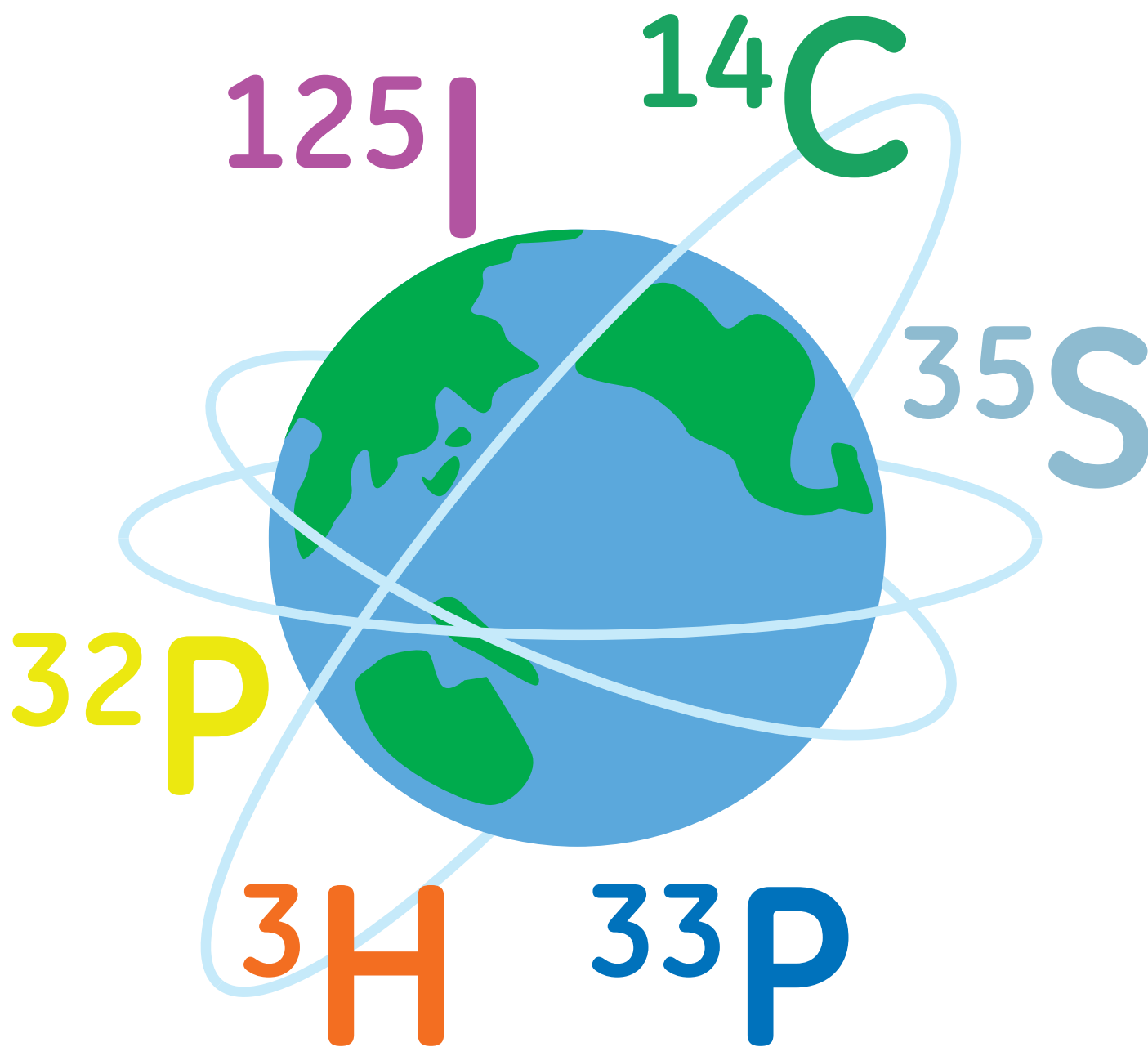


ラジオアイソトープ利用ガイドブック

— Radioisotopes for Life Science Research —



GE imagination at work

ラジオアイソトープ標識化合物の安全取扱い

Phosphorus-32

半減期	14.3日
放出放射線	高エネルギーβ線（最大1.709 MeV）
汚染の検出	GM管式サーベイメータ
空気中の最大飛程	790 cm
水中の最大飛程	0.76 cm
線量	1 ml中の1 MBqによる線量は、表面で210 mSv/時（21 rem/時）、 1 mの距離で2.5 μSv/時（0.25 mrem/時）
しゃへい	1 cm厚アクリル板がβ線を十分にしゃへいし、制動放射線の発生も最小にする

特記事項

- ライフサイエンス研究で使用する核種の中では最大のβ線エネルギーがあります。不必要な被ばくを避けるよう、アクリル製ホルダーかケースも使用してください。
- 30 MBq（～1 mCi）以上を扱う場合、指や手首に装着するタイプの線量計 もあわせて使用してモニタしてください。
- 300 MBq（～10 mCi）以上を扱う場合、アクリルの外側をさらに鉛で囲い、制動放射線をしゃへいする必要があります。

H-3 (Tritium)

半減期	12.3年
放出放射線	弱エネルギーβ線 （最大0.0186 MeV）
汚染の検出	スミア法—液体シンチレーション カウンタで測定
空気中の最大飛程	6 mm
水中の最大飛程	0.006 mm
しゃへい	特に必要なし

Phosphorus-33

半減期	25.3日
放出放射線	中エネルギーβ線（最大0.249 MeV）
汚染の検出	GM管式サーベイメータ
空気中の最大飛程	49 cm
水中の最大飛程	0.6 mm
しゃへい	1 cm厚アクリル板（3 mm厚程度までうすくてもよいが、 強度が不十分になる）

Carbon-14

半減期	5,730年
エネルギー	中エネルギーβ線 （最大0.156 MeV）
汚染の検出	薄窓GM管式サーベイメータ
空気中の最大飛程	24 cm
水中の最大飛程	0.28 mm
しゃへい	1 cm厚アクリル板 （3 mm厚程度までうすくても よいが、強度が不十分になる）

Sulphur-35

半減期	87.5日
放出放射線	中エネルギーβ線（最大0.167 MeV）
汚染の検出	薄窓GM管式サーベイメータ
空気中の最大飛程	26 cm
水中の最大飛程	0.32 mm
しゃへい	1 cm厚アクリル板（3 mm厚程度までうすくてもよいが、 強度が不十分になる）

特記事項

- 亜硫酸ガスや硫化水素が発生するおそれがあるので、吸引しないように実験条件に注意を払ってください。
- バイアルの開封や使用にあたっては、必ず換気の良いフード中で行ってください。
- ³⁵S標識アミノ酸は、放射線分解で揮発性分解生成物を生じ、反応容器や装置内面が汚染している可能性があるので注意してください。

特記事項

- 放出β線のエネルギーがきわめて低いいため、サーベイメータでの検出が困難です。スミア法で定期的に実験台等の汚染のモニタを行ってください。
- ^3H 標識化合物を使用する場合は特にしゃへいを行う必要はありませんが、肌から吸収されやすいので必ず防護用手袋を着用してください。
- 外部からの被ばくは影響がないのですが、体内に取り込まれた ^3H 標識化合物による内部被ばくに注意してください。
- ALI（年摂取限度）は対象となる ^3H 標識化合物によって非常に差があります。
たとえばDNA前駆体の ^3H 標識チミジンでは放射能が細胞の核に取込まれ集中することになるので、トリチウム水よりも影響が大きいと考えられます。

特記事項

- ある種の有機化合物は手袋を通じて浸透します。
また、使用時に CO_2 ガスとして吸引するのを防ぐために、 CO_2 を生じないように注意してください。

Iodine-125

半減期
主要放出放射線

59.4日
35 keV γ 線（7 %放出、93 %内部転換）
27-32 keV X線（140 %Teのk X線）

汚染の検出
線量
しゃへい

^{125}I 用シンチレーションサーベイメータ
1 GBq点線源から1 mの距離で41 $\mu\text{Sv/時}$ （4.1 mrem/時）
0.02 mm厚鉛で半減

特記事項

- ヨウ素は揮発性物質であり、体内に吸収された場合、甲状腺で選択的に濃縮・蓄積が起こります。使用にあたっては、換気に注意して、必ずフード内で全ての作業を行ってください。換気口にはチャコールフィルターなどを取り付け、汚染した空気がそのまま外部に出ないようにしてください。また、使用者の定期的な甲状腺検査も行うべきです。
- ヨウ素イオンを含む溶液を凍結したり、酸性化させた場合は、揮発性ヨウ素分子を生じます。
- ヨウ素標識化合物の中には手術用ゴム手袋を透過してしまうものがあります。ポリエチレン製の手袋を二重にして取り扱ってください。
- 誤って吸入してしまった場合、甲状腺保護のため、ヨウ化カリウム（130 mg）やヨウ素酸カリウム（170 mg）をすみやかに投与してください。
- 廃棄物は、可能な限り速やかに封をして処理してください。廃液中のヨウ素イオンを、アルカリ性チオ硫酸ナトリウム（チオ硫酸ナトリウム25 g、ヨウ化ナトリウム2 gを1 N水酸化ナトリウム溶液1 lに溶解したもの）で安定化させることも必要です。

Cromium-51

半減期
放出放射線

27.7日
0.32 MeV γ 線（9.8 %）
5 KeV X線（22 % V-51 kX線）

汚染の検出
線量

シンチレーションサーベイメータ
1 GBq点線源から1 mの距離で4.7 $\mu\text{Sv/時}$
（0.47 mrem/時）

しゃへい

3 mm厚鉛板で半減

はじめに

1896年にA. H. Becquerelにより放射能の現象が発見されて以来、ラジオアイソトープ (Radioisotope: 以降RI) は医学・薬学をはじめとして幅広い研究分野で応用されてきました。RIは今日のライフサイエンスの研究に多大な貢献をもたらしてきた反面、人体や環境への影響を懸念して、その使用や廃棄には法的な制約が設けられています。また、近年の科学技術の急速な進歩にともない、RIを使用した検出・測定技術から非RI (Non-RI) 手法への変換も積極的に行われています。しかし、検出感度と測定精度の高さ、実験手法の容易さから、引き続き多くの分野でRIは利用されています。

ライフサイエンス分野で利用されるRIは、リン酸基をもつ核酸の標識に ^{32}P や ^{33}P 、チオール基を持つアミノ酸残基を含むタンパク質の標識に ^{35}S 、チロシン残基を含むタンパク質の標識に ^{125}I が主に用いられていますが、これら以外にも ^3H や ^{14}C 、 ^{51}Cr が実験目的に応じて利用されています。いずれのRIも生体物質に直接取り込まれたり、RIからの放射線が人体や環境に大きな影響をもたらす可能性を持った同位元素です。誤った使用法は、使用者本人だけでなく共同使用者の健康に影響をおよぼし、実験の精度を落とします。RI実験を行うにあたっては、RIの特性を十分に理解し、適切に管理された実験環境のもとで正しく取り扱い、RI使用に関する法令を遵守することが求められています。

本書は、研究者の皆さまにRIの安全な取扱いと使用方法を十分理解していただくために作成いたしました。これからRI実験を始める研究者はもとより、RI実験を行う全ての研究者にも繰り返し参考にしていただけるよう、実験の準備段階からRIの基礎知識、安全な取り扱い、測定方法および実験例までをわかりやすく、かつ実践的にまとめました。本書がRI実験の参考書として皆さまのご研究に役立ちますよう、スタッフ一同、心から願っております。

最後になりますが、本書をまとめるにあたり、貴重なご意見をいただきました東京大学アイソトープ総合センター 巻出義紘 教授をはじめ、諸先生方に心から感謝を申し上げます。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

Contents

第1章 ー基礎編ー

1-1 ラジオアイソトープの基礎.....10	1-4 汚染と処理法22
1-2 ラジオアイソトープの取扱い14	1-5 除染の方法23
1-3 RIの検出法18	1-6 しゃへい材の種類と効果24
1-3-1 LSCによる放射エネルギー測定.....18	1-7 RI取扱い10か条の鉄則.....25
1-3-2 写真による検出：オートラジオグラム20	1-8 標識化合物の使用にかかわる法令26
1-3-3 イメージアナライザーによる検出と解析20	

第2章 ー実験編ー

計画から実験まで28	2-4 Iodine-125
2-1 Phosphorus-32	2-4-1 ¹²⁵ I標識42
2-1-1 核酸の標識法.....30	2-4-2 プロトコル.....44
2-1-2 プロトコル.....32	クロラミン-T法によるタンパク質標識 ..44
ランダムプライマー法.....32	レセプターアッセイ46
末端標識法.....34	2-5 Hydrogen-3 (Tritium)
2-2 Phosphorus-33	2-5-1 プロトコル.....48
2-2-1 プロトコル.....36	細胞増殖の測定.....48
マクロアレイによる	レセプターの解析.....50
遺伝子発現のプロファイリング36	2-6 Carbon-14
2-3 Sulphur-35	2-6-1 プロトコル.....52
2-3-1 プロトコル.....38	CATアッセイによる
<i>in vitro</i> Translation38	プロモーター活性の検討52
細胞の標識.....40	[¹⁴ C]標識 2DGを用いる
	局所脳グルコース利用率の測定54
	2-7 Chromium-51
	2-7-1 プロトコル.....56
	細胞傷害性試験.....56

第3章 ーデータ集ー

3-1 DNA/RNA58
3-2 バッファー／溶液の調製法.....60
3-3 標識化合物関連データ61

第1章 ー基礎編ー

1-1 ラジオアイソトープの基礎	10
1-2 ラジオアイソトープの取扱い	14
1-3 RIの検出法	18
1-3-1 LSCによる放射エネルギー測定	18
1-3-2 写真による検出：オートラジオグラム	20
1-3-3 イメージアナライザーによる検出と解析	20
1-4 汚染と処理法	22
1-5 除染の方法	23
1-6 しゃへい材の種類と効果	24
1-7 RI取扱い10か条の鉄則	25
1-8 標識化合物の使用にかかわる法令	26

1-1. ラジオアイソトープ (RI) の基礎

ラジオアイソトープ (Radioisotope ; 放射性同位体または放射性同位元素)

原子は、原子核と、その周囲の軌道をまわる電子からできています。さらに原子核は、**陽子**と**中性子**からできています。

原子核の種類は、陽子の数と中性子の数、およびエネルギー状態できまり、これを核種とよびます。

陽子の数が**原子番号**を表し、陽子と中性子の数の和が**質量数**になります。

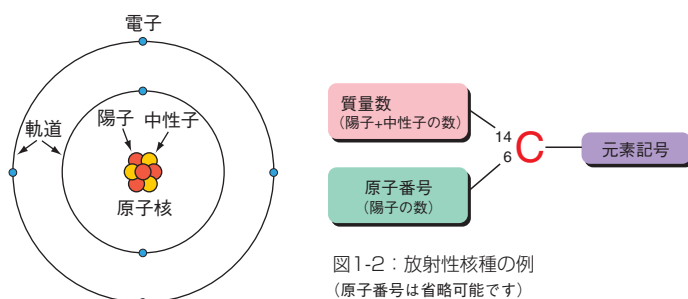


図1-1: 炭素原子の模式図

陽子の個数が同じで中性子の個数が異なる原子、すなわち原子番号が同じで質量数異なる原子をアイソトープ (**同位体**または**同位元素**) とよびます。アイソトープのうち、**放射線**をだして他の核種 (**娘核種**) にかわるものがラジオアイソトープ (RI*) です。水素では3種類のアイソトープのうち、トリチウムだけがRIです。

*RadioisotopeをRIと略記するのは日本でのみです。英語では決して略さずに Radioisotope(s)と記載しますが、本書では略称として国内で通用している 'RI' の用語を使用します。

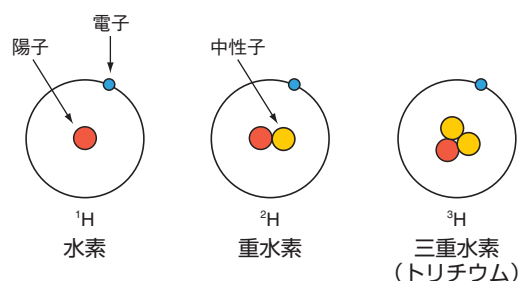


図1-3: アイソトープ

放射線の種類

α (アルファ) 線

原子核から飛び出したヘリウム原子核 (陽子2個、中性子2個から成る)

β (ベータ) 線

原子核から放出された電子

γ (ガンマ) 線

原子核内から放出された電磁波

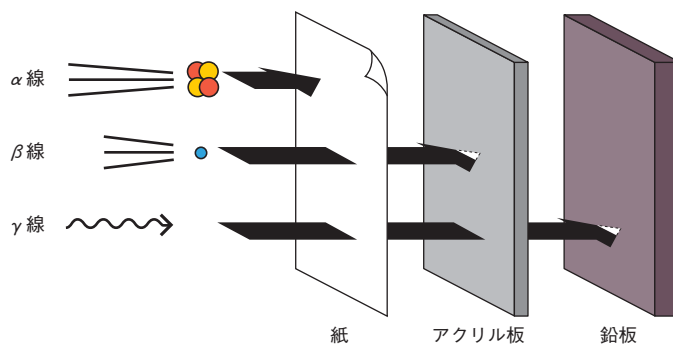


図1-4: 放射線の透過力

RIの製造法

ラジオアイソトープは自然界にも存在しますが、原子炉やサイクロトロンなどで人工的に作り出されたものが研究などに用いられています。

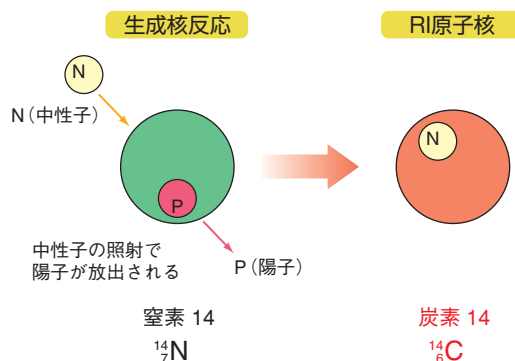


図1-5: 炭素14の生成核反応

参考資料



RI核種

	原子番号	アイソトープの例	ラジオアイソトープ（半減期）
水素	1	^1H 、 ^2H 、 ^3H	^3H （12年）
炭素	6	^{11}C 、 ^{12}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C	^{11}C （20分）、 ^{14}C （5730年）
リン	15	^{31}P 、 ^{32}P 、 ^{33}P	^{32}P （14日）、 ^{33}P （25日）
硫黄	16	^{32}S 、 ^{33}S 、 ^{34}S 、 ^{35}S 、 ^{36}S	^{35}S （88日）
ヨウ素	53	^{125}I 、 ^{127}I 、 ^{131}I	^{125}I （59日）、 ^{131}I （8日）

表1-1：アイソトープの例

各核種または他の核種について詳細を調べるには、Lawrence Berkeley National LaboratoryのTable of Isotopes (<http://ie.lbl.gov/toi.html>)などを参考にしてください。

α 壊変

α 線は重い原子核（ウランやアメリシウム、ラジウムなど）から飛び出した高速のヘリウム原子核です。 α 線が放出されると、もとの原子核よりも陽子、中性子がそれぞれ2個ずつ減少した原子核になります。このような壊変を α 壊変とよびます。原子核反応式では次の例のように表現します。



ライフサイエンスの研究では α 線を放出する核種を使用することはほとんどありません。しかし、身近なところで α 線放出核種は使用されています。（たとえば煙感知器には少量のアメリシウム-241を用いているものがあります）。

β 壊変

β 線は原子核から飛び出した高速の電子（electron）です。 β 線が放出されると、もとの原子核よりも陽子が1個多く、中性子が1個少ない原子核になります。このような壊変を β 壊変とよびます。また、原子核内の1個の陽子が中性子に変化し、高速の陽電子（positron）が飛び出す壊変の形式があります。これを β^+ 壊変と表現します。 β^+ 線が放出されるともとの原子核よりも陽子が1個少なく、中性子が1個多い原子核になります。このような壊変を β^+ 壊変とよびます。 β^+ 壊変に対し β 壊変を β^- 壊変と表記することもあります。



β 線放出核種は身近なところでは夜光塗料や、蛍光灯のグロー放電管などに使用されています。

γ 線

壊変が起こったあとの原子核は励起状態にあることが多く、通常はきわめて短い時間内に余分のエネルギーを電磁波として放出し、安定な状態になります。この原子核内より放出される電磁波を γ 線とよびます。

X線は γ 線と性質は同じですが、原子核外の軌道電子の状態変化により放出される電磁波です。たとえば β 壊変の1種である軌道電子捕獲（electron capture; EC）という壊変形式では、原子核内の1個の陽子が中性子に変化するとき、軌道電子を1個取込みますが、このときできた空孔が外側の軌道電子によって埋められるときX線が放出されます。この他、X線の放出には内部転換（Internal Conversion; IC）があります。



生成核反応

生成核反応	RI核種	壊変様式	娘核種
$^6\text{Li} (n, \alpha)$	^3H	β	Helium-3
$^{14}\text{N} (n, p)$	^{14}C	β	Nitrogen-14
$^{32}\text{S} (n, p)$	^{32}P	β	Sulphur*-32
$^{35}\text{Cl} (n, p)$	^{35}S	β	Chlorine-35
$^{124}\text{Xe} (n, \gamma)$ で生成する ^{125}Xe （半減期17時間）のEC壊変	^{125}I	EC	Tellurium-125

表1-2：よく使われるRIの生成核反応の例

生成核反応は括弧内の左側に入射粒子を、右側に放出粒子を標記します。

*硫黄の英語表記はSulphur（英）とSulfur（米）がありますが、本書ではSulphurを用いています。

放射能および放射性物質の量をあらわす単位

原子核が放射線を出して他の種類の原子核に変わる性質を放射能とよび、その現象を壊変とよびます。また放射能という言葉はこの性質の大きさを表すのにも使われます。単位は壊変毎秒（1秒あたりの壊変数、disintegration per second; dps）、これをSI単位ではベクレル（Bq）であらわします。以前使用されたキュリー（Ci）はSI単位ではありませんが、現在でもよく使用されています（RIの販売も、Ci単位で区切りのよい量となっています）。

1 Bq=1壊変毎秒（dps）=2.7×10⁻¹¹Ci

核種	³ H	¹⁴ C	³⁵ S	³³ P	³² P	¹²⁵ I	⁵¹ Cr
壊変形式	β	β	β	β	β	EC	EC
最大β線エネルギー（MeV）	0.0186	0.156	0.167	0.248	1.709		
半減期	12.3 年	5730 年	87.5 日	25.3 日	14.3 日	59.4 日	27.7 日
最大比放射能	9.6 Ci/mg	4.4 mCi/mg	43 Ci/mg	156 Ci/mg	285 Ci/mg	14.2 Ci/mg	92.2 Ci/mg
β線の最大飛程（mm）	空気中	6	240	260	490	7900	—
	水中	0.006	0.28	0.32	0.6	7.6	
有効なしゃへい材と厚さ	特に必要なし	1 cm厚アクリル板（3 mm厚でも十分）	1 cm厚アクリル板（3 mm厚でも十分）	1 cm厚アクリル板（3 mm厚でも十分）	1 cm厚アクリル板（多量に扱う場合は制動放射線のしゃへいも必要）	0.02 mm厚鉛で半減（1.2cm厚の鉛入りアクリル板でもよい）	3 mm厚鉛板で半減
実験試料の測定	LSC（液体シンチレーションカウンタ）	LSC	LSC	LSC	LSC（チェレンコフ光の測定も可能）	γまたはX線検出器	γまたはX線検出器
汚染の検査	スミア法を行い、LSCでモニタする（サーベイメータではモニタできない）	GM管式サーベイメータ	GM管式サーベイメータ	GM管式サーベイメータ	GM管式サーベイメータ	¹²⁵ I γ線用シンチレーションサーベイメータ	γ線用シンチレーションサーベイメータ

表1-3：ライフサイエンス分野でよく使用される核種の物理特性と取扱い法

*エネルギーの基本的単位はジュール（J）ですが、放射線のエネルギーを表すのによく用いられる単位に電子ボルト（electron volt、eV）があります。電子が1ボルトの電圧で加速されて得る運動エネルギーを1eVと定義し、次のように表されます。
1 eV=1.60×10⁻¹⁹ J
1 MeV（1メガ電子ボルト）は1 eVの10⁶倍を表します。

線量

物質や生物に対する**放射線の影響を評価**するために、3つの線量とその単位が定義されています。

		SI単位名	記号	定義	旧単位	SI単位と旧単位の関係
照射線量	γ（X）線が空気をどれだけ電離できるかをあらわす	クーロン毎キログラム	C/kg	空気1 kg中に1 クーロン（C）のイオンを作る γ（X）線の量	レントゲン（R）	1 C/kg = 3876 R
吸収線量	放射線のエネルギーがどれだけ物質に吸収されたかをあらわす	グレイ	Gy	1 kgあたり1 ジュールのエネルギーの吸収があるときの線量	ラド(rad)	1 Gy = 100 rad
実効線量	人体への影響がどのくらいかをあらわす	シーベルト	Sv	Σ 吸収線量×放射線荷重係数*1 ×組織荷重係数*2	レム（rem）	1 Sv = 100 rem

表1-4：線量の種類

*1放射線の種類とエネルギーにより人体への影響の程度が異なるために考慮される係数です。γ（X）線、β線は1で、中性子線は5～20、α線は20を用います。
*2放射線の種類とエネルギーにより人体の各部位への影響の程度が異なるために考慮される係数です。肺の場合は0.12のように、各部位によって決まっています。

参考資料



ベクレル／キュリー

ベクレル（Bq）は1896年にウランからの放射線を、キュリー（Ci）は1898年にラジウムを発見したそれぞれの研究者の名前から採られています。

1 Ciはラジウム1 gの放射能とほぼ同じです。

kBq MBq GBq	3.7	7.4	9.25	11.1	14.8	18.5	37	74	92.5	111	148	185	222	259	296	333	370	444	555	740	925
μCi mCi Ci	0.1	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	1	2	2.5	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	25

MBq GBq TBq	1.11	1.48	1.85	2.22	2.59	2.96	3.33	3.7	4.63	5.55	7.4	9.25	11.1	14.8	18.5	22.2	25.9	27.8	29.6	33.3	37
μCi mCi Ci	30	40	50	60	70	80	90	100	125	150	200	250	300	400	500	600	700	750	800	900	1000

表1-5：ベクレル／キュリー換算表



β線エネルギー

α壊変の場合には一定のエネルギーをもったα粒子（ヘリウムの原子核）が放出されるのに対し、β壊変では最大エネルギー $E_{\max}$ 以下種々のエネルギーをもったβ粒子（電子）が放出されます。β線スペクトルは固有の最大値（最大β線エネルギー）以下の連続スペクトルとなります。



半減期

核種の壊変の速度は外的条件などに影響されず、原子核にだけ依存する確率的現象です。半減期は、常に原子核の数（あるいは放射能）が**壊変して半分になるまでの時間**のことです。

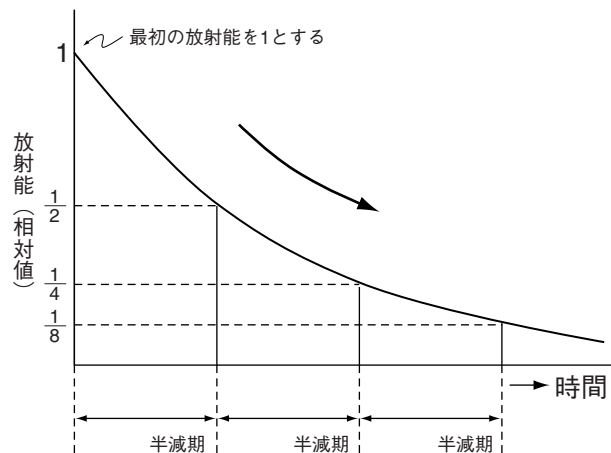


図1-6：半減期

1-2. ラジオアイソトープの取扱い

RI標識化合物

放射性核種を含む化合物（RI標識化合物、**ホット**とも表現します）は、通常の化合物（非RI標識化合物、**コールド**とも表現します）と一部の原子がラジオアイソトープに変わったただけなので、各種反応、化学的挙動はほぼ同じであると考えられます。したがって、RI標識化合物は種々の実験において‘**トレーサー**’（追跡子）として、元素や化合物の挙動を追跡、解析するための有効な手段として利用されています。

RI標識化合物安全使用のための3原則（3C）

Contain	放射性物質をできるだけ狭い空間にとじこめ、広がらないようにする
Confine	利用する放射線、放射能の量を必要最小限にし、効果的に利用する
Control	放射性物質の購入、使用、廃棄などを適切に管理する

