

免疫能からみた膵癌に対する術中照射療法の意義

和歌山県立医科大学消化器外科

山上 裕機 谷村 弘 角田 卓也
谷 眞至 岩橋 誠 井上 正也
川口 富司 東 芳典 青木 洋三

術中照射療法が免疫能に及ぼす影響, ことにNK およびLAK 活性の変動に関する報告は皆無である。総線量2,000~3,000cGyの分割外部照射を施行した6例(直腸癌3例, 食道癌2例, 胆管癌1例)を対照として, 3,000~3,500cGyの術中開創照射を施行した切除不能膵癌7例の免疫能を比較した結果, NK活性は, 分割照射では平均8%活性が低下するのに対し, 術中照射では照射後に7%も上昇した。また, LAK活性は, 分割照射では平均26%低下したが, 術中照射では軽度抑制されたにすぎなかった。IFN- γ によるキラー活性もむしろ術中照射後に9%の上昇を認めた。IAP値は術中照射では平均131 μ g/mlの上昇に対し, 分割照射では215 μ g/ml上昇した。しかし, PHA幼若化率はいずれも著変を認めず, OKT4/8比は他の免疫パラメーターとは反対の変動を示した。以上より, 1回大量照射法は開腹手術を施行しているにもかかわらず, 免疫反応を低下させず, むしろ回復させる方向に作用することが明らかとなった。

Key words: intraoperative radiation, unresectable pancreatic carcinoma, immunological parameter of the pancreas cancer, natural killer cell activity, lymphokine-activated killer cell activity

はじめに

膵癌は悪性腫瘍の中でも切除不能症例が多く, 依然として姑息的治療に終わってしまうのが現状である。集学的治療のひとつとして, 従来行われてきた分割外部放射線治療では免疫能が低下するのは明らかであり, natural killer (NK) 活性の低下^{1)~4)}, antibody dependent cellular cytotoxicityの低下⁴⁾, OKT4⁺およびOKT8⁺リンパ球の減少⁵⁾, インターフェロン(IFN)誘導キラー活性の低下⁶⁾などが報告されている。

しかし, ある特定の線量においては, 放射線照射により腫瘍細胞の膜表面抗原が変化することによる免疫能の増強効果も認められており⁷⁾⁸⁾, さらに放射線照射により腫瘍組織内に新たにリンパ球浸潤を認めたとする報告⁹⁾や abscopal effect¹⁰⁾なども確認されている。進行膵癌に対して術中開創照射を施行すれば, 生存期間の延長¹¹⁾, 照射局所の癌増殖の抑制¹²⁾, 除痛効果¹³⁾などの臨床効果が得られるとの報告は多数あるが, 一方,

免疫能に及ぼす術中照射の影響についてはほとんど明らかにされていない¹⁴⁾。今回, 進行膵癌に対して術中照射を施行し, その前後でNK活性, lymphokine-activated killer (LAK) 活性を含む種々の免疫学的パラメーターを測定し, 免疫能からみた術中照射療法の有用性を検討した。

対象と方法

膵癌取扱い規約¹⁵⁾によりVp₃・A₃などの理由で切除不能と判定し, かつ肝および腹膜転移を有さないStage IVの膵癌7例を対象とした。男女比は3:4, 平均年齢は68 \pm 9歳であった。電子線2門照射を施行し6,500cGyの線量となった1例を除き, 6例には12MeV, 3,000~3,500cGyの術中電子線1回照射を施行した。照射野は腫瘍の長径にほぼ一致する円形または五角形の金属tubulusを用い, 周囲臓器はミクリッガーゼ5~8枚にてtubulusの外へ圧排した。1回の照射時間は3分で終了した。これらの症例に対して麻酔導入前, 術中照射直前, 照射直後および術後3週間後の計4回, 30mlのヘパリン加静脈血を採血し, immunosuppressive acid protein(IAP), phytohemagglutinin (PHA)幼若化率, T細胞サブセット(T4/8)

