

2.3 低線量率放射線に対する生理応答影響実験調査

2.3.1 造血系解析

2.3.1.1 造血幹細胞の変化と寿命との関連の予備的検討

Preliminary Experiment to Examine the Correlation between the Hematopoietic Stem Cell Changes and the Life Span

箭内 敬典, 小村 潤一郎, 田中 聡
生物影響研究部

Takanori YANAI, Jun-ichiro KOMURA, Satoshi TANAKA
Department of Radiobiology

Abstract

With the objective of clarifying whether the decrease in the number of hematopoietic stem cells (HSCs) after continuous radiation exposure is due to a direct effect (on hematopoietic stem cells) or an indirect effect via changes in the microenvironment in the bone marrow, we have planned to transplant irradiated hematopoietic stem cells and investigate their self-renewal capacity, differentiation ability and the mouse life span. Preliminary experiments are underway to collect baseline data on the effects of transplantation of irradiated hematopoietic stem cells on to non-irradiated mast cell-deficient WBB6F1-W/W^v mice by comparing their life span to wild type (+/+) mice. Recent results reveal a need to finely adjust the number of hematopoietic stem cells for successful transplantation onto WBB6F1-W/W^v mice.

1. 目的

「平成 16 年度低線量放射線細胞影響調査報告書」において、メスマウス (C3H/HeN 系統) に低線量率 (20 mGy/日) 放射線を集積線量 8 Gy (400 日間照射) まで連続照射すると造血幹細胞数が照射を終了した後においても回復が見られないことを報告した。原因として、①放射線照射により減少した末梢血中白血球数を補うために血球細胞を生産し続けたため幹細胞自身が枯渇あるいは老化し、照射終了後も回復出来ない、②造血幹細胞の育成・増殖を制御している造血環境 (造血ニッチ: 骨芽細胞、血管内皮細胞、ストロマ細胞など) が放射線照射により不可逆的な影響を受け、照射終了後も幹細胞を回復させることが出来ない、の 2 つの可能性が考えられた。

そこで、本解析では放射線照射による造血幹細胞数減少が幹細胞自身への直接影響のためなのか、あ

るいは造血環境の変化による間接的な影響なのかを分別することを目的とした実験を行い、造血幹細胞移植マウスの寿命、造血細胞の自己複製能・分化能等を指標として検討を行う。

本年度は、放射線照射なしに骨髓移植が可能な遺伝子突然変異マウス (WBB6F1-W/W^v) を導入し、造血 (幹) 細胞移植の実験条件を検討するための予備試験を開始した。また、W/W^v マウス及び+/+マウスの寿命を調べるために、無処置のマウスの飼育を開始し、移植実験に適した造血 (幹) 細胞数を決定するための検討実験を行った。

2. 方法

2.1 マウス

造血幹細胞の移植は、一般的に同系統のマウス間で可能であるが、移植前にホスト (造血幹細胞受容

マウス)の造血系を破壊するために致死線量の放射線照射を必要とする。しかし、この方法は移植されたドナー(造血幹細胞提供マウス)の骨髄造血幹細胞の数や造血能など短期的な影響を見ることは可能であるが、ホストマウスに放射線照射による白血病などの影響が生じるため長期的な影響を見るためには適さない。 W/W^v 突然変異マウスは造血幹細胞の増殖能に異常があり、若年で重度の貧血を起し短命である。しかし、造血環境は正常なため、健全な造血幹細胞を移植することによりホストの造血幹細胞はドナーマウスのものに完全に置換され、正常に造血ができるようになる。したがって、通常の造血幹細胞移植に必要な放射線照射が必要なく、ホストマウスに放射線照射影響が生じない状況での解析が可能である。これらの特徴から本解析には W/W^v 突然変異マウスを用いた。

2.2 W/W^v マウスの生産

W/W^v マウスを得るために SPF のオス WB- $W/+$ とメス C57BL/6- $W^v/+$ を日本 SLC より導入した。雌雄 4 匹ずつの群飼育を行い、繁殖時には雌雄各 1 匹ずつ 4 日間同居・交配を行った。仔マウスの誕生後 4 週間目に離乳し、毛色によって W/W^v 、 $W/+$ 、 $W^v/+$ 、 $+/+$ の 4 つの遺伝子型を区別し、それぞれ 4 匹ずつで群飼育し、10~12 週目に移植実験に使用した。

2.3 移植実験

移植実験に適した造血幹細胞数を決定するために、細胞数を変えて雌雄の W/W^v マウスに移植を行った。手順としてはまず、10~12 週齢の $+/+$ マウスを安楽死させ、大腿骨を無菌的に取り出し常法に従い骨髄を採取、骨髄細胞の懸濁液を得た。造血支持細

胞を除くために、1%馬血清(HS)添加 α -MEM 培地に骨髄細胞を再懸濁し、37°C で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、浮遊細胞をピペットで回収し、遠心器で細胞を集めた後に適量の培地に再懸濁し、常法に従いチュルク液で処理した後、血球計算盤を用いて細胞数を算定した。移植用の細胞数は $(0 \sim 1 \times 10^5 \text{ 個}/200 \mu\text{l}/\text{マウス})$ に調整した。

ホストマウスの造血系(末梢血)が移植した細胞に置き換わった事を確認できるように、ホストとドナーの性別をそれぞれ逆の組み合わせになるようにして、10~12 週齢の W/W^v マウスの尾静脈より注射器で細胞を注入したのち、SPF の環境下で飼育を行った。

3. 成果の概要

移植実験に適した造血幹細胞数の決定のための予備的検討により (Table 1)、移植後 14 週までは 1×10^3 個~ 1×10^5 個の移植数で死亡する個体が見られないことが確認された。しかし、本解析に用いる移植細胞数を決定するためには非移植のマウスが死亡する約 30 週以降まで飼育を継続する必要がある。

平成 28 年度は、高線量率急照射の影響を調べるために、高線量率急照射を行った $+/+$ マウスの骨髄細胞を W/W^v マウスに移植し、照射線量の違いによる影響の差を検索する実験を行う。また、低線量率連続照射の影響を調べるために、 $+/+$ マウスに対する低線量率放射線連続照射を開始する。

Table 1 Number of WBB6F1-W/W^y mice alive post-transplantation

Weeks post-transplantation	Number of transplanted HSCs/mouse			
	0	1×10 ³	1×10 ⁴	1×10 ⁵
0	7	8	7	7
1	7	8	7	7
2	7	8	7	7
3	5	8	7	7
4	5	8	7	7
5	5	8	7	7
6	5	8	7	7
7	5	8	7	7
8	5	8	7	7
9	5	8	7	7
10	5	8	7	7
11	5	8	7	7
12	5	8	7	7
13	5	8	7	7
14	5	8	7	7