

Ehrlich 腹水癌に対する家兔抗血清と 制癌剤の併用に関する実験的研究

京都大学医学部外科第1講座（指導：本庄一夫教授）

土 橋 修

〔原稿受付：昭和41年3月9日〕

Studies on Combined use of Rabbit Antiserum and Anticancer Agents Against Ehrlich Ascites Tumor Cells

by

OSAMU TSUCHIBASHI

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

Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice were treated with rabbit anti EAC sera (serotherapy), antineoplastica, such as Mitomycin C or Endoxan (chemotherapy), or both (combination therapy), in various doses. Serial cytological observations were made, for the purposes (1) of comparing the antineoplastic effects of either serotherapy or chemotherapy alone with those of combination therapy, (2) of ascertaining whether the antisera and antineoplastica present a synergistic action or not, and (3) of clarifying the mechanisms of the synergistic action, if any, of these two agents when simultaneously administered.

In this experiment, the antineoplastic effects were estimated by (1) survival times, (2) eosin stained cell numbers, (3) mitotic indices, (4) percentage of increase in abnormal mitosis, (5) total ascitic cell numbers in the abdominal cavities, and (6) morphological changes of the tumor cells, photomicroscopically observed.

Regarding the far advanced carcinoma (4 to 7 days after inoculation), the antineoplastic effect was slightly greater in combination therapy than in serotherapy or chemotherapy alone. Mean survival times were as follows: 14.3 to 15.6 days with serotherapy, 17.0 to 18.6 days with chemotherapy, and 18.0 to 20.4 days with combination therapy. With serotherapy, the eosin stained cell numbers were markedly increased within 1 to 4 hours after antiserum administration, but the mitotic indices showed only a temporary suppression. With chemotherapy, the increase in the eosin stained cell numbers was not so remarkable. On the contrary, the suppression in the mitotic indices was remarkable and continued long. Combination therapy resulted in either an increase in the eosin stained cell number or a suppression in the mitotic index, but no other peculiar changes were observed. It seems that antisera and antineoplastica affect the carcinoma cells independently, even when simultaneously administered.

Regarding the early stage carcinoma (48 hours after inoculation) however, combina-

tion therapy was much more effective than serotherapy or chemotherapy alone, and the synergistic action of the antisera and antineoplastica was therapeutically suggested.

As a result, the differences of the antineoplastic effects of combination therapy in between the early and the late stages of carcinoma have been analysed, and possible mechanisms of synergistic action of antisera and antineoplastica, when simultaneously administered, has been discussed.

結 言

悪性腫瘍に対する免疫療法に関して、1902年、Leyden & Blumenthal³⁷⁾ が、2人の末期癌患者に対し、自家癌組織を免疫元とするワクチン療法を試みて以来、多数の業績が発表されているが、その成績は、われわれを十分満足せしめ得るものではない。一方、悪性腫瘍に対する化学療法の分野においても、各種の抗腫瘍性物質が研究され、その投与方法も種々考案されているが、これもまた単独では悪性腫瘍を根治せしめ得るには至らない。

免疫療法と化学療法の併用が、感染症に対し、その各々の単独療法に比し極めて有効な場合があることより、悪性腫瘍に対しても同様の併用効果を期待する研究が行なわれており、その多くは併用療法の有効なることを報告し、その効果は相乗的であるとしている。しかし、これらの報告はいずれも単に実験動物の延命効果をみたのみであり、いかなる機序で相乗効果が現われたかについては十分な説明がなされていない。

制癌実験において、1つの治療方法が有効であると判定するためには、1) 細胞効果、2) 延命効果、3) Dose-Response Relation ship の3点を確認すべきであり、教室の小野⁴³⁾は、先に、抗癌血清と制癌剤の併用により、担 Ehrlich 癌マウスに延命効果をもたらしている事実を示し、“Immunochemotherapy”の意義を強調したが、本実験では、抗 Ehrlich 癌家兎血清と制癌剤の併用時における腫瘍細胞の変化を形態学的に追究し、細胞効果をみると共に、併用療法による効果増強の機序についても論及した。

実 験 材 料

実験動物 体重約20gの雄性ddマウス

実験腫瘍 本教室において継代移植された Ehrlich 腹水癌。

抗癌血清 Ehrlich 腹水癌約 5×10^6 個腹腔内移植後7乃至10日目の担癌マウスより腹水を採取し、生理食塩水にて、浮遊、遠心沈殿を、その都度上清をとりか

えて数回繰り返して癌細胞を洗浄、混在せる液性成分及び赤血球を可及的除去した後、生理食塩水にて10%癌細胞浮遊液とし、これを免疫元として、その5ccを9匹の家兎に耳静脈より静注、これを週2回、5週間繰返して免疫を行ない、最終免疫の2週間後に頸静脈より無菌的に採血、血清を分離した。

マウス正常組織による吸収 採取した抗血清の一部は、正常マウスの組織により吸収した。即ち、正常マウスの肝、腎、脾の homogenate を遠心沈殿し、その沈渣を生理食塩水で洗い、抗血清に1/3量加え、37°C 2時間、次いで氷室に一昼夜放置し、抗正常組織抗体を吸収せしめた後遠心沈殿し、その上清を吸収抗血清とした。

非活性化 新鮮抗血清及び吸収抗血清の一部は、56°C、30分加温し、非活性化した。

凝集反応 以上の抗血清及び正常家兎血清を倍数希釈し、これに等量の1% Ehrlich 癌細胞浮遊液、或は1%マウス赤血球浮遊液を加え、37°Cにて2時間保温し凝集価をみた。

実験には、Ehrlich 癌細胞に対する凝集価5000倍以上の高力価血清のみを用いた。

制癌剤 Mitomycin C 及び Endoxan を、用時その都度生理食塩水に溶解、使用した。

実 験 I

実 験 方 法

1群5匹、27群のマウスに、Ehrlich 癌細胞約 5×10^6 個腹腔内に接種し、接種後4日目、或いは7日目の担癌マウスに、抗血清、制癌剤、或いはその両者を種々の量的組合わせて腹腔内に1回投与し、延命効果を見た。また、同一動物群にて、経時的に腹水を採取し、Eosin 可染率を観察し、同時に腹水の塗抹標本作製し、Giemsa 染色、Feulgen 染色により、細胞の形態学的変化及び分裂指数の変動をみた。

Eosin 可染率 2000倍 Eosin 溶液 (pH7.0 Tyrod 液) に1/10量の腹水を加え、4分後に鏡検、腫瘍細胞400個をかぞえ、Eosin にて赤染した細胞数を百分率をもつて示し、これをEosin 可染率とした。一方、Eosinに

て赤染しない細胞数を百分率で示したものを、Eosin 非染率とした。Eosin 可染率及び非染率は、それぞれ、non viable cells 及び viable cells の百分率を意味する。

Giemsa 染色 腹水塗沫標本をメタノール固定後、pH6.4に調整した Giemsa 氏液にて、20分間染色した。

Feulgen 染色 腹水塗沫標本を無水アルコール固定後、1 N HCl で洗い、60℃ 1 N HCl 中 4 分間密栓加温、加水分解を行ない、短時間 1 N HCl で洗い、次いで水洗、加水分解を中断し、Schiff 試薬にて1時間染色、新調した亜硫酸水で3回洗浄後水洗した。

分裂指数 Feulgen 染色を行なった腹水塗沫標本にて、腫瘍細胞2000個中の分裂細胞数をかぞえ、百分率で示した。

実験結果

延命効果 (表1) 平均生存日数は、対照群、抗血清単独投与群、制癌剤単独投与群、併用群の順に後者ほど長かった。対照群と抗血清単独投与群の差及び制癌剤単独投与群と併用群の差は僅微であつたのに対して、制癌剤投与群と非投与群の差は比較的明瞭であつた。抗血清0.5cc 以上投与群は、下痢及び血尿をきたし、中毒死したため、平均生存日数は対照群に比し、むしろ短縮した。

Eosin 可染率 (図1～6) 全例を通じ、抗血清を投与した場合には、抗血清単独投与群、併用群共に、処置後1時間に Eosin 可染率の著明な上昇を認め、1乃至8時間後に極大に達した。且つ、Eosin 可染率の上昇の程度は、抗血清の量を増すに従い著しく、また、比較的腫瘍増殖の軽度な接種後4日目処置群では、腹水貯留の著しい接種後7日目処置群に比し、その程度は著明であつた。

