— 原 著 —

近交系モルモット腫瘍に対するヒト型結核菌体 抽出物質 (SSM) の抗腫瘍効果

長江 晴男

日本医科大学ワクチン療法研究施設 (指導: 丸山千里名誉教授)

Effects of SSM, an extract from human type tubercle bacilli, on syngenic guinea pig tumors

Haruo Nagae

Institute of Vaccine Therapy for Tumors and Infectious Diseases, Nippon Medical School

SSM (specific substance of Maruyama) is used widely in cancer therapy. Rats and mice have generally been used in basic research. In this study the author used guinea pigs because their skin properties are easier to monitor than those of rats and mice. The following experiments were performed on guinea pigs:

- 1) Potency as sensitizer and elicitor of delayed hypersensitivity.
- 2) Antitumor effects on methylcholanthrene induced syngenic guinea pig tumors (U-1).

Intradermal skin tests with 20 μ g of SSM per 0.1 ml were done on guinea pigs 4 weeks after sensitization (SSM 1 mg-FIA (Freund's incomplete adjuvant)). SSM induced a delayed skin reactivity and the reaction increased in erythema and in duration after 24 h. In addition, SSM was active in direct inhibition of macrophage migration. The results show that SSM is related to cellular immunity reactions. In this study, antitumor effects of SSM were indicated in that the tumor growth was more greatly suppressed in animals injected intravenously and subcutaneously than in control animals. Histologic study of the tumors showed that collagen fibers enclosed the cancer cells and prevented cancer proliferation.

Key words: SSM (specific substance of Maruyama), guinea pig, antitumor effect, delayed hypersensitivity, collagen proliferation

結 言

SSM (specific substance of Maruyama) は 1944 年丸山によりヒト型結核菌より分離抽出された物質で、皮膚結核、肺結核ならびにハンセン病の治療に、またその後癌の治療剤として用いられてきた。癌に対する SSM の有効性を検討した報告¹⁻¹³⁾はみられるが、著者はその効果の有無を動物実験の面から明確に知ろうとした。

そこでこれまでに提示された動物実験が、いずれもマウス、ラットによる研究を主としていたことから、マウス、ラットよりも結核菌に対する反応が鋭敏で、かつヒトと同様に最もよく皮膚の遅延型過敏症反応を

示すモルモットを実験対象に選んだ。今回の実験は SSM による遅延型アレルギーの誘導およびそのモルモット同系腫瘍に対する抗腫瘍効果について、新たな知見の深化拡大を試み若干の知見が得られたので報告する。

研究材料および方法

(1) 動物

体重 400~500 g の近交系モルモット Hartley/F (千葉県船橋農場、埼玉県村井実験動物) を用いた。

(2) 腫瘍

植田ら¹⁴⁾により、1977 年 methylcholanthrene の皮下注射によって近交系モルモット Hartley/F に誘発せしめ、今日まで継代維持されている U-1 腫瘍を用いた。なおこの腫瘍はモルモットの継代および移植が容易で、その細胞浮遊液は静脈注射も可能であり、静脈

Correspondence to Haruo Nagae, Zeria Pharmaceutical Co., Ltd., 1212 Khonan-machi, Osato-gun, Saitama 360-01, Japan

注射によりモルモットの臓器、特に肺臓に多数の腫瘍を形成せしめる特徴がある。

抗腫瘍実験に際しては、Hartley/F モルモットに継代維持されている U-1 腫瘍を摘出後、植田らの方法¹⁴⁾に準じ腫瘍より腫瘍細胞浮遊液を調製して使用した。

(3) SSM による遅延型アレルギー感作

1) 感作抗原

各濃度 (2 mg/ml, 200 μ g/ml, 20 μ g/ml : アラビノース換算の糖含量) の SSM に Freund's incomplete adjuvant (FIA, Difco 社製) を等量加え十分混合したエマルジョンを感作抗原とした。

