〔泌尿紀要28巻2号
1982年2月〕

実験的膀胱腫瘍に対する免疫学的研究

神戸大学医学部泌尿器科学教室（主任：石神襄次教授）
伊　藤　　登

IMMUNOLOGICAL STUDIES ON EXPERIMENTAL URINARY BLADDER CARCINOMA IN RATS

Noboru Ito
From the Department of Urology, Kobe University School of Medicine
(Director; Prof. J. Ishigami)

Experimental bladder tumors were induced in rat by oral administration of BBN and investigations were performed concerning histological changes in the bladder and changes with time in the mitogen response of the lymphocytes of rats treated with carcinogen and immunostimulating agent. BBN was dissolved in deionized water as a 0.05% solution and administered, ad libitum, to the Fischer Strain Rats for 12 weeks. Levamisole was used as immunostimulating agent.

180 rats were devided to 6 groups. The first group was a control group which did not receive neither BBN nor Levamisole. The second group received BBN only and the 3–6th groups received both BBN and Levamisole.

The third group received Levamisole at a dose of 1 mg/kg of body weight every day from 8 to 25 weeks after the beginning of experiment. The 4–6th groups received at a dose of 1, 3 and 8 mg/kg every day from 12 to 25 weeks.

Lymphocytes from the second group which received BBN only had a lower response to mitogen than the first group. Lymphocytes from the 3–5th groups which received low dose of Levamisole had a higher response to mitogen than the second group. These were as well as the first group. But lymphocytes from the 6th group which received high dose of Levamisole did not have an increased response to mitogen.

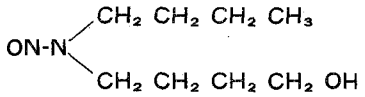
At 25 weeks after the beginning of experiment, any animals of the first group did not develop bladder tumor, and all animals of the second and the 6th groups had bladder tumors. 43% of the third group, 27% of the 4th group and 18% of the 5th group showed no appearance of bladder tumors.

Key words: Experimental bladder tumor, Cell-mediated immunity, Carcinogenesis, Immunostimmulating agent, Levamisole

はじめに

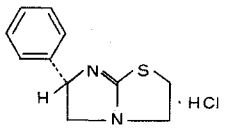
癌の発生および増殖に対して，宿主は何らかの応答を示し，それらを調節していることが知られている[1~3]．そのひとつとされている宿主免疫は癌の増殖に影響するのみでなく癌の発生にも関係することが推測されている[4~6]．この宿主免疫を癌の治療へ応用するため種々の免疫賦活剤が試用され，その治療効果が検討されている．ところで，近年までの外科的療法，放射線療法および化学療法などの単独あるいは併用療法が行なわれてきたが，ここに至り，第4番目の治療法として新たに免疫療法が脚光を浴びることになったといえる．しかし，非特異的免疫療法単独で癌を治癒せしめるうか否かは，疑問を残すところで，癌治療におけるこれら非特異的腫瘍免疫療法の位置づけはこれからの問題といえる．そこで著者は泌尿器科領域では

最も多い悪性腫瘍である膀胱腫瘍を対象として免疫療法の有用性について検討を加えた．膀胱腫瘍に対する膀胱保存手術は高率に再発することが諸家の報告でも明らかである[7,8]．これは腫瘍組織を完全に切除できなかった場合もあろうが，一見健常に見える膀胱粘膜にすでに前癌状態の所見が存在していたものとも考えられる．この高率の再発を抑制するために，種々の試みがなされているが[9~11]，著者は，外科的切除後の再発予防に免疫賦活剤使用の可能性を検討するため，ラット実験的膀胱腫瘍を用い，ラット膀胱粘膜に前癌状態を作り，免疫賦活剤により発癌を抑制できるか否かを実験した．実験モデルには，N-butyl-N-butanol-4-hydroxynitrosamine（以下 BBN と略す）誘発ラット実験的膀胱腫瘍を用いた．BBN (Fig. 1) はラットに対して組織学的にヒト膀胱腫瘍にきわめて類似した移行上皮型の腫瘍を，膀胱に選択的にかつほぼ 100％に発生せしめることは，多くの報告で明らかである．この BBN 誘発ラット実験的膀胱腫瘍を用い，免疫賦活剤としては最近注目されている Levamisole (Fig. 2) を使用し，腫瘍発生過程の免疫能の変動，また同時に免疫賦活剤を投与した場合の免疫能および腫瘍発生への影響を検討し若干の知見を得たので報告する．



B.B.N. (N-butyl-N-butanol-4 Hydroxy-nitrosamine)

Fig. 1



Levamisole (L-tetramisole, Levo-2, 3, 5, 6-tetrahydro-6-phenylimidazo (2, 1-b) thiazole monohydrochloride)

Fig. 2

実験材料と方法

用いた実験動物，発癌物質，免疫賦活剤は Table 1 に示すとおりである．

①発癌物質，免疫賦活剤の投与方法

BBN 10 ml に対して Tween 80（片山化学工業 K.K. 製）を 0.2 ml 混じ emulsion を作り，蒸留水を加えて，0.05％の飲料水とし12週間自由に摂取させた．ラットは6群に分けた．第1群は無処置群，第2群は BBN 12週間投与のみ，第3群は BBN 12週間投与し，8週目より25週目まで Levamisole 1 mg/kg 連日経口投与した群，第4～6群は BBN 12週間投与終了後より25週目まで Levamisole を，1 mg, 3 mg, および 8 mg/kg 連日経口投与した群である (Fig. 3)．各群のラットに同一の組成一定の基礎食を与え，ほぼ 22°C に保たれた飼育室で飼育観察した．各ラットは，実験開始後1週間ごとに体重を測定した．

②リンパ球幼若化能の測定

各群のラットを2週目または4週目ごとに，3～8匹づつを，25週目には残りすべてを屠殺し脾臓，胸腺重量の測定およびリンパ球幼若化能を測定した．すなわち脱血死させたラットより，胸腺，脾臓を採取し，Fig. 4 に示すように各臓器を細切し60番ステンレスメシュ，25ゲージ注射針を通すことにより single cell suspension をつくり Hank's 液 (Gibco Grand Isl-

Table 1. 実 験 材 料

1．実験動物；Fischer系雄ラット，系統名 CRJ：CDF (F 344)
　　5週令，体重95～105g，180匹，日本チャールズ・リバK.K.
　　より購入。

