마우스에서 전신 저선량 분할 방사선 조사에 의한 면역학적 변화 평가

김미형[*,†], 유상영[‡], 임대석[§], 송지영[*]

[*]한국원자력의학원 방사선의학연구소 방사선암연구부, [†]서울대학교 수의과대학,
[‡]한국원자력의학원 원자력병원 산부의과, [§]차의과학대학교 생명과학대학 바이오공학과

2014년 7월 8일 접수 / 2014년 8월 7일 1차 수정 / 2014년 8월 10일 채택

방사선요법은 항암 치료에서 널리 이용되는 요법으로, 항암치료에 저선량 방사선을 이용하는 것에 대한 관심이 증가되고 있고, 저선량 방사선의 다양한 생물학적 효과가 있음이 보고되고 있다. 그러므로 본 연구에서는 마우스 모델에서 저선량 방사선이 면역반응에 어떠한 영향을 미치는지, 또한 이를 감지할 수 있는지를 조사하였다. C57BL/6 마우스에 ^{137}Cs 선원을 이용하여 연속 3일간 총 90 mGy의 저선량 방사선을 전신 조사한 후 마지막 방사선 조사 2, 14, 28일 후에 마우스를 희생시켜 말초 혈액 세포수, 비장 세포수, 비장 내 면역세포의 비율과 활성화 정도를 분석하였다. 말초 혈액 검사를 통해, 저선량 방사선 조사군에서 적혈구와 혈소판 수의 유의적 변화는 관찰할 수 없었으며, 백혈구 수는 마지막 방사선 조사 후 2일째에 선량-의존적인 감소를 보였으나, 점차 회복되는 경향을 나타냈다. 비장세포 수도 2일째 감소를 보였지만 서서히 그 수가 증가됨을 확인하였다. 2일과 14일째에 비장세포의 Foxp3 mRNA가 감소된 반면, CD4 T 세포와 CD69 양성세포가 증가되었다. 마우스에서 분할 저선량 방사선을 전신조사한 결과, 방사선조사군에서 특이적인 임상 증상이나 유의적인 체중감소를 보이지 않았다. 본 연구에서는 마우스를 대상으로 저선량을 분할 조사하였을 경우에도 면역학적 변화를 확인할 수 있으며 이를 통해 향후 저선량 방사선의 생물학적 효과를 뒷받침하는 자료로 활용할 수 있으리라 기대한다.

중심어: 저선량 방사선, 전신 방사선 조사, 면역 활성

1. 서론[1)]

방사선의 의학적 활용목적으로 가장 흔히 사용되는 분야가 암의 진단에 필요한 각종 영상을 획득하거나 암 환자의 치료에 있다. 방사선치료는 수술요법, 항암제요법과 함께 암의 3대 치료법으로, 항암효과는 전리방사선이 염색체의 손상을 직접적으로 유발하거나 간접적으로 활성산소 생성을 증가시켜 세포사멸을 유발함으로써 나타나는 것으로 보고되어 있다 [1]. 종양 치료를 위한 방사선 조사는 주변의 정상세포는 손상되지 않도록 보호하면서 종양국소 부위에 집중적으로 고선량의 방사선이 전달될 수 있도록 하는 치료 설계가 요구된다.

이러한 치료 목적의 고선량 방사선과는 별개로 일상생활에서부터 의료용 방사선과 같은 저선량 방사선(〈 100 mGy)의 생물학적 효과에 대해서는 다양한 의견들이 존재한다 [2-3]. 1958년 UN방사선영향 과학위원회 (United Nations Scientific committee on the Effects of Atomic Radiation, UNSCEAR)에서 선형 무문턱(linear no-threshold, LNT)가설을 제시해왔고, 이는 고선량에 의해 관찰되는 생물학적 효과가 저선량에서도 그대로 적용되므로 안전할 수 없다는 견해를 피력하고 있다 [4-6]. 하지만 암 발생율이나 수명조사와 같은 역학적 연구결과 및 방관자 효과(bystander effects), 적응 효과(adaptive response), 항상성(hormesis)과 같은 다양한 작용들을 보면 저선량 방사선은 생물학적 활성을 자극할 수 있다는 것을 보여준다 [7-12]. 국제방사선방호위원회(ICRP)의 2007년 권고(2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection)에서도 LNT가설의 불확실성이 크기 때문에 이에 대한 의문이 꾸준히 제기되고 있다 [10,13-16]. 저선량 방사선의 인체 유해설에 대해서는 직접적으로 검증할 수 있는 표지분자나 유의적인 선량-반응곡선이 제시되지 않아 끊임없이 논쟁의 중심에 있지만 [13], 저선량 방사선에 의한 면역 활성을 입증하는 연구결과가 지속적으로 증가하고 있다 [17]. 저선량 방사선은 활성산소의 생성을 막아 항산화 효능을 나타내며, 손상된 DNA 회복과 종양세포의 사멸(apoptosis) 유도 또는 성장과 전이 억제 등의 다양한 생물학적 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다 [18]. 그 외에도, 저선량 방사선이 자

교신저자 : 송지영, immu@kcch.re.kr
서울특별시 노원구 노원로 75, 한국원자력의학원 방사선암연구부

연살해세포(NK cells), 대식세포의 활성화를 통해 선천면역반응을 증가시키고, 수지상세포와 T 세포간의 활성화를 통해 인터페론-감마(IFN-γ), 인터루킨-2(IL-2) 생성증가 등 획득면역반응의 유도를 통해 면역 반응 활성화에 기여함으로써 항암 치료 효과를 향상시킬 수 있다고 제시되고 있다 [19,32].

