IN VITRO ANTI-TUMOR ACTIVITY OF HUMAN BLOOD MONOCYTES
AGAINST CULTURED HUMAN CANCER CELLS

KAZURO KONISHI, M. D.

Department of Otolaryngology, Niigata University School of Medicine, Niigata
(Director: Y. Nakano, M. D.)

Anti-tumor activity of the human blood monocytes against cultured human cancer cells was examined in vitro. The cell lines used in this study were Okajima (a stomach cancer), Kato-III (a stomach cancer) and Hattori (a breast cancer).

The anti-tumor activity of the monocytes from healthy volunteers was not detected by ^{51}Cr -release assay of the target tumor cells, but was demonstrated by ^3H -thymidine incorporation test. This suggested that the anti-tumor activity was attributed to the cytostatic action. The inhibition of the growth of the tumor cells was observed irrespective of their origin. The growth of human normal fibroblasts was not inhibited by the activity of the monocytes.

The anti-tumor activity was enhanced by in vitro treatment of monocytes with immunopotentiators, such as *Propionibacterium acnes* (P. acnes), P. acnes-cell wall skeleton (CWS), a streptococcal preparation (OK-432) and *Nocardia rubra*-CWS. The activity was not enhanced by protein bound polysaccharide Kureha (PSK).

The activity of the monocytes from human umbilical cord blood was almost same to that of peripheral blood monocytes from healthy volunteers. The anti-tumor activity of peripheral blood monocytes from patients with head and neck cancer was also almost same to that of monocytes from healthy volunteers and was enhanced by the treatment with those immunopotentiators in vitro.

A85—0107—94362

ヒト培養癌細胞に対する単球の抗腫瘍性

新潟大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：中野雄一教授）

小 西 和 朗

I 緒 言

癌患者の多くは何らかの免疫能の低下を示すことが諸家により報告されており¹⁾²⁾³⁾、宿主免疫能を改善する目的で免疫賦活剤による治療が試みられている⁴⁾⁵⁾。免疫療法というからには、個々の癌に対する特異的免疫療法が望ましいが、ヒト癌では目下のところ臨床導入は不可能である。したがって、細菌製剤^{6)~9)}や植物蛋白多糖体¹⁰⁾、合成アジュバント¹¹⁾¹²⁾などを利用した非特異的免疫療

法が主流をなしている。これらの免疫賦活剤は、リンパ球、マクロファージ、抗体依存性細胞障害 (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC) に属する細胞など種々の細胞に作用をおよぼすとされているが¹³⁾、最近これらの有効細胞を誘導するためには、マクロファージが必要であること¹⁴⁾、またマクロファージ自身も強力な抗腫瘍性を示すこと¹⁵⁾などが明らかにされている。既に、鈴木ら¹⁶⁾は *Corynebacterium lique-*

faciens が、田中ら¹⁷⁾ は溶連菌製剤 OK-432 が in vivo ならびに in vitro でマクロファージを活性化し、腫瘍細胞の増殖を抑制することを報告している。一方、マクロファージの前駆細胞は血液単球であるとする考え方が台頭し^{18)~20)}、両者を一括して mononuclear phagocyte system (MPS) として取り扱う傾向にある。

ヒトでは通常の場合、マクロファージを多量に採取することが困難であることから、血液単球をマクロファージの前駆細胞とみなす立場に立ち、今回の実験を行った。その結果の一部はすでに内山ら²¹⁾ によって報告されている。今回、著者は採血量を少なくしたアッセイ系を開発すると同時に、単球の抗腫瘍性に関する機序についても若干の検討を行った。また、頭頸部悪性腫瘍患者の単球を用いた抗腫瘍性の実験成績についても合わせて報告する。

II 実験材料および実験方法

1. 血液単球の分離：実験操作手順の概略を図1に示した。

内山ら²¹⁾ の方法に準じ、ヘパリン加採血した人末梢静脈血 10ml を Ficoll-Conray (比重 1.076) に重層後遠心 (1,900rpm, 30min) し、リンパ球細胞層を分離回収した。ついで培養液 RPMI-1640 (日水製薬) で2回洗滌遠心 (1,400rpm, 10min) 後、20%牛胎児血清 (Gibco 社) 加 RPMI-1640 に 200 μ g/ml のカナマイシンを加えた培養液に再浮遊させ、直径 16mm のプラスチック・ディッシュ (Limbro 社) に入れ、CO₂細胞培養器 (5%CO₂, 37°C) にて約10分間静置培養し、単球をディッシュ底面に接着させた。非接着細胞を RPMI-1640 で十分洗滌除去し接着細胞を分離した。形態や貪食能などより約90%が単球であり、7~8%のリンパ球と1~2%の顆粒球の混入が認められた。

なお、上記手技で得られた非接着細胞をプラスチック・シャーレにまき、混在する接着細胞をできるかぎり除去し、浮遊性の細胞を非接着細胞として実験に供した。形態学的には、ほとんど100%がリンパ球と判断された。

2. 対象

基礎実験には20名 (18歳から34歳) の健康成人の末梢血単球を使用した。次いで頭頸部悪性腫瘍患者33名 (29歳から82歳：喉頭癌15名、舌癌・耳下腺癌・ワルダイエル輪原発悪性リンパ腫・上顎癌・口腔底癌各3名、外耳道癌・皮膚癌・口蓋悪性黒色腫各1名) と慢性炎症疾患10名 (20歳から68歳：慢性中耳炎5名、顎下腺炎・耳前

図1 実験方法

部瘻孔、反復性耳下腺炎、慢性副鼻腔炎、篩骨洞膿腫各1名) および対照として健康成人9名 (24歳から38歳) の計52名について、末梢血単球の抗腫瘍性を検索した。なお、一部では臍帯血の単球も実験に供した。

3. 血液単球 (接着細胞) の活性化

単球の活性化には主に *Propionibacterium acnes* (以下 P. acnes, Lot No 5M, 20mg/ampule 興和) を用いた。なお、P. acnes は当初 Prévôt 分類²²⁾ で *Corynebacterium liquefaciens* とされていた細菌と同一のものである。その他、一部の試験で OK-432 (中外製薬) 0.1KE/ml, Protein bound Polysaccharide Kureha: Krestin (PSK) 0.1 μ g-1,000 μ g/ml, *Nocardia rubra*-Cell Wall Skeleton (N. rubra-CWS), P. acnes-CWS 1-100 μ g/ml の濃度で約 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個/dish の単球に60分間作用させて活性化した。その後、培養液で洗滌し、20%牛胎児血清加 RPMI-1640 を新たに加えて混合培養 (5%CO₂, 37°C, 36時間から90時間) を行った。なお、リンパ球を主体とする非接着細胞に対しても同様の薬物を作用させたが、培養液からこれらの薬物を完全に除去することが困難なことから、多少残存したままの状態でも実験に使用した。

