

7.2 低線量放射線の生体防御機能に与える影響調査

7.2.1 低線量率 γ 線連続照射マウスの脾臓リンパ球サブセットの構成比解析

Analysis of Splenic Lymphocyte Subsets in Mice after Continuous Irradiation with Low-Dose-Rate Gamma-Rays

箭内 敬典, 小木曾 洋一

生物影響研究部

Takanori YANAI, Yoichi OGHISO

Department of Radiobiology

Abstract

Female specific pathogen-free (SPF) mice of three different strains were irradiated with low-dose-rate (20 mGy/22h/day) γ -rays to compare distribution of splenic lymphocyte subsets with those from the age-matched non-irradiated controls. A significant increase in body weights was observed in B6C3F1 mice irradiated for 400 days (8.0 Gy). However, no difference was observed in the other two strains compared with the control mice. No remarkable changes of the weight of spleens and the number of spleen cells were observed. The number of CD8⁺ T cells in the spleen decreased as the dose increased. CD4/CD8 T cell ratios tended to be higher in irradiated mice, compared with the control mice. The proportions of CD4⁺CD25⁺T cells and B220⁺ cells were not significantly different between irradiated and control mice.

1. 目的

低線量放射線生物影響実験調査(寿命試験)では、低線量率(20 mGy/22h/day)の γ 線を約400日間連続照射(集積線量8,000 mGy)した雌雄マウスおよび日線量1 mGyの γ 線を約400日間連続照射(集積線量400 mGy)したメスマウスに、有意な寿命の短縮、早期の腫瘍死および非腫瘍死等が観察されている(Tanaka S *et al.* 2003, Tanaka IB 3rd *et al.* 2007)。この機構の一つとして、腫瘍細胞の増殖抑制・排除や炎症等を制御する免疫系の変化等が考えられる。そこで、低線量率放射線長期連続照射により免疫系の細胞がどのような影響を受けるのかを明らかにするため、低線量率放射線を長期連続照射したマウスの脾臓中のリンパ球サブセットを蛍光標識特異抗体で染色し、フローサイトメトリー(FACS)により各サブセットの構成比を調べた。

2. 方法

3系統(C57BL/6J、C3H/HeN、B6C3F1)のSPFメスマウス(日本クレア)をそれぞれ6週齢で導入し、8週齢より連続照射を開始した。

連続照射室に設置された¹³⁷Cs- γ 線源を用い、低線量率(約20 mGy/22h/day; 以下、20 mGy/dayと記す)で、集積線量が1、2、4、8Gyに達するまで連続照射した。それぞれの照射終了直後(以下、Day50、Day100、Day200、Day400と記す)に解析を行い、非照射対照群(対照群)と比較した。

脾臓を無菌的に摘出し、重量測定後、単離細胞浮遊液を作製し、trypan blue dye (GIBCO)で未染色の生細胞を計数した。脾細胞浮遊液の細胞濃度を 2×10^6 個/mlに調整し、常法(高津聖志他 2004、中内啓光 2004、中島泉 2006)に従い、抗CD16/CD32 (BD Biosciences)抗体でFc γ Rブロック後、抗CD4 (APC-Cy7-CD4; BD Biosciences)、抗CD8 (PE-Cy7-CD8a; BD Biosciences)、抗CD25

(R-PE-CD25 ; BD Biosciences) 及び抗 B220 (FITC-CD45R/B220 ; BD Biosciences) の蛍光標識抗体を添加して細胞を染色した。脾細胞浮遊液は染色後、直ちに蛍光励起細胞分取装置 (FACS Aria; BD Biosciences) にて各サブセット (ヘルパーT リンパ球 : CD4⁺、細胞傷害性 T リンパ球 : CD8⁺、制御性 T リンパ球 : CD4⁺CD25⁺ および B リンパ球 : B220⁺) の構成比 (%) を測定し、全脾細胞中の各細胞数及び CD4/CD8 細胞比を算出した。

3. 成果の概要

B6C3F1 マウスでは 400 日間照射 (8.0 Gy) した体重の有意な増加が観察されたが、他の 2 系統では対照群と比べ差は観察されなかった。

C57BL/6 マウスの CD4⁺ 及び CD8a⁺ 細胞は、50 日間照射 (1.0 Gy) では増加する傾向を示した。線量が 2.0 Gy (Day 100)、4.0 Gy (Day 200) と増加するに従い減少傾向を示し、8.0 Gy (Day400) では再び増加傾向を示した。CD4/CD8 比は、100 日間照射 (2.0 Gy) までは対照群と比べ変らなかったが、200 日間照射 (4.0 Gy)、400 日間照射 (8.0 Gy) では、増加傾向を示した。B220⁺ 細胞は 200 日間照射 (4.0 Gy) で、増加傾向を示し、400 日間照射 (8.0 Gy) では、CD25⁺ 細胞、CD4⁺CD25⁺ 細胞及び B220⁺ 細胞が増加傾向を示した。

