

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻

平成 29 年度

修士論文

局所照射および貧血処理を用いたメダカ造血組織に  
おける放射線影響の評価

指導教員 三谷啓志 教授  
尾田正二 准教授

47-166310 大橋圭太

2018 年 1 月 26 日提出

## 目次

1. 背景・目的	1
1.1 放射線の組織影響と造血幹細胞	
1.2 モデル生物としてメダカを使う意義	
1.3 メダカを用いた放射線研究のバックグラウンド	
1.4 本研究の目的	
2. 方法	3
2.1 メダカ系統と飼育	
2.2 重粒子線照射	
2.2.1 炭素イオンビーム	
2.2.2 プロトンイオンビーム	
2.3 ガンマ線照射	
2.3.1 ガンマ線( $^{60}\text{Co}$ )照射装置	
2.3.2 ガンマセル ( $^{137}\text{Cs}$ )	
2.4 パラフィン切片の作製	
2.5 ヘマトキシレン-エオジン (HE) 染色	
2.6 抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色法	
2.7 貧血処理	
2.8 採血	
2.9 統計処理	
3. 結果	12
3.1 限局して照射した際の造血細胞への影響の解析	
3.1.1 局所照射の様子	
3.1.2 陽子線 15Gy 片側腎臓、両側腎臓、背側照射、腎臓以外照射 7 日後の腎臓組織像 (HE 染色)	
3.1.3 炭素イオンビーム 15 Gy マイクロビーム照射 7 日後の腎臓組織像 (HE 染色)	
3.1.4 炭素イオンビーム 15 Gy 片側腎臓照射 7 日後の腎臓組織像 (HE 染色)	
3.1.5 陽子線(15Gy)を片側腎臓、両側腎臓、背側照射、腎臓以外に照射し 7 日後の末梢血球数	
3.1.6 炭素イオンビーム(15Gy)を片側腎臓、両側腎臓、背側に照射し 7 日後の末梢血球数	
3.2 線種および照射 7 日後から 28 日日後までにおける造血組織への影響の解析	
3.2.1 炭素イオンビーム、ガンマ線および陽子線を照射し 14, 21, 28 日後の末梢血球	

数

3.2.2 炭素イオンビーム、ガンマ線および陽子線を照射し 14, 21, 28 日後の腎臓組織像 (HE 染色)

3.2.3 15 Gy 照射 7 日後における線種による影響の違い

3.3 照射線量による造血細胞への影響の解析

3.3.1 炭素イオンビーム 2 Gy, 5 Gy 照射 7 日後の末梢血球数

3.3.2 炭素イオンビーム 2 Gy, 5 Gy 照射 7 日後の腎臓組織像 (HE 染色)

3.3.3 ガンマ線 0.1 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy 照射 7 日後の末梢血球数

3.3.4 ガンマ線 0.1 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy 照射 7 日後の腎臓組織像 (HE 染色)

3.3.5 ガンマ線 0.1 Gy, 0.5 Gy, 照射 1 日後の末梢血球数

3.3.6 ガンマ線 0.1 Gy, 0.5 Gy, 照射 1 日後の腎臓組織像 (HE 染色)

3.4 貧血処理後における造血細胞の放射線応答の解析

3.4.1 貧血処理後にガンマ線 15 Gy を照射した際の末梢血球数

3.4.2 腎臓組織における PCNA 陽性細胞の割合の算出方法

3.4.3 貧血 1 日目、貧血 2 日目、貧血 8 日目の造血細胞数 (HE 染色)

3.4.4 貧血 1 日目、貧血 2 日目、貧血 8 日目の PCNA 陽性細胞数の割合

3.4.5 貧血 1 日目、ガンマ線 1 日目と貧血 1 日目および貧血 2 日目にガンマ線 15Gy を照射した 1 日後における腎臓組織像 (HE 染色)

3.4.6 貧血 1 日目、貧血 2 日目、ガンマ線 1 日目、ガンマ線照射 1 日後と貧血 1 日目および貧血 2 日目にガンマ線 15Gy を照射した 1 日後における PCNA 陽性細胞数の割合

3.4.7 ガンマ線照射 7 日後の貧血処理なしと貧血処理 1 日目、貧血処理 2 日目における腎臓組織像 (HE 染色)

3.4.8 ガンマ線照射 7 日後の貧血処理なしと貧血処理 1 日目、貧血処理 2 日目における PCNA 陽性細胞数の割合

4. 考察.....24

4.1. 末梢血球数は腎臓への直接照射によって減少する

4.2. 炭素イオンビーム 15 Gy 照射 14 日後に造血細胞は回復しなかった。

4.3. 造血細胞は線量依存的に減少した

4.4 メダカ造血細胞は放射線に抵抗性の増殖を示した

4.5 総括

5. 謝辞 .....29

6. 引用文献 .....30

7. 図 .....36

8. 表 .....66

## 1. 背景・目的

### 1.1 放射線の組織影響と造血幹細胞

ヒトにおいては骨髄、精巣、胸腺などの部位において特に放射線感受性が高いことが知られている<sup>(1)(2)(3)</sup>。ヒトを含む哺乳類において赤血球、白血球、リンパ球などの細胞が産生される造血器官は骨髄であり、それら細胞はいずれも造血幹細胞から分化する<sup>(4)(5)(6)(7)</sup>。活発に分裂している造血幹細胞は放射線感受性が特に高く、そのような造血幹細胞が損傷するとその影響は末梢の赤血球に反映される<sup>(8)(9)(10)(11)(12)(13)</sup>。また、放射線照射によって造血幹細胞が障害されて低下した造血機能が回復されず慢性的影響が表れるが、線量によっては造血機能が回復することも知られている<sup>(14)(15)(16)(17)(18)</sup>。

### 1.2 モデル生物としてメダカを使う意義

哺乳類では造血器官である骨髄が緻密骨の内部にあるために、造血組織の組織学的観察は困難を伴う。これに対して、同じ脊椎動物である魚類では腎臓が主たる造血器官であり、近年血球分化の研究においてゼブラフィッシュが有用なモデル動物となっている<sup>(19)(20)(21)(22)(23)</sup>。同じく生命科学のモデル動物として広く用いられているメダカ (*Oryzias latipes*) は 1 世代が 2~3 年と短いためヒトでの長期の放射線影響を短期間で観察可能であり<sup>(24)(25)</sup>、古くより放射線影響の研究に供せられ、放射線研究の知見が豊富に蓄積している<sup>(26)(27)</sup>。特に、体躯が透明である SK2 系統<sup>(28)</sup>は、生きたまま体内の臓器を観察することが可能<sup>(29)(30)</sup> なために、造血器官への放射線影響の研究を行うモデル動物とし

て非常に適していることが期待された。

### 1.3 メダカを用いた放射線研究のバックグラウンド

所属研究室ではこれまでにメダカ精巣や脳への局所照射や全身照射後の影響を観察してきた。背側照射による腎臓の萎縮<sup>(31)</sup>、p53 欠損メダカにおいて放射線照射による精巣卵の誘導<sup>(32)</sup>、メダカ胚の脳を狙った直径 2  $\mu\text{m}$  のマイクロビーム照射によって脳の آپトーシスおよび回復が明らかになった<sup>(33)</sup>ほか、貧血処理後の全身照射によって造血幹細胞が活性化された可能性も示唆されている<sup>(34)</sup>。

### 1.4 本研究の目的

本研究では、メダカ腎臓の造血細胞に着目し、腎臓をターゲットとした放射線照射法を確立し、線種および線量の違いによる造血組織への放射線影響を明らかにするとともに、貧血時の造血細胞の放射線感受性を明らかにすることを目的とした。

## 2.方法

### 2.1 メダカ系統と飼育

本研究では放射線照射および貧血処理後の腎臓の影響を観察するために体躯が透明な SK2 系統(SK2, *bg8*: null melanophore, *lf*: leukophore free, *gu*: guanine loss)<sup>(28)</sup>を使用した(図 1)。全長 25~30 mm かつ生後 6 か月~1 年の個体を使用し、1 個体あたり 2  $\mu$ l の採血を行い解剖に供した。飼育は明期 14 時間 (9:00~23:00)、暗期 14 時間(23:00~9:00)、水温  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$  の環境の屋内飼育室 (生命棟 1N06) でメダカの飼育および繁殖をおこなった。飼育室に設置された集合型循環式飼育装置 (名東水園製) を使用し、飼育水を循環させることによって 1 基あたり最大 48 個の小型水槽 (縦: 22.5 cm、横: 15 cm、高さ: 12.5 ccm、畜水量: 1.5 L) を使用してメダカを飼育することができ、1 個の水槽に成魚 2~7 匹を飼育し、飼料として成魚にはテトラフィンまたはブラインシュリンプのノープリウス幼生(*Artemia salina*)を、稚魚には稚魚用により細かく粉碎したテトラフィンを 1 日 2 回 10:00 と 17:00 に与えた。なお、本研究では全長 15 mm 以上のものを成魚とした。

### 2.2 重粒子線照射

#### 2.2.1 炭素イオンビーム

量子科学技術研究開発機構 高崎量子応用研究所のイオン照射研究施設 Takasaki Ion

Accelerators for Advanced Application (TIARA) を共同利用し、飛程 2.2 mm の炭素イオン  $^{12}\text{C}^{6+}$  ビームを照射した。ペットボトルにメダカを入れて東京大学柏キャンパスの所属研究室から高崎の研究施設まで輸送した。メダカ成魚の目的の領域へ限局的に照射を行うために、まず 2% 3-AMINOBENZONIC ACID ETHYL ESTER (MS-222, SIGMA Chemical co., USA) を用いてメダカを麻酔した。メダカがちょうど入る大きさの窪みを有する発砲スチロール製のトロフをシャーレにセットし、大量の麻酔液を含ませたキムワイプを用いてトロフ内でのメダカの位置と背腹の角度を調整した。メダカが窒息死しないようにビームを遮蔽しない範囲で飼育水をシャーレに満たした。カプトン膜でシャーレに蓋をしたのち TIARA の照射室へ移送し、深度制御種子照射装置を使用して 0.132 Gy/s の線量率で炭素イオンビームのブロード照射を行なった(図 2)。マイクロビーム照射については、メダカに上記と同様の処置をして照射室へ移送し、細胞局部照射装置により直径 250  $\mu\text{m}$  の炭素イオン  $^{12}\text{C}^{6+}$  ビームを深度 2.2 mm まで 0.132 Sv/s の線量率で照射した。照射後は通常の飼育水に戻してメダカの麻酔が解けたことを確認して千葉県柏市の研究室まで輸送し、一定期間の飼育を行った。

### 2.2.2 プロトンイオンビーム

2.2.1 と同様に TIARA 施設を利用して、炭素イオンビームと同様に 2.2 mm 程度の飛程であるプロトン ( $\text{H}^+$ )ビームを照射した。

## 2.3 ガンマ線照射

### 2.3.1 ガンマ線照射装置( $^{60}\text{Co}$ )

量子科学技術研究開発機構 高崎量子応用研究所の食品照射棟にあるガンマ線照射装置( $^{60}\text{Co}$ )を使用して、メダカ成魚にガンマ線を照射した。この施設では、線源から 212.8 cm、301.1 cm、650.65 cm の位置にメダカを配置することにより 1 Gy、0.5 Gy、0.1 Gy の総線量のガンマ線照射を行うことが可能である (図 3)。

### 2.3.2 ガンマセル ( $^{137}\text{Cs}$ )

所属研究室が所有するガンマ線照射装置 (ガンマセル 3000 Elan, MDS Nordion、Canada) を使用してメダカにガンマ線照射した (線量率 7.5 Gy/min)。照射を行うにあたり 2 重にしたプラスチック製の円形容器に飼育水を満たし、内側の円形容器 (直径 4 cm、深さ 3.5 cm) に成魚 3~6 匹を入れ、蓋に穴を開けた 7x7x10 (cm) の立方体のプラスチック容器に飼育水 200ml を入れたうえで、ガンマセルの照射室の中央位置にメダカが位置するように調整した(図 4)。

## 2.4 パラフィン切片の作製

メダカを 2 ml の 0.2%MS-222 にて麻酔したのち 15 ml チューブに 12 ml のデビッドソン液 (100%エタノール 31.9%、10%ホルマリン 22%、酢酸 20%、DW 35.1%) にて



2日間化学固定した。デビッドソン液を phosphate buffered saline (PBS) に置換し、70%エタノール、80%エタノール、90%エタノール、95%エタノール、100%エタノールにてそれぞれ1時間ずつ振とうした。さらに100%エタノール12mlにて15時間振とうした。エタノールをキシレンに置換し、キシレンにて1時間×3回、15時間振とうした。3回目にキシレン中で振とう処理する際はキシレンの揮発を防ぐためにパラフィルムにてチューブの口を封じた。

次に、実体顕微鏡下で観察しながら両刃カミソリを用いて鰓より頭側を切断単離し10mlのガラス瓶に移した。キシレン5mlを加え、60°Cのパラフィン5mlを加えて60°Cの恒温器(F-12、いすゞ製作所)にて1時間静置した。続いてパラフィン10mlに置換してさらに1時間×2回60°Cにて浸透させた。氷上に金属板の上に置いたベースモールド(24x30x9mm AS ONE6401016)の深さ1/3まで融解したパラフィンを流し入れ、組織片が沈まない程度に固まったことを確認して組織片を載せ、さらにパラフィンをベースモールドの縁まで注ぎ3分間静置した。冷えたのち、再度パラフィンを流し込み、パラフィンが固まったことを確認し、冷蔵庫内でさらに3時間保冷し完全にパラフィンを固化させた。組織片の入ったベースモールドを水道水を張った容器内に5分間沈め、ナイフを使って組織片が包埋されたパラフィンブロックをモールドから取り外した。縦横27x20x12mmのパラフィン用木製ブロック中(AS ONE)に合わせてパラフィンブロックをトリミングし、溶融したパラフィンをを用いて組織片を含

むパラフィンブロックと木製ブロックに固着させ、さらに固着面の周囲に溶かしたパラフィンを加えて補強した。パラフィンが固まったことを確認したのち、さらに1時間冷蔵庫で保冷した。

滑走式マイクロトーム (LEM-700、YAMATO) または回転式マイクロトーム

(RM2125RT、Leica) を使用して厚さ 5  $\mu\text{m}$  に薄切した。薄切した切片をスライドガラス上の水滴の表面に浮かべ、43°C のホットプレート上で加温して切片を十分に展開した後、乾燥させた。

## 2.5 ヘマトキシレン-エオジン (HE) 染色

切片をのせたスライドガラスを1日以上乾燥させた後に10分間×3回キシレンに浸漬させた。続いて、100%エタノール、95%エタノール、90%エタノール、80%エタノール、70%エタノールの順に各2分間浸漬させた。DDWに5分間、Mayer's Hematoxyline solution (No.3001-1、武藤化学株式会社) に5分間浸漬させ、5分間流水処理後、0.5% Eosin Alcohol Solution (No.3001-2、武藤化学株式会社) に1分30秒浸漬し、70%エタノール、80%エタノール、90%エタノール、95%エタノール、100%エタノール、100%エタノールに各2分浸漬した。キシレンに10分間×3回浸漬させ、封入するためにキシレンとソフトマウント (和光純薬工業株式会社、192-16301) を切片上に滴下し、幅広ピンセットを使って静かに25 x 60 mmのカバーガラスをのせて封入し

た。充分乾燥・固化したことを確認して顕微鏡(BX 50-F, OLYMPUS)で腎臓組織像を観察し、デジタルスチルカメラ(DFC-7000T,ライカ マイクロシステムズ)を使用して写真撮影した(図5)。

## 2.6 抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色

造血細胞における細胞増殖を観察するために G1 期から M 期の細胞だけを染色する抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色をおこなった。2.4 と同様の方法で組織切片を作製し、2.5 と同様の方法で脱パラフィン処理を行った。PCNA 抗原を賦活化させるために、耐熱性チャンバー (TPX 染色バット, 2-3028-01 AS ONE 株式会社) にクエン酸緩衝液 (pH6.0) を満たし、切片をのせたスライドガラスを浸漬し、オートクレーブ (BS-245、トミー工業) を用いて 121°C にて 20 分間熱処理した。約 35°C までチャンバー内の温度が下がったのちに取り出し、3 分間×3 回 PBS にて洗浄した。内因性ペルオキシダーゼを不活性化するために、3%過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 5 ml, PBS 45 ml) を数滴滴下し、15 分反応させた後、PBS(-)で 5 分間×2 回洗浄し、PBS(-)と PBST を 9:1 の割合で混合した液にて 5 分間洗浄した。Normal Horse Serum (4~6 drops in 10 ml PBS) (VECTASTAIN ELITE ABC Mouse/Rabbit IgG kit, VECTOR, USA) を滴下し、室温のモイストチャンバー内で 30 分間反応させブロッキング処理を行った。反応後 PBS(-)で 5 分間×2 回洗浄し、0.05% Tween-PBS(-) にて 5 分間洗浄した。

一次抗体希釈液 (0.5% BSA; A6003-10G SIGMA, 0.5% Triton X-100; 203-0215 和光純

薬工業株式会社, 0.1%NaN<sub>3</sub>; 190-14981 和光純薬工業株式会社 /PBS) にて 1,000 倍に希釈したマウス抗 PCNA 抗体 (PC10, NB500-106, NOVUS, USA) を一次抗体として用い、モイストチャンバー内で 3 時間インキュベートし反応させた。反応後に PBS(-)で 5 分間×2 回洗浄したのち、0.05% Tween-PBS(-) にてさらに 5 分間洗浄した。

二次抗体希釈液 (0.5% BSA, 0.5% Triton X-100 /PBS (-)) で希釈したビオチン化抗マウス IgG 抗体を二次抗体として用い、モイストチャンバー上で 3 時間インキュベートして反応させた。反応後に PBS(-)で 5 分間×2 回、および 0.05% Tween-PBS(-) にて 5 分間洗浄した。続いて、Avidin (VECTASTAIN ELITE ABC Mouse/Rabbit IgG kit, VECTOR, USA) および Biotynilated peroxidase (VECTASTAIN ELITE ABC Mouse/Rabbit IgG kit, VECTOR, USA) それぞれ 10 μl に二次抗体希釈液を 1 ml を混合してボルテックスし、30 分静置した混合液をスライドガラス上のサンプルに数滴滴下し、モイストチャンバー内で 3 時間インキュベートして反応させた。反応後に PBS(-)で 5 分間×2 回、および 0.05% Tween-PBS(-) にて 5 分間洗浄した。3'3-Diaminobenzine, tetra hydrochloride (DAB, 同仁化学株式会社) 0.051 g を 150 ml の 50 mM Tris-HCl (pH7.5)に溶解して調製した DAB 溶液にスライドガラスを 10 分間予備浸漬し、次に 1.5 ml の 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えた DAB 溶液にて 1 分 40 秒~2 分間発色させた。染色後、スライドガラスを PBS(-)に 10 秒、30 秒、10 分浸漬し、続いて 0.05% Tween-PBS(-) に 10 分間浸漬した。カウンター染色として、2.4 に従ってヘマトキシレン染色を行なった。

## 2.7 貧血処理

1%フェニルヒドラジン（P26252-5G, アルドリッチ）を飼育水 600 ml にて希釈した溶液にてメダカを 20 分間遊泳させ、曝露した。処理後にメダカを 20 分×2 回洗浄したのち、通常の飼育と同様に飼育した。

## 2.8 採血

1 個体あたり 2  $\mu$ l の採血を行うために全長 25~30 mm かつ孵化後 6 か月~1 年の個体を使用した。またサンプル数が偶数のときには雌雄の個体数が 1 : 1 になるように調整した。採血するにあたり、メダカの尾の周辺の水分をキムワイプでふき取った。採血した血液が凝固しないように、1 個体あたり 1 mL の血液希釈液（2% FCS, 10 mM EthyleneDiamineTetraacetic Acid, EDTA, 同仁化学株式会社 /PBS）を使用した。採血用の 1.5 ml チューブに 4  $\mu$ l の 0.5 M EDTA を予め入れておき、解剖ばさみでメダカの尾の付け根を切断し、切断面が下になるように垂直の姿勢でメダカを保持した。中心動脈から 10  $\mu$ l のマイクロピペットを用いて 2  $\mu$ l 採血した。採血用チューブの EDTA に採取した血液を速やかに加え、やさしくピペッティングして混合したのち、血液の凝固を防ぐため血液希釈液 994  $\mu$ l をさらに加えて血液懸濁液とした。この血液懸濁液から 10  $\mu$ l を分取し、血球測定板と正立顕微鏡（BX50, OLYMPUS, JAPAN）を用いて 4 視

