



Title	腫瘍に対する放射線局所照射と免疫細胞反応について-MM46腫瘍およびEhrlich腫瘍胆癌C3H/Heマウスを用いた酸素組織科学的検討-
Author(s)	今中, 一文
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1983, 43(2), p. 355-369
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/15077
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

腫瘍に対する放射線局所照射と免疫細胞反応について —MM46腫瘍およびEhrlich腫瘍担癌C3H/Heマウス を用いた酵素組織化学的検討—

神戸大学医学部放射線医学教室（指導 木村修治教授）

今 中 一 文

（昭和57年2月12日受付）

（昭和57年5月17日最終原稿受付）

The Experimental Study on Dose Related Tumor-cell-destruction and Mononuclear Cell Reaction—Histoenzymatical Study on Topical MM46-tumor or Ehrlich-tumor Inoculated in C3H/He Mice.

Kazufumi Imanaka

Department of Radiology, Kobe University School of Medicine
(Director: Prof. Shuji Kimura)

Research Code No.: 405.9

Key Words : Anti-tumor cell-mediated immunity, Histochemical enzymatic study,
MM46-tumor, Ehrlich-tumor, Dexamethasone

Radiotherapy is carried out more completely not only by killing directly tumor cells, but also by helping of host's immunological response against the rest tumor cells. In this study, firstly, the relationship between irradiation dose and stromal reaction, especially of lymphocytic infiltration was investigated, and secondly the influence of the administration of dexamethasone for the topical tumor tissue with local irradiation was investigated.

1) Irradiation dose and stromal reaction : MM46-tumor or Ehrlich-tumor inoculated in the thigh of the C3H/He mice were subjected to local electron-irradiation at the dose of 1,000, 2,000, 3,000 or 4,000 rad, and the other, which served as the unirradiated control. The mice were killed on days 1,3,5,7,10, 14 after irradiation, and resected tumor tissues were examined histologically and enzymatically using H.E. staining and α -naphthyl acetate esterase staining.

2) The influence of dexamethasone : A half number of MM46-tumor bearing C3/He mice was administered dexamethasone intraperitoneally. The tumor-bearing mice with or without administration of dexamethasone were subjected to local electron irradiation at the dose of 2,000 or 3,000 rad, and the others were not irradiated. The mice were killed, and resected tumor tissues were examined as same as above. Lymphocytic infiltration was definitely observed about on day 7 with no relation to irradiation dose and transplanted tumor species, and later, plasma cells and fibroblasts more infiltrated around tumor cells. In correlation with irradiated dose, the most intensive lymphocytic infiltration was observed in the group exposed to 2,000 rad in MM46-tumor bearing mice, and 3,000 rad in Ehrlich-tumor bearing mice respectively.

Characteristic discrete granules were observed in the cytoplasms, and the lymphocytes which infiltrated the area around the tumor tissue were identified as T-cells, histoenzymatically.

In the groups with administration of dexamethasone stromal lymphocytic infiltration was scarcely

found, where as plasma cells and histiocytes were relatively more infiltrated.

It is concluded that there would be an optimal dose for the most effective immunological resistance against topical tumor cells, and dexamethasone suppressed the local immune response.

目 次

- I. 緒言
- II. 実験材料および方法
 - 1) 照射方法および腫瘍測定
 - 2) MM46 腫瘍に関する腫瘍局所組織像の検討
 - 3) Ehrlich 腫瘍に関する腫瘍局所組織像の検討
 - 4) ステロイドの MM46 腫瘍局所組織像におよぼす影響
- III. 結果
 - 1) 腫瘍の発育および担癌動物の平均生存日数
 - 2) MM46 腫瘍局所組織像および末梢血リンパ球数の変動
 - 3) Ehrlich 腫瘍局所組織像および末梢血リンパ球数の変動
 - 4) ステロイドの MM46 腫瘍局所組織像におよぼす影響
- IV. 総括・考案
- V. 結語
- 文献

I. 緒 言

腫瘍に対する担癌宿主の防御反応すなわち細胞性免疫反応は、腫瘍局所のリンパ球を中心とする間質反応において最も直接的に現れると考えられ、実際、乳癌¹⁾、子宮癌²⁾など臨床的にリンパ球を中心とする細胞浸潤の程度が強いものの予後が良好であるとする報告が多い^{3)~5)}。さらに、リンパ球にはT、B細胞の亜群が存在し⁶⁾、このうち細胞性免疫反応をT細胞が担当することが明らかになり、一層この方面における研究が進んだといえよう^{7)~15)}。

さて、癌に放射線治療を行う場合、非常によい条件下で治療すると腫瘍の根絶もさして困難ではない¹¹⁾。この場合の放射線治療は正常組織の耐容内での物理化学的、生物学的作用による腫瘍細胞のtotal cell killingを目指している。根治照射の望めない症例に対しては、手術と放射線療法・化學療法と放射線治療などのcombination therapyが残された方法である。後者の場合には宿主の免

疫応答の助けを考慮に入れた照射が必要となる¹²⁾。周知の如く放射線は殺腫瘍効果と同時に免疫担当細胞であるリンパ系細胞に対する抑制的作用を有していることや¹³⁾、組織修復を障害することが知られ、併用療法においては必ずしも大線量による腫瘍細胞の根絶が最良の方法でない¹¹⁾。こういった意味で、今回、実験動物腫瘍を用い、種々の線量の放射線局所照射を行い、照射線量とリンパ球を中心とする腫瘍間質反応の程度および浸潤リンパ球中のT細胞の占める割合を酵素組織化学的に検討し、免疫学的観点に立った至適照射線量の存在について検討してみた。また、局所浸潤リンパ球の程度が、全身の免疫能と平衡関係にあるかどうかを見るため、全身免疫能のパラメーターの1つである末梢血リンパ球数の測定も同時に行った。さらに、免疫抑制剤としてステロイドを併用した場合の、腫瘍局所間質反応について照射線量との関連から併せ検討を加えた。

II. 実験材料および方法

腫瘍細胞は、C3H/Heマウス自然発生乳癌MM46(東北大学・抗研 橋 武彦教授より授与された)を同マウス腹腔内にて継代維持したもの、およびC3H/Heマウスに対して異系同種腫瘍であるEhrlich腫瘍(国立がんセンター・化療より授与された)をC3H/Heマウス腹腔内系代移植により維持したものを用いた。これらの腫瘍は本学附属動物実験施設においてpathogen freeの状態で固型飼料と水を自由にとれるように飼育された5~6週齢雌性C3H/Heマウス(日本チャールズ・リバー社)の右大腿部に 5×10^6 個移植され、固型腫瘍の状態で実験に供されている。

1) 照射方法および腫瘍測定

MM46腫瘍およびEhrlich腫瘍移植後5日目に放射線照射を行った。照射は、マウスをペントバルビタール換算0.65mg/匹のネンプタール腹腔内麻酔下で、小川ら¹⁴⁾の考案したマウス局所照射器に固定し、局所以外は厚さ4.5mmの銅板で遮

蔽し, Clinac 12型 linear accelerator(Varian 社)の 6 MeV 電子線による 1 回局所照射を行った。照射線量は, Given Dose で両腫瘍それぞれ40匹のマウスを用い, これを 4 群に分けて各群に1,000, 2,000, 3,000, 4,000rad 照射し, コントロールの非照射群は20匹とした。照射に用いた腫瘍の大きさは, mm オーダーの誤差はあるもののほぼ10mm × 10mm × 10mm (横径 × 縦径 × 厚さ) であった。これらを, 非照射コントロール群を含めて経日に前記 3 方向をノギスにて測定し, 積をもって大きさを評価した。また, 測定時に腫瘍の外観を観察するとともに, 担癌マウスの生存日数をも記録した (Table 1)。

2) MM46 腫瘍に関する腫瘍局所組織像の検討

腫瘍移植後 5 日目に, マウスをペントバルビタール換算0.65mg/匹のネンプタール腹腔内麻酔下で1)と同様の装置を用い, 電子線 1 回局所照射を行った。使用マウスは168匹で, これを 4 群に分け, Given Dose でそれぞれ1,000, 2,000, 3,000, 4,000rad 照射し, コントロールの非照射群には72匹を用いた。これらのマウスを照射後 1, 3, 5, 7, 10, 14 日目に, 各線量照射群は 7 匹ずつ, 非照射群は12匹ずつ心臓穿刺により血液を採取し,

