

脳腫瘍への⁶⁰Co局所照射による抗腫瘍細胞性免疫の誘導

京都大学医学部脳神経外科学教室（主任：半田 肇教授）

須 田 金 弥

〔原稿受付：昭和56年10月19日〕

Induction of Anti-tumor Cell-mediated Immunity by Local Irradiation Against Transplanted Brain Tumor

KINYA SUDA

Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School
(Director: Prof. Dr. HAJIME HANDA)

Effects of the radiotherapy on the induction of killer cell activity in mice with intracerebrally implanted glioma (methylcholanthrene induced 203-glioma) were studied. On the 10th day after implantation of glioma, cobalt irradiation of 1000 rad or 1500 rad was administrated. This radiotherapy significantly prolonged the survival time of mice and this was also confirmed by the histological examination. During this period, the killer activity against the glioma gradually increased in association with the tumor regression. The 10th day after irradiation, the killer activity revealed the maximum magnitude. This killer activity was markedly diminished by the treatment of anti-Thy 1.2 antibody and complement. It was also found that the natural killer activity against L-cells or YAC-1 cells was enhanced after the irradiation of glioma. Furthermore, this killer activity was markedly enhanced by Con A stimulation. We made an attempt at establishment of murine glioma antigen-specific cytotoxic T cell lines by utilization of a T cell growth factor, but it was not successful.

These results indicated that the cytotoxic T cells and the natural killer cells induced by the irradiation of glioma may play, in part, an important role on the regression of brain tumor.

I は じ め に

メチルコラントレンなどの化学発癌剤により誘発された実験腫瘍で免疫された純系動物が、その同一腫瘍を拒否するという事実は、1950年代にはすでにマウス

の一連の実験により明らかにされている^{15, 21, 37)}。それ以来、担癌生体から現在担っている腫瘍を外科的に切除したり、放射線照射を行うと、宿主に抗腫瘍抵抗性が誘導されるのは、細胞性免疫を中心とした腫瘍免疫応答の成立に基づくものと広く認められる様になっ

Key words: Glioma, Tumor immunity, Radiotherapy, Killer T cell, T cell growth factor.

索引語：グリオーマ、腫瘍免疫、放射線治療、キラーT細胞、T細胞成長因子。

Present address: Department of Neurosurgery, Kyoto University Medical School, Sakyo-ku, Kyoto, 606, Japan.

た^{16, 32, 45)}。そして、悪性腫瘍の免疫治療を確立するため、腫瘍関連抗原を宿主に強く認識させ、有効な免疫応答を成立せしめることを目的に実験的ならびに臨床的に種々の試みがなされている^{3, 23, 36)}。

但し、脳にはリンパ組織が無く、脳組織に於ては細胞性免疫が重要な役割を果す移植免疫や腫瘍免疫は成立し難いと考えられたが²⁶⁾、Scheinberg ら⁴¹⁾はメチルコラントレン誘発脳腫瘍を C57BL/6 マウスの脳内に移植し、放射線局所照射を行うと、同一腫瘍の脳内再移植を拒否することを報告した。彼らは、脳組織に於ても、皮下組織と本質的には同一の免疫学的抗腫瘍性が誘導されたことによると推論し、その後、これを支持する報告も相次いでいる^{23, 28, 29, 33)}。しかし、脳腫瘍の放射線局所照射による、宿主の免疫学的抗腫瘍性の誘導の機構については不明の点が多い。また、臨床的にも、脳腫瘍の放射線治療に伴う、宿主の腫瘍に対する抗腫瘍免疫機構の変動を解明することは重要である。それは、放射線による骨髄リンパ組織の障害という、副作用の予防をする観点からのみではない。放射線治療の効果は、放射線の腫瘍細胞への直接障害作用のみに基づくのではなく、放射線照射細胞に対する宿主の免疫学的排除機構の誘導が伴って始めて成立することを示す事実もあるからである^{9, 44)}。

そこで、担脳腫瘍マウスを作製し、⁶⁰Co 局所照射を行って脳腫瘍を退縮させ、放射線治療の効果に伴う脾細胞の腫瘍細胞に対する細胞障害活性 (killer activity) を中心に細胞性免疫反応の変動について解析した。さらに放射線治療の効果をたかめるため、宿主の免疫学的抵抗性を誘導することの重要性について考察を加えた。

II 材料及び方法

1) マウス及び移植脳腫瘍

4~8 週の C57BL/6 純系マウスの雄を静岡実験動物センターより入手し用いた。移植脳腫瘍は、群馬大学病理学教室石田陽一博士より供与された 203-glioma を用いた。203-glioma は C57BL/6 マウスの大脳へ 20-methylcholanthrene を注入し誘発させた脳腫瘍で、以後本教室にて同系マウス皮下に移植継代されてきた。

2) 担脳腫瘍マウスの作製

皮下で継代した 203-glioma を 0.1%トリプシン、0.01% EDTA にて細胞浮遊液とし、Hamilton の microinjector と矢追針によりマウス右大脳内に 5×10^5

10 μ l を注入した。頭蓋骨の針穴はアロンアルファ®にて塞ぎ、腫瘍細胞の流出を防いだ。

3) 担脳腫瘍マウスに対する ⁶⁰Co 局所照射

京都大学医学部附属病院放射線科に設置されている ⁶⁰Co 遠隔照射装置 (RT-2000, 島津製作所製) により、担脳腫瘍マウスの全脳に 1000 rad または 1500 rad の 1 回大量照射を行った。マウスは無麻酔下で固定し、頭部以外には鉛板を用いて遮蔽した。対照として 10 μ l の生理食塩水を脳内に注入したマウスに 1500 rad の ⁶⁰Co 局所照射を行った。⁶⁰Co 局所照射による脳腫瘍の治療効果は、マウスの生存率や実験時の脳組織の肉眼的所見及び光顕的所見により判定した。

