

## 7. 2. 2 低線量率 $\gamma$ 線連続照射マウスの脾臓ヘルパーT 細胞比率と T 細胞増殖応答

### Proportions of T-helper Cells and Proliferative Responses of T cells in the Spleen of Mice Continuously Irradiated with Low-Dose-Rate Gamma-Rays

高井 大策, 一戸 一晃, 小木曾 洋一  
生物影響研究部

Daisaku TAKAI, Kazuaki ICHINOHE, Yoichi OGHISO  
*Department of Radiobiology*

#### Abstract

To examine whether the immune system of mice could be changed even after continuous low-dose-rate gamma-irradiation, we investigated the proportions of T-helper (Th1 and Th2) cells and the proliferative responses of T cells in the spleen from three strains (C57BL/6J, C3H/HeN and B6C3F1) of mice. The proportions of T-helper cells and the proliferative responses of T cells in the spleen after low-dose-rate (20 mGy/22h/day) irradiation differed between the strains. In C57BL/6 and C3H/HeN mice, no changes were observed in the proportions of T-helper cells and the proliferative responses of T cells in the spleen at doses of less than 8000 mGy, while a decrease in T cell proliferation and an increase in the proportion of Th2 cells were observed in B6C3F1 mice at 1000 mGy and 2000 mGy, respectively. These results indicate that continuous low-dose-rate irradiation results in changes of the immune system, and that there is an apparent strain difference in the immune responses. Such changes of the immune system may lead to life-shortening due to early neoplastic death as observed in B6C3F1 mice continuously irradiated with low-dose-rate gamma-rays.

#### 1. 目的

低線量放射線生物影響実験調査(寿命試験;平成7-15年度)において、低線量率(20 mGy/22h/day) $\gamma$ 線を約400日間、集積線量8 Gyまで連続照射したマウスでは寿命が短縮することが分かった(Tanaka *et al.* 2003)。この寿命短縮は早期の腫瘍死によることが示唆されている。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が考えられる。低線量率放射線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明らかにするため、免疫細胞のうち特にT細胞に着目し、腫瘍免疫や炎症との関係が示唆されているTヘルパー(Th1及びTh2)細胞の比率と、マイトジェン等刺激に対するT細胞増殖応答を異なる低線量率・線量の $\gamma$ 線を照射したマウスで調べ比較した。

#### 2. 方法

3系統(C57BL/6J、C3H/HeN、B6C3F1)の雌SPFマウス(日本クレア)をそれぞれ6週齢で購入し、8週齢より連続照射実験を開始した。連続照射室に設置された<sup>137</sup>Cs- $\gamma$ 線源を用い、低線量率(20 mGy/22h/day及び1 mGy/22h/day;以下20 mGy/day及び1 mGy/dayと記す。)線照射を行った。20 mGy/day  $\gamma$ 線照射では、それぞれ設定した線量(1.0, 2.0, 4.0, 8.0 Gy)に達するまで連続照射し、照射終了直後(50, 100, 200, 400日目; Fig. 1, Fig. 3内でそれぞれDAY50, DAY100, DAY200, DAY400と記す。)に解析を行った。1 mGy/day  $\gamma$ 線照射では集積線量400 mGyに達するまで連続照射し、照射終了直後に解析を行った。脾細胞浮遊液を、Tヘルパー細胞(Th1およびTh2)特異的な抗CD4抗体、Th1細胞特異的な抗IFN- $\gamma$ 抗体及びTh2細胞特異的な抗IL-4抗体で染色後、フローサイ

トメトリーでそれぞれの細胞を検出し、その割合を測定した(中内 2004、中島 2006)。また脾細胞浮遊液をマイトジェン (ConA) 存在下あるいはアロ抗原 (BALB/cマウス脾細胞) との混合培養 (MLR) によりそれぞれ刺激培養後、 $[^3\text{H}]$ -TdR取り込みによるDNA合成能を液体シンチレーションカウンターにより測定しT細胞増殖活性を調べた(中島 2006)。

### 3. 成果の概要

#### 3.1 脾ヘルパーT細胞の比率

マウス脾臓細胞中のTh1 細胞( $\text{CD4}^+$ ,  $\text{IFN-}\gamma^+$ )及びTh2 細胞( $\text{CD4}^+$ ,  $\text{IL-4}^+$ )の割合を直接フローサイトメトリーで測定し、 $\text{CD4}^+$ 脾臓細胞画分中のTh1 細胞画分の割合(%)及びTh2 細胞画分の割合(%)を求め、更に得られたTh1 細胞画分のTh2 細胞画分に対する比(Th1/Th2 比)を求めた。その結果、20 mGy/day  $\gamma$ 線照射B6C3F1 マウスでは、より早い時期 (照射開始後100日目)からTh2細胞画分の増加が観察されたが、C57BL/6 やC3H/HeNマウスでは、有意な変化を検出するためには400日間連続照射(集積線量8.0 Gy)を要し、線量や系統による反応の違いがみられた(Fig. 1)。一方、1 mGy/day  $\gamma$ 線を400日間連続照射した照射マウスの脾臓Tヘルパー細胞の割合には有意な変化が観察されなかった(Fig. 2)。

