7.2.2 低線量率γ線連続照射マウスの脾T細胞の構成比と増殖応答能解析

Proportions of T Cell Subsets 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，田中 公夫, 小木曽 洋一
生物影響研究部
Daisaku TAKAI, Kazuaki ICHINOHE, Kimio TANAKA, Yoichi OGHISO
Department of Radiobiology

Abstract

To examine whether the immune system of mice is changed even after continuous low-dose-rate (20 or 1 mGy/22h/day) gamma-irradiation, we compared the proportions of T cell subsets (Th1, Th2, Th17 and Treg) and the proliferative responses of T cells in the spleen between non-irradiated and irradiated female $B6C3F_1$ mice. The numbers of Th1 cells were significantly increased in irradiated mice but numbers of Th2, Th17 and Treg cells were not significantly different between irradiated and non-irradiated control mice. In spite of increased proportions of Th1 cells, the Th1/Th2 ratio did not change after irradiation. Thus, the proportions of T-helper cells were not altered even after low-dose-rate gamma-irradiation for 400 days, accumulating to a high dose (8000 mGy). ConA-stimulated proliferative activity of T-cells was not significantly different, whereas allogeneic T cell proliferation (allo-MLR) of irradiated mice was significantly lower than that of non-irradiated mice. Such changes of the immune system may lead to early neoplastic death as observed in $B6C3F_1$ 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)のγ線を約400日間、集積線量8000 mGyまで連続照射したマウスでは雌雄いずれも寿命が短縮することが分かった。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(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が放射線照射によって変化している事などが考えられる。本調査では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、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細胞サブセットの構成比と、マイトジェン刺激等に対する増殖応答能を異なる線量率・線量のγ線を照射したマウスで調べ比較した。

2. 方法

B6C3F1系統の雌SPFマウスを用い、高線量率(約900 mGy/min)、中線量率(約400 mGy/22h/day)、または低線量率(約20 mGy/22h/day及び約1 mGy/22h/day) γ線照射を行った。T細胞のサブセットであるTh1細胞、Th2細胞、Th17細胞及びTreg細胞それぞれに特異的なサイトカインや転写因子の発現を検出するために、脾臓細胞をそれぞれの細胞特異的な抗体で染色後、フローサイトメトリー解析を行った。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（allo-MLR）によりそれぞれ刺激培養後、[^{3}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。

3. 成果の概要

マウス脾臓細胞中の Th1 細胞($CD4^+$, IFN-γ^+)、Th2 細胞($CD4^+$, IL-4^+)、Th17 細胞($CD4^+$, IL-17^+)及び Treg 細胞($CD4^+$, $Foxp3^+$)の割合をフローサイトメトリーで測定し、$CD4^+$脾臓細胞中に占めるそれぞれの細胞画分の割合(%)を求めた。同時にマウス脾臓 T 細胞の ConA 及び allo-MLR 刺激 による増殖活性を測定した。

高線量率(900 mGy/min) 、 中線量率(400 mGy/22h/day)γ 線連続照射マウスとは異なり、低線量率(20 mGy/22h/day)γ 線連続照射マウスでは、Th1 細胞画分の割合は集積線量 8000 mGy（400 日）で同日齢非照射マウスと比べて有意に増加していたが(Fig. 1)、Th2 細胞画分の割合に有意な変化は観察されなかった。Th17、Treg 細胞画分の割合にも有意な変化は観察されなかった。一方 ConA 刺激による T 細胞増殖応答能には有意な変化は見られなかったが、allo-MLR 刺激による T 細胞増殖応答能は、集積線量 2000 mGy(100 日)、8000 mGy(400 日)の各時点で同日齢非照射マウスと比べてそれぞれ有意に低下していた(Fig. 2)。低線量率(1 mGy/22h/day)γ 線を約 400 日間連続照射（集積線量 400 mGy）したマウスでは、Th1･Th2 細胞画分の割合には放射線照射による影響は観察されなかったが、allo-MLR 刺激による T 細胞増殖応答能は同日齢非照射マウスに比べて有意に低下していた（Fig. 2)。

