

同種腫瘍移植に於ける cellular cytotoxicity に及ぼす BCG—腫瘍混合接種の影響

岡山大学医学部第一外科教室（主任：田中早苗教授）

田 中 紀 章

（昭和52年11月29日受稿）

緒 言

弱毒の牛型結核菌である BCG が動物の腫瘍に対して効果があるという事実はかなり古くから知られていたが、最近に至ってヒトの悪性腫瘍の免疫療法的手段として利用され、悪性黒色腫など一部の癌¹⁾で顕著な成果を収めている。

BCG が免疫機構に及ぼす効果については既に様々な働きが知られているが、腫瘍免疫について言えば抗腫瘍性に働く場合²⁾³⁾⁴⁾とともに逆に腫瘍の発育促進に働く場合⁵⁾⁶⁾も知られ、これらの機作の解明が問題として残されている。

さてあらかじめ BCG に感作された動物では、腫瘍内に BCG を注入、浸潤させることにより腫瘍を抑制、退縮させて、この腫瘍に対する特異的抵抗性をもたらし得ることができる。⁴⁾ 腫瘍と BCG の混合接種もまたモルモットでは同様の結果が得られる。⁷⁾ しかしある種のマウスの腫瘍では、BCG との混合により腫瘍の生育は抑えられるにもかかわらず、腫瘍の再移植で示される免疫性は、腫瘍を単独で接種、発育後これを切除して得られる免疫に比して弱いという報告⁸⁾がある。このように腫瘍と BCG の混合接種は一般的には腫瘍免疫を強化するものとは言い難い。

そこで以下の実験ではこの問題を *in vitro* で観察、同種腫瘍に対して感作されたリンパ球の cytotoxicity に及ぼす BCG の影響を検討した。

方 法

Mice. 雌の CBA(H-2^k)、BALB/c(H-2^d)を岡山大学医学部マウスコロニーより購入、生後2~4カ月で実験に用いた。

腫瘍. メチルコラントレにより CBA に誘発した線維肉腫2種、それぞれ MC2、MC4 と仮称し、前者を *in vitro* に継代培養して細胞株とし、標的細胞として使用、後者は *in vivo* で継代し感作に用いた。

培養液. GIBCO の Eagle's-minimum essential medium(MEM)に10%の非働化胎児血清(FCS)とペニシリン G100 単位/ml、ストレプトマイシン 100 μ g/ml を加えて使用。

免疫. MC4 を0.25%トリプシン含有 PBS により分散、その遊離細胞 10^7 個を0.1mlとして単独に、あるいは BCG2 mg⁹⁾ (日本ビーシー製造 K. K.)と混じて BALB/c の背部皮内に接種する。

リンパ球. リンパ節を眼科剪刀で細切、150メッシュに通じた後、 3×10^7 個/5ml を7cm径のガラスシャーレに1時間培養、ゆるやかに振とうして得られる浮遊細胞を用いる。脾も同様に細切、150メッシュに通じた後、Harris ら¹⁰⁾の方法に従って、Lymphoprep を用いて比重勾配遠心、赤血球を排除して用いた。腹腔細胞は、脱血死せしめたマウスの腹腔をヘパリン0.5U/mlを含む10% FCS加MEMを用いて繰り返し洗浄、得られた細胞は PBS で3回洗浄した後、使用に供す。

⁵¹Cr release assay (CRA)

マイクロテストII型プレート (Falcon Plastics) の各穴に MC2 を 1.5×10^4 個分注、翌日⁵¹Cr (放射性クロム酸ナトリウム、科研化学)添加培養液(0.03 mCi/ml)0.1ml に代えて12時間培養、再び⁵¹Cr を含まない培養液に替えてさらに2時間、リンパ球浮遊液 2×10^6 個/0.2ml に代えて18時間培養、上澄みの半量を採取して放出された⁵¹Cr を γ カウンターで測定する。

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{2 \times \left[\frac{\text{Mean release with test lymphoid cells}}{\text{Total label}} - \frac{\text{Mean release with normal lymphoid cells}}{\text{Total label}} \right]}{\text{Total label}} \times 100$$

⁵¹Cr postlabeling assay (CPLA)

マイクロテストII型プレートの各穴に標的細胞MC2を2000個分注, 18時間後, 培養液をエフェクター浮遊液に替えて48時間培養した後, プレートを反転洗浄, ⁵¹Cr(0.03mCi/ml 10%FCS加MEM)0.1mlを加え18時間かけて標的細胞をラベル, その後⁵¹Crを含まない液にかえてさらに24時間培養した後もう一度反転洗浄, 残存せる標的細胞をトリプシンで剥脱させ, これを測定する.

