



JAEA-Review

2019-026

DOI:10.11484/jaea-review-2019-026

**iPS 細胞由来組織細胞における  
放射線依存的突然変異計測系の確立  
(委託研究)**

—平成 30 年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業—

Establishment of Measurement System for Radiation-dependent Mutation  
in Organ Tissue Cells Derived from Human iPS Cells  
(Contract Research)

-FY2018 Center of World Intelligence Project for Nuclear Science/Technology  
and Human Resource Development-

廃炉国際共同研究センター  
東京工業大学

Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science  
Tokyo Institute of Technology

福島研究開発部門  
福島研究開発拠点

Fukushima Research Institute  
Sector of Fukushima Research and Development

January 2020

Japan Atomic Energy Agency

日本原子力研究開発機構

JAEA-Review

本レポートは国立研究開発法人日本原子力研究開発機構が不定期に発行する成果報告書です。  
本レポートの入手並びに著作権利用に関するお問い合わせは、下記あてにお問い合わせ下さい。  
なお、本レポートの全文は日本原子力研究開発機構ホームページ (<https://www.jaea.go.jp>)  
より発信されています。

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構 研究連携成果展開部 研究成果管理課  
〒319-1195 茨城県那珂郡東海村大字白方2番地4  
電話 029-282-6387, Fax 029-282-5920, E-mail:ird-support@jaea.go.jp

This report is issued irregularly by Japan Atomic Energy Agency.  
Inquiries about availability and/or copyright of this report should be addressed to  
Institutional Repository Section,  
Intellectual Resources Management and R&D Collaboration Department,  
Japan Atomic Energy Agency.  
2-4 Shirakata, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 319-1195 Japan  
Tel +81-29-282-6387, Fax +81-29-282-5920, E-mail:ird-support@jaea.go.jp

© Japan Atomic Energy Agency, 2020

iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変異計測系の確立（委託研究）

－ 平成 30 年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業 －

日本原子力研究開発機構  
福島研究開発部門 福島研究開発拠点

廃炉国際共同研究センター

東京工業大学

(2019 年 11 月 13 日受理)

日本原子力研究開発機構（JAEA）廃炉国際共同研究センター（CLADS）では、平成 30 年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業（以下、「本事業」という）を実施している。本事業は、東京電力ホールディングス株式会社福島第一原子力発電所の廃炉等を始めとした原子力分野の課題解決に貢献するため、国内外の英知を結集し、様々な分野の知見や経験を、従前の機関や分野の壁を越えて緊密に融合・連携させた基礎的・基盤的研究及び人材育成を推進することを目的としている。平成 30 年度の新規採択課題から実施主体を文部科学省から JAEA に移行することで、JAEA とアカデミアとの連携を強化し、廃炉に資する中長期的な研究開発・人材育成をより安定的かつ継続的に実施する体制を構築した。

本研究は、研究課題のうち、平成 30 年度「iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変異計測系の確立」について取りまとめたものである。

これまで組織間における突然変異率を検討する際は、異なる個人間の細胞株を用い、それぞれの組織の突然変異発生率を評価していたために統一的な評価を下すのが困難であったが、本研究では、近年の iPS 細胞を始めとした幹細胞分野の生物学の技術革新により単一の細胞から組織細胞を分化誘導することが可能になったため、これらの技術を統合し、東京工業大学の研究室で樹立した iPS 細胞を用いて神経系、皮膚、血液系、循環器系の組織細胞を作製し、放射線照射後の各組織の突然変異率を計測して、組織による突然変異の違いを数理モデルの構築により評価する実験系の確立を目指す。

---

本報告書は、日本原子力研究開発機構の英知事業における委託業務として、東京工業大学が実施した成果に関するものである。

廃炉国際共同研究センター：〒979-1151 福島県双葉郡富岡町大字本岡字王塚 790-1

Establishment of Measurement System for Radiation-dependent Mutation in Organ Tissue Cells Derived from  
Human iPS Cells (Contract Research)  
– FY2018 Center of World Intelligence Project for Nuclear Science/Technology and Human Resource  
Development –

Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science

Tokyo Institute of Technology

Fukushima Research Institute, Sector of Fukushima Research and Development

Japan Atomic Energy Agency

Tomioka-machi, Futaba-gun, Fukushima-ken

(Received November 13, 2019)

The Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science (CLADS), Japan Atomic Energy Agency (JAEA), had been conducting the Center of World Intelligence Project for Nuclear Science/Technology and Human Resource Development (hereafter referred to “the Project”) in FY2018. The Project aims to contribute to solving problems in nuclear energy field represented by the decommissioning of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Station, Tokyo Electric Power Company Holdings, Inc. For this purpose, intelligence was collected from all over the world, and basic research and human resource development were promoted by closely integrating/collaborating knowledge and experiences in various fields beyond the barrier of conventional organizations and research fields. The sponsor of the Project was moved from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to JAEA since the newly adopted proposals in FY2018. On this occasion, JAEA constructed a new research system where JAEA-academia collaboration is reinforced and medium-to-long term research/development and human resource development contributing to the decommissioning are stably and consecutively implemented.

Among the adopted proposals in FY2018, this report summarizes the research results of the “Establishment of Measurement System for Radiation-dependent Mutation in Organ Tissue Cells Derived from Human iPS Cells”.

The purpose of the present study is to establish an experimental system to evaluate the difference in radiation-dependent mutation among tissues. In previous studies, unified evaluation of the difference in radiation-dependent mutation among tissues has been difficult because the mutation rate among tissues had been evaluated using cell lines taken from different individuals. Recent biotechnological innovation in stem cell field represented by iPS cells has become enable to induce differentiation of tissue cells from a single cell. In the present study, Tokyo Institute of Technology produce tissue cells in nervous, dermal, blood and circulatory systems by unifying these new technologies. Using these tissue cells, we measure the mutation rate for each tissue after the radiation exposure, and aim to establish an experimental system to evaluate the difference in mutation depending on tissues by constructing a mathematical model.

Keywords: iPS Cells, Organ Tissue Cells, Mutation, Mathematical Model, Ionizing Radiation

---

This work was performed by Tokyo Institute of Technology under contract with Japan Atomic Energy Agency.

目次

1. 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業の概要 .....	1
2. 平成 30 年度採択課題 .....	2
付録 成果報告書 .....	5

Contents

1. Outline of Center of World Intelligence Project for Nuclear Science/Technology and Human Resource Development .....	1
2. Accepted Proposal in FY2018 .....	2
Appendix Result Report .....	5

This is a blank page.

## 1. 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業の概要

文部科学省では、「東京電力(株)福島第一原子力発電所の廃止措置等研究開発の加速プラン(平成26年6月文部科学省)」等を踏まえ、平成27年度から「英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業」(以下、「本事業」という。)を立ち上げ、「戦略的原子力共同研究プログラム」、「廃炉加速化研究プログラム」及び「廃止措置研究・人材育成等強化プログラム」を推進している。

具体的には、国内外の英知を結集し、国内の原子力分野のみならず様々な分野の知見や経験を、機関や分野の壁を越え、国際共同研究も含めて緊密に融合・連携させることにより、原子力の課題解決に資する基礎的・基盤的研究や産学が連携した人材育成の取組を推進している。

一方、日本原子力研究開発機構(以下、「JAEA」という。)では、平成27年に廃炉国際共同研究センター(以下、「CLADS」という。)を組織し、「東京電力ホールディングス(株)福島第一原子力発電所の廃止措置等に向けた中長期ロードマップ」等を踏まえ、東京電力ホールディングス(株)福島第一原子力発電所廃炉(以下、「1F廃炉」という。)に係る研究開発を進めている。

また、平成29年4月にCLADSの中核拠点である「国際共同研究棟」の運用を開始したことを踏まえ、今後はCLADSを中核に、廃炉の現場ニーズを踏まえた国内外の大学、研究機関等との基礎的・基盤的な研究開発及び人材育成の取組を推進することにより、廃炉研究拠点の形成を目指すことが期待されている。

このため、本事業では平成30年度の新規採択課題から実施主体を文部科学省からJAEAに移行することで、JAEAとアカデミアとの連携を強化し、廃炉に資する中長期的な研究開発・人材育成をより安定的かつ継続的に実施する体制を構築することとし、従来のプログラムを、①共通基盤型原子力研究プログラム、②課題解決型廃炉研究プログラム、③国際協力型廃炉研究プログラム、④研究人材育成型廃炉研究プログラム(平成31年度より新設)に再編した。

2. 平成 30 年度採択課題

平成 30 年度は「共通基盤型原子力研究プログラム」、「課題解決型廃炉研究プログラム」、「国際協力型廃炉研究プログラム」において、研究課題の採択を決定した。公募の概要は以下のとおりである。

- ・ 公募期間：平成 30 年 5 月 22 日（火）～6 月 22 日（金）  
平成 30 年 5 月 22 日（火）～7 月 12 日（木）※日英共同研究のみ
- ・ 提案数：  
共通基盤型原子力研究プログラム 49 課題（若手研究 14 課題、一般研究 35 課題）  
課題解決型廃炉研究プログラム 28 課題  
国際協力型廃炉研究プログラム 5 課題

これらの提案について、外部有識者から構成される審査委員会において、書面審査及び面接審査、日英共同研究については二国間の合同審査を実施し、採択候補課題を選定し、その後、PD（プログラムディレクター）・PO（プログラムオフィサー）会議での審議を経て、表 2-1 に掲げる 19 の採択課題を決定した。

表 2-1 平成 30 年度採択課題一覧（1/3）

共通基盤型原子力研究プログラム

【若手研究】

課題名	研究代表者	所属機関
被災地探査や原子力発電所建屋内情報収集のための半自律ロボットを用いたセマンティックサーベイマップ生成システムの開発	河野 仁	東京工芸大学
汚染土壌の減容を目的とした重液分離による放射性微粒子回収法の高度化	山崎 信哉	筑波大学
ラドンを代表としたアルファ核種の吸入による内部被ばくの横断的生体影響評価	片岡 隆浩	岡山大学
炉心溶融物の粘性及び表面張力同時測定技術の開発	大石 佑治	大阪大学
iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変異計測系の確立	島田 幹男	東京工業大学

表 2-1 平成 30 年度採択課題一覧 (2/3)

課題名	研究代表者	所属機関
レーザー共鳴イオン化を用いた同位体存在度の低いストロンチウム 90 の迅速分析技術開発	岩田 圭弘	東京大学

【一般研究】

課題名	研究代表者	所属機関
放射性核種の長期安定化を指向した使用済みゼオライト焼結固化技術の開発	新井 剛	芝浦工業大学
燃料デブリ取り出しを容易にするゲル状充填材の開発	牟田 浩明	大阪大学
レーザー蛍光法を用いた燃料デブリ変質相の同定	斉藤 拓巳	東京大学
過酷炉心放射線環境における線量測定装置の開発	岡本 保	木更津工業高等専門学校
レーザー加工により発生する微粒子の解析と核種同定手法の開発	長谷川 秀一	東京大学

課題解決型廃炉研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
合金相を含む燃料デブリの安定性評価のための基盤研究	桐島 陽	東北大学
ガンマ線画像スペクトル分光法による高放射線場環境の画像化による定量的放射能分布解析法	谷森 達	京都大学
燃料デブリ取出し時における放射性核種飛散防止技術の開発	鈴木 俊一	東京大学
アルファダストの検出を目指した超高位置分解能イメージング装置の開発	黒澤 俊介	東北大学

表 2-1 平成 30 年度採択課題一覧 (3/3)

課題名	研究代表者	所属機関
ナノ粒子を用いた透明遮へい材の開発研究	渡邊 隆行	九州大学
先端計測技術の融合で実現する高耐放射線燃料デブリセンサーの研究開発	萩原 雅之	大学共同利用機関法人高エネルギー加速器研究機構

国際協力型廃炉研究プログラム (日英共同研究)

課題名	研究代表者	所属機関
放射性微粒子の基礎物性解明による廃炉作業リスク低減への貢献	五十嵐 康人	茨城大学
放射線耐性の高い薄型 SiC 中性子検出器の開発	三澤 毅	京都大学

国際協力型廃炉研究プログラム (日仏共同研究)

課題名	研究代表者	所属機関
採択なし	—	—

本報告書は上記のうち、共通基盤型原子力研究プログラム【若手研究】「iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変異計測系の確立」について記したものである。

研究成果を取りまとめた成果報告書を付録として添付する。

付録  
成果報告書

This is a blank page.

平成 30 年度

日本原子力研究開発機構

英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業

iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的  
突然変異計測系の確立  
(契約番号 30I108)

成果報告書

平成 31 年 3 月

国立大学法人東京工業大学

本報告書は、国立研究開発法人日本原子力研究開発機構の「英知を結集した原子力技術・人材育成推進事業」による委託業務として、東京工業大学が実施した平成 30 年度「iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変異計測系の確立」の成果を取りまとめたものです。

目次

	頁
概略 .....	v
1. はじめに .....	1. 1-1
1.1. 研究背景 .....	1. 1-1
2. 業務計画 .....	2. 1-1
2.1. 全体計画 .....	2. 1-1
2.2. 平成 30 年度の成果の目標及び業務の実施方法 .....	2. 2-1
3. 平成 30 年度の実施内容及び成果 .....	3. 1-1
3.1. iPS 細胞から神経系、皮膚系、心筋細胞および血液細胞の作製 .....	3. 1-1
3.1.1. 各組織細胞樹立のための条件検討 .....	3. 1-1
3.1.2. 神経細胞樹立のための条件検討 .....	3. 1-3
3.1.3. 皮膚細胞樹立のための条件検討 .....	3. 1-5
3.1.4. 血液細胞樹立のための条件検討 .....	3. 1-7
3.1.5. 心筋細胞樹立のための条件検討 .....	3. 1-9
3.2. 各種細胞における各種放射線照射後の突然変異率測定 .....	3. 2-1
3.2.1. 実験条件の検討と試薬の準備 .....	3. 2-1
3.2.1.1. pSP189 DNA ベクターの調整 .....	3. 2-2
3.2.1.2. MBM7070 コンピテントセルの調整 .....	3. 2-3
3.2.1.3. 大腸菌用遺伝子導入装置(エレクトロポレーター)の準備 .....	3. 2-4
3.2.1.4. 哺乳細胞用遺伝子導入試薬の準備 .....	3. 2-5
3.2.2. 突然変異計測の実験条件検討(東京工業大学 再委託先:量研機構)....	3. 2-6
3.2.3. 放射線照射のための環境整備 .....	3. 2-8
3.2.3.1. 紫外線照射の準備 .....	3. 2-9
3.2.3.2. ガンマ線照射の準備 .....	3. 2-10
3.2.3.3. 中性子線照射の準備 .....	3. 2-11
3.3. 突然変異した塩基配列の傾向を知る数理モデルの構築(連携先:原子力機構) .	3. 3-1
3.3.1. 突然変異計測結果のデータ解析手法の検討 .....	3. 3-1

3.3.2.	突然変異計測結果の演習用データによる解析例 .....	3.3-2
3.3.3.	突然変異計測結果の解析例によるデータ解析手法の比較検討.....	3.3-9
3.4.	研究推進 .....	3.4-1
4.	結言 .....	4-1