野の血球細胞を計数し、その平均値をもとに細胞密度を算出した。1 個体につき血球数の測定を 2 度行い、平均をその個体の血球数密度 ( $\times 10^9/\text{mL}$ ) とした。

## 2.9 統計処理

全ての個体において血球数密度の平均値を算出した。n=3 以上の個体群については標準偏差を算出した。n=3 以上の個体群では 2 群の比較に際して t-test を行い、有意差の有無を 5% 水準で検定した。すべて Excel を使用した。

### 3. 結果

#### 3.1. 限局して照射した際の造血細胞への影響の解析

##### 3.1.1 局所照射の様子

造血組織への局所照射において、照射面積が造血細胞に及ぼす影響を解析するために厚さ 3.0 mm のアクリル板を使って炭素イオンビームを遮蔽できることを確認し (CR39)、照射したい領域だけに穴を開け、メダカの全身を遮蔽できる大きさ (縦 46 mm、横 23.5 mm) に切り出し、照射したい領域に穴がくるように配置し、照射をおこなった (図 6)。

先行研究<sup>(34)</sup> から腹側照射より背側照射のほうが末梢血球数並びに造血細胞への影響が大きいことが明らかになっている。そこで本研究では魚類の造血の場である腎臓への局所照射を行うことで末梢血球数と造血細胞の関係を明らかにすることを目標とした。

##### 3.1.2 陽子線 15Gy 片側腎臓、両側腎臓、背側照射、腎臓以外照射 7 日後の腎臓組織像 (HE 染色)

腎臓組織切片の HE 染色の観察より片側腎臓、両側腎臓、背側照射のいずれにおいても照射した腎臓領域において造血細胞が減少していることが確認された。また腎臓以外照射では造血組織に影響がないことが確認できた (図 7、8)。

##### 3.1.3 炭素イオンビーム 15 Gy マイクロビーム照射 7 日後の腎臓組織像 (HE 染色)

細胞局部照射装置を使用して直径 250  $\mu\text{m}$  の炭素イオンビームをメダカの左側腎臓に数回照射した。照射 7 日後の腎臓組織像 (HE 染色) より照射した側の腎臓の一部領域局限して造血細胞の減少が確認できた (図 9)。

### 3.1.4 炭素イオンビーム 15Gy 片側腎臓照射 7 日後の腎臓組織像 (HE 染色)

アクリル板でメダカを遮蔽し、直径 2.5 mm、2.8 mm、3.0 mm の穴をアクリル板に開け炭素イオンビーム 15 Gy の照射をおこなった。照射 7 日後パラフィン切片を作製し HE 染色した組織像を検鏡することにより、炭素イオンビームを片側照射した個体では非照射側と比べて照射側の腎臓の造血細胞数が減少していることが明らかとなった。また片側腎臓照射 3.0 mm の腎臓組織において、造血細胞の障害の有無をもとに照射側と非照射側を確認することができた (図 10)。

### 3.1.5 陽子線 (15Gy) を片側腎臓、両側腎臓、背側照射、腎臓以外に照射し 7 日後の末梢血球数

片側腎臓、両側腎臓への照射と腎臓以外の領域への陽子線の局所照射をおこない、陽子線 15Gy 照射 7 日後においてこれらの個体から採血および組織 (HE 染色) を得た。末梢血球数は  $2.11 \pm 0.22 \times 10^6$  個/mL ( $n = 8$ )、 $1.96 \pm 0.23 \times 10^6$  個/mL ( $n = 7$ )、 $2.37 \pm 0.12 \times 10^6$  個/mL ( $n = 3$ ) であった。両側腎臓照射ではコントロール群と比べて末



梢血球数は有意に減少した ( $p=0.014$ )。一方で、片側照射とコントロール間の  $p$  値は 0.075、腎臓以外照射とコントロール間の  $p$  値は  $p=0.42$  であり、片側腎臓照射と腎臓以外への照射ではいずれもコントロールとの間には有意な減少はみられなかった。ただし、片側腎臓照射と腎臓以外照射において有意な差がみられた ( $p=0.045$ ) ほか、両側腎臓照射と腎臓以外照射においても有意な差がみられた ( $p=0.011$ )。これらの結果より腎臓への照射が末梢血球数の減少を引き起こす可能性が示唆された (図 1 1)。

以上より、陽子線を局所照射された個体の造血細胞は照射されていない領域と比べて減少していることがわかった。また腎臓だけを遮蔽し照射した際には造血細胞数は非照射群と比べて差がない可能性が示された。

### 3.1.6 炭素イオンビーム (15Gy) を片側腎臓、両側腎臓、背側に照射し 7 日後の末梢血球数

腎臓への局所照射を行うにあたり、片側 (右側) 腎臓への照射と両側腎臓への照射と腎臓以外の領域への照射を試みた。炭素イオンビーム (15G)  $\gamma$  照射 7 日後において片側腎臓、両側腎臓、背側領域へ照射した個体から採血および組織 (HE 染色) を得たところ末梢血球数は  $2.265 \times 10^6$  個/mL ( $n=2$ )、 $2.12 \pm 0.54 \times 10^6$  個/mL ( $n=3$ )、 $1.995 \times 10^6$  個/mL ( $n=2$ )であった (図 1 2)。炭素イオンビーム両側照射ではコントロール群と比べて末梢血球数の有意な減少はみられなかった ( $p=0.18$ )。

これらの結果より炭素イオンビーム (15Gy) を照射して7日後においては、照射領域が大きくなるほど末梢血球数が減少する傾向を確認した。

### 3.2 線種および照射7日後から28日後までにおける造血組織への影響の解析

#### 3.2.1 炭素イオンビーム、ガンマ線および陽子線を照射し14, 21, 28日後の末梢血球数

14, 21, 28日後の末梢血球数は、炭素イオンビーム照射群においてそれぞれ、 $1.69 \times 10^6$  個/mL (n=1)、 $1.69 \times 10^6$  個/mL (n=2)、 $1.85 \times 10^6$  個/mL (n=2)、陽子線照射群においてそれぞれ  $2.01 \pm 0.33 \times 10^6$  個/mL (n=6)、 $2.30 \pm 0.31 \times 10^6$  個/mL (n=7)、 $2.20 \pm 0.12 \times 10^6$  個/mL (n=5)、ガンマ線照射群においてそれぞれ、 $2.17 \pm 0.19 \times 10^6$  個/mL (n=4)、 $2.27 \pm 0.06 \times 10^6$  個/mL (n=3)、 $1.88 \times 10^6$  個/mL (n=2)であった (図13)。陽子線照射群において放射線照射後に末梢血球数の有意な回復は認められなかった (照射14日後 p=0.083) (照射21日後 p=0.45) (照射28日後 p=0.22)。全身照射を行なったガンマ線照射群では、照射した12個体のうち10個体が14日目から28日目までに死亡したが、炭素イオンビーム、およびガンマ線照射群共に放射線照射後に減少した末梢血球数は28日後まで回復しない傾向にあった。

#### 3.2.2 炭素イオンビーム、ガンマ線および陽子線を照射し7, 14, 21, 28日後の腎臓組織像 (HE染色)

次に、炭素イオンビームおよび陽子線の背側照射（ブロードビーム）とガンマ線の全身照射後の造血組織への影響をパラフィン切片の HE 染色により評価した。放射線照射 7 日目において、炭素イオンビーム、陽子線、ガンマ線ともにコントロール群より造血細胞は減少していた（図 1 4 - 1 6）。照射 14 日後、21 日後、28 日後いずれもガンマ線と陽子線では造血細胞の回復が確認できたのに対し、炭素イオンビームでは回復が確認できなかった（図 1 4 - 1 6）。

### 3.2.3. 15 Gy 照射 7 日後における線種による影響の違い

放射線照射 7 日後における非照射コントロール、炭素イオンビーム、陽子線、 $\gamma$  線照射群における末梢血球数はそれぞれ、 $254.1 \pm 47.7 \times 10^6$  個/mL ( $n = 7$ )、 $199.5 \times 10^6$  個/mL ( $n = 2$ )、 $199.2 \pm 30.7$  ( $n = 7$ )、 $201.5 \pm 35.5 \times 10^6$  個/mL ( $n = 7$ )であった（図 1 3 a-c）。コントロールと陽子線を照射した個体では末梢血球数の有意な減少は確認できなかった ( $p = 0.29$ )。コントロールとガンマ線では末梢血球数が有意に減少していた ( $p = 0.054$ )。また陽子線とガンマ線の間には有意な差は認められなかった ( $p = 0.21$ )。

末梢血球数の比較より炭素イオンビーム、陽子線、ガンマ線の順に組織影響が大きいと考えられる。

### 3.3. 照射線量による造血細胞への影響の解析

### 3.3.1 炭素イオンビーム 2 Gy、5 Gy 照射 7 日後の末梢血球数

高崎原子力研究所にて炭素イオンビーム (2Gy、5Gy、15Gy) をメダカ成魚の背側に 2.2cm の深さまで照射した。照射 7 日後に採血を行った。放射線照射 7 日後における非照射コントロール、炭素イオンビーム 2Gy、5Gy、15Gy 照射群における末梢血球数は、それぞれ  $1.99 \times 10^6$  個/mL (n=2)、 $2.08 \pm 0.25 \times 10^6$  個/mL (n=3)、 $2.00 \times 10^6$  個/mL (n=2) であった (図 1 7)。非照射コントロールと炭素イオンビーム 2Gy の間には有意な差は確認できなかった ( $p = 0.14$ )。

以上より炭素イオンビーム 2Gy、5Gy、15Gy を照射して 7 日後は、有意な差ではないがコントロールとくらべて末梢血球数が減少する傾向にあった。しかし末梢血球数において 2Gy、5Gy、15Gy の間に線量依存性は確認されなかった。

### 3.3.2 炭素イオンビーム 2 Gy、5 Gy 照射 7 日後の腎臓組織像 (HE 染色)

次に、炭素イオンビームの全身照射後の造血組織に線量依存的な影響があるか、パラフィン切片の HE 染色により評価した。放射線照射 7 日目において、炭素イオンビーム 2Gy、5Gy (図 1 8)、15Gy (図 1 5 a) はいずれもコントロール群より造血細胞が減少していた。組織においては 15Gy、5 Gy、2Gy の順に腎臓内の造血細胞が減少している傾向がみられた。

### 3.3.3 ガンマ線 0.1 Gy、0.5 Gy、1 Gy 照射 7 日後の末梢血球数

造血組織における線量の閾値を調べるために高崎原子力研究所のガンマ線 ( $^{60}\text{Co}$ ) 照射装置を使用して 0.1Gy、0.5Gy、1Gy を、所属研究室のガンマセルを使用して 5 Gy、15Gy のガンマ線 ( $^{137}\text{Cs}$ ) を照射し、照射 7 日後にデビッドソン液で固定して組織を得た。また 0.1Gy、0.5Gy から末梢血と造血細胞への放射線影響を確認するために照射 1 日後と 7 日後に採血をおこなったところ、末梢血球数は照射 1 日後では  $2.01 \pm 0.25 \times 10^6$  個/mL (n = 4)、 $2.20 \pm 0.41 \times 10^6$  個/mL (n = 4) (図 19)であり、照射 7 日後では  $2.06 \pm 0.37 \times 10^6$  個/mL (n=5)、 $2.10 \pm 0.28 \times 10^6$  個/mL (n=5)であった(図 20)。照射 1 日後、7 日後ともにコントロールと 0.1Gy、0.5Gy の間には有意な差はみられなかった(0.1Gy1 日 p=0.096)(0.1Gy7 日 p=0.111)(0.5Gy1 日 p=0.322)(0.5Gy7 日 p=0.112)。1 Gy 照射 1 日後の末梢血球数は  $2.28 \times 10^6$  個/mL (n=1)だった。

### 3.3.4 ガンマ線 0.1 Gy、0.5 Gy、1 Gy 照射 7 日後の腎臓組織像 (HE 染色)

ガンマ線 0.1Gy 照射 7 日後の組織では造血細胞の減少が確認できなかったがガンマ線 0.5Gy 照射 7 日後の組織では造血細胞の減少が確認できた。1Gy 照射 7 日後の組織では造血細胞の減少が確認できなかった (図 21)。

### 3.3.5 ガンマ線 0.1 Gy、0.5 Gy、照射 1 日後の末梢血球数

いずれの群においても有意な差は確認できなかった。よってガンマ線 0.1 Gy, 0.5 Gy, は末梢赤血球には影響を及ぼさないと考えられる (図 1 9)。

### 3.3.6 ガンマ線 0.1 Gy、 0.5 Gy、照射 1 日後の腎臓組織像 (HE 染色)

コントロールと比較していずれも造血細胞の減少は確認できなかった。よってガンマ線 0.1 Gy、0.5 Gy 照射 1 日後では造血組織には影響がないと考えられる (図 2 2)。

## 3.4 貧血処理後における造血細胞の放射線影響の解析

造血細胞の放射線感受性を確認するためにフェニルヒドラジン投与によって貧血処理した後の個体にガンマ線 (15Gy) を照射した。

### 3.4.1 貧血処理後にガンマ線 15 Gy 照射した際の末梢血球数

貧血処理 2 日後の末梢血球数は  $1.32 \times 10^6$  個/mL ( $n = 2$ )、貧血 7 日後では  $1.85 \pm 0.12 \times 10^6$  個/mL ( $n = 3$ ) であった。貧血処理の 1 日後にガンマ線を照射した場合は、照射 1 日後では  $1.79 \times 10^6$  個/mL ( $n = 1$ )、照射 2 日後では  $1.36 \pm 0.24 \times 10^6$  個/mL ( $n = 5$ )、照射 3 日後では  $1.25 \pm 0.23 \times 10^6$  個/mL ( $n = 6$ ) であった (図 2 3)。貧血処理 1 日後にガンマ線を照射し 2 日後 (A1G2) とコントロールの間で末梢血球数の平均値に関して t 検定を実施したところ、p 値は  $3.48 \times 10^{-4}$  であった。貧血処理 1 日後にガンマ線を照射し 3 日後 (A1G3) とコントロールの間では p 値は  $6.84 \times 10^{-6}$ 、貧血処理 3 日後

(A3) とコントロールの間では  $p$  値は 0.02 であり、いずれもコントロール群と比べて末梢血球数は有意に減少した。一方で、貧血処理群 (A1G2、A1G3) の間には有意な差は認められなかった ( $p = 0.157$ )。

以上の結果よりフェニルヒドラジン投与後にガンマ線を照射した個体群では未処理の個体群と比べて造血細胞の回復が早くなった可能性が示唆された。

### 3.4.2 腎臓組織における PCNA 陽性細胞の割合の算出方法

組織切片上の腎臓における PCNA 陽性細胞数の割合を算出するために撮影した画像を ImageJ の cell count 機能を使い、画像上の PCNA 陽性の造血細胞を紺色で、PCNA 陰性の造血細胞を水色で、赤芽球、赤血球を黄緑色で標識して細胞数を測定した (図 2 4)。

40 倍対物レンズを使用して視野が重複しないよう 1 切片につき 3 枚以上を撮影し、各画像ごとの造血細胞に占める PCNA 陽性細胞の割合を PCNA 陽性/全造血細胞 (PCNA 陽性+ PCNA 陰性) より算出し、1 切片あたりの各細胞数の平均値を算出した。

### 3.4.3 貧血 1 日目、貧血 2 日目、貧血 8 日目の造血細胞数 (HE 染色)

貧血 1 日目、貧血 2 日目、貧血 8 日目はいずれもコントロールと比べて造血細胞が減少していなかった (図 2 5 a-c)。

#### 3.4.4 貧血 1 日目、貧血 2 日目、貧血 8 日目の PCNA 陽性細胞数の割合

組織切片上の腎臓の造血細胞における PCNA 陽性細胞数の割合はコントロール では 22.4%、貧血処理 1 日目では 64.2%、貧血処理 2 日目では 55.0%、貧血処理 8 日目では 63.8%であった(図 2 6、図 2 7、表 1)。これらの結果より貧血処理 1 日目、2 日目、8 日目ともにコントロールより PCNA 陽性細胞の割合が高いことがわかった。よって貧血処理によって PCNA 陽性細胞が増加する可能性が示唆された

#### 3.4.5 貧血 1 日目、ガンマ線 1 日目と貧血 1 日目および貧血 2 日目にガンマ線 15Gy を照射した 1 日後における腎臓組織像 (HE 染色)

ガンマ線 15Gy 照射 1 日後の HE 染色像よりガンマ線照射は造血細胞を減少させた。また貧血処理 1 日後および 2 日後にガンマ線照射した 1 日後の HE 染色像でも造血細胞の減少が確認できた (図 2 5 a、図 2 8 a-c)。

#### 3.4.6 貧血 1 日目、貧血 2 日目、ガンマ線 1 日目、ガンマ線照射 1 日後と貧血 1 日目および貧血 2 日目にガンマ線 15Gy を照射した 1 日後における PCNA 陽性細胞数の割合

コントロール群と貧血処理 1 日後の群 (A1)、貧血処理 2 日目の群 (A2)、ガンマ線照射 1 日後の群 (G1) と貧血 1 日目にガンマ線 15Gy を照射した 1 日後の群 (A1G1) また貧血 2 日目にガンマ線 15Gy を照射した 1 日後の群 (A2G1) において PCNA 陽性



細胞数を測定したところ、コントロール群は22.4%、貧血処理1日目の群(A1)は64.2%、貧血処理2日目の群(A2)は55.0%、ガンマ線照射1日後の群(G1)は64.2%、貧血1日後にガンマ線照射した1日後の群(A1G1)は21.9%、貧血2日後にガンマ線照射した1日後の群(A2G1)は36.7%であった(図27、図29、表1)。これらの結果よりコントロールと比べて貧血1日後(A1)および貧血2日後(A2)と照射のみ1日後(G1)におけるPCNA陽性細胞数の割合は増加し、貧血1日後にガンマ線を照射した1日後(A1G1)と貧血2日後にガンマ線を照射した1日後(A2G1)ではともに減少した。

#### **3.4.7 ガンマ線照射7日後の貧血処理なしと貧血処理1日目、貧血処理2日目における腎臓組織像(HE染色)**

貧血処理なしガンマ線照射7日後(G7)と比べて貧血処理1日目にガンマ線照射した7日後(A1G7)の造血細胞が多いことから、貧血処理してからガンマ線照射をおこなうと造血細胞の細胞増殖が亢進されている可能性が示唆された(図30)。

#### **3.4.8 ガンマ線照射7日後の貧血処理なしと貧血処理1日目、貧血処理2日目におけるPCNA陽性細胞数の割合**

貧血処理なしガンマ線照射7日後(G7)と貧血処理1日目にガンマ線照射した7日

後 (A1G7)、貧血処理 2 日目にガンマ線照射した 7 日後 (A2G7) の造血細胞数を測定し、造血細胞中に占める PCNA 陽性細胞の割合を算出したところ、コントロール 22.4%、貧血処理なし (G7) 12.5%、貧血処理 1 日後 (A1G7) 41.7%、貧血処理 2 日後 (A2G7) 67.9%であった (図 2 7、図 3 1、表 1)。照射のみ 7 日後 (G7) では細胞増殖がコントロールと比べて不活発になっているのに対して、A1G7 および A2G7 では大きく活性化していることから、造血細胞が放射線抵抗性に増殖している可能性が示唆された。

