
第12回研究報告会

予 稿 集

日時： 平成22年10月28日(木)13 時～16 時 40 分

場所： 福井大学 総合研究棟 I 13階会議室

《主催》

財団法人若狭湾エネルギー研究センター

《共催》

福井大学

ふくい未来技術創造ネットワーク推進協議会

プ ロ グ ラ ム

開会挨拶

(財)若狭湾エネルギー研究センター 理事長 旭 信 昭
国立大学法人 福井大学長 福 田 優

座長：研究開発部長 峰 原 英 介

(下線が発表者)

「陽子線がん治療臨床研究の成果」・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
13:15～13:35

粒子線医療研究グループ 山本和高

「イオンビーム照射によるキチン分解細菌変異株を用いたN-アセチルグルコサミン製造技術開発」
13:35～13:55・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3

(株)エル・ローズ 能登亜有美 氏・森山展行 氏
生物資源グループ 高城啓一・畑下昌範
福井県立大学 准教授 木元久

「イオンビームによる植物工場用野菜の新品種開発」・・・・・・・・・・・・ 5
13:55～14:15

生物資源グループ 畑下昌範・高城啓一
福井県立大学 教授 大城閑
福井シード(株) 井村裕治 氏

「太陽熱エネルギー利用による熱交換器設計要素技術の検証試験」・・・・ 7
14:15～14:35

三菱重工業(株) 大久保剛 氏・堀江茂斉 氏
エネルギー開発グループ 天田健一・重田達雄

－ 14:35～15:00 休憩 －

「高分子電解質および電極構造の制御による化学アクチュエータの創製」・・・・ 9
15:00～15:20

福井大学 准教授 庄司英一
生物資源グループ 畑下昌範

「低炭素領域がん幹細胞を標的とした陽子線がん治療」・・・・・・・・・・・・ 11
15:20～15:40

福井大学 准教授 吉井裕・助教 吉井幸恵
粒子線医療研究グループ 久米 恭
放射線医学総合研究所 藤林康久 氏

「細胞増殖制御の可能な工業用動物細胞の育種」・・・・・・・・・・・・・・ 14
15:40～16:00

生物資源グループ 高城啓一
福井大学 千田泰史 氏・川原渉 氏・准教授 寺田聡

「放射性同位元素分析によるズワイガニの年齢評価」・・・・・・・・・・・・ 16
16:00～16:20

元エネルギー開発グループ 小野真宏 氏
元協力研究員 今攸 氏
関電プラント(株) 白木秀人 氏
元越前海遊公社 大間憲之 氏

総括質疑

閉会挨拶

所長 小 林 紘 二 郎

陽子線がん治療臨床研究の成果
Present Status of Proton Therapy Clinical Trials
山本和高
Kazutaka YAMAMOTO

要旨

若狭湾エネルギー研究センター(WERC)では、平成 21 年 11 月の臨床照射終了までに前立腺がん、肝細胞がん、非小細胞肺がんの患者、計 62 名に対して陽子線照射を実施し、現在は経過観察を行っている。この WERC での成果を活かし、福井県立病院で陽子線がん治療センターを建設中である。現在施設整備は今年度中の運転開始を目指して順調に進んでいる。今回は WERC における臨床研究の成績、並びに福井県立病院陽子線がん治療センターの施設整備状況について報告する。

I, 若狭湾エネルギー研究センター(WERC)における臨床研究の成績

WERC では、平成 14 年 6 月より陽子線がん治療装置の臨床試験を行い、平成 15 年度より陽子線がん治療臨床研究を実施した。平成 21 年 11 月の臨床照射終了までに陽子線照射を行った対象は総計 62 例（前立腺がん 55 例、肝細胞がん 6 例、非小細胞肺がん 1 例）となった。

前立腺がんに対しては、1 回 2.5GyE で左右 2 方向（9.5 度下向き）より、通常 27 回、総線量 67.5GyE を照射した。前立腺は、直腸や膀胱などの影響により数 mm 程度は移動することがあるので、毎回の照射直前に CT を撮影して前立腺の位置を確認して、陽子線照射の精確な位置決めを試みた。照射期間中には軽微な皮膚変化のみで、問題となるような急性障害は認めなかった。これまでに、Phoenix 基準で前立腺がんの再発と判定される PSA 値の再上昇が認められた症例は 1 例のみである（図 1）。陽子線照射の晩発性障害と考えられる直腸出血が 6 例で、血尿が 1 例で認められたが、いずれも軽症で、外来治療等により改善した。

肝細胞がんには、1 回 4.5GyE で 16 回、総線量 72.0GyE を呼吸同期で照射したが、軽度の皮膚変化のみで、問題となるような急性障害はなく、照射した部位のがん病巣は良好に制御できたが、経過観察を続けると多くの症例で照射部以外の部位に新規の肝細胞がんの再発が認められた。

II, 福井県立病院陽子線がん治療センターの施設整備状況

WERC での陽子線がん治療成果を活かし、福井県では陽子線がん治療センターを福井県立病院に建設中である。

平成 22 年 9 月現在、陽子線治療装置については、放射線障害防止法の許可ならびに施設検査合格を取得し、治療用ビームのコミッショニング作業を実施している。周辺機器や建築工事についても、平成 23 年 3 月の運用開始を目指して整備が順調に進んでいる（図 2）。

運用開始後は、WERC での経験を生かし、CT による自動位置決めや積層原体照射法といった新しいシステムを導入し、これまでの陽子線がん治療臨床研究の対象としていない膵がん、乳がん、転移性腫瘍などにも適応を拡げ、抗がん剤との併用療法等も実施できるようにして、年間 200～400 人の患者を先進医療として治療することを目指している。

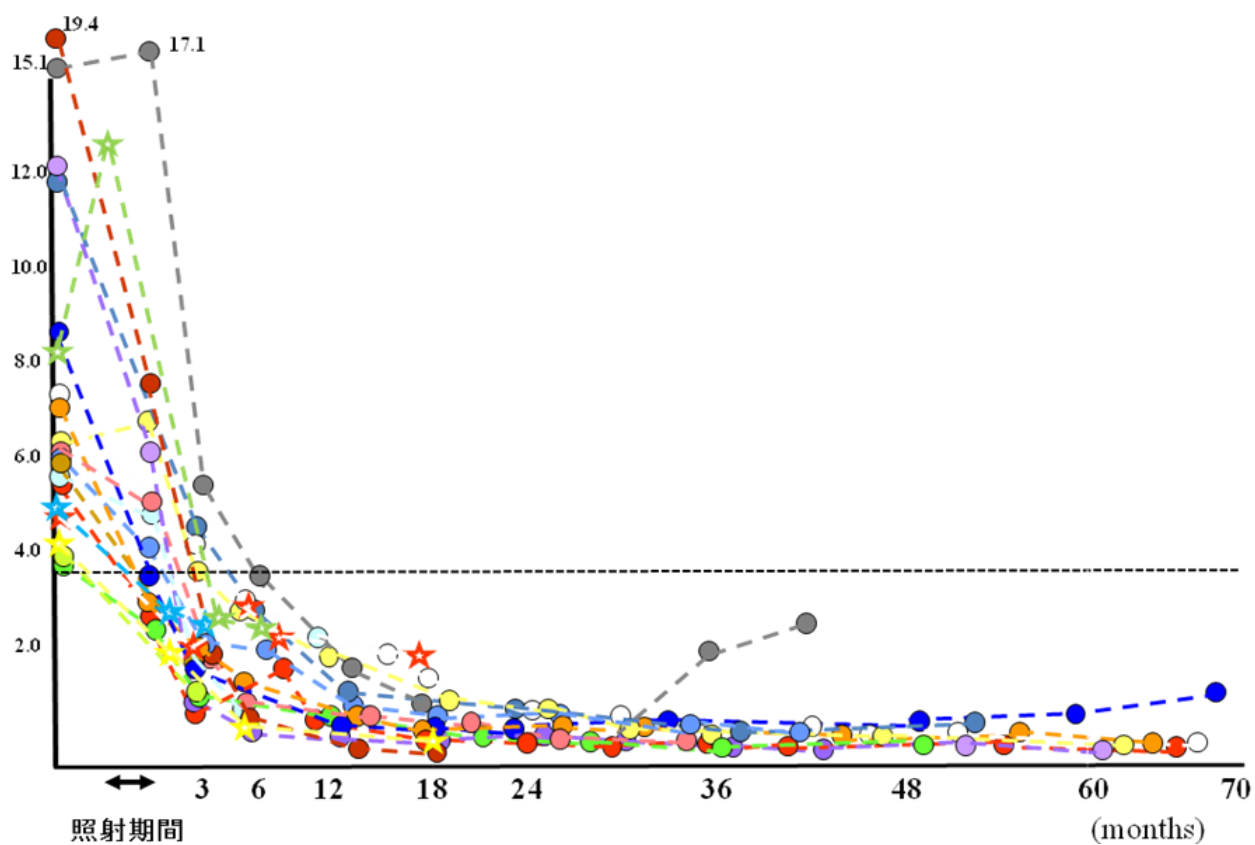


図1 前立腺がん患者（陽子線単独治療症例）の血中 PSA 値の経時的変化
 PSA（前立腺特異抗原）値の正常上限は、4ng/ml。
 横軸は、照射終了日からの月数。



