

EFFECTS OF  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  RADIATION ON DEFENSE FUNCTION OF  
HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES

ヒト多形核白血球の生体防御機能に対する  
 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  放射線の効果

SUMIKO SASAGAWA, Ph.D. 笹川澄子

KAZUO SUZUKI, Ph.D. 鈴木和男

TATSUICHIRO SAKATANI, M.D. 坂谷達一郎

GARY T. BROOKS, Ph.D.

TOSHIO FUJIKURA, M.D. 藤倉敏夫



RADIATION EFFECTS RESEARCH FOUNDATION  
財団法人 放射線影響研究所

A Cooperative Japan - United States Research Organization

日米共同研究機関

## ACKNOWLEDGMENTS

### 謝 辞

The authors would gratefully acknowledge Dr. Roswell K. Boutwell and Dr. Donovan J. Thompson for their encouragements to the study. The authors wish to thank Mr. Takeoka, Mr. Tsujimura, Miss Kuroda, and Mr. Kawami, the technicians of Research Institute for the Nuclear Medicine and Biology, Hiroshima University, for their help with irradiation techniques.

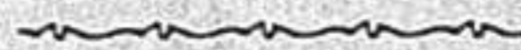
著者らは、Dr. Roswell K. Boutwell 及び Dr. Donovan J. Thompson の激励に対し感謝の意を表す。放射線照射技術を提供していただいた広島大学原爆放射能医学研究所技術員の竹岡，辻村，黒田，川見の各氏に感謝する。

## RERF TECHNICAL REPORT SERIES

### 放影研業績報告書集

The RERF Technical Reports provide the official bilingual statements required to meet the needs of Japanese and American staff members, consultants, and advisory groups. The Technical Report Series is not intended to supplant regular journal publication.

放影研業績報告書は、日米研究職員、顧問、諮問機関の要求に応えるための日英両語による公式報告記録である。業績報告書は通例の誌上発表論文に代わるものではない。



*The Radiation Effects Research Foundation (formerly ABCC) was established in April 1975 as a private nonprofit Japanese Foundation, supported equally by the Government of Japan through the Ministry of Health and Welfare, and the Government of the United States through the National Academy of Sciences under contract with the Department of Energy.*

放射線影響研究所(元 ABCC)は、昭和50年4月1日に公益法人として発足したもので、その経費は日米両政府の平等分担により、日本は厚生省の補助金、米国はエネルギー省との契約に基づく米国学士院の補助金とをもって運営されている。

EFFECTS OF  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  RADIATION ON DEFENSE FUNCTION OF  
HUMAN POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTESヒト多形核白血球の生体防御機能に対する  
 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  放射線の効果SUMIKO SASAGAWA, Ph.D. (笹川澄子)<sup>1</sup>; KAZUO SUZUKI, Ph.D. (鈴木和男)<sup>1</sup>;  
TATSUICHIRO SAKATANI, M.D. (坂谷達一郎)<sup>1,2</sup>; GARY T. BROOKS, Ph.D.<sup>3</sup>;  
TOSHIO FUJIKURA, M.D. (藤倉敏夫)<sup>1</sup>*Departments of Radiobiology<sup>1</sup>, Clinical Studies<sup>2</sup>, and Statistics<sup>3</sup>*放射線生物学部<sup>1</sup>, 臨床検査部<sup>2</sup>, 統計部<sup>3</sup>

## SUMMARY

The effects of radiation on defense function of polymorphonuclear leukocytes (PMN) were studied following irradiation with  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  radiation (30-3,000 rad) using PMN separated from the peripheral blood of healthy volunteers. The migration distances for all three measures of chemotaxis to fMet-Leu-Phe ( $10^{-8}$  M), chemokinesis induced by fMet-Leu-Phe, and random migration tended to decrease with increasing dose, showing  $0.0054 \mu\text{m}/\text{rad}$  ( $p < 0.001$ ) for chemotaxis, and  $0.0018 \mu\text{m}/\text{rad}$  ( $p = 0.005$ ) for both chemokinesis and random migration. For releases of  $\beta$ -glucuronidase (BGL) and lysozyme (LYZ) from PMN stimulated by fMet-Leu-Phe ( $10^{-5}$  M) in conjunction with cytochalasin B (CB,  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) there was a significant dose trend, showing the dose effects of decreasing 0.0022% release/rad for BGL and 0.0030% release/rad for LYZ with increasing dose. In superoxide anion ( $\text{O}_2^-$ ) production, a slight and marginally significant linear dose trend was found. These results suggest that the defense function of PMN is not so resistant to radiation as predicted from the fact that PMN in the peripheral blood are differentiated and mature. It is thought that radiation inflicts substantially harmful effects on the defense function of peripheral PMN.

## INTRODUCTION

Whole-body irradiation can cause an increase in susceptibility to infection.<sup>1,2</sup> The susceptibility is thought to be due to a decline of defense

## 要 約

多形核白血球 (PMN) の生体防御機能に対する放射線の影響を、健康な有志の末梢血から分離した PMN を用い  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  放射線照射 (30~3,000 rad) によって調べた。遊走距離は fMet-Leu-Phe ( $10^{-8}$  M) へのケモタキシス、fMet-Leu-Phe 誘発のケモキネシス及び自然遊走のすべてにおいて線量増加に伴って低下し、ケモタキシスは  $0.0054 \mu\text{m}/\text{rad}$  ( $p < 0.001$ )、ケモキネシスと自然遊走は  $0.0018 \mu\text{m}/\text{rad}$  ( $p = 0.005$ ) を示した。fMet-Leu-Phe ( $10^{-5}$  M) とサイトカラシン B (CB,  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) で刺激された PMN からの  $\beta$ -グルクロニダーゼ (BGL) 及びライソザイム (LYZ) の放出について、有意な dose trend があり、線量の増加に伴い BGL では減少 0.0022% release/rad, LYZ では減少 0.0030% release/rad の線量効果が示された。活性酸素 ( $\text{O}_2^-$ ) 産生能においては、わずかに有意な dose trend が見られた。これらの結果は、末梢血中の PMN が分化成熟しているということから推測されるわりには PMN の生体防御機能が放射線に対して抵抗性でないことを示唆する。放射線は末梢 PMN の生体防御機能に実質的に有害な影響を及ぼすことが考えられる。

## 緒 言

全身の放射線被曝は易感染性の増大を起し得る。<sup>1,2</sup> 放射線被曝後白血球の著明な減少がみられる

mechanisms for which leukocytes such as lymphocytes and neutrophils are responsible, since there is a remarkable loss of them after exposure to radiation.<sup>3</sup> Especially at the early phase of infection PMN play an important role in the defense function by killing invading microorganisms.<sup>4-6</sup> An early report concluded that the increased susceptibility to infection is probably a consequence of damage to the leukocyte lysosomes in connection with membrane-associated phenomena.<sup>7</sup> However, other reports suggest that irradiation to PMN in vivo and in vitro had little effect on the capacity of the cells to phagocytose bacteria.<sup>8,9</sup> Thus the effects of radiation on the defense function of PMN are not clear.

