin	3192	8	0.25
REV1	ポリ A	puromycin	8448	12	0.14
REV3	ポリ A	puromycin	2328	0	<0.04
	ポリ A	neomycin	3984	5	0.13

表 1 : 種々の遺伝子座における遺伝子破壊頻度

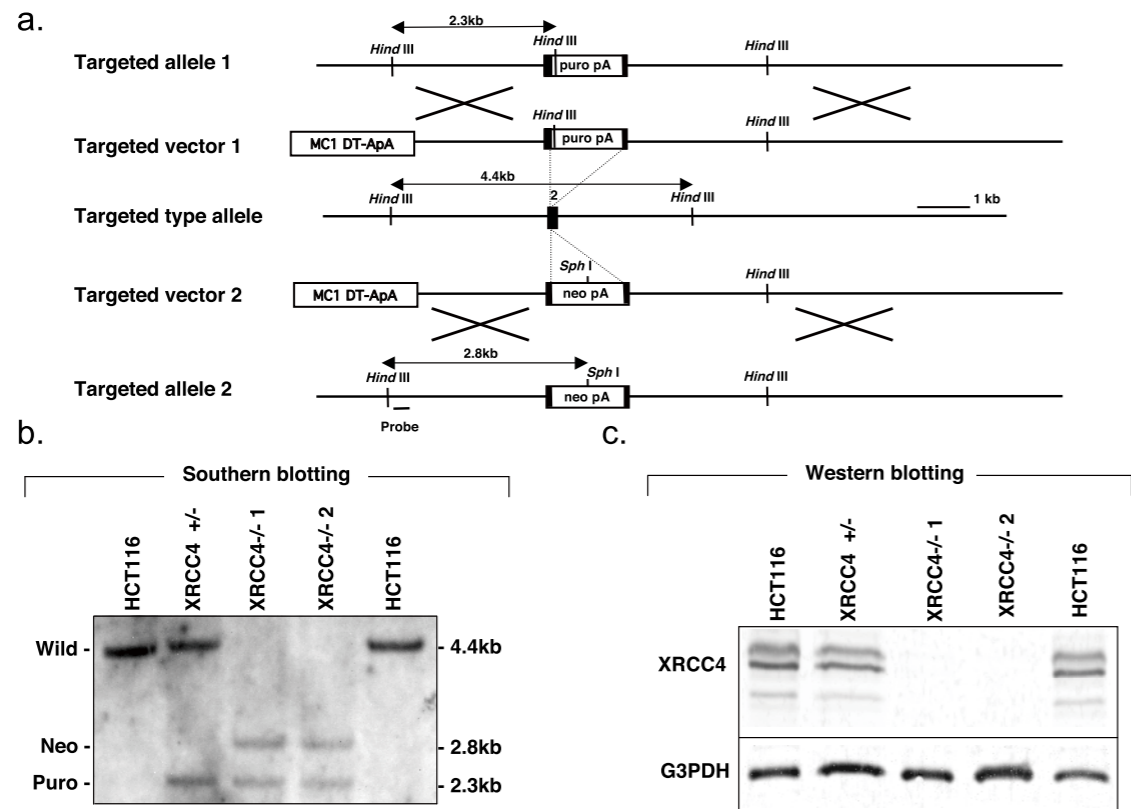


図4-4: XRC4遺伝子座のジーンターゲティング模式図とサザンプロット、ウエスタンプロットによる検証  
 a. XRC4遺伝子座とターゲティングベクターのデザイン: 第2エクソンの翻訳開始点の直下流に薬剤耐性遺伝子が挿入される構造になっている。  
 b. サザンプロットによるXRC4遺伝子の解析: PCRによるスクリーニングでジーンターゲティング陽性を示したものをサザンプロットによってさらに確認をおこなった。  
 c. ウエスタンプロットによるXRC4タンパク質の解析: サザンプロットで相同組換えによるジーンターゲティングが確認された細胞では、XRC4タンパク質が欠損している。

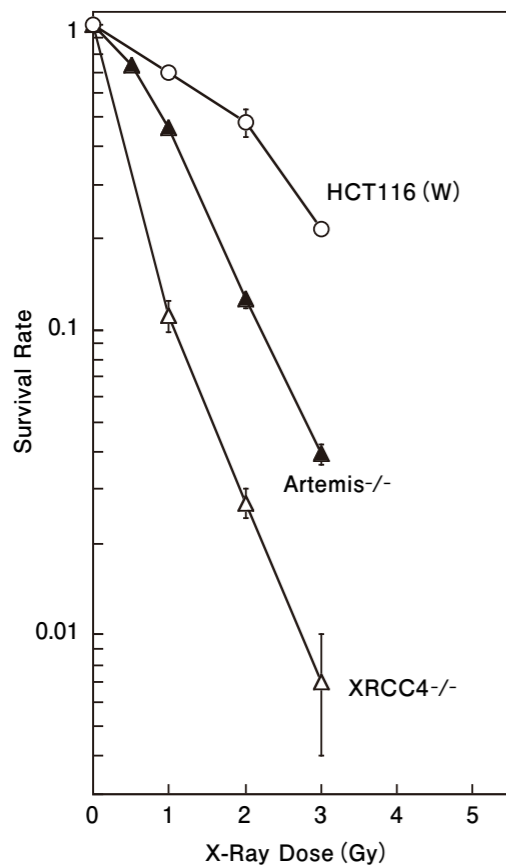


図4-5: XRC4遺伝子欠損細胞におけるX線感受性: コロニー生存率によるX線感受性の測定を行ったところXRC4欠損細胞では、放射線に対して高い感受性を示す。

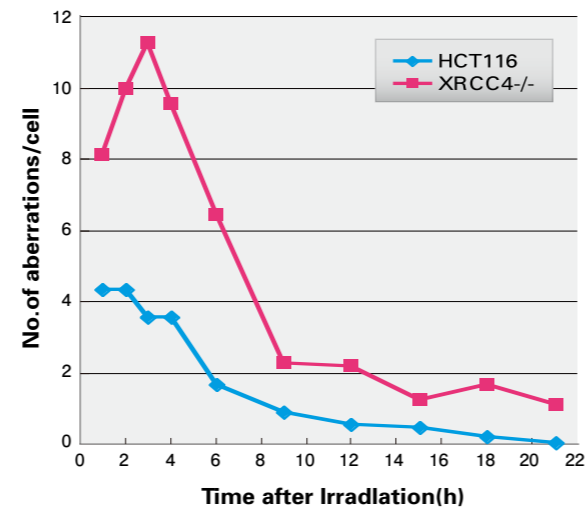
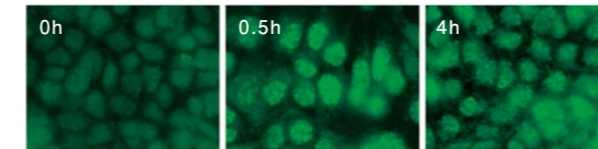


図4-6: XRC4欠損細胞におけるX線誘発染色体の異常: 親株よりも高頻度でX線により染色体異常が誘発されることが示された。

HCT116 (野生型)



XRC4<sup>-/-</sup>細胞

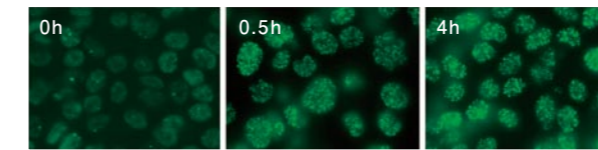


図4-7: NHEJ経路に関与する遺伝子XRC4遺伝子破壊細胞におけるγ-H2AXフォーカス: XRC4欠損した細胞では、X線照射後4時間においてもDNA二本鎖切断損傷が残っていることを示している。

