

人型結核菌多糖体成分による高分化型腺癌, 扁平上皮癌における collagen 増殖と癌細胞の癒痕化促進について

木本 哲夫, 平尾 優子, 大久保茂樹, 兵藤 文則, 西谷 耕二

癌細胞を取り巻く血管構築を基盤とする間質成分をはじめ, **extracellular matrix**, および癌細胞自らが産生する **collagen** 増殖は, 発癌または癌移植時にみられる生体の示す重要な生体防御機転である. **collagen** の増殖は免疫亢進により増強されるが **collagen** 産生の始動は本質的には癌細胞の性状特に細胞膜の相異により異なるものである. 腺癌の場合についてはすでに述べたが, 抗原性の知られている扁平上皮癌をはじめ, 肺癌の腺癌に端をえし高分化化生を来した類表皮癌, 扁平上皮癌は原発巣, 転移巣を問わずオリジナルの腺癌に比して著明な間質細胞の増殖と **collagen** 増殖を伴う間質反応が極めて顕著となる. この事実を証明するため, ノードマウスにヒト胃扁平上皮癌・ヒト肺高分化型腺癌(類表皮癌)を移植し, 他方肺未分化癌のヒト燕麦細胞癌やマウス Lewis 肺癌を移植して, ヒト結核菌抽出多糖体 (SSM) による間質反応, 特に **collagen** 増殖を検討したが, 生検所見と同じく無処理の場合でも著明な **collagen** 増殖のみられる扁平上皮癌では **collagen** 増殖はさらに促進され, 癌増殖の抑制と限局化による癌巣の癒痕化が促進した. これに反して燕麦細胞・Lewis 肺癌等の極めて未分化で **collagen** 産生の全くみられないか, 乏しい癌細胞の増殖は急速で SSM も無効であった.

SSM の扁平上皮癌細胞への **cytotoxic effect** は高濃度のものを除いて弱いが, 殺癌効果の顕著な放射線治療等との併用は将来癌浸潤, 転移抑制に極めて期待できるものと考えられる.

(昭和63年2月19日採用)

Antitumor Effect of Polysaccharides of Human-type Mycobacterium Tuberculosis by Stromal Collagenation and Cicatrization on High Differentiated Adenocarcinoma and Squamous Cell Carcinoma

Tetsuo Kimoto, Yuko Hirao, Shigeki Ohkubo, Fuminori Hyodoh and Koji Nishitani

The stromal collagen fibers resulting from angiogenic responses to cancer cells, and collagen fibers produced by cancer cells themselves have important antitumor effects on cancer bearing individuals.

In the case of differentiated adenocarcinoma of the lung and squamous cell carcinomas of the stomach resulting from metaplastic changes in adenocarcinoma, marked proliferation of interstitial cells and collagenation has been found to be much more prominent than in the original adenocarcinoma.

In order to verify the antitumor effects of collagenation, cultured differentiated adenocarcinoma (epidermoid), squamous cell carcinoma, and, undifferentiated carcinomas such as oat cell carcinoma and mouse Lewis lung cancer were grafted into nude mice, and the stromal reactions, to SSM, particularly collagenation, were investigated. Collagenation in grafted squamous cell carcinoma, which was remarkable in biopsy findings, and cicatrization of the tumors were facilitated by SSM. On the other hand, the growth of oat cell carcinoma and Lewis lung cancer, which produce no or a little collagen as a stromal response, was rapid and SSM was ineffective.

Since the cytotoxic effect of SSM on squamous cell carcinoma is weak unless a highly concentrated dose (200 μ g) is used *in vitro*, a combination of concentrated SSM and radiotherapy or chemotherapy should be very promising for future cancer treatment. (Accepted on February 19, 1988) *Kawasaki Igakkaishi* 14(3): 416-441, 1988

Key Words ① Squamous cell carcinoma ② Oat-cell cancer ③ SSM
④ Xenografts ⑤ Collagen

はじめに

今日、癌免疫療法は tumor necrosis factor (TNF)^{1),2)} interferon (IFN)³⁾ 等 biological response modifier (BRM) を主眼に癌細胞を標的とし cytotoxic effect を期待したものであるが、体内既存の T-細胞, macrophage の殺癌作用のみに依存しても効少なく、最近では T-細胞, NK 細胞, 脾細胞等の体外培養を行い IL₂ との接触処理を行った活性化 LAK 細胞^{4),5)} を再度体内に還元し、より著明な BRM の活性化をはかったり、モノクローナル抗体の精製によってゆきづまった癌の免疫療法に新しい局面を開きつつあることは言うまでもない。

著者らはつとに、癌と免疫に関しては間質細胞、特に fibroblast の役割に着目してきた。その理由として、上皮細胞由来の癌増殖に伴う共通な所見は全身に分布する血管の癌巣への集合 (angiogenesis) で、ひいては癌間質の構築となりやがて癌巣は血管網化する事実で、癌と血管構築はリンパ球, macrophage 以上に密接な関係がある (Figs. 1~3)。さらに、この間質 collagen の反応と増殖は癌の進展・転移を抑制する極めて重要な生体防御機転でもある。この collagen の反応増殖は癌細胞により相異があ

り、癌細胞を取り巻き著しく増殖するもの、ほとんど反応増殖のないものもあり、collagenation は癌進展の予後を左右する重要な生体防御反応であることを人型結核菌多糖体 (SSM: Specific Substance, Maruyama) の作用をモデルとして報告してきた。^{6)~14)}

人型結核菌 (青山株) 抽出多糖体 (arabino-mannan) の長期間使用による進行性または末期癌患者の延命効果について今日、多数症例が報告されているが、^{15)~18)} この理由の一つとして、長期間の使用によって癌による破壊組織の修復を促進し、理想的には癌巣を瘢痕化へ導き強い cicatrization を起こして癌細胞を封じ込め、癌増殖の抑制を来すことを報告してきた。^{6)~9), 13), 14)}

このように、癌と collagen との因果関係は lymphokine 等の作用とも考え併せて、将来癌治療の上に癌間質・基質の役割は生物学的問題として重要であるので、今回はさらに、肺癌・胃癌を中心として高分化型腺癌に由来する類表皮癌 epidermoid carcinoma, 扁平上皮癌 squamous cell carcinoma と癌間質の collagenation について注目すべき所見を得たので臨床生検を含めヌードマウスへの癌移植実験の結果を報告する。



Fig. 1. Nude mouse (Balb/c nu-nu) 506-1 ♀

Simultaneous with transplantation of TRPC-9 cells (10^7), 50 μ g of SSM was injected subcutaneously. The tumor was grafted, grew to thumb size after 50 days and then was perfused with Mercox. It had a vascular architecture due to angiogenesis.

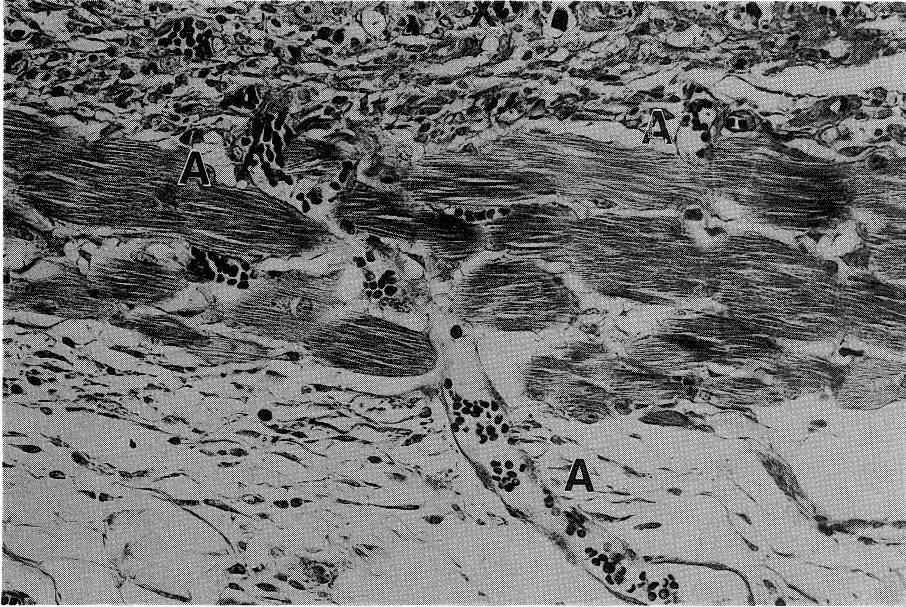


Fig. 2. Nude mouse 271-1 ♀

New formation of blood capillaries due to angiogenesis was observed around the graft 5 days after transplantation of HGC cells (1.5×10^7). Newly proliferated blood capillaries (A). Cancer cell xenograft (X). Mallory stain, $\times 200$.

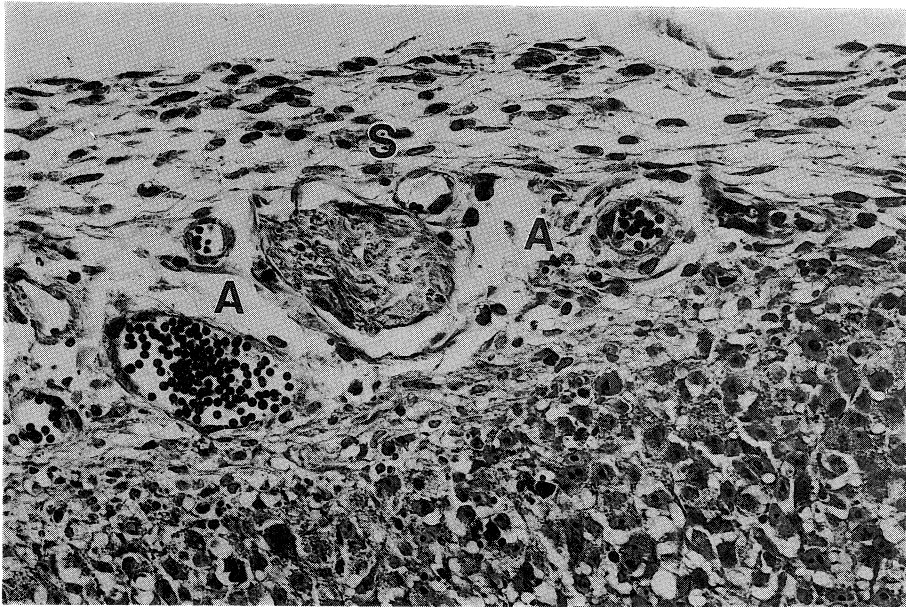


Fig. 3. Nude mouse 273-3 ♂

Fibroblastic stroma (S) derived from blood vessels (A) developed around the graft 4 days after transplantation. Mallory stain, $\times 200$.