In this study, effects of <sup>60</sup>Co  $\gamma$  radiation on migration, lysosomal enzyme release, and O<sub>2</sub><sup>-</sup> production of PMN in vitro were investigated. This basic investigation is expected to provide important information in evaluating the defense function in A-bomb survivors.

## MATERIALS AND METHODS

**Materials.** fMet-Leu-Phe (Protein Research Foundation, Osaka), and CB and dried *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma Chemicals, St. Louis, Missouri) were purchased. Human placental lysozyme (The Green Cross Corporation, Osaka) was used as a standard.

**Preparation of PMN.** The blood samples were collected from the authors and some laboratory employees and not from subjects of RERF studies. There was a total of seven volunteers who were not A-bomb survivors. They ranged from age 26 to 36 years and were healthy at least to the best of their knowledge. The blood was heparinized (20 U/ml of blood). A pellet containing PMN and erythrocytes was separated from whole blood on a Lymphoprep (Nyegaard Co., Oslo) density gradient by the method of Boyum.<sup>10</sup> A fraction was obtained by sedimentation of the pellet in a 1.5% (w/v) dextran (MW 177,000)-phosphate-buffered saline solution. Contaminating erythrocytes in the PMN fraction were removed by lysis with a 0.75% ammonium chloride solution containing 20 mM Tris-HCl buffer (final pH 7.4) and 0.25% autologous plasma for 10 minutes at 37°C with gentle shaking. Viability of PMN tested by trypan blue exclusion was greater than 96%.

ことから,<sup>3</sup> この易感染性は、リンパ球及び好中球などの白血球が関与する生体防御機能の低下によると考えられる。特に PMN は、感染の初期に、侵入微生物を殺すことにより防御機能において重要な役割を果たしている。<sup>4-6</sup> 初期の報告は、易感染性の増大はおそらく、細胞膜関連現象にかかわる白血球ライソゾームの障害の結果であると結論している。<sup>7</sup> しかし、in vivo 及び in vitro での PMN への放射線照射は、バクテリアに対する PMN の食作用にほとんど影響を与えないという別の報告もある。<sup>8,9</sup> このように、PMN の生体防御機能に対する放射線の影響は明らかではない。

本研究では、PMN の遊走能、ライソゾーム酵素放出能、及び O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生能に対する <sup>60</sup>Co  $\gamma$  放射線の影響を in vitro で検討した。この基礎研究は、原爆被爆者の生体防御機能を評価する上に重要な情報を提供すると考えられる。

## 材料及び方法

**材料。** fMet-Leu-Phe (蛋白質研究奨励会、大阪) 及び、CB、乾燥 *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma Chemicals 社、St. Louis, Missouri) を購入した。ヒト胎盤ライソザイム (ミドリ十字社、大阪) を標準品として用いた。

**PMN の調製。** 血液は、著者ら及び研究室職員 (原爆被爆者ではない有志計 7 名) から採取したもので、放影研の研究対象者からのものではない。年齢は 26 歳から 36 歳までの範囲で、少なくとも本人らの判断では健康であった。血液はヘパリン処理した (20U/ml の血液)。Boyum 法<sup>10</sup> により Lymphoprep (Nyegaard 社、Oslo) 密度勾配上で全血から PMN と赤血球を含むペレットを分離した。1.5% (w/v) デキストラン (MW 177,000) 燐酸緩衝生理食塩水中にペレットを沈降させて PMN 分画を得た。PMN 分画に混在する赤血球は、20mM トリス塩酸緩衝液 (最終 pH 7.4) 及び 0.25% 自己血漿を含む 0.75% 塩化アンモニウム溶液中で 37°C、10 分間静かに振とうさせて溶解除去した。PMN の生存率はトリパン青排除法によって検討した結果、96% 以上であった。

**Irradiation to PMN.** PMN suspended in a Hanks' balanced salt solution (HBSS) at a concentration of  $2 \times 10^6$  cells/ml was divided into six tubes for six exposure doses (0 to 3,000 rad) of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  radiation. The irradiation equipment [Shimadzu Isotron-21 (Co)(pellet type 111.0 TBq, 3,000 Ci)] installed at the Research Institute for Nuclear Medicine and Biology, Hiroshima University was used. During irradiation the tubes were mounted in the same fixed position, and kept at constant room temperature. The mean exposure times resulting from the doses employed were as follows; 12 sec for 30 rad, 42 sec for 100 rad, 126 sec for 300 rad, 353 sec for 1,000 rad, and 1,191 sec for 3,000 rad. The mean dose rate was 144.0 rad/min absorbed dose. Irradiation was performed for various times up to 25 minutes from a source 50 cm away. The quality control and the measurement of absorbed dose were supervised by the technicians of Hiroshima University.

**Measurement of Migration.** Migration was performed as previously described<sup>11</sup> using a modification of the Boyden technique.<sup>12</sup> The migration distance ( $\mu\text{m}/45$  min) was measured from the surface of a Millipore filter (3.0  $\mu\text{m}$  pore size; Millipore, Bedford, Massachusetts) to the leading front of the cells in the filter.<sup>13</sup> The resulting value was used to determine chemotaxis to fMet-Leu-Phe ( $10^{-8}$  M), chemokinesis in response to fMet-Leu-Phe ( $10^{-8}$  M), and random migration.

**Lysosomal Enzyme Release from PMN.** After irradiation, the PMN suspension was put into a 200  $\mu\text{l}$  plastic tube in ice, fMet-Leu-Phe (a chemotactic peptide,  $10^{-5}$  M) was added in conjunction with CB (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), and incubated for 15 minutes at 37°C to induce extracellular release of lysosomal enzyme. Then the PMN suspension was centrifuged at  $1,700 \times g$  for two minutes at 4°C to separate supernatant which contains lysosomal enzymes released by the cells, and PMN which contained the remaining ones.

**Measurement of Enzyme Activity.** The supernatant and the cell homogenate to which 0.1% (w/v) Triton X-100 was added, were used to measure released enzymes and the ones remaining in the cells. BGL was measured according to a microassay method.<sup>14</sup> One unit

PMN への放射線照射. Hanks 平衡化塩類溶液 (HBSS) 中に  $2 \times 10^6$  cells/ml の濃度で浮遊させた PMN を 6 本のプラスチック試験管に分注し,  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  放射線を, 6 種の線量 (0 ~ 3,000 rad) で照射した. 照射機器は, 広島大学原爆放射能医学研究所に設置されている [島津 Isotron-21 (Co) (ペレット型 111.0 TBq, 3,000 Ci)] を用いた. 照射中試験管は同位置に固定し, 一定の室温下に維持した. 各線量の平均照射時間は次のとおりである; 30 rad は 12 秒, 100 rad は 42 秒, 300 rad は 126 秒, 1,000 rad は 353 秒, 3,000 rad は 1,191 秒. 平均線量率は 144.0 rad/min 吸収線量であった. 照射は線源から 50 cm 離れた場所で 25 分間までの種々の時間で行った. 吸収線量の精度管理及び測定は広島大学の技術員が担当した.