Table 1 Classification of groups and number of mice used

1) Tumor growth, surviving days		
i) non irradiated group		20 mice
ii) 1,000rad irradiated group		10
iii) 2,000rad irradiated group		10
iv) 3,000rad irradiated group		10
v) 4,000rad irradiated group		10
2) 3) Histological study		
i) non irradiated group		72 mice
ii) 1,000rad irradiated group		42
iii) 2,000rad irradiated group		42
iv) 3,000rad irradiated group		42
v) 4,000rad irradiated group		42
4) Influence with administration of dexamethasone		
a) dexamethasone (-)		
b) dexamethasone (+)		
i) non irradiated group	a)	18 mice
	b)	18
ii) 2,000rad irradiated group	a)	18
	b)	18
iii) 3,000rad irradiated group	a)	18
	b)	18

リンパ球数のカウントに供した。その後ただちに右大腿部の腫瘍組織を切除し, 組織学的検索を行った (Table 1)。すなわち, 腫瘍組織の増殖状態, 腫瘍細胞の変性・壊死, 正常構造の破壊, 間質リンパ球, プラズマ細胞, 線維芽細胞等の浸潤の程度につき, H.E.染色により検討した。腫瘍細胞の壊死は, 腫瘍組織が ghost 化, 硝子様変性あるいは石灰化, debris を示したもので, 変性は腫瘍細胞の巨細胞化, 個々の腫瘍細胞離開, 核の変性などがみられるものとした。評価は, こういった変化が腫瘍組織標本の1/2以上みられるものを(++)、1/3～1/2を(+)、1/3までを(+)とし, ほとんどみられないか, あっても軽度の場合を(−)とした。間質細胞浸潤の程度, 筋組織の破壊の程度は, 腫瘍を移植していないマウスの皮下組織, あるいは筋組織を(−)とし, 全組織標本を100倍の倍率で, 最も程度の強い視野を選んで検鏡した結果, 程度の強かった標本を(++)で示し, その間を(+), (++)の2つに分けた。各群, 各グループの総合評価としては, 各グループ使用マウス 7 匹より得られた検体に対して (コントロールは12匹), (−)～(++) の 4 段階の組織像判定を行ったのち, これらの平均をとった。また, 腫瘍周囲浸潤リンパ球のうち, T 細胞の占める程度をみるため, Horwitz^{15)～17)}の方法による α -naphthyl acetate esterase 染色を行った。本法の原理は, 基質として加えた α -naphthyl acetate が細胞内に存在する esterase により分解され, その分解産物が同時に加えたジアゾニウム塩と結合し, 不溶性のアゾ色素を形成・沈着せしめることにある¹⁸⁾。本法によると, T 細胞は granular pattern を, macrophage は homogeneous pattern を, B 細胞は染色陰性となり, T 細胞の識別が可能である¹⁵⁾。染色の前に, 作製した試薬および手技の有効性をみるために, ヒト末梢血よりリンパ球を分離し, 本染色法と E ロゼット形式による方法で¹⁹⁾, T 細胞の検出率を比較するとともに, E ロゼット形成リンパ球に対して α -naphthyl acetate esterase 染色を施行し, その多くが granular pattern を呈することを確かめた。

3) Ehrlich 腫瘍に関する腫瘍局所組織像の検

計

腫瘍移植後6日目に、ペントバルビタール換算0.65mg/匹のソムノベンチル腹腔内麻酔下で、以後2)と同様の検討を行った。

4) ステロイドのMM46腫瘍局所組織像における影響

腫瘍移植後2, 3, 4, 5日目の連続4日間、54匹のマウスに対してデカドロンA水性懸濁液(塩野義製薬)を酢酸デキサメサゾンに換算して7mg/kgに調整して腹腔内投与を行った。残り54匹には投与せず、コントロールとした。ステロイド投与群は、非投与群3グループに分け、このうち2グループに対して1)~3)と同様の装置を用いてそれぞれ2,000radおよび3,000rad照射し、残りのグループは非照射群とした。以後同様に、照射後1, 3, 5, 7, 10, 14日目にマウスを殺し、局所組織像の検討を行った(Table 1)。組織像の判定基準は、2), 3)と同様であるが、腫瘍増殖の状態は次のように評価した。つまり、各標本で、腫瘍辺縁部において、周囲組織との境界不整が1/2以上みられる場合や、血管内への腫瘍細胞侵入が強い場合、あるいは主病巣より離れた腫瘍細胞巣において、胞巣形成傾向が弱く、腫瘍細胞がバラバラにみられるものを invasive、腫瘍辺縁部の境界が鮮明で、主病巣より離れた部位でも腫瘍細胞の胞巣形成傾向の強い場合を massive とした。

III. 結 果

1) 腫瘍の発育および担癌動物の平均生存日数

照射後の日数による腫瘍の大きさの変化はFig. 1の如くである。

MM46腫瘍においては、1,000rad照射群では腫瘍の成長の程度に非照射群と大きな差がみられず、2,000, 3,000rad照射群では、照射後7日目までは腫瘍の成長が抑えられているが、その後は再びゆっくり発育し、その程度は2,000rad照射群の方がやや強い。4,000rad照射群では、照射後14日目においてもなお、照射前と腫瘍体積はほぼ同じである。

Ehrlich腫瘍では、1,000rad照射群は、非照射群よりも発育が抑えられる程度で、10日目以後の発育カーブは非照射群とほぼ同じである。2,000,

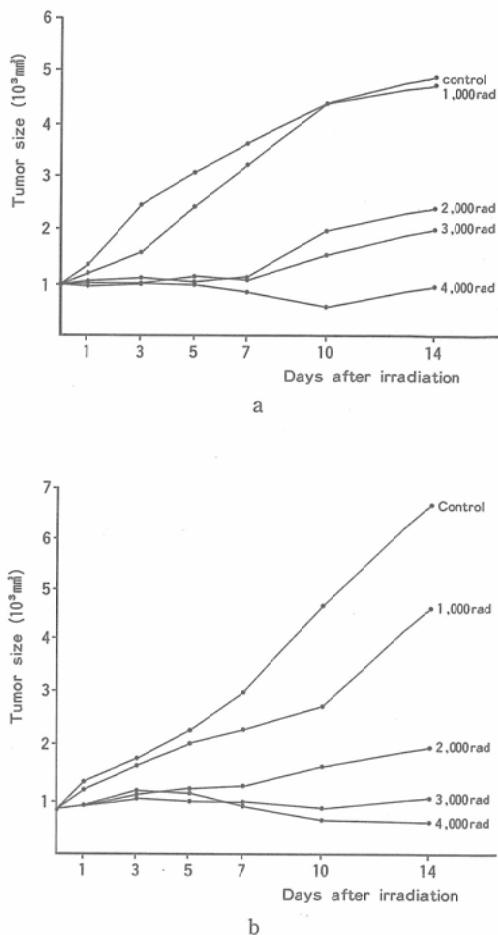


Fig. 1 Growth curve of MM46-tumor (a) and Ehrlich-tumor after several dose of local irradiation.

3,000, 4,000rad照射群では、腫瘍の発育抑制は、線量が大きい程強く、4,000rad照射群の照射後10, 14日の計測では照射前よりむしろ縮小を示した。また、MM46腫瘍に比べて全体に放射線による腫瘍成長抑制が強い傾向であった。

両腫瘍とも、非照射群、1,000rad照射群の腫瘍局所の肉眼的な変化は、腫瘍増大による局所循環障害によると思われる腫瘍遠位側の下肢の浮腫、びらん、壞死が強くなり、ついには脱落がおこる。2,000~4,000rad照射群では、線量が増加するに従い、放射線の直接作用である局所の脱毛、びらん、変形、脱落が強くなり、下肢の著明な浮腫は少なくなる傾向にあった。

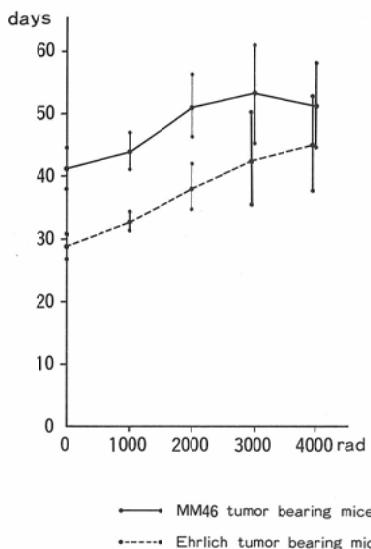


Fig. 2 Mean surviving days of MM46-tumor bearing mice (●—●) and Ehrlich-tumor bearing mice (●···●) after irradiation.

