



Title	マウスにおける腫瘍特異的遅延型過敏症(DTH)反応に対する放射線の影響
Author(s)	河原, 俊司; 橋本, 東児; 峰須, 玲子
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1989, 49(5), p. 675-680
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/15590
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

マウスにおける腫瘍特異的遅延型過敏症

（DTH）反応に対する放射線の影響

*¹昭和大学医学部放射線医学教室

*²昭和大学歯学部歯科放射線医学教室

河原 俊司*¹ 橋本 東児*¹ 蜂須 玲子*²

（昭和63年8月26日受付）

（昭和63年12月23日最終原稿受付）

Effect of Radiation on Tumor-Specific Delayed-Type Hypersensitivity (DTH) Response in Mice

Shunji Kawahara*¹, Toshi Hashimoto*¹ and Reiko Hachisu*²

*¹Department of Radiology, School of Medicine, Showa University

*²Department of Dental Radiology, School of Dentistry, Showa University

Research Code No. : 405.9

Key Words : *Delayed-type hypersensitivity, Radiosensitivity,
Antitumor immunity, Mice*

Delayed-type hypersensitivity (DTH) response is generally considered as one of major mechanism of anti-tumor immunity in vivo. We studied the effect of radiation on the immune spleen cells mediating tumor-specific DTH response based on a local adoptive transfer system. The spleen cells from C3H mice which were immunized with syngenic MH134 hepatoma cells were employed for the effector cells. The immune spleen cells were irradiated in vitro. Then the spleen cells and mitomycin C (MMC)-treated MH134 cells were mixed and inoculated into the hind footpad of normal C3H mice. Twenty-four hours later, the thickness of the footpad was measured with micrometer and increase in the footpad thickness was calculated comparing with a value before the inoculation. Irradiation with 4 Gy-12 Gy did not affect the DTH response. Then irradiation over 16 Gy dose dependently decreased the DTH response. Irradiation with 20 Gy decreased the DTH response about 50% and 28 Gy abolished the response to a control level.

As two types of cells, antigen specific effector T cells and non-specific effector cells such as macrophages, are required to induce DTH response, we studied which type of cells is suppressed by irradiation. Non-irradiated normal spleen cells as a source of non-specific effector cells were added into the irradiated immune spleen cells. The addition of normal spleen cells to 20 Gy irradiated immune spleen cells recovered the DTH response to a control level of non-irradiated group. The other hand, the addition of normal spleen cells to 32 Gy irradiated immune spleen cells failed to recover the DTH response. This result suggest that 20 Gy irradiation suppress the activity of non-specific effector cells but not tumor-specific DTH effector T cells and that 32 Gy irradiation suppress the activity of tumor-specific DTH effector T cells.

I. 緒 言

近年癌の治療効果に担癌宿主の免疫能の関与があることが認識されてきた。ヒトの悪性腫瘍では腫瘍免疫が存在するという証明は難しいが、同系腫瘍を用いた動物実験系では担癌宿主に癌に対する種々の免疫反応がおこっていることが証明されている。腫瘍免疫機構の究明が進むにつれて免疫担当細胞への放射線照射の影響を研究することが重要になってきた。遅延型過敏症(DTH)反応は抗腫瘍性免疫反応の一つであり腫瘍抗原と免疫担当細胞によって惹起される炎症反応と考えられている。実験動物腫瘍においてはマウスの腫瘍塊内より分離したリンパ球は腫瘍特異的なDTH反応を惹起する能力があり¹⁾、これらの細胞を腫瘍細胞と共に正常マウスに接種すると、腫瘍の発育が抑制されることが報告²⁾されている。これらのことおよび藤原らの一連の報告^{3)~7)}から、in vivoでの抗腫瘍効果にはDTH反応が重要な役割をはたしているということが示唆される。

免疫系に対する放射線の効果としては一般的にリンパ球の破壊や機能障害が知られている。我々は同系腫瘍でマウスを免疫して腫瘍特異的DTHエフェクター細胞を誘導し、それらに対する放射線の影響を検討した。

II. 実験材料及び実験方法

① 実験動物

7週齢の雄性C3Hマウス(日本チャールズリバー社)を購入し、1週間の予備飼育後に用いた。1群は7匹とした。

② 腫瘍

MH134肝癌細胞(大阪大学医学部癌研究施設より供与された)は、腹腔内継代移植にて維持した。

③ 免疫マウスの作成

MH134細胞 2×10^6 個をマウス背部皮内に注射し7日後に直径約1cmに成長した腫瘍を外科的に切除、さらに7日後にMH134細胞 2×10^5 個を攻撃接種した。その3週間後に腫瘍の発育がみられないものを免疫マウスとした。上記の方法によりほぼ100%免疫マウスが得られた。