3Cは放射線管理の基本である**放射線障害の防止**を達成するために実行されるものです。**10か条の鉄則**（p.25参照）を基本原則として理解し、計画の立案、実施を確実に行ってください。

- ・ 使用者自身の放射線障害の防止をはかる
- ・ 周囲の人の放射線障害の防止をはかる
- ・ 一般の人々の放射線障害の防止をはかる

RI標識化合物の分解とその抑制法

化合物の安定性は、ホットとコールドでは大きく異なります。ホットはコールドより分解しやすくなります。標識化合物を有効に利用するには、その特性を十分に理解して実験計画をたて、分解が起こる前に使用することが重要です。納品後のRI標識化合物は、添付の仕様書に記載されている最適な条件に従って保存してください。

分解様式	原因	抑制法
一次（内的）分解	放射性核種の壊変	なし
一次（外的）分解	放射線による化合物分子の直接破壊	RI標識化合物分子の分散
二次分解	ラジカルなどとの相互作用	RI標識化合物分子の分散 低温保存 ラジカルスカベンジャーの添加
化学的および微生物による分解	熱力学的不安定性 保存環境の不適正	低温保存 環境の適正化

表 1-6：RI標識化合物の分解様式と抑制法

一次（外的）分解の抑制法として、標識化合物分子の分散化があります。比放射能あるいは放射能濃度を低くすると、放射線とRI標識化合物分子の衝突による分解の確率を下げるができます。16ページの表1-8に市販RI標識化合物の核種による一般的な放射能濃度を示しました。この放射能濃度のRI標識化合物は一般的に安定であると考えられています。

二次分解は低温保存により抑制できます。例として $[^{35}\text{S}]$ Cysteineの保存温度と分解の程度を示しました（図1-7）。-140℃で保存した場合はほとんど分解しませんが、-20℃では1週間で30 %以下まで**放射化学的純度**（p.16参照）が低下します。二次分解は、また、放射線の作用によって生成する**フリーラジカル類**が集積した**スプール**（Spur）によっても起こります。したがって、ラジカルの生成を少なくする**スカベンジャー**を溶液に加えても分解を抑制することができます。スカベンジャーとしてはエタノールなどが用いられます。

表1-7に、それぞれの核種によって実験に使用できる、期間の目安をまとめました。これはあくまでも一般的なものです。目的のRI標識化合物がどのくらいの期間使用可能かは各実験内容によって判断してください。この期間を過ぎたRI標識化合物は、できるだけすみやかに正規の手順に従って廃棄してください。

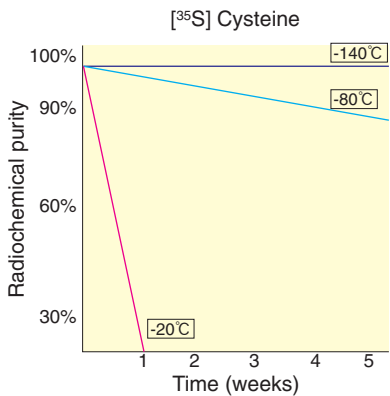


図 1-7：温度による分解の違いの例

^3H 化合物	製造後1-6ヶ月以内
^{14}C 化合物	製造後3ヶ月-1年以内
^{32}P 化合物	製造後1-2週間以内
^{35}S 化合物	製造後2週間-2ヶ月以内
^{125}I 化合物	製造後2週間-1ヶ月以内

表 1-7：標識化合物の使用期間の目安

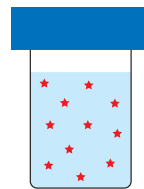
参考資料



凍結方法による分解の違い

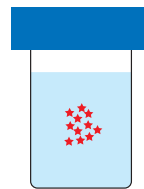
溶液を液体窒素で急速凍結した場合と、冷凍庫に入れてゆっくり凍結した場合では、図1-8のように分子の集まり方が異なり、緩慢な場合にはクラスターを形成します。弱β線放出核種の場合、このクラスター内でエネルギーの吸収が生じて、分解を促進します。液体窒素での急速凍結ができない場合、-20℃のフリーザーで保存するより、クラスターを形成しない4℃のほうが安定です。

液体窒素での急速凍結



分子は分散したまま

冷凍庫での緩慢凍結



分子が凝集(クラスター)を形成する

図1-8：クラスターの形成



標識化合物の分解

現在最も広く使用されているRI標識化合物、³²P標識ヌクレオチドを例に説明します。

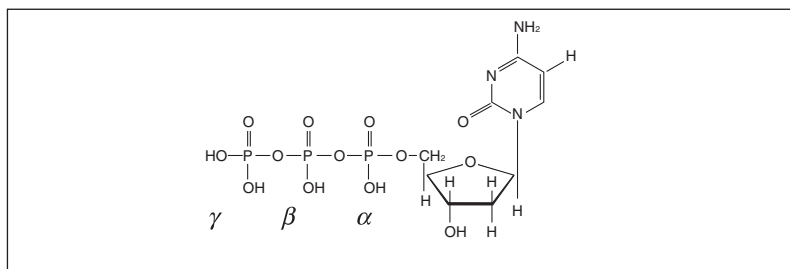


図1-9：dCTPの構造

[α-³²P] dCTPの分解

図1-9のα位のPが³²Pになっているものを[α-³²P] dCTPと表わします。

《β壊変により³²Pが³²Sになる》

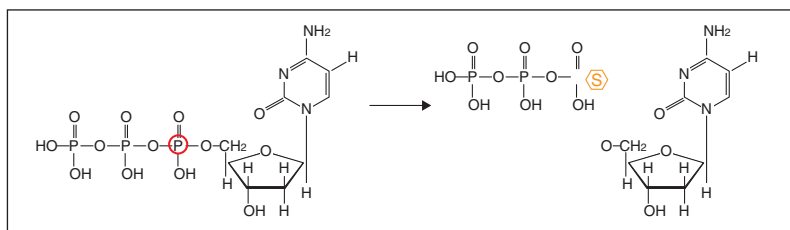


図1-10：β壊変によるdCTPの分解

³²Pが壊変すると³²Sになります。原子価ではPは5、Sは6ですから、そのままの結合は維持できません。ヌクレオシド（塩基と糖部分）とリン酸部分は離れてしまい、DNAの基質にはなりません。

《β線エネルギーによる分子結合の切断》

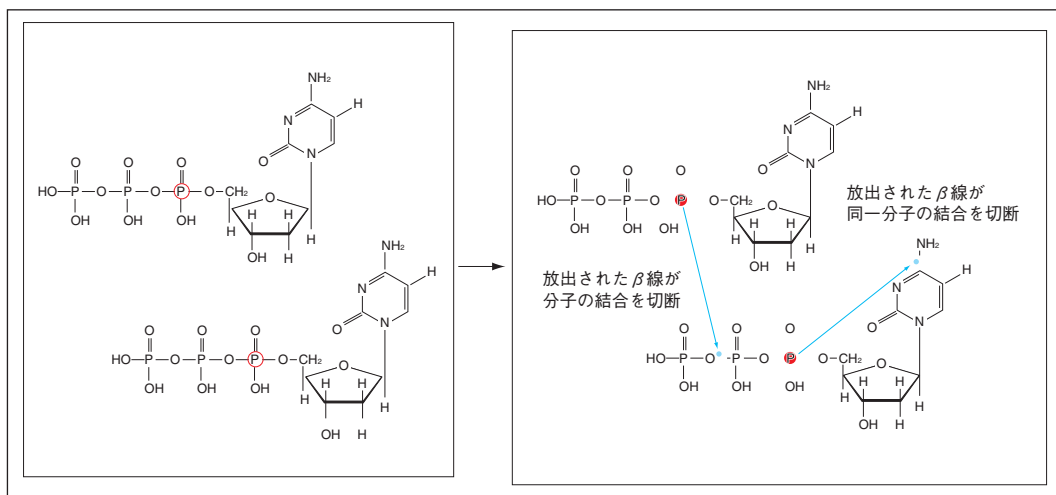


図1-11：β線エネルギーによる分子結合の切断

³²Pのβ線エネルギーは、化合物の結合を切断します。化合物分子の集団の中で、切断される結合位置は特定できません。

そのためRI標識化合物が分解した場合に、分解されて生じるものは特定できず、いろいろな分解物の混合したものとなります。

RI標識化合物の選択法

論文などでメーカー名や製品コード番号まで指定されていれば同一製品を選択すれば良いのですが、そのようなケースはほとんどありません。必要なRI標識化合物の情報を読み取り、カタログから同一のものや適したものを選んでください。新しい系では実験の目的や検出系により、核種、標識位置、比放射能、溶媒など最適なものを選択してください。

標識位置

酵素基質として使用する場合など、標識位置が重要です（図1-12）。また、標識位置によって抗体やレセプターとの親和性が変化する場合があります（図1-13）。特に新規の実験を構築する場合、位置の選択は重要ですので、十分検討してください。

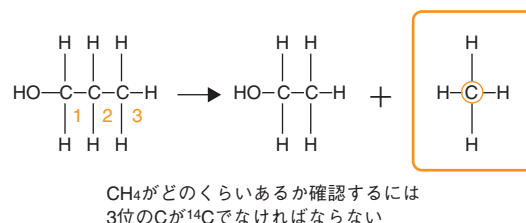


図1-12：標識位置

比放射能 (Specific Radioactivity)

化合物単位質量あたりどのくらいの放射能があるかを示す重要な値です（図1-14）。低比放射能の場合、標識体（●）にくらべ、非標識体（○）の割合が多くなります。一般的に比放射能が高いほうが検出しやすくなりますので実験には便利です。しかし分解が早い、同一放射能量中では化合物の分子数が少なくなるので大量に使わなければならない、などのデメリットもあります。

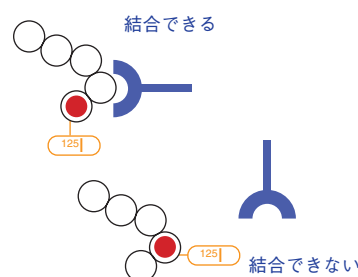


図1-13：¹²⁵Iの標識位置による抗体との結合親和性の変化

総放射能 (実験に必要な放射能)

1本のチューブや実験系に、どのくらいRI標識化合物を加えるのか、どのくらいの数をこなすのかで必要総量は決まります。一定期間以降は使えなくなるので、実験期間内で使う必要最小量のパッケージを購入するようにしてください。

放射化学的純度 (Radiochemical Purity)

あるRIが目的とする化合物の目的位置に正しく標識された化合物としてどのくらい存在するかを表します。RIを使用、選択する上で重要なポイントです。HPLC（高速液体クロマトグラフィー）や薄層などのクロマトグラフィー、電気泳動、酵素を使用したアッセイなどで分析されます。図1-15にL-[4,5-³H] LeucineのラジオHPLCでの分析例を示します。

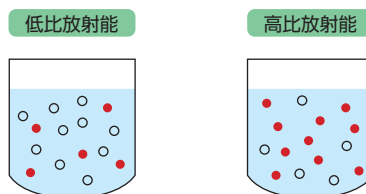


図1-14：比放射能の模式図

溶媒

RI標識化合物の安定性を優先するため、目的の実験には適さない溶媒に溶解されて販売されている場合があります。溶媒の交換が必要かどうか確認してください。RI標識化合物が実際に使用する実験系に適した状態で品質管理・販売されて問題なくそのまま使用できる製品もあります。

放射能濃度 (Radioactive Concentration)

一般的に市販のRI標識化合物は、安定性の高い放射能濃度で販売されています。化合物によりスカベンジャーや安定化剤を添加したり、溶液や凍結乾燥として販売されています。実験系に適しているか、適していないなら変更が可能か、検討が必要です。

[³ H]化合物	37 MBq/ml (1 mCi/ml)
[¹⁴ C]化合物	1.85 MBq/ml (50 μCi/ml)
[³² P]ヌクレオチド (高濃度水溶液)	370 MBq/ml (10 mCi/ml)

表1-8：市販RI標識化合物の一般的な放射能濃度

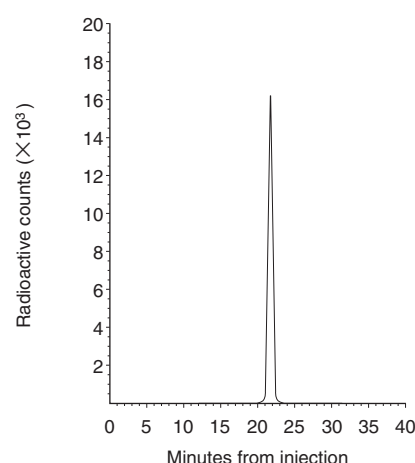


図1-15：ラジオHPLCでの分析例

参考資料



RI標識化合物の標記法

RI標識化合物の標記の方法はいろいろあります。ここではChemical SocietyやAmerican Chemical Societyなどの雑誌で利用されている‘Square-brackets-preceding’によるRI標識化合物の標記法を紹介します。

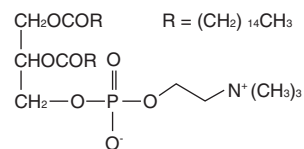


図1-16：L-3-Phosphatidylcholine, 1,2-dipalmitoyl

RIは、**標識されている物質の直前の括弧中に**標記します。

L-3-Phosphatidyl[N-methyl- ^{14}C]choline, 1,2-dipalmitoyl

L-3-Phosphatidylcholine, 1,2-di[^{14}C]palmitoyl

アラビア数字、ギリシャ文字や接頭語で標記位置を示す場合はRIの標記の前におきます。

[8- ^{14}C]Adenosine 5'-triphosphate

Adenosine 5'-[γ - ^{32}P]triphosphate

[adenine- ^{14}C]Adenosine 5'-triphosphate

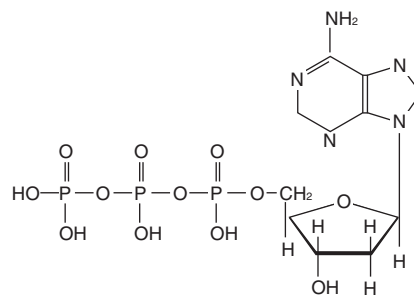


図1-17：Adenosine 5'-triphosphate

特殊な表現として[U- ^{14}C]や、[G- ^3H]という標記の場合

があります。UniformとGeneralの頭文字で、これらはその化合物中に均一に、または全体に標識核種があることを意味します。



比放射能と実験に使用する化合物量、全放射能量

3種類の比放射能の [α - ^{32}P]dCTP（放射能濃度370 MBq/ml、9.25 MBqパッケージ）を使用し、25 ngの鋳型DNAから標識プローブを作る場合には必要なRI総量と得られるプローブの比放射能との関係の例を以下に示します。（詳細は32ページをご覧ください）

比放射能（TBq/mmol）	220	110	30
必要なRI総量（MBq）	4.18	2.09	0.55
液量（ μl ）	11	5.6	1.5
標識回数	2	4	16
プローブの比放射能（cpm/ μg DNA）	1×10^{10}	5×10^9	1.3×10^9

実験でどのくらいの検出感度が必要か、1回あたりのプローブの量、実験を何回行うかなどを考慮し、無駄のない使用計画を立ててください。



溶媒の除去の方法（例）

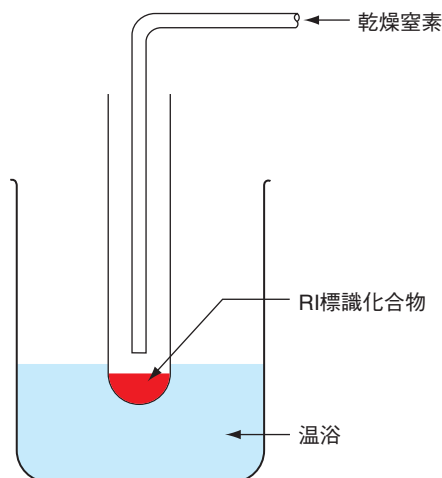


図1-18：溶媒の除去

トルエン溶液、エタノール溶液あるいはエタノール水溶液などで販売されている不揮発性のRI標識化合物では、容器を30～35℃の温水に浸し、溶液表面に乾燥窒素をゆるやかに吹きつけながら溶媒を飛ばします。揮発性のRI標識化合物ではこのような開放した状況での溶媒除去は絶対に行わないでください。

1-3. RIの検出法

放射能は直接目に見えず、匂いもしません。放射線は高速の粒子や電磁波であり、物体に対して

- 1) 電離・励起作用
- 2) 発光作用
- 3) フィルム感光作用

などがあります。これらを利用して適当な装置や機器を用いることで私たちは放射線を検出することができます。ここでは、一般的に行われている3種のRI検出法について紹介します。

1-3-1. LSC（液体シンチレーションカウンタ）による放射能量測定

これは β 線放出RIを検出する代表的な方法です。有機溶媒と溶質（蛍光体）よりなる**液体シンチレータ（シンチラント）**に試料を加えると、 β 線による有機溶媒の π 電子の励起がおこり、これが基底状態に戻るときに高エネルギーの光子を生じます。この光子が蛍光体に作用し発光しますので、光電子増倍管（PM管）で検出します。

- ・ 現在良く使われている液体シンチレータ

キシレン（トルエン）系シンチレータ：

計数効率が高いが親水性試料は測定できない

乳化シンチレータ：

含水量の高い試料でも計数効率が高い

LSCとサンプルにより、各放射性核種の計数効率は異なります。ご使用のLSCの計数効率を確認してください。

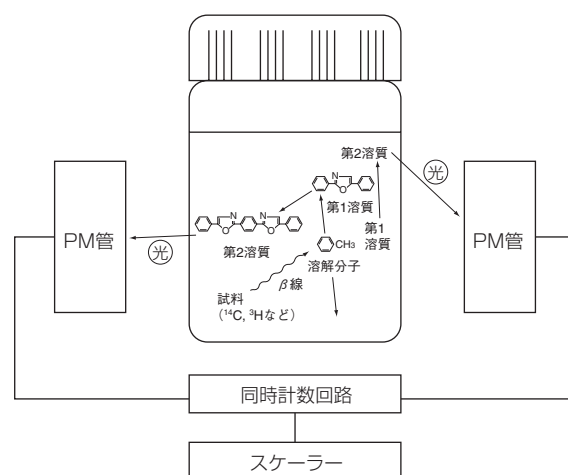


図1-19：LSCの原理

LSCで測定して、予測されるカウント数と大きく異なるカウント数が得られることがあります。カウントが高い場合は**化学ルミネセンス**、低い場合は**クエンチング**の影響を検討してください。

化学ルミネセンス（Chemiluminescence）

化学ルミネセンスは、試料の化学反応により生じます。可溶化剤の第四級アミン水酸化物などのアルカリ溶液や、過酸化物が混在しているときに良くみられ、以下の操作などで抑えます。

- ・ 溶液をpH 7以下にする
- ・ 加温により化学反応を早く終了させてから測定する

また、測定用バイアルを日光や紫外線にさらした場合、りん光の影響でカウントが異常に高くなります。この場合にはバイアルを数時間暗所に置くと影響が見られなくなります。

クエンチング（消光）

クエンチングは β 線→発光→PM管での検出の各段階で起こります。発光前は酸素や化学クエンチング、発光後は色によるクエンチングが生じます。酸素や化学クエンチングを排除することが重要です。試料中にクエンチンになりうる物質を含まないようにする必要があります。また溶液中の溶存酸素量が多いとクエンチングの影響が大きくなるのですが、溶存酸素を除いても、一定時間空放置すると溶存酸素量が一定に戻ってしまう（平衡化）ので、ライフサイエンス分野の研究の場合にはそのまま測定することがほとんどです。

γ 線の測定

^{125}I のような γ 線放出核種はLSCでも効率よく測定できます。しかし、一般的には液体シンチレータを使用せずに測定できる γ カウンタなどの、 γ 線専用の測定機器が用いられます。

	計数効率の目安	使用するLSCでの効率
^3H	30～50%	%
$^{14}\text{C} / ^{35}\text{S}$	>80%	%
^{32}P	ほぼ100%	%

表1-9：計数効率

■ 参考資料 ■



測定器とバイアル

LSC測定では、用いるバイアルの選択も重要です。バックグラウンドの問題、計数効率、有機溶媒に対する耐性、容量、コストなどから、使いやすいバイアルを選択してください。



固体シンチレータ

液体シンチレーションカウンタ用の製品として、シリカビーズに蛍光体が入ったものが市販されています。これに少量（200 μ l以下）の不揮発性の液体試料を吸収させ、乾燥後カウントします。液体シンチレータを用いませんので、放射性廃棄物を減少できます。



チェレンコフ光

荷電粒子がある媒質（水、ポリエチレン等）中を移動する際、その媒質の電子の伝導速度より速く移動したとき（通常 β 線は光速に近い）、円すい状の波面の衝撃波が生じます。これがチェレンコフ光です。水を媒質とした場合、チェレンコフ光を生じる電子のしきいエネルギーは0.263 MeVですので、これ以上の最大 β 線エネルギーをもつ核種で測定できます。測定はLSCを用いますが、液体シンチレータを使用せずに測定できますので、試料の再使用や、放射性有機廃液を減少させることができます。



試料の可溶化

計数効率を高くするには、試料が液体シンチレータ中に均一に分散することが必要です。生体試料の多くは、そのままでは均質な溶液になりません。そのため可溶化剤で処理し、均質な試料にして測定します。

可溶化剤としては第4級アミン水酸化物が良く用いられます。ただし可溶化剤は色クエンチングや、化学ルミネセンスの原因物質となりますので使用にあたって注意が必要です。



色クエンチャの除去

一般的に用いられる液体シンチレータの発光波長は350～450 nmです。そのため、試料が黄色ないし赤色に着色していると影響が大きく、青色ではあまり影響がありません。タンパク質を酸処理したり、 FeCl_3 を使用した試料などは淡黄色になるので注意が必要です。またヘモグロビンやポルフィリンなどはごく微量でも影響が大きいため、脱色（漂白）操作が必要です。

過酸化水素や塩素水で試料を脱色させます。ただし、脱色剤自体さまざまなクエンチャとして作用するので、その後の処理が必要です。



クエンチング補正

クエンチングの影響を100%取り除くのは、ほとんど不可能です。LSCの種類によって、さまざまなクエンチング補正のプログラムやシステムが組み込まれています。また、内部標準法、試料チャネル比法や外部標準法などのクエンチング補正法をおこなうこともできます（これらの詳細については南山堂発行、石川寛昭著「最新液体シンチレーション測定法」などを参考にしてください）。

1-3-2. 写真による検出：オートラジオグラム（Autoradiogram；Autoradiography）

放射線に感光作用があることから、古くから用いられている方法です。結果は像として得られ、形態、分布がわかります。黒化度から量も推定可能です。

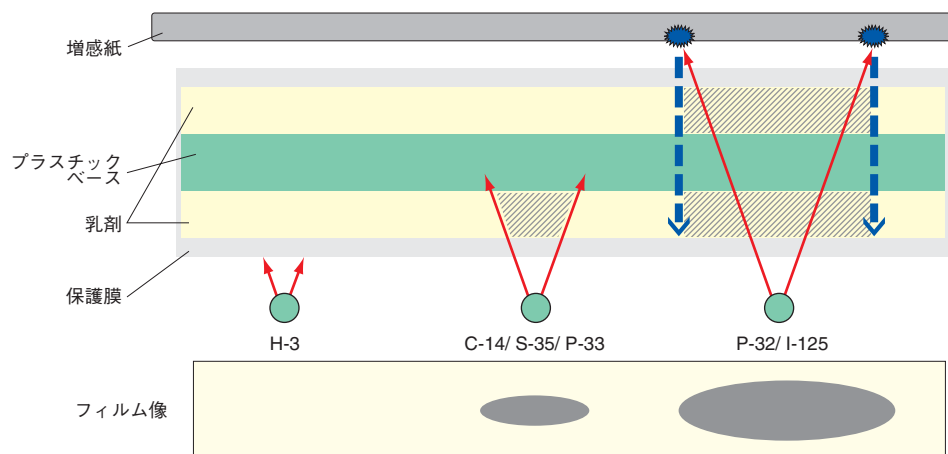


図1-20：オートラジオグラム

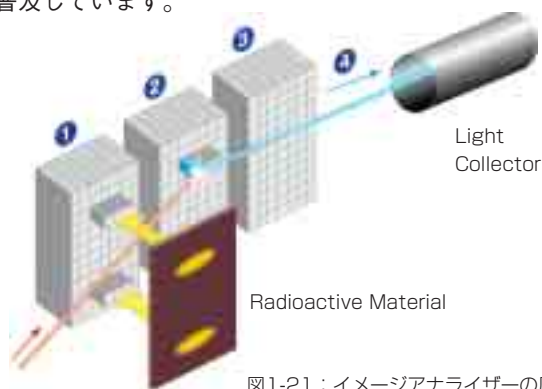
増感紙（Intensifying Screen）：エネルギーの強い核種（ ^{32}P や ^{125}I ）の場合にエネルギーを反射させ増感させる目的で使用します。上図のように、反射により像が大きくなりますので解像度は下がります。

フィルム：最良の結果を得るために、フィルムをきちんと選んでください。一般的に感度が高いフィルムは解像度が低く、逆に解像度が高いフィルムは感度が低くなります。像は黒くなりますので、ベースが無色透明に近いほうが、コントラストが高くきれいな結果になります。

- ・ 乳剤が二層（図1-21の場合）：最も汎用されるタイプです。増感紙を使用する場合は必ずこのタイプをご使用ください。
- ・ 乳剤が一層： ^{35}S などの中 β 線核種で、高解像度を求める場合、バックグラウンドを下げるためには乳剤が一層のほうが適しています。露光面を確認して使用します。
- ・ 乳剤が露出： ^3H の場合、保護膜を β 線が透過できません。乳剤（エマルジョン）をサンプル上に塗布する方法や、保護膜のない、乳剤が露出しているフィルムを使用しなければなりません。

1-3-3. イメージアナライザーによる検出と解析

最近では放射線のエネルギーを直接フィルム上に撮る方法にかわり、特別なスクリーン（プレート）を用いて放射線エネルギーを潜像としてとらえ、それをレーザーでスキャンしてコンピュータ処理により検出および解析が一度にできるシステムが普及しています。



- 放射線がPhosphorScreenに到達すると
- 1) BaFBr:Eu²⁺結晶がイオン化され、潜在的イメージが形成される。
 - 2) レーザースキャンを行うと、結晶から青色光としてエネルギーが開放される。
 - 3) 基底状態にもどる。
 - 4) 青色光を捕集して、解析する。

図1-21：イメージアナライザーの原理

オートラジオグラフィーにくらべ、非常に高感度で短時間、簡単な操作で結果を得られます。さらにオートラジオグラフィーにくらべダイナミックレンジが非常に広いこと、高解像度であることも有用な特徴です。



図1-22：STORM™システムとPhosphorScreen（右）

参考資料



オートラジオグラム

1896年にベクレルがウランからの放射線を発見したときも、原理的にはオートラジオグラムでした。現在までRIを利用した研究に欠かせないものになっています。



核種によるオートラジオグラフィーの選択

オートラジオグラムによる結果は、標識核種、使用量（単位面積あたりの放射エネルギー）、露光時間などで変わってきます。実験系や目的に最適なフィルムを選択してください。

核 種	実験系	感度／解像度	方法
³² P	サザン／ノーザンブロット ブランク／コロニーハイブリゲル中のサンプル	高感度	プレフラッシュフィルム＋増感紙を用い、 -70℃露光
	DNAシーケンシング	高解像度	ダイレクトオートラジオグラフィー
¹⁴ C ³³ P ³⁵ S	タンパク質合成 細胞溶解液、ゲル中のサンプル	高感度	プレフラッシュフィルムを用い、 フルオログラフィーを-70℃露光
³⁵ S	サザン／ノーザンブロット ウェスタンブロット DNAシーケンシング <i>In Situ</i> ハイブリダイゼーション	高解像度	ダイレクトオートラジオグラフィー
	薄層／ペーパークロマトグラム	高解像度	ダイレクトオートラジオグラフィー (フルオログラフィーにより、多少増感できる)
	タンパク質合成 細胞溶解液、ゲル中のサンプル	高感度	乳剤の保護膜のないフィルムを用いるか、 ³ H用のイメージアナライザー用プレート
³ H	<i>In Situ</i> ハイブリダイゼーション	高解像度	ダイレクトオートラジオグラフィー、 乳剤の保護膜のないフィルムを用いる
	¹²⁵ I ウェスタンブロット	高感度	プレフラッシュフィルム＋増感紙を用い、 -70℃露光

*プレフラッシュフィルム：簡単に表現すると、像が見える直前のレベルまで露光しておくことです。このようにしておくと、少量の光で露光するだけで像が現れるので、感度が上がることになります。

