



Title	骨髓幹細胞の放射線感受性（第2報）：内因性脾コロニー形式について
Author(s)	田中，敬正；黒田，康正；高橋，正治
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1968, 27(11), p. 1418-1424
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/16220
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

特別掲載

骨髓幹細胞の放射線感受性 (第2報)

— 内因性脾コロニー形式について —

天理病院放射線科

田中敬正 黒田康正 高橋正治

(昭和42年12月4日受付)

Radiosensitivity of Bone Marrow Stem Cells (2nd Report)
(Endogenous Spleen Colony Method)

Yoshimasa Tanaka, Yasumasa Kuroda and Masaji Takahashi

Department of Radiology, Tenri Hospital, Nara, Japan

In this experiment, the endogenous colony method was employed. This method is based on the finding that mice irradiated with whole body radiation doses in the range from 500 to 800 rads develop microscopically visible colonies of cells in the spleen within about 10 days after irradiation.

The histological examination of these colonies and dose survival curve in relation to ^{59}Fe uptake by spleen were studied. We also examined the R.B.E. (Relative Biological Effectiveness) of 18 Mev electron beam versus 200 KVp X-rays, the problem of early or late repair and the protective effect of AET by this endogenous colony technique. The results were as follows:

1) The number of colonies and ^{59}Fe uptake by spleen were decreased exponentially from 550 to 750 R and the radiosensitivity of endogenous colony forming cells was similar to that of transplanted colony forming cells.

2) The R.B.E. of 18 Mev electron beam versus 200 KVp X-ray were 0.77 on the number of spleen colonies and 0.89 on $^{125}\text{IUdR}$ uptake by spleen.

3) The initial maximum of recovery in the early repair process took place at about 5 hours after the first dose fraction, followed by an intermediate minimum at about 10 hours.

4) In the late repair observed when the time interval between the dose fractions was over 24 hours, larger total doses were required to produce the same level of surviving endogenous colony forming cells as the time interval between the dose fractions increased.

5) The protective effect was found on the dose range from 500 to 750 R when AET (150 mg/kg) was intraperitoneally injected.

1. 緒言

第1報¹⁾に於て、800～900Rの致死量照射を行つたマウスに isologous の骨髓細胞を移植すると幹細胞により、脾に可視的のコロニーを生じコロニー数と照射線量との間に一定の関係があることがわかつた。即ちここで述べている幹細胞 (St-

em Cell) は Till, McCulloch が行つた方法で脾にコロニーを生ずる細胞を指しているわけである。

この場合致死線量に至る迄の線量例えば d-d 系マウスでは 500～900Rを全身照射すると、全身の骨髓等にある Colony forming cell により内因

的に脾にコロニーを生ずることが Till, McCulloch²⁾により証明された。之を内因性脾コロニー形成 (Endogenous Spleen Colony Formation) と呼んでいる。この方法は第1報の移植による方法と比べて、実験的に極めて簡便であり、Smith³⁾等も述べている如く、哺乳動物の線量効果関係を調べる上に於て有効な方法であると考えられる。

今回は、之等の内因性脾コロニー形成法により線量効果関係、及び脾への鉄摂取率との関係を調べると同時に Colony forming cell の回復の問題を追求した。更に Colony forming cell の放射線感受性を指標にして電子線の R.B.E. を又 AET の化学防禦剤としての効果を検討した。

2. 研究方法

1) 使用動物としては、d-d 系マウス (生後10—13週) 体重28~35 g であった。

実験方法は 500~750R 全身照射を行い、9日後に ^{59}Fe citrate 又は $^{125}\text{IUdR}$ (5-Iododeoxyuridine- ^{125}I) $0.2\mu\text{C}$ を腹腔内に注入し、注入後24時間で脾を摘出し、その重量及び ^{59}Fe 又は $^{125}\text{IUdR}$ 摂取率を調べた。 ^{59}Fe 、 $^{125}\text{IUdR}$ 摂取率は前報と同じく (脾全体の放射能/腹腔内注入放射能) $\times 100 (\%)$ で求めた。脾はブアン固定を行い、コロニー数を数え、又同時に組織学的検索を加えた。

2) 200 kVp X線に対する 18 MeV ベータートロン電子線の R.B.E.