방사선 조사는 방사선원, 방사선량, 방사선량율, 조사방법, 활성 측정 방법 등에 따라 생물학적 효과가 다르며 치료 목적의 고선량 방사선조사는 일반적으로 2~2.5 Gy의 방사선을 주 5회, 1~7주간 국소 분할 조사하는 방법을 임상적으로 사용하고 있다. 하지만, 실험실내 종양 세포주를 대상으로 한 기전 연구에서는 대부분 단회, 치사선량의 방사선을 조사하는 경우가 많으며, 저선량 방사선 실험 역시 단회 방사선 조사를 주로 실시하고 있다. 또한 저선량이라고 칭하고 수행한 실험들이 0.1~3 Gy까지 다양한 범위의 방사선량을 사용함으로써, 2012년 UNSCEAR에서 저선량으로 정의한 기준 선량인 100 mSv(100 mGy) 미만의 방사선에 의한 생물학적 효과를 정확히 대변한다고 보기 어렵다 [20-21]. 따라서 본 연구에서는 100 mGy 미만의 저선량 방사선을 택하여 마우스를 대상으로 3회 분할 전신 방사선 조사를 실시하고, 마지막 방사선을 조사한 후 2일, 14일, 28일째 마우스를 희생하여 면역반응 평가를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 마우스

6주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 오리엔트 바이오(Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하여 실험동물 사육실에서1주일간의 순화기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 사육실의 환경은 22±3℃의 온도와 50±20%의 상대습도, 150-300 Lux의 조도를 유지하였으며, 마우스에게 방사선 멸균사료(Purina, Korea)와 역삼투압 초순수를 자유급이하였다. 본 실험은 한국원자력의학원 동물실험윤리위원회의 승인(KIRAMS-063) 하에 시행되었으며 한국원자력의학원 동물실험 윤리위원회의 규정에 따라 수행되었다.

2.2 저선량 분할 전신 방사선조사

7주령 C57BL/6 마우스의 체중을 측정한 후 임의대로 대조군, 선량별 방사선 조사군(총 0.9, 9, 90 mGy)의 4군(군 당 30마리)으로 분류하였다. 각 군의 마우스에 ^{137}Cs 조사선원(LDI-KCCH-137, KIRAMS)을 이용하여 저선량 감마선(1 mGy·min^{-1})을 하루 1회, 연속 3일간 전신 조사하였다. 2~3일 간격으로 마우스의 체중 변화를 관찰하였으며, 면역반응 평가를 위해, 마지막 방사선 조사 후 2일, 14일, 28일째에 마우스를 희생시켜 혈액과 비장을 채취하였다.

2.3 혈액학적 분석

마우스의 안와정맥총으로부터 혈액을 EDTA microtainer(BD biosciences, USA)에 채취하여 HEMAVET® 950 (Drew Scientific Inc., USA) 기기를 이용하여 전혈구검사(complete blood count, CBC)를 실시하였다.

2.4 비장세포수 측정과 유세포 분석을 통한 면역세포 비율 변화 관찰

마우스의 비장을 적출하여 RPMI-1640 배지(Welgene, Korea)에서 비장세포를 모은 후 ACK lysing solution(Lonza, USA)을 이용하여 적혈구를 제거하고 nylon mesh에 통과시켜 단일 세포 부유액을 만들었다. 비장세포를 0.4% trypan blue 시약으로 염색한 후 염색되지 않은 살아있는 세포의 수를 측정하였다.

각 군의 비장세포 중 면역세포의 비율 변화를 관찰하기 위해, 비장세포를 2% FBS, 0.05% sodium azide가 포함된 PBS에서 세포 표면의 특이 항원에 대한 항체를 이용하여 4℃, 30분간 형광염색한 후 유세포분석(flow cytometry)을 수행하였다. 실험에 사용한 항체는 FITC-conjugated anti-CD3, anti-CD25, anti-CD44 또는 anti-CD11c와 PE-conjugated anti-TCRβ, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD69, anti-CD80 또는 anti-CD86이며, 모두 BD Bioscience(USA)에서 구입하였고, FACSCalibur™와 Cell Quest™ Pro software(BD bioscience, USA)를 이용하여 분석하였다.

