

腫瘍に対する Microwave Coagulation と Streptococcal Preparation (OK-432) の併用効果 — Interleukin 2 産生能に関する基礎的臨床的検討 —

和歌山県立医科大学消化器外科 (主任: 勝見正治教授)

山上 裕機, 勝見 正治, 田伏 克惇, 田伏 洋治, 江川 博
野口 博志, 永井 祐吾, 小林 康人, 森 一成

[原稿受付: 昭和61年5月29日]

A Study of the Synergy of Microwave Coagulation and Streptococcal Preparation (OK-432) in Experimental Tumor in Regard to the Interleukin 2 Producing Activity.

HIROKI YAMAUE, MASAHARU KATSUMI, KATSUYOSHI TABUSE, YOJI TABUSE,
HIROMU EGAWA, HIROYUKI NOGUCHI, YUGO NAGAI,
YASUHITO KOBAYASHI and KAZUNARI MORI

Department of Gastroenterological Surgery, Wakayama Medical College
(Director: Prof. Dr. MASAHARU KATSUMI)

In our department, Microwave Tissue Coagulator (MTC) has been made use of the coagulation for the malignant tumor that expects to destroy the tumor lesions and to increase the anti-tumor immunity. This report revealed whether the interleukin 2 (IL-2) producing activity of spleen cells was augmented in use of the microwave coagulation (MC) with OK-432 in experimental tumor, or not.

The IL-2 activity of spleen cells, ratio of tumor growth and viability percentage were experimented in BALB/c mice after MC and/or OK-432 injection toward the transplanted Meth A fibrosarcoma. All experimental mice were injected OK-432 subcutaneously (s.c.), after that, mice were divided to the following groups; Group 1: control (no treatment), Group 2: OK-432 s.c., Group 3: Group 2+MC toward the tumor, Group 4: Group 2+OK-432 injected intratumorously (i.t.), Group 5: Group 2+MC, OK-432 i.t., Group 6: Group 5+OK-432 s.c. after treatment. Tumor growth of each group was investigated every few days. Viability

Key words: Microwave coagulation, Streptococcal preparation (OK-432), Interleukin 2, Lymphokine, Immunotherapy.

索引語: マイクロ波凝固, OK-432, インターロイキン2, リンホカイン, 免疫療法

Present address: Wakayama Medical College 1, 7-bancho Wakayama City, 640, Japan.

percentage of each group was compiled statistically by Kaplan-Meyer's method. IL-2 producing activity of spleen cells was searched by the method of Gillis.

The tumor growth in Group 3, 5 and 6 was significantly inhibited as compared with that of Group 1, 2 and 4. Viability percentage in Group 3, 5 and 6 was significantly higher as compared with that of Group 1. From the view point of IL-2 producing activity of spleen cells, immunity of Group 5 and 6 was more augmented.

Depending upon the facts above mentioned, the clinical application was done. The patients of study were inoperable gastroenterological cancer bearers. The patients treated by both MTC and OK-432 i.t. were improved in symptoms and signs, still more, IL-2 producing activity of peripheral mononuclear cells was more augmented as compared with that of the patients of either MTC or OK-432 i.t. alone.

As mentioned above, synergy of MC and OK 432 toward the malignant tumor was proved and it was suggested that the beneficial effect was due to the high level of IL-2 producing activity.

結 言

切除不能悪性腫瘍をいかに制御するかは大きな問題であり、化学療法、免疫療法をはじめ種々の試みがなされており、ある一定の効果を上げている。しかし免疫化学療法をおこなうにあたり tumor reduction が重要であるのは異論のない点である。私たちは数年前より tumor reduction をめざして腫瘍に対する Microwave coagulation を施行し、腫瘍抗原性の増強^{17,18)} および転移抑制効果³⁸⁾をはじめとする抗腫瘍効果を報告してきた。また Streptococcal preparation (OK-432) は、腫瘍細胞に対しての直接的殺細胞効果^{23,19)}と Biological Response Modifier (以下 BRM と略す)としての宿主介在作用が報告されてきている。今回腫瘍に対する microwave coagulation で可及的に tumor reduction を行ない、さらに OK-432 を腫瘍内投与する、すなわち異なる作用機序の BRM を併用する事で、より強い抗腫瘍効果が得られるか否かを研究した。また Interleukin 2 (以上 IL-2 と略す)は PHA 刺激リンパ球培養上清中に出現する T cell growth factor として発見され¹³⁾、その非用は、抗原刺激を受けた T 細胞の増殖、natural killer 細胞活性化、Interferon- γ の誘導および細胞障害性 T 細胞の誘導²⁾に働くと考えられている。それゆえ IL-2 産生能は BRM の作用の示標となり得ると思われたので、基礎的実験ではマウス脾リンパ球の IL-2 産生能を、臨床応用ではヒト末梢血リンパ球の IL-2 産生能を示標として測定した。

基礎的検討

1. 実験材料および実験方法

(1) 実験材料

実験動物には 8~10週齢雄性 BALB/c マウス (静岡実験動物センター) を用い、実験腫瘍には BALB/c マウスから methylcholanthrene により誘発された Meth-A fibrosarcoma を用いた。Meth-A は 10% 非動物胎児血清 (fetal calf serum, FCS, GIBCO Diagnostics Laboratories, Madison, Wisconsin) を添加された培養液 RPMI-1640 (Nissui Pharmaceutical Co, LTD, Tokyo) の培地において、5% CO₂, 37°C の条件下で継代培養した。microwave coagulation は当料で開発した Microwave Tissue Coagulator^{29,30)} (以下 MTC と略す) により施行した。MTC は発振周波数 2450 MHz, 波長 12 cm のものを使用し、monopolar 型アンテナとして電極長 5 mm のものを使用した。OK-432 (中外製薬 KK, 東京より供与) は使用直前に生理食塩水 (以下生食と略す) で溶解した。なお OK-432 の 1 KE は溶連菌乾燥菌体の 0.1 mg を含有する。

