

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) B6C3F1 mice were irradiated with low-dose-rate (20 mGy/22h/day or 1 mGy/22h/day) γ -rays to compare distribution of splenic lymphocyte subsets with those from age-matched non-irradiated controls. A significant increase in body weights was observed in mice irradiated at 20 mGy/22h/day for approximately 400 days (total accumulated dose of 8000 mGy). However, no difference was observed in mice irradiated at 1 mGy/22h/day for approximately 400 days (total accumulated dose of 400 mGy) compared with the non-irradiated control mice. No remarkable changes of the weight of spleens and the number of spleen cells were observed. The number of splenic CD8⁺ T cells decreased in mice irradiated at 20 mGy/22h/day. The number of splenic CD4⁺ T cells increased in mice irradiated at 1 mGy/22h/day. CD4/CD8 T cell ratios tended to be higher in mice irradiated at both low-dose rates, compared with the non-irradiated control mice. The numbers of CD4⁺CD25⁺T cells and B220⁺ cells were not significantly different between irradiated and non-irradiated 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 8000 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 *et al.* 2003; Tanaka *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 (20 mGy/22h/day 及び 1 mGy/22h/day) γ 線を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) により構成比を調べ、同日齢非照射対照マウスと比較した。

2. 方法

SPF の B6C3F1 メスマウス (日本クレア) を 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 (20 mGy/22h/day) で、目的集積線量 (1000、2000、4000、8000 mGy) に達するまで連続照射し、それぞれ照射終了日 (50、100、200、400 日目) に解析を行った。同様に、連続照射室に設置された ¹³⁷Cs- γ 線源を用い、低線量率 (1 mGy/22 h/day) の γ 線を 400 日間連続照射 (集積線量 400 mGy) し、照射終了日 (400 日目) に解析を行った。

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 (高津他 2004; 中内 2004; 中島 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) の蛍光標識抗体をそれぞれ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。

各データの統計解析は、Wilcoxon の順位和検定 (マン・ホイットニーの U 検定) に従った。

3. 成果の概要

低線量率 (20 mGy/22h/day) γ 線連続照射マウスの体重は 200 日目 (集積線量 4000 mGy) で増加傾向を示し、400 日目 (集積線量 8000 mGy) で有意に増加していた。白血球数、赤血球数、ヘマトクリット値、血小板数は対照群と比べ差はなかった。また、脾細胞数、骨髄細胞数も対照群と比べ差はみら

れなかった。

低線量率 (20 mGy/22h/day) γ 線連続照射マウスの CD8⁺細胞は照射期間を通して対照群と比べ減少傾向を示し、200 日目 (集積線量 4000 mGy) では有意に減少した (Fig.1)。照射群の CD4/CD8 比は対照群と比べ高い傾向を示した。CD25⁺細胞、CD4⁺CD25⁺細胞及び B220⁺細胞は、対照群と比べ差は見られなかった。CD4⁺CD8⁺細胞は集積線量が 2000 mGy (100 日目)、4000 mGy (200 日目)、8000 mGy (400 日目) と増加するに従い、減少傾向を示したが有意差は見られなかった。

一方、低線量率 (1 mGy/22h/day) γ 線を 400 日間連続照射 (集積線量 400 mGy) したマウスの体重は対照群と比べ差はみられなかった。白血球数、赤血球数、ヘマトクリット値、血小板数も対照群と比べ差はなかった。また、脾細胞数も対照群と比べ差はみられなかった。

低線量率 (1 mGy/22h/day) γ 線を 400 日間連続照射 (集積線量 400 mGy) したマウスの脾臓中の CD8⁺細胞数は対照群と比べ差は見られなかったが、CD4⁺細胞数は有意に増加していた。このため、照射群の CD4/CD8 比は対照群と比べ、有意ではないが高かった。

腫瘍免疫における重要な担当細胞の一つである CD8⁺細胞数が、低線量率 (20 mGy/22h/day) γ 線連

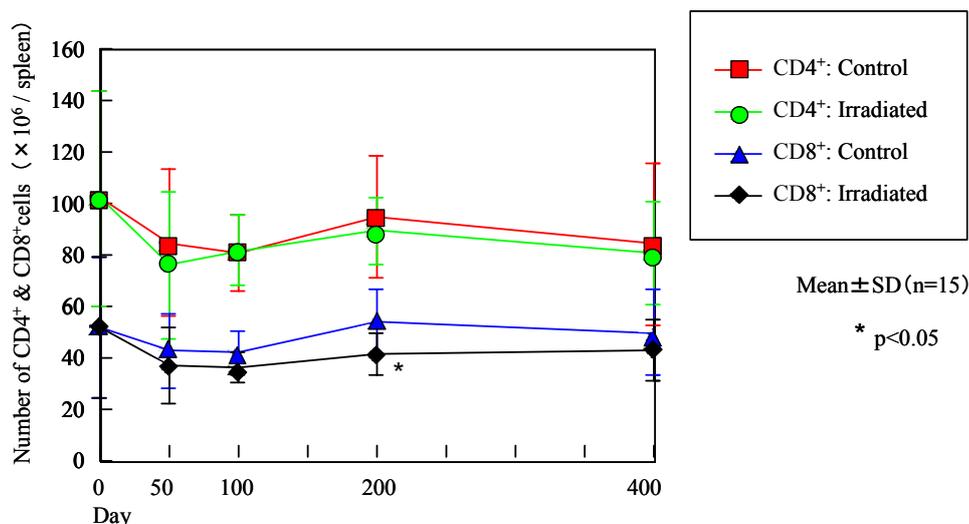


Fig.1 Number of CD4⁺ and CD8⁺T cells in spleen cells from B6C3F1 mice after low-dose-rate(20 mGy/22h/day) gamma-ray irradiation

続照射によって有意に減少し、CD4/CD8 比が高くなる
ことが示された。さらに、より低い線量率（1
mGy/22h/day）でも腫瘍免疫を調節・制御する CD4⁺
細胞数が多く、CD4/CD8 比が有意ではないが高くな
ることが示された（Fig.1）。これらのことから、低
線量率γ線長期連続照射によって、T リンパ球の構
成比に一部変化は認められたものの、本解析からは
寿命試験で認められた早期の腫瘍死による寿命短縮
に直接関わるような証拠は得られなかった。

引用文献

- Tanaka, S. *et al.* (2003) *Radiat. Res.*, **160**, 376-379.
Tanaka, I.B. III *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
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