2.5 Real-time PCR

비장세포로부터 Trizol(Invitrogen, USA) 시약을 이용해 total RNA를 얻어낸 후, RNA(1 ug)에 oligo dT(10 pM), dNTPs(10 mM), RNase inhibitor(20 units), M-MLV RTase(200 units), RT buffer(Bioneer, Korea)가 포함된 혼합액을 반응시켜 42℃에서 1시간 동안 역전사반응을 수행하였다. 이렇게 합성된 cDNA에 TNF-α와 Foxp3에 대한 forward 또는 reverse primer를 Maxima SYBR Green qPCR Master Mix(Thermo Scientific Fermentas, USA)에 첨가한 후 CFX96 Connect™ Real-time PCR Detection System(Biorad, USA)을 이용하여 분석하였다. 결과 그래프에서 Foxp3 또는 TNF-α의 상대적인 발현양을 GAPDH의 양으로 나누어 표시하였다. 실험에 사용된 primer sequence는 다음과 같다. FoxP3: forward 5'-TCAAAGAGCCCTCACAACCAGCTA-3',reverse 5'-TTTGAAGGTTCCAGTGCTGTTGC-3'; TNF-α: forward 5'-GACGTGGAAGTGGCAGAAGAG-3',reverse 5'-TGCCACAAGCAGGAATGAGA-3'; GAPDH: forward 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGGGCTC-3', reverse 5'-TGGAAGAGTGGGAGTTGCTGTTGA-3'.

2.6 통계 분석

자료는 평균±표준오차로 나타내었고, 통계학적인 유의성 평가를 위해 GraphPad Prism 프로그램 (version 3.02, USA)을 이용하여 일원분산분석과 Newman-Keuls 방법의 사후 검정을 수행하였다 (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

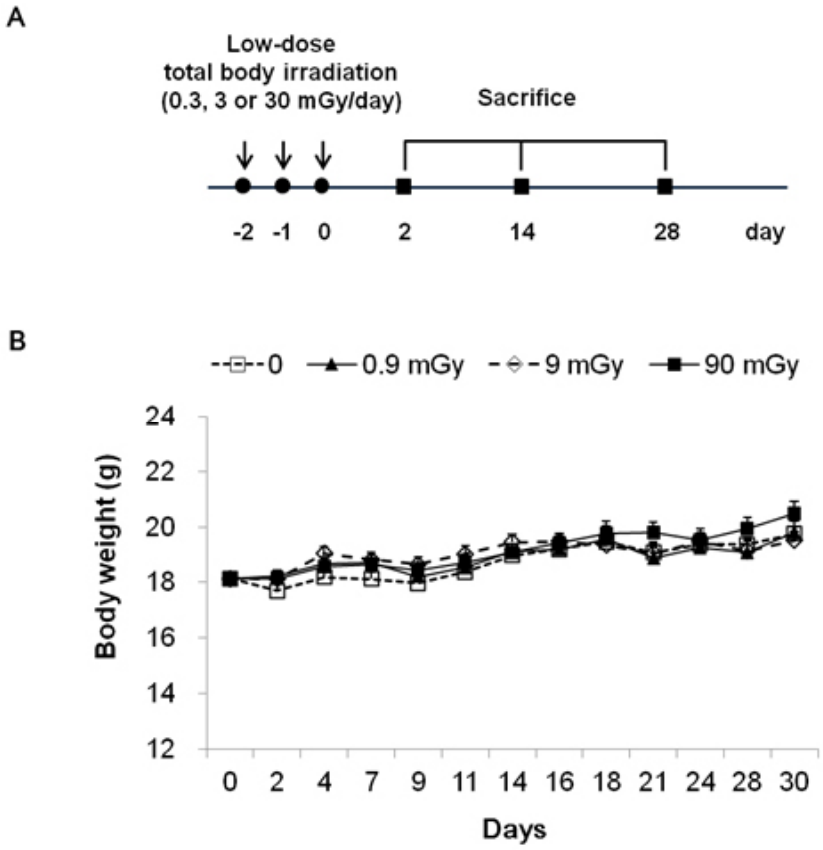

Fig. 1. Body weight change of mice with fractionated low-dose total body irradiation.

3. 결과 및 논의

3.1 마우스의 임상증상 관찰과 체중 변화

본 연구에서는 마우스에 저선량 방사선을 분할 전신 조사하여 면역계에 어떠한 영향을 미치는지 확인하고자 하였다. 위의 재료 및 방법에서 기술한 대로, C57BL/6 마우스의 체중을 토대로 대조군과 선량별 방사선 조사군(총 0.9, 9, 90 mGy)의 4군으로 임의 분류한 후, 방사선 조사군의 마우스에 저선량 감마선(1 mGy·min^{-1})을 하루 1회(0.3, 3, 30 mGy), 연속 3일간 같은 시간에 전신 조사하였다(Fig. 1A). 시험기간 동안 대조군 포함 모든 시험군에서 피모나 피부의 변화, 눈과 점막의 변화, 진전, 경련, 유연, 설사 등의 특이적인 임상 증상은 관찰되지 않았으며, 마우스의 체중 변화를 관찰한 결과, 대조군 대비 전 방사선 조사군에서 유의적인 체중 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 1B).

