

摂餌制限を施した動物における  
骨髄細胞反応の解析

高松 一彦

博士論文

摂餌制限を施した動物における骨髄細胞反応の解析

高松 一彦

甲南大学大学院 フロンティアサイエンス研究科

2015年3月

指導教官

西方 敬人 教授

甲南大学大学院 フロンティアサイエンス研究科

# 目次

第1章 要旨	5
第2章 諸言	6
第3章 背景	
1. 骨髄の機能および構造	8
2. 薬剤による骨髄抑制	8
3. 低栄養状態による骨髄抑制研究の現状	9
4. 骨髄抑制を検出する方法	10
5. 細胞死の様式	11
第4章 研究方針の概要	13
第5章 結果	
1. ラットにおける骨髄抑制のための摂餌制限条件の設定	14
2. イヌにおける骨髄抑制のための摂餌制限条件の設定	18
3. Colony-Forming Units assay (CFU assay) 法の確立	22
4. 摂餌制限を施したラット由来骨髄細胞の特殊検査	35
5. 摂餌制限を施したイヌ由来骨髄細胞の特殊検査	39
6. 摂餌制限動物由来骨髄および低栄養条件下培養細胞における遺伝子発現変化	42
第6章 考察	
1. ラットにおける骨髄抑制のための摂餌制限条件の設定	57
2. イヌにおける骨髄抑制のための摂餌制限条件の設定	58
3. CFU assay 法の確立	59
4. 摂餌制限を施したラット由来骨髄細胞の特殊検査	61
5. 摂餌制限を施したイヌ由来骨髄細胞の特殊検査	63
6. 摂餌制限動物由来骨髄および低栄養条件下培養細胞における遺伝子発現変化	65
第7章 まとめと今後の展望	68
第8章 材料と方法	
1. ラットにおける骨髄抑制のための摂餌制限条件の設定	70
2. イヌにおける骨髄抑制のための摂餌制限条件の設定	72
3. CFU assay 法の確立	74
4. 摂餌制限を施したラット由来骨髄細胞の特殊検査	79
5. 摂餌制限を施したイヌ由来骨髄細胞の特殊検査	81
6. 摂餌制限動物由来骨髄および低栄養条件下培養細胞における遺伝子発現変化	83
謝辞	86

引用文献	87
公表リスト	96

## 第1章 要旨

薬剤候補化合物の非臨床毒性試験においては、しばしば化合物が直接的に臓器に影響を及ぼす毒性以外に、二次的な反応として表れる毒性がある。その主なものとして知られているものが、摂餌量低下による生体反応変化である。摂餌量が低下した生体における臨床病理学的あるいは組織学的変化についてはラットでいくつかの研究がなされており、主な反応として骨髄細胞の減少（骨髄抑制）とそれに伴う血液学的パラメーターの変化が知られている。しかしながら、その発生メカニズムは不明である。骨髄抑制の過程で細胞内に起こっている事象を解明することは、化合物投与によって摂餌量が減少した動物に骨髄抑制が認められた際、その直接の原因が化合物の細胞毒性作用か、あるいは摂餌量の減少か、そのいずれかを見極めを行うための有用な情報になる。そして、化合物の毒性を正確に評価することに大きく寄与すると考えられる。そこで、摂餌制限を施した動物における骨髄細胞反応のプロファイリングを行うことを主目的として本研究を行った。

研究を進めるにあたり 2 つのテーマを設定した。一つは骨髄細胞培養系を用いた細胞の分化・増殖の精査、すなわち細胞機能の解析である。そしてもう一つが骨髄細胞内の遺伝子発現変化の探索、すなわち遺伝子発現プロファイルの解析である。それぞれの解析を進める前に、まずは生体反応系を確認した。ラットにおいては、既存の報告通りの 2 週間の摂餌制限で骨髄細胞領域の減少が誘発されることを確認した。さらに、これまで報告されていなかった、網赤血球数が減少することも見出した。また、毒性試験の汎用動物種であるにもかかわらず、これまで摂餌制限下の生体反応の報告が不十分であったイヌについても、4 週間の摂餌制限で骨髄細胞領域が減少することを見出した。

続いて、軽度な骨髄抑制を起こす条件で摂餌制限を施したラットあるいはイヌ由来の骨髄由来造血前駆細胞の細胞診断（ミエログラム）、および培養系による分化・増殖能の検査を実施した。培養系は、我々が本研究の一環として確立した両動物種骨髄細胞の Colony-Forming Units assay（以降 CFU assay）を用いた。その結果、両種ともに主に赤血球系の前駆細胞が摂餌制限の影響を受けて減少しやすいことがわかった。そして制限期間早期にはすべての分化段階の細胞が、後期には分化段階の進んだ細胞が、それぞれ摂餌制限の影響を受けることも示唆された。

遺伝子発現プロファイルの解析についても、摂餌制限を施したラット、イヌの両種について実施した（*in vivo* 解析）。同時に、解析の参考データとするために、骨髄由来株細胞である HL60 において飢餓状態による細胞増殖抑制を誘発し、そのときの遺伝子発現プロファイルを取得した（*in vitro* 解析）。*in vivo* および *in vitro* 両解析結果を総合的に評価したところ、主に細胞死に関わる遺伝子変動の傾向が強く、その中でもラットにおける *Bcl11b* の変動が顕著であった。

以上の細胞機能解析結果と遺伝子発現プロファイル結果を照らし合わせて考察し、摂餌量減少による骨髄細胞反応の特徴についてまとめた。

## 第2章 緒言

薬剤候補化合物の開発には、治験を安全に実施するために、そして市販後に薬剤を安全に使用するために、慎重な安全性評価が欠かせない。特に第1相の治験は開発候補化合物を初めてヒトに投与する段階であり、慎重な計画が求められる。その計画に非常に重要な役割を果たすのが動物実験による化合物の毒性評価、すなわち非臨床安全性試験である。非臨床安全性試験は、概略として規定されている試験群で構成されており、その中でも中核をなすのが齧歯類あるいは非齧歯類に反復投与を施す一般毒性試験である。一般毒性試験においては、症状観察、血液学的検査、血液生化学的検査、そして病理組織学的検査などを組み合わせることで、毒性標的臓器を探索する。種々臓器のなかでも、比較的標的になりやすい臓器は肝臓、腎臓、そして造血器官である骨髄である。

骨髄は哺乳類の生体における主たる造血器官であり、その障害は生体における血液細胞供給の異常につながる。このことから、骨髄毒性は造血毒性とも表現され、重篤性が認知されている。生活習慣病などの疾患に対する薬剤では、直接生死に関わる病状への投薬ではないことから、骨髄毒性作用を示すような細胞毒性の強い薬剤は望まれない。それ故、同疾患領域の薬剤開発においては、骨髄毒性を誘発する化合物は、早期の段階で候補から外される。その一方で、致死性の疾病に適用する薬剤、例えば抗がん剤の開発などにおいては骨髄毒性を有する化合物が開発され、その毒性の発現を指標に投与量の増量あるいは投与を中止することがしばしばある。つまり、骨髄毒性は多くの場合可逆性の変化であり、毒性発現後すぐに投与を中止して十分な期間が経過すれば回復が見込めるため、薬剤の最大耐用量を規定する指標として積極的に利用されるのである。そのため、薬剤候補化合物のもつ骨髄毒性作用を動物実験で検出し、精査することは、骨髄毒性の発現を回避する面と至適投与量を見極める面の両面で重要な意味がある (Bloom 1993)。

骨髄毒性は、骨髄細胞数の減少、すなわち骨髄抑制を主徴とする。毒性試験における骨髄抑制は、化合物が骨髄細胞に直接的な細胞毒性作用により誘発される場合と、化合物の他臓器あるいは全身性の影響を介した間接的な作用により誘発される場合に大きく分けられる

(トキシコロジー学会教育委員会 2009)。前者の直接的な細胞毒性は、抗がん剤に代表される殺細胞作用あるいは細胞増殖抑制作用である。後者の間接的な影響については、腎臓が障害されることによるエリスロポエチンの低下からの骨髄抑制などが知られているが、具体的な事例は乏しい。その中で、Reagan ら (2011) らは、毒性試験における骨髄抑制評価の総説中で、化合物が間接的に骨髄抑制作用を誘発する事象として、摂餌量が低下した動物の例を唯一挙げている。そして、その場合においては慎重に原因の解釈を行うことが重要性であると説いている。なぜなら、非臨床における骨髄抑制の原因が摂餌量低下によるものであれば、栄養管理が整った臨床試験においては骨髄抑制を示さない可能性が高い。その場合、骨髄抑制を指標にした最大耐用量は極めて高い数値になることとなり、臨床試験を危険なものにする可能性があるからである。臨床における骨髄抑制発現の可能性を正確に予測するために、非臨床毒性試験における原因解明の作業が非常に重要な意味をもつ。

毒性試験において摂餌量の減少は毒性試験においてしばしば認められる所見であるため、もし、化合物の直接的な細胞毒性による骨髄抑制と、摂餌低下による骨髄抑制を見分ける指標があれば、解釈を進めるための有用な手段になる。しかしながら、摂餌量の低下による骨髄抑制の特徴を精査して、化合物の細胞毒性と明確に区別する手法を試みる研究はほとんどなされていない。そのため、摂餌量が低下した動物で骨髄抑制がみられても、原因の判断が付きづらい。このことは、臨床では骨髄毒性を示さない化合物の開発を誤って断念すること、あるいは骨髄毒性により最大耐用量を決めようとしている臨床試験の失敗につながることで懸念される。細胞死研究が進展し、細胞形態や発現遺伝子変動により細胞傷害を詳細に記述できるようになった現在においては、これまで骨髄抑制として一括りにされてきた所見を、その発現機序の違いで種別化できるかもしれない。そのことにより、上述の懸念が払拭されることが期待される。そのためには、まず、低摂餌量の動物の骨髄反応を詳細に調べるのが重要である。

そこで、低摂餌量による骨髄細胞反応を精査することを目的として本研究を行うこととした。そのアプローチとして、摂餌量を制限した動物の骨髄細胞の機能及び遺伝子発現の精査に主眼を置いた。本研究で得られる成果は、毒性試験における骨髄抑制反応を正確に評価するための重要な基盤になると考えられる。

## 第3章 背景

### 1. 骨髄の機能および構造

骨髄は、赤血球系、顆粒球系、リンパ球、単球、および血小板の産生機能を担う、主な造血およびリンパ器官であり、生体内で最も大きな器官の一つである (Travlos 2006A, 2006B)。薬剤開発の非臨床および臨床の安全性評価において、骨髄は肝臓や腎臓と並び、嚴重に注意すべき器官と考えられる。なぜならば、造血の場においては細胞の増殖活動が盛んであり、外的要因による影響を受けやすい状態になっているからである (Bloom 1990, 1993, Hoagland 1982, Travlos 2006B)。

骨髄は全身の骨の髄腔内に存在し、細胞髄である造血実質部 (赤色髄) と脂肪髄 (黄色髄) とに分けられる。赤色髄は造血を行う部位で、各種の血球成分が存在する。造血能が失われ、脂肪組織に置換されると、黄色髄となる。その他にも間質としての細網組織、血管系、神経組織なども構成成分であり、これらの構成成分は構造的、機能的に密接な関係がある (Weiss 1986, 神山 1989)。

血管系は細胞髄と脂肪髄を囲むように存在する。栄養動脈が骨の栄養孔を通して骨髄内に入り、そこから数回分岐し、動脈枝を経て毛細血管になる。毛細血管は骨と骨髄の境界部分で静脈洞と連結し、閉鎖性血流路を形成する。静脈洞は集合洞、中心静脈洞を経て栄養静脈となり、栄養孔より骨外に出る (Weiss 1986, Travlos 2006A, 伊東 1994, 神山 1989)。

造血細胞は、細網細胞と細網線維からなる細網組織に囲まれて存在する。造血細胞のうち、赤血球系の細胞は、分化・成熟過程の各段階にあるものが小集団を形成している。この集団は赤芽球島と呼ばれ、静脈洞の付近に認められる。赤芽球系細胞は、造血幹細胞から前赤芽球、好塩基性赤芽球、多染性赤芽球、正染性赤芽球、の順に分化・成熟していく。白血球細胞群の中で多くの割合を占める顆粒球系細胞は、骨髄の実質内に不規則に分布しているが、おおよその傾向として、幼若な細胞は骨梁や小動脈周囲に位置し、成熟するにつれて静脈洞に近接して存在する。顆粒球系においては、造血幹細胞から骨髄芽球、前骨髄球、骨髄球、後骨髄球の順に分化・成熟していく (Travlos 2006A, 神山 1989)。

細網組織は、造血を支持するうえで、その足場および増殖因子供給の重要な役割を果たしている。(Reagan 1993A, Conrad 1995)。細網細胞は骨髄組織内に普遍的に認められるが、特に静脈洞周囲に多く存在する。この細胞は、黄色髄を構成する脂肪細胞の起源でもある (Weiss 1991, Verfaillie 1994, 神山 1989)。

このように、血管系による栄養供給と細網組織が提供する微小環境により、骨髄における定常的な造血機能が保たれている。そしてこれらの構造および機能は、毒性試験に用いる動物種あるいはヒトにおいて種差なく保有されている (Bloom 1993)。この定常状態は外的要因により影響を受けやすい。よく知られている外的要因としては、薬剤、環境中の化学物質、放射線、そして栄養不良がある (Bloom 1993, Conrad 1995, Travlos 2006A)。

### 2. 薬剤による骨髄抑制

骨髄抑制とは骨髄の造血細胞が減少する状態を指す。骨髄抑制は、非臨床毒性試験においては病理組織学的検査における骨髄組織像の変化として検出される。その所見は“骨髄細胞数の減少”と表現され、細胞髄の領域が小さくなる像を呈する (Reagan 2011)。また、血液学的検査においても捉えることができ、寿命の短い白血球系あるいは血小板系の変化が早く表れ、寿命の長い赤血球には遅れて変化が表れる (Weiss 1993)。赤血球、白血球あるいは血小板の産生が抑えられると貧血、感染症あるいは溶血につながり、生命活動を脅かす危険性がある。骨髄抑制は薬剤投与、特に抗がん剤投与や免疫抑制剤投与による悪影響として比較的高頻度に認められ、しばしば投与量や投与期間を規定する指標になる (Haak 1980, Heipel 1980, Magee 1991, Bloom 1993)。

骨髄抑制には血球種特異的なものと非特異的なものがある。血球種特異的な毒性は動物では起こりにくく、ヒト特異的あるいは特定の背景を有するヒトに特化して発現することが多い (Bloom 1993)。血球種非特異的な毒性は、抗がん剤や免疫抑制剤による細胞毒性作用や細胞増殖抑制作用により引き起こされる例が多くみられる。これらの薬剤は、増殖活性の高い骨髄に細胞毒性を発現しやすく、そしてその変化は動物でも捉え易い (Bloom 1985, 1993, Hoagland 1982, Manyan 1972, 伊東 1994)。一方、明らかな細胞毒性を有する薬剤でなくとも、降圧剤あるいは血糖管理薬の PPAR $\gamma$  アゴニストなどは骨髄抑制作用を有することが知られている。しかしながら、それらの化合物が骨髄抑制を誘発する原因は明確に述べられていない (Ali 2005, Gimble 1996, Martin 1985, Waites 2007, Weiss 1993, Yanik 2011)。その他の骨髄抑制の事例として、造血支持を担う細網細胞を薬剤が障害することも報告されている。抗がん剤にこの作用を示す例が多い (Guest 2000, Weiss 1993)。

### 3. 低栄養状態による骨髄抑制研究の現状

低栄養状態により骨髄抑制が誘発されることは既知の事象である (Meierhenry 1990, Travlos 2006A, 2006B, 伊東 1994)。摂餌量を制限されたマウスあるいはラットにおける血球数減少や骨髄細胞数の減少、そして栄養失調状態のヒトにおいて貧血が誘発されることが報告されている (Alt 1938, Aschkenasy 1957, Borelli 1995, Brown 1954, Bethard 1985, Catchatourian 1980, El-Nawawy 2002, Finch 1975, Fried 1978, Fruhman 1955, Macdougall 1982, Oishi 1979, Ogawa 1985, Reissmann 1964, Seki 1997, Vilter 1975)。これらの報告に鑑みると、毒性試験において摂餌量が減少した動物においても、骨髄抑制が誘発される可能性が高いことが考えられる。そしてそのような動物に骨髄抑制が認められた場合は、安易に被験物質の直接的な骨髄抑制作用と考察せずに、摂餌量低下も原因の一つとして慎重に考察しなければならない。骨髄検査法のワーキンググループがまとめた総説においても、摂餌量減少による骨髄細胞数減少と、被験物質による直接的な造血細胞毒性を混同しないように警告している (Reagan 2011)。ただし、毒性試験の定型検査項目のみで被験物質の直接的な作用と摂餌量減少などの二次的な作用を区別することは困難である。

動物における摂餌量と骨髄抑制の関連性については、毒性試験の定型検査項目に従って調べた研究が Levin ら (1993) により報告されている。彼らは、2 週間にわたる制限給餌をラットに施した。その結果、対照群 (実験実施施設の定めた標準給餌量) の 75% 以下の給餌量で

骨髄抑制が認められた。彼らの研究では、定型的な検査以外の解析は行っていないため、病理組織学的検査以外には骨髄抑制に関する記述はされていない。より詳細な細胞反応を調べるには、特殊な検査を組み合わせることが必要である。

Borelli らのグループは、蛋白摂取を制限したマウスにおける細胞の状態を詳細に検査している (Borelli 2007, 2009, Fock 2010)。彼らの研究において、蛋白摂取制限状態の骨髄細胞は、静止期の細胞が増加していることがわかった。すなわち、細胞の増殖活性が低下していることが示唆されている。このように、骨髄抑制の成因が精査されることで、被験物質の直接的な作用と二次的な作用の区別をする指標が得られることが期待できる。Borelli らは増殖活性の観点で研究を行っているが、その他に、細胞が死んでいく過程、すなわち細胞死実行経路も重要な観点であると考えられる。骨髄抑制は細胞が減少している状態であるため、細胞増殖抑制のみならず、細胞死の観点でも特徴を精査することが重要と考えられる。しかしながら、摂餌量減少における骨髄抑制を、細胞死実行経路の観点で精査している報告はない。現状においては、研究の余地がまだ多く残されている。

ところで、低栄養状態における骨髄抑制に関する動物実験は、そのほとんどがマウスあるいはラットを用いており、非齧歯類で同現象を精査している報告はほとんどない。例えば毒性試験に汎用されるイヌにおいては、制限給餌下における生体反応を調べた研究はあるものの (Hill 2005, Lawlaer 2007, Morita 2012)、いずれも骨髄組織検査は行われておらず、骨髄評価としては不十分なものと考えられる。毒性試験における骨髄抑制の原因を精査するためには、齧歯類を対象とするだけでなく、イヌやサルといった、毒性試験に汎用される非齧歯類の反応を精査することも、現状の不足点を埋める大きな課題の一つと考えられる。

#### 4. 骨髄抑制を検出する方法

骨髄を検出する主な方法には、血液学的検査、造血組織（骨髄および脾臓）の病理組織学的検査、細胞学的検査、およびコロニーアッセイがある。毒性試験を規定するいくつかのガイドランスでは、このうちの血液学的検査と病理組織学的検査を定型検査として定めていて、これらはコア検査と呼ばれる。塗抹標本は血液学的検査で異常が認められた際に観察することが推奨されている。またフローサイトメトリーやコロニーアッセイは、特にガイドランス上での規定はなく、施設ごとに実施の有無を判断する。コア検査以外のこれらの検査は、特殊検査と呼ばれる (Bloom 1993, Weingand 1992, Reagan 2011)。

血液学的検査や病理組織学的検査は、その個体において造血機能の何らかの障害があることを検出する上では十分に機能する検査である。しかしながら、影響を受けた造血細胞の分化・成熟段階や機能障害の有無などを見極めることはできない (Reagan 2011)。その点を補うのが細胞学的検査である。細胞学的検査は、各分化段階の細胞の割合や、各分化段階の細胞の状態を解析できる検査方法である。例えば、核の形態や免疫抗体染色により識別した特定の分化段階の造血前駆細胞について、その形態的解析、細胞周期あるいは生理活性状態を調べられる。方法は、骨髄塗抹標本の観察（ミエログラム）が汎用されている。用いる器具がスライドガラスのみであることから、安価で手軽であることが大きな利点である。ただし、標本の出来ばえや観察結果が実験者の習熟度によって異なるため結果に施設差が生じ易い欠

点もある。もう一つの実験系としてフローサイトメトリーがある。フローサイトメトリーの利点は、一度に多くの細胞を迅速に解析できることである。また、ミエログラムのように実験者の技術的習熟度に結果が左右されることもない。ただし、ミエログラムほど細胞一つ一つの形態を詳細に観察できないことが欠点である (Reagan 2011)。加えて測定機器が高額であることから、毒性評価におけるフローサイトメトリーの普及は遅れている。近年になり、毒性試験を意識した骨髄細胞フローサイトメトリーの条件検討が報告されているものの、その数は決して多くはない (Criswell 1998A, 1998B, Kurata 2007, Schomaker 2002)。

以上のべた検査は、細胞や組織を採取した時点の状態のまま観察あるいは解析する方法であるが、採取した骨髄細胞を培養することで、その機能が正常に維持されているかどうかを見極める実験系もある。それが Colony-Forming Units assay (CFU assay) である。CFU assay は Metcalf (1969) によって開発された造血前駆細胞の培養系であり、造血前駆細胞の性質を調べることや、あるいは造血因子を同定することを目的に使用されてきた。近年では、薬剤あるいは薬剤候補化合物の骨髄毒性を調べる系としてもその有用性が認められており、複数の研究施設でこの系を用いた骨髄毒性評価が行われている (Deldar 1993, Parchment 1993, Gribaldo 1996)。実験系の概略は、増殖させたい造血細胞の分化段階に応じた造血因子を添加した半固形培地中で、造血前駆細胞を数日以上培養するものである。その結果、培地中には系列ごとの血液細胞コロニーが形成される。方法の詳細部分は施設ごとに異なっており、その方法を統一していく動きもある (Pessina 2009, 2010)。なお、毒性試験の汎用種であるラットとイヌの骨髄細胞を用いた報告が多くはないため、安定した結果を出せるように施設ごとに丁寧に系を確立する必要がある。

## 5. 細胞死の様式

骨髄障害の有無、そして障害されている細胞の分化・成熟段階は、既存の検査方法で検出できる。一方で、近年になり細胞死の実行経路に関する多くの知見が構築されているにも関わらず、骨髄障害がおこる過程、あるいは細胞死の実行経路を詳細に究明している研究はほとんどない。上述したとおり、薬物投与で骨髄細胞障害が誘発された場合、その薬剤が同時に動物の摂餌量も低下させていれば、その障害が薬剤の直接的な細胞毒性に因っているのか、あるいは低栄養状態に因っているのかを見分けることが難しい。このような場合においては、その障害における細胞死の実行経路を調べることで障害原因の究明に繋がると考えられる。低栄養状態の骨髄障害においては、すでに紹介したように Borelli ら (2009) が細胞周期をプロファイリングしている報告があるのみであり、細胞致死の観点での解析はなされていない。細胞死のプロファイリングも行えば、低栄養状態における骨髄障害の細胞状態をより詳細にパターン化できると期待される。

細胞死は、形態学的には3つに分類され、それぞれがタイプ1、タイプ2、タイプ3と呼ばれている。タイプ1はアポトーシス、すなわち実行経路がプログラムされた細胞死であり、核の凝縮およびクロマチンの凝集、そしてピクノーシスと呼ばれる核濃縮が引き起こされる。細胞膜は、いくつかの部位が膨潤する。タイプ2は、細胞の自己食食、すなわちオートファジーを伴う細胞死である。このタイプは核の一部が膨潤し分離することがある。また、ピク

ノーシスが認められる場合もある。細胞膜においては細胞外物質を取り込む像（エンドサイトーシス）が見られたり、あるいは膨潤が起こる。タイプ3はそれ以外の形態をとるもので、細胞小器官の膨潤像（タイプ3A）あるいは小胞を伴った像（タイプ3B）を呈する。タイプ3Bは壊死と同義語のネクローシスと呼ばれる形態、すなわちミトコンドリアの膨潤、小胞体の拡張、核溶解を呈する（Clarke 1990, Schweichel 1973）。それぞれのタイプにまたがる形態的特徴があるため、通常の病理組織学的検査レベルで明確にタイプを区別することは難しい。また近年の研究で、オートファジーによりネクローシスが誘導される報告があり、タイプ2と3の区分けは曖昧になっている面がある（Bell 2008, Bonapace 2010）。骨髄細胞についても、形態学的な観察のみならず、その実行経路の面も併せて細胞死をプロファイリングすることにより、より確かな細胞死の区別が可能になると考えられる。そのアプローチとして、細胞死の過程を各細胞死に特徴的な分子マーカーや遺伝子発現で同定することが有用と思われる。例えば低栄養状態においては、自己食食によりエネルギーを補填しようとする反応が起きていることは考えやすく（Edinger 2004, Levine 2005, Lum 2005）、その反応から細胞死が誘導される可能性なども推察できる。その推察を検証するための手段としては、低栄養状態の動物の骨髄細胞におけるオートファジー関連遺伝子群（Atg）の変動解析が考えられる。オートファジー誘導が示唆された場合には、LC3などのオートファジーマーカーにより（Kabaya 2000, Mizushima 2004, Tanida 2004）、可視的に誘導の有無をの検証することが有用と考えられる。もしアポトーシスが起きているのであれば、アポトーシス実行経路に関わる遺伝子発現の変化が捉えられるかもしれない。変化が捉えられた分子や遺伝子発現を整理することで、摂餌量減少に伴う骨髄抑制に特徴のある反応が捉えられることが期待される。

以上に述べた背景を踏まえて、方針の概要を策定した。

## 第4章 研究方針の概要

- ・ 本研究には以下の2つのテーマを設定した。
  - 1) 摂餌制限したラット及びイヌの造血機能の解析：  
既知情報の確認に加え、これまで実施の報告がない検査を行う。それにより、これまでに知られていないプロファイルを明らかにする。
  - 2) 摂餌制限したラット及びイヌの骨髄細胞における遺伝子発現解析：  
GeneChip を用いた網羅的な遺伝子発現解析により、特に細胞死実行経路に焦点を当てた骨髄細胞反応の特徴を見つけ出す。
  
- ・ それぞれの解析の中で実施した試験系の確立および主な検査項目を以下に記述する。
  - 1) 摂餌制限を施したラット及びイヌの造血機能の解析
    - ① ラット及びイヌにおける、摂餌制限による骨髄細胞数減少系の確立。
    - ② ラット及びイヌ由来骨髄細胞を用いた CFU assay 法の確立。
    - ③ ①で確立した条件下における、造血に関わる検査の実施。
      - 血液学的検査
      - ミエログラム
      - 骨髄の病理組織学的検査（ラットは電子顕微鏡検査も実施）
      - CFU assay
  - 2) 摂餌制限したラット及びイヌの骨髄細胞における遺伝子発現解析
    - ① 摂餌制限を施したラット及びイヌ由来骨髄細胞の、網羅的遺伝子発現データの取得。
    - ② 骨髄由来株細胞 HL60 を低栄養培地で培養した際の網羅的遺伝子発現データの取得。  
培養細胞のように単純化された系における遺伝子発現データは、より明確な遺伝子変動を示すと予想される。ラット及びイヌの骨髄細胞における遺伝子発現変動が複雑で解析が困難な場合には、HL60 の遺伝子変動を参照し、意義のある遺伝子変動を絞り込むことができると考えた。

## 第5章 結果

### 1. ラットにおける骨髄抑制のための摂餌制限条件の設定

Levin ら (1993) が実施したラットの2週間摂餌制限試験の結果を確認するために、同じ摂餌制限期間の実験を実施した。1群あたりに7週齢の雄6例を割り当て、1個体に1日あたり25gの飼料を与えた群を対照群(100%給餌群)とした。25gは飽食条件下のラットが1日に摂食する量であることを事前に確認している。摂餌制限群は、1個体に1日あたり19g(75%給餌群)、13g(50%給餌群)および6g(25%給餌群)の給餌量に設定した。すべての個体が、摂餌制限期間中に給餌した全量を摂食した。各群の体重の変化を経時的に測定し、2週間の摂餌制限期間終了時点の血液学的検査、骨髄(胸骨および大腿骨)、脾臓および胸腺の組織切片病理組織学的検査を実施して、造血機能への影響を調べた。

対照群、75%給餌群および50%給餌群のいずれの個体にも、摂餌制限期間を通して状態の異常はみられなかった。25%給餌群では、摂餌制限開始後7日目から削瘦が、12日目からは立毛がそれぞれ全例に認められた。体重の経時変化は図1-1に示した。摂餌制限期間中、対照群の体重は経時的に増加して、開始から終了までに71g増加した。75%給餌群も経時的に増加したものの、対照群に比して増加速度は小さく、開始から終了までの増加量は30gであった。50%給餌群では摂餌制限期間中に体重が減少し続け、開始から終了までに19g減少した。25%給餌群はさらに体重減少の速度が大きく、摂餌制限開始から終了までに87g減少した。25%給餌群の状態変化は、体重減少の程度が反映されたものであると考えられた。これらの体重減少の結果は、Levin ら (1993) の報告に比べていずれの群でも減少量に違いがみられた(表1-1)。対照群の体重増加量はLevin らの研究で変化が大きかった一方で、摂餌制限による体重増加抑制あるいは減少の程度は本研究のほうが大きかった。両実験間で明確に条件が異なる点は週齢のみである。Levin らが使用したラットの週齢は毒性試験で使用する週齢よりも若齢である4~5週齢であった。一方、本実験では毒性試験で利用される週齢に合わせて7週齢で実験に供している。そのほかの違いとして対照群の給餌量が可能性として考えられたが、Levin らの対照群の摂餌量は個体あたり21.8gであり、本実験との大きな違いはなかった。これらのことから、体重増加量が異なる原因は週齢の違いである可能性が大きいと考えられた。

続いて、血液学的検査の結果を表1-2に示した。各群の平均値を比較したところ、制限給餌を施したすべての群で網赤血球数の比率、白血球数が減少した。白血球分画の中で減少していた血球種はリンパ球、好塩基球および単球であった。50%以下の給餌群では、その他にヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度および赤血球数が増加し、好中球が減少した。さらに25%給餌群のみでヘマトクリット値が増加し、血小板が減少した。Levin らは網赤血球の検査を実施していなかったため、赤血球系が減少する事象を捉えていない。本研究には網赤血球も測定したことにより、摂餌制限下のラットで赤血球系細胞が減少することを捉えることができた。なお、50%以下の給餌群でヘモグロビン濃度と赤血球数が増加している原因には、摂餌量減少に伴う給水の低下あるいは一般状態の悪化によって血液が濃縮したことが、可能性のひとつとして考えられる(伊東1994)。Levin らの報告においても同じく赤血球数の

増加がみられており、彼らの考察でも血液濃縮による増加の可能性が高いと述べられている。その他の Levin らの報告と重なる検査項目についても、彼らの実験と本実験はほぼ同じ結果を示した。

骨髄組織切片の病理組織学的検査においては、摂餌制限を施したすべての群で胸骨および大腿骨の細胞数減少、すなわち骨髄抑制が認められた。その程度は、給餌制限量に依存して大きくなった。各群の変化の程度を表 1-3 に、程度の階層化の指標にした代表的な組織像を図 1-2 に示した。脾臓でも、対照群では髄外造血を示す像が確認された一方で、摂餌制限を施したすべての群で髄外造血が減少していた。また、25%給餌群のみで脾臓および胸腺が委縮した（表 1-3）。Levin らは脾臓の変化には言及していないが、骨髄および胸腺の変化については、本研究と Levin らの報告の間ではほぼ一致していた。

以上の結果は、Levin らによる摂餌制限モデルの造血反応が、本研究の中で再現できたことを示している。この後の検討に用いる条件としては、明確に骨髄抑制が認められるが極度な変化には至らない 50%給餌が適切であると判断した。なお、上述した通り、Levin らは 4~5 週齢のラットを用いたが、本研究で用いる週齢は、毒性試験に汎用される 7 ないし 8 週齢とする。

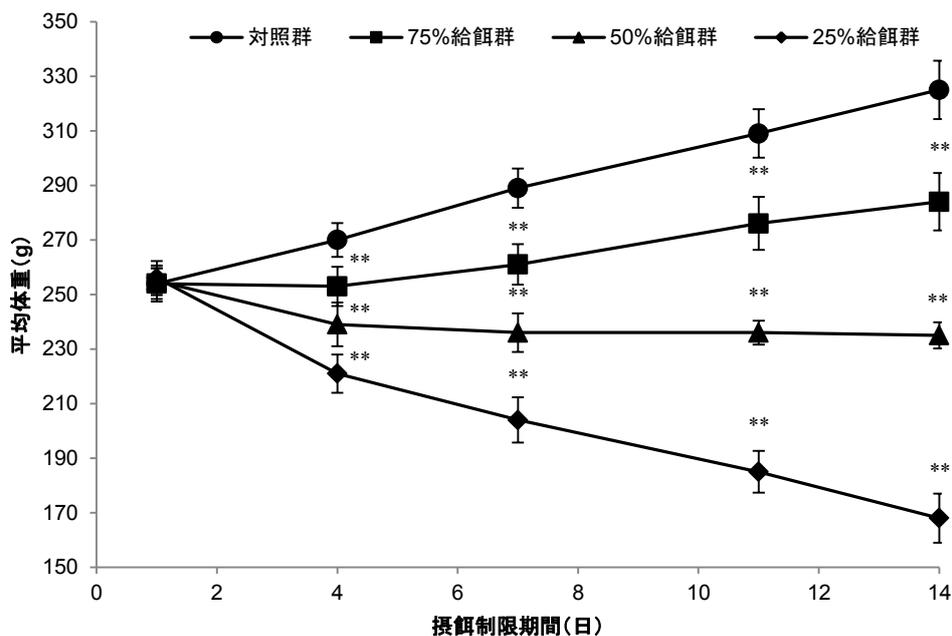


図 1-1 2 週間の摂餌制限を施したラットにおける体重の経時的変化

各群平均体重の推移を表示。エラーバーは標準偏差 (n=6)。\*\* : P < 0.01 で対照群に対して統計学的に有意な差あり。体重測定は制限給餌期間の各測定日 (1, 4, 7, 11 および 14 日目) の給餌直前に実施している。

