



Title	放射線治療前および治療中における癌組織中フィブロネクチンの免疫組織化学的検討
Author(s)	西岡, 明人; 小川, 恭弘; 猪俣, 泰典 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1991, 51(9), p. 1087-1097
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/14783
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

放射線治療前および治療中における癌組織中 フィブロネクチンの免疫組織化学的検討

高知医科大学放射線医学教室

西岡 明人 小川 恭弘 猪俣 泰典 前田 知穂

高知医科大学第2解剖学教室

瀬 口 春 道

（平成2年9月20日受付）

（平成2年12月12日最終原稿受付）

Immunohistochemical Study of Fibronectin Expression in the Cancer Tissue Before and after Irradiation

Akihito Nishioka, Yasuhiro Ogawa, Taisuke Inomata and Tomoho Maeda

Department of Radiology, Kochi Medical School

Harumichi Seguchi

Second Department of Anatomy, Kochi Medical School

Research Code No. : 405.9

Key Words : Immunohistochemistry, Monoclonal antibody,
Fibronectin, Radiation therapy,
Cancer of the head and neck regions

We examined the expression and distribution of fibronectin in cancer tissues from 19 patients with cancer of the head and neck regions. Samples taken before and after irradiation with approximately 10 Gy and 20 Gy or 30 Gy were immunohistochemically stained by the avidin-biotin-horseradish peroxidase method using a monoclonal antibody against human fibronectin. No remarkable changes in the expression or distribution pattern of fibronectin were found between tissue specimens taken before and after each dose of irradiation. The prognosis, however, differed according to the pattern of fibronectin distribution. Eight patients in whom the cancer tissue was thickly encircled by fibronectin are alive without local recurrence or distant metastasis. Meanwhile, six patients in whom fibronectin was expressed faintly or focally (or scattered) in the cancer tissue died or developed recurrence soon after treatment. These findings indicate that the immunohistochemical analysis of fibronectin in cancer tissue exposed to irradiation may be applicable as a predictive assay in radiotherapy of cancer.

I. 緒 言

癌の放射線治療効果を検討するためには、その発生部位、臨床的進行度（TNM 分類，Stage），組織型及び分化度等についての十分な検索が必要であることは言うまでもないことである。しかしながら、これら諸条件が同一の症例においても、

その放射線治療効果が必ずしも一致しないことは臨床上市しばしば経験することである。従って、癌放射線治療効果のより詳細な検討のためには、それらに加えて、小線量放射線照射時に宿主に惹起される抗腫瘍免疫応答能や、放射線に対する個々の腫瘍の生物学的特性（腫瘍細胞自身、あるいは

腫瘍組織中に分布する血管の状態により決定される腫瘍組織の放射線感受性、腫瘍細胞の遠隔転移・局所浸潤能とその放射線による修飾等)の解析を総合的に行うことが重要であると思われる。

一方、細胞外マトリックスの構成要素に関する研究は、近年著しく進歩し、それらが単に細胞と細胞の間を埋めるためだけのものではなく、各構成要素間あるいは構成要素と細胞間の相互作用によって極めて多彩な現象(その中でも特に癌の遠隔転移・局所浸潤)に密接に関わっていることが知られるようになってきた。

しかし、癌組織中における細胞外マトリックスの発現とその放射線照射による変化が、癌の放射線治療効果にいかなる影響をもたらすかについての報告は未だみられず、人癌を対象とした報告も

皆無である。

そこで、我々は、腫瘍間質としての細胞外マトリックスとその放射線による変化が、癌の放射線治療効果にいかなる影響を及ぼすかを評価するために、細胞外マトリックス構成要素の代表的なものの1つであり、一般に癌の遠隔転移・局所浸潤に対しては抑制的に作用するといわれているフィブロネクチンにつき、その放射線治療前および治療中における癌組織中での発現度および分布様式を免疫組織化学的に解析し、個々の症例の予後との関連を検討した。

II. 対象および方法

1) 対象

1986年10月から1988年9月までの2年間に、高知医科大学付属病院放射線科において放射線治療

Table 1 Summarized data of patients studied

Case	Sex	Age	Site	TNM Stage ¹	Histology	Treatment
1	M	61	nasal cavity	T3N0M0 III*	PD-SCC	30Gy+op.
2	F	71	maxillary sinus	T3N1M0 III	WD-SCC	50Gy+chemo.+op.
3	M	62	maxillary sinus	T4N0M0 IV	WD-SCC	50Gy+chemo.+op.
4	M	75	maxillary sinus	T4N0M0 IV	WD-SCC	50Gy+chemo.+op.
5	M	65	maxillary sinus	T4N0M0 IV	WD-SCC	30Gy+chemo.+op.
6	M	40	tongue	T2N0M0 II	WD-SCC	30Gy+op.
7	M	50	tongue	T2N1M0 III	WD-SCC	30Gy+op.
8	M	84	tongue	T2N0M0 II	MD-SCC	60Gy
9	F	57	tongue	T3N2M0 IV	WD-SCC	80Gy
10	M	76	tongue	T3N2M0 IV	WD-SCC	60Gy
11	M	38	tongue	T2N0M0 II	WD-SCC	20Gy+op.
12	M	45	tongue	T2N0M0 II	WD-SCC	20Gy+chemo.+op.
13	M	66	parotid gland	T3bN0M0 III	PD-SCC	30Gy+op.
14	F	57	epipharynx	T2N3M0 IV	PD-SCC	30Gy+chemo.
15	M	60	larynx	T4N1M0 IV	MD-SCC	20Gy+op.
16	M	60	larynx	T3N1M0 III	MD-SCC	20Gy+op.
17	M	87	hypopharynx	T2N0M0 II	PD-SCC	60Gy
18	M	66	oral floor	T1N0M0 I	WD-SCC	60Gy
19	M	75	buccal mucosa	T4N0M0 IV	SCC	40Gy+chemo.

