



Title	モルモット多型核白血球スーパーオキシド産性能に対する放射線照射の影響
Author(s)	新屋, 晴孝
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1987, 47(1), p. 64-68
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/19846
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

モルモット多型核白血球スーパーオキシド産生能に 対する放射線照射の影響

岡山大学医学部放射線医学教室

新 屋 晴 孝

（昭和61年9月2日受付特別掲載）

（昭和61年11月5日最終原稿受付）

Effect of Whole Body Irradiation on O_2^- Production in Polymorphonuclear Leukocyte of Guinea Pig

Harutaka Niiya

Department of Radiation Medicine, Okayama University Medical School

Research Code No. : 402.1

Key Words : Whole body irradiation, Polymorphonuclear leukocyte, Superoxide anion, Zymosan

The capacity of superoxide anion production of polymorphonuclear leukocytes (PMNL) has been determined after whole body irradiation. A diminished capacity of superoxide anion production in the presence of opsonized zymosan was found in PMNL taken from guinea pigs irradiated in vivo with 5, 10, and 20 Gy. However, no such diminution was found after a dose of 2 Gy. On the other hand, levels of superoxide anion production stimulated by myristate, N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (FMLP), and Concanavalin A remained unchanged compared to the control. PMNL irradiated in vitro with 20 Gy had a capacity of superoxide anion production similar to that of the control samples in the presence of either opsonized zymosan or FMLP and myristate. These results suggest that the capacity of superoxide anion production stimulated by zymosan is damaged by whole body irradiation.

序 論

多型核白血球は骨髄中での分化後、末梢血中に放出され感染、炎症における生体防御機構において中心的役割を担う細胞である。放射線の多型核白血球に対する影響については in vivo あるいは in vitro で多くの報告がされている。in vivo として、Selvaraj と Sbarra¹⁾は100radの全身照射で、照射後3～6日目のモルモットから分離した多型核白血球細胞の殺菌作用が著しい障害を、Turch と Albu²⁾は1,200R照射したラット多型核白血球の呼吸能の低下を、また Paul et al.³⁾は100radの全身照射で、照射後、3～5日目の細胞の H_2O_2 生成能や殺菌作用の低下を報告している。この他に

興味ある例としては、トロトラスト症の末梢血多型核白血球の貪食能の低下が、Nakamura et al. によって報告されている⁴⁾。

in vitro として、Turcu と Albu²⁾は2,000R照射ラット多型核白血球の呼吸能の低下を、Holley et al.⁵⁾はヒト末梢血多型核白血球に高線量を照射し、貪食能および走化性について検討し、5,000radまでは変化がなく、5,000rad以上で機能が低下したとしている。また、Sasagawa et al.⁶⁾はヒト末梢血白血球に30～3,000radの⁶⁰Co照射を行い、遊走能、ライソゾーム酵素放出能、スーパーオキシド産生能に対する影響を検討し、高線量での遊走能の低下、酵素放出能の減少、スーパーオキ

サイド産生の増加について報告している。以上のように多型核白血球の機能に対して放射線が障害をもたらすことが報告されているが、その障害の機構については充分に解明されておらず不明の点が多い。

放射線の多型核白血球への障害の機構を明らかにするために多型核白血球のスーパーオキシド産生能への *in vivo*, *in vitro* での照射の影響について検討し、若干の結果を得たので報告する。

材料と方法

実験動物として使用した Hartley 雄モルモット (400~500g) は紀和実験動物センターより購入して、動物センター内で飼育した後、実験に使用した。照射は東芝製深部X線治療装置を使用して 2~20Gy (200~2,000rad) の全身照射を行った (Cu 0.5mm+Al 0.5mm, 0.69Gy/min)。なお、照射時に使用したケージに30分間入れておいた群を対照群とした。*in vitro*での照射は145mM KCl, 1mM Na₂HPO₄·12H₂O, 0.5mM MgSO₄·7H₂O, 5mM Glucose, 10mM HEPES (pH 7.4) 緩衝液に懸濁した多型核白血球 (5×10⁷cells) をプラスチック試験管にいて、室温化でアクロバットスターラーで緩く攪はんしながら20Gy (1.08Gy/min) の照射を行った。同一時間室温化で攪はんしたものを対照群とした。なお、トリパンブルー排除で観察した照射後の生存率は対照群と照射群で差を認めなかった。X線全身照射1時間後、モルモットに体重の1/10量の2%カゼインを腹腔内に注射して、14~15時間後に腹水中に集ってくる多型核白血球を採取し実験に使用した。このようにして採取した細胞の95%は多型核白血球で単球とリンパ球の存在は5%程度であった。また実験終了後、トリパンブルー排除で観察した生存率は98%以上であった。対照群と照射群間には純度、生存率ともに差は認められなかった。

