

ビタミンC合成酵素ノックアウトマウスを用いた
ビタミンCによる放射線防護効果に関する研究

日本大学大学院医学研究科博士課程
病理系病態代謝学専攻

嵯峨 玲奈

修了年 2019年

指導教員 榎島 誠

目次

1	概要.....	1
2	諸言.....	2
3	実験方法.....	8
4	結果.....	13
5	考察.....	17
6	まとめ.....	25
	謝辞.....	26
	図.....	27
	図説.....	36
	引用文献.....	39

1 概要

急性放射線症はヒトが高線量被曝をした場合に生じる。その中には骨髄症候群と消化管症候群がある。消化管症候群に対しては、現在、有効な予防・治療法がなく、放射線被曝後の救命率を上げるためには放射線による消化管障害への新しい対処方法を見出すことが不可欠である。

ビタミンCによる放射線防護効果は以前より報告があるが、その多くはマウスやラットというビタミンCを合成できる動物での実験モデルであり、ビタミンC合成を行わないヒトの放射線障害モデルとしては不十分であった。

今回、ビタミンC合成酵素の一つであるSMP-30のノックアウトマウスを用いて、ヒトと同様に、ビタミンC摂取を外部に依存した動物での放射線障害モデルを作成した。

SMP-30ノックアウトマウスを用いた消化管障害モデルにおいて、ビタミンC不足状態では、生存率が悪化することが分かった。生存率の悪化に一致して、組織学的には小腸上皮層の萎縮がより顕著に認められた。ヒトでもビタミンCが不足することによって、消化管障害が悪化する可能性があり、ビタミンCを十分に摂取することで、被曝後の救命率をあげられる可能性が示唆された。

一方で、骨髄障害モデルにおける生存率はビタミンC不足状態でも悪化を認めず、ビタミンCの効果は組織ごとに異なる可能性が示唆された。

2 諸言

2-1 人体に対する放射線被曝の影響

人体は放射線被曝によって様々な障害を受ける。障害の受けやすさは組織ごとに異なる。細胞周期が早く分裂を頻回に繰り返している細胞と未分化細胞は障害を受けやすいとされ、骨髄や消化管は放射線感受性が高く障害を受けやすい臓器である。

ヒトが 1Gy 以上の高線量被曝後に発症する臨床症状の総称を急性放射線症 (acute radiation syndrome ; ARS) と言う。ARS は神経血管症候群、消化管症候群、骨髄症候群、皮膚症候群という 4 つの臓器別の障害が合わさって成り立つ。また、被曝後の時間経過に沿って、①前駆期、②潜伏期、③発症期、④死亡・回復期の 4 つの段階に分類される¹²。全身被曝後 48 時間から 72 時間以内に生じる症状を前駆症状と言い、食欲不振、嘔気、嘔吐、下痢、発熱、頭痛、頻脈などが生じる。前駆症状と被曝線量はおおまかに相関するため、前駆症状の程度によって被曝線量の推定を行う³。その後、数日から数週間の潜伏期を経て、発症期となる。潜伏期間の長さも被曝線量と相関し、9Gy 以上では潜伏期はなくなる。発症期には、上記の 4 つの症候群が合わさって様々な症状が現れる。神経血管症候群は中枢神経系の障害であり、微小血管循環の損傷による血液脳関門の破綻、間質浮腫、急性炎症、点状出血、髄膜炎、血管周囲の星状膠細胞の肥大などに起因する。3Gy から 4Gy 以上の被曝で軽度、10Gy 以上で重度となる。20Gy から 30Gy の被曝では、数分以内に発熱、血圧低下、意識レベルの低下、嘔吐が生じ、このような症状がみられた際は致死線量を超える線量の被曝であると判断される。消化管症候群は被曝から約 5 日間で進行し、1.5Gy 以下の被曝であれば前駆症状の嘔気、嘔吐、胃部不快感のみであるが、5Gy から 12Gy の被曝では、腸管上皮細胞の欠落により、より重症となる。症状としては、腹痛、腸管蠕動障害、吸収障害、

下痢、消化管出血、粘膜バリアの機能不全による感染などである。骨髄症候群は 1Gy 以上の被曝で生じ、2Gy から 3Gy の被曝では分裂がさかんな血球前駆細胞が障害を受け、分裂ができなくなる。3Gy から 4Gy では 2 週間から 4 週間の骨髄抑制が生じ、末梢血中の血球減少をきたし、赤血球減少による貧血、白血球減少による易感染性、血小板減少による出血傾向が生じる。5Gy から 7Gy 以上では自己複製能と多分化能を持つ造血幹細胞が障害を受けることにより、骨髄不全となり、上記の症状がより重度となる。皮膚症候群は、上記の 3 つの症候群とは異なり、全身被曝線量ではなく局所の被曝線量が問題となり、発症時期は被曝後早期から年単位での経過後と長期間に及び、発疹、湿性落屑、潰瘍などが生じる。

高線量の放射線被曝は、原子力発電所の事故、核兵器の使用、テロなどで生じる危険性があり、それらの際に傷病者の救命率を上げるための対策が必要となる。上述のように、重度の神経血管症候群を引き起こす 20Gy 以上の高線量被曝は致死線量とされ、救命は困難である。10Gy から 20Gy 以上の高線量被曝は、集中治療室での集約的治療により延命することはできるかもしれないが、救命は困難とされ、被曝後数日から数週間後に死亡するとされる。よって、この被曝線量で生じる消化管障害、骨髄障害を軽減する方法を模索することが重要となる（図 1）。骨髄障害に関しては、現在、輸血、サイトカイン療法、感染症予防の抗菌薬・抗真菌薬の投与、さらに同種造血幹細胞移植という治療が主として行われるが、重度の消化管障害に対しては、支持療法が中心で有効な治療法がない⁴。

日本では 1999 年の東海村 JCO 臨界被曝事故がきっかけとなり、高線量被曝による放射線障害に関する研究が注目を集めるようになった。この事故で、日本国内で初めて事故被曝による死亡者が出た。高線量被曝し急性放射線症を発症した 3 名の作業員

の推定被曝線量は、それぞれ 1-4.5 GyEq、6-10 GyEq、16-20 GyEq とされた⁵。もっとも高線量を被曝した 1 名に対して、HLA 適合の血縁者からの末梢血幹細胞移植を含めた集中治療がなされたが、腸管障害による重度の下痢と腸管出血、全身に及ぶ皮膚障害による体液消失が生じ、最終的には多臓器不全によって死亡した⁶。この事事例より、造血幹細胞移植を行っても救命できない消化管障害への治療、機序の解明のための研究が注目されるようになった。

一方で、悪性腫瘍の治療としての放射線治療は、医療の発達とともにより局所的照射となり、正常細胞の損傷が少なくなるため、有害事象も減少する傾向にある。しかし、血液悪性腫瘍領域で行われる骨髄移植の一環として行われる全身放射線照射に代表されるように、依然として全身への高線量被曝を必要とする治療もある。また、腹腔内臓器や骨盤内臓器の腫瘍への腹腔内や骨盤内局所的照射では、有害事象である下痢や腹痛などの消化器症状に苦しむ症例が存在する⁷。よって、放射線治療における正常細胞への障害を軽減する方法の模索が必要である。

2-2 細胞に対する放射線の影響

放射線には直接作用と間接作用がある。直接作用とは、放射線が標的分子の電離・励起を引き起こし、その分子のラジカル生成を引き起こすことである。間接作用とは、標的以外の分子が電離・励起された後に生じた活性酸素種（reactive oxygen species ; ROS）が標的分子を攻撃することである。生物学的影響にとっての標的分子とは DNA 分子であり、間接作用の主体となるのは、生体を構成する主成分である水分子となる。水分子は放射線によってイオン化、または励起され、ヒドロキシルラジカル（ $\cdot\text{OH}$ ）、水和電子、H ラジカル（ $\cdot\text{H}$ ）を生じ、さらに酸素分子と反応することで、一重項酸

素や過酸化水素を生じる。これらの ROS が DNA 分子を標的としてその構造を修飾する。X 線を照射した場合、哺乳類の細胞での DNA への障害は直接作用と間接作用は 1 : 2 程度であるとされる。直接・間接作用により DNA が損傷を受け、細胞死を生じる (図 2)。また、DNA 損傷に対して修復が開始されることもある。修復されない DNA 損傷が長期わたって残存した場合、将来的な悪性腫瘍の発生に寄与する。ROS は DNA 分子以外に、mRNA、たんぱく質、細胞膜などにも損傷を与える。

放射線による細胞障害は、放射線によって発生したラジカルによるものとされるため、生成したラジカルを取り除く物質は放射線防護効果を持つ。これらの物質をラジカルスカベンジャーと呼び、SH 基を持つ化合物が有名である。具体的には、グルタチオン、N-アセチル-L-システイン (NAC) などがある。放射線防護剤として米国食品医薬品局 (FDA) で承認されているアミフォスチンも、体内で脱リン酸化を受けて遊離 SH 基を生じることで効果を発揮する⁸。

2-3 ビタミン C の放射線防護効果

ビタミン C は強力な酸化還元能を持つため、ラジカルスカベンジャーとして作用し、ROS を除去することで、放射線防護効果があるとされる (図 3)。

山本らは、野生型マウスを用いて様々な放射線障害モデルを作成し、ビタミン C を投与することで、ビタミン C の放射線防護効果を示した。具体的には、まず、消化管障害モデルを、全身放射線照射後に骨髄移植を行って再現する方法にて作成した。全身照射 10Gy 以上を照射すると骨髄障害によってマウスは死亡するが、照射 1 日後に同系統のマウスより骨髄移植を施行すると、造血機能は回復し、マウスは生存する。さらに照射線量をあげると、造血機能は回復しても、消化管障害で死亡するようにな

るため、消化管障害を検証することができる。このモデルマウスに対して、照射前3日間、経口で150 mg/kg/dayのビタミンC水を予防摂取させることで、生存率が0%から42%に改善した⁹。さらに、消化管障害モデルを、マウス腹部にのみ限局して放射線を照射する方法にて作成した。このモデルでは腹部限局照射のため造血機能は維持される。このモデルマウスにおいても、ビタミンCを照射前後に摂取させることで生存率が改善した¹⁰。次にビタミンCが骨髄障害に効果があるかを検証した。消化管障害モデルと同様の経口摂取によるビタミンC投与では防護効果を認めなかったが、3 g/kgという大量ビタミンCを照射直前に腹腔内投与することで、8 Gy 全身照射後の生存率が0%から65%へと改善を認めた¹¹。超大量ビタミンC投与は末期がん患者への静脈投与にて安全性が検証されており¹²、3 g/kgは人への投与が可能な量である。

以上のように、マウスモデルにおいて、様々な投与方法によってビタミンCの放射線防護効果があることを示されている。しかしながら、野生型マウスは体内でビタミンCを合成しており、ビタミンCが常に体内に豊富である状態であるのに対して、ヒトは体内でビタミンCを合成できないという違いがあるため、野生型マウスモデルでヒトの放射線障害モデルを作成するには限界があると考えられた。

2-4 Senescence Marker Protein-30 (SMP-30) ノックアウトマウス

ヒト、サル、モルモットは、ビタミンC合成の最終段階の酵素であるL-グルコノラクトン酸化酵素 (GLO) に遺伝子変異があるために体内でビタミンCを合成することができず、外部からの摂取に依存している。これに対して、野生型マウスを含む多くの動物は、GLOに変異がないため体内でビタミンCを合成することができる。SMP-30はグルコノラクトナーゼ (GNL) という酵素で、ビタミンC合成経路の最後より2

番目の段階で、L-グルロン酸を L-グルノノ-γ-ラクトンに変換する酵素である。SMP-30 ノックアウトマウスは、この酵素が欠損しているため体内でビタミン C を合成できず、ビタミン C を摂取しないと壊血病を発症する¹³ (図 4)。

SMP-30 は加齢に伴い減少するタンパク質の一つとして、1991 年にラットの肝臓からプロテオーム解析により同定された¹⁴。分子量約 34kDa で、ホルモンの影響を受けずに雌雄差なく加齢で減少する。タンパク質として全身の臓器に発現しているが、特に肝臓、腎臓に多い。SMP-30 の機能は長らく不明であったが、ノックアウトマウスの解析により、上述の酵素であることが判明した。SMP-30 ノックアウトマウスは、ビタミン C を全く含まない餌で飼育すると、体重減少、コラーゲン線維の構築不全による骨密度の低下、大腿骨の骨折、壊血病性念珠（肋軟骨形成異常）などの壊血病の症状を認めた¹³。また、ごく少量のビタミン C を摂取させることで、壊血病にならない程度のビタミン C 不足状態が継続すると、野生型マウスより寿命が短くなり、老化が加速した¹⁵。このため、老化モデルマウスとして閉塞性肺疾患、白内障などの研究に用いられている^{16,17}。SMP-30 の遺伝子は X 染色体上に存在し、そのプロモーター領域には 8 つの転写因子結合部位がある¹⁸。その遺伝子発現は、抗酸化活動によって調節されており、酸化ストレスが減少すると発現が維持され、酸化ストレスが増加すると発現が低下する。また、ERK シグナル経路が関与していることが知られる¹⁹。

