

## 微量培養細胞試料に対する定量分析法の開発

世良耕一郎<sup>1</sup>、後藤祥子<sup>2</sup>、細川貴子<sup>2</sup>、齊藤義弘<sup>2</sup>、長嶺竹明<sup>3</sup>

<sup>1</sup> 岩手医科大学医歯薬総合研究所高エネルギー医学研究部門（サイクロトロンセンター）  
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

<sup>2</sup> 日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター  
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

<sup>3</sup> 群馬大学大学院保健科学教室  
371-8514 群馬県前橋市昭和町 3-39-22

### 1 はじめに

生命科学の分野では、培養細胞試料に対する定量分析の需要が高まっている<sup>1,4</sup>。しかしその最適な手法は未だに確立されていない。例えば培養フラスコからの細胞の剥がし方にも種々の方法がある。その中で最も一般的な方法は、トリプシンと PBS (phosphate buffered saline) を用い採取する方法である。その場合、細胞が損傷することなくその数を正確に数えられるが、トリプシン・PBS に含まれる P、Na、Cl などの元素が不純物となり分析の精度・感度に大きな影響を与える。一方、それらを使用せずスクレイパーで細胞を機械的に剥がす場合、不純物元素の影響はなくなるものの、細胞はある程度損傷し正確な数を数えることが難しくなる。このように、フラスコからの細胞の剥離方法そのものが、その後の分析方法の選択にも深く関係する。

試料調製法としては、我々は多くの生命科学試料に対し硝酸灰化・内部標準法<sup>5,6</sup>を用いており、培養細胞にも同法を適用してきた<sup>7,8</sup>。しかし内部標準法適用には試料の秤量が前提となるが、培養細胞の量が秤量不能なほど少ない場合も多い。一方、我々が開発を行ってきた「無標準法」は試料の秤量を前提としないため、極微量の生物試料の定量分析が可能となる<sup>9,10</sup>。我々は超微小生物試料に対する定量分析法の開発を進め、1 μg 程度の超微小試料の定量分析を可能とし、報告を行った<sup>11,12</sup>。その方法を適用すれば、理論的には数千個の細胞で定量分析が可能となることが期待されるが、そのような少量の細胞の場合、個数は数えられても秤量は不可能であるため通常の内標準法は適用できず、細胞一個あたりの元素量を求めることのみが可能となる。

本研究においては、まず細胞数あたりの元素量を求める内部標準法を確立し、次の段階として細胞の重量あたりの元素濃度を求める無標準法を開発する。それと同時に、細胞のフラスコからの剥離法を含む最適な試料調製法を確立する。特に不純物を含むトリプシンや PBS を用いずに調製を行う方法の開発を目指す。それら不純物の存在は、元素濃度に影響を与えるだけではな

く、それらの元素から大量に発生する連続 X 線がスペクトルの形状にも影響を与え、それが無標準法の適用にも制約を与えることが予想されるためである。

## 2 実験方法

### 2.1 培養細胞

フラスコで培養された TRL1215 細胞 (epithelial-like liver cell normally nontumorigenic)<sup>13</sup> が、内部標準法、無標準法の開発のために使用された。これを用いた理由の一つは、著者の一人である長嶺がこの細胞に対しマイクロビーム PIXE を用いた研究を行っていたためである。HeLa 細胞<sup>14</sup> は確立された無標準法の精度確認・有効性確認のために用いられた。He 細胞<sup>15</sup> (normal human fetal hepatocytes) は、主に最適な試料調製法開発のために用いられた。これらの中で TRL1215 細胞は、もともと Fischer 344 ラット (Idoine et al., 1976)<sup>13</sup> の新生児から取り出されたものである。一方 HeLa 細胞は頸部上皮腺癌の系統であり (ATCC number: CCL-2)<sup>14</sup>、形質転換されておらず、しばしばヒト肝細胞モデルとして使用される。

### 2.2 培養細胞の剥離と調製

フラスコで培養された TRL1215 細胞と HeLa 細胞はトリプシンを加え剥離し(1 フラスコ当たり 5 cc のトリプシン原液を添加)、プラスチックチューブに採取された。細胞数を数えた後、PBS 溶液で希釈し遠心分離機にかけられ遠沈された。さらに、超音波破碎により均一化され、1cc あたりの細胞数の違いにより 2 種の溶液が作成された。最終的な細胞数濃度は  $2.0 \times 10^6/0.5$  mL (溶液 A) 及び  $1.2 \times 10^7/0.6$  mL (溶液 B) である。B の細胞数濃度は A の 5 倍となった。

無標準法のターゲットは、これらの溶液を  $5 \mu\text{L}$  ほど  $4 \mu\text{m}$  厚の prolene フィルム上に滴下し、クリーンベンチの中で乾燥させ作成された。一方内部標準法のターゲットは、これらの溶液に  $10 \mu\text{g/mL}$  の In 標準液を加えた後、同様の操作で製作された。HeLa 細胞に関しては、無標準法のターゲットのみが作成された。

### 2.3 照射・測定条件

島津製作所小型サイクロトロンより引き出された 2.9 MeV の陽子ビームは、2 組の三連 Q magnet、steering magnet などでその位置・形状を調整され、真空散乱槽に導入される。発生した X 線は、2 台の Si (Li) 検出器により同時に測定される<sup>16</sup>。検出器 1 には  $300 \mu\text{m}$  Mylar 膜の X 線吸収体を装着し K、Ca から重元素までの測定が行われ、検出器 2 には計数率を調整するためのグラファイト製 X 線コリメータ ( $1.5 \text{ mm}\phi$ ) が装着され、Na~Ca までの軽元素測定が行われた。ビーム径は  $5 \text{ mm}\phi$ 、平均的ビーム電流及び測定時間は  $30 \text{ nA}$ 、5~8 分であった。

Fig. 1 に TRL1215 細胞 (B) のスペクトルを例として示す。図中には、電流値で規格化した  $4 \mu\text{m}$  prolene フィルムのブランクスペクトル、及びそれを差し引いた試料からの正味のスペクトルが合わせて示されている。

## 3 培養細胞試料に対する無標準法

培養細胞試料に対する無標準法の手順はほぼ血清試料<sup>10</sup> 及び他の生物試料<sup>17-21</sup> に対するものと同様である。試料内の平均原子番号がほぼ同一であれば、連続 X 線スペクトルの形状も不変であるため、基本的な考え方はそのまま適用可能である。Fig. 2 には、培養細胞 (TRL1215 細胞) に対する無標準法の手順を示す。まず  $4.3\sim 5.7 \text{ keV}$  の領域内の全てのピーク収量を差し引き、連続 X 線の収量  $Y_{\text{cx}}$  を求める。図中の斜線部の面積がそれに相当する。人・小実験動物・家畜から採取された血清を含む種々の体液試料の場合<sup>10, 19, 21</sup> には以下の手順で求められる。まず上記連続 X 線収量  $Y_{\text{cx}}$  に対する指標元素 K の収量の比  $R_{\text{K}}=Y_{\text{K}}/Y_{\text{cx}}$  を求める。K の濃度  $C_{\text{K}}$  は  $C_{\text{K}}=K_{\text{K}} \cdot R_{\text{K}}$  から求められる。ここで  $K_{\text{K}}$  は  $R_{\text{K}}$  から指標元素濃度  $C_{\text{K}}$  を求める変換係数であり、それは以