今後の展開

現在、我々は、系統的にDNA修復に関与する遺伝子を破壊に成功しており、順次諸性質について解析を加えつつある<sup>2,3)</sup>。また、ヒト細胞では相同組換えの頻度が低いことから薬剤処理あるいは遺伝子操作により相同組換え頻度を一過性に上昇させる方法について検討を重ねている。同様の試みは他のグループでも成されており、高頻度で姉妹染色分体交換がおこるブルーム症候群の原因遺伝子であるBLM遺伝子をsiRNAで抑制することによりジーンターゲティングの頻度を上昇させる方法も報告されている<sup>4)</sup>。また、遺伝子の細胞への導入効率を上げるためにアデノ随伴ウイルスをターゲティングベクターに用いる試みも行われている<sup>5)</sup>。我々はHCT116細胞の欠点といえるMLH1のナンセンス変異を遺伝子修復することによりミスマッチ修復能を野生型に戻すことも試みており、MLH1遺伝子を正常に戻した遺伝的背景でのジーンターゲティングと標的遺伝子の諸性質の解析をおこなえる段階になってきた。我々は、相同組換えをコントロールすることにより、より正常細胞に近いヒト細胞を用いてのジーンターゲティングシステムを構築し、ヒトの遺伝子機能解析を推し進めること目指したい。

おわりに

これら一連の研究は、塩見忠博博士との共同研究によっておこなわれたものであり、また、小野田真博士、辻秀雄博士、塩見尚子、野代勝子、中村篤子の各氏のご協力に感謝いたします。

付録

ゲノム情報サイト

GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/index.html>

EMBL <http://www.ebi.ac.uk/embl/>

DDBJ <http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcome-j.html>

反復配列の検索サイト

RepeatMasker <http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker>

文献

- 1) Masramon L, Ribas M, Cifuentes P, Arribas R, Garcia F, Egozcue J, Peinado MA, Miro R. Cytogenetic characterization of two colon cell lines by using conventional G-banding, comparative genomic hybridization, and whole chromosome painting. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000 Aug;121 (1) :17-21.
- 2) Shiomi N, Mori M, Tsuji H, Imai T, Inoue H, Tateishi S, Yamaizumi M, Shiomi T. Human RAD18 is involved in S phase-specific single-strand break repair without PCNA monoubiquitination. *Nucleic Acids Res.* 2007;35 (2) :e9.
- 3) Nakajima S, Lan L, Kanno S, Usami N, Kobayashi K, Mori M, Shiomi T, Yasui A. Replication-dependent and -independent responses of RAD18 to DNA damage in human cells. *J Biol Chem.* 281 (45) 2006:34687-95.
- 4) So S, Nomura Y, Adachi N, Kobayashi Y, Hori T, Kurihara Y, Koyama H. Enhanced gene targeting efficiency by siRNA that silences the expression of the Bloom syndrome gene in human cells. *Genes Cells.* 11 (4) 2006:363-71.
- 5) Topaloglu O, Hurley PJ, Yildirim O, Civin CI, Bunz F. Improved methods for the generation of human gene knockout and knockin cell lines. *Nucleic Acids Res.* 2005 ;33 (18) :e158.

## 最近の成果

# 放医研で繁殖しているSPF近交系マウスの解剖学的特性

## (6) C57BL/10およびB10コンジェニック系(B10.BR、B10.D2、B10.Thy1.1/Nrs)について

上野 渉<sup>\*</sup>、早尾辰雄<sup>\*</sup>、新妻大介<sup>\*\*\*</sup>、石原直樹<sup>\*\*\*</sup>、宇野真弘<sup>\*\*\*</sup>、森竹浩之<sup>\*\*\*</sup>、石井 学<sup>\*\*\*</sup>、永井絢也<sup>\*\*\*</sup>、鈴木大輔<sup>\*\*\*</sup>、竹内隆二<sup>\*\*\*</sup>、伊田大貴<sup>\*\*\*</sup>、伊藤正人<sup>\*\*\*</sup>、南久松丈晴<sup>\*\*\*</sup>、宇原英樹<sup>\*\*\*</sup>、川島直行<sup>\*</sup>、河野明広<sup>\*</sup>、池田 学<sup>\*</sup>、渡邊香里<sup>\*\*\*</sup>、小久保年章<sup>\*</sup>、松下 悟<sup>\*\*</sup>

<sup>\*</sup> 基盤技術センター研究基盤技術部実験動物開発・管理課  
<sup>\*\*</sup> 基盤技術センター  
<sup>\*\*\*</sup> 株式会社サイエンス・サービス

### 1. はじめに

動物実験は放射線科学研究のみならず生物・医学研究において必要不可欠である。動物実験による正確な実験結果を得るためには、使用する実験動物の品質を高めることが重要である。それには、遺伝的要因、微生物学的要因および飼育環境要因を適正に制御することが必要となる。そのため放射線医学総合研究所（放医研）基盤技術センター研究基盤技術部実験動物開発・管理課では、1960年以來維持していた近交系マウス（近親交配を行って遺伝的背景を均一にしたマウス）を、1971年からSPF（specific pathogen freeの略：特定の病原微生物等を排除した微生物学的に清浄な状態）化して微生物学的制御を行いながら今まで維持・繁殖を行っている。これらの制御とともに、動物実験の結果を解析する上で、使用した実験動物の特性をあらかじめ理解しておくことは非常に重要である。これまで、当課で維持してきたC3H近交系マウスについて、乳がんの発がん率<sup>1)</sup>や繁殖<sup>2)</sup>に関するデータ、さらに解剖学的特性データを10系統（A/JNrs, BALB/c-nu/nu, BALB/c-nu/+, C3H/HeNrs, C3H/HeJ-bg, C57BL/6JNrs, C.B-17/Icr-+/+, C.B-17/Icr-scld, RFM/Ms, STS/A）について発表してきた<sup>3-7)</sup>。今回統報として、当課においてSPFマウスとして繁殖しているC57BL/10(B10)マウスとB10コンジェニック系マウスについての解剖学的特性データを報告する。

なお、コンジェニック系マウスとは、ある近交系マウス（基礎となるマウス系統）の一部特定の遺伝子を、別の近交系マウスの遺伝子に置き換わるように交配して育成した、特殊なマウス系統のことである。基礎となる近交系マウスに、置き換えたい遺伝子を持つ別のマウス系統を10世代以上にわたって交配（戻し交配）したのちに、その子同士で交配（兄妹交配）を行って作出する。B10コンジェニック系マウスには、マウスの免疫にかかわる

主要組織適合性H-2遺伝子座を置き換えた系統など、多くの系統が育成されており、移植免疫実験などの際、ホスト細胞（宿主）とドナー細胞（供与体）の関係を調べるためによく使われている<sup>8-10)</sup>。

### 2. 材料と方法

#### 1) マウス

C57BL/10(B10)：1973年にジャクソン研究所から入手した後、帝王切開により無菌化し、放医研SPFマウス生産施設において維持・繁殖しているものである<sup>11)</sup>。このうち2003年10月から2004年5月に生まれた244（オス：121、メス：123）匹を調査の対象とした（写真1）。

C57BL/10.C57BR/SgSn(B10.BR)：1973年にジャクソン研究所から入手した後<sup>12)</sup>、帝王切開により無菌化し、放医研SPFマウス生産施設において維持・繁殖しているものである<sup>11)</sup>。このうち2002年12月から2004年3月に生まれた248（オス：123、メス：125）匹を調査の対象とした（写真2）。



写真1 C57BL/10(B10) ♂ 5週齢

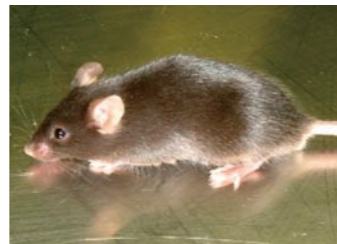


写真2 C57BL/10.C57BR/SgSn (B10.BR) ♂ 9週齢



写真3 C57BL/10.DBA/2/newSn (B10.D2) ♂ 5週齢

C57BL/10.DBA/2/newSn(B10.D2)：1973年にジャクソン研究所から入手した後、帝王切開により無菌化し、放医研SPFマウス生産施設において維持・繁殖しているものである<sup>11)</sup>。このうち2005年1月から2005年8月に生まれた243（オス：124、メス：119）匹を調査の対象とした（写真3）。

