

2.4 低線量率放射線に対する生理応答影響実験調査

2.4.1 造血系解析

2.4.1.1 造血幹細胞の変化と寿命との関連(照射+/+マウス骨髓細胞の W/W^u マウスへの移植実験)

Correlation between Hematopoietic Stem Cell Changes and 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 HSCs or indirectly via changes in the microenvironment in the bone marrow, we have planned to transplant irradiated HSCs and investigate their self-renewal capacity, differentiation ability and possible contribution to mouse life span.

Experiments are underway to determine the effect on the life span of non-irradiated mast cell-deficient WBB6F1-W/W^u mice transplanted with HSCs from wild type (+/+) mice irradiated at a low dose-rate (20 mGy/day; total dose: 8000 mGy) or a high dose-rate (770 mGy/min; total dose: 2000 or 4000 mGy). As of March 31, 2018, there is no significant difference in the survival rates among W/W^u mice transplanted with 1×10^5 HSCs derived from low or high dose-rate-irradiated or non-irradiated wild type (+/+) mice.

We also started *in vitro* culture of HSCs from the bone marrow of the mice continuously irradiated with low dose-rate gamma-rays (20 mGy/day; total dose: 8000 mGy). So far, we observed no significant difference in cell counts between cells cultured from irradiated and non-irradiated mice.

1. 目的

「低線量放射線細胞影響調査:平成 13~16 年度」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 8000 mGy (400 日間照射) まで連続照射すると、末梢血中の白血球数には減少傾向が見られ、骨髓中の造血幹細胞 [CFU-S (day-12)] 数の有意な減少が認められた。さらに、骨髓中の造血幹細胞 [CFU-S (day-12)] 数は照射終了後 210 日目 (666 日齢) においても完全には回復しないことを報告した。

この原因として、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 (老化) した (造血幹細胞への直接的影響)、並びに②造血幹細胞の育成・増殖を制御している造血ニッチが放射線照射により不可逆的な影響を受けた (造血幹細胞への間接的影響) の 2 つの可能性が考えられる。

そこで、本解析では、①の放射線照射による造血幹細胞数減少は造血幹細胞自身への直接影響のためであるという仮説を検証するために、低線量率放射線照射造血幹細胞を移植したマウスの寿命及び *in vitro* で培養した造血細胞の自己複製能・分化能等を

指標として調査する。

本年度は、8週齢の+/+（野生型）マウスへの高線量率放射線急照射及び低線量率放射線連続照射（20 mGy/日の線量率で400日間照射：集積線量8000 mGy）を継続して行うとともに、造血（幹）細胞の W/W^v マウスへの移植実験を継続実施した。また、低線量率放射線（20 mGy/日）を400日間連続照射したマウスの骨髄（幹）細胞の *in vitro* での培養実験を開始した。

2. 方法

実験には自家生産した W/W^v 突然変異マウス（造血細胞移植時に致死線量の放射線全身照射を前処置として必要としない突然変異マウス）をホストとして使用し、その野生型である+/+マウスをドナーとして使用した。

2.1 移植実験

8週齢の+/+マウスを非照射群、低線量率連続照射群および高線量率急照射群に分け、低線量率放射線照射群には、20 mGy/日の線量率で400日間（集積線量8000 mGy）の連続照射、高線量率急照射群には線量率770 mGy/分で集積線量2000または4000 mGyまで照射した。照射終了後、マウス大腿骨骨髄から骨髄細胞を採取し、細胞数を 1×10^5 個/200 μ l/マウスに調整し、8~10週齢の W/W^v マウスに尾静脈より注射器で細胞を注入したのち、SPF環境下で飼育を行った。

2.2 培養実験

2.1の移植実験で得られた骨髄細胞を 1×10^5 個/mlに調整し、コンフルエントになった培養フラスコの MS-5（造血支持細胞株：造血幹細胞を養い自己複製・分化させる事ができる細胞株）上に8mlずつ播種し培養を行った。MS-5に接着・増殖した細胞を採取するために、毎週（7日ごと）に培養液をピペティングして細胞浮遊液を7mlずつ回収し、血球計算器を用いて造血細胞数を計測した。

3. 成果の概要

3.1 移植実験

平成29年度末現在（移植後90日）、照射を行なった+/+マウス由来の造血（幹）細胞を 1×10^5 個ずつ移植した W/W^v マウス（Table 1）の生存率に関して、急照射群、連続照射群、対照群の間に差は見られていない。

3.2 培養実験

細胞浮遊液中の細胞数を毎週計測した結果、非照射対照群由来骨髄細胞および照射群由来骨髄細胞ともに、培養13週の時点では同程度の増殖能を維持しており、細胞数に差は見られていない（Fig. 1）。今後、培養日数100日ごとに回収した細胞を用いて CFU-S アッセイを行い、培養細胞中に含まれる造血（幹）細胞数を計測する予定である。

平成29年度末現在、実験は順調に進捗している。

Table 1 Ongoing experiments of transplantation of HSCs from irradiated $+/+$ mice to non-irradiated W/W^u mice; status at March, 2018.