*-70℃露光：高感度の検出を行う場合には、露光を低温下で行ってください。

表1-10：オートラジオグラフィーの選択



フルオログラフィー（Fluorography：Fluorogram）

エネルギーの弱いβ線放出核種（³H、¹⁴C、³³Pや³⁵S）の増感法です。原理は液体シンチレータを用いてLSCで測定するのと同じで、蛍光体（PPOなど）でβ線エネルギーを光子に変換させたものを露光します。ゲルのような厚みがある試料の場合に、蛍光体がRIの近傍に十分集積されるので効果が高く、メンブランやTLCプレートのような薄い場合には効果が低くなります。シート状の蛍光体で測定試料を包み込んでフルオログラフィーの効果をj得るような市販品もあります。放射性廃液を減らすのに有用です。



定量

オートラジオグラフィーでもイメージアナライザーでも、定量のためには既知RI量との比較、校正が必要です。段階的な放射能標準を用い、測定試料と同一の検出を行い、標準曲線を求めます。試料を標準曲線と比較して定量します。



イメージアナライザー用プレート

イメージアナライザーに使用するプレートは、核種によって最適なものがあります。機器の取扱説明書に従い適切なものを使用してください。

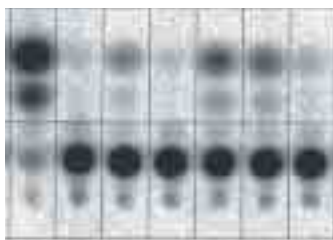


図1-23：CATアッセイ

CATアッセイは、遺伝子の転写や転写安定性、翻訳効率を測定する目的で使用されます。STORMシステムでは、リポーター遺伝子アッセイに対し、イメージ作成から最終レポートまでの分析を自動化します。

1-4. 汚染と処理法

非密封のRIを使用した実験を行えば、危険性の大小はありますが、必ず‘汚染’の可能性があります。RI実験に使用した全ての器具が**広い意味で汚染**したといえます。実験に使用した器具はすべて適切な‘除染’処理を行ってください。その処理が不適切であると、実験台の上や周辺、実験室全体にまで汚染が広がることがあります。

正しい汚染の処理、除染法を身につけて、いつでも行えるようにしてください。

“おそれない”

きちんとした防御をして、モニタをしっかり行えば除染は安全にできます。

“あわてない”

あわててしまうと、拾い上げた汚染源を再度落としたり倒したりして、かえって汚染領域を広げてしまいますので、落ち着いて除染してください。

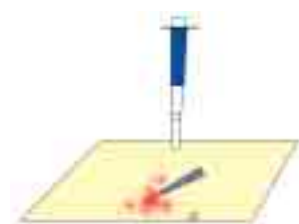
“あなどらない”

手袋をしてる紙で拭き取っているから大丈夫、とか、汚染範囲内の除染が終了して一安心！…ではありません。

手袋の汚染に気づかずにその手袋で触ったところが汚染していませんか？

汚染範囲外のモニタはしましたか？

注意深く除染してください。



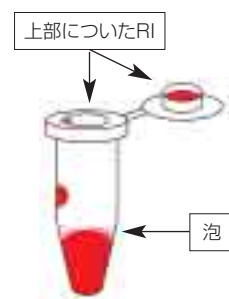
しばしばおこる小規模汚染の原因

ピペットチップを落としてしまった

RI標識化合物を取り出すために使用したチップを落としたときは、周囲にも溶液が飛び散っていないか確認してください。確認しないで次にすすむと思わぬところにまで汚染が広がる原因となります。

取り出し／分注の際に溶液が泡立ち、それがはじけた

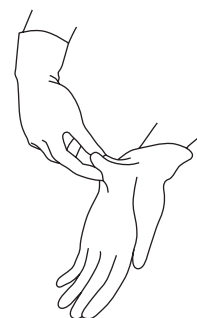
試験管などの深い部分でおこると、外部飛散はなくても、ピペット本体が汚染した可能性があります。確認しないで次にすすむと、他に汚染が広がってしまうことがあります。ピペット先端を汚染させないため、エアロゾルバリア付のチップなどを使用するのも良いでしょう。



キャップの開閉で上部についたRI標識化合物を飛散させてしまった

注意してもピペット先端がチューブ上部に触れてしまうことがあります。付いてしまった溶液は遠心で下部に集めたり、拭き取ってください。そのままキャップをした場合、次に開くときに飛散して汚染を広げてしまいます。

開封時にはろ紙でキャップを覆い、飛散しないようにしてください。開封前には遠心し、溶液を底部に集めてください。



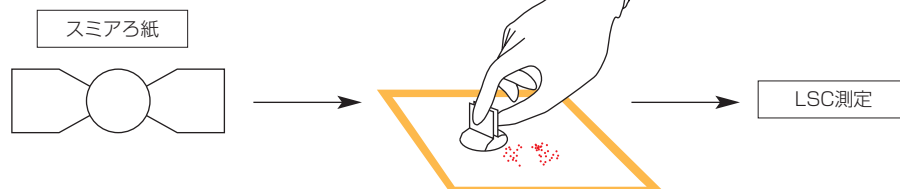
汚染した手袋を取ろうとして、他の部分を汚染させてしまった

手袋を引っ張って取ろうとして、手袋表面の汚染が飛散したり、汚染した手袋で触れた部分をさらに汚染させることがあります。ゆっくりと静かに取ってください。

スミア（拭き取り）法による汚染のモニタ

必ず手袋をして行ってください。

^3H の場合には、この方法でないと確認できません。



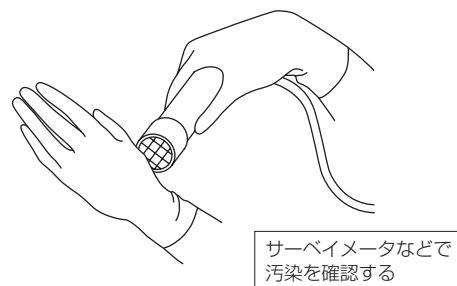
1-5. 除染の方法

同じ実験室内にいる人に汚染が発生したことを知らせる

一人での処理を考えないでください。**必ず他の人に知らせ、RI管理者に連絡**してもらったり、除染を共同で行ったりしてください。

身体および衣服などへの汚染が無いことを確認する

もし、衣服などに汚染が見つかったら、すみやかに脱いでください。実験室内の広い場所に移動し、実験衣は汚染部分を確認しながらゆっくりと脱ぎ、他に汚染が広がらないようビニール袋に入れてください。



皮膚についた場合、まず大量の水で洗い流す

水がはねて他の場所を汚染しないよう注意してください。

ぬるま湯で、手洗い用石鹸や中性洗剤を用いてよく洗ってください。

あまり強くこすって、皮膚表面を削ったり、傷をつけないよう注意してください。

3〜4回繰り返し、再度モニタします。

それでも落ちない場合、チタン酸ペースト（酸化チタンを0.01 N HClで溶いたもの、なければ練り歯磨きのような研磨剤のはいったもの）で注意深く洗う（皮膚表面を多少削り取る）必要があります。

効果の少ない方法を何十回も繰り返すのは無駄です。



適切なモニタで汚染区域を確認する

汚染した区域を明確に示すためテープなどで囲い、はっきり分かるようにしてください。

実験衣や手袋、防護めがねなどの保護具をきちんとつけていることを確認してから行ってください。汚染の程度に応じて、例えば実験用のしゃへい板などを使用することも考えてください。



周辺に汚染がないか適切なモニタを使用して再確認する

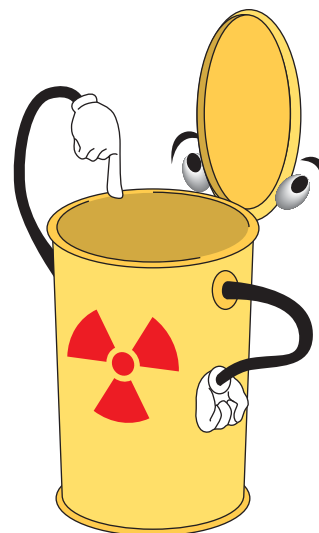
大きな汚染物を取り除き、ビニール袋や廃棄用容器に入れる

除染したあと再使用するのがよいか、そのまま廃棄するのがよいか考えてください。

こぼれた溶液をろ紙や吸収紙で拭き取る

手袋をきちんとしていることを再確認の上、ピンセットなどを用いてろ紙などで拭き取ってください。使用したろ紙などはビニール袋や廃棄容器に入れてください。

さらに溶液がなくなるまで拭き取ってから、モニタしてください。



＜除染が不十分＞
さらに水ぶきを行う。
↓（モニタ）
洗剤を使用して十分に拭き取る。
↓（モニタ）
酸・アルカリ溶液や市販の除染剤を使用する。

除染は安全が最優先されます。そして除染の効果、メリットと、放射性廃棄物の量がどのくらいになるのか考えてください。たとえば、床や壁の一部を非常に労力をかけてきれいに拭き取る場合と削り取って補修した場合を考えると、拭き取りには時間と労力がかかり廃棄物も多くなります。人件費を考えなかったとしても廃棄物の処理コストが増加します。削り取って補修する場合、補修費用がかかりますが廃棄物量は少なくなります。

安全性、労力、廃棄物量やコストなどを判断して最適な方法を決めてください。とくにRI管理者と必ず相談してください。

1-6. しゃへい材の種類と効果

^{32}P や ^{125}I などのRI標識化合物を使用する場合には、被ばく線量をできるだけ低くするため、効果的なしゃへい材を適切に用いて実験を行ってください。 ^{32}P などの β 線をしゃへいするにはアクリルなどのプラスチック、 ^{125}I の低エネルギー γ 線をしゃへいするには鉛入りガラスや鉛入りアクリルを使用します。

^{32}P のしゃへい

^{32}P などの核種から放出される β 線は、物質を通過する際に制動放射線（制動X線）とよばれるX線を放出します。制動放射線の透過力は β 線より大きいのでこれを確実にしゃへいしなければなりません。この制動放射線の強さは、 β 線のエネルギーの強さと、通過する物質を構成する原子の原子番号の大きさに比例し増大します。アクリルのようなプラスチック類は原子番号の小さい物質からできています。このアクリルでできたしゃへい体では発生する制動放射線が弱いため、実質しゃへい体でほぼ吸収されてしまいます。そのため、1 cm厚のアクリル板は β 線を効果的にしゃへいし、制動放射線の発生を抑えることができます。

^{32}P のしゃへい効果

1 cm厚のアクリル製しゃへい板 β -Safety Screen※を用いたしゃへい効果の実験例をご紹介します。この例ではガラスバイアルに入れた407 MBqの ^{32}P サンプルのカウントを、 β -Safety Screenとの距離を変えて測定しています。

この結果より、しゃへい材の効果がわかります。

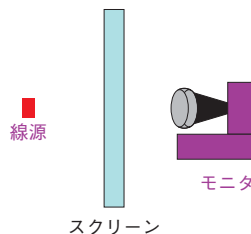


図1-24： β -Safety Screenを使用した実験

線源をスクリーンから10cm離して置く	
スクリーンからモニタまでの距離 (cm)	カウント (cps)
0	15
5	12
10	7
15	4

表1-11： β -Safety Screenのしゃへい効果

^{125}I のしゃへい

γ 線をしゃへいするためには、鉛のように大きな原子番号を有する物質を用いるのが効果的です。しかし、通常大きな原子番号の物質は透明ではありません。 ^{125}I などから放出される低エネルギー γ 線の場合には鉛を入れたアクリルを用いることでこの問題を解決し、 γ 線を効果的にしゃへいできる製品が販売されています。

^{125}I のしゃへい効果

モニタを一定にしておき、74 MBqの ^{125}I のカウントを測定しました。 ^{125}I 用しゃへい板、 ^{125}I -Safety Screen※（12 mm厚の鉛入りアクリル製）でしゃへいした場合としなかった場合のカウントをそれぞれ求めました。

スクリーンから線源までの距離 (cm)	スクリーンあり (cps)	スクリーンなし (cps)
10	8	振り切れ
20	4	振り切れ
30	3	5,000
40	2	4,000
50	1	2,200

表1-12： ^{125}I -Safety Screenのしゃへい効果



図1-25：鉛入りアクリル製の ^{125}I 試料保存箱

1-7. RI取扱い10か条の鉄則（10ゴールデンルール）

以下にRI標識化合物を使用した実験をRI管理区域内で行う場合の**10か条の鉄則（10ゴールデンルール）**を記載します。放射線防護はいろいろな要素が絡み合って複雑ですが、少なくともこの10か条を理解して実践すると、RI標識化合物を安全に使用することができます。14ページに記載した**安全使用のための3原則**をふまえて、この**10か条の鉄則**を実践してください。なお、放射線障害防止法で認められた少量のRIを管理区域外に持ち出して使用する場合は、使用施設の放射線取扱主任者の指示に従ってください。

1. 危険性の認識および安全取扱い技術の習得

- ・必ず手袋など適切な保護具を着用する。口で吸い上げるピペットなどでRI標識化合物を取り扱わない。
- ・RI標識化合物は適切な条件で保存する。
- ・すべての容器には核種、化合物名、総放射能量、比放射能、使用期日や使用者などの必要事項を明記する。
- ・容器は確実に密閉する。

2. 取扱い時間を最小限にする実験計画の作成

- ・実験マニュアルを再確認し、充分なコールド実験を行い、RI標識化合物取扱いの時間、操作回数が最小限で行えるようにする。

3. 放射線源からの適切な距離

- ・放射線量は逆二乗の法則で、距離が2倍になると量は1/4になる。実験器具、容器の配置を検討して、最適な位置にRI標識化合物を置くようにする。

4. 各放射線に適したしゃへい物の使用

- ・厚さ1 cmの亚克力板は全ての β 線をしゃへいする。高エネルギー β 線については生じる制動放射線に注意する。
- ・ γ 線やX線には適切な厚さの鉛板または鉛入り亚克力板を使用する。

5. RI標識化合物使用区域の制限

- ・RI実験施設内で使用するのはもちろん、実験室内もさらにRI標識化合物を使用する区域を特定して、その他の区域と区別する。
- ・すべてのRI標識化合物の取扱いは換気されたフード内で行うことを基本にする。
- ・トレイおよび吸収材などを敷き、実験終了後または汚染除去時に確実に処理清掃できるようにしておく。

6. 適切な実験衣や防御用器具と外部被ばく線量計の装着

- ・実験中は必ず専用の実験衣、防護めがね、手袋などを着用する。
- ・実験中は個人外部被ばく線量計を指定された位置に装着する。

7. 汚染確認のため頻繁に実験区域周辺をモニタ

- ・汚染があったら、指定された緊急措置を確実に行う。
 - 1) 付近にいるすべての人に知らせる。
 - 2) 汚染区域の立入りを制限する。
 - 3) 放射線管理担当者、放射線取扱主任者等に連絡し、指示をあおぐ。
 - 4) 実験者が中心となり除染を行う。
 - 5) マニュアルにしたがって除染作業を行う。

8. RI実験施設の規則や安全な作業法の遵守

- ・飲食、喫煙、化粧その他RI標識化合物を体内に摂取する可能性のある行為は決して行わない。
- ・実験室内ではハンカチなどは使用せず、ペーパータオルを使用して随時廃棄する。

9. 放射性廃棄物を最小にする実験系の構築と、生じた廃棄物を適切に処理し長時間貯めない

- ・RI標識化合物は実験に必要な最少量を用いる。
- ・放射性廃棄物は規則に従って分類し、適切な廃棄処理をする。
- ・放射性廃棄物の量を確認して記録する。

10. 実験終了後、汚染有無の確認。手洗い、再度モニタ、汚染が無いことの確認

- ・実験施設から外部に出る場合は、必ず念入りにモニタする。
- ・汚染が見つかった場合には、すみやかに放射線管理担当者に連絡し、指示を受ける。

1-8. RI標識化合物の使用にかかわる法令

日本国内でRI標識化合物を使用する上で基本になる法律は「**放射性同位元素等による放射線障害の防止に関する法律**（昭和32年6月10日法律第167号）」（以下‘放射線障害防止法’）です。

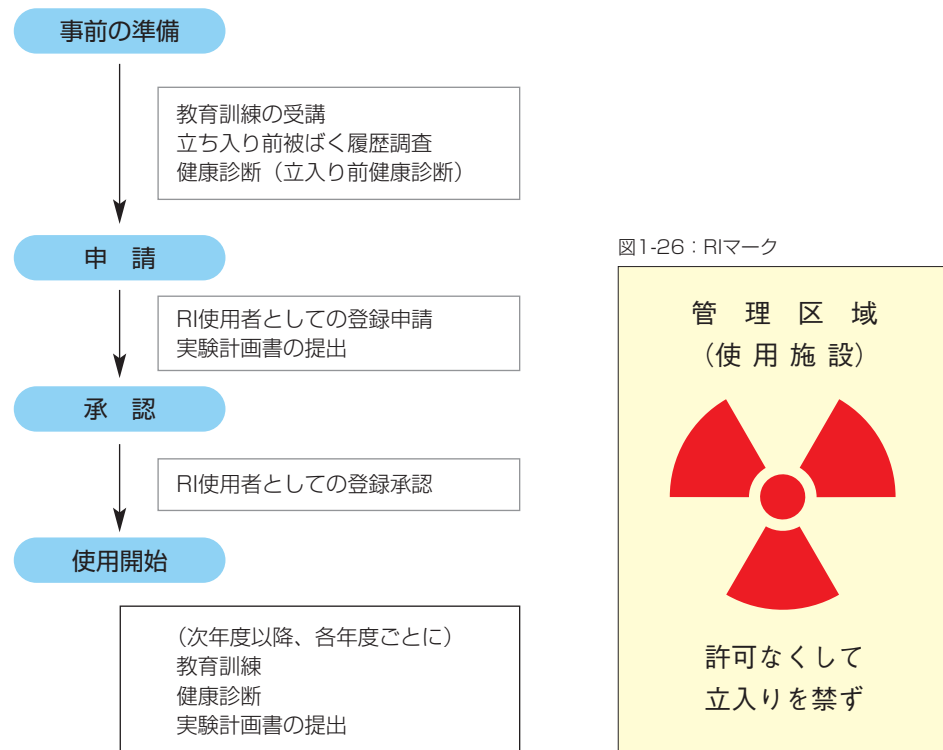
この法律の目的は第一条に述べられています。

放射性同位元素の取扱い、放射線発生装置の使用及び放射性同位元素によって汚染した物の取扱いを規制することにより、放射線障害を防止し、公共の安全を確保する。

RI標識化合物を取り扱うには、この放射線障害防止法および関連法令を理解し、遵守しなければなりません。RI使用者（放射線業務従事者）は、その施設の放射線取扱主任者の管理、監督のもと、正しく安全にRI標識化合物を使用することが求められています。

RI使用者は必ずその施設の規則および主任者の指示に従わなければなりません。

- 各施設によりその管理体制や方法、教育訓練の方法、内容や時期など異なりますが、概略は以下のようになります。



RI使用者は各施設で定められた内部規定「放射線障害予防規定」に従って行動しなければなりません。

RIの使用・保管・廃棄の記録はきちんと実施しなければなりません。その他にも詳細なルールがありますので、管理区域に立入る前に教育訓練を受講する義務があります。

第2章 一実験編一

chapter.2

計画から実験まで	28
2-1 Phosphorus-32	
2-1-1 核酸の標識法	30
2-1-2 プロトコール	32
ランダムプライマー法	32
末端標識法	34
2-2 Phosphorus-33	
2-2-1 プロトコール	36
マクロアレイによる遺伝子発現のプロファイリング	36
2-3 Sulphur-35	
2-3-1 プロトコール	38
<i>in vitro</i> Translation	38
細胞の標識	40
2-4 Iodine-125	
2-4-1 ¹²⁵ I標識	42
2-4-2 プロトコール	44
クロラミン-T法によるタンパク質標識	44
レセプターアッセイ	46
2-5 Hydrogen-3 (Tritium)	
2-5-1 プロトコール	48
細胞増殖の測定	48
レセプターの解析	50
2-6 Carbon-14	
2-6-1 プロトコール	52
CATアッセイによるプロモーター活性の検討	52
[¹⁴ C]標識 2DGを用いる局所脳グルコース利用率の測定	54
2-7 Chromium-51	
2-7-1 プロトコール	56
細胞傷害性試験	56

計画から実験まで

RI標識化合物安全使用のための3原則（3C）

Contain	放射性物質をできるだけ狭い空間にとじこめ、広がらないようにする
Confine	利用する放射線、放射能の量を必要最小限にし、効果的に利用する
Control	放射性物質の購入、使用、廃棄などを適切に管理する

3Cは放射線管理の基本である**放射線障害の防止**を達成するために実行されるものです。**10か条の鉄則**（p.25参照）を基本原則として理解し、計画の立案、実施を確実に行ってください。

実験計画

RI標識化合物を使用するといっても、取り立てて特別のことを考える必要はありません。どのような実験でも、最良の結果を得るためにはどうするのが良いか、それを安全にかつ効率よく行うためにはどうすべきかをいつも考えているはずです。RI標識化合物実験の場合には、安全に実験を行うために、取扱い時間を最小にして、実験台の上の器具・試薬の配置やししゃへいなどについて再度注意深く見直します。効率良い実験のためには、操作ステップの見直し、廃棄物をできるだけ少なくする方法を考えることが大切です。

コールドラン

事前にRI標識化合物を用いずに、全く同じ環境（機器の配置や使用する器具など）で実験操作を行ってみてください。これは大変重要なことです。実験操作に慣れている方も必ず行ってください。

- ・ 実験器具、試薬などの配置が安全にかつ使いやすい位置にあるか
- ・ 必要なものがすべて揃っているか
- ・ 実験操作に無理や無駄がないか

何か不都合が見つかれば、実験計画を立て直してください。

RI標識化合物の受け取り（検収）

予定の入荷時刻を事前に確認して、その時刻には他の仕事に長時間拘束されていないようにスケジュールを組んでください。RI標識化合物の受け取りと確認（検収）は必ずすぐに実験者が行ってください。外容器に汚染がないことを確認した上で、ただちに適切な保管を行ってください。最適な保管方法と輸送形態が異なることがありますので、必ず添付書を確認してください。

管理と記録

RI標識化合物を受け取り後、所属施設の手順にしたがって記録してください。使用前および使用中、使用後の記録と管理も責任を持って実験者が行ってください。それぞれの所属施設で定められた記録帳票に必ず記録してください。

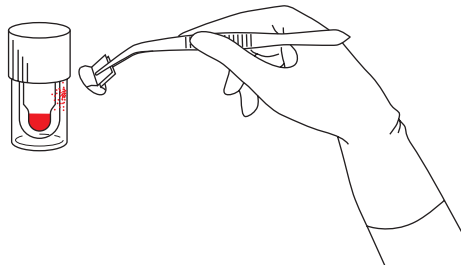
実験をはじめるにあたって

安全に使用することを心がけてください。個人用被ばく線量計を決められた位置に装着してください。決して一人で実験を行わないでください。事前の準備がきちんとなされていることを確認してください。特に被ばく、汚染に対する予防措置が十分であることを確認してください。

10か条の鉄則（p.25参照）を守ってください。

RI標識化合物容器の開封

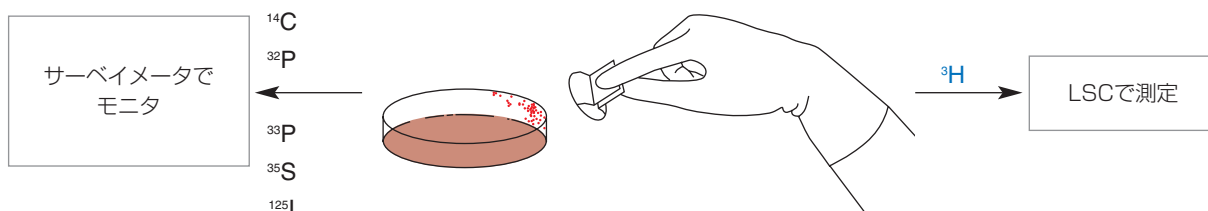
- よく換気されているフード内で開封してください。
- 容器表面などに汚染がないことを必ず確認してください。
- 溶液状のRI標識化合物は、開封前に遠心して溶液を容器の下部に集めてください。



原液の容器開封では、必ずピンセット等を使用して距離をとり、スミア法で拭き取り、離れたところでGM管式サーベイメータ等で汚染がないかどうかを確認してください。

実験上の注意

- ゴムやプラスチック手袋、防護めがねなどの放射線防護用具をきちんと装着してください。
- しゃへい材を適切な位置に設置してください。
- RI溶液の入った容器の中を直接のぞかないでください。
- 器具やチューブの取り扱いは、丁寧に落ち着いて行ってください。
- 廃棄物入れをあらかじめきちんと設置してください。
- ^{32}P 使用中はGMサーベイメータで、 ^{125}I 使用中は ^{125}I 用シンチレーションサーベイメータで実験区域を常時モニタしてください。
- 実験後はスミア法で汚染の無いことをモニタしてください。
- 誤ってRIをこぼして汚染させても、**決してあわてないでください。**



廃棄と洗浄

廃棄と洗浄は十分注意しないと、周囲に汚染を広げてしまいます。あわてずあせらずゆっくりと行ってください。

- 廃棄するものと洗浄するものを分けてください。
- 決められた区分にしたがって廃棄してください。
- 溶液など、廃棄する総放射エネルギーを確実に記録してください。
- 洗浄剤、洗浄方法が最適であることを確認してください。
- はね返った水で周囲を汚染させないように注意してください。
- 使用した手袋でさわった部分を汚染させてしまうことがあります。汚染チェックが終わるまでは手袋で周囲をさわらないようにしてください。
- 洗浄終了後は必ず周囲のモニタを行って、汚染がないことを確認してください。
- 洗浄廃液の処理、廃棄を安全にかつ確実に行ってください。
- 汚染が生じたら、23ページの方法にしたがって、除染してください。**

実験終了

- 実験に使用した器具の整理整頓をしてください。
- RI実験室に持ち込んだものは、汚染のないことを確認して持ち出してください。
- 実験台、身体の汚染のチェックを入念に行ってください。
- 汚染などの問題がないことを確認してから実験室を退出してください。
- 使用記録を必ず記入してください。
- 個人用被ばく線量計の管理、保管を行ってください。

Phosphorus-32

2-1. Phosphorus-32

半減期	14.3日
放出放射線	高エネルギーβ線（最大1.709 MeV）
汚染の検出	GM管式サーベイメータ
空気中の最大飛程	790 cm
水中の最大飛程	0.76 cm
線量	1 ml中の1 MBqによる線量は、表面で210 mSv/時 (21 rem/時)、 1 mの距離で2.5 μSv/時 (0.25 mrem/時)
しゃへい	1 cm厚アクリル板がβ線を十分にしゃへいし、 制動放射線の発生も最小にする

特記事項

- ライフサイエンス研究で使用する核種の中では最大のβ線エネルギーがあります。不必要な被ばくを避けるよう、アクリル製ホルダーかケースも使用してください。
- 30 MBq（～1 mCi）以上を扱う場合、指や手首に装着するタイプの線量計もあわせて使用してモニタしてください。
- 300 MBq（～10 mCi）以上を扱う場合、アクリルの外側をさらに鉛で囲い、制動放射線をしゃへいする必要があります。

³² P	Phosphorus-32 T _{1/2} : 14.3days							
days/hours	0	12	24	36	48	60	72	84
0	1.000	0.976	0.953	0.930	0.908	0.886	0.865	0.844
4	0.824	0.804	0.785	0.766	0.748	0.730	0.712	0.695
8	0.679	0.662	0.646	0.631	0.616	0.601	0.587	0.573
12	0.559	0.546	0.533	0.520	0.507	0.495	0.483	0.472
16	0.460	0.449	0.439	0.428	0.418	0.408	0.398	0.389
20	0.379	0.370	0.361	0.353	0.344	0.336	0.328	0.320
24	0.312	0.305	0.298	0.291	0.284	0.277	0.270	0.264
28	0.257	0.251	0.245	0.239	0.234	0.228	0.223	0.217
32	0.212	0.207	0.202	0.197	0.192	0.188	0.183	0.179
36	0.175	0.170	0.166	0.162	0.159	0.155	0.151	0.147
40	0.144	0.140	0.137	0.134	0.131	0.127	0.124	0.121
44	0.119	0.116	0.113	0.110	0.108	0.105	0.102	0.100
48	0.098	0.095	0.093	0.091	0.089	0.086	0.084	0.082
52	0.080	0.078	0.077	0.075	0.073	0.071	0.070	0.068

2-1-1. 核酸の標識法

膨大な量の遺伝情報の中から、目的とする遺伝子がどこにあるか、どのくらい存在、発現しているかなどを調べるために、 ^{32}P で標識した核酸プローブが用いられます。必要なRIの比放射能とRIを導入する鋳型核酸の位置により標識方法を選択します。一般的に行われている方法には下記の手法があります。

