

# 悪性腫瘍に対する局所温熱療法とCalmette-Guérin 菌療法の併用に関する実験的研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 市橋, 匠 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7731">http://hdl.handle.net/2297/7731</a>

## 悪性腫瘍に対する局所温熱療法と Calmette-Guérin 菌 療法の併用に関する実験的研究

金沢大学医学部第一外科学教室 (主任: 岩 喬教授)

市 橋 匠

(昭和59年4月14日受付)

本研究は局所温熱療法と BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) 生菌の局所投与を併用した時の治療効果および免疫学的パラメーターへの影響を検討するために行った。腫瘍移植の 31 日前に C57BL/6 マウスの腹腔内に 0.1 mg の BCG 生菌または 0.2 ml の生理食塩水を投与した。ついで、Lewis 肺癌の生細胞  $2.5 \times 10^6$  個を全てのマウスの左後肢足蹠に接種した。腫瘍移植後 14 日目に、腫瘍を 44°C、30 分間の温浴に浸漬するか、電気焼灼 (electrocautery) により切除するか、または何も処置を行わない群に分けた。移植後 15 日目にこれらのマウスに対し、2 mg の BCG 生菌または 0.05 ml の生理食塩水の腫瘍内投与、または 2 mg の BCG 生菌の腹腔内投与を行った。生存率の検討では、局所温熱療法と BCG 腫瘍内投与を行った 10 匹 (STHB 群) のうちの 1 匹、および生理食塩水の代りに BCG で前処置してから STHB 群と同様の処置を行った 10 匹 (BTHB 群) のうちの 2 匹が、腫瘍移植後 50 日目にも腫瘍の再発なく生存していた。他の治療群でも軽度の生存期間の延長を認めたが、全て 44 日以内に死亡した。Winn テストを行うと、腫瘍移植 31 日前に BCG で前感作され、移植後 15 日目に BCG の腫瘍内投与を受けた BTB 群では腫瘍増殖が完全に抑制され、また BTHB 群では腫瘍増殖が部分的に抑制された。前もって抗 Thy-1.2 抗体と補体で脾細胞を処理しておくと、腫瘍増殖抑制は BTHB 群では消失し、BTB 群では減少した。BTHB 群における T 細胞または NK (natural killer) 細胞の脾細胞総数に対する割合は、BTB 群および対照群 (STS 群) におけるものより多かった。一方 BTB 群においては単球 (マクロファージであると考えられた) の脾細胞数に対する割合が増加していた。これらの結果から、マウスを BCG 生菌で前感作し、さらに局所温熱療法と BCG 生菌の腫瘍内投与の併用治療を行うことは、増加した抗腫瘍免疫の誘導に有利であることが示唆された。

**Key words** hyperthermia, immunotherapy, BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*)

悪性腫瘍に対する免疫療法は、ウィルスまたは化学物質によって修飾した腫瘍細胞で生体を免疫するか、生腫瘍細胞から抽出分離した腫瘍特異抗原もしくは腫瘍関連抗原を利用する特異免疫の誘導が合理的、かつ有効であることはいままでの間、臨床的には種々の制約がある。これに対し、細菌類、担子菌類、またはそれらの抽出物を利用する非特異的免疫療法<sup>1)</sup>は、腫瘍増殖の抑制効果に限界はあるが、現在臨床面で広く適用されている。

一方、悪性腫瘍に対する温熱療法は、丹毒を併発した肉腫患者において高熱が腫瘍の退縮をもたらしたと

する Busch<sup>2)</sup>の観察に始まり、その後 Coley<sup>3)</sup>は直接腫瘍内に連鎖球菌を注入し、発熱による腫瘍の治療を試み、温熱療法の有用性を示した。Crile<sup>4)</sup>、Cavaliere<sup>5)</sup>の加温血液灌流による悪性腫瘍の治療効果が 1960 年代に報告されてからは、悪性腫瘍に対する温熱療法の有用性が再認識されるようになった。しかしながら、新しい治療法としての全身性温熱療法が一時的に宿主免疫機能を低下させる<sup>6)</sup>のに対し、局所温熱療法はむしろ増強する傾向にあるとされており<sup>7)</sup>、臨床例でも主腫瘍の局所加温により転移巣が消失した報告<sup>10)</sup>もある。

Experimental Studies on the Combined Modality of *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) - Treatment and Local Hyperthermia for Malignant Tumor. Takumi Ichihashi, Department of Surgery (I) (Director: Prof. T. Iwa) School of Medicine, Kanazawa University.

今回著者は、局所温熱療法と BCG 投与による局所免疫療法を併用した場合の治療効果と、背景となる免疫機能の諸パラメーターについて、動物実験モデルで検討した。

### 材料および方法

#### I. 実験材料

##### 1. 供試マウス

全実験を通じ、約 6 週齢の雌性 C57BL/6, SPF (specific pathogen free) マウス (静岡実験動物, 浜松) を使用した。飼育管理は一定の空調室内で行い、給餌は固型飼料 (MF, オリエンタル) 給水は煮沸滅菌水をそれぞれ自由に摂取させた。

##### 2. 腫瘍ならびに癌細胞浮遊液

C57BL/6 マウス由来の Lewis 肺癌 (国立ガンセンターより分与) を同系マウスの側胸部皮下に移植継代し、実験に供した。細胞浮遊液の調製には、移植 14 日目の摘出腫瘍を 80 メッシュのステンレス網上で細切、濾過し、燐酸緩衝液 (pH 7.4, 以下 PBS と略) で 1 回洗浄後、再度 PBS に浮遊させ、トリパンブルー (0.2% 液, Merck) - 除外テストにより生細胞数 (約 30%) をカウントし、ペニシリン-G (明治製薬) を 100 U/ml に含む PBS, またはゲンタマイシン (塩野義製薬) を 10  $\mu$ g/ml に含む RPMI 1640 培地 (日水製薬) に、所定の生細胞濃度となるように浮遊させた。

##### 3. 脾細胞浮遊液

無菌的に摘出したマウス脾を RPMI 1640 培地中に、載物ガラス板で軽く圧挫、自由化した脾細胞の浮遊液を 80 メッシュのステンレス網で濾過した。ついで Tris-NH<sub>4</sub>Cl 緩衝液処理によって赤血球を除去し、RPMI 1640 培地で 3 回洗浄後、pellet は RPMI 1640 培地に浮遊させ、0.2% トリパンブルーにより生細胞数 (約 100%) をカウント後、所定の脾細胞濃度液に調整した。

##### 4. 抗血清および抗体

fluorescein isothiocyanate<sup>11)</sup> (以下 FITC と略) - ウサギ抗マウス IgG<sub>1</sub>, FITC-ヤギ抗ウサギ IgG, および抗ヒツジ赤血球ストローマ抗血清<sup>12)</sup> (IgM 抗体) は、金沢大学がん研究所免疫生物部坂井俊之助助教授より供与をうけた。また、抗 Thy-1.2 抗体 (モノクローナル抗体; clone 5a-8, Cedarlane 社, Canada) および抗 asialo GM 1 抗体 (和光純薬工業 K.K., 大阪) はそれぞれ市販品を供用した。

#### II. 実験方法

##### 1. 抗腫瘍試験

本研究において、局所温熱療法と免疫療法を単独に、あるいは併用して行う実験のプロトコールおよび群別

は図 1 に一括提示した。BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) 弱毒株製剤 (日本 BCG K.K., 生菌数  $4 \sim 6 \times 10^7$ /mg) の生理食塩水 (以下 PSS と略) 浮遊液 (0.5 mg/ml) 0.2 ml をマウス腹腔内に投与した BCG 感作マウス群と、対照としての PSS 0.2 ml の腹腔内投与群に大別した (Day-31). BCG 感作 (または PSS 投与) 31 日後, Lewis 肺癌細胞  $2.5 \times 10^5$  個/0.05 ml PBS を全マウスの左後肢足趾皮下に移植した (Day 0). 腫瘍移植後 14 日目に,  $44.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$  の温水中に, 腫瘍を移植した患肢を 30 分間浸漬した群, 電気焼灼 (electrocautery) によって患肢を大腿部で切断した群, および無処置の群に分別した (Day 14). さらに腫瘍移植後 15 日目に, 腫瘍内に BCG 2 mg/0.05 ml PSS を注入した群, PSS 0.05 ml を注入した群, および腹腔内に BCG 2 mg/0.05 ml PSS を注入した群を設定し, 分別した (Day 15).