	Levin らの研究における各群平均体重			本研究における各群平均体重		
	開始直前	終了後	終了後と開始直前の比	開始直前	終了後	終了後と開始直前の比
対照群	132.7 g (5.2)	238.6 g (9.9)	180%	254 g (6.6)	325 g (10.7)	128%
75%給餌群	132.7 g (5.1)	183.1 g (3.0)	138%	254 g (5.7)	284 g (10.5)	112%
50%給餌群	133.5 g (6.9)	147.2 g (5.5)	110%	255 g (4.6)	235 g (4.8)	92%
25%給餌群	133.9 g (4.6)	91.3 g (4.4)	68%	256 g (6.3)	168 g (9.0)	66%

表 1-1 Levin ら（1993）の研究と本研究における各群の平均体重変化の比較

（）内は標準偏差，Levin の研究は n=10，本研究は n=6。

開始直前は，摂餌制限開始日の給餌直前を示している。終了後は，Levin らの研究においては制限給餌期間（14 日間）翌日の剖検日，本研究は制限給餌期間最終日（14 日目）を示している。終了後と開始直前の比については，開始直前の平均体重に対する終了後の平均体重の比を，百分率で表した。

検査項目	群平均値（標準偏差）			
	対照群	75%給餌群	50%給餌群	25%給餌群
ヘマトクリット値（%）	42.6 (1.83)	43.3 (1.72)	44.5 (1.08)	48.9**(2.47)
ヘモグロビン量（g/dL）	14.4 (0.55)	14.6 (0.69)	15.5*(0.31)	17.1**(0.97)
赤血球数（ $10^6/\mu\text{L}$ ）	7.2 (0.32)	7.3 (0.14)	7.70*(0.17)	8.4**(0.35)
網赤血球数百分率（%）	3.0 (0.56)	2.1 (0.19)	0.6*(0.18)	0.1**(0.05)
平均赤血球容積（fL）	59.0 (2.27)	59.0 (1.85)	57.8 (0.52)	58.4 (1.50)
平均赤血球ヘモグロビン濃度（g/dL）	33.8 (0.63)	33.8 (0.44)	34.8*(0.49)	34.9**(0.55)
平均赤血球ヘモグロビン量（pg）	19.9 (0.90)	20.0 (0.69)	20.1 (0.31)	20.4 (0.70)
白血球数（ $10^3/\mu\text{L}$ ）	11.8 (2.64)	7.5*(2.39)	5.5**(1.78)	3.8**(0.65)
リンパ球数（ $10^3/\mu\text{L}$ ）	9.8 (2.60)	6.2*(2.4)	4.8**(1.4)	3.1**(0.59)
好中球数（ $10^3/\mu\text{L}$ ）	1.6 (0.35)	1.1 (0.60)	0.5**(0.29)	0.5**(0.23)
好酸球数（ $10^3/\mu\text{L}$ ）	0.09 (0.02)	0.08 (0.02)	0.09 (0.05)	0.05 (0.05)
好塩基球数（ $10^3/\mu\text{L}$ ）	0.03 (0.01)	0.01*(0.01)	0.01**(0.01)	0.01**(0.01)
単球数（ $10^3/\mu\text{L}$ ）	0.21 (0.02)	0.12**(0.03)	0.07**(0.02)	0.06**(0.03)
血小板数（ $10^3/\mu\text{L}$ ）	1099 (110)	1107 (156)	995 (81)	855*(183)

表 1-2 2 週間の摂餌制限を施したラットにおける血液学的検査結果（n=6）

\*：P<0.05 で対照群に対して統計学的に有意な差あり。\*\*：P<0.01 で対照群に対して統計学的に有意な差あり。

病理組織学的所見	変化の程度	対照群	75%給餌群	50%給餌群	25%給餌群
検査した例数		6例	6例	6例	6例
胸骨骨髓の細胞数減少	軽微	-	1例	3例	-
	軽度	-	-	2例	2例
	中等度	-	-	-	4例
大腿骨髓の細胞数減少	軽微	-	6例	3例	-
	軽度	-	-	3例	2例
	中等度	-	-	-	4例
脾臓髓外造血あり	軽微	4例	-	-	-
脾臓萎縮	軽微	-	-	-	3例
	軽度	-	-	-	1例
胸腺萎縮	軽微	-	-	-	2例
	軽度	-	-	-	2例
	中等度	-	-	-	2例

表 1-3 2週間の摂餌制限を施したラットにおける造血関連臓器の病理組織学的検査結果  
 所見の程度は実施施設の基準により、変化なし、軽微、軽度、中等度、高度の5段階で評価した。-：対象所見を呈した個体はなし。

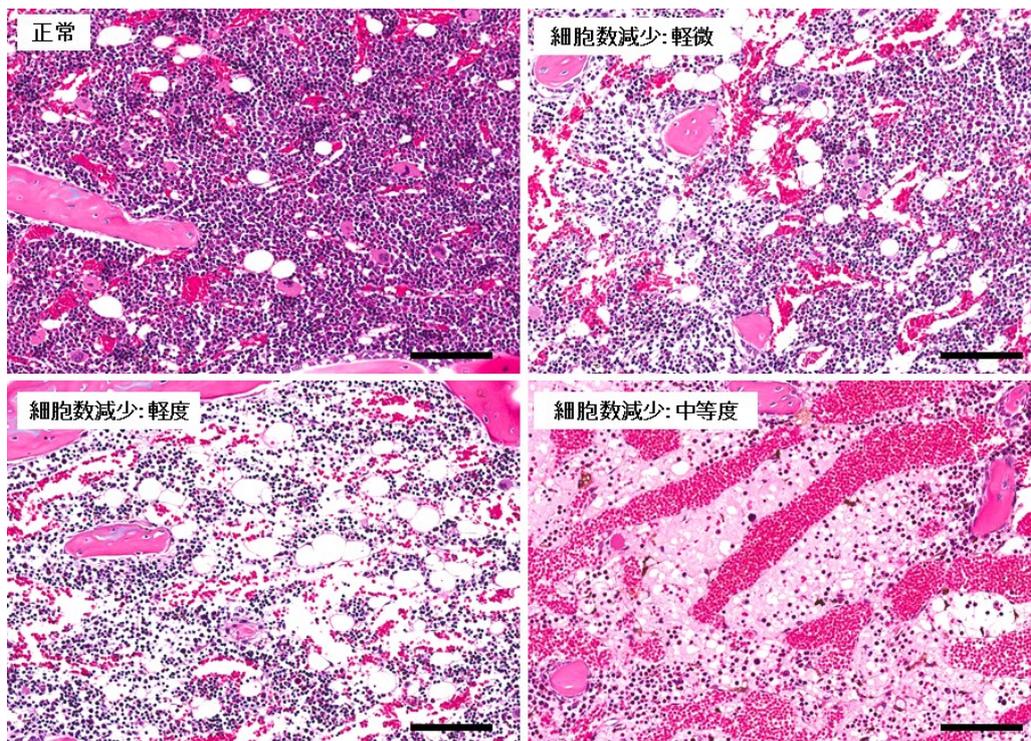


図 1-2 2週間の摂餌制限を施したラットにおける骨髓の病理組織像(スケールバー:100 μm)  
 正常な組織：造血細胞が髓腔に充満している(紫色の領域)。脂肪化の領域はごく一部に留まっている(白色の領域)。

軽微な細胞数減少：造血細胞の領域がわずかに減少し、脂肪化の領域が増えている。

軽度な細胞数減少：造血細胞の領域が明らかに減少し、脂肪化の領域が顕著に増えている。

中等度の細胞数減少：骨髓細胞の領域が極端に減少し、脂肪化の領域も減少している。赤血球が領域の多くを占めている(赤色の領域)。

## 2. イヌにおける骨髄抑制のための摂餌制限条件の設定

実験開始当初はラットと同様に2週間の摂餌制限期間を設定したが、2週間経過後の体重変化の結果から、十分な摂餌制限の影響を評価するには足りないと判断し、制限期間をさらに2週間延長して合計4週間とした。1群あたり7か月齢の雄2例を割り当て、1個体に1日あたり300gの飼料を与えた群を対照群（100%給餌群）とした。300gは、イヌが1日に完食する上限付近の量であることを事前に確認している。摂餌制限群は、1個体に1日あたり150g（50%給餌群）、70g（23%給餌群）の給餌量に設定した。すべての個体が摂餌制限期間中に給餌した全量を摂食した。各群の体重の変化を経時的に測定し、4週間の摂餌制限期間終了時点の血液学的検査、骨髄（胸骨および大腿骨）、脾臓および胸腺の組織切片病理組織学的検査を実施して、造血機能への影響を調べた。

対照群、50%給餌群および23%給餌群のいずれの個体にも、摂餌制限期間を通して全身状態の異常はみられなかった。体重の経時変化は図2-1に示した。ラットに比して体重に個体差があるため、縦軸には実体重ではなく、各測定日の体重の投与開始直前の体重に対する比率（%）で示した。対照群においては摂餌制限期間中継続的に緩やかな増加を示し、摂餌制限直前の約110%まで増加した。50%および23%給餌群においては、摂餌制限期間中継続的に減少し、50%給餌群では摂餌制限直前の約85%まで、23%給餌群では約75%まで減少した。

血液学的検査の結果を、摂餌制限開始10日前の値と摂餌制限終了直前（27日目）の値を対比する形で、個体別に表2-1に示した。摂餌制限による変化の有無は、摂餌制限前後の値の比較および対照群の変動範囲を総合的に評価して判断した。摂餌制限を施した群では、給餌量に依存して網赤血球数の比率が顕著に減少した。いずれの動物も赤血球数には変化がなかったことから、網赤血球数の実数も減少したことを示している。白血球数も給餌量に依存した減少が認められた。白血球の分画については、リンパ球、好中球、好酸球、好塩基球および単球のすべての数が減少した。なお、50%給餌群の1例（No.3）においては、好酸球と単球の減少あるいは減少傾向が認められたが、その他の項目には変化がみられなかった。

造血器官の病理組織学的検査においては、摂餌制限群で胸骨および大腿骨の骨髄細胞数減少が認められた。また、同じく骨髄において成熟顆粒球の増加も認められた。成熟顆粒球の増加の原因は、未熟な細胞、すなわち新たに造られる血液前駆細胞が減少し、さらに赤芽球系細胞の減少がより大きいため成熟顆粒球細胞の割合が増えている組織像になったこと、あるいは成熟顆粒球が実際に増えていることが可能性として挙げられる。骨髄細胞全体が減少している中で成熟顆粒球のみが増加することは考えづらく、前者の可能性のほうが高いと考えられる。胸腺においてはラットと同様に摂餌制限群で委縮が認められたが、脾臓には異常が認められなかった。なお、病理組織学的検査においても、50%給餌群の1例（No.3）においては造血器官の異常が認められなかった。

以上の結果から、イヌにおいても摂餌制限による骨髄抑制が認められることがわかった。50%給餌群の変化は、2例中の1例において明確であったが、もう1例については血液学的検査でわずかな変化が認められたのみであった。一方23%給餌群では、2例中2例で造血に対する明らかな影響が認められたため、イヌにおける制限条件は23%給餌（1日あたり70g）が適切であると判断した。

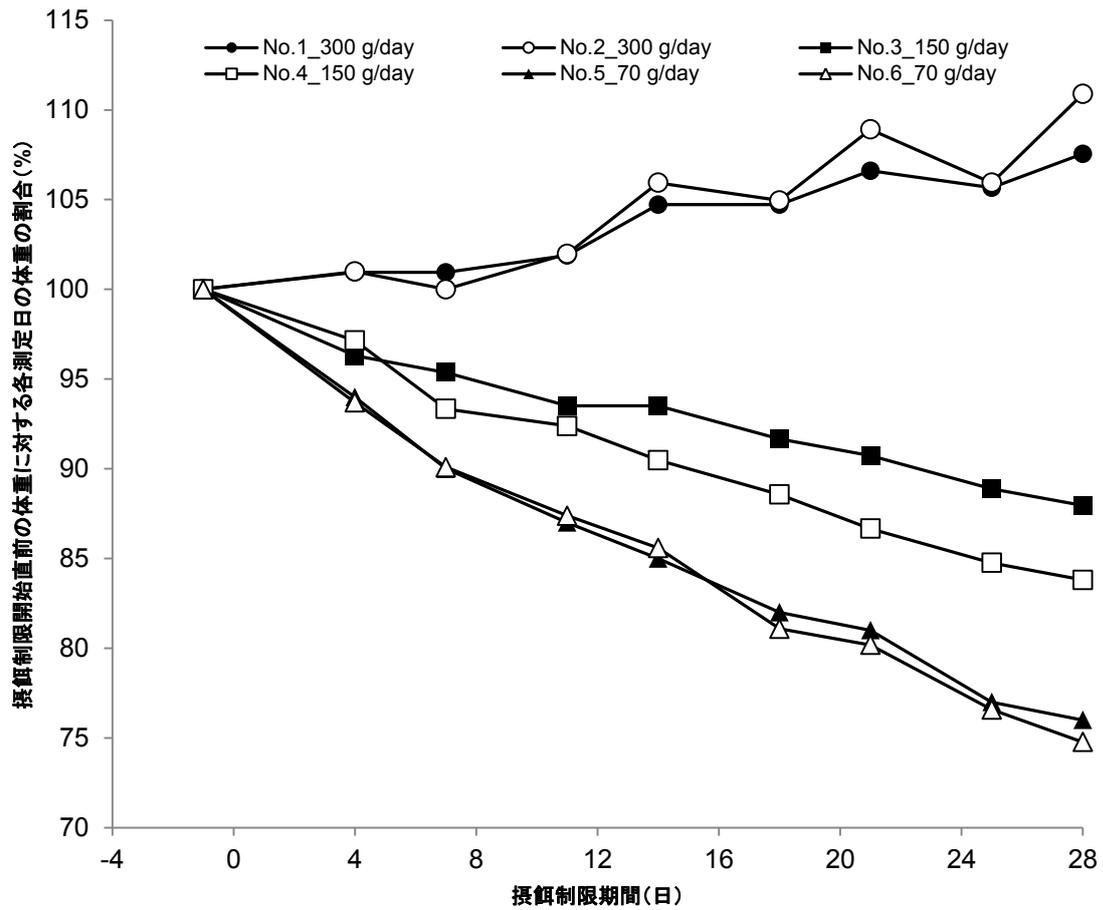


図 2-1 4 週間の摂餌制限を施したイヌにおける体重の経時変化

個体別に体重の推移を表示した。体重測定は制限給餌期間の各測定日（摂餌制限開始前日，摂餌制限期間 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 および 28 日目）の給餌直前に実施している。

測定項目	測定日	対照群		50%給餌群		23%給餌群	
		No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
ヘマトクリット値 (%)	-10	40.8	42.0	44.2	43.0	46.1	42.6
	27	41.9	38.2	43.6	41.8	44.0	44.6
ヘモグロビン量 (g/dL)	-10	13.5	13.9	14.2	14.2	14.9	14.2
	27	13.9	12.9	14.6	14.0	14.9	14.7
赤血球数 ( $10^6/\mu\text{L}$ )	-10	6.04	6.42	6.38	6.36	7.17	6.3
	27	6.05	5.79	6.21	6.14	6.63	6.4
網赤血球数百分率 (%)	-10	0.7	0.5	0.9	0.5	0.7	0.6
	27	0.4	0.6	0.5	↓0.1	↓0.1	↓0.1
平均赤血球容積 (fL)	-10	67.5	65.4	69.2	67.5	64.3	67.7
	27	69.3	66.0	70.1	68.0	66.5	69.6
平均赤血球ヘモグロビン濃度 (g/dL)	-10	33.0	33.0	32.1	33.0	32.4	33.2
	27	33.1	33.9	33.5	33.6	33.8	33.0
平均赤血球ヘモグロビン量 (pg)	-10	22.3	21.6	22.2	22.3	20.8	22.5
	27	22.9	22.4	23.5	22.9	22.5	23.0
白血球数 ( $10^3/\mu\text{L}$ )	-10	9.80	10.15	11.90	10.78	8.64	9.41
	27	8.53	8.85	9.65	↓6.45	↓5.08	↓4.35
リンパ球数 ( $10^3/\mu\text{L}$ )	-10	4.05	3.34	4.20	3.75	4.50	4.02
	27	3.67	2.95	3.00	↓2.00	↓2.58	↓1.64
好中球数 ( $10^3/\mu\text{L}$ )	-10	4.13	5.72	5.8	4.3	3.04	3.92
	27	3.64	4.95	5.47	(↓)2.92	(↓)1.86	↓2.25
好酸球数 ( $10^3/\mu\text{L}$ )	-10	0.77	0.39	1.21	1.96	0.47	1.02
	27	0.52	0.3	↓0.72	↓1.00	↓0.41	↓0.19
好塩基球数 ( $10^3/\mu\text{L}$ )	-10	0.10	0.07	0.12	0.05	0.11	0.06
	27	0.06	0.05	0.06	(↓)0.04	↓0.03	↓0.02
単球数 ( $10^3/\mu\text{L}$ )	-10	0.72	0.6	0.53	0.71	0.49	0.36
	27	0.63	0.58	(↓)0.39	(↓)0.49	↓0.18	↓0.23
血小板数 ( $10^3/\mu\text{L}$ )	-10	330	417	165	294	240	293
	27	371	452	218	307	234	342

表 2-1 4 週間の摂餌制限を施したイヌにおける血液学的検査結果

測定日-10 は摂餌制限開始から 10 日前（馴化期間中），測定日 27 は摂餌制限期間 27 日目を示す。

↓：減少，馴化期間中の各検査日の値よりも 27 日の値が低値を示し，その変動幅が対照群の示す変動幅（馴化期間中を含む）よりも大きい場合を減少とした。

(↓)：減少傾向，馴化期間中の各検査日の値よりも 27 日の値が低値を示したが，その変動幅が対照群の示す変動幅（馴化期間中を含む）に含まれる場合を減少傾向とした。

病理組織学的所見	対照群		50%給餌群		23%給餌群	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
胸骨骨髄の細胞数減少	-	-	-	軽度	-	軽微
胸骨骨髄の成熟顆粒球増加	-	-	-	中等度	中等度	中等度
大腿骨髄の細胞数減少	-	-	-	中等度	-	軽度
大腿骨髄の成熟顆粒球増加	-	-	-	中等度	中等度	中等度
胸腺萎縮	-	-	-	軽度	軽度	軽度

表 2-2 4週間の摂餌制限を施したイヌにおける造血関連臓器の病理組織学的検査結果  
 個体別に造血に関わる組織の病理組織学的所見を表示した。所見の程度は実施施設の基準により、変化なし、軽微、軽度、中等度、高度の5段階で評価した。-: 変化なし。

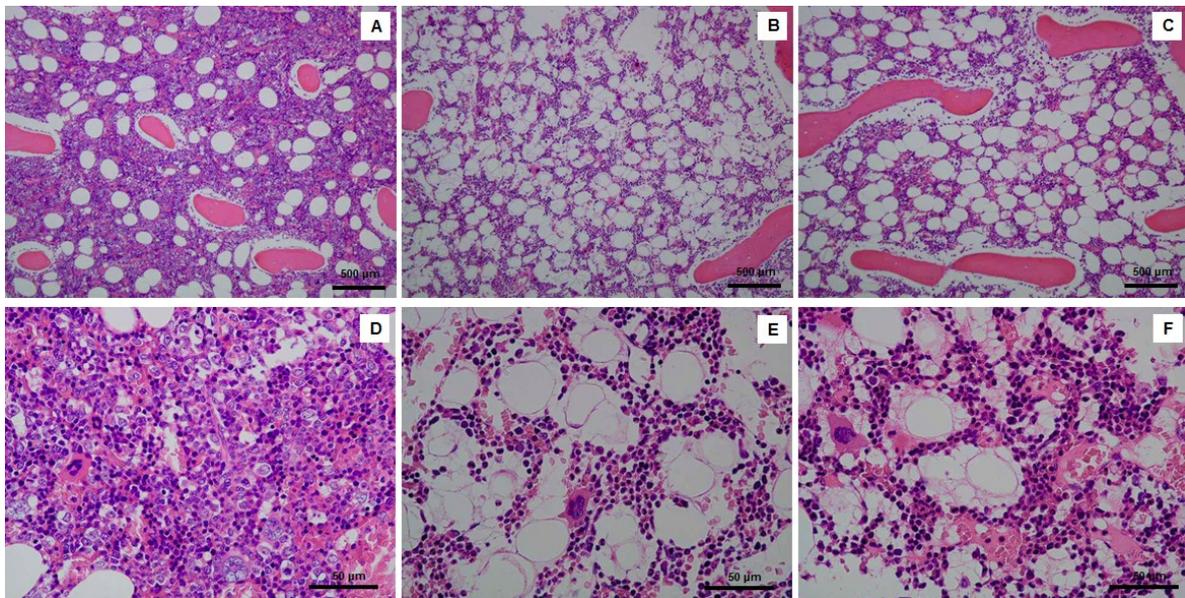


図 2-2 4週間の摂餌制限を施したイヌにおける胸骨骨髄の病理組織像

A: No.1 (対照群, 変化なし), B: No.4 (50%給餌群, 軽度), C: No.6 (23%給餌群, 軽微, 以上スケールバー: 500 μm), D-F: それぞれ A-C の拡大写真 (以上スケールバー: 50 μm)

A, D: 造血細胞が髓腔に充満しており, 脂肪化している領域は少ない。

B, C: 造血細胞の領域が明らかに減少し, 脂肪化した領域が顕著に増えている。

E, F: Dに比べて薄い色の核を持つ細胞 (未熟な細胞) が減少し, さらに核が分葉している細胞 (成熟顆粒球) の割合が高くなっている。

### 3. Colony-Forming Units assay (CFU assay) 法の確立

#### 3.1 標本作製ができる CFU assay 法の開発と利用

ラットおよびイヌ骨髓細胞の CFU assay を確立するにあたり、Kubota ら (1980) によるヒト骨髓細胞を用いた方法を基にした。図 3-1 に示したように、造血前駆細胞を培養する基礎培地に agar を加えることで半固形化し、さらに前駆細胞種特異的な刺激因子を加えることで特定細胞種のコロニーを形成させた。培養後に全コロニーを培地ごとスライドグラスに移し、スライドグラス上で乾燥および固定した。固定後に、観察対象の細胞に特殊染色を施し、標本として保存した。赤血球系に対する評価には、刺激因子として erythropoietin (EPO) を培地に加えて赤芽球コロニーを形成させた (CFU-E assay)。白血球系の評価においては、ラットの刺激因子に granulocyte and macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) を、イヌの刺激因子に lipopolysaccharide を投与したイヌ由来の血清をそれぞれ培地に加えて、好中球コロニーとマクロファージコロニーを形成させた (CFU-GM assay)。

ラットおよびイヌ赤芽球コロニーの写真を図 3-2 に示した。いずれの動物種においても、diaminobenzidine 染色により細胞質が赤色に染まり、かつ円形の核をもつ細胞を赤芽球と同定した。そして、赤芽球を 8 個以上含む細胞集団を赤芽球コロニーと定義した。図 3-3 および図 3-4 には、ラットおよびイヌ骨髓細胞由来の好中球コロニーおよびマクロファージコロニーの写真を示した。好中球コロニーについては、ラットとイヌで細胞の形状が異なっていた。ラットでは、中心部が抜けた環状 (ドーナツ状) の核を有し (図 3-3 A)、AS-D chloroacetate による特異的エステラーゼ染色によって細胞質が青色に染色 (Fast Blue を色素としたため青色) された細胞 (図 3-3 B) を好中球コロニーと同定した。一方イヌでは、桿状あるいは馬蹄形の核を有し (図 3-4 A)、AS-D chloroacetate による特異的エステラーゼ染色によって細胞質が染色された細胞 (図 3-4 B) を好中球と同定した。両種とも、好中球を 40 個以上含む細胞集団を好中球コロニーと定義した。マクロファージコロニーについては、ラットイヌとも共通の形状であった。円形の核を有し (図 3-3 C, 図 3-4 C)、 $\alpha$ -naphthyl butyrate による非特異的エステラーゼ染色によって細胞質が染色 (Fast Garnet を色素としたため褐色) された細胞をマクロファージと同定した。両種とも、マクロファージを 40 個以上含む細胞集団をマクロファージコロニーと規定した。

以上で基本的な方法とコロニーの定義を確定し、以降に各動物種で至適条件を検討した。

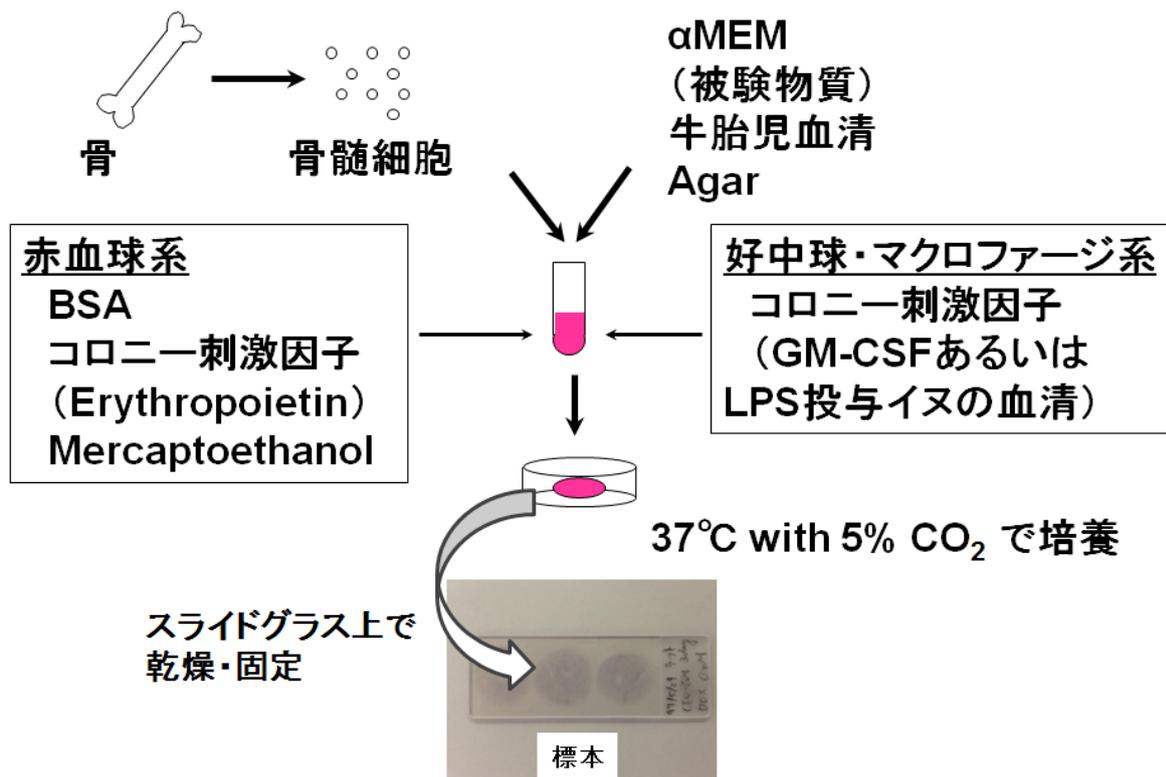


図 3-1 CFU assay の標本作製までの手順の概略

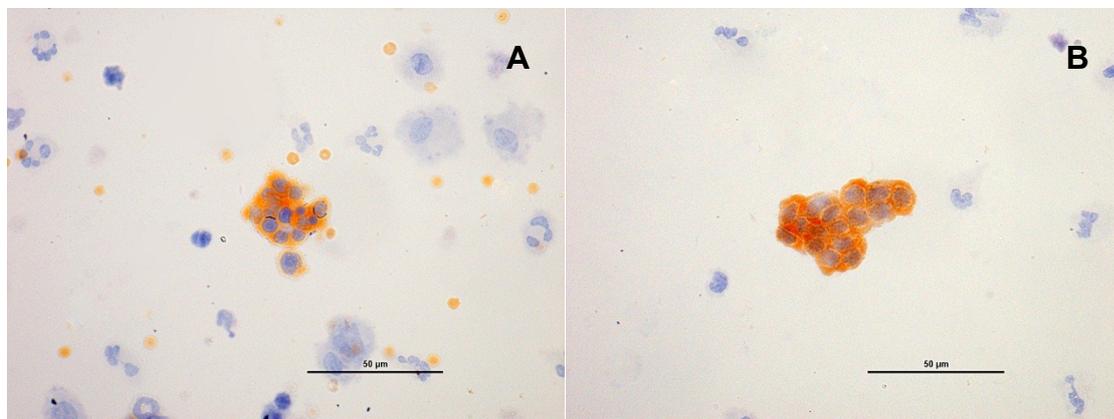


図 3-2 CFU-E assay の標本写真 (スケールバー : 50 µm)

DAB による細胞質染色およびヘマトキシリンによる核染色を施した。

A : ラット骨髓細胞の CFU-E assay において形成された赤芽球コロニー, B : イヌ骨髓細胞の CFU-E assay において形成された赤芽球コロニー

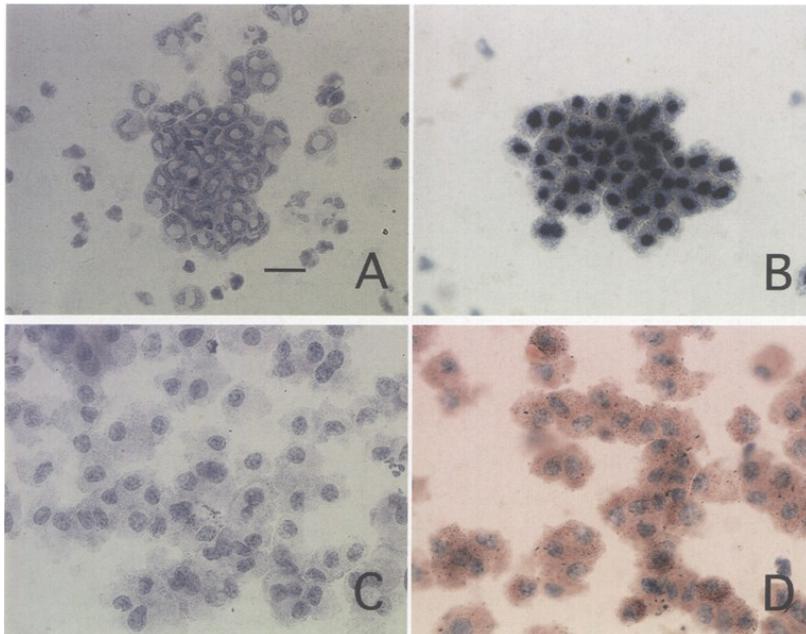


図3-3 ラットCFU-GM assayの標本写真(Takamatsu 1998より抜粋, スケールバー: 20  $\mu$ m)  
 A : 好中球コロニーのヘマトキシリン染色像, B : 好中球コロニーの特異的エステラーゼおよびヘマトキシリン染色像, C : マクロファージコロニーのヘマトキシリン染色像, D : マクロファージコロニーの非特異的エステラーゼ染色像

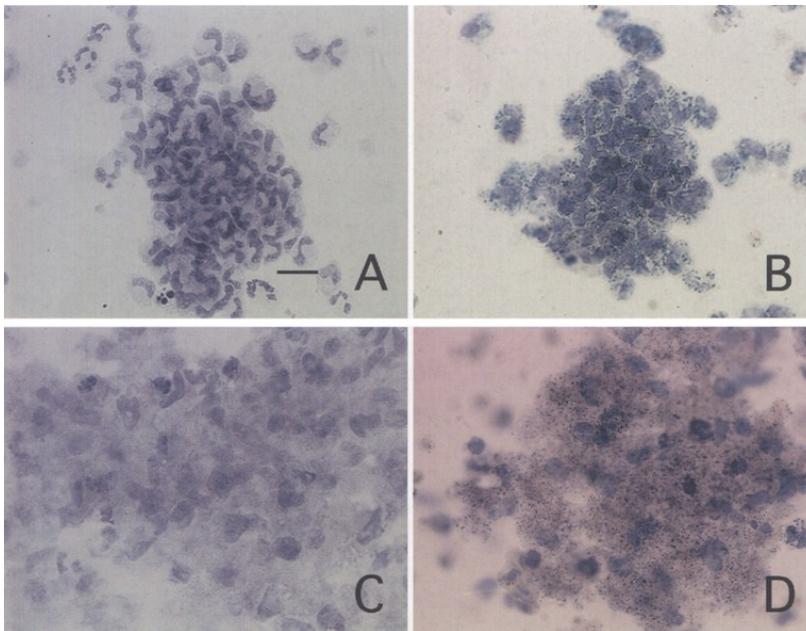


図 3-4 イヌ CFU-GM assay の標本写真 (Takamatsu 1998 より抜粋, スケールバー : 20  $\mu$ m)  
 A : 好中球コロニーのヘマトキシリン染色像, B : 好中球コロニーの特異的エステラーゼおよびヘマトキシリン染色像, C : マクロファージコロニーのヘマトキシリン染色像, D : マクロファージコロニーの非特異的エステラーゼ染色像

## 3.2 ラット CFU assay の至適条件設定

ラット骨髄細胞 CFU assay の至適条件設定のために、CFU-E assay における赤芽球コロニー、CFU-GM assay における好中球およびマクロファージコロニーの培養期間、播種細胞数および刺激因子濃度を検討した。