- ・ ランダムプライマー（プライマーエクステンション）法
- ・ ニックトランスレーション法
- ・ PCR法
- ・ 末端標識法
- ・ *in vitro* 転写法

ランダムプライマー法

6～10 bp程度のランダムなプライマー-DNAを一本鎖にしたDNAにアニールさせ、DNAポリメラーゼの5' → 3' 合成活性を利用して短鎖DNAを合成します。プライマー濃度の設定にもよりますが、標準的なプロトコルでは平均300 bpの長さのプローブが得られます。高比放射能のプローブを作成できます。

RI標識化合物は $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ などの α 位を標識したデオキシヌクレオチドを使用します。

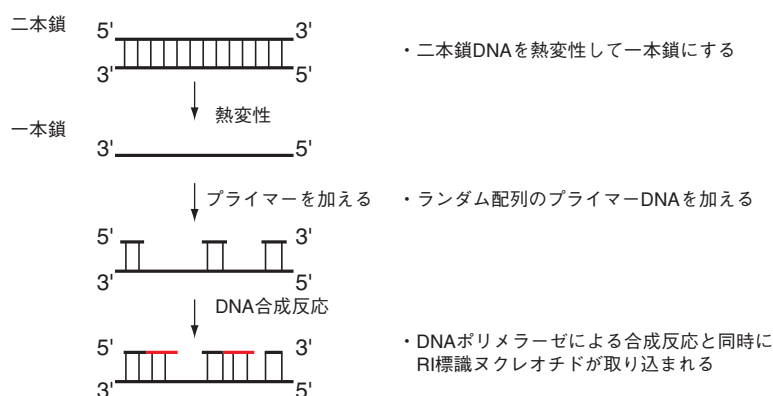


図2-1：ランダムプライマー法による核酸標識

ニックトランスレーション法

DNase Iでニックを入れた二本鎖DNAに、DNAポリメラーゼ I を作用させ、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性でDNAを分解すると同時に、DNAポリメラーゼ活性により 5'→3'方向へ新たにDNAを合成します。比較的長い（鋳型DNAに依存します）DNAプローブを作成できます。RI標識化合物は $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ などの α 位を標識したデオキシヌクレオチドを使用します。

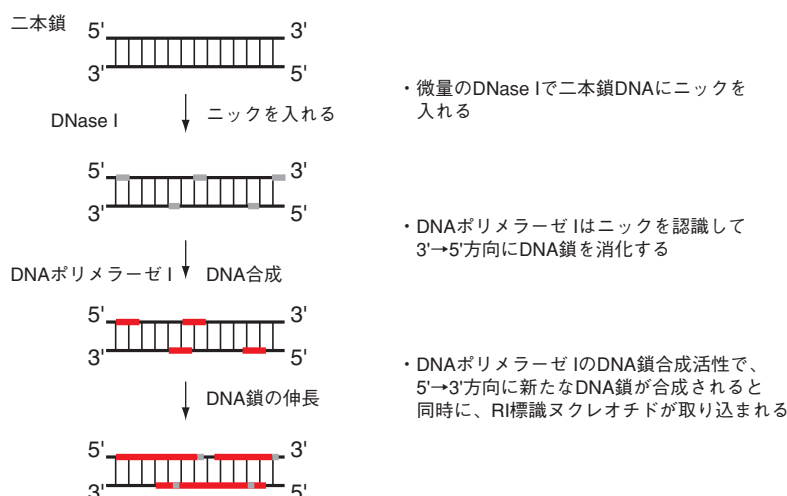


図2-2：ニックトランスレーション法による核酸標識

PCR (Polymerase Chain Reaction) 法

RI標識ヌクレオチドを加えてPCR反応を行います。2種類のプローブで挟まれた一定の長さのプローブDNAが合成できます。1度プライマーを合成してPCR条件を設定しておけば、均一なプローブを何度でも作製できます。RI標識化合物は[α - 32 P]dATPなどの α 位を標識したデオキシヌクレオチドを使用します。

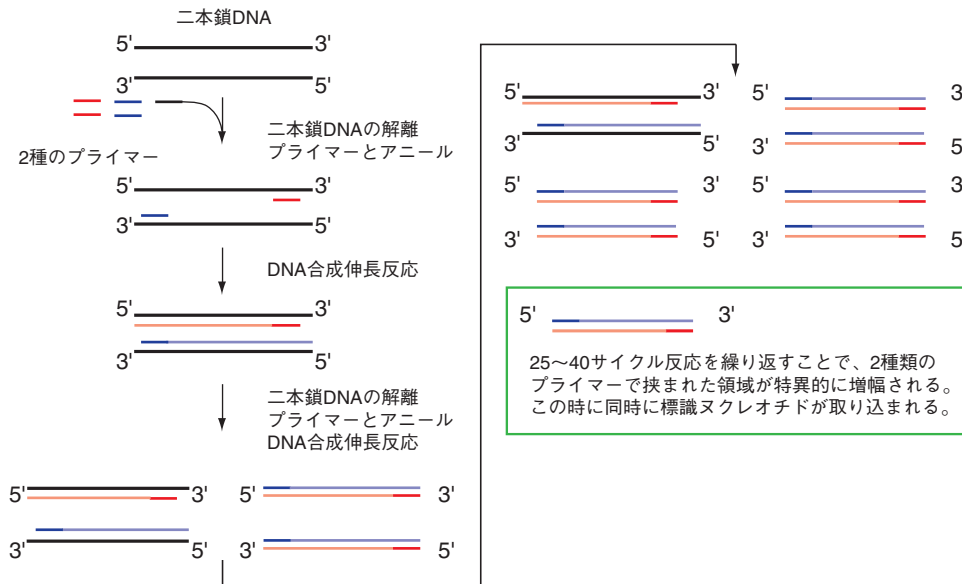


図2-3：PCR法による核酸標識

末端標識法

T4ポリヌクレオチドキナーゼ (PNK) による5'-末端標識

アルカリフォスファターゼで脱リン酸化したDNAの5'-末端に、T4 PNKによるリン酸化反応で[γ - 32 P]ATPの γ -位の 32 Pを取り込ませます。一本鎖、二本鎖DNAのどちらも標識できますが、DNAの末端形状により取り込み効率が変わります。3'-末端が突出した形状の二本鎖DNAでは取り込み効率が低下するので、T4 DNAポリメラーゼなどで平滑末端にした後で標識反応を行います。

ターミナルトランスフェラーゼ (TdT) による3'-末端標識

TdTによりDNAの3'-末端に[α - 32 P]dNTPまたは[α - 32 P]ddNTPを付加して標識します。3'-末端の形状により効率がかわります。反応液にカコジル酸（医薬用外毒物）を加えるので、廃棄に注意が必要です。

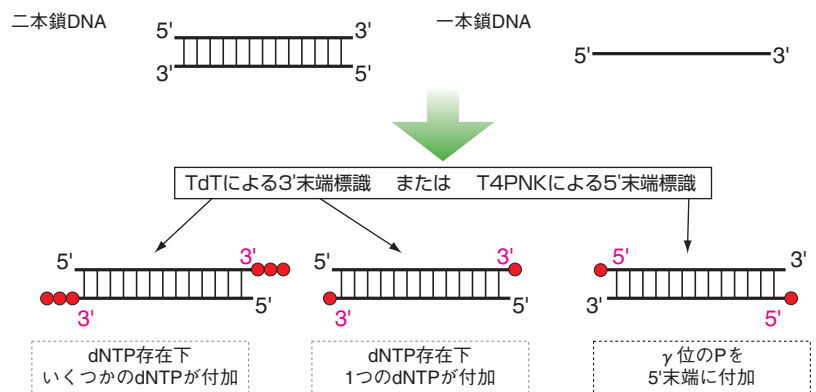


図2-4：末端標識法による核酸標識

in vitro 転写法による標識RNA合成

SP6やT3, T7 RNAポリメラーゼの転写プロモーター配列を持つベクターに、プローブとする目的DNA断片をクローニングし、プロモーター特異的ポリメラーゼでRNAを合成させるときに[α - 32 P]UTPなどのRI標識リボヌクレオチドを取り込ませてRI標識RNAプローブを作製します。2種類のプロモーターを向かい合わせ持つベクターに目的のDNA断片を組み込めば、ポリメラーゼの使い分けでセンスあるいはアンチセンスRNAの両方を合成できます。

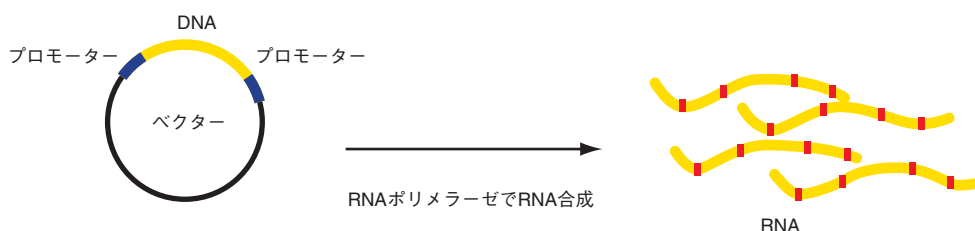


図2-5：in vitro 転写法による核酸標識

2-1-2. プロトコール

ランダムプライマー法

ランダムプライマー法による標識プローブ作製には、各社からキットが数多く市販されています。詳細はご使用キットのプロトコールや添付書をご確認ください。

ここではMegaprime DNA標識キット※（製品コード：RPN1606）を使用した実験例をご紹介します。

<メガプライム標識キットによるDNA標識>

■ 準備する機器と試薬 ■	■ プロトコール ■	■ One Point advice ■
● 試薬 • Megaprime DNA標識キット ([α-³²P]dCTP用) • ランダムプライマー • 標識反応バッファー (ヌクレオチドを含む) • 酵素 • コントロール標準DNA • キャリアーDNA • [α-³²P]dCTP (110 TBq/mmol, 370 MBq/ml) • 標識用鋳型DNA (5 ng DNA/μl) • 0.2 M EDTA溶液 ● 機器 • 恒温水槽 (酵素反応用) ● オプション • 標識プローブの比放射能および取り込み率測定 赤外線ランプ、 シンチラント、 液体シンチレーションカウンタ用バイアル A) 2×SSC、 ワットマンDE81ろ紙 (1 cm×1 cm以上) B) TCA、ガラスファイバーまたはニトロ セルロースフィルター、真空吸引機など • 未反応ヌクレオチドの除去 ProbeQuant G-50 Micro Columnsなどの 核酸精製用マイクロカラム	鋳型DNAの調整 ↓ 標識反応 キット中の酵素溶液以外を冷凍庫から取り出し、室温にもどす。 酵素溶液は使用するまで冷凍庫に入れておく。 鋳型DNA 5 μl (25 ng) *¹ プライマー溶液 5 μl ↓ 熱変性 (沸騰水中、5分) する。*² ↓ チューブのふたをして遠心し、 溶液を底に集める。 ↓ 室温にもどしてプライマーを アニールさせる。 標識バッファー 10 μl 精製水 23 μl 酵素溶液 2 μl*³ を加える ↓ チューブのふたをして遠心し、 溶液を底に集める。 [α-³²P] dCTP 5 μl を加える ↓ ピペットで数回穏やかに吸い上げて 混合する。*⁴ ↓ チューブのふたをして遠心し、 溶液を底に集める。 ↓ 37℃、10分間反応させる。*⁵ ↓ 0.2 M EDTA 5 μl を加え、 反応を停止する。*⁶ 未反応ヌクレオチドの除去 標識効率の確認	*¹ 鋳型DNA量は2.5-25 ng/mlで十分ですが、熱変性の容量が10 μl未満では効率が悪くなりますので、精製水を加えて調整してください。 *² 熱変性後、急冷するプロトコールもありますが、標識効率はほとんど変わりませんので省略しています。 *³ 酵素溶液は使用直前に冷凍庫より取り出し、使用後はすみやかに冷凍庫に戻してください。 *⁴ 激しく混合しないでください。酵素の活性低下の原因になります。 *⁵ 反応時間は1時間くらいまで伸ばしても影響ありません。RI標識ヌクレオチドアナログ ([α-³⁵S]dCTP αS など) を使用する場合は、反応時間を伸ばす必要があります。 *⁶ ハイブリダイゼーションを引き続いておこなう場合は、反応液を熱変性し、急冷して使用してください。すぐに使用しない場合は冷凍庫 (-20℃) で保存してください。プローブの分解が起こるので、数日以内に使用してください。

標識ヌクレオチドの比放射能の違いによるプローブ比放射能への影響

[α -³²P]dCTP (370 MBq/ml、9.25 MBq/パッケージ) には、3種類の比放射能を持つ製品があり、それぞれを用いてDNAを標識すると、RI標識ヌクレオチドの使用量と合成されるプローブの比放射能との間には次のような関係があります。25 ngの鋳型DNAに4種のヌクレオチドが均一に存在すると考えると、ヌクレオチドのモル濃度は約75 pmolで、dCTPは約18.8 pmolになります (Davidson, N. and Szybalski, W., p45-82 in The Bacteriophage Lambda, edited by Hershey A.D., Cold Spring Harbor Laboratory [1971])。全てのdCTP (18.8 pmol) をRI標識dCTPに置き換えるために必要な量は、それぞれの標識ヌクレオチドについて以下のように計算されます。

- (1) 比放射能220 TBq/mmolの場合は、約11.0 μ l (4.18 MBq [113 μ Ci])
(2) 比放射能110 TBq/mmolの場合は、約5.6 μ l (2.09 MBq [56.4 μ Ci])
(3) 比放射能30 TBq/mmolの場合は、約1.5 μ l (0.55 MBq [15.0 μ Ci])

このように、比放射能が高い [α -³²P]dCTPの方が多量の標識化合物を使用しなければなりません。しかし、標識プローブの比放射能は、全ての放射能が取り込まれたとすれば以下のようになります。

- (1) 1×10¹⁰ cpm/ μ gDNA
(2) 5×10⁹ cpm/ μ gDNA
(3) 1.3×10⁹ cpm/ μ gDNA

実験でどのくらいの検出感度が必要か、1回あたりのプローブの量、何回実験を行うかなどを考慮に入れて、無駄のない使用計画を立ててください。

比放射能 (TBq/mmol)	220	110	30
必要なRI総量 (MBq)	4.18	2.09	0.55
液量 (μ l)	11	5.6	1.5
標識回数	2	4	16
プローブの比放射能 (cpm/ μ gDNA)	1×10 ¹⁰	5×10 ⁹	1.3×10 ⁹

表2-1：各種標識ヌクレオチドでの標識反応の違い

■ 参考資料 ■



標識プローブの比放射能および取り込み効率の測定

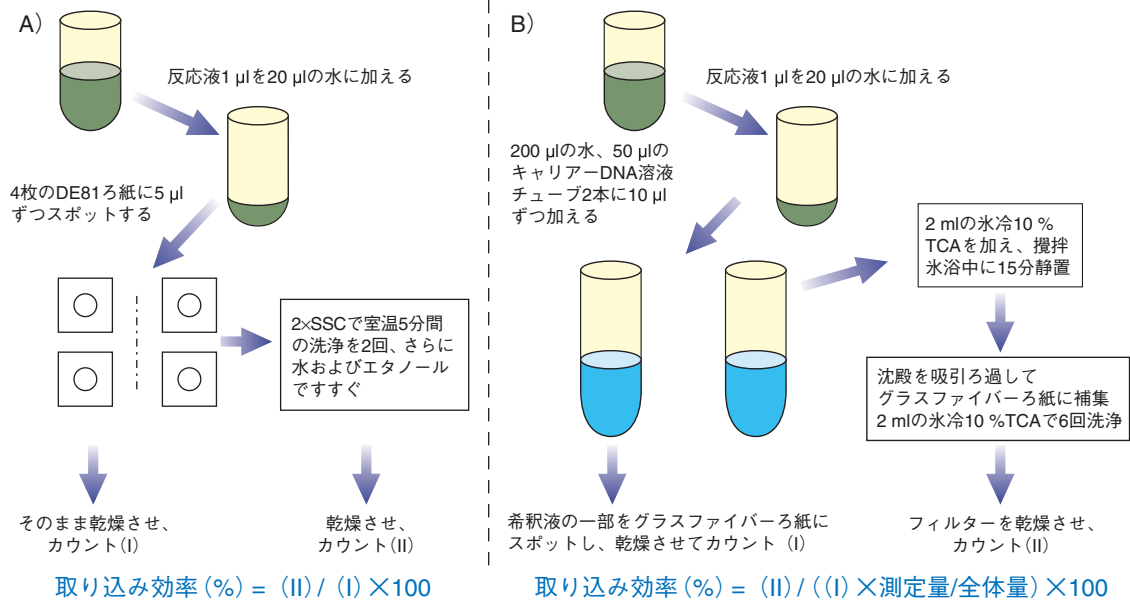


図2-6：取り込み効率の測定



比放射能の計算

比放射能は単位（1 µgDNA）あたりの放射能（dpm）になります。ニックトランスレーション法のようなdNTPの置換えではDNA量は増加しませんが、ランダムプライマー法では新しいDNA鎖が合成されますから、反応液中にある‘すべて’のDNA量を計算する必要があります。以下はMegaprimeキットに掲載している計算式を用いて計算しています。

$$\text{全DNA量 (ng)} = \frac{\text{加えたRI量 (\mu Ci)} \times 13.2 \times \text{取り込み効率 (\%)}}{[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTPの比放射能 (Ci/mmol)}} + \text{鋳型DNA量 (ng)}$$

(*4種のヌクレオチドの平均分子量の4倍を1320とし、それを100で割ったもの)

実験例の場合、取り込み効率が70 %なら、

$$\text{全DNA量} = \frac{50 (\mu\text{Ci}) \times 13.2 \times 70 (\%)}{3000 (\text{Ci/mmol})} + 25 (\text{ng}) = 40.4 (\text{ng})$$

取り込まれたdpmは $50 (\mu\text{Ci}) \times 2.2 \times 10^4 \times 70 (\%) = 7.7 \times 10^7 (\text{dpm})$

$$\text{これらより、比放射能は} \frac{7.7 \times 10^7 (\text{dpm})}{40.4 (\text{ng})} = 1.9 \times 10^6 (\text{dpm}/\mu\text{g})$$

となります。



未反応ヌクレオチドの除去

ランダムプライマー法では取込み効率は60 %以上になりますので、未反応ヌクレオチドの除去は必須ではありません。しかし、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションのように非常に高感度が要求される検出系や、非特異的バックグラウンドが出やすい場合には除去を行ってください。ヌクレオチド除去用のゲルとミニカラムを用いて自作することもできますが、ここでは市販のProbeQuant G-50 Micro Columns※を用いた精製法を紹介します。

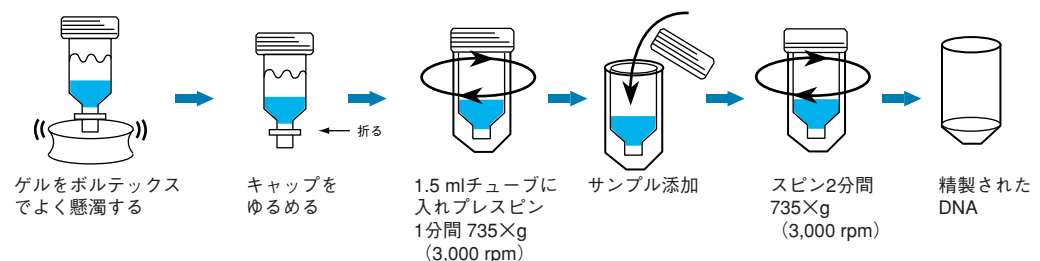


図2-7：スピнкаラムでの精製

ランダムプライマー法の参考文献；

Feinberg, A. P. and Vogelstein, B., *Anal. Biochem.*, 132, p.6-13 (1983)

Sambrook, J., Fritsch, E. F and Maniatis, T., *Molecular Cloning, a laboratory manual (second edition)*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989)

末端標識法 —T4ポリヌクレオチドキナーゼ（PNK）による5'-末端標識反応

T4 PNKは、DNAの5'-末端のリン酸化反応を触媒する酵素です。リン酸化反応は可逆的な交換反応なので、制限酵素などで切り出したDNA断片をそのまま使用することもできますが（交換反応）、DNAの5'-末端をアルカリフォスファターゼにより脱リン酸化しておくことでリン酸化を効率よく行うことができます（リン酸化反応）。標識効率は、DNA末端の形状によって変わります。一本鎖DNAで最も高く、3'-末端が突出したDNAでは効率は低くなります。

一本鎖DNA > 二本鎖5'-突出末端 > 二本鎖平滑末端 > 二本鎖3'-突出末端

比放射能の高い標識プローブを作製するには、DNA断片を切り出す際に5'-突出末端を作る制限酵素を用いてください。

■ 準備する試薬 ■	■ プロトコール1：交換反応 ■	■ プロトコール2：リン酸化反応 ■																
● 試薬 • T4 PNK (10 U/μl) • 10×リン酸化バッファー 0.5 M Tris-HCl, pH7.6 0.1 M MgCl₂ 50 mM DTT • 10×交換反応バッファー 0.5 M イミダゾール-HCl, pH6.6 0.1 M MgCl₂ 50 mM DTT 2 mM ADP • [γ-³²P]ATP (111 TB q/mmol, 370 MB q/ml) • エタノール • 7 M酢酸アンモニウム溶液	エッペンドルフチューブに以下の試薬を加えます。 <table><tr><td>DNA断片</td><td>16.5 μl (≤5 pmol 5'-末端)</td></tr><tr><td>10×交換反応バッファー</td><td>2.5 μl</td></tr><tr><td>[γ-³²P]ATP</td><td>5 μl</td></tr><tr><td>T4 PNK</td><td>1 μl / 全量で25 μl</td></tr></table> ↓ 37℃、30分間反応 ↓ 70℃、10分間加熱して酵素を失活 ↓ +7 M酢酸アンモニウム10 μlを加える +冷エタノール87.5 μl (2.5倍量) ↓ -20℃で60分間 ↓ 遠心分離 ↓ 沈殿に70 %冷エタノール1 ml加え 洗浄 ↓ 乾燥 適当なバッファーに溶解	DNA断片	16.5 μl (≤5 pmol 5'-末端)	10×交換反応バッファー	2.5 μl	[γ- ³² P]ATP	5 μl	T4 PNK	1 μl / 全量で25 μl	反応液に加えるDNA断片に脱リン酸化したDNAを用いて、[γ-³²P]ATP量を変更する以外、操作はプロトコール1と同じです。 エッペンドルフチューブに以下の試薬を加えます。 <table><tr><td>脱リン酸化DNA断片</td><td>20.5 μl (≤5 pmol 5'-末端)</td></tr><tr><td>10×リン酸化反応バッファー</td><td>2.5 μl</td></tr><tr><td>[γ-³²P]ATP</td><td>1 μl</td></tr><tr><td>T4 PNK</td><td>1 μl / 全量で25 μl</td></tr></table> ↓ 以下プロトコール1と同様	脱リン酸化DNA断片	20.5 μl (≤5 pmol 5'-末端)	10×リン酸化反応バッファー	2.5 μl	[γ- ³² P]ATP	1 μl	T4 PNK	1 μl / 全量で25 μl
DNA断片	16.5 μl (≤5 pmol 5'-末端)																	
10×交換反応バッファー	2.5 μl																	
[γ- ³² P]ATP	5 μl																	
T4 PNK	1 μl / 全量で25 μl																	
脱リン酸化DNA断片	20.5 μl (≤5 pmol 5'-末端)																	
10×リン酸化反応バッファー	2.5 μl																	
[γ- ³² P]ATP	1 μl																	
T4 PNK	1 μl / 全量で25 μl																	

α -³²Pと γ -³²Pとの使い分け

ヌクレオチドが結合してDNA鎖を作るときには、 α 位のリン（P）が結合に使用されます（下記ヌクレオチドの簡略図を参照）。 β 位と γ 位のPは遊離します。したがって、DNAポリメラーゼで標識を行う場合には α -³²Pを使用し、T4ポリヌクレオチドキナーゼで5'-末端を標識する場合には γ -³²Pを使用しなければならないことがわかります。

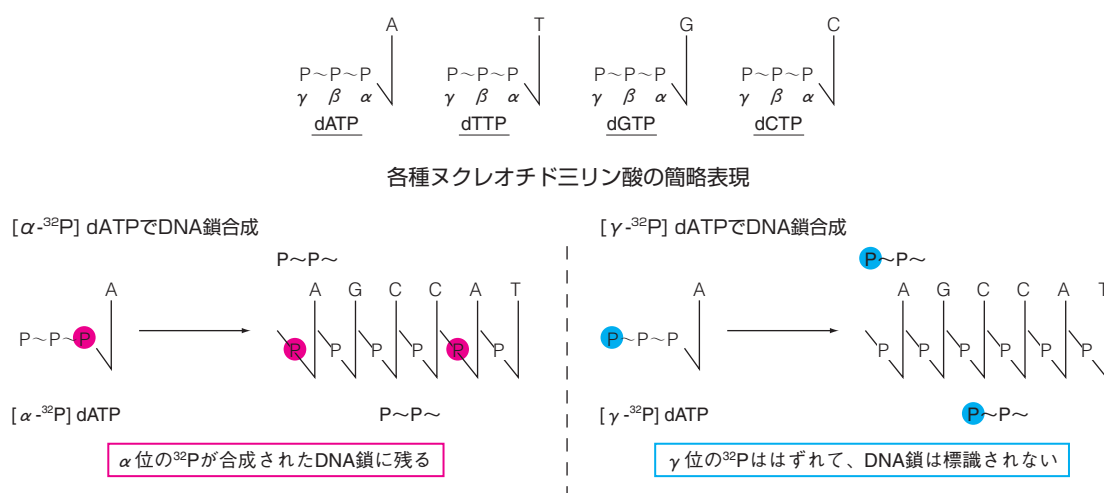


図2-8：DNA鎖の伸長に用いられるリン酸部位

■ 参考資料 ■



■ 末端mol数の計算

標識に使用するDNAは、末端のmol数から計算します。直鎖状DNAであれば、

一本鎖DNAの場合 $5'\text{-末端 (mol)} = \text{DNA断片数 (mol)}$

二本鎖DNAの場合 $5'\text{-末端 (mol)} = \text{DNA断片数 (mol)} \times 2$

となります。またプラスミドのような環状二本鎖DNAを一種の制限酵素で処理して開環させた場合には、上記二本鎖DNAの場合と同じになります。

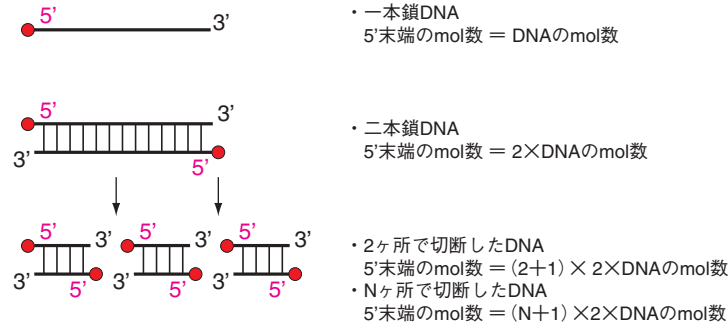


図2-9：DNAの5' 末端



■ プローブの比放射能計算

標識するDNAの5'-末端mol数と $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ のmol数の比がプローブの比放射能に影響します。大過剰の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いれば比放射能は高くなります。また、比放射能の高い $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いてもプローブ比放射能を上げることができます。

5 μl の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (111 TBq/mmol, 37 MBq/ml) には約1.7 pmol

5 μl の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (222 TBq/mmol, 37 MBq/ml) には約0.8 pmol

のATPが含まれ、そのうち $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ は両方とも約0.5 pmol含まれています。222 TBq/mmolの方が $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ の割合が高いので、標識されたプローブの比放射能は高くなります。



■ DNAの純度

目的DNAを効率よく標識するためには、用いるDNAの純度が高いことが必要です。低分子の核酸が混在していると、5'-末端のmolが増えて標識効率の低下をまねきます。ディスパーザブルのゲルろ過カラムを通して低分子DNAを除くなど、できるだけ高純度で均一なDNAを用いてください。



■ 標識プローブの精製

ランダムプライマー法やニックトランスレーション法などで標識したプローブと異なり、用いたDNA断片そのものには変化がないので、通常はカラム処理などでの精製・分画は必要ありません。ただしオートラジオグラフィーでバックグラウンドが高い場合、カラムによる未反応の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の除去を行ってください。

参考文献

Chaconas, G and van de Sande, J. H., *Methods. Enzymol.* **65**, 75-88 (1980)

Phosphorus-33

2-2. Phosphorus-33

- 半減期 25.3日
- 放出放射線 中エネルギーβ線（最大0.249 MeV）
- 汚染の検出 GM管式サーベイメータ
- 空気中の最大飛程 49 cm
- 水中の最大飛程 0.6 mm
- しゃへい 1 cm厚アクリル板（3 mm厚程度までうすくてもよいが、強度が不十分になる）

