



# 放射線肺臓炎の発生機序に関する研究 : マウス全肺照射後の接着分子 ICAM-1, VCAM-1, P-selectinの発現の変化について

辻野, 佳世子  
児玉, 明久  
河野, 道雄

---

**(Citation)**

神戸大学医学部紀要, 58(1/2/3):57-65

**(Issue Date)**

1997-12

**(Resource Type)**

departmental bulletin paper

**(Version)**

Version of Record

**(URL)**

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00177382>



# 放射線肺臓炎の発生機序に関する研究

—マウス全肺照射後の接着分子ICAM-1, VCAM-1,

P-selectinの発現の変化について—

神戸大学医学部放射線医学講座

辻野佳世子, 児玉明久, 河野通雄

(平成9年9月16日)

## 要約

放射線肺臓炎の発症における接着分子の関与を解明するために, C57BL/6Jマウスの全胸郭に電子線を用いて1回照射を行い, 経時的に肺を摘出し, 肺組織中の接着分子mRNAの発現をNorthern blot法により定量した。12Gy 1回照射後のICAM-1 mRNAは4時間後に非照射群と比較して42% ( $p<0.05$ ), 24時間後には76% ( $p<0.01$ ), 48時間後には51% ( $p<0.05$ )の有意な増加を認めた。1週間後以降8週までには有意な変化はみられなかった。VCAM-1 mRNAはICAM-1よりやや早く12時間後に49% ( $p<0.01$ )のピークを有する発現の増加を認めた。1週間後にも25% ( $p<0.05$ )と有意な増加を認めた。P-selectin mRNAは12時間後に59% ( $p<0.05$ )と一過性の発現増加を認めた。また, ICAM-1の発現と放射線量との関係の検討では, ICAM-1は3Gyの低線量から発現が誘導され, 24Gyまでは線量依存性に発現量が増加した。これらの一過性ではあるが有意なICAM-1, VCAM-1, P-selectinの発現増加は, *in vivo*における電離放射線照射後の肺の遺伝子レベルの変化として報告されている中では最も早いもののひとつであり, その後に続く放射線肺臓炎の発症に関与していると考えられた。

## 緒言

肺癌や乳癌, 食道癌などの胸部の悪性腫瘍において, 放射線治療は重要な役割を担う。しかし正常肺への放射線照射はある程度は避けられず合併症として照射後数カ月で発症する放射線肺臓炎および引き続く肺繊維症は時に重篤となり, 治療を行う上での線量制限因子となっている(1, 2)。放射線肺臓炎の発症機序に関しては未だ不明な点が多いが, その早期に見られる病理学的変化のひとつに肺胞隔壁及び肺胞内へのマク

ロファージ, リンパ球や好中球などの炎症細胞浸潤が見られること(3-8)や, 肺胞洗浄液中の細胞組成をみると照射後早期よりリンパ球や好中球の割合が著名に増加すること(9, 10)等よりいわゆる炎症反応が関与していると考えられる。

一方, 近年炎症反応の場においては様々な細胞が接着分子を介して相互作用を示す事が解明されている。特に好中球やリンパ球等の炎症細胞と血管内細胞との相互作用には免疫グロブリンスーパーファミリーの Interleukin adhesion molecule-1 (ICAM-1) やVascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), セレクチン・ファミリーの P-selectin や E-selectin を介する経路が重要である事が示されている。すなわち, 炎症性刺激に対してまず局所の血管内皮細胞にセレクチンが発現して白血球が血管内皮上を転がる現象(rolling)をひきおこし, 引き続いてICAM-1 やVCAM-1 が血管内皮細胞に発現してICAM-1 /LFA-1 およびVCAM-1 /VLA-4 の経路を介して内皮細胞と白血球が強固に接着し(sticking), 白血球が内皮間隙を通り局所の組織内へ浸潤していく(11-13)。これらの接着分子は, Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) やInterleukin-1 (IL-1), Interferon- $\gamma$  などの proinflammatory cytokine (14-16) や, 紫外線照射(17, 18)等で誘導されることが*in vitro*及び*in vivo*で報告されている。電離放射線照射においても, *in vitro*ではHeLa細胞等の培養腫瘍細胞系でICAM-1が誘導されること(19)や血管内皮細胞で照射後数時間後からE-selectin及びICAM-1の発現が誘導され, 好中球との接着が見られること(20, 21)が最近明らかとなった。さらに, 高濃度酸素(22-24)や, エンドトキシン(25)による肺障害などの種々の炎症性肺疾患においてもこれらの接着分子の関与が報告されている。

そこで今回我々は, 放射線肺臓炎の発症においても

これらの接着分子が関与するのではないかと考え、マウスの全肺に放射線照射後の肺組織中のICAM-1, VCAM-1, P-selectinの発現を照射直後より経時的に測定した。

## 対象及び方法

### (1) 実験動物及び照射

8週齢にて日本クレアより購入した雄のC57BL/6Jマウス(22.7±1.1g)をすべての実験で用いた。4-6匹ずつプラスチックケージにいれ、温度22±2℃、湿度55±5%の部屋で飼育し、通常飼料および水分は自由に摂取できるようにした。動物はすべて神戸大学動物実験施設のガイドラインに基づいて取り扱われた。