表一覧

	頁
表 1 放射線による DNA への影響 .....	1. 1-1
表 2 演習用データ（トレーニングデータ） .....	3. 3-2
表 3 演習用データ（テストデータ） .....	3. 3-3
表 4 演習用データによるニューラルネットワークの予測解析の結果例 .....	3. 3-7
表 5 演習用データによるサポートベクターマシンの予測解析の結果例 .....	3. 3-8

図一覧

	頁
図 1 実験計画のフローチャート .....	vii
図 2 本事業の全体計画 .....	2. 1-1
図 3 本事業の研究項目 .....	2. 2-1
図 4 iPS 細胞の明視野顕微鏡像 .....	3. 1-2
図 5 iPS 細胞から樹立した神経幹細胞の蛍光顕微鏡像 .....	3. 1-4
図 6 iPS 細胞から樹立した皮膚角質細胞（ケラチノサイト）の蛍光顕微鏡像 .....	3. 1-6
図 7 iPS 細胞から樹立した血液細胞の蛍光顕微鏡像 .....	3. 1-8
図 8 iPS 細胞から樹立した心筋細胞の蛍光顕微鏡像 .....	3. 1-9
図 9 pSP189DNA ベクターマップ .....	3. 2-2
図 10 コンピテントセルの調製 .....	3. 2-3
図 11 大腸菌用遺伝子導入エレクトロポレーター .....	3. 2-4
図 12 哺乳類遺伝子導入の実験法 .....	3. 2-5
図 13 突然変異計測実験法 .....	3. 2-7
図 14 紫外線照射設備と紫外線検出器 .....	3. 2-9
図 15 コバルト 60 ガンマ線照射施設 .....	3. 2-10
図 16 ペレトロン加速器 .....	3. 2-11
図 17 演習用データによるヒストグラムの作成例 .....	3. 3-4
図 18 演習用データによる主成分分析のデータ解析結果例 .....	3. 3-5
図 19 演習用データによる自己組織化マップのデータ解析結果例 .....	3. 3-6
図 20 放射線作用の時間経過 .....	4-1

略語一覧

DNA	: DeoxyriboNucleic Acid	(デオキシリボ核酸)
iPS 細胞	: Induced Pluripotent Stem Cells	(人工多能性幹細胞)
ICRP	: International Commission on Radiation Protection	(国際放射線防護委員会)
ES 細胞	: Embryonic Stem Cells	(胚性幹細胞)
mGS 細胞	: Multipotent Germline Cells	(多能性生殖幹細胞)
PCS 細胞	: Pluripotent Stem Cells	(多能性幹細胞)
mRNA	: messenger RiboNucleic Acid	(メッセンジャーRNA)

## 概略

福島原発事故以来、我が国における放射線の生体影響に関する社会的関心は増加傾向にある。特に放射線による突然変異の発生および発がんの関係を研究することは廃炉措置作業者に対するがん化リスクの評価と放射線防護の立場からも重要である。放射線が生体に与える影響は細胞レベルではゲノムDNAに対する損傷が最も大きい。放射線によって生じるDNA損傷は塩基損傷、DNA架橋、一本鎖切断、二本鎖切断など幅広く、損傷が放置されると突然変異や細胞死の原因となる。生物のDNA損傷に対する防御機構としてDNA修復機構が存在するが、まれに完全に修復されずに修復エラーが生じる場合がある。そういった場合、ゲノムDNAに突然変異として残存し、染色体不安定性や発がんの原因となる。細胞一つ一つのDNA修復頻度や活性は年齢や臓器・組織によって異なるが、その要因の一つとして細胞分裂活性があげられる。例えば細胞分裂が盛んな組織細胞の例として皮膚細胞や血液細胞および腸管細胞がある。これらは常に外環境に接しており、消化するために様々な食物に接しているため、細胞自体の新陳代謝が活発になっているために細胞分裂活性が高い。逆に神経細胞は近年になってようやく成人の脳神経組織に神経幹細胞が存在しており、わずかに細胞分裂をしている可能性が報告されたが、疾患や事故によって神経組織が傷害を受けた場合、修復のために細胞分裂を行うことはないと考えられている。また、同様に心筋細胞も成人ではほとんど細胞分裂を行わない組織であると考えられている。

細胞分裂が活発な皮膚や血液と細胞分裂をあまりしない神経細胞や心筋細胞を比較した際、DNA修復がどのように制御されているか、その修復エラーがどの程度発生しているかは突然変異の発生頻度、さらには発がんリスクを評価する上で、重要な要素となってくる。特に放射線に対する生体反応は「ベルゴニー・トリボンドーの法則」より盛んに細胞分裂する細胞ほど感受性が高いとされている。細胞分裂が盛んな細胞とは個体レベルでは幹細胞が該当する。受精卵から細胞卵割を経て個体発生が進行する際、外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉分化後、皮膚、神経などそれぞれの組織幹細胞へと分化する。

これまでマウスなどのモデル生物を用いて臓器間での突然変異頻度の比較の報告やヒトでは異なる個人間の組織細胞を用いての突然変異の比較の報告はあったがヒトの同じ個体由来の組織細胞における突然変異頻度の比較はなかった。そこで我々は、ヒト新生児皮膚線維芽細胞からiPS細胞を樹立し、それを用いて神経、皮膚、心筋、血液細胞を分化誘導し、それらの組織幹細胞から突然変異頻度の活性を計測する実験系の確立を本研究事業の目的とした。

本事業の研究計画は突然変異頻度の活性測定系の確立であるが、本事業達成のために研究計画を大きく3つの段階に分けることができる。

1つ目がiPS細胞から神経、皮膚、心筋、血液細胞の分化誘導である。これら4つの組織細胞を選択した狙いは放射線に対する感受性の違いである。皮膚、血液細胞は放射線に対する感受性やがん化のリスクが高い。一方で神経、心筋細胞は放射線感受性とがん化リスクが比較的低いことが示唆されている。これらの原因として上述した細胞分裂活性の違いが考えられるが実際に組織細胞として突然変異頻度を比較検討した報告は少ないことが本事業で実施する理由である。

2 つ目が突然変異測定系の確立である。突然変異は放射線等により DNA に生じた傷が修復されずに残存することが原因と考えられる。本来は細胞内のゲノム DNA そのものを直接次世代シーケンサーで読み取るのが理想であると考えられるが、コストと所用時間との関係から現実的ではない。そこで溶液状の 5kbp (塩基対) の DNA ベクターに放射線を照射し、損傷を生じさせたのち、この DNA ベクターを細胞に遺伝子導入することにより損傷を修復させる手法を選択した。DNA 損傷を修復する際、細胞の種類によって DNA 修復活性が異なることが予想されるために不完全な修復から突然変異が生じると考えられる。DNA ベクターに生じた突然変異はこのままでは計測することが出来ないので一旦、細胞から抽出し、再度大腸菌に遺伝子導入し、X-Gal の青白コロニーセクション法により突然変異の頻度を計測する。

3 つ目のステップは組織細胞による突然変異の頻度の結果を機械学習法と数理モデルにより解析することである。突然変異は A→G、C→G などの点突然変異に加えて欠失、付加など様々な種類が想定される。そこで、単純な棒グラフのみで結果を表現するだけでなく、得られた結果を視覚的に読み取りやすいように表現するとともに、新たな解釈を加えて結果を再考する。

本事業計画に先駆けて研究代表者（東京工業大学 島田所属）の研究室において理化学研究所バイオリソース研究センターより入手したヒト新生児皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立しており、本事業ではその iPS 細胞を主に使用することとした。また、iPS 細胞から神経幹/前駆細胞および皮膚系細胞であるケラチノサイトも分化誘導済みである。今年度はさらに iPS 細胞から心筋細胞と血液細胞樹立のための準備を実施するほか、細胞に照射するための紫外線、 $\gamma$ 線、中性子線放射線設備の準備のほか、突然変異測定計のための試薬、大腸菌、DNA ベクター、遺伝子導入用エレクトロポレーション装置の準備を実施した。また数理モデル構築のための情報および資料の収集を実施した。

心筋、血液細胞樹立のために BMB4、レチノイン酸といった分化誘導因子を準備し、適宜、iPS 細胞にそれらの因子と適当な細胞培養用培地を加えて培養し、培養時間、温度、因子の濃度などの検討を実施した。

紫外線、ガンマ線、中性子線照射設備の調整を行った。紫外線照射装置は紫外線殺菌灯、木製ラックなどを準備し自作製作した。ガンマ線はコバルト 60 を線源としたガンマ線照射施設が研究代表者所属の東京工業大学に設置されているためにそれらを使用することとした。また、中性子線は同じく研究代表者所属の東京工業大学にペレットロン加速器による中性子線発生装置が設置されているためにそれらを使用することとした。

突然変異計測系のために哺乳類用遺伝子導入試薬、大腸菌用遺伝子導入装置の購入、大腸菌の調整、DNA ベクターの調整、大腸菌培養試薬および DNA ベクター抽出試薬を準備し、ヒト大腸癌細胞 HCT116、ヒト骨肉腫細胞 U2OS、iPS 細胞を用いて遺伝子導入条件の調整を行った。

数理モデル、機械学習による実験データ解析のためにラップトップ型 PC を購入し、文献、書籍等の資料収集を実施した。

また、平成 30 年度は東京工業大学科学技術創成研究院先導原子力研究所と日本原子力開発機構人形峠環境技術センターとで計 2 回の研究打ち合わせを実施し、研究計画の確認と進捗状況の報告を行った。

次年度は各種組織細胞の樹立条件を検討するとともに得られた組織幹細胞を用いて突然変異計測実験を実施する。また、機械学習によるデータ解析と数理モデル構築のための方法を探索する。

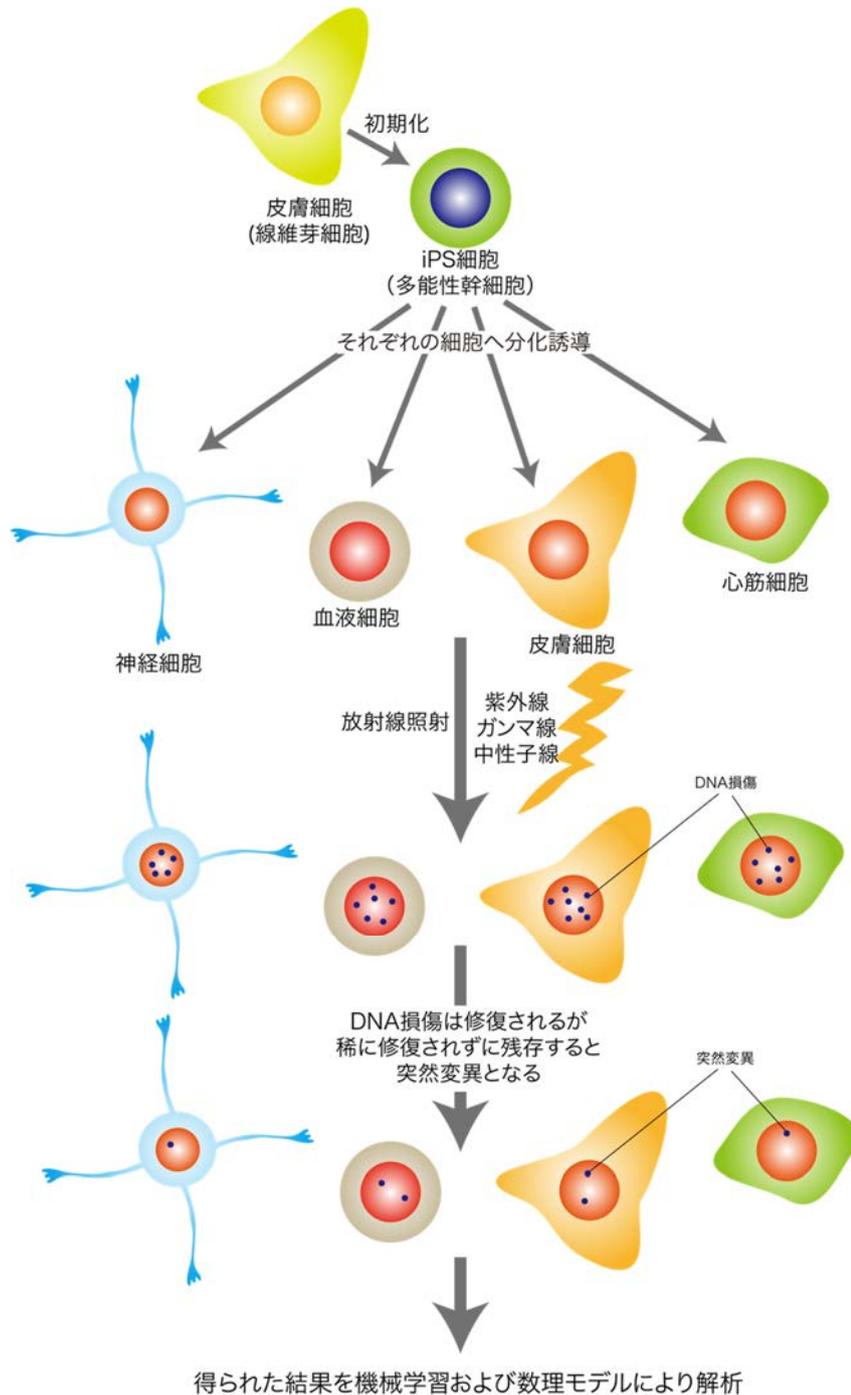


図 1 実験計画のフローチャート

ヒト新生児由来皮膚線維芽細胞から樹立した iPS 細胞を用いて神経、皮膚、血液、心筋細胞へと分化誘導する。紫外線、ガンマ線、中性子線を照射した際のこれらの細胞の突然変異頻度および突然変異の種類を解析する。得られた結果を機械学習および数理モデルにより解析する。

## 1. はじめに

### 1.1. 研究背景

福島原発事故以降、我が国における放射線の生体影響の社会的関心は増加する傾向にあり、特に放射線照射による突然変異の発生は廃炉措置作業員におけるがん化リスクの考察と放射線防護の立場からも重要である。

放射線の生体影響は細胞内 DNA に対する損傷が最も深刻であると考えられている。表 1 に記したのは放射線線量 1Gy に対する DNA 損傷や細胞影響を定量化したものである。物理的過程として 1Gy 照射に対して 1 細胞あたり細胞核内で 100000 個の電離、DNA 分子内で 2000 個の電離と励起を起こしていると考えられている。これら物理的な損傷の見積もりに対して DNA 分子自体が損傷を受けている量は DNA 一本鎖切断と塩基損傷が 1000 個前後、DNA 二本鎖切断が 40 個ほどと見積もられている。そしてこれらの DNA 損傷の結果として細胞に生じる影響は 1 細胞あたり 20-80%の細胞死、1 個以下の染色体異常、10 万分の 1 前後の確率での突然変異である。