2) 感作および遅延型アレルギー反応

i. 1 回感作

1 群 5 匹のモルモットを用い、上述の各感作抗原液 1 ml を後肢の左右足蹠に各 0.2 ml, および前肢の左右皮下に各 0.3 ml を分散注射して感作を行った。感作 4 週後に SSM 20 μ g/0.1 ml を剃毛した側腹中央部に皮内投与し、24 時間後の遅延型アレルギー反応を投与局所に生じた発赤の直径を測定することにより判定した。

ii. 3 回感作

上述の感作抗原液 (SSM 1 mg-FIA) 1 ml を 1 回感作と同様の方法で 5 匹のモルモットの足蹠と皮下に分散注射した。さらに同じ感作抗原液を 1 週後には右後肢筋肉内に 0.5 ml, 頸部の左右皮下に各 0.25 ml, 2 週後には左後肢筋肉内に 0.5 ml, 後肢の左右皮下に各 0.25 ml を分散注射して 3 回感作を行った。3 回感作終了日より 3 日後に SSM 20 μ g/0.1 ml を剃毛した側腹部に皮内投与し、4, 8, 24 時間後の発赤径を 1 回感作と同様の方法で測定した。なお対照として精製ツベルクリン (PPD (purified protein derivative), 標準品 5 μ g 相当量含有, 日本ビーシージー社製) 0.2 μ g/0.1 ml を SSM 投与部位と 40 mm 以上離れた側腹部に皮内投与した。

3) マクロファージ遊走阻止試験 (MI (macrophage migration inhibition) 試験)

3 回感作法により感作したモルモットに対し、最終感作日から 3 週後に流動パラフィン 20 ml を腹腔内に投与した。投与後 4 日目に腹腔内浸出細胞を集め、芳賀の方法¹⁵⁾に従って MI 試験を行った。なお対照とした PPD は 3 回感作と同様の製品を用いた。

(4) 抗腫瘍実験

1) 皮下腫瘍と SSM 投与法

i. SSM 皮内投与

Exp. 1 : 1 群 5 匹のモルモットを用い、腫瘍細胞 5.5×10^7 個をリン酸緩衝液 (PBS (phosphate buffer solution), 日水製薬製) 1 ml に浮遊させ、その 1 ml を剃毛した側腹中央部に皮下移植した。移植 6 日後に腫瘍の触診により皮内腫瘍の生着を確認し、SSM 100 μ g/0.5 ml を腫瘍上部の 2 カ所に各 0.25 ml を分散投与した。その後 3 週間 (6 回/週) 同様に投与した。ただし腫瘍が大きくなり、その上部に皮内投与することが困難な動物が出た時点より、全例の投与を可能な限りの腫瘍近辺の皮内 2 カ所に各 0.25 ml を分散投与した。腫瘍の大きさは腫瘍の皮膚面からの隆起部位を触診により確認し、その長径および短径を週 2 回測定した。3 週間の投与を終了した翌日に全例を屠殺剖検した。腫瘍を摘出後に周囲の皮膚および腹膜を可能な限り切除して重量を測定し抗腫瘍効果を判定した。なお対照群としては無処置のものを用いた。

Exp. 2 : 腫瘍細胞 5.0×10^6 個を、1 群 4 匹のモルモットに Exp. 1 と同様に皮下移植した。移植 8 日後に腫瘍の触診により腫瘍の生着を確認した。投与法および判定法は Exp. 1 と同様に行った。なお対照群には生理的食塩水 (生食, 大塚製薬社製) を SSM と同様に投与した。

ii. SSM 皮下投与

Exp. 3 : 腫瘍細胞 2.9×10^7 個を、1 群 5 匹のモルモットに Exp. 1 と同様に皮下移植した。移植 5 日後に腫瘍の触診により腫瘍の生着を確認し、SSM 20 μ g/2 ml を左右の腋窩部皮下に各 1 ml を分散投与した。その後 3 週間 (6 回/週) 同様に投与し、投与終了の翌日に全例を屠殺剖検した。腫瘍径の測定および腫瘍重量の測定方法は Exp. 1 と同様に行った。なお対照群には生食を投与した。

Exp. 4 : 腫瘍細胞 2.3×10^7 個を、1 群 8 匹のモルモットに皮下移植し Exp. 3 と同様の実験を行った。

2) 肺腫瘍と SSM 投与法

Exp. 5 : 1 群 5 匹のモルモットを用い、腫瘍細胞 4.0×10^6 個を PBS 1 ml に浮遊させ、その 1 ml を後肢足背静脈内に移植した。移植当日 SSM 10 μ g/ml を右腋窩部皮下に 1 回投与し、翌日から 30 日間午前 10 時および午後 4 時に 1 日 2 回、さらにその後 5 日間は 1 日 1 回、同量の SSM を腋窩部皮下の左右に交互に投与し、投与終了の 2 日後に全例を屠殺剖検した。なお