遊走能の測定. 遊走能は既に報告した<sup>11</sup> Boyden 法の変法<sup>12</sup> によって測定した. ミリポアフィルター (孔径 3.0  $\mu\text{m}$ ; Millipore 社, Bedford, Massachusetts) の表面から, フィルター内に遊走した最先端の細胞までを遊走距離 ( $\mu\text{m}/45$  min) として測定した.<sup>13</sup> この値を fMet-Leu-Phe ( $10^{-8}$  M) 誘発のケモタキシス, fMet-Leu-Phe ( $10^{-8}$  M) 誘発のケモキネシス, 及び自然遊走の測定に用いた.

PMN からのライソゾーム酵素放出能. 照射後, 氷水中の 200  $\mu\text{l}$  プラスティックチューブに PMN 浮遊液を注入し, fMet-Leu-Phe (走化性ペプチド,  $10^{-5}$  M) 及び CB (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を添加し 37°C, 15 分間インキュベートし, ライソゾーム酵素の細胞外放出を誘発した. 次に, PMN 浮遊液を 4°C, 2 分間,  $1,700 \times g$  で遠心分離し, 細胞外放出ライソゾーム酵素を含む上清と細胞内残存酵素を含む PMN を分離した.

酵素活性の測定. 上清及び 0.1% (w/v) トリトン X-100 を添加した細胞ホモジェネートを用い細胞外放出酵素及び細胞内残存酵素を測定した. BGL は微量定量法<sup>14</sup> により測定した. 酵素活性の 1 単位は,

of the enzyme activity was expressed as 4-methylumbelliferone formation in pmol/min/ml of  $2 \times 10^6$  PMN supernatant. Assay of LYZ was carried out by the method previously reported which is essentially the same as that of Selsted and Martinez.<sup>15</sup> One unit of the enzyme activity was expressed as  $\mu\text{g}$  of human placental LYZ/ml of  $2 \times 10^6$  PMN supernatant. Percent-release of enzyme was calculated as percent-released activity divided by the total which is released activity plus remaining ones.

**Measurement of  $\text{O}_2^-$  Production.**  $\text{O}_2^-$  was assayed by the reduction of ferricytochrome c, using a spectrophotometer at a wavelength of 550 nm.<sup>16</sup> After the addition of ferricytochrome c ( $66 \mu\text{M}$ , Sigma Chemicals, Type IV), fMet-Leu-Phe ( $10^{-6}$  M) in conjunction with CB ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ), or fMet-Leu-Phe alone was added to PMN to initiate the reaction.<sup>11</sup> The molar extinction coefficient for this change in absorption at 550 nm is 21,000.<sup>17</sup>

**Test of Cytotoxicity of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  Radiation to PMN.** After irradiation, the PMN suspension was centrifuged at  $1,700 \times g$  for two minutes at  $4^\circ\text{C}$  to separate supernatant and cells. The activity of a cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) was measured by the method of Wacker et al.<sup>18</sup> Enzyme activity leaked from the cells to the supernatant was calculated as percent-leaked activity divided by the total which is leaked activity plus ones remaining in the cells.

**Statistical Analysis.** A simple linear regression analysis was carried out to detect a dose-related trend in PMN functions. Using a first-order approximation to the true relationship, least-square estimates of the slopes were obtained and tested. Residual analysis verified the lack of departure from normality justifying the use of t-tests. The observations tended to be highly correlated for a given subject, with the subjects varying significantly. To reduce this variability, all tests were blocked on subject. All p-values are two sided unless otherwise stated. The data were represented as the mean  $\pm$  standard error (SE) of the combined experiments.

## RESULTS

**Effects on Migration.** Figure 1 shows the effects of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  radiation on migration responses of PMN. The migration distances tended to decrease with increasing dose for all three

pmol/min/ml of  $2 \times 10^6$  PMN supernatant の 4-メチルウンベリフェロン形成として表示した。LYZ の測定は Selsted 及び Martinez<sup>15</sup> の方法に基本的には同様で以前報告した方法により行った。酵素活性の 1 単位はヒト胎盤 LYZ  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の  $2 \times 10^6$  PMN supernatant として表示した。酵素放出率は、放出活性と残存活性を加算した全酵素活性で放出活性を割り百分率として計算した。

**$\text{O}_2^-$  産生能の測定.**  $\text{O}_2^-$  は、波長 550nm におけるフェリチトクローム c の還元により測定した。<sup>16</sup> フェリチトクローム c ( $66 \mu\text{M}$ , Sigma Chemicals 社, Type IV) 添加後、反応を開始させるために fMet-Leu-Phe ( $10^{-6}$  M) と CB ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) あるいは fMet-Leu-Phe のみを PMN に添加した。<sup>11</sup> 550nm での吸収変化のモル吸光係数は 21,000 である。<sup>17</sup>

**$^{60}\text{Co}$   $\gamma$  放射線の PMN に対する細胞毒性試験.** 照射後 PMN 浮遊液を  $4^\circ\text{C}$ , 2 分間,  $1,700 \times g$  で遠心分離し上清と細胞を分けた。Wacker らの方法<sup>18</sup> により、細胞質酵素である乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定した。細胞から上清に漏出した酵素活性は、漏出活性と細胞内残存活性を加算した全酵素活性で漏出活性を割り百分率として計算した。

**統計解析.** PMN 機能の dose trend を検出するため単純線形回帰分析を行った。真の関係に対する一次近似法を用いて、傾きの最小平方推定値を求め、検定した。残差解析により正規性を逸脱していないことが認められたので、t 検定を行うことができた。観察値は特定の対象者に対し強い相関傾向があり、対象者間で有意に変動した。この変動を減ずるために対象者についてすべての検定をブロックにした。p 値は特に記載のない場合、すべて両側検定による。実験値は平均値  $\pm$  標準誤差で表示した。