4) Effector 細胞及び標的細胞の調整

⁶⁰Co 治療を行った担脳腫瘍マウスより、無菌的に脾臓を摘出細切し、Tris-NH₄Cl 液にて赤血球を溶血除去し、脾細胞浮遊液を作製した。これら脾細胞は 3~4 匹のマウスからプールしたものを effector 細胞として用いた。一方、標的細胞として、中尾ら³¹⁾の方法により in vitro で継代培養した 203-glioma, C3H マウス由来の fibrosarcoma である L 細胞、及び A 系マウス由来のリンパ腫 YAC-1 細胞を用いた。L 細胞及び YAC-1 細胞は京都大学病理学教室より供与され、本教室にて RPMI 1640 培養液に 10% 非動化仔牛血清 (FCS; GIBCO, Grand Island, N.Y.), ストレプトマイシン、ペニシリンを添加したもので in vitro の継代培養した。

5) ⁵¹Cr 放出細胞障害試験 (⁵¹Cr release assay)

細胞障害試験は Minato²⁷⁾らの方法に準じて行った。標的細胞は 1×10^7 /ml に調整し、Na₂⁵¹CrO₄ (New England Nuclear, NEZ-030) を 100 μ Ci 加え、37°C 50 分間反応させた後、RPMI 1640 液で 3 回洗浄し 1×10^5 /ml に調整した。203-glioma 細胞及び L 細胞に対する ⁵¹Cr release assay は 24 ウェルの組織培養プレート (Falcon 3008) で行った。⁵¹Cr を標識した標的細胞を各 well に 1 ml 入れ、37°C 5% CO₂ 下で培養した。12 時間後、上清のみ捨て新たに種々の濃度の effector 細胞を 1 ml 加え、18 時間 37°C、5% CO₂ 下で混合培養した。そして、300G、10 分間遠沈し、上清 0.5 ml とり、ガンマカウンターで放射能活性を測定した。YAC-1 細胞を標的細胞とした ⁵¹Cr release assay では Herberman ら¹⁹⁾の方法に準じて行った。⁵¹Cr を標識した YAC-1 細胞と effector 細胞を試験管 (Falcon 2003) にて 37°C 5% CO₂ 下で 6 時間混合培養した後、

同様に上清の放射能活性を測定した。対照として、標的細胞のみで培養したもの（自然放出；spontaneous release, SR）と Nordnet P-40 detergent を含む培養液で培養したもの（最大放出；maximum release, MR）を置き、常に duplicate で行った。細胞障害活性 (killer activity) の計算は以下の公式に依った。

$$\% = \frac{\text{ER-SR}}{\text{MR-SR}}$$

ER は experimental release (被検サンプルよりの放出) で、標的細胞と effector 細胞の比 (T:E Ratio) は 1:50 を中心に行った。release assay の培養液は 7.5% FCS 添加 RPMI 1640 液に 20 mM/ml HEPES を加えたものを用いた。

6) Con A stimulation & Con A induced killer T cell activity の測定

以前に我々が報告した方法³⁰⁾を用いた。 ^{60}Co 局所照射を行った担脳腫瘍マウスの脾細胞を Con A (Sigma chemical Co., USA) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 mM/ml 2-mercaptoethanol を含む 7.5% FCS 添加 RPMI 1640 液にて 37°C, 5% CO_2 下で 72 時間培養した。収穫し洗浄し effector 細胞とし、203-glioma 細胞と L 細胞を標的細胞とし 4 時間の ^{51}Cr release assay を行った。この Con A induced killer activity (Con A killer activity) は Falcon tube (No. 2003) を用い 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Con A を含む RPMI 1640 液を使用し、T:E Ratio は 1:50 を中心に行った。

7) 脾細胞の抗 Thyl. 2 抗体及び抗 BAT 抗血清による処理

脾細胞を 3% FCS 含む RPMI 1640 液にて $1 \times 10^7/\text{ml}$ に調整し、抗 Thyl. 2 抗体又は抗 BAT 抗血清を種々の濃度で加え、4°C 1 時間反応させた。1 回洗浄した後、補体として家兎血清 (20 倍) を加え 37°C 30 分間反応させ、死細胞をトリパンブルーで分別し、生細胞を算定した。生細胞を 2 回洗浄した後、Effector 細胞として用いた。抗 BAT 抗血清は C57BL/6 マウス脳を complete Freund's adjuvant とともに家兎に免疫して得た抗血清で、マウス赤血球、血清、肝臓で吸収したものを用いた。C57BL/6 胸腺細胞に対する 50% cytotoxicity は 500 倍であり、一方抗 Thyl. 2 抗体はモノクローナル抗体 (Olacl Ltd., Blackthorn Bicester, U.K.) で 50% cytotoxicity は 40 万倍であった。細胞表面マーカーの検索には抗 BAT 抗血清 ($\times 40$)、抗 Thyl. 2 抗体 ($\times 500$) を用い、同様の方法で cytotoxic

test を行った。

8) T cell growth factor (TCGF) の作製と脾細胞の長期継代培養

TCGF の作製は Rosenberg ら^{39, 40)} の報告に基づいて行った。今回は C57BL/6 マウスの正常脾細胞を $5 \times 10^6/\text{ml}$ の細胞濃度とし、Con A 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む RPMI 1640 液にて 37°C, 5% CO_2 の環境下で 48 hr 培養した。900G, 10 分間遠沈し、その上清を 0.45 μm フィルターを通し、TCGF として用いた。脾細胞の長期継代培養には、TCGF を 20% 含む、7.5% FCS, 50 mM/ml 2ME, 20 mM/ml HEPES, 500,000 u/ml ペニシリン G, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン添加 RPMI 1640 液 (以下 growth medium と略す) を使用し、 $5 \times 10^5/\text{ml}$ の細胞濃度で培養を開始した。TCGF に反応し、増殖するリンパ球様細胞数を経的に測定し、また増殖した細胞を洗浄した後、Effector 細胞とし、203-glioma 細胞や L 細胞を標的細胞とした 4 hr の ^{51}Cr release assay を行った。

9) 統計学的処理

統計学的処理は 2 試料 t 検定を行い、危険率 (P) が 5% 以下を有意の差ありと判定した。

III 結 果

1) 担脳腫瘍マウスに於ける ^{60}Co 局所照射の及ぼす延命効果

5×10^5 個の 203-glioma 細胞が C57BL/6 マウスの脳内に注入されると、その移植率はほぼ 100% で、移植後 3 週間以内に、脳圧亢進症状により、100% 死亡する。203-glioma 細胞の脳内移植後、10 日目に ^{60}Co 局所照射を行うと延命効果は最も著明で、50% 死亡率は非 ^{60}Co 照射群で 2.5 週、1000 rad 照射群で 4.5 週、1500 rad 照射群で 6.5 週となった ($P < 0.01$)。また、1500 rad 照射群では、30% の担脳腫瘍マウスが 2 ケ月以上生存した。なお、2000 rad の ^{60}Co 局所照射では、マウス口腔粘膜に潰瘍が出現するなどの放射線障害により、全例 2 週以内に死亡した (Fig. 1)。500 rad 以下の ^{60}Co 局所照射では有意の延命効果は認められなかった。

