

原 著

BCGによる腫瘍の抑制効果と促進効果の発現機構に関する研究

山 田 穂 積

九州大学医学部胸部疾患研究所

受付 昭和 52 年 5 月 12 日

THE IMMUNOPOTENTIATING ACTION OF BCG AND
ITS VARIOUS EFFECTS ON TUMORS

Hozumi YAMADA*

(Received for publication May 12, 1977)

In this study, the author tried to determine whether the immunopotentiating action of BCG was related to its various effects on tumors.

The immunologic responses to sheep red blood cells (sRBC) were used as the indicator of the immunopotentiating action of BCG. Delayed type hypersensitivity (DTH) was evaluated by footpad reaction and Jerne's hemolytic plaque test was used to determine the humoral immune response.

The author investigated the immunoprophylactic effect of BCG on the development of tumors induced by 20-Methylcholanthrene (MCA) and also investigated the anti-tumor effect of BCG on a transplanted MCA-induced fibrosarcoma.

1) The level of DTH to sRBC reached the highest peak 5 weeks after BCG priming. The humoral immune response reached its maximum in 7 to 11 weeks.

2) In the experiment of MCA-tumorigenesis, the rate of tumor appearance increased by BCG given at the same time as MCA exposure. On the other hand, BCG proved to be somewhat effective for tumor protection when it was given 4 weeks after MCA exposure. A significant, but temporary protection against tumorigenesis was obtained by BCG given 8 weeks after MCA exposure.

The rate of tumor appearance increased by Wax D given at the same time as MCA exposure, or 8 weeks after MCA exposure. On the other hand, Wax D proved to be exceedingly effective in preventing the development of tumors when it was administered 4 weeks after MCA exposure.

3) When MCA was administered to mice, DTH and humoral immune response to sRBC markedly decreased. BCG administration antagonized these immuno-suppressive effects.

When BCG was given 1 week after MCA exposure, BCG recovered the decreased level of DTH by MCA in 4 to 8 weeks. The humoral immune response, however, was markedly increased 12 weeks after MCA administration.

4) In the experiment dealing with transplanted MCA-induced fibrosarcoma, the inhibition of tumor growth was noticed in mice receiving BCG administration before tumorgrafting. On the other hand, if BCG was administered after tumorgrafting rather than before, tumor growth was enhanced.

* From the Research Institute for Diseases of the Chest, Faculty of Medicine, Kyushu University, Maidashi, Fukuoka 812 Japan.

5) In tumor-bearing mice, the level of DTH to sRBC was not increased but rather decreased by BCG administration although the humoral immune response to sRBC was strongly increased.

When BCG and cyclophosphamide were used in combination, the level of DTH was greatly increased in spite of the fact that humoral immune response was totally arrested.

6) Sera of tumor-bearing mice, when injected, accelerated the growth of a transplanted tumor although sera of normal mice did not do so.

緒 論

BCG 免疫療法は、G. Mathé¹⁾ が1969年に急性リンパ芽球性白血病の患者に、緩解後大量の BCG 生菌を皮内接種し、接種群に明らかな緩解期の延長、または再発の阻止がみられたと報告して以来、人の悪性腫瘍の治療法として大きな関心を集めるようになった。最近では、この BCG 生菌に始まる免疫療法も生菌のみならず、Cell Wall Skeleton(CWS)²⁾⁻⁴⁾・Methanol Extraction Residue (MER)⁵⁾⁶⁾等の BCG 菌体成分や、他の種々の免疫賦活物質が日常の臨床例に用いられるまでになつてきた。しかしながら、現時点ではこれらの BCG をはじめとする免疫療法に確実な治療効果を期待するには、なお多くの未解決の問題が残されている。

これまでに報告された多くの動物実験では、BCG が抗腫瘍効果を発揮するどころか、かえつて腫瘍発生や腫瘍発育を促進したとの報告も数多くある。Weiss⁷⁾ は 1966 年にすでに、BCG が移植腫瘍の発育を促進したことを指摘し、それ以後、Ankerst⁸⁾ や Lavrin⁹⁾ らが BCG による腫瘍発生の促進を報告し、また Stjernswärd¹⁰⁾、Piessens¹¹⁾、Bansal¹²⁾ らは BCG による腫瘍発育の促進を報告している。これら数多くの BCG による腫瘍促進効果の発現は免疫療法の期待とは反する結果であり、現在、悪性腫瘍の治療法に有効性が大きく期待され、一般化されはじめた免疫療法に一つの警告を与えるものとして看過することはできない。

本研究では BCG が腫瘍に及ぼす効果について、20-Methylcholanthrene (MCA と略) を用いた腫瘍発生実験と MCA 誘発肉腫を用いた移植腫瘍実験で検討を行ない、BCG がその接種時期の相違によつて、腫瘍抑制効果から促進効果に至るまでの多様な効果を発現することを明らかにした。また BCG 接種によつて惹起される免疫賦活作用を、ヒツジ赤血球に対する免疫反応を用いて検討を行ない、BCG 接種による多様な腫瘍効果の発現機構の解明を試みた。

実験材料ならびに実験方法

① 実験動物

主として 8 週から 12 週齢の C₃H/He 雄マウスを使用

したが、Cyclophosphamide (CY と略) を用いた実験には雌マウスを使用した。実験マウスはすべて九大純系動物飼育センターから供給を受けた。

② BCG の接種法

BCG は市販の日本株 (日本ビーシージー製造株式会社) を使用し、1 mg/0.05 ml の生理食塩水 (生食) 浮遊液としてマウスの足蹠に接種した。その接種時期は各実験の目的によつて選定した。

③ ヒツジ赤血球に対する足蹠反応 Footpad Reaction (FPR と略) とプラーク形成細胞, Plaque Forming Cell (PFC と略) の測定法

ヒツジ赤血球は生食で 3 回よく洗浄し、1×10⁷/0.05 ml の浮遊液として使用した。1×10⁷ 個のヒツジ赤血球をマウス足蹠に感作し、その 4 日後に FPR と脾 PFC および所属リンパ節である膝窩リンパ節の PFC を測定した。なお BCG 接種群においてはヒツジ赤血球感作は常に BCG 接種と同一部位に行なつた。FPR は Miller and Mackaness¹³⁾ に従い、1×10⁸ 個のヒツジ赤血球を感作の対側足蹠に注射し、24 時間後の足蹠の腫脹を dial gauge caliper ("Öditest" H. C. KRÖPLIN GMBH) で 0.01 mm 目盛で測定した。PFC は Jerne's hemolytic plaque method¹⁴⁾ を用いて測定した。

④ MCA の投与方法

20-MCA をオリーブ油に溶解し、0.5 mg/0.1 ml としてマウスの大腿部皮下に注入した。腫瘍発生は注入部位の触知可能な腫瘍形成によつて判定した。

⑤ Wax D の投与方法

Lederer and Asselineau¹⁵⁾ の方法によつて H₃₇Ra 菌から抽出したものを Drakeol 6-VR に溶解し、300 μg/0.05 ml を MCA と同側の足蹠に注射した。投与時期は各実験によつて選定した。

⑥ 腫瘍細胞浮遊液

MCA 誘発肉腫を同系マウスに 6 代以上継代移植し、腫瘍の性質が一定したものを実験に用いた。腫瘍塊を無菌的に切り出し、細かく刻み、それを 37°C の 0.25% トリプシン含有 Dulbecco's PBS で magnetic stirrer を用い、15 分から 20 分間よく攪拌し、細胞浮遊液を採取した。細胞浮遊液はガーゼ濾過後 Hanks 液で 3 回よく洗浄し用いた。腫瘍細胞の生存率は trypan blue を用いた dye

exclusion test によつて計算した。

⑦ 腫瘍移植

マウスの背部を剃毛し、各実験によつて選定した腫瘍細胞数を 0.1 ml の浮遊液として、皮下に移植した。移植腫瘍の発育は腫瘍の長径と短径を計測し、Attia and Weiss¹⁶⁾ の法によつて腫瘍体積 (ml) として表した。

⑧ 腫瘍移植マウス

マウス背部皮下に 5×10^4 個の腫瘍細胞を移植するか、または尾静脈より 1×10^5 個を静注移植し、腫瘍皮下移植の場合では移植後28日で、静注移植の場合は移植後30日で“腫瘍移植マウス”として実験に使用した。

⑨ CY の投与方法

CY はエンドキサン (シオノギ社製) の 100mg パイアルを使用し、ヒツジ赤血球感作の2日前にマウス腹腔内に 4mg を投与した。

⑩ 腫瘍マウス血清

背部皮下に腫瘍を移植し、腫瘍が径 20 mm 以上に成長したマウスから心臓穿刺にて採血し、血清を分離後、56°C、30分 で非働化したものを腫瘍マウス血清として用いた。

