

Title	マウス造血系の放射線障害からの回復に対する瀉血の影響
Author(s)	窪田, 宣夫
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1975, 35(4), p. 180-186
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19766
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

マウス造血系の放射線障害からの回復に 対する瀉血の影響

横浜市立大学医学部放射線医学教室 (主任：伊東乙正教授)

窪 田 宜 夫

(昭和49年8月9日受付)

(昭和50年1月18日 最終原稿受付)

Effect of bleeding on recovery of erythropoiesis in mice after irradiation

Nobuo Kubota

Department of Radiology, Yokohama City University, School of Medicine

(Director: O. Ito)

Research Code No.: 400

Key Words: Bleeding, Erythropoiesis, Spleen colony assay

Radioprotective effect of bleeding was studied by the depletion of 0.4 ml of blood immediately after the whole body irradiation. As the indicator of this experiment, 30-day survival rate was used. To analyse the effect of bleeding, erythropoietic recovery after irradiation was examined. Before these experiments, erythropoietic activity after the depletion was examined in the non-irradiated mice. Also, radioactive iron uptake was measured in femur and spleen as an indicator of erythropoietic activity in both irradiated and non-irradiated groups. The experimental results were as follows:

- 1) Increase in 30-day survival rate was noted; 40% in the group of blood depletion after 700 R irradiation, but only 15% in the group without blood depletion.
- 2) Marked erythropoietic activity was observed in the spleen in blood-depleted mice, but this activity was not increased in the femur bone marrow.
- 3) Gradual and relatively early increase in iron-59 uptake was observed in the blood-depleted mice immediately after irradiation but not in those with irradiation alone. This phenomenon indicates the early recovery of erythropoietic repopulation in the spleen.
- 4) Mean number of endogenous spleen colonies was 13 and 27 respectively, in the mice without and with blood depletion immediately after 750 R irradiation.

I. 緒 言

マウスは 500～1,000 R の放射線全身照射を行うと、一定の割合で30日以内に造血系の障害で死亡するが、しかし、この30日生存率は照射前後に

マウスの生理的状态を変えることによつて変化する。一方、マウスの30日生存率と密接に関係している造血系幹細胞の放射線障害の回復に影響を与える因子については、多くの研究が行なわれてお

り、エリトロポエチン¹⁸⁾、外因性DNA¹⁹⁾、細菌内毒素²¹⁾、その他が回復促進に有効的に働くことが報告されている。

これらの因子と同様に、照射前後に溶血性薬剤 phenylhydrazine の投与、又は汚血を行うと、マウスの30日生存率は上昇する¹²⁾²⁰⁾²²⁾。この30日生存率の上昇は、特に照射後の汚血又は phenylhydrazine の投与の場合は、造血系の放射線障害からの回復の差異に基因している。

筆者はマウスの放射線照射後の汚血による30日生存率の上昇の機構を解析することを目的として、照射後の汚血がマウスの造血系の回復に及ぼす影響、そして正常マウスを汚血した場合の造血臓器の造血活性の反応について調べたので報告する。

II. 実験方法

1. 実験動物

実験に使用した動物はすべて dd 系雄マウスである。マウスは4週齢で購入し、当教室の動物室にて自由に水と餌を与えて飼育し、6～8週になつたところで、体重20g以上のマウスを実験に使用した。

2. 実験方法

a. 造血能の測定

赤血球造血能は放射性鉄 ^{59}Fe の造血臓器への取り込みを指標として測定した。鉄の投与後のマウスの屠殺時間は $^{59}\text{FeCl}_3$ 、 $0.5\mu\text{Ci}$ を腹腔内投与後、経時的にマウスを屠殺して脾臓と大腿骨の放射活性を測定することによつて決定した。使用した $^{59}\text{FeCl}_3$ の比放射能は 19.45mCi/mg であつた。放射活性の測定はウェルタイプシンチレーションカウンターで、試料をプラスチックチューブに入れて行つた。大腿骨と脾臓の放射性鉄の取り込みは投与量のパーセントで表示した。

b. 赤血球系造血能に対する汚血の影響

正常マウスからの体重の約2%に相当する血液量 0.4cc の汚血が、マウスの造血臓器に及ぼす影響を調べた。この血液量は末梢血液の約 $1/4$ に相当する。汚血は眼の内嚙部より 0.4cc を 1ml ツベルクリン注射器を用い、静脈用 $1/2$ 針で穿刺して行

