

# 腫瘍の自動免疫に関する実験的ならびに臨床的研究

## —矢追抗原処理癌組織による癌免疫療法の試み—

金沢大学医学部外科学第2講座(主任 水上哲次教授)

簗 靖 男

(昭和44年9月26日受付)

本論文の要旨は、1967年10月第5回日本癌治療学会および1969年4月第69回日本外科学会総会において発表した。

癌の免疫に関する研究の究極の目的の一つは、生体の免疫学的防禦反応によって、同種移植組織片が宿主が拒否するのと同じ機作で癌組織を障害し、臨床的に癌治療への応用を図ることにある。このような癌免疫療法成立の可能性は、発癌個体が自己の癌を非自己と認識して、抗腫瘍性に作用しているか否かにかかっており、その解明の第一歩として、腫瘍特異抗原の検索が進められ、種々の癌原性物質や Virus で誘発された実験腫瘍においては、微弱ながら抗原性が存在し、これが宿主の抵抗性に関与していることが、1953年 Foley<sup>1)2)</sup>、1957年 Prehn ら<sup>3)</sup> 1960年 Klein ら<sup>4)</sup> 1958年武田ら<sup>5)</sup> によって明らかにされている。さらに人癌についても、1950年代から石川ら、<sup>6)7)</sup> Zilber<sup>8)</sup> をはじめ特異性抗原の存在を主張する報告が次第に増加して癌治療への免疫学的アプローチに期待を抱かせているが、癌患者の大多数が、その腫瘍の無制限の増殖をゆるしている現実から、仮令癌に特異抗原が存在するとしても、それは宿主生体に非自己として認識され難く、抗原として極めて微弱なものと考えられ、人癌の免疫療法をはばむ第1の原因に挙げられている。

次に第2の原因として、担癌宿主側の内部環境が免疫反応の発現を阻害する何らかの欠陥状態にあるものと推定されることである。すなわち、田中<sup>9)10)</sup>らが指摘しているように、癌の微弱な抗原に対しては、これに対応する宿主の免疫細胞が immunological tolerance 様となり、癌の進展に伴って過剰の抗原が産生されるために、immunological Paralysis の状態が発現し、自己の癌を非自己として認識できなくなるいわゆる免疫学的寛容状態が招来されることである。

ところで、水上ら<sup>11)</sup>、Lytton ら<sup>12)</sup> 多数の研究者によって、悪性腫瘍患者においては、細菌抗原に対する免疫学的防禦力あるいは遅延型アレルギー反応の減弱していることが報告されており、さらに癌に対する防禦反応と本質的に同一機序によって発現するとみなされている同種皮膚移植片の拒否反応が進行した癌患者では健康人に較べて著しく弱く、長期生着することが Grace ら<sup>13)</sup> によって報告されている。このような態勢において、近年免疫学の領域で関心をあつめている自己免疫疾患の病態生理の研究成果から、病的な代謝によって変化した臓器の組織内には、正常組織と異なった蛋白が生成され、これが抗原性を発現して、特定の臓器に抗原抗体反応をおこすことが判明し、他方、Landsteiner ら、<sup>14)15)</sup> 朝隈<sup>16)</sup> によって、血清蛋白を formaldehyde あるいは制癌剤で処理すると、その動物に対し明らかに抗原性を発揮するようになることが報告され、これらの代謝異常ならびに各種薬剤の影響により自己固有の蛋白の免疫学的特異性が変換されて自己に対し抗原性を発揮するようになる現象が、癌免疫療法の手段のひとつに導入されたのである。すなわち、癌の特異抗原の存在が明確にされていない現状において、人為的に何らかの措置を講じ、癌組織の抗原構造を修飾あるいは変換し、宿主に非自己として認識させ、これに対する免疫学的反応を発動せしめんとするいわゆる強化免疫法の構想が生れ、腫瘍組織のX線照射 (Klein<sup>4)</sup>)、凍結処理 (Stoneら<sup>17)</sup>)、結紮解放 (Lewis<sup>18)</sup>、武田<sup>5)</sup>)、電気凝固 (Straussら<sup>19)</sup>) あるいは異種血清処理 (Southamら<sup>20)</sup>) などの方法が開発されて、実験的にこれらの免疫措置を施した動物においては同一腫瘍に対抗移植性を示す

Experimental and Clinical Studies on Active Immunity of Malignant Tumor —An Attempt for Immunotherapy of Cancer by Use of Cancer Tissue Modified by Purified Variola Virus. **Yasuo Takamura**, Department of Surgery (II) (Director : Prof. T. Mizukami), Medical School Kanazawa University.

ことが判明し、その一部は臨床的にも応用が試みられある程度の治療効果を挙げ得たことが報告されている。

これらの強化免疫法のうち、腫瘍組織のX線照射、凍結、結紮解放ならびに電気凝固法は、種々の処置によって腫瘍構成成分が変性をきたし、時にその抗原構造が変換され、自己に対して抗原性を発揮するものと推定されるが、異種血清処理の抗原性賦与機序については、Laudsteiner ら、<sup>21)</sup> Rapport ら、<sup>22)</sup> Witebsky ら<sup>23)</sup> が指摘しているように、lipid あるいは lipid 分画に存在するそれ自体では抗原性をもたない haptene に Schlepper として異種蛋白を結合させると抗原性を獲得して宿主の免疫担当組織に、その haptene に特異的に反応する抗体が産生され、抗腫瘍作用を発動するものと解釈され、haptene と異種蛋白の結合が確実に行ない得れば、X線照射など腫瘍組織の変性による方法に比べ、より確実な効果が期待される。

そこで著者も、癌強化免疫法として、異種蛋白結合法を採用したのであるが、免疫効果を持続せしめるには、反覆して抗原刺激を与える必要があり、この場合、異種血清の使用は少なからぬ制約をうけるため、haptene と結合させる異種蛋白について種々検討を加え、従来用いられたことのない Virus 蛋白に着目し、矢追抗原（精製痘苗）すなわち牛痘 Virus 蛋白を使用して、まず in vivo 実験において、異種血清処理との効果を比較、宿主動物に、より確実な抗腫瘍性を発揮せしめ得たので、さらに in vitro 実験による Kabat & Mayer の Benzidine coupling 法<sup>24)</sup> を用いて牛痘 Virus 蛋白を結合させた腫瘍 Vaccine 投与の効果を検索して、臨床癌患者の治療に応用を試み、減弱している宿主免疫能力の賦活措置を同時に行なうことによって、認むべき制癌効果を期待し得ることが判明したので報告する。

#### 〔I〕 in vivo における腫瘍組織内異種蛋白注入の腫瘍増殖に及ぼす影響

##### I. 実験材料および実験方法

###### 1. 実験動物

呑竜系雄ラットおよび Wistar 系雄ラットで体重 70～150g のものを使用した。

###### 2. 実験腫瘍ならびに移植方法

教室で呑竜ラットに継代移植している腹水肝癌 AH 130 および武田研究所より譲渡を受け Wistar ラットに継代移植している Walker Carcinosarcoma 256 を使用した。腹水肝癌 AH 130 は腹腔内接種後 6～8 日目に無菌的に穿刺した腹水の、Walker Carcino-

sarcoma 256 は腋窩皮下に移植後 9～11 日目に拇指頭大に増殖した腫瘍を無菌的に摘出し、一部の壊死および脂肪組織を除外して生食水で 2 回洗滌後細片にきりきざみ、イボ付ホモジナイザーで緩徐に磨細して作成した腫瘍細胞浮遊液の、各々 0.2ml ( $2 \times 10^7$  ケ) をラットの背部皮下に注入した。

##### 3. 腫瘍組織内注入異種蛋白液

###### 1) 矢追抗原

本剤は鳥居薬品より市販されており、矢追秀武博士により創製され、東大伝研において「精製痘苗」として試験製造されてきた「牛痘ウィルス浮遊液」であり蛋白量として 1cc 中に 10mg を含有する。

###### 2) 異種血清

健康人血清および犬血清を使用し、蛋白量は各々 1cc 中に 70mg, 60mg を含有するが、実験に際しては 1cc 中 10mg を含有するように生食水で稀釈したものを使用した。

##### 4. 実験群ならびに実施処置

###### 1) 腹水肝癌 AH 130 における腫瘍組織内矢追抗原注入実験

###### i) 腫瘍組織内矢追抗原注入群 (a 群)

呑竜ラットの両側背部皮下に腹水肝癌 AH 130 の各々 0.2ml ( $2 \times 10^7$  ケ) を移植し、7～8 日後直径約 1cm に触知する一側腫瘍を皮膚と共に摘みあげ、その根元を 6 号絹糸で結紮し、できた腫瘍内に矢追抗原 0.1cc を注入し、48 時間後暗紫色に変色した腫瘍の結紮を解除する。

###### ii) 腫瘍組織内生理食塩水注入群 (b 群)

背部に着床増殖した 2 個の腫瘍の一側腫瘍を結紮し、できた腫瘍内に生食水 0.1cc を注入し、48 時間後結紮を解除する。

###### iii) 腫瘍組織外矢追抗原投与群 (c 群)

一側の背部皮下に腫瘍を移植し、7～8 日後着床増殖した腫瘍と離れた部位の皮膚を摘みあげ、その根元を結紮し、できた skin pouch 内に矢追抗原 0.1cc を注入する。(図 1)

以上の 3 群に分けた実験を時期をおいて計 4 回行ない、最終的には 4 回の実験結果の総計したものの平均値をもって実験成績とした。

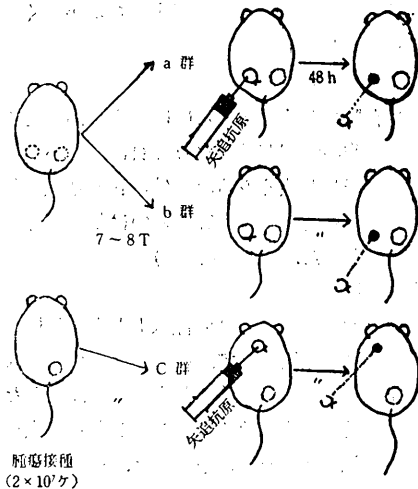
###### 2) Walker carcinosarcoma 256 における腫瘍組織内異種血清注入実験

###### i) Walker carcinosarcoma 256 を Wistar ラット

両側背部皮下に各々 0.2cc ( $2 \times 10^7$  ケ) 移植し、7～8 日後着床増殖した 2 個の腫瘍の一側を結紮し、できた腫瘍内に犬血清 0.1cc を注入し 48 時間後結紮を解除する。

図1. in vivo の自動免疫実験

- a 群：腫瘍結紮+矢追抗原  
b 群：腫瘍結紮+生食水  
c 群：skin pouch+矢追抗原



ii) 上と同様に結紮した一側腫瘍内に健康人血清 0.1cc を注入し、48時間後結紮を解除する。

iii) 同様に結紮した一側腫瘍内に矢追抗原 0.1cc を注入し、48時間後結紮を解除する。

以上の3群に分けた実験を時期をおいて計3回行い最終的には3回の実験結果の総計したものの平均値をもって実験成績とした。

## 5. 検索項目

### 1) 腫瘍の増殖率

各群の対側残存腫瘍について経日的にその長径と短径を計測して面積を求め腫瘍の大きさとし Blum<sup>25)</sup> や Shimkin ら<sup>26)</sup> の方法に従って腫瘍の増殖係数 (K) を算出した。すなわち

$$K = \frac{\log_2 b_2 - \log_2 b_1}{t_2 - t_1}$$

ここで a, b は各々腫瘍の縦径, 横径を, また  $t_2 - t_1$  は第1回の計測から第2回の計測までの期間を週単位で表わしたものである。

### 2) 生存率

腫瘍を移植後、宿主が死亡するまでの日数を生存日数とし、腫瘍が縮小消褪し40日以上生存したものを治癒と判定し、生存率を求めた。

### 3) 腫瘍の組織学的変化

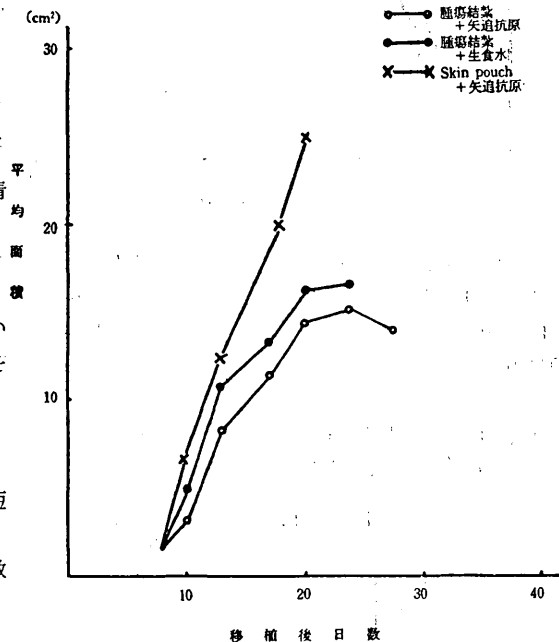
移植後3~5週目の各群の一部の残存腫瘍を切除してヘマトキシリン・エオジン染色を行ない組織学的検索に供した。