2．発癌物質；N-butyl-N-butanol-4 hydroxy nitrosamine (BBN)
　　泉化学研究所製

3．免疫賦活剤；Levamisole　協和発酵提供

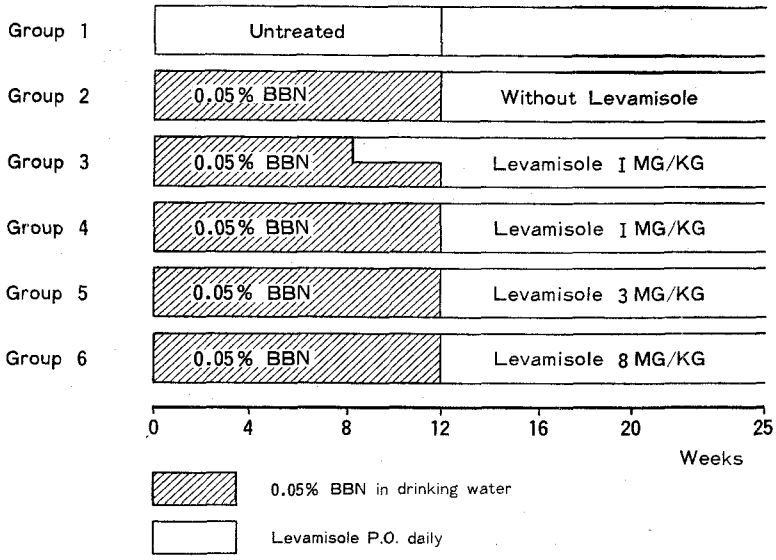


Fig. 3. Experimental protocol

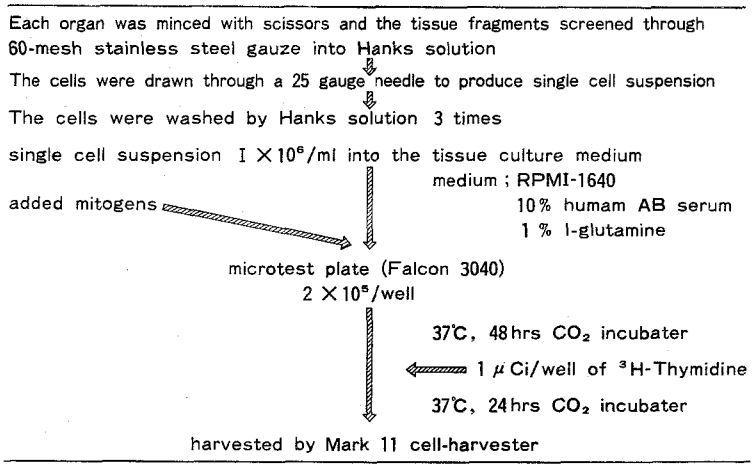


Fig. 4. Method of culture

and, N.Y.) で3回洗浄後，培養液中に 1×10^6/ml の濃度に浮遊させた．得られた細胞浮遊液は，その95%以上がリンパ球で，90%以上が生細胞であった．培養液は RPMI 1640 (Gibco Grand Island N.Y.) に10%非働化ヒトＡＢ型血清および１% 1-Glutamine を加えたものである．この細胞浮遊液を Microtest plate (Microtest II™ Tissure culture plate 3041, Falcon oxnard Ca.) に 200 μl/well ずつ各種 mitogen とともに注入して，５% CO_2incubater で 37°C 48時間培養後，^{3}H-Thymidine (New England Nuclear, Boston Mass.) を 1μCi/well ずつ加え，さらに24時間培養後，Mark II cell harvester を用い glass fiber filter (和研薬 K.K.) により harvest した．

filter を十分に乾燥させた後に counting vial に移し，cintilater 液 (popop 0.05 g, ppo 4.0 g を 1 *l* のトルエンに溶解) を加えて液体シンチレーションカウンターにて測定した．幼若化能の値は triplicate した標本の液体シンチレーションカウンターによる値を平均し CPM で示した．mitogen は Con A. PWM PHA-P および L.P.S. を使用した．また一部幼若化能測定に際して，直接培養液中に各種濃度の Levamisole を注入，*in vitro* で Levamisole がリンパ球幼若化能にあたえる影響も検討した．

③腫瘍発生に対する検索

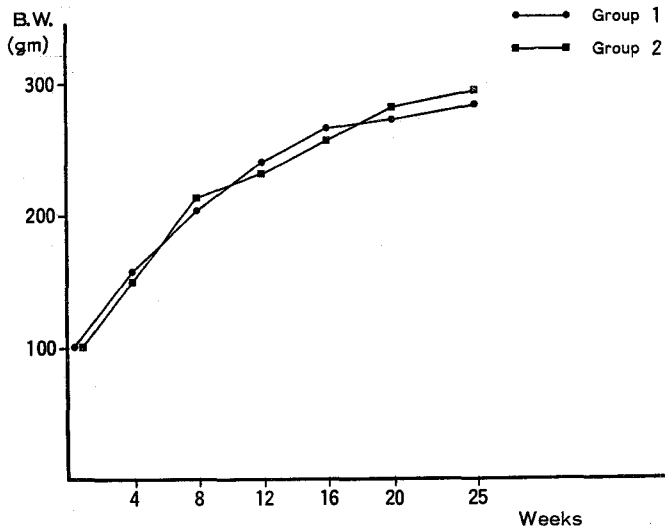


Fig. 5.

リンパ球幼若化能測定と同時に，尿路系および他臓器における腫瘍発生，転移の有無を組織学的に検索した．膀胱にかぎっては組織の死後変化を最小限にとどめるべくまず後部尿道を結紮し膀胱内へ10%ホルマリンを直接注入固定し hematoxylin-eosin 染色を行なった．

実 験 成 績

1) 体重，臓器重量の変化

Fig. 5 は BBN 単独投与群 (Group 2) と無処置群 (Group 1) の体重変化を比較図示したもので，両者間に有意の差は認めなかった．第1～第6群までの各群の25週目の胸腺および脾重量が Table 2 に示されているが各群間に有意差は認められなかった．

2) 各実験群の各種 mitogen 刺激による幼若化能の推移

i) 脾細胞の幼若化反応について (Fig. 6–9).

まず第1群および2群間における Con A に対する脾細胞の幼若化反応をみると，BBN のみ投与した第2群において第1群の無処置群と比して，若干抑制傾向が見られ PHA, PWM に対する反応 (Fig. 7,8) でも同様の傾向がみられた．しかし，LPS (Fig. 9) に対する反応では，第1群と第2群の間に差を認めなかった．第3～6群の Levamisole 投与群では Con A (Fig. 6), PHA (Fig. 7), PWM (Fig. 8) に対する反応は，8 mg/kg 投与の第6群以外は BBN のみ投与の第2群より高い値を示すが，コントロールの第1群を大きく越える値を示さなかった．第6群は第2群と同じかむしろ低い値を示した．LPS に対する反応では，この Levamisole 投与による影響は認めなかった．

Table 2. Organ weight (g)

	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4	Group 5	Group 6
Thymus	0.20 ±0.05	0.21 ±0.04	0.19 ±0.02	0.20 ±0.04	0.21 ±0.05	0.19 ±0.04
Spleen	0.60 ±0.07	0.62 ±0.06	0.59 ±0.04	0.60 ±0.10	0.59 ±0.07	0.63 ±0.09

ii) 胸腺細胞の幼若化反応について (Fig. 10–13).

胸腺細胞の Con A に対する反応では，脾細胞の場合と同様に，BBN のみ投与した第2群は無処置の第1群より低い値を示し，Levamisole 投与により第3～第5群は投与開始後しばらくは第1群よりやや高い値を示すが，その後第1群と同程度の値を示している．第6群では上昇傾向は認めず第2群と同様の傾向を示した．このように Levamisole 1 mg～3 mg/kg 投与した際に無処置の第1群の反応よりやや高いか，同程度の値を示す傾向は Con A, PHA に対する場合に認められたが PWM, LPS では認められなかった．

3) In vitro での Levamisole の幼若化能増強効果 (Fig. 14–17).