図2 完成した治療室3回転ガントリー室。

イオンビーム照射によるキチン分解細菌変異株を用いた N-アセチルグルコサミン製造技術開発

能登亜有美^{*1}、森山展行^{*1}、高城啓一^{*2}、畑下昌範^{*2}、木元 久^{*3}

^{*1}株式会社エル・ローズ、^{*2}財団法人若狭湾エネルギー研究センター、^{*3}公立大学法人福井県立大学

I. 概要

キチン分解細菌を用いた N-アセチルグルコサミン(NAG)の発酵生産に関する試験を実施した。本試験では、イオンビームを用いた微生物の変異育種、微生物の発酵条件、精製条件の検討を行った。イオンビームにより、NAG を取り込まない微生物株の取得、実験室レベルでの発酵・精製条件の確立が完了し、現在、工業化に向けたスケールアップ試験を行っている。

II. 緒言

カニやエビの殻に含まれる NAG は関節痛の軽減や美容効果が期待される素材であり、市場が拡大している。NAG の一般的な製造工程は、煩雑であり、大量の劇薬を使用していることが問題となっている。そこで我々は、キチン分解細菌を用いた NAG 製造技術の開発を目的とした研究を進めており、これまでの成果として、イオンビームによる NAG 代謝欠損株の取得、発酵条件の確立、精製技術の確立が完了している。現在、工業生産を目的とした、生産工程の最適化(イオンビームによる微生物の更なる高機能化、発酵・精製条件)、商品化に向けた工業スケールでの NAG 製造試験に関する研究開発を行っている。また、並行して本研究で得られた NAG を使用した健康食品や化粧品等の商品化も進めている。

III. 試験

キチンの分解には、我々が福井県内の土壌から分離した *Paenibacillus* sp. FPU-7 株を使用した。微生物の変異育種は、イオンビーム照射により行った。キチン原料にはカニ殻由来の食品用精製キチンを用い、フレーク状だけでなく、産業用粉砕機により微粉末化したものについても分解試験を行った。キチンの糖化は、FPU-7 株の培養液にキチンを加え、酵素反応を行った。キチンの糖化効率、NAG 純度は、HPLC により確認した。

IV. 結果

・イオンビームによる変異育種

イオンビームの照射により、約 1/30 万分の確立で NAG の代謝欠損株の取得に成功した。しかしながら、得られた菌株は、キチンの分解能力が低下していたため、得られた変異株へさらにイオンビームを照射し、キチン分解能力の高機能化変異株の変異育種に成功した。このようにして得られた変異株は、キチン分解酵素を野生株より多く分泌生産していることを確認した。

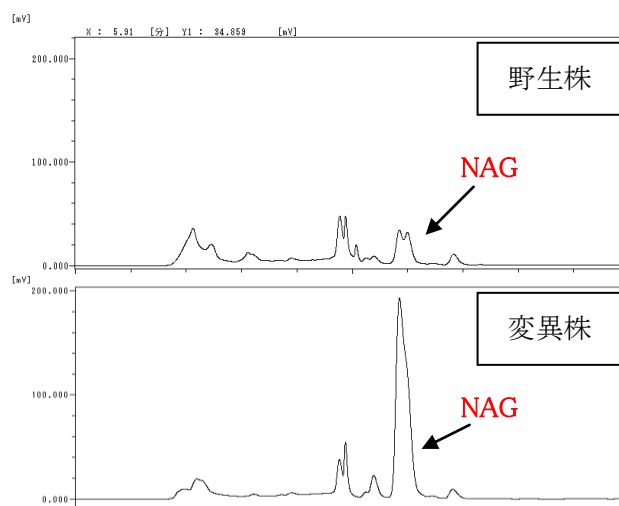


図-1 HPLC 分析による NAG の代謝確認

・発酵条件の検討

得られた菌株について、培地条件、培養条件の検討を行ったところ、組成が単純で精製が容易な合成培地での効率が良いキチンの分解が確認された。また、植菌と同時にキチンを分解させたところ、微粉碎を行っていないフレーク状のキチンも分解可能であった。

・精製条件の検討

複数の組み合わせによる発酵液の精製により、純度 95%以上の NAG 粉末の精製が可能となった。

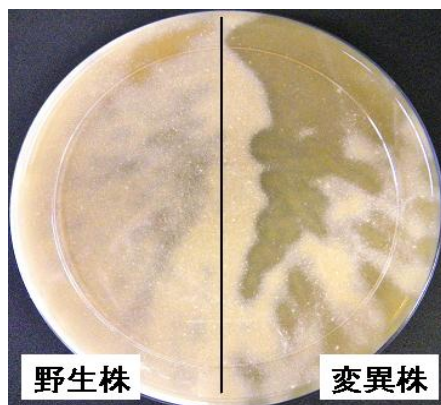


図-2 変異株によるキチン分解

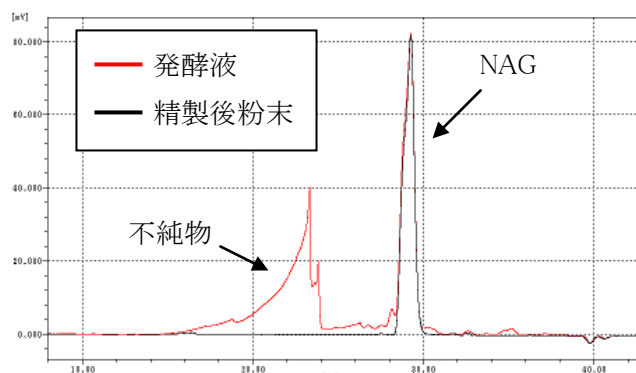


図-3 HPLC 分析による NAG 精製結果

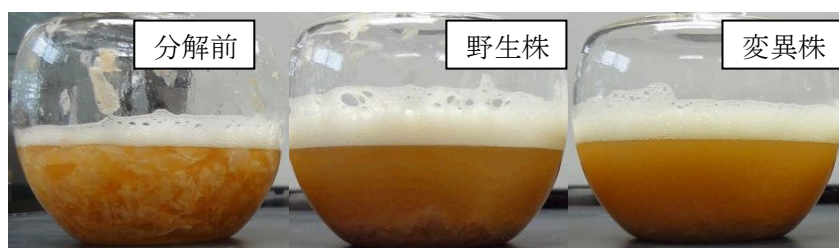


図-4 野生株と変異株のフレークキチン分解

V. まとめ

酸・アルカリなどの劇薬を使用しない、低環境負荷型 NAG 製造技術の開発に向けた研究の成果として、イオンビームによる NAG 代謝欠損株、キチン分解能力の高機能化変異株の取得、実験室レベルでの発酵・精製条件の確立に成功した。今後は、NAG 生産効率の向上のため、微生物の更なる高機能化や発酵条件の至適化、精製条件の簡素化などについても検討し、工業スケールでの試験を実施する予定である。現在、健康食品や化粧品等の商品化についても開発を進めている。

イオンビームによる植物工場用野菜の新品種開発

Development of new varieties of green vegetables which are suitable for the green factory
by ion beam breeding

畑下昌範^{*1}、大城閑^{*2}、高城啓一^{*1}、井村裕治^{*3}

Masanori HATASHITA, Shizuka OHKI, Keiichi TAKAGI and Yuji IMURA

Abstract

High productive varieties which grow up in a short term and are suitable for the green factory would be developed through new plant breeding method that combines ion beam irradiation and tissue culture technique for green vegetables and optimization of cultivation condition.

