

## 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<sup>u</sup>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

To clarify whether the decrease in the number of hematopoietic stem cells (HSCs) after continuous radiation exposure is a direct effect on HSCs or indirect effect through changes in the bone marrow microenvironment, we transplanted irradiated HSCs and investigated their self-renewal capacity, differentiation ability and possible effect on mouse life span.

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) of gamma rays were transplanted to non-irradiated mast cell-deficient WBB6F1-W/W<sup>u</sup> mice to determine the effect of life span. As of March 31, 2019, we observed that the life spans of W/W<sup>u</sup> mice transplanted with  $1 \times 10^5$  HSCs derived from mice exposed to high dose-rate gamma rays were shortened.

*In vitro* cultures of HSCs from the bone marrow of mice that were continuously irradiated with low dose-rate gamma rays (20 mGy/day; total dose: 8000 mGy) showed no viable cells at the 25th week whereas HSCs bone marrow cells from the non-irradiated mice continued to proliferate up to 30 weeks in culture.

#### 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、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血球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)、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 (幹) 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、前年度に引き続き 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<sub>v</sub> 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* での培養実験を行なった。

## 2. 方法

実験には自家生産した W/W<sub>v</sub> 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  $1 \times 10^5$  個/200  $\mu$ l/マウスに調整し、8~10 週齢の W/W<sub>v</sub> 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 移植実験で得られた骨髄細胞を  $1 \times 10^5$  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 8 ml ずつ播

種し培養を行った。7 日ごとに培養液をピペッティングして細胞浮遊液を 7 ml ずつ回収し、血球計算器を用いて造血細胞数を計測した。また、培養 23 週目の細胞を回収し、常法に従い CFU-S アッセイを行い、浮遊細胞中の CFU-S 数を計測した。

## 3. 成果の概要

### 3.1 移植実験

平成 30 年度末現在、照射を行なった+/+マウス由来の造血（幹）細胞を移植した W/W<sub>v</sub> マウスの生存率に関して、急照射群雄では、4 Gy 照射群は一部死亡したが、非照射対照群及び 2 Gy 照射群では死亡マウスは観察されていない。急照射群雌では 2 Gy 及び 4 Gy 照射群は 470 日目までに全てが死亡したが、対照群では 60%以上が生存中である。低線量率放射線照射群では、非照射対照群は雌雄全て生存中で、平成 30 年度末現在（実験 140 日目）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 7 日ごとに計測した結果、非照射対照群由来骨髄細胞は、培養 30 週の時点で増殖能を維持していた。しかし、低線量率放射線照射群由来骨髄細胞は、培養開始 25 週の時点で細胞が検出できなくなった。培養 23 週目に回収した細胞を用いて CFU-S アッセイを行った結果、非照射対照群は培養細胞中に造血（幹）細胞を維持していたが、低線量率放射線照射群では造血（幹）細胞を検出することができなかった。以上の結果から、*in vitro* の実験系では、連続照射により造血（幹）細胞の増殖能が低下していることが示唆された。

Table 1 Number of CFU-S per flask (using cells collected at 23 weeks of culture).

	Non-irrad	20 mGy/day x 400 days (8,000 mGy)
No. of cells/flask ( $\times 10^6$ )	$0.8 \pm 0.5$	$0.2 \pm 0.1$
No. of CFU-S/flask	$186.7 \pm 23.1$	Not detected

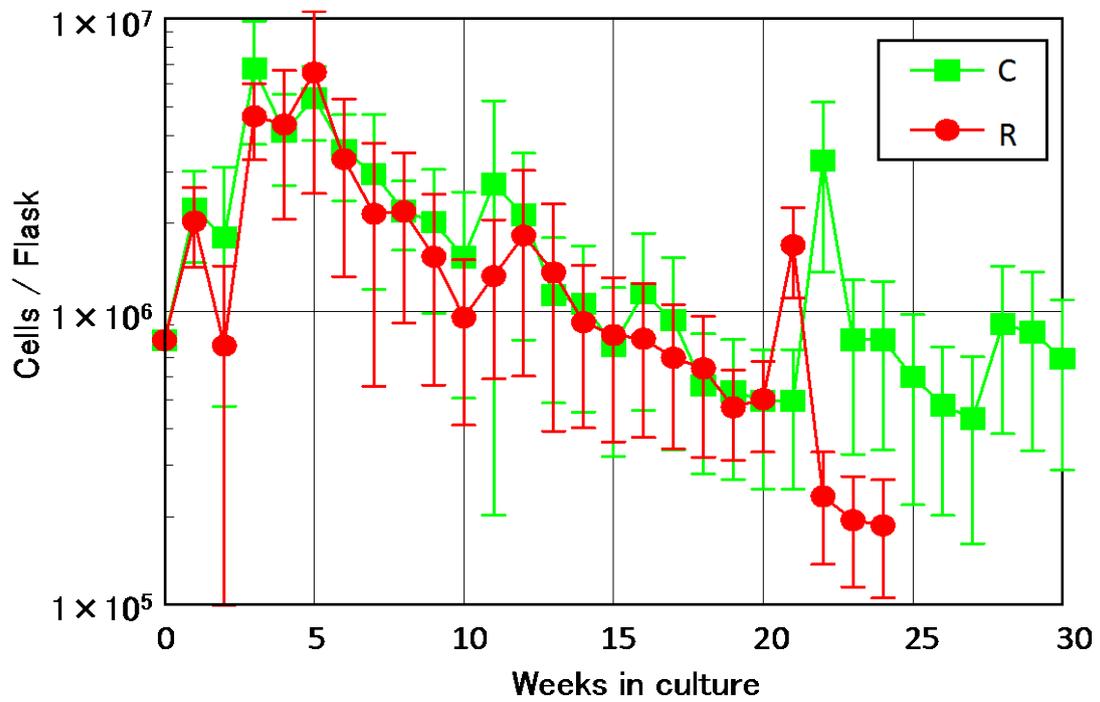


Fig. 1 Number of HSCs in culture (per flask). Cells were subcultured every week at a split ratio of 1:8.

C: cells derived from non-irradiated mice.

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