## 4. 考察

### 4.1 末梢血球数は腎臓への直接照射によって減少する

造血細胞は活発に細胞分裂し、増殖していることから放射線感受性が高く、放射線を全身照射した際には造血細胞が減少することが多くの動物種において広く知られている<sup>(35)(36)(37)(38)</sup>。造血細胞は分化して末梢血の血球となる。末梢の血球数を調べることで造血細胞の状態を知ることができると期待できる。本研究においてメダカにおいても照射により腎臓の造血細胞が減少することを確認した。さらに、末梢血球数を計数し造血細胞の状態の評価を行ったところ、両側腎臓のみに陽子線を局所照射した個体群では、腎臓以外を照射した個体群および照射していないコントロール個体群と比較して末梢血球数が有意に減少した。魚類における主たる造血組織は腎臓であることから、メダカにおいて腎臓の造血細胞が照射により細胞死、増殖停止等の障害を受けることによって末梢血球数が減少し、腎臓以外の被ばくは末梢血球数には影響しないことが明らかとなった。

メダカの腎臓の一部に炭素イオンのマイクロビームを照射したところ、照射された領域における造血細胞の減少を確認したが、末梢血球数の減少は認められなかった。本研究において使用したマイクロビームは直径が 250  $\mu\text{m}$  であったことから、照射領域の面積は片側の腎臓の 10%未満であり、造血細胞の減少による末梢血球数の減少分が軽微（全体の 5%程度）で個体差の範囲に収まり、造血細胞の減少による末梢血球数の減少

を確認できなかったと考えられる。

#### 4.2. 炭素イオンビーム 15 Gy 照射 14 日後に造血細胞は回復しなかった

放射線 15 Gy 照射 7 日後にはいずれの線種においても組織切片上の腎臓内で造血細胞は減少した。照射 14, 21, および 28 日後には、ガンマ線および陽子線照射個体の腎臓内では減少した造血細胞の回復が確認できた。しかし照射 14, 21, 28 日後の炭素イオンビーム照射個体では回復が確認できなかったことから造血細胞の回復度は線種により異なっていたと考えられる。

炭素イオンビーム照射個体では 14 日目以降に造血細胞が回復しなかった理由として RBE (生物学的効果比) の違いによる組織影響が考えられる。各線種の RBE はガンマ線を 1 としたときに陽子線が 5、炭素イオンビームが 20 であり<sup>(38)</sup>、結果 3.2 より造血組織の回復度合いは炭素イオンビーム、陽子線、ガンマ線の順に高かった。RBE の違いは LET (線エネルギー効果比) の違いによってもたらされると一般的に考えられている。よって 15 Gy 炭素イオンビーム照射 14 日後ではエネルギー量が大きかったために造血細胞のダメージが大きく回復できなかったものと考えられる。

### 4.3 造血細胞は線量依存的に減少した

本研究ではメダカ成魚腎臓の造血細胞における線量依存性および造血細胞が細胞死する閾値線量を明らかにした。15 Gy、5 Gy、2 Gy の各線量の炭素イオンビームを照射して7日後に腎臓の組織切片を観察したところ、線量依存的に造血細胞が減少した。また、1 Gy、0.5 Gy、0.1 Gy の線量のガンマ線を照射した場合には、1 Gy では造血細胞の減少が確認できなかったが0.5 Gy では造血細胞が減少した。0.1 Gy のガンマ線を照射した腎臓では造血細胞は減少しなかった。以上より、炭素イオンビーム15 Gy から2 Gy の線量域において造血細胞の放射線応答に線量依存的があり、さらに炭素イオンビームの場合には2 Gy よりも低線量域に、ガンマ線の場合には15 Gy 照射による減少が確認されていることから15 Gy と1 Gy の間に造血細胞の細胞死が誘導される閾値線量があることが示唆された。

他の生物種の造血細胞における放射線感受性の知見として、2 Gy の X 線の照射によってマウスの造血幹細胞・前駆細胞 (Hematopoietic Stem and Progenitor Cell) のコロニー形成能が抑制されることが報告されており、1 Gy の X 線照射では影響が確認されていない<sup>(39)</sup>。一方1 Gy のガンマ線照射により造血幹細胞の減少を確認した報告もある<sup>(18)</sup>。X 線とガンマ線の LET はほぼ同じである<sup>(39)</sup>ことからマウス造血細胞が細胞死する閾値線量は X 線およびガンマ線1 Gy の周辺にあると予測できる。よってメダカはマウスと比べてほぼ同じ閾値線量であると考えられる。

#### 4.4 メダカ造血細胞は放射線に抵抗性の増殖を示した

哺乳類では放射線照射により細胞周期チェックポイントが機能して細胞周期が停止し DNA 修復が起こることで知られているが、メダカの培養細胞においても同様に放射線照射により細胞周期が停止して速やかに DNA 修復が誘導される<sup>(40) (41) (42)</sup>。これに対して、メダカではガンマ線が照射された 1 日後には造血細胞の増殖が活発になることを見出した。この結果は、メダカの造血細胞においては放射線照射によって細胞増殖が停止していないものと考えられる。加えて貧血処理では 1 日後から 8 日後まで造血細胞の増殖が活性化することから、貧血後に照射した場合においても、貧血後の照射でも増殖が停止しないと予想された。しかし、貧血処理後にガンマ線を照射した場合には、照射 1 日後に増殖期の細胞が減少した。よって、貧血処理後のメダカの造血細胞では照射 1 日後において細胞周期チェック機能が機能して細胞増殖が停止したと考えられ、貧血処理によって通常時の細胞増殖とは異なる細胞増殖が誘導されていることが示唆された。

ガンマ線照射の 1 日後には細胞増殖は活性化したが造血細胞は減少した。ガンマ線照射の 7 日後にも造血細胞数は回復せず、また増殖期にある細胞も減少したことから、造血細胞がガンマ線照射によって死滅したと考えられる。一方、貧血処理後にガンマ線を照射した場合には、照射 7 日後には増殖期の細胞が増加し、造血細胞数も増加した。貧血処理後のガンマ線照射 1 日後に停止していた細胞増殖が、照射 7 日後には再開し造

血細胞数が増加したことから、ガンマ線照射群とは異なり貧血後照射群ではガンマ線照射に応答して造血細胞が増殖を停止して DNA 損傷を修復し、7 日後までに増殖を再開したものと考えられる。

以上の結果から、メダカ造血細胞は通常時においては放射線に抵抗性を示さないが、貧血処理によって放射線に抵抗性の細胞増殖が誘導されることが示唆された。

#### 4.5 総括

先行研究より造血細胞以外の体細胞も放射線抵抗性の増殖を示すことより本研究はメダカが放射線生物学のモデル動物として通常時には DNA 修復が抑制される性質を持っている可能性を示唆した。今後は本研究で明らかになった貧血後のメダカ造血細胞が放射線に抵抗性になるメカニズムが遺伝子発現解析や免疫染色などの手法によって解明されることを期待する。

## 5. 謝辞

本研究をまとめるにあたり指導教員の三谷啓志先生には研究の方向性から考察までご指導いただきました。指導教員の尾田正二先生にはメダカの飼育方法から実験手法、生活習慣に至るまで相談にのっていただきました。また所属研究室の研究員である浅香智美博士には実験手法や実験の方向性についていつもご指導いただきありがとうございました。所属研究室の保田隆子博士には組織切片や染色方法に関して多くのご指導をいただきました。日本原子力研究開発機構の舟山知夫博士には実験手法についての相談や照射装置を利用させていただきありがとうございました。所属研究室の博士課程の永田健斗さんには日頃から組織切片を中心に研究活動に関する多くのことを教えていただきありがとうございました。梶原亮之さんには高崎量子応用研究所までの運転および照射の準備を手伝っていただきありがとうございました。

動物生殖システム分野の皆様には日頃よりセミナーや実験の手伝いから生活に関することまで多くのご支援をいただき誠にありがとうございました。

最後になりますが家族、友人および知人の皆様による援助のおかげで修士課程での研究に励むことができましたことを厚く御礼申し上げます。



## 6. 引用文献

(1) 吉井義一

放射線生物学概論 第2版

北海道大学図書刊行会 1986, p222-p225, P116-121, P124-p127

(2) Stone, H.B., Coleman, C.N., Anscher, M.S., McBride, W.H.

Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms.

The lancet oncology 2003.4, 529-536.

(3) Tatsuya, K.

Local bone marrow changes following therapeutic telecobalt irradiation.

日本医学放射線学会雑誌 1963, 22, p1334-1345

(4) 青山喬, 木村博, 池淵誠ほか

放射線基礎医学 第9版

金芳堂 2000, p148-150

(5) Yokota, A., Okuda, T.

Current topics in regulatory mechanisms of hematopoiesis.

京府医大誌 2010, 119(10), 681-693

(6) Nakeff, A., McLellan, W., Bryan, J., Valeriote, F.

Response of megakaryocyte, erythroid, and granulocyte-macrophage progenitor cells in mouse bone marrow to gamma-irradiation and cyclophosphamide,

Experimental Hematology Today,

Springer, 1979, p. 99-104.

(7) Alberts, B., et al.

Molecular Biology of THE CELL, 3rd Edition

Cell press 2009, p1167-1168

(8) 帯刀益夫

赤血球分化と遺伝子発現の制御

化学と生物 1990, 28(1), p20-27

(9) 柴田徳思

放射線概論 第9版  
通商産業研究社, 2016

(10) 藤井順逸

活性酸素とシグナルと酸化ストレス, 酸化ストレスによる貧血—造血幹細胞の老化と赤血球の酸化  
実験医学, 2009, 27(15), p164-168

(11) Orkin, S.H., Zon, L.I,

Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology.  
Cell 2008, 132, p631-644.

(12) Chasis, J.A., Mohandas, N.

Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis.  
Blood 2008, 112, p470-478.

(13) Wang, Y., Liuab, L., Pazhanisamy, S. K., Liac, H., Mengac, S., Zhoua D.

Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells  
Free Radical Biology and Medicine, 2010, 48(2), p348-356

(14) Wang, Y., Schulte, B.A., LaRue, A.C., Ogawa, M., Zhou, D.

Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence.  
Blood 2006. 107, p358-366.

(15) Blanpain C.

DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cell  
Cell Stem Cell 2011, 8, p16-29

(16) 吉川敏一

酸化ストレスフリーラジカル医学生物学の最前線  
医歯薬出版 2006, 10, p28-33

(17) Baranov A. E.

Hematopoietic recovery after 10-Gy acute total body radiation

Blood, 1994 83(2), p596-599

(18) Mohrin M.

Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis cell

Stem Cell, 2010, 7, p174–185

(19) 森本忠明

魚類造血機構の解明

Fish Pathology, 2014, 49 (3), p85-92

(20) Davidson A.J., Zon L.I.

The ‘definitive’ (and ‘primitive’) guide to zebrafish hematopoiesis.

Oncogene. 2004, 23(43), p7233–7246

(21) Chen, A.T., Zon, L.I.

Zebrafish blood stem cells.

Journal of cellular biochemistry, 2009, 108, p35-42.

(22) Lenard, A., Alghisi, E., Daff, H., Donzelli, M., McGinnis C., Lengerke, C.

Using zebrafish to model erythroid lineage toxicity and regeneration.

Haematologica, 2016, 101, p164-167

(23) Kobayashi, I., Katakura, F., Moritomo T., et al.

Isolation and characterization of hematopoietic stem cells in teleost fish

Developmental & Comparative Immunology, 2016, 58, p86-94

(24) Wittbrodt, J., Shima, A., Schartl, M.

Medaka - a model organism from the far east

Nature Reviews. Genetics, 2002, 3(1), 53-64

(25) 岩松鷹司

新版メダカ学全書

大学教育出版, 2016.

- (26) Sayed, A. E. H., Igarashi, K., Watanabe-Asaka, T., et al.  
Double strand break repair and  $\gamma$ -H2AX formation in erythrocytes of medaka (*Oryzias latipes*) after  $\gamma$ -irradiation  
Environmental Pollution, 2017, 224, p35-43
- (27) Sayed, A. E. H., Oda, S., Mitani, H.  
Nuclear and cytoplasmic changes in erythrocytes of p53-deficient medaka fish (*Oryzias latipes*) after exposure to gamma-radiation. Mutation research.  
Genetic toxicology and environmental mutagenesis, 2014, 771, p64-70.
- (28) Fukamachi, F., Kinoshita, M., Tsujimura, T., Shimada, A., Oda, S., Shima A., Meyer A., Kawamura S., Mitani, H.  
Rescue from oculocutaneous albinism type 4 using medaka slc45a2 cDNA driven by its own promoter.  
Genetics 2008, 178, p761-769.
- (29) Watanabe-Asaka, T., Nihoroi, M., Terada, M., Oda, S., Iwasaki, K., Sudoh, M., Yamada S., Ohshima H., Mukai, C.  
Technology with high-speed movies to analyze the movement of internal organs in medaka  
Transactions of the Japan Society for Aeronautical and Space Sciences, Aerospace Technology Japan, 2012, 10, No. ists28, p1-4,
- (30) 尾田 正二, 西槇 俊之, 勝村 啓史, 片田 吉彦, 小賀 厚徳, 池本 健三, 谷口 善仁, 太田 博樹  
連続全身組織切片と 24 時間トラッキングによるメダカの組織形態と活動性の網羅的な解析  
Cytometry Research 2014, 24(2), p9~14,
- (31) Nagata, K., Hashimoto, C., Watanabe-Asaka, Kazusa Itoh, K., Yasuda, T., Ohta, K., Oonishi, H., Igarashi, K., Suzuki, M., Funayama, T., Kobayashi, Y., Nishimaki, T., Katsumura, T., Oota, H., Ogawa, M., Oga, A., Ikemoto, K., Itoh, H., Kutsuna, N., Shoji Oda, S., Mitani, H.  
*In vivo* 3D analysis of systemic effects after local heavy-ion beam irradiation in an animal mode  
Scientific Report, 2016, 6, Article number: 28691

(32)永田健斗

メダカ精巣における放射線誘発性精巣卵の形成メカニズムの解明

2016, 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻修士論文

(33) Yasuda, T., Kamahori, M., Nagata, K., Watanabe-Asaka, T., Suzuki, M., Funayama, T., Mitani, H., Oda, S.

Abscopal activation of microglia in embryonic fish brain following targeted irradiation with heavy-ion microbeam

International journal of molecular science 2017, 18(7), pii: E1428. doi: 10.3390/ijms18071428.

(34) 橋本知佳

メダカをモデルとした赤血球・赤芽球細胞系における放射線応答の解析

2016, 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻修士論文

(35) Fukuda, M., Itoh, H., T Ohshima, T., Saidoh, M., Tanaka, A.

New applications of ion beams to material, space, and biological science and engineering.

Charged Particle and Photon Interactions with Matter Chemical, Physicochemical, and Biological Consequences with Applications Marcel Dekker Inc New York-Basel 2004, p813-859

(36) X, B., Feng, D., Korczeniewska, J., Alper, N., Hu, G., Barnes, B. J.

Deletion of Irf5 protects hematopoietic stem cells from DNA damage-induced apoptosis and suppresses g-irradiation-induced thymic lymphomagenesis

Oncogene 2014, 33, p3288–3297

(37) Chang, J., Feng, W., Wang, Y., Luo, Y., Allen, A. R., Koturbash, I., Turner, J., Stewart, B., Raber, J., Hauer-Jensen, M., Zhou D., Shao, L.

Whole-body proton irradiation causes long-term damage to hematopoietic stem cells in mice  
Radiation Research, 2015, 183(2), p240-248.

(38) Eckerman, K., Harrison, J., Menzel, H-G., Clement, C. H.

Annals of the ICRP publication 119

ICRP, 2012, volume41 supplement 1

(39) Till, J. E., McCulloch, E. A.

A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells

Radiation Research, 1961, 14, p213-222

(40) Igarashi, K., Kobayashi, J., Katsumura, T., Urushihara, Y., Hida, K., Watanabe-Asaka, T., Oota, H., Oda, S., Mitani, H.

An approach to elucidate NBS1 function in DNA repair using frequent nonsynonymous polymorphism in wild medaka (*Oryzias latipes*) populations

PLOS ONE 2017. DOI:10.1371/journal.pone.0170006

(41) Hidaka, M., Oda, S., Kumahara, Y., Fukumoto M., Mitani H.

Cell lines derived from a medaka radiation-sensitive mutant have defects in DNA double-strand break responses

J. Radiat. Res, 2010, 51, p165–171

(42) Urushihara, Y., Kobayashi, J., Matsumoto, Y., Komatsu, K., Oda, S., Mitani, H.

DNA-PK inhibition causes a low level of H2AX phosphorylation and homologous recombination repair in Medaka (*Oryzias latipes*) cells

Biochemical and Biophysical Research Communications, 2012, 429(3–4), p131-136



図1 体躯が透明である SK2 系統 (Fukamachi et al., 2008)

解剖することなく成体の腎臓を目視することができるため、放射線照射や貧血処理の際の造血系への影響を確認することができる。

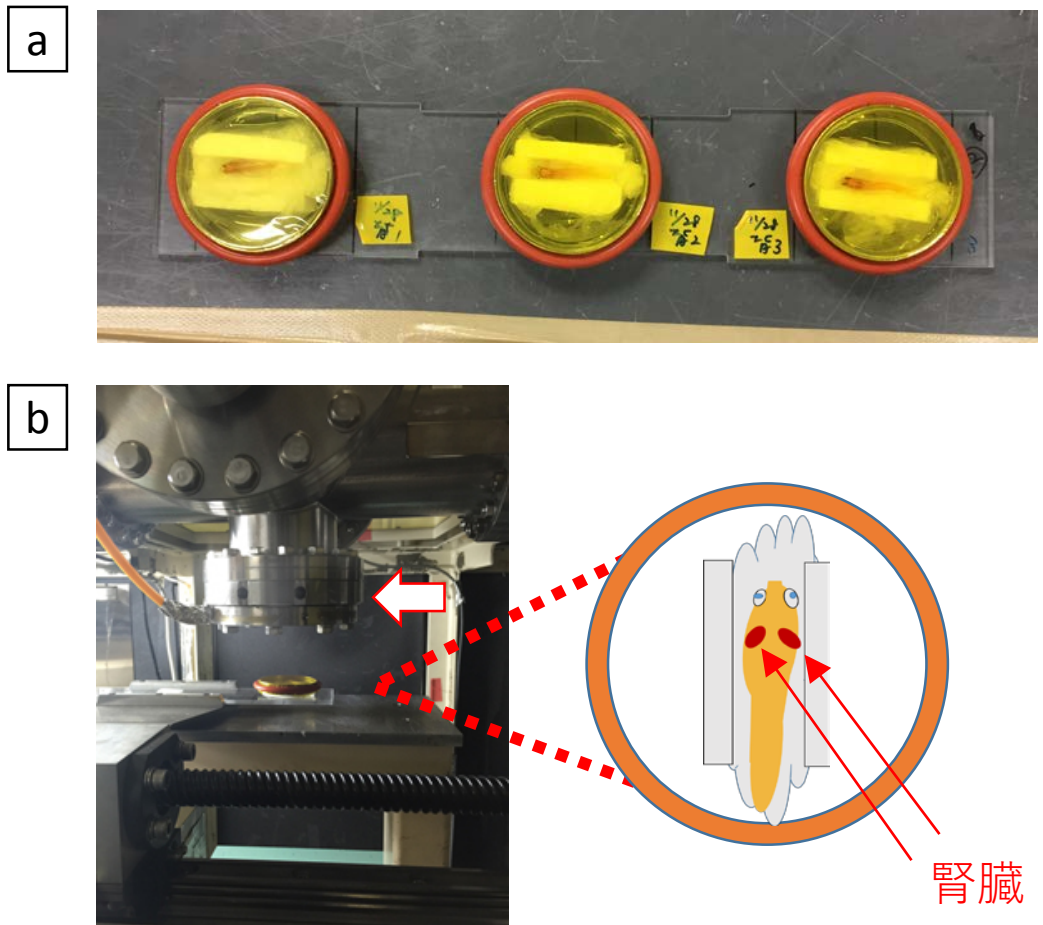


図2 炭素イオンビーム、陽子線の照射の実際

(a) 麻酔したメダカ成魚の背側が上になるように発泡スチロール製の台を使用して60 mm 径プラスチックディッシュ内にメダカを固定した。また、十分な量の麻酔液を浸みこませたキムワイプをディッシュ内に詰めて照射中（通常は5分間程度）にメダカが窒息しないように配慮した。照射中にメダカが逃げないように放射線透過性のカプトン膜を用いて蓋とした。使用したイオンビーム照射装置では同時に3サンプルまで照射が可能である。

