

放射線照射の細胞性免疫に及ぼす影響の研究 (II)

全身照射マウスによる検討

京都大学医学部外科学教室第2講座(指導:日笠頼則教授)

木 下 誠 一

(原稿受付:昭和55年9月9日)

A Study on Non-specific Immunity of Whole Body Irradiated Mice

SEIICHI KINOSHITA

Second Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University

(Director: Prof. Dr. YORINORI HIKASA)

The present study was designed to examine the influence of whole body irradiation on the cell-mediated immunity of C3H/He mice. After irradiation, spleen weight and lymphoproliferative response to mitogens of spleen cells were periodically examined.

Immunopotentiator, OK-432, was administered in whole body irradiated mice, and its influence was compared with that received irradiation alone.

1. Spleen weight and the response to PHA and Con A decreased and recovered in close relation with the dose of irradiation.

2. The response to LPS changed variously with the dose of irradiation. Its decrease caused by irradiation was much markedly than that to PHA and Con A, suggesting that B-cell was more radiosensitive than T-cell. The response to LPS was recovered much earlier than the response to PHA and Con A.

3. OK-432 increased spleen weight, the ratio of peroxidase stain positive cells and the response to LPS, but had little effect on the response to PHA and Con A in irradiated mice.

4. The mitogenic response of spleen cells in irradiated mice injected with OK-432 recovered slightly after Sephadex G-10 passage.

5. Spleen cells in irradiated mice were observed to suppress lymphoproliferative response to PHA of normal spleen cells. Spleen cells in irradiated mice injected with OK-432 suppressed lymphoproliferative response to PHA, Con A and LPS of normal spleen cells.

6. It was indicated that Sephadex G-10 adherent cells had more suppressive activity than Sephadex G-10 non-adherent cells.

Key words: Whole body irradiation, Immunosuppression, Mitogenic response, OK-432, Suppressor T.

索引語: 全身照射, 免疫抑制, リンパ球幼若化反応 OK-432, サプレッサー T.

Present address: The Department of Surgery, Ako Municipal Hospital, Nakasu, Kariya, Ako, Hyogo, 678-02, Japan.

はじめに

放射線療法が、その強力な制癌作用にもかかわらず充分な臨床的效果を発揮しえない主な理由として、放射線の持つ免疫抑制作用が指摘されている。その詳細については、临床上のさまざまな制約のため、つまびらかにされていない。そこで C3H/He マウスを用いて、1回大量全身照射を行い、mitogen に対する脾細胞の反応性より、非特異的細胞性免疫能を測定し、放射線のもつ免疫抑制の程度を検索した。

さらに最近 immunopotentiator として注目されている OK-432 が、放射線照射により低下した宿主免疫能を回復させるか否かについても併せて検討した。

I 実験材料及び方法

1. 実験材料

試獣：実験開始時 7~8 週齢の♂の C3H/He マウス。
照射： ^{60}Co による一回全身照射。

薬剤 OK-432 (A 群溶血性連鎖球菌々体製剤) マウス 1 尾当たり、1 回、1 K E. (生理的食塩水 1 ml に溶解) を週 3 回背部皮下注射。

2. 実験方法

1) 脾細胞浮遊液の作製

無菌的に脾臓を摘出、脾重量を測定したのち細切し、#200 の stainless mesh を通過させ、Hanks 液に浮遊後遠沈した。Tris-buffer⁶⁸⁾ にて赤血球除去を行い、さらに Hanks 液で 3 回洗浄後、最終的に 10% の牛胎児血清と 0.1 mg/ml の Gentamicin を加えた RPMI 1640 に 5×10^6 /ml となるように浮遊させた。(Türk 液に染まる単核細胞で cell count を行った。)

2) 脾細胞浮遊液からのマクロファージの除去

Ly³⁷⁾ らの原法に従って、上記の脾細胞浮遊液を Sephadex G-10 column に流し、その通過細胞を回収した。この手技により、T cell と B cell の比率に大きな変化を与えることなくマクロファージのほとんどを除去しうる^{4, 20)}。

脾細胞浮遊液および Sephadex G-10 column 通過細胞の 0.5% Trypan blue による生体染色ではすべての実験を通じ 90~95% の viability を示した。

3) ペルオキシターゼ反応陽性細胞の計測

全身照射のみを行ったマウスと、照射に OK-432 を併用したマウスの脾細胞浮遊液中のリンパ球の比率に

はかなりの違いのあることが推察され、mitogen に対する脾細胞浮遊液の反応性が、その影響を受ける可能性が考えられる。

そこで橘⁵⁹⁾らの方法により、ペルオキシターゼ反応陽性細胞の計測を行い、陽性細胞としてのマクロファージと多核白血球がどの程度含まれているか、さらに、Sephadex G-10 column 通過により、ペルオキシターゼ陽性細胞がどのように変化するかを検討した。

4) 脾細胞浮遊液ならびに Sephadex G-10 column 通過細胞の mitogen に対する幼若化反応

マウスの T cell mitogen として、Phytohaemoagglutinin-P (Wellcome) (以下 PHA を) 40 γ /ml, Concanavalin A (和光純薬) (以下 Con A) を 100 r/ml, マウスの B cell mitogen として E. Coli の Lipopolysaccharide (Difco) (以下 LPS) を 1 mg/ml の濃度となるように、それぞれ Hanks 液にて溶解し、millipore filter (0.22 μm pore size) を通過させて無菌化した。

脾細胞浮遊液あるいは Sephadex G-10 column 通過細胞をそれぞれ 5×10^5 /0.2 ml づつ、マイクロテストプレート (Nunc) の各 well に入れたのち、PHA 0.4 γ /10 μl , Con A 1 γ /10 μl , LPS 10 γ /10 μl を加え、mitogen 非添加対照群と共に、37°C, 5% CO₂ 加湿下に培養した。48 時間後、各 well に ³H-thymidine (比活性 21.8 Ci/mmol: New England Nuclear, Boston, U.S.A.) 0.25 μCi /25 μl を加え、さらに 18 時間培養したのち、automatic cell harvester (和研薬製) にてグラスファイバーフィルター上に細胞を集めた。フィルターを乾燥後、シンチミニバイアルに入れ、トルエンシンチレーター液 (トルエン 1 l 中に DPO 4 g, POPOP 0.1 g を含む) を 3 ml 加え、液体シンチレーションカウンター (Isocap 300, Nuclear Chicago Co.) にて放射活性を測定した。

すべての検索を triplicate で行い、単純平均と標準偏差を算出した。

5) 正常マウス脾細胞の mitogen に対する反応性に及ぼす抑制効果の検討

正常マウス脾細胞浮遊液 5×10^6 /well に各種の mitogen を加えたものに、同数の検索すべき脾細胞浮遊液、または、その Sephadex G-10 column 通過細胞を加え、上記と同様の条件下に混合培養し、その抑制効果を検討した。

抑制効果は以下の公式により算定した。

% suppression = 100 - 100

$$\times \frac{\text{cpm (N+X) stimulated} - \text{cpm (N+X) unstimulated}}{\text{cpm (N) stimulated} - \text{cpm (N) unstimulated}}$$

N: normal X: tested

II 成績

1 脾重量ならびに脾細胞の mitogen に対する反応性に及ぼす 1 回全身照射の影響

1, 2, 3 週間前に, おおの 200, 300, 400 rad の 1 回全身照射を受けたマウスと, 非照射対照マウスを同一実験日に屠殺, 脾臓を摘出した。(以下すべての実験を 1 群 5 尾で行い, 5 個の脾より脾細胞浮遊液を作製した.)