対照群には生食を投与した。

肺における抗腫瘍効果の評価は、正常肺組織を含めた担癌肺重量、および肺における腫瘍増殖の程度を柳沢ら¹⁶⁾による肺表面の結節数を尺度とする肺病変度の分類を参考とし、肺表面における腫瘍数を肉眼的に計測することで行った。

3) 病理組織学的検索

摘出した皮下腫瘍を10%ホルマリン固定し、型のごとくパラフィン包埋切片を作成してアザン染色を行い、病理組織学的検査を実施した。

結 果

1. SSM による遅延型アレルギー感作

SSMで動物が感作できるか否かを検討した。SSM 1 mg-FIA で1回感作した動物は、感作4週後にSSM 20 μ g/0.1 ml をモルモット側腹部皮内に接種すると、**Fig. 1**に示すように惹起抗原注入24時間後に遅延型

Sensitizing sample	Skin reaction size (SSM 20 μ g)	
	10	20 (mm)
SSM 1000 μ g		
SSM 100 μ g		
SSM 10 μ g		
Saline		

Fig. 1 Delayed-type hypersensitivity responses of sensitized guinea pigs with SSM.

Guinea pigs had been sensitized with SSM (1 mg)-FIA 4 weeks previously. 20 μ g/0.1 ml of SSM was administered intradermally on the shaved flank. Skin reaction size was determined as a erythema diameter with caliper.

皮膚反応の起こるのが認められた。しかしSSMを100 μ g、10 μ gと感作量を減ざると、その誘導が認められなくなった。そこで1週おきに3回、SSM 1 mg-FIAを用いて感作した。最終感作3日後にモルモット側腹部の皮内にSSM 20 μ g/0.1 mlを接種し、その皮膚反応を4、8、24時間後に観察した。その結果は**Fig. 2**に示すように惹起抗原注入4時間後には紅斑を認めることはなかったが、8時間後には境界の不鮮明な発赤が出現、24時間後には明確な発赤と硬結を示す皮膚反応が出現するのを認めた。このようにSSMに対して皮膚反応を示す動物では0.2 μ gのPPDに対しても遅延型皮膚反応が認められた。

この際の3回感作群についてMI試験を実施した結

Sample	Hours after injection	Skin reaction size	
		10	20 (mm)
SSM 20 μ g	4 h		
	8 h		
	24 h		
PPD 0.2 μ g	4 h		
	8 h		
	24 h		

Fig. 2 Skin test data obtained in sensitized guinea pigs with SSM or purified protein derivative (PPD).

Guinea pigs were sensitized weekly from week 1 to week 3 with SSM (1 mg)-FIA and then 3 days after, 20 μ g/0.1 ml of SSM was administered intradermally on the shaved flank. Skin reaction size was determined as a erythema diameter with caliper.

Table 1 Results of macrophage migration inhibition test

Conc of antigen (μ g/ml)	SSM		PPD	
	MI(%) ^{a)}	Inhibition ^{b)}	MI(%)	Inhibition
200	65.5	+	N.D. ^{c)}	
100	65.7	+	N.D.	
50	69.0	+	66.0	+
5	95.5	—	86.5	—
0.5	95.0	—	93.0	—

Guinea pigs were sensitized weekly from week 1 to week 3 with SSM (1 mg)-FIA and these delayed skin reactivity of SSM were positive. The peritoneal exudate cells were harvested from sensitized guinea pigs 4 days after the injection liquid paraffin.

a) Migration index % : $\frac{\text{mean migration of test group}}{\text{mean migration of control group}} \times 100$

b) Positive inhibition : MI < 80

c) Not done

Sample	Animal no.	Tumor weight (g)	
		50	100
SSM	1		
	2		
	3		
	4		
	5		
None	11		
	12		
	13		
	14		

Fig. 3 Effect of intradermal injection of SSM on syngenic tumor (U-1) growth. (Exp. 1)
U-1 (5.5×10^7) was inoculated subcutaneously on the flank of Hartley/F guinea pigs. 100 $\mu\text{g}/\text{head}$ SSM was injected intradermally on the tumor 6 times in a week for 3 weeks starting 7 days after tumor inoculation. Results indicate tumor weight on 29 days after inoculation.

Fig. 4 Growth curve of U-1 carcinoma inoculated subcutaneously into Hartley/F guinea pigs. (Exp. 1)
U-1 (5.5×10^7) was inoculated in guinea pigs. The largest and smallest diameters of tumors were measured at 3- or 4-day intervals and its mean diameter was recorded.
○—○, 100 $\mu\text{g}/\text{head}$ of SSM was administered 6 times in a week.
△—△, Control (None)
* $p < 0.05$: as compared to the values obtained control group.