⑪ 摘脾マウス

マウスにエーテル吸入麻酔を行ない、左上側腹部の皮膚を切開し、脾の位置を確認し、腹膜を切開した後、脾臓を摘出した。脾臓摘出後は絹糸で腹膜、皮膚を縫合した。この脾摘出術による死亡は5%以下であつたが、手術侵襲の影響をできるだけ避けるため、摘脾の4週後に実験に用いた。

⑫ 有意差の検定

FPR, PFC, 腫瘍の体積は平均値の対照との有意差を Student の *t*-test によつて検定した。腫瘍発生 の検定には life table method¹⁷⁾ と censored rank test¹⁸⁾ を用いた。

実験結果

I. BCG による ヒツジ赤血球に対する免疫反応の賦活作用

BCG によつて惹起される免疫賦活作用についてヒツジ赤血球を抗原とした免疫反応を用い、delayed type hypersensitivity (DTH と略) を FPR で、抗体産生系を脾および膝窩リンパ節の PFC で検討した。BCG (1mg) を正常 C₃H/He マウスの足蹠にあらかじめ 1, 3, 5, 7, 11 週前に接種し、 1×10^7 のヒツジ赤血球を BCG の接種部位に感作した。FPR と PFC は感作4日後に行なつた。マウスは各群5匹を使用した。結果は図1で示すようにヒツジ赤血球単独感作では FPR (平均±標準偏差×0.1 mm) は 6.6 ± 1.0 であるのに対し、BCG 接種群では、BCG 接種からヒツジ赤血球感作までの期間が3週の場合の FPR は 9.1 ± 1.2 ($p < 0.025$)、5週では 10.9 ± 0.7

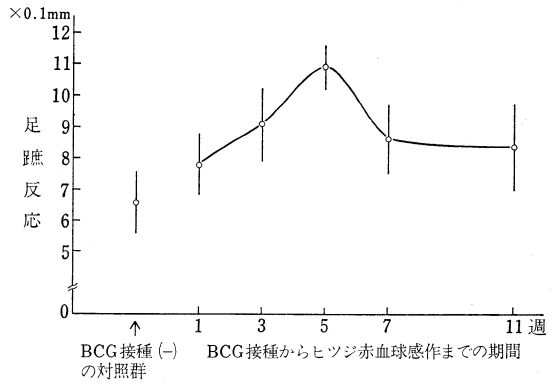


図1 BCG による足蹠反応の賦活

BCG (1mg) を 1, 3, 5, 7, 11 週前にマウスの右足蹠に接種し、 1×10^7 のヒツジ赤血球を BCG の接種と同一部位に感作し、その4日後に FPR を行なつた。各点は各群5匹の平均を示し、縦線は標準偏差を示す。

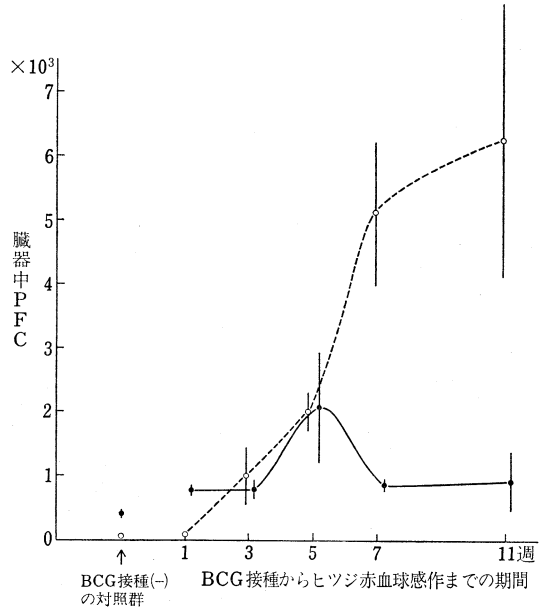


図2 BCG による脾およびリンパ節 PFC の賦活

BCG (1mg) を 1, 3, 5, 7, 11 週前にマウスの右足蹠に接種し、 1×10^7 のヒツジ赤血球を BCG の接種と同一部位に感作し、その4日後に脾 (○●) および膝窩リンパ節 (●●) PFC を測定した。各点は各群5匹の平均を示し、縦線は標準誤差を示す。

($p < 0.01$)、また7週では 8.6 ± 1.1 ($p < 0.05$) となつて、BCG 接種は FPR を有意に賦活した。一方、図2で示すようにヒツジ赤血球単独感作では脾 PFC (平均±標準誤差) は 62 ± 40 であるのに対し、BCG 接種群では、BCG 接種からヒツジ赤血球感作までの期間が5週の場合の脾 PFC は $2,000 \pm 310$ ($p < 0.01$)、7週では $5,100 \pm 1,160$ ($p < 0.025$)、また11週では $6,240 \pm 2,180$ ($p < 0.05$) となり、BCG 接種は脾 PFC を有意に増加し、特に7週以上では単独感作の80倍から100倍にも達した。また図2に示すようにヒツジ赤血球単独感作では膝窩リンパ節 PFC は 400 ± 50 であるのに対し、BCG 接種群では、

BCG 接種からヒツジ赤血球感作までの期間が5週の場合の膝窩リンパ節 PFC は $2,100 \pm 940 (p < 0.05)$ また7週では $860 \pm 60 (p < 0.05)$ となつて、BCG 接種は膝窩リンパ節 PFC に対しても有意にこれを増加した。

II. 腫瘍発生実験

(1) MCA 腫瘍発生に対する BCG および Wax D の効果

C₃H/He マウスの大腿部皮下に MCA(0.5mg) を注入し、BCG(1mg) または Wax D(300μg) を MCA と同時投与、4 週後投与、8 週後投与と変えて、その効果を比較検討した。MCA による腫瘍発生率は特に実験途中での非腫瘍死亡マウスを考慮し、life table method¹⁷⁾ を用いて表に示した。また各群の腫瘍発現の差については censored rank test¹⁸⁾ を用いて検定を行なつた。

表1は BCG または Wax D を MCA と同時投与し

た結果を示す。MCA 単独投与群の腫瘍発現に比較し、BCG接種群では腫瘍発現が有意に速められ ($p < 0.025$)、また Wax D 投与群においても MCA 単独投与群に比較し、腫瘍発現が著しく速められた ($p < 0.001$)。表2は BCG または Wax D を MCA 投与の4 週後に投与した結果を示す。MCA 投与の4 週後に BCG を接種した群では MCA 単独投与群に比較し、腫瘍発現が遅延される傾向がみられ、また MCA 投与の4 週後に Wax D を投与した群においては、MCA 単独投与群に比較し、腫瘍発現が有意に遅延された ($p < 0.025$)。なお、この表2に示された結果については、他の実験結果と比較し、最終的な MCA による腫瘍発生率が低く、また BCG 接種群や Wax D 投与群に非腫瘍死亡マウスが多くみられているので、このことを十分考慮しておかねばならないと思われる。表3は BCG または Wax D を MCA と同

表1 MCA 腫瘍発生に対する BCG および Wax D の効果
(その 1. MCA と BCG または Wax D 同時投与群)

| 処 置 | マウス匹数 | MCA 投与後週数 | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-------|-----------|----|----|----|----|-----|----|----|----|----|----|-----|----|
| | | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | |
| 1. MCA 単独投与群 | 30 | 腫瘍発生累積 | 0 | 0 | 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 12 | 14 | 19 | 21 | 23 |
| | | 非腫瘍死亡累積 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| | | 腫瘍発生率(%) | 0 | 0 | 0 | 10 | 21 | 32 | 43 | 43 | 52 | 72 | 80 | 88 |
| 1. MCA・BCG 同時投与群 | 30 | 腫瘍発生累積 | 0 | 0 | 3 | 8 | 11 | 18 | 22 | 26 | 28 | 29 | 30 | |
| | | 非腫瘍死亡累積 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | 腫瘍発生率(%) | 0 | 0 | 10 | 27 | 37 | 60 | 73 | 87 | 93 | 97 | 100 | |
| 3. MCA・Wax D 同時投与群 | 10 | 腫瘍発生累積 | 0 | 0 | 0 | 7 | 9 | | | | | | | |
| | | 非腫瘍死亡累積 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | |
| | | 腫瘍発生率(%) | 0 | 0 | 0 | 74 | 100 | | | | | | | |

20-MCA (0.5 mg) を 0.1 ml のオリーブ油に溶解し、マウスの右大腿部皮下に注入した。
BCG (1mg) または Wax D (300 μg) を MCA 投与と同日に右足趾に注射した。
BCG は生食浮遊液で、また Wax D は Drakeol 6-VR に溶解し使用した。
なお MCA 注入部位に触知可能な腫瘍形成を腫瘍発生とした。