平均生存日数は、MM46腫瘍では、非照射群で 41.2 ± 2.8 日 S.D., 1,000rad 照射群 44.0 ± 2.8 日 S.D., 2,000rad 照射群 51.2 ± 5.4 日 S.D., 3,000rad 照射群 53.0 ± 8.1 日 S.D., 4,000rad 照射群 51.6 ± 7.4 日 S.D.で、非照射群に比べて1,000rad 照射群($p < 0.05$), 2,000~4,000rad 照射群($p < 0.001$)に有意な生存日数の延長がみられた。Ehrlich腫瘍では、非照射群 28.6 ± 2.1 日 S.D., 1,000rad 照射群 32.6 ± 1.5 日 S.D., 2,000rad 照射群 38.4 ± 3.7 日 S.D., 3,000rad 照射群 42.6 ± 7.8 日 S.D., 4,000rad 照射群 44.8 ± 8.0 日 S.D.で、非照射群に比べて、1,000~4,000rad 照射群に有意な生存日数の延長がみられた($p < 0.001$) (Fig. 2)。

2) MM46腫瘍局所組織像および末梢血リンパ球数の変動

照射後、各線量にはほぼ共通して、腫瘍細胞の変性、壊死の程度、正常構造の破壊の程度は日数が経つにつれて著明となっていくが、間質へのリンパ球浸潤は、照射後7日目位に最も強くみられ、以後日数が経つとむしろ減少し、線維芽細胞、プラズマ細胞を中心とする線維化がみられる。この傾向は、4,000rad 照射群では、他の群に比べてやや早く始まった。

Table 2 Histological findings on the 7th day after irradiation (MM46 tumor)

	Tumor cell		Stromal reaction			Tissues around foci
	Necrosis	Giant cells Detachment	Lymphocyte	* Plasma cell	* Fibroblast	Muscle
Non-irradiation	+	**—~+	+	+	+	**—~+
1000 rad	++	**+~-	+	+	+	+
2000 rad	++	+~++	#	+	#	**+~++
3000 rad	++	#	**++~#	#	#	++
4000 rad	++	#	+	#	#	#

(—) None
(+) Slight
(++) Moderate
(#) Remarkable

* On the 14th day after irradiation
** The former is dominant

照射線量別にみると、照射線量が多くなるに従い、腫瘍細胞の変性、壊死、正常構造の破壊は次第に強くなるが、間質細胞浸潤の程度は2,000rad 照射群で最も強く、線量が増加するに従い減少し、4,000rad 照射群では、むしろ非照射群より少なかった。

次に、間質細胞浸潤の強くみられた照射後7日目における、各線量ごとの局所組織像の差をTable 2に示した。

(i) 非照射群 (Fig. 3-a)

腫瘍の中心部で自然発生壊死がみられるが、辺縁部では腫瘍細胞の発育が盛んである。腫瘍周囲間質の単核球細胞浸潤は少ない。

(ii) 1,000rad 照射群

放射線照射による腫瘍細胞の壊死が軽度にみられ、発育辺縁部にも個々の腫瘍細胞離開がわずかにみられる。単核球細胞浸潤は非照射群と大差なく、腫瘍辺縁部の境界が明瞭である。

(iii) 2,000rad 照射群 (Fig. 3-b)

腫瘍細胞の巨細胞化、個々の腫瘍細胞離開などの変化と、間質への著しい単核球細胞浸潤がみられる。強拡大で観察すると、変性した腫瘍細胞をとり囲むように浸潤した単核球細胞は、リンパ球であることがわかった。

(iv) 3,000rad 照射群 (Fig. 3-c)

腫瘍細胞の変性、壊死の程度はさらにすすみ、間質単核球細胞浸潤も比較的多くみられるもの、2,000rad 照射群に比べると少ない。

(v) 4,000rad 照射群 (Fig. 3-d)

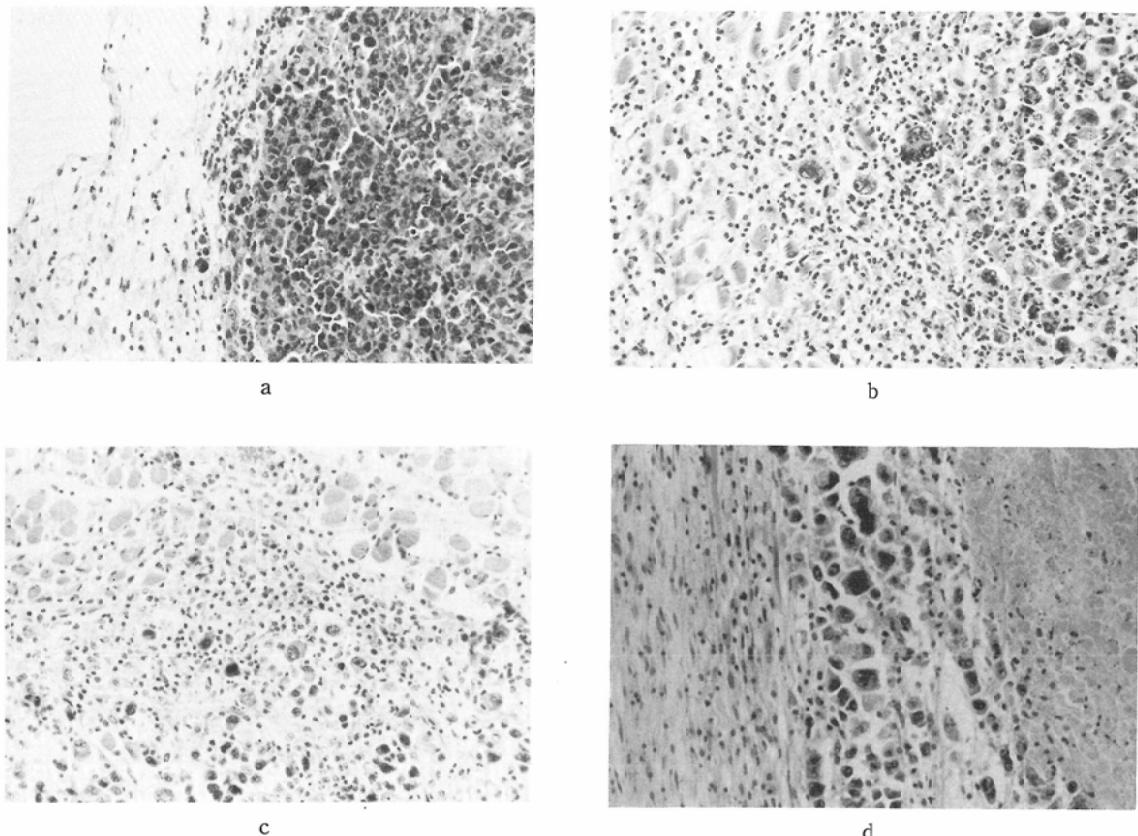


Fig. 3 Photomicrograph of topical MM46-tumor tissue on the 7th day after irradiation of 2000 rad (d), 3000 rad (c), 4000 rad (d) and control (a)

腫瘍細胞、正常組織とともに著しい壊死、破壊に陥り、リンパ球浸潤は非照射群に比べて少なく、強拡大では、リンパ球浸潤が少なく線維芽細胞が出現し、線維化が始まっている。

(vi) α -naphthyl acetate esterase 染色による検討 (Fig. 4)

腫瘍細胞は esterase 活性が強いため濃褐色に染まり、間質への浸潤リンパ球は胞体に褐色の反応生成物を有するものが多く、T 細胞を中心とするリンパ球浸潤であることがわかる。

末梢血リンパ球数の変動をみると、Fig. 5 にみられる如く、1,000~4,000rad それぞれの照射群に経日的変動は明らかな傾向が認められない。しかし照射後 7 日目における各照射線量群の末梢血リンパ球数では、Fig. 5 (f) にみられる如く、照

(H.E. $\times 200$)。The most intensive lymphocytic infiltration was observed in the specimen exposed to 2000 rad.

