

Title	担癌マウスの抗腫瘍効果に与える放射線局所照射の影響：放射線障害部位での免疫学的検討
Author(s)	森山, 知是
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/35342">https://hdl.handle.net/11094/35342</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

論文表題

担癌マウスの抗腫瘍効果に与える

放射線局所照射の影響

— 放射線障害部位での免疫学的検討 —

所属：大阪大学歯学部口腔外科学第二講座

著者：森山知是

## 緒言

悪性腫瘍の治療において、腫瘍局所制御効果の高い放射線療法は欠くことのできない治療法である。なかでも、頭頸部悪性腫瘍の治療においては、形態及び機能の保存の立場から、放射線療法のもつ意義はきわめて高い。

一方、この放射線療法において、局所照射が生体の免疫系に及ぼす影響については、多くの報告がなされている。1-15)免疫系をつかさどるリンパ球が放射線高感受性であるため、照射野内を循環するリンパ球への障害<sup>1)</sup>、照射野内に含まれるリンパ節、骨髄、脾臓などの重要臓器への障害などによって、放射線照射は免疫系に抑制的に働くものと考えられていた。事実、放射線治療中の末梢血リンパ球数の低下<sup>2)</sup>はよく見られることである。又、放射線治療患者のPhyto hemagglutinin(PHA)、ツベルクリン(Purified protein derivative, PPD)反応<sup>3)</sup>、ナチュラルキラー (Natural

killer, NK) 活性などのリンパ球機能が低下する(4, 5) という報告も多い。

近年ある特定の線量においては、腫瘍細胞が放射線照射により修飾され、抗原性が変化し、免疫能が増強するという報告(6, 7)や、リンパ球サブセットにおいて放射線感受性が異なり、感受性の強いサプレッサー-T細胞

(Suppressor T lymphocyte)の障害が強く、相対的にキラー-T細胞 (Cytotoxic T lymphocyte, CTL)が多くなるという報告(8-10)など、放射線照射による免疫増強を支持する報告もなされている。その他、放射線照射により腫瘍組織内に一過性のリンパ球浸潤が著明に認められたという報告(11, 12)、腫瘍組織への浸潤リンパ球と予後に正の相関が見られたという報告(13, 14)、Abscopal effect(15)など、種々な報告が見られることから、放射線照射による治療効果は、照射による直接の殺細胞効果の他に、宿主免疫能を介した間接的な抗腫瘍効果(以下抗腫瘍効果とする)も関

与しているということが推察された。

しかし、放射線照射を受けた局所組織は組織学的に大きな障害をうけており、これら障害をうけた局所での、免疫学的抗腫瘍効果の発現に関しては、疑問とされるところであるが、現在このことに関する報告はほとんどなされていない。

そこで、本研究では、放射線局所照射による担癌宿主免疫能及び局所免疫反応を検討し、さらに照射により障害を受けた部位でのエフェクター細胞 (effector cell: 免疫担当効果細胞) の関与につき検討を加えた。

## 実験材料ならびに実験方法

### 1. 実験動物

静岡県実験動物農業協同組合より供給された生後5週齢のBALB/c Cr Slc雄マウスを使用した。

### 2. 腫瘍材料

1) Meth-A: BALB/cマウスより発生したメチルコラントレン誘発線維肉腫Meth-A<sup>16</sup>(東北大学薬学部 橋本嘉幸教授より恵与を受けた)を実験に用いた。

2) YAC-1: Moloney ウイルス誘発リンパ腫YAC-1<sup>17</sup>)は、大日本製薬(大阪)より入手し、NK活性測定の際の標的細胞として用いた。

### 3. 細胞培養

Meth-AおよびYAC-1腫瘍細胞は、10%牛胎仔血清(Fetal calf serum, FCS)(Whittaker Co., U.S.A.)、2%ペニシリン・ストレプトマイシン混合液(Flow Lab., Australia)および重曹

を含む RPMI1640 培養液（日水製薬，東京）を用いて、37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件で培養器（ALSCO 社製，U.S.A.）中で培養した。培養液は2～3日ごとに交換した。

#### 4. Meth-A 腫瘍細胞の移植方法

移植には、BALB/c マウス腹腔内で継代している Meth-A 腫瘍細胞を用いた。Meth-A 腫瘍細胞を無菌的に採取し、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>を含まないリン酸緩衝生理食塩水（PBS(-)，Flow Lab., England）にて3回洗浄後、PBS(-)で1×10<sup>7</sup>個/mlに調整、浮遊液とした。なお、細胞数の算定には、Neubauer 改良型血球計算盤を使用した。この浮遊液0.1ml（Meth-A 1×10<sup>6</sup>個）を、注射器（23G×1<sup>1</sup>/<sub>4</sub>”針）を用いて、マウス下肢皮下に移植した。Meth-A 1×10<sup>6</sup>個移植時、生着率は100%、平均生存日数は45.2日であった（n=10）。

#### 5. 局所 X 線照射方法

X線照射にあたっては、無麻酔下にて10匹のマウスをアクリル製容器に固定し(図1)、照射を均一化するために照射台を回転させた。照射には、ソフテックスX線照射装置M-150型(大阪ソフテックス、大阪)を用い、130 kVp, 5mA, フィルター: 0.1mmCu, 照射野:  $\phi$  165mm, FSD: 30cm, 36.2cGy/minの条件下で照射した。この際のHVLは3.5mmAlで、実効電圧は、35.5keVであった。なお、照射線量はIONEX線量計Type2500/3(Nuclear Enterprises, England)を用いて測定し、吸収線量はR-rad変換係数 $F=0.9018$ )を用いて算出した。なお、照射側の下肢以外の部位は4mmPbで遮蔽した。遮蔽部位の線量は照射野における線量の0.1%であった。

照射の時期は、移植後1日目より照射を行う移植直後照射群(実験I)、及び腫瘍が10mm大の腫瘍として触知される10日目より照射を行う腫瘍形成後照射群(実験II)の2通りとした。



## 6. 腫瘍体積の測定

ノギスにて腫瘍の長径・短径を計測し、以下に示す Frindelら (19.20) の腫瘍体積計算式を用い腫瘍体積を算定した。

$$V = \frac{4}{3} \pi \left\{ (R+r-1) \times \frac{1}{2} \right\}^3$$

V : 腫瘍体積    R : 長径    r : 短径

## 7. 末梢血白血球数及びリンパ球数測定法

ヘパリン添加注射器にてマウス心臓穿刺により血液採取を行った。採取された血液は、白血球計算用チュルク試液(石津製薬K.K., 大阪)を用い、血球計算板にて白血球数を測定した。又、同血液の塗抹標本について、メイグリュンワルトーギムザ染色を行い、リンパ球の百分率を求め、 $1\text{mm}^3$ 当りのリンパ球数を算出した。

## 8. 脾臓リンパ球の分離法

マウスより無菌的に脾臓を摘出し、ステンレス網製サイトシーブ(#80, 亀井商店, 大阪)

上でプラスチック棒を用いて、すりつぶした。これを、RPMI-1640培養液に浮遊させ、軽くピペティングを繰り返して均等な細胞浮遊液とした。この細胞浮遊液から、Conray400（第一製薬，東京）-Ficoll(Pharmacia, Uppsala, Sweden)（比重1.090）を用いる比重遠沈法<sup>21)</sup>により、リンパ球を採取した。

#### 9. 中和試験 (Winn Assay)

in vivoにおけるキラー細胞活性を測定するために、以下の方法でWinn Assayを行った。Meth-A（標的細胞）と前述の方法で採取した脾臓リンパ球浮遊液（一部、さらに後述の抗体処理を行ったリンパ球を使用した）とを1:200の比率で混合し、リンパ球 $1 \times 10^7$ 個/mlとなるように10%FCS添加RPMI-1640培養液で調製後、37℃、1時間培養した。培養後PBS(-)で3回洗浄し、この混合液をMeth-A $5 \times 10^4$ 個/0.1mlPBS(-)となるように調製し、宿主反応を除外する為、24時間前にX線4 Gy

全身照射しておいたBALB/cマウスの下肢皮下に、混合液 0.1ml ( Meth-A  $5 \times 10^4$ 個 ) を移植した。移植後、経日的に腫瘍体積を測定した。

## 10. 抗体処理

### (1) 抗アジアロ GM<sub>1</sub>抗体<sup>22,23)</sup>

NK細胞の除去には、ウサギ抗アジアロ GM<sub>1</sub>抗血清 (和光純薬, 大阪) と低毒性モルモット補体 (マウスリンパ球用: Cedarlane, Canada) を用いた。抗アジアロ GM<sub>1</sub>抗血清 (10mg/vial) およびモルモット補体は、蒸留水 1ml/vial で溶解した後、RPMI-1640培養液で希釈して使用した。常法に従って採取した脾臓リンパ球をRPMI-1640培養液にて  $1 \times 10^7$  個/ml に調製し、これに抗アジアロ GM<sub>1</sub> 抗血清を 1:100 の濃度で 4℃、30分間作用させた後洗浄し、次に 5倍希釈のモルモット補体 2ml 中で 37℃、30分間インキュベートした。この細胞を培養液で 3回洗浄後、実験に用い

た。

## (2) 抗 Thy-1 抗体

T 細胞の除去には、抗 Thy-1 抗体<sup>24)</sup>

(Thy-1.2 F7D5 モノクロナール IgM 抗体 : Serotec, England) と モルモット 補体 を 用 いた。すなわち、 $1 \times 10^7$  個 / ml に 調 製 した 脾 臓 リンパ 球 浮 遊 液 に、抗 Thy-1 抗 体 を 1:1000 の 濃 度 で 4℃、30 分 間 作 用 さ せ た 後 洗 浄 し、次 に 5 倍 希 釈 の モルモット 補 体 2 ml 中 で 37℃、30 分 間 インキュベートした。この細胞を培養液で 3 回 洗 浄 後、実 験 に 用 いた。

## 1 1 . 細胞障害試験

### (1) エフェクター細胞の調製

前述の方法にて、脾臓リンパ球を採取し、10% FCS 添加 RPMI-1640 培養液で、 $1 \times 10^7$  個 / ml の細胞浮遊液に調製した。

### (2) 標的細胞の調製

NK assay では YAC-1 を 標 的 細胞 として 用 いた。標 的 細胞  $5 \times 10^6$  個 を  $^{51}\text{Cr}$ -Sodium

chromate (Specific activity; 240 mCi/mg, Amersham, England) 50  $\mu$ g を含む 10% FCS 添加 RPMI-1640 培養液 1ml に浮遊させ、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養器中で、1 時間 インキュベートして標識した。標識後、3 回洗浄し、10% FCS 添加 RPMI-1640 培養液で  $1 \times 10^5$  個/ml の細胞浮遊液に調製した。

### (3) NK 活性の測定

Brunnerら<sup>25)</sup>の <sup>51</sup>Cr 放出試験を用いた (図 2)。すなわち、マイクロプレート (96 U shaped wells, Flow Lab., U.S.A.) に上述のようにして調製したエフェクター細胞 (脾臓リンパ球) と標識細胞 (YAC-1) を、それぞれ  $1 \times 10^6$  個/0.1ml および  $1 \times 10^4$  個/0.1 ml ずつ加え (E/T ratio=100:1)、1 well あたりの全量を 0.2ml として、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 培養器中で 4 時間、静置培養した。なお、対照には、エフェクター細胞を含まない培養液 0.2ml を分注した。培養終了後、各 well より上清の 0.1ml を採取し、その放射活性 (cpm) をガンマ

カウンター (LKB 1280COMPUGAMMA, Finland) に  
より測定した。なお、実験群および対照群は、  
全上清 0.2mlのうち 0.1mlのみを測定してい  
るので、測定値すべて2倍し、それをそれぞ  
れの cpm of experimental release および  
cpm of spontaneous releaseとして次式に  
代入して、% of specific releaseを算出し、  
その値をNK活性とした。

% of specific release

$$= \frac{\text{cpm of experimental release} - \text{cpm of spontaneous release}}{\text{cpm of maximum release} - \text{cpm of spontaneous release}} \times 100$$

また、実験ごとにcontrolの値が変動する  
ため、各実験間のNK活性の比較には、次式  
のようにして求めた刺激係数 Stimulation  
Index (S.I.)を用いた。

$$S.I. = \frac{\text{実験群の \% of specific release}}{\text{control群の \% of specific release}}$$

## 12. 組織標本の作製

### (1) HE染色

マウス下肢の腫瘍組織は、下肢を切断し、直ちに10%中性ホルマリン液にて固定後、急速脱灰法(Plank u. Rychlo法)<sup>26)</sup>にて脱灰を行った。すなわち脱灰液に12時間浸した後、5%硫酸ナトリウム液中に2時間放置し、以下、通法に従い水洗、脱水、パラフィン包埋、薄切を行いパラフィン切片を作製した。脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡下で、観察した。

(2) 酵素抗体法(Avidin-Biotin-Peroxidase Complex法:ABC法)<sup>27)</sup>

組織標本中のリンパ球を、さらにサブセット(T細胞, B細胞, NK細胞)に分類するために、ABC法をもちいた。ABC法は、従来の酵素抗体法より、感度も特異性も高いとされ<sup>28)</sup>、以下の3段階の過程をへて染色が行われる。すなわち、第1段階では、リンパ球膜抗原にモノクローナル抗体(ラットIgG:一部ウサギ抗血清)が結合し、第2段階では、ビオチン標識抗ラットIgG(一部ウサギIgG)

抗体がモノクローナル抗体に結合し、第3段階で Horseradish Peroxidase を標識した Avidin が Biotin に結合し、Peroxidase の作用により DAB (3,3-diaminobenzidine: 同仁化学, 熊本) が発色するというものである。

図3に示したフロー・チャートの操作手順29)で、染色を行った。なお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、すべて湿箱中で行った。

今回一次抗体には、T細胞の染色に抗Thy-1.2抗体 (Rat IgG: Becton, U.S.A.)、B細胞の染色に抗マウスIgG抗体 (Rat IgG: Serotec, England)、NK細胞の染色にウサギ抗アシアロGM1抗血清 (和光純薬, 大阪) を使用した。二次抗体およびABCには、VECTASTAIN ABCキット (Vector Lab., U.S.A.) を使用した。又、マウスの顎下リンパ節の染色を行い Positive control とした。

### 13. 組織学的検索方法



## ( 1 ) リンパ球の浸潤

腫瘍胞巢内を実質、腫瘍胞巢の周囲組織を間質とし、リンパ球の浸潤を実質および間質に分けて検索を行った。間質へのリンパ球浸潤は、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( - )Point 0とし、全組織標本(180枚)を100倍の倍率で検鏡した結果、最も浸潤の程度が強かった標本群を( 卍 )Point 4、浸潤のほとんどみられない浸潤の程度が最も弱かった標本群を( ± )Point 1で示し、その間を( + )Point 2, ( 卍 )Point 3の2つに分けた<sup>30)</sup>。実質へのリンパ球浸潤も同様に、リンパ球浸潤の全く見られない標本を( - )Point 0とし、最も浸潤の程度が強かった標本群を( 卍 )Point 4、浸潤のほとんどみられない、浸潤の程度が最も弱かった標本群を( ± )Point 1で示し、その間を( + )Point 2, ( 卍 )Point 3の2つに分けた。なお、腫瘍組織の増殖に伴い腫瘍組織の中央部にできる壊死組織及び同部に浸潤するリンパ球は、今回

のリンパ球浸潤・腫瘍細胞壊死の組織学的検査から除外している。

## (2) 腫瘍細胞の変性・壊死

腫瘍細胞の変性は、腫瘍細胞の巨細胞化、核の変性・濃縮などが見られるもので、壊死は、腫瘍細胞が、ghost化、硝子様変性あるいは石灰化を示したものとした。評価は、腫瘍細胞の変性・壊死の全く見られない標本を(-) Point 0とし、最も変性・壊死の程度が強かった標本群を(+) Point 4、変性・壊死のほとんどみられなかった標本群を(±) Point 1で示し、その間を(+) Point 2、(+) Point 3の2つに分けた。

## (3) 各群の組織の総合評価

各群の組織の総合評価は、各群使用マウス3-5匹よりえられた検体に対して(-)~(+)の5段階の組織像判定を行った後、これらの平均をとった。なお各マウスについては、2ヵ所の切片を作製し、それぞれの評価の平均をとった。

#### 1 4 . 照 射 後 の 血 管 の 変 化 の 観 察

照 射 後 の 血 管 の 変 化 を 観 察 す る た め に 、 照 射 後 6 週 目 の 照 射 局 所 の 組 織 に て 、 非 照 射 側 と の 比 較 を 行 っ た 。 す な わ ち 、 前 述 の 方 法 に て マ ウ ス 右 下 肢 に 20Gy 照 射 後 、 6 週 目 に 屠 殺 。 両 側 下 肢 切 断 後 、 ホ ル マ リ ン で 固 定 し 、 通 法 に 従 っ て 、 パ ラ フ ィ ン 切 片 を 作 製 し た 。 脱 パ ラ フ ィ ン 後 、 マ ッ ソ ン ト リ ク ロ ー ム 染 色 を 行 っ た 。 本 法 に よ り 、 血 管 壁 は 橙 黄 色 、 周 囲 の 膠 原 線 維 は 青 色 に 染 る 為 、 容 易 に 血 管 を 識 別 で き る 。 な お 、 マ ウ ス は 5 匹 使 用 し 、 各 下 肢 2 ヲ 所 の 切 片 を 作 製 し た 。 血 管 の 比 較 に お い て は 、 COSMOZONE-1S に よ る 二 次 元 画 像 解 析 シ ス テ ム (Nikon, 東 京 ) を 使 用 し た 。 す な わ ち 、 顕 微 鏡 像 を モ ニ タ ー し た 画 面 上 で 、 血 管 を デ ジ タ イ ザ ー を 使 用 し て ト レ ー ス す る こ と に よ り 、 面 積 を 測 定 し た 。 測 定 に 際 し て は 、 切 片 上 で 最 大 で あ っ て 、 容 易 に 皮 下 に 観 察 さ れ る 伏 在 動 脈<sup>31)</sup> の 血 管 断 面 積 及 び 血 管

内腔面積を測定し、その比（内腔面積／血管  
断面積）で非照射側との比較を行った。

## 実験結果

### 1. 放射線照射のMeth-A腫瘍増殖に与える影響

in vivoにおけるMeth-Aの放射線感受性を検索するため、マウス下肢へMeth-A移植後1日目(移植直後照射群)及び、腫瘍が10mm大の腫瘍として触知される移植10日目(腫瘍形成後照射群)のそれぞれの時期より5Gy/dayの局所連日照射(以下局所照射とする)を行い、腫瘍増殖に与える影響を検討した。なお、各実験群にはマウス5匹を使用した。

図4(1)は、移植後1日目より、それぞれ5Gy/day, total 5 Gy, 10Gy, 20Gyの局所照射をおこなった後の腫瘍体積変化を示した。その結果、移植直後照射群(実験I)において, total 20Gyの照射において、腫瘍の生着及び増殖傾向を示さなかった。そこでMeth-A移植マウスに、照射によるMeth-Aの抗原の感作が行われるのみで、腫瘍の生着を認めない線量とし

て20Gyを以下の実験Ⅰ移植直後照射群の線量とした。

図4(2)は、腫瘍移植後10日目より、それぞれ5Gy/day, total10GY, 20Gy, 40Gyの局所照射をおこなった後の腫瘍体積変化を示した。その結果、腫瘍形成後照射群(実験Ⅱ)において、total20Gy以上の照射により腫瘍体積の増加の抑制効果が顕著に認められた。なお、40Gy照射群では、腫瘍増殖抑制効果は著明であったが、照射の直接の影響による体重減少及び生存日数の低下が著明に認められた為、主として20Gyを以下の実験Ⅱ腫瘍形成後照射群に与える線量とした。

なお、実験Ⅰ・実験Ⅱのそれぞれtotal 20Gyの照射スケジュールを図5に示した。

## 2. Meth-A in vivo 照射後の非照射部位における抗腫瘍効果

### (1)照射時期による比較

右下肢腫瘍に対する放射線照射後、照射に

よる障害・炎症などの直接の影響の及ばない左下肢を使って、照射後の抗腫瘍効果を検討する為に、図6に示す実験を行った。(以下、これを再移植実験とする。)すなわち、図5に示すスケジュールで右下肢の局所照射終了後、1日目、7日目、14日目、21日目のそれぞれの時期に、左下肢にMeth-A  $1 \times 10^6$ 個を移植し、左下肢腫瘍の生着率及び腫瘍体積の変化を検討した。なお、対照実験として、Meth-A移植後、右下肢の照射を行わなかった場合及び、腫瘍を移植せず右下肢の照射のみ行った場合を検討した所、いずれも左下肢に腫瘍が100%生着し、抗腫瘍効果は認められなかった。

その結果、移植直後照射群(実験I)では、照射後7日目より左下肢への移植腫瘍に対し有意な腫瘍増殖抑制効果を示した(図7-1)。

なお、生着率については、14日目に生着率40%と有意な抑制を示し、14日目をピークとし、生着率抑制効果は減少傾向を示した(表

1)。腫瘍形成後照射群(実験Ⅱ)では、照射後7日目に生着率43%及び有意の腫瘍体積の抑制効果を示したが、照射後14日目には、生着率100%を示し腫瘍体積抑制効果も減少した(図7-2,表1)。以上の結果、実験Ⅱにおける抗腫瘍効果は、照射後7日目に著明に認められるが、実験Ⅰに比しその効果は短期間のものであると考えられた。