効果判定については, 1) 生命延長は median survival time (以下 MST と略), および腫瘍移植後 50 日目 (Day 50) における生存率の比較によって, また 2) 局所腫瘍の増殖抑制は移植後 18 日目 (Day 18) においてスライディングキャリパーで腫瘍の長径 (L, mm) と短径 (W, mm) を計測し, 次式によって算出した腫瘍サイズの比較によった。

$$\text{腫瘍重量 (mg)} = L \times W^2 / 2$$

なお, 温熱療法時, 腫瘍中心部の温度と直腸温をサーミスタデジタル温度計 TD-311 とサーミスタ測温体 NST (ともに芝浦電子製作所) にて測定した。

##### 2. マウス脾細胞による腫瘍細胞傷害試験 (Winn's test<sup>13)</sup>)

STS 群: PSS 投与 (Day-31)  $\rightarrow$  腫瘍移植 (Day 0)  $\rightarrow$  PSS 投与 (Day 15).

BTB 群: BCG 投与 (Day-31)  $\rightarrow$  腫瘍移植 (Day 0)  $\rightarrow$  BCG 投与 (Day 15).

STHS 群: PSS 投与 (Day-31)  $\rightarrow$  腫瘍移植 (Day 0)  $\rightarrow$  温熱処置 (Day 14)  $\rightarrow$  PSS 投与 (Day 15).

BTHB 群: BCG 投与 (Day-31)  $\rightarrow$  腫瘍移植 (Day 0)  $\rightarrow$  温熱処置 (Day 14)  $\rightarrow$  BCG 投与 (Day 15).

以上のような処置を行った各群 (図 1 参照) および非担癌正常群について, Day 21 に 1 群 10 匹分をプールした脾細胞浮遊液を調製し, 実験に供した。

また各群の脾細胞浮遊液の一部を, 抗 Thy-1.2 抗体の 40 倍希釈液で  $4^\circ\text{C}$ , 30 分処理した後, RPMI 1640 培地で 2 回洗浄し, さらに新鮮ラット補体の 10 倍希釈液で  $37^\circ\text{C}$ , 30 分反応させ, RPMI 1640 培地で 2 回洗浄したものを [抗 Thy-1.2 抗体 + 補体] 処理脾細胞とした。

それぞれの脾細胞浮遊液 ( $0.8 \times 10^6$ 個/ml) と, PRMI 1640 培地に浮遊させた Lewis 肺癌細胞浮遊液 ( $0.8 \times 10^6$ 個/ml) を等容量混合し, その 0.2 ml (癌細胞  $8 \times 10^4$ 個) 宛を, マウスの右背側部皮下に接種した。接種 13 日目に腫瘍重量を, また 27 日目に生着率を, それぞれ比較検討した。

### 3. NK (natural killer) 活性の測定<sup>14)</sup>

標的腫瘍細胞としては A/Sn マウス由来の Moloney virus induced lymphoma YAC-1 細胞 (Flow Lab., England) を用いた。10% 非働化ウシ胎児血清 (GIBCO, 以下 FCS と略) 加 RPMI 1640 培地 1 ml に YAC-1 細胞  $1 \times 10^7$  個を浮遊させ,  $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$  (日本アイソトープ協会)  $100 \mu\text{Ci}$  (0.1 ml) を加え,  $37^\circ\text{C}$ , 60 分反応させた後, N-2-hydroxy-ethylpiperazine N'-2-ethane sulfonic acid (Sigma, 以下 HEPES と略) 加 RPMI 1640 培地で 3 回洗浄し, 細胞濃度  $1 \times 10^6$  個/ml となるように前記血清加 RPMI 1640 培地に浮遊させた。

腫瘍移植後 19 日目 (Day 19) に, 各群 2 匹分のマウス脾細胞をプールした脾細胞浮遊液 ( $1 \times 10^7$  個/ml) を調製した。脾細胞浮遊液の一部を, 抗 asialo GM 1 抗体の 90 倍希釈液で  $4^\circ\text{C}$ , 30 分反応させ, HEPES 加 RPMI 1640 培地で 2 回洗浄し, さらに新鮮モルモット血清 (補体) の 15 倍希釈液で  $37^\circ\text{C}$ , 30 分反応させた後, HEPES 加 RPMI 1640 培地で 2 回洗浄した。

前もって 2-mercaptoethanol を加えた 10% 非働化 FCS 加 RPMI 1640 培地で細胞濃度  $1 \times 10^7$  個/ml に調整した脾細胞浮遊液 (effector cell) 0.1 ml を  $^{51}\text{Cr}$  標識 YAC-1 細胞浮遊液 (target cell) 0.1 ml と U 型マイクロプレート (# 76-013-05, Falcon 社, USA) のウェル内で混合し,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  下で 4 時間培養後, 1500 rpm にて 10 分間遠沈し, 上清液 0.1 ml について放射活性を Auto well gamma counter system (アロカ JDC-751) で測定した。標識腫瘍細胞からの maximum release 値は, effector 細胞浮遊液の代わりに 0.1 ml の 5% Triton X100 を加えて測定し, また spontaneous release 値は effector 細胞浮遊液の代わりに 2-mercaptoethanol を混じた 10% 非働化 FCS 加 RPMI 1640 培地 0.1 ml を加えて測定した (spontaneous release は maximum release の 27% であった)。次式によって % lysis を算定し, 各群 3 ウェルの平均値および S.E.M. (standard error of mean) を求めた。

$$\% \text{ lysis} = \frac{\text{experimental release (cpm)}}{\text{maximum release (cpm)}} - \frac{\text{spontaneous release (cpm)}}{\text{spontaneous release (cpm)}} \times 100$$

### 4. 単球, T 細胞, B 細胞および NK 細胞数の測定

1) 総脾有核細胞数: 各群 4 匹宛個別に計測し, 平均値と S.D. (standard deviation) を求めた。

2) 単球: 各群 2 匹分の脾細胞をプールした脾細胞浮遊液を調製し, 総脾有核細胞数を測定した。脾細胞浮遊液をプラスチックシャーレ (No. 3001, Falcon 社, USA) に入れ, 室温にて 2 時間静置し, 非付着細胞を回収し, その数を測定した。次式により単球の総脾有核細胞に占める比率を計算した。

$$\text{単球}\% = 100 - \frac{\text{非付着細胞数}}{\text{総脾有核細胞数}} \times 100$$

3) T 細胞, B 細胞および NK 細胞については, 各群 4 匹宛, それぞれ個別に脾細胞浮遊液を調製し, プラスチックシャーレ (No. 3001) に入れ, 室温にて 2 時間静置した後, 非付着細胞を 10% 非働化 FCS 加 RPMI 1640 培地で洗浄, 収集し, それぞれについて下記の方法で, 総脾有核細胞数に対する各細胞数の比率を算出した。

