

原 著

## 頭頸部放射線療法の好中球貪食機能に及ぼす 影響に関する研究

富 田 真 一\*

### A Study of the Effect of Radiation Therapy in Head and Neck Region on Phagocytic Activity of Polymorphonuclear Leukocytes

Shinichi Tomita

(平成3年12月13日受付)

#### 緒 言

放射線療法は、形態や機能を損なわず、高い腫瘍制御効果を期待できることから、今日では悪性腫瘍患者の治療において欠くことのできない治療法となっている。なかでも、頭頸部悪性腫瘍患者の治療においては、容貌の保存性や咀嚼や嚥下機能の維持性に優れ、Quality of Life の立場から、放射線療法の重要性がますます認識されてきている。

このように、放射線は生体に対し物理的損傷を与えず腫瘍細胞を破壊できる反面、生物学的にはさまざまな障害作用を示し、特に増殖の盛んな造血組織に対する障害は古くからよく知られている。

従来より放射線療法が免疫系へ及ぼす影響は、放射線感受性が高く、特異的免疫に中心的な役割を果たすリンパ球で最もよく研究されてきた<sup>1-5)</sup>。これに対して、初期の非特異的免疫に関与する好中球については、成熟細胞が放射線耐性を示す<sup>6,7)</sup>こともあって、広範囲に造血組織をその照射野内に含む局所放射線療法<sup>8)</sup>や全身照射<sup>9-11)</sup>以外ではほとんど報告されていない。

しかしながら、近年リンパ球やマクロファージが産生するサイトカインや造血因子が好中球機能活性化作用を示すという報告<sup>12-15)</sup>や好中球に由来するリンパ

球活性化因子の存在<sup>16)</sup>、さらに好中球がリンパ球やマクロファージの機能を制御していること<sup>17,18)</sup>が報告されるに至り、好中球はリンパ球、マクロファージといった免疫応答細胞と密接な関連性を持って機能していることが明らかにされつつある。このような背景から、免疫抑制状態にある悪性腫瘍患者<sup>5,19,20)</sup>やその免疫系が修飾されると考えられる放射線療法後の患者<sup>2,21,22)</sup>では、好中球機能に様々な変化が起こっている可能性が推測され、実際、悪性腫瘍患者の好中球機能に変化を認めた報告<sup>23-25)</sup>も散見される。それ故、担癌状態および放射線療法後の好中球機能変化を明らかにすることは悪性腫瘍患者の治療に際し重要であると考えられる。

貪食作用は1884年、Metchnikoff によって、はじめて食細胞による真菌の食菌現象が観察されて以来<sup>26)</sup>、感染防御因子の1つとして広く認識されてきた。この貪食作用を示す血液中の食細胞には、多形核白血球 (polymorphonuclear leukocyte, PMN) と単球 (monocyte) の二種類が知られ、骨髄の血液幹細胞に由来する。このうち多形核白血球は、細胞質内顆粒の染色性から好中球、好酸球、好塩基球に分類されているが、そのほとんど大部分を構成する好中球は、細菌、真菌や異物等の生体への侵入に対する初期の生体防御において主要な役割を担っている。

この好中球の貪食機能測定法については、従来よりさまざまな方法が開発されているが、従来の測定法はいずれも *in vivo* とはかなり異なる条件下で貪食現象をみているという欠点があった。近年、この欠点を改善し、より *in vivo* に近い好中球の貪食活性が観察できる貪食プラーク法<sup>27)</sup> (図1) が、関らによって開発

\* 広島大学歯学部歯科放射線学講座 (主任: 和田卓郎教授) 本論文の要旨は平成2年6月の第23回広島大学歯学会総会、平成3年8月の第16回中国地区放射線影響研究会および平成3年10月の第32回日本歯科放射線学会総会において発表した。

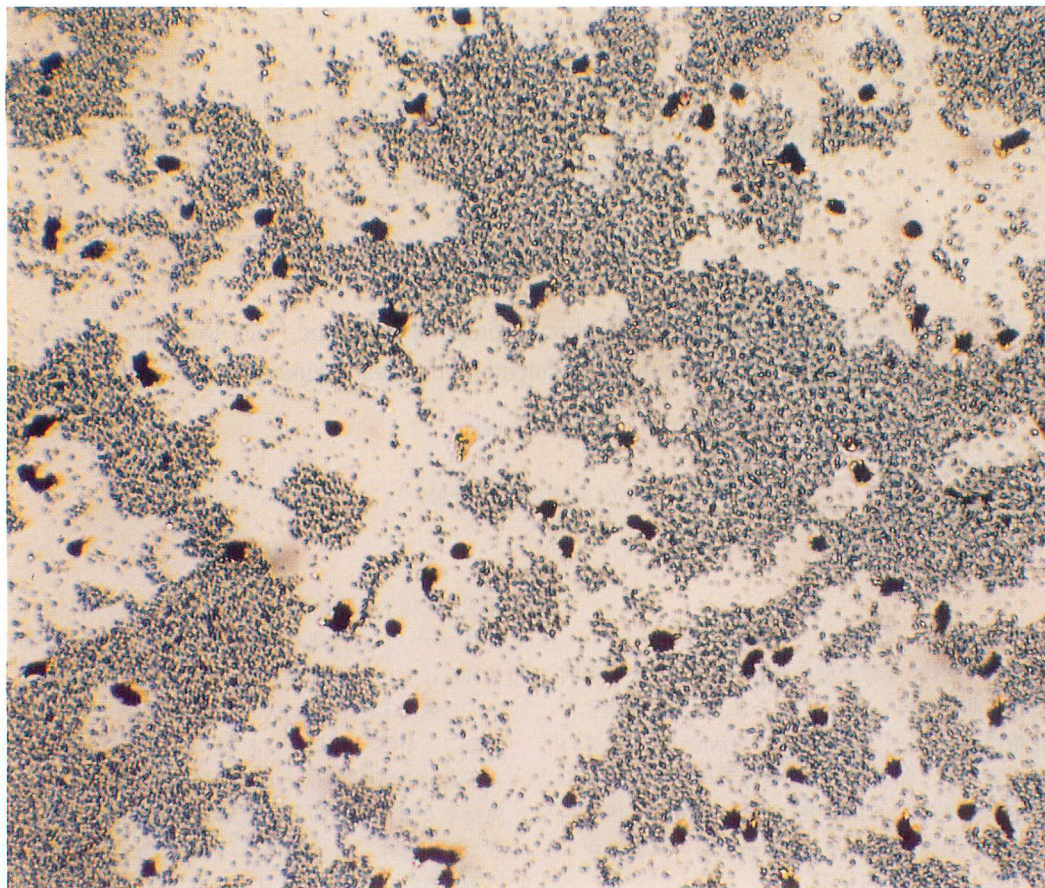


図1 貪食プラーク像。

白くぬけた部分は貪食プラーク，黒く染まる円形から卵円形の細胞は好中球を示す。直接倍率(×150)

されたが定性的観察の域を出ず，未だ定量化は試みられていない。

そこで，本研究では，この貪食機能をより明確に測定するため，貪食プラーク法を画像処理システムを用いて定量化し，頭頸部悪性腫瘍患者について，担癌状態における好中球貪食活性の状態を検討し，さらに放射線療法によって好中球貪食活性がどのように修飾されるかという点に着目し検討を行った。

### 材料ならびに方法

#### 1. 使用菌株

使用菌株として，本学歯学部口腔細菌学講座より供与をうけた *Staphylococcus aureus* Cowan I (ATCC 12598) 株を用いた。

本菌の保存は，Trypticase-soy Broth (Beckton Dickinson and Co., Cockeysville, MD) 斜面培地に接種し 4°C にて冷蔵保存を行い，約1.5ヵ月毎に凍結保存し

たものと交換した。

#### 2. 培養条件および菌懸濁液の調製

培地は Trypticase-soy Broth を用い，37°C で一夜 (12~18 hrs) 静置培養を行った。

培養後，遠心 (14,000×g, 5分, 4°C) 操作により集菌した。10 mM リン酸塩緩衝生理食塩水 (pH 7.4, 以下 PBS と略す) にて洗浄後同様の操作を2回繰り返し，最終の遠心沈査を PBS に懸濁させた。細菌数は，その指標として菌液の濁度 (optical density, 以下 O.D. と略す，φ12 mm 660 nm) を用い，分光光度計 (100-10型，日立製作所，東京) にて O.D.<sub>660</sub> = 1.0 (菌濃度は約 10<sup>9</sup> CFU/ml) となるように調製した。

#### 3. ヒト好中球および血漿の調製

健康成人および頭頸部悪性腫瘍患者の肘静脈より採取したヘパリン加末梢血 5 ml を，mono-poly resolving



medium (Flow Laboratories., Scotland) 3 ml 上に重層した後、遠心 (300×g, 20°C, 30分) し好中球と血漿を分離した。好中球は PBS にて2回洗浄後、その沈査 (PMNs 95%以上) を0.1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS に浮遊させ、好中球懸濁液を作製した。血漿は PBS にて3倍に希釈し実験に用いた。

#### 4. 血球数 (好中球, リンパ球, 単球) の算定

血球数の算定は、患者より採血した血液の一部を用いた。血液中の総白血球数を白血球計算用チュルク液 (ナカライテスク社, 京都) を用いて血球算定板にて求め、次いで同血液の塗抹標本を Giemsa 染色し白血球百分率を得た後、1 mm<sup>3</sup> 当りの好中球数, リンパ球数および単球数を算出した。