1週間の予備観察期間を経て、マウス胸郭全体へ9MeV電子線(三菱)による1回照射を線量率3Gy/分にて行った。照射に際しては、マウスは無麻酔下に自製の固定具に固定し、頭部と腹部以下を10mmの鉛板で遮蔽し、全肺が照射野内に入っている事をX線撮影にて確認した。5匹ずつ同時に照射した。同週齢の非照射マウスを全実験過程同じ条件下におきコントロールとした。

### (2) 組織学的検討

照射後経時的に照射群及びコントロール群のマウスを頸椎脱臼にて屠殺し、直ちに両肺を摘出した(各群2-3匹)。10%ホルマリンを気管より注入して肺胞を膨らませた後、10%ホルマリン固定し、H-E染色およびAzan染色を行い、組織学的変化を観察した。

### (3) RNA抽出

組織学的検討と同様に、照射後経時的にマウス両肺を摘出した(各群3-5匹)。摘出肺は直ちにIsogen<sup>®</sup>(ニッポンジーン)1ml中でホモジナイズし、-80℃にて保存した。後日に解凍後、使用説明書に従ってtotal RNAを抽出した。得られたtotal RNAは水に溶解してOD260nmにて定量した。

### (4) Northern blotting

各total RNA 20μgをホルムアルデヒドを含む1.2%アガロースゲルにて電気泳動し、ナイロン膜(Hybond-N:Amersham)に転写した。その後random primer法(Megaprime DNA labelling system:Amersham)にて<sup>32</sup>Pでラベリングしたrat ICAM-1, mouse VCAM-1, mouse P-selectinおよびコントロールとしてrat β-actinのcDNAを順次プローブとして42℃で16時間以上hybridizeさせた。ICAM-1 cDNAは第一製薬創薬基盤研究所の堀内正博士より、VCAM-1 cDNAはDepartment of Pathology, Centre Medical Universitaire,

GenevaのDr. Pierre Vassalliより、P-selectin cDNAはZMBE, Institut für Zellbiologie, MunsterのDr. Dietmar Vestweberよりそれぞれ御供与いただいた。Hybridizationは50%ホルムアミド、6×SSC、5×デンハルト液、0.5%SDS、2μg/mlサケ精子DNA溶液中で行った。ナイロン膜を1×SSC、0.1%SDSおよび0.1×SSC、0.1%SDS溶液中において、55℃で15分2回ずつ洗浄し、イメージングプレート(Fuji)に露光し、バイオイメージアナライザー(Fuji, BAS2000)にて定量した。各mRNAの定量値はβ-actinの定量値で補正した。

### (5) 統計

統計的処理には、Stat View(Avacus concepts, Inc.)を用い、2群間の検定は、unpaired student t-test(両側検定)で行い、p<0.05を有意とした。

## 結果

### (1) 組織学的変化

12Gy 1回照射後24, 48, 72時間後、1, 2, 4, 8週後に光学顕微鏡による組織学的検討を行った。観察した照射後8週までには明らかな肺臓炎はみられず従来の報告と同様に放射線肺臓炎発症前の潜伏期と考えられた。しかし詳細に検討すると、照射後24時間で血管周囲の浮腫が出現し、48時間後にはII型肺胞上皮細胞の腫大、肺胞隔壁及び肺胞腔内へ局所的にマクロファージ、リンパ球の軽度の浸潤が観察された(Fig.

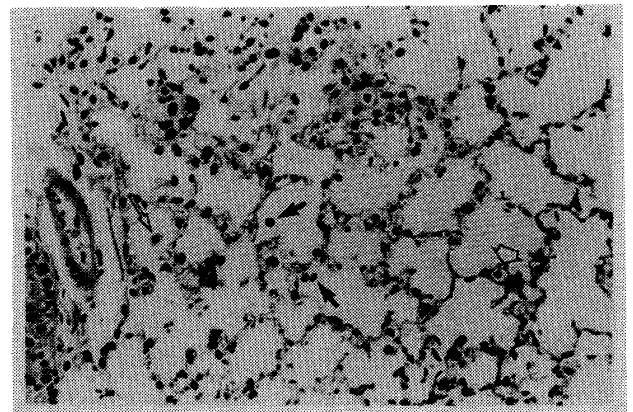


Fig. 1 12Gy照射48時間後の肺組織光顕像(H-E染色, ×100)。II型肺胞上皮細胞の腫大(◻), 肺胞内にマクロファージ(↑)及びリンパ球(↓)を認める。

1)。2週間後には細気管支壁及びその周囲、肺胞隔壁内にリンパ球の集簇を認めた(Fig. 2)。これらの変化は4, 8週後にはほとんど認められなかった。4週後には数個の好中球を肺胞隔壁内に認めた(Fig.