2-5 本研究での目的

本研究では、体内でビタミン C を合成できない SMP-30 ノックアウトマウスを用いて放射線照射実験を行うことで、よりヒトに近い放射線障害モデルを作成し、ビタミン C の放射線防護効果を明確にすることを目的とした。加えて、その作用機序を明ら

かにすることを目的とした。

3 実験方法

3-1 使用薬剤

ビタミン C (L-アスコルビン酸) は DSM ニュートリションジャパン (Tokyo, Japan)、もしくは和光純薬 (Osaka, Japan) のものを使用した。

3-2 マウスとその飼育方法

野生型マウスは、日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入した C57BL/6NCr、雄マウスを用いて実験を行った。SMP-30 ノックアウトマウス²⁰ は東京都立健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム 分子老化制御 石神昭人先生よりご厚意により供与していただいた。SMP-30 ノックアウトマウスは、ターゲティングベクターにエクソン 1 ~ 3 の領域を構築し、エクソン 3 を破壊したものを用い、129/Sv E14 embryonic stem (ES) 細胞へエレクトロポレーション法にて導入し、ES 細胞株を樹立させた後、C57BL/6NCr のバックグラウンドを持つマウス初期胚に注入してキメラマウスを作成し、野生型マウスと交配させて作成されたものを使用した²⁰。SPF 環境下で飼育を行い、水および飼料は自由に摂取させた。飼料はビタミン C を含まない CL-2 (CLEA, Tokyo, Japan) を用いた。飲料水は 0.1 M EDTA を含んだビタミン C 水で、十分群は 1.5 g/L、不足群は 0.0375 g/L の濃度に設定した¹⁷。野生型は 0.1 M EDTA を含んだ水とした。EDTA は金属イオンによるビタミン C の分解を阻害するために加えた。さらにビタミン C の分解を避けるために週 2 回の水交換を行った。SMP-30 ノッ

クアウトマウスは、生後 4 週齢に離乳とともに群分けを行い、雄マウスをビタミン C 水で 4 週間飼育した後、8 週齢で照射実験を行った。

全ての動物実験は防衛医科大学校で行い、防衛医科大学校の動物実験倫理委員会の許可（承認番号 17001）及び組換え DNA 実験安全委員会の許可（承認番号 2016-46）を得て行った。

3-3 X 線照射と骨髄移植

X 線照射装置は MBR-1503R（日立パワーソリューションズ、茨城）を使用した。照射条件は 150Kv、2.8mA の設定で、厚さ 2 mm のアルミニウム板のフィルターを用いて、X 線焦点-テーブル間距離 40 cm で、空間カーマ率 0.35 Gy/min にて、マウスを照射専用ケージに収めてターンテーブルを回転させながら、設定放射線量に達するまで照射を行った。骨髄障害モデルは 6 Gy、8 Gy を全身照射し、消化管障害モデルは 14 Gy を照射した。消化管障害モデルでは照射 1 日後に骨髄移植を行った。骨髄移植は同系統野生型の同週齢の雄マウスをドナーとした。ドナーマウスをペントバルビタール過量投与により安楽死させた後、両側下腿より大腿骨、下腿骨を RPMI（10%牛胎児血清を含む）の入ったシャーレに採取した。23 G の注射針を装着した 10 ml シリンジ（テルモ、東京）で RPMI にて骨髄を骨より洗い流し、細胞懸濁液にした。Red Blood Cell Lysing Buffer Hybri-Max（Sigma-Aldrich, MO, USA）にて赤血球を溶血させた後、凝集細胞塊などを取り除くため、100 μ m セルストレイナー（Becton Dickinson (BD), NJ, USA）に通し、移植する骨髄細胞とした。全ての操作を氷上にて行った。細胞数を数えて、レシピエントマウス 1 匹あたり骨髄細胞 1×10^7 個を $1 \times$ PBS 200 μ l に懸濁して輸注した。輸注は、マウスホルダーにて固定したマウスの尾静脈よりマイジェク

ター29 G (0.5 ml) (テルモ) にて行った。生存率の観察期間は骨髄障害では 28 日間、消化管障害では 14 日間とした。

3-4 組織中ビタミン C 濃度測定

1.5 g/L のビタミン C 水で飼育した 8 週齢マウスを用いて、照射前と全身照射 14 Gy を施行し照射 3 時間後の組織中ビタミン C 濃度を測定した。照射後はビタミンを含まない水を自由飲水させ、外部からビタミン C を摂取できないようにした。4 頭ずつで測定した。

組織採取は、まず、生理食塩水で 20 倍希釈したペントバルビタールを体重 20 g あたり 200 μ l、腹腔内投与し麻酔した後、0.2 M EDTA で内筒をぬらしたシリンジ 1 ml (テルモ) と 25 G の注射針 (テルモ) で心採血を行った。880 g、4 $^{\circ}$ C、15 分の遠心にて上清の血漿成分を分け、等量の 10%メタリン酸/1 mM EDTA 溶液を加えて混濁させた後、21000 g、4 $^{\circ}$ C、10 分の遠心し、上清をサンプルとして保存した。次に、マウスの下腿より大腿骨と下腿骨を採取し、骨髄を RPMI 1 ml で骨より洗い出し、遠心により上清の骨髄液と骨髄細胞に分離した。骨髄液はそのままサンプルとし、等量の 10%メタリン酸/1 mM EDTA 溶液を加えて混濁させた後、21000 g、4 $^{\circ}$ C、10 分の遠心し、上清をサンプルとして保存した。骨髄細胞は溶血させて細胞数を数えた後、細胞ペレットに 5%メタリン酸/1 mM EDTA 溶液 200 μ l を加えて、TAITEC VP-5S (タイテック、埼玉) にてソニケーションを行い、21000 g、4 $^{\circ}$ C、10 分の遠心し、上清をサンプルとして保存した。その他の臓器採取は、ペリスタポンプ (アトー、東京) に 23 G 翼状針 (テルモ) にサフィード延長チューブ (テルモ) をつないだものをセットし、23 G 翼状針を開胸したマウスの心尖部に刺し、右心耳をハサミでカットし、氷上で

冷却した PBS を用いて PBS 灌流を 5 分間行った。灌流後、解剖して各臓器を採取し、液体窒素で凍結してから保存した。小腸は幽門部遠位を断端として肛側へ組織長 2cm の部位を採取し、大腸は回盲部遠位を断端として肛側へ組織長 2cm の部位を採取した。測定時に、0.1 g に対して 5.4%メタリン酸/1 mM EDTA 溶液 1.4 ml を加えてホモジナイズし、21000 g、4 °C、10 分の遠心し、上清をサンプルとした。

測定は HPLC-ECD 法を用いて行い、ウォーターズ 2465 電気化学検出器（日本ウォーターズ、東京）によって検出し、Waters Empower2 software（日本ウォーターズ）にて解析した。ビタミン C の酸化型である dehydroascorbic acid (DHA) の濃度測定は、サンプル、終濃度 5%メタリン酸/1 mM EDTA を含んだ溶液に、35 mM トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩（TCEP）を終濃度 10%になるように加え、2 時間氷上に安置して、DHA をビタミン C に完全に還元させてから総ビタミン C 濃度を測定した。TCEP を添加しないで測定したビタミン C 濃度との差を DHA 濃度とした²¹。骨髓細胞中の濃度は細胞数にて補正し、 10^6 個あたりの濃度とした。

3-5 血算測定

SMP-30 ノックアウトマウスを用いて、ビタミン C 十分群（5 匹）、不足群（6 匹）を用いて行った。4 週齢より設定したビタミン C 水を飲水させて飼育し、9 週齢で放射線全身照射（4Gy、照射条件は上記と同様）を行った。照射前と照射 1.5 時間後に採血を行った。採血はマウスホルダーで固定して、尾静脈から行い、微量検査用ガラス毛細管 Drummond Scientific Hemato-Clad™ Mylar™-Wrapped Hematocrit Tubes（フナコシ、東京）で吸い取った。全自動血球計数装置 PCE-210N（エルマ、東京）にて血算を測定した。

3-6 組織学的評価のための検体採取

組織学的評価のための検体は、消化管障害モデルで照射後 30 日間の生存率を観察した後に生存したマウスの中から、野生型 5 頭、ビタミン C 十分群 5 頭、ビタミン C 不足群 2 頭より照射後 30 日目に採取した。腸管組織は回盲部より口側へ 2 cm の部位を断端として、さらに口側の組織長 3 cm の検体を採取した。肝臓は右葉の一部を採取した。腸管組織は 4 % パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて、肝臓は 10 % 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。その後パラフィン包埋し、4 μm に薄切しプレパラート上に標本切片を作成した。Hematoxylin-eosin (HE) 染色を行い観察した。

絨毛長の測定は、マウス 1 頭より作成したスライド 1 枚上の 4 か所の測定を各群 2 頭ずつより行い、のべ 8 か所の測定数値の比較を行った。測定にはオールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE、大阪) を用いた。

3-7 免疫染色

野生型マウスに 14Gy 全身照射を行い 1 時間後、3 時間後、72 時間後に採取した検体を使用した。パラフィン包埋された検体を 4 μm に薄切し、プレパラート上に標本切片を作成した。キシレンによる脱パラフィン処理を行い、エタノールによる親水化を行った。抗原の賦活化は、Dako Target Retrieval solution, pH6 (Agilent, CA, USA) を用いて 120 $^{\circ}\text{C}$ 、10 分間処理した。内因性ペルオキシダーゼ反応を阻害するために、5% H_2O_2 で 5 分間処理した。水で洗浄後、ブロックエース (DS ファーマバイオメディカル、大阪) で 5 分間処理して、ブロッキングを行った。1 次抗体として 1000 倍に希釈した anti-gamma H2A.X(phosphor S139) (abcam, MA, USA) 抗体を 4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩反

応させた。2次抗体は goat anti-rabbit 抗体 (Dako EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit (Agilent)) を用いて、室温で1時間反応させた後、DAB染色、マイアールヘマトキシリン染色を行った。ネガティブコントロールは放射線非照射の検体を用いた。

3-8 電子顕微鏡試料の作成

透過電子顕微鏡試料の作成は、マウス組織を1.0%グルタルアルデヒド・リン酸緩衝液にて前固定した後、1.0%酸化オスミウム・リン酸緩衝液にて後固定した。その後、エタノールにて脱水し、置換、樹脂の浸透、包埋および重合後、薄切し、電子染色をした。得られた標本を JEM-1400Plus (JEOL 日本電子株式会社、東京) にて観察した。

3-9 統計解析

データは平均値および標準誤差を算出し、Student's *t* test にて有意差検定を行った。P<0.05 で統計学的に有意差があると判定した。生存率は Log-rank 検定、Bonferroni 多重比較検定にて有意差検定を行った。解析ソフトは、フリーソフト EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター血液科)²² と GraphPad Prism8 (GraphPad Software, CA, USA) を用いた。

4 結果

マウス骨髄障害モデルにおけるビタミンCの影響

SMP-30 ノックアウトマウスは、飲水に含まれるビタミンC濃度を調節することで

摂取ビタミン C 量を調節し、ビタミン C 十分群は 1.5 g/L、不足群は 0.0375 g/L の濃度のビタミン C 水を与えて、4 週間の飼育後、8 週齢で 6 Gy、8 Gy の X 線全身照射を行い、30 日間の生存率の観察を行った。各群 6 頭ずつ行った結果を示す。野生型では、6 Gy の全身照射で全頭が生存し（生存率 100%）、8 Gy の全身照射を行うと全頭が死亡した（生存率 0%）。SMP-30 ノックアウトマウスでも野生型と同様の結果となり、ビタミン C 十分群、不足群ともに、6 Gy 全身照射後の生存率は 100%、8 Gy では 0%となり、各群に有意差を認めなかった（図 5a）。

生存率に有意差を認めなかったが、照射後の血球数を確認するため、末梢血の血算を測定した。白血球数は、照射前はビタミン C 十分群と不足群で変化がなかったが、4 Gy 全身照射 1.5 時間後では、不足群のほうが有意差をもって低値となった（図 6）。