第1群，第2群の16～20週目のラット脾細胞および胸腺細胞を用いて *in vitro* で 1～100 μg/ml の各濃度の Levamisole を mitogen と同時に加え，それぞれの幼若化能増強効果を検討した．その結果第1群の脾細胞，胸腺細胞を用いた場合 Levamisole 1～5 μg/ml の濃度でその反応はやや増強していたが，stimulation index (S.I.) は2倍以下であった．これに対し第2群では，S.I. は2～4倍により増強されているのが観察

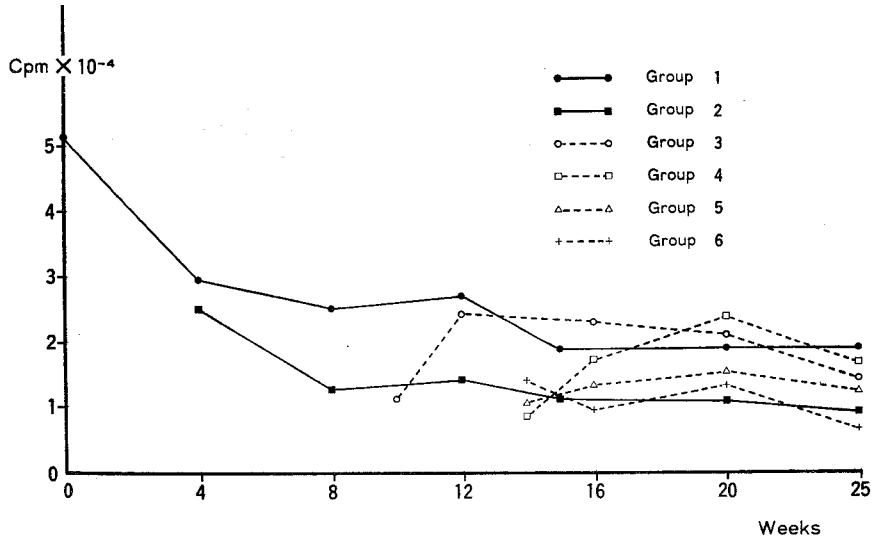


Fig. 6. Spleen cell response to Con-A

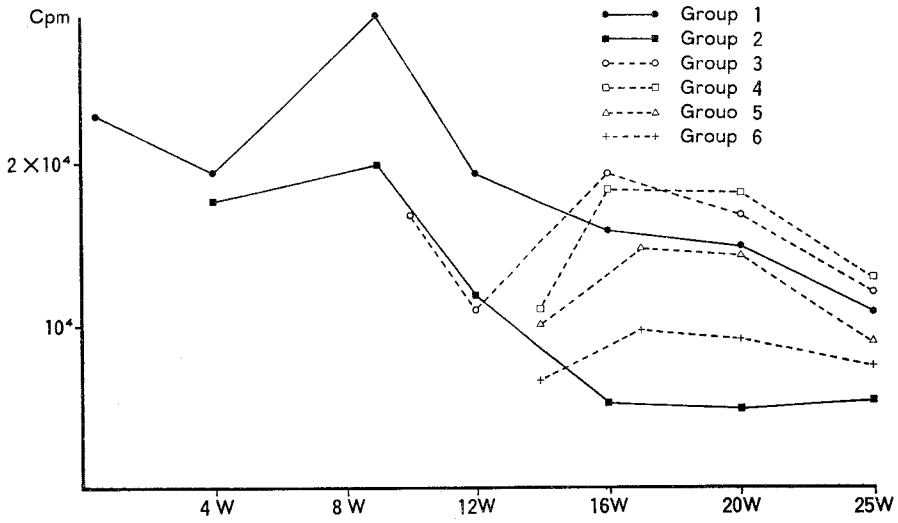


Fig. 7. Spleen cell response to PHA

された．しかし Levamisole 10～100 μg/ml の高濃度になると，第1群，第2群ともにほとんど増強されないか，または抑制される傾向にあった．mitogen 別幼若化能増強効果は Con A, PHA で強く，PWM では弱い傾向にあった．

4) 腫瘍発生に対する検索 (Table 3).

第1群を除いて25週目における膀胱の組織像は，わずかではあるが粘膜にほとんど変化のないもの，(Fig. 18)，膀胱粘膜の肥厚がみられるもの (Fig. 19)，乳頭腫の発生を認めるもの，(Fig. 20)，および移行上皮癌が発生するもの (Fig. 21)，の4つに分類された．なお発生した腫瘍は，いずれも米粒大以下の小腫瘍で，節層に達する浸潤や他臓器への転移，他臓器での腫瘍発生は認めなかった．25週目において乳頭腫を含め腫瘍発生を認めたのは，第2群13例中13例，第3群14例中8例，第4群15例中11例，第5群11例中9例，第6群11例中11例で，癌発生を認めたのは，第2群13例中12例，第3群14例中5例，第4群15例中9例，第5群11例中5例，第6群11例中10例であった．すなわち無処置群は，腫瘍発生，癌発生ともに認めず，BBN 単独投与群では，腫瘍発生は全例に，癌発生は92％に出現している．これに対して，BBN と

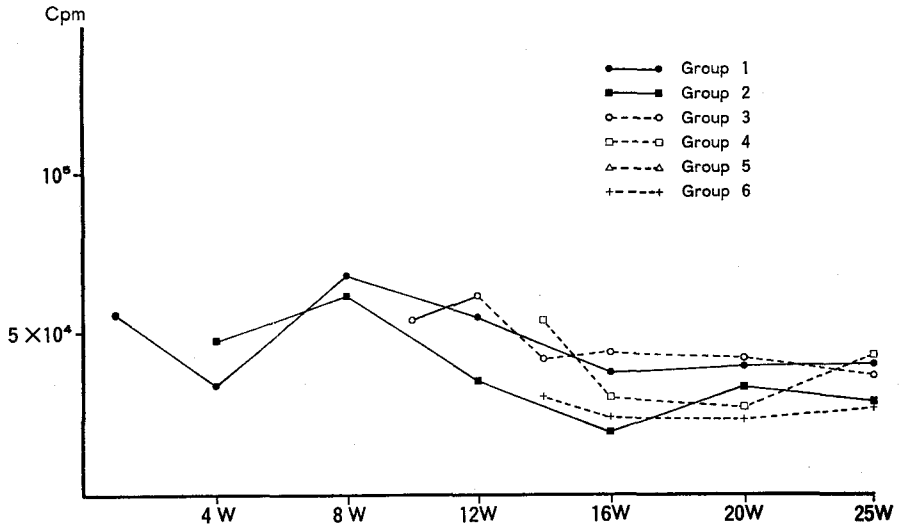


Fig. 8. Spleen cell response to PWM

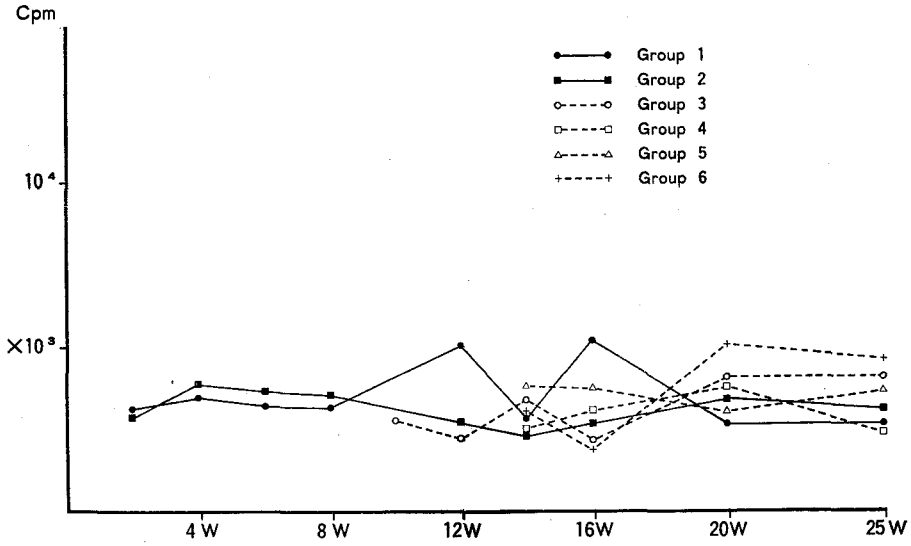


Fig. 9. Spleen cell response to LPS

Levamisole 1～3 mg/kg を投与した群 (Group 3–5) は，腫瘍発生率57～82%，および癌発生率36～60%とそれぞれの発生頻度は BBN 単独投与群に比し減少していた．しかし BBN と Levamisole 8 mg/kg 投与した群では，腫瘍発生率 100 %，癌発生率 81 %と BBN 単独投与群とほぼ同じ結果で，Levamisole を増量しても投与量に比例して腫瘍発生が抑制される成績ではなかった．これら腫瘍発生率を Fischer の直接確率計算法で有意差をみてみると，腫瘍発生率において，BBN 単独投与群と，8週目より25週目まで Levamisole 1 mg/kg 投与した群 (Group 3) との間でのみ，腫瘍発生率が危険率1%以下で有意に低かった．癌発生率では5%以下の危険率で BBN 単独投与群と Group 3 および5との間で有意に癌発生率が低かった．