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{mean counts/min of } ^{51}\text{Cr retained in experimental wells}}{\text{mean counts/min of } ^{51}\text{Cr retained in control wells}} \times 100$$

結 果

1. BCG加MC4(10⁷個)皮下接種の局所リンパ節細胞と脾細胞の cytotoxicity に及ぼす影響.

CBA 背部皮下で継代されているMC4をトリプシナイゼーションし, その10⁷個を単独もしくはBCG 2mgと混じてBALB/cの背部皮下に接種, これによって感作されたリンパ球の cytotoxicity を⁵¹Cr release assayを用いて測定, 経日的に観察した.

まずこの場合の腫瘍の発育をみると, 接種後5日目では腫瘍単独, BCG-腫瘍混合接種いずれに於いても硬結の大きさはほぼ同じであるが, 腫瘍単独接種の場合, 10日目には早くも一部で拒絶が見られるに対し, 一部では著しい増殖を示す個体もあり, 15日目になると2/3の個体が腫瘍の拒絶を示すにもかかわらず

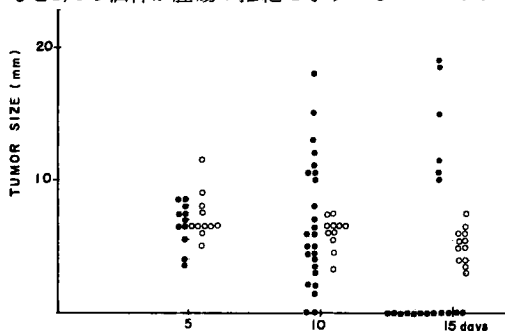


図1. a.

同種腫瘍MC4の増殖に及ぼすBCG混合接種の影響.

腫瘍の大きさはその長径と短径の和を2で割った値で示す.

黒丸は腫瘍単独接種, 白丸は腫瘍-BCG混合接種の個体を示す.

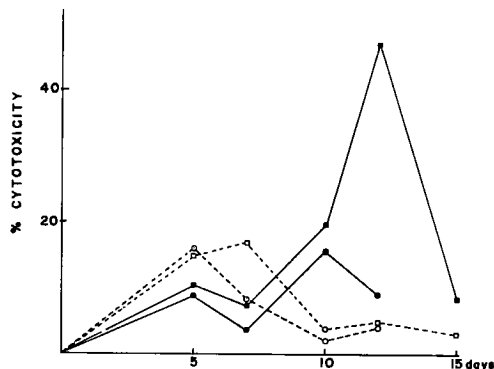


図1. b.

BCG-腫瘍混合接種の局所リンパ節, 脾細胞の cytotoxicity に及ぼす影響.

MC4(10⁷個)をBALB/c背部皮下に, 単独あるいはBCGと混じて接種, 局所リンパ節および脾細胞の cytotoxicity をCRAで示す.

●—● MC4(10⁷)感作リンパ節, ○---○ MC4(10⁷)+BCG 2mg 感作リンパ節, ■—■ MC4(10⁷)感作脾, □---□ MC4(10⁷)+BCG 2mg 感作脾.

1/3では増殖促進が見られる. これに対しBCG混合接種群の15日目では全例に小さな硬結を認めるが, それも多くは膿瘍化したもので, 腫瘍の増殖促進は一例も見られない(図1. a).

次にこれに対応する cytotoxicity を示すと, 図1bは各個体の示す活性のメジアン値を経日的に見たものである. 全体として反応の経過をみると, 脾細胞の活性は腫瘍単独接種群で12日目, BCG-腫瘍混合接種群で7日目にピークに達し, 局所腋窩リンパ節ではそれぞれ10日目, 5日目にピークが見られる.

活性の強さとしては, 感作後5日目, 7日目ではBCG混合接種群が高い値を示しているが, 10日, 12日, 16日目では逆に腫瘍単独接種群の方が強い活性を示す.

図に示されていないが個体による反応のパラッキは大きくその分布の性格が明らかでないので, 個々の活性値(% lysis)を次の三段階に分けて再編, 各段階に占める個体の数を示した(表1).

specific lysis 0~5% (確実な有為性を欠くもの), 5~20%, 20%以上 (実際には標的細胞破壊50%以上).