i) T 細胞: 脾細胞浮遊液を抗 Thy-1. 2 抗体の 30 倍希釈液と  $0^\circ\text{C}$ , 30 分反応させ, RPMI 1640 培地で 3 回洗浄後, 10% 非働化 FCS 加 RPMI 1640 培地に浮遊させた。ついでこの浮遊液を, 前もってマウスの脾細胞および赤血球で吸収処理した FITC-ウサギ抗マウス  $\text{IgG}_1$  抗体と  $0^\circ\text{C}$ , 30 分反応させ, RPMI 1640 培地で 3 回洗浄後, 再度 10% 非働化 FCS 加 RPMI 1640 培地に浮遊させた。蛍光顕微鏡下で蛍光陽性細胞数を測定し, 光学顕微鏡下で測定した総有核細胞数に対する比率を求めた。

ii) NK 細胞: 脾細胞浮遊液を抗 asialo GM 1 抗体の 30 倍希釈液と  $0^\circ\text{C}$ , 30 分反応させた後, RPMI 1640 培地で 3 回洗浄し, 10% 非働化 FCS 加 RPMI 1640 培地に浮遊させた。ついでこの浮遊液を, 前もってマウスの脾細胞および赤血球で吸収処理した FITC-ヤギ抗ウサギ  $\text{IgG}$  抗体と  $0^\circ\text{C}$ , 30 分反応させ, RPMI 1640 培地で 3 回洗浄後, 再度 10% 非働化 FCS 加 RPMI 1640 培地に浮遊させた。蛍光顕微鏡下で蛍光陽性細胞数を測定し, 総有核細胞数に対する比率を求めた。

iii) B 細胞: 橋ら<sup>15)</sup>の微量測定法によって算出した。ヒツジ赤血球を  $\text{GVB}^{++}$  (2% gelatin,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  加 veronal buffer, pH 7.2, 0.01M) で洗浄し,  $\text{GVB}^{++}$  にて細胞濃度を  $1 \times 10^6$  個/ml に調整した。これを抗ヒツジ赤血球ストローマ抗血清から分離した  $\text{IgM}$  抗体の 3000 倍希釈液で  $37^\circ\text{C}$ , 30 分反応させた。  $\text{GVB}^{++}$  で 3 回洗浄後, C5 欠損マウス血清の 5 倍希釈液で  $37^\circ\text{C}$ , 15 分反応させ,  $\text{GVB}^{++}$  で 3 回洗浄, PBS で  $2 \times 10^6$  個/ml に調整した (補体レセプター検出用指示細胞)。この sheep erythrocyte-antibody-complement 結合物 (以

下 EAC と略) にマウス脾細胞浮遊液の 5 倍容量を加え, 37°C, 30 分反応させ, 光学顕微鏡下で観察した。総有核細胞数に対する, ヒツジ赤血球が 2 個以上附着した EAC ロゼット形成細胞数の比率を求めた。

成 績

1. 局所温熱療法と BCG による局所免疫療法の併用効果

Lewis 肺癌細胞を足蹠に移植した C57BL/6 マウスに対し, 局所温熱療法と BCG の局所投与による免疫療法をそれぞれ単独に適用するか, または種々の組み合わせで両者を併用する抗腫瘍試験 (図 1 参照) で得

Fig. 1. Treatment schedule of the therapy with BCG and/or hyperthermia.

Group (symbol)	Treatment schedule			
STS	saline (ip) <sup>a)</sup>	LLC (sc) <sup>b)</sup>		saline (it) <sup>c)</sup>
	-31	0		15
BTS	BCG (ip)	LLC (sc)		saline (it)
	-31	0		15
BTB	BCG (ip)	LLC (sc)		BCG (it)
	-31	0		15
STHS	saline (ip)	LLC (sc)	Htm <sup>d)</sup>	saline (it)
	-31	0	14	15
STHB	saline (ip)	LLC (sc)	Htm	BCG (it)
	-31	0	14	15
BTHS	BCG (ip)	LLC (sc)	Htm	saline (it)
	-31	0	14	15
BTHB	BCG (ip)	LLC (sc)	Htm	BCG (it)
	-31	0	14	15
BTB'	BCG (ip)	LLC (sc)		BCG (ip) <sup>e)</sup>
	-31	0		15
BTHB'	BCG (ip)	LLC (sc)	Htm	BCG (ip)
	-31	0	14	15
STE	saline (ip)	LLC (sc)	E <sup>f)</sup>	
	-31	0	14	
BTE	BCG (ip)	LLC (sc)	E	
	-31	0	14	

a) Intraperitoneal (ip) injection of 0.2 ml saline or 0.1 mg BCG in 0.2 ml saline.

b) Implantation of  $2.5 \times 10^5$  viable cells of Lewis lung carcinoma (LLC) into the left hind footpad subcutaneously (sc).

c) Intratumoral (it) injection of 0.05 ml of saline or 2 mg BCG in 0.05 ml saline.

d) Local hyperthermia (Htm): tumors were immersed in a water-bath at 44°C for 30 min.

e) Intraperitoneal injection of 2 mg BCG in 0.05 ml saline.

f) Resection of the left hind leg by electrocautery (E).

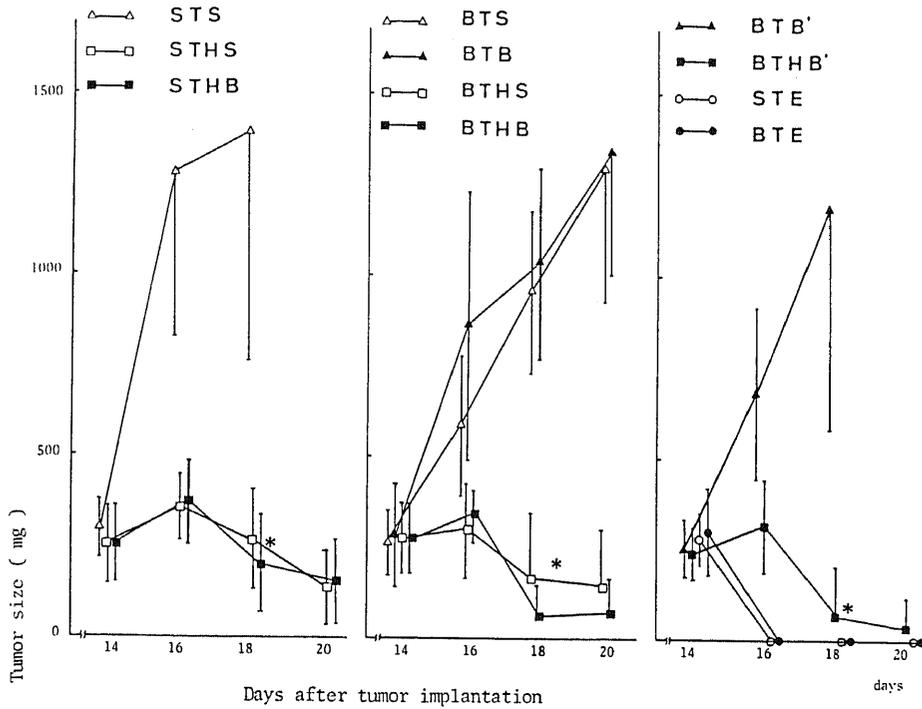


Fig. 2. Growth inhibition of Lewis lung carcinoma in C57BL/6 mice treated with BCG and/or hyperthermia. Each point represents a mean ( $\pm$ S.D.).  
 \* : The significance of the differences was assessed by Student's *t*-test or Welch's test ;  $p < 0.05$  (STS, BTS, BTB, BTB' vs STHS, STHB, BTHS, BTHB, BTHB').