④ DTH 反応

DTHエフェクター細胞には免疫マウスの脾臓

細胞を用いた。すなわち免疫マウスより脾臓を摘出し、細胞浮遊液を作成して RPMI-1640培養液(日本製薬)で3度洗浄、遠心後 $5 \times 10^7/\text{ml}$ に調整した。これらの細胞を照射して照射群として用いた。抗原細胞は MH134細胞を Mitomycin C(MMC、協和発酵工業)で処理して用いた。MH134細胞 5×10^6 個/mlを MMC 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び10% FBS(Gibco社)を含む培養液を用いて炭酸ガス培養器(37°C, 5% CO₂)中で1時間静置した後に、過剰の MMC を洗浄により除去した。脾臓細胞 1×10^7 個と MMC 処理した MH134細胞 1×10^6 個(Effecter : Target = 10 : 1)を混和後 $25\mu\text{l}$ として正常マウスの足蹠に皮内注射し、DTH反応を惹起した。コントロール群には免疫脾臓細胞の代わりに正常脾臓細胞(1×10^7 個)を用いた。DTH反応は投与後約24時間後の足蹠の腫脹をマイクロメーター(尾崎製作所)を用いて測定し、投与前の測定値との差をとり反応値とした。測定は盲検法により実験内容を知らない測定者2名により行なった。

⑤ DTH エフェクター細胞への照射

免疫脾臓細胞の照射は in vitro で行なった。照射には⁶⁰Co回転治療装置(東芝K.K製; RCR-120-C1型)を用いた。線源被射体間距離は50cm、線量率は174R/分であった。

⑥ 統計

統計処理は Student の t 検定で、P が 0.05 より小さいものを有意差ありとした。

III. 結 果

① 免疫脾臓細胞への放射線照射線量と DTH 反応の関係

DTHエフェクター細胞として用いた免疫脾臓細胞への放射線照射により DTH 反応の低下が認められた。4Gy から 12Gyまでの照射線量では、DTH 反応は影響されず(Fig. 1)、非照射群と同じく約0.25mmの腫脹が認められた。16Gy以上からは有意に DTH 反応が低下し 20Gy では約 50%, 28Gy ではコントロールと同様の値にまで(100%)反応値が低下した。すなわち 16~28Gy の範囲では線量に依存して DTH 反応の低下がみられた。

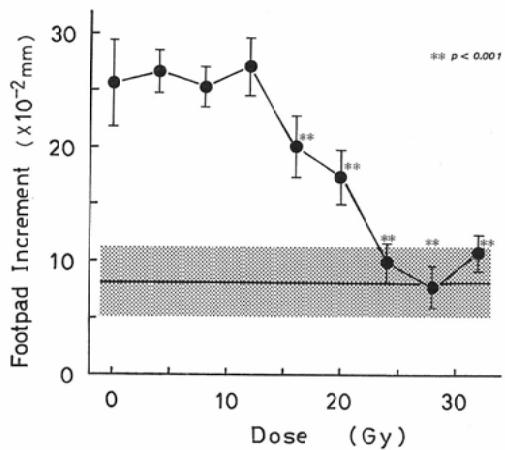


Fig. 1 Effect of various doses of irradiation on footpad increment. The immune spleen cells (1×10^7 cells) were irradiated in vitro and were inoculated into the footpad of normal mice with MMC-treated tumor cells (1×10^6 cells). Each point represents mean \pm SE of 7-14 experiments. Shadow indicates the range of control value.
**p = 0.001; compared with non-irradiated active control (0Gy)

② 放射線照射後 2 時間又は 24 時間に免疫脾臓細胞を接種した場合における足蹠の腫脹に及ぼす影響

これまでの実験では、免疫脾臓細胞を照射約 2 時間後にマウスの足蹠に接種した。この実験条件で放射線による免疫脾臓細胞の障害が充分発現するか否かを検討した。免疫脾臓細胞を照射後 2 群に分け、約 2 時間又は 24 時間後マウスの足蹠に接種した。これら 2 群の免疫脾臓細胞の細胞数は照射を行なう前に同数に調整した。照射後 2 時間又は 24 時間の接種による DTH 反応には各線量の照射群においてその反応値に有意差が認められなかった (Fig. 2)。