考　　察

Ehrlich は，宿主は癌細胞に対して免疫的な監視を行なっているとの宿主の免疫監視機構の概念を古くより提唱している。発癌に関するこの概念には，i) 正常細胞から変異した癌細胞，またはその前駆細胞には，正常細胞とは異なった抗原が出現すること，ii)

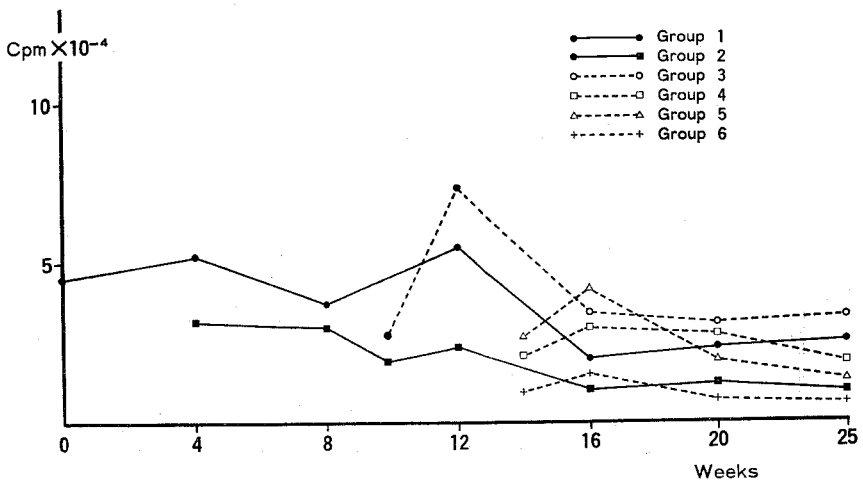


Fig. 10. Thymocyte response to Con-A

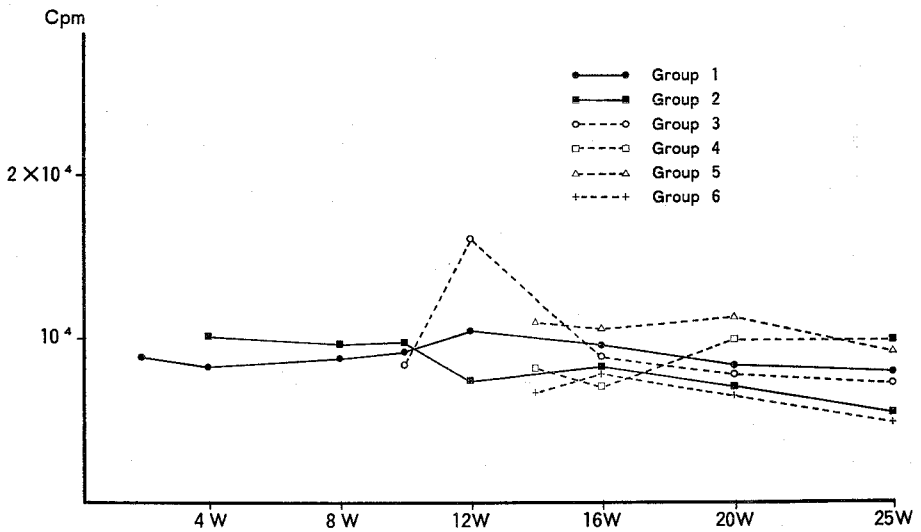


Fig. 11. Thymocyte response to PHA Thymocyte response to PHA

この抗原に対し，宿主は免疫応答を営むこと，iii) 癌はこのような免疫応答から逃れて増殖した新細胞により形成されることの3つの考え方がその骨子とされている[12]．このことは宿主の免疫能を低下させてやればより容易に発癌が起きることを示している．ウイルス発癌においては，免疫抑制条件により，明らかに発癌は促進される[13]．それは，ウイルス感染細胞に出現するところのウイルス関連抗原に対する宿主免疫の応答が癌発生を支配する1つの因子と考えられている[14]．しかし，化学発癌剤の場合，発癌に宿主免疫がどの程度関与するかは明確でなく，Lappe[15] は methylcholanthrene であらかじめ処理したマウス皮膚をX線処理により免疫抑制した同系マウスに移植すると乳頭腫の発生時期の速度およびその頻度が増強され，逆にBCG 成分で処理し，免疫刺激を行なったマウスに移植した場合には抑制されると述べている．一方 Rygaard ら[13] は，ヌードマウスにおける MC 肉腫の発生は，正常マウスにおけるそれと変わらないと述べている．このように化学発癌剤による発癌に免疫抑制条件が影響するか疑問をもつ意見もあり，また化学発癌剤に対する免疫療法についても意見の分かれるところである．

ところで膀胱腫瘍は職業癌の代表的なものの1つで Rehn が[16]染色工場で膀胱腫瘍を発見して以来，多数の報告があり，膀胱腫瘍の癌原性化学物質として，芳香族 amine，tryptophan 代謝産物などを用いた多く

