

平成19, 20年度共同研究報告書

放射線大量被ばくの人体への影響軽減研究

弘前大学大学院医学研究科放射線科学教室

代表者 教授 阿部由直

平成21年3月

研究協力者

助教	工藤 幸清	(弘前大学大学院保健学研究科医療生命科学領域 放射線生命科学分野)
助教	劉 勇	(京都大学原子炉実験所粒子線腫瘍学研究センター)
准教授	胡 東良	(弘前大学大学院医学研究科感染生体制御学講座)
教授	中根 明夫	(弘前大学大学院医学研究科感染生体制御学講座)
教授	鬼島 宏	(弘前大学大学院医学研究科病理生命科学講座)

目次

I. 研究目的	1
II. 研究概要	5
III. 研究内容	6
IV. 研究成果	1 2
V. これまでの成果のまとめと今後の展望	2 8
VI. 参考図書	2 9
VII. 学会報告	2 9
VIII. 論文	3 1

I. 研究目的

1999 年におきた JCO による臨界事故で大量に被ばくした 2 名が死亡した。JCO の被ばく事故に対する医療で以下の点が明らかになった。(1) 放射線による骨髄障害に対しては骨髄移植を主として行い、補助的に好中球増殖因子、血小板増殖因子等の投与あるいは抗生物質、止血剤、輸血等で対処することが可能となったこと。(2) 放射線による皮膚障害に対しては、障害が真皮層まで達し表皮全体の脱落が生じた場合には皮膚移植が最善の治療となる。(3) 腸管障害が発生した場合には補液管理を中心とした対症療法しか行えず、根本的な治療法が存在しない。

腸管障害^{注1)}は腺窩・絨毛といった上皮組織の脱落による消化管の機能障害、つまり電解質喪失・出血性病変である。ここで放射線による腸障害に対する新しい治療法の開発を行うことが急務である。造血組織および皮膚と同様に幹細胞の移植による腸管の再生以外には方法はないと考える。マウス ES 細胞^{注2)}、MS 細胞^{注3)}さらに iPS 細胞^{注4)}の腸管への移植さらに腸管細胞の増殖をコントロールすると思われる数種の生物学的製剤・細胞等を用い齧歯類の腸管障害を実験的に制御することを目的とする。これらの成果をもとに将来的に臨床的に応用することを企図するものである。

注1) 放射線による腸管障害の病理

小腸は消化管の中で最も放射線感受性が高い。これは小腸が哺乳類の体内で最も早く細胞増殖を行っている組織であることに起因していると考えられている。

構造的に小腸は上皮と間質に分けられる(図 1)。間質は支持組織であり、腸管の運動を司る平滑筋、免疫系のリンパ組織、栄養を運搬する血管系などから構成され、漿膜に包まれる。一方、上皮は腺窩と絨毛に分けられる。腺窩は約 250 個の細胞から構成される。腺窩の底部近傍に小腸の幹細胞が存在し、幹細胞から分裂した細胞がさらに分裂増殖を行うことにより細胞数を増加させる。増加した細胞は腺窩に留まることなく腺窩の細胞を押し上げ絨毛に移行していく。腺窩から絨毛に移行すると細胞は増殖能力を失い、絨毛の中で、機能細胞として生命の維持に関与する。絨毛の主な役割は食物の消化吸収と消化管から進入する異物に対する免疫防御作用である。絨毛細胞も、次から次へと腺窩で生まれる細胞が下から押し上げてくるので次第に絨毛の上方に移行し、最終的に絨毛の先端から脱落し、死ぬこととなる。

腺窩では主として分裂、増殖を行っているが増殖の早さは体内の分裂可能細胞のなかで最も早いことが特徴である。マウスの場合、腺窩で細胞数が倍になる時間は

10 - 19 時間、腺窩で生まれた細胞が絨毛の頂点から脱落するまで約 3.5 日である。増殖の点から検討すると、単位時間に生まれた腺窩細胞数と腺窩から絨毛に移行する細胞数および単位時間あたりに絨毛の先端から脱落する細胞数は等しい。つまり、腺窩・絨毛系は細胞数の点で定常状態にあると考えられる。腺窩での細胞生産と絨毛での細胞脱落がつり合っている。

放射線の標的は腺窩細胞である。マウスを用いた放射線照射による実験では、おおむね 10 Gy 程度以上を全身投与することにより 3 - 5 日目に個体の死を誘発する。線量および平均致死日数はマウスの種類および飼育条件に大きく影響される。照射されたマウスは下痢をおこし、全身衰弱を起こし死亡する。このときにマウスの消化管を肉眼的に観察すると腸管内に流動物が充満している。さらにミクロ的に観察すると腺窩の消失と絨毛の短小化と脱落消失が観察される。つまり、腺窩細胞が放射線による細胞死を起こし、腺窩自体が縮小喪失することにより絨毛を維持することができなくなり、絨毛細胞の喪失と破綻が起こる。機能的には消化吸收等の生命維持機構の破綻により、吸収ができなくなるのみならず体液が消化管から漏出し喪失する現象が生じることになる。つまり、腺窩細胞が放射線の標的となり、腺窩細胞が増殖できなくなるようになると絨毛への細胞供給ができなくなり、絨毛の短小化がおこる。さらに腺窩細胞が枯渇してしまえば、完全に絨毛への供給が不可能になり絨毛が消失することになる。

しかし、腺窩内に 1 個の細胞が生残した場合には、ここから再生することが知られている。マウスの場合には照射 3.5 日目に観察される、いわゆる再生腺窩（図 1）である。肥厚したエオジン好性の腺窩として顕微鏡下に観察される。この再生腺窩 1 個が一個の細胞から成り立つと考えた場合にはポアソン分布から放射線生物学的に線量—生残率を求めることが可能となる。この方法は Withers 博士により発表されたもので、マイクロコロニー法とも呼ばれ、最もスタンダードな腸の放射線感受性の検定法である。

再生の様式を経時的に検討すると、再生腺窩が隣に新しい腺窩をつくるような形で、次々と横に拡がって行われることが知られている。したがって十分な時間があれば腸上皮は再生可能である。実際に障害の範囲が限局している場合、たとえばマウスなどで腸管の一部に限局して放射線を照射するような場合には長期生存も可能となる。つまり、これが個体死を防げる程度に再生できるか否かは障害の範囲と個体が再生するまでの間、体力を維持することができるかにかかっている。

また 10 Gy という致死線量以下の線量を投与した場合には腺窩に多数の

apoptosis が起き、多数の死細胞が観察される。興味深いことに非常に低線量の範囲から観察されるが、2 Gy から 10 Gy 程度では apoptosis 数に変化はない。この範囲の中では腺窩の構造を変更するものではない。同時に小腸腺窩が再生能力の極めて大きい組織であることも示している。2 Gy 程度の線量を投与した場合、障害を受けた腺窩では直ちに再生が起こり、24 時間後にはほとんど元に回復することである。2 Gy を 4 時間間隔で投与した場合も速やかな回復が観察される。このように増殖が盛んであること、外部からの侵襲に対して速やかな反応を有していること、障害から回復する手だても持っているということで、ある条件下では再生も容易であることを示している。

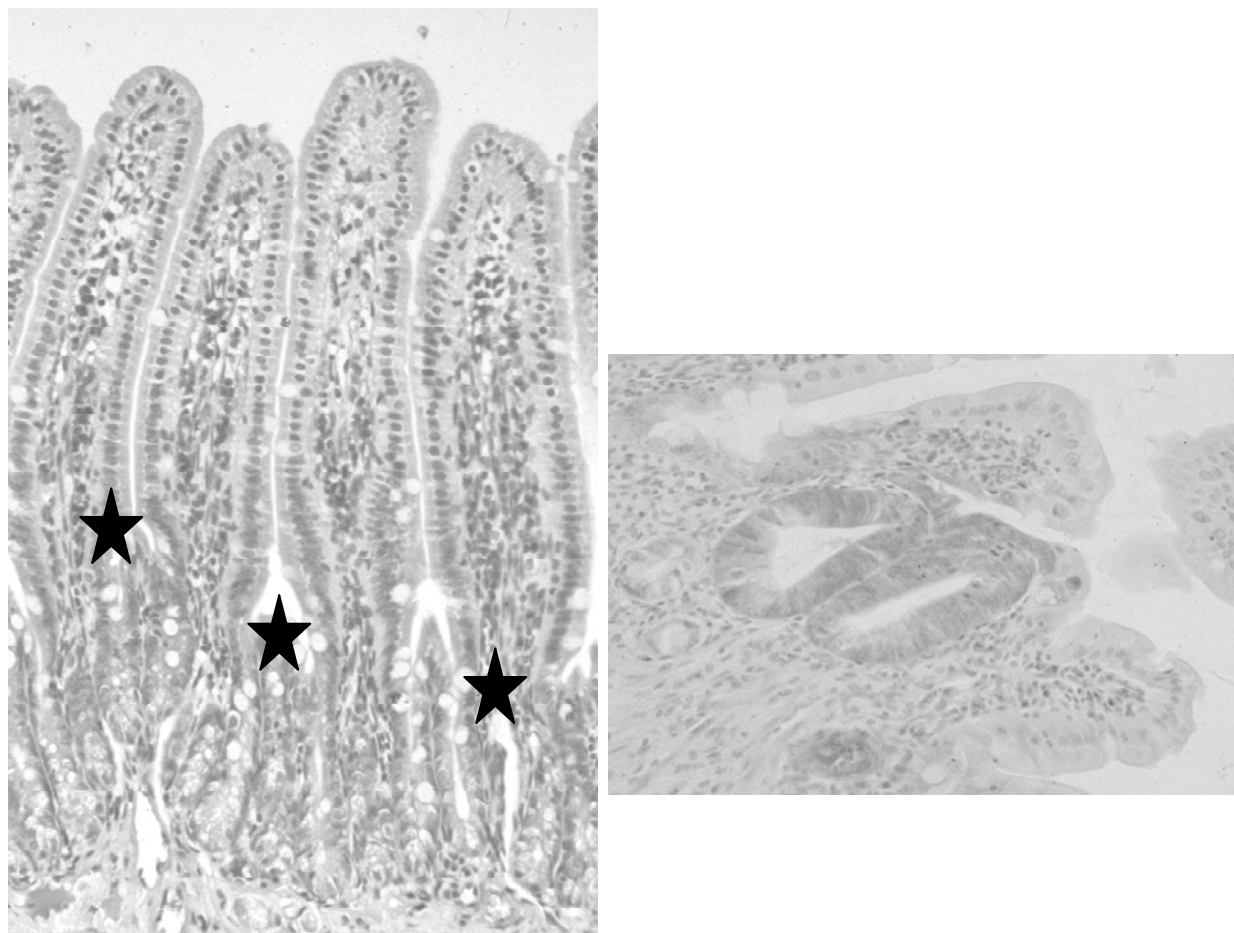


図 1. 正常の腸管（左）：星印が絨毛と腺窩の境界を示す。再生腺窩（右）：腺窩の再生に伴って、肥大化している。

注 2) ES 細胞

胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cells ; ESCs) で胎児の組織などから樹立された。多様の分化機能を有しクローン個体を生み出す基になる細胞。また分化誘導の条件をつけることにより、皮膚・心臓・神経・眼・血管・造血組織・消化器緒器官・筋肉・骨などの組織を形成する能力を有している細胞である。これらの臓器の中には、ある程度分化した形の幹細胞があることが知られている。