3.2 혈액학적 분석 결과

저선량 방사선의 면역학적 영향평가를 위해 방사선 조사시 가장 민감하게 변화하는 인자 중 하나인 말초 혈액 세포수의 변화를 측정하였다. 말초 혈액 내 백혈구 수는 2일째에 대조군 대비 선량-의존적 감소가 유의적으로 나타났으며 14일째는 감소폭의 둔화가 관찰되었다. 방사선 조사 후 28일째에 저선량 방사선 조사군에서 선량-비의존적으로 감소된 결과가 나타났으나 대조군과 비교하여 대략 15% 감소된 수준으로, 방사선 조사 후 2 일째보다는 훨씬 증가된 수치이며 점차 회복되고 있음을 알 수 있었다(Fig. 2A). 최근 Balb/c마우스에서 선량율에 따른 혈액 구수와 싸이토카인 분비능을 확인한 실험에 따르면 저선량율로 50 mGy (3.49 mGy·h^{-1}) 용량의 방사선 조사 후 24시간째에 혈액 내 호중구 수의 증가가 나타났으나 통계적으로 유의하진 않았으며 기타 혈구수의 변화가 동반되지 않고, 혈청 중 Flt3와 G-CSF가 증가됨을 보고하였다[22]. 상기 결과와 마찬가지로 본 실험에서도 방사선 조사 후 14일째에 호중구 수가 선량-의존적으로 증가되었을 뿐만 아니라, 이와 함께 림프구 수, 총 백혈구 수 또한 증가하였으므로, 이는 조혈 촉진 효과가 나타난 것으로 생각된다. 하지만, 호중구가 증가되는 시점은 서로 상이한데, 이는 총 조사선량이나 선량율, 마우스의 성별, 방사선 조사 후 분석시간 등 실험 조건의 차이에서 기인한 것으로 해석할 수 있다. 적혈구 수와 혈소판 수는 방사선 조사 후 2일, 14일, 28일째 모두 대조군과 비교하여 유의적인 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 2B, 2C). 본 연구에서 관찰된 변화는 단회 전신 저선량 방사선조사시 말초혈구수에는 변화가 없다는 보고와 상반되는 결과이나 [23], 백혈구 수가 정상적인 범위(1.8~10.7 × 10^6 ml^{-1}) 내에서 변화되고 있음을 확인하였다 [24-25].

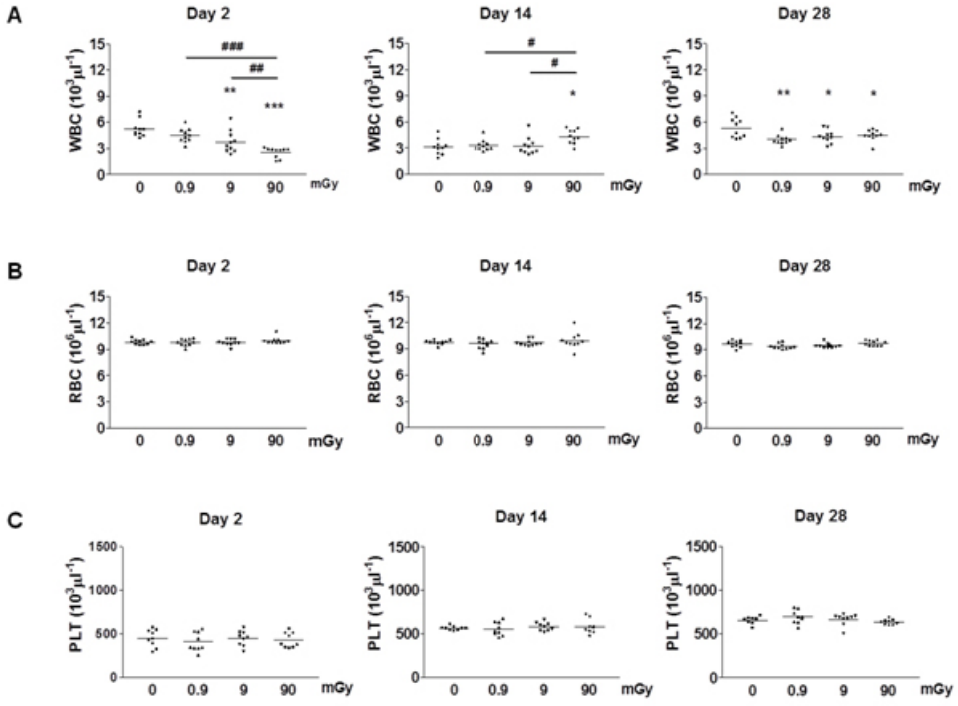

Fig. 2. Hematological analysis in mice with fractionated LDI.

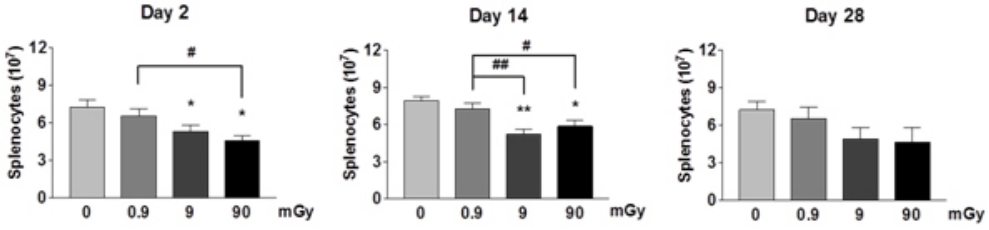

Fig. 3. The effects of fractionated LDI on the murine spleen cellularity.