## 結果

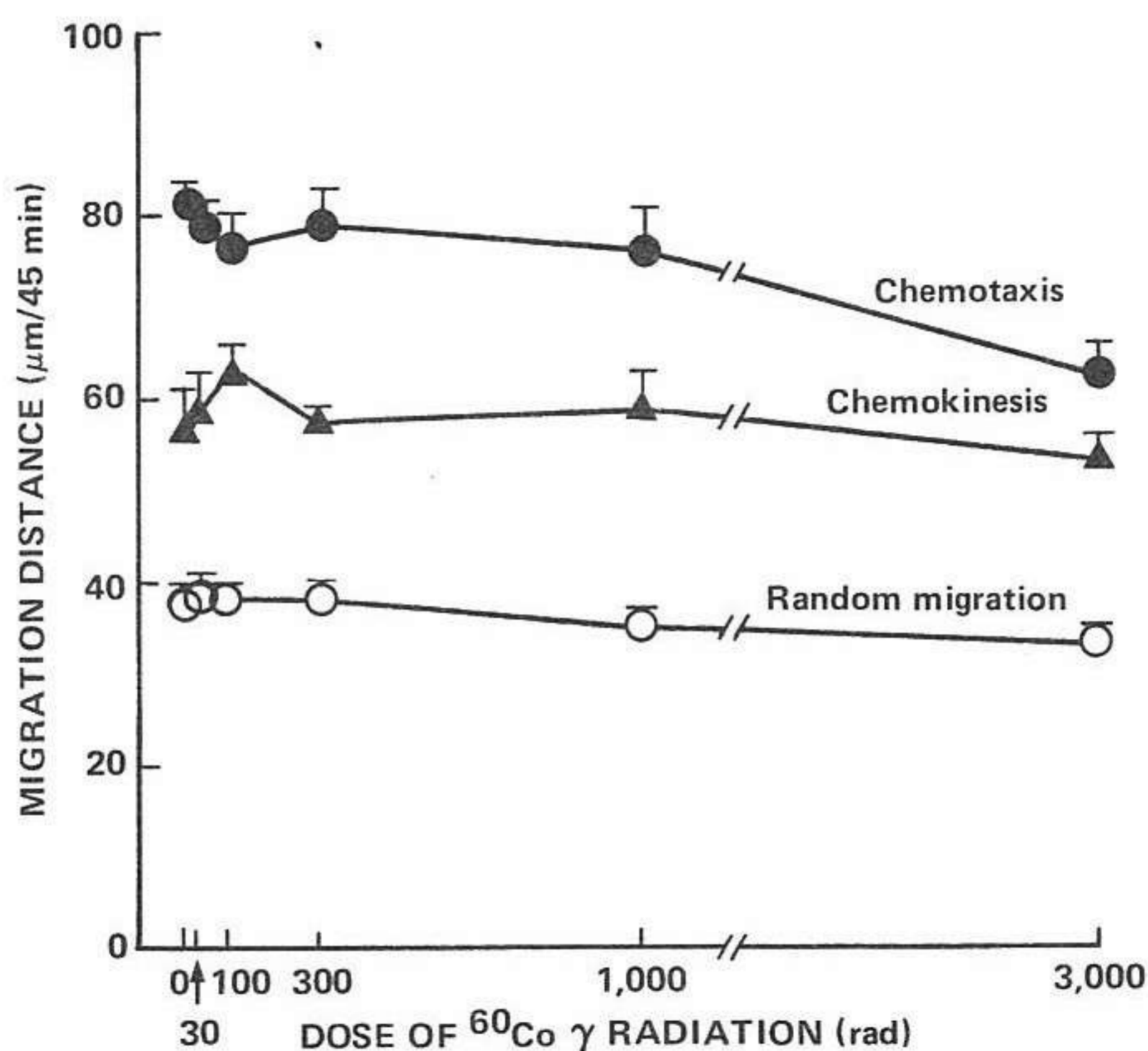
**遊走能に対する影響.** 図 1 に PMN の遊走反応に対する  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  放射線の影響を示す。遊走距離は三つ

measures: chemotaxis to fMet-Leu-Phe showed a significant dose trend decreasing  $0.0054 \mu\text{m}/\text{rad}$  ( $p < 0.001$ ), for random migration and chemokinesis induced by fMet-Leu-Phe the dose trends were the same decreasing  $0.0018 \mu\text{m}/\text{rad}$  ( $p = 0.005$ ). When chemotaxis was adjusted by subtracting the corresponding random migration distances, the adjusted chemotaxis also showed a dose effect ( $p = 0.01$ ). In order to examine the effect of doses which are generally sublethal for humans, the analysis was done using only observations for doses of 300 rad or less. Although all estimates showed a decrease in distance with increasing dose, none were significant.

の測定ですべて線量の増加に伴い減少する傾向にあった。fMet-Leu-Phe に対するケモタキシスは、1 rad 当たり  $0.0054 \mu\text{m}$  の減少で有意な dose trend ( $p < 0.001$ ) を示し、自然遊走及び fMet-Leu-Phe 誘発のケモキネシスについては、dose trend は同様の減少  $0.0018 \mu\text{m}/\text{rad}$  ( $p = 0.005$ ) を示した。ケモタキシスを、対応する自然遊走距離を差し引くことによって調整した場合も、その調製されたケモタキシスは線量の影響を示した ( $p = 0.01$ )。ヒトに対して一般に致死的でない線量の影響を調べるため、300 rad 以下の線量についての観察値のみを用いて解析を行った。推定値はすべて線量の増加に伴い遊走距離の減少を示したが、いずれも有意ではなかった。

FIGURE 1 EFFECTS OF  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  RADIATION ON MIGRATION OF PMN

図 1 PMN 遊走能に対する  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  放射線の影響



PMN irradiated with various doses of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  radiation were incubated in a Boyden chamber for 45 minutes at  $37^\circ\text{C}$  under 5%  $\text{CO}_2$ . The distance that PMN migrated from the surface into a  $3.0 \mu\text{m}$  pore diameter Millipore filter was measured. The resulting value was used to determine chemotaxis to fMet-Leu-Phe ( $10^{-8} \text{ M}$ , ●), chemokinesis in response to fMet-Leu-Phe (▲), and random migration (○). Each point and vertical bar represents the mean and SE for six experiments.