マウス消化管障害モデルにおけるビタミン C の影響

消化管障害モデルでも骨髄障害モデル同様、SMP30 マウスをビタミン C 十分群（1.5 g/L の高濃度ビタミン C 水を飲水）とビタミン C 不足群（0.0375 g/L の低濃度ビタミン C 水を飲水）の 2 群に分け、さらに野生型群を加えた 3 群で実験を行った。骨髄障害モデルと同様、4 週齢より群分けを行い、8 週齢にて 14 Gy の X 線全身照射を行い、翌日に同系統のマウスより骨髄移植を行った。その後、ビタミン C 十分群、不足群ともに、0.0375 g/L の低濃度ビタミン C 水で飼育を行い 14 日間の生存率を観察した。両群ともに低濃度ビタミン C で飼育したのは、放射線被曝後に高濃度ビタミン C 水では飲水量が減少したため、被曝後の粘膜障害を高濃度ビタミン C 水が悪化させる可能性を考慮したためである。各群 4 匹ずつ、2 回施行した結果をまとめて示す。生存率は、野生型マウスで生存率 100%（8/8 頭）であったのに対して、ビタミン C 十分

群で 62.5% (5/8 頭)、不足群で 25% (2/8 頭) と、ビタミン C 不足群での明らかな低下を認めた(図 5b)。Log-rank 検定により 3 群間の生存率に有意差を認め ($p=0.00671$)、Bonferroni 多重比較検定により、その差に寄与しているのはビタミン C 不足群と野生型群の比較であった。

マウス消化管障害モデルにおける照射 30 日後の組織学的評価

消化管障害モデルにて、照射 30 日後に生存したマウスの検体で小腸 (回腸) の組織学的評価を行った。HE 染色では、ビタミン C 不足群に小腸上皮層の萎縮を認め (図 7a)、それぞれの上皮細胞も萎縮し円柱上皮が立方上皮化していた (図 7b)。一方で野生型、ビタミン C 十分群では認めなかった (図 7a,b)。小腸上皮層の萎縮を定量化するために絨毛長を測定したところ、ビタミン C 不足群で有意差をもって短縮していた (図 9)。また、ビタミン C 不足群では陰窩上皮の脱落部位に一致して好中球主体の炎症細胞浸潤を認めた (図 7c)。これは野生型ではほとんど認められず、十分群では一部に認められたが、不足群では広範囲にわたっていた。

電子顕微鏡による微細構造変化では、野生型と十分群で陰窩内での核分裂像を多く認めたのに対して、不足群では認めなかった (図 8a)。また不足群では間質の好中球浸潤も認められた (図 8a)。小腸絨毛の表層部では、不足群で上皮細胞の暗調化に加え、ミトコンドリアなどの細胞小器官や微絨毛に顕著な超微形態所見を認めた。具体的には、野生型と十分群では微絨毛の長さや密度に変化が見られなかったのに対して、不足群では微絨毛の分布密度の低下と長さの短縮がみられた (図 8b,c)。細胞内では不足群で、ミトコンドリア基質内に多数の dense deposit を認めた (図 8d)。肝臓では、不足群でミトコンドリアの淡明化と大小不同、クリステの不明瞭化を認めた (図 8e)。

また、不足群でペルオキシソームの増加とグリコーゲン顆粒の減少を認めた(図 8e)。

照射後の組織中ビタミン C 濃度

ビタミン C は放射線によって発生したラジカルを還元することで、ラジカルスカベンジャーとして機能すると考えられているため、1.5 g/L ビタミン C 水で飼育したマウスに放射線を照射して、照射後のビタミン C 濃度、酸化型ビタミン C である DHA 濃度の測定を行った。血漿中のビタミン C は非照射時と比較して、照射 3 時間後に 70.6%に減少した ($p=0.021$)。骨髄細胞中の濃度は 43.7%に減少した ($p=0.010$)。一方で、小腸、大腸中の濃度は照射 3 時間では非照射時と比較して全く変化しなかった(図 10 a)。また、DHA の増加を検証するために、ビタミン C と DHA の総和に対する DHA の比率を、照射前と照射後 3 時間後でそれぞれの組織ごとに比較したところ、小腸での DHA 比率が照射後に有意に増加した(図 10 b)。

γ -H2AX による放射線による DNA 損傷の検出

放射線は細胞の DNA 損傷を引き起こすことが知られ、放射線による DNA 損傷が腸管組織でどのように生じるのかを検討するために、野生型マウスを用いて、 γ -H2AX の免疫染色を行った。野生型マウスの小腸で非照射時、14Gy 全身照射 1 時間後、3 時間後、72 時間後の検体を用いた。腸管上皮細胞の核内の γ -H2AX は、非照射時には発現しないが、照射 1 時間後からすべての細胞で発現し、3 時間後にも発現し、72 時間後には弱く発現する細胞が残存した。これに対して、間質や粘膜下、漿膜側の細胞では、照射 1 時間後より照射 3 時間後に強く発現するようになり、72 時間後には発現しなくなった(図 11)。

5 考察

急性放射線症の病態解明、予防・治療法に関する研究は数多く行われており、野生型マウスを用いた動物モデルの報告が多くある。骨髄障害モデルに関しては、白血球と血小板が減少することによる感染と出血により 30 日以内に死亡するとされる²³⁻²⁵。本研究でも、骨髄障害モデルで野生型マウスを用いた予備実験にて、マウス個体死は 12~22 日目（中央値 17 日）に生じたため、観察期間を 30 日とした。またマウスの系統ごとに放射線感受性が異なり致死線量が異なること、線量依存的に症状が悪化することが知られているが、今回用いた C57B/6 マウスでは 7Gy から 8Gy の間で生存率が直線的に減少し、致死線量が 8Gy で、50%致死量 (LD₅₀) が 7.3Gy であるという報告がある²⁴。本研究での野生型マウスの生存率が 6Gy では 100%、8Gy では 0%であるという結果と合致しており、モデルとして使用できると判断した。骨髄障害モデルでは造血器の機能評価として血算測定が有用であるが、繰り返す採血は侵襲性が高く、経時的な血算測定は生存率への影響も無視できないため、生存率を検証する際には血算測定は施行しなかった。

消化管障害モデルとしては、放射線の全身照射後に同系統マウスより骨髄移植を行う方法、あるいは造血組織である骨組織への照射を避けて腹部のみに照射を行う *sub-total-body irradiation* を行う方法がある^{23,26-28}。いずれの方法でも急性放射線症における消化管障害による個体死は 10 日以内に生じるとされる^{23,25}。本研究の消化管障害モデルにおいては、放射線全身照射に骨髄移植を組み合わせる手法を採用した。野生型マウスでの予備実験にて、まず 12Gy の全身照射後に骨髄移植を行わないと生存率が 0%であったが、骨髄移植を行うと生存率が 100%となった。さらに照射線量をあ

げると、15Gy、16Gy では生存率は0%となり、消化管障害での死亡と判断した。個体死は照射後6～7日目（中央値6日）に生じ、既報告同様10日以内であったため、生存期間の観察は14日とした。SMP-30 ノックアウトマウスのビタミンC不足群では野生型より生存率が低下するのではないかと仮説を立てて実験したため、検証した線量値の中で野生型の生存率が100%となる最大線量値であった14Gyを基準にSMP-30 ノックアウトマウスでの実験を行った。

また、本研究では放射線照射にX線照射装置を用いた。放射線とは電離放射線を指すが、電離放射線には粒子線（ α 線、 β 線、陽子線、中性子線）と電磁波（ γ 線、X線）が存在する。放射線の動物実験を行う際には、実験用X線照射装置またはコバルト線源（ ^{60}Co ）による γ 線照射装置を行うことが多い。近年、放射性同位元素の安全上の問題よりX線発生装置による実験に移行しつつあるが、両者には違いがある。常用電圧式のX線発生装置は、コバルト線源による γ 線照射装置より生物学的効果は強いとされる。加えて吸収線量の最大値は常用電圧式のX線装置では被照射物の表面であるのに対して、コバルト線源による γ 線では表面より深度5mmであるとされる²⁵。以上より、X線とコバルト線源による γ 線による実験は単純に比較できないが、本研究ではX線照射装置を用いた。

ビタミンCによる放射線防護効果を示した報告はあるが、実験動物としてラットやマウスを用いており^{9,10,11,29,30}、これらは体内でビタミンCを合成できる動物である。ヒトは体内でビタミンCを合成できず、外部より摂取する。2015年版食事摂取基準（厚生労働省）では成人では1日推奨量が100mgとされている。マウスの肝臓における

1日のビタミンCの生合成量を275 mg/kgとする報告もあり³¹、ヒトの1日摂取推奨量を体重あたりの換算した2 mg/kgよりも多くのビタミンCをマウスは体内で産生していることになる。組織中濃度で見ても、マウスの臓器中のビタミンC濃度はヒトよりも高いことが知られている³²。つまり、マウスを用いた動物実験モデルでは、ヒトに比べてビタミンC過剰状態になっていると言える。今回用いたSMP-30ノックアウトマウスは、ビタミンC合成に関与する酵素であるGNLが欠損しているため、ビタミンCを外部摂取に依存している。本研究では、このマウスを用いることで、初めてビタミンC不足状態での放射線障害モデルを作成した。このモデルにより、ビタミンCを外部摂取に依存するヒトへの放射線の影響を、より正確に検証できるのではないかと考えた。また、ビタミンCの放射線防護効果の機序を明確にすることができるのではないかと考えた。

ビタミンC十分群のビタミンC水1.5 g/Lという濃度は、SMP-30ノックアウトマウスが4週間摂取すると野生型マウスと同等に組織中ビタミンC濃度が回復し、なおかつ酸味によってビタミンC水の経口摂取量が低下しない濃度として、0.0375 g/Lという濃度は、壊血病にならない最低限のビタミンC濃度として既報告に基づいて設定した¹⁷。この条件下で4週間飼育すると、ビタミンC不足群のビタミンC濃度は、野生型と比較して、小腸で14.5%、血漿中で0.4%にまで減少するとされる³³。このように、野生型群と、野生型群と同等の組織中ビタミンC濃度を保つビタミンC十分群、そしてビタミンC濃度が非常に低値となるビタミンC不足群を用いて放射線照射実験を行った。

消化管障害モデルでは、不足群での生存率が大きく低下したことから、ビタミンC

が不足していると被曝後の放射線障害が悪化するということが考えられた。

生存率に影響を及ぼす因子を探るため、照射後 30 日後の組織学評価を行った。まず、HE 染色、電子顕微鏡の所見のいずれにおいても、不足群で小腸上皮層の萎縮が著明であった。消化管症候群は、腸管上皮層の陰窩に存在する腸幹細胞が死ぬことによるとされる。つまり、放射線が腸幹細胞の DNA 損傷を引き起こし、がん抑制遺伝子である p53 誘導のアポトーシスが生じることに起因する³⁴。腸管上皮層が失われることで、栄養吸収や物理的バリアなどの上皮機能が失われ、吸収障害、出血、下痢に加えて、組織内への腸内細菌の侵入に伴って感染症や敗血症などの障害が引き起こされる。10~12Gy の被曝では被曝後数時間で p53 が仲介するアポトーシスにより陰窩の収縮が生じるが、これは生存細胞が爆発的に増殖することで一過性に陰窩の肥大化が生じ、腸管の再生が生じる。さらに高線量の被曝ではさらに広範囲にアポトーシスが生じることで再生反応が障害され、消化管障害による死亡となる³⁵という報告があり、このように線量依存的に症状が悪化することが知られる。以上より、腸管上皮層の萎縮の所見は、腸幹細胞の死滅、それに伴う腸管上皮細胞の増殖不良が関与することによる腸管上皮の再生不良であると考えた。不足群の HE 染色、電子顕微鏡所見にて認められた、小腸粘膜下の好中球を主体とした炎症細胞の浸潤は、陰窩上皮の放射線障害による壊死・消失後に、壊死細胞の処理の為に好中球が浸潤してきたと考えられた。もしくは、消化管障害の生存率に影響する因子として、腸管からの **bacterial translocation** による敗血症の関与を示した報告があるため³⁶、**bacterial translocation** による炎症を見ている可能性があるとも考えたが、粘膜バリアの破綻の重要な所見である基底膜の変化は観察しておらず、明言はできない。