### 3.2.1 ラット CFU-E assay

既存報告 (Sifri 2006, Badami 2007, Hannoush 2011) を参考に、暫定的に EPO 濃度を 2 IU/mL とし、1 培地あたりの播種細胞数を  $1 \times 10^5$  個として、赤芽球コロニー数の経時的变化を調べた結果を図 3-5 A に示した。培養開始後 1 日目はほとんどコロニーが形成されていなかったが、2 日目にかけて急激に数が増加し、3 日目までその数が維持され、4 日目以降急激に減少した。この結果から、適切な培養期間は 2~3 日間であると判断した。続いて播種細胞数の検討を行った。経時的变化の検討と同様、暫定的に EPO 濃度を 2 IU/mL とし、培地あたり骨髄細胞が 0.125, 0.25, 0.5, 1 および  $2 \times 10^5$  個のときの培養 3 日目の赤芽球コロニー数を調べた結果、図 3-5 B に示したように播種細胞数に比例したコロニー数が計測された。骨髄細胞に対する影響の有無を見極めるためにはある程度の数のコロニー形成が求められるが、計数にかかる作業負荷を考慮すると、培地あたり約 50~400 個形成される 0.25~ $1 \times 10^5$  個/dish が適切な播種細胞数と判断した。ここまで検討した培養日数および播種細胞数条件を基に、EPO の最適濃度を確定するための検討を行った。播種細胞数を  $1 \times 10^5$  個/dish とし、EPO 濃度 0.25, 0.5, 1, 2 および 4 IU/mL の培地中のコロニー数を培養 2 日目に計数した。その結果を図 3-5 C に示した。コロニー数は 2 IU/mL まで濃度に依存して増加し、2 IU/mL 以上では飽和した。この結果から、最適 EPO 濃度は 2 IU/mL と判断した。

以上をまとめると、最適条件は培養期間が 2~3 日間、播種細胞数が 0.25~ $1 \times 10^5$  個/dish、EPO 濃度が 2 IU/mL であった。

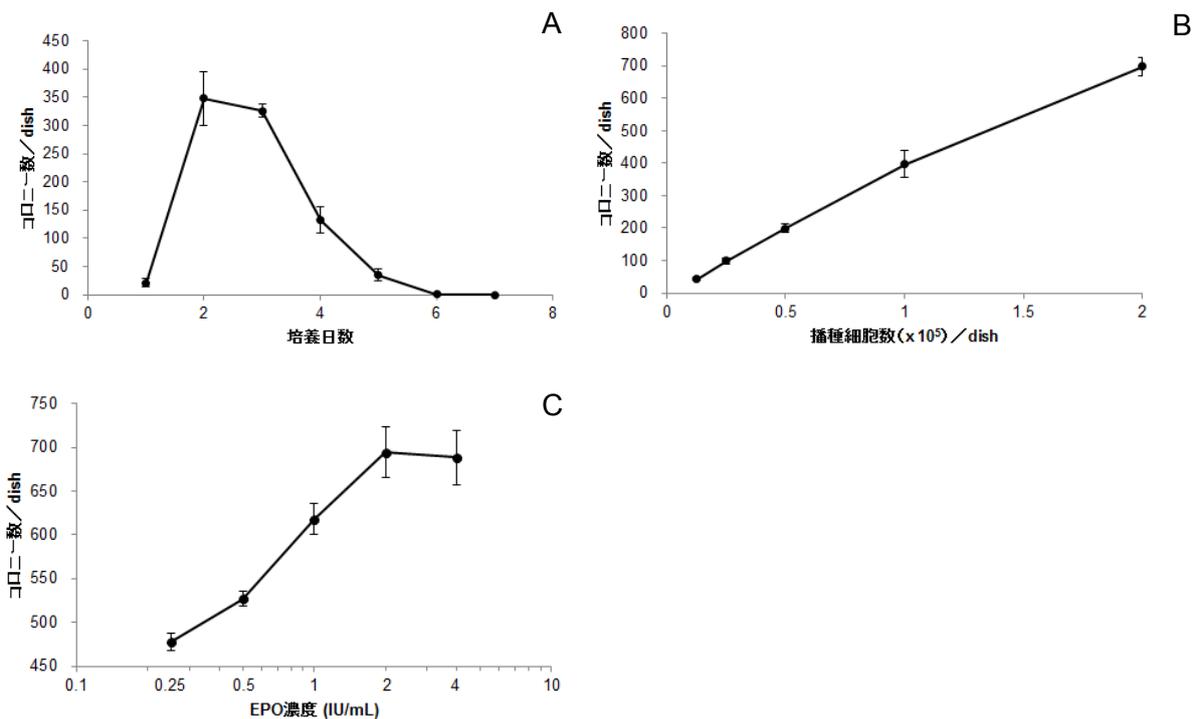


図 3-5 ラット骨髄細胞 CFU-E assay における条件検討結果

いずれのグラフもエラーバーは標準偏差 (n=3)。A : 赤芽球コロニー数の経時変化, B : 各播種細胞数における赤芽球コロニー数, C : EPO 各濃度における赤芽球コロニー数

### 3.2.2 ラット CFU-GM assay

GM-CSF 濃度を 10 ng/mL とし, 1 培地あたりの播種細胞数を  $1 \times 10^5$  個として, 好中球コロニー数およびマクロファージコロニー数の経時変化を調べた結果を図 3-6 A に示した。培養開始後 2 日目まではほとんどコロニーが形成されなかったが, 2 日目から 3 日にかけて急激に好中球コロニー数が増加し, 4 日目までその数が維持され, 5 日目以降急激に減少した。一方マクロファージコロニー数は好中球コロニーと入れ替わるように 5 日目から増加し始め, 7 日目まで増加した。9 日目まではほぼ数が安定し, 10 日目以降徐々に減少していった。この結果から, 適切な培養期間は好中球コロニーが 3 日間, マクロファージコロニーが 8 日間であると判断した。続いて播種細胞数の検討を行った。GM-CSF 濃度を 10 ng/mL とし, 培地あたり骨髄細胞が 0.125, 0.25, 0.5, 1 および  $2 \times 10^5$  個のときの培養 3 日目の好中球コロニー数と培養 8 日目のマクロファージコロニー数を調べた結果を図 3-6 B に示した。 $1 \times 10^5$  個/dish までの播種細胞数では, 好中球コロニー数は播種細胞数にほぼ比例して増加し, 播種細胞数  $1 \times 10^5$  個/dish におけるコロニー数は約 120 個であった。マクロファージコロニーは  $0.5 \times 10^5$  個までの播種細胞数では, 播種細胞数にほぼ比例して増加した。 $1 \times 10^5$  個ではコロニー数の増加はみられたものの, 増加率はそれまでよりも低下し, それ以上の播種細胞数では増加もみられなかった。好中球コロニーとマクロファージコロニーの結果を総合的に評価すると, 両

コロニーが比例増殖をする  $0.5 \times 10^5$  個/dish までが播種細胞数として望ましいと考えられる。しかしながら、播種細胞数  $1 \times 10^5$  個/dish で好中球コロニーの数が 100 を超えること、そして  $1 \times 10^5$  個/dish でもマクロファージコロニーの増加はみられていることから、培地あたりの播種細胞数は  $1 \times 10^5$  個/dish が適切であると判断した。最後に GM-CSF 濃度の検討を行った。播種細胞数を  $1 \times 10^5$  個/dish とし、GM-CSF 濃度 0.1, 0.3, 1, 3, 10 および 30 ng/mL の培地中の好中球コロニー数を培養 3 日目に、マクロファージコロニー数を培養 8 日目に計数した。その結果を図 3-6 C に示した。好中球コロニー数は 30 ng/mL まで濃度に依存して増加し、30 ng/mL 以上では飽和した。マクロファージコロニー数は 10 ng/mL まで濃度に依存して増加し、10 ng/mL 以上では飽和した。10 ng/mL において好中球コロニー数は飽和に達していなかったが、約 100 個のコロニーが形成されたことから、GM-CSF 濃度は 10~30 ng/mL が適した範囲であると判断した。

以上をまとめると、至適条件は好中球コロニーの培養期間が 3 日間、マクロファージコロニーの培養期間が 8 日間、播種細胞数が  $1 \times 10^5$  個/dish、GM-CSF 濃度が 10~30 ng/mL であった。

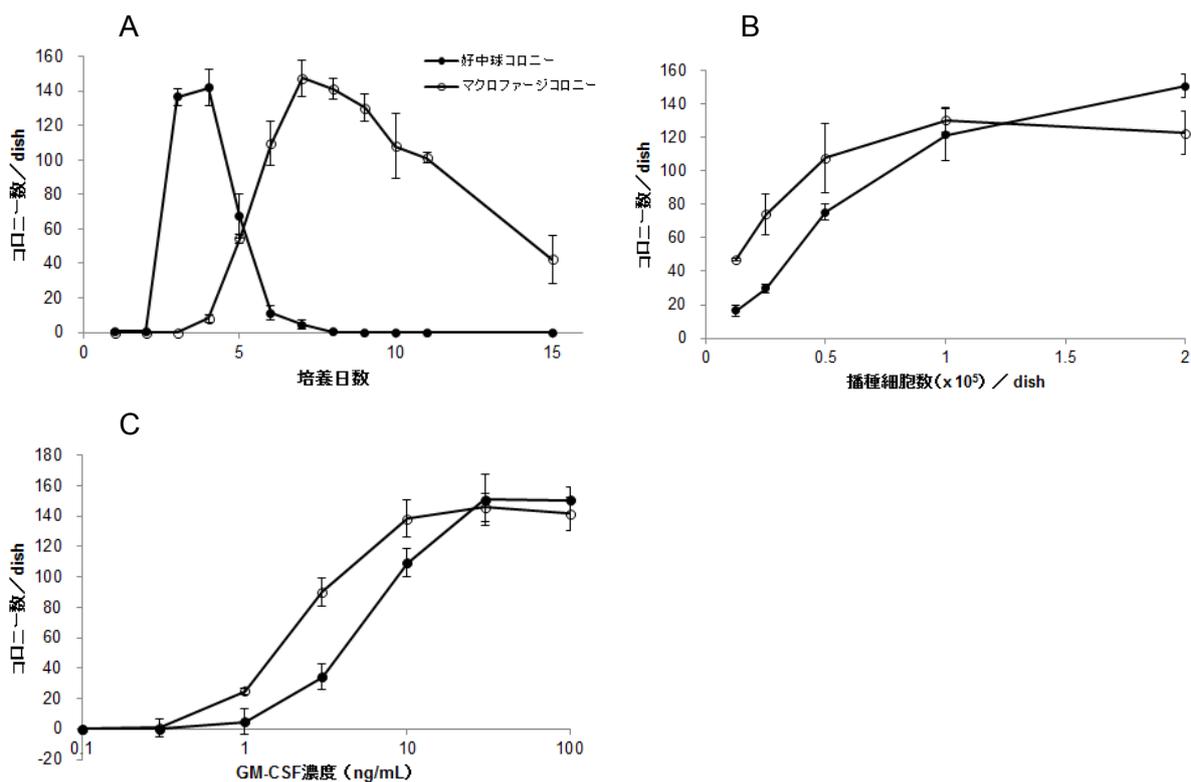


図 3-6 ラット骨髄細胞 CFU-GM assay における条件検討結果

いずれのグラフもエラーバーは標準偏差 (n=3)。A: 好中球コロニー数およびマクロファージコロニー数の経時変化, B: 各播種細胞数における赤芽球コロニー数およびマクロファージコロニー数, C: GM-CSF 各濃度における好中球コロニー数およびマクロファージコロニー数

### 3.3 イヌ CFU assay の至適条件設定

イヌにおいても、骨髓細胞 CFU assay の至適条件設定のために、CFU-E assay における赤芽球コロニー、CFU-GM assay における好中球およびマクロファージコロニーの培養期間、播種細胞数および刺激因子濃度を検討した。

#### 3.3.1 イヌ CFU-E assay

既存報告 (Deldar 1990) を参考に、暫定的に EPO 濃度を 2 IU/mL とし、1 培地あたりの播種細胞数を  $5 \times 10^4$  個として、赤芽球コロニー数の経時的变化を調べた結果を図 3-7 A に示した。培養開始後 1 日目はほとんどコロニーが形成されなかったが、2 日目にかけて急激に数が増加し、その後わずかに減少するものの 4 日目まではその数がほぼ維持された。7 日目にはコロニーはみられなかった。この結果から、適切な培養期間は 2~4 日間であると判断した。続いて播種細胞数の検討を行った。経時的变化の検討と同様、暫定的に EPO 濃度を 2 IU/mL とし、培地あたり骨髓細胞が 0.625, 1.25, 2.5 および  $5 \times 10^4$  個のときの培養 2 日目の赤芽球コロニー数を調べた結果、図 3-6 B に示したように播種細胞数に比例したコロニー数が計測された。計数にかかる作業負荷を考慮すると、培地あたり約 10~300 個形成される  $0.625 \sim 2.5 \times 10^4$  個/dish が適切な播種細胞数と判断した。ここまで検討した培養日数および播種細胞数条件を基に、EPO の最適濃度を確定するための検討を行った。播種細胞数を  $2.5 \times 10^4$  個/dish とし、EPO 濃度 0.25, 0.5, 1, 2 および 4 IU/mL の培地中のコロニー数を培養 2 日目に計数した。その結果を図 3-7 C に示した。コロニー数は 2 IU/mL まで濃度に依存して増加し、2 IU/mL 以上では飽和した。この結果から、至適 EPO 濃度は 2 IU/mL と判断した。

以上をまとめると、至適条件は培養期間が 2~3 日間、播種細胞数が  $0.625 \sim 2.5 \times 10^4$  個/dish、EPO 濃度が 2 IU/mL であった。

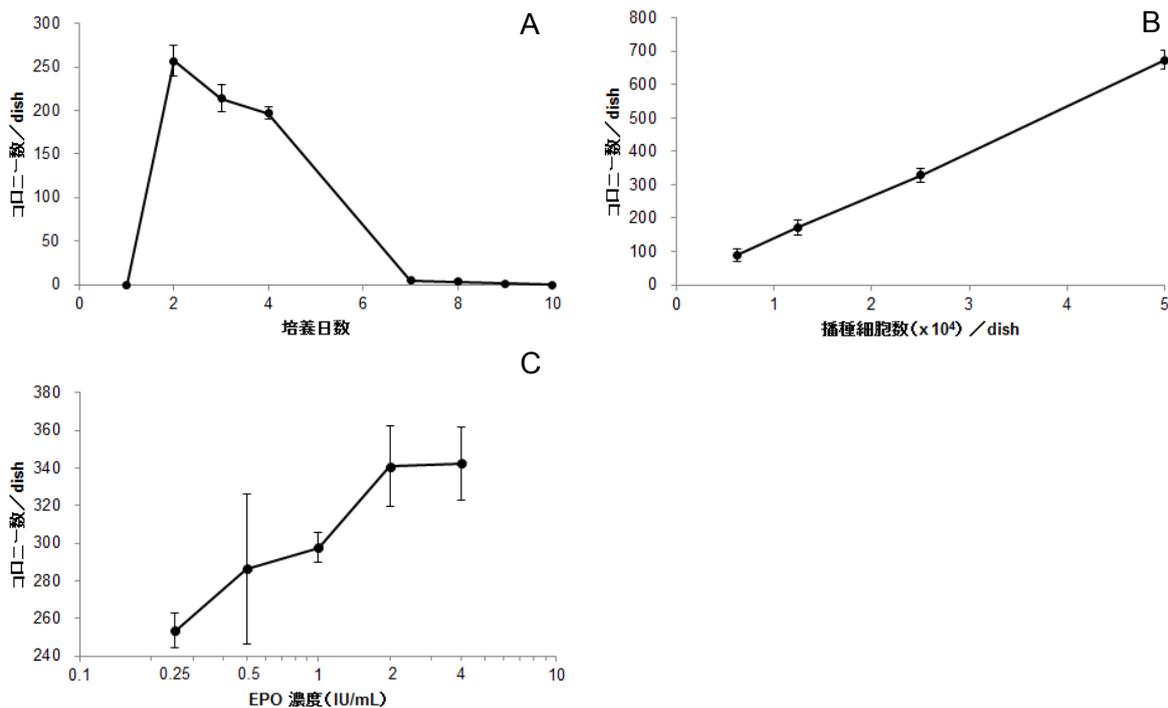


図 3-7 イヌ骨髄細胞 CFU-E assay における条件検討結果

いずれのグラフもエラーバーは標準偏差 (A: n=2, B, C: n=3)。A: 赤芽球コロニー数の経時的变化, B: 各播種細胞数における赤芽球コロニー数, C: EPO 各濃度における赤芽球コロニー数

### 3.3.2 イヌ CFU-GM assay

イヌの CFU-GM assay 法を確立するにあたり、コロニー形成のための適切な刺激因子の検討から行った。ヒト組み換え型の GM-CSF を刺激因子としている報告 (Volpe 1996) を基にコロニーを形成させることを試みたが、市販のヒト組み換え型 GM-CSF にはコロニー形成を促進する作用が認められなかった (データは提示せず)。そこで Deldar らの報告を基に (Deldar 1988A), lipopolysaccharide (LPS) を投与したイヌの血清を刺激因子として、その効果を調べた。無処置のイヌから採取した血清と LPS を投与したイヌの血清を各濃度で培地に添加し、培養 4 日目の好中球コロニー数および 8 日目のマクロファージコロニー数を計測した。播種細胞数は  $1.5 \times 10^5$  個/dish とした。結果を図 3-8 A, B にそれぞれ示した。いずれのコロニーもイヌ血清が無添加であってもわずかに形成されるが、イヌ血清の添加によって明らかに形成数が増加した。そして LPS を投与したイヌ由来の血清を添加した場合は、好中球コロニー、マクロファージコロニー共に、いずれの濃度においても無処置イヌ由来の血清添加に比して約 2 倍の数のコロニーが形成された。これらの結果から、イヌ CFU-GM assay におけるコロニー刺激因子には LPS を投与したイヌから採取した血清 (以降イヌ血清と記載) を用いることとした。続いてイヌ血清の至適濃度を設定するために、血清濃度を 1.25~60%まで設定して好中球コロニー数とマクロファージコロニー数の濃度依存性を調べた。播種細胞数は  $1 \times 10^5$  個

/dish とし、好中球コロニーは培養 4 日目、マクロファージコロニーは培養 8 日目に計数した。結果を図 3-8 C, D に示した。図 3-8C では、20%までは血清濃度の増加に伴ってコロニー数も増加したが、それ以上では減少していった。この結果から 20%が至適濃度と考えられたが、血清のロットが異なる図 3-8D の結果においては、至適濃度がより低い 5%であった。よって、イヌ血清のロットごとに至適濃度を確認してから使用することとした。続いて、適切なイヌ血清濃度の培地で播種細胞数を  $1.5 \times 10^5$  個/dish とし、好中球コロニー数とマクロファージコロニー数の経時的变化を調べた。その結果を図 3-8 E に示した。好中球コロニーは培養 4 日目に形成数が最大となり、以降減少していった。マクロファージコロニー数は 4 日目から増え始め、8 日目に最大となり以降 13 日目までは数が維持された。これらの結果から、適切な培養期間は好中球コロニーが 4 日間、マクロファージコロニーが 8 日間であると判断した。最後に播種細胞数とコロニー数の関係を調べた。培地あたり 0.125, 0.25, 0.5, 1 および  $2 \times 10^5$  個の細胞を播種した際の培養 4 日目の好中球コロニー数と培養 8 日目のマクロファージコロニー数を図 3-8 F に示した。好中球コロニーは  $1 \times 10^5$  個の播種細胞数から計測でき、それ以上では播種細胞数に比例して増加した。マクロファージコロニーは  $1 \times 10^5$  個までは播種細胞数に比例して増加したが、それ以上では増加はみられるものの増加率は低下した。いずれのコロニーも  $1 \times 10^5$  個の播種細胞数でコロニーが約 100 個形成されていたため、至適播種細胞数は培地あたり  $1 \times 10^5$  個と判断した。

以上をまとめると、至適条件は好中球コロニーの培養期間が 4 日間、マクロファージコロニーの培養期間が 8 日間、播種細胞数が  $1 \times 10^5$  個/dish であり、イヌ血清濃度はロットごとに設定することが必要であった。

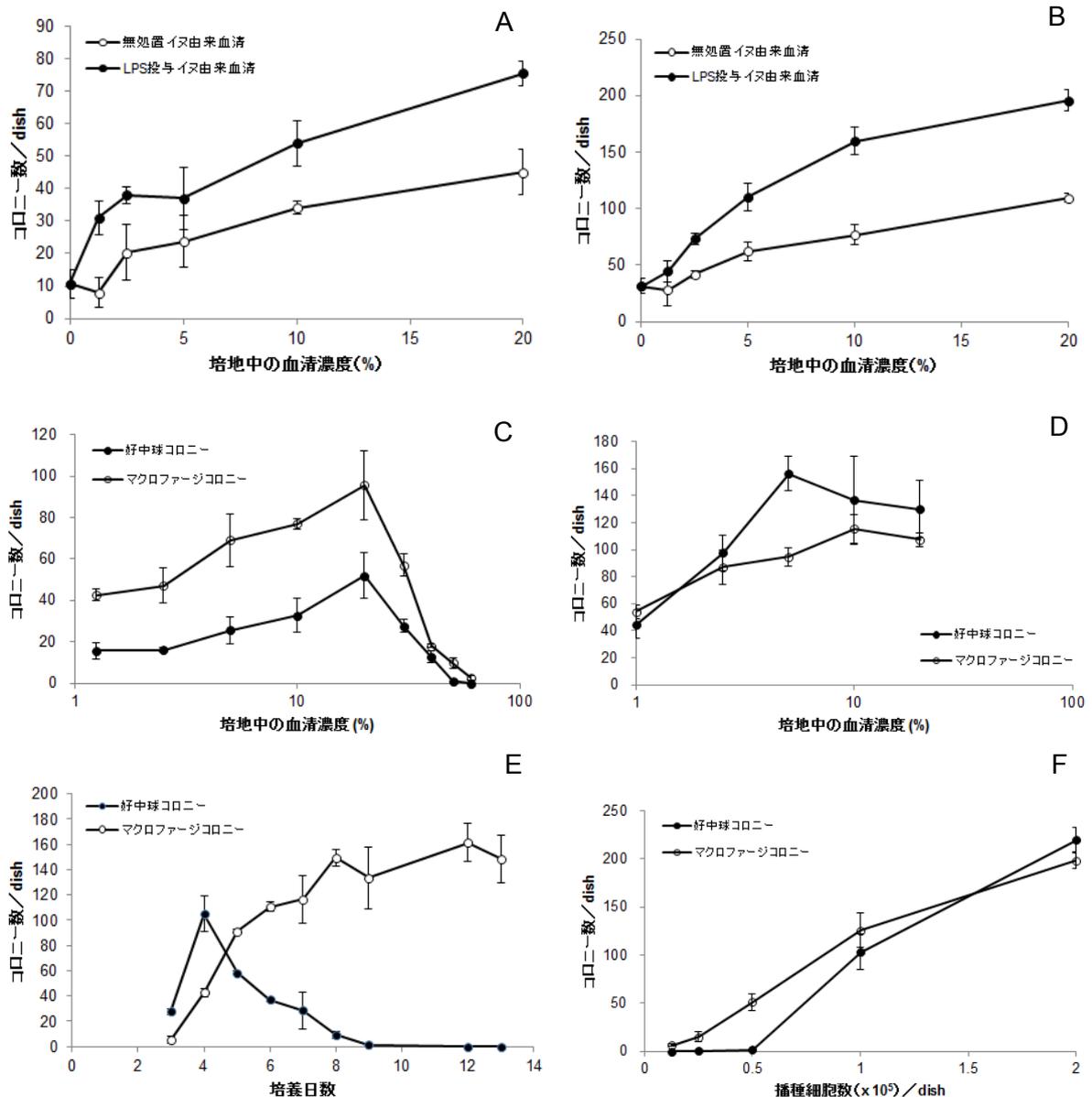


図 3-8 イヌ骨髄細胞 CFU-GM assay における条件検討結果

いずれのグラフもエラーバーは標準偏差 (A, B, C, D, F : n=3, D : n=2)。

A : 無処置イヌ由来あるいは LPS イヌ由来各血清の各濃度における好中球コロニー数

B : 無処置イヌ由来あるいは LPS イヌ由来各血清の各濃度におけるマクロファージコロニー数

C, D : LPS 投与イヌ由来血清各濃度における好中球コロニー数およびマクロファージコロニー数 (C の試験と D の試験はそれぞれ別のロットの血清でデータを取得した。)

E : 好中球コロニー数およびマクロファージコロニー数の経時的変化

F : 各播種細胞数における赤芽球コロニー数およびマクロファージコロニー数

### 3.4 細胞毒性試験系としての有用性の検証

#### 3.4.1 *in vitro* 試験系としての有用性検証

3.2 および 3.3 で確立した CFU assay 法が毒性の検出系として機能することを確認するために、骨髄毒性物質を培養系に暴露し、各種コロニーの反応を調べた。試験する骨髄毒性物質には、5-fluorouracil (5-FU), doxorubicin, cis-platinum (cisplatin) および azidothymidine (AZT) を使用した。各化合物のラット CFU assay の結果を図 3-9 に、イヌ CFU assay の結果を図 3-10 に示した。コロニー種により若干の反応の違いはみられたが、概ねラットとイヌとも同じ濃度範囲で各種コロニーが濃度依存的に減少反応を示した。これらの結果は、本研究で確立した骨髄細胞 CFU assay 法において、造血前駆細胞が毒性物質に対して反応する性質が維持できていることを示している。

続いて生体に骨髄毒性物質を投与後、その生体由来の骨髄細胞が本 CFU assay において示す反応を調べた。生体にはラットを、骨髄毒性物質には cisplatin を用いた。

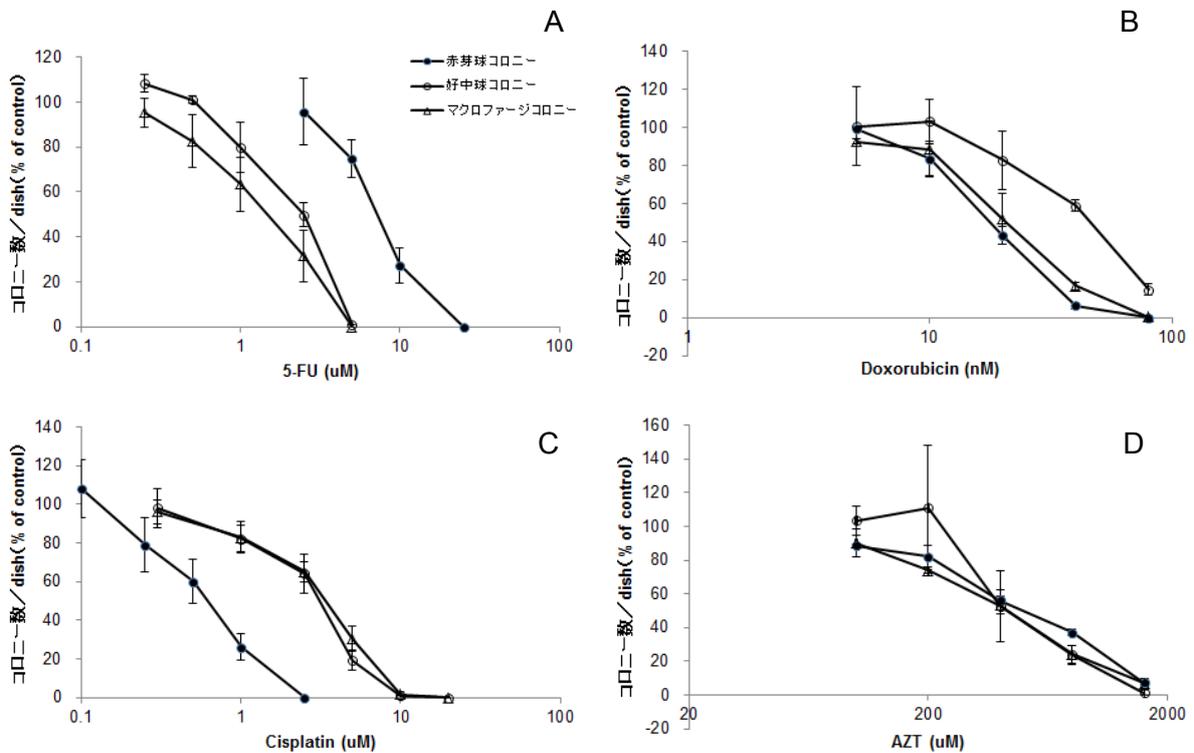


図 3-9 ラット骨髄細胞 CFU assay における骨髄毒性化合物に対する各種コロニーの濃度反応曲線

いずれのグラフもエラーバーは標準偏差 (n=3)。A : 5-FU, B : Doxorubicin, C : Cisplatin, D : AZT

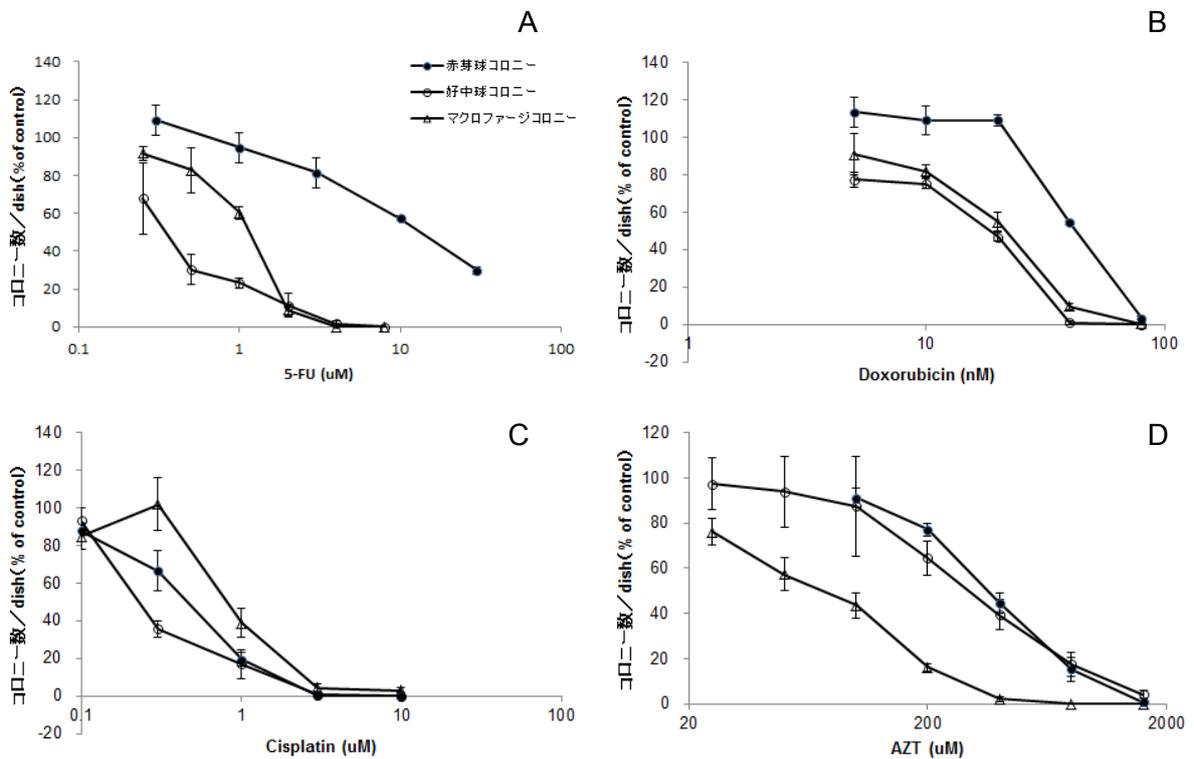


図3-10 イヌ骨髄細胞 CFU assay における骨髄毒性化合物に対する各種コロニーの濃度反応曲線

いずれのグラフもエラーバーは標準偏差 (n=3)。A : 5-FU, B : Doxorubicin, C : Cisplatin, D : AZT

### 3.4.2 *ex vivo* 試験系としての有用性検証

続いて、骨髄毒性が誘発された生体における造血前駆細胞の反応を本 assay で検出することを試みた。Cisplatin を 1 mg/kg 静脈内投与したラットの骨髄を採取し、設定した至適条件下で無処置動物由来骨髄細胞とコロニー数比較を行った。無処置群、cisplatin 投与群いずれも 3 例の雄ラットを設定し、個体ごとに CFU assay を実施した。各種コロニー数の群平均を比較した図を図 3-11 に示した。赤芽球コロニーと好中球コロニーは明らかに cisplatin 投与群のコロニー数が少なかった。マクロファージコロニーは標準偏差が大きく、また明らかな差とは言えなかったが、減少の傾向を示した。これらの結果から、骨髄毒性が誘発された動物における造血前駆細胞の毒性を本 assay で検出できることが検証された。

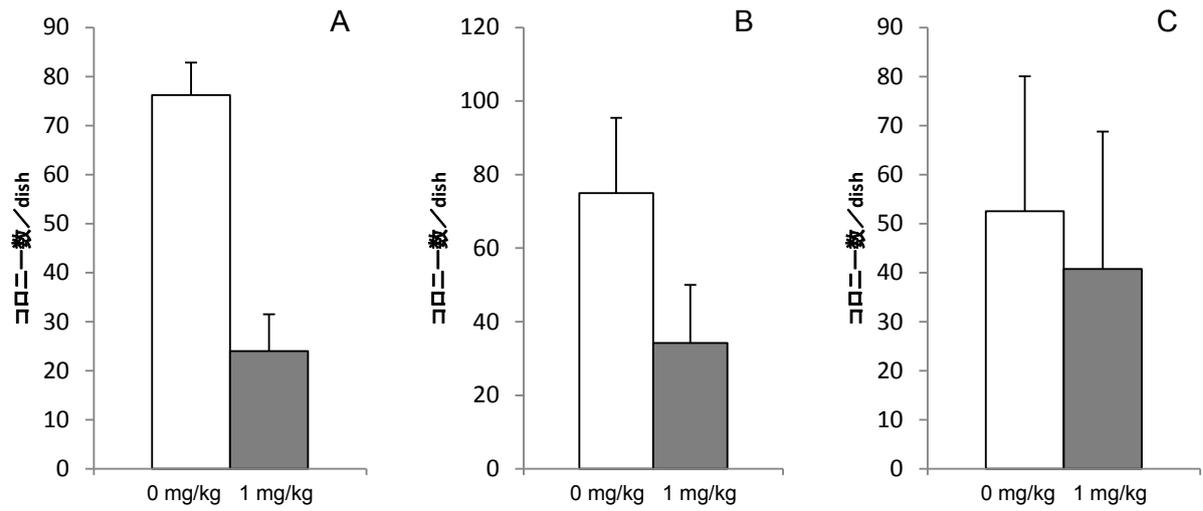


図 3-11 Cisplatin を投与したラット由来骨髄細胞の CFU assay 結果

いずれのグラフも各群の平均のコロニー数を表示。エラーバーは標準偏差 (n=3)。A: 赤芽球コロニー, B: 好中球コロニー, C: マクロファージコロニー

#### 4. 摂餌制限を施したラット由来骨髄細胞の特殊検査

摂餌制限を施したラットの骨髄細胞の状態を精査するために、特殊検査による解析を行った。1群あたり8週齢の雄3例を割り当て、1日当たりの給餌量が25gの群（対照群）と13gの群（50%給餌群）を設定した。2週間の摂餌制限期間後に骨髄を採取して、骨髄有核細胞数測定、ミエログラム、CFU assay および電子顕微鏡検査を実施した。全個体とも、摂餌制限期間中に給餌した全量を摂食したことが確認できた。