200, 300, 400 rad を全身照射した場合の脾重量の推移を図 1 に示した.

200 rad の場合, 1 週間後にもっとも脾重量の減少が

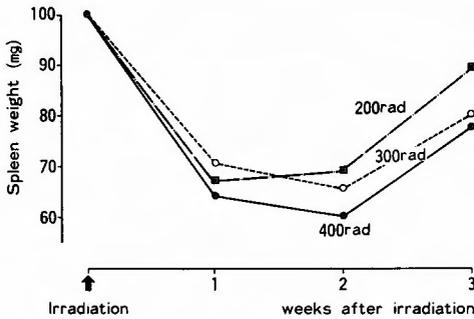


図 1 Changes of spleen weight after whole body irradiation

著しいが, 2 週間後には, わずかながら回復の傾向がみられ, 3 週間後には対照群に比し 90% まで回復する. 300 rad, 400 rad の場合には, 1 週間後より, 2 週間後の脾重量の減少が著しいが, 3 週間後には対照群の 80% 程度までの回復がみられており, ほぼ照射線量に依存した脾重量の減少と, 回復の遅延がみられた.

脾細胞浮遊液の mitogen に対する反応性に及ぼす 1 回全身照射の影響としては, 照射線量が 400 rad の場合 (表 1, 図 2), PHA および Con A に対する反応性は, 照射 1 週間後には, 非照射対照マウスのわずか 10% にまで低下し, 2 週間後も, その反応性の低下は持続するが, 照射 3 週間後には, 対照群のほぼ 50% まで回復する. 一方 LPS に対する反応性は, 照射 1 週間後には PHA や Con A に比しさらに著明に低下する. しかしながら照射 2 週間後には回復の傾向がみられ, 照射 3 週間後には, 対照群の 90% まで回復することが

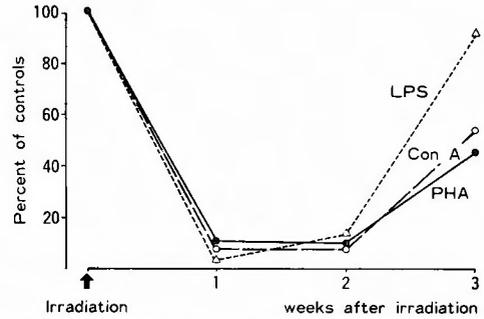


図 2 Changes in in vitro mitogenic response of spleen cells in 400 rad whole body irradiated mice

表 1 In vitro mitogenic response of spleen cells in whole body irradiated mice

Dose	Weeks after irradiation	Mitogen in culture			
		None	PHA	Con A	LPS
	Unirradiated controls	2014 ± 223	41531 ± 4668	53655 ± 7292	28399 ± 4087
400 rad	1	150 ± 6	4740 ± 371	3723 ± 237	608 ± 120
	2	188 ± 49	3720 ± 239	4171 ± 860	3237 ± 593
	3	3181 ± 1513	18620 ± 4747	28784 ± 1856	25790 ± 1040
300 rad	1	608 ± 218	12435 ± 1700	16191 ± 458	5899 ± 304
	2	373 ± 27	9215 ± 1372	10445 ± 189	24977 ± 1400
	3	4985 ± 599	16570 ± 810	35940 ± 5120	30547 ± 3038
200 rad	1	742 ± 223	30719 ± 8932	34081 ± 5786	18298 ± 991
	2	1112 ± 143	24850 ± 1566	32378 ± 4149	44515 ± 6405
	3	2868 ± 1234	34846 ± 3337	41970 ± 2975	41221 ± 2550

Results are expressed as mean cpm from triplicate cultures ± standard error

表2 Effect of OK-432 on mitogenic response of spleen cells in 400rad whole body irradiated mice

Weeks after irradiation	OK-432	Mitogen in culture			
		None	PHA	Con A	LPS
Unirradiated controls		1640±207	56548±8898	59430±4293	37264±3829
1	-	338±24	11611±339	13307±877	1852±279
1	+	459±222	7828±360	9288±303	1734±283
2	-	495±151	12549±1981	9764±619	2563±73*
2	+	1708±206	10112±1071	12731±2161	29558±367*
3	-	1135±95	29691±4540*	29071±1619*	34625±3440
3	+	1518±231	8563±1424*	9511±111*	31334±1586

Results are expressed as mean cpm from triplicate cultures ± standard error

* $p < 0.005$

特徴的である。

照射線量が 300 rad の場合 (表 1, 図 3) PHA に対する反応性は, 照射 1 週間後には, 対照群の約 30% まで低下, 2 週間後には, さらに 20% まで低下したが, 3 週間後には 40% まで回復した。Con A に対する反応性は, 1~2 週間後には, 対照群の 30% 前後であるが, 3 週間後には 70% 近くまで回復した。LPS に対する反応性は, 1 週間後には対照群の 20% まで低下するが, 2 週間後には 90% と回復が顕著である。

照射線量が 200 rad の場合 (表 1, 図 4) 各 mitogen に対する反応性の低下は比較的軽微である。

PHA に対する反応性は, 照射 1 週間後には対照群の 80% までしか低下せず, 2 週間後には 60% まで低下するが, 3 週間後には 80% 以上にまで回復した。Con A に対する反応性も 1, 2 週間後には, 約 60% まで低下するが, 3 週間後には, ほぼ 80% まで回復した。

LPS に対する反応性は, 照射 1 週間後には 60% まで

低下するが, 照射 2 週間後では, 反応性の亢進がみられ, 対照群の 150~160% にまで達する。

2. 400 rad 全身照射に OK-432 を併用した場合の脾重量と脾細胞の mitogen に対する反応性及び影響

1, 2, 3 週間前に 400 rad 全身照射を行った照射単独群と, 照射日より週 3 回, OK-432 を 1 回当り 1 K.E. 皮下注射した OK-432 併用群の脾重量を比較すると, 図 5 に示す如く, OK-432 併用群では, 照射 1 週間後の脾重量の減少は照射単独群より軽度であり, 2 週間後には非照射対照マウスに比して, 著明な脾重量の増大がみられる。この増大の傾向は 3 週間後にも認められる。