3.3 비장세포 중 면역세포의 비율 및 활성화 분석

방사선조사 후 2일, 14일, 28일째 비장을 적출하여 세포수를 측정하였을 때, 대조군 대비 모든 방사선 조사군에서 비장세포 수의 감소가 지속적으로 관찰되었다. 방사선 조사 후 2일째와 14일째 대조군 대비 선량의존적인 감소를 나타냈으나 시간경과에 따라 회복되는 추세로 28일째는 대조군 대비 통계학적 유의성이 확인되지 않는 변화를 보였으며 이는 말초혈액 내 백혈구 수치 변화와 거의 유사한 양상으로 나타났다(Fig. 3).

비장세포로부터 면역세포의 비율과 활성화 정도를 파악하기 위해 다양한 표면 마커를 사용하여 유세포 분석을 실시하였을 때, 대조군과 비교하여 3 mGy 혹은 30 mGy로 3회 분할 조사한 군에서 비장세포 중 T 림프구(CD3/CD4, CD3/TCRβ 양성세포)의 증가가 방사선 조사 후2일과 14일째 관찰되었고, T 림프구와 NK cell의 활성화 상태에서 발현이 증가되는 C-type lectin protein인 CD69의 발현 또한 증가되었다. 방사선 조사 후 14일째 활성화된 림프구에서 증가되는 IL-2 수용체의 alpha 사슬인 CD25의 발현 증가도 확인되었다. 방사선 조사 후 28일째 9 mGy 조사군에서 T 림프구의 활성화보조인자인 CD28의 증가가 관찰되어 면역활성이 증가됨을 알 수 있었다. 그 외 표지분자에 대한 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 4).

이와 같이 비장세포수의 감소는 있으나 세포성 면역을 담당하는 T 림프구의 활성은 오히려 증가된 것으로 나타났다. 이는 저선량 방사선에 의해 림프구의 감소가 유발되고, 이로 인해 항상성 증식(homeostatic proliferation)을 초래한다는 보고와 일치하는 결과이며 [26-27], 이러한 증식 과정에서 naïve T 림프구는 항원-특이적 T 림프구로 증식, memory T 림프구로 분화하며, 흉선에서 naïve T 림프구의 생성 또한 증가되어 림프구 수의 회복이 이루어진다 [28-29].

본 실험에서는 단회 방사선 조사군을 설정하지 않았으므로, 이러한 백혈구 수나 비장세포수의 감소가 단지 분할 방사선조사에 의한 효과인지 아니면 마우스의 품종이나 주령에 따른 변화인지 향후 추가 실험을 통해 검증해

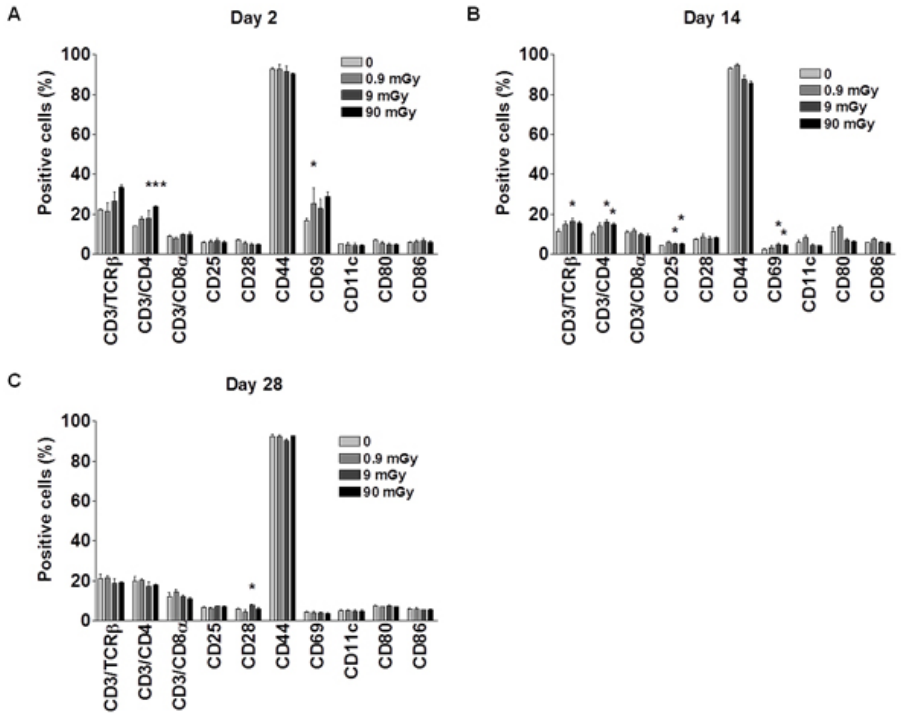

Fig. 4. Alterations in the relative number of spleen cells with fractionated LDI.