下の手順で求められる。複数(8枚ほど)のターゲットに対し  $R_K$  を求めその平均値  $R_{KA}$  を得る。また、同一の試料原液に対し調製された内部標準を加えたターゲットを同数枚ほど用意し、それらを測定することにより  $C_K$  の平均値  $C_{KA}$  を得る。 $K_K = C_{KA}/R_{KA}$  より、変換係数  $K_K$  が決定される。ここで CRL1215 細胞に対しては多量の培養細胞が得られ秤量が可能であったため、 $C_K$  は細胞数に対する元素重量ではなく、試料の重量濃度で求めることが可能であった。他の元素に対する重量濃度は、K を内部標準とみなし、X線発生断面積<sup>22,23</sup>、吸収体の透過率<sup>24</sup>、検出効率<sup>25</sup>を考慮し内部・外部標準法と同様に求めることができる。

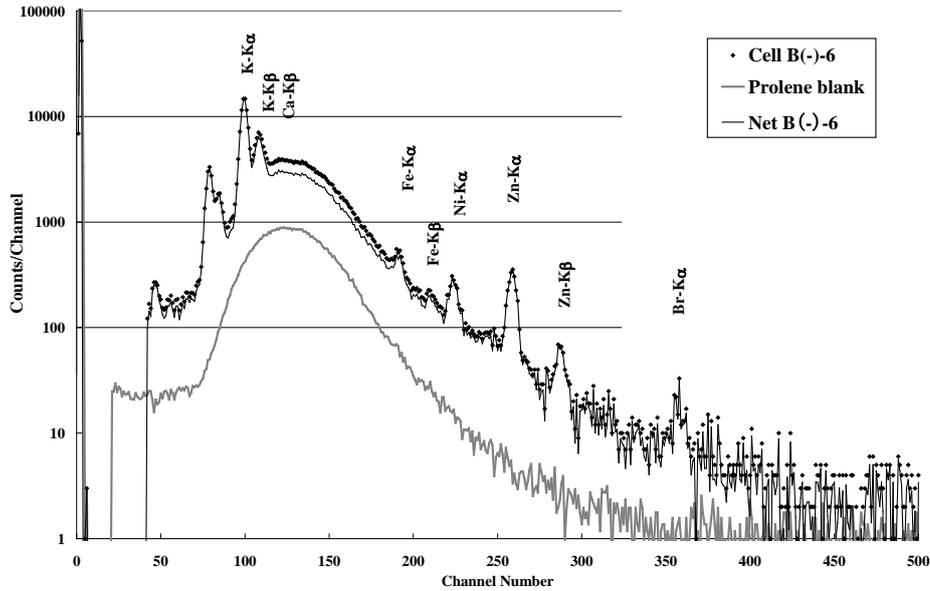


Fig 1 Typical X-ray spectrum obtained by irradiating TRL1215 cells (B), where a normalized blank spectrum and the net spectrum after subtraction are also shown.

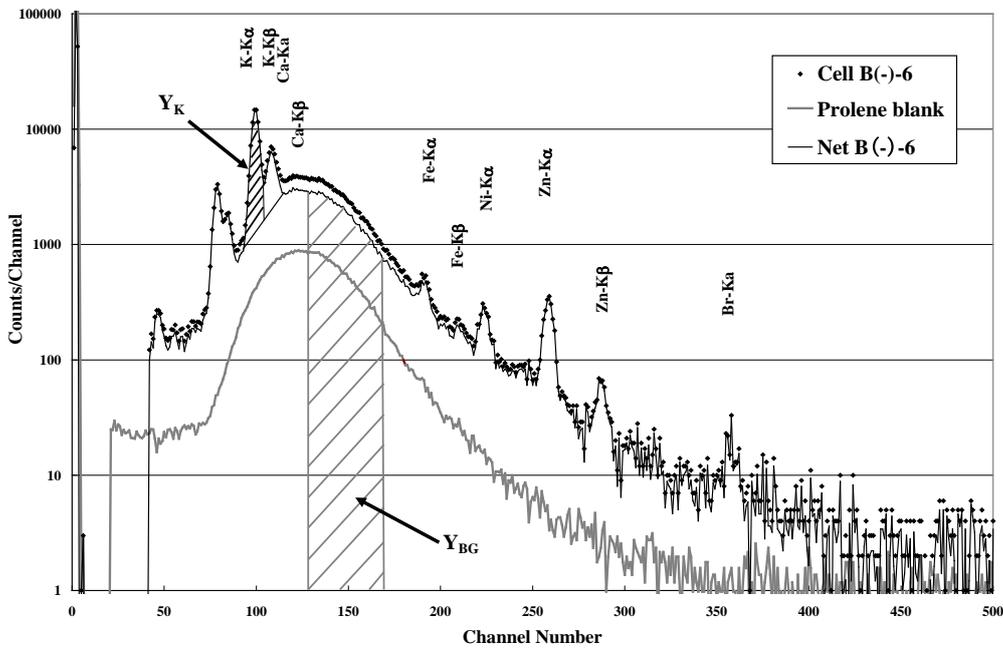


Fig 2 Procedure for the standard-free method for cultured cell samples. All peak functions are subtracted from the spectrum in the region between 4.3-5.7 keV indicated by the shaded portion and the total yield of continuous X-rays  $Y_{cx}$  is obtained. Potassium was designated as an index element.

しかしトリプシンを使用した場合、乾燥後に残存するトリプシンからの連続 X 線の寄与が大きく、それが無標準法の結果に影響を与えることが分かった。それは、TRL1215 細胞の溶液 A と B の比較において、単にバックグランドからの連続 X 線を差し引いただけでは矛盾が生じるという事実から確認できた。試算の結果、滴下した 5  $\mu$ L の溶液の中には 3.5 mg ものトリプシンが残存していることが分かった。それを仮定し、その分の寄与を差し引き正味の連続 X 線収量を求めた結果、細胞濃度の異なる試料に対し、同一の K 濃度が得られることが確認された。

Fig. 3 には、TRL1215 溶液 B に対し 8 枚の無調製ターゲットが作成され無標準法により求めた K 濃度を、内部標準法に基づき作成された 8 枚のターゲットにより求めた K 濃度の平均値と比較して示す。図中には、内部標準法の 8 枚のターゲットに対する平均値とその標準偏差の値も示されている。Fig. 4 には、溶液 B よりも 5 倍濃度の低い溶液 A に対する結果を示す。無標準法の結果に対する実験誤差は 5-8%と見積もられ、内訳は統計誤差を反映する fitting 誤差が 3-6%、300  $\mu$ m Mylar 吸収体中の透過率に対する誤差がおよそ 2%、検出効率に対する誤差がおよそ 3%であり、後二者は X 線エネルギーの関数である。一方、内部標準法の結果に対する誤差は最大で 6%程度である。これらの図から確認できるように、無標準法により求められた K 濃度は実験誤差や標準偏差の範囲内で内部標準法の結果と一致している。