Sample	Animal no.	Tumor weight (g)		
		20	40	60
SSM	1			
	2			
	3			
	4			
Saline	11			
	12			
	13			
	14			

Fig. 5 Effect of intradermal injection of SSM on syngenic tumor (U-1) growth. (Exp. 2)
U-1 (5×10^6) was inoculated subcutaneously on the flank of Hartley/F guinea pigs. 100 $\mu\text{g}/\text{head}$ SSM or saline was injected intradermally on the tumor 6 times in a week for 3 weeks starting 8 days after tumor inoculation. Results indicate tumor weight on 30 days after inoculation.

Fig. 6 Growth of U-1 carcinoma inoculated subcutaneously into Hartley/F guinea pigs. (Exp. 2)
U-1 (5×10^6) was inoculated in guinea pigs. The largest and smallest diameters of tumors were measured at 3- or 4-day intervals and its mean diameter was recorded.
○—○, 100 $\mu\text{g}/\text{head}$ of SSM was administered 6 times in a week.
△—△, Saline was administered 6 times in a week as control.
* $p < 0.05$: as compared to the values obtained saline group.

果を Table 1 に示す。SSM, PPD とともに 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にて遊走阻止がみられた (Table 1)。

2. 皮下腫瘍に対する SSM の効果

(1) SSM 皮内投与

Sample	Animal no.	Tumor weight (g)				
		10	20	30	40	50
SSM	1					
	2					
	3					
	4					
	5					
Saline	11					
	12					
	13					
	14					

Fig. 7 Effect of subcutaneous injection of SSM on syngenic tumor (U-1) growth. (Exp. 3)
U-1 (2.9×10^7) was inoculated subcutaneously on the flank of Hartley/F guinea pigs. 20 μ g/head SSM or saline was injected subcutaneously into the axilla 6 times in a week for 3 weeks starting 5 days after tumor inoculation. Results indicate tumor weight on 24 days after inoculation.

Fig. 8 Growth curve of U-1 carcinoma inoculated subcutaneously into Hartley/F guinea pigs. (Exp. 3)
U-1 (2.9×10^7) was inoculated in guinea pigs. The largest and smallest were measured at 3- or 4-day intervals and its mean diameter was recorded.
○—○, 20 μ g/head of SSM was administered 6 times in a week.
△—△, Saline was administered 6 times in a week as control.
** $p < 0.01$, * $p < 0.05$: as compared to the values obtained saline group.

U-1 細胞をモルモット側腹中央部に皮下移植し、腫瘍の生着を触診により確認した。その後 SSM 100 μ g/

Sample	Animal no.	Tumor weight (g)				Area of tumor center (mm ²)
		10	20	30	40	
SSM	1					144
	2					108
	3					256
	4					372
	5					156
	6					104
	7					236
	8					288
Saline	11					304
	12					420
	13					320
	14					448
	15					952
	16					476
	17					352
	18					264
						Mean $\pm$ SD
						208 $\pm$ 96
						442 $\pm$ 219

Fig. 9 Effect of subcutaneous injection of SSM on syngenic tumor (U-1) growth. (Exp. 4)
U-1 (2.3×10^7) was inoculated subcutaneously on the flank of Hartley/F guinea pigs. 20 μ g/head SSM or saline was injected subcutaneously into the axilla 6 times in a week for 3 weeks starting 5 days after tumor inoculation. Results indicate tumor weight and area of center on 28 days after inoculation. Tumors were cut through at the center. The cutting surface was put on a paper and draw the equal shape. Area of tumor center was measured by weight of the paper.

0.5 ml を腫瘍上部の皮内 2 カ所に分散投与し、その効果を 2 回の実験により観察した。その結果は Fig. 3～6 に示すとおりである。無処置群を対照とした Exp. 1 については剖検時の腫瘍重量が、その平均値において SSM 投与群 19.0 g, 対照群 91.3 g であり 1 % の危険率で有意差を認めた。また腫瘍径の測定においても腫瘍移植後 20 日および 25 日では 5 % の危険率で有意差を認め、腫瘍増殖抑制の傾向を示していた (Fig. 3, 4)。

Exp. 2 では生食投与群を対照としたが、剖検時の腫瘍平均重量は SSM 投与群 18.3 g, 対照群 39.5 g であり 5 % の危険率で有意差を認めた。また腫瘍径の測定においても腫瘍移植後 18 日以降は 5 % の危険率で有意差を認め、腫瘍増殖抑制の傾向を示していた (Fig. 5, 6)。