#### (2)線量による比較(10Gy,30Gy)

次に実験Ⅱにおいて、右下肢への照射量を10Gy及び30Gyに変えた場合の抗腫瘍効果の比較を行った(図7-3,表1)。照射方法は、右下肢腫瘍移植10日目より同様に5Gy/day total 10及び30Gyの局所連日照射とした。

10Gyでは、早期よりの抗腫瘍効果が認められたが、右下肢腫瘍の照射による殺細胞効果が低い為、生存日数も短く、腫瘍体積の増加の抑制も前半に限られた。逆に30Gyでは、右下肢腫瘍の照射による殺細胞効果が増強するが、照射による免疫系への抑制の為か、左下



肢への抗腫瘍効果は減少した。従って、実験Ⅱにおいて、20Gyが照射した腫瘍の増殖を押さえる線量であり、高い抗腫瘍効果の認められる至適線量であると考えられた。

### 3. 放射線照射のマウス末梢血白血球数・リンパ球数・脾臓重量および脾臓リンパ球総数に与える影響

右下肢腫瘍に対し20Gy照射後のマウスの末梢血白血球数・リンパ球数・脾臓重量及び脾臓リンパ球数について、最も強い抗腫瘍効果の認められた実験Ⅰ照射後14日目・実験Ⅱ照射後7日目と、同時期の照射を行わなかった担癌マウス対照群 (Tumor control) 及び未処置マウス対照群 (Normal control) とを量的に比較検討した(表2)。なお脾臓重量の比較には、(脾臓重量 [mg] ÷ 体重 [g]) より求めた Spleen Index を用いた。

その結果、末梢血の白血球数及びリンパ球数において、対照群に比し腫瘍の抑制効果が

見られた実験群に量的な増加は認められず、むしろ実験Ⅱ照射後7日目で、Tumor control及びNormal controlに比し、有意な減少が見られた。

又、脾臓重量において、Tumor controlはNormal controlに比し有意な増加が見られたのに対し、実験群ではTumor controlに比し有意な減少、Normal controlに比し有意な増加が見られた。同様に脾臓リンパ球においても、Tumor controlはNormal controlに比し有意な増加が見られたが、実験群では脾臓重量程の変化は見られなかった。

又、腫瘍を移植せず、右下肢の照射のみ行った場合の照射対照群(Radiation Control)につき、照射後のマウスの末梢血白血球数・リンパ球数・脾臓重量及び脾臓リンパ球数を同様に検討した(表3)。本実験には、照射後7日目・14日目及び未処置マウス(Normal Control)を使用した。

その結果、放射線照射により、照射後末梢

血白血球数・リンパ球数・脾臓重量及び脾臓リンパ球数は、Normal Controlに比し減少傾向を示し、照射後14日目においても照射前の状態への回復は見られなかった。

#### 4. マウス脾臓リンパ球による中和試験

(Winn Assay)

実験結果3. ではリンパ球の量的な増加が認められなかった為、リンパ球の機能の面を検討した。実験は図8の如く脾臓リンパ球による中和試験を行った。すなわち、右下肢腫瘍に対し20Gyの照射を行った後、実験Iでは14日目、実験IIでは7日目のマウスの脾臓リンパ球を Effector cellとし、E/Tの比を200:1で行った。なお、対照として Tumor control及び Normal controlマウスの脾臓リンパ球を用いた。

その結果、実験Iの照射後14日目のマウス脾臓リンパ球には、対照群に比し、腫瘍体積の抑制効果が認められた(図9-1)。又、実

験Ⅱの照射後7日目のマウス脾臓リンパ球には、対照群に比し、有意な腫瘍体積の抑制効果が認められた(図9-2)。

そこで、さらにこの脾臓リンパ球のサブセットにつき検討を加えた。表4は、実験Ⅰ・実験Ⅱそれぞれのマウス脾臓リンパ球をNK細胞の表面マーカーであるアシアロGM<sub>1</sub>抗原に対する抗体及びT細胞の表面マーカーであるThy-1抗原に対する抗体で処理した後の、中和試験の結果である。移植10日目の腫瘍体積で比較を行った結果、実験Ⅰでは、有意差は認められなかったが、抗アシアロGM<sub>1</sub>抗血清及び抗Thy-1抗体で処理することで腫瘍体積の抑制効果は、減少した。実験Ⅱでは、両抗体の処理により有意に抑制効果が消失した。以上の結果、照射後の抗腫瘍効果にNK細胞及びT細胞の関与が示唆された。

#### 5. マウス脾臓リンパ球のNK細胞活性

実験結果4.においてマウス脾臓リンパ球

の in vivo 抗腫瘍活性が認められた為、  
in vitro におけるマウス脾臓リンパ球のNK  
活性につき検討を加えた。図2の如く、  
YAC-1を標的細胞として、4時間の $^{51}\text{Cr}$ 放出  
試験により、脾臓リンパ球のNK活性を、照射  
後経時的に測定した。なお、腫瘍を移植せず  
右下肢の照射のみ行ったマウスのNK活性を測  
定した所、表5に示す如くNK活性の増強は見  
られなかった。

実験Iでは照射後1日目、有意にNK活性の  
減弱が見られるが、徐々に回復し、照射後14  
日目には、Normal Controlに対し有意なNK活  
性の増強が認められた(図10-1)。実験IIに  
おいても照射後1日目、有意なNK活性の減弱  
が見られた。以後7日目には、Normal  
Controlに対し有意なNK活性の増強が認めら  
れたが、14日目には再び減弱した(図10-2)。  
以上の結果より、実験Iの照射後14日目及び  
実験IIの照射後7日目に、宿主免疫応答能の  
亢進がみられ、放射線照射の宿主免疫系への

関与が示唆された。

## 6. 左下肢（非照射側）の抗腫瘍効果発現部位における組織学的検討

### (1) 経時的変化

実験結果 2. で見られた抗腫瘍効果の背景にある effector cell の、局所への集積の有無を調べる為、組織学的検討を加えた。

実験には、実験 I 照射後 14 日目及び実験 II 照射後 7 日目のマウスを用い、局所照射反対側である左下肢皮下に Meth-A を移植後、経時的に屠殺した。通法に従い左下肢の H E 染色標本を作製し、組織学的にリンパ球浸潤及び腫瘍細胞変性・壊死の経時的変化を検討した（表 6）。対照として、未処置マウスの下肢皮下に Meth-A を移植したマウスの組織標本を使用した。

その結果実験 I 及び II において、間質及び実質へのリンパ球浸潤が、対照群ではほとんど見られない移植後 3, 5 日目より認められ

た。なお、浸潤の程度は、実験Ⅰの方がより強い傾向を認めた。又、腫瘍細胞の変性、壊死にも同様の結果が見られた。

## (2) 照射条件による比較

次に、照射後左下肢への移植までの日数につき、組織学的に比較検討を行った。

実験は、移植後照射群(実験Ⅰ:20Gy)、生着後照射群(実験Ⅱ:10Gy,20Gy,30Gy)の各照射条件による実験群につき、右下肢の局所照射終了後、1日目、7日目、14日目、21日目のそれぞれの各時期に、左下肢にMeth-Aを移植したマウスを用いた。表7(1)は、左下肢へ移植後5日目、表7(2)は左下肢へ移植後10日目における組織像を比較したものである。なお左下肢へ移植後5日目は、表6の結果より、実験群において初期よりのリンパ球浸潤の見られた時期にあたる。また左下肢へ移植後10日目は、実験群のリンパ球浸潤が増強すると共に、対照群にもリンパ球浸潤の認められた時期にあたる。

実験 I 及び実験 II とともに、実験結果 3 . の左下肢腫瘍の生着率及び腫瘍体積の抑制による抗腫瘍効果に概ね比例したリンパ球浸潤が見られた。すなわち、最も強い抗腫瘍効果の認められた実験 I では照射後 14 日目及び実験 II では照射後 7 日目に移植したマウスにおいて、移植後 5 日目及び 10 日目の各時期(リンパ球浸潤の初期及び最盛期)で、他の群に比し顕著なリンパ球浸潤が見られた。又、腫瘍細胞の変性・壊死にも同様の結果が得られた。

10Gy 照射群の左下肢移植後 10 日目では、リンパ球浸潤が顕著に見られたが、5 日目のリンパ球浸潤は、ほとんど見られなかった。逆に、30Gy 照射群では、5 日目でリンパ球浸潤が認められるが、10 日目では、ほとんど認めなかった。

以上の結果より、抗腫瘍効果の背景にある effector cell は、腫瘍局所へ集積することが示唆された。

### (3) 免疫組織学的検討



局所の浸潤リンパ球サブセットの解析を  
Avidin-Biotin-Peroxidase complex法(ABC法)  
を用いて、免疫組織学的に検討した。

実験は図11の如く、実験I移植後照射群で  
照射後14日目、実験II生着後照射群で照射後  
7日目にそれぞれ左下肢に腫瘍を移植し、左  
下肢腫瘍移植後7日目にマウスを屠殺、左下  
肢腫瘍部分を摘出し、図3に示した手順で染  
色を行った。なお、一次抗体には、T細胞  
の染色に抗Thy-1抗体、B細胞の染色に抗IgG  
抗体、NK細胞の染色に、抗アジアロGM1抗  
血清を用いた。各標本の評価方法は、各抗体  
の陽性細胞の浸潤の程度に0-4までの評点  
を付与し、1群5匹でその平均をとった。図  
12(1)(2)(3)に代表的な標本の同一部位にお  
ける200倍率の光顕像を示した。各標本左上  
のControlは、1次抗体にPBSを使用した  
Negative Controlの標本である。

その結果、実験群で、アジアロGM1及び  
Thy-1抗原陽性細胞浸潤が、担癌対照群に比

し、著明に認められた(表8)。又、浸潤の程度は、共に実験Iの方が著明であった。IgG陽性細胞は、実験Iで僅かに増加傾向が、認められた。

以上の結果より、抗腫瘍効果の背景にあつて、腫瘍局所へ集積していた effector cell は、主にT細胞及びNK細胞であることが示唆された。

#### 7. 右下肢(照射側)腫瘍部位における組織学的検討

右下肢(照射側)腫瘍における effector cell の集積についても、組織学的検討を行った。

実験には、移植直後照射マウス(実験I)および生着後照射マウス(実験II)を用い、右下肢照射後経時的に屠殺し、左下肢(非照射側)における組織学的検討(実験結果6)同様に検討を行った(表9)。その結果、実験Iでは、間質および実質へのリンパ球浸潤は共に照射

後 7 日目に最大となり、以後徐々に減少した。実験 II では、7 日目に著しい実質へのリンパ球浸潤を認めたのに対し、間質へのリンパ球浸潤は僅かであった。以後、実質へのリンパ球浸潤は徐々に減少したのに対し、間質へのリンパ球浸潤は短期間でほとんど消失していった。腫瘍細胞の変性・壊死は、照射による直接作用が加わり、両群共に顕著に認められた。

#### 8. Meth-A 移植前照射の腫瘍増殖に与える影響

これまでの実験結果に見られた effector cell が、照射による組織障害を受けた部位で、関与するか否かにつき検討を加えた。

初めに、照射による障害を受けた部位での、腫瘍の増殖を検討する為に以下の実験を行った。マウス下肢に各線量の放射線分割照射をした後、照射による急性炎症の消退した 6 週目に Meth-A を移植し、経時的に腫瘍体積を測

定した(図13)。その結果、線量の増加に伴い腫瘍の増殖は抑制され、20Gy前照射マウス群では、一端生着した腫瘍も100%消失した。従って、照射による組織障害は腫瘍の増殖にも抑制的に働くことが明らかとなった。

#### 9. 放射線照射の血管に与える影響

照射による組織障害が腫瘍増殖に与える要因の1つとして、照射後の局所障害部位での血管の変化につき検討を加えた。

実験には20Gyの前照射を行ったマウスを用い、照射側下肢及び非照射側下肢それぞれの伏在動脈の血管面積及び内腔面積を測定し、その比で非照射側との比較を行った(表10)。

その結果、20Gyの照射側では、非照射側に比し有意に血管断面積に対する内腔面積の比の減少が認められた。

#### 10. Meth-A 移植前照射の抗腫瘍効果に与える影響

腫瘍が100%生着する10Gyの前照射部位を用いて、前述の照射後の抗腫瘍効果を持つ effector cell が、放射線障害部位へも浸潤し、抗腫瘍効果をしめすか否かを検討する為に、図14に示す実験を行った。すなわち、左下肢を移植前照射したマウスを用い、対照群(左下肢未照射マウス群)同様の実験を行った所、前照射の有無に関係せず、生着率の低下が見られた。このことから、放射線照射された部位へも、照射によって得られた抗腫瘍効果を持つ effector cell が関与することが推察された。

#### 11. 照射部位での抗腫瘍効果の組織学的ならびに免疫組織学的検討

抗腫瘍効果のみられた前照射部位において、組織学的検討を行った。実験は、左下肢に照射を行わなかった群と、10Gy及び20Gyの前照射を行った群について、左下肢へ腫瘍移植後見られる局所反応を、組織学的に比較検討し

た(図15)。なお、実験Ⅰでは照射後14日目、実験Ⅱでは照射後7日目、担癌対照群では同時期の右下肢に処置を行っていないマウスを使用し、各マウスの左下肢へ腫瘍移植後7日目の組織標本を用いた。

その結果、実験Ⅰにおいて、浸潤リンパ球及び腫瘍細胞の変性・壊死は、前照射線量の増加と共に、減少傾向を示した。また、10Gy群、20Gy群を比較すれば、20Gy前照射群で減少の傾向が強く認められた。実験Ⅱ及び担癌対照群において、著明な減少傾向は認めなかった。

さらにこの局所放射線障害部位への浸潤リンパ球のサブセットの解析を、ABC法を用い免疫組織学的に行った(図16)。

その結果、実験Ⅰにおいて、前照射線量の増加と共に、すべてのリンパ球サブセットに減少が見られた。又、実験Ⅱ及び担癌対照群において、アジアロGM1及びThy-1陽性細胞は、10Gyの前照射群ではほとんど変化を示さなか

ったが、20Gyの前照射群において減少が見られた。

以上の結果、放射線照射による障害を受けた部位へも、抗腫瘍効果の背景にある effector cellが集積するが、集積の程度は、線量により多少減少する傾向が認められた。

## 考 察

頭頸部癌においては、機能及び形態保存の立場から、放射線治療のもつ意義はきわめて大きい。

近年放射線療法、外科療法、化学療法の外に、免疫療法が癌治療の場に積極的に導入されるようになった。しかし放射線療法も化学療法も共に宿主免疫能を障害する要因となり、人癌の多くが癌抗原性の低いものであることもあいまって、癌免疫療法はあくまで補助療法の域を出ていないのが現況である。しかし、放射線療法、化学療法が担癌宿主の持つ癌免疫能に対し必ずしもマイナスの面だけではなく、むしろ癌免疫の増強をもたらすことも判明してきた(6, 7, 32-36)。従って放射線療法、化学療法を適切に行うことにより、生体の持つ癌免疫能の増強を計ることは、今後の癌治療を考える上で重要なことである。

さて、放射線療法を行うことにより、照



射された局所は組織学的に障害を受け、免疫学的な作用の場として機能しなくなる可能性も十分にある。このことは、頭頸部癌の中でも上顎洞癌については、従来より議論のあるところである。上顎洞癌においては、放射線療法と動注法による化学療法を併用し、さらに放射線治療中に洞内の癌組織を可及的に搔爬減量する、いわゆる三者併用療法が本邦では主流を占めるに至っている<sup>37-41)</sup>。この際、原発巣に照射される放射線線量については、局所の癌抵抗性とくに癌免疫能を重視して10Gy程度の低線量で十分かつ適切であるとする考え方と<sup>37, 38)</sup>、放射線の持つ直接的な殺癌的な効果を期待する50Gy以上の線量を必要とする考え方<sup>39-41)</sup>が大きく対立している。

また、癌化学療法を効果的に行うために、免疫機構を利用したミサイル療法<sup>42-43)</sup>の検討も進められている。この際にも放射線の照射された局所における免疫機構の発現の状態

を十分に把握しておくことは、極めて重要なことと言える。

そこで本実験では、放射線治療による免疫増強を明らかにしえた実験系を用い、照射により障害をうけた局所での免疫反応につき検討を加えた。

従来より、放射線照射された腫瘍部位について、免疫学的に検討を加えた報告は、多数なされている(44-46)。しかし照射された腫瘍部位は、放射線照射の直接の影響を見るのには、自然であり確実な方法ではあるが、そこには、炎症により生じた非特異的な反応と、腫瘍免疫反応が混在し、個々の分析を不可能としている。そこで著者は、非特異的な炎症の認められない左下肢を使って、マウス右下肢腫瘍を放射線照射することによって誘導された局所腫瘍免疫の検索を行った。

その結果、右下肢腫瘍を放射線照射することによって、左下肢に腫瘍免疫が誘導されることが判った。

さらに図 14 に示すごとく、照射により障害を受けた部位(左下肢)へも右下肢腫瘍を照射することによって誘導された腫瘍免疫が作用することが明らかとなった。

そこで、初めに放射線照射による腫瘍免疫の増強につき考察を加えると伴に、放射線障害部位における抗腫瘍効果についてもさらに検討を加えた。

#### 1. 放射線照射による腫瘍免疫の増強

本実験に先立って、in vitroにおける Meth-A の放射線感受性を検索した所、生存曲線における  $D_{50}$  は 1.6 Gy であり、3 Gy の<sup>照射</sup>照射

により腫瘍の増殖は、完全に抑制された。

このことから、これまで報告されている

in vitroでの培養腫瘍細胞の中であって、

Meth-A 腫瘍細胞は標準的な放射線感受性を示す細胞であると思われた(1)。

そこで Meth-A 腫瘍細胞の in vivoにおける放射線感受性を測定し、以後の線量を決定

する為、放射線照射のMeth-A腫瘍増殖に与える影響を検討した。なお、本実験における照射方法は、一回照射に比べ正常組織の障害を軽減し、腫瘍を消退させるのに効果的である分割照射とした。その結果、実験Ⅰ：移植直後照射群では照射によって腫瘍の生着を認めない最小線量として20Gyを、また、実験Ⅱ：生着後照射群では腫瘍の増殖を抑制する最適線量として20Gyを以後の実験に用いる線量とした。さて現在、臨床の場において合計線量や全照射日数や分割法の異なる治療法の比較に当たっては名目標準線量(Nominal standard dose, NSD)の概念に基づいたTDF (Time Dose Fractionation)係数<sup>48)</sup>が用いられている。この係数を用いて、本実験の照射法によるtotal 20Gyの線量を換算したところ、通常の照射法(2Gy×5/week)でのtotal 32Gyの線量に相当した。人における照射量とマウスにおける照射量を単純に比較することはできないが、照射野を循環するリンパ球の量が

ら考えれば、マウスにとって人の受ける線量以上の免疫学的障害を受けていると想定される。

なお、実験 I においては、担癌状態が宿主免疫能に及ぼす影響を除外する為、腫瘍の生着を待たず移植直後より放射線照射を開始した。すなわち実験 I では、実験 II に比し宿主の受ける抗原量は少量であり、又、放射線により修飾を受けた Meth-A 腫瘍細胞の抗原を認識した、非担癌状態のマウスが使用されたことになる。

次に右下肢に移植された腫瘍に対し、放射線照射後の抗腫瘍効果を検討する為、照射による障害・炎症などの及ばない左下肢を用いた再移植実験を行った。同様の実験は、それぞれの条件は異なるものの、土屋<sup>49)</sup>、Crileら<sup>50)</sup>によって報告されている。土屋は、マウス両側下肢に二種類の量の腫瘍を移植し、片側の腫瘍に 20Gy の照射後、反対側の少量移植した腫瘍 (1/40 量) が消失したと報告してい

る。Crileらは、さらに照射(40Gy)と患肢の切断とを比較し、照射の場合にのみ再移植腫瘍に対する抗腫瘍効果や肺への転移が抑制されたと報告している。しかし、照射開始時期、照射後再移植までの期間、線量につき、一連の詳細な検討を行った研究は未だ報告されていない。

そこで本実験では図6の如く、実験I・IIの2種類の照射開始時期、照射後1,7,14,21日目の再移植までの期間、10,20,30Gyの線量について検討を行った。その結果、実験Iでは照射後14日目、実験IIでは照射後7日目に著明な抗腫瘍効果を認めた。又、照射を行わなかった担癌対照群や、照射のみ行った照射対照群では、抗腫瘍効果が認められなかったことから、この抗腫瘍効果は、腫瘍が放射線照射されることで誘導されたものであることが明らかとなった。

なお、実験Iでは照射後7日目より抗腫瘍効果が見られ、以後14日目をピークとし徐々に

減少したのに対し、実験Ⅱでは照射後7日目に著明な抗腫瘍効果を認めましたが、以後14日目には短期間でその効果はほぼ消失した。このことは、図4(2)の20Gyの照射後の右下肢腫瘍の増殖曲線と、ほぼ一致した結果である。すなわち、右下肢で照射後腫瘍体積が再増殖傾向を示す時期と左下肢における抗腫瘍効果が消失する時期とが一致した。