要約

葉菜類などの野菜に対する組織培養技術とイオンビーム育種技術とを組合せた新しい育種技術および栽培条件の最適化などにより、短期間で高生長する植物工場に適した高生産性品種の開発を目指している。

I. 緒言

天候や場所にとらわれない連続生産が可能であり、無農薬、高栄養価などの高付加価値作物を作る植物工場による農業生産が注目されてきている。植物工場のさらなる普及には、人工的な栽培環境制御にかかるコストの低減が不可欠であり、照明を主とする設備面からの生産性向上の取り組みがなされているが、植物工場用に適した植物の品種開発についてはほとんど研究が行われていない。本研究では、短期間で高生長する植物工場に適した高生産性品種を開発することを目的として、葉菜類などの野菜に対する組織培養技術とイオンビーム育種技術とを組合せた育種技術および栽培環境条件の最適化について検討を行った。地域イノベーションクラスタープログラムにおける3カ年研究の現況について報告する。

II. 材料および方法

1. 再分化能の条件検討

より効率的な再分化個体を得るために、レタス (*Lactuca sativa* L.) 50 品種を用いて再分化能の条件検討を行った。滅菌種子を 9cm プラスチックシャーレの 1/2MS 培地上に播種した。発芽した無菌個体を 1/2MS 培地のプラントボックスに移植した。展開した葉を約 10mm 角に切って外植片とした。再分化条件を探索するために、オーキシンおよびサイトカイニンを各々 3 種類用い、濃度段階 5 水準を組み合わせ合わせて加えた MS 培地で培養した。培養は 23℃で行った。

2. 放射線照射

培養条件の確立した品種に対して、葉片の再分化に対する放射線照射の影響を調査した。培養した葉片に X 線を種々の線量で照射し、その後の再分化反応を調査した。

変異体選抜のためのイオンビーム照射には、200MeV プロトンビーム、660MeV カーボンビームを用い、10Gy 以下の線量で照射し、再分化を行った。

3. 照射葉片の再分化におけるホルモン処理開始時期の依存性

プロトンビームの照射が行われる 1 週間前と 2 週間前にそれぞれホルモン処理を行った。非照射区も含めて、その後の再分化の度合いと発芽した幼芽の 7 日間における伸長度を調査した。

III. 結果

1. レタス葉片に対する組織培養条件

1 葉片あたり安定して発芽発根するものが 2 つ以上あるかどうかを一つの目安に、品種、培養条件を検討した。50 品種のレタス葉片から、個体が再分化するような培地組成の条件を各々検討して、最終的に 6 品種で培養条件を確立した(表-1)。

^{*1} 研究開発部・生物資源グループ、^{*2} 福井県立大学、^{*3} 福井シード株式会社

表-1 レタス葉片からの再分化に必要な至適植物ホルモン濃度

供試材料	オーキシシン NAA(μ M)	サイトカイニン BAP(μ M)	カルス生成量	再分化数/葉片
L-4	1~3	0.3~1	+++	>3
L-6	1	1	+++	>3
L-8	0.3~1	1	++	>3
L-13	1~3	1	+++	>3
L-14	1	1~3	++	>3
L-39	0.3~1	1~3	++	>3

2. レタス葉片の放射線に対する反応

再分化率を指標としてレタス葉片に対する照射条件を検討した。2例の結果を図-1 に示す。

品種 L-8 は 10Gy 以上の線量で全葉片が枯死し、再分化はみられなかった。品種 L-6 は 50Gy の線量でも生存した。しかし、15Gy 以上の線量ではカルスが形成されるのみで、再分化は認められなかった。これらの結果から、変異体選抜のための線量は 5Gy 以下が望ましいと思われた。

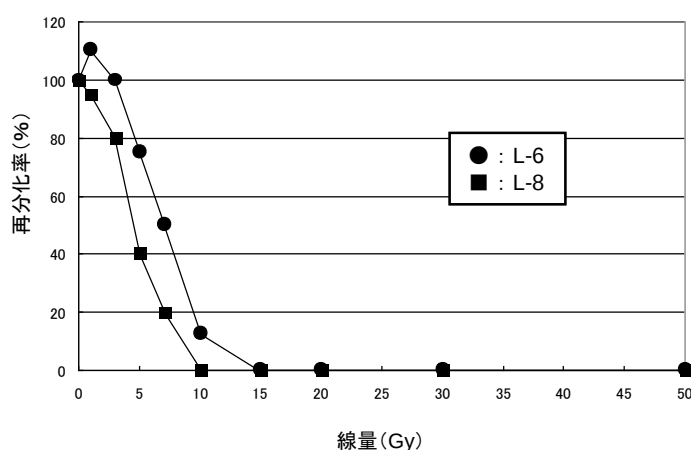


図-1 レタス葉片の再分化に対する放射線の影響

3. 照射葉片の再分化におけるホルモン処理開始時期の依存性

照射の2週間前にホルモン処理をした試験区は、非照射の試験区に比べて、幼芽の伸長度合いのばらつきがより拡大した(図-2)。非照射区の平均値にくらべて、半分以下の伸長しか示さない幼芽がある一方で、5割増の伸長を示した幼芽も認められた。

照射の1週間前にホルモン処理をした試験区は、他の試験区に比べて、より大きな伸長を示した幼芽が少なかった。

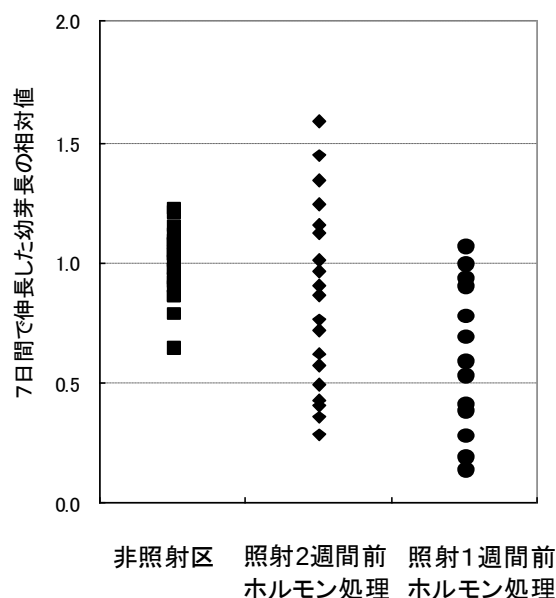


図-2 照射葉片の再分化におけるホルモン処理開始時期依存性

IV. 今後の予定

現在、7900 の照射葉片から再分化個体を約 7,000 個体再生し、そのうち、非照射区と比べて生育の早い個体を1品種あたり50個体残し、開花、採種作業を行っている。今後は、照射第2世代の栽培試験を行って、短期間で高生長する系統の選抜を行う予定である。

太陽熱エネルギー利用による熱交換器設計要素技術の検証試験

Verification test of the element technology for design of heat exchanger using solar heat energy

大久保 剛^{*1}、堀江 茂斉^{*1}、天田 健一^{*2}、重田 達雄^{*2}

Takeshi OKUBO, Shigenari HORIE, Kenichi AMADA and Tatsuo SHIGETA

Abstract

The element test concerning the heat exchanger characteristic that utilized solar heat was carried out. In this test, heat source was converged sunlight by using 10kW solar furnace, and amount of the heat exchange in the heat exchanger and the temperature distribution in the tube of heat exchanger were measured. The result of the simulation of the heat exchanger performance and the measurement result showed good correspondence.

要約

太陽熱を利用した熱交換器特性に関する要素試験を実施した。本試験は 10kW 太陽炉を使用して太陽光を集光し、これを熱源とした熱交換器での熱交換量、熱交換器内の温度分布を測定した。計測結果と性能評価ツールの解析結果との比較を行った結果、両者は良い一致を示した。

I. 緒言

近年、二酸化炭素排出による地球温暖化、化石燃料の枯渇による地球レベルでの環境問題、エネルギー問題が取り立たされており、省資源・省エネルギー化やエネルギー再生等の研究・開発が盛んに行われている。その中でも、地球上に最大約 $1\text{kW}/\text{m}^2$ で降り注ぐグリーンで無尽蔵な太陽光を利用したエネルギー変換技術・材料開発が重要となってきた。本研究では、太陽熱エネルギーを利用した高効率熱交換器の開発を目的としており、熱交換器の設計に必要な性能評価解析ツールの検証を行うため、試験と解析を実施し、解析精度の評価を行った。

II. 試験装置

1. 光源

集光用フレネルレンズは図-1 に示す 10kW 大型太陽炉のフレネルレンズを使用した。レンズ面の大きさは $3.3\text{m} \times 3.3\text{m}$ であり、日射強度 $1\text{kW}/\text{m}^2$ とすると約 10kW の太陽光を集光できることになる。

