

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	https://hdl.handle.net/11094/35342
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論 文 表 題

ļ

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ー

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 頚 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。 1‐1 5)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1)、 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~)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³⁾、ナチュラルキラー(Natural

- 1 --

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 effect¹⁵) 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

— 2 —

与しているということが推察された。

しかし、放射線照射をうけた局所組織は組 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、現在このことに関しての報告はほとんど 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。

— 3 —

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

 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-A¹⁶⁾(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-117)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%ベニシリン・ストレプトマイシ ン混合液 (Flow Lab.,Australia)および重曹

- 4 -

を 含 む RPMI1640培 養 液 (日 水 製 薬 ,東 京) を 用 い て 、 37℃ 、 5%C02の 条 件 で 培 養 器(ALSC0 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、 Ca²⁺,Mg²⁺を含まない リン酸緩衝生理食塩水 (PBS(一),Flow Lab., England)にて3回洗浄後、 PBS(一)で1×10⁷ 個 /m1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 0.1m1(Meth-A 1×10⁶個) を、注射器 (23G×1¹/4"針)を用いて、マウス 下肢皮下に移植した。 Meth-A 1×10⁶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

- 5 -

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: φ 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 4 m m Pb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 大の腫瘤として触知される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 -

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。

> ▼ = $\frac{4}{3}\pi$ { (R+r-1)× $\frac{1}{2}$ } 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 ー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、1mm3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)

- 7 -

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 ピペッ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 21)により、リンパ球を採取した。

9. 中和試験 (Winn Assay)

<u>in vivo</u>における そうー 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1×10⁷個/m1 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 5×104個/0.1m1PBS(-)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

- 8 -

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 5×104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)抗アシアロGM1抗体^{22,23})

N K 細胞の除去には、ウサギ 抗アシアロ GM1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。抗アシアロ GM1抗血清 (10mg/vial)およびモルモット補体は、蒸留 水 1m1/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 1×107個/m1に調製し、これに抗アシアロGM1 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 2m1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²⁴ (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、1×10⁷個/m1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 2m1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。

11. 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、1×10⁷個/m1 の細胞浮遊液に調製した。

(2) 標的 細胞の 調製

N Kassayでは YAC-1を標的細胞として用いた。標的細胞 5×10⁶ 個を ⁵¹Cr-Sodium

chromate (Specific activity; 240 mCi/mg, Amersham, England) 50 μ gを含む 10% FCS添加 RPMI-1640培養液1mlに浮遊させ、 37℃, 5% CO 2 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1×105個/mlの細胞浮遊液に 調製した。

(3)NK活性の測定

Brunnerら²⁵⁾の ⁵¹Cr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 1×10⁶個/0.1mlおよび 1×10⁴個/0.1mlずつ 加え(E/T ratio=100:1)、1wellあたりの全 量を0.2mlとして、 37℃, 5%C02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

- 11 -

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

<u>cpm of experimental release - cpm of spontaneous release</u> x 100 <u>cpm of maximum</u> release - cpm of spontaneous release

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。

実験群の% of specific release S.I. = ______ control群の% of specific release

12. 組織標本の作製

(1) H E 染色

- 12 -

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)^{2 &})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)²⁷

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 28)、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 抗原にモノクロナール抗体(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)

- 13 -

抗体がモノクロナール抗体に結合し、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 28)で、染色を行った。なおモノクロナール 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

- 14 -

(1)リンパ球の浸潤

腫瘍胞巣内を実質、腫瘍胞巣の周囲組織を 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(++),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, (牛) Point 3の 2 つに分 けた30)。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(Hh、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, (+); 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索から除外している。

(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。 14.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ヵ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 ^{3 1)}の 血 管 断 面 積 及 び 血 管

- 17 -



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

<u>in vivo</u>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 腫瘤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 5 Gy/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

- 19 -

て 20 G y 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 20 Gyの照射スケジュールを図5に示した。

2 · Meth-A <u>in vivo</u> 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

-20 -

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 1×10[®]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

- 21 -

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。

10 Gy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30 Gy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

- 22 -

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)。 なお脾重量の比 較には、(脾重量 [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、脾臟重量において、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

- 24 -

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 (∀inn 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I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GM1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GM1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I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<u>in vivo</u>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⁵¹Cr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 I 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I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 I: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I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 I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、抗アシアロ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、アシアロ GM 1 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って、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

- 32 -

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. Met'h-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ら週 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 20 Gy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

— 34 —
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)同様の実験を行初 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。

1 1 . 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 I 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I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I及び担癌対照群 において、アシアロ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

— 36 —

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

頭頚部癌においては、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、化学療法の他 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、頭頚部癌の中で 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掻 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 37-41)。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^{37,38)}、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 39-41)が大きく対立してい δ.