#### 5. 好中球貪食活性の測定

##### 1) 貪食活性試験

好中球貪食活性試験は、関らの方法 (貪食プラーク

法)<sup>27)</sup> に準じて行った。すなわち、2枚の組織培養用プラスチックディッシュ (FALCON 3002 φ60 mm) に細菌懸濁液 2 ml を添加し、室温にて1時間放置し、菌を底面に付着させ上清を吸引除去し PBS にて2回洗浄した後、一方には PBS を、他方には3倍希釈の自己血漿を添加し、30分間室温にて静置した。その後、上清を吸引し 2 ml の好中球懸濁液を添加し、一定温度にて反応させた。

反応終了後、上清を吸引除去し PBS にて2回洗浄した後5%グルタルアルデヒドにて固定、ギムザ染色して試料を作製し測定に用いた。

##### 2) 貪食プラーク法の定量化

作製した試料の光学顕微鏡画像を、TV カメラ (SONY 社製 M3A) に取り込み、その出力像を A/D コンバータを介して高速画像処理装置 (柏木研究所製 NEXUS 6400) に入力した。入力画像を、高解像度ディスプレイ上 (拡大率は約280倍) で観察しながら、マイクロコンピュータ (NEC 社製 PC-9801 VM) の



図2 貪食プラークの画像解析像。  
好中球1個によって形成されたプラークの面積 (貪食面積) を画像解析により求めた。

表1 頭頸部悪性腫瘍患者39症例の腫瘍発生部位, 病期, 組織型および分化度の内訳

発生部位		病 期		組 織 型		分化度 (扁平上皮癌)	
舌	18例	I 期	12例	疣贅状癌	1例	高分化型	9例
歯肉	7例	II 期	13例	扁平上皮癌	38例	中等分化型	23例
口底	7例	III 期	3例			低分化型	3例
口唇	1例	IV 期	11例			不明	3例
口蓋	3例						
上顎洞	3例						

制御下に画像処理を行った。すなわち、ディスプレイの画像上で、視覚的に最も貪食プラークの輪郭に一致する点で画像の閾値設定を行うことにより、画像は二値画像としてコントラストが強調され、好中球が細菌を貪食した領域と細菌が付着している領域を高解像度ディスプレイ上に描出することができた。さらに、ノイズ処理、貪食プラーク内部の塗りつぶし処理等の操作を施行後、輪郭内(貪食プラークから好中球を除いた領域)の面積を測定した(図2)。

3) 貪食プラーク法の特性的検討および条件の決定  
貪食プラーク法における好中球貪食活性は、細菌の付着したプラスチックディッシュ上に形成された貪食プラークの数(以下プラーク数と称す)と面積(以下貪食面積と称す)を指標とした。プラーク数は、顕微鏡下60倍にて3視野のプラーク数の平均値として観察した。貪食面積は、50個以上の貪食プラークの面積を測定し、その平均値として求めた。ただし、貪食プラークが融合していると考えられる好中球が2個以上存在する貪食プラークおよび好中球の存在しない貪食プラークは、貪食面積測定から除外した。

貪食プラーク法の検討は、測定系の再現性としてプラスチックディッシュに付着する細菌数の安定性、同一試料測定時の再現性を、本測定系の特性として貪食反応時のpH、温度、時間および血漿処理効果について検討し、最適な測定条件を決定した。

## 6. 健康成人の貪食活性測定

23歳~58歳(平均年齢32.8歳)の健康成人25名(男性20名, 女性5名)についてプラーク数および貪食面積の測定を行い対照値とした。さらに、性および年齢と貪食活性との関連性についても検討した。

## 7. 頭頸部悪性腫瘍患者の貪食活性測定

### 1) 頭頸部悪性腫瘍患者における好中球貪食活性の検討

広島大学歯学部附属病院(歯科放射線科, 口腔外科)および広島大学医学部附属病院(放射線科)を受診し, 入院加療, あるいは放射線療法予定の34~89歳

(平均年齢61.4歳)の頭頸部悪性腫瘍患者39名(男性26名, 女性13名)を対象とした。これらの症例は, 全例組織学的に確定診断されており, 腫瘍発生部位, 病期(UICC分類), 組織型, 分化度は表1に示した通りである。

これらの患者のうち, 採血時すでに制癌剤が投与されていた症例は19例, 全く治療を受けていない未治療症例は20例であった。投与された制癌剤の種類(投薬量)は Tegafur (~7800 mg), 5-Fluorouracil (~250 mg), Cisplatin (~110 mg), Peplomycin (~100 mg)で, それぞれ単独あるいは併用されていた。そこで, まず制癌剤投与による好中球貪食活性への影響について検討し, 次いで, 発生部位, 組織型, 分化度について検討した。

### 2) 放射線療法による好中球貪食活性への影響の検討

頭頸部悪性腫瘍患者39名中, 放射線療法後経過観察しえた27名を対象とした。これらの症例に対して行われた放射線療法の術式は, 表2に, 採血時期は図3に示したとおりである。ただし, 図に示した採血時期④については, 長期経過観察できた経過良好症例9例について検討した。

これらの症例において, 放射線療法前後および治療後1カ月, 4~12カ月における好中球数, リンパ球数, 単球数および好中球貪食活性の変化について検討した。

表2 放射線療法の様式

外照射	19例	
	(線源: 6 MeV 電子線, 4~10 MeV X線)	
平均照射線量		
単独症例	9例	49.1 Gy
外科療法併用症例	10例	35.2 Gy
外照射・組織内照射併用	2例	
	(線源: 4 MeV X線, Ra 針)	
平均照射線量		80.2 Gy
組織内照射	6例 (線源: Ra 針, Ir ワイヤ)	
平均照射線量		66.6 Gy

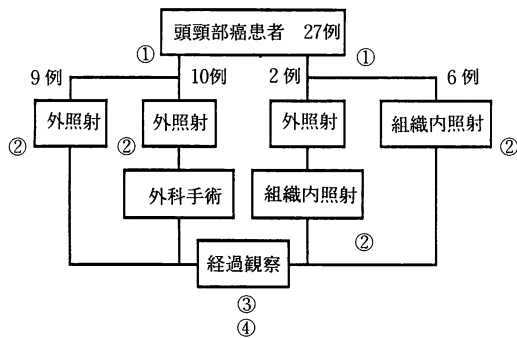


図3 採血時期。

放射線療法前①，放射線療法終了直後②，放射線療法（あるいは外科手術）終了後1カ月③，治療終了後4～12カ月④に採血を行った。

## 8. 有意差の検定

統計学的検討については，Student *t*-test, Welch *t*-test, 相関係数の有意差検定法および Paired *t*-test を用い，危険率5%を有意水準とし判定した。

## 結 果

### 1. 貪食プラーク法の特性の検討および条件の決定

#### 1) プラスチックディッシュに付着する細菌数の安定性

菌を付着させ，血漿未処理および血漿処理後直ちに，固定，染色したディッシュを顕微鏡下1,500倍にて  $100 \mu\text{m}^2$  に付着した細菌数を3視野について計測し，その平均値をプラスチックディッシュに付着する細菌数とした。その結果，血漿未処理 ( $n=21$ ) では  $54.1 \pm 3.4$  (平均値±標準偏差)，血漿処理 ( $n=10$ ) で

は  $53.1 \pm 3.6$  で両者間に有意な差はみられなかった。

#### 2) 画像解析システムの再現性

同一試料(好中球濃度  $1.0 \times 10^4/\text{ml}$ ，反応時 pH 7.4，反応温度  $37^\circ\text{C}$ ，反応時間30分，血漿未処理)を顕微鏡下および画像解析システムにて10回測定した場合，プラーク数の変動係数は0.15，貪食面積の変動係数は0.05であった。ただし，変動係数は標準偏差/平均値として求めた。

#### 3) 好中球懸濁液 pH の影響

好中球貪食活性に及ぼす好中球懸濁液 pH の影響を好中球懸濁液濃度  $1.0 \times 10^4/\text{ml}$ ，反応温度  $37^\circ\text{C}$ ，反応時間30分，血漿未処理の条件下で検討した。その結果，プラーク数は pH 8.0 で，貪食面積は pH 7.4 で最大値を示した(図4)。

#### 4) 反応温度および時間の影響

好中球貪食活性に及ぼす反応温度の影響を4，20および  $37^\circ\text{C}$  について好中球濃度  $1.0 \times 10^4/\text{ml}$ ，反応時間15～120分，血漿未処理の条件下で検討した。その結果，反応温度  $4^\circ\text{C}$  ではすべての反応時間で，反応温度  $20^\circ\text{C}$  では反応時間30分まで，貪食プラークの形成はみられなかった。反応温度  $37^\circ\text{C}$  では反応時間当初より貪食プラークの形成がみられ，プラーク数は時間経過とともに増加し，反応時間30分以降で，貪食面積は反応時間90分以降でプラトーに達した(図5)。

#### 5) 血漿処理の影響

好中球貪食活性に及ぼす血漿処理(オプソニン化)効果について好中球濃度  $1.0 \times 10^4/\text{ml}$ ，反応時 pH 7.4，反応温度  $37^\circ\text{C}$ ，反応時間15～120分の条件下で検討した。