C3H/HeN マウスの CD4⁺ 細胞は対照群と比べ、50 日間照射 (1.0 Gy) では変化が観察されなかったが、線量が 2.0 Gy (Day 100)、4.0 Gy (Day 200) と増加するに従い減少し、8.0 Gy (Day400) では差がみられなかった。CD8a⁺ 細胞は線量が増加するに従い減少し、4.0 Gy (Day200) では有意に減少していたが、8.0 Gy (Day400) では差がみられなかった。CD4/CD8 細胞比は 4.0 Gy (Day 200) までは増加したが、8.0 Gy (Day400) では差がみられなかった。CD25⁺ 細胞、CD4⁺CD25⁺ 細胞及び B220⁺ 細胞に関しては、200 日間照射 (4.0 Gy) までは変化は観察されなかったが、400 日間照射 (8.0 Gy) では、減少傾向を示した。

B6C3F1 マウスでは、CD4⁺ 細胞、CD25⁺ 細胞、CD4⁺CD25⁺ 細胞及び B220⁺ 細胞は、50 日間照射 (1.0 Gy) ではいずれも減少傾向を示し、線量が増加する

に従い対照群と同じか上回る傾向を示した。CD8a⁺ 細胞は、2.0 Gy (Day 100)、4.0 Gy (Day 200)、8.0 Gy (Day400) と線量が増加するに従い対照群と同じか下回る傾向を示したが、いずれの線量でも CD4/CD8 細胞比は増加傾向を示した (Fig. 1)。CD25⁺ 細胞、CD4⁺CD25⁺ 細胞及び B220⁺ 細胞は 50 日間照射 (1.0 Gy) では対照群と比べ減少傾向が観察されたが、100 日間照射 (2.0 Gy)、200 日間照射 (4.0 Gy) では対照群と比べ同じか、やや高くなる傾向を示し、400 日間照射 (8.0 Gy) では、増加傾向を示した。

腫瘍免疫における重要な担当細胞のひとつである CD8a⁺ 細胞数が、低線量率放射線連続照射によって減少傾向を示した今回の結果は、寿命試験で認められた早期の腫瘍死による寿命の短縮に、免疫細胞の変化が関わっている可能性を示唆するものである。

引用文献

- Tanaka S *et al.* (2003) *Radiat Res.*, **160**, 376-379.
Tanaka IB 3rd *et al.* (2007) *Radiat Res.*, **167**, 417-437.
高津聖志他 (2004) 実験医学別冊 タンパク質研究のための抗体実験マニュアル
中内啓光 (2004) 細胞工学別冊 フローサイトメトリー自由自在—マルチカラー解析からクローンソーティングまで
中島泉 (2006) 免疫学実験法ハンドブック 名古屋大学出版会

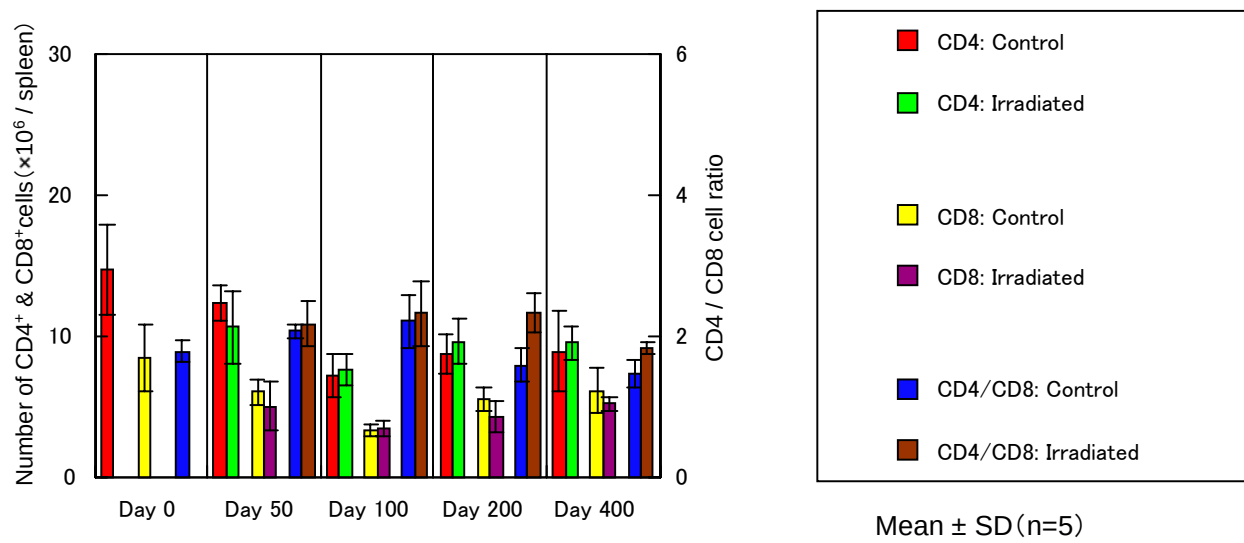


Fig.1 Number of CD4⁺ and CD8⁺T cells in spleen cells from B6C3F1 mice after low-dose-rate gamma-ray irradiation .