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 4 2 - 4 3)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 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、<u>in vitro</u>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Duは1.6 Gyであり、3 Gyの_へ照射

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 <u>in vitro</u>での培養腫瘍細胞の中にあって、 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 ⁴⁷⁾。

そこで Meth-A 腫 瘍 細 胞 の <u>in vivo</u>に お け る 放 射 線 感 受 性 を 測 定 し 、 以 後 の り 線 量 を 決 定

- 41 -

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⁴⁸)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か

- 42 -

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I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使っ ての再移植実験を行 った。同様の実験は、 それぞれの条件は異なるものの、土屋⁴⁹⁾、 Crileら⁵⁰⁾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

- 43 -

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・I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 I 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

- 44 --

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 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、 □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、_へ照射 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、

従来より多くの報告がなされている1)。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I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 51.52)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GM1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GM1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、<u>in vitro</u>におけるマウス脾臓リンパ球の N K 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、

- 48 -

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 - フェロンによる NK細胞の活性化 53,54)、 NK 細胞からのインターフェロンの産生55)、イ ンターロイキン – 2 による NK細胞の活性化と 増殖 5 6, 5 7) 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 58.5

⁸⁾。故にNK細胞の表面マーカーにはアシアロ GM1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 6 l . 6 1)、 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GM1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 5 1 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 - T 細 胞 の 前 駆 細

— 50 —

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 G M 1 抗 原 陽 性 、 及 び Thy-1 抗 原 陽 性 の N K 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

- 51 -

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 44-48)。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48)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

- 52 -

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⁸³)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 唐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 マイナスに働ら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⁶⁴⁾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言う報告が 数多くなされている 65-69)。 Jirtleら 69)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^{10,11})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^{12・13)}。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、純粋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 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

- 57 -

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、 20 Gy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、 10 Gy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なった場合、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

、高線重の照別を行うた場合、磁場先及 能は、放射線照射による障害の為か減少し、 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、<u>in vivo、in vitro</u>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、<u>in vitro</u>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わ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。

— 63 —

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

of secondary transplantation on the 14th day case 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 antitumor 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

- 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.
- Rafla,S.,Yang,S.J.and Meleka,F.(1978):Changes in cellmediated 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 ーその基礎 – 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 療法の病理,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 cellsurface antigens determined by Moloney leukemia virus in cultured murine lymphomas. J.Natl.Cancer Inst., 50, 347-

362.

- 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 GM₁ 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 ⁵¹Cr-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-Bistin-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BRM, 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 culuture by 4-hydroperoxycyclophosphamide. 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 intraperitoneal 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、渕端孟(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):頭頚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-monoclonal 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-monoclonal 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ナール抗体による解 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., Yogeeswaran, 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):Uber 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 stoma 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 <u>in vivo</u> 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-A10[®]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)、2
0Gy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3
5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<u>in vivo</u>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 10⁶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-A10⁸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 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 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 1 0 ・ 脾臓リンパ球の N K 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 5 1 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±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 N K 活性の増強が 認められた(t 検定)。

図 1 0 (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)と同様の方法で行ニった。その結果、実 験群で Normal Controlに対し照射後 7 日目に 有意な N K 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12.(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ABC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GM1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GM1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12.(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 A B C 染 色 , 倍 率 200倍)

ー次抗体は図12(1)と同様のものを使用した。その結果、アシアロGM1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 1 2 . (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 A B C 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GM1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I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 A B C 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、N K 細胞の染色に、抗アシアロ GM 1 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 ー 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 5 Gy/day total 20 Gy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 1 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 土標準偏差で示した。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 5 Gy/day total 20 Gy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 Ι で は 照 射 後 14日 目 、 実 験 Ⅱ で は 照 射 後 7 日 目 に 、 左 下 肢 ヘ 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 祖 織 標 本 を 使 用 し た 。 そ の 結 果 、 実 験 Ι 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Ig G抗体、 NK細胞の染色に、抗アシアロ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ー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 20 Gy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)。

.



X 2

生の組織 T 凍結(液化窒素, -160℃) Ť 薄切 Ţ 固定(アセトン,4℃,10分) 洗浄:1~2時間 t 一次抗体 (MoAb: 30~60分 異種抗血清: 30分) L 洗浄(生食, PBS):15分×2回 Ŧ 二次抗体:30分 t 洗浄:15分×2回 Ł ABC:30分 Ł 洗浄:10分×3回 t 発色:室温で1~3分 Ŧ 20%フォルマリンで固定:10分以上 1 核染色 (ヘマトキシリン:15~20秒) 脱水・封入

図 3



移植後日数

図 44 (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 5



図 6



図7(1)

.



図 (2) 7





図 8



叉 (1) 9



叉

9 (2)



図 1 0 (1)


図 10(2)



図 1 1



移植後日数

図 13





図 15



γ− leg 照射後	実験 I 移植後	後照射群	3	実験 Ⅱ 生着後 照射群						
の日数	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%	ד⁄ד	100 %	5/5	100 %		
21	4/6	67%	_		4/4	100 %				

.