4. 標的細胞との混合培養

標的細胞は胃癌培養細胞株 OKAJIMA と KATO-III および乳癌培養細胞株 HATTORI である。OKAJIMA と HATTORI は国立ガンセンター 下山正徳博士、KATO-III は東京大学医科学研究所、関口守正博士より恵与されたものである。三者とも浮遊増殖を営む細胞株

である。なお、 ^{51}Cr -sodium cromate を用いた基礎実験では他に MOLT (リンパ性白血病細胞), BT-I (パーキッドリンパ腫細胞) 株も使用した。以上の5株は20%牛胎児血清加 RPMI-1640 で培養した。細胞数を血球計算盤にて算出し、約 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個/ml の単球あるいは 1×10^5 個/ml のリンパ球 (非接着細胞) に対し、 1×10^4 個/ml の癌細胞を加えて混合培養を行った。混合培養期間は1～5日である。各実験毎に、実験群以外に癌細胞のみの培養、あるいは活性化しない正常単球、リンパ球と癌細胞の混合培養とを対照群として設置し、各群とも少なくとも3シャーレを準備した。

5. 抗腫瘍性の判定法

1) ^{51}Cr 標識細胞障害試験

本法は菊地²³⁾の方法に準じて行った。標的細胞 $1 \sim 5 \times 10^5$ 個/ml に ^{51}Cr -sodium cromate $100\mu\text{Ci}/0.5\text{ml}$ を加え、 37°C で45分間培養することにより標識した。その後培養液で数回洗滌遠心 ($1,200\text{rpm}$, 5分) し、ついで非特異的に吸着した ^{51}Cr を取り除くために、冷却した20%牛胎児血清加RPMI-1640に標的細胞を浮遊 (4°C , 30分) させた。その後細胞を洗滌し、上清中の放射能活性をできるだけ低くなるようにした。ついで20%牛胎児血清加 RPMI-1640 に再浮遊させ、 2×10^4 個/ml の細胞濃度に調整した。

上記のようにして準備した ^{51}Cr 標識癌細胞を、24時間から96時間単球と混合培養 ($5\%\text{CO}_2$, 37°C) し、培養液中に遊離する ^{51}Cr 量をオートウェル・カウンター (島津製作所) で測定した。

2) ^3H -Thymidine 取り込み抑制試験

本法は、Krahenbuhl, Remington²⁴⁾の方法に準じて行った。すなわち、単球あるいはリンパ球と標的癌細胞を36～60時間混合培養後、各ディッシュに ^3H -Thymidine $5\mu\text{Ci}/0.2\text{ml}$ (全培養液量 0.7ml) を加え、6時間パルスラベルし、各ディッシュを生理的食塩水で十分洗滌して全細胞を回収した。ディッシュ底部に固着した細胞は0.25%のトリプシン処理および、ラバー・クリーナーで剝離回収した。回収細胞は生理的食塩水で3回洗滌遠心 ($2,000\text{rpm}$ 10分) し、細胞ペレットとした。細胞ペレットは凍結保存しておき、測定時に冷却したトリクロロ酢酸に浮遊させ、ミリポアフィルターに吸着後十分乾燥し、液体シンチレーションカウンター (ALOKA 社) で、標的細胞 DNA に取り込まれた ^3H -Thymidine の放射能活性を測定した。

Ⅲ 実験成績

1. ^{51}Cr 標識細胞障害試験

標的細胞の適格性を決定するため、基礎実験として、MOLT, BT-I, HATTORI, KATO-Ⅲ, OKAJIMA の各細胞株を用いて検討した。

1) 各細胞の標識率

各細胞株が $100\mu\text{Ci}/0.5\text{ml}$ の ^{51}Cr -Sodium cromate でどの程度ラベルされるかを測定した。その結果、 1×10^4 個あたり平均して MOLT は 185cpm , BT-I は 535cpm , KATO-Ⅲ は 976cpm , OKAJIMA は $1,300\text{cpm}$, HATTORI は 530cpm であった。

2) ^{51}Cr の自然放出率

図2に示すように ^{51}Cr でラベルした腫瘍細胞は、培養経過とともに自然に ^{51}Cr を培養液中に放出する。しかも培養初期には放出量が直線的に増加し、各細胞株ともほぼ同じ様な傾向を示した。MOLT, KATO-Ⅲ, BT-I 細胞では早期より自然放出率が高く、標識後24時間ですでにそれぞれ約40%, 45%, 35%であり、48時間では65%, 55%, 50%であった。自然放出率が高いということは、腫瘍細胞単独培養液中の遊離 ^{51}Cr 量が多いことを意味し、単球作用群の明確な細胞障害性を検出するためには不都合である。それに対して、OKAJIMA, HATTORI 細胞の24時間後の ^{51}Cr の放出率は30%と25%であり、48時間後でも45%, 40%であった。したがって、前記の3種の腫瘍細胞株に比較して自然放出率が低く、実験に適するものと判断した。しかし、これらの細胞でも3日以上培養すると放出率が高くなりすぎることから、 ^{51}Cr 標識細胞障害試験は少なくとも2日から3日以内に終了すべきであると判断した。

3) ^{51}Cr の最大遊離率

標識細胞培養液に3倍の蒸留水を加え、3回の凍結融解により細胞を破壊した。ついで、遠心 ($2,000\text{rpm}$ 10min) 上清中の ^{51}Cr 量をカウントし、全体のラベル量で除して最大遊離率を求めた。その結果、OKAJIMA 細胞で86%, BT-I 細胞で82%, KATO-Ⅲ 細胞で78%であった。

4) 血液単球による細胞障害試験

一般にマクロファージの細胞障害性は、マクロファージと標的細胞とが直接接触することによって生ずるときから、各ディッシュ底部に接着した単球と標的腫瘍細胞とが、均一に接触する必要がある、このためには培養液量が問題となる。培養液量が 0.7ml 以上では、標的細胞が中央に集まる傾向があり、培養液量が