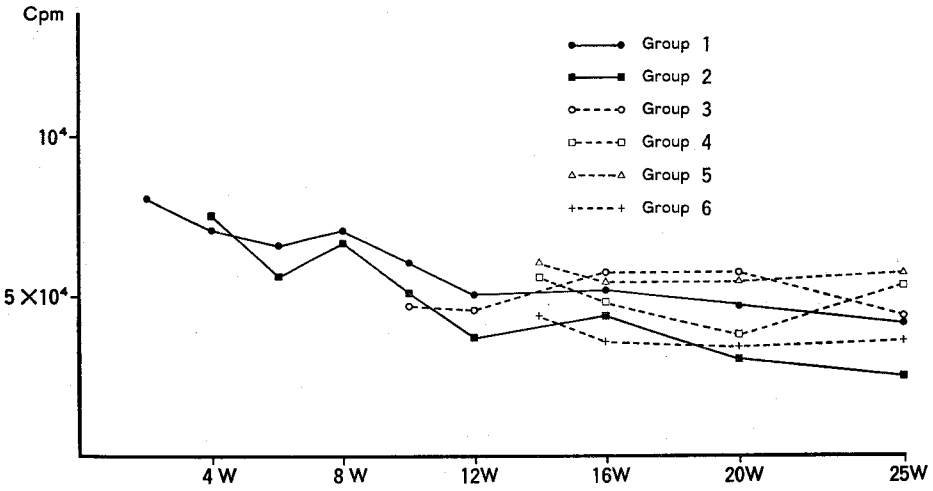


Fig. 12. Thymocyte response to PWM

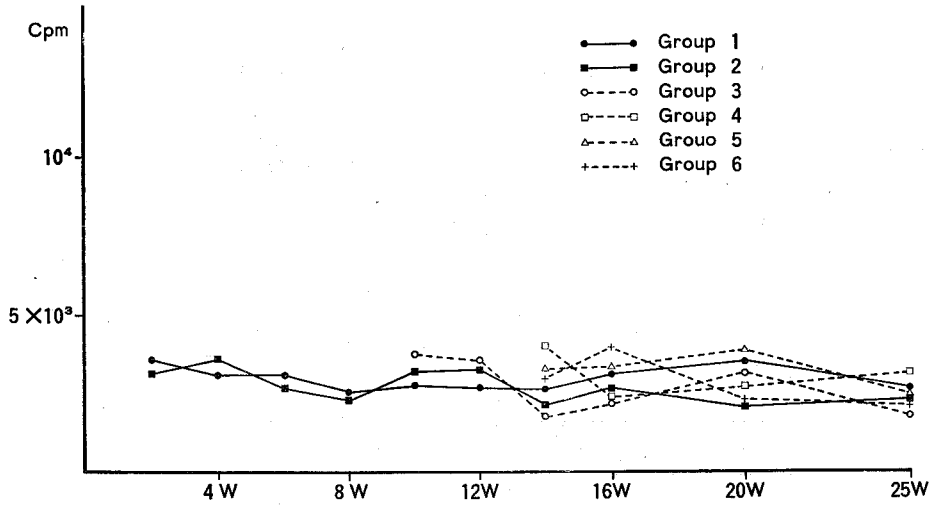


Fig. 13. Thymocyte response to LPS

の研究がなされていること，さらに発癌物質として，今回用いた BBN は選択的に，しかも高率に，ヒト膀胱腫瘍ときわめて類似した移行上皮癌を発生させることが可能で，実験モデルとしては非常に興味深いものと考えられる．この BBN でラットの膀胱にいわゆる前癌状態を作り，それに対して免疫賦活剤 Levamisole を投与し，リンパ球幼若化能の推移，膀胱腫瘍の発生状態を観察した．

発癌剤と実験動物

実験的膀胱腫瘍に用いる発癌物質は，今回使用したニトロソ化合物である BBN とニトロフラン誘導体である FANFT がよく知られている[17,18]．従来より，芳香族 amine[19,20]，azo 化合物[21]，tryptophan 代謝産物[22]，3-methylcholanthrene など[23]多くの発癌物質が報告されており，種々の動物に経口あるいは，膀胱内注入で膀胱腫瘍の発生がえられている．しかし，これら芳香族アミンなどの物質は，短期間に移行上皮腫瘍を，特に選択的に高率に発生させる点からは，BBN および FANFT に劣っている．BBN は FANFT と比較するとより低濃度で発癌させることが出来る．BBN は少量の Tween 80 を添加した飲料水に0.05%の濃度で混ぜて，ラットに12週間投与し，その後放置すれば28週間で 100 %膀胱癌の発生を認め，その投与濃度と投与期間の相違によりラット膀胱癌の発生頻度に明瞭な相関関係があることが知られている[24]．また，BBN 膀胱癌はラットのいずれの系にも発生しう

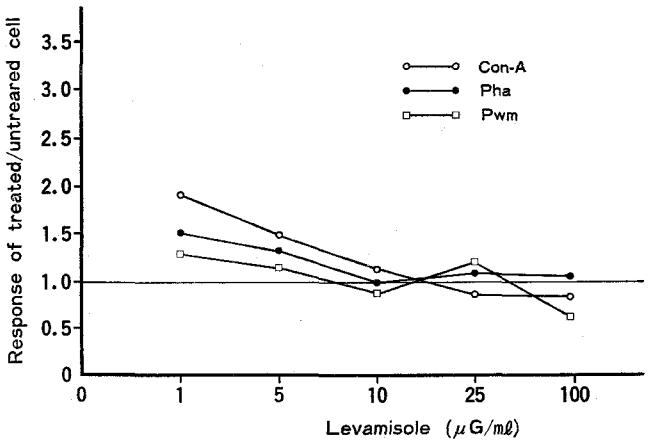


Fig. 14. The effect of levamisole on spleen cell response to mitogen (Group 1)

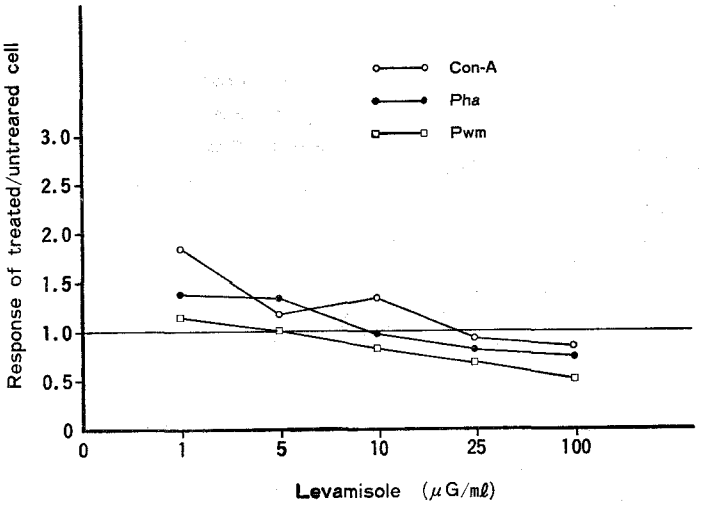


Fig. 15. The effect of levamisole on thymocyte response to the mitogen (Group 1)

るが，ACI, Wistar 系ラットは，Lewis, Sprague-Dalwey, BDIX 系よりも特に高い感受性を示すと言われている[25]．今回使用した Fischer 系 (F-344) ラットに関する報告は少ないが，著者は予備実験において0.05% BBN を12週間投与し，その後放置25週目に観察した結果，ほぼ 100 %に移行上皮癌の発生を認めている．しかし，BBN 誘発ラット膀胱腫瘍に対する石川らによる組織学的分類でみてみるとわれわれの得られた移行上皮癌は Grade I が大部分で一部に Grade II が認められ，Grade III は認められなかった．これは使用したラットの系統差および，BBN 投与期間が短いことに起因するものと考えている．

BBN 膀胱癌の組織発生および発生過程の変化が追求されており[26,27]，それは4つの段階に大別され，まず粘膜がびまん性に6～8層となり（単純性過形成）その後乳頭状ないし結節状過形成が起こり，ついで乳頭腫，さらに移行上皮癌である．粘膜の単純性過形成が発癌要因の消失により容易に正常に移行するのに比し，乳頭状ないし結節状過形成のもののなかには可逆性と非可逆性のものとが存在すること，すなわち発癌要因の消失後もなお癌へ移行する事実が知られており，この変化は前癌変化として重要視されている[25]．また，BBN により発生した移行上皮癌の組織は光顕的だけでなく電顕的にもヒト膀胱癌ときわめて類似していると言われている．

リンパ球幼若化能測定法について

種々の細胞性免疫能パラメーターの中でも mitogen を用いてのリンパ球幼若化能 (blast transformation) 測定は，非特異的なリンパ球機能の指標であるが，比較的安定した定量的反応結果が得られ，かつ再現性に

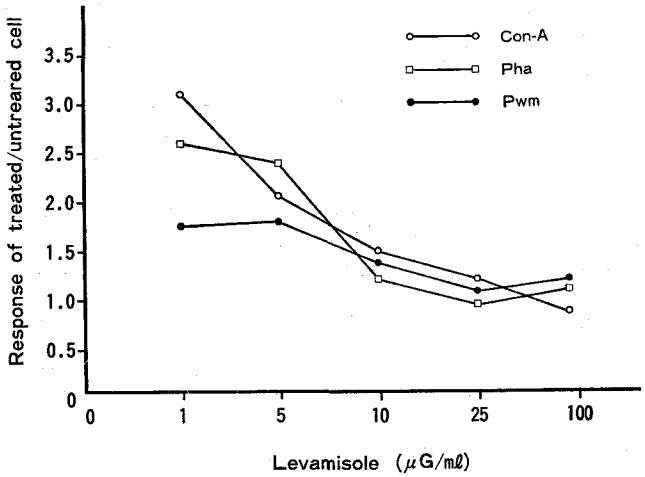


Fig. 16 The effect of levamisole on spleen ceell reponse to the mitogen (Group 2)