又、実験ⅠとⅡの抗腫瘍効果持続期間の差異につき考察を加えれば、実験Ⅱの抗腫瘍効果発現期間が短期間で消失した原因については、右下肢の腫瘍増殖による担癌状態が照射による抗腫瘍効果を抑制したと考えられる。

なお、照射後抗腫瘍効果の発現までの日数は、実験ⅠとⅡ共に7日目であったが、抗腫瘍効果のピークは実験Ⅰで照射後14日目及び実験Ⅱで照射後7日目と差異を認めた。実験Ⅰ、Ⅱの条件が異なるため単純な比較はできないが、それぞれの時期が右下肢腫瘍移植後日数に換算すると18日、20日とほぼ同時期である

ことから、抗原を認識後、細胞性免疫が作働するまでの日数であると想定できる。

さらに<sup>20Gy</sup>照射の抗腫瘍効果を、10Gy・30Gyの抗腫瘍効果と比較すると、10Gyでは、右下肢腫瘍の制御が出来ず生存率の低下が見られたものの、左下肢腫瘍への抗腫瘍効果は20Gy相当もしくはそれ以上の結果であった。それに反し30Gyでは右下肢腫瘍の制御は勝るものの、照射による免疫能の抑制が大きい為か左下肢腫瘍に対する抗腫瘍効果は減少した。10Gyの照射に関して、10Gyの線量が、腫瘍を完全に殺さなくても腫瘍の免疫原性、抗原性を十分高めたことから、今後外科療法などを組合せて、右下肢腫瘍の制御の向上がなされた場合、20Gy単独治療を上回る結果を期待しうると思われた。

次に、放射線照射後の宿主免疫能の変動を検討するために、マウス末梢血白血球数・リンパ球数・脾臓重量および脾臓リンパ球総数につき検討した。その結果、免疫能の増強が



見られた実験群に末梢血白血球数・リンパ球数・脾臓重量および脾臓リンパ球総数などの量的な増加は認められず、むしろ実験Ⅱ照射後7日目で、Tumor control 及び Normal control に対し有意な減少が見られた。このことは、腫瘍を移植せず右下肢の照射のみ行った場合の照射対照群 (Radiation Control) が、Normal Control に比しすべての値が減少傾向を示したことから、担癌+照射によって宿主免疫能は増強するものの、照射による影響のため量的な変化においては一次的に抑制されることが判った。

局所照射後の生体にリンパ球の減少が見られることは、放射線の照射野内を循環するリンパ球に対する直接の殺細胞作用ということである。従来より多くの報告がなされている<sup>1)</sup>。本実験の結果にも同様の理由が考えられる。従って照射後の宿主免疫能の増強は、量的な増強ではなく、質的な、言い換えれば機能の面の増強であったことが予想された。

そこで、放射線照射後の宿主免疫能の機能的な変動を検討する為に、照射後のマウス脾臓リンパ球による中和試験を行った。その結果、実験Ⅰの照射後14日目、実験Ⅱの照射後7日目のマウスの脾臓リンパ球にMeth-A腫瘍細胞に対する細胞障害活性が認められた。山下<sup>51,52)</sup>は他の腫瘍系で同様の中和試験を行い、20Gy照射後7日目の担癌マウスの脾細胞に抗腫瘍性を認めたと報告しており、著者の実験Ⅱの結果と一致した。著者は、さらにこの脾臓リンパ球のサブセットに付き検討を加えた所、この活性は抗アシアロGM<sub>1</sub>抗血清及び抗Thy-1抗体で処理することで消失した。したがって、アシアロGM<sub>1</sub>抗原を表面マーカーにもつNK細胞及び、Thy-1抗原を表面マーカーにもつT細胞がこの Effector cellであることが考えられた。

又、in vitroにおけるマウス脾臓リンパ球のNK活性につき検討を加えた所、実験Ⅰの照射後14日目及び実験Ⅱの照射後7日目に、

Normal Controlに対し有意なNK活性の増強が認められた。

NK細胞は、キラーT細胞とは異なり、非特異的に腫瘍細胞を破壊する細胞であり、NK細胞そのものの免疫監視機構における役割もさることながら、NK細胞を介した非特異的免疫系の増強が注目される。すなわちインターフェロンによるNK細胞の活性化<sup>53, 54)</sup>、NK細胞からのインターフェロンの産生<sup>55)</sup>、インターロイキン-2によるNK細胞の活性化と増殖<sup>56, 57)</sup>などNK細胞が非特異的免疫系の重要な位置にあるという報告がなされている。したがって著者の結果でNK活性が増強した時期には、NK細胞のみならず非特異的免疫系が増強していることが予想される。

一方近年、NK細胞はT細胞と類似した性質を持ち個体発生的に同じ幹細胞を起源とすると思われるが、その後はそれぞれ異なる分化の道筋をたどり成熟し、それぞれの特異的機能を受け持つようになると考えられている<sup>58, 5</sup>

9)。故にNK細胞の表面マーカーにはアシアロGM<sub>1</sub>抗原に代表される「NK細胞に出現が限局する抗原群」、Thy-1抗原に代表される「T細胞にも出現する抗原群」が存在する。しかしThy-1抗原は一部の幼弱なNK細胞に存在するものの<sup>80, 81)</sup>、T細胞の代表的な表面マーカーであることから、抗Thy-1抗体処理による中和試験の結果は、T細胞の関与による所が大きいと考えられる。しかし、本実験系の脾臓リンパ球にアシアロGM<sub>1</sub>抗原とThy-1抗原の両抗原に陽性のNK細胞がどの程度存在するかは明確ではなく、今後さらに詳細なマウスリンパ球サブセットの検討が必要であろう。実験結果では述べていないが、マウス脾臓リンパ球のMeth-Aに対するキラーT細胞活性をin vitroで12時間の<sup>51</sup>Cr放出試験で検討したところ活性を検出しえなかった。しかしin vivoの抗Thy-1抗体処理による中和試験においてキラーT細胞活性が存在したことから、マウス脾臓リンパ球にキラーT細胞の前駆細

胞の存在が示唆された。

一方、放射線照射後の局所免疫反応を組織学的に検討した結果、実験群では早期よりのリンパ球浸潤が見られたこと(表6)、再移植実験における抗腫瘍効果に比例したリンパ球浸潤、腫瘍細胞の変性・壊死が見られたこと(表7)は、抗腫瘍効果の背景にある

effector cell が腫瘍局所へ集積することを組織学的に示すものといえる。又、このリンパ球を免疫組織学的に検討した所、アシアロGM1抗原陽性、及びThy-1抗原陽性のNK細胞及びT細胞であり、脾臓リンパ球による中和試験の結果と一致した。

さらに右下肢(照射側)腫瘍におけるeffector cellの集積についても、組織学的検討を行ったところ、実験I及びII共に照射後7日目に著しいリンパ球浸潤を認めた。以後、照射後の非照射部位における抗腫瘍効果の結果とほぼ一致した減少パターンをとった。これまで、照射側腫瘍部位におけるリンパ球

浸潤につき免疫組織学的に詳細な検討を加えた報告は多数なされている(44-46)。しかし、著者のおこなった、非照射側における腫瘍の組織学的な検討に関する報告はほとんど見られていない。今中ら(45)、広田ら(46)はマウス下肢に移植した腫瘍に局所照射を行い、20Gy一回照射7日目に最も強いリンパ球浸潤を認めたと報告している。照射後7日目のリンパ球浸潤について、今中らは酵素組織学的に、また広田らは免疫組織学的に、リンパ球のサブセットを検討した結果、Thy-1.2, Lyt-1, L3T4陽性細胞浸潤、即ち helper/inducer Tリンパ球が主体であったと報告している。又 Hiratukaら(62)は、人の非照射腫瘍への浸潤リンパ球について検討を加え、suppressor / cytotoxic Tリンパ球が優勢であったと報告している。

今回著者の非照射側における浸潤リンパ球において、NK細胞浸潤が顕著に認められたことは、他の報告との間に明らかな違いがみとめ

られ、興味ある結果となった。今後、この違いの意義、経時的変化や詳細なリンパ球サブセットの解析が必要と思われた。

Brovallら<sup>83)</sup>は、健常人の末梢血リンパ球を in vitro で放射線照射した際、低線量においてNK活性の増強が見られたことから、NK細胞が他のリンパ球サブセットに比べ放射線感受性が低いと報告している。本実験の照射後の脾臓リンパ球におけるNK細胞活性の増強や、局所免疫反応におけるNK細胞浸潤と、なんらかの関連性があると思われ、放射線照射後の免疫系におけるNK細胞の意義は大きいものと考えられた。

なお、実験Ⅰ照射後14日目と実験Ⅱ照射後7日目のマウスの左下肢への再移植部位における組織像の比較において、実験Ⅱよりも顕著なリンパ球浸潤を認めた実験Ⅰは、より強い局所免疫反応を示していたにもかかわらず、実験Ⅰ及びⅡの間で、マクロ的な抗腫瘍効果にほとんど差は認められなかった。逆に、脾

臓リンパ球の中和試験におけるリンパ球機能の面においては、実験Ⅱにより強い細胞障害活性が認められた。このことは、実験Ⅱにおける局所のリンパ球数が少ないにもかかわらず、リンパ球の機能亢進が実験Ⅰより強く見られることから、抗腫瘍効果は実験Ⅰと同程度を示すと考えられるが、他にも実験ⅠとⅡに違いが認められた。それは、表9に示した右下肢照射側腫瘍部位におけるリンパ球浸潤である。すなわち実験Ⅱでは、右下肢腫瘍へも多数のリンパ球浸潤が認められる為、左下肢へ浸潤すべきリンパ球にとって量的な面でマイナスに働いたとも考えられる。このことは、放射線治療と外科療法を併用する意義の一つとなると共に、外科療法を行うタイミング(時期)の重要性をも示唆した結果であると考えられた。すなわち、免疫学的に最適な時期に外科療法が併用された場合には、腫瘍による免疫学的な抑制を受けることなく、機能の面で増強のみられたリンパ球を温存で



きる可能性が予想された。

## 2. 放射線障害部位における抗腫瘍効果

既に照射を行った部位へ腫瘍を移植した際、なんの治療を行わずとも、腫瘍増殖が抑制される現象は、1914年Franklら<sup>64)</sup>によってTumor Bed Effect (TBE)として報告されている。以後TBEについては照射によって生じる血管への障害が原因であるという報告が数多くなされている<sup>65-69)</sup>。Jirtleら<sup>69)</sup>は、照射部位へ移植した腫瘍の血流は正常組織に移植した腫瘍の52%であったと報告している。また、Beggら<sup>70,71)</sup>は、放射線分割照射の正常組織への影響の検討において、TBEを正常組織の放射線感受性の指標として使用した。著者のBALB/c及びMeth-Aの実験系においても図13のごとくTBEが認められた。また20Gyの前照射部位において、腫瘍は100%消失したことから、BALB/cマウス組織の放射線感受性が非常に高く血管への障害も強く現れていると

予想された。そこで、照射後の血管の変化を画像解析にて行った(表10)。組織切片上での面積測定である為、単純に血管断面積や内腔面積の比較ができないが、両側の血管断面積にほとんど差が見られなかったことと、有意に「血管断面積に対する内腔面積の比」の減少が認められたことを考え合わせると、照射後の血管壁の肥厚と血管腔の狭窄が考えられた。

これまで、放射線照射による正常組織の慢性障害に関し、多くの研究がなされているが、その発症において、血管系の照射による障害が重要な役割を果たしていると考えられている(2,73)。この血管への障害が、正常組織より豊富な栄養血管を必要とする腫瘍の増殖に、抑制的に働いたことが推察された。

さて、本実験系において放射線照射により宿主免疫能が増強されること、又放射線組織障害が、腫瘍増殖に対し抑制的に働くことが明かとなった。そこで、本研究の目的である、

照射により障害を受けた局所での免疫反応、につき検討を加えた。前述の如く、非照射側下肢(左下肢)では、照射により誘導された腫瘍免疫のみを、純粹な反応として見ることができる。従って、左下肢を使って実験を行うことで、腫瘍免疫と放射線組織障害という二つの現象を分析可能とした。

図14の如く、腫瘍が100%生着する10Gyの前照射部位を用いて、腫瘍照射後の再移植実験を行った結果、前照射の有無に関係せず、生着率の低下が認められた。このことから、放射線照射された部位へも、照射によって得られた抗腫瘍効果を持つ effector cell が関与することが推察されたため、抗腫瘍効果のみられた前照射部位の組織学的検討を行った。

(図15・16) その結果、実験Iにおいて、前照射線量が10Gy, 20Gyと増加するにつれて、リンパ球浸潤は減少し、リンパ球サブセットも全てにわたり平行して減少が認められた。実験IIでは、前照射線量の増加にもかかわらず

ず、ほとんどリンパ球浸潤の差は認められなかった。リンパ球サブセットにおいては、機能の増強が予想されたNK細胞、T細胞が20Gyの高線量時、減少が認められた。

したがって、実験Iの様に著しいリンパ球浸潤が見られる場合や、20Gyの照射を行った場合には、機能の増強が予想されたNK細胞、T細胞において、放射線組織障害は多少抑制的に働くものと考えられた。しかし、図14に示す結果とこの組織学的実験結果を総合すれば、10Gyの放射線組織障害は、リンパ球が浸潤し機能する上で、ほとんど影響していないと考えられた。

さらに、以上の結果をもとに、癌治療に際しての放射線組織障害と免疫反応について、考察を加えた。

本実験系において、腫瘍に低線量の照射を行った場合、腫瘍免疫能の増強が見られた。

又、この際の放射線組織障害の程度は小さく、effector cellは十分局所で作用しうる程度の障害であった。このことから、原発腫瘍を、放射線療法と外科療法などの他の治療法との併用によって制御できれば、宿主免疫能と密接な関係を有する再発・転移に対し抑制効果が十分期待できると考えられた。しかし、この増強された宿主免疫能は、担癌により抑制を受けやすいことから、癌組織の可能な限りの減量が必要である。

又、高線量の照射を行った場合、腫瘍免疫能は、放射線照射による障害の為に減少し、抗腫瘍免疫による効果は低いと考えられるが、局所の放射線組織障害は、腫瘍の増殖に、大きな障害となった。又、照射後の腫瘍の再増殖に対しても、放射線組織障害が十分効果的に作用すると推察された。

従って、放射線治療と外科療法との併用時期に関しては、宿主免疫能並びに放射線組織障害との関連において、今後十分な検討の必要が

あると思われた。

## 結 論

放射線治療の生体免疫系に与える影響を検討するため、担癌マウスに放射線局所照射を行い、照射後の宿主免疫能および局所免疫反応を、in vivo、in vitroの両面から検索した。そしてさらに、抗腫瘍効果をもつ effector cellの、照射により障害を受けた部位での関与につき検討を加え、以下の結論を得た。

1. 担癌マウスへの放射線局所照射により、  
(1)照射後、非照射部位への再移植実験において抗腫瘍効果の発現を認めた。しかし、この抗腫瘍効果は、担癌状態において短期間で消失した。  
(2)腫瘍に対する放射線照射により、脾臓リンパ球の抗腫瘍機能の増強が見られた。なかでもNK細胞及びT細胞の関与が示唆された。又、in vitroにおける脾臓リンパ球のNK活性の増強も認められた。

(3) 抗腫瘍効果発現部位に、早期よりのリンパ球浸潤が認められた。又、主にこのリンパ球は、免疫組織学的にNK細胞及びT細胞であった。

2. 放射線による組織障害部位において、腫瘍の増殖と抗腫瘍効果について、検討を行ったところ、

(1) 高線量の放射線組織障害部位においては、主に照射による血管の変化に基づくと思われる腫瘍増殖抑制が認められた。

(2) 低線量の放射線組織障害部位においては、主に免疫機能が作用し、抗腫瘍効果が認められた。又、組織学的にも、抗腫瘍効果を持つ effector cell の浸潤に対して、放射線組織障害の影響はきわめて少なかった。



稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ、御指導と御校閲を賜った作田正義教授に謹んで感謝の意を表します。また、免疫組織学について御教示御助言を頂いた岐阜大学医学部病理学第二講座 高見 剛 助教授、線量測定に際し御教示御助言を頂いた古川惣平博士並びに歯科放射線学教室の方々、組織標本の作製に際し御助言を頂いた附属病院検査部の方々に深謝致します。

最後に本研究を進めるにあたり、御援助、御協力を頂いた口腔外科学第二講座の教室員諸先生に厚くお礼申し上げます。

Effect of local tumor irradiation on the immunity  
in the tumor-bearing mice

---Immunological study on the radiation damaged tissue---

Tomoji MORIYAMA

The Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery  
Osaka University Faculty of Dentistry  
1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Key words: Radiation immunology, Radiation damage,  
Meth-A tumor, Local irradiation

In order to investigate the effect of radiotherapy on the immunity in the tumor-bearing mice, the status of general immunity and local immune reaction were studied after irradiation of transplanted Meth-A tumor cells.

On the 7th day after local irradiation against the Meth-A tumors transplanted into the right hind legs, the same strain tumors were transplanted into the left hind legs of the same mice again. As a result, the growth of the left hind leg tumors was suppressed. However, this anti-tumor effect was decreased in the

case of secondary transplantation on the 14th day after irradiation. From the study of Winn assay, it was suggested that these anti-tumor effects after local tumor irradiation resulted from the anti-tumor immunity by mouse spleen lymphocytes, especially Natural killer (NK) and T cells. At the same time, NK activity of spleen lymphocyte against YAC-1 target cells was also increased.

The histological findings showed that lymphocyte infiltration into the tumor tissue was recognized at the earlier stage and more markedly in the left hind leg tumor tissue of mice, of which right hind leg tumors were irradiated, than in the tumor tissue of non-irradiated mice. In the immunohistological analysis with monoclonal antibodies following ABC technique revealed that the subpopulations of these infiltrated lymphocytes were composed of mainly NK and T cells.

Still more, the transplantability and growth of Meth-A tumors at the pre-irradiated tissue were studied. At first, left hind legs were irradiated with doses of 10 and 20Gy. On the other hand, right hind leg of the same mouse was transplanted with Meth-A tumor, and then tumor of the right hind leg was irradiated. Next, Meth-A tumors were transplanted into the pre-irradiated

left hind legs. Tumor growth at the pre-irradiated left hind legs was suppressed in any cases of high-dose or low-dose irradiation.

It is suggested that ,in the low-dose irradiation, the anti-tumor immunity mainly acted on the suppression of the tumor growth,and in the high-dose irradiation, suppression of the tumor growth was mainly induced by both the anti-tumor immunity and the radiation damage to blood vessels which was recognized in the histological analysis by the image analyzer.

## 参考文献

- 1) Raben, M., Walach, N., Galili, U. and Schlesinger, M. (1976): The effect of radiation therapy on lymphocyte subpopulations in cancer patients. *Cancer*, 37, 1417-1421.
- 2) Stratton, J.A., Byfield, P.E., Byfield, J.E., Small, R.C., Benfield, J. and Pilch, Y. (1975): 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.
- 3) Rafla, S., Yang, S.J. and Meleka, F. (1978): Changes in cell-mediated immunity in patients undergoing radiotherapy. *Cancer*, 41, 1076-1086.
- 4) 根住直史、小西淳二、御前隆、小野公二、高橋正治、阿部光幸、鳥塚莞爾 (1983): 放射線治療による悪性腫瘍患者免疫関与細胞の変動について - 特に Natural killer 活性について - 日本医放会誌, 43, 1415-1425, 昭和58.
- 5) Dean, D.M., Pross, H.F. and Kennedy, J.C. (1978): Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells III Stimulatory and inhibitory effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Bio. Phys.*, 4, 633-641.
- 6) 下里幸雄、永井完治、池内駿之 (1978): 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, 昭和53.
- 7) Yata, J., Klein, G., Hewetson, J. and Gergely, L. (1970): Effect of metabolic inhibitors on membrane immunofluorescence reactivity of established Burkitt lymphoma cell lines. *Int. J. Cancer*, 5, 394-403.
- 8) Anderson, R.E., Sprent, J. and Miller, J.F.A.P. (1974): Radiosensitivity of T and B lymphocytes. 1. Effect of irradiation on cell migration. *Eur. J. Immunol.*, 4, 199-203.