表2 MCA 腫瘍発生に対する BCG および Wax D の効果
(その 2. BCG または Wax D の4 週後投与群)

| 処 置 | マウス匹数 | MCA 投与後週数 | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-------|-----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | |
| 1. MCA 単独投与群 | 23 | 腫瘍発生累積 | 0 | 1 | 4 | 5 | 7 | 10 | 10 | 11 | 12 | 13 | 13 | 13 |
| | | 非腫瘍死亡累積 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | 腫瘍発生率(%) | 0 | 4 | 18 | 23 | 32 | 45 | 45 | 50 | 54 | 59 | 59 | 59 |
| 2. MCA + 4 週後 BCG 接種群 | 24 | 腫瘍発生累積 | 1 | 2 | 3 | 4 | 4 | 4 | 6 | 8 | 9 | 9 | 10 | 10 |
| | | 非腫瘍死亡累積 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 4 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| | | 腫瘍発生率(%) | 4 | 9 | 13 | 18 | 18 | 18 | 23 | 37 | 42 | 42 | 49 | 49 |
| 3. MCA + 4 週後 Wax D 投与群 | 24 | 腫瘍発生累積 | 0 | 0 | 2 | 3 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 8 |
| | | 非腫瘍死亡累積 | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | | 腫瘍発生率(%) | 0 | 0 | 9 | 13 | 13 | 18 | 18 | 18 | 18 | 18 | 28 | 39 |

20-MCA (0.5 mg) を右大腿部皮下に注入し、4 週後に BCG (1mg) または Wax D 300 μg を右足趾に注射した。

表3 MCA腫瘍発生に対するBCGおよびWax Dの効果
(その3. BCGまたはWax Dの同時投与群および8週後投与群)

| 処 置 | マウス匹数 | MCA投与後週数 | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-------|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|-----|----|
| | | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | |
| 1. MCA・BCG 同時投与群 | 24 | 腫瘍発生累積 | 1 | 3 | 6 | 10 | 11 | 14 | 18 | 19 | 19 | 20 | 21 | 22 |
| | | 非腫瘍死亡累積 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | 腫瘍発生率(%) | 4 | 13 | 25 | 42 | 47 | 60 | 78 | 81 | 81 | 87 | 91 | 96 |
| 2. MCA・Wax D 同時投与群 | 23 | 腫瘍発生累積 | 4 | 6 | 9 | 13 | 16 | 17 | 19 | 20 | 21 | | | |
| | | 非腫瘍死亡累積 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | | | |
| | | 腫瘍発生率(%) | 18 | 28 | 42 | 61 | 76 | 81 | 90 | 95 | 100 | | | |
| 3. MCA 単独投与群 | 25 | 腫瘍発生累積 | 0 | 2 | 5 | 7 | 11 | 13 | 15 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |
| | | 非腫瘍死亡累積 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| | | 腫瘍発生率(%) | 0 | 8 | 20 | 28 | 44 | 54 | 64 | 74 | 79 | 85 | 90 | 95 |
| 4. MCA+8週後BCG接種群 | 21 | 腫瘍発生累積 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 | 5 | 10 | 13 | 16 | 19 | 19 |
| | | 非腫瘍死亡累積 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | | 腫瘍発生率(%) | 0 | 0 | 0 | 5 | 10 | 15 | 25 | 50 | 65 | 80 | 95 | 95 |
| 5. MCA+8週後Wax D投与群 | 24 | 腫瘍発生累積 | 0 | 3 | 6 | 9 | 14 | 17 | 17 | 19 | 21 | 21 | 22 | |
| | | 非腫瘍死亡累積 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | |
| | | 腫瘍発生率(%) | 0 | 13 | 27 | 41 | 63 | 77 | 77 | 86 | 95 | 95 | 100 | |

20-MCA (0.5 mg) を右大腿部皮下に注入し、BCG (1 mg) または Wax D (300 µg) を右足趾に MCA と同日 (同時投与群) および 8 週後 (8 週後投与群) に注射した。

表4 MCA腫瘍発生に対するWax DおよびDrakeolの効果
(その4. Wax DまたはDrakeolの4週後投与群)

| 処 置 | マウス匹数 | MCA投与後週数 | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------|----------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| | | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 18 | 20 | |
| 1. MCA 単独投与群 | 21 | 腫瘍発生累積 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 5 | 10 | 16 | 19 |
| | | 非腫瘍死亡累積 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| | | 腫瘍発生率(%) | 0 | 0 | 0 | 10 | 21 | 21 | 24 | 48 | 79 | 95 |
| 2. MCA+Drakeol 4週後投与群 | 21 | 腫瘍発生累積 | 1 | 1 | 3 | 3 | 7 | 10 | 13 | 13 | 16 | 19 |
| | | 非腫瘍死亡累積 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| | | 腫瘍発生率(%) | 5 | 5 | 15 | 15 | 35 | 50 | 65 | 65 | 81 | 100 |
| 3. MCA+Wax D 4週後投与群 | 21 | 腫瘍発生累積 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 5 | 8 | 16 | 19 |
| | | 非腫瘍死亡累積 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 |
| | | 腫瘍発生率(%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 10 | 25 | 40 | 84 | 100 |

20-MCA (0.5 mg) を右大腿部皮下に注入し、Drakeol 6-VR (0.05 ml) または Wax D (300 µg) を MCA 投与後 4 週で右足趾に注射した。

時投与した結果と、BCG または Wax D を MCA 投与の 8 週後に投与した結果を示す。BCG を MCA と同時接種した群では MCA 単独投与群に比較し、わずかであるが腫瘍発現が速められ、また Wax D を MCA と同時投与した群においては、MCA 単独投与群に比較し、腫瘍発現が有意に速められた ($p < 0.05$)。一方 BCG を MCA 投与の 8 週後に接種した群では MCA 単独投与群に比較し、腫瘍発現が著しく遅延され ($p < 0.05$)、また MCA 投与後 8 週での Wax D 投与群では MCA 単独投与群に比較し、腫瘍発現が速められる傾向が示され

た。表4は Drakeol または Wax D を MCA 投与の 4 週後に投与した結果を示す。MCA 投与の 4 週後に Drakeol を投与した群では MCA 単独投与群に比較し、腫瘍発現が速められる傾向が示され、MCA 投与の 4 週後に Wax D を投与した群では MCA 単独群に比べ、わずかであるが腫瘍発現が遅延された。なお Wax D 投与群の腫瘍発現を Drakeol 投与群のそれと比較した場合では MCA 投与 4 週後の Wax D 投与は腫瘍発現を有意に遅延した ($p < 0.025$)。以上表1から表4までに示されたように、BCG は MCA 腫瘍発生に対して、MCA

表5 MCAによるヒツジ赤血球に対する免疫反応の抑制とBCGによる回復

| 処置 | 足趾反応 (平均±標準偏差) | t-検定 | 脾PFC (平均±標準誤差) | t-検定 | 膝窩リンパ節PFC (平均±標準誤差) | t-検定 |
|------------------|-------------------|-------------|-------------------|-------------|------------------------|------------|
| 正常対照群 | 8.8±1.3 | | 1,380±245 | | 1,510±280 | |
| MCA処置群(1週後) | 5.0±1.2 | $p < 0.025$ | 840±135 | N. S. | 880±200 | N. S. |
| 正常対照群 | 11.2±1.4 | $p < 0.01$ | 140±16 | N. S. | 360±100 | $p < 0.05$ |
| MCA処置群(4週後) | 6.2±1.1 | $p < 0.01$ | 100±15 | N. S. | 90±23 | $p < 0.01$ |
| MCA・BCG処置群(4週後) | 12.4±1.8 | | 170±46 | | 780±120 | |
| 正常対照群 | 8.2±1.5 | $p < 0.05$ | 250±63 | N. S. | 525±75 | $p < 0.01$ |
| MCA処置群(8週後) | 4.6±2.4 | $p < 0.025$ | 100±24 | $p < 0.025$ | 50±10 | $p < 0.01$ |
| MCA・BCG処置群(8週後) | 9.4±3.6 | | 2,610±750 | | 760±240 | |
| 正常対照群 | 6.5±0.5 | $p < 0.01$ | 160±65 | N. S. | 110±25 | $p < 0.01$ |
| MCA処置群(12週後) | 1.4±1.0 | $p < 0.01$ | 120±35 | $p < 0.025$ | 12±5 | N. S. |
| MCA・BCG処置群(12週後) | 5.7±1.6 | | 4,470±1,230 | | 33±6 | |

MCA (0.5 mg) をマウス背部皮下に投与し、MCA 投与後 1, 4, 8, 12 週でヒツジ赤血球 (1×10^7) の右足趾感作を行ない、4 日後に足趾反応と PFC を測定した。

BCG (1 mg) は MCA 投与後 1 週で右足趾に接種した。なお MCA 投与後 4, 8, 12 週は BCG 接種群では BCG 接種後 3, 7, 11 週にあたる。検定は Student の t-検定による。N.S. は有意差なし。

と同時接種で腫瘍発現を速め、MCA の 4 週後接種では腫瘍発現をわずかであるが遅延させ、MCA 投与の 8 週後接種にて顕著に腫瘍発現を遅延させた。また WaxD は MCA 投与と同時に投与で MCA による腫瘍発現を著しく速め、MCA 投与の 4 週後投与では腫瘍発現を遅延させ、MCA 投与の 8 週後投与にて腫瘍発現を速めた。