<1989年10月11日受理>別刷請求先: 山上 裕機
〒640 和歌山市七番丁27 和歌山県立医科大学消化器外科

と、以下の免疫学的パラメーターを測定した。

対照は、総線量2,000~3,000cGyの分割外部照射を施行した直腸癌3例、食道癌2例、および肝門部胆管癌1例の消化器癌6例とした。男女比は5:1、平均年齢は55±13歳であった。分割外部照射開始直前と総線量照射終了直後の2回、同様に採血して免疫学的パラメーターを測定した。なお、術中照射群と分割外部照射群との年齢差にはt検定により有意差を認めなかった。

1. 単核球の分離法

静脈血をペニシリン(100IU/ml)、ストレプトマイシン(100μg/ml)、およびグルタミン(2mM)を加えたpH7.2~7.4のRPMI-1640(日本製薬)で2倍量に希釈後、20℃、400G、30分間のFicoll-Hypaque(Pharmacia, Uppsala, Sweden)比重遠沈法で単核球を分離し、RPMI-1640にて3回洗浄した後、以下の実験に供した。

2. NK活性の測定法

Fetal calf serum (FCS, GIBCO, Grand Island, New York, USA)が10%になるように加えたRPMI-1640に単核球を浮遊して効果細胞とした。標的細胞には、100μCi Na₂⁵¹CrO₄(第1ラジオアイソトープ研究所)で37℃、60分間処理した⁵¹Cr標識K562を用いた。効果細胞は15×10⁶/ml、標的細胞は1×10⁵/mlに調整後、丸底型マイクロタイタープレート(Corning, No. 25850)におおの100μl/wellずつ加えて4時間の⁵¹Cr遊離法を施行し、培養終了後の上清中の放射活性を測定した。自然遊離は効果細胞のかわりに10%FCS加RPMI-1640を100μl加えたものの、最大遊離は1NHClを100μl加えたものとし、%細胞障害率は以下の式で求めた。

$$\%細胞障害率 = \frac{実験遊離 - 自然遊離}{最大遊離 - 自然遊離}$$

なお、K562の自然遊離/最大遊離は10%以下であった。

3. LAK活性の測定法

単核球を56℃、30分間の処置で非働化した健常人のAB型血清を10%含むRPMI-1640にて1×10⁶/mlに調整した後、10単位/mlのヒトr-IL-2(塩野義製薬)を加えて4日間培養した。培養単核球を効果細胞、⁵¹Cr標識K562を標的細胞として効果細胞/標的細胞の比(E/T比)が15の条件下にて4時間⁵¹Cr遊離法でLAK活性を測定した。

4. IFN-γ誘導キラー活性の測定法

単核球を200単位/mlのヒトr-IFN-γ(協和発酵)と4日間混合培養し、培養単核球を効果細胞としてE/T比が15でK562に対するキラー活性を測定した。

5. LAK細胞およびIFN-γ誘導キラー細胞の細胞表面抗原の解析

IL-2またはIFN-γによる培養単核球の細胞表面抗原を免疫細胞融解法、すなわちNegative selection法にて解析した。培養単核球を1×10⁷/mlに調整し、抗ヒトリンパ球単クローン抗体である抗CD2, CD3, CD4, CD8, CD16およびLeu 7抗体(Beckton-Dickinson, California, USA)を最終濃度が1/10となるように加え、4℃で60分間反応させた後、1/8希釈した補体(Low-tox-M-rabbit complement, Cederlane, Ontario, Canada)を1×10⁷/mlあたり1ml加え、37℃、60分間培養した。抗体と補体による処置の後、K562を標的細胞としてキラー活性を測定した。%抑制率は以下の式により求めた。

$$\%抑制率 = 1 - \frac{抗体・補体処理時キラー活性}{補体単独時キラー活性}$$

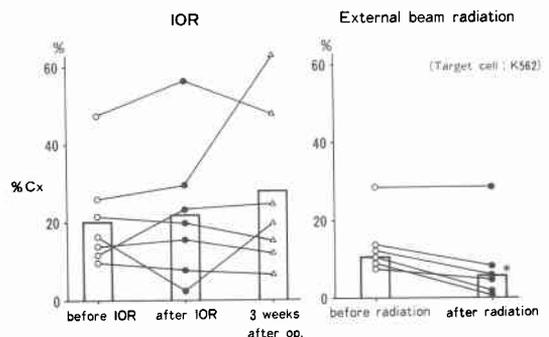
成 績

1. 照射前後のNK活性の変動

K562に対する新鮮単核球の細胞障害活性でNK活性とした。術中照射においては、麻酔前、照射前、照射後および術後3週目のNK活性は、それぞれ24.2±11.0, 21.1±4.7, 22.1±6.1および27.7±7.5%であり、手術および麻酔の影響は認めず、かつ術後3週目には高い活性を示した。一方、分割外部照射では照射前後で17.2±2.7から8.8±4.5%に活性が低下した(p<0.05, Mann-Whitney U検定)(Fig. 1)。

2. LAK活性の変動

Fig. 1 NK activity



After IOR, the NK activity increased 7% in spite of 8% decrease in external beam radiation (*p<0.05, by Mann-Whitney U test).