どのような条件下である臓器への指向性を持つのか、一部のみが解析されているにすぎない。ある種のものでは多くの遺伝子発現が関与しており、それらを制御することにより分化誘導される。ある場合には、分化誘導する「場」が必要になっているのではないかと思われる。実際に間質系あるいはアンカーされるものがあると容易に形を作るようである。

注 3) MS 細胞：骨髄間葉系幹細胞

MS 細胞 (Mesenchymal Stem Cells ; MSCs) は多能性細胞として知られている。多くの分野で再生医療のキー細胞として注目されている。ES 細胞との違いは癌化傾向を持たない点にある。心筋などの再生では壊死心筋層へ直接筋注して投与している。間葉系のみならず上皮系細胞への分化傾向も示され、腸の再生にも役立つ可能性がある。

注 4) iPS 細胞：人工多能性幹細胞

京大の山中教授らによって作成されたマウスならびにヒト由来の人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cells ; iPSCs)。マウス体細胞に 4 つの因子 (Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4) をレトロウィルスベクターで導入することにより、形態や増殖能が ES 細胞に類似し、分化多能性を持った人工万能幹細胞を樹立した。

II. 研究概要

研究は、万能細胞である ES 細胞または MS 細胞を用い、小腸腺窩の再生を企図するものである。そのためには ES 細胞を腸管に生着をさせる方法と生着した ES 細胞または MS 細胞の増殖を促進させる方法を考えなければならない。

研究は以下の三工程から成立する。(1) ES 細胞または MS 細胞の生着および増殖刺激と小腸腺窩細胞の増殖刺激条件に関する研究、(2) 照射された腸の防護および(3) 小腸腺窩を腸死から防ぐための総合的研究からなる。

それぞれの目的は次のようである。

1) ES 細胞または MS 細胞の生着および増殖刺激と小腸腺窩細胞の増殖刺激条件に関する研究：

ES 細胞または MS 細胞を荒廃した小腸上皮に生着させることを主たる目的とする。この目的のために投与法および刺激条件について検討する。投与法は初期には一番確実と思われる直接投与法を用いることとする。臨床的には上腸間膜動脈による経動脈的投与が必要と思われ、経年的にこの方法による投与法について検討していく予定である。

さらに、より効率的に ES 細胞または MS 細胞を定着・増殖させるためには増殖刺激因子による増殖刺激の必要性がある。これは ES 細胞を投与してから実験する必要性はなく、正常小腸に放射線を照射し、その前後に種々のタイプの増殖刺激因子を投与し、幹細胞の増加を検討することにより推測することが可能となる。

まとめると ES 細胞または MS 細胞を投与し、種々の増殖刺激因子を投与することにより ES 細胞または MS 細胞の生着と増殖を促進し、これにより腸上皮の回復を速やかに起こすことを目的とする研究である。

2) 照射された腸の防護に関する研究：

この研究は照射による損傷を防護する防護剤に関する検討を行うものである。腸からの体液逸脱を最小限に留めることにより個体の保護に努め、その間に幹細胞の増殖修復を待つという治療の可能性について探索する。今回ヘパラン硫酸の防護作用を見だし、その機構について検討を加えた。

3) 小腸腺窩を腸死から防ぐための総合的研究：

以上の実験結果を総括し、総合的に投与法、適切な増殖刺激因子を投与し、実際

に放射線による腸死を回避できるか否かについて、あるいは回避できる可能性、回避できる程度などについて検討するものである。

III. 研究内容

1) 腸腺窩コロニーの増殖因子

(1) 研究方法

Withers の開発した腸のコロニー形成能でマウス腸管の放射線感受性についての修飾を検討する。これは大線量を投与 3.5 日後に再生してきた腸腺窩(図 2)の数を測定する方法である。放射線を投与する前あるいは投与後に増殖因子等による放射線感受性を修飾する因子をマウスに与え、その影響を見る。

以下の動物実験は弘前大学医学部動物実験倫理委員会の審査を経て許可され弘前大学動物実験に関する指針に則り行われたものである。

実験動物は雌 C3H/He マウス 8 – 10 週令のものをを用い、医学部動物実験施設で飼育され実験に供された。X線照射は弘前大学医学部動物実験施設内の装置（日立メディコ、MBR-1505R2, 0.5 mm Al filter, 150 kV, 5 mA, 1.2 Gy/min）を用いて行われた。

実験は図 2 に示す手順で行われた。 β EGF とメラトニンは照射後、エーテル麻酔下に皮下切開を行い、薬剤の入った浸透圧性持続注入ポンプ（Alzet model 1003D）を皮下に埋め込んだ。このポンプは $93 \mu\text{l}$ の容量を持ち、浸透圧性に $0.97 \mu\text{l/hr}$ の速度で流出するもので約 96 時間持続投与することが可能である。

照射 3.5 日後にマウスを頸椎脱臼に屠殺し、小腸を摘出し、ホルマリン固定を行いパラフィン包埋後、 $4 \mu\text{m}$ の小腸輪切り薄切標本作製、ヘマトキシリン–エオジン染色を行い、顕微鏡下に観察するものである。1 切片から、少なくとも 30 個の小腸輪切り像を観察する必要がある。これをマウスの個体分行うことになる。

最終的に次の式から小腸一周あたりの生残細胞数を求め、これを用いて放射線感受性を決定する。

$$S=1-(\exp(-x/N0))$$

ここで S は、total cell survival per circumference（小腸 1 周あたりの総細胞生存数）、N0 は非照射小腸の一周あたりの腺窩数で x は小腸 1 周あたりの観測される腺窩数である。

今回、 β EGF、メラトニン、エダラボンという異なる三種類の薬剤をそれぞれ投与し、影響について検討する。 β EGF は上皮増殖促進因子であり、照射後の腸腺窩の増殖促進作用を、メラトニンは neuro-endocrine system の薬剤として、腸管保護作用を有し、エダラボンはフリーラジカル除去剤として放射線により惹起されるフリーラジカルを除去することにより腸管あるいは全身への影響を軽減する。これら三剤は結果次第によっては併用することが可能であり、今後の臨床応用にも効用の期待が大きい。

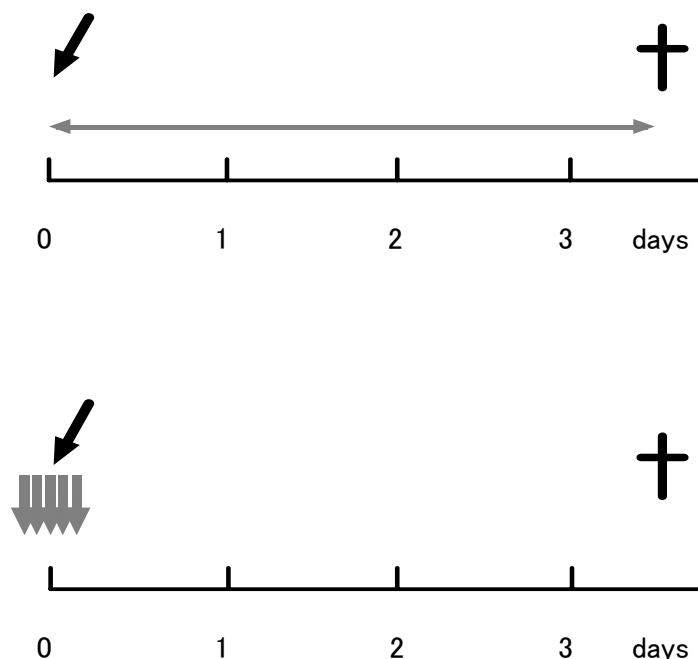


図 2．実験方法。上図は持続投与法で下図は一回投与法。実線矢印は放射線照射。十字はマウスの屠殺。薄い矢印は薬剤の投与。下図では複数の投与法を一つの図中に示している。実際は一回の薬剤投与に対して一回の放射線を投与している。詳細は本文参照。

2) 増殖因子等の投与実験 (図 2)

(1) β -EGF (上皮増殖促進因子)

β -EGF は最も普遍的な上皮増殖促進因子として知られている。皮膚等での実験から効果が知られているところであるが照射後の腸腺窩の増殖に関与するか否かを検討する目的で投与するものである。放射線はX線を用い、線量は、15、17、19 Gy

とした。1匹あたりの投与量は $1.86 \mu\text{g}$ であり、96 時間にわたり浸透圧作動埋め込み型持続ポンプ Alzet model 1003D により投与した。(図 2 上) 実験は 15、17、19 Gy において、それぞれ EGF の有無について行なった。

(2) melatonine (腸管障害防御作用)

メラトニン本来、脳の松果体から産生されるホルモンである。この作用は睡眠と密接な関係があるとされている。近年、腸管への作用もあり、腸管障害にたいして防御的に作用することが知られるようになった。線量は、15、17、19 Gy とした。1匹あたりの投与量は $200 \mu\text{g}$ であり、96 時間にわたり浸透圧作動埋め込み型持続ポンプ Alzet model 1003D により投与した。(図 2 上) 実験は 15、17、19 Gy において、それぞれメラトニンの有無について行なった。

(3) エダラボン (フリーラジカル除去剤)

低 LET 放射線によって引き起こされる障害はフリーラジカルが原因として起きることが知られている。エダラボンは、このフリーラジカルを除去する薬剤として開発されたものである。エダラボンは生体内で陰イオン化され、フリーラジカル(水酸基)と接触することによりラジカルをエダラボンに取り込みエダラボンラジカルと変化する。このラジカルは活性が弱いので、結果的にラジカルを無毒化すると考えられている。(図 3) これが現在、医薬品として認可を受け、臨床的に脳梗塞などの治療に用いられている。フリーラジカルの性格上、放射線照射直前に投与し、放射線により惹起されるフリーラジカルを除去するという作用が期待されるところであるが、本研究では照射直後に投与することによる影響について検討を行い、臨床的有用性について研究する。線量は 18 Gy とした。1匹あたりの投与量は 0.1 mg/g (マウス体重)とし、腹腔内に一回投与した。照射前 2 時間前、1 時間前、30 分前、直前、直後、1 時間後および 2 時間後に投与した。(図 2 下)

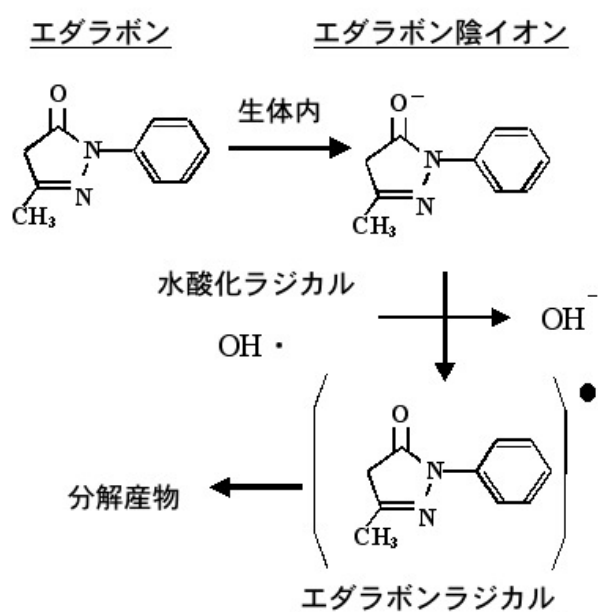


図3. エダラボンの作用機序。投与されたエダラボンは生体内で陰イオン化になる。水酸基ラジカルに出会うことによりラジカルを除去し、活性の低いエダラボンラジカルを形成、その後分解される。