図4-1に体重の推移を示した。摂餌制限期間が終了した時点で、50%給餌群の体重は開始時の約93%であった。終了時と開始時の体重比、および体重の経時的推移ともに、条件設定として実施した試験と同様の結果であった。また胸骨について骨髄病理組織学的検査を実施したところ、本実験でも50%給餌群の個体はすべての個体に軽微あるいは軽度の細胞数減少が認められた（表4-1）。病理組織学的検査では細胞数減少が観察されたものの、骨髄有核細胞数測定においては2群間に差が見られなかった。いっぽうミエログラムでは、明らかな変化として50%給餌群における多染性赤芽球の減少、全赤血球系細胞の減少傾向および全顆粒球系細胞と全赤血球系細胞の比の増加が認められた（表4-2）。CFU assay においては、赤芽球コロニー、好中球コロニーおよびマクロファージコロニーのいずれも2群間で明らかな差はみられなかった（図4-2）。障害の程度をより詳細に見極めるために、電子顕微鏡で細胞小器官レベルの変化の有無を観察した。電子顕微鏡写真像を図4-3に示した。50%給餌群が対照群よりも細胞間隙が広いことが観察されたが、生体変化として意義のある所見とは考えられなかった。その他にも細胞障害やその他の器質的異常を示唆する所見は認められなかった。

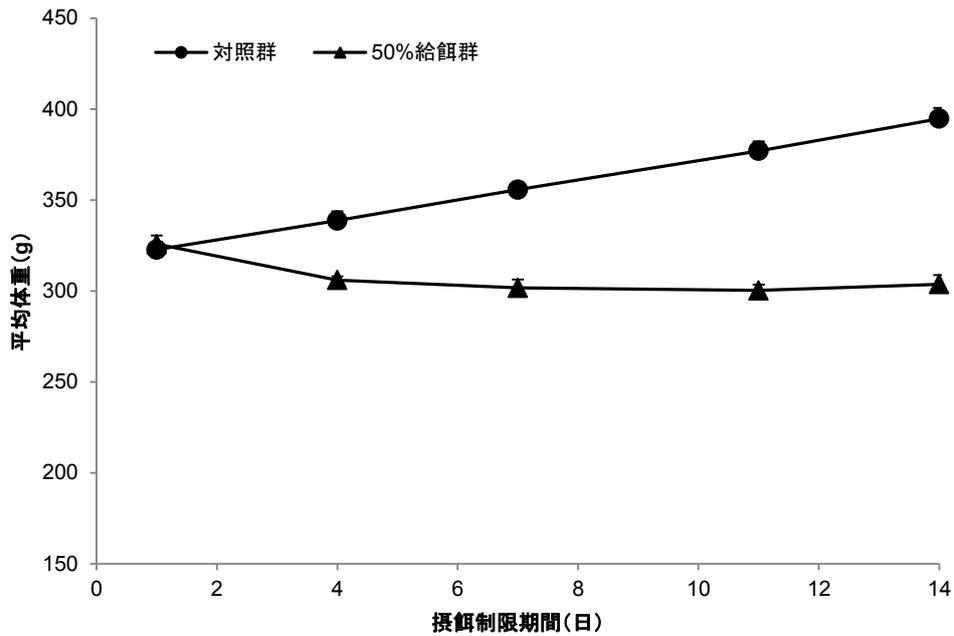


図 4-1 2 週間の摂餌制限を施したラットにおける体重の経時的変化

各群平均体重の推移を表示した。エラーバーは標準偏差 (n=3)。体重測定は制限給餌期間の各測定日 (1, 4, 7, 11 および 14 日目) の給餌直前に実施している。

病理組織学的所見	変化の程度	対照群	50%給餌群
検査した例数		3 例	3 例
胸骨骨髓の細胞数減少	軽微	-	1 例
	軽度	-	2 例

表 4-1 2 週間の摂餌制限を施したラットにおける胸骨骨髓の病理組織学的検査結果

所見の程度は実施施設の基準により、変化なし、軽微、軽度、中等度、高度の 5 段階で評価した。- : 対象所見を呈した個体はなし。

検査項目	群平均値 (標準偏差), 単位 : %	
	対照群	50%給餌群
骨髓有核細胞数( $10^4/\mu\text{L}$ )	211.3 (9.7)	213.0 (39.0)
前赤芽球	0.20 (0.35)	0.20 (0.00)
好塩基性赤芽球	2.37 (0.72)	3.00 (0.10)
多染性赤芽球	25.30 (1.18)	↓ 18.63 (0.35)
正染性赤芽球	0.07 (0.12)	0.00 (0.00)
分裂期赤芽球	0.07 (0.12)	0.00 (0.00)
全赤血球系細胞	28.00 (1.35)	(↓)21.83 (0.25)
骨髓芽球	0.20 (0.20)	0.27 (0.31)
前骨髓球	0.73 (0.23)	0.87 (0.12)
好中性骨髓球	4.07 (0.71)	4.20 (1.35)
好酸性骨髓球	0.27 (0.12)	0.13 (0.12)
好塩基性骨髓球	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
好中性後骨髓球	13.23 (1.18)	14.13 (0.76)
好酸性後骨髓球	1.43 (0.91)	1.13 (0.31)
好塩基性後骨髓球	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
好中性桿状核球	5.47 (1.40)	5.80 (1.67)
好中性分節核球	9.97 (0.93)	15.83 (2.06)
好酸球	1.33 (0.58)	0.87 (0.23)
好塩基球	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
分裂期顆粒球系細胞	0.00 (0.00)	0.13 (0.12)
全顆粒球系細胞	36.70 (2.14)	43.37 (2.23)
全顆粒球系細胞と 全赤血球系細胞の比	1.31 (0.04)	↑ 1.98 (0.08)
リンパ球	32.63 (3.44)	32.13 (2.56)
単芽球	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
単球	1.40 (0.20)	1.10 (0.46)
巨核芽球	0.00 (0.00)	0.07 (0.12)
巨核球	0.47 (0.31)	0.47 (0.64)
形質細胞	0.47 (0.12)	0.13 (0.12)
マクロファージ	0.33 (0.23)	0.93 (0.64)
破骨細胞	0.00 (0.00)	0.00 (0.00)
その他	0.13 (0.23)	0.13 (0.12)

表 4-2 2 週間の摂餌制限を施したラットにおける骨髓検査各項目の群平均値(n=3)

↓: 減少, ↑: 増加, 対照群に比してすべての個体で低値あるいは高値を示し, 実験実施施設における対照群の背景値の範囲を超える場合に, “減少”あるいは“増加”と判断した。

(↓): 減少傾向, 対照群に比してすべての個体で低値は示したが, 実験実施施設における対照群の背景値の範囲内の場合に, “減少傾向”とした。

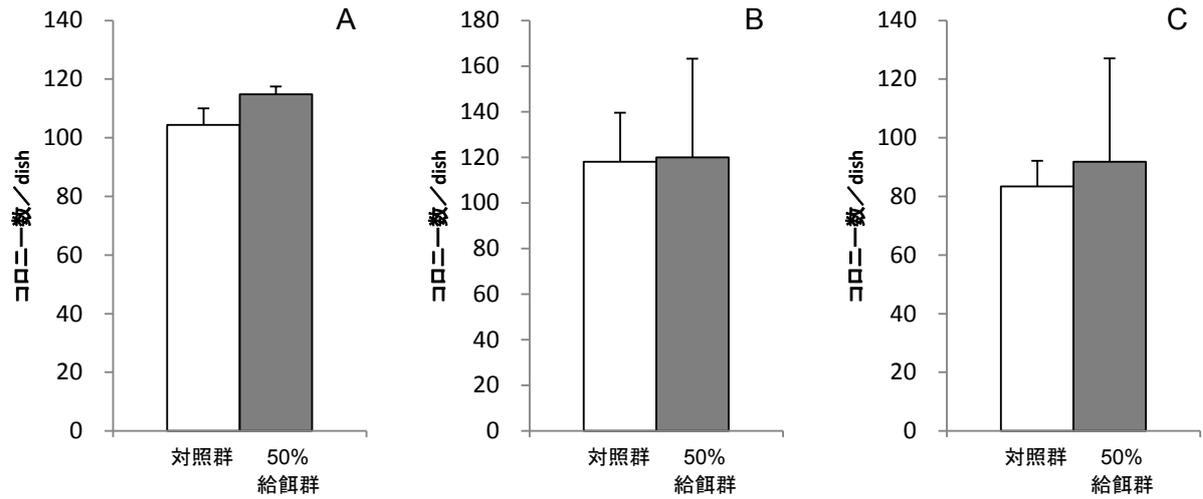


図 4-2 2 週間の摂餌制限を施したラット由来骨髄細胞の CFU assay 結果

いずれのグラフも各群の平均のコロニー数を表示した。エラーバーは標準偏差 (n=3)。A: 赤芽球コロニー, B: 好中球コロニー, C: マクロファージコロニー

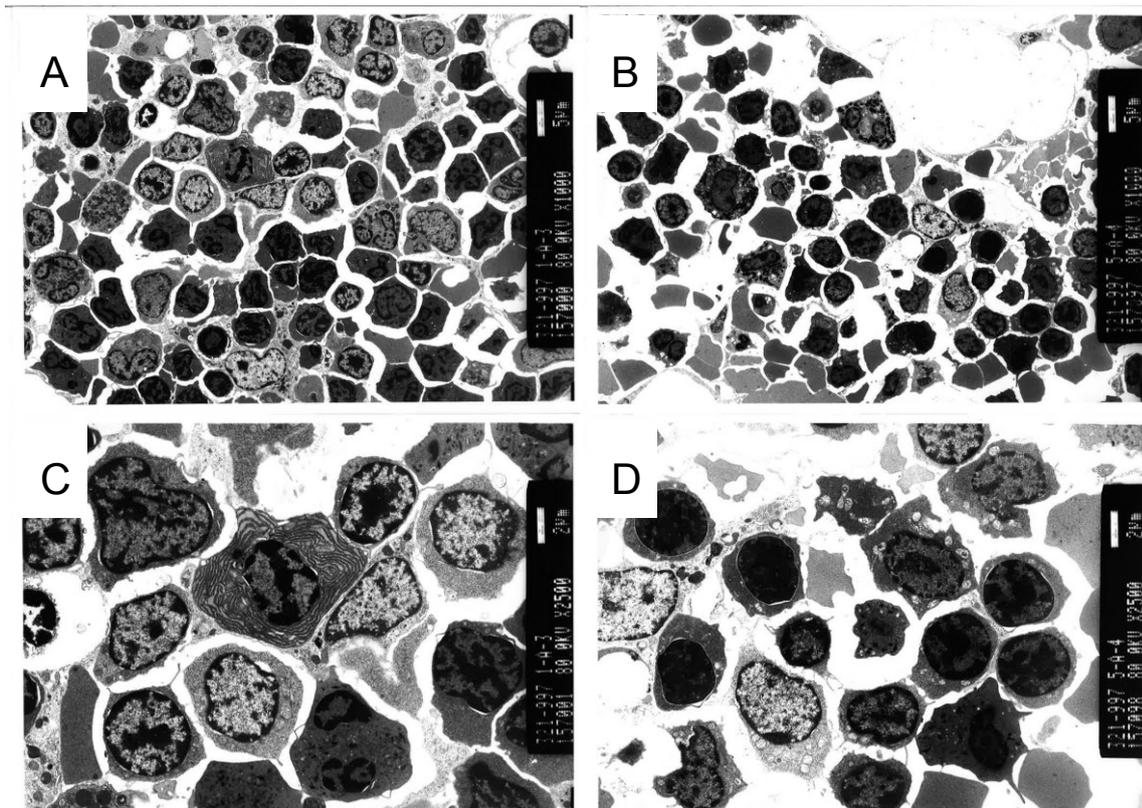


図 4-3 2 週間の摂餌制限を施したラットの胸骨骨髄電子顕微鏡写真 (スケールバー: 写真右に表示。A, B: 5  $\mu$ m, C, D: 2  $\mu$ m)

A: 対照群の胸骨骨髄, B: 50% 給餌群の胸骨骨髄, C: A の拡大像, D: B の拡大像

## 5. 摂餌制限を施したイヌ由来骨髓細胞の特殊検査

摂餌制限を施したイヌの骨髓細胞の状態を精査するために、特殊検査による解析を行った。結果の2で述べたイヌ4週間摂餌制限実験において採取した骨髓細胞の、骨髓有核細胞数測定およびミエログラムを実施し、さらに新たに摂餌制限を施した動物から採取した骨髓細胞のCFU assayを実施した。

図4-1に骨髓有核細胞数測定およびミエログラムの結果を示した。個体別に評価して明らかな変動を示した項目に増減の矢印を付した。骨髓有核細胞数は両摂餌制限群で減少が認められた。個体別にみると、骨髓の病理組織学的な変化がみられた個体と、有核細胞数が減少した個体は一致していた。ミエログラムについては、両摂餌制限群において正染性赤芽球以外のすべての赤血球系細胞比率が減少した。ミエログラムにおいては、骨髓の病理組織学的変化が認められなかった個体においても変化が検出された。赤血球系細胞比率の減少に対応し、両摂餌制限群とも比較的発生段階が後期にあたる数種の顆粒球系細胞比率、および単球比率に明らかな増加が認められた。その変化に伴い、全顆粒球系細胞の比率も増加した。

新たに摂餌制限を施したイヌについては、17~35か月齢の個体を用いて1群2例（雌雄各1例）を設定した。1個体に1日あたり300gの飼料を与えた条件（100%給餌）を対照群とし、群内の個体番号をNo.7（雄）およびNo.8（雌）と設定した。そして1個体に1日あたり70gの飼料（23%給餌）を与えた条件を23%給餌群とし、群内の個体番号をNo.9（雄）およびNo.10（雌）と設定した。No.8には50~120gの残餌が散見された。残餌が認められた日数は合計8日であった。同個体はこのほかに、摂餌期間の最終日にはまったく摂食しなかった。他の3例は、摂餌制限期間中に給餌した全量を摂食した。各群の体重の変化を経時的に測定し、4週間の摂餌制限期間終了時点の血液学的検査、胸骨および肋骨骨髓病理組織学的検査、および骨髓細胞のCFU assayを実施した。

いずれの個体にも、摂餌制限に起因したと考えられる全身状態の異常はみられなかった。体重の経時変化を図5-1に示したが、条件設定実験の同給餌量の動物と比較して、対照群の増加率および摂餌制限処置の減少率のいずれも変化の程度が小さかった。その原因は、本実験に用いた動物の月齢が大きく、成長が安定していたためと考えられる。本実験における23%給餌群の変化率は、条件設定時の50%給餌群の変化率と同程度であった。血液学的検査では摂餌制限に起因したと考えられる変化は認められなかった（データは提示せず）。骨髓の病理組織学的検査においても、胸骨および肋骨ともにいずれの群にも異常が認められなかった。

各個体から採取した骨髓細胞のCFU assayを実施したところ、図5-2に示した結果となった。赤芽球コロニーは23%給餌群の両個体で対照群よりも減少していた。このことは、病理組織学的検査では変化が検出できなくても、発生段階が未熟な赤血球前駆細胞には摂餌制限が影響していることを示している。一方で、好中球コロニーおよびマクロファージコロニーは個体差が大きく、影響の有無を明確には結論できなかった。しかしながら総じて評価すると、白血球系前駆細胞には明らかな影響がないと考えられた。

測定項目	対照群		50%給餌群		23%給餌群	
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6
骨髓有核細胞数 (10 <sup>4</sup> /μL)	126	150	152	↓65	↓82	↓86
以下ミエログラム (単位：%)						
前赤芽球	0.4	0.4	0.2	↓0.0	0.4	↓0.0
好塩基性赤芽球	2.4	1.7	1.6	↓0.2	1.6	↓0.6
多染性赤芽球	38.6	38.9	↓26.3	↓14.6	↓13.7	↓13.0
正染性赤芽球	0.2	0.2	0.0	0.0	0.2	0.2
分裂期赤芽球	0.8	1.0	↓0.0	↓0.4	↓0.0	↓0.6
全赤血球系細胞	42.4	42.2	↓28.1	↓15.2	↓15.9	↓14.4
骨髓芽球	0.0	0.0	0.0	0.0	↑0.2	0.0
前骨髓球	0.4	0.2	0.0	0.2	0.2	0.8
好中性骨髓球	1.8	2.5	1.6	1.4	2.8	3.5
好酸性骨髓球	0.6	0.6	1.3	0.6	1.4	0.0
好塩基性骨髓球	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
好中性後骨髓球	15.1	18.0	19.6	17.0	20.5	18.8
好酸性後骨髓球	0.8	0.4	↑1.3	↑3.6	↑1.2	0.6
好塩基性後骨髓球	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
好中性桿状核球	16.9	23.0	25.8	26.9	24.5	19.2
好中性分節核球	7.2	3.5	↑10.3	↑10.2	↑15.3	↑12.4
好酸球	1.6	0.8	↑2.5	↑10.6	↑4.0	↑2.1
好塩基球	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
分裂期顆粒球系細胞	0.0	0.4	0.5	0.4	0.2	0.0
全顆粒球系細胞	44.4	49.4	↑62.9	↑70.9	↑70.3	↑57.4
全顆粒球系細胞／全赤血球系細胞比	1.05	1.17	↑2.24	↑4.66	↑4.42	↑3.99
リンパ球	11.5	7.4	6.5	12.2	11.3	26.6
単芽球	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
単球	0.6	0.2	↑0.9	↑0.8	↑1.0	↑1.2
巨核芽球	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
巨核球	0.6	0.4	0.7	0.6	0.0	0.0
形質細胞	0.4	0.4	0.7	0.0	0.8	0.2
マクロファージ	0.2	0.2	0.0	0.4	0.8	0.2
破骨細胞	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
その他	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

表 5-1 4 週間の摂餌制限を施したイヌにおける骨髓検査各項目の個体別値

↓：減少，↑：増加，対照群に比して低値あるいは高値を示し，実験実施施設における対照群の背景値の範囲を超える場合に，“減少”あるいは“増加”と判断した。

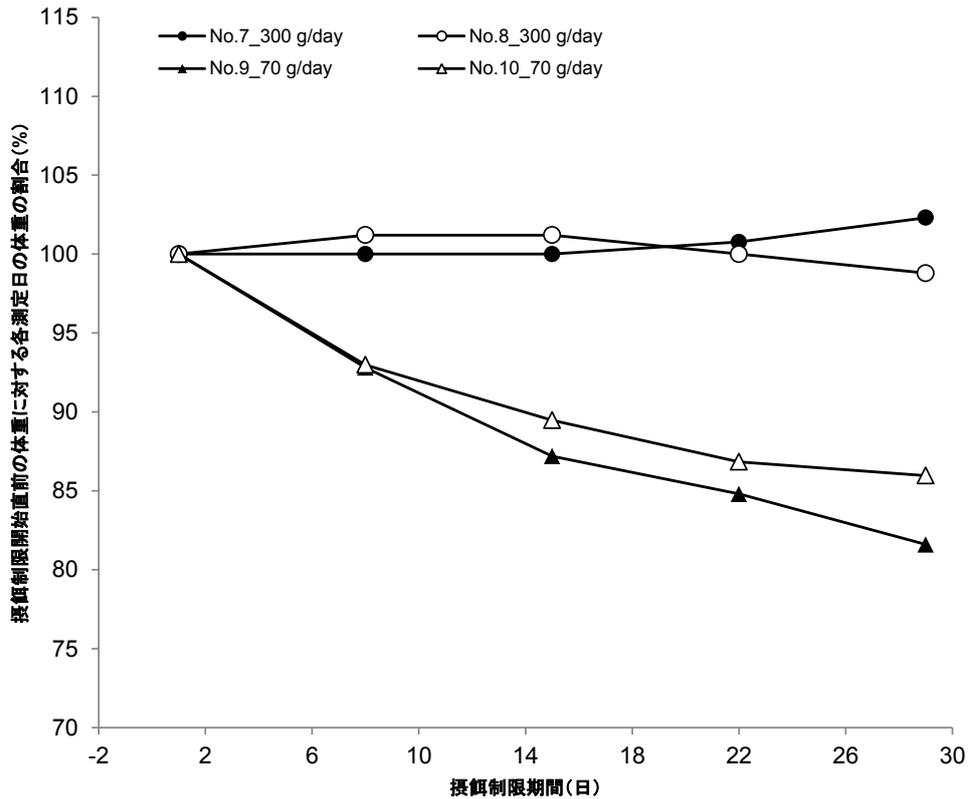


図 5-1 4 週間の摂餌制限を施したイヌにおける体重の経時変化

個体別に体重の推移を表示した。体重測定は制限給餌期間の各測定日（摂餌制限開始日，摂餌制限期間 8，15，22 および制限給餌期間終了の翌日）の給餌直前あるいは剖検前に実施している。

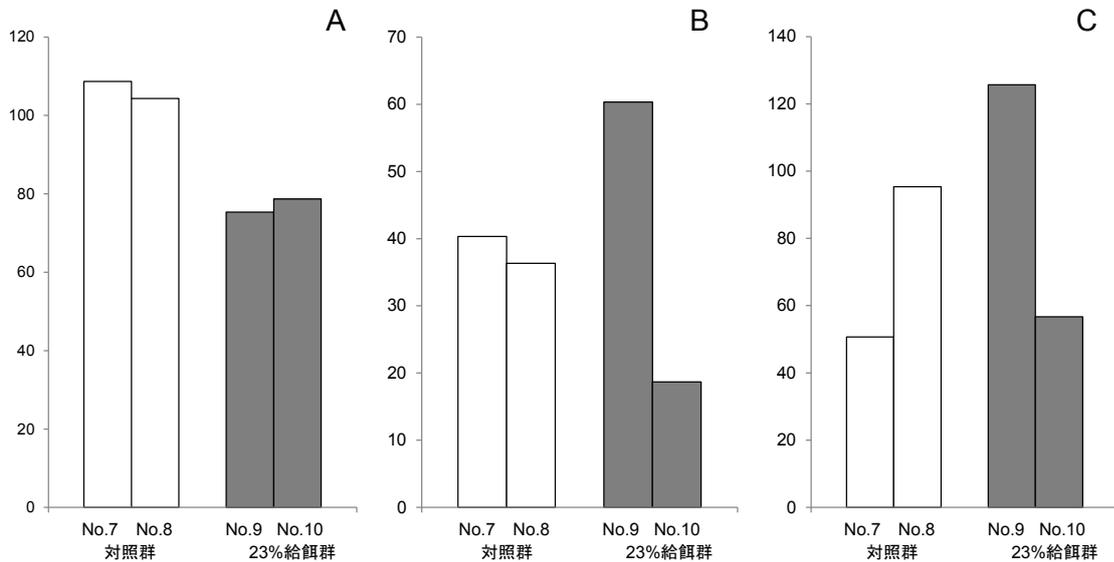


図 5-2 4 週間の摂餌制限を施したイヌ由来骨髓細胞の CFU assay 結果

個体ごとにコロニー数を表示した。A: 赤芽球コロニー，B: 好中球コロニー，C: マクロファージコロニー

## 6. 摂餌制限動物由来骨髄および低栄養条件下培養細胞における遺伝子発現変化

### 6.1 摂餌制限を施したラットおよびイヌ由来骨髄細胞の遺伝子発現データ取得

摂餌制限を施した動物の骨髄が示す変化を、組織あるいは細胞レベルで調べたが、さらに遺伝子発現レベルの特徴を調べるために、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。4および5項の摂餌制限ラットあるいはイヌ骨髄のCFU assayの際に調製した骨髄懸濁液の一部を本実験に適用した。まず全体の遺伝子発現の程度に群間差があることを確認するために、チップ上の全遺伝子の発現量を指標とした、個体間の階層的クラスタリング解析を行った。遺伝子発現量は、対照群のシグナルの平均値に対する各個体のシグナル比を指標とした。ラット個体間の遺伝子発現クラスタリングおよびヒートマップを図6-1に、イヌのクラスタリングおよび遺伝子発現のヒートマップを図6-2に示した。以降に示すクラスタリングおよびヒートマップも含め、次のような条件で解析および表示している。対照群のシグナル平均に対する比として、変化がない遺伝子は白、2倍以上の増加は赤、1/2以下の減少は灰色。その間の変化量は程度に対応した中間の色調（濃さ）。各ヒートマップの右上に示しているクラスタリングに使用した条件は、[クラスタリング方法:UPGMA, 距離の計測:Tanimoto, 並べ替えの重み:入力の前平均ランク, 正規化:なし, 空の値の置換:定数値0]である。

ラットについては大きく分かれた2つのクラスターに対照群の3例と50%給餌群の3例がそれぞれ分類され、各クラスター内での個体差はほとんどなかった。この結果は、骨髄細胞において、摂餌制限により一定の遺伝子発現変化が誘発されたことを示している。

イヌにおいても、まず対照群の2例のみが含まれるクラスターが明確に分類された。そこからかなり大きな距離で23%給餌群の1例が類似性を示し、そこからほとんど距離をとることなく23%給餌群のもう1例が類似性を示した。イヌの結果を総じて評価すると、対照群2例の類似性と23%給餌群2例の類似性が高く、2群間には明確な相違があると解釈できる。すなわちイヌにおいても摂餌制限の影響で骨髄細胞に一定の遺伝子発現変化が誘発されたことが示された。

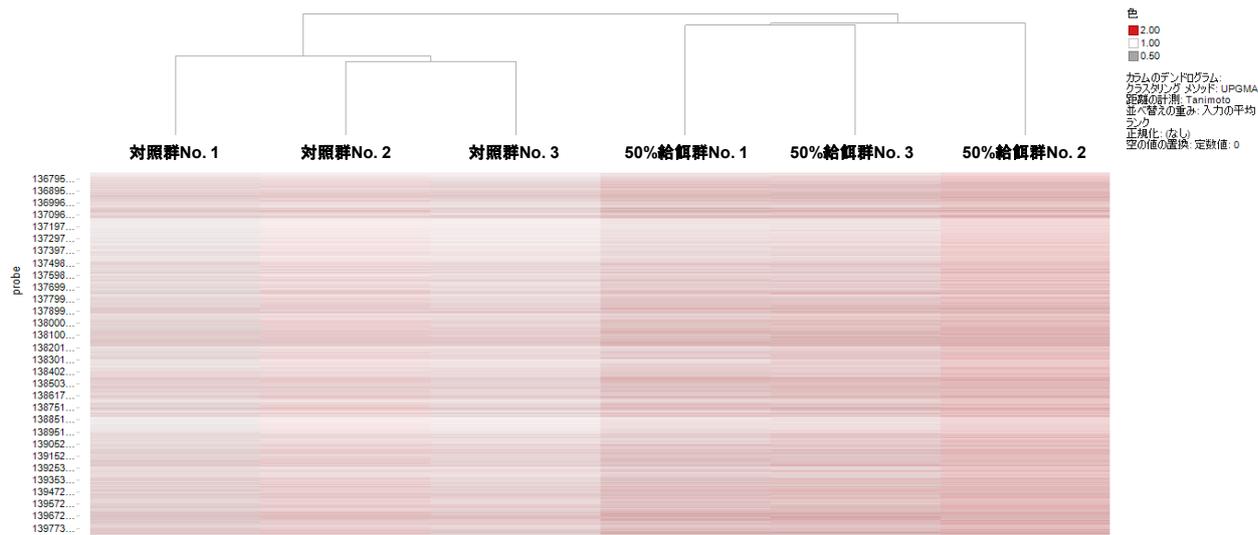


図6-1 摂餌制限群および対照群由来骨髄のラット GeneChip 上の全遺伝子発現を対象とした個体間のクラスタリング（上部）および遺伝子発現量のヒートマップ（下部）

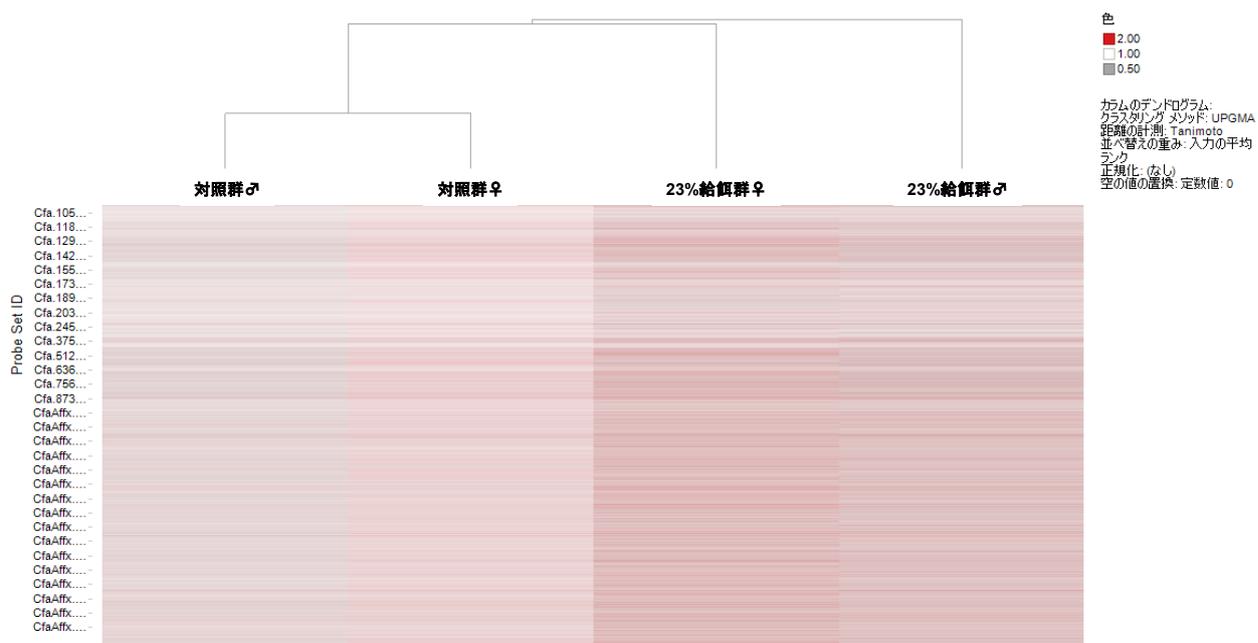


図6-2 摂餌制限を施したイヌおよび対照群由来骨髄のイヌ GeneChip 上の全遺伝子発現を対象とした個体間のクラスタリング（上部）および遺伝子発現量のヒートマップ（下部）

## 6.2 株細胞 HL60 の低栄養条件下培養および骨髄抑制誘発化合物処理による遺伝子発現データ取得

マイクロアレイにより得られるデータは膨大であり、また生体における反応は個体差が大きい場合があり、解析が困難になることも想定された。そこで、低栄養条件の本質的な変化

を捉えやすい系を思案し、低栄養条件の培地（低アミノ酸培地）で培養した株細胞、HL60（ヒト前骨髄球白血病細胞由来）の遺伝子変動を調べることにした。さらに、それぞれに細胞毒性メカニズムが異なる骨髄抑制物質である 5-FU, Doxorubicin (DOX), Cisplatin (DDP) に暴露された HL60 における遺伝子発現変動も調べた。複数化合物のプロファイルを調べることで、毒性メカニズムが異なっても共通に表れる遺伝子発現変化、すなわち非特異的な遺伝子発現変化を特定できることを期待した。骨髄抑制物質に非特異的な変化が低栄養条件には表れなければ、その変化の有無が摂餌量減少による骨髄反応を見分ける指標になる可能性がある。共通の変化を探索するためには、細胞反応をなるべく揃えることが望ましいと考え、細胞生存率がなるべく同じになる条件で遺伝子発現を調べることにした。具体的には、各処理における細胞増殖反応を予備的に調べ、明らかな細胞毒性を示すものの、細胞数を極端に減少させない条件（アミノ酸含有量あるいは化合物濃度）を設定し、それぞれで設定した条件で細胞生存率が大きく異なることを確認した（材料と方法の章に予備実験データを記載）。その条件は、低栄養培地は基礎培地をアミノ酸不含にすること、5-FU は 50  $\mu$ M, DOX は 100 nM, DDP は 2  $\mu$ M でそれぞれ暴露することであった。遺伝子発現データを取得した実験における増殖曲線は図 6-3 に示した。2 回の実験を行い、結果は良好に再現された。いずれの条件も、対象に比べると明らかに増殖の阻害あるいは細胞毒性が認められた。低栄養培地と DDP 処理においてはわずかな細胞数減少が培養 3 日目まで続いた。その後培地を標準培地に交換したところ、両条件とも細胞増殖が回復した。一方 5-FU 処理と DOX 処理においては、培養 3 日目までわずかな増殖あるいは細胞数の維持がみられたが、3 日目からの標準培地への交換にもかかわらず、その後は細胞数が減少し続けた。

各条件の増殖曲線を基に、培養 1 日目と 3 日目の細胞を回収し、マイクロアレイにより網羅的な遺伝子発現を調べた。培養 1 日目は対照群と各処理群の間で細胞増殖反応に差がなかったが、その後の差につながる遺伝子発現変動が始まっていることを期待して選定した。培養 3 日目は、細胞増殖反応に対照群と各処理群の間で明らかな差があり、かつ各処理群の細胞数が一定量保たれていることを根拠に選定した。全体の遺伝子発現の程度に群間差があることを確認するために、チップ上の全遺伝子の発現量を指標とした、群間の階層的クラスタリング解析を行った。その結果を図 6-4 に示した。各処理群の各遺伝子の発現量を、対照における発現量に対する比として表した。