2. 熱交換器

熱交換器はフレネルレンズに対向するように配置した断熱容器底面に平面状に伝熱管を配列した形状とした。熱交換媒体は空気とし、熱交換器内部温度を高温にするために空気予熱ヒータを設置している。図-2 に装置の写真を示す。空気の流量、熱交換器入口、出口の空気温度を測定することにより、熱交換量を評価する。また、伝熱管表面、熱交換器の壁面温度を測定し、解析との比較用データとした。

III. 試験結果

1. 熱交換器への入熱量分布

熱交換器への入熱量は熱流束計により測定した。フレネルレンズに設置した直達日射計の値を元に、単位日射強度 ($1\text{kW}/\text{m}^2$) に対する熱流束で評価した。測定結果を図-3 に示す。熱交換器内部への入熱量は日射強度 $1\text{kW}/\text{m}^2$ 当り平均 $3.77\text{kW}/\text{m}^2$ であった。検証試験では本データを元に日射強度を測定することにより、熱交換器への入熱量を算出した。



図-1 10kW 大型太陽炉

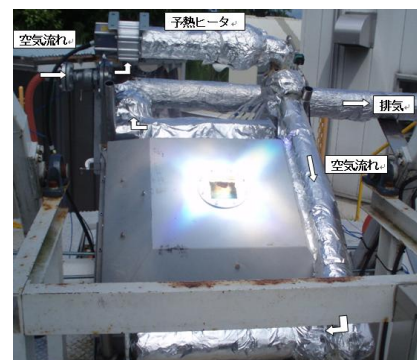


図-2 熱交換器外観

^{*1}三菱重工業(株)、^{*2}研究開発部 エネルギー開発グループ

本研究は、(財)若狭湾エネルギー研究センターと三菱重工業(株)との共同研究として実施した。

2. 伝熱試験結果

解析ツールの検証のため、日射量が比較的安定し熱交換器内部の温度が高温で安定した状態の各部の温度データを取得した。主な計測データを表－1に示す。

表－1 伝熱試験の主なデータ

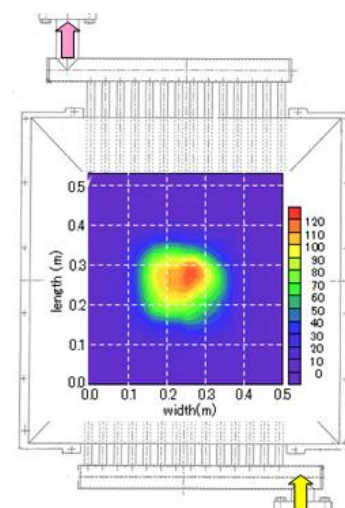
日射強度	0.855kW/m ²	熱交換器入熱量 ^(注1)	3.2kW
空気流量	0.66kg/min	入口空気温度	353℃
出口空気温度	440℃	熱交換量 ^(注2)	1.0kW
壁面からの放熱量 ^(注3)	1.8kW	入射窓からの放熱量 ^(注4)	0.4kW

(注1) 熱交換器入熱量は日射強度から算出

(注2) 熱交換量は空気流量と入口・出口空気温度差から算出

(注3) 壁面からの放熱量は熱交換器壁面温度から算出

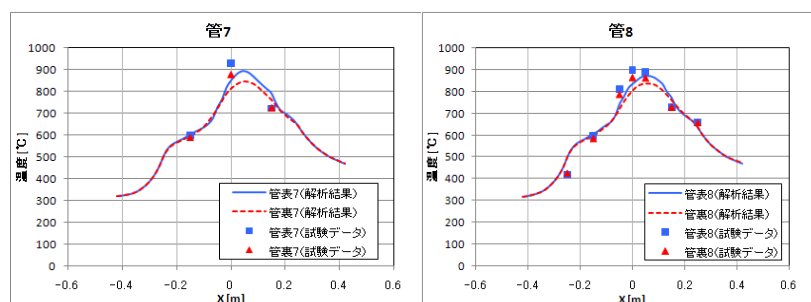
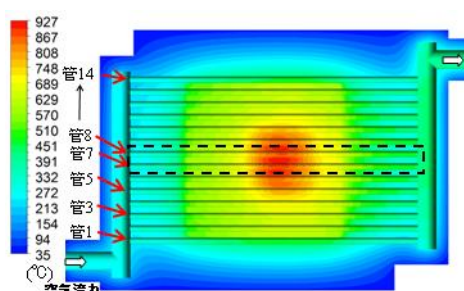
(注4) 入射窓からの放熱量は(熱交換器への入熱量-熱交換量-壁面からの放熱量)として算出



図－3 熱交換器内熱流束分布
(kW/m²)/(日射 1kW/m²)

IV. 解析結果

表－1に示した日射強度、空気流量、入口空気温度を境界条件として、性能予測ツールにより熱交換器における伝熱解析を行なった。入熱量が高い熱交換器中央の伝熱管表面温度の比較を図－4に、試験結果と解析結果の比較を表－2にまとめて示す。図－4において実線が解析結果、プロットが計測値を示す。各部の温度、熱交換量は良い一致を示し、誤差4%以内で予測可能であることが判った。



図－4 試験結果と解析結果の比較

(左側:解析の温度分布結果、右側:中央管表面温度の比較)

表－2 試験結果と解析結果の比較

	熱交換量 (kW)	伝熱管 最高温度(℃)	断熱材表面 最高温度(℃)	出側 空気温度(℃)
試験	1.01	930	930	440
解析	1.03	893	924	450
誤差 ^(注5)	0.98	1.04	1.01	0.98

(注5) 試験値/解析値

V. まとめ

太陽熱を利用した熱交換器の性能を評価するためには、入射した太陽光エネルギーを入熱条件として、伝熱管内の熱媒体の対流伝熱、熱交換器内部の放射伝熱、伝熱管材料内及び断熱壁内の熱伝導といった複合問題を解く必要がある。特に放射解析は内部の形態係数を算出するため、その計算精度の評価が必要となる。本研究により、試験結果と解析結果が誤差4%以内と良い一致を示し、実機でも本解析ツールを使用することが可能であることが判った。今後、実機レベルの熱交換器設計へ適用を図る予定である。

高分子電解質および電極構造の制御による化学アクチュエータの創製

(福井大学工学部) 庄司英一 (若狭湾エネルギー研究センター) 畑下昌範

1. 緒言

高分子・化学アクチュエータの特徴には、①作動電圧が数ボルト程度と低電圧であるということ、②屈曲変位量が多いこと、③自重の数百倍程度の力が発生できること、④大気中で作動できること、⑤作動音がないこと などがあり、近年注目されている。従来の研究例では、ほとんどはイオノマーとしてパーフルオロスルホン酸膜を用い、電極層として貴金属層が無電解メッキ法により付与されたものの検討となっている。しかし、パーフルオロスルホン酸膜は耐薬品性、耐熱性、耐放射線性、力学強度に欠けること、また、膜材への直接的なメッキではイオノマー膜と金属電極層の伸縮度の違いから起こる電極構造の破壊

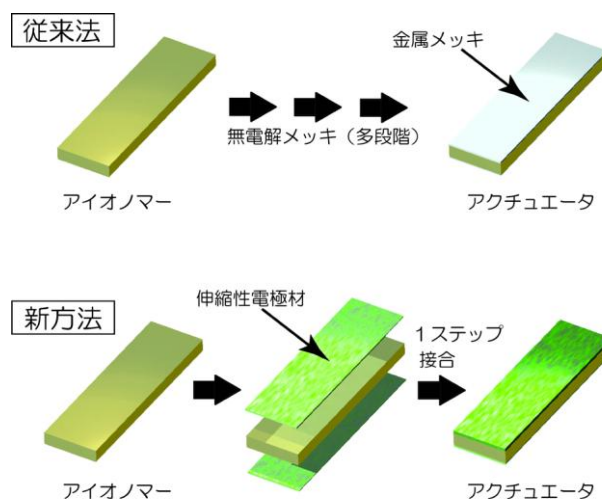


Fig.1 伸縮性電極材の接合によるアクチュエータの創製

や、メッキ液に溶解するイオノマー膜へはメッキが出来ない本質的な問題となっている。本研究ではこうした問題点のブレークスルーとして、芳香族系エンジニアリングプラスチックの構造をベースとした高分子電解質の合成と、これを用いたアクチュエータの創製を研究目的としている。中でもポリイミド類は、耐薬品性、耐熱性、耐放射線性、力学強度があり、大気中、低電圧で大きな屈曲変位運動を発生できる高分子アクチュエータの創製が期待できる。次世代の駆動原理としてアクチュエータの高性能化を図るには、高性能な電解質膜の創製と電極接合界面の構造の工夫が必要である。本研究では耐薬品性、耐熱性、耐放射線性、さらに力学強度を有するイオノマー膜の創製と伸縮性電極材を用いた従来の直接的なメッキによらない電極接合による方法からアクチュエータの創製をめざしている。

