



Title	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-
Author(s)	浜田, 富三雄; 小川, 恭弘; 前田, 知穂 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 1985, 45(2), p. 407-426
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/18129
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—

神戸大学医学部放射線医学教室（主任：木村修治教授）

浜田 富三雄

高知医科大学放射線医学教室

小川 恭弘 前田 知穂

高知医科大学第2解剖学教室

瀬口 春道

（昭和59年9月7日受付特別提載）

（昭和59年12月10日最終原稿受付）

Analysis of Lymphocytes Infiltrated in Cancer Tissues of Patients During Radiation Therapy by the Method of Monoclonal Antibodies of Lymphocyte Subsets

Fumio Hamada

Department of Radiology, Kobe University School of Medicine

(Chief: Prof. Shuji Kimura)

Yasuhiro Ogawa and Tomoho Maeda

Department of Radiology, Kochi Medical School

Harumichi Seguchi

Department of Anatomy, Kochi Medical School

Research Code No. : 405.9

Key words : Radiation therapy, Lymphocyte infiltration,
Cancer immunity, Monoclonal antibodies, T cells
and subset

The subsets of lymphocytes infiltrated in cancer tissues from 13 cancer patients during radiation therapy were analyzed by the method of Biotin-Avidin-Horseradish Peroxidase using monoclonal antibodies (Leu-Series). The infiltration of T-cells and their subsets increased significantly during radiation therapy than before irradiation. Other immune cells such as monocyte/macrophage, B-cell, activated lymphoblast, NK cell and neutrophil changed little by radiation. These results show that the transient lymphoid infiltration during radiation therapy are mostly due to T-cells and their subsets, and suggest that they may be related to enhancement of host-immune responses to cancer.

I. 緒 言

近年、癌による死亡数の上昇は著しく1981年にはついに国民死亡原因の一位を占めるにいたった¹⁾。しかし治療面でも多くの努力がなされ、現在、主として手術、放射線、化学、免疫といった

各療法が単独にあるいは集学的になされている。このうち放射線治療はすでに古い歴史をもち、癌治療の大きな柱となっている²⁾。免疫については、古くから癌組織へのリンパ球浸潤と予後の関係³⁾⁴⁾、癌の自然退縮⁵⁾⁶⁾といった事例から注目され

てきたが、担癌生体への自家癌細胞移植の拒絶という移植免疫の研究⁷⁸⁾から、癌免疫学の急速な進歩、種々の免疫賦活剤の登場⁹⁾¹⁰⁾と現在最も脚光をあびている分野といえる。放射線治療と免疫の関わりは強く、免疫を担う主役であるリンパ球が放射線感受性が最も高い細胞の一つであることから放射線治療による全身の免疫能の低下というマイナス面^{11)~13)}とともに、その治療過程には免疫の関与^{14)~16)}がいわれており、abscopal effect (放射線単独治療において照射の影響のおよばない部位の癌の縮小をみる現象)や^{17)~19)}、動物実験における放射線照射において、放射線照射により癌の抗原性の増強が示唆されること²⁰⁾²¹⁾、20~30Gyの照射時に癌組織に一過性にリンパ球浸潤を認める^{22)~23)}といった現象から、放射線治療による癌の免疫応答の増強というプラス面も示唆されている²⁴⁾²⁵⁾。さて、癌と免疫の関係については、ヒトでは多く癌組織へのリンパ球浸潤と予後との関係から論ぜられてきた³⁾⁴⁾²⁶⁾²⁷⁾。多くの報告はリンパ球浸潤を宿主の防衛反応とみ、その予後との関連に肯定的であり、medullary carcinoma of the breast³⁾²⁷⁾、Hodgkin病²⁸⁾、胃癌²⁹⁾³⁰⁾等についてはすでに認められている。癌に対する免疫応答は、癌組織において癌細胞と免疫担当細胞のいわば闘争として形態学的に表現されているはずである。一部の癌を除いて、ヒトにおいて癌持異抗原の見出されていない現在、局所におけるリンパ球浸潤は癌免疫のいわば最も精度の高い状況証拠といえよう³¹⁾。癌組織浸潤リンパ球を浮遊細胞として解析した報告はみられるが³²⁾³³⁾、組織切片上でこの様なリンパ球のsubsetを明らかにした報告は少ない³⁴⁾。さらに、前述のごとく放射線照射により、癌組織に一過性にリンパ球の浸潤をみることはよく知られているが、そのsubsetを明らかにした報告は今だ認められない。さて、1975年、Köhler & Milstein³⁵⁾により開発された細胞融合法によって、リンパ球分化抗原に対するモノクローナル抗体が作製され、リンパ球subset分類に応用されるようになった。われわれは今回、Leu-seriesモノクローナル抗体(Becton Dickinson社, U.S.A.)を使用し、Warnke³⁶⁾らの方法に従い、Biotin-Avidin

Horseradish Peroxidase法により、癌組織におけるT-cellおよびそのsubset、各免疫担当細胞の浸潤の変化を放射線照射線量に応じて経時的に観察し若干の知見をえたので、末梢血における変化とあわせて報告する。

II. 対象および方法

1) 対象

1983年10月から1984年5月に至る8ヵ月間に、高知医科大学附属病院放射線科において放射線治療を施行した患者のうち13例を対象とした(Table 1)。男性は8例、女性は5例であり、年齢は40歳代から90歳代におよび、60歳代が5例と最も多かった。部位別には肺1例、舌3例、上顎3例、口腔底1例、歯肉2例、上咽頭1例、子宮頸部2例であった。頭頸部は13例中10例となった。組織型別には扁平上皮癌10例、未分化癌2例、腺癌1例であった。Case 3, 6, 8, 9, 10, 11, 13の7例は30~40Gyの術前照射例であり、Case 4, 5は40Gyまで外照射を行い、以後は腔内照射のため検体は採取していない。放射線照射中の併用化学療法はCase 1, 6, 7, 8, 13に施行されているが、動脈内注入は行っていない。照射はLinear accelerator ML-15MIII (三菱電機 K.K.) にて、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) Biotin-Avidin System

Biotin-Avidin SystemはBiotinとAvidinの極めて強い親和性を利用したもので(Affinity constant = 10^{15} M)、従来の方法に代って様々な分野で応用されるようになった³⁷⁾。Immuno enzymatic assayの分野にも応用されるようになり³⁸⁾、Warnkeら³⁶⁾の報告でも従来のEnzyme-labelの抗体だけを使った方法より、感度も特異性も高いとしている。今回、行なったThe three stage Biotin-Avidin System³⁶⁾³⁹⁾は、第I段階ではリンパ球surface antigenにモノクローナル抗体(mouse IgG)が結合し、第II段階ではBiotin標識抗マウスIgGがモノクローナル抗体に結合し、第III段階でHorseradish Peroxidaseを標識したAvidinがBiotinに結合し、Peroxidaseの作用によりDAB (3,3-diaminobenzidine)が発色すると

Table 1 Summary of Patients

Case	Sex	Age	Organ	Clinical stage	Histology	Combined chemotherapy
1	F	49	Maxillary S.	T1N0M0 (1)	S. C. C.*	PSK, 5-Fluorouracil
2	F	71	Lung	T3N2M0 III(2)	Adeno.**	PSK
3	M	42	Tongue	T2N0M0 II(2)	S. C. C.	(-)
4	F	60	Portio	III b(3)	S. C. C.	PSK
5	F	57	Portio	III b(3)	S. C. C.	(-)
6	M	69	Maxillary S.	T3N0M0 (1)	Undiff.***	Peplomycin, 5-Fluorouracil OK-432
7	M	53	Maxillary S.	T3N1M0 (1)	S. C. C.	Peplomycin, 5-Fluorouracil
8	F	94	Gingiva	T3N1M0 III(2)	S. C. C.	Peplomycin, 5-Fluorouracil OK-432
9	M	59	Tongue	T3N0M0 III(2)	S. C. C.	(-)
10	M	69	Tongue	T3N0M0 III(2)	S. C. C.	(-)
11	M	71	Floor of mouth	T3N1M0 III(2)	S. C. C.	(-)
12	M	63	Nasopharynx	T1N1M1 IV(2)	Undiff.	(-)
13	M	67	Gingiva	T2N0M0 II(2)	S. C. C.	Peplomycin, 5-Fluorouracil OK-432

*S. C. C.; Squamous Cell Carcinoma **Adeno.; Adenocarcinoma ***Undiff.; Undifferentiated Carcinoma

(1) JJC classification (2) UICC classification (3) FIGO classification

いうものである。

b) 操作手順

検体は癌組織辺縁より、各照射線量時に生検し液体窒素中に保存した。術前照射例については、最終照射日より、Case 3 は 1 日、Case 6 は 13 日、Case 8 は 15 日、Case 9 は 20 日、Case 10 は 5 日、Case 11 は 20 日、Case 13 は 17 日後にそれぞれ手術が施行され、摘出組織より検体を採取した。

染色時にクリオスタットにて $6\mu\text{m}$ の切片を作製、風乾後 10 分間アセトンにて固定する。風乾後、PBS (Phosphate Buffered Saline) で 5 分間インキュベーション後 (以下、Inc.)、モノクローナル抗体約 $0.2\mu\text{g}$ 滴下 15 分間 Inc. 後、PBS で 3 分間洗浄、Biotin 標識抗マウス IgG 約 $0.7\mu\text{g}$ 滴下、15 分間 Inc.、PBS で 3 分間洗浄、Peroxidase 標識 Avidin $4\mu\text{g}$ 滴下、15 分間 Inc.、PBS で 3 分間洗浄、0.3% Peroxide PBS 0.1ml で溶解した DAB 0.3mg を滴下、5 分間 Inc.、PBS で 3 分間洗浄、蒸留水中に 10 回つける。次に、DAB による褐色の staining をより黒化するため 0.5% 硫酸銅溶液を滴下 (なお黒化度は DAB 濃度と硫酸銅の作

用双方に依存している)、5 分間 Inc.、PBS で洗浄、蒸留水中に数回つける。その後、モノクローナル抗体標識以外の細胞の核を染めるためヘマトキシリン染色を行いマウント後、検鏡した。

Fig. 1 に操作手順のフロー・チャートを示す。モノクローナル抗体滴下からの各操作は組織切片の乾燥を防ぐため、すべて湿潤状態で行なった。

なお、使用した PBS は、DAB を溶解するため、Thimerosal を 20mg/l 加えた modified PBS である。

また、使用したモノクローナル抗体のうち、抗 Leu-M4 および抗 Leu-11b は IgM 抗体のため、操作手順のうち Biotin 標識抗マウス IgG は同 IgM (Vector 社, U.S.A.) を使用した。

c) 使用したモノクローナル抗体について

抗 Leu-1⁺細胞 (以下、1⁺と省略)