電子顕微鏡による観察からは、不足群で、消化管と肝臓でのミトコンドリア障害を

認めた。放射線によるミトコンドリア障害があることは知られており、ラットによる腹部照射後の消化管障害の検討を行った報告にて、放射線照射後に、今回見られたようなミトコンドリアのクリステの不明瞭化を認めるとの報告もある²⁹。一般的に放射線による細胞死の直接の原因は DNA 二重鎖の損傷によるとされており、ミトコンドリア障害が細胞死、さらには個体死に関与するかどうかは不明である。しかしながら、ビタミン C 不足によって、放射線によるミトコンドリア障害が悪化する可能性が示唆された。しかしながら電子顕微鏡所見で組織の一部での形態学的変化を観察したのみであり、さらなる検証が必要である。さらに、肝臓ではグリコーゲン顆粒の減少、ペルオキシソームの増加の所見も認めた。肝臓のグリコーゲン顆粒の減少については、不足群で、粘膜障害に起因する栄養吸収障害が 30 日間続いた影響による可能性を考えた。一方で、SMP-30 はもともと肝臓に多く発現しているたんぱく質であり、今回の検討では、放射線障害による影響、ビタミン C 不足による影響、SMP-30 欠損による影響が考えなければならず、特にペルオキシソームの増加については判断が難しいと考えた。以上より、消化管障害モデルでの生存率の低下は腸管上皮の再生不良が主な原因と考えられ、今後、より被曝早期（数時間～数日）の検体の組織学評価を行い、ビタミン C 不足が、腸幹細胞のアポトーシスや上皮細胞増殖にどのような影響を与えるのかを観察する必要があると考えている。また、ビタミン C 不足状態下の SMP-30 ノックアウトマウスが野生型マウスと比較して腸管に変化があるという報告はないが、非照射時の腸管組織を評価することも今後の課題であると考えている。

マウスを用いた消化管障害モデルでは、生存率に加えて下痢の重症度をスコアリングして重症度を判定している報告もあり²⁸、本研究でも試みたが、下痢が生じることは確認できたが、そのスコアリングは困難であった。消化管モデルの作成にあたり、

照射後の体重測定、飲水量測定、飼料摂取量の測定を行ったが、いずれも照射後より低下し、照射後 5～6 日後に最も少なくなった際に個体死が生じる、もしくは回復するという経過であり、群間差は認めなかった。消化管症候群の症状は被曝線量によって悪化していくことが知られており、血便はより高線量被曝で生じるが、今回の線量では血便は観察されなかった。消化管障害モデルでは、生存率、下痢のスコアリングの他、陰窩の再生、吸収障害の指標として血中のシトルリン値などをエンドポイントとして設定している研究もあり^{25,37}、本研究でも今後の課題としたい。

消化管障害モデルでのビタミン C 十分群と野生型の生存率は、同程度の組織中ビタミン C 濃度となるため、同等の結果となることを予想していたが、結果は野生型より十分群の生存率の方が低下した。これは①14Gy 照射後のマウスは飲水量が低下すること、②十分群のマウスは照射後、0.0375 g/L のビタミン C 水を飲水させたこと、の 2 点から、十分なビタミン C を摂取できずに、照射後、野生型と同等のビタミン C 濃度が維持できなかつたためと考えた。一方で、十分群は不足群の治療モデルと考えることもできる。つまり、不足群に被曝前に高濃度ビタミン C 水を摂取させておくことで、生存率が改善したととらえることもできる。不足群と十分群の 2 群の生存率を Log-rank 検定で検定すると、p 値は 0.0625 であり有意差はつかなかったが、照射後、経口以外の投与方法によってビタミン C の組織中濃度を維持することができれば、予防・治療としても有効であることが示せる可能性がある。組織学的評価でも十分群の小腸絨毛の損傷は、野生型と同等で、不足群より回復が見られ、生存率の結果を裏付ける結果であった。

これらの消化管障害モデルの結果より、ヒトでも、何らかの事故で放射線被曝をして造血幹細胞移植を含む集学的治療を受けた場合、事前にビタミン C を十分摂取して

いる患者の方が、消化管障害が軽度となり救命できる可能性が高くなる、もしくは、悪性腫瘍に対する放射線療法において腹腔内照射をする場合において、ビタミンC摂取量が多く、腸管のビタミンC濃度が高い患者の方が、副作用が少ない可能性があると言えるのではないかと考えた。

消化管障害に対して、骨髄障害モデルでは、ビタミンC不足状態でも生存率に変化がなかった。これは生理的な濃度のビタミンCでは造血器に対する放射線防護効果が大きくはないことを示す。しかしながら、死亡までいたらない造血機能障害がビタミンC不足状態で悪化している可能性はあると考え、血算の推移を確認したところ、照射後1.5時間後の白血球数はビタミンC不足群の方が低値となっており、一過性の血球減少が、ビタミンC不足状態では悪化している可能性はある。今回は照射後1.5時間後の検体のみのデータなので、その後の血算の推移を検証する必要がある。一方で、骨髄障害にはビタミンC不足が影響しないとすれば、骨髄において生理的な濃度のビタミンCは放射線防護に寄与しておらず、骨髄と消化管でビタミンCによる放射線防護効果が異なる可能性もあることが示唆された。

放射線照射後のビタミンC濃度測定は、放射線照射によってラジカルスカベンジャーとして機能したビタミンCが消費される、もしくは酸化型であるDHAが増えるのではないかという仮説を立てて実験を行った。実験にはSMP-30ノックアウトマウスのビタミンC十分群を使用した。照射前の検体では、ビタミンCとDHAの濃度は組織ごとに異なり、それらの数値は既報告と同等の値であり³⁸、測定方法は妥当であると判断した。照射後3時間では、小腸、大腸におけるビタミンC濃度は照射前と比較

して全く変化しなかった。一方で血漿中、骨髄細胞中のビタミン C 濃度は照射により減少した。特に骨髄細胞での減少は顕著であった。ビタミン C と DHA の総和に対する DHA の比率は、照射前の時点で、血漿中に 7.7% と多く含まれるのに対して、小腸 2.5%、大腸 5.1%、骨髄細胞中には 6.8% と組織ごとに異なっていた。照射後 3 時間後には、小腸組織において DHA 比の増加を認めた。骨髄細胞でも DHA 比の増加を認めたが有意差はつかず、小腸以外の組織検体では DHA 比の増加という現象を認めなかったと判断した。以上より、放射線によって組織中のビタミン C の消費としてみられる場合（血漿、骨髄細胞）、または酸化型である DHA に変換される場合（小腸）があることが示された。放射線障害を受けやすい骨髄、小腸での変化を認めたことは、これらの臓器でのビタミン C が作用していることを示している可能性がある。消化管の中でも消化管障害の主体は細胞分裂がさかんな小腸であることが知られており²⁵、大腸ではなく小腸のみで DHA 比の上昇を認めたことは、放射線障害を受けやすい臓器である小腸でビタミン C がラジカルスカベンジャーとして作用して DHA となった現象をとらえられている可能性があると考えた。ビタミン C がラジカルスカベンジャーとして機能することを示す報告があり⁴⁰、ビタミン C の放射線障害に対する効果のメカニズムであることが考えられるが、詳細は今後の課題である。

ビタミン C の放射線防護の作用機序を明らかにするための別の方法を模索するため、野生型マウスの検体を用いて、 γ -H2AX の免疫染色を行った。 γ -H2AX は、DNA 二本鎖の損傷のマーカーとして知られる。ヒストン H2A の亜型である H2AX は、哺乳動物のクロマチンにおいて全体の 2-25% に含まれている。放射線等により DNA 二本鎖切断が誘導されると、Ataxia telangiectasia mutated (ATM) が活性化し、DNA 二本鎖切断部位を中心に近傍の H2AX の Ser139 をリン酸化する。同時に DNA 修復、細胞

周期のチェック機構、アポトーシス経路といったさらに下流の動きが起こっていくことが知られる³⁹。γ-H2AXは放射線障害の研究にしばしば使用されるが、その多くが培養細胞や末梢血中のリンパ球を用いて、照射線量依存的により核内に高頻度に染色されるようになることを示している。今回、このマーカーを14Gy照射後のマウス腸管組織にて染色したところ、細胞の種類ごとに発現の時間経過が異なっていた。文献的には細胞の放射線感受性によって発現が異なるという報告があり³⁹、腸管組織での発現もその現象を見ている可能性があると考えた。今後は、「ビタミンC投与によって発現のタイミングが遅くなる」「SMP-30ノックアウトマウスでより早期に発現する、もしくは長時間残存する」という現象が見られないかを検証し、ビタミンCの放射線防護の作用機序を明確にしたいと考えている。

6 まとめ

ビタミンC合成酵素(SMP-30)ノックアウトマウスを用いて、放射線照射実験を行ったところ、ビタミンC不足によって、放射線障害による消化管障害が悪化することが分かった。ビタミンCが不足状態では、消化管障害モデルでの生存率が悪化し、小腸上皮層の萎縮がより顕著であった。ヒトにおいても、ビタミンC不足で、消化管障害が悪化する可能性が示唆された。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、榎島誠教授（日本大学医学部 生体機能医学系生化学分野）に多大なるご指導、ご教授をいただきましたことに厚く御礼申し上げます。組織学的評価において、株式会社ピーシーエルジャパン 川越病理検査部 顧問 瀬野尾章先生にご指導いただきましたことをここに御礼申し上げます。

また、社会人大学院生として職務と学業を両立することを許可し、ご支援いただきました陸上自衛隊 部隊医学実験隊の皆様、心より感謝いたします。日常業務から研究にいたるまで様々な面でご指導・ご支援いただきました、日本大学医学部 生体機能医学系生化学分野の皆様、防衛医科大学校 防衛医学研究センター外傷研究部門の皆様、防衛医科大学校 免疫・微生物講座の皆様、防衛医科大学校 血液内科の皆様、心より御礼申し上げます。実験手技に関してご指導・ご支援いただきました、防衛医科大学校外傷部門研究技術員 佐伯孝美さまに心より感謝いたします。

本研究に用いた **SMP-30** ノックアウトマウスを提供していただきました東京都立健康長寿医療センター研究所 老化制御研究チーム 分子老化制御 石神昭人先生、近藤嘉高先生に深く御礼申し上げます。

最後に、研究する環境を整えてくれた夫 直樹、家族に感謝いたします。

図

図 1

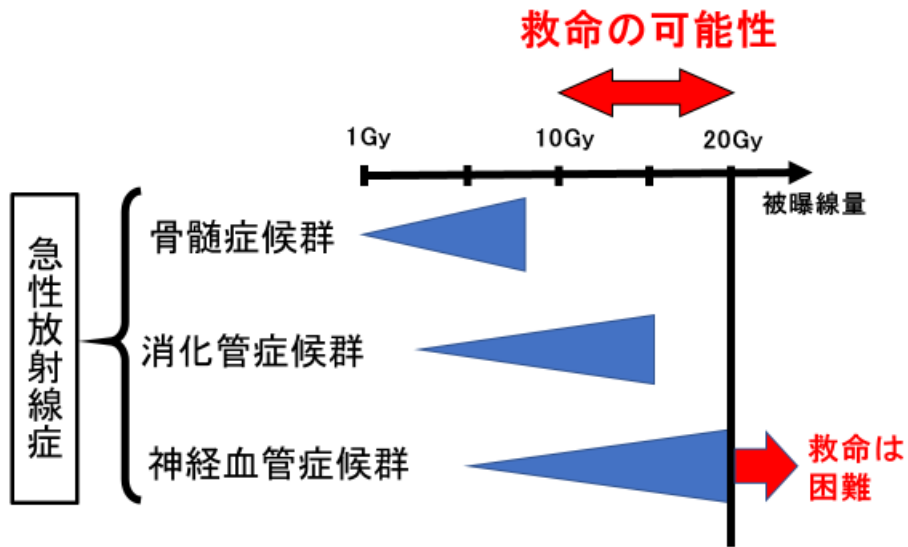
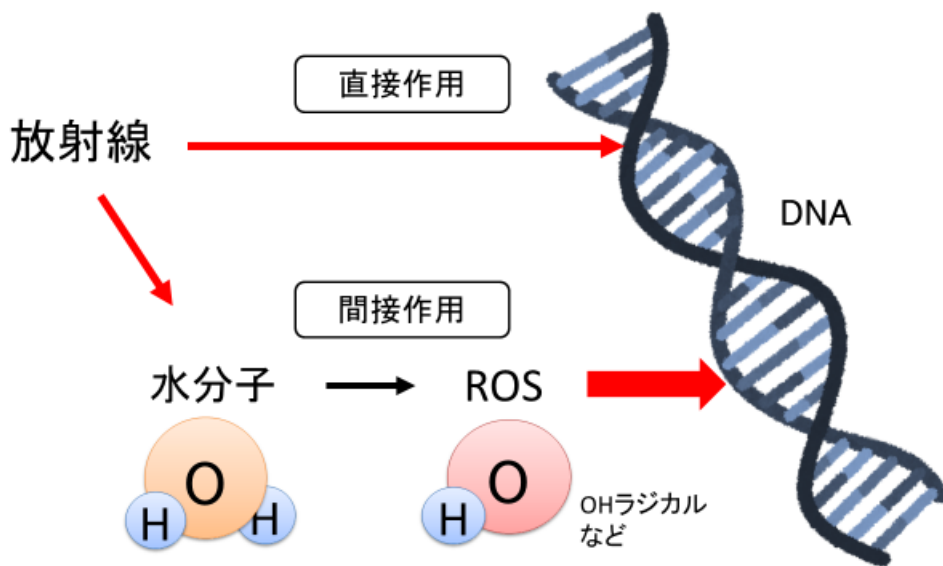
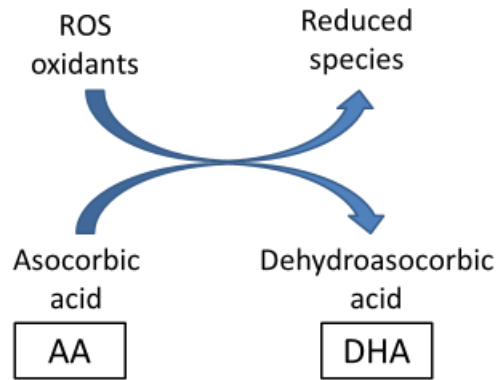


