

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12201

研究課題名(和文) 血球から捉える局所的放射線被ばくによる全身組織影響の分子メカニズム

研究課題名(英文) Systemic effect on blood cells caused by localized irradiation

研究代表者

浅香 智美 (Asaka, Tomomi)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員

研究者番号：90555707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、局所的な放射線照射に対する造血組織及び赤血球の放射線応答の解明を目的とし、メダカにおける線に加えて炭素イオンビームを利用した評価法の開発およびその解析を行った。血球数は、2 Gyから15 Gyの範囲では線量効果は認められず、造血組織である腎臓が放射線により照射されることで、面積依存的に1週間後には血球数が減少すること、また減少した血球数は28日後に回復しなかった。さらに貧血処理後において、放射線照射により貧血からの血球数の回復は1日程度遅れるが、放射線照射による血球数の低下が抑制されたことから、貧血処理後の造血細胞において放射線に対して抵抗性が上がったことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, to elucidate the physiological response of hematopoietic tissue and erythrocytes to localized irradiation, we developed an evaluation method using medaka fish irradiated by carbon ion beam and gamma rays and analyzed its effect. Dose dependency was not observed in the range of 2 to 15 Gy. The number of blood cell decreased in one week when the kidney, which is the hematopoietic tissue in medaka, was irradiated, and the reduction of blood cell number did not recover 28 days after the irradiation. Furthermore, in anemic state, recovery of blood cell number from anemia is delayed around one day due to the irradiation, but the reduction of the blood cell number after the irradiation was suppressed when the hematopoietic cells were in the anemic state. These results suggested that the hematopoietic cells became resistant to the radiation after anemia treatment.

研究分野：環境生理学

キーワード：放射線 血球 メダカ

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、がん治療等で個体への局所的放射線照射が広く普及している。このような放射線治療等において、局所の急性症状が発生することはよく知られている。個体への局所的な照射では、被照射部位への影響のみならず、近隣の組織への影響、離れた組織への影響の存在について議論されている (Blyth and Sykes, 2012)。

(2) メダカは、脊椎動物でありほ乳類と同様の臓器を有している上、その小ささと色素欠損系統などの利点により、体内の臓器を狙って照射することが可能である。さらに、照射したメダカの全身組織切片を作製して全身を細胞レベルで隈なく検証することが可能となり、これまで見逃されていた放射線の生体影響を捉えることが可能である。これまで応募者らは、予備実験としてメダカの全身、背・腹側各 2 mm の深度まで、輸血時の血液への  $\gamma$  線照射と同程度とみなされる線量の重粒子線を照射し、非照射部位のエラ組織の毛細血管に誘導される応答を確認している。

(3) 放射線照射による血管透過性の上昇について、従来は、放射線照射による酸化ストレスで血管内皮細胞が障害を受けて血管透過性が上がり、紅斑現象が認められると考えられてきたが、このような血管内皮の応答だけでは予備研究にて見出されている明瞭な組織障害を説明することはできず、全身を循環する血液 (血球) の関与が強く疑われ、末梢血血球がアブスコパルな影響を与える要因になるとの仮説を考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では血球に着目し、平成 27 年度から 28 年度の 2 年間に、TIARA マイクロビーム照射技術を用いることによってメダカ体躯の一部のみを照射し、放射線照射後のメダカの血球を分子レベルで解析し、観察された指標をもとに、全身応答が引き起こされる線量および部位・面積について検討する。照射していない部位に誘導されるアブスコパルな応答を個体レベルと分子レベルのそれぞれで解明することにより、全身性の応答を引き起こすメカニズムを明らかにすることを目的とする。本研究により、被ばくによる体内影響への対処法の発展に寄与することが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) メダカへの放射線照射

本研究では、透明メダカ SK2 系統に対し、飛程の長い  $\gamma$  線と短い炭素イオンビームによる照射を行った。生後 6~11 ヶ月のメダカを用い、照射後 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28 日後まで飼育し、放射線照射による影響および回復について検証した。なお、メダカにおける  $\gamma$  線照射 2 週間後の生存率を指標にした LD50 は 20 Gy であり、本研究で使用する最大線量 15 Gy を照射した場合のメダカ個体の生死への影