抗 Leu-1 はヒト T acute lymphoblastic leukemia 細胞で免疫された BALB/c マウス脾細胞と NS/1-AG4 マウス細胞とのハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体であり、末梢 T-cell の 95% 以上、胸腺細胞の 95%、脾、リンパ節の

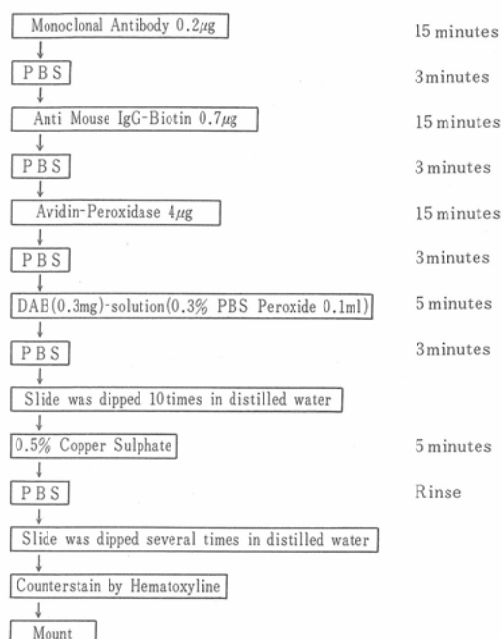


Fig. 1 Procedure

Apply about 0.2μg monoclonal antibody to the sections. Incubate at room temperature for 15 minutes. At the end of the incubation period rinse the section gently with PBS and immerse in buffer for 3 minutes. Repeat this procedure for anti-mouse IgG-Biotin etc. according to the schedule above.

T-cell areas のすべての細胞, B-cell areas の一部の細胞, 一部の Ig⁺CLL 細胞, T-leukemia, lymphoma 細胞および activated T-cell と反応するが, 正常の B-cell, monocyte および他の B-cell leukemia 細胞とは反応しないとされている³⁶⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾.

抗 Leu-2a⁺細胞 (以下, 2a⁺)

抗 Leu-2a はヒト末梢リンパ球のうち羊赤血球とのロゼット形成細胞で免疫された BALB/c マウス脾細胞と, マウス NS-1 ミエローマ細胞とのハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体であり, killer/suppressor T-cell および正常ヒト胸腺細胞の 85~95% と反応するとされている⁴¹⁾⁴²⁾.

抗 Leu-3a+3b⁺細胞 (以下, 3a+3b⁺)

抗 Leu-3a はヒト末梢リンパ球のうち, 羊赤血球とのロゼット形成細胞で免疫された BALB/c

Table 2 Monoclonal Antibodies and their Antigen Distribution on Immune Cell

Anti Leu-1	Pan T-cell Activated T-cell
Anti Leu-2a	Killer/Suppressor T-cell
Anti Leu-3a+3b	Helper/Inducer T-cell
Anti Leu-4	Pan T-cell
Anti Leu-HLA-DR	B-cell Monocyte/Macrophage Activated T-cell
Anti Leu-M3	Monocyte/Macrophage
Anti Leu-12	B-cell
Anti Leu-Transferrin Receptor	Activated Lymphoblast Monocyte/Macrophage
Anti Leu-11b	NK cell
Anti Leu-M4	Neutrophile

マウス脾細胞とマウス NS-1 ミエローマ細胞とのハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体で, helper/inducer T-cell および正常胸腺細胞の 95% と反応するとされる。

抗 Leu-3b は同様にして作製されたハイブリドーマから産生され, helper/inducer T-cell および正常胸腺細胞の 80~95% と反応するとされる。使用したのはこの 2 つの抗体を合せたポリクローナル抗体である⁴¹⁾⁴²⁾。

抗 Leu-4⁺細胞 (以下, 4⁺)

抗 Leu-4 はヒト胸腺細胞で免疫された BALB/c マウス脾細胞とマウス NS-1 ミエローマ細胞とのハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体であり, 羊赤血球ロゼット形成細胞の 80~95% および胸腺細胞の 65~85% と反応するとされる。また, 末梢リンパ球に対する mitogen としての作用を有し, 前述の抗 Leu-1 より T-cell 特異性は高いとされている⁴¹⁾⁴³⁾。

抗 HLA-DR⁺細胞 (以下, HLA-DR⁺)

抗 HLA-DR は, ヒト lymphoblastoid B-cell line RPMI 8846 細胞で免疫された BALB/c マウス脾細胞とマウス NS1/1-AG4 細胞とのハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体で, B-cell, monocyte/macrophage, activated T-cell, 胸腺上皮, 脾, リンパ節の B-cell areas およ

び B-cell lymphoma の各細胞と反応するとされる⁴⁴⁾⁴⁵⁾。

抗 Leu-M3⁺細胞 (以下, M3⁺)

抗 Leu-M3 は, rheumatoid arthritis の患者末梢血の monocyte で免疫された BALB/c マウス脾細胞とアウス SP 2/0 ミエローマ細胞とのハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体であり, 末梢血 monocyte の 70~90%, 胸水・腹水中の貪食細胞の 86~92% および末梢顆粒球のごくわずかと反応し, lymphocyte, activated T-cell, erythrocyte, platelet および immature monocyte cell line U937 とは反応しない。monocytic leukemia 細胞と反応するが, myelomonocytic leukemia 細胞とは反応せず, 一義的に成熟 monocyte/macrophage と反応する抗体とされている⁴⁶⁾。

抗 Leu-12⁺細胞 (以下, 12⁺)

抗 Leu-12 は, ヒト chronic lymphocytic leukemia 細胞で免疫された BALB/c マウス脾細胞とマウス P3-X63-Ag8653 細胞とのハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体で, ほとんどすべての末梢 B-cell および正常扁桃の B-cell areas の細胞と反応し, T-cell, 顆粒球および mitogen stimulated T-cell とはほとんど反応せず, monocyte とはごくわずかもしくは反応しないとされている⁴⁷⁾。

抗 Transferrin Receptor⁺細胞 (以下, Trans.⁺)

抗 Transferrin receptor は, Poke weed mitogen で刺激された末梢リンパ球の幼若化細胞で免疫された BALB/c マウス脾細胞とマウス P3-X63-Ag8653 ミエローマ細胞とのハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体で, すべての mitogen と alloantigen で活性化された lymphoblast, 多くのヒトの tumor cell line および正常末梢血 monocyte と反応するとされている⁴⁸⁾。

抗 Leu-11b⁺細胞 (以下, 11b⁺)

抗 Leu-11b は, ヒト顆粒球により免疫された BALB/c マウス脾細胞とマウス P3-X63 細胞とのハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体で, ヒト NK 細胞と反応するとされている⁴⁹⁾⁵⁰⁾。

る⁴⁹⁾⁵⁰⁾。

抗 Leu-M4⁺細胞 (以下, M4⁺)

抗 Leu-M4 は, ヒト顆粒球で免疫された BALB/c マウス脾細胞とマウス SP 2/0 ミエローマ細胞とのハイブリドーマより産生されるモノクローナル抗体で, ヒト好中球の 95% と反応し, eosinophile および platelet とは反応せず, monocyte および large granular lymphocyte とは弱い反応を示すとされている⁵¹⁾。

以上, 使用したモノクローナル抗体のヒト末梢血および組織における反応細胞を Table 2 に示す。

d) 末梢リンパ球 subset の解析

末梢リンパ球 subset については, レーザーフローサイトメトリーシステムを用いて行なった。その方法については既に報告した⁵²⁾。

III. 結 果

各モノクローナル抗体反応細胞は, DAB の反応物により褐色から黒色に染まり, それ以外の細胞核はヘマトキシリンで淡青色に染まっている。浸潤度は Shimokawara ら³⁴⁾の分類に従い, 認められないかごくわずかのもの; - (none), わずかに認めるもの; + (slight), 中等度に認めるもの; ++ (moderate), 著明に認めるもの; +++ (marked) と 4 段階に分類した。判定は, モノクローナル抗体を使用しないコントロール検体と比較検討して行った。全症例における判定結果を Table 3, 4 に示す。blank は検体が採取されなかったか, 染色不良により判定にたえなかったものである。Fig. 2~7 に症例を示す。光学顕微鏡と連動した撮影装置 (Olympus PM-10AD) にて 200 倍で撮影したものである。各照射線量時の検体は同一部位の連続切片であり, 写真は各検体の代表的部位を選んだ。

1) T-cell およびその subset について

Table 5 に免疫学的に意義のあると思われる ++ 以上の浸潤を示した症例数の放射線治療による変化を示す。すなわち, 治療前 ++ 以上の浸潤をみた症例数と放射線治療中 (20~40Gy) で ++ 以上の浸潤をみた症例数を比較した。

1⁺では, 放射線治療前に検索しえた 9 例中 3 例

Table 3 Score of T-cell and its Subsets

case	1 ⁺					2a ⁺					3a+3b ⁺					4 ⁺					HLA-DR ⁺				
	0	20	30	40	60Gy	0	20	30	40	60	0	20	30	40	60	0	20	30	40	60	0	20	30	40	60
1				++					+					++					++					++	
2	-	++		##	+	-	-		++	+	-			++	+	-	++		##	+	-	+		++	++
3	++		+			++		-			++		-			++		-			++				
4	-	++		##		-	##		++		-	++		++		-	++		##		-	+		++	
5	+	##		+		+	++		+		+	++		+		+	##		+		+	++		+	
6		+		+			+		+			+		+			++		+			##		++	
7	-			++	##	-			++	++	-			++	##	+			++	##	-			++	++
8	+			++		-			+		+			++		+			++		++			##	
9	##			++		##			++		##			+		++			++		##			##	
10	++	+				+	+				+	++				++	++				##	##			
11	-		-			-		-			-		-					-			-				
12						++					++					##					++				
13			++					++					++					++							

- : none, + : slight, ++ : moderate, ## : marked

Table 4 Score of other Immune Cells

case	M3 ⁺					12 ⁺					Trans. ⁺					11b ⁺					M4 ⁺				
	0	20	30	40	60Gy	0	20	30	40	60	0	20	30	40	60	0	20	30	40	60	0	20	30	40	60
1																									
2				+					+					+											
3																									
4		++		##			+		++			++							+					++	
5	-	++		+		+	++					++					++		+			++		+	
6		-		++			+		++		-		+						++						
7	-			-	-	-			-	+	-		-	+	-				-	-	-			-	-
8	+			+		+			+		+		+		+		+		+		+		+		
9	##			-		##			-		++		-		++		-		-		++			-	
10	-					-					-				+				++						
11	-		-			-		-			-		-			-		-			-		-		
12	+																								
13																									