照射条件としては 200 kVp X線、0.5 mmCu のフィルターを使用し、20mA、半価層は 0.5 mmCu を用いた。線量率は 40 R/min、焦点動物間距離は 60 cm であった。電子線照射には Siemens ベータートロンを用い、エネルギー 18 MeV、線量率約 300 R、線量測定には Siemens Dosemeter を用いた。

3) 2分割照射による回復の研究

a) 早期回復 (Early repair) の場合

初めに 400R 全身照射を行い、その後24時間迄種々の間隔で第2回目 320R 照射を行った。

第2回目照射後10日に、脾コロニー数、及び ^{59}Fe 摂取率を調べ第1回目照射の回復を調べた。

b) 後期回復 (Late repair) の場合

2分割照射の間隔を 2, 6, 15日間とする他は早期回復の場合と同様に行つた。

4) AET (S, 2-aminoethylisothiourea dihydrobromide) の防禦効果の検討

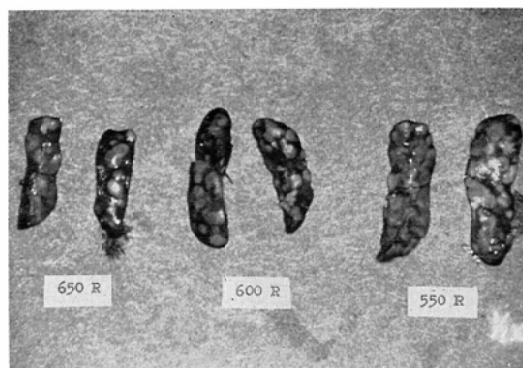
AET を照射前に 150mg/kg を腹腔内に注入し 500~750R の範囲で脾への ^{59}Fe 摂取率で調べた。

3. 実験結果

1) d-d 系マウスに 500~750R 全身照射を行い、7—10日後脾に粟粒大のコロニーを生じる。

之は第1報に於て述べた骨髓細胞移植の時に生じたものとよく似ており、Fig. 1に 550, 600, 650R 全身照射した時に生じた内因性脾コロニーを示す。図で見る如く線量がますますつれて脾が小さく、コロニー数が減少してくることがわかる。

Fig. 1. Spleen colonies following whole body irradiation with 550, 600, 650R.



組織像でも第1報の場合と同じく、大部分は比較的分化した Erythroblasts からなっており、その他に Myelocyte, Metamyelocyte, Megakaryocyte も見られ、Granulopoiesis も Erythropoiesis も共によく発達している (Fig. 2, 3)。

2) 照射線量とコロニー数及び脾の鉄摂取率との関係

脾コロニー数は 550~750R の照射範囲で、線量増加につれてコロニー数は exponential に減少する (Fig. 4)。しかし 550R 以下ではコロニー数が 30 以上をこすために測定数が不確実になり又 750R 以上ではコロニー数が少なくて誤差が多い。

^{59}Fe 摂取率の方は、400~800R の比較的広

Fig. 2. Histology of spleen. Dark portions shows spleen colonies.

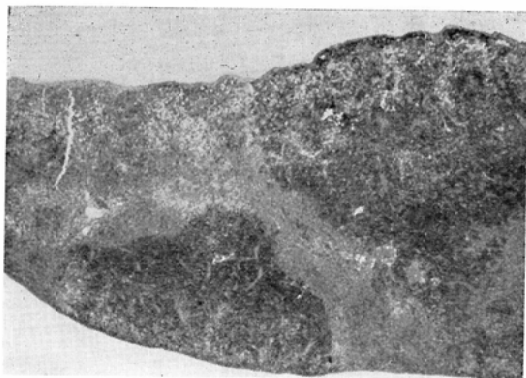


Fig. 3. Histology of colonies. Many Erythroblasts were seen.