響はない。

#### $\gamma$ 線による照射

東京大学大学院新領域創成科学研究科のガンマセル (線源  $^{137}\text{Cs}$ 、ガンマセル 3000 Elan, MDS Nordion, Canada) を用いて、メダカ成魚にガンマ線を照射した (線量率 8.82 Gy/min)。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) に成魚を入れ、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水位を調整した。

#### 炭素イオンビームによる照射

量子科学技術研究開発機構高崎量子応用研究所と研究協力をを行い、重粒子イオンビーム照射装置 Takasaki Ion Accelerators for Advanced Radiation Application (TIARA) に設置された細胞局所照射装置を使用した局所照射 (Funayama *et al.*, 2008) を実施した。メダカへの放射線照射については、MS-222 による麻酔処理後に、メダカを照射用の容器に入れ、照射される部分が上面になるように配置して行った。ビームのカウント数により照射線量を 2, 5, 15 Gy 相当となるようにした。なお、メダカへの炭素イオンビームの飛程については、水における飛程から予測した。また、照射面積については、アクリル板により遮蔽して照射面積を腎臓片側あるいは腎臓両側に変更して実施した。照射地までの輸送および麻酔処理を施した個体を非照射コントロールとして用いた。

#### (2) メダカへの貧血処理

本研究では、フェニルヒドラジン水溶液 (2.7  $\mu\text{g/L}$ ) に 20 分間曝露し、貧血の誘導を行った。フェニルヒドラジン処理後飼育水にて 4 回の洗浄後の個体を貧血個体として、貧血処理直後、1, 2, 3, 4, 7, 8 日後の個体を実験に用いた。

#### (3) メダカからの血液取得方法の確立

MS-222 を使用してメダカ個体を完全に麻酔し、尾部を眼科バサミにて切除し、中心動脈から 0.5 M EDTA にて処理したチップで 2  $\mu\text{l}$  の血液を採取した。

#### (4) 血清サンプルの調製と GC-MS での検討

得られた血液を希釈後、塗抹標本を作製し、血球濃度の測定と、血球の Giemza 染色による病理学的解析および形態的数値的評価を行った。また、血液から定法に従い脂質を抽出し、ガスクロマトグラフィ質量分析装置 (島津製作所 GCMS-PQ2010Plus) を用いて、既存の脂肪酸測定用カラムを利用してコルチゾール等の脂肪酸測定を行った。

#### (5) 全身切片の作製

血液取得後のメダカは Davidson 氏固定液にて室温で化学固定した後、全身のパラフィン切片を作製した。放射線照射後に生じた全身変化を検証するために、北里大学医学部病理学教室の協力を得て全身連続切片を作製した。得られた切片データは、山口大学医学部分子病理学分野の協力を得て画像をデータベースに登録し、一般に公開可能とした。

#### (6) 画像の 3D 解析

また、放射線照射によって大きく変化の認められた腎臓の切片画像を 50  $\mu\text{m}$  ごとに Photoshop( Adobe )にて抜き出し ImageJ( NIH )の Pixel ImageJ Plugins から LPX-Registration program ( LPixel )にて位置合わせ等のアラインメントを行ったのち、Paraview ( Kitware )を用いて 3D 組織構築を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) メダカからの採血手法の確立と血球の形態観察

メダカ SK2 成魚の中心動脈から 2  $\mu\text{l}$  の血液を取得する方法を確立した。放射線照射後の初期応答が観察されると推定できる 1 週間後に得られた血液を希釈後、塗抹標本作製し、赤血球および各種白血球の形態的数量的評価を行ったところ、赤血球の核および細胞形態の変化が観察された。これまでに UV などで観察されているような赤血球への異常を放射線照射した SK2 においても確認することができた。一方、2  $\mu\text{l}$  の血液では、白血球の検出頻度は極めて低く、放射線照射後に好中球の増加傾向が観察されたが、有意な差を見出すには至らなかった。

