

マイトマイシンあるいはトヨマイシン処理 エールリッヒ癌組織による自動免疫学的研究

京都大学医学部外科学教室第1講座 (指導 荒木千里教授)

永 松 良 夫

〔原稿受付 昭和39年5月13日〕

Studies on Active Immunization of Mice with Mitomycin- and Toyomycin- Prepared Ehrlich Ascites Carcinoma Tissue

by

YOSHIO NAGAMATSU

From the 1st Surgical Division, Kyoto University Medical School
(Director : Prof. Dr. CHISATO ARAKI)

Recently, the reports indicating existence of tumor specific antigen has been increasing. Even when the tumor specific antigen is proved to exist and its separation and purification are performed successfully, it may be another problem whether the antigen is potential enough to induce autoimmunological response which can benefit the clinical courses of patients. Judging from the results of the various studies on auto-immune diseases and the experimental studies of LANDSTEINER and others on serological specificity of the complex of chemicals and proteins, anticancer drugs which have strong affinity with tumor cells, might be combined with a certain component of the tumor cells or can modify their metabolic process, resulting in inducing new antigenicity to the cancer tissue. This study has been attempted to examine the possibility that this kind of antigenic modification in cancer tissue can be utilized in experimental cancer treatment.

Mitomycin or Toyomycin was injected into the peritoneal cavity of mice of dd strain which had been inoculated intraperitoneally with Ehrlich ascites carcinoma cells previously. After the tumor tissue was made contact with the anticancer agents in vivo for varying time, the ascitic fluid was collected to be used as antigens. With the antigen, healthy mice were immunized once or twice with interval of a week. From 10 to 25 days after the first immunization the mice were challenged with intraperitoneal inoculation of Ehrlich ascites carcinoma cells. In some groups of the mice, after the immunization and challenge inoculation, various anticancer agents including Mitomycin and Toyomycin were injected intraperitoneally. The effects of the immunization and its combination with the administration of anticancer agents on prolongation of the survival days were examined.

The results were as follows:

1) In the groups immunized with Mytomycin- or Toyomycin- prepared antigen, the animals challenged with Ehrlich ascites carcinoma cells died almost at the same time as

the control animals without immunization.

2) When Mitomycin or Toyomycin was given after the immunization, the animals survived much longer than the control animals immunized alone or given the drugs alone. The effect was marked when Mitomycin injection was given to the groups immunized with Mitomycin- prepared antigen or Toyomycin injection to the groups immunized with Toyomycin- prepared antigen respectively, when compared with the cases of the cross administration of the drugs.

3) After the immunization, the injection of anticancer agents other than Mitomycin and Toyomycin, for example, Nitromin, Tespamin, Endoxan, or Merphyrin showed no effect.

4) In the groups injected with Mitomycin after the immunization with Mitomycin- prepared antigen, the effectiveness of the antigens prepared in various ways was compared. It was shown that i) the amount of Mitomycin used in preparing the antigen did not have any correlation to the degree of its effect, provided that its amount was enough to prevent the inoculation from making a new tumor ; ii) the period of contact of the drug with the tumor tissue varied from 1 hr to 24.5 hrs, the best results being obtained with the antigen prepared after the contact for 12.5 hrs ; and iii) an antigen which was prepared by injecting Mitomycin into tumor bearing mice cooled previously seemed to give slightly better effect when compared with the antigens prepared normothermally. The final conclusion as to the most appropriate method to prepare the antigen has not yet been obtained.

To recapitulate, it was indicated that the immunization by itself could not effect prolongation of the survival days of the animals. When the same anticancer drug as used to prepare the antigen was given after the immunization, however, the effects of the immunization became manifest, resulting in marked prolongation of the survival days. Therefore, it can be said that the preparation of the tumor tissue with anticancer drugs might modify antigenicity of a certain component of Ehrlich ascites carcinoma tissue, and that the modified antigenicity might have specificity to the drug used to prepare the antigens.

In conclusion, cancer might be treated by inducing an analogous phenomenon to "Autoimmunization" in the patients. Before such a therapy as proposed in this report is applied to clinical use, more studies are required to find an appropriate method of preparing effective antigen.

第1章 緒 言

癌の免疫療法の歴史は古く、多数の実験的⁸⁾²⁴⁾乃至臨床的¹³⁾³³⁾研究が報告されているが、未だ、広く臨床的に応用される程の効果は、期待し難い段階にある。Homograft Rejection を除外する為、高度に純系化された動物株で、その自然発生癌を用いて行つた癌の免疫学的研究の中には、癌の特異抗原の存在を肯定する成績¹¹⁾¹⁷⁾²²⁾を報告しているものもあるが、この種の特異抗原を分離精製して、これを直接に癌の治療法に応

用する事は、現在でも極めて困難なようである。もし、腫瘍の新陳代謝を、何等かの方法、例えば、ある種の薬剤投与等により、人為的に変化させて、そのような病的過程で生ずる可能性のある、自己抗原の如きものを作るか、あるいは、腫瘍細胞と親和性の強い薬剤を用いて、何等かの細胞成分と結合させ、その免疫学的な特異性を交換して、新しい抗原を作る事が可能ならば、この物を癌の免疫療法に利用する道が開かれるかも知れない。

上述の可能性を検討する為に、マイトマイシン、又

はトヨマイシンで処理したエールリッヒ癌組織で、d d 系マウスを免疫して、エールリッヒ癌細胞接種に対する延命効果を検討し、若干の成績を得たので報告する。

第2節 実験材料

第1節 実験動物

京大和進会動物部より購入した、生後5～8週、体重15～20grの健康な雄性 d d 系マウスを、予め7～10日飼育し、1群を5, 8あるいは10匹として実験に供した。

第2節 実験腫瘍

実験に用いた腫瘍は、京大外科教室にて、累代移植せる、エールリッヒ腹水癌(「エ」癌)である。

第3節 制癌剤

次の各種制癌剤を使用した。ナイトロミン(NMO)は0.9%食塩水(生食)に溶解し、テスパミン(Tespa), エンドキサン(End), マーフィリン(MH), マイトマイシン(MM), 及びトヨマイシン(TM)は、夫々、蒸溜水に溶解し、所要量はすべて0.2ccに含有する如く調整した。なお、上記の各制癌剤はすべてその都度新製使用した。

第3章 実験方法及び実験成績

第1節 実験方法の概要

I 抗原作製

In vivo で、腫瘍組織を高濃度のMMあるいはTMに一定時間接触させ、これを抗原として使用する事にした。すなわち、「エ」癌細胞接種後1週間前後のマウスの腹水を、0.15～0.20ccづつ健康マウスの腹腔に移植し、4～6日後、MMあるいはTMの種々の量を0.2ccの蒸溜水に溶解したものを腹腔内に注射(腹注)した。種々の時間後腹水を採取し、これを集め、生食にて2倍に稀釈して抗原とした。なお、この際、出血性の腹水は使用しなかつた。又、抗原はその都度新製使用した。

II 免疫操作

上記の抗原は、十分混和後直ちに0.1ccづつ、健康マウスの右肩胛下部に皮下注射した。(初回免疫)又、ある動物群には、更に7日後、0.1ccづつ左肩胛下部に皮下注射した。(追加免疫)

III 「エ」癌細胞の接種及び制癌剤の併用

初回免疫を行った後ある期間をへてから、その免疫効果を知る為「エ」癌新鮮細胞接種による challenge を

行つた。すなわち、「エ」癌細胞接種後1週間前後の坦癌マウスから採取した「エ」癌新鮮細胞の 0.9×10^4 個、あるいは 100×10^4 個、時には 250×10^4 個を免疫動物の腹腔内に接種した。又、ある免疫動物群には、免疫操作と化学療法剤との併用の効果を知るため、上記「エ」癌細胞接種後、2日乃至4日の間に1乃至2回、制癌剤の一定量を腹注した。1回の投与量は、NMO10mg/kg, Tespa 10 mg/kg, End 50 mg/kg, MH 5 mg/kg, MM 1 mg/kg, あるいはTM0.25mg/kgで、すべて0.2ccの生食あるいは蒸溜水に溶解して注射した。

IV 対照群

各実験につき、その都度各種の対照群を置き、その成績を比較する事とした。

V 成績の判定

上記各群の動物は、80日あるいは100日以上長期に亘り生存日数を観察し、死亡したマウスは、剖検により腫瘍死なる事を確認する事にした。

第2節 マイトマイシン処理抗原群の実験

本節の実験では、抗原作成にMMを使用した。この際、用いたMMの量(処理MM量)とその腹注後腹水採取迄の時間(MM処理時間)とを種々に組合せ、この抗原の種類に応じ、実験IからVIIIに分けた。実験V, VIIでは、坦「エ」癌マウスに予め低体温法を施行し、復温後一定時期にMMを腹注して作製した抗原を使用した。

I 実験I

i) 実験方法

本実験に使用した抗原は、坦「エ」癌マウスにMM 15mg/kgを腹注し、2時間後に腹水を採取して作製したものである。

動物は5匹づつの5群に分けた。(表1)第1群には、この抗原をもつて1回だけ免疫し、免疫後10日目に「エ」癌新鮮細胞 250×10^4 個/0.2cc接種した。第2群には、第1群と同様免疫後「エ」癌細胞接種を行つたが、更に48時間後に1回MMを腹注した。第3及び4群は、それぞれ、「エ」癌細胞接種のみ及びこれにMM注併用の対照群とし、第5群は免疫のみの対照群とした。各群共に80日以上観察した。

ii) 実験成績

各動物群の生存日数は、図1の通りで、平均生存日数及び80日以上生存動物数は表1の如くであつた。なお、この際、第1と2群では免疫部位に10匹中7匹に(7/10と記す。以下同様に省略して記す。)皮下腫瘍を形成した。第5群では4/5に皮下腫瘍を形成した。