Fig. 2 LAK activity

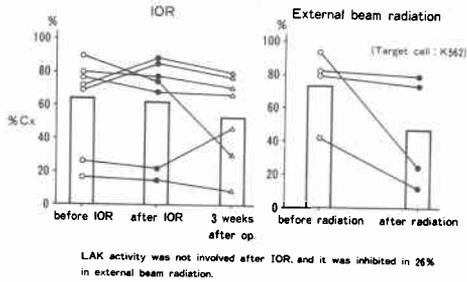
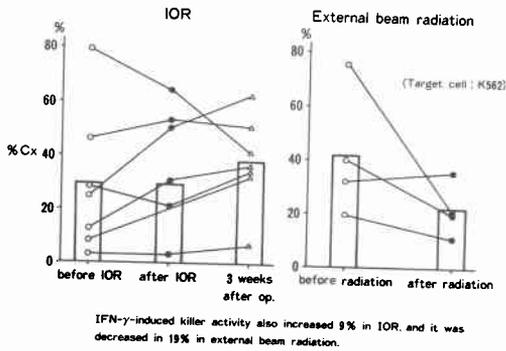


Fig. 3 IFN- γ -induced killer activity



IL-2と4日間混合培養した単核球のキラー活性は、麻酔前、術中照射前、照射後および術後3週目でそれぞれ66.7 \pm 12.9, 62.1 \pm 10.0, 61.6 \pm 10.7および54.1 \pm 9.4%と若干低下したにすぎなかったが、分割外部照射では74.4 \pm 8.2から48.2 \pm 12.1%と著しく低下した (Fig. 2).

3. IFN- γ 誘導キラー活性の変動

IFN- γ と4日間混合培養した単核球のキラー活性は、麻酔前、術中照射前、照射後および術後3週目でそれぞれ30.1 \pm 10.3, 28.9 \pm 9.3, 28.9 \pm 9.1および37.8 \pm 6.1%とキラー活性はむしろ上昇したのに対し、分割外部照射では、41.2 \pm 10.6から22.4 \pm 4.2%に低下した (Fig. 3).

4. 術中照射前後のキラー細胞表面抗原の解析

十分な細胞数が得られた2例でLAK細胞とIFN- γ 誘導キラー細胞の表面抗原を術中照射前後で解析した。症例5のLAK細胞は、照射前ではCD2, CD16陽性の活性化NK細胞とCD3, CD8陽性の細胞障害性T細胞であるのに対し、照射後では、キラー活性はほとんど変化しないにもかかわらず、細胞表面抗原はすべて陰性となった。症例6でも、CD2, CD8およびCD16のすべての抗原性が低下していた。

Table 1 Phenotype analyses of killer cells by IOR

(1) LAK cell

Case	In vitro treatment	% Reduction	
		before	after
5	C' + anti-CD2	57	0
	C' + anti-CD3	7	0
	C' + anti-CD8	15	0
	C' + anti-CD16	52	0
	C' + anti-Leu7	59	0
6	C' + anti-CD2	21	14
	C' + anti-CD3	0	5
	C' + anti-CD8	11	6
	C' + anti-CD16	51	23

(2) IFN- γ -induced killer cell

Case	In vitro treatment	% Reduction	
		before	after
5	C' + anti-CD2	29	84
	C' + anti-CD3	5	0
	C' + anti-CD8	7	16
	C' + anti-CD16	14	47
	C' + anti-Leu7	25	27
6	C' + anti-CD2	30	0
	C' + anti-CD3	17	4
	C' + anti-CD8	17	0
	C' + anti-CD16	82	59

Before IOR, LAK cells were composed of CD2⁺, CD16⁺-NK cell and CD3⁺, CD8⁺-cytotoxic T cell, and the phenotypic antigenicity of LAK cells was decreased after IOR, though the cytotoxic activity didn't alter after IOR. The alteration of IFN- γ -induced killer cell-phenotype was different between each case.