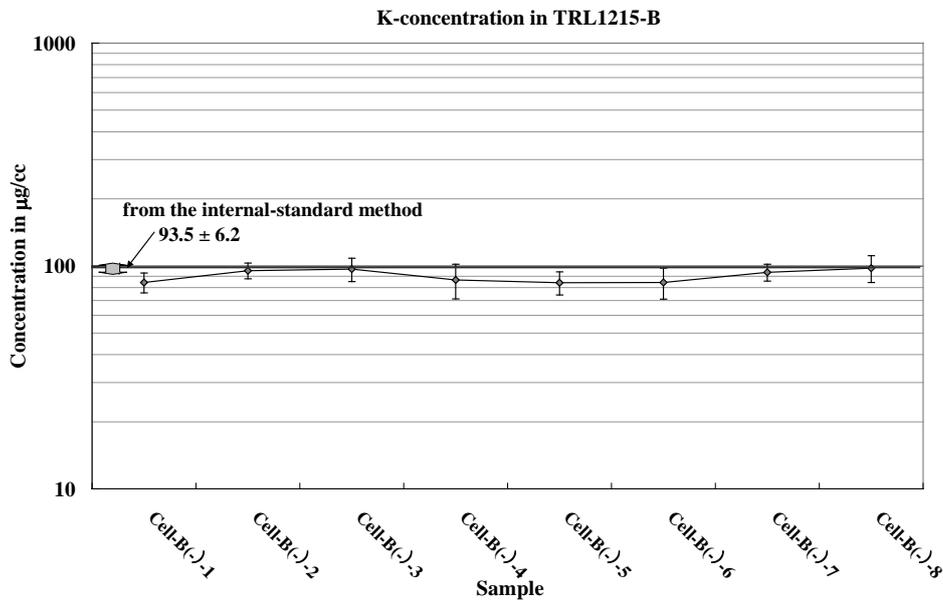


Fig. 3 Comparisons of the potassium concentrations for eight targets of TRL1215-B obtained by the standard-free method and that obtained by the internal-standard method.

上述のように、TRL1215 細胞の起源はラット肝細胞である。我々は以前から、実験用ラット肝組織の分析を行い、百数十試料の分析データが蓄積されている<sup>26</sup>。それらの結果を調べたところ、ラット肝組織中の K 濃度は全て 1900 ppm から 13000 ppm の間に存在している。通常の肝細胞 1 個の重量が 1 ng と仮定し、これらの溶液中の細胞数密度から濃度を換算すれば、今回得られた値は溶液 A、B とともにその範囲に含まれており、肝組織の結果と矛盾のない結果が得られたことが確認された。

無標準法の他の細胞に対する有効性を確認するため、HeLa 細胞においても同様の比較を行った。上述のように HeLa 細胞の培養量は少なく秤量は困難であったため、内部標準法においては細胞数密度の情報のみが得られることになる。Fig. 4 に結果を示すが、TRL1215 細胞に対して開発された無標準法の結果は、当然のことながら内部標準法の結果とは矛盾を示している。し

かし顕微鏡を用いた観察によれば、HeLa 細胞は TRL1215 細胞と比べ長径で 30%近く大きい。そのため細胞 1 個の質量もそれに応じ重いものと推測される。HeLa 細胞が TRL1215 細胞と比べ質量が 2 倍だと仮定しその分の補正を行うと、図に示すように両法の結果はほぼ一致する。

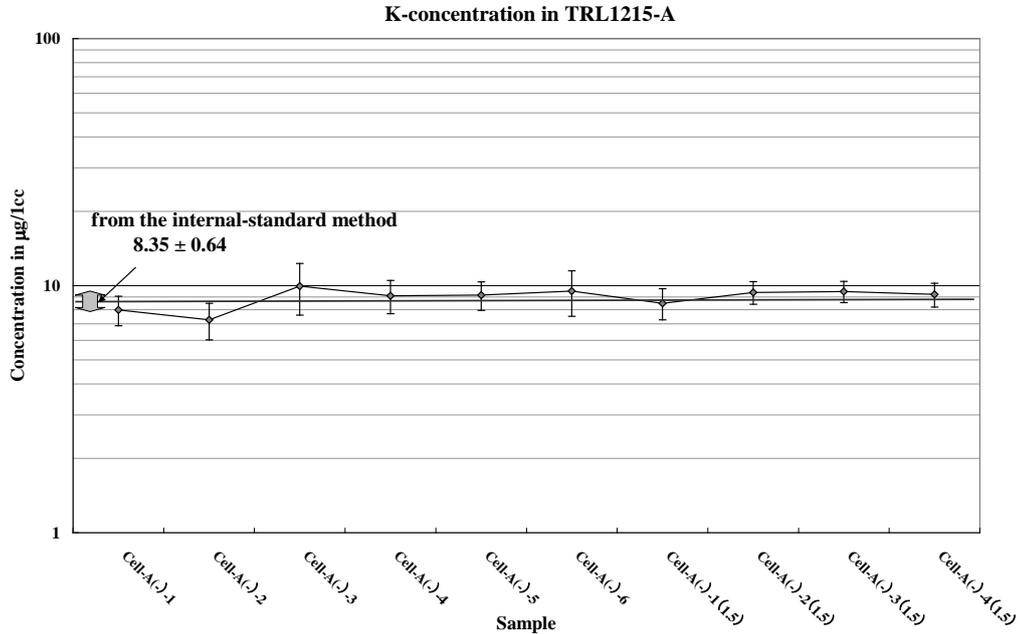


Fig. 4 Same comparisons as in Fig. 3 but for ten targets of TRL1215-A.

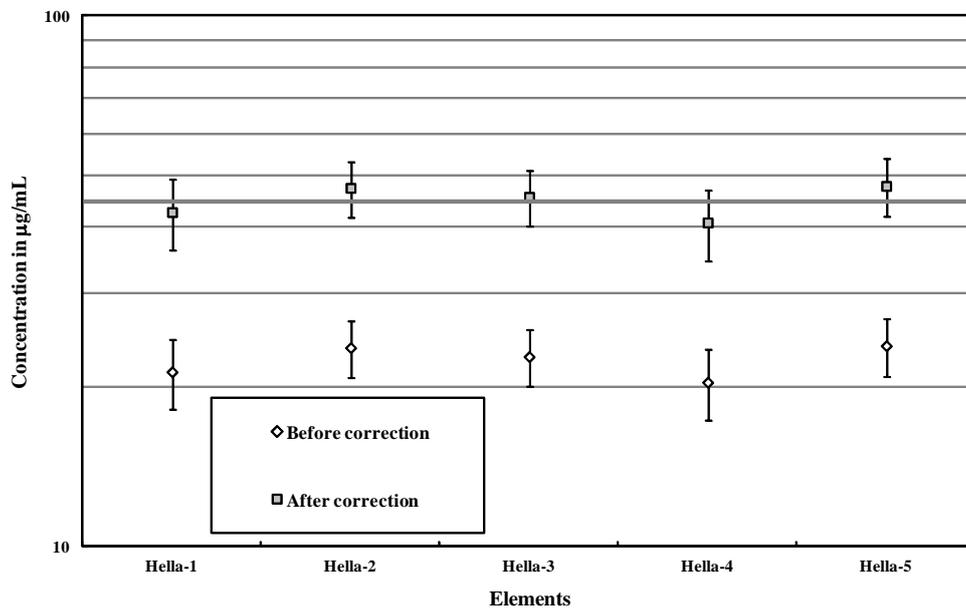


Fig. 5 Comparisons of the potassium concentrations for five targets of HeLa cells obtained by the standard-free method and that by the internal-standard method. Assuming that the average weight of HeLa cells is two times higher than that of TRL1215 cells, values obtained by the two methods show in good agreement.