表 1

群	操作成績	免疫	「エ」癌細胞接種	MM注	平均生存日	80日以上生存動物数
第1群	+	+	+	+	15.2日	0/5
第2群	+	+	+	+	35.0日	0/5
第3群	-	+	-	-	8.6日	0/5
第4群	-	+	+	+	25.6日	0/5
第5群	+	-	-	-	31.0日	1/5

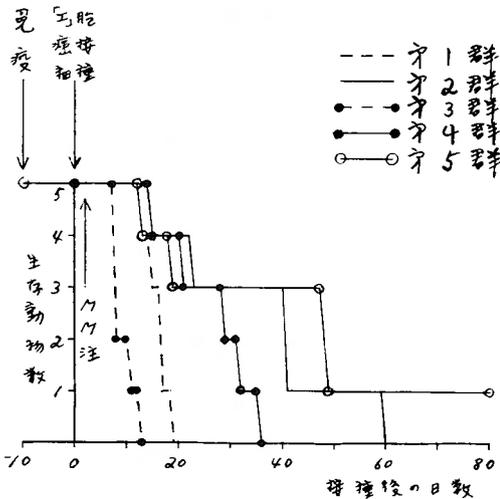


図 1

II 実験II

本実験においては、処理MM量を実験Iの2倍とし、免疫部位に皮下腫瘍を形成しないように試みた。又、「エ」癌細胞接種数を減じ、免疫効果の有無をより明白にしようと試みた。

i) 実験方法

本実験に使用した抗原は、担「エ」癌マウスにMM 15mg/kg を30分の間隔を置いて2回腹注し、2回目の注射後30分に腹水を採取して作製したものである。

動物は10匹づつの4群に分けた。(表2)第1群には、この抗原をもって1回だけ免疫し、免疫後12日目に「エ」癌新鮮細胞 0.9×10^4 個/0.2cc接種した。第2群には、第1群と同様免疫後「エ」癌細胞接種を行ったが、更に48時間後に1回MMを腹注した。第3及び4群は、それぞれ、「エ」癌細胞接種のみ及びこれにMM注を併用の対照群とした。各群共80日以上観察した。

ii) 実験成績

各動物群の生存日数は、図2に示す如くで、平均生存日数及び80日以上生存動物数は、表2の如くであつ

た。本実験において免疫効果の存在は明白となつた。なお、免疫部位に皮下腫瘍は形成しなかつた。以下述べる実験でも、すべて皮下腫瘍を形成しなかつた。

表 2

群	操作成績	免疫	「エ」癌細胞接種	MM注	平均生存日	80日以上生存動物数
第1群	+	+	-	-	80日以上	10/10
第2群	+	+	+	+	80日以上	10/10
第3群	-	+	-	-	26.7日	0/10
第4群	-	+	+	+	29.6日	0/10

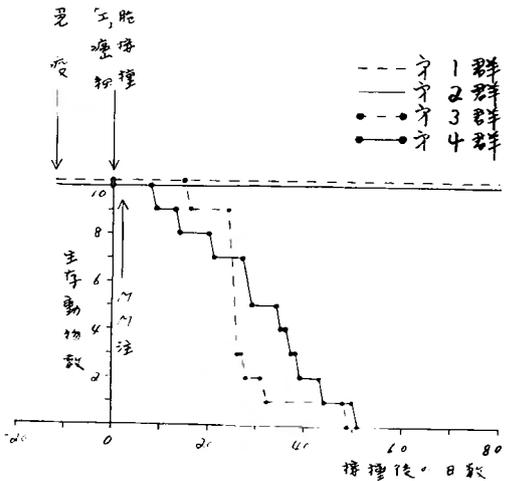


図 2

III 実験III

本実験においては、処理MMの量を更に増し、同時に、処理時間も増加して、免疫効果に如何なる差が現われるかを観察した。

i) 実験方法

本実験には次の3種の抗原を使用した。すなわち、担「エ」癌マウスに

- (1) MM 15mg/kg 30分毎に2回
- (2) MM 15mg/kg 30分毎に3回
- (3) MM 15mg/kg 30分毎に4回をそれぞれ腹注し、最終注射の30分後に腹水を採取して、それぞれ抗原(1), (2), (3)を作製した。

動物は5匹づつの8群に分け、次に述べるような操作を加えた。(表3)第1群には、この抗原(1)でもつて、1週間の間隔で2回免疫し、初回免疫後16日目に「エ」癌新鮮細胞 100×10^4 個/0.2cc 接種した。第2群には、第1群と同様免疫後「エ」癌細胞接種を行った

が、更に48時間後及び96時間後の2回に、それぞれ、MMを腹注した。第3及び4群、あるいは第5及び6群においても、それぞれ、抗原(2)あるいは(3)でもつて、第1及び2群と同様に操作した。第7及び8群は、それぞれ、「エ」癌細胞接種のみ及びこれにMM注を投与の対照群とした。各群共80日以上観察した。

ii) 実験成績

各動物群の生存日数は図3, 4, 5に示す如くで、平均生存日数及び80日以上生存動物数は表3の如くであつた。本実験においては、接種「エ」癌細胞数が実験IIより増しているのので、第1, 3及び5群を第7群と比較した場合、自動免疫の効果は認められなかつた。しかし、自動免疫にMMを併用した場合には、第2, 4及び

6群と第8群との比較で明らかな如く、免疫を行つた動物群の方が延命効果が大きであつた。又、この併用効果は、本実験の範囲内では、処理MMの量と時間との如何にかかわらず、抗原(1), (2), (3)の間に殆んど差がない事がわかつた。なお、本実験と平行して、MMを注射しない担「エ」癌マウスから採取した腹水を、2日間氷室に保存した後抗原を作製し、本実験のMM処理抗原に付する対照として使用してみたが、殆んど全例の免疫部位に皮下腫瘍を形成した。従つて、MM処理抗原群とはその成績を比較出来なかつた。

IV 実験IV

本実験においては、MM処理は一定にしておいて、

表 3

操作成績 群	免疫	エ癌細胞接種	MM注	平均生存日数	80日以上生存動物数
第1群	抗原(1) +	+	-	14.2日	0/5
第2群	抗原(1) +	+	+	37.3日	1/5
第3群	抗原(2) +	+	-	18.0日	0/5
第4群	抗原(2) +	+	+	38.5日	1/5
第5群	抗原(3) +	+	-	13.0日	0/5
第6群	抗原(3) +	+	+	37.0日	1/5
第7群	-	+	-	16.0日	0/5
第8群	-	+	+	29.4日	0/5

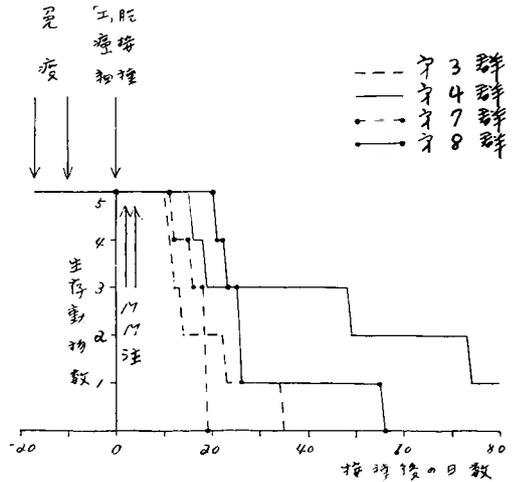


図 3

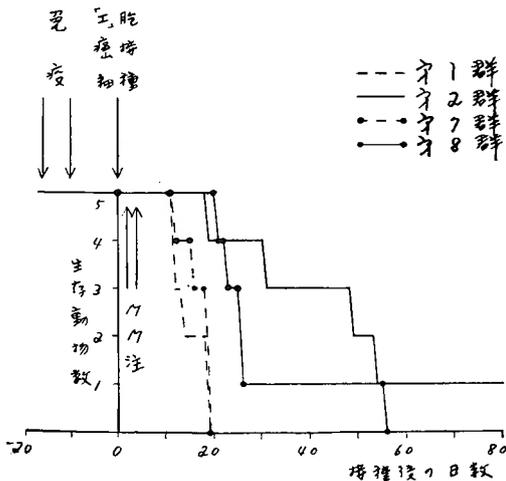


図 4

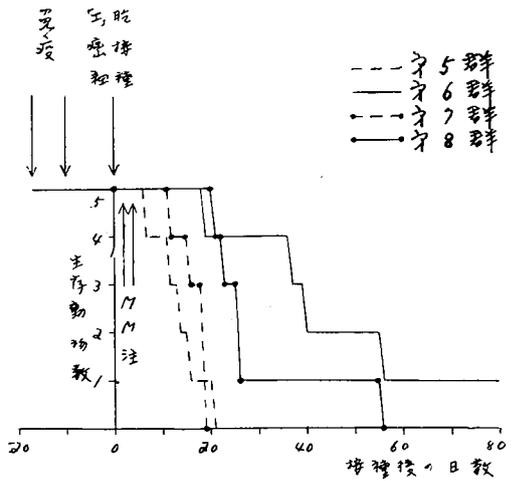


図 5

MM処理時間を変えて、免疫効果に如何なる差が現われるかを観察した。

i) 実験方法

本実験には次の2種の抗原を使用した。すなわち、MM 20mg/kg を30分の間隔を置いて2回腹注し、2回目の注射後30分及び1時間30分の2回腹水を採取し、それぞれ抗原(1)及び(2)を作製した。