培養 1 日目については、全体的な発現量が 1 回目の実験のほうが多い傾向がみられたが、2 回の実験ともに各処理による遺伝子発現変化は明らかに認められていた。そして群間の相違性、類似性については、ほとんど同じ傾向を示した。その内容は、骨髄毒性化合物の 3 群間で類似性が高く、続いてそれらと低栄養培地が類似性を示す、というものであった。

培養 3 日目についても、2 回の実験ともに各処理による遺伝子発現変化が明らかに認められており、群間の相違性、類似性については、ほとんど同じ傾向を示した。その内容は、低栄養培地、5-FU 処理および DDP 処理の 3 群間で類似性が高く、続いてそれらと DOX 処理が類似性を示す、というものであった。

ここまでの結果から、*in vivo*, *in vitro* とともに、さらなる遺伝子発現解析により、摂餌制限あるいは低栄養状態に特徴的な反応が示唆されると期待されたため、以降により詳細な解析を行った。

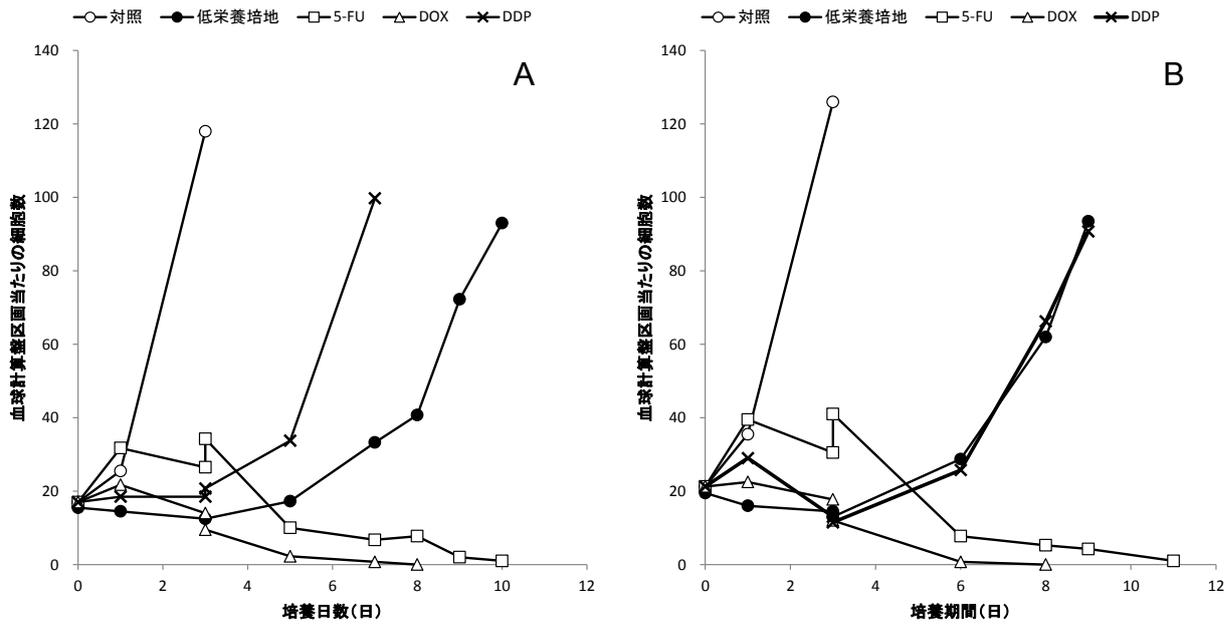


図 6-3 低栄養培地あるいは骨髄毒性誘発化合物による HL60 の増殖への影響  
 A : 1 回目の実験における増殖曲線, B : 2 回目の実験における増殖曲線, 各曲線のラベルはグラフの上部に示した。培養 3 日目で培地を標準培地に交換し回復性を調べた。

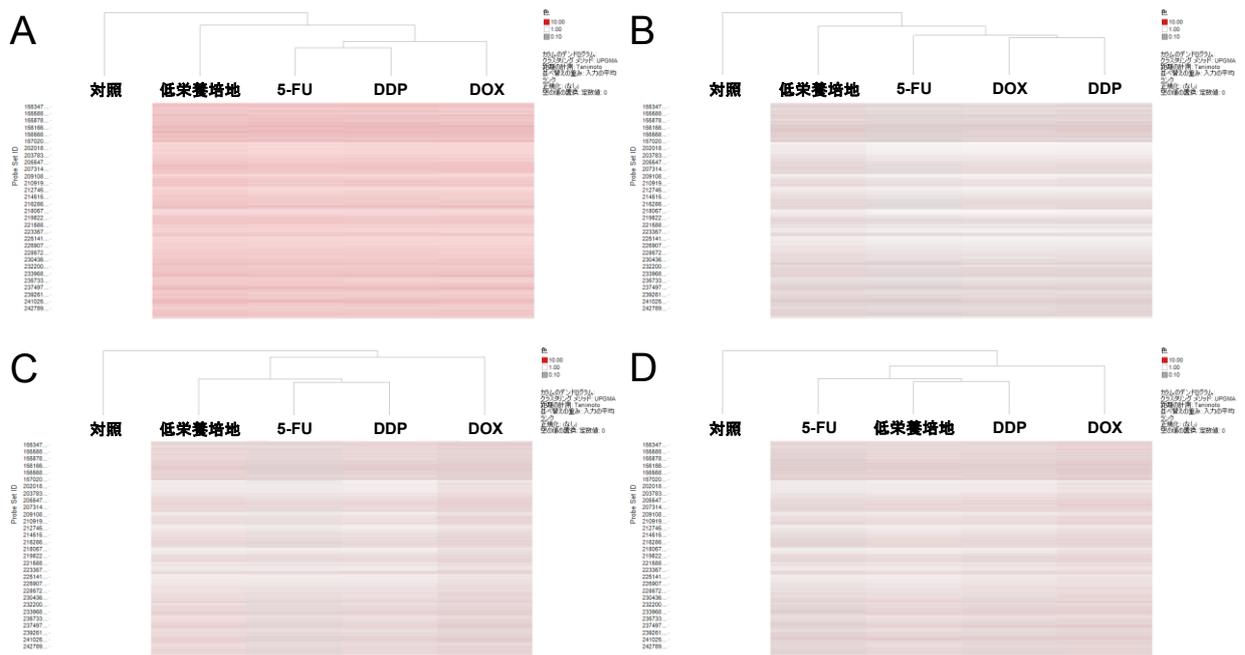


図 6-4 低栄養培地あるいは骨髄毒性誘発化合物による HL60 の, ヒト GeneChip 上の遺伝子発現を対象とした処理間のクラスタリング (上部) および遺伝子発現量のヒートマップ (下部)。  
 A: 1 回目の実験における培養 1 日目の遺伝子変動, B: 2 回目の実験における培養 1 日目の遺伝子変動,  
 C: 1 回目の実験における培養 3 日目の遺伝子変動, D: 2 回目の実験における培養 3 日目の遺伝子変動

### 6.3 摂餌制限を施したラット由来骨髄細胞遺伝子発現のパスウェイ解析

続いて遺伝子発現から推定される反応経路の解析を行った。摂餌制限を施したラットについては、各遺伝子について群間の平均値を比較して解析対象の遺伝子を絞り込んだ。対照群に対して給餌群で2倍以上増加し、かつt検定により $p < 0.05$ で有意な変化を示した遺伝子を対象にIngenuity Pathway Analysis (IPA, トミーデジタルバイオロジー株式会社, 東京都台東区)により解析を行った。遺伝子発現変化がその反応経路に関わっていない可能性を示すp値を指標とし、 $p < 0.05$  ( $-\log > 1.3$ )の反応経路を選定して表6-1に示した。表中に示した反応経路は、いずれも骨髄抑制に直接結びつくとは考えづらかった。

反応経路	-Log (p 値)
Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Apoptosis of Target Cells	4.01
OX40 Signaling Pathway	3.79
CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	3.49
iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	3.10
Type I Diabetes Mellitus Signaling	2.96
Nur77 Signaling in T Lymphocytes	2.75
Primary Immunodeficiency Signaling	2.49
Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis	2.39
Hematopoiesis from Pluripotent Stem Cells	2.39
Autoimmune Thyroid Disease Signaling	2.25
Graft-versus-Host Disease Signaling	2.20
CD28 Signaling in T Helper Cells	2.13
Cdc42 Signaling	2.09
Allograft Rejection Signaling	2.08
B Cell Development	1.85
T Cell Receptor Signaling	1.60
Glutamate Receptor Signaling	1.52
PKC $\theta$ Signaling in T Lymphocytes	1.47
Antigen Presentation Pathway	1.44
Retinoate Biosynthesis II	1.41
Tyrosine Biosynthesis IV	1.41
4-aminobutyrate Degradation I	1.41
L-serine Degradation	1.41
Calcium Signaling	1.35

表 6-1 摂餌制限を施したラットにおける遺伝子発現から推定される骨髄細胞の反応経路

IPA 解析により表示される p 値の -Log を記載した。p 値は遺伝子発現変化がその反応経路に関わっていない可能性を示す。-Log が大きいと、遺伝子発現変化と反応経路の関わりが大きいと推定される。

### 6.4 摂餌制限を施したイヌ由来骨髄細胞遺伝子発現のパスウェイ解析

摂餌制限を施したイヌについても、各遺伝子について群間の平均値を比較して解析対象の遺伝子を絞り込んだ。イヌにおいては、対照群に対して給餌群で8倍の発現変動を示した遺伝子を対象にIPA解析を行った。ラットと同様に、p値の $-\log$ が $>1.3$ の反応経路を選定して表6-2に示した。表中に示した反応経路は、ラットと同様に、いずれも骨髄抑制に直に結びつく

とは考えづらかった。

反応経路	-Log (p 値)
Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	2.88
MSP-RON Signaling Pathway	2.30
Xenobiotic Metabolism Signaling	2.14
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	1.84
Neurotrophin/TRK Signaling	1.82
Phenylethylamine Degradation I	1.79
PEDF Signaling	1.78
Complement System	1.76
NADH Repair	1.62
Dermatan Sulfate Biosynthesis (Late Stages)	1.58
Chondroitin Sulfate Biosynthesis (Late Stages)	1.53
Signaling by Rho Family GTPases	1.51
Coagulation System	1.51
Systemic Lupus Erythematosus Signaling	1.50
Virus Entry via Endocytic Pathways	1.50
Tetrahydrofolate Salvage from 5,10-methenyltetrahydrofolate	1.49
Thyroid Cancer Signaling	1.46
Heparan Sulfate Biosynthesis (Late Stages)	1.42
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	1.42
Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons	1.39
RhoGDI Signaling	1.38
Chondroitin Sulfate Biosynthesis	1.36
Dermatan Sulfate Biosynthesis	1.32
Role of Tissue Factor in Cancer	1.32

表 6-2 摂餌制限を施したイヌにおける遺伝子発現から推定される骨髄細胞の反応経路

IPA 解析により表示される p 値の -Log を記載した。p 値は遺伝子発現変化がその反応経路に関わっていない可能性を示す。-Log が大きいと、遺伝子発現変化と反応経路の関わりが大きいと推定される。

## 6.5 各条件下の HL60 遺伝子発現のパスウェイ解析

HL60 については、対照群に対して処置群で 10 倍の発現変動を示した遺伝子を対象に IPA 解析を行った。ラットおよびイヌの解析と同様に、関連性の大きさの指標を p 値とし、条件ごとに上位 5 つの反応経路を表 6-3 に示した。ランキングされた反応経路からは、骨髄抑制に関わると考えられる経路の推察が困難であった。そこで、遺伝子発現変化との関連が大きいと推察される細胞機能変化を IPA 解析で調べた。反応経路と同じく、ランキングを表 6-4 に示した。ランキングの指標は反応経路と同じく p 値であるが、値の表示は解析機能の表示に従って対数表示とした。各処理条件を対比すると、低栄養条件の 1 日目における Cell Death and Survival は、他の条件と照らし合わせて特異性の高い変化と考えられた。この機能の詳細を検索したところ、表 6-5 の内訳であった。白血球のアポトーシスが最上位にランクされ、続いてリンパ球のアポトーシスあるいは細胞死が続く結果であった。このうち上位 5 つの機能活性を規定した遺伝子を検索したところ、表 6-6 に示す遺伝子群が示された。これらの遺伝子はい

ずれも、対照群の発現シグナルの 10 倍以上のシグナル値を示すものであった。示された遺伝子は、多くの文献に示されているアポトーシス関連遺伝子は含まれていなかった (Moffitt 2010, Djavaheri-Mergny 2010, Gonzalez 2010, Jazirehi 2010, Schattenberg 2011, Zhou 2011, Ulukaya 2011, Kuranaga 2012, Long 2012, Würstle 2012, Ouyang 2012, Zielinski 2013)。しかしながら、アポトーシス実行経路に関わるものがよく知られている遺伝子変化についてシグナル値を確認したところ、caspase 依存のアポトーシスカスケードの主要因子である caspase 3, 8, 9 のシグナル値がいずれも対照の約 2~3 倍であった。Caspase 依存のカスケードの関与も可能性として残る結果と考えられた。

摂餌制限により軽度に抑制された骨髄、あるいは抑制が起きる直前の骨髄においては、骨髄細胞領域面積の変化の程度から推し測ると、*in vitro* の培養 1 日目の細胞反応よりも程度が弱い変化と考えられた。そのうえで、低栄養条件の培養細胞における初期段階の遺伝子発現プロファイルは、本研究で摂餌制限動物から採取した遺伝子サンプルに外挿できる可能性が高いと考えた。すなわち、摂餌制限動物の網羅的な遺伝子発現を、Cell Death and Survival に焦点を当てておこなうことで、骨髄抑制に関わる重要な反応がみえることを期待し、以降に摂餌制限ラットおよびイヌの骨髄細胞由来の遺伝子発現解析を継続した。

条件	反応経路	-Log (p 値)
1 日目		
低栄養 培地	• IL-17A Signaling in Fibroblasts	5.30
	• IL-17A Signaling in Gastric Cells	5.10
	• TNFR2 Signaling	4.80
	• Differential Regulation of Cytokine Production in Macrophages and T Helper Cells by IL-17A and IL-17F	4.67
	• Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	4.41
5-FU	• Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	3.12
	• Superpathway of Citrulline Metabolism	2.02
	• Glycerol-3-phosphate Shuttle	1.70
	• ERK5 Signaling	1.64
	• Methionine Salvage II (Mammalian)	1.53
DOX	• Glutamate Receptor Signaling	2.24
	• Methylglyoxal Degradation III	2.16
	• Thio-molybdenum Cofactor Biosynthesis	1.89
	• Altered T Cell and B Cell Signaling in Rheumatoid Arthritis	1.80
	• Glycerol-3-phosphate Shuttle	1.59
DDP	• nNOS Signaling in Skeletal Muscle Cells	3.15
	• Superpathway of Citrulline Metabolism	3.06
	• Agrin Interactions at Neuromuscular Junction	2.76
	• Citrulline-Nitric Oxide Cycle	2.62
	• Calcium Signaling	2.22
3 日目		
低栄養 培地	• Differential Regulation of Cytokine Production in Macrophages and T Helper Cells by IL-17A and IL-17F	7.08
	• Differential Regulation of Cytokine Production in Intestinal Epithelial Cells by IL-17A and IL-17F	6.24
	• IL-17A Signaling in Fibroblasts	6.00
	• IL-17A Signaling in Gastric Cells	5.96
	• Role of Hypercytokinemia/hyperchemokine in the Pathogenesis of Influenza	4.43
5-FU	• IL-17A Signaling in Gastric Cells	5.37
	• Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	4.92
	• Airway Pathology in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	3.72
	• Differential Regulation of Cytokine Production in Macrophages and T Helper Cells by IL-17A and IL-17F	3.59
	• Role of Pattern Recognition Receptors in Recognition of Bacteria and Viruses	3.55
DOX	• Role of Macrophages, Fibroblasts and Endothelial Cells in Rheumatoid Arthritis	8.36
	• Role of Hypercytokinemia/hyperchemokine in the Pathogenesis of Influenza	8.33
	• Differential Regulation of Cytokine Production in Macrophages and T Helper Cells by IL-17A and IL-17F	7.99
	• IL-10 Signaling	7.14
	• Differential Regulation of Cytokine Production in Intestinal Epithelial Cells by IL-17A and IL-17F	6.84
DDP	• Granulocyte Adhesion and Diapedesis	5.80
	• Agranulocyte Adhesion and Diapedesis	4.20
	• IL-17A Signaling in Gastric Cells	3.55
	• Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation	3.05
	• IL-6 Signaling	2.71

表 6-3 HL60 の遺伝子発現から推定される低栄養培地培養あるいは骨髄毒性誘発化合物暴露に対する反応経路

IPA 解析により表示される p 値の -Log を記載した。p 値は遺伝子発現変化がその反応経路に関わっていない可能性を示す。-Log が大きいと、遺伝子発現変化と反応経路の関わりが大きいと推定される。

条件	機能	p 値
1 日目		
低栄養 培地	Cell Death and Survival	2.40E-11-8.02E-04
	Cellular Development	1.14E-09-7.83E-04
	Cellular Growth and Proliferation	1.14E-09-7.27E-04
	Hematological System Development and Function	1.14E-09-8.02E-04
	Neurological Disease	3.15E-08-7.05E-04
5-FU	Amino Acid Metabolism	1.91E-05-1.99E-02
	Small Molecule Biochemistry	1.91E-05-2.36E-02
	Cell Morphology	5.85E-05-1.99E-02
	Nervous System Development and Function	5.85E-05-2.36E-02
	Cancer	9.74E-05-2.36E-02
DOX	Cell-To-Cell Signaling and Interaction	5.03E-05-1.87E-02
	Nervous System Development and Function	5.03E-05-2.19E-02
	Embryonic Development	6.13E-05-2.10E-02
	Organ Development	6.13E-05-1.96E-02
	Organismal Development	6.13E-05-2.19E-02
DDP	Organismal Injury and Abnormalities	1.35E-06-1.29E-02
	Organismal Development	6.25E-06-1.29E-02
	Cancer	8.39E-06-1.29E-02
	Cell Cycle	1.20E-05-1.29E-02
	Tumor Morphology	1.67E-05-1.29E-02
3 日目		
低栄養 培地	Cell-To-Cell Signaling and Interaction	8.05E-12-1.08E-03
	Cellular Movement	8.05E-12-1.23E-03
	Hematological System Development and Function	8.05E-12-1.23E-03
	Immune Cell Trafficking	8.05E-12-1.23E-03
	Inflammatory Response	4.23E-11-1.17E-03
5-FU	Cellular Movement	5.07E-08-1.86E-03
	Immunological Disease	9.18E-08-1.77E-03
	Cell-To-Cell Signaling and Interaction	9.76E-08-1.83E-03
	Hematological System Development and Function	9.76E-08-1.86E-03
	Immune Cell Trafficking	9.76E-08-1.86E-03
DOX	Cellular Movement	2.05E-21-8.17E-06
	Immune Cell Trafficking	2.05E-21-8.17E-06
	Inflammatory Response	4.44E-20-1.03E-05
	Hematological System Development and Function	6.19E-20-9.43E-06
	Cell-To-Cell Signaling and Interaction	4.58E-18-1.03E-05
DDP	Cellular Movement	2.70E-11-2.88E-03
	Immune Cell Trafficking	2.70E-11-2.66E-03
	Hematological System Development and Function	6.42E-11-2.70E-03
	Inflammatory Response	7.32E-11-2.99E-03
	Cell-To-Cell Signaling and Interaction	4.53E-09-2.99E-03

表 6-4 HL60 の遺伝子発現から推定される低栄養培地培養あるいは骨髄毒性誘発化合物暴露に対する機能変化

IPA 解析により表示される p 値を記載した。p 値は遺伝子発現変化がその反応経路に関わっていない可能性を示す。p 値が小さいと、遺伝子発現変化と反応経路の関わりが大きいと推定される。

機能	p 値
apoptosis of leukocytes	2.40E-11
apoptosis of lymphocytes	9.38E-10
cell death of lymphocytes	4.01E-09
apoptosis	5.99E-09
cell death of T lymphocytes	1.02E-08
apoptosis of T lymphocytes	1.45E-08
cell death of immune cells	3.68E-08
cell death of blood cells	4.48E-08
cell death	1.09E-07
apoptosis of hematopoietic progenitor cells	1.91E-07
cell death of prostate cancer cell lines	1.91E-07
cell death of hematopoietic progenitor cells	2.55E-07
necrosis	2.95E-07
cell viability of prostate cancer cell lines	1.52E-06
apoptosis of melanoma cell lines	3.28E-06
apoptosis of prostate cancer cell lines	3.44E-06
apoptosis of B lymphocytes	5.13E-06
apoptosis of thymocytes	1.48E-05
apoptosis of lymphoid organ	1.55E-05
apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes	7.71E-05
apoptosis of pre-B lymphocytes	9.67E-05
cell death of breast cell lines	1.24E-04
apoptosis of tumor cell lines	1.69E-04
apoptosis of myeloid cells	1.82E-04
cell death of myeloid cells	1.90E-04
apoptosis of kidney cancer cell lines	2.09E-04
loss of thymic medullary epithelial cells	3.99E-04
cell death of phagocytes	5.72E-04
apoptosis of phagocytes	6.57E-04
apoptosis of lymphoblasts	7.20E-04
apoptosis of peripheral blood leukocytes	7.20E-04
apoptosis of neurons	7.34E-04
cell death of tumor cells	7.69E-04
cell death of cancer cells	8.02E-04

表 6-5 HL60 の遺伝子発現から推定される低栄養培地 1 日間培養における機能変化の詳細  
IPA 解析により表示される p 値を記載した。p 値は遺伝子発現変化がその反応経路に関わっていない可能性を示す。p 値が小さいと、遺伝子発現変化と反応経路の関わりが大きいと推定される。

機能	機能活性を規定した遺伝子
apoptosis of leukocytes	BCL11B,BCL3,BIRC3,CAV1,CCL2,CCL3,CCL4,CCL5,CD22,CD69,CD70,CXCL8,DUSP4,EGR1,EGR3,EPHA4,FCGR3A/FCGR3B,FOS,FYN,G6PC,IER3,IGHM,JUN,LCK,LDLR,LEPR,NFKB2,NFKBIA,NFKBID,NR4A3,PAWR,RAG2,SERPINA3,TNF,TNFRSF17,TSLP,XCL1
apoptosis of lymphocytes	BCL11B,BCL3,CAV1,CCL3,CCL4,CCL5,CD22,CD70,DUSP4,EGR1,EGR3,EPHA4,FCGR3A/FCGR3B,FOS,FYN,IER3,IGHM,JUN,LCK,NFKB2,NFKBIA,NFKBID,NR4A3,PAWR,RAG2,TNF,TNFRSF17,TSLP,XCL1
cell death of lymphocytes	BCL11B,BCL3,CAV1,CCL3,CCL4,CCL5,CD22,CD70,DUSP4,EGR1,EGR3,EPHA4,FCGR3A/FCGR3B,FOS,FTH1,FYN,IER3,IGHM,JUN,LCK,NFKB2,NFKBIA,NFKBID,NR4A3,PAWR,RAG2,TNF,TNFRSF17,TSLP,XCL1
apoptosis	AKAP12,ARG1,ARID3B,ASB2,ASCL1,BCL11B,BCL3,BIRC3,BTC,BTF3,CALCR,CASZ1,CAV1,CCL2,CCL3,CCL4,CCL5,CD22,CD69,CD70,CDH1,CDH11,CDON,CLCA2,COL2A1,CRYAA/LOC102724652,CSNK1A1,CXCL8,DAB2,DKK3,DLEU7,DMP1,DUSP4,EDA,EGR1,EGR2,EGR3,EGR4,EPHA4,F2RL1,FCGR3A/FCGR3B,FOS,FTH1,FYN,FZD2,G6PC,GABRA5,GABRB2,GRIA3,GRIN2A,HES1,HIC1,HMOX1,HRK,HSPB6,IER3,IFNK,IGFBP5,IGHM,IRAK2,JUN,KCND2,KIF1B,KIFC3,LCK,LDLR,LEPR,LHX2,LPHN2,LRP2,MAP1B,MMP2,MYCN,NCOA3,NFKB2,NFKBIA,NFKBID,NFKBIZ,NOD2,NR4A3,PAWR,PEBP4,PIAS2,PPP1R15A,RAG2,RELB,REPS2,ROR1,SALL1,SCIN,SELENBP1,SERPINA3,SMOX,SOCS3,SORBS2,STX1A,TAC1,TBX5,TFEB,TNF,TNFAIP2,TNFRSF17,TP53INP1,TSLP,TULP1,WIF1,XAF1,XCL1,ZFP36L1
cell death of T lymphocytes	BCL11B,BCL3,CAV1,CCL3,CCL4,CCL5,CD70,EGR1,EGR3,EPHA4,FOS,FTH1,FYN,IER3,IGHM,JUN,LCK,NFKB2,NFKBIA,NFKBID,NR4A3,PAWR,RAG2,TNF,TSLP,XCL1

表 6-6 低栄養培地 1 日間培養を施した HL60 における機能変化を規定した遺伝子群

## 6.6 摂餌制限を施したラット由来骨髄細胞遺伝子発現の、細胞死シグナルに着目した遺伝子発現解析

HL60 の解析結果を受けて、摂餌制限を施したラット骨髄由来の遺伝子発現を、細胞死シグナルに着目して解析した。まず、遺伝子の annotation に cell death が含まれる遺伝子のみを選択し、それらの遺伝子発現と摂餌制限処置の相関の有無を調べた。選択した遺伝子の発現を指標とした階層的クラスタリング解析の結果を、図 6-5 に示す。全遺伝子を対象にしたクラスタリングと比べると、摂餌制限群の 1 例が同群の他の 2 例よりも対照群のクラスターに近くなった。しかしながら、階層的には対照群の 3 例は類似しており、摂餌制限群の 3 例は明らかにそのクラスターから離れていた。さらにこの中から、より明らかな変動を示す遺伝子群を絞り込むことで、骨髄抑制の本質的要素の特定を試みた。具体的には、全個体において非常に少ない発現シグナルを示した遺伝子は解析の対象から除外し、さらに対照群のシグナル平均値に対する比として、対照群すべての個体で変動幅が 0.6~1.4 に収まる遺伝子のみを抽出した。その遺伝子群の中で、摂餌制限群全個体の変動幅が 0.5 以下、あるいは 2 以上の遺伝子を絞り込んだ。その結果を表 6-7 に示す。絞り込まれた遺伝子のうち、骨髄抑制に関わる可

能性のある遺伝子は Bcl11b のみであった。カスパーゼ, Bcl2, Atg 遺伝子群, RIP といった, アポトーシスあるいはオートファジーを介した細胞死 (含ネクロトーシス) 誘導のシグナルに関わることがよく知られている分子 (Wolf 2002, Shimizu 2004, Degterev 2005, Bonapace 2010) については, その遺伝子発現に明らかな変動傾向はみられなかった。

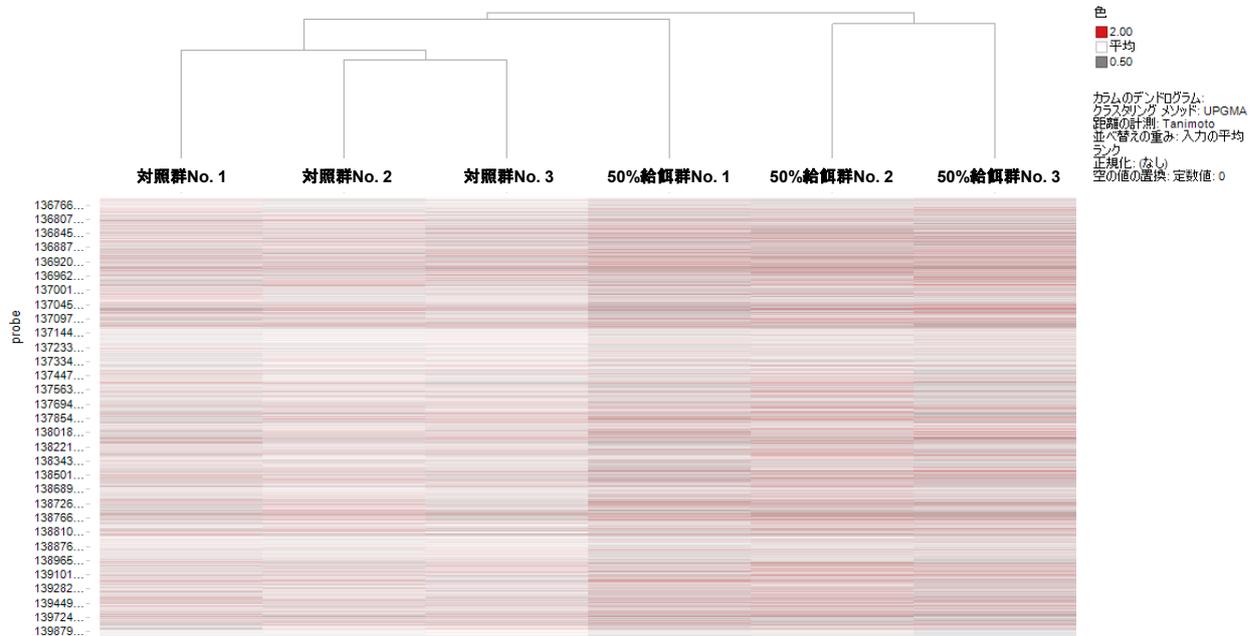


図 6-5 摂餌制限群および対照群由来骨髄のラット GeneChip 上のアポトーシスに関わる遺伝子発現を対象とした個体間のクラスタリング (上部) および遺伝子発現量のヒートマップ (下部)。

遺伝子	機能	対照群			摂餌制限群		
		No.1	No.2	No.3	No.1	No.2	No.3
Lcat	lecithin cholesterol acyltransferase	1.1	1.1	0.9	0.4	0.1	0.2
Rbp1	retinol binding protein 1, cellular	1.0	1.0	1.0	0.2	0.4	0.2
Clcn2	chloride channel 2	0.7	0.9	1.4	0.2	0.1	0.1
Thbs4	thrombospondin 4	0.7	1.3	1.0	0.5	0.3	0.3
Homer1	homer homolog 1 (Drosophila)	0.8	1.3	0.9	2.6	2.7	2.6
Map1b	microtubule-associated protein 1b	0.9	0.7	1.4	2.2	2.7	2.2
Sftpb	surfactant associated protein B	1.1	1.0	0.9	4.9	7.7	5.4
Bcl11b	B-cell leukemia/lymphoma 11B (predicted)	1.0	1.3	0.6	2.9	3.7	4.0

表 6-7 摂餌制限を施したラットの骨髄細胞における発現変動が明確であった細胞死シグナル関連遺伝子。

数値は対照群のシグナル平均値に対する各個体のシグナル値の比。灰色のセルは対照群よりシグナルが小さいことを、赤色のセルは大きいことを示している。

## 6.6 摂餌制限を施したイヌ由来骨髄細胞遺伝子発現の、細胞死シグナルに着目した遺伝子発現解析

摂餌制限を施したラットの遺伝子発現解析と同様に、摂餌制限を施したイヌの遺伝子サンプルについても、細胞死に関わるシグナルに焦点を当てた解析を行った。遺伝子の annotation に cell death が含まれる遺伝子のみを選択し、それらの遺伝子発現と摂餌制限処置の相関の有無を調べたところ、対照群と摂餌制限群がそれぞれ別のクラスターとして明確に区別された (図 6-6)。全遺伝子を対象にしたクラスタリングと比べても、その区別はより明確になっている。イヌにおいても、cell death に関わる遺伝子群の発現が、摂餌制限により変動したことを示唆している。続いてラットにおける解析と同じ基準で、摂餌制限により明らかに変動する細胞死関連遺伝子を絞り込んだ。その結果を表 6-8 に示す。オートファジーに関わる ATG7 が減少したことは興味深い結果だが、数値を精査すると、対照群の 1 個体において 0.6、摂餌制限群の 1 個体において 0.5 であり、このシグナル比の比較からは注目するレベルの変動ではないと考えられた。その他には骨髄抑制作用に直結することが考えられる遺伝子はリスト上には認められなかった。ラットと同様に、細胞死に関わるがよく知られている分子については、その遺伝子発現に明らかな変動傾向はみられなかった。



遺伝子	機能	対照群		摂餌制限群	
		♂	♀	♂	♀
COL1A1	collagen, type I, alpha 1	1.2	0.8	0.1	0.5
GJA1	gap junction protein, alpha 1, 43kDa	1.1	0.9	0.5	0.5
CHGA	chromogranin A (parathyroid secretory protein 1)	1.1	0.9	0.5	0.4
HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	1.3	0.7	0.4	0.5
LUM	lumican	0.8	1.2	0.4	0.4
LAMA4	laminin, alpha 4	0.7	1.3	0.3	0.5
PARD3	par-3 partitioning defective 3 homolog (C. elegans)	1.3	0.7	0.5	0.4
FNTA	farnesyltransferase, CAAX box, alpha	0.9	1.1	0.0	0.5
YBX2	Y box binding protein 2	0.9	1.1	0.5	0.3
A2M	alpha-2-macroglobulin	1.3	0.7	0.3	0.3
PRAF2	PRA1 domain family, member 2	0.8	1.2	0.5	0.4
NRP1	neuropilin 1	0.7	1.3	0.4	0.5
GEM	GTP binding protein overexpressed in skeletal muscle	0.7	1.3	0.5	0.4
THRB	thyroid hormone receptor, beta	0.6	1.4	0.1	0.1
RPGR /// SRPX	retinitis pigmentosa GTPase regulator /// sushi-repeat containing protein, X-linked	1.0	1.0	0.5	0.5
DCN	decorin	0.9	1.1	0.2	0.1
CDH13	cadherin 13, H-cadherin (heart)	0.8	1.2	0.5	0.3
ATG7	autophagy related 7	0.6	1.4	0.5	0.2
LUM	lumican	0.6	1.4	0.4	0.4
CHL1	cell adhesion molecule with homology to L1CAM (close homolog of L1)	0.6	1.4	0.3	0.1
FGF9	fibroblast growth factor 9 (glia-activating factor)	1.3	0.7	0.5	0.4
MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	0.9	1.1	0.5	0.4
PTPRB /// PTPBR	protein tyrosine phosphatase, receptor type, B /// protein tyrosine phosphatase, receptor type, R	0.7	1.3	0.3	0.5
BTLA	B and T lymphocyte associated	0.8	1.2	0.3	0.3
CSTA	cystatin A (stefin A)	1.0	1.0	0.3	0.5
BRMS1	breast cancer metastasis suppressor 1	0.8	1.2	0.5	0.2
GCLC	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	0.9	1.1	0.3	0.2
NRCAM	neuronal cell adhesion molecule	0.7	1.3	0.2	0.3
PCDH18	protocadherin 18	1.3	0.7	0.4	0.5
GAB2 /// NARS2	GRB2-associated binding protein 2 /// asparaginyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial (putative)	0.8	1.2	0.5	0.4
PTPRF	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	0.9	1.1	0.5	0.5
PRKD1	protein kinase D1	1.4	0.6	4.1	3.1
APOE	apolipoprotein E	1.1	0.9	3.8	3.9
SCP2	sterol carrier protein 2	1.3	0.7	2.1	2.4
FZD3	frizzled family receptor 3	1.2	0.8	2.2	2.8
ST8SIA2	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 2	1.0	1.0	2.9	2.3
FEN1	flap structure-specific endonuclease 1	1.0	1.0	2.7	2.9
NTN1	netrin 1	1.0	1.0	2.9	2.2
ANXA2	annexin A2	1.4	0.6	4.1	4.5