Table 1. Effect of the combined therapy with BCG and hyperthermia against Lewis lung carcinoma in mice

Treatment group	Survival time (day)		No. of tumor-free mice/tested on day 50	$p < 0.05^a)$
	Median	Range		
STS	19	18-22	0/15	
BTS	28	20-31	0/7	>STS
BTB	34	19-42	0/9	>BTS, STS
STHS	31.5	27-39	0/10	>BTB', STS
STHB	28.5	24->50	1/10	>BTB', STS
BTHS	31.5	25-43	0/10	>BTB', STS
BTHB	34	26->50	2/10	>BTS, BTB', STS
BTB'	20	19-35	0/8	>STS
BTHB'	32	25-42	0/8	>BTS, BTB', STS
STE	29	25-44	0/19	>BTB', STS
BTE	29.5	25-43	0/10	>BTB', STS

a) : Wilcoxon rank sum test

られた成績は、図2と表1および図3に示した。

まず、局所における腫瘍増殖については、図2にみられるように、温熱療法を適用したすべての群において有意に腫瘍の増殖抑制が認められた。とくにBCG感作マウスに温熱療法を施行後、BCGを腫瘍内、または腹腔内に投与したBTHB群およびBTHB'群では、移植後18日目の腫瘍サイズの平均値は、いずれも100mg以下の低値にあった。なお電気焼灼により患肢を切断したSTE群、BTE群ともに、切断部における腫瘍増殖はなかった。

抗腫瘍試験における各治療群マウスのMST、腫瘍移植後50日目におけるマウス生存数、およびWilcoxon rank sum testによる生存率の有意差検定の結果は表1に一括表示した。局所にBCGを投与したBTB群や温熱治療のみを施行したSTHS群のMSTは、それぞれ34日および31.5日を示し、移植後50日目の生存マウスはみられなかったものの、いずれも対照のSTS群(MSTは19日)に比較して有意に延命がみられた。とくに温熱療法にBCG投与を併用したBTHB群およびSTHB群では、MSTはそれぞれ34日および28.5日であり、また前者で10匹中2匹のマウス、後者で10匹中1匹のマウスが、肉眼的に腫瘍所見なしに移植後50日目でも生存していた。また、5匹の正常マウスの下肢を電気焼灼によって切断しても死亡例はみられなかったが、担瘤マウスの患肢を切除したSTE群およびBTE群マウスのMSTは、29日前後を示し、移植後44日までに全例肺転移によって腫瘍死した。これら各治療群における延命、生存率の様相は図3に示した。

温熱療法施行群の局所腫瘍所見では、加温後24時間で腫瘍全体が外見上黒変し、以後徐々にミイラ化した。加温後6日目までに患肢の脱落をみとめたものはなかった。

局所腫瘍中心部の温度は、温熱治療開始後約5分で36°Cから43.5°Cに上昇し、以後その温度が持続した。治療終了後は、約2分で処置前の温度に復した。また直腸温は、温熱治療開始後約8分で37°Cから38°Cに上昇し、以後一定温度を保ち、終了後は約5分で37°Cを示した。

## 2. 各治療群マウス脾細胞の腫瘍細胞傷害活性 (Winn's test による)

担瘤マウスにおける無治療群、局所腫瘍へのBCG投与、および温熱処置のそれぞれ単独治療群、もしくは両者併用治療群、ならびに非担瘤正常マウス群について、腫瘍移植後21日目 (Day 21) におけるマウス脾細胞の細胞傷害活性を、Lewis肺癌を標的とするWinn's assay によって検討し、その結果を表2に示し

た。BTB群においては、腫瘍の生着・増殖が完全に抑制され、assay後27日目においても腫瘍生着マウスはまったくみられなかった。またassay後13日目の腫瘍重量で、温熱治療のみのSTHS群では有意な増殖抑制はみられなかったが、温熱治療とBCG投与を併用したBTHB群では、対照のSTS群に比較し、著明な増殖抑制効果が認められ、assay後27日目でも8匹中2匹に腫瘍の生着がみられなかった。次にこれらの有効と判断された治療群 (BTB群およびBTHB群) マウス脾細胞を、あらかじめ抗Thy-1.2抗体およびラット補体で前処理した後Winn's assayを行うと、BTB群では部分的に、BTHB群ではほとんど完全に、抑制効果が消失した。

## 3. 各治療群マウス脾細胞のNK活性

前項2. におけると同様のスケジュールで処置した

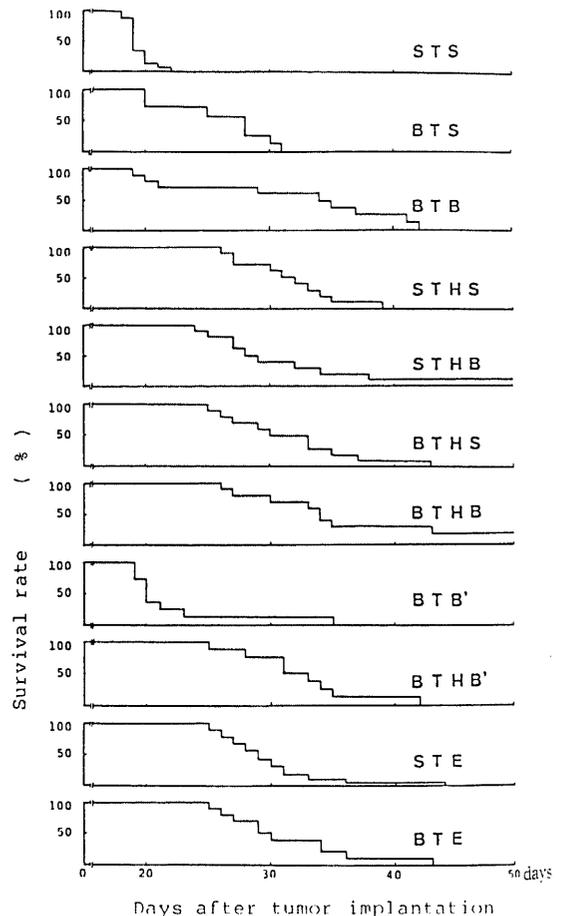


Fig. 3. Survivors received the combined therapy with BCG and/or hyperthermia.

各治療群マウス, および非担癌正常マウスの脾細胞について, 腫瘍移植後 19 日目 (Day 19) における YAC-1 細胞に対する細胞傷害活性を<sup>51</sup>Cr-release 試験によって検討し, その結果を表 3 に示した。

腫瘍移植後 19 日目の NK 活性は, STS 群では非担癌正常マウスの約 1/2 に低下していた。また BCG 投与, あるいは局所温熱療法による単独治療群でも同様の傾向がうかがわれた。しかし BCG 投与に温熱治療を併用すると, NK 活性はある程度保持されていた。

そして脾細胞をあらかじめ抗 asialo GM 1 抗体お

よびモルモット補体で処理しておく, 処理前の値と比較して細胞傷害活性は, BTB 群ではあまり変わらないのに, 他の群ではかなり減少していた。このことは, 各群マウス脾細胞における effector cell の種類および比率の相違を示唆するものである。

4. 各治療群マウス脾細胞における単球, T 細胞, B 細胞および NK 細胞集団の分布

前項 2. の実験とほぼ同様に, 担癌マウスにおける無治療群, BCG の腫瘍内投与による局所免疫群およびこれに局所温熱治療を併用した群, ならびに非担癌正

Table 2. Suppression of tumor growth by spleen cells from BCG-and/or heat-treated mice (Winn's test\*)

Treatment group	Mean tumor weight ± S.D. (mg)			
	Untreated spleen cells (No. of tumor takes/tested**)		Spleen cells treated with anti-Thy-1.2 antibody and complement (No. of tumor takes/tested**)	
STS	2578 ± 1725 <sup>a)</sup>	(8/8)	2160 ± 1775	(8/8)
BTB	0 <sup>b)</sup>	(0/8)	242 ± 267 <sup>c)</sup>	(6/8)
STHS	1947 ± 2008	(8/8)	Not done	
BTHB	400 ± 531 <sup>d)</sup>	(6/8)	2439 ± 1106 <sup>e)</sup>	(8/8)
Normal	1298 ± 1532	(8/8)	Not done	

\*: A mixture of 0.1 ml of  $0.8 \times 10^7$  spleen cells from the treated or untreated mice on day 21 and equal volume of  $0.8 \times 10^5$  Lewis lung carcinoma cells was subcutaneously injected into C57BL/6 mice. E (effector): T (target)=100:1. The tumor weight was estimated 13 days after the Winn's assay. The significance of the differences was assessed by Student's *t*-test or Welch's test; a) vs d), b) vs c), d) vs e) ( $p < 0.05$ ).