<b>●初期損傷（物理的過程）</b>		<b>1 細胞あたり</b>
細胞核内の電離		～100,000
DNA分子内での電離数		～2,000
DNA分子内での励起数		～2,000
<b>●DNA分子に対する損傷（生化学反応過程）</b>		<b>1 細胞あたり</b>
DNA一本鎖切断		1,000
塩基損傷		950
DNA二本鎖切断		40
<b>●細胞に対する効果</b>		<b>1 細胞あたり</b>
細胞致死		0.2～0.8
染色体異常		～1
突然変異（hprt mutation）		～10 <sup>-5</sup>

表 1 放射線による DNA への影響

X 線、ガンマ線 1Gy 照射時の細胞への影響を「初期損傷」、「DNA 分子に対する損傷」、「細胞に対する効果」に分類してそれぞれの影響を定量化した結果。

近年は放射線の医療応用も盛んであり、様々な組織のがんに対して最も適当といえる放射線種が用いられ放射線治療に使用されている。特に先端医療として注目されている量子科学技術研究開発機構（量研機構）放射線医学総合研究所（千葉）の重粒子線照射装置は炭素線など high linear energy transfer（高 LET）放射線を照射することが可能でがん治療に関して著しい成功を治めつつある。

重粒子線は一定の飛程後に高いエネルギー付与を付近の物質に与えるブラッグピークという現象が知られており、ブラッグピークをちょうどがん組織に照射するよう計算することに

より効率的な効果を得ることができる。しかし、重粒子線照射装置は大型の加速器を必要とするために現段階では使用できる施設は限定されている。一方でX線やガンマ線を用いた放射線治療はできるだけ患部に照射するためにガンマナイフのような多方向から弱い放射線を照射し、患部にエネルギーが集中するような工夫がされているが、少量の放射線が正常組織に被曝することは避けることができない。それら低線量放射線が組織に与える影響、突然変異などの効果は不明な点が多い。本事業では廃炉措置における作業員への影響に加えて、医療被曝における影響の解明にも寄与することが期待される。

本事業はこれらの背景を踏まえて、iPS細胞より樹立した組織細胞を用いることによってそれぞれの組織における突然変異率を測定する実験系を確立することを目的とする。これまで組織の放射線影響を調べる際は主にモデル動物としてマウスを使用し、全身照射したマウスから各種臓器を摘出し得られた細胞内ゲノムDNAからそれらの影響を解析することが研究方法の1つであった。しかし、同じ哺乳類といえどもヒトとマウスでは細かな分子制御経路は異なっていることが最近の知見により明らかになっており、マウスで得られたデータをそのままヒトに外挿することはリスクが高いと考えられる。ヒトの場合正常な細胞は通常、体への負担が少ない、皮膚細胞および血液細胞に限定されているために採取が難しい正常な内臓系細胞の解析は困難であった。しかし、近年の再生医学の発展により健常者から採取した血液細胞や皮膚細胞から人工多能性幹(iPS)細胞を樹立することが可能になり、それらから様々な臓器へと分化誘導することが可能になった。このため、本事業では発生・再生医学分野のiPS細胞技術と突然変異測定系の技術を統合し、我々の研究室で樹立したiPS細胞を用いて神経系、皮膚、血液系、循環器系の組織細胞を作製し、放射線照射後の各組織の突然変異率を計測して、組織ごとの突然変異の違いを数理モデルの構築により評価する実験系の確立を目指す。本事業によりこれまで困難であった放射線による異なる組織間の突然変異率を比較することが可能になり、がん化リスクを評価することを目標とする。

2. 業務計画  
2.1. 全体計画

本業務の全体計画図を図2に示す。

実施項目	平成30年度	平成31年度	平成32年度
(1) iPS細胞から神経系、皮膚系、心筋細胞および血液細胞の作製 (東京工業大学)		神経細胞の樹立と確認	神経細胞の培養維持
		皮膚細胞の樹立と確認	皮膚細胞の培養維持
		血液細胞の樹立法の確立と確認	血液細胞の培養維持
		心筋細胞の樹立法の確立と確認	心筋細胞の培養維持
(2-1) 各種細胞における各種放射線照射後の突然変率の測定 (東京工業大学および放射線医学総合研究所)		突然変異測定法の確立	
	各種放射線照射の準備		
		各組織細胞および各種放射線種を用いて突然変異の測定	
(2-2) 突然変異した塩基配列の傾向を知る数理モデルの構築 (東京工業大学および日本原子力研究機構)			突然変異塩基配列の決定
	数理モデル構築の準備	突然変異塩基配列からの数理モデル構築	
			まとめ

図2 本事業の全体計画

3ヶ年計画の各研究項目の概要と実施機関。

## 2.2. 平成 30 年度の成果の目標及び業務の実施方法

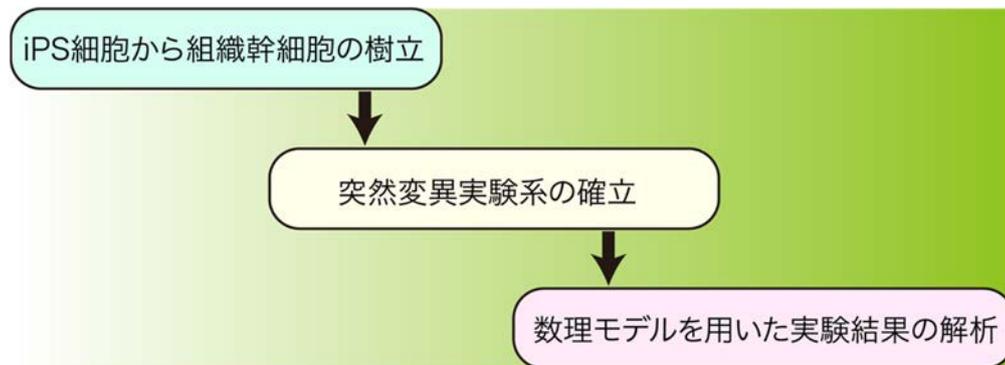
平成 30 年度の計画の概要は 3 ヶ年の全体計画のうち、初年度であるために情報収集、試薬、実験設備の準備、調整を主な業務とする。

「iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変異計測系の確立」が業務の全体像とすると実際の業務は

1. 「iPS 細胞から組織幹細胞の樹立」
2. 「突然変異実験系の確立」
3. 「数理モデルを用いた実験結果の解析」

の三段階に分類することができる。

平成 30 年度はそれぞれの段階の材料の準備と調整を目標とした。



### 図 3 本事業の研究項目

本事業項目は「iPS 細胞から組織幹細胞の樹立」、「突然変異実験系の確立」、「数理モデルを用いた実験結果の解析」から構成される。

以下詳細を記す。

#### 1. 「iPS 細胞から組織幹細胞の樹立」

本年度の目標は iPS 細胞から神経、皮膚、血液、心筋細胞樹立のための分化誘導試薬、使用条件の検討である。iPS 細胞は当研究室で樹立済みであるためにそれを使用して各種組織細胞への分化条件を検討する。全ての細胞は試験管内(正確にはペトリ皿)で培養し、細胞の分化も試験管内で実施する。iPS 細胞に分化誘導因子として組換えタンパク質である BMP4、SCF 等を加え、適当な時間培養することにより各種細胞へと分化させる条件を検討する。

#### 2. 「突然変異実験系の確立」

本年度の目標は突然変異計測実験のための試薬の調製、設備品の準備、工程の確認である。突然変異実験は 1992 年に Siedman らによって報告された実験方法を改良し実施する。実験の概要としてはまず指標となる DNA ベクターに各種放射線を照射し、DNA 損傷を生じさせる。そ

の後、DNA ベクターを各種組織細胞に遺伝子導入し、細胞の中で DNA ベクターの DNA 損傷を修復させる。この際、細胞によって DNA 修復活性が異なることが予想され、いくつかの突然変異が生じる。そしてこの DNA ベクターを細胞から抽出後、今度は大腸菌の中に遺伝子導入する。一晚培養することにより大腸菌はコロニー状に増殖するが突然変異を持っていないと青いコロニーになり、突然変異を持っていると白いコロニーになるように培地に X-Gal 試薬を加えておく。青いコロニーと白いコロニーの比を算出することにより突然変異頻度を計測する。さらに白いコロニーを採取し、DNA シークエンサーで解析することによりどんな種類の突然変異が挿入されたかを検出する。

本実験で使用する放射線は紫外線、ガンマ線、中性子線を予定しており、このうちガンマ線、中性子線は研究代表者所属の東京工業大学科学技術創成研究院先導原子力研究所に設置されているため、それらの調整及び確認を行う。紫外線照射装置は研究代表者の研究室で自作する。

本年度はこれらの工程を一通り実施し、それぞれの工程で必要な試薬の調整と確認を行う。

### 3. 「数理モデルを用いた実験結果の解析」

前項の突然変異計測で得られた結果を解析するための手法の開発を実施する。得られた突然変異の頻度を自己組織化マップなどの機械学習法を用いて解析する予定である。

本年度の目標は設備品の調整から情報収集とする。

### 3. 平成 30 年度の実施内容及び成果

#### 3.1. iPS 細胞から神経系、皮膚系、心筋細胞および血液細胞の作製

##### 3.1.1. 各組織細胞樹立のための条件検討

当研究室で樹立したヒト新生児皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞を用いて、神経、皮膚、血液、心筋細胞へ分化誘導するための条件検討を実施した。神経、皮膚は当研究室においてすでに樹立条件を確立させていたが、血液、心筋細胞は実施していなかったために、細胞樹立のために最適な試薬、温度等の条件を検討した。

##### 概要

iPS 細胞は京都大学の山中伸弥教授により開発された細胞で多能性幹細胞の一種である。多能性幹細胞とは原則全ての組織に分化することができる幹細胞のことで iPS 細胞の他、胎生幹細胞 (ES 細胞)、生殖幹細胞 (mGS 細胞) が存在する。ES 細胞はマウスおよびヒトの胚から採取することができる幹細胞で各種組織細胞への分化においてこれまでに多くの知見があり、iPS 細胞における研究にも ES 細胞の研究結果が大きく貢献している。また、mGS 細胞にも多能性が認められており、不妊治療などへの貢献が期待されている。iPS 細胞は様々な組織細胞から樹立することが報告されているが、一般的にヒトからは皮膚細胞や血液細胞が採取容易であるために用いられることが多い。また、当初は初期化のための遺伝子導入に対してウイルスベクターを用いた方法が採用されており、細胞のがん化のリスクが課題であったが、近年は mRNA を直接細胞に導入する方法が開発され、初期化のための遺伝子がゲノム DNA に挿入されることなく iPS 細胞を樹立することが可能となっている。我々の研究室においても mRNA を用いて iPS 細胞を樹立することに成功しており、本事業においても主にそれらの細胞を使用した。

個体の発生過程は受精から細胞の卵割を経て、外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉への分化過程を経る。実験室の試験管レベルで多能性幹細胞から組織細胞へ分化させる際はまずこれら三胚葉のいずれかに分化を促進させる必要がある。神経系、皮膚系の細胞は個体発生における三胚葉の分類において外胚葉由来の組織細胞である。神経系は特に神経外胚葉、皮膚系は表層外胚葉に分類される。試験管では適当な密度に播種した iPS 細胞に対して Noggin、BMP4 など分化誘導因子を加え、誘導していく必要がある。以下にそれぞれの細胞に分化するための概要と実施した研究の成果を述べる。

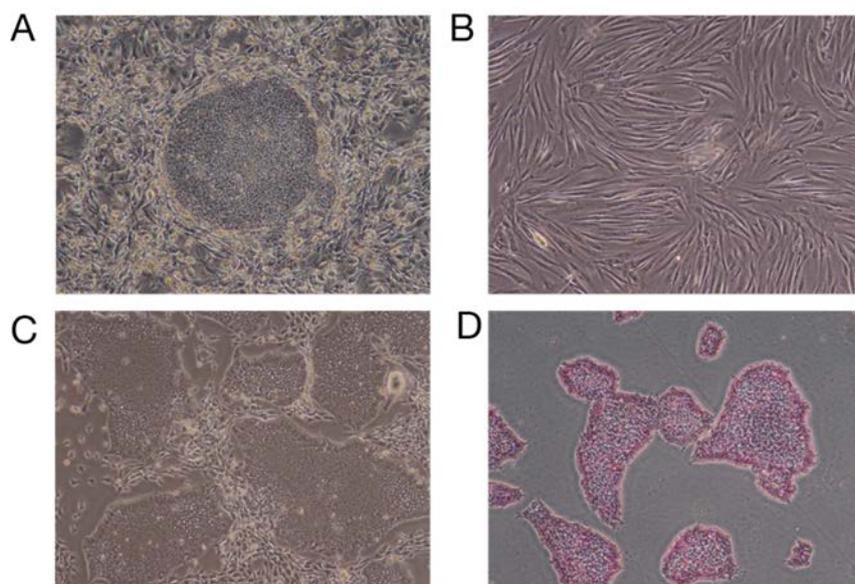


図 4 iPS 細胞の明視野顕微鏡像

(A) 京都大学山中伸弥教授の研究室で樹立された皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞 201B7 (理化学研究所バイオリソース研究センターより入手)

(B) 新生児皮膚由来線維芽細胞 NB1RGB (理化学研究所バイオリソース研究センターより入手) 本研究室で iPS 細胞の樹立に使用した元の細胞である。

(C) NB1RGB を初期化することにより樹立した iPS 細胞 NB1RGB C2 フィーダフリーで培養。

(D) NB1RGB を幹細胞のマーカであるアルカリフォスファターゼ染色により確認したもの。赤く染まっている箇所が幹細胞を表している。

### 3.1.2. 神経細胞樹立のための条件検討

神経系の細胞は三胚葉系列では外胚葉に由来し、その後、神経幹細胞を経て各種末端神経細胞へと分化していく。本事業ではこのうち神経幹細胞を樹立し、突然変異実験に使用する。神経細胞への分化誘導は iPS 細胞を 6 well プレートに播種し、40~60%のコンフルエントになるまで幹細胞用培地 (NutriStem XF/FF) で 4~5 日培養後、神経幹細胞分化培地 (PSC neuro basal medium; GIBCO Thermo Fiser Scientific) で 4 日間培養し、再度細胞を播種し (この時点で継代 0 (P0) と定義)、神経維持培地に変更後し、4~6 日培養後 (P1 と定義)、神経用マーカー PAX2、Nestin、Sox1、Sox2 抗体で免疫染色法により樹立を確認した。

#### 神経幹細胞樹立の実験方法

1. 神経分化には PSC Neural induction medium (神経幹細胞誘導培地) を使用する。iPS 細胞を 6 well プレートに播種する。培地は NutriStem XF/FF 培地 (iPS 細胞維持培地、ROCK 阻害剤入り) で細胞を 1 well あたり  $1 \times 10^4$  cells になるように播種する。
2. 翌日培地を ROCK 阻害剤なしの NutriStem XF/FF 培地に交換する。
3. 4~7 日間培養する。
4. 細胞が 15~25%コンフルエントになったら分化開始とし、培地を 2.5 ml PSC Neural Induction medium に交換する。
5. 2 日後、2.5 ml PSC Neural Induction medium に培地交換する。
6. 2 日後、5 ml PSC Neural Induction medium に培地交換する。
7. 翌日、細胞を播き直す。この時点で NSCs P0 とする。細胞を Tryple select で剥がした後、5 ml の PBS で懸濁し、遠心分離する。その後、PBS を除き、Neural expansion medium を 5 ml 加え懸濁する。最終的に 6 well プレートで 1 well あたり  $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$  cells になるように播種。培地には ROCK 阻害剤を最終濃度 5 mM になるように加える。
8. 翌日、ROCK 阻害剤なしの Neural expansion medium を 5 ml 加える。
9. P0 から 4~6 日後に P1 NSCs として凍結保存、あるいは実験に使用する。