材料と実験方法

生検組織

癌生検における癌と collagen の関係を示した。特に腺癌よりも扁平上皮癌では極めて著明な間質細胞の増殖と collagen 増殖がみられることは重要である。

Case I 47歳, 女性. Krukenberg's tumor 胃癌(腺癌)の卵巣播種性転移: 癌転移巣周囲に著明な collagen fiber の増殖がみられる。周囲にリンパ球, macrophage はみられない (Fig. 4)。

Case II 73歳, 男性. 右肺癌(S3), squamous cell carcinoma の腋窩リンパ節転移巣: 癌周囲の著明な fibroblasts の増殖と collagen 増殖がみられ, リンパ節はほとんど線維化に陥る。

Case III 62歳, 女性. 左肺下葉肺癌, 中等度分化型腺癌(epidermoid carcinoma)で, 腺癌よりも著明な collagenation がみられる。

Case IV 63歳, 女性. 右下葉肺癌, 中等度分化型腺癌, 手術摘出の組織で腺癌と扁平上皮癌が混在。扁平上皮癌の癌巣では腺癌よりもさらに著明な collagenation がみられる所見は特記すべきである (Figs. 5~8)。

ヌードマウスへの癌細胞移植実験 (Table 1) 移植に用いた培養ヒト癌細胞

ヒト胃癌細胞

HGC (未分化型腺癌)

TRMKN-I (胃扁平上皮癌) BBL より購入

TRKATO-III (胃印環細胞癌) BBL より購入

※ MKN-I, KATO-III, は 3×10^7 cells の nude mouse xenografts を再培養した TRMKN-I, TRKATO-III を用いた。

ヒト肺癌細胞

HLC (腺癌)

TRPC-3 (中等度分化型腺癌)

TRPC-6 (肺燕麦細胞癌)

TRPC-9 (肺分化型腺癌) epidermoid carcinoma

※ HLC を除き, 胃癌と同じく移植癌を再培養した TRPC-3, TRPC-6, TRPC-9 を用いた。

これらの癌細胞の培養は MEM, 10% FCS を用い, 一部のものは半閉塞系で CO_2 5% で培養した。人由来肺癌の TRPC-6 (燕麦細胞癌, 2×10^7 個移植) は 14/40 生着し, 生着したものは 100 日で鶏卵大となった。また, TRPC-3 (中等度分化型腺癌, 腺癌類表皮癌, 2×10^7 個

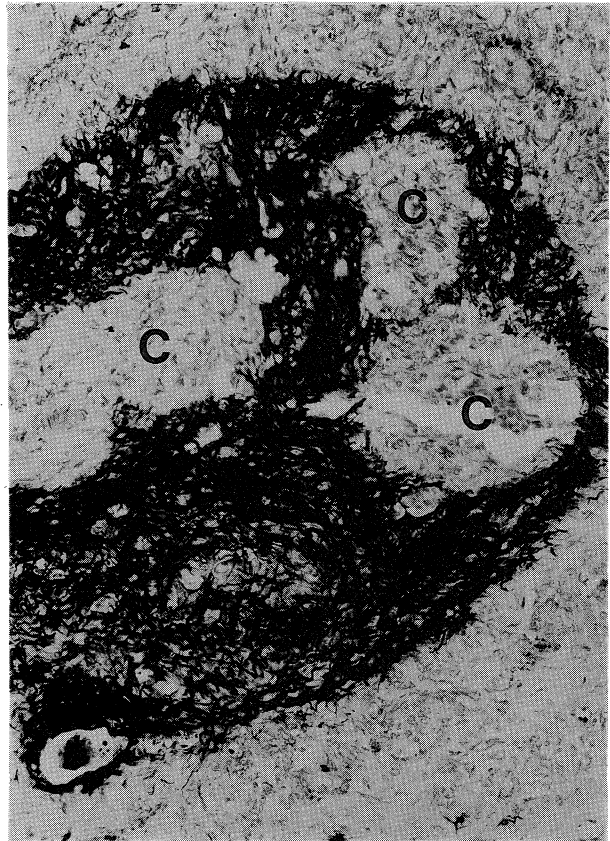


Fig. 4. 47-year-old female. Krukenberg's tumor. Metastatic adenocarcinoma (stomach cancer) to the ovary. Remarkable proliferation of collagen fibers was observed in the stroma around the metastatic cancer cells (C). Pap silver impregnation, $\times 100$.

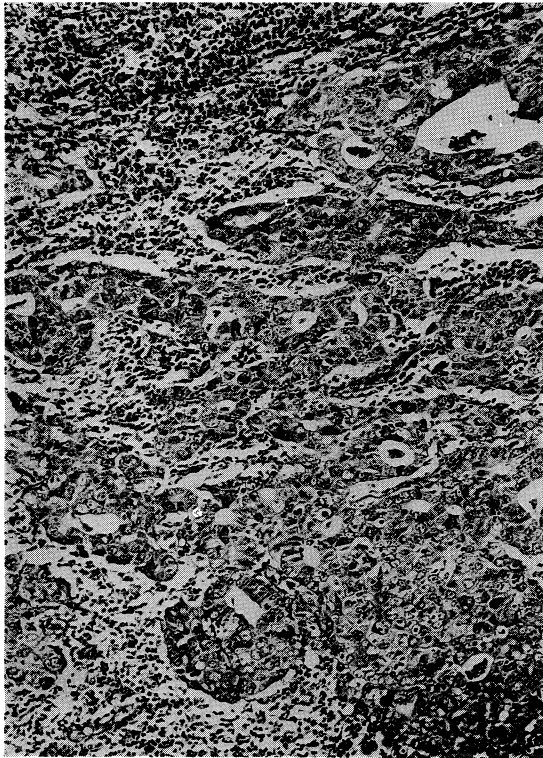


Fig. 5. Mallory stain, $\times 100$

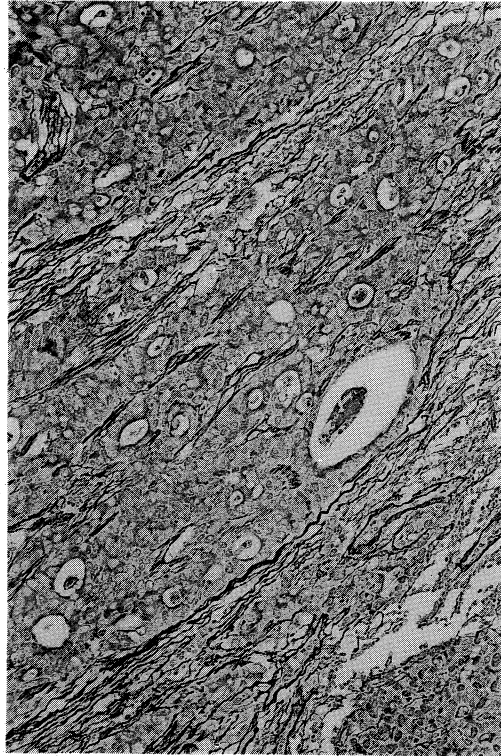


Fig. 6. Pap silver impregnation, $\times 100$

Figs. 5, 6. 63-year-old female. Clinical case IV. Metastasis of lung cancer (adenocarcinoma) to the lymph nodes. Collagenation was not yet remarkable around the adenocarcinoma.

移植)は4/5生着率であった。この cell line を用いた xenografts については、collagen 増殖の病理所見のみを比較するとどめ、今回の移植実験では TRPC-9 (分化型腺癌，類表皮癌)と TRMKN-I (胃扁平上皮癌)の100%着床のものについて行い、その他、100%着床する mouse 由来未分化癌の Lewis 肺癌細胞を移植した。ヌードマウスは可及的無菌の飼育に努め ATCL-4 Clean Rack $4\text{m}^3/\text{min} \times 0.3\ \mu\text{g}$ 99.97% D.O.P. Ac. 100V, 50/60 Hz (日本クレア株式会社)を使用した。

HLC は 6×10^5 ，その他ヒト由来癌は $1 \sim 2 \times 10^7$ ，また Lewis 肺癌は 5×10^4 ， 10^5 を皮下移植した。以上の実験に使用した癌細胞は100%生着し、人癌では3か月、Lewis 肺癌では20日位で、腫瘍は直径 $30 \times 30\ \text{mm}$ に発育した。

SSM の皮下および腫瘍内注射

この実験系では、癌細胞は100%生着するので、癌細胞移植と同時に SSM $1\ \mu\text{g} \sim 50\ \mu\text{g}$ を移植癌遠隔部位の皮下 (S.C.) と腫瘍内 (I.T.) へ隔日注射し比較検討した。angiogenesis の観察には、移植後 24, 48, 72 時間および 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 日目に殺し組織的検索をした。腫瘍は10%ホルマリン固定し、HE 染色，Mallory 染色，Masson 染色，Pap 銀染色を行って collagen 増殖を観察した。

In vitro における collagen fiber 産生の観察 培養細胞

線維芽細胞：12歳男性の前頸部より採取した皮膚片を用いて培養し、4~6継代のものを使用した。

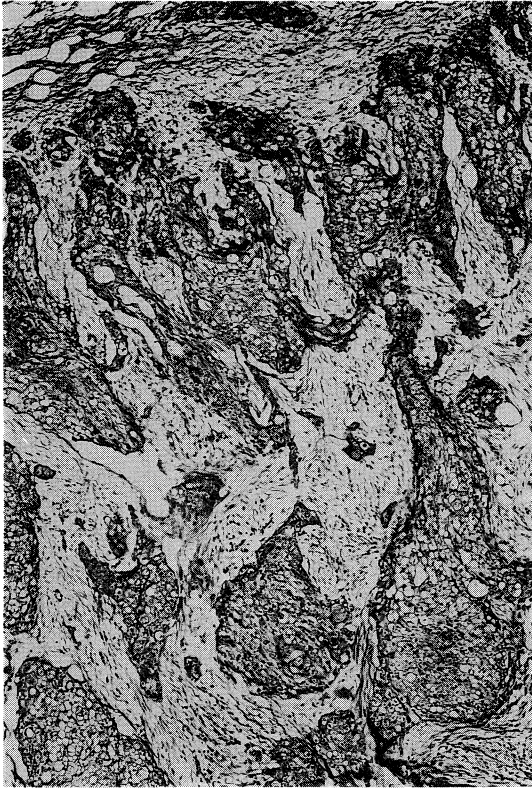


Fig. 7. Mallory stain, $\times 100$

癌細胞

肺癌: HLC, PC-3, 胃癌: HGC を用いた。培養液は、線維芽細胞培養には Eagle's MEM に 10% FCS を添加培養した。

混合培養における collagen 増殖

fibroblast (10^4 cell/dish) を 5 ml 培養液とともに 60 mm plastic dish (Falcon) に播き、12日後 HLC (10^5 cell/dish) を重層し 37°C , 5% CO_2 下で35日間培養した。培養液は4~5日間隔で medium change した。対照群としては、同一条件下で fibroblast および HLC を単独培養した。

癌細胞培養後採取した conditioned medium の線維芽細胞の増殖および collagen 合成に及ぼす影響

conditioned medium

25 mm² Tissue Culture Flask (Corning) で HGC および HLC, PC-3 を 5 ml 培養液でそれぞれ4日間培養し、得た培養液を 2000 r. p. m., 30 min 遠心し、さらに $0.22 \mu\text{m}$

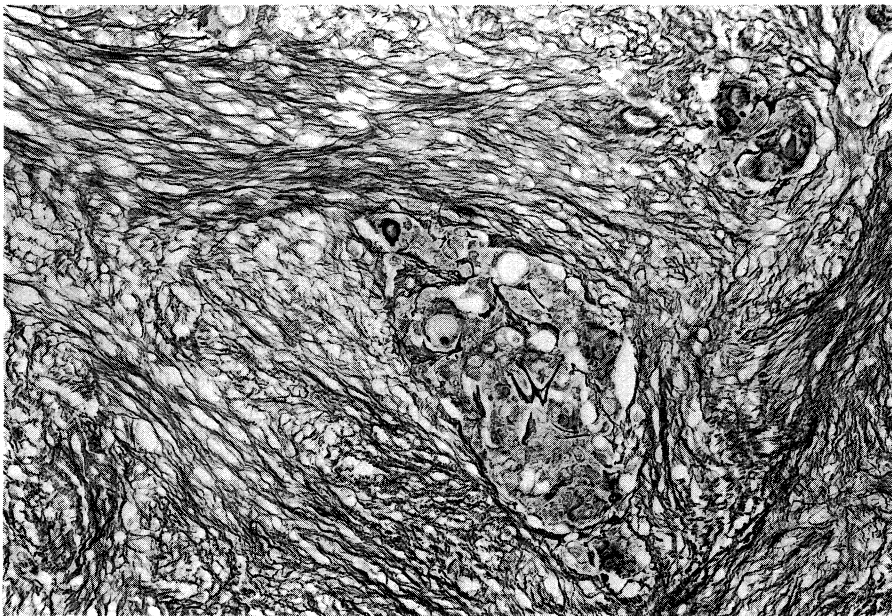


Fig. 8. Pap silver impregnation, $\times 200$

Figs. 7, 8. Same patient. Metastasis of lung cancer (squamous cell carcinoma) to the lymph nodes. Proliferation of stromal cells (fibroblasts and fibrocytes) and collagen fibers were remarkable around the squamous cell carcinoma lesion (compare to Figs. 5 and 6).