Fig. 4 IAP

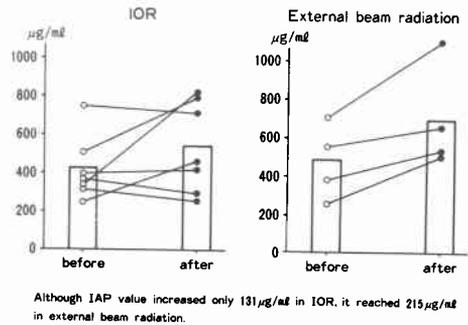
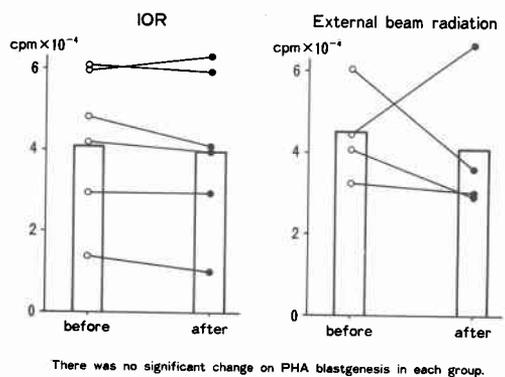


Fig. 5 PHA blastogenesis

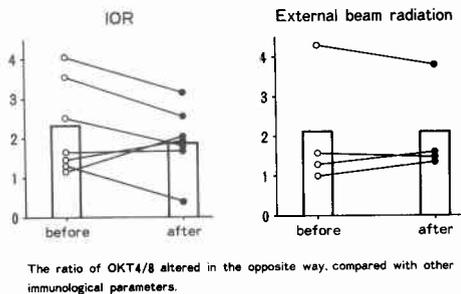


一方、IFN- γ 誘導キラー細胞は、症例5ではCD2が上昇しCD2強陽性NK細胞が照射後のキラー細胞の主体となり、症例6では反対にCD2陰性CD16陽性NK細胞が照射後に誘導されていた (Table 1).

5. IAPの変動

IAP値は、術中照射では421 \pm 57.4から552 \pm 84.9

Fig. 6 T4/8



$\mu\text{g/ml}$ と $131\mu\text{g/ml}$ の上昇にとどまったが、分割外部照射では 482 ± 87.0 から $697\pm 120\mu\text{g/ml}$ と $215\mu\text{g/ml}$ の上昇を認めた (Fig. 4)。

6. PHA 幼若化率の変動

PHA 幼若化率は、術中照射では $42,300\pm 6,660$ から $40,000\pm 7,200\text{cpm}$ に、分割外部照射では $44,000\pm 5,100$ から $41,100\pm 8,200\text{cpm}$ とほとんど変動しなかった (Fig. 5)。

7. T細胞サブセット (T4/8) の変動

T4/8は、術中照射前後では 2.3 ± 0.4 から 1.9 ± 0.3 に抑制されるのに対し、分割外部照射では 2.1 ± 0.7 から 2.1 ± 0.5 と全く変動しなかった (Fig. 6)。

考 察

切除不能膀胱癌に対する集学的治療のひとつとして術中照射が行われ、臨床効果については数多くの報告がある。たとえば Wood らは12か月生存率が IOR の併用で30%から80%に増加したと述べ¹¹⁾、Gunderson ら¹²⁾や Nishimura ら¹⁶⁾は腫瘍増殖の IOR による抑制効果を報告した。また、IOR により57~63%の症例で除痛効果が確認されている¹³⁾¹⁷⁾。しかし、一般には、放射線療法の副作用のひとつとして放射線照射により免疫能は低下するが、術中照射による免疫能の変動に関する詳細な報告はない。

今回、膀胱癌に対する術中照射前後で、NK, LAK 活性を含む種々の免疫能を測定したところ、分割外部照射に比較して免疫能の抑制が軽度であるという結論を得た。まず、NK 活性は諸家の報告^{1)~4)}と同様に、分割外部照射では抑制されたが術中照射においては活性がむしろ増強する傾向にあった。