(2) MCA によるヒツジ赤血球に対する免疫反応の抑制と BCG による回復

MCA の免疫抑制作用と BCG 接種による免疫能の回復についてヒツジ赤血球を抗原とした免疫反応を用いて検討した。各マウスに MCA (0.5 mg) を背部皮下に投与し、投与後 1, 4, 8, 12 週と経時的に MCA がヒツジ赤血球に対する反応に与える影響を検討した。BCG の効果については MCA 投与後 1 週で BCG (1 mg) を足趾に接種し、その効果をみた。ヒツジ赤血球は 1×10^7 を足趾に感作し、その 4 日後に FPR と PFC を測定した。

結果を表 5 に示す。MCA が FPR に与える影響をみると、MCA 投与後 1 週では対照のマウスの FPR が 8.8 ± 1.3 であるのに対し、MCA 処置マウスの FPR は 5.0 ± 1.2 ($p < 0.025$) であり、この FPR の低下は MCA 投与後 4 週および 8 週においても同様に認められた。また MCA による腫瘍発現がみられる MCA 投与後 12 週となると対照の正常マウスの FPR が 6.5 ± 0.5 であるのに対して、MCA 処置マウスの FPR は 1.4 ± 1.0 ($p < 0.01$) と極端に低下した。一方、MCA 投与後 4 週では MCA 単独処置マウスの FPR は 6.2 ± 1.1 であるのに対し、BCG 接種マウスの FPR は 12.4 ± 1.8 ($p < 0.01$) となり、MCA 投与後 8 週で比較するとそれぞれ 4.6 ± 2.4 と 9.4 ± 3.6 ($p < 0.025$) と BCG 接種す

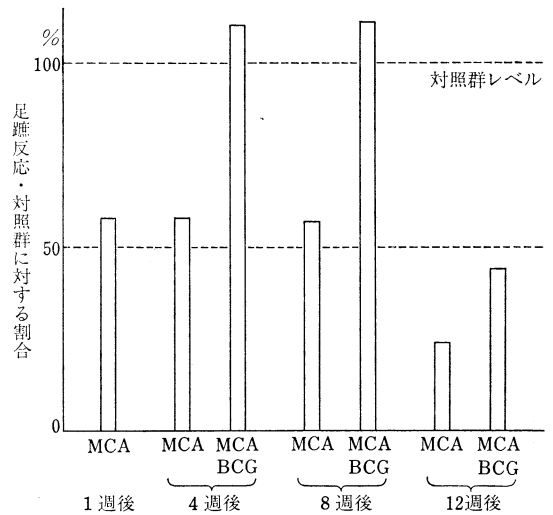


図3 MCAによる足趾反応抑制効果とBCGによる回復

棒グラフは対照群を100としたときの割合を表す。

ることで MCA によつて抑制された FPR が図 3 に示すように対照の正常マウスの FPR のレベル以上に回復された。しかし MCA によつて極端に FPR が 1.4 ± 1.0 と低下した MCA 投与後 12 週では BCG 接種群においても FPR は 5.7 ± 1.6 であり、対照の正常マウスの FPR 6.5 ± 0.5 以下であつた。次に MCA が脾 PFC に与える影響をみると、MCA 投与後 1 週から 12 週に至るまで MCA 処置マウスの脾 PFC は対照の正常マウスの脾 PFC の 50% 前後であり、MCA は顕著に脾 PFC を減少させた。一方、MCA 処置後 1 週で BCG を接種した群についてみると、MCA 投与後 8 週では MCA 単独処置マウスの脾 PFC が 100 ± 24 であるのに対して、BCG

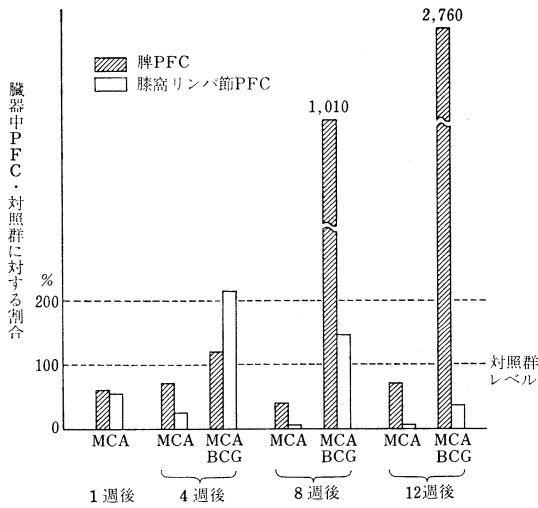


図4 MCAによるPFCの抑制効果とBCGによる回復

棒グラフは対照群を100としたときの割合を表す。

接種群の脾PFCは、 $2,610 \pm 750$ ($p < 0.025$)であり、MCA投与後12週と比較すると、それぞれ 120 ± 35 と $4,470 \pm 1,230$ ($p < 0.025$)とBCG接種はMCAによつて抑制された脾PFCを図4に示すように対照の正常マウスの脾のPFC 10倍から25倍にも増加した、またMCAの膝窩リンパ節PFCに与える影響をみると、MCA投与後1週でMCA処置マウスのPFCは対照の正常マウスのPFCの58%であり、MCA投与後4週、8週、12週では極端に低下し、対照の正常マウスと比較すれば10%から25%となつて、MCAは膝窩リンパ節PFCに対しても強い抑制作用を示した。一方、MCA処置後1週でBCGを接種した群についてみると、MCA投与後4週ではMCA単独処置マウスの膝窩リンパ節PFCは 90 ± 23 であるのに対してBCG接種群のPFCは 780 ± 120 ($p < 0.01$)であり、MCA投与後8週ではそれぞれ 50 ± 10 と 760 ± 240 ($p < 0.01$)であり、BCG接種はMCAで抑制された膝窩リンパ節PFCを図4で示すように対照の正常マウスのPFC以上に増加した。しかしMCA処置によつて膝窩リンパ節PFCが 12 ± 5 と極端に低下したMCA投与後12週ではBCG接種群においてもPFCも 33 ± 6 と対照の正常マウスのPFCの 110 ± 25 より著しく低値であつた。

III. 移植腫瘍実験

(1) BCGによる移植腫瘍の発育抑制と発育促進

MCA誘発肉腫 (fibrosarcoma) を用いて、BCGが移植腫瘍に及ぼす効果について検討した。はじめにBCG (1mg) をマウス足趾に接種し、3週後に 1×10^5 の腫瘍細胞を背部皮下に移植した。図5は移植後の腫瘍発育を示す。腫瘍移植後25日では無処置対照群の腫瘍の大きさ

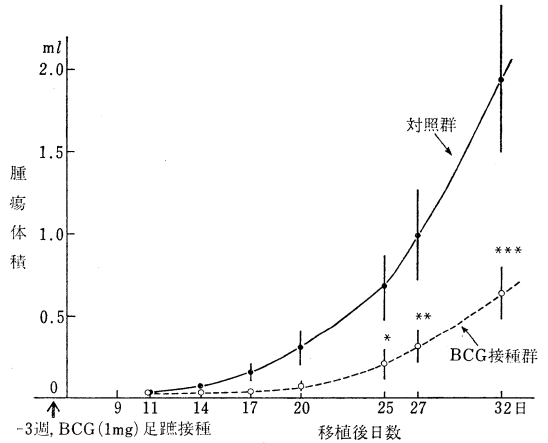


図5 BCGによる移植腫瘍の発育抑制効果

C₃H/HeマウスにBCG (1mg) を足趾接種し、3週後にMCA誘発肉腫細胞 (1×10^5) を背部皮下に移植した。BCG接種群、対照群ともに9匹の平均を示す。縦線は各群の標準誤差を示し、*t*-検定は*、 $p < 0.05$ **、 $p < 0.025$ ***、 $p < 0.01$ を表す。

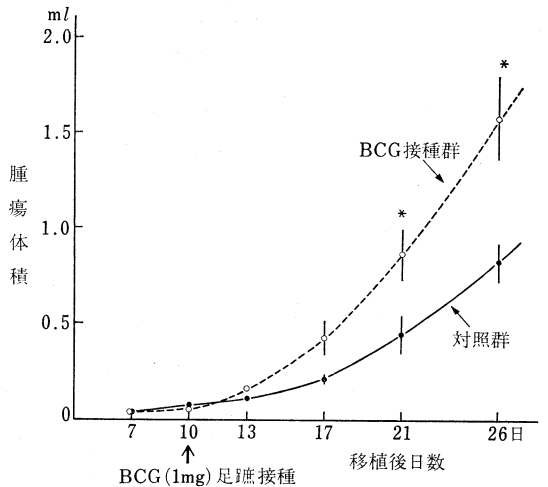


図6 BCGによる移植腫瘍の発育促進効果

MCA誘発肉腫細胞 (1×10^5) をC₃H/Heマウスの背部皮下に移植し、移植腫瘍が腫瘍を形成した後(移植後10日目)に足趾にBCG (1mg) を接種した。BCG接種群は9匹、対照群は5匹の平均を示す。縦線は各群の標準誤差を示し、*t*-検定は*、 $p < 0.05$ を表す。