脾細胞の PHA に対する反応性 (表 2, 図 6) および Con A に対する反応性 (表 2, 図 7) は, 照射単独群も, OK-432 併用群も, 照射 1~2 週間後では, 対照群の 20% まで低下し, 両群に差がみられないが, 3 週間後に

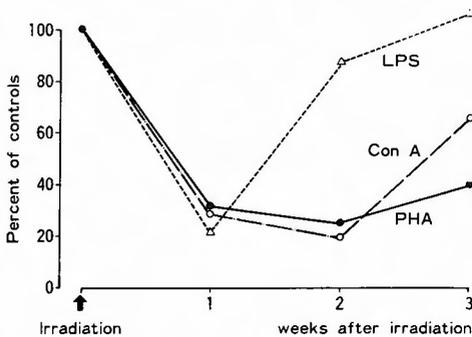


図 3 Changes in in vitro mitogenic response of spleen cells in 300rad whole body irradiated mice

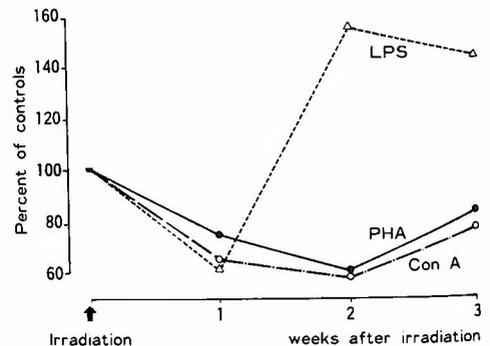


図 4 Changes in in vitro mitotic response of spleen cells in 200rad whole body irradiated mice

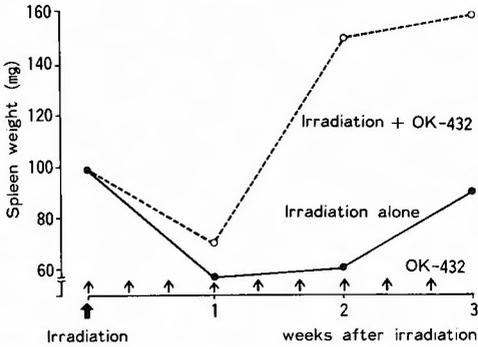


図5 Effect of OK-432 on spleen weight on 400 rad whole body irradiated mice

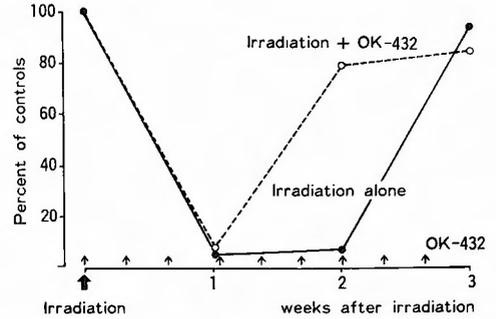


図8 Effect of OK-432 on LPS response of spleen cells in 400 rad whole body irradiated mice

なると、PHA および Con A に対する反応性は、照射単独群では、50%まで回復してくるのに対し、OK-432併用群では、なお反応性は20%以下と低く回復がみられていない。Student-t test による検定では両者共に $P < 0.005$ で有意差が認められた。

LPS に対する反応性は (表2, 図8), 照射単独群 OK-432 併用群共に1週間後には対照群の10%以下に

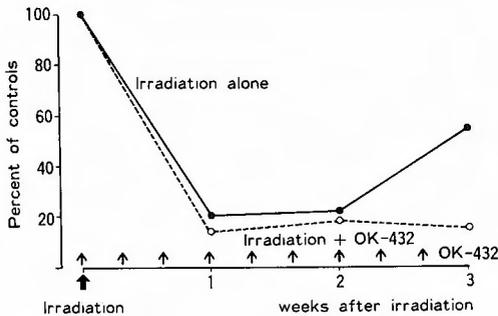


図6 Effect of OK-432 on PHA response of spleen cells in 400 rad whole body irradiated mice

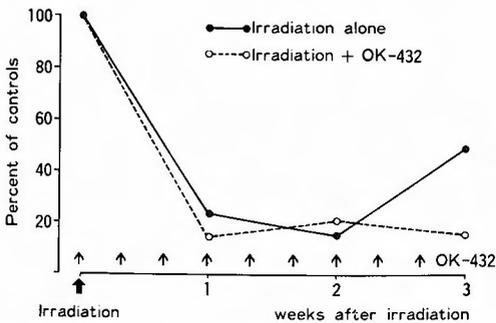


図7 Effect of OK-432 on Con A response of spleen cells in 400 rad whole body irradiated mice

まで低下する。2週間後には、照射単独群に反応性の回復はみられないが、OK-432併用群では、80%近くまで回復した ($P < 0.005$)。3週間後には照射単独群にも反応性の回復がみられ、OK-432併用群との間に差は認められない。

3. Sephadex G-10 column 通過細胞の mitogen に対する反応性

400 rad 全身照射後3週の照射単独群, 照射とともにOK-432を週3回, 1回あたり1 K.E. 合計9 K.E.を背部皮下注射したOK-432併用群, および非照射対照群の脾細胞のおのおのにつき, Sephadex G-10 column 通過前後のペルオキシダーゼ反応陽性細胞の比率と回収率は表3のとおりである。Sephadex G-10 通過前のペルオキシダーゼ反応陽性細胞は, 正常群, 照射単独群, OK-432併用群で, おのおの11%, 18%, 46%であるのに対し, Sephadex G-10 通過後では, 6%, 8%, 13%で, OK-432併用群では, column 通過によりペルオキシダーゼ反応陽性細胞の比率が46%から13%と著減しているのが目立つ。

表3 Percent of peroxidase positive cell before and after Sephadex G-10 column passage

Source of cells	Before	After	回収率 (%)
C	11	6	50
A	18	8	22
B	46	13	23

C Control

A 3 Weeks after 400rad whole body irradiation

B 3 Weeks after 400rad whole body irradiation + OK-432

表4 Influence of Sephadex G-10 column passage on mitogenic response of spleen cells

Source of cells	Mitogen in culture			
	None	PHA	Con A	LPS
C	1146±20	30861±2371	42104±3199	13970±1281
C SG-10	1108±125	28521±2732	35420±2014	14612±903
A	947±105	10715±1772(35)	18574±2363(44)	12245±169
A SG-10	758±107	13564±1708(44)	21962±2660(52)	10649±496
B	832±104	6838±459 (22)*	6492±476 (15)**	12307±1346
B SG-10	1392±204	10363±1962(34)*	12346±467 (29)**	11089±1362