¹UICC Classification (1987)

WD-SCC=well differentiated squamous cell carcinoma

MD-SCC=moderately differentiated squamous cell carcinoma

PD-SCC=poorly differentiated squamous cell carcinoma

op.=operation; chemo.=chemotherapy

*refer to UICC classification of maxillary cancer

を施行した頭頸部領域癌の初回治療患者のうち19例を対象とした (Table 1). その内訳は, 舌癌 7 例, 上顎癌 4 例, 喉頭癌 2 例, 鼻腔癌, 耳下腺癌, 上咽頭癌, 下咽頭癌, 口腔底癌, 頬粘膜癌が各 1 例であり, 全例扁平上皮癌であった. 年齢は, 38 歳から 87 歳までで, 平均年齢は, 63 歳であった. また, 男女比は, 男性 16 例に対し女性 3 例となっていた. 治療計画は, 原則的に Fletcher のテキストに記載されている方法に準じて行い¹⁾, 照射は Linear accelerator ML-15MIII (三菱電機 K.K.) の 10MV X 線を用いて, 単純分割, 1 回腫瘍線量 2Gy, 週 5 回法を主体とした.

2) 方法

a) モノクローナル抗体 (Table 2)

使用したモノクローナル抗体は, Hybritech 社のマウス抗ヒトフィブロネクチン抗体であり, ヒト羊水中のフィブロネクチンで免疫された Balb/C マウスの脾細胞とマウスミエローマ細胞とのハイブリドーマより産生される IgG 1 クラスの抗体である. 反応はヒトフィブロネクチンに比較的特異的であるが, ニワトリフィブロネクチンと強く, またラットおよびウシフィブロネクチンとわずかに交差反応性を有すると言われている.

b) 免疫ペルオキシダーゼ染色

免疫組織化学的染色法としては, Warnke と Levy により開発された Avidin-Biotin-horseradish peroxidase 法 (ABC 法) に若干の改良を加えて用いた²⁾. ABC 法は, Avidin と Biotin の極めて強い親和性 (Affinity constant: 10^{-15} M) を利用したもので, 特異性, 感受性ともにすぐれており, 現在, 一般に広く使用されている方法である³⁾⁴⁾. この方法は, 第 1 段階で目的とする抗原 (本研究の場合ヒトフィブロネクチン) にその抗原に対するモノクローナル抗体 (mouse IgG) が結合し, 第 2 段階で Biotin 標識抗マウス IgG 抗体がモノクローナル抗体に結合, 第 3 段階で Horseradish Peroxidase を標識した Avidin が Biotin に結合し, Peroxidase の作用によって DAB (3,3-diaminobenzidine) が褐色に発色するという機序により目的とする抗原を同定する⁵⁾. 本研究においてはそのためのキットとして Vector 社製

Table 2 Monoclonal antibody

	anti-fibronectin
producer	Hybritech
immunogen	human fibronectin(amniotic fluid)
hybridoma	murine myeloma × Balb/C mouse spleen cells
class	IgG1(mouse)
specificity	human fibronectin and others

Vectastain™ ABC キットを使用した⁶⁾.

c) 操作手順

1. 放射線治療前, 10Gy 照射後, 20Gy あるいは 30Gy 照射後の各時期において癌組織辺縁部より生検にて 5mm 角程度の検体を採取し, 速やかに液体窒素中に凍結保存する. 尚, 放射線照射後の生検は, 原則として 24 時間以内に実施した.

2. 凍結検体からクライオスタットを用いて 6 μ m 厚の切片を作成し, 約 1 時間風乾する.

3. 10 分間アセトン固定し, その後 30 分間以上再度風乾する.

4. PBS (Phosphate Buffered Saline: 7.5g/l of K_2HPO_4 , 1.3g/l of $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ and 7.2g/l of NaCl) で 5 分間 incubation した後, ヒトフィブロネクチンに対するモノクローナル抗体約 10 μ g を滴下し 30 分間 incubation する.

5. PBS で数回洗浄したのち Biotin 標識抗マウス IgG 抗体約 0.7 μ g を滴下し 30 分間 incubation する.

6. 0.15% peroxide を含んだ PBS 中に短時間浸し内因性 peroxidase をブロックする.

7. PBS で十分に洗浄したのち Peroxidase 標識 Avidin 約 4 μ g を滴下し 30 分間 incubation する.

8. PBS で数回洗浄したのち 0.3% peroxide を含んだ PBS 0.1ml にて溶解した DAB 0.3mg を滴下し数分間 incubation, その後 PBS にて十分に洗浄する.

9. ヘマトキシリンにてカウンター染色を行った後マウントする.