\*\* : Estimated 27 days after the Winn's assay.

Table 3. Natural cell-mediated cytotoxicity against YAC-1 cells

Treatment group	Cytolysis (%) <sup>a)</sup>	
	Untreated whole spleen cells	Spleen cells pretreated with anti-asialo GM 1 antibody and complement
STS	10.6 ± 2.4	4.4 ± 3.6
BTB	9.9 ± 3.2	8.7 ± 2.8
STHS	8.5 ± 1.9	3.6 ± 1.7
STHB	14.4 ± 1.6	8.0 ± 3.0
BTHS	14.0 ± 4.2	5.9 ± 1.9
BTHB	17.1 ± 2.1	2.8 ± 1.7
Normal	19.7 ± 4.1	1.3 ± 2.8

a): Mean ± S.E.M. of three wells pooling spleen cells from two mice.

E: T=100:1. Assayed on the 19th day after tumor implantation.

常マウスの腫瘍移植後 21 日目 (Day 21) における脾細胞集団の構成について検討し、その成績を表 4 に示した。

治療、無治療を問わず、担癌マウス脾の総細胞数は、正常マウス脾に比較して一般的に増加していた。単球、T 細胞、B 細胞および NK 細胞の集団比についてみると、まず BCG による単独治療の BTB 群マウス脾では、単球が約 41% で他群の 30% 前後より高く、逆に B 細胞は約 8% ときわめて低い比率であった。BCG 投与と温熱治療を併用した BTHB 群では、対照の STS 群に比し、単球はやや少ないが、T 細胞、NK 細胞とも有意に増加していた。

### 考 察

Goldenberg ら<sup>16)</sup>は GW 77 human colonic tumor をハムスターの両頬に移植し、一方の腫瘍を加温すると対側の非加温腫瘍にも増殖抑制がみられたと報告している。Alfieri ら<sup>17)</sup>は fibrosarcoma 担癌マウスに局所加温 (44.5°C, 20 分間) を施行し、免疫機能が正常であるマウスでは完全な腫瘍退縮がみられたのに対し、先天的に T 細胞が欠如した immunodeficient のマウス、あるいはマクロファージ inhibitor の投与、あるいは全身照射などの処置をうけた immunosuppressed のマウスでは、局所加温によって一過性に腫瘍縮小がみられたが、完全退縮には至らなかったこ

とから、局所加温処置後にみられる腫瘍退縮にはマクロファージおよび T 細胞が関与していると述べている。また臨床面においても、Stehlin ら<sup>10)</sup>は悪性黒色腫に対し局所温熱灌流を施行し、その前後で自己の末梢血リンパ球、あるいは血清中に、悪性黒色腫細胞に対する細胞傷害活性が著明に増強していたと報告している。これらのことから、担癌個体に対する局所温熱療法の適用は抗腫瘍免疫の促進増強をもたらすものと思われる。

一方 BCG、コリネ菌 (*Propionibacterium acnes*)、溶連菌製剤 (OK-432) のような細菌性免疫療法剤は、非特異的に宿主機能を賦活、調節することが知られている<sup>1)</sup>。BCG 生菌を癌腫内に注射すると、インターフェロン産生による NK 細胞の賦活や<sup>18)</sup>、局所における BCG に対する遅延型過敏反応の誘発 (BCG で前感作してあればさらに速やかに、強く発現する)、BCG に特異性を示す T リンパ球からのリンフォカインの放出、さらには活性化マクロファージの動員集積がおこり<sup>19)</sup>、結果として腫瘍細胞の傷害、ひいては局所腫瘍の崩壊、いわゆる「捲き込み効果<sup>20)</sup>」がみられることが知られている。この場合、腫瘍細胞傷害に伴って、腫瘍特異抗原に対する細胞性免疫の誘導に、BCG は有効なアジュバントとして作用することも周知のとおりである。

局所温熱療法施行後にみられる宿主免疫機能の改善

Table 4. Total cell number and cell population in spleens from the tumor-bearing mice treated with BCG and hyperthermia

Treatment group	Total cells/spleen <sup>a)</sup> ( $\times 10^7$ , mean $\pm$ S.D.)	Cell population in whole spleen cells <sup>a)</sup> (%, mean $\pm$ S.D.)			
		Monocyte <sup>b)</sup>	T cell <sup>c)</sup>	B cell <sup>d)</sup>	NK cell <sup>e)</sup>
STS	14.4 $\pm$ 5.5	31.1	6.2 $\pm$ 2.2	17.1 $\pm$ 4.3	20.3 $\pm$ 2.8
BTB	10.9 $\pm$ 2.8	41.3	6.7 $\pm$ 1.5	7.7 $\pm$ 1.1 <sup>*3</sup>	18.0 $\pm$ 4.2
BTHB	14.7 $\pm$ 4.5 <sup>*1</sup>	25.3	11.6 $\pm$ 1.9 <sup>*2</sup>	18.3 $\pm$ 3.3	25.1 $\pm$ 2.2 <sup>*4</sup>
Normal	8.6 $\pm$ 1.4	29.3	7.7 $\pm$ 2.6	18.1 $\pm$ 7.3	18.5 $\pm$ 3.7

a): Estimated on the 21th day after tumor implantation.

b): Spleen cells harvested from two mice were pooled and kept in plastic dishes at room temperature for 2 hours. Adherent cells were collected and counted.

c): Non-adherent spleen cells were treated with anti-Thy-1.2 antibody (mouse), and then incubated with FITC (fluorescein isothiocyanate)-rabbit anti-mouse IgG<sub>1</sub>. The ratio of fluorescence-positive cells to whole spleen cells was calculated.

d): Non-adherent spleen cells were incubated with EAC (sheep erythrocyte-antibody-complement complex) suspension. The ratio of EAC rosette-forming cells to whole spleen cells was calculated.

e): Non-adherent spleen cells were treated with anti-asialo GM 1 antibody (rabbit), and then incubated with FITC-goat anti-rabbit IgG. The ratio of fluorescence-positive cells to whole spleen cells was calculated.

\*1 :  $p < 0.05$  (BTHB vs Normal)

\*2 :  $p < 0.01$  (BTHB vs STS or BTB)

\*3 :  $p < 0.01$  (BTB vs STS or BTHB)

\*4 :  $p < 0.05$  (BTHB vs STS or BTB or Normal)

P values were all examined according to Student's *t*-test.