#### 試薬詳細

- PSC Neural Induction medium (神経幹細胞誘導培地)  
(Neurobasal medium 490 ml + Neural induction supplement 10 ml)
- Neural expansion medium (神経幹細胞維持培地)  
(Neurobasal medium 49 ml + DMEM/F12 49 ml + Neural induction supplement 2 ml)
- ROCK 阻害剤 (5 mM)  
(Y27632 1 mg + DW 0.625 ml)

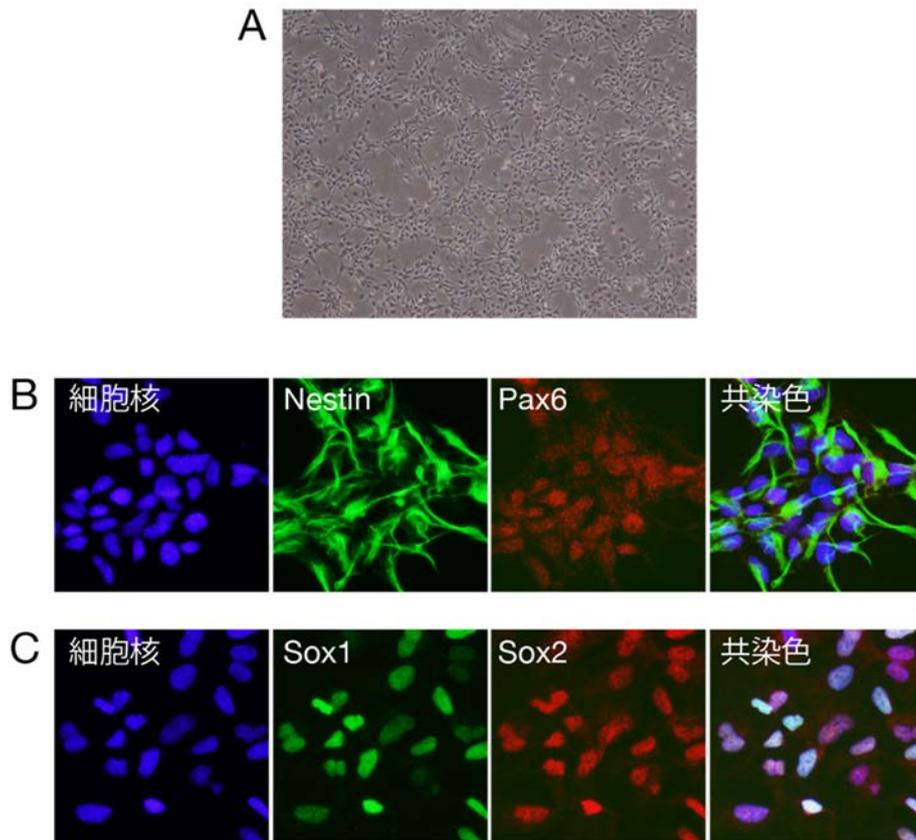


図 5 iPS 細胞から樹立した神経幹細胞の蛍光顕微鏡像

(A) iPS 細胞から樹立した神経幹細胞を明視野顕微鏡で観察した像

(B) 神経幹細胞を神経幹細胞のマーカーである Nestin、Pax6 抗体で染色した細胞サンプルを蛍光顕微鏡で観察した像。細胞核は DAPI で染色し、それぞれの染色像を重ねあわせた像が共染色像である。

(C) 神経幹細胞を神経幹細胞のマーカーである Sox1、Sox2 抗体で染色した細胞サンプルを蛍光顕微鏡で観察した像。細胞核は DAPI で染色し、それぞれの染色像を重ねあわせた像が共染色像である。

樹立した細胞は神経幹細胞マーカーである Nestin、Pax6、Sox1、Sox2 に対して陽性であるために神経幹細胞としての特徴を保持している。

### 3.1.3. 皮膚細胞樹立のための条件検討

皮膚の表面 0.5 mm～1 mm は表皮層と呼ばれている。表皮層はケラチノサイト、メラニン細胞、ランゲルハンス細胞から構成されており、その中でもケラチノサイトは表皮の大部分を占める。放射線によるがん化の影響が大きいのもケラチノサイトである。また、ケラチノサイトは表皮の基底層部位に幹細胞が存在し、それらが細胞分裂と分化を繰り返し、上層部へ移動していく。皮膚の最外層はケラチノサイトから細胞核が抜け落ちた状態になっており（脱核）、保湿の役割を持つ。皮膚細胞の中でも本実験ではケラチノサイト（角質細胞）の樹立を行った。ケラチノサイトへの分化誘導は皮膚細胞分化培地（Defined keratinocytes serum free medium; GIBCO/Thermo Fisher Scientific）にレチノイン酸、骨形成因子（BMP4）、上皮成長因子（EGF）を加えた培地で培養することにより樹立し、皮膚用マーカー K14 抗体で免疫染色法により樹立を確認した。

#### 皮膚細胞（ケラチノサイト）樹立の実験方法

1. ケラチノサイトへの分化にはまず iMatrx511 でコートした iPS 細胞を 10 cm dish に  $0.8 \times 10^4$  cells を播種し、ROCK 阻害剤を含んだ iPS 細胞用培地で培養する。
2. 24 時間後、細胞培地をレチノイン酸、BMP4 を含んだケラチノサイト誘導培地へ交換する。
3. 分化開始 4 日後、細胞培地を EGF を含んだケラチノサイト誘導培地へ交換する。
4. 分化開始 14 日後、タイプ 1 コラーゲンとフィブロネクチンでコートした 10 cm dish に EGF と ROCK 阻害剤を含んだケラチノサイト誘導培地へ継代する。この時点のケラチノサイトを P1 とする。
5. 分化開始 24 日後、同様にタイプ 1 コラーゲンとフィブロネクチンでコートした 10 cm dish に EGF と ROCK 阻害剤を含んだケラチノサイト誘導培地へ継代する。この時点のケラチノサイトを P2 とする。
6. 分化開始 34 日後、タイプ 1 コラーゲンとフィブロネクチンでコートした 10 cm dish に EGF と ROCK 阻害剤を含んだケラチノサイト誘導培地へ継代する。この時点のケラチノサイトを P3 とする。

#### 試薬詳細

- Defined keratinocyte serum free medium（皮膚ケラチノサイト誘導培地）
- レチノイン酸
- BMP4（分化促進組換えタンパク質）
- EGF（分化促進組換えタンパク質）
- ROCK 阻害剤（5 mM）（Y27632 1 mg + DW 0.625 ml）
- タイプ 1 コラーゲン（細胞接着用）
- フィブロネクチン（細胞接着用）

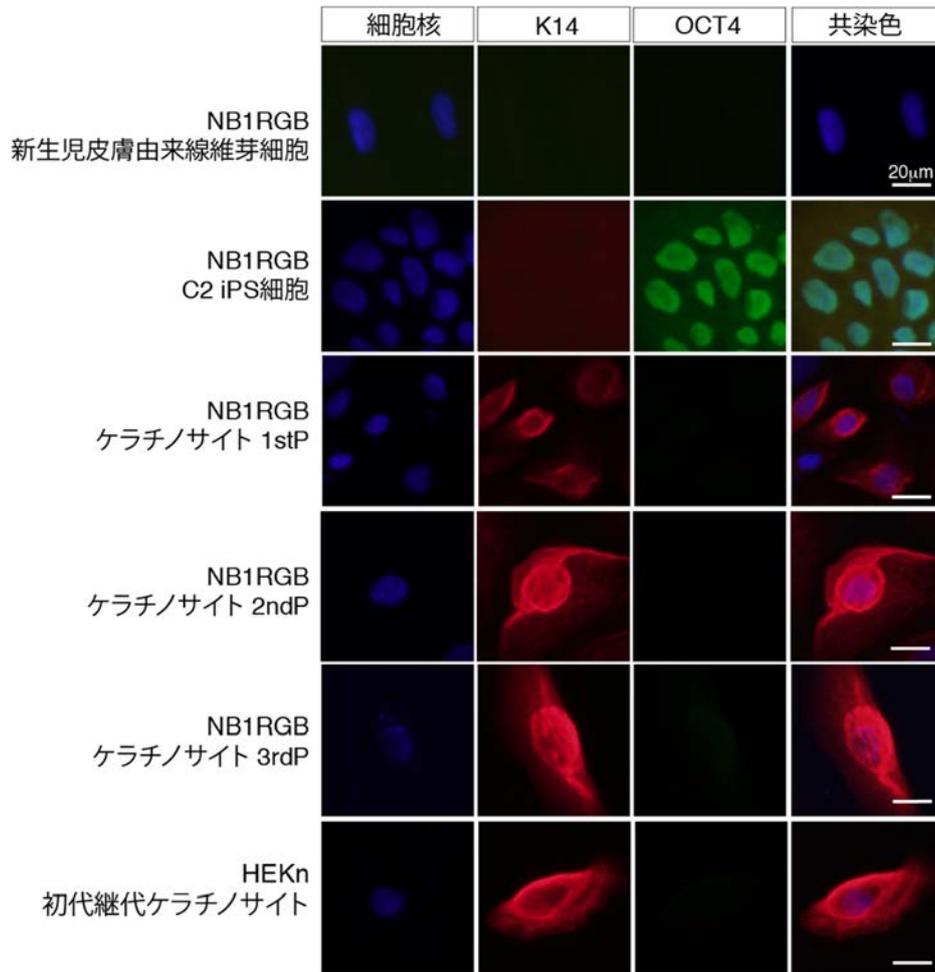


図 6 iPS 細胞から樹立した皮膚角質細胞（ケラチノサイト）の蛍光顕微鏡像

細胞は全て DAPI (細胞核)、ケラチノサイトのマーカーとして K14 抗体、多能性幹細胞のマーカーとして OCT4 抗体を用いて免疫染色法により染色した。新生児皮膚由来線維芽細胞は両方のマーカーで陰性だが、iPS 細胞は OCT4 のみに陽性である。一方でケラチノサイトに分化誘導した細胞は 1stP、2ndP、3rdP 全てで K14 に対して陽性であるが、OCT4 には陰性である。HEKn は初代継代ケラチノサイトであるために陽性ケラチノサイトのコントロール細胞として使用した。HEKn も K14 に陽性である一方で OCT4 には陰性であった。

### 3.1.4. 血液細胞樹立のための条件検討

血液成分は赤血球、白血球、血小板に分類でき、その中でも白血球は好中球、好塩球、好酸球からなる顆粒球、T細胞、B細胞、NK細胞からなるリンパ球に分類することができる。また、これらの細胞の元の未分化状態な細胞が造血幹細胞である。それぞれの細胞に特異的な造血誘導因子が存在し、濃度、条件等を検討する必要がある。本事業では汎用性の高さから造血幹細胞の樹立を目標とする。造血幹細胞への分化誘導は幹細胞用培地 (NutriStem XF/FF) で培養していた iPS 細胞に対して幹細胞分化培地 (Stemline II medium) に交換後、BMP4、幹細胞因子 (SCF) 等、造血因子を順次加えて分化誘導の条件を検討した。

#### 血液細胞樹立の実験方法

1. iPS 細胞を ibidi スライドグラス、24 well、6 well プレートに播種する。培地は NutriStem XF/FF 培地 (ROCK 阻害剤入り) で細胞を 1 well あたり  $1 \times 10^3$  cells、 $1 \times 10^2$  cells、 $0.5 \times 10^2$  cells になるように播種する。参考文献では 1 つの well あたりコロニーが 5 個以下になるようにとある。また、コロニーのサイズが 500  $\mu\text{m}$  になってから分化実験を開始と記載されている。
2. 翌日培地を ROCK 阻害剤なしの NutriStem 培地に交換する。
3. 4~7 日間培養する。
4. コロニーサイズが 500  $\mu\text{m}$  になったら培地を Stemline II Serum free medium supplemented with Insulin transferrin Selenium-X (ITS-X) に交換する。20 ng/ml BMP4 を加える。それぞれ 100  $\mu\text{g/ml}$  stock を 1 ml 培地あたり 0.2  $\mu\text{l}$ 、10  $\mu\text{g/ml}$  stock を 1 ml 培地あたり 2  $\mu\text{l}$  とする。(中胚葉分化ステップ)
5. 4 日後、培地を Stemline II + ITS-X に交換し、40 ng/ml VEGF165 と 50 ng/ml SCF を加える。それぞれ 10  $\mu\text{g/ml}$  stock を 1 ml 培地あたり 4  $\mu\text{l}$  と 5  $\mu\text{l}$  とする。(血液細胞誘導ステップ)
6. 2 日後、培地を Stemline II + ITS-X に交換し、血液分化カクテル (50 ng/ml SCF、10 ng/ml TPO、50 ng/ml IL3) を用途に応じて加える。(血液分化誘導ステップ)
7. 2 日後頃には血液前駆細胞があらわれてくる。

#### 試薬詳細

- Stemline II Serum free medium (#S0192 Sigma) (幹細胞培地)
- ITS-X (#51500-056 Invitrogen) (幹細胞用補助剤)
- BMP4 (#314-BP-010 R & D) (分化促進組換えタンパク質)
- VEGF165 (#293-VE-050 R & D) (分化促進組換えタンパク質)
- SCF (#255-SC-050 R & D) (分化促進組換えタンパク質)
- TPO (#288-TPN-025 R & D) (分化促進組換えタンパク質)
- IL3 (#203-IL-050 R & D) (分化促進組換えタンパク質)
- FLT-3 ligand (#308-FK-025 R & D) (分化促進組換えタンパク質)
- EPO (#329871 EMD) (分化促進組換えタンパク質)

### 血液分化実験 8日目

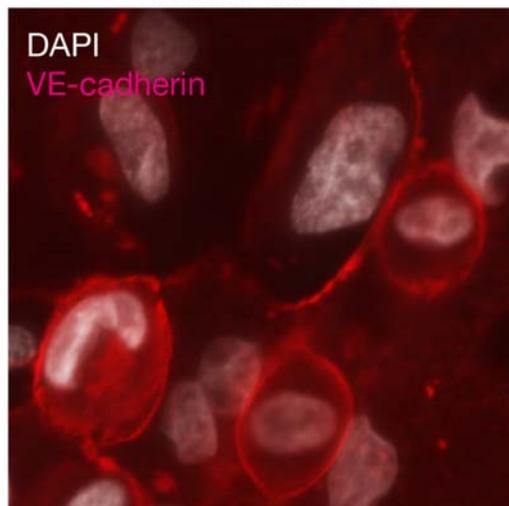


図 7 iPS 細胞から樹立した血液細胞の蛍光顕微鏡像

DAPI は細胞核の染色を示し、VE-cadherin は血管内皮細胞で発現する細胞間接着細胞であることから血管内皮細胞に分化していることを示している。いくつかの血液細胞は血管内皮細胞から産生されることが知られており、本結果は血液の分化が進んでいることを示している。