は 0.67 ± 0.19 ml であるのに対し、BCG前処置群は 0.20 ± 0.07 ml ($p < 0.05$) であり、移植後27日では無処置対照群の 1.00 ± 0.29 ml に対し、BCG接種群は 0.32 ± 0.10 ml ($p < 0.025$)、また、移植後32日では無処置対照群の 1.93 ± 0.4 ml に対し、BCG接種群は 0.64 ± 0.16 ml ($p < 0.01$) であつた。腫瘍移植前3週でのBCG接種は移植腫瘍の発育を有意に抑制した。次に 1×10^5 の腫瘍をマウス背部皮下に移植し、腫瘍形成が明らかになつた腫瘍移植後10日目にBCG (1mg) を足趾に接種した。図6は移植後の腫瘍発育を示す。腫瘍移植後21日では無処置対照群の腫瘍の大きさは 0.46 ± 0.08 ml あるの対

表 6 腫瘍皮下移植マウスにおける BCG の足蹠反応賦活作用

| 処 | 置 | 足蹠反応 (平均±標準偏差) | t-検定 |
|---------|------------------|-------------------|----------------------------------|
| 正常対照群 | a. ヒツジ赤血球単独 | 10.0±1.6 | a-b $p < 0.05$ a-c $p < 0.01$ |
| | b. BCG+ヒツジ赤血球 | 12.6±1.7 | |
| | c. BCG+CY+ヒツジ赤血球 | 18.6±2.0 | |
| 腫瘍皮下移植群 | d. ヒツジ赤血球単独 | 6.2±2.0 | a-d $p < 0.025$ |
| | e. BCG+ヒツジ赤血球 | 7.7±2.0 | d-e N.S. |
| | f. BCG+CY+ヒツジ赤血球 | 14.8±3.4 | d-f $p < 0.01$ |

MCA 誘発肉腫細胞 (5×10^4) をマウス皮下に移植し, 7日後に BCG (1 mg) を右足蹠に接種した。腫瘍移植後28日
でヒツジ赤血球 (1×10^7) の右足蹠感作を行ない, その4日後に足蹠反応を行なった。CY は 4 mg をヒツジ赤血球感作
の2日前に腹腔内に投与した。各群5匹の平均を示す。検定は Student の t-検定による。N.S. は有意差なし。

表 7 腫瘍皮下移植マウスにおける BCG の PFC 賦活作用

| 処 | 置 | 脾 PFC (平均±標準誤差) | t-検定 | 膝窩リンパ節 PFC (平均±標準誤差) | t-検定 |
|---------|------------------|--------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| 正常対照群 | a. ヒツジ赤血球単独 | 125±40 | a-b $p < 0.05$ a-c N.S. | 125±40 | a-b $p < 0.05$ a-c $p < 0.05$ |
| | b. BCG+ヒツジ赤血球 | 1,230±450 | | 570±160 | |
| | c. BCG+CY+ヒツジ赤血球 | 180±40 | | 10±0 | |
| 腫瘍皮下移植群 | d. ヒツジ赤血球単独 | 380±95 | a-d $p < 0.05$ | 40±5 | a-d N.S. |
| | e. BCG+ヒツジ赤血球 | 3,390±660 | d-e $p < 0.01$ | 1,950±470 | d-e $p < 0.01$ |
| | f. BCG+CY+ヒツジ赤血球 | 20±10 | d-f $p < 0.05$ | 10±0 | d-f $p < 0.01$ |

MCA 誘発肉腫細胞 (5×10^4) をマウス皮下に移植し, 7日後に BCG (1 mg) を右足蹠に接種した。腫瘍移植後28日
でヒツジ赤血球 (1×10^7) の右足蹠感作を行ない, その4日後に PFC を測定した。CY は 4 mg をヒツジ赤血球感作の2日前に腹腔内に投与した。各群5匹の平均を示す。
検定は Student の t-検定による。N.S. は有意差なし。

表 8 腫瘍静注移植マウスにおける BCG の足蹠反応賦活

| 処 | 置 | 足蹠反応 (平均±標準偏差) $\times 0.1 \text{ mm}$ | t-検定 |
|---------|------------------|--|----------------|
| 正常対照群 | a. ヒツジ赤血球単独 | 6.4±1.2 | |
| 腫瘍静注移植群 | b. ヒツジ赤血球単独 | 6.7±0.5 | a-b N.S. |
| | c. BCG+ヒツジ赤血球 | 3.9±0.8 | b-c $p < 0.01$ |
| | d. BCG+CY+ヒツジ赤血球 | 11.9±1.3 | b-d $p < 0.01$ |
| | e. CY+ヒツジ赤血球 | 9.1±2.3 | b-e $p < 0.01$ |

MCA 誘発肉腫細胞 (1×10^5) をマウス尾静脈より静注移植し, 10日後に BCG (1 mg) を右足蹠に接種した。腫瘍移植後
30日, 前に腹腔ヒツジ赤血球 (1×10^7) の右足蹠感作を行ない, その4日後に足蹠反応を行なった。CY は 4 mg をヒツジ赤血
球感作の2日以内に投与した。各群5匹の平均を示す。検定は Student の t-検定による。N.S. は有意差なし。

し, BCG 処置群では $0.87 \pm 0.13 \text{ ml}$ ($p < 0.05$) であり, 移植後26日では無処置対照群の $0.82 \pm 0.10 \text{ ml}$ に対し, BCG 接種群は $1.58 \pm 0.23 \text{ ml}$ ($p < 0.05$) であつた。移植腫瘍が腫瘍形成した後での BCG 接種は腫瘍発育を有意に促進した。

(2) 腫瘍移植マウスにおけるヒツジ赤血球に対する免疫反応と, BCG および CY の併用効果

5×10^4 の MCA 誘発肉腫細胞をマウス背部に皮下移植し, 径が 10 mm から 20 mm の腫瘍を形成したマウスを腫瘍皮下移植マウスとし, また 1×10^5 の腫瘍細胞を尾静脈より静注し, 腫瘍が肺に多数の腫瘍を形成したマウスを腫瘍静注移植マウスとして用いて, 腫瘍移植マウスにおけるヒツジ赤血球に対する免疫反応と, それに及ぼ

す BCG の効果について検討した。腫瘍皮下移植マウスでは腫瘍移植後7日目に BCG (1 mg) を足蹠に接種し, 腫瘍移植後28日目に 1×10^7 のヒツジ赤血球を BCG 接種部に感作した。FPR と PFC は感作後4日目に行なつた。また腫瘍静注移植マウスでは腫瘍移植後10日目に BCG (1 mg) を足蹠に接種し, 腫瘍移植後30日目に腫瘍皮下移植の場合と同様にヒツジ赤血球に対する反応を見た。表6は腫瘍皮下移植マウスのFPRとBCGの効果を示す。対照の正常マウスFPRが 10.0 ± 1.6 であるのに対し, 腫瘍皮下移植マウスのFPRは 6.2 ± 2.0 ($p < 0.025$) と顕著に低下した。また, この腫瘍皮下移植マウスでは BCG 接種した群においても FPR は 7.7 ± 0.20 (N.S.) であつて, BCG 接種による FPR の有意の賦活はみられ

表9 腫瘍静注移植マウスにおけるBCGのPFC賦活作用

| 処 置 | 脾 PFC (平均±標準誤差) | t-検定 | 膝窩リンパ節 PFC (平均±標準誤差) | t-検定 |
|-------------------|--------------------|-------------|----------------------------|-----------------|
| 正常対照群 a. ヒツジ赤血球単独 | 190±130 | | 90±20 | |
| 腫瘍静注移植群 | b. ヒツジ赤血球単独 | 190±90 | 140±40 | a-b N.S. |
| | c. BCG+ヒツジ赤血球 | 3,200±1,250 | 360±50 | b-c $p < 0.01$ |
| | d. BCG+CY+ヒツジ赤血球 | 110±30 | 10±5 | b-d $p < 0.025$ |
| | e. CY+ヒツジ赤血球 | 10±10 | 0 | b-e $p < 0.025$ |

MCA 誘発肉腫細胞 (1×10^5) をマウス尾静脈より静注移植し、10日後に BCG (1mg) を右足趾に接種した。腫瘍移植後 30 日でヒツジ赤血球 (1×10^7) の右足趾感作を行ない、4 日後に PFC を測定した。CY は 4mg をヒツジ赤血球感作の 2 日前に腹腔内に投与した。各群 5 匹の平均を示す。検定は Student の t-検定による。N.S. は有意差なし。