以上の結果から、低線量率（20 及び 1 mGy/22h/day）放射線長期連続照射マウスの脾臓 T 細胞各サブセットの細胞画分の割合については、20 mGy/22h/day で集積線量 8000 mGy(400 日間)照射したマウスで有意な増加が観察された Th1 細胞を除き有意な変化が観察されなかった。しかしながら、Th1/Th2 細胞比は有意に変化しておらず、この Th1 細胞の増加が寿命試験で認められた寿命短縮や早期腫瘍死の原因となるとは考えにくい。この結果から、脾臓 T 細胞サブセットの割合に対する低線量率（20 及び 1 mGy/22h/day）放射線長期連続照射照射の影響はほとんどなく、寿命短縮や早期腫瘍死に直接関わる要因ではないと結論する。

また、同日齢で同じ集積線量の実験群を比較すると線量率の違いによりその影響が異なっているように見えるが、今回の結果のみでは、線量率や照射期間の違いのみで単純に説明できないような、マウス体内における個々の免疫細胞のターンオーバーや放射線感受性の違いなど様々な因子が複雑に相関し合っていることが推察される。

更に、低線量率放射線長期連続照射マウスの脾臓 T 細胞の増殖応答能については、抗原非特異的な増殖刺激である ConA と抗原特異的な増殖刺激である allo-MLR とで異なっていることが示された。低線量

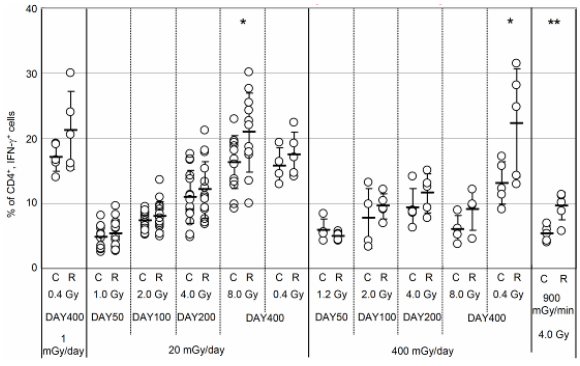

Fig. 1 Proportions of Th1 cells after high (900 mGy/min), intermediate (400 mGy/22h/day), and low (20 or 1 mGy/22h/day) -dose-rate irradiations. C, control; R, irradiated; *, p<0.05; **, p<0.01

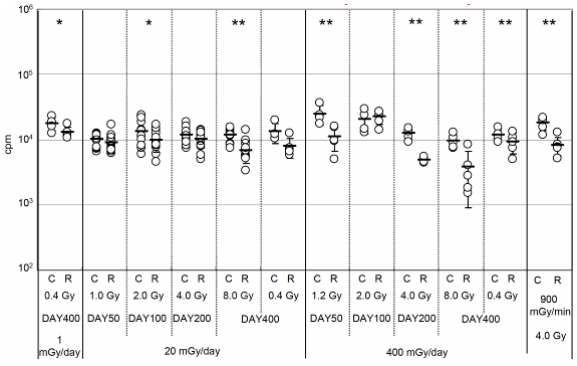

Fig. 2 Comparisons of proliferative response of splenic T cells after high (900 mGy/min), intermediate (400 mGy/22h/day), and low (20 or 1 mGy/22h/day) -dose-rate irradiations. C, control; R, irradiated; *, p<0.05; **, p<0.01

率（20 及び 1 mGy/22h/day）放射線照射ではいずれも ConA 刺激による脾臓 T 細胞増殖刺激には有意な影響が観察されず、allo-MLR でのみ有意な低下が観察された。脾臓 T 細胞の抗原特異的な増殖応答能の低下は腫瘍抗原に対する免疫活性の低下にもつながることから、腫瘍の発生・発達の早期化やそれによる早期腫瘍死の原因となる可能性がある。今後低線量率放射線長期連続照射によって引き起こされる T 細胞増殖応答能の低下が腫瘍免疫に及ぼす効果について研究を進め、寿命試験で認められた早期腫瘍死の機序を明らかにしたいと考えている。

引用文献

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

Tanaka, I. B. *et al.* (2007) *Radiat. Res.*, **167**, 417-437.