向上の原因としては、腫瘍縮小による免疫抑制因子の減少、腫瘍抗原の血中への流出<sup>8)10)</sup>のほか、腫瘍抗原の変化<sup>21)22)</sup>もあげられている。加温による腫瘍抗原の変化について Mondovi ら<sup>21)</sup>は Ehrlich 腹水癌細胞に対し *in vitro* で 42.5°C、3 時間の処理を行うと、該細胞に放射線照射を施した場合に比較し、その immunogenicity の増強がみられたが、42.5°C、6 時間の処理ではむしろ低下することを報告している。Suit ら<sup>23)</sup>は methyl-cholanthrene 誘発 fibrosarcoma 細胞を *in vitro* で 43.5°C、4 時間加温しても、その抗原性は増強されなかったと述べている。適当な加温では、腫瘍抗原の修飾、あるいは加温前には認識されていなかった抗原の発現などがおこり、抗原性の増強が招来されるが、過剰の加温処理では、腫瘍抗原の損傷が強度となり、かえって抗原性は低下するものと思われる。さらに Marmor ら<sup>24)</sup>は抗原性の異なる 2 種類の腫瘍、すなわち EMT 6 担癌マウスと KHJJ 担癌マウスをそれぞれ局所加温 (44°C、20 分間) した結果、抗原性の低い KHJJ 腫瘍での退縮率が 50%であったのに対し、より抗原性の高い EMT 6 担癌マウスでは 100%の腫瘍退縮が認められたと報告している。すなわち、抗原性の強い腫瘍ほど加温処置による抗腫瘍効果が期待され、腫瘍の抗原性は加温による変化をも含めて、局所加温による抗腫瘍効果と密接に関連していると思われる。

以上のことから、担癌個体に局所温熱療法と局所免疫療法を併用すれば、抗腫瘍免疫の誘導がさらに増強されることが期待される。著者は、抗原性が低いといわれているヒト癌の実験モデルとして、C57BL/6 マウスに自然発生した Lewis 肺癌を選び、温熱-免疫合併療法の有用性を検討し、有効因子の解析を行った。

著者が、BCG による前感作を行った理由は、BCG に対する遅延型過敏反応が速かに局所に惹起されることを期待したのと、ほとんどの日本人がすでに BCG に感作されていることを考慮したためである。竹内ら<sup>25)</sup>は、MC1 肉腫移植 3 週間前に BCG を C57BL/6 マウスの腹腔内に投与した場合の腫瘍定着の阻害について、BCG 投与量が 0.1 mg では無効であるが、1.0 mg では有効であったと報告している。また尾崎ら<sup>26)</sup>は、C57BL/6 マウスで BCG を静注した時の脾細胞の NK 活性を測定し、BCG 投与量が 0.1 mg の場合、NK 活性は 14~21 日をピークとして上昇し、28 日後に正常に復したが、BCG 投与量を 1.0 mg に増量すると、NK 活性は 7 日後に一過性の上昇を示したが、14 日後著明に低下し、28 日後になっても回復しなかったことを報告している。著者は BCG の前投与が、移植後の局所腫瘍の増殖に直接影響を及ぼさないように考慮し、腫瘍移植 31 日前に BCG を 0.1 mg 腹腔内に投与した。

実際、温熱処置を行う Day 14 (腫瘍移植後 14 日目) の腫瘍サイズでは、BCG 前感作の有無はほとんど影響をあたえなかったが、生存日数では、対照の STS 群に比較して BTS 群に有意の延命効果が認められた (図 3 参照)。

微小転移が成立していると思われる時点で移植局所の腫瘍に対する温熱処置を行うと、全身的な抗腫瘍免疫の誘導によって転移巣の抑制も期待しようと考えて、著者は腫瘍移植後 14 日目に局所温熱療法を施行した。実際、腫瘍移植後 14 日目に電気焼灼によって局所腫瘍を完全除去した STE 群および BTE 群ともに全例局所における腫瘍の再増殖はみられなかったが、肺転移巣における増殖によって全例腫瘍移植後 44 日目までに腫瘍死した。このことから、腫瘍移植 14 日後には、すでに微小転移巣は成立していたものと思われる。また腫瘍移植後 50 日目において、肉眼的にまったく腫瘍所見がなく生存していた STHB 群および BTHB 群のマウスでは、抗腫瘍免疫の成立によって転移巣の消失、あるいは形成阻害をきたしたものと推測された。腫瘍細胞の熱感受性が培養細胞レベルで正常細胞に比し選択的に高いという確証はない<sup>27)</sup>。腫瘍組織が温熱により選択的に傷害されるのは、血流増加から減少への変曲温度が正常組織では 45°C 前後であるのに対し、腫瘍組織では 41~42°C と低く<sup>28)</sup>、血流減少により蓄積した代謝産物によって pH が低下し、その結果腫瘍細胞の熱感受性が高められる<sup>29)</sup>からとされている。局所加温の際、正常組織では血流増加による放熱効果がみられるのに対し、腫瘍組織では血流減少により選択的に温度上昇がみられ<sup>29)</sup>、血栓形成、出血<sup>30)31)</sup>などの要因によって血流はさらに減少する。従って全身温熱療法に、血管新生のない微小転移巣への選択的、かつ直接的な傷害効果を期待するのは無理なようである。Crile ら<sup>32)</sup>は、Sarcoma 180 を移植した SWR マウスの下肢を 30 分間、44°C で温浴せしめ、移植直後または 24 時間後に加温処置を行うと無効であるのに、移植 3 日後における加温処置では、移植から加温までの日数と効果の間に正の相関がみられたと報告しているが、結局血流量との関係が問題となっている。

一方、Dickson ら<sup>33)</sup>は、ラットの下肢に吉田肉腫を移植し、下肢の温浴によって腫瘍内温度を 42°C として 1 時間局所加温を行うと、かえって転移促進の傾向がみられたことを報告している。また Dewey ら<sup>34)</sup>は、各温度での処理時間に対する Chinese hamster 細胞の生存率曲線を示し、その直線部の傾きの逆数と絶対温度の逆数をプロットしたグラフにおいて 43°C 付近に変曲点を認め、43°C 以上とした場合の不活性化エネルギーが、酵素や蛋白の不活性化エネルギーにほぼ一致

したことから、処理温度を 43°C 以上とした場合の細胞致死のメカニズムは、酵素や蛋白の不活性化であろうと推測している。前田ら<sup>39)</sup>は、Ehrlich 癌移植マウスにおいて、腫瘍内温度が 43°C 以上となる温浴を 1 時間以上継続し、加温肢が 2～3 日中に壊死、脱落したと報告している。著者は、腫瘍内に投与された BCG が宿主の免疫系と反応するのに必要な期間中は加温肢の早期脱落がないように留意し、44°C の温浴（腫瘍中心部の温度は 43.5°C）中、30 分間という条件を選択した。この条件下では、加温後 6 日目まで患肢の壊死による脱落は認められなかったし、また腫瘍増殖曲線では、非加温群に対比して加温群に有意な腫瘍増殖抑制が認められた。

BCG の後投与（腫瘍移植後 15 日目）を、局所温熱療法後にしたのは、局所腫瘍内の BCG 生菌が温熱により死滅することを避けるためである。BCG の後投与量を 2 mg としたのは、BTHB 群の後投与量のみを変えた予備実験において、0.5 mg または 1.0 mg 投与と比較して、2.0 mg 投与がより良い成績を示したからである。また、BCG の投与ルートは腹腔内とした BTHB' 群では、腫瘍内投与の BTHB 群に対比し、有効性が劣っていた。