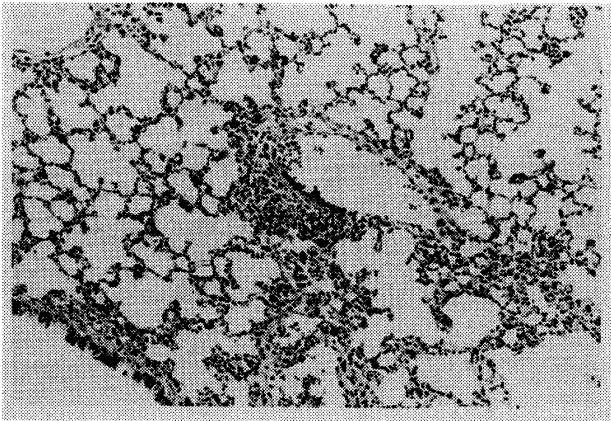


Fig. 2 12Gy照射2週間後の肺組織光顕像 (H-E染色,  $\times 50$ )。細気管支壁およびその周囲にリンパ球浸潤を認める。

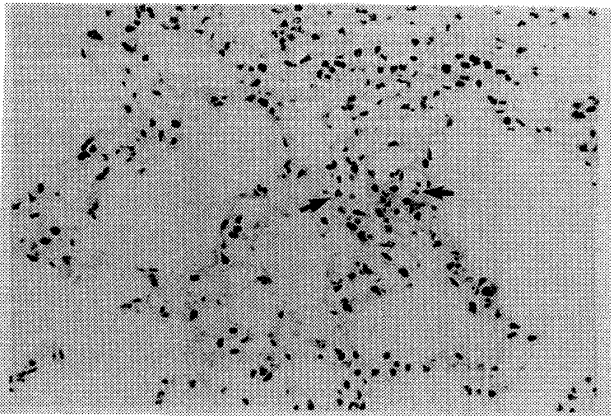


Fig. 3 12Gy照射4週間後の肺組織光顕像 (H-E染色,  $\times 100$ )。肺胞隔壁内に数個の好中球 (↑) を認める。

3)。8週までのすべての時点で照射群は非照射群と比較して出血巣を多く認め、易出血傾向にあると考えられた。8週まででは、コラーゲンの沈着等の繊維化を示す所見はみられなかった。

#### (2) 12Gy照射後の各mRNAの変化

12Gy 1回照射後、4, 12, 24, 48時間後及び1, 2, 4, 8週後にマウスを屠殺し、mRNAの変化をみた。各プローブによるNorthern blotの結果の代表例をFig. 4に示す。各群3-5匹を用い、定量値のコントロール値に対する増加の割合を平均値 $\pm$ SDで示したグラフがFig. 5-7である。

ICAM-1 mRNAは照射4時間後より42% ( $p < 0.05$ )と有意な発現増加がみられ、24時間後に76% ( $p < 0.01$ )と最も増加し48時間後には51% ( $p < 0.05$ )の増加となり、1週後にはコントロールのレベルに戻っていた。その後2から8週後にはコントロール群と比較して有意な発現の差は見られなかった (Fig. 5)。

VCAM-1 mRNAはICAM-1よりやや早く12時間後に49% ( $p < 0.01$ )とピークを有する発現の増加を

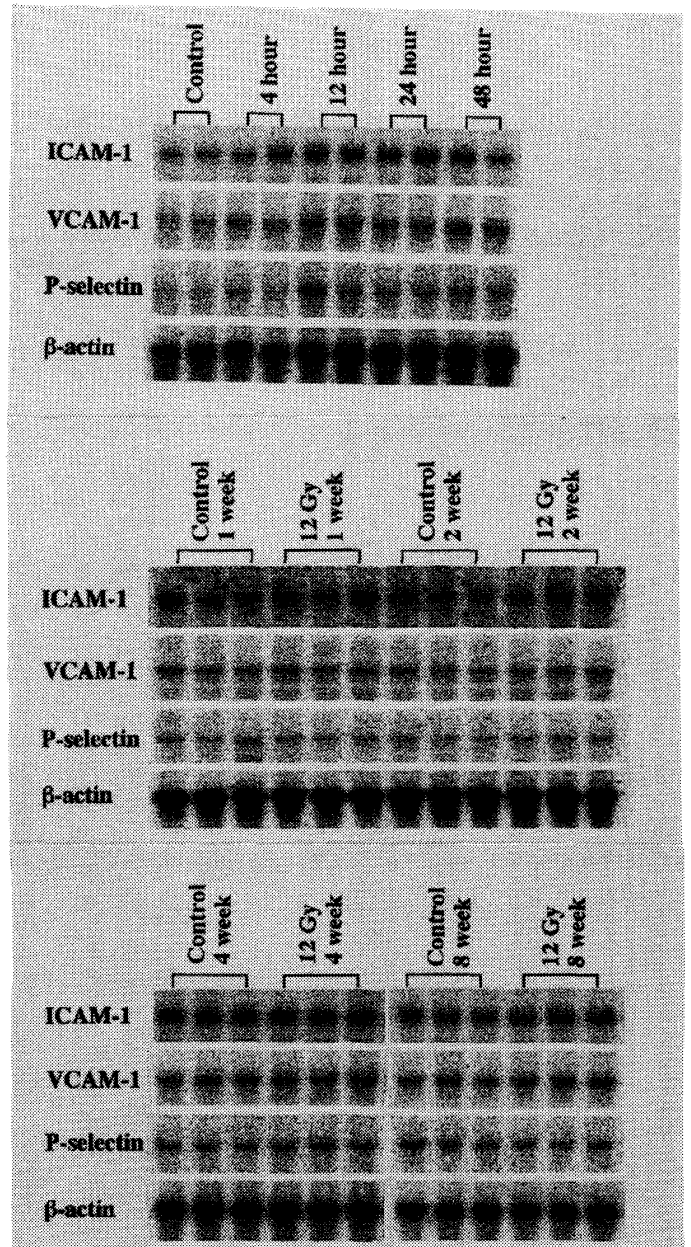


Fig. 4 12Gy照射後経時的に摘出した肺組織内のICAM-1, VCAM-1, P-selectinおよび $\beta$ -actin mRNAに対するNorthern blotの代表例。