56℃、30分加温により非活性化した抗血清を使用した場合には、抗血清投与群と抗血清非投与群との間に、Eosin 可染率の差は認められなかつた。

細胞分裂指数 (図7～12) 抗血清単独投与群は、投与後一時的に分裂指数は低下したが、比較的短時間内に恢復した。しかし、抗血清大量投与群では、分裂指数の低下は著しく、恢復に要する時間も長かつた。

制癌剤単独投与群は、投与1時間後に分裂指数低下を認め、投与量が大きなるに従い、分裂指数低下の程度、持続時間は著明となつた。処置後8乃至24時間で、一旦低下した分裂指数は恢復に向うが、抗血清単独投与群に比し、分裂指数低下の程度及び持続時間は顯著であつた。

併用群は、一般に、対応する制癌剤単独投与群に似

表1 平均生存日数

I			日
対	照		14.4
抗	血	清 0.2cc	15.6
マイトマイシン		20 γ	18.6
併	用		20.4
II			日
対	照		13.8
抗	血	清 0.2cc	15.3
マイトマイシン		40 γ	17.6
併	用		19.4
III			日
対	照		13.5
抗	血	清 0.6cc	11.0
マイトマイシン		60 γ	17.3
併	用		11.0
IV			日
対	照		14.0
抗	血	清 0.1cc	14.3
エンドキサン		2mg	17.0
併	用		18.2
V			日
対	照		14.0
抗	血	清 0.2cc	16.0
エンドキサン		2mg	17.0
併	用		18.0
VI			日
対	照		14.0
抗	血	清 0.5cc	13.6
エンドキサン		2mg	17.0
併	用		15.4