脾細胞の反応を7日目, 10日目についてみると, 腫瘍単独接種群, BCG-腫瘍混合接種群の間で有為の差 (Chi-square analysis 0.01 < P < 0.05) が認められ, BCG-腫瘍混合接種群の cytotoxicity は腫瘍単独接

表 1. BCG 加 MC4 (10⁷コ)皮下接種の局所リンパ節と脾の cytotoxicity に及ぼす影響

days after injection	inoculation *	cytotoxicity (CRA)			total case	valuation	cytotoxicity by CRA (%) (median)		
		0-5%	5-20%	20% <					
lymphnode	5	A	7	5	4	16	NS	8.9	
		B	3	7	6	16		15.8	
	7	A	10	6	3	19	NS	3.4	
		B	6	9	2	17		8.4	
	10	A	7	10	1	18	NS	15.4	
		B	11	4	2	17		2.4	
	12	A	2	3	1	6	NS	8.8	
		B	5	1	0	6		2.9	
	spleen	5	A	6	4	6	16	NS	10.5
			B	4	9	4	17		14.5
		7	A	9	5	5	19	S	7.2
			B	2	12	5	19		16.7
10		A	0	9	9	18	S	19.5	
		B	4	10	3	17		7.8	
12		A	0	0	6	6		46.8	
		B	0	5	1	6		8.7	
15		A	4	10	0	14	PS	8.3	
		B	9	2	0	11		3.0	

* A----- tumor only , B-----tumor-BCG mixture

表 2. BCG 加 MC4 (10⁶コ)皮下接種の局所リンパ節と脾の cytotoxicity^a に及ぼす影響.

days after immunization	lymph node cells		spleen cells	
	MC4 only	MC4 with BCG	MC4 only	MC4 with BCG
5	3/8 ^b (10.3%) ^c	0/5 (2.1)	2/6 (7.9)	1/5 (3.6)
7	1/3 (13.0)	0/3 (2.6)	1/3 (12.2)	1/3 (6.0)
9	2/3 (10.4)	0/3 (1.6)	3/6 (5.7)	1/6 (1.2)
12	0/1	0/1	2/3 (13.7)	0/2
	6/15	0/12	8/18	3/16

a. cytotoxicity は CRA により測定

b. cytotoxicity 陽性を示す個体の率

c. cytotoxicity の平均値

種群に較べて7日目には強く、10日ないし15日目では逆に弱く、前述の median 値の推移を裏付けるものであった。

2. BCG 加 MC4 (10⁶個)皮下接種の局所リンパ節細胞と脾細胞の cytotoxicity に及ぼす影響。

ここでは感作に用いる腫瘍細胞 MC4 を1/10の10⁶個に減じて BCG 混合接種の影響について検討を加えた。

表2は cytotoxicity の平均値と反応陽性を示す個体の割合を経的に示した。腫瘍と BCG 2mg の混

合接種はリンパ節、脾いずれにおいても反応を著しく弱めている。

3. MC4 (10⁷個)皮下接種後の局所リンパ節と脾細胞の cytotoxicity に及ぼす BCG 前感作の影響。

あらかじめ BCG 2mg を BALB/c 背部皮内に接種し、2週後 BCG 接種近傍に MC4 (10⁷個)を移植、その後の局所リンパ節の反応を経的に観察した。(表3)。

各個体の specific lysis のバラツキは大きく、厳密な比較は困難だが、BCG 前感作群では cytotoxicity

表3. 同種腫瘍感作マウスの局所リンパ節細胞の cytotoxicity に及ぼす BCG 前感作の影響

days after tumor inoculation	preimmunization (2 week before)	harvest of lymph node cells	cytotoxicity by CRA (%)	incidence of negative cytotoxicity
7	BCG 2mg	2153 ± 1041	11.0 ± 6.9	2/5
		3053 ± 539	12.6 ± 2.6	0/5
9	BCG 2mg	1305 ± 518	8.6 ± 7.8	2/5
		2413 ± 468	12.9 ± 6.1	0/5
14	BCG 2mg	1344 ± 424	1.5 ± 0.4	5/5
		2732 ± 1504	2.5 ± 2.4	4/5