(2) 担腫瘍マウスの作成

継代培養中の Meth-A を Eagle's MEM (Nissui Pharmaceutical CO, LTD, TOKYO) で 3 回洗浄後、0.04% Trypan blue dye exclusion 法¹¹⁾にて生細胞を 2×10^6 /ml に調整し、マウスあたり 0.5 ml ($1/10^6$ 個) を左後肢皮下に移植した。なお移植率は 100% であった。

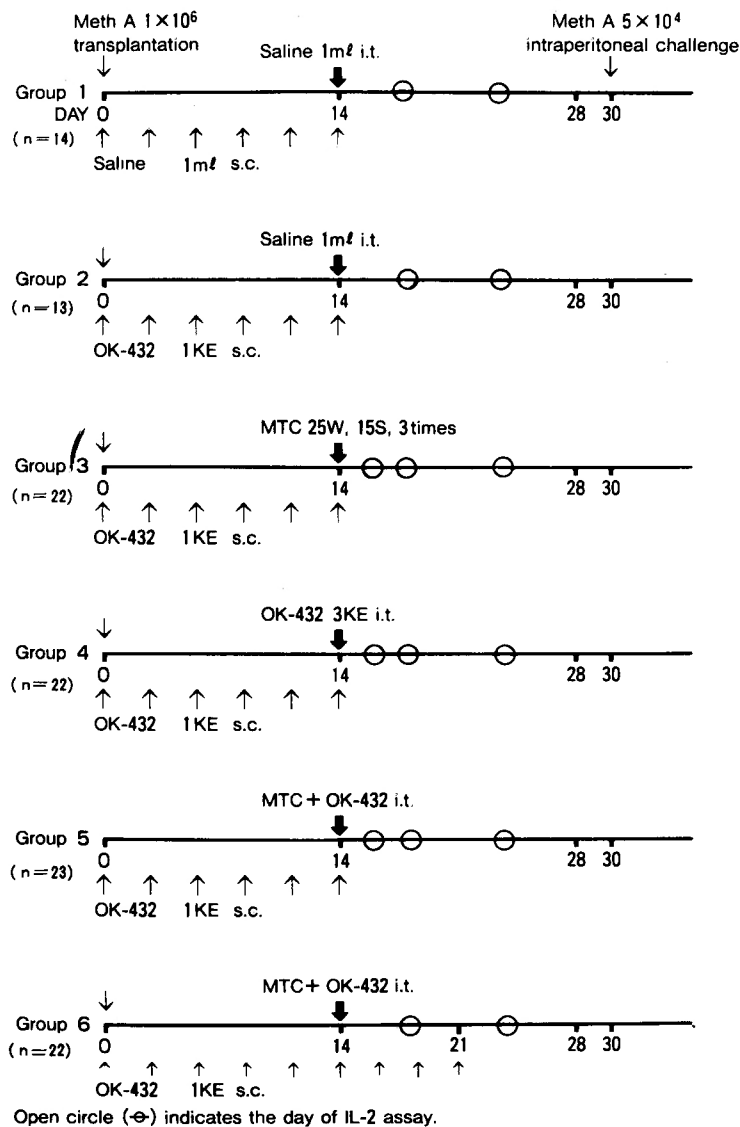


Fig. 1. Experimental protocol

(3) 実験方法 (Fig. 1)

Fig. 1 に実験のプロトコルを示した。Group 1 ($n=14$) はコントロール群で Meth-A 1×10^6 個移植後 1 週間に 3 回 (約 2 日毎), 生食 1 ml を皮下注し腫瘍移植後 14 日めに生食 1 ml を腫瘍内投与した群であり Group 2 から 6 は, Meth-A 移植後 1 週間に 3 回生食 1 ml に溶解した OK-432 1.0 KE ずつ皮下注射し, その後 14 日めに, Group 2 ($n=13$) は生食 1 ml 腫瘍内局注群, Group 3 ($n=22$) は 25 W, 15 秒間で 3 回腫瘍を

MTC 処置した群, Group 4 ($n=22$) は生食 1 ml に溶解した OK-432 3.0 KE を腫瘍内投与した群, Group 5 ($n=23$) は MTC 処置後残存する腫瘍へ OK-432 3.0 KE を局注した群, および Group 6 ($n=22$) は Group 5 に加えてさらに処置後 1 週間に 3 回, OK-432 1.0 KE ずつ皮下注射した群である。各グループの腫瘍体積の推移は経日的に腫瘍の長径, 短径, 厚さの積に $\pi/6$ を乗じて示した。生存率に関しては腫瘍移植後 30 日めに 5×10^4 個の Meth-A を腹腔内投与

し、各グループ毎に% survival rate で求めた。Fig. 1. の open circle は IL-2 の assay を施行した日であるが、IL-2 産生能の測定法を以下に示す。

(4) 脾の IL-2 産生能測定法⁴⁾

i) IL-2 活性の誘導

マウスをエーテル麻酔下に頸椎脱臼法により屠殺し無菌的に脾を摘出し、Eagle's MEM 10 ml で血球成分を可及的に単細胞化した後、tris-buffered NH_4Cl (pH 7.2) で赤血球を溶解し、単核球浮遊液を作成後 ME

Mで3回洗浄し complete medium (以上 CM と略す) に $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調整した。CM は RPMI-1640 に FCS (最終濃度10%), $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 2-mercaptoethanol, 100 U/ml penicillin と 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin (GIBCO, Laboratories, Madison, Wisconsin) および 0.3 g/1000 ml glutamine (Nissui Pharmaceutical Co, LTD, TOKYO) を加え 7% NaHCO_3 で pH 7.1 ~ 7.4 に調整したものをを用いた。単核球浮遊液を96穴平底マイクロプレート (Corning, No. 25820) に 10 $\mu\text{g}/$

The tumor volume of Group 1, control group and Group 2 increased day by day. On the 18th day after tumor transplantation, the tumor volume of Group 3, 4, 5 and 6 was suppressed as compared with that of Group 1 and 2 ($P < 0.01$), and disparity in volume was similarly recognized between Group 4 and Group 3, 5, 6 ($P < 0.01$).