3) 防護剤投与に関する方法論 (図4)

腸コロニー法では腸腺窩の再増殖のピークとなる 3.5 日後に観察することにより、腸腺窩の再生能を検討することが可能である。しかし、3.5 日を越えての腸管の放射線の効果を検討する、つまり再生によらない他の要素を検討するに際しては他の方法を用いなければならない。これに対してマウスを麻酔下において腹部にスリットで照射することにより、長期生存が得られることと、病的にも放射線の影響を確認することが可能となった。したがって、腸管の防護機構についてより詳細に検討できることになった。

【材料および方法】

動物

ICR nu/nu マウスの雌、8 - 10 週令、体重 25 - 31 g のものを使用した。

ヘパラン硫酸投与

ヘパラン硫酸 (SIGMA, H7640, Heparan sulfate sodium salt from bovine kidney) は、生理食塩水で $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調整し、一回当たりの投与量 $1 \mu\text{g/g}$ 体重とし、X線照射 24 時間前、および照射後 5 日目から 10 日目まで毎日、腹腔内投与を行った。

腹部照射（スリット照射）

マウスにペントバルビタール（50 mg/kg 体重）を腹腔内へ投与、麻酔下で仰臥位になるよう四肢を固定し、腹部は大きな動きを防止するため布テープにより固定した。マウスの腹部に対して、体幹部を横断する様なスリット幅 7.5 mm または 10 mm の間隙を設けた鉛板（厚さ 2 mm）で覆いかくし、スリット部（7.5 mm 幅または 10 mm 幅）に、X 線で 30 Gy を 1 回照射した。X 線照射は弘前大学医学部動物実験施設内に設置された X 線装置（日立メディコ、MBR-1505R2）により、1.0 mm Al + 0.2 mm Cu filter, 150 kV, 5 mA, 0.75 Gy/min の条件で行った。スリット幅と X 線の線量は予備実験より得られた最適な条件である。

マウス生存率と体重変化

照射日よりマウスの生存および体重を観察し、生存分析（Kaplan-Meier, Logrank test）および平均体重の差の検定（t 検定）を行った。

組織観察

X 線 30 Gy, スリット幅 7.5 mm または 10 mm で照射し、13 日 - 30 日を経過したマウスを頸椎脱臼に屠殺し、腸管を摘出、実体顕微鏡下に観察を行った後に、腸管をホルマリン（10%-中性緩衝ホルムアルデヒド液）固定し、パラフィン包埋後、4 μ m 厚の薄切標本作製、ヘマトキシリン-エオジン（H.E.）染色およびマッソントリクロール（M.T.）染色を行い、顕微鏡下に観察した。

照射後の腸腺窩の再生を促す因子として bFGF 塩基性線維芽細胞増殖因子が注目されているので原本に基づいて追試をおこなった。

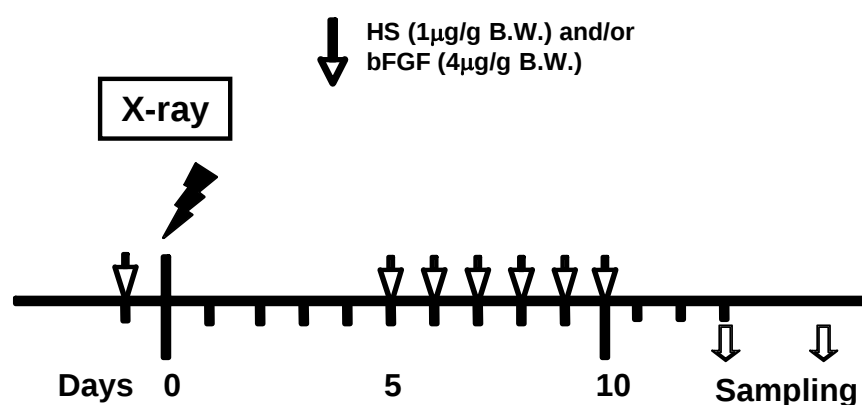


図 4. bFGF およびヘパラン硫酸またはヘパラン硫酸単独の腹腔内投与の実験
HS: ヘパラン硫酸、bFGF: 塩基性線維芽細胞増殖因子

4) ES 細胞または MS 細胞投与に関する方法論

マウスを麻酔下において開腹、腸管を引きだし 30 Gy の放射線を局所照射し（図 5, 6）、ただちに実体顕微鏡下にマニピュレーターを操作し、目的部位に細胞を注入する。縫合閉腹し個体を回復させる。その後 10 - 27 日を経た後にマウスを屠殺、腸管を摘出、実体顕微鏡下に観察を行った後に前述した小腸の輪切り切片を作成し、これにより細胞の生着の有無を検討する。

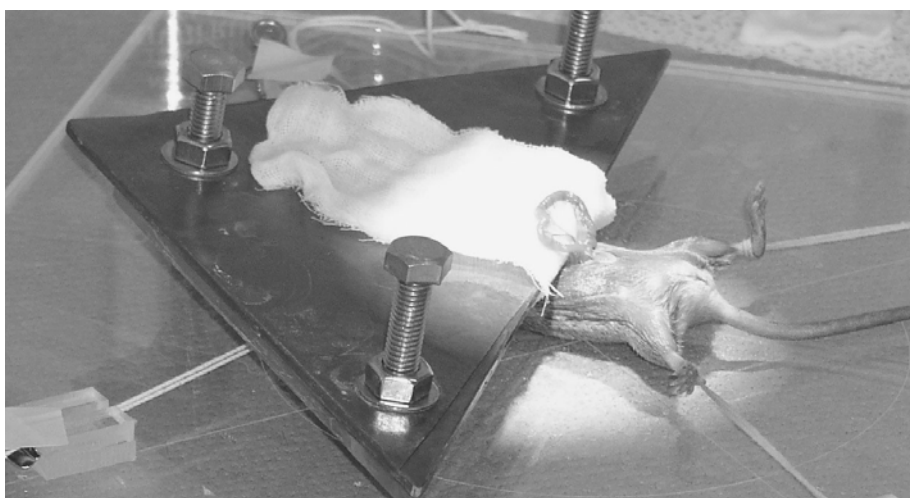


図 5. 腸が乾燥しないように生食で湿らした滅菌ガーゼにくるみ、上半身を鉛板で防護しているところ



図 6. 下半身を鉛で覆い、腸を選択的に照射している。

IV. 研究成果

1) 増殖因子等の投与実験の結果

β EGF、メラトニン、エダラボン投与の実験は終了した。

β EGF、メラトニン投与に関する実験では、これら薬剤による放射線腸腺窩障害への影響は認めなかった (図 7)。エダラボン投与実験では照射前にエダラボンを投与することにより腸のコロニー数の増加が見られ、特に照射 30 分前の投与では非投与群と比較し、有意差 ($p=0.023$) が明らかとなった (図 8)。エダラボンによる放射線腸腺窩障害を回避する可能性が示唆される。

これらのことから放射線終了後に腸腺窩を刺激しても効果なく、照射時に発生するフリーラジカルの除去が効果的であることが想定され臨床応用可能であることが示唆されている。しかし、エダラボンの実効性は被ばく前の作業に限定されるであろう。

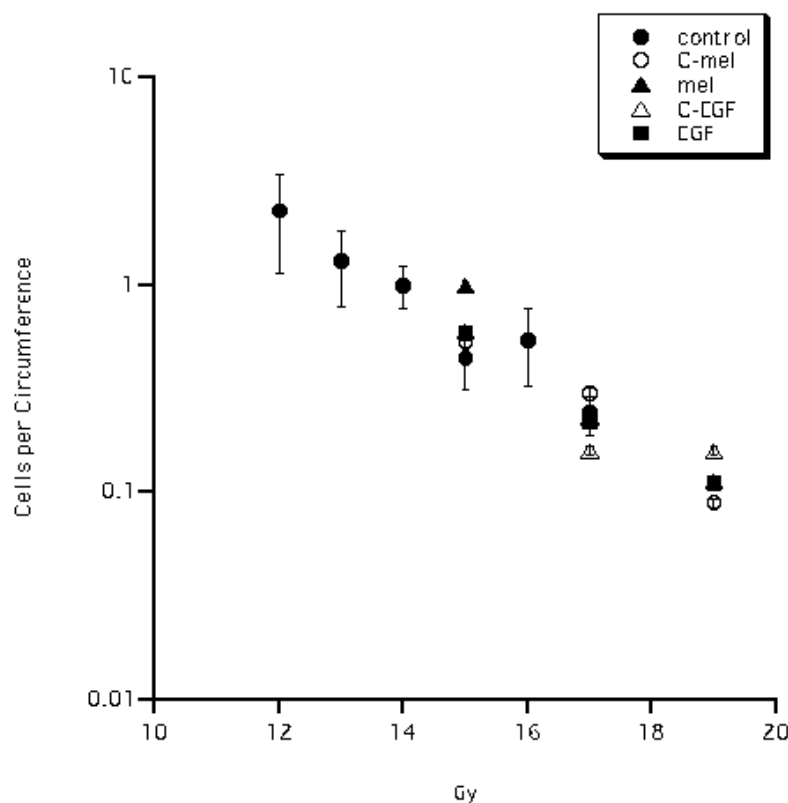


図 7. 放射線による腸腺窩の生存率。 β EGF (■) とメラトニン (▲) 投与による生存率。対照 (●)、(○)、(△) と差はない。異なる実験結果を合わせた。

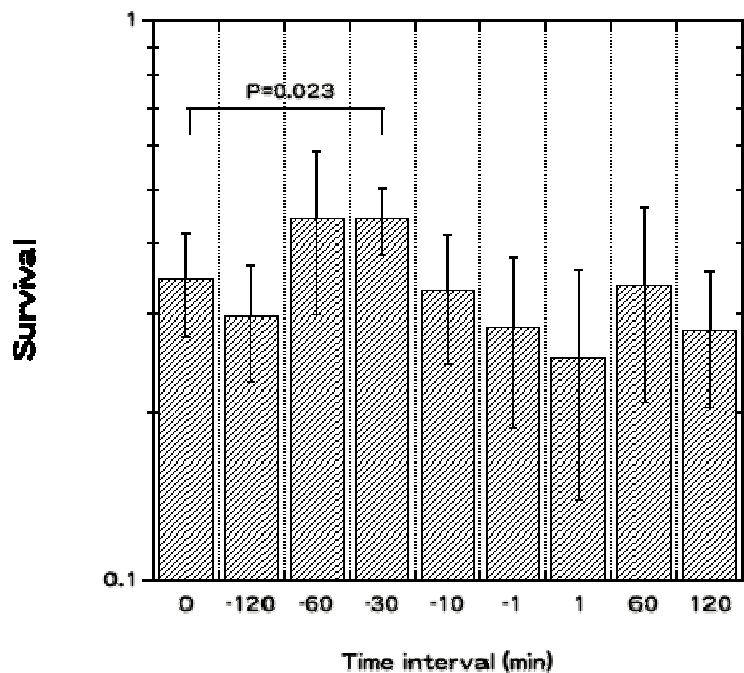


図 8. 腸腺窩の生存率に対するエダラボン投与の効果。エダラボンを照射前に投与することにより腸腺窩の防護が観察された。照射単独群と照射 30 分前投与群で有意差が得られた。

2) 防護剤の検討：ヘパラン硫酸 (HS)