## II. 実験成績

### 1. 残存腫瘍の増殖態度ならびに増殖率

実験1: c 群は大多数が急速な進行性増殖を続け、移植後20日で平均面積 24cm<sup>2</sup> に達し腫瘍の縮小傾向は殆んど見られなかった。b 群はc 群に比し腫瘍増殖は幾分緩徐であり一部少数に腫瘍の潰瘍化あるいは縮小傾向が見られたが大多数は進行性増殖を続けた。一方 a 群では始めは b 群と同様の腫瘍増殖を続けたが、移植後 20~25日を peak に進行が止り、腫瘍が潰瘍化あるいは縮小消褪するものが全体の 34% に認められた。なお、c, b, a 各群の増殖係数は各々 0.446, 0.383, 0.349, で a 群が最も低値を示した (図2, 写真2, 4)

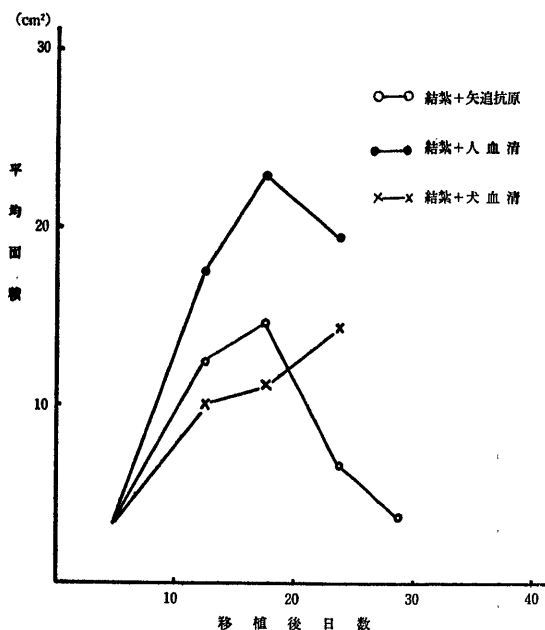
図2. 腹水肝癌 AH 130 皮下移植後の各群の増殖態度



実験2: 犬血清を注入した群は残存腫瘍の増大は比較的緩徐であったがすべて進行性増殖を続け、移植後25日以内に全例死亡した。人血清を注入した群は最も腫瘍増大が強く、かつ進行性増殖を続け半数以上が20日前に腫瘍死したが、一部少数に縮小傾向が見られた。一方、矢追抗原を注入した群では、腫瘍の増大は中間的態度をとり、移植後15日前後を peak に腫瘍増殖が止まり縮小消褪するものは全体の 28% に認められた。なお、各群の増殖係数はそれぞれ 0.31, 0.34, 0.21 でやはり矢追抗原注入群が最も低値を示した (図3)

### 2. 生存率

図3. Walker Carcinosarcoma 256 皮下移植  
各群の増殖態度



実験1: c群は移植後20日までに全体の半数以上が腫瘍死し、40日以上生存率はわずか5%であった。b群は移植後25日までに全体の半数以上が腫瘍死したが腫瘍が縮少消褪して40日以上生存したものが11%であった。

a群では全体の半数以上が30日以上生存し40日前後で多数が腫瘍死したが残りは腫瘍が縮少消褪し生存率

は23%であった(図4, 5)

実験2: 犬血清注入群は全例移植後25日以内に腫瘍死し生存率は0%, 人血清注入群は一部少数に縮少消褪するものがあり生存率は13%であった。一方矢追抗原注入群は比較的腫瘍の縮少消褪するものが多く生存率は21%であった(図6)

### 3. 組織学的変化

対側残存腫瘍が潰瘍化あるいは縮少傾向をとるものでは腫瘍細胞の配列が疎になり間質にリンパ球および形質細胞の浸潤が強くみられ、殊に腫瘍結紮-矢追抗原注入群では腫瘍細胞の浮腫あるいは粘液変性を認めるものが多かった。(写真1, 3)

### Ⅲ. 小 括

skin pouch に矢追抗原を注入した群では腫瘍の増殖抑制効果は全く見られず、移植後20日以内に大多数が腫瘍死したが、腫瘍を結紮し生食水を注入した群の一部少数に腫瘍が縮少消褪するものがあり、生存日数も軽度延長し、11%の生存率をみた。一方腫瘍を結紮し、矢追抗原を注入した群では腫瘍の増殖抑制効果が強く認められ、生存日数も著明に延長し、23%に自然治癒を認めた。次に異種蛋白液として矢追抗原の効果を異種血清と比較検討したところ、矢追抗原注入群が人血清あるいは犬血清注入群に比して、より強い腫瘍増殖抑制効果を示した。これらの実験結果から、腫瘍の結紮解除により自家融解した腫瘍組織に異種蛋白が接触することにより強い腫瘍の増殖抑制効果が得られると共に異種蛋白液としては、異種血清よりも矢追抗原が最も効果的であることがわかった。

図4の1. 腹水肝癌 AH 130 皮下移植各群の腫瘍の大きさと生存日数  
腫瘍組織内矢追抗原注入群

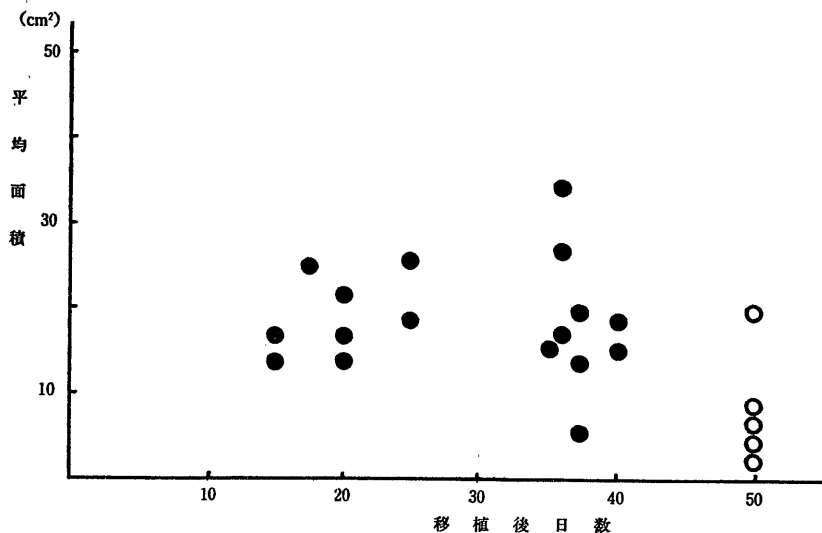


図4の2 腫瘍組織内生食水注入群

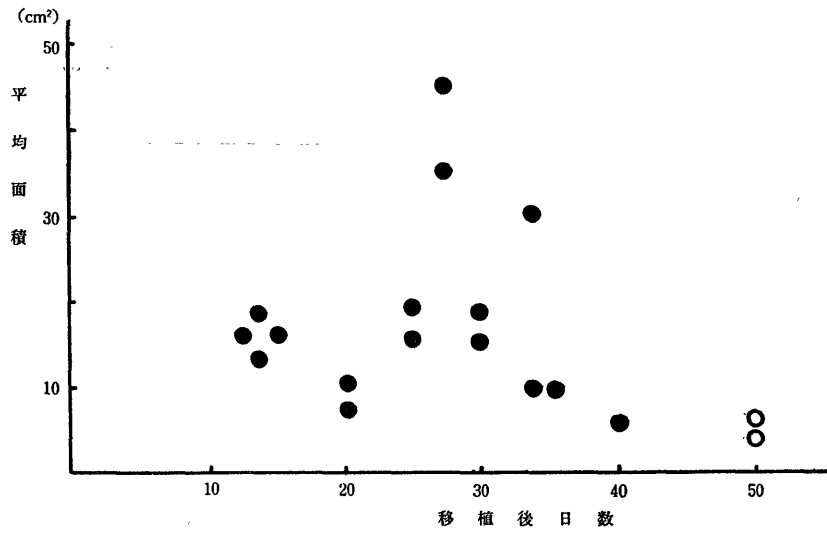


図4の3 腫瘍組織外矢追抗原注入群

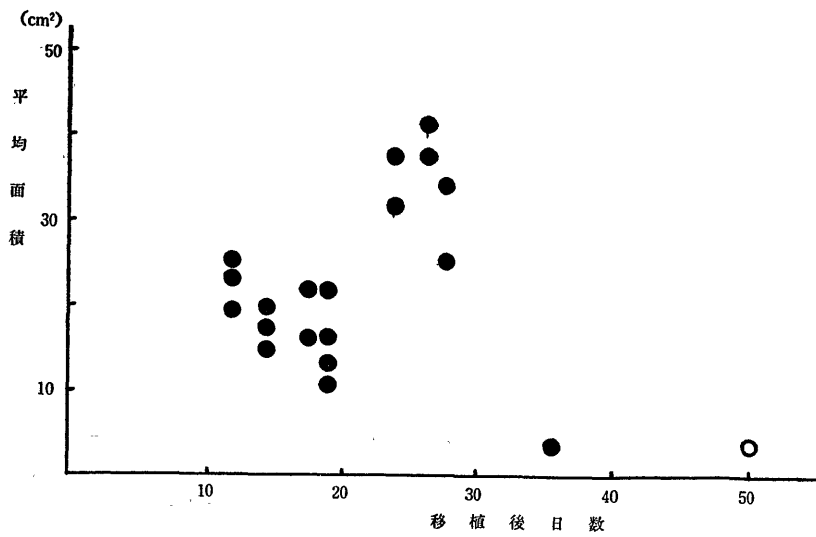


図5. 腹水肝癌 AH 130 皮下移植各群の生存率

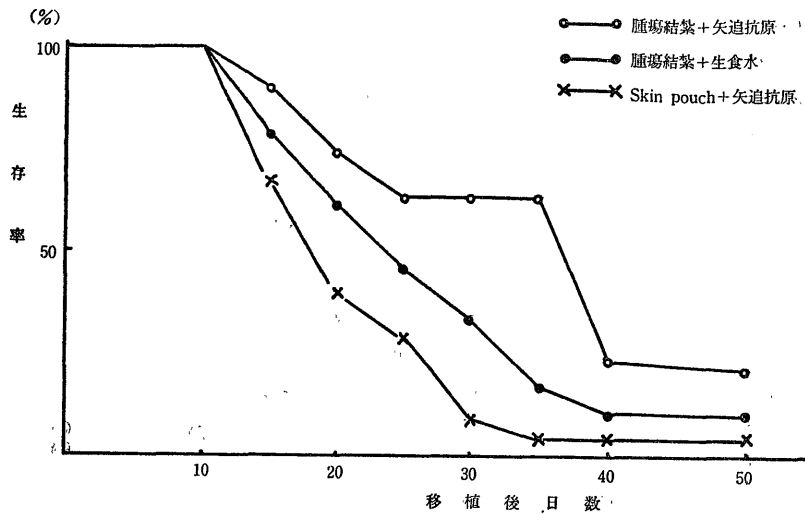
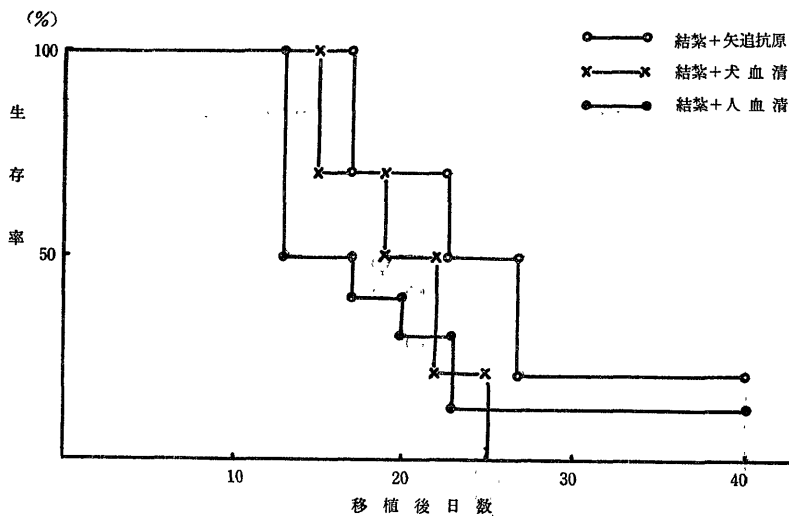


