

Title	低線量X線の全身照射によるラット脾細胞のマイトジェン誘導幼若化の亢進
Author(s)	石井, 敬一郎; 武藤, 徳男; 山本, 格
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1990, 50(10), p. 1262-1267
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18619
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

低線量 X 線の全身照射によるラット脾細胞のマイトジェン 誘導幼若化の亢進

1) (財) 電力中央研究所原子力部安全管理研究室, 2) 岡山大学薬学部生物薬品製造学教室

石井敬一郎^{1,2)} 武藤 徳男²⁾ 山本 格²⁾

(平成元年7月17日受付)

(平成2年3月2日最終原稿受付)

Augmentation in Mitogen-Induced Proliferation of Rat Splenocytes by Low Dose Whole Body X-Irradiation

Keiichiro Ishii^{***}, Norio Muto^{**} and Itaru Yamamoto^{**}

^{*}Nuclear Safety Section, Central Research Institute of Electric Power Industry

^{**}Department of Immunochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University

Research Code No. : 402.1, 405.9

Key Words : X-ray irradiation, Radiation hormesis,
Cell proliferation, Splenocyte, Thymocyte

The hypothesis of radiation hormesis has been proposed. To elucidate the hormetic effect on the immune system, we studied the effect of low dose whole body irradiation on the in vitro mitogen-induced proliferation of rat thymocytes and splenocytes. The rats were irradiated with low doses (0.01-2 Gy) of X-ray and the cells were cultivated in the presence of various mitogens. The cell proliferation was evaluated by the incorporation of ³H-thymidine into the cells.

Concanavalin A (Con A)-induced proliferation of splenocytes prepared at 4 hr after irradiation was augmented with 0.05 Gy, whereas that of thymocytes was not affected. Irradiation of rats with 0.05 Gy also induced the enhanced proliferation of splenocytes stimulated by phytohemagglutinin or lipopolysaccharide, though their responses were lower than that by Con A. This augmentation in mitogen-induced proliferation of splenocytes was observed within a few hours after irradiation, being a temporary effect. These results suggest that very low dose whole body irradiation possibly induce a hormesis-like effect on the immune splenocytes.

1. 序 論

近年 Luckey¹⁾によって、低線量放射線によるホルミシス効果の可能性が示唆された。特に免疫機能に関しては、T細胞の活性化²⁾、イムノグロブリンG抗体産生の活性化³⁾、脾臓のプラーク形成細胞の増加⁴⁾、などの例が報告されている。疫学調査の結果からは、中国広東省の自然放射線の高線量地域住民におけるリンパ球活性化の可能性⁵⁾、アメリカ在住原爆被爆者における細胞障害性機能やインターフェロン産生の活性化の可能性⁶⁾、など

が報告された。

このため我々は、放射線に対する感受性が高く傷害を受け易い免疫系の細胞について、ホルミシス効果の有無の確認を目的に、低線量 X 線をラットに全身照射し、胸線細胞と脾細胞のマイトジェンによるリンパ球幼若化反応（以下、マイトジェン応答という）におよぼす影響を検討した。その結果、0.05Gy程度の照射によりマイトジェン応答が亢進する、という新しい知見を得たので報告する。

2. 実験方法

2-1. 実験動物

7週齢の雄 F344/NSIc ラット（日本エスエルシー社）を購入し、1週間の予備飼育後に用いた。

2-2. X線の照射

X線の照射は、日立 X線照射装置 MBR-1505R で行い、フィルターには Cu 0.1mm + Al 0.5mm を用いた。実験動物は、2mm 厚みのアクリル製 ケージ内に固定し、照射口から 40cm の距離にある照射台に置いた。

X線は、実験動物を全身照射したときに、背部の皮膚における吸収線量が 0.01Gy ~ 2Gy となるように、Victoreen 社製 500A-1線量計と同社製 550-6A プローブで校正し、印加電圧と電流を 70KV で 1.1mA、80KV で 1.5mA および 2.3mA、100KV で 2.7mA、ならびに 110KV で 4.4mA とし、発生させた。この条件下で、動物背部皮膚面での線量率は、それぞれ 0.01, 0.025, 0.05, 0.1 および 0.2Gy/分である。照射時間は 1分、5分または 10分とした。対照群も、照射群と同様に空操作した。照射後、決められた時間の経過まで動物を安静状態で放置・飼育した。