射線量が増大するに従い減少する傾向がみられ、4,000rad 照射群では非照射群に比べて有意な低下がみられた ($p < 0.01$)。

3) Ehrlich 腫瘍局所組織像および末梢血リンパ球数の変動

照射後、腫瘍細胞の変性、壊死、正常構造の破壊の程度は日数が経つにつれて強くなる。間質へのリンパ球を中心とする单核球細胞浸潤の程度は、1,000, 2,000rad 照射群においては照射後 7~10 日目位に、3,000, 4,000rad 照射群では照射後 5~7 日目位に peak の時期がみられる。線量が増加すると peak が早くなる傾向にあったが、各線量にはほぼ共通して照射後 7 日目前後に強い浸潤がみられた。これ以後は、MM46 腫瘍でみられたのと同様に、比較的プラズマ細胞が多くなり、線

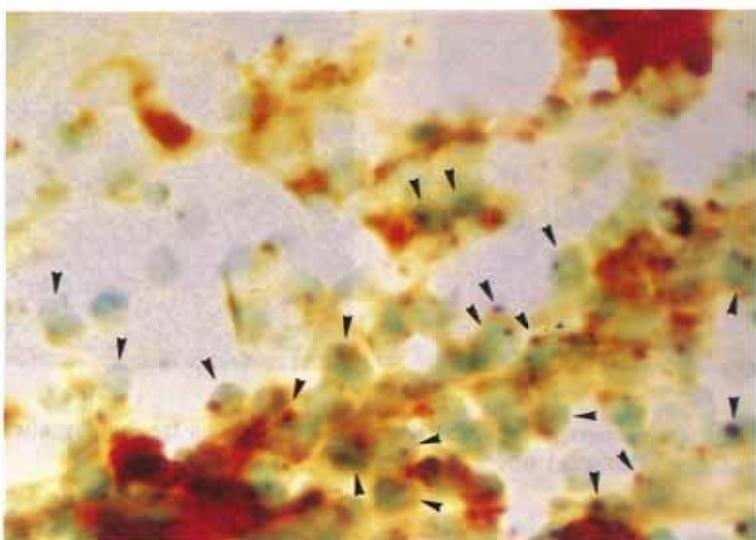


Fig. 4 α -naphthyl acetate esterase staining of MM46-tumor tissue exposed to 2000 rad. Discrete granules were observed in the cytoplasms in nearly all lymphocytes (arrows), which were characteristic of T-cells. (Methyl green \times 400).

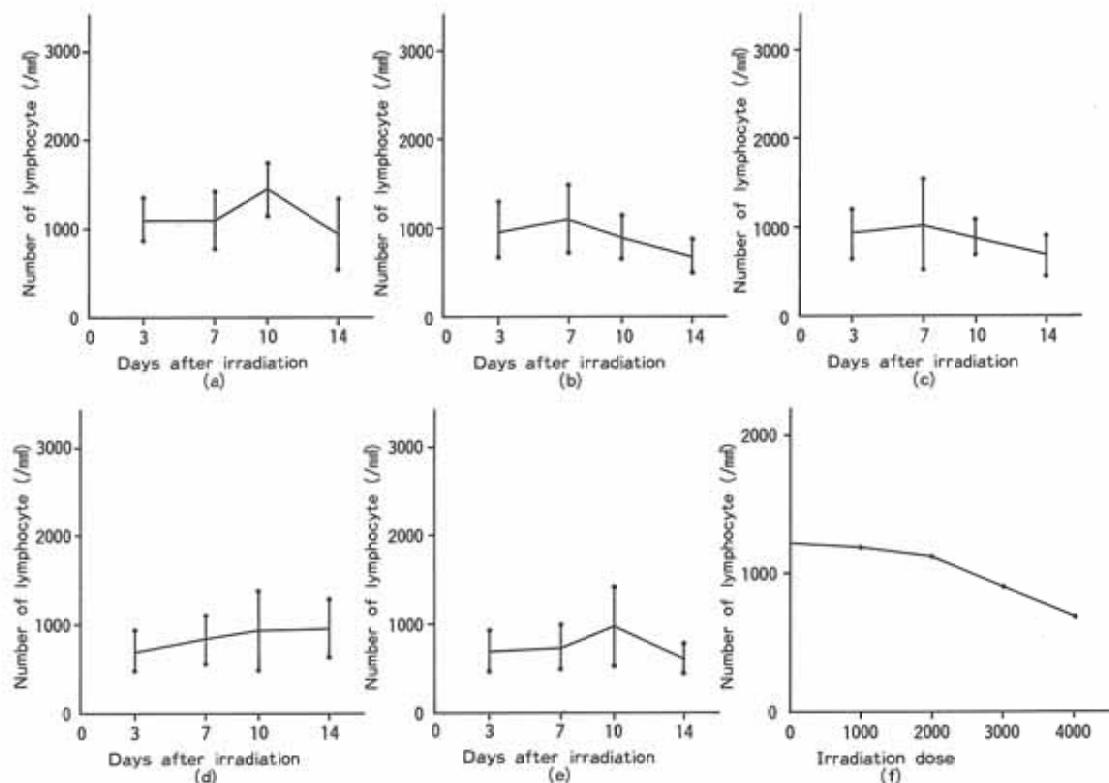


Fig. 5 The transition of absolute lymphocyte counts in MM46-tumor bearing mice after irradiation of 1000 rad (b), 2000 rad (c), 3000 rad (d), 4000 rad (e) and control (a). Peripheral lymphocyte counts decreased according to increment of irradiated dose, on the 7th day after irradiation (f).

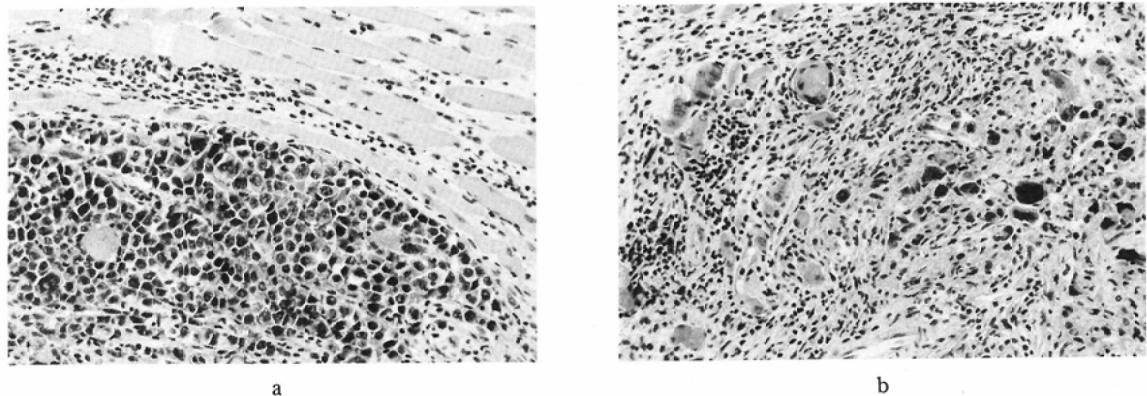


Fig. 6 Photomicrograph of topical Ehrlich-tumor tissue on the 7th day after irradiation of 3000 rad (b), and control (a) (H.E. $\times 200$).

Table 3 Histological findings on the 7th day after irradiation (Ehrlich)

	Tumor cell		Stromal reaction			Tissues around foci
	Necrosis	Giant cell Detachment	Lymphocyte	*Plasma cell	*Fibroblast	
Non-irradiation	++	-	*#~+	+	+	-
1000rad	+	+	**+~++	**-~+	+	**+~-
2000rad	+	+	#	+	#	+
3000rad	**#~#	#	#	#	#	#
4000rad	#	#	#	#	#	#

(-) None
(+) Slight
(++) Moderate
(#) Remarkable

* On the 14th day after irradiation
** The former is dominant.

Table 4 The influence of dexamethasone on the histological findings on the 7th day after irradiation (MM46 tumor)

	Steroid	Tumor cell			Stromal reaction	
		Tumor growth	Necrosis	Giant cell	Lymphocyte	Histiocyte Plasma cell
Non-irradiation	-	Massive	+	*-~+	*+~-	+
	+	Invasive	#	*-~+	*-~+	+
2000rad	-	Massive	#	*+~#	#	+
	+	Invasive	#	*+~#	+	#
3000rad	-	Massive	#	#	#~#	+
	+	Invasive	#	#	+	#

(-) None
(+) Slight
(++) Moderate
(#) Remarkable

* The former is dominant.