動物は、5匹あるいは8匹づつの6群に分け、表4に示すような操作を加えた。すなわち、第1群には、この抗原(1)でもつて、1週間の間隔を置き2回免疫し、初回免疫後21日目に「エ」癌新鮮細胞 100×10^4 個/0.2cc 接種した。第2群には、第1群と同様免疫及び「エ」癌細胞接種を行ったうえに、更に48時間後及び96時間後に計2回MMを腹注した。第3及び4群では、抗原(2)でもつて、それぞれ第1及び2群と同様に操作した。第5及び6群は、それぞれ「エ」癌細胞接種のみ及びこれにMM注を併用の対照とした。各群共80日以上観察した。

ii) 実験成績

各動物群の生存日数は、図6及び7に示す如くで、平均生存日数及び80日以上生存動物数は表4の如くであった。本実験においても、自動免疫とMMとの併用効果は認められたが、抗原(1)及び(2)の免疫効果は、本実験の範囲内では、処理時間の差にかかわらず、殆んど同様である事がわかった。

表 4

群	操作成績	免疫	「エ」癌細胞接種	MM注	平均生存日数	80日以上生存動物数
第1群		抗原(1) +	+	-	16.8日	0/5
第2群		抗原(1) +	+	+	40.0日	1/8
第3群		抗原(2) +	+	-	13.2日	0/5
第4群		抗原(2) +	+	+	36.7日	2/8
第5群		-	+	-	10.4日	0/5
第6群		-	+	+	31.3日	0/8

V 実験V

本実験においては、低体温法⁵⁾³⁷⁾⁴³⁾⁵¹⁾を応用して作製した抗原を使用した。

i) 実験方法

Nembutal 50mg/kg を筋肉内注射し、直腸温が 20°C になるように冷却し、この温度を6時間維持した後に、正常体温に戻る迄加温した。復温後2時間目より、

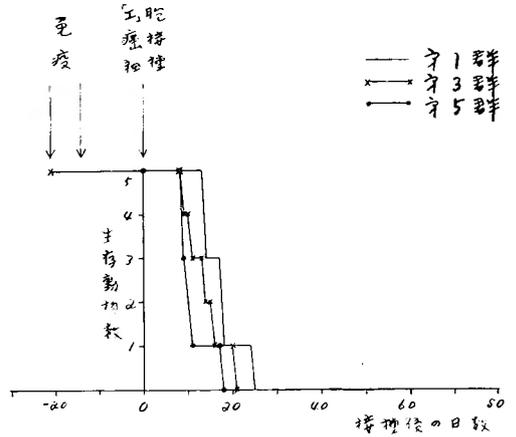


図 6

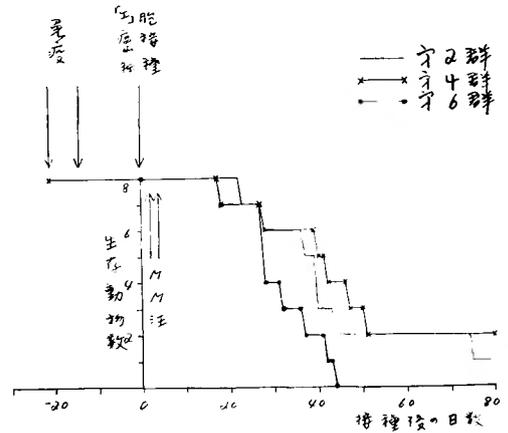


図 7

MM 15mg/kg 30分毎に3回腹注し、最終注射の30分後に腹水を採取し、抗原を作製した。

動物は、5匹づつの4群に分け、表5に示すような操作を加えた。すなわち、第1群には、この抗原をもつて、1週間の間隔を置いて2回免疫し、初回免疫後25日目に「エ」癌新鮮細胞 100×10^4 個/0.2cc 接種した。第2群には、第1群と同様免疫後「エ」癌細胞接種を行ったが、更に48時間後及び96時間後の2回に、それぞれMMを腹注した。第3及び4群は、それぞれ「エ」癌細胞接種のみ及びこれにMM注を併用の対照群とした。各群共80日以上観察した。

ii) 実験成績

各動物群の生存日数は図8に示す如くで、平均生存日数及び80日以上生存動物数は表5の如くであった。自動免疫にMM注を併用した第2群では、3/5は80日

以上生存 (内1/3は第84日目に腫瘍死)した。同一条件で、ただ低体温法を利用せずに作った抗原を使用した実験Ⅲの第4群と比較すると、やや良い成績のようである。

表 5

操作成績 群	免疫	「エ」癌細胞接種	MM注	平均生存日	80日以上生存動物数
第1群	+	+	-	22.8日	3/5
第2群	+	+	+	30.5日	0/5
第3群	-	+	-	19.6日	0/5
第4群	-	+	+	29.2日	0/5

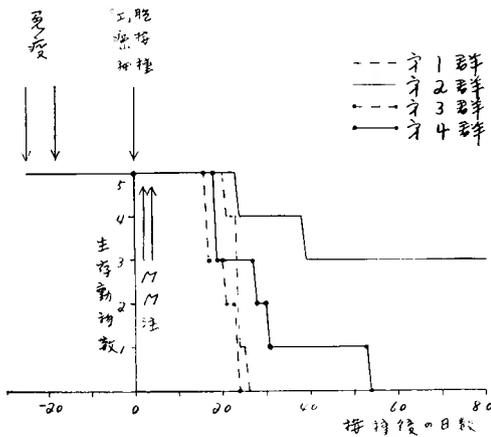


図 8

VI・実験VI

実験Ⅰ～Ⅳにおいては、比較的短時間、すなわち1～2時間程度のMM処理時間により作製した抗原を使用した。本実験においては、MM処理時間を6時間乃至12時間に延長した。

i) 実験方法

本実験には次の3種の抗原を使用した。すなわち、MM 20mg/kgを30分の間隔を置いて2回腹注し、2回目の注射の30分後、6時間後、及び12時間後それぞれ腹水を採取し、それぞれ抗原(1),(2),(3)を作製した。

動物は、10匹ずつの8群に分け、表6に示すような操作を加えた。すなわち、第1群には、この抗原(1)でもつて、1週間の間隔を置き2回免疫し、初回免疫後21日目に「エ」癌新鮮細胞 100×10^4 個/0.2cc接種した。第2群には、第1群と同様免疫後「エ」癌細胞接種を行ったが、更に48時間後及び96時間後に計2回MMを腹注した。第3及び4群、又は第5及び6群においても、

それぞれ、抗原(2)又は(3)でもつて、第1及び2群と同様に行つた。第7及び8群は、それぞれ、「エ」癌細胞接種のみ及びこれにMM注を併用の対照群とした。各群共100日以上観察した。

ii) 実験成績

各動物群の生存日数は図9,10,11に示す如くで、平均生存日数及び100日以上生存動物数は表6の如くであった。本実験においても、自動免疫単独の効果は、各抗原間で処理時間に相当差があつたにもかかわらず、殆んど認められなかつた。ところが、更にMMを併用した場合には、免疫の効果が証明されただけでなく、各抗原の有効性の間に明瞭な差が現れた。すなわち、抗原(3)は、MM腹注と併用した場合に、他の処理時間による抗原では得られない程有効な効果をもたらす事が判明した。

表 6

操作成績 群	免疫	「エ」癌細胞接種	MM注	平均生存日	100日以上生存動物数
第1群	抗原(1) +	+	-	15.9日	0/10
第2群	抗原(1) +	+	+	39.5日	2/10
第3群	抗原(2) +	+	-	22.6日	1/10
第4群	抗原(2) +	+	+	53.4日	5/10
第5群	抗原(3) +	+	-	22.0日	1/10
第6群	抗原(3) +	+	+	100日 以上	10/10
第7群	-	+	-	11.7日	0/10
第8群	-	+	+	36.3日	1/10

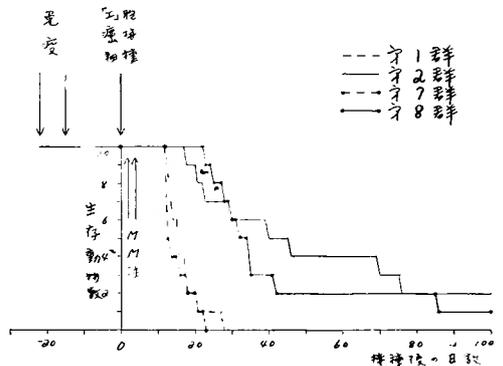


図 9

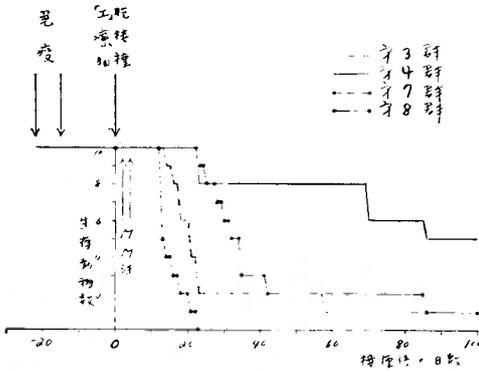


図10

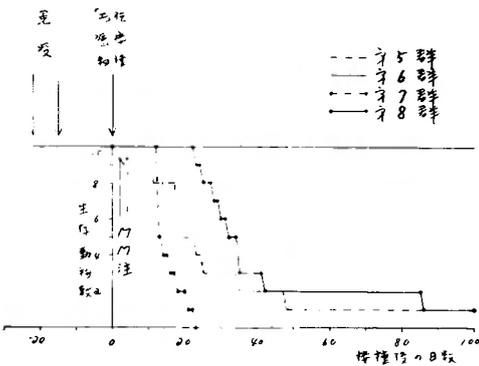


図11

Ⅶ 実験Ⅶ

本実験においては、実験Ⅴ及びⅥの成績を考慮して、抗原作製に際し、低体温法を応用し且つ処理時間を12時間及び24時間にした。「エ」癌細胞接種後に用いるMMは1回のみとした。

i) 実験方法

実験Ⅴと同様に、予め低体温法を施行し、復温後30分及び60分後にそれぞれMM 20mg/kgを腹注し、2回目の注射の12時間後及び24時間後にそれぞれ腹水を採取し、抗原(1)及び(2)を作製した。