2-3. 細胞浮遊液の調製と培養および幼若化の測定

(1) 細胞浮遊液の調製

エーテル麻酔下で胸線と脾臓を摘出し、それぞれ 4ml の Eagle's MEM（日水製薬）を入れたペトリディッシュ（Falcon 社）内に置いたステンレスメッシュ上でスパーテルを用いてほぐし、細胞を MEM 中に浮遊させた。21G 針付きの 5ml 注射筒（テルモシリンジ）を用いて、ディッシュ内でこの細胞浮遊液の注入・射出を 5 回繰り返す。浮遊液中の細胞の分離度を高めた。さらに、細胞浮遊液を 15ml 遠沈管（Corning 社）内で 1 時間静置して組織片等を沈澱させた後、細胞が浮遊している上層部をパスツールピペットを用いて別の遠沈管に回収した。回収した細胞は、軽いピベッティングと 2,000rpm で 5 分間の遠心分離を行い、4ml の MEM で 2 度洗浄した。洗浄された細胞浮遊液の一部について、トリパンブルー染色のうえ顕微鏡を用いて血球計算盤により、細胞数を測定した。

細胞数の測定結果より、細胞浮遊液から一定数の細胞を分取し、3,000rpm で 10 分間の遠心分離を行い、MEM から 10% 牛胎児血清（FCS, Gibco 社）含有 RPMI 1640 培地（Flow 社）へ培地交換し、最終的に 5×10^6 個/ml に調製した。

(2) 細胞の培養

96 穴 U 底マイクロプレート（Nunc 社）に、2 倍濃度の各種マイトジェンを含む RPMI 1640 培地 100 μ l を予め分注し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下で平衡化した。各ウエルに最終細胞調製液 100 μ l を分注した後、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 下にて 48 時間培養した。培養 44 時間目に、細胞の幼若化のアッセイのために、生理食塩水で希釈した 18.5KBq の ³H-チミジン を 25 μ l ずつ各ウエルに添加した。

(3) 幼若化の測定

培養終了後、セルハーベスターを用いて細胞をガラスフィルター上に回収した。フィルター上に固定された細胞の ³H-チミジン取り込み量は、トルエン系の液体シンチレータを用いて 1 時間測定した。

2-4. 実験のプロトコール

(1) 照射線量依存性および免疫組織の応答性

0.01Gy ~ 2Gy の X 線照射後 4 時間目に胸線細胞と脾細胞を調製し、2.5 μ g/ml のコンカナバリン A (ConA, E-Y 社) に対するマイトジェン応答を調べた。

(2) マイトジェンの種類による応答性

0.05Gy の X 線照射後 4 時間目に脾細胞を調整し、1 μ g/ml および 2.5 μ g/ml の ConA、ならびに 25 μ g/ml のフィトヘムアグルチニン（PHA-P, Difco 社）およびリポ多糖（LPS, Sigma 社）のそれぞれに対するマイトジェン応答を調べた。

(3) 照射後経過時間依存性

0.05Gy の X 線照射直後ならびに 1 時間、4 時間、8 時間、12 時間、および 24 時間経過した時点で脾細胞を調製し、1 μ g/ml の ConA、および 25 μ g/ml の PHA-P と LPS のそれぞれに対するマイトジェン応答を調べた。

2-5. データ処理

X 線照射による胸線細胞と脾細胞の各種マイトジェンに対する応答の変化は、実験の繰り返し

毎に、非照射の対照群における応答のレベルと照射群の応答のレベルの比を求め、この相対的な比活性を%表示したもので、次式によって計算した。

$$\text{比活性 (\%)} = \frac{\text{照射群の}^3\text{H-チミジンの取り込み量 (cpm)}}{\text{対照群の}^3\text{H-チミジンの取り込み量 (cpm)}} \times 100$$

