

人型結核菌体抽出多糖体成分の悪性黒色腫における cytotoxic effect と collagenation による増殖抑制に関する研究

木本 哲夫, 平尾 優子, 兵藤 文則, 西谷 耕二, 定平 吉都, 上平 賢三*

悪性黒色腫細胞の移植腫瘍に対する人型結核菌(青山株)より抽出した菌体多糖体成分(SSM)の抗腫瘍性を検討した。人由来株 G-361 を athymic mouse (Balb/c nu-nu) へ, マウス由来株 clone-M-3 及び B-16 は athymic mouse 及び thymic mouse (Balb/c 及び C57BL/6) へ移植し, xenografts 及び allogeneic grafts を作って SSM 0.5~100 μ g を, 隔日, 皮下及び腫瘍内へ注射した。いずれの細胞も著明な tumor angiogenesis がみられるが, 特に B-16 は著明であった。X 線解析で各細胞の (TAF) の一つとして知られている copper (ceruloplasmin) を調べたが陰性であった。athymic mouse に比し, 正常マウスの thymic mouse での collagen 産生は in vitro 及び in vivo でも著明で, 後者の方が collagenation と cicatrization による腫瘍の強い癒痕化を示した。高濃度 SSM (50~100 μ g) は著明な間質反応を誘起し, collagen としては, 移植1カ月では腫瘍内では, IV type, 本来の間質では III type が主体で, その他 mast cell, macrophage, fibroblast の著明な増殖がみられた, B-16 では好中球の走向がみられた。また, 高濃度 SSM (100~200 μ g) は悪性黒色腫に著明な cytotoxic effect を示した。したがって, 高濃度 SSM の腫瘍内注射では, cytotoxic effect による広汎な壊死を増強し, collagenation の促進とともに腫瘍増殖の抑制がみられた。悪性黒色腫細胞の移植実験では, athymic 及び thymic mouse への移植癌の間質反応の比較ができ, collagen 増殖による腫瘍「封じ込め」には, 正常な免疫基盤の重要性が示唆された。

(平成元年2月10日採用)

Antitumor Activities of Polysaccharides of Human Type Mycobacterium by Cytotoxic Effect and Collagenation on the Growth of Malignant Melanoma Grafts

Tetsuo Kimoto, Yuko Hirao, Fuminori Hyodoh, Koji Nishitani,
Yoshito Sadahira and Kenzo Uehira*

We studied the antitumor effects of polysaccharides (SSM: Specific Substance, Maruyama) extracted from human mycobacterium tuberculosis (Aoyama strain) on grafted malignant melanoma tumor cells. To prepare xenografts and allogeneic grafts, a human-derived cell line, G-361, was grafted onto athymic mice (Balb/c nu-nu), and two mouse-derived cell lines, clone-M-3 and B-16, were grafted onto athymic and thymic mice (Balb/c and C57BL/6), respectively. SSM

川崎医科大学 実験病理学
〒701-01 倉敷市松島577

* 同

組織電子顕微鏡センター

Department of Pathology, Kawasaki Medical School:
577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-01 Japan

Tissue, Electron Microscope Research Center

0.5—100 μg was injected either subcutaneously or into tumors every other day. Although all the cell lines exhibited a notable tumor angiogenesis, it was especially conspicuous in B-16.

An X-ray analysis of each cell line for copper (ceruloplasmin), which is a well-known TAF, yielded negative results. Collagen production in normal thymic mice was conspicuous both in vitro and in vivo in the thymic mice when compared to the athymic mice, and collagenation and intense cicatrization were also observed. Fifty to one hundred micrograms of SSM induced a noticeable interstitial reaction. One month after grafting, type IV collagen was found mainly in the tumors and type III collagen in the original interstitium. Mast cells, macrophages, and fibroblasts had greatly increased in number, and migration of neutrophils was observed in B-16.

In contrast, SSM 100—200 μg had a marked cytotoxic effect on malignant melanomas. Injection of high doses of SSM into tumors promoted extensive necrosis and inhibited tumor growth. By grafting malignant melanoma cells onto athymic and thymic mice, we were able to compare the interstitial reactions following growth of the malignant tumors. The tumor confinement induced by collagen proliferation suggests the importance of a normal immunological foundation. (Accepted on February 10, 1989) *Kawasaki Igakkaishi* 15(2): 217—241, 1989

Key Words ① Human mycobacterium tuberculosis ② Melanoma cell
③ Angiogenesis ④ Cytocidal effect ⑤ Collagenation

はじめに

1960年, Mathéら^{1),2)}は牛型結核菌 BCG で1例の子供の急性リンパ性白血病患者の治験例を報告し, BCG の癌治療が世の注目を引くようになった. その後 Bluming ら³⁾も悪性黒色腫に著効を奏したことを報告した. しかし, その後の続報に接しない. 本邦でも, 山村ら⁴⁾は BCG-cws (牛型結核菌の細胞壁基本成分)で悪性黒色腫及び癌性胸膜炎の治験例を報告し, ここではじめて, かつては一顧だにされなかった結核菌による癌の非特異的免疫療法が注目され, 結核と癌発生の因果関係に着目した人型結核菌体抽出物質⁵⁾ (SSM: Specific Substance, Maruyama) は新たな脚光をあびはじめ, 今日に至っている.

著者はこの SSM の癌に対する作用機序について病理学的な見解と知見^{6)~14)}を発表してきたが, 悪性黒色腫にも腫瘍増殖抑制を有することが認められ, この作用機序について, 人由来

の培養悪性黒色腫細胞及びマウス由来の悪性黒色腫細胞のヌードマウス及び正常マウスへの移植腫瘍における SSM の抗癌作用を検討したので報告する.

実験材料と方法

細胞株:

人由来悪性黒色腫として G-361, マウス由来細胞として clone-M-3, B-16 細胞株を用いた. cell lines は大日本製薬より購入した. G-361 はあらかじめ 3×10^7 細胞を皮下移植し, 着床腫瘍を再培養した TRG 361 を用いた. Athymic nude mouse (Balb/c nu-nu) 及び thymic mouse Balb/c と C57BL/6 マウスへの悪性黒色腫細胞の移植を行った.

clone-M-3 及び B-16 は $2.5 \sim 6 \times 10^6$ で, TRG 361 は 10^7 cells でマウスに 100% 着床腫大し, allogenic grafts 及び xenografts を作製することができた. したがって, 免疫不全

動物と健康動物での間質反応を比較検討することができた。腫瘍はすべてパラフィン切片で、H-E, Mallory 染色, pap 銀染色を施した。

SSM 注射:

SSM 0.5 μg , 1.0 μg , 50.0 μg , 100.0 μg を、細胞移植と同時にまたは5~15日後に、皮下(S. C.) または腫瘍内(I. T.) に隔日注射した。

実験動物:

athymic mouse としては Balb/c nu-nu 雌雄, thymic mouse は Balb/c nu/(+) 及び C57BL/6 雌雄を用い, athymic mouse は可及的感染防止につとめ, ATC L-4 Clean Rack 4m³/min \times 0.3 μg 99.97% D.O.P. Ac 100V 50/60 Hz (日本クレア株式会社) を使用して飼育した。

合成樹脂血管内注入による腫瘍の血管構築: 前報¹⁴⁾ のように、合成樹脂を左心室より注入した。

悪性黒色腫細胞内の銅局在の組織学的 X 線分析

悪性黒色腫, 特に B-16 は肺転移を起しやすいうことで知られている。B-16 をはじめ clone-M-3 は今日まで報告した癌細胞より更に angiogenesis が著明であったので, angiogenesis 誘発物質 (tumor angiogenesis factor: TAF) として知られている copper (celuoplasmin) の存在の有無について組織学的 X 線分析を試みた。細胞内の銅流出の可及的防止のため, 次の3方法を試みた。

I. 走査電顕での X 線分析:

細胞 (clone-M-3, TRG 361) を 2.5% glutaraldehyde (G. A) で固定後, phosphate buffered saline (PBS) で洗い, 以下の処理を行った。

- 1) 1% 四酸化オスミウムで後固定
- 2) アルコール脱水
- 3) 臨界点乾燥
- 4) カーボン蒸着
- 5) X線分析

II. 透過電顕での X 線分析:

細胞のペレットを 2.5% G. A で固定後, PBS で洗浄後, 次の処理を行った。

- 1) 1% 四酸化オスミウムで後固定
- 2) アルコール脱水
- 3) エポキシ樹脂に包埋
- 4) 0.2 μg 切片を分析

III. 細胞を PBS で洗浄した後自然乾燥, カーボン蒸着してから分析:

TRG361 mesh CPD は細胞をニッケル mesh に培養し, 後処理は (I) の方法で行った。またプラスチック CPD は細胞をプラスチック板上で培養し, 後は方法 (I) による。

プラスチック自然乾燥の場合は細胞をプラスチック上で培養し, 後は方法 (III) による。

plating efficiency による SSM の cytotoxicity:

TRG361, B-16, SSM 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の実験では MEM, clone-M-3 では DMEM へそれぞれ 10% FCS を添加培養し, SSM 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈調整した。

colony formation assay:

30~60 mm dish を用い 5% CO₂, 37°C, 7日間培養後, コロニー数を計算し, cloning efficiency は無処理対照群を 100% として換算した。

collagen type の組織化学的同定

indirect-immuno-peroxidase method:

10%ホルマリン固定, パラフィン切片 (4 μm) を用いた。

脱パラ後, 内因性 peroxidase 除去のため 0.3% H₂O₂ 含有 methanol で処理した。PBS (pH 7.4) で洗い, 0.5% トリプシン (PBS 溶液) で処理した。PBS で洗った後, non-specific binding を防ぐため正常羊血清で 30分間 incubation した。次いで, 次の一次抗体を 60分作用させた。

1. fibronectin (PAESEL GmbH) 同定には, 抗ヒト fibronectin ウサギ抗体 (affinity

purified)

2. collagen type I の同定には, ウシ真皮由来 collagen type I-ウサギ抗体 (Advance 社)

3. collagen type III の同定には, ウシ真皮由来 collagen type III-ウサギ抗体 (Advance 社)

4. collagen type IV の同定には, 抗ヒト placenta collagen IV ウサギ抗体 (Medac Gesellschaft; FRG)

5. Laminin 同定には, 抗マウス EHS 由来 ラミニン-ウサギ抗体 (affinity purified) (重井医学研究所山田博士より恵与) をそれぞれ使用した。

処理後 PBS で洗い, 二次抗体: (peroxidase conjugated affinity purified goat anti-Rabbit IgG; Cappel, PA, USA) を作用させた。

さらに PBS で洗い, 0.2 mg/ml 濃度の 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride と 0.005% H_2O_2 を PBS 中で反応発色させた。

ヘマトキシリンで核染した。

fibroblast と悪性黒色腫細胞の in vitro co-culture による collagen fiber 産生

前報^{14), 15)} と同じく, 60 mm dish に thymic mouse (Balb/c) fibroblast, 及び athymic mouse Balb/c nu-nu embryo fibroblasts をまき, clone-M-3 と co-culture した。その方法は前回と同じである。3~4 w 後 pap 銀染色を施し, collagen fiber production の有無を形態学的に観察した。

実験結果

thymic mouse, athymic mouse における悪性黒色腫増殖に及ぼす SSM の作用

clone-M-3 grafts 実験群

thymic mouse (Balb/c nu/(+)) (80頭) と athymic mouse (Balb/c nu-nu) (80頭) の grafts について観察した。いずれのマウスにも生着し著明な増殖をしたので免疫基盤を考慮に入れて比較検討できた。

thymic mouse grafts について:

clone 1×10^7 移植で50日まで腫瘍増大 (40×40 mm) するが SSM $50 \mu\text{g}$ S. C. の場合, 移植と同時にまたは10日以内に注射する場合と, 移植後25日で開始する場合と差がみられるが, 早期注射では腫瘍は増大しながら著明な cell death と cicatrization を来し, 80日以後で増殖を停止するか癒痕化へ向かった (Figs. 1 a, b, c, 2)。特に, SSM $50 \mu\text{g}$ I. T. 注射では腫瘍の癒痕



Fig. 1. Effect of injection of SSM on inhibition of tumor proliferation in clone-M-3 cell (6×10^6 and 10^7) grafts.