### 3 結果と議論

Fig. 6 に TRL1215 細胞溶液 B の 8 ターゲットに対する結果を示す。濃度は  $2 \times 10^7$  cells/mL の溶液に対し  $\mu\text{g/mL}$  の単位で求められている。図に示されるように、ほぼ全ターゲットから 26 元素が検出されている。Fig. 7 には同様の結果を溶液 A ( $4 \times 10^6$  cells/mL) に対して示す。

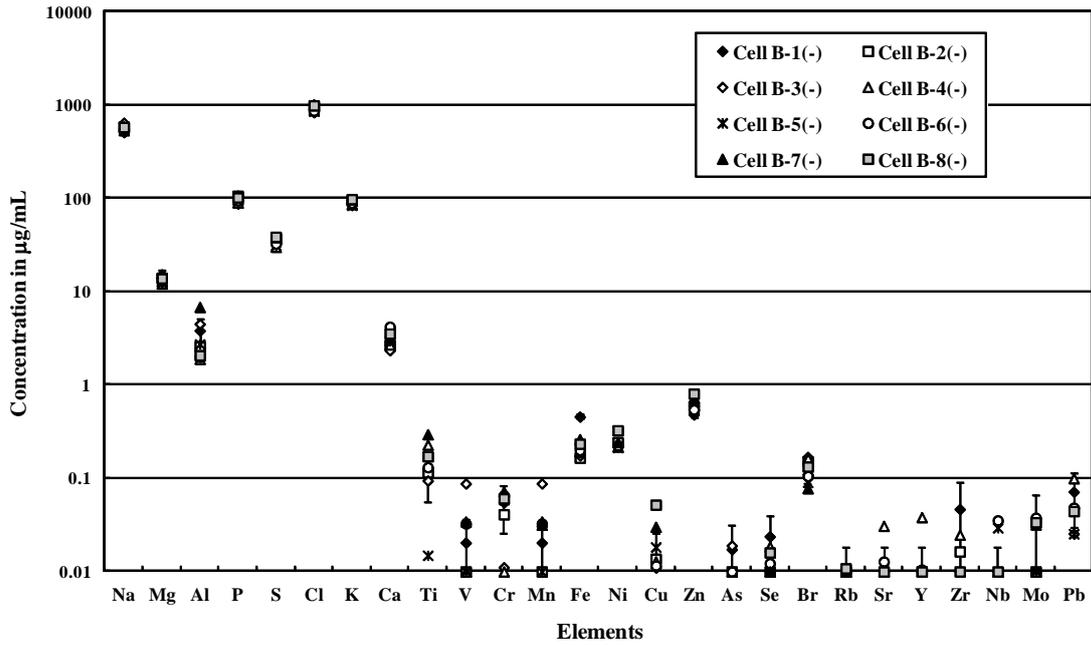


Fig. 6 Elemental concentration in TRL1215 cells (B)..

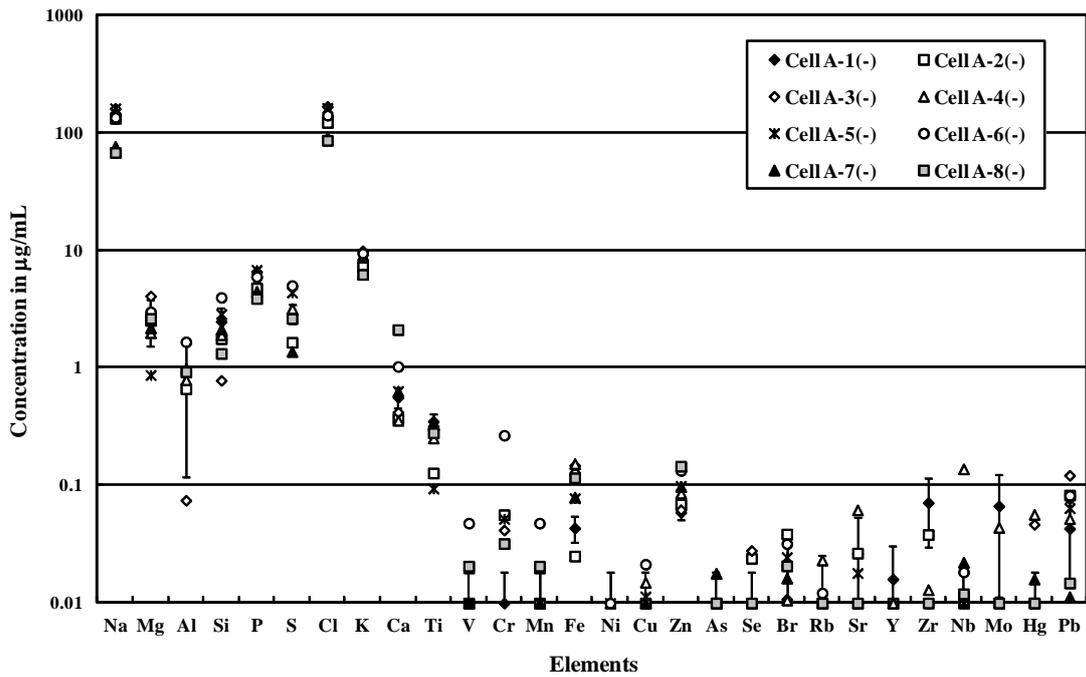


Fig. 7 Same as Fig. 5 but for TRL1215 cells (A).

