

器官培養したマウス精巣に対するすだれ状 X 線マイクロビーム照射と
精子形成に与える影響

Radiation Effect on Spermatogenesis of Ex Vivo Mouse Testis
Exposed to Slit-X-ray-microbeam

福永久典^{1*}, 神長輝一², Karl T. Butterworth¹, 佐藤卓也³, 渡辺立子², 宇佐美德子⁴, 小川毅彦³,
横谷明德², Kevin M. Prise¹

¹ Centre for Cancer Research and Cell Biology, Queen's University Belfast,
97 Lisburn Road, Belfast BT9 7AE, UK

² 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 量子ビーム科学研究部門
〒319-1106 茨城県那珂郡東海村白方 2-4

³ 横浜市立大学 生命医科学研究科 創薬再生科学
〒236-0004 横浜市金沢区福浦 3-9

⁴ 高エネルギー加速器研究機構 物質構造科学研究所 放射光
〒305-0801 つくば市大穂 1-1

Hisanori FUKUNAGA^{1*}, Kiichi KAMINAGA², Karl T. Butterworth¹, Takuya SATO³, Ritsuko
WATANABE², Noriko USAMI⁴, Takehiko OGAWA³, Akinari YOKOYA² and Kevin M. Prise¹

¹ Centre for Cancer Research and Cell Biology, Queen's University Belfast,
97 Lisburn Road, Belfast BT9 7AE, UK

² Quantum Beam Science Research Directorate, National Institutes for Quantum and Radiological
Science and Technology, Tokai, Ibaraki, 319-1106, Japan

³ Institute of Molecular Medicine and Life Science, Yokohama City University Association of
Medical Science, Yokohama, 〒236-0004, Japan

⁴ Photon Factory, Institute of Materials Structure Science,
High Energy Accelerator Research Organization,
1-1 Oho, Tsukuba, 305-0801, Japan

1 はじめに

低線量あるいは低線量率の放射線による被ばく影響の特徴はその「不均一な線量分布」にある。高線量域においては照射範囲内の全細胞を放射線トラックが複数回通過する（ヒットする）と確率的にみなされるが、低線量域では放射線がヒットする細胞は全体の一部に留まることになる。すなわち、照射範囲内において「放射線がヒットする細胞とヒットしない細胞が混在する」という状況が生じる。このような不均一な線量分布が生じる低線量域では、高線量域のように線量依存的に生物学的影響を推定することが出来ず、放射線による被ばく影響の評価を困難にしてきた。

実験が難しい低線量の放射線を照射する実験の代わりに、X 線やイオンのマイクロビームを利用することで低線量環境を模擬し、細胞集団の一部の細胞のみに放射線ヒットを与える研究が近年数多く試みられてきた[1]。これらの研究により、非照射細胞にも照射細胞と似たような細胞死（アポトーシス）や染色体異常が誘発されることが次々と報告され、いわゆるバイスタンダー効果として注目されている。

そのメカニズムとして、細胞同士の物理的な接続（ギャップジャンクション）あるいは照射細胞から放出されたシグナル分子のメディウム中への拡散を介した情報伝達が新たに推定され、その検証実験が継続されている。

一方これらの多くの研究では、培養ディッシュ上に単層培養した細胞試料を使う場合が多く、生体のような三次元的に構築された細胞組織とは様相が大きく異なることも事実である。そこで本研究では、実際のマウス胎児から取り出した精巣を器官培養し、これを試料として放射光 X 線マイクロビームを照射することで、組織レベルで「放射線がヒットする細胞とヒットしない細胞が混在する」状況を人為的に作り出す。これにより、不均一な放射線照射場が精子形成に与える生物学的影響について検討を行った。

2 実験

当研究グループの佐藤、小川らにより開発された[2]、精子幹細胞から生殖能のある精子まで分化誘導を可能とする器官培養法を利用した。分娩後 7 日目の *Acr-GFP* トランスジェニックマウスの精巣を摘出

し、1mm³程度の大きさのブロックに切り分けた後1.5%アガロースゲル上で培養した。この器官培養 (ex vivo) 試料を PF に持ち込み、BL-27B の顕微鏡を備えたマイクロビーム照射装置により 5.35 keV の X 線を照射した (図 1)。X 線は、横幅 200 μm とする縦長ビームを 400 μm の間隔で“すだれ”状に照射した。質量エネルギー吸収係数から算出される試料に対するビームの透過率は、約 53% であり、照射部位の吸収線量は 5Gy であった。また比較のため、試料全体に X 線 2.5Gy を照射した場合、及び非照射 (コントロール) の場合についても同様に実験を行った。