プラーク数は血漿未処理に比較し，血漿処理ではす

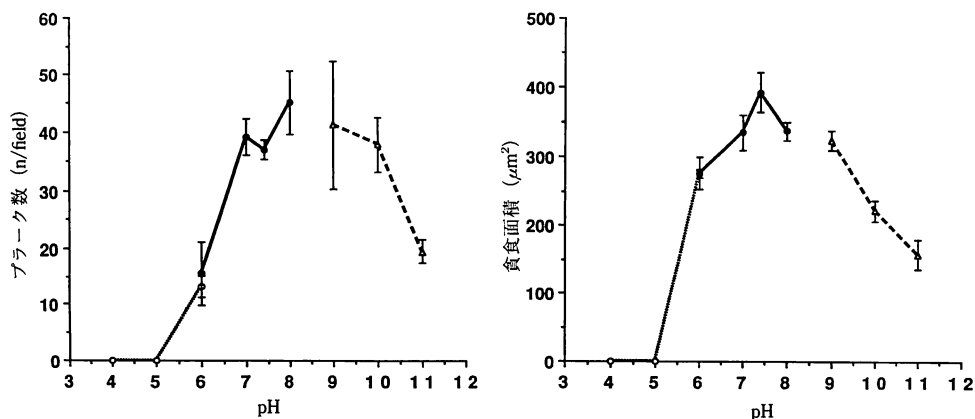


図4 プラーク数および貪食面積に及ぼす pH の影響。

○—○—○— : クエン酸-リン酸二ナトリウム緩衝液  
 ●—●—●— : リン酸緩衝液  
 □- - -□- - : グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液

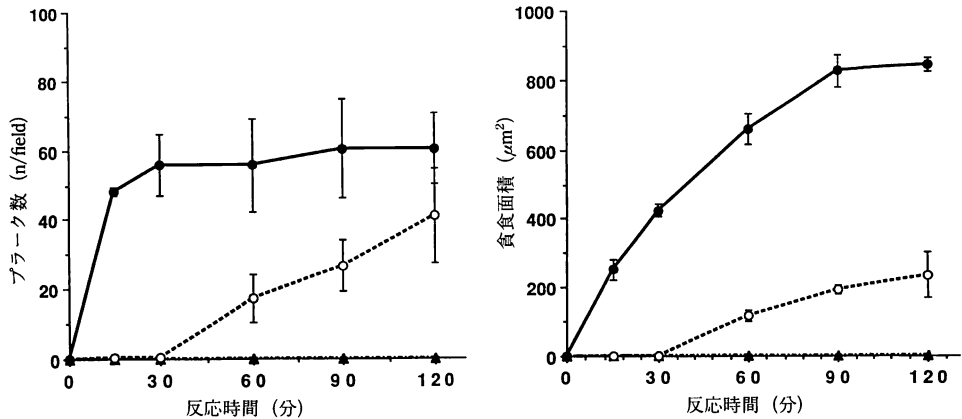


図5 プラーク数および食食面積に及ぼす温度の影響.

-▲- : 4°C  
 -○- : 20°C  
 -●- : 37°C

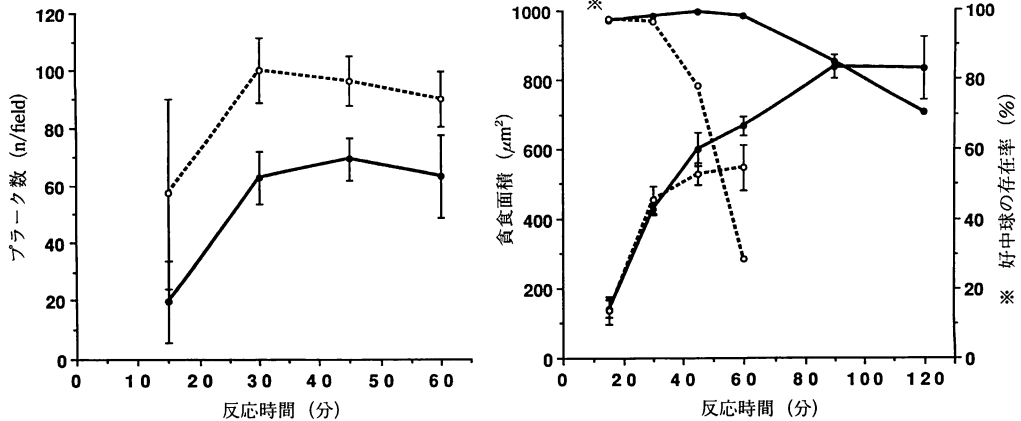


図6 プラーク数および食食面積に及ぼす血漿処理の影響.

-●- : 血漿未処理  
 -○- : 血漿処理

べての反応時間で高値を示したが、両者ともに反応時間30分以降ではほぼ一定値をとった。一方、食食面積は時間経過とともに増加したが、反応時間が30分を越えると、血漿処理では血漿未処理に比し低値を示し、これと時期を同じくして血漿処理では好中球の存在しないプラークが時間経過とともに著しく増加した(図6)。

以上の結果から、測定条件を好中球濃度  $1.0 \times 10^4$  /ml, 反応時 pH7.4, 反応温度 37°C, 反応時間30分に決定し、以後この条件を用いて健康成人および頸頭部悪性腫瘍患者の食食活性を検討した。

## 2. 健康成人における好中球食食活性

健康成人におけるプラーク数の平均は血漿未処理・

処理でそれぞれ 46.77 n/field および 75.26 n/field, 食食面積の平均は血漿未処理・処理でそれぞれ 442.82  $\mu\text{m}^2$  および 492.81  $\mu\text{m}^2$  であった。

性差および加齢の食食活性への影響は、血漿未処理・処理ともにみられなかった。図には血漿未処理における加齢の影響について示した(図7)。

また、健康成人の食食活性における血漿処理の影響について検討した。その結果、プラーク数、食食面積ともに、血漿処理の方が血漿未処理に比べ高値を示す傾向がみられたが、血漿処理の影響はプラーク数では認められず、食食面積でのみ認められた(相関係数  $r=0.89$ ,  $p<0.01$ ) (図8)。

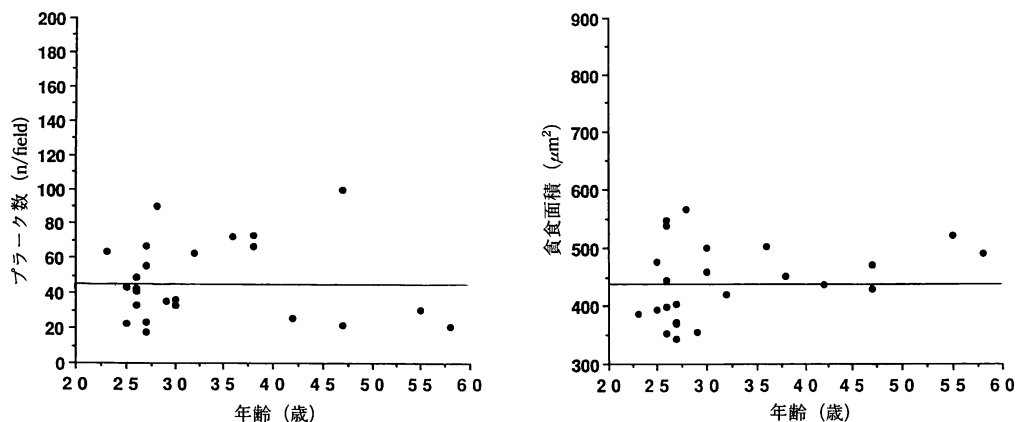


図7 プラーク数および食食面積に及ぼす加齢の影響 (血漿未処理).  
 ——— は平均値を示す.

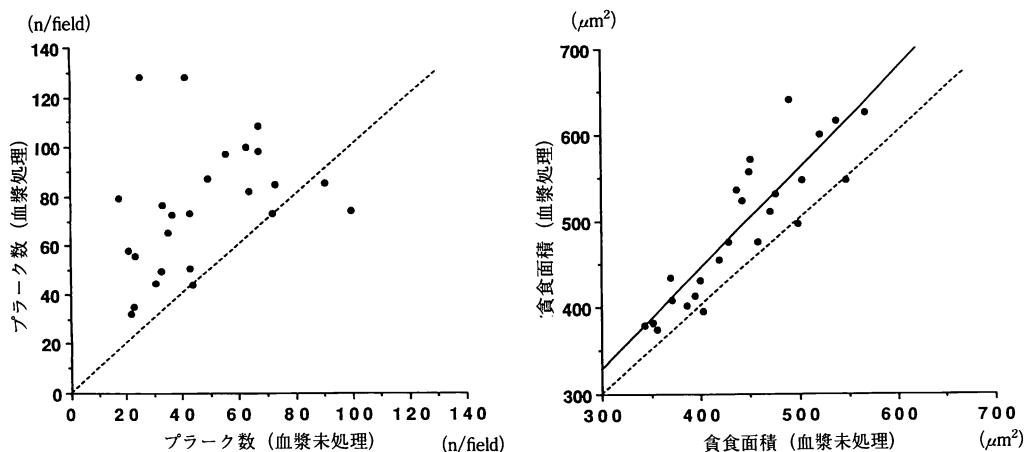


図8 プラーク数および食食面積における血漿未処理と血漿処理の関係.  
 ——— : 回帰直線  
 - - - - - : 血漿未処理と血漿処理が一致する仮想直線

### 3. 頭頸部悪性腫瘍患者における好中球食食活性

#### 1) 頭頸部悪性腫瘍未治療症例における好中球食食活性

未治療症例20例において、プラーク数については対照と未治療症例間で差は認められなかったが、食食面積では対照の健康成人と比較し未治療症例で有意に高値を示した ( $p < 0.01$ ) (図9)。

#### 2) 制癌剤投与症例における好中球食食活性

放射線療法前の患者では、制癌剤を投与されている場合が多いため、頭頸部悪性腫瘍患者を未治療症例と制癌剤投与症例にわけ、制癌剤の好中球食食活性に及ぼす影響について検討した。プラーク数については、血漿未処理で対照との間に有意の差 ( $p < 0.05$ ) がみ

られ、食食面積については、血漿未処理・処理とも対照と比較し有意の高値を示した ( $p < 0.01$ )。また、プラーク数および食食面積はともに、未治療症例と制癌剤投与症例間で差は認められなかった (図9)。