On the 25th day after tumor transplantation, the tumor volume of Group 3, 5 and 6 was suppressed as compared with of Group 1, 2 and 4.

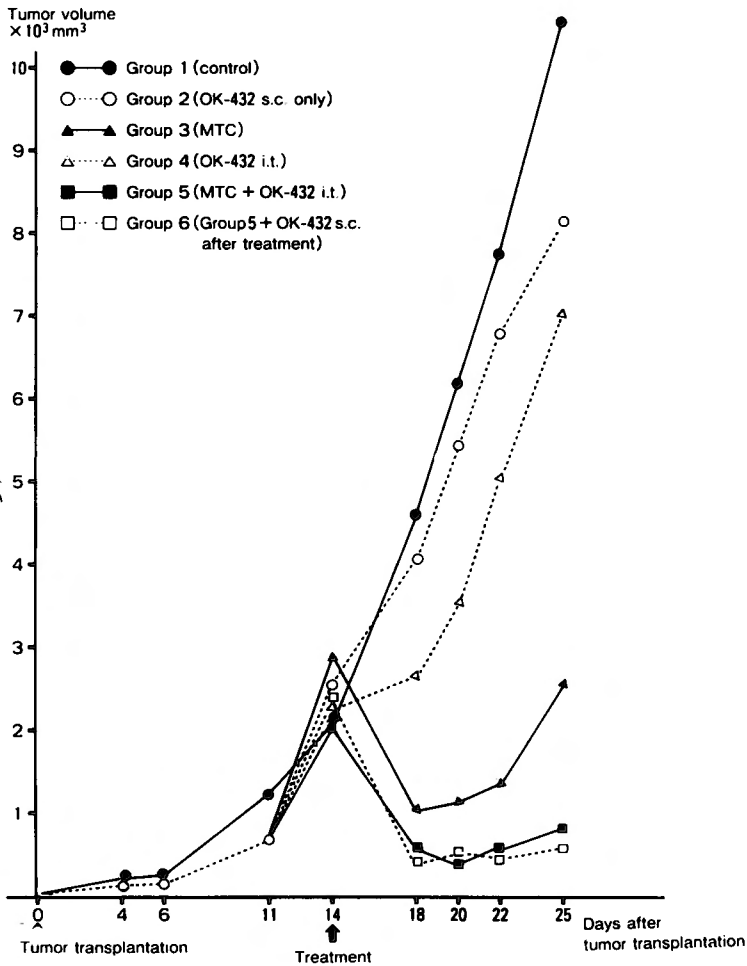


Fig. 2. Changes in tumor volume

ml concanavarine A, Con A, type IV (Sigma chemical company, ST. LOUIS, USA) を加えて, 24時間, 37°C, 5%CO₂ 下に培養した. 24時間培養後の supernatant, すなわち Con A-sup. の IL-2 活性を測定した.

ii) standard IL-2 (T Cell growth factor, TCGF) の作成

Wistar 系ラットの脾細胞を CM で 1×10^7 /ml に調整後, 75 cm² 培養フラスコ (Corning, No. 25110) にて 10 µg/ml, Con A を加えて48時間培養後, その Con A-sup. を standard IL-2 (TCGF) として用いた.

iii) Cloned mouse cytolytic T lymphocyte line (CTL) の作成

IL-2 dependent Killer T cell line (CTL) は, BALB/c の脾単核球を 10% TCGF 存在下に15% FCS 加 CM を培地として20日以上継代培養したものを実験に供した. なお培地は3日毎に更新し, clone 化した.

iv) Con A-sup. のIL-2 活性測定法

96穴平底マイクロプレートに各 well あたり10%

FCS 加 CM で調整した 1×10^5 /ml CTLL を 100 µl と Con A-sup. 100 ul を加え24時間培養した. 培養終了5時間前に各 well あたり 1µCi の ³H-Thymidine (New England Nuclear, Boston, Massachusetts) を加え, glass fiber filter で cell harvest 後, キシレン液体シンテレーション法にて DNA 合成能 (³H-Thymidine uptake) を測定した. 測定は triplicate で施行し, 平均 cpm を求めた. IL-2 1 unit は standard IL-2 の最高値と最低値の平均値の cpm とし, 測定された IL-2 活性は以下の式で求めた.

$$\text{units of IL-2} = \frac{\text{cpm of sample} - \text{cpm of minimum}}{\text{cpm of mean} - \text{cpm of minimum}}$$

II. 結果

(1) 各群における腫瘍体積の推移 (Fig. 2)

1×10^6 個 Meth A を移植後, Group 1 すなわちコントロール群は経目的に腫瘍体積は増加した. Group 2, OK-432 皮下注射単独群では Group 1 とほとんど差がなく経日的に腫瘍体積は増加した. Group 3, 腫瘍の MTC 処置群では処置後腫瘍体積は約50%に抑制され

For each group, on the 30th day after tumor transplantation, 5×10^4 Meth A were rechallenge intraperitoneally.
In Group 1, all mice died less than 37 days.

By generalized wilcoxon test, there was a significant difference between Group 1 and Group 3, 5.6 (p < 0.05).