(b) 照射装置にセットし、炭素イオンビームあるいは陽子線をメダカ成魚背側から照射した。イオンビームは写真の上部ポート（矢印）より照射される。



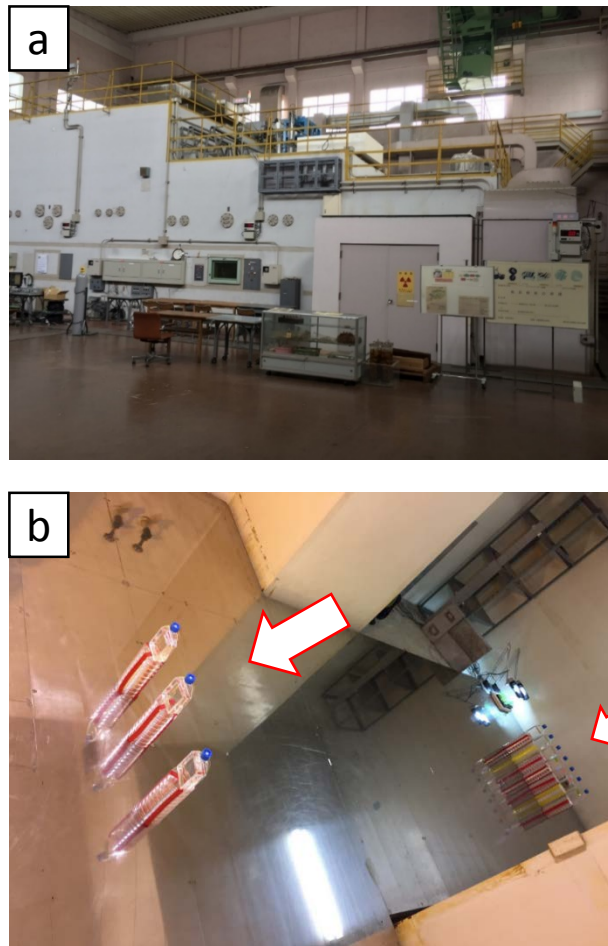


図3 高崎量子応用研究所のガンマ線照射装置

コバルトを線源とするガンマ線照射装置の外観 (a) と照射装置内でのメダカ成魚への照射の実際 (b) を示す。メダカ成魚を入れたフラスコ (矢印) と線源からの距離を調整することにより、照射線量を決定した。線源 (図 b の左方向) から 212.8 cm 離して照射した場合の線量は 1 Gy であり、301.1 cm では 0.5 Gy、650.7 cm では 0.1 Gy であった。

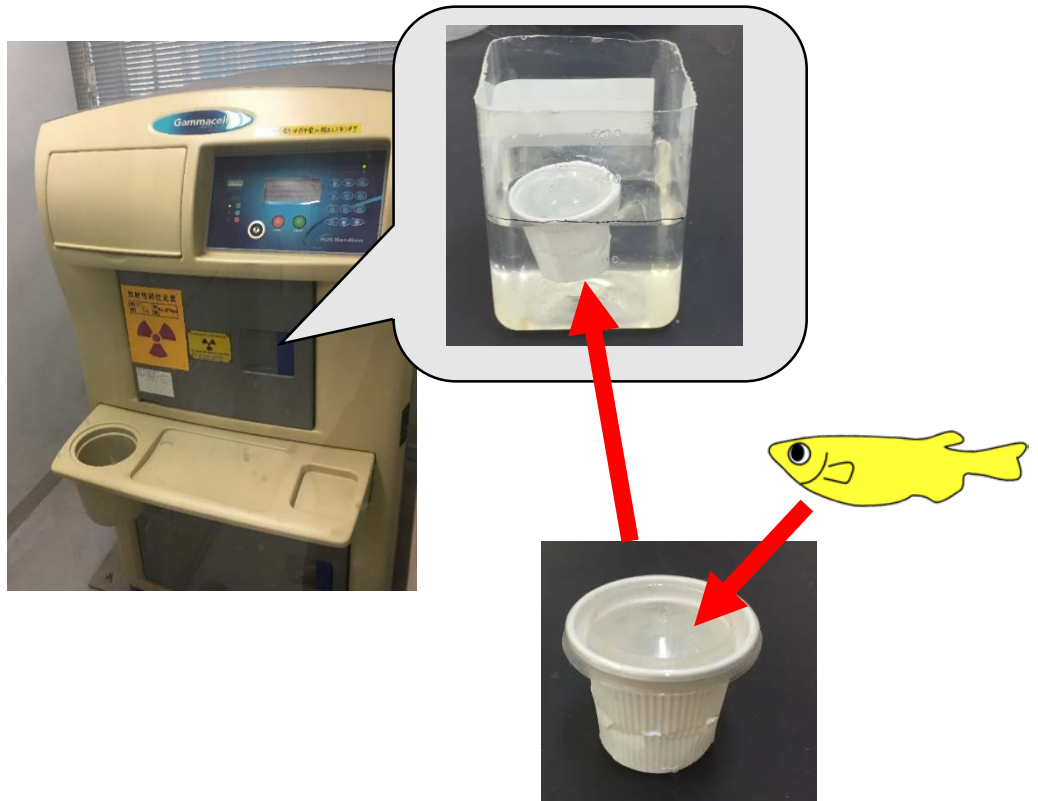


図4 ガンマセルを使用したガンマ線照射の方法

メダカ成魚が無理なく入るサイズのプラスチック製の容器にメダカ成魚を入れて照射中に逃げないように蓋をし、ガンマ線照射装置（ガンマセル）の照射室中央付近にメダカが位置するように配置して照射を行った。この方法により、照射中（1分間程度）のメダカ成魚が受けるストレスを減じることができる。



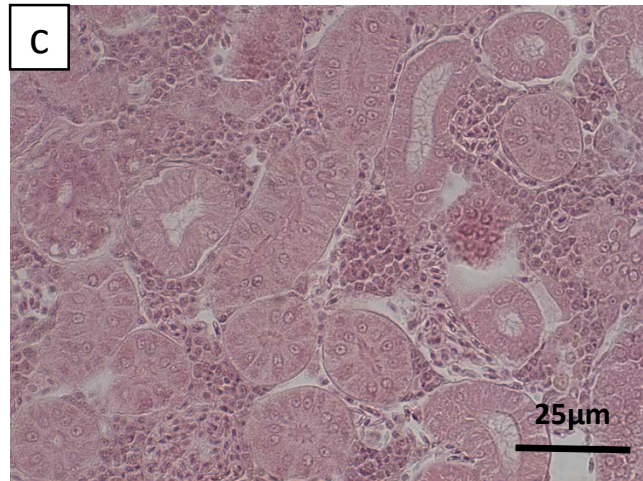
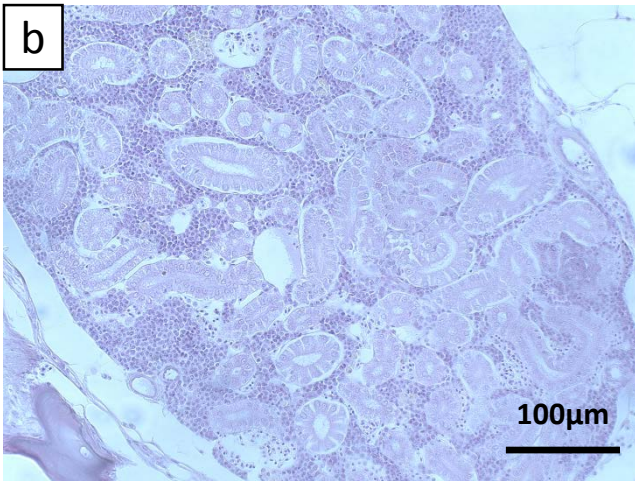
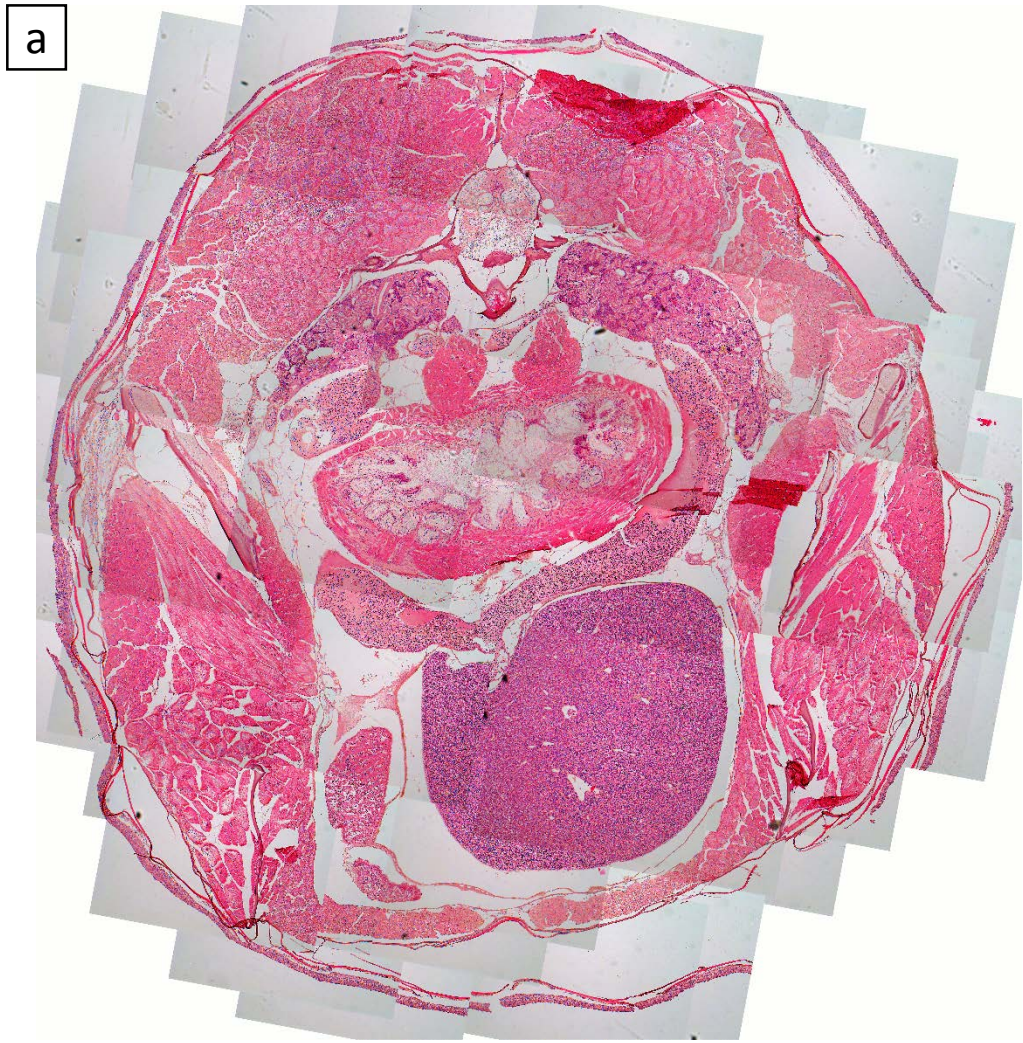


図5 照射していないコントロール個体の腎臓の組織像(HE染色)  
a. 10倍対物レンズで撮影して統合した画像

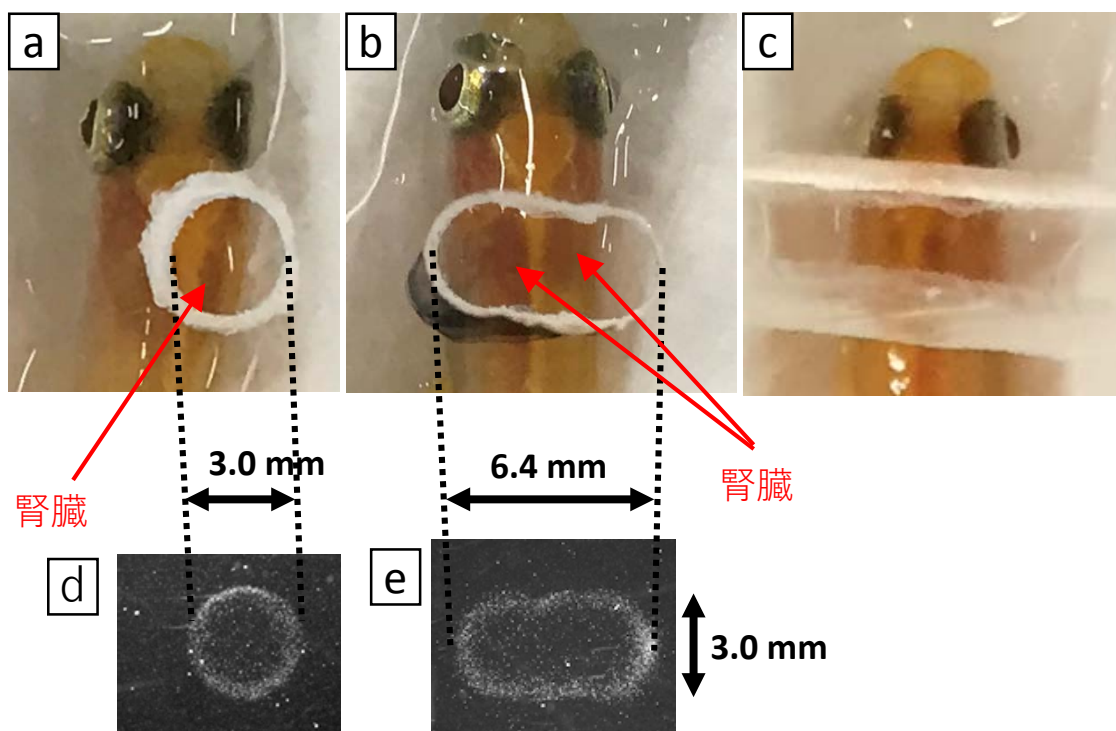


図6 遮蔽板による炭素イオンビーム/陽子線の局所照射の実際

a. 片側腎臓への局所照射では、遮蔽版（厚さ 5 mm の透明なアクリル板）に開けた直径 3 mm の円形の貫通部が、照射対象である片側の腎臓の直上に位置するようにセットし、照射を行った。

b. 両側腎臓への局所照射では、遮蔽版に開けた長径 6.4 mm 短径 3 mm の楕円形の貫通部が、照射対象である両側の腎臓の直上に位置するようにセットし、照射を行った。

c. 腎臓以外への局所照射では、幅約 4 mm の遮蔽版を左右の腎臓の直上にセットして腎臓部位を遮蔽し、頭部側、尾部側に照射した。

d. 片側腎臓照射用の遮蔽板を用いて CR39 を照射し、被照射領域を確認した。

e. 両側腎臓照射用の遮蔽板を用いて CR39 を照射し、被照射領域を確認した。



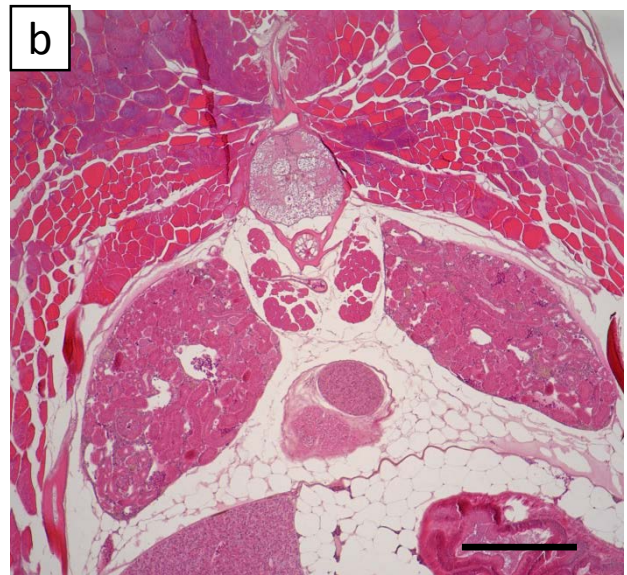
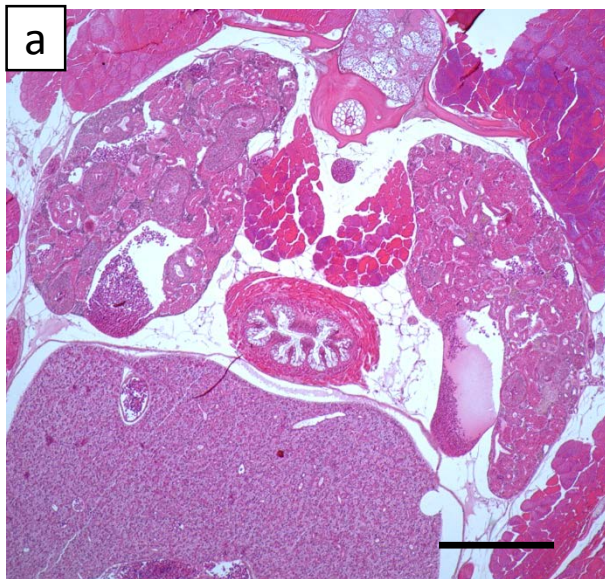


図7 陽子線(15 Gy)を局所照射した7日後のメダカ成魚の腎臓を含む横断切片の弱拡大像 (HE染色)

- (a)右側腎臓を局所照射した個体
- (b)両側腎臓を局所照射した個体
- (c)腎臓以外を照射した個体

スケールバーは 250  $\mu\text{m}$  を示す。

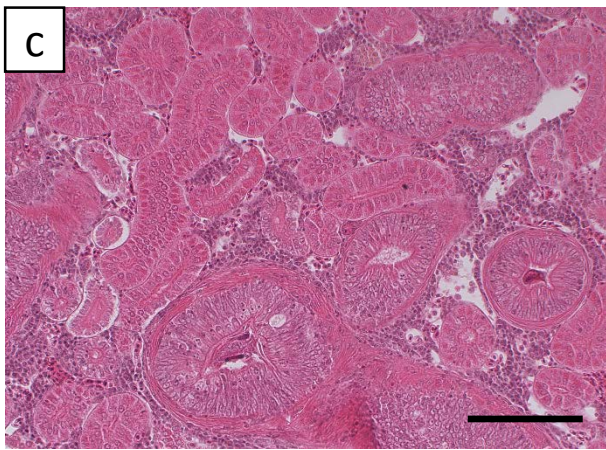
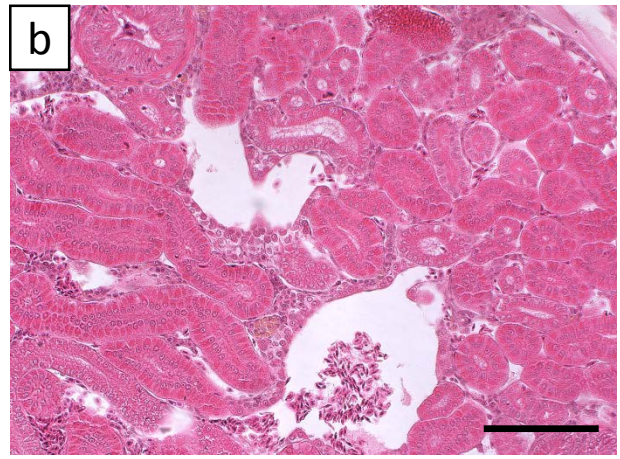
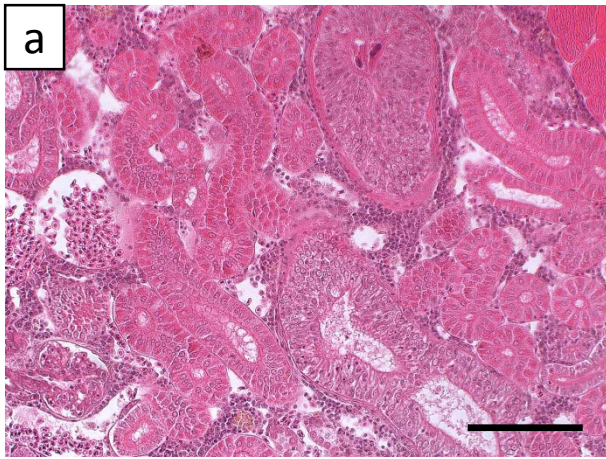