##### (2) 血液成分からの免疫応答物質の同定解析

血液成分における変化を検証するために、無処理メダカ 3 匹から 5  $\mu\text{l}$  の血液を採取し、GC-MS を用い血清中に存在する脂溶性低分子化合物を測定したが、そもそもメジャーピークとなるはずのコルチゾール等が検出限界以下であり、放射線による各種ストレスホルモン変化を解析できないことが想定された。したがって、以降の実験では本手法は実施しないこととした。

##### (3) 全身応答を促す最小照射面積の検討

TIARA を利用して、背側あるいは腹側からの炭素イオンビームを照射し、その後の血球数の変化を観察したところ、造血組織である腎臓が照射される背側からの照射群において、8 日後に血球数の有意な減少が観察された(図 1)。次に、その減少が照射される腎臓の面積に依存するかについて、腎臓の両葉あるいは片葉のみが照射されるように厚さ 5 mm のアクリル板に穴を開け、メダカの体全体を遮蔽し、限局した炭素イオンビーム照射を行った。腎臓の両葉が照射された際には、背側全体が照射されたのと同程度の血球数の減少が認められた一方で、片葉ではコントロールと比較して有意な減少が認められなかったことから、造血組織における照射野の面積増加に伴い血球数が減少することが明らかとなった(図 1)。

これら実験に使用したメダカの腎臓領域から作製した切片の HE 染色およびこれらの立体構築による 3D 解析から、1 週間後において、照射された領域の腎臓では血球が顕著に減少しており、この結果が造血細胞の減少に伴うことが予想された。

##### (4) 全身応答を促す最低線量の検討

次に、線量依存性を検証するために、

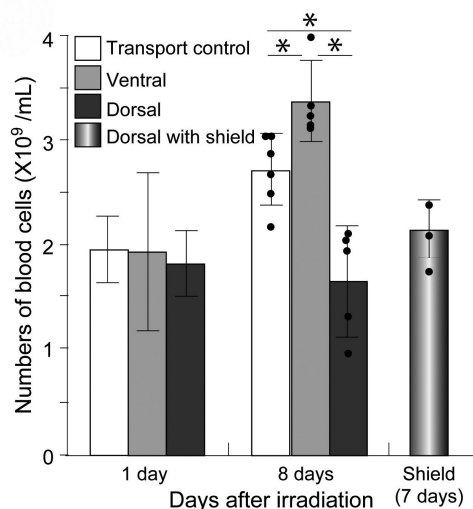


図 1 炭素イオンビーム照射後 1、8 日目および遮蔽照射 7 日後における血球数変化

TIARA を利用して、2, 5, 15 Gy 相当の炭素イオンビームを背側から照射したが、いずれも同程度コントロールから血球数が減少している結果となった。これらの線領域において線量依存性は認められなかった。

##### (5) 日数の経過に伴う放射線影響

これまで、線等により照射 1 日後までに血球の形態変化が生じていることが明らかとなっている。一方で、造血細胞への影響については、1 日では不明である。そこで、放射線照射 1, 3, 5, 8 日後における血球数の変化について解析を行った。比較対象のために線による照射群についても同様に検討した。その結果、腹側、背側、線、背側照射 1 日後には血球数の減少が観察され、7 日後にはメダカの造血組織である腎臓が照射された背側照射のみで顕著な血球数の減少が観察された。また、腹側照射群では照射後 7 日目には照射前より有意な増加が認められた。

7 日目において、腎臓が照射されたことにより血球数の減少が示されたことから、その後の回復について 7, 14, 21, 28 日後における回復について検証したところ、照射後 28 日後においても炭素イオンビームおよび線照射群の双方において血球数の回復は認められなかった(図 2)。