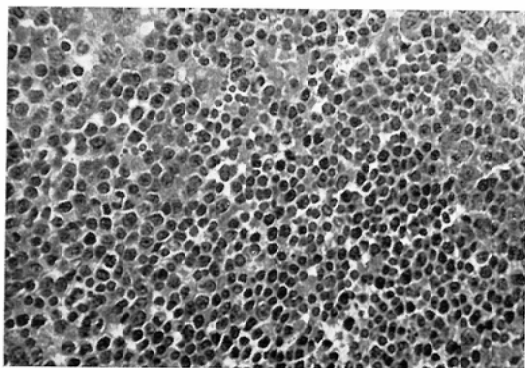
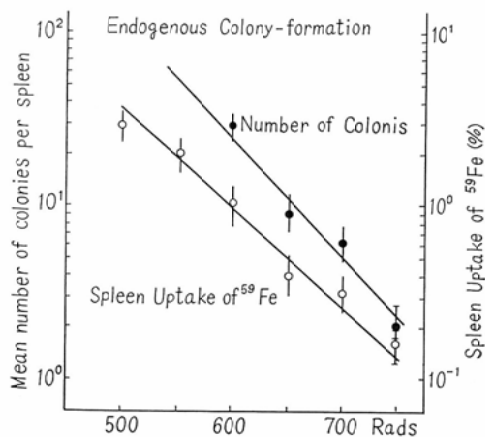


Fig. 4. Mean number of colonies per spleen and ^{59}Fe uptake by spleen as a function of exposure dose of X-rays.



い範囲に於てやはり exponential に減少することがわかった (Fig. 4)

3) 200 Kv X線に対する18 MeV ペータートロン電子線の R.B.E.

200Kv X線を base line radiation とした時の18 MeV 電子線の R.B.E. を夫々脾重, 脾コロニー数, 脾による $^{125}\text{IUdR}$ 摂取率で調べた.

a) 脾重の場合は, Fig. 5 で見る如く照射線量の増加につれて脾重の減少が見られるが, 減少のしかたが不規則であり之より R.B.E. を求めることは困難である.

Fig. 5. Spleen weight as a function of dose of 200kVp and 18MeV electron beam

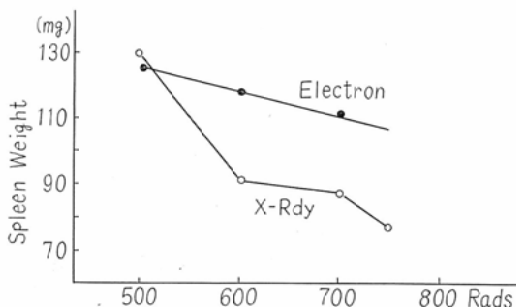
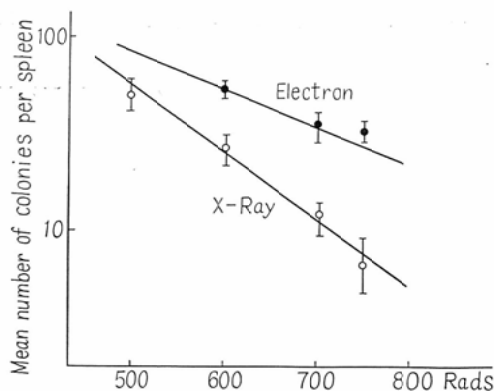


Fig. 6. Mean number of colonies per spleen as a function of dose of 200 kVp X-rays and 18 MeV electron beam.



b) 脾のコロニー数より見た場合には線量の増加につれてX線と電子線で減少の勾配が異なる (Fig. 6). 即ちX線の方が電子線よりも減少の程度が急速で平行にならないが, カーブの下面積の比較で R.B.E. を求め0.77の値を得た. (Table. 1). $^{125}\text{IUdR}$ 摂取率の場合も同様にして R.B.E. を求め0.89の値を得た (Fig. 7) Table(1).

Fig. 7. ^{125}I uptake by spleen as a function of dose of 200kVpX-rays and 18MeV electron beam.

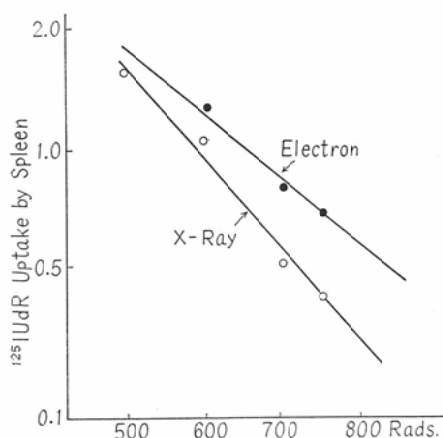


Table 1. The R.B.E. value of 18MeV electron beam versus 200 kVp Xrays using the indicators of spleen weight, number of colonies per spleen and ^{125}I uptake by spleen.