C57BL/10.NRH-*Thy-1<sup>a</sup>*(B10.Thy1.1/Nrs)：1973年にジャクソン研究所から入手したB10を基礎系統とし、その*Thy-1<sup>b</sup>*遺伝子をCF#1マウス（クローズドコロニー）を元に放医研で近交系として確立したNRHマウスの*Thy-1<sup>a</sup>*遺伝子（B10が*Thy-1<sup>b</sup>*であるためThy1.2と表記されるのに対し、*Thy-1<sup>a</sup>*はThy1.1と表記される）と置き換えた系統である。放医研の佐渡博士らによって、1975年から10世代戻し交配が行われ、1979年より兄妹交配が行われて作出された<sup>10)</sup>。その後、帝王切開により無菌化し、放医研SPFマウス生産施設において維持・繁殖しているものである<sup>11)</sup>。このうち1998年2月から2004年2月に生まれた262（オス：133、メス：129）匹を調査の対象とした（写真4）。

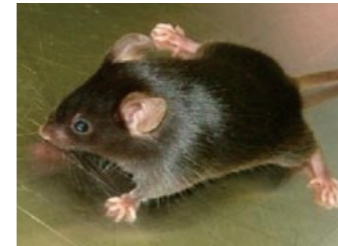


写真4 C57BL/10.NRH-Thy-1a (B10.Thy1.1/Nrs) ♂ 5週齢

#### 2) 衛生検査

毎月以下の検査を実施して、維持・繁殖しているマウスがSPFであることを確認した。

##### a) マウスの検査

各系統のリタイアーマウス（繁殖不適となった老齢マウス）を解剖して以下の検査を行った。  
 病理学的検査：解剖時に病理肉眼検査（寄生虫検査を含む）を行い、異常な部位は病理組織検査を実施した。

細菌検査：鼻腔、口腔、気管、腸管から血液寒天培地、DHL寒天培地、NAC寒天培地、PPLO寒天培地、F5寒天培地を用いて、サルモネラ (*Salmonella spp.*) 菌、*Citrobacter rodentium*、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、*Pasteurella pneumotropica*、*Corynebacterium (C.) kutscheri*、*Mycoplasma (M.) pulmonis*の感染を調べた。  
 血清検査：凝集反応、酵素抗体 (ELISA) 法、間接蛍光抗体 (IFA) 法を用いて、*C. kutscheri*、*M. pulmonis*、ティザー菌 (Tyzzer's organisms)、カー・バチルス (*CAR bacillus*)、センダイウイルス (Sendai virus (HVJ))、マウス肝炎ウイルス (Mouse hepatitis virus) に対する血清中の抗体を調べた。  
 顕微鏡検査：腸管寄生原虫を調べた。

##### b) 糞便の検査

飼育中のマウスから新鮮糞便を採取し、NAC液体培地・NAC寒天培地、およびDHL寒天培地で培養して緑膿菌と病原性腸内細菌の感染を調べた。

##### c) 生産施設の検査

マウス飼育室等の落下菌をトリプティックソイ寒天培地で培養してその清浄度を、また、飼育室の床スワブをNAC液体培地で培養して緑膿菌の有無を調べた。

#### 3) 飼育環境

マウスはSPF動物生産・実験棟1階マウス飼育室で繁殖し、生後3週齢より5匹ずつケージに入れて同一飼育室で飼育した。ケージは17cmW × 30cmD × 11cmHのアルミニウム製（トキワ科学器械製）で、木材チップの床敷き（道央理化学工業製）を入れて121℃ 20分の高圧蒸気滅菌後に使用した。飼料は121℃ 20分高圧蒸気滅菌したペレット状の固形飼料MB-1（船橋農場製）を、また、飲料水は逆浸透膜製純水（オルガノ製）を塩素濃度10 ± 2 ppmおよび塩酸添加後pH 3.0 ± 0.2

に調整した後、自由摂取させた。飼育室は温度  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 10\%$  に維持した。

#### 4) 測定項目と測定方法

各系統のオス・メスそれぞれ約 20～30 例について、同一個体の体重、体長、尾長を生後 3 週齢から 12 週齢まで毎週測定した。また、それらと別の個体について 3～12 週齢まで 1 週ごとに解剖し、臓器重量を測定した。さらに、各項目のポイントごとに平均値と標準偏差を求め、t 検定を行って有意差を判定した。

##### a) 体重

電子上皿天秤（最小目盛：0.1g）を用いて測定した。さらに、3 週齢の体重を基準として各週齢の体重増加率（%）を計算した。

##### b) 体長、尾長、尾率

毎回ジエチルエーテル軽麻酔下で、定規（最小目盛：0.1cm）を用いて測定した。さらに、尾率（%）は尾長／体長＋尾長により求めた。

##### c) 臓器重量、体重比

3 週齢から 12 週齢まで各週齢ごとにオス・メス各 10～15 例について、過量の麻酔薬で安楽死させた。その後心臓より全採血を行い、解剖を行って臓器を摘出し、臓器重量を電子上皿天秤（最小目盛：0.001g）で測定した。さらに、各臓器の体重比（%）を臓器重量／体重により求めた。

### 3. 結果・考察

表 1～8 および図 1～18 に各系統の測定結果を示した。また、各図には、同一週齢ごとに B10 を基準として他のコンジュニク系の測定値を比較し、t 検定後の結果を示した。

体重（図 1、2）について、オスでは B10.D2、B10.

Thy1.1/Nrs、B10、B10.BR の順に重かった。一方メスでは、B10.D2 が他の 3 系統より重かったが、他の 3 系統間での差は目立たなかった。詳しく分析すると、オス・メスともに B10 より B10.D2 が有意に重かった。一方、体重増加率では、メスでは両系統間に差はなかったが、オスでは B10.D2 の方が有意に低かった。B10.BR は B10 より体重が軽く、特にオスで有意さが大きかった。B10.BR の体重増加率はオス・メスともに B10 より有意に低かった。B10.Thy1.1/Nrs は、オスでは B10 より体重が有意に重かったが、体重増加率は 6 週齢以降で B10 より低い傾向にあった。メスでは 6 週齢以降体重、体重増加率ともに B10 よりやや低かった。

臓器重量について、特定の系統のすべての臓器が他系統より常に重かったという傾向はなく、系統間、臓器間、オス・メス間でその差はまちまちであった。概観的な傾向として、肝重量（図 3、4）と心重量（図 9、10）では B10.Thy1.1/Nrs がオス・メスともに他の系統よりも重かった。すなわち、肝重量はオス・メスともにいずれの週齢においても B10.Thy1.1/Nrs、B10.D2、B10、B10.BR の順に重かったが、肝重量体重比では順位性は明確ではなく B10.Thy1.1/Nrs が高値で B10.BR が低値を示す週齢が多かった。心重量は、オスでは B10.Thy1.1/Nrs、B10.D2、B10、B10.BR の順に重く、メスでは B10.Thy1.1/Nrs と B10.D2 の 2 系統が他の 2 系統より重い傾向にあった。心重量体重比では、オス・メスともに B10.Thy1.1/Nrs が他の 3 系統より高値を示し、他の 3 系統間での差は目立たなかった。脾重量（図 5、6）では、オス・メスともにいずれの週齢でも B10.D2 が重い傾向にあり、特にメスで目立った。他の 3 系統間では、B10.Thy1.1/Nrs のメスの脾重量が 5 週齢以降に B10 より有意に軽い傾向を示した。腎重量（図 7、8）はオス・メス間に統一性はなく、オスでは B10.BR が他の 3 系統より軽く、メスでは B10.D2 が重くなっていた。肺重量（図 11、12）では、オス・メスともに B10.BR が他の 3

系統より軽かったのに対し、肺重量体重比では B10.D2 が他の 3 系統より低値を示す傾向にあった。胸腺重量（図 13、14）は、オス・メスともに B10 で他の 3 系統より軽い傾向にあり、またメスの B10.D2 では他の 3 系統より重い傾向にあった。精巢重量（図 15）は、B10.D2 で 8 週齢以降に他の 3 系統より重くなっていた。子宮重量（図 16）は、いずれの週齢においても 4 系統間に一定の差は認められなかった。