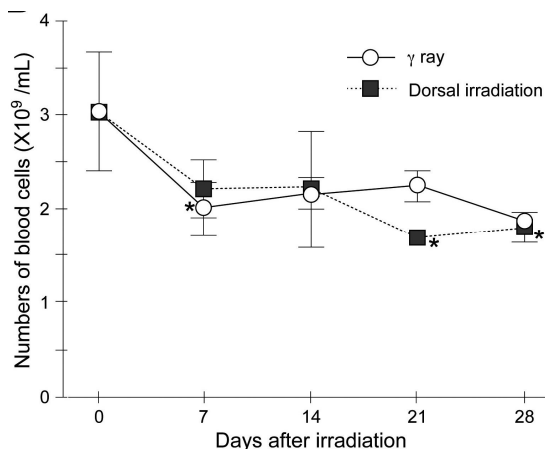


図 2 炭素イオンビームおよび  $\gamma$  線照射後 7, 14, 21, 28 日後における血球数変化

これら照射後 28 日目までの個体から腎臓領域の組織切片を解析したところ、線照射群では、腎臓の組織は視野内の血球数と腎臓細胞との構成比がコントロールとほぼ変わらないところまで回復していた。以上の結果は、放射線照射により造血細胞が受けたダメージは、徐々に回復しているように見えるが、全身レベルでは、28 日後においても回復していないということを示唆している。

#### (6) 貧血処理による造血組織への影響放射線影響の解析

フェニルヒドラジンによる貧血誘導直後、1, 2, 3, 4, 7, 9 日後のメダカから血液を採取し、血球数の変化を解析した。その結果、貧血誘導後 2 日目まで血球数が減少し、5 日目には回復してくることが明らかとなった。次に、貧血処理 1 日後に線を照射し、その 1, 2, 3, 4, 7 日後に血球数を解析し、貧血による造血誘導時における造血細胞の放射線応答を解析した。その結果、放射線照射 1 日後には末梢赤血球における細胞死や形態異常などの放射線影響は、貧血誘導の有無により変化しない一方で、貧血からの血球数の回復は 1 日程度遅くなった。また、放射線照射 7 日後における血球数の比較から貧血環境下では造血組織が放射線に対して抵抗性を示すことが明らかとなった。造血器官である腎臓は、貧血処理 1 週間後でコントロールと同程度まで組織像が回復しており、放射線影響のみが観察された(図 3)。

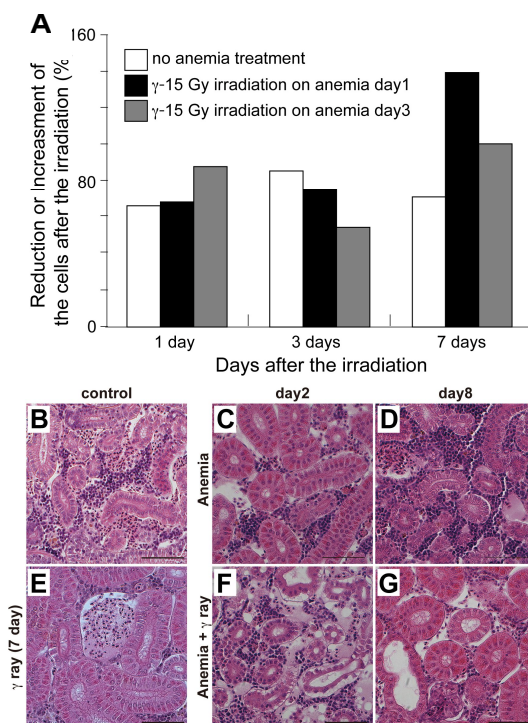


図 3 A. 貧血処理個体に対して貧血処理後に放射線を照射した 1, 3, 7 日後の血球数の割合。B-G 腎臓の HE 染色。B. コントロール、C および D. 貧血処理。E.  $\gamma$  線照射 7 日後。F および G. 貧血処理 1 日後に  $\gamma$  線照射個体。C および F. 貧血処理後 2 日目。D および G. 貧血処理後 8 日目。スケールバーは 50  $\mu$ m。