2) ^{60}Co 局所照射による移植脳腫瘍の組織学的所見の変化

脳内に移植された 203-glioma 細胞は主に脳室内及び脳室壁より増殖し始め、徐々に脈絡叢や脳実質へと浸潤性に拡大増殖してゆく (Fig 2)。増殖した移植脳

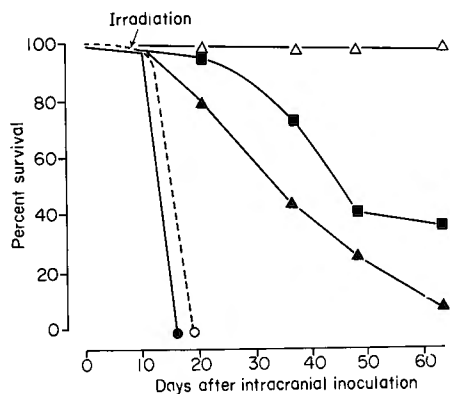


Fig. 1. Effects of irradiation on the survival rate of mice with the brain tumor. 5×10^5 cells of 203-glioma that were implanted intracerebrally grew and killed the host within 21 days (○---○). However, the local cobalt irradiation with 1000 rad (▲---▲), 1500 rad (■---■), prolonged the survival time. One group of mice were injected with saline and irradiated with 1500 rad as sham control (□---□). The local cobalt irradiation with 2000 rad killed the hosts within 20 days by the side effects (●---●). Each group of mice consisted of ten mice.

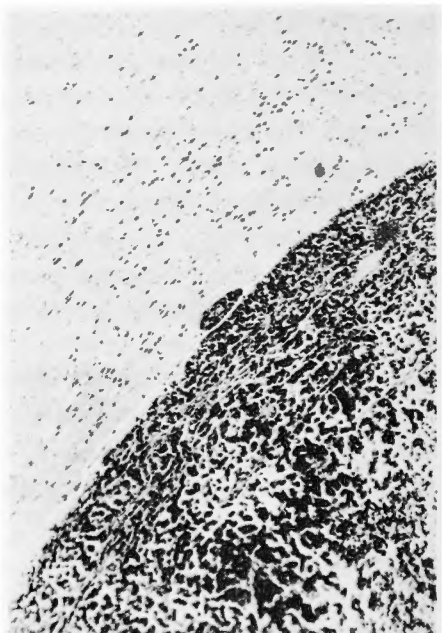


Fig. 2. The histological finding showed the diffuse proliferation of transplanted 203-glioma in the brain on 14th day after the implantation. (H.E. stain $\times 100$)

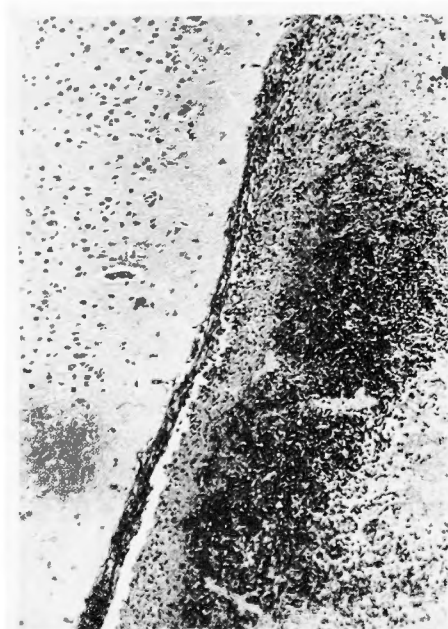


Fig. 3a.



Fig. 3b.

Fig. 3. a: On the tenth day after local cobalt irradiation, transplanted glioma tissue in the brain showed coagulation necrosis pattern with pyknotic nucleus. (H.E. stain $\times 100$)
b: On the 17th day after local cobalt irradiation, Necrotic glioma tissue diminished. The secondary hydrocephalus and spongy changes in the brain tissue were shown. (H.E. stain $\times 100$)

腫瘍に ^{60}Co 局所照射を行うと、腫瘍組織は核濃縮像を伴う著明な凝固壊死に落ち入る。そして照射後17日目以降にはこれら壊死組織は消失し、著明な空洞が形成されるようになる。また脳組織は海綿状となり、萎縮も進行している。組織学的所見により、移植10日目に1500 rad 又は1000 rad の ^{60}Co 局所照射を行った群に最も著明な腫瘍壊死と治癒を認めた (Fig. 3a, 3b)。しかし、203-glioma の増殖過程や ^{60}Co 照射による治癒過程に、腫瘍周囲組織にリンパ球様細胞の浸潤は軽度認められるにすぎなかった。

3) ^{60}Co 局所照射治療に伴う脾細胞の killer activity の上昇

担脳腫瘍マウスに ^{60}Co 局所照射を行い、経日的に脾細胞の killer activity を測定した (Fig. 4)。203-glioma 細胞を標的細胞とし T:E Ratio を 1:50 でみると、正常マウスや対照マウスでも15-20%の natural cytotoxicity が認められる。脳腫瘍への ^{60}Co 照射後、killer activity は徐々に上昇し、照射後10日目に1500 rad 照

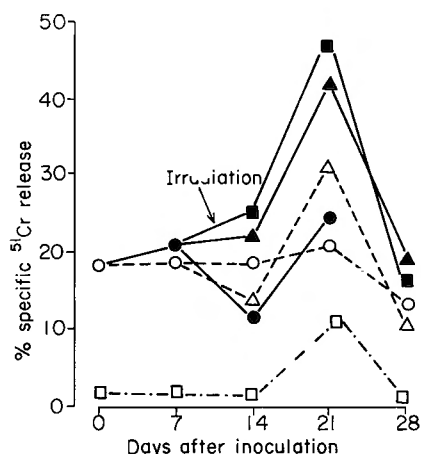


Fig. 4. Kinetics of killer activity of spleen cells following curative irradiation therapy in mice bearing glioma. The killer activity against 203 glioma cell in glioma bearing mice (●-●), in normal control mice (○-○), in irradiated mice of 1500 rad as sham control (△-△), in mice with curative irradiation therapy of 1000 rad (▲-▲), or 1500 rad (■-■) were shown. The killer activity against L cell in glioma bearing mice following curative irradiation (□-□) were also shown. Each group of mice consisted of two or three mice. The mean percent specific release by the 18 hr release assay at a target to effector ratio of 1:50 were plotted.