多型核白血球のスーパーオキシド産生能はチトクロームCの還元による550nmの吸光度増加を37℃下島津分光光度計 (UV-200型) で測定する方法で求めた。反応系は、多型核白血球 1×10⁶ cells/ml, 145mM NaCl, 5mM KCl, 1mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1mM Ca Cl₂, 0.5mM MgSO₄·7

H₂O, 5mM Glucose, 100μM チトクローム C, 10mM HEPES (pH 7.4) 緩衝液を含みチャートスピード1.25cm/minで1分間描かせたあと、代謝誘導物質としてオプソニン化チモザン (250μg/ml), コンカナバリン A (50μg/ml)-サイトカラシン D (2.5μg/ml), ミリスチン酸 (25μM), 走化性ペプチド (FMLP, 12.5nM) のいずれかを添加し反応を開始した。反応開始後5~10分間レコーダーで描かせ、スーパーオキシド産生能をチャートの直線部分の傾きから求め、ミリモル吸光係数21.1より10⁶cellsによる1分間に還元したチトクロームCの量 nmole/min/10⁶cells として表わした。

結果

(1) 多型核白血球スーパーオキシド生成に対する全身照射の影響：X線照射のスーパーオキシド産生能への影響を検討するために、2~20Gy照射したモルモットから分離した多型核白血球のオプソニン化チモザン誘導によるスーパーオキシド生成を測定した。

Fig. 1は対照群と20Gy照射群から分離した多型核白血球のスーパーオキシド生成反応の

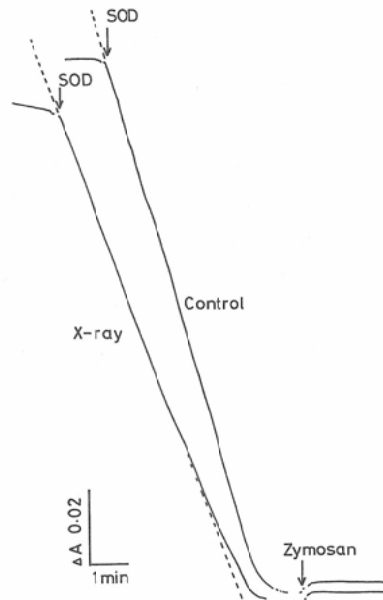


Fig. 1 Superoxide anion generation in polymorphonuclear leukocyte.

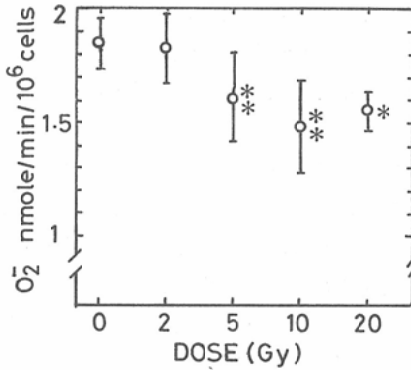


Fig. 2 Effect of whole body irradiation on superoxide anion production by polymorphonuclear leukocyte in the presence of opsonized zymosan. Mean \pm SD of 5 experiments. *Significantly different from control ($p < 0.01$). **Significantly different from control ($p < 0.05$).

チャートを示したものである。オプソニン化チモザンを添加していない状態では、ほとんどスーパーオキシドの生成は認められないがオプソニン化チモザンの添加によりスーパーオキシドの生成が認められ、スーパーオキシドディスムターゼの添加により完全に阻害された。

Fig. 1 に示すチャートの直線部分から、対照群と照射群のスーパーオキシド生成量を求め、各照射群毎にまとめたものが Fig. 2 である。2Gy 照射群では生成量 $1.81 \text{ nmol/min}/10^6 \text{ cells}$ と対照群 ($1.85 \text{ nmol/min}/10^6 \text{ cells}$) に比較して有意の差は認められなかった。しかし、5, 10, 20Gy 照射群では、それぞれ、1.61, 1.50, $1.54 \text{ nmol/min}/10^6 \text{ cells}$ と有意の抑制が認められた。

以上のようにオプソニン化チモザンによるスーパーオキシド生成能への X 線全身照射での抑制効果が認められたことから、多型核白血球への作用部位が異なると考えられている他の代謝誘導物質での刺激によるスーパーオキシド生成への X 線全身照射の影響について検討した。