図8 陽子線(15 Gy)を局所照射した7日後のメダカ成魚の右側腎臓の組織切片の強拡大像 (HE染色)

- (a) 右側腎臓を局所照射した個体
- (b) 両側腎臓を局所照射した個体
- (c) 腎臓以外を照射した個体

スケールバーは 50  $\mu\text{m}$  を示す。



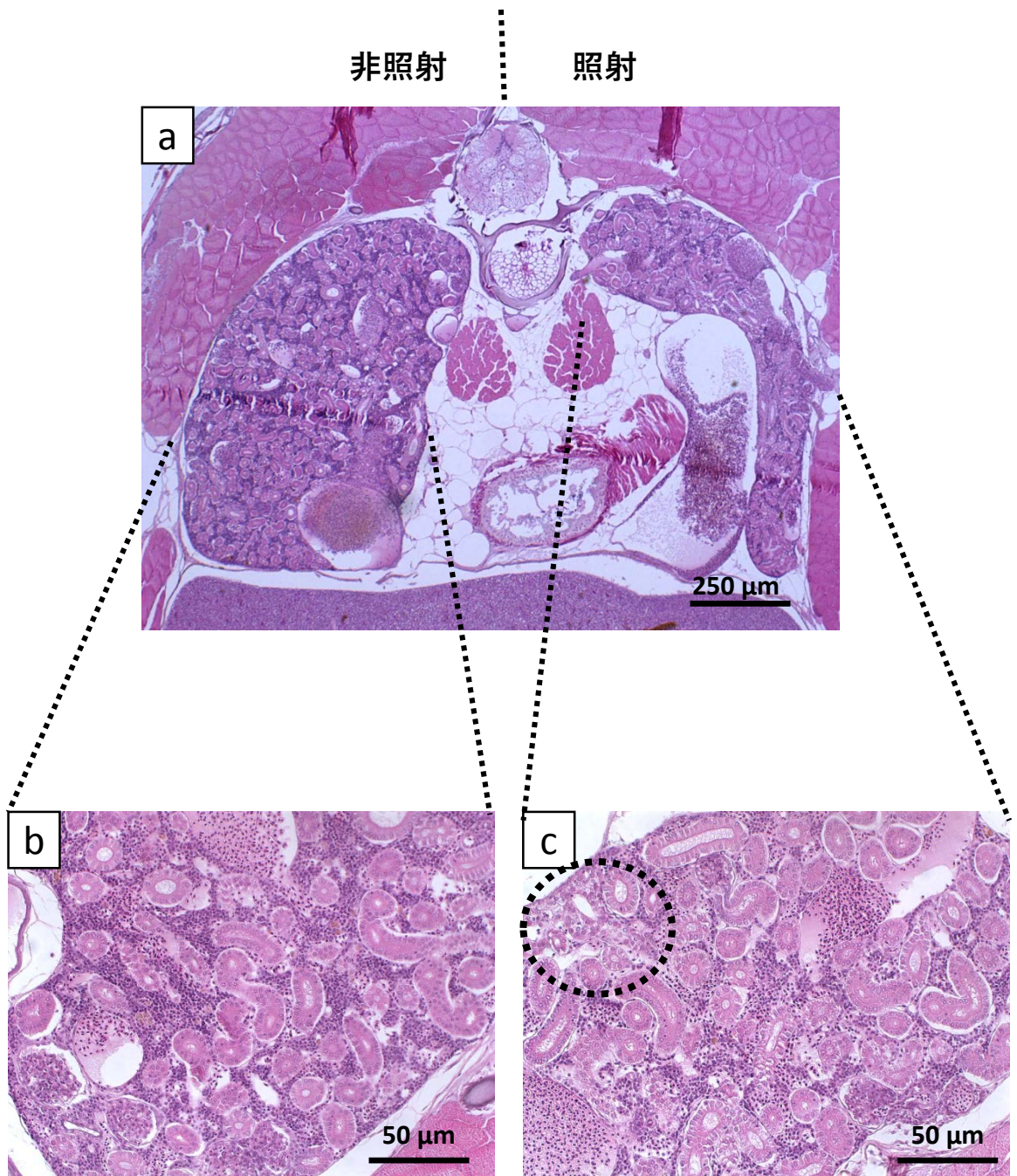


図9 炭素イオンビーム(15 Gy)のマイクロビーム(250  $\mu\text{m}$ )を右側腎臓に複数回照射した場合の腎臓の組織切片像(HE染色)

- (a) 腎臓組織切片
- (b) 非照射側腎臓
- (c) 照射側腎臓

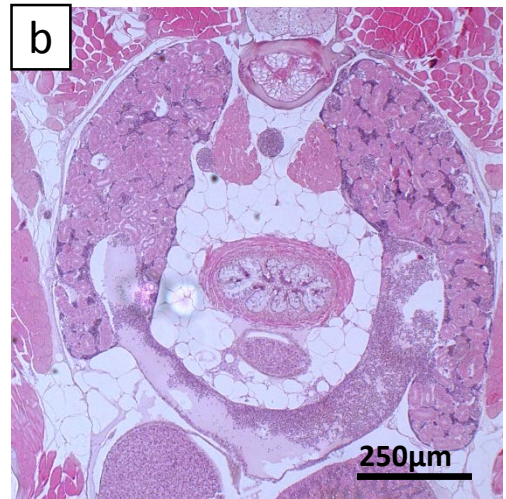
cにおける点線で囲んだ領域では、照射による細胞死と考える像が確認できる。



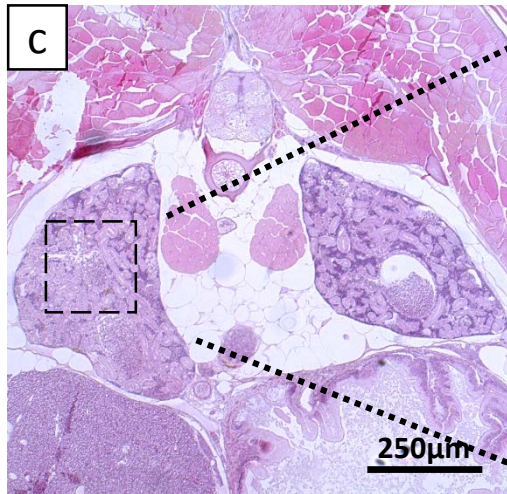
**直径2.5mm照射**



**直径2.8 mm照射**



**直径3.0 mm照射**



**照射**

**非照射**



図10 炭素イオンビーム(15 Gy)を右側腎臓へ局所照射し7日後のメダカ成魚の腎臓を含む横断切片像 (HE染色)

- (a) 直径2.5mmの局所照射7日後の腎臓組織
- (b) 直径2.8mmの局所炭素イオンビーム15Gy照射7日後の腎臓組織
- (c) 直径3.0mmの局所炭素イオンビーム15Gy照射7日後の腎臓組織
- (d) 直径3.0mmの局所炭素イオンビーム15Gy照射7日後の腎臓組織



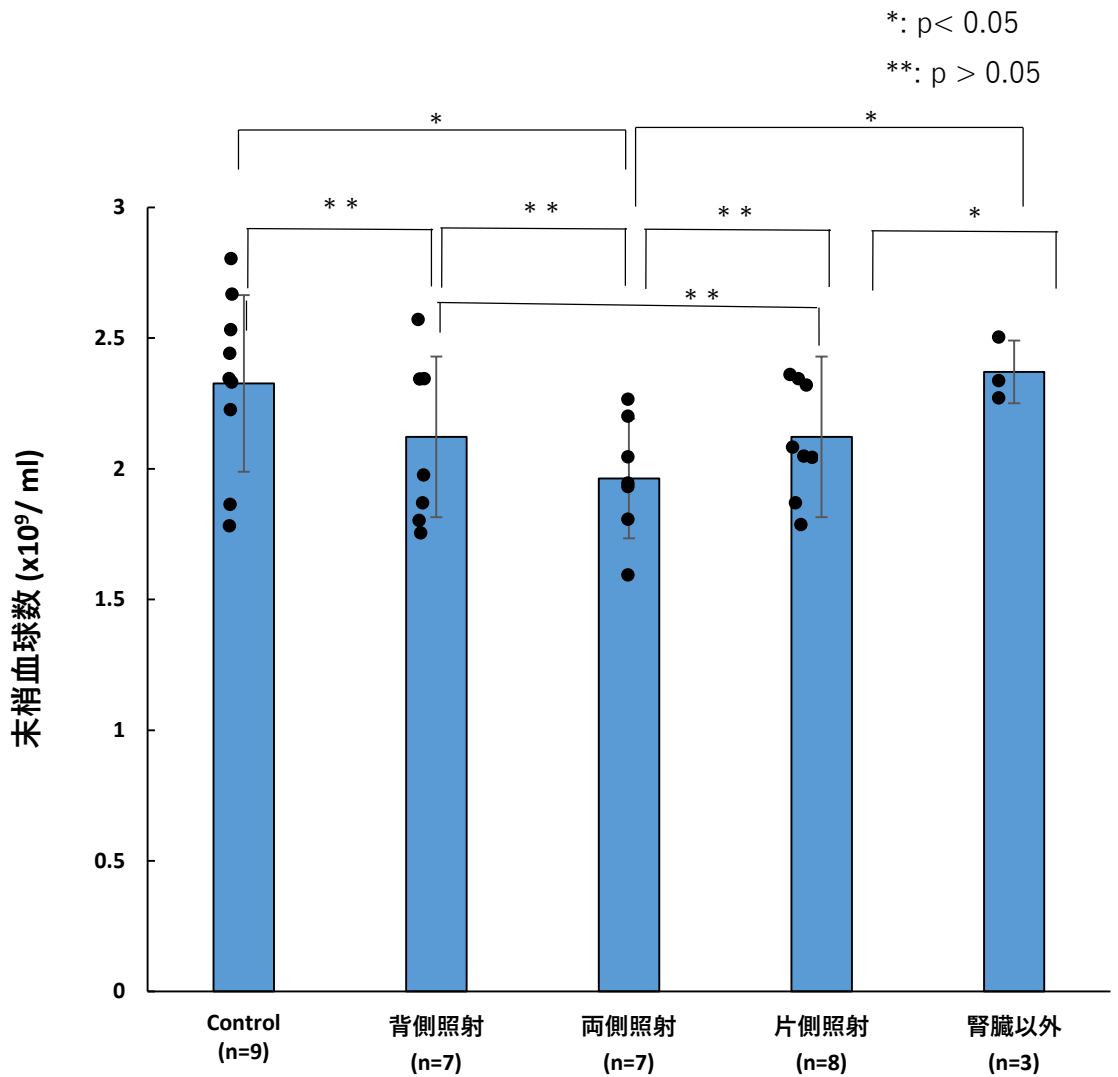


図 1 1 片側腎臓照射、両側腎臓照射、背側照射、腎臓以外へ陽子線(15 Gy)を照射した7日後における抹消血球数

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p > 0.05$

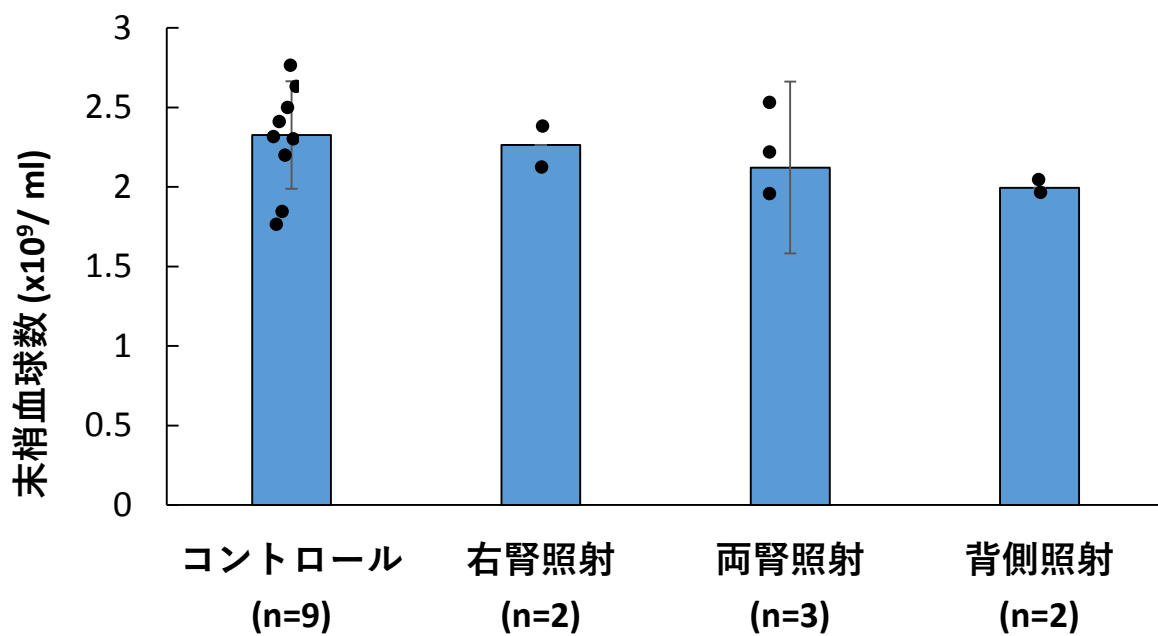


図 1 2 片側腎臓照射、両側腎臓照射、背側照射、腎臓以外へ炭素イオンビーム (15 Gy) を照射した7日後における末梢血球数

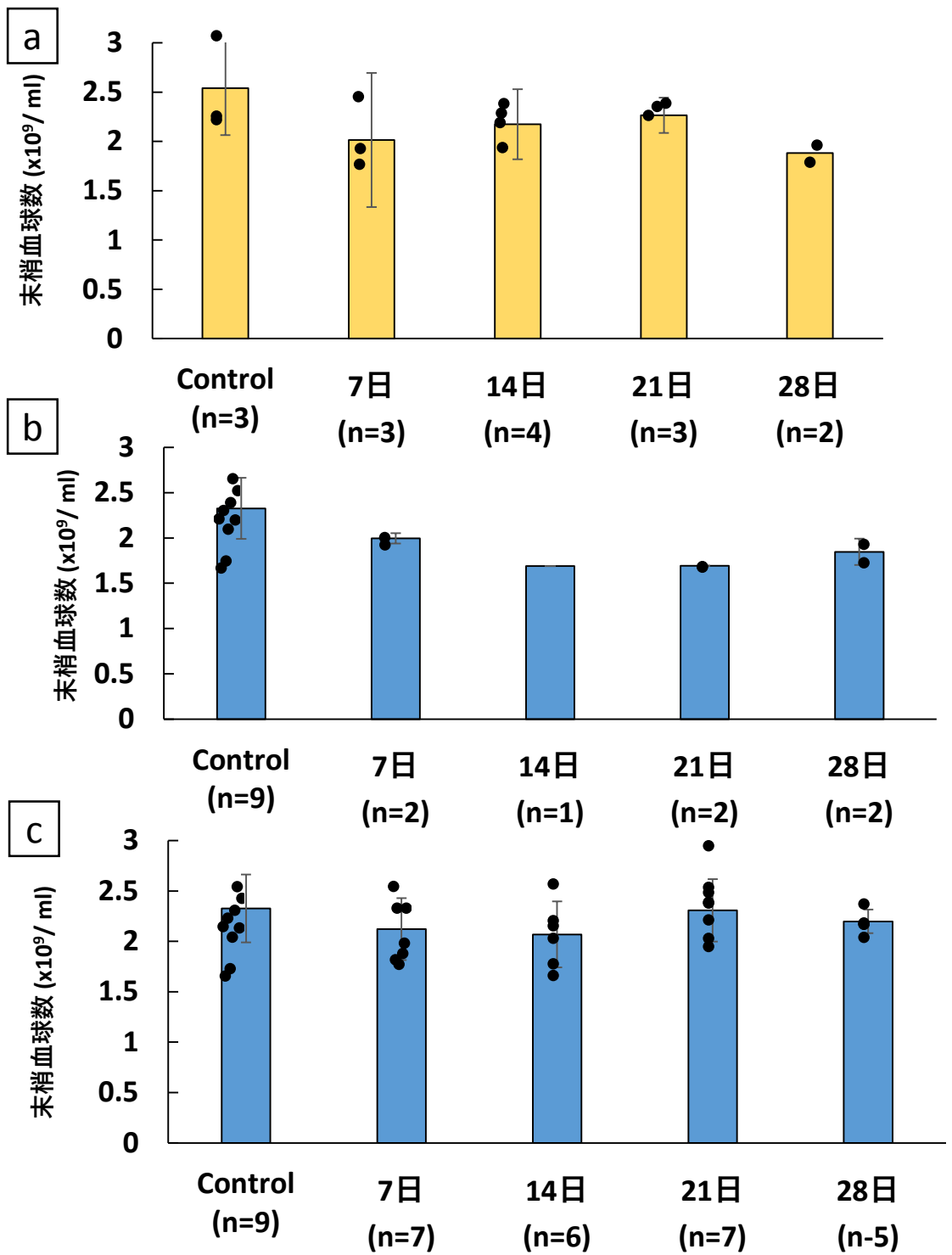


図 1 3 照射7日後から28日後までの末梢血球数の経時的変化

- (a) ガンマ線 (15Gy)
- (b) 炭素イオンビーム (15Gy)
- (c) 陽子線 (15Gy)

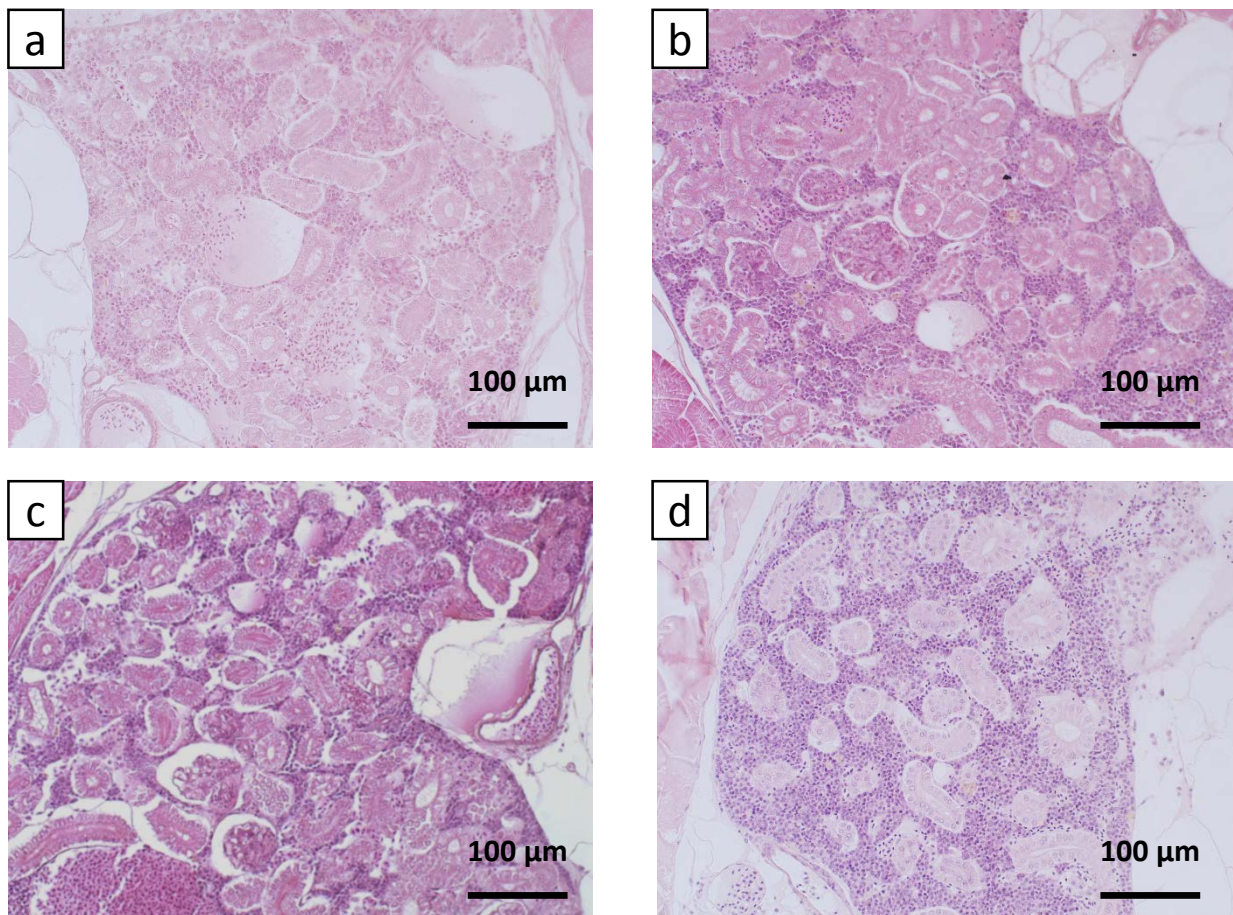


図 1 4 ガンマ線(15 Gy)を全身照射した7日後から28日後までの腎臓組織の強拡大像(HE染色)