- 9) Kwan, D.K. and Norman, A. (1977): Radiosensitivity of human lymphocytes and thymocytes. *Radiat. Res.*, 69, 143-151.
- 10) Durum, S.K. and Gengozian, N. (1978): The comparative radiosensitivity of T and B lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.*, 34, 1-15.
- 11) 今中一文 (1983): 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 -, 日本医放会誌, 43, 355-369. 昭和58.
- 12) 大星章一, 下里幸雄, 板倉克明, 梅垣洋一郎 (1967): 癌放射線療法 of 病理, 医学のあゆみ, 61, 618-625 665-671 725-730. 昭和42.
- 13) Ridolfi, R.L., Rosen, P.P., Port, A., Kinne, D. and Mike, V. (1977): Medullary carcinoma of the breast. A clinicopathologic study with 10 year follow-up. *Cancer*, 40, 1365-1385.
- 14) Watanabe, H., Enjoji, M. and Imai, T. (1976): Gastric carcinoma with lymphoid stroma. Its morphologic characteristics and prognostic correlations. *Cancer*, 38, 232-243.
- 15) Kingsley, D.P.E. (1975): An interesting case of possible abscopal effect in malignant melanoma. *Br. J. Radiol.*, 48, 863-866.
- 16) Boyse, E.A., Old, L.J. and Stockert, E. (1962): Some further data on cytotoxic isoantibodies in the mouse. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 99, 574-587.
- 17) Cikes, M., Friberg, S. and Klein G. (1973): Progressive loss of H-2 antigens with concomitant increase of cell-surface antigens determined by Moloney leukemia virus in cultured murine lymphomas. *J. Natl. Cancer Inst.*, 50, 347-

- 18) 立入弘(1978):診療放射線技術.第3版,南江堂,東京,下巻, 369-403,昭和53.
- 19) Frindel,E.,Malaise,E.P.,Alpen,E.and Tubiana,M.(1967): Kinetics of Cell Proliferation of an Experimental Tumor. Cancer Research,27,1122-1131.
- 20) François,D.L.,Troise,G.D.,Chavaudra,N.,Malaise,E.P.and Barski,G.(1974):Comparative effect of local radiotherapy and surgery on cell-mediated immunity against a mouse transplantable mammary tumor.Int.J.Cancer,13,629-639.
- 21) 辻 公美(1971):比重遠沈法によるリンパ球の分離,Conray-Ficoll法.免疫実験操作法(A)(日本免疫学会編).金沢,443-446,昭和46.
- 22) Kasai,M.,Iwamori,M.,Nagai,Y.,Okumura,K.and Tada,T.(1980) :A glycolipid on the surface of mouse natural killer cell. Eur.J.Immunol.,10,175-180.
- 23) Habu,S.,Fukui,H.,Shimamura,K.,Kasai,M.,Nagai,Y.,Okumura, K.and Tamaoki,N.(1981):In vivo effects of anti-asialo GM<sub>1</sub> 1.Reduction of NK activity and enhancement of transplanted tumor growth in nude mice.J.Immunol.,127, 34-38.
- 24) Lake,P.,Clark,E.A.,Khorshidi,M.and Sunshine,G.H.(1979): Production and characterization of cytotoxic Thy-1 antibody-secreting hybrid cell lines Detection of T cell subsets.Eur.J.Immunol.,9,875-886.
- 25) Brunner,K.T.,Mauel,J.,Cerottini,J.C.and Chapuis,B.(1968) :Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on <sup>51</sup>Cr-labeled allogeneic target cells in vitro;inhibition by isoantibody and by drugs. Immunology,14,181-196.

- 26) Plank, J. und Rychlo, A. (1952): Eine Schnellentkalkungsmethode. Zentralbl. f. Path. Anat., 89, 252-254.
- 27) Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. (1981): Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques. J. Histochem. Cytochem., 29, 577-580.
- 28) Warnke, R. and Levy, R. (1980): Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: A Biotin-Avidin-Horseradish-Peroxidase Method. J. Histochem. Cytochem., 28, 771-776.
- 29) 高見剛, 石井良文 (1985): Avidin-Biotin-Peroxidaseを用いた免疫酵素法, 臨床免疫, 17, 395-402. 昭和60.
- 30) Shimokawara, I., Imamura, M., Yamanaka, N., Ishii, Y. and Kikuchi, K. (1982): Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance: An immunoperoxidase study with anti-human T- and B-cell sera. Cancer, 49, 1456-1464.
- 31) Cook, M.J. (1965): The Anatomy of the Laboratory Mouse. Academic Press, New York, 112-114.
- 32) 細川真澄男 (1983): 化学療法と B R M, Oncologia, 6, 65-75. 昭和58
- 33) Cowens, J.W., Ozer, H., Ehrke, M.J., Greco, W.R., Colvin, M. and Mihich, E. (1984): Inhibition of the development of suppressor cells in culture by 4-hydroperoxy-cyclophosphamide. J. Immunol., 132, 95-100.
- 34) Morikawa, K., Hosokawa, M., Hamada, J., Xu, Z. and Kobayashi, H. (1986): Possible participation of tumoricidal macrophages in the therapeutic effect of bleomycin on a transplantable rat fibrosarcoma. Cancer Res., 46, 684-688.
- 35) Ikenami, M., Mizuno, D. and Yamazaki, M. (1985): Drug-dependent cellular cytotoxicity mediated by polymorphonuclear



leukocytes. *Jpn. J. Cancer Res.*, 76, 637-643.

- 36) Shindo, H., Ogura, T., Masuno, T., Hayashi, S. and Kishimoto, S. (1985): Induction of activated macrophages by intra-peritoneal injection of mitomycin C in mice. *Cancer Immunol. Immunother.*, 20, 145-150.
- 37) 佐藤靖雄 (1974): 上顎癌. 癌の臨床, 20, 881-884, 昭和49.
- 38) Sato, Y., Morita, M., Takahashi, H., Watanabe, N. and Kirikae, I. (1970): Combined surgery, radiotherapy and regional chemotherapy in carcinoma of the paranasal sinuses. *Cancer*, 25, 571-579.
- 39) 手島昭樹、田中義弘、西山謹司、池田恢、真崎規江、重松康、中村太保、淵端孟 (1984): 上顎洞扁平上皮癌の集学的治療成績の検討, 日本医放会誌, 44, 1383-1390. 昭和59.
- 40) Sakai, S., Hohki, A., Fuchihata, H. and Tanaka, Y. (1983): Multidisciplinary treatment of maxillary sinus carcinoma. *Cancer*, 52, 1360-1364.
- 41) 斎藤等 (1979): 頭頸部癌の合併療法の理論と実際 - とくに上顎癌について -. 癌の臨床, 25, 526-531, 昭和54.
- 42) Rowland G.F., Axton, C.A., Baldwin, R.W., Brown, J.P., Corvalan, J.R.F., Embleton, M.J., Gore, V.A., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., Jacobs, E., Marsden, C.H., Pimm, M.V., Simmonds, R.G. and Smith, W. (1985): Antitumor properties of vindesine-mono-clonal antibody conjugates. *Cancer Immunol. Immunother.*, 19, 1-7.
- 43) Embleton, M.J., Rowland, G.F., Simmonds, R.G., Jacobs, E., Marsden, C.H., Baldwin, R.W. (1983): Selective cytotoxicity against human tumour cells by a vindesine-mono-clonal antibody conjugate. *Br. J. Cancer*, 47, 43-49.
- 44) 浜田富三雄, 小川恭弘, 前田知穂, 瀬口春道 (1985): 放射線治療中の癌組織浸潤リンパ球サブセットの変動 - モノクロナール

抗体による解析 - , 日本医放会誌, 45,407-426.昭和60.

- 45) 今中一文(1983):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 -, 日本医放会誌, 43,355-369.昭和58.
- 46) 広田佐栄子, 小川恭弘, 瀬口春道(1986):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.昭和61.
- 47) Hall,E.J.(1978):Radiobiology for the Radiologist.ed.2, Harper&Row,Publishers,Inc.,Maryland,33-38.
- 48) Orton,C.G.and Ellis,F.(1973):A simplification in the use of the NSD concept in practical radiotherapy.Br.J. Radiol.,46,529-537.
- 49) 土屋武彦(1983):放射線治療における免疫機能の関与, 癌の臨床,29,1499-1505.昭和58.
- 50) Crile,G.and Deodhar,S.D.(1971):Role of preoperative irradiation in prolonging concomitant immunity and preventing metastasis in mice.Cancer,27,629-634.
- 51) 山下孝, 早川幸子, 花島加寿子, 望月幸夫(1983):腫瘍への放射線照射により誘導される腫瘍免疫について, 癌の臨床,29,1506-1511.昭和58.
- 52) 山下孝(1981):マウスにおける細胞性腫瘍免疫能に対する放射線の効果, 日本医放会誌, 41,887-893.昭和56.
- 53) Welsh,R.M.,Karre,K.,Hansson,M.,Kunkel,L.A.and Kiessling,R.W.(1981):Interferon-mediated protection of normal and tumor target cells against lysis by mouse natural killer cells.J.Immunol.,126,219-225.
- 54) Herberman,R.B.(1980):Natural cell-mediated immunity against tumors.Academic Press,New York,593-607.

- 55) Timonen, T., Saksela, E., Virtanen, I. and Cantell, K. (1980): Natural killer cells are responsible for the interferon production induced in human lymphocytes by tumor cell contact. *Eur. J. Immunol.*, 10, 422-427.
- 56) Kuribayashi, K., Gillis, S., Kern, D. E. and Henney, C. S. (1981): Murine NK cell cultures: Effects of interleukin-2 and interferon on cell growth and cytotoxic reactivity. *J. Immunol.*, 126, 2321-2327.
- 57) Dennert, G., Yogeewaran, G. and Yamagata, S. (1981): Cloned cell lines with natural killer activity. Specificity, function and cell surface markers. *J. Exp. Med.*, 153, 545-556.
- 58) Abo, T., Miller, C. A., Gartland, G. L. and Balch, C. M. (1983): Differentiation stages of human natural killer cells in lymphoid tissues from fetal to adult life. *J. Exp. Med.*, 157, 273-284.
- 59) Minato, N., Reid, L. and Bloom, B. R. (1981): On the heterogeneity of murine natural killer cells. *J. Exp. Med.* 154, 750-762.
- 60) Herberman, R. B. and Holden, H. T. (1979): Natural killer cells as antitumor effector cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, 62, 441-445.
- 61) Mattes, M. J., Sharrow, S. O., Herberman, R. B. and Holden, H. T. (1979): Identification and separation of Thy-1 positive mouse spleen cells active in natural cytotoxicity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.*, 123, 2851-2860.
- 62) Hiratsuka, H., Imamura, M., Kasai, K., Kamiya, H., Ishii, Y., Kohama, G. and Kikuchi, K. (1984): Lymphocyte subpopulations and T-cell subsets in human oral cancer tissues: Immunohistologic analysis by monoclonal antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.*, 81, 464-470.

- 63) Brovall, C. and Schacter, B. (1981): Radiation sensitivity of human natural killer cell activity: control by X-linked genes. *J. Immunol.*, 126, 2236-2239.
- 64) Frankl, O. und Kimball, C.P. (1914): Über die Beeinflussung von Mäusetumoren durch Röntgenstrahlen. *Wiener klinische Wochenschrift*, 27, 1448-1450.
- 65) Trott, K.R. and Kummermehr, J. (1982): Split dose recovery of a mouse tumour and its stroma during fractionated irradiation. *Br. J. Radiol.*, 55, 841-846.
- 66) Denekamp, J. (1980): Is any single in situ assay of tumour response adequate? *Br. J. Cancer*, 41, Suppl. IV, 56-63.
- 67) Tenforde, T.S., Curtis, S.B., Woodruff, H.K., Parks, D.L., Daniels, S.J., Crabtree, K.E., Schilling, W.A. and Deguzman, R.J. (1979): Studies on the regrowth rate, morphological characteristics and transplantation properties of rat rhabdomyosarcoma tumours following large doses of X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 35, 589-596.
- 68) Jirtle, R. and Clifton, K.H. (1973): Effect of preirradiation of the tumor bed on the relative vascular space of mouse gastric adenocarcinoma 328 and mammary adenocarcinoma CA755. *Cancer Res.*, 33, 764-768.
- 69) Jirtle, R., Rankin, J.H.G. and Clifton, K.H. (1978): Effect of X-irradiation of tumour bed on tumour blood flow and vascular response to drugs. *Br. J. Cancer*, 37, 1033-1038.
- 70) Begg, A.C. and Terry, N.H.A. (1984): The sensitivity of normal stroma to fractionated radiotherapy measured by a tumour growth rate assay. *Radiotherapy and Oncology*, 2, 333-341.
- 71) Begg, A.C. and Terry, N.H.A. (1983): Modification of stromal radiosensitivity by misonidazole and WR-2721. *Br. J. Radiol.*

,56,565-570.

- 72) 前原康延(1985): 放射線慢性障害発症機序に関する定量的研究  
—マウス横紋筋組織を用いて—, 日本医放会誌,45,1548-1557.  
昭和60.
- 73) Dimitrievich,G.S.,Fischer-Dzoga,K.and Geiem,M.L.(1984):  
Radiosensitivity of vascular tissue.1.Differential  
Radiosensitivity of Capillaries:A quantitative in vivo  
study.Radiat.Res.,99,511-535.

## 脚注

大阪大学歯学部口腔外科学第二講座（主任：  
作田正義教授）

本論文の要旨は第40回日本口腔科学会総会  
（昭和61年5月，福岡）および第45回日本癌  
学会総会（昭和61年10月，札幌）において一  
部発表した。

## 図表の説明

図 1 . アクリル製マウス固定装置

図 2 . NK細胞活性の測定法

図 3 . A B C 法における染色手順

点線以降は、切片の乾燥を防ぐ為すべて湿箱中で行った。

図 4 . Meth-A腫瘍増殖に対する放射線局所照射の影響

(1) 実験 I : 移植直後照射群

Meth-A $10^8$ 個をマウス右下肢皮下に移植後 1 日目より 5Gy/dayでそれぞれ total 5(■), 10(●), 20Gy(▲)の局所連日分割照射を行い、経日的に腫瘍体積を測定した。又、Control には照射を行わなかったマウスの腫瘍体積を、移植後経日的に測定した。なお、各点は  $n=5$  の平均腫瘍体積を示す。移植後 35 日目における対照群との有意差は、10Gy群 ( $p < 0.01$ )、20Gy群 ( $p < 0.001$ )に認められた(t検定)。

図 4 (2) 実験 II : 腫瘍形成後照射群

腫瘍移植後 10 日目より、total 10(●), 20

(▲), 40Gy(△)の放射線照射を行ったこと以外、図4(1)と同様の方法で行った。移植後35日目における対照群との有意差は、20Gy群( $p < 0.01$ )、40Gy群( $p < 0.001$ )に認められた(t検定)。

図5. 実験I及びIIの右下肢照射スケジュール

図6. 再移植実験スケジュール

右下肢腫瘍照射後の照射による *in vivo*での抗腫瘍効果を検討するために、再移植実験を行った。実験I及びII、それぞれ右下肢腫瘍局所照射後、1日目、7日目、14日目、21日目のそれぞれの各時期に、左下肢にMeth-A  $10^6$ 個を移植、左下肢腫瘍の生着率及び腫瘍体積を測定した。

図7. 非照射部位(左下肢)における照射後の抗腫瘍効果 その1



### (1) 実験 I : 移植直後照射群

図 6 の実験スケジュールに従って再移植実験を行った際の左下肢腫瘍体積を示した。各グラフ右に示す日数は、右下肢への照射後左下肢へ Meth-A を移植するまでの日数を示した(それぞれ 1 日目 ●、7 日目 △、14 日目 ◎、21 日目 ▲ で示す)。横軸には、左下肢へ Meth-A 移植後の日数を示した。又、Control は未処置マウスの左下肢に Meth-A $10^6$  個を移植後、腫瘍体積を経日的に測定した。なお、各点は各群使用マウスの平均腫瘍体積を示した。移植後 28 日目における対照群との有意差は、照射後 7 日目群 ( $p < 0.05$ )、14 日目群 ( $p < 0.01$ )、21 日目群 ( $p < 0.01$ ) に認められた (t 検定)。

### 図 7 (2) 実験 II : 腫瘍形成後照射群 (20Gy)

図 7 (1) と同様に実験 II : 腫瘍形成後照射群 (20Gy) における、左下肢腫瘍体積を示した。移植後 28 日目における対照群との有意差は、

照射後7日目群 ( $p < 0.001$ )、14日目群 ( $p < 0.001$ )、21日目群 ( $p < 0.05$ )に認められた ( $t$  検定)。

図7 (3)実験Ⅱ：腫瘍形成後照射群 (10, 30Gy)

図7 (1)と同様に実験Ⅱ：腫瘍形成後照射群 (10, 30Gy)における、左下肢腫瘍体積を示した。移植後21日目における対照群との有意差は、10Gy照射群で照射後1日目 ( $p < 0.001$ )、7日目 ( $p < 0.01$ )、14日目 ( $p < 0.01$ )に認められた。しかし、30Gy照射群では認められなかった ( $t$  検定)。

図8．脾臓リンパ球による中和試験方法

図9．脾臓リンパ球による中和試験

(1) 実験Ⅰ：移植直後照射群

図5の実験Ⅰのスケジュールに従って右下肢腫瘍への放射線照射後14日目のマウス脾臓リンパ球を実験群 (Radiation Group: ©) に、

同時期の照射を行わなかった担癌マウス及び未処置マウスの脾臓リンパ球を Tumor control(●)及び Normal control(○)に用いて、図8の中和試験を行った。Meth-A腫瘍細胞との混合液を移植後、経日的に腫瘍体積を測定し、各群の平均値を示した(n=4)。実験群に、対照群との有意差は認められなかった(t検定)。

#### 図9 (2) 実験II：腫瘍形成後照射群

図5の実験IIのスケジュールに従って右下肢腫瘍への放射線照射後7日目のマウス脾臓リンパ球を実験群(Radiation Group)に用いたこと以外、図9(1)と同様の方法で行った。対照群に比し、移植後21日目より実験群に有意な腫瘍体積抑制効果( $p < 0.05$ )が認められた(t検定)。

#### 図10. 脾臓リンパ球のNK活性に対する放射線局所照射の影響 その1

##### (1) 実験I：移植直後照射群

図5の実験Iのスケジュールに従って右下肢腫瘍への放射線照射後1,7,14,21日目のマウス脾臓リンパ球のNK活性を、4時間の $^{51}\text{Cr}$ 放出試験にて測定した。対照として、同時期の照射を行わなかった担癌マウス及び未処置マウスの脾臓リンパ球を使用した。数値はS.I.で示した。(平均値 $\pm$ S.E.,各群 $n=7$ )その結果、実験群でNormal Controlに対し照射後14日目に有意なNK活性の増強が認められた(t検定)。

#### 図10 (2) 実験II：腫瘍形成後照射群

図5の実験IIのスケジュールに従って右下肢腫瘍への放射線照射後1,7,10,14,日目のマウス脾臓リンパ球を用いたこと以外、図10(1)と同様の方法で行った。その結果、実験群でNormal Controlに対し照射後7日目に有意なNK活性の増強が認められた(t検定)。

図11. 表8の実験スケジュール

図 1 2 . (1) 実験 I : 移植後照射群で照射後 14日目に左下肢に移植した腫瘍組織(移植後 7日目)の組織像の代表例(同一部位における A B C 染色, 倍率 200倍)

左上は、一次抗体に PBS を使用した Negative Control の標本。リング状の褐色(写真上では黒色)の発色は認められない。

右上は、一次抗体に抗アシアロ GM<sub>1</sub>抗体を使用した標本。リング状の発色を認める多数の細胞は、アシアロ GM<sub>1</sub>抗原陽性細胞である。

左下は、一次抗体に抗 Thy-1抗体を使用した標本。リング状の発色を認める多数の細胞は、Thy-1抗原陽性細胞である。

右下は、一次抗体に抗 IgG抗体を使用した標本。僅かに認められるリング状の発色を示す細胞は、IgG抗原陽性細胞である。

図 1 2 . (2) 実験 II : 生着後照射群で照射後 7日目に左下肢に移植した腫瘍組織(移植後

7日目)の組織像の代表例(同一部位におけるABC染色,倍率200倍)

一次抗体は図12(1)と同様のものを使用した。その結果、アシアロGM<sub>1</sub>抗原陽性細胞(右上)及びThy-1抗原陽性細胞(左下)が、多数認められたが、その程度は、実験Iの方が著明であった。IgG陽性細胞は、ほとんど認められなかった。

図12.(3)担癌対照群:未処置マウス左下肢に移植した腫瘍組織(移植後7日目)の組織像の代表例(同一部位におけるABC染色,倍率200倍)

一次抗体は図12(1)と同様のものを使用した。その結果、アシアロGM<sub>1</sub>抗原陽性細胞(右上)及びThy-1抗原陽性細胞(左下)が、認められたが、その程度は実験I及びIIに比し少数であった。IgG陽性細胞は、ほとんど認められなかった。

図 1 3 . Meth-A 移植前照射の腫瘍増殖に与える影響

マウス下肢に、5 (◎), 10 (●), 20Gy (▲) の放射線分割照射をした後、照射による急性炎症の消退した 6 週目に Meth-A を移植し、経時的に腫瘍体積を測定した。その結果、線量の増加に伴い腫瘍の増殖は抑制された。

図 1 4 . Meth-A 移植前照射の抗腫瘍効果に与える影響

図左に対照実験として、実験 II における右下肢腫瘍への放射線照射後 7 日目のマウスの再移植実験結果を示した。図右に示す本実験では、腫瘍が 100% 生着する 10Gy の前照射部位 (左下肢) を用いて、対照実験と同様の実験を行った。その結果、前照射の有無に関係せず、生着率の低下が見られた。

図 1 5 . 放射線照射部位での抗腫瘍効果の組織学的検討

左下肢に照射を行わなかった群と、10Gy及び20Gyの前照射を行った群の3群のマウスを使用した。図5のスケジュールで右下肢腫瘍への放射線照射後実験Ⅰでは照射後14日目、実験Ⅱでは照射後7日目、担癌対照群では同時期の未処置マウスの左下肢へ腫瘍を移植。移植後7日目の組織標本にて、間質及び実質へのリンパ球浸潤・腫瘍細胞変性・壊死について、Point 0~4の評価を行った。各群5匹のマウスを使用し、その平均値を示した。

#### 図16. 放射線照射部位での抗腫瘍効果の免疫組織学的検討

図15で行ったと同様のマウスを用い組織切片を作製し、図3に示した手順でABC染色を行った。なお、一次抗体には、T細胞の染色に抗Thy-1抗体、B細胞の染色に抗IgG抗体、NK細胞の染色に、抗アシアロGM<sub>1</sub>抗血清を用いた。各標本の評価方法は、各抗体の陽性細胞の浸潤の程度に0-4までの評点



を付与し、1群5匹でその平均をとった。

表1. 非照射部位(左下肢)における照射後の  
抗腫瘍効果 その2 生着率による比較

図6の実験スケジュールに従って再移植実験を行った際の左下肢腫瘍生着率を示した。なお、各生着率左に示す分数は(各群の左下肢腫瘍が生着したマウス数)/(各群実験マウス数)を表わしている。対照実験として、

Meth-A移植後右下肢の照射を行わなかった場合、及び腫瘍を移植せず右下肢の照射のみ行った場合、左下肢へは100%腫瘍が生着した。

表2. マウス末梢血白血球数・リンパ球数・脾臓重量・脾臓リンパ球数に与える放射線局所照射の影響 その1 .