#### 3) 頭頸部悪性腫瘍患者の病期分類、分化度および発生部位と好中球食食活性の関係

病期 (Stage)、分化度については、好中球食食活性との関連性はみられなかった (図10, 図11)。発生部位別にみると、プラーク数では差がみられなかったものの、食食面積では、血漿未処理では、舌癌、歯肉癌で口底癌と比較し有意に高値を示し ( $p < 0.05$ ) (図12)、血漿処理では、歯肉癌のみが口底癌に比べ有意に亢進 ( $p < 0.05$ ) していた。

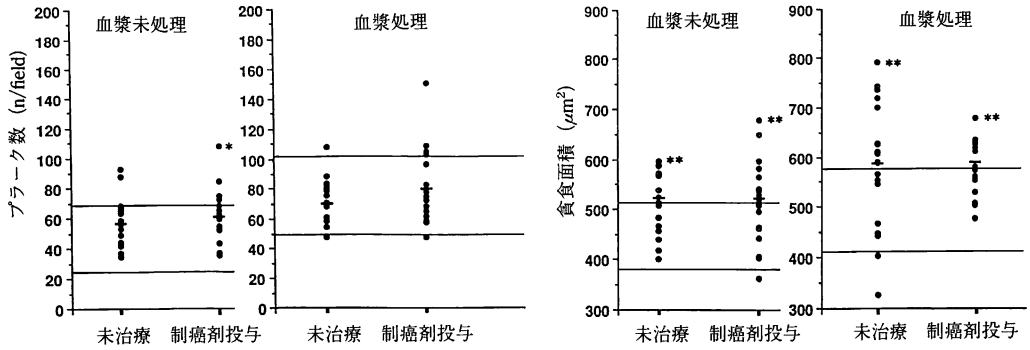


図9 頭頸部悪性腫瘍患者における食食活性。  
健康成人と比較し頭頸部悪性腫瘍患者では、食食面積の亢進がみられるが未治療症例と制癌剤投与症例間では差はみられない (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ )。ただし、2本の平行線は、対照における平均値 ± 標準偏差の範囲を示す。

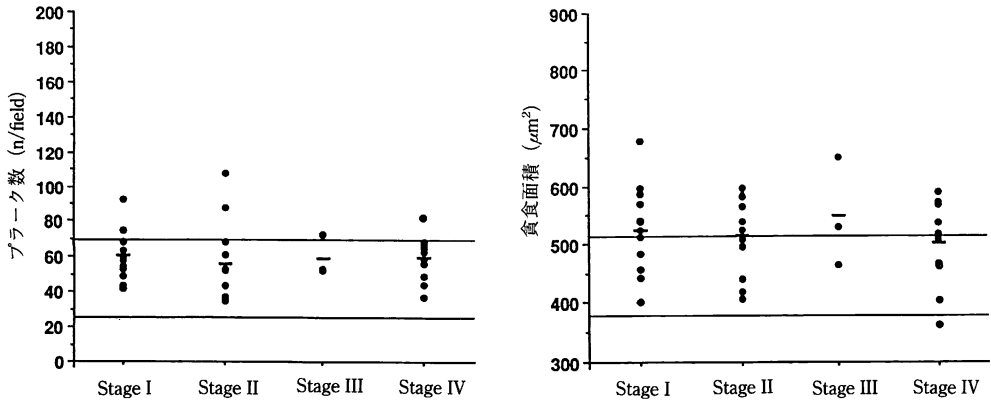


図10 食食活性と病期との関係 (血漿未処理)。  
ただし、2本の平行線は、対照における平均値 ± 標準偏差の範囲を示す。

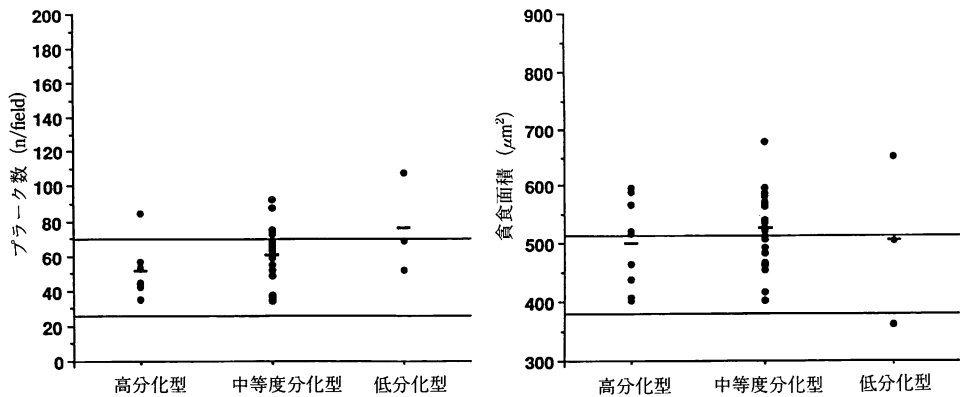


図11 食食活性と扁平上皮癌の分化度との関係 (血漿未処理)。  
ただし、2本の平行線は、対照における平均値 ± 標準偏差の範囲を示す。



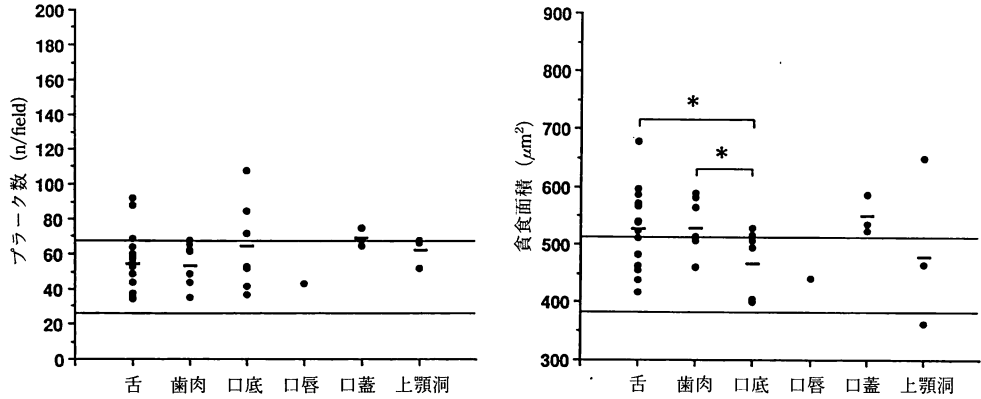


図12 食食活性と腫瘍発生部位との関係 (血漿未処理).  
舌癌・歯肉癌では口底癌に比較し食食面積は高値を示した (\* p<0.05). ただし, 2本の平行線は, 対照における平均値±標準偏差の範囲を示す.

4. 頭頸部放射線療法の血球数および好中球食食活性に及ぼす影響

好中球機能は好中球, リンパ球および単球により複雑に制御されていることが近年明らかにされつつある。そこで, 放射線療法前後および経過観察中のこれら血球数の変動と好中球食食活性を比較した (図13)。好中球数, 単球数は患者によりばらつきが大きく, 一定した動向はみられなかったが, リンパ球数では放射線療法終了直後より, 治療後長期にわたり有意に低下していた。一方, 好中球の食食活性は, プラーク数については治療前後および治療後の全期間にわたり,

変化はみられなかったが, 食食面積は放射線療法後1カ月までは変化がみられなかったものの, 治療後4~12カ月では対照値レベルまで低下しており (図14), 血球数との相関はみられなかった。

放射線療法別での好中球食食活性の変動についての検討では, 外科療法併用を含む外照射症例は治療後1カ月まで好中球の食食面積に変化はみられなかったのに対し, 組織内照射症例では治療直後早期に対照値レベルへの低下傾向を示し, 治療後4~12カ月では, 外照射症例, 組織内照射症例ともに対照値レベルに低下していた (図15)。

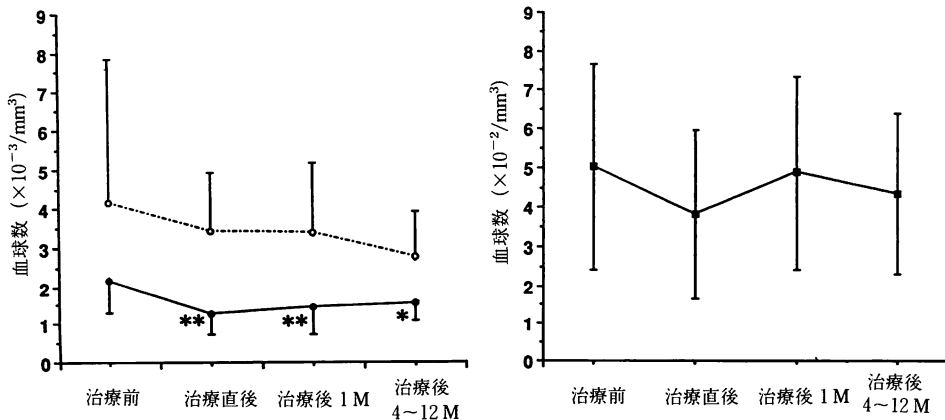


図13 白血球数の変化.  
 ---○--- : 好中球数  
 —●— : リンパ球数  
 —■— : 単球数  
 (\* p<0.05, \*\* p<0.01)

