

2.3.1.2 低線量率放射線がマウス骨髄に及ぼす影響を明らかにするための

実験手法の検討

Preliminary Experiments for Investigating the Effect(s) of Low Dose-rate Radiation in Murine Bone Marrow

廣内 篤久, 田中 聡, 田中 イグナシヤ, 小村 潤一郎
生物影響研究部

Tokuhisa HIROUCHI, Satoshi TANAKA, Ignacia TANAKA, Jun-ichiro KOMURA
Department of Radiobiology

Abstract

In a previous study, we showed that hematopoietic stem cells (HSCs) in the bone marrow were the most sensitive to whole body low dose-rate (LDR) radiation exposure. Gene expression analysis showed that the decrease in the number of HSCs by LDR irradiation was associated with alteration of biomolecules that control cell cycle and differentiation of HSCs, such as cytokines and hormones. The current investigation focuses on examining these alterations in the bone marrow cell microenvironment during and after LDR irradiation, and requires the preparation of fresh frozen bone marrow tissue sections using Kawamoto's method. Bone marrow tissue sections of femurs and humeri from healthy non-irradiated male C3H mice prepared by using Kawamoto's method were determined to be suitable for immunostaining. After several attempts, we were able to eliminate the autofluorescence produced by lipofuscin (a pigment that appears when mice age), using 3 commercially available reagents. Using these methods, we were able to locate the blood vessels thought to be key structures in the bone marrow microenvironment (niche).

1. 目的

「DNA 修復関連遺伝子への影響調査：平成 22～26 年度」では、低線量率（20 mGy/日）放射線を 400 日間に渡り連続照射したマウスの造血幹細胞数は照射期間中及び照射終了後 100 日間に渡り非照射群に比べて少ないまま経過することが明らかになった。また、この時期の造血幹細胞の遺伝子発現解析により、これらの細胞が周辺環境からのシグナルに応答していることが示唆されたことから、低線量率放射線連続照射が周辺環境を介して造血幹細胞の動態に影響を与え、さらには白血病の発症を促進している可能性も考えられる。そこで、本研究では、低線量率放射線によって生じる造血幹細胞周辺環境の変化が白血病の誘発に及ぼす影響を明らかにすることを最終的な目的とし、マウスの造血幹細胞への周辺環

境の影響について、20 mGy/日の低線量率放射線長期間照射の場合と中・高線量率放射線照射の場合との違いを明らかにすることを当面の目標とする。

2. 方法

本実験では、骨髄内の造血幹細胞及び周辺環境を構成する細胞を観察するために川本法による実験条件の検討を行った。川本法は下記の SCEM 包埋剤（SectionLab 社）を用いて試料を凍結標本にし、これに適した専用の粘着フィルムを用いて薄切片を作成する方法である。非照射の C3H/He Nrs オスマウスの大腿骨と上腕骨を摘出し、素早く SCEM 包埋剤でコーティングして急速凍結させた。これをクリオスタット CM3050S（Leica 社）により粘着フィルム上に 3～10μm の厚さで薄切した。作成した薄切片を、

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色法もしくは蛍光抗体による免疫染色法により染色した。また、加齢により自家蛍光が観察されたので、これを抑制するために 3 種類の自家蛍光抑制試薬 Autofluorescent Eliminator Reagent for IHC (Merck Millipore 社)、TrueBlack Lipofuscin Autofluorescent Quentcher (Biotium 社)、MaxBlock Autofluorescence Reducing Reagent Kit (Maxvision 社) による検討を行った。

3. 成果の概要

骨質と骨髄のような硬さの異なる組織を同時に薄切する場合、刃の温度やサンプルに対する角度が重要になる。これを検討した結果、薄切温度を-25~-15℃、刃角を 10~15°に設定することで、骨髄・骨質共に良好な結果が得られることが分かった。

次に薄切サンプルの染色前の処理についての検討を行った。薄切後の解凍時間が短い場合は粘着フィルムからサンプルが剥離し、逆に長過ぎる場合は細胞が乾燥によって収縮して形状が変化してしまう。種々の条件で検討を行った結果、解凍時間を 10~30 秒にすることで良好な結果が得られるようになった

