

【序論】

先行研究において、脳内における放射線照射時のアポトーシス誘導とミクログリアによる貪食過程は明らかにされたが、非照射胚の発生段階にもなったアポトーシス細胞の分布や、脳内の活性化したミクログリアの詳しい分布は明らかにされていない。この研究をメダカ胚で行う利点として、メダカは体外で受精し孵化までの間の卵殻が透明なこと、メダカ胚が小さいこと、発生のスピードがゼブラフィッシュよりも遅く発生の細かい段階ごとの観察を行うことができることが挙げられる。本研究での活性化したミクログリアとは、神経系の異常を感知して、貪食などの活動をするものをしめす。

本研究では、HdrR 系統のメダカ胚における活性化ミクログリアについて立体画像構築を用いて解析をおこなった。放射線に対して高感受性である st.28 から孵化直前の st.39 までを研究対象とし、10Gy 照射胚と非照射胚で、アクリジンオレンジ (AO) 染色・apoE 遺伝子発現に対する whole mount in situ hybridization (WISH) 法・WISH 結果の立体画像構築を用いてミクログリアとアポトーシス細胞そして放射線影響の関係性に着目して解析をおこなった。10Gy という数値は、先行研究で孵化を指標とした放射線の半数致死量が 12.5Gy 前後だということとを考慮し、12.5Gy よりも低めに設定した

【結果】

アクリジンオレンジ (AO) 染色

AO 染色によってアポトーシスをおこした細胞を検出した。

非照射の正常発生胚ではアポトーシス細胞は 2~10 個の単一のアポトーシス細胞を確認することが出来た。

10Gy 照射胚 st.30 では脳全体で多くのアポトーシス細胞が見られたが、st.33 ではアポトーシス細胞の集合体はみられなくなり、単一にアポトーシス細胞も 10 個程度まで減少した。

WISH

ミクログリアに特異的に発現する遺伝子 apolipoproteinE(apoE)遺伝子を probe とした whole-mount in situ hybridization(WISH)法によって、活性化したミクログリアを検出した。非照射の正常発生胚でも apoE 遺伝子発現部位が終脳と中脳で確認された。眼の中の apoE 遺伝子発現部位を観察することはできなかったが、切片にすることで眼の中にも apoE 遺伝子発現部位があることがわかった。切片を重ね合わせて立体構築をすることで、脳や眼全体での分布や、大きさを明らかにすることを目的とした。



図1 非照射胚 WISH 結果

立体画像構築

WISH によって明らかになった apoE 遺伝子発現部位と、ニュートラルレッドによる連続組織切片の染色で空白となっていた部分を立体画像に構築し、脳や眼全体の観察を行った。先行研究において、アポトーシス細胞は

複数個まとめてミクログリアに取り込まれ、分解される様子が確認されているため、空白部は複数のアポトーシス細胞を取り込んだミクログリアであると考えられる。

非照射では apoE 遺伝子発現部位が st.28、30 では終脳から中脳で数個しか確認されず、st.33 で中脳視蓋を中心に増加している。脳のうち終脳で多く、視床下部では少ない。放射線を 10Gy 照射した胚では、照射後 24 時間で非照射胚の st.33 と同じ位の数の apoE 遺伝子発現部位がみられ、照射後 42 時間ではさらに apoE 遺伝子発現部位が増加する。放射線の照射・非照射に関わらず、脳の終脳から中脳までの方が小脳や延髄よりも apoE 遺伝子発現部位が多いことが明らかとなった。

放射線照射後 24 時間の胚では、非照射胚では見られなかった、切片で大きく白く抜けた部分が脳や眼全体で観察される。切片で白く抜けた部分を立体構築してみると、10Gy 照射後 24 時間で AO 染色を行ったときの、アポトーシスを起こした細胞が集まっている部位と同じような分布場所になっていることが確認出来る。

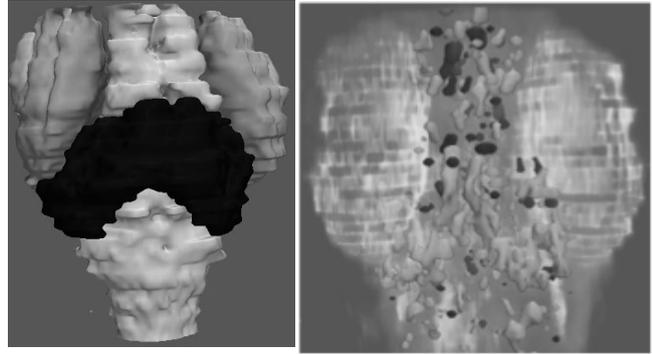


図2 脳と眼、空隙部の立体

【考察】

非照射のメダカ胚では、AO 染色で検出されるアポトーシスをおこす細胞は少ないにも関わらず、活性化したミクログリアは脳全体に存在しており、st.33 になると中脳視蓋でのミクログリア活性化が盛んになることが明らかになった。非照射胚 WISH 結果の立体画像から、st.28 では終脳と中脳を中心に、st.30 では脳全体が、st.33 では中脳視蓋が特に発達していると考えられる。眼では水晶体に沿うようにある細胞増殖域に活性化したミクログリアが局在し、発生が進むにつれて水晶体の吻側から尾側に移動することが分かった。

st.28 で 10Gy の γ 線を照射した胚では、st.30 でアポトーシス細胞が増えて活性化したミクログリアによってアポトーシス細胞が複数個ずつ取り込まれていることが報告されている。この時点では apoE 遺伝子の発現部位数は大きな変化はないが、その後 st.33 で apoE 遺伝子が発現する場所は増え、アポトーシス細胞は減少している。これらのことから、放射線を照射するとアポトーシスを起こす細胞が増え、活性化したミクログリアは多数のアポトーシス細胞を生体から取り除くために複数のアポトーシス細胞をまとめて取り込むが apoE 遺伝子を発現せず、その後 apoE 遺伝子を発現するようになるという一連の流れが新たに示唆された。また、脳と同時に眼を観察することでこの流れは脳でも眼でも同じであることがわかった。ただし眼では、放射線の影響で増加したアポトーシス

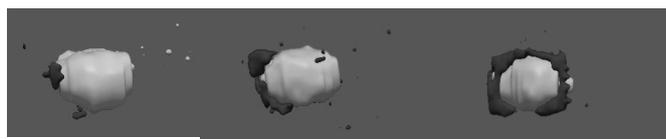


図3 非照射胚の水晶体と apoE 遺伝子発現部位

左から、st.28 ,st.30 ,st.33 (左眼を左側面より観察)

がみられることが明らかとなった。この減少は、放射線照射により、ミクログリアが移動した可能性と apoE 発現が水晶体周辺細胞で抑制されることを示唆している。活性化したミクログリアが apoE 遺伝子を発現しない時期があることが本研究で新たに明らかになった。

細胞を活性化したミクログリアが複数個まとめて取り込む時期に、非照射時に活性化したミクログリアが局在する水晶体のまわりの部分で

apoE 遺伝子発現部位が確認できなくなり、孵化

直前には再び水晶体まわりに apoE 遺伝子発現部