2. 方法

ポリイミド骨格を有する高分子電解質としてポリイミドスルホン酸の合成を検討している。モノマーとして 1,4,5,8-ナフタレンテトラカルボン酸無水物 (NTDA) と、スルホン酸基を持つ二官能性モノマー 4,4' ジアミノジフェニルエーテル-2,2'-ジスルホン酸 (DADES)、4,4' ジアミノフェニルエーテル (DADE) による重合反応を検討した。モノマー類は昇華精製により純度を上げた。重合反応により得られたポリイミドスルホン酸 (Fig. 1) は再沈の後、ソックスレー抽出器により洗浄操作を行った後、キャスト法により製膜を行った。この膜に、伸縮性の電極材として導電性布帛を接合した後、所定の大きさに切り取って動きの応答性を調べる試験片とした。

アクチュエータの変位量と発生力の計測は独自に開発を進めている専用の評価計測システムにより行った。

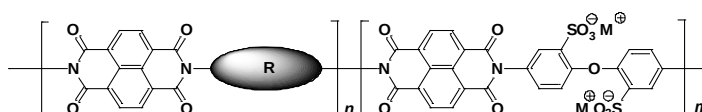


Fig.2 ポリイミドスルホン酸 (R: 芳香族系ジアミン類)

3. 結果及び考察

DADES は DADE のスルホン化反応より合成した。モノマーとなる、NTDA、DADES、さらに R として DADE の共重合反応から目的のポリイミドスルホン酸を得た (Fig.2)。

溶媒キャスト法により成膜した後、伸縮性の電極材として導電性布帛を接合することによりアクチュエータを作製した。試験片として大きさが 4mm×22mm のアクチュエータを切り出し、印加電圧を±1.5V、30 秒間隔で極性をスイッチングさせた時の運動性(屈曲変位量、発生力)を評価計測システムにより計測した。

屈曲変位量として±1.2mm、発生力として 1.3mN を観測し、アクチュエータとして良好に

作動することを確認した。ポリイミドスルホン酸の共重合体組成や化学構造が成膜性や膜の物性やアクチュエータの運動性に与える効果、電極構造の検討などについて今後検討を進める予定である。

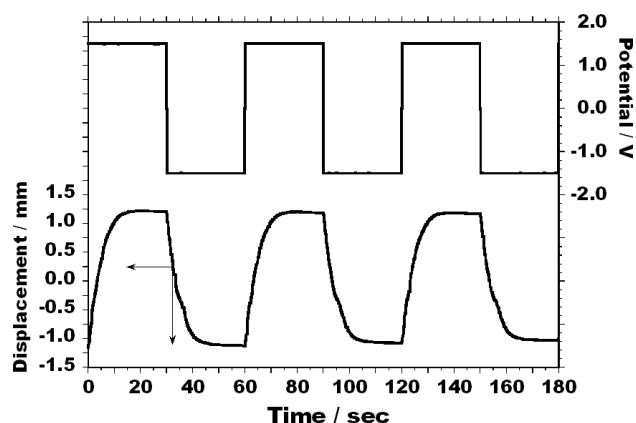


Fig.3 ポリイミドスルホン酸を高分子電解質膜として作成したアクチュエータの運動パフォーマンス
の屈曲変位量の計測

要約

本研究では、陽子線による低酸素がん細胞標的治療への知的基盤を整備する目的で、「陽子線の低酸素がん細胞に対する治療効果とそのメカニズム」に関して詳細な検討を行った。まず、マウス大腸がん (Colon-26) 腫瘍モデルにおいて、低酸素マーカーである放射性 ^{64}Cu -ATSM の集積によって示される腫瘍内低酸素領域には腫瘍形成能の高くがん幹細胞と考えられる CD133 陽性細胞が多く存在することを示した。また、Colon-26 細胞に対する X 線照射と陽子線照射の酸素増感比 (Oxygen Enhancement Ratio: OER) を測定したところ、陽子線照射における OER は、X 線照射における OER に比べ小さい値となった。このことは、低酸素環境下にあるがん細胞に対し、陽子線照射が X 線照射よりも効果的な場合があることを意味している。さらに、X 線照射と陽子線照射によって発生するラジカルの種類と量の比を測定したところ、どちらの場合でも発生するラジカルの種類と量は等しく、これらの放射線の影響における間接作用の割合は等しいことが明らかとなった。これらの結果は、腫瘍内の ^{64}Cu -ATSM 集積領域に対し、陽子線照射が X 線照射よりも効果的であることを期待させる。

I. 緒言

がんは、日本人の死因第一位の疾患であり、がんの克服は重要な課題である。

これまでのがん研究は、腫瘍を均質な細胞集団としてとらえ、その診断法・治療法を見出そうとする傾向にあった。しかし、近年、腫瘍中には、「がん幹細胞」と呼ばれる少数の細胞群が存在し、腫瘍の治療抵抗性や転移能に関連していることが明らかとなってきた。すなわち、がん幹細胞は、腫瘍内に少数しか存在していないにも関わらずがんの悪性化に関与しているのである。このため、がん幹細胞を標的に治療すればより治癒率の高いがん治療が可能になるとして注目を集めている。これに対し、最近の研究から、腫瘍内の低酸素領域はこうしたがん幹細胞が多く存在する「がん幹細胞ニッチ」(がん幹細胞の“居場所”)になっている可能性が示唆されている。

細胞実験において、X 線照射の酸素増感比 (Oxygen Enhancement Ratio: OER) は 3 程度であるとされている。これは、低酸素下にある細胞に対しては 3 倍の線量を照射しなければ同等の効果が得られないことを示しており、このように低酸素下で細胞の放射線耐性が高まる現象を酸素効果という。これに対し、炭素線などの重粒子線を照射したときの OER は X 線照射時よりも低いことが知られており、重粒子線は低酸素状態に置かれた腫瘍細胞に対して X 線よりも効果的であるとされている。しかし、建設費用の問題などから、重粒子線治療施設は陽子線治療施設ほど広がっていない。30 年ほど前の文献に基づき、陽子線照射の OER は X 線照射と変わらないとされているが、最近では陽子線のほうが X 線よりも腫瘍の低酸素領域に対して効果的なのではないかと考えられるようになってきた。

このように、腫瘍内の低酸素領域に悪性度の高いがん幹細胞が多く存在し、陽子線が X 線よりも腫瘍内の低酸素領域に対して攻撃的であるならば、陽子線治療は X 線治療よりも治癒率の高い治療法であるということになるだろう。本研究では腫瘍内低酸素領域とがん幹細胞の関係を明らかにすること、腫瘍低酸素治療法として特に陽子線照射の可能性を探ることを目的として、腫瘍内低酸素領域の分布とがん幹細胞分布の比較検討、および陽子線を用いた低酸素がん細胞治療効果の基礎検討を行った。

II. 方法

(1) 腫瘍内低酸素領域の分布とがん幹細胞分布の比較検討

雄 BALB/c マウス大腿部に、マウス大腸がん細胞 (Colon26) を移植し、腫瘍モデルを作成した。一晩絶食後、 ^{18}F FDG+ ^{64}Cu -ATSM のダブルトレーサーを尾静脈注射し、1 時間後犠牲死させ、腫瘍の autoradiography 画像を得た。また、隣接切片を用いて、免疫組織染色を行い、がん幹細胞の分布を検討した。本研究では、がん幹細胞マーカーとして汎用されている抗 CD133 抗体を用いた。なお、本実験の動物実験は、動物の愛護及び管理に関する法律等に基づき福井大学動物実験委員会における審議承認を経て行った。また、CD133 陽性 (CD133+) Colon26 細胞ががん幹細胞様の性質を持つか確認する目的で、そのコロニー形成能について検討した。さらに、培養 Colon26 細胞を用い、がん幹細胞の低酸素耐性・栄養飢餓耐性についても検討した。