図6. Walker Carcinosarcoma 256 皮下移植各群の生存率



## 〔Ⅱ〕 in vivo における 腫瘍組織内矢追抗原注入 および間葉系組織賦活措置の免疫学的宿主抵抗性に及ぼす影響

次に in vivo の自動免疫処置に間葉系組織賦活剤併用の効果を検索すると共に、一部のラット血清について流血抗体の検索を行なった。

### I. 実験材料および実験方法

#### 1. 実験動物ならびに実験腫瘍

Wistar 系雄ラットに継代移植している Walker carcinosarcoma 256 を使用した。

#### 2. 実験群ならびに実施処置

#### 1) 腫瘍組織内矢追抗原注入+Parotin 投与群

〔Ⅰ〕の4に記載したのと同様に Wistar ラットの両側背部皮下に着床増殖した直径 1cm 前後の腫瘍の一侧を結紮し、できた腫瘍内に矢追抗原 0.1cc を注入後、帝國臓器製薬より市販せる唾液腺ホルモン Parotin 0.5mg を週2回ラット大腿に筋注した。

#### 2) 腫瘍組織内生理食塩水注入群

実験〔Ⅰ〕の4に同じ。

#### 3. 検索項目ならびに方法

#### 1) 腫瘍の増殖率および生存率

実験〔Ⅰ〕の5に同じ。

## 2) 間葉系機能の推移

免疫前と免疫後2週目のラット血清についてデキストラン鉄グリアランス法により測定した。本法は Barkan<sup>27)</sup> と松原<sup>28)</sup> によるものである。すなわち 5~10mgFe/kg のデキストラン鉄(以下 DF と略す)をラット右大腿静脈に注射し、左大腿静脈から 0.1cc あて採血し、以下原法に従って操作を行ない次式により DF 係数を算出した。

$$\text{DF 係数} = \frac{60\text{分後の全血吸光度} - \text{注射前全血吸光度}}{4\text{分後の全血吸光度} - \text{注射前全血吸光度}} \times 100$$

## 3) 宿主血清中における腫瘍感作赤血球凝集素価の推移

腫瘍の結紮処置後2週目のラット血清を採取し、Boyden の原法<sup>29)</sup> より本学西東教授の指導により流血抗体の検出を行なった。なお、被検血清は各実験群より各々4匹宛採血した。

## i) 材 料

抗原液: 後述の松橋の方法<sup>30)</sup> により作製した腫瘍抽出液を濾紙で濾過した。

緩衝食塩水: Sørensen リン酸緩衝液 (pH 7.2 および pH 6.4) に等量の生食水を混じて作製。

羊赤血球: Alsever 液を用いて採血、4°C に保存し使用時は生食水で3回洗滌した。

タンニン酸液: pH 7.2 PBS にて2万倍稀釈したものを使用。

抗血清: 被検血清は採血分離後、不活化 (56°, 30'), 1. -20°C に保存。使用時には羊血球で吸収 (37°C 30', 混合後, 2500 rpm, 5分) した。

血清稀釈液: 不活化した羊血清を生食水にて1%に稀釈したものを使用。

## ii) 方 法

a. 赤血球のタンニン酸処理: 2.5%血球浮遊液 (pH 7.2) 1容量に2万倍タンニン酸液1容を混和、37°C、均10分放置後、遠沈 (1500.rpm, 3分) し、PBS (pH 7.2) で1回洗滌。

b. タンニン酸処理赤血球の抗原感作: 該血球生食水浮遊液1容量に抗原 PBS (pH 6.4) 浮遊液 (蛋白量 25mg/dl) 5容量を混和、室温15分放置後、2倍量の血清稀釈液で2回洗滌し、200倍容量の血清稀釈液を加え、0.5%の感作血球液を調整。対照として別にタンニン酸処置のみの赤血球、タンニン酸処置をせず抗原感作のみを行なった血球および正常血球の3種類の0.5%赤血球液を作製。

c. 赤血球凝集反応の術式: 被検血清の血清稀釈系列 (各管 0.25cc) を4例つくり、第1列に0.5%の感作

赤血球、第2列、第3列および第4列には、それぞれ上記対照血球液を 0.25cc ずつ加えて室温に放置、2時間、12時間後に管底像を見て判定。判定基準は Boyden および Stavitsky の基準に従った。

## II. 実験成績

## 1. 腫瘍の増殖率ならびに生存率

腫瘍組織内生食水注入+Parotin 投与群は移植後20日までは急速な進行性増殖を続けたが一部少数に腫瘍の潰瘍化あるいは縮小化を辿るものがあり、増殖係数平均生存日数および生存率はそれぞれ 0.45, 22日および25%であった。一方、腫瘍組織内矢追抗原注入+Parotin 投与群は、腫瘍の増殖態度は約半数が大体前者と同様に急速な増殖を続けるが、残り半数は比較的緩徐な増殖を続け移植後15日頃より縮小傾向を辿るものが多く一部には完全に消失痕痕化する例が見られ、その増殖率、平均生存日数および生在率はそれぞれ 0.42, 25.5日および42%であった (図7, 8)。

なお、背部一側に腫瘍を移植した無処置ラットは全例進行性増殖を続け、移植後30日以内に全例死亡した。

## 2. 間葉系機能の推移

移植後3週目 (免疫処置2週後) のラット血清についてその鉄食能 (DF 係数) を検索したところ、両群の平均値は矢追抗原注入群42%, 生食水注入群54%で前者に強い間葉系機能亢進が認められた。なお無処置対照群では65%であった。 (図9)

図7. 間葉系賦活措置群の増殖態度

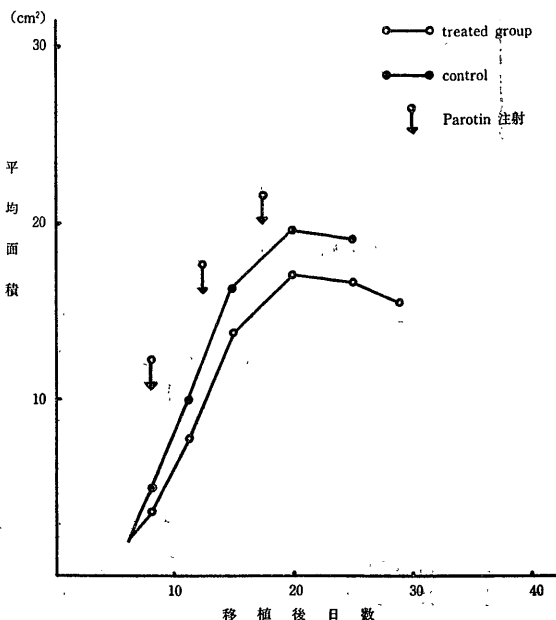


図8. 間葉系賦活措置各群の生存率 (Walker Carcinosarcoma 256 移植)

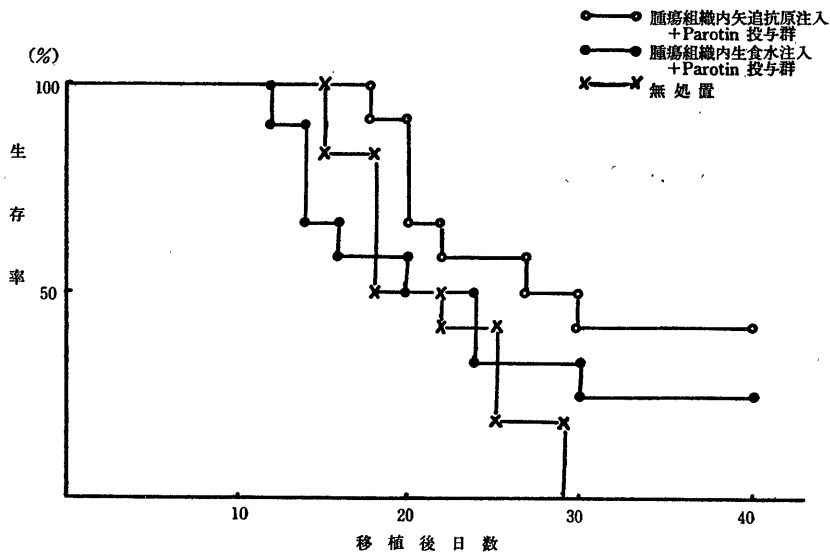
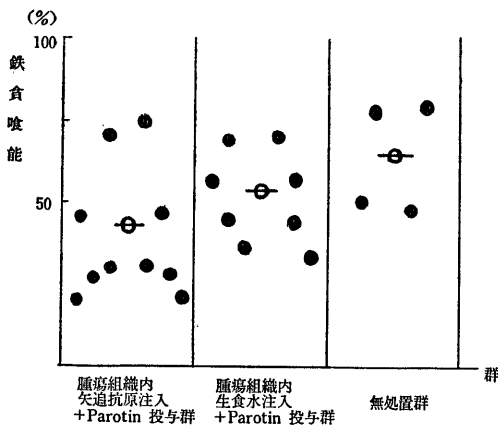


図9. 間葉系賦活措置各群の網内系機能—Dextran Fe-Clearance 法



### 3. 宿主血清中における腫瘍感作赤血球凝集素価の推移

矢追抗原注入—間葉系賦活群では採血時に腫瘍を有するもの(2匹), および縮少, 消失しているもの(2匹)ともに凝集素価 16~32 を呈し生食水注入間葉系賦活群(4匹)はいずれも凝集素価を証明し得なかった。

### Ⅲ. 小 括

本実験では, 実験〔Ⅰ〕で認められた腫瘍組織自家融解物と矢追抗原との混合物の吸収による腫瘍増殖抑制効果をさらに強める目的で, 宿主の間葉系組織賦活措置として間葉系賦活剤 Parotin 0.5mg の筋注を併

用したのであるが, その腫瘍増殖抑制効果については実験Ⅰの成績に比べ, とくに有効とは断定できないが矢追抗原注入間葉系賦活群の半数において, 非常に明確な残存腫瘍の縮少消褪傾向が認められ, 一方生食水注入間葉系賦活群ではわずか1例にのみ明確な腫瘍縮少傾向が認められた。また DF 係数による間葉系機能検査において, 矢追抗原注入群に軽度亢進が認められた。さらにこれらのラット血清について腫瘍抗原に対する流血抗体を Boyden 法により検索したところ矢追抗原注入群に32価前後の凝集素の出現を証明し, すくなくとも腫瘍増殖抑制効果に何らかの影響を与えていることが推定された,

### 〔Ⅲ〕 in vitro における矢追抗原処理腫瘍抽出液投与の腫瘍増殖におよぼす影響

#### Ⅰ. 実験材料および実験方法

1. 実験動物および移植腫瘍: 実験〔Ⅰ〕と同様に Wistar 雄ラットに継代移植した Walker Carcinosarcoma 256 と, 呑竜ラット皮下に発癌せしめた 20-Methylcholanthrene 肉腫を用いた。すなわち cholesterol を 170°C に加熱溶解しこれに 25% の割合で 20-Methylcholanthrene を加え, 型に入れて冷却作製した MC-cholesterol Pellet 20mg (MC 量として 5mg) を呑竜ラットの背部皮下に挿入し約 150~250 日後に拇指頭大に発癌増殖した腫瘍を摘除して, 一辺 2mm の骰子状 slice として同系のラット背部皮下に継代移植し実験には移植 2 代目以後の腫瘍を使用した。

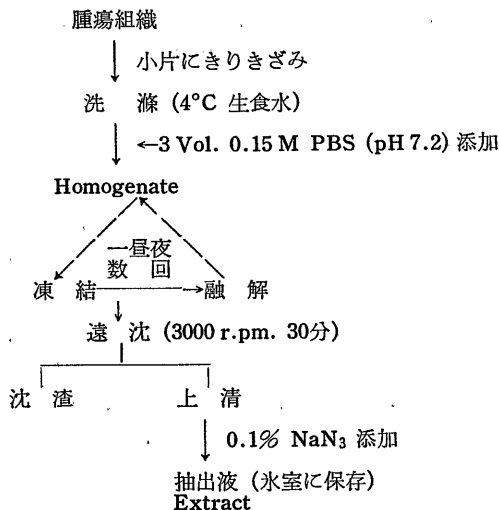


## 2. 切除腫瘍の処理

### 1) 腫瘍抽出液の作製

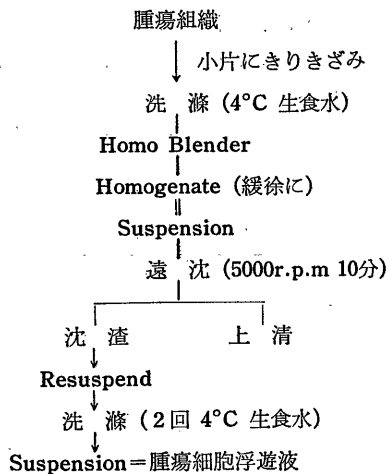
ラットの両側背部皮下に 20 MC slice 挿入後, 10 ~12日目に直径 1cm 前後に着床増殖した腫瘍の一侧を摘除し松橋<sup>30)</sup>の抗原液作製法 (図10)