³³ P	Phosphorus-33 T _{1/2} : 25.3days									
days	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	1.000	0.973	0.947	0.921	0.896	0.872	0.848	0.826	0.803	0.782
10	0.760	0.740	0.720	0.700	0.681	0.663	0.645	0.628	0.611	0.594
20	0.578	0.563	0.547	0.533	0.518	0.504	0.491	0.477	0.464	0.452
30	0.440	0.428	0.416	0.405	0.394	0.383	0.373	0.363	0.353	0.344
40	0.334	0.325	0.316	0.308	0.300	0.292	0.284	0.276	0.269	0.261
50	0.254	0.247	0.241	0.234	0.228	0.222	0.216	0.210	0.204	0.199
60	0.193	0.188	0.183	0.178	0.173	0.169	0.164	0.160	0.155	0.151
70	0.147	0.143	0.139	0.135	0.132	0.128	0.125	0.121	0.118	0.115
80	0.112	0.109	0.106	0.103	0.100	0.097	0.095	0.092	0.090	0.087
90	0.085	0.083	0.080	0.078	0.076	0.074	0.072	0.070	0.068	0.066
100	0.065	0.063	0.061	0.060	0.058	0.056	0.055	0.053	0.052	0.051

2-2-1. プロトコール

マクロアレイによる遺伝子発現のプロファイリング

現在、ヒト遺伝子の全シーケンスの解読をはじめ日々膨大な数の遺伝情報が蓄積されています。さらに、遺伝子としての機能別分類が多くのシーケンスに対して行われています。しかし、これらの遺伝子が生体内でどのような役割分担のもとに発現・機能しているのか、また、調節されているかについてはまだこれから解明されなければならない点です。このような遺伝子の役割を理解するのに重要なことは、単独の遺伝子発現を追及するのではなく、組織や器官、生体中でのあらゆる段階でのすべての遺伝子発現を連関付けて解析することです。

DNAアレイ解析は、サンプルのフォーマットサイズやスポット密度によってマクロアレイとマイクロアレイに区別されます。マイクロアレイの場合にはスポットが非常に高密度なため、アレイの作成から検出までに専用の機器が必要となります。特に検出系では蛍光レーザースキャンによる検出とコンピューターによる解析までがシステム化されています。発現の解析に用いられるマクロアレイには、正確な定量と解析を行うための大きなフォーマットサイズを十分な解像度でイメージ化する容量が求められます。また、高感度であることはもちろん、広い直線的な定量範囲（1,000-10,000倍）も必要です。この目的には、RI核種として³²Pがよく用いられています。

ここでは市販の核酸アレイ、Atlas cDNA Expression Arraysを用いて、STORMシステムで解析する方法をご紹介します。詳細なプロトコールはClontech社の製品添付書をご参照ください。

■ 準備する試薬と機器 ■

● 試薬

- Atlas Human Cancer cDNA Array (Clontech社)
- [α -³²P] dATP (>92.5 TBq/mmol : 370 MBq/ml)

● 機器

- PCR用サーマルサイクラー
- ハイブリダイゼーション用ボトル、振とう恒温槽
- STORM840システム (GEヘルスケア)

■ プロトコール概略 ■

細胞の培養

- ↓ RNAの精製^{*1}
- ↓ 標識cDNAプローブの調製
- ↓ カラム精製^{*2}
- ↓ ハイブリダイゼーション

解析

■ One Point advice ■

^{*1} RNAの純度が結果を左右します。精製の段階で、純度確認を必ず行ってください。

^{*2} 必ず標識cDNAプローブの精製を行ってください。



図2-10 : STORMシステム

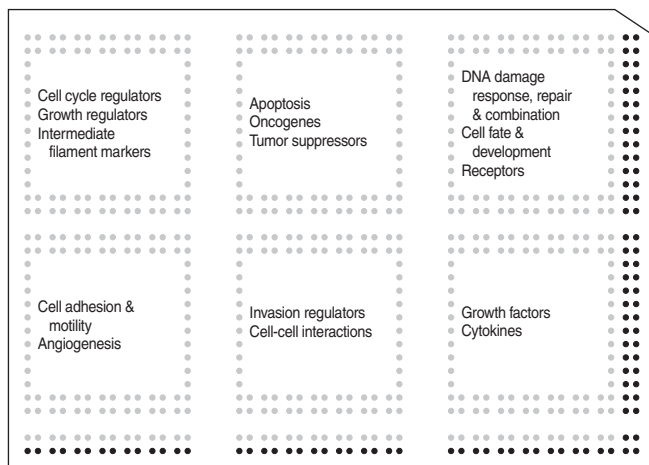


図2-11 : Atlas Human Cancer cDNA Expression Array

それぞれのスポットには、200~600 bpのcDNA断片が10 ng含まれています。陰性コントロールとハウスキーピング遺伝子も含まれるため、正確な遺伝子発現プロファイルの作成が可能です。

■ 参考資料 ■

【実験結果の例】

ヒトJurkat T細胞白血病株は、抗原刺激後のT細胞における情報伝達を研究するための実験モデルとして利用されています(1)。PHAおよびPMAは、インターロイキン2(IL-2)とインターロイキン2レセプター(IL2-R)遺伝子の発現を活性化します(2, 3)。IL-2遺伝子の発現制御は、Jurkat細胞株をモデルとして詳細に調べられており、T細胞を刺激後、数日間で100以上の遺伝子が活性化されることが知られています(4, 5)。

T細胞刺激に関わる遺伝子を同定するため、活性化したJurkat細胞の遺伝子発現をAtlas Human Cancer cDNA Expression Arrayによって分析しました。まず、PHAとPMAで刺激および未刺激のJurkat細胞からmRNAを抽出後、³³P標識したcDNAプローブを調製し、2重にスポットしたAtlas Arrayでそれぞれハイブリダイゼーションしました。図2-12は、³³P標識したプローブを用いた場合のハイブリダイゼーションのパターンを示しています。これをImageQuant※ソフトウェアで解析した結果が図2-13です。ImageQuantの定量データをExcelで解析し、PHAとPMAの刺激に反応して遺伝子発現が大きく変化した20種類の遺伝子をリストアップしました(表2-2)。この解析によって検出された遺伝子は、Atlas cDNA Expression Arrayの座標、遺伝子名と相対的な誘導レベルによって同定しました。

VimentinとEarly Growth Response Protein 1(EGR-1)は、Atlas Human Cancer cDNA標識の遺伝子の中で、最も高く発現が誘導される遺伝子であることがこの研究で明らかにされました。Vimentinは細胞骨格の伸長を制御する遺伝子産物で、ヒトT細胞白血病ウィルスタイプIを形質転換した細胞株で高レベルに転写されていることが知られています(6)。

PHA/PMA刺激によるJurkat T細胞の活性化は、同様の効果を持つことがわかりました。EGR-1遺伝子は、休止T細胞の増殖刺激に反応して活性化されるジンクフィンガー転写因子ファミリーをコードしています(7, 8)。したがって、刺激後のJurkat細胞内でEGR-1 mRNAの転写レベルが高いことは予測されました。

このように、Atlas human Cancer cDNA Expression Arrayを用いることによって、Jurkat T細胞を刺激して誘導される多数の遺伝子が正確に同定できることがわかります。

参考文献

1. Weiss, A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 4169-4173 (1984)
2. Manger, B. *et al.*, *J. Immunol.* **139**, 2755-2760 (1987)
3. Taniguchi, T. *et al.*, *Nature* **302**, 305-310 (1983)
4. Brunvand, M.W. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **263**, 18904-18910 (1988)
5. Ullman, K.S. *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* **8**, 421-452 (1990)
6. Lilienbaum, A. *et al.*, *J. Virol.* **64**, 256-263 (1990)
7. Muller, H-J. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10079-10083 (1991)
8. Patwardhan, S. *et al.*, *Oncogene* **6**, 917-928 (1991)



図2-12: ³³P標識cDNAをプローブとしたAtlas Human Cancer cDNA Expression Arrays解析例

休止(左)および刺激後(右)のJurkat T細胞から抽出したmRNAを使用してcDNAプローブを作製しました。プローブ化したアレイはストレージフラスコで2日間露光し、STORM 840システムを用いてイメージ化しました。明らかな発現誘導が見られる遺伝子の一例を丸印で示しました(座標A7m)。左右のアレイを正確に比較するには、ハウスキーピング遺伝子のシグナル強度に基づいて、それぞれ標準化します。

Differential Expression - Atlas Human Cancer cDNA Expression Array			
	Coordinate	Gene	Level
Up-regulated Genes	A7d	Keratin	2.2
	A7m	Vimentin	7.7
	B2c	Apo-2 ligand (TRAIL)	3.6
	B7n	STAT5B	2.0
	D5b	Zyxin & Zyxin-2	3.2
	D6b	Semaphorin (CD100)	2.2
	E2b	TIMP-1	3.5
	E6a	Alpha-catenin	2.4
	F1e	VEGF (VGF)	2.2
	F3j	EGR-1	7.1
Down-regulated Genes	A1a	Cell Division Control Protein 2	3.8
	A1b	Cell Division Protein Kinase 2	2.1
	A1c	Cell Division Protein Kinase 3	2.0
	A2j	Cyclin B1 G2/Mitotic Specific	2.3
	A2n	Cyclin D3	2.0
	A3k	PLK-1	3.0
	A5e	PCNA (Cyclin)	2.1
	B5c	CD27BP (Siva)	2.6
	C1n	DNA Topo II Alpha Isozyme	2.1
	E3f	NDK B	2.0

表2-2: Atlas Human Cancer cDNA Expression Arrayから得られたPHA/PMA刺激によって活性化したJurkat細胞内で発現した遺伝子

アップレギュレートおよびダウンレギュレートされた顕著な10個の遺伝子をリストにしました。スポットの位置は、Atlas Human Cancer cDNA Expression Arrayスポット座標から求めました。シグナル強度の標準化には、ハウスキーピング遺伝子(HPRT)を用いました。遺伝子の発現レベルは、標準化シグナルに比した遺伝子の発現の強度を示しています。

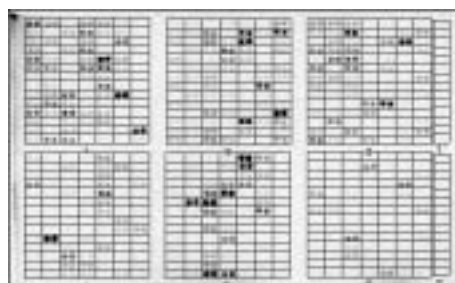


図2-13: ImageQuantによりグリッド化したAtlas Human Cancer cDNA Expression Arrayの解析結果

グリッドオブジェクトを使用して分けし、各アレイ上のすべての2重スポットを同時に定量しました。ゲノムDNAとハウスキーピング遺伝子のスポット用のグリッドは別枠として示されています。アレイ間のシグナル強度を合わせるためには、HPRTハウスキーピング遺伝子の測定値を使用して標準化しました。

Sulphur-35

2-3. Sulphur-35

半減期	87.5日
放出放射線	中エネルギーβ線（最大0.167 MeV）
汚染の検出	薄窓GM管式サーベイメータ
空気中の最大飛程	26 cm
水中の最大飛程	0.32 mm
しゃへい	1 cm厚アクリル板（3 mm厚程度までうすくてもよいが、強度が不十分になる）

特記事項

- 亜硫酸ガスや硫化水素が発生するおそれがあるので、吸引しないように実験条件に注意を払ってください。
- バイアルの開封や使用にあたっては、必ず換気の良いフード中で行ってください。
- ³⁵S標識アミノ酸は、放射線分解で揮発性分解生成物を生じ、反応容器や装置内面が汚染している可能性があるので注意してください。

³⁵ S	Sulphur-35						
	T _{1/2} : 87.5days						
days	0	1	2	3	4	5	6
0	1.000	0.992	0.984	0.977	0.969	0.961	0.954
7	0.946	0.939	0.931	0.924	0.917	0.909	0.902
14	0.895	0.888	0.881	0.874	0.867	0.860	0.854
21	0.847	0.840	0.833	0.827	0.820	0.814	0.807
28	0.801	0.795	0.789	0.782	0.776	0.770	0.764
35	0.758	0.752	0.746	0.740	0.734	0.728	0.723
42	0.717	0.711	0.706	0.700	0.695	0.689	0.684
49	0.678	0.673	0.668	0.662	0.657	0.652	0.647
56	0.642	0.637	0.632	0.627	0.622	0.617	0.612
63	0.607	0.602	0.598	0.593	0.588	0.584	0.579
70	0.574	0.570	0.565	0.561	0.557	0.552	0.548
77	0.543	0.539	0.535	0.531	0.526	0.522	0.518
84	0.514	0.510	0.506	0.502	0.498	0.494	0.490

2-3-1. プロトコール

in vitro Translation

cDNAがコードするタンパク質を試験管内で無細胞的（大腸菌や培養細胞を使用せず）に合成させる方法です。細胞中ではさまざまなタンパク質が作られているので、ある特定タンパク質の発現を確認するには、抗体を用いて免疫学的に検出しなければなりません。目的タンパク質の遺伝子を入手可能な場合には、cDNAを発現するプラスミドを大腸菌などの細胞に導入して、発現したタンパク質を検出することはできます。しかし、結果を得るまでに多大な時間が必要です。さらに、抗体が無い場合には、発現タンパク質を確認できない可能性もあります。

in vitro Translationでは、反応系に加えたmRNA（SP6やT7 RNAポリメラーゼで合成）からコードするタンパク質を直接合成します。この反応過程に標識アミノ酸を添加すると、新規に合成されたタンパク質のみが標識されます。一般的に、細胞抽出液には細胞由来のmRNAが僅かに含まれるため、目的のタンパク質に加えて細胞由来タンパク質も標識されます。しかし、in vitro Translation後の反応液を電気泳動で分離すると、多くの場合、目的タンパク質はcDNAから推測される分子量にバンドとして検出することができます。発現を確認するために抗体の調製が必要でなく、cDNAクローンさえ得られればすぐにタンパク質の確認ができる点が利点です。

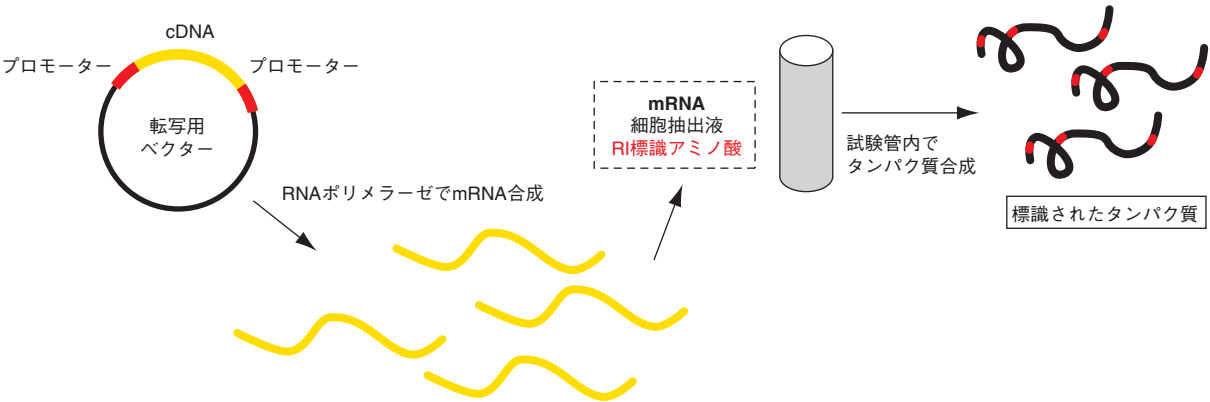


図2-14 : in vitro Translationによる標識タンパク質合成

ここではRabbit reticulocyte lysateシステム※（製品コード：RPN3150）を用いた方法をご紹介します。

■ 準備する試薬と機器 ■	■ プロトコール ^{*3} ■	■ One Point advice ■
● 試薬 • RRLシステム (コード番号：RPN3150) lysate^{*1} translation mix^{*2} 2.5 M 酢酸カリウム溶液 2.5 M 塩化カリウム溶液 25 mM 酢酸マグネシウム溶液 RNase-free 水 コントロールRNA • L-[³⁵S] methionine (>37 TBq /mmol, 555 MBq/ml) • SDS-PAGE用試薬 ● 機器 • 電気泳動用機器 • フィルム、現像用機器 (またはイメージアナライザー)	mRNAの調製 ↓ translation反応混合液 translation mix 4 μl 2.5 M 酢酸カリウム 2 μl 25 mM 酢酸マグネシウム 1 μl L-[³⁵S] methionine 4 μl lysate^{*4} 20 μl RNA (0.5~2.0 μg) を加え、 全量を50 μlにする ↓ 30℃、60~90分間反応 ↓ 氷浴上に置く SDS-PAGEで合成の確認	^{*1} lysateにはtRNA、ヘミン、クレアチンホスホキナーゼとEGTAが含まれています。 ^{*2} translation mixには、加えるRI標識アミノ酸を除いたアミノ酸Mixを使用します (本実験例ではMethionineが除かれています)。 ^{*3} 全てのステップでRNaseが混入しないように注意してください。 ^{*4} -70℃のフリーザーから取り出し、使用分だけを溶かして加えてください。混合は穏やかに行ってください。

参考資料



細胞抽出液

細胞抽出液としては、Rabbit Reticulocyte Lysate (RRL：ウサギ網状赤血球ライセート) や Wheatgerm Extract (小麦胚抽出液) などが使われます。

どの細胞抽出液が適しているかはmRNAの種類によって異なります。一般的には、まずRRLで試してみることをおすすめします。

転写から翻訳までを試験管一本で行うことのできるシステムも市販されています。このようなシステムを使用すれば、RNAの抽出・精製のステップを行わずにDNAから簡便にタンパク質を合成することができます。



コントロール実験

in vitro Translationを行う場合、mRNAを加えないコントロール反応を必ず行ってください。RRLなどの細胞抽出液は内在性mRNAが多少存在しており、それらから翻訳される少量のタンパク質がバックグラウンドになります。導入したmRNAから合成されたタンパク質の検出を容易にするためには、コントロール実験の結果との比較が必須になります。



翻訳効率

in vitro Translationの実験条件が正しいことを、コントロールRNAを用いて確認してください。上述したシステムに添付されるコントロールRNAからは、メチオニンを含まない一つのペプチドを入れて7種類のペプチドとタンパク質が合成されます。オートラジオグラフィーでは下記の6種類のタンパク質が認められます。

RNAの大きさ	アミノ酸数	分子量	等電点	Mr (12.5 %gel)	Mr (7 %gel)
2800 nucleotides	741	82,323	8.90	65 k	84 k
	665	73,751	8.44	60 k	76 k
	460	51,993	6.44	50 k	57 k
	281	30,348	10.32	31 k	32.7 k
	205	21,776	10.35	23 k	dye front
	56	6,323	9.36	9.1 k	dye front

表2-3：コントロールRNAから翻訳されるタンパク質

コントロールRNAに比べて、実際のサンプルmRNAから十分量のタンパク質合成が認められない場合は、カリウムおよびマグネシウムイオンの濃度を調整してください。

プロトコールでは

$K^+=100 \text{ mM}$ 、 $Mg^{2+}=0.5 \text{ mM}$ になっています。

カリウム濃度は、

CAP構造のないRNAを使用する場合は $50 \sim 175 \text{ mM}$

CAP構造があるRNAでは $70 \sim 90 \text{ mM}$

マグネシウム濃度は $0.25 \sim 2 \text{ mM}$ の範囲で至適条件を検討してください。

参考文献

Pelham, R. B. and Jackson, R. J., *Eur. J. Biochem.*, **67**, 247 (1976)

細胞の標識

細胞培養液中にRI標識アミノ酸を加えると、それらは細胞に取り込まれてRI標識タンパク質が合成されます。実験操作は非常に簡単ですが、一般的に使用される $[^{35}\text{S}]$ 標識のメチオニンやシステインは分解して揮発性の放射性亜硫酸ガスなどを生成しますので、実験環境には特別に注意を払う必要があります。放射能を持った揮発性のガスを拡散させないように、また、体内に取り込まないように細心の注意をしなければなりません。細胞培養や実験操作は必ず換気の良いフードの中で行ってください。そして、フードの吸い込み口にはチャコールフィルターを付けてガスを吸収させるようにしてください。細胞のRI標識用に恒温槽を用いる場合は、可能な限り専用の恒温槽を準備するようにしてください。恒温槽内の底には水をはったトレイを置き、頻繁に水を交換してください。また、恒温槽内の上部にはチャコールフィルターをセットし、棚やガラス扉、ファン部分も汚染しますので定期的に除染してください。専用の恒温槽を用意できない場合には、チャコールをキムワイプなどに包んだものを入れて揮発性生成物を吸収させるようにした箱の中で細胞を培養するようにしてください。

■ 準備する試薬と機器 ■

- 試薬
 - ・ L- $[^{35}\text{S}]$ methionine^{*1}
 - ・ 培地
 - ・ 培地（メチオニン不含）^{*2}
- 機器
 - ・ 細胞培養に必要な機器類

■ プロトコール^{*3} ■

細胞の培養^{*3}
↓ 培地（メチオニン不含）で洗浄
↓ 3.7 MBq/ml L- $[^{35}\text{S}]$ methionine/培地（メチオニン不含）を添加
↓ 2～24時間培養
細胞の捕集、洗浄^{*4}

■ One Point advice ■

- ^{*1} 細胞標識用のL- $[^{35}\text{S}]$ methionineを使用します。
- ^{*2} 培地（メチオニン不含）は、各培地メーカーから販売されています。
- ^{*3} 付着細胞は70～80 %コンフルエントまたは5～10×10⁵/6 cm dish、浮遊細胞は70～80 %コンフルエントくらいを目安にしてください。
- ^{*4} 洗浄することで、取り込まれなかった標識アミノ酸を除いて次の実験へ進みます。

フルオログラフィー

免疫沈降法では、目的タンパク質と抗体との複合体を形成させた後にSDS-PAGEなどの電気泳動法で分離・検出します。高感度な検出を行うためにフルオログラフィーが用いられます。フルオログラフィー用増感剤はPPO（蛍光体）をDMSOに溶解して自作することも可能ですが、DMSOなどの有機溶媒を含まない無臭で安全な市販品も市販されています。ここでは、Amplify※（製品コード：NAMP100）を使用した方法をご紹介します。

■ 準備する試薬と機器 ■

- 試薬
 - ・ Amplify
 - ・ ゲル染色液（または固定液、メタノール：酢酸：水＝25：10：65）
- 機器
 - ・ 染色用トレイ
 - ・ ゲル乾燥機
 - ・ フィルム / 現像用機器（またはイメージアナライザー）

■ プロトコール ■

ゲルの固定
↓ 15～30分間、ゲルをAmplifyに浸して静かに振とう
↓ ゲルを取り出し、60～80℃で乾燥
-70℃^{*1}でフィルム^{*2}に露光（またはイメージアナライザーで解析）

■ One Point advice ■

- ^{*1} β 線より生成した不安定な光子の消去時間が延長しますので、室温にくらべて有効な露光を長く行うことができます。
- ^{*2} 感度を上げるために、フィルムをプレフラッシュすることもあります。

参考資料



標識アミノ酸 細胞標識では、*in vitro* Translation で使用するほどの高純度標識アミノ酸を用いる必要はありません。取り込まれなかった標識体は、実験の次ステップに進む段階で除かれます。³⁵Sの場合には、一半減期くらいの間は使用することができますが、高い標識効率を得るためにはフレッシュな標識アミノ酸を使用してください。単一の標識アミノ酸では標識効率に限界がありますので、L-[³⁵S] methionine とL-[³⁵S] Cysteinを混合した細胞標識用アミノ酸混合液も販売されています。



実験例

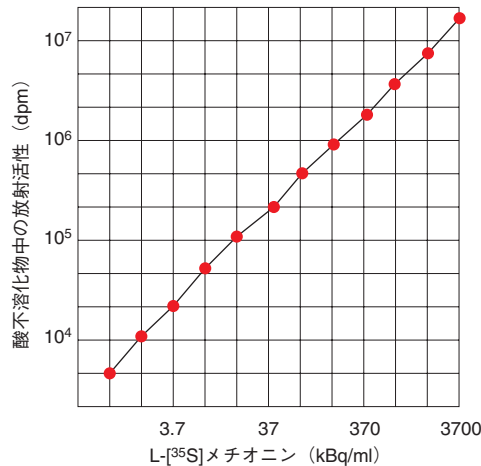


図2-15：メチオニン濃度の違いによる細胞への取り込み

MRC-5細胞を細胞標識用メチオニン※（製品コード：SJ1015）で標識しました。メチオニン不含EMEM培地（10 %Calf Serum添加）で1時間、37℃で培養して標識し、細胞を回収後、10 %TCA沈殿によりガラス繊維ろ紙にタンパク質を捕集して液体シンチレーションカウンタで放射活性を測定しました。

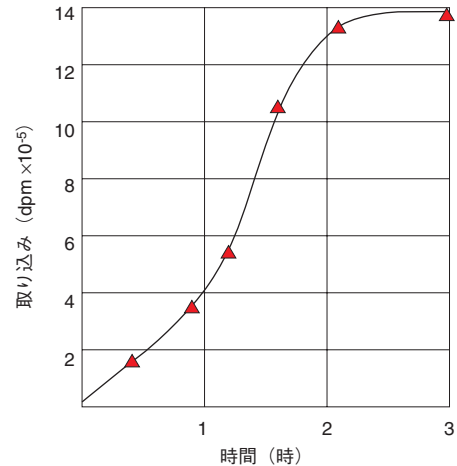


図2-16：標識の時間変化

細胞標識用メチオニン※（製品コード：SJ1015）でマウス3T3細胞を標識しました。標識メチオニンを370 kBq/mlになるようにメチオニン不含培地に加えて左図と同様に液体シンチレーションカウンタで測定しました。



安定化剤

標識メチオニン溶液にはRI化合物およびアミノ酸の安定性を保つためにさまざまな物質が添加されている場合があります。下記のように、細胞に対して悪影響を与える物質もありますので、用いる細胞株の培養に支障をきたす物質が含まれていないか確認してください。

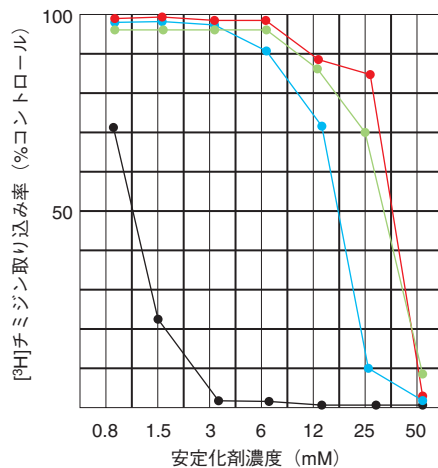


図2-17：安定化剤の細胞に与える影響

標識メチオニンの安定化のために加えられる物質の細胞に与える影響について、BHK21細胞を用いたチミジンの取り込みによって評価しました。それぞれの安定化剤存在下で細胞を37℃、48時間培養した後、ウェルあたり37 kBqのチミジンを加えて取り込みを液体シンチレーションカウンタで測定しました。

- コントロール
- 2-ピリジル酢酸
- p-アミノ安息香酸
- ピリジン3,4-ジカルボン酸

Iodine-125

2-4. Iodine-125

半減期	59.4日
主要放出放射線	35 keV γ線（7 %放出、93 %内部転換） 27-32 keV X線（140 %Teのk X線）
汚染の検出線量しゃへい	¹²⁵ I用シンチレーションサーベイメータ 1 GBq点線源から1 mの距離で41 μSv/時（4.1 mrem/時） 0.02 mm厚鉛で半減

特記事項

- ヨウ素は揮発性物質であり、体内に吸収された場合、甲状腺で選択的に濃縮・蓄積が起こります。使用にあたっては、換気に注意して、必ずフード内で全ての作業を行ってください。換気口にはチャコールフィルターなどを取り付け、汚染した空気がそのまま外部に出ないようにしてください。また、使用者の定期的な甲状腺検査も行うべきです。
- ヨウ素イオンを含む溶液を凍結したり、酸性化させた場合は、揮発性ヨウ素分子を生じます。
- ヨウ素標識化合物の中には手術用ゴム手袋を透過してしまうものがあります。ポリエチレン製の手袋を二重にして取り扱ってください。
- 誤って吸入してしまった場合、甲状腺保護のため、ヨウ化カリウム（130 mg）やヨウ素酸カリウム（170 mg）をすみやかに投与してください。
- 廃棄物は、可能な限り速やかに封をして処理してください。廃液中のヨウ素イオンを、アルカリ性チオ硫酸ナトリウム（チオ硫酸ナトリウム25 g、ヨウ化ナトリウム2 gを1 N水酸化ナトリウム溶液1 lに溶解したもの）で安定化させることも必要です。

