

# 人型結核菌体抽出多糖体 (SSM: 丸山ワクチン)

## の癌増殖抑制に関する研究

癌細胞膜分子構築の変化に伴う間質反応と

コラーゲン増殖 collagenesis

川崎医科大学 実験病理

木 本 哲 夫

(昭和59年10月19日受付)

## Responses and Protective Proliferation of Collagen Fiber against Cancer Due to Polysaccharides of Human-type Mycobacterium Tuberculosis (SSM: Special Substance Maruyama)

Tetsuo Kimoto

Department of Pathology, Kawasaki Medical School

(Accepted on October 19, 1984)

T細胞欠除のヌードマウスを使用して人癌由来の培養細胞、胃癌 (HGC, 未分化癌) および肺癌 (HLC, 腺癌) を中心に xenografts を作製した。他方マウス由来の神経芽細胞腫 NB41 A3 の allografts をも作製し比較した。HGC は  $2 \times 10^7$  で 80~100%, HLC は  $6 \times 10^6$  で 100%, NB41 A3 は  $3 \times 10^5$  で 100% 生着し巨大な固型腫瘤を形成する。以上の癌生着の高度な確率より SSM-A 投与を移植と同時にを行うと癌増殖に伴って、コラーゲン増殖はさらに顕著となった。

前報の乳癌の経過報告とともに SSM-A は癌の中でも乳癌に著効を奏した。SSM-A は元来リンパ球賦活としての免疫療法として登場したが、著者の知見に関する限りリンパ球活性化より間質、間葉系細胞の活性化が癌増殖の抑制には重要であると考えられた。間質細胞の代表的な線維芽細胞は *in vitro* でも旺盛な増殖をするが、本細胞と癌細胞との混合培養でリンパ球、食細胞の媒介なくとも両細胞間の直接接触によっても著明なコラーゲンの産生と増殖が見られる。

ヌードマウスでの実験でコラーゲン増殖は癌移植の初期は血管細胞からのコラーゲン増殖が重要であり、この誘発と増殖パターンはそれぞれの癌細胞によって反応を異にした。重要なことは、癌細胞膜の分子構築の変化に依存することで、円二色性を検討した。その結果、細胞膜上に局在する多糖体、蛋白の変化よりも糖蛋白等の複合体の分子構造の変化が重要で、血管由来のコラーゲンの反応と増殖の誘発に関与していることがわかった。この誘発後のコラーゲンの増殖促進に人型結核菌多糖体は重要な役割を演じている。

ヌードマウスを使用しての実験で明らかにしたことは癌増殖の抑制には全身に分布する間質細胞とこれに由来するコラーゲン増殖が重要で、このコラーゲン増殖には線維芽細胞

のほかに筋線維、神経線維、軟骨等も癌細胞の浸潤により破壊されればコラーゲン産生源となり、SSMはコラーゲン増殖促進に役立ち、修復機転を促進し、ひいては癌増殖阻止に役立つものと考えられる。

Polysaccharides extracted from human tubercle bacilli, Aoyama B strain (SSM), occasionally exhibited a remarkable effect on human breast cancer and other cancers. The preventive mechanism of these polysaccharides against cancerous invasion appears to be due to the induction of a marked promotive proliferation of collagen fibers from the stromal cells of hosts. SSM stimulated the proliferation of collagen fibers in stromal cells and matrix destroyed by cancer infiltration, and the maturation of these fibers was promoted by SSM. Their collagen fiber formation in cancer-bearing athymic mice varied with the properties of cancer cells, and the pattern of proliferation depended upon conformational change in the molecular structures of the cell membrane of the cancer. When examined by CD., it was found to be dependent upon changes in the molecular structure of the substances making up the cell membrane. Fibronectin was presumed to be the most important of these substances.

Key words ① SSM ② Collagen responses to cancer ③ Cancer cell membranes

## はじめに

癌患者の組織標本を検鏡するとき、癌細胞を取り巻く間質の増殖は程度の差はあるが、常に見られる癌特有の所見と言ってよい。古くから肉腫との鑑別に役立っていることは周知の事実である。この事は癌患者の生体内に見られる所見のみでなく、癌細胞、または正常上皮細胞を試験管内で培養するとき、collagen産生細胞であるfibroblastは、常に旺盛に、かつ、早期に増殖し、ついにはこのfibroblastで置換され、上皮細胞の継代培養を目的とする培養家にとっては、むしろ煩わしい招かざる細胞でもある。しかし、我々はこのように環境異変にある*in vitro*の環境でさえも旺盛な増殖を続けるfibroblastが、生体内で何らかの重要な役割を演じていることに着目した結果、血液細胞を中心とする細胞増殖因子をはじめ、この細胞が細胞膜荷電または免疫に依存する貪食能<sup>1),2)</sup>を有し、macrophageの機能を代行する可能性のあること、さらにリンパ球と同じように細胞膜にC<sub>3</sub>-receptorの存在を明らかにし、免疫

学的にも重要な役割を果たしていることを報告してきた。<sup>3)</sup> このことはfibroblastがリンパ球のように直接免疫に関与する細胞ではないにしても免疫現象を基盤に長期の炎症過程において生体防禦機構に関与している第三の細胞として重視している。さらに前報に記載したように癌とコラーゲン増殖の重要性から、fibroblastは、fibronectinをはじめcollagen産生に関与する癌間質細胞の中でも重要な細胞の一つである。

前報ではSSM長期注射が癌細胞浸潤部位でのcollagenの産生と増殖を促進させ、癌細胞を封じ込め、癌増殖の抑制を来す抗癌作用を強調する一連の実験と臨床治験例を報告した。

今回は癌の侵襲浸潤に対する生体防禦に関してコラーゲン合成と増殖はリンパ球, macrophageのmediated cellは必ずしも必要とせず、癌細胞に左右される生体内血管系を構成する間質細胞、またはmatrixよりのcollagen産生の有無が癌増殖阻止にいかに重要であるかを試験管内実験と動物実験を中心に報告し、併せて前報の乳癌患者の現在までの経過について

報告する。

## 材料と方法

1) その後の乳癌治験症例の経過：2例の乳癌患者とも3年後の今日、癌と共存しながら2例ともなお元気で働いているが、このたびは前報治験Ⅲ (31歳 主婦 breast cancer) の最近の状況を follow-up した。SSM 投与22ヵ月後、同側腋窩部皮下リンパ節転移 (小豆大腫瘤) を認めたので生検を行った。

本患者の今日までの clinical history を略記すると、

- 1979-7-4: **Biopsy I** により breast cancer (adenocarcinoma) と診断、腋窩部リンパ節転移を認む。
- 1979-7-11: マイトマイシン (MMC) 4 mg 投与 (1回のみ)。
- 1979-7-18: Operation (1. mastectomy + Maj + Ax.). コバルト照射 5000R 1回のみ。
- 1979-19より1980-7-20: ハロテストイン3 Tab. 1ヵ月。
- 1980-7-28: 左鎖骨上窩リンパ節転移。
- Biopsy II.**
- 1980-8-11より1980-9-10: PSK 3.0 投与 (約1ヵ月)。
- 1980-8-11: 1. Oophorectomy. 左鎖骨上窩腫瘤にコバルト照射 4000 R。
- 1980-9-13: **SSM 単独投与開始**。隔日。SSM-A (2A/日)。SSM-B (2B/日) 経過順調。
- 1981-9-22: 左胸壁部硬結。 **Biopsy III.**
- 1981-10-2: 右腋窩部リンパ節腫脹摘出。
- Biopsy IV (Fig. 1).**

- 1982-5: 左腋窩部リンパ節摘出。 **Biopsy V (Fig. 2).**

上記のように乳癌および卵巣摘出後は直ちにSSM 単独投与を実施し、3ヵ年経て肺、肝等には転移は見えないが腰椎への転移が見られる。その他多数の小豆大腫瘤として皮下に転移を認めた。患者は元気で主婦業を続けているが、

リンパ節、皮膚に転移を起こし、白血球数減少 (3000) のため制癌剤投与はできない。前報治験例のⅡ例は癌性潰瘍の完全治癒<sup>3), 5)</sup> が見られ腫瘤は限局化し残存している。現在なお復職中である (SSM 投与4年後)。

上記のように31歳主婦の皮下腫瘤およびリンパ節転移の生検を漸次行い、手術時のものと組織学的に比較検討し follow-up を続けている。

## 2) 癌細胞と fibroblasts の混合培養：

Human gastric cancer,<sup>5), 6), 8)</sup> (HGC: undifferentiated cancer), human lung cancer (HLC: adenocarcinoma)<sup>5), 6), 8)</sup> の cell lines とマウスおよびヒト由来の各種 fibroblast cell lines を用いた。Detroit 550 (ヒト皮膚), human breast cancer (45歳), SSM 不使用患者の皮下組織の fibroblast, 健康人の皮膚線維芽細胞, 人胎児肺由来線維芽細胞, マウス胎仔皮膚線維芽細胞, マウス肺線維芽細胞は当教室にて primary culture を行い、10~20代継代の fibroblast を使用した。この human cancer (HGC, HLC) と fibroblasts との混合培養 (mixed culture) 時における collagen 産生の有無について観察した。すなわち、ヒトおよび mouse 由来の各種 fibroblast (10<sup>4</sup>個) の monolayer 上に HGC, HLC (10<sup>3</sup>個) の癌細胞を重層培養し、1, 2, 3週間および7週後 PAP 染色 (渡辺変法) を施し、好銀線維および膠原線維形成の有無を調べた。なお混合培養は6cm プラスチックシャーレを使用し、MEM 10% FBS の培養液を用い5% CO<sub>2</sub> 恒温器で培養した。

3) 生着能の比較のため Balb/c nu/nu (athymic mouse) および Balb/c (thymic mouse) 癌移植実験 (xenografts および allografts) に用いた悪性腫瘍株：HGC, HLC および neuroblastoma 由来の NB41A3 (mouse), IMR-32 (Human, Neuroblastoma) 等の培養細胞株の分裂増殖の比較検討 (Fig. 3)

各種腫瘍細胞の5×10<sup>4</sup>細胞数を蒔き込み1週間の growth rate を調べた。NB41A3 (Neuroblastoma, Mouse, Established by G. August's Tocco et al. in February, 1969), IMR-32

(Neuroblastoma, Human, Established by W. W. Nichols *et al.* in April, 1967) はいずれも Flow (U. S. A.) より購入した. Neuroblastoma cell line の培養には Ham's F12 を用い mouse cell line では horse serum 15% および FCS 2.5% を添加し human cell line では FCS 15% を添加した. その他の cell lines は MEM + 10% FCS 培養液を使用した.