(2) 陽子線を用いた低酸素がん細胞治療効果の基礎検討

マウス大腸がん細胞 (Colon-26) を用いて、常酸素状態および低酸素状態での X 線照射と陽子線照射の効果について比較した。X 線照射は福井大学の X 線照射装置 (MXC-18, MISONO) を用いて、陽子線照射は若狭湾エネルギー研究センターにおいてそれぞれ行い、コロニーアッセイ法によって細胞生存率を評価した。また、細胞の大部分を占める水を X 線および陽子線で照射したときに発生する $\cdot\text{OH}$ と $\cdot\text{H}$ の量を、電子スピン共鳴法 (Electron Spin Resonance: ESR) で測定し、比較検討した。5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) はよく知られた $\cdot\text{OH}$ と $\cdot\text{H}$ のトラップ剤である。細胞培養に用いる DMEM 培地に 200 mM の DMPO を混合した試料を作成し、X 線照射は福井大学の X 線照射装置 (MXC-18, MISONO) を用いて、陽子線照射は若狭湾エネルギー研究センターにおいてそれぞれ行い、照射からちょうど 5 分後に ESR 測定を行った。ESR 装置は、福井大学に備えられた JEOL JES-RE3XR と若狭湾エネルギー研究センターに備えられた JOEL JES-FR30EX-WC をそれぞれ用いた。2 つの ESR 装置の校正には安定なラジカル剤である 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) を用いた。

III. 結果

(1) 腫瘍内低酸素領域の分布とがん幹細胞分布の比較検討

^{64}Cu -ATSM 高集積領域では、CD133+細胞の割合は $1.08\% \pm 0.33\%$ であり、比較的高かった (Fig. 1)。一方、血管が多数観察され細胞が活発に増殖している ^{18}F FDG 高集積領域では、CD133+細胞の割合は $0.09\% \pm 0.1\%$ であり、それほど高くなかった。また、CD133+細胞の存在比は、 ^{64}Cu -ATSM 高集積領域 $>$ ^{64}Cu -ATSM 中集積領域 $>$ ^{64}Cu -ATSM 低集積領域、 ^{18}F FDG 高集積領域の順に高かった。

また、CD133+ Colon26 細胞は、CD133 陰性 (CD133-) 細胞に比べて、コロニー形成能が高く、がん幹細胞様の性質を持つ事が確認された。さらに、CD133+ Colon26 細胞は、低酸素・栄養飢餓に対し耐性を有すること、低酸素・栄養飢餓環境下で ^{64}Cu -ATSM の取り込みが増大することが明らかとなった (Fig. 1)。

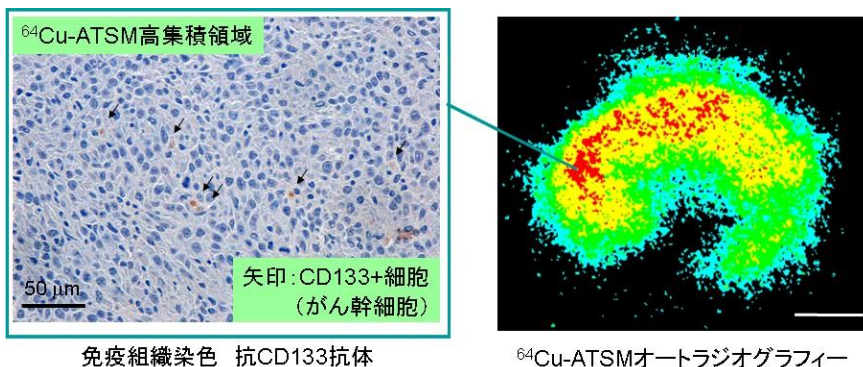


Fig. 1 腫瘍内 ^{64}Cu -ATSM 高集積領域と CD133+細胞分布

(2) 陽子線を用いた低酸素がん細胞治療効果の基礎検討

得られた細胞生存率曲線を Fig. 2 に示す。細胞生存率の対数を取り、これを二次関数でフィッティングしたフィッティングパラメータから算出された生物学的効果比 (Relative biological effectiveness: RBE) は 1.1 ± 0.2 で、文献値と一致した。得られた OER は、X 線照射で 2.0 ± 0.2 であったのに対し、陽子線照射では 1.6 ± 0.2 であった。すなわち、X 線照射、陽子線照射ともに低酸素状態の細胞に対して効果が低下したが、その下がり方は陽子線照射の方が緩やかだった。

測定された ESR スペクトルにおける、DMPO-OH アダクトと DMPO-H アダクトのピーク強度を Fig. 3 に示す。X 線照射と陽子線照射で、これらのラジカルアダクト生成量に差がないことが示された。

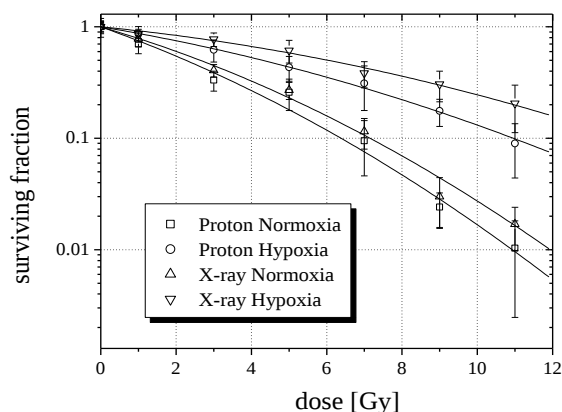


Fig. 2 細胞生存率曲線

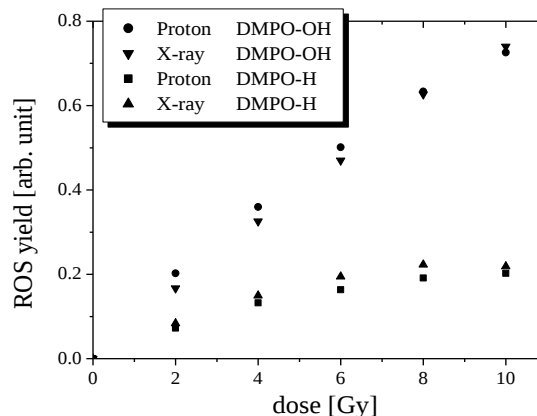


Fig. 3 ラジカルアダクト生成量

IV. 考察

^{64}Cu -ATSM 高集積領域で比較的 CD133+細胞が多く存在したことから、 ^{64}Cu -ATSM はがん幹細胞局在領域 (がん細胞ニッチ) を描出するものと考えられる。また、がん幹細胞は、低酸素・栄養飢餓耐性を有することで、血管の乏しい低酸素領域に多く存在できる可能性が示された。

細胞生存率曲線の解析によって得られた OER は、X 線照射の場合よりも陽子線照射の場合のほうが低かった。このことは、陽子線のほうが X 線よりも低酸素状態に置かれた細胞に対して効果的な場合があることを示している。この原因として、陽子線のほうが間接作用の割合が低いことが予想されたが、ラジカル測定の結果、X 線照射と陽子線照射で間接作用に大きな差はないことが明らかとなった。

V. 結語

本研究によって、 ^{64}Cu -ATSM が集積するような腫瘍内の低酸素領域に対して、陽子線が X 線よりも効果的である可能性が示唆された。今後、動物腫瘍モデルを用いて、腫瘍内低酸素領域に対する陽子線の効果を検討したい。また、陽子線の低い OER の原因についても明らかにしていきたい。

細胞増殖制御が可能な工業用動物細胞の育種
Breeding of Growth-Regulated Animal Cell-line for Industrial Use
高城啓一*¹、千田泰史*²、川原渉*²、寺田聡*²

Keiichi TAKAGI, Yasushi CHIDA, Wataru KAWAHARA, and Satoshi TERADA

Abstract

Applying animal cell lines for drug production has a serious problem of excess proliferation, which brings abrupt massive cell death and reduction of the productivity. Therefore, we are trying to establish cell lines obtaining the property of growth inhibition at the high cell density condition by means of radiation breeding. We have been able to obtain several candidates.