	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
★梢血の 白血球数 (/mm ³)	5850 ±650	3280 ± 230	7330 ±1270	5600 ±770
末梢血の リンパ球数 (/mm ³)	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 ⁷)	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

*p<0.05 ☆未処置マウス対照群との有意差

. **p<0.01

*** p<0.001

	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 [/mm ³]	4900 ±1500	5400 ±500	6100 ±1600
末梢血の リンパ球数 [/㎜³]	3000 ±1200	3900 ± 500	4400 ±1100
脾臟重量 [Spleen Index]	4.6 ±0.4	5.2 ±0.2	6.2 ±0.8
脾臓 リンパ球数 [×10 ⁴]	1920 ±190	2000 ±370	2450 ±530

3.4 ± 1.6
014 - 100
2.3 ± 0.6
2.3 ± 0.6
4.8 ± 1.6
11.6 ± 6.9
0.8±0.8 ^{☆★}
3.8 ± 1.5*
3.6 ± 1.2**
:Means ±SD [cm ²]
差 ☆ p < 0.05
. ★ p<0.05
9 9 7 思定 * n < 0.05

	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		ļ	5		7	. 1	0.	1	4
実験I.移植後照射群	間質	1.5		3.2		3.5		2.8 .		3.0	
(照射後 14 日目)	実質		1.2		3.0		3.0		2.7		3.3
実験Ⅱ。生着後照射群	間質	2.3		1.6		1.6		2.3		1.5	
(照射後 7 日目)	実質		1.4		2.1		1.1		1.5		1.7
担癌対照群	間質	0		0.6		1.7		1.9		2.2	
(未処置マウス)	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	1	0	1	4
実験 I. 移植後照射群	変性	1.3		1.7		2.3		2.7		2.7	
(照射後 14 日目)	壞死		0		1.3		1.3		1.3		2.7
実験Ⅱ。生着後照射群	変性	1.6		1.1	=	1.0		1.5		1.7	
(照射後 7 日目)	壊死		0		0.3		0.1		0.3	[0.7
担癌対照群	変性	0		0.1		0.5		0.6		0.7	
(未処置マウス)	壊死		0		0		0.2	[0	[0

井評価方法:n=3~5の平均

- Point 0: none
- Point 1 : slight
- Point 2: moderate
- Point 3: marked
- Point 4: very marked

●☆リンパ球浸潤

	the second s			_					
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	間質	0.7		1.8		3.2		0.8	
(20 Gy 照射群)	実質		0.5		0.8		3.0		0.3
実験 II. 生着後照射群	間質	1.0		1.6		0.5		0.7	
(20Gy 照射群)	実質		0.3		2.1		0.2		0
	間質	0.7		0.5		0.3			
(10Gy 照射群)	実質		0.5		0.3		0		
	間質	2.0		1.2		1.3		0.5	
(30Gy 照射群)	実質		1.8		1.2		0.8		0
担癌対照群	間質	0.6							
(未処置マウス)	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	変性	0.2		0.5		1.7	•	0.2	
(20Gy 照射群)	壞死		0		0		1.3		0
実験 II. 生着後照射群	変性	0		1.1		0		` 0	
(20Gy 照射群)	壊死		0		0.3		0		0
生着後照射群	変性	0.2		0.3		0			
(10Gy 照射群)	壊死		0		0		0		
生着後照射群	変性	1.3		0.5		0.5		0	
(30Gy 照射群)	壊死		1.0		0.2		0.2		0
担癌対照群	変性	0.1							
(未処置マウス)	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	間質	1.8	<u>.</u>	2.7		2.8		2.0	
(20Gy 照射群)	実質		1.2		3.3		2.7		1.8
実験 II. 生着後照射群	間質	1.8		2.3		1.0		1.5	
(20Gy 照射群)	実質		1.2		1.5		0.5		1.0
生着後照射群	間質	2.7		1.2		0.5			
(10Gy 照射群)	実質		3.0		0.8		0.3		
生着後照射群	間質	1.5		2.0		1.3		0.8	
(30Gy 照射群)	実質		1.3		1.8		1.7		0.3
担癌対照群	間質	1.9							
(未処置マウス)	実質		1.4						

☆**腫瘍細胞** 変性·壞死

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

表 7(2)

	アシアロ GM _I	Thy – 1	lg—G
実験 I . 移植後照射群 (照射後14日目)	3. 4	3. 0	1.3
実験 I. 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

☆リンパ球浸潤

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

☆ 順重 兆易 糸田 肥包 変性・壊死

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

	血管断面積	血管内腔面積	S ₂
	S _I 〔µm²〕	S ₂ 〔μm²〕	S ₁
照射側	1686.4	418.6	0. 244 [#]
	±544.6	±177.9	± 0. 049
非照射側	1673. 7	525. 3	0. 316 [#]
	± 424. 0	± 171. 2	± 0. 052

p < 0.01

÷







図 12(1)



图 12(2)

Control Asialo-GM1 Thy-1 Ig

図 1 2 (3)