図10. Extract 作製法  
(松橋による)



あるいは Czajkowski ら<sup>31)</sup>の方法 (図11) に従って腫瘍抽出液および腫瘍細胞浮遊液を作製した。

図11. 腫瘍細胞浮遊液作製法  
(Czajkowski らによる)



### 2) 腫瘍修飾抗原液の作製

i) 松橋の方法で作製した腫瘍抽出液に 矢追抗原および incomplete Freund の adjuvant を下記の割合で室温混合した。

arlacel A	1.5vol	} 混和 室温放置 10分
流動パラフィン	8.5vol	
腫瘍抽出液	10vol	
矢追抗原	10vol	

ii) Czajkowski らの方法により作製した腫瘍細胞浮遊液と矢追抗原を in vitro で結合するため彼らの用いた Kabat & Mayer<sup>24)</sup>の方法 (図12) により調製した bisdiazobenzidine を用いて, 腫瘍修飾抗原液を作製した (図13)。

図12. Bis-diazobenzidine 作製  
(Kabat & Mayer 法1948年)

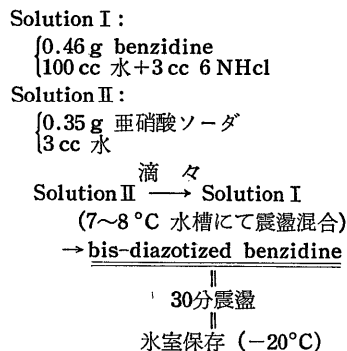
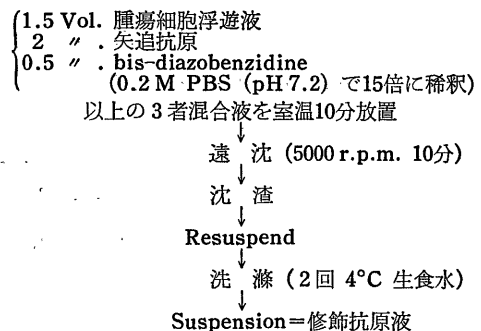


図13. 修飾抗原液作製法  
—Czajkowski らによる



## 3. 実験群ならびに実施処置

ラットの両側背部皮下に着床増殖した直径 1cm 前後の腫瘍の一侧を切除し i) あるいは ii) の方法により作製した腫瘍修飾抗原液の 0.6ml (矢追抗原 0.2ml) を3日間隔で2回筋注射し, 同時に Parotin 0.5mg. 週2回筋注射した (図14)。

なお対照群は背部両側に着床増殖した腫瘍の一侧切除のみを行なった。

## 4. 検索項目

実験 I と同様に対側残存腫瘍の大きさを経日的に測定して面積を算出し, 移植後腫瘍死するまでの平均生

存日数および40日以上生存の生存率を求めた。

## II. 実験成績

### 1. 松橋の方法による腫瘍修飾抗原液の投与実験

Wistar ラットに Walker Carcinoma 256 を移植し、自動免疫処置を行なった結果は、免疫群は対照に比し腫瘍の増殖は比較的遅く両群の増殖係数は各々 0.31, 0.33, で(図15) また平均生存日数は各々 27.3日, 21.7日で免疫群に平均約 5.6日の延命効果を見たが、両群とも移植後30日までに全例死亡し40日以

図14. in vitro の自動免疫実験

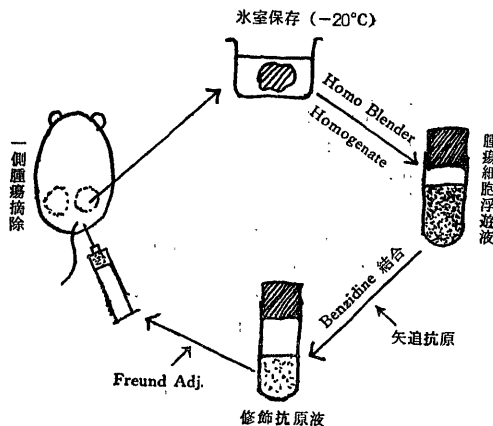
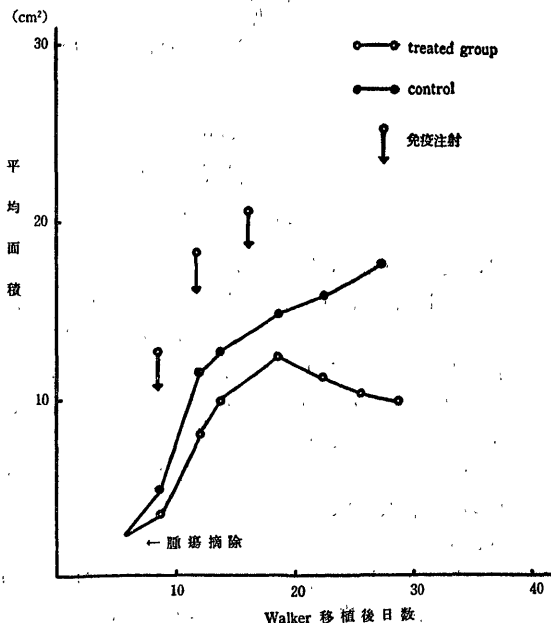


図15. 一侧摘除腫瘍修飾抗原液注射後の対側残存腫瘍の増殖態度 (修飾抗原液は松橋の方法により作成) —Walker Carcinoma 256—



上生存するものはなかった (図16)。

次に吞竜ラット誘発癌 20-MC についても同様に松橋の方法に従がい免疫処置を行なったところ、免疫群に強い腫瘍増殖抑制効果が見られ平均面積 14.5cm<sup>2</sup> を peak に腫瘍の縮小、治癒傾向が強く認められたに反し対照群は大多数が進行性増殖を呈し、各々の増殖係数は 0.32, 0.42 であった (図17)。

また免疫群、対照群の平均生存日数はそれぞれ32.3日, 25.1日で40日以上生存率は50%, 12.5%と免疫群に強い延命効果が認められた。(図18)

### 2. Czajkowski の方法による腫瘍修飾抗原液の投与実験

Wistar ラットに着床増殖した Walker Carcinoma 256 を用いて自動免疫処置を行なったところ、腫瘍自体の増殖、致死力が弱く、実験条件は悪かったが、免疫群は対照群に比し腫瘍の増殖は緩徐で約半数に腫瘍の縮小、治癒傾向がみられ対照群は約3分の1に治癒傾向を認め各々の増殖係数は 0.34, 0.36 であった。また腫瘍死したラットの平均生存日数は各々 30.2日, 28.4日, 生存率は50%, 28%でやはり免疫群に延命効果が認められた (図19, 20)。

## III. 小 括

今回は in vitro で腫瘍抽出液と矢追抗原を混合あるいは Benzidine-coupling し、さらに Freund Adjuvant を加えて抗原性を増強した腫瘍組織修飾抗原液による免疫実験であるが、実験 I の in vivo の場合に比べ、Wistar ラットに Walker 腫瘍で行なった実験結果では免疫効果はやや弱いようであるが、一方吞竜ラット誘発癌 20-MC で行なった実験では対照群に比し比較的強い免疫効果が得られ、生存率も著明に延長した。

## 〔IV〕 矢追抗原処理癌組織による自動免疫の臨床的研究

### I. 研究対象ならびに実施方法

昭和42年2月より43年2月までの1年間に金沢大学医学部第2外科教室にて入院治療を行なった癌患者の中 (表1に示す)、試験開腹または姑息的切除に終った癌患者17例についてそれらの切除腫瘍、リンパ節転移腫瘍または腹水中腫瘍細胞より先述の Czajkowski らの Benzidine-coupling 法に従って癌 Vaccine を作製しその 1cc (矢追抗原 0.4cc) を2日間隔で3回患者の臀部あるいは大腿上外側部に注射 (0.2cc 皮内 0.8cc 筋内) し、他方これらの癌患者にはその間葉系組織を賦活して抗体産生能を亢進させる目的で、西独 Südmedica 社製間葉系賦活剤 Mesacton を 1cc 隔日および Parotin 3mg 週2回筋注を同時に行なった。