- : none, + : slight, ++ : moderate, ## : marked

(33%)に++以上の浸潤をみたが、放射線治療中で++以上の浸潤は検索しえた12例中8例(67%)となった(危険率 $p < 0.05$ で有意: F検定)

同様に 2a⁺では、治療前++以上の浸潤は10例中3例(30%)であったが、治療中12例中6例(50%)となった。

3a+3b⁺では、治療前++以上の浸潤は10例中3例(30%)であったが、治療中12例中8例(67%)となった($p < 0.05$ で有意: F検定)。

4⁺では、治療前++以上の浸潤は10例中4例(40%)であったが、治療中12例中10例(83%)と

なった($p < 0.05$ で有意: F検定)。

HLA-DR⁺では、++以上の浸潤は10例中5例(50%)であったが、治療中10例中9例(90%)となった($p < 0.05$ で有意: F検定)。

以上、T-cell およびその subset については放射線治療前と比較して、治療中(20~40Gy)で++以上の浸潤を示した症例数が増加した。1⁺, 3a+3b⁺, 4⁺, HLA-DR⁺については統計的に有意であった($p < 0.05$: F検定)。

2) その他の免疫担当細胞について

Table 6に1)と同様に、T-cell およびその

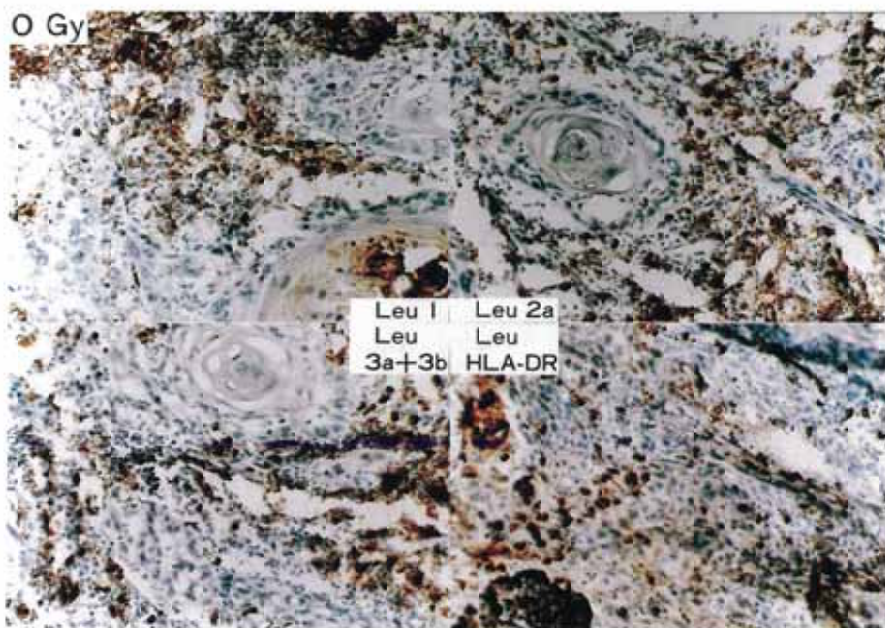


Fig. 2 Case 3

	++	++
Infiltration	++	++

Cells which bear the antigen recognized by the monoclonal antibody display brown black rings (surface staining) or diffuse brown black (cytoplasmic staining) in addition to the counterstain. Cells which do not bear the antigen only display the counterstain (purple color), with darker nuclear stain.

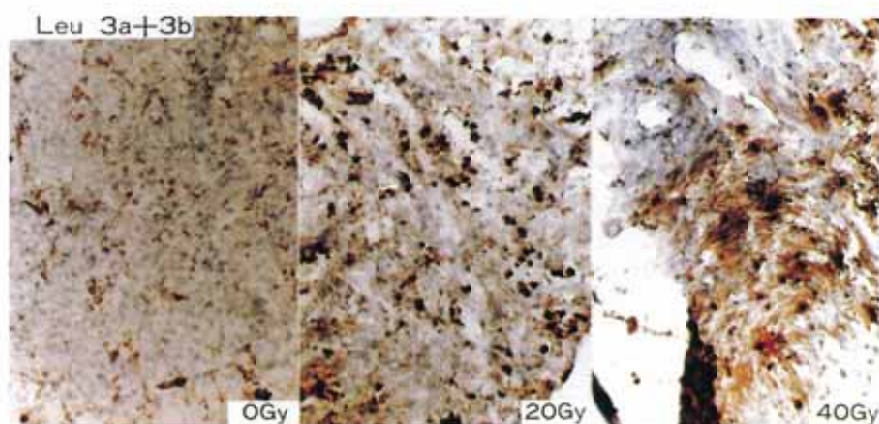


Fig. 3 Case 4

Infiltration	-	+	++	++
--------------	---	---	----	----

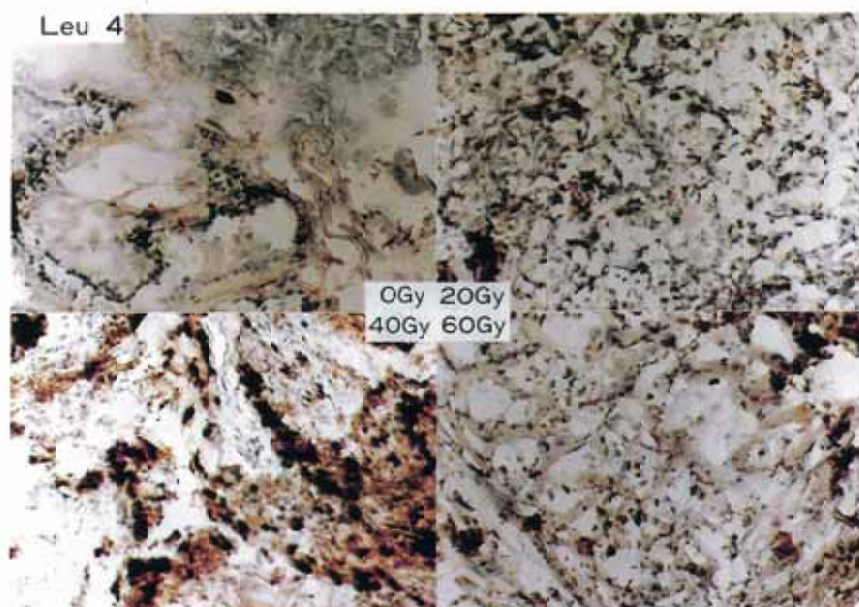


Fig. 4 Case 2

	-	++
Infiltration	+++	+

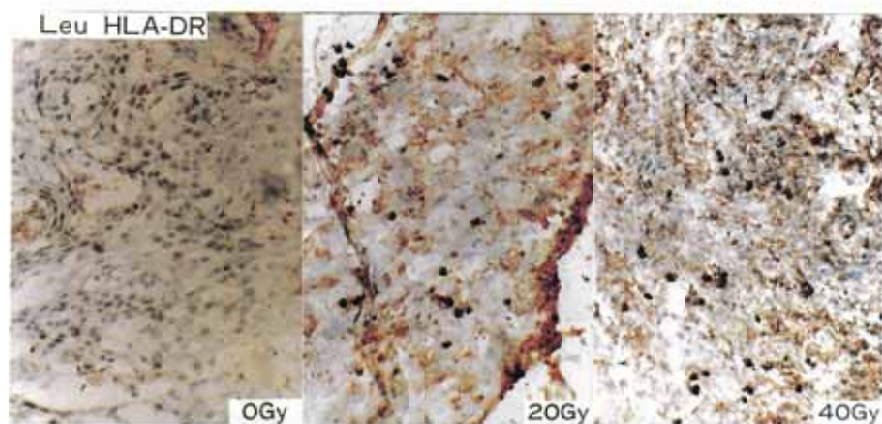


Fig. 5 Case 4

Infiltration	-	+	++
--------------	---	---	----

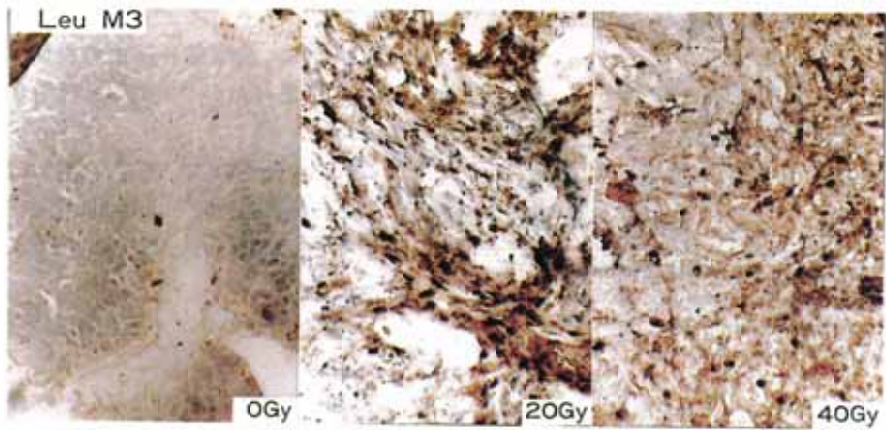


Fig. 6 Case 5

Infiltration - | ++ | +

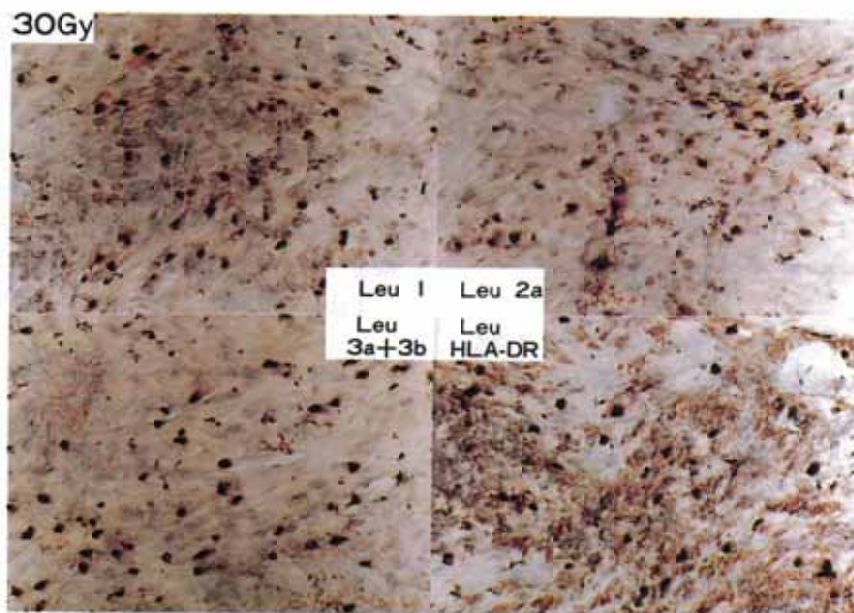


Fig. 7 Case 13

	++	++
Infiltration	++	++

Table 5 Change of Number of Patients with Infiltration ++~##.