#### 4) マウスへの培養癌細胞の移植実験

A) Balb/c nu/nu (athymic mouse) への人由来およびマウス由来悪性腫瘍の培養細胞の移植

HGC, HLC, Neuroblastoma (IMR-32) cell lines およびマウス由来悪性神経芽細胞腫 (Neuroblastoma NB41A3) の移植実験

HGC は  $10^6$  以上の細胞数であれば移植可能 (xenograft) であるが培養状況で移植率にやや変動が見られることもあるが, 完全着床のために  $6 \times 10^6$  (現在では  $2 \times 10^7$  以上) の培養細胞を移植した. HLC の場合は HGC よりも生着力強く  $6 \times 10^6$  で 100% 移植可能である. HGC,

HLC のヌード移植実験は前報では癌細胞生着後, 腫瘍の生育を確認した後に SSM 注射を行ったが, このたびの実験では  $6 \times 10^6$  個 HLC で 100% 生着が見られる HLC 移植癌に対しては全て腫瘍移植と同時に SSM 皮下または局所注射を開始した. SSM は SSM-A ( $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  多糖体成分) を使用し, 0.5 ml ~ 1.0 ml 隔日皮下注射を行った (Table 1).

Neuroblastoma は mouse 由来 NB41A3 ( $3 \times 10^6$  個移植), Human 由来 IMR-32 ( $3 \times 10^7$  個移植) を皮下移植し allografts と xenografts を作製し実験を行った.

実験動物は死亡時, 死前, 腫瘍消失時に 10% ホルマリン固定して組織標本を作成し H. E., Masson, Mallory 染色, PAP 染色をした.

#### NB41A3 移植と Balb/c (thymic mouse) の正常脾細胞注射

NB41A3 細胞は  $3 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^6$  で 100% の生着と巨大な腫瘍を形成した. ヌードマウスを 3 群にわけ, 1) 対照群として無処理または PBS 注射, 2) 脾細胞のみ注射 (1回  $1 \times 10^7$ ),

Table 1. The effect on the transplantability of tumor cell lines when SSM treatment and cell transplantation were done simultaneously.

	Donor Cell Lines	Transplanted cell counts	Recipients	Number of recipients	Trans- plantability
Culture Living Cells	HGC*	$1-2 \times 10^7$	Nude Mouse  {Athymic Mouse}  Balb/c nu-nu	{CT 29 SSM 14	+ + → -
	HLC*	$6 \times 10^6$		{CT 10 SSM 10	++ ++ → ±
	IMR-32	$3 \times 10^7$		{CT 5 SSM 5	- -
	NB41A3	$6 \times 10^6$		{CT 7 SSM 5	++ ++
0.25 % Glu- taraldehyde fixed culture cells	HGC	$3 \times 10^7$		{CT 7 SSM 5	- -
	HLC	$3 \times 10^7$		{CT 11 SSM 13	- -
Culture Living Cells	HGC	$3 \times 10^7$	Thymic Mouse	{CT 5 SSM 10	- -
	HLC	$3 \times 10^7$	Balb/c	{CT 2 SSM 3	- -

CT: xenografts and allografts treated with PBS or without SSM

SSM: xenografts and allografts treated with SSM

\* Supplementary Experiments<sup>5)</sup>



3) SSM-A 0.5 cc と脾細胞 (1回  $1 \times 10^7$ ) の同時注射群。

脾細胞は無菌状態でマウス脾を摘出し分散し、Sodium Metrizoate-Ficol solution (比重 1.077) 法でリンパ球分画層を分離し、(Nylon-wool による T-細胞分離を行っていない)  $-90^\circ\text{C}$  に凍結し、使用した。

**B) Balb/c nu/nu (athymic mouse) への 0.25 % glutaraldehyde (G. A.) 固定 HGC, HLC の移植 (Table 1) :** 培養細胞の HLC, HGC を 0.5 % G. A. 3 分間固定後遠心し、PBS (Phosphate buffer saline solution) で遠心洗浄を繰り返した後、透析し (1 日)、この固定細胞  $3 \times 10^7$  個をマウス皮下に移植した。移植と同時に 0.5-1.0 cc SSM-A 皮下注射を開始し、以後同量の SSM-A 隔日皮下注射を行い、処理群と無処理対照群に分けた。7~14 日後の移植部腫瘍の組織所見を比較観察した。組織は 10 % ホルマリン固定後 H. E., Mallory 染色, PAP 染色を施し検鏡した。

**C) Balb/c, nu/+ mouse (thymic mouse) への培養癌細胞 (HGC, HLC) の移植 (xenografts): (Table 1)**

培養した HGC ( $3 \times 10^7$ ), HLC ( $3 \times 10^7$ ) を皮下移植し、同じく実験群を移植後 SSM 無処理対照群と移植と同時に SSM-A 投与し以後隔日 SSM-A 0.5-1.0 cc 注射した実験群に分け 7~14 日観察した。ことに移植腫瘍の消失前、消失後の移植部を摘出し、上記同じ方法で組織検索した。

**D) Nude Balb/c nu/nu への HGC, HLC 培養細胞移植による xenograft における好銀線維 (reticulum fiber) と膠原線維形成の観察**

前報の HGC, HLC 移植後 SSM-A 注射群 (130 例) および対照群 (40 例) と今回実験マウスの reticulum fiber (reticulin) と collagen 増殖をさらに詳細に検索するため、全例の PAP 染色を行い、Mallory 染色, Masson 染色陽性の collagen の増殖について比較検討した (Table 1)。

円二色性の測定<sup>7), 15), 16)</sup>

測定材料: Concanavalin A (Con A: Sigma

Chemical Co., U. S. A.), Human fibronectin (Waltham, Mass., U. S. A.), Mannose (Merk, West Germany), Glucose (Katayama Kagaku, Japan), Sialic acid (Tokyo Kasei, Japan), Poly-L-lysine (Sigma Chemical Co., U. S. A.), N-Acetyl-Glucosamine (E. Y. Lab., U. S. A.), N-Acetyl-Galactosamine (E. Y. Lab., U. S. A.), N-Acetyl-Lactosamine (E. Y. Lab., U. S. A.), Methyl- $\beta$ -D-Mannopyraminoside isopropylate (E. Y. Lab., U. S. A.) 等細胞膜に存在する代表的な多糖体, アミノ酸, アミノ糖, 糖蛋白を選択的に検索した。

円二色性スペクトル Circular Dichroism (CD.) の測定はユニオン技研社製マーク II 円偏光分光機を用い、スリット幅  $10 \text{ \AA}$ , 温度  $25^\circ\text{C}$  で行った。分光機は D-カンファスルホン酸を用いて吸収強度および波長の補正を行った。すべてのスペクトルは 1.0, 5.0, あるいは 10.0 mm 光路長の石英セルおよび pH 7.4 の PBS 緩衝液中で感度 0.01-0.05 で記録した。円二色性スペクトルは平均残基分子楕円率 ( $[\theta] \cdot \text{deg} \cdot \text{cm}^2 \text{ d mole}^{-1}$ ), および HGC, HLC, 赤血球の場合は左右円偏光吸収光の差 ( $\Delta\epsilon - \epsilon_L - \epsilon_R$ ;  $\epsilon_L$  および  $\epsilon_R$  はそれぞれ左右の円偏光の分子吸光係数を表す) で表現している。普通 10 回の測定を平均し、200 nm 以下の領域でも確かに吸収が観察されたが、ノイズが大きかったので無視した。

**HGC, HLC 細胞のフィブロネクチンの存在:**

癌細胞を G. A. で固定することにより一部の細胞表面の分子構築の変化が起こり、血管を中心とする好銀線維の増殖が誘発されることがわかったので、細胞表面に存在すると考えられる主要な物質を選び G. A. 固定操作による変化を CD. でしらべた。その結果、fibronectin の変化に着目した。そこで、xenograft に用いた HGC, HLC, NB41A3 に fibronectin が存在するか否かを間接蛍光抗体法を用いて検索した。

**Indirect immuno-fluorescence method:**

細胞を cold ethanol で 3 分間固定後、2 回 PBS で洗浄、ヒトの fibronectin に対する抗体 (Behringwerke AG, Marburg, W. Germany)

を 37°C, 1 hour 処理後 PBS で 3 回洗浄, 次に acetone powder でよく吸収を行った. anti-rabbit  $\gamma$ -globulin (Fluorescein conjugated, Goat) (Behringwerke AG, Marburg) 1 hour, 37°C 処理, 次いで PBS 3 回洗浄, Glycerin で封入 (Glycerin 1: PBS 1) し検鏡した.