図5のスケジュールにて右下肢腫瘍への放

射線照射後実験Ⅰでは照射後14日目、実験Ⅱでは照射後7日目のマウスを用いた。対照として、同時期の照射を行わなかった担癌マウス及び未処置マウスを使用した。各群4匹のマウスを使用し、平均値±標準偏差で示した。t検定を用い、各対照群との有意差を検定した。

表3. マウス末梢血白血球数・リンパ球数・脾臓重量・脾臓リンパ球数に対する放射線局所照射の影響 その2 照射対照群

未処置マウスに5Gy/day total 20Gyの局所連日分割照射を行い、照射後7日目及び14日目と照射を行わなかったマウスを使用した。各群4匹のマウスを使用し、平均値±標準偏差で示した。対照群との有意差は認められなかった(t検定)。

表4. 脾臓リンパ球による中和試験 その2  
リンパ球サブセットによる解析

図9の実験I及びIIのマウス脾臓リンパ球をそれぞれ抗アシアロGH<sub>1</sub>抗血清及び抗Thy-1抗体で処理したリンパ球を用いて、同様の中和試験を行った。Meth-A腫瘍細胞との混合液を移植後10日目の腫瘍体積を測定し、平均値±標準偏差で示した。各群4匹のマウスを使用した。実験IIにおいて、両抗体の処理により、有意に腫瘍体積抑制効果が消失した(t検定)。

表5. 脾臓リンパ球のNK活性に対する放射線局所照射の影響 その2 照射対照群

未処置マウスに5Gy/day total 20Gyの局所連日分割照射を行い、照射後7日目及び14日目と照射を行わなかったマウス脾臓リンパ球のNK活性を測定した。各群4匹のマウスを使用し、平均値±標準偏差で示した。対照群との有意差は認められなかった(t検定)。

表6. 左下肢(非照射側)の抗腫瘍効果発現部

## 位における組織学的所見 その1 経時的変化

図5のスケジュールにて右下肢腫瘍への放射線照射後、実験Ⅰでは照射後14日目、実験Ⅱでは照射後7日目に、左下肢へMeth-Aを移植。移植後3, 5, 7, 10, 14日目の左下肢腫瘍組織にて、間質及び実質へのリンパ球浸潤・腫瘍細胞変性・壊死について、Point 0~4の評価を行った。各群3~5匹のマウスを使用し、その平均値を示した。なお、対照として、未処置マウスの下肢皮下にMeth-Aを移植したマウスの組織標本を使用した。その結果、実験Ⅰ及びⅡで、早期よりのリンパ球浸潤が見られた。

## 表7. 左下肢(非照射側)の抗腫瘍効果発現部位における組織学的所見 その2 照射条件による比較

実験は、移植後照射群(実験Ⅰ:20Gy)、生着後照射群(実験Ⅱ:10Gy, 20Gy, 30Gy)の各照

射条件による実験群につき、右下肢の局所照射終了後、1日目、7日目、14日目、21日目のそれぞれの各時期に、左下肢にMeth-Aを移植したマウスを用いた。(1)は、左下肢へ移植後5日目、(2)は左下肢へ移植後10日目における組織像を比較したものである。

表8. 左下肢(非照射側)の抗腫瘍効果発現部位における組織学的所見 その3 免疫組織学的検討

図11のスケジュールに従って、実験Iでは照射後14日目、実験IIでは照射後7日目のマウスの左下肢に腫瘍を移植。左下肢腫瘍移植後7日目にマウスを屠殺、左下肢腫瘍部分を摘出し、図3に示した手順でABC染色を行った。なお、一次抗体には、T細胞の染色に抗Thy-1抗体、B細胞の染色に抗IgG抗体、NK細胞の染色に、抗アジアロGM1抗血清を用いた。各標本の評価方法は、各抗体の陽性細胞の浸潤の程度に0-4までの評点を付与

し、1群5匹でその平均をとった。なお、対照として、未処置マウスの下肢皮下にMeth-Aを移植したマウスの組織標本を使用した。その結果、実験I及びIIで、NK細胞・T細胞の増加が見られた。

表9. 放射線照射腫瘍部位(右下肢腫瘍)における組織学的所見

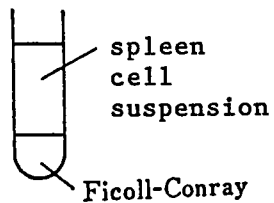
図5のスケジュールに従って右下肢腫瘍への放射線照射を行った後、5,7,10,14日目の組織にて、間質及び実質へのリンパ球浸潤・腫瘍細胞変性・壊死について、Point 0~4の評価を行った。各群3~5匹のマウスを使用し、その平均値を示した。

表10. 放射線照射の血管に与える影響

実験には20Gyの前照射を行ったマウスを用い、照射側下肢及び非照射側下肢それぞれの伏在動脈の血管面積及び内腔面積を測定し、その比で非照射側との比較を行った(n=5)。

20Gyの照射側では、非照射側に比し有意に  
( $p < 0.01$ ) 血管断面積に対する内腔面積の  
比の減少が認められた(t検定)。

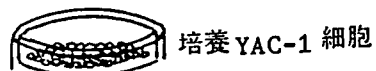
エフェクター細胞  
の作成



↓  
遠心分離

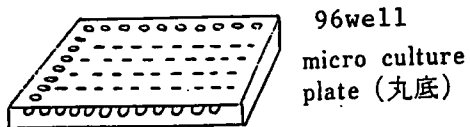
$1 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml / well}$

標的細胞の  
作成



↓  
 $1 \times 10^6$   
 $^{51}\text{Cr}$  標識 1 時間

$1 \times 10^4 / 0.1 \text{ ml / well}$



37°C 4 時間培養

↓  
上清採取 (0.1ml)

↓  
放射活性を測定

図 2



生の組織



凍結 (液化窒素,  $-160^{\circ}\text{C}$ )



薄切



固定 (アセトン,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10分)



洗淨 : 1~2時間



一次抗体

(MoAb : 30~60分 異種抗血清 : 30分)



洗淨 (生食, PBS) : 15分×2回



二次抗体 : 30分



洗淨 : 15分×2回



ABC : 30分



洗淨 : 10分×3回



発色 : 室温で1~3分



20% フォルマリンで固定 : 10分以上



核染色

(ヘマトキシリン : 15~20秒)



脱水・封入

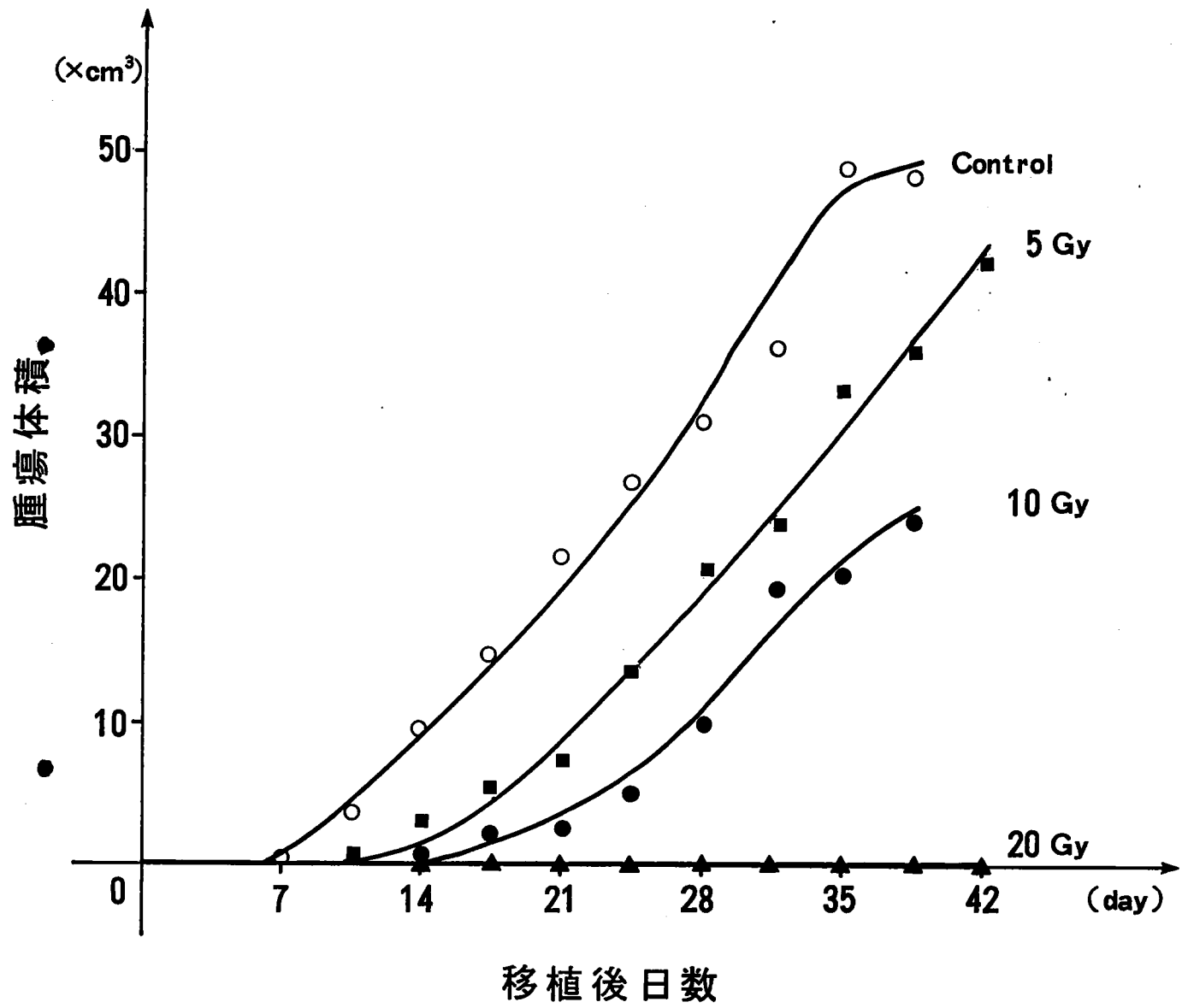


図 4 (1)

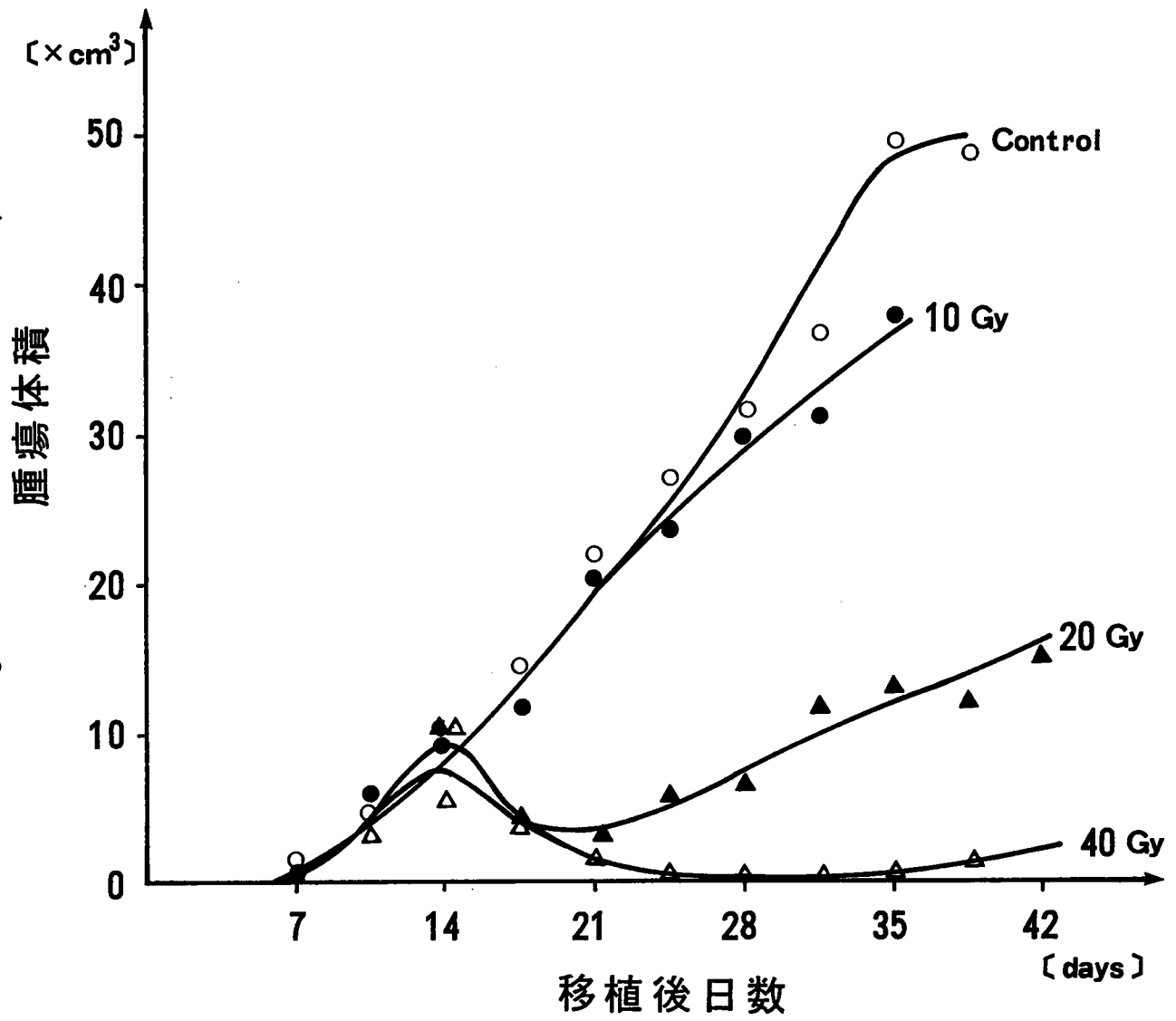
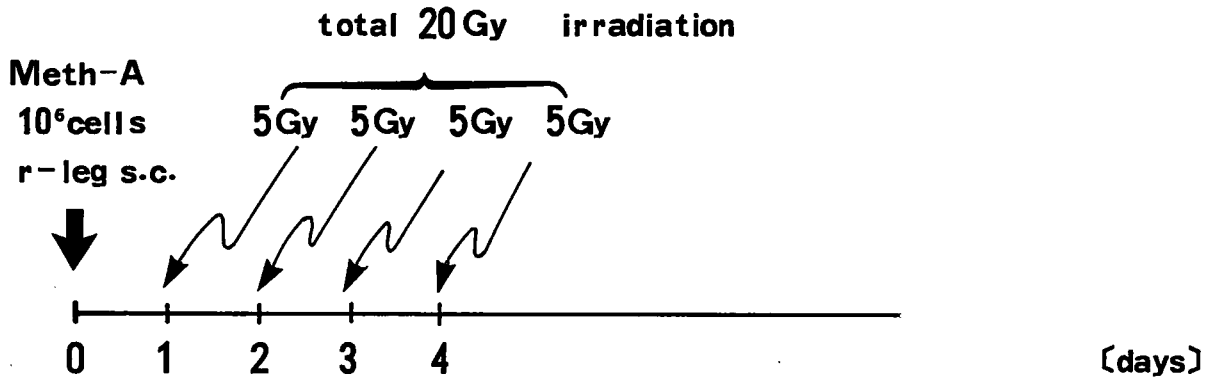
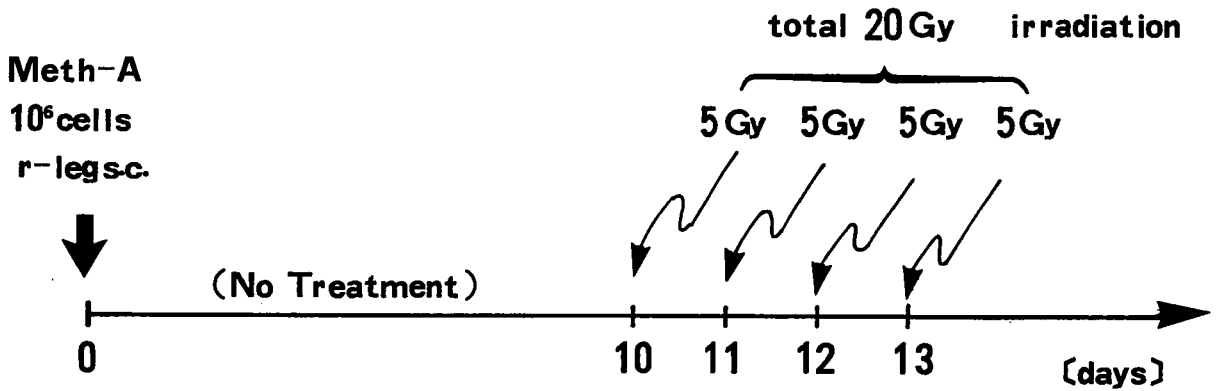


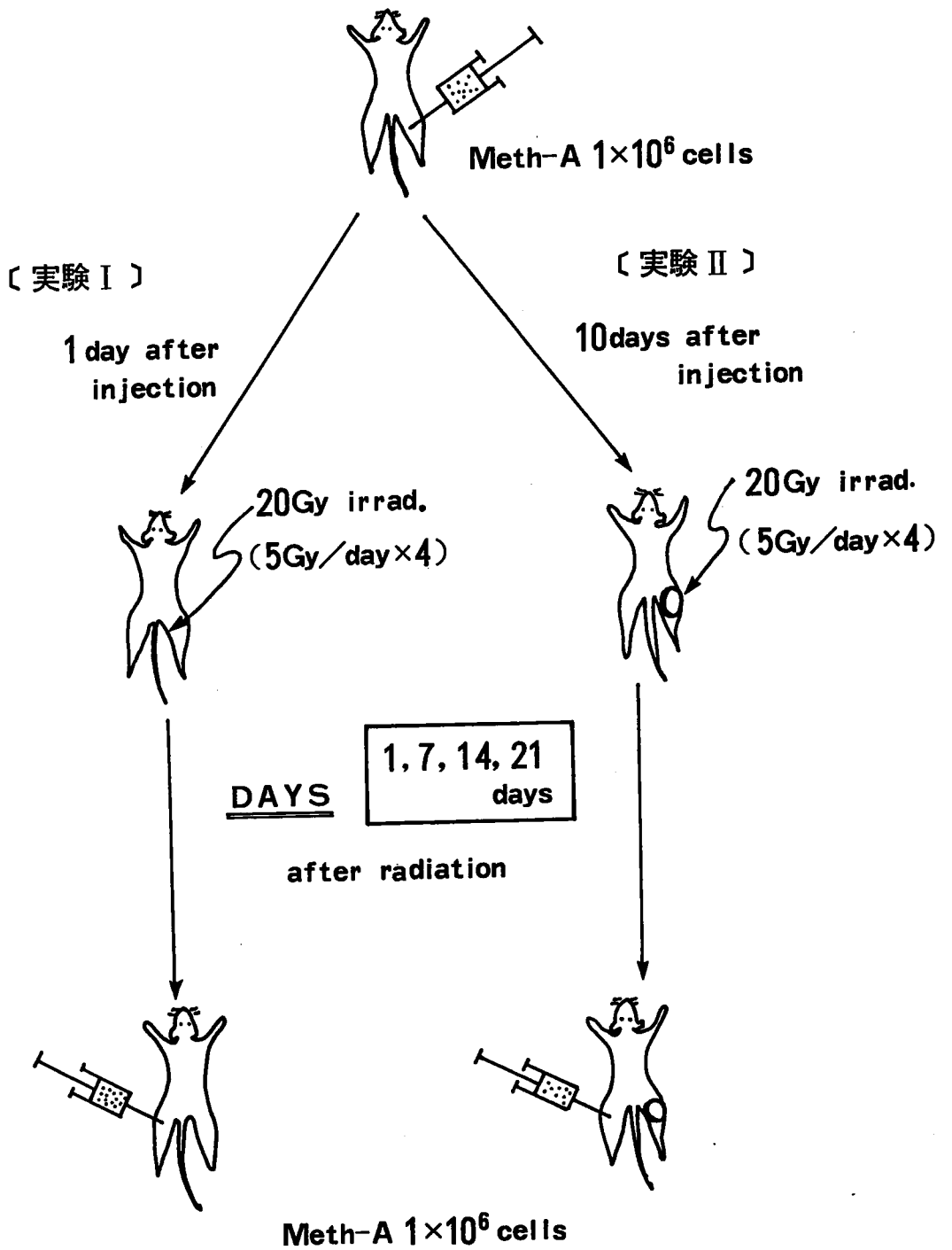
図 4 (2)