また X 線照射による各種マイトジェン応答の変化の有意性は、paired t test の方法により、t 検定した。

3. 結 果

3-1. 照射線量依存性および免疫組織の応答性

2.5 $\mu\text{g/ml}$ の ConA によって誘導される胸腺細胞と脾細胞のマイトジェン応答について、その応答の X 線の照射線量に対する依存性、および免疫組織の違いによる応答性の差を調べた。Fig. 1 には、胸腺細胞の ConA 応答の変化を示した。Fig. 2 には、脾細胞の ConA 応答の変化を示した。

Fig. 1 および Fig. 2 から、胸腺細胞と脾細胞の ConA 応答は、いずれも実験動物が 0.1Gy 以上の皮膚線量を全身照射されると、非照射の対照群に比べて低下した。しかし脾細胞では、0.01Gy ~ 0.05Gy の全身照射により、ConA 応答は特異的に亢進した。特に 0.05Gy の照射では、ConA 応答

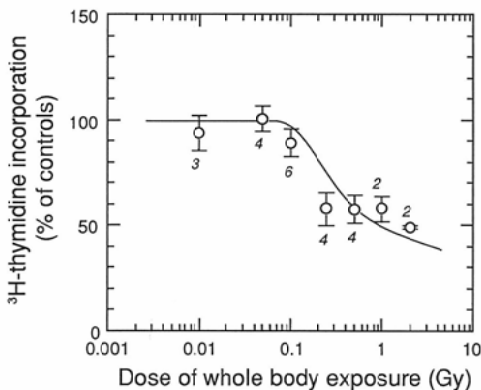


Fig. 1 Effect of various doses of whole body X-irradiation on Con A-induced proliferation of rat thymocytes. The thymocytes were obtained from rats at 4 hr after irradiation and cultivated in the presence of Con A (2.5 $\mu\text{g/ml}$). The data are presented as percentages of sham-irradiated controls (bars indicate \pm SE; the number of rats per experimental point is shown in italics).

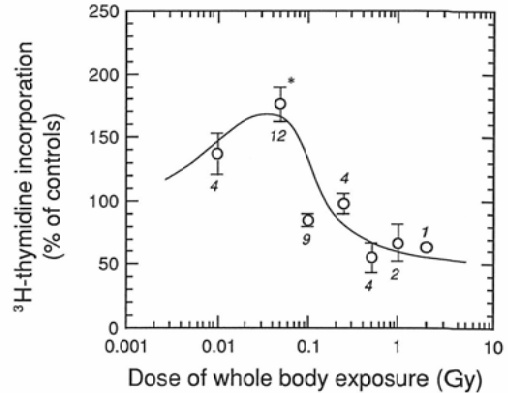


Fig. 2 Effect of various doses of whole body X-irradiation on Con A-induced proliferation of rat splenocytes. The splenocytes were obtained from rats at 4 hr after X-ray irradiation and cultivated in the presence of Con A (2.5 $\mu\text{g/ml}$). The data are expressed as described in Fig. 1. Significance; * $p < 0.02$ by paired t test.

は対照群の1.8倍程度まで亢進し、照射群と対照群の間に2%の危険率で有意差が認められた。一方胸腺細胞では、このような亢進は見られず、0.1Gy以下の照射では、照射群と対照群の間に有意差はなかった。

3-2. マイトジェンの種類による応答性

有意な亢進が認められた脾細胞を対象として、マイトジェンの種類を変えた際の応答性の違いを調べ、Fig. 3に、その結果を示した。

0.05Gyの皮膚線量の全身照射によって、脾細胞のマイトジェン応答は、1 $\mu\text{g/ml}$ および2.5 $\mu\text{g/ml}$ のConA、ならびに25 $\mu\text{g/ml}$ のPHA-PとLPSのいずれの濃度についても、1%あるいは2%の危険率で有意に亢進した。特に、低濃度のConAに対しては応答の亢進は対照群の2倍に達し、用いた条件下においては、低線量照射によるマイトジェン応答の亢進が最も強く現われた。