照射野内を循環するリンパ球への放射線障害が免疫能低下の一因と考えられ¹⁸⁾、分割外部照射でも照射野が 50cm^2 以下と小さい場合は、線量の増加に伴い NK 活性は増強し、 100cm^2 以上の大照射野では、線量の増

加に伴い NK 活性は抑制されるとの成績¹⁹⁾があり、術中照射では比較的小さな照射野で施行されることも NK 活性が抑制されなかった原因と考えられる。

つぎに、放射線治療ではリンホカインの産生が抑制され²⁰⁾、リンホカインに対する反応性も抑制されると考えられるので、照射前後における LAK 活性を測定したところ、分割外部照射では著しく活性が低下したが、術中照射では軽度の抑制に留まった。

また、IFN 誘導キラー活性は $5,000\sim 8,000\text{cGy}$ の分割外部照射を受けた子宮内膜癌症例で低下すると成績があり⁶⁾、われわれの結果と一致している。しかるに、術中照射症例では照射後で IFN- γ 誘導キラー活性がわずかながら増強した。すなわち、術中照射では IL-2 や IFN- γ などのリンホカインに対する反応性が保持されていることが明らかになった。

この機序を明らかにするために、術中照射前後の LAK 細胞と IFN- γ 誘導キラー細胞の細胞表面抗原を解析したところ、LAK 細胞では、そのキラー活性の主体を成す NK 細胞分画とキラー活性の一部を成す細胞障害性 T 細胞²¹⁾ともに、照射後には抑制されており、他の細胞がキラー活性を担うようになると考えられる。同様に、IFN- γ 誘導キラー細胞は術中照射後で CD2陽性 CD3陰性の未熟 T 細胞がキラー活性を担うようになった。しかし、これらのキラー細胞の変動は、おのおののリンパ球の放射線感受性を考慮に入れて、今後、症例を重ねて解析する必要がある。

以前より免疫能の指標としてリンパ球数があるが、今回の術中照射前後では $1,650\pm 440$ 、 $1,520\pm 580/\text{mm}^3$ 、分割外部照射前後では $1,780\pm 510$ 、 $1,610\pm 490/\text{mm}^3$ といずれも軽度に低下したが、有意差は認めなかったが、T細胞サブセットは他の免疫学的パラメーターとは反対の変動を示し、術中照射で低下する傾向にあった。放射線療法で OKT4陽性、OKT8陽性 T 細胞ともに低下する報告があるが⁹⁾、これらの T 細胞サブセットの検討は単にリンパ球の数と比率の問題に過ぎず、リンパ球の機能を表すものではないと考えられた。今回われわれが測定した T 細胞サブセット以外の免疫学的パラメーターはすべてリンパ球の機能を反映するものであることから、T 細胞サブセットと放射線照射とは相関しなかったと考えたい。