尚, モノクローナル抗体滴下以降の各 incubation は, 組織切片の乾燥を防止するために, すべ

て湿潤状態にて行った。また、内因性 peroxidase ブロック後の PBS には、DAB を溶解するために Thimerosal を 20mg/l 加えた。

d) コントロール実験

フィブロネクチンに対するモノクローナル抗体のかわりにマウスミエローマ細胞 (Sp2/0) の培養液上澄を添加した検体を同時に作成し、ネガティブコントロールとして使用した。

e) 染色標本の解析と予後との関連の検討

フィブロネクチンの存在部位は組織切片上では褐色に染色される部位として認識されるので、染色標本を光学顕微鏡にて観察し、癌組織中のフィブロネクチンの発現度および分布様式を解析す

る。そして、それらの結果と個々の症例の予後との関連を検討した。フィブロネクチンの発現度は、全然認められないものを (－)、軽度認められるものを (+)、中等度認められるものを (++)、高度に認められるものを (+++) として 4 段階に評価した。また、分布様式は、フィブロネクチンが腫瘍組織を取り囲んでいるものを Encircle (E)、腫瘍組織中に瀰漫性に認められるものを Diffuse (D)、腫瘍組織中に巣状あるいは散在性に認められるものを Focal (F) として区別した。

Table 3 Fibronectin expression and distribution, antitumor effect and prognosis

Case	expression & distribution of fibronectin ²			Antitumor effect of irradiation ³	prognosis ⁴	
	0 Gy	10 Gy	20 or 30 Gy			
1	D++	D++	D+	III	Fair : alive +	3.5 years
2	E+	E++		II b	Good : alive -	2.5 years
3	F+	F+		II b	Fair : alive +	3 years
4	E+	E++	E++	II b	Good : alive -	2 years
5	E++	E++	E+	III	Good : alive -	2 years
6	E++	E++		III	Good : alive -	3 years
7	—	—		II a	Poor : dead	10 months
8	F++	F++		II a	Poor : dead	6 months
9	F+	F++		II a	Poor : dead	1 yer
10	E++	E++	E++	III	Good : alive -	2 years
11		E++		II b	Good : alive -	3 years
12	E+			III	Good : alive -	2 years
13	D+	D+		II b	Good : alive -	3.5 years
14	F++	F++	F++	II a	Poor : dead	1.5 years
15	D++	D+	D+	II a	Fair : alive +	2 years
16	D+	D+		II a	Good : alive -	2 years
17	D+	D+		III	Good : alive -	2 years
18	E++	E++		III	Good : alive -	2 years
19		—		II a	Poor : dead	8 months

²D : diffuse=Fibronectin distributes diffusely in cancer tissue

F : focal=Fibronectin distributes focally in cancer tissue

E : encircled=Cancer tissue is encircled by fibronectin

³Ohboshi and Shimamoto's classification for effect of radiotherapy

⁴+ : with local recurrence or distant metastasis

— : without local recurrence or distant metastasis

III. 結 果 (Table 3)

1) 腫瘍組織におけるフィブロネクチンの発現度, 分布様式の病巣線量による変化

腫瘍組織中のフィブロネクチンの発現度が4段階評価において病巣線量の違いにより変化した症例は, 症例1, 2, 4, 5, 9, 14, 15の7症例であり, 変化のみられなかった症例は, 症例3, 6, 7, 8, 10, 13, 16, 17, 18の9症例であった。病巣線量の違いにより変化のみられた症例のうちほとんどすべての症例ではその変化はごく軽度なものであり, また一定の傾向も見られなかった。分布様式の変化に関しては, 2時点以上の解析をし得た16症例全例で明らかな変化を認め得なかった。

2) フィブロネクチンの発現度, 分布様式と発生部位, 臨床病期, 分化度との関係

分布様式と発生部位との関係については, 上顎癌4例中3例が(E)タイプ(他の1例は(F)タイプ), また舌癌7例中4例が(E)タイプ(他は, 2例が(F)タイプ, 1例が発現度(-))であり, その他の癌8例中5例が(D)タイプ(他は, (F)タイプ, (E)タイプ, 発現度(-)が各1例ずつ)となっていた。分布様式と分化度との関係では, 高分化型癌11例中8例が(E)タイプ(他の3例は(F)タイプ), 中及び低分化型癌7例中5例が(D)タイプ(他の2例は(F)タイプ)であった。しかし, 上顎癌の全例及び舌癌7例中6例が高分化型癌であり, その他の癌8例中6例が中あるいは低分化型癌となっており, 発生部位と分化度とのあいだに若干の片寄りがみられた。次に, 分布様式とTNM分類, 病期との関係であるが, (F)タイプの症例にN因子においてやや進行したものが多く, そのために病期も全体的にみると軽度進行していたが, いずれも有意の差ではなかった。尚, 発現度と発生部位, 病期, 分化度とのあいだには, 一定の傾向はみられなかった。