動物は、10匹ずつの6群に分け、表7に示すような操作を加えた。すなわち、第1群では、この抗原(1)でもつて、1週間の間隔を置き2回免疫し、初回免疫後21日目に「エ」癌新鮮細胞 100×10^4 個/0.2cc接種した。第2群には、第1群と同様免疫後「エ」癌細胞接種を行ったが、更に48時間後に1回MMを腹注した。第3及び4群では、抗原(2)でもつて、それぞれ第1及び2群と同様に操作した。第5及び6群は、それぞれ、「エ」癌細胞接種のみ及びこれにMM注を併用の対照群とし

た、各群共100日以上観察した。

ii) 実験成績

各動物群の生存日数は図12, 13に示す如くで、平均生存日数及び100日以上生存動物数は表7の如くであった。本実験においても、自動免疫単独の効果は、MM処理時間のいかんにかかわらず、殆んどなかつた。しかし、更にMMを併用した場合には著しい延命効果が

表 7

群	操作成績	免疫	「エ」癌細胞接種	MM注	平均生存日数	100日以上生存動物数
第1群	抗原(1) +	+	+	-	15.6日	0/10
第2群	抗原(1) +	+	+	+	37.0日	5/10
第3群	抗原(2) +	+	+	-	19.6日	1/10
第4群	抗原(2) +	+	+	+	33.7日	3/10
第5群	-	-	+	-	16.9日	0/10
第6群	-	-	+	+	27.4日	0/10

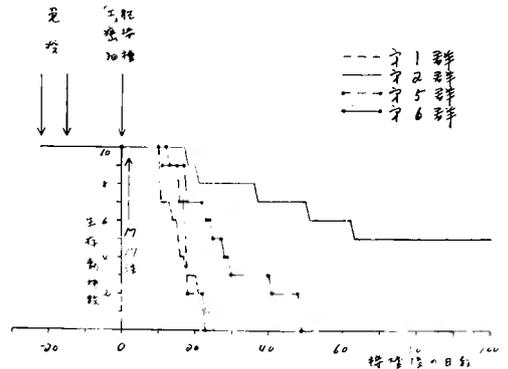


図12

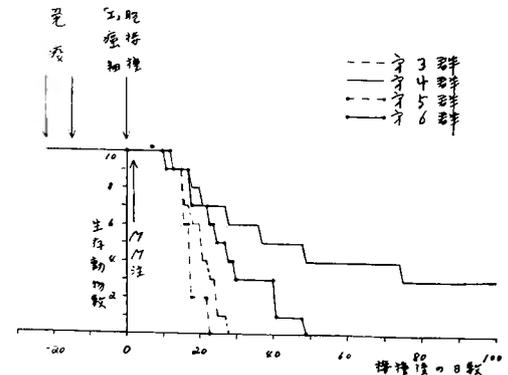


図13

現われた。この際、抗原(1)と(2)を比較すると、抗原(1)を使った第2群の方が、抗原(2)を使った第4群より多少成績が良いようであった。

Ⅷ 実験Ⅷ

本実験においては、実験ⅥのMM処理抗原(3)を用いたが、自動免疫後に併用する制癌剤は、抗原処理に使用したMMの他に、NMO、Tespa、及びTMをも使用して、MM併用の場合との比較を行った。

i) 実験方法

動物は、5匹づつの10群に分け、表8に示すような操作を加えた。すなわち、第1群は実験Ⅵの抗原(3)をもって、1週間の間隔で2回免疫し、初回免疫後21日目に「エ」癌新鮮細胞 100×10^4 個/0.2cc接種し、その48時間後にMMを1回だけ腹注した。同様にして、第3群にはMMの代わりにNMOを、第5群にはTespaを、第7群にはTMを1回だけ腹注した。第2,4,6,8群には、免疫操作を施行せず、「エ」癌細胞接種48時間目に、それぞれ、MM、NMO、Tespa、TMを1回だけ腹注した。第9群は、第1群と同様に免疫し、「エ」癌細胞接種を行ったが、制癌剤は使用しなかつた。第10群は「エ」癌細胞接種のみを行った。各群共80日以上観察した。

ii) 実験成績

各動物群の生存日数は図14,15,16,17に示す如くで、平均生存日数及び80日以上生存動物数は表8の如くであった。本実験においても、自動免疫単独では殆んど効果はなかつた。これにNMO及びTespaを併用しても依然として免疫の効果は現われず、又TMの併用でも殆んど免疫の効果は認められなかつた。所が、抗原処理に使用した制癌剤であるMMを使用した場合に

表 8

群	操作成績		制癌剤注	平均生存日数	100日以上生存動物数
	免疫	「エ」癌細胞接種			
第1群	+	+	MM	35.3日	2/5
第2群	-	+	MM	15.8日	0/5
第3群	+	+	NMO	23.4日	0/5
第4群	-	+	NMO	19.2日	0/5
第5群	+	+	Tespa	21.0日	0/5
第6群	-	+	Tespa	27.0日	0/5
第7群	+	+	TM	29.7日	2/5
第8群	-	+	TM	28.2日	1/5
第9群	+	+	-	15.0日	0/5
第10群	-	+	-	15.0日	0/5

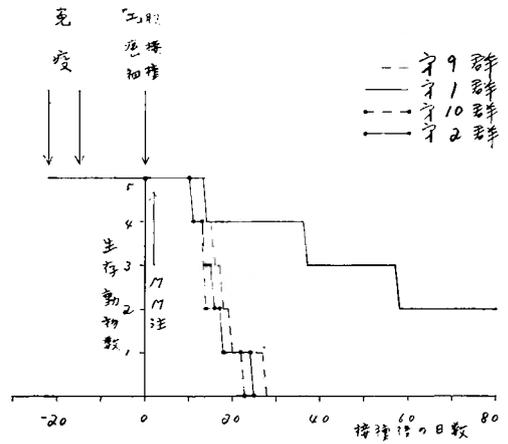


図14

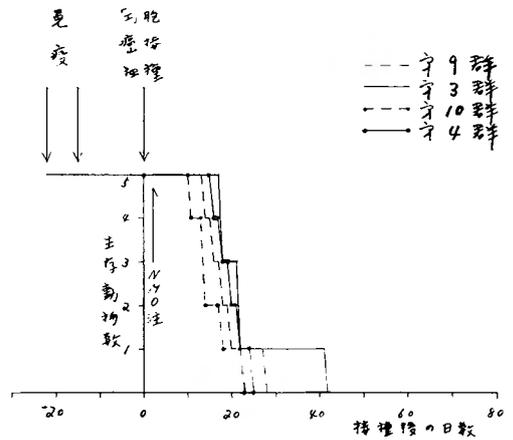


図15

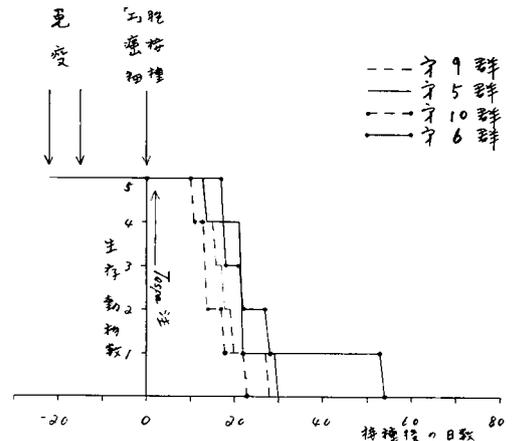


図16

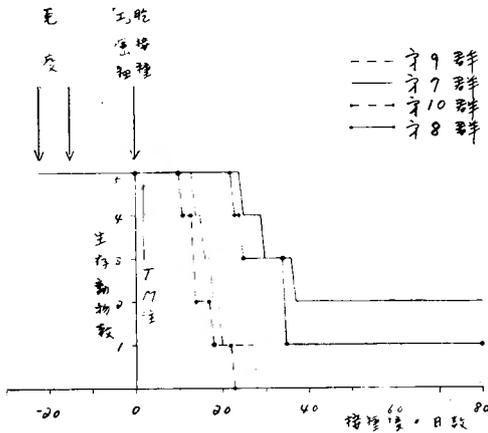


図17

は、第1群の成績に見る如く、飛躍的な効果の増強が見られた。

第3節 トヨマイシン処理抗原群の実験

本節には、TM処理によつて作製した抗原を用いた実験を述べる。

抗原作成に際し、用いたTMの量とその腹注後腹水採取迄の時間との組合せにより、2種の抗原を作製した。

I 実験Ⅱ

i) 実験方法

本実験に使用した抗原は、坦「エ」癌マウスにTM 5 mg/kgを腹注し、2時間後に腹水を採取して作製したものである。

動物は5匹づつの5群に分けた。(表9)第1群には、この抗原をもつて1回だけ免疫し、免疫後10日目に「エ」癌新鮮細胞 250×10^4 個/0.2cc接種した。第2群には、第1群と同様免疫後「エ」癌細胞接種を行ったが、更に48時間後に1回TMを腹注した。第3及び4群は、それぞれ、「エ」癌細胞接種のみ及びこれにTM併用の対照群とし、第5群は免疫のみの対照群とした。各群共80日以上観察した。

ii) 実験成績

各動物群の生存日数は図18に示す如くで、平均生存日数及び80日以上生存動物数は表9の如くであつた。本実験においては、自動免疫のみでも多少の延命効果は認められたが、更にTMと併用した場合にその効果は一層大となつた。しかし、これを免疫操作を行わずにTM投与のみを行った第4群と比較した場合には、両群間には殆んど差は認められなかつた。なお、免疫