Rads		Spleen Weight (mg)	No. of colonies per Spleen	^{125}I UdR Uptake by Spleen (%)
500	X-Ray	130 $\pm$ 13	50.4 $\pm$ 4.2	1.66
	Electron	126 $\pm$ 18		
600	X-Ray	91 $\pm$ 5	27.0 $\pm$ 4.5	1.05
	Electron	118 $\pm$ 25	53.8 $\pm$ 4.0	1.43
700	X-Ray	87 $\pm$ 7	12.0 $\pm$ 2.2	0.50
	Electron	110 $\pm$ 12	36.0 $\pm$ 3.5	0.78
750	X-Ray	79 $\pm$ 8	7.1 $\pm$ 2.4	0.41
	Electron	107 $\pm$ 19	31.0 $\pm$ 1.2	0.68
Mean RBE			0.77	0.89

4) 2分割照射による回復.

a) 早期回復 (Early repair) の場合

一定線量を24時間以内の分割照射を行うと幹細胞の回復に於て著しく周期的な変動を示すことがわかった. (Fig. 8). 即ち4~6時間の間隔の時が最大の回復を示し之以上の時間になると減少し, 10時間後に最小になり次にゆるやかに増す. 之は ^{59}Fe 摂取率を指標にした時も同じ傾向が見られた (Fig. 9).

b) 後期回復 (Late repair) の場合 (Fig. 10,

11)

分割照射の間隔が24時間以上になると, その間

Fig. 8. Survival ratios for endogenous colony forming cells irradiated with fractionated X-ray doses. First dose, 400 R; second dose, 320R. It shows kinetics of early repair of radiation damage in colony forming cells.

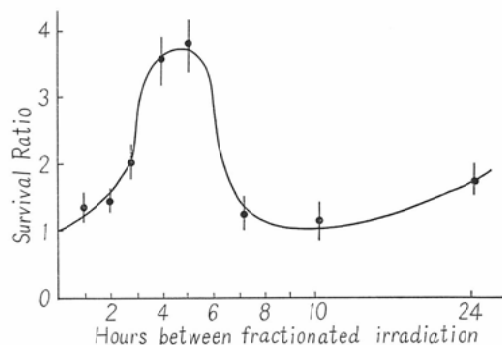
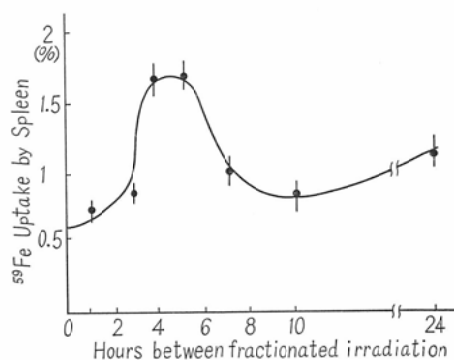


Fig. 9. ^{59}Fe uptake by spleen irradiated with fractionated X-ray dose. Experimental conditions are the same with Fig. 8



隔が大になればなる程, 同じ生存率を得るのに大きな総線量を要することがわかった.

しかし之等のカーブが平行であることより細胞の感受性には差がないと考えられる.

5) AETの防禦効果は Fig. 12に示す如く, 550~750Rの範囲に於て防禦効果を認めそのD.R.F (Dose Reduction Factor)は1.1であつた.

4. 考案

内因性脾コロニーは, 体の他の部分から来た細胞によることは Hermann 等⁴⁾⁵⁾の実験により明らかである. 即ち Fig. 13は一方の下肢を遮蔽して種々の線量率で900R照射した時の9日後の脾コロニー数を照射に要した時間に対して現わした

Fig. 10. Survival curves for endogenous colony forming cells irradiated with X-rays given as two-fractions separated by time intervals of 2 and 15 days. First dose, 400R; second dose, 320R.