3) フィブロネクチンの発現度, 分布様式と長期予後との関係

分布様式が(E)タイプの症例8例は, 全例とも遠隔転移, 局所再発を認めず現在に至っており, 良好な経過となっている(Fig. 1)。反対に, 分布

様式が(F)タイプあるいは発現度が(-)の症例6例はいずれも, 放射線治療後早期に, 遠隔転移や局所再発がみられ, 症例7, 8, 9, 14, 19はすでに死亡した(Fig. 2)。また, 分布様式が(D)タイプの症例は, 5例のうち3例(症例13, 16, 17)には遠隔転移, 局所再発ともみられていないものの, 残り2例(症例1, 15)には遠隔転移あるいは局所再発がみられた(Fig. 3)。

4) 抗腫瘍効果について

放射線による抗腫瘍効果を大星, 下里の効果判定基準に従って評価した⁷⁸⁾。評価は, 原則として手術(照射終了から約2週間後に実施)がなされた症例においては手術標本の病理学的検索結果をもとに行い, 手術がなされなかった症例においては照射終了後の臨床症状および生検の結果をもとに行った。従って, 各症例において照射線量, 照射終了から検索組織採取までの期間に差があることは否定できないが, 分布様式が(E)タイプ(予後良好例)の症例にGrade III, Grade IIbのものが多く, 分布様式が(F)タイプあるいは発現度が(-)の症例(予後不良例)にGrade IIaのものが多く傾向はやはりみられた。

IV. 考 察

癌の放射線治療効果をより詳細に検討するためには, 治療前における腫瘍の進展範囲や, 所属リンパ節および遠隔部への転移の有無, 組織型・分化度等に関する正確な把握が必要であることは言うまでもないことであるが, それらに加えて小線量放射線照射時に宿主に惹起される抗腫瘍免疫応答能を検討することや, 放射線に対する個々の癌の生物学的特性を理解することも極めて重要である⁹⁾。そして, 個々の癌の生物学的特性に関しては, その放射線感受性と遠隔転移・局所浸潤能の把握が特に問題となるものと思われる。

一方, 細胞外マトリックス構成要素に関する研究の進歩は近年著しく, それらが極めて多くの生理活性を有すること, そしてまた, 癌の遠隔転移・局所浸潤にも密接に関わっていることが明らかとなってきた。フィブロネクチンは, 1948年に Morrison らによって発見され¹⁰⁾, 1970年 Mosesson と Umfleet によりヒト血漿中からはじめて抽出され

Immunohistochemical staining of fibronectin in cancer tissue. Fibronectin positive sites were stained brown.

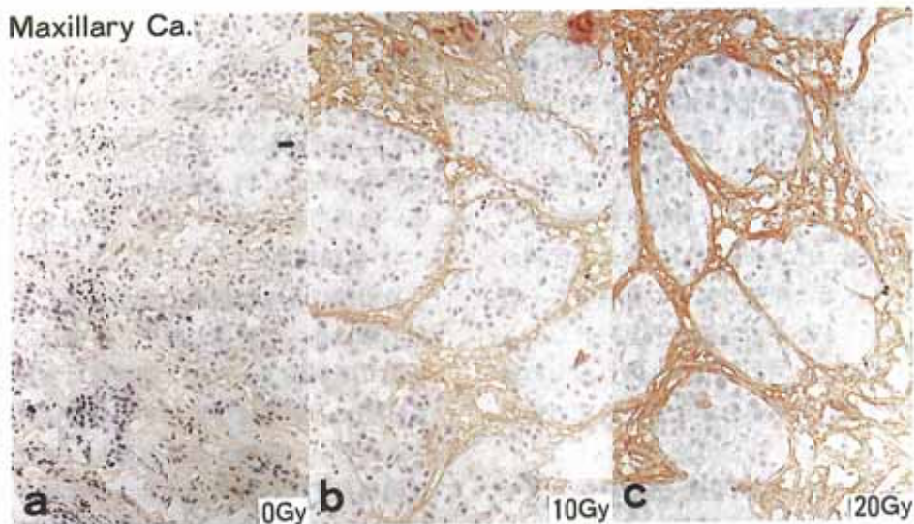


Fig. 1 Maxillary cancer tissue from a patient (case 4) before irradiation (Fig. 1a), after 10Gy (Fig. 1b) and 20Gy irradiation (Fig. 1c). Cancer tissue was encircled by fibronectin. $\times 200$.

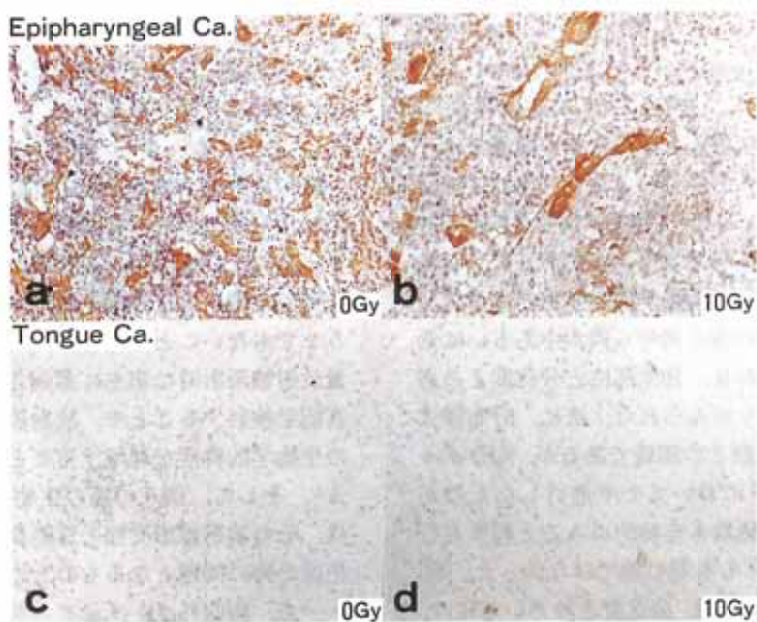


Fig. 2a, 2b Epipharyngeal cancer tissue from a patient (case 14) before irradiation (Fig. 2a) and after 10Gy irradiation (Fig. 2b). Fibronectin was focally distributed in cancer tissue. $\times 200$.