部位には皮下腫瘍は形成しなかつた。

表 9

群	免疫	エ腫細胞接種	TM注	平均生存日数	80日以上生存動物数
第1群	+	+	-	17.6日	0/5
第2群	+	+	+	24.6日	0/5
第3群	-	+	-	8.6日	0/5
第4群	-	+	+	22.8日	0/5
第5群	+	-	-	80日以上	5/5

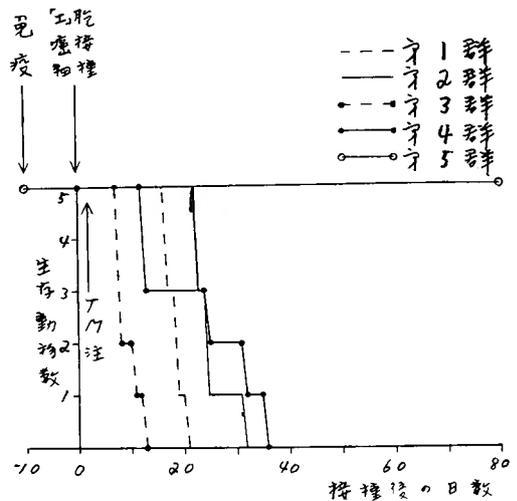


図18

II 実験Ⅲ

本実験においては、第2節実験Ⅱの如く、自動免疫後に併用する制癌剤は、抗原処理に使用したTMの外に、NMO, Tespa, End, MH 及び MM を併用してTM 併用の場合との比較を行った。

i) 実験方法

本実験に使用した抗原は、坦「エ」癌マウスにTM 5 mg/kg を30分の間隔で2回腹注、2回目の注射後30分に腹水を採取して作製したものである。

動物は5匹づつの11群に分け、表10に示すような操作を加えた。すなわち、第1群は、この抗原をもつて、1週間の間隔で2回免疫し、初回免疫後21日目に「エ」癌新鮮細胞 100×10^4 回/0.2cc 接種し、その48時間後にTMを1回だけ腹注した。同様に、第3群にはTMの代わりにNMOを、第5群にはTespaを、第7群にはEndを、第9群にはMHを、第11群にはMMを1回だけ腹注した。第2,4,6,8,10,12群には、免

疫操作を施行せず、「エ」癌細胞接種後48時間目に、それぞれ、TM, NMO, Tespa, End, MH, MM を1回だけ腹注した。第13群は、第1群と同様に免疫し、「エ」癌細胞接種を行ったが、制癌剤は使用しなかつた。第14群は「エ」癌細胞接種のみを行った。各群共80日以上観察した。

ii) 実験成績

各動物群の生存日数は図19, 20, 21, 22, 23, 24に示す如くで、平均生存日数及び80日以上生存動物数は表10の如くであつた。本実験においても、自動免疫単独では効果はなかつた。これに NMO, Tespa, End, MH をそれぞれ併用しても延命効果は現われなかつたが、MM と併用した場合には、第1群の成績に見る如く、

表 10

操作成績	免疫	「エ」癌細胞接種	制癌剤注	平均生存日数	80日以上生存動物数
第1群	+	+	TM	39.0日	4/5
第2群	-	+	TM	18.4日	0/5
第3群	+	+	NMO	21.2日	0/5
第4群	-	+	NMO	13.2日	0/5
第5群	+	+	Tespa	15.0日	0/5
第6群	-	+	Tespa	13.6日	0/5
第7群	+	+	End	11.4日	0/5
第8群	-	+	End	13.4日	0/5
第9群	+	+	MH	12.0日	1/5
第10群	-	+	MH	11.6日	0/5
第11群	+	+	MM	28.0日	1/5
第12群	-	+	MM	18.0日	0/5
第13群	+	+	-	13.5日	1/5
第14群	-	+	-	14.0日	0/5

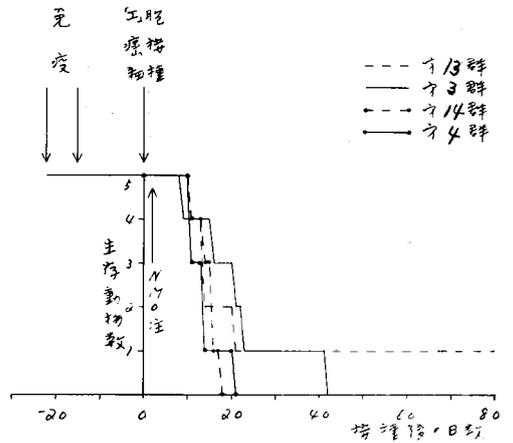


図20

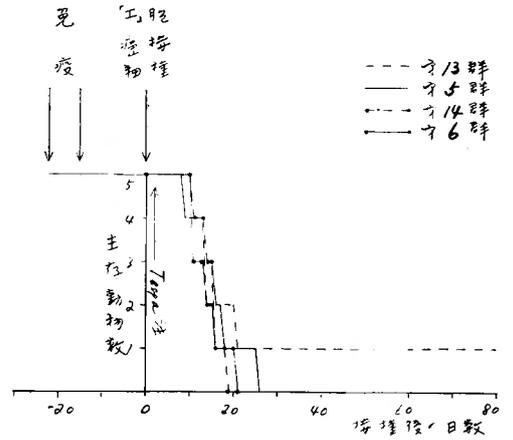


図21

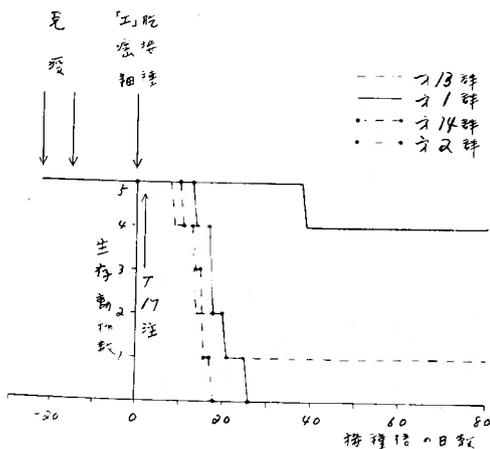


図19

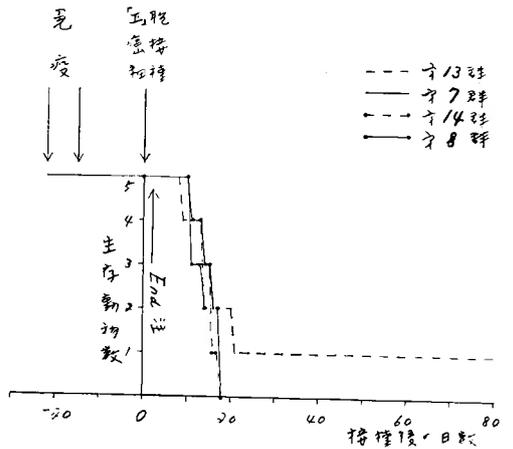


図22

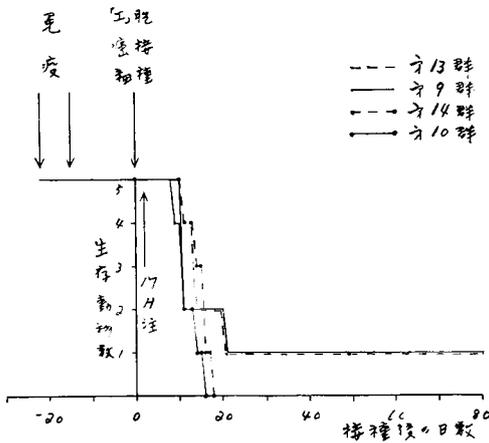


図23

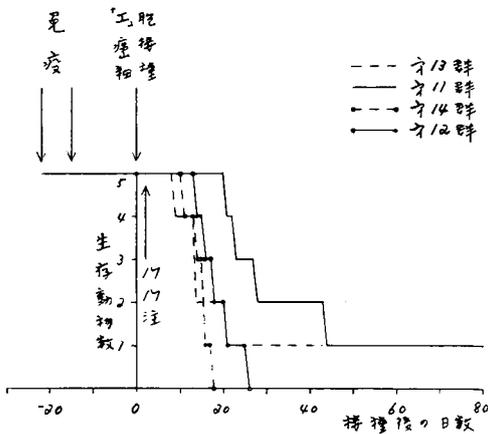


図24

飛躍的な効果の増強が見られた。これは第2節実験ⅦのMMの場合と類似の関係を示すものである。

第4章 総括

I MM 処理抗原群内の実験Ⅰでは、併用した抗原はMM15mg/kgを投与後2時間目に腹水を採取して作製したものであるが、この抗原では「エ」癌細胞のviabilityは保持され免疫部位に腫瘍を形成した。