Table 1. Number of experimental mice, doses and localization of SSM injection

INJECTION locali- zation	DOSES (μg)	TRPC-9 10 ⁷	TRMK N-I 10 ⁷	TRMKN-I 3 \times 10 ⁷	TRPC-6 2 \times 10 ⁷	Lewis Lung Cancer		
		No. Nude	No. Nude	No. Nude	No. Nude	5 \times 10 ⁴	10 ⁵	5 \times 10 ⁴
						No. Nude	No. Nude	Thymic Black 57
S. C.	1	15	30	15	10	10	10	10
	5	15	0	0	0	0	0	0
	50	15	20	15	10	10	10	10
I. T.	1	15	15	15	0	0	5	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	50	15	15	15	10	5	0	0
Control		30	10	5	5	10	10	10

S. C.: Subcutaneous injection I. T.: Intra-tumor injection

microfilter (Milipore) で濾過滅菌した conditioned medium を用い線維芽細胞への影響を調べた。線維芽細胞 (10⁵ cell/well) を 6 well plastic plate (Falcon) に 2 ml/well の培養液で 2 日間培養後，MEM+10% FCS で 20 倍希釈の conditioned medium で 3 日ごとに medium change と同時に細胞数を測定した。

Conditioned medium の線維芽細胞の collagen 合成に及ぼす影響

6 well plastic plate に fibroblast を培養液 (2 ml/well) とともに播き込み，定常期に達した後，培養液を種々の濃度の HGC, HLC および PC-3 から得られた conditioned medium にそれぞれ交換し，線維芽細胞の collagen 合成能を測定した。

Collagen 合成能の測定

HLC, HGC, PC-3, 線維芽細胞をそれぞれ 10⁵個ずつ 6 well plastic plate に 2 ml/well の培養液とともに播き込み，4 日間培養後 collagen 合成能を測定した。

collagen 合成能測定前の培養液をすべて吸引し，5 $\mu\text{Ci/ml}$ の L-[2,3-³H] proline (Amersham) と 50 $\mu\text{g/ml}$ の sodium ascorbate および 3, 4 $\mu\text{g/ml}$ の sodium α -ketoglutarate を含んだ無血清の Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM) (日水製薬) で 24 時間培養後，培養液を 3000 r.p.m., 20 分遠心した上清を蒸留水で透析 (2 日間, 4°C) した。

well に残った細胞は PBS と 10% trichloroacetic acid 溶液 (TCA) で洗浄し，乾燥後 1 N-NaOH を 2 ml 加え室温で 1 日放置し細胞成分を溶解した。溶解した細胞成分を含む NaOH 溶液と透析した培養液をネジ付試験管 (Pyrex) に移し 20% TCA 溶液を 2 ml 加えた。4°C で 1 日放置後遠心 (3000 r.p.m., 20 min) し，蛋白成分を沈殿させた。上清除去後 6N のアミノ酸分析用塩酸 (半井化学) を 2 ml 加え，テフロンライナー付キャップ (岩城硝子) で密栓し，オートクレーブ (125°C, 1.5 気圧, 6 時間) で加水分解した。

加水分解した蛋白成分を含む塩酸溶液に charcoal (Merck) と Dowex 1 \times 2 (lic) を少量加え，混和後遠心 (2000 r.p.m., 10 min) し，humin 等の不純物を除去し，ロータリーエバポレーターで塩酸を除去した。

乾燥した水解物を 4 ml の蒸留水で溶解し，以後 Juva and Prockop の方法¹⁹⁾ で [³H]-hydroxyproline を分解し，液体シンチレーションカウンター CSC-900 (Aloka) で [³H]-hydroxyproline の放射活性を測定した。

PAP 法による collagen type の組織化学

ヒト胃癌 (MKN-I), およびヒト肺癌 (PC-9) の腫瘤について間接法を用い collagen type を調べた。

抗体としては，一次抗体としてウサギ抗 type I (1000 倍希釈), II (500 倍), III (1000

Envelopment of Cancer Cells by Collagenation with SSM Treatment

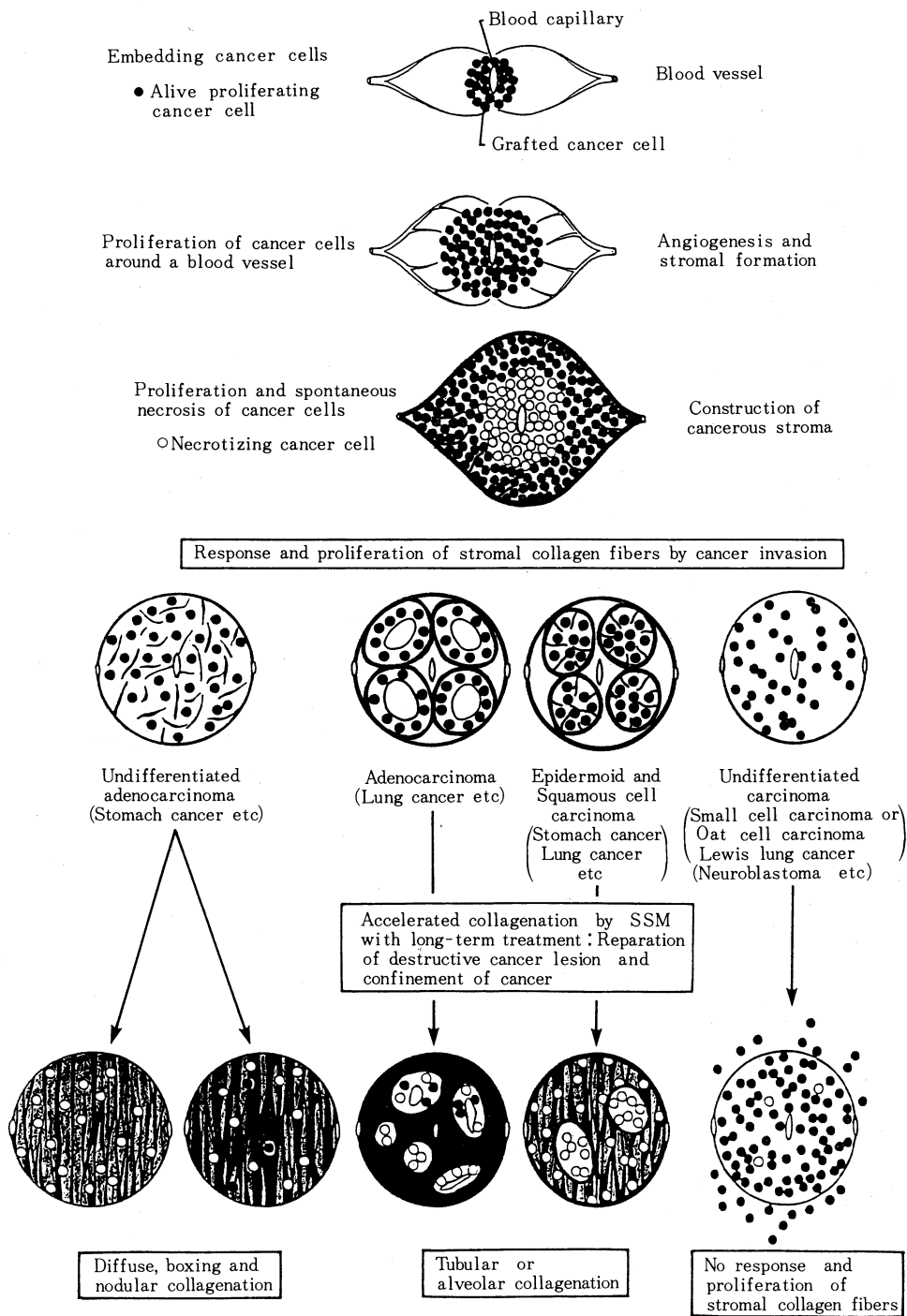


Fig. 9. Schema of the various responsive patterns of stromal collagenation due to transplanted cancer cells in the nude mice.

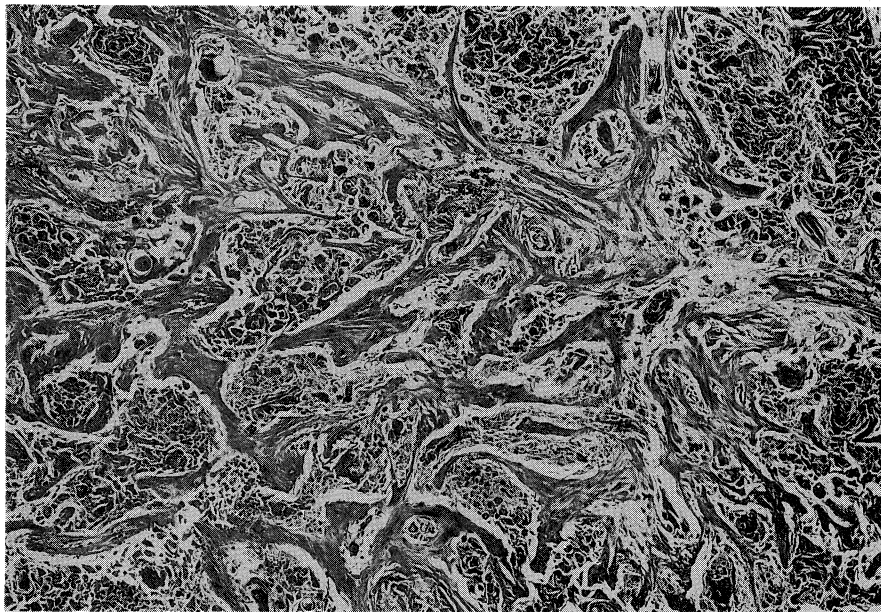


Fig. 10. Nude mouse 432-3 ♀

TRMKN-I cell (10^7) transplantation. 170 days. Non-treated control. Remarkable proliferation of collagen fibers was observed. The proliferating pattern of collagen fibers was of a mixed type with lobular and diffuse patterns. Mallory stain, $\times 100$.