Ehrlich 癌細胞 5×10^6 個/マウス腹腔内移植後、各群5匹の平均生存日数

I～III 移植後7日目に、吸収抗血清、マイトマイシンを腹腔内に1回投与

IV～VI 移植後4日目に、吸収抗血清、エンドキサンを腹腔内に1回投与

図 1

エオジン可染率

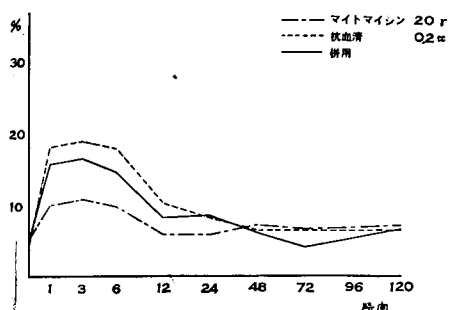


図 4

エオジン可染率

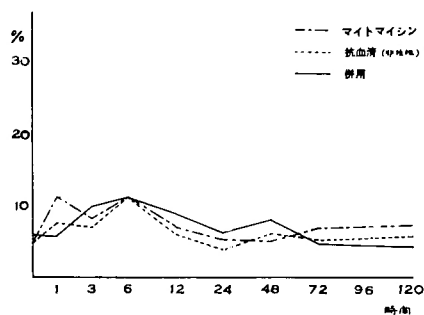


図 2

エオジン可染率

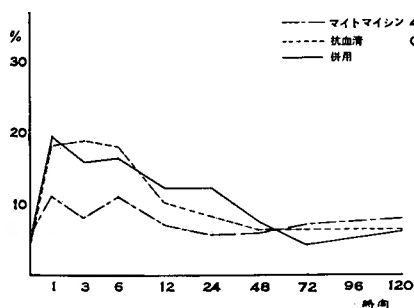


図 5

エオジン可染率

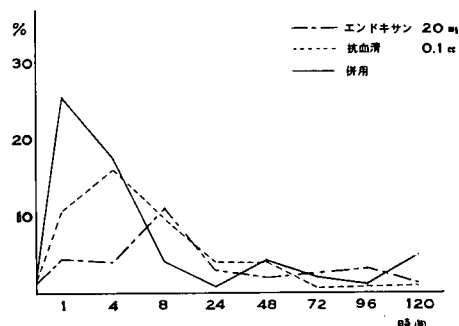


図 3

エオジン可染率

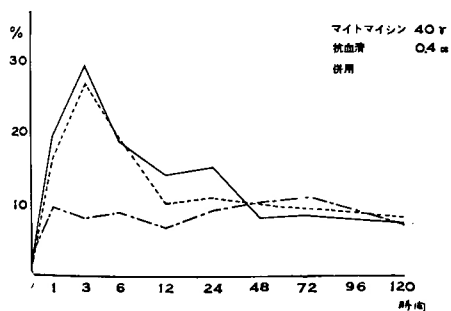


図 6

エオジン可染率

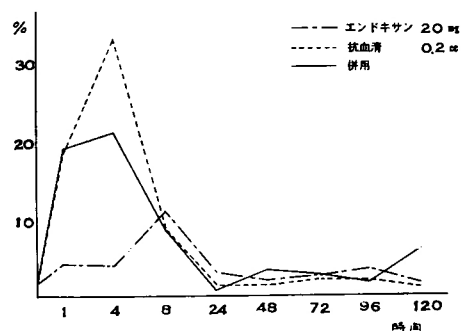


図1～3 Eosin可染率 Ehrlich癌細胞 5×10^6 個/マウス腹腔内移植後7日目に、吸収抗血清、マイトマイシンを腹腔内に1回投与

図4 同量移植後7日目に、非活性化吸収抗血清、マイトマイシンを腹腔内に1回投与

図5～6 同量移植後4日目に、吸収抗血清、エンドキサンを腹腔内に1回投与
縦軸はEosin可染率(%) 各群5匹の平均値
横軸は処置後時間

図 7

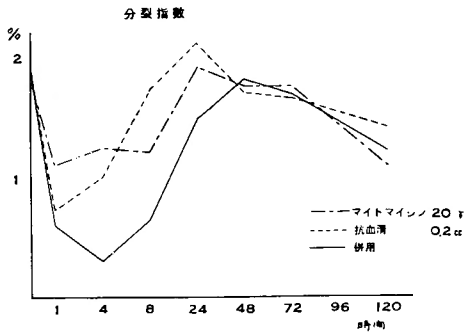


図 10

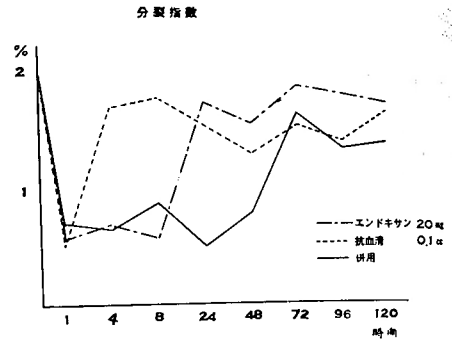


図 8

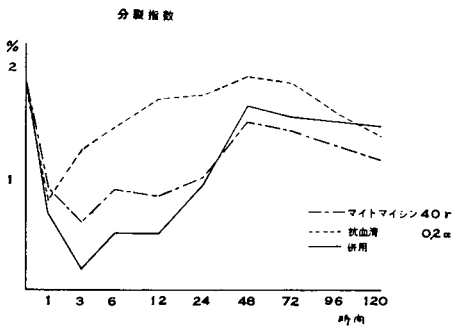


図 11

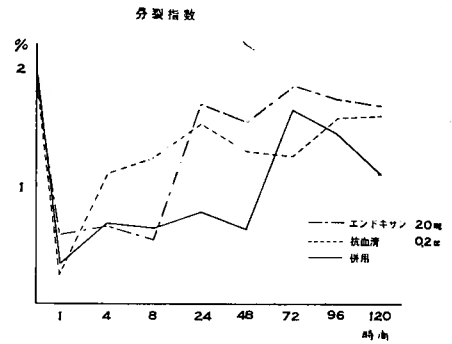


図 9

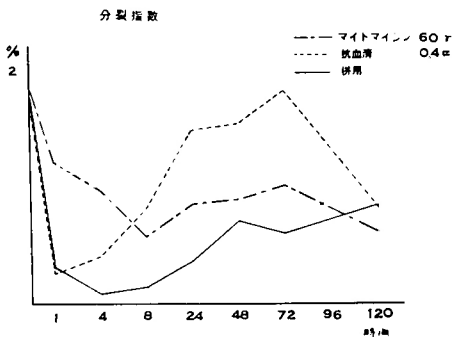


図 12

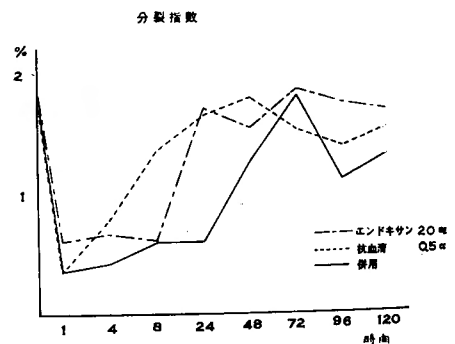


図 7~9 分裂指数 Ehrlich 癌細胞 5×10^6 個/マウス腹腔内移植後 7 日目に、吸収抗血清、マイトマイシンを腹腔内に 1 回投与

図 10~12 同量移植後 4 日目に、吸収抗血清、エンドキサンを腹腔内に 1 回投与
縦軸は分裂指数 (%) 各群 5 匹の平均値
横軸は処置後時間

た変化を示すが、分裂指数低下の程度及び持続時間は、制癌剤単独投与群に比し稍まさっていた。制癌剤を増量すれば、分裂指数の低下は著明となるが、制癌剤量を一定にすると、本実験の範囲内では、分裂指数の低下と抗血清量とは比較的關係にみえた。

鏡検所見 抗血清単独投与群は、処置後1時間に、遊走細胞の増加、腫瘍細胞の凝集、空胞化、変性細胞の増加を認めた。細胞の膨化は多少認められたが著明ではなかつた。一部の細胞には blister formation が認められた。分裂核においては染色体の粘着が増加した。処置後12時間以降には、対照群と殆ど差を認めなかつた。

Mitomycin 投与群は、処置後1乃至4時間に多少の変性細胞の増加と著明な白血球の増加を認め、腫瘍細胞は一般に Giemsa 染色で濃染し、細胞質に空胞を認めた。24時間以後には、著明な巨細胞化、静止核染色質の粗造化及び染色体の断片化、散乱、橋形成等の異常分裂像の増加を認めた。48乃至72時間以後には、再び徐々に正常に近い腫瘍細胞の増加を認めた。

Endoxan 投与群は、処置後早期の変化は軽微であり、変性細胞、遊走細胞の増加、細胞の凝集等は殆ど認められなかつたが、24乃至48時間後には、著明な巨細胞化、異常分裂の増加を認めた。異常分裂像は Mitomycin 投与群に類似し、染色体の断片化、散乱、橋形成が主であつた。

併用群では、処置後早期には、細胞の凝集、空胞化、blister formation、遊走細胞の増加を認めたが、抗血清単独投与例と比較し、本質的に異なつた点は認め難く、24時間以後には対応する制癌剤単独投与群と同様の变化を認めた。

予 備 実 験

実験Ⅰでは、抗血清及び制癌剤の単独及び併用投与による、腫瘍細胞の、同一動物内における変化を、腫瘍接種後4日目、或は7日目の末期癌の状態で、経時的に観察し、併用時における抗血清と制癌剤の作用効果は、一見、相加的と考えられる結果を得たのであるが、制癌剤による細胞障害が、投与数時間後より徐々に現われるに反し、抗血清による細胞障害は、極めて短時間内に現われることより、抗血清と制癌剤の同時併用において、腹腔内腫瘍細胞の大多数が、抗血清の作用により短時間内に死滅し、制癌剤による治療対象となるのが、残部の少数細胞のみであろうことは容易に想像される。この場合、どの程度の細胞が抗血清の作用をまぬがれて生き残り、増殖するか、また、この

残存する細胞の増殖能力は健康な細胞のそれと異なるか否かを知るため、実験Ⅱに先立ち、下記の予備実験を行なつた。

Ⅰ. 腫瘍細胞を十分量の抗血清と均等に、in vitro で接触させた場合、抗血清の作用を受けぬ腫瘍細胞数を知るため、10% Ehrlich 癌細胞浮遊液に、等量及び5倍量の新鮮抗血清を加え、in vitro, 37°C, 30分間保温、Eosin 可染率をしらべた。対照として、等量の新鮮正常家兎血清を用いた。

Eosin 可染率は、抗血清使用例はいずれも96%、正常家兎血清使用例は12%であつた。これより、Ehrlich 癌細胞を十分量の抗血清と均等に接触させた場合、約4%の細胞が抗血清の作用をまぬがれることを知つた。

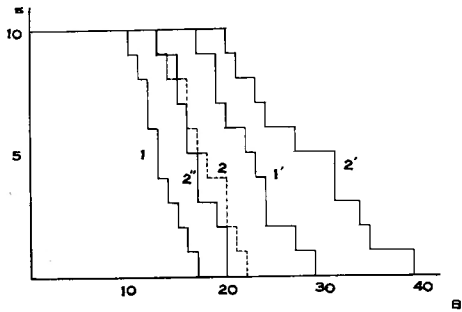
Ⅱ. 腫瘍細胞を十分量の抗血清と in vivo で接触させた場合、抗血清の作用を受けぬ腫瘍細胞数を知るため、Ehrlich 癌細胞 5×10^6 個腹腔内接種後48時間の担癌マウスを、1群5匹とし、これに新鮮抗血清0.05cc, 0.1cc, 0.2cc, 0.4cc を腹腔内に注入し、2時間後に腹水を採取し、腫瘍細胞の Eosin 可染率をしらべ、抗血清0.05cc投与群 50~80%, 0.1cc投与群 70~95%, 0.2cc投与群 80~95%, 0.4cc投与群 80~95%の結果を得た。これにより、Ehrlich 癌細胞 5×10^6 個接種後48時間の担癌マウスにおいて、腫瘍細胞を中和するには、約0.2ccの抗血清を要することを知つた。in vivo と in vitro における、抗血清に対する腫瘍細胞の Eosin 可染率の差は、主として、腫瘍細胞と抗血清が均等に接触するか否かによると考えられる。極めて大量の抗血清を用いれば、in vivo においても、Eosin 可染率が96%の値に一定することは予想されるが、抗血清0.4cc以上の投与は、動物がすべて中毒死するため、実験を行ない得なかつた。

Ⅲ. 予備実験Ⅰ、Ⅱにおける Eosin 非染細胞が果して生きており、増殖する能力をもつか、また、その増殖の程度が健康な腫瘍細胞と同様であるか否かを知るため、マウスを1群10匹とし、Ehrlich 癌細胞 5×10^6 個移植群（普通量移植群）(1) に対し、in vitro, 30分間、十分量の抗血清にて処理した Ehrlich 癌細胞 1.25×10^6 個（この中に Eosin 非染細胞約 5×10^6 個を呑む）(1)' を、また、普通量移植48時間後-抗血清0.2cc投与群 (2) に対し、普通移植量の4%及び20%に相当する、 2×10^5 個及び 1×10^6 個移植群（少量移植群）(2)' (2)'' を対応させ、その生存日数を比較した。

結果は、図13の如くであり、生存日数は、(2)' (1)'

(2) (2)'' (1) の順に前者ほど長く、(1)' の生存日数は予想に反して長かつた。この結果より、十分量の抗血清と接触した場合においても、腫瘍細胞の一部は抗血清による障害を受けず、動物に接種すると増殖することが判明したが、その増殖能力が健康な腫瘍細胞と同一か否かは判定困難であつた。

図13 生存率



- 1 Ehrlich癌細胞 5×10^6 個/マウス腹腔内移植 - 普通量移植群
 - 1 Ehrlich癌細胞 5×10^6 個/マウス腹腔内移植後48時間に、新鮮抗血清0.2 cc 腹腔内投与 - 普通量移植抗血清単独投与群
 - 1' 抗血清処理Ehrlich癌細胞 1.25×10^6 個/マウス腹腔内移植
 - 2' Ehrlich癌細胞 2×10^5 個/マウス腹腔内移植 - 少数移植群
 - 2'' Ehrlich癌細胞 1×10^6 個/マウス腹腔内移植 - 少数移植群
- 縦軸は生存動物数、横軸は移植後日数