図 2 各癌細胞の ^{51}Cr 自然放出曲線

0.2～0.3ml では標的細胞が ディッシュ 周辺に散在する傾向がある．したがって 0.5ml の培養液量で実験を行った．また，混合培養において経時的に腫瘍細胞の形態学的変化を観察すると，24時間から36時間で腫瘍細胞の周囲に単球がロゼット状に接着し，48時間から72時間で腫瘍細胞に空胞形成や膨化が認められた（図 3）．以上の所見から，細胞障害性を明確に検出するには2日から3日にわたる混合培養が必要であると判断した．以上の基礎実験の結果から，OKAJIMA, HATTORI, KATO-III の3株を選び，*P. acnes* によって活性化された単球が細胞障害性を有するか否かを試験した．培養開始後，24, 48, 72, 96時間目に培養液中の ^{51}Cr 量を測定した．その結果を図 4 に示す．混合方法により A 群：腫瘍細胞単独群，B 群：腫瘍細胞に正常単球を作用させた群，C 群：腫瘍細胞に活性化単球を作用させた群，の3群について検討したが各群間に有意の差は認められず，活性化単球に特異的な細胞障害性を検出することは不可能であった．単球—腫瘍細胞比（Effector to target cell ratio 以下 E/T 比と略す）を 20:1, 10:1 あるいは 5:1 として実験を行っても結果はほぼ同様であった．

2. ^3H -Thymidine (TdR) の取り込み抑制試験

以下に述べる各項目につき検討した．

1) 血液単球による ^3H -TdR 取り込み抑制の経時的推移

図 5 に OKAJIMA を標的細胞とした場合を例示する．

図 3 ① 腫瘍細胞単独群
② 活性化単球作用群
③ 膨化・変性した腫瘍細胞

図4 P. acnes 処理単球の ^{51}Cr 標識細胞障害試験

- A: 腫瘍細胞単独群
B: 非活性化単球作用群
C: 活性化単球作用群

E/T 比は 10:1 で混合培養後 12~18 時間, 36~42 時間, 60~66 時間, 84~90 時間, 108~114 時間と各々 6 時間のパルスラベルを行い, ^3H -TdR の取り込み量を測定した. 単球の活性化は P. acnes (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で行ったので, 腫瘍細胞に P. acnes を添加培養した群も設置した. ^{51}Cr 標識細胞障害試験と同様に A 群: 腫瘍細胞単独群, B 群: 腫瘍細胞に正常単球を加えた群, C 群: 腫瘍細胞に活性化単球を加えた群の 3 群について検討した. まず A 群では 12~18 時間で約 6,500cpm, 60~66 時間で約 24,000cpm, 108~114 時間では約 67,000cpm の ^3H -TdR の取り込みを示すのに対して, B 群では 12~18 時間で約 3,000cpm, 60~66 時間で約 11,000cpm, 108~114 時間では約 18,500cpm と A 群に比較して著しい ^3H -TdR 取

図5 P. acnes 処理単球の腫瘍細胞 ^3H -TdR 取り込み抑制効果

- A: 腫瘍細胞単独群
B: 非活性化単球作用群
C: 活性化単球作用群

り込みの抑制が認められた. さらに C 群では, 同じパルスラベル時間で 1,000cpm, 3,000cpm, 3,000cpm と, より一層 ^3H -TdR の取り込みが抑制された. 以上のように, ^3H -TdR の取り込みは標的細胞にまだ形態学的な変化が認められず, cell count 法でも差を認め得ない 12~18 時間という初期の段階において抑制され, 経時的に各群の ^3H -TdR 取り込み量の差は増大した. なお, P. acnes (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) そのものは, 腫瘍細胞の ^3H -TdR の取り込みに関して何ら影響を与えなかった. 一方, 単球単独の ^3H -TdR 取り込みは, 正常, 活性化群ともすべてのパルスラベル時間において 200cpm 前後であり, これは A 群の 60~66 時間以後の取り込み量の 1% 以下である. したがって, 混合培養後 60 時間あるいはそれ以後に判定する場合, 単球による ^3H -TdR 取り込み量は無視しても問題ないと判断された (図 5).

また免疫賦活剤として OK-432 (0.1 KE/ml) を用いても (図 6), 標的細胞を MOLT に変更 (図 7) して

図6 OK-432処理単球の $^3\text{H-TdR}$ 取り込み抑制効果

A: 腫瘍細胞単独群
B: 非活性化単球作用群
C: 活性化単球作用群

図7 *P. acnes* 処理単球の MOLT 細胞 $^3\text{H-TdR}$ 取り込み抑制効果

A: 腫瘍細胞単独群
B: 非活性化単球作用群
C: 活性化単球作用群

も、全く同様の成績を得ることができた。

2) E/T 比の $^3\text{H-TdR}$ 取り込み抑制効果によぼす

図8 E/T 比が腫瘍細胞 (OKAJIMA) の $^3\text{H-TdR}$ 取り込みに与える影響 (*P. acnes*)

図9 N-CWS 処理単球の抗腫瘍効果

A: 腫瘍細胞単独群
B: 非活性化単球作用群
C: 活性化単球作用群

影響

以上のような $^3\text{H-TdR}$ 取り込み抑制効果は、E/T 比によって左右された。図8に示すように E/T 比が 2.5:1 程度では、B 群と C 群とはほとんど差がなく、5:1 以上で差が明らかとなるが、逆に 40:1 以上の比では正常単球の作用が強く表現されて、B 群と C 群との差が減少する傾向が認められた。したがって、E/T 比 10:1

図10 P. acnes-CWS 処理単球の抗腫瘍効果

- A: 腫瘍細胞単独群
B: 非活性化単球作用群
C: 活性化単球作用群

図11 PSK 処理単球の抗腫瘍効果

- B: 正常単球作用群
C: 活性化単球作用群

程度で抗腫瘍効果を検討するのが良いと思われた。

3) その他の免疫賦活剤による血液単球の活性化

P. acnes, OK-432 以外に N. rubra -CWS (10μg/ml), P. acnes -CWS (1-100μg/ml) および PSK (10⁻⁴-10μg/ml) で血液単球を処理し 活性化されるか否かを検討した。その結果、図9, 10, 11に示すごとく N-rubra-CWS, P. acnes-CWS で処理された単球は、P. acnes, OK-432 の場合と同様、正常単球に比しより強く標的細胞の増殖を抑制した。一方、PSK 処理血液単球にはこ