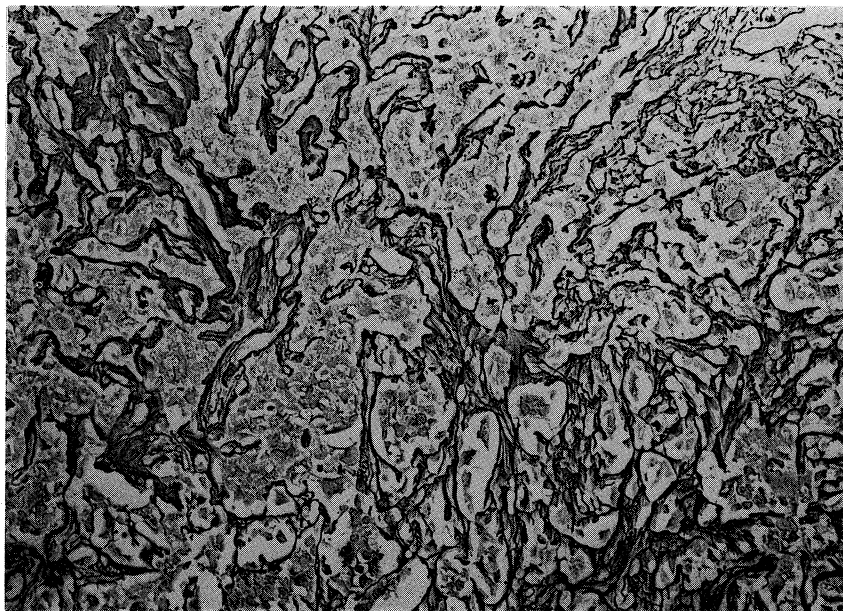


Fig. 11. Nude mouse 274-2 ♂

TRPC-3 cell (2×10^7) transplantation. 68 days. Non-treated control. The proliferating pattern of collagen fibers was of a mixed type with lobular and diffuse patterns. Pap silver impregnation, $\times 100$.

倍), IV (500倍) collagen 抗体 (Didets 社) を用い, ヤギ抗 rabbit IgG 抗体 (Cappet 社) で処理し, Pap (Cappet 社) 染色した.

一次抗体は, 室温, 1 hr で反応, ヤギ抗 rabbit IgG 抗体 20倍希釈は室温 30分反応, peroxidase 染色は 0.05% diaminobenzidin 0.01% H₂O₂ (in 0.05 M Tris HCl, pH 7.6) 室温, 5 min 行った.

Cloning efficiency による SSM の cytotoxic effect

HGC, HLC, TRMKN, TRPC-9 についての SSM の cytotoxicity を plating efficiency で検討した. HGC では final 220 cells/dish (60 mm, 2.0 ml), HLC では 400 cells/dish (60 mm, 2.0 ml), TRMKN では 190 cells/dish (35 mm, 2.0 ml), TRPC-9 では 180 cells/dish (60 mm, 2.0 ml), Balb/c fibroblast (whole embryo) 500 cells/dish (60 mm, 2.0 ml), human skin fibroblast (2PPL) では 400 cells/dish (60 mm, 0.2 ml), medium は MEM, 10% FCS で人癌細胞は 7日間, fibroblast は 14日間培養し, SSM 含量は 2 γ , 100 γ ~200 γ /ml で処理した.

合成樹脂注入による腫瘍内血管構築²⁰⁾

担癌マウスをエーテル麻酔下で開胸し, 左心室壁の一部を切開し, JMS カットダウンチューブ (日本メディカルサプライ) を挿入し大動脈に通し, チューブを結紮した.

ヘパリン加生食塩水をテルモシリンジでチューブより注入し, 右心室壁の一部を切断し, 血液・食塩水の流出口とし, 血液を洗い流す. 重合促進剤 MAX を加えた Mercox (大日本インキ化学, CL-2R-5) を鋳型剤として用い, シリンジから圧力加注入する. 注入後マウスは 1 晩室温に放置. 50°C, 20% NaOH 水溶液にて組織の腐蝕を行う (3日間, 液交換). 中性洗剤液に入れて, 鹼化した組織を取り除き, 希釈したライボン F を使用し流水中で洗浄した.

実験結果

移植癌と血管構築

ヌードマウス xenografts に用いた HGC (6 \times 10⁶ 以上), TRMKN-I (10⁷), HLC (3 \times 10⁶ 以上), TRPC-6 および TRPC-9 (1~2 \times 10⁷) は生着後 3 か月で拇指頭大以上の腫瘍を形成した.

合成樹脂注入でこれらの腫瘍は **Figure 1** に示すように血管網を構築し, 腫瘍と密接な関係を保っている.

Angiogenesis

移植後 24 時間で癌巣に向かって近位の小血管が進展, 囲繞する. 約 3 日後より癌巣内に新生血管が芽出し (**Fig. 2**), 癌細胞の生着と増殖に役立ち, 流血中のリンパ球 (B-細胞), macrophage が少数一過性に見られるが, 5 日後には消失, 7~10 日後にこれら血管由来の間質層が形成され, fibroblasts の増殖が著明で, 癌細胞を取り囲み (**Fig. 3**), 癌細胞-間質細胞 (fibroblast) の接触がみられる. また, 本来の個体の間質では網内系細胞の増殖著明. この fibroblasts は癌の増大に伴う collagen 産生と増殖に関与し, in vitro co culture での collagen 産生と増殖の所見を考えると, この in vivo での細胞相互の関係は collagen 増殖の基盤となる. **Figure 9** に示したように, 癌巣を取り巻く初期間質形成はすべての癌細胞に共通ではあるが, 血管中心性の stromal collagen の増殖様式は癌細胞によりそれぞれ異なっている. この癌増殖に伴う collagen 増殖の強弱は, 癌の増殖抑制に関係し SSM 長期注射で collagenation の促進がみられる. なかでも TRPC-9 や TRMKN-I では collagen 増殖は顕著で, 早期に Mallory, Masson 染色で強陽性の成熟 collagen がみられ (type I, III collagen) (**Figs. 10, 11**), SSM によりさらに collagen 増殖は増強される (**Figs. 12~14**). これに反して未分化の oat cell carcinoma や Lewis lung cancer は **Figure 16** に示すように初期では癌間質は形成されるが癌巣内での血管

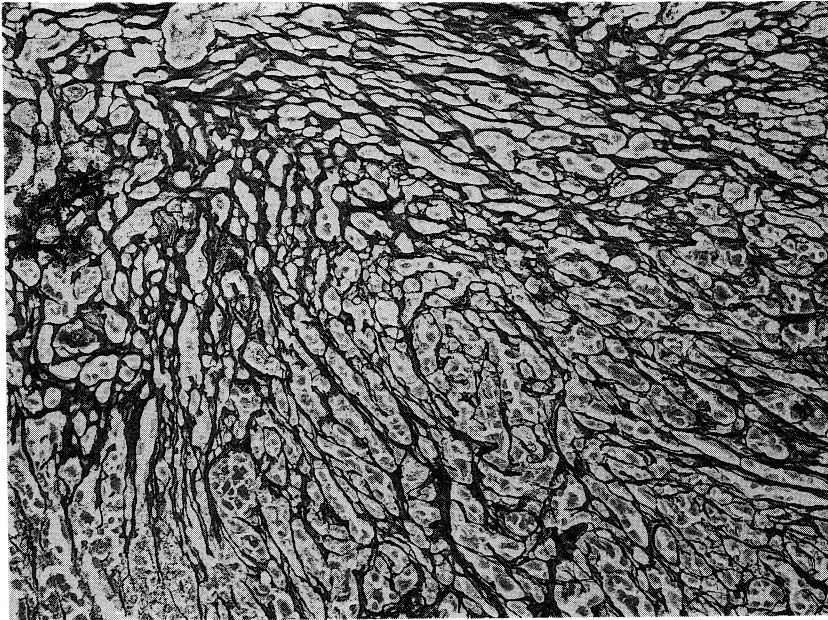


Fig. 12. Nude mouse 356-4 ♀

Simultaneous with transplantation of TRPC-9 cells (10^7) every other day, $50 \mu\text{g}$ of SSM was injected subcutaneously. 68 days. Cancer cells were confined by remarkable proliferation of collagen fibers and collagenation showed a boxing pattern. Tumor growth was inhibited and the tumor healed by cicatrization. Pap silver impregnation, $\times 100$.

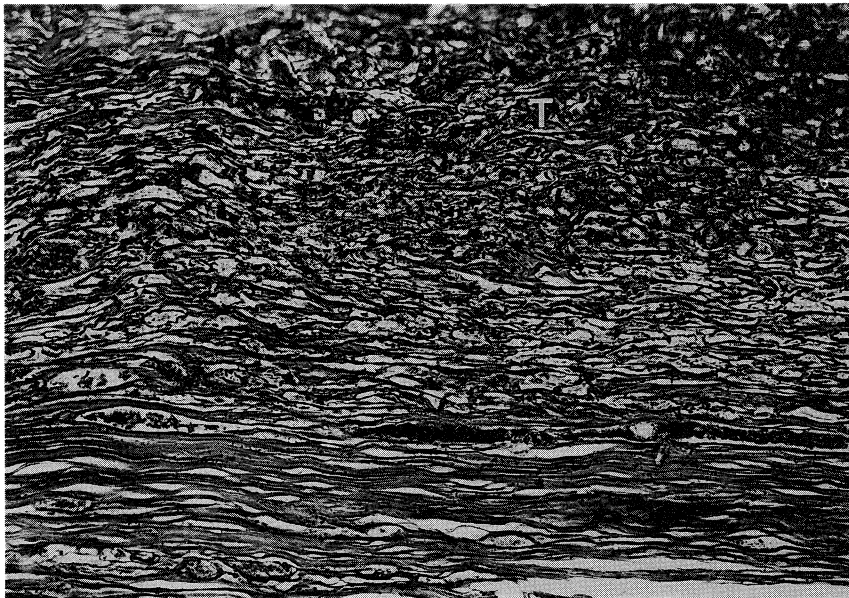


Fig. 13. Nude mouse 501-3 ♀

Simultaneous with transplantation of TRPC-9 cells (10^7) every other day, $50 \mu\text{g}$ of SSM was injected into the tumor. 62 days. The tumor was cicatrized by collagenation gradually and healed (T). Pap silver impregnation, $\times 100$.



Fig. 14. Nude mouse 437-1 ♂

Simultaneous with transplantation of TRMKN-I cells (10^7) every other day, $50 \mu\text{g}$ of SSM was injected subcutaneously. 92 days. Cancer cells were confined, degenerated and then disappeared gradually. The tumor was cicatrized and healed. Pap silver impregnation, $\times 200$.



Fig. 15. Nude mouse 437-1 ♂

Squamous cell carcinoma cells were confined by stromal collagenation and then disappeared gradually. Tumor growth was inhibited. Pap silver impregnation, $\times 400$.

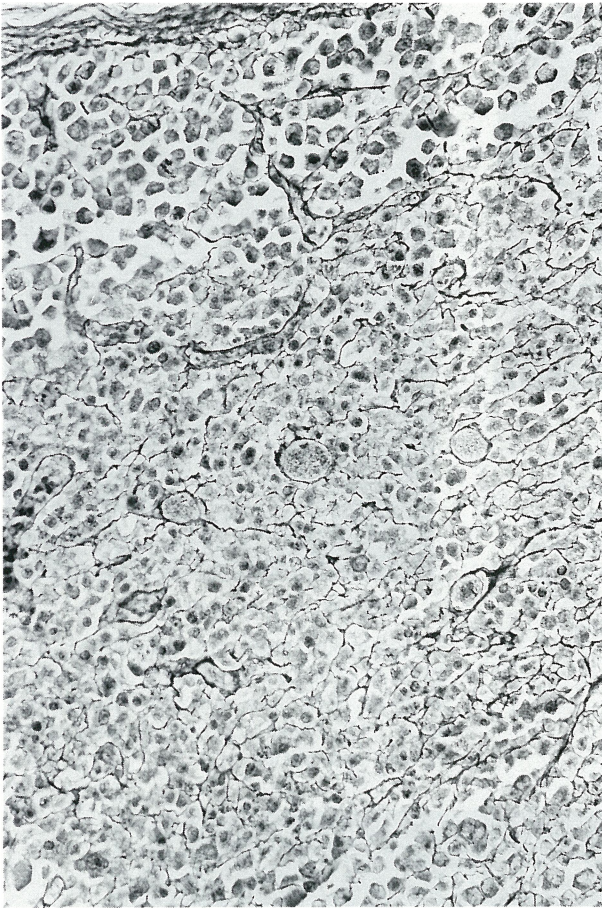


Fig. 16. Nude mouse 264-2 ♀

Transplantation of TRPC-6 cells (2×10^7). 52 days. Non-treated control. Proliferation of collagen fibers was not seen or fibers were very fine. Pap silver impregnation, $\times 100$.