つた。汚血後、経時的に $^{59}\text{FeCl}_3$ 、 $0.5\mu\text{Ci}$ を腹腔内投与して、8時間後に屠殺して大腿骨と脾臓の放射性鉄の取り込みを測定した。

c. 30日生存率

照射後の 0.4cc 汚血がマウスの30日生存率に及ぼす影響を調べた。マウスの使用数は照射のみのグループで20匹、照射後汚血のグループで20匹であつた。両グループのマウスは ^{60}Co ガンマー線 700R 全身照射を行い、その後、30日間飼育して30日生存率を求めた。

照射はアクリル樹脂の照射箱の個室にマウスを入れて、ターンテーブル上で毎分3～4回転させながら行つた。線量率は 40R/min であつた。

d. 照射後の汚血の赤血球造血能に対する影響

^{60}Co ガンマー線 700R 照射後15分以内に汚血すると、マウスの30日生存率が上昇することの機構を解析するために、汚血が照射後の造血系の回復に与える影響を検討した。

照射後の造血能の回復は $^{59}\text{FeCl}_3$ 、 $0.5\mu\text{Ci}$ 腹腔内投与後、8時間目での大腿骨と脾臓の放射活性を指標とした。30日生存率の実験では照射線量は ^{60}Co ガンマー線 700R であつたが、15日以内に半分以上のマウスが死ぬことがわかつたので、線量は 600R に下げた。

e. 内因性脾コロニー数

照射後、脾臓に表われる脾コロニー数が照射後の汚血でどのように変化するかをみた。

^{60}Co ガンマー線 750R 照射後、15分以内に、 0.4cc 汚血を行い、8日目に屠殺して、脾コロニー数を照射のみのマウスのそれと比較した。

脾臓は摘出後、ブアン液で固定し、翌日、肉眼的に見分けられる内因性脾コロニー数を求めた。

III. 結果

1. 造血臓器の ^{59}Fe の取り込み

マウスの造血臓器への $^{59}\text{FeCl}_3$ の摂取率が最高となる時間を知るために、 $^{59}\text{FeCl}_3$ 腹腔内投与後、経時的に大腿骨と脾臓の放射活性を測定した。結果は Fig. 1 に示す。

$^{59}\text{FeCl}_3$ の摂取率は脾臓では投与後6時間目で最高に達し、以後プラトーを示したが、大腿骨で

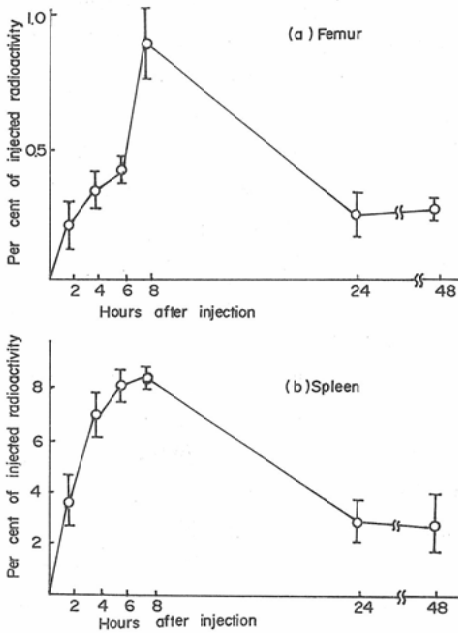


Fig. 1 Turnover of Fe-59 in the femur and spleen following injection of $^{59}\text{FeCl}_3$. Mice were injected with $0.5\mu\text{Ci}$ of $^{59}\text{FeCl}_3$ and killed at various intervals thereafter. The Fe-59 uptake by the femur and spleen was measured. Each point represents the mean \pm S.E. for 4-8 mice.