表 6-8 摂餌制限を施したイヌの骨髄細胞における発現変動が明確であった細胞死シグナル関連遺伝子。

数値は対照群のシグナル平均値に対する各個体のシグナル値の比。灰色のセルは対照群よりシグナルが小さいことを、赤色のセルは大きいことを示している。

## 第6章 考察

### 1. ラットにおける骨髄抑制のための摂餌制限条件の設定

本実験は Levin ら (1993) による実験の再現性の確認を主眼に実施した。ただし、Levin らは亜急性毒性試験では汎用しない週齢のラットで実験を行ったが、本実験では汎用週齢である7週齢を用いたことに意義がある。結果は Levin らによる実験結果をほぼ再現した。摂餌制限を施したいずれの個体にも同程度の体重減少あるいは増加抑制、および骨髄抑制が認められ、同じ処置群の中では個体間に差はほとんど見られなかった。そして、体重変化および骨髄抑制の程度は制限摂餌量に対応していた。ラットは系統が確立しており、遺伝的背景も統一された個体が供給される。本実験における反応も各個体の背景に差がないため、精度の高い個体間の再現性と、各群の処置の程度に対する依存性が認められたと考えられる。この結果は、摂餌制限による骨髄抑制を研究する系としてラットは有用であることを示している。

ところで、Levin らの論文においては骨髄抑制が誘発される機構について考察されていない。本研究では、この後に続く実験で骨髄細胞の状態を精査した。その結果については結果の項に記載したとおりである。そして条件確認である本実験においても、Levin らの実験よりも踏み込んだデータを取得している。それが網赤血球数百分率の測定である。網赤血球は、赤血球が成熟する前段階の細胞である (関 1981)。赤血球の成熟には時間を要することから、細胞分裂期にある赤血球の前駆細胞が短期間の影響を受けたとしても、その影響を直後の血液学的検査における赤血球の測定で捉えることはできない。また、仮に変動があっても、赤血球が血球全体に占める割合は非常に大きく、その寿命の長さもラットでは約60日と長い (関 1981)。それらの点を考慮すると、非常に大きな変化でない限り赤血球数の変化として明確には表れない。赤血球しか測定していない Levin の実験においては、赤血球系の変化がないという記載になっている点は、このような理由であろうと考えられる。その一方で、本実験において網赤血球百分率を測定した結果は、網赤血球数の減少が明確に認められていた。すなわち、摂餌制限が明らかに赤血球系細胞に影響することを示した。摂餌制限により主に赤血球系に変化が表れることを示した実験は、本研究が最初の報告になる。長期間低蛋白食を与えたマウスあるいはラットでも軽度の赤血球減少が誘発されることを考慮すると (Aschkenasy 1957, Reissmann 1964)、摂餌制限に伴う蛋白摂取量の減少が赤血球細胞に影響していることが、可能性の一つに考えられた。

骨髄抑制の組織像をみると、中等度の変化においては、明らかに細胞の脱落があり、何らかの過程で細胞死が誘発されていることが示唆された。軽微あるいは軽度な変化においては、明らかに細胞領域が減少しているものの、中等度の変化で見られた細胞の脱落は明確には観察されなかった。軽微あるいは軽度の変化においては細胞増殖が阻害されるのみで、細胞死は誘導されていないのかもしれない。あるいは細胞死が誘導されているものの、光学顕微鏡観察のレベルでは捉えられていない可能性もある。低栄養状態による骨髄抑制において、低蛋白食を施したマウスにおける細胞周期抑制の研究報告はあるものの (Borelli 2007, 2009, Fock 2010)、細胞死誘導の観点で精査している研究は知られていない。Levin ら、あるいは本

実験で得られた骨髄組織像は、細胞増殖への影響のみならず、細胞死誘導の観点も取り入れた細胞反応の精査をする意義があることを示唆している。

## 2. イヌにおける骨髄抑制のための摂餌制限条件の設定

毒性試験において動物の摂餌が減少した際に骨髄抑制が認められること、そしてそのことに注意して骨髄毒性を評価することが重要であること (Reagan 2011) を背景の項で述べた。ラットにおいては先述のとおり、摂餌制限による骨髄抑制を示した論文により明確にその事実が示されている。ところが、毒性試験における汎用動物にもかかわらず、イヌでは実験的に示した報告がない。本実験は、イヌにおいてもラットと同様に摂餌制限による骨髄抑制が誘発されたことを示した最初の報告であり、その点で非常に意義の大きい情報を提供するものである (Takamatsu 投稿中)。イヌは使用できる個体数に制限があるため、ラットほど個体差の有無を見極める規模で実験ができなかった。それでも 1 群 2 例で実施した実験結果は、体重変化に個体差はほとんど認められないことを示した。このことは、摂餌制限による生体反応をみる試験系として、イヌも十分に評価できる系であることを示している。ただ、ラットと比較して、体重が減少する給餌量におけるイヌの体重減少速度は小さい。今後両種の実験を行う際には、体重減少を確認するのに必要な制限期間の違いを十分に考慮しなければならない。また、ラットの 2 倍期間の給餌制限にもかかわらず、イヌにおける骨髄抑制の程度はラットよりも大きくなかった。摂餌制限による骨髄抑制がラットでのみ報告されている理由は、このような感受性の違いにあるのかもしれない。

血液学的検査結果では、イヌとラットはほぼ同様の変化を示した。すなわち、赤血球数に変化はないものの、摂餌制限群で網赤血球百分率は明確に減少し、白血球の各血球種も減少した。血小板も骨髄障害に伴い減少しやすい血球種であり (Rebar 1993)、給餌制限を施したラットでも減少していたが、本実験のイヌでは変化が認められなかった。この点のみが種差として認められた反応であるが、原因は明らかにできなかった。

骨髄の組織学的変化は、50%給餌群の 2 例中 1 例、そして 23%給餌群の 2 例全例に認められた。総合的には給餌量に依存した骨髄の反応と考えられる。しかしながら、個体ごとの変化の程度を比較すると、50%給餌群で変化のあった個体 No.4 は中等度の細胞数減少が認められているが、23%給餌群の No.5 は赤血球系細胞の減少を示唆する成熟顆粒球の増加が認められたのみであった。同群の No.6 については骨髄細胞数減少が認められたものの、その程度は No.4 に比して一つ下のグレードであった。血液学的検査結果と病理組織学的検査結果を照合すると、血液学的検査においても 50%給餌群の No.3 の変化がほとんどないことは病理組織学的検査結果と一致している。しかし、血液学的検査では、給餌量、あるいは体重変化に対応して No.4 の変化の程度は No.5 および No.6 よりも小さく、このことは病理組織学的検査とは異なっていた。体重および血液学的検査が摂餌量と相関を示したにもかかわらず、骨髄の病理組織学的には個体ごとの比較において摂餌量と相関しない点があったことは、イヌにおける評価の難しさを示している。イヌにおいて摂餌制限による骨髄抑制の研究がなされない理由には、このような細かな点における再現性の乏しさがあるのかもしれない。しかしながら、50%以上

の給餌制限が骨髄抑制を誘発することは確かめられた。この反応のプロファイリングを進めるにあたっては、実験ごとに血液学的変化や体重変化を参照しつつ、摂餌制限期間や給餌制限量の調整によって目的とするレベルの骨髄抑制を誘発できると考えられた。

### 3. CFU assay 法の確立

背景にも述べた通り、CFU assay は 1960 年代に Metcalf (1969) によって開発された造血前駆細胞の *in vitro* における分化・増殖系である。造血研究における増殖因子や幹細胞の探索に本系が果たしてきた役割は非常に大きいですが、毒性評価への適用はいまだに浸透していない。本研究で確立したラットおよびイヌ骨髄細胞の CFU assay 法は、研究目的である摂餌制限動物の造血機能を調べるだけでなく、骨髄の毒性評価全般に適用できる、有用かつ汎用性の高い系と考えている。本方法の特記すべき特徴は、全コロニーの標本を作製できることである。CFU assay は、細胞のコロニーを形成させるためにコロニーの基になる細胞を半固形培地中に固定させる。半固形化させる基質には、メチルセルロースを使用する施設が多くある。メチルセルロースは半固形ではあるものの、流体の性質が強いため、培地のハンドリングは不可能である。基質に agar を用いる施設もある。Agar 培地の場合はほぼ固まっているため、ハンドリングが可能である。Moezzi ら (1986) は、agar 培地の一部を切り取って保存する試みをしている。しかし Moezzi らのグループも含めたほとんどの施設では、培養皿全体に培地を広げるため、そこから培地全体を取り出すことは困難であり、よって全コロニーを保存することはできていない。全コロニーを保存する方法は、唯一、Kubota ら (1980) によって報告されている。この系は、培養皿の中心部のみに agar 培地を播種することで培地を小さくし、ハンドリングによる崩れがないように工夫されている。さらに液体培地を重層することで、半固形培地を皿上で滑らせることができるようにしている。この方法は細胞の特殊染色も可能であるため、一つ一つのコロニーを正確に同定しながら計数できる利点がある。Kubota らは、この方法でヒト骨髄細胞の培養方法を確立した。本研究では同方法を毒性評価に適用することを試みて、ラットおよびイヌ骨髄細胞の培養条件を整えた (Takamatsu 1998, 2014A, B)。

まずラットの条件の検討を行った。赤血球系細胞の評価系である CFU-E assay においては、培養 2~3 日目にコロニー数が最大になり、その後減少していった。この結果は異なる方法の既知データとほぼ一致していた (Beamonte 2005)。この結果から、本方法は培地の形状においては特殊性があるものの、コロニー形成の過程においては他の方法と差異がないことが示された。そしてヒト組み換え型の EPO に反応すること、その最適濃度が 2 IU/mL であることも既存報告 (Sifri 2006, Badami 2007, Hannoush 2011) と一致しており、方法の妥当性がさらに裏打ちされた。播種細胞数とコロニー数が直線的に相関することは、この方法の安定性を示すものである。白血球系細胞の評価系である CFU-GM assay については、培養 7 日目を以降に観察のしやすい大きなコロニーができてくることは既存の報告 (French 2002, Matsumura-Takada 2002, Beamonte 2005, Sifri 2006, Badami 2007, Pessina 2009, 2010) に一致することである。そしてマウス組換え型の GM-CSF を添加すると用量依存的な増殖反応を示すことも併せて、本方法が客観的に妥当な系であることが示された。

さらには本方法の中で、他の報告にはない観察結果も得た。それは、培養早期には主に好中球コロニーが形成され、後期すなわち7、8日目には主にマクロファージコロニーが形成される、ということである。この観察結果により、本研究では好中球コロニーとマクロファージコロニーのそれぞれを形成させる培養期間を区別し、好中球コロニーは培養3日目、マクロファージコロニーは培養8日目に固定して計数することにした。一方で、上記で引用した文献は、すべてが培養6日目以降の1点のみでコロニーを計測し、コロニーを構成する細胞は詳細に分類されていない。本研究では好中球コロニーとマクロファージコロニーの区別を明確にし、その種類によって培養期間を変えているのに対し、他の報告ではそのような区別をしていない。その理由は、本研究では特殊染色を施して観察しているのに対し、他施設では染色を施さずに観察しているためだと考えている。本方法で観察している培養3日目の好中球コロニーは、位相差顕微鏡を用いて固定前の培地中で観察しても、明らかなコロニーとしてとらえるほどの大きさをもたない。特異的エステラーゼ染色による細胞質染色、およびヘマトキシリンによる核染色によって、細胞の輪郭とコロニーあたりの細胞数が明確になり、それを顕微鏡下で観察することで好中球コロニーと同定できる。コロニーを同定および観察する精度の違いが、培養3日目の好中球コロニーを捉えるか否かを分けるものと考えられた。

CFU-GM assay における播種細胞数とコロニー数の相関は、CFU-E assay ほどの安定性はみられず、一定の密度以上でコロニー数の増加がみられなくなった。培地中の細胞密度が大きいと、細胞間で増殖抑制の作用が働くものと推察される。この作用のより詳細な検討を進めることで、白血球系細胞の増殖制御に関する重要な情報を得られるかもしれない。今後の研究課題として興味深い結果と考えられた。CFU-GM assay を行う上では、明らかな増加抑制がみられない播種細胞数で試験を行えば問題ないと考えているが、そのためには播種する骨髄細胞の正確な計数が求められる。本研究では自動測定器を用いず、血球計算盤を用いて顕微鏡下の目視で細胞形態を確認しながら計数しているため、その後の試験でも安定した結果が得られている。

イヌの CFU assay については、複数の研究報告があるものの (Deldar 1988A, B, C, 1990, 1991, 1993, Elickson-Millar 1997, Parchment 1994, Pessina 2009, Reagan 1993B, Volpe 1996), その数はラットに比して明らかに少なく、限られた研究グループによる研究のみである。そして、CFU-E assay と CFU-GM assay の試験条件を系統立てて検討している報告はない。そこで本研究ではラット CFU assay の検討過程を踏襲して、イヌ CFU assay の条件を検討した。CFU-E assay においては、ラットと同様に他の研究の報告内容 (Deldar 1990) に合致した至適培養日数と指摘 EPO 濃度が設定された。このことから、イヌにおいても適切に培養が行われていることが示された。また、播種細胞数とコロニー数の相関も直線的であることは、本方法の安定性を示している。

CFU-GM assay については、コロニー刺激因子の調製が課題であった。結果の項でも述べたとおり、Volpe ら (1996) の報告で使用されているにもかかわらず、ヒト組み換え型の GM-CSF はコロニー形成を促進しなかった。本研究でも示している通り、GM-CSF 無添加の培地でも、イヌにおいては一定数のコロニーが形成される。Volpe らの報告では GM-CSF 濃度とコロニー数の相関を示した実験は提示されていないため、GM-CSF への依存性は確認していないのかもしれない。一方で、Deldar ら (1988) は LPS をイヌに投与して白血球系の刺激因子を誘導

した血清を用いている。その理由は、他に有効な手段がなかったことが考えられる。我々は Deldar らの方法を取り入れて、LPS を投与したイヌの血清をコロニー刺激因子として用いた。その結果、最もコロニーが形成されやすい条件を設定することができた。しかし、血清を調製するごとに至適濃度を検討する必要があることは、今後に残されている課題である。イヌの白血球系前駆細胞を増殖させる刺激因子を単離し、常に同一の活性を持つ分子の製品化ができれば、それは造血毒性研究における貴重な財産になるはずである。

至適濃度のイヌ血清でコロニーを形成させた結果は、ラットと類似していた。すなわち培養早期の 4 日目に好中球コロニーが、後期の 6 日目頃からマクロファージが顕著に認められた。ラットとイヌの血球の発生期間に明らかな種差はない (関 1981)。このことが *in vitro* にも明確に反映された。ラットと異なる点は、播種細胞数を増やしてもコロニー数が飽和しなかったことである。イヌにおいては密度勾配法遠心法により、血球前駆細胞の密度を高くしているが、ラットは特定の細胞層を単離していないため、骨髄を形成する多種の細胞が混在している。同一種の細胞比率が大きいと、増殖が抑制されないのかもしれない。コロニー刺激因子を改善する課題は残されているものの、本研究で確立したイヌの CFU-GM assay も適切な試験系であることが示された。

さらに、ラットとイヌの両 CFU assay において、骨髄毒性誘発物質の反応性を調べた。全ての化合物で、いずれの assay においても同濃度の dish 間のバラツキが小さく、かつ明確な用量反応性のある毒性を検出した。手法の異なる他の CFU assay の結果に照らし合わせたところ、5-FU および DOX のラット CFU assay と、DOX および AZT のイヌ CFU assay は既存報告があり (Matsumura-Takeda 2002, Pessina 2010, Reagan 1993B, Deldar 1993)、本研究の結果はそれらの報告と整合していた。さらに、DDP を投与したラットの骨髄を本方法で培養した結果でも、明確なコロニーの減少が認められた。*ex vivo* 評価においても、適切に毒性検出ができることを示す結果と考えられる。ここまでの検討により、本研究で確立した CFU assay は化合物毒性の試験系として適切に働く系であると結論づけた。

本研究のように、ラットとイヌの骨髄細胞 CFU assay の方法を、同じ過程を踏んで確立した報告はない。毒性試験における汎用種の CFU assay を系統立てて確立した点で、本研究は毒性研究上の大きな価値をもつと考えている。しかも本研究で取り入れた方法では、全コロニーの標本作製し、保存できる。化合物の毒性評価においては、さまざまな毒性試験種を組み合わせる過程で新たな疑問あるいは考察が生じることがある。そのようなときに、過去の標本を見返して疑問への回答、あるいは考察の妥当性を得たくなる。本方法は、そのような毒性評価者の要望に応える系である。今後、乾燥、固定、染色、そしてコロニー計数を自動化できれば、より汎用性の高い試験法になると思われる。

#### 4. 摂餌制限を施したラット由来骨髄細胞の特殊検査

ラットおよびイヌで骨髄抑制が誘発される摂餌条件設定、および両種の骨髄細胞 CFU assay 法の確立については、それ自体が学術的に価値のある研究である。しかしながら、本研究はそれらを組み合わせ、かつその他の特殊検査も加えることで、摂餌制限による骨髄細胞反応

の特徴を見出すことが目的である。まずはラットにおいて摂餌制限を施して骨髄細胞を採取し、ミエログラムと CFU assay を実施した。さらに骨髄の電子顕微鏡検査も行った。摂餌制限群の給餌量は、結果の項で示した根拠で 13g とし、軽度な骨髄抑制はみられるものの生細胞は十分に存在している状態の骨髄を精査した。2 回目の実験でも、条件設定の実験とほぼ同様の体重推移と骨髄病理組織像が認められたことは、ラットが本研究に適した安定な系であることを改めて示している。

特殊検査においてまず予想に反した結果は、摂餌制限群に骨髄有核細胞数の変化がなかったことである。測定系の感度が低く、軽微あるいは軽度の骨髄抑制を捉えることができなかったと考えられる。しかしながら、ミエログラムにおいて多染色赤芽球が明らかに減少した。また、明らかな減少とは評価しなかったものの、正染色赤芽球が対照群ではスライド上に観察されているのに対して、摂餌制限群では全く観察されていない。そしてこれらの変化を反映して、全赤血球系細胞が減少していた。このデータにおいて注目すべき点は、赤血球の前駆細胞の中でも比較的発生後期の細胞が影響を受けていることである。一方で白血球系細胞には明確な変化が認められなかったことは、赤血球系細胞の感受性の高さを示している。すなわち、発生後期の赤血球系前駆細胞が摂餌制限の影響を一番受けやすいと考えられた。CFU assay においては、いずれのコロニー種にも摂餌制限による変化が認められなかった。CFU-GM に変化がないことはミエログラムと整合がとれている結果と考えられる。また CFU-E についても、ミエログラムにおいて発生後期の細胞が減少していたことと整合する結果と考えられる。Cheng ら (2014) は、造血幹細胞がストレスに対し耐性があることを報告している。本結果において発生前期の赤芽球への影響が少なかったことは、幹細胞により近い発生段階の赤芽球においては、摂餌制限期間中に耐性を獲得したことが可能性の一つとして考えられる。また、Warr ら (2013) により、24 時間絶食したマウスにおいて造血幹細胞にオートファジーが誘導され、そのことにより細胞数減少が阻止される可能性が示されている。オートファジーは飢餓状態に対する細胞反応の起点と考えられ、そこから生存のための耐性を獲得する可能性、あるいは細胞死へのプログラムされた反応経路が活性化する可能性が考えられている (Kroemer 2008)。Warr らによる報告は非常に興味深い知見であり、摂餌制限下のラットにおいてもオートファジーが血球の発生段階によって細胞生存の維持、あるいは細胞死への反応経路活性化のきっかけになっているのかもしれない。ただし、飢餓状態の哺乳類の生体においては、細胞死の観点では実際にオートファジーが起点となる実行経路は検証されておらず、その存在に疑問も呈されている (Shen 2012)。幹細胞に近い発生ステージの細胞はオートファジーによる生存維持反応が進み、後期ステージの細胞は別の反応経路のスイッチが入ることで細胞死に向かうのかもしれない。

では、実際に骨髄内でオートファジーあるいはその他の反応経路を示唆する形態を骨髄細胞が呈しているのだろうか？その点を見極めるために、特殊検査を実施した個体の骨髄を電子顕微鏡検査に供した。結果に述べた通り、電子顕微鏡検査においては細胞反応を特定する所見は得られなかった。少なくとも 2 週間摂餌制限後の状態では、オートファジーが進行している細胞は存在しない可能性が高い。細胞死の過程にある細胞が観察されなかったことは疑問の残る結果であったが、標本として残りづらい状態であるか、あるいは軽度な抑制の原因は細胞増殖の抑制が主に働く可能性も考えられた。その可能性を裏付ける一つの実験証拠

として、明確な変化ではなかったが、摂餌制限を施したラットではミエログラムにおいて増殖期の赤芽球が観察されていなかったことがある。しかしながら、より摂餌量を制限したラットにおいては明らかに細胞が脱落していることも考慮する必要がある。増殖の抑制がかかると同時に、この状態において内因性に細胞死実行経路が動き始めていることは、考えておかなければならない可能性の一つである。

## 5. 摂餌制限を施したイヌ由来骨髄細胞の特殊検査

ラットと同様に、摂餌制限を施したイヌにおいても骨髄の特殊検査を実施した。骨髄有核細胞測定およびミエログラムは、条件設定実験で採取した骨髄細胞において実施した。イヌにおいては有核細胞数の明らかな減少が認められた。ラットとイヌを比較して、病理組織像における骨髄抑制の程度に大きな違いがなかったにもかかわらず、ラットでは捉えられなかった有核細胞数の減少がイヌでは検出された理由は不明であった。ラットにおいてより強い骨髄抑制を示す条件での有核細胞数のデータを追加し、ラットの有核細胞数反応の感受性を精査したうえで、今回の両種の反応の違いを考察する必要がある。

ミエログラムにおいては、総じてラットと相同の変化を示した。すなわち血球系の細胞減少がみられ、白血球系細胞は赤血球系細胞の変化に対応して比率が増加した。そして発生後期の多染性赤芽球における変化が顕著であった。しかしながら、特記すべき相違点も認められている。病理組織学的に骨髄抑制が認められた個体では、発生前期の前赤芽球および好塩基性赤芽球でも明らかな減少が認められた。イヌにおいては早期発生段階の赤芽球の耐性が弱いのかもしない。あるいは、ラットに比して摂餌制限期間を長くとしているため、一時的に獲得した耐性も消失したことも考えられる。そして CFU assay においても示唆に富むデータが得られた。CFU assay は新たに摂餌制限を施したイヌの骨髄細胞を用いて実施した。2 回目の実験においては、条件設定実験時に比べてイヌの体重変化が小さかった。血液学的検査にも影響がなかったが、むしろ抑制が起り始める変化を調べるためには適した条件であると判断し、この状態の細胞を assay した。その結果、白血球系前駆細胞には明らかな変化が認められなかったが、赤血球前駆細胞、すなわち CFU-E は明確に減少した。しかし、これらの個体の骨髄には病理組織学的な変化は認められていない。このことは、軽度の飢餓ストレスであれ、4 週継続すると発生早期の赤芽球細胞を抑制することを示している。変化の程度は、シスプラチンを投与したラットでみられたような極端な減少ではなく、また個々のコロニーの大きさは対照群と差がなかったことから（データは提示せず）、急性的な強い細胞毒性を示すものではなく、また生存している細胞には回復能があることが示唆される。

現時点で取得しているデータからは、イヌの 4 週間摂餌制限における発生早期の赤芽球系細胞減少がイヌ特有の変化であるのか、制限期間の長さによるものなのか、あるいは他に要因があるのか、その点を結論することはできない。明確に言えることは、赤血球系細胞の感受性が高く、それは動物種に依らない可能性が高いこと、そして、生存している細胞は増殖能を失ってはならず、栄養条件が整えば回復できることである。説制限動物におけるこのような特徴は、前述のとおり蛋白摂取量への依存度が高いと考えられる。毒性試験において摂

餌量が減少した動物が認められた場合は、剖検時に骨髓塗沫標本の作製と骨髓 CFU assay を実施し、それらのデータと血液学的検査および病理組織学的所見を併せた評価が有用であることを、ここまでのデータは示している。

推察の面が多々あることを承知で、これまでに述べた考察をまとめると、以下のようなになる。

#### 摂餌制限による軽度な骨髓抑制作用

- ・ 基本的に赤血球系細胞に作用する。
- ・ 早期の影響は末梢血での全血球種の減少として表れる。  
幹細胞を含めた多段階の細胞に作用  
↓  
幹細胞に対する影響により各種・各段階の前駆細胞が減少  
↓  
剖検時の末梢血における各種血球種の減少・影響が出始めた時点における CFU-E assay のコロニー数減少
- ・ 後期の影響は赤血球系細胞特異的に表れる。  
幹細胞の感受性が低下（耐性の獲得？）  
↓  
発生後期の赤血球系細胞の減少  
↓  
ミエログラムにおける赤血球系細胞の減少（比率）・CFU assay における無影響

#### 摂餌制限による中等度以上の骨髓抑制

- ・ 早期・後期に関わらず、赤血球系への作用が強く、加えて全血球種の各発生段階に作用する。  
幹細胞を含めた多段階の細胞に作用  
↓  
幹細胞に対する影響により各種・各段階の前駆細胞が減少  
↓  
剖検時の末梢血における各種血球種の減少・ミエログラムにおける赤血球系細胞の減少（比率）

今後の研究において、摂餌制限動物の細胞レベルの変化をより明確に特徴づけることが求められると考えている。それには、摂餌制限によってより強い骨髓抑制が誘発される際の細胞反応過程の特徴を精査することも必要と考えられる。例えばラットで、23%給餌を施し、1週目の反応を精査して、本研究の50%給餌のデータと比較検討することにより、より明確に

特徴を記述できるかもしれない。さらには、骨髄毒性化合物を投与した動物の骨髄で同じプロセスの検討を行い、反応を比較することで、摂餌量減少に特異的な細胞反応を特定できると思われる。

## 6. 摂餌制限動物由来骨髄および低栄養条件下培養細胞における遺伝子発現変化

骨髄細胞反応を組織学的あるいは細胞学的に検査した結果を、細胞内反応の解析により説明し、細胞内反応の面からも摂餌制限の特徴を記述することを試みた。その手段として、ラット、イヌともに2回目の摂餌制限実験で採取した骨髄細胞から mRNA を抽出し、各遺伝子発現変動を網羅的に解析することとした。網羅的な遺伝子発現解析は、生体の反応経路を探索する上で有効な手段の一つである (Miki 2001)。ラット、イヌともに、全体の遺伝子発現の傾向に対照群と摂餌制限の間で明確な違いがあったことは、この着眼点から反応を同定する道筋が描けることを期待させた。得られた膨大な遺伝子発現データを解析するためには、より確からしい反応を予測して、その予測を検証していくアプローチをとることが適切であると考へ、単一の骨髄細胞系で低栄養処理を施した際の遺伝子発現データも取得した。実験系として、細胞死の研究等に用いられている骨髄由来細胞である HL60 を使用した (Liu 2011)。低栄養状態の細胞に特異的な反応を検出するために、そのほかに骨髄毒性誘発化合物 (5-FU, DOX, DDP) 処理による遺伝子発現データも取得し、比較しながら解析した結果は興味深いものであった。それは処置後早期の反応として、低栄養処置を施した細胞のみが細胞死に関わる機能変化が顕著であったことである。しかも、細胞レベルの解析においては、細胞死シグナルが示唆された細胞を培養3日目から標準培地で培養すると、増殖機能が回復したことである。これは、生体の骨髄内における回復性を反映する反応かもしれない。そして、5-FU あるいは DOX で処置した細胞は、早期にはわずかな増殖反応を示し、しばらく数が維持されるが、その後は標準培地に交換しても、急激に減少していった。これらの化合物処理においては、細胞死シグナルのスイッチが遅れてオンになり、その反応は不可逆であることを示唆している。しかし、そのシグナルが顕著になる時期には細胞内のさまざまな変化が起きてしまい、網羅的な検索では顕在化しづらくなっているものと思われる。結果の章にも述べたが、本実験において 5-FU、DOX および DDP のデータを取得した理由は、非特異的な反応の選別である。結果としてこれら3つの化合物で共通の非特異的反応を特定することは困難であったが、細胞死シグナルが見えづらくなるくらいの多くの変動が起きていることは確かである。その一方で、低栄養状態の細胞は細胞死シグナル以外の変動が少なかったことは、低栄養状態における反応の特徴であると推察された。そして早期に細胞死に関わるシグナルがオンになるが、細胞が置かれる環境によってそのシグナルが消失しうることも、低栄養状態の細胞に特徴的な反応なのかもしれない。しかし、上位にランキングされた個々の反応経路をみると、早期の細胞死シグナルを示唆する反応は見当たらなかった。現時点では概念的ではあるが、早期に何らかの細胞死シグナルがオンになる可能性が示されたことになる。個々の遺伝子発現を精査すると、非常に興味深い反応が認められた。まず、飢餓状態による細胞死実行経路として予測されたオートファジー誘導による細胞死を示唆する遺伝子変化は認められな

かった。培養細胞では、短時間の低栄養処理によってオートファジーが誘導されることが示されている (Muzushima 2004)。24 時間もの低栄養処理を行った本研究では、細胞死実行経路を誘導する起点としてオートファジーが本質ではないものと考えられた。一方でアポトーシスに関わるものがよく知られている因子には、一定の変化が認められた。この結果は、早期に誘導されるアポトーシスが低栄養状態の細胞死に関わる可能性を示唆している。しかしながら API 解析において細胞死機能の変化を規定した遺伝子変化は、主にリンパ球系の発生やケモカインに関連する遺伝子であった。よく知られたアポトーシス実行経路に加えて、低栄養状態に特異性のある細胞死実行経路が働いているのかもしれないが、現時点のデータからはこれ以上の推察はできなかった。

生体の反応に目を向け直すと、軽度な抑制であれば、摂餌制限を 2 週間あるいは 4 週間施した骨髄細胞にも培養細胞と同様の変化があり、なんらかの特徴的な細胞死反応経路が含まれる可能性が考えられた。パスウェイ解析においては、ラット、イヌともに培養細胞と同様に骨髄抑制に関わる可能性のある反応が見当たらなかった。全体の多様な変動の中で、抑制に関連する変化を掘り出すアプローチの難しさを示す結果となった。つづいて概念的に細胞死と摂餌制限処置の相関をとった結果は良好な相関を示したことから、なんらかの関連する細胞死シグナルが働いているものと考えられた。そこで、細胞死（一部オートファジーと細胞周期も含む）に着目した個別の遺伝子検索を行ったが、唯一関連性が示唆された遺伝子変化はラットにおける *Bcl11b* の発現増加のみであった。イヌでは同遺伝子の変動は明確ではなかった。*Bcl11b* は B 細胞の悪性腫瘍で機能し、そして T 細胞の発生および維持に主要な役割を果たすと考えられている zinc finger protein 遺伝子である (Satterwhite 2014, Liu 2010)。ラットの骨髄はイヌに比べてリンパ球の割合が顕著に高いため、リンパ球に表れた変化が顕在化したと考えられる。なお、この遺伝子は定常状態においてはほとんど発現がみられていない。低栄養が直接の引き金となるのか、あるいは骨髄細胞の減少によりフィードバックがかかるのか、そのメカニズムを推察するには現状のデータでは不十分である。しかし、*Bcl11b* の異常な発現増加は摂餌制限動物における骨髄細胞反応の明確な特徴であることは間違いない。結果には示していないが、同じ個体から採取した肝細胞の遺伝子発現解析においては、摂餌制限動物でも同遺伝子の発現量に変化がなかったことから、骨髄における同遺伝子発現変動の重要性は支持される。そして生体においても、オートファジー、あるいはよく知られているアポトーシス実行経路の活性を示唆する遺伝子変化は認められなかった。一般的な知見から推察される実行経路とは異なる細胞反応の誘導が期待される。今後、これらの遺伝子発現に関する情報をより掘り下げた解析により、摂餌制限による特徴的な反応経路が見えてくるかもしれない。

現時点の状況を総じて述べると、網羅的な遺伝子発現解析により反応経路の検索し、そこから摂餌量減少における骨髄反応の指標を同定することは非常に困難である。しかしながら、唯一ポジティブな結果として *Bcl11b* の発現増加を得ることができた。現時点において、*Bcl11b* は摂餌量減少による骨髄抑制を、化合物の細胞毒性による骨髄抑制と区別するための指標として有力な候補である。今後は、複数の細胞毒性化合物による骨髄抑制モデルにおいて、*Bcl11b* が変動するか否かを見極めることが重要である。細胞毒性化合物の骨髄抑制モデルで変動がなければ、*Bcl11b* は摂餌量低下による骨髄毒性を見極めるための有用な指標となる。