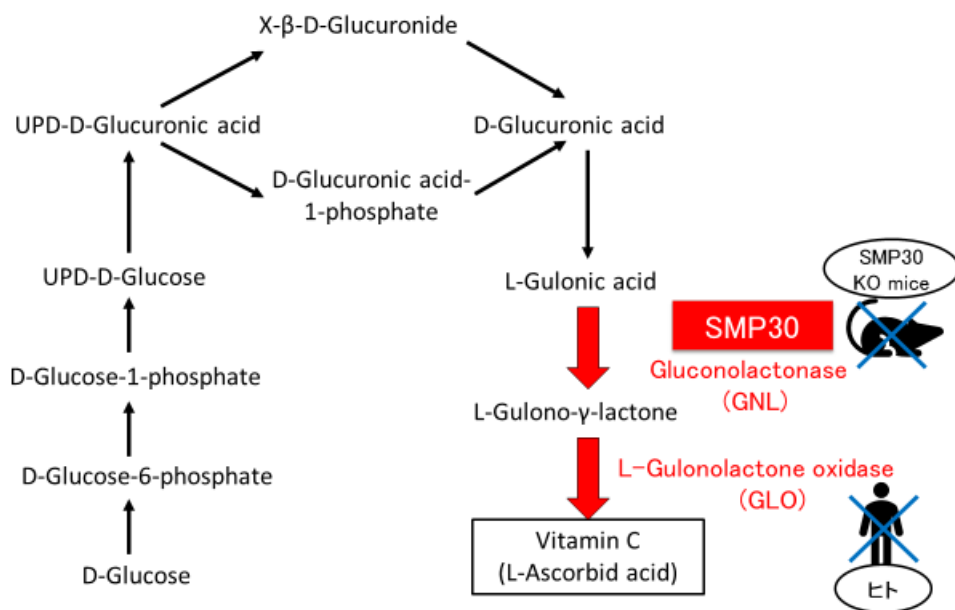
図 2



☒ 3

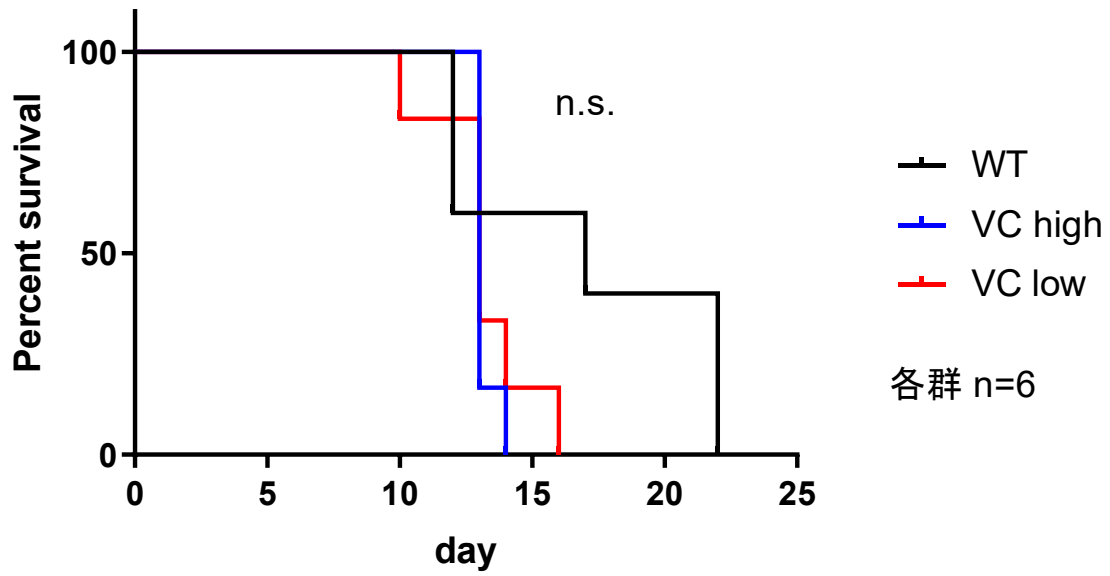


☒ 4



a

Total Body Irradiation (8Gy)



b

Total Body Irradiation (14Gy) +Bone Marrow Transplantation

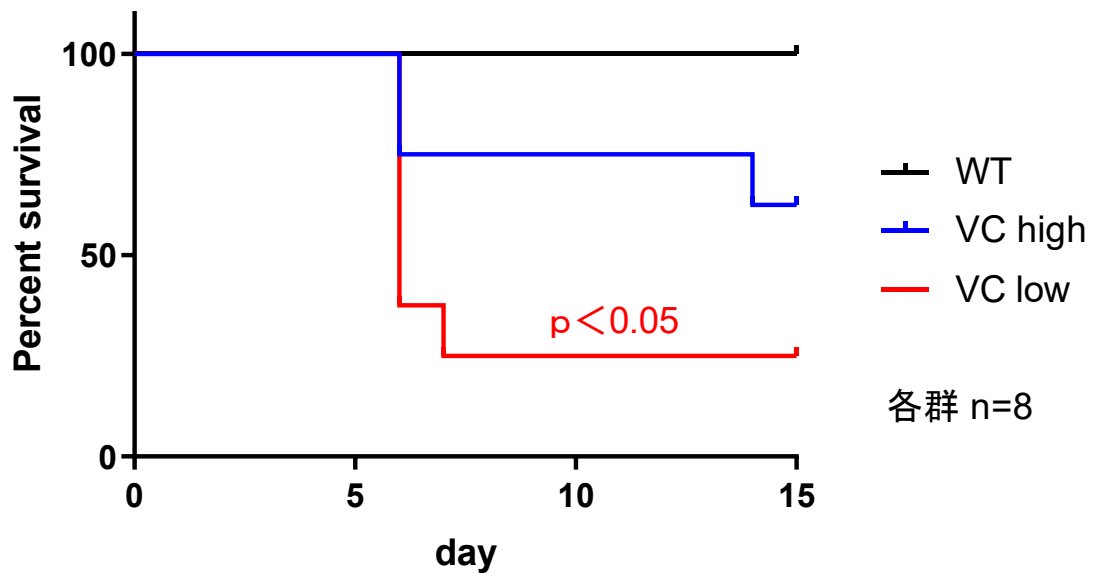


图 6

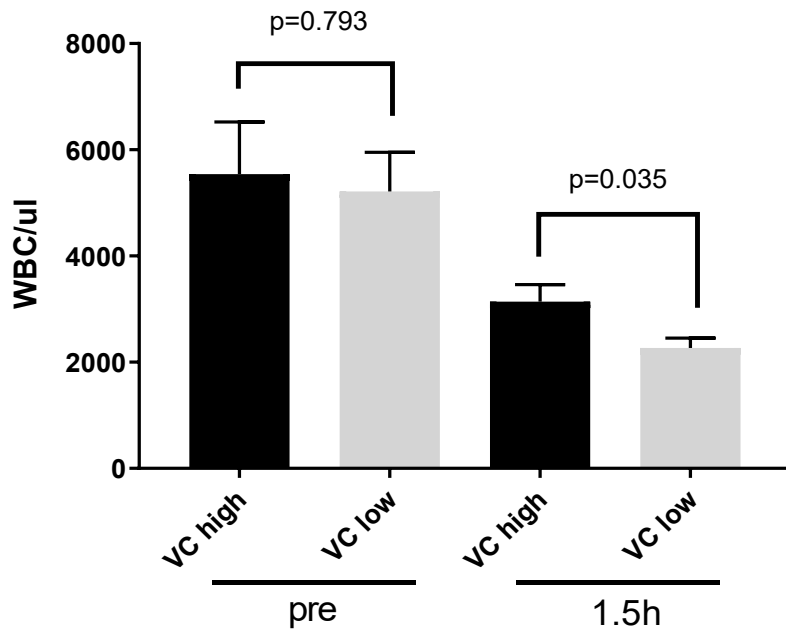
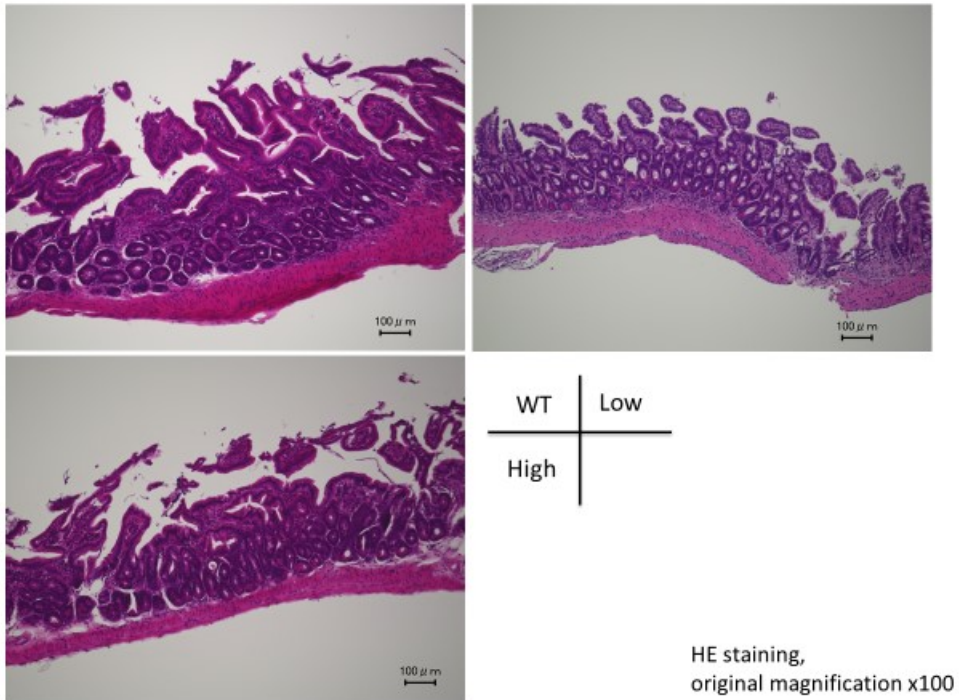
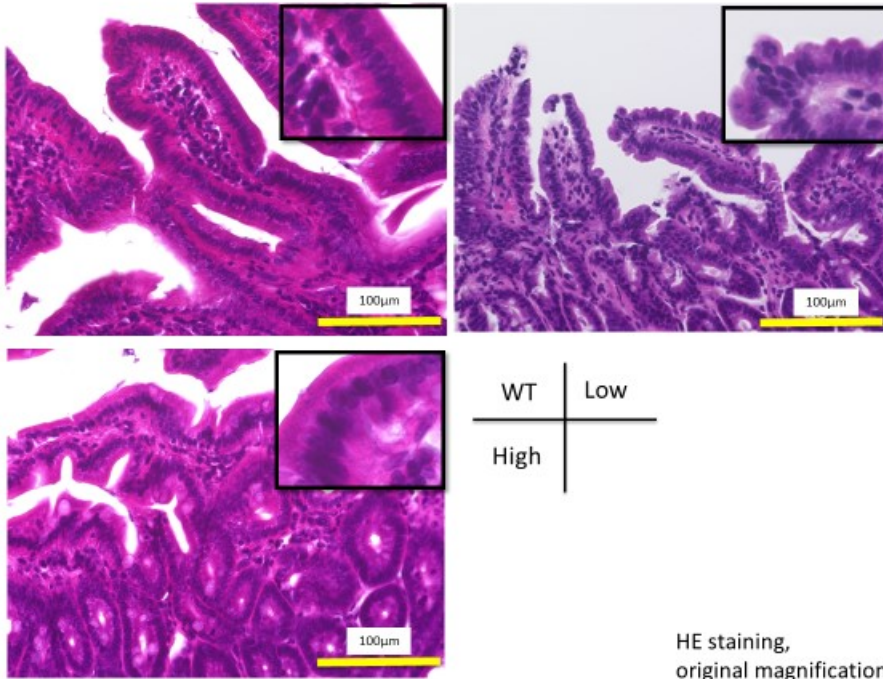