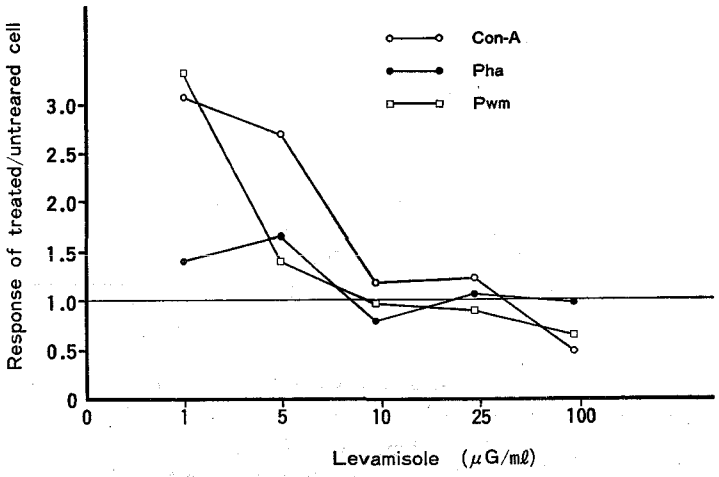


Fig. 17. The effet of levamisole on thymocyte response to the mitogen (Group 2)

Table 3

	No. of Rats	Incidence of Tumor	Incidence of Cancer
Group 1	10	0/10 (0 %)	0/10 (0 %)
Group 2	13	13/13 (100%)	12/13 (92%)
Group 3	14	8/14 (57%)	5/14 (36%)
Group 4	15	11/15 (73%)	9/15 (60%)
Group 5	11	9/11 (82%)	5/11 (45%)
Group 6	11	11/11 (100%)	10/11 (91%)

富むことから，細胞性免疫能を知る目的で広く用いられている．しかし，種々の条件により反応性が規制されることは言うまでもなく，加齢とともに免疫能の低下することはよく知られた事実であり，また，個体差を除外するため，本実験では同一週齢の純系ラット(CRJ: CDF(344) を用い age matched control 群を対照としておいた．また，幼若化能を測定する手技としては従来，試験管法[28]が最も広く行なわれていたが，一度に多数の検体を処理するため，マイクロプレート法[29]を用い行なった．このマイクロプレート法の長所は96個の well をもち，1 well あたり 0.2 ml 培養液中にて 1～2×10^5 個位のリンパ球数で培養できる点であり automated multiple cell harvester を用いて96検体が20分位で処理可能となっている．Mitogen の種類は T cell mitogen として PHA, ConA, PWM, それに B cell を幼若化させることで知られている LPS を用いた．T cell mitogen に反応する T cell は同一でなく違った subset にあることが明らか

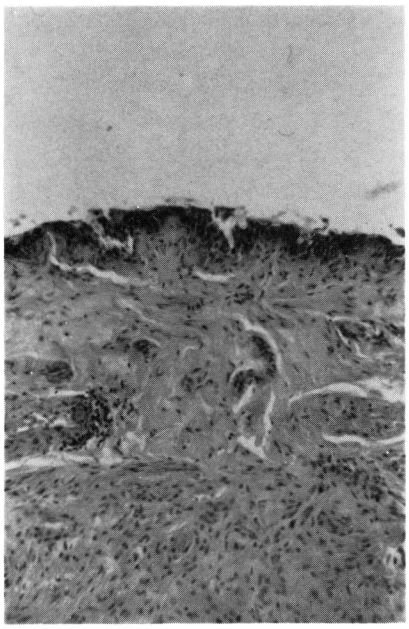


Fig. 18

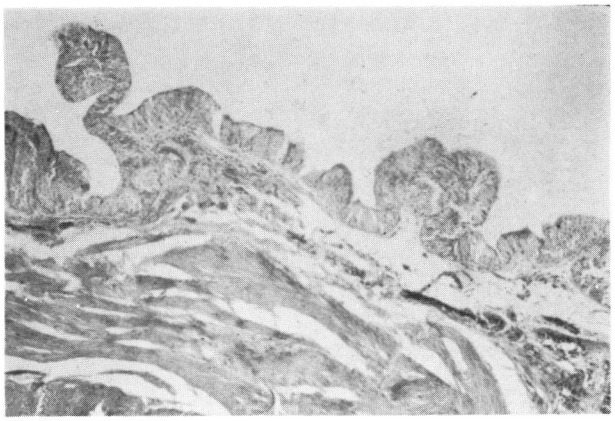


Fig. 19

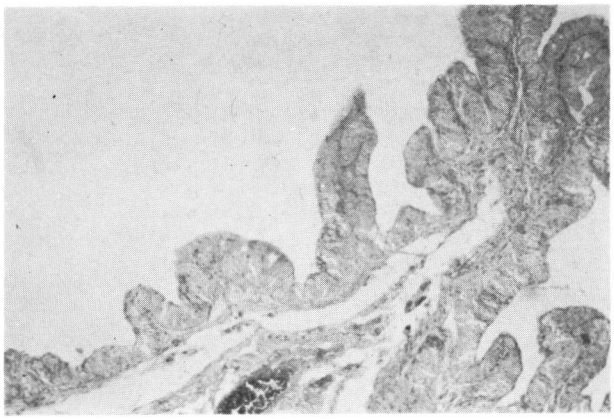


Fig. 20

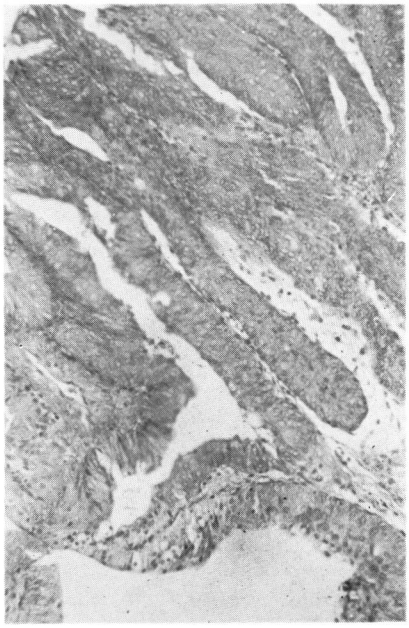


Fig. 21

にされつつあり[30]，多種類の mitogen を用いて同一検体を同時に測定することは宿主免疫能の状態をより適確に把握する上で参考になると考えたからである．mitogen の濃度については，Oppenheim ら[31]は optimal 濃度で正常でも，suboptimal 濃度ではじめて異常値を示す例を報告しているが，今回は予備実験にて得られた optimal 濃度のみにて検討した．

発癌過程の免疫能の変動について

化学発癌剤自体の免疫抑制について MC[6] および DMBA[5] などは免疫を顕著に抑制することが知られているが，肝癌発生作用のあるアゾ色素，およびジアルキルニトロソアミンは比較的弱いとされている．BBN による膀胱発癌過程のリンパ幼若化能の変動について橋本[12]は C 57 BL/6 マウスを用い Con A による幼若化率を測定し，BBN 投与群と正常群の間に差はないと述べており，西島[32]は Wistar 系ラットに 0.025 % BBN を投与し胸腺小リンパ球の幼若化率を測定し，膀胱腫瘍の発生が認められる以前より，幼若化率の低下が認められると報告している．今回の著者の成績も西島の報告と同様発癌以前より幼若化能低下傾向を示している．これらから判断し BBN は実験条件は異なっているが，軽度の免疫能抑制作用があるものと推察される．

