

### 7. 2. 3 低線量率 $\gamma$ 線連続照射マウスの移植腫瘍応答解析

#### Transplantability of Tumor Cells to Syngeneic B6C3F1 Mice Continuously Irradiated with Low-Dose-Rate Gamma-Rays

高井 大策, 一戸 一晃, 田中 公夫, 小木曾 洋一  
生物影響研究部

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

#### Abstract

Significant life-shortening due to early neoplastic death was seen in specific-pathogen-free (SPF) B6C3F<sub>1</sub> mice continuously irradiated with low-dose-rate (20 mGy/22h/day) gamma-rays accumulating to a high dose (8000 mGy) as has been reported previously. To understand the mechanisms for this life-shortening, female B6C3F<sub>1</sub> mice were continuously exposed to low-dose-rate (20 mGy/22h/day) gamma-rays under SPF conditions for 400 days. OV3121 cells, which are derived from an ovarian granulosa cell tumor arose in irradiated B6C3F<sub>1</sub> mice, were inoculated into irradiated and age-matched, non-irradiated control mice. We found that tumor formation of subcutaneously inoculated tumor cells occurred earlier in irradiated mice than in non-irradiated mice. Proliferative activity of draining lymph node lymphocytes against transplanted tumor cells was significantly reduced in irradiated mice compared to non-irradiated mice. These results suggest the possibility that tumor-specific immune suppression due to continuous low-dose-rate gamma-ray irradiation may enhance tumorigenesis resulting in early neoplastic death of mice after continuous low-dose-rate gamma-ray irradiation.

#### 1. 目的

低線量放射線生物影響実験調査(身体的影響に係る実験; 寿命試験)では、多様な腫瘍発生スペクトルを示し、毒性試験で多用されている、SPFのB6C3F<sub>1</sub>マウスが用いられた(Tanaka *et al.* 2003, Tanaka *et al.* 2007)。前年度までに、低線量率(20 mGy/22h/day)の $\gamma$ 線を約400日間まで連続照射したB6C3F<sub>1</sub>マウスの脾T細胞増殖応答能の低下という、腫瘍に対する免疫機能の低下にもつながりうる結果が一部得られたことから、低線量率(20 mGy/22h/day)放射線長期連続照射の腫瘍免疫に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、低線量率 $\gamma$ 線を長期連続照射したB6C3F<sub>1</sub>マウスに同系マウス由来の固形腫瘍(卵巣腫瘍)の培養細胞を移植して、生着率や腫瘍に対する免疫細胞応答等を観察する実験を行った。

#### 2. 方法

雌SPF B6C3F<sub>1</sub>マウスに、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) $\gamma$ 線を200日間(集積線量4000 mGy)及び400日間(集積線量8000 mGy)それぞれ連続照射した。移植腫瘍細胞株としてB6C3F<sub>1</sub>メスマウスに高線量率ガンマ線を照射後生じた卵巣顆粒膜細胞腫由来の培養細胞株(OV3121)を使用した(Yanagihara *et al.* 1995)。培養した腫瘍細胞を回収・計数した後、生理食塩水に懸濁し、照射及び非照射マウスの背部皮下に接種した。以後毎週2回観察を行い、触診により腫瘍形成が確認された場合に腫瘍が生着したと判断した。中途死亡した個体を除き、移植後60日目に麻酔下で安楽死させ、病理解剖して腫瘍の大きさと重量を測定するとともに、転移の有無等、肉眼的観察と病理組織学的検索を行った。