图 7

a



b



c

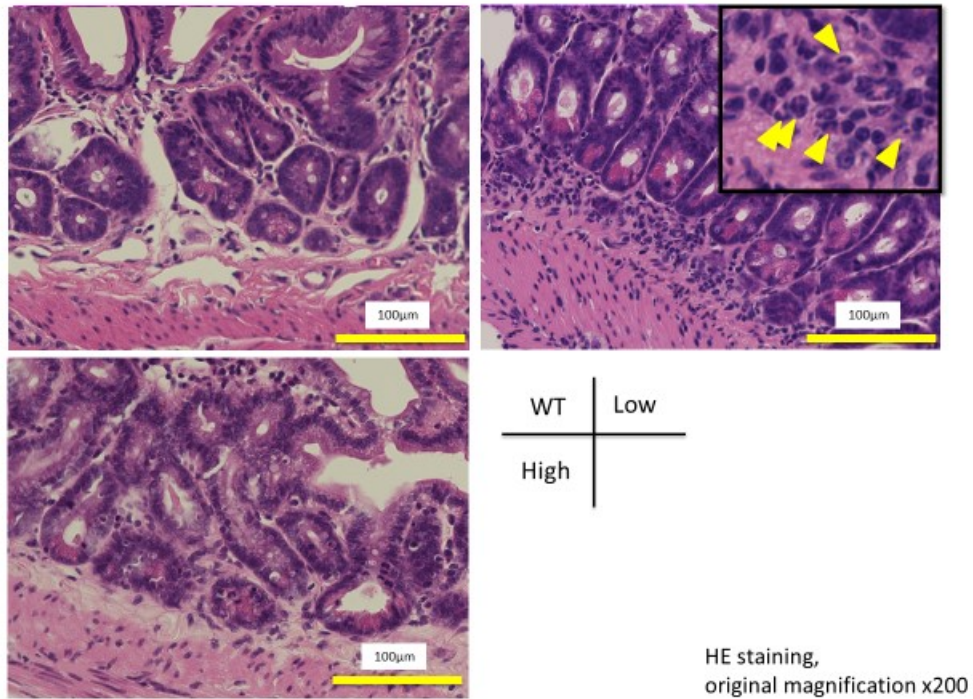
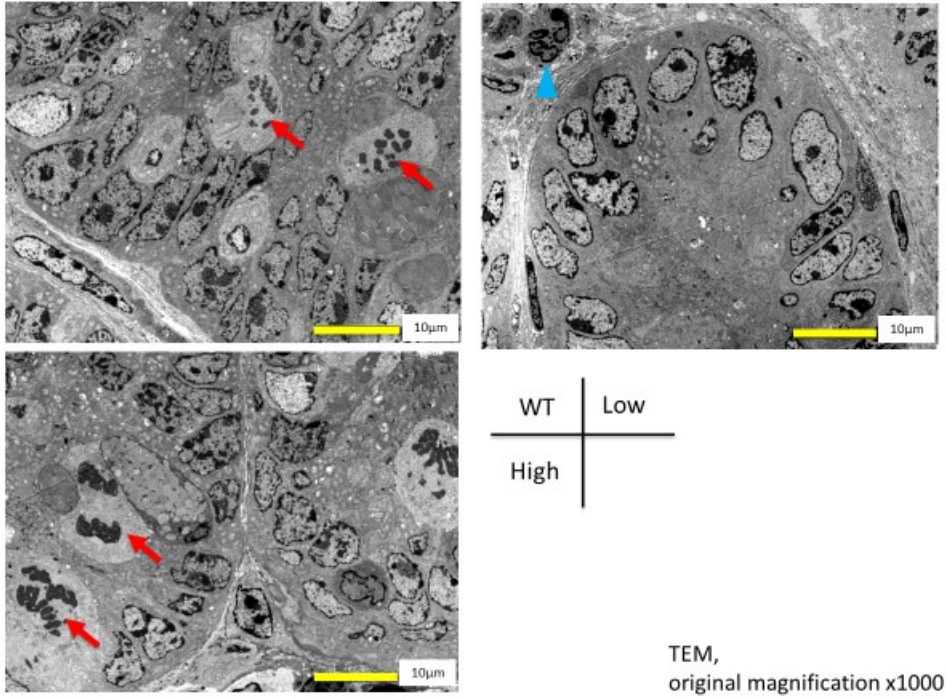
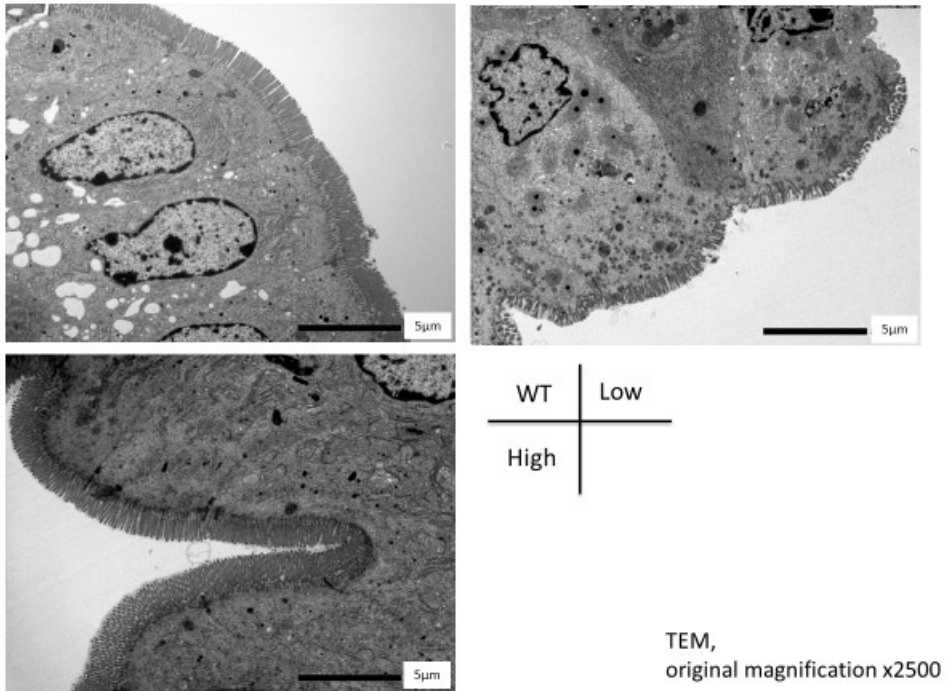


图 8

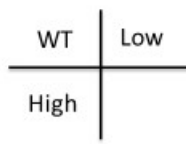
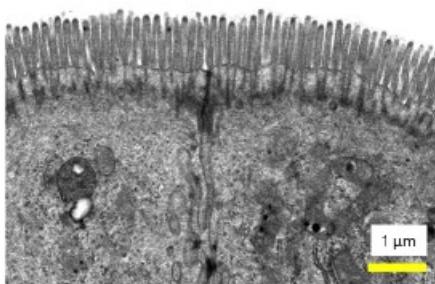
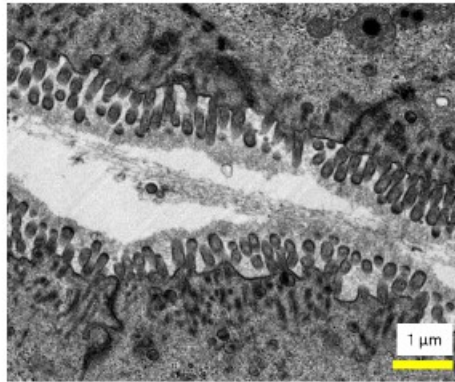
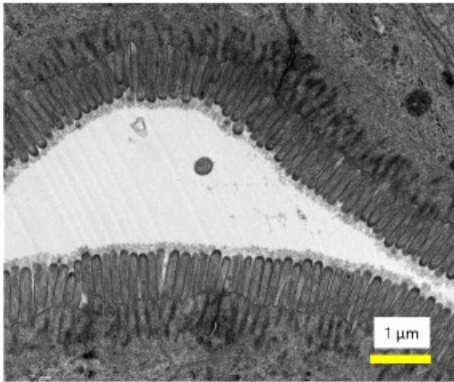
a



b

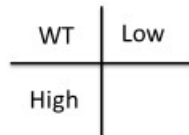
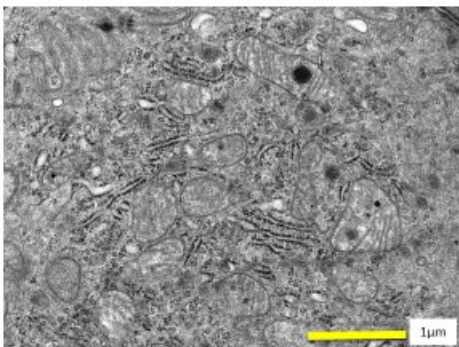
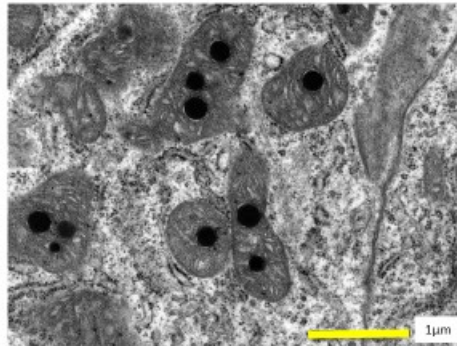
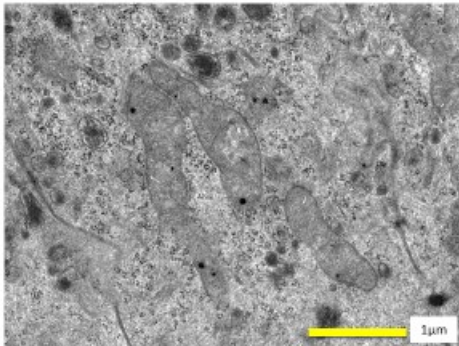