③ 放射線照射後の免疫脾臓細胞に対する正常脾臓細胞添加の影響

DTH 反応の発現には、腫瘍特異的な DTH エフェクター T 細胞 (T_{DTH}) と、マクロファージ等の非特異的な細胞の両者が必要である。放射線照射による DTH 反応の低下がそのどちらに起因するかを検討した。免疫脾臓細胞に 20Gy 又は、32Gy を照射後、非特異的細胞が含まれている正常脾臓

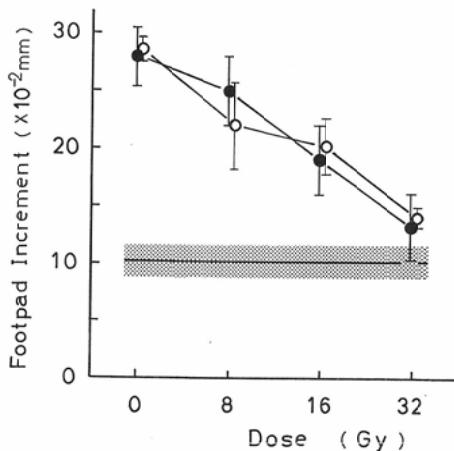


Fig. 2 Influence of the immune spleen cells which were inoculated 2 hours or 24 hours after irradiation on DTH response. The irradiated immune spleen cells were divided into two groups i.e., one is inoculated 2 hours after the irradiation with MMC-treated tumor cells into the footpad of normal mice (●), and another one is incubated for 24 hours in a CO_2 incubator then inoculated similarly (○). The number of the immune spleen cells were adjusted before the irradiation to the same number for these two groups. Each point represents mean \pm SE of 7 experiments.

細胞 (1×10^7 個) を加え、腫瘍細胞と共に足蹠に接種して、DTH 反応が回復するか否かを検討した。非照射の免疫脾臓細胞に正常脾臓細胞を加えても DTH 反応には影響はなかった。DTH 反応をコントロールレベルにまで抑制する 32Gy を照射した免疫脾臓細胞に、同数の正常脾臓細胞に加えても反応の回復は認められなかった (Fig. 3)。これに対し、DTH 反応を約 50% に減少させる 20 Gy 照射群に正常脾臓細胞を加えると、DTH 反応は非照射群とほぼ同等の値を示し、反応の回復が認められた (Fig. 4)。

IV. 考 察

① 放射線による DTH 反応の低下

免疫脾臓細胞に照射すると DTH 反応は 4Gy ~ 12Gy までは低下しなかった (Fig. 1)。すなわち DTH 反応に関与する細胞は 12Gy までは放射線抵抗性であると考えられる。DTH 反応の低下は 12 ~ 28Gy の照射で起こり、線量の増加に依存し

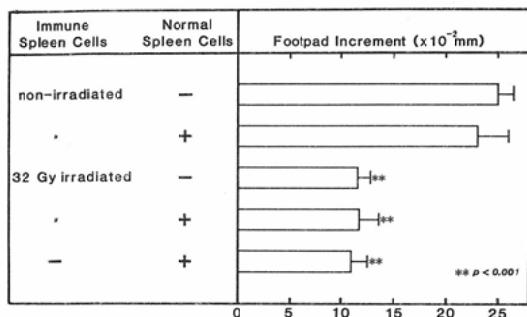


Fig. 3 Influence of normal spleen cells (1×10^7 cells) which were added to 32Gy irradiated or non-irradiated immune spleen cells on the DTH response. The immune spleen cells with or without normal spleen cells were mixed with MMC-treated tumor cells (1×10^6 cells) and inoculated into the footpad of normal mice. The top column represents non-irradiated active control. The bottom column represents negative control without immune spleen cells. Each column represents mean \pm SE of 7 experiments.

**p < 0.001; compared with non-irradiated control.

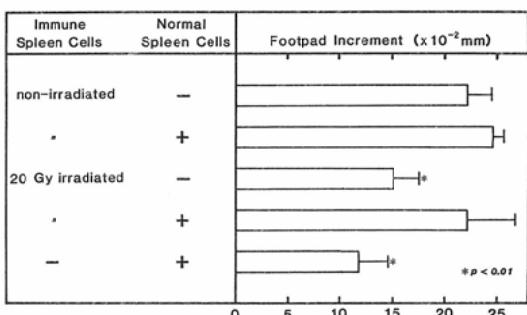


Fig. 4 Influence of normal spleen cells (1×10^7 cells) which were added to 20Gy irradiated or non-irradiated immune spleen cells on the DTH response. The immune spleen cells with or without normal spleen cells were mixed with MMC-treated tumor cells (1×10^6 cells) and inoculated into the footpad of normal mice. The top column represents non-irradiated active control. The bottom column represents negative control without immune spleen cells. Each column represents mean \pm SE of 42 experiments.