図16. 一側摘除腫瘍修飾抗原液注射群の生存率  
—Walker Carcinosarcoma 256—

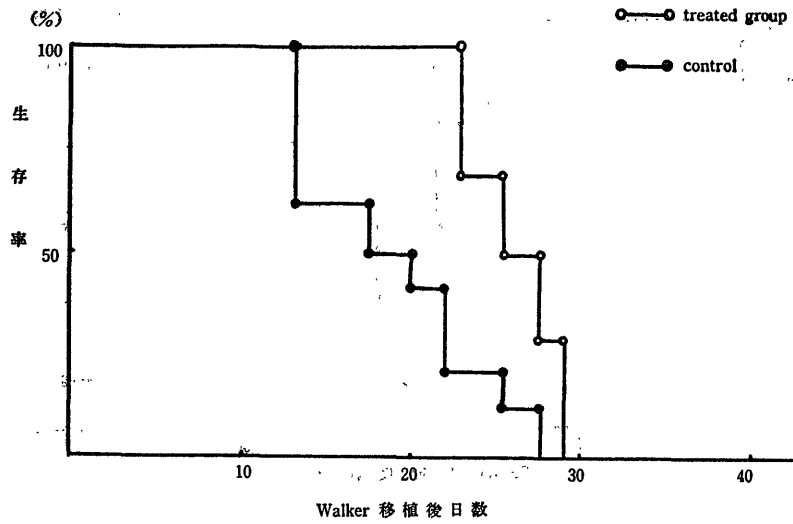


図17. 一側摘除腫瘍修飾抗原液注射後  
の増殖態度—20Mc 肉腫

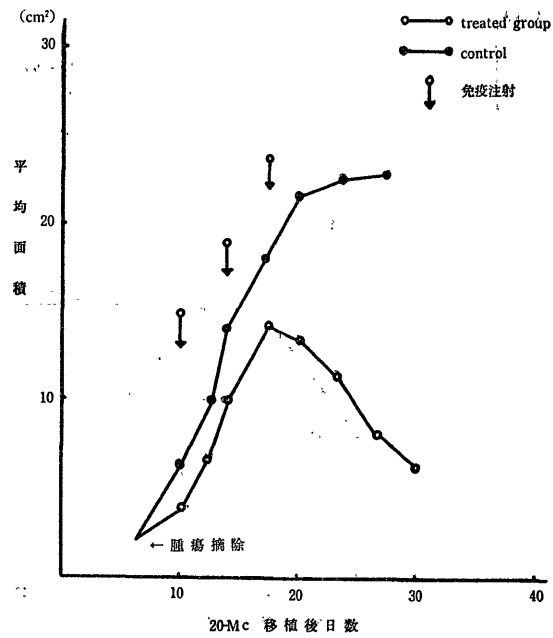


図18. 一侧摘除腫瘍修飾抗原液注射群の生存率—20Mc 肉腫—

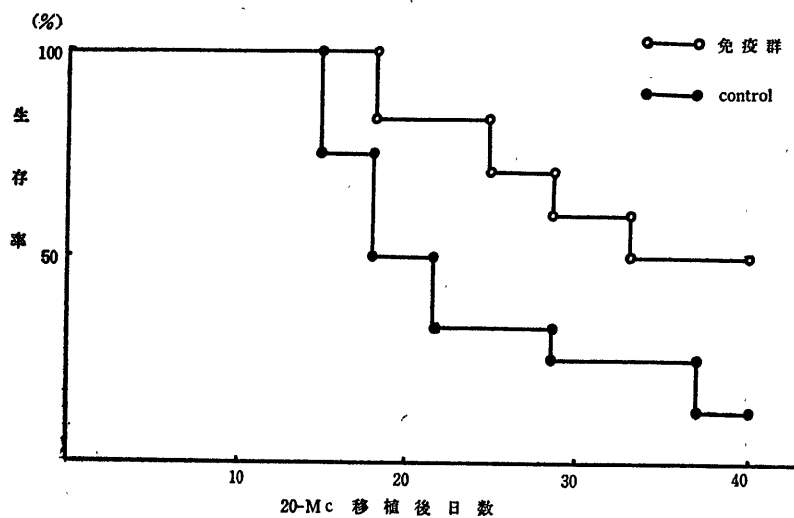


図19. Benzidine-coupling 法による腫瘍修飾抗原液注射後の対側残存腫瘍の増殖態度

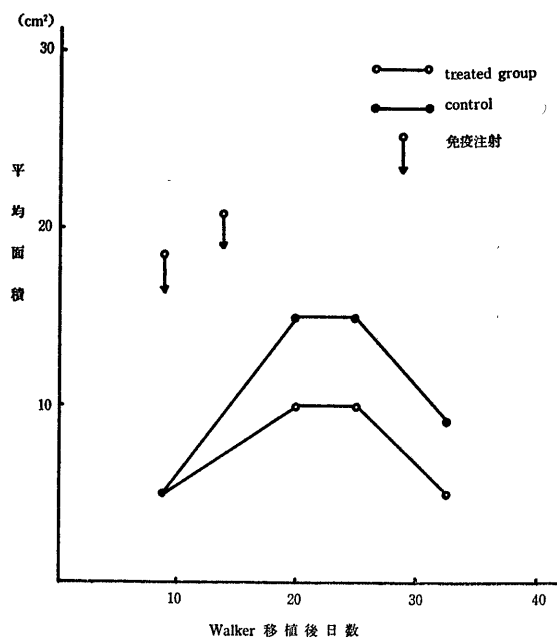


図20. Benzidine-coupling 法による腫瘍修飾抗原液注射群の生存率

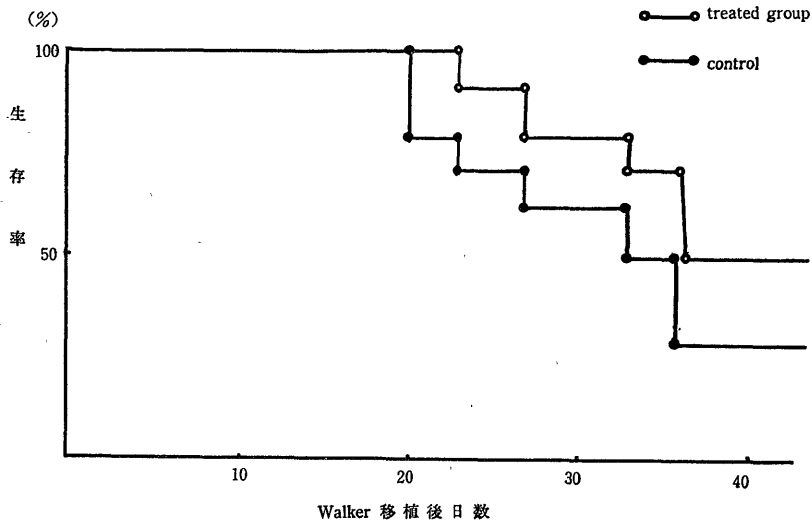


表1 臨床例

昭和42年2月より昭和43年2月まで

No	症 例	病 名	進 展 度	治 療	免疫注射	そ の 他	転 帰 昭和42. 10月	転 帰 昭和44. 8月
1	M.M,65, ♂	胃 癌	Stage IV	試験開腹	術前 2日 術後 8日		退院(40日)	不 明
2	M.S,60, ♂	胃 癌	Stage III	胃 全 剔	術後 7, 14日		生存(5ヵ月)	死亡(1年)
3	N.K,21, ♀	胃 癌	Stage IV	試験開腹	術後 7, 14日		死亡(50日)	—
4	S.S,62, ♂	胃 癌	Stage IV	腹水穿刺	穿刺後 5, 12日	① Mesacton 1cc(隔日)	死亡(30日)	—
5	H.H,72, ♀	乳癌(左)	リンパ腺転移 (左腋窩, 鎖骨上)	腋窩リンパ節 切除	術後 2, 5日		生存(3ヵ月)	不 明
6	K.S,46, ♀	乳癌(左)	リンパ腺転移 (左腋窩, 鎖骨上)	左乳房切断	術後 1, 4, 10日		生存(3ヵ月)	死亡(7ヵ月)
7	D.K,67, ♀	胃 癌	Stage IV	胃 切 除	術前 6, 4日 術後 13日		生存(3ヵ月)	不 明
8	S.K,55, ♂	回盲部癌	リンパ腺転移 (腸 間 膜)	回盲部切除	術後 5, 21日		生存(3ヵ月)	生存(2年1ヵ月)
9	M.S,19, ♀	小腸肉腫	リンパ腺転移 (腸 間 膜)	回盲部切除	術後12, 17日 術1年後6回		生存(2ヵ月)	生存(2年)
10	T.K,65, ♂	胃 癌	Stage IV	試験開腹	術後 14日, 24日		生存(2ヵ月)	不 明
11	O.I,35, ♂	胃 癌	Stage IV	腸 瘻 形 成	術後 3, 7日	② Parotin 3mg (週2回)	生存(3ヵ月)	不 明
12	I.K,68, ♂	胃 癌	Stage IV	胃 全 剔	術後 6, 12日		生存(2ヵ月)	不 明
13	M.K,65, ♂	子 宮 癌	Stage IV	皮膚転移腫瘍 切除	術後 5, 8, 10日		死亡(3ヵ月)	—
14	I.T,64, ♂	リンパ肉腫	全身多発リンパ 腺腫	鼠径リンパ 節切除	術後 3, 5日		不 明	不 明
15	M.K,21, ♀	頭給癥痕癌	脳 転 移	局所腫瘍切除	術後 3, 5, 8日		死亡(3ヵ月)	—
16	N.S, ♀	細網肉腫	頸部リンパ腺腫	頸部リンパ節 切除	術後 2, 5, 8日		—	軽快退院
17	K.K, ♂	胃 癌	Stage IV	開腹術穿刺	穿刺後 2, 5, 8日		—	軽 快

## II. 検索項目および検索方法

### 1. 一般状態

食欲、体重、局所々見等の他肝機能、血清電解質、酵素などの臨床検査を行なった。

### 2. 血清蛋白分画

東洋濾紙 No.51 を用い、濾紙電気泳動後、Amid Schwarz 10 B にて染色、濾紙用光度計、プラニオメーターにて測定した。

### 3. 血清 LDH

Cabaud and Wróblewski<sup>32)</sup> の原法によりヤトロ社製、緒方医学化学研究所編の測定法に従った。

### 4. 間葉系機能

実験Ⅱで用いた DF 係数の測定方法は、臨床的に使用経験がないので、操作の比較的簡単な Congored 法を用いた。

すなわち、New Congored Index は Adler<sup>33)</sup> らの原法を改め、次の方法で測定した。1% Congo red 液 0.25ml/kg を 1 側の肘静脈より注入し、4 分後および 60 分後に対側肘静脈より 4cc 採血し血清を分離して、その 1ml に生食水を等量加えて 2ml とし、光電比色計で 560Å にて比色し、次式によって算出した。

$$\text{New Congored Index} = \frac{4 \text{ 分後の血清 Congored 濃度}}{60 \text{ 分後の血清 Congored 濃度}} \times 100$$

### 5. 血清抗体の検索

癌 Vaccine 注射前（手術前）と、初回注射後 3 週目に採血した患者血清について、実験Ⅱに記載した Boyden 法により血清抗体価を測定した。

## III. 研究成績

### 1. 一般状態

症例 1, 4 では胃癌末期の癌性腹膜炎の併発にも拘

らず、一時食欲の亢進、浮腫の軽減などが認められ、症例 5 は再発乳癌で（写真 5）左腋窩の転移リンパ節より作製した Vaccine 注射後数日目から再発腫瘍が急速に縮小消褪し、2 週後には完全に消失（写真 6）し、約 1 カ月後に全快退院した。退院後は軽度の左胸膜炎を併発したが腫瘍再発の徴候は認めていない。症例 8 は進行性回盲部癌で姑息的切除後、約 1 年目に皮膚転移腫瘍を切除し、2 年 1 カ月後の現在、創部瘻孔の処置のため、外来通院しながら仕事に従事している。また、症例 9 は進行性回腸細網肉腫で姑息的切除後、約 6 カ月目に左鼠径部および左顎下部に転移性リンパ腫を認め、鼠径部リンパ腫より作成した Vaccine により再度免疫注射を行ない、最初の切除腫瘍 Vaccine 注射と合わせて総計 8 回の Vaccine 注射後、2 年 2 カ月の現在約 10kg 体重増加し元気に仕事に従事している。（写真 7, 8 はその組織像を示す）

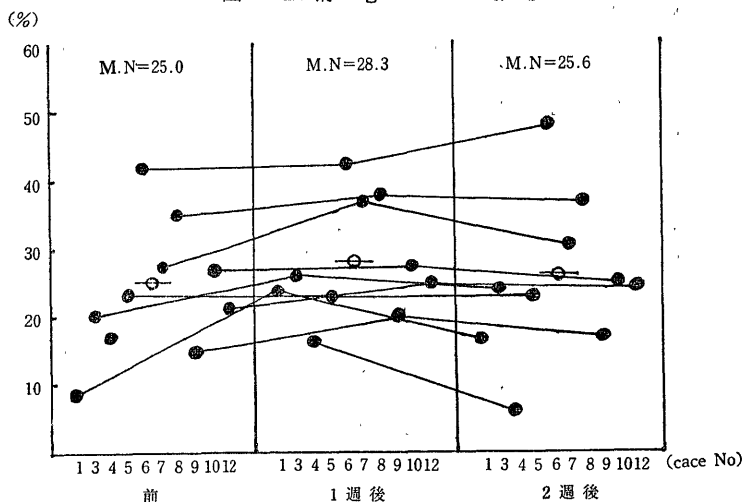
症例 16, 17 は細網肉腫症および進行性胃癌単開腹例であるが、前者は Endoxan の静注と Vaccine 注射を併用し著明な脾腫の縮小と胸水の消褪を認め、軽快退院し、後者は術後 11 カ月の現在全身状態の悪化の徴候を認めず、なお入院加療中である。

他の症例の中にも一時的な一般状態の軽快を認めるものがあり、腹痛または四肢の神経痛様疼痛の消失した症例もあった。

### 2. 血清 r-globulin 値

注射前、1 週、2 週後の平均値が各々、25%、28.3%、25.6% で注射後 1 週目にやや上昇し、2 週、3 週目に前値に戻る傾向が認められた。また、比較的一般状態の良好な症例 6, 7 では、血清蛋白の上昇に比例して血清 r-globulin 値も上昇する傾向が認められた（図 21）

図 21. 血清 r-globulin の推移



### 3. 血清 LDH

注射前, 1 週, 2 週後の平均値は各々 683, 623, 598 単位で, 注射後漸次低下の傾向が認められ, 殊に症例 5, 6 では, 一時的, 一般状態の改善に比例して, 血清 LDH は著明に低値を示した. 一方腹水貯溜の甚だしい症例 1 では, 免疫注射後も, 漸次, 全身状態が悪化を辿り, これに比例して血清 LDH も上昇し, 最高値 2000 単位を示した (図 22).

### 4. 間葉系機能 (New Cengored Index)

注射前, 3 週後の平均値は 1.401, 1.416 で注射後に軽度機能亢進が認められ, 中でも主腫瘍切除後, 経過良好で長期生存している症例 9 では著明な上昇を呈した (図 23).

### 5. 血清抗体の推移

17 例の患者中, 7 例について, 血清抗体の検出を行なったところ, 表 2 の如く, 比較的一般状態の良好な

症例 6 および 8 の血清中に 32 価, 症例 9, 12 には 8 ~ 16 価の抗体が検出され, 癌性腹膜炎を併発している進行癌症例 3, 10 では, いずれも抗体は検出されず, 症例 5 は局所腫瘍の消失など免疫効果があったと思われる症例にも拘らず, 抗体は検出されなかった.

### IV. 小 括

臨床的に進行癌あるいは再発癌 17 例に対し本免疫療法を実施した結果, 進行癌患者の中にも一時的にせよある程度の一般状態の軽快が認められ, それに比例して血清  $\gamma$ -globulin の軽度上昇, LDH の低下および Congo-red 係数の上昇が認められ, 流血抗体の検索においても比較的全身状態の良好な症例に抗体価 8 ~ 32 を検出し得た. 殊に本研究対象が全て進行癌患者にも拘わらず, 前述した如く, 本療法が有効であったと思われる腫瘍の縮小あるいは長期生存の 5 症例を得ており, これらの患者で検索し得た臨床検査所見でも本

図 22. 血清 LDH の推移

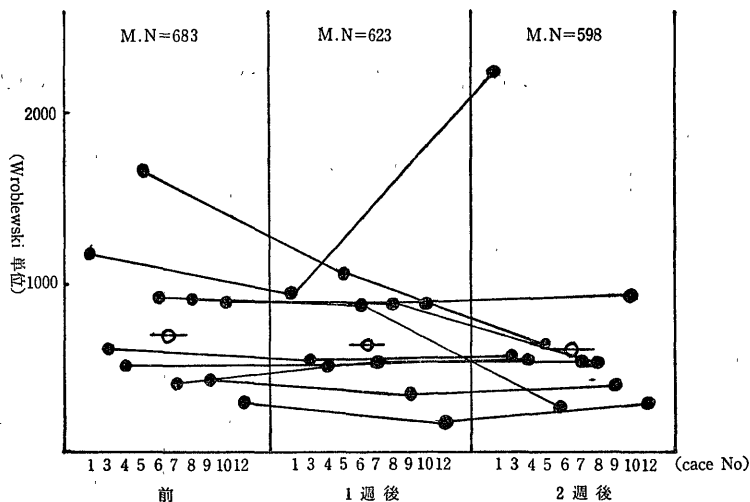
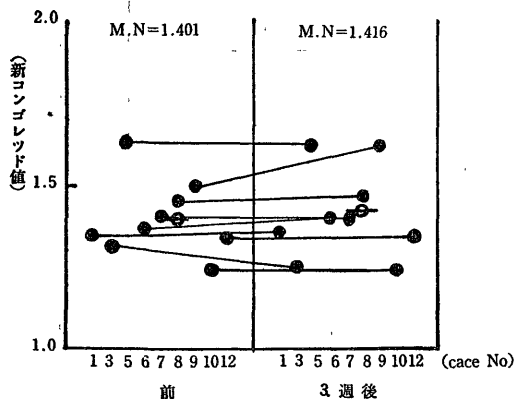


図 23. 網内系機能



療法による宿主抵抗の亢進を証明し得た.