c



TEM,
original magnification x6000

d



TEM,
original magnification x10k

e

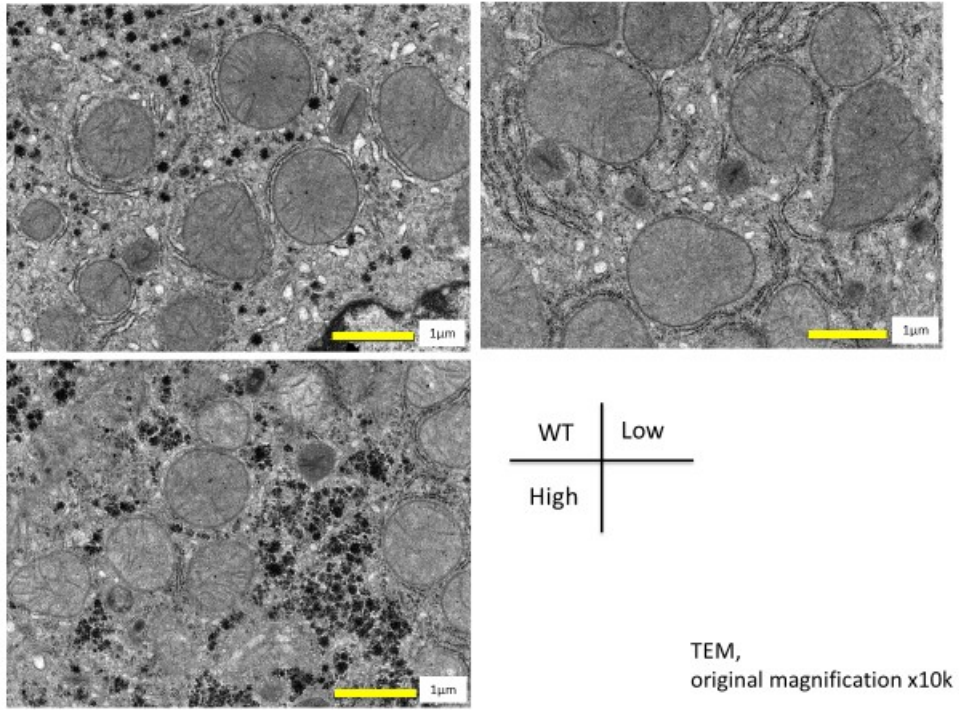


图 9

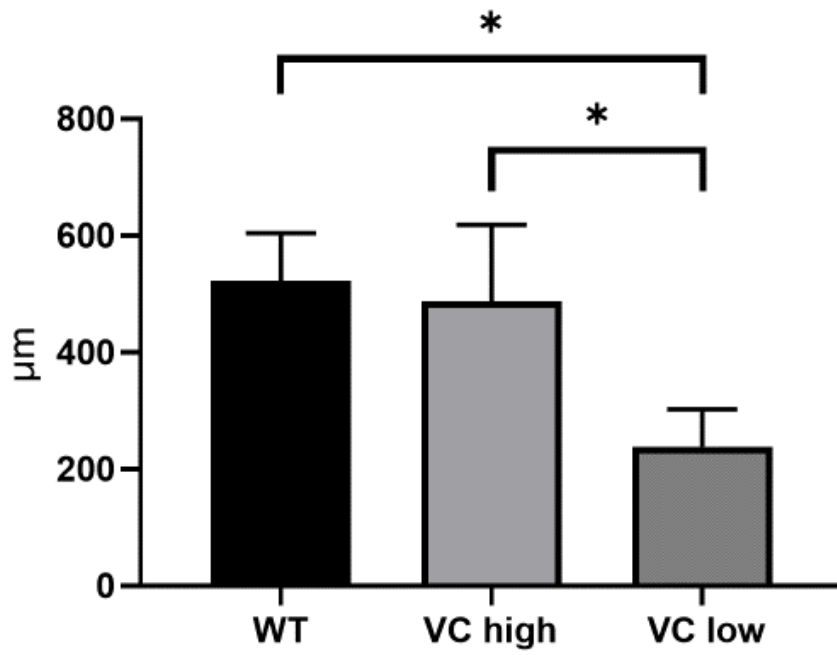
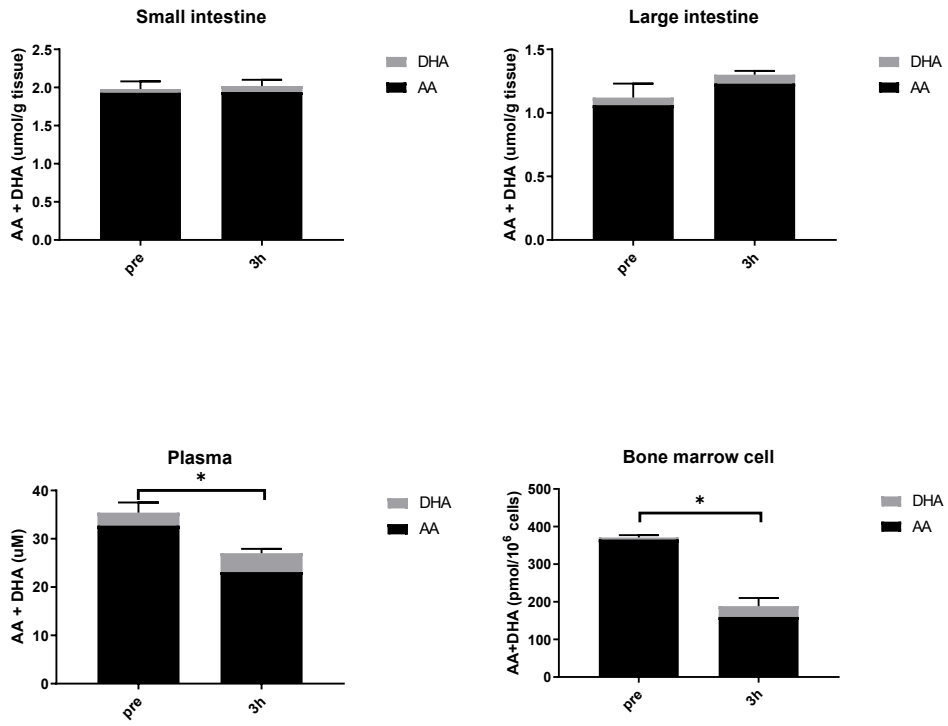


Figure 10 a



b

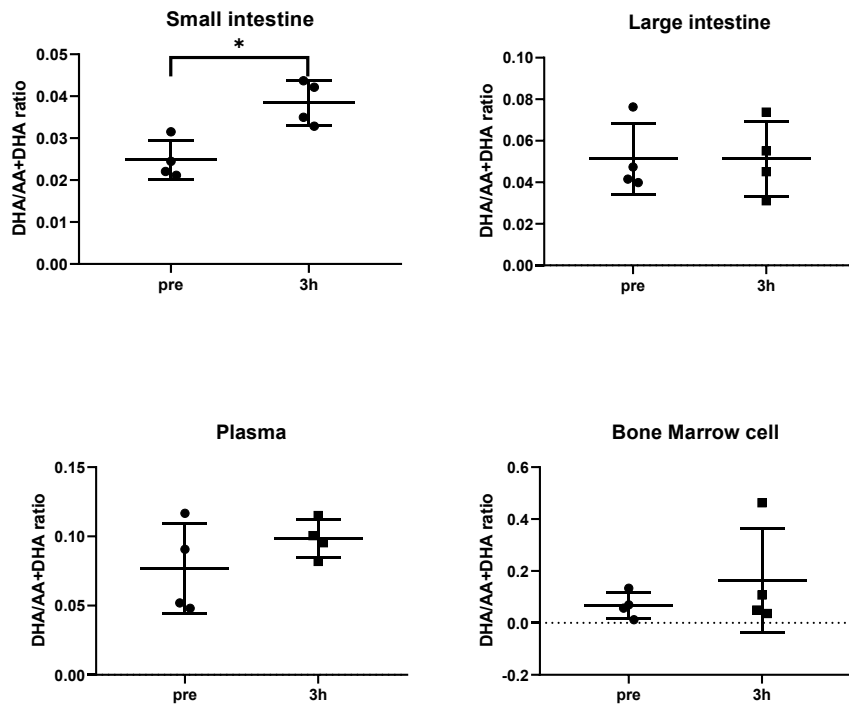
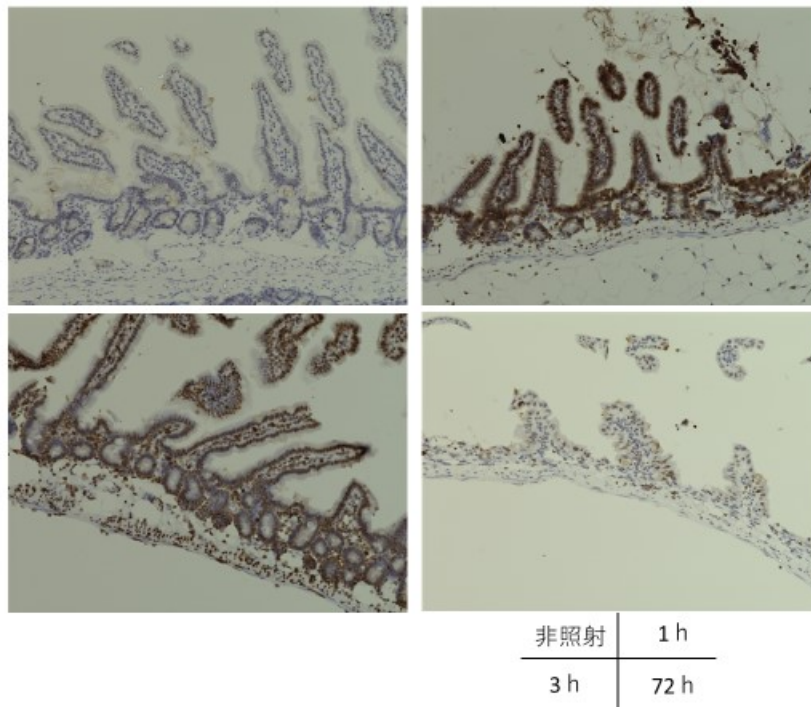


図 11



図説

図 1 人体に対する放射線被曝の影響

人体が被曝すると急性放射線症を発症する。

図 2 細胞に対する放射線の影響

放射線は直接作用と reactive oxygen species (ROS) を介した間接作用により、DNA に損傷を与える。

図 3 ビタミン C の作用機序

ビタミン C (ascorbic acid) はラジカルスカベンジャーとして作用し、ROS を除去する。

図 4 ビタミン C 合成経路と Senescence Marker Protein-30 (SMP-30)

SMP-30 はビタミン合成経路の最後から 2 番目の反応を触媒する酵素である。

図 5 SMP-30 ノックアウトマウスを用いた骨髄障害モデル(a)と消化管障害モデル(b)

の生存率 (WT ; 野生型群、VC high ; ビタミン C 十分群、VC low ; ビタミン C 不足群)

- a 全身照射 8Gy を行うと全群生存率は 0% であった。
- b 全身照射 14Gy と骨髄移植を行うと、ビタミン C 不足群で生存率が低下した。

図 6 放射線照射 1.5 時間後の白血球数の変化

(VC high ; ビタミン C 十分群、VC low ; ビタミン C 不足群)

ビタミン C 十分群 (5 匹)、不足群 (6 匹) を用いて行った。全身照射 4Gy、1.5 時間後の白血球数はビタミン C 不足群で低下した。

図 7 放射線照射後 30 日後の組織学的検討 (H.E 染色)

(WT ; 野生型群、High ; ビタミン C 十分群、Low ; ビタミン C 不足群)、

a 小腸上皮 (弱拡大)、b 小腸上皮 (強拡大)、c 小腸粘膜下への炎症細胞浸潤

- a ビタミン C 不足群で腸管上皮層の萎縮を認めた。
- b 腸管上皮細胞における個々の細胞の萎縮を示した。
- c ビタミン C 不足群で好中球を主体とした炎症細胞の浸潤を認めた。

図 8 放射線照射後 30 日後の組織学的検討 (電子顕微鏡所見)

(WT ; 野生型群、High ; ビタミン C 十分群、Low ; ビタミン C 不足群)、

a 陰窩内の細胞、b 小腸絨毛の表層部、c 小腸上皮細胞の微絨毛の拡大、d 小腸上皮細胞内のミトコンドリア、e 肝細胞

- a 陰窩の細胞の核分裂像 (赤矢印)、浸潤する好中球 (青矢頭) を示した。
ビタミン C 不足群では核分裂像をほとんど認めず、好中球の浸潤を認めた。
- b ビタミン C 不足群で上皮細胞の暗調化に加え、ミトコンドリアと微絨毛に顕著な超微形態所見を認めた。

- c ビタミン C 不足群で微絨毛の分布密度の低下と長さの短縮がみられた。
- d ビタミン C 不足群でミトコンドリア基質内に **dense deposit** を認めた。
- e ビタミン C 不足群で、ミトコンドリアの淡明化と大小不同、クリステの不
明瞭化、ペルオキシソームの増加とグリコーゲン顆粒の減少を認めた

図 9 絨毛長の比較

(WT ; 野生型群、VC high ; ビタミン C 十分群、VC low ; ビタミン C 不足群)

各群 2 匹からのべ 8 か所の測定を行った。ビタミン C 不足群で絨毛長の短縮を認めた。

図 10 放射線照射後のビタミン C 濃度の変化

組織ごとのビタミン C 濃度 (AA) と酸化型であるデヒドロアスコルビン酸 (DHA) 濃度を示す。(AA ; 黒、DHA ; グレー) 照射前、照射 3 時間後の各ポイント 4 匹ずつ測定した。

- a AA と DHA の総和値の照射前と照射 3 時間後の変化を示す。
- b AA と DHA の総和に対する DHA の比率の照射前と照射 3 時間後の変化を示す。

図 11 野生型マウスにおける放射線照射後の小腸上皮の免疫染色 (γ -H2AX)

腸管上皮細胞の核内の γ -H2AX は、非照射時には発現しないが、照射 1 時間後からすべての細胞で発現し、3 時間後にも発現し、72 時間後には弱く発現する細胞が残存した。