- (a) 照射 7日後
- (b) 照射14日後
- (c) 照射21日後
- (d) 照射28日後

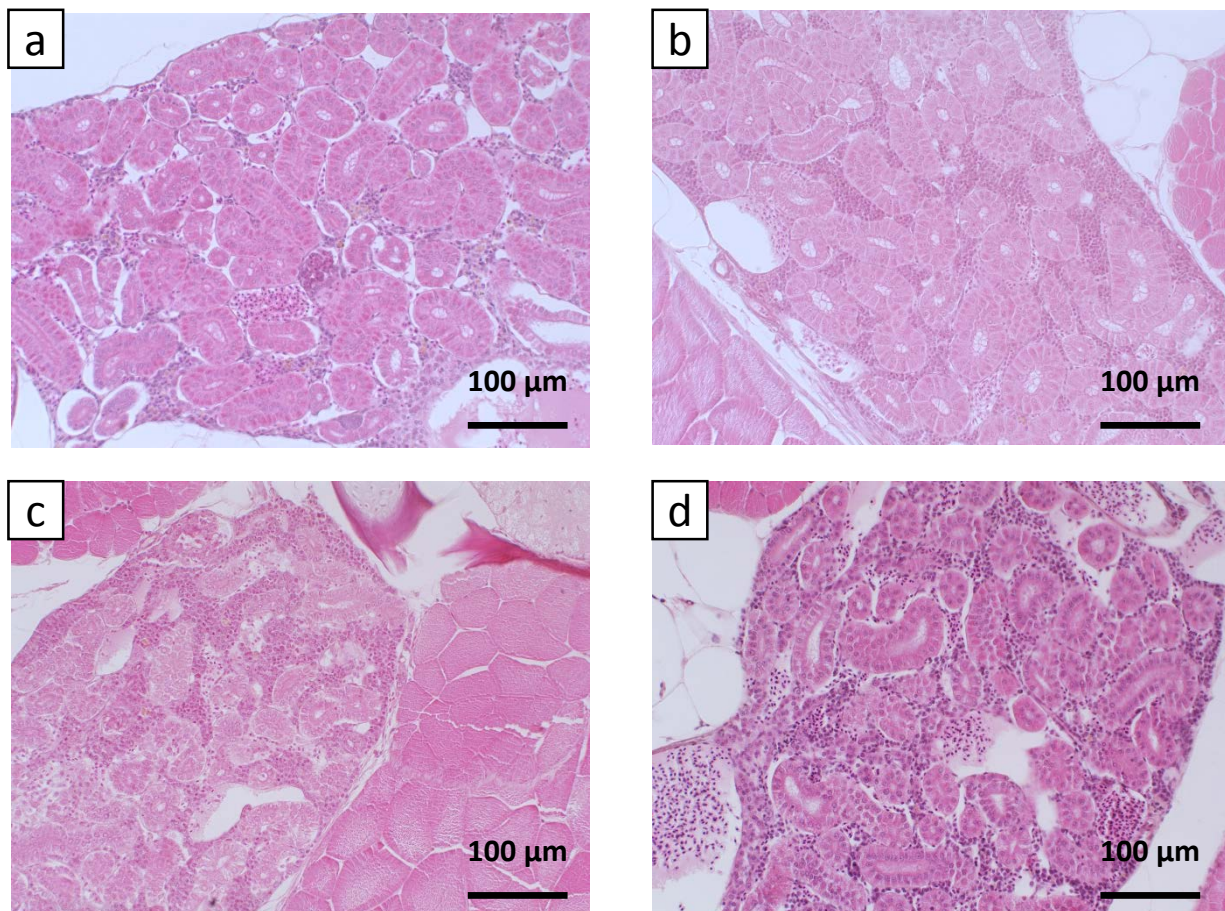


図15 炭素イオンビーム(15 Gy)を全身照射した7日後から28日後までの腎臓組織の強拡大像(HE染色)

- (a) 照射 7日後
- (b) 照射14日後
- (c) 照射21日後
- (d) 照射28日後



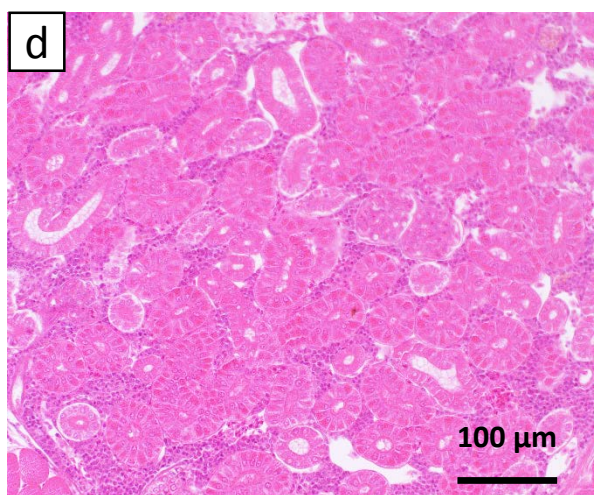
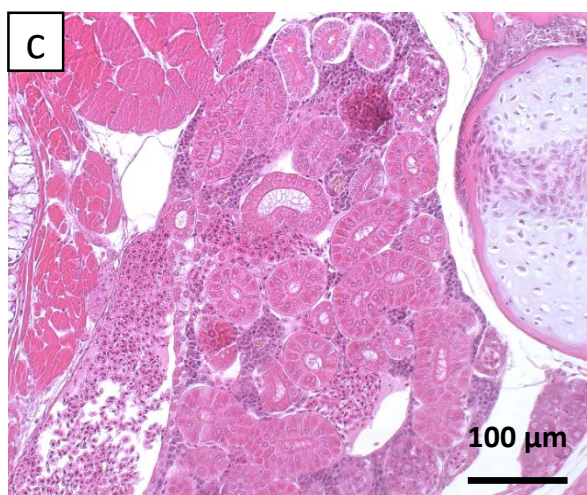
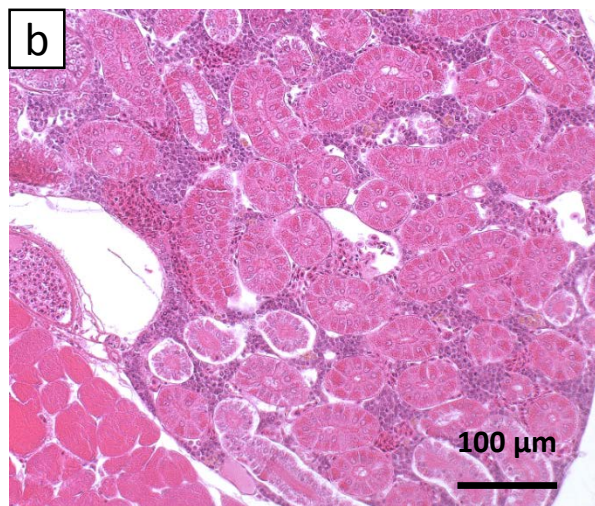
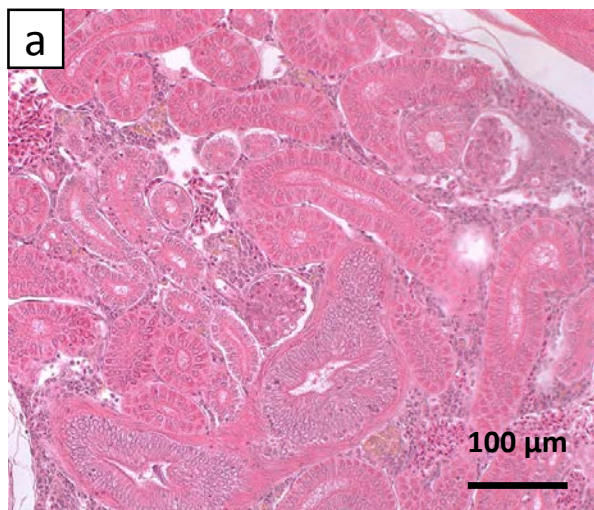


図 1 6 陽子線(15 Gy)を全身照射した7日後から28日後までの腎臓組織の強拡大像(HE染色)

- (a) 照射 7日後
- (b) 照射14日後
- (c) 照射21日後
- (d) 照射28日後

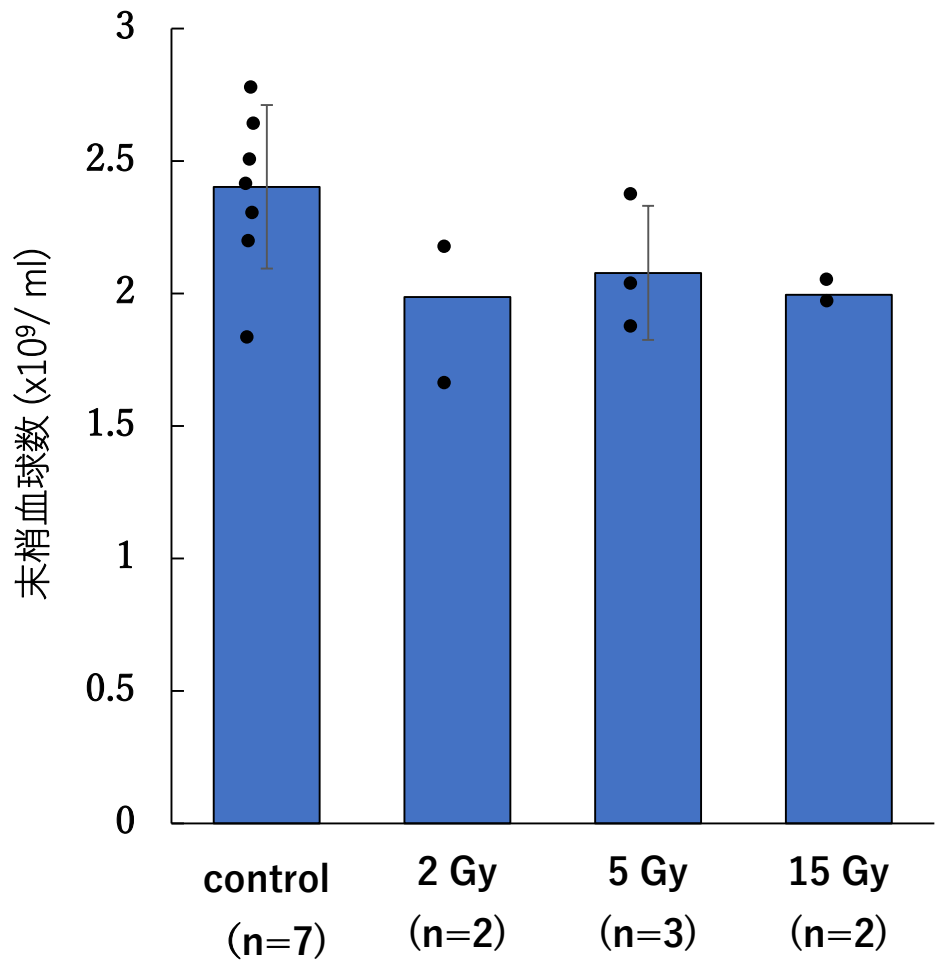


図 1 7 炭素イオンビーム (2 Gy, 5 Gy, 15 Gy) を照射した7日後の末梢血球数



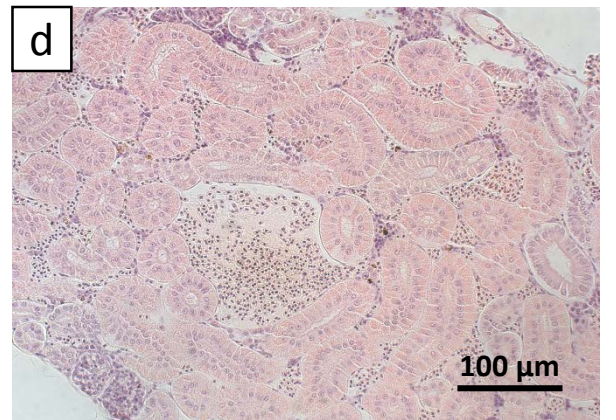
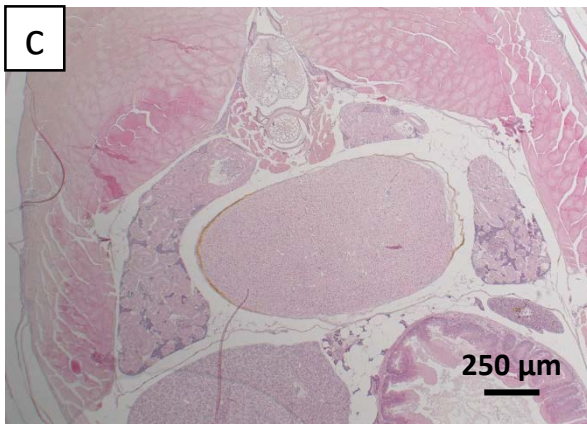
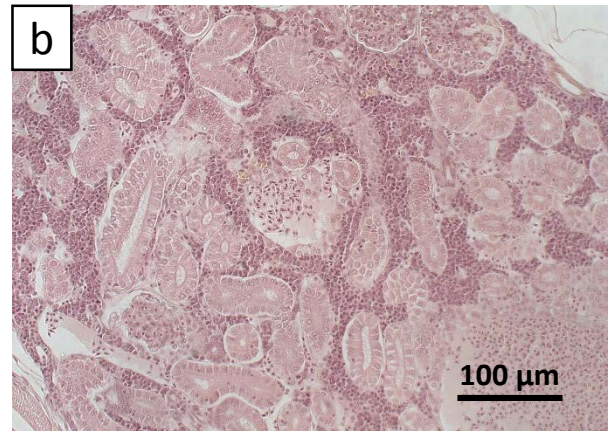
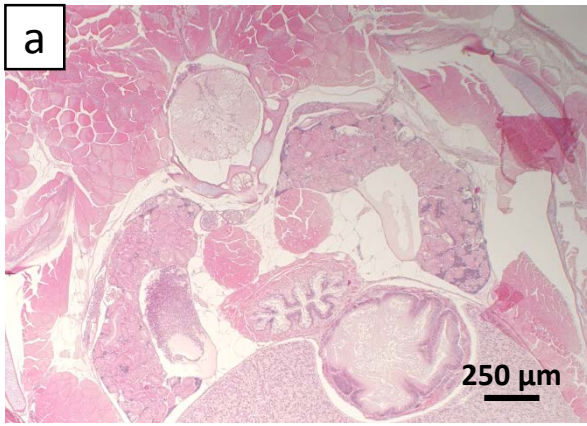


図18 炭素イオンビーム (2 Gy, 5 Gy) を照射した7日後の腎臓の組織像 (HE染色)

(a, b) 2 Gy 照射の7日後

(c, d) 5 Gy 照射の7日後



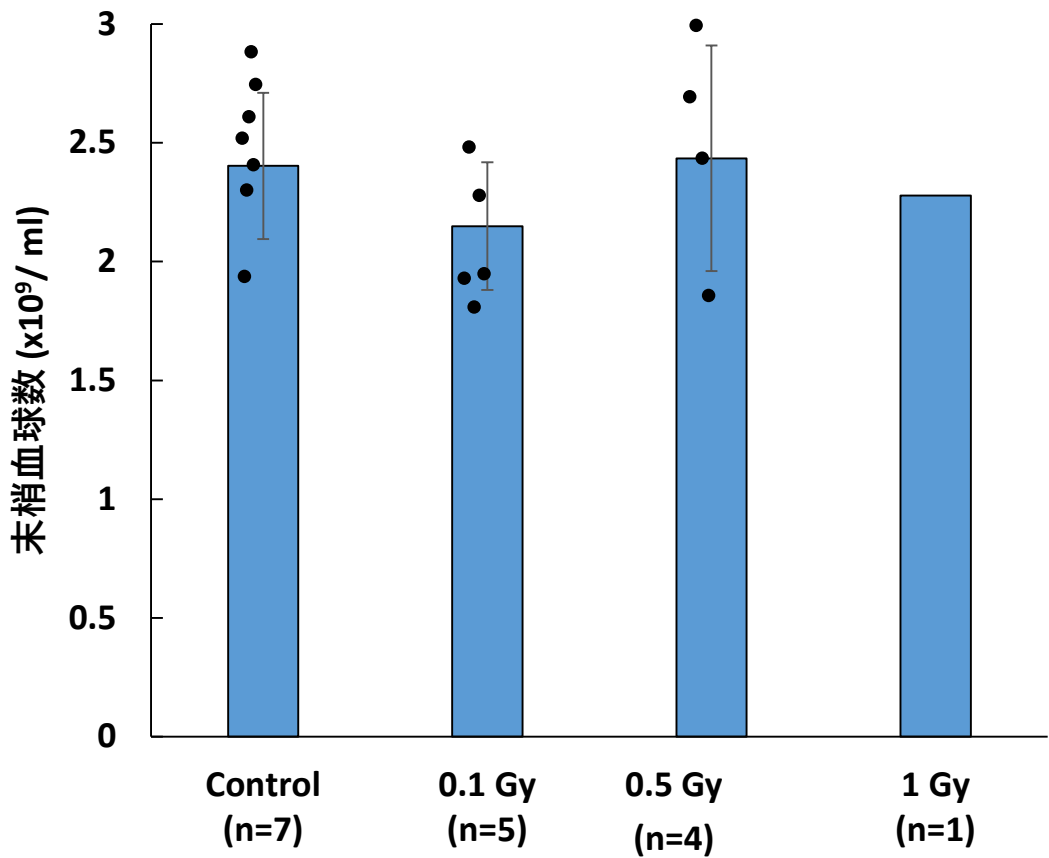


図19 ガンマ線（0.1 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy）を照射した1日後の末梢血球数