Fig. 3 はそれぞれ作用部位が異なる各代謝誘導物質によるスーパーオキシド生成量を示したものである。オプソニン化チモザンをのぞくミリスチン酸、コンカナバリン A、走化性ペプチド FMLP の刺激によるスーパーオキシド生成で

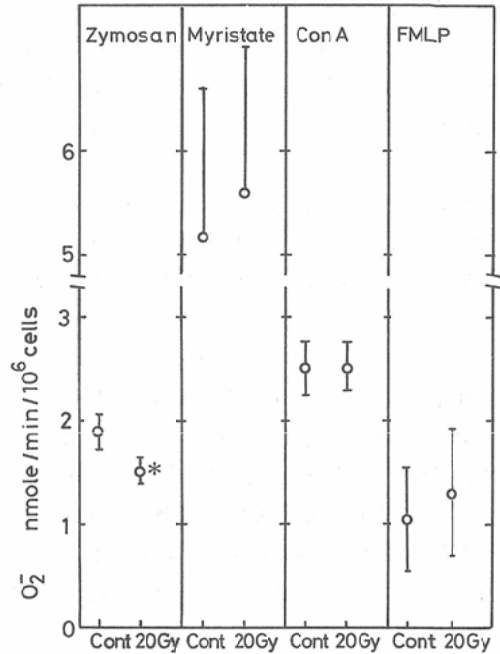


Fig. 3 Production of superoxide anion by polymorphonuclear leukocyte under different conditions. Mean \pm SD of 8 experiments. *Significantly different from control ($p < 0.01$).

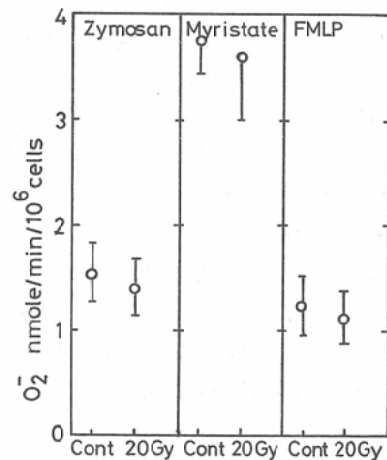


Fig. 4 Effect of irradiation in vitro on superoxide anion production by polymorphonuclear leukocyte in the presence of opsonized zymosan, myristate and FMLP. Mean \pm SD of 4 experiments.

は対照群と照射群とに有意の差は認められなかった。

(2) スーパーオキシド産生への in vitro 照射

の影響：in vivo の照射でオプソニン化チモザンによるスーパーオキシド生成の抑制が認められたことから、in vitro での影響についても検討した。

Fig. 4 は20Gy 照射でのチモザン、FMLPそしてミリスチン酸誘導によるスーパーオキシド生成の結果を示したものである。チモザンの場合、対照群の $1.56\text{nmol}/\text{min}/10^6\text{cells}$ の値に比較して、照射群では $1.40\text{nmol}/\text{min}/10^6\text{cells}$ と有意の差は認められなかった。また、FMLPとミリスチン酸の場合も同様に差は認められなかった。

考 察

X線の多型核白血球の機能に対する影響については既に多くの報告がなされており¹¹⁻¹³⁾、X線が白血球に障害をもたらす事が明らかにされている。しかし、障害の機構については不明の点が多く、膜のリセプター、細胞骨格系、膜に存在する酸素代謝酵素系のいずれの障害によるのか充分には解明されていない。

本実験においては、白血球の細胞膜との反応部位が異なると考えられている代謝誘導物質を用いて⁷⁻⁹⁾、スーパーオキシド産生能を指標に、X線の影響について検討し以下の結果を得ることができた。

(1) ミリスチン酸は膜に直接作用すると考えられているが、この物質によるスーパーオキシド生成にはin vivo, in vitro ともに対照群と照射群で差が認められなかった。この結果から細胞膜に存在するNAD(P)H酸化酵素系自体が、in vivo でのX線照射によってスーパーオキシドの生成に影響が出るような障害を受けてはいないと推定された。

(2) コンカナバリンAは膜の糖鎖に結合してスーパーオキシド生成を誘導すると考えられているが、コンカナバリンA-サイトカラシンDによるスーパーオキシド生成にはin vivo, in vitro ともに対照群と照射群では差は認められなかった。この結果から膜の糖鎖の部分はX線照射によって障害されていないと推定された。