#### 電顕的観察<sup>6)</sup>

このたびは nude mouse に HGC を移植 (2~3 $\times$ 10<sup>7</sup>) 後同時に SSM-A 注射を開始し, 腫瘤を形成するが, 増殖抑制の著明な xenograft における collagen と癌細胞との関係を透過電顕 (日立, HU-12A) で観察した.

### 実験結果

前報の SSM 注射加療による breast cancer その後の経過と病理組織学的所見

前報臨床治験例 II (50歳): Ulcer を伴う breast carcinoma で ovarium, peritoneum の metastasis を発見後 SSM 投与 (隔日 A と B) を続けている現在の状況.

4 カ月で cancerous ulcer は治癒した既報後 3 年間, 復職しているが, 癌 (adenocarcinoma) は腫瘤として前胸部に触知される. その他腰椎骨の転移を認めるが元気で生活を送っている (1983 年現在転移発見後 6 年, 骨盤転移増大).

臨床治験例 III: 27 歳 (現在 31 歳) breast cancer を発見し mastectomy を行い, 手術時同側の腋窩リンパ節の転移を認めている. 卵巣摘出後は SSM-A, B の単独投与, 2 年 6 カ月後, 健在に通院している. 最近他側と同側腋窩リンパ節 (小豆大) を摘出, 癌転移を認めたが, 癌巣周囲

は著明な collagen fiber の増殖で取り囲まれている (Fig. 1). 癌細胞の血管内および血管壁侵入を見るが血管壁からの線維化が著明で, 一部では癌細胞の癒着化を認めた (Fig. 2). またビマン性浸潤をしている癌細胞を取り囲み網目状の collagen (reticulum fiber) の著しい増殖が見られる. この所見は nude mouse への胃癌細胞移植時の collagen 増殖および HLC 移植癌の浸潤破壊部における collagen 増殖様式に類似している.

ヌードマウスの移植に用いた培養悪性腫瘍細胞の *in vitro* での growth rate と移植能との関係 (Fig. 3)

IMR-32 は 2 日まで lag phase がみられるが HGC, HLC, NB41A3 は lag phase なく増殖し human cancer cell line である HLC, HGC とを比較すると培養では移植力の強い HLC よりも HGC 細胞の方がむしろ旺盛な growth rate を示した. また lag phase のある IMR-32 は 2 $\times$ 10<sup>7</sup> 個の移植では nude mouse 移植に成功しなかった.

ヒト皮膚 (男) 由来の fibroblasts (Detroit

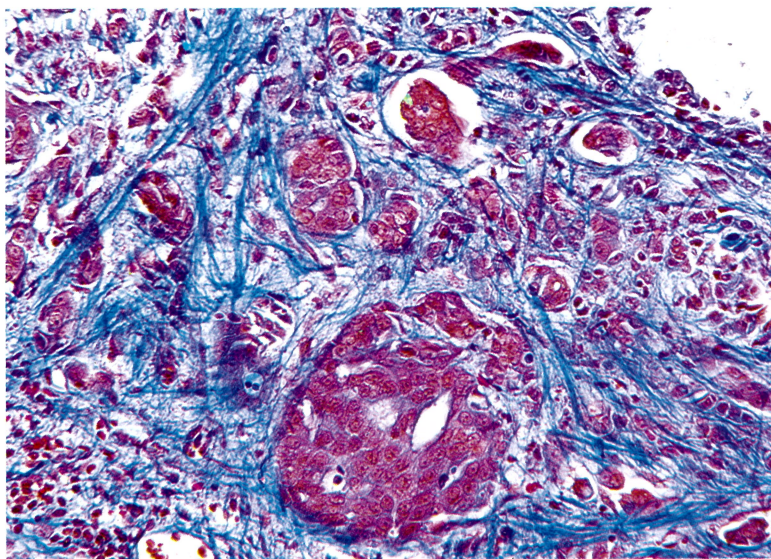
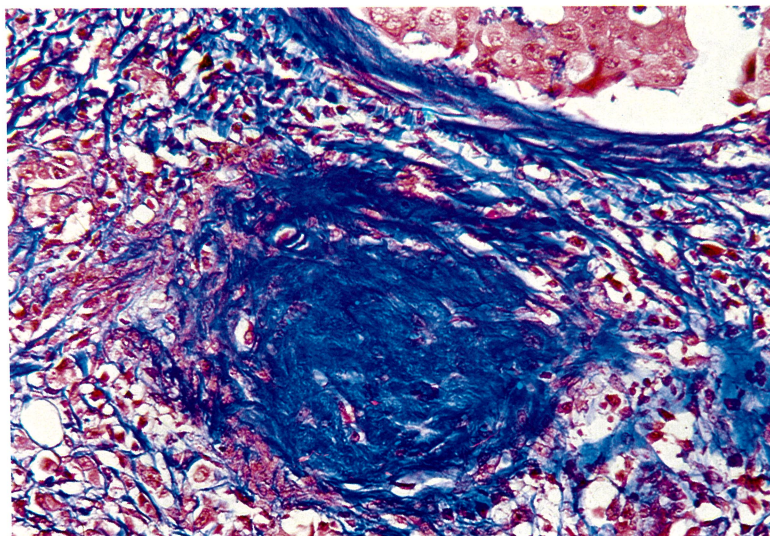


Fig. 1. Clinical Case III.

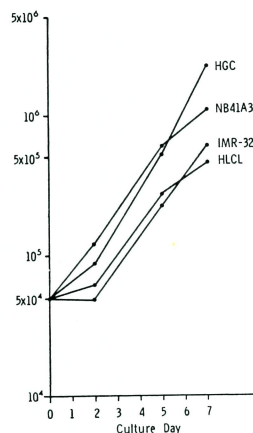
30 years old (Oct. 2, 1981). Biopsy IV. Metastatic breast cancer to the  $\gamma$ , axillary lymphnode. 13 months after SSM treatment. 200 $\times$ . Collagen production and proliferation around cancer cells is remarkable and similar to findings in Fig. 8.





**Fig. 2.** Clinical Case III.

31 years old (April, 1982). Biopsy V. Metastatic breast cancer to the lymph node. 20 months after SSM treatment. Remarkable collagenesis from the walls of blood vessels invaded by cancer cells was found and cancer cells began to disappear. 200 $\times$ .



**Fig. 3.** *In vitro* growth rate of HGC, HLC, IMR-32 and NB41A3 cell lines transplanted to Balb/c nu/nu mice.

550), 乳癌の間質由来 fibroblasts, WI-38, およびマウス由来 fibroblast として Balb/c nu/nu (athymic mouse), Balb/c (thymic mouse) の胎仔肺由来の fibroblasts を培養し, HLC, HGC 細胞を重層し混合培養を行った. 1w~7w における collagen 形成をみると HLC, HGC 周囲で同種, 異種を問わず著明な collagen の産生が見られた. この場合, HLC では PAP 染色で認められる collagen の著明な形成は 3w~7w を要し, 癌細胞による試験管内での collagen 産生は HGC の方が HLC より強い傾向を示した. この事は 癌細胞周囲の collagen は mediated cell がなくても癌細胞一線維芽細胞の直接的相互関係でも産出されることを示している.

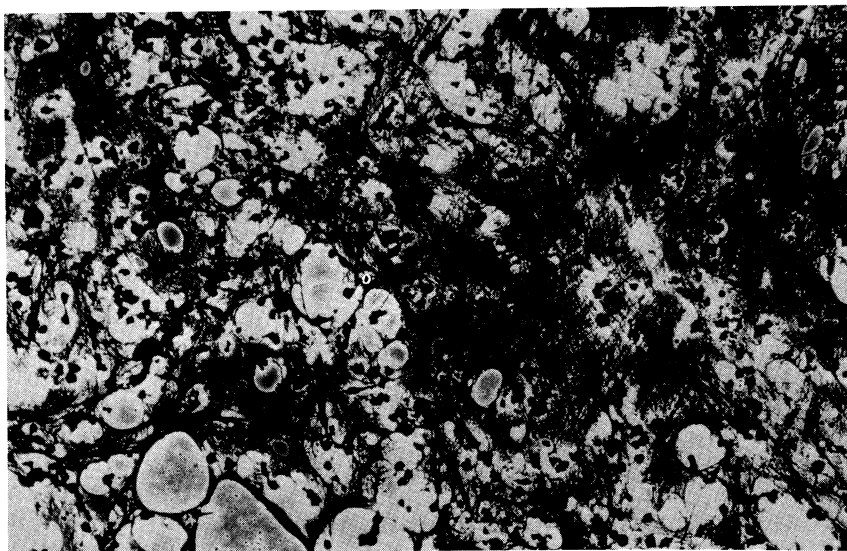
**Balb/c nu/nu (athymic mouse) への培養 HGC, HLC の移植における好銀線維 (reticulum fiber) 形成と Mallory 染色陽性の成熟 collagen 増殖**