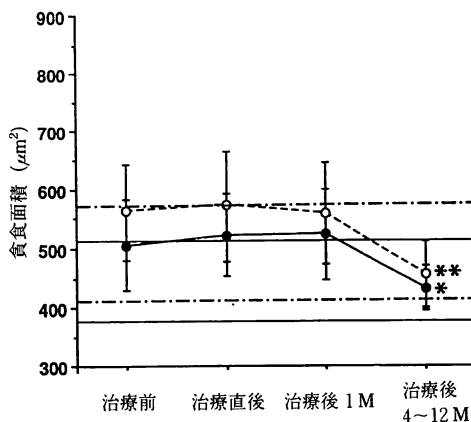
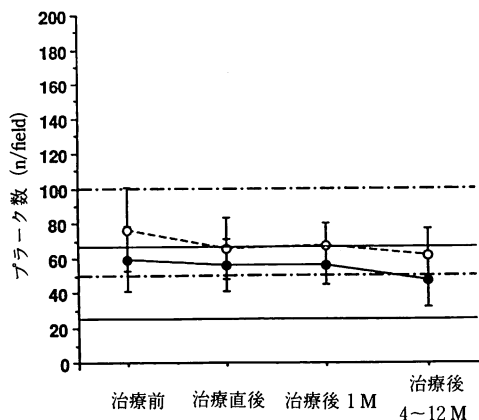


図14 放射線療法後の貪食活性の変化。  
 実線は血漿未処理，破線は血漿処理を示し，2本の平行線（実線および鎖線）は，対照における平均値±標準偏差の範囲を示す。

●—● : 血漿未処理  
 ○- -○ : 血漿処理  
 (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ )

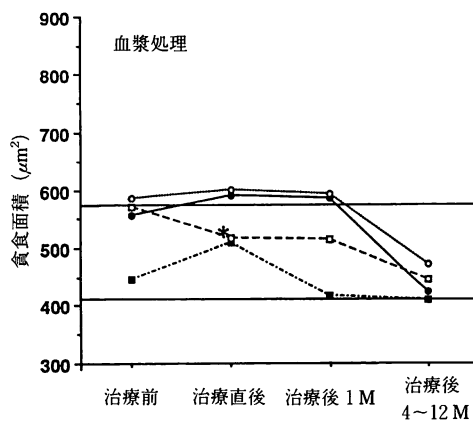
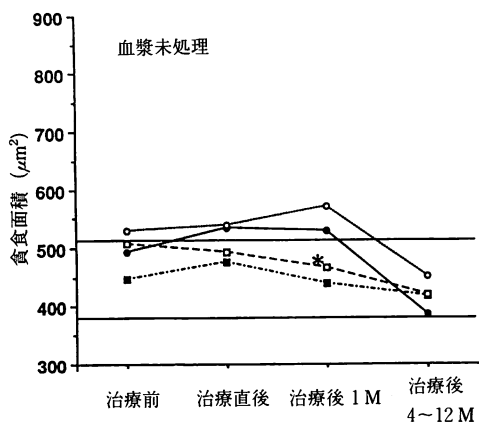


図15 治療別にみた放射線療法後の貪食面積の変化。  
 ただし，2本の平行線は，対照における平均値±標準偏差の範囲を示す。

●—● : 外照射単独症例  
 ○—○ : 外照射+外科手術症例  
 ■···■ : 外照射+組織内照射症例  
 □- -□ : 組織内照射症例  
 (\*  $p < 0.05$ )

### 考 察

悪性腫瘍患者では，免疫能の低下がよく知られているが，放射線療法や外科療法において腫瘍を制御できなかった症例では，癌進行による免疫能の低下や種々の治療（外科的療法，化学療法，放射線療法等）によって，さらに免疫抑制が加わり易感染状態すなわち compromised host の状態に陥ると考えられている<sup>28)</sup>。しかしながら，放射線療法が担癌患者における好中球

機能にどの程度影響しているのかは現在まで明らかにされていない。

そこで，本研究では貪食プラーク法を用いてこの問題を明らかにしようと試みた。

#### 1) 測定系について

好中球貪食機能測定法は従来より数多くの方法が開発されているが，現在主に用いられている方法には，細菌，墨汁，ラテックス粒子等を好中球に取り込ませ顕微鏡で観察する方法<sup>29)</sup>，細菌を放射性同位元素でラ

ベルし好中球への取り込みを測定する方法<sup>30)</sup>、好中球が細菌を貪食・殺菌する際に放出する活性酸素を化学発光によって測定するケミルミネッセンス(化学発光)法<sup>31)</sup>、フローサイトメトリー(細胞自動解析装置)を利用した蛍光標識ラテックス粒子取り込み法<sup>32)</sup>などがある。これらの方法はいずれも、好中球と細菌をともに浮遊状態か、ガラス等に付着させた好中球と浮遊状態の菌との反応系が用いられ生体内でおこる好中球の貪食過程とはかなり異なった条件下で貪食反応を測定している、測定に特殊な装置や実験室を要し手間と時間がかかるため臨床応用が困難である、また好中球の代謝過程を間接的に測定しているといった欠点があった。

近年開発された貪食ブランク法は、プラスチックディッシュ上に付着した細菌に浮遊好中球を付着させ、細菌を貪食させる測定法で、貪食活性を直接視覚的に観察でき、従来法に比べより *in vivo* に近い状態を再現し、少量の血液採取で血漿中のオプソニン効果を判定でき臨床応用が容易であるといった利点がある。さらに、本法で用いた黄色ブドウ球菌は、病原性が強く悪性腫瘍患者の感染巣から高率に分離されること<sup>28)</sup>、口腔内にも常在する菌であること<sup>33)</sup>、また MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)は院内感染の原因菌として近年 *compromised host* に対する脅威となっている<sup>34)</sup> ことから、本研究の目的に適していると考えられる。

しかしながら、本法はいまだ定性的観察法にとどまり、定量化がなされておらず、好中球貪食機能測定法として不完全であるという欠点があった。そこで、著者は画像解析システムを用いて貪食ブランク法の定量化を試み、まず本法の特性を明らかにし、臨床応用の可能性について検討した。

本法において観察されるブランク像は、プラスチックディッシュ上に付着した細菌に好中球がまず付着し、その後貪食が行われて形成されると考えられるため、好中球貪食活性の指標はプラスチックディッシュ上に形成されたブランク数およびブランク面積(貪食面積)をパラメーターとして用いた。

黄色ブドウ球菌のプラスチックディッシュへの付着数は、測定される貪食活性に影響すると考えられるが、血漿未処理および血漿処理ともによく安定しており、両者間で差はみられなかった。さらに、測定系の再現性として血漿未処理におけるブランク数および貪食面積の変動係数を求めたところ、ブランク数では 0.15、貪食面積では 0.05 とブランク数で貪食面積の 3 倍の変動がみられたものの、その再現性は測定上十分満足できるものと考えられた。

好中球懸濁液の pH の貪食活性に及ぼす影響は、生理的 pH で最大をとると報告<sup>35)</sup> されている。本実験では、ブランク数は pH 8.0、貪食面積は pH 7.4 でそれぞれ最大値を示し、貪食面積については過去の報告と一致したものの、ブランク数で塩基性に偏位しており、この不一致がみられた理由は明らかではない。

反応温度 4°C では全くブランク形成がみられず、37°C で貪食活性が最大値を示し、過去の報告<sup>36),37)</sup> とよく一致していた。

好中球が細菌を貪食する場合、オプソニンが好中球の貪食活性に関与し増強することが広く認められている<sup>38)</sup> が、オプソニン非存在下においても弱いながらも貪食現象がみられることも報告されている<sup>39)</sup>。そこで、本研究では、細菌を血漿で処理した場合と処理しない場合の各々について好中球貪食活性の動態について検討した。ブランク数では、血漿処理では未処理に比し約 1.6 倍、貪食面積では、約 1.4 倍の増加が認められた(30分値比較)。しかしながら、反応時間が 30 分を経過すると貪食面積はブランク数とは逆に、血漿未処理で血漿処理よりも高値を示す結果が得られた。この逆転現象は、血漿処理においてブランク中に存在する好中球の割合が著しく減少し始める時期と一致すること、さらに反応時間 60 分後の上清および洗浄液から回収した好中球に対しトリパンブルー排除試験を行うとトリパンブルーの取り込みが血漿未処理に比べ血漿処理で高値を示す(未発表)ことから、菌を血漿処理した場合には、好中球の活性が早期に低下するため、この現象が生じたと考えられた。

## 2) 対照群について

対照とした健康成人は、頭頸部悪性腫瘍患者と年齢構成および性構成が異なっていた。原則として頭頸部悪性腫瘍患者と年齢および性構成を一致させる必要性があると考えられるが、頭頸部悪性腫瘍患者の年齢、性と一致する健康成人から採血することはかなり困難であった。そこで本研究では、健康成人と頭頸部悪性腫瘍患者の比較に先立ち、好中球貪食活性と性および年齢との相関性について検討した。その結果、性差および加齢によって好中球貪食活性に変化がみられないことが確認されたため、対照値として採用した。貪食活性と加齢との関係についての報告では、単球についての検討ではあるが、加齢とともに貪食活性が低下するとするもの<sup>40)</sup> と変化がみられないとするもの<sup>41)</sup> とがある。今回の検討では、貪食活性に加齢による変化はみられず後者の報告と一致していた。

## 3) 担癌患者の好中球貪食能について

高頻度に感染症を合併し、それが死因となることが多い白血病患者では古くから好中球機能が検討されて

きた<sup>42)</sup>。しかしながら、白血病に限らず進行した悪性腫瘍患者では感染症を合併し、これが死因となることも少なくない<sup>43)</sup>。現在までに、多くの血清中の免疫抑制因子や細胞性免疫の抑制が報告されてきた<sup>20)</sup>が、さらに近年になって好中球が抗腫瘍作用を有するエフェクター細胞として作用していることやリンパ球や単球と密接な関係を持って機能していることが明らかにされるに至り、担癌患者の好中球機能を十分把握しておくことは癌患者の治療に際し重要であるとの認識がされつつある。担癌状態の単球の貪食機能については、Meltzer らの研究<sup>44)</sup>をはじめとして数多く報告されている<sup>45)</sup>が、好中球貪食機能についての報告<sup>23-25)</sup>は少ない。