Fig. 8には Fig. 1と同様のTRL1215細胞のスペクトルを示すが、Fig. 1の溶液Bよりも細胞数密度が5倍薄い溶液Aに対するものである。図中にはクーロン数で規格化された4 µm prolene バックリングからのスペクトルと、それをraw spectrumから差し引いたnet spectrumも示されているが、全領域にわたりBG spectrumの収量がnet spectrumのそれを上回り、差し引に伴う誤差が大きいことが分かる。このことから、さらに薄いバックリング膜を用いることにより分析の精度・感度が改善されることが期待される。そこで1.5 µm Mylarを用い、溶液Bに対

して同様のスペクトルを得た。このバックリング膜は Ca、Si などの不純物を多く含むことから通常の測定には用いられていないが、それら以外の元素に対しては有効である。そのスペクトルを Fig. 9 に示す。

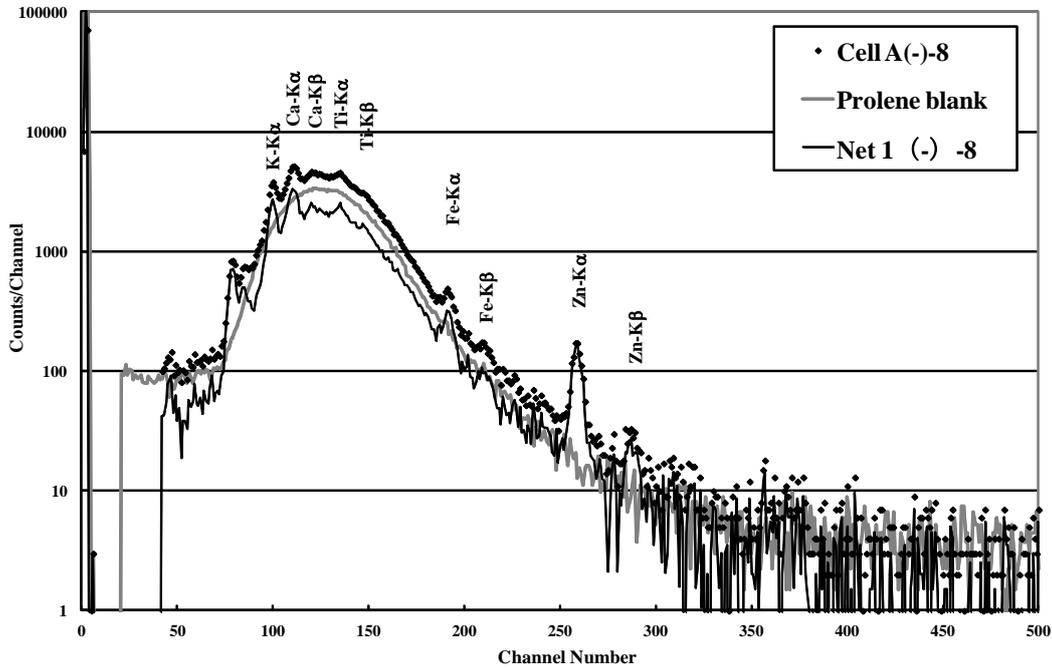


Fig. 8 Same spectrum as in Fig. 1 but for TRL1215 cells (A) whose cell density is one tenth that of (B).

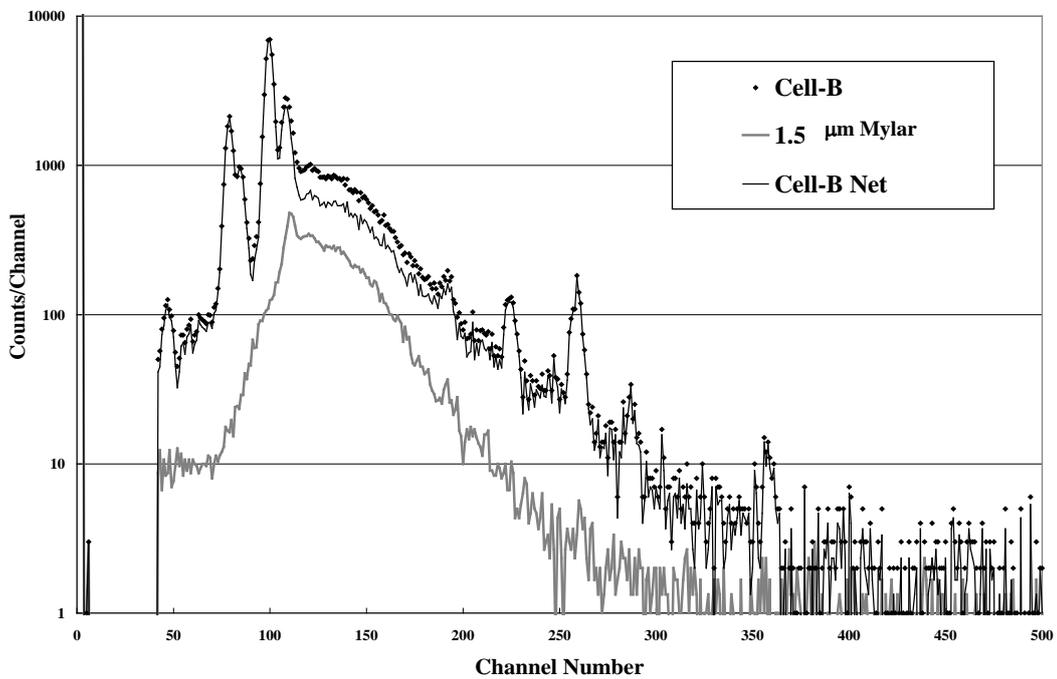


Fig. 9 Same as Fig. 8 but for using a 1.5  $\mu\text{m}$ -thick Mylar film as a backing.

図に見られるように、Fig. 1 と比べ S/N 比は著しく改善され、分析の感度が向上していることが分かる。強度的には 1  $\mu\text{m}$  の厚さがあれば十分であり、不純物の少ないバックリング膜を選択

することにより分析感度は確実に向上することが分った。

より薄く不純物の少ないバックリング膜の選択により分析の感度が向上することは、検出器 2 による軽元素スペクトルでも確認することができる。Fig. 10 に TRL1215 細胞の溶液 A・B に対する 1.5  $\mu\text{m}$  Mylar を用いた軽元素スペクトルを示す。細胞数密度の小さい溶液 A においても十分な感度で分析可能なことが確認できる。

Fig. 11 には、細胞のフラスコからの剥離に用いるトリプシン原液の分析結果を示す。図に見られるように、NaCl をはじめ多くの元素の不純物が高濃度で存在し、それが分析結果に影響を与える恐れがある。トリプシンは遠沈によりかなりの部分を取り除かれると思われるが、乾燥後も残存し、そのトリプシンから発生する連続 X 線が無標準法の結果にも大きく影響を与えることが推測される。

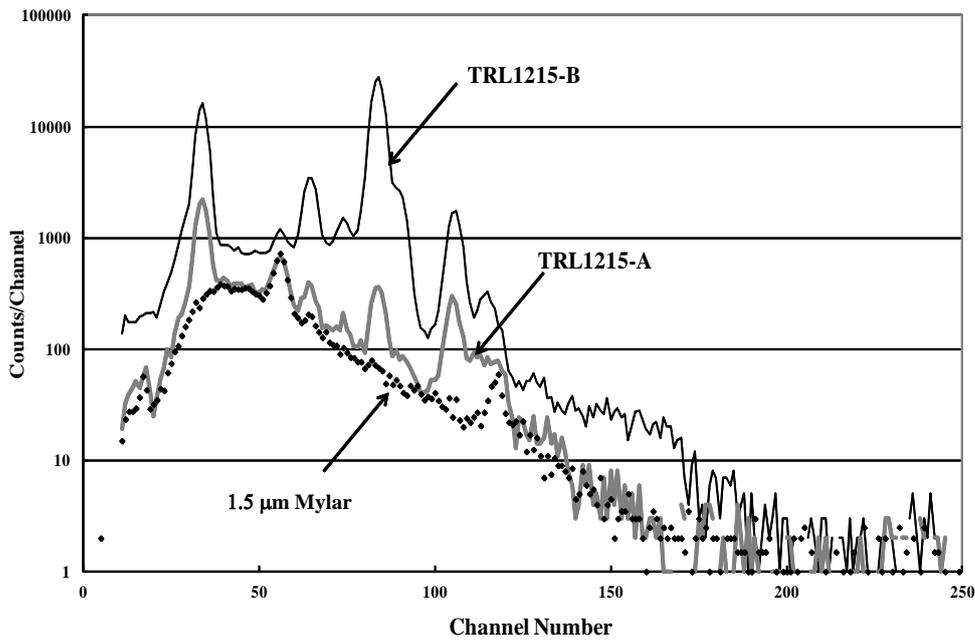


Fig. 10 Same as Fig. 9 but for the spectra at low energies obtained without absorber.