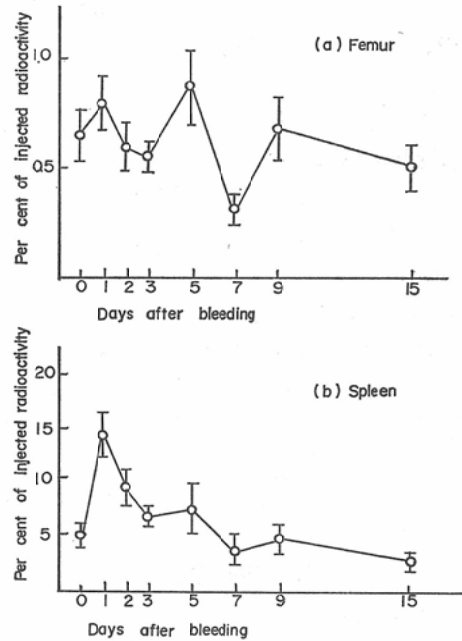


Fig. 2 Effect of bleeding of 0.4 ml blood on Fe-59 uptake in femoral marrow (a) and spleen (b). Mice were bled by orbital sinus puncture. Iron uptake into marrow and spleen was determined by injecting $^{59}\text{FeCl}_3$. Each point represents the mean \pm S.E. for 5-8 mice.

は投与後8時間目で最高に達した。そこで、以後の実験での造血能の測定では、 $^{59}\text{FeCl}_3$ 投与後8時間目にマウスを屠殺し、造血臓器の放射活性の測定を行うことにした。

2. マウスの造血臓器の鉄の摂取率に対する沍血の影響

Fig. 2 は正常マウスから 0.4cc沍血後の大腿骨と脾臓の放射性鉄の摂取率の変化を示す。

大腿骨は沍血後、鉄の取り込みの変化をほとんど示さないが、脾臓は沍血後1日目と2日目で鉄の摂取率が正常時の2~3倍の増加を示した。脾臓の造血活性の上昇は沍血後5日目まで続き、7日目以後はコントロールレベルに下つた。

Fig. 3 は沍血後の脾臓の重量変化を示す。

脾臓重量は沍血後、急激に増加しはじめ、2日目で最高となり、以後7日目まで徐々に減少を示した。その後、9日目でわずかに増加を示した

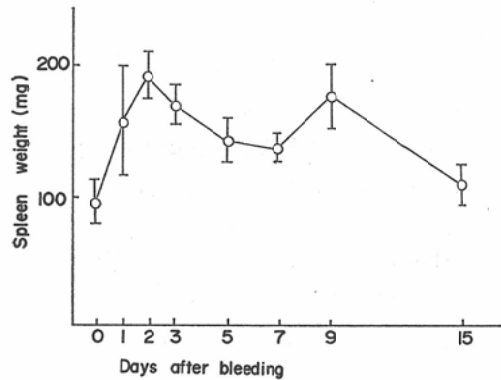


Fig. 3 Spleen weight response in mice after bleeding. Mice were bled by orbital sinus puncture. At various time intervals thereafter spleens were removed and weighed. Each point represents the mean \pm S.E. for 5-8 mice.

が、14日目ではコントロールレベルに減少した。マウスでは、0.4cc沍血に反応して脾臓で活発な造血活性の上昇が起こるが、骨髓ではほとんど

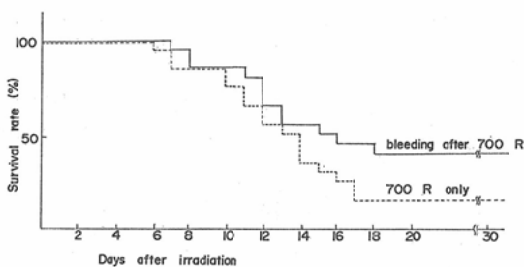


Fig. 4 Effect of bleeding immediately after 700 R irradiation on thirty days percent survival in mice. Experiment mice were depleted immediately after irradiation. Controls received irradiation only. Animal death was observed for 30 days.