- a. Transplanted Balb/c 440-1 δ . 10^7 cells. SSM $0.5 \mu\text{g}$ was injected S. C. every other day for 107 days. The grafts grew, but were cicatrized.
- b. Balb/c 334-1 η . The tumor underwent necrotic ulceration, was cicatrized and dropped off after SSM $100 \mu\text{g}$ was injected S. C. every other day for 76 days.
- c. Nude 117-5 η , SSM $100 \mu\text{g}$ was injected S. C. every other day for 61 days after transplantation of clone-M-3 cells (6×10^6). The tumor grew and finally caused remarkable cicatrization.

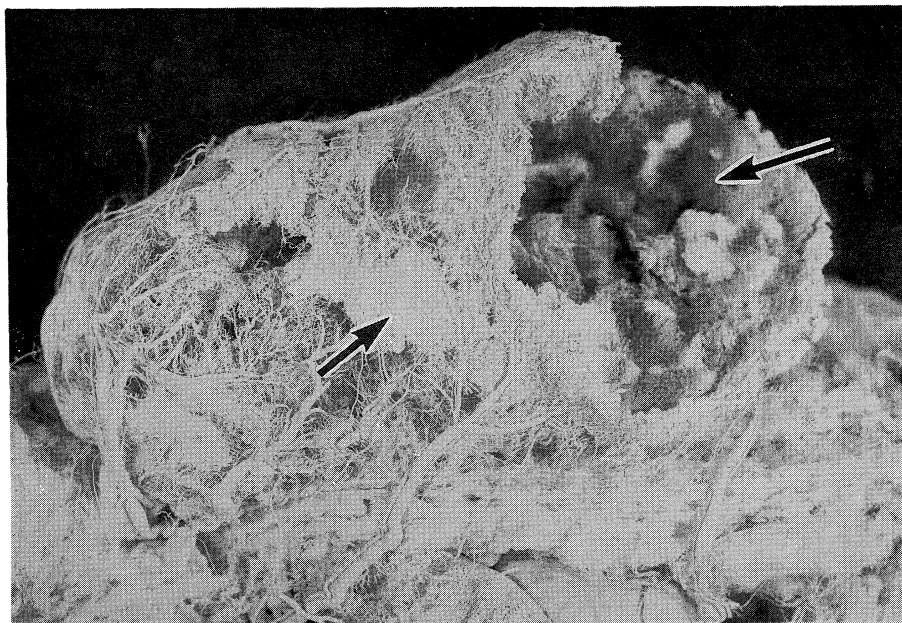


Fig. 2. Balb/c 673-1 ♂. 10^7 clone-M-3 cells was transplanted.

The mice were sacrificed 44 days after injection of SSM $100 \mu\text{g}$. Synthetic resin was infused from the left side of the heart. The tumor proliferated in close association with the formation of new capillaries. The arrow indicates the region of the tumor that dropped off due to necrosis.

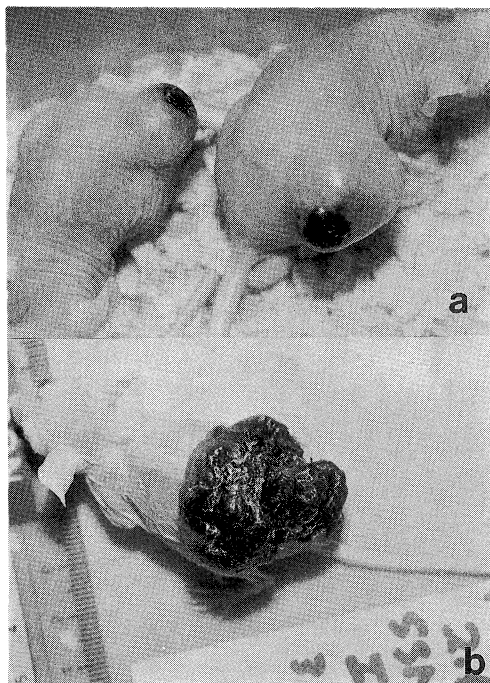


Fig. 3. Nude mice with a transplanted B-16 melanoma.

- a.** Nude 520-1 ♂.
 5×10^6 cells were transplanted for 22 days. Untreated control.
- b.** Nude 478-1 ♂.
 2.5×10^6 cells were transplanted. SSM $100 \mu\text{g}$ was injected I. T. every other day for 77 days. The tumor caused remarkable cicatrization.

化, cicatrization または脱落がみられた。ただし, SSM 1.0 μg S. C. の場合, 移植と同時に開始したものは50日経て cicatrization の促進がみられ, 150日以後腫瘍の癒痕化がみられた。

これに反して, thymic mouse 無注射対照群 (20頭) では 10^7 移植で100日で $40\sim 50\times 50$ mm に増殖し癒痕化の傾向はみられなかった。

athymic mouse grafts では無処理対照群 (20頭) では 10^7 移植で40日で 35×30 mm に腫大し自然治癒の傾向は全くみられなかった。

これに反して, SSM 50~100 μg 10^7 移植と同時に I. T. 注射 (15頭) または S. C. 注射 (15頭) は, 腫瘍の増殖抑制がみられ cicatrization を来し癒痕化へ進行した。SSM 1.0 μg (30頭) でも移植後10日以内に注射開始した場合腫瘍の癒痕化がみられ, 特に I. T. の場合著明であった。

B-16 graft 実験群

thymic mouse (C57 black/6 nu/(+)) について:

B-16(2×10^7) 移植の場合, 腫瘍は著明な増

大を来し, 40日で 40×30 mm に増大, 無処理対照群 (15頭) では全く治癒傾向はみられなかった (Fig. 3a)。SSM 1.0 $\mu\text{g}\sim 50$ μg S. C. 注射 (30頭) も, 10日以後開始では著効がないが, I. T. 注射 (10頭) では cell death による necrosis が強く, 嚢胞形成と増殖の抑制がみられた (Fig. 3b)。

移植数を $2.5\sim 5\times 10^6$ に減らして grafts を作り, 移植と同時に注射した場合, SSM 1.0 μg S. C. (10頭), I. T. (10頭) 注射で長期間生存のものみに増殖抑制がみられたが, 著効がなかった。SSM 50 μg I. T. (10頭) 注射を移植と同時に開始した場合, 増殖の抑制がみられ, 30日で 20×15 mm 程度のものが多かった。

athymic mouse (Balb/c nu-nu) について:

B-16 (2.5×10^6) 移植で, SSM 1.0 μg S. C. (10頭) 注射では著効がなかったが, 早期 I. T. 注射 (10頭) では60日以後癒痕化が急速化した。

他方, SSM 50 μg S. C. 注射 (10頭) では腫瘍は40日目まで増大する (45×40 mm) が, 70日以後急速に癒痕化が高率にみられた。特に, I. T. 注射 (10頭) では60日以後高率かつ急速

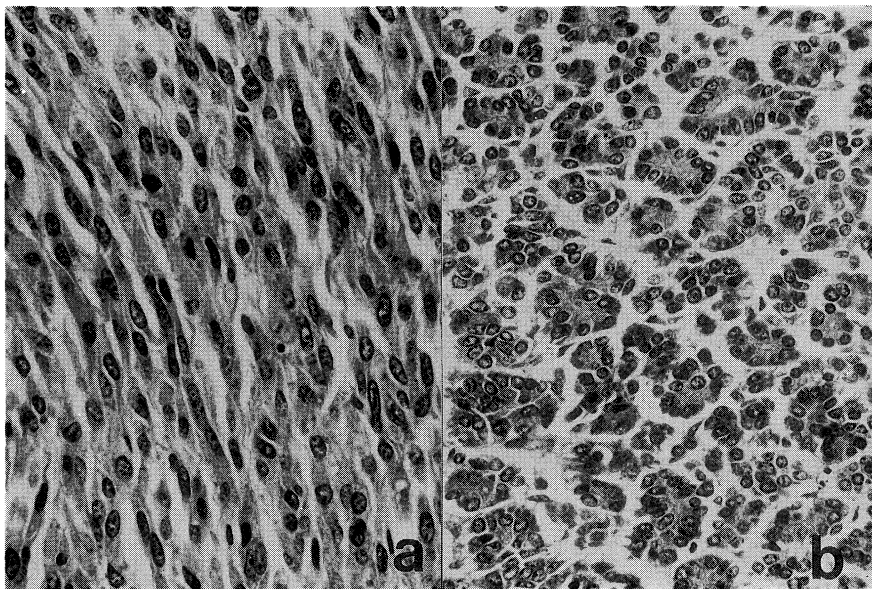


Fig. 4. Two cellular morphologies of the clone-M-3-transplanted tumor.

a. Fusiform pattern (fibrous). H. E. stain, $\times 200$.

b. Adenomatous pattern (epithelial cellular). H. E. stain, $\times 200$.

に癩痕化を来した (20~30×25 mm).

無処理対照群では、 2.5×10^6 grafts (30頭)、 5×10^6 grafts (30頭) では腫瘍は増大かつ深組織に浸潤、50日で40×40 mmに達し、spontaneous cell deathと表在性の潰瘍がみられるが、SSM注射群に比して軽度であった。

SSM注射はgrafts作製後同時注射のものに著効があり、SSM 50 μ g S.C.注射 (10頭)、I. T.注射 (10頭)でも、増大と同時に70日以後から徐々に癩痕化とcicatrizationが進んだ。SSM 1.0 μ g S.C. または I. T. 注射 (10頭)の場合も、同時注射のものは60日以後癩痕化と増殖抑制がみられた。

B-16移植実験で、thymic, athymic mouseともに40日まで腫瘍の増大がみられるが、70日以後では著明なcicatrizationが進み、特に、50~100 μ g腫瘍内注射群では著効がみられた。

TRG 361 grafts 実験群

10^7 移植で、対照群(40頭)では70日位で30×30 mmに達し、自然治癒の傾向はみられなかった。

10^7 移植後5日以内に50 μ g S.C.注射 (20頭)では、腫瘍の硬度を増し顆粒状となった。移植と同時にSSM 50~100 μ g (20頭)を注射したものは、50日以後増殖は停止し、80日以後10~28×20 mmで次第に癩痕化へ進んだ。SSM 1.0 μ g注射 (40頭)は、50~100 μ gに比してcicatrizationの進行も遅れたが、延命効果は対照群に比して2~3倍延長した。

clone-M-3 allogenic grafts の組織所見：

$2.5 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ cells 皮下移植で100%生着し3カ月に腫瘍は鶏卵大に達した。組織学的に細胞形態に2種類が認められた。一つは紡錘状の線維型の悪性黒色腫細胞 (fibroblastic type) (Fig. 4a)で、今一つは線腫状で腺管構造または偽ロゼットを形成している上皮様またはadenoma-like type (Fig. 4b)のもので、後者では間質反応は移植初期では極めて弱く、髄様でコラーゲン増殖はほとんどみられないが、前者では癌細胞移植時にみられたようなMallory染色陽性のcollagen fiberは少ないが、繊細なpap銀染色陽性コラーゲン

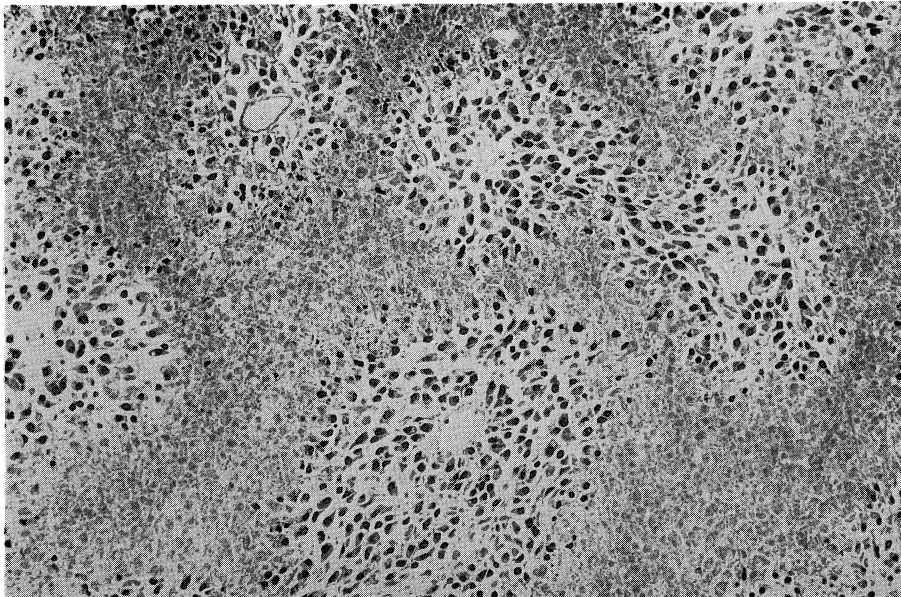


Fig. 5. Nude 223-2 ♀.