認め、1週後でも25% ( $p < 0.05$ )とわずかではあるが有意な増加がみられた。2週間後以降は有意な変化はみられなかった (Fig. 6)。

P-selectin mRNAは、VCAM-1と同様に、12時間後に59% ( $p < 0.05$ )とピークをもつ発現の増加を認めたが、より一過性の変化であった (Fig. 7)。

#### (3) 線量依存性の検討

最も著明に発現が誘導されたICAM-1について、線量との関係を検討した。3, 6, 12, 18, 24Gy 1回照射後、24時間後のICAM-1 mRNAの発現は、3Gyから有意に増加し、照射線量の増加に伴って、発現量も増加した (Fig. 8)。

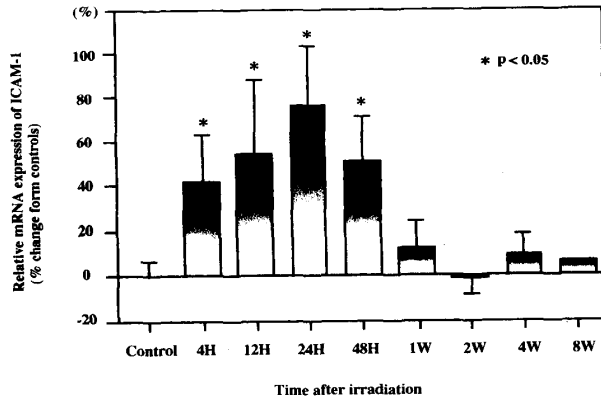


Fig. 5 ICAM-1 mRNA発現量の経時的変化。12 Gy照射後経時的にNorthern blotでみた肺組織内のICAM-1 mRNAの発現をバイオイメージアナライザーを用いて定量し、 $\beta$ -actinの発現量にて補正し、非照射コントロール群と比較した増加率を表した。Mean $\pm$ SD; n=3~5. \*P<0.05.

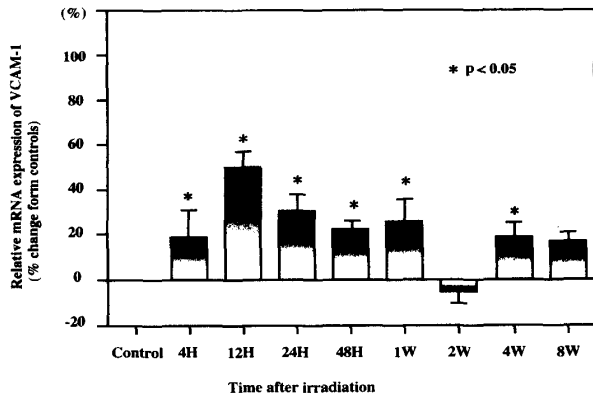


Fig. 6 VCAM-1 mRNA発現量の経時的変化。12 Gy照射後経時的にNorthern blotでみた肺組織内のVCAM-1 mRNAの発現をバイオイメージアナライザーを用いて定量し、 $\beta$ -actinの発現量にて補正し、非照射コントロール群と比較した増加率を表した。Mean $\pm$ SD; n=3~5. \*P<0.05.

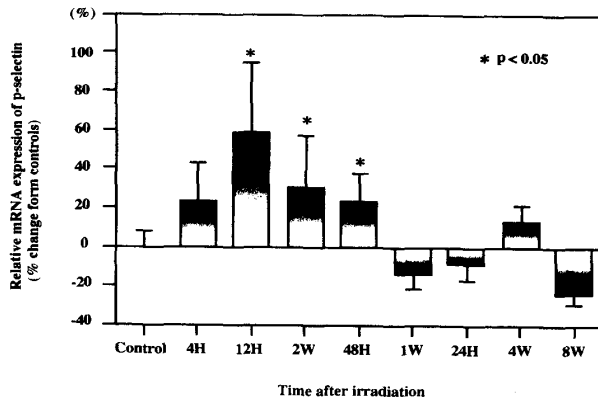


Fig. 7 P-selectin mRNA発現量の経時的変化。12 Gy照射後経時的にNorthern blotでみた肺組織内のP-selectin mRNAの発現をバイオイメージアナライザーを用いて定量し、 $\beta$ -actinの発現量にて補正し、非照射コントロール群と比較した増加率を表した。Mean $\pm$ SD; n=3~5. \*P<0.05.