本研究における頭頸部癌未治療症例では、好中球貪食活性は健康成人に比較し有意に上昇しており、ラテックス粒子を用いて検討した Cron の報告<sup>25)</sup>とよく一致していた。これに対して、松永<sup>23)</sup>、朝長<sup>46)</sup>、松本<sup>47)</sup>は好中球の貪食殺菌能に変化はみなかったとしている。これらの相異が生じた理由をさらに検討すると、松永、松本らは好中球貪食機能をケミルミネッセンス（化学発光）法を用いて検討していることが挙げられる。小林ら<sup>48)</sup>によると、定性的な比較ではあるが、貪食プラーク法とケミルミネッセンス法の結果が相関しない場合があることが指摘されていること、さらに、ケミルミネッセンス法は活性酸素を化学発光によって測定するため貪食過程よりもむしろ殺菌過程を強く反映している<sup>29)</sup>ことが、この不一致を招いたと考えられる。

本研究で頭頸部悪性腫瘍患者においては、貪食プラーク法で測定した場合、好中球貪食活性の亢進がみられることが明らかとなった。現在に至るまで、悪性腫瘍患者において好中球貪食活性が亢進するという報告<sup>25,49)</sup>はいくつかみられるが、その原因については明らかにされていない。しかし、単球についてみた Baum らの報告<sup>50)</sup>では、同系の乳癌を移植したマウスでは単球造血が促進し、この変化は単球の貪食活性上昇と平行していたと述べている。彼らは担癌状態での単球の貪食活性の変化と骨髄での単球産生の変化との関連性を示唆しており、担癌状態における好中球においても同様の変化が生じている可能性が考えられる。担癌状態における好中球貪食活性の亢進がどのような機序で生じているかは、今回の検討では明らかにできないが、好中球貪食活性に影響を及ぼすと考えられる因子には、(1)好中球造血に影響を与える癌細胞由来の液性因子の存在に起因するもの<sup>51-53)</sup>、(2)感染による炎症巣の存在や抗生物質に起因するもの<sup>54,55)</sup>、(3)担癌状態における細胞性免疫の低下に起因するもの<sup>12-15)</sup>、(4)制癌剤に起因するもの<sup>56,57)</sup>の可能性が考えられる。

の<sup>12-15)</sup>、(4)制癌剤に起因するもの<sup>56,57)</sup>の可能性が考えられる。

頭頸部悪性腫瘍患者の好中球数は変動が大きく一定した傾向はみられなかったが、近年ヒト扁平上皮癌から分離された G-CSF（顆粒球コロニー刺激因子）<sup>51)</sup>が好中球機能亢進作用を示す<sup>52,53)</sup>ことも明らかにされてきており、頭頸部癌から放出されるこのような液性因子が好中球貪食活性亢進に関与している可能性が考えられる。

敗血症のような重篤な感染症では、好中球機能は低下する<sup>54)</sup>とされるが、局所的な感染では好中球貪食活性は亢進するという報告<sup>55)</sup>が多い。さらに、抗生物質も好中球機能に影響することは広く知られているが、一般には好中球貪食活性を抑制する<sup>55)</sup>とされている。対象となった頭頸部悪性腫瘍患者では、未治療症例では2例、制癌剤投与症例では3例において細菌感染が疑われ抗生物質が投与されていた。しかし、これらの患者では抗生物質の投与を受けていない症例と比較しても差はみられず、さらに抗生物質は一般に代謝が速く早期に体外へ排泄される<sup>58)</sup>ことから、感染や抗生物質による好中球貪食活性への寄与は大きくないと考えられる。

担癌状態においては抗体産生や細胞性免疫能の低下、さらにサプレッサーマクロファージの出現はよく知られている<sup>20)</sup>。一方で、リンパ球の産生する IL-4 および 6 やマクロファージの産生する IL-1 ならびに好中球走化性因子である IL-8 は好中球機能亢進作用がある<sup>12,14,15,59)</sup>ことが知られている。これらの報告から推測されることは、好中球機能低下であって、担癌患者の好中球貪食活性亢進を説明することはできないが、対照値よりも低値をとるような症例ではこのような機序が関与している可能性もある。

制癌剤の副作用の1つとして、骨髄機能抑制を含めた免疫不全がよく知られている。今回検討した頭頸部悪性腫瘍患者では、Tegafur, 5-Fluorouracil, Cisplatin, Peplomycin が単独あるいは併用して投与されていた。これらの薬剤はいずれも骨髄機能の抑制を招来する可能性があるが、さらに 5-Fluorouracil は顆粒球の貪食活性を低下させ<sup>56)</sup>、Cisplatin, Peplomycin では好中球の活性酸素産生の抑制<sup>56)</sup>が動物実験や *in vitro* の実験で示されている。しかしながら、制癌剤投与患者では未治療症例と比較しても差がみられず、また好中球数にも明らかな差がみられなかったことから、放射線療法前に投与される制癌剤の用量では好中球機能に変化をもたらしたり、骨髄機能の抑制を招来しないと推察される。

好中球の貪食活性は、舌癌、口底癌および歯肉癌に



についてみると、プラーク数では差はみられないものの、食食面積では、血漿未処理では舌癌および歯肉癌が、血漿処理では歯肉癌が口底癌に比べて有意に高値を示した ( $p < 0.05$ ) が、病期や扁平上皮癌の分化度との関連性はみられなかった。

過去に頭頸部悪性腫瘍患者における腫瘍の発生部位や分化度と好中球機能についての関係をみた報告はみあたらないが、リンパ球機能と腫瘍の発生部位との関係をみた報告<sup>5)</sup>では、発生部位により機能に差がみられた理由として腫瘍の組織型の相異を挙げている。しかしながら、本研究で対象とした症例は疣贅状癌の1例を除いてすべて扁平上皮癌であることから、発生部位による好中球食食活性の差を説明することはできなかった。松永<sup>23)</sup>はT<sub>3</sub>喉頭癌患者で好中球遊走能の低下を、平野<sup>24)</sup>は、早期胃癌で好中球遊走能の亢進を、進行胃癌で低下を観察しているが、本研究においては好中球食食活性と腫瘍の進展度に関連性はみられなかった。このことは、悪性腫瘍の進展に伴い好中球食食能と好中球遊走能に機能的開離が生じる可能性を疑わせるが、単球について検討した動物実験においても、悪性腫瘍存在下では食食能と遊走能の活性に差が生じたとの報告<sup>45)</sup>もみられ、今後の検討が必要と考えられる。

#### 4) 頭頸部放射線療法の影響について

放射線療法による免疫系への影響は、細胞性免疫や腫瘍免疫に中心的な役割をはたし、長寿命で放射線感受性を示すリンパ球でよく研究されてきた<sup>1-5)</sup>。これに対し、成熟好中球は末梢血中での寿命も平均2~3日と短く<sup>60)</sup>、しかも放射線耐性を示す<sup>6,7)</sup>ことから、頭頸部放射線療法による直接的な障害はほとんどないと考えられてきた。しかし、近年になって好中球がリンパ球、マクロファージと密接な関係をもって機能していることやマクロファージは放射線に対し耐性を示す<sup>61)</sup>ものの、リンパ球は放射線に対し高感受性を示し局所放射線療法においても障害をうけることが明らかにされており<sup>1-5)</sup>、局所放射線療法は間接的ではあるが好中球機能に変化を生じさせる可能性が考えられるようになってきた。

本研究における好中球食食活性は、放射線療法全体でみると、治療前、治療直後、治療1カ月まで変化はみられず治療後4~12カ月で対照値レベルまで低下していた。頭頸部領域では造血組織が少なく、全身の1割程度を占めるにすぎないこと<sup>62-64)</sup>、および好中球は末梢血管にせいぜい数時間とどまっているだけで消化管、呼吸器、口腔、泌尿器に浸出し破壊されるという好中球の生体内での動態<sup>65)</sup>を考慮すると頭頸部放射線療法による好中球への直接的な障害は考えにく

く、間接的な影響が好中球食食活性の低下を生じさせたと考えられる。Mcripley<sup>8)</sup>は、担癌状態において好中球食食機能は異常値を示したものの、放射線治療後低下したと述べており、さらに、治癒患者における好中球殺菌能について検討したHaim<sup>66)</sup>は、殺菌能はかなり低下していたと報告している。本研究では、担癌状態と比較すると治療後4~12カ月では好中球食食活性は低下しており、Mcripley<sup>8)</sup>らの報告と一致する。しかし、この低下は正常状態へ回復したと捉えるべきものであり、この点においてHaim<sup>66)</sup>の結果とは異なっている。これは、Haim<sup>66)</sup>らが検討した治癒症例が治療後経過良好な期間が3~20年(中央値7.5年)とわれわれの症例とはかなり条件が異なっていることや好中球殺菌能について検討していることに起因している可能性も考えられる。

担癌状態では、好中球の食食活性は有意に亢進しており、治療経過良好な症例では好中球の食食活性が対照値レベルまで低下していたことを考慮すると、放射線療法後においてみられた好中球食食活性の変化は、(1)悪性腫瘍が消失したことに起因するもの、(2)リンパ球等の免疫細胞への障害に起因するもの、(3)制癌剤に起因するもの、(4)麻酔薬や手術侵襲に起因するもの、の可能性が考えられる。