局所温熱療法と局所免疫療法の併用で問題となることは、加温による局所での血栓形成、出血および凝固壊死<sup>30)</sup>などの要因により、腫瘍内に投与された免疫療法剤が宿主免疫系と十分反応しえなくなるのではないかと懸念である。著者の実験系においては、加温 24 時間後の腫瘍は全体が黒変し、患部は以後徐々にミイラ化していった。従って後投与された BCG はかなりの loss があり、2 mg のうち実際に宿主免疫系と反応しえたのはその一部であろうと思われた。脾細胞による Winn's test で、BTB 群の方が BTHB 群より好成績であったのも、このような背景が原因となっているのかもしれない。臨床における悪性腫瘍の温熱療法では、深部腫瘍組織までも加温できるようになってきており<sup>36-38)</sup>、加温により壊死に陥った深部腫瘍組織が乾燥し、ミイラ化することは考えられないことから、臨床的には今回の実験系よりは良好な結果が期待するものと思われる。

局所温熱療法時の免疫学的パラメーターとしては、Shah ら<sup>8)</sup>は VX 2 担癌家兎の局所加温において、癌腫が縮小するにつれ、腫瘍の 3M KCl 抽出物、および dinitrochlorobenzene に対する皮内反応力の上昇、抗ウシ血清アルブミン抗体価の上昇がみられたと報告している。泉ら<sup>9)</sup>は MH 134 細胞を大腿筋内に移植したマウスに対し、局所加温を行い、脾リンパ球の PHA 刺激幼若化能、および細胞傷害活性が癌腫の外科切除群

や非加温群と比較して有意に増強されたと報告している。今回著者は、免疫学的パラメーターとして脾細胞による生体内細胞傷害試験、いわゆる Winn's test や、NK 活性の測定、また脾における単球、T 細胞、B 細胞および NK 細胞の割合を検討した。BTB 群で単球が多い傾向にあったのは後投与された BCG の一部が全身的に散布されたためとも考えられるし、BTB 群で NK 活性が低かったのも後投与された BCG の一部が全身的に散布され、NK 活性には over dosis に<sup>26)</sup>作用したためであろう。

Winn's test では、BTB 群で標的腫瘍細胞の生着・増殖が完全に抑制され、BTHB 群では対照の STS 群に比較し明らかに増殖抑制が認められた。抗 Thy-1.2 抗体と補体により effector cell を前処理すると、BTB 群では部分的に、また BTHB 群では完全に、標的細胞に対する傷害活性が消失した。Winn's test における腫瘍の増殖抑制が、BTHB 群ではほとんどキラー T 細胞によってもたらされ、BTB 群ではキラー T 細胞に加えてキラーマクロファージなどの関与が推測された。

また Winn's test では、BTB 群が BTHB 群より好成績であったが、抗腫瘍試験における生命延長の点では逆の関係がみられた。BTB 群では、原発巣が局所免疫療法のみで制御しきれず、結局腫瘍死するのに対し、BTHB 群では原発巣が主に温熱療法により破壊されてしまい、微小転移巣も NK 活性等を含めた抗腫瘍免疫により消失または抑制されるためであろうと思われる。

担癌個体に対する化学療法、放射線治療、あるいは外科的治療の適用は、一般に免疫抑制的であることが多いのに対し、局所温熱療法には少なくとも宿主免疫機能を賦活・亢進させる効果があり、局所腫瘍の退縮、微小転移巣の完全抑制を指向する上で、局所温熱療法に局所免疫療法を併用することは、きわめて有意義であると考えられる。

## 結 論

Lewis 肺癌担癌マウスに対し、局所温熱療法および BCG 投与による局所免疫療法を、それぞれ単独適用あるいは併用した場合の抗腫瘍効果と、その背景となる宿主免疫機能を検討し、次の成績が得られた。

1. C57BL/6 マウスの足蹠に Lewis 肺癌を移植し、14 日目に電気焼灼によって患肢を切断すると、局所の再発なしに全例、肺転移巣の増殖により死亡した。従って腫瘍移植 14 日後にはすでに肺転移が成立しているものとみなされた。

2. BCG で前感作したマウスに腫瘍を移植し、その

14日後に局所温熱療法を施行し、さらに24時間後にBCGの腫瘍内投与を行ったBTHB群では、局所腫瘍の退縮、ならびに著しい生命延長がみられた(対照のSTS群のMSTとの差が15日あり、50日以上生存マウスが10匹中2匹あった)。

3. BCGによる前感作およびBCGの腫瘍内投与を行ったBTB群、腫瘍移植後温熱療法のみを施行したSTHS群ともにその脾細胞のNK活性は、無処置担癌群と大差なく抑制されていたが、BTHB群では非担癌正常群に近い値を示した。

4. Lewis肺癌細胞を標的とする脾細胞によるWinn's testでは、BTB群、BTHB群ともに有効であり、とくに前者に著明であった。またこの脾細胞による細胞傷害活性は、抗Thy-1.2抗体と補体での処理によって、前者では部分的に、後者ではほとんど完全に消去された。

5. BTHB群マウス脾におけるT細胞、B細胞およびNK細胞などの各リンパ系細胞の割合は、BTB群のそれらより有意に多かったが、単球(マクロファージ)では逆にBTB群に優位であった。

以上のことから、BCGで前感作された担癌マウスに対し、局所温熱療法に加えて、BCGの腫瘍内注射を行うことは、局所主病巣の破壊のみならず、全身的抗腫瘍免疫の誘導にきわめて有利であり、転移抑制効果も十分期待しうることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました岩橋教授、また終始御指導、御教示を頂きました金沢大学がん研究所越村三郎教授に深甚の謝意を表わします。また御指導、御協力を賜りました金沢大学がん研究所免疫生物部の坂井俊之助助教授、金沢医科大学微生物学教室の村山次哉先生、金沢大学がん研究所化学療法部ならびに金沢大学第1外科学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Okamoto, H., Shoin, S. & Koshimura, S.: Streptolysin S-forming and antitumor activities of Group A Streptococci, p259-289. In J. Jeljaszewicz & T. Wadström (ed.), Bacterial toxins and cell membranes, 1st ed. Academic Press, Inc., London, 1979.
- 2) Busch, W.: Den Einfluss, welchen heftigere Erysipeln zuweilen auf organisierte Neubildungen ausüben. Naturhistorische Verhandlungen Preussen, 23, 28-30 (1866).
- 3) Coley, W. B.: The treatment of malignant tumors by repeated inoculation of erysipelas: with

a report of ten original cases. Am. J. Med. Sci., 105, 487-511 (1893).

4) Crile, G.: Selective destruction of cancers after exposure to heat. Ann. Surg., 156, 404-407 (1962).

5) Cavaliere, R., Ciocatto, E. C., Giovannella, B. C., Heidelberger, C., Johnson, R. O., Margottini, M., Mondovi, B., Moricca, G. & Rossifanelli, A.: Selective heat sensitivity of cancer cells. Biochemical and clinical studies. Cancres, 20, 1351-1381 (1967).

6) Yerushalmi, A.: Influences on metastatic spread of whole-body or local tumor hyperthermia. Europ. J. Cancer, 12, 455-463 (1976).

7) 古賀成昌・前田勉郎・泉 明夫: 全身温熱療法の臨床と宿主免疫反応. 癌と化療, 10, 921-930 (1983).

8) Shah, S. A. & Dickson, J. A.: Effect of hyperthermia on the immunocompetence of VX 2 tumor-bearing rabbits. Cancer Res., 38, 3523-3531 (1978).

9) 泉 明夫: 癌に対する hyperthermotherapy の宿主免疫能に及ぼす影響 - 局所加温時の宿主免疫能に関する実験的検討. 日癌治療会誌, 17, 1255-1263 (1982).

10) Stehlin, J. S., Giovannella, B. C. & De Ioplyi, P. D.: Results of hyperthermic perfusion for melanoma of the extremities. Surg. Gynecol. Obstet., 140, 339-348 (1975).

11) 増田 徹: 医化学実験法講座第4巻免疫化学(右田俊介編), 第1版, 263-270頁. 中山書店, 東京, 1972.