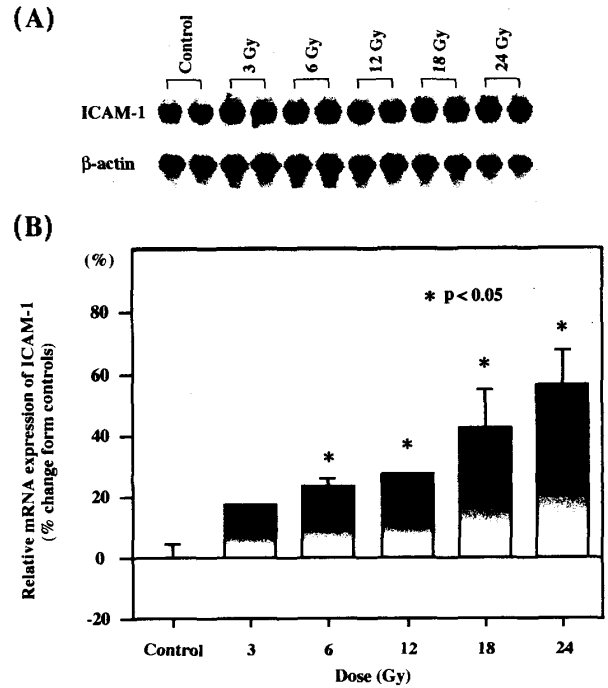


Fig. 8 (A) 3~24Gy照射24時間後に摘出した肺組織内のICAM-1および $\beta$ -actin mRNAに対するNorthern blot。(B)ICAM-1 mRNA発現量の線量による変化。3~24Gy照射24時間後にNorthern blotでみた肺組織内のICAM-1 mRNAの発現をバイオイメージアナライザーを用いて定量し、 $\beta$ -actinの発現量にて補正し、非照射コントロール群と比較した増加率を表した。Mean $\pm$ SD; n=3~5. \*P<0.05.

## 考 察

従来放射線照射後数週間から数ヶ月の潜伏期間を経て発症するとされてきた放射線肺臓炎およびそれに引き続く放射線肺線維症の発現機序についてはRubinらの研究により照射直後よりダイナミックな変化が分子生物学的にはみられることが明らかにされつつある。すなわちproinflammatory cytokineであるTNF $\alpha$ やIL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , growth factorであるTGF $\beta$ やcollagen I, III, IVのmRNAの肺における発現が照射後1日という早期より26週まで持続的に変化している事が示された(26-30)。今回のわれわれの検討においてはそれよりさらに早く、照射後4時間の急性期より接着分子ICAM-1, VCAM-1, P-selectinのmRNAの発現の増加がみられることを示した。ICAM-1の発現は24時間後をピークとし、VCAM-1, P-selectinの発現は12時間後をピークとする一過性のものではあったが、この変化が、その後に発症する肺臓炎における炎症細胞浸潤をひきおこす最初のステップになっている可能性があると考えられる。組織学的にみてもわずかではあるが、48時間後より炎症細胞の

肺胞隔壁内への浸潤が認められている。

放射線照射により、ICAM-1などの接着分子の発現の増加する機序は今回の実験からのみでは不明であるが、照射後4時間という早期から増加傾向のみられることよりサイトカインの生成などを介さない放射線の作用である可能性が高いと思われる。電離放射線の細胞に対する作用としては、標的の原子や分子を直接電離する直接作用と、水などの他の分子に働いてOH $\cdot$ 等のfree radicalが形成され間接的に標的細胞に作用する間接作用の二つが知られている(31)。x線や $\gamma$ 線等の低LET (linear energy transfer) 放射線では後者の作用が主であるといわれている。一方TNFやIL-1, IFNなどによるICAM-1やVCAM-1等の接着分子の誘導は、free radicalの形成を介し、Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B), AP-1, AP-2などの転写因子が活性化される事によると報告されている(32-35)。ICAM-1遺伝子のregulatory regionにAP-1とNF $\kappa$ Bのbinding siteがある事も報告されている(36)。また電離放射線照射により、転写因子NF $\kappa$ Bが活性化されるという報告も見られる(37)。従って、free radicalを形成する電離放射線においても同様の機序で肺内の接着分子が誘導されている可能性がある。われわれの検討においても放射線肺臓炎の発症にfree radicalが関与している事が示唆されている(38)。

*In vivo*において電離放射線によるICAM-1などの接着分子のmRNAの発現の変化の報告は調べ得た範囲では今回の我々の報告以外ではHongらによりマウスの脳において照射後4-8時間でICAM-1 mRNAが増加したとするもの(39)のみである。彼等の報告ではICAM-1の発現は一過性ではあるが、われわれの検討よりも著明に増加していた。投与線量の差もあるが、脳では肺と異なり、照射前には全くICAM-1の発現がみられていない事が関与しているのかもしれない。*In vivo*における他の手法を用いた検討では、Panerらはラットの腹部に20Gy 1回照射後、2から6時間で腸間膜血管と接着し遊走する白血球数の増加を観察しており、それは抗CD18抗体または抗ICAM-1抗体の投与により抑制されたとしている(40)。また最近ラット肺においても20Gy照射後1週間より肺胞洗浄液中のマクロファージ上のICAM-1およびそのリガンドであるLymphocyte function associated antigen-1 (LFA-1)の発現が増加していることが免疫組織学的検討により報告されている(41)。これらの研究からもわれわれの結果と同様に照射後早期より*In vivo*においても接着分子特にICAM-1がその後の反応を引き起こす役割を果たしているであろうこと