要約

薬剤生産に用いられている株化動物培養細胞では、増殖制御ができないため過剰増殖による生産性が低下するという問題点がある。そこで、放射線照射により、増殖制御が可能な培養細胞株の獲得を試みている。その結果、現在のところ幾種類かの候補系統を得ることができた。

I. 緒言

蛋白質性薬剤の多くは、翻訳後修飾や三次構造形成の必要性から細菌を使って生産することができず、株化した動物培養細胞を用いて生産が行われている。株化した動物培養細胞は、無限増殖能を獲得すると共に高密度条件下における増殖抑制能を失っており、培養器の収容能力を越えて増殖をした場合、急速に死滅するため、目的とする物質の生産ができなくなってしまうという問題点がある。

そこで本研究では、株化動物培養細胞に放射線照射によって突然変異を誘発し、高密度条件下で増殖が抑制されるような変異株の選抜を試みた。変異の選抜は、細胞増殖時に DNA に取り込まれて毒性を表すピリミジンアナログ、もしくは、DNA 合成阻害剤とピリミジンアナログを組み合わせ用いた。その結果、X 線照射を行った細胞から 4 種類の候補系統が得られた。また、陽子線照射、炭素線照射においても選抜作業を実施している。

II. 材料と方法

1. 実験材料

実験材料として、チャイニーズハムスター卵巣由来の細胞株 CHO-DP12 を用いた。この細胞は、5% ウシ胎児血清を含む DMEM を用いて 5% CO₂、37 °C の環境下で培養を行った。

2. 放射線照射

陽子線照射(H⁺, 200 MeV)、および、炭素線(¹²C⁶⁺, 660 MeV)照射には、福井県若狭湾研究センターの生物照射コース(高エネルギー)を用いた。

X 線照射には、日立メディコ製 X 線照射装置 MBR-1520R-3(150 kVp)を用いた。

3. 増殖抑制系統の選抜

高密度条件下で増殖が抑制される変異細胞を選抜するために、照射を受けた細胞の培養を、細胞が増殖して容器底面を埋め尽くすまで継続し、増殖性細胞への選択性が強い薬剤処理による選抜試験を行った。

ピリミジンアナログとして、5-fluorodeoxyuracil (5-FU)を、DNA 合成阻害剤としてヒドロキシ尿素(hydroxyurea, HU)を用いた。

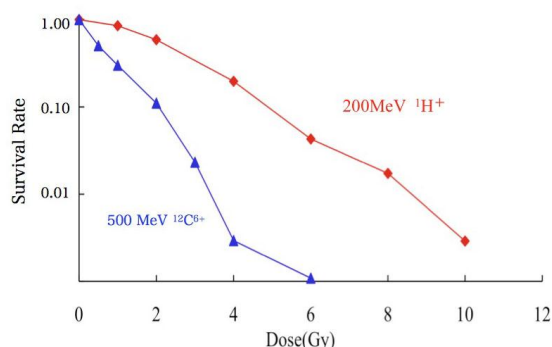


図- 1 陽子線、炭素線に対する CHO-DP12 の生残率

III. 結果と考察

1. CHO-DP12 の放射線感受性

増殖抑制株の選抜にあたって、変異細胞を得るために適正な

*¹若狭湾エネルギー研究センター研究開発部生物資源 G、*²福井大学工学研究科生物応用科学
本研究は、(財)若狭湾エネルギー研究センターの公募型共同研究事業として実施した。

照射線量を得るために、コロニー形成試験による感受性の調査を行った。陽子線、および、炭素線での感受性調査の結果を図- 1に示す。炭素線が CHO-DP12 の生残率に及ぼす影響は陽子線よりも大きかった。これらの結果より、陽子線の適正線量を 2 Gy 前後、炭素線の適正線量を 1 Gy 前後 とした。陽子線は、X 線とほぼ同じ生物効果比を持つとされていることから、X 線の適正線量は 2.5 Gy とした。

2. 5-FU 処理条件の決定

選抜試験を行うため、5-FU の濃度や処理時間を変えて条件検討を行った。5-FU の濃度を、0.1, 1.0, 10 mM と変えて処理を行ない、4 日後に 5-FU を含まない培地に交換して培養を継続したところ、1 mM、10 mM で、ほとんどの細胞が死滅した。次に、5-FU の処理時間を 1 日、あるいは、2 日として同様の実験を行ったところ、1 mM 処理では、1 日では十分な細胞数の減少は見られなかったが、2 日間 5-FU 処理を行ったものでは、1 mM、10 mM とともに、ほとんどの細胞が死滅した。さらに、5-FU の処理時間を 2 日間として、処理濃度に関して細かく調べた(図- 2)。その結果、2 日の処理では、1 mM 以上の濃度で培養 10 日目(処理終了から 8 日目)には細胞が死滅することがわかった。そこで、5-FU の処理条件は、1 mM、2 日間とすることにした。

3. 増殖抑制系統の選抜

陽子線、および、炭素線を所定の線量を照射した後、培養を継続し、細胞が容器底面いっぱいに増殖したところで 5-FU 処理を開始して、生き残り、増殖を再開する細胞の選抜を試みた。しかし、期待するような増殖抑制系統は得られなかった。今回の処理条件下で、5-FU が増殖を停止した細胞に対して毒性を示している可能性が考えられたため、接触阻害を示す細胞株で、増殖が停止した条件下で同様の試験を実施したところ、増殖を停止した細胞に対しての毒性を示唆するような結果は得られなかった。しかし、5-FU 処理後の CHO-DP12 細胞像を観察すると、多くの細胞で、位相差顕微鏡下で核周部へのフェイズダークの微粒子が沈積と、それにともなうアポトーシスとは異なる異常核像が見られた。5-FU は、RNA へも取り込まれる。したがって、核周部の異常像は、5-FU の rRNA や tRNA を介した毒性を反映しているのではないかと考えられる。照射から選抜のための処理の間に、目的とする変異を起こした細胞が、5-FU の DNA 取り込み以外に起因する毒性によって生き残るのに順分な数が存在しなかった可能性が示唆された。

そこで、5-FU 処理による選抜を行う前に、よりおだやかな薬剤処理で一次選抜を行ない、目的とする変異細胞の数が十分に増えた後に 5-FU による選抜試験を行った。一次選抜試験のための薬剤として HU を用いた。HU は、細胞内のプリン体プールを枯渇させることにより DNA 複製停止をもたらし、S 期初期の細胞に対し殺作用を示すと考えられている。そこで、細胞に X 線を照射し、照射した細胞が底面いっぱいに増殖した段階で、4 mM HU で 24 時間処理し、処理を終了してから 6 時間後に再び 24 時間の HU 処理を行うことで、同調して S 期に入った細胞を殺し、分裂する細胞の数を減少させた。一次選抜の後、生き残った細胞は増殖を再開した。生き残った細胞が底面いっぱいにまで増殖した後に 5-FU 処理を行ったところ、6 つの増殖性コロニーが得られた。図- 3に、処理の結果生残り、増殖を再開したコロニーの例を示す。これらを分離して培養し、底面いっぱいまで増殖させた後、再び 5-FU 処理を繰り返したところ、6 つのコロニーに由来する候補系統のうち 2 系統では、5-FU 処理に対して顕著な耐性を示し、多くの細胞が生き残って増殖を再開した。これらの系統は、高密度条件下で増殖が停止、ないしは、抑制されている可能性が高い。

今後は、これまで得られた候補系統の性質を詳しく調査すると共に、陽子線照射、炭素線照射においても同様の選抜を行ない、より有効な細胞系統の確立を目指す。

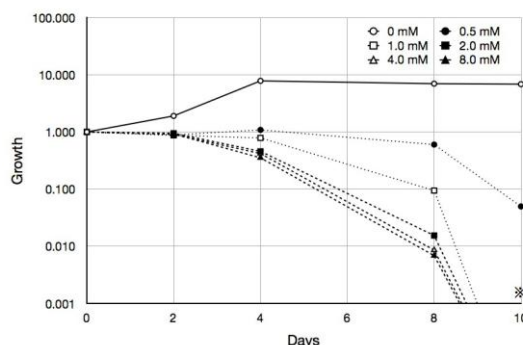


図- 2 5-FU 処理の CHO-DP12 生残に対する効果

5-FU 処理は、2 日まで実施。※は、細胞が死滅

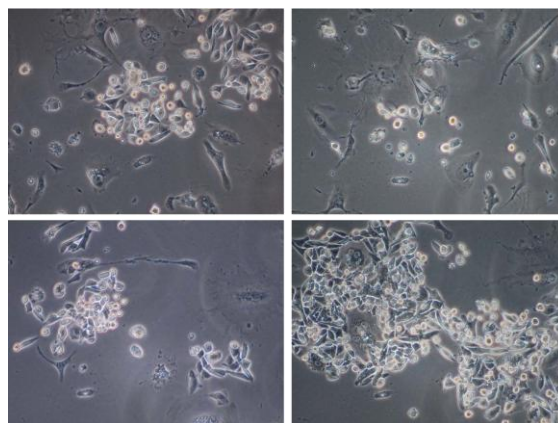


図- 3 HU 処理後に 5-FU 処理を行った際に形成された増殖性コロニー

上段左: 5-FU 処理終了時、上段右: 処理 4 日目、下段左: 処理 9 日目、下段右: 処理 19 日後。

小野真宏・今 攸(元若狭エネ研)・白木秀人(関電プラント)・大間憲之(元越前海遊公社)