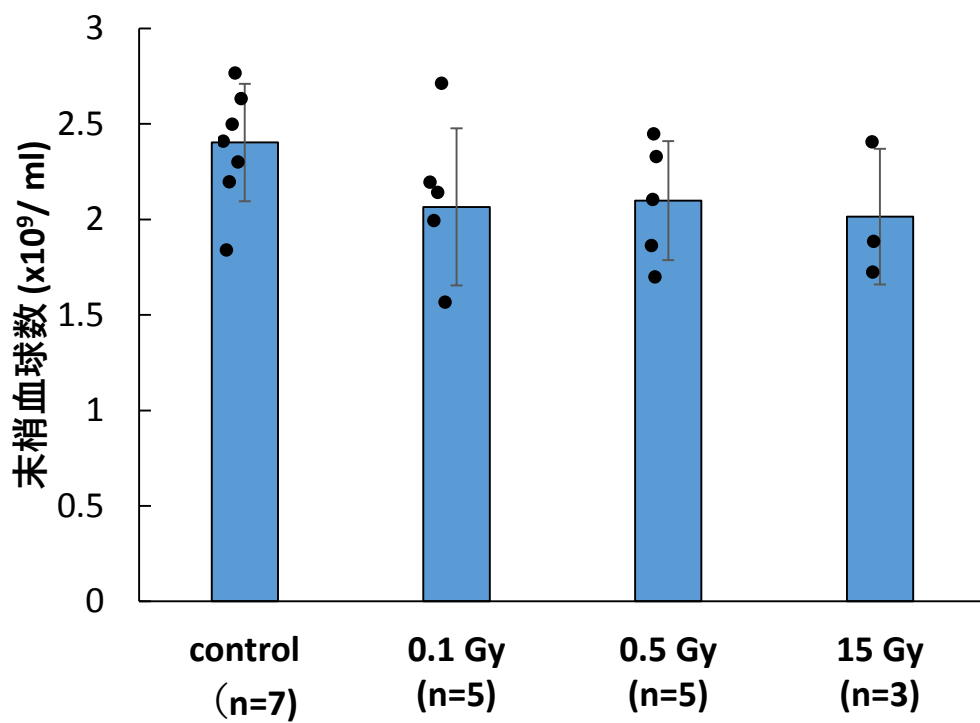


図 2 0 ガンマ線 (0.1 Gy, 0.5 Gy, 15 Gy) を照射した 7 日後の末梢血球数

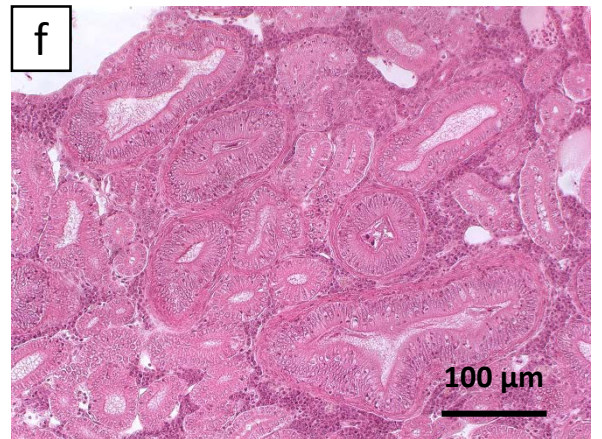
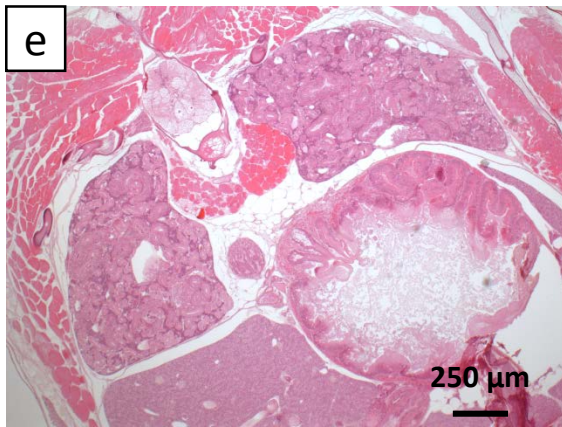
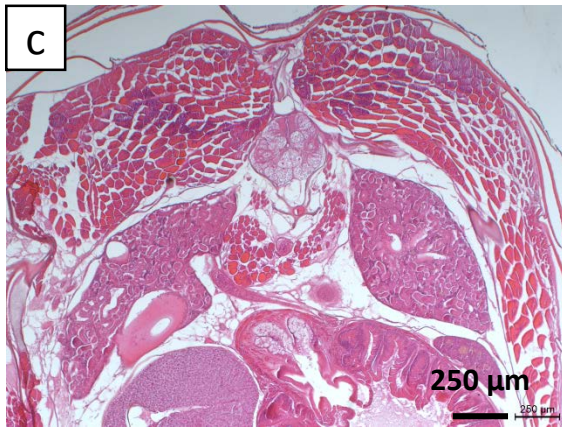
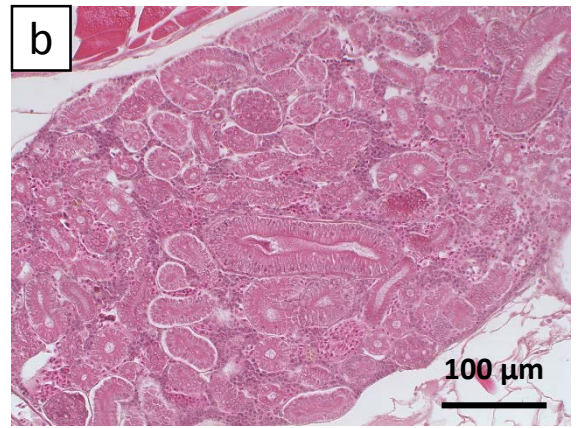
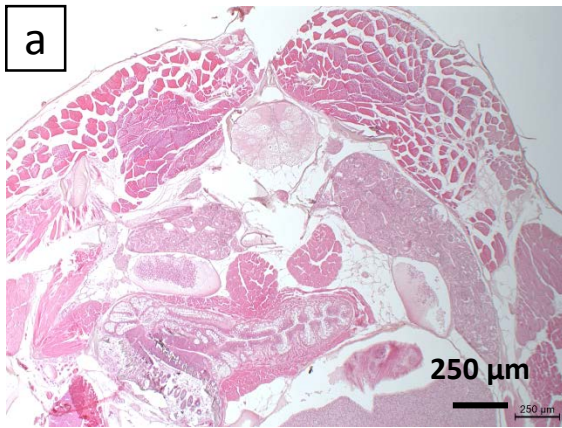


図 2 1 ガンマ線 (0.1 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy) を照射した 7 日後の腎臓の組織像(HE染色)

(a, b) 0.1 Gy 照射の 7 日後

(c, d) 0.5 Gy 照射の 7 日後

(e, f) 1 Gy 照射の 7 日後



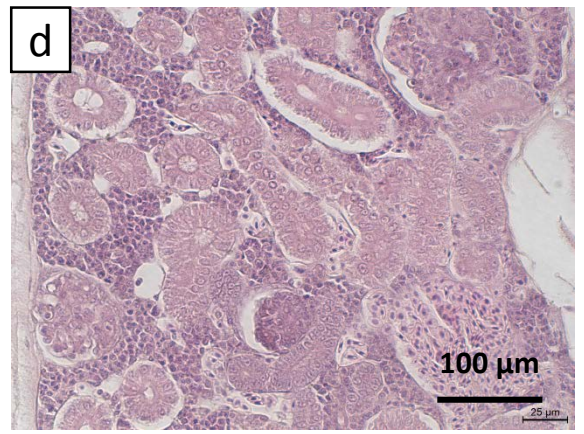
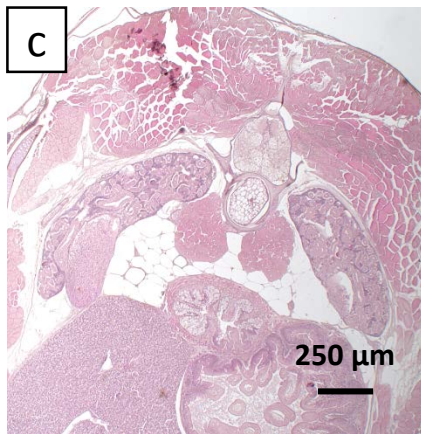
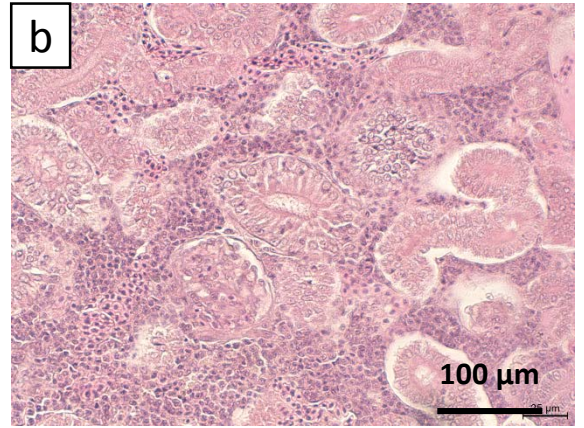
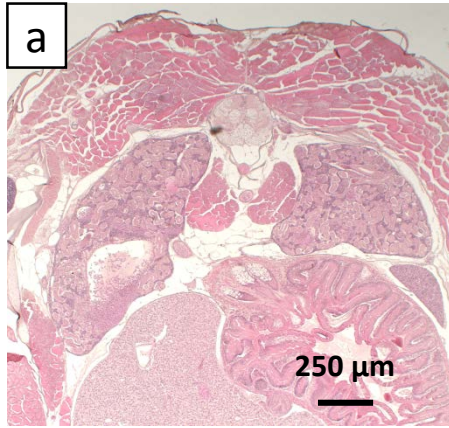


図 2 2 ガンマ線 (0.1 Gy, 0.5 Gy, 1 Gy) を照射した 1 日後の腎臓の組織像(HE染色)

(a, b) 0.1 Gy 照射の 1 日後

(c, d) 0.5 Gy 照射の 1 日後

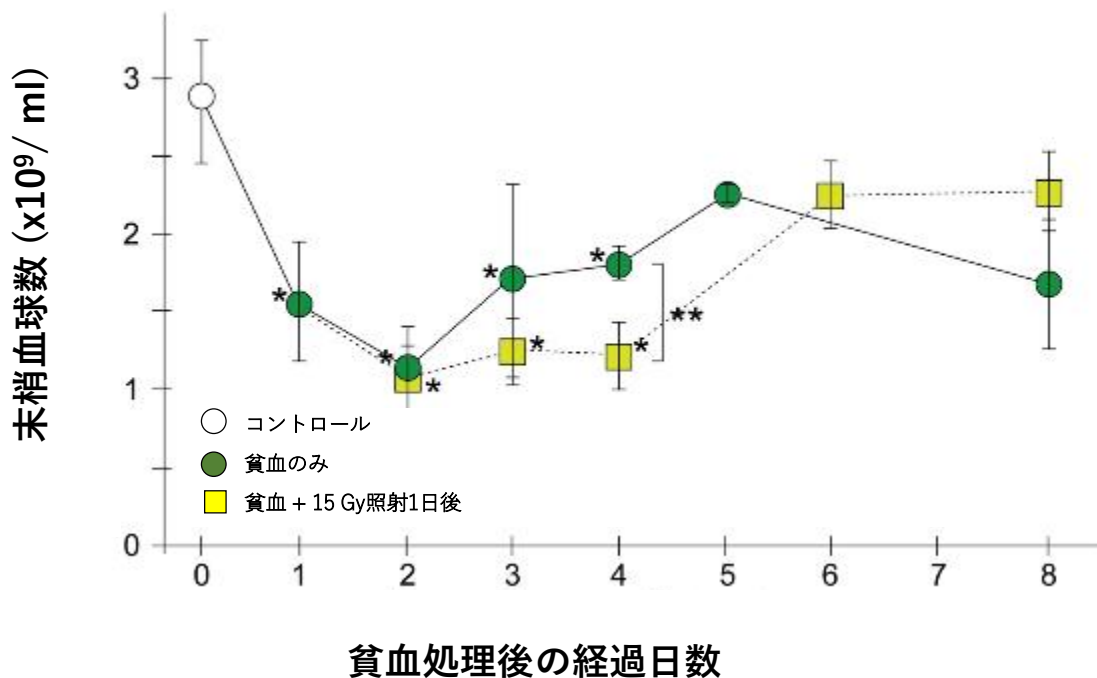
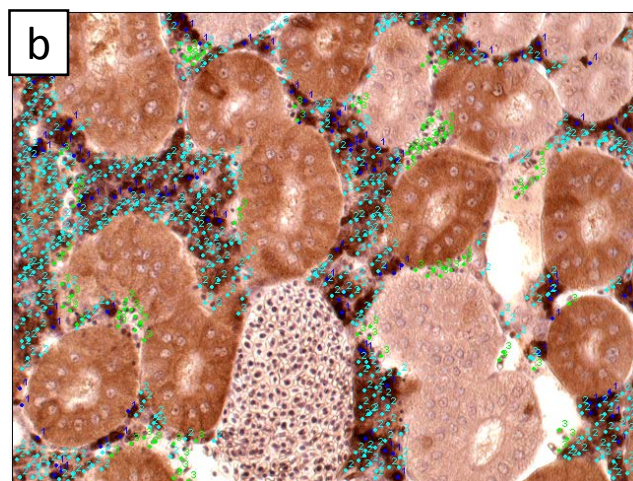
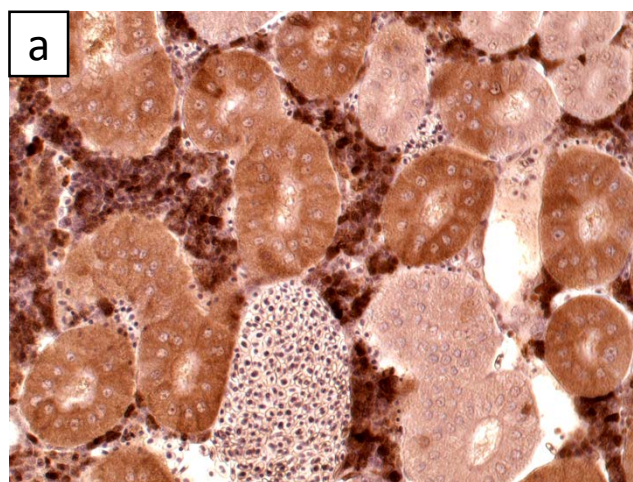


図 2 3 貧血処理およびガンマ線(15 Gy) 照射の1日後から4日後までの末梢血球数の経時変化

本研究において得られたに) データと先行研究 (34) におけるデータをもとにグラフを作成した。ここで、図23に示すグラフにおいて大橋が計測した末梢血球数は以下の値である。

貧血2日目 (n=2) 1.26, 1.38 (x10<sup>9</sup>/ ml)、貧血7日目 (n=3) 1.75, 1.82, 1.98 (x10<sup>9</sup>/ ml)、貧血1日後ガンマ線照射1日後 (n=1)1.79 (x10<sup>9</sup>/ ml)、貧血1日後ガンマ線照射2日後(n=5) 1.53, 1.63, 1.39, 1.07, 1.17 (x10<sup>9</sup>/ ml)、貧血1日後ガンマ線照射3日後(n=6) 1.05, 1.44, 1.08, 1.12, 1.64, 1.19 (x10<sup>9</sup>/ ml)。



- : PCNA陽性の造血細胞
- : PCNA陰性の造血細胞
- : 赤芽球、赤血球

図24 腎臓（コントロール個体）の造血組織における細胞数の測定例（抗PCNA免疫染色像, ×40対物レンズ使用）

(a) 腎臓を含む組織切片（PCNA染色）のオリジナル画像

(b) ImageJのcell count機能を使用して手動にてPCNA陽性細胞（●）、PCNA陰性細胞（●）および赤血球、赤芽球（●）を測定した画像



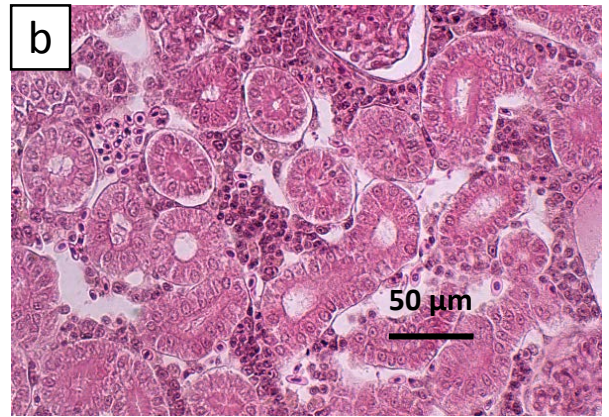
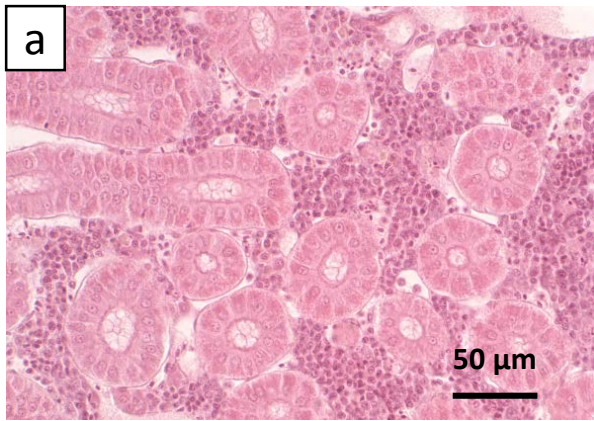


図 2 5 貧血処理した個体の腎臓の組織切片像 ( HE 染色)

- (a) 貧血処理の 1 日後
- (b) 貧血処理の 2 日後
- (c) 貧血処理の 8 日後

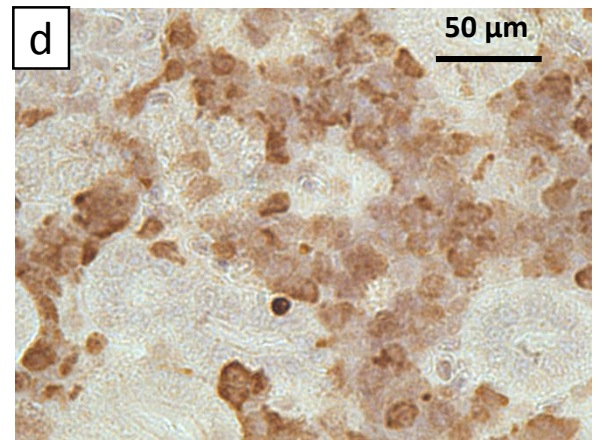
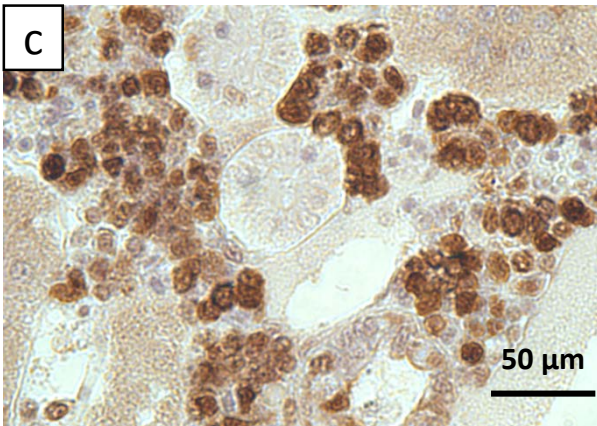
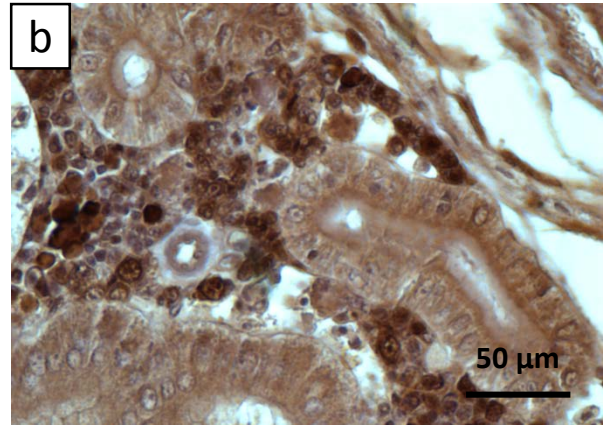
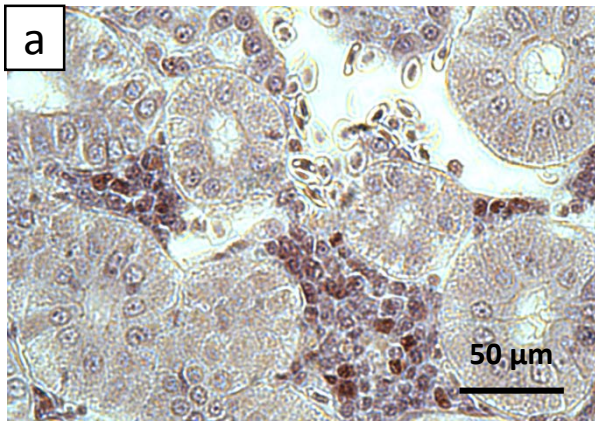