維芽細胞を中心とする線維化が強くなっていた。

照射線量別では、線量が多くなれば腫瘍細胞、正常構造の壊死の程度が強かった。間質単核球細胞浸潤の程度は、照射後7日目でみると(Table 3), 1,000rad 照射群では非照射群と大きな差がない、2,000rad 照射群では1,000rad 照射群よりも多く、3,000, 4,000rad 照射群では強い細胞浸潤がみられた。なかでも、3,000rad 照射群で、より強い傾向を示した (Fig. 6-a, b)。

浸潤リンパ球中のTの占める程度をみると、 α -naphthyl acetate esterase 染色を施行すると、浸潤リンパ球の胞体中にT細胞に特徴的な陽性顆粒を有するリンパ球が多くみられた (Fig. 7)。

末梢血リンパ球数の推移をみると、1,000rad 照

射群では14日目にリンパ球数の回復がみられるが、2,000~4,000rad 照射群においては、日数が経つに従いリンパ球数の減少の傾向がみられ、照射後7日目では、4,000rad 照射群で、非照射群に比べて有意な低下がみられた ($p < 0.05$) (Fig. 8)。

4) ステロイドの MM46 腫瘍局所組織像における影響

全体的に、ステロイド非投与群では、腫瘍増殖状態が集塊状で、胞巣形成傾向がみられたのに対し、ステロイド投与群では、浸潤性に発育する傾向がみられた。腫瘍細胞の壊死の程度は、線量の増加で強くなり、その傾向はステロイド投与群において明らかであった。間質反応のリンパ球浸潤の程度は、ステロイド非投与群で、2,000rad > 3,000rad > 非照射群の順に強くみられたが、ステ

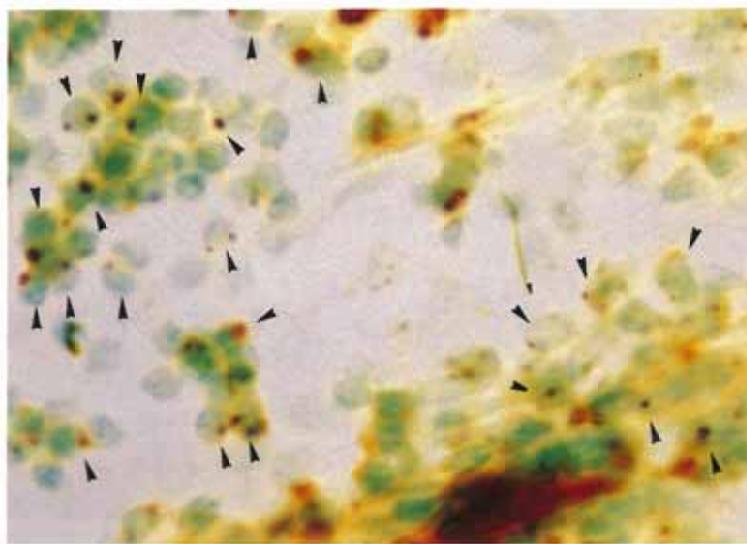


Fig. 7 Alpha-naphthyl acetate esterase staining on the 7th day after irradiation.
T-lymphocytes have discrete granules in the cytoplasms (arrows). (Methyl green $\times 400$).

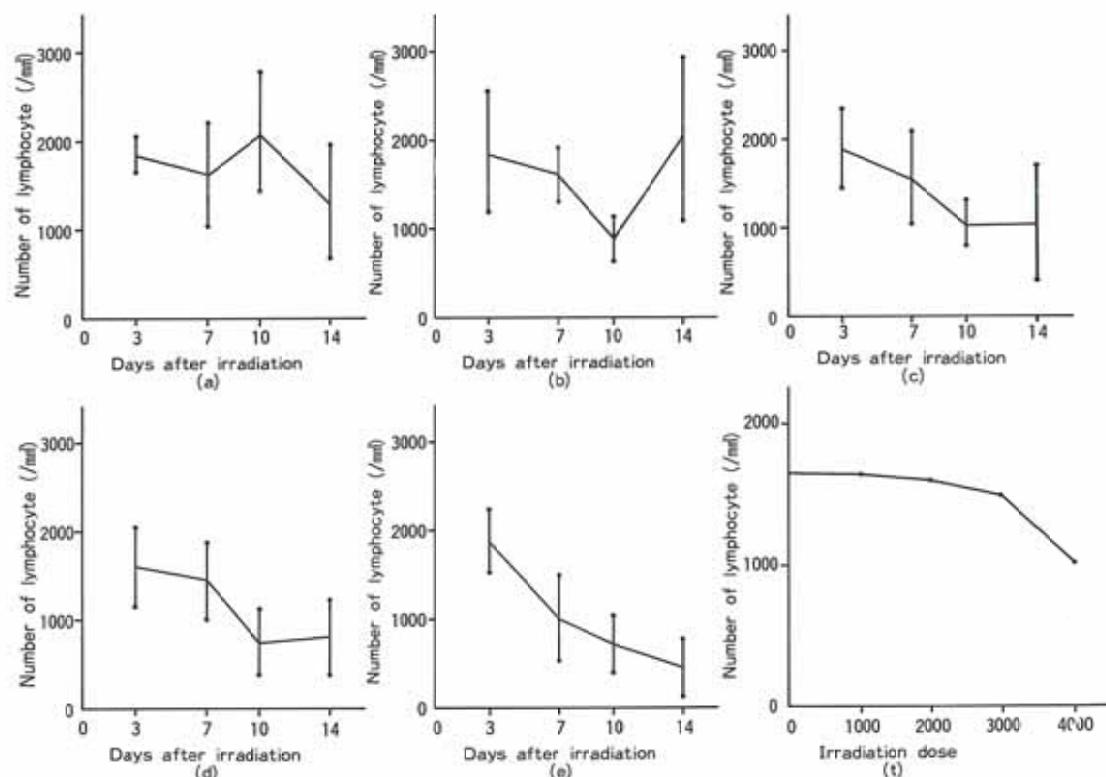


Fig. 8 The transition of absolute lymphocyte counts in Ehrlich-tumor bearing mice after irradiation of 1000 rad (b), 2000 rad (c), 3000 rad (d), 4000 rad (e) and control (a). Peripheral lymphocyte counts decreased according to increment of irradiated dose, on the 7th day after irradiation (f).

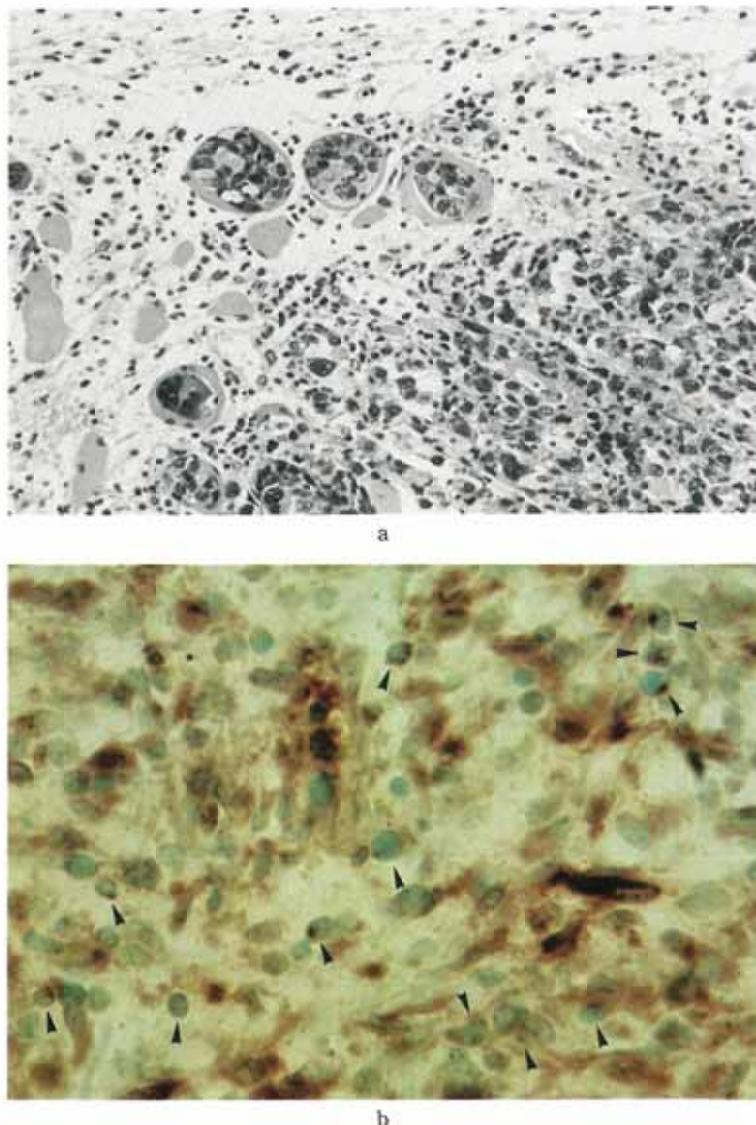


Fig. 9 Photomicrograph of topical MM46-tumor tissue exposed to 2000 rad with administration of dexamethasone (H.E. $\times 200$ (a)).
T-lymphocytes were scarcely found by alpha-naphtyl acetate esterase staining (arrows). (Methyl green $\times 200$ (b)).