### 考 察

癌治療の基本である外科的療法にも限界があり, これに化学療法あるいは放射線療法を加えても, なお十分な成果を挙げえない現状において, 最近宿主条件を抗癌的環境に改善する手段を癌治療に導入することの必要性が喚起されてきている.

すでに 1882 年 Cohnheim<sup>34)</sup> は, 腫瘍はその生体の生理的防禦力すなわち抵抗力が減弱したときに, はじめて悪性増殖を営むものであることを指摘しているが近年このような観点から, 担癌生体の内部環境の解析がすすめられ, 生体防禦機構の中核をなす網内系の機

能検索が行なわれた結果, Krätschell<sup>35)</sup>, Barbera<sup>36)</sup>, Kavetskiy<sup>37)</sup>, Schröder<sup>38)</sup> Stern<sup>39)</sup> 多数の研究者によって, 担癌患者の絶対多数において, その網内系貪食能が Congo red 係数70%以上の障害を示していることが判明し, 教室における検索でも, 良性疾患群では, かなりの消耗性疾患を含めても, Congo red 係数70%以上の機能低下例は56%であったのに反し, 悪性腫瘍群では82%の高率を占め, ことに進行癌および再発癌に, その低下の著しい傾向が認められた。さらに担癌生体の網内系抗体産生能についても, Barr<sup>40)</sup> Lytton<sup>12)</sup> が Tetanus toxoid に対する循環抗体の産生能が, その一般状態に関係なく著しく障害されていることを認め, 教室における Diphtheria toxoid を用いた検索でも, 血中抗毒素価が0.64単位以下の抗体産生能低下例は, 良性疾患群では19%にすぎなかったが, 悪性腫瘍群においては, 65%の高率にのぼり, しかもその大多数が進行癌で根治手術が不能であった。

なお, 細胞性抗体の産生能を窺知する目的で行なったツベルクリン反応による遅延型アレルギーの検索<sup>41)</sup>でも, 同年令層の非癌症例の陽性率が71.8%であるのに対し, 癌患者では45.7%と陰性例が多く, これにはかなり初期の癌症例も含まれ, 担癌体においては, 網内系の種々の機能, なかんずく免疫担当細胞の機能が何らかの原因によって障害されていることが判明し, 癌の発生, 増殖に好条件を提供しているものと推察された。

水上<sup>42)</sup> は, これらの担癌体において生体防禦力が低下しているとの事実に基づき, 生体防禦力を司る網内系の賦活による制癌効果の検索をすすめ, Caspari<sup>43)</sup> の提唱した一定組織への血行を阻害すると, その組織からいわゆる necrohormon が発生し, これと同一系統に属する組織に新生細胞の増殖が惹起される現象を応用した網内系の代表的臓器である脾に流入する動脈の結紮によって, 生体の全網内系組織を賦活し得ることを確認し本法を進行肺癌症例に実施して, 腫

表2. 血清抗体の検出

(Boyden 法)

No	血※ 清	血 清 稀 釈 倍 数										
		2 <sup>0</sup>	2 <sup>1</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>10</sup>
3	2	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
5	1	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
"	2	—	—	±	±	—	—	—	—	—	—	—
"	3	±	±	±	±	—	—	—	—	—	—	—
6	1	≡	≡	≡	+	±	±	—	—	—	—	—
"	2	≡	≡	≡	≡	+	±	—	—	—	—	—
"	3	≡	≡	+	+	+	±	±	—	—	—	—
7	1	±	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—
"	2	+	+	±	±	±	±	—	—	—	—	—
8	1	±	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
"	2	≡	≡	+	±	±	±	±	—	—	—	—
"	3	≡	≡	+	±	±	±	±	±	—	—	—
9	1	—	—	—	±	±	±	±	±	±	±	±
"	2	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
"	2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
12	1	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
"	2	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

※ 1: 免疫注射前 2: 免疫注射2週後 3: 免疫注射3週後



瘍の顕著な縮少を認めるなどの臨床効果を収め、他方 Typhus Vaccine, Zymosan, Parotin, Mesacton など一連の網内系賦活剤の制癌効果を実験的に検索<sup>44) 45)</sup>、これらの非特異的な網内系の活力増強措置によっても、ある程度、癌の発生ならびに増殖を抑制する効果を認めることができたが、網内系機能の検索において、その貪喰能さらには抗体産生能が著明に賦活されているのかかわらず、癌の増殖を許容している例が少なからず経験された。

そこで、著者はこのような例においては、近年、癌組織中さらには血清中に正常組織には存在しない癌特異抗原が微量証明されるとの報告もあるが、他方、Green<sup>46)</sup> は人癌のモルモットへの移植実験において、早期癌には移植性がないが、末期癌では生着率が高くなる現象から癌の進行による抗原性の低下を指摘している。ともかく、実際には担癌生体が癌組織を非自己と認識し得ないために、その免疫担当組織の活力が増大していても、抗癌性の反応を誘起し得ない場合が多いものと考えられるので網内系賦活法を行なうと同時に、癌組織の Antigenicity を高めて、非自己と認識させる措置を講ずれば制癌により効果的であろうとの見解に達し、本研究に着手したのである。

腫瘍の抗原性の増強法については、1960年、Klein<sup>47)</sup> が、Maus に発生した腫瘍を切除し、これにX線照射を行なって、反覆注射することによって、自動免疫を成立させて以来、多くの研究者によって、腫瘍組織への暫定的血流遮断、腫瘍組織の凍結あるいは電気凝固処理など種々の腫瘍の抗原構造修飾法が提唱され、実験的に自動免疫の発現が証明されている。しかしこれらは種々の処置による腫瘍細胞の変質による抗原性の取得を企図したものであるが、1961年小野<sup>47)</sup> は、C3H Maus 自然発生乳癌を用いて、Landsteiner の haptene の概念に基づき腫瘍組織内に異種血清を注入することによって自動免疫を成立させることに成功した。すなわちこれは、単独で動物を免疫しても抗体を産生できないが、一定の条件によって蛋白と混じて動物に注射すれば、蛋白に対する抗体とは別に、その物質に対する抗体を産生するような物質（この物質に1921年 Landstener<sup>48)</sup> は haptene なる名称を与えた）を癌特異抗原の本体と見做し、腫瘍組織中に存在すると考えられる腫瘍特異性 haptene に異種血清を結合させれば、宿主に腫瘍に対する免疫反応を起し得るであろうという作業仮説に基づいている。著者はX線照射、凍結などの方法を検討したが、処理の過不足などの原因によるものか、毎常確実な抗原性の賦与が得られなかったため、異種蛋白結合法を採用したの

である。

さて、結合させる異種蛋白として、上述の如く、小野は異種動物の血清を用いているのであるが、担癌体の免疫産生系に抗原刺激を反覆して与える場合には異種血清の使用は血清病発現のおそれがあり、臨床的に癌治療への応用が困難であるため、このような制約をうけない異種蛋白として Virus 蛋白に着目し、なかんずく私共臨床医が入手し易い矢追抗原として市販されている牛痘 Virus 浮遊液の使用を試みたのである。これは矢追が東京大学伝染病研究所において粗苗から組織成分および雑菌を除いて精製に成功した痘苗で、実験方法の項で述べたように、1cc 中約 10mg の高分子 Virus 蛋白を含有している。本剤は種々のアレルギー疾患の抗アレルギー療法に用いられているほか、尋常性疣贅および青年性扁平疣贅など Virus 性腫瘍の頑症にしばしば著効を奏することが報告されており、免疫学的に興味深い薬理作用を営み、しかも注射局所に軽度のアレルギー反応を一過性に発現する程度で、忌むべき副作用は認められないものである。そこでまず、実験的に in vivo で腫瘍組織と牛痘 Virus 蛋白を結合させ、従来用いられている異種血清注入法との抗腫瘍効果を比較検討したのであるが、同種移植反応を除外するため、ラットの背部皮下の2カ所に同時に腫瘍を移植し、着床増殖した一側の腫瘍を、それを被う皮膚とともに結紮して、その中へ異種血清あるいは矢追抗原液を注入、腫瘍細胞と接触させ48時間後に結紮を解除し、内容物を吸収させて、対側腫瘍の増殖に及ぼす影響を比較観察した結果、イヌ血清注入群およびヒト血清注入群に較べて、矢追抗原注入群の対側腫瘍の増殖は緩徐で、処置後1週頃から腫瘍の増殖が停止、その後縮少退縮を認める例が多く、矢追抗原注入は異種血清注入よりも優れた腫瘍増殖抑制効果の得られることが判明した。しかしこの際、矢追抗原自体の宿主に対する非特異的な免疫効果の関与も考えられたので、1カ所に腫瘍を移植し、その着床増殖をまって、他の部位に skin pouch を作成し、その中へ矢追抗原を注入して、腫瘍の増殖に及ぼす影響を観察した結果、全く抑制効果は認められず、非特異的な免疫効果を否定し得た。なお、本実験は自然発生腫瘍を用いたものではないが、90%以上の腫瘍死亡率をもつ腫瘍を用い、その移植後8日目にすでに着床増殖しているいわゆる existing tumor を対象として、その増殖抑制効果が明らかに認められているので、腫瘍組織と牛痘 Virus 蛋白を接触させることによって抗腫瘍反応の発現を充分に期待し得るものであると考えられる。

ところで、このように *in vivo* において腫瘍を結紮し、その中へ矢追抗原液を注入する方法は、体表の腫瘍でも、その実施は容易ではなく、これを臨床に応用する場合適応が極めて限定されるので次に、*in vitro* で腫瘍組織の抽出液に牛痘 Virus 浮遊液を混合し、これに Freund の adjuvant を加えて投与する方法の効果を実験的に検討した。すなわち、ラットの背部皮下に2カ所腫瘍を移植し、その着床増殖後一側の腫瘍を摘除して、松橋の方法にしたがいその組織の凍結融解をくり返すことによって破壊し、得られた抽出液に矢追抗原ならびに Freund の adjuvant を加え、同じラットの大腿に3日間隔で3回筋注し、対側腫瘍の増殖に対ぼす影響を検討したところ、移植腫瘍に対しては延命効果を認める程度の効果にとどまったが、Methylcholanthrene 誘発癌を対象とした実験においては、腫瘍の増殖が抑制され、著明な延命効果が認められた。

このように *in vitro* で腫瘍組織抽出液に牛痘 Virus 蛋白を混合して投与しても抗腫瘍反応を誘起させ得ることが判明したが、腫瘍組織の凍結融解をくり返す方法では、抽出液の作成に長時間を要し、操作が複雑であるので、臨床応用をより容易にするため、さらに Czajkowski ら<sup>31)</sup>の方法により切除腫瘍組織より直接腫瘍細胞浮遊液を作成し、これに Kabat & Mayer の benzidine coupling 法<sup>24)</sup>を用いて牛痘 Virus 蛋白を結合させ、Freund の Adjuvant を加えて投与する方法の効果を検討した結果、腫瘍抽出液を用いた場合に匹敵する効果の得られることが判明、臨床応用の手技を確立し得た。