#### (7) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究は、局所的な放射線が及ぼす全身応答の原因として造血組織および血球に着目して研究を進めた結果から、メダカの有核赤血球はであり、無核のは乳類よりも顕著な放射線応答を示している可能性を明らかにした。哺乳類の胎児期の赤血球は有核であり、有核赤血球を有するメダカで得られた知見と同様の現象が生じると予想される。

また本研究は、放射線照射の際の個体レベルでの応答の分子的基盤を探索・解明することを狙う基礎的研究であり、今後この研究を進展させ直接・間接的な被ばく影響に対する対処法、或いは治療に使用する照射線量を適切に調節するなど、医療現場での患者さんの医療被ばくのリスク評価に応用できると期待できる。特に照射後の生体影響の時間変化を追跡することにより、照射によるダメージと全身性の応答を引き起こす副作用を抑えられるようなキレート剤等の創薬においても有用な知見を得ることが出来ると期待される。

#### <引用文献>

Blyth, B. J. & Sykes, P. J. (2011) Radiation-induced bystander effects: what are they, and how relevant are they to human radiation exposures? *Radiation research* **176**, 139-157

Beer, L., et al. (2014) High dose ionizing radiation regulates micro RNA and gene expression changes in human peripheral blood mononuclear cells. *BMC Genomics* **15**:814

Funayama, T. et al. (2008) Heavy-Ion Microbeam System at JAEA-Takasaki for Microbeam Biology. *Journal of radiation research* **49**, 71-82.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### [雑誌論文](計 7 件)

Sayed, A. E. D. H., Igarashi, K., Watanabe-Asaka, T., Mitani, H. Double strand break repair and  $\gamma$ -H2AX formation in erythrocytes of medaka (*Oryzias latipes*) after  $\gamma$  - irradiation. *Environ. Pollut.*, 査読有, vol. 224, 2017, pp. 35-43. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.11.050

Igarashi, K., Kobayashi, J., Katsumura, T., Urushihara, Y., Hida, K., Watanabe-Asaka, T., Oota, H., Oda, S., Mitani, H. An approach to elucidate DNA repair function of NBS1 using frequent nonsynonymous polymorphism in wild medaka (*Oryzias latipes*) populations. *PLoS ONE*, 査読有, vol. 12, No. 1, 2017, pp. e0170006. DOI: 10.1371/journal.pone.0170006

Sayed, A. E. D. H., Watanabe-Asaka, T., Oda,

S., Mitani, H. Apoptotic cell death in erythrocytes of p53- deficient medaka (*Oryzias latipes*) after - irradiation. *Int. J. Radiat. Biology*, 査読有, vol. 92, No. 10, 2016 pp. 572-576. DOI: 10.1080/09553002.2016.1222091

K. Nagata, C. Hashimoto, T. Watanabe-Asaka\*, K. Itoh, T. Yasuda, K. Ohta, H. Oonishi, K. Igarashi, M. Suzuki, T. Funayama, Y. Kobayashi, T. Nishimaki, T. Katsumura, H. Oota, M. Ogawa, A. Oga, K. Ikemoto, H. Itoh, N. Kutsuna, S. Oda, and Hiroshi Mitani. *In vivo* 3D analysis of systemic effects after local heavy-ion beam irradiation in an animal model. *Sci. Rep.*, 査読有, vol. 6, 2016, pp. 28691; doi: 10.1038/srep28691. (\*Corresponding author) Sayed, A. E. D. H., Watanabe-Asaka, T., Oda, S., Mitani, H. Apoptosis and morphological alterations after UVA irradiation in red blood cells of p53 deficient Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 査読有, vol. 161, 2016, pp. 1-8. Yasuda T., Kimori Y., Nagata K., Igarashi K., Kakimoto F., Watanabe-Asaka T., Oda S., Mitani H. Irradiation-injured brain tissues normally self-renewed in the absence of p53, the pivotal tumor suppressor, in medaka (*Oryzias latipes*) embryo. *J Radiat Res*, 査読有, vol. 57 (1), 2016, pp. 9-15. doi: 10.1093/jrr/trv054