Clone-M-3 (6×10^6)-transplanted tumor. Untreated control mouse at 41 days. Tumor cells proliferated in association with new capillaries, but its natural cell death was remarkable. H. E. stain, $\times 200$.

(reticular fibers) が移植後5日ぐらいより中程度にみられた. collagen IV type に一致した.

悪性黒色腫細胞移植巣では特に angiogenesis が著明で, 腫瘍はそれぞれ新生血管を腫瘍巢中

心に擁して増殖し, 小葉状増殖を行い, 小葉周辺部はやがて腫瘍細胞の増殖に伴う血管構築の改築による著明な循環障害を招来し, 著明な変性壊死におちいった (Fig. 5). 移植後1週間ぐらいで間質構築は完成するが, 今まで報告し

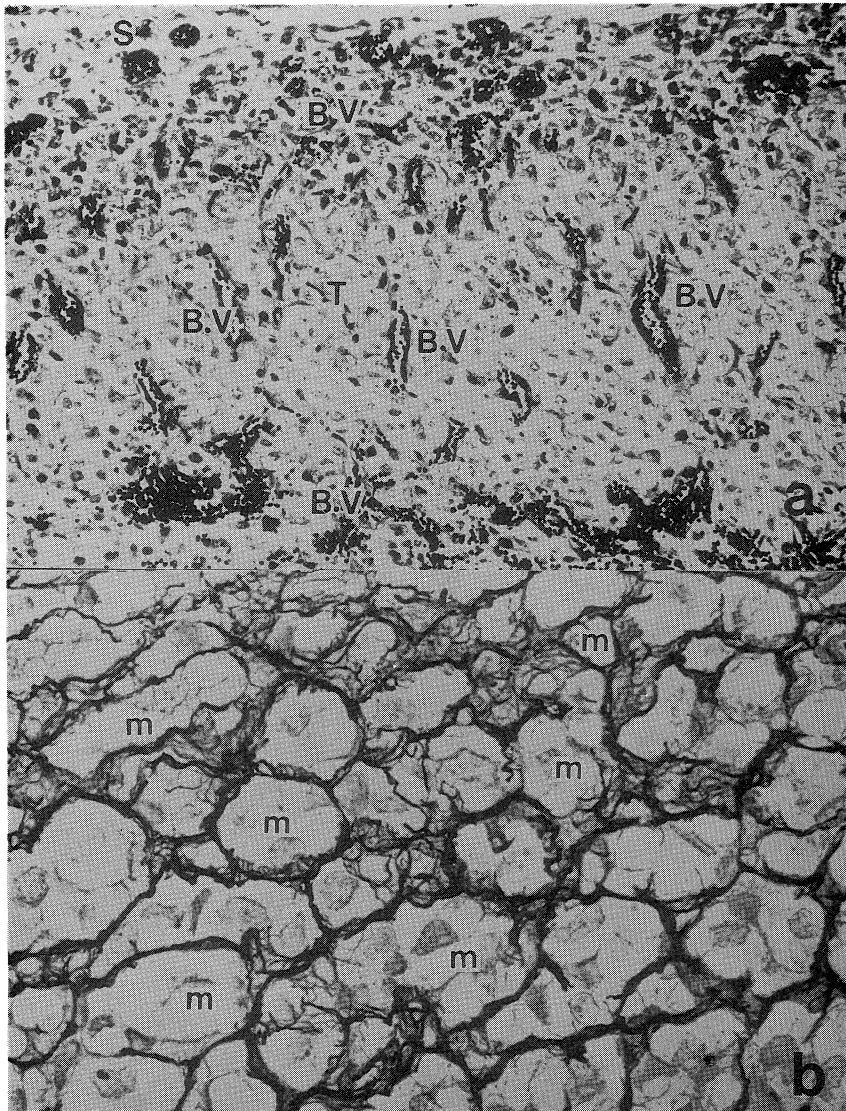


Fig. 6. Nude 428-3 ♂. Untreated control.

- a. Sacrificed 12 days after clone-M-3 (10^7) transplantation. Angiogenesis (B.V) was remarkable at the periphery and inside the tumor. Mallory impregnation, $\times 200$.
- b. Nude 336-5 ♂. Sacrificed 7 days after clone-M-3 (10^7) transplantation. The structure of the reticular fibers in the tumor was already completed, surrounding intermixing with tumor cells (m). Collagen IV type. Pap silver impregnation, $\times 400$.

た癌細胞移植の場合に比較して Mallory 染色陽性の collagen 増殖は弱いが、移植後5日で angiogenesis に端を発する血管中心性の繊細な鍍銀線維の増殖がびまん性に見られる。この場合、腫瘍巣では collagen IV type が網目状に増殖伸展 (Fig. 6 a, b) し、次いで fibronectin が確認され、本来の間質には collagen III type, 次いで I type が分布し、40日以後 SSM 処理期間が長引くにつれてこれらの collagen の増殖も著明になった。

移植3日目には本来の間質にマクロファージ、多核白血球が一過性に出現した。腫瘍は増大しながら SSM 無処理の対照マウスでも改築現象に伴う著明な自然壊死を伴った。

SSM 処理は、高濃度 (50~100 μg) のものほど collagenation を促進し、特に腫瘍内注射が効果的であったが、皮下注射 (1.0~100 μg) でも長期間の使用の場合は有効であった。SSM による *in vitro* での高濃度処理の場合 cytotoxic effect がみられるので、腫瘍内注射による cytotoxic effect も考えられるが、自然壊死との鑑別は困難であった。しかし、SSM 注射により40日頃より著明な reticular fiber の増殖が徐々に進み、cicatrization が著明に促進した。特に、thymic mouse での SSM 注射は collagenation の促進が著明で、SSM 0.5 μg 皮下注射でも、athymic mouse よりも著明な

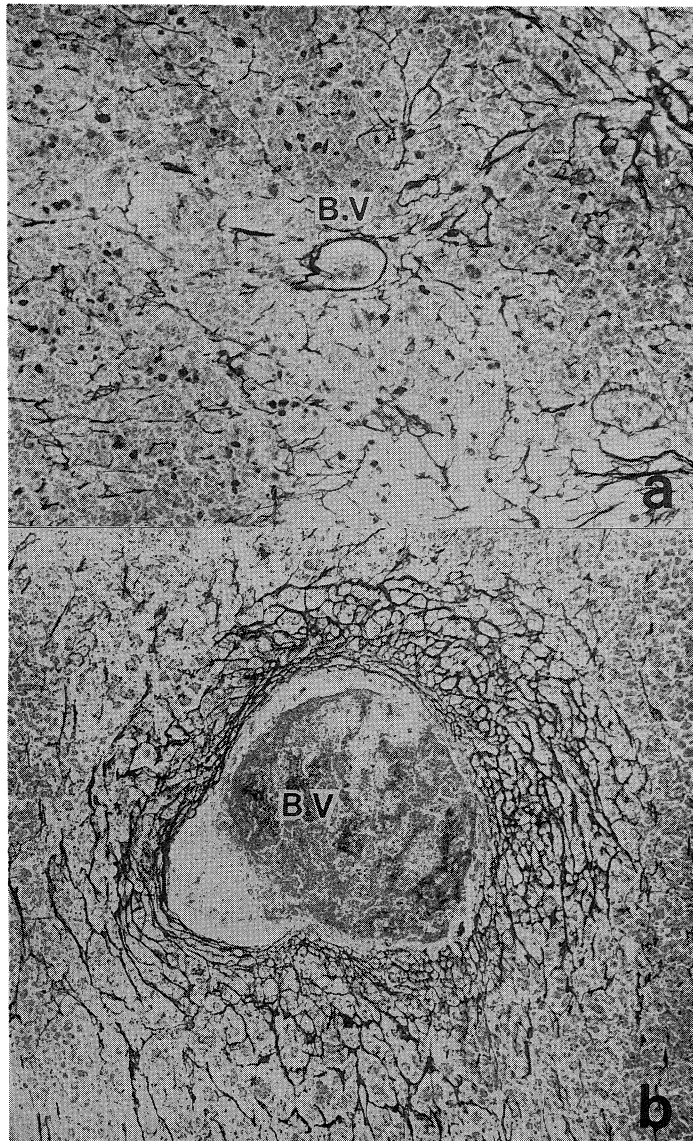


Fig. 7.