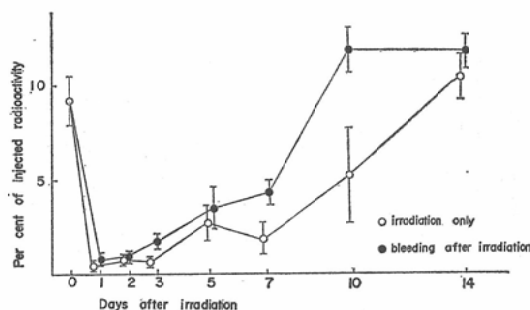


Fig. 6 Effect of depletion immediately after irradiation on splenic Fe-59 uptake. Mice were depleted after irradiation. Controls received irradiation only. At various intervals, mice were injected with Fe-59 and sacrificed 8 hours later. Fe-59 counts per spleen were made. Each point represents the mean \pm S.E. for 5-8 mice.

変化しないことが明らかとなった。

3. マウス30日生存率

Fig. 4は dd 系マウスでの ^{60}Co ガンマー線 700 R 照射群と照射後汚血群の生存率を表わしている。

照射のみのグループのマウスの30日生存率は15% (3/20) であつたが、照射後 0.4cc 汚血したグループの生存率は40% (8/20) で、汚血による生存率の上昇が認められた。

4. 造血系の放射線障害からの回復に対する汚血の影響

Fig. 4 は照射後の汚血がマウスの30日生存率を上昇させることを示している。この生存率上昇は照射後の造血臓器での造血能の回復パターンと関係しているであろうという考えから、照射後の汚

血による赤血球系造血能の回復パターンの変化を調べた。結果は Fig. 5 と Fig. 6 に示す。

大腿骨では造血活性は照射後 2 日目に最低となつた。鉄の取り込みの上昇は 5 日目から起こり、7 日目にはコントロールレベルまで回復した。以上の回復パターンは照射後に、汚血という生理的の刺激を加えても変化しなかつた。

Fig. 6 は脾臓での照射後の造血能の回復パターンを示す。

照射後の脾臓での造血活性は 1 日目に最低となつた。照射のみのグループは 5 日目でわずかの ^{59}Fe の取り込みの増加を示したが、7 日目以後に顕著な造血活性の回復を示した。一方、照射後汚血を行つたグループは 3 日目から鉄の摂取率の増加が起こり、10 日目ではコントロールを上回る造血活性を示した。

Fig. 5 及び Fig. 6 より、照射直後に汚血をしたマウスは照射のみのマウスに比べて、骨髄での鉄の摂取率の回復は変わらないが、脾臓では早期に鉄の取り込みの回復が起こるといえる。

Fig. 7 は照射後の脾臓の重量の変化を表わしている。両グループの間に、1 日目から 7 日目の間は重量の差異はみられなかつたが、照射後 10 日目では明らかに、汚血マウス群の脾臓重量がコントロール群に比べて増加している。このことは、

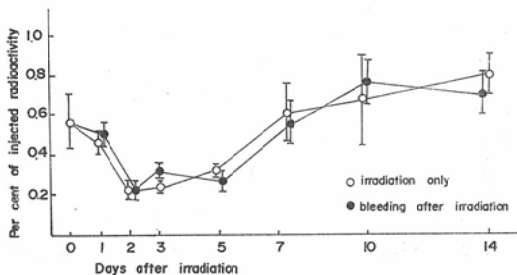


Fig. 5 Effect of bleeding immediately after 600 R irradiation on femoral Fe-59 uptake. Mice were depleted after irradiation. Controls received irradiation only. At various intervals, mice were injected with Fe-59 and killed 8 hours later. Fe-59 counts per femur were made. Each point represents the mean \pm S.E. for 5-8 mice.