(2) SSM 皮下投与

U-1 細胞をモルモット側腹中央部に皮下移植し、腫瘍の生着を触診により確認した。その後 SSM 20 μ g/2 ml を左右の腋窩皮下に 1 ml/ずつ分散投与し、その効果を 2 回の実験により観察した。対照群にはいずれも生食を投与した。結果は Fig. 7～10 に示すとおりである。Exp. 3 における剖検時の腫瘍平均重量は SSM 投与群 9.0 g, 対照群 32.0 g であり 1 % の危険率で有意差を認めた。腫瘍径の測定においても腫瘍移植 12 日

Fig. 10 Growth curve of carcinoma inoculated subcutaneously into Hartley/F guinea pigs. (Exp. 4)

U-1 (2.3×10^7) was inoculated in guinea pigs. The largest and smallest of tumors were measured at 3- or 4-day intervals and its mean diameter was recorded.

○—○, 20 μ g/head of SSM was administered 6 times in a week.

△—△, Saline was administered 6 times in a week as control.

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$: as compared to the values obtained saline group.

以降は有意差を認め腫瘍増殖抑制の傾向を示していた (Fig. 7, 8).

Exp. 4における剖検時の腫瘍平均重量はSSM投与群 9.6 g, 対照群 19.3 gであり5%の危険率で有意差を認めた。また腫瘍径の測定においても腫瘍移植後20日以降は有意差を認め、腫瘍増殖抑制の傾向を示していた (Fig. 9, 10)。

さらにExp. 4において摘出した腫瘍の病理組織学的検討を行った。U-1細胞は線維肉腫の性状を示し、Kimotoら^{7,8)}のヒト癌細胞移植の時よりも腫瘍間質増殖は少なく間質反応も著明でない (Photo 1~3)。これに反しPhoto 4~6に示したように、SSM注射群における腫瘍周辺を取り巻く間質からのコラーゲン増生は著明で、腫瘍の封じ込めや萎縮がみられた。しかし血管増生については観察されなかった。なお同実験群における摘出腫瘍の中央部を水平に切開し、腫瘍中心部切片の面積を測定した。その結果対照群の面積を1とした場合のSSM皮下投与群の面積は0.47であり、腫瘍の広がり少ないことが認められた (Fig. 9)。

Sample	Animal no.	Lung weight (g)		Lung lesion ^{a)}
		10	20	
SSM	1			+
	2			+
	3			+
	4			+
	5			+
Saline	11			###
	12			###
	13			###
	14			###
	15			###

Fig. 11 Effect of subcutaneous injection of SSM on syngenic tumor (U-1) growth. (Exp. 5)
U-1 (4×10^6) was inoculated intravenously in Hartley/F guinea pigs. 10 μ g/head SSM or saline was injected subcutaneously into the axilla once on day 0 and 2 times a day for 30 days starting on day 1.
Results indicate lung weight on 37 days after inoculation.

a) Lung lesion divided into the following classes.

(+) A few tumors on the lung surface

(++) About 10 tumors on the lung surface

(++) Many tumors on the lung surface

(###) All over the lung surface with tumors

3. 肺腫瘍に対するSSMの効果

U-1細胞をモルモット後肢足背静脈内に移植し、SSMの肺における腫瘍の増殖抑制効果を調べた。SSMは10 μ g/mlを腫瘍移植当日に1回、翌日より朝夕2回、各10 μ g/mlを腋窩皮下に投与した。結果はFig. 11に示すとおりである。腫瘍細胞を 10^6 個静脈内接種すると、5~6週後には肺全域にわたり腫瘍を形成し、全例が腫瘍死した。そこで腫瘍を静脈内に接種後、動物の運動状態、毛並を毎日観察し、実験に使用した動物の死亡例が確認された当日に剖検し、腫瘍死であることを確認した時点にて全例を屠殺剖検した。担癌肺臓の平均重量はSSM投与群が4.7 g, 対照群が14.4 gであり、1%の危険率で有意差を認めた。また柳沢ら¹⁶⁾の分類法を参考とした肉眼的病変所見においても腫瘍増殖抑制の傾向が認められた (Fig. 11)。