- a. Balb/c nu/+ 421-4 ♂.
Clone-M-3 (2×10^7)-transplanted at 140 days. Untreated control.
The tumor proliferated, centering on the blood vessels (B. V), caused necrosis and exhibited residual argyrophilic collagen fibers. Pap silver impregnation, $\times 200$.
- b. Balb/c 408-1 ♂.
Clone-M-3 (10^7) was transplanted, and, concurrently, SSM 0.5 μg injected S. C. every other day for 40 days. Remarkable proliferation of argyrophilic fibers was observed at the periphery of the blood vessels remaining in the tumor necrotic lesion. (One of the centers of collagen proliferation or reproduction.) Pap silver impregnation, $\times 200$.

collagenation の促進と延命がみられた。腫瘍は壊死、及び collagenation の促進で cicatrization を起こした (Figs. 7~9)。この cicatrization を起こした壊死巣には、著明な血管由来の collagen と変性壊死におちいった悪性黒色腫細胞が残存している (Fig. 9)。SSM 無処理の場合は、移植後90日でも collagen 増殖は極めて弱かった。

B-16 allografts の組織所見:

athymic 及び thymic mouse (C57BL/6 を問わず、angiogenesis は、三者のうちの最も著明で (Fig. 10)、転移傾向の強い腫瘍であることを物語っている。新生血管を中心とした collagenation 及び本来の間質からの collagen 増殖も30日以内ではなお弱い、移植後20日で間質は二重間質層を形成し (Fig. 11)、SSM 0.5~2 μg 注射でも fibroblast の著明な増殖が促進された。clone-M-3 の移植と同じ

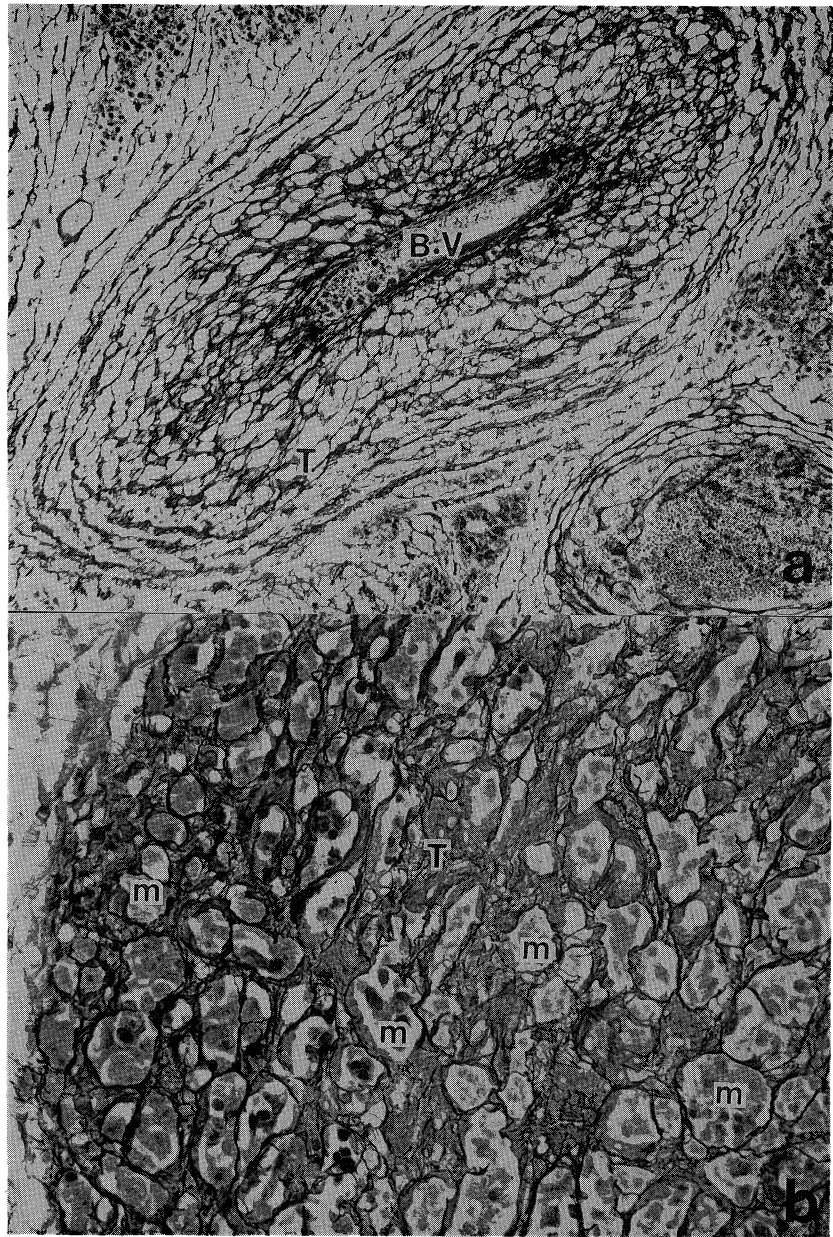


Fig. 8.

a. Balb/c nu/+ 422-3 ♂.

Clone-M-3 (10^7) was transplanted, and concurrently, SSM 0.5 μg was injected S. C. every other day for 53 days. Collagen proliferation, centering on the blood vessels (B. V), accelerated and cicatrization of the tumor advanced.

b. Balb/c nu/+ 334-1 ♂.

Clone-M-3 (10^7) was transplanted, and concurrently, SSM 100 μg was injected I. T. every other day for 148 days. Melanoma cells (m) were contained due to the remarkable proliferation of reticular fibers in the tumor. Pap silver impregnation, $\times 200$.

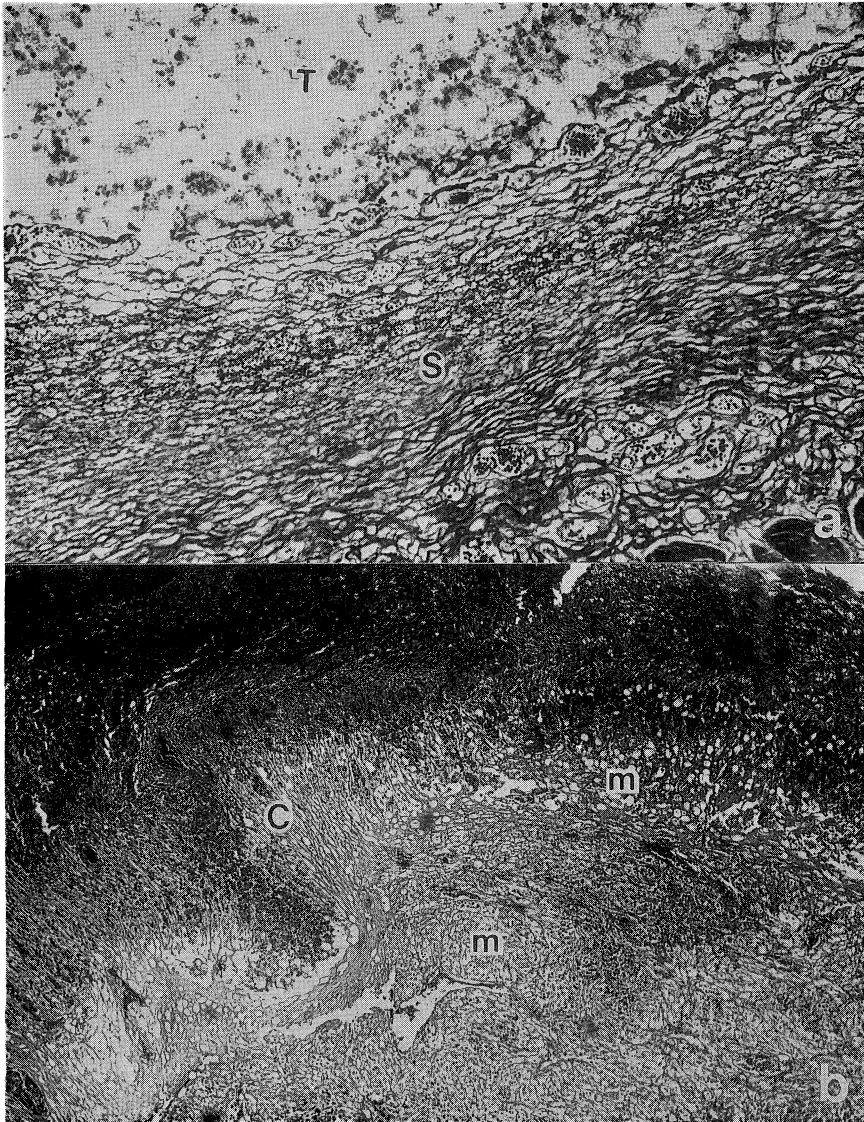


Fig. 9.

- a. Balb/c nu/+ 425-5 ♂.
Clone-M-3 (10^7) was transplanted, and concurrently, SSM $50 \mu\text{g}$ was injected I. T. every other day for 162 days. The tumor was cicatrized and healed. Tumor cells (T) were contained due to the remarkable collagenation of the interstitium, which caused degenerative necrosis. Pap silver impregnation, $\times 200$.
- b. Balb/c nu/+ 440-6 ♂.
Clone-M-3 (10^7) was transplanted, and concurrently, SSM $0.5 \mu\text{g}$ was injected S. C. every other day for 229 days. The tumor caused cicatrization due to remarkable collagenation, and healed with cicatrization. Melanoma cells (m) were contained due to the proliferation of collagens and disappeared after undergoing vacuolation and necrosis. Pap silver impregnation, $\times 40$.

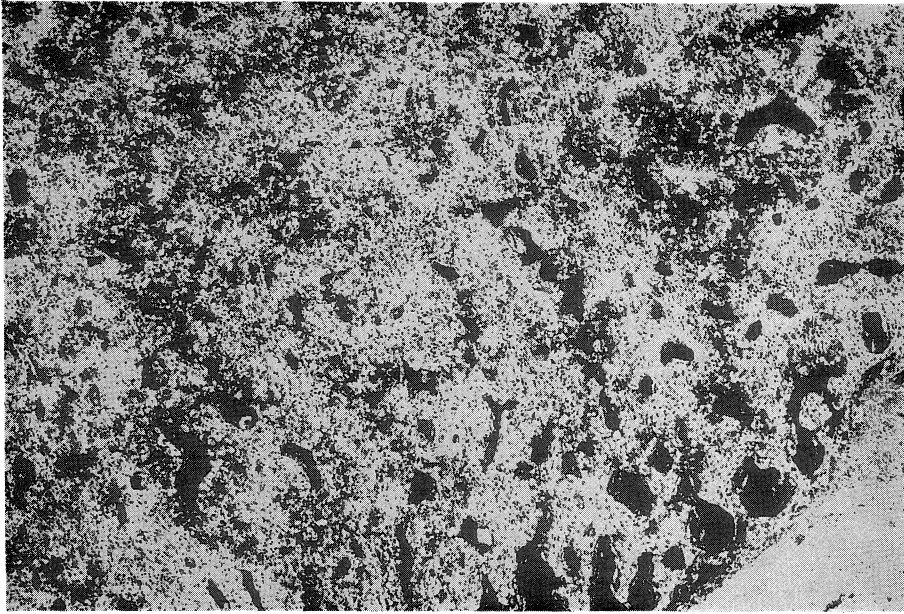


Fig. 10. Nude 476-2 ♂.

B-16 (5×10^6) was transplanted, and concurrently, SSM $0.5 \mu\text{g}$ was injected I. T. every other day for 21 days. There was remarkable angiogenesis. Mallory impregnation, $\times 100$.

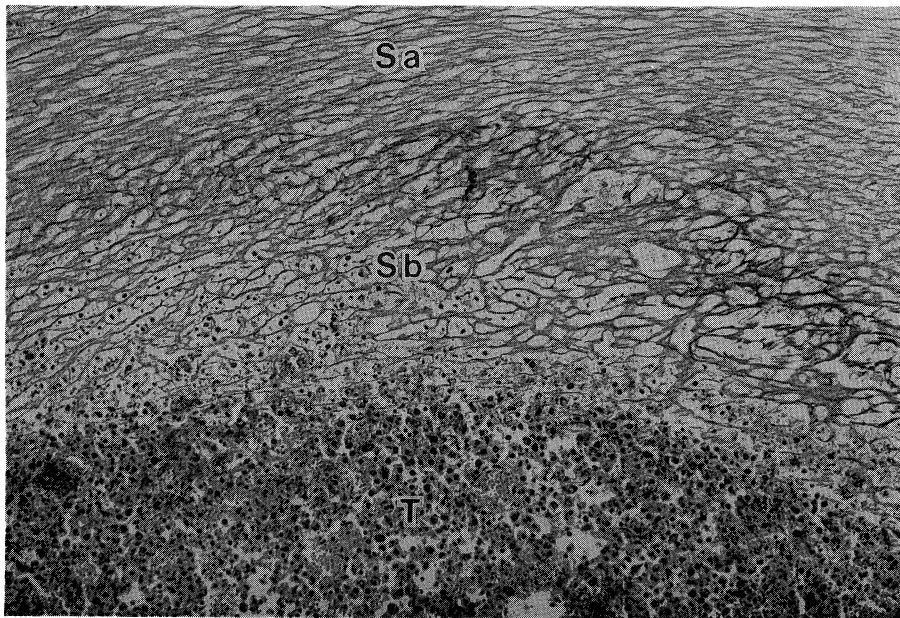


Fig. 11. Nude 450-1 ♂.