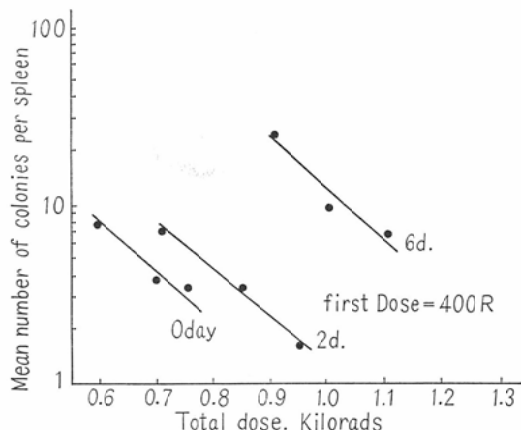
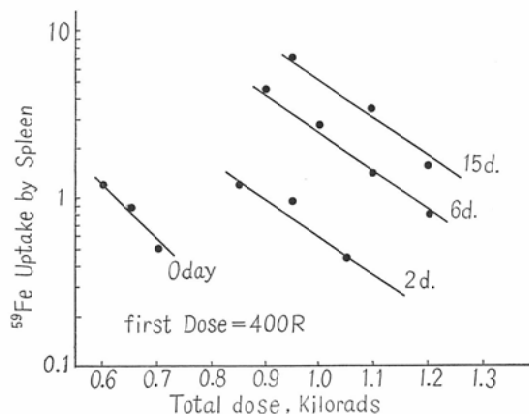


Fig. 11. ^{59}Fe uptake irradiated with fractionated doses by time intervals of 2, 6 and 15 days. Experimental conditions are the same with Fig. 10.



ものである。短い時間の照射では遮蔽された部分にあつて照射されない幹細胞が循環による移動のため照射時間が長くなると遮蔽から出て照射されその結果脾コロニー数も減少するということを意味する。

以上の実験により内因性脾コロニーの由来せる部分としては主に骨髓細胞が考えられるが小腸の部分の遮蔽しても腸にコロニーを生ずることより腸内リンパ節、パイエル板のリンパ節も内因性脾コロニー形成にあづかると考えられる⁶⁾。又幹細胞

Fig. 12. Protective effect of AET.

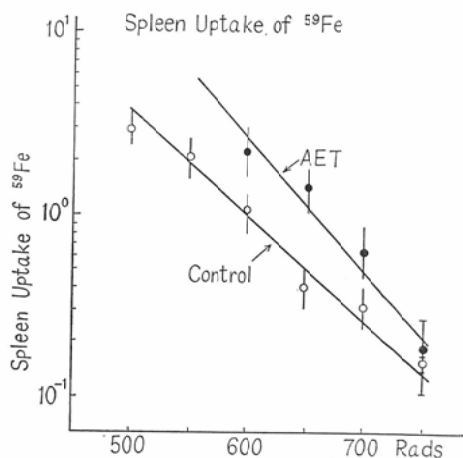
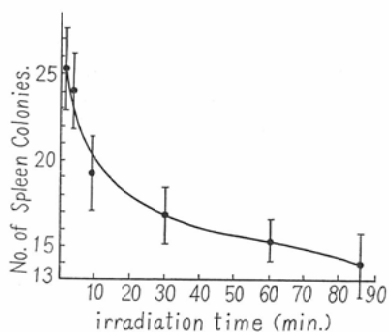


Fig. 13. Circulating stem cells (Hellman, S)



胞は末梢血にも存在することが証明されており⁷⁾、部分照射をした場合その部の回復が早いのは遮蔽された部分の幹細胞が照射部分へ移行して回復を早めたことが観察されている⁵⁾⁴⁾⁸⁾⁹⁾。

^{59}Fe 摂取率と脾コロニー数は共に Fig. 4 に見る如く 500～750R の範囲に於て線量の増加につれて exponential に減少し2者の間に殆んど感受性の差が見られない。之は脾コロニーを組織学的に見ると (Fig. 3) 種々の发育段階にある Erythroblasten, Megakaryocytes 等が多く見られ ^{59}Fe citrate が転入するのは赤芽球系が圧倒的に多いため脾コロニー数と ^{59}Fe 摂取率は同じ傾向をとるものと思われる。