のような効果が認められず、また PSK そのものは腫瘍細胞を直接障害する作用はみられなかった。

4) 単球の、線維芽細胞の ³H-TdR 取り込みにおよぼす影響

単球による ヒト癌培養細胞の ³H-TdR 取り込み抑制効果が、正常細胞であるヒト線維芽細胞にも同様に認められるか否かを検討した。ヒト線維芽細胞としては、岡山大学医学部癌源研究施設、佐藤二郎教授より恵与された IMR-90 株細胞を用い 1 × 10⁴個/dish の濃度にまき、ついで別に接着分離した血液単球をそのままか、あるいは P. acnes で活性化した後 0.25% トリプシン処理により回収し、20% 牛胎児血清加 RPMI-1640 に再浮遊させて、線維芽細胞が入っている ディッシュに 1 × 10⁵個/0.5 ml となるように単球を入れ 混合培養した。その際、トリパン青により単球の生死を判定したが、生存率は約95%であった。なお、同時に陽性対照として OKAJIMA 細胞とトリプシン処理単球の混合培養ディッシュも準備した。形態学的には、腫瘍細胞と同様に単球が線維芽細胞の周囲にロゼット状に接着するが、その程度は腫瘍細胞が標的である場合程顕著ではなかった。また、腫瘍細胞で認められたような細胞質の空胞化、膨化変性の所見は認められなかった。混合培養開始60時間後に ³H-TdR を加え、6時間後の ³H-TdR 取り込み量をみると、正常人線維芽細胞単独群 (A群) では約4,000cpm と同じ時間における OKAJIMA 細胞の ³H-TdR 取り込み量の約1/5前後と著しく ³H-TdR 取り込みが少なかった。また B群, C群の ³H-TdR 取り込みは、A群に比較してやや低いものの著明な差は認められなかった (図12)。

また、トリプシン処理単球を用いて同時に施行した OKAJIMA 細胞の ³H-TdR 取り込み抑制は、トリプシン未処理の単球を用いて行った実験の結果と同一であった。このことから、線維芽細胞の ³H-TdR 取り込みがほとんど抑制されなかったのは、単球のトリプシン処理による機能低下にもとづくものではないと判断された。

5) 臍帯血単球の活性化

無処理の成人単球にもかなりの抗腫瘍効果があることから、何らかの外的刺激により in vivo においてすでに活性化されているのではないかと推測された。したがって、いまだ外界からの刺激があまり無いと思われる人臍帯血中の接着細胞を分離し、同様の実験を行った。標的細胞は OKAJIMA, E/T 比は 10:1, P. acnes を用いて活性化した。その結果、図13に示すように未処置の単球には、成人単球とほぼ同様の標的細胞の ³H-TdR

図12 *P. acnes* 処理単球の 正常人線維芽細胞 ³H-TdR 取り込みに与える影響

- A: Fibroblasts 単独群
B: 非活性化単球作用群
C: 活性化単球作用群

取り込み抑制力があり、かつ *P. acnes* によって活性化されその抑制作用が増強した。

6) 正常血液単球の抗腫瘍性に影響する因子

すでに明らかなように、正常の血液単球もかなりの抗腫瘍性を示すが、今までは血清は非働化せず、単球も分離直後から実験に用いていたので、この2点について検討した。

牛胎児血清は使用前に 56°C, 30分で非働化し、単球は分離後 12~24時間静置培養してから混合培養に用いた。KATO-III を標的細胞とし、E/T 比を 20:1 で実験を行った。その結果、表1に示すように、非働化血清と preincubation した単球とを用いて混合培養した時のみ、正常単球の抗腫瘍性が減弱した。それ以外の組合せの場合には、正常単球の抗腫瘍性は何の影響も受けなかった。

7) トリパン青処理による活性化単球の抗腫瘍性の減弱

トリパン青 (Chroma 社) は2日間蒸留水で透析し、凍結乾燥後 0.5mg/ml の濃度に培地に溶解し、高圧滅

図13 *P. acnes* 処理臍帯血単球の抗腫瘍性

- A: 腫瘍細胞単独群
B: 非活性化単球作用群
C: 活性化単球作用群

表 1

単球の前培養と血清非働化の抗腫瘍性に与える影響

前培養 (12-24H)	血清非働化	単球の抗腫瘍性
無し	無し	有り
無し	有り	有り
有り	無し	有り
有り	有り	減弱

菌して用いた。正常あるいは *P. acnes* で活性化した単球に 0.1mg/dish のトリパン青を加えて1時間 (5% CO₂, 37°C) 培養した。培養液を更新し、標的細胞 (OKAJIMA) を E/T 比 10:1 となるように加えて混合培養し、³H-TdR の取り込み率を測定した。その結果、図14に示すように活性化単球の ³H-TdR 取り込み抑制効果は、正常単球のそれとほぼ等しいレベルまで低下した。

8) 非接着性細胞の ³H-TdR 取り込みに およぼす影響

図14 トリパン青処理が単球活性化におよぼす影響

図15 P. acnes 処理リンパ球の抗腫瘍効果

図16 末梢静脈血 2.5ml より分離できる単球数

リンパ球を主体とする末梢血中の非接着細胞を、P. acnes, OK-432, PSK, N. rubra-CWS, P. acnes-CWS で単球の場合と同様に処理し、その後標的細胞 (OKAJIMA) と E/T 比 10 : 1 で混合培養し、 ^3H -TdR の取り込みにおよぼす影響を検討した。その結果、P. acnes の場合を例に示すように、無処理あるいは処理細胞とも、標的細胞の ^3H -TdR の取り込みを抑制しなかった。(図 15)

9) 頭頸部悪性腫瘍患者および慢性炎症疾患患者の血液単球の抗腫瘍性

頭頸部悪性腫瘍患者 33 名、慢性炎症疾患患者 10 名、対照群 9 名について実験を行った。悪性腫瘍患者の病期は、Stage I が 4 名、II が 13 名、III が 13 名、IV が 3 名であった。

(1) 分離可能な単球 (接着細胞) 数

末梢血 2.5ml あたり分離できる単球数は、頭頸部悪性腫瘍群では $(2.2 \pm 0.75) \times 10^5$ 個、慢性炎症疾患群では $(1.79 \pm 0.30) \times 10^5$ 個、対照群では $(1.37 \pm 0.30) \times 10^5$ 個であり、対照群に比較して悪性腫瘍群の接着細胞 (単球) 数の増加傾向が認められた (図 16)。

(2) 各疾患群の血液単球 (接着細胞) の抗腫瘍性

各群の血液単球を in vitro で P. acnes で処理し、標的細胞 (OKAJIMA) と E/T 比 10 : 1 から 20 : 1 で混合培養しその抗腫瘍性を検討した。