考 察

SSMの抗腫瘍効果に関する動物実験はそのほとんどがマウスであり、モルモットについては全く検討されていない。周知のごとくモルモットはマウスなどの実験動物に比べ、ヒトと同様に結核菌に対する反応を皮膚反応としてとらえやすい点大きな特徴である。したがってモルモットを使用することにより、ある物質の細胞性免疫を惹起する力を皮膚反応を指標として

Photo 1 Control animal no. 18. 28 days after transplantation of U-1 (2.3×10^7). Tumor cells (T) grow remarkably and separate from stroma (S) clearly. Proliferation of stromal collagen is not remarkable. (Azan stain, $\times 132$)
Abbreviation: M, muscle

Photo 2 Control animal no. 14. Tumor cells (T) grow remarkably and press ($\downarrow$) stroma (S). No collagen proliferate between tumor cells and muscle (M). (Azan stain, $\times 132$)

Photo 3 Control animal no. 12. Tumor cells (T) grow remarkably and press stroma (S). No collagen proliferate between tumor cells and muscle (M). (Azan stain, $\times 132$)

Photo 4 SSM treatment animal no. 6. 28 days after transplantation of U-1 (2.3×10^7). SSM was injected subcutaneously into the axilla 6 times in a week for 3 weeks starting 5 days after tumor inoculation. Proliferation of stromal collagen (S) is remarkable. Tumor cells (T) are enclosed by thick collagen fibers. (Azan stain, $\times 132$)
Abbreviation: M, muscle

Photo 5 SSM treatment animal no. 8. Proliferation of stromal collagen (S) is remarkably between tumor cells (T) and muscle (M). Part of the tumor cells are necrotic. (Azan stain, $\times 132$)

Photo 6 SSM treatment animal no. 3. Proliferation of stromal collagen (S) is remarkably between tumor cells (T) and muscle (M). Proliferation of tumor cells are surrounded. (Azan stain, $\times 132$)

検索することができる。

そこで著者はこの利点に着目し、まずSSMの細胞性免疫を惹起する力を検討した。すなわち1mgのSSMをFIAとともにモルモットに接種すると、その動物は4週以降にはSSMに対して遅延性の皮膚反応を示すことが観察された (Fig. 1)。

このような方法でSSMによって免疫されたモルモットは、SSMのみならずPPDによっても遅延型皮膚反応が惹起された。このことは、SSMがPPDと共通する抗原決定基をもつことを意味するものである。しかし惹起抗原注入後、SSM感作モルモットの皮膚反応の発現において、両抗原の間に時間的相違がある (Fig. 2)のは、両者の主たる抗原決定基の差に起因するのかもしれない。しかも、このような感作モルモットの腹腔内浸出細胞を用いて、遅延型アレルギーの試験管内モデルといわれるMI試験を行うと、SSM、PPDともにほとんど同程度の抑制を惹起することが明らかになった (Table 1)。これらの事実、SSMが遅延型皮膚反応を惹起する抗原となりうることを示している。一般に蛋白抗原は、遅延型皮膚反応を惹起する力の大きい抗原であるが、多糖体抗原も遅延型皮膚反応を惹起する場合が報告されている。Daniel¹⁷⁾は結核菌培養ろ液中の多糖体が赤血球を凝集させる抗体を産生させるのみならず、遅延型皮膚反応を惹起することを指摘している。また Godfrey¹⁸⁾や Chaparas¹⁹⁾も、*Mycobacterium bovis*の培養ろ液由来の多糖体で免疫された動物が遅延型皮膚反応を起こし、その動物の腹腔細胞のmigrationが免疫に用いた抗原を添加することで抑制されることをみている。SSMはアラビノマンナン等の多糖体を主成分とする物質^{20,21)}であることから、このような免疫原性も多糖体部分に由来するものと考えられるが、一方含窒素成分の存在も認められており、その免疫原性がいずれの成分に由来するのかは現在のところ明らかではない。SSMのこの免疫原性に関しては、今後さらにリンパ球の幼若化反応、受身伝達およびマクロファージなどを用いてさらに詳細な検索を加える必要があるものと思われる。

U-1腫瘍に対するSSMの抗腫瘍作用を検討する予備実験として、正常モルモットにSSM 20 μ g/2mlを左右の腋窩皮下に投与した (6回/週)。4週間の運動状態、毛並、体重変動、白血球数を観察したが対照 (生食)群と変わらず、SSMのモルモットに対する副作用は認められなかった。