さて、著者の牛痘 Virus 蛋白結合腫瘍細胞による癌免疫療法の臨床応用に当たって問題となるのは、先述したように、担癌患者においては、生体防衛機構の中核をなす網内系の諸機能が低下しており、このような腫瘍組織を非自己として認識させる措置を講じて、宿主の免疫担当系がこれに充分に反応し得ない事態が予想される。そこで緒方、伊藤らによって牛の唾液腺抽出液中に発見され、全身の間葉系組織機能を賦活する作用が証明されている唾液腺ホルンの製剤 Parotin を、矢追抗原による修飾腫瘍抗原感作と同時に投与し腫瘍増殖に及ぼす効果を検索した結果、実験腫瘍を移植した動物においては、自然発生癌をもつ生体に較べ宿主網内系機能の障害が軽微であるためか、Parotin を投与しない実験群と対比して、とくに有効とは断ぜられなかったが、腫瘍の明瞭な退縮消失を認める例が多く、このような例においては、Dextran 鉄クリアランス法によって、網内系食食能の亢進が認められて

いる。

ところで、以上述べてきた実験成績における腫瘍の増殖抑制効果が、果たして自動免疫の成立による宿主の抗腫瘍性抵抗力の増大の結果か否かが問題になるので、牛痘 Virus 蛋白を結合させた腫瘍細胞で感作したラットについて、Boyden 法により血清中に腫瘍感作血球凝集素の証明を試みた結果、単に担癌状態にある動物の血清には検出されなかったが、牛痘 Virus 蛋白を結合させた腫瘍組織で感作した動物なかんずく腫瘍退縮例にその出現が認められ、本免疫療法を実施した臨床例においても、治療効果の得られた症例に凝集素価の高い傾向を認めたことは、このような免疫学的措置を講ずることによって、宿主生体に癌に対する特異的な免疫学的防衛反応の誘起されている可能性を示唆するものといえよう。他方 Finney ら<sup>49)</sup>も末期癌患者を対象に、Freund Adjuvant 型の自家ワクチン注射あるいは放射線治療を行ない、その患者血清について Boyden 法で腫瘍抗体の検出を試み、いずれも高い抗体価を証明し、ことにワクチン注射を行なった患者は最高 1:5120 の高い抗体価を示したと述べこれらの抗体は血清蛋白分画中  $\beta$ ,  $\gamma$ -globulin 分画に在り、その Cytotoxicity について、直接局所の腫瘍内に注入してその効果を認めている。

臨床的に免疫治療の効果を判定することはかなり難かしいことであるが、著者は患者の一般状態や局所々見の他に、血清  $\gamma$ -globulin 値、LDH 活性値および流血抗体の検索を行ない、さらに Congored 係数による間葉系機能の検索を実施した。

癌患者の血清蛋白分画は複雑で、その解析は困難とされているが、一般に健康人に比し Albumin の減少と globulin の代償的または相対的増加がみられ、癌の進行とともに globulin 分画中の  $\alpha$ ,  $\gamma$ -globulin 値が上昇するといわれているが、平井<sup>50)</sup>は動物実験で移植免疫を獲得したラットの血清  $\gamma$ -globulin 値は正常ラットの2倍、担癌ラットの6倍の高値を示したといい、赤井<sup>51)</sup>の癌患者700例の血清  $\gamma$ -globulin 値の検索によれば、とくに一定の傾向はみられず、 $\gamma$ -globulin 値の上昇しているものにも予後良好なものが多かったと報告している。著者も免疫注射前後の血清について、免疫後の血清  $\gamma$ -globulin 値の軽度上昇を認めており、免疫抗体産生に実際に関与するといわれる  $\gamma$ -globulin 値の推移は免疫効果の示標として意義あるものと思われる。また  $\alpha$ -globulin 値については、著者の症例は少ないが、癌の進行と特に一定の関係を有するとは思われなかった。

また乳酸脱水素酵素 (LDH) は、心筋、骨格筋、

肝、赤血球など広く生体に分布し、補酵素 DPN の存在下でピルビン酸と乳酸の間の酸化、還元反応を可逆的に触媒するもので、血清中の活性は臓器活性に比してはるかに低く、その起源、排泄、生理的意義については不明の点が多いといわれるが、1943年 Warburg ら<sup>52)</sup> が、担瘤ラットの血清中に LDH 活性が高率に上昇することを、さらに 1958年 West ら<sup>53)</sup> が肝転移による血清 LDH 活性の上昇を報告して以来、悪性腫瘍と血清 LDH との関係が注目されるようになり、腫瘍細胞や障害細胞から血中への酵素の逸脱や担瘤生体における代謝異常などがその上昇原因として重視されている。

平木ら<sup>54)</sup>によれば、臓器癌の種類により、LDH 上昇率に差はあるが転移の有無で陽性率が異なり、癌の広がりや LDH 上昇率にある程度の相関々係があるといい、野口<sup>55)</sup>は胃癌では、Stage IV に高率に LDH 活性値の上昇を認めている。著者も当教室で入院治療した患者の中で検索し得た50数例の血清 LDH 活性値は、胃潰瘍、胆石症など良性疾患の大多数は400単位以下を示し、治療手術を行ない得た癌患者では400~500単位、進行癌とくに消化器癌患者の大多数は500単位以上の高値を呈し、症状の悪化とともに上昇する傾向を認めており、しかも著者の免疫療法を実施した症例においてみられた、一時的にせよ LDH 活性の低下の傾向は、一般状態の改善と相まってその免疫効果を示唆するものといえよう。これらの血液生化学的所見の改善とともに現在までに、本免疫療法を実施した17例中5例に顕著な治療効果が認められ、なかんずく、左前胸壁に多発した再発乳癌腫瘍の完全消失を認めた例をはじめ、進行回盲部癌および回腸細網肉腫の姑息的切除に終わった例で、それぞれ免疫療法後2年1カ月、2年2カ月の現在、健存して社会生活に復帰している症例の得られている事実は、開発途上にある癌免疫療法の将来に明かるい希望を与えるものといえよう。

癌免疫療法の終局の目的が、あらゆる癌に共通の特異抗原を発見し、その精製抗原による予防ワクチン開発にあることは論を俟たない。Witebsky<sup>23)</sup>は2人の卵巣癌患者の血清と細胞形態が類似している他の癌患者の腫瘍抽出液との間に交叉反応がみられたといい、Czajkowski や<sup>56)</sup> Decarvalho ら<sup>57)</sup>は pool した多数の腫瘍の Fluoro-Carbon 中に腫瘍抽出液で免疫された全ての癌患者の抗血清と反応する単一の特異抗原が存在することを示唆し、石川<sup>7)</sup>らも、癌組織の可溶性蛋白分画を沈降線パターンで追跡して、酸性ムコ蛋白、 $\alpha$ 、 $\beta$ -globulin 分画に特徴的組成を認める

とともに、癌細胞凝集阻止反応を示標として、癌細胞表面に位置する癌特異抗原に注目し、その本体は Lipopolysaccharide であり人の全ての臓器癌に共通に存在すると述べている。

著者も甚だ少数例ではあるが、Boyden 法や Skin test により、免疫治療を行なった患者の相互に交叉反応を認めている。しかし、そこでみられた流血抗体が果して癌に対して抑制的に働いているか否かは問題のあるところであって、血清学的方法で証明される流血抗体には、Kallis ら、<sup>58)</sup> Kaudutsch<sup>59)</sup> のいう enhancement Antibody である場合も否定は出来ない。事実実者も、Methylcholanthrene 誘発癌の抽出物であらかじめ感作したラットの一部に、却って移植率が高かった例を経験しており、これらの問題を慎重に解析し、その危険性を回避してゆくことが今後の癌免疫療法の研究における重要な課題のひとつであろう。

### 総括ならびに結論

癌の免疫療法の試みとして、腫瘍組織中に存在すると考えられる腫瘍特異性 haptene に異種蛋白を結合させれば、autologous host で免疫反応を起し得るであろうとの作業仮説に基づき、腫瘍組織に異種蛋白として牛痘 Virus 蛋白を結合させる方法を考案し、これによって宿主に発現せしめ得る抗腫瘍性を実験的ならびに臨床的に検討し、次の知見ならびに結論を得た。

1. ラットの両側背部皮下に腫瘍を移植し、8日後に着床増殖した腫瘍の1側を、それを被う皮膚とともに結紮し、腫瘍組織内に矢追抗原 0.1cc を注入、in vivo で両者を接触させ、48時間後に結紮を解放して対側腫瘍の増殖ならびに腫瘍移植後40日の生存率を検討した結果、腹水肝癌 AH 130 移植呑竜ラットの34%に腫瘍の縮少退縮傾向を認め、その生存率は23%で、Walker carcinosarcoma 256 移植 Wistar ラットでも28%に腫瘍の縮少が認められ、生存率は20%であった。これに反し、腫瘍組織内生理食塩水注入対照群および腫瘍よりはなれた部位の skin pouch に矢追抗原を注入した群では、それらの大多数の腫瘍は進行性の増殖を示し、生存率も低く、腹水肝癌 AH 130 移植ラットで、それぞれ11%および5%、Walker Carcinosarcoma 256 移植ラットで10%および0%であった。

なお、Walker Carcinosarcoma 256 移植ラットを対象に本免疫処置を行なうと同時に Parotin 0.5mg を週2回筋注し、網内系の賦活をはかった群においては、腫瘍増殖の抑制傾向が顕著で、生存率も42%にの

ばり、Dextran 鉄クリアランス法により網内系貪食能の亢進が認められた。これとともに、腫瘍退縮例の血清中に腫瘍感作血球凝集素の出現が Boyden 法により証明された。

2. 臨床応用を容易にする目的で、ラットの両側背部皮下に腫瘍を移植し、8日後にその1側腫瘍を摘出して、松橋あるいは Czajkowski らの方法により腫瘍組織抽出液を作成、これらに *in vitro* で矢追抗原を混合ないしは Benzidine coupling 法で結合させ、Freund の Adjuvant を加えて、3日間隔で3回大腿筋内に投与する方法を用い、対側残存腫瘍の増殖および生存率に及ぼす影響を観察したところ、Walker Carcinosarcoma 256 移植 Wistar ラットでは、単に1側腫瘍を摘出したのみの対照群に比べ、平均5.6日の延命効果を認めるにとどまったが、Methylcholanthrene 肉腫移植呑竜ラットにおいては、対側残存腫瘍の顕著な縮小傾向を認め、生存率も対照群の12.5%に対して50%の高率を示した。

3. 進行癌あるいは再発癌患者17例を対象に、それらの癌組織の一部を採取し、その腫瘍細胞に上述の Benzidine coupling 法により矢追抗原を結合させ、Freund の Adjuvant を加えて、2日間隔で2ないし8回投与するとともに、Parotin あるいは Mesacton による網内系賦活を行ない、臨床的效果ならびに血清  $\gamma$ -globulin, LDH および Congored 係数の消長を検索した結果、本免疫療法の実施後、血清  $\gamma$ -globulin の軽度上昇、LDH の低下および Congo-red 係数の上昇する傾向が認められ、現在までの経過観察において、乳癌再発腫瘍の完全消失例、細網肉腫症の脾腫縮小および胸水消褪例、進行性回盲部癌姑息的切除後の2年1カ月健存例、進行性回腸細網肉腫姑息的切除後の2年2カ月健存例および進行性胃癌単開腹例の11カ月生存例と、本療法が奏功したと考えられる5症例が得られている。なお有効例の血清中に腫瘍感作血球凝集素の出現が証明された。

以上の実験結果ならびに臨床成績は、上述の作業仮説を支持するものと思われ、この点は、さらに腫瘍組織から分離精製した haptene に牛痘 Virus 蛋白を結合させ、その結合物で免疫感作を行ない抗腫瘍性の発生を検することが必要であるが、腫瘍に Virus 蛋白を結合させて宿主に抗腫瘍性を発生せしめ得た本研究は、現今注目されている Virus 性発癌因子の問題とも関連して、癌免疫療法の開発に新たな手がかりを与えるものと考えらる。

稿を終るに臨み、終始御懇篤な御指導、御校閲を賜った恩師水上哲次教授、ならびに御教示された小坂進講師に心から感謝の意を捧

げます。なお本学癌研究所、西東利男教授ならびに倉田自章教授の御教示、御援助に深く感謝の意を捧げるものであります。なお本研究は文部省がん特別研究費によるものである。