図9 に照射後 30 日までのマウス生存率と体重変化を示す。スリット 10 mmで照射したヘパラン硫酸投与群の生存率は、非投与コントロール群に比べ、照射後 13 日目で有意 ($P < 0.05$) に高くなった (左図)。また、スリット 7.5 mmで照射したヘパラン硫酸投与群の体重は、非投与コントロール群に比べ、照射後 8 日目以降有意 ($P < 0.01$) に高くなった。

さらに、照射後 13 日でのH.E.染色による組織像 (図10) では、ヘパラン硫酸投与群は再生腺窩数が多く (丸印)、放射線による潰瘍部辺縁の障害の程度も非投与コントロール群より軽度であった。図11 には照射後 30 日でのH.E.染色像を示す。HS投与群と非投与群にはっきりとした差はなかった。次に、照射後 13 日でのM.T.染色像を図12 に示す。HS投与群では粘膜下組織と筋層との境界 (基底膜部分) が厚く観察され (矢印)、コラーゲンの集積形成が確認できた。

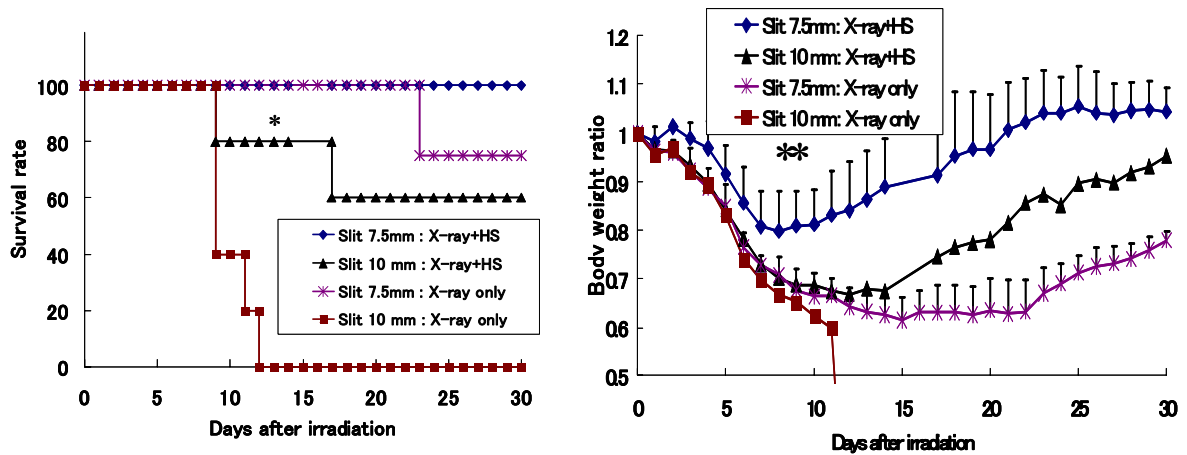


図 9. 腹部スリット照射後のマウス生存率（左図）と体重変化（右図）を示す。

* : $P < 0.05$ 左図はスリット 10mm 照射のみの対象群に対して
 ** : $P < 0.01$ 右図はスリット 7.5mm 照射のみの対象群に対して
 1 群あたりのマウス数は 4~5 匹である。

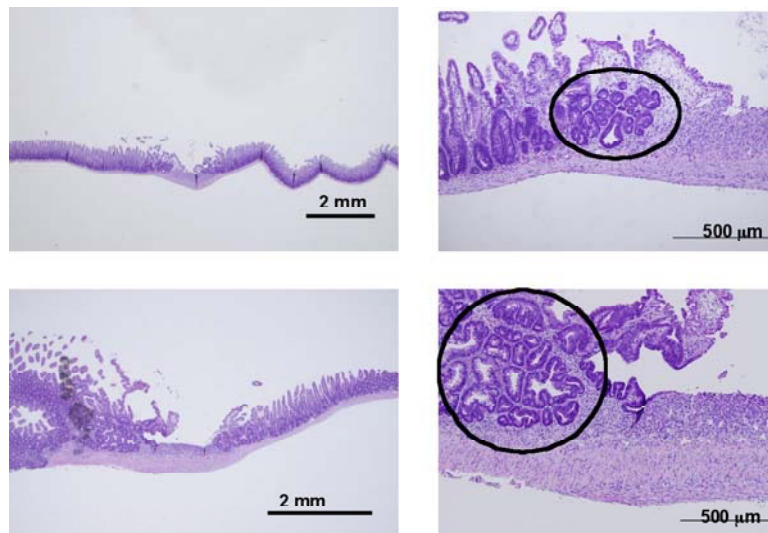


図 10. スリット (7.5mm) 照射後 13 日経過マウス小腸の H. E. 染色像

上図 : X-ray only、低拡大 (左) と中拡大 (右)

下図 : X-ray + HS、低拡大 (左) と中拡大 (右)

丸印 : 再生腺窩

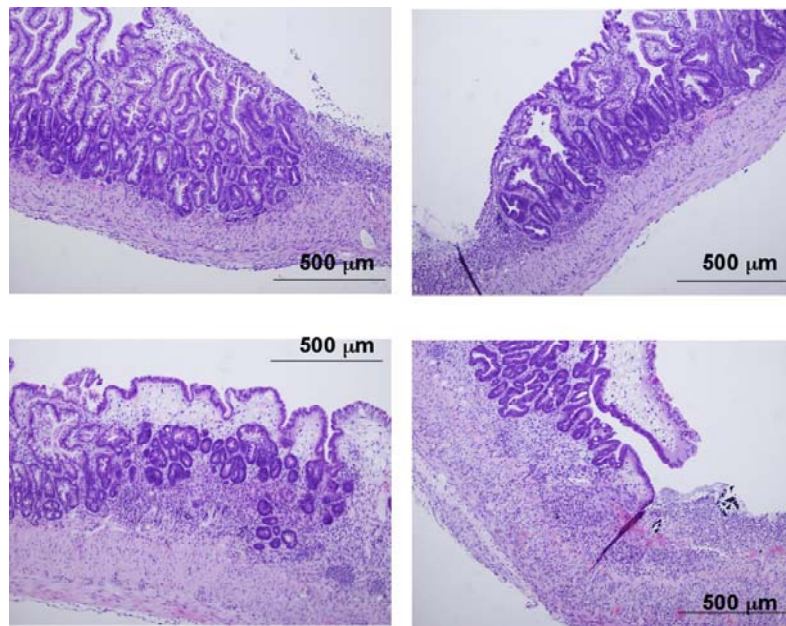


図 11. スリット (7.5mm) 照射後 30 日経過マウス小腸の H.E. 染色像を示す。

上図 : X-ray only、左図、右図ともに中拡大
 下図 : X-ray + HS、左図、右図ともに中拡大

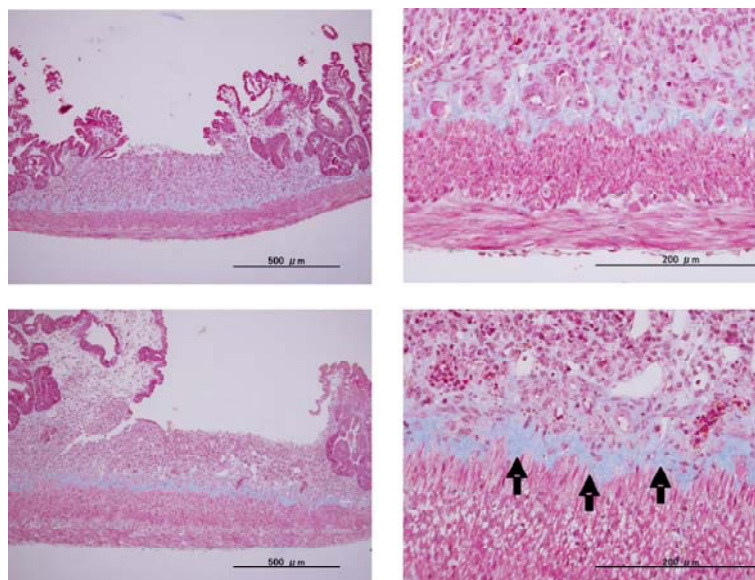


図 12. スリット (7.5mm) 照射後 13 日経過マウス小腸の M.T. 染色像を示す。

上図 : X-ray only、中拡大 (左) と高拡大 (右)
 下図 : X-ray + HS、中拡大 (左) と高拡大 (右)
 矢印 : 粘膜下組織と筋層との境界 (基底膜部分)

3) 防護剤の検討：bFGF ± ヘパラン硫酸 HS

次に bFGF の作用を検討した。基剤としてヘパラン硫酸(HS)を用いた。図 13 に示すように、体重減少抑制効果は HS 単独群で顕著に観察された。bFGF の効果は照射単独よりも優れていたが、HS 単独群よりも劣った。このため HS だけに焦点を絞り、30 Gy 照射後の体重変化と生存を 30 日まで追跡したのが図 14 である。この結果で明らかなように HS 投与群は単独群に比して明らかに回復傾向を示し、生存の延長に寄与していることが明らかになった。

HS 投与群と非投与群の組織学的比較を図 15 に示す。明確な差は見いだせないが、HS 投与群の方が、強い炎症を伴い生体反応が強いようである。

これらのことから、HS の効果は腸組織の崩壊により内腔への体液濾出を抑制する効果があるのではないかと考える。

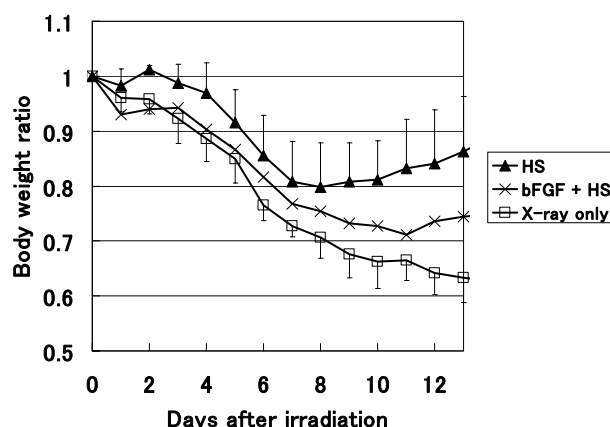


図 13. 30 Gy、10mm スリットを用いた場合 bFGF と HS の体重変化に与える影響

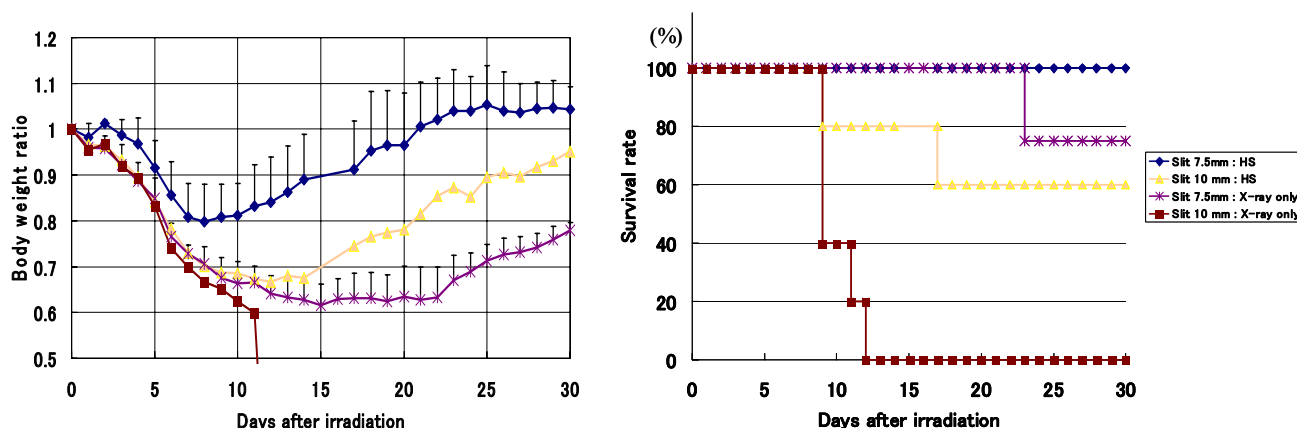


図 14. 7.5 と 10 mm スリットにおける 30 Gy 照射による HS 投与、非投与群における照射 30 日までの体重変化 (左) と生存率 (右)