—About T-cell and its Subsets—					
	1+ (1)	2a+	3a+3b+ (1)	4+ (1)	HLA-DR+ (1)
B	*3/9** (33%)	3/10 (30%)	3/10 (30%)	4/10 (40%)	5/10 (50%)
D	8/12 (67%)	6/12 (50%)	8/12 (67%)	10/12 (83%)	9/10 (90%)

B = Before Irradiation D = During Irradiation

(1) This change was significant to $p < 0.05$ by F test

*Numerator; Number of ++~##

**Denominator; Number of --~##

Table 6 Change of Number of Patients with Infiltration ++~##.

—About other Immune Cells—					
	M3+	12+	Trans+.	11b+	M4+
B	*1/7** (14%)	1/6 (17%)	1/5 (20%)	1/5 (20%)	2/5 (40%)
D	3/8 (38%)	3/8 (38%)	2/8 (25%)	2/7 (29%)	2/6 (33%)

B = Before Irradiation D = During Irradiation

*Numerator; Number of ++~##

**Denominator; Number of --~##

Table 7 Change of T-cell and its Subsets Infiltration by Irradiation

	1+	2a+	3a+3b+	4+	HLA-DR+
B < D	5	5	6	5	5
B = D	1	2	1	3	3
B > D	3	2	2	1	0

B = Before Irradiation D = During Irradiation

subset 以外の各免疫担当細胞が、++以上の浸潤を示した症例数の放射線治療による変化を示す。

M3+では、治療前++以上の浸潤は7例中1例(14%)であったが、治療中8例中3例(38%)となった。

12+では、治療前++以上の浸潤は6例中1例(17%)であったが、治療中8例中3例(38%)となった。

Trans.+では、治療前++以上の浸潤は5例中1例(20%)であったが、治療中8例中2例(25%)となった。

11b+では、治療前++以上の浸潤は5例中1例(20%)であったが、治療中7例中2例(29%)と

なった。

M4+では、治療前++以上の浸潤は5例中2例(40%)であったが、治療中6例中2例(33%)となった。

これらの細胞については、全体に放射線治療中++以上の浸潤度を示した症例は少なく、治療前、治療中ともに浸潤度+以下の症例が過半数以上であった。

3) 癌組織へのリンパ球浸潤度の放射線治療による変化

Table 7にT-cellおよびそのsubsetについて、放射線治療前および治療中(20~40Gy)に検体を採取しえた同一症例で、治療前の浸潤度と治療中の浸潤度の変化をみた。1+では9例中5例(56%)、2a+では9例中5例(56%)、3a+3b+では9例中6例(67%)、4+では9例中5例(56%)、HLA-DR+では8例中5例(63%)に治療中に浸潤度の増加を認めた。また、治療中に浸潤度の減少した症例は、1+ではCase 3, 9, 10, 2a+ではCase 3, 9, 3a+3b+ではCase 3, 9, 4+ではCase 3の、すべて舌癌の症例で、いずれも治療前すでに++以上の浸潤を認めていた。浸潤度に変化を認めなかったのは、1+ではCase 11, 2a+ではCase 10, 11, 3a+3b+ではCase 11, 4+ではCase 9, 10, 11, HLA-DR+ではCase 9, 10, 11であった。このうち、Case 11は共通して治療前、治療中共に浸潤度+であった。他はすべて舌癌の症例であった。

Table 8に同じくその他の免疫担当細胞の変化

Table 8 Change of other Immune Cell Infiltration by Irradiation

	M3+	12+	Trans+.	11b+	M4+
B < D	1	1	0	0	0
B = D	3	3	3	3	3
B > D	1	1	1	1	1

B = Before Irradiation D = During Irradiation

Table 9 Comparison between 2a+ and 3a+3b+

	0	20	30	40	60Gy
2a+ > 3a+3b+	0	1	0	1	0
2a+ = 3a+3b+	9	2	3	5	1
2a+ < 3a+3b+	1	1	0	1	2

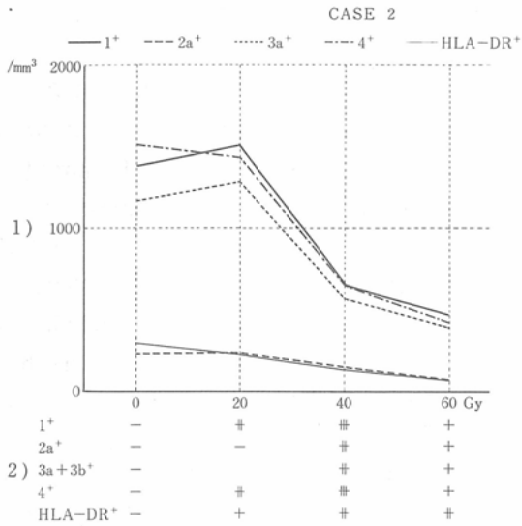


Fig. 8a

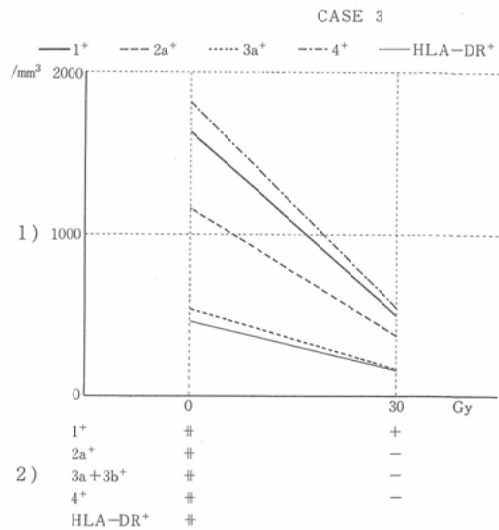


Fig. 8b

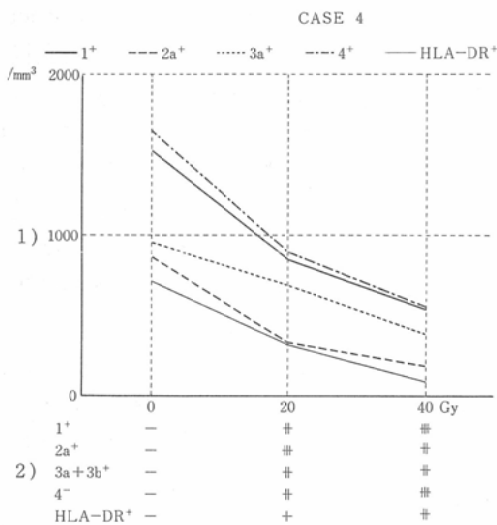


Fig. 8c

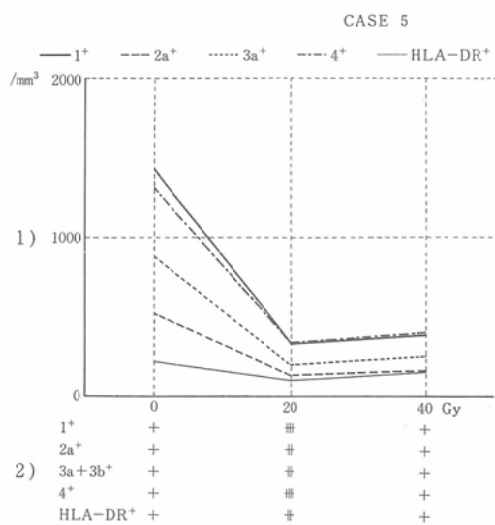


Fig. 8d

Fig. 8 Correlation between peripheral Lymphocyte Number and Lymphocyte Infiltration in the Cancer Tissue during the Radiotherapy

1) Peripheral Lymphocytes, 2) Lymphocytes in the Cancer Tissue.

For peripheral Lymphocyte, anti Leu-3a was used

を示す。M3+と12+で浸潤度の増強を認めた Case 5 の子宮頸部癌の 1 例を除けば、治療中浸潤度の上昇した症例を認めない。

4) 2a+ と 3a+3b+ の浸潤度の比較

Table 9 に 2a+ と 3a+3b+ の浸潤度を比較しえ

た全検体数を、各放射線照射線量について分類した。各照射線量時同等の浸潤度を示す症例が大多数で、今回行った 4 段階の判定基準では 2a+ と 3a+3b+ の間に浸潤度の違いは見出せない。

5) 放射線治療中の末梢血と癌組織でのリンパ

球サブセットの変化

Case 2, 3, 4, 5については, 1^+ , $2a^+$, $3a^+$, 4^+ , $HLA-DR^+$ について末梢血における変化も同時に測定した。Fig. 8にその変化を示す。Case 3の舌癌を除いた3例には、末梢血における変化と癌組織での浸潤度の変化とくに相関は認められない。

IV. 考 案

癌組織に浸潤しているリンパ球様細胞は、古くから病理学者の注目を集めてきた。今世紀初頭、Russelが初めてstromal reactionとよび、これを宿主の癌に対する免疫反応ととらえたのは1921年Murphyといわれる³¹⁾。1921年Maccarty⁴⁾らが胃癌について初めて予後と関連づけて報告して以来、予後との関連を論じた多くの報告がある。1949年には有名なMooreら³⁾のmedullary carcinoma with lymphoid infiltrationの予後が良好であるとの報告があり、その後多くの追試によって確かめられ²⁷⁾⁵³⁾⁵⁴⁾、乳癌における一組織型となっている。また、Black一派²⁶⁾⁵⁵⁾⁵⁶⁾は胃癌および乳癌について、その所属リンパ節のsinus histiocytosisと癌組織のリンパ球浸潤は予後に相関すると報告している。本邦でも胃癌についてInokuchi²⁹⁾、Watanabe³⁰⁾等の報告がある。Watanabeは胃癌においても乳癌におけるごとく、gastric cancer with lymphoid stromaの概念を提唱し、このような組織型の患者の予後がよいことを報告している。その他、子宮頸部癌⁵⁷⁾⁵⁸⁾、泌尿器系癌⁵⁹⁾、食道癌⁶⁰⁾、皮膚癌⁶¹⁾等多くの癌について報告がみられる。概ね、その予後との関連に肯定的であるが、それに懐疑的な見解も依然として根強い^{62)~66)}。例えば、1973年Morrison等⁶⁴⁾は日本とU.S.A.との比較において(日本では乳癌の予後がよい)、medullary carcinoma with lymphoid infiltrationは日本に多いが、全体にリンパ球浸潤と予後との間に相関はなかったと報告している。この問題に関して、Ioachim³¹⁾は現在のところ、乳癌のmedullary carcinoma with lymphoid infiltration, Hodgkin病以外には、はっきりした相関は認められないとし、患者の予後、癌の再発といった複雑な因子のからんだ問題を直