C control

A 3 weeks after 400rad whole body irradiation

B 3 weeks after 400rad whole body irradiation + OK-432

SG-10 Sephadex G-10 non-adherent

Numbers in parentheses percent of controls

* p<0.05; ** p<0.005

Results are expressed as mean cpm from triplicate cultures ± standard error

PHA, Con A および LPS に対する反応性の検討では(表4), 非照射対照マウス脾細胞の場合, Sephadex G-10 column 通過の前後に大きな差異はみられない。照射単独群の column 未処理脾細胞では, PHA や Con A に対しては, おのおの非照射対照群の35%, 44%の反応性を示したのに対し, Sephadex G-10 column 通過細胞では44%, 52%と比較的反応性の低下は軽度で

あるが, Student-t test による検定では有意差は認められなかった。

OK-432 併用群の脾細胞の場合では, PHA に対する反応性は, 非照射対照群の22%まで低下しているが, Sephadex G-10 通過後では, 34%と反応性の低下が軽度である (P<0.05). Con A に対する反応性でも, Sephadex G-10 column 未処理脾細胞では, 非照射対

表5 Suppressive effect of OK-432 in 400rad whole body irradiated mice on mitogen-induced proliferation of normal spleen cells

—Spleen cells from normal and tested mice were cultured mixed together in the presence of PHA, Con A and LPS.—

Source of cells		Mitogen in culture			
5×10 ⁵	5×10 ⁵	None	PHA	Con A	LPS
N	—	1485±198	21095±1275	23443±1669	9943±1344
N	N	1640±208	20435±1247	23002±1934	10170±1086
N	A	748±161	9417±944 (56)*	22701±3248	9589±738
N	A SG-10	1071±161	12465±1132(42)*	22721±3028	9698±795
N	B	459±82	4270±584 (81)**	10795±948 (53)*	3079±619 (69)**
N	B SG-10	1135±95	12731±1237(41)**	14555±1592(39)*	10656±499**

N Normal

A 3 weeks after 400rad whole body irradiation

B 3 weeks after 400rad whole body irradiation + OK-432

SG-10 Sephadex G-10 non-adherent

Numbers in parentheses % suppression

$$\% \text{ suppression} = 100 - 100 \times \frac{\text{cpm (N+X) stimulated} - \text{cpm (N+X) unstimulated}}{\text{cpm (N) stimulated} - \text{cpm (N) unstimulated}}$$

N: normal X: tested

* p<0.05, ** p<0.005

Results are expressed as mean cpm from triplicate cultures + standard error

照群の15%に低下していたが、Sephadex G-10 通過細胞では29%にまで回復した ($P < 0.005$).

4. 抑制効果の検討

正常マウス脾細胞 5×10^5 の mitogen に対する反応系に全身照射, または, 全身照射に OK-432 を併用したマウス脾細胞, あるいはその Sephadex G-10 通過細胞をおのおの 5×10^5 加えて混合培養し, 正常マウス脾細胞の mitogen に対する反応性に及ぼす影響を検討した(表5).

400 rad 全身照射3週間後の脾細胞は, 正常マウス脾細胞の PHA に対する反応性を56%抑制した. Sephadex G-10 通過細胞の場合では, この抑制効果は42%に減弱した ($P < 0.05$). 正常脾細胞の Con A や LPS に対する反応性には, 照射単独群の脾細胞も, その Sephadex G-10 通過細胞も, ともに抑制効果を示さなかった.

照射後 OK-432 併用群の脾細胞は, 正常脾細胞の PHA, Con A に対する反応性を, おのおの81%, 53%抑制した. Sephadex G-10 通過細胞を用いた場合, PHA, Con A に対する反応性はおのおの41% ($P < 0.005$), 39% ($P < 0.05$) の抑制を受けた. Sephadex G-10 を通過することによりこの抑制効果は減弱したわけである. 照射後 OK-432 併用群の脾細胞は, 正常脾細胞の LPS に対する反応性を69%抑制した. Sephadex G-10 通過細胞を用いると抑制効果は認められなかった ($P < 0.005$).

III 考 按

放射線と免疫反応との関係は, X線が発見されてまもなく, Heinecke²¹⁾ によってリンパ系組織が著しく放射線感受性であることを示したことに始まる. ついで Benjamin²⁾ らはX線照射後の数日の間に抗原を与えた場合, 抗体産生反応が抑制されると報告した. そのうち, 抗原刺激後の抗体反応にX線照射が与える影響について多くの研究者^{11, 34, 60, 61)} は, 抗原刺激前のX線照射は抗体価の上昇をつよく抑制するのに対して, 抗原刺激後の照射は抗体価にあまり影響を与えないか, むしろ上昇させることがあることを指摘している. 一方, X線照射の時期に関係なく, 照射によって抗体反応はつよく抑制または遅延することを強調するもの^{3, 50, 51)} もあり, 必ずしも意見の一致をみていない.

1960年代になって, 細胞性免疫の概念が確立され, ことに担癌生体の免疫反応の主役は細胞性免疫が担っていることが広く認められる⁷⁾ に至っており, また癌

の進行とともに一般に細胞性免疫が低下するとの報告が多い^{9, 27, 42)}. 癌患者にとって重要な意味を持つ細胞性免疫能に対する放射線の及ぼす影響についても, 近年多くの報告^{8, 9, 22, 36, 40, 47, 53, 56, 62, 63, 64, 67)} がみられる. われわれも³¹⁾ 乳癌に対する術後照射が患者の非特異的細胞性免疫能に及ぼす影響についてはすでに報告した.

実験動物の, ことに脾に対する放射線照射の及ぼす影響について, 1950年 Jacobson²³⁾ らはウサギに500~800 rad の全身照射をするさい, 脾臓を鉛で保護した場合, 抗体産生反応の低下はみられず, 生存率がよかったとし, 脾臓の重要性について初めて言及した.

全身照射によるマウス脾重量の変化について, Ramentos⁴⁰⁾ は照射線量に依存した脾重量の減少と, その回復の遅延を指摘した. さらに Storer⁵⁷⁾ らは放射線の生物学的効果比を脾重量の変化で観察し, Maqsood⁴⁸⁾ らは放射線障害からの回復促進効果の指標として脾重量を用いた.

早川¹⁹⁾ らは350 rad 全身照射後のマウス脾重量の変化を経時的に観察し, 照射3~5日後に脾重量は急激に減少するが, 7日以後は回復に向い, その後は, C57BL マウスでは照射後20日で非照射対照マウスの脾重量と等しくなるが, RF や CF₁ マウスでは, 回復が一層早くRFでは照射15日後の, CF₁では20日後の脾重量は, 非照射対照マウスのおよそ2倍にまで異常肥大したと報告し, 照射後の脾重量の推移はマウス系統間の差が著しいことを指摘した. Smith⁵⁴⁾ らも LAF₁ マウスにおいて, 全身照射後の脾の異常肥大を認め, 組織学的には, 赤脾髄が増大すると報告した. また佐藤⁴⁹⁾ らは500 rad 全身照射の場合, ddY/SLC マウスの脾重量は2週間で回復したと報告している.