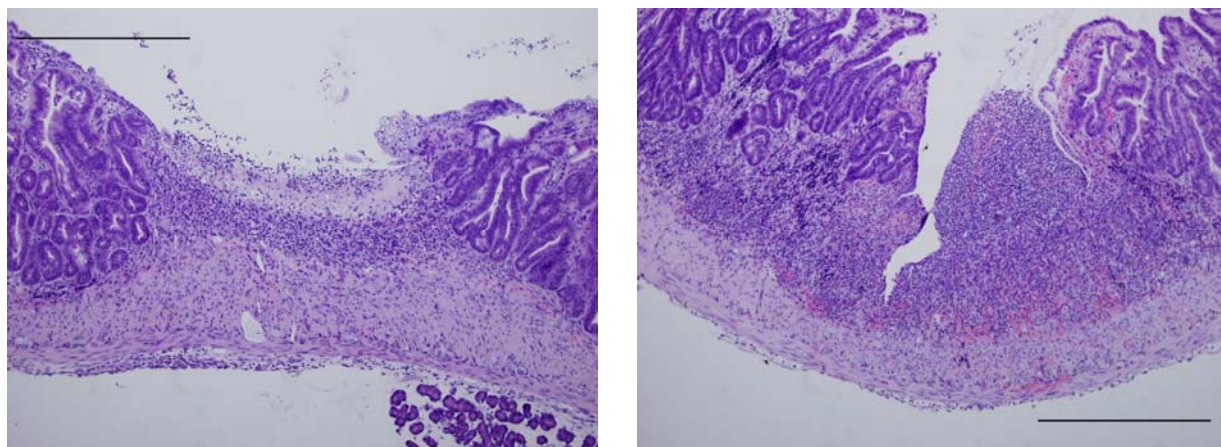


図 15. 7.5mm スリット、30 Gy 照射における対照（左）と HS 投与（右）の HE 染色

4) ES 細胞または MS 細胞投与に関する研究

局所腸に 30 Gy 照射することにより、腸上皮の脱落が明らかに観察される（図 16 左）。この状態が腸全体に及べば腸死を引き起こす。したがって、局所照射された腸に ES 細胞または MS 細胞を局所的に注射することにより着床、再生が可能になると考える。図 16 右に示すのは照射範囲に隣接した部位で、照射 13 日目では残存腸組織からの照射部位への再生が観察されている。30 Gy 照射後、直ちに ES 細胞を移植し、13 日目に観察した所、明らかな腸管コロニーの形成を確認した。コロニーは白色に盛り上がっており、肉眼で明らかに観察された。肉眼所見を図 17 に示す。

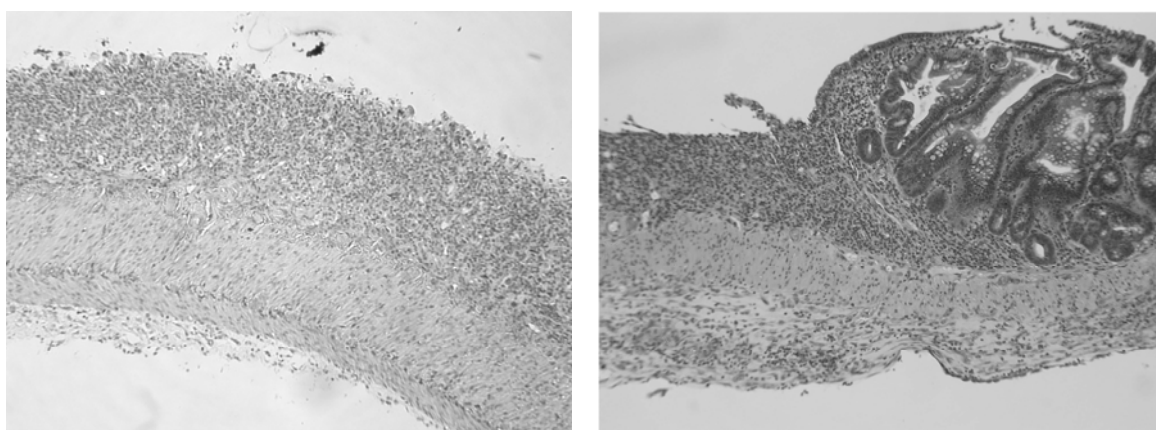


図 16. 30 Gy を照射 13 日目の小腸顕微鏡像。上皮が完全に脱落している（左）。放射線により荒廃した腸上皮が隣接健常組織から再生しているところ（右）。右方の腺構造を有する細胞群が再生腺窩を示す。

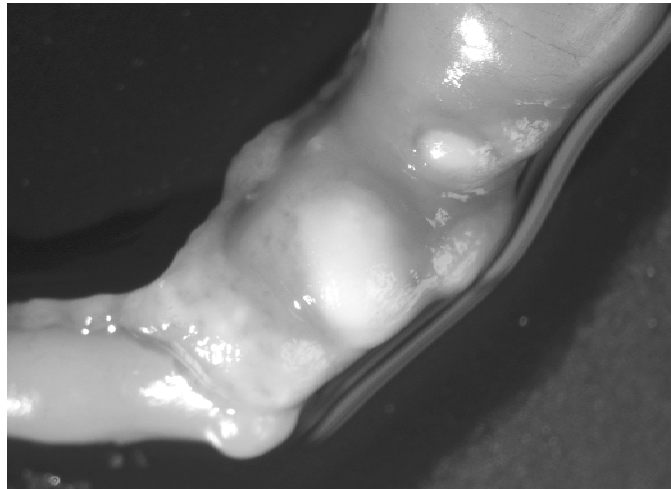


図 17. 腸管の摘出標本。白い盛り上がったコロニーを観察する。

5) コロニーが ES 細胞由来であるという証明

ES 細胞が雄由来であるので雌の宿主マウスに移植し、雌雄を判別すれば ES 細胞由来であるのか宿主由来であるのか証明できる。Y 染色体の遺伝子の一部をプライマー(148bp)としてコロニーの PCR を行って判別を行った。この結果、コロニーは 148 bp に陽性を認め、雄由来つまり ES 細胞由来であることが証明された。(図 18)

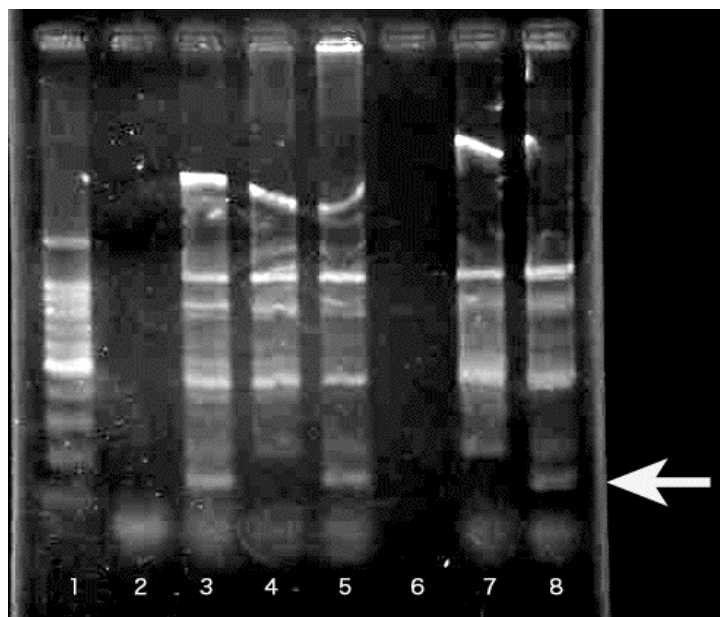


図 18. 腸コロニーが ES 細胞由来であることを DNA 解析での検討。プローブは Y 染

色体由来のプライマーで 148 bp (矢印) である。1 はマーカー、2 は陰性対照、3 は ES 細胞、4 は動物 1 の非移植部、5 は動物 1 のコロニー、6 は空、7 は動物 2 の非移植部、8 は動物 2 のコロニーから得られたカラムであり、3, 5, 8 に雄由来のプライマーが存在していることが確認される。

6) コロニーの組織学的検討

コロニーには多数の細胞が観察され、照射部位と明瞭に区別された。(図 19) また未分化な細胞に出現するとされる CD15 抗体を染色した所、陽性所見が得られ (図 20)、コロニー内には未分化な細胞が含まれていることが分かった。さらにコロニー形成部位の形態に腺管構造を確認することができた (図 21)。組織学的にコロニーでは増殖分化が活発に行われていることが示唆された。しかし、投与 27 日目に死亡したマウスを解剖して得られた標本は図 22 に示すように、多分化傾向を示し、奇形癌への進展が示唆された。