体長（図 17、18）は、オス・メスともに B10.D2 が長く、

B10.BR が短かった。尾長（図 17、18）については、オス・メスともに B10.D2、B10.Thy1.1/Nrs、B10.BR、B10 の順に長い傾向にあった。尾率（図 17、18）については、オス・メスともに B10 が他の 3 系統より低値を示したが、他の 3 系統間での差は目立たなかった。

マウスの尾率は亜種を区別する指標になると言われているがその報告は少く<sup>13)</sup>、今後蓄積したデータをもとに亜系間での差を解析してみたい。

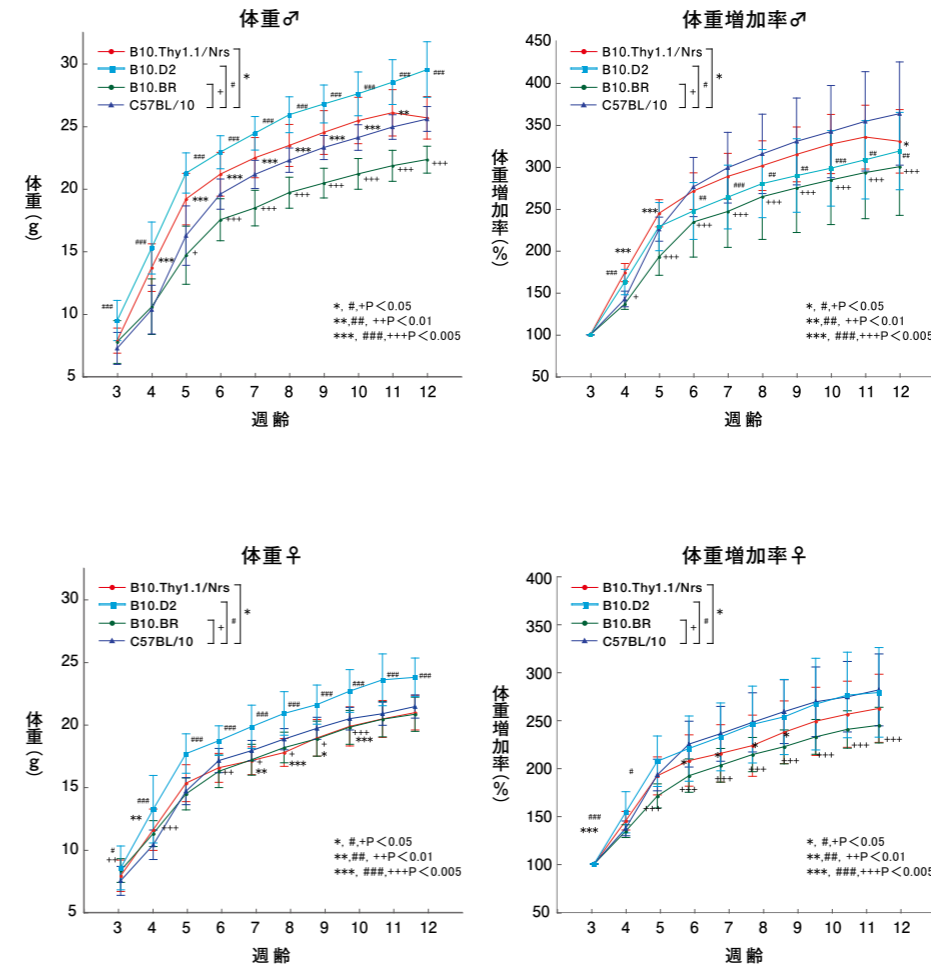


図1: C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrs の体重変化(♂)

図2: C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrs の体重変化(♀)

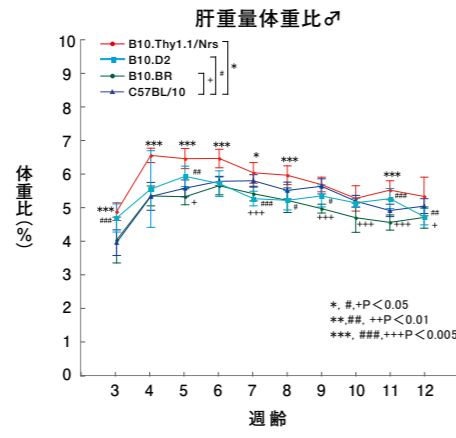
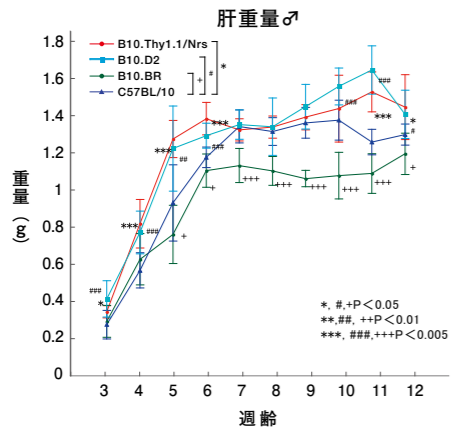


図3:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの肝重量変化(♂)

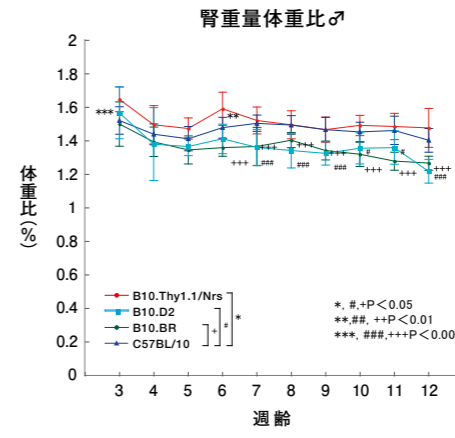
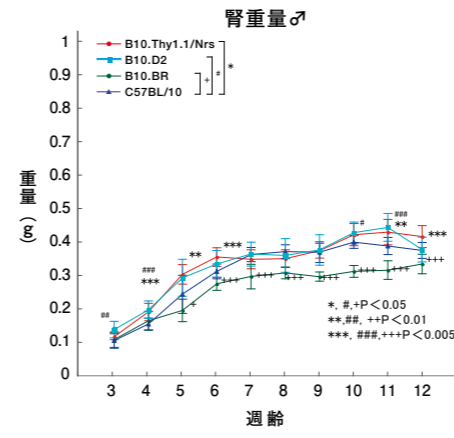


図7:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの腎重量変化(♂)

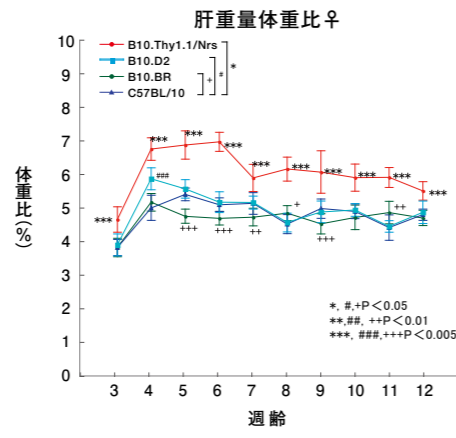
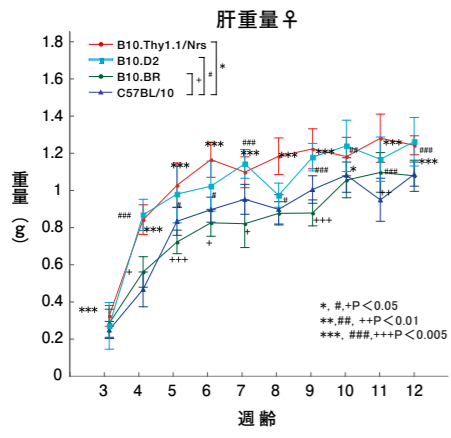


図4:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの肝重量変化(♀)