Levamisole の免疫賦活作用

Levamisole は 1966 年 Raeymaekers ら[33]によって駆虫薬として開発されたものであるが，駆虫作用のほ

かに，免疫賦活作用があることが見い出され[34]，最近癌治療への応用が試みられている．その免疫賦活作用は若い健康人には，効果がほとんどないが，老人の免疫不全には効果が認められるとされている．また癌治療だけでなく，自己免疫疾患，アレルギー性疾患，免疫不全症などにも応用されており，数多くの免疫学的パラメータに影響を与えることがわかっている[35]．しかしその作用機序には，不明な点が多く，投与量および投与間隔などにおいても統一した見解は出ていない．今回，T cell mitogen として Con A，PHA および PWM を用いた時の幼若化能は Levamisole を 1 mg/kg 3, mg/kg 投与した群において賦活効果を認めたが，8 gm/kg 投与群では認められず B cell を刺激する LPS を用いての幼若化能では，賦活効果は認められなかった．このことは Levamisole には T cell に対して mitogen や antigen と同様に核酸および蛋白合成を増加させる働きがあり，B cell に対しては影響しないと言う諸家の報告[35]と一致している．

Levamisole の *in vitro* での効果について

リンパ球幼若化能測定に際して，mitogen と各種濃度の Levamisole を同時に加えた際の Levamisole による幼若化能増強効果を調べたところ，BBN 投与群および無処置群ともに Levamisole 1～10 μg/ml の濃度で S.I. は増強され，25～100μg/ml では変化しないか，むしろ抑制傾向を示した．このことは Hadden ら[36]の言うように，Levamisole それ自体がある一定濃度で minor mitogen としての働きを示すものと考えられる．岩口ら[34]は Levamisole の mitogen としての作用が弱いのは，分子量が 240 と低分子のためと推察している．Wood らは[37] Levamisole の幼若化率への影響は動物の系統差，培養時間により異なると述べており，Balb/c マウス脾細胞に Levamisole 0.1～10μg/ml の濃度で培養液中に加え stimulation Index 1.5～1.7 の幼若化反応を得ている．Merluzzi らは[38] CBA/J マウス脾細胞に低濃度の Levamisole と mitogen を同時に加えて Con A の場合，幼若化能の増強効果を認めたが，LPS では認めず Levamisole が *in vitro* で T cell に作用することを示している．また Sampson は[39] *in vitro* での効果が臨床的至適投与量と一致していると述べている．著者の結果では BBN 投与群の幼若化能増強効果が，無処置群のそれより強くあらわれていたが，これは Amery[40] が述べているように Levamisole がいわゆる antianergic chemotherapeutic agent であり免疫能を正常レベル以上に亢進させることはできないが anergic 状態にある動物の免疫能は回復させることが可能であることに起因するものと考えている．

Levamisole 投与と瘍腫および癌発生率

今回の実験で Levamisole の効果をみてみると BBN 単独投与群では腫瘍発生率 100 %，癌発生率92%であったのに対して，BBN と Levamisole 1～3 mg/kg 投与した群は，腫瘍発生率57～82%，癌発生率36～60%と，それぞれの発生頻度は BBN 単独投与群と比較して減少していた．しかし BBN と Levamisole 8 mg/kg 投与した群では腫瘍発生率 100 %，癌発生率 81 %と BBN 単独投与群とほぼ同じ結果であった．この成績と免疫能の関係をみるに腫瘍および癌発生率の低い群では免疫能の抑制はみられず，高い群では免疫能が抑制される傾向にあり，また *in vitro* における成績でも Levamisole は，リンパ球幼若化能に対して低濃度では増強効果を示し，高濃度では影響しないか，むしろ抑制的に働くことから，これら発生率と免疫能はほぼ相関する成績であった．このことは Levamisole 1～3 mg/kg の投与量でラットの宿主免疫能が賦活化され，それらが何らかの形で腫瘍発生に抑制的に働くものと推測され，Levamisole にはある範囲の濃度において腫瘍発生抑止効果を認めることが考えられた．BBN 誘発ラット膀胱腫瘍に対する免疫賦活剤の影響について柴田ら[41]は OK-432，川喜多ら[42]は BCG-CWS を投与することにより，BBN 単独投与に比較して，癌発生率の低下あるいは，low grade tumor がより多く出現したと述べている．Levamisole にはほかに宿主の細胞性免疫関与する細胞に作用し，抗体産生細胞には影響しない非特異的免疫賦活剤で thymosin 様作用があるといわれており，またリンパ球の幼若化能の促進，リンホカインの増量，顆粒球の遊走性貪食作用への影響などの作用があることが報告されている．制癌剤と Levamisole の併用は実験的には，白血病，固型腫瘍いずれの場合にもその効果が報告されており，化学療法だけでなく，外科療法あるいは放射線療法との併用が考えられつつある．今回の実験成績から膀胱腫瘍の膀胱保存手術後の再発予防に対して免疫療法の応用が何らかの効果が期待できるものと推測された．

結　　語

0.05% BBN を12週間ラットに経口投与し，膀胱粘膜に前癌状態をつくり，これに 1～8 mg/kg の Levamisole を連日経口投与し，各種 mitogen によるリンパ球幼若化能の推移および，実験開始後25週目の膀胱腫瘍発生状態について検討した．

1．各種 mitogen (Con A, PHA および PWM) に対する脾細胞，胸腺細胞の幼若化能は，無処置群に較

べて，BBN 単独投与群は徐々に抑制される傾向にあったが，LPS の場合は両者に差は認められなかった．Levamisole 投与群のうちでは低単位投与群である1～3 mg/kg 投与群で，BBN 単独投与群より高い値を示したが，無処置群より賦活される成績ではなかった．

高単位投与の 8 mg/kg 投与群は，BBN 単独投与群と同じかむしろ低い値を示した．しかし LPS に対する反応では，この Levamisole 投与による影響は認められなかった．

2．幼若化能測定に際して，mitogen とともに Levamisole を培養液中に加えると Levamisole 1～5 μg/ml の濃度で幼若化能増強効果が認められ，10～100μg/ml の濃度では増強されないか，または抑制される傾向にあった．この影響は無処置群より BBN 単独投与群に強くあらわれた．

3．腫瘍発生率は，BBN 単独投与群に較べて8週目より25週目まで Levamisole 1 mg/kg 投与した群が有意 ($P<0.01$) に低かった．

癌発生率では，BBN 単独投与群に較べて，8週目より25週目まで Levamisole 1 mg/kg 投与した群および12週目より25週目まで Levamisole 3 mg/kg 投与した群が有意 ($P<0.05$) に低い発生率であった．以上より Levamisole はラット実験的膀胱腫瘍発生過程における非特異的免疫能に何らかの形で影響することが示唆された．

本論文の要旨は第67回 日本泌尿器科学会総会，第28回泌尿器科中部連合地方会ならびに第13回 兵庫がん化学療法研究会において発表した．

稿を終るに当り，御懇篤な御指導と御校閲を賜った恩師石神襄次教授に心から感謝の意を表します．さらに直接御指導を賜った守殿貞夫助教授ならびに本研究に御協力下さった当教室員各位に厚く御礼申し上げます．