図 2 6 貧血処理した個体の腎臓の組織切片像（抗PCNA 免疫染色）

- (a) コントロール
- (b) 貧血処理の 1 日後
- (c) 貧血処理の 2 日後
- (d) 貧血処理の 8 日後



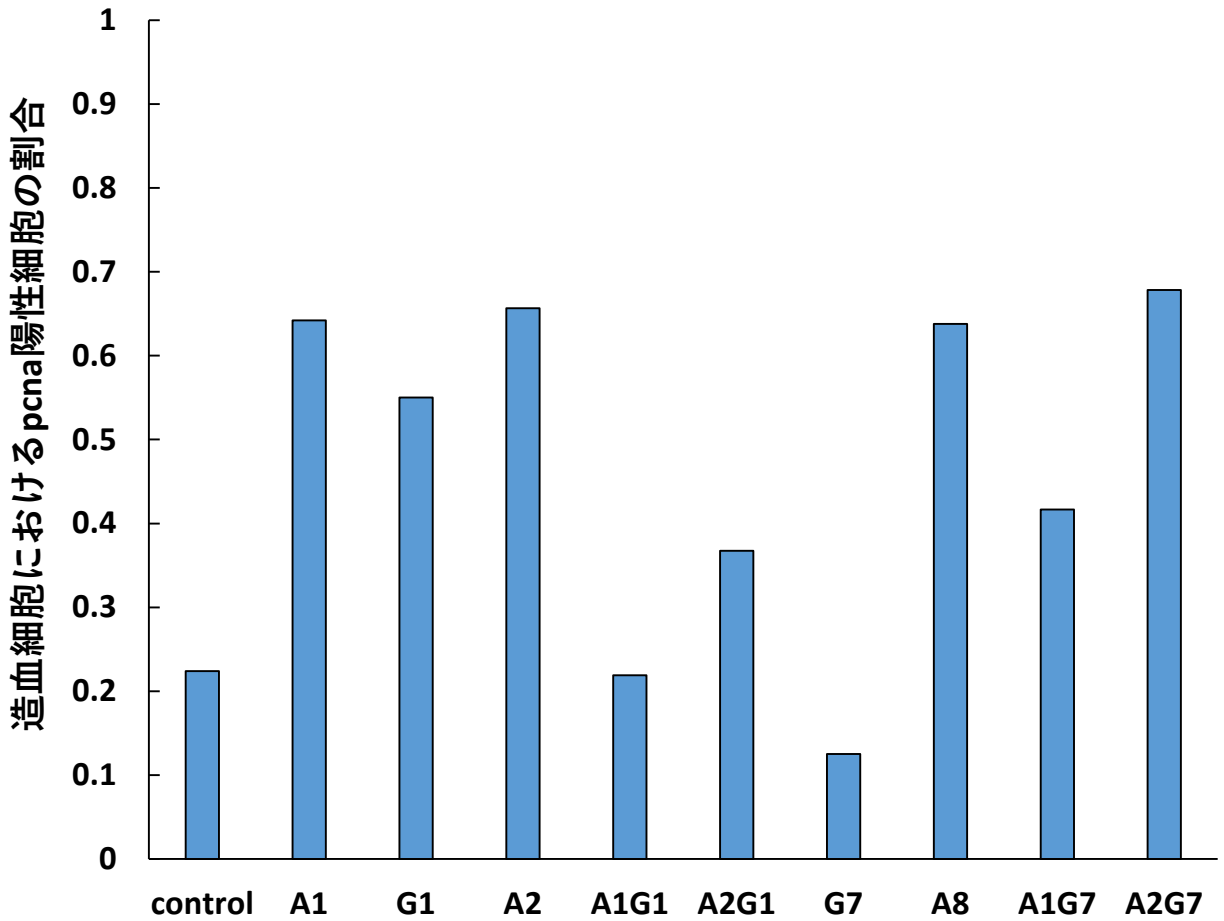


図 2 7 貧血処理およびガンマ線照射した個体の腎臓の造血系細胞に占める PCNA 陽性細胞の割合 (1次抗体1000倍希釈)

Control: 照射していないコントロール

A1: 貧血 1 日目

G1: ガンマ線(15 Gy)照射 1 日目

A2: 貧血 2 日目

A1G1: 貧血 1 日後ガンマ線(15 Gy)照射 1 日目

A2G1: 貧血 2 日後ガンマ線(15 Gy)照射 1 日目

G7: ガンマ線(15 Gy)照射 7 日目

A8: 貧血 8 日目

A1G7: 貧血 1 日後にガンマ線 (15 Gy) 照射 7 日後

A2G7: 貧血 2 日後にガンマ線 (15 Gy) 照射 7 日後

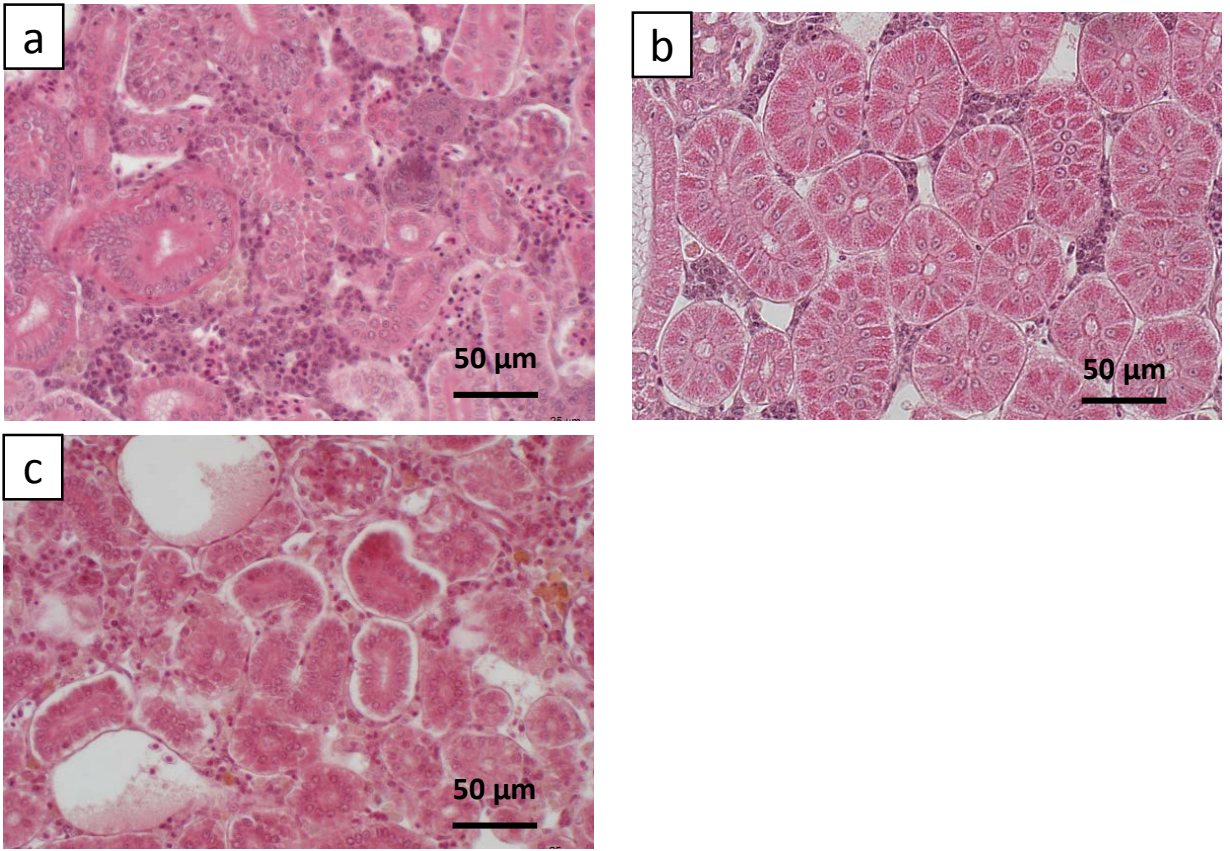


図 2 8 貧血処理およびガンマ線照射した個体の腎臓の組織切片像  
( HE 染色)

(a) ガンマ線(15Gy)照射の 1 日後

(b) 貧血処理の 1 日後に ガンマ線 (15 Gy) を照射した 1 日後

(c) 貧血処理の 2 日後に ガンマ線 (15 Gy) を照射した 1 日後

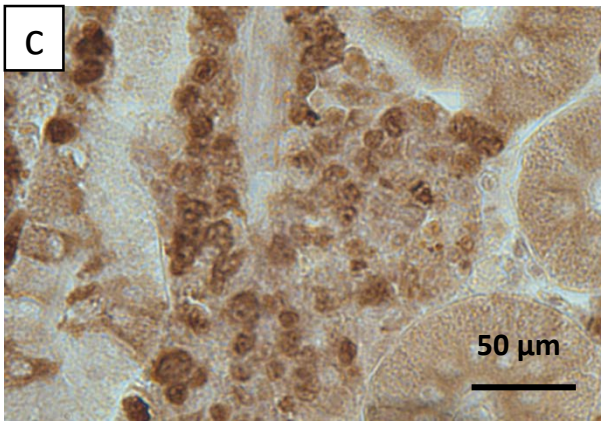
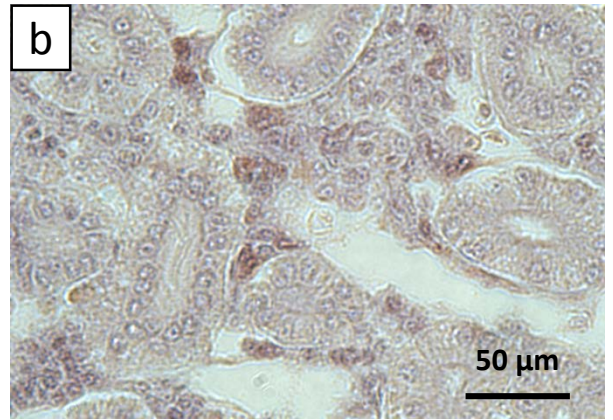
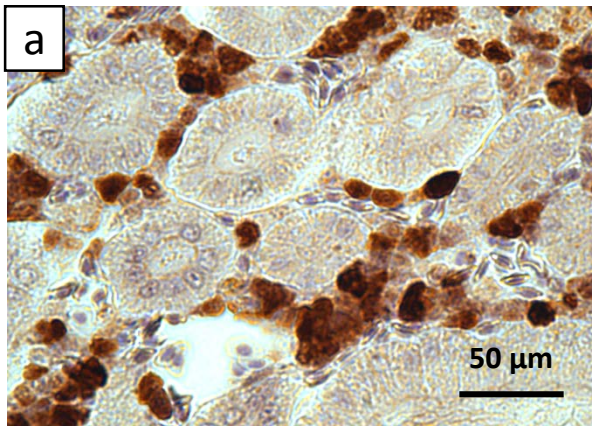


図 2 9 貧血処理およびガンマ線照射した個体の腎臓の組織切片像（抗PCNA免疫染色）

(a) ガンマ線(15Gy)照射の1日後

(b) 貧血処理の1日後にガンマ線(15 Gy)を照射した1日後

(c) 貧血処理の2日後にガンマ線(15 Gy)を照射した1日後



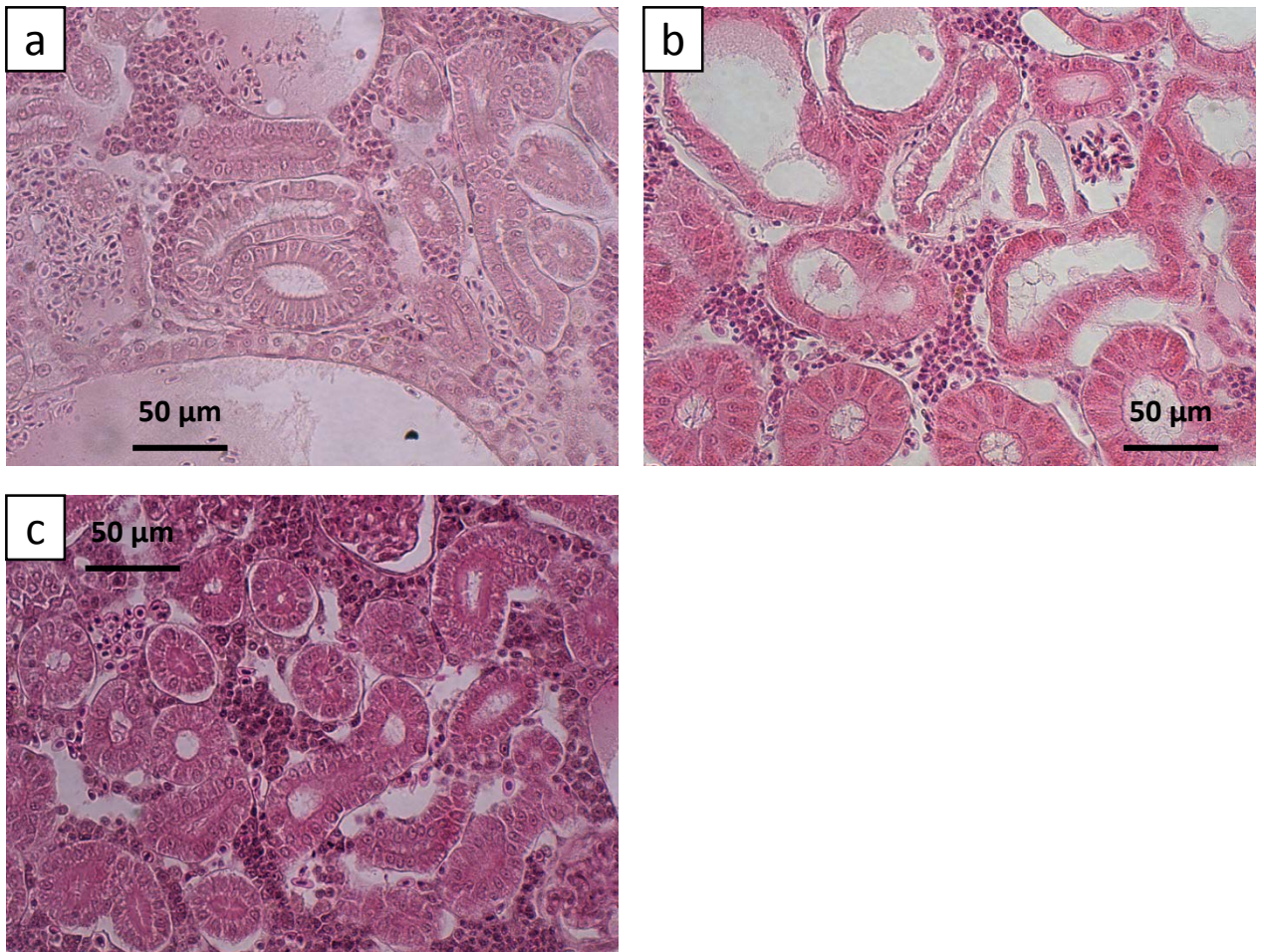


図 3 0 貧血処理およびガンマ線照射した個体の腎臓の組織切片像 (HE 染色)

(a) ガンマ線(15Gy)照射の 7 日後

(b) 貧血処理の 1 日後にガンマ線 (15 Gy) を照射した 7 日後

(c) 貧血処理の 2 日後にガンマ線 (15 Gy) を照射した 7 日後

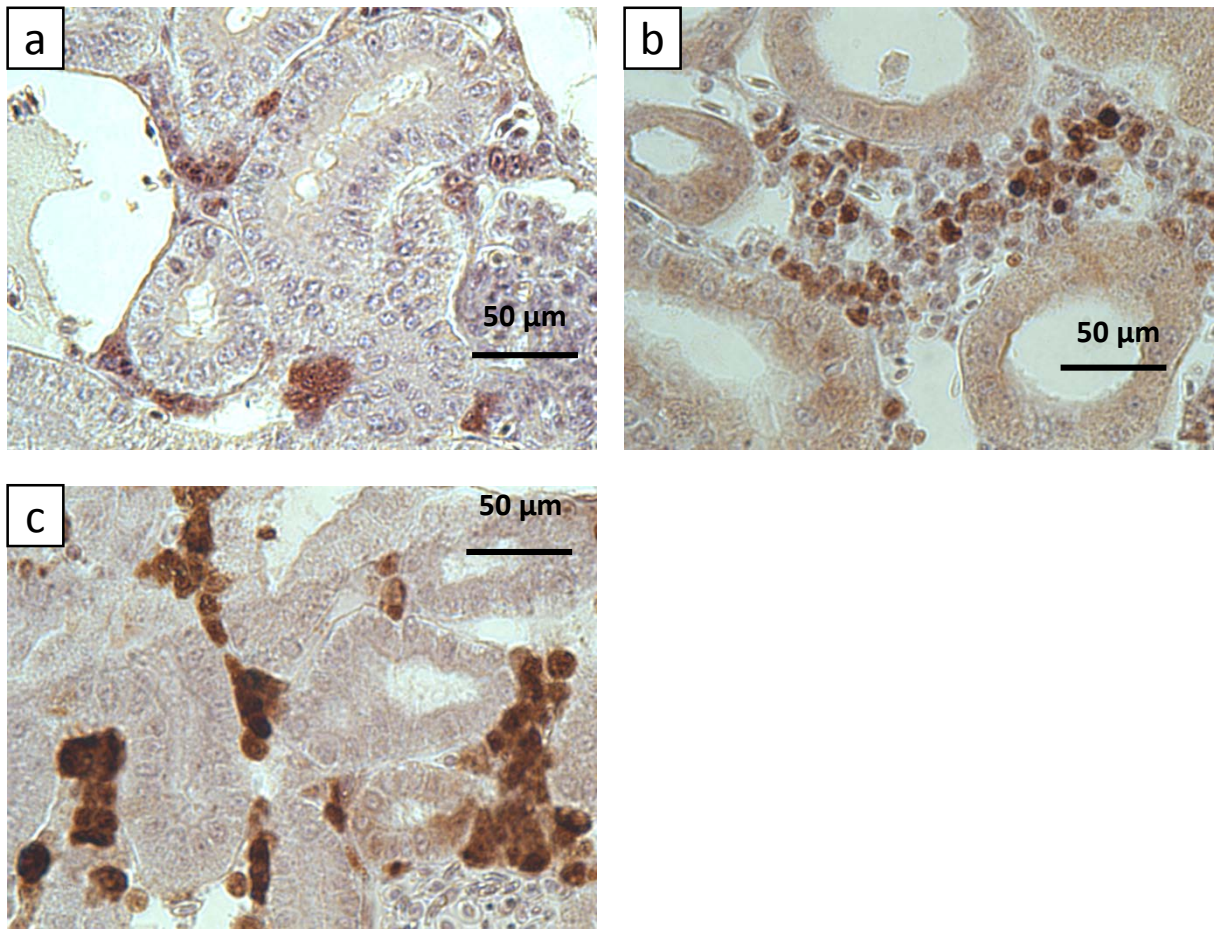


図 3 1 貧血処理およびガンマ線照射した個体の腎臓の組織切片像 (抗 PCNA 免疫染色)

(a) ガンマ線(15Gy)照射の 7 日後

(b) 貧血処理の 1 日後にガンマ線 (15 Gy) を照射した 7 日後

(c) 貧血処理の 2 日後にガンマ線 (15 Gy) を照射した 7 日後

PCNA																				
	control-1	a1-1	a2-1	a2-2	g1	a1g1-1	a1g1-2	a2g1	g7	a8-1	a1g7	a2g7								
+	30	122	53	35	11	5	2	18	4	37	25	38								
-	104	68	28	18	9	12	13	31	28	21	35	18								
total	134	190	20		67	16		49	32	58	60	56								
+/total	0.223881	0.642105	0.55		0.656716	0.21875		0.367347	0.125	0.637931	0.416667	0.678571								

表1. 造血系細胞中に占める PCNA 陽性細胞の割合 (1次抗体1000倍希釈)