3-3. 照射後経過時間依存性

脾細胞を対象に、0.05Gyの皮膚線量の全身照射から組織摘出までの時間を変化させ、1 $\mu\text{g/ml}$ のConA、ならびに25 $\mu\text{g/ml}$ のPHA-PおよびLPSのそれぞれによって誘導されるマイトジェン応答の照射後経過時間依存性を調べ、Fig. 4にその結

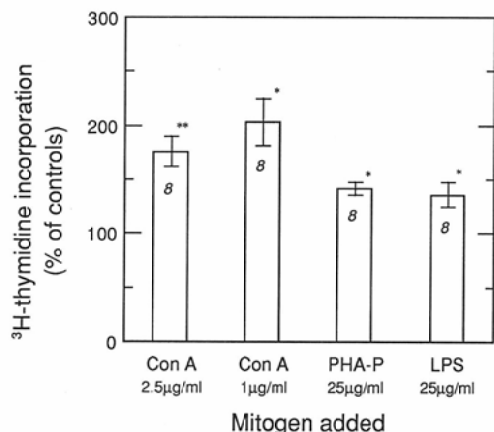


Fig. 3 Augmentation in mitogen-induced proliferation of splenocytes from rats irradiated with 0.05 Gy. The splenocytes were obtained from rats at 4 hr after irradiation and cultivated in the presence of each mitogen. The data are expressed as described in Fig. 1. Significance; * $p < 0.01$, ** $p < 0.02$ by paired test.

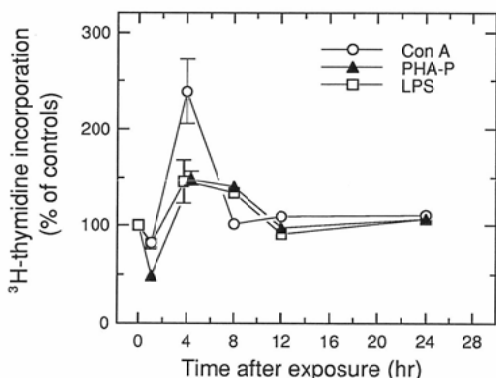


Fig. 4 Effect of 0.05 Gy whole body irradiation on mitogen-induced proliferation of rat splenocytes, as a function of time after irradiation. The splenocytes were obtained from rats at the indicated times and cultivated in the presence of each mitogen. The data are expressed as described in Fig. 1. The number of experiments (2 rats per experiment) is 4 at 4 hr, 8 at 0 hr and 1 at other times.

果を示した。

ConA 応答は、X 線の照射後 4 時間目に対照群の 2 倍を超える顕著な亢進現象を示し、一方 PHA 応答および LPS 応答は、ConA 応答に幾分遅れて 4 時間目から 8 時間目までの時間で 1.5 倍

の亢進を示した。

4. 考 察

今回の実験では、脾細胞のマイトジェン応答が、0.05Gy 程度の X 線照射により亢進することが、ConA, PHA-P および LPS のいずれのマイトジェンに対しても確認された。一方、胸線細胞の ConA 応答には、今回の実験条件では、X 線照射による変化は認められなかった。マイトジェン応答はリンパ球の応答であり、このような応答の亢進には、次のような理由が考えられる。