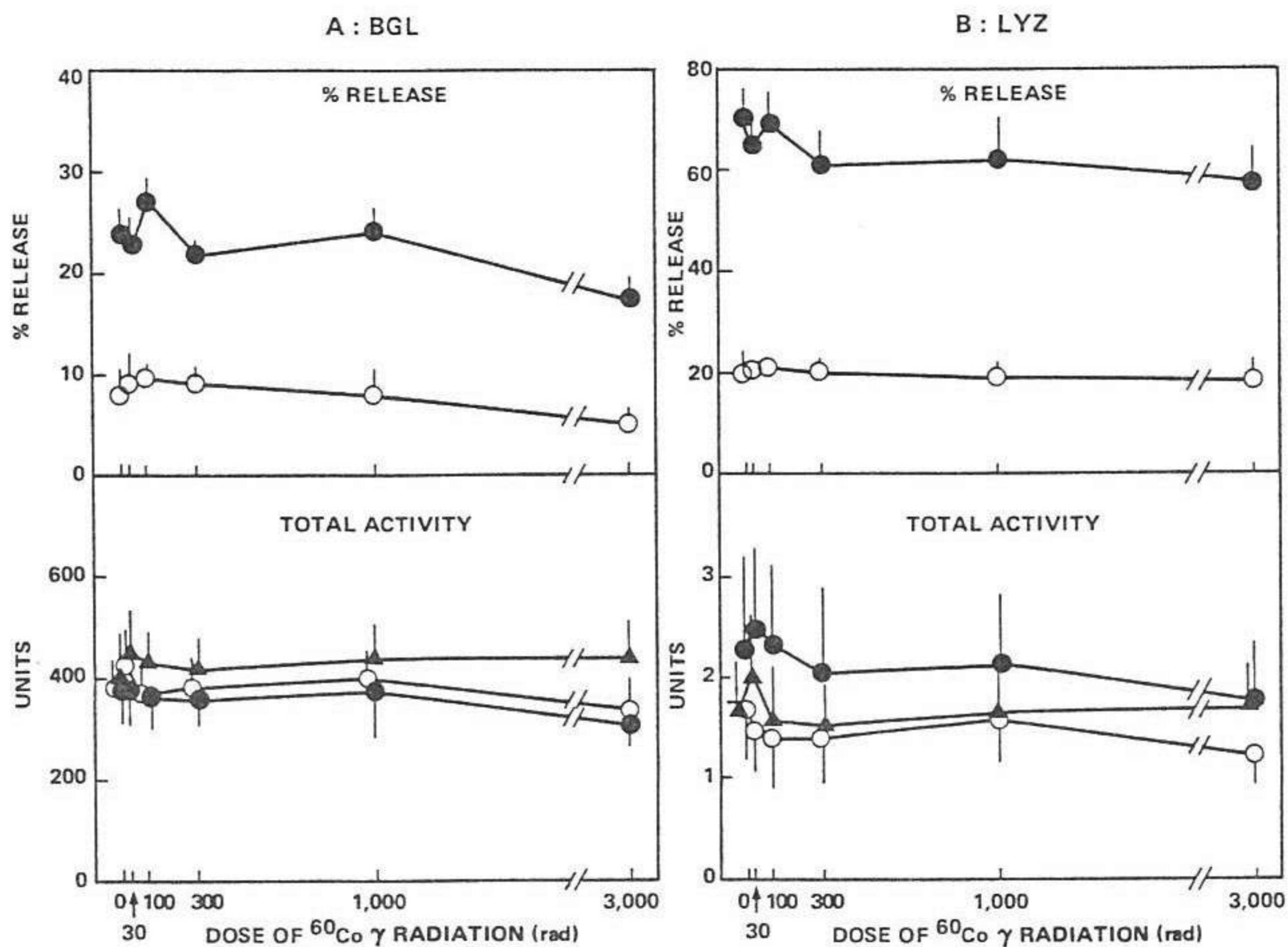
種々の線量の  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  放射線を照射した後、PMN を  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下におかれた Boyden チェンバー中で45分間インキュベートした。PMN が孔径  $3.0 \mu\text{m}$  のミリポアフィルターの表面からフィルター内へ遊走した距離を測定した。その結果得られた値は、fMet-Leu-Phe へのケモタキシス ( $10^{-8} \text{ M}$ , ●)、fMet-Leu-Phe 誘発のケモキネシス (▲) 及び自然遊走 (○) を決定するのに用いた。各点と垂直線は6例の実験の平均値と標準誤差を示す。

**Effects on Lysosomal Enzyme Release.** Figure 2 shows the effects of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  radiation on the percent-release and total activity of lysosomal enzymes in PMN. Release of BGL from PMN stimulated by fMet-Leu-Phe in conjunction with CB or unstimulated, tended to decrease with increasing dose 0.0022% release/rad ( $p=0.001$ ) and 0.0014% release/rad ( $p<0.001$ ),

ライソゾーム酵素放出能に対する影響. 図2にPMNのライソゾーム酵素活性の放出率及び全活性に対する $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 放射線の影響を示す. fMet-Leu-PheとCBで刺激されたPMN,あるいは刺激しなかったPMNからのBGL放出は,各々0.0022% release/rad ( $p=0.001$ )及び0.0014% release/rad ( $p<0.001$ )で

FIGURE 2 EFFECTS OF  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  RADIATION ON THE PERCENT-RELEASE AND TOTAL ACTIVITIES OF LYSOSOMAL ENZYMES IN PMN

図2 PMNにおけるライソゾーム酵素の放出率と全活性に対する $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 放射線の影響



After irradiation with various doses of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  radiation, PMN were incubated for 15 minutes at  $37^\circ\text{C}$  with or without stimulation, or reserved at  $4^\circ\text{C}$ . ●: stimulated by fMet-Leu-Phe ( $10^{-5}\text{M}$ ) in conjunction with CB ( $5\mu\text{g/ml}$ ). ○: unstimulated (incubated only). ▲: reserved at  $4^\circ\text{C}$ . Percent-release of the longitudinal axes represents the percent of released enzyme activity divided by total activity which includes the released plus remaining ones in the cells. The unit of the longitudinal axes represents the enzyme activity expressed as 4-methylumbelliferone formation in  $\text{pmol/min/ml}$  of  $2 \times 10^6$  PMN for BGL, and  $\mu\text{g}$  of human placental LYZ/ml of  $2 \times 10^6$  PMN for LYZ. Each point and vertical bar represents the mean and SE for five experiments.

種々の線量の $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 放射線を照射した後,PMNを15分間, $37^\circ\text{C}$ で刺激下又は非刺激下でインキュベート,あるいは $4^\circ\text{C}$ で保存した.●:fMet-Leu-Phe( $10^{-5}\text{M}$ )とCB( $5\mu\text{g/ml}$ )で刺激.○:非刺激(インキュベーションのみ).▲: $4^\circ\text{C}$ で保存.縦軸の放出率は,放出酵素活性を放出活性と細胞内残存活性を含む全活性で割った百分率で示している.縦軸の単位はBGLについては,4-メチルウンベリフェロン形成を $\text{pmol/min/ml}$ の $2 \times 10^6$ PMNで表しその酵素活性として,LYZについては,ヒト胎盤LYZ $\mu\text{g/ml}$ の $2 \times 10^6$ PMNとして表示している.各点と垂直線は5例の実験の平均値と標準誤差を示す.



respectively. When the percent-release of BGL was adjusted by subtracting the corresponding unstimulated values, no significant dose effect was observed. Total activity of BGL decreased significantly with increasing dose, 0.0186 units/rad for stimulated and 0.0167 units/rad for unstimulated ( $p=0.01$ ; each), but the decrease was not significant when only reserved at  $4^{\circ}\text{C}$ . For the stimulated and unstimulated, the trend was still significant after subtracting the corresponding only reserved values ( $p=0.03$ ,  $0.01$ , respectively), and they did not differ significantly from each other. The analysis using doses of 300 rad or less, found no significant effects.