射群では $46.0\% \pm 4.2$, 1000 rad 照射群では $42.2\% \pm 1.7$ と最高の % specific release を示した. ($P < 0.01$). 一方、L細胞に対する killer activity は正常マウスや対照マウスでは検出できないが、脳腫瘍への照射治療後10日目に1500 rad の照射群にのみ $12.4\% \pm 0.6$ の killer activity が認められるようになる ($P < 0.01$). 但し、1500 rad の ^{60}Co 局所照射を行った対照群でも、照射10日目に203-glioma に対し $32.4\% \pm 3.1$ と軽度ながら killer activity が上昇する傾向を認めた ($P < 0.1$). そして、照射後17日目には203-glioma に対し、1500 rad 照射群では $16.0\% \pm 1.1$, 1000 rad 照射群では $19.7\% \pm 0.3$ と killer activity は減少した。

4) ^{60}Co 局所照射に伴う Natural killer activity の増強 (Fig. 5)

担脳腫瘍マウスへ ^{60}Co 局所照射を行った後、脾細胞の YAC-1 細胞に対する killer activity (いわゆる natural killer activity 活性) を経日的に測定した (Fig. 5)。無処置及び対照マウスの NK 活性は T:E Ratio を 1:50 で 6 hr release assay を行うと20%前後の % specific release を示した。担脳腫瘍マウスへ ^{60}Co 局所照射を行うと、NK 活性は徐々に上昇し照射後10日目に1500 rad 照射群で $44.0\% \pm 1.2$, 1000 rad 照射群

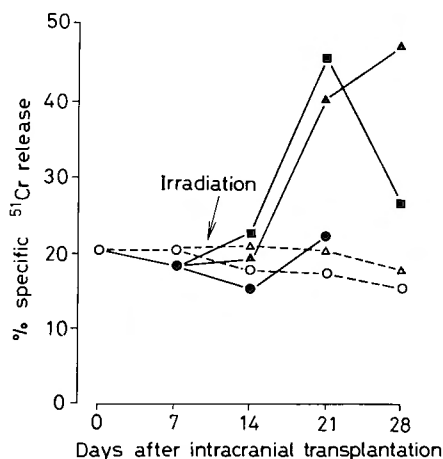


Fig. 5. Kinetics of natural killer activity of spleen cells in glioma bearing mice that were treated by curative irradiation of 1000 rad (▲-▲) or 1500 rad (■-■). The natural killer activity in normal mice (○-○), in irradiated mice of 1500 rad as sham control (△-△), in non-treated mice bearing glioma (●-●) were also shown. Each group of mice consisted of two or three mice. The mean percent specific release by the 6 hr release assay at a target to effector ratio of 1:50 were plotted.

で $47.6\% \pm 0.5$ と最高値を示した ($P < 0.01$). そして照射後17日目には 1500 rad 照射群で $26.7\% \pm 1.8$ と減少したが, 1000 rad 照射群では $48.3\% \pm 0.8$ となお高い NK 活性を有していた ($P < 0.001$). 但し, 1500 rad 照射した対照マウスの NK 活性も照射後10日目に $22.3\% \pm 1.3$ と軽度ながら上昇するのを認めた ($P < 0.05$).

5) Con A による killer activity の増強 (Fig. 6, 7)

^{60}Co 局所照射を行った担脳腫瘍マウスの Con A killer T cell activity を経日的に測定した. 203-glioma 細胞に対する Con A killer activity を T:E Ratio 1:50 でみると, 正常マウスでも 10-20%の活性が認められる. また, ^{60}Co 照射対照マウスや ^{60}Co 照射を行わなかった担脳腫瘍マウスでも, Con A killer activity は 10-20%を示し, 経日的に測定しても変動は認められなかった. しかし, 脳腫瘍に 1500 rad の ^{60}Co 局所照射を行った群では Con A killer activity は急激に上昇し, 照射後10日目には $113.1\% \pm 2.4$ と著しい活性を示した ($P < 0.001$). 1000 rad 照射群でも $38.1\% \pm 1.1$ と上昇し ($P < 0.01$), 照射後17日目でもなお $25.3\% \pm$

1.0 と高値を示した ($P < 0.01$). L細胞を標的細胞とした場合の Con A killer activity も全く同様の経過を示し, 照射後10日目に 1500 rad 照射群で $86.3\% \pm 3.7$, 1000 rad 照射群で $42.9\% \pm 1.2$ と最高値となった ($P < 0.01$) ($P < 0.05$).

6) 抗 Thyl. 2 抗体, 抗 BAT 抗血清と補体処理による脾細胞の killer activity の減少

担脳腫瘍マウスに 1500 rad の ^{60}Co 局所照射を行い, 照射後10日目の脾細胞を抗 Thyl. 2 抗体と補体で処理し, 又抗 BAT 抗血清と補体で処理し, 203-glioma 細胞に対する killer activity を測定した (Table 1). 実験1に於て, 全脾細胞のうち, 抗 Thyl. 2 抗体 5000倍で 43.8%, 50,000倍で 40.8%の Thyl. 2 陽性細胞を除去すると, 全脾細胞で $40.8\% \pm 0.1$ の killer activity がそれぞれ $7.7\% \pm 0.8$, $8.4\% \pm 1.6$ と著明に減少した. また実験2に於て, 抗 BAT 抗血清 $\times 20$ 倍で 39.5%, $\times 200$ 倍で 20.3%の BAT 抗原 (brain associated T cell antigen) 陽性細胞を除去すると, 処理前では $38.9\% \pm 3.1$ の killer activity はそれぞれ $2.5\% \pm 1.3$, $11.7\% \pm 0.6$ と著明な減少をきたした. そこで, 20万倍の抗 Thyl. 2 抗体と 200倍の抗 BAT 抗血清でそれぞれ 20%