文　　献

1) Haskil JS, Yamamura Y, Radov L: Host responses within solid tumors; Non-thymus-derived specific cytotoxic cells within a murine mammary adenocarcinoma. Int J Cancer **16**: 798～809, 1975
2) Kikuchi K, Ishii Y, Ueno H, Koshiba H: cell-mediated immunity involved in autochthonous tumor rejection in Rats. Ann NY Acad Sci **276**: 188～206, 1976
3) Elbim CM, Reinsch CL, Schlossman SF: T and B lymphocyte migration into syngeneic tumors. J Immunol **118**: 1042～1048, 1977
4) Baldwin RW: Immunological aspects of chemical carcinogenesis. Adv Cancer Res **18**: 1～75, 1973
5) Matsuoka Y, Yamashita U, Fujiwara H, Senoh H, Kitagawa M: Disturbance of the immune-surveillance mechanism in mice during chemical carcinogenesis: GANN Monograph for Cancer Res **16**: 3～14, 1974
6) Eisenberg E, Shklar G: Levamisole and hamster pouch carcinogenesis. Oral Surg **43**: 562～571 1977
7) 岡島英五郎・平松　倪・本宮善炭・入江一之・林威三雄・石川昌義：膀胱腫瘍に関する臨床的研究：日泌尿会誌 **61**: 783～804, 1970
8) 鈴木茂章・島谷政佑・寺尾暎治：膀胱腫瘍の臨床統計．泌尿紀要 **19**: 425～435, 1973
9) 徳永　毅・天本太平：膀胱保存手術，特に TUR と部分切除の比較検討と適応限界について．西日泌尿 **38**: 186～191, 1976
10) 村田庄平・三品輝男・大江　宏・渡辺康介・高橋徹・秋山喜久夫：膀胱癌に関する研究．泌尿紀要 **23**: 47～50, 1977
11) 近藤　厚：膀胱腫瘍に対する手術療法の遠隔成績と手術の限界について．手術 **29**: 1243～1251, 1975
12) 橋本嘉幸：癌細胞に対する免疫応答：蛋白質，核酸，酵素 **23**: 615～624, 1978
13) Rygaard J, Povlsen CO: The nude mouse vs. The hypothesis of immunological surveillance. Transpl Rev **28**: 43～61, 1976
14) Lilly F, Pincus T: Genetic control of murine viral leukemogenesis. Adv Cancer Res **17**: 231～277, 1973
15) Lappe MA: Tumor specific transplantation antigens. Nature **223**: 82～84, 1969
16) Rehn L: Blasengeschwülste bei Fuchsic-Arbeitem. Arch Klin Chir **50**: 588～600, 1895
17) Druckrey H, Precussmann R, Ivankovic S, Schmidt CH, Mennel HD, Stahl KW: Selektive Erzeugung von Blasenkrebs and Ratten durch Dibutylund N-Butyl-N-Butanol (4)-nitrosamin. Z Krebsforsch **66**: 280～290, 1964
18) Ertürk E, Price J: The production of carcinoma of the urinary bladder in Rats by feeding N-

[4-(5-Nitro-2-furyl)-2-thiazolyl] formamide. Cancer Res **27**: 1998～2002, 1967

19) 石川昌義：B-Naphthylamin ヲ以テセル膀胱腫瘍ノ実験的研究（其一）家兎ニ於ケル場合．日泌尿会誌：**30**, 1, 1941.

20) Mcdonald DF, Lund RR: The role of the urine in vesical neoplasm. J Urol **71** : 560～570 1954

21) Yoshida T: Über die nebensächlich beobachteten Harnblasenepithcliome der mit o-Amidoazotoluol gefütterten Hepatomratten. GANN **29**: 295～301, 1935

22) Allen MJ, Boyland E, Dukes CE, Horning ES: Cancer of the Urinary bladder induced in mice with metabolites of aromatic amines and tryptophan. Brit J Cancer **11**: 212～228, 1957

23) Jull JW: The Induction of tumors of the bladder epithelium in mice by the direct application of a carcinogen. British J Cancer **5**: 328～330, 1951

24) Ito N: Experimental studies on tumors of Rats induced by chemical carcinogenesis. Acta Pathol Japon **23**: 87～109, 1973

25) 福島昭治・伊東信行：癌原性物質誘発腫瘍の病理，化学物質と癌の発生．小田島成和・橋本嘉幸，初版，p.247～264, 学会出版センター，東京 1978

26) Ito N, Sugihara S, Makiura S, Arai M, Hirao K, Denda A, Nishio O: Effect of N-(3,5-Dichlorophenyl) succinimide on the histological pattern and incidence of kidney tumors in rats induced by dimethylnitrosoamine. GANN **65**: 131～138, 1974

27) Ito N: Early changes caused by N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine in the bladder epithelium of different animal species. Cancer Res **36**: 2528～2531, 1976

28) Pauly JL, Sokal JE, Han T: Whole-blood culture technique for functional studies of lymphocyte reactivity to mitogens, antigens, and homologus lymphocytes. J Lab Clin Med **82**: 500～512, 1973

29) 大野竜三・三島秀人・平林憲之・山田一正・浅井紀一：ヒトリンパ球の微量培養法と Multiple automated sample harvester による DNA 合成能の測定．医学のあゆみ **97**: 776～768, 1976

30) Serrou B, Thierry C, Chollet P, Chassagne J, Sauvezie B, Bidet JM, Plagne R: Differences in mitogen response and electrophoretic motility of two T-Lymphocyte sub-populations. Europ J Cancer **13**: 361～365, 1977

31) Oppenheim JJ, Blaese RM, Waldmann TA: Defective lymphocyte transformation and delayed hypersensitivity in wiskott-aldrich syndrome. J Immunology **104**: 835～844, 1970

32) 西島高明：実験的膀胱腫瘍に関する研究—特に担癌生体の細胞性免疫能について．日泌尿会誌 **69**: 1044～1054, 1978

33) Raeymaekers AHM, Allewijn FTN, Vandenberk J, Demoen PJA, Offenwert TTTV, Janssen PAJ: Novel broad-spectrum anthelmintics. Tetramisole and related derivatives of 6-Arylimidazo [2, 1-b] thiazole. J Med Chem **9**: 545～551, 1966

34) 岩口孝雄・穂積豊治：癌治療における Levamisole; 臨床免疫 **9**: 423～433, 1977

35) Symoens J, Rosenthal M: Levamisole in the modulation of the immune response: The current experimental and clinical state. J Reticuloendthel Soci **21**: 177～221, 1977

36) Hadden JW, Coffey RG, Hadden EM, Corrales EL, Sunshine GH: Effects of Levamisole and imidazole on Lymphocyte proliferation and Cyclic Nucleotide Levels. Cell Immunol **20**: 98～103, 1975

37) Woods WA, Siegel MJ, Chirigos MA: In vitro stimulation of spken cell cultures by Poly 1, Poly C and Levamisole. Cell Immunol **14**: 327～331, 1974

38) Merluzzi VJ, Badger AM, Kaiser CM, Cooperband SR: In vitro stimulation of murine lymphoid cell cultures by levamisole. Clin Exp Immunol **22**: 486～492, 1975

39) Sampson D, Lui A: The effect of Levamisole on cell-mediated immunity and suppressor cell function. Cancer Res **36**: 952～955, 1976

40) Amery WK: Immunopotentiation with Levamisole in resectable bronchogenic carcinoma; A double blind Controlled trial. Brit Med J **3**: 461～464, 1975

41) 柴田道子・福島昭治・Cohen SM. 中西敬介・荒井昌之・伊東信行：第37回日本癌学会総会紀事 p.157, 1978

42) 川喜多 順二：ラット実験的膀胱腫瘍に対する BCG および BCG-CWS 投与の影響について．第66回日本泌尿器科学会総会予稿集 p.110, 1978

（1981年9月16日迅速掲載受付）

アレルギー性疾患
慢性肝疾患に……
■グリチルリチン製剤
強力ネオミノファーゲンシー
健保略称　強ミノC
●作用
抗アレルギー作用，抗炎症作用，解毒作用，インターフェロン誘起作用，および肝細胞障害抑制・修復促進作用を有します。
●適応症
アレルギー性疾患（喘息，蕁麻疹，湿疹，ストロフルス，アレルギー性鼻炎など）。食中毒。薬物中毒，薬物過敏症，口内炎。
慢性肝疾患における肝機能異常の改善。
●用法・用量　1日1回，1管（2ml，5ml，または20ml）を皮下または静脈内に注射。
症状により適宜増減。
慢性肝疾患には，1日1回，40mlを静脈内に注射。年齢，症状により適宜増減。
包装　20ml 5管・30管，5ml 5管・50管，2ml 10管・100管
※使用上の注意は，製品の添付文書をご参照下さい。
●内服療法には　グリチロン錠二号
包装　1000錠，5000錠
健保適用
合資会社 ミノファーゲン製薬本舗（〒160）東京都新宿区新宿3-1-12