Y. Murata, T. Yasuda, T. Watanabe-Asaka, S. Oda, A. Mantoku, K. Takeyama, M. Chatani, A. Kudo, S. Uchida, H. Suzuki, F. Tanigaki, M. Shirakawa, K. Fujisawa, Y. Hamamoto, S. Terai, H. Mitani. Histological and Transcriptomic Analysis of Adult Japanese Medaka Sampled Onboard the International Space Station. *PLoS One*, 査読有, vol. 10(10), 2015, pp. e0138799

〔学会発表〕(計 6件)

Alaa El-Din Sayed, Tomomi Watanabe-Asaka, Shoji Oda and Hiroshi Mitani “Apoptosis and morphological alterations after UVA irradiation in red blood cells of p53 deficient Japanese medaka (*Oryzias latipes*)”; 2016 4th International Conference on Environment Pollution and Prevention (ICEPP 2016), December 25-27, 2016、ホテルコープイン京都、京都府・京都市)

Tomomi Watanabe-Asaka, Chika Hashimoto, Keita Ohashi, Takako Yasuda, Kento Nagata, Tomoo Funayama, Michiyo Suzuki, Alaa El-din H. Sayed Aly, Shoji Oda, and Hiroshi Mitani “Evaluation of radiation sensitivity in erythrocytic series cells and the hematopoietic organ using Japanese medaka, *Oryzias latipes*”; Joint Events of the 22<sup>nd</sup>

International Congress of Zoology and the 87<sup>th</sup> meeting of Zoological Society of Japan, 14 – 19 November, 2016、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

Tomomi Watanabe-Asaka, Kazusa Ito, Chika Hashimoto, Takako Yasuda, Kento Nagata, Toshiyuki Nishimaki, Takafumi Katsumura, Hiroki Oota, Hiroko Ikeda, Yuichiro Yokota, Tetsuya Sakashita, Michiyo Suzuki, Tomoo Funayama, Yasuhiko Kobayashi, Shoji Oda, and Hiroshi Mitani “Availability of Medaka as Systemic Effect Model of Local Irradiation by Histological Analysis”; 15<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research, 24<sup>th</sup> to 29<sup>th</sup> May 2015、京都国際会館(京都府・京都市)

Chika Hashimoto, Kazusa Ito, Tomomi Asaka, Takako Yasuda, Tomoo Funayama, Yasuhiko Kobayashi, Shoji Oda, Hiroshi Mitani “Investigation of somatic acute responses induced by local irradiation in adult medaka”; 15<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research, 24<sup>th</sup> to 29<sup>th</sup> May 2015、京都国際会館(京都府・京都市)

Tomomi Watanabe-Asaka “3D Analysis of the irradiation effect by local irradiation with carbon ion particles in medaka (*Oryzias latipes*)”; Space Radiation and Heavy Ions in Therapy Symposium 2015, 22<sup>nd</sup> to 24<sup>th</sup> May 2015、あべのハルカス(大阪府・大阪市)

浅香智美、関谷義男、和田浩則、保田隆子、大久保郁哉、尾田正二、三谷啓志 “メダカ胚では心拍開始期の低温誘発不整脈が心臓機能獲得を妨げる”; 日本動物学会第86回新潟大会 2015年9月17-19日、朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

〔その他〕

ホームページ等

所属機関における研究ニュース

<http://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/new-approach-to-evaluate-irradiation-effect-on-whole-body.html>

メダカバーチャルスライド

[https://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~vs\\_08\\_2p/newpage4.html](https://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~vs_08_2p/newpage4.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

浅香 智美 (ASAKA, Tomomi)  
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任研究員  
研究者番号：90555707

(2)研究協力者

橋下 知佳 (HASHIMOTO, Chika)  
大橋 圭太 (OHASHI, Keita)