% Survival

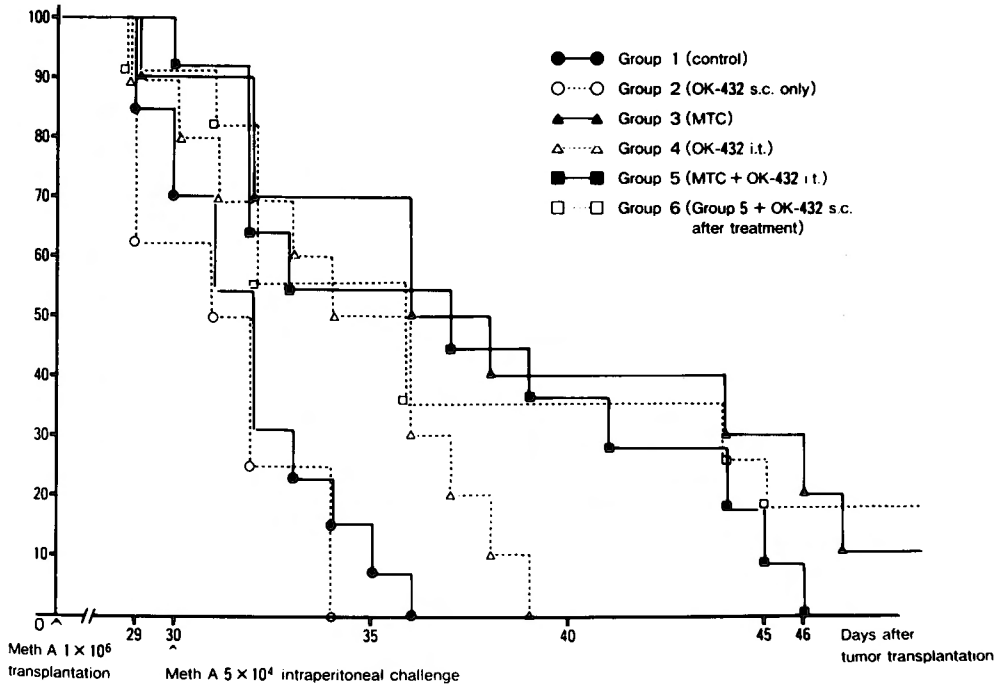


Fig. 3. Survival rate

たが、以後経日的にはやはり増加した。Group 4, OK-432 腫瘍内局注群では局注後やや腫瘍増殖が抑制され、Group 1, 2 と有意差を認めた。Group 5, MTC+OK-432 局注群では Group 3 よりさらに腫瘍体積は減少し、Group 6, Group 5 + 処置後 OK-432 皮下注群と同じような経過をとった。腫瘍移植後18日めで Group 1, 2 と Group 3~6 および Group 4 と Group 3, 5, 6 の間にいずれも Student's t 検定で1%以下の危険率で有意差を認めた。25日めでは Group 1, 2, 4 と Group 3, 5, 6 は1%以下で有意差を認めたが、Group 3 と Group 5, 6 の間には有意差を認めなかった。

(2) 生存率 (Fig. 3)

Group 1, すなわちコントロール群では腫瘍移植後37日で全例死亡した。Group 2 も Group 1 とほとんど同じ経過であった。Group 4 では、Group 1, 2 に比べて

若干生存率が良かったが、有意差は認めなかった。Group 3 では1匹、Group 6 では2匹生存するマウスがあった。なお、generalized Wilcoxon 検定で、Group 1 と Group 3, 5, 6 の間には5%以下の危険率で有意差を認めた。

(3) Interleukin 2 産生能 (Fig. 4)

腫瘍処置前および処置後の脾単核球の IL-2 産生能の変化を Fig. 4 に示した。Group 1 では時間の経過とともに、すなわち腫脹の増大とともに IL-2 産生能は抑制された。Group 2 の推移は Group 1 とほぼ同様であったが、腫瘍移植後23日め、すなわち terminal stage においては Group 1 のような著明な IL-2 産生能の抑制は認めなかった。Group 3 では処置後上昇傾向にあり、処置後9日目でピークとなった。Group 4 では処置後2日めより上昇しはじめ、一時抑制されたが9日め

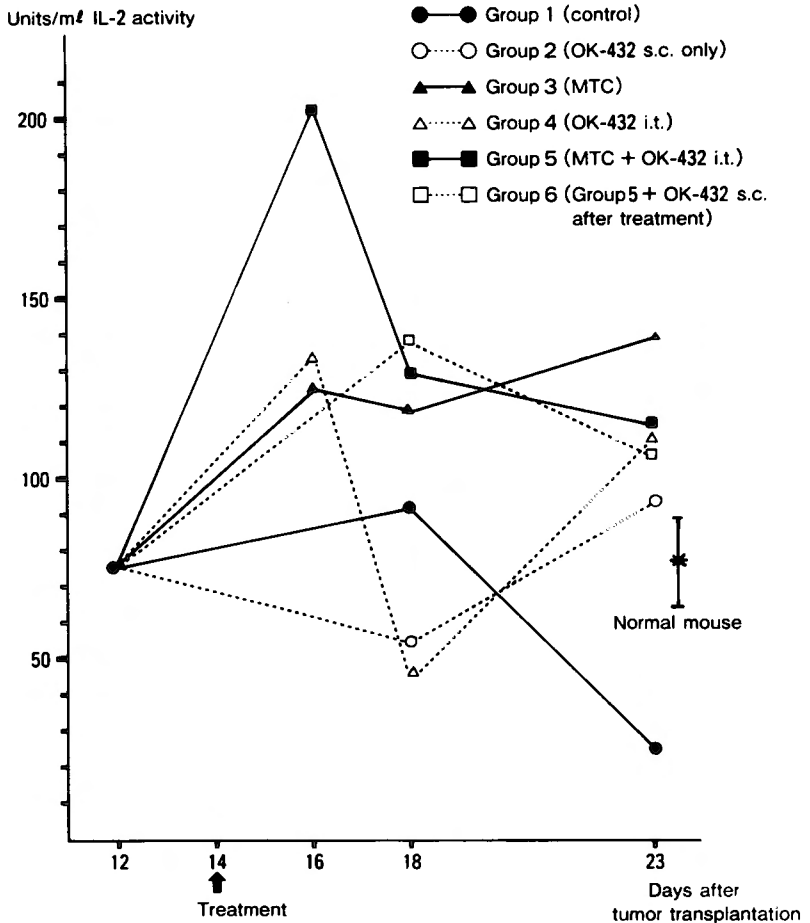


Fig. 4. Interleukin 2-producing activity of spleen cells

The left figure shows the additional effect of OK-432 to microwave coagulation, and the right shows the additional effect of microwave coagulation to OK-432. Both figures show the IL-2 activity of Group 5 in more augmented as compared with that of Group 3 or 4 through the experimental course.