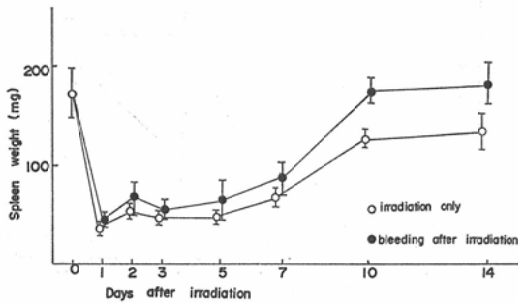


Fig. 7 Spleen weight response in mice bled immediately after irradiation, as compared to irradiated controls. Mice were depleted after irradiation and the spleen weight was measured at various intervals. Each point represents the mean \pm S.E. for 3-8 mice.

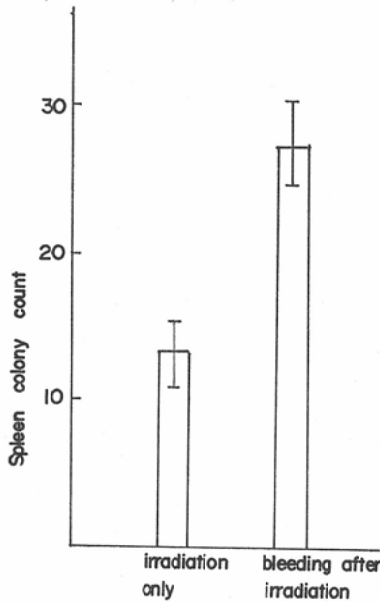


Fig. 8. Effect of depletion on endogenous spleen colonies. Mice were bled shortly after irradiation with 750 R. Controls were given irradiation only. Spleens were harvested 8 days later, and colonies were counted. Each point represents the mean \pm S.E. for 8 mice.

Fig. 6 で示したところの沍血マウスでの照射後3日目から10日目までの赤血球系造血能の顕著な回復に由来すると考えられる。

5. 内因性脾コロニー

Fig. 8 は ^{60}Co ガンマー線 750 R 照射後8日目

でのマウスの脾臓に生じる内因性脾コロニー数に対する沍血の影響を示す。

内因性脾コロニー数は照射のみのマウスのグループで平均13であり、照射後沍血グループは平均27であった。

IV. 検 討

マウスでは 1,000 R 以下の放射線照射による死亡は、造血系細胞の障害による、いわゆる造血死であると考えられている。そのため、マウスの30日生存率は照射後の造血系の回復の度合に強く依存している。マウスの放射線感受性は個体の生死を基準として、一般に、 $\text{LD}_{50(30)}$ で示される。マウスの $\text{LD}_{50(30)}$ を決定する因子として考えられているものには、造血幹細胞の放射線感受性の差異¹⁵⁾²⁵⁾、照射時にマウスに存在する幹細胞数の差異⁷⁾¹⁴⁾などがある。マウスの $\text{LD}_{50(30)}$ はその他に、薬剤の投与、生理的的刺激によつても変化する。L.H. Smith²⁰⁾は照射前にマウスに phenylhydrazine を投与すると、生存率の上昇することを示した。又、Marsh らは¹²⁾照射前に沍血すると、マウスの生存率が上昇し脾臓の CFU-s が10倍増加することをみている。一方、菅原ら²³⁾²⁴⁾はマウスを照射前に沍血したり、running を行なわせると、30日生存率が上昇し、その放射線抵抗性は造血活性の増加と相関していることを示した。

しかし、沍血又は phenylhydrazine の投与によるマウスの生存率上昇の機構は、沍血又は薬剤の投与を照射前に行う場合と、照射後に行う場合とでは、異なっていると筆者は考えている。照射前処置の場合は生存率を比較している2つのマウスのグループ間に、照射時にすでに、生理的に差異が存在している。そして、 $\text{LD}_{50(30)}$ の差はこの生理的な差異と密接に関係していると考えられる。ところが、Fig. 4 で示した照射後の沍血による30日生存率の上昇は、照射時の生理的な差異ではなく、照射後の造血系、とくに造血系幹細胞の回復に依存している。