が推察される。

ICAM-1やVCAM-1が関与する炎症性疾患においてはモノクローナル抗体の投与による予防や治療への応用の可能性が期待される。動物実験においては、関節リュウマチや急性心筋炎、神経炎などの自己免疫疾患モデルにおいて抗体投与による発症抑制が報告されている(42, 43)。心、腎、骨髄などの同種移植における拒絶反応やGVHDに対する抑制効果も報告されており(44, 45)、ヒトにおいても臨床治験が開始されている(46)。肺疾患においても動物実験では、気管支喘息や気道過敏性、高濃度酸素肺障害などにおいて、抗ICAM-1抗体や抗VLA-4抗体の投与によりその発症が抑制されることが示されている(22, 47, 48)。放射線肺臓炎においては他の因子の関与も大きいと考えられ、酸素障害の様な劇的な効果は期待されないかもしれないが、予防・治療法の一つの選択肢となりうる可能性はあると考える。

今回我々は、マウス肺放射線照射後、一過性ではあるが有意な接着分子ICAM-1, VCAM-1, P-selectinのmRNAの発現の増加をみだした。特にICAM-1は4時間という早期から48時間後まで発現の増加がみられ、またその発現は3Gyの低線量からみられ線量依存性であった。これらは生体における肺の照射後の変化として報告されているなかで最も早いものの一つであり、その後ひきつづく肺臓炎の発症に関与している可能性があると考えた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました河野通雄教授に深謝いたします。また、終始御協力頂きました神戸大学放射線医学教室の教室員および神戸大学医学部附属病院中央放射線部技師の皆様、および肺組織標本について御指導いただきました兵庫県加古川病院病理部大林千穂先生に謝意を表します。

## 文 献

1. McDonald, S., Rubin, P., Phillips, T.L. and Marks, L.B. : Injury to the lung from cancer therapy : Clinical syndromes, measurable endpoints, and potential scoring systems. *Int. J. Radiat. Oncol. Phys.*31 : 1187-1203, 1995.
2. Morgan, G.W., Breit, S.N. : Radiation and the lung : A reevaluation of the mechanisms

- mediating pulmonary injury. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 31 : 361-369, 1995.
3. Ward, H.E., Kemsley, L., Dqvies, L., Holecek, M. and Berend, N. : The pulmonary response to sublethal thoracic irradiation in the rat. *Radiat. Res.* 136 : 15-21, 1993.
  4. Travis, E.L. : The sequence of histological changes in mouse lungs after single doses of X-rays. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 6 : 345-347, 1980.
  5. Maisin, J.R. : The ultrastructure of the lung of mice exposed to a supra-lethal dose of ionizing radiation on the thorax. *Radiat. Res.* 44 : 545-464, 1970.
  6. Slauson, D.O., Hahn, F.F., Benjamin, S. A., Chiffelle, T.L. and Jones, R.K. : Inflammatory sequences in acute pulmonary radiation injury. *Am. J. Pathol.* 82 : 549-572, 1976.
  7. Loyd, J.E., Bolds, J.M., Sheller, J.R., Duke, S.S., Gillette, A.W., Malcolm, A. W., Meyrick, B.O. and Brigham, K.L. : Acute effects of thoracic irradiation on lung function and structure in awake sheep. *J. Appl. Physiol.* 62 : 208-218, 1987.
  8. Fliss, H and Menard, M. : Rapid neutrophil accumulation and protein oxidation in irradiated rat lung. *J. Appl. Physiol.* : 2727-2733, 1994.
  9. 大道和宏 : 放射線肺炎・肺線維症の病態に関する実験的研究—気管支肺胞洗浄液所見を中心に—*広大医誌*, 36 : 811-823, 1988.
  10. Roberts, C.M., Foulcher, E., Zaunders, J. J., Bryant, D.H., Freund, J., Cairns D., Penny, R., Morgan, G.W. and Breit, S.N. : Radiation Pneumonitis: A possible lymphocyte-mediated hypersensitivity reaction. *Ann. Intern. Med.* 118 : 696-700, 1993.
  11. Springer, T.A. : Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration : the multistep paradigm. *Cell.* 76 : 301-314, 1994.
  12. Butcher, E.C. : Leukocyte-endothelial cell recognition : three steps to specificity and diversity. *Cell.* 67 : 1033-1036, 1991.
  13. Carlos, T.M., Harlan, J.M. : Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 84 : 2068-2101, 1994.
  14. Myerw, C.L., Wertheimer, S.J., Schembri-King, J., Parks, T. and Wallace, R.W. : Induction of ICAM-1 by TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , and LPS in human endothelial cells after downregulation of PKC. *Am. J. Physiol.* 263 : C767-C772, 1992.
  15. Pober, J.S., Gimbrone Jr., M.A., Lapierre, L.A., Mendrick, D.L., Fiers, W., Rothlein, R., and Springer, T.A. : Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J. Immunol.* 137 : 1893-1896, 1986.
  16. Makcay, F., Loetscher, H., Stueber, G., Gear, G., and Lesslauer, W. : Tumor necrosis factor-alpha induced cell to human endothelial cells is under dominant control of one TNF type, TNF-R55. *J. Exp. Med.* 177 : 1277-1286, 1993.
  17. Krutman, J. and Grewe, M. : Involvement of cytokines, DNA damage, and reactive oxygen intermediates in ultraviolet radiation induced modulation of intercellular adhesion molecule-1 expression. *J. Invest. Dermatol.* 105 : 67S-70S, 1995.
  18. Heckman, M., Eberlein-Konig, B., Wollenberg, A., Przybilla, B. and Plewig, G. : Ultraviolet-A radiation induces adhesion molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Br. J. Dermatol.* 131 : 311-318, 1994.
  19. Behrends, U., Peter, R.U., Hintermeier-Knabe, R., Eibner, G., Holler, E., Bornkamm, G.W., Caughman, S.W. and Degits, K. : Ionizing radiation induces human intercellular adhesion molecule-1 *in vitro*. *J. Invest. Dermatol.* 103 : 726-730, 1994.
  20. Hullahan, D., Kuchibhotla, J. and Wyble, C. : Cell adhesion molecules mediate radiation induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium. *Cancer Res.* 56 : 5150-5155, 1996.
  21. Hallahan, D., Clark, E.T., Kuchibhotla, J., Geweretz, B.L. and Collins, T. : E-selectin gene induction by ionizing radiation is independent of cytokine induction.