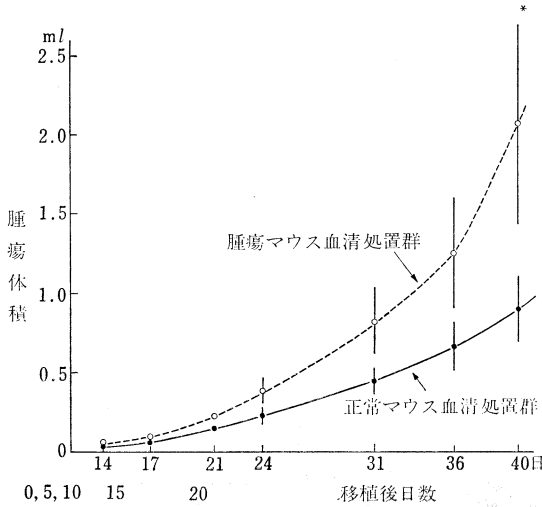


図7 腫瘍マウス血清による移植腫瘍の発育促進効果

MCA 誘発肉腫細胞 (3×10^4) を C,H/He マウスの背部皮下に移植し、腫瘍移植後 0, 5, 10, 15, および 20 日で 0.2ml (計 1.0ml) の腫瘍マウス血清または正常マウス血清を腹腔内に注射した。腫瘍マウス血清群は 10 匹、正常マウス血清群は 17 匹の平均を示す。縦線は各群の標準誤差を示し、t-検定は $*p < 0.05$ を表す。

なかつた。表7は腫瘍皮下移植マウスの脾 PFC、膝窩リンパ節 PFC と BCG の効果を示す。脾 PFC については、対照の正常マウスの脾 PFC が 125 ± 40 であるのに対し、腫瘍皮下移植マウスの脾 PFC は 380 ± 95 ($p < 0.05$) と有意な増加がみられ、この腫瘍皮下移植マウスに BCG 接種すると脾 PFC は $3,280 \pm 660$ ($p < 0.01$) と極端に増加した。また膝窩リンパ節 PFC については対照の正常マウスの PFC が 125 ± 40 であるのに対し、腫瘍皮下移植マウスの PFC は 40 ± 5 (N.S.) と減少がみられ、この腫瘍皮下移植マウスに BCG を接種すると、膝窩リンパ節 PFC は $1,950 \pm 470$ ($p < 0.01$) となつて、BCG 接種によつて膝窩リンパ節 PFC の顕著な増加がみられた。表8は腫瘍静注移植マウスの FPR と BCG の効果を示す。対照の正常マウスの FPR が 6.4 ± 1.2 であるのに対し、腫瘍静注移植マウスの FPR は $6.7 \pm$

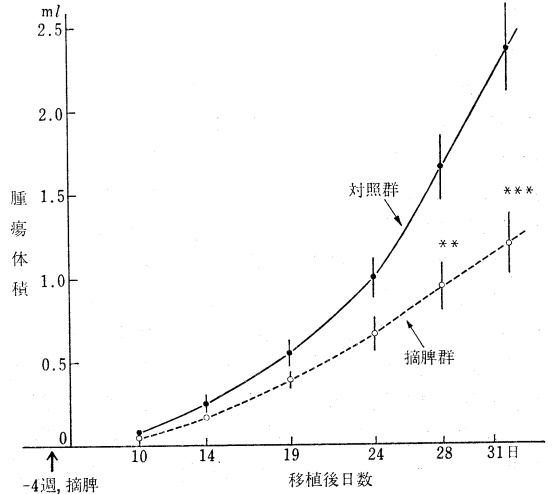


図8 摘脾による移植腫瘍の発育抑制効果

C,H/He マウスの脾摘出を行ない、4 週後に MCA 誘発肉腫細胞 (2×10^5) を移植した。摘脾群、対照群ともに 8 匹の平均を示す。縦線は標準誤差を示し、t-検定は $**p < 0.025$ $***p < 0.01$ を表す。

0.5 とほぼ同じであつた。しかし、この腫瘍静注移植マウスに BCG を接種すると FPR は 3.9 ± 0.8 ($p < 0.01$) とかえつて BCG 接種によつて低下した。表9は腫瘍静注移植マウスの脾 PFC、膝窩リンパ節 PFC と BCG の効果を示す。脾 PFC については対照の正常マウスの脾 PFC が 190 ± 130 であるのに対し、腫瘍静注移植マウスの脾 PFC も 190 ± 90 と同じであつた。また、この腫瘍静注移植マウスに BCG を接種すると脾 PFC は $3,200 \pm 1,250$ ($p < 0.01$) と顕著に増加した。膝窩リンパ節 PFC については対照の正常マウスの PFC が 90 ± 20 であるのに対し、腫瘍静注移植マウスの PFC は 140 ± 40 (N.S.) であり、この腫瘍静注移植マウスに BCG を接種すると膝窩リンパ節 PFC は 360 ± 50 ($p < 0.025$) と有意に増加した。一方、この腫瘍皮下移植マウスおよび静注移植マウスにおけるヒツジ赤血球に対する反応を検討した際に CY の併用効果についても検討した。CY はヒツジ赤血球感作の 2 日目に腹腔内に 4mg を注射した。表6に示すように、腫瘍皮下移植マウスの FPR は 6.2 ± 2.0 であり、BCG 接種群においても 7.7 ± 2.0 (N.S.) で

あつて BCG による賦活は示されなかつた。しかし BCG と CY の併用群では FPR は 14.8 ± 3.4 ($p < 0.01$) と顕著に増強された。また表 8 に示すように腫瘍静注移植マウスの FPR は 6.7 ± 0.5 であり、BCG 接種群においては FPR は 3.8 ± 0.8 ($p < 0.01$) とかえつて低下したのに対し、BCG と CY の併用群では FPR は 11.9 ± 1.3 ($p < 0.01$) と顕著に増強された。なお脾 PFC、膝窩リンパ節 PFC は CY 併用群ではすべて完全に抑制された。

(3) MCA 誘発肉腫に対する腫瘍マウス血清と摘脾の効果

MCA 誘発肉腫をマウス背部に移植し、径が 20mm 以上の腫瘤形成がみられるマウスから血清を採取し、これをマウス血清として用いた。マウス背部皮下に 3×10^4 の腫瘍細胞を移植し、腫瘍移植後 0, 5, 10, 15, 20 日にそれぞれ 0.2 ml の腫瘍マウス血清を腹腔内に投与した。対照群には C_3H/He 正常マウス血清を同様に投与した。図 7 は移植後の腫瘍発育を示す。腫瘍移植後 40 日において正常マウス血清投与群の腫瘍の大きさは 0.96 ± 0.22 ml であるのに対し、腫瘍マウス血清投与群では 2.17 ± 0.64 ml ($p < 0.05$) となつて腫瘍マウス血清は腫瘍発育を有意に促進した。次に C_3H/He マウスの摘脾を行ない、摘脾の 4 週後に 2×10^5 の腫瘍細胞をマウス背部皮下に移植した。図 8 は移植後の腫瘍発育を示す。腫瘍移植後 28 日では無処置対照群の腫瘍の大きさは 1.64 ± 0.21 ml であるのに対し、摘脾群では 0.94 ± 0.16 ($p < 0.025$) であり、腫瘍移植後 31 日では無処置対照群の 2.37 ± 0.28 ml に対し、摘脾群は 1.19 ± 0.19 ml ($p < 0.01$) となつて腫瘍移植の 4 週前の摘脾は腫瘍発育を有意に抑制した。

考 察

BCG の抗腫瘍効果に関する研究はかなり古くから行なわれ、これまで多くの興味ある結果が報告されている。腫瘍発生に関して、Old¹⁹⁾(1961年)はマウスに MCA を用いた実験で MCA 投与後 86 日で BCG を接種し、MCA による腫瘍発現が遅延したと述べ、その後、Lemond²⁰⁾(1966年)はハムスターに Polyomavirus、Sjögren²¹⁾(1969年)はマウスに Adenovirus Type 12、徳永²²⁾(1974年)はマウスに MCA を用いて腫瘍誘発を行ない、BCG が腫瘍発現を抑制したと報告している。また Ankerst⁹⁾(1972年)はマウスに Adenovirus Type 12 を感染させ、感染後 4 週で BCG を接種すると腫瘍発現の抑制がみられ、感染後 9 週で BCG 接種した場合は反対に腫瘍発現が促進されることを指摘し、BCG の抗腫瘍効果の発現にはその接種時期が重要であると述べている。その後、この BCG の接種時期の重要性は Lavrin⁹⁾(1975年)が行なつた MCA を用いた実験においても述べられている。