引用文献

1. UpToDate (<https://www.uptodate.com/>) Biology and clinical features of radiation injury in adults, Nicholas Dainiak, Last updated: Mar 31, 2017.
2. 防衛医学 防衛医学振興会出版 2007年3月1日刊行
3. Koenig, K. L. *et al.* Medical treatment of radiological casualties : current concepts. *Ann. Emerg. Med.* **45**, 643–652 (2005).
4. Singh, V. K. *et al.* Expert opinion on therapeutic patents medical countermeasures for unwanted CBRN exposures : part II radiological and nuclear threats with review of recent countermeasure patents nuclear threats with review of recent countermeasure patents. *Expert Opin. Ther. Pat.* **26**, 1399–1408 (2016).
5. Tanaka, S.-I. Summary of the JCO criticality accident in Tokai-mura and a dose assessment. *J. Radiat. Res.* **42**, 1–9 (2001).
6. Ishii, T. *et al.* Brief note and evaluation of acute-radiation syndrome and treatment of a Tokai-mura criticality accident patient. *J. Radiat. Res.* **42**, 167–182 (2001).
7. Andreyev, J. Gastrointestinal symptoms after pelvic radiotherapy: a new understanding to improve management of symptomatic patients. *Lancet. Oncol.* **8**, 1007–1017 (2007).
8. Koukourakis, M. I. Radiation damage and radioprotectants: New concepts in the era of molecular medicine. *Br. J. Radiol.* **85**, 313–330 (2012).
9. Yamamoto, T. *et al.* Pretreatment with ascorbic acid prevents lethal gastrointestinal syndrome in mice receiving a massive amount of radiation. *J. Radiat. Res.* **51**, 145–156 (2010).
10. Ito, Y. *et al.* A combination of pre- and post-exposure ascorbic acid rescues mice from

- radiation-induced lethal gastrointestinal damage. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 19618–19635 (2013).
11. Sato, T. *et al.* Treatment of irradiated mice with high-dose ascorbic acid reduced lethality. *PLoS One* **10**, 1–15 (2015).
 12. Stephenson, C. *et al.* Phase I clinical trial to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of high-dose intravenous ascorbic acid in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **72**, 139–146 (2013).
 13. Kondo, Y. *et al.* Senescence marker protein 30 functions as gluconolactonase in L-ascorbic acid biosynthesis, and its knockout mice are prone to scurvy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 5723–5728 (2006).
 14. Fujita, T. *et al.* Purification of senescence marker protein-30 (SMP30) and its androgen-independent decrease with age in the rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.* **1116**, 122–128 (1992).
 15. Ishigami, A. *et al.* SMP30 deficiency in mice causes an accumulation of neutral lipids and phospholipids in the liver and shortens the life span. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315**, 575–580 (2004).
 16. Koike, K. *et al.* Complete lack of vitamin C intake generates pulmonary emphysema in senescence marker protein-30 knockout mice. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **298**, 784–792 (2010).
 17. Ishikawa, Y. *et al.* Effect of vitamin C depletion on UVR-B induced cataract in SMP30/GNL knockout mice. *Exp. Eye Res.* **94**, 85–89 (2012).
 18. Supakar, P. *et al.* Identification of novel sequence-specific nuclear factors interacting

- with mouse Senescence Marker Protein-30 gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **272**, 436–440 (2000).
19. Jung, K. *et al.* . The redox-sensitive DNA binding sites responsible for age-related downregulation of SMP30 by ERK pathway and reversal by calorie restriction. *Antioxid. Redox Signal.* **8**, 671–80 (2006).
 20. Ishigami, A. *et al.* Senescence marker protein-30 knockout mouse liver is highly susceptible to tumor necrosis factor-alpha- and Fas-mediated apoptosis. *Am. J. Pathol.* **161**, 1273–1281 (2002).
 21. Yasunori, S. *et al.* Determination of dehydroascorbic acid in mouse tissues and plasma by using tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride as reductant in metaphosphoric acid/ethylenediaminetetraacetic acid solution. *Biol. Pharm. Bull.* **33**, 364–369 (2013).
 22. Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* **48**, 452–458 (2013).
 23. Kirsch, D. G. *et al.* P53 controls radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice independent of apoptosis. *Science* **327**, 593-596 (2010).
 24. Brown, S. L. *et al.* Antioxidant diet supplementation starting 24 hours after exposure reduces radiation lethality. *Radiat. Res.* **173**, 462–468 (2010).
 25. Williams, J. P. *et al.* Animal models for medical countermeasures to radiation exposure. *Radiat. Res.* **173**, 557–578 (2010).
 26. Hu, B. *et al.* The DNA-sensing AIM2 inflammasome controls radiation-induced cell death and tissue injury. *Science* **354**, 765–768 (2016).
 27. Huang, E. *et al.* Aminoguanidine alleviates radiation-induced small-bowel damage

- through its antioxidant effect. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **74**, 237-244 (2009).
28. Takemura, N. *et al.* Blockade of TLR3 protects mice from lethal radiation-induced gastrointestinal syndrome. *Nat. Commun.* **5**, 3492-3507 (2014).
 29. Kanter, M. *et al.* Vitamin C protects against ionizing radiation damage to goblet cells of the ileum in rats. *Acta Histochem.* **110**, 481–490 (2008).
 30. Okunieff, P. Interactions between ascorbic acid and the radiation of bone marrow, skin, and tumor. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 1281–1283 (1991).
 31. Chatterjee, I. B. Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science* **182**, 1271–1272 (1973).
 32. Padayatty, S. J. & Levine, M. Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral Dis.* **22**, 463–493 (2016).
 33. Iwama, M. *et al.* Time course of vitamin C distribution and absorption after oral administration in SMP30/GNL knockout mice. *Nutrition* **27**, 471–478 (2011).
 34. Qiu, W. *et al.* PUMA regulates intestinal progenitor cell radiosensitivity and gastrointestinal syndrome. *Cell Stem Cell* **2**, 576–583 (2008).
 35. Metcalfe, C. *et al.* Lgr5⁺ stem cells are indispensable for radiation-induced intestinal regeneration. *Cell Stem Cell* **14**, 149–159 (2014).
 36. Suzuki, F. *et al.* Role of M2b macrophages in the acceleration of bacterial translocation and subsequent sepsis in mice exposed to whole body [¹³⁷Cs] gamma-irradiation. *J. Immunol.* **189**, 296–303 (2012).
 37. Bujold, K. *et al.* Citrulline as a biomarker for gastrointestinal-acute radiation syndrome: Species differences and experimental condition effects. *Radiat. Res.* **186**,

- 71–78 (2016).
38. Kondo, Y. *et al.* Potato chip intake increases ascorbic acid levels and decreases reactive oxygen species in SMP30/GNL knockout mouse tissues. *J. Agric. Food Chem.* **62**, 9286–9295 (2014).
 39. Sak, A. *et al.* Use of H2AX and Other Biomarkers of Double-Strand Breaks During Radiotherapy. *Semin. Radiat. Oncol.* **20**, 223–231 (2010).
 40. Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radic Biol Med.* **122**, 116-129 (2018).

研究業績

嗟峨 玲奈

I	発表	①一般発表	6	
		②特別発表	1	
II	論文	①原著論文	5	(共 5)
		②症例報告	1	(共 1)
		③総説	なし	
III	著書		なし	

以上

I 発表

① 一般発表

1. 渡邊純一、佐藤謙、堀内俊克、加藤章一郎、嗟峨玲奈、前川隆彰、山村武史、小林彩香、大澤有紀子、小林真一、木村文彦. CBL and MEFV mutations can predict tumor reduction with glucocorticoid in CMML patients. 第78回日本血液学会学術集会, 横浜, 2016年10月
2. 岡田陽介、山村武史、和泉拓野、長尾茂輝、高野昂佑、寺本昌弘、田地規朗、河村俊邦、堀内俊克、加藤章一郎、嗟峨玲奈、前川隆彰、渡邊純一、小林彩香、大澤有紀子、小林真一、佐藤謙、木村文彦. Translocation t(8;14) can be a prognostic factor among patients with multiple myeloma in the R-ISS II. 第78回日本血液学会学術集会, 横浜, 2016年10月

3. 田地規朗、前川隆彰、河村俊邦、堀内俊克、加藤章一郎、嵯峨玲奈、山村武史、渡邊純一、小林彩香、大澤有紀子、小林真一、佐藤謙、木村文彦. Delayed onset tumor lysis syndrome after initial pomalidomide treatment in multiple myeloma. 第78回日本血液学会学術集会, 横浜, 2016年10月
4. 高野昂佑、加藤章一郎、堀内俊克、前川隆彰、嵯峨玲奈、山村武史、渡邊純一、小林彩香、大澤有紀子、小林真一、佐藤謙、木村文彦. Successful treatment with CHOEP and IFRT for ALK-negative anaplastic large-cell lymphoma of bone. 第78回日本血液学会学術集会, 横浜, 2016年10月
5. 前川隆彰、和泉拓野、長尾茂輝、高野昂佑、岡田陽介、寺本昌弘、田地規朗、河村俊邦、堀内俊克、加藤章一郎、嵯峨玲奈、山村武史、渡邊純一、小林彩香、大澤有紀子、小林真一、佐藤謙、木村文彦. MAIT cells in peripheral blood significantly decrease in ITP patients depending on their severity. 第78回日本血液学会学術集会, 横浜, 2016年10月
6. 前川隆彰、大澤有紀子、和泉拓野、長尾茂輝、高野昂佑、岡田陽介、田地規朗、寺本昌弘、河村俊邦、堀内俊克、嵯峨玲奈、加藤章一郎、山村武史、渡邊純一、小林彩香、小林真一、佐藤謙、橋本倫拓、鈴伸也、木村文彦. MPL activation directly induces fibrocyte differentiation to cause myelofibrosis. 第79回日本血液学会学術集会, 東京, 2017年11月

②特別発表

嵯峨玲奈、山本哲生、山本泰輔. ビタミンC合成酵素 (SMP-30) ノックアウトマウスを用いた放射線障害の研究. 第17回医学実験隊・防衛医科大学校 研究交流会, 東京, 2018年7月

II 論文

① 原著論文

1. 櫻井健一, 藤崎滋, 窪田仁美, 原由起子, 鈴木周平, 安達慶太, 富田涼一, 榎本克久, 平野智寛, 嵯峨玲奈, 槇島誠. Letrozol が長期に奏効している超高齢者局所進行乳癌症例治療経過中の Indoleamine 2,3-Dioxygenase の発現について. 癌と化学療法. **44**, 892–895 (2017).
2. 櫻井健一, 藤崎滋, 窪田仁美, 原由起子, 鈴木周平, 安達慶太, 富田涼一, 榎本克久, 平野智寛, 嵯峨玲奈, 槇島誠. 乳癌担癌状態で同一臨床病期における年齢別 Indoleamine 2,3-Dioxygenase の発現状態の検討. 癌と化学療法. **44**, 886–888 (2017).
3. 窪田仁美, 櫻井健一, 藤崎滋, 原由起子, 鈴木周平, 安達慶太, 富田涼一, 榎本克久, 平野智寛, 嵯峨玲奈, 槇島誠. 局所進行乳癌における Mohs ペースト使用時の Indoleamine 2,3-Dioxygenase 発現の変化について. 癌と化学療法. **44**, 915–917 (2017).
4. 後藤洋伯, 櫻井健一, 藤崎滋, 窪田仁美, 原由起子, 鈴木周平, 安達慶太, 富田涼一, 榎本克久, 平野智寛, 嵯峨玲奈, 槇島誠. 炎症性乳癌型再発における治療経過中の IAP の変化について. 癌と化学療法. **44**, 909–911 (2017).
5. Maekawa, T., Osawa, Y., Izumi, T., Nagao, S., Takano, K., Okada, Y., Tachi, N., Teramoto, M., Kawamura, T., Horiuchi, T., Saga, R., Kato, S., Yamamura, T., Watanabe, J., Kobayashi, A., Kobayashi, S., Sato, K., Hashimoto, M., Suzu, S., Kimura, F. Myeloproliferative leukemia protein activation directly induces fibrocyte differentiation to cause myelofibrosis. *Leukemia*. **31**, 2709–2716 (2017).

②症例報告

1. Okada, Y., Sato, K., Kobayashi, S., Nagao, S., Takano, K., Teramoto, M., Tachi, N., Kawamura, T., Horiuchi, T., Kato, S., Saga, R., Maekawa, T., Yamamura, T., Watanabe, J., Kobayashi, A., Kimura, F. Sudden blast phase in chronic myeloid leukemia developed during nilotinib therapy after major molecular response was achieved. *Internal Journal of Hematology*. **107**, 495–497 (2018).

③総説

なし

III 著書

該当なし