### 3.1.5. 心筋細胞樹立のための条件検討

心筋細胞は心臓の筋肉の細胞で心臓の拍動に必須の細胞種である。心筋細胞分化誘導のために PSC cardiomyocyte differentiation medium を加えて分化を検討した。

#### 心筋細胞樹立の実験方法

1. 心筋分化には PSC Cardiomyocyte differentiation kit を使用する。iPS 細胞を ibidi スライドガラス、24 well、6 well プレートに播種する。培地は NutriStem XF/FF 培地 (ROCK 阻害剤入り) で細胞を 1 well あたり  $1 \times 10^4$  cells、 $1 \times 10^3$  cells になるように播種する。キットのプロトコルでは 1 つの well あたり 35~60%コンフエントになってから分化を開始することを推奨している。
2. 翌日培地を ROCK 阻害剤なしの NutriStem 培地に交換する。
3. 4~7 日間培養する。
4. 細胞が 35~60%コンフルエントになったら培地を Cardiomyocyte differentiation medium A に交換する。
5. 2 日後、培地を Cardiomyocyte differentiation medium B に交換する。
6. 2 日後から毎日、培地を Cardiomyocyte maintenance medium に交換する。
7. 分化開始後 10 日ごろから心筋細胞があらわれてくる。
8. 免疫染色で確認する。マーカー抗体は NKX2-5 抗体 (初期心筋中胚葉) と TNNT2/cTNT 抗体 (心筋細胞) を使用する。

#### 試薬詳細

- PSC Cardiomyocyte differentiation kit (Thermofisher Scientific GIBCO) (心筋細胞分化培地)
- Human Cardiomyocyte Immunocytochemistry Kit (#A25973) (神経細胞確認用マーカー抗体キット)



図 8 iPSC 細胞から樹立した心筋細胞の蛍光顕微鏡像

心筋細胞マーカーである TNNT-2 抗体と初期心筋中胚葉マーカーである NKX2-5 抗体を用いて免疫染色した蛍光顕微鏡像。DAPI は細胞核染色。それぞれのマーカーでわずかに染色されていることがわかる。

### 3.2. 各種細胞における各種放射線照射後の突然変異率測定

#### 3.2.1. 実験条件の検討と試薬の準備

哺乳類細胞において突然変異を計測する実験系を確立するための条件検討を実施した。実験系に必要な備品（大腸菌へ遺伝子導入するエレクトロポレーター等）、試薬の準備をした。最初は実験操作が容易なヒト大腸がん細胞 HCT116 あるいはヒト骨肉腫細胞 U2OS を用いて、条件検討を実施した。

#### 突然変異実験における概要

2.1 概要で記した通り、放射線影響として突然変異を測定する当該項目における実施項目は以下である。

pSP189 DNA ベクターの調整

MBM7070 コンピテントセルの調整

大腸菌用遺伝子導入装置(エレクトロポレーター)の準備

哺乳細胞用遺伝子導入試薬の準備

詳細を以下に記す。

### 3.2.1.1. pSP189 DNA ベクターの調整

1. pSP189 DNA ベクターはアンピシリン抵抗遺伝子を保持しているために pSP189 ベクターが導入された大腸菌はアンピシリン含有培地で培養した際、増殖することができる。そのため、コンピテントセル大腸菌 DH5α に 42°C、30 秒の条件でヒートショックによるトランスフォーメーションで pSP189 DNA ベクター 1 μg を導入後、アンピシリン含有培地で一晩 37°C の条件で培養した。
2. 翌日、コロニー状に増殖した大腸菌からコロニーを一つピックアップし、3 ml アンピシリン含有 LB 培地が入った 15 ml チューブへ移し、一晩 37°C の条件で培養した。
3. 翌日、大腸菌が十分増殖していることを確認し、0.5 ml の大腸菌液を 200 ml LB 培地が入ったアンピシリン含有 500 ml フラスコへ移し、一晩 37°C の条件で培養した。
4. 大腸菌液からプラスミド DNA 抽出キットを用いて pSP189DNA ベクターを調整した。

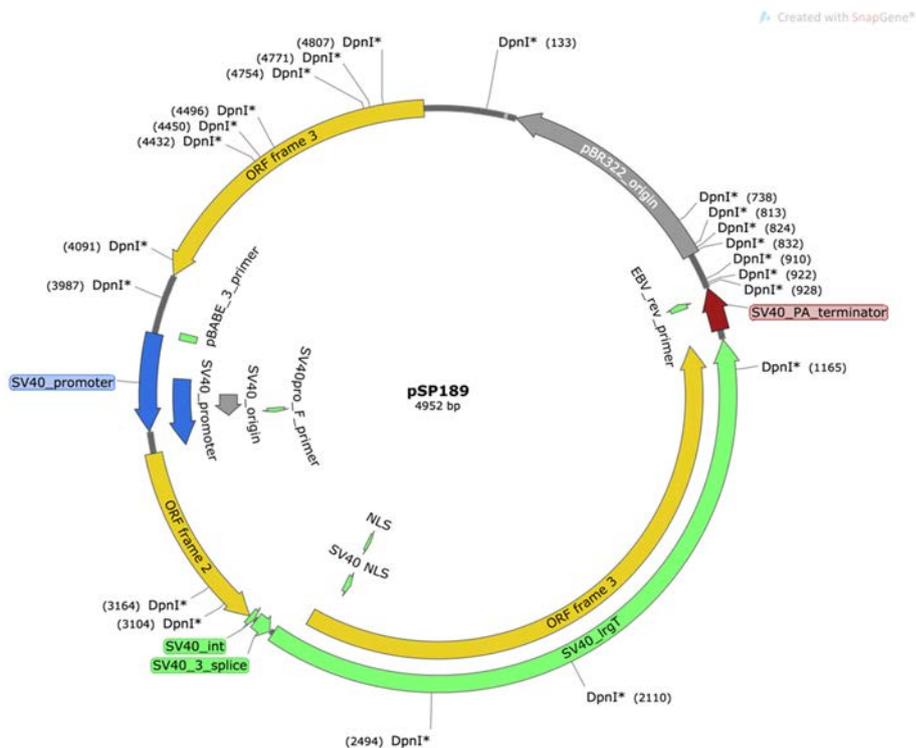


図 9 pSP189DNA ベクターマップ

突然変異計測実験に使用した pSP189DNA ベクターマップ。

### 3.2.1.2. MBM7070 コンピテントセルの調整

1. 大腸菌 MBM7070 を 3 ml LB 培地で一晚 37°C の条件で培養する。
2. 0.5 ml の大腸菌液を 50 ml LB 培地に加え一晚 37°C の条件で培養する。
3. 10 ml の大腸菌液を 990 ml LB 培地が入った 2 L フラスコに移す。LB 培地はあらかじめ 37°C で前日晩から温めておいたものを使用する。
4. OD600 を測定し、0.5~0.6 になるまで約 2.5 時間培養する。
5. OD600 が目的値に達したらあらかじめ冷蔵庫で冷やしたチューブで 250 ml ずつ 4 本で遠心する (5000 rpm (7000×g)、25 min、4°C)。
6. 上澄みを捨てて、沈殿にそれぞれ 10 ml の 10% glycerol を加え再懸濁後、更に 10% glycerol を 240 ml 加え氷上でよく懸濁する。
7. 遠心 (5000 rpm、30 min、4°C) し、上澄みを捨てる。10 ml の 10% glycerol に再懸濁後、手順 6 と同様に 250 ml までメスアップし、遠心 (5000 rpm、30 min、4°C) を行う。
8. 上澄みを捨て、沈殿をわずかにチューブに残った液で懸濁し、全サンプルを 1 本のチューブに集める。
9. あらかじめ冷やしておいた 1.5 ml チューブに 110 μl ずつ分注し、-80°C で保存する。



図 10 コンピテントセルの調製

本事業で使用したコンピテントセルの調製法。

### 3.2.1.3. 大腸菌用遺伝子導入装置(エレクトロポレーター)の準備

大腸菌用の遺伝子導入エレクトロポレーターとして gene pulser Xcell エレクトロポレーション システム (BioRad 社) を購入した。また、消耗品として Gene Pulser エレクトロポレーションキュベットを準備した。エレクトロポレーターは装置の中にすでに微生物、真菌、哺乳類用のエレクトロポレーションの条件がプリセットされており、本事業では主に微生物用の 1.8 kV、250  $\Omega$  の条件を使用した。また、エレクトロポレーションキュベットはサンプルの挿入幅が 1 mm のキュベットと 2 mm のキュベットがあるが、主に 1 mm のキュベットを使用した。



図 11 大腸菌用遺伝子導入エレクトロポレーター

装置の下部に使用電流などをセットアップするコントロール部位が備わっている。大腸菌と DNA の混合液をキュベットに設置し、エレクトロポレーションを行う。キュベットをセットする外部装置は外部に備わっている (右端：緑の装置)。

### 3.2.1.4. 哺乳細胞用遺伝子導入試薬の準備

哺乳類細胞遺伝子導入試薬として Lipofectamin 2000 (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific 社) を準備した。実験の条件は試薬のプロトコルに従った。

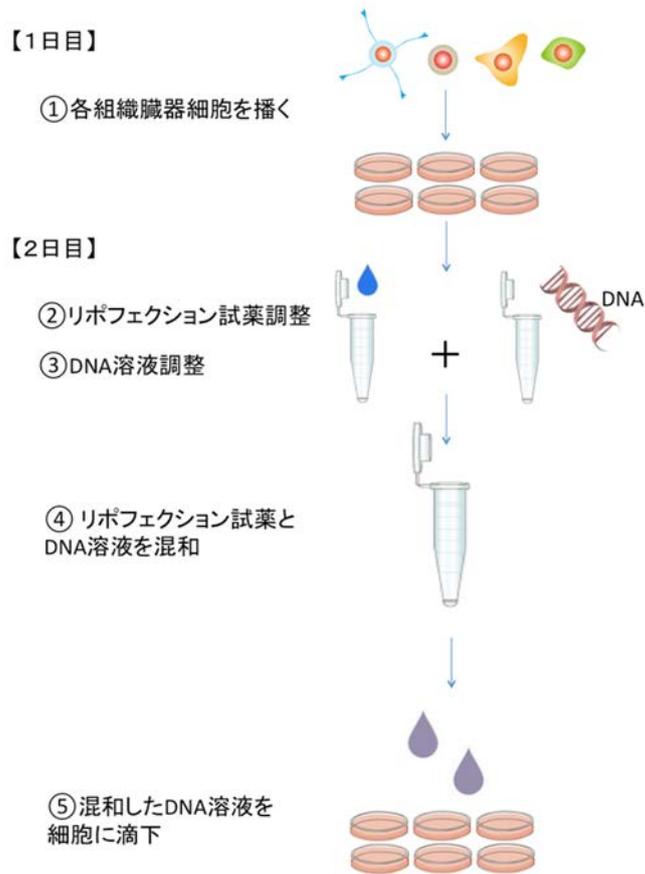


図 12 哺乳類遺伝子導入の実験法

リポフェクション法による哺乳類細胞への遺伝子導入の概要。

### 3.2.2. 突然変異計測の実験条件検討（東京工業大学 再委託先：量研機構）

DNA ベクターに照射する線量の条件検討および大腸菌への遺伝子導入条件の検討を実施した。

DNA ベクターの濃度の調整と大腸菌に遺伝子導入する際に使用する試薬を氷冷にするなど、実験条件の最適化を実施した。まず、30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に調整した pSP189DNA ベクター 1 ml を氷冷した 6 cm dish に広げた。HCT16 および U2OS 細胞に使用する試薬と消耗品を準備するとともに、実際に上述した HCT116 および U2OS を用いて遺伝子導入を実施し、試薬の反応時間、温度、濃度の条件の最適化を行った。実験手法は下記項目、「突然変異計測実験の手順」に記載の通り、また、最適化した条件は実験の手順の下段に記載の通りである。

#### 突然変異計測実験の手順

1. 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の pSP189 ベクターを 1 mL の TE に溶解したものを氷冷した 6 cm dish に広げる。
2. pSP189 ベクター溶液に UVC (100~500  $\text{J}/\text{m}^2$ ) を 200 J 照射する。
3. エッペンチューブに 330  $\mu\text{l}$  (10  $\mu\text{g}$  分) ずつ回収し、33  $\mu\text{l}$  の 3 M AcONa を加える。その後、950  $\mu\text{l}$  の 100% EtOH を加え、 $-80^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させエタノール沈殿を行う。
4. 遠心後、上澄みを捨てて沈殿を 70% EtOH で洗浄し再度遠心を行う。上澄みを捨てて沈殿を乾燥後 20  $\mu\text{l}$  の TE に溶解し、最終濃度 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  とする。
5. トランスフェクションを行うため、3  $\mu\text{g}$  (~5  $\mu\text{g}$ ) の pSP189 を 250  $\mu\text{l}$  の Opti-MEM によく懸濁する。6  $\mu\text{l}$  の Lipofectamine 2000 を 250  $\mu\text{l}$  の Opti-MEM によく懸濁する。その後、両者を混ぜ合わせ 20 分静置させる。あらかじめ 6 cm dish に播種した細胞に pSP189 懸濁液を加え  $37^\circ\text{C}$  で培養する。
6. 36~48 時間後、細胞を trypsin で剥がして PBS で洗浄しエッペンチューブに回収する。プラスミド回収 mini column(kit) を用いてプラスミドを回収する。
7. 2  $\mu\text{l}$  を制限酵素 DpnI で  $37^\circ\text{C}$ 、1 時間で処理する。
8. 切断した環状プラスミドに 70% EtOH を加えて洗浄後、沈殿物を乾燥させ 1  $\mu\text{l}$  x0.5 TE に溶解する。
9. エレクトロポレーションを行うため、1  $\mu\text{l}$  x0.5 TE を 20  $\mu\text{l}$  のコンピテントセル (MBM7070) に懸濁する。懸濁液を、あらかじめ冷やした 1 mm 幅のキュベットに入れ、2.5 kV、25  $\mu\text{F}$ 、200  $\Omega$  の条件で大腸菌に導入を行う。エレクトロポレーション後、1 ml の SOC を加え、よく懸濁しチューブに回収し、 $37^\circ\text{C}$  で 15~30 分振盪する。
10. 100  $\mu\text{l}$  の懸濁液を LB plate (Amp, X-Gal, IPTG) へ播種後、 $37^\circ\text{C}$  で一晩培養する。
11. 得られたコロニーを青白選択し、突然変異率を測定する。

#### 本項目で最適化した条件

1. 各組織細胞に遺伝子導入する DNA 量：3 $\mu\text{g}$
2. 遺伝子導入後の培養時間：48 時間
3. 制限酵素 Dpn1 で処理後、行うエタノール沈殿の際に室温で乾燥させる時間：15 分