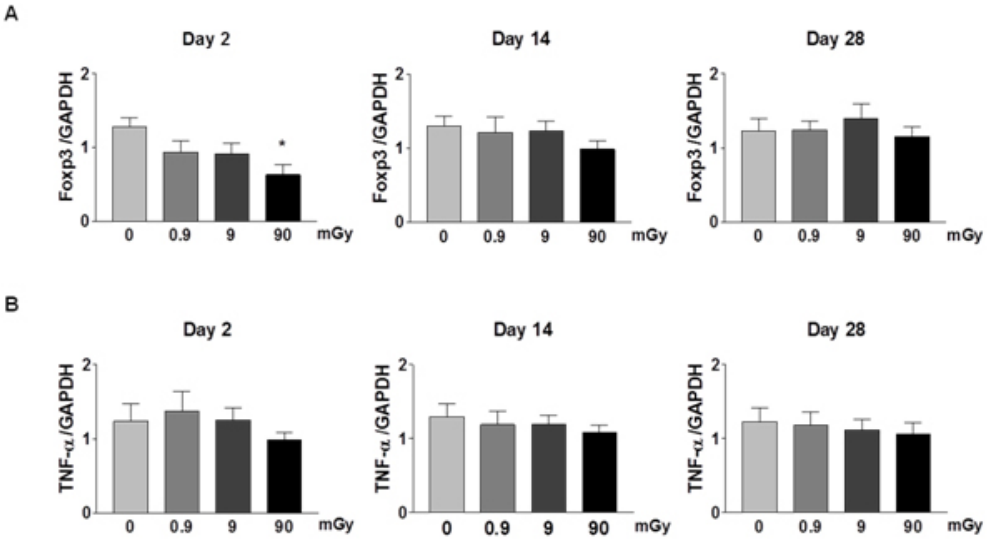

Fig. 5. The expression of Foxp3 and TNF-α mRNA in fractionated LDI.

야 할 것으로 사료된다.

최근, 기존의 고식적 종양치료 방법 외에 면역치료를 병행하여 복합 치료하는 기술이 새롭게 각광을 받고 있으며, 이러한 관점에서 저선량 방사선의 면역활성 효과에 의한 항암 효능을 입증하는 연구가 종양이식 마우스를 대상으로 간혹 보고되고 있으나 정상적인 마우스에 저선량 방사선 분할조사에 의한 면역학적 변화를 관찰한 연구는 거의 전무하다. 본 연구와 유사하나 분할조사가 아닌 단회조사에 의한 연구 논문을 고찰해 보면, 0~0.1 Gy 선량의 방사선을 단회 조사한 다음 21일째 T 세포, B 세포, NK 세포, $CD4^+$ T 세포, CD4:CD8 T 세포 비 모두 감소하였으며, 0.01 Gy에서만 혈구수 변화 없이 총 T 세포, $CD4^+$ T 세포, NK 세포가 증가됨을 확인하고 저선량방사선이 $CD4^+$ T 세포에 미치는 영향이 선량, 시간 의존적이라 결론지었다 [32]. 또 다른 논문에서는, 0.01~2 Gy 방사선을 단회조사하고 일주일간 관찰하였을 때 2 Gy 고선량에서는 확실한 면역억제효과가 나타나는 반면, 0.1 Gy 이하의 저선량에서는 NK세포나 수지상세포의 세포사멸은 감소되었으나 모든 면역세포수가 방사선 조사 후 3일 째 최저수준으로 감소됨을 나타냈다. 하지만 IL-5의 지속적 증가, 초기 IL-6의 증가, 후기 IL-10의 증가가 전반적으로 감소된 사이토카인 발현과는 대비되어 나타났고, 저선량 방사선의 영향이 일괄적이지 않고 개체별 변동이 큰 것으로 보고하였다 [33]. 따라서 상기 언급한 논문들과 비교하

여 볼 때, 저선량 조사에 의한 비장세포 수 혹은 면역세포 타입 별 감소나 활성변화 유무는 어느 정도 일치하는 것으로 나타나지만, 그 정도나 시간적 변화는 실험조건에 의한 차이가 상당히 발생되는 것으로 사료된다.

3.4 비장세포 중 면역세포의 Foxp3와 TNF-α의 발현

Foxp3는 regulatory T cells의 분화와 기능에 중요한 역할을 담당하는 전사인자이며 [30-31], TNF-α는 전신적 염증반응을 초기에 유발하는 사이토카인으로 알려져 있다. 따라서 이들은 면역반응의 억제 혹은 활성 정도를 대변할 수 있는 대표적 인자로 간주된다. 방사선조사 후 2일째 대조군과 비교하여 방사선 조사군에서 선량 의존적인 Foxp3의 발현 감소가 관찰되었고, 특히, 90 mGy 조사군에서 유의적인 Foxp3 발현 감소를 확인하였다. TNF-α의 발현은 유의성 있는 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 5). Fig. 4에서 CD4 양성 T 세포는 증가된 반면 비장세포 내의 Foxp3 mRNA 발현이 감소된 것으로 보아 면역억제효과가 있는 regulatory T 세포가 유의적으로 감소한 것으로 나타났다. 이는 마우스 종양 모델에서 저선량 방사선 조사에 의해 regulatory T 세포의 비율이 선택적으로 감소한다는 보고와 맥락을 같이 한다 [34].