反応と間質反応とは全くみられず，癌は増大し小鶏卵大に達し，SSM注射も多くの場合無効であった (Fig. 17). しかし少数では癌細胞の自然壊死により潰瘍が形成されて修復機転がみられることもある. 高濃度SSMで癌細胞間に繊細なcollagenの産生もみられるが，癌増殖を抑制するようなcollagenではない.

ヒトおよびマウス由来癌細胞をヌードマウスに移植した癌巣における癌間質，特に間質反応としてのcollagen増殖

胃癌 (HGC) および肺癌 (HLC) についてはすでに報告したように，collagen産生と増殖は前者ではびまん性に個々の癌細胞を取り囲み，後者では小葉状に取り囲むが，今回の実験でわかったことは，高分化腺癌 (TRPC-9) および扁平上皮癌 (TRMKN-I) では間質のcollagen増殖が極めて顕著なことであった. 癌細胞周囲のfibroblastの増殖とcollagen産生増殖ははなはだ著明で移植初期からMasson, Mallory染色強陽性 (type I, III collagen) のcollagenationがみられalveolar patternからさらにびまん性に増殖し，alveolar patternとboxing patternの両者が混在 (Figs. 10~12)

Fig. 17. Nude mouse 283 ♀

Simultaneous with transplantation of TRPC-6 cells (2×10^7) every other day, $50 \mu\text{g}$ of SSM was injected subcutaneously. 124 days. Tumor growth was not inhibited.

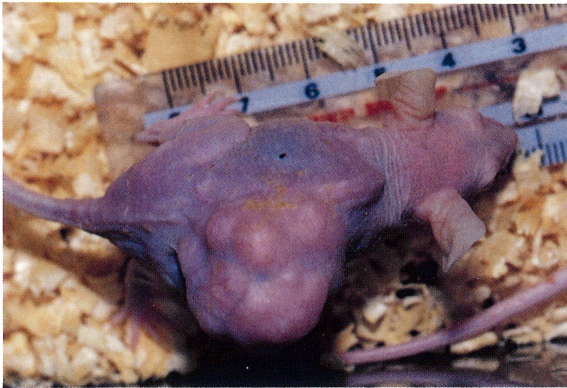


Fig. 18. Nude mouse 437-2 ♂

Simultaneous with transplantation of TRMKN-I cells (10^7) every other day, $50 \mu\text{g}$ of SSM was injected subcutaneously. 79 days. The appearance of a tumor resembling cirrhotic liver as a result of stromal collagenation was observed, but the other three mice healed by cicatrization 127 days after transplantation.



Fig. 19. Nude mouse 357-1 ♂

Simultaneous with transplantation of TRPC-9 cells (2×10^7) every other day, $50 \mu\text{g}$ of SSM was injected subcutaneously. 156 days. The tumor was cicatrized and healed.



Fig. 20. Nude mouse 392-3 ♂

Simultaneous with transplantation of TRPC-9 cells (2×10^7) every other day, $5 \mu\text{g}$ of SSM was injected subcutaneously. 72 days. The cicatrized tissue consisted of necrotic collagen fibers and cancer cells. Tumor growth was inhibited and the tumor healed. Pap silver impregnation, $\times 100$.



Fig. 21.



Fig. 22.



Fig. 23.

Fig. 21. Nude mouse 501-3 ♀

Simultaneous with transplantation of TRPC-9 cells (10^7) every other day, $50 \mu\text{g}$ of SSM was injected into the tumor. 62 days. Epidermoid cancer cells were confined by remarkable proliferation of collagen fibers, degenerated and then disappeared. Pap silver impregnation, $\times 400$.

Fig. 22. Nude mouse 445-2 ♂

Simultaneous with transplantation of TRMKN-I cells (10^7) every other day, $1.0 \mu\text{g}$ of SSM was injected into the tumor. 108 days. The tumor was cicatrized and healed. Star-like necrotic ghost cancer cells remained in the cicatrized tissue.

Fig. 23. Nude mouse 437-1 ♀

Simultaneous with transplantation of TRMKN-I cells (10^7) every other day, $50 \mu\text{g}$ of SSM was injected into the tumor. 92 days. Squamous carcinoma cells were enveloped by collagenation and finally disappeared. Tumor growth was inhibited. Pap silver impregnation, $\times 400$.

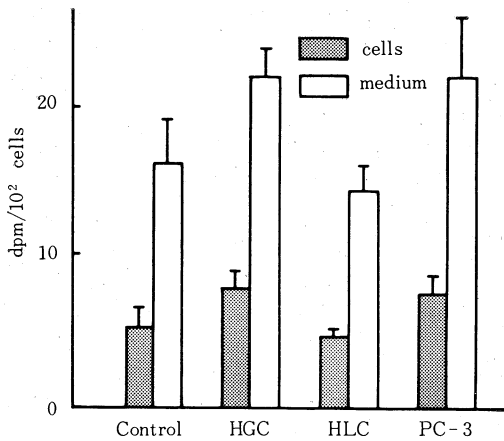


Fig. 24. Effect of supernatant of various cancer cell lines on collagen synthesis. Supernatant was obtained by culturing confluent cancer cells for 3 days in RPMI 1640 with 10% FBS. A 1:20 dilution of supernatant was tested for its ability to stimulate collagen synthesis by incubating them with confluent fibroblasts in MEM with 10% FBS for 4 days.

した。この所見は対照の SSM 無処置移植癌でも顕著である。重要なことは、この collagenation が SSM 長期注射によりさらに促進し、cicatriziation を起こし 癍痕となって治癒することである (Figs. 18~23)。この cicatrization の過程は、著明な collagenation により癌細胞が取り囲まれ、壊死を起こし、陳旧化して赤染(フクシン酸)した cicatrization の中に封入され、star sky のようにみられる。Mallory 染色で、陳旧化し凝固壊死を起こした collagen は赤染し、増殖中の癌巣にみられる新しい collagen は青染する (Figs. 20, 22)。

生検組織における癌と collagen の増殖

ヌードマウスへの人癌細胞の移植と同じく、すべての癌では程度の差はあっても常に collagen 増殖がみられる。ここでは生検での所見を示した。Krukenberg's tumor でも卵巣に転移した癌巣周囲には in vitro での fibroblasts と癌細胞との混合培養の所見と同じように、子宮の間質組織よりの collagen 産生と増殖が転移癌周囲にみられる。リンパ球, macrophage

等の関与はみられない (Fig. 4)。

また case IV は肺癌の中等度分化型腺癌で、同一癌のリンパ節転移巣の所見は重要で、腺癌と扁平上皮癌とが共存するが、癌細胞周囲の fibroblasts の出現と collagenation は後者の方が著しく扁平上皮癌における SSM 効果を期待できることを示唆している (Figs. 5~8)。

In vitro における collagen 産生

in vitro での fibroblast cancer cells co-culture で著明な collagen 増殖がみられることは生体内の所見と併せて極めて重要である。^{7), 13)}

癌細胞を培養した培養液の conditioned medium による fibroblast 自身の細胞増殖促進は認められなかった。

次に、この癌産生物質による fibroblast の collagen 合成促進について検討した結果、5% 濃度の HGC, HLC, PC-3 の conditioned medium を添加した場合、5% 濃度で 16 日間培養したものが最も collagen 合成能が高く、なかでも HGC, PC-3 (肺癌分化型) の conditioned medium で培養したものが高値を示した (Fig. 24)。このことはヌードマウスにおける xenografts での HGC および分化型腺癌、扁平上皮癌における collagenation の程度と一致していた。

癌細胞自身の collagen 合成能

ここでは HLC, PC-3, HGC の 3 細胞について collagen 合成能を測定し、同時に対数増殖期の fibroblast を比較対照として測定した。Figure 25 のように培養液と細胞内 [³H]-hydroxyproline の全量は fibroblast が最大であったが、細胞内の [³H]-hydroxyproline の量は HLC が多く、HGC, PC-3 の全量および培養液中ともに低い。これら癌細胞内においても collagen 合成能を認めたことは特記すべきである。

SSM 長期使用による collagenation の促進と癌癍痕化の促進 (Fig. 9)

Figures 1~3 に示すように移植した癌細胞によって集合する血管を中心とした間質増殖は、

angiogenesis に端を発し癌細胞は間質結合織で囲繞され，間質構築がみられるが，以後癌細胞の増殖に伴う collagen 増殖のパターンは癌細胞の種類によって異なる．この collagen 増殖は既報の HGC のように低分化癌でも癌の細胞間にびまん性に増殖し，移植1か月後には Mallory 染色陽性の collagen fiber が個々の癌細胞の周辺に芽出し，SSM 長期注射によって collagen 増殖は促進し，ついには癌巣は結節状となり癒痕化が促進される．他方 HLC のような adenocarcinoma では tubular または alveolar pattern を形成し，Mallory, Masson 染色で青染する強い collagenation がみられる．しかし，小葉内へのびまん性増殖は初期ではみられない．SSM 長期または高濃度 SSM 注射で癌壊死巣よりの collagen の素材からの collagen 産生も促進され collagenation は小葉内へ侵入し，liver cirrhosis の癒痕化に似た増殖が起こり癌細胞の強い封じ込めが起こる．今回の実験で特に注目したのは高分化型腺癌 (epidermoid carcinoma) または扁平上皮癌での stromal collagenation であった．本来

の扁平上皮癌はもちろん，肺癌 (PC-9)，胃癌 (MKN-I) 等の高分化癌の扁平化生を起こした癌でも同じで，間質増殖は移植初期から強く，Mallory, Masson 染色で濃青染した collagen の増殖がみられ，tubular または alveolar pattern で漸次小葉内にも侵入 boxing pattern となり diffuse pattern と alveolar pattern が混在した (Figs. 10~12)．このような著明な collagenation は SSM 注射で著明な cicatrization を起こして脱落した (Figs. 14, 15, 22, 23)．Figure 26 のように癌巣の定型的な癒痕化治癒を起こした場合も，リンパ球・macrophage の介入を強調する所見はなく collagen 増殖による癌の理想的な癒痕化治癒がみられた．

これら xenografts における collagen type は I および III 型であった．

この collagenation と cicatrization による癌の癒痕化治癒は無処理対照マウス群ではみられないが，時に，癌の自然壊死による潰瘍が起こり，表層性の浅い superficial cicatrization は稀にみられることがある．しかし，高濃度 (50 µg 以上) の SSM 長期注射群はこれらの

扁平上皮細胞癌で著明な collagenation を起こし，しばしば癌腫増大の停止・癒痕化を起こした．しかし，これに反して肺癌でも極めて未分化なヒトの oat cell carcinoma や Lewis 肺癌 (マウス) のような collagen 産生が極めて弱いから，ほとんどみられないものは急速な増殖を起こした (Fig. 16)．SSM の効果も無効で，癌は急速に鶏卵大に増大した (Fig. 17)．

SSM の cytotoxic effects

Table 2 に示すように，SSM 2 µg~200 µg/ml 濃度で plating efficiencies を調べたが fibroblast への cytotoxic effect は全くみられ

Table 2. Cytotoxic effect of various doses of SSM on human cancer cells and fibroblasts.