C3H/He を使った本実験でも, 照射線量に依存した脾重量の減少がみられるとともに, 照射3週間後には回復の傾向がみられるが, 非照射対照群の脾重量より, なおかなりの低下が認められた. これはマウスの系統間の差によるものと考えられる.

細胞性免疫能の測定には, 現在さまざまなパラメーターが用いられるようになってきているが, 非特異的な免疫能の動態を知るのに最も広く用いられているのが, 各種 mitogen に対する in vitro でのリンパ球の反応性を測定する方法である³²⁾. T cell の mitogen としては, PHA や Con A が^{24, 25)}, B cell の mitogen としては LPS が⁵²⁾ 用いられるのが一般的である. 動物実験上^{1, 14, 65)}でも, 臨床例による検索^{5, 10, 12, 13, 27, 42, 63, 66)}

からも担癌生体ではこれらの mitogen に対する反応性が低下していることが諸家により明らかにされている。

放射線照射が、リンパ球の mitogen に対する反応性に及ぼす影響について、Ilbery²²⁾ らは正常ヒト末梢血リンパ球の in vitro での照射により PHA に対する反応性は、照射線量に依存して低下することを示すとともに、放射線照射を受けた患者のリンパ球の PHA に対する反応性も低下すると報告している。多くの研究者^{6, 8, 36, 47, 56, 62, 63, 64, 67)} は照射療法を受けた種々の癌患者の末梢血リンパ球の PHA に対する反応性は低下したとしている。Con A に対する反応性についても、Slater⁵³⁾ らは照射療法により低下することを報告している。

放射線照射が、リンパ球の PHA に対する反応性に及ぼす影響がどの位の期間続くかについて、Thomas⁶³⁾ らは肺癌患者において、放射線照射による PHA に対する反応性の低下は、照射終了後、8ヶ月以上も続いたと述べており、また Stjernswärd⁵⁶⁾ らも肺癌患者において照射終了後、数年の間持続する PHA に対するリンパ球の反応性の低下について言及している。Tarpley⁶²⁾ らは咽頭癌患者において、照射後数年の間、末梢血 T 細胞数の減少と、PHA に対する反応性の低下を報告し、照射の影響がかなり長期間に及ぶとしている。一方 Slater⁵³⁾ らはリンパ球の mitogen に対する反応性は、照射終了後2ヶ月ではなお低下しているが、6ヶ月後には回復がみられたと述べており、照射後に持続する免疫抑制の期間については、照射部位、照射線量の他に、患者の年齢、栄養状態などによりかなりな違いのあることが推察される。

本実験成績によると、200, 300, 400 rad の1回全身照射後のマウス脾細胞の PHA および Con A に対する反応性は、両者とも照射線量に依存して低下するが、照射3週後には、かなりな程度にまで回復している。(表1, 図2, 3)

Gorini¹⁵⁾ らの 450rad 全身照射後の C3HeB/HeJ マウス脾細胞の PHA や Con A に対する反応性の検討では、両者とも照射5週後までは反応性の低下が持続し、6週後に初めて反応性の回復がみられたと述べ、PHA に対する反応性も Con A に対する反応性も、ほぼ同様の経過をたどると報告している。

Janossy^{24, 25)} は、T細胞のうち PHA に反応する細胞と、Con A に反応する細胞とは、一部の重複はあるものの異った subset であるとしているが、今回の

検索や、Gorini¹⁵⁾ の成績からは放射線感受性に關する限り、PHA に反応する細胞と、Con A に反応する細胞との間にはっきりとした差異があるという根拠はみられない。

ヒトにおいては、Pokeweed mitogen (以下 PWM) に対するリンパ球の反応性は、B細胞の機能を反映していると考えられ^{24, 25)} ており、Bice⁵⁾、Dean¹⁰⁾ らは、健康人に比し、癌患者では、その反応性が低下していると報告した。

Braeman⁶⁾ は PWM に対する反応性は、照射療法により影響を受けなかったと述べているが、一方、Slater⁵³⁾ は照射療法により、PWM に対する反応性は低下したと報告している。

われわれの乳癌の術後照射症例における検討³¹⁾ では、PHA や Con A に比して PWM に対する反応性は照射の影響がより少いというデータが得られている。

全身照射を行ったマウス脾細胞の LPS に対する反応性は、PHA や Con A に対するそれと異なり、照射線量によってかなりの差異が観察された。200, 300, 400 rad 1回全身照射の場合、照射1週後では、LPS に対する反応性は、PHA や Con A に対する反応性に比して、より低下しており、これは LPS に反応する B細胞の方が、PHA や Con A に反応する T細胞に比して、放射線感受性がより高いことを示唆するものかもしれない。

Nossal⁴³⁾、Sprent⁵⁵⁾ らもマウスにおいては B細胞の方が、T細胞に比して放射線感受性がより高いと報告、また Kataoka²⁸⁾ らはマウス脾細胞の T細胞中に放射線感受性の高い population と低い population のあることを指摘している。

Gorini¹⁵⁾ らは 450rad 全身照射マウス脾細胞の PHA や Con A に対する反応性は、6週間後に回復がみられるが、LPS に対する反応性は照射5週後にすでに回復がみられたという。また Kwan³⁵⁾ らはヒトの B細胞は、T細胞に比し放射線感受性がより高いと報告している。

本実験では 200 rad 全身照射の場合、LPS に対する反応性は、照射2, 3週後には非照射正常マウスより、むしろ亢進していることが注目される(図4)。また、300, 400 rad の場合でも、おのおの2, 3週間後には対照群と同程度の反応性の回復がみられている。このことは、PHA や Con A に反応する T細胞に比し、LPS に反応する B細胞の方が、早期にその反応性が回復していることを示しており、B細胞の方が T細胞に比し

て放射線感受性は高いが、放射線障害からの回復は早いことが示唆される。

最近では、T-B 間のみならず、T-T 間の細胞間相互作用の存在することが指摘され、種々の免疫反応における suppressor T の役割が注目されている。helper T に比し、suppressor T は放射線感受性が高いとされている²⁰⁾ので、照射線量の少ない場合、suppressor T が特に損傷を蒙るため、LPS に反応する細胞に対する抑制効果が減弱ないし減少して高い反応性が得られたか、あるいは照射後再生してくる細胞中に suppressor T が少ないといった可能性も否定できない。