好中球数、リンパ球数および単球数と好中球食食活性の相関性をみたところ、好中球数および単球数では全期間をとおして変化はみられておらず、リンパ球数では治療直後より低下がみられ、好中球食食活性の推移とは一致していなかった。このことから、好中球食食活性の低下はリンパ球等の免疫細胞への障害に起因するというよりも、悪性腫瘍が消失したことに起因する可能性が強く示唆された。

放射線療法中あるいは放射線療法後に制癌剤が投与された患者では、制癌剤の投与量が多くなるため好中球食食活性への影響が出る可能性が考えられる。しかしながら、組織内照射をうけた患者では治療中あるいは治療後において制癌剤はほとんど投与されていないにもかかわらず、治療後4~12カ月では好中球食食活性は制癌剤との併用が多かった外照射症例と同様に対照値レベルへ低下していたことから制癌剤による影響は大きくないと考えられた。

麻酔薬や外科的侵襲による好中球機能への影響については、影響を及ぼさないとする報告<sup>67)</sup>や抑制するが術後1週ではほぼ術前の状態へ回復するとする報告<sup>68)</sup>が多い。本研究においては、採血時期を外科治療後1カ月としたことから、外科治療による好中球食食活性への影響は今回の結果にはほとんど反映されていないと考えられる。

治療後、好中球貪食活性が正常に回復するまでに4カ月以上の時間を要しているが、この時間差が生じた理由は明らかではない。好中球遊走能の局所放射線療法による影響をみた研究<sup>4)</sup>でも、治療後1カ月までの経過では治療前と比べ変化は認められておらず、本研究結果と一致している。治療別にみると、外科療法を含めた外照射に比べ組織内照射ではより早期に対照値レベルへ回復する傾向がみられた。さらに、治療後4～12カ月では、両者とも対照値レベルへ回復していることを考慮すると、放射線治療後好中球貪食活性が対照値レベルへ回復するまでの期間は、治療法の相異なるによる生体への侵襲の差が関与していると考えられた。すなわち、組織内照射では、外照射でみられる健全組織への障害や外科的侵襲による生体への障害が非常に少なく、その後を引き起こす炎症の程度が軽度であるため早期に回復傾向を示したのであろうと考えられた。

以上の結果から、頭頸部放射線療法が好中球貪食活性に及ぼす影響は直接的な障害作用ではなく、腫瘍消失に伴う二次的な変化、すなわち好中球貪食活性の正常化であることが強く示唆された。

## 総 括

頭頸部放射線療法が好中球貪食機能に及ぼす影響を明らかにする目的で、貪食ブランク法に画像解析を応用し、担癌状態における好中球貪食活性および放射線療法後の好中球貪食活性の変化を検討し、以下の結果を得た。

1) 貪食ブランク法での変動係数は、ブランク数測定では0.15、貪食面積測定では0.05であり、本法の定量化が可能となった。

2) 頭頸部悪性腫瘍患者では、好中球貪食活性は有意に亢進していた。この亢進は、制癌剤投与患者でも同様であった。

3) 頸部悪性腫瘍患者の病期(Stage)分類、分化度、発生部位と好中球貪食活性の関係では、病期、扁平上皮癌の分化度と好中球貪食活性との関連性はみられなかった。しかし、発生部位では貪食面積において血漿未処理で舌癌、肉内癌が口底癌に比較し有意に高値を示し、血漿処理では、肉内癌が口底癌に比べ有意に亢進していた。

4) 頭頸部放射線療法後の好中球貪食活性の変化は、ブランク数では治療前後および治療後の全期間にわたって変化はみられなかった。しかし、貪食面積では放射線療法後1カ月までは変化がみられなかったものの治療後4～12カ月では対照値レベルまで回復した。また、この好中球貪食活性の変化と血球数(好中

球、リンパ球、単球)との相関は認められなかった。

5) 頭頸部放射線療法の様式別に好中球貪食活性の変動をみると外科療法併用を含む外照射症例では治療後1カ月まで好中球の貪食面積に変化はみられなかったが組織内照射症例では、治療直後より早期に対照値レベルへ回復する傾向を示した。さらに治療後4～12カ月では外照射症例、組織内照射症例ともに対照値レベルに回復した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜った広島大学歯学部歯科放射線学講座、和田卓郎教授に深厚なる謝意を表します。また、終始御指導、御教授を賜った本学口腔細菌学講座、杉中秀壽教授ならびに御校閲を賜りました本学第1口腔外科学講座高田和彰教授に心から御礼申し上げます。さらに研究を遂行および論文を作製するにあたり、御指導、御助言を頂戴した本学口腔細菌学講座三宅洋一郎助教授、本学歯科放射線学講座小川正見助手、藤田實講師に心から感謝いたします。最後に、御協力戴いた本学歯科放射線学講座、口腔細菌学講座、医学部放射線学講座、口腔外科学第1講座および口腔外科学第2講座の諸先生ならびに、広島大学歯学部附属病院病棟の看護婦さんに感謝いたします。

## 文 献

- 1) Raben, M., Walach, N., Galili, U. and Schlesinger, M.: The effect of radiation therapy on lymphocyte subpopulations in cancer patients. *Cancer*. **37**, 1417-1421, 1976.
- 2) Stratton, J.A., Byfield, P.E., Byfield, J.E., Small, R.C., Benfield, J. and Pilch, Y.: 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, 1975.
- 3) 押谷高志: 宿主免疫能に及ぼす放射線治療の影響. 日本医学会誌 **41**, 873-886, 1981.
- 4) Trask, C.W.L., Llewellyn, I. and Souhami, R.L.: The effect of radiotherapy on blood mononuclear cell numbers and phagocyte migration. *Clin. Radiol.* **31**, 733-738, 1980.
- 5) 坂口幸作: 頭頸部悪性腫瘍患者の非特異的免疫能. 日耳鼻 **86**, 899-911, 1983.
- 6) Holly, T.R., Epps, D.E.V., Harvey, R.L., Anderson, R.E. and Williams, R.C.: Effect of high doses of radiation on human neutrophil chemotaxis, phagocytosis and morphology. *Am. J. Pathol.* **75**, 61-72, 1974.
- 7) Selvaraj, R.J. and Sbarra, A.J.: Effect of X-irra-

- Effect of pH on in vitro phagocytosis of *streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.* **100**, 1204-1207, 1969.
- 36) Mandell, G.L.: Effect of temperature on phagocytosis by human polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* **12**, 221-223, 1975.
- 37) Silverstein, S.C., Steinman, R.M. and Cohn, Z.A.: Endocytosis. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 669-772, 1977.
- 38) 高野達哉, 峰尾千恵子: 食作用; 白血球と生体防御 水上茂樹, 柿沼カツ子, 竹重公一朗編, 講談社サイエンティフィク, 東京, 64-75, 1990.
- 39) Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Thijssen, H.M.W. and Verhoef, J.: Interaction between human polymorphonuclear leukocytes and *staphylococcus aureus* in the presence and absence of opsonins. *Immunol.* **52**, 427-435, 1984.
- 40) Bongrand, P., Bartolin, R., Bouvenot, G., Arnaud, C., Delboy, C. and Depieds, R.: Effect of age on different receptors and functions of phagocytic cells. *J. Clin. Lab. Immunol.* **15**, 45-50, 1984.
- 41) Olmos, J.M., Bentio, D., Garcia, D., Sanchez, J.J. and Jimenez, A.: Monocyte function in elderly. *Allergol. Immunopathol.* **14**, 369-373, 1986.
- 42) Rosner, F., Valmont I., Kozinn, P.J. and Caroline, L.: Leukocyte function in patient with leukemia. *Cancer.* **25**, 835-842, 1970.
- 43) 蝶良英郎: 生体防御の低下と食細胞不全; 生体防御の機構 水野伝一, 武谷健二, 石田名香雄編, 東京大学出版会, 東京, 149-161, 1982.
- 44) Meltzer, M.S. and Stevenson, M.M.: Macrophage function in tumor-bearing mice: Dissociation of phagocytic and chemotactic responsiveness. *Cell. Immunol.* **35**, 99-111, 1978.
- 45) Braun, D.P., Harris, J.E., Maximovich, S., Marder, R. and Lint, T.F.: Chemiluminescence in peripheral blood mononuclear cells of solid tumor cancer patients. *Cancer. Immunol. Immunother.* **12**, 31-37, 1981.
- 46) 朝長昭光: 肺癌患者における好中球 Superoxide 産生能—とくに化学療法, 放射線療法の影響について. 肺癌 **26**, 245-258, 1986.
- 47) 松本隆任, 上野範博, 大川正人, 鹿野高明, 外岡立人, 松本脩三: 全血利用 luminol 依存性 chemiluminescence. II. 種々疾患における反応性. 日臨免誌 **6**, 195-203, 1983.
- 48) 小林則之, 鴨井久一: *Streptococcus sanguis* の刺激によるヒト末梢白血球の化学発光および食能に関する研究. 日菌周誌 **31**, 380-402, 1989.
- 49) Hofmann, R., Lehmer, A., Braun, J. and Bauer, S.: Activity of phagocytic granulocytes in patients with prostatic cancer. *Urol. Res.* **14**, 327-330, 1986.
- 50) Baum, M. and Fisher, B.: Macrophage production by the bone marrow of tumor-bearing mice. *Cancer. Res.* **32**, 2813-2817, 1972.
- 51) Nomura, H., Imazeki, I., Oheda, M., Kubota, N., Tamura, M., Ono, M., Ueyama, Y. and Asano, S.: Purification and characterization of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *EMBO. J.* **5**, 871-876, 1986.
- 52) 浅野茂隆: hG-CSF の in vivo 作用. *Medical immunology.* **14**, 455-461, 1987.
- 53) Kondo, S., Okamura, S., Ohhara, N. and Niho, Y.: Direct action of human granulocyte colony-stimulating factor on mature human neutrophils: Flow-cytometric analysis. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **67**, 249-257, 1990.
- 54) Solomkin, J.S., Jenkins, M.K., Nelson, R.D., Chenoweth, D. and Simmons, R.L.: Neutrophil dysfunction in sepsis. II. Evidence for the role of complement activation products in cellular deactivation. *Surgery.* **90**, 319-327, 1981.
- 55) 天野正道: 尿路感染症における白血球機能 (特に腎盂腎炎について). 第2報 人白血球貪食能に及ぼす化学療法剤の影響について. 西日泌尿 **38**, 319-335, 1976.
- 56) Ishituka, H., Umeda, Y., Nakamura, J. and Yagi, Y.: Protective activity of thymosin against opportunistic infections in animal models. *Cancer. Immunol. Immunother.* **14**, 145-450, 1983.
- 57) Hara, N., Ichinose, Y., Notohiro, A., Kuda, T., Aso, H. and Ohta, M.: Influence of chemotherapeutic agents on superoxide anion production by human polymorphonuclear leukocytes. *Cancer.* **66**, 684-688, 1990.
- 58) Keller, F., Offermann, G. and Lode, H.: Supplementary dose after hemodialysis. *Nephron*, **30**, 220-227, 1982.
- 59) Matsushima, K., Morishita, K., Yoshimura, T., Lavu, S., Kobayashi, Y., Lew, W., Appella, E., Kung, H.F., Leonard, E.J. and Oppenheim, J.J.: Molecular cloning of human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* **167**, 1883-1893, 1988.
- 60) Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D.K.: Immunology. Gower Medical Publishing Ltd., London, 1985. (多田富雄訳: 免疫学イラストレイテッド, 南江堂, 東京, 1986, 昭和60.)
- 61) Schmidtke, J.R. and Dixon, F.J.: The functional capacity of X-irradiated macrophages. *J. Immunol.* **108**, 1624-1630, 1972.
- 62) UNSCEAR, *Ionizing Radiation: Levels and effects. Annex B dose from medical irradiation. 1972 report to the general assembly.* United Nations, New York, 133-172, 1972.
- 63) Miyakawa, T.: Population dose from medical ex-