- Biochem. Biophys. Res. Comm. 217 : 784-795. 1995.
22. Wegner, C.D., Wolyniec, W.W., LaPlante, A.M., Marschman, K, Lubbe, K., Haynes, N., Rothlein, R. and Letts, L.G. : Intercellular adhesion molecule-1 contributes to pulmonary oxygen toxicity in Mice : Role of leukocytes revised. *Lung* 170 : 267-279, 1992.
  23. Takahashi, T., Yu, X., Schofield, B.H., Kleeberger, S.R., Scott, A.L., Hasagawa, S., and Spannhake, E.W. : Expression of ICAM-1 in airway epithelium after acute ozone exposure in the mouse. *J. Appl. Physiol.* 79 : 1753-1761, 1995.
  24. Griffin, R.L., Krzesicki, R., Filder, S.F., Rosenbloom, C.L., Auchampach, J.A., Manning, A.M., Haas, J.V., Cammarate, S.K., Chin, J.E. and Richards, I.M. : Attenuation of oxidant-induced lung injury by 21-Aminosteroids (Lazaroids) : Correlation with the mRNA expression for E-selectin, P-selectin, ICAM-1, and VCAM-1. *Environ. Health. Perspect.* 102 : 193-200, 1994.
  25. Burns, A.R., Takei, F., and Doerschuk, C.M. : Quantitation of ICAM-1 expression in mouse lung during pneumonia. *J. Immunol.* 153 : 3189-3198, 1994.
  26. Rubin, P., Finkelstein, J., and Shapiro, D. : Molecular biology mechanisms in the radiation induction of pulmonary injury syndromes : Interrelationship between the alveolar macrophage and the septal fibroblast. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 24 : 93-101, 1992.
  27. Finkelstein, J.N., Johnston C.J., Baggs, R., and Rubin, P. : Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor  $\beta$  gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis. *Int. J. radiat. Oncol. Phys.* 28 : 621-631, 1994.
  28. Johnston, C.J., Piedboeuf, B., baggs, R., Rubin, P., and Fikelstein., J.N. : Differences in correlation of mRNA gene expression in mice sensitive and resistant to radiation-induced pulmonary fibrosis. *Radiat. Res.* 142 : 197-203, 1995.
  29. Johnston C.J., Piedboeuf, B., Rubin, P., williams, J.P., Baggs, R., and Finkeltein J.N. Early and persistent alterations in the expression of interleukin-1  $\alpha$ , interleukin-1  $\beta$  and tumor necrosis factor  $\alpha$  mRNA levels in fibrosis-resistant and sensitive mice after thoracic irradiation. *Radiat. Res.* 145 : 762-767, 1996.
  30. Rubin, P., Johnston C.L., Williams J.P., McDonald, S., and Finkelstein, J.N. : A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 33 : 99-109, 1995.
  31. Hall, E.J. ed. *Radiobiology for the radiologist.* J.B. Lippincott Company, Philadelphia, P8-10. 1994.
  32. Stolpe, A., Caldenhoven, E., Stade, B.G., Koenderman, L., Raaijmakers J.A.M., Johnson, and Saag, P.T., : 12-o-Tetradecanolphorbol-13-acetate and tumor necrosis factor  $\alpha$  mediated induction of intercellular adhesion molecule-1 is inhibited by dexamethasone : functional analysis of the human intercellular adhesion molecule-1 promoter. *J. Biol. Chem.* 269 : 6185-6192, 1994.
  33. Ledebur H.C., Parks, T.P. : Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270 : 933-943, 1995.
  34. Read, M.A, Whitley, M.Z., Willeams, A, J., and Collins, T. : NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B  $\alpha$  : an inducible regulatory system in endothelial activation. *J. Exp. Med.* 179 : 503-512, 1994.
  35. Grether-Beck, S., Olaizola-Horn, S., Schmitt, H., Grewe, M., Jahnke, A., Jhonson, J.P., Briviba, K., Sies, H., and Krutmann, J. : Activation of transcription factor AP-2 mediates UVA radiation and singlet oxygen-induced expression of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 14586-14591.