接、単純に癌組織のリンパ球浸潤と関連づけることは困難であるとしている。

一方、癌と免疫の関係については、近交系マウスやラットを用いての動物実験においてすすめられてきた。すでに1950年代、Foley⁷⁾、Prehn⁶⁷⁾等がmethylcholanthrene induced sarcomaを用いての移植実験で癌の抗原性を確かめている。その抗原性は腫瘍個々について独立したものであり、他の腫瘍と共通しないとしている。Baldwin⁶⁸⁾は種々の化学物質で誘発した癌、また、同じmethylcholanthreneで誘発した癌でもそれぞれその抗原性が異なるとまとめている。その他、ウイルス発癌、放射線発癌等の多くの報告により、いわゆる癌特異移植抗原の存在は証明されてきている⁶⁹⁾。さて、このような癌移植実験を背景に、癌が免疫系によって認識される抗原をもっているということから、1959年Thomas⁶⁹⁾、1970年Burnet⁷⁰⁾により、ヒトにおける発癌に際しての免疫監視説(Immune Surveillance System)がうたがされた。この説は今なお完全に証明されているとはいえないが、多くの支持を集め癌免疫研究の大きなhypothesisとなっている。この免疫監視の主役をなしているのはT-cellであるとされているが、その後さらに液性抗体、macrophage、NK cell等多くのsystemの関与もいわれている。

1968年Hellström⁷¹⁾らはin vitroにおいて、癌患者の末梢血中にヒト癌細胞を特異的に障害する細胞を見出した。その他、種々の方法で癌に対する細胞性免疫の役割が確かめられてきている⁷²⁾⁷³⁾。しかし、癌組織浸潤リンパ球のcytotoxicityは低かったとの報告⁷⁴⁾もあり、in vitroでの成績はそのままin vivoには結びつかないようである。それにはserum blocking factorの存在⁷⁵⁾、組織での免疫担当細胞のparalysis³¹⁾等、種々の原因が考えられるが、細胞性免疫が十分な機能を発現する条件が生体内においても整えられれば、細胞性免疫が癌拒絶に十分な機能を発揮すると考えられる⁷⁶⁾。

癌組織浸潤リンパ球subsetについての報告は意外に少ないが、その多くはT-cellであることは確かめられてきている。1978年Svenning等⁷⁷⁾は、ヒ

ト癌組織の細胞浮遊液で E-rosette 法および免疫蛍光法で、末梢血より T-cell の割合は低かったが、T-cell 41%, B-cell 18%であったと報告している。同じく、Häyry 等⁷⁸⁾はヒト癌組織の細胞浮遊液で、E-rosette 法、 α -naphtyl acetate esterase 染色で、seminoma では T-cell が 83%であったという。癌組織浸潤リンパ球 subset の解析は、正確には組織切片上で行なわれるべきであるが、技術的困難さもあってそのような報告は少ない。そのなかで 1976 年、Kikuchi 等⁷⁹⁾は動物実験において、抗 T-cell 血清を使い浸潤リンパ球の多くは T-cell であったとしている。また 1976 年、Husby 等⁸⁰⁾は免疫蛍光法で、その浸潤リンパ球の平均 80%は T-cell であったと報告している。1982 年、Shimokawara 等³⁴⁾は抗 T-cell 血清と抗 B-cell 血清を用いて、Immunoperoxidase 法によって乳癌患者の癌組織中には T-cell が predominant であったとしている。このように癌組織浸潤リンパ球の多くは T-cell であることが証明されている^{81)~83)}。

さて、放射線による癌の治療過程に免疫が関与していることはよく知られている^{84)~86)}。動物実験においても、放射線照射が癌の抗原性を高めることが報告されており、例えば、Crile 等²¹⁾はマウスに接種した Sarcoma180 を外科的に切除した群と、40Gy 一回照射で癌を破壊した群に、それぞれ癌細胞を再移植すると、放射線により破壊した群の方が免疫性をより強く長く保ち、肺への転移も少なかったとしている。また、興味深いことの一つに癌の自然退縮に似た abscopal effect (放射線単独治療において照射の影響のおよばない部位の癌の縮小をみる現象)^{17)~19)}があり、本邦においても、乳癌の術前照射例についての御厨ら¹⁸⁾の報告がみられる。この現象も免疫の関与を示すものと考えられる。

さらに、癌の放射線治療中に一過性に癌組織にリンパ球浸潤をみることは、大星・下里の報告²²⁾以来よく知られており、放射線による癌の免疫応答増強を示唆するものとされてきた^{23)~25)}。前述したごとく、癌と免疫の関わりは、癌組織において癌と免疫担当細胞のいわば闘争として、最も端的に

表現されているはずであり、このような浸潤リンパ球の subset の解析は、放射線治療と免疫の関わりを研究するうえで重要であるが、それについての報告は非常に少ない。そのなかで 1982 年、今中等²³⁾は動物実験で、放射線照射線量 20~30Gy で最も強い癌組織リンパ球浸潤を認め、 α -naphtyl acetate esterase 染色によってその多くは T-cell であると報告している。

今回、われわれはリンパ球分化抗原に対する Leu-series モノクローナル抗体 (Becton-Dickinson 社, U.S.A.) を用い、Biotin-Avidin-Horseradish Peroxidase 法により³⁶⁾、ヒト癌組織において放射線治療中に一過性に増加するリンパ球 subset の解析を行った。各モノクローナル抗体の特性および染色法については前述のごとくである。

T-cell およびその subset については、Table 5 に示すごとく放射線治療中に浸潤度++ (moderate) 以上をみた症例が多かった。1⁺、3a+3b⁺、4⁺および HLA-DR⁺については、放射線治療前と比べて有意な増加をみた ($p < 0.05$: F 検定)。さらに、放射線治療前および治療中 (20~40Gy) に検体を採取し染色を完成させた同一症例について検討しても、Table 7 に示すごとく浸潤度の増加をみた症例が多い。減少した症例は、1⁺では Case 3, 9, 10, 2a⁺では Case 3, 9, 3a+3b⁺では Case 3, 9, 4⁺では Case 3 のいずれも舌癌の症例で、これらの Case 3, 9, 10 は治療前すでに++以上の浸潤度を示し放射線治療効果は染色時、大星・下里分類の grade IV であり、最もリンパ球浸潤の強いとされる癌細胞の変性期を過ぎていたためと思われる²²⁾²³⁾。浸潤度に変化を認めなかったのは、1⁺では Case 11, 2a⁺では Case 10, 11, 3a+3b⁺では Case 11, 4⁺では Case 9, 10, 11, HLA-DR⁺では Case 9, 10, 11 であった。このうち、Case 11 は放射線治療前、治療中ともに全くリンパ球浸潤をみなかった症例である。治療効果は grade I~II でほとんど癌細胞に変性を認めず、また検体採取時は放射線照射終了後 20 日目であり、組織の線維化も影響していると思われる。他は Case 9, 10 の先に述べた舌癌の症例である。放射線治療に

より癌組織の浸潤度に変化をみなかったか、減少した症例は Case 3, 9, 10, 11 となった。したがって、放射線治療によって多くの症例で、一過性に T-cell およびその subset に癌組織の浸潤度の増加を認めるといえる。

2a⁺と3a+3b⁺については、Table 9 に同一症例での各放射線線量時の比較を示した。4段階の比較ではとくに差は認められない。各検体を比較検討すれば、2a⁺と比べて3a+3b⁺の方がより浸潤度は強いようであるが、末梢血においても3a+3b⁺は末梢リンパ球の40~60%、2a⁺は20~40%であるとされており、この差の範囲をこえるものではないと思われる。suppressor T-cell については放射線感受性が高いとされており⁸⁷⁾、また大量の癌細胞を移植した場合より、ごく少量の癌細胞を移植した時の方が生着率が高いといういわゆる sneaking through phenomenon をおこす原因等、癌免疫にその挙動が注目されているリンパ球であるが⁸⁸⁾、2a⁺は同時に killer T-cell を認識することもあって今回の検討ではその意義づけは困難である。ただ、T-cell の各 subset はそれぞれ複雑に関連しあって免疫学的役割を果たしているわけであり⁸⁹⁾、末梢における2a⁺と3a+3b⁺のバランスは、放射線照射癌組織に浸潤するリンパ球においても大きくはくずれていないといえよう。

HLA-DR⁺についてはその表現細胞は多いが、他の共通する M3⁺、12⁺と比較してその浸潤度は明らかに高く、その多くは activated T-cell を表すものと思われる。HLA-DR⁺は、放射線治療によりその浸潤度が増加した症例が有意に多い。activated T-cell はやがて effector T-cell へと分化していく細胞と考えられる。このことは、放射線照射により癌の免疫応答が増強することを、前の T-cell およびその subset の癌組織への浸潤増加の事実とともにより強く示唆しているものと思われる。

他の免疫担当細胞については、Table 6 に示すごとく治療中以上の浸潤度を示した症例は少なく、Table 8 に示すごとく同一症例で治療中浸潤度の増加した症例はほとんどなかった。

M3⁺については、monocyte/macrophage の細

胞性免疫において果す役割は大きいとされている。Evans 等⁹⁰⁾は動物実験で癌組織には5~56%の割合で含まれるとし、Eccles 等⁹⁰⁾は同じく動物実験において、癌組織の macrophage の割合は宿主の適切な免疫応答に関連し、また癌の転移を防ぐのに関与していると報告している。Lauder 等⁹¹⁾は50例の乳癌患者において、癌組織の macrophage の浸潤と癌転移の間には関係があったとしている。しかし、今回の検討では治療中以上の浸潤は Case 4, 5, 6 の3例にすぎず、治療前、治療中とも浸潤度以下の症例が多かった。

11b⁺ (NK cell) については、T-cell を欠除したヌードマウスにおいて発癌率が低いとされているが、NK 活性の高いことが見出され、Immune Surveillance System の主役を担っているのではと注目された細胞である⁹²⁾。しかし、その後ヌードマウスでも月齢14カ月を過ぎると発癌率が高まるとの報告もあり³¹⁾、さらに Vose 等⁹³⁾⁹⁴⁾ヒトの癌組織に浸潤しているリンパ球のNK活性は低かったと報告している。今回のわれわれの検討でも11b⁺の浸潤度は放射線治療前、治療中とも以下が大部分であった。