図 19. 腸コロニー (ヘマトキシリンエオジン染色) のルーペ像。

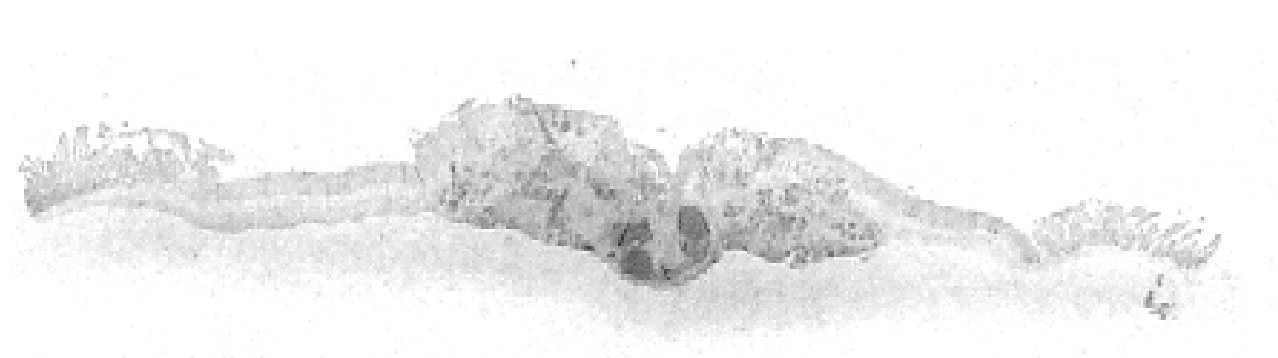


図 20. 腸コロニー (CD15 染色) のルーペ像。コロニーが部分的に染色されている。

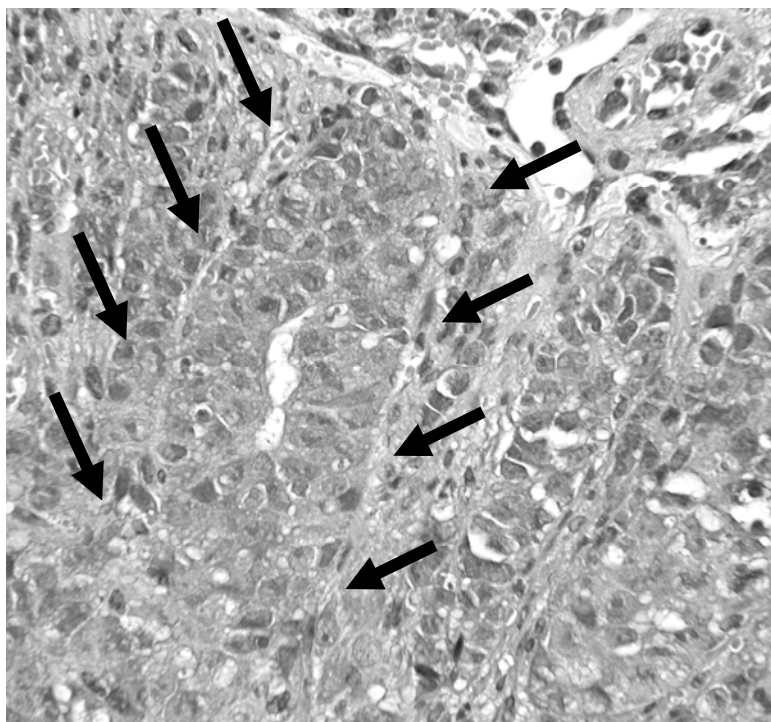


図 21. コロニー内に観察される腺管構造。腺管構造を有する腺窩類似の構造を示す。

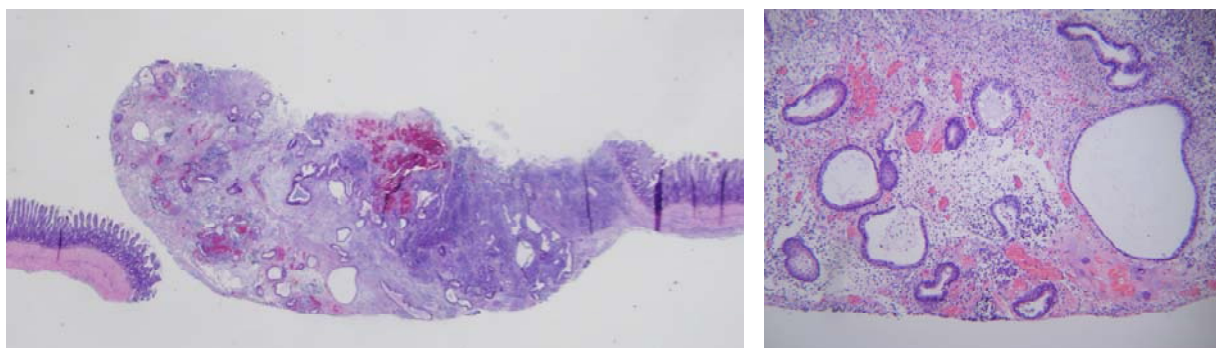


図 22. ES 細胞投与 27 日目の組織標本。多分化能を示し、奇形癌への進展が示唆される。

7) ES 細胞生着にあたる bFGF の効果

実験には Female ICR nu/nu mice を使用し、前述の手技に従い ES 細胞を投与した。照射後 5 ～ 9 日目に、1 日 1 回 bFGF 4 μ g/g(B.W.) またはヘパラン硫酸 1 μ g/g(B.W.) を腹腔内投与 (I.P.) した。照射後 13 日経過したマウスを頸椎脱臼に屠殺し、腸管を摘出し組織学的検討および下記のような免疫組織化学を行った (表 1)。なおヘパラン硫酸を同時投与するのは bFGF の効果を安定させる目的である。

実験群は次のように行った。グループ 1 (G1) : 30 Gy 照射後 ES 細胞注入 (移植)

した。グループ 2 (G2) : 30 Gy 照射後 ES 細胞注入 (移植)、5 ~ 9 日目の期間中毎日 1 回、ヘパラン硫酸 (1 μ g/g (B. W.)) を I. P. により投与した。グループ 3 (G3) : 30 Gy 照射後 ES 細胞注入 (移植)、5 ~ 9 日目の期間中毎日 1 回、bFGF (4 μ g/g (B. W.)) とヘパラン硫酸 (1 μ g/g (B. W.)) を I. P. により投与した。

bFGF を投与した群 (G3) では、ヘパラン硫酸のみを投与した群に比して、H. E. 染色で増殖性の細胞が多い印象はあるが、定量的評価には至らず。各種免疫染色の結果 (表 1)、ES 細胞コロニーでは SSEA1 陽性となり、bFGF ならびに α SMA が陽性であった。ヘパラン硫酸のみでは、ケラチン AE1/AE3 は陰性であったが、bFGF 投与により陽性化した。ES 細胞コロニーでは未分化な状態から分化している細胞まで多様性は見られたが、bFGF 投与により、さらに上皮系への分化が示唆されたが、明瞭な差違ではない。

処置	実験番号	SSEA1	AE1/AE3	bFGF	α SMA
無処置	N-intestine	—	+	+	+
30Gy 照射、ES 投与、1 3 日目 (ヘパラン硫酸 1 μ /g/day、5~9 日)	N94	+	—	+	+
	N95	+	—	+	+
30Gy 照射、ES 投与、1 3 日目 (ヘパラン硫酸 1 μ /g/day + bFGF 4 μ /g/day、5~9 日)	N104	+	+	+	+
	N105	+	+	+	+
	N106	+	+	+	+

表 1. 放射線照射部位の各種免疫染色結果

注) SSEA1 (Stage specific embryonic antigen) : SSEA1 は CD15 と同じで ES 細胞のマーカー;bFGF (Basic fibroblast growth factor antigen) : 間葉系、上皮および神経外胚葉起源の細胞増殖を刺激する; α - SMA (Alpha-smooth muscle actin antigen) : 平滑筋を染色;Cytokeratin AE1/AE3 (Cytokeratin AE1/AE3 antigen) : 上皮細胞に特異的な蛋白

体重の変動に関しては、図 23 に示すように bFGF 投与群 (G3) では bFGF 投与後から減少し始め、この減少は投与期間中続いた。投与終了後は体重が増加傾向を示した。一方、比較対照群であるへパラン硫酸のみ投与した群 (G2) では体重変化は認められなかった。体重減少にも関わらず衰弱傾向はなかった。この原因は不詳である。スリット照射で見られたのと同様の現象であり、へパラン硫酸の作用機序については詳細に検討する必要がある。

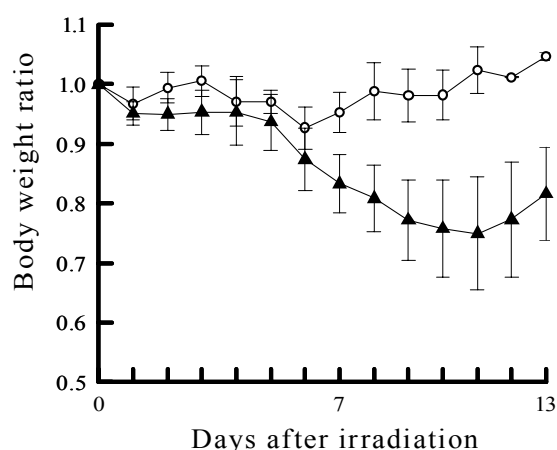


図 23. bFGF 投与による体重変化 ○へパラン硫酸のみ (G2)、▲bFGF 投与 (G3)

8) MS 細胞の投与実験

移植に使用した MS 細胞を図 24 に示した。この細胞は付着細胞でかつ粘性が高く紡錘形を呈していた。

移植後、13 日までの生存率と体重変化を図 25 に示す。MS 細胞移植群の生存率は非移植群より高く ($P < 0.05$)、かつ体重は移植後 8 日以降、非移植群より高値 ($P < 0.01$) を示した。比較のため、我々の実験で得られた胚性幹細胞 (ES 細胞) 移植の結果も併せて示した。ES 細胞移植時の移植群と非移植群の生存率および体重は差がみられなかった。

図 26 に摘出したマウス小腸の実体顕微鏡写真を示す。矢印部分が放射線による絨毛の脱落を示すが、MS 細胞移植マウスの方が X 線照射のみのマウスより潰瘍の範囲は狭く、回復傾向にあるように観察された。

H. E. 染色による組織像を図 27 に示す。X 線照射のみのマウス小腸は放射線による絨毛の脱落および広範囲な潰瘍が確認できる。一方、MS 細胞移植のマウス小腸は潰瘍を認めるが、粘膜下組織および筋層部位が厚く間質に覆われている。また、不規

則ではあるが絨毛側には陰窩も存在する。この陰窩細胞が MS 細胞由来であるか IV. 5) と同じ方法で確認したが、MS 細胞由来ではなかった。MS 細胞由来でなければ、自己の細胞による再生細胞の可能性が高い。

照射、移植後 27 日後のマウス小腸組織像を図 28 に示す。図 27 同様に粘膜下組織および筋層部が厚く支持されていた。確認のため右側には基底膜や結合組織が青く染色される M.T. 染色像を示した。やはり、厚く支持されている部分は間質に覆われていた。

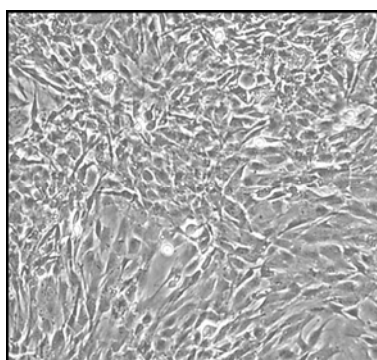
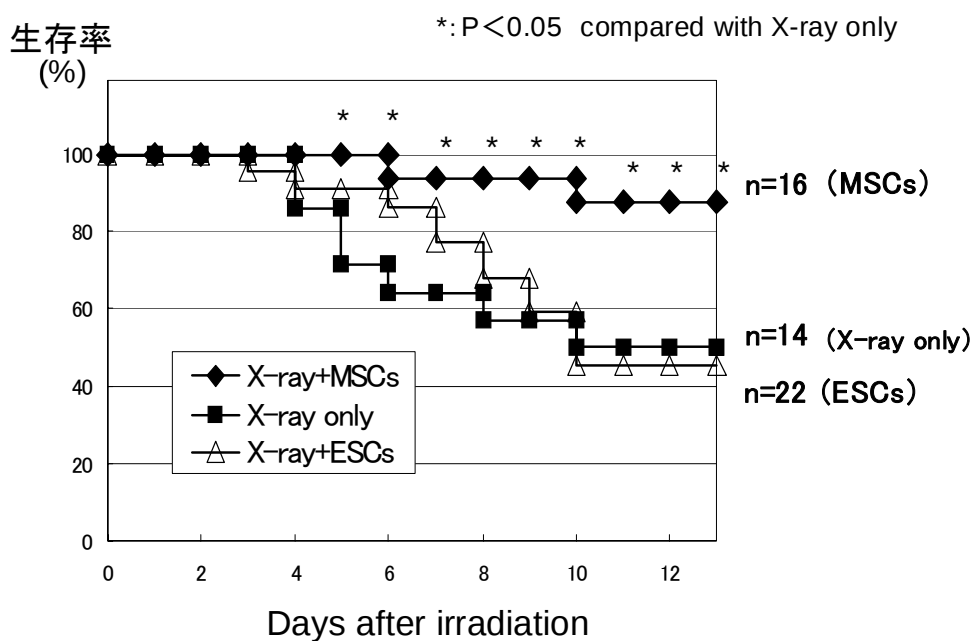