その結果を図 17 に示す。癌細胞のみの培養による取り込みを 100% とした場合、60～66 時間の ^3H -TdR 取り込みは対照群で、非活性化単球作用群 $32.0 \pm 11.1\%$ 、活性化単球作用群 $16.6 \pm 4.2\%$ であるのに対し、悪性腫瘍群では非活性化群 $32.8 \pm 12.8\%$ 、活性化群 $22.0 \pm 9.8\%$ と対照群に比較して活性化される率が弱いように思わ

図17 担癌生体単球の抗腫瘍性

れるが、統計学的に有意の差を認めなかった。同様に、慢性炎症群についてみると、非活性化群 $29.8 \pm 7.9\%$ 、活性化群 $18.0 \pm 6.8\%$ であり、対照群との間に有意の差を認めなかった。さらに、症例は少ないが悪性腫瘍患者を Stage 別にみると I, II, III, IV のいずれの単球も *P. acnes* で活性化されその抗腫瘍性が増強するが、単球による標的細胞の $^3\text{H-TdR}$ 取り込み抑制については、Stage 間に有意の差が認められなかった (図 17)。

IV 考 察

従来、抗腫瘍性を示す細胞の主役はリンパ球、中でもキラーT細胞とされていた¹³⁾²⁵⁾。しかしながら、Eccles ら²⁶⁾ がマクロファージの浸潤の多い癌程、転移が少なく予後が良好であることを報告して以来、マクロファージの抗腫瘍性が注目され、すでに種々の物質によりマクロファージが *in vivo* のみならず *in vitro* でも活性化され、抗腫瘍性を示すことが明らかにされている¹⁶⁾¹⁷⁾。

一方、血液単球をマクロファージの前駆細胞とみなす mononuclear phagocyte system の概念が Van Furth ら¹⁸⁾ によって提唱され、単球とマクロファージとはほ

ぼ同質の細胞と考えられるようになってきた¹⁹⁾²⁰⁾。したがって、単球はマクロファージと同様の機能を有しているものと期待されているが、ヒトの場合、マクロファージを容易にしかも多量に採取することは不可能なことから、血液単球についてその抗腫瘍性を検討した。しかし単球を純粹に分離することは意外に困難であり、種々の分離方法が報告されている^{27)~31)}。なかでも Sanderson ら³²⁾ は、末梢血 10ml から約 3×10^6 個近くの単球を 90% 近くの純度で回収できると報告している。しかし、この方法では counter flow centrifugation のために特殊な装置を必要とし一般的ではない。通常は、著者や³³⁾ 内山ら²¹⁾ の記載した方法が用いられており、Johnson ら³⁴⁾ も同様の方法を記載している。これらの方法は Sanderson らの方法に比較し、回収細胞数はかなり少ないがその 90% 近くが単球であり、純度の点から言えば遜色ない。ただし、単球の接着法も付着壁の材質、培養液中の血清の有無、接着させるに要する時間など種々の条件により左右されるので、単球のみが接着するに最も良い条件を今後とも検討する必要があると思われる。

また今回の実験では、ディッシュに接着した細胞数を位相差顕微鏡下に数えて使用したため、個々の実験で E/T 比を一定にすることは不可能であった。しかし、E/T 比が 10 : 1 から 20 : 1 の間では抗腫瘍性に関してさほどの差が認められなかったので、この範囲内で実験を行った。また、接着単球をトリプシンで剥離し数をかぞえ、E/T 比を正確に設定して行った実験でもほぼ同様の結果が得られたので、E/T 比はある範囲内であれば単球の抗腫瘍性を検出し得ると判断した。血液単球が *in vitro* で抗腫瘍性を示すことはすでに内山ら²³⁾ が報告している。この点からみても、逆に単球はマクロファージに近い細胞であるということができよう。ただし、血液単球はマクロファージと異なり無処置の場合でも例外なく、かなりの抗腫瘍性を示した。以上の抗腫瘍効果は、健康成人の末梢血単球を用いた場合の結果であったので、単球がすでに何らかの刺激を受けているためこのような現象がみられるものかもしれないと考え、まだ外界からの刺激が少ないであろう臍帯血単球を用いて実験を行ったが、結果は全く同じであった。しかしながら、あらかじめ培養しておいた血液単球は、非働化した血清を添加した培養液中では非常に弱い抗腫瘍性しか示さなかった。したがって、回収直後の単球は牛胎児血清によって多少とも活性化されるように思われた。ただ、*P. acnes*, OK-432 などで処理するとなお一層抗腫瘍性が増強したが、この

点はマクロファージと同様である。Nocardia rubra-CWS, P. acnes-CWS も単球を *in vitro* で活性化するが PSK は全く無効であった。

何故このような物質で単球が活性化されるのかその機序は全く不明であるが、前記の物質を貪食した単球の胞体内でそれを消化するためにライソゾーム系の酵素活性が著増し¹⁶⁾、それに関連して活性化が起るのかもしれない。その理由は、活性化マクロファージの場合と同様³⁵⁾、活性化単球の抗腫瘍性はライソゾーム酵素の阻害剤であるとトリパン青によって消失したからである。同様の現象が、やはりマクロファージ阻害剤であるシリカ・カラゲナンを用いた実験でも観察されている³⁶⁾。

一方、あらかじめトリパン青で処理した単球が細菌製物質で活性化される現象は、貪食されたトリパン青がライソゾームに取り込まれ¹⁵⁾、そこでトリパン青の活性が阻害されるため単球の活性化機構を障害しえないからであろうと推測した。活性化単球の抗腫瘍性は、しかしながら、ライソゾーム系酵素そのものによるか否かは即断できない。活性化マクロファージが腫瘍細胞にライソゾーム系酵素を移入し癌細胞を障害するという報告³⁷⁾³⁸⁾もあるが、活性マクロファージの産生する H_2O_2 ³⁹⁾、あるいはある種の可溶性物質⁴⁰⁾⁴¹⁾などが腫瘍細胞障害性に働くとの見解もある。さらに単球あるいはマクロファージが、無傷の腫瘍細胞を貪食して抗腫瘍性を発揮するとの報告もあったが⁴²⁾⁴³⁾、現在ではこのような機序に関しては否定的で、一般的にはマクロファージが腫瘍細胞と直接接触はするが、非貪食的なメカニズムで抗腫瘍性を発揮するものと考えられている。今回の実験でも、単球が腫瘍細胞にロゼット状に直接接触する像が観察された。

またマクロファージが抗腫瘍性を発揮するもう一つの機序に、いわゆる抗体依存性細胞障害 (ADCC)⁴⁴⁾がある。しかし、この機序については今回の実験系では抗血清の添加はしていないので検討できなかった。