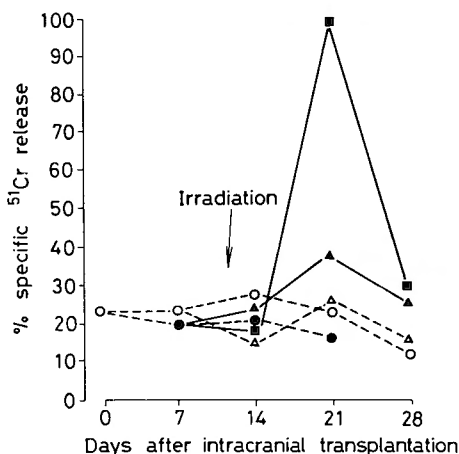


Fig. 6. Kinetics of Con A induced killer T cell activity against 203 glioma in mice that were treated by curative irradiation of 1000 rad (▲—▲) or 1500 rad (■—■). The Con A Killer activity in normal mice (○—○), in irradiated mice of 1500 rad as sham control (△—△), in non-treated mice bearing glioma (●—●) were shown. Each group of mice consisted of two or three mice. The mean percent specific release by the 4 hr release assay at a target to effector ratio of 1:50 were plotted.

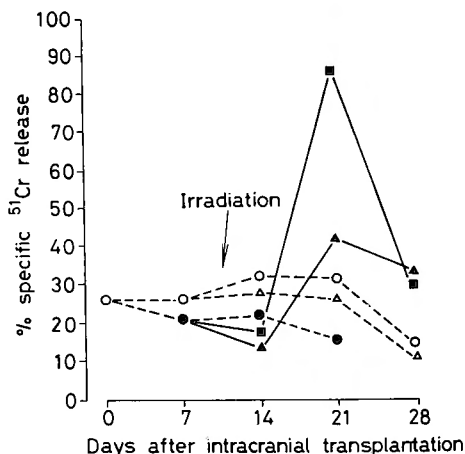


Fig. 7. Kinetics of Con A induced killer T cell activity against L cell in mice that were treated by curative irradiation of 1000 rad (▲—▲) or 1500 rad (■—■). The Con A induced killer T cell activity in normal mice (○—○), in irradiated mice of 1500 rad as sham control, (△—△), in non-treated mice bearing glioma (●—●) were shown. Each group of mice consisted of two or three mice. The mean percent specific release by 4 hr release assay at a target to effector ratio of 1:50 were plotted.

Table 1. Effect of treatment of spleen cells by anti-Thy-1.2 antibody and anti-BAT serum on killer activity against 203-glioma

spleen cells treated with		cytotoxic activity** % specific release***	
Expt 1			
anti-Thy-1.2+C ($\times 5,000$)	43.8*	7.7(± 0.8)	P < 0.001
anti-Thy-1.2+C ($\times 50,000$)	40.8*	8.4(± 1.6)	P < 0.01
C alone	14.8*	19.4(± 8.9)	N. S
None	0	40.8(± 0.1)	—
Expt 2			
anti-Thy-1.2+C ($\times 50,000$)	37.0*	14.6(± 1.2)	P < 0.01
anti-Thy-1.2+C ($\times 200,000$)	24.8*	19.0(± 1.6)	P < 0.01
anti-BAT + C ($\times 20$)	39.5*	2.5(± 1.3)	P < 0.02
anti-BAT + C ($\times 200$)	20.3*	11.7(± 0.6)	P < 0.01
C alone	5.4*	32.0(± 2.0)	—
none	0	38.9(± 3.1)	—

* % eliminated cells

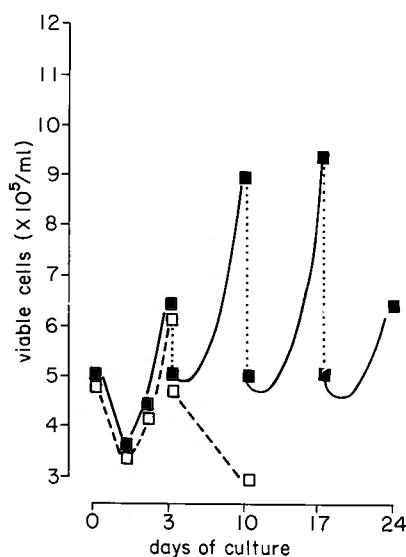
** Target : Effector ratio = 1 : 50

*** The 18 hr release assay

程度の脾細胞を除去し, killer activity を比較した. 抗 Thy-1.2 抗体による処理にて $19.6\% \pm 1.6$, 抗 BAT 血清の処理で $11.7\% \pm 0.6$ と, ともに減少したが, 抗 BAT 抗血清の処理により強い減少を示した ($P < 0.05$).

7) TCGF による脾細胞の長期継代培養

移植脳腫瘍に ^{60}Co 局所照射を行うことにより, 腫

**Fig. 8.** Growth pattern of the sensitized spleen cells by repeated addition of T cell growth factor (■—■). The long-term culture of the sensitized spleen cells were independent upon addition of Con A only (□---□).

瘍関連抗原に感作された脾細胞は TCGF によく反応し増殖した. 培養開始後 3 日目に growth medium を交換し, 細胞数を $5 \times 10^5/\text{ml}$ に調整し再び同じ growth medium にて培養し, 以後 1 週間毎に同様の操作にて継代培養を行った. 培養開始後 24-48 時間では細胞数は減少するが, 2 代~3 代では細胞は著明な増殖を示し, 1 週間で約 1.8—1.9 倍の細胞数となる (Fig. 8). しかし, 4 代目より増殖速度が低下するのを認めた.