実験 II

実験 I 及び予備実験の結果よりみて、抗血清と制癌剤の併用時において、十分量の抗血清を使用した場合には腫瘍細胞の大多数は死滅するが、一部分は抗血清による障害を殆ど受けずに生き残り、この少数細胞が制癌剤による治療の対象となるであろうことが推測される。これらの腫瘍細胞に対する制癌剤の作用が、健康な腫瘍細胞に対する作用と異なるか否かを知るため、実験 II では、移植後48時間の早期癌の状態、抗血清と制癌剤の単独投与及び併用投与後の細胞変化を、延命効果、腹腔内腫瘍細胞数と共に観察した。また治療対象となる腫瘍細胞数が、少数の場合と多数の場合では、制癌剤の効果が異なることが知られているため、本実験においては、併用群の対照として、抗血清が腫瘍細胞に十分に作用した場合を想定して、普通移植量の4%に相当する 2×10^5 個移植 - 制癌剤単独

投与群を、少数細胞移植 - 制癌剤単独投与群として実験に加えた。

実験方法

Ehrlich 癌細胞 5×10^6 個及び少数移植群として約 2×10^5 個腹腔内接種後48時間の担癌マウスに、抗血清、制癌剤、或はその両者を腹腔内に投与し、処置後、1, 2, 3, 4, 7 日に各群 5 匹宛マウスを屠殺し、可及的に全腹水を採取し、腹腔内腫瘍細胞数を測り、同時に、採取した腹水の塗抹標本を作製し、Giemsa染色、Feulgen 染色にて細胞変化を観察した。

実験結果

延命効果 (表 2) 平均生存日数が、対照群、抗血清単独投与群、制癌剤単独投与群、併用群の順に後者はど長くなることは、実験 I と同様であつたが延命効果は実験 I に比し顕著であつた。対照群と抗血清単独投与群及び制癌剤単独投与群の延命効果に、かなり明らかな差が認められた。これらの差は実験 I では著明ではなかつた。今回の実験では、抗血清0.1cc投与群と抗血清0.2cc投与群の間には、延命効果に殆ど差を認めなかつた。抗血清による中毒症状は、抗血清2 cc投与群にも若干認められたが、抗血清0.2cc投与群では、全例が処置後4日以内に中毒死した。少数移植 - 制癌剤単

表 2 生存日数

対 照	10	12	14	16	16
抗 血 清 0.1cc	14	14	16	18	19
マイトマイシン 20γ	18	20	23	27	27
併 用	20	20	25	30	32
マイトマイシン 20γ少数細胞群	22	25	28	32	治

対 照	11	12	12	15	17
抗 血 清 0.2cc	13	16	16	18	19
マイトマイシン 20γ	16	18	23	25	25
併 用	14	18	25	30	32
マイトマイシン 20γ少数細胞群	19	20	25	33	治

対 照	12	13	11	16	18
抗 血 清 0.4cc	3	4	4	5	6
マイトマイシン 40γ	18	23	25	26	27
併 用	3	3	4	4	6
マイトマイシン 40γ少数細胞群	23	25	38	治	治

独投与群における延命効果は極めて顕著であり、腫瘍接種後60日間の経過観察で、約27%に腫瘍の増殖を認めず、治癒と判定した。

腹腔内腫瘍細胞数 (図14~16) 抗血清単独投与群は、腫瘍細胞数の増加が著しく、対照群より若干低値をとるのみであつた。図16の場合はかなり有効と思われたが、この実験では抗血清の毒性が強く、抗血清投与群は治療の翌日より5日以内にすべて中毒死した。

制癌剤単独投与群は、対照群及び抗血清単独投与群に比し著明に低値をとり、大量投与群では、処置後7日目にも腫瘍増殖の傾向を示さなかつた。

併用群では一層低値を示し、腫瘍細胞数は著減した。

少数細胞移植-制癌剤単独投与群では、腫瘍細胞数は著減し、一見、制癌剤が非常に効果的に作用したように考えられた。

分裂指数 (図17~19) 対照群の細胞分裂指数は15乃至20%であつた。抗血清単独投与群は比較的低値をとり、制癌剤単独投与群は著明に低値を示した。併用群と少数細胞移植-制癌剤単独投与群は更に低値を示した。

異常分裂像 (図20~22) 一般に、少数細胞移植-制癌剤単独投与群が最高値をとり、併用群、制癌剤単独投与群の順に頻度は低下するが、その差は著明ではなかつた。抗血清単独投与群、対照群では、数%の異常分裂を示すにすぎなかつた。制癌剤投与群に認められた異常分裂像の大部分は、染色体散乱及び染色体断裂であつた。橋形成及び染色体遺残は、前2者に比し少ないが、対照群や抗血清単独投与群にくらべれば、明らかに多かつた。

考 按

悪性腫瘍に対する免疫療法と化学療法の併用効果を論ずるにさきだち、まず、その各々の作用機序について考察を加えておく必要がある。

所謂抗腫瘍免疫が、果して腫瘍特異的であるか否かに関しては、未だ結論は出ていないと云える。実験腫瘍における腫瘍特異性免疫と称せられるものの多くは Histoincompatibility の面より疑問を持たれているが、しかし、Histoincompatibility の問題を除外し得る実験系においても、なお、腫瘍組織とそれに対応する正常組織の間に免疫学的差異を認め、或は、人癌または動物の自然発生癌に、Auto-乃至 Isoimmunity を認めた報告もあり¹⁰⁾¹⁶⁾²⁰⁾²⁷⁾、悪性腫瘍の自然退縮¹⁾⁹⁾¹¹⁾³³⁾³⁴⁾、

図 14

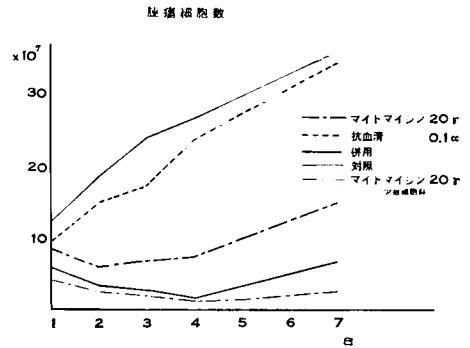


図 15

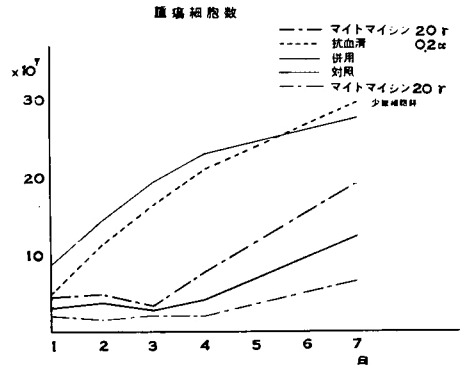


図 16

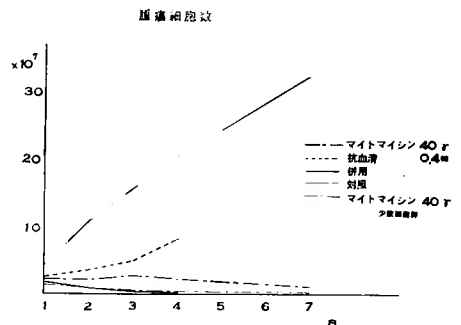


図14~16 腹腔内腫瘍細胞数 Ehrlich 癌細胞 5×10^6 個/マウス (普通量移植群) 或は 2×10^5 個/マウス (少数移植群) 移植後48時間に、新鮮抗血清、マイトマイシンを腹腔内に1回投与。縦軸は腹腔内腫瘍細胞数 各群5匹の平均値 横軸は処置後日数