A marginally significant dose effect ( $p=0.02$ ) was observed for the percent-release of LYZ from stimulated PMN, decreasing 0.003% release/rad. The dose trend was not significant when PMN was only incubated nor when the stimulated percentages were adjusted as for BGL percent-release. The analysis using doses of 300 rad or less showed no significant dose effect for the percent-releases of LYZ. The total activity of LYZ was not related to dose when unstimulated (0.00008 units/rad) or reserved (0.00002). When stimulated, the total activity decreased significantly (0.00017,  $p<0.01$ ); this effect remained ( $p=0.02$ ) after subtracting the corresponding reserved values. The analysis using doses of 300 rad or less showed that the total activity when stimulated was marginally related to dose ( $p=0.04$ ), with over five times the effect, decreasing 0.00094 units/rad.

No statistical difference was found between the dose effects on percent-releases of BGL and LYZ when stimulated or when unstimulated. The common estimates of decreasing 0.0011% release/rad and decreasing 0.0026% release/rad for stimulated and unstimulated were both marginally significant ( $p=0.02$ ,  $0.02$ , respectively).

**Effects on  $\text{O}_2^-$  Production.** As demonstrated in Table 1, a slight and marginally significant linear dose trend was found for  $\text{O}_2^-$  production. The increase was slightly larger for the stimulation of fMet-Leu-Phe with CB ( $0.892 \times 10^{-4}$  nmole/min/ $1 \times 10^6$  cells/rad,  $p=0.02$  one sided) than that without CB ( $0.587 \times 10^{-4}$ ,  $p=0.03$ ), although the difference was not significant. The analysis using only doses of 300 rad or less showed that the dose effect when stimulated by fMet-Leu-Phe

線量の増加に伴い低下する傾向にあった。対応する刺激しなかった場合の値を差し引いて BGL の放出率を調整すると、線量の影響は有意ではなかった。BGL の全活性は、刺激された場合 0.0186unit/rad, 刺激しなかった場合 0.0167unit/rad (いずれも  $p=0.01$ ) で、線量の増加に伴って有意に減少したが、 $4^{\circ}\text{C}$  で保存しただけの場合は有意ではなかった。刺激した場合及び刺激しなかった場合について、対応する  $4^{\circ}\text{C}$  保存の値を差し引いた後でもなお有意な傾向があり (各々  $p=0.03$ ,  $0.01$ )、相互の間では有意に違わなかった。300rad 以下の線量を用いた解析は有意な影響を見いださなかった。

刺激された PMN からの LYZ 放出率は、0.003% release/rad の減少を示し、わずかに有意な線量の影響が認められた ( $p=0.02$ )。PMN がインキュベートされただけ、あるいは BGL の場合と同様に刺激された場合の放出率が調整されたときのいずれも、dose trend は有意でなかった。300rad 以下の線量を用いた解析は LYZ の放出率に対する有意な線量の影響を示さなかった。LYZ の全活性は、刺激しなかった場合 (0.00008unit/rad) も  $4^{\circ}\text{C}$  保存の場合 (0.00002) も線量との関連を示さなかった。刺激された PMN の場合、全活性は有意に減少し (0.00017,  $p<0.01$ )、この影響は対応する  $4^{\circ}\text{C}$  保存の値を差し引いた後もみられた ( $p=0.02$ )。300rad 以下の線量を用いた解析は、刺激された場合の全活性が線量とわずかに関連し ( $p=0.04$ )、5倍以上の減少 0.00094unit/rad を示した。

刺激された場合又は刺激しなかった場合も、BGL 放出率と LYZ 放出率に対する線量の影響の間に統計的差はなかった。刺激された場合及び刺激されない場合に対する減少傾向の BGL と LYZ 共通の推定値、0.0011% release/rad 及び 0.0026% release/rad は共にわずかに有意であった (各々,  $p=0.02$ ,  $0.02$ )。

$\text{O}_2^-$  産生能に対する影響。表 1 に示すように、 $\text{O}_2^-$  産生能についてわずかに有意な線形線量傾向がみられた。その増加は fMet-Leu-Phe と CB の刺激の方が ( $0.894 \times 10^{-4}$  nmole/min/ $1 \times 10^6$  cell/rad,  $p=0.02$ , 片側検定) CB を用いない場合よりも ( $0.587 \times 10^{-4}$ ,  $p=0.03$ ) わずかに大きかったが、有意ではなかった。300rad 以下の線量のみを用いた解析は、fMet-Leu-Phe と CB で刺激されたときの線量の

in conjunction with CB was of an order of magnitude larger,  $0.891 \times 10^{-3}$  (one sided,  $p=0.02$ ).

影響が1桁大きく、 $0.891 \times 10^{-3}$ であることを示した(片側検定,  $p=0.02$ ).

TABLE 1 EFFECTS OF  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  RADIATION ON  $\text{O}_2^-$  PRODUCTION OF PMN  
表1 PMNの $\text{O}_2^-$ 産生能に対する $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 放射線の影響

Radiation dose in rad	nmole/ $1 \times 10^6$ cells/min	
	fMet-Leu-Phe and CB	fMet-Leu-Phe
0	$3.68 \pm 1.06$	$1.47 \pm 0.37$
30	$3.63 \pm 1.00$	$1.46 \pm 0.34$
100	$3.99 \pm 1.12$	$1.55 \pm 0.43$
300	$3.93 \pm 1.12$	$1.50 \pm 0.38$
1000	$4.03 \pm 1.12$	$1.58 \pm 0.33$
3000	$4.03 \pm 1.03$	$1.66 \pm 0.39$

After irradiation at each dose, PMN at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml in HBSS were stimulated by fMet-Leu-Phe ( $10^{-6}$  M) in conjunction with CB ( $5 \mu\text{g/ml}$ ), or fMet-Leu-Phe alone. Each value represents the mean  $\pm$  SE for six experiments.

各線量の放射線照射後、HBSSに $1 \times 10^6$  cells/mlの濃度で浮遊させたPMNをfMet-Leu-Phe( $10^{-6}$  M)とCB( $5 \mu\text{g/ml}$ )あるいはfMet-Leu-Phe単独で刺激した。各値は6例の実験の平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。

**LDH Leakage from Irradiated PMN.** Dose had no effect ( $p=0.85$ ) on the percent-leakage of LDH from irradiated PMN (Table 2).

照射PMNからのLDH漏出。照射PMNからのLDH漏出率に線量の影響はみられなかった( $p=0.85$ ) (表2)。

TABLE 2 EFFECTS OF  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  RADIATION ON LDH LEAKAGE FROM PMN

表2 PMNからのLDH漏出に対する $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ 放射線の影響

Radiation dose in rad	% leakage of LDH mean $\pm$ SE
0	$9.50 \pm 1.32$
30	$10.85 \pm 1.03$
100	$10.93 \pm 0.73$
300	$10.65 \pm 0.94$
1000	$10.35 \pm 0.94$
3000	$10.25 \pm 1.59$

After irradiation at each dose, PMN ( $2 \times 10^6$  cells/ml) in a  $200 \mu\text{l}$  were centrifuged at  $1,700 \times g$  for 2 minutes at  $4^\circ\text{C}$ . Activities of LDH in the supernatant and in the cells to which 0.1% (w/v) Triton X-100 were added, were measured. Percent-leakage was calculated as percent of activity of supernatant to total activity (supernatant and remaining ones in the cells). Each value represents the mean  $\pm$  SE for six experiments.