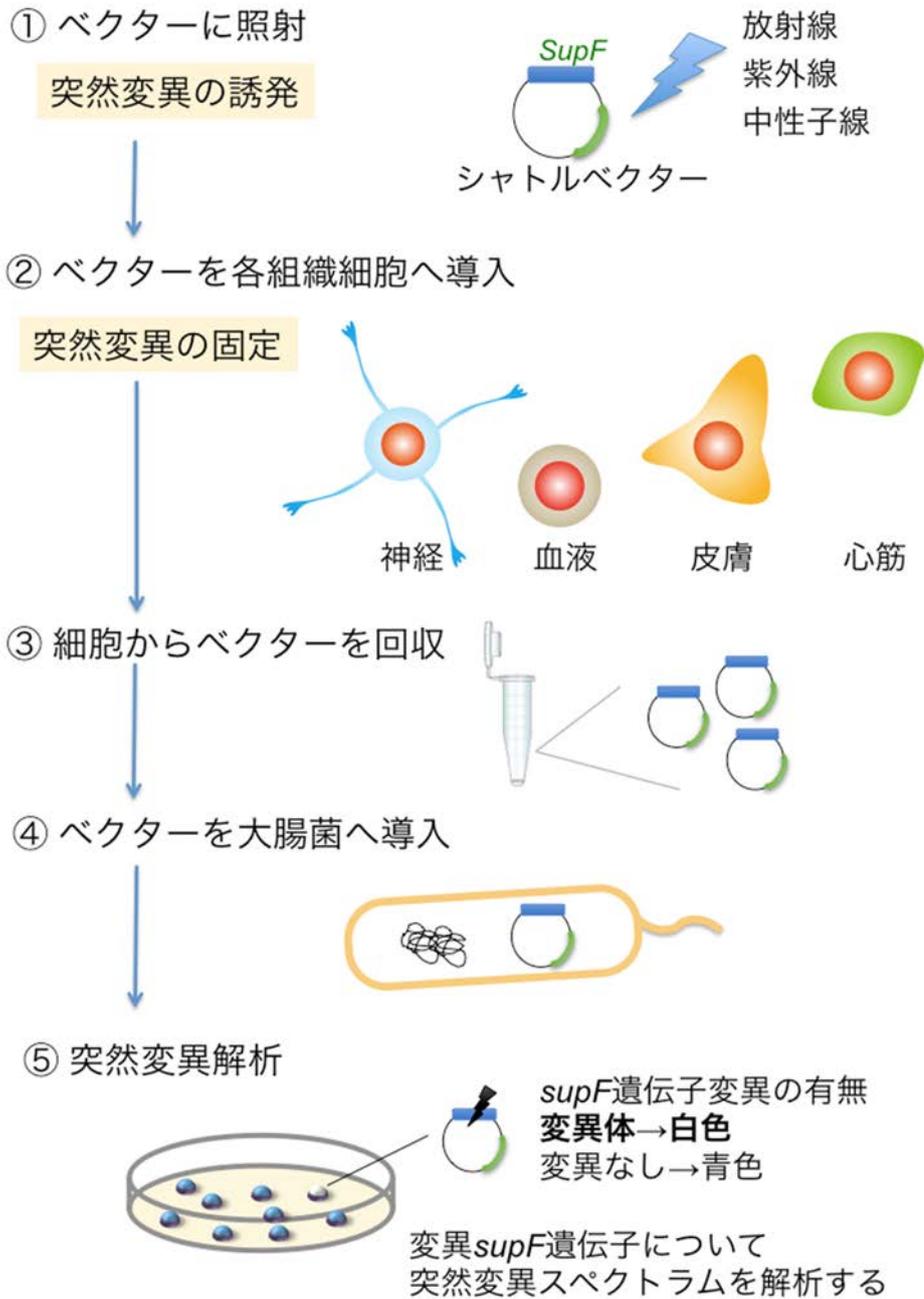


図 13 突然変異計測実験法

本事業で実施した突然変異計測実験の概要。

### 3.2.3. 放射線照射のための環境整備

本実験計画で放射線照射として用いる $\gamma$ 線、中性子線、紫外線のDNAベクターに照射するための設備条件の調整を実施した。

東京工業大学科学技術創成研究院先導原子力研究所附属コバルト照射施設における $\gamma$ 線照射、同研究所所属のペレトロン加速器を用いた中性子線照射、および本実験のために自作した紫外線照射装置での照射調整の確認を行った。

### 3.2.3.1. 紫外線照射の準備

紫外線照射は市販の殺菌灯を改良し、紫外線照射装置を自作した。キャビネット内に殺菌灯(UV-C)を3本設置し、外部に配線をつないで外部からスイッチのオンオフを操作できる仕様にした。使用する際は、殺菌灯のスイッチをオンにした後、点灯が安定するまで5分ほど待ってから、紫外線検出器で紫外線の線量を測定後、任意の時間、サンプルを暗幕内に設置して照射する。



図 14 紫外線照射設備と紫外線検出器

(A) 自作した紫外線照射設備。キャビネットの中に殺菌灯3本を設置し、開口部に暗幕を張ることにより紫外線が外部に漏れることを防ぐ仕様にした。照射設備はキャスターに載せることで移動が可能である。

(B) 紫外線量検出器。上部の検出部に入射した紫外線の線量を下部のモニターで表示することができる。

### 3.2.3.2. ガンマ線照射の準備

$\gamma$ 線照射実験は東京工業大学科学技術創成研究院先導原子力研究所付属のコバルト 60 照射施設において実施するため、照射設備の確認とサンプルを設置する場所の確認を実施した。



図 15 コバルト 60 ガンマ線照射施設

コバルト 60 照射施設(左)正面玄関、(右)照射実験の様子。

### 3.2.3.3. 中性子線照射の準備

中性子線は東京工業大学科学技術創成研究院先導原子力研究所内の片渕竜也准教授研究室所有のペレトロン加速器由来の中性子線を使用するために、照射施設の確認とサンプル設置場所の確認を行った。



図 16 ペレトロン加速器

本事業のために調製したペレトロン加速器。

### 3.3. 突然変異した塩基配列の傾向を知る数理モデルの構築（連携先：原子力機構）

突然変異計測結果の数理モデル解析のための設備環境の整備を実施した。既知の論文のデータや演習用データを用い、第3.3.2項に記すように、①ヒストグラムは従来法として、②主成分分析と③自己組織化マップは多変量解析の例として、④ニューラルネットワークと⑤サポートベクターマシンの予測解析の例として、解析結果を比較して最適化を実施した。

#### 3.3.1. 突然変異計測結果のデータ解析手法の検討

突然変異計測結果のデータ解析の設備環境整備のため、データ解析用のソフトウェアなどを入手し、データ解析手法の検討を実施した。演習用に既知の論文データを用いて、数理モデルが構築できるかの検討を実施した。

#### 突然変異計測結果のデータ解析における概要

突然変異は放射線等による DNA に生じた傷が修復されずに残存することが原因と考えられ、点突然変異、欠失、付加などの様々な種類が想定される。また、突然変異の種類や発生頻度は細胞分裂が活発な皮膚細胞や血液細胞と細胞分裂をあまりしない神経細胞や筋細胞では異なると考えられるが、これまでヒトの同じ個体由来の組織細胞におけるそれらの比較をした報告は皆無である。そこで、本事業において、皮膚細胞、血液細胞、神経細胞、筋細胞の各々の突然変異の特徴を明らかにする。得られた結果は従来の単純なヒストグラムのみならず、機械学習などのデータ解析手法を用いて評価する。本年度は、環境整備を中心にを行い、データ解析手法の検討に着手した。

#### データ解析の設備環境整備

シーケンスデータの解析は情報量も多く複雑であり、高スペックのパソコンが必要となるため、データ解析用に Apple Mac Book Pro 13 インチ（CPU: 第8世代 2.3 GHz Intel Core i5 プロセッサ, メモリ: 16 GB, ハードディスク: 1 TB SSD ストレージ）を購入した。また、オープンソースでフリーソフトウェアであるデータ解析用ソフトウェア R および R Studio 等をインストールし、データ解析の設備環境を整備した。

#### データ解析手法の検討

得られたシーケンスデータからマッピングにより突然変異を検出する。検出された突然変異は種類ごとに頻度を算出して多次元データとして扱う。多次元データを解析する方法としては、各群について各突然変異の種類ごとの情報をまとめるか多変量解析を行って総合的な評価をするのが適していると考えられる。一般的には、各群について各突然変異の種類ごとの情報をヒストグラムでまとめることがほとんどであるが、多変量解析による総合的な評価では、その特徴をわかりやすく感覚的に捉えることが可能な視覚的表現がある。また、機械学習等では予測も可能となる。そこで、本年度は、①ヒストグラム、②主成分分析、③自己組織化マップ、④ニューラルネットワーク、⑤サポートベクターマシンでの演習用データの解析をし、データ解析手法の比較検討を行った。

### 3.3.2. 突然変異計測結果の演習用データによる解析例

突然変異計測結果は、各群についての各突然変異の種類ごとの突然変異率で多次元データとして扱う。既存の論文データ(Yanagihara et al. Molecular Cell, 2011)を参考に演習用データを作成し、データ解析手法の比較検討を行った。

#### 演習用データの作成

A~Dの4群（各群  $n = 5$ ）で、トランジション変異（G:C-A:T、A:T-G:C）、トランスバージョン変異（G:C-T:A、G:C-C:G、A:T-T:A、A:T-C:G）、挿入、欠失の8項目の突然変異率が得られることを想定した演習用データを作成した。突然変異率の値は、既存の論文のデータの参考値から、正規乱数を発生させて作成した（表2）。予測に用いるテストデータはシードを変えた同様の正規乱数とした（表3）。

トレーニングデータ									
群	サンプル Nb.	置換						挿入	欠失
		トランジション変異		トランスバージョン変異					
		G-C-A:T	A-T-G:C	G-C-T:A	G-C-C:G	A-T-T:A	A-T-C:G		
A	1	9.69	2.91	2.76	0.00	4.18	0.00	2.95	2.87
A	2	11.40	3.21	2.81	0.00	3.38	0.00	3.06	3.07
A	3	9.44	3.16	2.96	0.00	3.08	0.00	2.95	3.09
A	4	10.30	2.52	3.29	0.00	3.80	0.00	2.88	3.20
A	5	10.46	2.61	2.29	0.00	3.62	0.00	3.14	2.91
B	1	47.58	5.41	4.48	4.42	9.92	10.98	8.40	5.10
B	2	36.63	4.95	5.34	4.55	10.76	12.30	7.06	4.88
B	3	30.42	4.50	5.70	5.20	10.41	11.37	8.29	5.12
B	4	23.06	4.67	5.04	4.72	10.76	9.52	7.91	4.99
B	5	42.94	4.21	4.24	4.81	9.42	8.25	9.05	5.04
C	1	27.81	11.82	4.60	2.72	9.86	8.79	0.00	9.00
C	2	28.85	7.78	5.70	2.84	10.43	9.43	0.00	9.02
C	3	10.30	13.36	5.33	2.92	9.75	11.75	0.00	9.06
C	4	27.06	11.08	3.77	3.35	9.91	10.48	0.00	8.93
C	5	34.04	5.55	5.37	3.54	9.59	11.08	0.00	8.98
D	1	46.11	13.30	8.11	0.00	13.42	0.00	1.08	3.12
D	2	38.21	7.29	15.30	0.00	24.00	0.00	0.99	2.74
D	3	37.33	13.84	9.00	0.00	27.90	0.00	1.92	2.96
D	4	40.27	19.86	8.01	0.00	28.65	0.00	2.21	3.10
D	5	34.46	6.46	9.58	0.00	13.01	0.00	1.03	2.77

表2 演習用データ（トレーニングデータ）

既存の論文のデータの参考値から、正規乱数を発生させて作成した演習用データ。ニューラルネット等の予測解析ではトレーニングデータとして使用した。

テストデータ									
群	サンプル Nb.	置換						挿入	欠失
		トランジション変異		トランスバージョン変異					
		G-C:A-T	A-T-G-C	G-C:T-A	G-C:C-G	A-T:T-A	A:T-C-G		
A'	1	11.31	2.96	4.00	0.00	3.40	0.00	3.18	3.02
A'	2	9.72	2.76	3.76	0.00	2.42	0.00	3.02	2.93
A'	3	11.63	2.92	2.93	0.00	3.38	0.00	3.07	3.03
A'	4	9.57	2.86	3.54	0.00	2.96	0.00	2.98	3.06
A'	5	8.89	3.05	2.90	0.00	2.89	0.00	2.85	2.98
B	1	29.01	4.25	5.02	4.30	9.74	10.27	7.97	5.12
B	2	34.69	5.70	5.54	5.46	10.96	9.76	7.66	5.08
B	3	31.28	4.70	5.15	5.77	9.80	9.77	7.53	5.03
B	4	51.68	6.18	5.65	4.25	9.47	8.12	9.31	4.92
B	5	33.79	4.18	3.90	5.56	10.93	9.34	6.81	4.97
C	1	29.39	9.61	5.16	3.17	10.37	9.43	0.00	9.06
C	2	23.98	13.20	5.33	3.26	10.02	10.95	0.00	9.05
C	3	15.76	11.13	4.41	2.78	9.58	8.56	0.00	8.99
C	4	51.99	9.34	4.99	2.98	9.88	8.86	0.00	9.05
C	5	37.07	14.24	5.14	3.47	9.92	8.53	0.00	9.12
D	1	38.39	10.38	12.53	0.00	11.29	0.00	0.29	3.13
D	2	49.40	7.04	8.74	0.00	17.91	0.00	1.49	3.01
D	3	21.52	9.59	14.93	0.00	19.37	0.00	1.30	2.90
D	4	32.66	7.21	9.88	0.00	16.09	0.00	0.50	3.07
D	5	42.03	12.97	11.08	0.00	16.54	0.00	0.96	3.04

表 3 演習用データ（テストデータ）

既存の論文のデータの参考値から、正規乱数を発生させて作成した演習用データ。ニューラルネット等の予測解析ではテストデータとして使用した。

① ヒストグラム

表 2 のデータを用いて、Excel®でヒストグラムを作成した（図 17）。演習用データは単純に正規乱数を発生させて作成したため参考にした既存論文とは多少異なるが、既存論文内では B 群と C 群は似通った特徴があると述べられている。しかしながら、その結論は他の知見も踏まえての結果であり、このグラフのみでその情報を読み取ることは容易ではないと言える。特に、各項目間の相互作用について理解することは困難である。