1) リンパ球が低線量照射によって直接刺激され、マイトジェンに対する感受性が変化し、応答が亢進した。

2) マクロファージ (M ϕ) 系の細胞が低線量照射によって刺激され、その機能が変化し、それがリンパ球のマイトジェン応答を亢進させた。

これまでに、M1株細胞に10Gy という高線量を照射した結果として、細胞膜表面の ConA 結合能が変化すること⁷⁾が明らかにされている。これは、照射によって膜の構造が変化したためと考えられるが、60KVp の X 線の低線量照射によっても、膜の構造変化は高感度に起きること⁸⁾が報告されている。このため今回の実験結果も、低線量照射によって免疫組織のリンパ球の膜構造が変化し、各種マイトジェンとの結合能すなわちマイトジェンに対する感受性が変化したことが考えられる。しかしこのことから、脾細胞と胸腺細胞の応答の差を説明することは困難である。また M1株は、骨髓芽球様細胞で M ϕ への分化誘導の研究によく用いられる細胞である⁹⁾ため、M ϕ への作用についても考える必要がある。0.1Gy という T リンパ球と B リンパ球に影響を与えないとされる低線量に対しても、顕著な放射線感受性を示す M ϕ 系の細胞の存在が明らかにされており¹⁰⁾、このことから低線量照射を受けた免疫組織中の M ϕ 系細胞の機能変化を重視する必要性がうかがわれる。リンパ球に対する各種マイトジェンの作用については、ヒトとマウスの例がよく知られており、ConA は、ヒトの T リンパ球のうち T4⁺細胞と T8⁺細胞に作用するが、PHA-P は主として T4⁺細胞に作用し、LPS はマウスでは B リンパ球に作

用する¹¹⁾。また、Tリンパ球のマイトジェン応答には、Mφによる補助作用が必要であり¹²⁾、特にインターロイキン-1の1次刺激と、その結果として起きるインターロイキン-2による2次刺激が重要である¹³⁾。Bリンパ球に作用するLPSも、Mφが存在しないとその作用を発揮しない¹⁴⁾¹⁵⁾といわれている。このようなヒトやマウスにおけるマイトジェンの作用機構は、今回の実験では実験動物にラットを用いたため、必ずしも成立しているとは言い切れないが、ラットにおいてもほぼ同様の作用機構の存在は十分考えられる。今回の結果では、Tリンパ球のConA応答とPHA応答、およびBリンパ球のLPS応答のいずれも亢進する傾向を示し、この傾向は、Mφが多く存在する脾臓¹⁶⁾で観察された。特に今回の実験では、X線の照射から細胞培養に至るすべての段階において、Mφの除去などの細胞分離は行っていないため、この点で、脾細胞と胸腺細胞の応答性に差が現われた可能性は高い。またラットTリンパ球のうちT8+が、T4+やBリンパ球などよりも特に強い亢進を示した今回の結果は、ヒト末梢血中のリンパ球を低線量照射した実験で、T8+のマイトジェン応答が強く亢進される結果¹⁷⁾と関連して、興味深い。今後は、この応答亢進に関与する細胞の同定が重要な課題である。

今回の実験結果のもう1つの特徴は、上記のマイトジェン応答の亢進が、X線照射後4時間から8時間までの間という、比較的速いかつ短時間の現象として見いだされたことである。このことは、低線量X線を全身照射したNMRIマウスにおいて、骨髄細胞などにおけるDNA合成が、照射4時間後に最も強く抑制される時間的依存性¹⁸⁾と、よく一致している。またこの時間依存性は、起炎物質として水酸化アルミゲルを用いて人工的に炎症を発生させた場合の、炎症性に起きる免疫応答のそれ¹⁹⁾とも、よく一致している。電離放射線は、生体内において水を電離し活性酸素を生成する²⁰⁾。また炎症もその発生にともない活性酸素が炎症部位に産生され、この活性酸素の作用によってさらに炎症が進展することも知られている²¹⁾。一般に、活性酸素の過剰産生は細胞障害を惹起するが、今

回用いた低線量X線によって生体内に生成された微量な活性酸素は、逆に脾臓のリンパ球やMφなどの細胞機能を活性化される可能性が考えられる。今後、活性酸素の関与や細胞活性化のメカニズムの解明を含めて、低線量照射によるホルミシス効果の研究が期待される。

5. 結 論

低線量X線(0.01Gy~2Gy)をF344/NSIcラットに全身照射し、胸腺細胞と脾細胞のマイトジェン応答におよぼす影響について検討した。

(1) 0.05GyのX線照射によって、照射4時間後の脾細胞のConA応答は、非照射の対照群と比較して有意に亢進した。しかし、胸腺細胞では、このような亢進は見られなかった。

(2) X線照射による脾細胞のConA応答の亢進は、対照群の2倍に達するという最も強い反応を示し、またPHA応答とLPS応答の亢進は、いずれも1.5倍程度であった。