この場合の LD_{50} は50～70Rであつたが、移植した場合の (Exogenous Spleen Colony Method) LD_{50} は第1報で見る如く90—100Rで殆んど一

致している。

電子線の R.B.E. に関する報告は比較的多く見られる。岡村等¹³⁾は睪丸重量を指標にした時に50%効果時に15 MeV 電子線で0.87の値を出している。Austin は¹³⁾17 MeV 電子線で再生毛の灰白色化で 0.6 ± 0.09 を Fuller J.B.¹⁴⁾ 等はラットの LD₅₀₍₃₀₎ で 0.7, Seaman¹⁵⁾等のはうさぎの耳の皮膚紅斑で 0.5であつたといっているが一般に 0.5~0.9の値が多い。

しかし骨髓障害を指標にした報告は少い。中塚¹¹⁾は骨髓細胞数の面より15 MeV の電子線の R.B.E. は 0.7の値を出しているが、幹細胞の面より見た場合とよく一致している。

只骨髓に対する放射線の影響を見る場合に複雑な骨梁に囲まれた骨髓内での線量分布が一様でない。Sinclair¹⁰⁾によると骨髓の平均線量は軟組織よりも大であつてマウスを用いての実験で求めると ⁶⁰Co γ 線等の高エネルギー放射線では軟組織に対する増加はわづかであるが(約1.01倍) 200 kVp X線では1.09倍であるといっている。

一般に骨髓に対する R.B.E. を求める時にはいつも以上のことを考慮に入れるべきでその場合には軟組織線量として求めた R.B.E. の約10%近く上昇することになる。

分割照射で回復を見たものとしては Elkind 等の Chinese Hamster, HeLa Cell を用いた実験がある。我々の内因性脾コロニーでは、Elkind¹⁶⁾の Chinese Hamster のカーブとよく一致しているが、初めの最大と次の最小の点で、Chinese Hamster では2時間と5時間であるが、我々では5時間と10時間となつている。この差がどこからくるかは不明であるが、Till, McCulloch¹⁷⁾では、同じく内因性脾コロニー法を用いて5, 11時間後となつている。

Hornsey, Silini¹⁸⁾はエールリツヒ腹水癌を用いて5~7時間に最大値があり、9.5時間後では減少しなかつたといっている。

之等の曲線の意味する所は照射による細胞周期の同期化と之に伴う感受性の変動が重つたものと考えられる。即ち初めの山は回復を示すが次の谷は主にこの同期化により高感受性期に細胞集団が

入つたためであると考えられる。

以上述べたものは照射後24時間におこる所謂早期回復過程についてであるが、之は Elkind 等によつて定義された回復であり、この時期には Colony forming cell の増加は来していない。しかし照射1日以後になると再生が起り細胞増殖を来し照射後の日数がますますつれて回復過程が進むわけで2分割の間隔がひらくとそれだけ同じ効果を生ずるのに多くの線量を要するわけである (Fig. 10, 11)。之等の生存曲線は殆んど平行である所より2分割の間隔がのびても細胞の感受性には差がないことを示している。又後期回復で照射後約15日以上では全線量に差がなく over shoot したものと考えられる。

AETのDose Reduction Factor (D.R.F.) は、1.1の値を得たが、W.W. Smith 等も述べている如く化学防禦剤の D.R.F. を求める場合にもこの内因性脾コロニー法は非常にすぐれた方法であると考えられる。30日生存率は他の色々の因子が入り複雑であると同時に30日を要する。又、D.R.F. を求めるのに末梢リンパ球、顆粒白血球を計測する方法もあるが¹⁹⁾之等も生理的、技術上の影響を受け易く、内因性脾コロニー法の方がまさつている。

Elkind もいつている如く、Colony forming cell 即ち Stem cell こそは、全身照射後、造血組織の repopulation をあづかる本質的なもので、放射線の致死効果も、幹細胞の増殖能力、生存率ということで説明しようと考えられる。

結 語

我々は d-d 系マウスを用いて 500~750R の全身照射を行い、内因性脾コロニー形成法によりコロニーの組織学的検索、線量効果関係、脾の ⁵⁹Fe 摂取率との関連性を調べた。又、Colony forming cell に対する電子線の R.B.E., 分割照射の回復の問題、AETの防禦効果を調べた結果を得た。