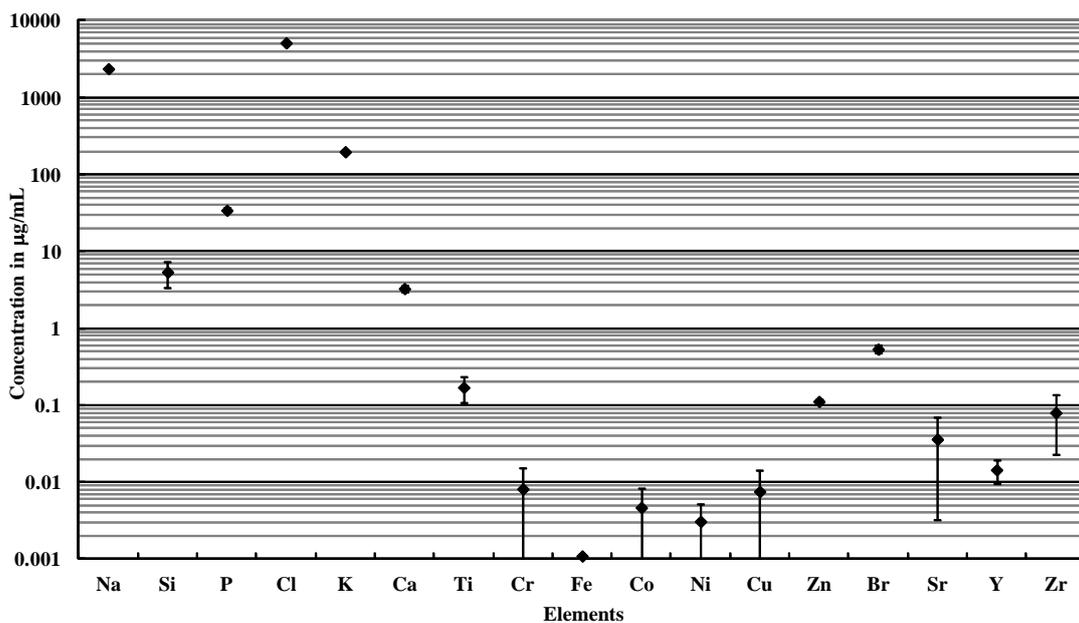


Fig. 11 Elemental concentration in trypsin.

上述のように、トリプシンは乾燥後もターゲット中に残存し、元素分析に大きな影響を与える。そのため我々は、トリプシンを用いずに培養細胞を剥離する方法を Hc 細胞に対して試みた。その手順は以下のとおりである。

- ① 培養細胞にはトリプシンを加えず、スクレイパーを用いてフラスコから剥離する。
- ② 採取した細胞を遠沈し上澄みを捨て残りの試料に生食を加え希釈する。
- ③ ピペッティングにより一部を採取し、細胞数を数える。
- ④ 再び遠沈し蒸留水を加え希釈し、1 mL 中の細胞数を計算する。
- ⑤ 最終的に超音波破碎により完全に均一化する。

この処理過程の間、トリプシンは一切用いない。この調製法に基づき得られた溶液の細胞数密度は、 $3.9 \times 10^5 / 1 \text{ mL}$  である。Fig. 12、13 には、それぞれ検出器 1 により 300  $\mu\text{m}$  Mylar 吸収体を用いて得られた重元素スペクトル、吸収体なしで検出器 2 により得られた軽元素スペクトルを示す。図から明らかなように、生食中の NaCl がスペクトルの形状、S/N 比に大きく影響を与え、それが分析感度ばかりではなく無標準法の精度も悪化させている。それは、C・H・O・N 以上の重元素の軌道電子速度分布の違いが、連続 X 線の形状に影響し、試料の平均原子番号が高くなると、連続 X 線の endpoint が高エネルギー側に大きく張り出すためである<sup>27</sup>。

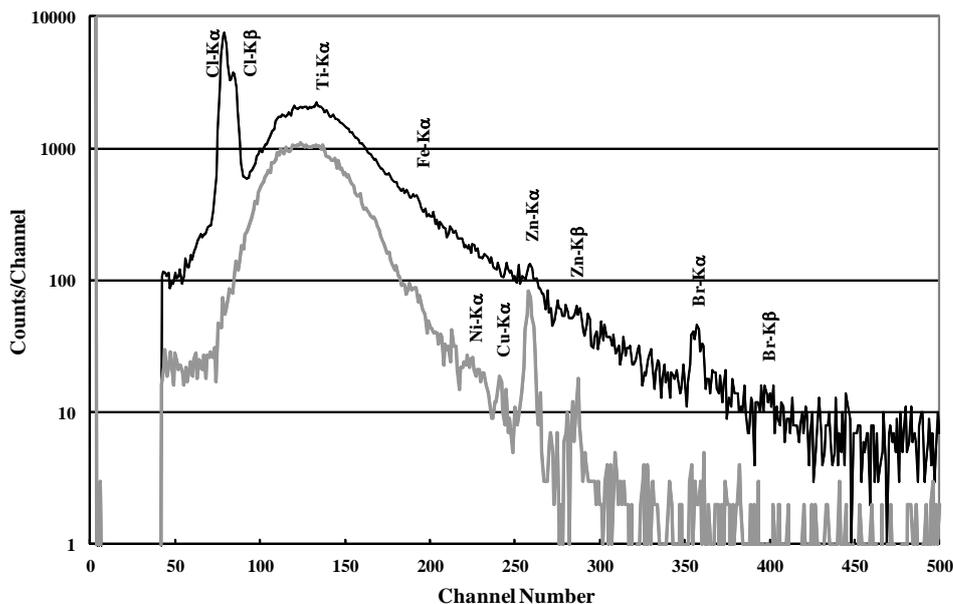


Fig. 12 X-ray spectra for Hc cells obtained with a 300  $\mu\text{m}$ -thick Mylar absorber for the samples removed from a flask with (black line) and without (gray line) using PBS

これらの図からわかるように Hc 細胞中にはカリウムが殆ど存在しない。そのため新たに安定して存在する亜鉛を指標元素とし、無標準法を適用することとした。Zn に対する変換係数は、K に対する変換係数より、X 線発生断面積の理論値<sup>22,23</sup>から計算で求めることができる。無標準法により得られた Zn の値は、内部標準法により得られた値と実験誤差範囲内で一致することが確認された。Fig. 14 には、Hc 細胞中の元素濃度を示す。これらの元素濃度値は、8 枚のターゲットの平均値であり、誤差棒はその標準偏差を示す。図に見られるように、すべてのターゲットから 21 元素が検出されている。