¹²⁵ I	Iodine-125 T _{1/2} : 59.4days									
days	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18
0	1.000	0.977	0.954	0.932	0.911	0.890	0.869	0.849	0.830	0.811
20	0.792	0.774	0.756	0.738	0.721	0.705	0.688	0.673	0.657	0.642
40	0.627	0.613	0.598	0.585	0.571	0.558	0.545	0.533	0.520	0.508
60	0.497	0.485	0.474	0.463	0.452	0.442	0.431	0.423	0.412	0.403
80	0.393	0.384	0.375	0.367	0.358	0.350	0.342	0.334	0.326	0.319
100	0.311	0.304	0.297	0.290	0.284	0.277	0.272	0.264	0.258	0.252
120	0.247	0.241	0.235	0.230	0.225	0.219	0.214	0.209	0.205	0.200
140	0.195	0.191	0.186	0.182	0.178	0.174	0.170	0.166	0.162	0.158
160	0.155	0.151	0.148	0.144	0.141	0.138	0.134	0.131	0.128	0.125
180	0.122	0.120	0.117	0.114	0.112	0.109	0.106	0.104	0.102	0.099
200	0.097	0.095	0.093	0.090	0.088	0.086	0.084	0.082	0.080	0.079
220	0.077	0.075	0.073	0.072	0.070	0.068	0.067	0.065	0.064	0.062
240	0.061	0.059	0.058	0.057	0.055	0.054	0.053	0.052	0.050	0.049

2-4-1. ^{125}I 標識

新規物質の研究を行う場合には、その化合物のRI標識体が必要になります。トリチウム水やトリチウムガスを使用した置換による方法が簡便ですが、置換反応には多量のトリチウムを必要とし、効率もよくない上に、得られるRI標識化合物のRI標識位置や比放射能の点で最善の方法であるとは言えません。ライフサイエンス分野の研究で必要になるRI標識化合物は、タンパク質やペプチドがほとんどで、これらの標識のために ^{125}I が用いられています。

Na^{125}I から酸化剤や酵素で遊離の ^{125}I を生じさせ、芳香族アミノ酸（チロシン残基やヒスチジン残基）に導入する**直接標識法**と、 ^{125}I で官能基のある化合物を標識しておき、この ^{125}I 標識化合物と目的の物質との親和性を利用して結合させる**間接標識法**に大別できます。

いずれの標識方法でも、1度の実験に使用する ^{125}I 標識体（18.5 MBq以上）は市販の ^{125}I 標識化合物（370 kBq以下）を使用する場合の数十倍以上になります。開封、分注および反応操作は、必ずよく換気されたフードの中で行ってください。また、適切なしゃへい材を使用して、気化した ^{125}I を捕集するチャコールトラップも準備してください。

直接標識法

酸化剤として遊離の ^{125}I を生成するための物質として、**クロラミン-T**（N-Chloro-P-toluensulphonamide）や、**イオドジェン**（**IDO-GEN**※：1,3,4,6-Tetrachloro-3 α , 6 α -diphenylglycoluril）などがよく使用されます。これらの酸化剤は、RI標識ヨウ化ナトリウムを酸化型に活性化し、主にチロシン残基のフェノール環に ^{125}I を導入します。

また、酵素標識法に**ラクトペルオキシダーゼ**（Lactoperoxidase）が一般的に用いられています。

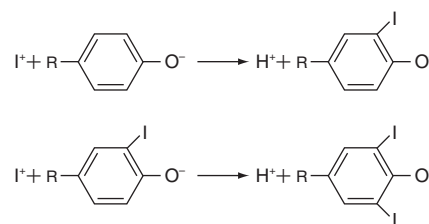


図2-18： ^{125}I のフェノール環への導入

間接標識法

間接法には、市販の ^{125}I 標識**Bolton & Hunter試薬**（N-Succinimidy 3-(4-hydroxy, 5- ^{125}I)iodophenyl)propionate）が使われます。これはアシル化剤のN-Succinimidy 3-(4-hydroxyphenyl)propionateをクロラミン-T法で ^{125}I 標識したものです。これと、タンパク質のアミノ基（たとえばリジンの ϵ アミノ基や、N末端アミノ基）が縮合反応し、アミド結合を形成します。他にも多数の ^{125}I 標識化合物を使用した例が報告されています。

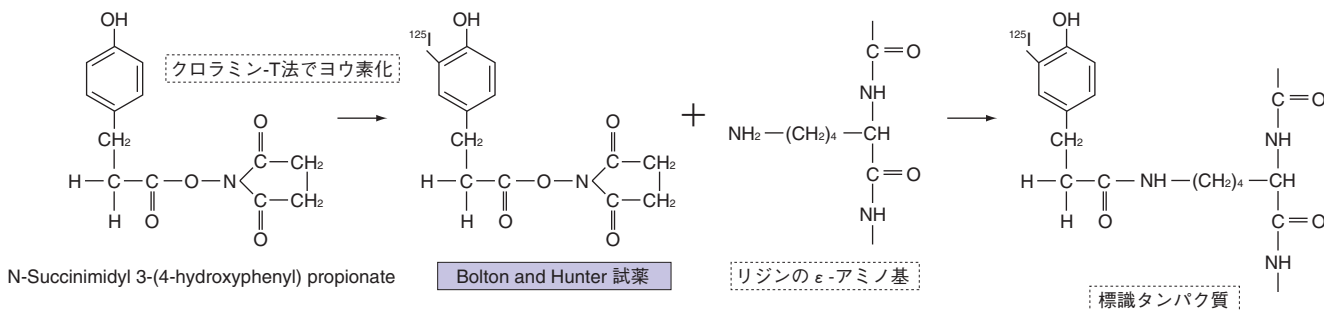


図2-19：Bolton & Hunter試薬とアミノ基の反応

参考資料



¹²⁵Iと¹³¹I

¹²⁵I (放射性ヨウ素-125) はライフサイエンスの研究によく用いられます。同じヨウ素の放射性同位体として¹³¹Iがあります。¹³¹Iは高比放射能ですが、半減期が8日と短いため、現在は研究目的であまり使用されません。診断、治療目的ではよく使用されています。



クロラミン-T法

幅広いpH条件で標識できますが、pH 7.5付近で効率が最も高く、pH 6.5以下または pH 8.5以上では低下します。ヒスチジンのイミダゾール環へはpH 8.0-8.5以上で標識効率が高くなります。



標識法の選択

標識する物質にチロシン残基が存在しない場合は、間接標識 (B&H) 法で¹²⁵Iを目的分子に取り込ませます。チロシン残基を持つタンパク質・ペプチドの場合は、まずクロラミン-T法を試して生理活性の有無を確認します。標識反応後に生理活性の低下や消失が起こった場合は、ラクトペルオキシダーゼ法で標識を行います。それでも活性の低下が起こる場合は、間接標識 (B&H) 法で標識を行います。



直接標識法の注意点

酸化剤の量

過剰な酸化剤の存在はタンパク質の酸化、特にトリプトファンのインドール環、メチオニン、システインのSH基と反応を起こし、タンパク質を不安定にします。

mono-, di-Iodide

チロシン残基が一ヨウ素化あるいは二ヨウ素化される程度は、反応時の水素イオン濃度やイオン環境とタンパク質分子内のチロシン残基の立体的な配置によって左右されます。

たとえば、インスリンをpH 1.0とpH 7.5で標識した場合、pH 7.5で標識した方がモノヨードチロシンとして存在するヨウ素が多く、均一なヨウ素化を行うことができます。また、ゆっくり反応させるほど分子間に均一にヨウ素が分配されます。

反応条件

直接法の標識反応は幅広いpH範囲で行うことができます。標識反応後に生理活性が低下あるいは失活してしまう場合、標識反応条件を変えて行うことで満足いくRI標識体が得られることもあります。

反応液の混和

均一なヨウ素化を行うために、反応液を迅速に混和してください。

放射性ヨウ素の付着

放射性ヨウ素はガラス器具に付着します。反応には、プラスチックチューブやシリコン処理したガラスチューブを使用してください。さらに、付着を防ぐためにBSAなどでコーティングすること行われます。

間接標識法

B&H試薬は、mono-iodo ester体で分子量387です。あまり小さなタンパク質を標識すると、構造の変化が大きく、生理活性がなくなる場合があります。

B&H試薬は、製品の安定化のため、ベンゼン溶液になっています。使用前に良く換気されたフード内で乾燥窒素を吹きかけながら除去してください。汚染、吸入しないよう十分注意して行ってください。

各標識法の参考文献

クロラミン-T法	Greenwood <i>et.al.</i> ,	<i>Biochem.J.</i> , 89 ,114 (1963)
ラクトペルオキシダーゼ法	Marchalonis	<i>Biochem.J.</i> , 113 ,229 (1969)
イオドジェン法	Fraker <i>et.al.</i> ,	<i>B.B.R.C.</i> , 80 ,849 (1978)
B&H法	Bolton <i>et.al.</i> ,	<i>Biochem.J.</i> , 113 ,529 (1969)

2-4-2. プロトコール

クロラミン-T法によるタンパク質標識

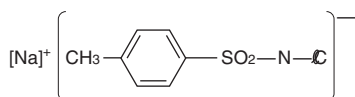


図2-20：クロラミン-Tの構造

クロラミン-Tの強力な酸化力でRI標識ヨウ化ナトリウム (Na^{125}I) を酸化し、タンパク質中に含まれるチロシン残基中のフェノール環の水酸基に対してオルト位の炭素と反応が起こり ^{125}I が導入されます。標識反応後、未反応の ^{125}I と標識されたタンパク質はゲルろ過カラムで分離精製します。

チロシン残基の標識（最も一般的な方法）

■ 準備する試薬と機器 ■

- 試薬
 - ・ Na^{125}I (carrier-free : 3.7 GBq/ml)
 - ・ 0.25 M PBS, pH 7.5
 - ・ 0.5 mg/ml クロラミン-T (in 0.05 M PBS)
 - ・ 0.17 mg/ml システイン (in 0.05 M PBS)
 - ・ 2 mg/ml NaI (または KI) (in 0.05 M PBS)
 - ・ BSA (または血清)
 - ・ 標識用タンパク質 (0.5-1.0 mg/ml PBS)
- 機器
 - ・ ポリスチレンチューブ (直径12 mm×70 mm、容量4 ml)
 - ・ PD-10カラム※ (製品コード：17-0851-01)
 - ・ マグネチックスターラー

■ プロトコール ■

標識反応*
ポリスチレンチューブに Na^{125}I を 18.5~37 MBq (5~10 μl) 入れ、50~100 μl の PBS を加える
↓
標識タンパク質 10 μl (5-10 μg)
クロラミン-T 10~20 μl を加える
↓ 15~30秒間混合*2
↓ システイン 100 μl を加える
↓ 0.5 % BSAを含むNaIで全量を1 mlにする

精製
PD-10カラムを、0.5 % BSAを含むPBS 30 mlで平衡化する
↓
標識反応液をアプライし、カウントがなくなるまでPBSで溶出する*3

■ One Point advice ■

*1 チューブに小さな攪拌子（ペーパークリップなどを5 mm位に切断し、ガラスキャピラリーに溶封して作成）を入れて反応中攪拌してください。各試薬の分注はできるだけ速やかに行ってください。

*2 反応時間は標識するタンパク質によって適切な時間を設定してください。

*3 ^{125}I 用シンチレーションサーベイメータでモニタしながら、ポリスチレンチューブに1 mlずつ集めてください。

【注意】

- 標識ヨウ化ナトリウム (Na^{125}I) を用いるタンパク質の標識は、比較的多量のRIを使用します。安全面からも、市販のRI標識タンパク質が入手可能であれば、それを用いることで、 ^{125}I の取扱い量を減らすことができます。
- 標識反応は必ずよく換気されたフード内で行ってください。取扱いには細心の注意を払い、無理はしないでください。手袋、めがねはもちろん、チャコール（活性炭）を含んだマスクなども着用すると良いでしょう。
- 衣服、特に袖や袖口、手袋は頻繁にモニタしてください。特に、手袋は汚染が2~10 $\mu\text{Ci}/\text{mm}^2$ を超えたら速やかに交換してください。
- 作業用のドラフト内には以下のものを備えておいてください。
 - ・ 十分量の手袋
 - ・ 十分量のティッシュペーパー
 - ・ 交換した手袋や、汚染物を入れるための、ふた付廃棄物入れ
 - ・ ^{125}I 用しゃへい材

参考資料



¹²⁵I 標識によるタンパク質の変性

¹²⁵Iで標識したタンパク質では、生理活性や免疫活性が低下する場合があります。これは、次のようなことが原因と考えられます。

1) ヨウ素原子の付加

チロシン残基などにヨウ素原子が付加されたために生ずる活性の低下や消失で、クロラミン-T法で特に問題になります。標識部位がそのタンパク質の活性に大きく関与している場合には、異なる位置に¹²⁵I標識を導入することを検討しなければなりません。

2) 放射線の影響

¹²⁵Iからの放射線により、タンパク質の構造が変化して変性することがあります。しかし、一般的には変性を引き起こすほど大量の¹²⁵Iは使用しないのでそれほど大きな問題ではありません。

3) 標識用試薬の影響

酸化剤や還元剤によりS-S結合やSH基が酸化あるいは還元されて、タンパク質の立体構造に変化が起きる場合があります。クロラミン-T法で用いる酸化剤や還元剤は非常に低濃度で、また短時間しか使用しませんが、標識されるタンパク質によっては影響が大きくあらわれることもあります。このような場合には、他の標識法を検討しなければなりません。

4) 標識ヨウ化ナトリウム (Na¹²⁵I) 中の不純物の影響

同じ条件で標識反応を行ったにもかかわらず、異なる結果、たとえばタンパク質が失活したり標識効率が低下する場合、標識ヨウ化ナトリウムに原因があることがあります。高比放射能の標識体を得るために、可能な限りフレッシュなバッチを使用することをおすすめします。



標識タンパク質の比放射能計算

得られた放射能カウントから、標識されたタンパク質の比放射能などは以下のように計算します。(検定日より2日後のNa¹²⁵Iを18.5 MBq使用して、2 μgのタンパク質(ヒトα・プロテイン)を標識し、ゲルろ過後の各フラクションのカウントが下記のような場合。)

- ・放射能量 $18.5 \text{ MBq} / 5 \mu\text{l}$
- ・測定日における実際の放射能量(壊変率表から求めた壊変係数) 0.977
- ・実験段階での総放射能量 $18.5 \times 0.977 = 18.1 \text{ (MBq)}$
- ・標識反応後の全カウント $10,811 \text{ (cps)}$ (この値が18.1 MBqに相当)
- ・標識されたタンパク質のカウント $(\text{全カウント}) - (\text{フリーの}^{125}\text{I}) = 10,811 - 5,199 = 5,612 \text{ (cps)}$
- ・標識効率 $(5,612 / 10,811) \times 100 = 51.9 \text{ (\%)}$
- ・タンパク質に取り込まれた¹²⁵Iの量 $18.1 \times 0.519 = 9.4 \text{ (MBq)}$
- ・比放射能(タンパク質の放射活性) / (使用したタンパク質量) $= 9.4 / 2 = 4.7 \text{ (MBq}/\mu\text{g)}$
- ・ピーク(4番目)の放射活性の割合 $(2,874 / 5,612) \times 100 = 51.2 \text{ (\%)}$
- ・ピークフラクションのタンパク質量 $(51.2 \times 2) / 100 = 1.024 \mu\text{g}$

フラクション番号	cps	
1	-	
2	-	
3	4	
4	2874	標識タンパク質の溶出ピーク
5	1587	
6	173	
7	73	
8	29	
9	31	
10	2094	フリーの ¹²⁵ I溶出
11	1976	
12	545	
13	77	
14	35	
15	12	

表2-4: 各フラクションのカウント

レセプターアッセイ

レセプター（受容体）は、細胞膜や細胞質に存在していて、外界からの刺激、細胞間や細胞内の情報伝達に中心的な役割を果たします。レセプターの機能、働きの研究に欠かせないものが**リガンド（Ligand）**です。RI標識リガンドとレセプターとの結合（親和性）を定量する実験を**レセプターアッセイ**、あるいはレセプターバインディングアッセイ（受容体結合試験）とよびます。この目的に使用されるRI核種は³Hおよび¹²⁵Iです。どちらの核種にもメリットとデメリットがありますので、実験目的により使い分ける必要があります。

レセプターアッセイは、細胞あるいは膜画分をサンプルとして用いて、標識リガンドを加えてインキュベートした後に、サンプル中に含まれるレセプターと結合したRI標識リガンドの放射活性を測定する方法です。そのため、新薬の研究開発では、オートメーション化して**HTS（High Throughput Screening）**にも応用されています。HTSにはγカウンタで放射活性を直接測定できる¹²⁵I標識リガンドが適しています。³Hの測定には試料をバイアルに移してシンチラントを加える操作が入るため、多量の検体を処理するのには適していません。

レセプターの解析（レセプターとの架橋実験）については50ページを参照してください。

■ 準備する試薬と機器 ■	■ プロトコール ■	■ One Point advice ■
● 試薬 ・ ¹²⁵I標識リガンド ・ 未標識リガンド ・ 結合バッファー ・ 洗浄バッファー ● 機器 ・ ろ過装置 ・ ガラスフィルター ・ γカウンタ	細胞を集め、結合バッファーで数回洗浄 ↓ 段階希釈した標識リガンドを加える*1 ↓インキュベーション ↓ガラスフィルターでろ過*2 ↓洗浄操作 γカウンタでカウントを測定	*1 ¹²⁵I標識リガンドは、ガラスなどに吸着しやすいので、ポリプロピレンなどのチューブを用いてください。 *2 フィルターへの吸着が強い¹²⁵I標識リガンドの場合には、チューブを遠心し、上清を除いた沈殿のカウントを測定します。

リガンド濃度

レセプターアッセイで使用するリガンドの濃度は非常に低い（ペプチドではピコ（10⁻¹²）モル レベル）、チューブなどの実験器具への吸着に注意してください。特に、小スケールでアッセイを行う場合には、レセプターと結合していないフリーのリガンドがチューブの壁面などに吸着して実験誤差の原因になることがあります。

非特異的結合（NSB ; Non Specific Binding）

レセプターアッセイでは、RI標識リガンドがサンプル中のタンパク質などに非特異的に結合する量を必ず測定してください。これは、特異的結合のグラフ化や、用いた実験条件や試薬、¹²⁵I標識リガンドに問題がないことを確認するために必須です。反応系に大過剰（¹²⁵I標識リガンド量の100倍以上）の未標識リガンドを加えて反応させた後、カウントを測定します。非特異結合が少なければ、この値は小さくなります。

反応温度、時間

レセプターアッセイには、平衡に達する反応条件（温度、時間）を検討することが必須です。反応時間は、リガンド-レセプターの結合速度から決定されます。また、反応は4℃で行うのが一般的です。これは、37℃で反応すると、レセプターに結合したリガンドはインターナリゼーションやリサイクリングなどのプロセッシングを受けることがあるためです。したがって、細胞表層のレセプター数と若干異なる結果が得られます。4℃での反応が困難な場合には、代謝過程の阻害剤（アジ化ナトリウム、2-デオキシグルコースなど）を加えることもあります。

参考資料



Scatchard解析

レセプターとリガンドとの結合は、種々の方法により解析されます。Rを受容体、Lをリガンドとしたとき、



の平衡関係があります。ここで、解離定数をKdとすると

$$K_d = \frac{[R][L]}{[RL]}$$

が成立します。これを酵素反応速度論におけるミカエリス-メンテンの式と同様に变形させると

$$[RL] = \frac{B_{\max}[L]}{K_d + [L]}$$

ここで、Bmax は最大結合量を表します。

レセプターアッセイは、標識リガンドを用いて [L] と [RL] との関係測定して、この式からBmaxとKdを求めることです。一般的には、横軸に結合量、縦軸に結合量/濃度をとったグラフから求めます。結合様式が単一の場合にはグラフは直線になり、複数の場合では曲線になります。

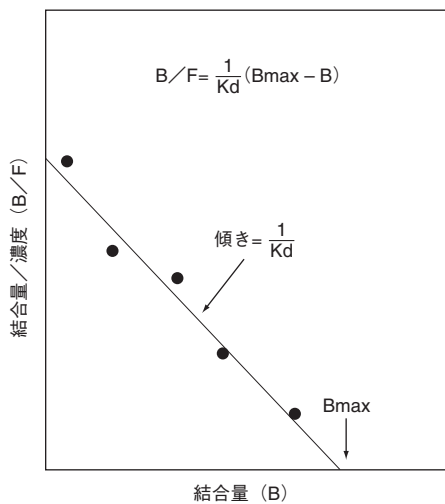


図2-21：レセプターの結合様式が単一の場合

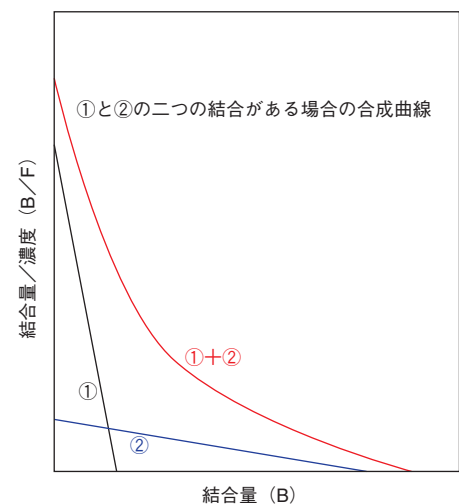


図2-22：結合様式が複数の場合



標識リガンド

¹²⁵I 標識リガンドはペプチドなどの高分子の化合物に、³H標識リガンドは低分子の化合物によく用いられます。しかし、ペプチドであっても、レセプターとリガンドの結合位置、RI標識が化合物の構造や分子量に大きな変化を与えて生物活性の変化が生じる場合には、¹²⁵I 標識リガンドは使用できません。

¹²⁵I 標識リガンドはその比放射能が高いのが利点です。³H標識リガンドでは～100 Ci/mmol程度の比放射能しか得られませんが、¹²⁵I 標識リガンドはその20倍（2000 Ci/mmol）にもなるため、高感度なアッセイシステムを組むことができます。特にレセプターの数が少ない場合などでは、¹²⁵I 標識リガンドでなければ検出できません。

リガンドは、**アゴニスト (agonist)** と **アンタゴニスト (antagonist)** に分れます。アゴニストはレセプターに結合して、そのレセプターの活性発現を引き起こします（作用薬）。一方、アンタゴニストはレセプターに結合しますが、そのレセプターの活性発現を引き起こしません（拮抗阻害薬・遮断剤）。アゴニストとアンタゴニストが混在するとアンタゴニストはアゴニストのレセプターへの結合に影響を与えます。

参考文献

- Scatchard, G, Ann. N. Y. Acad. Sci., **51**, 660 (1949)
 Rothenthal, H. E., Anal. Biochem., **20**, 525-532 (1967)
 Bylund, D. B., Anal. Biochem., **159**, 50-57 (1986)

H-3 (Tritium)

2-5. H-3 (Tritium)

半減期	12.3年
放出放射線	弱エネルギーβ線（最大0.0186 MeV）
汚染の検出	スミア法—液体シンチレーションカウンタで測定
空気中の最大飛程	6 mm
水中の最大飛程	0.006 mm
しゃへい	特に必要なし

特記事項

- 放出β線のエネルギーがきわめて低いため、サーベイメータでの検出が困難です。スミア法で定期的に実験台等の汚染のモニタを行ってください。
- ^3H 標識化合物を使用する場合は特にしゃへいを行う必要はありませんが、肌から吸収されやすいので必ず防護用手袋を着用してください。
- 外部からの被ばくは影響がないのですが、体内に取り込まれた ^3H 標識化合物による内部被ばくに注意してください。
- ALI（年摂取限度）は対象となる ^3H 標識化合物によって非常に差があります。たとえばDNA前駆体の ^3H 標識チミジンでは放射能が細胞の核に取込まれ集中することになるので、トリチウム水よりも影響が大きいと考えられます。

2-5-1. プロトコール

細胞増殖 (Cell Proliferation) の測定

遺伝子の発現を含め、目的物質が細胞に対してどのような効果があるかを研究するためには、細胞レベルでの実験を行う必要があります。それには以下のような実験が行われ、トレーサーとして [methyl-³H] チミジンが用いられます。

- ・細胞が刺激により増殖する
- ・細胞が刺激により傷害を受け、死にいたる
- ・細胞内器官、内容物が増加する
- ・遺伝子 (DNA) が複製され、細胞が分裂・増殖する
- ・細胞の生物活性が増加する

チミジンは細胞膜を通過して細胞内へ取り込まれます。そして、細胞内で**チミジンキナーゼ**の働きにより、**TMP→TDP→TTP**と変換され、DNAに取り込まれるようになります。チミジンには、様々な標識位置の製品がありますが、細胞増殖の検出には**[methyl-³H]チミジン**が主に使用されています。

図に示したチミジンの水素で、**x**位置が標識されている場合には、DNA伸長・合成の段階ではずれるので合成のモニタには使用できません。二重下線部分の標識水素原子がDNA合成のモニター実験に使用できますが、5-methyl基以外に標識が入っている場合、インキュベーション中に脱methyl化が起こりやすく、その結果、標識Deoxyuridineになってしまいます。これはPyrimidine phosphorylaseによりRNA precursorとなりDNAには取り込まれません。methyl基には3つ水素があるので、比活性が高くできます。すなわち、検出感度が高くなります。以上のことから、細胞増殖の検出には[methyl-³H]チミジンが最も多く使用されています。

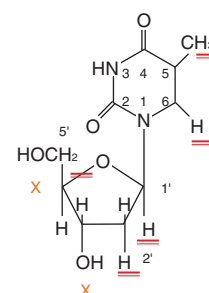


図2-23：チミジンの構造

<リンパ球幼若化試験の例>

■ 準備する試薬と機器 ■

- 試薬
 - ・細胞培養用培地 (RPMI-1640)
 - ・FCS
 - ・Ficoll-Paque PLUS※
 - ・マイトゲン (PHA-P、ConAやPWMなど)
 - ・[methyl-³H]チミジン
- 機器
 - ・CO₂インキュベーター
 - ・平底マイクロプレート (細胞培養用)
 - ・液体シンチレーションカウンタ (LSC)

■ プロトコール ■

血液よりFicoll-Paque PLUSで、単核球を採取*1
↓ RPMI-1640で3回洗浄
↓ 0.1mlをマイクロプレートのウェルに分注*2
↓ マイトゲン添加、10 %FCS添加
RPMI-1640で全量を0.3 mlにする
↓ 5 % CO₂インキュベーターで、37℃、72時間培養
↓ [methyl-³H]チミジン7.4 kBqを添加
↓ 6時間培養
洗浄後、LSCでカウント測定

■ One Point advice ■

*1 ヘパリン採血した静脈血を用いてください。

Ficoll-Paque PLUSの操作法については57ページを参照してください。

*2 同一の系を3重測定して、その平均値を求めてください。また、コントロール (無刺激) 実験を必ず行ってください。

■ 参考資料 ■



DNA合成量の測定方法

[methyl-³H]チミジンを用いるとDNA合成量を直接測定することができます。細胞が増殖する場合、遺伝子（DNA）が必ず複製し、その複製したDNA量を測定することで真の細胞増殖を定量することができます。さまざまな生体内産生物質の評価のバイオアッセイ法としてこの方法が用いられています。また、RIを用いずにチミジンアナログの**ブロモデオキシウリジン**をDNAに取り込ませ、抗ブロモデオキシウリジン抗体で検出する方法もあります。

RIを使用せずに細胞増殖を検出する方法として、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromideによる発色で検出する**MTT法**があります。細胞を培養しているウェルにMTTを添加し、吸光度計で測定する簡単な操作です。ただし、この方法は、生細胞の酵素活性を測定しているので、DNA合成量の直接測定で得られる結果と異なる場合があります。

[³H]チミジンの選択方法

RIカタログで、[³H]チミジン製品は10種類以上記載されています。どのチミジン製品が目的の実験に適しているかは、以下を目安に決めます。

1) DNA合成の測定：

- ・ [methyl-³H]チミジンを選択

2) [methyl-³H]チミジンの比放射能選択：

- ・ 一般的には185～925 GBq/mmol（製品自体、毎ロット同じ比放射能に調整されています）
- ・ DNA合成量が少ない細胞や、検出感度を高くしたい場合、2.22～3.2 TBq/mmolを使用

3) スカベンジャー（エタノール）入りと水溶液の選択：

- ・ エタノールが細胞に影響を与える場合は水溶液（あるいは、使用前にエタノールを除去）
- ・ 一般的な実験には水溶液（比放射能185～925 GBq/mmol）