#### HGC 移植マウスと SSM 注射群

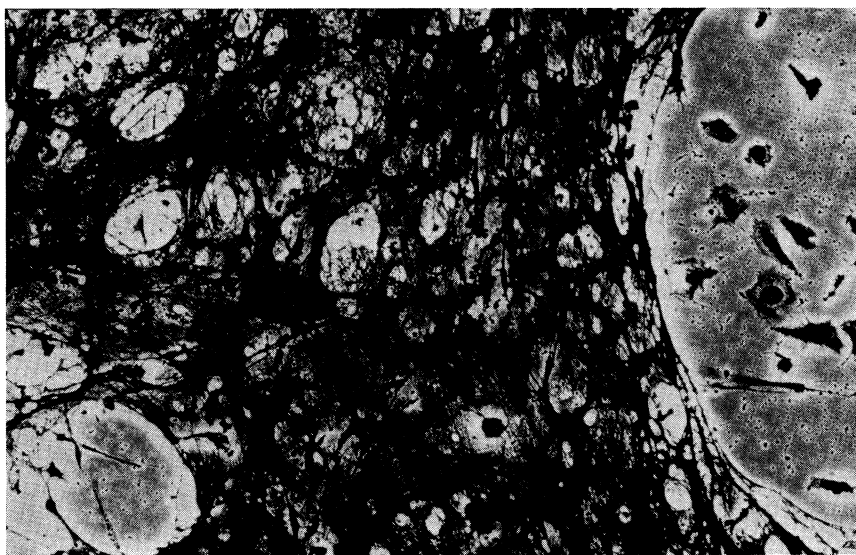
培養 HGC 細胞 ( $2 \times 10^7$ ) で 80-100% の transplantability を示した. しかし生着率は HLC

細胞 ( $6 \times 10^6$ ) 100% に比し今日では  $2 \times 10^7$  以上を必要とする. 1w~2w で腫瘍は米粒大となり無処理対照動物と SSM 投与群との組織学的変化を調べた. SSM 投与群の追加実験では SSM-A 注射は主に移植と同時に行った. 高率の腫瘍の消失, または増殖の抑制を来し, 移植癌細胞の数により異なるが前回同様の結果を得た. SSM-A 投与群では無処理または食塩注射群の対照群に比し, 著しく癌抑制傾向を示した. xenograft を組織学的に検索し, 特に今回は PAP 染色と Mallory 染色, Masson 染色を中心に collagen の産生について検討した.

重要なことは HGC  $3 \times 10^7$  移植 24 時間, 48 時間, 3, 4, 5, 6, 7 日後の癌周囲の組織反応としての毛細血管の反応である. まず癌組織周囲で angiogenesis<sup>9)-14)</sup> が起こり癌巣周囲, および癌巣内に血管新生が開始された. この場合, 流血中の好中球, 単球が癌周囲に集まってくるが, これらの血液細胞動員は一過性であり, 1 週間後には消失する. リンパ球は初期では散見するにすぎない. 最も重要なことは, この新生血管に由来する内皮細胞および線維芽



**Fig. 4.** Reticulum fiber production in a mixed culture of Detroit 550 fibroblasts and HGC. 4 weeks culture. PAP stain. 400 $\times$ .

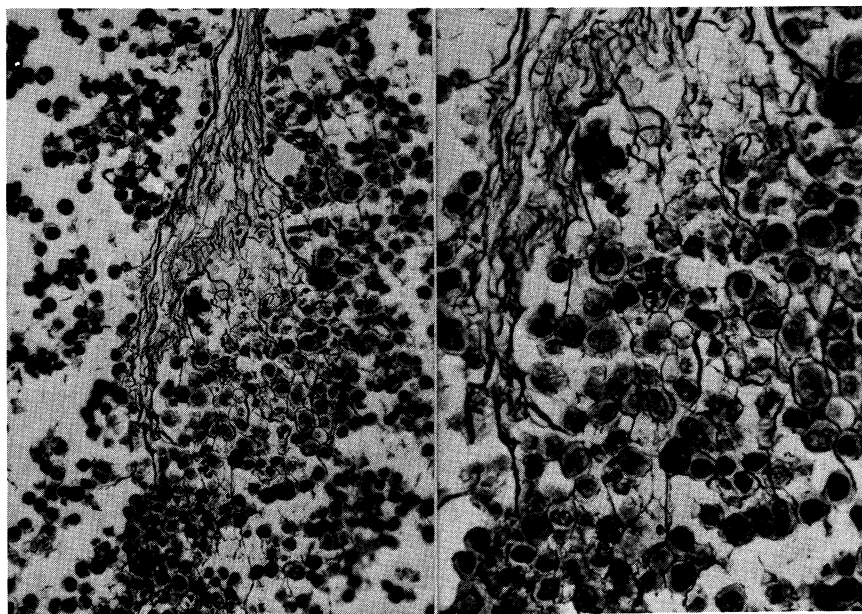


**Fig. 5.** Reticulum fiber production in a mixed culture of human fibroblasts (Detroit 550) and HLC. 4 weeks culture. PAP stain. 400 $\times$ .

細胞，線維細胞による癌巣の取り巻きである。癌移植初期ではこの angiogenesis をはじめ fibroblast の増殖により癌細胞は生着に成功し，1週間後より増殖を開始した。この所見については後述するが SSM 投与による重要な collagen 増殖はこの angiogenesis を基盤として開始され，単球，マクロファージの存在は

collagen 増殖促進に役立つものと思われる。対照群に見られるように，いったん癌生着後増殖を開始する癌細胞に対して SSM 無処理マウスではこれを阻止する著しい collagen 増殖は見られなかった。

この所見は undifferentiated cancer である胃癌 (HGC:  $6 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ ) を移植し，移植と



**Fig. 6.** Balb/c nu/nu.

SSM (0.5 ml) injections (every other day) subcutaneously were started simultaneously with the transplantation of G. A. fixed HGC ( $2.4 \times 10^7$ ). There was remarkable proliferation of reticulum fibers extending from the perivascular connective tissues. Mice were sacrificed 2 weeks later. PAP stain.  $200\times$ .

**Fig. 7.** High magnification of Fig. 6.

Collagen fibers surround each cancer cell. The pattern of collagen proliferation was similar to that of living HGC cells. PAP stain.  $400\times$ .

同時に SSM 皮下注射した場合は、癌生着率が著しく低下し無処理対照群の70-100%の生着率に比し20%の低率であった<sup>5), 8)</sup> (Table 1). この場合も移植した癌周囲には血管由来の PAP 陽性の reticulum fiber を主体とする collagen の形成が見られ、リンパ球, 単球, macrophage 等は消失し、以後、これらの細胞が癌抑制に効果があると思われる所見はなく、癌生着後の組織反応は癌細胞に反応する angiogenesis に起因する線維芽細胞と癌細胞との因果関係が成立し、collagen の纏絡が癌増殖抑制の重要な鍵を握るものと考えられた。

#### 0.25% glutaraldehyde (G. A.) 固定 HGC 細胞の移植実験

固定胃癌細胞を移植し collagen の動態を観察した結果、この場合も移植初期ではリンパ

球, 単球 macrophage の集合は少なく、培養した生細胞移植と同じく collagen が個々胃癌細胞を網目状に包囲し、移植固定癌は100%瘢痕化した。SSM 投与群での collagen 増殖の促進効果は固定癌移植においても SSM 非投与または食塩注射群の対照群より著明であった。この collagen 増殖は血管由来であった (Figs. 6, 7).

#### 0.25% G. A. 固定肺癌細胞および生細胞 (HLC) の Balb/c nu/nu (athymic mouse) への移植実験

培養での growth rate は HGC に比しやや低いにもかかわらず生細胞の移植実験では100%かつ旺盛な移植能を示した。この度は PAP 染色による reticulum fiber について調べたが SSM 投与群における Mallory 染色陽性の



collagen 増殖は胃癌の場合個々の癌細胞を纏絡しているのに比し前記したと同じように小葉状に腺癌の腺管構造を取りまき collagen 増殖も弱い、長期生存した nude mouse では腫瘍の著明なニカワ化を来したことは前報と同じである<sup>5),8)</sup>が、特にこの場合注意すべき所見は、肺癌細胞浸潤により著しく宿主組織を破壊し、かつ癌細胞の壊死巣で崩壊した host matrix を素材として新しく collagen の産生が著明に見られたこと

とである。この所見は乳癌患者 Case III の2.5年後のリンパ節転移巣においても観察された (Fig. 8)。

そこで、固定肺癌細胞を移植した場合は Figures 9, 10 のごとく胃癌細胞移植時に見られたと同じく collagen は個々の癌細胞を取りまき胃癌細胞移植時に示した collagen の反応と全く同じであった。移植された固定癌細胞は2w~3w で消失または痕跡化した。この場合もリンパ球、単球 macrophage による癌消失への関与を重要視する直接的な所見は見られなかった。