Table 2. Surface markers and cytotoxicity of sensitized mouse spleen cells grown in growth medium

Days in growth medium	serum*		cytotoxicity**	
	anti-Thy-1.2 ($\times 5,000$)	anti-BAT ($\times 40$)	203-glioma	L cell
0	38.6	30.7	5.6 $\pm$ 3.7	N. S***
3	59.2	65.8	48.0 $\pm$ 4.9	42.6 $\pm$ 2.4
10	16.4	33.3	16.8 $\pm$ 2.2	10.2 $\pm$ 4.0
17	10.0	15.7	N. S	N. S
24	3.3	7.2	N. S	S. S

* Percentage of dead cells (cytotoxicity index) by treatment with antisera + complement.

$$\text{cytotoxic index} = \frac{\% \text{ dead cell with test serum} - \% \text{ dead cell with complement alone}}{100 - \% \text{ dead cell with complement alone}} \times 100$$

** % lysis at an effector to target ratio of 25 : 1 by 4 hr chromium release assay

*** Not significantly different from spontaneous release

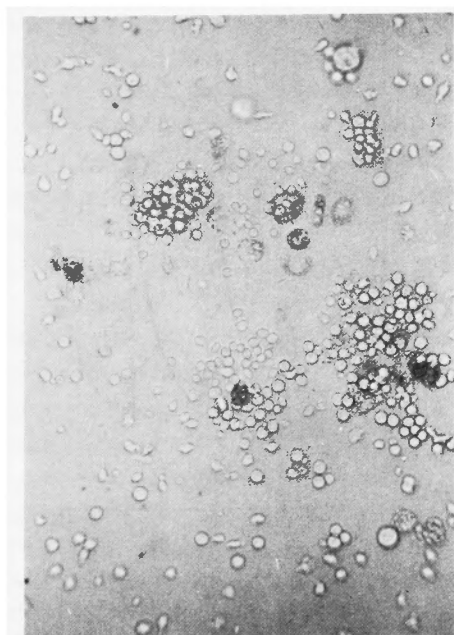


Fig. 9. Spleen cells grown in T cell growth factor. The lymphoid cell proliferation in vitro were shown.

また位相差顕微鏡で形態を観察すると、増殖するのはやや大型のリンパ球様の円形細胞で、細胞塊を形成していた。巨細胞を比較的多く伴い、パイペティングで容易に浮遊した (Fig. 9)。

8) TCGF 反応細胞の killer activity 及び表面マーカーの経日的変化

感作脾細胞を growth medium により培養を開始し、3日後には培養開始前と比べて killer activity は著明に上昇し、203-glioma 細胞に対しては $48.0\% \pm 4.9$ 、L細胞に対しては $42.6\% \pm 2.4$ となった。しかし継代培養が長期になる程、killer activity は減少し、培養開始後17日以降は203-glioma 細胞に対してもL細胞に対しても killer activity は認められなかった。一方、培養開始後3日目の脾細胞の表面マーカーを検索すると、Thyl. 2 陽性細胞が59.2%、BAT 陽性細胞が65.8%と著明に増加するのを認めた。しかし、10日目以降のTCGFによる増殖細胞でThyl. 2 陽性細胞やBAT 陽性細胞は減少し、培養開始後24日目の収穫細胞にはThyl. 2 陽性細胞は3.3%、BAT 陽性細胞は7.2%認めただけであった。

IV 考 案

本実験にて、担脳腫瘍マウスへの ^{60}Co 局所照射は脳腫瘍を退縮させ、その治療効果に伴い脾細胞に著しい killer activity を誘導しうることを in vitro の細胞障害試験により示した。脾細胞に誘導された Killer activity は抗 Thyl. 2 抗体、あるいは抗 BAT 抗血清により処理されると、著しく減少することから、いわゆる killer T 細胞が重要な役割を果たす細胞性免疫反応であると考えられる⁹⁾。また、nylon wool column を通すと著しく活性は減少し (未発表)、polyclonal T cell activator である Con A とともに in vitro で培養を行うと^{2,10)} killer activity は著明に増強されるなどの特徴を有している。しかし、この killer activity は203-glioma 細胞に特異的ではなく、同種異系の腫瘍細胞であるL細胞やYAC-1細胞に対しても killer activity は上昇している。特に、YAC-1細胞に対する killer activity 即ち、いわゆるNK活性が著明に上昇し、やや長期にわたりその活性が維持されていることや、抗NK細胞活性を有す抗BAT抗血清が、抗Thyl. 2抗体よりも強く killer activity を失活させることなどから、203-glioma 細胞に対する killer activity はNK活性をも含んだ細胞障害活性を検出している可能性がある。むしろ、脳腫瘍に対する放射線照射により、腫瘍細胞からの可溶性腫瘍関連抗原が流出し、多様な抗腫瘍免疫機構が活性化しており、脾細胞の killer activity はその一端を表現しているとも考えられる^{13,20,34)}。

一方、担脳腫瘍マウスの脳への ^{60}Co 局所照射は、マウスの骨髄やリンパ組織を障害し、その機能に少なからぬ影響を及ぼす。これは、 ^{60}Co 局所照射を脳に行った対照マウスに於ても脾細胞の killer activity やNK活性が軽度ながら上昇している事から容易に知れる。対照マウスでも脾細胞の killer activity やNK活性が上昇する機序は不明であるが、恐らく放射線に比較的高感受性の抑制性T細胞が機能を失い、放射線に比較的抵抗性のNK細胞やマクロファージなどが残ることにより、相対的に正常マウスに比べ、killer activity が増強したと推測される^{8,10,38)}。本実験で、担脳腫瘍マウスに対する ^{60}Co 局所照射により誘導された killer activity も、小線量の放射線が全身リンパ組織に及び、脾細胞の機能的亜集団のバランスを変化させ、killer activity の活性化を促進するという機序が介在していることによるのかも知れない。

この様に、脳腫瘍に放射線局所照射を行うと抗腫瘍

細胞性免疫機構が誘導される事実は同一腫瘍の脳内再移植を拒絶する現象を説明しうが、その機序については、なお不明の領域が多い。悪性腫瘍に対する免疫応答は、リンパ球、及び関連細胞群の複雑な相互作用により営まれていることも¹⁷⁾、解析を困難にしている。そこで、脾細胞に誘導された 203-glioma 細胞に対する killer T 細胞の長期継代培養とそのクローン化を TCGF を用いて試みた。すでに、分化した T 細胞即ち機能を有した T 細胞が TCGF により長期にわたり分裂増殖しうことは実証されており、アロ腫瘍細胞に対する killer T 細胞や H-Y 抗原に対する killer T 細胞の長期継代培養とその細胞株のクローン化の成功が相次いで報告されている^{1, 12, 18, 16)}