ロイド投与群では照射群、非照射群ともに少なく、むしろ組織球、プラズマ細胞などが比較的多くみられた (Table 4)。

次に、2,000rad 照射群のステロイドの投与の有無による局所組織像の差をみた。

i) ステロイド非投与2,000rad 照射群は、すでに述べたように、放射線照射のため腫瘍細胞の変

性、壊死がみられ、変性した腫瘍細胞周囲には高度のリンパ球浸潤がみられる (Fig. 3-b).

ii) ステロイド投与2,000rad 照射群

腫瘍細胞は胞巣がバラバラになり、浸潤性に増殖する傾向にあり、拡張した毛細血管内への浸潤が認められる。リンパ球反応は、ステロイド非投与群に比べて著しく少なく、むしろ組織球が多く

みられる (Fig. 9-a).

iii) ステロイド投与2,000rad照射群の照射後7日目の局所組織を、 α -naphtyl acetate esterase染色で検討すると、間質にT細胞特有のgranular patternを呈するリンパ球がみられるが、その数、割合が非投与群に比べて少ない傾向を示した (Fig. 9-b).

IV. 総括・考案

今回の実験で、放射線を局所照射した後の腫瘍成長の経日の変動は、1,000rad照射群では非照射群と大きな差ではなく、成長は明らかに早かった。2,000~4,000rad照射群では、線量が増加するに従い腫瘍の成長はよく抑えられるとともに、局所の放射線障害の程度も強くなっていた。担癌マウスの平均生存日数をみると、MM46腫瘍では1,000~4,000rad照射群が非照射群に比べて、さらに2,000~4,000rad照射群が1,000rad照射群に比べて有意に生存日数が延長した(2,000, 3,000rad照射群 $p < 0.01$, 4,000rad照射群・ $p < 0.02$)が、2,000~4,000rad照射群の間には有意差はみられなかった。しかし、平均生存日数は、4,000radにおいてやや短かかった。Ehrlich腫瘍でも、非照射群に比べて1,000~4,000rad照射群の有意な生存日数の延長があり、さらに、1,000rad照射群に比べて2,000~4,000rad照射群に有意な生存日数延長がみられた($p < 0.001$)が、2,000~4,000rad照射群の間には有意差がなかった。

今回の実験モデルでは、腫瘍成長が4,000rad照射群でよく抑えられており、これは他群に比べて腫瘍への放射線の直接破壊作用が強かったためと思われるが、局所の正常構造の破壊の点や、照射線量の多い群で平均生存日数がやや短い場合もあるなどの点から、必ずしも大線量照射が最良でないことがわかる¹¹⁾。そこで、放射線照射の効果を左右する宿主側の因子の1つと考えられる宿主免疫能²⁰⁾、特にその直接の現われと思われる局所免疫反応に注目した。

照射局所では、腫瘍や正常構造の破壊、あるいはこれらより放出される因子により、複雑な細胞反応がおこっているものと推察される。大星ら²¹⁾²²⁾は、腫瘍局所において、放射線による腫

瘍細胞の変性、壞死と時期を同じくしてみられるリンパ球様反応を、宿主の免疫応答であると考えたように、主体はやはりリンパ球を中心とする免疫反応であると思われる。今回の実験では、各腫瘍、各線量いづれも照射後7日目位に、MM46腫瘍では照射線量2,000~3,000rad、Ehrlich腫瘍では3,000~4,000radでリンパ球反応が強くみられ、この時期および線量で強い免疫反応がおこっているといえる。

リンパ球には、T細胞、B細胞の亜群があり⁶⁾、腫瘍に対する細胞性免疫反応としてT細胞の重要性が指摘されている^{7)~10), 23)~26)}。この意味で、局所組織像におけるT細胞の浸潤の程度を検討してみた。組織内T細胞の同定方法としては、抗T血清による蛍光抗体法²⁴⁾²⁵⁾、T細胞に対する特異的異種抗血清を用いたベルオキシダーゼ酵素抗体法などがあるが、今回は、リンパ球胞体内の α -naphtyl acetate esterase活性の染色パターンにより同定する酵素組織化学的方法によった^{15)~19)}。本法は、Müllerら²⁸⁾が、マウスのリンパ節を用いた実験で、T細胞領域であるparacortical areaの94%の細胞が本染色法にて点状の反応生成物を有し、一方、B細胞領域であるfollicular cortexでは、7%の陽性率しかなかったことより、T・B細胞の亜分類の可能性をみい出した。さらに、Horwitz¹⁵⁾がヒトにおいても同様のパターンがみられることを確かめるとともに、本法がエロゼット形成によるT細胞検出よりやや低い値を示すことや、プラスト化したT細胞が染色陰性となることより、染色陽性T細胞は成熟T細胞であろうと報告し、その後本法による報告が多くみられている²⁹⁾³⁰⁾。著者の実験では本法による浸潤リンパ球の多くがT細胞パターンを呈することがわかり、このリンパ球反応が細胞性免疫反応であることが確認できた。

さらに、T細胞にはsubsetが存在し⁶⁾、浸潤T細胞がsuppressor T細胞である場合には、宿主免疫応答としては負の方向に働くことになり、腫瘍のrejectに不利である。これに関してGrossiら³¹⁾が報告しているように、ヒトの α -naphtyl acetate esterase染色陽性T細胞の約95%以上

が、IgM・FC レセプター陽性 T 細胞、つまり主に helper T 細胞であること、あるいは、浸潤リンパ球にとり囲まれた腫瘍細胞の変性、壞死が強かつたことなど考えあわすと、マウスにおける今回の実験は、suppressor T 細胞である可能性が少ないと思われる。しかし、マウスの α -naphthyl acetate esterase 染色陽性 T 細胞と、ヒトのそれとの性質の異同についてはさらに検討される問題として今後の成果を期待したい。

さて、このような細胞性免疫反応が、照射後 7 日目位を境にして、以後プラズマ細胞、線維芽細胞などを中心とする間質反応に変わっていったわけであるが、この理由として、楨殿の報告³²⁾にみられるように、腫瘍を照射したことにより死細胞が増加し、生細胞が減少する結果、細胞性免疫反応が抑制され、抗体産生系の免疫応答にすすむためと思われる。また、線維芽細胞は、障害局所の修復のため少し遅れて増殖し、最終的には強い線維化がおこるものと思われる³³⁾。

ここで、局所照射における生体の免疫応答におよぼす影響についての文献を涉獵すると、免疫能が高まるとする説³⁴⁾³⁷⁾、不变であるとする説^{38)~39)}、低下するとする説⁴⁰⁾⁴⁶⁾など種々の報告がみられ、未だ、明らかな事実を示す実験結果は得られていない。低下するとする説の主な理由は、リンパ球の放射線感受性が強く、照射中に照射野内を通過する際にリンパ球が障害されるため⁴⁰⁾⁴¹⁾、あるいは、照射野内にリンパ節、脾臓などの重要臓器が含まれ、障害されるため免疫能の低下をひきおこす¹¹⁾などが報告されている。實際、放射線治療中に、PHA、PPD 皮内反応の低下や、末梢血リンパ球の減少がみられるることはよく知られており⁴²⁾、著者の実験でも、非照射群に比べて照射群の末梢血リンパ球数の低下があり、線量が増加するに従い、より強い減少がみられる傾向にあった。しかし局所のリンパ球反応は、MM46 腫瘍で 2,000~3,000rad、Ehrlich 腫瘍では 3,000~4,000 rad で非照射群より強い反応がみられ、末梢血リンパ球数との相関はなかった。