#### Balb/c (thymic mouse) へのヒト胃癌 (HGC) および肺癌 (HLC) の移植

Balb/c nu/nu の対照動物として同系の胸腺保有マウスへの人癌の移植では  $3 \times 10^7$  の大量を移植し nude mouse での collagen 反応を比較した。移植癌細胞は2w 以内に吸収、消失した。この場合 nude mouse と同じく1w では xenografts へ対して最初血管由来の reticulum fiber の出現が先発し、続いて nude mouse に比し著しいリンパ球、単球、macrophage が浸潤し、癌細胞は強い肉芽化によって癰瘍化、吸収された。この場合でも SSM 投与

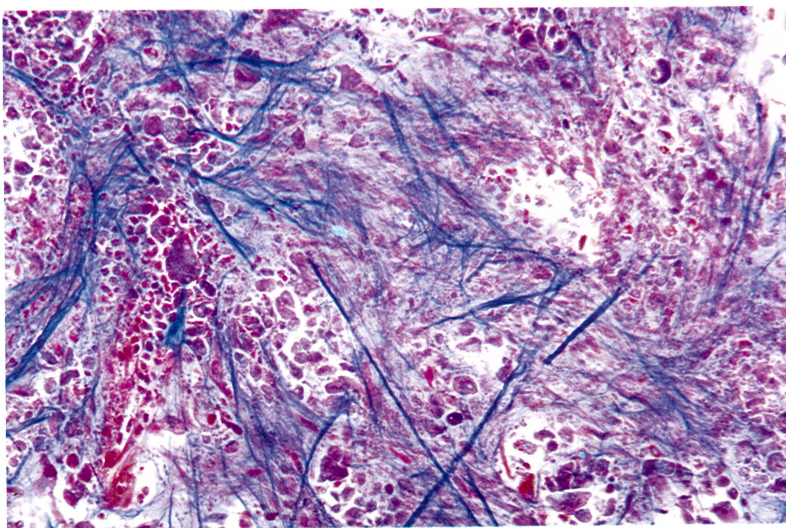


Fig. 8. Balb/c nu/nu.

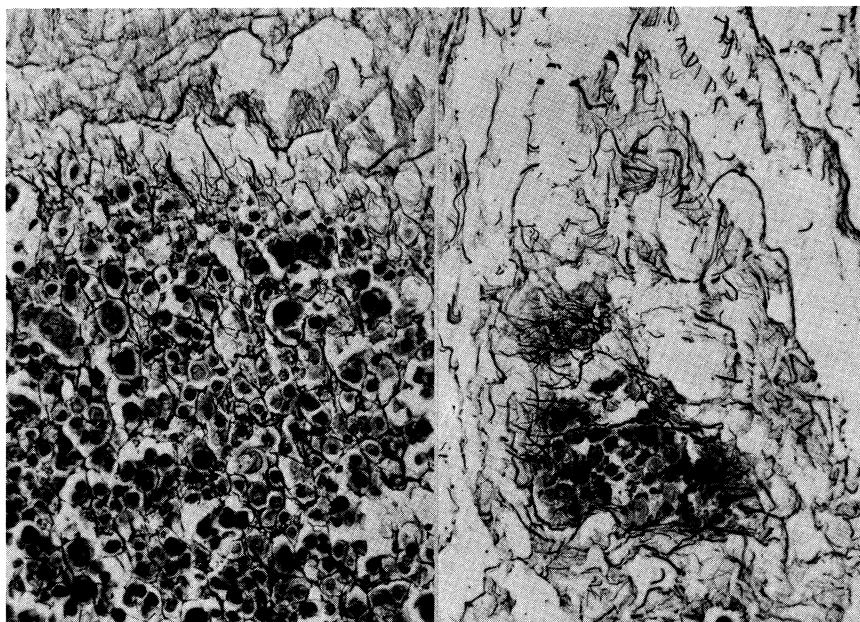
Collagen production and proliferation was remarkable in the necrotic lesion invaded by cancer cells.

群は無処理マウスに比し collagen 増殖はさらに著明であった。

#### ヒト由来 (neuroblastoma, IMR-32), マウス由来 (NB41A3) 培養細胞の nude mouse (Balb/c nu/nu) への移植

Mouse 由来 neuroblastoma (NB41A3) 培養細胞は、 $3 \times 10^6$  個で移植能 100% を有し腫瘍形成著明であったが  $10^7$  の human neuroblastoma (IMR-32) は生着しなかった。NB41A3 の腫瘍は発育著明で3w で小豆大—拇指頭大の tumor を形成した。この場合腫瘍細胞に対する間質反応特に血管周囲よりの reticulum fiber をはじめ collagen 増殖は皆無であった。すなわち本細胞は血管由来の collagenesis を誘発することなく腫瘍は増大した。この場合も培養細胞移植実験ではリンパ球、単球、macrophage の出現はほとんど見られなかった (Fig. 11)。

NB41A3 0.25% glutaraldehyde (G. A.) 固定細胞に対する血管反応および collagen 形成 癌細胞に対して、生体の collagen fiber の response が何に起因するかを検討するため、前述と同様に G. A. fixation で異物化を行った。G. A. fixation によって細胞特に細胞膜構



**Fig. 9.** Balb/c nu/nu.

Collagenesis from the blood vessels after simultaneous injection of SSM-A and transplantation of G. A. fixed HLC ( $3 \times 10^7$ ). 2 weeks.

Collagenesis showed a lobular pattern in response to native HLC cells but showed diffuse proliferation around the individual cells, such as seen in the response to native HGC cells. PAP stain.  $200\times$ .

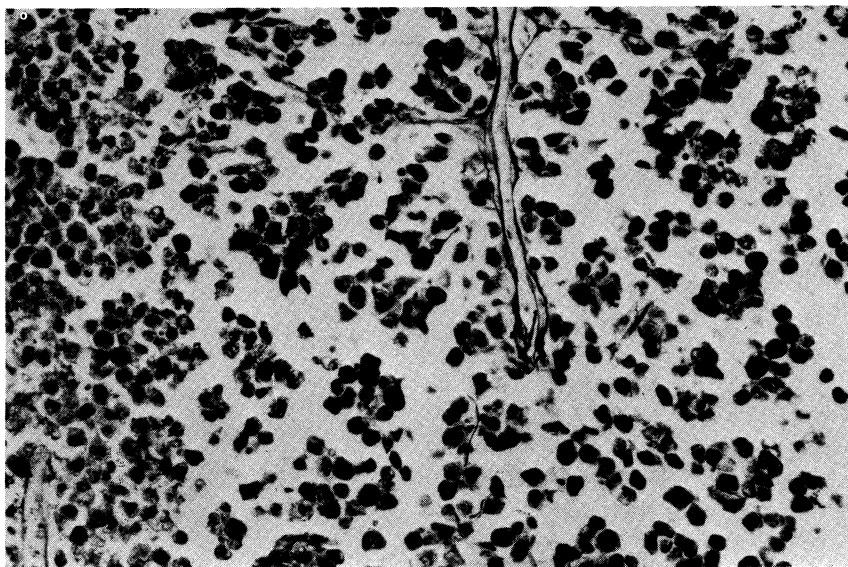
**Fig. 10.** Balb/c nu/nu.

G. A. fixed HLC ( $3 \times 10^7$ ) cells were transplanted to nude mice. 2 weeks of SSM-A treatment. Cancer cells were absorbed and began to disappear due to confinement by collagenesis. PAP stain.  $200\times$ .

造をできるだけ native structure に保つことを意図した。すなわち native NB41A3 cell に対しては **Figure 11** のように血管よりの collagen 増殖は全く見られなかったが、G. A. fixed cells を移植した場合、固定処理による細胞膜の分子構築の変化を来し、血管を中心として格子状のコラーゲンが個々の細胞にからみつくように増殖が誘起された (**Fig. 12**)。これにより host の collagen 増殖は移植癌の種類はもちろんのこと、同一細胞であっても細胞膜の分子構築に依存することがわかった。そこで G. A. 処理によって、いかなる分子構築の変化が起こっているかを調べるため CD. により測定した。

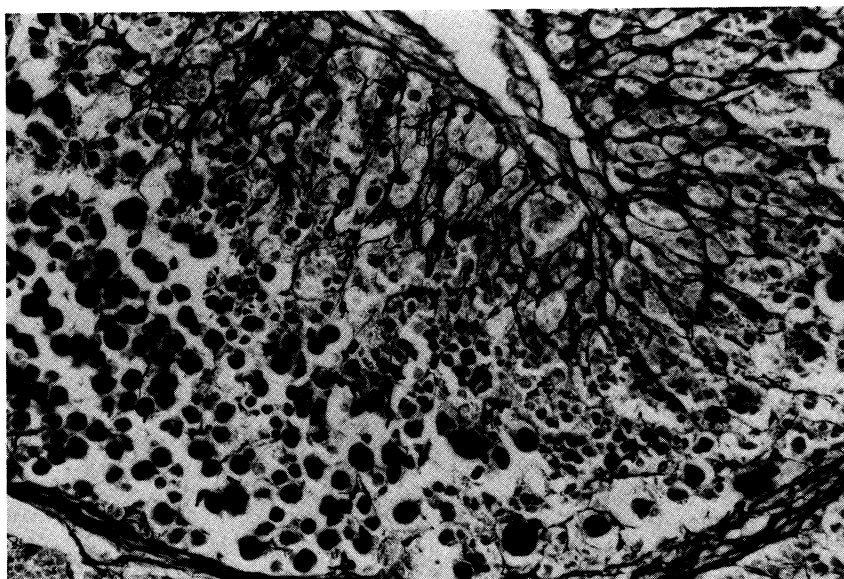
**CD.<sup>15)</sup>** による G. A. 固定によって起こる分子構築の変化

**Figure 13** は HGC および HLC の G. A. 処理および未処理の native cell の  $200\sim 260$  nm の CD. spectra を示す。両癌細胞ともに未固定の native cell では  $230$  nm に同強度の負の吸収が観察されたが、G. A. 固定すると未固定のものに比して HGC では  $1/9$  倍、HLC は  $1/3$  倍吸収強度が弱くなった。これは細胞表面上の G. A. による Schiff base の固定を受ける成分の相違によるか、または量によるものと思われる。そこで蛍光抗体法で両癌細胞の糖蛋白である fibronectin の存在を確認したので、上記の aldehyde 処理による分子構円性の減少に寄与した成分の一つとして fibronectin を想定し、高純度の fibronectin の  $200\sim 250$  nm の CD. spectra を G. A. の存否の状態で測定した (**Fig. 14**)。Aldehyde 処理しない fibro-



**Fig. 11.** Balb/c nu/nu.

Allograft of NB41A3 ( $6 \times 10^6$ ). No response of collagenesis from the blood vessels was observed and the tumor grew to the size of a hen's egg inspite of SSM-A treatment. PAP stain.  $200\times$ .