12) 西岡久寿弥: ヒツジ血球に対する抗体の作り方. 蛋・核・酵, 11, 1485-1486 (1966).

13) Winn, H. J.: Immune mechanisms in homotransplantation. II. Quantative assay of the immunologic activity of lymphoid cells stimulated by tumor homografts. J. Immunol., 86, 228-239 (1961).

14) 布山繁美・渡部 茂・仙道富士郎: 実験動物の natural cytotoxicity, 2791-2794頁. 免疫実験操作法 IX (日本免疫学会編), 日本免疫学会, 金沢, 1980.

15) 橘 武彦・吉田明子: ヒトのT細胞, B細胞の微量測定法, 907-914頁. 免疫実験操作法III(日本免疫学会編), 日本免疫学会, 金沢, 1974.

16) Goldenberg, D. M. & Langner, M.: Direct and abscopal antitumor action of local hyperthermia. Z. Naturforsch., 26b, 359-361 (1971).

17) Alfieri, A. A., Hahn, E. W. & Kim, J. H.:

- Role of cell-mediated immunity in tumor eradication by hyperthermia. *Cancer Res.*, **41**, 1301-1305 (1981).
- 18) Djeu, J. Y., Heinbaugh, J. A., Holden, H. T. & Herberman, R. B.: Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. *J. Immunol.*, **122**, 175-181 (1979).
- 19) Houchens, D. P., Goldberg, A. I., Gaston, M. R., Kende, M. & Goldin, A.: Studies of the effects of *Bacillus Calmette-Guérin* on Moloney sarcoma virus-induced tumors in normal and immunosuppressed mice. *Cancer Res.*, **33**, 685-690 (1973).
- 20) 徳永 徹: BCGの抗腫瘍作用の機序. 結核, **55**, 351-357 (1980).
- 21) Mondovi, B., Scioscia Santoro, A., Strom, R., Faiola, R. & Rossi Fanelli, A.: Increased immunogenicity of Ehrlich ascites cells after heat treatment. *Cancer*, **30**, 885-888 (1972).
- 22) Bhatti, R. A., Ablin, R. J. & Guinan, P. D.: Hyperthermia and cellular immunity. *JAMA*, **236**, 2844-2845 (1976).
- 23) Suit, H. D.: Hyperthermic effects on animal tissues. *Radiology*, **123**, 483-487 (1977).
- 24) Marmor, J. B., Hahn, N. & Hahn, G. M.: Tumor cure and cell survival after localized radiofrequency heating. *Cancer Res.*, **37**, 879-883 (1977).
- 25) 竹内 実・木本 実・鈴木伊豆美・野本亀久雄: 腫瘍抗原特異的キラーT細胞誘導のBCG感作による増強効果. 癌と化療, **10**, 1980-1986 (1983).
- 26) 尾崎 彰・西條長宏・渋谷昌彦・別府保男・清水英治・滝沢好子: BCGおよび *Nocardia rubra* cell wall skeletonのマウス脾および腹腔リンパ球NK活性に及ぼす影響. 癌と化療, **10**, 104-112 (1983).
- 27) 小野山靖人: 癌の温熱療法序説. 癌と化療, **10**, 874-885 (1983).
- 28) Bicher, H. I., Hetzel, F. W., Sandhu, T. S., Frinak, S., Vaupel, P., O'Hara, M. D. & O'Brien, T.: Effects of hyperthermia on normal and tumor microenvironment. *Radiology*, **137**, 523-530 (1980).
- 29) LeVeen, H. H., Wapnick, S., Piccone, V., Falk, G. & Ahmed, N.: Tumor eradication by radiofrequency therapy. *JAMA*, **235**, 2198-2200 (1976).
- 30) Fajardo, L. F., Egbert, B., Marmor, J. & Hahn, G. M.: Effects of hyperthermia in a malignant tumor. *Cancer*, **45**, 613-623 (1980).
- 31) Eddy, H. A.: Alterations in tumor microvasculature during hyperthermia. *Radiology*, **137**, 515-521 (1980).
- 32) Crile, G.: The effects of heat and radiation on cancers implanted on the feet of mice. *Cancer Res.*, **23**, 372-380 (1963).
- 33) Dickson, J. A. & Ellis, H. A.: Stimulation of tumour cell dissemination by raised temperature (42°C) in rats with transplanted Yoshida tumours. *Nature*, **248**, 354-358 (1974).
- 34) Dewey, W. C., Hopwood, L. E., Sapareto, S. A. & Gerweck, L. E.: Cellular responses to combinations of hyperthermia and radiation. *Radiology*, **123**, 463-474 (1977).
- 35) 前田勉郎・平井泰明・浜副隆一・清水法男・谷田理・古賀成昌: Hyperthermochemotherapyの基礎的, 臨床的検討. 日癌治療会誌, **14**, 1-9 (1979).
- 36) LeVeen, H. H., Ahmed, N., Piccone, V. A., Shugaar, S. & Falk, G.: Radio-frequency therapy. Clinical experience. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **335**, 362-371 (1980).
- 37) Storm, F. K., Kaiser, L. R., Goodnight, J. E., Harrison, W. H., Elliott, R. S., Gomes, A. S. & Morton, D. L.: Thermochemotherapy for melanoma metastases in liver. *Cancer*, **49**, 1243-1248 (1982).
- 38) 柄川 順: 治療用ME機器, ハイバサーミア. 治療, **64**, 1517-1523 (1982).

**Experimental Studies on the Combined Modality of *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)—Treatment and Local Hyperthermia for Malignant Tumor** Takumi Ichihashi, Department of Surgery (I) (Director: Prof. T. Iwa) School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — J. J. J. Med. Soc., 93, 427—439 (1984)

**Key words:** Hyperthermia, Immunotherapy, BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*)

#### Abstract

The present study was undertaken to examine the therapeutic effect of combined treatment with local hyperthermia and the local injection of live BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) and the influences on immunological parameters. C57BL/6 mice receiving an intraperitoneal injection of 0.1 mg of live BCG or 0.2 ml of physiological saline. Thirty one days later,  $2.5 \times 10^5$  viable cells of a Lewis lung carcinoma were implanted to the left hind footpad of all the mice. On the 14th day after the implantation, tumors were directly immersed in a water-bath at  $44^\circ\text{C}$  for 30 min, or resected by electrocautery, or left untreated. On the 15th day, these mice receiving an intratumoral injection of 2 mg of live BCG or 0.05 ml of saline, or an intraperitoneal injection of 2 mg of the BCG. In the survival test, one out of 10 mice which had been treated with local hyperthermia and an intratumoral injection of BCG (Group STHB), and 2 out of 10 mice which had been pretreated with BCG instead of saline and treated in the same way as Group STHB (Group BTHB) were alive without tumor recurrence until 50 days. All the mice of the groups treated otherwise died within 44 days, though a moderate prolongation of life-span was observed. In the Winn's test tumor growth was suppressed completely by spleen cells from the mice which had been presensitized with BCG 31 days before and receiving an intratumoral injection of BCG on the 15th day (Group BTB), and it was suppressed partially by those from the mice of Group BTHB. When spleen cells were treated previously with anti-Thy-1.2 antibody and complement, suppression of tumor growth was eliminated or reduced even in the mice of Group BTHB and Group BTB. The population of T cells or NK (natural killer) cells in total spleen cells from the mice of Group BTHB was greater than those of Group BTB and Group STS (control group), while in the mice of Group BTB the rate of monocytic cells (presumably macrophages) was high in population among spleen cells. These results suggest that presensitization of mice with live BCG, followed by the combined treatment with local hyperthermia and the intratumoral injection of live BCG, is favorable to induce the increased antitumor immunity.