一方、移植腫瘍に関しては Old¹⁹⁾(1961年)や Weiss²³⁾(1961年)が数種類のマウス移植腫瘍を用いた実験で、BCG を腫瘍移植の 1 週間または 4 週前に接種することによつて移植腫瘍の発育抑制がみられたと報告している。その後、Weiss⁷⁾(1966年)はマウスの移植腫瘍を用いて、BCG の接種時期とその効果について詳細な検討を行ない、一般に腫瘍移植前の BCG 接種は腫瘍発育を抑制し、腫瘍移植後の BCG 接種は腫瘍発育を促進すると述べている。また、このような BCG 接種時期とその効果発現に関して Bansal¹²⁾(1973年)はラットの Polyoma-induced sarcoma (PW 13) を用いた実験で BCG を腫瘍移植の 2 週間、または腫瘍移植と同時に接種すると、腫瘍発育が抑制され、移植腫瘍が触知可能な腫瘤形成した後の BCG 接種では、かえつて腫瘍発育が促進されたと述べている。本実験では C_3H/He マウスにおいて MCA による腫瘍誘発を行ない、BCG または Wax D がこの MCA による腫瘍誘発に与える効果をその投与時期をかえ、比較検討した。BCG の場合では、BCG を MCA 投与と同時に接種(表 1, 3)すると、MCA による腫瘍発現が速められ、MCA 投与の 4 週後(表 2)に接種すると腫瘍発現がわずかに遅延され、MCA 投与の 8 週後(表 3)に接種すると腫瘍発現が顕著に遅延された。また Wax D の場合では、Wax D を MCA と同時投与(表 1, 3)するか、または MCA 投与の 8 週後(表 3)に投与することで MCA による腫瘍発現が速められ、MCA 投与の 4 週後(表 2, 4)に投与すると腫瘍発現が遅延された。このように BCG や Wax D は MCA による腫瘍発現に対し、その投与時期によつて腫瘍発現の抑制から促進までの多様な効果を発現することが示された。一般に BCG による免疫賦活作用としては、網内系の賦活¹⁹⁾²⁴⁾²⁵⁾と抗体産生および細胞性免疫の賦活¹³⁾などがよく知られ、また、これらの免疫賦活作用は BCG を接種して 2 週から 4 週後に最も強く発現されると述べられている¹³⁾¹⁹⁾²⁴⁾²⁵⁾。しかし、これまで BCG の免疫賦活作用を長期間にわたつて検討した報告はない。本実験では正常 C_3H/He マウスにおけるヒツジ赤血球に対する免疫反応を用い、BCG 接種によつて惹起される免疫賦活作用を BCG 接種 11 週後まで検討した。BCG の足蹠接種では、BCG 接種後 5 週で FPR で表される DTH の強い賦活(図 1)が現れ、7 週以後、特に 11 週後では脾 PFC で表される抗体産生の顕著な賦活(図 2)が発現された。この実験結果は BCG の免疫賦活作用では DTH の賦活時期と抗体産生の賦活時期が異なつて発現されるということを示している。なお CF_1 ²⁶⁾、 C_57BL (unpublished data) 等の他の系のマウスにおいても BCG によつて DTH の賦活時期と抗体産生の賦活時期が異なつて発現されることが確認されている。これまで腫瘍誘発に使用される化学物質はそれ自体が免疫能を抑制する

作用をもつことはよく知られている。MCA による抗体産生の抑制作用として、MCA 処置マウスではヒツジ赤血球に対する脾 PFC が著しく低下することが Stjernswärd²⁷⁾ によつて報告されている。しかし MCA による細胞性免疫の抑制に関しては、Stjernswärd²⁷⁾ が同種移植片拒絶反応を用い、また Rees²⁸⁾ は GVH を用いて検討し、MCA による細胞性免疫の抑制は明らかでなかつたと述べている。本実験では MCA 処置マウス (表5) ではヒツジ赤血球に対する脾 PFC、膝窩リンパ節 PFC は低下し、また、前述のように同種移植片拒絶反応や、GVH を用いる方法ではみることができなかつた MCA の細胞性免疫の抑制をも、ヒツジ赤血球に対する FPR を用いることで明らかに確認できた。また、この FPR の低下は MCA 投与の1週後ですでに著明にみられ、特に MCA による腫瘍発現がみられる MCA 投与後12週では極端に低下し、この FPR の低下で表される細胞性免疫の障害と腫瘍発現との相関が示唆された。一方、Stjernswärd²⁹⁾ はこの MCA による脾 PFC の低下は BCG 接種によつて回復されうると述べている。本実験においても MCA 投与によつて低下した FPR は MCA 投与後1週で BCG を接種することによつて、MCA 投与後4週、8週において正常マウスの FPR 以上に回復され (図3)、また MCA によつて低下した脾 PFC は、BCG 接種によつて MCA 投与後8週、12週で正常マウスの脾 PFC の10倍から30倍にも増加した (図4)。このように BCG は MCA 処置マウスの低下した DTH、抗体産生ともに回復しうが、DTH 賦活の発現時期と抗体産生賦活の発現時期が異なることが示された。MCA 腫瘍誘発実験では MCA 投与後8週の BCG 接種は腫瘍発現を遅延したが、この場合では MCA による腫瘍発現がみられる MCA 投与後12週ごろが BCG による DTH の賦活時期に一致する。また BCG の MCA 同時接種では腫瘍発現が速められたが、この場合では MCA による腫瘍発現時期が BCG による抗体産生の顕著な賦活時期に一致することがわかる。また、以前³⁰⁾ に Wax D の免疫賦活に関しては Wax D 投与後3週から4週で抗体産生の賦活が出現し、Wax D 投与後9週以後になつて DTH の賦活がみられることを報告している。Wax D を MCA 投与後4週で投与すると腫瘍発現が遅延されたが、この場合では MCA による腫瘍発現の時期が Wax D の DTH の賦活時期に一致する。また MCA 投与の8週後に Wax D を投与すると MCA による腫瘍発現は速められ、この場合では MCA による腫瘍発現時期は Wax D の抗体産生の賦活時期に一致する。このように BCG、Wax D いずれの場合にも、腫瘍発現時期が著しい抗体産生の賦活と一致したときに腫瘍発現が速められていることがわかる。このことからこの腫瘍発現が速められる機序としては、

Hellström³¹⁾³²⁾、Baldwin³³⁾、Ankerst⁸⁾ が指摘した blocking factor(s) の関与が最も大であると考えられる。なお Wax D 投与によつて腫瘍発現が速められたことについては Drakeol (表4) が MCA の腫瘍発現を速めているし、また、これまで完全フロインドアジュバント自体が T 細胞を抑制すると述べた報告³⁴⁾³⁵⁾ もあり、この点も考慮する必要があると思われる。移植腫瘍実験では、BCG の腫瘍移植前接種 (図5) は腫瘍発育を抑制し、移植腫瘍の腫瘍形成後の BCG 接種 (図6) は腫瘍発育を促進した。正常マウスでの BCG によつて惹起される免疫賦活作用 (図1, 2) からすると、腫瘍移植の3週前に BCG を接種した場合では、移植された腫瘍が生着し、発育する時期に BCG によつて DTH の強い賦活が発現されていることがわかる。また、腫瘍皮下移植マウス (表6, 7) や腫瘍静注移植マウス (表8, 9) における BCG の免疫賦活からすると、腫瘍形成後の BCG 接種は DTH の賦活は発現されず、抗体産生のみ著しい賦活が発現されていると思われる。Bansal¹²⁾ が PW13 を使用した実験で腫瘍形成後の BCG 接種による腫瘍発育の促進機序には blocking factor が関与していると述べていることからしても、腫瘍形成後の BCG 接種で抗体産生のみ著しい賦活が発現されることが blocking factor の産生を高め、腫瘍発育を促進すると考えることができる。更に本実験では腫瘍マウス血清 (図7) は Bansal³⁶⁾ の報告と同様に腫瘍発育を促進し、また摘脾は Möller³⁷⁾、Pollack³⁸⁾、Milas³⁹⁾ の指摘したように腫瘍発育を抑制し、間接的ではあるが、この MCA 誘発肉腫の形成に blocking factor が関与していることが示された。一方、Hellström⁴⁰⁾ や Currie⁴¹⁾ が人の癌の血清中にこの blocking factor を証明し、人の癌の進展機序においてもこの blocking factor がもつ意味は極めて大きいと述べていることは、BCG がある条件で blocking factor の産生を促進するということが臨床的にも極めて重要な問題であることを示唆している。なお腫瘍移植マウスで BCG と CY の併用⁴²⁾ は抗体産生を抑制し、DTH のみを顕著に賦活したが、このような CY⁴³⁾⁴⁴⁾ の併用というものは、抗体産生を抑制することで blocking factor の産生を減少し、BCG の抗腫瘍効果発現に対して有効に働く可能性を示唆しているのかもしれない。近年、免疫反応を抑制する機序については、この blocking factor の他に免疫反応を抑制する T 細胞 (いわゆる Suppressor T cell) の概念が提唱され、特に Hardin⁴⁵⁾、Ha⁴⁶⁾、Zembala⁴⁷⁾ らは細胞性免疫を抑制する T 細胞の存在を指摘し、更に Fujimoto⁴⁸⁾⁴⁹⁾ らは移植腫瘍を用いた実験で、腫瘍免疫にもこの Suppressor T cell が存在すると述べている。本実験に用いた MCA 誘発肉腫についても、Fujimoto らの手技に従つてこの Suppressor T cell の関与について検討したところ、明らかにその存在