B-16 (5×10^8) was transplanted, and concurrently, SSM $0.5 \mu\text{g}$ was injected I. T. every other day for 29 days. The interstitium had a double structure: a new stromal layer mainly composed of the original interstitial proliferation (Sa) and newly generated capillary vessels in the layer in contact with the tumor. Pap silver impregnation, $\times 200$.

く延命とともに腫瘍内でも網目状に pap 銀染色陽性の reticular fibers の増殖がみられる (collagen type IV). 重要なことは、間質の二重層構築で、特に移植腫瘍と間質境界の内層で

は、著明な多核白血球の走向と集積が、移植後30日位にみられた (Fig. 12a).

SSM 注射により、無処理の対照群に比し、これらの間質反応は著しく促進し reticular

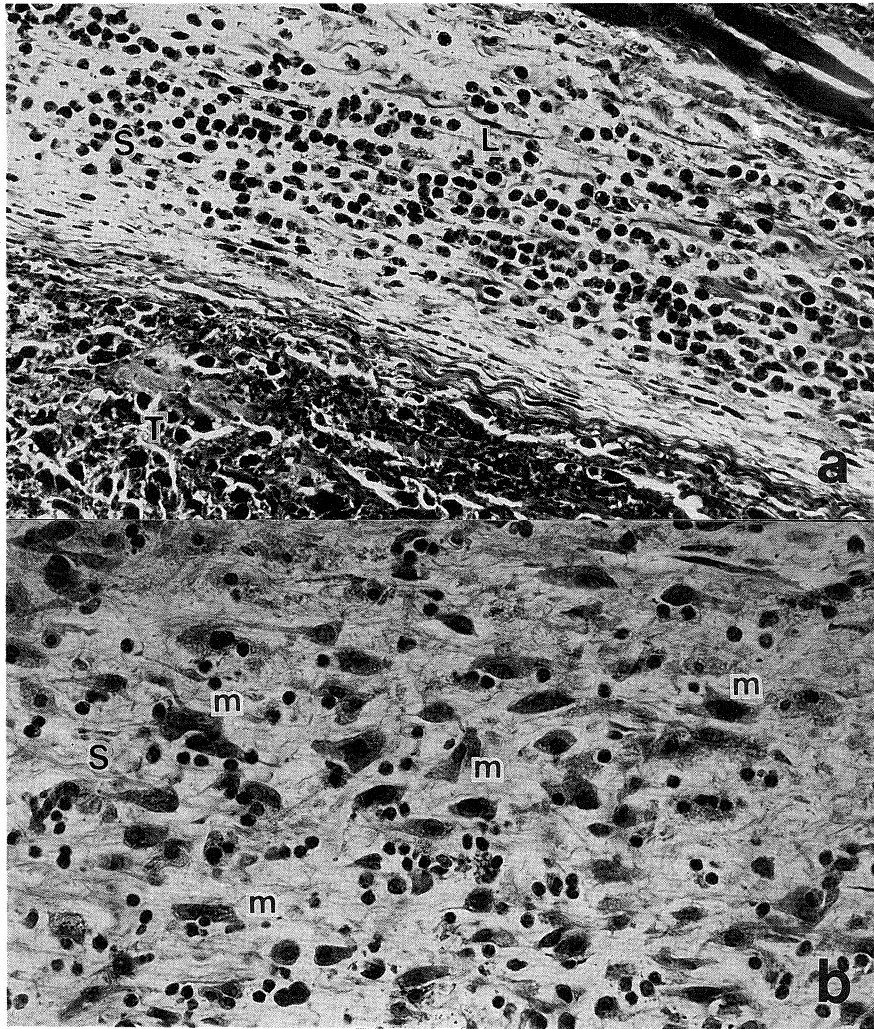


Fig. 12. Remarkable interstitial reaction in a tumor transplanted onto athymic mice.

a. Nude 474-1 ♂.

B-16 (2.5×10^8) was transplanted, and concurrently, SSM $1.0 \mu\text{g}$ was injected. S. C. every other day for 16 days. There was remarkable migration of neutrophils into the interstitium. Mallory impregnation, $\times 200$.

b. Nude 450-2 ♂.

B-16 (5×10^8) was transplanted, and concurrently, SSM $100 \mu\text{g}$ was injected S. C. for 39 days. Remarkable macrophage (m) proliferation can be seen in progress: in the interstitium, collagen proliferation and lymphocyte infiltration can be observed. Mallory impregnation, $\times 200$.

fiber の増殖は著明で、血管周囲の collagen fiber は、腫瘍増殖巣周辺部の壊死巣に伸展し、修復機転がみられた (Fig. 13). 経時的に collagenation は間質型の collagen III type

も著明となり、びまん性に増殖した. SSM 50~100 μg の腫瘍内注射ではこれらの所見のほかに、30~40日でマクロファージの増殖も著明で、これに比例して collagenation も腫瘍巣



Fig. 13. Remarkable interstitial reaction caused by SSM in a tumor transplanted into a thymic mouse.

a. C 57 BL 617-1 δ .

SSM 0.5 μg was injected S. C. every other day for 21 days from 3 days after transplantation of B-16 (3×10^6). There was remarkable proliferation (S) of interstitial collagen at the periphery of the transplanted tumor (T). Mallory impregnation, $\times 100$.

b. Magnification of the topical region.

Proliferation of fibroblasts and collagen was accompanied by remarkable macrophage proliferation at the periphery of the tumor (T). Mallory impregnation, $\times 200$.

境界部で著明で、次いで腫瘍巢内に侵入増殖した (Figs. 12b, 13).

B-16 腫瘍細胞の増殖は極めて速いが、高濃度 SSM の腫瘍内注射で cytotoxic effect も

加わり、壊死の増大とともにこれらの間質反応のために collagenation も促進され、注射後 50日位から腫瘍増殖の抑制がみられ、潰瘍形成に伴い cicatrization を来した。この場合も

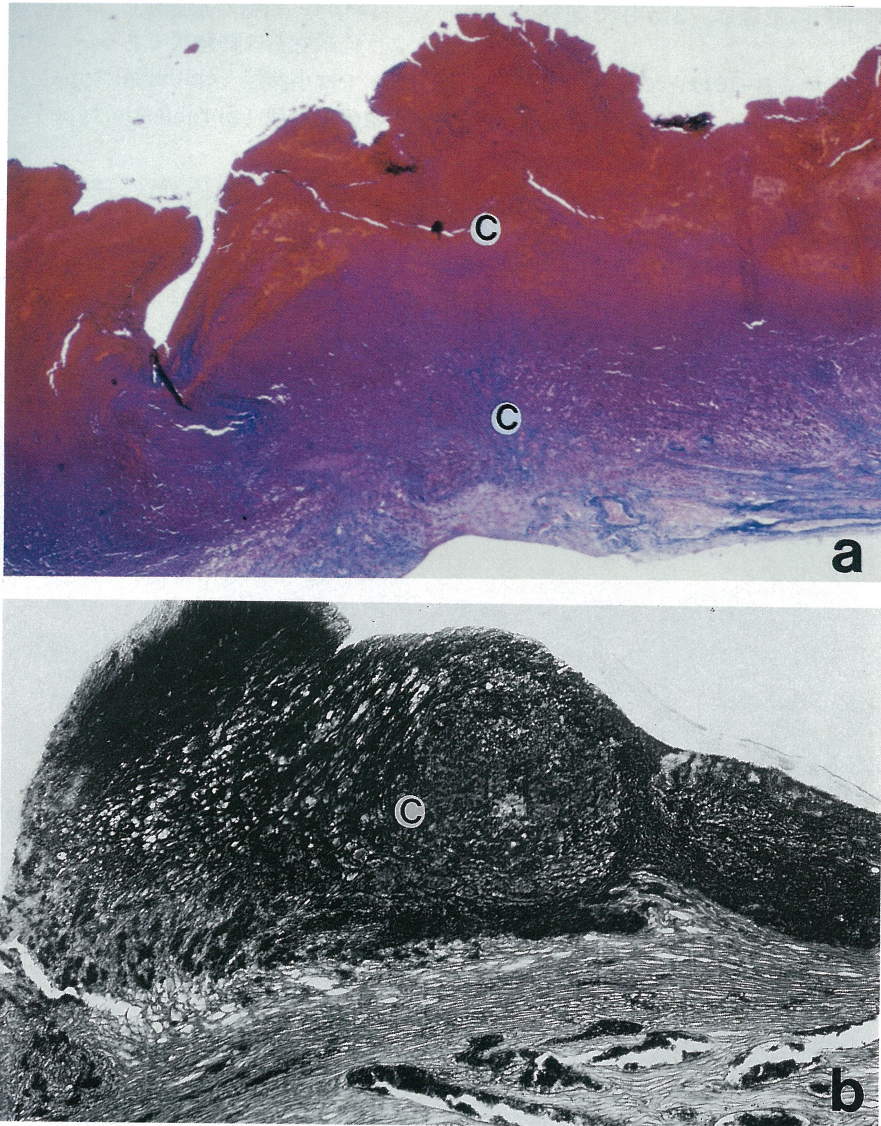


Fig. 14. Cicatrization caused by SSM injection.

a. Nude 457-4 ♀.

B-16 (5×10^6) was transplanted, and concurrently, SSM $1.0 \mu\text{g}$ was injected I. T. for 48 days. The tumor healed with cicatrization. Old cicatrization (red) and new collagenation (blue) were observed. Mallory impregnation, $\times 40$.

b. Nude 462-3 ♂.

B-16 (5×10^6) was transplanted, and concurrently, SSM $100 \mu\text{g}$ was injected S. C. every other day for 55 days. Tumor cells, which caused vacuolation and necrosis, were observed between remarkable tumor cicatrization (c) and collagen proliferation. Remarkable collagen proliferation and necrotic tumor cells were also observed in the interstitium (b). Pap silver impregnation, $\times 400$.

nude mouse (Fig. 14a, b) よりも thymic mouse で collagenation は顕著であった。

TRG361 xenografts の組織所見:

ヒト由来であるが、 1×10^7 個の移植で 100% nude mouse に生着し、3カ月で鶏卵大に達した。

angiogenesis も B-16 ほどではないが clone-M-3 と同程度にみられ、腫瘍の増大も比較的速

い。collagen は血管中心性でリボン状の増殖が最初にみられるが、この部分を中心に SSM 注射により collagen 増殖は促進してくる (Fig. 15a)。

TRG361 細胞の形態像は clone-M-3 と同じように細胞質は紡錘状であるが、増殖パターンとしては小葉性 (epithelial type) (Fig. 15a) と線維細胞型 (fibroblastic type) の2種のパ