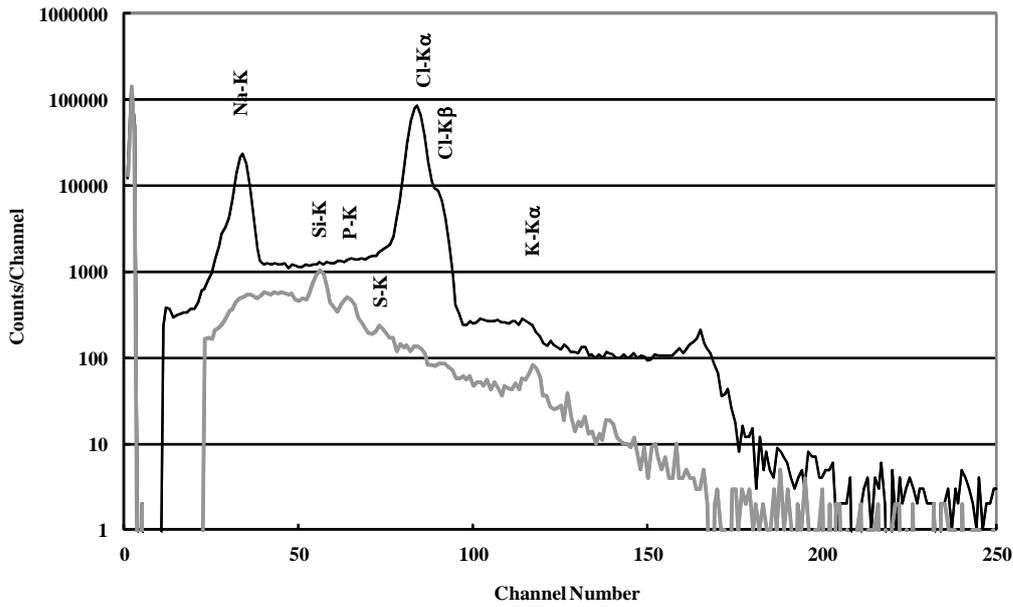


Fig. 13 Same as Fig. 12 but for the spectra obtained without X-ray absorber (Det. 2)

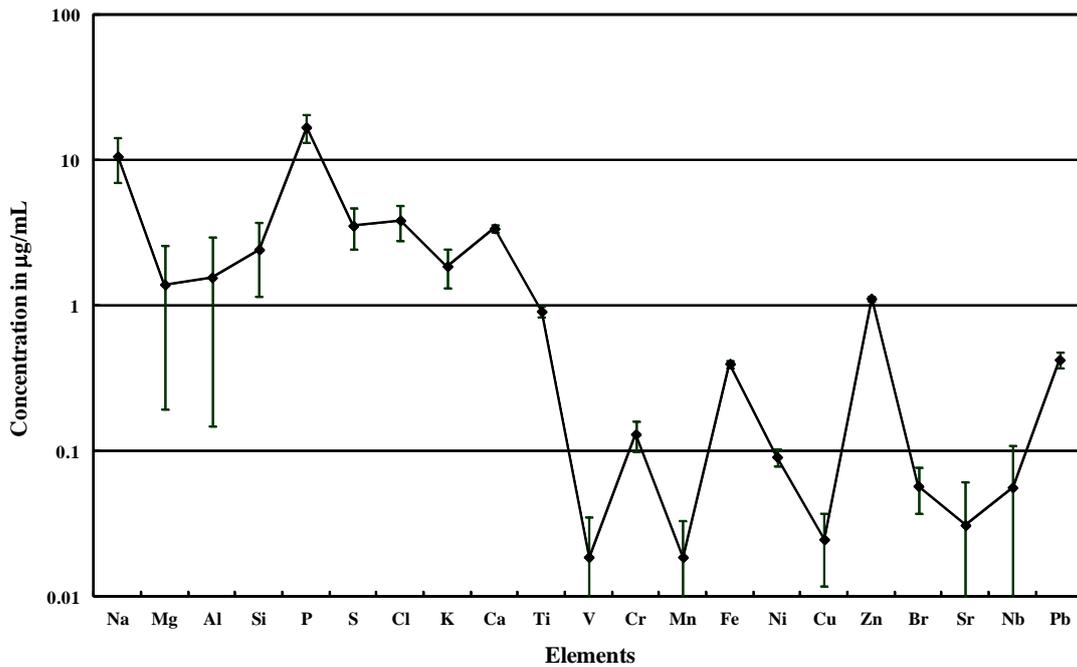


Fig. 14 Elemental concentration (µg/mL) in Hc cells obtained by the standard-free method.

TRL1215 細胞の結果から、ターゲット上に 20000 個の細胞があれば高感度分析が可能であることが確認された。Fig. 8, 9 から分かるように、バックグ膜が薄ければ薄いほど分析の精度・感度が向上する。我々は昨年、1 µg ほどの超微量生物試料に対する無調製・無標準法を開発し、その中で糸状の細いバックグを開発した<sup>11, 12</sup>。試算によれば、0.5 µm ほどのバックグ膜が得られれば 2000 個の細胞試料に対し高感度・高精度の分析が可能となる。Formvar や polycarbonate 膜を自作することを含め、今後より薄く不純物の少ないバックグを模索し、細胞試料に対する分析の感度・精度を上げていきたいと考えている。