アッセイ用の機器

細胞増殖測定はマイクロプレートやチューブを用いて実験を行います。最終的には液体シンチレーションカウンタ（LSC）でカウントを測定します。多数のサンプルについて、各ウェルから1つずつ液シンバイアルに移し、シンチラントを加え測定するには、多大な手間と時間がかかります。セルハーベスタを用いてマイクロプレートごと洗浄を行い、さらにマイクロプレート用のLSCによりカウント測定するためのシステムも販売されています。詳細は各機器メーカーなどにお問い合わせください。

細胞増殖試験結果の解釈

3重測定を行ったカウントのばらつきが少なくなければなりません。10～20 %以下を目安にしてください。また、コントロールが、2,000 cpm以下であることが必要です。マイトゲンによる刺激では、通常10,000～500,000 cpmが取り込まれます（細胞数10⁵あたり）。

Stimulation Index（SI）は、**[SI=取り込みのカウント / コントロールのカウント]** で表されます。

参考文献

Cleaver, J. E., Thymidine Metabolism and Cell Kinetics, p43, North-Holland, Amsterdam (1967)

Feinendegen, L. E., Prospects and Problems in the application of isotopes to pure and applied cytology, Chapter 17, p769-821, in Radiotracer Techniques and Applications, volume 2, edited by E. A. Evans, and M. Muramatsu, M. Dekker inc., New York (1977)

レセプターの解析

レセプター（受容体）は、細胞膜や細胞質に存在していて、外界からの刺激、細胞間や細胞内の情報伝達に中心的な役割を果たします。レセプターの機能、働きの研究に欠かせないものが**リガンド**（Ligand）です。RI標識リガンドをレセプターとの結合実験に用いる方法をレセプターアッセイあるいはレセプターバインディングアッセイ（受容体結合試験）とよびます。この目的に使用されるRI核種は ^3H か ^{125}I です。どちらもメリットとデメリットがありますので、実験目的で使い分けてください。レセプターアッセイについては46ページを参照してください。

レセプターとリガンドを架橋試薬で複合体を作らせて検出する方法が、多くの研究分野で用いられています。受容体の分子量やサブユニット構造の解析など、多くの情報を得ることができます。架橋試薬で安定化した複合体を細胞膜から可溶化し、電気泳動で分離して検出します。

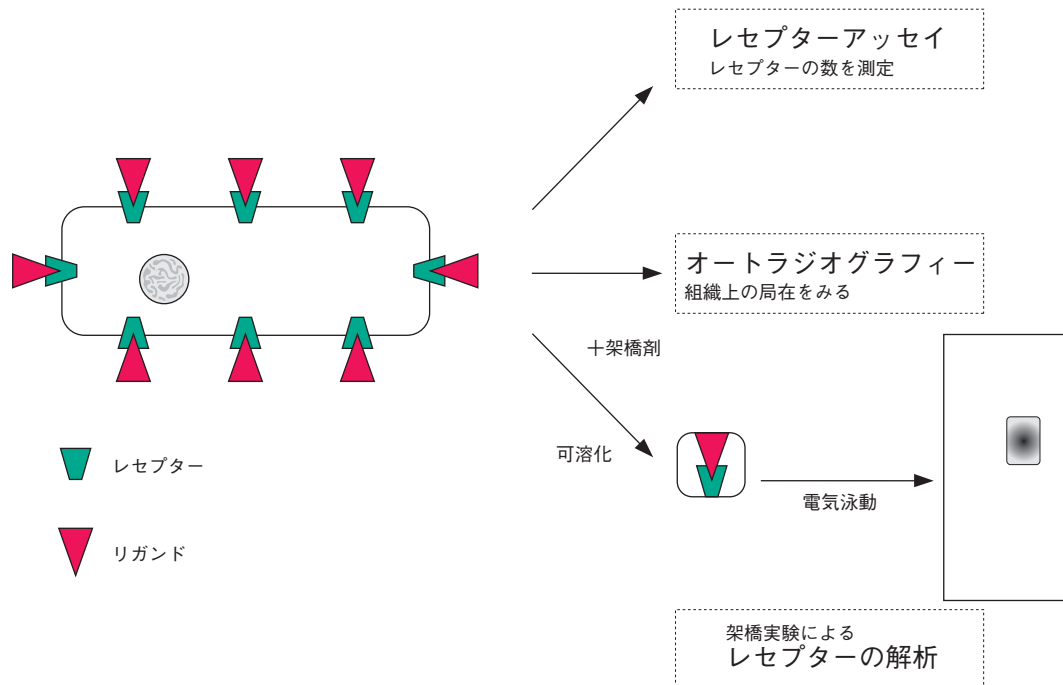


図2-24：レセプター解析の方法

■ 準備する試薬と機器 ■

- 試薬
 - ・ ^3H 標識リガンド
 - ・ 結合バッファー
 - ・ PBS
 - ・ DSS（Disuccinimidyl suberate）
（架橋剤）*¹
 - ・ 可溶化試薬
 - ・ 電気泳動試薬
 - ・ グリシン
- 機器
 - ・ 電気泳動装置
 - ・ X線フィルムと現像用具
（または、イメージアナライザー）

■ プロトコール ■

細胞を集め、結合バッファーで数回洗浄し、
 10^8 cells/ml程度に調製*²
 ↓ 充分量の標識リガンドを添加*³
 ↓ インキュベーション
 ↓ PBSで2回洗浄し、0.5 mlにする
 ↓ 50 mM DSS溶液25 μl 加える
 ↓ 氷上で、30分インキュベーション
 ↓ 0.2 Mグリシンを加え、反応停止
 ↓ PBSで洗浄*⁴
 ↓ 可溶化試薬を加え、氷上で5分静置
 ↓ 遠心分離
 上清を電気泳動し、解析

■ One Point advice ■

- *¹ DSSは第一級アミノ基に反応するため、バッファー中に血清やタンパク質、Trisバッファーなどが混在すると架橋効率が低下します。
- *² 細胞数を増やしすぎると、電気泳動での解像度が悪くなります。
- *³ 非標識リガンドを大過剰に加えたコントロール実験を必ず行ってください。
- *⁴ レセプターとリガンドの解離が早いことがありますので、できるだけ手早く行ってください。

参考資料



架橋剤

架橋剤としては第一級アミノ基と反応するDSS（Disuccinimidyl suberate）がよく用いられています。他に、試薬内にジスルフィド結合を持ち、還元処理により開裂するDSP（Dithiobis succinimidyl propionate）や、酸化処理により開裂するDST（Disuccinimidyl tartarate）などがあります。また、これらを水溶性にした誘導体も多く開発されており、目的に応じて使い分けることができます。

光親和性標識リグンドがある場合には、非常に簡便な架橋が可能になります。これは、標識リグンドとインキュベーションした後、たとえば紫外線を照射することで、レセプターとリグンドが結合します。インキュベーション後の架橋操作反応をせずに、可溶化と電気泳動を行えます。



レセプターの精製

目的のレセプターが発見されたら、次の段階としてレセプターを単離・精製して様々な応用実験に用いることができます。レセプターはきわめて微量のため、均一精製標品を得るためには数万倍の濃縮精製が必要になります。そのために、特異的リグンドを結合したアフィニティーカラムの開発が必須になります。この目的で用いられるリグンドには、レセプターアッセイに必要な能力に加えて、さらに結合能を壊すことなくマトリックスに結合できる化学的に修飾可能な反応基グループを持っていない限りなりません。解離定数が 10^{-8} Mより小さい場合には、結合したレセプターの活性を維持したまま溶出するのが困難な場合があります。

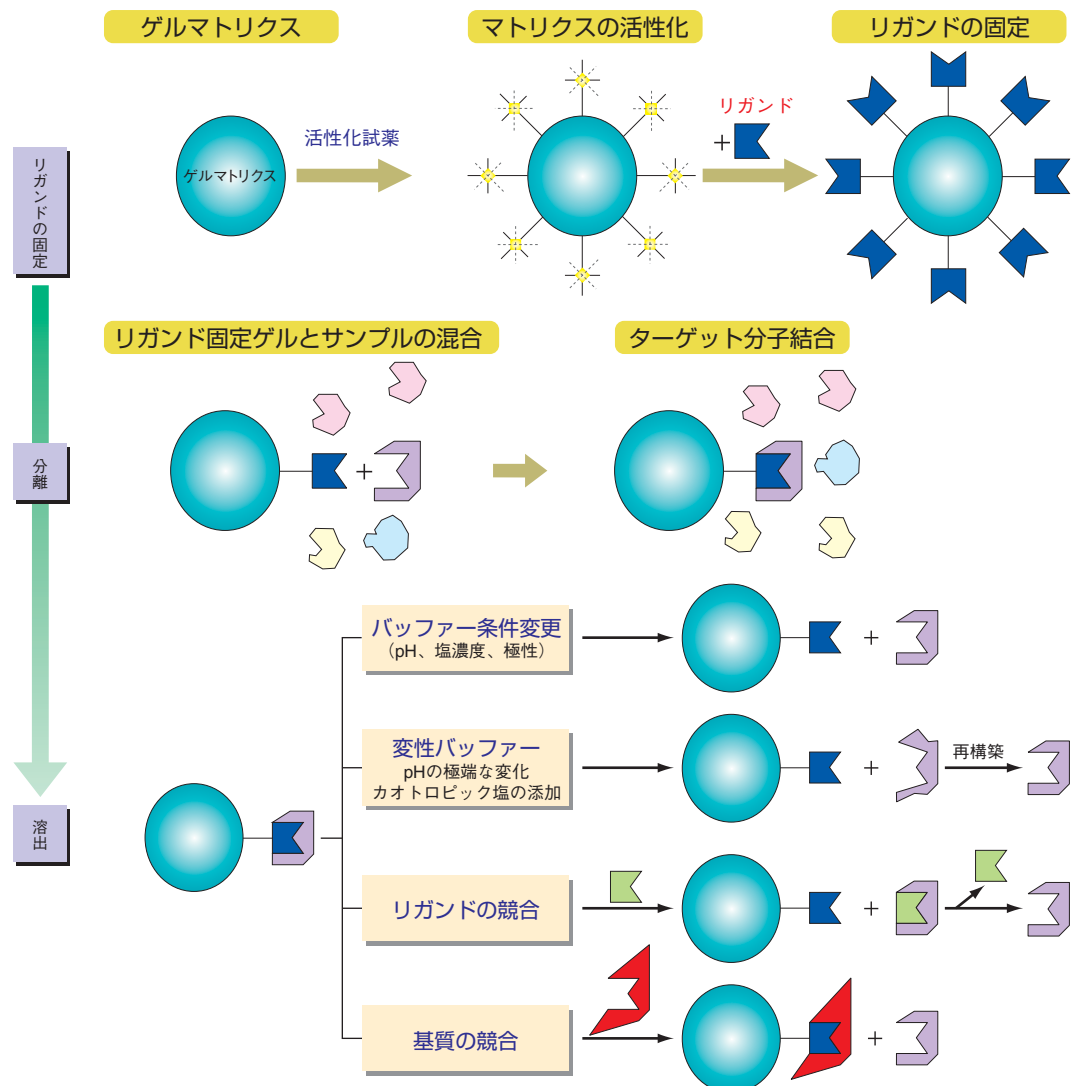


図2-25：レセプター精製法

参考文献

Pilch, P. F., *et al.*, Receptor Biochemistry and Methodology, vol.1,161 Alan R.Liss, Inc, New York (1984)

Carbon-14

2-6. Carbon-14

半減期	5,730年
エネルギー	中エネルギーβ線（最大0.156 MeV）
汚染の検出	薄窓GM管式サーベイメータ
空気中の最大飛程	24 cm
水中の最大飛程	0.28 mm
しゃへい	1 cm厚アクリル板（3 mm厚程度までうすくてもよいが、強度が不十分になる）

特記事項

ある種の有機化合物は手袋を通じて浸透します。また、使用時にCO₂ガスとして吸引するのを防ぐために、CO₂を生じないように注意してください。

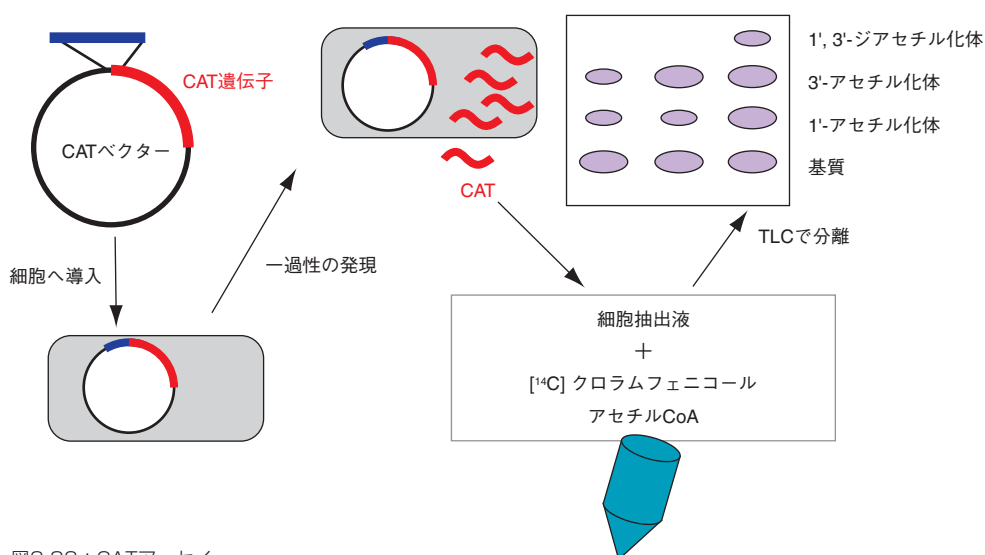
2-6-1. プロトコール

CATアッセイによるプロモーター活性の検討

レポータージーンアッセイとよばれる手法のうちのひとつです。遺伝子のプロモーターやエンハンサー領域の転写活性の解析に、また、そこに働く因子の影響をみるために、さまざまな“**レポーター遺伝子**”を利用するシステムが用いられています。レポーターとして使用される遺伝子には、発現産物が簡単に、高感度に検出でき、発現産物の活性および類似の活性が導入する細胞中に存在しないことが求められます。以下のレポーター遺伝子がよく使用されています。

- CAT (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)
- ルシフェラーゼ
- GFP (Green Fluorescent Protein)
- β -ガラクトシダーゼ
- GH (成長ホルモン)

CATは原核生物由来の酵素であるため、真核細胞由来のバックグラウンドの影響を受けずに酵素活性の測定が可能です。



<CATアッセイ>

■ 準備する試薬と機器 ■

● 試薬

- 0.25 M Tris-HCl, pH7.5
- 10 mM アセチルCoA
in 0.25 M Tris-HCl, pH7.5
- [14 C] クロラムフェニコール (25 μ Ci/ml)
- タンパク質定量試薬
- 酢酸エチル
- クロロホルム/メタノール (95 : 5, v/v)

● 機器

- 薄層クロマトグラフィー (TLC) プレート
- 薄層クロマトグラフィー展開槽
- ボルテックスミキサー
- ドライヤー
- 遠心エバポレーター
- 真空ポンプ
- アスピレーター
- X線フィルムと現像装置
(またはイメージアナライザー)

■ プロトコール ■

CATベクターへの遺伝子挿入

↓
細胞へのCATベクター導入

↓
細胞抽出液の調製

CATアッセイ

氷上で細胞抽出液25 μ lに下記の試薬を加える

0.25 M Tris-HCl 112 μ l
10 mM アセチルCoA 8 μ l
[14 C] クロラムフェニコール 5 μ l

↓ 37°C、1時間

↓ 1 mlの酢酸エチルを加える

↓ ボルテックスで激しく攪拌
(30秒間)

↓ 上層 (酢酸エチル) 900 μ lを
1.5 ml エッペンドルフチューブ
に移す

↓ 遠心エバポレーターで蒸発乾固

↓ 20 μ lの酢酸エチルで溶解

↓ TLCプレートにスポット

↓ クロロホルム/メタノールで
展開 (プレートの先端0.5 cmま
で展開)

↓ TLCプレートを風乾

↓ オートラジオグラフィー

RIをカウントしてアセチル化率を
算出する

または、イメージアナライザーで
画像を取り込み解析

■ 参考資料 ■



導入効率

CATアッセイの成否は、CATプラスミドベクターの導入効率にかかっています。サンプル間のトランスフェクション効率の違いを補正するために、コントロールプラスミドを同時に導入することも行われます。また、導入するDNAに薬剤耐性マーカーなどを挿入しておき、その薬剤に耐性な細胞だけを使ってCATアッセイを安定して行うこともできます。CATプラスミドおよびプラスミドの導入には、さまざまな試薬、機器が市販されています。各製品の特長を理解して、最適なものを選んでご使用ください。

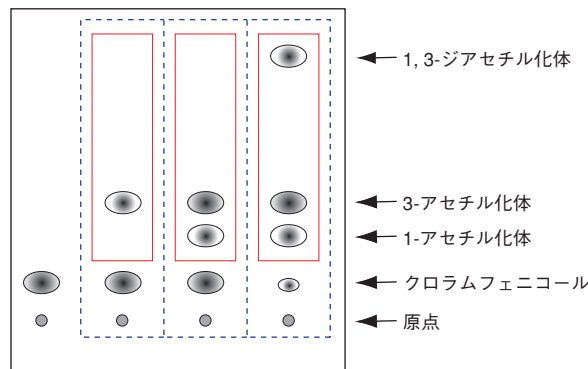


細胞抽出液の調製

CATは細胞抽出液として回収します。凍結-融解法によって細胞を破碎することで抽出液を回収します。界面活性剤を含むバッファー（Triton lysisバッファー）で抽出液を調製する例もあります。細胞および実験系により回収量は異なります。そのため、抽出液中のタンパク質量を測定して、CATアッセイに用いる抽出液量を決めるようにしてください。または、いくつかの濃度（液量）で試験的にアッセイしてから、適当な量を決めるのも良いでしょう。



CATアッセイの実験例



TLCプレートオートラジオグラフィーを確認しながら、左図赤枠中のスポットに相当する部分に印をつけます。その部分をすべて一本のバイアルに集めて液体シンチレーションカウンタで測定します。加えた全放射能（青い点線枠）との比からアセチル化率を算出します。イメージアナライザーも同様に、枠中のスポット部分の放射能を求めてアセチル化率を計算します。

図2-27：CATアッセイのTLCでの展開例



基質濃度

CATアッセイでは**酵素活性**を測定します。そのため、反応はCATのクロラムフェニコールに対する**K_m**（12 μM）に近い基質濃度で行うようにします。上述のプロトコールでは、¹⁴C クロラムフェニコールの比放射能を60 mCi/mmolとすると濃度は約13 μMになります。また、アセチル化率が50 %を超える場合、反応の直線性が失われる場合があります。その場合には、細胞抽出液量を減らすなどして、実験系を再度組み直してください。ひとつの目安として、1,3-ジアセチル体がはっきり検出される場合には注意してください。



アセチル化体

¹⁴C クロラムフェニコールのアセチル化体は3種類あります。そのため、スポットを取る場合にどうしても誤差が生じてしまう可能性があります。CATにより単一のアセチル化体だけを産生する1-デオキシ¹⁴C クロラムフェニコールを用いると、結果の処理・解析が行いやすくなります。



2層分離法

上記の標準的なCATアッセイでは、TLCでのアセチル化体の分離が必須です。TLCでの分離を行わずに簡便に行える方法もあります。アセチル基供与体としてRI標識体（³H Acetyl CoA）を用いて、二層分離したサンプル中から有機溶媒層（**シンチラント**）にアセチル化クロラムフェニコールが移動することを利用した測定系です。有機溶媒層のカウントを測定してアセチル化率を算出することができます。

参考文献

CATアッセイ

Gorman, C. M. *et.al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1044-1051 (1982)

CATのK_m

Oldham, K. D., *Radiotracer Techniques and Applications*, vol.2, ch.18, 823-891, M.Dekker Inc., New York (1977)

Triton lysis バッファー

Ausubel, F. M. *et.al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (1987)

1-デオキシ¹⁴C クロラムフェニコール

Murry, I. A. *et.al.*, *Nucl. Acids Res.*, **19**, 6648 (1991)

二層分離の方法

German, C. M. *et.al.*, *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1044-1051 (1982)

[¹⁴C] 標識2-DGを用いる局所脳グルコース利用率の測定

[¹⁴C] デオキシグルコース（DG）法は、**局所脳グルコース利用率**（local cerebral glucose utilization : **LCGU**）をオートラジオグラフィーにより計測し、脳の活動を画像的、定量的に測定する方法です。Sokoloffらにより1977年に発表されました。

脳のニューロン活動はエネルギー消費を伴うので、脳の主要なエネルギー源であるグルコースの局所的な代謝状態を測定することにより、局所的脳活動の程度を知ることができます。2-Deoxy-D-[1-¹⁴C] glucoseはマクロオートラジオグラフィーに、2-Deoxy-D-[1-³H] glucoseはマイクロオートラジオグラフィーによく用いられます。

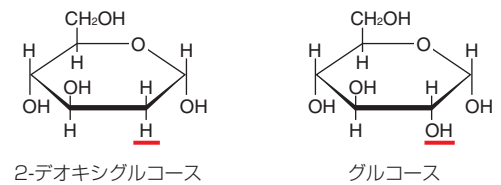


図2-28：2-デオキシグルコースとグルコースの構造

2-デオキシグルコース（2-DG）は上記のようにグルコースの2位の炭素原子が脱酸素化したものです。グルコースと同一機序で血液から脳組織へ運ばれ、最初の解糖段階としてヘキソキナーゼによりDG-6-リン酸へ代謝されます。しかし、次のステップのグルコースリン酸イソメラーゼでは代謝されません。そのため、DG-6-リン酸へ代謝されるのに必要な時間（通常45分間）以降に脳切片を作成してオートラジオグラフィーを行うと、その濃度はDG-6-リン酸の濃度を反映します。すなわち、解糖系の最初の段階における代謝の程度を表しています。この実験には動物を用いますので、実験動物の生理状態（血液、呼吸、循環、代謝など）が良好であり、またグルコース代謝が定常状態にあることが必要です。

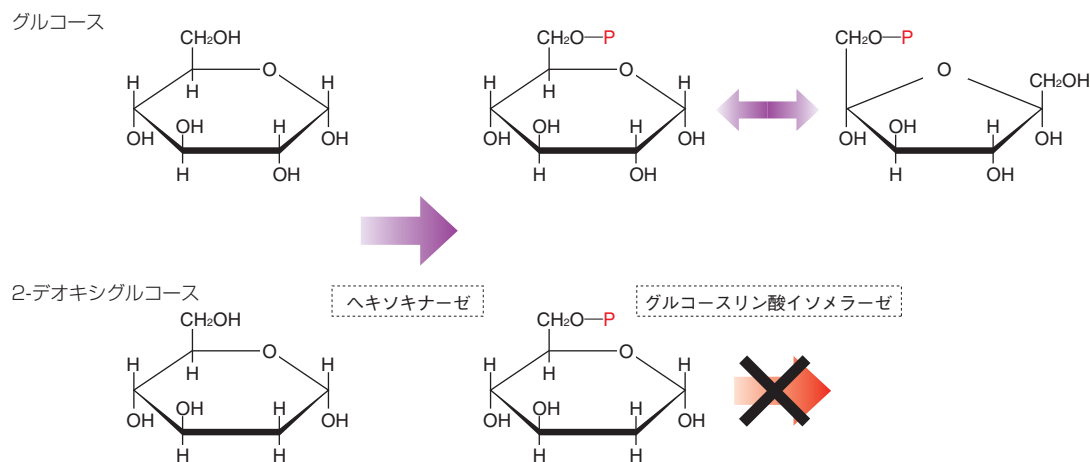


図2-29：2-デオキシグルコースとグルコースの代謝

■ 準備する試薬と機器 ■

- 実験動物
- 試薬
 - ・ 2-Deoxy-D-[1-¹⁴C] glucose
 - ・ 動物用麻酔薬
- 機器
 - ・ カテーテル
 - ・ 注射器
 - ・ 手術道具
 - ・ ミクロトーム
 - ・ グルコース分析器
 - ・ 急速凍結装置
 - ・ [¹⁴C] マイクロスケール*1※
 - ・ X線フィルムと現像装置、デンシトメータ（またはイメージアナライザー）

■ プロトコル ■

動物の準備
↓
生理状態のチェック
↓
[¹⁴C] DGの静脈投与*2
↓ 経時的動脈血採血*3
↓ 45分後に屠殺し、脳を取り出す
↓ 急速凍結
↓ 切片作成
オートラジオグラフィー
（またはイメージアナライザーで解析）
また、採血したサンプルを液体シンチレーションカウンタとグルコース分析器で測定する

■ One Point advice ■

- *1 オートラジオグラフィー用の標準線源で、数段階の異なる放射能濃度のブロックが薄い1枚のフィルムになっています。
- *2 [¹⁴C] DGは1.85～2.2 GBq/mmolのものを、3.7～4.6 MBq/kg程度投与します。
- *3 グルコース、[¹⁴C] DG濃度を経時的にモニターします（45分間に10回前後）。

参考資料



LCGUの計測

オートラジオグラフィーの結果をデンストメータで解析します(イメージアナライザーを用いると、露光から解析までを1台の測定機器で行うことができます)。フィルムをデンストメータにセットし、50~100 μm径の脳組織の黒化度を測定します。あらかじめマイクロスケールなどの標準線源の黒化度を測定し、¹⁴Cの量と黒化度との相関を求めてサンプル中の¹⁴C量を計算します。得られた脳組織中の¹⁴C量C₁*(T) および経時的な動脈血漿中のグルコース濃度C_P(t) と¹⁴C DG濃度 C_P*(t) から、Sokoloffらの式によりLCGU値 (R) を計算します。単位はμmol / 100 g・minが用いられます。

$$R = \frac{C_1^*(T) - K_1^* e^{-(K_2^* + K_3^*) T} \int_0^T C_P^*(t) e^{(K_2^* + K_3^*) t} dt}{Lc \left[\int_0^T (C_P^*(t) / C_P(t)) dt - e^{-(K_2^* + K_3^*) T} \int_0^T C_P^*(t) / C_P(t) e^{(K_2^* + K_3^*) t} dt \right]}$$

Tは¹⁴C DGを静脈注射してから屠殺するまでの時間、tは各採血の時刻、K₁^{*}, K₂^{*}, K₃^{*}, Lcは定数で、Sokoloffらの文献から以下ようになります。

	ラット		サル	
	灰白質	白質	灰白質	白質
K ₁ [*]	0.189	0.079	0.189	0.079
K ₂ [*]	0.245	0.133	0.245	0.133
K ₃ [*]	0.052	0.020	0.052	0.020
Lc	0.483		0.344	

表2-5：LCGU計算のための定数



マイクロスケール

一般的な較正用線源では1つの単位が大きすぎ、放射能標準としてオートラジオグラフィー用に使えません。マイクロスケールは、スライドガラスに載せられる大きさの中に、8~10種類の異なる放射能濃度のブロックが設けられています。サンプルと一緒に露光させるだけで、同じフィルム上に記録されます。

¹⁴ C Microscales					
RPA504※			RPA511※		
kBq/g	nCi/g		Bq/g	nCi/g	
31.89	862		3635.0	98.26	
25.90	700		1793.0	48.46	
19.39	524		888.7	24.02	
12.91	349		352.6	9.53	
8.55	231		177.2	4.790	
4.44	120		87.21	2.357	
2.18	59		33.63	0.909	
1.11	30		16.02	0.433	
			9.29	0.251	
			3.70	0.100	

参考文献

Sokoloff, L., et al., *J. Neurochem.*, **28**, 897 (1977)
Kennedy, C., et al., *Ann. Neurol.*, **4**, 293 (1978)

Chromium-51

2-7. Chromium-51

半減期	27.7日
放出放射線	0.32 MeV γ線 (9.8 %) 5 KeV X線 (22 % V-51 kX線)
汚染の検出	シンチレーションサーベイメータ
線量	1 GBq点線源から1 mの距離で4.7 μSv/時 (0.47 mrem/時)
しゃへい	3 mm厚鉛板で半減

⁵¹ Cr	Chromium-51 T _{1/2} : 27.7days						
days	0	1	2	3	4	5	6
0	1.000	0.975	0.951	0.928	0.905	0.882	0.861
7	0.839	0.819	0.798	0.779	0.759	0.741	0.722
14	0.705	0.687	0.670	0.654	0.637	0.622	0.606
21	0.591	0.577	0.562	0.549	0.535	0.522	0.509
28	0.496	0.484	0.472	0.460	0.449	0.438	0.427
35	0.417	0.406	0.396	0.386	0.377	0.368	0.359
42	0.350	0.341	0.333	0.324	0.316	0.309	0.301
49	0.293	0.286	0.279	0.272	0.266	0.259	0.253
56	0.246	0.240	0.234	0.229	0.223	0.217	0.212
63	0.207	0.202	0.197	0.192	0.187	0.182	0.178