局所照射により免疫能が高まることの理由として、放射線により腫瘍細胞数が減少し、相対的に

リンパ球数の割合が多くなるためとする報告³⁶⁾、また、土屋ら³⁵⁾は、リンパ球の subset の相互細胞間の放射線感受性が異なり、感受性の強い suppressor T 細胞の障害が強く、相対的に killer T 細胞が多くなるためと報告している。本実験でも、適当な線量の照射により、局所の細胞性免疫反応が強くなることを証明し得たと思われる。すなわち、MM46 腫瘍で 2,000rad、Ehrlich 腫瘍で 3,000 rad というように特定の線量で最も強い細胞性免疫反応がみられた。細胞性免疫反応の程度が、腫瘍細胞数の減少により決まるのなら、線量が増加するに従いリンパ球浸潤の程度も強くなるものと思われ、また、浸潤リンパ球が全身リンパ球数の影響を受けるならば、線量が増加するにつれて局所リンパ球数も減少するはずである。また、リンパ球の subset、すなわち、放射線感受性の高い suppressor T 細胞の障害の程度で免疫反応の程度が決まるのならば、MM46 および Ehrlich 両腫瘍において、免疫反応の peak をおこすのは同じ線量になるものと思われる。にもかかわらず、こういった特定の線量において強いリンパ球反応がみられた理由として、腫瘍の種類により、特定の線量により腫瘍細胞が修飾され、抗原性が変化する可能性が示唆されている⁴⁶⁾。今後さらに抗原を抽出し、各線量ごとの抗原量をすることにより、この点の検討を加えたい。

ステロイド剤は、担癌宿主の免疫能を低下させることが知られ⁴⁷⁾、本剤が照射により増強する局所リンパ球反応に対してどのような影響を与えるか検討し、さらにこの影響が照射によるリンパ球増殖を間接的にも免疫反応であることを示し得るものと考えてみた。その結果、局所組織像上、ステロイド投与群では非投与群に比べて反応リンパ球の減少がみられるとともに、腫瘍細胞は浸潤性に発育していた。また、 α -naphthyl acetate esterase 染色による T 細胞の占める割合が少なく、むしろ組織球、プラズマ細胞が多い傾向であった。これは前述のように、強い腫瘍増殖のため、腫瘍中心部の anoxic な状態が強く、死細胞が増加した結果、プラズマ細胞を中心とする抗体産生系免疫応答への変化があり、さらにこの壞死や debris

に対する処理反応として組織球浸潤が多くなっていったのではないかと思われる。また、ステロイドが免疫抑制のメカニズムをもち、本剤投与下での放射線局所照射がリンパ球反応を低下させたことより、逆に非投与下局所照射時の強いリンパ球浸潤が宿主の免疫反応であることを間接的に示すものと思われる。

ステロイドの免疫抑制の作用機構に関しては種々の報告がみられるが^{48)~52)}、今回の実験で、局所リンパ球浸潤が増加した2,000rad照射群において、ステロイド投与群に著明な抑制がみられたのは、担癌マウスリンパ球数の低下により起因したものか、あるいは腫瘍の細胞膜に対する作用の結果として、抗原性を低下させたためなのかに関しては未解決で、今後に検討が必要であろう。

以上、照射線量と腫瘍局所における細胞性免疫反応の程度、およびステロイドがこれに対してどのような影響を与えるかを検討した。動物実験における結果がすぐヒトにあてはめられないこと、また、臨床では分割照射が広く行なわれていることなどから、今回の実験をすぐ臨床放射線治療の場に結びつけるには問題があるが、放射線照射による抗原性の変化、最も強い細胞性免疫反応をおこす線量といったものを考慮に入れた放射線治療の可能性に対し基礎的データを提供したものと思う。しかし今後さらに、腫瘍局所のリンパ球を分離した上での検討も企図している。

V. 結語

局所照射線量と、腫瘍局所のリンパ球を中心とする間質細胞反応の程度を動物実験により検討した。

腫瘍周囲のリンパ球数浸潤は、照射後7日前後に強くみられ、その後プラズマ細胞が比較的多くなり、また、線維芽細胞による線維化が強くなった。腫瘍細胞および正常組織の破壊の程度は線量が増加するに従い強くなつたが、リンパ球浸潤はMM46腫瘍で2,000rad、Ehrlich腫瘍で3,000radにおいて最も強くみられ、しかも α -naphthyl acetate esterase染色により、T細胞を中心とするリンパ球浸潤であることがわかった。

一方、局所照射にステロイドの腹腔内投与を併

用すると、リンパ球浸潤の減少がみられ腫瘍局所における宿主の免疫能低下がみられた。

以上の結果より、放射線照射において、最も強い細胞性免疫反応を起こし得る線量の存在を提示した。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った木村修治教授に深甚なる謝意を表します。また、研究方法について直接御指導頂いた、今城吉成先生、小川恭弘先生、兵庫県立こども病院・伊東 宏先生、本研究に御協力頂いた押谷高志先生、御勢久平先生、一柳明弘先生、芦田千尋先生および教室員各位に深謝申しあげます。さらに、MM46腫瘍を提供し、かつ助言を頂いた東北大学抗酸菌研究所 橋武彦教授、有益な助言を頂いた産業医大・土屋武彦教授に深謝申しあげます。

本論文の要旨は、第39回日本医学放射線学会総会宿題報告の一部として発表され、第40回日本医学放射線学会総会、第40回日本癌学会総会において発表した。

本研究の一部は、昭和56年度文部省科学研究費B56480205の補助によつた。

文 献

- 1) 小堀鷗一郎、草間 悟、富山次郎、武藤徹一郎、喜納 勇：乳癌の組織学的性格と予後。癌の臨床, 16: 223-226, 1970
- 2) 浜崎美景、藤田 甫、新太喜次、高田 茂、浜崎 陸：子宮頸癌のリンパ球浸潤を伴う髓様癌。癌の臨床, 14: 787-792, 1968
- 3) Bennet, S.H. Futrell, J.W. and Roth, J.A.: Prognostic significance of histologic host response in cancer of the larynx or hypopharynx. Cancer, 28: 1255-1265, 1974
- 4) Lauder, I. and Aherne, W.: The significance of lymphocytic infiltration in neuroblastoma. Brit. J. Cancer, 26: 321-330, 1972
- 5) 白日高歩：肺癌病巣周囲リンパ球浸潤の意義—組織型および全身免疫能との関連—癌の臨床, 24: 1277-1281, 1978
- 6) Moretta, L., Webb, S.R., Grossi, C.E., Lydyard, P.M. and Cooper, M.D.: Functional analysis of two human T-cell subpopulations: Help and suppressor of B-cell responses by T-cells bearing receptors for IgM or IgG. J. Exp. Med., 146: 184-200, 1979
- 7) 菊地浩吉：癌細胞破壊の免疫学的機序。臨床科学, 10: 280-290, 1974
- 8) Husby, G., Hoagland, P.M., Strickland, R.G. and Williams, R.C.Jr.: Tissue T and B cell infiltration of primary and metastatic cancer. J. Clin. Invest., 57: 1471-1482, 1976