(Fig. 1)。

骨髄中の細胞種を特定するには蛍光抗体による細胞表面抗原の多重標識が有効であるが、組織標本の観察においては標識した蛍光と自家蛍光とを識別することが必須である。自家蛍光は赤血球の破壊によって生じるリポフスチンや、血管壁に含まれるエラスチンとコラーゲンなどから発せられる。特にリポフスチンは加齢によって増加することが知られており、本調査で検索対象となる 800 日齢前後のサンプルにおいてもリポフスチンに特有の赤色の蛍光が骨髄全体に散在して観察された。これを抑制するために市販の試薬によるリポフスチン自家蛍光抑制の検討を行った。その結果、今回検討した 3 種類の試薬は加齢による赤色自家蛍光に対して有効であり、これら各試薬について、自家蛍光の抑制と抗体の蛍光観察の両者が可能な希釈条件をそれぞれ決定した。以上の条件を用い組織標本を作成した結果、基底膜の Laminin を示す緑色の蛍光の観察により、骨髄内の造血細胞周辺環境の重要な構成要素である毛細血管(血管内皮細胞)の位置を同定することができた。(Fig. 2)。

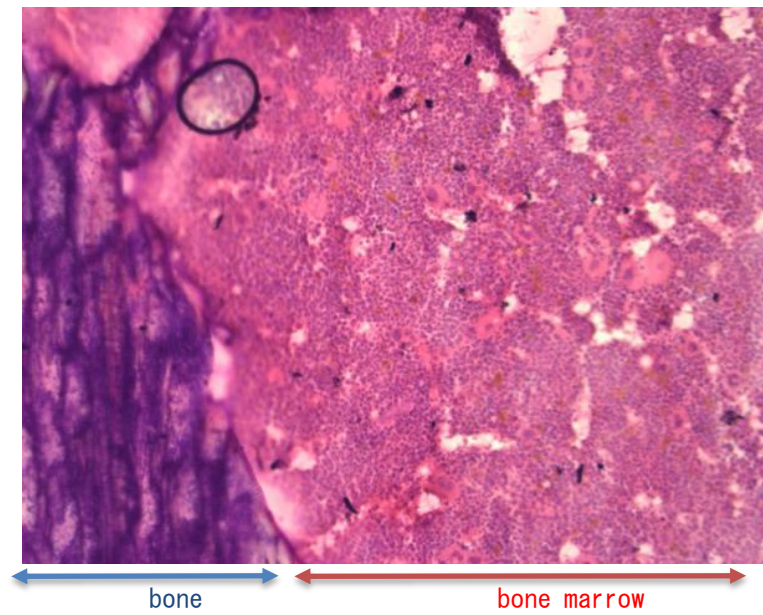


Fig.1 Fresh frozen tissue section of the bone marrow (H&E Stain).

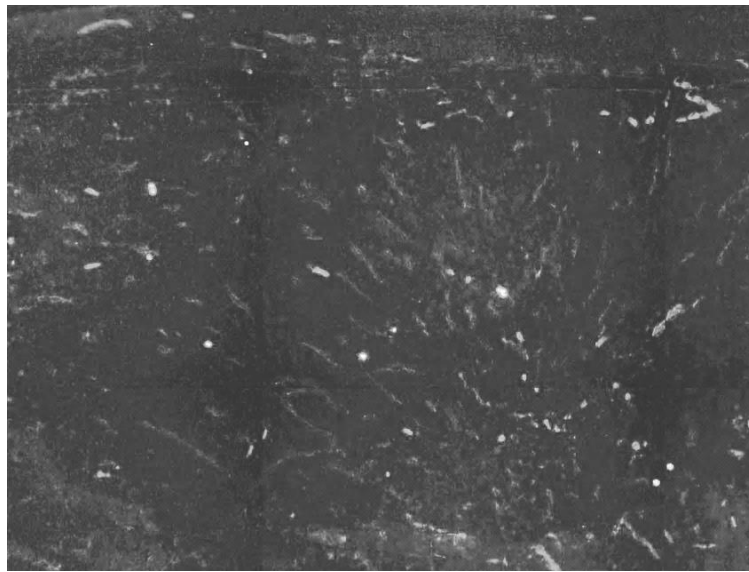


Fig. 2 Fresh frozen tissue section of the bone marrow immunostained with FITC-conjugated Laminin antibody