- diation on the metabolic changes accompanying phagocytosis. *Nature*. **210**, 158-161, 1966.
- 8) Mcricley, R.J., Selvaraj, R.J., Glosky, M.M. and Sbarra, A.J.: The role of the phagocyte in host-parasite interactions. VI. The phagocytic and bactericidal capabilities of leukocytes from patients undergoing X-irradiation. *Radiat. Res.* **31**, 706-720, 1967.
  - 9) 新屋晴孝：モルモット多型核白血球スーパーオキシド産生能に対する放射線照射の影響。日本医放会誌 **47**, 64-68, 1987.
  - 10) Selvaraj, R.J. and Sbarra, A.J.: Role of the phagocyte in host-parasite interactions. VIII. Effect of whole body X-irradiation on nicotinamides, lysosomal enzymes, and bactericidal activity of leukocytes during phagocytosis. *J. Bacteriol.* **94**, 149-156, 1967.
  - 11) Paul, B., Strauss, R. and Sbarra, A.J.: The role of the phagocyte in host-parasite interactions. XVI. Effect of X-irradiation on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in guinea pig exudate cells. *J. Reticuloendothel. Soc.* **5**, 538-549, 1968.
  - 12) Sullivan, G.W., Carper, H.T., Sullivan, J.A., Murata, T. and Mandell, G.L.: Both recombinant interleukin-1 (beta) and human monocyte interleukin-1 prime human neutrophils for increased oxidative activity and promote neutrophil spreading. *J. Leukoc. Biol.* **45**, 389-395, 1989.
  - 13) Ferrante, A.: Tumor necrosis factor alpha potentiates neutrophil antimicrobial activity increased fungicidal activity against *Torulopsis glabrata* and *Candida albicans* and associate increases in oxygen radical production and lysosomal enzyme release. *Infect. Immun.* **57**, 2115-2122, 1989.
  - 14) Boey, H., Rosenbaum, R., Castrance, J. and Borish, L.: Interleukin-4 is a neutrophil activator. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **83**, 978-984, 1989.
  - 15) Borish, L., Rosenbaum, R., Albury, L. and Clark, S.: Activation of neutrophil by recombinant interleukin 6. *Cell. Immunol.* **121**, 280-289, 1989.
  - 16) Yoshinaga, M., Nakamura, S. and Hayashi, H.: Interaction between lymphocytes and inflammatory exudate cells. I. Enhancement of thymocyte response to PHA by products of polymorphonuclear leukocytes and macrophages. *J. Immunol.* **115**, 533-538, 1975.
  - 17) Chapes, S.K. and Haskill, S.: Evidence for granulocyte-mediated macrophage activation after *C. parvum* immunization. *Cell. Immunol.* **75**, 367-377, 1983.
  - 18) Nakayama, J., Rodriguez-Pinzon, Nakamura, S. and Yoshinaga, M.: A possible role of PMN in a casein-induced enhancement of PFC response to sheep erythrocytes in mice. *Immunol.* **45**, 669-677, 1982.
  - 19) 漆崎一郎：癌患者の免疫能。癌の臨床 **24**, 378-385, 1978.
  - 20) 漆崎一郎, 矢田純一, 野本亀久雄：癌と生体のかかわりあい；免疫療法への展開。ライフサイエンス, 東京, 15-62, 1982.
  - 21) Rafla, S., Yang, S.J. and Meleka, F.: Changes in cell mediated immunity in patients undergoing radiotherapy. *Cancer.* **41**, 1076-1086, 1978.
  - 22) 森山知是：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—。阪大歯学雑誌 **32**, 181-209, 1987.
  - 23) 松永信也：頭頸部疾患と末梢血好中球機能。日耳鼻 **90**, 1963-1967, 1987.
  - 24) 平野達雄, 中山博司, 田淵純宏, 石井俊世, 下山孝俊, 三浦敏夫, 富田正雄, 辻 芳郎：各種外科疾患患者の多核好中球運動能の測定—特に担癌患者を中心として—。日臨免誌 **6**, 186-194, 1983.
  - 25) Cron, J.: Phagocytic activity of leukocytes in tumors (clinical studies). *Neoplasma.* **22**, 211-223, 1975.
  - 26) Metchnikoff, E.: Lecons sur la pathologie comparee de l'inflammation. Masson, Paris, 1892. (飯島宗一, 角田力弥訳：メチニコフ炎症論, 文光堂, 東京, 1976. 昭和51.)
  - 27) Seki, K., Murai, M., Sakurada, J., Shirahige, A., Kobayashi, N., Hwang, S. and Masuda, S.: A simple method for observation of phagocytosis on bacterial thin-layer. *Microbiol. Immunol.* **33**, 81-85, 1989.
  - 28) 酒井克治, 藤本幹夫：癌患者の感染症と治療。医薬ジャーナル **21**, 635-642, 1985.
  - 29) 堀内 篤, 長谷川広文：1. 食能検査法；細胞性免疫機能検査のすべて。月刊 Medical Technology 編, 医歯薬出版, 東京, 8-14, 1985.
  - 30) Verhoef, J., Peterson, P.K. and Quie, P.G.: Kinetics of staphylococcal opsonization, attachment, ingestion and killing by human polymorphonuclear leukocytes.: A quantitative assay using [<sup>3</sup>H] thymidine labeled bacteria. *J. Immunol. Methods.* **14**, 303-311, 1977.
  - 31) 西田 朗：白血球の O<sub>2</sub><sup>-</sup> 産生能の測定；活性酸素と発光 中野稔, 吉川敏一編, 日本医学館, 東京, 107-112, 1990.
  - 32) 熊谷善博, 奥村 康：FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) の原理とその応用例；免疫生化学研究法 (続生化学実験講座 5), 東京化学同人, 東京, 112-126, 1986.
  - 33) 熊田秀文, 金子信雄, 菅沼宏行, 鹿谷 実：口腔より分離したブドウ球菌の性状と分類に関する研究。神奈川歯学 **15**, 623-635, 1981.
  - 34) Brumfitt, W. and Hamilton-Miller, J.: Medical progress: Methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* **26**, 1188-1196, 1989.
  - 35) Beck, A., Bergner-Rabinowitz, S. and Ofek, I.:



- posures in japan. (Bone marrow dose and genetically significant dose). *Excerpta Medical International Congress Series No. 105. Proceedings of the XIth International Congress of Radiology*. Medical International Congress. Rome, 1574- 1579, 1965.
- 64) Russel, W.J., Yoshinaga, H., Antoku, S. and Mizuno, M.: Active bone marrow distribution in the adult. *Br. J. Radiol.* **39**, 735-739, 1966.
- 65) 河合 忠：白血球数と好中球数；異常値の出るメカニズム。河合忠，玄番昭夫，屋形稔編，医学書院，東京，39-42, 1985.
- 66) Haim, N., Obedeau, N., Meshulam, T., Robinson, E., Schreiber, H. and Merzbach, D.: Neutrophil function in cured cancer patients. *Cancer*. **40**, 2273-2277, 1977.
- 67) Heberer, M., Zbinden, A.M., Ernst, M., Durig, M. and Harder, F.: The effect of surgery and anesthetic agents on granulocyte-chemiluminescence in whole blood. *Experimentia*. **41**, 342-346, 1985.
- 68) 小原 進：ケミルミネッセンス法による術前・術後の好中球機能に関する研究。ICU と CCU **12**, 401-407, 1988.