が示唆される結果がみられ、BCG の多様な腫瘍効果発現にも、この Suppressor T cell が関与している可能性もあると思われ、今後検討しなければならないと考えている。

以上総括すると、癌に対する BCG 免疫療法の有効性は BCG によつて、いかなる免疫賦活作用がひき出されるかにかかっていると思われ、抗体産生のみを賦活する条件では、BCG 接種がかえつて癌の進展を促進する危険が常にあると考えなければならない。

結 論

(1) 正常 C₃H/He マウスにおける BCG の免疫賦活をヒツジ赤血球を抗原とした免疫反応でみると、ヒツジ赤血球を BCG 接種後5週で感作した場合は DTH の賦活が顕著に発現され、BCG 接種11週で感作した場合は DTH の賦活は発現されず、抗体産生のみ著しく賦活された。

(2) MCA 腫瘍発生実験においては、BCG を MCA と同時接種すると腫瘍発現がわずかに遅延され、8週後に接種すると腫瘍発現が顕著に遅延された。一方、Wax D を MCA と同時投与、あるいは8週後に投与すると腫瘍発現が速められ、4週後に投与すると腫瘍発現が遅延された。

(3) MCA 処置マウスでは DTH および抗体産生ともに抑制された。MCA 投与後1週で BCG を接種すると、MCA 投与後4週から8週では DTH は正常レベル以上に回復され、12週では再び抑制傾向が示された。一方、抗体産生は BCG 接種によつて、MCA 投与後8週から12週で極端に賦活された。

(4) BCG の移植腫瘍に対する影響をみると、BCG の移植前接種は移植腫瘍の発育を抑制し、移植腫瘍の腫瘍形成後の BCG 接種は逆に腫瘍発育を促進した。

(5) 腫瘍移植マウスにおいては、ヒツジ赤血球に対する DTH は低下し、抗体産生系はむしろ亢進を示した。この腫瘍移植マウスに BCG を接種した場合は DTH の賦活は発現されず、抗体産生のみ極端に賦活された。一方、BCG と CY の併用はこれら腫瘍移植マウスにおいて抗体産生を抑制し、強い DTH を発現した。

(6) 腫瘍マウス血清は移植腫瘍の発育を促進し、一方、移植前の摘脾は逆に腫瘍発育を抑制した。

(稿を終わるにあたり、ご指導とご校閲を賜つた 恩師杉山浩太郎教授、石橋凡雄講師に衷心より感謝いたします。なお、本研究の要旨は第50回、第51回日本結核病学会において発表いたしました。)

文 献

- 1) Mathé, G., Amiel, J.L., Schwarzen, L., Schneider, M., Cattani, A., Schlumberger, J.R. and De Vassal, F.: *Lancet*, 1: 697, 1969.
- 2) Yamamura, Y., Yoshizaki, K., Azuma, I., Yagura, T. and Watanabe, T.: *Gann*, 66: 355, 1975.
- 3) Yamamura, Y., Ogura, T., Yoshimoto, T., Nishikawa, H., Sakatani, M., Itou, M., Masuno, T., Namba, M., Yazaki, H., Hirao, F. and Azuma, I.: *Gann*, 67: 669, 1976.
- 4) Yamamura, Y., Azuma, I., Taniyama, T., Sugimura, K., Hirao, F., Tokuzen, R., Okabe, M., Nakahara, W., Yasumoto, K. and Ohta, M.: *Ann. NY. Acad. Sci.*, 277: 209, 1976.
- 5) Moertel, C.G., Ritts, R.F., Jr., Schutt, A.J. and Hahn, R.G.: *Cancer Res.*, 35: 3075, 1975.
- 6) Perloff, M., Holland, J.F., Lumb, G.J. and Bekesi, J.G.: *Cancer Res.*, 37: 1191, 1977.
- 7) Weiss, D.W., Bonhag, R.S. and Leslie, P.: *J. Exp. Med.*, 124: 1039, 1966.
- 8) Ankerst, J. and Jonsson, N.: *Int. J. Cancer*, 10: 351, 1972.
- 9) Lavrin, D.H., Rosenberg, S.A., Connor, R.J. and Terry, W.D.: *Cancer Res.*, 33: 472, 1973.
- 10) Stjernswärd, J.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 40: 13, 1968.
- 11) Piessens, W.F., Lachapelle, F.L., Legros, N. and Heuson, J.C.: *Nature*, 228: 1210, 1970.
- 12) Bansal, S.C. and Sjögren, H.O.: *Int. J. Cancer*, 11: 162, 1973.
- 13) Miller, T.F., Mackaness, G.B. and Lagrange, P.H.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 51: 1669, 1973.
- 14) Jerne, N.K., Norclin, A.A. and Henry, C.: *Cell bound antibodies*, p.109, The Wister Institute Press, Philadelphia 1963.
- 15) Asselineau, J.: *Les lipides bacteriens*, p. 232 Herman, Paris 1962.
- 16) Attia, M.A. and Weiss, D.W.: *Cancer Res.*, 26: 1787, 1966.
- 17) Pike, M.C. and Roe, F.J.C.: *Brit. J. Cancer*, 17: 605, 1963.
- 18) Gehan, E.A.: *Biometrika*, 52: 203, 1965.
- 19) Old, L.O., Benacerraf, B., Carswell, F.A. and Stockert, F.: *Cancer Res.*, 21: 1281, 1961.
- 20) Lemonde, P. and Clode-Hyde, M.: *Cancer Res.*, 26: 585, 1966.
- 21) Sjögren, H.O. and Ankerst, J.: *Nature*, 221: 863, 1969.
- 22) Tokunaga, T., Yamamoto, S., Nakamura, R. and Kataoka, T.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 53: 459, 1974.
- 23) Weiss, D.W., Bonhag, F.A. and DeOme, K.B.: *Nature*, 190: 889, 1961.
- 24) Biozzi, G., Benacerraf, B., Grumbach, F., Halpern, B.N., Levaditi, J. and Rist, R.: *Ann. Inst. Pasteur*, 87: 291, 1955.
- 25) Blanden, R.V., Lefford, M.J. and Mackaness, G.B.: *J. Exp. Med.*, 129: 1079, 1969.
- 26) Harada, Y.: *Kekkaku*, 52: 515, 1977.

- 27) Stjernswärd, J.: J. Natl. Cancer Inst., 35 : 885, 1965.
- 28) Rees, J.A. and Symes, M.O.: Int. J. Cancer, 11 : 202, 1973.
- 29) Stjernswärd, J.: Cancer Res., 26 : 1591, 1966.
- 30) Ishibashi, T., Harada, Y., Yamada, H., Harada, S., Takamoto, M. and Sugiyama, K.: Jap. J. Exp. Med., 47 : 163, 1977.
- 31) Hellström, I. and Hellström, K.E.: Int. J. Cancer, 4 : 587, 1969.
- 32) Tamerius, J., Nepom, J., Hellström, I. and Hellström, K.E.: J. Immunol., 116 : 724, 1976.
- 33) Baldwin, R.W., Price, M.R. and Robins, R.A.: Nature New Biol., 238 : 185, 1972.
- 34) Asherson, G.L. and Allwood, G.G.: Clin. Exp. Immunol., 9 : 249, 1971.
- 35) Zola, H.: Clin. Exp. Immunol., 16 : 469, 1974.
- 36) Bansal, S.C., Hargreaves, R. and Sjögren, H.O.: Int. J. Cancer, 9 : 97, 1972.
- 37) Möller, E.: J. Natl. Cancer Inst., 35 : 1053, 1965.
- 38) Pollack, S.B.: Int. J. Cancer, 8 : 264, 1971.
- 39) Milas, L. and Mujangic, H.: Int. J. Cancer, 11 : 186, 1973.
- 40) Hellström, I., Sjögren, H.O., Warner, G. and Hellström, K.E.: Int. J. Cancer, 7 : 226, 1971.
- 41) Currie, G.A. and Basham, C.: Brit. J. Cancer, 26 : 427, 1972.
- 42) Mackaness, G.B., Lagrange, P.H. and Ishibashi, T.: J. Exp. Med., 139 : 1540, 1974.
- 43) Turk, J.L. and Poulter, L.W.: Clin. Exp. Immunol., 10 : 285, 1972.
- 44) Stockman, G.D., Heim, L.R., South, M.A. and Trentin, J.J.: J. Immunol., 110 : 277, 1973.
- 45) Hardin, J.A., Chused, T.M. and Steinberg, A.D.: J. Immunol., 111 : 650, 1973.
- 46) Ha, T.Y. and Waksman, B.H.: J. Immunol., 110 : 1290, 1973.
- 47) Zenbala, M. and Asherson, G.L.: Nature, 244 : 227, 1973.
- 48) Fujimoto, S., Green, M.I. and Schon, A.H.: J. Immunol., 116 : 791, 1976.
- 49) Fujimoto, S., Green, M.I. and Schon, A.H.: J. Immunol., 116 : 800, 1976.