図 17

分裂指数

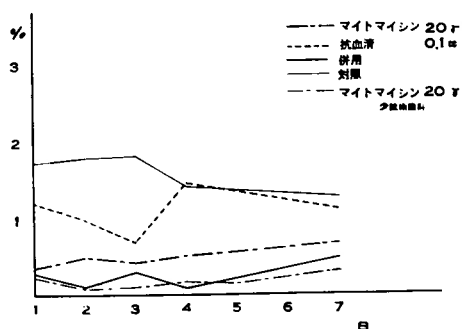


図 18

分裂指数

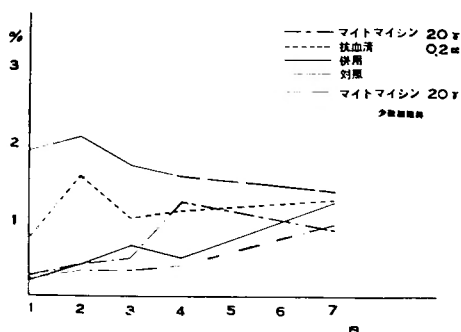


図 19

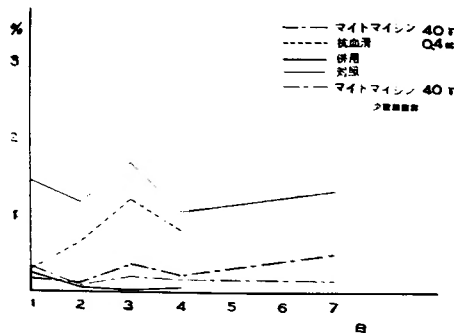


図17~19 分裂指数 Ehrlich 癌細胞 5×10^6 個/マウス (普通量移植群) 或は 2×10^5 個/マウス (少数移植群) 移植後48時間に、新鮮抗血清、マイトマイシンを腹腔内に1回投与
縦軸は分裂指数(%) 各群5匹の平均値
横軸は包置後日数

図 20

異常核分裂

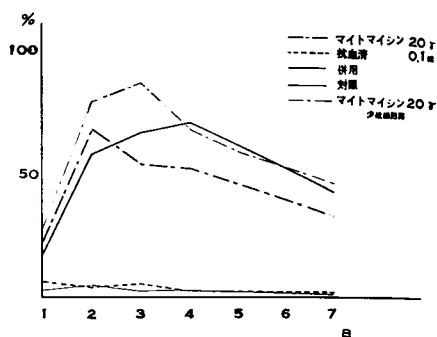


図 21

異常核分裂

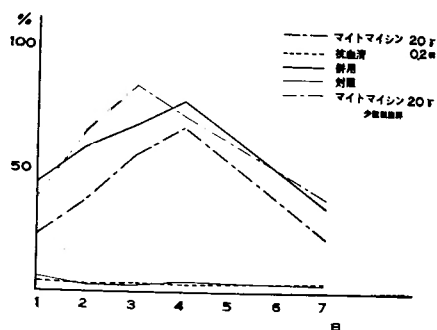


図 22

異常核分裂

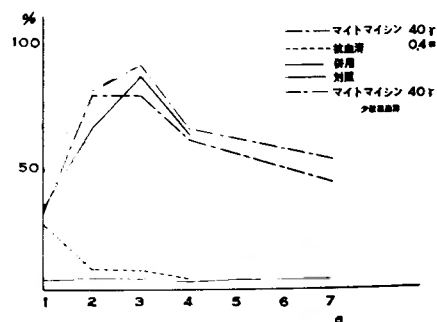


図20~22 異常核分裂 Ehrlich 癌細胞 5×10^6 個/マウス (普通量移植群) 或は 2×10^5 個/マウス (少数移植群) 移植後48時間に、新鮮抗血清、マイトマイシンを腹腔内に1回投与
縦軸は異常分裂頻度(異常核分裂数/核分裂総数 $\times 100\%$)、横軸は包置後日数

自己免疫疾患の存在等を考え併せると、腫瘍特異性免疫の存在を一概に否定し去ることはできない。ここでは、腫瘍特異性の問題は今後の研究に待つこととし、所謂抗腫瘍血清による被動免疫と制癌剤の併用について論じたい。

抗腫瘍血清による細胞障害に関しては、多数の業績があるが、これを要約すれば、

- 1) 抗血清による細胞の破壊には、補体及び、 Ca^{++} 、 Mg^{++} の関与を必要とし、
- 2) 細胞の破壊は極めて短時間に行なわれ、
- 3) 細胞の変化は、まず細胞膜、細胞質に認められ、
- 4) 大量の腫瘍細胞を中和するには、大量の抗血清を要し、
- 5) 十分量の抗血清を使用しても、抗体の作用を受け難い細胞 (refractory cells) が少数存在することが知られている。

即ち、抗体による細胞破壊に補体が関与することは、大多数の文献に認められており²⁾¹²⁾¹⁷⁾²²⁾²⁸⁾³⁷⁾⁴⁶⁾⁵²⁾、Ross & Repow⁴⁷⁾は、human amnion cells と家兎抗血清を用いた実験で、細胞はまず γ_2 globulin antibody と反応し、次で、 C_1' 、 Ca^{++} 、更に、 C_2' 、 C_3' 、 C_4 、 Mg^{++} と反応するとし、Schreck & Preston⁵³⁾は、非活性化抗血清の復活には大量の補体を要することを指摘し、Wissler & Flax⁶⁷⁾は、in vivo の実験においても、補体を必要とすることを示している。

細胞の破壊に要する時間に関しては、多くは in vitro の実験であるが、Goldberg & Green¹²⁾ 及び Green et al.¹⁷⁾は、家兎抗血清による Krebs-2 ascites tumor cells の変化は、2分以内に始まり、20分以内に最大になるとし、Ellem⁸⁾は、Ehrlich 癌に家兎抗血清を作用させ、10分以内に著明な変化を認め、Kalfayan & Kidd²⁸⁾は、Brown Pearce 癌と家兎抗血清を用い、5分後に細胞の腫脹、好塩基性の減少、核濃縮を認めており、Reif⁴⁶⁾、Schreck & Preston⁵³⁾、Winn⁶⁵⁾等はいずれも、1時間以内に大部分の細胞は死滅するとしている。いずれにしても、抗体による細胞障害が極めて短時間に行なわれることは特異的であり、且つ、この反応速度は温度に関係することも知られている。in vivo の実験で、細胞障害に要する時間を追究した文献は比較的少いが、板倉²⁶⁾は、吉田肉腫に白鼠抗血清を用い、1時間後に腫瘍細胞の著減、変性を認め、本実験でも、抗血清投与後1乃至3時間に著明な Eosin 可染率の上昇を認めたことより、抗体による細胞障害が急速に起こることは認められる。

細胞障害が細胞のどの部分に著明であるかについては、Goldberg & Green¹²⁾、Green et al.¹⁷⁾は、細胞膜及び細胞質の変化が主であり、核は通常障害を受けないとし、Kalfayan & Kidd²⁸⁾は、細胞質の変化と共に、分裂核の著明な Pyknosis を認め、Miller & Hsu⁴⁰⁾も、核の変化もまた著明であるとしているが、immune cytolysis において最初に起る著明な変化が、細胞膜の透過性に関して起るものであることは、一般に認められるところである。

腫瘍細胞数とその中和に要する抗体及び補体との量的関係については、近時、定量的乃至半定量的研究が行なわれている。即ち、Schreck & Preston⁵³⁾、Reif & Norris⁴⁶⁾等は、Eosin 或いは Eosin と Trypan blue による unstained cell count により、Winn⁶⁶⁾は中和試験により、McAllister³⁷⁾は cytotoxic metabolic inhibition test により、Bases²⁾は single cell の colony formation により、抗血清量と障害を受ける腫瘍細胞数の間に比例関係を認めている。

しかし、いかに大量の抗血清を用いても、少数の細胞は殆ど障害を受けずに生存することも知られており、Kalfayan & Kidd²⁸⁾は、Brown Pearce 癌と家兎抗血清を用い、in vitro で、その接触時間のいかに拘わらず、0.5%、Miller & Hsu⁴⁰⁾は、He La 細胞と家兎抗血清を用いて3~5%、Schreck & Preston⁵³⁾は、Bagg tumor で0.7%、Wissler & Flax⁶⁷⁾は Ehrlich 癌を用い、in vivo で1~2%と記載している。本実験においても、Ehrlich 癌に家兎抗血清を用い、in vitro 37°C、30分間接触後、約4%の Eosin 非染細胞を認めている。これらの所謂 refractory cells について、Miller & Hsu⁴⁰⁾は、mitotic cells が抗血清の作用を受け難いとし、Reif & Norris は、細胞膜の強い若細胞は抗血清に対し抵抗性を持つと考え、一方、Wissler & Flax⁶⁷⁾は、refractory cells は主として多核巨細胞よりなることを認め、polyploid cells と考えている。