加えて、Bcl11b は摂餌量減少による骨髄抑制の反応経路を解析するうえで、一つの入り口になるかもしれない。本研究を通して、反応経路を見極める作業は非常に厳しいと思われた。しかしながら、より強い骨髄抑制反応の誘導、例えばより摂餌を制限した動物の骨髄を処置の早期に採取して Bcl11b を手掛かりに解析すれば、反応経路を捉えられるかもしれない。今後の課題および方向性として、細胞死実行経路に着目しつつ、それを検出するための摂餌制限処置の系を吟味することが求められる。さらには、赤血球系に強く出る反応であることから、赤血球系の細胞を単離して反応を解析することも有用と考えられる。それには、ラットあるいはイヌにおいて、フローサイトメーターで骨髄の各細胞種を選別して単離する技術を確立することが大きな課題である。まだ発展途上にある骨髄毒性研究分野においては、このようにラットやイヌの細胞を用いた方法の確立と現象の解明を、それぞれに研究課題として取り組んでいくことが必要と思われる。

## 第7章 まとめと今後の展望

化合物の毒性試験評価において重要な課題である，“摂餌量が減少した動物における骨髄抑制の原因考察”の一助とするために，摂餌制限をした動物に特徴的な骨髄細胞反応を，組織および細胞レベルで調べた。研究過程で以下の新たな発見あるいは成果が得られた。

- ・ イヌにおいて，摂餌制限による骨髄抑制誘発を実験的に初めて示した。そしてその条件を明確に記述した。
- ・ ラットおよびイヌ骨髄細胞を用いた CFU assay の試験法を，系統的な条件検討により確立した。動物において，標本作製およびその保存ができる系を確立した例は，本研究が初めてである。
- ・ 摂餌制限動物において，主に影響を受ける細胞が赤血球系細胞であること，つまり赤血球系前駆細胞が減少することを明確に示した。
- ・ 摂餌制限開始直後はすべての分化段階の細胞に影響が認められるが，制限期間に依存して分化段階の進んだ細胞に影響が特化していくことを示唆した。
- ・ 摂餌量が減少した動物においては，ミエログラムと CFU assay をコア試験と組み合わせて実施することが，摂餌量減少が原因で誘導された骨髄抑制を見極める一助になることを見出した。摂餌量が低下した動物における骨髄細胞反応の特徴は以下のとおりである。
  - ラット，イヌともにミエログラムにおいて多染性赤芽球の減少が顕著である。
  - ラット骨髄細胞 CFU assay では明確な障害が認められない。イヌにおいては，赤芽球コロニー数のわずかな減少が認められるが，好中球コロニー数およびマクロファージコロニー数には影響を及ぼさない。
- ・ 網羅的な遺伝子発現の解析において，細胞死実行経路に関わる遺伝子群の発現変動と摂餌制限処置に相関が認められた。
- ・ 摂餌制限を施したラットの骨髄細胞に特徴的な発現増加をする遺伝子として，*Bcl11b* が同定された。

以上の発見および成果により，赤血球系前駆細胞が優位に減少することと，骨髄細胞中の *Bcl11b* の発現増加が，摂餌量減少による骨髄抑制を見分けるための有用な指標になる可能性が示された。すなわち，ラットおよびイヌの毒性試験で摂餌量減少を伴う骨髄抑制が認められ，ミエログラムにおいてはラットイヌともに多染性赤芽球の減少が認められ，CFU assay においてはラットではいずれのコロニー種にも形成数に変化がなく，イヌでは赤芽球コロニーのみ軽度に減少し，ラット骨髄細胞の *Bcl11b* 遺伝子発現が増加する場合，骨髄抑制の原因は被験物質の直接的な細胞毒性作用ではなく，摂餌量低下に伴う二次的な影響であると推察できる。その場合は，栄養管理状態が整った臨床試験においては骨髄抑制が起こらないものと見込んで臨床試験計画を作ることが適切である。

今後の毒性試験において動物に摂餌量低下が認められた場合は，ミエログラム用の標本作製しておき，病理組織学的検査で骨髄抑制が認められた際にはミエログラムを実施することをルーチンにすることが望ましい。そして，病理組織学的検査と併せて CFU assay を実施し，

赤血球系および白血球系の造血前駆細胞に及ぼされる障害を精査できる体制を施設ごとに整えていくことが求められる。整えられた評価体制の下で血球前駆細胞の反応を解析すれば、摂餌量の減少した動物の骨髄抑制が臨床試験でも起こるかどうかということを、上述のように正確に推察できると思われる。これまで組織切片の観察のみで病理発生を推察していた事象を、本研究に示した実験的証拠を追加して考察すれば、直近で創出される抗がん剤などの細胞毒性の強い化合物の安全な臨床試験の実施、あるいは生活習慣病領域などで高い有効性が見込まれる薬剤候補の開発継続につながり、質の高い薬剤創出の実現に大きく寄与するものと思われる。

今後の研究では、本研究で可能性が示された指標の有用性をさらに見極めるために、骨髄抑制物質を投与したラットあるいはイヌにおけるミエログラム、骨髄細胞 CFU assay および骨髄細胞の遺伝子発現データを蓄積することが求められる。そして蓄積されたデータを基に、赤血球前駆細胞や *Bcl11b* 遺伝子発現の反応が、摂餌量の減少した動物に特異的であることを確認することが必要である。これらの反応が摂餌量の減少した動物に特異的であれば、臨床試験における骨髄毒性発現を予測するための重要かつ唯一の指標になる。同時に、反応をより捉えやすい実験条件を検討することも必要である。より感度のよい系において遺伝子発現の解析を掘り下げることにより、*Bcl11b* 以外の指標が見えてくるかもしれない。そしてフローサイトメトリーを用いて、血球種ごとの細胞レベルおよび遺伝子発現解析も実施することで、指標探索の感度がさらに高くなると考えられる。このように研究を進展させることにより、実験証拠に裏付けられた確実な骨髄毒性評価系を確立できると考えている。

さらには、低栄養状態の細胞における反応を、骨髄細胞を起点に他の種細胞種にも展開できると考えている。具体的には、癌細胞への適用である。遺伝子発現プロファイルが整っている癌細胞と骨髄細胞を照らし合わせ、そのプロファイルが近似していれば、その癌細胞に対する低栄養処置を施すことも視野に入れられると考える。あるいは、癌細胞の遺伝子発現プロファイルと、本研究の HL60 の処理結果を照らし合わせ、有効な抗癌治療を講じることができるとも期待できる。著者の属する研究グループでは、そのような展望も併せて、癌患者から提供いただいた癌細胞を用いて初代培養系を確立し、遺伝子発現プロファイルも取得した (Nishikata 2013)。ヘテロな細胞群の中におかれる癌細胞の環境とやはりヘテロな細胞集団である骨髄細胞の環境の類似性、そして両細胞とも高い増殖活性を持つ類似性を考え合わせると、骨髄細胞の細胞死実行経路を多面的に究明していくことは抗癌治療の大きなヒントになるはずである。

本研究は未開の研究領域を開拓している途上であるが、精度の高い骨髄毒性評価の基盤作りにおいて、非常に重要な位置づけにある。本研究のさらなる進展によって、摂餌量減少が原因で生じる骨髄抑制を見分ける指標が確立されれば、それは臨床試験における骨髄抑制発現の正確な予測に大きく寄与する。そしてそのほかにも、癌治療に貢献できる大きな魅力と期待を持ち合わせている。

## 第 8 章 材料と方法

### 1. ラットにおける骨髄抑制のための摂餌制限条件の設定

#### 1.1 動物および飼育条件

日本チャールス・リバー株式会社（横浜市）から購入した CrI:CD (SD) 系ラットを使用した。実験に供したラットは 7 日間の検疫及び 7 日間の順化を行い、その間に状態および体重に異常がないことを確認した。飼育ケージにはステンレス床網付きアルミニウムケージ (F151 型) を使用し、摂餌制限期間中はケージ毎に 1 匹のラットを割り当てた。給水については、濾過器を通した上水道水を自動給水装置で自由摂水させた。飼育室の環境は次の通りであった。換気回数: 14.2~21.2 回/時間, 照明時間: 7:00~19:00, 温度: 20~26°C, 湿度: 40~70%。

#### 1.2 給餌および摂餌量測定

餌には固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社, 東京) を用いた。給餌は午前に行い、摂餌量は摂餌制限期間中毎日測定した。

#### 1.3 摂餌量設定

試験を成立させるには、群内の個体間の摂餌量に違いがないようにすることで、摂餌量と骨髄細胞反応との対応を定量化できるようにする必要がある。そのためには、対照群の摂餌量を設定することが重要になる。実験実施施設の過去の毒性試験における対照群のラットが、飽食下で摂取する餌の量を調べたところ、本研究に用いたラットと同週齢のラットは、ほぼ一定して 1 日あたり約 25 g 摂取していた。また、個体差はほとんどなかった。そこで本研究の対照群の給餌量を 25 g に統一することで、実験期間中にラットごとの摂餌量が変動しないようにした。なお、実験に供したすべてのラットについて、馴化開始から摂餌制限開始まで、給餌量を 25 g にして馴らした。そしてその期間中、各ラットが全量を摂取することを確認した。本研究では 2 施設でラットの摂餌制限実験を実施したが、上述の条件は両施設で共通して適用できることを確認した。

#### 1.4 採血および血液学的検査

摂餌制限期間最終日の翌日にラットをイソフルラン麻酔して腹大静脈より約 2 mL 採血した。採血前にラットに 16 時間以上の絶食を施した。採取した血液中の以下のパラメーターを、総合血液学的検査装置 ADVIA120 (シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社, 東京) を用いて測定した。なお、採血後のラットは、直ちに放血により安楽死させた。

項目	方法	単位
赤血球数	レーザーフローサイトメトリー	$\times 10^6/\mu\text{L}$
平均赤血球容積	赤血球容積ヒストグラム検出法	fL
ヘマトクリット値	計算値：赤血球数 $\times$ 平均赤血球容積/10	%
ヘモグロビン量	シアンメトヘモグロビン法（国際標準法変法）	g/dL
網赤血球百分率	レーザーフローサイトメトリーおよび RNA 染色	%
平均赤血球ヘモグロビン濃度	計算値：ヘモグロビン量 $\times$ 100/ヘマトクリット値	g/dL
平均赤血球ヘモグロビン量	計算値：ヘモグロビン量 $\times$ 10/赤血球数	pg
白血球数 白血球分類：リンパ球数，好中球数， 好酸球数，好塩基球数，単球数	レーザーフローサイトメトリー及び細胞化学染色法	$\times 10^3/\mu\text{L}$
血小板数	レーザーフローサイトメトリー	$\times 10^3/\mu\text{L}$

### 1.5 病理組織学的検査

安楽死後のラットから大腿骨，胸骨，脾臓，胸腺を摘出し，中性緩衝 10%ホルマリン溶液で固定した。各臓器とも，固定後にパラフィンブロック及び切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。病理組織学的変化の程度は，変化なし，軽微，軽度，中等度，高度の 5 段階で判定した。

### 1.6 統計学的解析

体重及び血液学的検査について，Bartlett 法による各群の分散の均一性について検定した。等分散の場合には，対照群を基準とする Dunnett の多重検定による対照群と投与各群の群間比較を行った。不等分散の場合には，順位変換を行った後，等分散の場合と同様に解析した。

## 2. イヌにおける骨髄抑制のための摂餌制限条件の設定

### 2.1 動物および飼育条件

北山ラベス株式会社（山口県岩国市）から購入したビーグル犬で、特定の試験に割り当てられていない、ストック動物から選別して実験に用いた。実験に供したイヌは検疫済みのものを21日間順化し、その間に状態、体重及び血液学的検査に異常がないことを確認した。選別にあたっては純化期間中の検査結果を優先し、月例は事前に特定しなかった。ただし選別時に、毒性試験に使用される範囲内の月齢であることは確認した。飼育ケージにはステンレススチールのケージ（900 mm (D) x 900 mm (W) x 800 mm (H)）を使用し、ケージあたり1匹のイヌを割り当てた。摂餌制限期間以外の給水については、上水道水を自動給水装置で自由摂水させた。摂餌制限期間中は2500 mLの給水ボトルを用いて摂水させた。飼育室の環境は次の通りであった。換気回数：15回/時間、照明時間：7:00～19:00、温度：20.4～23.9℃、湿度：37～80%。

### 2.2 給餌および摂餌量測定

餌には固型飼料NVE-10（日本ペットフード株式会社、東京）を用いた。給餌は14:30～16:00に行い、摂餌量は摂餌制限期間中毎日測定した。

### 2.3 摂餌量設定

ラットにおける摂餌量設定と同じ理由で、実験実施施設における対照群のイヌが1日あたりに摂取する餌の量を調べた。その結果、大きな個体差はなく、300 gがほぼ間違いなく全量を摂取する最大量と判断された。そのため、対照群の給餌量を300 gに定めた。なお、実験に用いたイヌは、馴化期間中も300 gの給餌で馴らし、完食することを確認した。本研究では2施設でイヌの摂餌制限実験を実施したが、上述の条件は両施設で共通して適用できることを確認した。

### 2.4 血液学的検査

摂餌制限開始17日前および10日前、そして摂餌制限期間7、13、20および27日目に採血した血液を検査した。各採血日の午前中に頸静脈から約1 mL採血し、総合血液学的検査装置ADVIA120を用いて以下のパラメーターを測定した。

項目	方法	単位
赤血球数	レーザーフローサイトメトリー	$\times 10^6/\mu\text{L}$
平均赤血球容積	赤血球容積ヒストグラム検出法	fL
ヘマトクリット値	計算値：赤血球数 $\times$ 平均赤血球容積/10	%
ヘモグロビン量	シアンメトヘモグロビン法（国際標準法変法）	g/dL
網赤血球百分率	レーザーフローサイトメトリーおよび RNA 染色	%
平均赤血球ヘモグロビン濃度	計算値：ヘモグロビン量 $\times$ 100/ヘマトクリット値	g/dL
平均赤血球ヘモグロビン量	計算値：ヘモグロビン量 $\times$ 10/赤血球数	pg
白血球数 白血球分類：リンパ球数，好中球数， 好酸球数，好塩基球数，単球数	レーザーフローサイトメトリー及び細胞化学染色法	$\times 10^3/\mu\text{L}$
血小板数	レーザーフローサイトメトリー	$\times 10^3/\mu\text{L}$

## 2.5 病理組織学的検査

ペントバルビタールナトリウム静脈内投与による麻酔下で放血することにより、イヌを安楽死させた。安楽死後に、大腿骨，胸骨，脾臓，胸腺を摘出し，中性緩衝 10%ホルマリン溶液で固定した。各臓器とも，固定後にパラフィンブロック及び切片を作製し，ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。病理組織学的変化の程度は，変化なし，軽微，軽度，中等度，高度の 5 段階で判定した。

## 2.6 統計学的解析

1 群 2 例という例数は，一般毒性試験における例数としては少ないことから，統計学的解析は実施しなかった。

### 3. CFU assay 法の確立

#### 3.1 系の導入, 条件設定および *in vitro* 骨髄毒性化合物試験

##### 3.1.1 骨髄細胞懸濁液の調製

###### 3.1.1.1 ラット

ラットは日本チャールス・リバー株式会社から購入した6~22週齢の雄あるいは雌のCrl:CD (SD) 系ラットから採取した細胞を用いた。エーテル麻酔下の放血により安楽死させたラットから、大腿骨を採取した。大腿骨は両骨端を切断することにより取り出した。大腿骨の片側から、19 G の注射針を取り付けたシリンジで、fetal calf serum (FCS, Life Technologies, Inc.) を2%含むMinimum Essential Medium Alpha Medium ( $\alpha$ MEM, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA) \*を5 mL 流し込み、遠沈管中に骨髄細胞懸濁液として回収した。懸濁液を複数回攪拌し、細胞塊をなるべく少なくして約5分間静置後、上清を別の遠沈管に移した。細胞懸濁液の一部をTürk液で1/10に希釈後、血球計算盤で細胞を計数した。細胞密度を計算後、元の細胞懸濁液を250 g, 室温で5分間遠心した。遠心後に上清を除き、所定密度になるように $\alpha$ MEM-2%FCSを加えて再懸濁してCFU assayに使用した。

\*: 2%のFCSを含む $\alpha$ MEMを以降では $\alpha$ MEM-2%FCSと記載する。

###### 3.1.1.2 イヌ

Covance Research Product inc. (Battle Creek, MI, USA) から購入した13~53例の雄あるいは雌のビーグル犬から細胞を採取した。ペントバルビタール麻酔下で、腸骨より約5 mLの骨髄液を吸引した。骨髄液を15 mLの $\alpha$ MEM-2%FCSで希釈し、同量のFicoll (Histopaque®, d=1.083, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) に重層後に450 g, 室温で30分間遠心した。遠心後に分離された単核細胞層を回収し、10 mLの $\alpha$ MEM-2%FCSで希釈後に250 g, 室温で10分間遠心した。上清を除き、12 mLの $\alpha$ MEM-2%FCSに再度希釈し、250 g, 室温で5分間遠心した。上清を除き、適量の $\alpha$ MEM-2%FCSに懸濁後、懸濁液の一部の細胞を血球計算盤で計数した。細胞密度を計数後、所定密度になるように $\alpha$ MEM-2%FCSを追加して、CFU assayに使用した。

###### 3.1.2 コロニー刺激因子

ラット, イヌの両CFU-E assayともに、コロニー刺激因子にはヒト組み換え型 erythropoietin (EPO, Connaught, Willowdale, Canada あるいは GIACLONE Research, Besançon, France) を用いた。ウシ血清アルブミン(BSA)を0.1%含む $\alpha$ MEM( $\alpha$ MEM-0.1%BSA)にEPOを20 IU/mLの濃度で溶解し、-80°Cで保存した溶液を適宜溶解および希釈して実験に使用した。

ラット CFU-GM assay のコロニー刺激因子には、マウス組換え型 granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, Intergen Company, Purchase, NY, USA) を用いた。GM-CSFを $\alpha$ MEM-0.1%BSAに1  $\mu$ g/mLの濃度で溶解し、-80°Cで保存した溶液を適宜溶解および希釈

して実験に使用した。

イヌ CFU-GM assay のコロニー刺激因子として検討したヒト組み換え型 GM-CSF は、Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA) から発売されたものを用いた。GM-CSF を  $\alpha$ MEM-0.1%BSA に 1  $\mu$ g/mL の濃度で溶解し、-80°C で保存した溶液を適宜溶解および希釈して実験に使用した。イヌ血清は次のように調製および保存した。*Salmonella typhosa* の lipopolysaccharide (Sigma-Aldrich) を生理的食塩水に溶解し、ビーグル犬に 2  $\mu$ g/kg の投与量で静脈内投与した。投与の 5 時間後に採血し、血液を室温に 1 時間静置後 1700 g、室温で 10 分間遠心した。血清の層を遠沈管に分取し、56°C の温水に 30 分間静置した (非動化)。非動化後に -80°C に保存し、適宜溶解および希釈して実験に使用した。

### 3.1.2 培地

CFU-E, -GM 両 assay とも、ラットとイヌで培地の成分は同一である。両 assay の成分は以下のとおりである。含有率は v/v を示している。

#### CFU-E assay

$\alpha$ MEM : 23%, FCS : 30%, 10%BSA 溶液 : 10%, EPO 溶液 : 10%, 1mM 2-Mercaptoethanol 水溶液 : 2%, 被験物質溶液 (溶媒は  $\alpha$ MEM) : 10%, 3% Agar 水溶液 : 10%, 細胞懸濁液 : 5%

#### CFU-GM assay

$\alpha$ MEM : 45%, FCS : 20%, コロニー刺激因子溶液 : 10%, 被験物質溶液 (溶媒は  $\alpha$ MEM) : 10%, 3% Agar 水溶液 : 10%, 細胞懸濁液 : 5%

### 3.1.3 CFU assay

CFU-E, -GM 両 assay とも同じ手順で培養開始までの作業を行った。3% Agar 水溶液および細胞懸濁液以外の成分を遠沈管中で混和し、37°C に保温した。続いて 3% Agar 水溶液を混和し、再び 37°C に保温した。最後に細胞懸濁液を混和しよく攪拌後、直ちに培養皿 (直径 3 cm, 浮遊細胞培養用) に 0.5 mL ずつ播種した。播種にあたっては、培養皿の全体に培地が広がらぬよう、なるべく中心部に限局して培地が盛られる形にした (結果の図 3-1 参照)。播種後 30 分間室温で静置し、培地が固まったことを確認できたら培地に 0.5 mL の  $\alpha$ MEM-10%FCS を滴下した。その後 37°C, 5%CO<sub>2</sub> に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養を開始した。

### 3.1.4 細胞の乾燥, 固定

所定期間培養後の培養皿をインキュベーターから取り出し、培地に滴下した  $\alpha$ MEM-10%FCS を除いた。培地を滑らせるようにスライドグラス上に移動させ、その上にメンブレンフィルターを被せた。メンブレンフィルターが完全に湿ったら、その上に濾紙を被せた。濾紙も完全に湿ったらさらにその上にもう一枚濾紙を乗せ、完全に湿ったら一番上の濾紙のみ新しいものに交換する作業を繰り返した。ここまでの作業は CFU-E, CFU-GM 両 assay に共通であった。以降の作業は assay ごとに手順が異なった。

### CFU-E assay

上の濾紙が湿らなくなったら、上の濾紙のみ取り除き、その下の濾紙の上から 5%グルタルアルデヒド水溶液を培地あたり約 50  $\mu$ L 滴下した。室温で 5 分間静置後、濾紙を取り除いて、新しい濾紙でフィルター的水分を除き、その濾紙とフィルターを取り除いた。水分が除かれた培地がスライドグラス上に残っていることを確認し、スライドグラスを蒸留水に 8 分間浸した。乾燥後に染色に供した。

### CFU-GM assay

上の濾紙が湿らなくなったら、濾紙を 2 枚とも取り除き、さらに培地を剥がさぬようにフィルターを慎重に取り除いた。水分が除かれた培地がスライドグラス上に残っていることを確認し、スライドグラスを 10 分間風乾した。風乾後、ホルマリン/アセトンリン酸緩衝液（ホルマリン 25%，アセトン 45%，pH 6.6）に 30 秒間浸し、流水に 20 分間浸した。乾燥後に染色に供した。

### 3.1.5 細胞の染色

ラット、イヌの両種で同一の特殊染色法を用いた。

#### CFU-E assay（赤芽球染色）

0.05 M トリス塩酸緩衝液を溶媒とした 0.5 mg/mL の 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride 溶液に 3%  $H_2O_2$  を数滴加え攪拌して染色液とした。培地ごと固定した細胞を染色液に 5 分間浸し、流水に 5 分間浸した。風乾後にマイヤーのヘマトキシリン液 10 分間浸して核染色を施した。流水で 10 分間水洗後風乾し、標本とした。

#### CFU-GM assay

##### ・ 特異的エステラーゼ染色（好中球染色）

1/15 M 燐酸緩衝液(pH 7.4)を溶媒とした 0.84mg/mL の fast blue BB salt 溶液と N,N-dimethyl formamide を溶媒とした 1.5 mg/mL の naphthol AS-D chloroacetate 溶液を、19:1 の割合で混和後に濾過し、染色液とした。培地ごと固定した細胞を染色液に 40 分間浸し、流水に 5 分間浸した。風乾後にマイヤーのヘマトキシリン液 10 分間浸して核染色を施した。流水で 10 分間水洗後風乾し、標本とした。

##### ・ 非特異的エステラーゼ染色（マクロファージ染色）

1/15 M 燐酸緩衝液(pH 6.3) を溶媒とした 1.6 mg/mL の fast garnet GBC 溶液と ethylene glycol monomethyl ether を溶媒とした 20 mg/ml の  $\alpha$ -naphthyl butyrate を 19:1 の割合で混和後に濾過し、染色液とした。培地ごと固定した細胞を染色液に 15 分間浸し、流水に 5 分間浸した。風乾後にマイヤーのヘマトキシリン液 10 分間浸して核染色を施した。流水で 10 分間水洗後風乾し、標本とした。

### 3.1.5 観察

両 assay とも、光学顕微鏡下でコロニーを観察した。CFU-E assay における赤芽球コロニー

は 200 倍，CFU-GM assay における好中球コロニーは 100 倍，マクロファージコロニーは 40 倍の倍率でコロニーの同定および計数を行った。

### 3.2 Cisplatin を投与したラット由来骨髄細胞の CFU assay

#### 3.2.1 動物および飼育条件

日本チャールス・リバー株式会社から購入した 8 週齢の Crl:CD (SD) 系ラットを使用した。実験に供したラットは 7 日間の検疫および 7 日間の順化を行い，その間に症状及び体重に異常がないことが確認されている。飼育ケージにはポリイソペンテン製箱型ケージ (F109 型) を使用し，被験物質投与期間中はケージ毎に最大 3 匹のラットを割り当てた。餌には固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を用い，自由摂食させた。給水については，濾過器を通した上水道水を自動給水装置で自由摂水させた。飼育室の環境は次の通りであった。換気回数：14.4～21.6 回/時間，照明時間：7:00～19:00，温度：20～26℃，湿度：40～70%。

#### 3.2.2 被験物質溶液調製および投与方法

cis-Diammineplatinum (II) dichloride を生理的食塩水で 0.2 mg/mL の濃度に溶解し，投与液とした。投与方法は尾静脈からの急速静脈内投与とし，投与容量は 5 mL/kg，投与回数は 1 日 1 回の 7 日間とした。被験物質溶液は投与直前に 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターを通してろ過滅菌した。

#### 3.2.3 骨髄細胞の採取

イソフルラン麻酔下の放血により安楽死させたラットの右肢大腿骨全体を取り出し，両骨端に 19G の注射針で穴をあけた。その穴から，5 mL の  $\alpha\text{MEM-2\%FCS}$  を流し込み，遠沈管に骨髄細胞懸濁液を採取した。以降の操作は方法の 3.1.1.1 と同じ手順で実施した。細胞数の計数にあたっては，遠心後に再懸濁後の細胞数を計数し，assay に供する細胞懸濁液の密度を調整した。

#### 3.2.4 CFU assay

CFU-E，-GM 両 assay とも，方法の 3.1 に記載した手順に従った。また，CFU-GM assay のコロニー刺激因子にはラット組換え型 GM-CSF (Life Technologies, Inc.) を用いた。ラット組み換え型 GM-CSF はマウス組換え型 GM-CSF と活性が同等であることを別途確認済みである (データ提示せず)。また，EPO は Life Technologies, Inc. から市販されたものを用いた。培地あたりの播種細胞数は，CFU-E assay で  $5 \times 10^4$  個，CFU-GM assay で  $1 \times 10^5$  個とした。CFU-E assay では動物あたり 3 培地，CFU-GM assay では 6 培地培養し，CFU-E assay は全培地を培養 2 日目に固定した。CFU-GM assay では，好中球コロニー評価に 3 培地を培養 3 日目に，マクロファージコロニー評価に残り 3 培地を 8 日目に固定した。動物ごとに 3 培地のコロニー数の平均を算出し，各動物の培地平均値を群内で平均した値を，その群のコロニー数としてデー

タ表示した。

### 3.2.5 統計学的解析

1群3例という例数は、一般毒性試験における例数としては少ないことから、統計学的解析は実施しなかった。

## 4. 摂餌制限を施したラット由来骨髄細胞の特殊検査

### 4.1 動物および飼育条件

日本チャールス・リバー株式会社から購入した Crl:CD (SD) 系ラットを使用した。実験に供したラットは 7 日間の検疫及び 7 日間の順化を行い、その間に症状及び体重に異常がないことを確認した。飼育ケージにはステンレスケージを使用し、摂餌制限期間中はケージ毎に 1 匹のラットを割り当てた。給水については、濾過器を通した上水道水を自動給水装置で自由摂水させた。飼育室の環境は次の通りであった。換気回数：15 回/時間，照明時間：7:00～19:00，温度：21.7～22.3°C，湿度：48～63%。

### 4.2 給餌および摂餌量測定

餌には固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を用いた。給餌は午後に行い、摂餌量は摂餌制限期間中毎日測定した。

### 4.3 摂餌量の設定

摂餌量の設定は 1.3 に記述した内容に倣い、対照動物の 1 日当たりの給餌量を 25 g とした。

### 4.4 骨髄病理組織学的検査

安楽死後のラットから胸骨を摘出し、中性緩衝 10%ホルマリン溶液で固定した。固定後にパラフィンブロック及び切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。病理組織学的変化の程度は、変化なし，軽微，軽度，中等度，高度の 5 段階で判定した。

### 4.5 骨髄検査

骨髄有核細胞数測定は、骨髄を Türk 液により希釈および染色し、自動血球装置 (F-820, シスメックス株式会社, 神戸市) を用いて実施した。ミエログラムについては、骨髄塗沫標本を作製し、メイグリュンワルドとギムザの二重染色を施して光学顕微鏡下で観察した。

### 4.6 CFU assay

3.2.4 に示した内容と同じ試薬，手順で実施した。

### 4.7 骨髄電子検見鏡検査

全例を観察対象とした。病理組織学的検査に供した部位に隣接した部位を切り出し、2.5% グルタルアルデヒド溶液で固定した。4.13% EDTA-2Na にて脱灰後、約 3 x 1 x 1 mm に細切し、1%四酸化オスミウム溶液で後固定後にエポキシ樹脂 (Quetol 812) 包埋を行った。樹脂包埋標本を超薄切後、酢酸ウラニル・クエン酸鉛にて電子染色を施した。透過型電子顕微鏡

(JEM-1200EX, 日本電子株式会社, 東京都昭島市) にて観察領域の写真を撮影した。写真を観察することで検査を実施した。

#### 4.8 統計学的解析

1群3例という例数は、一般毒性試験における例数としては少ないことから、統計学的解析は実施しなかった。

## 5. 摂餌制限を施したイヌ由来骨髓細胞の特殊検査

### 5.1 骨髓検査

骨髓有核細胞数測定は胸骨骨髓を Türk 液により希釈および染色し、自動血球装置 (F-820) を用いて実施した。ミエログラムについては、骨髓塗沫標本を作製し、メイグリュンワルドとギムザの二重染色を施して光学顕微鏡下で観察した。

### 5.2 CFU assay のための動物および飼育条件

Covance Research Product Inc. (Denver, PA, USA) で生産されたビーグル犬を使用した。特定の試験に割り当てられていない、ストック動物から実験に使用する個体を選別した。実験に供したイヌは検疫済みのものを 7 日間順化し、その間に状態、体重及び血液学的検査に異常がないことを確認した。選別にあたっては順化期間中の検査結果を優先し、月齢については事前に特定しなかった。ただし、毒性試験に使用される範囲内の月齢であることは確認した。飼育ケージには F511 型ステンレス製ケージ (940 mm (D) x 940 mm (W) x 740 mm (H)) を使用し、ケージあたり 1 匹のイヌを割り当てた。給水は、上水道水を自動給水装置で自由摂水させた。飼育室の環境は次の通りであった。換気回数：14.6～22.0 回/時間、照明時間：7:00～19:00、温度：18～28℃、湿度：40～70%。

### 5.3 給餌および摂餌量測定

餌には固型飼料 TC-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を用いた。給餌は 15:00～17:00 に行い、残餌は翌日の 8:00～10:00 に回収した。摂餌制限の最終日については、給餌後約 2 時間で残餌を回収した。摂餌量は摂餌制限期間中毎日測定した。

### 5.4 摂餌量設定

摂餌量の設定は 2.3 に記述した内容に倣い、対照動物の 1 日当たりの給餌量を 300 g とした。

### 5.4 骨髓病理組織学的検査

チオペンタール・ナトリウム静脈内投与による麻酔下で放血することにより、イヌを安楽死させた。安楽死後に、胸骨および肋骨を摘出し、中性緩衝 10%ホルマリン溶液で固定した。各臓器とも、固定後にパラフィンブロック及び切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して鏡検した。

### 5.5 骨髓細胞懸濁液の調製

安楽死後のイヌから、両骨端の切断により肋骨を採取した。片方の切断面から、19G の注射針を取り付けた注射筒で  $\alpha$ MEM-2%FCS を 10 mL 流し込み、遠沈管中に骨髓細胞懸濁液を回収した。回収後後速やかに細胞懸濁液を 15℃, 200 g で 5 分間遠心し、10 mL の  $\alpha$ MEM-2%FCS

に再懸濁した。懸濁液の一部を Türk 液で 1/10 に希釈後に細胞密度を計数した。元の細胞懸濁液の一部を  $\alpha$ MEM-2%FCS で  $4 \times 10^5$  個/mL に希釈して CFU-E assay に、 $4 \times 10^6$  個/mL に希釈して CFU-GM assay にそれぞれ供した。

## 5.6 CFU assay

CFU-E, -GM 両 assay とも、方法の 3.1 に記載した手順に従った。CFU-GM assay のイヌ血清は 5%で適用した。EPO は Life Technologies, Inc.から市販されたものを用いた。CFU-E assay では動物あたり 3 培地, CFU-GM assay では 6 培地培養し, CFU-E assay は全培地を培養 2 日目に固定した。CFU-GM assay では, 好中球コロニー評価に 3 培地を培養 4 日目に, マクロファージコロニー評価に残り 3 培地を 8 日目に固定した。動物ごとに 3 培地のコロニー数の平均を算出し, データ表示した。