### 実験 I : 移植直後照射群



### 実験 II : 腫瘍形成後照射群





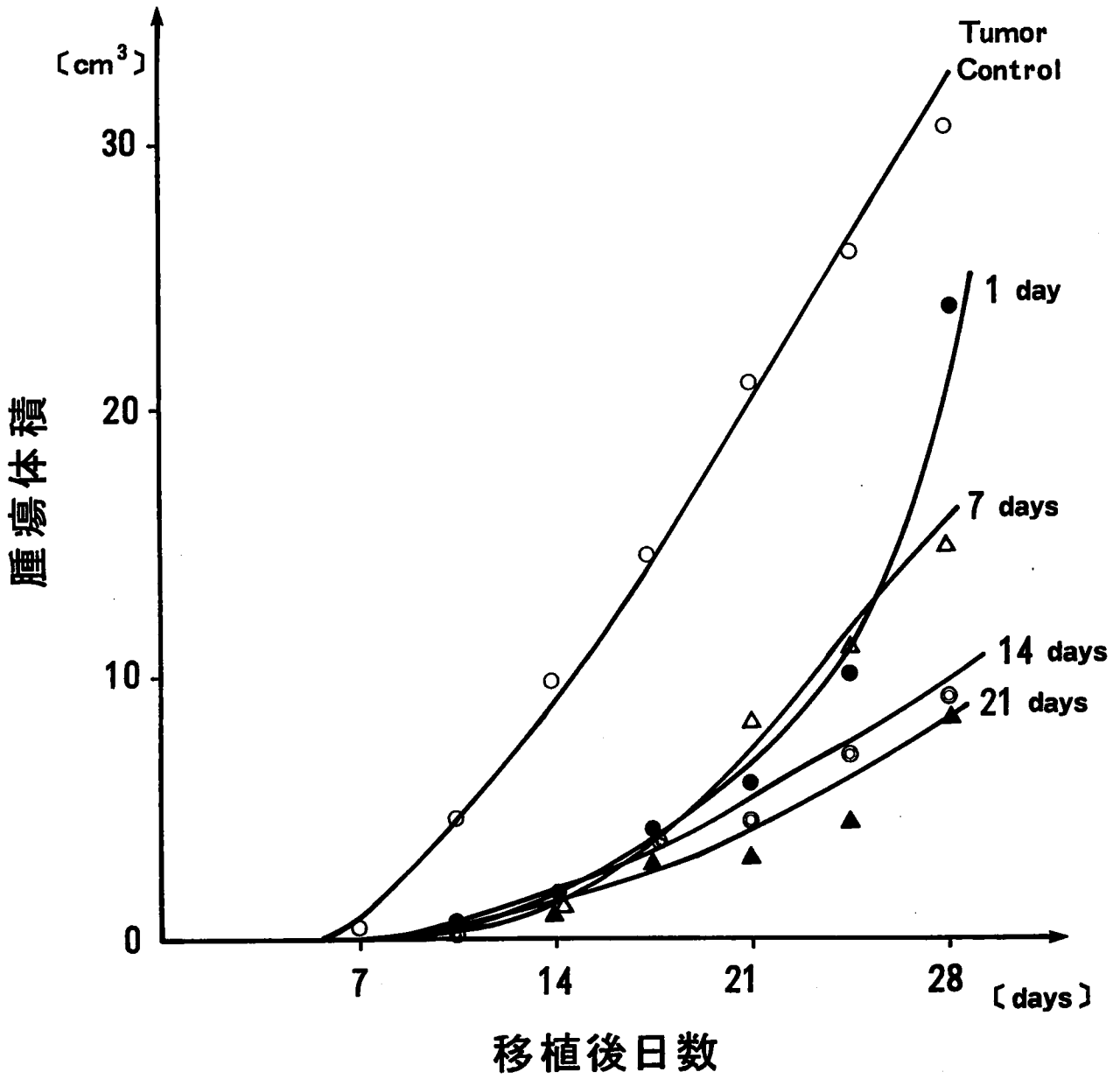


図 7 (1)

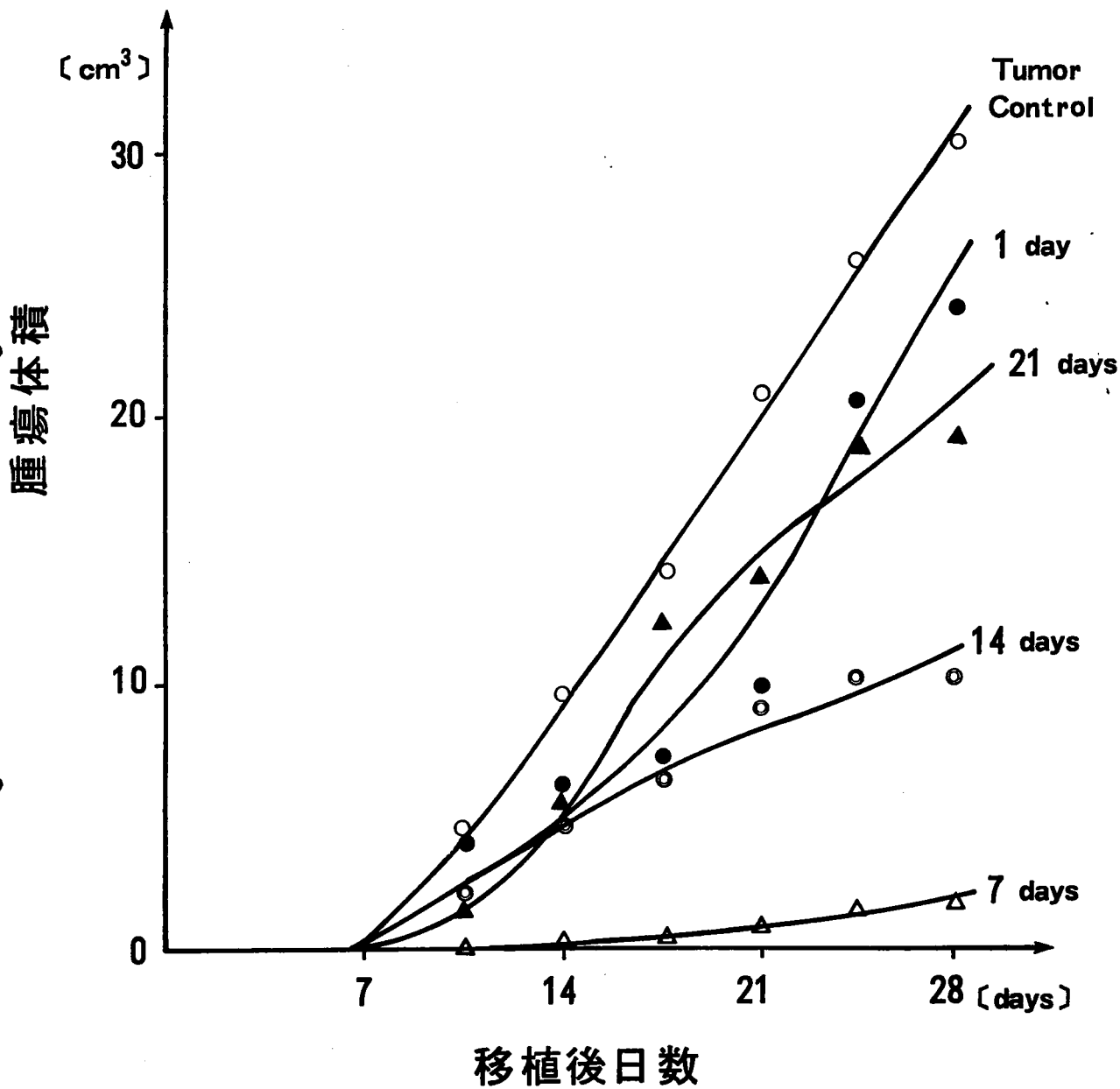


图 7 (2)

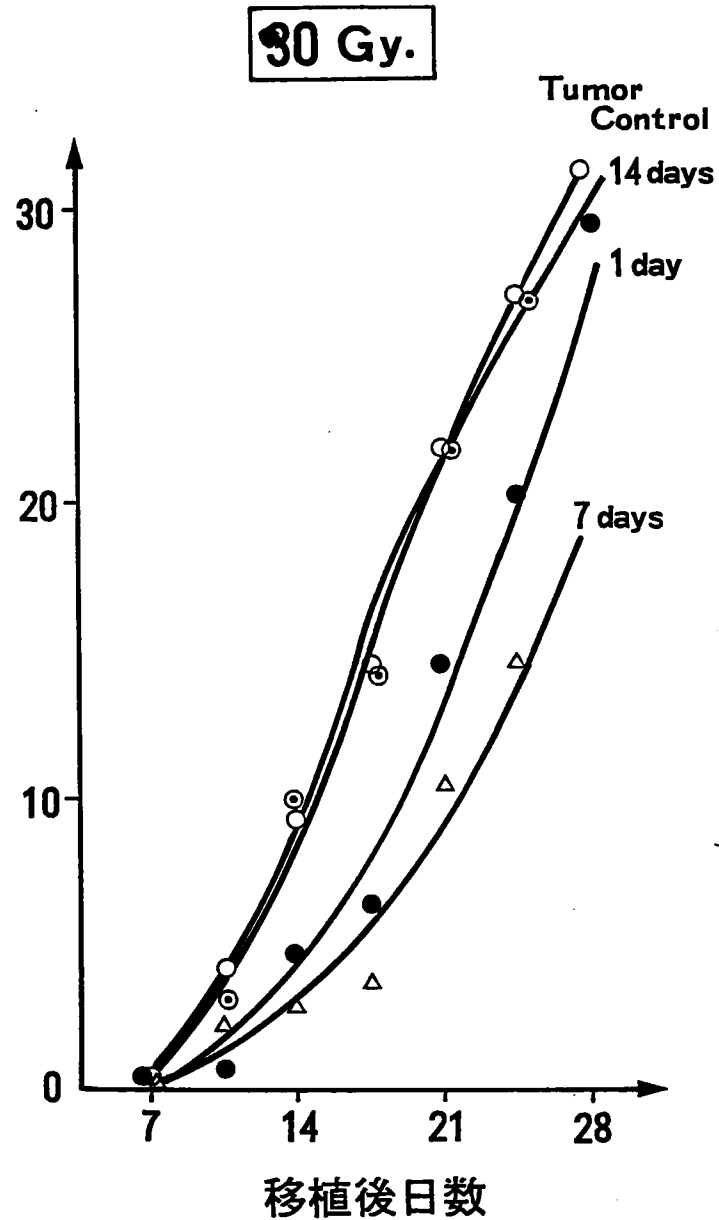
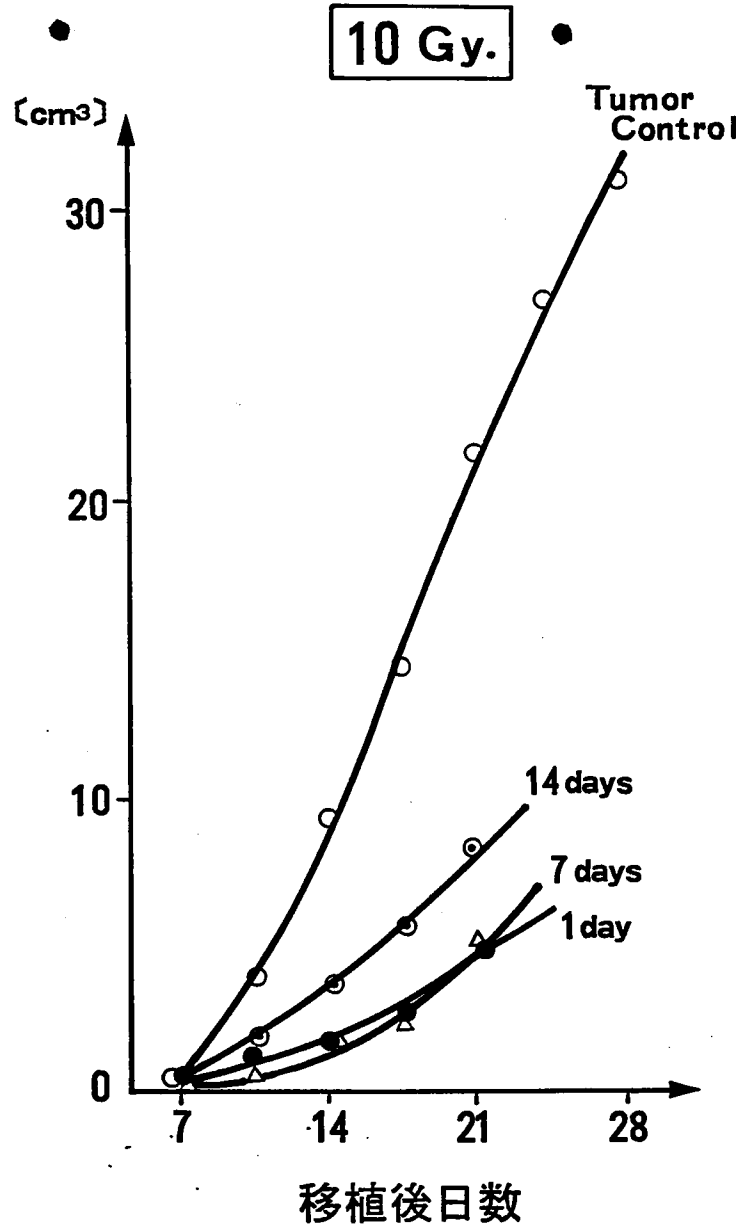


図 7 (3)

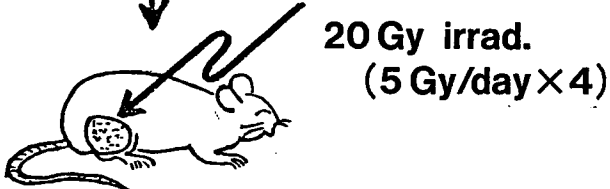


# Effector cell

# Target cell



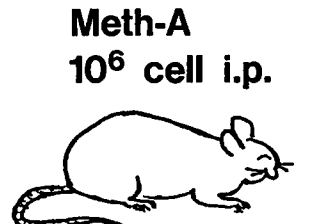
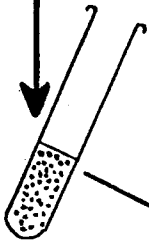
(実験 I 1 day  
実験 II 10 days)



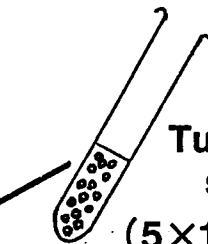
(実験 I 14 days  
実験 II 7 days)



Spleen  
lymphocyte  
suspension

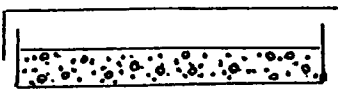


10 days



Tumor cell  
suspension  
( $5 \times 10^4$  cell/mouse)

E/T = 200

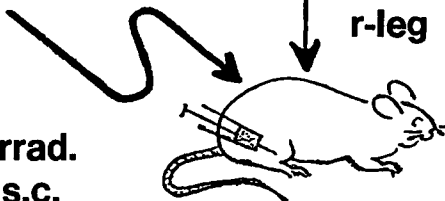


Culture

(10% FBS + RPMI 1640  
37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 1hr)

r-leg s.c.

4 Gy  
Whole body irradi.  
24 hr. before s.c.



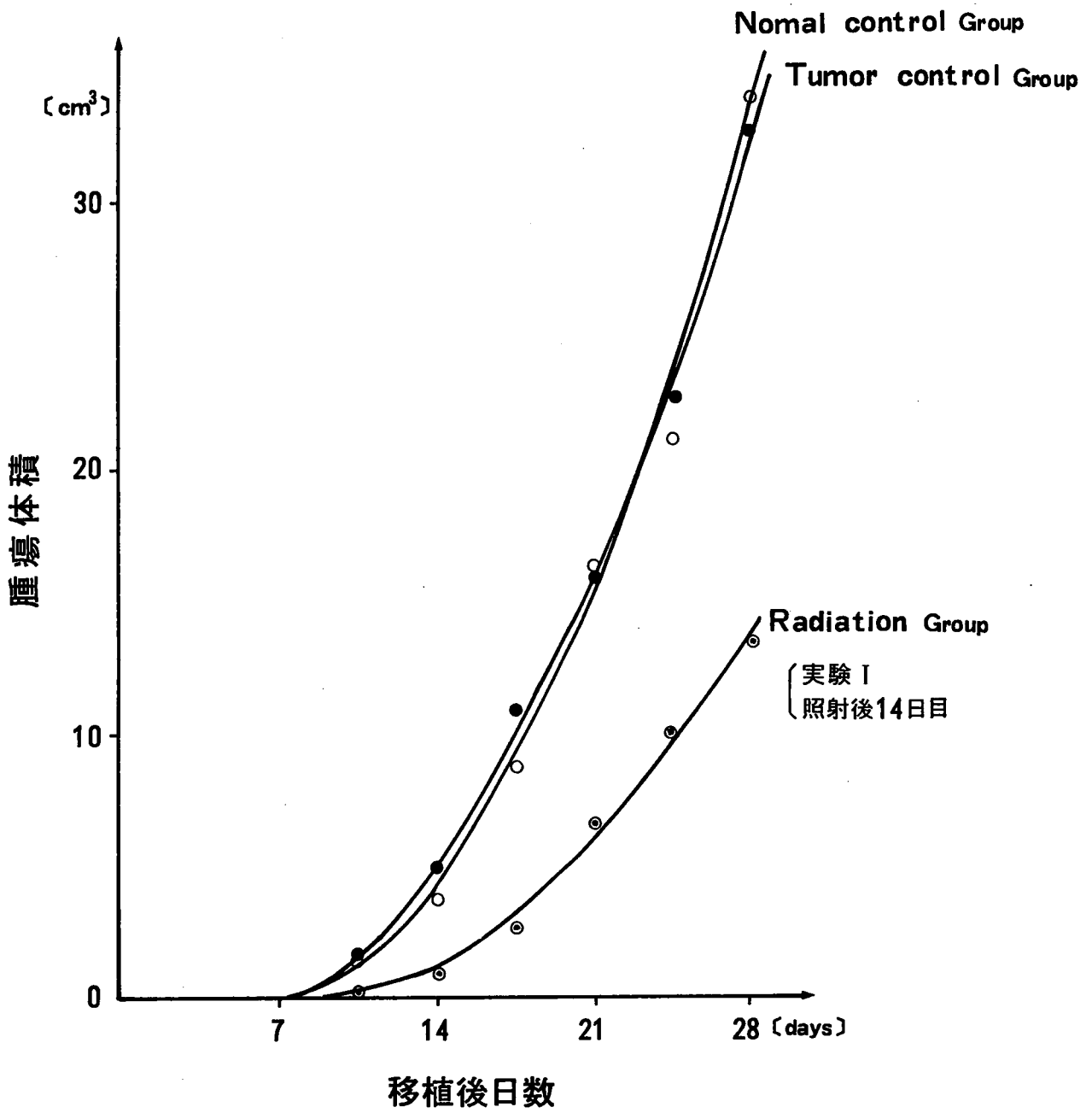
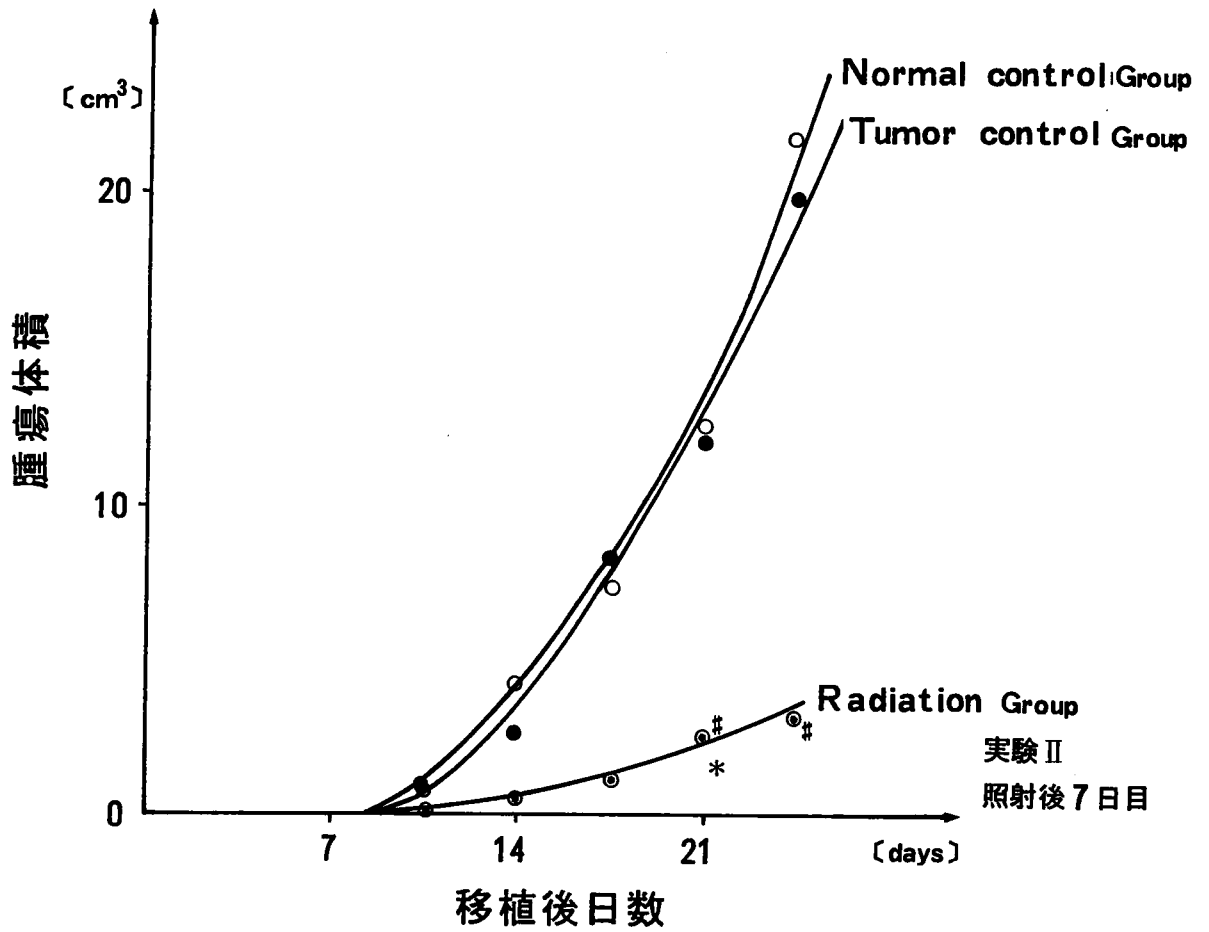