上述の基礎的知見を背景として、モルモット皮下腫

瘍および肺腫瘍に対するSSMの抗腫瘍性を多面的に検討した。言うまでもなくヒトの癌とモルモットに作られた皮下腫瘍および肺腫瘍ではその成立過程から異なり、本実験の成績をそのままヒト癌に当てはめることはできない。しかしU-1腫瘍を大量皮下または静脈に注入して、そこから発生進展する腫瘍の病変形成にSSMがいかなる程度まで抑制的に影響しうるかを知ることが極めて重要と思われる。特に副作用のないSSMを繰り返し注射することにより、形成された皮下または肺腫瘍が対照動物に比べ抑制されたことは、ヒト癌に対するSSMの効果を説明するうえで役立てる知見と言えよう (Fig. 3~11)。しかしU-1細胞の抗腫瘍実験においては、同程度の移植細胞数を用いてもその増殖状態にかなりの差異を認めており、今後移植細胞の管理、移植時の取り扱い方法等をさらに検討し均一な実験系の確立が必要であると思われる。

SSMの作用機序に関しては、今回の実験から示唆されるようにSSMに遅延型アレルギー感作能があるとすれば、SSMがSSM感作リンパ球と密接な関連のもとにマクロファージ、あるいは肺泡マクロファージ (肺腫瘍の場合) を活性化させ、移植して定着した腫瘍細胞のその後の増殖をある程度抑制するものと推察される。

また皮下腫瘍にSSMを投与した群にみられたコラーゲンの増生は、Kimoto^{7,8)}がヌードマウスを用いたヒト癌移植実験でSSM投与群に認めている、癌間質よりのコラーゲン増生の促進と類似している。本実験においてコラーゲンは対照群にも存在するが、増生促進の点からSSM投与群では極めて著明で幅広い増生がみられ、あたかも腫瘍の増殖を封じ込めるように増生した。この像はKimotoらの観察と一致し、SSMの抗腫瘍効果の機序を考える上で癌間質の問題は極めて重要と考えられる。Schmidt²²⁾はこのコラーゲンの増生がinterleukin 1 (IL-1) によって刺激された線維芽細胞に起因することを示唆している。このことをSSMにIL-1の誘起能があるという和田らの報告²³⁾と併せ考えると、SSMがIL-1を誘起し、腫瘍を取り巻く間質細胞、主として線維芽細胞に働き、コラーゲンを増生させることが、腫瘍細胞の増殖を抑制する機序の一つではないかと考えられる。

結 論

1) SSMの生物活性をモルモットを使って検討した結果、遅延型皮膚反応やMI試験の感作抗原および惹

起抗原として作用し、細胞性免疫反応に関与することが認められた。

2) 近交系モルモット Hartley/F の可移植性腫瘍 U-1 を用いて、皮下および肺の移植腫瘍に対する SSM の抗腫瘍効果を検討した結果、SSM が有効と思われる結果が認められた。

3) SSM がモルモット U-1 腫瘍に対する抗腫瘍効果を示す作用機序については明確ではないが、皮下腫瘍実験における病理学的検索から、腫瘍周囲のコラーゲンの増生が SSM 投与群に著明で、腫瘍の浸潤、増殖を封じ込める所見が観察された。

稿を終えるにあたり御指導と御校閲を賜った日本医科大学微生物・免疫学教室横室公三教授に深謝致します。また終始御支援、御指導戴きました国立予防衛生研究所細胞免疫部 BCG・ツベルクリン室三浦馨博士、高橋宏博士および病理組織学的検討を賜った佐々木研究所佐藤博博士、川崎医科大学実験病理学教室木本哲夫教授に深謝致します。