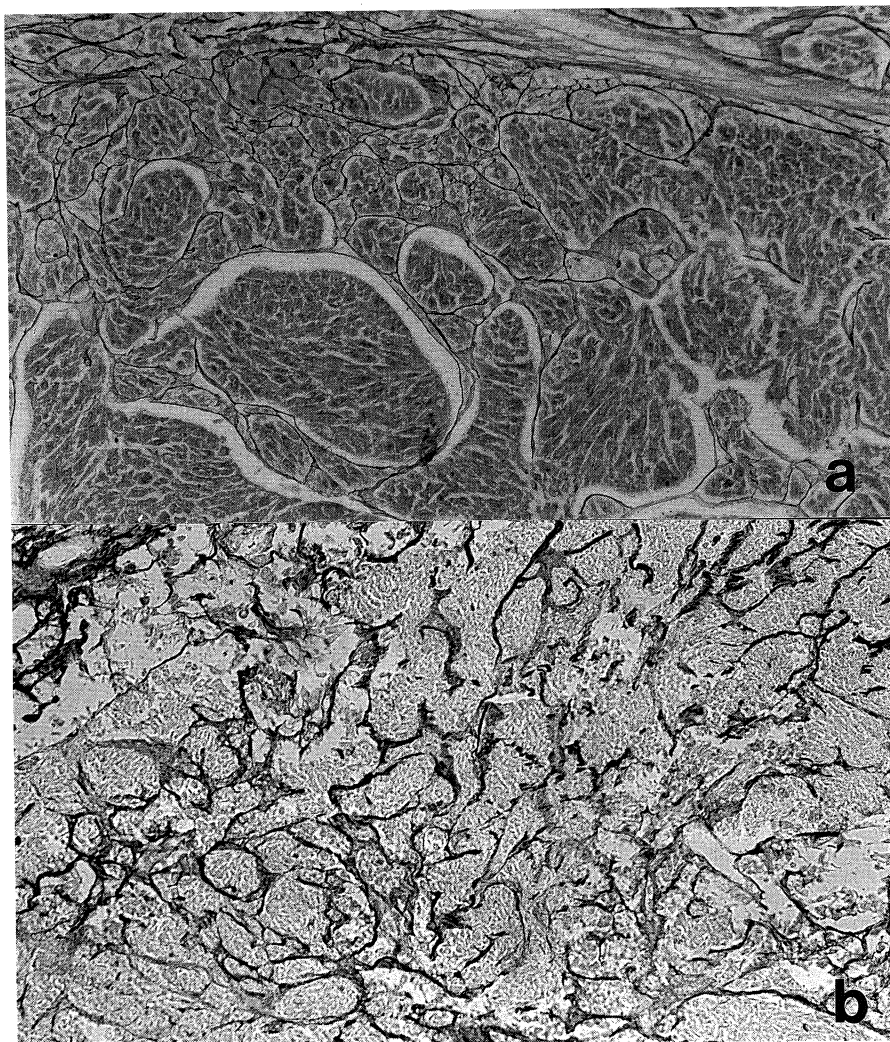


Fig. 15. Nude 333-2.

TRG 361 (10^7) was transplanted. Untreated control in 88 days.

- a. Ribbon-like collagen proliferation was observed, centering on the capillaries. Pap silver impregnation, $\times 200$.
- b. Nude 347-3 ♀.

TRG 361 (10^7) transplanted. Untreated. 185 days. Collagen type IV was seen reticularly in the tumor. Pap enzyme-antibody method, $\times 200$.

ターンが認められた。collagen は、無処理では増殖がおそく、185日で腫瘍内に IV type (Fig. 15b) が、次いで間質型の III, I type の増殖がみられるが、fibronectin はわずかであるが腫瘍内で認められた。無処理では collagen の

増殖は著明ではない。

腫瘍内へ高濃度 (50~100 μg) SSM 注射した場合、固有間質には mast cells の増殖, macrophage の増殖も著明にみられ、好中球の走向も中程度みられた。

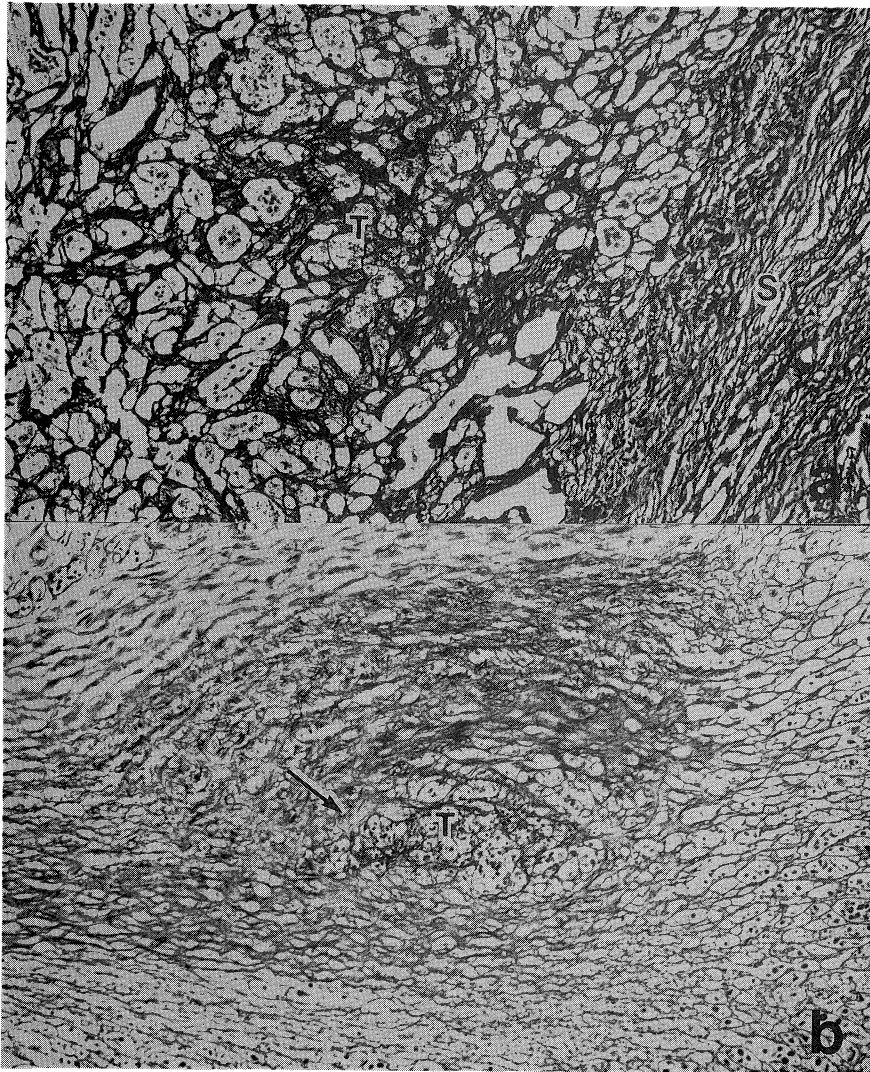


Fig. 16. Remarkable collagenation caused by SSM injection.

- a. Nude 329-4 ♂.
TRG 361 (10^7) was transplanted, and concurrently, SSM 100 μg was injected I. T. for 102 days. Diffuse collagen proliferation was also observed in the interstitium and tumor, and confinement of the tumor cells began. Pap silver impregnation, $\times 200$.
- b. Nude 343-5 ♀.
TRG 361 (10^7) was transplanted, and concurrently, SSM 100 μg was injected I. T. every other day for 91 days. Remarkable collagenation and confinement of the tumor (T) (arrow-marks) were observed. Pap silver impregnation, $\times 40$.

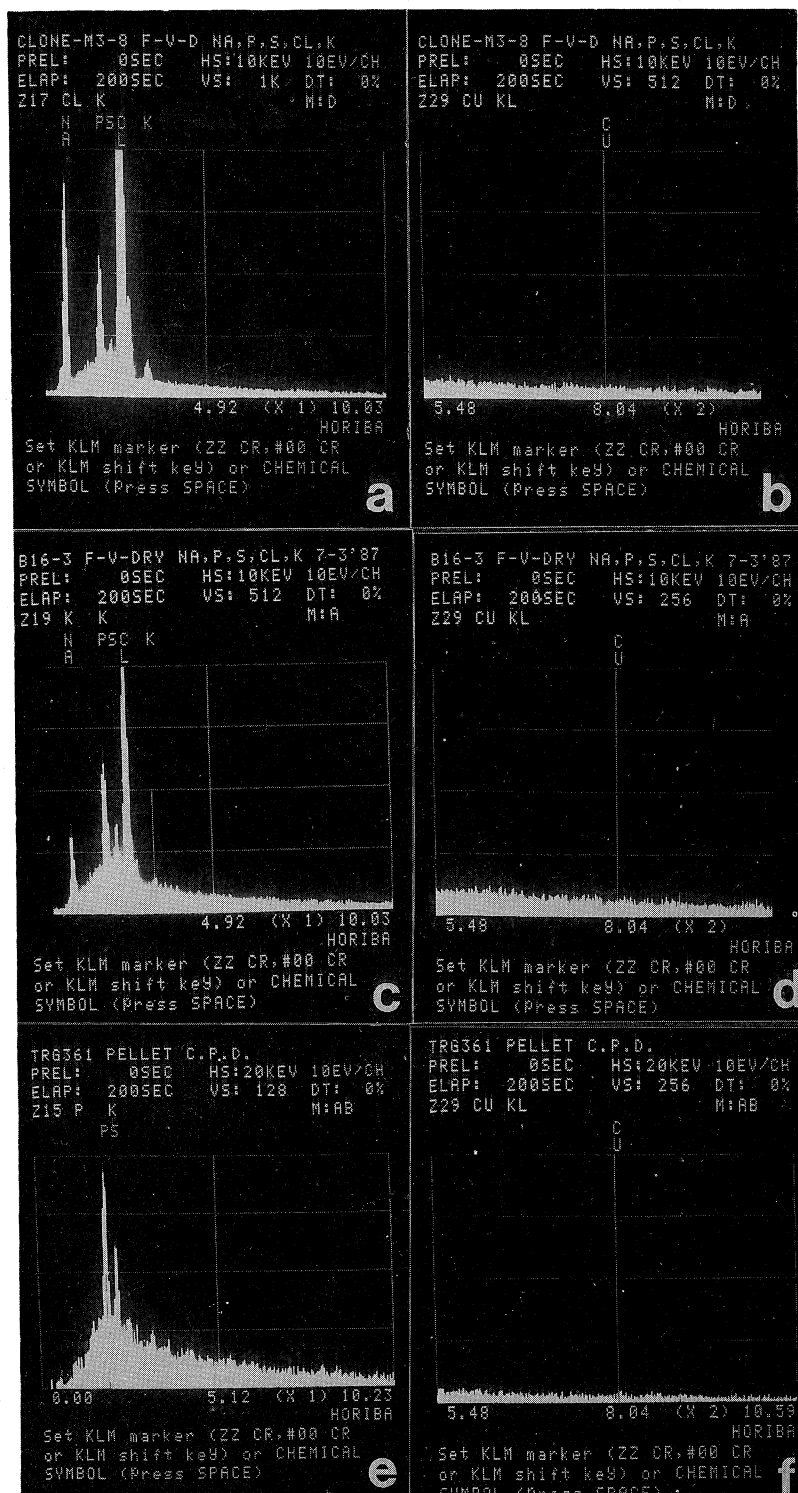


Fig. 17.

この間質層では collagen 増殖も著明となり、III type collagen, 腫瘍内 IV type collagen, 腫瘍内 fibronectin が増加し、I type も本来の間質増殖層に認められた (Fig. 16a, b).

悪性黒色腫細胞移植における二層間質の構築:

本来の固有間質と angiogenesis によって新しくできた腫瘍間質により、間質は二重間質層を形成した。この間質形成は癌の場合も同じである。ただし、clone-M-3, B-16, TRG361 等の悪性黒色腫細胞は異種、同種を問わず癌細胞移植よりも更に著明な angiogenesis を誘発した。このために、移植細胞は新生血管中心性に血管単位の腫瘍巣を作り増殖した。やがてこの急速な腫瘍増大に伴って、改築 umbau が起

Fig. 17. Histological X-ray analysis of localized copper.

(a-f): b, d, f are magnified images of the region where copper was present. Na, P, S, Cl and K (a, c, e) were observed in melanoma cells, but no copper was detected.

こり、乏血領域や血流の遮断が起こり、腫瘍巣は自然壊死におちいった (Figs. 5, 7). 特に血管中心性に増殖した腫瘍巣の末梢部分では広汎な壊死巣が出現する (Fig. 5).