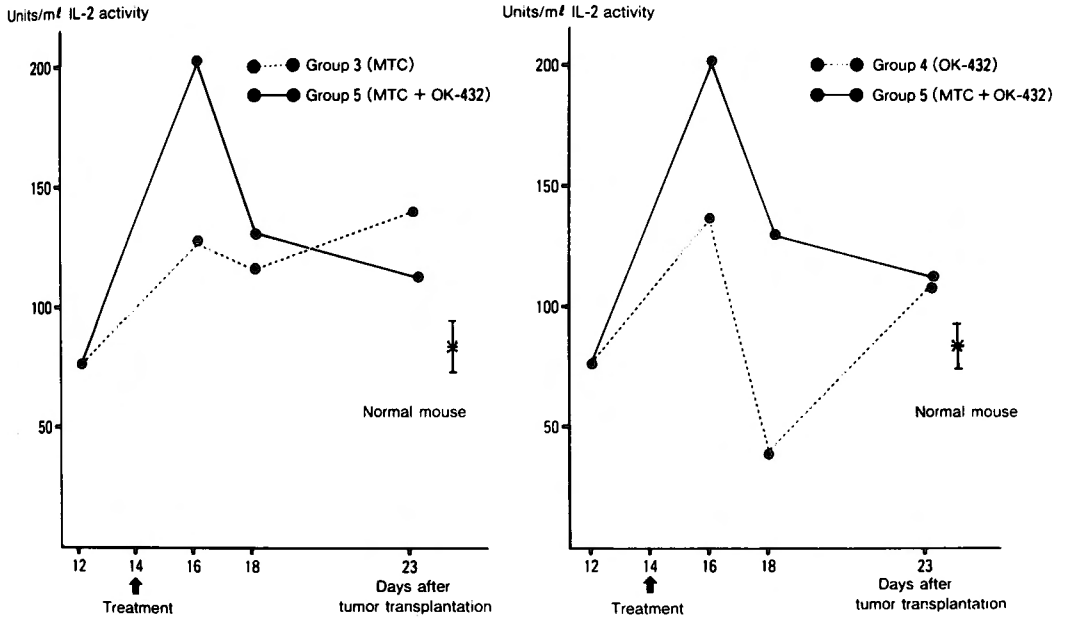


Fig. 5. Synergy of microwave coagulation and OK-432 for interleukin 2-producing activity

では再上昇し, terminal stage においても良好な産生能を示した Group 5, MTC と OK-432 の併用群では処置後 2 日めにピークとなり漸次下降するが, 処置後 9 日めでも良好な IL-2 産生能を保っていた. Group 6 でも全経過を通じて良好な産生能を保っていた. MTC と OK-432 の併用群と単独使用群の IL-2 産生能について比較検討すると, Fig. 5 左図に示す如く Group 5 では Group 3 に比べて処置後 2 日めで高値をとった. 同右図では Group 5 は Group 4 に比して処置後 2~4 日で安定した高値をとった.

以上より腫瘍に対して MTC と OK-432 を併用する事で安定した IL-2 産生能が得られ, その併用効果が認められた. 以上の基礎的実験的結果に基づいて, 臨床応用を試みた.

臨床的検討

1. 対象

対象は当科に入院した切除不能消化器癌症例 10 例で, その内訳を Table 1. に示した. いずれの症例も入院直後, すなわち化学療法等の癌に対する治療を施していない時期および処置後 8~12 日めに静脈血をへパリ

ン加注射器にて 20 ml 採血し, 末梢単核球の IL-2 産生能を検討した. Table 1 の症例 1, 3 は内視鏡下に MTC 処置を施行し, 他の症例はいずれも全身麻酔下開腹の上, 腫瘍に対して MTC 処置または OK-432 20~30 KE 腫瘍内局注, 動脈内注入, または両者併用により処置した.

II. 末梢単核球 IL-2 産生能測定法

対象症例より処置前後にへパリン加静脈血 20 ml を採血し, Eagle's MEM にて倍量に希釈後, Ficoll-Conray 比重遠沈法 (20°C, 1400 rpm, 30 分間) にて単核球を分離し MEM にて 3 回洗浄した. IL-2 誘導は 96 穴平底マイクロプレートを使用し, 10% FCS 加 CM で単核球を 2.5×10^6 /ml に調整し phytohemagglutinine (PHA-P, Difco laboratories, Detroit Michigan USA) 10 μ g/ml で 24 時間刺激した. その培養上清, すなわち PHA-sup. 100 μ l あたりの IL-2 活性を前述の如く CTLL, standard IL-2 を用いて測定した.

III. 結果 (Fig. 6)

IL-2 産生能が処置により上昇した症例は, Group (1): MTC 処置群では 3 例中 2 例, Group (2): OK-432 局注群では 4 例中 3 例, および Group (3): 両者併用群

Table 1. The clinical cases examined

All cases were inoperable gastroenterological cancer bearers.