この TCGF による機能的 T 細胞のクローン化は腫瘍関連抗原に対する免疫応答の機序の解析だけでなく、悪性腫瘍の免疫治療に応用しうと期待される。今回、マウスやラットの脾細胞を用い、Con A などの T 細胞マイトゲンにて数種類の TCGF を作製したが、203-glioma 細胞に対する killer T 細胞の長期継代培養及びクローン化は達成できなかった。TCGF により、リンパ球様細胞の分裂増殖は可能であったが、培養継続中に T 細胞表面マーカーも細胞障害活性も喪失し、また 4 代目の継代時期より、増殖速度は減少する傾向を示した。TCGF による感作脾細胞の培養開始 3 日後の killer activity は著明に上昇するが、Con A により 3 日間培養した Con A killer activity とは差が認められず、TCGF の作用のみで killer activity が増強したとは言えない。より効果的な killer T 細胞の増強作用を有する TCGF の作製が重要と考えられる^{17, 22)}。

以上の実験的事実、即ち脳腫瘍への効果的な放射線治療は、脾細胞に抗腫瘍細胞性免疫を誘導しうことや、抗腫瘍細胞性免疫反応を増強しうことは、悪性脳腫瘍の放射線治療を行う上で、考慮すべき点を示している。つまり、放射線治療の効果は放射線の腫瘍細胞への直接障害作用だけによるものではなく、宿主の免疫学的防禦機構の活性化を伴って完成されるという点である。放射線の局所照射は骨髄リンパ組織を障害し、その機能を抑制するが^{4, 5, 11, 43)}、外科手術に先立ち脳腫瘍局所に放射線局所照射をしておく方が、治療成績の良い場合もあり、むしろ免疫機能を活性化していることを示唆する臨床的経験も多い。また、ある種の悪性腫瘍では外科的治療をせず、放射線治療のみを行う方が転移が少ないことや、悪性腫瘍細胞の放射線感受性が、宿主の免疫抑制状態では著しく低下する事

実なども、放射線治療の効果には宿主の免疫反応が介在していることを示している^{7, 9, 25, 35)}。

放射線治療の成績を向上させるため、悪性脳腫瘍に対する宿主の免疫応答をいかに効果的に誘導するかという観点より、個々の症例にて放射線照射後、腫瘍関連抗原を検出し^{33, 42)}、宿主の腫瘍に対する免疫応答を解析することが必要と考えられる。

V 結 語

1) C57BL/6 マウスの脳内へ 203-glioma 細胞を $5 \times 10^5/10 \mu\text{l}$ を移植すると、ほぼ 100% 生着し、脳腫瘍の増殖のために全例が 21 日以内に死亡した。

2) 担脳腫瘍マウスの全脳へ、腫瘍細胞の移植後 10 日目に 1500 rad 又は 1000 rad の ^{60}Co 局所照射を行うと、生存率及び組織学的所見に於て、著明な治療効果を認めた。

3) ^{60}Co 局所照射による治療を行った担脳腫瘍マウスの脾細胞の killer activity を測定したところ、203-glioma 細胞、L 細胞、及び YAC-1 細胞のいずれの腫瘍細胞に対しても著明な killer activity の上昇を認め、 ^{60}Co 局所照射治療後 10 日目に最高値の活性を示した。

4) 上昇した killer activity は抗 Thyl. 2 抗体、抗 BAT 抗血清と、補体で処理すると著明に減少することから、いわゆる killer T 細胞が重要な役割を果たすことを示した。しかし、NK 活性の上昇を伴い、他の様々な抗腫瘍免疫機構が活性化されていると推測した。

5) 脳腫瘍へ ^{60}Co 局所照射治療を行うことにより、感作されたマウス脾細胞は Con A に著しく反応する。特に、移植後 10 日後に 1500 rad の ^{60}Co 照射を行った群では著明な Con A killer activity を示した。

6) ^{60}Co 局所照射により、腫瘍関連抗原に感作された脾細胞は TCGF によく反応し、in vitro で長期継代培養が可能であった。しかし、TCGF により増殖させた脾細胞の killer activity は徐々に減少し、また T 細胞表面マーカーの陽性細胞も減少した。203-glioma 細胞に対する特異的な killer T 細胞株の樹立は今回の試みでは達成できなかった。

7) 本実験は、実験的脳腫瘍に対する放射線治療が、宿主をして抗腫瘍細胞性免疫応答を誘導せしめていることを示したものである。これを臨床的な立場よりみると、放射線治療の効果を向上させる為には、宿主の抗腫瘍免疫機構を誘導し、より強化すべく工夫するという観点が重要であることを示唆していると考えられる。