**p < 0.01; compared with non-irradiated control.

て認められた。これは免疫脾臓細胞中のDTHエフェクター細胞の放射線感受性が比較的低いことを示していると考えられる。

② 放射線照射から効果発現に要する時間

免疫脾臓細胞を放射線照射2時間後、又は24時間後にマウス足蹠に接種した結果は、両者に有意な差がなかった(Fig. 2)。このことから免疫脾臓細胞への放射線照射の効果は照射後約2時間の接種で充分発現すると考えられる。したがって以後の実験は、照射約2時間後に接種した。

③ DTH反応に関与する腫瘍特異的T_{DTH}細胞と非特異的細胞の放射線感受性の差

DTH反応は、抗原に対して特異的に反応するT_{DTH}細胞が抗原を認識しリンフォカインを産生し、この液性因子によってマクロファージ等の非特異的細胞が炎症反応を起こすと考えられている。免疫脾臓細胞に対する放射線照射によって生じたDTH反応の低下は、これら両者の放射線感受性を一括してみていることになる。20Gy照射した免疫脾臓細胞に正常脾臓細胞を加えて接種すると、非照射とほぼ同様のDTH反応が見られた(Fig. 4)。この現象はDTH反応に非特異的に関与する細胞が正常脾臓細胞中に含まれており、これがDTH反応の回復に働いたためと考えられる。すなわち20Gyでの反応の低下は免疫脾臓細胞中のマクロファージの障害によるものと思われる。これを支持するデーターは本論文では示してはないが、我々は20Gy照射した免疫脾臓細胞に、正常脾臓細胞から分離したマクロファージ(付着性細胞)を加えるとDTH反応は回復するが、非付着性細胞を加えても反応は回復しないことを観察している。マクロファージの放射線感受性に関しては、貪食能が3,000~5,000R照射後も保持され⁸⁾、抗原提示機能も同様に強い放射線抵抗性があることが報告されている⁹⁾。これらの報告より、16~20Gyの照射でマクロファージが死滅したとは考えにくく、DTH反応の低下は、リンフォカインに対するマクロファージの反応性あるいは炎症反応を惹起する能力が照射によって障害されたと考えられる。

一方32Gy照射後正常脾臓細胞を加えて接種し

ても反応の回復が起こらなかった (Fig. 3)。このことは、 T_{DTH} 細胞が32Gyによって完全に抑制されたことを示唆している。以上の結果より T_{DTH} 細胞は20Gyで失活せず比較的放射線抵抗性と考えられる。一般にリンパ球の放射線感受性は、動物の細胞のなかで最も高いものの1つでありそのDo値は75~100radとされている¹⁰⁾。しかしリンパ球の放射線感受性は、各サブセット群、マイトジエンや抗原刺激の有無、刺激後の期間によって異なる¹¹⁾。成熟リンパ球では未熟なものと比較して放射線抵抗性であることが知られている。 T_{DTH} 細胞では前駆細胞の放射線感受性は約5Gyと報告されている¹²⁾が我々の実験では成熟した T_{DTH} 細胞であるため20Gyには抵抗性であったと思われる。ヒッジ赤血球を抗原としたDTH反応において免疫脾臓細胞に1,500R照射して、抗原細胞と共に正常マウスの足蹠に接種するとDTH反応が発現する。しかし、recipientの正常マウスにあらかじめ1,500Rの照射を行なったのちに、足蹠反応を行なうとDTH反応はおこらないということが報告¹³⁾されている。この結果から抗原特異的 T_{DTH} 細胞は1500Rに抵抗性であるが、DTH反応に必要な正常マウス由来の非特異的細胞は1,500Rで失活していると考えられる。このことは我々の実験結果ともよく一致する。

④ 腫瘍特異的 DTH 反応と抗腫瘍効果

DTH反応は腫瘍特異的免疫反応の一つと考えられている。他の腫瘍特異的免疫反応としては、①細胞障害性T細胞(CTL)、②抗腫瘍抗体と補体により細胞破壊に至る機構、③抗体がK細胞やマクロファージのようなFcレセプターを有する細胞と共に腫瘍細胞破壊を起こす機構(ADCC)等がある。非特異的な反応としては、①活性化マクロファージ、②Natural Killer(NK)、③Lymphokine Activated Killer(LAK)等の細胞障害機構が知られている。これらの抗腫瘍活性の多くは従来in vitroで見出されていた。しかし、in vitroでの細胞障害性を示す抗腫瘍エフェクター細胞が必ずしもin vivoでの腫瘍排除に働くとは限らないことが報告されている^{5,6)}。C3HマウスのMH134腫瘍において我々が用いた免疫条件では、in vivo