Fig. 6 は照射後に沍血をすると、脾臓では鉄を取り込む能力を有した赤芽球系へ分化した細胞が、照射のみのマウスに比べて、早期に現われる

ことを示している。照射後、汚血することによって、脾臓での機能細胞の産生が促進され、末梢血中の機能細胞数がある閾値以下に減少する前に、新たに産生された細胞が末梢血中へ流入するために、生き残るマウスが増加すると筆者は考えている (Fig. 4)。

Chervenick ら²⁾は内因性脾コロニー形成細胞を使つて、分割照射法により、CFU-s の増殖と分化について調べ、照射等で CFU-s のプールがある閾値以下に減少すると、CFU-s は分化なしに self-replication を行うと述べている。そして、CFU-s の分化は CFU-s がある閾値以上に達した後起こる。Degowin ら³⁾も照射後の脾臓で同様の結論を得ている。一方、平嶋⁹⁾は 500 R 照射後の汚血で、10日目のマウスの骨髄中の CFU-s が増加していることを報告している。

以上の報告を基に、本実験の脾臓での鉄の取り込みの回復の汚血による促進については、筆者は次の様に考えている。

照射直後の汚血により、Erythropoietin-responsive cell (ERC) が赤芽球系への分化を促進され、その結果、CFU-s が ERC へ分化する。それを補うために、Go 期にある CFU-s が増殖を開始する。そのため、照射のみのマウスに比べて、汚血マウスでは、骨髄中の CFU-s の数はより早期にある閾値以上に達し、CFU-s は分化する能力を有する。ERC の赤芽球系への分化が CFU-s の増殖を開始させることについては、いくつかの報告がある⁵⁾¹¹⁾¹⁷⁾。

ところで、放射線感受性⁵⁾、generation time¹⁸⁾、致死線量照射マウスに対する防護能力¹⁰⁾などの研究から、骨髄中の CFU-s と脾臓中の CFU-s は、機能的に異なっていると考えられている。即ち、脾臓の CFU-s は骨髄の CFU-s よりも赤芽球系へ一段階分化した unipotential の幹細胞を多く含んでいる。今回の実験でも、Fig. 2, Fig. 3 より、正常マウスを汚血することにより、脾臓はすみやかに鉄の摂取率の上昇を示したが、骨髄ではほとんど変化を示さなかつたこと、及び Fruhman⁴⁾、小宮山⁹⁾の報告からも、マウスは脾臓に赤芽

球系へ一歩分化した unipotential CFU-s を多く含むことが示唆される。

そこで、骨髄中で CFU-s がある閾値以上に増加して、分化する条件を備えた CFU-s は、一部が脾臓へ移動し、そこで unipotential CFU-s に分化後、増殖してコロニーを形成する。そのために、照射後の汚血により、内因性脾コロニー数は増加する (Fig. 8)。CFU-s が骨髄から脾臓へ移動することは、Rencricca¹⁷⁾ によつて、phenylhydrazine 投与マウスで、及び多血症マウスの¹⁹⁾エリトロポエチン投与で Shadduck ら¹⁹⁾によつて示唆されている。

本実験での汚血による30日生存率の上昇と内因性脾コロニー数の増加の関係は、Puro¹⁶⁾らの示した線量率の大小によるマウスの生存率の差異は、内因性脾コロニー数の差異と関連しているというデータと一致する。

しかし、Boggs¹⁾らは C57BL×DBA/F₁ マウスで照射後1時間目に汚血を行つたが、内因性脾コロニー数の増加は認められないと述べている。一方、菅原²²⁾は照射後の30日生存率の汚血による上昇の度合は、マウスの系統により差のあることを報告している。照射後の汚血による30日生存率の上昇の大小は、CFU-s の骨髄から脾臓への移動の大小と関係していると想像することもできるが、マウスの系統間の放射線感受性の差の問題と共に、今後、解決されるべき問題であろう。

V. 結 論

マウスの放射線感受性の差異を解析する目的で、照射後の 0.4cc 汚血によるマウスの30日生存率の上昇について検討し、次の結果を得た。

(1) マウスの急性貧血時の赤血球系細胞の産生には脾臓が第一の器官である。

(2) ⁶⁰Co ガンマー線 700 R 照射後のマウスの30日生存率は15% (3/20) であり、照射直後汚血を行つたマウスは40% (8/20) であつた。