しかし、腫瘍は血管網と密接な関係を有し (Fig. 2), 新生血管で構築された新生の腫瘍間質と本来の固有間質とにわかれて、腫瘍間質は二層性を形成した (Fig. 11). すなわち、腫瘍細胞に隣接した間質成分は、腫瘍細胞の増殖に伴った angiogenesis に端を発した新生 collagen で、type IV collagen が主体であった. この外層の間質は本来の固有間質であり、腫瘍細胞が増殖し間質組織内を浸潤していくとき、元来存在していた血管や結合組織でとりこまれたもので、type III が主体で、次いで I 型 collagen で、mallory 陽性結合織で、SSM 注射でこの間質には、組織球, mast cell, macrophage の増殖がみられ、間質細胞の活性化がみられ、これに伴って collagen 増殖も促進した.

tumor angiogenesis factor (TAF) として知られている銅局在の X 線解析:

悪性黒色腫細胞による著明な angiogenesis がみられたので、TAF の一つとして知られている銅 (ceruloplasmin) 等の存否についてしらべた.

ベレットにした clone-M-3, B-16, TRG361 を銅流出を可及的に防ぐため前記の方法で固定後、走査透過像付属の電子顕微鏡 (HU-12A) で観察しながら、微小部 X 線分析装置 (EDAX 711) を使って分析を行った. 分析結果から Cu-K α 線 (8,040 KeV) は認められず、銅は検出されなかった (Fig. 17).

cytotoxic effect

興味あることは、SSM が癌細胞に対しては弱いのに、Table 1 に示すように悪性黒色腫細胞に対して強い cytotoxic effect を有していることであった. 特に、SSM の 2 μ g (臨床治験

Table 1. Cloning efficiency of melanoma cells treated with SSM.

Cells	SSM μ g/ml	Plating Efficiency	Percent of Control	Inhibition
TRG-361	0	48.2	—	
	2	44.3	92.0	8.0
	200	14.3	29.7	70.3
Clone-M-3	0	10.0	—	
	2	6.7	66.7	33.3
	200	0.1	1.3	98.7
B-16	0	55.8	—	
	2	60.3	108.1	-8.1
	200	16.8	30.0	70.0

に使用されている SSM A 相当含量) では殺腫瘍細胞効果はなかったが、200 μ g 濃度で TRG-361 と B-16 は 70%, clone-M-3 で 100% に近い殺細胞作用をみとめた. この事実は、SSM が collagen 増殖を促進することと併せて悪性黒色腫細胞に対する抗腫瘍作用として重要である.

in vitro collagen 産生¹⁵⁾

in vitro で、C₃H mouse fibroblasts 及び Deteroit fibroblast (human) と B-16, clone-M-3, G-361 の co-culture を行った. 癌細胞と同じく co-culture することによって著明な collagen fiber の産生促進がみられた. 特に、T-cell 欠如の nude mouse (Balb/c nu-nu) の fibroblast からの collagen 産生よりも、thymic mouse fibroblast (Balb/c 及び C₃H または C57BL/6 からの collagen 産生の方が強靱かつ著明であった. この in vitro の所見は、細胞レベルでも thymic Balb/c 及び C57BL mouse での clone-M-3, B-16 移植実験で athymic mouse よりも著明な cicatrization を起こしたことを反映した (Fig. 18).

collagen, 及び fibronectin の組織化学:

すでに述べたように、悪性黒色腫瘍での collagen, fibronectin の動態は、無処置対照群 (ヌードマウス) でも、移植後 5~7 日ですでに腫瘍内では IV type の増殖がみられ、間質では type III, 及び I がこれに次ぎ、fibronectin は局所的に腫瘍内でもみられた. SSM 注射群

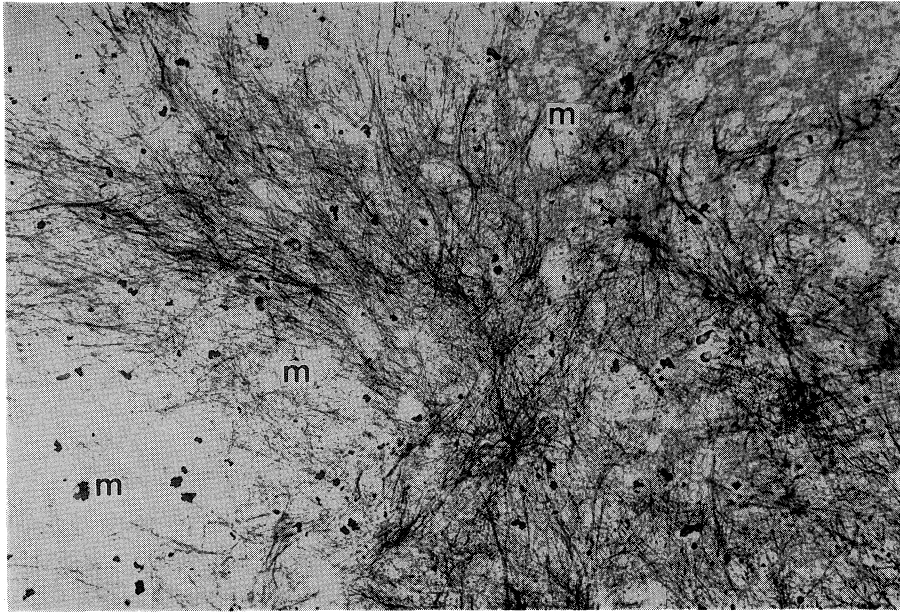


Fig. 18. Thymic mouse fibroblasts and clone-M-3 cells in an in vitro co-culture. 4 weeks. Remarkable proliferation of collagen fibers was observed around of melanoma cells (m). Pap silver impregnation, $\times 100$.

では、移植後 100 日ぐらいから固有間質での collagen III type の増殖が著明にみられ、次いで腫瘍内 IV type, fibronectin, I type の増殖も加わり、長期注射マウスではいずれも著明な増殖がみられた。collagen 増殖は血管中心性であるが、壊死巣中に残存する血管周囲の collagen IV の残存よりの collagen 新生は結核乾酪壊死巣に残存する血管を中心とした膠原線維の増殖による瘢痕化への進行と同じく、腫瘍壊死巣の瘢痕化への再生修復現象の起点として重要であった (Fig. 7)。

考 按

著者は、人型結核菌体抽出多糖体成分による癌細胞を中心とした抗癌作用について報告^{6)~14)}してきたが、BCG,^{1)~4)}モノクローナル抗体,^{16)~19)}インターフェロン,²⁰⁾インターロイキン^{16), 21), 22)}等が悪性黒色腫に有効であることが報告されているので、副作用のない長期使用可能な人型結核菌体より抽出した多糖体成分 (アラビノマンナン) に着目して実験を試み

た。今回の実験では、athymic mouse 及び thymic mouse に移植可能な clone-M-3, B-16 の移植腫瘍について、言い換えれば T-細胞欠如のマウスと T-細胞を有する正常マウス移植腫瘍における SSM 効果を比較することができた。この場合重要なことは、T-リンパ球を欠如していない正常マウスでは、移植実験でも、細胞レベルでの in vitro でも、thymic mouse 由来の fibroblast の collagen 産生は athymic mouse 由来のものよりも顕著で、collagen 線維は太く強靱かつ増殖も著明であった。この問題に関しては今後 collagen gene を中心に遺伝子の変化に伴う collagen 産生能について生化学的な比較検討を行う必要がある。

さて、Barsky ら²³⁾も悪性黒色腫細胞 (B-16) を C57BL/6 に移植したとき、ヒトの乳癌にみられる desmoplastic response の特徴である myofibroblast と collagen の増殖を伴う fibrotic response が起こることに注目し、この inhibitor である L-3, 4-dehydroproline を毎日注射すると collagen response が 70%

inhibition をうけ、tumor の浸潤と spontaneous pulmonary metastasis が促進したことを述べ、collagen が悪性黒色腫細胞の浸潤、転移に極めて重要な役割を果たしていることを指摘している。

なお、B-16, clone-M-3 の細胞性格には、epithelial と fibroblastic type とがみられたが、前者の場合は髄様で間質反応は弱かった。最近悪性黒色腫細胞には surface antigen にもとづく heterogeneity^{17), 21), 24)~30)} のあることが証明されているが、すでに報告したように、癌細胞に対する間質反応は細胞膜に依存するので、surface antigen の相異によるのかもわからない。

SSM の悪性黒色腫細胞に対する殺細胞作用は重要で、上皮細胞由来の癌細胞と異なって、濃厚液 (100~200 μg) の SSM は、悪性黒色腫細胞では著明な cytotoxic effect を有することであった。特に、clone-M-3 や転移性の高い B-16 は著しく傷害された (Table 1)。この事実と併せて、悪性黒色腫移植巣での angiogenesis は極めて著明で、腫瘍は血管を擁して著しい増殖がみられた。この時期での間質反応は重要で、初期では間質反応は強くなく、collagen III, I type の増殖も少ないが、collagen IV type の grafts 内への増殖が早くからみられ、移植 5 日ですでに腫瘍内に張り巡らされ (Figs. 6, 15), SSM 長期使用により著明な増殖がみられた。Ogawa ら³¹⁾ も soft tissue tumor での collagen IV type の分布をしらべ、blood vessel tumors にも証明され、vascular pattern を示すことを報告し、Karttunen,³²⁾ Natalis³³⁾ も laminin type IV collagen^{34), 35)} が Hodgkin's disease や悪性黒色腫の病巣でも reticular fibers の重要な components であると言っている。最近 IV 型 collagen に着目した報告も多い。^{36), 37)} 高濃度 SSM (50~100 μg) の腫瘍内注射で著しい cytotoxic effect とともに、他方では collagenation を伴い、腫瘍の増大はかなり抑制され、ついには著しい cicatrization がみられ著しい延命効果が

みられた (Figs. 9, 14)。

なかでも、B-16 をはじめ、clone-M-3 の angiogenesis (Figs. 6, 10) は著明で、新生血管を中心に著しい小葉状の増殖がみられ、血管分布の増大に伴い腫瘍も最初 40 日くらいで急速に増大するが、肝硬変症の発生機序と同じようにやがて改築現象 (umbau) による血管分布の不平等化が起こり、循環障害により、増大した腫瘍の小葉状の腫瘍周辺部から壊死が起こり、SSM による cytotoxic effect も加わり広範な壊死がみられる。この場合、Ziche ら³⁸⁾ の ATF として重要視する copper の存在についてしらべたが、我々の方法では copper の局在は検出できなかった。

G-361 腫瘍では collagen fiber ははじめ新生血管を中心としてリボン状の増殖、B-16, clone-M-3 ではやがて collagenation の促進に伴ってびまん性の増殖が著明にみられるが、対照群では弱く腫瘍は増大した。

この場合移植と同時または早期 (2 日後) に SSM を皮下、または腫瘍内に注射すると、以上の悪性黒色腫細胞への cytotoxic effect を増強し、更に collagenation の進行とともに腫瘍は癒痕化を来した (Fig. 16)。この場合、皮下注射の場合は腫瘍増大は 40 日以内では対照群と変わらないが、150 日以後では著しい腫瘍抑制効果に差がみられた。腫瘍内注射では 40 日くらいより壊死と collagen 増殖が進行し、この現象は athymic mouse におけるよりも thymic mouse において強かった。SSM 0.5~2.0 μg の注射でも、thymic mouse の場合は長期間の注射で著しい抗腫瘍性がみられ、腫瘍は増大を停止、または cicatrization におちいった。