## 文 献

- 1) Folev, E. J. : Cancer Res., 2, 578 (1953).
- 2) Foley, E. J. : Cancer Res., 2, 835 (1953).
- 3) Prehn, R. T., & Main, J. M. : J. Nat. Cancer Inst., 18, 769 (1957).
- 4) Klein, G., Sjogren, H. O., Klein, E., & Hellstrom, K. E. : Cancer Res., 20, 1561 (1960).
- 5) 武田勝男・相沢 幹・辻由生子・山脇慎也・中村恭二 : 最新医学, 20, 2826 (1965).
- 6) 石川大刀雄・高柳尹立 : 日新医学, 44, 361 (1959).
- 7) 石川大刀雄・橋 武彦・高柳立尹 : 癌の臨床, 8, 593 (1962).
- 8) Zilber, L. A. : J. Nat. Cancer Inst., 18, 341 (1957).
- 9) 田中早苗・折田薫三・国米欣明 : 医学のあゆみ, 60, 227 (1967).
- 10) 田中早苗・折田薫三 : 治療, 48, 495 (1966).
- 11) 水上哲次・小坂 進 : 日医事新報, 2269, 9 (1967).
- 12) Lytton, B. & Hughes, L. E. : Lancet, 1, 69 (1964).
- 13) Grace, J. T., & Kondo, T. : Ann. Surg., 148, 633 (1958).
- 14) Landsteiner, K. & Tablons, B. : Zschr. Immunit. Forsch., 20, 618 (1914).
- 15) Landsteiner, K. & Lampl, H. : Zschr. Immunit. Forsch., 26, 133 (1917).
- 16) Asakuma, R. : Arch. Jap. chir., 33, 297 (1964).
- 17) Stone, H. B., Curtis, R. M. & Brewer, J. H. : Ann. Surg., 134, 519 (1951).
- 18) Lewis, M. R. & Aptekman, P. M. : Cancer, 5, 411 (1952).
- 19) Strauss, A. A., Appel, M. & Saphir, O. : Amer. J. Surg., 104, 37 (1962).
- 20) Southam, C. M., Brunshwig, A., Levin, A. G. & Dizon, Q. : Cancer, 19, 1743 (1966).
- 21) Landsteiner, K. & Simms, S. : J. Exper. Med., 38, 127 (1923).
- 22) Rapport, M. M. & Graf, L. : Cancer, 8, 538 (1955).
- 23) Witebsky, E., Rose, N. R. & Shulman, S. : Cancer Res., 16, 831 (1956).
- 24) Kabat, E. A. & Mayer, M. M. : Experimental Immunochemistry, 1. ed., P142, Springfield III, Charles C. Thomas, 1948.
- 25) Blum, H. F. : J. Nat. Cancer Inst., 4, 24 (1943).
- 26) Shimkin, M. B. ryan,

- W. R. : J. Nat. Cancer Inst., 18, 769 (1957).  
 27) Barkan, G. & Walker, B. S. : J. Biol. chem., 131, 447 (1939). 28) 松原高賢・鳥井正道 : 医学と生物, 42, 151 (1957).  
 29) Boyden, S. : J. Exper. Med., 93, 107 (1951). 30) 松橋 直 : 臨病理, 12, 219 (1964). 31) Czajkowski, N. P., Rosenblatt, M., Wolf, P. L. & Vazquez, J. : Lancet II, 905 (1967). 32) Cabaud, P. G. & Wróblewski, F. : Amer. J. Clin. Path., 30, 234 (1958). 33) Adler, H. & Reimann, F. : Zschr. Exper. Med., 47, 617 (1925). 34) Cohnheim, J. F. : Vorlesung über allgemeine Pathologie, Bd. 1~2, 2. Auff, Berlin Hirxhwalld 597, 1882.  
 35) Krätshell, U. : Fortschr. Med., 44, 983 (1933). 36) Bavbera, S. : Gazz. Int., med. chir., 45, 710 (1935). 37) Kavetskiy, R. E. : Med. Zh., 7, 91 (1937).  
 38) Schröder, W. : Klin. Wschr., 18, 268 (1939). 39) Stern, K., Davidsohn, I. : J. nat. CancerInst., 23, 1319 (1960).  
 40) Barr, M. & G. H. Fairly : Lancet, I, 1305 (1961). 41) 水上哲次・西尾 功・土原一弘・木藤光彦・藤田秀春 : 第25回癌学会記事 163, 1966. 42) 水上哲次 : 臨と研, 39, 247 (1962). 43) Caspaspari, W. & Flörken, H. : Zschr. Z. Krebsforsch., 30, 546 (1932). 44) 宮城文男 : 十全医会誌, 76, 541 (1968). 45) 林征一郎 : 十全医会誌, 76, 526 (1968). 46) Green, H. S. N. : Ann. N. Y. Aca. Sci, 69, 818 (1957).  
 47) 小野博道 : 日外室, 133, 16 (1964).  
 48) Landsteiner, K. : Biochem. Z., 119, 294 (1921). 49) Finney, J. W., Byers, E. H. & Wilson, R. H. : Cancer Res., 20, 351 (1960). 50) 平井秀松 : 日臨, 23, 51 (1965). 51) 赤井貞彦 : 腫瘍免疫研究組 織連絡会議報告, 東京, 1964. 52) Warburg, O. & Chrstian, W. : Biochem. Ztschr., 314, 399 (1943). 53) West, M. & Zimmerman, H. J. : Arch. Intern. Med., 102, 103 (1958). 54) 平木 潔・浅野健夫 : 臨床 酵素学 (赤堀・沖中監修), 第1版, 141頁, 東京, 朝倉書店, 1965. 55) 野口政宏 : 日消会誌, 46, 284 (1967). 56) Czajkowski, N. P., Roenblatt, M., Cushing, F. R., Vazquez, J. & Wolf, P. L. : Cancer, N. Y., 19, 739 (1966). 57) DeCarvalho, S. : J. Lab. clin. Med., 56, 333 (1960). 58) Kallis, N. & Bryant, B. F. : J. Nae. Cancer Inst., 20, 691 (1958). 59) Kaudutsch, A. A. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 64, 1002 (1956).

## Abstract

As an attempt for immunotherapy of malignant tumor, it is presumed that tumor specific hapten, when combined with heterologous protein, can produce immune reaction in autologous host. In the present study, purified variola virus was combined with tumor tissue as a heterologous protein, and antitumoral effect of this with modified tumor tissue in tumorbearing host was investigated experimentally and clinically. The obtained results were summarized as follows.

I. Tumor was inoculated subcutaneously in the back of rats bilaterally. One of these bilateral tumors was ligated and 0.1 cc of purified variola virus was injected into the ligated tumor. The ligation was released 48 hours later. Tumor development on the other side of the back and the survival rate of 40th day of the inoculation were investigated. In 34 per cent of the animals, tumor regression was observed with the survival rate of 23 per cent. On the contrary, in most of the animals with saline injection in the tumor or injection of purified variola virus outside of the tumor, tumor development was progressive with the survival rate of 11 and 5 per cent, respectively. When 0.5mg of Parotin was injected twice a week subcutaneously with the above-described immunological maneuver in order to activate the RES, inhibitory effect on tumor development was outstanding with the survival rate of 42 per cent and an increase in phagocytic activity of the RES was observed as examined

of Dextran-Fe clearance. In these animals with tumor regression, agglutinin for red blood cell sensitized by tumor was detected in the serum by the Boyden's method.

2. One of the bilateral subcutaneous tumor growths in the back was extirpated and tumor cell suspension was produced after the method of Czajkowski, and purified variola virus was combined with the suspended tumor cells by benzidine coupling, which was further mixed with Freund adjuvant and intramuscularly injected 3 times with the interval of 3 days in the femur, and tumor development on the other side of the back and the survival rate were investigated. Tumor regression was remarkable compared with the control animals of unilateral extirpation of the tumor, and the survival rate was as high as 50 per cent, whereas it was 12.5 per cent in the control group.

3. Some parts of the tumor tissues were taken from 17 patients of advanced or recurrent cancer, and purified variola virus was combined with the tumor cells by the method of benzidine coupling and mixed with Freund adjuvant. Then, this mixture was administered to these patients from 2 to 8 times every other day, with RES activation maneuver with parotin or Mesacton, and clinical effect, serum  $\gamma$ -globulin, LDH and Congo-red index were examined. After this immunotherapy, a slight increase in serum  $\gamma$ -globulin, a decrease in LDH and increase in Congo-red index were observed. Clinical observations until the publication of the present paper revealed 5 cases of favorable course presumably owing to the author's immunotherapy, a case of complete disappearance of recurrent tumor of breast cancer, a case of improvement of splenomegaly and disappearance of thoracic fluid in reticulosarcoma, a case of 25-month survival after palliative resection of progressive cancer in ileocecal portion, a case of 26-month survival after palliative resection of progressive reticulosarcoma in the ileum and a case of 11-month survival after simple exploratory laparotomy in progressive cancer in the stomach.

---

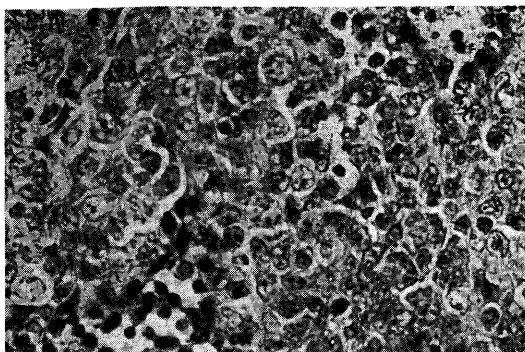


写真1. 腫瘍結紮+生食水注入ラットの移植後25日目の腹水肝癌 AH130 皮下移植腫瘍の組織像。

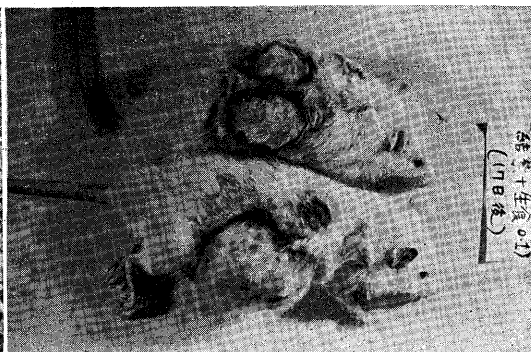


写真2. 腫瘍結紮+生食水注入ラットの移植後17日目の対側残存腫瘍を示し、腫瘍は進行性増殖を呈し、結紮部の一部にも再発腫瘍を認める。

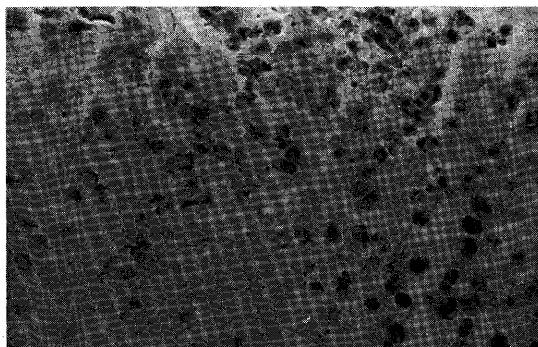


写真3. 腫瘍結紮+矢追抗原注入ラットの移植後28日目の腹水肝癌 AH130 腫瘍の組織像で、腫瘍細胞は一部浮腫状、粘液変性を起している。



写真4. 腫瘍結紮+矢追抗原注入ラットの移植34日目の対側残存腫瘍を示し、腫瘍は一部潰瘍化あるいは縮少消褪し、治癒に向っている。



写真5. 症例5, 再発乳癌で, 左前胸壁に  $6.0 \times 8.0$  cm の腫瘍と左腋窩に  $3.0 \times 4.0$  cm の転移リンパ腺腫を認める.



写真6. 症例5, 左腋下部の腫瘍より作成した Vaccine を注射後3週目の写真で, 前胸壁の再発腫瘍は完全に消失している.

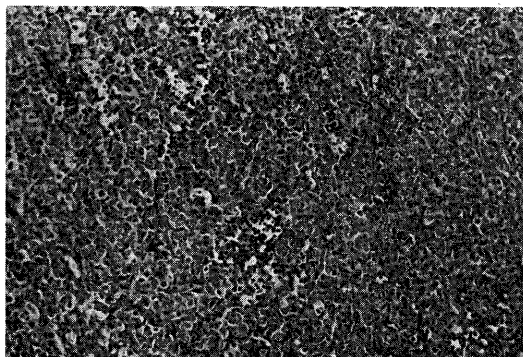


写真7. 症例9 進行性回腸細網肉腫の手術時転移腸間膜リンパ腺の組織像.

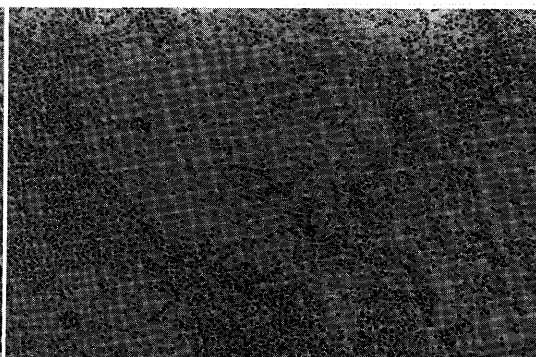


写真8. 症例9 進行性回腸細網肉腫の手術後1年目, 免疫注射8回後の左顎下部リンパ腺腫の組織像で, 腫瘍細胞の配列は疎になり, 間質のリンパ球および形質細胞の浸潤が強く見られる.