(3) 脾細胞のマイトジェン応答の亢進は、照射後数時間の間だけに生じる一過性の現象であった。

以上のことは、ラットの脾細胞におけるマイトジェン応答が低線量のX線照射によって亢進する、というホルミシス様効果の存在を示唆するものである。

文 献

- 1) Luckey TD: Hormesis from ionizing radiation. *Health Phys* 46: 705, 1984
- 2) James SJ, Makinodan T: T cell potentiation in normal and autoimmune-prone mice after extended exposure to low doses of ionizing radiation and/or caloric restriction. *Int J Radiat Biol* 53: 137-152, 1988
- 3) Gras J, Morros JM, Guix J, et al: Stimulation of IgG antibody formation by sublethal irradiation during persistently repeated immunization with *Brucella abortus*. *Immunology* 28: 629-634, 1975
- 4) Liu SZ, Liu WH, Sun JB: Radiation hormesis: Its expression in the immune system. *Health Phys* 52: 579-583, 1987
- 5) Liu SZ, Xu GZ, Li X, et al: A restudy of immune functions of the inhabitants in high background radiation area in Guangdong. *Chin J Radiol Med Prot* 5: 124-127, 1985

- 6) Bloom ET, Toji DS, Onari K, et al: Immune function in aging atomic bomb survivors residing in the United States. *Radiat Res* 96: 399—410, 1983
- 7) Kazuhide T, Ichiro K: Radiation-induced alterations in binding of concanavalin A to cells and in their susceptibility to agglutination. *Int J Radiat Biol* 49: 979—986, 1986
- 8) Surendra PV: Low levels of irradiation modify lipid domains in model membranes: A laser raman study. *Radiat Res* 107: 183—193, 1986
- 9) 穂積本男: バイオテクノロジー素材としての培養細胞, 細胞分化 (1), 蛋核酵, 33: 1, 1988
- 10) 宮本美弥子, 坂本澄彦: 担癌マウスの低線量全身照射に認められるマクロファージ系前駆細胞の分化増殖抑制効果, 日医放生物部会誌, 1: 48—51, 1988
- 11) 森本幾夫, 安倍 達: 膠原病の T 細胞サブセット, 臨床免疫, 15: 943—949, 1983
- 12) 山下優毅, 白川文彦: マクロファージによる T 細胞の活性化とその機構異常. マクロファージ 1985, マクロファージの分化・成熟と細胞増殖の調節, p18—23, ライフ・サイエンス出版, 1985
- 13) 山本 格(編集), 大森 齊, 小森谷恵司, 他: 薬学領域の基礎免疫学, p146, 廣川書店, 1986
- 14) 中野昌康: マイトーゲンによる B リンパ球活性化の機序, 臨床免疫, 16: 12—19, 1984
- 15) 若林芳久, 広瀬俊一: ヒト B リンパ球を分化させる mitogen の作用機序, 臨床免疫, 16: 576—583, 1984
- 16) 徳永 徹: マクロファージ, p18, 講談社サイエンティフィック, 1988
- 17) Norbert G, James SG: Effect of irradiation on human T-cell proliferation: Low dose irradiation stimulates mitogen-induced proliferation and function of suppressor/cytotoxic T-cell subset. *Cell Immunol* 84: 439—445, 1984
- 18) Feinendegen LE, Bond VP, Booz J, et al: Biochemical and cellular mechanisms of low-dose effects. *Int J Radiat Biol* 53: 23—37, 1988
- 19) 畔柳武雄(編集), 大河原進, 吉永 秀, 他: 新免疫学叢書 9, 免疫ネットワーク, p148, 医学書院, 1983
- 20) 小沢俊彦, 中村 稔(編集), 大柳善彦(編集), 他: 活性酸素, p160—165, 共立出版, 1988
- 21) 山下 昭(編集), 吉永 秀(編集), 丹羽鞆負, 他: 炎症の化学伝達 2, 細胞性因子, p147—175, メディカルリサーチセンター, 1984