制癌剤は、Schmidt によると、1) アルキル化剤、2) 代謝拮抗剤、3) 植物性核分裂毒、4) 抗癌性抗生物質、5) 酵素並びに補酵素、6) ホルモン、7) 癌性ウイルスに分類されるが、本実験では、小野の実験の後をうけ、主として Mitomycin C を用い、一試、transportform のアルキル化剤である Endoxan を用いた。

Mitomycin C の作用機序としては、芝、寺脇、Schwarz, Iyer 等はDNA合成を阻害するとし、Reich は合成のDNAを崩壊さるとしている。Schwarz は、Mit-

mycin C も masked compound であり、体内で活性化されてDNAに作用すると考えている。

Endoxan は Nitrogen mustard の cyclic phosphamide ester であり、in vitro では不活性であるが、in vivo では強い抗腫瘍性を示す。

細胞内DNA中の guanine moiety 或は cytosine moiety が mustard 類と反応し易いことは知られており、mustard 類による細胞障害の少なくとも一部分は、DNA 中の guanine moiety のアルキル化によるDNAの活性化、低分子化によつて説明し得ることは、Wheeler⁶⁵⁾ 或は Warwick⁶⁴⁾の総説にも述べられている。

投与後、これらの薬物が腫瘍細胞内へ浸透し、作用を発現するに要する時間に関しては、白淵⁶¹⁾等は、弘前肉腫及び白淵肉腫に Mitomycin C を投与し、前者で3時間後、後者で1時間後に分裂細胞の減少を認め、小林³⁵⁾は、ラッテ紡錘形肉腫の培養組織片に Mitomycin C を作用させ、50 γ /ccで1時間後、25 γ /ccで3時間後に細胞変化を認めた。海老名等⁷⁾は、吉田肉腫に Endoxan を投与し、6時間後に分裂指数の低下を認めている。これらの事実より、Mitomycin C 或いは Endoxan の作用発現は、投与後1乃至数時間に始まると考えられるが、細胞学的に最も特異な所見は、投与後12乃至24時間に現われる染色体断裂、橋形成、散乱等の異常分裂像であり、本実験で認めた Mitomycin C と mustard 系アルキル化剤による異常分裂の類似性は白淵によつても指摘されている。

抗腫瘍免疫血清と制癌剤の併用効果については、吉尾⁶⁸⁾、武田⁵⁷⁾、石橋²³⁾、小野⁴³⁾の、また、自働免疫と制癌剤の併用に関しては、佐藤⁵¹⁾の報告があるが、これらはいずれも延命効果を観察したのみであり、治療効果増強の機序に関しては何ら説明がなされていない。

免疫血清と制癌剤の併用により、制癌効果の増強される理由として、

- 1) 抗血清が制癌剤の作用を増強する。
- 2) 制癌剤が抗血清の作用を増強する。
- 3) 両者が相互に作用を増強し合う。

という可能性が考えられるが、抗血清の腫瘍細胞に対する作用は極めて迅速であり、制癌剤の作用発現は、それより少なくとも1乃至数時間は遅れるであろうことより、制癌剤が抗血清の作用を増強するという可能性は考え難く、果して併用効果ありとすれば、抗血清が制癌剤の作用を増強するという可能性が考慮されなければならないこととなる。この場合、投与された抗

血清及び補体が十分量であれば、腫瘍細胞の大多数は短時間内に死滅するため、制癌剤による治療対象となるのは抗体に抵抗性を有する少数細胞であるべきである。これらの所謂 refractory cells は、抗血清の作用を受けても、外観上殆ど障害を認めず、且つ、動物に接種すれば増殖することより、これらの細胞に対する抗体の作用は、全くないか、或いは極めて軽微であると考えられ、抗血清の作用に抵抗して生き残つたこれらの細胞に関しては、併用療法の効果は、制癌剤単独療法の効果にほぼ等しいと考えられる。

投与された抗血清量が不十分量であれば、抗体の作用を強く受けた一部の腫瘍細胞は、比較的短時間内に死滅し、残部は種々の程度の障害を受けるが再び増殖することも考えられ、この場合、障害を受けた細胞の細胞膜透過性の変化により、制癌剤の細胞内浸透が大となり、制癌剤の作用が増強する可能性を予想される。しかし、本実験Iにおいて、同一抗血清量において制癌剤量を増加すると、併用群の分裂指数低下が顕著となるが、制癌剤量が一定の場合、抗血清量を増加しても、併用群の分裂指数は殆ど変化しないことより、抗血清が特に制癌剤の作用を増強するとは考え難く、また、Green & Goldberg¹⁸⁾ は、Krebs-2 ascites tumor cells 及びマウス赤血球と家兎抗血清を用いた実験で、抗体は補体と共に細胞膜に作用し、細胞膜に holes を生じ、macromolecule の通過を可能とし、且つ、一旦変化を受けた細胞は、その障害より恢復し得ず、non viable であると述べている。Kalfayan & Kidd²⁸⁾ も、一旦抗血清により障害を受けた細胞は viability を失なうとし、Miller & Hsu⁴⁰⁾ も、障害が一旦核に及ぶと、その細胞は死滅するとしている。これらの説より考えても、抗血清が一旦作用した細胞は、同時に投与された制癌剤の作用如何に拘らず、すべて死滅するものと考えられ、抗血清の作用が軽微であるため、一旦障害を受けた細胞が生存し、しかもその細胞において、抗血清の作用による細胞膜透過性の変化のため、制癌剤の細胞内高濃度滲透を来し、制癌効果の増強をもたらすという可能性は期待し難いと思われる。

また、抗血清は主として細胞膜、細胞質に作用し、Endoxan、Mitomycin C は主として核に作用するため、作用点を異にする2物質の併用による相乗効果の可能性も一応考えられるが、小野⁴³⁾は、主として細胞質に作用する Toyomycin にも、Mitomycin C や Nitro-min と全く同様の併用効果を認めているので、抗血清と Endoxan、或いは Mitomycin C との併用効果は、

その各々の作用点が異なるためであるとは考え難い。

抗血清に対する refractory cells が, Miller & Hsu⁴⁰⁾, 及び Reif & Norris⁴⁶⁾ の述べる如く, mitotic cells 或いは young cells であれば, 抗血清の使用により mitotic cells 或いは young cells が撰別的に生き残ることになるので, その結果, 細胞分裂の同調を来し, 制癌剤の作用時期の如何によつては, 同調分裂を利用する制癌剤の効果増強に関する研究^{30) 41) 58)}における如く, 制癌剤の作用増強を期待することも可能であるが, 本実験の範囲内では明らかな細胞分裂の同調は認められなかつた。

本実験において, 併用群と制癌剤単独投与群の効果を比較すると, 一般に, 併用群において分裂指数の低下, 異常分裂の増加が著明となるが, 併用群と少数移植-制癌剤単独投与群を比較すると, 分裂指数の低下, 異常分裂増加の程度がかなり類似する傾向を認める。一般に, 腫瘍細胞が少数の場合には制癌剤の併用が顕著に認められるのであり, このことは石館^{20) 25)}神崎²⁷⁾佐藤⁵⁰⁾等によつて指摘されており, 以後便宜的に, 少数細胞効果と称することにする。本実験において, 抗血清の作用を受けないと思われる Eosin 非染細胞は, in vitro で 4%, in vivo では 4% 以上であつた。ここで普通量移植 (Ehrlich 癌細胞 5×10^6 個/マウス) に対し, その 4% に相当する 2×10^5 個/マウス移植群を少数移植群とした場合, もし抗血清と制癌剤の作用が相乗的ならば, 併用群において少数移植-制癌剤単独投与群以上の効果を認め得る場合があり, 一方, 抗血清と制癌剤の作用が相加的であれば, 併用群の制癌効果は少数移植-制癌剤単独投与群と普通量移植-制癌剤単独投与群の中間に位するであろうとの予想のもとに本実験Ⅱが行なわれたのであるが, この実験では, 併用群の効果は, 普通量移植-制癌剤単独投与群にまさるが, 少数移植-制癌剤単独投与群に比し, 稍劣る結果を得た。

これらの事実より, 抗血清と制癌剤の併用による延命効果増強の機序は, 抗血清により増殖性を有する腫瘍細胞が著減し, 残つた少数細胞に制癌剤が作用することにより, 制癌効果が増強されると説明するのが最も妥当と思われる。腫瘍細胞の増殖は host-tumor relation-ship によつて決定されるものであり, 宿主側よりみて, この他にも, 宿主動物の腫瘍に対する自然抵抗性の変化, 死滅した腫瘍細胞による自働免疫の発生, その他多数の複雑な因子の関与することは考えられるが, 少なくとも, 本実験の如き抗血清と制癌剤の