II しかし、実験Ⅱでは、使用した抗原はMM15mg/kgを2回投与し、2回目の注射後30分に腹水を採取して作成したもので、この方法で得た抗原は免疫部位に腫瘍を形成しなかつた。従つて、以後の実験では、少くともMM15mg/kgを2回以上使用したが、すべて腫瘍は形成しなかつた。

III なお、実験Ⅱでは、免疫した第1,2群共全例80

日以上生存し、免疫効果の存在する事が明白となつた。免疫しなかつた第3,4群は全例50日以内に死亡し、平均生存日数はそれぞれ26.7日及び29.6日であつた。接種細胞数を、実験Ⅰより少くした結果、本実験では免疫操作が有効な事が検出出来たが、免疫単独の効果と制癌剤併用の場合の効果との間の差を検出出来なかつたので、以後の実験では接種量を再び増加した。

IV 実験Ⅲでは、MM15mg/kgを2回、3回、あるいは4回投与し、最終注射の30分後に腹水を採取して、抗原(1),(2),(3)を作製し、又、実験Ⅳでは、MM20mg/kgを2回投与し、2回目の注射後30分、あるいは1時間30分後に腹水を採取して、抗原(1),(2)を作製し、これらの抗原でマウスを免疫した。この場合、自動免疫のみの効果は認められなかつたが、MMを併用すればその効果は明らかに認められた。しかし、この併用効果は、処理MM量あるいはMM処理時間のかんにかかわらず、いずれの抗原でも、殆んど同様であつた。

V 実験Ⅴでは、抗原作製に際し、予め坦「エ」癌マウスに教室高橋等が報告した低体温法を施行した。すなわち、坦「エ」癌マウスを直腸温20℃に6時間冷却し、復温後2時間目より、MM15mg/kgを3回投与し、最終注射後30分目に腹水を採取し、抗原を作成した。この場合も、自動免疫のみの効果は明瞭ではなかつたが、MMと併用した場合には、免疫の効果は明らかとなつた。

VI 実験Ⅵでは、MM20mg/kgを2回投与し、2回目の注射後30分、6時間、あるいは12時間後に腹水を採取し、抗原(1),(2),(3)を作製した。この場合でも、自動免疫のみでは効果は明らかではなかつたが、MMと併用した場合には、MM処理時間の長さに応じて極めて明瞭な差があり、抗原(1)では2/10、抗原(2)では5/10が、抗原(3)では10/10、すなわち、全例が100日以上生存した。

VII 実験Ⅶでも、抗原作製に低体温法を応用し、且つMM処理時間を実験Ⅵより更に延長した。すなわち、低体温より復温後30分及び60分後に、MM20mg/kgを2回投与し、2回目の注射後12時間あるいは24時間目に腹水を採取し、抗原(1),(2)を作製した。本実験においても、自動免疫のみでは効果は認められなかつたが、更にMMを併用した場合には、明らかに有効であつた。しかし、実験Ⅵの場合と異り、MM処理時間の長さに反して、免疫効果はかえつて低下するようであつた。すなわち、実験Ⅵ,Ⅶを通じて、MM処理時間が長ければ、それだけ有効な抗原が得られたが、MM処理

時間が12時間半の抗原が最も有効で、処理時間が24時間半になるとかえって免疫効果は劣るようであった。

VIII 実験VIIIでは、最も有効と思われた実験VIの抗原(3)を用いてマウスを免疫し、抗原処理に使用したMM以外にも、NMO, Tespa, 及び TM を併用した。この場合、NMO 及び Tespa は併用しても延命効果はなく、TM も殆んど効果はなかつた。しかし、MM を併用すると飛躍的な効果が得られた。

IX TM 処理抗原群の内の実験 IX では、使用した抗原は、TM 5 mg/kg を投与後2時間目に腹水を採取して作製したものであるが、この抗原では免疫部位に皮下腫瘍は形成しなかつた。TM 処理量を増加した以後の実験でも、免疫部位に皮下腫瘍は形成しなかつた。

X 実験IXでは、自動免疫単独の効果は認められたが、TM を併用しても、その効果は、免疫操作を行わなかつた第4群と比較した場合には、飛躍的な増強は得られなかつた。

XI 実験Xでは、TM 5 mg/kg を2回投与し、2回目の注射後30分目に腹水を採取して抗原を作製した。この場合も、実験VIIIと同様に抗原処理に使用したTM以外にも、NMO, Tespa, End, MH, 及び MM を併用した。この場合は、自動免疫のみでは効果はなかつた。併用した場合、NMO, Tespa, End, 及び MH では効果なく、MM では若干の効果が現れたに過ぎなかつた。しかし、TM と併用すると飛躍的な効果が得られた。

XII 要約すると、MM 及び TM 処理抗原群共、自動免疫のみでは余り効果はなかつたが、MM 及び TM と併用した時には、免疫効果の増強が認められた。しかも、その程度は、MM 処理抗原群では MM 投与の場合に、TM 処理抗原群では TM 投与の場合には遙かに大であり、逆の場合はほぼ相加的效果しかなかつた。

第5章 考 案

実験的に腫瘍特異性抗原の存在を主張する報告が次第に多くなりつつある。例えば、武田等の報告⁴⁴⁾⁴⁵⁾、石川等の研究²⁾²⁵⁾²⁶⁾、Zilber 等の感作と脱感作を巧みに併用した研究⁴⁸⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾等である。石川等は、血清中の癌特異抗原は、 α_1 - α_2 - β -Globulin に含まれ、あるものでは全因子が、他のものではその一部が現われ、しかも胃癌、子宮癌、その他の人癌を通じて、共通の抗原があるだけでなく、更に、人癌と動物癌の間にも共通

の抗原があるという²⁾²⁵⁾²⁶⁾。Zilber 等は、人原発性肝癌の蛋白分画でモルモットを感作し、正常肝の蛋白分画で脱感作し、次いで最初の肝癌抗原で Anaphylaxie を発現させる事により、腫瘍内に、正常組織には存在しない所の特異抗原が含まれている事を実証している。彼等は、同様に、肝癌、胃癌、子宮癌について、共通の抗原が存在する事を示した⁴⁸⁾⁴⁹⁾⁵⁰⁾。

以上の如き成績は、癌の特異抗原の存在を示唆するものであるが、これが宿主に対し、臨床的に病像の好転を招来するにたる程の有効な自己抗原になるかどうかは極めて疑わしい。もしある程度有効な免疫反応を誘起するものならば、腫瘍の増殖、転移、再発等の問題を如何に説明すべきであろうか？一方において Weiler⁴⁶⁾⁴⁷⁾、Green¹⁴⁾¹⁵⁾ 等は、正常組織にない癌の特異抗原の存在に対しては、寧ろ否定的である。

免疫血清学的方法のみならず、生化学的方法によつても、腫瘍細胞の中の特異的な物質が種々研究され、Toxohormon³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾、Malignolipin²⁷⁾²⁸⁾、Cytolipin H¹²⁾³⁹⁾⁴⁰⁾ 等の存在が指摘されているが、これ等の物質が腫瘍にのみ特異的な抗原であるという確証はない。Greenfield & Meister は、Toxohormon と同じ作用のある物質が、ごく少量ながら、正常組織からも証明出来る¹⁶⁾、中原は少量の Toxohormon は正常の生理的な存在であり、癌細胞はこの物を大量に生産し、その結果 Toxohormon としての作用を発揮する。癌細胞にかぎり、どうしてそのように大量の Toxohormon を生産するのか不明であるが、おそらく癌細胞特有の代謝機構によるのではなくて、正常の代謝機構がある点で極端にゆがめられている事を示すと云つている³⁶⁾。

さて、悪性腫瘍の自然退縮については、Penner³⁸⁾、Morton & Morton³²⁾、今井²¹⁾、Allen¹⁾、Everson & Cole⁹⁾、Levin³¹⁾、及び Summer & Foraker⁴²⁾ 等の多くの報告があるが、Stewart の報告例は、癌の免疫という立場からみて示唆に富んでいる。すなわち、手術不能な子宮筋肉腫の1例に、ラジウム療法を行つていたが、突然高熱、全身の蕁麻疹等の過敏症々状を来し、巨大な腫瘍が急速に消失した。彼は、癌の蛋白質に何等かの変化が起り、その変化した蛋白に対し患者が過敏化され、強力な免疫反応を起したのではあるまいか、と推測している⁴¹⁾。

ところで、Parnes は、結核患者のアミロイド脾からとつた抗原でモルモットを感作し、次いで正常脾で脱感作し、後にアミロイド脾の抗原で Anaphylaxie が起

る事を確かめた²⁹⁾。石橋も述べている如く、これ等の事実及び今日自己免疫疾患と呼ばれる各種の疾患における研究成績等より判断して、病的新陳代謝の下にて、病的に変化した組織内には、正常蛋白と異なる蛋白、自家抗原が合成される可能性がある。この事は腫瘍の免疫学的治療法を検討する上に重大な手掛りを与えるものと思われる²⁹⁾。すなわち、ある種の薬剤投与により、腫瘍の新陳代謝を人為的に変化させれば、そのような病的過程で自家抗原が合成される可能性が期待される。