各線量の放射線照射後、PMN( $2 \times 10^6$  cells/ml)溶液 $200 \mu\text{l}$ を $1,700 \times g$ で2分間、 $4^\circ\text{C}$ で遠心分離した。上清におけるLDH活性と0.1%(w/v)トリトンX-100を添加した細胞におけるLDH活性を測定した。漏出百分率を全活性(上清中の活性及び細胞内の残存活性)に対する上清活性の百分率として計算した。各値は6例の実験の平均値 $\pm$ 標準誤差を示す。

## DISCUSSION

In the present study, the effects of  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  radiation on migration, lysosomal enzyme release, and  $\text{O}_2^-$  production, which participate in the defense function of PMN, were studied in vitro.

Regression analysis showed that the migration distances tended to decrease with increasing dose for all three measures. Holley et al.<sup>19</sup> reported that there was impairment of chemotaxis over 5,000 rad. Our result on chemotaxis implies that this impairment can be detected even at lower doses than their report,<sup>19</sup> although none was detected using doses of 300 rad or less. This might be partly due to a difference of chemotactic factor used; their factor was human serum and ours fMet-Leu-Phe. On the other hand, the effect of radiation on random migration and chemokinesis was one-third of the effect on chemotaxis. It is possible that fMet-Leu-Phe receptors on the PMN cell membrane were affected by radiation since Fc receptors on the rat mast cell can be damaged by irradiation.<sup>20</sup>

There were significant dose trends for releases of BGL and LYZ. These data suggest that the releasing activity of lysosomal enzymes in PMN may be damaged by irradiation. A significant reduction in total activity with increasing dose was found for both BGL and LYZ. It is possible that the activities of lysosomal enzymes might be damaged by irradiation, since an activity of alcohol dehydrogenase has been shown to be inactivated by irradiation.<sup>21</sup> It is also possible that  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  irradiation destroys the mechanisms which are involved in exocytosis of lysosomal enzymes as reported for histamine release of mast cells,<sup>22</sup> and for damage of leukocyte lysosomes.<sup>7</sup> For the data at the top of Figure 2, no significant difference was found in the dose effect on corresponding percent-releases of BGL and LYZ. These results may indicate that the effects of radiation on the releasing processes of BGL and LYZ are the same, although BGL is contained in azurophil granules and LYZ in both specific and azurophil granules.<sup>4,23</sup> The pooled estimate of the dose effect of the stimulated group ( $\sim 0.0026\%$  release/rad) was over twice that of the unstimulated group ( $\sim 0.0011$ ). This may reflect the stimulating effects of fMet-Leu-Phe in conjunction with CB.

## 考 察

本研究では PMN の生体防御機能に關与する遊走能、ライソゾーム酵素放出能、及び  $\text{O}_2^-$  産生能に対する  $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  放射線の影響を in vitro で調べた。

回帰解析により遊走能は3種の測定すべてに線量の増加に伴って低下する傾向があることが示された。Holley ら<sup>19</sup> は 5,000 rad 以上でケモタキシスに障害が現れることを報告した。本研究のケモタキシスに關する結果では、300 rad 以下の線量を用いた場合は認められなかったが彼らの報告<sup>19</sup> よりも低い線量でもこの障害が認められることが示唆された。これは、用いた遊走因子の違いによるところがあるかもしれない。彼らの用いた因子はヒト血清で、我々のそれは fMet-Leu-Phe であった。一方、自然遊走及びケモキネシスに対する放射線の影響はケモタキシスに対する影響の 1/3 であった。ラット肥満細胞の Fc 受容体が放射線照射によって傷付けられ得ることから、<sup>20</sup> PMN 細胞膜上の fMet-Leu-Phe 受容体が放射線により影響を受けた可能性が考えられる。

BGL 及び LYZ 放出に有意な dose trend がみられた。これらの結果から、PMN のライソゾーム酵素放出能は放射線照射で障害を受ける可能性があることが示唆される。BGL 及び LYZ は共に線量の増加に伴って全活性の有意な低下が見いだされた。アルコール脱水素酵素の活性が放射線照射により不活性化されることが示されていることから、<sup>21</sup> ライソゾーム酵素の活性が照射により壊されたかもしれない可能性はある。また、肥満細胞のヒスタミン放出、<sup>22</sup> 及び白血球ライソゾーム損傷<sup>7</sup> に關して報告されているように、 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$  照射はライソゾーム酵素の細胞外放出に關与する機構を破壊する可能性がある。図 2 の上段のデータでは、対応する BGL 及び LYZ 放出率に対する線量の影響には有意差がみられなかった。この結果は、BGL はアズール顆粒に、LYZ は特異顆粒及びアズール顆粒の両方に含まれているが、<sup>4,23</sup> BGL 及び LYZ の放出過程に対する放射線の影響は同様であることを示すかもしれない。両者を総合した刺激群に対する線量影響の推定値 ( $\sim 0.0026\%$  release/rad) は、非刺激群 ( $\sim 0.0011$ ) の 2 倍以上であった。これは fMet-Leu-Phe と CB の刺激効果を反映するものかもしれない。

$O_2^-$  production is related to the oxygen metabolism concomitant with phagocytosis.<sup>24</sup> Turcu and Albu<sup>25</sup> reported a decrease in the respiratory capacity of the rat PMN irradiated in vitro with 2,000 rad. In the present study, both  $O_2^-$  productions induced by fMet-Leu-Phe in conjunction with CB and by fMet-Leu-Phe alone were found to have significant dose trends; increased production with increasing dose. Holley et al<sup>19</sup> reported the impairment of phagocytosis of human neutrophils at doses over 10,000 rad. A difference of stimulation between particle phagocytosis and soluble synthetic chemotactic peptide may explain the inconsistency.

The irradiation doses employed in the present study were high and exceeded by far the lethal doses for experimental animals and for man.<sup>26</sup> However, regression analysis found a significant dose trend for all measurements of migrations, lysosomal enzyme release, and  $O_2^-$  production. These data imply that effects of radiation on PMN defense functions are possible, although peripheral PMN are differentiated and mature, and are thought to be resistant to radiation.

The kinetics of PMN in the peripheral blood is rapid and the half-life period of PMN in the blood vessel is reported to be 6.7 hours.<sup>27</sup> Although PMN with injured functions can be recovered from the peripheral blood and replaced with normal ones within a day when the bone marrow fulfills its function, PMN in the peripheral blood may be functionally disordered immediately after in vivo exposure to radiation, with the possibility that the function of replacing PMN has also been affected by irradiation while they were pooled in the marrow granulocyte reserve. However, the analysis using doses of 300 rad or less indicated that radiation did not affect the functions of PMN. Defense mechanisms attributable to PMN are not clearly understood in A-bomb survivors, and are now undergoing examination. The data here are expected to provide some information and references for considering the conditions of the PMN defense functions in A-bomb survivors.