Group (1): Microwave coagulation

No	Age	Sex	Diagnosis
1.	70	M	esophageal cancer
2.	74	F	gall bladder cancer
3.	84	M	esophageal cancer

Group (2): OK-432 intratumoral or intraarterial injection

No	Age	Sex	Diagnosis
4.	68	F	pancreatic cancer
5.	65	M	hepatocellular carcinoma
6.	75	F	gastric cancer
7.	76	M	hepatocellular carcinoma

Group (3): Microwave coagulation + OK-432 injection

No	Age	Sex	Diagnosis
8.	62	M	pancreatic cancer
9.	58	M	gall bladder cancer
10.	59	M	hepatocellular carcinoma

では3例中2例であった。なお術前値に比べて術後150%以上のIL-2活性を示した症例はGroup (1)では症例2のみ、Group (2)では症例6のみと各々1例ずつであったが、Group (3)では症例9、10の2例で著明なIL-2産生能の上昇を認めた。なおGroup (3)の症例9は肝両葉へのびまん性浸潤をきたした切除不能胆嚢癌で、開腹の上、主病巣をMTC処置の後、肝門部腫瘍に対してOK-432 30 KEを局注した。CA 19-9は術前21000 ng/mlあったが、術後9000 ng/mlまで減少し術後胆管造影で肝内胆管から総胆管への胆管開通が認められ一時的にPTCDが不要となった。しかし術後45病日に肝不全で死亡した。また症例10は、切除不能肝癌であり開腹の上、固有肝動脈よりOK-432 30 KEを動注し娘結節に対してMTC処置を加えた症例であるが、術後超音波検査で腫瘍内壊死が著明であり右季肋部痛の愁訴も改善し術後30病日で軽快退院した。以上のようにMTCとOK-432両者併用により2例の有効例を得る事ができた。なお、副作用はOK-432に伴う発熱が全例認められたがいずれもIndomethacin投与により解熱し、ショック等の重篤な副作用

は認めなかった。

考 察

MTCは当教室の田伏らにより開発され、そのすぐれた止血能により主として肝切除^{29,30,31)}、脾部分切除^{32,3)}に応用されている。また脾尾側切除においても脾液漏出等の合併症の軽減に役立ち¹⁰⁾、内視鏡的応用として出血性潰瘍の止血¹⁴⁾および腫瘍凝固術¹⁵⁾に用いられるようになり、さらには超音波ガイドによる肝生検における後出血および腫瘍散布の予防に効果がある³³⁾とされている。またMTCにより腫瘍を凝固した場合、腫瘍抗原性の増強によりT細胞を介した免疫系の賦活が誘導されるという実験結果^{17,18)}および腫瘍凝固により脾は膨大し、腫瘍の肺への自然転移率が抑制された³⁸⁾とする報告等によりMTCの抗腫瘍効果が論じられているが、いまだその機序は十分には解明されていない。今回著者らは腫瘍のMTC処置によりマウスの実験系では脾リンパ球の、ヒトの実験系では末梢血リンパ球のIL-2産生能が上昇する結果を得た。腫瘍のmicrowave coagulationにより腫瘍重量が減少し、腫瘍による生体へのsuppression効果が減弱がマウスではLyt 1⁺リンパ球のIL-2産生能を高めたのか、もしくはmicrowave coagulationにより腫瘍関連抗原の増強をきたしmacrophageを介してLyt 1⁺リンパ球が賦活化されたのか、今後検討する必要があると思われた。またOK-432との併用によりさらに高いIL-2活性を誘導できるという興味深い結果を得た。OK-432による抗腫瘍効果の作用機序は次第に明らかになりつつある。すなわち腫瘍細胞に対する直接抗腫瘍効果がSakuraiら²³⁾によりin vitroで証明され、Onoら¹⁹⁾もOK-432が腫瘍細胞の核酸合成を阻害する事実を認めた。またOK-432の宿主介在作用として、すなわちBRMとしての作用は(i)好中球の活性化³⁷⁾、好中球活性化因子(NAF)の増強³⁹⁾、(ii)マクロファージの活性化^{8,34,24)}、(iii)Natural Killer(NK)細胞の活性化^{36,2,21)}、(iv)cytotoxic T細胞の活性化^{5,12)}、(v)interferon- γ 誘起作用^{25,26)}、(vi)IL-1、IL-2およびNK細胞活性化因子(NKAF)の誘起⁶⁾等々が実験的に報告されてきた。一方臨床的にはOK-432の腫瘍内投与は頭頸部腫瘍患者に対して施され、腫瘍の縮小、消失がもたらされた報告^{35,27)}をはじめとし、肝細胞癌患者⁷⁾、胃癌患者^{16,1,40)}、乳癌患者²⁰⁾、肺癌患者²⁸⁾に応用され有効な治療法であると報告されている。しかしながら悪性腫瘍治療の原則は大部分の固型癌に