【目的】 ズワイガニの年齢と寿命は、生物学的手法によって、各脱皮齢の脱皮間隔を積算することによって求められてきた。しかし、脱皮間隔の推定には不確定要素が多く、研究者による推定値の変動幅が大きく、新たな手法による確認の必要性が求められている。そこで、各脱皮齢の外骨格(甲羅など体を覆う硬い組織)を放射性同位元素分析し、既往の年齢を評価する。

【材料と方法】 甲殻類は脱皮直後に外骨格を硬化させるために、外界から多量のカルシウム(Ca)を取り込むが、Caと同じ第2族のアルカリ土類金属であるラジウム(Ra)をも間違えて取り込む。そこで、本研究では取り込まれた放射性 Ra が、物理学的法則に従って、時間と共に崩壊して形成されるトリウム(Th)との放射線量比を測定し、ズワイガニの各脱皮齢について、脱皮してから採集された時までの期間を下記の式(A は放射能、tは年で示される時間の長さ)に基づいて求めた。ただし、この法則が生物体内で適用されるためには、①外骨格がCa化する過程で ^{228}Th が取り込まれないこと、② ^{228}Ra の取り込みは脱皮後直ちに完結すること、③Ca化の終了後に外骨格は閉鎖系にあり、 ^{228}Ra と ^{228}Th の追加と喪失がないこと、の3条件が必要である。

$$\frac{A^{228}\text{Th}}{A^{228}\text{Ra}} = 1.4974(1 - e^{-0.2424t})$$

用いた材料は 2007 年から 2009 年にかけてのズワイガニ漁期中に、福井県の漁船が漁獲した個体、および 2009 年 5 月 15 日に独立行政法人水産総合研究センター日本海区水産研究所の備船が山陰沖で採集した個体である。これら個体の外骨格を風乾後に 80℃で 24 時間乾燥させて粉末とし、V-1 容器(約 80ml)に密封した。その後、財団法人若狭湾エネルギー研究センターに設置された古い鉛材を基本遮蔽、放射性不純物をほとんど含まない、約 200 年前の古い鉛材を内張りした極低バックグラウンド仕様のプレナ型ゲルマニウム半導体検出器(CANBERRA 製 EGMP-60-30-R)で、 ^{228}Ac から出てくる γ 線量を測定して、 ^{228}Ra と ^{228}Th 線量を算出した。なお、一部の検体は金沢大学自然計測応用研究センター低レベル放射能実験施設においても測定し、比較検討した。

【結果と考察】 本研究は 2007 年度から 3 年計画で開始し、2007 年度と 2008 年度では、放射性同位元素分析に関する基礎研究として、本手法によってどの程度正確な値が得られるのかを検証し、2009 年度は応用研究として、各脱皮齢の外骨格年齢を明らかにしようとした。

1 基礎研究

外骨格の汚れや硬さ、および色などの外観から、脱皮後 1 年以内とみられる検体の測定結果をみると、外観から 0 年とみられる放射能測定値は 0 年、1 年では 1.01 年、0.5～1 年では 1.02～1.17 年、0.2～0.4 年では 0.23～0.48 年であり、測定値は外観などからの推定年齢とほぼ一致していた(表 1)。ただし、測定誤差をみると低いものでは 0.1 年程度であるが、高いものでは 0.7 年もあり、物理学的測定結果といっても、必ずしも高い精度ではない場合もあることに留意する必要がある。

表 1 外骨格の外観などから 0～1 年と推定された検体の放射能測定結果

検 体	推定年齢	
	外観など	放射能測定
第12齢♂ 新外骨格	0	0
二重ガニ 旧外骨格	1	1.01±0.22
第12齢♂ 外骨格	0.5～1	1.02±0.34
硬ガニ		1.17±0.71
第13齢♂		0.23±0.14
水ガニ 外骨格	0.2～0.4	0.40±0.14
		0.48±0.15

次いで、外観から 1.5、2.5 ないしは 3.5 年とみられる検体では 2.98～3.25 年、4.5～5.5 年とみられる検体では 5.81 年であり、測定値は外観などからの推定年齢とほぼ一致していた(表 2)。

しかし、外観から 9.5 年以上とみられる検体の放射能測定結果は 2.39～4.25 年と大きく過小評価された(表 3)。外観などから推定された 9.5 年という数値は、標識票をつけて放流してから採捕されるまでの期間であり、信頼できる数値である。表 2 の結果から、5 年以内なら信頼できる数値が得られると考えられたが、表 3 から実際は 9.5 年以上の外骨格年齢でありながら、2 年代という測定値がでるということから、2 年以内の数値しか信頼できないと考えられた。したがって、2 年を超えて生存していることが明らかな最終齢雌雄の生存期間を求めることはできないと判断された。

表 2 外骨格の外観から 1.5～5.5 年と推定された検体の放射能測定結果

検 体	推定年齢	
	外観など	放射能測定
		3.04±0.52
第11齢♀ 硬ガニ	1.5, 2.5, 3.5	2.98±0.76
		3.25±0.84
	4.5～5.5	5.81±1.47

表 3 外骨格の外観から 9.5+ α と推定された検体の放射能測定結果

検 体	推定年齢	
	外観など	放射能測定
		2.39±0.19
第11齢♀ 硬ガニ	9.5+ α	3.23±0.34
		4.25±0.63

カニの外骨格が十分に硬くなるまでは Ca を取り入れ、その間は Ca の喪失がない、あるいは少ないとみられるが、その後は環境との間で Ca の交換が頻繁に行われているため、高齢の外骨格は実際の年齢よりも過小評価されているものと推察された。

2 応用研究

2009 年 5 月 5 日に採集された第 7～10 齢雌雄の外骨格を測定した。これらの個体は小さいため、1 個体では測定に供する十分な重量が得られないため、複数個体をもって 1 検体とした。採集個体の一部には脱皮直後や脱皮直前の個体も含まれ、脱皮時期が始まっているようにみられた。測定結果はいずれの脱皮齢および雌雄共に 0.67～1.65 年の範囲にあった(表 4)。これまでの生物学的研究結果ではこれらいずれの脱皮齢および雌雄共に脱皮間隔はほぼ 1 年と考えられているので、巨視的にみればこれまでの結果を追認するものであった。しかし、測定年齢を個々に詳しくみると、第 7 齢から第 9 齢と成長するにつれて測定年齢が小さくなっていることから、各齢の脱皮時期および脱皮間隔が異なっている可能性も推察される。

第 11～13 齢雄 12 個体の外骨格年齢はいずれも 1.19 年以下であった(表 5)。この年齢を基に、個々の個体の脱皮時期を遡って求めると、第 10 齢は 1～3 月、第 11 齢は 11～2 月、第 12 齢は 7～10 月となり(表 6)、既往の研究で報告されているいずれの脱皮齢も 7～11 月という時期とは第 10 齢と第 11 齢で異なっていた。また、各脱皮齢の脱皮時期から推定される脱皮間隔は第 11 齢が 1 年、第 12 齢が 1.5 年となり(表 6)、既往の研究結果でいずれの脱皮齢も 1 年という期間とは第 12 齢で異なっていた。

表 4 第 7～10 齢の外骨格年齢

脱皮齢 (甲幅mm)	雌雄	外骨格年齢
7	♀	1.65
(27-28)	♂	1.52
8	♀	0.97
(36-37)	♂	1.25
9	♀	0.67
(49-50)	♂	0.82
10	♀	1.04
(66-67)	♂	0.86

今回の研究では、最終脱皮後の生存期間が 2 年を超えていることから、最終齢である雌の第 11 齢及び雄の第 13

齢の外骨格年齢を本手法では求めることができなかったが、第 7～12 齢までは求めることができた。その結果、第 7～12 齢までの脱皮間隔は既往の研究結果と若干異なる部分もあったが、概ね一致していた。第 6 齢以下の脱皮時期や脱皮間隔は本研究を継続すれば推定でき、年齢を明かにできると考えられた。また、本手法は他の大型甲殻類についても応用が可能緒であると考えられた。

表 5 第 11～13 齢雄の外骨格年齢

脱皮齢	検 体	外骨格年齢
11	硬ガニ	A 0.82
		B 1.14
		C 0.67
12	硬ガニ	D 0.85
		E 0.77
		F 0.85
		G 0.99
	二重ガニ	H 1.19
		I 1.28
		J 1.61
13	水ガニ	K 1.18
		L 0.35
		M 0.51
		N 0.32

表 6 第 10～12 齢雄の脱皮時期と脱皮間隔

	脱皮齢	今回の研究	既往の研究
脱皮時期 (月)	10	1～3	7～11
	11	11～2	7～11
	12	7～12	7～11
脱皮間隔 (年)	11	1	1
	12	1.5	1