一方、Landsteiner 一派は、一連の実験において、各種薬剤により自己固有蛋白を処理すれば、その免疫学的特異性は変換し、自己に対して抗原性を発揮するようになるという。すなわち、家兎血清蛋白を Formaldehyde で処理したところ、家兎に対して明らかに抗原性を発揮するようになった。この際、家兎血清蛋白の種属特異性は、完全には破壊されなかつたが、自己に対し foreign になつたという²⁸⁾³⁰⁾。Horsfall²⁰⁾, Hopkins & Wormald¹⁸⁾¹⁹⁾, Gaunt et al¹⁰⁾, Berenblum & Wormald⁴⁾ 等も種々な薬剤を用いた実験により同様な結論を述べている。教室朝隈は³⁾、モルモット血清蛋白、及び牛血清アルブミンをそれぞれ Nitrogenmustard, あるいは Tespamin にて処理し、血清蛋白の免疫学的特異性の変化を追求し、抗原性に修飾が行われた事を証明している。これ等の実験的事実に、腫瘍細胞と親和性の強い薬剤を用い、何等かの細胞成分と結合させ、あるいは代謝過程を変換させる事により、その免疫学的特異性を修飾し、新しい抗原を作り得る可能性を示唆していると思われる。この事は、腫瘍細胞と担癌個体との関係が同系間 (isologous) 乃至自体間 (autologous) の場合に特に意義が深い。Dameshek は Autoimmunization を起し得る機転を次の3つに分けている⁷⁾。第1は Hapten interaction によるもので、Landsteiner 等により証明された如く、ある化学物質が Hapten となり赤血球、血小板、白血球等の正常体固有成分と結合して出来た複合体が、体内の抗体産生能のある細胞に対し抗原性を有するようになるために起るものである。

Quinidine あるいは Sedormid により惹起される ITP がその実例である。感作の成立には既往に当該薬剤が投与されている事が必要で、引き続き投与が行われた時に抗体産生が起つてくる。その抗体は当該薬剤を特異的 Hapten としてその存在下のみ関係体成分に反応する。第2は Release of previously sequestered anti-

gen によるもので、水晶体、Thyroglobulin、及び Spermatozoa の成分の如く、抗体産生能のある細胞乃至細網内皮系と隔離された状態で成熟したものが、何等かの機転で循環流に遊出された場合に、それに対し抗体が産生されて、Sympathetic Ophthalmia や Thyroiditis が起るとされているものである。この仮説は未だ直接的には証明されていないが、Witebsky 等の家兎の甲状腺に関する実験的研究や慢性甲状腺患者血中の甲状腺特異抗体の証明等により、充分に根拠のあるものと見做されるに至つた。第3は Abnormal antibody forming cells によるものである。第1,第2が抗体産生能のある正常な細胞によるものであるのに対し、Mutation あるいは癌化等の何等かの機転が抗体産生能を保有したまま体細胞の性格が abnormal に変化して、正常体成分に対し抗体を産生するようになったために起ると考えられるもので、Chronic lymphocytic leukemia や Lymphosarcoma の如きリンパ系細胞の異常増殖の際、これら異常細胞で正常な赤血球、血小板、白血球等を not self として、これらに対し抗体を産生するとする考えである。臨床的には Autoimmune hemolytic anemia, Systemic lupus erythematosus, Idiopathic hemolytic anemia 等がこの範疇に属するものと考えられる。実験的には、体外から移入された抗体産生能のある細胞が、Host 側から免疫学的に許容され受け入れられた場合に、その細胞が自己と genetic に異なる Host 側の成分を not self として抗体を産生する結果起る事の証明されている Runt disease もこの第3の範疇に属するものと見做し得る。本実験は、Dameshek の第1の機転による Autoimmunization と類似の現象を担癌個体に惹起させ、これを治療面に応用せんとするものである。

本実験においては、抗原処理の目的で MM 及び TM を用いたが、両薬剤共腫瘍細胞の新陳代謝を障碍する事が知られている。制癌剤を用いる有利さは、制癌剤が腫瘍組織に親和性の強い事、及び出来た抗体とともに腫瘍細胞を二重に障害する可能性がある事などである。更に、制癌剤で処理した抗原を用いた場合には、免疫操作により腫瘍移植の行われる可能性を少なくする事が出来る。なお、本実験は、雄性 dd 系マウスを用い、且つ長期累代移植せる「E」癌細胞により行つたものであるから、当然 genetic の差による実験成績の修飾を除外する事は出来ないが、しかし、各実験成績の評価にあつては、すべて対照群との比較を行い、この問題をなるべく除外するように心掛けた。又、抗

原作製に際しては、肉眼的に出血性の腹水はすべて棄却したが、癌細胞以外の各種の細胞の混入はまめがれないところである。しかし、本実験においては、有効なる抗原の分離精製を主目的とするものではないので、そのまま2倍に薄めて抗原として使用した。従つて、in vivoで、「エ」癌組織にMMあるいはTMを接触させる事により、いかなる Mechanism により、いかなる抗原が出来たかは、勿論明らかになされていない。本実験において、製癌剤で処理しなかつた腹水で作つた抗原で免疫を行つた場合には、皮下に腫瘍を形成して、未処理抗原による免疫効果と処理抗原による免疫効果との比較を行う事は出来なかつた。しかし、本実験において、免疫操作後製癌剤を併用した場合に、抗原処理に使用した薬剤と同じ制癌剤を併用した場合に限り著しい延命効果が認められたという事実は注目し得る。この事実は、制癌剤による処理により、「エ」癌組織内の何等かの成分に抗原性の転換が行われ、このようにして出来た抗原の特異性は、処理に併用した制癌剤と対応関係があるものと解する事が出来る。従つて、本実験の如き抗原処理方法を用いる事により、isologous 乃至 autologous な腫瘍細胞でも、宿主に対し充分有効な抗原となり得る可能性がある。この点は更に検討中である。この場合でも、本実験成績に示された如く、免疫操作だけで臨床的な病像の好転を期待する事は困難で、抗原処理に使用したものと同一の制癌剤の併用が必要であろう。通常行われている悪性腫瘍の化学療法の際には、本質的には、上述の場合と同様な過程が体内で起つてもよい筈であるが、一般に行われているような薬剤投与方法では、充分な抗原転換が起り難いのであろう。本実験においても、制癌剤との接触時間の短かつた抗原の場合には、充分有効な免疫反応をもたらす事が出来なかつたという事がある。又、Perfusion chemotherapy で高濃度の制癌剤を腫瘍組織に灌流した場合に、ある程度時間が経過してから腫瘍の縮少を来す例があり、Crech は Perfusion Chemotherapy により免疫反応の増強が行われたのではないかと相像している⁶⁾が、むしろ高濃度の制癌剤の灌流により、本実験に見られるような抗原転換が行われた結果ではないかと考えられる。いずれにしても、本実験の意図の如き治療法を臨床に応用するに当つては、有効な抗原を作製するための処理方法を更に吟味する必要がある。

第6章 結 語

「エ」癌細胞腹腔内接種後4乃至6日目の坦癌 d d 系マウスの腹腔内に、比較的大量のマイトマイシンあるいはトヨマイシンを投与する事により、in vivo でこれら制癌剤に「エ」癌細胞を一定時間接触させた。次にその腹水を採取して抗原とし、健康な d d 系マウスを免疫した。一定期間後「エ」癌細胞を接種して、免疫による延命効果を検討した。なお、ある動物群では、免疫及び「エ」癌細胞接種後、更にナイトロミン、テスパミン、エンドキサン、マーフィリン、マイトマイシン、あるいはトヨマイシンの投与を併用して、その効果を比較した。

1) マイトマイシン及びトヨマイシン処理抗原群共、自動免疫のみではその効果は殆んど認められなかつたが、マイトマイシンあるいはトヨマイシンの投与を併用すると、免疫による延命効果が現れた。

2) その効果は、マイトマイシン処理抗原群ではマイトマイシンの併用投与の場合、トヨマイシン処理抗原群ではトヨマイシン併用投与の場合に遙かに大であり、逆の場合は略相加的效果しかなかつた。

3) マイトマイシン及びトヨマイシン処理抗原群共、ナイトロミンあるいはエンドキサンを併用しても効果はなかつた。トヨマイシン処理抗原群では、その他にエンドキサンあるいはマーフィリンを併用してみたが、同様に効果は認められなかつた。

4) マイトマイシン処理抗原群のマイトマイシンとの併用効果は

i) 処理に使用したマイトマイシンの量は、本実験の範囲内では、抗原の有効性と無関係であつた。

ii) 処理時間が1時間、1時間半、2時間、6時間半、12時間半、及び24時間半の物を比較したが、効果は12時間半の時最大となり、24時間半ではかえつて減少した。

iii) 抗原作製に際し、予め低体温法を施行した坦癌マウスを使用したものがあるが、抗原の効果は若干高められた。

この事実は、制癌剤による処理により、「エ」癌組織内の何等かの成分に、抗原性の修飾が行われ、このようにして出来た抗原は、処理に使用した制癌剤に対し特異性を示したものと解する事が出来る。