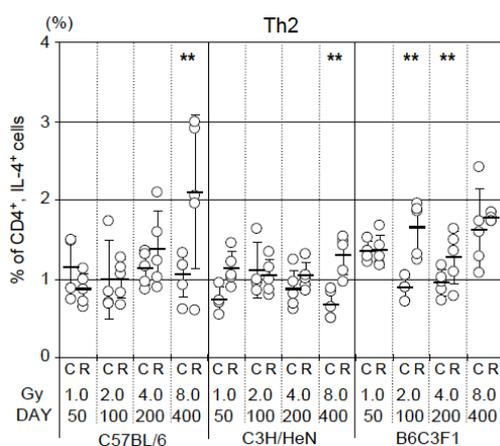


Fig. 1 Proportions of Th2 cells after low-dose-rate (20 mGy/day) irradiation. C, control; R, irradiated; \*\*,  $p < 0.01$

#### 3.2 T細胞増殖応答

マウス脾臓T細胞の ConA 及び MLR による増殖応答を測定した。その結果、低線量率  $\gamma$  線照射 B6C3F1 マウスではより早い時期から MLR 増殖応答の有意な低下を示した(Fig. 3)。一方、1 mGy/day  $\gamma$  線連続照射マウスの T細胞増殖応答には有意な変化がほとんど観察されなかった(Fig. 4)。

以上の結果から、低線量率放射線長期連続照射マウスの脾臓ヘルパーT細胞の割合や増殖応答の変化には集積線量や系統による差があることが示された。今後は、寿命試験で用いられ、また今回 2.0 Gy 以上の集積線量域で反応が認められた B6C3F1 系統に絞り、低線量率放射線照射が腫瘍免疫等に及ぼす影響について解析を進めていきたいと考えている。

#### 引用文献

- S. Tanaka, et al. (2003) *Radiat Res*, **160**, 376-379.  
 中内啓光(2004)すべてのバイオ研究に役立つ免疫学的プロトコール、羊土社  
 中島泉(2006)免疫学実験法ハンドブック、名古屋大学  
 出版会

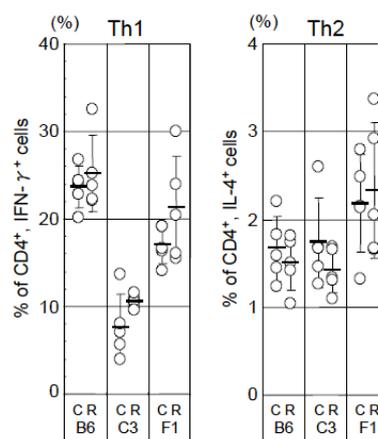


Fig. 2 Proportions of Th1 and Th2 cells after low-dose-rate (1 mGy/day) irradiation for 400 days. C, control; R, irradiated.

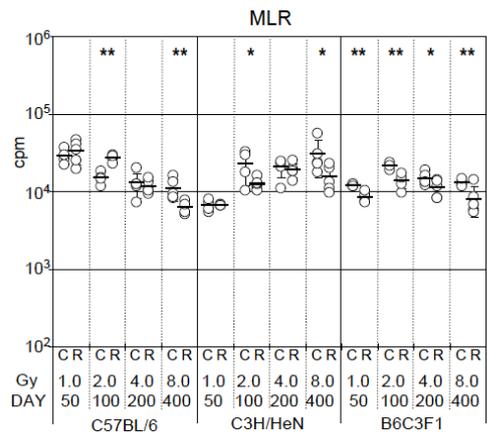


Fig. 3 Comparisons of proliferative response of splenic T cells after low-dose-rate (20 mGy/day) irradiation. C, control; R, irradiated; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$

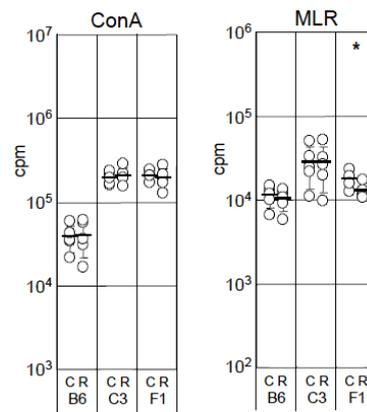


Fig. 4 Comparisons of proliferative response of splenic T cells after low-dose-rate (1 mGy/day) irradiation for 400 days. C, control; R, irradiated; \*,  $p < 0.05$