併用時においては, これらの因子は minor factor であると考えられる。

小野は⁴³⁾ Ehrlich 癌移植後48時間の担癌マウスに, Mitomycin C 40 γ と種々の量の抗血清を投与し, 抗血清 0.1cc 以上と 0.05cc 以下とで, 延命効果に明瞭な差を認め, これを悉無律 (all or non law) に従うと解釈したが, 著者は, これを, 抗血清 0.1cc がその実験において腫瘍を中和するに十分な量であつたと考え, これ以上の量の抗血清を投与しても refractory cells は減少せず, 従つて, より以上の効果を認めず, また, 0.05 cc 以下の量では, その併用効果は, 抗血清の投与量により差を生ずべきであるが, 実験誤差のため, 当然生ずべき差が不明瞭であつたと解釈したい。

最後に, 悪性腫瘍に対する併用療法の臨床的応用に関しては, その困難性は悪性腫瘍に対する免疫単独療法の困難性に共通する。即ち, 問題を異種抗血清と制癌剤の併用に限定すると

1) 非特異性抗体を含む抗血清は極めて毒性が強く, 従つて, 腫瘍特異性抗体の精製を必要とする。このことは, 必然的に, 自然発生腫瘍における腫瘍特異性抗原の有無という, 現在未解決の, 且つ, 最も本質的な問題につながるものであるが, 以下腫瘍特異性免疫の存在を前提として論をすすめることにする。

2) 抗体の所要量として, Mc Allister³⁰⁾は, 10×10^6 HeLa cells を中和するには, 5.2 ml の家兎抗血清, 或いは 21 ml の白鼠抗血清を要するとし, また, Day & Pressman⁵¹⁾によれば, Murphy rat lymphosarcoma に対する tumor localizing antibody の収量は, 抗血清グロブリン分画の 0.07~0.09% の微量であり, 腫瘍の中和には大量の抗血清を要することが知られている。

3) 現在行なわれている悪性腫瘍に対する免疫血清療法の動物実験の多くは, 腹水腫瘍に対する抗血清の腹腔内投与によるものであり, 抗血清を腫瘍細胞と直接接触させることができるが, 臨床例ではこのような場合は例外的である。抗血清を静脈内に投与する場合, Wissler⁶⁷⁾は blood vessel barrier の存在を強調し, 抗体はそれを通過し難いため, 腫瘍細胞に到達することが困難であるとしている。

4) 腫瘍特異性抗原が存在すると仮定しても, それが surface antigen か, intracellular のものかが問題であり, 後者の場合, 抗体の抗原への到達に困難性があることは, intracellular の virus が抗体にて中和されないことより^{21) 63)}類推される。また, 腫瘍特異性抗体が存在し得ても, それが果して cytotoxicity を持つか否

かは不明である。

以上の如く、今後解決を要する問題は非常に多い。

結 語

担 Ehrlich 腹水癌マウスに、家兎抗血清と制癌剤を、種々の量的組み合わせて、単独或いは併用投与し、延命効果及び細胞効果を観察し、下記の結果を得た。

1) 平均生存日数は、対照群、抗血清単独投与群、制癌剤単独投与群、併用群の順に、後者ほど延長する。早期治療例においては、末期治療例に比し、延命効果は著明であり、且つ、各群間の延命効果の差も顕著である。

2) 抗血清投与群では、投与後短時間内に腫瘍細胞の Eosin 可染率の著明な上昇を認めるが、抗血清非投与群では認められない。

3) 制癌剤投与群では、投与後比較的長期間の分裂指数の低下及び投与数時間後より数日間にわたる異常分裂の増加を認めるが、制癌剤非投与群では認められない。

4) 光学顕微鏡的観察では、抗血清と制癌剤の併用例における、抗血清による細胞障害と、制癌剤による細胞障害は、互に無関係に、且つ、時相を異にして現われ、抗血清と制癌剤が互に作用を増強し合う如き所見は得られない。

5) 腫瘍細胞に十分量の抗血清を作用させた場合、Eosin非染率は4%以上であつた。普通移植量(5×10^6 個/マウス)の4%に相当する少量移植群(2×10^5 個/マウス)を実験に加えた場合、普通量移植-抗血清・制癌剤併用群における治療効果は、普通量移植-制癌剤単独投与群にまさるが、少量移植-制癌剤単独投与群に劣る。

6) 併用群における顕著な延命効果は、抗血清が腹腔内腫瘍細胞の大多数を数時間内に死滅させ、残部の少数細胞に制癌剤が作用することによりもたらされるものであり、相加的作用に近いものと説明し得る。

文 献

- 1) Arcomano, J. P., Barnett, J. C. and Botton, J. J. : Spontaneous disappearance of pulmonary metastasis following nephrectomy for hypernephroma. *Am. J. Surg.*, **96** : 703, 1958.
- 2) Bases, R. : Antigenic differences between normal and polyoma virus induced hamster cells.

- I. A quantitative study of the cytotoxic effect of antisera. *Cancer Res.*, **23** : 811, 1963.
- 3) Bickis, I. J., Quastel, J. H. and Vas, S. I. : Effects of Ehrlich ascites antisera on the biochemical activities of Ehrlich ascites carcinoma. *Cancer Res.*, **19** : 602, 1959.
- 4) Colter, J. S., Kritchevsky, D., Bird, H. H. and McCandless, R. F. J. : In vitro studies with antisera against tumor cell protein fractions. *Cancer Res.*, **17** : 272, 1957.
- 5) Day, E. D. and Pressman, D. : Purification of tumor localizing antibodies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **69** : 651, 1957.
- 6) Eaton, M. D., Scala, A. R. and Jewell, M. : Method for measuring viability of ascites cells. Dye exclusion and respiration as affected by depletion, poisons, and viruses. *Cancer Res.*, **19** : 945, 1959.
- 7) 海老名敏明, 他 : Endoxan 及び Trenimon の制癌作用に関する基礎的研究. *日本臨床*, **19** : 1990, 1961.
- 8) Ellem, K. A. O. : Some aspects of the ascites tumor cell response to a heterologous antiserum. *Cancer Res.*, **18** : 1179, 1958.
- 9) Everson, T. C. and Cole, W. H. : Spontaneous regression of cancer ; Preliminary report. *Ann. Surg.*, **144** : 366, 1956.
- 10) Finney, J. W., Byers, E. H. and Wilson, R. H. : Studies in tumor auto-immunity. *Cancer Res.*, **20** : 351, 1960.
- 11) Fox, F., Davidson, J. and Thomas, L. B. : Maturation of sympathetic ganglioma into ganglioneuroma. *Cancer*, **12** : 108, 1959.
- 12) Goldberg, B. and Green, H. : The cytotoxic action of immune gamma globulin and complement on Krebs ascites tumor cells. *J. Exp. Med.*, **109** : 505, 1959.
- 13) Goldner, H., Bogden, A. E. and Aptekman, P. M. : Immunity against a transplantable ascites tumor of spontaneous origin in an inbred rat strain. *J. Immunol.*, **82** : 520, 1959.
- 14) Grace, J. T. : Investigation of host resistance in cancer patient. *Ann. Surg.*, **148** : 633, 1958.
- 15) Graham, J. B. and Graham, R. M. : Antibodies