表4. 同種腫瘍の増殖促進の発生頻度に及ぼす BCG 混合接種の影響

		Incidence *		
		Number of cells injected		
		10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵
BALB/c	Tumor alone	10/23	3/3	2/2
	Tumor-BCG mixture	0/12	0/3	0/3
A/St	Tumor alone	10/10		
	Tumor-BCG mixture	0/6		
	Tumor-BCG separate site	4/4		

* BALB/c 14日目の硬結が50mm²以上を示す個体の頻度
A/St 25日目の硬結が50mm²以上を示す個体の頻度

表5 a. BCG 感作マウスのリンパ節、脾細胞の非特異的 cytotoxicity

	cytotoxicity	
	5 days	7 days
lymph node	-0.5%	-0.2%
spleen	-0.3%	-3.3%

b. BCG 感作マウスの腹腔細胞の非特異的 cytotoxicity

	cytotoxicity	
	7 days	12 days
BCG 2mg s.c.	4.8%	-1.0%
BCG 2mg s.c. + i.p.	11.6%	19.1%
BCG 2mg i.p.	11.2%	15.5%

BCG 2mg をマウスの腹腔 (i.p.), 皮下 (S.C.)あるいはその両方に接種した後、7日目、12日目の腹腔細胞をエフェクターとする。

標的細胞 1×10^4 に対し腹腔細胞 50×10^4 を加え 18 時間培養、標的細胞より放出された ⁵¹Cr をカウント。

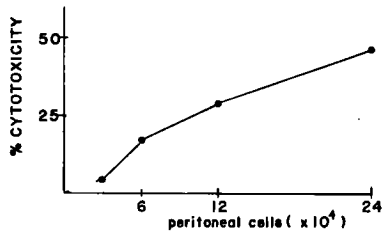


図 2. a.

一定数の感作リンパ球(12.5×10⁶/穴)の cytotoxicity に及ぼす各種濃度の正常腹腔細胞の影響

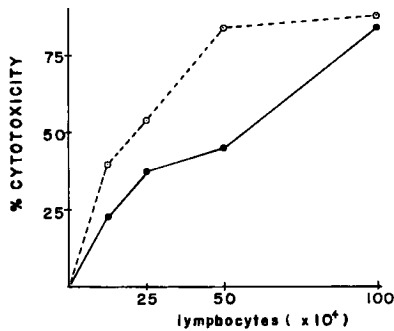


図 2. b.

各種濃度の感作リンパ球の cytotoxicity に及ぼす一定数の正常腹腔細胞(6×10⁶/穴)の影響

- リンパ球単独
- リンパ球+腹腔細胞

city 陰性の個体は少なく、リンパ節の腫大は著しく細胞収獲量は大きいので、反応は増強されたものと考え。

これまでの実験を小括すると、MC4(10⁷個)感作に対する BALB/c の cytotoxicity の推移は、BCG

混合投与の場合、5日ないし7日で小さなピークに達し、その後はすみやかに消退する。これに対し腫瘍単独投与ではこれより遅れて10日ないし12日に大きなピークに達する。従って BCG は lymphocyte mediated cytotoxicity の推移を促進させる働きがあるといえるが、10日ないし15日の反応経過後半に注目すると、腫瘍単独投与に較べて活性はきわだって微弱になっている。さらに BCG-MC4(10⁶個)感作の条件では、全経過にわたって反応は弱く、このように BCG 混合投与によって cytotoxicity 活性そのものは増強されるどころかむしろ減弱している。

しかし in vivo で MC4 の発育を見ると、腫瘍単独投与群では BALB/c で 40%、A/St で 100% が enhancement されるに対し、BCG 混合投与群ではいずれも完全に抑制される。(表 4)。

腫瘍と BCG をそれぞれ別の場所に接種したのではこのような効果は認められないので、BCG 混合接種の場合、リンパ球の活性の弱さを補う他の effector の局在を考えなければならない。

4. BCG による非特異免疫。

BCG 2mg を BALB/c 背部皮下に接種した後、5日目、7日目の腋窩リンパ節、脾の cytotoxicity を CRA で検討したが、何ら活性は認められなかった。(表 5 a)。