- 9) Kikuchi, K., Ishii, Y., Ueno, H. and Koshiba, H.: Cell-mediated immunity involved in autochthonous tumor rejection in rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 276 : 188—206, 1976
- 10) Galili, U., Rodriguez, L. and Klein, E.: Activated T lymphocyte within human solid tumors. *Cancer Immunol. Immunother.*, 6 : 129—133, 1979
- 11) 梅垣洋一郎：腫瘍免疫と放射線治療—その臨床一癌、放射線療法、癌の臨床・編、篠原出版、東京、27—34, 1978
- 12) 宮地千尋、小川恭弘、今城吉成、今中一文、浜田富三雄、猪俣泰典、木村修治：放射線療法と非特異的免疫賦活剤における併用時期に関する実験的研究。第1報。PSKの併用時期について。日本医学会誌, 41 : 442—444, 1981
- 13) Stewart, C.C. and Perez, C.A.: Effect of irradiation on immune responses. *Radiology*, 118 : 201—202, 1976
- 14) 小川恭弘、宮地千尋、今中一文、井上善夫、今城吉成、木村修治：マウスの放射線局所照射器具の作製。免疫実験操作法X、日本免疫学会・編、3317—3320, 1981
- 15) Horwitz, D.A., Allison, A.C., Ward, P. and Kight, N.: Identification of human mononuclear leucocyte populations by esterase staining. *Clin. Exp. Immunol.*, 30 : 289—298, 1977
- 16) Knowles, D.M.II. and Holck, S.: Tissue localization of T lymphocytes by the histochemical demonstration of acid α -naphthyl acetate esterase. *Lab. Invest.*, 39 : 70—76, 1978
- 17) 篠原英和、阿南貞雄、松山俊文、笠岡和夫、高橋勇：Acid α -naphthyl acetate esterase (ANAE)染色によるヒト末梢血リンパ球の同定法について一本法のT-cell markerとしての意義。医学のあゆみ, 8 : 405—408, 1979
- 18) 小川和朗：細胞生物学講座 XXXV 電子顕微鏡的細胞化学(4)—エステラーゼ概論—。細胞, (5) : 12—32, 1973
- 19) 矢田純一、藤原道夫：ヒトリンパ球機能検索法、2. ヒトT, B細胞の同定法、中外医学社、三和印刷、東京、23—33, 1980
- 20) 木村修治：癌の放射線治療効果に関する2, 3の宿主側因子。日本医学会誌, 41 : 559—573, 1981
- 21) 大星章一、下里幸雄、板倉克明、梅垣洋一郎：癌放射線療法の病理(I)。癌組織の治癒過程の組織学的追跡。医学のあゆみ, 61 : 618—625, 665—671, 1967
- 22) 大星章一、下里幸雄、板倉克明、梅垣洋一郎：癌放射線療法の病理(II)。癌組織の治癒過程におけるリンパ球様細胞反応の免疫学的意義。医学のあゆみ, 61 : 725—730, 1967
- 23) North, R.J. and Kirstein, D.P.: T-cell-mediated concomitant immunity to syngeneic tumors. 1. Activated macrophages as the expressions of non specific immunity to unrelated tumors and bacterial parasites. *J. Exp. Med.*, 145 : 275—292, 1977
- 24) 西岡幹夫、菅大三、竹本忠良、加藤征治、栗屋和彦：ヒトリンパ球に関する研究。II. 原発性肝がん組織中のヒトリンパ球の浸潤。臨床免疫, 10 : 373—376, 1978
- 25) 西岡幹夫、菅大三、竹本忠良、山本憲男、酒徳治三郎、加藤征治、栗屋和彦：ヒトリンパ球に関する研究。III. 膀胱がんにおける組織内Tリンパ球反応。臨床免疫, 11 : 943—948, 1979
- 26) Dellon, A.E., Potvin, C. and Chretien, P.B.: Thymus-dependent lymphocyte levels in bronchogenic carcinoma: Correlations with histology, clinical stage, and clinical course after surgical treatment. *Cancer*, 35 : 687—694, 1975
- 27) 下川原出、今村正克：乳癌組織内浸潤リンパ球亞群の抗T, 抗B細胞血清による識別とその意義について。一酵素抗体法による検索一。札幌医誌, 48 : 453—474, 1979
- 28) Mueller, J., Brun del Re, G., Buerki, H., Keller, H.U., Hess, M.W. and Cottier, H.: Nonspecific acid esterase activity: A criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. *Eur. J. Immunol.*, 5 : 270—274, 1975
- 29) Knowles, D.M.II., Halper, J.P., Machin, G.A. and Sherman, W.: Acid α -naphthyl acetate esterase activity in human neoplastic lymphoid cells. *Am. J. Pathol.*, 96 : 257—277, 1979
- 30) Pinkus, G.S., Hargreaves, H.K., McLeod, J.A., Nadler, L.M., Rosenthal, D.S. and Said, J.W.: α -naphthyl acetate esterase activity -A cytochemical marker for T lymphocytes. Correlation with immunologic studies of normal tissues, lymphocytic leukemias, non-Hodgkin's lymphomas, Hodgkin's disease, and other lymphoproliferative disorders. *Am. J. Pathol.*, 97 : 17—39, 1979
- 31) Grossi, C.E., Webb, S.R., Zicca, A., Lydyard, P. M., Moretta, L., Mingari, C. and Cooper, M.D.: Morphological and histochemical analyses of two human T-cell subpopulations bearing receptors for IgM or IgG. *J. Exp. Med.*, 147 : 1405—1417, 1978
- 32) 横殿玲子：腫瘍免疫を考慮に入れた放射線治療。癌の臨床, 20 : 90—95, 1974
- 33) 山口武雄： β 線照射後長期間の皮膚組織の細胞動態。癌の臨床, 21 : 459—463, 1975

- 34) Francois, D.L., Troise, D., Chavaudra, N., Malaise, E.P. and Barski, G.: Comparative effect of local radiotherapy and surgery on cell-mediated immunity against a mouse transplantable, mammary tumor. *Int. J. Cancer*, 13: 629—639, 1974
- 35) 土屋武彦：局所照射における免疫作用の役割。1. 抗腫瘍細胞性免疫について。日本医学会誌, 36: 922—929, 1976
- 36) Song, C.W. and Guertin, D.P.: Combined effect of X irradiation and cell-mediated immune reaction. *Rad. Res.*, 75: 586—592
- 37) 橋 武彦：腫瘍細胞の表面抗原の表現と放射線照射。一放射線治療への免疫学的考察—癌の臨床, 20: 84—89, 1974
- 38) Gross, L., Manfredi, O.L. and Protos, A.A.: Effect of cobalt-60 irradiation upon cell-mediated immunity. *Radiology*, 106: 653—1973
- 39) Clement, J.A. and Kramer, S.: Immunocompetence in patient with solid tumors undergoing cobalt 60 irradiation. *Cancer*, 34: 193, 1974
- 40) Stratton, J.A., Byfield, P.E., Byfield, J.E., Small, R.C., Benfield, J. and Pilch, Y.: A comparison of the acute effects of radiation therapy, including or excluding the thymus, on the lymphocyte subpopulations of cancer patients. *J. Clin. Invest.*, 56: 88—97, 1975
- 41) Raben M., Walach, N., Galili, U. and Schlesinger, M.: The effect of radiation therapy on lymphocyte subpopulations in cancer patient. *Cancer*, 37: 1417—1421, 1976
- 42) 小川恭弘, 木村修治：肺癌の放射線化学療法併用疾患患者における免疫能パラメーターの評価。日本医学会誌, 40: 341—354, 1980
- 43) 朴 採俊, 多淵芳樹, 広本秀治, 川口勝徳, 滝口安彦, 加藤道男, 井上和則, 南 正樹, 斎藤洋一, 光野孝雄, 山中 昇, 菊地浩吉：放射線による腫瘍治療効果と宿主細胞性免疫能に関する実験的研究。癌の臨床, 2: : 556—564, 1980
- 44) Birkeland, S.A.: Influence of irradiation on the capacity of human T and B lymphocytes to form E and HEAC rosettes. *Transplant.*, 29: 23—24, 1980
- 45) Hellstrom, K.E., Hellstrom, I., Kant, J.A. and Tamerius, J.D.: Regression and inhibition of sarcoma growth by interference with a radiosensitive T-cell population. *J. Exp. Med.*, 24: 799—804, 1978
- 46) 下里幸雄, 永井完治, 池内駿之：腫瘍免疫と放射線治療。—その基礎—癌。放射線療法, 癌の臨床・編, 篠原出版, 東京, 21—26, 1978
- 47) 野崎忠信, 熊谷 朗：副腎皮質ステロイドと免疫不全。臨床免疫, 12: 599—606, 1980
- 48) 安保 亘：Steroid Hormone の免疫抑制作用に関する研究。札幌医誌, 48: 624—634, 1979
- 49) Fauci, A.S. and Dole, D.C.: The effect of hydrocortisone on the kinetics of normal human lymphocyte. *Blood*, 46: 235—243, 1975
- 50) Gills, S., Crabtree, G.R. and Smith, K.A.: Glucocorticoid-induced inhibition of T-cell growth factor production. 1. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *J. Immunol.*, 123: 1624—1631, 1979
- 51) Gills, S., Crabtree, G.R. and Smith, K.A.: Glucocorticoid-induced inhibition of T-cell growth factor production. 11. The effect on the in vivo generation of cytolytic T cells. *J. Immunol.*, 123: 1632—1638, 1979
- 52) Crabtree, G.R., Gills, S., Smith, K.A. and Munch, A.: Glucocorticoid and immune response. *Arthritis. Rheum.*, 22: 1246—1256, 1979