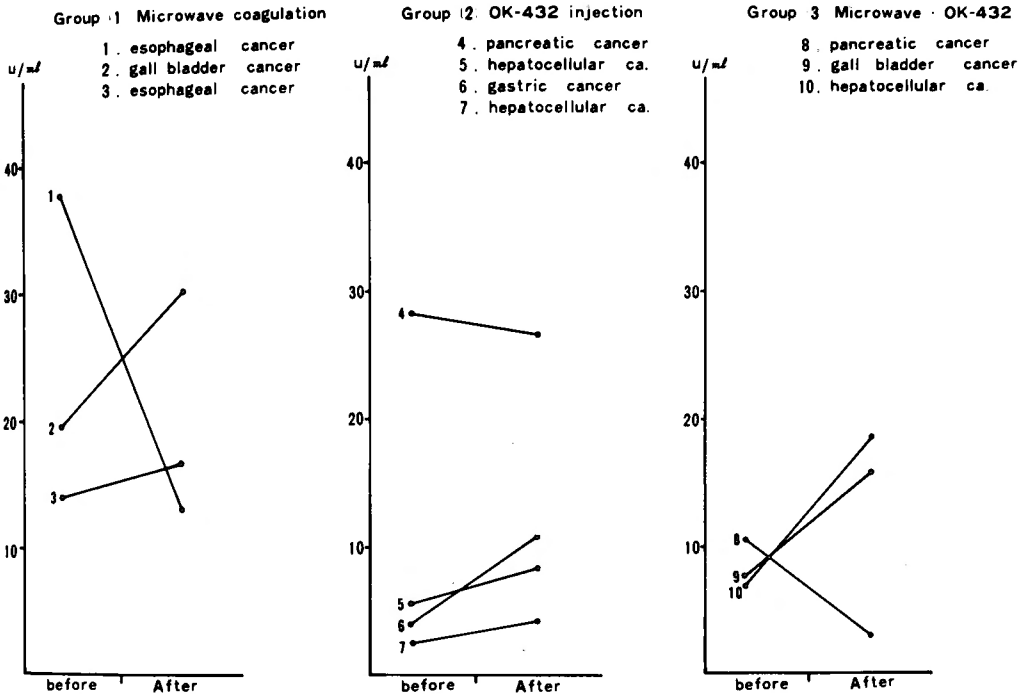


Fig. 6. Interleukin 2-producing activity of peripheral mononuclear cells in the clinical cases. IL-2-producing activity of case 9 and 10 in Group (3) was augmented, and still more, these clinical symptoms and signs improved.

においては外科的切除がすべての治療に優先するが、切除不能腫瘍に対して免疫化学療法を施行する場合においても tumor reduction を先行して施行できればより効果的であると考えられ、microwave coagulation によりできるだけ tumor reduction を施した後、種々の BRM を作用させる事は悪性腫瘍治療の原則にかなった方法であるとする。今回、著者らの基礎実験では担腫瘍マウスにまず腫瘍の microwave coagulation による tumor reduction を施し、さらに OK-432 を腫瘍内局注する事で腫瘍増殖の抑制、良好な生存率が得られ、かつ脾リンパ球の IL-2 産生能の増強を認めた。また臨床例では両者併用により 3 例中 2 例の切除不能消化器癌に対して有効であった。以上の結果によりたとえ切除不能と判断しても積極的に開腹し microwave coagulation による tumor reduction を施行した後、OK-432 等の BRM を腫瘍内局注する事による治療効果を期待してさらに症例を重ねてその効果を検討することは意義のある trial と考える。

結 語

BALB/c マウスに syngeneic Meth A fibrosarcoma

を移植し担腫瘍マウスを作成し、OK-432 前感作の後、腫瘍に対して microwave coagulation による tumor reduction を施行後、OK-432 を腫瘍内局注することにより腫瘍増殖抑制効果、生命延長効果、および脾リンパ球の IL-2 産生能の増強を認めた。また臨床例では両者併用により 3 例中 2 例に末梢血リンパ球 IL-2 産生能の著明な上昇を認め、かつ臨床症状の改善を認める有効例を経験した事から、今後切除不能消化器癌に対しても積極的に開腹し microwave coagulation による tumor reduction の後、OK-432 の腫瘍内投与を試みたい。

稿を終るにあたり IL-2 assay に御指導、御協力いただきました和歌山県立医科大学第 2 病理学講座齋藤晃治教授、西原亨講師に感謝いたします。なお本論文の要旨は第 23 回日本癌治療学会総会ワークショップ (1985 年 11 月、広島) ならびに第 4 回 Microwave Surgery 研究会 (1985 年 12 月、東京) で発表した。

参 考 文 献

1) 朴 探俊, 尾崎敏彦, 上山幸治, 他: 溶連菌製剤 OK-432 を用いた免疫化学療法により腫瘍縮少がみられた胃進行癌の 1 例. 癌と化学療法 8: 1084-