12⁺、Trans.⁺については、液性免疫を担うと思われる B-cell、immunoblast を表現するとされる。Trans.⁺については monocyte/macrophage も表現するが、Table 4 に示すごとく浸潤度以上の症例はいずれも M3⁺と共通している。液性免疫も ADCC (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)⁹⁵⁾、さらに免疫阻害因子と考えられる Immune Complex⁸⁸⁾等で注目されているが、今回の検索では放射線治療前、治療中とも12⁺、Trans.⁺の浸潤度は+以下の症例が多かった。

M4⁺については、好中球は主に炎症や壊死巣に集まるとされているが、癌免疫においても ADCC 等で何らかの役割を果たしているものと思われる⁹⁶⁾。しかし、今回の検索では、放射線治療前、治療中とも浸潤度は+以下の症例が多かった。

放射線照射による末梢リンパ球の著明な減少はすでに広く知られているところである。その subset については、すでに小川等^{97)~107)}が OKT series モノクローナル抗体を用いてくわしく報告

している。治療効果不良群には、放射線治療中に未熟胸腺細胞と思われる OKT6⁺が増加するといった興味ある事実等が報告されているが、ここでは詳細はふれない。今回、Leu-series を用いて、T-cell およびその subset について、同時に末梢リンパ球数を測定しえたのは 4 例あった。Fig. 8 に示すごとく、癌組織で浸潤度の減少した Case 3 の舌癌の症例を除くと、浸潤度の増加した 3 例では末梢リンパ球数との相関は認められない。過去の多くの報告からも^{2)11)~13)97)~107)}、放射線治療中の癌組織におけるリンパ球 subset の一過性の浸潤増加は、末梢血中に少なくとも数のうえでは全く反映されていないとみるのが妥当なところであろう。これは、末梢血中のリンパ球減少は放射線照射容積内を通過するリンパ球が放射線により障害されるためとみられるのに対し¹¹⁾¹²⁾、癌組織に浸潤するリンパ球 subset 増加は放射線照射による癌の免疫応答増強によると推察されるためである²²⁾²³⁾²⁵⁾。

さて、さきに述べたごとく癌組織に浸潤するリンパ球については古くから注目されているが、著明なリンパ球浸潤を認める癌は全体では決して多いものではない。medullary carcinoma with lymphoid infiltration の乳癌全体に占める割合は 2~5%²⁷⁾とされており、Shimokawara 等³¹⁾の報告のなかでも、乳癌において T-cell の 1/4 以上の浸潤は 31 例中 12 例である。胃癌についても、Watanabe 等³⁰⁾は gastric carcinoma with lymphoid stroma は全体の 4% 程度としている。しかし、放射線治療中に大部分の症例に一過性に癌組織にリンパ球浸潤をみることは周知の事実とあってよく、しかも今回の検索でこのようなリンパ球の大多数は T-cell およびその subset であることが明らかとなった。このことは、放射線治療において従来の殺細胞効果をねらった治療法のみでなく、新しい免疫学的治療法の可能性を示唆するものといえる。われわれはすでに放射線治療と免疫賦活剤との併用時期についての検討を行ってきたが¹⁰⁸⁾¹⁰⁹⁾、さらに小川等^{25)110)~119)}は、放射線照射によるこのような現象に着目し、MM46腫瘍と C3H/He マウスを用いた実験系において、20Gy

照射 7 日目の MM46腫瘍細胞とその局所の浸潤リンパ球をプログラムフリーザーおよび液体窒素中にて超低温保存し、これを免疫原とした特異免疫療法を成功させている。今回の検索結果は、さらに臨床面における新たな適応の可能性を示唆するものといえ、癌の放射線治療の新たな展開を求めて、さらに詳細な解析をすすめている。

V. 結 語

13 例の癌患者について、放射線治療による癌組織への種々のリンパ球 subset の浸潤の変化を、Leu-series モノクローナル抗体を用いて、Biotin-Avidin-Horseradish Peroxidase 法により検討した。

(1) 放射線治療中 (20~40Gy) の癌組織に増加するリンパ球は、その大多数は Leu-1⁺ (以下、1⁺のごとく省略)、2a⁺、3a+3b⁺、4⁺、HLA-DR⁺である T-cell およびその subset であった。

(2) 2a⁺ (killer/suppressor T-cell) と 3a+3b⁺ (helper/inducer T-cell) の比較では、今回の判定基準においてはとくに癌組織での浸潤度に差は見出しえなかった。

(3) 他のモノクローナル抗体との比較から、多くは activated T-cell を表していると思われる HLA-DR⁺の癌組織浸潤度の増加は (1) の事実と合せて、放射線照射による癌の免疫応答増強の可能性を示唆している。

(4) 他の免疫担当細胞を表現する M3⁺、12⁺、Trans⁺、11b⁺、M4⁺の各細胞は、放射線治療中 (20~40Gy) に治療前と比べて癌組織への浸潤度に増強を認めなかった。

稿を終えるにあたり、御指導を賜った神戸大学医学部放射線医学教室の木村修治教授、今城吉成講師、直接、研究に御協力いただいた猪俣泰典大学院生ならびに高知医科大学放射線医学教室の諸先生方に深謝いたします。

また、複雑な生検を施行いただき、さらに貴重な手術組織を提供くださいました高知医科大学歯科口腔外科尾崎登喜雄教授、大野彰彦助教授、米田和典医員、同産科婦人科学教室秋山實雄講師、同耳鼻咽喉科学教室田辺正博助教授、田島和幸助手、中谷宏章医員に深甚なる謝意を表します。

なお、本論文の要旨は、第 62 回日本医学放射線学会中国・四国地方会 (1984 年 7 月、徳島)、第 22 回日本癌治療学会総会 (1984 年 9 月、東京) の公募パネルディスカッションーモ

ノクロール抗体応用の現状—において発表した。

本研究の一部は、文部省科学研究費奨励研究(A) 58770785および59770762の補助による。

文 献

- 1) 厚生統計協会：国民衛生の動向，30：61—64，1983
- 2) 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。日本医放会誌，41：559—573，1981
- 3) Moore, O.S. and Foote, F.W.: The relatively favorable prognosis of medullary carcinoma of the breast. *Cancer*, 2: 635—642, 1969
- 4) Maccarty, W.C., Mohle, A.E.: Relation of differentiation and lymphocytic infiltration to postoperative longesity in gastric carcinoma. *J. Lab. Clin. Med.*, 6: 473—480, 1921
- 5) 中川俊二，吉村陸夫，永田九子，松岡 茂，池見西次郎：癌の自然退縮および長期生存例に関する心身医学的考察。心身医，21：217—227，1981
- 6) Mohr, S.J. and Whitsel, J.A.: Spontaneous regression of renal cell carcinoma metastasis after preoperative embolization of primary tumor and subsequent nephrectomy. *Urology*, 14: 5—8, 1979
- 7) Foley, E.J.: Antigenic properties of methylcholanthren-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res.*, 13: 835—843, 1953
- 8) Southam, C.M. and Brunshwig, A.: Quantitative studies of autotransplantation of human cancer. *Cancer*, 14: 971—980, 1961
- 9) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. and Shimizu, R.: Studies on the anticancer and streptolysin s-forming antibodies of hemolytic streptococci. *Jap. J. Microbiol.*, 11: 323—336, 1967
- 10) 塚越 茂：多糖類を利用することによる免疫化学療法の基礎的研究。医学のあゆみ，91：505—510，1974
- 11) Chee, C., Illbert, P. and Rickinson, A.: Depression of lymphocyte replicating ability in radiotherapy patients. *Br. J. Radiol.*, 47: 37—43, 1974
- 12) Raben, M., Walach, N., Galili, U. and Schlesinger, M.: The effect of radiation therapy on lymphocyte subpopulations in cancer patients. *Cancer*, 37: 1417—1421, 1976
- 13) 小川恭弘，木村修治：肺癌の放射線化学療法併用治療患者における免疫能パラメーターの評価。日本医放会誌，40：341—354，1980
- 14) 土屋武彦：局所照射における免疫作用の役割，抗腫瘍性細胞免疫について。日本医放会誌，36：922—929，1976
- 15) Moroson, H., Nowakowski, J. and Schachter, M.: Enhanced lymphocyte-mediated killing of tumor cells after tumor irradiation in vivo. *Int. J. Radiat. Biol.*, 33: 473—482, 1978
- 16) Powers, W.E., Palmer, L.A. and Tolmach, L.J.: Cellular radiosensitivity and tumor curability. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 24: 169—185, 1967
- 17) Nobler, M.P.: The abscopal effect in malignant lymphoma and its relationship to lymphocyte circulation. *Radiology*, 93: 410—412, 1969
- 18) 御厨修一，斎藤 勉，此枝紘一，松葉卓郎，島居 有人，佐藤 修，安藤秀治，横張竜一，山田清美，浅野 哲，松村健三，瀬戸輝一，高谷 治：術前照射を行なった進行乳癌における abscopal effect とその評価。日癌治，14：997—1008，1979
- 19) Kingsley, D.P.E.: An interesting case of possible abscopal effect in malignant melanoma. *Br. J. Radiol.*, 48: 863—866, 1975
- 20) Klein, G., Sjögren, H.O., Klein, E. and Hellström, K.E.: Demonstration of resistance against methylcholanthren induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res.*, 20: 1561—1572, 1961
- 21) Crile, G. Jr. and Deodhar, S.D.: Role of preoperative irradiation in prolonging concomitant immunity and preventing metastasis in mice. *Cancer*, 27: 629—634, 1971
- 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〕癌組織の治療過程に出現す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) 今中一文，今城吉成，小川恭弘，御勢久平，木村修治，伊東 宏：照射線量と腫瘍局所の間質反応の程度について。臨床免疫，14〔Suppl. 5〕：111—118，1982
- 24) 橋 武彦：腫瘍組織の表面抗原の表現と放射線照射。癌の臨床，20：84—89，1982
- 25) Ogawa, Y., Imanaka, K., Ashida, C., Takashima, H., Imajo, Y. and Kimura, S.: Active specific immunotherapy using the immune reaction of a low-dose irradiated tumor tissue. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, 9: 533—537, 1983
- 26) Black, M.M., Feeman, C., Mork, T., Harrei, S. and Cutler, S.J.: Prognostic significance of microscopic structure of gastric carcinomas and their regional lymphnodes. *Cancer*, 27: 703—711, 1971
- 27) Ridolfi, R.L., Rosen, P.P., Port, A., Kinne, D. and Mike, V.: Medullary carcinoma of the breast, A clinico-pathological study with 10 year follow-up. *Cancer*, 40: 1365—1385, 1977