**Fig. 12.** Balb/c nu/nu.

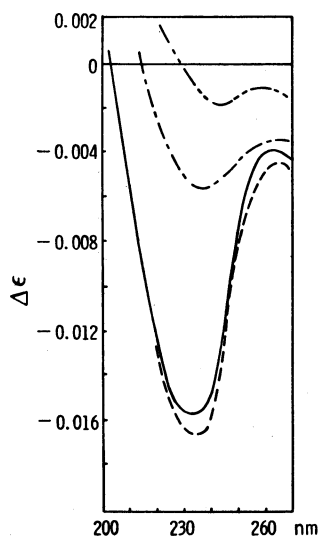
An allograft of G. A. fixed NB41A3 ( $3 \times 10^7$ ) was transplanted subcutaneously. 2 weeks.

Collagenesis occurred from the walls of the blood vessels without the appearance of lymphocytes. PAP stain.  $400\times$ .

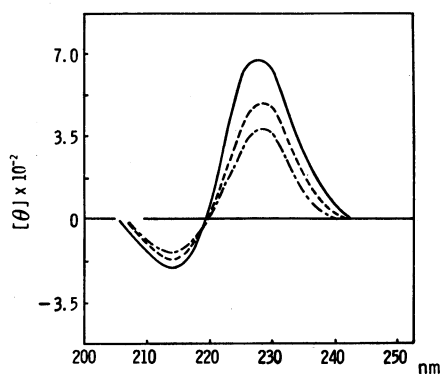
nectin の CD. spectra は Mosesson, M. W.<sup>16)</sup> の測定結果と同様に 214 と 228 nm に負と正の極大を有する spectra を示した。同一試料に

10% G. A. を  $5\mu\text{l}$  加えた 5 分後の CD. spectra の強度は約 28% 弱くなり、さらに  $5\mu\text{l}$  を加えると 23% 減弱した。このように 228 nm の吸





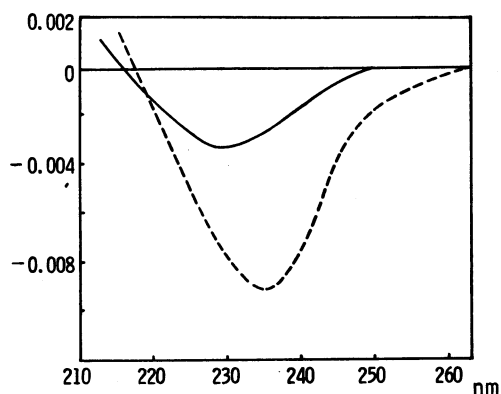
**Fig. 13.** The circular dichroism spectra of native HGC (—) and HLC (---), and fixed HGC (— · —) and HLC (— · —) with 0.25% glutaraldehyde.



**Fig. 14.** The circular dichroism spectra of human fibronectin (0.72  $\mu$ M) in the absence (—) or presence (---: 5.0mM, — · —: 10.0mM) of glutaraldehyde as a value of 114 for mean residue weight.

収強度は aldehyde の添加量と比例して減少したが、214 nm の吸収強度は aldehyde 処理の影響は見られなかった。しかし 201 nm 付近の測定が本使用機器では不可能であったので 213 nm の吸収については言及できない。

次に fibronectin が細胞表面に検出されていない赤血球の native cell と G.A. 処理の CD.



**Fig. 15.** The circular dichroism spectra of native (—) and G. A. fixed human erythrocytes (---).

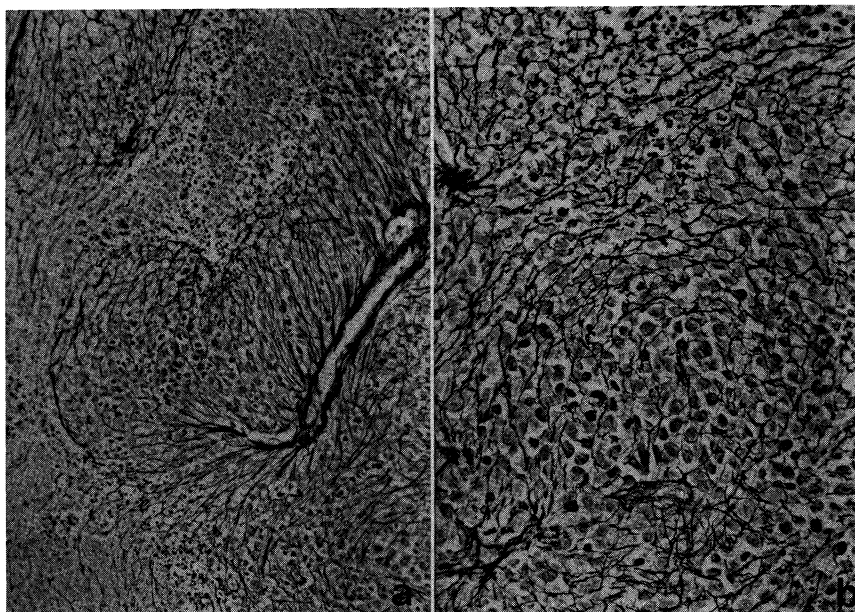
spectra を **Figure 15** に示した。230 nm に fibronectin を有する癌細胞とは逆で、吸収強度が 2.9 倍強くなると同時に 5 nm 長波長側に移動した。このように fibronectin の有無の細胞を aldehyde 処理することで CD. spectra が逆の結果を生じたことは、fibronectin の固定による変化が強く暗示される。

この他、細胞表面の構成成分として重要な、N-acetyl-D-galactosamine, N-acetyl-D-glucosamine, N-acetyl-lactosamine, N-acetyl neuramic acid および methyl- $\beta$ -D-mannopyranosine や con A 等の lectin の CD. を測定した結果、3 番目までの化合物は 213 nm に負、最後の化合物は同波長領域に正、その他の化合物は吸収がなかった。すなわち、いずれの化合物も aldehyde 処理により CD. spectra は変化しなかった。HGC および HLC の CD. spectra は 213 nm に吸収がなかったため、これらの分子からの寄与はなかったものと思われる。

#### 電顕的所見

**Figure 17, 18** のものは **Figure 16** の電顕所見である。

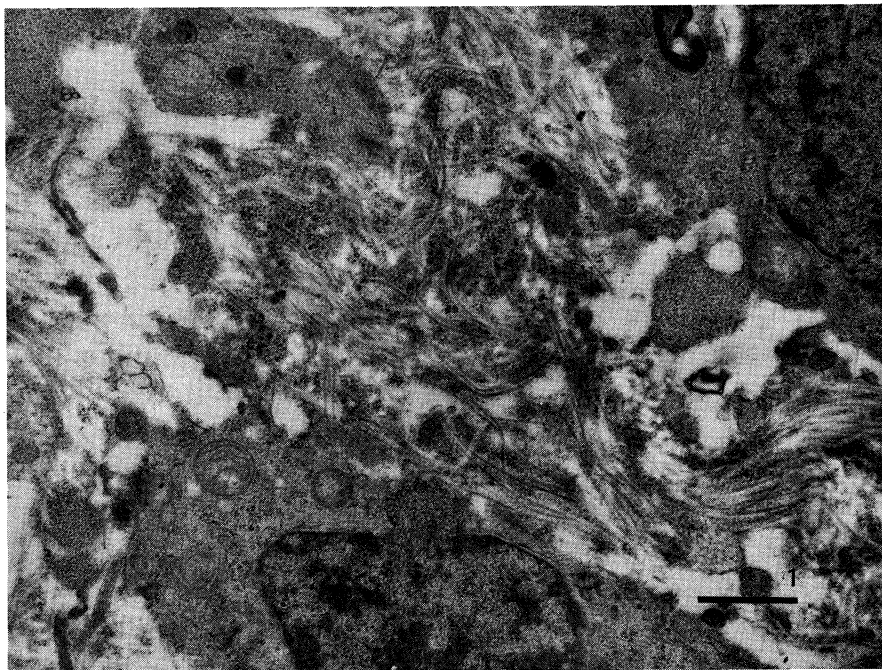
HGC ( $2 \times 10^7$ ), Balb/c nu/nu に移植し、同時に SSM-A (0.5 ml) 皮下に隔日注射を開始して 55 日後のものである。**Figure 16(a)** に示すごとく nude mouse は HGC 細胞移植により



**Fig. 16.** Balb/c nu/nu.

The collagenesis response resulting from simultaneous treatment with SSM-A and transplantation with HGC ( $2 \times 10^7$ ). 55 days.