Cells	SSM µg/ml	Plating Efficiency (%)	Percent of Control	Inhibition
HGC	0	64.5	100	0
	2	69.5	107.7	-7.7
	200	28.2	43.7	56.3
TRMKN-I	0	16.1	100	0
	2	25.9	161.3	-61.3
	100	10.4	64.5	35.5
HLC	0	17.8	100	0
	2	17.3	97.2	2.8
	200	9.8	54.9	45.1
TRPC-9	0	76.1	100	0
	2	76.1	100	0
	100	38.3	50.4	49.6
Human Skin Fibroblast	0	27.2	100	0
	2	25.0	92.5	7.5
	100	28.0	112	-12
Balb/c (whole embryo) Fibroblast	0	1.8	100	0
	2	1.6	88.9	1.1
	100	2.0	111.1	-11.1

ず、むしろ増殖促進への傾向を示した。癌細胞では $2\mu\text{g/ml}$ では全く影響はないが、 100γ 、 $200\gamma/ml$ で $30\sim 50\%$ inhibition がみられた。

Survival rate

担癌動物でのSSM注射を行ったものでHGC, HLC についてはすでに報告しているので、⁶⁾ 今回は特に高分化型腺癌 (epidermoid carcinoma, TRPC-9) および扁平上皮癌 (TRMKN-I), および Lewis 肺癌について述べる (Figs. 27~30).

Figure 27 に示すように TRPC-9 においては無処理 mouse でも基質 collagen 増殖が著明で延命がみられる。対照群の rate に差があるのは、移植時の培養細胞の状態によるもので、注射実験はすべて同一継代の培養細胞の移植実験で比較した。SSM $1\mu\text{g}$ 、 $5\mu\text{g}$ 、 $50\mu\text{g}$ 注射で著しい延命効果がみられた。特に SSM

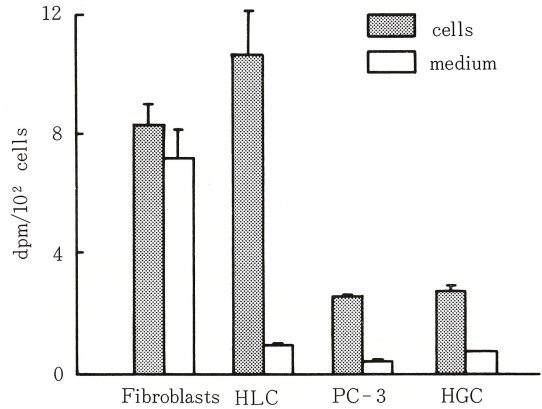


Fig. 25. The amount of radioactive hydroxyproline synthesized by cancer cell lines and fibroblasts. Cells in a logarithmic growth phase were labeled with [³H]-proline ($5\mu\text{Ci/ml}$) for 24 hr at 37°C in the presence of sodium ascorbate ($50\mu\text{g/ml}$) and sodium α -ketoglutarate (3.4mg/ml).

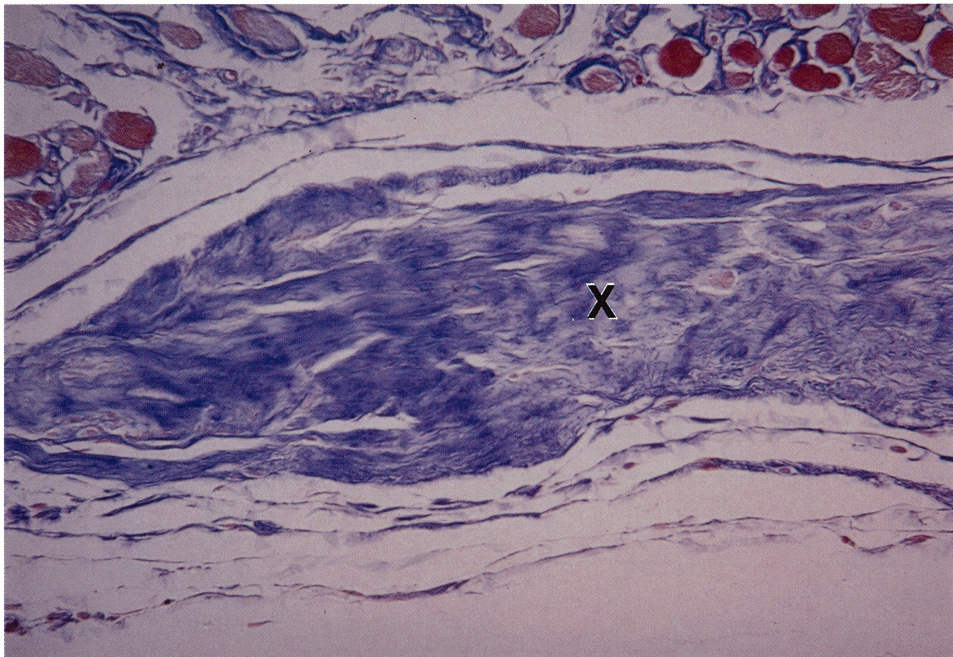


Fig. 26. Nude mouse 352-4 ♂

Simultaneous with transplantation of TRPC-9 cells (10^7) every other day, $40\sim 50\mu\text{g}$ of SSM was injected subcutaneously. 133 days. The tumor was enveloped and completely replaced by collagen fibers. This is a mode of cure of cancer. X: tumor. Mallory stain, $\times 100$.

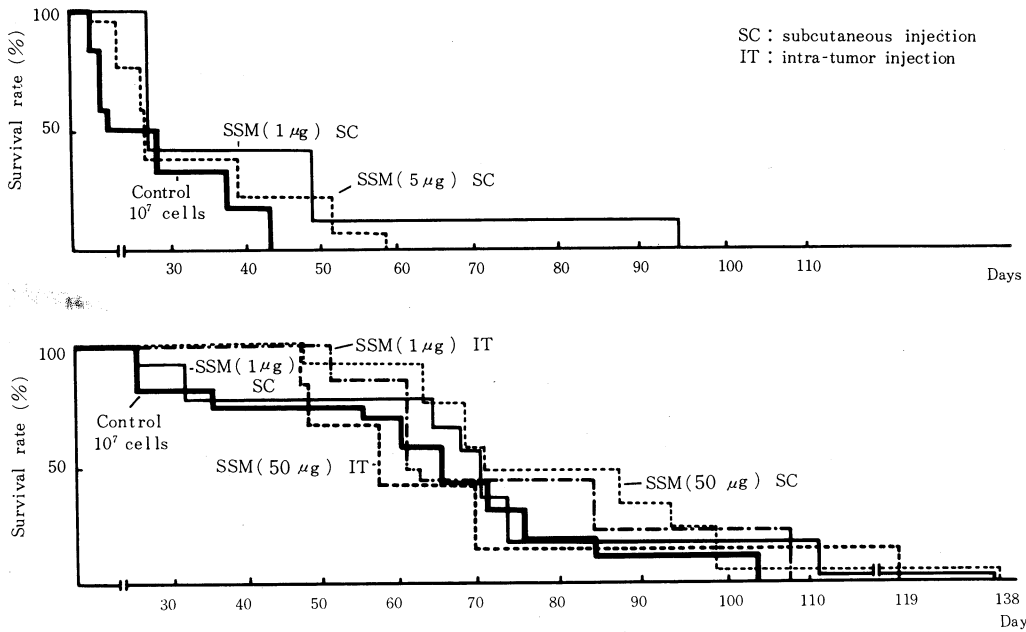


Fig. 27. Survival of xenografts (TRPC-9, human lung cancer: epidermoid cancer) bearing athymic mice (Balb/c nu-nu) injected with various doses of SSM.

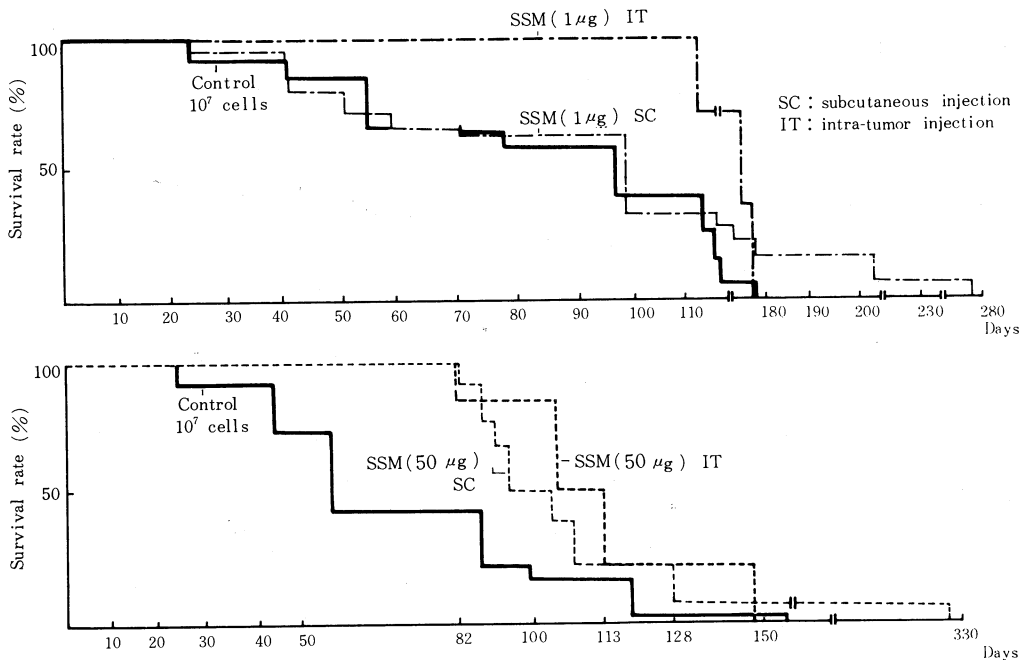


Fig. 28. Survival of xenografts (TRMKN-I, human stomach cancer: squamous cell carcinoma) bearing athymic mice (Balb/c nu-nu) injected with various doses of SSM.

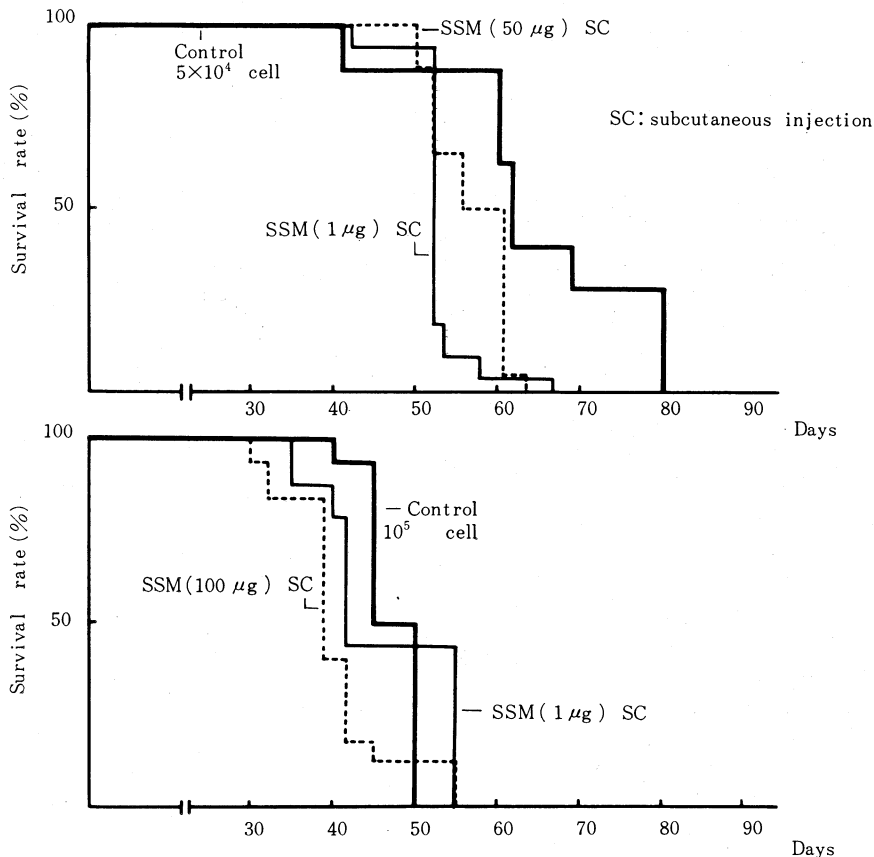


Fig. 29. Survival of allografts (Lewis lung cancer: mouse undifferentiated carcinoma) bearing athymic mice (Balb/c nu-nu) injected with various doses of SSM.