(3) 走化性ペプチドFMLPによるスーパーオキシド生成でも、in vitro, in vivo ともに対照

群と照射群では差は認められなかった。しかし、本実験では腹腔内に浸出してきた細胞を用いていることから、走化性に大きな障害を受けた細胞は浸出してこないとも考えられ、このような結果になったとも思われた。なお、浸出細胞の数は対照群 $4.3 \times 10^8 \pm 1.5$ 照射群 $2.2 \times 10^8 \pm 1.3$ と有意($p < 0.05$)な差があり、照射による影響が認められた。ところで、Sasagawa et al.⁶⁾は、in vitro ⁶⁰Co 照射でのスーパーオキシド産生の増加を報告しているが、本実験条件下では同じような結果は得られなかった。

(4) オプソニン化チモザンによるスーパーオキシド生成はin vivo の照射群で、対照群に比較してスーパーオキシド生成の抑制が認められた。この結果はin vivo での照射による殺菌作用の抑制や H_2O_2 生成の抑制の報告と¹³⁾一致するものであると考えられた。しかし、in vitro の照射(20Gy)では、照射群と対照群とに有意の差は認められなかった。

以上のような結果から、多型核白血球膜のC3bリセプターに何らかの変化が起きているのではないかと推定した。その原因については現在のところ不明の点が多いが可能性のひとつとしては照射によって生じた活性酸素の白血球への直接の作用によるリセプターの障害である。ただし、現在のところin vitro での照射では同様の結果を得ておらず更に検討を要すると思われる。もうひとつの可能性としては照射群と対照群から集めた多型核白血球の集団構成に違いがあるのではないかという事である。というのは5Gy以上の照射では血中白血球数が一時的に増加する現象が知られており、しかもこの増加は骨髄の顆粒球前駆細胞の成熟が早められたことや辺縁区画の顆粒球の動員によるものであることがあきらかにされており¹⁰⁾¹¹⁾、照射によって腹腔内に浸出してきた多型核白血球の集団の構成が変化していることも予想され、これが機能の変化をもたらしているとも考えられる。現在のところ集団を構成している細胞の種類についての十分な検討は行ってはおらず、今後、検討する必要があると思われる。

文 献

- 1) Selvaraj, R.J. and Sbarra, A.J.: Role of the phagocyte in host-parasite interactions. VIII. Effect of whole body X irradiation on nicotinamides, lysosomal enzymes, and bactericidal activity of leukocytes during phagocytosis. *J. Bacteriol.*, 94: 149-156, 1967
- 2) Turcu, Gr. and Albu, A. St.: Reespiratory capacity at rest and during phagocytosis of rat polymorphonuclear leukocytes under various conditions of irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 12: 505-513, 1967
- 3) Paul, B., Strauss, R. and Sbarra, A.J.: The role of the phagocyte in host-parasite interactions. XVI. Effect of X-irradiation on H₂O₂ production in guinea pig exudate cells. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 5: 538-549, 1968
- 4) Nakamura, S., Sano, Y., Sakaguchi, S., Kaneko, M., Takai, M., Hirano, I. and Hayashi, T.: Phagocytic function of polymorphonuclear cells of patients underwent thorotrast administration. *医学のあゆみ*, 135: 499-500, 1985. (in Japanese)
- 5) Holly, T.R., Van Epps, D.E., Harvey, R.L., Anderson, R.E. and Williams, R.C. Jr.: Effect of high doses of radiation on human neutrophil chemotaxis, phagocytosis and morphology. *Am. J. Pathol.*, 75: 61-72, 1984
- 6) Sasagawa, S., Suzuki, K., Sakatani, T. and Fujikura, T.: Effects of radiation on the host defense function of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J. Radiat. Res.*, 25: 72, 1984
- 7) Silverstein, S.C., Steinman, R.M. and Cohn, Z. A.: Endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.*, 46: 669-722, 1977
- 8) 柿沼カッ子: 食作用に伴う代謝変化. 水上茂樹, 柿沼カッ子編. 白血球と食作用, 93-124, 講談社, 東京
- 9) Hoffstein, S.T., Korchak, H.M., Smolen, J.E. and Weissmann, G.: Early consequences of neutrophil activation and their association with degranulation. (In) Karnovsky ML, Bolis L ed: *Phagocytosis-Past and future*. 47-66, 1982, Academic Press, New York
- 10) Maloney, M.A. and Patt, H.M.: Radiation effects on neutrophil balance. (In) Wolstenholme GEW, O'Connor M: *Ciba foundation symposium on haemopoiesis*. 262-281, 1960, J & A Churchill LTD, London
- 11) 山口武雄: 白血球系における障害の回復. 江上信雄編, *放射線障害の回復*, 133-151, 1970, 朝倉書店, 東京