- (a) Dendritic proliferation of reticulum fibers from the walls of small blood vessels. PAP stain. 100 $\times$ .
- (b) High magnification of Fig. 16 (a). Collagenesis surrounds the individual HGC cells. PAP stain. 200 $\times$ .



**Fig. 17.** The E. M. findings of the Balb/c nu/nu shown in Fig. 16.

HGC ( $2 \times 10^7$ ) were transplanted and treated with SSM-A for 55 days. Production and proliferation of collagen fiber from the interstitial cells by invading cancer cells.



**Fig. 18.** Balb/c nu/nu.

High magnification of Fig. 17. Production of collagen from the stromal cells in the HGC tumor.

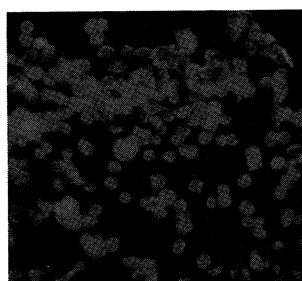
血管壁の結合織を中心とする reticulum fiber の形成が著明で SSM 投与により Mallory 染色陽性の膠原線維への collagen の maturation が著明となった。腫瘍は増大発育を抑制され縮小し、ついには瘢痕化への傾向を強く示した (Figs. 17, 18).

#### 蛍光抗体法によるフィブロネクチンの存在

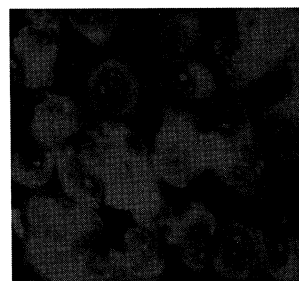
HLC, HGC とともに存在していることがわかった (Figs. 19, 20).

#### 考 察

癌免疫療法として今日まで免疫担当細胞であるリンパ球に依存する考えが強く、リンホカイン、インターフェロンをはじめ macrophage,



**Fig. 19.** Fibronectin of the HGC cells. Indirect immunofluorescence stain. 50 $\times$ .



**Fig. 20.** Fibronectin of the HLC cells. Indirect immunofluorescence stain. 200 $\times$ .

単球モノカイン等の cytotoxic effect を期待する免疫機構が考えられ、著者らも数年来癌細胞—リンパ球の相互関係について研究を続けてきた。<sup>1), 2)</sup> このことは、試験管内の培養細胞を使ったモデル実験をはじめ、正常環境では皮膚移植、臓器移植の場合見られる拒絶反応、癌発生初期の監視機構に参加する生体内既存のリン

パ球の役割は大きく、数的にも細胞免疫の効果を発揮するものと考えられる。しかし、体内で刻々と無限に増殖する癌細胞に対抗する体内既存のリンパ球、N-K細胞、macrophage等の抗癌性に関する限り皮膚移植の拒絶反応と同じようにはたして満足すべき細胞であろうかと考えられる。特に、癌細胞は抗原性のきわめて弱いことから、この癌増殖、浸潤にたち向かう免疫的に活性化されたリンパ球の動員が行われても免疫力は弱く、強烈な monoclonal antibody等を作らない限り強い特異的免疫による殺癌能も見られず、非特異的免疫に依存しても生体内のリンパ球動員のみでは抗癌性に関する限り従来の免疫療法は満足するものではない。これに反して、全身に分布する間質由来の collagen 増殖の動員と補強は今後、新しい癌抑制に関して問題を提示するものと考えられる。この collagen 原としては単に血管のみならず筋線維、神経線維、さらに基底膜、軟骨等も癌侵襲により破壊されれば、必ず collagen 産生細胞となるし、癌細胞自らが collagen を産生する事実から、SSMが癌間質の collagen を増殖促進することは制癌効果として極めて重要な役割を演じていることは実験からも示唆された。ここで一刻も早くリンパ球の組織培養等による抗癌有効成分の抽出純化、特に monoclonal antibodyの生産が急がれるわけである。しかし、免疫現象としてあまりにもリンパ球、macrophage、N-K細胞にとらわれすぎ、間質成分の動態についてははなはだ知見に乏しく、ようやく最近に至って注目されはじめてきたといえる。

ここ数年、癌と collagen の生合成と増殖が注目されるに至ったが、特に注目すべき研究として、榊原<sup>17), 18)</sup>の培養肝細胞が collagen を産生するという報告である。従来、考えられていた間質細胞のほか、上皮細胞も collagen を産生する報告は重要な課題を提起した。その他、内藤、嘉納らも<sup>19)</sup> collagen 産生について胃癌細胞も自ら僅少ながら collagen を産生することを報告している。

人型結核菌多糖体の生物学的研究にとって重要なことは、乳癌細胞も collagen 産生をしたり、この collagen 増殖には、腫瘍間質成分の特性と構築が密接な相関関係のあることも報告されるようになった事実である。<sup>20), 21)</sup>

つとに、我々も乳癌、胃癌をはじめ、肝臓癌(特に cholangiole cell carcinoma)においても未分化になるにつれて、本来の上皮細胞の性格を逸脱し、間葉系細胞と区別困難となったり、癌細胞が collagen を産生するようになることはしばしば経験している。<sup>22)</sup>したがって SSM 投与は宿主構築の破壊に伴う collagen 増殖の促進のみならず未分化癌の産生する collagen 増殖をも促進することとなり癌増殖の抑制機序に関して collagen 増殖は今後さらに検討すべき問題であると考えている。

そこで、このたびは癌と collagen 増殖に関してさらに検索を進めた結果、担癌体の collagen 増殖は個体の免疫能を基盤として癌細胞の性状に依存する事実である。癌細胞発生周辺には通常 SSM 処理をしなくても必ず間質増殖を伴ってくることである。中には硬性癌のごとく極めて間質成分の増殖が著しい未分化癌のあることは注目すべきで、既述のごとく未分化癌は自らが collagen を産生し、さらに間質増殖を促進する傾向が見られる。しかし、この所見はすべての未分化癌というわけではなく、中には未分化癌といえども急速な増殖を行い collagen 増殖も少ないものもあり、collagen 増殖の観点からこのような癌に対しては SSM は癌増殖を抑制することはできない。すなわち、余りにも急速な浸潤、増殖を行い、かつ collagen 産生能の少ない癌に対しては SSM 効果は弱いと考えられる。

そこで、癌細胞増殖—collagen—SSM の相互関係をしらべてみた。NB41A3というマウス由来神経芽細胞腫はヌードマウスで巨大な増殖を続け、**Figure 11**のように癌巢内の血管を中心とする collagen 増殖は生細胞のままでは誘発できなかった。この場合 SSM による制癌効果は全く見られず増殖を阻止することはできな





**Fig. 21.** Allograft of NB41A3.

The growing tumor at 45 days after transplantation of NB41A3 ( $3 \times 10^6$ ). Control.



**Fig. 22.** Allograft of NB41A3.

45 days after transplantation of NB41A3 ( $3 \times 10^6$ ).

Treatment with SSM-A and normal splenic cells from a thymic mouse Balb/c. Remarkable collagenesis combined with a cytotoxic effect was observed on the surface of the tumor.

かった。この場合 SSM 投与と正常マウスの脾細胞を添加注射すると腫瘍のニカワ化は促進した(Figs. 21, 22)。この作用は胸腺細胞よりも脾細胞の方が著明であり、脾細胞による殺癌細胞と SSM による collagen 増殖が見られたが、従来血管由来の collagen 増殖の弱いこの NB41

A3 による collagenesis は表層的であった。

そこで使用した nude mouse と同系の thymic mouse へ癌細胞を移植して xenografts(HGC, HLC) を検索した。Xenograft は肉芽化し collagen 増殖とリンパ球浸潤が混在し、脱落した。

次に HLC, NB41A3 の生細胞を 0.25 % のグルタルアルデヒドで短時間固定し透析後、動物に移植した。この場合 angiogenesis とともに生細胞では見られなかった小血管からの collagen 増殖の誘発が起こった。この collagen 増殖に関して mediated cells として考えられるようなリンパ球は極めて少なく、初期段階で、ヌードマウスではむしろ、単球, macrophage の動員が見られるが、以後これが癌増殖の抑制に重要な鍵を握るような所見でなく、極めて散在性で 6 日後ほとんど消失し、癌は生着した。胃癌細胞を  $3 \times 10^7$  個移植して経時的に観察すると、癌巣を取り巻き新生血管が伸展し、癌巣に見られる少数の多核白血球、リンパ球は常時血流中のもの

が主体で、これらの白血球も 4 日後にはほとんど消失した。そして angiogenesis による初期の癌間質が一週間位ででき上がり、SSM 無処理の場合、癌細胞は増殖を続け大豆大ないし鶏卵大の腫瘍を形成していった。

肺癌（腺癌）の場合、生細胞に対して間質増

殖は小葉状に取り巻き collagen 増殖の状態は胃癌(未分化)の場合におとるが, グルタルアルデヒド固定肺癌では胃癌と同じように, 個々の固定癌細胞を取り巻き, collagen 増殖のパターンの変化を来した (Figs. 6, 7, 9, 10).