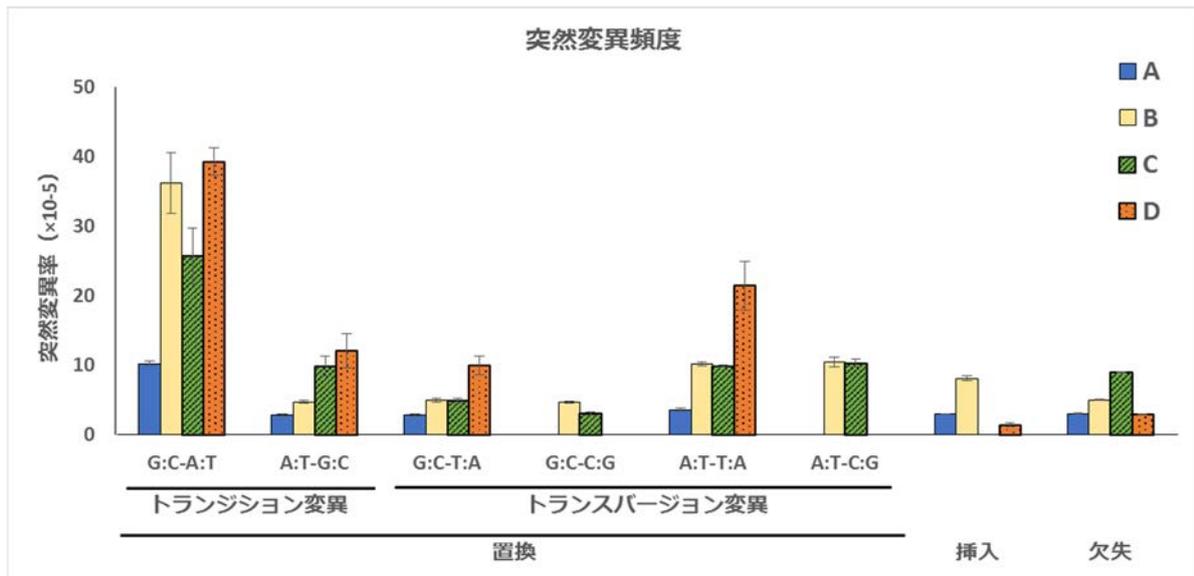


図 17 演習用データによるヒストグラムの作成例

演習用データを用いて作成したヒストグラム。A~D の 4 群での 8 種類の突然変異の頻度をヒストグラムにした。平均値 ± 標準誤差。

② 主成分分析

表 2 のデータを用いて、R のパッケージ multcomp を用いて主成分分析を行った。その結果、A 群 (No. 1~5) は特に寄与する項目はないが 5 つ全てのデータで同じ特徴を持っており、B 群 (No. 6~10) と C 群 (No. 11~15) は G:C-C:G、A:T-T:A、A:T-C:G の置換、挿入、欠失の項目に寄与が高く、D 群 (No. 16~20) は A:T-G:C、G:C-T:A、G:C-C:G、A:T-T:A の置換の項目に寄与が高いことが表された (図 18A) 。①ヒストグラムの結果で述べたように既存論文によると B 群と C 群は似通った特徴である可能性が高く、主成分分析ではその結果がはっきりと表れていると言える。累積寄与率は、第 1 主成分で 0.3867、第 2 主成分で 0.7079、第 3 成分で 0.8994 であり、第 3 主成分までのグラフでは、100%判別可能であった (図 18B) 。

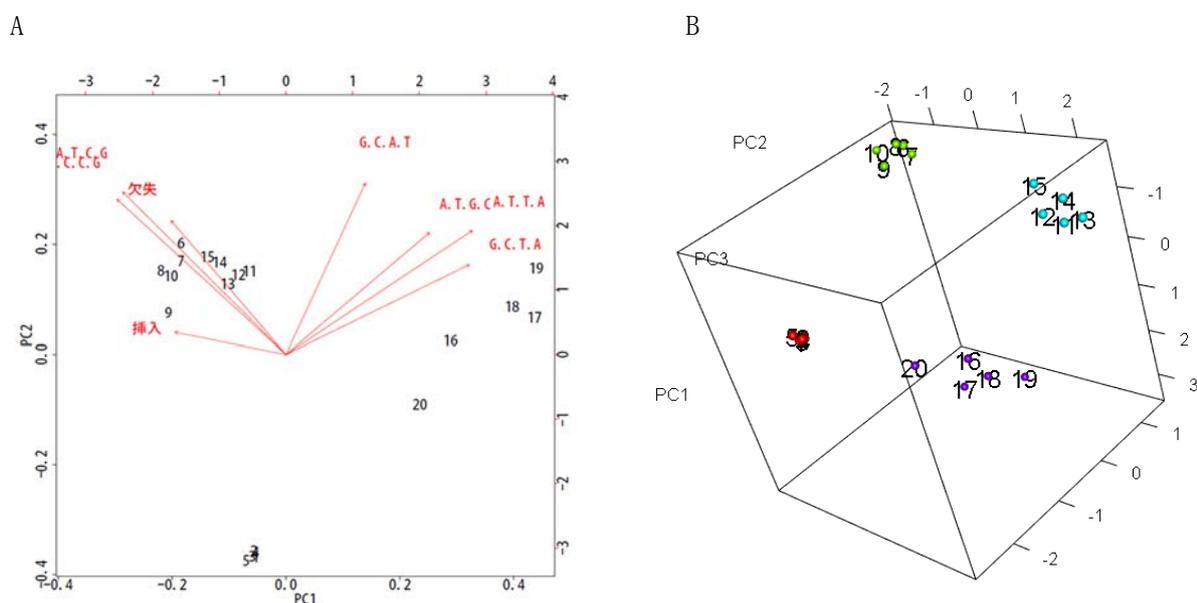


図 18 演習用データによる主成分分析のデータ解析結果例

(A) 演習用データによる主成分分析の結果を第 2 主成分 (PC1、PC2) まで表したグラフ。矢印は各突然変異の軸の寄与を表し、A 群 (No. 1~5)、B 群 (No. 6~10)、C 群 (No. 11~15)、D 群 (No. 16~20) のデータは通し番号で示した。A 群はデータが固まっているのでかなり似通った特徴をもつ群であること、B 群と C 群は近くに配置されていることからよく似た特徴を持っていることなどがわかる。

(B) 演習用データによる主成分分析の結果を第 3 主成分 (PC1~PC3) まで表したグラフ。A 群 (No. 1~5)、B 群 (No. 6~10)、C 群 (No. 11~15)、D 群 (No. 16~20) のデータは通し番号で示した。各群でデータが固まっており、クラスタリングが容易であることがわかる。

### ③ 自己組織化マップ

表 2 のデータを用いて、R のパッケージ som で自己組織化マップを生成した (図 19) 。  
 図中では、A 群は黒色の○、B 群は赤色の△、C 群は緑色の+、D 群は青色の×で示した。  
 データ数が 20 個、群数が 4 個であることから、マップの大きさを 4~100 ユニットまで試  
 し、見た目でクラスタリングが上手くいっている 6×6=36 ユニットに設定した。図 19 で  
 は、各ユニットに配置されたデータ数を n で示し、一目で各ユニットに配置されたデー  
 タの特徴を捉えることができるよう各ユニット内の折れ線グラフで各項目の特徴量を示した。  
 結果としては、自己組織化マップでは似通ったデータが近くに配置されるが、全 4 群がそ  
 れぞれの特徴を表し、クラスタリングされていることがわかる。折れ線グラフの様子から  
 は、A 群と D 群、B 群と C 群が似通った特徴を持っているのではないかと予想できる。ま  
 た、それらの異なる特徴を洗い出すと、A 群より D 群の方が挿入は少ないこと、B 群より C  
 群の方が A:T-T:A、A:T-C:G の置換と挿入、欠失で変化が大きいことなどの特徴が挙げられ、  
 それらの変化に注目することが重要ではないかと考えられる。

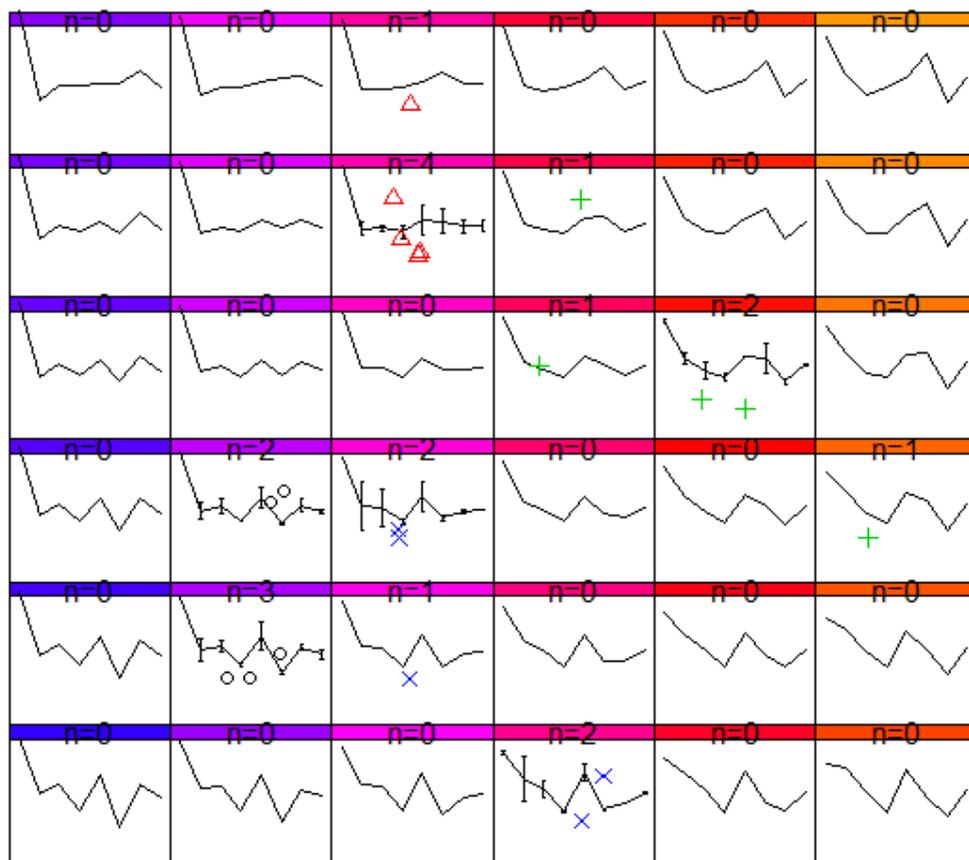


図 19 演習用データによる自己組織化マップのデータ解析結果例

演習データを用いて作成した自己組織化マップ。6×6 ユニット上でのデータ配置を示して  
 いる。各ユニットで、n 数、折れ線グラフによる 8 種類の突然変異の変化特性、データ配  
 置を示している。各群のデータは完全に違うユニットに配置され、クラスタリングが可能  
 であり、その各クラスタの特徴把握も容易であることがわかる。

④ ニューラルネットワーク

表 2 と表 3 のデータを用いて、R のパッケージ nnet を用いて隠れ層の数を調整して、2 層として予測を行った。その結果、トレーニングデータは正答率 85% (20 個中 3 個誤り)、テストデータは正答率 55% (20 個中 9 個誤り) であった (表 4)。表中では、1 がそのクラスに判別されたこと、0 がそのクラスには判別されなかったことを示した。つまり、網掛けのセルが 1 であれば正解とする。まだパラメータ設定などの課題は残っているが、トレーニングデータでは悪くない結果である。しかしながら、テストデータでは精度が優れず、汎用性に欠けるモデルであったと言える。

トレーニングデータ	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5
A	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1
テストデータ	A'-1	A'-2	A'-3	A'-4	A'-5	B'-1	B'-2	B'-3	B'-4	B'-5	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5
A	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1

表 4 演習用データによるニューラルネットワークの予測解析の結果例

演習用データによるニューラルネットの予測解析の結果。上段にトレーニングデータ、下段にテストデータ、1 列目に群名、1 行目にサンプル名を記述した。網掛け部分が正解となる。解析によりそのサンプルが分類されると予測された群に 1 と記した。

⑤ サポートベクターマシン

表2と表3のデータを用いて、Rのパッケージkernlabを用いて予測解析を行った。その結果、トレーニングデータは正答率100%（20個中0個誤り）、テストデータは正答率95%（20個中1個誤り）であった（表5）。表中の表現は④ニューラルネットワークと同様である。トレーニングデータでもテストデータでも優れた正答率であったと言える。

トレーニングデータ	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5
A	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
テストデータ	A'-1	A'-2	A'-3	A'-4	A'-5	B'-1	B'-2	B'-3	B'-4	B'-5	C'-1	C'-2	C'-3	C'-4	C'-5	D'-1	D'-2	D'-3	D'-4	D'-5
A	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1

表5 演習用データによるサポートベクターマシンの予測解析の結果例

演習用データによるサポートベクターマシンの予測解析の結果。上段にトレーニングデータ、下段にテストデータ、1列目に群名、1行目にサンプル名を記述した。網掛け部分が正解となる。解析によりそのサンプルが分類されると予測された群に1と記した。

### 3.3.3. 突然変異計測結果の解析例によるデータ解析手法の比較検討

本事業における最適なデータ解析手法を探索するため、既存論文のデータを参考にした演習用データを作成し、突然変異計測結果の解析例によって、データ解析手法を比較検討した。

5つのデータ解析手法を比較した結果、①ヒストグラムの見た目を②主成分分析や③自己組織化マップの多変量解析と比較すると、感覚的に複数の項目間の関係性等を把握することに劣っていると言える。ただし、②主成分分析や③自己組織化マップでは、解析時の距離尺度に何をを用いるか等のパラメータ設計が単純ではないことが課題である。解析対象のデータを吟味して、最適なパラメータ設計を行わなければならない。また、④ニューラルネットワークと⑤サポートベクターマシンでの予測解析は悪くない結果であったが、これらに関しても最適なパラメータ設計が必須となる。さらに、機械学習では、解析結果の精度はデータの量やデータの質に大きく左右されることも考慮しなければならない。

以上のことから、実際に解析対象のデータが得られたら、その特徴を吟味して、最適なパラメータを設計し、モデルを構築していく必要があることが分かった。

### 3.4. 研究推進

本研究を推進するにあたり、平成 30 年度は二回の研究打ち合わせを実施した。

第一回目は平成 30 年 12 月 3 日に東京工業大学を会場として東京工業大学の島田（研究代表者）、JAEA の神崎（研究分担者）、量研機構の柳原（研究分担者）が参加した他、東京工業大学のエネルギー科学専攻大学院生の三宅、東京工業大学受託研究グループの浅井氏が事務代表として参加した。本事業は 10 月 31 日開始であったために 12 月の研究打ち合わせでは全体研究計画の再確認と今後の展望を島田が説明したほか、神崎が数理モデルに関する説明、柳原が突然変異測定実験に関する説明を実施した。

第二回目は平成 31 年 3 月 7 日～8 日にかけて日本原子力研究開発機構人形峠環境技術センターを会場として実施した。参加者は東京工業大学の島田（研究代表者）、JAEA の神崎（研究分担者）、量研機構の柳原（研究分担者）JAEA の神崎の手配の元、研究施設の見学を実施した。本打ち合わせでは研究設備、試薬の準備状況の説明と、具体的な今後の方針の確認を行った。

#### 4. 結言

この研究では、放射線による生体影響として DNA 損傷とそれに起因するゲノム DNA の突然変異に着目し、放射線が与える影響の臓器・組織の特異性を測定することを主眼とした。ヒトの臓器・組織は部位によって細胞分裂の速度や回数の特徴が異なることから組織ごとに放射線の影響も異なると考えられる。図 20 にあるように放射線の DNA への影響は物理的過程、化学的過程、生物学過程によってその影響時間が異なり、物理過程である水・生体分子への影響は $10^{-14}$ 秒で生じるのに対し、生物学過程である細胞死・突然変異が生じるには数日から数十日かかる。これは生物が分子シグナルの制御などの短時間で生じる過程と細胞分裂などの比較的長い時間を要する過程と複雑な過程を経ることに起因している。放射線によって細胞の核内 DNA に傷が生じた際、それを修復する分子メカニズムの活性に差があると考えられるがその実態は不明である。そのため同じ線量を被曝し、同量の DNA 損傷が生じても修復活性が異なり、突然変異の発生頻度が異なる可能性があるため本事業ではそれらを解析するための実験系の確立を目指した。本事業は原子炉の廃炉作業者の生体影響と放射線防護の観点から放射線によって臓器によって突然変異頻度の差を知ることにより遮蔽部位などの工夫の一助になることが期待される。

本年度は 3 ヶ年事業の初年度のためにその多くを研究に使用する試薬、材料、装置の準備と実験条件の検討に費やした。

#### 放射線作用の時間経過



図 20 放射線作用の時間経過

放射線の DNA への影響は物理過程、化学過程、生物学過程に分類することができ、物理過程の水・生体内分子の電離が $10^{-14}$ 秒であるのに対し突然変異過程である生物学過程は数日から数十日と時間がかかる。

This is a blank page.