4. 결론

본 연구에서는 저선량 방사선의 단회 조사가 아닌 분할 전신조사에 의한 면역반응의 변화 여부를 마우스를 대상으로 확인하고자 하였다. 저선량이라 함은 100 mGy 미만의 방사선량을 지칭하므로, 90 mGy를 최고용량으로 설정하고 3회 분할 방사선 조사하였으며 10배씩 방사선량을 감소하여 시험군을 구성하였다. 본 연구결과에 의하면 저선량 방사선의 분할 조사에 의해 비장 내 CD4 T세포와 그 활성화 마커인 CD25, CD28, CD69의 증가, Foxp3 mRNA 발현 감소를 확인할 수 있었으며, 더욱 주목할 만한 점은 단회 조사가 아닌 분할 조사에 의한 면역학적 변화를 확인한 것이다. 이는 저선량 분할 조사가 좀 더 실제 생활 환경을 모사한다고 할 수 있기 때문에 인체 영향을 보다 정확히 예측할 수 있으리라 생각되며 그 변동을 감지할 수 있음을 제공하는 연구라 할 것이다.

요약해보면 100 mGy 미만의 저선량 방사선을 전신 분할 조사한 마우스 혈액 중 백혈구수 및 비장세포수의 감소가 나타났으나 유의적인 체중감소나 특이적인 임상증상은 발견되지 않았다. 비장 내 T세포 표면의 TCR/CD3, CD4, CD28의 발현증가는 면역세포의 수적인 감소와는 달리 오히려 약간 상승되는 것으로 나타났다. 본 연구는 생물학적 반응을 입증하기 어려운 저선량 영역에서 마우스를 대상으로 전신 분할 방사선 조사 시 면역학적 변화가 유발됨을 확인하였으며 이를 고찰함으로써 향후 유의적으로 평가 가능한 인자들을 도출하는 자료로 활용할 수 있으리라 기대한다.

감사의 글

본 연구의 일부는 지식경제부의 지식경제 기술혁신사업(20131610101840)의 지원을 받아 수행한 것으로 감사의 말씀을 드립니다.

참고문헌

01. Hall EJ, Giaccia AJ. Radiobiology for the Radiobiologist. 5th ed. New York; Lippincott Williams and Wilkins, 2000.
02. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry, estimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Pharmacology and Toxicology. 2005.
03. Williams JP, Brown SL, Georges GE, et al. Animal models for medical countermeasures to radiation exposure. Radiat. Res. 2010;173(4):557-578.
04. Macklis RM. Radithor and the era of mild radium therapy. JAMA. 1990;264(5):614-618.
05. Sowby FD. International commission on radiological protection: 1978 Stockholm meeting. Radiology. 1978;129(2):533-535.
06. Calabrese EJ. Origin of the linearity no threshold (LNT) dose-response concept. Arch. Toxicol. 2013;87(9):1621-1633.
07. Liu SZ, Jin SZ, Liu XD. Radiation-induced bystander effect in immune response. Biomed. Environ. Sci. 2004;17(1):40-46.
08. Otsuka K, Koana T, Tomita M, et al. Rapid myeloid recovery as a possible mechanism of whole-body radioadaptive response. Radiat. Res. 2008;170(3):307-315.
09. Liu SZ. Radiation hormesis. A new concept in radiological science. Chin. Med. J. (Engl). 1989; 102(10):750-755.
10. Prekeges JL. Radiation hormesis, or, could all that radiation be good for us? J. Nucl. Med. Technol. 2003;31(1):11-17.
11. Safwat A. The immunobiology of low-dose total-body irradiation: More questions than answers. Radiat. Res. 2000;153(5 Pt 1):599-604.
12. Tubiana M, Feinendegen LE, Yang C, et al. The linear no-threshold relationship is inconsistent with radiation biologic and experimental data. Radiology. 2009;251(1):13-22.
13. Doss M. Shifting the paradigm in radiation safety. Dose Response. 2012;10(4):562-583.
14. Doss M. Linear no-threshold model vs. radiation hormesis. Dose Response. 2013;11:480-497.
15. Morgan WF, Bair WJ. Issues in low dose radiation