(3) 照射後の造血能の回復を鉄の摂取率で見ると、骨髄は汚血の影響がみられなかつたが、脾臓は汚血マウスで鉄の取り込みの回復の促進が認められた。

(4) ^{60}Co ガンマー線 750 R 照射後 8 日目の脾臓の内因性コロニー数は、浮血によつて 2 倍に増加した。

(5) 放射線照射後の浮血によるマウスの 30 日生存率の上昇と、CFU-s の増殖、分化との関係について検討を加えた。

稿を終るに当り、御指導を頂いた伊東乙正教授、及び都立養育院放射線科、松井謙吾博士に深く感謝いたします。

本論文の要旨は第33回日本医学放射線学会で発表した。

References

- 1) Boggs, D.R., Marsh, J.C., Chervenick, P.A., Cartwright, G.E., and Wintrobe, M.M.: *Radiat. Res.* 35 (1968), 68—77.
- 2) Chervenick, P.A., and Boggs, D.R.: *Blood* 37 (1971), 568—580.
- 3) Degowin, R.L., Miller, S.H., and Grund, F.M.: *J. Lab. Clin. Med.* 77 (1971), 219—227.
- 4) Fruhman, G.J.: *Z. Zellforsch.* 75 (1966), 258—271.
- 5) Guzman, E., and Lajtha, L.G.: *Cell Tissue Kinet.* 3 (1970), 91—98.
- 6) 平嶋邦猛: *最新医学*, 28 (1973) 1720—1732.
- 7) Juhas, J.M., and Storer, J.B.: *Radiat. Res.* 35 (1967), 596—605.
- 8) Juraskova, V., and Drasil, V.: *Int. J. Radiat. Biol.* 11 (1966), 531—537.
- 9) 小宮山淑: *日医放会誌*, 32 (1972) 50—62.
- 10) Kretchmar, A.L., and Conover, W.R.: *Blood* 36 (1970), 772—776.
- 11) Lajtha, L.G., Gilbert, C.W., and Guzman, E.: *Brit. J. Haematol.* 20 (1971), 343—354.
- 12) Marsh, J.C., Chervenick, P.A., and Cartwright, G.E.: *J. Cell Physiol.* 71 (1968), 65—76.
- 13) Naidu, N.V., and Reddi, O.S.: *Nature* 214 (1967), 1223—1224.
- 14) Porteous, D.D., Lajtha, L.G.: *Brit. J. Haematol.* 12 (1966), 177—188.
- 15) Proukakis, C., and Lindop, P.J.: *Nature* 215 (1967), 655—656.
- 16) Puro, E.A., and Clark, G.M.: *Radiat. Res.* 52 (1972), 115—129.
- 17) Rencricca, N.L., Rizzoli, V., Howard, D., Duffy, P., and Stohlman, F., Jr.: *Blood* 36 (1970), 764—771.
- 18) Schofield, R.: *Cell Tissue Kinet.* 3 (1970), 119—130.
- 19) Shadduck, P.K., Tyler, W., Porcellini, A., Howard, D.E., and Stohlman, F., Jr.: *Radiat. Res.* 50 (1972), 379—387.
- 20) Smith, L.H., and Mckinley, T.W.: *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 129 (1968), 702—705.
- 21) Smith, W.W., Brecher, G., Fred, S., and Budd, R.A.: *Radiat. Res.* 27 (1966), 710—717.
- 22) Sugahara, T., and Tanaka, T.: *Int. J. Radiat. Biol.* 18 (1970), 395—397.
- 23) Sugahara, T., Tanaka, T. and Antonin, V.: *J. Radiat. Res.* 8 (1967) 152—160.
- 24) Sugahara, T., Tanaka, T., Nagata, H., Man-i, M., and Kikuchi, K.: *Comparative cellular and species radiosensitivity*, p. 30. Igaku-Shoin. (1969).
- 25) 土屋武彦: *放射線障害の回復*, 175, 朝倉書店.