2-7-1. プロトコール

細胞傷害性試験 (Cytotoxic Assay / Test)

標的細胞に細胞表面抗原に対する抗体を反応させ、さらに補体を作用させると細胞膜が破壊されて細胞の傷害（細胞死、細胞融解など）が引き起こされます。この傷害の程度を簡便に測定するために⁵¹Crが用いられます。

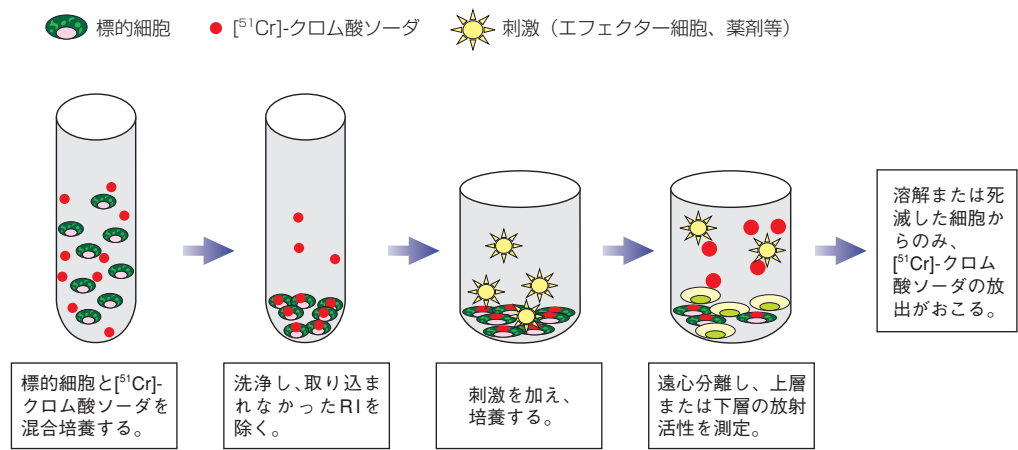


図2-30：細胞傷害性試験

<NK細胞活性の測定>

■ 準備する試薬と機器 ■	■ プロトコール ■	■ One Point advice ■
● 試薬 • Ficoll-Paque PLUS※ • 培養液（FCS添加RPMI-1640） • [⁵¹Cr] クロム酸ソーダ ● 機器 • CO₂恒温槽 • 冷却遠心器 • γカウンタ • 培養用チューブ	末梢血リンパ球の採取 Ficoll-Paque PLUSによる密度勾配遠心で血液から単核球を採取*1し、RPMI-1640培地で3回洗浄する K562細胞*2の標識 5×10⁶株化培養細胞 / 200 μl培養液 ↓ [⁵¹Cr] クロム酸ソーダを3.7 MBq加える ↓ 37℃、2時間培養 ↓ 1,000 rpmで5分間遠心し、上清を捨てる ↓ 培養液で3回洗浄 2×10⁵細胞 / mlに調製 [⁵¹Cr] クロム放出実験 マイクロプレートに、[⁵¹Cr] クロム標識細胞を50 μl入れる ↓ 段階希釈したリンパ球を100 μl加える*3 ↓ プレートを1,000 rpmで5分間遠心する ↓ 4～8時間培養 各ウェルから100 μl取り、γカウンタで測定	*1 ヘパリン採血した静脈血を用いてください。Ficoll-Paque PLUSの操作は次ページを参照してください。 *2 ここでは標的細胞としてNK細胞に感受性の高いK562株を用いました。 *3 リンパ球と標的細胞の割合は、標的細胞に対してリンパ球を1～50倍の範囲で実験を行います。

参考資料



Ficoll-Paque PLUSによるリンパ球の分離方法

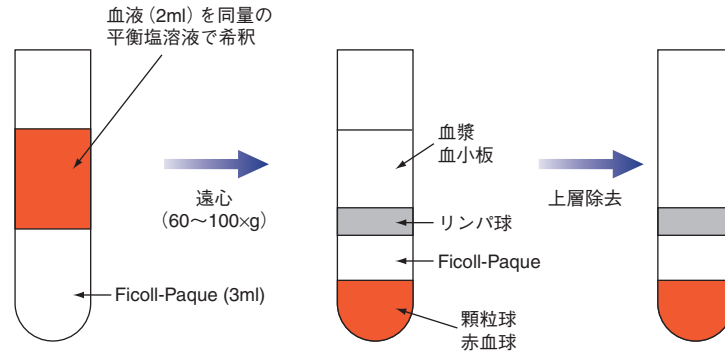


図2-31：Ficoll-Paque PLUSによるリンパ球分離



細胞依存性細胞傷害反応の例

種類	誘導因子	エフェクター細胞	特異性	
			エフェクター細胞	標的細胞
同種細胞抗原誘導	アロ抗原	T細胞	特異的	特異的
ウイルス誘導	ウイルス	T細胞	特異的	特異的
腫瘍特異的抗原誘導	腫瘍特異移植抗原、腫瘍関連抗原	T細胞 armed macrophage	特異的	特異的
マイトゲン誘導	PHA	T細胞	非特異的	非特異的
ADCC	標的細胞に特異的に結合しているIgG, IgM抗体	K細胞 T細胞 多核白血球 マクロファージ	非特異的	特異的 抗体依存
NK	インターフェロン、ウイルス等	NK細胞	非特異的	選択的
LAK	インターロイキン-2	T細胞 NK細胞	非特異的	選択的

表2-6：細胞傷害反応



リンパ球混合培養試験 (MLR)

リンパ球混合培養試験 (Mixed lymphocyte reaction ; MLR) は、T細胞が抗原によって刺激されて増殖を起こす、いわゆるリンパ球幼若化反応の特殊な例で、MHC-complexの異なった同種抗原を認識して反応します。たとえば、ヒトまたはマウスではHLAまたはH-2 complexの異なる2種のリンパ球を混合培養すると、やがてリンパ球は芽球化反応を起こすようになります。一卵性双生児または同一近交系マウス間同士で普通は反応がおこりません。すなわち、同種抗原の相違をT細胞が認識して反応したものと考えられます。この実験では、³H] チミジンの取り込みで増殖能を測定し、⁵¹Cr] クロムを用いて細胞障害性試験を合わせて行ないます。



赤血球、血小板の寿命

細胞障害性を測定するのと同じく、⁵¹Cr] クロムを用いて赤血球、血小板の寿命測定も行われます。動物から採血した血液より赤血球と血小板を分離して、それらを⁵¹Cr] クロムで標識した後で再度動物に投与して、標識された赤血球や血小板が時間変化によりどのように減少していくかをみるものです。赤血球には⁵⁹Fe、血小板には¹¹¹In (¹¹¹In-oxineや¹¹¹In-troporon) などのRIも標識に使用されます。

【注意】

研究用RIは臨床の核医学診断に用いることができません。診断目的には絶対に使用しないでください。

参考文献

Brunner, K. T., et al., *Immunology*, 14,181 (1969)
免疫実験操作法 (右田ら編)、南江堂 (1995)

第3章 ーデータ集ー

3-1 DNA／RNA.....	58
3-2 バッファー／溶液の調製法	60
3-3 標識化合物関連データ.....	61

3-1. DNA／RNA

コドン暗号表

		2番目の塩基				
		U	C	A	G	
1番目の塩基	U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Try	UGU Cys	U
		UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
		UUA Leu	UCA Ser	UAA stop (<i>och</i>)	UGA stop (<i>opal</i>)	A
		UUG Leu	UCG Ser	UAG stop (<i>amb</i>)	UGG Trp	G
	C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
		CUC Leu	CCC Pro	CUC His	CGC Arg	C
		CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
		CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
	A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
		AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Arg	C
		AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
		AUG Met start	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
	G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
		GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
		GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
		GUG Val (Met)	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

* 塩基はリボスクレオチドで表記しています。GUGは通常バリンをコードしますが、開始コドンのメチオニンをコードする場合があります。

アミノ酸の略号表記と分子量

アミノ酸		3文字 表記	1文字 表記	分子量
アラニン	Alanine	Ala	A	89.1
アルギニン	Arginine	Arg	R	174.2
アスパラギン	Asparagine	Asn	N	132.1
アスパラギン酸	Aspartic acid	Asp	D	133.1
アスパラギン／アスパラギン酸	Asparagine／Aspartic acid	Asx	B	-
システイン	Cysteine	Cys	C	121.2
グルタミン	Glutamine	Gln	Q	146.1
グルタミン酸	Glutamic acid	Glu	E	147.1
グルタミン／グルタミン酸	Glutamine／Glutamic acid	Glx	Z	-
グリシン	Glycine	Gly	G	75.1
ヒスチジン	Histidine	His	H	155.2
イソロイシン	Isoleucine	Ile	I	131.2
ロイシン	Leucine	Leu	L	131.2
リジン	Lysine	Lys	K	146.2
メチオニン	Methionine	Met	M	149.2
フェニルアラニン	Phenylalanine	Phe	F	165.2
プロリン	Proline	Pro	P	115.1
セリン	Serine	Ser	S	105.1
トレオニン	Threonine	Thr	T	119.1
トリプトファン	Tryptophan	Trp	W	204.2
チロシン	Tyrosine	Tyr	Y	181.2
バリン	Valine	Val	V	117.1

単位換算表

1 kg (kilogram)	=	10 ³ g
1 g (gram)	=	1 g
1 mg (milligram)	=	10 ⁻³ g
1 µg (microgram)	=	10 ⁻⁶ g
1 ng (nanogram)	=	10 ⁻⁹ g
1 pg (picogram)	=	10 ⁻¹² g
1 fg (femtogram)	=	10 ⁻¹⁵ g

溶液中のDNA溶液

二本鎖DNA (50 µg/ml)	分子数/ml	モル/ml	モル濃度	末端モル濃度
Bacteriophage λ	9.78×10^{11}	1.62×10^{-12}	1.6 nM	3.24 nM
pBR322	1.09×10^{13}	1.81×10^{-11}	18.1 nM	36.2 nM
pUC18/pUC19	1.77×10^{13}	2.94×10^{-11}	29.4 nM	58.8 nM
Segment of DNA (1 kb)	4.74×10^{13}	7.87×10^{-11}	78.7 nM	157.4 nM
Octameric double-stranded linker	5.92×10^{15}	9.83×10^{-9}	9.8 µM	19.7 µM

50 µg/mlの二本鎖DNA溶液の吸光度は $A_{260}=1.0$ になります。37 µg/mlの一本鎖DNA溶液の吸光度は $A_{260}=1.0$ になります。これらの濃度はDNA塩基対の分子量を660で計算した値に基づいています。

ヌクレオチド溶液の濃度決定

ヌクレオチド溶液の濃度は次の式から求めることができます。

$$\frac{\text{Measured absorbance at } \lambda_{\max} \text{ for the nucleotide}}{\text{Absorbance at } \lambda_{\max} \text{ for a 1 M solution of the nucleotide}} = \text{Molar concentration}$$

オリゴヌクレオチドの濃度計算

N = オリゴヌクレオチドの塩基数

$$\epsilon_{260} \div 10^4 \times N \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$$

$$m \div 324.5 \text{ g/mol} \times N$$

$$A_{260} / \epsilon_{260} \times 10^6 = \text{濃度 (}\mu\text{M)}$$

$$\text{濃度 (}\mu\text{M)} \times m = \text{濃度 (ng/ml)}$$

二本鎖DNAの分子量と末端モル数の計算

$$\text{二本鎖DNAの分子量} = (\# \text{ of bp}) \times (649 \text{ g/mol/bp})$$

$$\text{直鎖状DNAのモル量} = 2 \times (\text{g of DNA}) / (\# \text{ of bp}) \times (649 \text{ g/mol/bp})$$

$$\text{制限酵素消化によるDNA末端のモル量: 直鎖状DNA} = (\# \text{ of cuts}) \times (\text{moles of DNA}) \times 2 \text{ (ends per cut)} + 2 \text{ (ends of linear DNA)} \times (\text{moles of DNA})$$

$$\text{環状DNA} = (\# \text{ of cuts}) \times (\text{moles of DNA}) \times 2 \text{ (ends per cut)}$$

核酸の分子量

デオキシリボヌクレオチドの平均分子量	=	324.5 g/mol
1塩基対の平均分子量	=	649.0 g/mol
リボヌクレオチドの平均分子量	=	340.5 g/mol
1 kb of dsDNA (sodium salt)	=	6.5×10^5 g/mol
1 kb of ssDNA (sodium salt)	=	3.3×10^5 g/mol
1 kb of ssRNA (sodium salt)	=	3.4×10^5 g/mol
1×10^6 g/mol of ds DNA (sodium salt)	=	1.54 kb
λ DNA	=	3.1×10^7 g/mol
pBR322 DNA	=	2.8×10^6 g/mol
φ X-174 DNA	=	3.6×10^6 g/mol
<i>E. coli</i> DNA	=	3.1×10^9 g/mol
28S rRNA	=	1.6×10^6 g/mol
23S rRNA (<i>E. coli</i>)	=	1.2×10^6 g/mol
18S rRNA	=	6.1×10^5 g/mol
18S rRNA (Yeast)	=	6.1×10^5 g/mol
16S rRNA (<i>E. coli</i>)	=	5.5×10^5 g/mol
5S rRNA (<i>E. coli</i>)	=	3.6×10^4 g/mol
tRNA (<i>E. coli</i>)	=	2.5×10^4 g/mol

分子量からモルへの換算

1 µg/ml of DNA	=	3.08 µM phosphate
1 µg/ml of a 1 kb DNA fragment	=	3.08 nM 5'-ends
1 µg of a 1 kb DNA fragment	=	1.5 pmol = 9.1×10^{11} molecules
1 µg of a 1 kb DNA fragment	=	3.0 pmol 5'-ends
1 pmol of a 1 kb DNA fragment	=	0.65 µg
1 µg of pUC18/19 DNA (2,686 bp)	=	0.57 pmol = 3.4×10^{11} molecules
1 pmol of pUC 18/19 DNA	=	1.77 µg
1 µg of pBR322 DNA (4,361 bp)	=	0.35 pmol = 2.1×10^{11} molecules
1 µg of linear pBR322 DNA	=	0.70 pmol of 5'-ends
1 pmol of pBR322 DNA	=	2.83 µg
1 pmol of 5'-ends of linear pBR322	=	1.4 µg
1 µg of M13mp18/19 DNA (7,249 bp)	=	0.21 pmol = 1.3×10^{11} molecules
1 pmol of M13mp18/19 DNA	=	4.78 µg
1 µg of λ DNA (48,502 bp)	=	0.033 pmol = 1.8×10^{10} molecules
1 pmol of λ DNA	=	32.01 µg

3-2. バッファー／溶液の調製法

バッファー／溶液の調製方法

溶 液	容量	試 薬	調 製 法	保存 温度	備 考
1 M DTT	10 ml	1.54 g Dithio threitol	10 mlの10 mM酢酸ナトリウムバッファー (pH 5.2) に溶解してろ過滅菌する。	-20℃	分注保存して凍結融解を避ける。(1,4-dithio-DL-threitol, MW=154.25)
5 M 酢酸アンモニウム	100 ml	38.54 g NH ₄ OAc	80 mlのH ₂ Oに溶解し、100 mlにメスアップした後、オートクレーブ滅菌する。	室温	(NH ₄ OAc, MW=77.08)
3 M 酢酸ナトリウム	100 ml	40.82 g NaOAc・3H ₂ O	80 mlのH ₂ Oに溶解し、氷酢酸でpH 5.2に調整した後、100 mlにメスアップしてオートクレーブ滅菌する。	室温	(NaOAc・3H ₂ O, MW=136.08)
1 M 塩化カルシウム	100 ml	21.9 g CaCl ₂ ・6H ₂ O	80 mlのH ₂ Oに溶解し、100 mlにメスアップした後、オートクレーブ滅菌する。	室温	(CaCl ₂ ・6H ₂ O, MW=219.08)
0.5 M EDTA pH 8.0	100 ml	18.61 g Na ₂ ・EDTA	80 mlのH ₂ Oに溶解し、NaOHでpH 8.0に調整した後、100 mlにメスアップしてオートクレーブ滅菌する。	室温	酸性条件下では完全に溶解しない。(Na ₂ ・EDTA・2H ₂ O, MW=372.24)
1 M 塩化マグネシウム	100 ml	20.33 g MgCl ₂ ・6H ₂ O	80 mlのH ₂ Oに溶解し、100 mlにメスアップした後、オートクレーブ滅菌する。	室温	(MgCl ₂ ・6H ₂ O, MW=203.31)
5 M 塩化ナトリウム	100 ml	29.22 g NaCl	80 mlのH ₂ Oに溶解し、100 mlにメスアップした後、オートクレーブ滅菌する。	室温	溶解しにくいので長時間攪拌する。(NaCl, MW=58.44)
1 M Tris-HCl	100 ml	12.14 g Tris (hydroxymethyl) aminomethane	80 mlのH ₂ Oに溶解し、HClでpHを調整した後、100 mlにメスアップしてオートクレーブ滅菌する。	室温	温度によりpHは大きく変動する。(Tris, MW=121.14)
0.1 M IPTG	50 ml	1.19 g Isopropyl b-D-thiogalactopyranosid	40 mlのH ₂ Oに溶解し、50 mlにメスアップした後、ろ過滅菌する。	-20℃	分注保存して凍結融解を避ける。(IPTG, MW=238.3)
10 % SDS	100 ml	10 g Sodium dodecyl sulfate	90 mlのH ₂ Oに溶解し、HClでpHを中性に調整した後、100 mlにメスアップする。	室温	秤量の際、吸引を避けるためにマスクをする。
100 % (W/V) TCA		500 g Trichloroacetic acid	227 mlのH ₂ Oを加える。	4℃	500 gのTCAが入ったボトルにH ₂ Oを直接加える。
10×PBS	100 ml	8.0 g NaCl 0.2 g KCl 2.68 g Na ₂ HPO ₄ ・7H ₂ O 0.24 g KH ₂ PO ₄	80 mlのH ₂ Oに溶解し、HClでpH 7.4に調整した後、100 mlにメスアップしてオートクレーブ滅菌する。	室温	
20×SSC	1,000 ml	175.3 g NaCl 88.2 g Sodium citrate・2H ₂ O	800 mlのH ₂ Oに溶解し、HClでpH 7.0に調整した後、オートクレーブ滅菌する。	室温	
100×デンハルト溶液	500 ml	10 g Ficoll PM 400※ 10 g Polyvinilpyrrolidone 10 g Bovine serum albumin	300 mlのH ₂ Oに溶解し、500 mlにメスアップした後、分注保存する。	-20℃	Ficoll PM 400 : code 17-0300-10 (100 g) code 17-0300-50 (500 g)
10×TBE (Tris-borate)	1,000 ml	107.8 g Tris 55.6 g Boric acid 40 ml 0.5 M EDTA pH 8.0	900 mlのH ₂ Oに溶解し、40 mlのEDTA溶液を加え、1,000 mlにメスアップする。	室温	
50×TAE (Tris-acetate)	1,000 ml	242.3 g Tris 100 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 57.1 ml Glacial acetic acid			
10×MOPS	1,000 ml	41.85 g 4-morpholinepropanesulfonic acid 6.80 g NaOAc・3H ₂ O	800 mlのDEPC処理水に溶解し、20 mlの0.5 M EDTA (DEPC処理水で調製)を加えて、10 M NaOHでpH 7.0に調整する。DEPC処理水で1,000 mlにメスアップする。	室温 遮光 保存	上清液の色が黄色に変色したら廃棄して、再度調製し直す。(MOPS, MW=209.27)
10×SDS-PAGEバッファー	1,000 ml	30.28 g Tris 144.11 g Glycin 10.0 g SDS	800 mlのH ₂ Oに溶解し、1,000 mlにメスアップする。	室温	
IPG DryStrip※膨潤液	25 ml	12.06 g Urea 0.5 g CHAPS 70 mg DTT 125~500 µl IPG buffer※ BPB (微量)	20 mlのddH ₂ Oに溶解し、25 mlにメスアップして小分け分注して保存する。	-20℃	(Urea, MW=60.06)
TEバッファー pH 8.0	100 ml	1 ml 1M Tris-HCl pH 8.0 0.2 ml 0.5M EDTA pH 8.0	98.8 mlのH ₂ Oに左記溶液を加えて、オートクレーブ滅菌する。	室温	
飽和フェノール		100 gのPhenolに100 mlの1 M Tris溶液を加えて溶解し、上清を除去する。 100 mlの100 mM Tris pH 8.0溶液を加えて攪拌し、上清を除去する。上清のpHが中性になるまで操作を繰り返す。		4℃ 遮光 保存	上清液の色が変色したら廃棄して、再度調製し直す。 Phenolは腐食性の毒性物質。 取り扱いにはグローブと安全メガネを着用する。
DEPC処理水	100 ml	100 mlの溶液に0.1~0.2 ml のDiethylpyrocarbonate (DEPC)をドラフト中で加えて激しく攪拌する。一晩放置した後、オートクレーブして残存するDEPCを不活化する。アミノ基を含む溶液 (Tris, MOPS, EDTA, HEPESなど) はDEPC処理できない。これらの溶液はDEPC処理水を用いて調製する。		室温	DEPCは発ガン性が疑われる有害物質。取り扱いにはグローブと安全メガネを着用し、ドラフト内で操作する。

3-3. 標識化合物関連データ

国際単位系（SI）における放射能の単位はベクレル（becquerel：Bq）で、1秒当たりの壊変数に相当し、キュリー（Ci）との関係は下記の通りです。

$$1 \text{ Bq} = 1 \text{ 壊変/秒} = 2.7 \times 10^{-11} \text{ Ci}$$

$$1 \text{ mCi} = 3.7 \times 10^7 \text{ Bq} = 37 \text{ MBq}$$

$$1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq} = 37 \text{ GBq}$$

$$1 \text{ } \mu\text{Ci} = 3.7 \times 10^4 \text{ Bq} = 37 \text{ kBq}$$

ベクレル／キュリー換算表

kBq MBq GBq	3.7	7.4	9.25	11.1	14.8	18.5	37	74	92.5	111	148	185	222	259	296	333	370	444	555	740	925
μCi mCi Ci	0.1	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5	1	2	2.5	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	25

MBq GBq TBq	1.11	1.48	1.85	2.22	2.59	2.96	3.33	3.7	4.63	5.55	7.4	9.25	11.1	14.8	18.5	22.2	25.9	28.8	29.6	33.3	37
μCi mCi Ci	30	40	50	60	70	80	90	100	125	150	200	250	300	400	500	600	700	750	800	900	1000

比放射能の決定

標識化合物の比放射能は通常、全放射能量と放射能を持った物質の質量から求めています。

しかし、まれにBarium [^{14}C] carbonateやトリチウム水のような前駆体の比放射能から計算によって求めることもあります。

比放射能とは、

放射性核種を含んでいる化合物一定量当たりの放射能で表われ、キロベクレル／ミリグラム（kBq/mg）やキロベクレル／ミリモル（kBq/mmol）などと表記されます。

アイソトープ実験に必要な比放射能

アイソトープ実験に必要な比放射能は、必要とする化合物の質量と放射能量によって決まります。

$$\text{比放射能 (kBq/mmol)} = \frac{\text{全放射能量 (kBq)} \times \text{分子量}}{\text{質量 (mg)}} = \frac{\text{放射能濃度 (kBq/ml)}}{\text{濃度 (mmol/ml)}}$$

標識化合物の濃度は次式で計算されます。

$$\text{濃度 (mmol/ml)} = \frac{\text{放射能濃度 (kBq/ml)}}{\text{比放射能 (kBq/mmol)}}$$

RI取扱い10か条の鉄則（10ゴールデンルール）

RI標識化合物安全使用のための3原則（3C）

- Contain** 放射性物質をできるだけ狭い空間にとじこめ、広がらないようにする
- Confine** 利用する放射線、放射能の量を必要最小限にし、効果的に利用する
- Control** 放射性物質の購入、使用、廃棄などを適切に管理する

● 危険性の認識および安全取扱い技術の習得

- ・必ず手袋など適切な保護具を着用する。口で吸い上げるビペットなどでRI標識化合物を取り扱わない。
- ・RI放射性化合物は適切な条件で保存する。
- ・すべての容器には核種、化合物名、総放射能量、比放射能、使用期日や使用者などの必要事項を明記する。
- ・容器は確実に密閉する。

● 取扱い時間を最小限にする実験計画の作成

- ・実験マニュアルを再確認し、十分なコールド実験を行い放射性化合物取扱いの時間、操作回数が最小限で行えるようにする。

● 放射線源からの適切な距離

- ・放射線量は逆二乗の法則で、距離が2倍になると量は1/4になる。実験器具、容器の配置を検討して、最適な位置にRI標識化合物を置くようにする。

● 各放射線に適したしゃへい物の使用

- ・厚さ1 cmの亚克力板は全てのβ線をしゃへいする。高エネルギーβ線については生じる制動放射線に注意する。
- ・γ線やX線には適当な厚さの鉛板または鉛入り亚克力板を使用する。

● RI標識化合物使用区域の制限

- ・RI実験施設内で使用するのはもちろん、実験室内もさらにRI標識化合物を使用する区域を特定して、その他の区域と区別する。
- ・すべてのRI標識化合物の取扱いはフード内で行うことを基本とする。
- ・トレイおよび吸収材などを敷き、実験終了後または汚染除去時に確実に処理清掃できるようにしておく。

● 適切な実験衣や防御用器具と外部被ばく線量計の装着

- ・実験中は必ず専用の実験衣、防護めがね、手袋などを着用する。
- ・実験中は個人外部被ばく線量計を指定された位置に装着する。

● 汚染確認のため定期的に実験区域周辺をモニタ

- ・汚染があったら、指定された緊急措置を確実に行う。
 - 1) 付近にいるすべての人に知らせる。
 - 2) 汚染区域の立ち入りを制限する。
 - 3) 放射線管理担当者、放射線取扱主任者等に連絡し、指示をあおぐ。
 - 4) 実験者が中心となり除染を行う。
 - 5) マニュアルにしたがって除染作業を行う。

● RI実験施設の規則や安全な作業法の遵守

- ・飲食、喫煙、化粧その他RI標識化合物を体内に摂取する可能性のある行為は決して行わない。
- ・実験室内ではハンカチなどは使用せず、ペーパータオルを使用して随時廃棄する。

● 放射性廃棄物を最小にする実験系の構築と、生じた廃棄物を適切に処理し長時間貯めない

- ・RI標識化合物は実験に必要な最小量を用いる。
- ・放射性廃棄物は規則にしたがって分類し、適切な廃棄処理をする。
- ・放射性廃棄物の量を確認して記録する。

● 実験終了後、汚染の有無の確認。手洗い、再度モニタ、汚染が無いことの確認

- ・実験施設から外部に出る場合は必ず念入りにモニタする。
- ・汚染が見つかった場合には、すみやかに放射線管理担当者に連絡し、指示を受ける。

Trademarks;

Ficoll, Ficoll-Paque, ImageQuant, Imobiline, IPGphor, Megaprime, ProbeQuant and STORM are trademarks of GE Healthcare Bio-Sciences or its subsidiaries.

Atlas is a trademark of Clontech Laboratories, Inc. (TAKARA Bio Company)

Iodo-gen is a trademark of Pierce Chemical Company.

本書記載製品の販売会社（2006年4月現在）

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社	: Amplify、Ficoll-Paque Plus、Ficoll PM400、IPG buffer、IPG DryStrip、Megaprime DNA標識キット、PhosphoScreen、ProbeQuant G-50 Micro Columns、Rabbit Reticulocyte lysateシステム、 β -Safety Screen、 ¹²⁵ I-Safety Screen、STORMシステム、細胞標識用メチオニン、マイクロスケール、
Clontech（タカラバイオ株式会社）	: Atlas cDNA Expression Arrays
PIERCE社	: IODO-GEN

This image shows a full page of blank, lined paper. It features approximately 28 horizontal grey lines spaced evenly apart, typical of notebook paper. The lines extend across the entire width of the page, leaving small margins at the top and bottom. There are no vertical lines, text, or other markings present.

ラジオアイソトープ利用ガイドブックー Radioisotopes for Life Science Research ー

編集および発行 GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

〒169-0073 東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルヂング

TEL : (03) 5331-9336

FAX : (03) 5331-9370

Internet Home Page : <http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>

©2006 GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上での例外を除き、禁じられています。

www.gehealthcare.co.jp/lifesciences

掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。

掲載されている内容は、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。

© 2006 GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社 本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073

東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルヂング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL: 03-5331-9336 FAX: 03-5331-9370

e-mail: Tech-JP@ge.com

掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。



ISO 9001:2000認証取得

取扱店