Fig. 2c, 2d Tongue cancer tissue from a patient (case 7) before irradiation (Fig. 2c) and after 10Gy irradiation (Fig. 2d). Fibronectin was faintly expressed in cancer tissue. $\times 200$.

Ca. of the nasal cavity

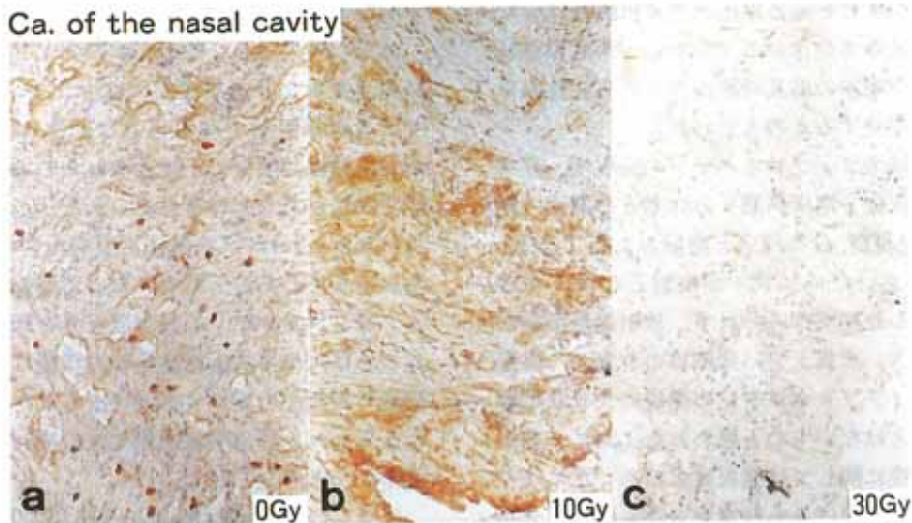


Fig. 3 Cancer tissue of nasal cavity from a patient (case 1) before irradiation (Fig. 3a), after 10Gy (Fig. 3b) and 30Gy irradiation (Fig. 3c). Fibronectin was diffusely distributed in cancer tissue. $\times 200$.

た高分子糖タンパク質であり¹¹⁾、それら細胞外マトリックス構成要素のなかの代表的なものの一つである。現在ではその塩基配列、アミノ酸の一次構造等にいたるまで詳細な分子生物学的研究がなされ¹²⁾¹³⁾、基本的には各々の分子量が250KDaのふたつのサブユニットからなる2量体であること、分子中に6個の機能的ドメインをもち¹⁴⁾、細胞との接着に際し極めて重要なRGD配列¹⁵⁾¹⁶⁾やヘパリン、フィブリン、コラーゲンとの結合部位を有することなども明らかにされている。生理作用に関しても細胞の接着¹⁷⁾、伸展、移動の促進¹⁸⁾、細胞分化の調節、貪食能¹⁹⁾、組織修復の促進^{20)~22)}等多くの作用が報告されており^{23)~25)}、また、細胞の癌化に伴ってその表面から激減するとか²⁶⁾²⁷⁾、*in vivo*、*in vitro*の実験系において癌細胞の転移能および浸潤能を減弱させるといった報告^{28)~31)}からもわかるように、細胞の癌化³²⁾³³⁾および癌の遠隔転移・局所浸潤にも密接にかかわっている³⁴⁾³⁵⁾。

故に、癌の放射線治療効果の検討に際して、癌組織中のフィブロネクチンの発現と放射線照射によるその変化を解析することは、非常に重要なことであると思われる。しかしながら、癌組織におけるフィブロネクチンの発現を検討した報告に関

しては、唾液腺癌³⁶⁾、肺癌³⁷⁾、乳癌^{38)~40)}、上部消化管癌³⁶⁾⁴¹⁾および大腸直腸癌⁴²⁾⁴³⁾、子宮癌や卵巣癌⁴⁴⁾等でみられるものの、放射線治療前後における癌組織中のフィブロネクチンの発現とその変化の有無を解析し、さらに予後との関連を検討した報告は未だみられない。このような理由から、我々は放射線照射前後の癌組織中のフィブロネクチンを免疫組織化学的に染色し検討を行った。