OK-432 は *Streptococcus pyogenes* Su 株を凍結乾燥した菌体制剤で、岡本⁴¹⁾らによって腫瘍細胞に対して直接作用する薬剤として開発された。服部¹⁸⁾らは Ehrlich 腹水型腫瘍-ddV マウスの系において化学療法と OK-432 の併用による抗腫瘍相乗効果について報告した。松野³⁹⁾らは OK-432 が Ehrlich 結節腫瘍や、Sarcoma 180 に対して示した抗腫瘍効果が、抗リンパ球血清の投与により著しく減弱することから、宿主免疫能を介して抗腫瘍効果を発揮するものと推察しており、現在非特異的免疫賦活剤として OK-432 は臨床的に広く用いられている。

木村²⁹⁾らはⅢ、Ⅳ 期肺癌症例において化学療法に OK-432 を併用したところ、化学療法単独群に比し、OK-432 併用群では、50%生存月数の延長と長期生存例がみられたと報告、三沢⁴¹⁾らも胃癌を中心とした末期進行癌症例で、化学療法と OK-432 の併用による延命効果を認めたと述べた。

橋本¹⁷⁾らは、放射線療法に OK-432 を併用することによりリンパ球数やT細胞数の減少が軽度となることを報告した。木村³⁰⁾らは肺癌の放射線制癌剤併用療法に、さらに OK-432 を追加した場合には、PPD や PHA に対する皮内反応などの宿主免疫能の低下が軽度であったと述べている。

このように OK-432 は非特異的な免疫賦活作用を有していると考えられている。そこで、全身照射により低下したマウス脾細胞の非特異的細胞性免疫能が、OK-432 の併用により、どのような影響を受けるかを検討した。

400 rad 全身照射に OK-432 を併用した場合、PHA や Con A に対する反応性は(図 6, 7)、照射 1~2 週後では、照射単独群も OK-432 併用群も同程度の抑制を受けているが、照射 3 週後になると、照射単独群に

は回復の傾向がみられるが、OK-432 併用群では回復傾向が明らかでなかった。(ともに $P < 0.005$)

一方 LPS に対する反応性は(図 8)、照射 1 週後には、照射単独群、OK-432 併用群ともに顕著な抑制がみられたが、2 週後では、照射単独群にはなお回復傾向がみられないのに対し OK-432 併用群ではその反応性の回復がみられた。($P < 0.005$)

また脾重量も OK-432 併用群では照射 2 週後より著明な増大がみられ(図 5)、OK-432 は B 細胞の機能を早く回復させることに役立つことが示唆される。

非照射対照マウス脾細胞の PHA, Con A, LPS に対する反応性は、脾細胞を Sephadex G-10 column に通過させる前後で明らかな変化は認められないが(表 4)、全身照射に OK-432 を併用した群における脾細胞の PHA ならびに Con A に対する反応性の低下は、Sephadex G-10 column を通過させることにより軽減される(おのおの $P < 0.05$, $P < 0.005$)。この場合 Sephadex G-10 column を通過させることにより脾細胞内に含まれる PHA または Con A に反応するリンパ球の占める比率が増加したことによって、見かけ上、PHA や Con A に対する反応性の回復がみられた可能性も完全には否定できないが、むしろ OK-432 併用によって招来された脾重量の増大に伴って、脾細胞内に Sephadex G-10 column 付着細胞の占める率が増加し、この附着細胞群の PHA あるいは Con A に対する反応性への抑制作用が、Sephadex G-10 通過細胞を用いることによって除外され、その結果、PHA あるいは Con A に対する反応性が回復したものと考えられる。

Kirchner³³⁾, Sugimoto⁵⁸⁾ らは移植腫瘍の増大とともにマウス脾重量の増加することを指摘、Adler¹⁾, Whitney,⁶⁵⁾ Gorczynski¹⁴⁾ らは担癌マウス脾細胞の mitogen に対する反応性が低下していることを報告した。更に Guatam¹⁶⁾, Rudczynski⁴⁸⁾, Gorczynski¹⁴⁾, Pope⁴⁵⁾, Kirchner³³⁾ らは担癌マウス脾細胞に正常マウス脾細胞の mitogen に対する反応性を抑制する non-specific な suppressor cell の存在を指摘している。その本体については、T 細胞の特徴をもつというもの¹⁶⁾, B 細胞の特徴をもつというもの⁴⁸⁾, monocyte-macrophage 系統の細胞であろうというもの^{33, 45)} があり、必ずしも意見の一致をみていない。

全身照射に OK-432 を併用した場合、著明な脾重量の増大のみられること、しかも PHA や Con A に対する反応性が低いことは、OK-432 の併用により non-specific な suppressor cell が誘導された可能性が考え

られる。そこで正常マウス脾細胞の mitogen に対する反応系に、全身照射や、全身照射に OK-432 を併用したマウス脾細胞を加えて混合培養し、正常マウス脾細胞の mitogen に対する反応性がどのような影響を受けるかを検討した (表5)。

PHA に対する正常マウス脾細胞の反応性は、照射単独群の脾細胞を追加して混合培養することにより、56%の抑制がみられたが、OK-432 併用群では81%とさらに顕著な抑制効果がみられた。Con A や LPS に対する正常脾細胞の幼若化反応においては、照射単独群にはほとんど抑制効果は認められなかったが、OK-432 併用群では著明な抑制効果が認められた。このように OK-432 併用群の脾細胞は、正常脾細胞の PHA, Con A, LPS のおのおのに対する幼若化反応を抑制するのに対し、照射単独群では、PHA に対する幼若化反応のみを抑制し、Con A や LPS に対する反応性を抑制しないことが注目される。

次にこれらの抑制効果を Sephadex G-10 column 通過細胞について検討すると、PHA や Con A に対してみられた81%、53%の抑制効果は、Sephadex G-10 通過細胞では、おのおの41%、39%と減弱した (おのおの $P < 0.005$, $P < 0.05$)。

さらに LPS に対する反応性においては、Sephadex G-10 の通過細胞には抑制効果の消失が認められた ($P < 0.005$)。これらのことから、OK-432 併用によって誘導された正常脾細胞の各種 mitogen に対する反応性への抑制効果の多くは Sephadex G-10 column 附着細胞によるものと思われる。

ま と め

放射線の細胞性免疫能に及ぼす影響について、C3H/He マウスに1回全身照射を行い、脾重量の推移とともに、mitogen に対する脾細胞の反応性を観察、さらに OK-432 を併用した場合についてもあわせて検討した。

① 照射線量に依存した脾重量の減少と回復の遅延が認められた。

② PHA と Con A に対する反応性の低下と回復の程度は照射線量に依存した。

③ LPS に対する反応性は照射線量によりかなり違いがみられる。PHA や Con A に比して照射による反応性の低下が目立つが、照射後の回復は早い。

④ OK-432 は照射により低下した PHA, Con A に対する反応性を回復せしめ得なかったが、LPS の対す

る反応性を早期に回復した。

⑤ OK-432 は脾重量を増大させペルオキシダーゼ陽性細胞の比率を増加させた。

⑥ 照射に OK-432 を併用した場合の脾細胞の mitogen に対する反応性は、Sephadex G-10 column を通過させることによりわずかに回復したが有意差は検出できなかった。