$O_2^-$  産生は、食作用に付随する酸素代謝に関連する。<sup>24</sup> Turcu 及び Albu<sup>25</sup> は、in vitro で 2,000 rad の放射線を照射したラット PMN の呼吸能が低下することを報告した。本研究では、fMet-Leu-Phe と CB で誘発された  $O_2^-$  産生と fMet-Leu-Phe 単独で誘発された  $O_2^-$  産生が共に有意な dose trend を示した；線量の増加に伴い産生能が増加した。Holley ら<sup>19</sup> は 10,000 rad 以上の線量でヒト好中球の食作用に障害が起こることを報告した。粒子食作用と可溶性合成遊走ペプチドの間の刺激の違いはこの不一致を説明するかもしれない。

本研究で用いた照射線量は高く、実験動物やヒトの致死線量をはるかに超えるものであった。<sup>26</sup> しかし、回帰解析は遊走能、ライソゾーム酵素放出能及び  $O_2^-$  産生能のすべての測定に対し有意な dose trend を見いだした。これらの結果は、末梢 PMN は分化成熟しており放射線に抵抗性であると考えられているが、PMN の生体防御機能に対して放射線の作用があり得ることを意味する。

末梢血 PMN の回転は速く、血管内 PMN の半減期は 6.7 時間であると報告されている。<sup>27</sup> 機能に損傷を受けた PMN は、骨髄が通常に機能していれば末梢血から回収され一日で正常なものと置換されるが、末梢血 PMN は生体内での放射線被曝直後に機能的に障害されているかもしれない、したがって PMN が骨髄顆粒球貯蔵所にプールされている間に PMN 置換機能もまた被曝により影響を受けている可能性がある。しかし、300 rad 以下の線量を用いた解析は、放射線は PMN の機能に影響を与えないことを示した。原爆被爆者について PMN による生体防御機能は明確にわかっておらず、現在検査が進行中である。今回呈示した結果は原爆被爆者における PMN 生体防御機能の状態を考える上に、幾つかの情報及び参考資料を提供すると思われる。

## REFERENCES

## 参考文献

1. BENACERRAF B: Influence of irradiation on resistance to infection. *Bacterial Rev* 24:35-40, 1960
2. BALISH E, PEARSON TA, CHASKES S: Irradiated humans: Microbial flora, immunoglobulins, complement (C'3), transferrin, agglutinins, and bacteriocidins. *Radiat Res* 43:729-56, 1970
3. ANDREWS GA: Radiation accidents and their management. *Radiat Res (Suppl)* 7:390-7, 1967
4. BAINTON DF: Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear leukocyte granules during phagocytosis of microorganisms. *J Cell Biol* 58:249-64, 1973
5. KLEBANOFF SJ: Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *Semin Hematol* 12:117-42, 1975
6. FUJIMIYA Y, ROUSE BT, BABIUK LA: Human neutrophil-mediated destruction of antibody sensitized herpes simplex virus type I infected cells. *Can J Microbiol* 24:182-6, 1978
7. HARRIS JW: Response of isolated leukocyte lysosomes to gamma irradiation. *Radiat Res* 28:766-78, 1966
8. SELVARAJ RJ, SBARRA AJ: Effects of x-irradiation on the metabolic changes accompanying phagocytosis. *Nature* 210:158-61, 1966
9. SMITH MR, FLEMING DO, WOOD WB Jr: The effect of acute radiation injury on phagocytic mechanisms of antibacterial defense. *J Immunol* 90:914-24, 1963
10. BOYUM A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 21(Suppl 97):77-89, 1968
11. SASAGAWA S, SUZUKI K, SAKATANI T, FUJIKURA T: Effects of nicotine on the function of human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *J Leuko Biol* 37:493-502, 1985 (RERF TR 7-84)
12. CATE KL, RAY CE, QUIE PG: Modified Boyden chamber method of measuring polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. In *Leukocyte Chemotaxis*. Ed by Galin, J.I., and Quie, P.G. New York, Raven Press, 1977. pp67-71
13. ZIGMOND SH, HIRSCH JG: Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation, and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. *J Exp Med* 137:387-410, 1973
14. SUZUKI K, SWENSON C, SASAGAWA S, SAKATANI T, WATANABE M, KOBAYASHI M, FUJIKURA T: Age-related decline in lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes after N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine stimulation. *Exp Hematol* 11:1005-13, 1983 (RERF TR 9-82)
15. SELSTED ME, MARTINEZ RJ: A simple and ultrasensitive enzymatic assay for the quantitative determination of lysozyme in the picogram range. *Anal Biochem* 109:67-70, 1980
16. KITAGAWA S, TAKAKU F: Effect of the chemotactic peptide on the subsequent superoxide releasing response in human polymorphonuclear leukocytes. *FEBS Lett* 128:5-8, 1981
17. MASSEY V: The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 34:255-6, 1959
18. WACKER WEC, ULMER DD, VALLEE BL: Metalloenzymes and myocardial infarction. II. Malic and lactic dehydrogenase activities and zinc concentrations in serum. *N Engl J Med* 255:449-56, 1956

19. HOLLEY TR, VAN EPPS DE, HARVEY RL, ANDERSON RE, WILLIAMS RC: Effect of high doses of radiation on human neutrophil chemotaxis, phagocytosis and morphology. *Am J Pathol* 75:61-72, 1974
20. ASTORQUIZA MI, OJEDA F: Mast cell degranulation by low doses of irradiation. *IRCS Med Sci* 13:30-1, 1985
21. GEE CA, KITTRIDGE KJ, WILLSON RL: Peroxy free radicals, enzymes and radiation damage: Sensitization by oxygen and protection by superoxide dismutase and antioxidants. *Br J Radiol* 58:251-6, 1985
22. NORRBY K, ABOK K, ADAMSON P, FORSBERG B: Radiation effects on mast cells: Secretory ability, histamine release and recovery, and cell number. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [A]* 92:417-27, 1984
23. WRIGHT DG, BRALOVE DA, GALLIN JI: The differential mobilization of human neutrophil granules. *Am J Pathol* 87:273-84, 1977
24. BABIOR BM, CURNUTTE JT, McMURRICH BJ: The particular superoxide-forming system from human neutrophils. Properties of the system and further evidence supporting its participation in the respiratory burst. *J Clin Invest* 58:989-96, 1976
25. TURCU G, ALBU AS: Respiratory capacity at rest and during phagocytosis of rat polymorphonuclear leukocytes under various conditions of irradiation. *Int J Radiat Biol* 12:505-13, 1967
26. BOND VP: *Comparative Cellular and Species Radiosensitivity*. Ed by Bond, V.P., and Sugahara, T. Tokyo, Igaku Shoin, 1969
27. CARTWRIGHT GE, ATHENS JW, WINTROBE MM: The kinetics of granulopoiesis in normal man. *Blood* 24:780-803, 1964