次に BCG 2mg を背部皮下あるいは、腹腔に投与した場合、腹腔内投与に限って腹腔細胞に cytotoxicity を認めた。(表 5 b)。

5. 感作リンパ球によるマクロファージの活性化。同種腫瘍によって感作されたリンパ球と正常マクロファージ。

MC4 (2×10⁷個)を BALB/c の背部皮下に接種、

表 6. 同系腫瘍感作マウスの局所リンパ節細胞の cytotoxicity に及ぼすマクロファージの影響

sensitization		harvest of lymph node cells 6 days after	effector cells		
1 week before	0 day		nontreatment cells	nonadherent cells	nonadherent cells + normal peritoneal cells
MC2 10 ⁶	MC2 10 ⁶	1480 × 10 ⁴		5.4 %	
BCG 4mg	MC2 10 ⁶	1056 × 10 ⁴	-28.0 %	-14.0 %	
BCG 4mg	MC2 10 ⁶	3136 × 10 ⁴	26.0 %	8.0 %	43.0 %
BCG 4mg + MC2 10 ⁶	MC2 10 ⁶	2272 × 10 ⁴		4.0 %	

cytotoxicity の測定には CPLA を用いる。

標的細胞 1×10⁴コ、リンパ球 50×10⁴コ、48 時間培養。

7日目の局所リンパ節細胞の cytotoxicity におよぼす正常マクロファージの影響をみたものが図2である。リンパ球を加える前にあらかじめ BALB/c の正常腹腔細胞を加え数時間インキュベート、マクロファージが付着したところで洗浄、non-adherent cell を排除した後リンパ球を加える。cytotoxicity は CPLA で測定、

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{CPM}(\text{sensitized lymphocytes} + \text{normal peritoneal cells})}{\text{CPM}(\text{control lymphocytes} + \text{normal peritoneal cells})} \times 100$$

で示す。

リンパ球数を 12.5×10^4 /well に一定し、正常マクロファージとして腹腔細胞を 3×10^4 /well から 24×10^4 /well に増加させると、これに伴って cytotoxicity は著しく増加する(図2. a.)。

また一定数の正常腹腔細胞 6×10^4 /well にリンパ球を $12.5 \sim 100 \times 10^4$ /well 加えた場合、感作リンパ球数が $12.5 \sim 50 \times 10^4$ までの間で活性の増強が認められた。

6. 感作リンパ球によるマクロファージの活性化。同系腫瘍によって感作されたリンパ球と正常マクロファージ。

CBA 内来 MC2 を 10^6 個 CBA 背部皮内に接種、一週後の腋窩リンパ節より感作リンパ球を得た。この際 CBA をあらかじめ一週前に MC2 (10^6 個), BCG 4mg, MC2 (10^6 個)+BCG 4mg で前感作した3群のリンパ球を比較した結果、BCG 4mg で前感作したものに微力ながら有為の cytotoxicity を検出した。そこでこの実験系に CBA の正常腹腔細胞 3×10^4 /well を加えたところかなり強い cytotoxicity を認めた。(表6)

BCG 前感作によって誘導された微弱な免疫はマクロファージを加えることにより強い効果を発揮することになる。

考 察

マウスやモルモットの皮内に生着した腫瘍のなかに BCG を接種すると、この腫瘍はやがて退縮に向い、その後の特異的な免疫が成立する。⁴⁾ 腫瘍細胞と BCG の混合接種もまたモルモットでは同様の結果が得られる。ところが Bartlett ら⁹⁾ は、ある程度の免疫原性を有するマウスの腫瘍を用いた実験で、腫瘍細胞と BCG の混合接種により腫瘍の生着が抑えられるにもかかわらず、腫瘍の再移植に対して示される免疫は、始め腫瘍単独で接種されその後切除を

受けた場合に比し弱くなると報告している。

さてこのような in vivo の実験に対し、東ら¹¹⁾ は細胞性免疫の発現に対する BCG-CWS のアジュバント活性を in vitro で検討している。それによると C57 BL/6J マウスの腹腔内に mastocytoma P815-X2 細胞 (1×10^4) を鉱物油処理 BCG-CWS (100 μ g) とともに投与する事により、P815-X2 に対する cell mediated cytotoxic effector cell の産生の増強が認められた。

今回の我々の実験においても同様に cell mediated cytotoxicity の発現に対する BCG の影響が検討されたわけだが、方法的には感作経路が皮下で、移植抗原差も大きく、⁵¹Cr release assay に用いる標的細胞の感度が弱いといった諸点で東らの実験とは異った条件で行われたものである。また使用された BCG の量は 2mg で、この量は Hepatoma 134 の腫瘍内注入により抗腫瘍性を発揮することが認められている。⁹⁾