- elicited by cancer in patients. *Cancer*, **8** : 409, 1955.
- 16) Graham, J. B. and Graham, R. M. : The effect of vaccin on cancer patient. *Surg. Gyn. Obst.*, **109** : 131, 1959.
- 17) Green, H. and Goldberg, B. : The action of antibody and complement on mammalian cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **87**, 352, 1960.
- 18) Green, H., Fleischer, R. A., Barrow, P. and Goldberg, B. : The cytotoxic action of immune gamma globulin and complement on Krebs ascites tumor cells. II. Chemical studies. *J. Exp. Med.*, **109** : 511, 1959.
- 19) 平井秀松, 他 : 胃癌及び Rhabdo myosarcoma の特異抗原の証明. *最新医学*, **19** : 449, 1964.
- 20) Hirsch, H. M., Bittner, J. J., Cole, H. and Iverson, I. : Can the inbred mouse be immunized against its own tumor? *Cancer Res.*, **18** : 344, 1958.
- 21) Howes, D. W. : The growth cycle of polio virus in cultured cells. II. Maturation and release of viruses in suspended cell populations. *Virology*, **9** : 96, 1959.
- 22) Imagawa, D. T., Syverton, J. T. and Bittner, J. J. : The cytotoxicity of serum for mouse mammary cancer cells. *Cancer Res.*, **14** : 1, 1954.
- 23) Ishibashi, Y., et al. : Studies on tumor autoimmunity. *Jap. J. Exp. Med.*, **31** : 1, 1961.
- 24) 石館守三, 他 : 吉田肉腫を用いた悪性腫瘍の化学療法に関する実験的研究 (X), 吉田肉腫の少数細胞に対する各種ナイトロゼンマスタード類の抑制能力試験. *癌*, **46** : 480, 1955.
- 25) 石館守三, 他 : 吉田肉腫を用いた悪性腫瘍の化学療法に関する実験的研究 (XIV), 吉田肉腫少数細胞に対するナイトロミンの抑制能力試験. *癌*, **47** : 380, 1956.
- 26) Itakura, S. : Studies on the immunological therapy of Yoshida sarcoma. The antigenicity of tumor cells, Nanzando press, 229, 1957.
- 27) Itakura, K. : Studies on human cancer antigen by gel-diffusion method. *Gann*, **54** : 93, 1963.
- 28) Kalfayan, B. and Kidd, J. G. : Structural changes produced in Brown-Pearce carcinoma cells by means of a specific antibody and complement. *J. Exp. Med.*, **97** : 145, 1953.
- 29) Kanzaki, K. : Inhibitory effects of various compounds upon small number of Yoshida sarcoma cells. *Gann*, **43** : 326, 1952.
- 30) Kato, T. : Experimental studies on application of hypothermia to cancer chemotherapy. *Arch. Jap. Chir.*, **33** : 724, 1964.
- 31) 川嶋 望 : 癌細胞の電子顕微鏡的研究. Nitro-min の癌細胞に及ぼす影響について. *長崎医学会雑誌*, **37** : 1, 1962.
- 32) 鎌田英男, 他 : Mitomycin C の薬理作用. *協和酸酵パンフレット*, 1, 1958.
- 33) Kessel, L. : Spontaneous disappearance of bilateral pulmonary metastasis. *J. A. M. A.*, **169** : 1737, 1957.
- 34) Klein, G. and Revesz, L. : Quantitative studies on the multiplication of neoplastic cells in vivo. *J. Nat. Canc. Inst.*, **14** : 229, 1953.
- 35) 小林仁道 : 培養した腫瘍細胞に及ぼすマイトマイシンの影響. *遺伝学雑誌*, **34** : 344, 1959.
- 36) Korngold, L. : The distribution and immunochemical properties of human tissue and tumor antigens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **69** : 681, 1957.
- 37) Leyden, E. von, and Blumenthal, F. : Attempts to immunize humans by inoculation of their own cancer. *Deutsche Med. Wochenschr.*, **28** : 637, 1902.
- 38) Masukawa, A. : On proteins of gastric cancer. *Tohoku J. Exp. Med.*, **58** : 251, 1953.
- 39) McAllister, R. M., Grunmeier, P. W., Coriell, L. L. and Marshak, R. R. : The effects of heterologous immune serum upon He La tumors in vivo. *J. Nat. Canc. Inst.*, **21** : 541, 1958.
- 40) Miller, D. G. and Hsu, T. C. : The action of cytotoxic antisera on the He La strain of human carcinoma. *Cancer Res.*, **15** : 306, 1955.
- 41) Miura, R. : In vivo synchronous mitosis of cancer cells induced by hypothermia and its application to cancer chemotherapy. *Arch. Jap. Chir.*, **33** : 581, 1964.
- 42) Mountain, I. M. : Cytopathogenic effect of antiserum to human malignant epithelial cells (Strain He La) on He La cell culture. *J. Im-*

- munol., **75** : 478, 1955."
- 43) Ono, H. : Immunotherapy of cancer. Arch. Jap. Chir., **32** : 751, 1963.
- 44) Reich, C. : Apparent recovery in chronic lymphocytic leukemia. J.A.M.A., **170** : 169, 1959.
- 45) Reif, A. E. : Immune cytotoxicity of the mouse ascites tumors. J. Immunol., **89** : 849, 1962.
- 46) Reif, A. E. and Norris, H. J. : A system for quantitative differentiation of cytotoxic activity of antisera to ascites tumor cells. Cancer Res., **20** : 1235, 1960.
- 47) Ross, A. and Lepow, I. H. : Studies in immune cellular injury. J. Exp. Med., **112** : 1083, 1960.
- 48) Rubin, H., Franklin, R. M. and Baluda, M. : Infection and growth of New Castle disease viruses in cultures of chick embryo lung epithelium. Virology, **3** : 587, 1957.
- 49) 桜井欽夫 : Endoxan の基礎的研究及び考察. 最新医学, **16** : 1729, 1961.
- 50) 佐藤春郎 : 癌転移と少数細胞. 癌の臨床, **7** : 629, 1961.
- 51) 佐藤隆一 : 癌の免疫効果と化学療法剤との相乗効果に関する実験的研究. 第22回日本癌学会記事, **88**, 1963.
- 52) Schreck, R. and Preston, F. W. : Toxicity of homologous immune serum to a transplantable tumor : Studies using phase microscopy and cinemicrography. J. Nat. Canc. Inst., **16** : 1021, 1956.
- 53) Schreck, R. and Preston, F. W. : Cytotoxicity of a homologous immune serum to transplantable rat tumor by the methods of unstained cell counts. Cancer Res., **17** : 102, 1957.
- 54) Schwarz, H. S., Sternberg, S. and Philips, F. S. : Pharmacology of Mitomycin C. IV. Effects in vivo on nucleic acid synthesis ; Comparison with Actinomycin D. Cancer Res., **23** : 1125, 1963.
- 55) Shiba, S. et al. : Studies on the effects of Mitomycin C on nucleic acid metabolism in Escherichia coli strain B. Biken's J., **1** : 179, 1958.
- 56) Shinozawa, S. : Electron and light microscopic studies on the effect of Nitrovin on ascites tumor. Gann, **55** : 9, 1964.
- 57) Snell, G. D. : Incompatibility reactions to tumor homotransplants with particular reference to the role of the tumor. Cancer Res., **17** : 2, 1957.
- 58) Takahashi, M. : Intensification of effects of anti cancer agents by use of hypothermia. Arch. Jap. Chir., **32** : 648, 1963.
- 59) 武田勝男, 他 : 化学療法剤を合併した腹水腫瘍の免疫学的治療. 癌, **48** : 452, 1957.
- 60) 寺脇朝治, 他 : Mitomycin C の作用機序に関する研究. 癌, **49** : 12, 1958.
- 61) 臼淵 勇, 他 : Mitomycin C の実験腫瘍に対する治療効果. Chemotherapy, **6** : 378, 1958.
- 62) Vinegar, R. : Metachromatic differential fluorochroming of living and dead ascites tumor cells with acridine orange. Cancer Res., **16** : 900, 1956.
- 63) Vogt, P. and Rubin, H. : Localization of infectious viruses and viral antigen in chick fibroblasts during successive stages of infection with Rous sarcoma viruses. Virology, **13** : 528, 1961.
- 64) Warwick, G. P. : The mechanism of action of alkylating agents. Cancer Res., **23** : 1315, 1963.
- 65) Wheeler : Studies related to mechanisms of resistance to biological alkylating agents. Cancer Res., **23** : 1334, 1963.
- 66) Winn, H. J. : Immune mechanisms in homotransplantation. I. The role of serum antibody and complement in the neutralization of lymphoma cells. J. Immunol., **84** : 530, 1960.
- 67) Wissler, R. W. and Flax, M. H. : Cytotoxic effects of antitumor serum. Ann. N. Y. Acad. Sci., **69** : 773, 1957.
- 68) 吉尾正四, 他 : 各種化学的薬剤及びこれに免疫血清を併用した吉田肉腫の治療成績. 癌, **43** : 250, 1952.