- 28) Kellar, A.R., Kaplan, H.S., Lukes, R.J., Rappaport, H.: Correlation of histopathology with other prognostic indicators in Hodgkin's disease. *Cancer*, 22: 487—499, 1968
- 29) Inokuchi, K., Inutsuka, S., Furusawa, M., Soejima, K. and Ikeda, T.: Stromal reaction around tumor and metastasis and prognosis after curative gastrectomy for carcinoma of the stomach. *Cancer*, 20: 1924—1929, 1967
- 30) Watanabe, H., Enjoji, M. and Imai, T.: Gastric carcinoma with lymphoid stroma. Its morphologic characteristics and prognostic correlations. *Cancer*, 38: 232—243, 1976
- 31) Ioachin, H.L.: The stromal reaction of tumors: An expression of immune surveillance. *J. Natl. Cancer Inst.*, 57: 465—474, 1976
- 32) 赤座英之: 尿路悪性腫瘍における腫瘍内リンパ球浸潤の意義. T.B. リンパ球分画およびTリンパ球の subsets と機能について. *日泌尿会誌*, 72: 86—97, 1981
- 33) Eremín, O., Coombs, R.R., Prusero, T.D. and Plumb, O.: T-lymphocyte and B-lymphocyte subpopulations infiltrating human mammary carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 69: 1—8, 1983
- 34) Shimokawara, I., Imamura, M., Yamanaka, N., Ishii, Y. and Kikuchi, K.: Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance. *Cancer*, 49: 1456—1464, 1982
- 35) Köhler, G. and Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting of predefined specificity. *Nature*, 256: 495—497, 1975
- 36) Warnke, R. and Levy, R.: Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: A Biotin-Avidin-Horseradish-Peroxidase Method. *J. Histochem. Cytochem.*, 28: 771—776, 1980
- 37) Bayer, F.A. and Wilche, K.M.: The avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Trends in Biochem. Sci.*, 3: 257—259, 1978
- 38) Guesdon, J.L., Ternynck, T. and Avrameas, S.: The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 1131—1136, 1980
- 39) Wood, G.S. and Warnke, R.: Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and relevance to biotin-avidin detection system. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 1196—1204, 1981
- 40) Engelman, E.G., Warnke, R., Fox, R.I., Dilley, J., Benike, C.J., Levy, R.: Studies of a human T lymphocyte antigen recognized by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 1791—1795, 1981
- 41) Ledbetter, J.A., Evans, R.L., Lipinski, M., Cunningham-Rundles, C., Good, R.A. and Herzenberg, L.A.: Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T lymphocyte helper/inducer and T cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J. Exp. Med.*, 153: 310—323, 1981
- 42) Evans, R.L., Wall, D.W., Platsoucas, C.D., Siegal, F.P. and Fikrig, S.M.: Thymus dependent membrane antigens in man: Inhibition of cell mediated lympholysis by monoclonal antibodies to TH₂ antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 544—548, 1981
- 43) Borst, J., Prendiville, M.A. and Terhorst, C.: Complexity of the human T lymphocyte specific cell surface antigen T₃. *J. Immunol.*, 128: 1560—1564, 1982
- 44) Lampson, L.A. and Levy, R.: Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J. Immunol.*, 152: 393—398, 1980
- 45) Levy, R.M., Bergman, Y. and Finn, O.: Hybridoma monoclonal antibodies in the analysis of human cell surface antigens. *In Vitro*, 17: 1051—1057, 1982
- 46) Dimitriu-Bona, A., Burmester, G.R., Water, S.J. and Winchester, R.J.: Human mononuclear phagocyte differentiation antigens. I. Patterns of antigenic expression on the surface of human monocyte and macrophage defined by monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 130: 145—152, 1983
- 47) Meeker, T.C., Miller, R., Link, M., Bindle, J., Warnke, R. and Levy, R.: A novel human B lymphocyte antigen defined by a monoclonal antibody. (manuscript in preparation).
- 48) Sutherland, R., Jelja, D., Shneider, C., Newman, R., Kemshead, J. and Grevaves, M.I.: A ubiquitous membrane glycoprotein defined by monoclonal antibody. (In) Knapp, W., ed.: *Leukemia markers*, pp. 157—165, Academic Press, New York
- 49) Phillips, J.H. and Babcock, G.F.: NPK-15: A monoclonal antibody reactive against purified human natural killer cells and granulocytes. *Immunol. Lett.*, 6: 143—149, 1983
- 50) Lanier, L.L., Le, A.M., Philips, J.H., Warner, N. L. and Babcock, G.F.: Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) antigens. *J. Immunol.*, 131: 1789—1796, 1983

- 51) Beverley, P.C.L., Linch, D. and Peria, D.: Isolation of human haematopoietic progenitor cells using monoclonal antibodies. *Nature*, 287: 332—333, 1980
- 52) 小川恭弘, 前田知穂, 小川由紀子, 猪俣泰典, 森田 賢, 山本洋一, 小谷了一, 吉田祥二: 癌患者の放射線治療中のリンパ球サブセットの変動—フローサイトメトリーによる解析. *日癌治*, 18: 1883—1903, 1983
- 53) Richardson, W.W.: Medullary carcinoma of the breast. *Br. J. Cancer*, 10: 415—423, 1956
- 54) Bloom, H.J.G., Eer, F. and Field, J.R.: Impact of tumor grade and host resistance on survival of women with breast cancer, 28: 1580—1589, 1971
- 55) Black, M.M. and Asire, A.J.: Palpable axillary lymphnode in cancer of the breast. *Cancer*, 23: 251—259, 1969
- 56) Black, M.M., Backlay, T.H.C. and Hankey, B. F.: Prognosis in breast cancer utilizing histologic characteristics of the primary tumor. *Cancer*, 36: 2049—2055, 1975
- 57) 浜崎美景, 藤田 甫, 新太喜治, 高田 茂, 派崎睦: 子宮頸部の“リンパ球様浸潤を伴う髄様癌”—予後良好な頸癌の一組織型—. *癌の臨床*, 14: 787—791, 1968
- 58) Van Nagell, J.R. Jr., Donaldson, E.S., Wood, E. G. and Parker, J.C. Jr.: The significance of vascular invasion and lymphocytic infiltration in invasive cervical cancer. *Cancer*, 41: 228—234, 1978
- 59) Dixon, F.J. and Moore, R.A.: Testicular tumors. A clinicopathological study. *Cancer*, 6: 417—454, 1953
- 60) Takahashi, K.: Squamous cell carcinoma of the esophagus. Stromal inflammatory cell infiltration as a prognostic factor. *Cancer*, 11: 921—933, 1961
- 61) Maddox, J.C. and Evanx, H.L.: Angiosarcoma of skin and soft tissue: A study of forty-four cases. *Cancer*, 48: 1907—1921, 1981
- 62) Berg, J.W.: Sinus histiocytosis: A fallacious measure of host resistance to cancer. *Cancer*, 9: 935—939, 1956
- 63) Underwood, J.C.E.: Lymphoreticular infiltration in human tumors: Prognostic and biological implications: A review. *Br. J. Cancer*, 30: 538—548, 1974
- 64) Morrison, A.S., Black, M.M., Lowe, C.R., Macmahon, B. and Yuasa, S.: Some international differences in histology and survival in breast cancer. *Int. J. Cancer*, 11: 261—267, 1973
- 65) Berg, J.W.: Morphological evidence for immune response to breast cancer, An historical review. *Cancer*, 28: 1453—1455, 1971
- 66) Hacen, K., Doussal, V.L., Brunet, M., Lemoine, F., Guelin, P. and Hebert, H.: Prognostic index for clinical stage I cutaneous melanoma. *Cancer Res.*, 43: 2991—2996, 1983
- 67) Prehn, R.T., Main, J.M.: Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, 18: 769—778, 1957
- 68) Baldwin, R.W.: Tumor specific immunity against spontaneous rat tumors. *Int. J. Cancer*, 1: 257—263, 1966
- 69) Thomas, L.: Reaction to homologous tissue antigens and relation to hypersensitivity. (in) Lawrence, H.S., ed.: Cellular and humoral aspects of the hypersensitivity state. pp. 529—532, 1959, Hoeber-Harper, New York
- 70) Burnet, F.M.: The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.*, 13: 1—27, 1970
- 71) Hellström, I., Hellström, K.E., Pierce, G.E. and Yang, G.E.: Cellular and humoral immunity to different types of human neoplasms. *Nature*, 220: 1352—1354, 1968
- 72) Cerottini, J.C., Nordin, A.A. and Brunner, K. T.: Specific in vitro cytotoxicity of thymus derived lymphocytes sensitized to alloantigens. *Nature*, 228: 1308—1310, 1970
- 73) Pilch, Y.H. and Golub, S.H.: Lymphocyte-mediated immune responses to neoplasia. *Am. J. Clin. Pathol.*, 62: 184—211, 1974
- 74) Vose, M., Vanky, F. and Klein, E.: Human tumor-lymphocyte interaction in vitro. Comparison of the reactivity of tumor-infiltrating, blood and lymph-node lymphocytes with autologous tumor cells. *Int. J. Cancer*, 20: 895—902, 1977
- 75) Hellström, I. and Hellström, K.E.: Cell-mediated immune reactions to tumor antigens with particular emphasis on immunity to human neoplasms. *Cancer*, 34: 1461—1468, 1974
- 76) 石井良文, 武井 崇: Killer T細胞の役割, 遠藤武男編, 臨床免疫hand book, pp. 854—858, 1984, 日本臨床社, 大阪
- 77) Svenning, J.L., Closs, O., Harboe, M. and Svaar, H.: Characterization of lymphocytes isolated from non-lymphoid human malignant tumors. *Scand. J. Immunol.*, 7: 487—493, 1978
- 78) Häyry, P. and Totterman, T.H.: Cytological and functional analysis of inflammatory infiltrates in human malignant tumors. 1. Composi-