その結果は MC4 (10^7 個) という大量の感作の場合、BCG の混合は cytotoxicity の立ち上がりを早め、その経日的推移を促進させるが、活性のピークは低く、移植後 10 日以後の反応もきわだって微弱になっており、殊に脾臓に於いてこの傾向が著しい。MC4 (10^6 個) の条件では、BCG の混合により反応は移植後の全経過にわたって微弱で、このように腫瘍と BCG の混合投与はリンパ球の cytotoxicity そのものを増強するどころか、むしろ減弱させている。この事は東らの報告とは相反し、前述の Bartlett らの観察を裏付けるものである。

しかし in vivo で見る限り BCG 混合接種によって MC4 は確実に生着を阻止されている。BCG が腫瘍細胞に対して直接傷害するものでないことは既に幾つかの報告で確認されているので、この弱い cell mediated cytotoxicity を補うリンパ球以外の effector を考えなければならない。

さて我々の実験によると BCG の皮下接種ではリンパ節、脾、腹腔の各細胞のいずれにも cytotoxicity は認められないが、BCG を腹腔内投与すると腹腔細胞中に CRA で検出される cytotoxic activity を認めた。Melzer ら¹²⁾ によるとこのような活性の所在は腹腔細胞中のマクロファージにある。この cytotoxicity には、CRA で検出される cytolysis に加えて DNA 合成阻害で示される cytostasis¹³⁾ の二つの機構がある事が知られている。このような BCG によるマクロファージの活性化はヌードマウスにお

いても見られ、T cellの機能の関与なしに発現する。¹⁴⁾ またマクロファージはエンドトキシンの成分である lipid A や細菌の細胞壁の成分である peptidoglycan によって in vitro でリンパ球の関与なしに活性化される。¹⁵⁾

一方マクロファージの活性化は腫瘍に対して感作されたリンパ球によっても惹起される。我々の実験では同種腫瘍細胞に感作されたリンパ球に正常腹腔細胞を加えると cytotoxicity (CPLA) は増強され、さらに感作リンパ球として同系腫瘍を用いた場合にも同様の効果を認めた。同じ事は Zembala ら¹⁶⁾ によって polyoma virus induced tumor で観察されている。それによると活性は主として specific なものであるが、non-specific な活性も軽度含まれる。

以上の諸点から、BCG によって接種局所に多数集積したマクロファージは、感作リンパ球によって活性化されたり、BCG によって直接活性化されて抗腫瘍性を発揮する。腫瘍と BCG の混合接種は、まず免疫応答をはやめて腫瘍細胞集団が小規模のうちに処理を開始し、また多量のマクロファージを局所に動員してこれを活性化し、リンパ球の cytotoxicity の一部を肩代わりさせる。これらの働きによって感作リンパ球の cytotoxicity そのものは結果的に小規

模のものになると推定される。

ま と め

BCG が細胞性免疫に与える影響を同種腫瘍移植に対する BALB/c の cellular cytotoxicity を用いて検討した。

この腫瘍細胞は CBA 内来のもので、BALB/c, A/St に接種されると高率に enbancement されるが、BCG と混合接種されると例外なく拒絶される。

腫瘍移植後の局所リンパ節、脾の cytotoxicity の推移をみると、BCG—腫瘍混合接種は感作後 5～7 日目の活性を強めるが、10～12 日ではむしろ活性を著しく弱め、全経過として活性の発達と消退を促進している。この cytotoxicity の経過の中でピークをなす活性の値を比較すると BCG 混合接種の方が弱い。

この弱いリンパ球の活性が腫瘍局所で有効に働く機構を検討した。その一つとして、感作リンパ球に正常腹腔細胞を加えると cytotoxicity が強められる事を示した。