の腫瘍内注射は皮下注射よりも腫瘍増大は抑制され、癌の癒痕化への促進がみられた。しかし、xenograftsの縮小、治癒がみられたにもかかわらず死亡するものもあったが、治癒傾向（癒痕化の傾向）をみたものは多くの場合著しい延命効果がみられた。

以上のことは TRMKN-I の場合も同じで SSM 注射群では著しい collagenation による癌増殖の抑制と癒痕化への組織所見がみられ、Figure 28 のように著明な延命効果がみられた。

これに反して、Figures 16, 17 のように腫瘍内にほとんど間質反応および collagen 増殖のみられない oat cell carcinoma や Lewis lung cancer では SSM 効果は nude mice, thymic mice とともに全くみられなかった。したがって、

collagenation がみられず、急速な増殖をする癌では SSM は無効であった。しかし、前報のように HGC (胃癌低分化癌) は未分化癌であるが、collagen 合成と増殖は著明で SSM 注射で著しい延命がみられることは重要である。^{6), 13)}

考 察

人型結核菌青山株より抽出した多糖体を主成分とする SSM は 1944 年抗結核剤として難治皮膚結核に著効を奏し、故土肥東大名誉教授により「丸山ワクチン」^{15), 16)} と命名された。その後丸山は結核・癩患者に癌発生率の少ないことに着目し、世界に先がけて抗腫瘍効果を報告し、故緒方知三郎東大名誉教授は前立腺癌自己体験に基づき、卓越した抗腫瘍性について激賞し

た。しかし，多くの臨床治験例が報告されながら抗癌作用機序に関して実験的解明には成功しなかった。しかしその後，SSMの重要な生物学的活性が注目され，macrophageを活性化し

て IFN 産生の促進，癌患者の低下したリンパ球活性の回復，ラット肝癌の肺転移の消失が報告されたが，なお抗癌作用の解明には到らなかった。^{7),15)}

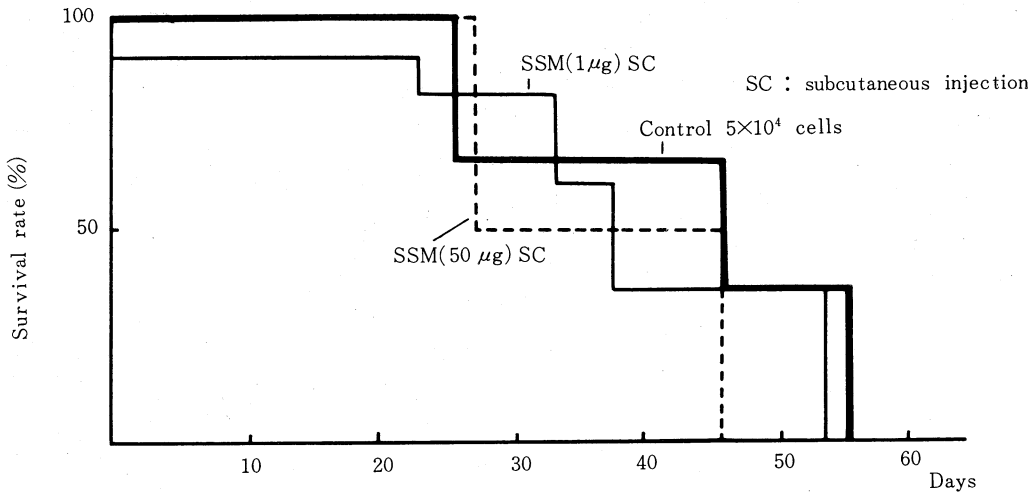


Fig. 30. Survival of allografts (Lewis lung cancer: mouse undifferentiated carcinoma) bearing C57 black mice injected with various doses of SSM.

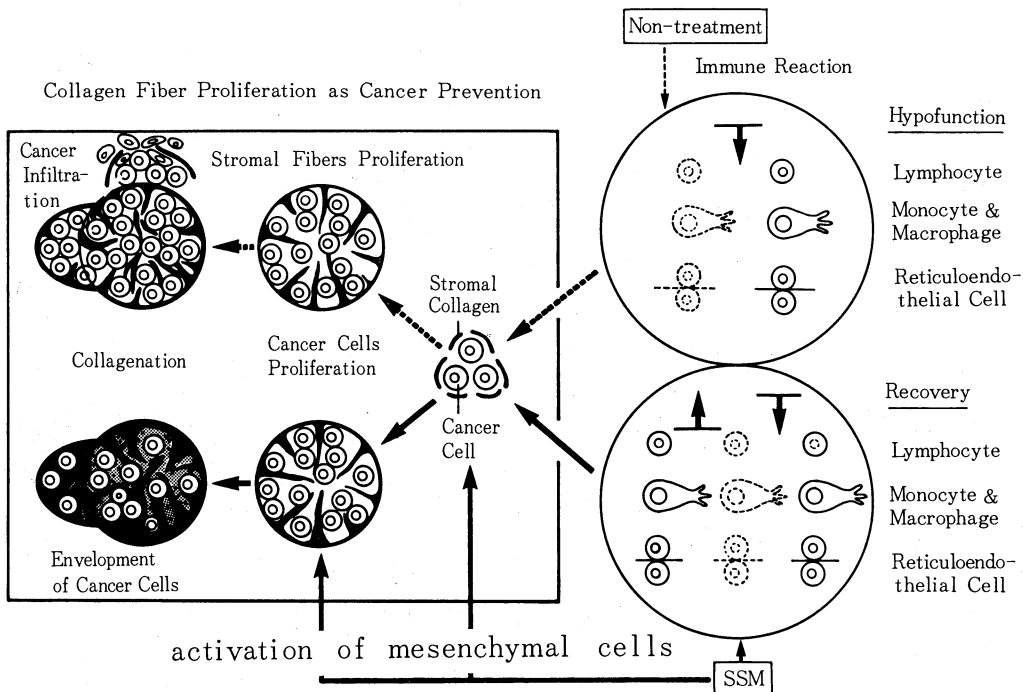


Fig. 31. Schema of antitumor activity by SSM administration. Promotion of stromal collagenation in the cancer lesion is the most important adjuvant activity of constant long-term SSM treatment.

著者らは前報においてSSMによる抗癌作用は低濃度では他種抗癌剤にみられるような癌細胞の直接的な殺細胞作用は弱い、免疫不全マウスでも癌の増殖抑制と治癒をみることは特に「免疫」を強調するものでもなく、癌細胞と間質細胞の相互関係によるcollagenの増殖が重要であることを指摘してきた。すなわち、癌発生と同時にangiogenesisによる癌間質の構築を基盤に、癌の進展とともにこの間質からのcollagen増殖が起こるが、癌増殖に伴って起こるcollagenationは癌浸潤の抑制に極めて重要であることを指摘してきた。このcollagen産生と増殖は癌細胞によって異なるが、この多寡は癌発生、浸潤、転移に極めて重要な生体防御機転である。本論文は前報の腺癌(HLC)、低分化癌(HGC)に加うるに高分化型腺癌、特に肺癌・胃癌における類表皮癌、扁平上皮癌ではcollagen増殖が初期より極めて顕著で癌抑制に関与するが、これに反して、最も未分化なoat cell carcinoma、マウスのLewis肺癌^{23)~25)}は癌細胞の急速な増殖に比してcollagen増殖はほとんどみられず(Fig. 16)、collagenの制癌効果の重要性を述べた。

特に注目すべきはSSM無処理の生検組織でも扁平上皮癌(肺癌、食道・咽喉癌等)における間質増殖とcollagen増殖は他種の癌に比して極めて著明で、癌巣周辺における著明なfibroblastの増殖を伴い、癌発生・進行と同時にMallory, Masson染色により青染された成熟collagenの著明な増殖がみられることである。この所見は、扁平上皮細胞由来の扁平上皮癌のほかに肺癌・胃癌等の化生によりみられた分化型癌の転移巣でも明らかであった。Clinical case IVは、肺癌(腺癌)のリンパ節転移で同一個体に発生した肺癌であり、腺癌では癌周囲collagen増殖は中等度であるが(Figs. 5, 6)化生を起こした高分化型の扁平上皮癌転移部では、著明なfibroblastとcollagen増殖による線維化がリンパ節の広範にみられた(Figs. 7, 8)。このことはSSM使用の有効性の適応を示唆していると考えている。この間質collagen

増殖の癌細胞の性状による相異は分化に伴う重要な癌細胞膜の分子構造上の変化に左右されると考えている。^{8), 9), 13)} その他癌産生物質によるfibroblastのcollagen geneとの関係に関しては、将来分子生物学的にも解明しなければならないと考えている。

今回は、これまで述べたように間質細胞の増殖が著明である肺癌の分化型腺癌(epidermoid carcinoma, PC-9)および胃癌(胃扁平上皮癌, MKN-I)を移植しxenograftを作製してSSMによる間質反応とcollagen増殖を調べたが、生検所見と同じように初期より極めて著明なcollagen増殖がみられ、collagenationとcicatrizationによる著明な癌の癒痕化を導いた(Fig. 26)。この治癒機転は、癌の自然治癒の機転の一理想像であるが、SSMのcollagen増殖の促進による癌癒痕化への問題は将来重要な課題と考える。陳旧化したcicatrizationの組成はFigures 20~23に示すように、血管を中心としたcollagenationと散在する癌細胞の壊死細胞が混在した壊死巣で、かつてのcollagenationからcicatrizationへの過程がよくわかる。また、この壊死巣の境界層で増殖を続ける癌巣では、著明なMallory, Masson染色陽性の新鮮な成熟collagenがみられ、このcollagenationは先に報告した腺癌(HLC)による小葉型と低分化型腺癌(HGC)のdiffuse patternの両者混合型で、高濃度のSSM注射、特に腫瘍内注射によりさらに促進され、xenograftsは断層状に癒痕化へと移行した。

このような類表皮癌・扁平上皮癌では癒痕巣のcollagen性状はtype Iとtype III型が主体で、酸性染料による染色性の相異がみられるがこれは、染料分子の大きさと組織の構密度によるもので、両者は同一collagenである。すなわち、染色性についてはMöllendorff (1924)、関 (1932, 1936, 1939),²¹⁾ 大倉²²⁾らが指摘しているように、溶液内の酸性染料分子の大きさと被染物の構造密度によるもので、cicatrizationの赤染部分は変性溶解したcollagenでミセル間隙を塞いでいるため、大分子染料の侵入が妨げられ、分子体積の小さい染料で赤染し、

変性のない新鮮な collagen 増殖部分は分子相互の間隙がみられるため大分子染料で青染する。したがって、赤染 cicatrization は、青染 collagen の陳旧化変性壊死を起こしたものであり質的には同じで、中に多数の collagen の断裂像がみられ collagenation から cicatrization の構成過程がうかがわれる (Figs. 20~23)。