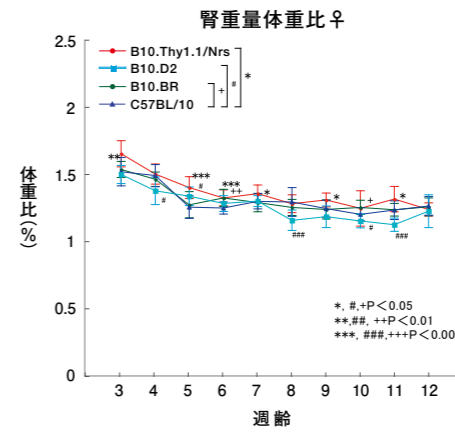
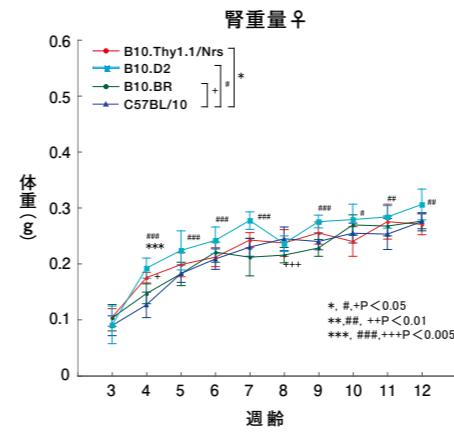


図8:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの腎重量変化(♀)

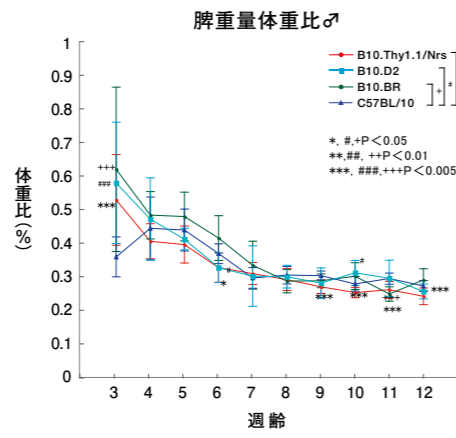
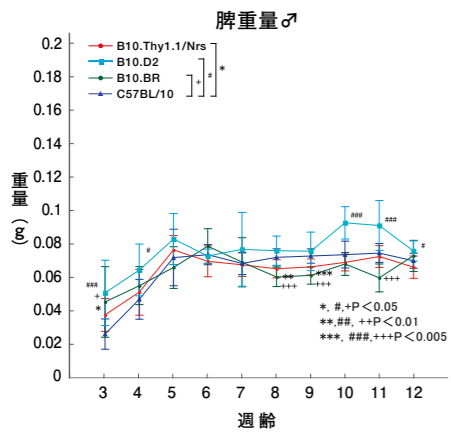


図5:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの脾重量変化(♂)

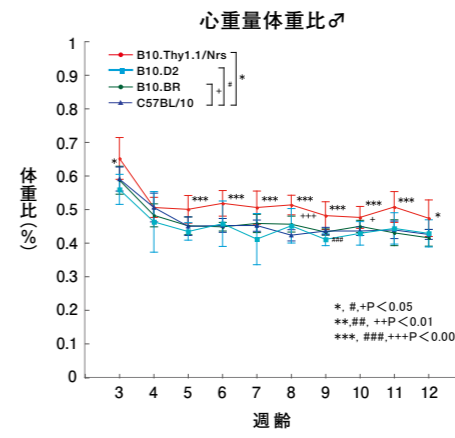
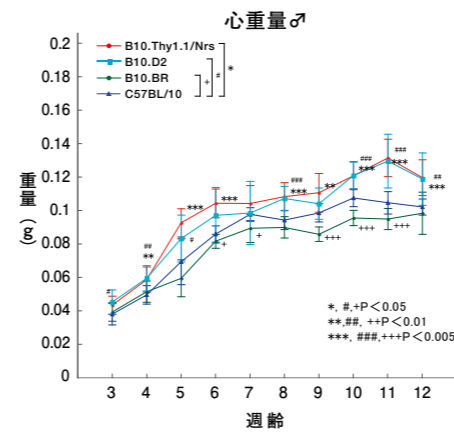


図9:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの心重量変化(♂)

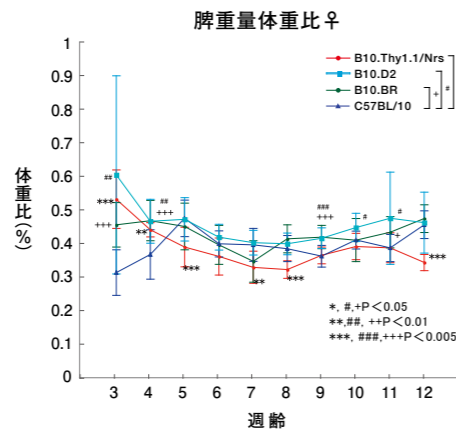
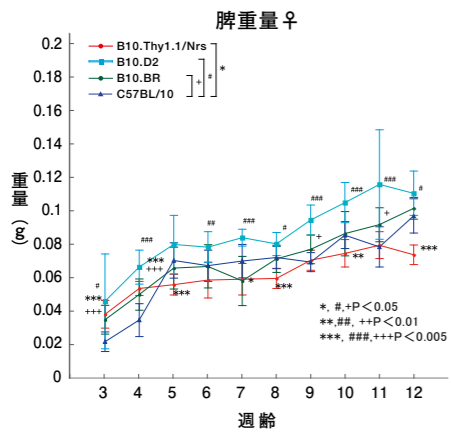


図6:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの脾重量変化(♀)

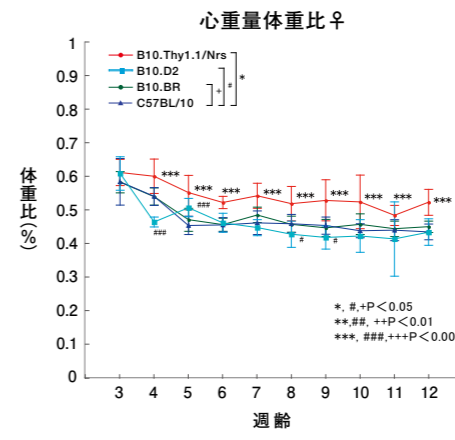
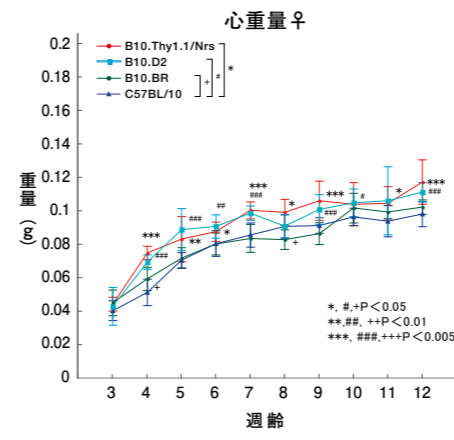


図10:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの心重量変化(♀)

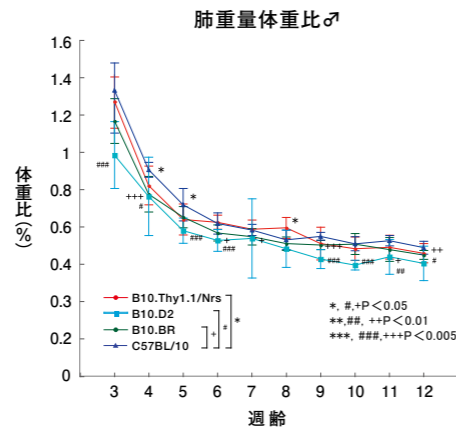
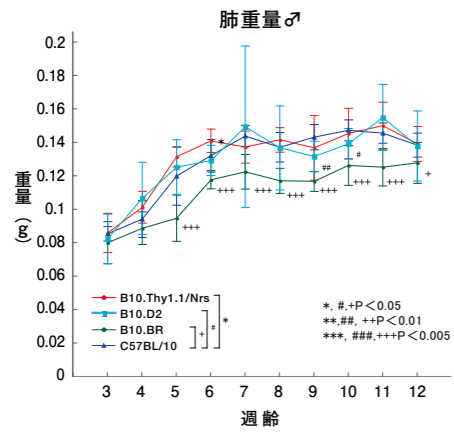