最近、B-16 細胞に好中球走向性因子^{21), 39), 40)} のあることがみとめられているが、我々の実験でも、移植後 40 日で腫瘍巣周辺に著明な好中球集積層を認めた。このような間質反応は、SSM 高濃度 (100 μg) 腫瘍内注射にみられ、本来の間質には mast cells, macrophage の増殖も著明で、この出現に伴ってこの層では著明な collagenation がみられた (Figs. 12, 13)。

このような癌及び悪性黒色腫移植時の間質反応は、つとに吉田富三教授⁴¹⁾が、腫瘍間質には本来の固有間質と腫瘍移植によって新生された collagen 層がみられることを重視しているが、我々の移植実験で悪性黒色腫細胞の移植巣では早期(5日)にみられ、腫瘍内間質では網目状の好銀線維がみられ、type IV によるものが主体をなし新生血管に基づくものと考えられた。固有間質は、collagen type III, 次いで I が主体を占め、その他、fibronectin の分布もみられた。

以上のように SSM は高濃度注射の場合、悪性黒色腫細胞では cytotoxic effect を有し、他方、間質反応を促進することがわかり、悪性黒色腫の増殖抑制に役立つものと考えられる。

SSM の腫瘍内注射により、悪性腫瘍細胞へ cytotoxic effect と collagenation を促進し創傷治癒的な効果を与え、intra-dermal tumors の regression と cicatrization を起こした。ただし、B-16 細胞をはじめ、malignant melanoma の cell cycle は 2.5 時間で、癌細胞に比

して短く、移植後腫瘍の増殖は約 40 日ぐらいで拇指頭大に達した。2.0~100 μ g 注射により SSM 効果は経時的にみられるが、多くの場合腫瘍は増大しながら cicatrization におちいった。特に、cicatrization の促進は、100 μ g 以上の高濃度のものを腫瘍内に注射した場合、腫瘍の抑制が高率にみられた。Zbar ら⁴²⁾が悪性黒色腫のリンパ節転移巣に直接生きた牛型結核菌を注射して、腫瘍増殖の抑制を報告しているが、SSM 高濃度の腫瘍内注射は副作用もなく、将来これら腫瘍の regression と prevention に役立つものと考えられる。

謝 辞

本研究は、川崎医科大学 プロジェクト 研究費 62-603 及び、服部孝子助成金(東京小金井)によった。なお、SSM は日本医科大学 丸山千里先生、及びゼリア新薬からの御恵与を受けたことを感謝します。ノードマウスは、本学動物飼育センター 北 徳氏からの供給を感謝します。

文 献

- 1) Mathé, G., Amiel, J. R., Schwarzenberg, L., Schneider, M., Cattani, A., Schlymberger, J. R., Hayat, M. and de Vassal, F.: Demonstration de l'efficacité de l'immunothérapie active dans la leucémie aiguë lymphoblastique humaine. *Rev. Fr. études clin. et biol.* 13: 454-459, 1968
- 2) Mathé, G.: Immunological approaches of leukemia treatment. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol. (Paris)* 122: 855-881, 1972
- 3) Bluming, A. Z., Vogel, C. L., Ziegler, J. L., Mody, N. and Kamya, G.: Immunological effects of BCG in patient with malignant melanoma. A comparison of two models of administration, 1971. *Ann. intern. Med.* 76: 405, 1972
- 4) Yamamura, Y., Kitagawa, M. and Azuma, I.: Cancer immunotherapy and its immunological basis. *In Gann monograph cancer res.* Vol. 21, Japan Scientific Society Press. 1978, p. 21
- 5) 丸山千里: 結核菌体抽出物質による悪性腫瘍の治療について. *日皮会誌* 76: 399-404, 1966
- 6) Kimoto, T.: Collagen and stroma proliferation as preventive mechanisms against cancer invasion by purified polysaccharides from human tubercle bacillus (SSM). *Cancer Detect. Prev.* 5: 301-304, 1982
- 7) 木本哲夫: 人型結核菌体抽出多糖体成分(SSM: 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(SSM: 丸山ワクチン)の癌増殖抑制に関する研究——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) 木本哲夫: 人型結核菌体抽出多糖体成分(SSM: 丸山ワクチン)の抗癌作用に関する研究——高濃度

SSM (100倍濃度多糖体成分) とヒト癌細胞 double xenografts におけるコラーゲン増殖について。
川崎医学会誌 11 : 153—177, 1985

- 10) 木本哲夫：人型結核菌体抽出多糖体成分 (S. S. M.: Special Substance, Maruyama) の抗癌作用に関する研究——末期癌剖検症例を中心とした癌の治癒と結核の治癒に関する病理学的考察——。川崎医学会誌 11 : 355—392, 1985
- 11) Kimoto, T.: Collagen fiber formation proliferation as mechanism of cancer prevention and regression induced by extract from mycobacterium tuberculosis: Correlation between clinical observations and animal experiments. Cancer Detect. Prev. (USA) Alan Liss Co. 11 : 173—189, 1988
- 12) 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
- 13) Kimoto, T.: Role of polysaccharides extracted from human-type *mycobacterium tuberculosis* in the collagen proliferation and the suppression of cancer growth: From a point of pathobiological view. Kawasaki med. J. 13 : 151—167, 1987
- 14) 木本哲夫, 平尾優子, 大久保茂樹, 兵藤文則, 西谷耕二：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。川崎医学会誌 14 : 416—441, 1988
- 15) 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
- 16) Eisenthal, A., Lafreniere, R., Lefor, A. T. and Rosenberg, S. A.: Effect of anti-B 16 melanoma monoclonal antibody on established murine B 16 melanoma liver metastases. Cancer Res. 47 : 2771—2776, 1987
- 17) Bystryń, J., Oratz, R., Harris, M. N., Roses, D. F., Golomb, F. M. and Speyer, J. L.: Immunogenicity of a polyvalent melanoma antigen vaccine in human. Cancer 61 : 1065—1070, 1988
- 18) Hu, F. and Lesney, P. F.: The isolation and cytology of two pigmented cell strains from B 16 mouse melanoma. Cancer Res. 24 : 1634—1643, 1964
- 19) Duray, P. H., Palazzo, J., Gown, A. M. and Ohuchi, N.: Melanoma cell heterogeneity. A study of two monoclonal antibodies compared with S-100 protein in paraffin sections. Cancer 61 : 2460—2468, 1988
- 20) Legha, S. S.: Interferons in the treatment of malignant melanoma: A review of recent trials. Cancer 57 : 1675—1677, 1986
- 21) Bröcker, E. B., Zwadlo, G., Holzmann, B., Macher, E. and Sorg, C.: Inflammatory cell infiltrates in human melanoma at different stages of tumor progression. Int. J. Cancer 41 : 562—567, 1988
- 22) Taramelli, D., Fossati, G., Balsari, A., Marolda, R. and Parniani, G.: The inhibition of lymphocyte stimulation by autologous human metastatic melanoma cells correlates with the expression of HLA-DR antigens on the tumor cells. Int. J. Cancer 34 : 797—806, 1984
- 23) Barsky, S. H. and Gopalakrishna, R.: Increased invasion and spontaneous metastasis of BL 6 melanoma with inhibition of the desmoplastic response in C 57 BL/6 mice. Cancer Res. 47 : 1663—1667, 1987
- 24) Houghton, A. N., Real, F. X., Davis, L. J., Gordon-Cardo, C. and Old, L. J.: Phenotype heterogeneity of melanoma. Relation to the differentiation program of melanoma cells. J. exp. Med. 164 : 812—829, 1987
- 25) Buchegger, F., Mach, J. P., Leonard, P. and Carrel, S.: Selective tumor localization of

- radiolabeled anti-human melanoma monoclonal antibody fragment demonstrated in the nude mouse model. *Cancer* 58 : 655—662, 1986
- 26) Albino, A. P., Lloyd, K. O., Houghton, A. N., Oettgen, H. F. and Old, L. J.: Heterogeneity in surface antigen and glycoprotein expression of cell lines derived from different melanoma metastases of the same patient. Implications for the study of tumor antigens. *J. exp. Med.* 154 : 1764—1778, 1981
 - 27) Hotta, H., Ross, A. H., Huebner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M. V., Ricciardi, R. P., Tsujimoto, Y., Croce, C. M. and Koprowski, H.: Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stage of melanoma tumor progression. *Cancer Res.* 48 : 2955—2962, 1988
 - 28) Atkinson, B., Ernst, C. S., Ghrist, B. F. D., Herlyn, M., Blaszczyk, M., Ross, A. H., Herlyn, D., Steplewski, Z. and Koprowski, H.: Identification of melanoma-associated antigens using fixed tissue screening of antibodies. *Cancer Res.* 44 : 2577—2581, 1984
 - 29) Vries, J. E., Keizer, G. D., Velde, A. A., Voordoun, A., Ruiten, D., Rümke, P., Spits, H. and Figdor, C. G.: Characterization of melanoma-associated surface antigen involved in the adhesion and motility of human melanoma cells. *Int. J. Cancer* 38 : 465—473, 1986
 - 30) Raz, A.: Modulation of the metastatic capability in B 16 melanoma by cell shape. *Science* 221 : 1307—1310, 1983
 - 31) Ogawa, K., Oguchi, M., Yamabe, H., Nakashima, Y. and Hamashima, Y.: Distribution of Collagen Type IV in soft tissue tumors: An immunohistochemical study. *Cancer* 58 : 269—277, 1986
 - 32) Karttunen, T., Alavaikko, M., Apaja-Sarkkinen, M. and Antio-Harminen, H.: An immunohistochemical study of laminin, type IV collagen and type-III pN-collagen with relation to reticular fibers in Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* 41 : 52—58, 1988
 - 33) Natali, P. G., Nicotra, M. R., Bellocchi, M., Cavaliere, R. and Bigotti, A.: Distribution of laminin and collagen type-IV in benign and malignant lesion of melanocyte origin. *Int. J. Cancer* 35 : 461—467, 1985
 - 34) Charonis, A. S., Tsilibary, E. C., Yurchenco, P. D. and Furthmayr, H.: Binding of laminin to type IV collagen: A morphological study. *J. Cell Biol.* 100 : 1848—1853, 1985
 - 35) Herbert, T. J., McCarthy, J. B., Tsilibary, E. C. and Furcht, L. T.: Differential effects of laminin, intact type IV collagen, and specific domains of type IV collagen on endothelial cell adhesion and migration. *J. Cell Biol.* 106 : 1365—1373, 1988
 - 36) Ausprunk, D. H. and Folkman, J.: Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.* 14 : 53—65, 1977
 - 37) Keegan, A., Hill, C., Kumar, S., Phillips, P., Schor, A. and Weiss, J.: Purified tumor angiogenesis factor enhances proliferation of capillary, but not aortic, endothelial cells in vitro. *J. Cell Sci.* 55 : 261—276, 1982
 - 38) Ziche, M., Jones, J. and Gullino, P. M.: Role of prostaglandin E, and copper in angiogenesis. *JNCI* 69 : 475—482, 1982
 - 39) Ishikawa, M., Koga, Y., Hosokawa, M. and Kobayashi, H.: Augmentation of B 16 melanoma, lung colony formation in C 57 BL/6 mice having marked granulocytosis. *Int. J. Cancer* 37 : 919—924, 1986
 - 40) Stracke, M. L., Kohn, E. C., Aznavoorian, S. A., Wilson, L. L., Salomon, D., Krutzsch, H. C.,

Liotta, L.A. and Schiffmann, E.: Insulin-like growth factors stimulate chemotaxis in human melanoma cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153 : 1076—1083, 1988

41) 佐藤春郎：がん細胞の営み. 朝日選書 324. 朝日新聞社 1987, pp. 142—150

42) Zbar, B. and Tanaka, T.: Immunotherapy of cancer. Regression of tumors after intralesional injection of living mycobacterium bavis. *Science* 172 : 271—273, 1971