⑦ 照射単独群の脾細胞は、正常脾細胞の PHA に対する反応性のみを抑制した。OK-432 併用群では、正常脾細胞の PHA, Con A, LPS に対する反応性をすべて抑制した。

⑧ この抑制効果は、Sephadex G-10 附着細胞においてより強いことが示唆された。

本研究の要旨は第39回日本癌学会 (1980 東京) にて報告した。

稿を終るに当たり、御指導、御校閲を賜った京都大学第2外科日笠頼則教授に深謝するとともに、一方ならぬ協力と助言を頂いた京都大学第1外科戸部隆吉教授、放射線医学教授阿部光幸教授ならびに児玉宏学兄をはじめとする京都大学第2外科癌免疫グループの諸氏に感謝する。

参 考 文 献

- 1) Adler WH, Takiguchi T, et al: Phytohemagglutinin unresponsiveness in mouse spleen cells induced by methycholanthrene sarcomas. *Cancer Res* **31**: 864-867, 1971.
- 2) Benjamin E and Sluka F: Antikörperbildung nach experimenteller Schädigung des hämatopoetischen Systems durch Röntgenstrahlen. *Wien Klin Wschr* **21**: 311-313, 1908.
- 3) Berlin BS: Interruption of macroglobulin synthesis in mice by exposure to X-rays. *J Immunol* **93**: 315-318, 1964.
- 4) Berlinger NT, Lopey C, et al: Facilitation or attenuation of mixed leukocyte culture responsiveness by adherent cells. *Nature (Lond)* **260**: 145-146, 1976.
- 5) Bice CE, Heins G, et al: Lymphocyte stimulation and plasma inhibition in patients with malignant neoplasmas. *Int Arch Allergy Appl Immunol* **50**: 613-624, 1976.
- 6) Braeman J: Lymphocyte response after radiotherapy. *Lancet* **2**: 683, 1973.
- 7) Brunner KT and Cerottini JC: Cytotoxic lymphocytes as effector cells of cell-mediated immunity. *Prog Immunol* **1**: 385-391, 1971.
- 8) Chee CA, Ilbery RLT, et al: Depression of lymphocyte replicating ability in radiotherapy patients. *Brit J Radiol* **47**: 37-43, 1974.
- 9) Chretien PB, Crowder WL, et al: Correlation of preoperative lymphocyte reactivity with

- the clinical course of cancer patients. *Surg Gynec Obstet* **136**: 380-384, 1973.
- 10) Dean JH, Conner R, et al: The relative proliferation index as a more sensitive parameter for evaluating lymphoproliferative response of cancer patients to mitogens and alloantigens. *Int J Cancer* **20**: 359-370, 1977.
 - 11) Dixon FJ, Talmage DW, et al: Radiosensitive and radioresistant phases in the antibody response. *J Immunol* **68**: 693-700, 1952.
 - 12) Ducos J, Migueres J, et al: Lymphocyte response to PHA in patients with lung cancer. *Lancet* **1**: 1111-1112, 1970.
 - 13) Garrioch DB, Good RA, et al: Lymphocyte response to PHA in patients with non-lymphoid tumors. *Lancet* **1**: 618, 1970.
 - 14) Gorcynski RM: Immunity to murine sarcoma virus induced tumors II Suppression of T-cell mediated immunity by cells from progressor animals. *J Immunol* **112**: 1826-1836, 1974.
 - 15) Gorini G, Adorini L, et al: Effects of whole-body irradiation on antibody affinity. *Immunology* **33**: 373-380, 1977.
 - 16) Guatam SC and Deodhar SD: Presence of suppressor cells in spleens of mice bearing a weakly immunogenic syngeneic tumor. *Cancer Res* **39**: 2945-2951, 1979.
 - 17) 橋本省三, 宮本 宏: 免疫療法 (OK-432 を例として) と放射線療法との併用療法. *癌の臨床* **24**: 510-514, 1978.
 - 18) 服部隆延, 山本 繁, 他: 溶連菌製剤 (OK-432) 導入による癌の多剤併用療法. *癌の臨床* **19**: 929-934, 1973.
 - 19) 早川純一郎, 村松 普, 他: 3近交系マウスにおける X 線全身照射後の臓胸腺の重量の変化. *日本医学放射線学会誌* **24**: 370-376, 1964.
 - 20) Hellström KE, Hellström I, et al: Regression and inhibition of sarcoma growth by interference with a radiosensitive T-cell population. *J Exp Med* **147**: 799-804, 1978.
 - 21) Heinecke H: Über die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf Tiere. *München med Wschr* **50**: 2090-2092, 1903.
 - 22) Ilbery PLT, Rickinson AB, et al: Blood lymphocyte replicating ability as a measurement of radiation dosage. *Brit J Radiol* **44**: 834-840, 1971.
 - 23) Jacobson LO, Simmons EL, et al: *Proc Soc exp Biol* **73**: 455-459, 1950.
 - 24) Jannetty G and Greaves MF: Lymphocyte activation. I. Response of T and B Lymphocytes to phytoantigens. *Clin Exp Immunol* **9**: 483-498, 1971.
 - 25) Jannetty G and Greaves MF: Lymphocyte activation. II. Discriminating stimulation of lymphocyte subpopulations by phytoantigens and heterologous antilymphocyte sera. *Clin Exp Immunol* **10**: 525-536, 1972.
 - 26) Jerrells TR, Dean JH, et al: Role of suppressor cells in depression of in vitro lymphoproliferative responses of lung cancer and breast cancer patients. *J Nat Cancer Inst* **6**: 1001-1009, 1978.
 - 27) 金谷 隆: 癌患者における細胞性免疫能に関する研究 第1編 癌患者末梢リンパ球の PHA による幼若化現象について. *札幌医誌* **43**: 48-59, 1974.
 - 28) Kataoka Y and Sado T: The radiosensitivity of T and B lymphocytes in mice. *Immunology* **29**: 121-130, 1975.
 - 29) 木村郁郎: 溶連菌製剤 OK-432 と癌の免疫化学療法の可能性. *癌と化学療法* **2**: 21-33, 1975.
 - 30) 木村修治, 小川恭弘, 他: 肺癌の放射線制ガン剤併用療法における免疫療法の検討. *癌の臨床* **24**: 979-984, 1978.
 - 31) 木下誠一: 放射線照射の細胞性免疫に及ぼす影響の研究 (I) 乳癌術後照射症例における検討. *日外宝* **48**: 498-510, 1979.
 - 32) 木下誠一: 癌免疫研究の現状—臨床の立場から. *あいみっく* **2**: 2-7, 1979.
 - 33) Kirchner H, Chused TM, et al: Evidence of suppressor cell activity in spleens of mice bearing primary tumors induced by malony sarcoma virus. *J Exp Med* **139**: 1473-1487, 1974.
 - 34) Kohn HI: Effect of X-rays upon hemolysin production in the rat. *J Immunol* **66**: 525-532, 1951.
 - 35) Kwan DK and Norman A: Radiosensitivity of human lymphocytes and thymocytes. *Radiation research* **69**: 143-151, 1977.
 - 36) Lamelin JP, Ellouz R, et al: Lymphocyte subpopulations and mitogenic responses in nasopharyngeal carcinoma, prior to and after radiotherapy. *Int J Cancer* **20**: 723-728, 1977.
 - 37) Ly IA and Mishell RI: Separation of mouse spleen cells by passage through columns of Sephadex G-10. *J Immunol methods* **5**: 239-247, 1974.
 - 38) Maqsood M and Ashikawa JK: Post-irradiation protection and recovery. I. Effects of lipids on haematopoietic organs of X-irradiated male mice. *Intern J Rad Biol* **4**: 521-531, 1962.
 - 39) 松野 隆, 大杉義征, 他: ピシバニール (OK-432) の宿主介在性抗腫瘍効果について. 第32回日本癌学会総会記事 p. 214, 1973.
 - 40) Millard RE: Effect of previous irradiation on the transformation of blood leucocytes. *J Clin Pathol* **18**: 783-785, 1965.