図11:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの肺重量変化(♂)

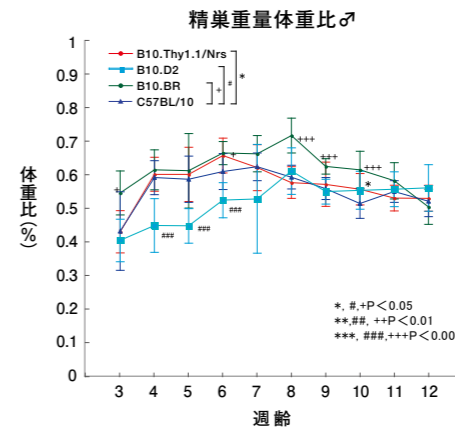
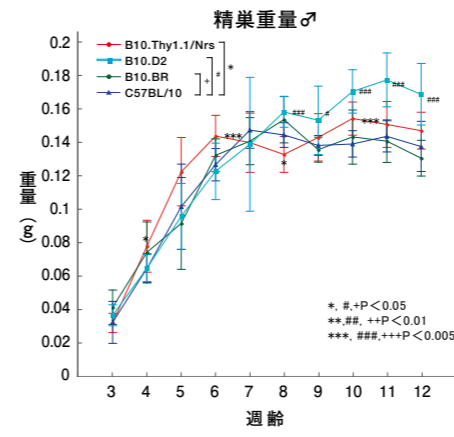


図15:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの精巣重量変化(♂)

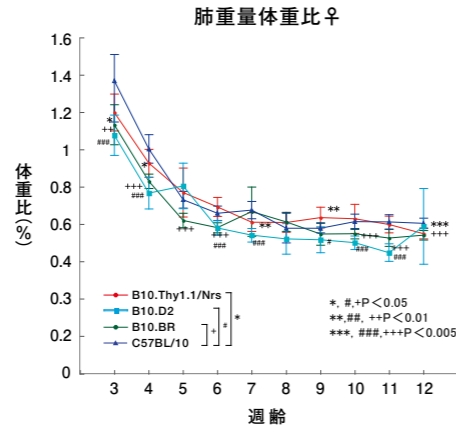
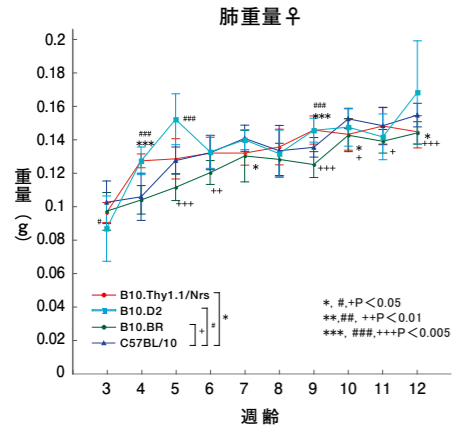


図12:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの肺重量変化(♀)

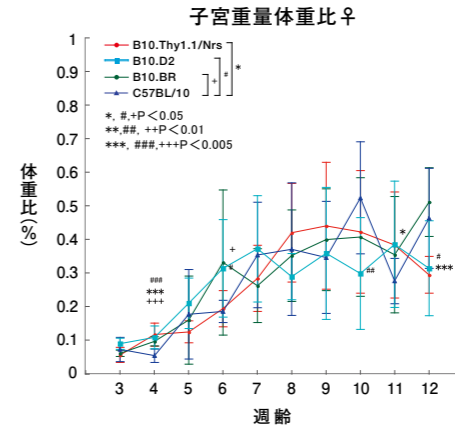
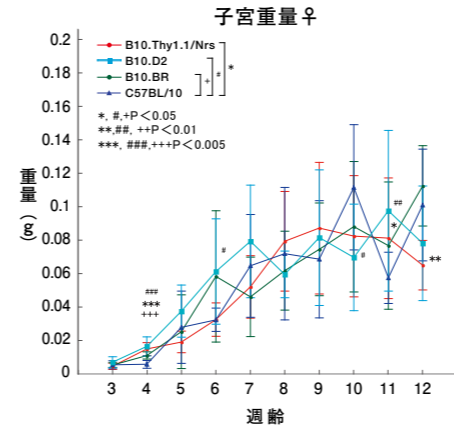


図16:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの子宮重量変化(♀)

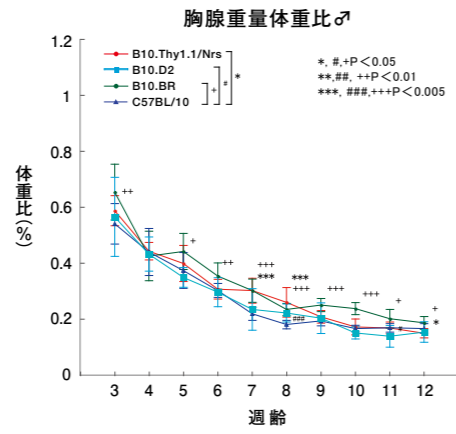
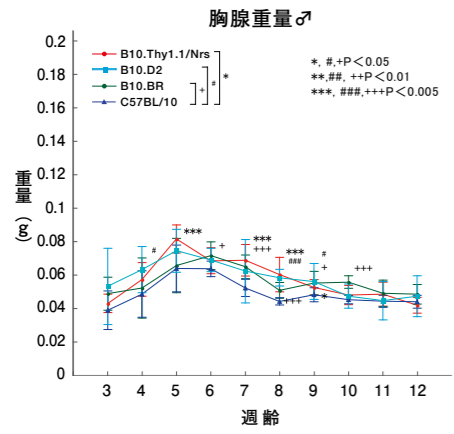


図13:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの胸腺重量変化(♂)

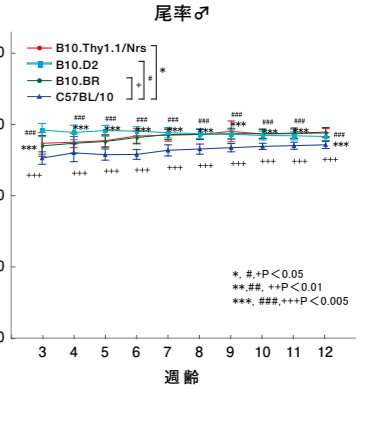
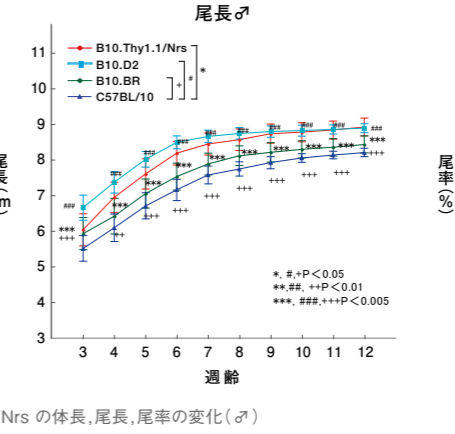
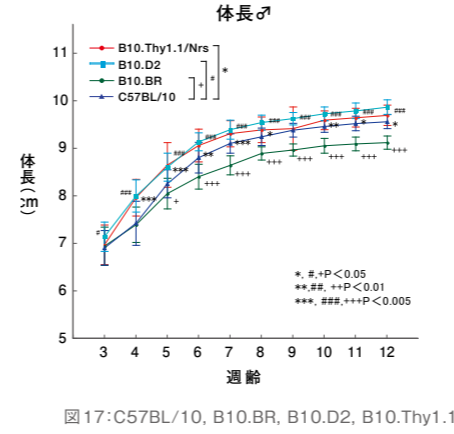


図17:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの体長,尾長,尾率の変化(♂)