図 9 (1)



\* Normal control group に対する有意差 \* $p < 0.05$   
 Tumor control group に対する有意差 # $p < 0.05$

図 9 (2)

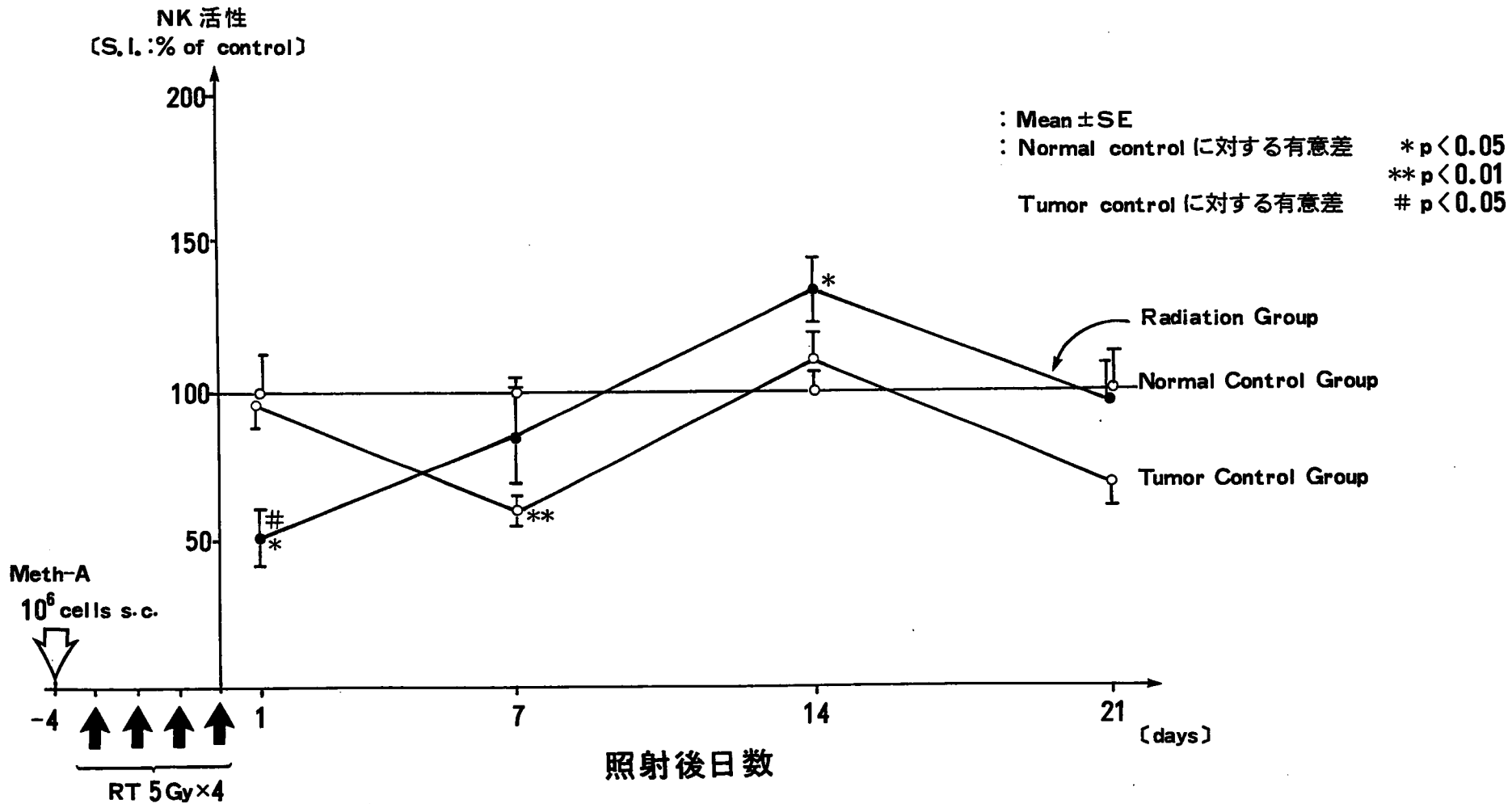
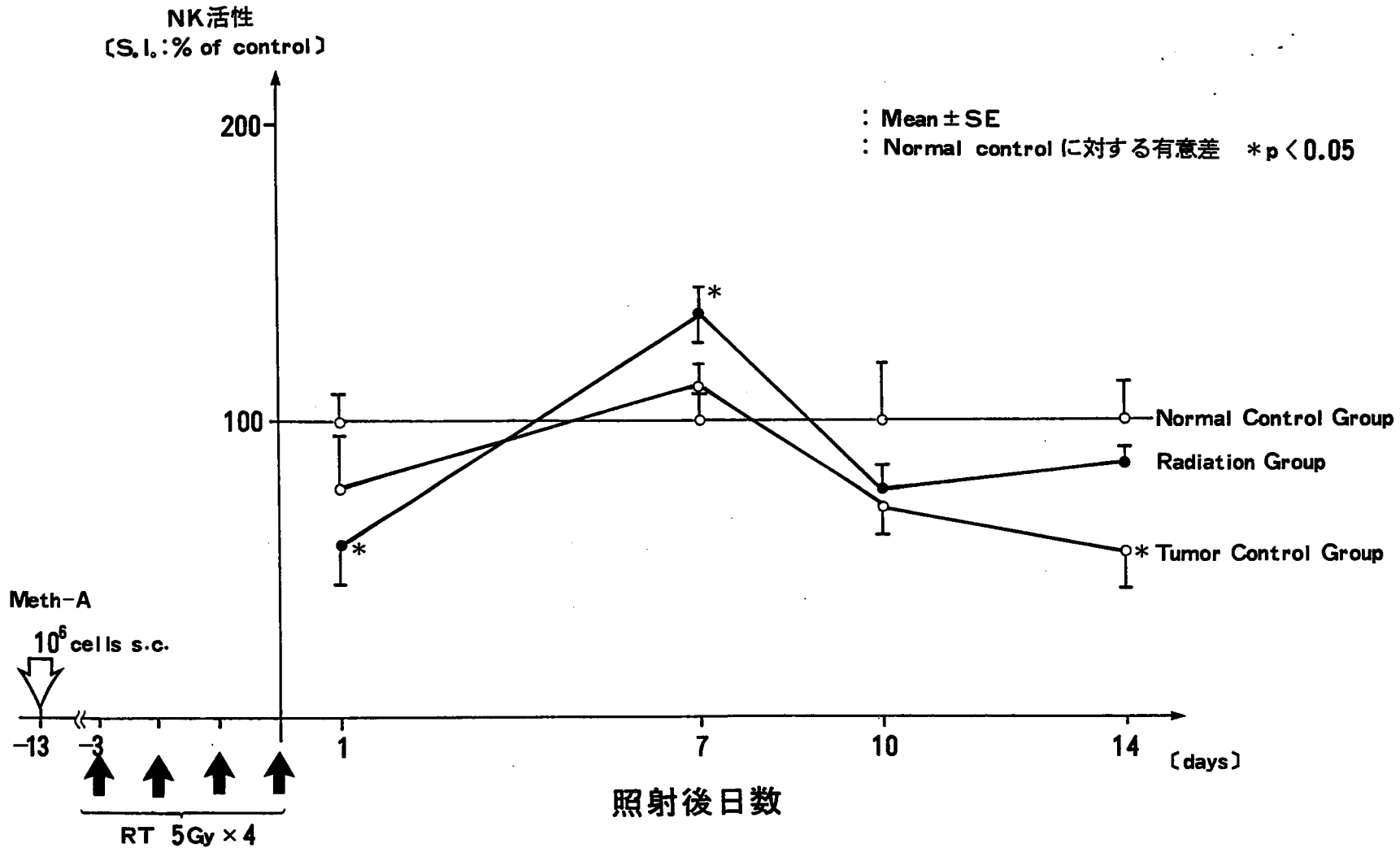
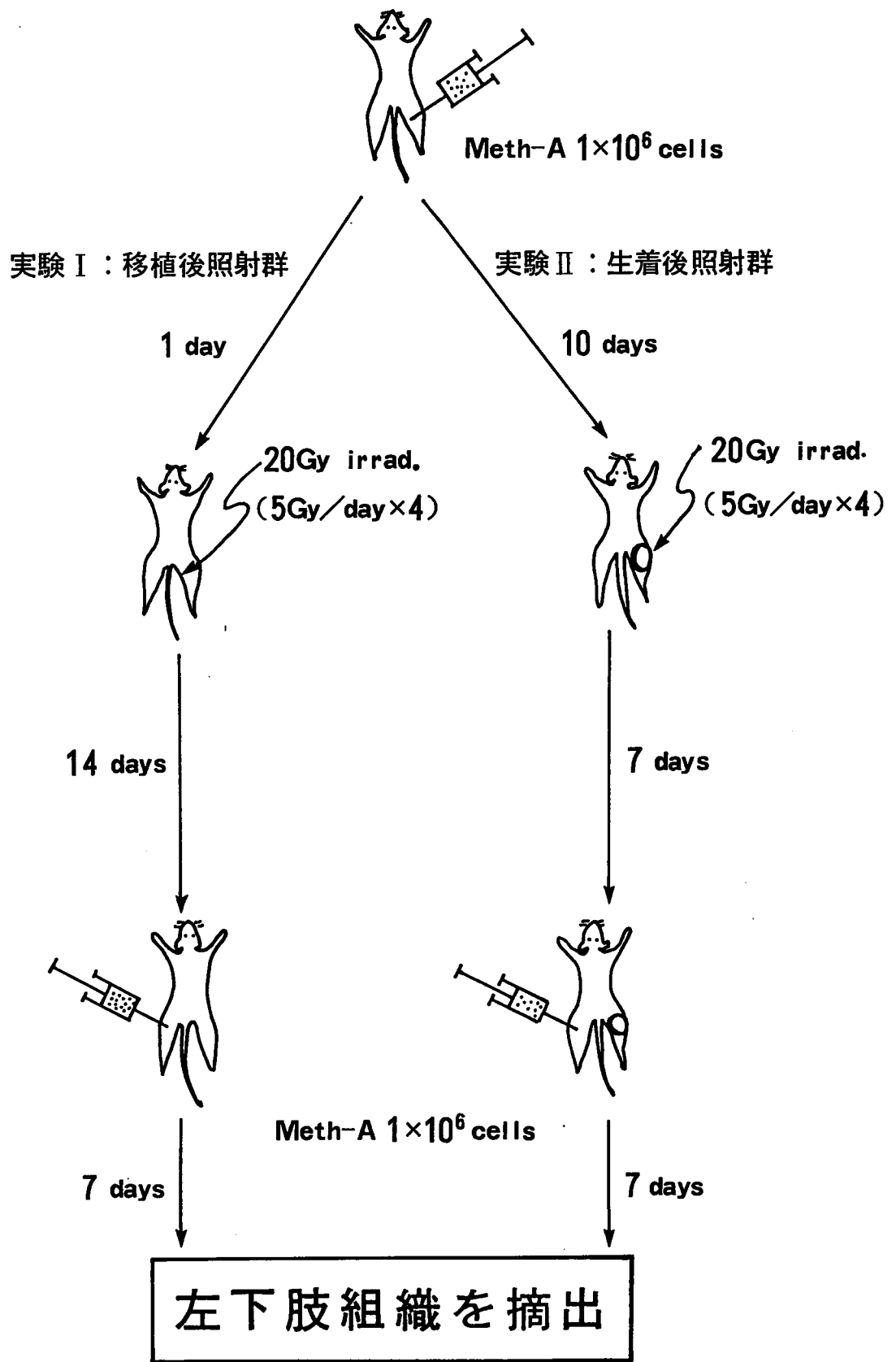


図 10 (1)





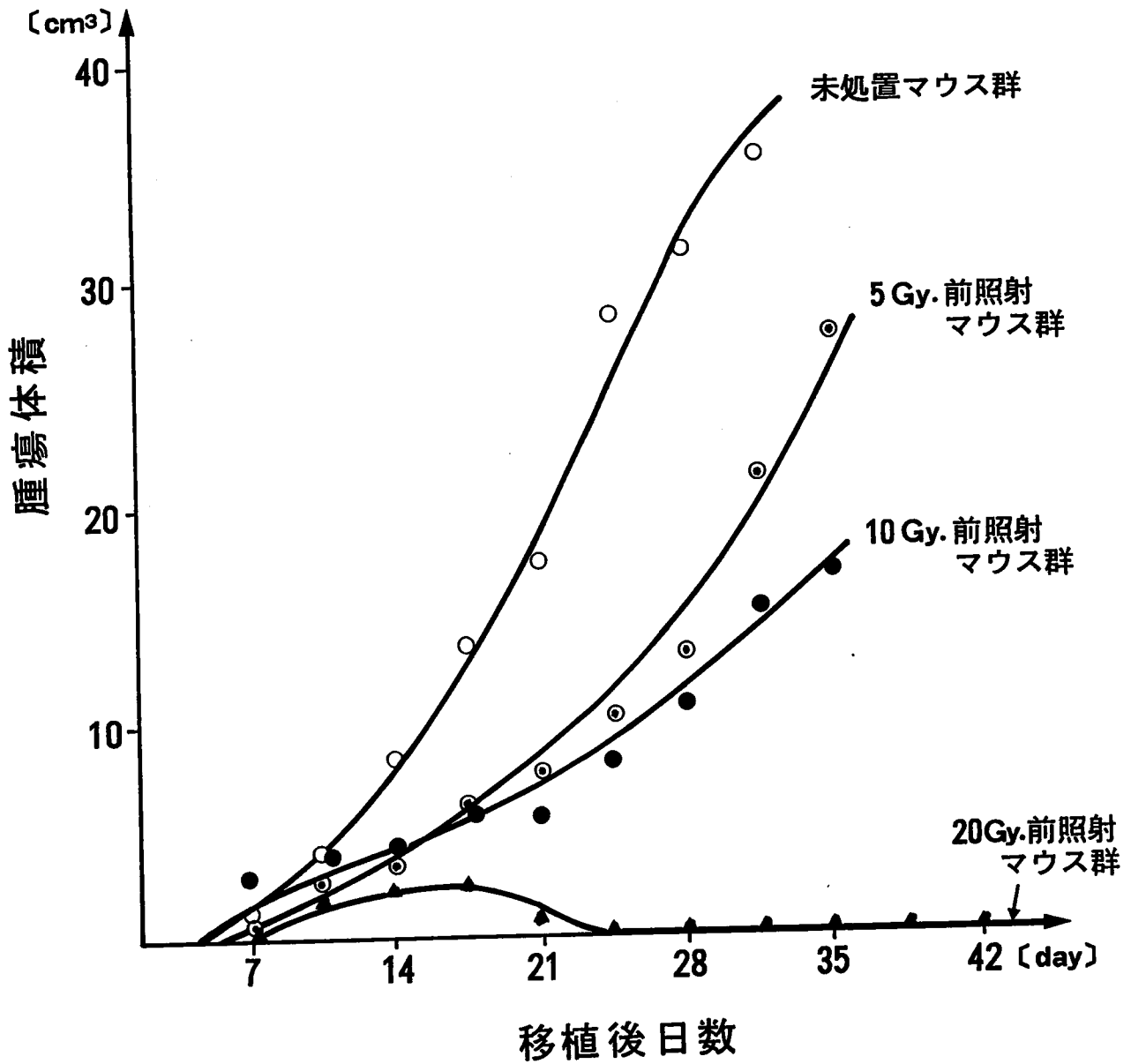
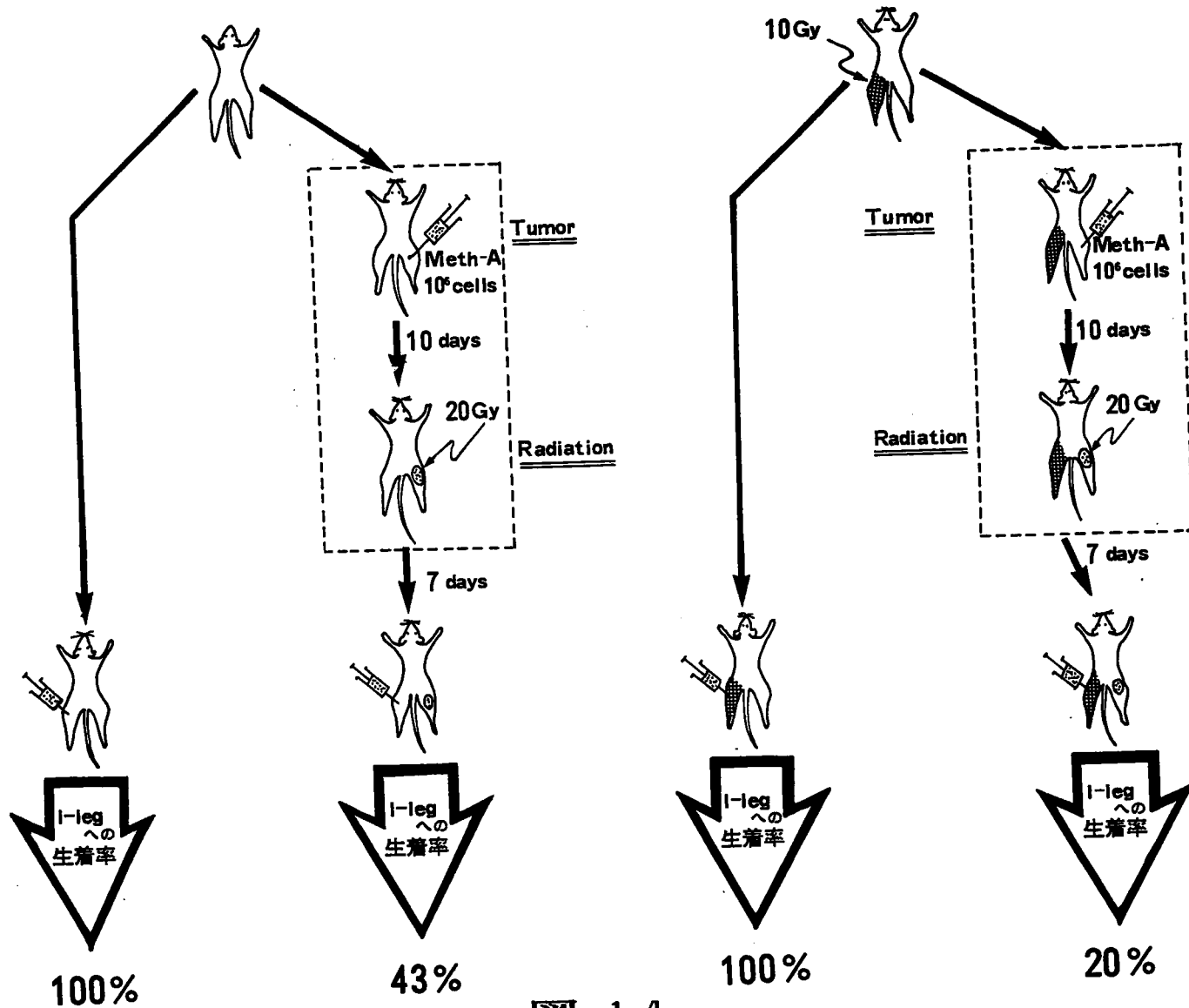