単球と腫瘍細胞を能率的に接触させるためには、まず狭い場所で培養し、その培養液量を調節することによって両細胞が均等に分布するようにしなければならない。今回の実験でもこの点については特に意を用いたが、こうすることによって Krahebull⁴⁵⁾の言うように、E/T比が一定であっても接触率の高い程強い抗腫瘍性を検出することが可能となる。単球と腫瘍細胞が接触し、腫瘍細胞に空胞形成あるいは胞体の膨化などの形態学的な変化が観察できるまでには、2～3日の混合培養期間を要する。今回の実験で腫瘍細胞の 3H -TdR の取り込みは、

形態学的変化にはるかに先立って抑制され、単球との接触初期の12～18時間から腫瘍細胞の増殖が抑制されることが明らかにされた。Kaplan ら⁴⁶⁾も活性化マクロファージが腫瘍細胞の ^{125}I -UdR の取り込みを混合培養約16時間以内で著明に抑制することを報告している。しかも、この時期には腫瘍細胞数は対照と同様に増加しており、DNA合成を伴わない異常な腫瘍細胞の増殖が起こるものと理解される。混合培養後、腫瘍細胞の減少が認められるのは24時間位経過してからであるから、活性化マクロファージがこのような作用を腫瘍細胞におよぼすことが、おそらくマクロファージの抗腫瘍性に結びつくものと Kaplan らは考察している。血液単球の抗腫瘍性は、著者のアッセイ系では増殖抑制性であり、細胞障害性ではないであろうと結論された。その理由は、 ^{51}Cr 放出試験では全く抗腫瘍性が検出できず、 3H -TdR の取り込み試験によってのみ例外なく抗腫瘍性が検定できたからである。ただ、細胞数算定法で抗腫瘍性を判定した場合²³⁾、明らかに腫瘍細胞数がスタートの時点に比較して減少していることがあり、cytostatic cell death とも言ふべき現象が起っている可能性は否定できない。また 3H -TdR 放出試験でヒト血液単球に有意の細胞障害性を検出している報告⁴⁷⁾もあるが、これは標的細胞を含めたアッセイ系の差違によるものと考えられる。このような単球-マクロファージの抗腫瘍性は、免疫学的に非特異的で、同系、同種、異種のいずれの腫瘍をも攻撃するとされている^{48)~50)}。その理由として、おそらく腫瘍細胞に特有の膜性状の変化がありそれを認識して攻撃するという説⁴⁷⁾⁴⁸⁾⁵⁰⁾と、細胞の正常、悪性に関係なく増殖速度の速い細胞を障害するにすぎないとする説⁴⁹⁾がある。

今回、著者はヒト線維芽細胞株を用いて実験を行ったが、血液単球によって 3H -TdR の取り込みはほとんど抑制されなかった。ただ、線維芽細胞の 3H -TdR 取り込み量は癌細胞のその約 1/5 程度と非常に少ない。したがって、増殖力が弱いためみかけ上取り込み量の差が出るまでに至らなかった可能性もあるが、逆に単球は細胞分裂の乏しい細胞は障害しないということをも示唆しており、その意味では、腫瘍細胞のような際限なく分裂増殖する細胞を障害する可能性がより大きいのではないかと解される。

マクロファージ系の細胞は最も原始的な免疫監視能を有し、膜性状から正常細胞と異常細胞とを区別できるとする説⁵¹⁾⁵²⁾、あるいは正常線維芽細胞を障害することはないが、いったん悪性化した線維芽細胞は攻撃されると

いう報告⁵³⁾などは、マクロファージの細胞障害には種特異性はないが、腫瘍特異性のあることを強く支持するものである。

単球による ^3H -TdR の取り込み抑制試験は、今回の実験条件下で行う場合 E/T比は 10:1 から 20:1、混合培養期間は 2～3 日が適当と思われ、この条件で耳鼻科領域の悪性腫瘍患者単球（接着細胞）の抗腫瘍性を測定した。

悪性腫瘍患者の免疫能を中心とした細胞機能検査には種々のものがあるが⁵⁴⁾⁵⁵⁾、単球－マクロファージ系のそれは充分確立されていない。したがって、Territo ら⁵⁶⁾の正常人血液単球の貪食能、殺菌能、Chemotaxis などに関する報告はあるものの、悪性腫瘍者の単球－マクロファージの機能についての報告は少なく、Fc 受容体の増加⁵⁷⁾、Chemotaxis の低下などの記載にとどまっている^{58)~62)}。

一般に悪性腫瘍患者の末梢血単球が増加していることを Barrett⁶³⁾、Rhodes ら⁶⁴⁾が報告しており、ラットの移植腫瘍系でも移植後の末梢血単球の増加することが観察されている⁶⁵⁾。この単球増加の意義や機序に関しては現在のところ明確でないが、癌細胞の分泌する刺激物、あるいは癌に伴う炎症に対する反応⁶⁶⁾などの可能性が推測される。癌細胞の存在そのものが単球増加を促進するか否かは不明であるが、悪性腫瘍患者では骨髓での単球産生が亢進しているとの報告⁶⁷⁾もある。

悪性腫瘍患者の血液単球は、今回のアッセイ系では対照群のそれと同程度の *in vitro* 抗腫瘍性を示し、しかも *P. acnes*, OK-432, *N. rubra*-CWS, *P. acnes*-CWS などにより活性化され、より強い抗腫瘍性を示した。以上のことより、悪性腫瘍患者単球の抗腫瘍性に関する機能低下はないと思われた。

最近 Yanagawa ら⁶⁸⁾によって、著者とほぼ同様の結果が報告されており、以上の結果は、免疫賦活剤を *in vivo* で用いる妥当性を裏付けるものと考えられた。

V 結 語

ヒト血液単球の抗腫瘍性に関し、いくつかの実験を行いつつ、以下のような結論を得た。なお、研究の対象は基礎実験に健康人 20 名、臨床応用として、頭頸部悪性腫瘍患者 33 名、慢性炎症疾患患者 10 名、対照群 9 名の計 72 名である。

1. ヒト血液単球の抗腫瘍性は、 ^{51}Cr 放出試験では検出できず、 ^3H -thymidine の取り込み抑制試験によって提

えることができた。したがって、細胞障害性というよりも増殖抑制の作用機序が主体をなすものと考えられた。

また、血液単球は、*P. acnes*, OK-432, *Nocardia rubra*-CWS, あるいは *P. acnes*-CWS によって活性化され、正常単球に比しより強力な抗腫瘍性を発揮した。しかし、PSK には単球の活性化作用は認められなかった。なお、臍帯血単球にも機能的に同様の特徴が認められた。