36. Degitz, K., Lian-jie, L., and Caughman, W. : Cloning and characterization of the 5'-transcriptional regulatory region of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *J. Biol.Chem.* 226 : 14024-14030, 1990.
37. Brach, M.A., Hass, R., Sherman, M.L., Gunji, H., Weichselbaum, R., and Kufe, D. : Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor  $\kappa$ B. *J. Clin. Invest.* 88 : 691-695, 1991.
38. 橋村孝久, 河野通雄, 今城吉成 : 放射線肺臓炎の発症機序並びに予防に関する実験的研究—とくに脂質過化反応を中心として—. *日本医学放射線学会雑誌* 49 : 335-343, 1989.
39. Hong, J., Chiang, C., Campbell, I.L., Sun, Withers, and McBride, W.H. : Induction of acute phase gene expression by brain irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 33 : 619-626, 1995.
40. Paness, J., Anderson, D.C., Miyasaka, M., and Granger, D.N. : Role of leukocyte-endothelial cell adhesion in radiation induced microvascular dysfunction in rats. *Gastroenterology* 108 : 1761-1769, 1995.
41. Kawana, A., Shioya, S., Katoh, H., Tsuji, C., Tsuda, M., and Ohta, Y : Expression of intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 on alveolar macrophages in the acute stage of radiation-induced lung injury in rats. *Radiat. Res.* 147 : 431-436, 1997.
42. Archelos, J.J., Maurer, M., Jung, S., Toyka, K., Hartung, H.P. : Suppression of experimental allergic neuritis by antibody to the intercellular adhesion molecule ICAM-1. *Brain* 116 : 1043-1058, 1993.
43. Seko, Y., Matsuda, H., Kato, K., Hashimoto Y., Yagita, H., Okumura, K., and Yazaki, Y. : Expression of intercellular adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3. *J. Clin. Invest.* 91 : 1327-1336, 1993.
44. Cosmi, A.B., Conti, D., Delmonico, F.L., Preffer, F.I., Wee, S., Rothien, N.R., Fanes, R., and Colvin, R.B. : In vivo effects of monoclonal antibody to ICAM-1 (CD54) in nonhuman primates with renal allografts. *J. Immunol.* 144 : 4604-4612, 1993.
45. Isobe, M., Yagita, H., Okumura, K., and Ihara, A. : Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* 255 : 1125-1126, 1992.
46. Haug, G.E., Colvin, R.B., Delmonico, F. L., Auchincloss, H Jr., Tolckoff-Rubin, N., Preffer, F.I., Rothelein, R., Norris, S., Scharshmidt, L., Cosmi, A.B : A phase I trial of immunosuppression with anti ICAM-1 (CD54) mAb in renal allograft recipients. *Transplantation* 55 : 766-773, 1993.
47. Wegner C.D., Gundel., R.H., Reilly, P., Haynes, N., Letts, L.G., and Rothlein, R. : Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the pathogenesis of asthma. *Science* 247 : 456-459, 1990.
48. Pretolani, M., Ruffie, C., Lapae Silva, J. R., Joseph, D., Lobb, R.R, and Vargaftig, B.B. : Antibody to very late activation antigen-4 prevents antigen-induced bronchial hyperactivity and cellular infiltration in the guinea pig airways. *J. Exp. Med.* 180, 795-805, 1994.

A STUDY ON THE PATHOGENESIS OF THE RADIATION  
PNEUMONITIS  
—ALTERATIONS IN PULMONARY mRNA ENCODING  
ADHESION MOLECULES ICAM-1, VCAM-1, AND P-selectin  
FOLLOWING THORACIC IRRADIATION IN MICE.—

Kayoko Tsujino, Akihisa Kodama, and Michio Kono

Department of Radiology, Kobe University School of Medicine

ABSTRACT

To investigate the role of the adhesion molecules in the pathogenesis of the radiation pneumonitis, we quantified the mRNA expression of the adhesion molecules in the lung by Northern blot method following whole thorax irradiation to C57BL/6J mice. After irradiation of 12Gy to the whole thorax, there were increase of mRNA for ICAM-1 by 42% at 4 hours ( $p < 0.05$ ), 76% at 24hours ( $p < 0.01$ ) and 51% at 48hours ( $p < 0.05$ ) compared with controls. And it returned to control level at 1 week. No significant change was observed thereafter until 8 weeks. The expression of VCAM-1 mRNA were also increased by 49% ( $p < 0.01$ ) at 12hours and were still increased by 25% at 1 week. P-selectin mRNA were transiently increased by 59% at 12hours. We examined the relationship between the ICAM-1 induction and the radiation dose, and found that ICAM-1 expression was increased by 3 Gy of irradiation and it was increased in radiation dose dependent manner up to 24Gy. These early inductions of mRNA for ICAM-1, VCAM-1 and P-selectin in mice lungs following thoracic irradiation were transient but significant, and they were one of the most immediate change reported *in vivo*. It is suggested that these adhesion molecules are possibly related to the pathogenesis of the radiation pneumonitis.