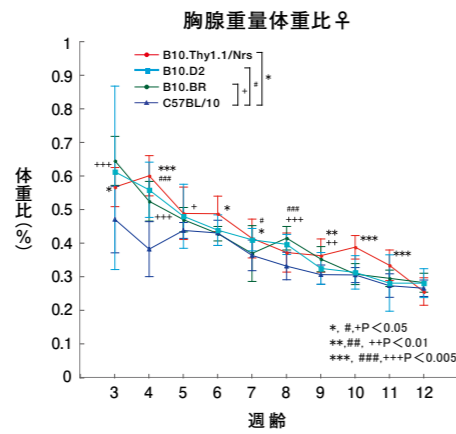
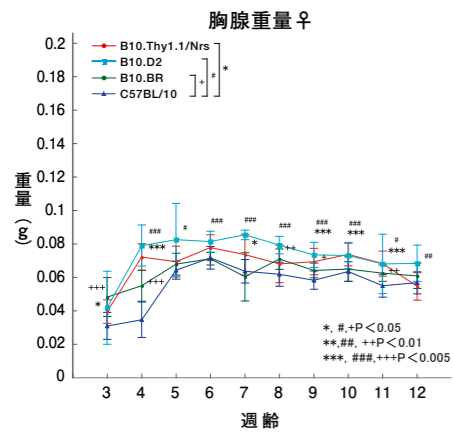


図14:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの胸腺重量変化(♀)

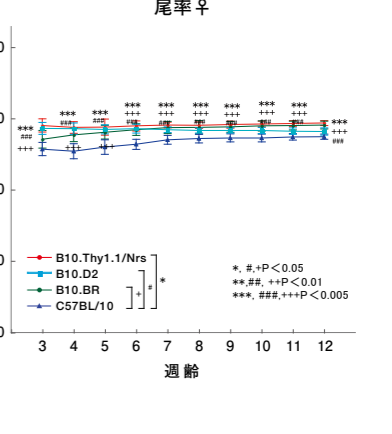
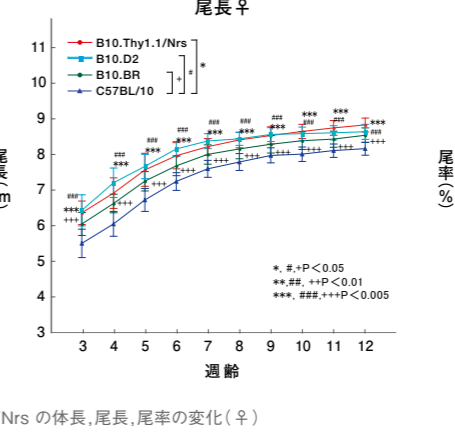
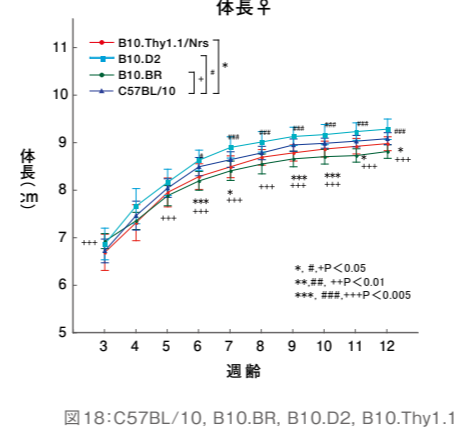


図18:C57BL/10, B10.BR, B10.D2, B10.Thy1.1/Nrsの体長,尾長,尾率の変化(♀)









## 印象記

# 米国・放射線医学物理センター訪問と放射線治療品質管理 および先進技術への挑戦シンポジウム参加報告

重粒子医科学センター  
放射線治療品質管理室  
水野 秀之



陽子線治療センターにて(治療室)

私の所属する放射線治療品質管理室は、2005年6月に放医研重粒子医科学センターに新設された組織です。国内の度重なる放射線治療誤照射事故を契機に、放射線治療の品質管理を専門に担う、放射線治療品質管理士の認定制度が2005年に発足し、放射線治療における品質管理の重要性が改めて認識されるようになりました。そこで放医研では、全国に先駆けて重粒子医科学センター内に独立した組織として放射線治療品質管理室を設置し体制整備を図りました。放射線治療品質管理室では所内の放射線治療に係る品質管理をはじめ、郵送による全国の放射線治療施設の線量調査等に取り組んでいます。2006年度は約100施設の地域がん診療連携拠点病院の治療線量調査を実施し、治療線量の改善に尽力しました。しかし、本調査はまだ校正条件(一番基本的な照射野・深度条件)のみが対象で、様々な放射線治療のバリエーションへの対応は今後の課題です。

一方、米国においては、国立がん研究所(National Cancer Institute: NCI)のファンドにより、放射線医学物理センター(Radiological Physics Center: RPC)の

医学物理士を中心として、長年にわたり治療線量の郵送・訪問調査が行われ放射線治療の品質管理が担保されてきました。今回、放射線治療の品質管理に関するシンポジウムに出席する機会を得て、併せてその中心的役割を担っているRPCを訪問いたしました。本稿ではこれらについて簡単に紹介いたします。

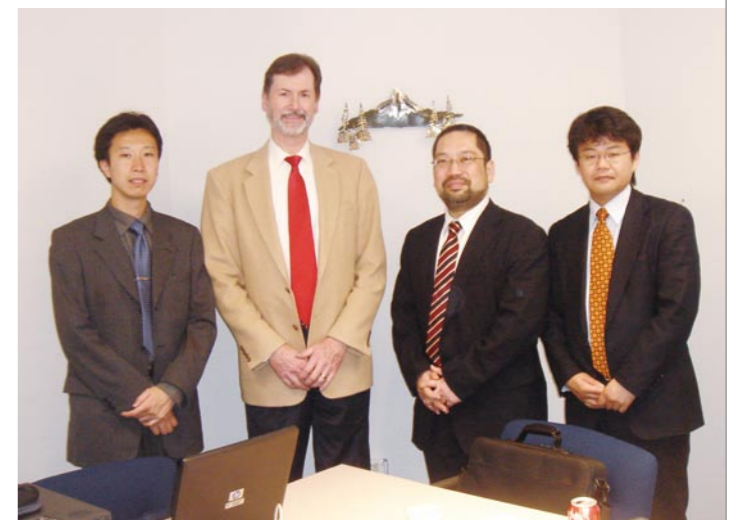
まず2007年2月20～22日に米国テキサス州ダラスにおいて開催された、放射線治療品質管理および先進技術への挑戦シンポジウム(Quality Assurance of Radiation Therapy and The Challenges of Advanced Technologies Symposium、米国放射線腫瘍学会ASTRO、米国医学物理学学会AAPM、米国国立がんセンターNCI主催)に参加しました。放射線治療の品質管理に焦点を絞ったユニークな研究会であり、20年以上前に一度、同様の会議が開催されて以来の集まりでした。イメージガイド下放射線治療(Image Guided Radiation Therapy: IGRT)や強度変調放射線治療(Intensity Modulated Radiation Therapy: IMRT)、定位照射(Stereotactic radio surgery/therapy)、イメージガイド下密封線源放射線治療(Image Guided Brachytherapy: IGBT)等の最先端治療技術の品質管理を中心に、現状・各種既存のガイドラインの紹介、また、ピットフォールの側面に焦点を当てた発表が行われました。医学物理士を中心に、300名以上の参加者があり、会場は立錫の余地もないほどでした。

一つのテーマに対して、4人程度の演者が異なる角度(モダリティーの違い等)から30分ずつ発表後、議論というセッションが3日間続きました。30分という限られた時間のため、概説の観が強かったですが、多業コリメータの品質管理データや、固定具等、細かい内容にも触れており、すぐに参考になる内容もありました。日本の研究会等との最大の違いは議論の時間です。その時間を待っていたかのように、マイクの前に列ができ、活発な議論が交わされました。ほとんどのセッションで、時