要するに、術中照射療法には少なくとも免疫応答を低下させない何らかの機構が関与していることが示唆された。

本論文の要旨は、第33回日本消化器外科学会総会 (1989

年)にて発表した。

文 献

- 1) 根住直史, 小西淳二, 御前 隆ほか: 放射線療法による悪性腫瘍患者免疫関与細胞の変動について. 日医放線会誌 43: 1415—1425, 1983
- 2) 松本博城: ヒト natural killer cell activity (NK 活性) の基礎的及び臨床的研究. 日癌治療会誌 20: 571—583, 1985
- 3) Pierce GF, Polmar SH, Schacter BZ et al: Natural cytotoxicity in immunodeficiency diseases: Preservation of natural killer activity and the in vivo appearance of radioresistant killing. Hum Immunol 15: 5—96, 1986
- 4) Satam MN, Suraiya JN, Nadkarni JJ: Natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxicity in cervical carcinoma patients. Cancer Immunol Immunother 23: 56—59, 1986
- 5) Onsrud M, Grahm I, Gaudernack G: Early stage carcinoma of the uterine cervix. Effects of intracavitary radium treatment on lymphoid cells in blood and pelvic lymph nodes. Acta Radiol Oncol 25: 127—130, 1986
- 6) Mandeville R, Sidrac-Ghali, Ajdukovic Iva et al: Early inhibition of natural and interferon-activated killers in endometrial cancer patients treated with local radiotherapy. Cancer Detect Prev 10: 129—139, 1987
- 7) Yata J, Klein G, Hewetson J et al: Effect of metabolic inhibitors on membrane immunofluorescence reactivity of established Burkitt lymphoma cell lines. Int J Cancer 5: 394—403, 1970
- 8) 坂本澄彦, 宮本美彌子: 低線量全身照射による腫瘍効果の増強. Oncologia 20: 86—88, 1987
- 9) 今中一文: 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—. 日医放線会誌 43: 355—369, 1983
- 10) Kingsley DPE: An interesting case of possible abscopal effect in malignant melanoma. Br J Radiol 48: 863—866, 1975
- 11) Wood WC, Shipley WU, Gunderson LL et al: Intraoperative irradiation for unresectable pancreatic carcinoma. Cancer 49: 1272—1275, 1982
- 12) Gunderson LL, Martin JK, Kvoles LK et al: Intraoperative and external beam irradiation ± 5-FU for locally advanced pancreatic cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys 13: 319—329, 1987
- 13) 池田由弘, 松野正紀, 小寺太郎ほか: 膵癌に対する術中照射療法の効果—疼痛に対する効果を中心として—. 日消外会誌 19: 942—947, 1986
- 14) 御厨修一, 斎藤 勉, 松本恵一ほか: 術中照射法, 柄川 順編. 癌・放射線療法. 癌の臨床別冊, 新編. 篠原出版, 東京, 1978p133—136
- 15) 日本膵臓学会編: 膵癌取り扱い規約. 金原出版, 東京, 1986
- 16) Nishimura A, Otsu H, Itoh I et al: Prognostic significance of pancreatic tumor regression after intraoperative radiotherapy. Strahlenther Oncol 163: 350—356, 1987
- 17) 真辺忠夫, 永井利博, 戸部隆吉ほか: 膵癌に対する術中照射法. 日癌治療会誌 20: 776—783, 1985
- 18) Raben M, Walach N, Galili U et al: The effect of radiation therapy on lymphocyte subpopulations in cancer patients. Cancer 37: 1417—1421, 1976
- 19) 尾形 均, 三好武美, 伊丹 純ほか: 多変量解析を用いた頭頸部癌患者の NK 活性に及ぼす諸因子の検討. 日癌治療会誌 24: 592—600, 1989
- 20) Manori I, Kushelevsky A: Effect of radiation on the production of interleukins and T-lymphocyte activities. J Natl Cancer Inst 74: 1215—1221, 1985
- 21) 角田卓也, 谷村 弘, 山上裕機ほか: Interleukin-2 と Interferon- γ 併用による胃癌患者脾細胞のキラー活性増強効果について. Biotherapy 3: 95—98, 1989

Effect of Intraoperative Radiation Therapy for Pancreatic Cancer on Immunological Parameters

Hiroki Yamaue, Hiroshi Tanimura, Takuya Tsunoda, Masaji Tani, Makoto Iwahashi, Masaya Inoue,
Tomiji Kawaguchi, Yoshinori Azuma and Yozo Aoki

Department of Gastroenterological Surgery, Wakayama Medical College

This study is the first one that clarifies the effect of intraoperative radiation (IOR) therapy on the immunological parameters, including NK and LAK cell activity of inoperable pancreatic cancer patients treated with 3000~3500 cGy-IOR, compared with that of cancer patients treated with 2000~3000 cGy-external beam radiation. After IOR, the NK activity increased 7% in spite of an 8% decrease after external beam radiation. LAK activity was not involved after IOR, and it was inhibited in 26% by external beam radiation. IFN- γ -induced killer

activity also increased 9% after IOR. Although the immunosuppressive acid protein (IAP) value increased only to 131 $\mu\text{g}/\text{ml}$ after IOR, it reached 215 $\mu\text{g}/\text{ml}$ after external beam radiation. There was no significant change in PHA blastogenesis in either group. The ratio of OKT4/8 was altered in the opposite way. Thus, there might be an immunological system to stabilize immunity in IOR.

Reprint requests: Hiroki Yamaue Department of Gastroenterological Surgery, Wakayama Medical College
27 Shichibancho, Wakayama, 640 JAPAN