稿を終えるに臨み、御指導御校閲を賜りました恩師半田肇教授に、並びに免疫学的実験に御指導を頂きました京都大学医学部病理学教室浜島義博教授に衷心より感謝の意を表します。また終始御協力を頂きました京都大学附属病院放射線科野原弘基氏、同脳神経外科学教室武内重二講師、大塚信一学兄に深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Baker, PE, et al: Monoclonal cytolytic T-cell lines. *J Exp Med* **149**: 273-278, 1979.
- 2) Bevan MJ, et al: Cytotoxic effects of antigen- and mitogen-induced T cells on various targets. *J Immunol* **114**: 559-565, 1975.
- 3) Bloom EH, et al: Autologous glioma transplantation. *Lancet* **2**: 77-78, 1960.
- 4) Braeman, J, et al: Immunological studies in irradiation of lung cancer. *Ann Clin Res* **4**: 355-360, 1972.
- 5) Braeman J, et al: Radiotherapy and the immune response in cancer of the lung. *Br J Radiol* **46**: 446-449, 1973.
- 6) Civin CI, et al: Cell-mediated cytotoxic responses of spleen cells from mice bearing primary, chemically induced tumors. *J Immunol* **123**: 2250-2257, 1979.
- 7) Cohen A, et al: Estimation of the cellular lethal dose for the C3H mouse mammary carcinoma from radiosensitivity studied in vivo. *Nature* **185**: 262-263, 1960.
- 8) Cosenza H, et al: The third cell type required for the immune response of spleen cells in vitro. *J Immunol* **107**: 414-421, 1971.
- 9) Crile G Jr, et al: Role of preoperative irradiation in prolonging concomitant immunity and preventing metastasis in mice. *Cancer* **27**: 629-634, 1971.
- 10) Cudkowicz G, et al: Do natural killer cells engage in regulated reactions against self to ensure homeostasis? *Immunological Rev* **44**: 13-41, 1979.
- 11) Davies AJS, et al: The thymus and cellular basis of immunity. *Immunological Rev* **1**: 43-91, 1969.
- 12) Dennert G, et al: Cloned cell lines with natural killer activity. *J Exp Med* **153**: 545-556, 1981.
- 13) Evans R, et al: Mechanism of immunologically specific killing of tumor cells by macrophages. *Nature* **236**: 168-170, 1972.
- 14) Falkoff RM, et al: Evidence that Con A induces cytotoxicity in the same subclass of T cells as doses also immunization.
- 15) Foley EJ, et al: Antigenic properties of methylcholanthrene induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res* **13**: 835-837, 1953.
- 16) Francois DL, et al: Comparative effect of local radiotherapy and surgery on cell-mediated immunity against a mouse transplantable mammary tumor. *Int J Cancer* **13**: 629-639, 1974.
- 17) Gillis S, et al: T cell growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol* **120**: 2027-2032, 1978.
- 18) Gillis S, et al: Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines. *J Exp Med* **148**: 1093-1098, 1978.
- 19) Herberman RB, et al: Cell-mediated immunity to tumor cells. *Adv Cancer Res* **19**: 207-263, 1974.
- 20) Kasai M, et al: Direct evidence that natural killer cells in nonimmune spleen cell populations prevent tumor growth in vivo. *J Exp Med* **149**: 1260-1264, 1979.
- 21) Klein G, et al: Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autotransfused host. *Cancer Res* **20**: 1561-1572, 1960.
- 22) Kurnick JT, et al: Long term growth in vitro of human T cell blasts with maintenance of specificity and function. *J Immunol* **122**: 1255-1260, 1979.
- 23) Levy NL, et al: In vitro demonstration of cell-mediated immunity to human brain tumors. *Cancer Res* **32**: 477-482, 1972.
- 24) Lindenman J, et al: Viral oncolysis; Increased immunogenicity of host cell antigen associated with influenza virus. *J Exp Med* **126**: 93-108, 1967.
- 25) McCredie JA, et al: Effect of postoperative radiotherapy on peripheral blood lymphocytes in patients with carcinoma of the breast. *Cancer* **29**: 349-356, 1971.
- 26) Medawar PB, et al: Immunity to homologous grafted skin; Fate of skin homograft transplanted to brain, subcutaneous tissue and to anterior chamber of eye. *Brit J Exp Path* **29**: 58-69, 1948.
- 27) Minato N, et al: Mode of regulation of natural killer cell activity by Interferon. *J Exp Med* **152**: 124-137, 1980.
- 28) Morantz RA, et al: Macrophages in experimental and human brain tumors. Part 1: Studies of the macrophage content of experimental rat brain tumors of varying immunogenicity. *J Neurosurg* **50**: 298-304, 1979.
- 29) Morantz RA, et al: Macrophages in experimental and human brain tumors. Part 2: Studies of the macrophage content of human brain tumors. *J Neurosurg* **50**: 305-311, 1979.
- 30) Nagata N, et al: Subpopulation of T cells sensitive to natural thymocytotoxic autoantibody

- (NTA) of New Zealand Mice. I. Distinct expression of Thy-1 and NTA reactive antigens on functional T cell subsets. Submitted for publication.
- 31) Nakao S, et al: In vitro and in vivo demonstration of specific killer T lymphocytes to transplanted glioma. *Neurol Med Chir (Tokyo)* **18**: 393-400, 1978.
- 32) Parajpe MS, et al: Kinetics of the anti-tumor delayed hypersensitivity response in mice with progressively growing tumors: Stimulation followed by specific suppression. *Int J Cancer* **13**: 179-186, 1974.
- 33) Pfreundschuh M, et al: Serological analysis of cell surface antigens of malignant human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 5122-5126, 1978.
- 34) Pollack S, et al: Specific killing of tumor cells in vitro in the presence of normal lymphoid cells and sera from hosts immune to the tumor antigens. *Int J Cancer* **9**: 316-323, 1972.
- 35) Power WE, et al: Cellular radiosensitivity and tumor curability. *Nat Cancer Inst Monograph* **24**: 169-185, 1967.
- 36) Prager MD, et al: Method of modification of cancer cell to enhance their antigenicity. In: *Method in Cancer Research* 9. P 339 (New York: Academic Press)
- 37) Prehn RT, et al: Immunity to methylcholanthrene induced sarcomas. *J Nat Cancer Inst* **18**: 679-778, 1957.
- 38) Roseman J: X-ray resistant cell required for the induction of in vitro antibody formation. *Science* **165**: 1125-1127, 1969.
- 39) Rosenberg SA, et al: In vitro growth of murine T cells 1. Production of Factors necessary for T cell growth. *J Immunol* **121**: 1946-1950, 1978.
- 40) Rosenberg SA, et al: In vitro growth of murine T cells 2. Growth of in vitro sensitized cells cytotoxic for alloantigens. *J Immunol* **121**: 1951-1955, 1978.
- 41) Scheinberg LC, et al: Is the brain an "immunologically privileged site?" 2. Studies in induced host resistance to transplantable mouse glioma following irradiation of prior implants. *Arch Neurol* **13**: 283-286, 1965.
- 42) Sinclair WK: Cyclic X-ray responses in mammalian cells in vitro. *Relation Res* **33**: 620-643, 1968.
- 43) Stjernward J, 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.
- 44) Umegaki Y, et al: Immunopathologic aspects of radiation therapy. *Proc Int Conf Rad Biol Ther P* 183, 1967.
- 45) Vaage J: Influence of tumor antigen on maintenance versus depression of tumor-specific immunity. *Cancer Res* **33**: 493-503, 1973.
- 46) Watson J: Continuous proliferation of murine antigen-specific helper T lymphocytes in culture. *J Exp Med* **150**: 1510-1519, 1979.
- 47) Yamauchi K, et al: Differential activation of cytotoxic and suppressor T cells against syngeneic tumors in the mouse. *J Immunol* **123**: 1653-1658, 1979.