- 41) 三沢信一: 溶連菌製剤 Picibanil と制癌剤の併用による免疫化学療法 の臨床的検討. 癌と化学療法 **5**: 413-420, 1978.
- 42) 三輪恕照, 折田薫三, 他: 癌進行度とリンパ球幼若化率との相関—消化器癌を中心に—. 医学のあゆみ **80**: 634-635, 1972.
- 43) Nossal GJV and Pike B: Studies on the differentiation of B lymphocytes in the mouse. *Immunol* **25**: 33-45, 1973.
- 44) Okamoto H, Shoin S, et al: Studies on the anticancer and streptolysin S-forming abilities of hemolytic streptococci. *Jap J Microbiol* **11**: 323-336, 1967.
- 45) Pope BL, Whitney RB, et al: Suppressor cells in the spleens of tumor-bearing mice: enrichment by centrifugation of Hypaque-Ficoll and characterization of the suppressor populations. *J of Immunol* **116**: 1342-1346, 1976.
- 46) Raventes A: An abscopal effect of X-ray upon mouse spleen weight. *Rad Research* **1**: 381-387, 1945.
- 47) Reddy MM, Goh KO, et al: Mitogenic stimulation of lymphocytes in cancer patients. *Oncology* **32**: 47-51, 1975.
- 48) Rudczynski AB and Mortensen RF: Suppressor cells in mice with murine mammary tumor virus-induced mammary tumors. I. Inhibition of mitogen-induced lymphocyte stimulation. *J Natl Cancer Inst* **60**: 205-211, 1978.
- 49) 佐藤文昭, 村松 普, 他: 遠隔作用とマウス脾重量の回復, 日本医学放射線学会誌 **30**: 136-140, 1971.
- 50) Silverman MS and Chin PH: The effect of whole body X-irradiation of mice on immunity to tetanus toxoid. I. The effectiveness of pre- and post-irradiation injections of tetanus toxoid with respect to the development of immunity. *J. Immunol* **75**: 321-325, 1955.
- 51) Silverman MS and Chin PH: The effect of whole body X-irradiation of mice on immunity to tetanus toxoid. II. The delayed immune response to infections of tetanus toxoid. *J Immunol* **77**: 266-270, 1956.
- 52) Sjöberg O, Andersson J, et al: Lipopolysaccharide can substitute for helper cells in the antibody response in vitro. *Eur J Immunol* **2**: 326-331, 1972.
- 53) Slater JM, Ngo E, et al: Effect of therapeutic irradiation of the immune response. *Am J Roentgenol* **126**: 313-320, 1976.
- 54) Smith WW, Anderson W, et al: Spleen adenosine triphosphatase activity in irradiated mice treated with spleen homogenate. *Am J Physiol* **178**: 471-473, 1954.
- 55) Sprent J, Anderson RE, et al: Radiosensitivity of T and B lymphocytes. II. Effect of irradiation on response of T cells to alloantigens. *Eur J Immunol* **4**: 204-210, 1974.
- 56) Stjernswärd J, Tondal M, et al: Lymphopenia and change in distribution of human B- and T-lymphocytes in peripheral blood induced by irradiation for mammary carcinoma. *Lancet* **1**: 1352-1356, 1972.
- 57) Storer JB, Harris, Ps. et al: The relative biological effectiveness of various ionizing radiations in mammalian systems. *Rad Res* **6**: 188-288, 1957.
- 58) Sugimoto T, Sawada T, et al: Blastogenic response of spleen cells from C1300 neuroblastoma bearing mice to tumor cells or soluble and insoluble tumor antigens. *Gann* **70**: 327-336, 1979.
- 59) 橘 武彦, 吉田明子: ヒトのT細胞B細胞の数量測定法. 免疫実験操作法 455-462, 1975.
- 60) Tada T, Taniguchi M, et al: Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. II. Effect of X-irradiation. *J Immunol* **106**: 1012-1018, 1971.
- 61) Taliaferro WH and Taliaferro LG: Effects of irradiation of initial and anamnestic hemolysis responses in rabbits: Antigen injection before X-rays. *J Immunol* **104**: 1364-1376, 1970.
- 62) Tarpley JL, Potvin C, et al: Prolonged depression of cellular immunity in cured laryngopharyngeal cancer patients treated with radiation therapy. *Cancer* **35**: 638-644, 1975.
- 63) Thomas JW, Coy P, et al: Effect of therapeutic irradiation on lymphocyte transformation in lung cancer. *Cancer* **27**: 1046-1050, 1971.
- 64) Wara WM, Phillips TL, et al: Immunosuppression following radiation therapy for carcinoma of the nasopharynx. *Am J Roentgenol* **123**: 482-485, 1975.
- 65) Whitney RB, Levy JG, et al: Influence of tumor size and surgical resection on cell mediated immunity in mice. *J Natl Cancer Inst* **53**: 111-116, 1974.
- 66) Whittaker MG, Rees K, et al: Reduced lymphocyte transformation in breast cancer. *Lancet* **1**: 892-893, 1971.
- 67) Yamagata S and Green GH: Radiation-induced immune changes in patients with cancer of the cervix. *Brit J Obstet Gynaec* **83**: 400-408, 1976.
- 68) 吉永 秀: 赤血球除去用トリス緩衝液, 免疫実験操作法: 450, 1975.