図 13

対照群 (未照射群)

実験群 (前照射群)

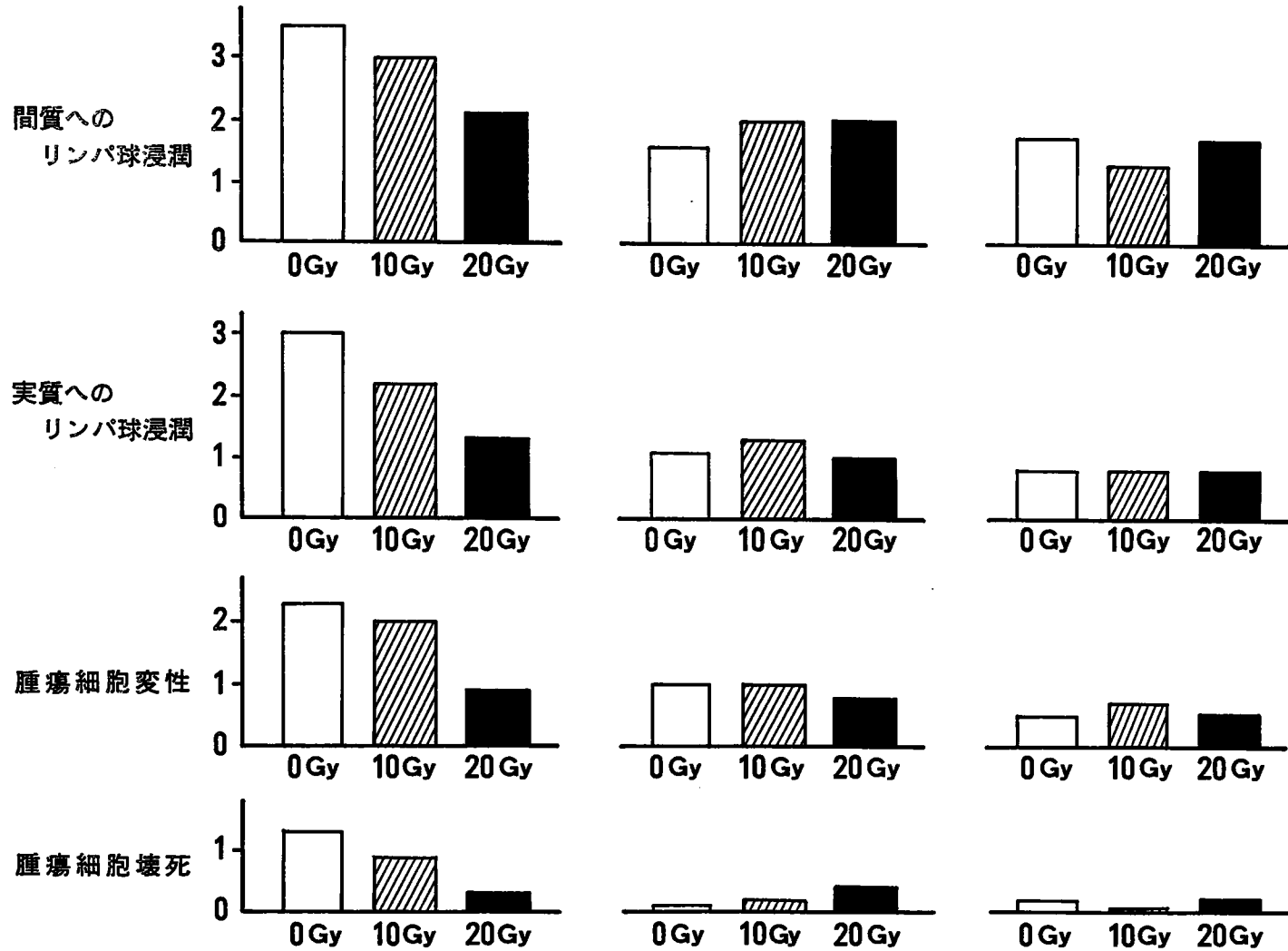




実験 I  
移植後照射群

実験 II  
生着後照射群

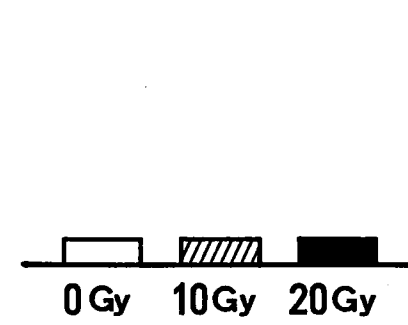
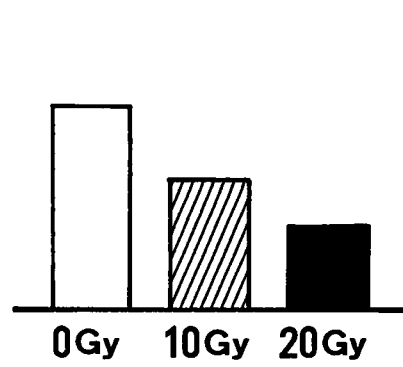
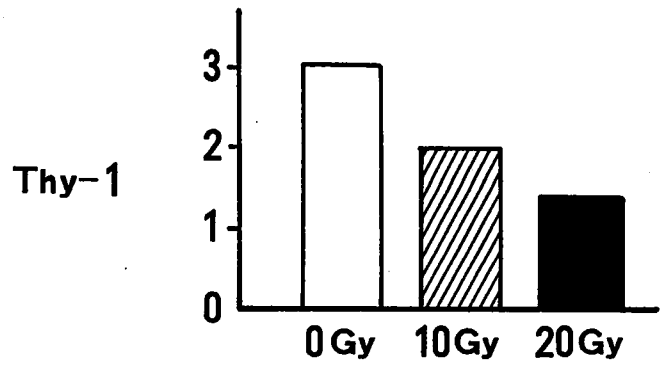
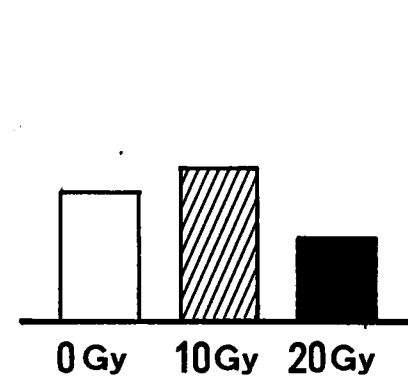
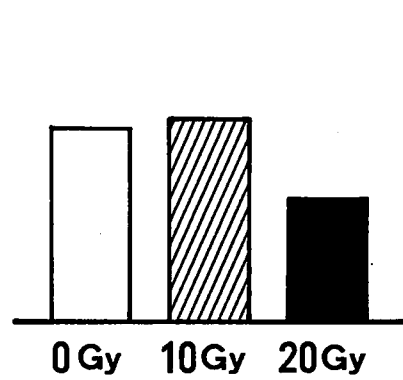
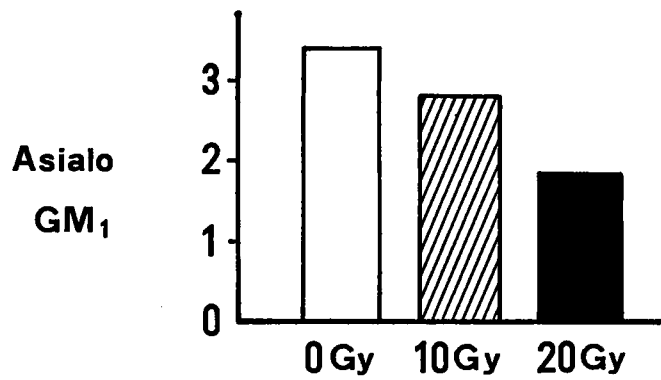
担癌対照群  
(未処置マウス)



実験 I  
移植後照射群

実験 II  
生着後照射群

担癌対照群  
(未処置マウス)



γ-leg 照射後 の日数	実験 I 移植後照射群	実験 II 生着後照射群		
	20 Gy.	10 Gy.	20 Gy.	30 Gy.
1	5/5 100%	3/5 60%	5/6 83%	5/5 100%
7	4/5 80%	1/5 20%	6/14 43%	4/5 80%
14	2/5 40%	3/4 75%	7/7 100%	5/5 100%
21	4/6 67%	—	4/4 100%	—

表 1

	実験 I: 移植後照射群 照射後14日目	実験 II: 生着後照射群 照射後7日目	担癌マウス 対照群	未処置マウス 対照群
末梢血の 白血球数 (/mm <sup>3</sup> )	5850 ±650	## ** 3280 ±230	7330 ±1270	5600 ±770
末梢血の リンパ球数 (/mm <sup>3</sup> )	4550 ±670	# ** 2780 ±430	5000 ±1290	4900 ±690
脾臓重量 (Spleen Index)	### * 5.7 ±0.2	### ** 6.1 ±0.4	*** 7.5 ±0.5	5.0 ±0.5
脾臓リンパ球数 (×10 <sup>7</sup> )	3.0 ±0.7	# 2.7 ±0.5	** 3.5 ±0.5	2.8 ±0.5

☆担癌マウス対照群との有意差

#p<0.05  
##p<0.01  
###p<0.001

☆未処置マウス対照群との有意差

\*p<0.05  
\*\*p<0.01  
\*\*\*p<0.001

表 2

	照射後7日目	照射後14日目	未処置(対照マウス)
末梢血の 白血球数 [ $\text{mm}^3$ ]	4900 $\pm$ 1500	5400 $\pm$ 500	6100 $\pm$ 1600
末梢血の リンパ球数 [ $\text{mm}^3$ ]	3000 $\pm$ 1200	3900 $\pm$ 500	4400 $\pm$ 1100
脾臓重量 [Spleen Index]	4.6 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 0.2	6.2 $\pm$ 0.8
脾臓リンパ球数 [ $\times 10^4$ ]	1920 $\pm$ 190	2000 $\pm$ 370	2450 $\pm$ 530

表 3

1. 未処置マウスリンパ球群 (Normal control mouse)	3.4 ± 1.6
2. 担癌マウスリンパ球群 (Tumor control mouse)	2.3 ± 0.6
3. 移植直後照射マウスリンパ球群 (実験 I : 20Gy 照射後 14 日目)	2.3 ± 0.6
1) 抗アジアロ GM <sub>1</sub> 抗血清処理群	4.8 ± 1.6
2) 抗 Thy-1 抗体処理群	11.6 ± 6.9
4. 腫瘍形成後照射マウスリンパ球群 (実験 II : 20Gy 照射後 7 日目)	0.8 ± 0.8 <sup>☆☆</sup>
1) 抗アジアロ GM <sub>1</sub> 抗血清処理群	3.8 ± 1.5 <sup>*</sup>
2) 抗 Thy-1 抗体処理群	3.6 ± 1.2 <sup>**</sup>

: Means ± SD [cm<sup>2</sup>]

未処置マウスリンパ球群に対する有意差 ☆ p < 0.05

担癌マウスリンパ球群に対する有意差 ★ p < 0.05

腫瘍形成後照射マウスリンパ球群に対する有意差

\* p < 0.05

\*\* p < 0.01

	照射後7日目	照射後14日目	未処置(対照マウス)
脾臓リンパ球 NK活性 [% of control]	82.0 ±2.9	87.8 ±18.6	100.0 ±23.2

表 5

# リンパ球浸潤

左下肢への移植後日数		3	5	7	10	14
実験Ⅰ. 移植後照射群 (照射後14日目)	間質	1.5	3.2	3.5	2.8	3.0
	実質	1.2	3.0	3.0	2.7	3.3
実験Ⅱ. 生着後照射群 (照射後7日目)	間質	2.3	1.6	1.6	2.3	1.5
	実質	1.4	2.1	1.1	1.5	1.7
担癌対照群 (未処置マウス)	間質	0	0.6	1.7	1.9	2.2
	実質	0	0.1	0.8	1.4	1.2

## 腫瘍細胞 変性・壊死

左下肢への移植後日数		3	5	7	10	14
実験Ⅰ. 移植後照射群 (照射後14日目)	変性	1.3	1.7	2.3	2.7	2.7
	壊死	0	1.3	1.3	1.3	2.7
実験Ⅱ. 生着後照射群 (照射後7日目)	変性	1.6	1.1	1.0	1.5	1.7
	壊死	0	0.3	0.1	0.3	0.7
担癌対照群 (未処置マウス)	変性	0	0.1	0.5	0.6	0.7
	壊死	0	0	0.2	0	0

# 評価方法：n=3~5の平均

Point 0 : none

Point 1 : slight

Point 2 : moderate

Point 3 : marked

Point 4 : very marked

表 6



● ☆リンパ球浸潤

照射後左下肢への 移植までの日数		1	7	14	21
実験 I. 移植後照射群 (20 Gy 照射群)	間質	0.7	1.8	<b>3.2</b>	0.8
	実質	0.5	0.8	<b>3.0</b>	0.3
実験 II. 生着後照射群 (20 Gy 照射群)	間質	1.0	<b>1.6</b>	0.5	0.7
	実質	0.3	<b>2.1</b>	0.2	0
生着後照射群 (10 Gy 照射群)	間質	0.7	0.5	0.3	
	実質	0.5	0.3	0	
生着後照射群 (30 Gy 照射群)	間質	2.0	1.2	1.3	0.5
	実質	1.8	1.2	0.8	0
担癌対照群 (未処置マウス)	間質	0.6			
	実質	0.1			

☆腫瘍細胞 変性・壊死

照射後左下肢への 移植までの日数		1	7	14	21
実験 I. 移植後照射群 (20 Gy 照射群)	変性	0.2	0.5	<b>1.7</b>	0.2
	壊死	0	0	<b>1.3</b>	0
実験 II. 生着後照射群 (20 Gy 照射群)	変性	0	<b>1.1</b>	0	0
	壊死	0	<b>0.3</b>	0	0
生着後照射群 (10 Gy 照射群)	変性	0.2	0.3	0	
	壊死	0	0	0	
生着後照射群 (30 Gy 照射群)	変性	1.3	0.5	0.5	0
	壊死	1.0	0.2	0.2	0
担癌対照群 (未処置マウス)	変性	0.1			
	壊死	0			

表 7 (1)

☆リンパ球浸潤

照射後左下肢への 移植までの日数		1	7	14	21
実験 I. 移植後照射群 (20 Gy 照射群)	間質	1.8	2.7	<b>2.8</b>	2.0
	実質	1.2	3.3	<b>2.7</b>	1.8
実験 II. 生着後照射群 (20 Gy 照射群)	間質	1.8	<b>2.3</b>	1.0	1.5
	実質	1.2	<b>1.5</b>	0.5	1.0
生着後照射群 (10 Gy 照射群)	間質	2.7	1.2	0.5	
	実質	3.0	0.8	0.3	
生着後照射群 (30 Gy 照射群)	間質	1.5	2.0	1.3	0.8
	実質	1.3	1.8	1.7	0.3
担癌対照群 (未処置マウス)	間質	1.9			
	実質	1.4			

☆腫瘍細胞 変性・壊死

照射後左下肢への 移植までの日数		1	7	14	21
実験 I. 移植後照射群 (20 Gy 照射群)	変性	0.7	2.5	<b>2.7</b>	1.0
	壊死	0.3	1.3	<b>1.3</b>	0.2
実験 II. 生着後照射群 (20 Gy 照射群)	変性	0.8	<b>1.5</b>	0.5	0.8
	壊死	0.3	<b>0.3</b>	0	0.3
生着後照射群 (10 Gy 照射群)	変性	2.0	0.2	0.2	
	壊死	1.7	0	0	
生着後照射群 (30 Gy 照射群)	変性	1.0	1.3	0.8	0
	壊死	0.7	1.3	0.2	
担癌対照群 (未処置マウス)	変性	0.6			
	壊死	0			

表 7 (2)

	アジア口 GM <sub>1</sub>	Thy-1	Ig-G
実験Ⅰ. 移植後照射群 (照射後14日目)	3.4	3.0	1.3
実験Ⅱ. 生着後照射群 (照射後7日目)	2.4	2.5	0.4
担癌対照群 (未処置マウス)	1.6	1.4	0.3

表 8

☆リンパ球浸潤

照射後日数		5	7	10	14
I.移植後 20GyRT群	間質	2.5	2.8	1.3	1.5
	実質	2.8	3.3	2.3	2.5
II.生着後 20GyRT群	間質	2.8	1.5	0.8	1.3
	実質	2.5	4.0	3.0	2.3

☆腫瘍細胞 変性・壊死

照射後日数		5	7	10	14
I.移植後 20GyRT群	変性	2.7	3.2	2.0	3.0
	壊死	2.3	3.5	4.0	3.3
II.生着後 20GyRT群	変性	3.3	2.0	1.8	1.5
	壊死	2.0	3.5	4.0	4.0

	血管断面積 $S_1$ ( $\mu\text{m}^2$ )	血管内腔面積 $S_2$ ( $\mu\text{m}^2$ )	$\frac{S_2}{S_1}$
照射側	1686.4 $\pm 544.6$	418.6 $\pm 177.9$	0.244 <sup>#</sup> $\pm 0.049$
非照射側	1673.7 $\pm 424.0$	525.3 $\pm 171.2$	0.316 <sup>#</sup> $\pm 0.052$

#  $p < 0.01$

表 1 0

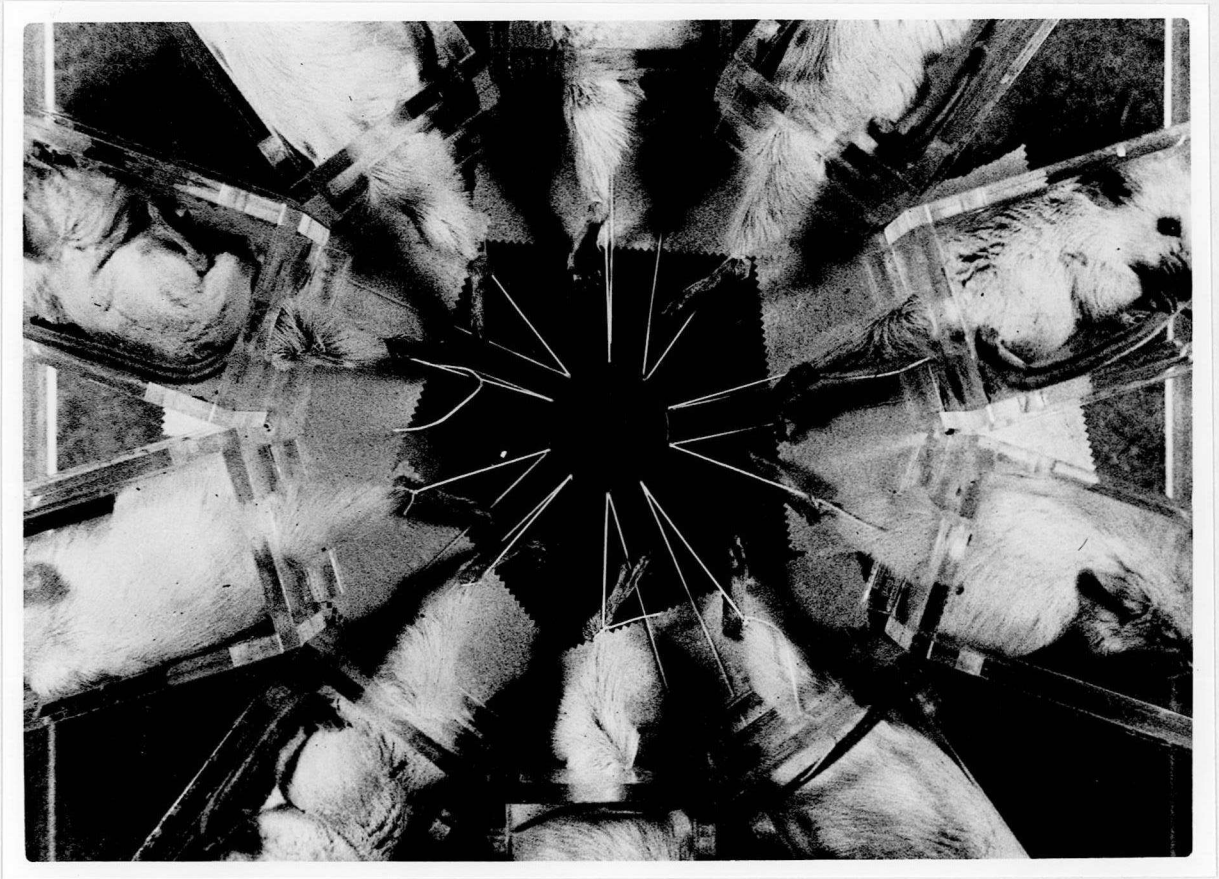


图 1