で抗腫瘍性を持つT細胞サブセットはLyt 1⁺2⁻細胞群であり、これには T_{DTH} 細胞とヘルパーT細胞が含まれている^{3,7)}。さらにこの抗腫瘍機構が働くためにはマクロファージが必要であることから、腫瘍の排除はDTH反応を介して行なわれることが示唆される^{4,7)}。また、腫瘍で免疫したモルモットに腫瘍細胞を接種すると強いDTH反応と共に腫瘍が拒絶されることが報告¹⁴⁾されている。これらの実験では腫瘍の排除にDTH反応が重要であると考えられる。今回我々の実験系では16~32Gyの放射線1回照射で、DTH反応に関与する細胞の機能が低下するという結果を得た。腫瘍の放射線治療において、担癌宿主に対する低線量の放射線照射によっては抗腫瘍作用のある T_{DTH} 細胞やマクロファージ等の活性は抑制されず、腫瘍拒絶作用を持続して行なうことが期待される。

V. まとめ

①免疫脾臓細胞に対する放射線照射では12GyまではDTH反応に影響しなかった。16Gy~28Gyでは照射線量に依存してDTH反応の低下が認められた。

②免疫脾臓細胞に20Gy照射後、正常脾臓細胞を加えると反応の回復がみられた。32Gyの照射では反応の回復がみられなかった。20GyではDTH反応に関与する非特異的細胞が障害され32Gyでは腫瘍特異的な T_{DTH} 細胞が障害されたものと考えられる。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲くださいました昭和大学医学部放射線科菱田豊彦教授、快く腫瘍細胞を供与してくださいました大阪大学医学部癌研究施設の浜岡俊之教授、藤原大美助教授に心から感謝いたします。

文 献

- 1) Radov LA, Haskell JS, Korn JH, et al: Correlation between tumor-specific systemic and in situ immunity as manifested by the delayed hypersensitivity response. *J Natl Cancer Inst* 62: 103~108, 1979
- 2) Tomita S, Fujiwara H, Yamane Y, et al: Demonstration of intratumoral infiltration of tumor-specific Lyt-1⁺2⁻ T cells mediating delayed-type hypersensitivity response and in vivo protective immunity. *Jpn J Cancer Res*

- (Gann) 77 : 182—189, 1986
- 3) 藤原大美：腫瘍に対する宿主免疫応答機構、免疫薬理、1 : 131—140, 1983
 - 4) Nakajima H, Fujiwara H, Takai Y, et al : Studies on macrophage-activating factor immune responses. J Immunol 135 : 2199—2205, 1985
 - 5) Fukuzawa M, Fujiwara H, Yoshioka T, et al : Effector cell analysis of tumor cell rejectin in vivo in two syngenic tumor systems exhibiting distinct in vitro cytotoxic mechanisms. Gann 75 : 912—919, 1984
 - 6) Fujiwara H, Fukuzawa M, Yoshioka T, et al : The role of tumor specific Lyt-1⁺²⁻ cells in eradicating tumor cells in vivo. J Immunol 133 : 1671—1676, 1984
 - 7) Fujiwara H, Takai Y, Sakamoto S, et al : The mechanism of tumor growth inhibition by tumor-specific Lyt-1⁺²⁻ T cells. J Immunol 135 : 2187—2191, 1985
 - 8) Buescher S, Gallin JI : Radiation effects on cultured human monocytes and monocyte-derived macrophages. Blood 63 : 1402—1407, 1984
 - 9) Schmidtke JR, Dixon FJ : The functional capacity of X-irradiated macrophages. J Immunol 108 : 1624—1630, 1972
 - 10) Markoe AM : The effect of combined radiation therapy and chemotherapy on the immune response. Prog Exp Tumor Res 25 : 219—228, 1980
 - 11) 坂本澄彦, 佐久間貞行(編集者) : 医学のための放射線生物学. 145—148, 秀潤社, 1985
 - 12) Bharambe SD, Sains KB, Sundaram K, et al : Effect of whole body gamma irradiation on delayed hypersensitivity to dinitrobenzene in CBA mice. Indian J Exp Biol 23 : 175—179, 1985
 - 13) Kettman J, Mathews MC : Radio-resistance of cells responsible for delayed hypersensitivity reactions in the mouse. J Immunol 115 : 606—608, 1975
 - 14) Zbar B, Wepsic HT, Borsos T, et al : Tumor-graft rejection in syngeneic guinea pigs : Evidence for a two-step mechanism. J Nat Cancer Inst 44 : 473—481, 1970