まず、放射線照射前後における癌組織中フィブロネクチンの発現度の変化であるが、各症例ともに病巣線量の違いにより若干の変化が見られたことは否定できないものの、変化はいずれも著明なものではなく、4段階評価においても不変あるいは軽度の変化のみでみられるのみであった。また病巣線量の違いによるフィブロネクチンの分布様式の変化については評価し得た全症例において認められなかった。これらのことより、放射線治療前および治療中において癌組織中のフィブロネクチンの発現状態には明らかな変化はなく、30Gy程度までの放射線照射が癌組織中のフィブロネクチンに与える影響はあまり大きくはないものと考えられた。またこの結果は、少なくとも小線量の放射線照射がすぐに、癌間質としての細胞外マトリッ

クスの断裂を生ぜしめる原因となる可能性は少なく、それによってひきおこされることが危惧される癌の浸潤、転移の助長の原因となる可能性も少ないことを意味するものと思われた。

次に癌組織中フィブロネクチンの発現度、分布様式と発生部位・臨床病期・分化度との関連であるが、まず発現度、分布様式と病期およびT因子、N因子とのあいだには我々が検討した限りにおいては明らかな相関はみられず、放射線治療前の腫瘍の大きさ、所属リンパ節転移の有無が、直接癌組織中のフィブロネクチンの発現に大きな影響を及ぼすことはないものと思われた。次に、発生部位と分化度に関しては発現度とのあいだにはやはり明らかな傾向はみられなかったものの、分布様式とのあいだには若干の相関がみられた。しかし、これは、癌組織中フィブロネクチンの発現度、分布様式が癌の発生部位あるいは分化度によって決定されると考えるよりはむしろ、それらが個々の癌の生物学的特性を反映した結果として、発生部位、分化度とのあいだにある程度の相関がみられたと考えるべきであろうと思われた。

最後に、フィブロネクチンの発現度、分布様式と予後との関係であるが、これには明らかな相関が見られた。即ち、フィブロネクチンが癌組織を厚く取り囲んでいた8症例では、いずれも現在まで遠隔転移、局所再発が認められておらず、予後良好であるが、フィブロネクチンの発現度が(一)あるいは分布様式が巣状または散在性であった6症例ではいずれも、治療後早期に遠隔転移もしくは局所再発がみられた。フィブロネクチンが癌組織中に瀰漫性に認められた5症例については予後はさまざまであった。この結果は、フィブロネクチンの発現度、分布様式と予後とのあいだに密接な関係があることを示唆し、諸家の報告にもあるように、フィブロネクチンが癌の遠隔転移・局所浸潤に対して抑制的に作用することを示すものと考えられた。そして、さらに、実際の人癌においてフィブロネクチンによる抑制効果が十分に発揮されるためには、フィブロネクチンの存在自体による化学的抑制作用と、癌組織を取り囲むという物理的抑制作用の両者が必要であることを示唆

するものと思われた。

以上の結果から、癌組織中のフィブロネクチンの発現度および分布様式には少なくとも30Gyまでの放射線照射では明らかな変化はみられないが、放射線治療後の予後とそれらのあいだには密接な関係があるものと考えられた。このことは、見方をかえれば、(放射線治療前を含めて)30Gy照射時までのある一時点において癌組織中におけるフィブロネクチンの発現度と分布様式を検討することは、その放射線治療後の予後に関し、ある程度の推測を可能にするということを意味するものと思われ、癌放射線治療効果の検討上重要な要因の一つと考えられた。

ただし、癌放射線治療後の予後に関していえば、實際上フィブロネクチンの発現度、分布様式のみによって決定される可能性は少ないものと思われ、それは複雑に絡み合って関与している多くの予後決定要因のうちの一つにしかすぎないと考えべきであろう。そして、それら多くの予後決定因子の総合的な検討が最も重要であると思われる。我々は、これまでに、癌の放射線治療効果の検討においては小線量放射線(ヒトの場合約10Gy)照射時に惹起される宿主の抗腫瘍免疫応答能が重要であることをマウスの実験系^{45)~47)}及び人癌^{48)~50)}で報告し、特にヒトにおいてはヘルパーTリンパ球の浸潤とHLA-DR抗原の発現が重要であることを見いだしている⁵¹⁾⁵²⁾。従って、小線量放射線(約10Gy)照射時に癌組織中のフィブロネクチンの発現度、分布様式を検討することに加えて、ヘルパーTリンパ球の浸潤、HLA-DR抗原の発現を検討すれば、より正確な治療効果及び予後の推定が可能になるものと思われる。さらに現在我々は、放射線照射癌組織中のラミニン、微小血管(抗 von Willebrand 因子抗体使用)の検討および癌細胞の activity の検討(抗 DNA polymerase α 抗体使用)についても開始しており、これらを総合的に検討することが癌放射線治療の感受性試験の開発に大きく寄与するものと考えている。

V. 結 語

癌の放射線治療におけるフィブロネクチンの変化と治療効果との関係を検討するために、放射線

治療前, 10Gy 照射直後, 20Gy あるいは30Gy 照射直後の癌組織中のフィブロネクチンを免疫組織化学的に染色し解析した。対象は、頭頸部領域癌19例であり、染色には、ヒトフィブロネクチンに対するモノクローナル抗体と、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法を用いた。結果、放射線治療前および治療中におけるフィブロネクチンの発現度および分布様式には、明らかな変化はみられなかった。しかし、予後に関しては、フィブロネクチンが癌組織を厚く取り囲んでいた8例においては良好であったが、癌組織中に散在性あるいは巣状に発現していた4例および発現がほとんど認められなかった2例においては不良であったことから、癌組織中のフィブロネクチンの発現、特にその分布様式と予後の間に密接な関係のあることが示唆された。故に、小線量放射線照射時に宿主の抗腫瘍免疫応答能や癌細胞の activity 等を検討することに加えて、これら細胞外マトリックスの検討を行い、それらを総合的に評価することにより、更に有用な癌放射線治療の感受性試験の開発が可能になるものと思われた。