結局、in vivo で制癌剤による処理を行つた腫瘍組織を、抗原として自動免疫を行うと、それ自身では腫瘍細胞接種動物に対しての延命効果は余りないが、抗

原処理に使用したものと同一薬剤の投与を併用すると優れた延命効果が得られる事が判明した。

本実験成績は、Autoimmunization 利用する癌治療法成立の可能性を示唆しているものと思われる。本法を臨床に応用するにあつては、有効な抗原の作製法を更に検討する必要がある。

本論文の要旨は第22回日本癌学会総会において発表した。稿を終るに臨み、終始御指導をたまわつた横山育三助教授にあつく感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Allen, E. P. : malignant melanoma · spontaneous regression after pregnancy. Brit. M. J., **2** : 1067, 1955.
- 2) 天野重安, 石川太刀雄, 進藤宙二, 西岡久寿弥, 三宅康雄 : 抗原抗体反応, 癌抗原と癌の血清反応等を中心に, (1) 癌抗原(2) 胎生期臓器分化の免疫学的解析(3) 抗体の理論. 最新医学, **14** : 2762~2787, 1959.
- 3) Asakuma, R. : Antigenicity of nitrogen mustard-treated guinea pig serum to guinea pig. Arch. Jap. Chir., **33** : 297~313, 1964.
- 4) Berenblum, I., & Wormal, A. : X The immunological properties of proteins treated with $\beta\beta'$ -dichlorodiethyl sulphide (mustard gas) and $\beta\beta'$ -dichlorodiethyl sulphone. Biochem. J., **33**, 75~80, 1939.
- 5) Campbell, A. : Synchronization of cell division. Bact. Reviews, **21** : 263~272, 1957.
- 6) Creech, Oscar, Jr. : Cancer chemotherapy reports, **10** : 135, 1960.
- 7) Dameshek, W., Schwartz, R., & Oliner, H. : Current concepts of autoimmunization : An interpretive review. Blood, **17**, 775~783, 1961.
- 8) Donaldson, D. M., & Mitchell, J. R. : Immunization against Ehrlich's ascites carcinoma with X-irradiated tumor cells. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., **101** : 204~207, 1959.
- 9) Everson, T. C., & Cole, W. H. : Spontaneous regression of cancer : preliminary report. Ann. Surg., **144** : 355~383, 1956.
- 10) Gaunt, W. E., Higgins, G., & Wormal, A. : Action of Benzyl carbonyl Chloride on Insulin and other proteins. Nature., **136**, 438~439, 1935.
- 11) Gorer, P. A. : Some recent work on tumor immunity. adv. Cancer Research, **4** : 149~186, 1956.
- 12) Graf, L. & Rappert, M. M. : Immunochemical studies of organ and tumor lipids. VII. The reactivity of anti-human tumor sera with Cyto-lipin H, Cardiolipin, and Forssman haptens. Cancer Research, **20** : 546~550, 1960.
- 13) Graham, J. B., & Graham, R. M. : The effect of vaccine on cancer patients. Surg. Gyn. & Obst., **109** : 131~138, 1959.
- 14) Green, H. N. : Absence of immunological identity in neoplastic cells. Ann. N. Y. Acad. Sc., **68**, 268~301, 1957.
- 15) Green, H. N. : Immunological basis of Carcinogenesis. Brit. Med. Bull., **14** : 101~105, 1958.
- 16) Greenfield, R. E. & Meister, A. : The effect of Injections of tumor fractions on liver catalase activity of mice. J. Nat. Cancer Inst., **11** : 997~1005, 1951.
- 17) Hirsch, H. M., Bittnes, J. J., Cole, H. & Iversen, I. : Can the inbred mouse be immunized against its own tumor ? Cancer Reserch, **18** : 344~346, 1958.
- 18) Hopkins, S. J., & Wormal, A. : CCXXYII. Phenyl Isocyanate protein compounds and their immunological properties II the gelatin compounds. Biochem. J., **27**, 1706~1715, 1933,2.
- 19) Hopkins, S. J., & Wormal, A. : XXXI phenyl Isocyanate protein derivatives and their immunological properties 111 The amino-acid devivatives and serological Inhibition tests. Biochem. J., **28** : 228~236, 1934.
- 20) Horsfall, F. L. Jr : Formaldehyde and Serum proteins, their immunological characteristics. J. immunol., **27**, 553~567, 1934.
- 21) 今井昭和 : 興味ある経過をたどつた Krebs の 1 例. 日外宝 **33** : 671, 1954.
- 22) Isojima, S., Graham, R. H. & Graham, J. B. : Effect of active immunization on development of mammary tumors in C₃H (JAX) mice. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **2** : 310, 1958.
- 23) 石橋幸雄 : 癌と免疫. 科学 **30** : 200~205, 1960.
- 24) Ishibashi, Y., Hattori, T., Fujii, G., Okada, K., Sekiguchi, M., Ashikawa, K., & Motoya, K. : Studies on tumor auto-immunity. Jap. J. Exp. Med., **31**, 1~11, 1961.
- 25) 石川太刀雄, 高柳尹立 : 腫瘍組織の免疫化学的分析. 日新医学, **44**, 361~368, 1959.
- 26) 石川太刀雄, 高柳尹立, 建部守昭, 朝倉志良, 内田 一 : 癌の抗原分析, 岡山地方癌研究会々報, **3** : 10,8~9, 1959.
- 27) Kosaki, T., Ikeda, T., Kotani, Y., Nakayama, N., & Saka, T. : A new phospholipid, Maliginolipin, in human malignant tumors. Science, **127** : 1176~1177, 1958.
- 28) 神崎武和 : 悪性腫瘍に特異な脂質マリブノリド

- ンに就て, 岡山地方癌研究会々報 **2**: 12, 126, 1958.
- 29) Landsteiner, K. & Jablons, B.: Über die Bildung von Antikörpern gegen verändertes artieigenes Serum eiweiß. *Z. immun. Forsh.*, **20**: 618~621, 1914.
 - 30) Landsteiner, K. & Lampl, H.: Über die Einwirkung von Formaldehyd auf Eiweiß antigen. *Z. Immun. Forsh.*, **26**, 133~141, 1917.
 - 31) Levin, E. J.: spontaneous regression (cure?) of a malignant tumor of bone. *Cancer*, **10**, 377~381, 1957.
 - 32) Morton, J. J., & Morton, J. H.: Cancer as a chronic disease. *Ann. Surg.*, **137**: 683~703, 1963.
 - 33) Murray, G.: Experiments in immunity in Cancer. *Canad. M. Assoc. J.*, **79**: 249~259, 1958.
 - 34) Nakahara, W., & Fukuoka, F.: Toxohormone: A characteristic toxic substance produced by cancer tissue. "Gann", **40**, 45~69, 1949.
 - 35) Nakahara, W., & Fukuoka, F.: The newer concept of Cancer toxin. *adv. Cancer Research*, **5**, 157~177, 1958.
 - 36) 中原和郎: 癌研究の諸問題, 癌研究の進歩, 第2版, 1~15. (医学書院), 1960.
 - 37) Newton, A. A., & Wildy, P.: Parasynchronous division of HeLa cells. *Exptl. cell Research*, **16**: 624~635, 1959.
 - 38) Penner, D. W.: Spontaneous regression of a case of myosarcoma, *Cancer*, **6**, 776~449, 1953.
 - 39) Rapport, M. M. & Graf, L.: Immunochemical studies of organ and tumor lipids. I The production of antibodies against a Lipid Hapten by injection of the mitochondrial fraction of rat lymphosarcoma. *Cancer*, **8**, 538~545, 1955.
 - 40) Rapport, M. M., Graf, L., Skipski, v. p., & Alonzo, N. F.: Immunological studies of organ and tumor lipids. VI. Isolation and properties of Cytolipin H. *Cancer*, **12**: 438~445, 1959.
 - 41) Stewart, F. W.: Experiences in spontaneous regression of neoplastic disease in man.: *Texas Rep. Biol. Med.*, **10**: 239~254, 1952.
 - 42) Summer, W. C. & Foraker, A. G.: Spontaneous regression of human melanoma: clinical and experimental studies. *Cancer*, **13**, 79~81, 1960,
 - 43) Takahashi, M.: Intensification of effects of anticancer agents by use of hypothermia. *Arch. Jap. chir.*, **32**, 648~672, 1963.
 - 44) 武田勝男: 癌細胞の抗原性. 日本病理学叢書, 第12巻, (南山堂), 1957.
 - 45) 武田勝男, 相沢 幹: 癌と免疫. 癌研究の進歩, **2**: 563~591, (医定書院), 1960.
 - 46) Weiler, E.: Die Änderung der serologischen organ-spezifität beim Buttergelbtumor der Ratte im Vergleich zu normaler Leber. *Ztschr. Naturforsch.*, **76**, 324~326, 1952.
 - 47) Weiler, E.: Antigenic differences between normal hamster kidney and stilboestrol-induced kidney carcinoma: Complement fixation reactions with cytoplasmic particles. *Brit. J. Cancer*, **10**, 553~559, 1956.
 - 48) Zilber, L. A.: Studies on tumor antigens. *J. Nat. Cancer Inst.* **18**, 341~358, 1957.
 - 49) Zilber, L. A.: specific tumor antigens. *adv. Cancer Research*, **5**: 291~329, 1958.
 - 50) Zilber, L. A.: Some aspects of anti-tumor immunity. *Neoplasma*, **6**: 337~352, 1959.
 - 51) Zeuthen, E.: Artificial and induced periodicity in living cells. *Advances Biol. Med. physiol.*, **6**, 37~73, 1958.