文 献

- 藤田敬四郎, 飯田和美, 小関正倫, 丸山千里, 吉井隆博, 豊田博子, 鈴木伊豆美, 柳田秀雄: 動物移植癌に対する「丸山ワクチン」(SSM) の効果。基礎と臨, 11, 37~44, 1977.
- 佐藤博: ラット腹水肝癌に対する人型結核菌体抽出物質(丸山ワクチン・SSM) の抗腫瘍作用。癌と化療, 5, 545~548, 1978.
- 安部茂, 水野伝一: ツベルクリンアレルギー感作マウスにおける SSM (丸山ワクチン) の Ehrlich 癌増殖抑制効果。医のあゆみ, 108, 407~409, 1979.
- 田中昇, 時田尚志, 関本一義, 上野哲夫, 岡本嘉六: ヌードマウス移植ヒト子宮頸部類上皮癌を用いたがんの実験的治療モデル: 人型結核菌体抽出物質 (SSM) の影響。癌の臨, 25, 1320~1325, 1979.
- 田中昇, 時田尚志, 木本実, 上野哲夫, 岡本嘉六, 藤村真示: 人癌治療を目的とした癌化学療法における複合療法に関する基礎的実験的研究: 移植固形癌に対するヒト型結核菌体抽出物質 (SSM) の影響。癌の臨, 26, 469~478, 1980.
- 中川久義, 中川洋一, 大久保淳子, 加藤綾子, 島田徹, 藤田浩: ヒト型結核菌体抽出物質 (SSM) の adjuvant 活性および実験腫瘍に対する抗腫瘍効果について。鶴見歯学, 7, 119~123, 1981.
- Kimoto, T.: Collagen and stromal proliferation as preventive mechanisms against cancer invasion by purified polysaccharides from human tubercle bacillus (SSM). Cancer Detect. Prev., 5, 301~314, 1982.
- Kimoto, T., Watanabe, S., Hyodoh, F. and Saito, T.: Collagen fiber formation and proliferation as a mechanism of cancer prevention and regression induced by extract from *Mycobacterium tuberculosis*; Correlation between clinical observation and animal experiments. Cancer Detect. Prev., 11, 173~189, 1988.
- 木本哲夫: 人型結核菌体抽出多糖体成分 (SSM: 丸山ワクチン) の抗癌作用に関する研究。川崎医学会誌, 10, 286~304, 1984.
- 木本哲夫: 丸山ワクチン研究の歩みと歯科領域における適応。歯薬物療, 6, 253~265, 1987.
- Kimoto, T.: Role of polysaccharides extracted from human-type *Mycobacterium tuberculosis* in the collagen proliferation and the suppression of cancer growth; From a point of pathobiological view. Kawasaki Med. J., 13, 151~167, 1987.
- Kimoto, T.: Pathological studies on three cases of cancer treated with polysaccharides from human-type *Mycobacterium tuberculosis* antitumor activity through collagen fiber proliferation. Acta Pathol. Jpn., 37, 1919~1934, 1987.
- 木本哲夫, 平尾優子, 大久保茂樹, 兵藤文則, 西谷耕二: 人型結核菌多糖体成分による高分化型腺癌, 扁平上皮癌における collagen 増殖と癌細胞の癒着促進について。川崎医学会誌, 14, 416~441, 1988.
- 植田直則, 宇佐美善政, 三浦馨: 本邦近交系モルモット Hartley/F における可移植性腫瘍の確立。医と生物, 94, 363~367, 1977.
- 芳賀伸治: 毛細管両端法による MI 試験。"免疫実験操作法" (日本免疫学会編), 第 6 巻, p. 1903~1910, 日本免疫学会, 金沢, 1977.
- 柳沢謙, 橋本達一郎: 実験的結核症。"日本結核全書" (藤田真之助, 岩崎龍郎, 北本治, 宮本忍, 笹本浩, 篠井金吾, 砂原茂一, 柳沢謙編), 第 2 巻, p. 302, 金原出版, 東京, 1957.
- Daniel, T.M.: The antigenicity in guinea pigs and monkeys of three mycobacterial polysaccharides by affinity chromatography with concanavalin A. Am. Rev. Respir. Dis., 111, 787~793, 1975.
- Godfrey, H.P., Baer, H. and Chaparas, S.D.: Inhibition of macrophage migration by a skin-reactive polysaccharide from BCG culture filtrates. J. Immunol., 102, 1466~1473, 1969.
- Chaparas, S.D., Thor, D.E., Godfrey, H.P., Baer, H. and Hedrick, S.R.: Tuberculin-active carbohydrate that induces inhibition of macrophage migration but not lymphocyte transformation. Science, 170, 637~639, 1970.
- 三好朋子: 結核ワクチン (丸山ワクチン) の生化学的分析とその活性因子に関する研究。日医大誌, 36, 434~447, 1969.
- 小島寛, 末包孝広, 村上幸利, 丹羽誠一, 岡平明, 柳田秀雄: 人型結核菌体抽出物質に関する研究 (第 1 報)。多糖成分の化学構造。薬誌, 101, 713~722, 1981.
- Schmidt, J.A., Mizel, S.B., Cohen, D. and Green, I.: Interleukin 1, potential regulator of fibroblast proliferation. J. Immunol., 128, 2177~2182, 1982.
- 田治一郎, 馬島敏郎, 石田名香雄: SSM によるインターロイキン-1 産生マクロファージの誘導。私信。

(受付: 1989年10月28日)