- tion of the inflammatory infiltrates. *Eur. J. Immunol.*, 8: 866—871, 1978
- 79) Kikuchi, K., Ishii, Y., Ueno, H. and Koshiba, H.: Cell-mediated immunity involved in autochthonous tumor rejection in rats. *Ann. New York Acad. Sci.*, 276: 188—206, 1976
- 80) Husby, G., Hoagland, P.M., Strichand, 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
- 81) Catalona, W.J., Mann, R., Nime, F., Potvin, C., Harty, J.L., Comolka I. and Eggleston, J.C.: Identification of complement-receptor lymphocytes (B cells) in lymph nodes and tumor infiltrates. *J. Urol.*, 114: 915—921, 1975
- 82) Schoorl, R., Riviere, A.B., Borne, A.E.G. Jr. and Feltkamp-Vroom, T.M.: Identification of T and B lymphocyte in human breast cancer with immunohistochemical techniques. *Am. J. Pathol.*, 84: 529—544, 1976
- 83) 古阪 徹: 頭頸部癌組織における T リンパ球について—免疫組織学的検討—. *日耳鼻*, 85: 557—566, 1982
- 84) 今城吉成, 御勢久平, 一柳明弘, 木村修治, 小川恭弘, 今中一文: 腫瘍免疫治療の展開 (1) 細胞性免疫を主として. *癌の臨床*, 29: 1512—1520, 1983
- 85) 御厨修一, 上村志伸, 加藤利雄, 大網 弘, 織田敏次: 腫瘍免疫治療の展開 (2) 放射線治療と腫瘍免疫. *癌の臨床*, 29: 1521—1536, 1983
- 86) 山下 孝: マウスにおける細胞性免疫能に対する放射線の効果. *日本医会誌*, 41: 887—893, 1981
- 87) Lotzová, E.: Experimental radiation and immune defense interactions. (In) Prasad, N., ed.: *Radiotherapy and cancer immunology*. pp. 1—20, 1981, CRC Press, Florida
- 88) 橋 武彦: 放射線治療と免疫療法の組合せ. 1. 腫瘍免疫の現状. *癌の臨床*, 29: 1492—1498, 1983
- 89) Evand, R.: Macrophages in syngeneic animal tumors. *Transplant.*, 14: 468—473, 1972
- 90) Eccles, S.A. and Alexander, P.: Macrophage content of tumors in relation to metastatic spread and host immune reaction. *Nature*, 250: 667—669, 1974
- 91) Lander, I., Aherne, W., Stewart, J. and Sainsbury, R.: Macrophage infiltration of breast tumors: A prospective study. *J. Clin. pathol.*, 30: 563—568, 1977
- 92) 熊谷勝男, 伊東恭悟: NK 細胞の役割. 遠藤武男編, *臨床免疫 handbook*, pp. 859—868, 1984, 日本臨床社, 大阪
- 93) Vose, B.M., Banky, F., Argov, S. and Klein, E.: Natural cytotoxicity in man: Activity of lymphnode and tumor infiltrating lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 7: 753—757, 1977
- 94) Moore, M. and Vose, B.M.: Extravascular natural cytotoxicity in man: Anti-K562 activity of lymph-node and tumor-infiltrating lymphocytes. *Int. J. Cancer*, 27: 265—272, 1981
- 95) 一柳明弘: 放射線治療中担癌患者における ADCC の変動. *日癌治*, 19: 1032—1040, 1984
- 96) Gale, R.P. and Zighelboim, J.: Polymorphonuclear leukocytes in antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Immunol.*, 114: 1047—1051, 1975
- 97) 小川恭弘, 前田知穂, 小川由紀子, 猪俣泰典, 森田 賢, 山本洋一, 小谷了一, 吉田祥二, 今城吉成, 木村修治: 癌の放射線治療におけるリンパ球サブセットの検討. 第 1 報 OKT 11⁺リンパ球について. *日癌治*, 19: 64—70, 1984
- 98) 小川恭弘, 前田知穂, 小川由紀子, 猪俣泰典, 森田 賢, 山本洋一, 小谷了一, 吉田祥二, 今城吉成, 木村修治: 癌の放射線治療におけるリンパ球サブセットの検討. 第 2 報. OKM 1⁺リンパ球について. *日癌治*, 19: 566—572, 1984
- 99) 小川恭弘, 前田知穂, 小川由紀子, 猪俣泰典, 森田 賢, 山本洋一, 小谷了一, 吉田祥二, 今城吉成, 木村修治: 癌の放射線治療におけるリンパ球サブセットの検討. 第 3 報. OKT 4⁺リンパ球について. *日癌治*, 19: 573—579, 1984
- 100) 小川恭弘, 前田知穂, 小川由紀子, 猪俣泰典, 森田 賢, 山本洋一, 小谷了一, 吉田祥二, 今城吉成, 木村修治: 癌の放射線治療におけるリンパ球サブセットの検討. 第 4 報. OKT 8⁺リンパ球について. *日癌治*, 19: 1041—1048, 1984
- 101) 小川恭弘, 前田知穂, 小川由紀子, 猪俣泰典, 森田 賢, 山本洋一, 小谷了一, 吉田祥二, 今城吉成, 木村修治: 癌の放射線治療におけるリンパ球サブセットの検討. 第 5 報. OKIa 1⁺リンパ球について. *日癌治*, 19: 2138—2145, 1984
- 102) 小川恭弘, 前田知穂, 小川由紀子, 浜田富三雄, 森田 賢, 山本洋一, 小谷了一, 吉田祥二, 今城吉成, 木村修治: 癌の放射線治療におけるリンパ球サブセットの検討. 第 6 報. OKT 3⁺リンパ球について. *日癌治*, 19: 2279—2286, 1984
- 103) 小川恭弘, 前田知穂, 小川由紀子, 浜田富三雄, 森田 賢, 山本洋一, 吉田祥二, 今城吉成, 木村修治: 癌の放射線治療におけるリンパ球サブセットの検討. 第 7 報. OKT 4⁺/OKT 8⁺について. *日癌治*, 20: 掲載予定
- 104) 小川恭弘, 前田知穂, 小川由紀子, 浜田富三雄, 森田 賢, 山本洋一, 小谷了一, 吉田祥二: 癌の放射線治療におけるリンパ球サブセットの検討. 第 8 報. OKT 10⁺リンパ球について. *日癌治*, 20: 掲載予定

- 105) 猪俣泰典, 小川恭弘, 前田知穂: 肺癌患者の放射線治療におけるリンパ球サブセットの変動—フローサイトメトリーによる解析—(第1編 総合的にみた変動について), 日癌治, 19: 1055—1067, 1984
- 106) 猪俣泰典, 小川恭弘, 前田知穂: 肺癌患者の放射線治療におけるリンパ球サブセットの変動—フローサイトメトリーによる解析—(第2編 治療効果別にみた変動について), 日癌治, 19: 1068—1078, 1984
- 107) 小川恭弘, 前田知穂, 小川由紀子, 猪俣泰典, 森田 賢, 山本洋一, 小谷了一, 吉田祥二, 今城吉成, 木村修治: 癌患者の放射線治療中の末梢血 OKT 6⁺リンパ球の変動—フローサイトメトリーによる解析—, 日癌治, 18: 2072—2078, 1983
- 108) 宮地千尋, 小川恭弘, 今城吉成, 木村修治: 放射線治療と免疫調整剤の併用時期に関する実験的研究, 日癌治, 17: 1035—1042, 1981
- 109) Miyaji, C., Ogawa, Y., Imajo, Y., Imanaka, K. and Kimura, S.: Combination therapy of radiation and immunomodulators in the treatment of MM46 tumor transplanted in C3H/He mice. *Oncology*, 40: 115—119, 1983
- 110) 小川恭弘, 高島 均, 今中一文, 奥野武彦, 平塚純一, 一柳明弘, 芦田千尋, 押谷高志, 今城吉成, 木村修治: 放射線治療を利用した活動性特異免疫療法の実験的研究, 第1報, 放射線治療との併用療法の効果, 日癌治, 17: 752—757, 1982
- 111) 今中一文, 小川恭弘, 高島 均, 奥野武彦, 猪俣泰典, 一柳明弘, 芦田千尋, 御勢久平, 押谷高志, 今城吉成, 木村修治: 放射線治療を利用した活動性特異免疫療法の実験的研究, 第2報, 免疫 C3H/He マウスにおける移殖 MM46腫瘍成長抑制効果について, 日癌治, 17: 1043—1047, 1982
- 112) 小川恭弘, 今中一文, 御勢久平, 今城吉成, 木村修治: 放射線照射腫瘍組織の免疫反応を利用した活動性特異免疫療法の実験的研究, 第3報, 超低温保存した免疫反応の効果, 日癌治, 17: 1293—1298, 1982
- 113) 今中一文, 小川恭弘, 御勢久平, 今城吉成, 木村修治: 放射線照射腫瘍組織の免疫反応を利用した活動性特異免疫療法の実験的研究, 第4報, 超低温保存した免疫反応の効果, 日癌治, 17: 1299—1304, 1982
- 114) 小川恭弘, 今中一文, 御勢久平, 今城吉成, 木村修治: 放射線照射腫瘍組織の免疫反応を利用した活動性特異免疫療法の実験的研究, 第5報, 超低温保存した免疫反応と OK-432の併用効果, 日癌治, 17: 1305—1310, 1982
- 115) 今中一文, 小川恭弘, 御勢久平, 今城吉成, 木村修治: 放射線照射腫瘍組織の免疫反応を利用した活動性特異免疫療法の実験的研究, 第6報, 非特異免疫賦活剤 PSK 併用による効果, 日癌治, 17: 2101—2106, 1982
- 116) 小川恭弘, 前田知穂, 吉田祥二, 山本洋一, 森田賢, 今中一文, 御勢久平, 今城吉成, 木村修治: 放射線照射腫瘍組織の免疫反応を利用した活動性特異免疫療法の実験的研究, 第7報, 超低温保存した免疫反応と PSK の併用効果, 日癌治, 18: 682—685, 1983
- 117) 今中一文, 御勢久平, 一柳明弘, 芦田千尋, 浜田富三雄, 橋村孝久, 滝本佐栄子, 村上昌雄, 今城吉成, 木村修治, 小川恭弘: 放射線照射腫瘍組織の免疫反応を利用した活動性特異免疫療法の実験的研究, 第8報, Mitomycin C 処理活動性特異免疫療法の効果, 日癌治, 18: 940—945, 1983
- 118) 小川恭弘, 前田知穂, 吉田祥二, 山本洋一, 森田賢, 小川由紀子, 今中一文, 御勢久平, 今城吉成, 木村修治: 放射線照射腫瘍組織の免疫反応を利用した活動性特異免疫療法の実験的研究, 第9報, Mitomycin C 処理した免疫反応と OK-432の併用効果, 日癌治, 18: 940—945, 1983
- 119) 小川恭弘, 前田知穂, 吉田祥二, 山本洋一, 森田賢, 小川由紀子, 平塚純一, 今中一文, 今城吉成, 木村修治: 活動性特異免疫療法としての放射線照射腫瘍組織と放射線照射腫瘍細胞の効果の比較, 日癌治, 18: 1181—1188, 1983