間切れで質問者の数を制限する事態になっていました。発表は、全て招待講演でAAPMレポート著者になっているような専門家が、これらレポートの紹介を交えて講演していました。ほとんどのテーマについて、対応するAAPMレポートがすでにあり、米国の医学物理の層の厚さが窺い知れました。最新の治療技術に関するものでまだレポートになっていないものもありましたが、発表の中で、今、準備中で今年発刊予定、というものがいくつもあり、今後の参考になりました。その中で一つ、興味深い報告がありました。やはり発刊準備中というもので、セッション丸ごとその解説に当てていました。これを紹介しますと、放射線治療の品質管理というのは、手間・人手がかかる割にコストが見合わない、施設の理解が得られない等のために、十分になされていない現状がある、そこで限られた人手・時間で治療の品質を維持するために、施設の現状を項目毎に点数化して、どこに労力を注ぐべきかを決定する、というものでした。点数化する作業自身が大変そうでしたが、医学物理士が世界で一番充足されているはずの米国でも品質管理への危惧が高まっていることは意外であり、また、わが国の窮状を鑑みても検討に値するテーマとして興味深いものでした。

本研究会後、ヒューストンへ移動し、テキサスメディカルセンターにあるRPCを訪問・見学しました。RPCは、NCIから財政支援を受け、NCI主導の臨床試験のためのクレデンシャルを行っています。今回は、その中でも、線量の訪問・郵送調査プロジェクトを中心に見学しました。RPCは、医療センターの中にあるのかと思いきや、隣の普通のオフィスビルにあり、わかりにくい場所でした。会議室に通されると、一人1部ずつ、分厚いファイルが渡され、まず驚きます。午後まで、各セッションのチーフが入れ替わり立ち代わり来て、スライドや、ファントム実物を持ってきて説明してくれます。見学者に対する対応の充実度に圧巻されました。しかも各プロジェクトの内容が日本より十年程度以上は進んでいま

す。さまざまなファントムを利用した肺定位や、IMRTの検証までも含めた郵送調査がすでに行われていました。IMRT検証においては、絶対線量のみならず、ファントムにガフクロミックフィルムをはさんだ状態で郵送し、相対線量も含めた検証が行われていました。ここで一定のレベルに達していないと臨床試験に参加できないようです。また、訪問調査も郵送調査と組み合わせられて有機的に行われていました。日本はようやく校正条件のみでの郵送調査が今年度よりスタートしますが、その牽引役を担っている放医研としては、多くの努力が必要であることを痛感しました。午後には、陽子線治療センターの見学も行い、診療カンファレンスにも出席させていただきました。ここで印象的だったのは、医師が中国系・インド系が半数以上を占めていたことです。米国の多民族性を実感すると同時に、日本の閉鎖性も何われました。本出張で得られた知見を活かし、国内の郵送調査の質を向上させ、今後のわが国での放射線治療品質向上に努めていきたいと思えます。



RPCにて左から筆者、Irbottセンター長及び放医研関係者

## 放射能御三家のこと

市川 龍資

今年 2007 年は、放医研、放射線影響学会ができてから半世紀ほどになるそうである。あの頃つまり 1950 年代中頃から 10 年ないし 20 年くらいの間はビキニ環礁における米国の大型水爆実験による第五福竜丸の放射能被災事件やそれにつづくマグロその他の魚類放射能そして空からも降ってくるようになった放射性フォールアウトが社会を大きくゆるがした時代であった。

それゆえ、広い学術領域の学者達が、それぞれの専門分野の学識を生かして放射能問題に取り組んでいた。そしてこの放射能問題の分野で世に知られた学者も大勢いたが、中でも指導的立場の人として注目を浴びていた先生方が三人いて、世に「放射能御三家」と呼ばれるようになった。知恵のある誰かが名付けたのであろうが、どこからでてきたのかよくわからない。おそらくマスコミ関係からでたのではないかと想像される。この放射能御三家にはマスコミの人達がいつも眼をつけていて、何か新しい情報をつかもうと追いかけていたからである。

この放射能御三家と呼ばれた方々は、田島英三(立大)、三宅泰雄(気象研のちに教育大)と松山義夫(東大)の三先生だった。もともとの専門分野も違って、田島先生は物理、三宅先生は化学、松山先生は生物の範囲の出身であったから、それぞれの特長を生かして三者協力してこの放射能問題の対処に大きく貢献した。

田島英三先生は初期の「原子放射線の影響に関する国連科学委員会」の事務局(ニューヨークの国連本部内)で科学秘書を務めておられ、空からの<sup>90</sup>Srの降下率と地上蓄積量と、ミルク中<sup>90</sup>Sr濃度との関係式を考案され、科学委員会報告の1958年報告以降いつも<sup>90</sup>Sr濃度の推移の評価と予測に有効利用されている。大変有益な仕事であった。放医研設立当時から、田島先生に環境衛生研究部長(副所長格とする条件もついていた)になってくれるよう随分働きかけがあったが、ついに実現しなかった。役所から信頼も厚かったから、原子力委員、原子力安全委員を歴任された。

三宅泰雄先生は大気と海洋の放射能の研究に良い業績を挙げておられた方である。日本ではじめて使用済核燃料施設の試験プラントの設立操業を計画したとき、沿岸海域への低レベル放射性廃液の放出の影響評価を行うため「海域放出調査特別委員会」がつくられたとき、先生はこれを「見えざる研究所」と呼んで各分野の研究者の研究協力の推進に力をつくされた功績は大きい。

松山義夫先生は多芸多才な方であり、また抜群の行動力を持っておられた。戦時中は南方の海の毒魚の研究もされ、立派な図鑑が残っている。戦後は水産資源学に転向され、東京湾のマハゼの標識放流を数年間にわたって実施し、その資源量の推定を試みられた仕事も興味深いものであった。アジアの留学生達を多数引受けられて面倒をよくみられた。ご自宅でのパーティで留学生の一人がコリアンダーというスパイスを持ってきたとき、先生は「こりゃなんだあ」と呼んで皆を笑わせておられた。

絵が上手で、外国に行ってもスケッチブックを持参して画いておられた。変わったものとしては、美しい芸術的な魚拓をつくることに巧みで、これを扇子や団扇に表装して外国からのお客にあげて大層喜ばれた。初期の頃の国連科学委員会へ提出する日本のデータの取りまとめを一手に引き受けておられ、委員会の会議でも大いに熱弁を振るって活躍され、余人をもって代え難いと云われていた。

ICHIKAWA RYUSHI (元放医研科学研究官)



## 編集後記

今月号の「放射線科学」では特集として幹細胞を取り上げました。生物学の新たな可能性を切り開く最先端領域です。これに続いて放医研で維持繁殖させているマウスが紹介されていますが、実験動物に関する地道な情報の蓄積が最先端の動物実験を支えています。「印象記」で触れられている放射線治療の品質管理も同様です。重粒子線治療を含めて放射線治療の進歩には目を見張るものがありますが、その効果は「照射すべき部位に、照射すべき線量をきちんと照射する」ことによっけてはじめて達成されます。この意味で品質管理は最先端の治療法を支えていると言えます。

このように、「最先端」と「支える技術」が連携しながら展開している放医研の活動を今後も紹介していければと考えています。

## 次号予告

### 特集 「緊急被ばく医療の教育・訓練 -アジアの現状-

明石 真言 緊急被ばく医療研究センター長  
Khalid Saleem Pakistan  
Chairat Temlaksup Thailand  
立崎 英夫 緊急被ばく医療研究センター  
上田 順市 緊急被ばく医療研究センター

<印象記> 「ビキニ環礁」  
林 光夫 監事

<印象記> 「放医研国際シンポジウム」  
伴 貞幸 企画部

### 〈編集委員会〉

委員長	酒井 一夫		
委員	内堀 幸夫	金澤 光隆	石井 伸昌
	白川 芳幸	小橋 元	立崎 英夫
	高田 真志	菊池 達矢	鈴木 敏和
	玉手 和彦	長谷川純崇	杉森 祐樹
	加藤 博敏	神田 玲子	
事務局	近江谷敏信		

## 放射線科学

第50巻第5号

2007年5月15日発行

### 〈編集・発行〉

独立行政法人 放射線医学総合研究所  
〒263-8555 千葉県稲毛区穴川4-9-1  
電話 043(206)3026 Fax.043(206)4062 Eメール info@nirs.go.jp

(禁無断転載)



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