1) 照射線量の増加につれて脾コロニー数、脾鉄摂取率は共に exponential に減少する。

2) 200 kVp X線に対する18 MeV ベータatron電子線の R.B.E. は、脾コロニーを指標にした時には0.77, ¹²⁵IUdR 摂取率を指標にした時に

は0.89の値を得た。

3) a) 24時間以内の色々な間隔で分割照射を行つた時に、5時間で最高の回復を見た。

b) 2, 6, 15日の間隔で分割照射をした時には照射後15日では殆んど回復していることがわかつた。

4) AETを照射前に150mg/kgを腹腔内に注入した時には、500～750Rの線量域にわたつて防禦効果を見た。

文 献

- 1) 田中敬正他：骨髓幹細胞の放射線感受性（第1報），日医放，26巻，1966（979—987）。
- 2) Till, J. E. and McCulloch, E. A.: Early repair processes in marrow cells irradiated and proliferating in vivo. *Rad. Res.* 18 (1963), 96—105.
- 3) Smith, W. W., Budd, R. A. and Cornfield, J.: Estimation of radiation dose-reduction factor for β -mercaptoethylamine by endogenous spleen colony counts. *Rad. Res.* 27 (1966), 363—368.
- 4) Hellman, S.: A paradoxical effect of dose rate in partial body irradiation. *Rad. Res.* 24 (1965), 611.
- 5) Hellman, S.: Circulating stem cells; Variation with duration of partial body x-irradiation. 205 (1965), 100.
- 6) Murphy, M. J., Porteous, D. D. and Gordon, A. S.: Haematopoietic repopulation after intestinal shielding from x-irradiation. *Nature* 215 (1967), 772—773.
- 7) Goodman, J. W. and Hodgson, G. S.: Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* 19 (1962), 702.
- 8) Fujioka, S., Hirashima, K. and Kumatori, T.: Mechanism of hematopoietic recovery in the x-irradiated mouse with spleen or one leg shielded. *Rad. Res.* 31 (1967), 826—839.
- 9) Kurnick, N. B. and Nokey, N.: Repopulation of bone marrow in mice: Number and type of cells required for post-x-irradiation protection. *Rad. Res.* 25 (1965), 53.
- 10) Sinclair, W. K.: *Rad. Res.* 16 (1962), 369.
- 11) Nakatsuka, H., Takeuchi, T., Ochi, N. and Fujino, M.: Comparative studies on the biological effects of 15MeV x-rays and electrons 200 kV x-rays on the Ehrlich ascites tumor and bone marrow of mice. *The Proc. Intern. Conf. Rad. Biology and Cancer. Kyoto, (1966), 21—24.*
- 12) 岡村重昭，中村寛，古賀充：率丸重量を指標とした200 kV X線， ^{60}Co γ 線，15MV X線及び15 MeV 電子線の生物学的効果比率 第I報 局所照射の場合，日医放，23巻，昭38，189—193.
- 13) Austin, M.: *Brit. J. Radiol.* 26 (1953), 152—153.
- 14) Fuller, J. B. and Laughlin, J. S.: *Amer. J. Pathol.* 27 (1951), 675—676.
- 15) Seaman, W. B.: *Radiology* 65 (1955), 260—264.
- 16) Elkind, M. M. and Sutton, H.: Radiation response of mammalian cells grown in culture. I. Repair of x-ray damage in surviving chinese hamster cells. *Rad. Res.* 13 (1960), 556—593.
- 17) Till, J. E. and McCulloch, E. A.: Repair processes in irradiated mouse hematopoietic tissue. *Ann. New York Acad. Sciences.* 114 (1964), 115—125.
- 18) Hornsey, S. and Silini, G.: Recovery of tumor cells cultured in vivo after x-ray and neutron irradiation. *Rad. Res.* 16(1962), 712—722.
- 19) Smith, W. W., Cornfield, J., Luskus, C. and Miller, C.: β -Mercaptoethylamine effect on radiation dose-response characteristics of granulocyte and lymphocyte counts. *Rad. Res.* 26 (1965), 146—158.