# 国際単位系 (SI)

表1. SI基本単位

基本量	SI基本単位	
	名称	記号
長さ	メートル	m
質量	キログラム	kg
時間	秒	s
電流	アンペア	A
熱力学温度	ケルビン	K
物質량	モル	mol
光度	カンデラ	cd

表2. 基本単位を用いて表されるSI組立単位の例

組立量	SI組立単位	
	名称	記号
面積	平方メートル	m <sup>2</sup>
体積	立方メートル	m <sup>3</sup>
速度	メートル毎秒	m/s
加速度	メートル毎秒毎秒	m/s <sup>2</sup>
波数	毎メートル	m <sup>-1</sup>
密度, 質量密度	キログラム毎立方メートル	kg/m <sup>3</sup>
面積密度	キログラム毎平方メートル	kg/m <sup>2</sup>
比体積	立方メートル毎キログラム	m <sup>3</sup> /kg
電流密度	アンペア毎平方メートル	A/m <sup>2</sup>
磁界の強さ	アンペア毎メートル	A/m
量濃度 <sup>(a)</sup> , 濃度	モル毎立方メートル	mol/m <sup>3</sup>
質量濃度	キログラム毎立方メートル	kg/m <sup>3</sup>
輝度	カンデラ毎平方メートル	cd/m <sup>2</sup>
屈折率 <sup>(b)</sup>	(数字の)	1
比透磁率 <sup>(b)</sup>	(数字の)	1

(a) 量濃度 (amount concentration) は臨床化学の分野では物質濃度 (substance concentration) ともよばれる。  
 (b) これらは無次元量あるいは次元1をもつ量であるが、そのことを表す単位記号である数字の1は通常は表記しない。

表3. 固有の名称と記号で表されるSI組立単位

組立量	SI組立単位			
	名称	記号	他のSI単位による表し方	SI基本単位による表し方
平面角	ラジアン <sup>(b)</sup>	rad	1 <sup>(b)</sup>	m/m
立体角	ステラジアン <sup>(b)</sup>	sr <sup>(e)</sup>	1 <sup>(b)</sup>	m <sup>2</sup> /m <sup>2</sup>
周波数	ヘルツ <sup>(d)</sup>	Hz		s <sup>-1</sup>
力	ニュートン	N		m kg s <sup>-2</sup>
圧力, 応力	パスカル	Pa	N/m <sup>2</sup>	m <sup>-1</sup> kg s <sup>-2</sup>
エネルギー, 仕事, 熱量	ジュール	J	N m	m <sup>2</sup> kg s <sup>-2</sup>
仕事率, 工率, 放射束	ワット	W	J/s	m <sup>2</sup> kg s <sup>-3</sup>
電荷, 電気量	クーロン	C		s A
電位差 (電圧), 起電力	ボルト	V	W/A	m <sup>2</sup> kg s <sup>-3</sup> A <sup>-1</sup>
静電容量	ファラド	F	C/V	m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> s <sup>4</sup> A <sup>2</sup>
電気抵抗	オーム	Ω	V/A	m <sup>2</sup> kg s <sup>-3</sup> A <sup>-2</sup>
コンダクタンス	ジーメン	S	A/V	m <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> s <sup>3</sup> A <sup>2</sup>
磁束	ウェーバ	Wb	Vs	m <sup>2</sup> kg s <sup>-2</sup> A <sup>-1</sup>
磁束密度	テスラ	T	Wb/m <sup>2</sup>	kg s <sup>-2</sup> A <sup>-1</sup>
インダクタンス	ヘンリー	H	Wb/A	m <sup>2</sup> kg s <sup>-2</sup> A <sup>-2</sup>
セルシウス温度	セルシウス度 <sup>(e)</sup>	°C		K
光照射量	ルーメン	lm	cd sr <sup>(e)</sup>	cd
放射線量	グレイ	Gy	J/kg	m <sup>2</sup> s <sup>-2</sup>
放射性核種の放射能 <sup>(f)</sup>	ベクレル <sup>(d)</sup>	Bq		s <sup>-1</sup>
吸収線量, 比エネルギー分与, カーマ	グレイ	Gy	J/kg	m <sup>2</sup> s <sup>-2</sup>
線量当量, 周辺線量当量, 方向性線量当量, 個人線量当量	シーベルト <sup>(g)</sup>	Sv	J/kg	m <sup>2</sup> s <sup>-2</sup>
酸素活性化	カタール	kat		s <sup>-1</sup> mol

(a) SI接頭語は固有の名称と記号を持つ組立単位と組み合わせても使用できる。しかし接頭語を付した単位はもはやコヒーレントではない。  
 (b) ラジアンとステラジアンは数字の1に対する単位の特別な名称で、量についての情報をつたえるために使われる。実際には、使用する時には記号rad及びsrが用いられるが、習慣として組立単位としての記号である数字の1は明示されない。  
 (c) 測光学ではステラジアンという名称と記号srを単位の表し方の中に、そのまま維持している。  
 (d) ヘルツは周期現象についてのみ、ベクレルは放射性核種の統計的過程についてのみ使用される。  
 (e) セルシウス度はケルビンの特別な名称で、セルシウス温度を表すために使用される。セルシウス度とケルビンの単位の大きさは同一である。したがって、温度差や温度間隔を表す数値はどちらの単位で表しても同じである。  
 (f) 放射性核種の放射能 (activity referred to a radionuclide) は、しばしば誤った用語で"radioactivity"と記される。  
 (g) 単位シーベルト (PV, 2002, 70, 205) についてはCIPM勧告2 (CI-2002) を参照。

表4. 単位の中に固有の名称と記号を含むSI組立単位の例

組立量	SI組立単位		
	名称	記号	SI基本単位による表し方
粘力のモーメント	パスカル秒	Pa s	m <sup>-1</sup> kg s <sup>-1</sup>
表面張力	ニュートンメートル	N m	m <sup>2</sup> kg s <sup>-2</sup>
角加速度	ラジアン毎秒	rad/s	m m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> = s <sup>-1</sup>
角加速度	ラジアン毎秒毎秒	rad/s <sup>2</sup>	m m <sup>-1</sup> s <sup>-2</sup> = s <sup>-2</sup>
熱流密度, 放射照度	ワット毎平方メートル	W/m <sup>2</sup>	kg s <sup>-3</sup>
熱容量, エントロピー	ジュール毎ケルビン	J/K	m <sup>2</sup> kg s <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup>
比熱容量, 比エントロピー	ジュール毎キログラム毎ケルビン	J/(kg K)	m <sup>2</sup> s <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup>
比エネルギー	ジュール毎キログラム	J/kg	m <sup>2</sup> s <sup>-2</sup>
熱伝導率	ワット毎メートル毎ケルビン	W/(m K)	m kg s <sup>-3</sup> K <sup>-1</sup>
体積エネルギー	ジュール毎立方メートル	J/m <sup>3</sup>	m <sup>-1</sup> kg s <sup>-2</sup>
電界の強さ	ボルト毎メートル	V/m	m kg s <sup>-3</sup> A <sup>-1</sup>
電荷密度	クーロン毎立方メートル	C/m <sup>3</sup>	m <sup>-3</sup> s A
電表面電荷	クーロン毎平方メートル	C/m <sup>2</sup>	m <sup>-2</sup> s A
電束密度, 電気変位	クーロン毎平方メートル	C/m <sup>2</sup>	m <sup>-2</sup> s A
誘電率	ファラド毎メートル	F/m	m <sup>3</sup> kg <sup>-1</sup> s <sup>4</sup> A <sup>2</sup>
透磁率	ヘンリー毎メートル	H/m	m kg s <sup>-2</sup> A <sup>-2</sup>
モルエネルギー	ジュール毎モル	J/mol	m <sup>2</sup> kg s <sup>-2</sup> mol <sup>-1</sup>
モルエントロピー, モル熱容量	ジュール毎モル毎ケルビン	J/(mol K)	m <sup>2</sup> kg s <sup>-2</sup> K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup>
照射線量 (X線及びγ線)	クーロン毎キログラム	C/kg	kg <sup>-1</sup> s A
吸収線量率	グレイ毎秒	Gy/s	m <sup>2</sup> s <sup>-3</sup>
放射線強度	ワット毎ステラジアン	W/sr	m <sup>4</sup> m <sup>-2</sup> kg s <sup>-3</sup> = m <sup>2</sup> kg s <sup>-3</sup>
放射輝度	ワット毎平方メートル毎ステラジアン	W/(m <sup>2</sup> sr)	m <sup>2</sup> m <sup>-2</sup> kg s <sup>-3</sup> = kg s <sup>-3</sup>
酵素活性濃度	カタール毎立方メートル	kat/m <sup>3</sup>	m <sup>3</sup> s <sup>-1</sup> mol

表5. SI接頭語

乗数	名称	記号	乗数	名称	記号
10 <sup>24</sup>	ヨタ	Y	10 <sup>1</sup>	デシ	d
10 <sup>21</sup>	ゼタ	Z	10 <sup>2</sup>	センチ	c
10 <sup>18</sup>	エクサ	E	10 <sup>3</sup>	ミリ	m
10 <sup>15</sup>	ペタ	P	10 <sup>6</sup>	マイクロ	μ
10 <sup>12</sup>	テラ	T	10 <sup>9</sup>	ナノ	n
10 <sup>9</sup>	ギガ	G	10 <sup>12</sup>	ピコ	p
10 <sup>6</sup>	メガ	M	10 <sup>-15</sup>	フェムト	f
10 <sup>3</sup>	キロ	k	10 <sup>-18</sup>	アト	a
10 <sup>2</sup>	ヘクト	h	10 <sup>-21</sup>	ゼプト	z
10 <sup>1</sup>	デカ	da	10 <sup>-24</sup>	ヨクト	y

表6. SIに属さないが、SIと併用される単位

名称	記号	SI単位による値
分	min	1 min=60 s
時	h	1 h=60 min=3600 s
日	d	1 d=24 h=86 400 s
度	°	1°=(π/180) rad
分	'	1'=(1/60)°=(π/10 800) rad
秒	"	1"=(1/60)'=(π/648 000) rad
ヘクタール	ha	1 ha=1 hm <sup>2</sup> =10 <sup>4</sup> m <sup>2</sup>
リットル	L, l	1 L=1 l=1 dm <sup>3</sup> =10 <sup>3</sup> cm <sup>3</sup> =10 <sup>-3</sup> m <sup>3</sup>
トン	t	1 t=10 <sup>3</sup> kg

表7. SIに属さないが、SIと併用される単位で、SI単位で表される数値が実験的に得られるもの

名称	記号	SI単位で表される数値
電子ボルト	eV	1 eV=1.602 176 53(14)×10 <sup>-19</sup> J
ダルトン	Da	1 Da=1.660 538 86(28)×10 <sup>-27</sup> kg
統一原子質量単位	u	1 u=1 Da
天文単位	ua	1 ua=1.495 978 706 91(6)×10 <sup>11</sup> m

表8. SIに属さないが、SIと併用されるその他の単位

名称	記号	SI単位で表される数値
バール	bar	1 bar=0.1MPa=100 kPa=10 <sup>5</sup> Pa
水銀柱ミリメートル	mmHg	1 mmHg=133.322Pa
オングストローム	Å	1 Å=0.1nm=100pm=10 <sup>-10</sup> m
海里	M	1 M=1852m
バイン	b	1 b=100fm <sup>2</sup> =(10 <sup>12</sup> cm) <sup>2</sup> =10 <sup>-28</sup> m <sup>2</sup>
ノット	kn	1 kn=(1852/3600)m/s
ネーパ	Np	SI単位との数値的関係は、 対数量の定義に依存。
ベレル	B	
デシベル	dB	

表9. 固有の名称をもつCGS組立単位

名称	記号	SI単位で表される数値
エルグ	erg	1 erg=10 <sup>-7</sup> J
ダイン	dyn	1 dyn=10 <sup>-5</sup> N
ポアズ	P	1 P=1 dyn s cm <sup>-2</sup> =0.1Pa s
ストークス	St	1 St=1cm <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> =10 <sup>-4</sup> m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
スチルブ	sb	1 sb=1cd cm <sup>-2</sup> =10 <sup>4</sup> cd m <sup>-2</sup>
フオト	ph	1 ph=1cd sr cm <sup>-2</sup> =10 <sup>4</sup> lx
ガリ	Gal	1 Gal=1cm s <sup>-2</sup> =10 <sup>-2</sup> ms <sup>-2</sup>
マクスウェル	Mx	1 Mx=1 G cm <sup>2</sup> =10 <sup>-8</sup> Wb
ガウス	G	1 G=1Mx cm <sup>-2</sup> =10 <sup>-4</sup> T
エルステッド <sup>(a)</sup>	Oe	1 Oe <sub>e</sub> =(10 <sup>3</sup> /4π)A m <sup>-1</sup>

(a) 3元系のCGS単位系とSIでは直接比較できないため、等号「△」は対応関係を示すものである。

表10. SIに属さないその他の単位の例

名称	記号	SI単位で表される数値
キュリー	Ci	1 Ci=3.7×10 <sup>10</sup> Bq
レントゲン	R	1 R=2.58×10 <sup>-4</sup> C/kg
ラド	rad	1 rad=1cGy=10 <sup>-2</sup> Gy
レム	rem	1 rem=1 cSv=10 <sup>-2</sup> Sv
ガンマ	γ	1 γ=1 nT=10 <sup>-9</sup> T
フェルミ	f	1 フェルミ=1 fm=10 <sup>-15</sup> m
メートル系カラット		1 メートル系カラット=0.2 g=2×10 <sup>-4</sup> kg
トル	Torr	1 Torr=(101 325/760) Pa
標準大気圧	atm	1 atm=101 325 Pa
カロリ	cal	1 cal=4.1858J (「15°C」カロリ), 4.1868J (「IT」カロリ), 4.184J (「熱化学」カロリ)
マイクロ	μ	1 μ=1μm=10 <sup>-6</sup> m