稿を終るにのぞみ御指導、御校閲を賜った田中教授、折田助教授に深甚の謝意を表す。

参 考 文 献

- 1) Morton, D. L., Eilber, F. R., Malmgren, R. A. and Wood, W. C.: Immunological factor which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. *Surgery*, **68**, 158, 1970.
- 2) Old, L. J., Benacerraf, B., Clarke, D. A., Carswell, E. A. and Stockert, E.: The role of the reticuloendothelial system in the host reaction to neoplasia. *Cancer Res.*, **21**, 1281, 1961.
- 3) Weiss, D. N., Bonhag, R. S. and DeOme, K. B.: Protective activity of fractions of tubercle bacilli against isologous tumours in mice. *Nature*, **190**, 889, 1961.
- 4) Zbar, B. and Tanaka, T.: Immunotherapy of cancer: Regression of tumors after intralesional injection of living *Mycobacterium bovis*. *Science*, **172**, 271, 1971.
- 5) Weiss, D. N., Bonhag, R. S. and Leslie, P.: Studies on the heterologous immunogenicity of a methanolinsoluble fraction of attenuated Tubercle Bacilli (BCG). 2. Protection against tumor isograft. *J. Exp. Med.*, **124**, 1039, 1966.
- 6) Piessens, W. F., Lachapelle, F. L., Legros, N., Heuson, J. C.: Facilitation of rat mammary tumor growth by BCG. *Nature*, **228**, 1210, 1970.
- 7) Zbar, B., Bernstein, I. D., Bartlett, G. L.: Immunotherapy of cancer: Regression of intradermal tumors and prevention of growth of lymph node metastases after intralesional injection of living *Mycobacterium bovis*. *J. Natl. Cancer Inst.*, **49**, 119, 1972.
- 8) Bartlett, G. L., Zbar, B. and Rapp, H. J.: Suppression of murine tumor growth by immune reaction to the Bacillus-Guérin strain of *Mycobacterium bovis*. *J. Natl. Cancer Inst.*, **48**,

245, 1972.

- 9) 林 茂夫, 湯村正仁, 岡田 剛, 折田薫三, 田中早苗: 腫瘍免疫療法のマクロファージ遊走阻止活性に及ぼす影響. 医学のあゆみ, **89**, 528, 1974.
- 10) Harris, R. and Ukaejifo, E. O.: Rapid preparation of lymphocytes for tissue-typing. *Lancet*, **2**, 327, 1969.
- 11) 東 市郎, 谷山忠義, 杉村和久, 山村雄一: Mycobacteria 細胞壁のアジュバント活性. 第四回日本免疫学会総会記録, **204**, 1974.
- 12) Meltzer, M. S., Tucker, R. W., Sanford, K. K. and Leonard, E. J.: Interaction of BCG-activated macrophages with neoplastic and nonneoplastic cell lines in vitro: Quantitation of the cytotoxic reaction by release of tritiated thymidine from prelabeled target cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**, 1177, 1975.
- 13) Germain, R. N., Williams, R. M. and Benacerraf, B.: Specific and nonspecific antitumor immunity. 2. Macrophage-mediated nonspecific effector activity induced by BCG and similar agents. *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**, 709, 1975.
- 14) 徳永 徹, 山本三郎, 水口康雄: ヌードマウスに於ける腫瘍抵抗性の試み. 第五回日本免疫学会総会記録, **252**, 1975.
- 15) Evans, R. and Alexander, P.: Mechanisms of extracellular killing of nucleated mammalian cells by macrophages. *Immunobiology of the macrophage* (D. S. Nelson, eds), 585-576. Academic Press, Inc., 1976.
- 16) Zembala, M., Ptak, W. and Hanczakowska, M.: The role of macrophages in the cytotoxic killing of tumour cells in vitro. 1. Primary immunization of lymphocytes in vitro for target cell killing and the mechanism of lymphocyte-macrophage cooperation. *Immunology*, **25**, 631, 1973.

**Effect of tumor-BCG mixture to the cellular cytotoxicity
against tumor allograft**

By

Noriaki TANAKA

Department of Surgery, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Sanae Tanaka)

The effects of tumor-BCG mixture to the cellular cytotoxicity of the regional lymph node and the spleen were observed in BALB/c mice received allogeneic tumor cells.

This tumor cells, when grafted subcutaneously, were normally enhanced in 40% of BALB/c mice and 100% of A/St mice, but failed to grow when injected as a mixture with tumor and BCG.

By injection of tumor-BCG mixture, the development and decline of the cytotoxicity (^{51}Cr release assay) to the tumor cells was accelerated, but the magnitude of the peak activity was diminished.

Possible mechanisms by which the decreased activity induced of complete tumor suppression were examined. The result showed that immunized lymphocytes with non-immune macrophages exhibited a significantly increased cytotoxicity as compared with immunized lymphocytes in the absence of macrophages.