癌の生細胞をグルタルアルデヒドで固定することにより, collagen 増殖のパターンが異なり, かつ, また増強することは極めて重要であり, T-細胞を持たぬヌードマウスでの実験では免疫細胞よりもむしろこの血管の動態が collagen 増殖に重要な鍵を握るものであった. この angiogenesis とリンパ球, macrophage との関係は今後さらに検討するが, SSM 投与により collagenesis はさらに著明となった.

周知のように, グルタルアルデヒドは電顕観察用の固定剤であり, 今日, 細胞の人工的变化を起こさない最良の固定液として知られている. 生細胞と同一細胞の固定細胞で血管よりの collagen の増殖が異なることは細胞膜の分子構築か, 構造上の変化によるものと考えて, 固定によってどのような変化が起こるかを検索するため, 細胞膜上に存在していることが知られているアミノ酸, 糖, 蛋白をとりあげ, 固定によりいかなる構造上の変化をうけるかを CD. で観察した. その結果, アミノ酸, 糖, 蛋白のグルタルアルデヒドによる変化はほとんど見られないが, fibronectin 等の糖蛋白結合物の変化が見られた. さらに HLC, HGC 細胞もこの fibronectin を有し, 今後は癌細胞膜と糖蛋白および糖脂質等の変化による collagen 反応について検索を進めるつもりである.

特記すべきは, このような collagen 誘発を起こした癌巣において, SSM 注射の継続は無処理対照群に比して collagen 増殖と成熟は明らかに異なり, SSM 投与によって collagen 増殖は促進された.

以上のように collagen 増殖機転について癌を取り巻く, 間質の組織構築の変化から観察したが, 僅少なながら存在するリンパ球が全く collagen 増殖に無関心であるかどうかは今のところ不明であるが, 少なくとも3週間後から開始される SSM による癌増殖の抑制には

collagen 増殖が本命であり, リンパ球, macrophage はこの collagen 増殖の促進に重要な役割を果たしているが, 直接的な癌増殖抑制に働いているとは考えにくい.

HGC, HLC 細胞と各種 fibroblast との混合培養を行った結果, 異種, 同種を問わず癌細胞との共存により著しい collagen 増殖が観察され, この collagen 増殖も *in vivo* における増殖パターンに類似していた (Figs. 4, 5). したがって collagen 増殖はリンパ球, macrophage の仲介細胞がなくても間質細胞と癌細胞の直接因果関係でも産生されることがわかった.

以上の結果から, 担癌体の示す癌と collagen との関係は, 癌発生初期では免疫基盤が重要であるが, 以後刻々と増殖を続ける癌に対してはむしろ癌間質反応が重要であり, この反応は生体内に発生した癌の種類により異なるもので, これを左右する重要な要因は癌細胞膜の分子構築の変化であると言える. したがって, SSM 効果は癌細胞の性状により, 血管反応および collagen 増殖の少ない担癌体に対しては効力も少ない. しかし, 癌細胞は大部分間質の増殖を多かれ少なかれ伴うものであり, 癌増殖速度と間質増殖との競合に癌増殖の抑制効果は結着するが, 臨床治験および剖検所見から SSM の早期からの使用により, 長期間使用すればするほど効果的であり, 癌が小さければ小さいほど効果的であることがわかった. したがって, 担癌体が生き永らえるほど効果的であるとも考えている.

癌増殖抑制には癌間質反応, 中でも collagen 増殖が極めて重要であり, 人型結核菌体多糖体成分は結核の治癒促進としての collagen 増殖, 癒痕化に役立つのと同じように, 癌の浸潤と破壊による組織の修復, 治癒機転にも関与し, 癌増殖の抑制には体内に存在する免疫細胞の動員もさることながら, 間質コラーゲンの増殖によることが極めて重要である事実を示唆するモデル実験として移植癌を中心に, 副作用のない丸山ワクチンを長期使用して検討を加えた.

本研究の要旨は 7th Latin-American Cancer Congress, 10~15 May, 1981, São Paulo, Brazil にて講演した。

## 謝 辞

CD. 測定に関しては本学薬理学教室の渡辺 悟 講師, SSM 注射臨床治験では岡山労災病院外科の諸先生, 特に古本雅彦, 石原弘道部長の御厚意に感謝します。

癌細胞の培養では川崎医大実験病理土田由美子, 同大学組織培養免疫センター 風早智美, 北 昭子研究補助員および技術員の援助を得た。顕微鏡写真では北昭子技術員, ノードマウス使用に関しても本学動物飼育センターの北徳技術員主任の御援助を得たことを深謝します。

本研究は川崎医大プロジェクト研究費59-201の支援を得たことを併せて深謝する次第です。

## 文 献

- 1) Kimoto, T.: Cell recognition and phagocytosis of SV 40 transformed cell. *Acta Pathol. Jpn.* 23: 291-305, 1973
- 2) Kimoto, T., Hyodoh, F., Nishitani, K., Namba, M. and Ueki, A.: Tumor cell phagocytosis and cytotoxicity of lymphoblastoid following concanavalin A treatment. *Acta Pathol. Jpn.* 28: 15-23, 1978
- 3) Ueki, A., Itaguchi, Y., Hyodoh, F. and Kimoto, T.: The receptor sites for complement (C<sub>3</sub>) on human diploid fibroblasts. *Virchows Arch. [Cell Pathol.]* 18: 101-107, 1975
- 4) Ueki, A., Fukushima, Y., Hyodoh, F. and Kimoto, T.: C3b and C3d receptor sites on human fibroblasts derived from several human tissues. *Virchows Arch. [Cell Pathol.]* 27: 155-157, 1978
- 5) 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 (U. S. A.)
- 6) Kimoto, T., Naito, Y., Nishioka, Y. and Hyodoh, F.: Collagen fiber formation and promotive proliferation as cancer prevention by polysaccharides extracted from human tubercle bacilli (SSM). *Cancer Detect. Prev.*, 1985 (in press)
- 7) Kimoto, T., Watanabe, S., Saito, T. and Hyodoh, F.: Protective proliferation of collagen against cancer by polysaccharides of human-type mycobacterium tuberculosis. *Cancer Detect. Prev.*, 1985 (in press)
- 8) 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—癌間質コラーゲン増殖による癌細胞「封じ込め」について。川崎医会誌 10: 286-304, 1984
- 9) Folkman, J.: Endothelium: Angiogenesis, imitation and control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 401: 212-227, 1982
- 10) Ziche, M. and Gullino, P. M.: Angiogenesis and neoplastic progression *in vitro*. *J. N. C. I.* 69: 475-482, 1982
- 11) Keegan, A., Hill, C., Kumar, S., Phillips, P., Schor, A. and Weiso, J.: Purified tumor angiogenesis factor enhances proliferation of capillary, but not aortic endothelial cells *in vitro*. *J. Cell Sci.* 55: 261-276, 1982
- 12) Ausprunk, D. H. and Folkman, J.: Migration and proliferation of endothelial cells in pre-formed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc. Res.* 14: 53-65, 1977
- 13) 佐藤春郎：昇圧化学療法で制癌効果が増す。モダンメディスン 83-5, 71-75.
- 14) 鈴木磨郎, 堀 勝義, 阿部郁夫, 斎藤祥子, 佐藤春郎：腫瘍血管の機能的特殊性。癌と化学療法 6 (Suppl. II): 287-291, 1979

- 15) Sarkar, P. K. and Doty, P.: The optical rotatory properties of the  $\beta$ -configuration in polypeptides and proteins. *Biochemistry* 55: 981—989, 1966
- 16) Mosesson, M. W., Chen, A. B. and Huseley, R. M.: The cold-insoluble globulin of human plasma: Studies of its essential structural features. *Biochim. Biophys. Acta* 386: 509—524, 1975
- 17) Sakakibara, K., Takaoka, T., Katsuta, H., Umeda, M. and Tsukada, Y.: Collagen fiber formation as a common property of epithelial liver cell lines in culture. *Exp. Cell Res.* 111: 63—71, 1978
- 18) Sakakibara, K., Suzuki, T., Motoyama, T., Watanabe, H. and Nagai, Y.: Biosynthesis of an interstitial type of collagen by cloned human gastric carcinoma cells. *Cancer Res.* 42: 2019—2029, 1982
- 19) Naito, Y., Kino, I., Horiuchi, K. and Fujimoto, D.: Promotion of collagen production by human fibroblasts with gastric cancer cells *in vitro*. *Virchows Arch. [Cell Pathol.]* 46: 145—154, 1984
- 20) Tremblay, G.: Elastosis in tubular carcinoma of the breast. *Arch. Pathol.* 98: 302—307, 1974
- 21) Tremblay, G.: Ultrastructure of elastosis in scirrous carcinoma of the breast. *Cancer* 37: 307—316, 1976
- 22) Kimoto, T. and Ugaki, M.: Hepatocellular carcinoma combined with hepatic mesenchymal cell and sarcoma. *Acta Pathol. Jpn.* 32: 1131—1141, 1982