稿を終えるにあたり、複雑な生検を施行していただき、さらに貴重な手術標本を提供くださいました齊藤春雄教授をはじめとする高知医科大学耳鼻咽喉科学教室の諸先生方および尾崎登喜雄教授をはじめとする同歯科口腔外科学教室の諸先生方に深甚なる謝意を表します。また、直接研究に協力いただきました高知医科大学放射線医学教室の皆様にも感謝いたします。

文 献

- 1) Fletcher GH: Head and neck; In Fletcher, Textbook of radiotherapy, p229-443 (Lea and Febiger, Philadelphia 1980)
- 2) Warnke R, Levy R: Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: A biotin-Avidin-Horseradsh-Peroxidase Method. J Histochem Cytochem 28: 771-776, 1980
- 3) Bayer FA, Wilche KM: The avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. Trends Biochem Sci 3: 257-259, 1978
- 4) Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. J Histochem Cytochem 27: 1131-1136, 1980
- 5) Wood GS, Warnke R: Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and relevance to biotin-avidin detection system. J Histochem Cytochem 29: 1196-1204, 1981
- 6) 基礎免疫研究用試薬キット ABC システム実験法 (その1). Vectastain™ ABC キットの使用の実際について, フナコシ技術レポート⑩, 1981
- 7) 大星章一, 下里幸雄, 梅垣洋一郎, 他: 癌放射線治療の病理. I. 癌組織の治療過程の組織学的追跡, 医学のあゆみ, 61: 618-625, 665-671, 1967
- 8) Shimamoto Y, Ohboshi S, Baba K: Histological evaluation of effects of radiotherapy and chemotherapy for carcinomas. Jpn J Clin Oncol 1: 19-35, 1971
- 9) Nishioka A, Ogawa Y, Maeda T, et al: Application of immunohistochemistry for prospective assay in cancer radiotherapy. 2. Special reference to composition of tumor matrix and vascularity. Radiat Syst Res Suppl 5: 225-228, 1988
- 10) Morrison PR, Edsall JT, Miller SG: Preparation and properties of serum and plasma protein XVIII. The separation of purified fibrinogen from fraction I of human plasma. J Amer Chem Soc 70: 3103-3108, 1948
- 11) Mosesson MW, Umfleet RA: The cold-insoluble globulin of human plasma. J Biol Chem 245: 5728-5736, 1970
- 12) 林 正男, 平野英保: フィブロネクチンの構造と機能, 蛋核酵, 28: 169-181, 1983
- 13) Hynes R: Molecular biology of fibronectin. Ann Rev Cell Biol 1: 67-90, 1985
- 14) Hayashi M, Yamada KM: Domain structure of the carboxyl-terminal half of human plasma fibronectin. J Biol Chem 258: 3332-3340, 1983
- 15) Pierschbacher MD, Ruoslahti E: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. Nature 309: 30-33, 1984
- 16) Ruoslahti E, Pierschbacher MD: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science 238: 491-497, 1987
- 17) Yamada KM, Yamada SS, Pastan I: Cell surface protein partially restores morphology, adhesiveness, and contact inhibition of movement to transformed fibroblasts. Proc Nat Acad Sci USA 73: 1217-1221, 1976
- 18) Duband JL, Thiery JP: Distribution of fibronectin in the early phase of avian cephalic neural crest cell migration. Dev Biol 93: 308-323, 1982
- 19) Bevilacqua MP, Amrani D, Mosesson MW, et al: Receptors for cold-insoluble globulin