図 24. 実験に使用した MS 細胞の顕微鏡写真 (×40) を示す。培養方法を末尾に示した。



体重の変化率

*: $P < 0.05$
 **: $P < 0.01$ compared with X-ray only

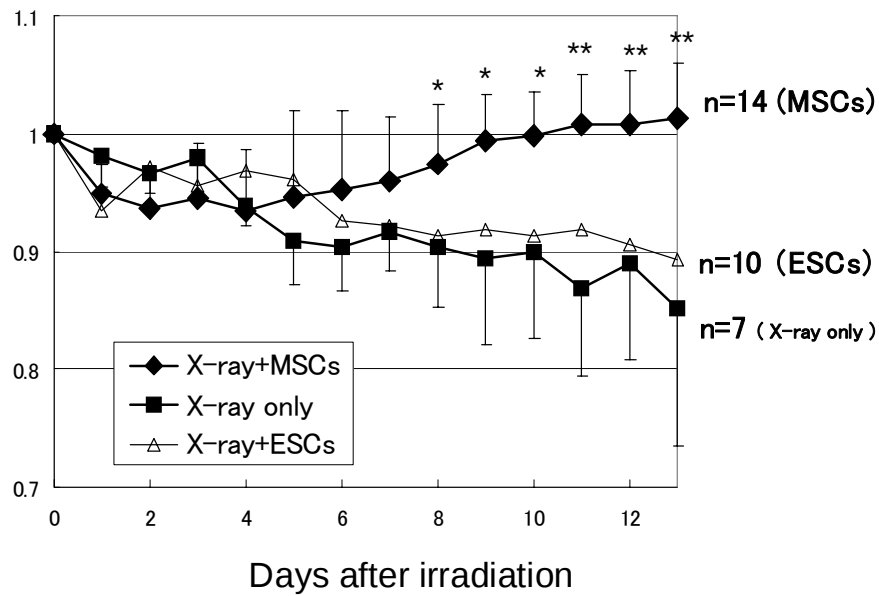


図 25. 腸管照射後のマウス生存率（前頁下図）と体重変化（上図）。MS 細胞移植群の生存率と体重は非移植群より有意に高いことがわかる。

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$ 照射のみの対象群に対して

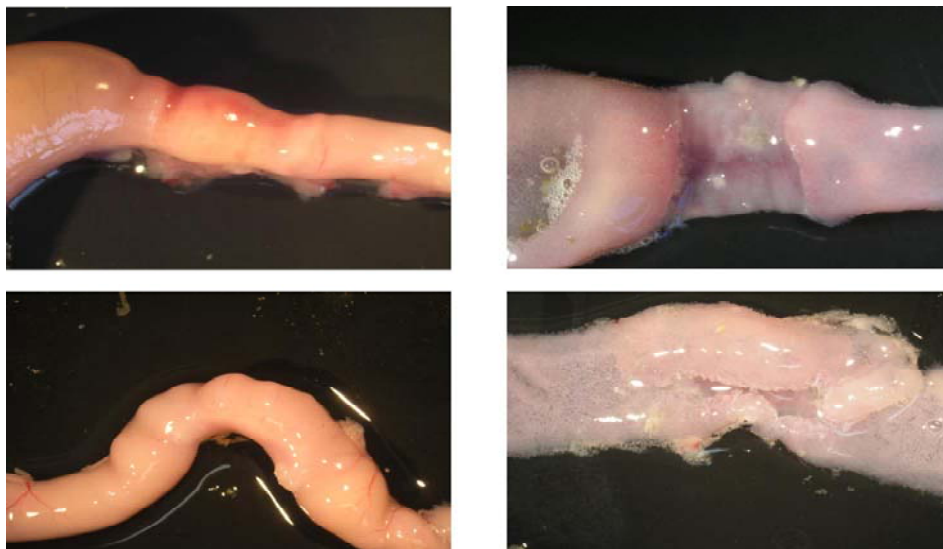


図 26. X 線照射後 13 日経過のマウス小腸実体顕微鏡写真。MS 細胞移植による障害の回復が示唆される。

上図 : X-ray only、摘出時の腸管（左）と小腸内側（右）

下図 : X-ray + MS 細胞、摘出時の腸管（左）と小腸内側（右）

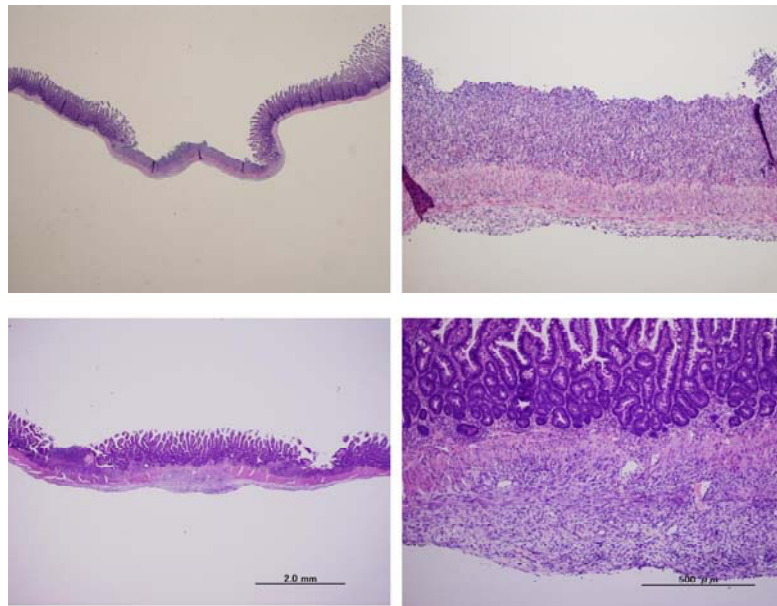


図 27. X 線照射後 13 日経過のマウス小腸の組織標本 (H.E. 染色)。MS 細胞移植による再生が期待される。

上図：X 線単独照射、弱拡大（左）と中拡大（右）

下図：X 線+MS 細胞、弱拡大（左）と中拡大（右）

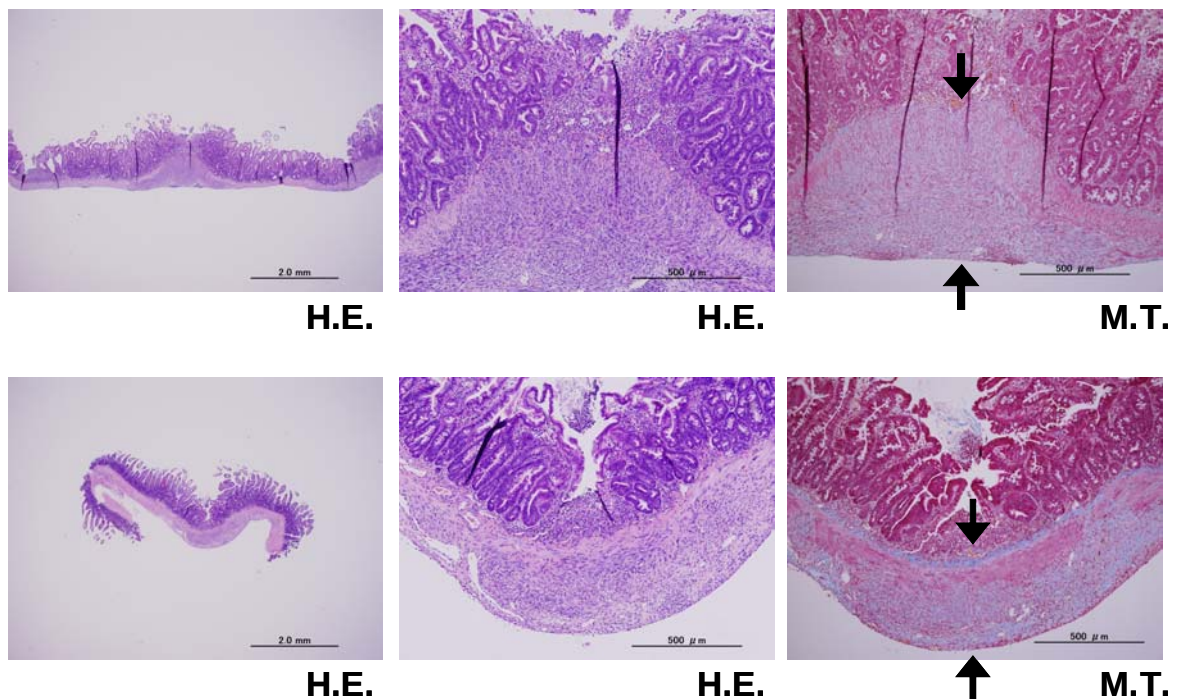


図 28. X 線照射 27 日後の MS 細胞移植マウス小腸の組織像（上段と下段の二例）。腸管上皮の支持組織の強靱化が示唆される。

H.E. 染色：弱拡大（左）と中拡大（中），M.T. 染色：中拡大（右）

肥厚部分を矢印で示す。

9) MS 細胞が組織内に生着したという証明

ES 細胞を移植したときの様なコロニーは観察されず、また、図 26 の潰瘍に隣接する絨毛部位の Y 染色体を ES 細胞生着の確認と同様の方法でおこなったが、結果は陰性であった。

そこで、MS 細胞の組織内での存在を明らかにするため、あらかじめ MS 細胞へ プラスミド EGFP を導入し移植した。組織内の蛍光を観察することにより MS 細胞の存在を確認した (図 29)。左が移植に使用した MS 細胞、真ん中が照射及び移植後 13 日での写真で、右が照射のみのものです。上段と下段が対になっており、下段が蛍光顕微鏡写真である。MS 細胞を移植した腸管組織 (図 29, B) で、厚くなっている矢印部分に相当する部位に蛍光を観察、MS 細胞の存在が証明された。

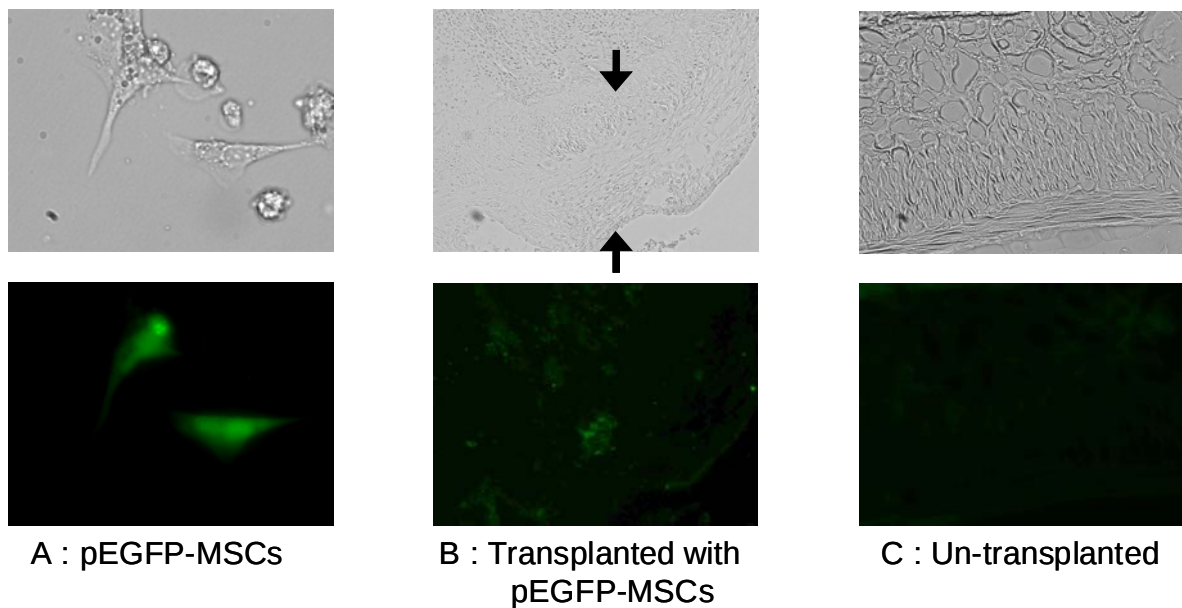


図 29. pEGFP 導入による蛍光顕微鏡写真。支持組織内に蛍光が観察された。

A : pEGFP (enhanced green fluorescent protein) を導入した MS 細胞

B : pEGFP を導入した MS 細胞を移植した小腸組織像 (照射後 13 日)