次に、Clinical case I は Krukenberg's tumor で、胃癌(腺癌)の卵巣播種例であり癌の着床部分では癌細胞周囲に間質からの著明な collagen 産生がみられる。この collagen 産生は全く mediated cell もみられず in vitro における癌細胞-間質細胞混合培養時の cell to cell interaction による collagen 産生と同じで in vitro の collagen 産生は in vivo でもみられることを示した (Fig. 4)。

著者らの実験でも示したように、最近、癌と collagen 産生について、癌細胞と fibroblast との関係が重要視され、癌細胞は fibroblast との接触で collagen fiber の増殖促進を起こすほか、癌細胞自らも collagen 合成能を有していることがわかってきた。^{26), 27)} KATO-III は胃印環細胞癌で自らも 3% 程度の collagen IV 型を分泌することが知られているので、この実験を行うためヌードマウスでの実験を試みたが 3×10^7 個以上の移植でも生着しなかった。

このように癌では、間質の構築と collagenation は程度の差はあるがほとんどすべての癌組織でみられ、生検で collagenation の著明なものほど SSM 効果が期待できるので、癌の診断時 collagenation の有無によっては、早期からの SSM 使用は癌治療に重要な役割を果たすと考える。Krukenberg's tumor でのように collagen 産生に lymphocyte, macrophage の関与はみられないが、脾細胞は SSM による collagenation を促進することはすでに述べたが、⁹⁾ collagenation 促進には免疫基盤との因果関係が重要である。すなわち癌患者の低下した免疫能を正常に回復することにより健常時の場合と同じ collagenation が促進されると考える。

以上のように、癌と collagenation は、癌細胞の浸潤・進展・転移に極めて重要な役割を有しているが、未分化で増殖の迅速な oat cell carcinoma や Lewis lung cancer ではほとんど間質 collagen の増殖はみられず SSM は無効であった。この場合、田中、森田らは SSM により細胞回転の早くなること、mitosis の活発化を指摘しているが、SSM の適応に関し著者らは注目している。^{23)~25)} また Figures 27, 28 のように SSM 注射により survival rate は短縮した。ただ、長期生存し癌細胞の自然壊死(潰瘍等)のおこる場合、修復機転の促進がみられ表層性の cicatrization やわずかな collagen fibers が散在するが抗癌に役立つようなものではなかった。これに反して、squamous cell carcinoma では collagenation は早期より極めて著明で、自然治癒傾向も強い。しかし SSM は、高濃度の SSM を除き殺癌作用は弱いので (Table 2)、癌進行の阻止には放射線照射・化学療法との combination も必要で、SSM による癌壊死巣の修復を促進し、結果的に癌増殖の抑制を来すと考えている。

最初 SSM は癌免疫療法剤として登場し、IFN 産生の促進、白血球機能の回復等重要な活性が報告されているが、免疫活性に関する限り本物質は必ずしも強くはない。しかし、免疫不全のヌードマウス移植癌をはじめ多くの延命効果の治験報告^{15)~18)} を考えれば、SSM は必ずしも免疫活性にのみに期待すべき物質ではない。本物質は、副作用なく長期に渡って使用できるため、活性としては弱いが、免疫力の衰微しがちな担癌体の免疫状態を長期に渡って正常レベルに回復したり保持できることが重要である。このことから、将来、免疫療法を単に一時的なリンパ球・macrophage の活性化のみに捉われず、図示 (Fig. 29) したような癌部で進行している癌と間質細胞との病理学的な因果関係を忘れてはならない。すなわち、今までの報告で理解されると思うが、癌と collagenation は、癌の転移・浸潤を抑制する重要な鍵を握るものである。この癌巣での癌細胞による癌破壊部、壊死巣の修復機転が、SSM 注射により、

可及的正常な免疫基盤の上で長期に進行し、かつ促進するものと考えられる。言いかえれば、SSM が IFN 産生を促進したり、macrophage が弱いながらも活性化される事実（永続したアジュバント的効果）とその結果は癌巣においてみられる collagenation 促進に役立つものと考ええる。ヌードマウスへの正常脾細胞の添加でさえ collagenation の促進がみられる。⁶⁾ このことは、結核菌の洗礼をうけた癌患者に SSM による免疫細胞の活性化がみられることが間接的に癌巣部の collagenation 促進へ連結していることを示唆している。最近の SSM の臨床治験で、癌患者の放射線治療時の白血球減少の抑制が注目されているが、単に白血球増減のみに捉われず、図示したように個体内で進行する癌の病理的所見に影響することに注目しなければならない。

本研究で示した扁平上皮癌は最近悪性黒色腫細胞と同じように抗原性のあることがわかってきたが、間質の collagenation は癌の中でも顕

著で時には抗原性に基づくのか著明なリンパ球浸潤を伴い SSM 注射により極めて高い延命効果を示した。今回の実験では生着しなかったが、KATO-III の印環細胞癌、特に硬性癌と SSM の問題を追求したが不成功に終わった。今後の課題である。

最後に TRPC-9, および TRMKN への SSM 効果は少なくとも2か月以上の使用が必要で経過中に起こる癌壊死または潰瘍形成と修復の促進は癌癒痕化への極めて重要な過程と考える。

謝 辞

本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費 62-603 および服部孝子助成金で完成したことを感謝します。また、病理組織標本の作製では本学組織電子顕微鏡センター 吉田陽子・若林かずみ、組織培養免疫センター立古文恵技術員の労を感謝します。ヌードマウス給与を受けた本学動物飼育センター 北主任にも感謝します。SSM を恵与いただいた日本医科大学ワクチン研究施設 丸山千里先生、ゼリヤ新薬に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Old, L. J.: Cancer immunology: The search for specificity-G. H. A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res.* 41: 361-375, 1981
- 2) Gifford, G. E., Ostrove, J. and Ruff, M. R.: Effects of rabbit tumor necrosis factor (TNF) on cells. *In Biochemical characterization of lymphokines*, ed. by de Weck. New York, Academic Press. 1980, pp. 307-313
- 3) Gresser, I.: Antitumor effects of interferon. *Adv. Cancer Res.* 16: 97-140, 1972
- 4) Rosenberg, S. A., Mulé, J. J., Spiers, P. J., Reichert, C. M. and Schwarz, S. L.: Regression of established pulmonary metastases and subcutaneous tumor mediated by the septic administration of high-dose recombinant interleukin 2. *J. exp. Med.* 161: 1169-1188, 1985
- 5) Rosenberg, S. A.: Lymphokine-activated killer cells: A new approach to immunotherapy of Cancer. *JNCL.* 75: 595-603, 1985
- 6) Kimoto, T.: Collagen and stromal proliferation as preventive mechanisms against cancer invasion by purified polysaccharides from human tubercle bacillus (SSM). *Cancer Detect. Prev. (Alan R. Liss., Co., U. S. A.)* 5: 301-314, 1982
- 7) 木本哲夫: 人型結核菌体抽出多糖体成分 (S. S. M.: 丸山ワクチン) の抗癌作用に関する研究. 癌間質コラーゲン増殖による癌細胞「封じ込め」について. *川崎医学会誌* 10: 286-304, 1984
- 8) 木本哲夫: 人型結核菌体抽出多糖体 (S. S. M.: 丸山ワクチン) の抗癌作用に関する研究. 癌細胞膜分子構築の変化に伴う間質反応とコラーゲン増殖 collagenesis. *川崎医学会誌* 10: 445-464, 1984
- 9) Kimoto, T., Watanabe, S. and Saito, T.: Collagen fiber formation and proliferation as a mechanism of cancer prevention and regression induced by extract from mycobacterium tuberculosis: Correlation between clinical observation and animal experiments. *Cancer*

- Detect. Prev. (Alan R. Liss, Co., U. S. A.) 11: 173—189, 1988
- 10) Kimoto, T.: L'action anticancéreuse du collagène de l'extrait du mycobacille tuberculeux type humain. *Kawasaki med. J.* 12: 177—189, 1986
 - 11) 木本哲夫：特集 Biomedical Science の進歩と線維化。結核菌多糖体成分によるコラーゲン増殖と癌増殖抑制について。最新医 42: 1903—1911, 1987
 - 12) 木本哲夫：歯科領域に於ける丸山ワクチン。日本歯科薬物療法学会。特別講演Ⅲ（東京市ケ谷。日本大学学士会館）昭和62年6月。歯科薬物療法 6: 253—265, 1987
 - 13) Kimoto, T. and Watanabe, T.: Antitumor effects of polysaccharides of human-type mycobacterium tuberculosis on collagenation in human cancer xenografts. *Acta Pathol. Jpn.* 37: 1743—1761, 1987
 - 14) Kimoto, T.: Pathological studies on three cases of cancer treated with polysaccharides from human-type mycobacterium tuberculosis. Antitumor activity through collagen fiber proliferation. *Acta Pathol. Jpn.* 37: 1919—1934, 1987
 - 15) Maruyama, C.: On the treatment of malignant tumors with an extract from tubercle bacilli (Maruyama vaccine) with the summary and some illustrations of the clinical results in 1965—1971. Institute of Vaccine Therapy for Tumors and Infections Diseases, pp. 1—68, Nippon Medical School, Tokyo, 1973
 - 16) Maruyama, C.: On the treatment of cancer patients with the extract from human type tubercle bacilli (SSM: Specific Substance Maruyama or Maruyama Vaccine)
 - 17) 岩城弘子，大竹 稔，飯田和美：丸山ワクチンを使用し長期生存（3年以上）した転移性肝癌60例について。日医大誌 49: 426—432, 1982
 - 18) 岩城弘子，大竹 稔，平井敏之：丸山ワクチンを使用し長期生存している転移性肝癌の追加例。66例の報告。延命条件の検討。日医大誌 51: 114—119, 1984
 - 19) Juva, K. and Prockop, D. J.: Modified procedure for the assay of ^3H -or C^{14} -labeled hydroxyproline. *Anal. Biochem.* 15: 77—83, 1966
 - 20) Murakami, T., Ohtani, O., Kikuta, A. and Ohtsuka, A.: Scanning electron microscopy of replicated blood vessels (A review of methods). *Electron Microscopy* 16: 11—18, 1981
 - 21) Seki, M.: Zur physikalischen Chemie der histologischen Färbung. I. *Fol. Anat. Jap.* 10: 621—634 1932
 - 22) 大倉卓治：構密度と染色性の関係のモデル実験。日組織記録 1: 3—11, 1950
 - 23) 田中 昇，時田尚志，岡本一義，上野哲夫，岡本嘉六：ヌードマウス移植ヒト子宮頸部類表皮癌を用いたがんの実験的治療モデル：人型結核菌体抽出物質 (SSM) の影響——とくに Mytomyacin などとの併用。癌の臨床 25: 1320—1325, 1979
 - 24) 田中 昇，時田尚志，木本 実，上野哲夫，岡本嘉六，蒔村真示：人癌治療を目的とした癌化学療法における複合療法に関する基礎的実験的研究：移植固型腫瘍に対するヒト型結核菌体抽出物質 (SSM) の影響。癌の臨 26: 469—478, 1980
 - 25) 森田 光，時田尚志，田中 昇，木本 実，有村慶子，上野哲夫，岡本嘉六，蒔村真示：固型腫瘍に対する化学療法の実験的研究。Lewis Lung Carcinoma に対して。癌と化療 8: 1216—1226, 1981
 - 26) Langness, U. and Udenfriend, S.: Collagen synthesis in nonfibroblastic cell lines. *Proc. natl. Acad. Sci. USA.* 71: 50—51, 1974
 - 27) 大久保茂樹：In vitro におけるヒト癌細胞と線維芽細胞の相互作用によるコラーゲン合成と増生。川崎医学会誌 11: 334—346, 1985