biology: The controversy continues. A perspective. Radiat. Res. 2013;179(5):501-510.
16. ICRP. The 2007 recommendations of the international commission on radiological protection. ICRP publication 103. Ann ICRP. 2007;37(2-4):1-332.
17. Rubner Y, Wunderlich R, Rühle PF, et al. How does ionizing irradiation contribute to the induction of anti-tumor immunity? Front. Oncol. 2012;2:75.
18. Farooque A, Mathur R, Verma A, et al. Low-dose radiation therapy of cancer: role of immune enhancement. Expert Rev. Anticanc. 2011;11(5):791-802.
19. Fourquet A, Teillaud JL, Lando D, et al. Effects of low dose total body irradiation (LDTBI) and recombinant human interleukin-2 in mice. Radiother. Oncol. 1993;26(3):219-225.
20. United Nations. Biological mechanisms of radiation actions at low doses. 1-2. New York. 2012.
21. Suzuki K and Yamashita S. Low-dose radiation exposure and carcinogenesis. Jpn. J. Clin. Oncol. 2012;42(7):563–568.
22. Son YH, Jung DH, Kim SD, et al. Dose and dose rate effects of irradiation on blood count and cytokine level in BALB/c mice. J. Radiation Protection. 2013;38(4):179-184.
23. Shin SC, Lee KM, Kang YM, et al. Alteration of cytokine profiles in mice exposed to chronic low-dose ionizing radiation. Biochem. Bioph. Res. Co. 2010; 397(4):644-649.
24. Gridley DS, Pecaut MJ, Dutta-Roy R, et al. Dose and dose rate effects of whole-body proton irradiation on leukocyte populations and lymphoid organs: part I. Immunol. Lett. 2002;80(1):55-66.
25. Pecaut MJ, Gridley DS, Smith AL, et al. Dose and dose rate effects of whole-body proton-irradiation on lymphocyte blastogenesis and hematological variables: part II. Immunol. Lett. 2002;80(1):67-73.
26. Ge Q, Hu H, Eisen HN, et al. Different contributions of thymopoiesis and homeostasis-driven proliferation to the reconstitution of naive and memory T cell compartments. P. Natl. Acad. Sci. USA. 2002;99(5): 2989-2994.
27. Min B, Paul WE. Endogenous proliferation: burst-like CD4 T cell proliferation in lymphopenic settings. Semin. Immunol. 2005;17(3):201-207.
28. Prlic M, Blazar BR, Khoruts A, et al. Homeostatic expansion occurs independently of costimulatory signals. J. Immunol. 2001;167(10):5664-5668.
29. Maine GN, Mule JJ. Making room for T cells. J. Clin. Invest. 2002;110(2):157-159.
30. Graca L. New tools to identify regulatory T cells. Eur. J. Immunol. 2005;35:1678-1680.
31. Ohkura N, Sakaguchi S. Regulatory T cells: roles of T cell receptor for their development and function. Semin. Immunopathol. 2010;32(2):95-106.
32. Gridley DS, Rizvi A, Luo-Owen X, et al. Low dose, low dose rate photon radiation modifies leukocyte distribution and gene expression in CD4(+) T cells. J. Radiat. Res. 2009;50(2):139-150.
33. Bogdándi EN, Balogh A, Felgyinszki N, et al. Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation. Radiat. Res. 2010;174(4):480-489.
34. Liu R, Xiong S, Zhang L, et al. Enhancement of antitumor immunity by low-dose total body irradiation is associated with selectively decreasing the proportion and number of T regulatory cells. Cell. Mol. Immunol. 2010;7(2):157-162.

Effects of Low-Dose Fractionated Total Body Irradiation on Murine Immune System

Mi-Hyoung Kim[•,†], Sang-Young Rhu[‡], Dae-Seog Lim[§], and Jie-Young Song[•]
[•]Division of Radiation Cancer Research, Korea Institute of Radiological & Medical Sciences, Seoul
[†]Laboratory of Immunology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul
[‡]Departments of Obstetrics and Gynecology, Korea Cancer Canter Hospital, Korea Institute of Radiological & Medical Sciences, Seoul
[§]Department of Biotechnology, CHA university, Gyeonggi-do, Republic of Korea

Abstract - Along with the wide use of radiotherapy in cancer treatment, there is growing interest in beneficial effect of low-dose irradiation (LDI) in cancer therapy. Therefore, we investigate how LDI affects immune responses in mice model. Total body irradiation (TBI) on C57BL/6 mice was given at low-dose rate of 1 mGy·min^{-1} using ^{137}Cs source at three times for consecutive three days. Hematological examination, total cell numbers of spleen, populations and characteristics of splenocytes were determined. Total numbers of RBC or platelet in irradiated mice showed no significant changes. WBC counts were decreased in a dose-dependent manner 2 days after TBI, however, these differences are gradually waned until 28 days. Dose-dependent decrease in the number of splenocytes of TBI mice at day 2 was also improved as time progressed. While the level of Foxp3 mRNA was decreased, the frequency of CD4$^+$ T cells and CD69$^+$ cells in spleen was increased at day 2 and 14. Fractionated low-dose TBI on mice exhibited normal body weight with no distinguishable behavior during whole experimental periods. These results suggest that some parameters of immune system could be altered and evaluated by fractionated low-dose TBI and be used to broaden boundary of low dose radiation research.

Key words : Low-dose irradiation, Total body irradiation, Immune modulation