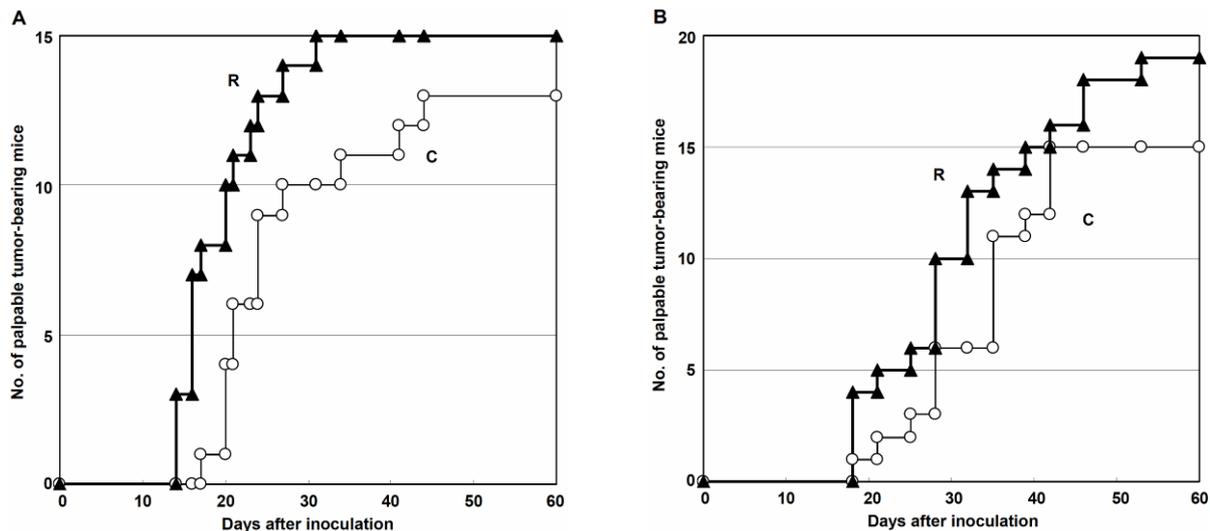


Fig. 1 Tumor cell transplantability to B6C3F<sub>1</sub> mice. OV3121 cells were inoculated into age-matched, non-irradiated control (C, open circles) and irradiated (R, black triangles) mice at 400 days after continuous irradiation with a total accumulated dose of 8000 mGy (A) and at 200 days after continuous irradiation with a total accumulated dose of 4000 mGy (B).

リンパ球の腫瘍細胞に対する増殖応答能を測定するために、OV3121細胞をマウスに移植後3日目に、近傍の流域リンパ節(DLN)を摘出し、リンパ球を単離した。このリンパ球を放射線照射で増殖抑制したOV3121細胞と120時間共培養した。[<sup>3</sup>H]-TdRを添加し4時間培養後、液体シンチレーションカウンターで取り込まれた[<sup>3</sup>H]-TdRのβ線量を測定した。

### 3. 結果

低線量率(20 mGy/22h/day)γ線を長期連続照射(集積線量4000及び8000 mGy)したマウスに照射終了直後(200日目及び400日目)にそれぞれOV3121細胞を背部皮下接種し、60日間皮下腫瘍の形成を観察した(Fig. 1)。その結果、集積線量8000 mGy照射実験群においてのみ非照射マウスと比べて皮下腫瘍の形成に有意な差(p=0.016)が観察された。一方、集積線量4000 mGy照射実験群においては有意な差は観察されなかった(p=0.098)。

そこで、この差を生じる原因を明らかにするために、8000 mGy照射後のマウスの移植腫瘍に対するリンパ球増殖応答能の解析を行った。腫瘍細胞を移植された照射マウスの流域リンパ節(DLN)から分離したリンパ球の腫瘍細胞に対する増殖応答能を測定したところ、非照射コントロールマウスと比べて有意な減少(p=0.038)が観察された(Fig. 2)。

これらの結果から、低線量率γ線を連続照射されたマウスでは、腫瘍細胞に対するリンパ球の増

殖応答能が低下しており、前項(7.2.2)のallo-MLR活性の低下と併せ、低線量率放射線の長期連続照射により異種抗原や腫瘍細胞に対する免疫細胞の応答が抑制されており、この免疫応答の抑制が移植腫瘍生着率を上昇させている可能性が唆された。これにより寿命試験で示された早期腫瘍死、すなわち腫瘍の早期発生または発育促進の理由を一部説明できる可能性がある。

今後はこの抗腫瘍免疫応答能の抑制をターゲット

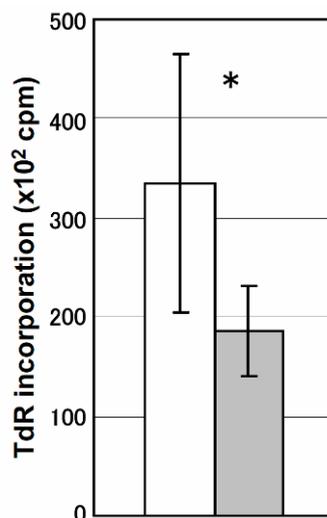


Fig. 2 Proliferative activities of draining lymph node (DLN) lymphocytes against OV3121 cells were compared between age-matched, non-irradiated control (□) and irradiated (■) mice with total accumulated dose of 8000 mGy. Each value represents mean ± SD. \*, p<0.05.

とし、低線量率放射線連続照射による発がんの機序を明らかにするため、放射線照射あるいは非照射のマウスの耳や尾等正常組織から RNA 等を抽出し、遺伝子発現パターンを発現アレイ法等の手法で調べ、移植腫瘍を受容した個体と拒絶した個体とで違いを比較することにより、移植腫瘍の生着率亢進に関わる因子や経路を同定する実験を行う。また、移植腫瘍の種類による応答の違いを調べるため、低線量率 (20 mGy/22h/day)  $\gamma$  線を連続照射した B6C3F1 マウスに発生する腫瘍から腫瘍細胞株を樹立し、移植実験を行いたいと考えている。

#### 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.  
Yanagihara, K. *et al.* (1995) *Jpn. J. Cancer Res.* **86**, 347-356.