2. 血液単球は、培養細胞株の種類を問わずその増殖を抑制するが、ヒト線維芽細胞の増殖は抑制しなかった。したがって、正常細胞に無関係な腫瘍特異的な作用ではないかと推定された。

3. 血液単球の抗腫瘍性は E/T比が 10:1 程度で検出するのが望ましく、混合培養期間は 2 日から 3 日が適当と思われた。

4. 一昼夜培養した単球は、非働化血清を添加した培養液中ではほとんど抗腫瘍性を示さなかった。また、活性化単球の抗腫瘍性はトリリンパ青処理により、正常単球のレベルまで減弱したことより、単球の抗腫瘍性の機序はライソゾーム系酵素が関与しているものと推定された。

5. 頭頸部悪性腫瘍患者から分離できる接着細胞（主に単球）は、対照群に比較し増加傾向が認められた。血液単球の抗腫瘍性は、頭頸部悪性腫瘍患者、慢性炎症疾患患者、対照群間においてほとんど差がなく、*P. acnes*, OK-432 などの非特異的免疫賦活にも良く反応することから、これらの物質による薬物療法の有効性が示唆された。

6. リンパ球を主体とした末梢血液中の非接着性細胞は、*in vitro* で腫瘍細胞の増殖をわずかに抑制する場合もあるが、前述の諸物質によってその作用が誘導、増強されることはなかった。

参 考 文 献

- 1) 漆崎一朗：癌と免疫抑制 臨免疫 11: 491-501, 1979.
- 2) Jenkin V K et al: Lymphocyte response in patients with head and neck cancer. Arch Otolaryngol 102: 596-600, 1976.
- 3) Papenhausen P R et al: Cellular immunity in patients with epidermoid cancer of the head and neck. Laryngoscope 89: 538-549, 1979.
- 4) Ishihara K and Hayasaka K: Immunotherapy of malignant melanoma. Gann. M 21: 231-235,

1978.

- 5) 浅岡一之: 頭頸部悪性腫瘍 に対する 免疫療法の 検討: 耳鼻臨 72: 391-412, 1979.
- 6) 藤田 浩, 才野佑之: 嫌気性コリネバクテリウムのヒト骨髓よりの分離成績とその制癌作用: 口病誌 38: 294-299, 1971.
- 7) Hattori T and Mori A: Antitumor activity of anaerobic corynebacterium isolated from the human bone marrow. *Gann* 64: 15-27, 1973.
- 8) Yasumoto K et al: Immunotherapy of human lung cancer with BCG-cell wall skeleton. *Gann* 67: 787-795, 1976.
- 9) Yamawaki M et al: Antitumor activity of squalene-treated cell wall skeleton of nocardia Rubra in mice. *Gann* 69: 619-626, 1978.
- 10) Yoshikumi C et al: Mouse strain difference in the expression of antitumor activity of PSK. *Gann* 66: 649-654, 1975.
- 11) Renoux G and Renoux M: Levamisole inhibits and cures a solid malignant tumor and its pulmonary metastasis in mice. *Nature New Biol* 240: 217-218, 1972.
- 12) 大久保修司 他: Levamisole の マウス網内系への影響 癌と化学療法 7: 1272-1277, 1980.
- 13) 岸本 進, 河野文夫: 免疫強化療法の現状 臨免疫 11: 471-481, 1979.
- 14) 徳永 徹: 癌免疫とマクロファージ 代謝 14: 49-58, 1977.
- 15) 鈴木富二夫, 石田名香雄: 癌免疫を司る第3のeffector. 活性化マクロファージ腫瘍細胞のみを直接破壊 化学と生物 16: 157-159, 1978.
- 16) Suzuki T et al: Antitumor activity of macrophage induced by *Corinebacterium liquefaciens*. *Gann* 68: 393-396, 1977.
- 17) 田中憲一 他: 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 癌と化学療法 5: 1233-1241, 1978.
- 18) Van Furth R et al: Mononuclear phagocyte. pp. 1-15, 1975. Blackwell Oxford.
- 19) Peasall N N and Weiser R S: The macrophage pp. 21-39, 1970. Lea and Febiger. Philadelphia.
- 20) Cline M J et al: Monocytes and macrophage, Functions and Diseases, *Ann Int. Med* 88: 78-88, 1978.
- 21) 内山春雄: ヒト血液単球の抗腫瘍性に関する実験的研究 新潟医学会誌 93: 284-296, 1979.
- 22) Prévôt A: Manual for the classification of anaerobic bacteria, 1966, Lea and Febiger, Philadelphia.
- 23) 菊地浩吉: ^{51}Cr 標識細胞障害試験 免疫実験操作法 A pp. 349-351, 1978. 日本免疫学会編
- 24) Krahenbuhl J L and Remington J S: The role of activated macrophages in specific and non specific cytostasis of tumor cells. *J Immunol* 113: 507-516, 1974.
- 25) 新保敏和 他: 癌患者にみられるリンパ球とマクロファージの異常 癌と化学療法 5: 261-272, 1978.
- 26) Eccle S and Alexander P: Macrophage content of tumors in relation to metastatic spread and host immune reaction. *Natur* 250: 667-669, 1974.
- 27) Einstein L P et al: Synthesis of the second component of complement by long-term primary cultures of human monocytes. *J Exp Med* 143: 114-126, 1976.
- 28) Steigbigel R T et al: Phagocytic and bactericidal properties of normal human monocytes. *J Clin Invest* 53: 131-142, 1974.
- 29) Rocklin R E et al: Activation of human blood monocytes by products of sensitized lymphocytes. *J Clin Invest* 53: 559-564, 1974.
- 30) Cline M J and Sweet V C: The interaction of human monocytes and lymphocytes. *J Exp Med* 128: 1309-1328, 1968.
- 31) Fisher D et al: A role for adenosine deaminase in human monocyte maturation. *J Clin Invest* 58: 399-407, 1976.
- 32) Sanders R J et al: Design principles for a counterflow centrifugation cell separation chamber. *Analytical Biochemistry* 71: 615-622, 1976.
- 33) 鈴木利光 他: ヒト血液単球の in vitro 抗癌活性化. 癌と化学療法 6: 201-206, 1979.
- 34) Johnson W D et al: The separation long term cultivation and maturation of the human monocyte. *J Exp Med* 46: 1613-1626, 1977.
- 35) Hibbs Jr J B: Activated macrophages as cyto-