## 5.7 統計学的解析

1 群 2 例という例数は, 一般毒性試験における例数としては少ないことから, 統計学的解析は実施しなかった。

## 6. 摂餌制限動物由来骨髄および低栄養条件下培養細胞における遺伝子発現変化

### 6.1 HL60 の低栄養条件下における遺伝子発現変動

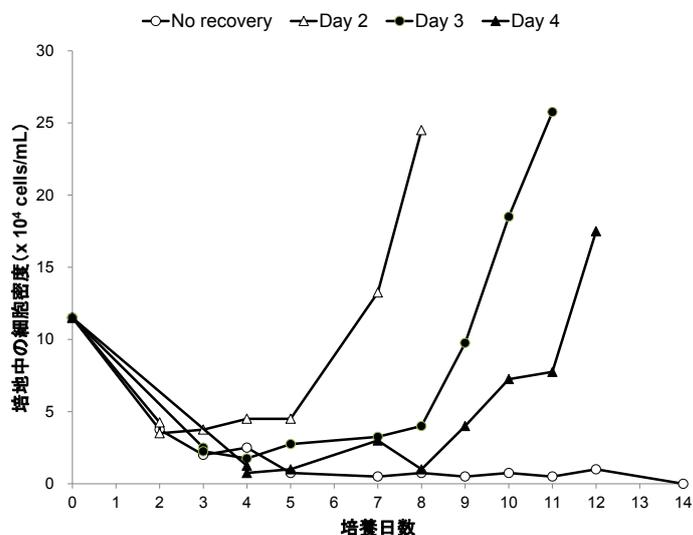
#### 6.1.1 細胞および培養方法

国立衛生試験所（現国立医薬品食品衛生研究所）より、1995年に入手したHL60（入手元管理番号：JCRB0085）を使用した。HL60はヒト前骨髄球白血病細胞由来の株細胞である。RPMI Medium 1640（RPMI1640, Life Technologies, inc.）を基礎培地とし、FCS（Hyclone™, GE Healthcare Life Sciences, South Logan, Utah, USA）を20%加えた培養液を標準培地としてHL60の継代、あるいは実験の対照群に使用した。実験操作の中で培養を回収する際は、15℃、300gで5分間遠心した。また培養は、25 cm<sup>2</sup>の浮遊培養用フラスコを用いて5%CO<sub>2</sub>、37℃の条件下で行った。細胞の計数は血球計算盤を用いて行った。生細胞の判別は、計数の際の光学顕微鏡下の観察により行った。

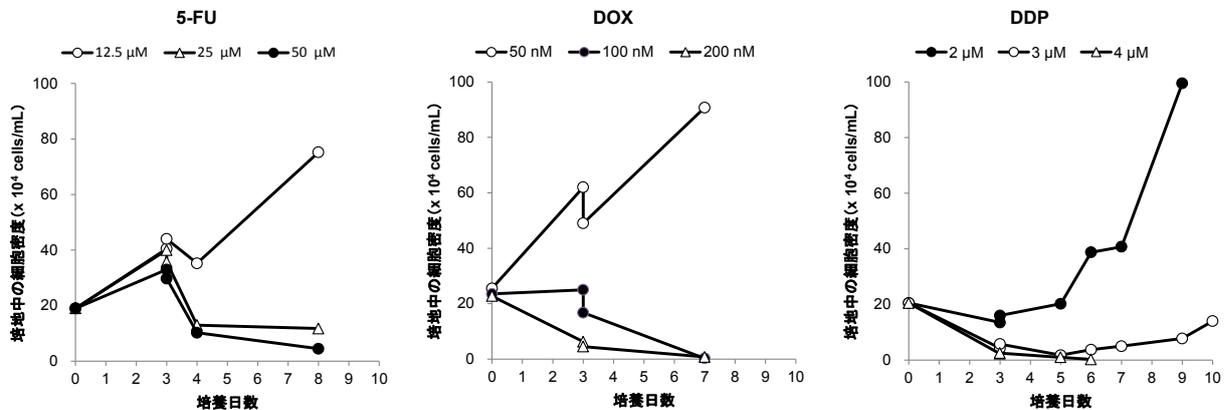
#### 6.1.2 低栄養条件培地および被験物質溶液

低栄養培地には、アミノ酸不含RPMI1640（Life Technologies, inc.）を基礎培地とし、FCSを20%くわえた培養液を使用した。骨髄毒性物質暴露による遺伝子変動を調べる実験に用いた被験物質溶液は、5-Fluorouracil（5-FU）、cis-Diamminedichloroplatinum (II)（DDP、以上Sigma-Aldrich）およびDoxorubicin Hydrochloride（和光純薬工業株式会社、大阪市）を、それぞれRPMI1640に溶解して調製した。結果の項で示した低栄養条件および各化合物の暴露量は、以下の予備実験のデータを基に設定した。

低栄養状態の条件設定については、アミノ酸不含の基礎培地（20%FSC）で培養し、培養2、3および4日目にそれぞれ培地を標準培地に交換した。また、標準培地に交換しない条件も設定した。以下のグラフにその結果を示す。○：培地交換なし、△：2日目に交換、●：3日目に交換、▲：4日目に交換。この結果から、短期間処理の培養1日目、そして培地交換による回復が明確な培養3日目を、それぞれ遺伝子抽出のタイミングに設定した。



化合物暴露群については、細胞毒性が明確に表れるが、培養3日目には一定数の細胞が回収できる用量を探索した。培養3日目に標準培地に交換した実験の経時的変化を以下のグラフに示す。この結果を基に、5-FU、DOX および DDP の暴露濃度を、それぞれ 50  $\mu\text{M}$ 、100 nM および 2  $\mu\text{M}$  に設定した。



### 6.1.3 遺伝子発現解析用サンプル調製および発現量測定

所定の処理を施した細胞を回収し、1% (v/v)の 2-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) を含む Buffer RLT (株式会社 QIAGEN, 東京都) 中で細胞を溶解した。溶解液から total RNA 抽出, cDNA 合成, cRNA 合成/精製/断片化, ハイブリダーゼーションカクテル作製の順で調製したサンプルを、ハイブリダーゼーションおよび染色/洗浄し、スキャンした。Total RNA は RNeasy Mini Kit (株式会社 QIAGEN) を用いて抽出した。cDNA 合成および cRNA 合成/精製/断片化は GeneChip 3' IVT Express Kit Box (Affymetrix, inc. Santa Clara, CA, USA) を用いて行った。ハイブリダーゼーションカクテル作製, ハイブリダーゼーション, 染色/洗浄は試薬に Hybridization, Wash and Stain Kit (Affymetrix, inc.) を使用し、ハイブリダイゼーションのインキュベーションには GeneChip hybridization Oven 640 (Affymetrix, inc.) を、染色/洗浄には GeneChip システム (いずれも Affymetrix, inc.) をそれぞれ用いた。スキャンは GeneChip システムを用いて実施した。各作業の操作は、キットあるいは機器に添付された手順書に従った。アレイには Genechip<sup>®</sup> Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix, inc.) を用いた。

### 6.2 摂餌制限を施したラットおよびイヌ由来骨髄細胞の遺伝子発現変動

ラット、イヌともに、骨髄細胞懸濁液を 15°C, 200 g で 5 分間遠心して細胞を回収した。細胞を BD Pharm Lyse Lysing Buffer (BD Biosciences, Sun Jose, CA, USA) で溶血後、再度 15°C, 200 g で 5 分間遠心して回収した。その後は 6.1.3 と同様の手順で遺伝子発現解析用サンプル調製および発現量測定を実施した。アレイは、ラットの遺伝子発現測定に Genechip<sup>®</sup> Rat Genome 230 2.0 Array を、イヌの遺伝子発現解析に Genechip<sup>®</sup> Canine Genome 2.0 Array (いずれも Affymetrix, inc.) を用いた。

### 6.3 個体間あるいは処理間の階層的クラスタリング

ラット、イヌおよび HL60 の個体間あるいは処理間の階層的クラスタリングは、各遺伝子発現シグナルの対照群平均値に対する比を指標とした。平均値および比の算出は Microsoft Excel を使用し、ヒートマップの作図を含めた階層的クラスタリングは TIBCO spotfire (Somerville, MA, USA) の Spotfire<sup>®</sup>を用いて行った。

## 謝辞

本研究の終始に渡りご懇篤なご指導と温かい励ましをいただいた、指導教官の西方敬人教授に謹んで感謝申し上げます。本研究をとおして、西方教授からは貴重な研究哲学を学びました。また本論文の執筆にあたっては、川上純司教授および藤井敏司教授にご校閲および貴重な助言をいただきました。深く感謝申し上げます。

西方研究室の卒業生および在学生のみなさまには、研究の助言をいただくとともに、いつも温かく励ましていただきました。そして同研究室の石川真実氏および松山哲大氏には、神戸アーバン乳腺クリニックの小西豊博士と共に、第7章に記した初代癌細胞の培養系の確立にご尽力いただきました。みなさまに厚くお礼申し上げます。

第5章に記した実験データの取得あるいは副論文の作成に際しては、次の方々のご協力をいただきました。アステラスリサーチテクノロジー株式会社安全性研究部の山田篤氏、高浦由美氏および中田あゆ美氏（ラットの摂餌制限条件設定）、新日本科学株式会社の木村葵氏（摂餌制限ラットの特殊検査）、山下浩幸氏および佐竹茂氏（イヌの摂餌制限条件）、アステラス製薬株式会社安全性研究所の若田明裕博士、田畑肇博士、廣田里香博士（CFU assay 法の確立）、岡山真二氏、森口聡博士、豊田祐司氏、中原豊氏、佐々木大祐氏、日貝千春氏（摂餌制限イヌの特殊検査）、および出合陽子氏（当時、遺伝子発現の網羅的解析）。ご協力をいただいたみなさまに厚くお礼申し上げます。

甲南大学における研究を始めるにあたっては、当時アステラス製薬株式会社安全性研究所長の関二郎博士および創薬毒性研究室長の大島武二博士にその機会を与えていただきました。所長を継いだ宮前陽一博士および中川壯一博士、分子毒性研究室長の宇波明博士には、研究を継続するためのご配慮と支援をいただきました。そして同研究所の池田一彦博士、田村幸太郎博士、大村功氏および神吉将之氏には、研究推進のための助言をいただきました。みなさまに厚くお礼申し上げます。

最後に、家族に心から感謝します。長女さくらの励ましと、妻弥生の言葉では表せない支えがあつてこそ、本研究を続けることができました。

## 引用文献

- Ali AA, Weinstein RS, Stewart SA, Parfitt AM, Manolagas SC and Jilka RL (2005) Rosiglitazone causes bone loss in mice by suppressing osteoblast differentiation and bone formation. *Endocrinology* 146: 1226–1235
- Alt HL (1938) The relation of growth and nutrition to the reticulocyte level in the young rat. *The Journal of Nutrition* 16: 597–602
- Aschkenasy A (1957) On the pathogenesis of anemias and leukopenias induced by dietary protein deficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition* 5: 14-25
- Badami CD, Livingston DH, Sifri ZC, Caputo FJ, Bonilla L, Mohr AM and Deitch EA (2007) Hematopoietic progenitor cells mobilize to the site of injury after trauma and hemorrhagic shock in rats. *The Journal of TRAUMA* 63: 596-602
- Bell BD, Leverrier S, Weist BM, Newton R H, Arechiga AF, Luhris KA, Morrissette NS and Walsh CM (2008) FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 16677–16682
- Beamonte A, Goldfain-Blanc F, Casadevall N, Bazot D, Bertheux H and Claude N (2005) A case of drug-induced hematotoxicity: from in vivo to in vitro assessment. *Comparative Clinical Pathology* 14: 61-65
- Bethard WF, Wissler RW, Thompson JS, Schroeder MA and Robson MJ (1985) The effect of acute protein deprivation upon erythropoiesis in rats. *Blood* 13: 216–225
- Bloom JC, Blackmaer SA, Bugelski PJ, Sowinski JM and Saunders LZ (1985) Gold-induced immune thrombocytopenia in the dog. *Veterinary Pathology* 22: 492–499
- Bloom JC and Lewis HB (1990) Bone marrow as a target organ: An integrated approach to investigative hematology in toxicologic evaluations. *Toxicologic Pathology* 18: 706–707
- Bloom JC (1993) Principle of hematotoxicology: Laboratory assessment and interpretation of data. *Toxicologic Pathology* 21: 130–134
- Bonapace L, Bornhauser BC, Schmitz M, Cario G, Ziegler U, Niggli FK, Schäfer BW, Scrape M, Stanulla M and Bourquin JP (2010) Induction of autophagy-dependent necroptosis is required for childhood acute lymphoblastic leukemia cells to overcome glucocorticoid resistance. *The Journal of Clinical Investigation* 120: 1310–1323
- Borelli P, Mariano M and Borojevic R (1995) Protein malnutrition: Effect on myeloid cell production

- and mobilization into inflammatory reactions in mice. *Nutrition Research* 15: 1477–1485
- Borelli P, Blatt S, Pereira J, de Maurino BB, Tsujita M, de Souza AC, Xavier JG and Fock RA (2007) Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. *British Journal of Nutrition* 97: 307–314
- Borelli P, Barros FEV, Nakajima K, Blatt S L, Beutler B, Pereira J, Tsujita M, Favero GM and Fock RA (2009) Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42: 523–530
- Brown JW (1954) A quantitative study of cellular changes occurring in bone marrow following protein deficiency in the rat. *Anatomical Record* 122: 515–532
- Catchatourian R, Eckerling G and Fried W (1980) Effect of short-term protein deprivation on hemopoietic functions of healthy volunteers. *Blood* 55: 625–628
- Cheng CW, Adams GB, Perin L, Wei M, Zhou X, Lam BS, Da Sacco S, Mirisola M, Quinn D, Dorff TB and other two persons. (2104) Prolonged fasting reduced IGF-1/PKA to promote hematopoietic-stem-cell-based regulation and reverse immunosuppression. *Cell Stem Cell* 14: 810–823
- Clarke PGH (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anatomy and Embryology* 181: 195–213.
- Conrad ME (1995) Bone marrow necrosis. *Journal of Intensive Care Medicine* 10: 171–178
- Criswell KA, Bleavins MR, Zielinski D, Zandee JC and Walsh KM (1998A) Comparison of flow cytometric and manual bone marrow differentials in Wistar rats. *Cytometry* 32: 9–17
- Criswell KA, Bleavins MR, Zielinski D, Zandee JC and Walsh KM (1998B) Flow cytometric evaluation of bone marrow differential in rats with pharmacologically induced hematologic abnormalities. *Cytometry* 32: 18–27
- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny G. D, Mitchison TJ, Moskowitz MA and Yuan J. (2005) Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology* 1: 112–119
- Deldar A, Kewis H, Bloom J and Weiss L (1988A) Reproducible cloning assays for in vitro growth of canine hematopoietic progenitor cells and their potential applications in investigative hematotoxicity. *American Journal of Veterinary Research* 49: 1393–1401
- Deldar A, Lewis H, Bloom J and Weiss L (1988B) Cephalosporin-induced alterations in erythroid (CFU-E) and granulocyte-macrophage (CFU-GM) colony-forming capacity in canine bone marrow. *Fundamental and Applied Toxicology* 11: 450–463

- Deldar A, Lewis H and Weiss L (1988C) Cephalosporin-induced changes in the ultrastructure of canine bone marrow. *Veterinary Pathology* 25: 211-218
- Deldar A, Stevens CE and Beineke PJ (1990) Comparative distribution of marrow CFU-e and CFU-gm progenitors in different anatomic sites in the dogs. *International Journal of Cell Cloning* 8: 196-208
- Deldar A, Stevens CE and Rodocker KB (1991) Canine BFU-e progenitor: adaptation of a reproducible assay and anatomical distribution. *International Journal of Cell Cloning* 9: 579-593
- Deldar A and Stevens CE (1993) Development and application of in vitro models of hematopoiesis to drug development. *Toxicologic Pathology* 21: 231-239
- Djavaheri-Mergny M, Maiuri MC and Kroemer G (2010) Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene* 29: 1717-1719
- Edinger AL and Thompson CB (2004) Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* 16: 663–669
- El-Nawawy A (2002) Evaluation of erythropoiesis in protein energy malnutrition. *Eastern Mediterranean Health Journal* 8: 281–289
- Erickson-Miller CL, May RD, Tomaszewski J, Osborn B, Murphy MJ, Page JG and Parchment RE (1997) Differential toxicity of camptothecin topotecan and 9-aminocamptothecin to human, canine, and murine myeloid progenitors (CFU-GM) in vitro. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 39: 467-472
- Finch CA (1975) Erythropoiesis in protein-calorie malnutrition. *Protein-Calorie Malnutrition* 247–256, ACADEMIC PRESS
- Fock RA, Blatt SL, Beutler B, Pereora J, Tsujita M, de Barros FEV and Borelli P (2010) Study of lymphocyte subpopulations in bone marrow in a model of protein-energy malnutrition. *Nutrition* 26: 1021–1028
- French RA, Broussard SR, Meier WA, Minshall C, Arkins S, Zachary JF, Dantzer R and Kelley KW (2002) Age-associated loss of bone marrow hematopoietic cells is reversed by GH and accompanies thymic reconstitution. *Endocrinology* 143: 690–699
- Fried W, Shapiro S, Barone J and Anagnostou A (1978) Effect of protein deprivation on hematopoietic stem cells and on peripheral blood counts. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 92: 303–310
- Fruhman GJ and Gordon AS (1955) Influence of starvation upon the formed elements of blood and bone marrow of the rat. *Anatomical Record* 122: 492

- Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kwilly KA, Rodriguez BR, Kliever SA, Lehmann JM and Morris DC. (1996) Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activation by thiazolidinediones induces adipogenesis in bone marrow stromal cells. *Molecular Pharmacology* 50: 1087–1094
- Gonzalvez F and Ashkenazi (2010) New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene* 29: 4752-4765
- Gribaldo L, Bueren J, Deldar A, Okland P, Meredith C, Moneta, D, Mosesso P, Parchment R, parent-Massin D, Pessina A and other two persons. (1996) The use of in vitro systems for evaluating haematotoxicity. *ATLA* 24: 211–231
- Guest I and Uetrecht J (2000) Drugs toxic to the bone marrow that target the stromal cells. *Immunopharmacology* 46: 103–112
- Haak HL (1980) Experimental drug-induced aplastic anemia. *Clinics in Haematology* 9: 621–639
- Hannoush EJ, Sifri ZC, Elhassan IO, Mohr AM, Alate WD, Offin M and Livingston DH (2011) Impact of enhanced mobilization of bone marrow derived cells to site of injury. *The Journal of TRAUMA* 71: 283-291
- Heipel H and Heit W (1980) Drug-induced aplastic anemia: Clinical aspects. *Clinics in Haematology* 9: 641–662
- Hill RC, Lewis DD, Randell SC, Scott KC, Omori M, Sundstrom DA, Jones GL, Speakman JR and Butterwick RF (2005) Effect of mild restriction of food intake on the speed of racing Grayhounds. *American Journal of Veterinary Research* 66: 1065–1070
- Hoagland HC (1982) Hematologic complications of cancer chemotherapy. *Seminars in Oncology* 9: 95–102
- Jazirehi AR (2010) Regulation of apoptosis-associated genes by histone deacetylase inhibitors: implications in cancer therapy. *Anti-Cancer Drugs* 21: 805-813
- Kabaya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisato T, Noda T, Kominami E, Osumi Y and Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal* 19: 5720–5728
- Kroemer G and Levine B. (2008) Autophagic cell death: the story of misnomer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9: 1004–1010
- Kubota K, Mizoguchi H, Miura Y, Suda T and Takaku F (1980) A new technique for the cytochemical examination of human hematopoietic cells grown in agar gel. *Experimental Hematology* 8: 339–344
- Kuranaga E (2012) Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo. *Genes to Cells* 17: 83-97

- Kurata M, Iidaka T, Hamada Y and Horii I (2007) Simultaneous measurement of nucleated cell counts and cellular differentials in rat bone marrow examination using flow cytometer. *The Journal of Toxicological Sciences* 32: 289–299
- Lawler DF, Ballam JM, Meadows R, Larson BT, Li Q, Stowe HD and Kealy RD (2007) Influence of lifetime food restriction on physiological variables in Labrador retriever dogs. *Experimental Gerontology* 42: 204–214
- Levin S, Semiler D and Ruben Z (1993) Effects of two weeks of feed restriction on some common toxicologic parameters in Sprague-Dawley rats. *Toxicologic Pathology* 21: 1–14.
- Levine B and Yuan J (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of Clinical Investigation* 115: 2679 – 2688. Lum JJ, et al (2005) Autophagy in metazoans: Cell survival in the land of plenty. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6: 439–448
- Liu L, Ynag M, Kang R, Wang Z, Zhao Y, Yu Y, Xie.M, Yin X, Livesey KM, Lotze MT and other two persons. (2011) HMGB1-induced autophagy promotes chemotherapy resistance in leukemia cells. *Leukemia* 25: 23–31
- Liu P, Li P and Burke S (2010) Critical roles of Bcl11b in T-cell development and maintenance of T-cell identity. *Immunological Reviews* 238: 138-149
- Long JS and Ryan KM (2012) New frontiers in promoting tumor cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene* 31: 5045-5060
- Macdougall LG, Moodley G, Eyberg C and Quirk M (1982) Mechanisms of anemia in protein-energy malnutrition in Johannesburg. *The American Journal of Clinical Nutrition* 35: 229–235
- Magee P and Beeley L (1991) Drug-induced blood dyscrasias (1). *The Pharmaceutical Journal* 246: 150–151
- Manyan DR, Arimura GK and Yunis AA (1972) Chloramphenicol-induced erythroid suppression and bone marrow ferrochelatase activity in dogs. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 79: 137–144
- Martin RA, Barsoum NJ, Sturgess JM and de la Igesia FA (1985) Leukocyte and bone marrow effects of a thiomorpholine quinazolin antihypertensive agent. *Toxicology and Applied Pharmacology* 81: 166–173
- Matsumura-Takeda K, Kotosai K, Ozaki A, Hara H and Yamashita S (2002) Rat granulocyte colony-forming units (CFU-G) assay for the assessment of drug-induced hematotoxicity. *Toxicology in Vitro* 16: 281-288
- Meierhenry EF (1990) Literature review – The effects of inanition on rat bone marrow. *Toxicologic Pathology* 18: 707–708

- Metcalf D (1969) Studies on colony formation in vitro by mouse bone marrow cells. I. Continuous cluster formation and relation of clusters to colonies. *Journal of Cellular Physiology* 74: 323–332
- Miki R, Kadota K, Bono H, Mizno Y, Tomaru Y, Carnici P, Itoh M, Shibata K, Kawai J, Konno H and other twenty persons (2001) Delineating developmental and metabolic pathways *in vivo* by expression profiling using the RIKEN set of 18,816 full-length enriched mouse cDNA arrays. *PNAS* 98: 2199–2204
- Mizushima N (2004) Methods for monitoring autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 2491–2502
- Moffitt KL, Martin SL and Walker B (2010) From sentencing to execution – the processes of apoptosis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 62: 547-562
- Moezzi J, Ali-Osman F and Murphy MJ (1986) Rapid method for permanent slide preparation of colonies in soft agar cultures. *International Journal of Cell Cloning* 4: 368-374
- Morita J, Izumi, S, Sunouchi S, Tsutsumi S, Ohno R, Arima K and Sato Y (2012) Effect of body weight loss on electrocardiography and blood parameters in dogs under reduced feeding conditions. *J. Toxicol. Sci.* 37, Supplement I: S250
- Nishikata T, Ishikawa M, Matsuyama T., Takamatsu K, Fukuhara T and Konishi Y (2103) Primary culture of breast cancer: a model system for epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells. *Anticancer Research* 33: 2867–2874
- Ogawa Y, Matsumoto K, Kamata E, Ikeda Y and Kaneko T (1985) Effect of feed restriction on peripheral blood and bone marrow cell counts of Wister rats. *Experimental Animals* 34: 407–416
- Oishi S, Oishi H and Hiraga K (1979) The effect of food restriction for 4 weeks on common toxicity parameters in male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 47: 15–22
- Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B and Bao JK (2012) Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation* 45: 487-498
- Parchment RE, Huang M and Erickson-Miller C (1993) Roles for in vitro myelotoxicity test in preclinical drug development and clinical trial planning. *Toxicologic Pathology* 21: 241–250
- Parchment RE, Volpe DA, LoRusso PM, Erickson-Miller CL, Murphy MJ, Grieshaber CK (1994) In vivo-in vitro correlation of myelotoxicity of 9-methoxypyrazoloacridine (NSC-366140, PD115934) to myeloid and erythroid hematopoietic progenitors from human, murine, and canine marrow. *Journal of the National Cancer Institute* 86: 273-280
- Rebar AH (1993) General responses of the bone marrow to injury. *Toxicologic Pathology* 21: 118–129

- Pessina A, Bonomi A, Baglio C, Cavicchini L and Gribaldo L (2009) Refinement and optimisation of the rat CFU-GM assay to incorporate the use of cryopreserved bone-marrow cells for *in vitro* toxicology applications. *ATLA* 37: 417-425
- Pessina A, Bonomi A, Cavicchini L, Albella B, Cerrato L, Parent-Massin D, Sibiril Y, Parchment R, Behrsing H, Verderio P and other six persons. (2010) Prevalidation of the rat CFU-GM assay for *in vitro* toxicology applications. *ATLA* 38: 105–117
- Reagan WJ (1993A) A review of myelofibrosis in dogs. *Toxicologic Pathology* 21: 164–169
- Reagan WJ, Handy V, Mckamey A, Bloom JC, Deldar A, Stevens C and Chan TCK (1993B) Effect of doxorubicin on the canine erythroid and myeloid progenitor cells and bone marrow microenvironment. *Comparative Haematology International* 3: 96-101
- Reagan WJ, Irizarry-Rovira A, Poitout-Belissent F, Bolliger AP, Ramaiah SK, Travlos G, Walker D, Bounous D and Walter G (2011) Best practices for evaluation of bone marrow in nonclinical toxicity studies. *Toxicologic Pathology* 39: 435–448
- Reissmann KR, Dietrich MR and Kennedy MJ (1964) Protein metabolism and erythropoiesis. II. Erythropoietin formation and erythroid responsiveness in protein-deprived rats. *Blood* 23: 146–153.
- Schomaker SJ, Clemo FAS and Amacher DE (2002) Analysis of rat bone marrow by flow cytometry following *in vivo* exposure to cyclohexanone oxime or daunomycin HCl. *Toxicology and Applied Pharmacology* 185: 48–54
- Satterwhite E, Sonoki T, Willis G, Harder L, Nowak R, Arriola EL, Liu H, Price HP, Gesk S, Steinemann D and other five persons. (2001) The BCL11 gene family: involvement of *BCL11A* in lymphoid malignancies. *Blood* 98: 3413-3420
- Schattenberg JM, Schuchmann M and Galle PR (2011) Cell death and hepatocarcinogenesis: Dysregulation of apoptosis signaling pathways *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 26 Suppl. 1: 213-219
- Schweichel JU and Merker HJ (1973) The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7: 253–266
- Seki M, Yamaguchi K, Marumo H and Imai K (1997) Effect of food restriction on reproductive and toxicological parameters in rats – in search of suitable feeding regimen in long-term tests. -. *The Journal of Toxicological Sciences* 22: 427–437
- Shen S, Kepp O and Kroemer G (2012) The end of autophagic cell death? *Autophagy* 8: 1–3.
- Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB. and Tsujimoto Y (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature Cell Biology* 6: 1221–1228

- Sifri ZC, Kaiser VL, Ananthkrishnan P, Wang L, Mohr AM, Hauser CJ, Rameshwar P, Deitch EA and Livingston DH (2006) Bone marrow failure in male rats following trauma/hemorrhagic shock (T/HS) is mediated by mesenteric lymph and modulated by castration. *SHOCK* 25: 12-16
- Takamatsu K, Wakata A, Shishido T, Hirota R, Izumisawa S and Matsuzawa T (1998) The time course of leucocyte colony-formation in cultures of bone marrow progenitor cells from rats and dogs. *Comparative Haematology International* 8: 191–196
- Takamatsu K, Wakata A, Tabata H and Nishikata T (2014A) Refinement and verification of test conditions for colony-forming units assay in rat bone marrow cells with preservable colony specimens. *Comparative Clinical Pathology* 23: 569–575
- Takamatsu K, Wakata A, Hirota R, Tabata H and Nishikata T (2014B) Refinement and verification of test conditions for colony-forming units assay in dog bone marrow cells with preservable colony specimens. *Comparative Clinical Pathology* 23: 1133–1139
- Takamatsu K, Yamashita H, Satake S, Kazusa K, Tabata H and Nishikata T (2015) Effect of four-week feed restriction on toxicological parameters in beagle dogs. *Experimental Animals* 64 (in press)
- Tanida I, Ueno T and Kominami E (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 2503–2518
- Travlos GS (2006A) Normal structure, function, and histopathology of the bone marrow. *Toxicologic Pathology* 34: 548–565
- Travlos GS (2006B) Histopathology of bone marrow. *Toxicologic Pathology* 34: 566–598
- Ulukaya E, Acilan C and Yilmaz Y (2011) Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell Biochemistry and Function* 29: 468-480
- Verfaillie C, Hurley R, Bhatia R and McCarthy JB (1994) Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 16: 201–224
- Vilter RW (1975) The anemia of protei-calorie malnutrition. *Protein-Calorie Malnutrition* 257–261, ACADEMIC PRESS
- Volpe DA, Tomaszewski JE, Parchment RE, Garg A, Flora KP, Murphy MJ and Grieshaber CK (1996) Myelotoxic effects of the bifunctional alkylating agent bizelesin on human, canine and murine myeloid progenitor cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 39: 143-149
- Waites CR, Dominick A, Sanderson TP and Schilling BE (2007) Nonclinical safety evaluation of muraglitazar, a novel PPAR $\alpha/\gamma$  agonist. *Toxicological Sciences* 100: 248–258
- Warr MR, Binnewies M, Flach J, Reynaud D, Garg T, Malhotra R, Debnath J and Passegué E (2013) FOXO3A directs a protective autophagy program in hematopoietic stem cells. *Nature* 494: 323–327

- Weingand K, Bloom CJ, Carakostas M, Hall R, Helfrich M, Latimer K, Levine B, Neptun D, Rebar A, Stitzel K and other one person. (1992) Clinical pathology testing recommendations for nonclinical toxicity and safety studies. *Toxicologic Pathology* 20: 539–543
- Weiss DJ (1986) Histopathology of canine nonneoplastic bone marrow. *Veterinary Clinical Pathology* 15: 7–11
- Weiss DJ (1993) Leukocyte response to toxic injury. *Toxicologic Pathology* 21: 135–140
- Weiss L and Geduldig U (1991) Barrier cells: stromal regulation of hematopoiesis and blood cell release in normal and stressed murine bone marrow. *Blood* 78: 975–990
- Wolf BB and Green DR (2002) Apoptosis: Letting slip the dogs of war. *Current Biology* 12: 177-179
- Würstle ML, Laussmann MA and Rehm M (2012) The central role of inhibitor caspase-9 in apoptosis signal transduction and the regulation of its activation and activity on the apoptosome. *Experimental Cell Research* 318: 1213-1220
- Yanik SC, Baker AH, Mann KK and Schlezinger JJ (2011) Organotins are potent activators of PPAR $\gamma$  and adipocyte differentiation in bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. *Toxicological Sciences* 122: 476–488
- Zhou F, Yang Y and Xing D (2011) Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. *FEBS Journal* 278: 403-413
- Zielinski RR, Eigel BJ and Chi KN (2013) Targeting the apoptosis pathway in prostate cancer. *The Cancer Journal* 19: 79-89
- 伊東 信行 (1994) 最新毒性病理学, 中山書店
- 神山 隆一, 島峰 徹郎 (1989) 骨髄の構造および造血. 現代病理学体系第 18 卷 A 骨髄, 中山書店
- 関 正利, 平嶋 邦猛, 小林 好作 (1981) 実験動物の血液学, ソフトサイエンス社
- トキシコロジー学会教育委員会 (2009) 新版 トキシコロジー, 朝倉書店

## 公表リスト

### 副論文

Nishikata T, Ishikawa M, Matsuyama T, Takamatsu K, Fukuhara T and Konishi Y (2103) Primary culture of breast cancer: a model system for epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells. *Anticancer Research* 33: 2867 – 2874

Takamatsu K, Wakata A, Tabata H and Nishikata T (2014A) Refinement and verification of test conditions for colony-forming units assay in rat bone marrow cells with preservable colony specimens. *Comparative Clinical Pathology* 23: 569 – 575

Takamatsu K, Wakata A, Hirota R, Tabata H and Nishikata T (2014B) Refinement and verification of test conditions for colony-forming units assay in dog bone marrow cells with preservable colony specimens. *Comparative Clinical Pathology* 23: 1133 – 1139

### 参考論文

Takamatsu K, Wakata A, Shishido T, Izumisa S, Hirota R and Matsuzawa T (1998) The time course of leucocyte colony-formation in cultures of bone marrow progenitor cells from rats and dogs. *Comparative Haematology International* 8: 191 – 196

Ishikawa M, Inoue T, Shirai T, Takamatsu T, Kunihiro S, Ishii H and Nishikata T (2014) Simultaneous Expression of Cancer Stem Cell-Like Properties and Cancer-Associated Fibroblast-Like Properties in a Primary Culture of Breast Cancer Cells. *Cancers* 6: 1570-1578

Takamatsu K, Yamashita H, Satake S, Kazusa K, Tabata H and Nishikata T (2015) Effect of four-week feed restriction on toxicological parameters in beagle dogs. *Experimental Animals* 64 (in press)

### 紀要

高松 一彦, 西方 敬人

エネルギー減少にともなう細胞死実行経路の解析に用いる試験系の検討 -薬剤候補化合物の毒性評価への応用を目指して-

Proceedings of the 2nd Annual Meeting of Multidirectional Biology Functions

### 学会発表

高松 一彦, 若田 明裕

ラット及びイヌ血球前駆細胞コロニー形成法 (CFU assay) を用いた in vitro 造血毒性試験系の検討第 11 回日本動物実験代替法学会, 東京 (1997 年 11 月)

高松 一彦, 若田 明裕

ラット造血前駆細胞コロニー形成法の確立及び毒性試験系としての可能性の検討  
第 25 回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋 (1998 年 6 月)

高松 一彦, 若田 明裕, 廣田 里香

毒性試験系としてのイヌ造血前駆細胞コロニー形成法の検討  
第 26 回トキシコロジー学会学術年会, 札幌 (1999 年 7 月)

高松 一彦

エネルギー減少にともなう細胞死実行経路の解析に用いる試験系の検討 -薬剤候補化合物の毒性評価への応用を目指して-

第 2 回生命機能研究会, 神戸 (2011 年 11 月)