	Non-irradiated group	20 mGy/day \times 400days (8000 mGy)	770 mGy/min (2000 mGy)	770 mGy/min (4000 mGy)
Number of donor ($+/+$) mice	6	8	2	3
Number of host (W/W^u) mice	17	25	6	8
(Number of deaths)	(0)	(0)	(0)	(1)

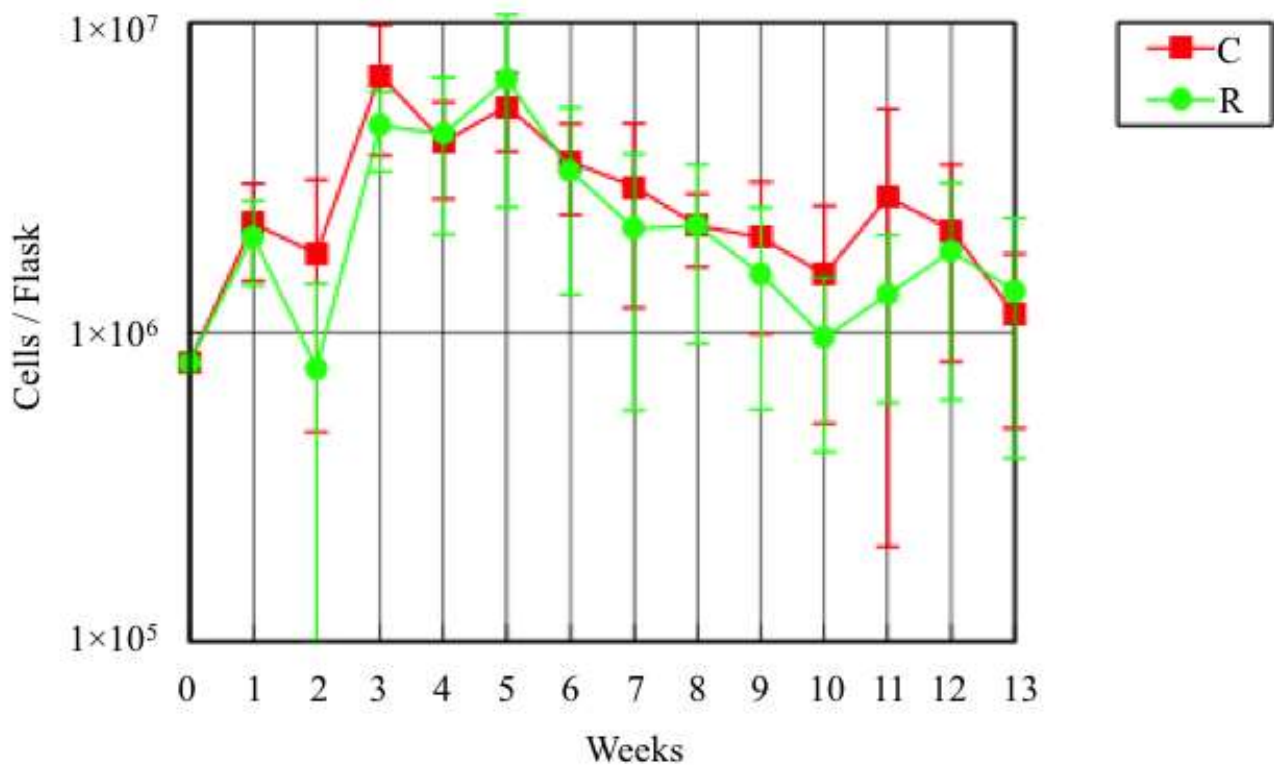


Fig. 1 Number of HSCs in culture (per flask). Cells were subcultured every week at a split ratio of 1:8.

C: cells derived from non-irradiated mice.

R: cells derived from irradiated (20 mGy/day; total dose: 8000 mGy) mice.