- (plasma fibronectin) on human monocytes. *J Exp Med* 153: 42—60, 1981
- 20) Gudewicz PW, Molnar J, Lai MZ, et al: Fibronectin-mediated uptake of gelatin-coated latex particles by peritoneal macrophages. *J Cell Biol* 87: 427—433, 1980
 - 21) 松田道生: フィブロネクチンおよびその関連物質と組織修復, 結合組織, 13: 177—184, 1982
 - 22) McDonald JA, Kelly DG, Broekelmann TJ: Role of fibronectin in collagen deposition: Fab' to the gelatin-binding domain of fibronectin inhibits both fibronectin and collagen organization in fibroblast extracellular matrix. *J Cell Biol* 92: 485—492, 1982
 - 23) Pearlstein E, Gold LI, Garcia-Pardo: Fibronectin: A review of its structure and biological activity. *Mol Cell Biochem* 29: 103—128, 1980
 - 24) Ruoslahti E, Engvall E, Hayman E: Fibronectin: Current concept of its structure and functions. *Coll Res* 1: 95—128, 1981
 - 25) Yamada KM: Fibronectin (Mosher DF ed.), Academic Press, New York, p47—121, 1988
 - 26) Hynes R: Cell surface proteins and malignant transformation. *Biochem Biophys Acta* 458: 73—107, 1976
 - 27) Vahri A, Mosher DF: High molecular weight, cell surface-associated glycoprotein (fibronectin) lost in malignant transformation. *Biochem Biophys Acta* 516: 1—25, 1978
 - 28) Smith HS, Riggs JL, Mosesson MW: Production of fibronectin by human epithelial cells in culture. *Cancer Res* 39: 4138—4144, 1979
 - 29) Murray JC, Liotta LA, Rennard SI, et al: Adhesion characteristics of murine metastatic and nonmetastatic tumor cell in vitro. *Cancer Res* 40: 347—351, 1980
 - 30) Terranova VP, Williams JE, Liotta LA, et al: Modulation of the metastatic activity of melanoma cells by laminin and fibronectin. *Science* 226: 982—985, 1984
 - 31) Humphries MJ, Olden K, Yamada KM: A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 233: 467—470, 1986
 - 32) Yamada KM, Olden K: Fibronectins—Adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature* 275: 179—184, 1978
 - 33) Stenman S, Vaheri A: Fibronectin in human solid tumors. *Int J Cancer* 27: 427—435, 1981
 - 34) Vlodavsky I, Gospodarowicz D: Respective roles of laminin and fibronectin in adhesion of human carcinoma and sarcoma cell. *Nature* 289: 304—306, 1981
 - 35) Mensing H, Albini A, Krieg T, et al: Enhanced chemotaxis of tumor-derived and virus-transformed cells to fibronectin and fibroblast-conditioned medium. *Int J Cancer* 33: 43—48, 1984
 - 36) D'Ardenne AJ, Burns BC, Bennett MK: Fibronectin and type III collagen in epithelial neoplasms of gastrointestinal tract and salivary gland. *J Clin Pathol* 36: 756—763, 1983
 - 37) 大橋昌彦, 臼田信光, 飯田 太, 他: 原発性肺癌組織における Fibronectin の局在様式, 癌の臨床, 32: 1787—1794, 1986
 - 38) Labot-Robert J, Birembaut P, Robert L: Loss of fibronectin in human breast cancer. *Cell Biol Int Res* 4: 609—616, 1980
 - 39) Asch BB, Kamat BR, Burstein N: Interaction of normal, dysplastic, and malignant mammary epithelial cells with fibronectin in vivo and in vitro. *Cancer Res* 41: 2115—2126, 1981
 - 40) Stampfer MR, Vlodavsky I, Smith HS, et al: Fibronectin production by human mammary cells. *JNCI* 67: 253—261, 1981
 - 41) 前田 守: 胃癌組織における fibronectin および関連血漿蛋白の分布—胃癌間質線維化形成に関する考察, 日外会誌, 11: 1454—1462, 1984
 - 42) 松田泰次, 浜田 宏, 安富正幸: 大腸組織における酵素抗体法による fibronectin の組織化学的研究, 日消外会誌, 15: 1798—1806, 1982
 - 43) Niemczuk P, Perkins RM, Critchley DR, et al: Lack of correlation between metastasis of human rectal carcinoma and the absence of stromal fibronectin. *Br J Cancer* 45: 500—505, 1982
 - 44) 高橋修三, 斉藤良治, 真木正博, 他: 婦人科における悪性腫瘍とフィブロネクチン, 最新医学, 39: 2066—2069, 1984
 - 45) 広田佐栄子, 小川恭弘, 前田知穂, 他: マウス放射線照射腫瘍組織浸潤リンパ球サブセットのモノクローナル抗体による解析, 日本医放会誌, 45: 663—665, 1985
 - 46) 広田佐栄子, 小川恭弘, 瀬口春道: マウス放射線照射腫瘍組織浸潤リンパ球サブセットのモノクローナル抗体による解析, 日本医放会誌, 46: 1331—1349, 1986
 - 47) Hirota S, Ogawa Y, Seguchi H: Histological analysis of lymphocyte subsets infiltrated into mouse tumor tissue exposed to local irradiation. *Oncology* 44: 312—318, 1987
 - 48) 浜田富三雄, 小川恭弘, 前田知穂, 他: 放射線治療中の癌組織浸潤リンパ球サブセットの変動—モ

ノクローナル抗体による解析一, 日本医放会誌,
45: 407—426, 1985

- 49) Ogawa Y, Maeda T, Seguchi H, et al: Evidence of existence of low dose radiation induced tumor immunity. *Nippon Act Radiol* 47: 845—848, 1987
- 50) Ogawa Y, Maeda T, Seguchi H, et al: Immunohistochemical study of mononuclear cell infiltrates in squamous cell carcinoma of oral cavity and paranasal sinus. *Oncology* 44: 219—223, 1987
- 51) Ogawa Y, Maeda T, Seguchi H, et al: Infiltration of Leu-3a+3b-positive lymphocytes and expression of human leukocyte antigen DR on tumor tissue induced by radiation therapy. *Oncology* 45: 18—20, 1988
- 52) Ogawa Y, Maeda T, Seguchi H, et al: Application of the immunohistochemical method as a predictive assay in radiotherapy of squamous cell carcinoma of oropharynx and hypopharynx. *Oncology* 47: 155—159, 1990
-