C : 非移植の照射後 13 日での小腸組織

肥厚部分を矢印で示し、下段が蛍光顕微鏡写真である。

参考. MS 細胞の培養法

マウス骨髄中にわずかながら含まれる、MS 細胞を培養、増殖することは比較的難しく、造血系の細胞をうまく取り除く工夫が必要であり、Alexandra Peister (Blood, 103; 1662-1668, 2004) らが示した方法を参考に培養した。

以下に培養条件について示す。

1. C57Bl/6 6-10 週齢マウスの大腿骨と脛骨を採取し、CIM (RPMI-1640) 培地に入れる。

2. 骨髄細胞を遠心分離し、沈殿した pellet を CIM 培地でピペッティング、ナイロン mesh (70 μ m) を通す。

3. flask に入れ 24 hr 培養する。

4. 浮遊細胞を PBS で洗い、捨てる。付着細胞に CIM 培地を入れる。

ここから、4 週間 3-4 日ごとに浮遊細胞を PBS で洗い、捨て、付着細胞に CIM 培地を入れる。

5. 4 週間後、浮遊細胞を PBS で洗い、捨てたあと付着細胞に EDTA トリプシンにより、はがれた細胞を別の flask に入れ、CIM 培地を加える。

6. さらに 2 週間培養する (3-4 日ごとに培地交換)。

7. 2 週間後、浮遊細胞を PBS で洗い、付着細胞に EDTA トリプシンを入れ、はがれた細胞は 50 cells/cm² になるように、今度は CEM (IMDM) 培地で plate に入れる。

ここから増殖してくる細胞を MS 細胞として使用する。

8. 1-2 weeks 培養する (3-4 日ごとに培地交換)。

9. 浮遊細胞を PBS で洗い、付着細胞に EDTA トリプシンを入れ、はがれた細胞は 50 cells/cm² になるように、CEM 培地で plate に入れる。

10. 8. 9. を繰り返し、増殖する細胞を使用した。

V. これまでの成果のまとめと今後の展望

放射線腸管障害については、ある程度の障害においては可逆的な反応であるが、7 - 10 Gy といった線量を超えると不可逆的な変化となり、致死的な結果になることが知られている。従来から解明されてきている腺窩-絨毛の系統のみならず、絨毛と腺窩を支持する粘膜固有層、弾性組織を含む粘膜下組織等の間質の役割も重要になっている。

最近、クリーブランドの研究グループが明らかにした Toll-like Receptor 5 の作動薬は NFkB の作用を活性化することにより腸管障害を軽減することを明らかにした。NFkB の活性化は、種々の作用を引き起こすが、腺窩細胞および粘膜固有層内の血管内皮細胞のアポトーシスを抑制する機序による防護作用と考えられている。

このことはアポトーシスを抑制することによる腸幹細胞の防護と考えて良い。しかし、ある程度の幅の線量では防護作用をもたらすが、大線量（マウスでは 18 Gy 以上）では十分な効果はもたらさないようである。腸死に対するアポトーシスの寄与には限度があると考えられる。

我々はこれまでマウスコロニー法を基本に放射線腸管防護について研究をおこなってきた。

腸管の放射線防護は難しい課題であるが、エダラボンは被ばく直前の効果が期待されるが、限定的な役割と思われる。今回、ヘパラン硫酸に新たな防護剤としての役割が明らかになった。上皮とそれを裏打ちする間質との関係において、間質を補強する事により体液の漏出を制限している可能性が大である。体液の漏出を制限する事により致死的に至るまでの時間を確保する事で、その間に上皮の再生が促されるという効果も考えられ、今後の研究の進展に大きく期待するところである。

ES 細胞については生着が確認されたが、癌腫への分化もあるので、単独では使用できない結果となった。分化の研究は重要であるが、未知の課題も多く今後の展開が必要であると考ええる。

MS 細胞を用いた実験では、ようやくマウスから樹立した細胞株を使えるようになった。MS 細胞は多能性細胞として知られており、上皮系細胞への分化傾向も示され、腸の再生にも役立つ可能性がある。そこで限られた範囲ではあるが、我々の研究により得られた成果では、間質を増強しているものであり、その一環として生残率を上昇させているものと思われる。ヘパラン硫酸と相同的な役割が示唆されており、新しい治療法の可能性を示すもので画期的であり、さらなる追試が望まれる。今後、iPS 細胞の供給を得る事で、益々の研究成果が期待されているところである。

最後に、腸管の防護においては、種々様々な因子を考慮して回答を得る必要があり、我々はアポトーシスの抑制、粘膜下組織の強靱化、再生腺窩の促進、幹細胞移植による再生促進などの可能性について検討してきた。今後、修復過程における血管構築の状況などを含め、総合的に検討していく必要があると考えている。

VI. 参考文献

- 1) B. Hogan 他著、山内他訳「マウス胚の操作マニュアル」第2版、近代出版
- 2) 横田・岡野編「幹細胞研究の最前線と再生医療への応用」実験医学増刊、羊土社
- 3) 大拙博善著「ES細胞」文春新書
- 4) CS Potten and JH Hendry eds.: Radiation and Gut. Elsevier, Amsterdam, 1995
- 5) K. Takahashi et al.: Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell 131: 861-872, 2007
- 6) LG Burdelya et al.: An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. Science, 320: 226-230, 2008

VII. 学会発表

- 1) 工藤幸清、阿部由直、樽澤孝悦、篠崎信世、中根明夫：エダラボンによる放射線腸障害の防護. 日本放射線影響学会第46回大会（京都），2003. 10. 6－10. 8
- 2) 工藤幸清、阿部由直、樽澤孝悦、篠崎信世、中根明夫：腸幹細胞におけるエダラボンの放射線防護効果. 平成15年度京都大学原子炉実験所専門研究会（大阪），2003. 11. 7－11. 8
- 3) 工藤幸清、阿部由直、樽澤孝悦、篠崎信世、胡 東良、中根明夫：エダラボンのマウス腸管における放射線防護効果. 日本放射線影響学会第47回大会（長崎），2004. 11. 25-11. 27
- 4) 篠崎信世、阿部由直、劉 勇、工藤幸清、祐川幸一：直腸部X線照射によるマウス直腸障害モデルについて. 日本放射線影響学会第47回大会（長崎）

2004. 11. 25-11. 27

- 5) 工藤 幸清, 阿部 由直, 胡 東良, 鬼島 宏, 中根 明夫: 放射線腸管障害に対する移植胚性幹細胞の生着と分化. 日本放射線影響学会第49回大会 (札幌), 2006. 9. 6-9. 8
- 6) 工藤幸清、阿部由直、劉 勇、樽澤孝悦、胡 東良、鬼島 宏、中根明夫: 腹部X線スリット照射によるマウス腸管障害に対するヘパラン硫酸の影響. 日本医学放射線学会生物部会第46回大会 (つくば), 2007. 7. 20-7. 21
- 7) 工藤幸清、阿部由直、劉 勇、樽澤孝悦、胡 東良、鬼島 宏、中根明夫: マウス放射線腸管障害に対するヘパラン硫酸の影響. 日本放射線影響学会第50回大会 (千葉), 2007. 11. 14-11. 17
- 8) 阿部由直、工藤幸清: 放射線腸管障害回復のための実験的検討. 第38回放射線による制癌シンポジウム (高知), 2008. 6. 20-6. 21
- 9) 工藤幸清、阿部由直、劉 勇、高橋賢次、樽澤孝悦、胡 東良、柏倉 幾郎、鬼島 宏、中根明夫: 間葉系幹細胞移植による放射線腸管障害の回復を試みる実験的研究. 日本医学放射線学会生物部会第47回大会 (高知), 2008. 7. 20-7. 21
- 10) 劉 勇、阿部由直、工藤幸清、胡 東良、中根明夫、鬼島 宏、小野公二: 慢性期放射線直腸障害における低酸素の影響. 日本医学放射線学会生物部会第47回大会 (高知), 2008. 7. 20-7. 21
- 11) 工藤幸清、阿部由直、劉 勇、高橋賢次、樽澤孝悦、胡 東良、柏倉 幾郎、鬼島 宏、中根明夫: マウス放射線腸管障害に対する間葉系幹細胞の移植効果. 日本放射線影響学会第51回大会 (北九州), 2008. 11. 19-11. 21
- 12) 工藤幸清、劉 勇、高橋賢次、樽澤孝悦、胡 東良、柏倉 幾郎、鬼島 宏、中根明夫: マウス放射線腸管障害に対する間葉系幹細胞移植効果. 第2回弘前大学大学院保健学研究科研究発表会 (弘前), 2009. 2. 26

VIII. 論文

- 1) 工藤幸清, 阿部由直, 樽澤孝悦, 篠崎信世, 胡 東良, 中根明夫: マウス X 線全身照射による放射線腸障害に対する EGF, メラトニン, エダラボンの影響 弘前大学医学部保健学科紀要 第4巻 109-113, 2005
- 2) 篠崎信世, 阿部由直, 劉 勇, 工藤幸清, 祐川幸一: 直腸部X線照射によるマウス直腸障害モデル作成 弘前大学医学部保健学科紀要 第4巻115-122, 2005
- 3) K. Kudo, K. Tarusawa, Y. Abe, Y. Liu, D-L. Hu, A. Nakane, H. Kijima: Effect of heparan sulfate on radiation-induced intestinal injury in the mouse model irradiated on abdomen. Bulletin of Health Sciences Hirosaki, 6:93-99, 2007
- 4) K. Kudo, Y. Abe, D-L. Hu, H. Kijima and A. Nakane: Colonization and differentiation of transplanted embryonic stem cells in the irradiated intestine of mice. Tohoku J Exp Med, 212(2); 143-150, 2007
- 5) Y. Liu, T. Nakahara, J. Miyakoshi, D-L. Hu, A. Nakane, Y. Abe: Nuclear accumulation and activation of Nuclear Factor κ B after split-dose Irradiation in LS174T cells. J Radiat Res, 48:13-20, 2007
- 6) Y. Liu, K. Kudo, Y. Abe, M. Aoki, D-L. Hu, H. Kijima, A. Nakane: Hypoxia expression in radiation-induced late rectal injury. J Radiat Res, 49:261-268, 2008