## 謝辞

共同利用の運営に携わる他の岩手医科大学サイクロトロンセンター、日本アイソトープ協会  
仁科記念サイクロトロンセンターのスタッフの方々に謝意を表します。

## 参考文献

1. N. Tanaka, H. Kimura, A. Faried, M. Sakai, A. Sano, T. Inose, M. Sohda, K. Okada, M. Nakajima, T. Miyazaki, M. Fukuchi, H. Kato, T. Asao, H. Kuwano, T. Satoh, M. Oikawa, T. Kamiya, and K. Arakawa, "Quantitative analysis of cisplatin sensitivity of human esophageal squamous cancer cell lines using in-air micro-PIXE.", *Cancer Sci.*, **101**(6), 1487-92 (2010)
2. J. Huang, H. Yao, X. Wu, R. Lu, Y. Gu, J. Zhu, J. Zhang, P. Hyang, B. Wu, Y. Xiao, and Z. Chao, "Study of Trace Elements in Cells Using SPM, SR-XRM and PIXE.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. **5**-1, 1-9 (1995)
3. H. Khodja, M. Carrière, L. Avoscan, and B. Gouget, "Heavy Metals Toxicity after Acute Exposure of Cultured Renal Cells: Intracellular Accumulation and Repartition.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. **15**-3, 4, 89-94 (2005)
4. K. Mizuma, K. Ishii, Y. Barbotteau, S. Abe, H. Yamazaki, S. Matsuyama, E. Sakurai, K. Yanai, T. Kamiya, T. Sakai, T. Satoh, M. Oikawa, and K. Arakawa, "The Elemental Analysis of IgE-Sensitized RBL-2H3 Cells Using In-Air Micro-PIXE", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. **14**-1, 2, 27-33 (2004)
5. S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh, and K. Sera, "Present Status of NMCC and Sample Preparation Method of Bio-Samples.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. **3**-4, 319-328 (1993)
6. ニッ川章二、畠山智、斎藤義弘、世良耕一郎、"PIXE 試料調整法の検討"、NMCC 共同利用研究成果報文集、第一巻、70-81 (1993)
7. S. Wada, M. Sudo, S. Tamura, T. Kakizaki, K. Sera and N. Itoh, "Analysis of the Lethal Effects of Low-Dose Radiation on Glioma cells.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. **21**-1, 2, 47-54 (2011)
8. 田村咲子、須藤繭子、和田成一、柿崎竹彦、伊藤じゅん、世良耕一郎、伊藤伸彦、"グリオーマにおける低線量放射線照射による細胞致死効果の解析 -バイスタンダー効果と微量元素との関連-"、NMCC共同利用研究成果報文集 第十四巻、144-149 (2008)
9. K. Sera, S. Futatsugawa, K. Matsuda and Y. Miura, "Standard-free method of quantitative analysis for bio-samples", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. **6**, No.3, 4, 467-481 (1996)
10. K. Sera, S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh and K. Matsuda., "Quantitative Analysis of Bio-medical Samples of Very Small Quantities by the Standard-free Method.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. **7**-3,4, 157-169 (1997)
11. K. Sera, S. Goto, C. Takahashi, Y. Saitoh, K. Kinoshita and M. Matsumasa, "Quantitative Analysis of Small Bio-Samples of Nearly 1  $\mu\text{g}$ .", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. **14**-3,4, (2014) (in press)
12. 世良耕一郎、後藤祥子、高橋千衣子、齋藤義弘、木下今日子、松政正俊、"1  $\mu\text{g}$  ほどの微小生物試料に対する定量分析法の開発"、本 NMCC 共同利用研究成果報、第 20 巻 (掲載予定)
13. J. Idoine, J. Elliott, M. Wilson, and E. Weisburger, ".Rat liver cells in culture: effect of storage, long-term culture, and transformation on some enzyme levels.", *In Vitro*. Vol. **12** (8), 541-53, (1976)
14. R. Rajesh, and M., Annappan, "Anticancer Effects of Brominated Indole Alkaloid Eudistomin H from Marine Ascidian Eudistoma viride Against Cervical Cancer Cells (HeLa).", *Anticancer Res.*, **35**(1), 283-93 (2015)
15. Y. Osawa, M. Nagaki, Y. Banno, D. Brenner, T. Asano, Y. Nozawa, H. Moriwaki, and S. Nakashima, "Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 production via NF-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes.", *Infect Immun.*, Vol. **70** (11) 294-301 (2002)

16. K. Sera, T. Yanagisawa, H. Tsunoda, S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh, S. Suzuki and H. Orihara., "Bio-PIXE at the Takizawa facility (Bio-PIXE with a baby cyclotron)", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. 2, No.3, 325-330 (1992)
17. K. Sera, S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh and K. Matsuda., "Quantitative Analysis of Untreated Bio-samples.", *Nucl. Instr. Meth.*, B 150, 226-233 (1999)
18. K. Sera, J. Itoh, S. Goto, Y. Saitoh, A. Fujimura, Y. Nosaka, Y. Noda, S. Nishizuka and G. Wakabayashi, "Quantitative Analysis of Very Small Quantity of Organs Taken from Patients and Experimental Animals; Standard-free Method for Organ Samples.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.18-3, 4, 111-122 (2008)
19. K. Sera, K. Terasaki, J. Itoh, Y. Saitoh, S. Futatsugawa and Y. Miura, "Standard-free Method for Body Fluid Samples such as Saliva, Sweat, Snivel and Tear.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.15-1,2, 47-57 (2005)
20. K. Sera, S. Futatsugawa and S. Murao, "Quantitative Analysis of Untreated Hair Samples for Monitoring Human Exposure to Heavy Metals.", *Nucl. Instr. Meth.*, B189, 174-179 (2002)
21. K. Sera, Y. Miura and S. Futatsugawa, "Application of a Standard-free Method to Quantitative Analysis of Urine Samples.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.11-3,4, 149-158 (2001)
22. W. Brandt, and G. Lapicki, "Energy-Loss Effect in Inner-shell Coulomb Ionization" by Heavy Charged Particles.", *Phys. Rev.* A23, 1717-1729, (1981)
23. K. Sera and S. Futatsugawa, "Personal Computer Aided Data Handling and Analysis for PIXE.", *Nucl. Instr. Meth.* B 109/110, 99-104 (1996)
24. K. Sera, S. Futatsugawa, S. Hatakeyama and Y. Saitou, "Determination of Physical Quantities for PIXE by Means of PIXE 1. Absorption Curve", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. 4-2, 3, 165-179 (1994)
25. K. Sera, S. Futatsugawa, and K. Matsuda, "Determination of Physical Quantities for PIXE by Means of PIXE 2 . Efficiency Curve", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. 4-2, 3, 181-191 (1994)
26. A. Ohta, G. Bu, T. Matsubayashi, H. Mihara, N. Nemoto, S. Miyazawa, K. Furukawa, T. Katou, E. Oda, K. Sera, S. Futatsugawa, and Y. Saitoh, "Differential Responses of Copper (I) and Copper (II) on Liver Copper Accumulation in the Long-Evans Cinnamon (LEC) Rats Studied by PIXE Determination.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.10-3,4, 155-160 (2000)
27. K. Ishii and S. Morita, "Continuous Background in PIXE.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.1-1, 1-29 (1990)

## Quantitative analysis of very small quantities of cultured cells

K. Sera<sup>1</sup>, S. Goto<sup>2</sup>, T. Hosokawa<sup>2</sup>, Y. Saitoh<sup>2</sup> and T. Nagamine<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Cyclotron Research Center, Iwate Medical University  
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

<sup>2</sup>Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association  
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

<sup>3</sup>Graduate School of Health Sciences, Gunma University  
3-39-22 Showa-machi, Mabashi, Gunma 371-8514, Japan

### Abstract

Methods of quantitative elemental analysis of very small quantity of cultured cells were developed. First of all, an internal-standard method for the solution containing cells whose density is more than  $1 \times 10^6$  cells / mL was established, and then a standard-free method for cultured cells was developed. It was confirmed that the method allows us to quantitatively analyze more than 25 elements in the samples containing only 20 thousand cells. Also, the methods for removing cultured cells from a flask were examined in order to improve accuracy and sensitivity of analysis, since the use of trypsin and PBS sometimes brings a large amount of sodium, phosphorus and potassium, which have direct effect upon accuracy of analysis based on the standard-free method. It was found that the method of removing cells with a scraper without using trypsin and PBS is the best manner. Also, the effects of using thinner backing materials were examined in order to improve sensitivity of analyses. It is expected that accurate analysis of samples containing nearly two thousand cells is possible on the basis of the standard-free method when using a thinner backing material.