照射後オフラインの蛍光顕微鏡を用いて、20 日間に渡り試料の観察を実施し、GFP 蛍光発現により精子形成能を評価した。

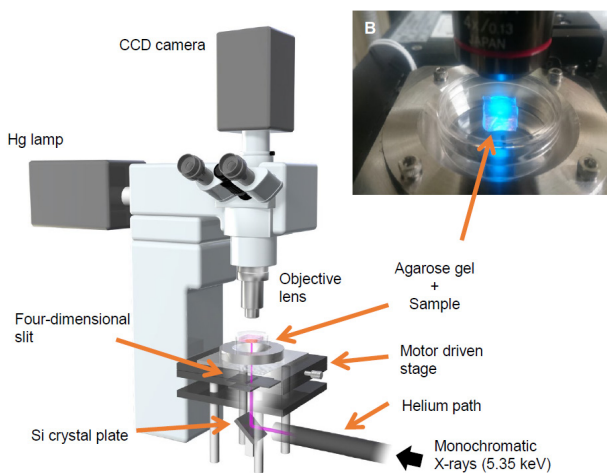


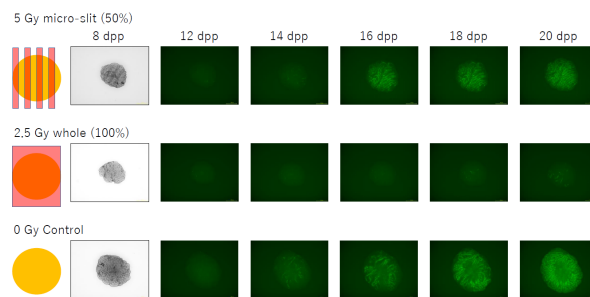
図 1 : マウスの胎児の精巣を器官培養上の精巣組織 (ex vivo) に対するマイクロビーム照射のセットアップの模式図

3 結果および考察

これまで実現不可能だった精子形成に対する不均一放射線照射場影響をリアルタイムで顕微鏡下に観察することに成功した。まず、精巣組織全体に均一に X 線を照射して精子形成を検討し、線量依存的に精子形成が一次的あるいは永久的に阻害されるのが確認された[3]。これらは臨床的に一時的不妊、永久不妊に相当するものと考えられた。さらに、マイクロビーム照射範囲を操作し、精巣体積約 50%に当たるように 5Gy を照射した場合 (すなわち 2.5Gy 換算相当) と、2.5Gy を全体に照射した場合で、精子形成阻害の程度に明らかな違い (Tissue-sparing effects) が認められた (図 2)。

「放射線がヒットする細胞とヒットしない細胞が混在する」という不均一放射線照射場条件では、組織当たり同じ被ばく線量であっても精巣組織内の空間的な照射分布条件の差異によって精子形成に対する放射線影響が変わることが示された。このような組織レベルでの放射線被ばく応答を鑑みると、組織感受性が線量率 (時間)、線量分布 (空間) などの放射線被ばく条件によって変化する可能性が示唆された。

図 2 : 器官培養したマウス精巣に対するすだれ状の



マイクロビーム照射

上 : 照射部位が 5 Gy となるように 200 μm のビーム幅、ビーム間隔 200 μm で照射した場合。照射面積は試料面積の 50% となるため、試料全体の平均線量は 2.5Gy となる。中 : 試料全体に均一に 2.5Gy を照射した場合。下 : コントロール (非照射)。

4 まとめ

X 線マイクロビーム技術とマウス精巣の器官培養法を用いることで、実際の生体組織に近い条件下における模擬的な低線量環境の影響評価に成功した。試料が均一に照射を受ける場合より、照射部位に空間的な変調をかけることで、組織の機能が大幅に回復することが新たに見いだされた。本成果は、医療分野においても、放射線治療の際の照射及び非照射のそれぞれの部位に対する影響評価の算定に対して新しい知見を提供すると期待される。

謝辞

本研究は、福永が丸文財団交流研究助成 (FY 2017-2019) 及び放射線影響協会の助成金 (FY 2018) のサポートを、K.T. Butterworth と K.M. Prise が Department of Health UK (Ref 091/0205) を、また横谷と神長が科研費基盤研究 B (特設分野・16KT0079) のサポートを受けて実施したものです。

参考文献

- [1] K. Prise *et al.*, *J. Radiat. Res.* 2009 **50**, Suppl A: A1-6 (2009).
- [2] T. Sato *et al.*, *Nature* **471**, 504-507 (2011).
- [3] Fukunaga *et al.*, *Radiat. Res.* **189**, 661-617 (2018).

成果

1. 福永久典 : 第 33 回 (2019 年度) 独創性を拓く先端技術大賞の学生部門・フジテレビジョン賞を受賞

* hfukunaga01@qub.ac.uk