- 1091, 1981.
- 2) Colotta F, Rambaldi A, Colombo N, et al: Effect of a streptococcal preparation (OK-432) on natural killer activity of tumor associated lymphoid cells in human ovarian carcinoma and on lysis of fresh ovarian tumour cells. *Br J Cancer* **48**: 515-525, 1983.
 - 3) Gillis S, Diane Y, Conlon PJ, et al: Molecular characterization of interleukin 2. *Immunol Rev* **63**: 167-209, 1982.
 - 4) Gillis S, Ferm SS, Ou W, et al: T cell growth factor: Parameters of production and a quantitative microassay for activity. *J Immunol* **120**: 2027-2032, 1978.
 - 5) Hojo H, Hashimoto Y: Cytotoxic cells induced in tumor-bearing rats by a streptococcus preparation (OK-432). *Gann* **72**: 692-699, 1981.
 - 6) Ichimura O, Suzuki S, Sugawara Y, et al: Lymphokines induction by streptococcal preparation OK-432 (Picibanil) in mice: Characterization of interleukin 1 (IL-1), interleukin 2 (IL-2) and natural killer cell activating factor (NKAF). *Excerpta Medica, Amsterdam* 1983, p. 50-72
 - 7) 今岡真義, 佐々木洋, 松井征雄, 他: 肝細胞癌に対する免疫賦活剤 (OK-432) 腫瘍内注入療法. *日本癌治学会誌* **17**: 1957-1962, 1982.
 - 8) Kawaguchi T, Suematsu M, Koizumi H, et al: Activation of macrophage function by intraperitoneal administration of the streptococcal antitumor agent OK-432. *Immunopharm* **6**: 177-189, 1983.
 - 9) 小林康人, 田伏克惇, 田伏洋治, 他: マイクロ波凝固法による脾温存法—脾損傷における止血性の実験的検討—日外宝 **54**(2): 91-99, 1985
 - 10) 小林康人, 田伏克惇, 田伏洋治, 他: 脾におけるマイクロ波凝固の影響について—肝実質, 胃粘膜との比較検討—最新医学 **38**: 2018-2110, 1983.
 - 11) Kuruse PF, Patterson MK: *Tissue culture; Methods and Applications*. Academic Press, New York, 1973.
 - 12) Mashiba H, Matsunaga K, Jimi S: Effects of immunostimulants of the in vitro generation of cytotoxic lymphocytes against cervical cancer cell lines. *Japan J Exp Med* **53**: 235-241, 1983.
 - 13) Morgen Da, Ruscetti DA: Selective in vitro growth of lymphocytes from normal human bone marrow. *Science* **193**: 1007-1008, 1976.
 - 14) 永井祐吾, 勝見正治, 田伏克惇, 他: 上部消化管出血に対する内視鏡的マイクロ波凝固止血法の検討 *Gastroenterol Endosc* **27**: 1750-1756, 1985.
 - 15) 永井祐吾, 勝見正治, 田伏克惇, 他: 内視鏡的マイクロ波凝固療法の新しい試み—悪性腫瘍による食道狭窄に対する始息的療法 *Gastroenterol Endosc* **25**: 1484-1491, 1983
 - 16) 新本稔, 大屋正章, 山県司政, 他: OK-432 の腫瘍内大量投与, 癌と化学療法 **3**: 1017-1028, 1976.
 - 17) 野口博志, 勝見正治, 田伏克惇, 他: 腫瘍の microwave coagulation による抗腫瘍効果. *日外宝* **52**: 520-524, 1983.
 - 18) Noguchi H: Experimental studies of anti-tumor effect induced by microwave tumor coagulation. *Arch Jpn Chir* **53**(2): 324-327, 1984.
 - 19) Ono T, Kurata S, Wakabayashi K, et al: Inhibitory effect of streptococcal preparation (OK-432) on the nucleic acid synthesis in tumor cells in vitro. *Gann* **64**: 59-69, 1973.
 - 20) 大森幸夫, 本田一郎, 高橋秀禎, 他: 局所進行乳癌に対する複合療法としての OK-432 の腫瘍内投与. *癌と化学療法* **7**: 283-292, 1980.
 - 21) Oshimi K, Kano S, Takaku F, et al: Augmentation of mouse natural killer cell activity by a streptococcal preparation, OK-432. *J Natl Cancer Inst* **65**: 1265-1269, 1980.
 - 22) Palladino MA, Obata Y, Stockert E, et al: Characterization of interleukin 2-dependent cytotoxic T cell clones: Specificity, cell surface phenotype, and susceptibility to blocking by Lyt antisera. *Cancer Research* **43**: 572-576, 1983.
 - 23) Sakurai Y, Tsukagoshi S, Sato H, et al: Tumor-inhibitory effect of streptococcal preparation (NSC-B 116209) *Cancer chemother Repts* **56**: 9-17, 1972.
 - 24) 斎藤元男, 青沼悦子, 野田哲生, 他: OK-432 の抗腫瘍効果(2)—OK-432 誘起活性化 Mφ の抗腫瘍性—癌と化学療法 **10**: 1363-1371, 1983.
 - 25) Saito M, Ebina T, Koi M, et al: Induction of Interferon- γ in mouse spleen cells by OK-432, a preparation of streptococcus pyogenes. *Cell Immunol* **68**: 187-192, 1982.
 - 26) Saito M, Yamaguchi T, Ebina T, et al: In vitro production of immune interferon (IFN- γ) by murine spleen cells when different sensitizing antigens are used in vivo and in vitro. *Cell Immunol* **78**: 379-386, 1983.
 - 27) 関谷忠雄, 大塚 基, 宮川公文, 他: 頭頸部悪性腫瘍に対する溶連菌製剤 OK-432 の臨床使用経験. *耳鼻咽喉科* **45**: 957-967, 1973.
 - 28) Suzuki Y: Studies concerning the effects of pre-sensitization on the antitumor activity of OK-432 (picibanil, a streptococcal preparation) in terminal lung cancer patients. *Excerpta Medica, Amsterdam* 1983, p. 315-324.
 - 29) Tabuse K: A new operative procedure for hepatic surgery using a microwave tissue coagulator. *Arch Jpn Chir* **48**: 160-172, 1979.
 - 30) Tabuse K, Katsumi M: Application of microwave tissue coagulator to hepatic surgery: The hemostatic effect on spontaneous rupture of hepatoma and tumor necrosis. *Arch Jpn Chir* **50**: 571-579, 1981.
 - 31) Tabuse K, Katsumi M, Kobayashi Y, et al.

- Microwave surgery: Hepatectomy using a microwave tissue coagulator. *World J Surg* **9**: 136-143, 1985.
- 32) Tabuse K, Katsumi M: Microwave tissue coagulation in partial splenectomy for nonparasitic splenic cyst. *Arch Jpn Chir* **50**: 711-717 1981.
- 33) Tabuse Y, Tabuse K, Mari K, et al: Microwave tissue coagulation in liver biopsy: experimental and clinical studies. *Arch Jpn Chir* **55**: 381-392, 1986.
- 34) 田中憲一, 鈴木利光, 大星章一: 溶連菌製剤 OK-432 処理マクロファージの抗腫瘍性に関する研究 腫瘍と化学療法 **5**: 1233-1241, 1978.
- 35) 豊田文一, 前坂明男, 槻陽一郎, 他: 溶連菌製剤 PC-B-45 の頭頸部悪性腫瘍に及ぼす影響 日本耳鼻咽喉科学会会報 **72**: 1332-1338, 1969.
- 36) Uchida A, Micksche M: In vitro augmentation of natural killing activity by OK-432. *Int J Immunopharmac* **3**: 365-375, 1981.
- 37) Watabe S, Sendo F: Activation of cytotoxic polymorpho-nuclear leukocytes by in vivo administration of a streptococcal preparation, OK-432. *J Natl Cancer Inst* **72**: 1365-1370, 1984.
- 38) 山上裕機, 勝見正治, 田伏克惇, 他: 腫瘍の Microwave coagulation による転移率の実験的検討. *日外宝* **53**: 662-666, 1984.
- 39) 安田 新: ヒト末梢血リンパ球 (PBL) 由来の細胞障害性好中球活性化因子—各種消化器癌患者での検討— *消化器と免疫* **13**: 206-210, 1984.
- 40) 芳野純治, 中澤三郎, 小沢 洋, 他: 胃癌の内視鏡的局所療法に関する臨床的研究 日本消化器内視鏡学会雑誌 **26**: 201-211, 1984.