- toxic effector cells. Inhibition of specific and nonspecific tumor resistance by trypan blue. *Transplantation* 19: 77-81, 1975.
- 36) Kellar R: Mononuclear phagocytes and anti-tumor resistance. A review. In 'The macrophage and cancer' (edited by James K et al) Econoprint Edinburgh, p. 31-49, 1977.
- 37) Hibbs Jr J B: Heterocytolysis by macrophages activated *Bacillus Calmette-Guerin*, lysosomal exocytosis into tumor cells. *Science* 84: 468-471, 1974.
- 38) Bucana C et al: Morphological evidence for the translocation of lysosomal organelles from cytotoxic macrophages into the cytoplasm of tumor target cells. *Cancer Res* 36: 4444-4458, 1976.
- 39) Nathon C F et al: Extracellular cytolysis by activated macrophages and granulocytes 11. Hydrogen peroxide as a mediator of cytotoxicity. *J Exp Med* 149: 100-113, 1978.
- 40) Sethi K K and Brandis H: Cytotoxic mediated soluble macrophage products. *J Natl Cancer Inst* 55: 393-395, 1978.
- 41) Vercammen Grandjean A F and Lejeune F J: Production and mode of action of macrophage secretion that interfere with in vitro incorporation of radioactive DNA precursors by tumor cells. A review. In *The macrophage and cancer* (edited by James K et al) Econoprint Edinburgh, p. 50-59, 1977.
- 42) Carr I et al: The ultrastructure of the local lymphoreticular response to an experimental neoplasm. *J Pathol* 113: 175-182, 1974.
- 43) Broome P et al: The lymphoreticular response to a transplanted adenovirus 12 induced tumor of CBA mice. *J Pathol* 118: 227-283, 1976.
- 44) Ralph P and Nabozin J: Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage related cell lines. *J Immunol* 119: 950-954, 1977.
- 45) Krahenbuhl J L and Lambert Jr L H: Cytokinetic studies of the effects of activated macrophages on tumor target cells. *J Natl Cancer Inst* 54: 1433-1437, 1975.
- 46) Kaplan A M et al: Mechanism of macrophage mediated tumor cell cytotoxicity. *J Immunol* 121: 1781-1789, 1978.
- 47) Mantovani A et al: Cytolytic and cytostatic activity on tumor cells of circulating human monocytes. *Int J Cancer* 23: 18-27, 1979.
- 48) Cleveland R P et al: Tumor cytotoxicity in vitro by macrophages from mice infected with mycobacterium bovis strain BCG. *J Natl Cancer Inst* 52: 1887-1895, 1974.
- 49) Keller R: Susceptibility of normal and transformed cell lines to cytostasis and cytotoxicity exerted by macrophages. *J Natl Cancer Inst* 56: 459-474, 1976.
- 50) Hibbs Jr J B et al: Control carcinogenesis, A possible role for activated macrophage. *Science* 77: 998-1000, 1972.
- 51) Holtermann O A et al: "Immunology of the macrophage." ed by Nelson D S. p. 584. Academic Press 1976.
- 52) 栗屋和彦: マクロファージの系統発生. 第1回阿蘇シンポジウム記録 (武谷健二 他編) 1-13. 南山堂, 1977.
- 53) Mantovani A et al: Cytolytic activity of circulating human monocytes on transformed and untransformed human fibroblasts. *Int J Cancer* 23: 28-31, 1979.
- 54) 螺良英郎 他: 癌患者の診断パラメーター 癌と化学療法. 4. 733-742, 1977.
- 55) 漆崎一朗: 癌患者の免疫能 癌の臨床. 24: 378-384, 1978.
- 56) Territo C M and Cline M J: Monocyte function in man. *J Immunol* 118: 187-192, 1977.
- 57) Rhodes J: Altered expression of human monocyte Fc-receptors in malignant disease. *Nature* 265: 253-255, 1977.
- 58) Synderman R et al: Abnormalities of monocyte chemotaxis in patients with melanoma. Effect of Immunotherapy and tumor removal. *J Natl Cancer Inst* 58: 34-41, 1977.
- 59) Normann S J et al: Inhibition of macrophage chemotaxis by neoplastic and other rapidly proliferating cells in vitro. *Cancer Res* 37: 705-

- 711, 1977.
- 60) Meltzer M S et al: Macrophage function in tumor bearing mice dissociation of phagocytic and chemotactic responsiveness. *Cell Immunol* 35: 99-111, 1978.
- 61) Boetcher D A et al: Abnormal monocyte chemotactic response in cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 52: 1091-1099, 1974.
- 62) Hausmann M S et al: Defective monocyte function in patients with genitourinary carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 55: 1047-1054, 1975.
- 63) Barrett Jr O: Monocytosis in malignant disease. *Ann Int Med* 73: 991-992, 1970.
- 64) Rhodes J: Regulatory effects normal human monocytes and monocytes activated in cancer on normal lymphocyte responses to mitogen. A review. *The macrophage and cancer* (edited by James K et al) Econoprint Edinburge, p. 438-444, 1977.
- 65) Eccles S et al: Monocytosis associated with the growth of transplanted syngenic rat sarcomata differing in immunogenicity. *Br. J Cancer* 34: 20-27, 1976.
- 66) Territo M et al: *Immunology of the macrophage* Nelson D S. p. 602-604, Academic Press, 1976.
- 67) Meuret G et al: Monocyte production in malignant diseases. A review. In *The macrophage and cancer* (edited by James K et al) Econoprint Edinburgh. p. 438-444, 1977.
- 68) Yanagawa E et al: Cytostatic activity of peripheral blood monocytes against bronchogenic carcinoma cells in patients with lung cancer. *Gann* 70: 533-539, 1979.
-
- 終りに臨み、新潟大学猪初男学長、耳鼻咽喉科学教室中野雄一教授、第1病理学教室故大星章一教授、鈴木利光助教授の御指導、御校閲を深謝いたします。また本研究に御協力いただきました、放射性同位元素中央研究室の清水泰二教授、第1病理学教室の諸先生、および耳鼻咽喉科学教室の内山春雄先生に感謝いたします。
- なお、本研究は文部省癌特別研究費の補助を受けて行われ、本論文の要旨は第37回日本癌学会総会、第80回日耳鼻総会で発表した。
-
- (原稿受付 昭和 56. 7. 8 日)
- 別刷請求先 〒951 新潟市旭町通一番通
新潟大学医学部耳鼻咽喉科学教室 小西 和朗