

エールリッヒ担癌マウスの延命に 及ぼす BCG および摘脾の効果

岡山大学医学部第一外科学教室（主任：折田薫三教授）

橋 本 雅 明

（昭和54年2月19日受稿）

Key words: BCG, 摘脾, エールリッヒ癌,
DDS マウス

はじめに

癌に対する免疫反応には、液性抗体、細胞性免疫など様々な機構が考えられ、生体内において腫瘍を排除する機構としては、細胞性免疫が主体をなすものと考えられている¹⁾。

in vitro の cytotoxicity test によると担癌動物には自家腫瘍に対する免疫リンパ球が存在し²⁾³⁾、しかも退縮型の腫瘍の場合だけでなく、進行型の腫瘍の場合でも殺腫瘍性のリンパ球が見出されている⁴⁾。担癌動物では、この殺腫瘍性を有する免疫リンパ球の働きが抑制されているものと考えられているが、その機構として大きく二つのものが知られている。その一つは、細胞性免疫を非特異的に抑制する因子⁵⁾と、今一つは、特異的に抑制する因子である、後者には blocking factor（阻止因子⁶⁾）と Suppressor-Tcell⁷⁾ の二つがある。阻止因子は可溶性の癌抗原と抗体（IgG）の複合物⁸⁾で、Suppressor-Tcell は殺腫瘍性 T 細胞と同一の T 細胞の subset に属しマウスでは脾中に存在し⁹⁾、いずれも in vitro では Killer cell の働きを阻害し⁸⁾⁹⁾、in vivo では tumor の発育を促進する⁷⁾¹⁰⁾。

もしもこのような特異的阻害因子を除くことができるならば細胞性免疫が十分に働き、癌の再発、転移に有効であると考えられる。

さて腫瘍接種に先立って摘脾を行えば、非摘脾群に比し腫瘍の生着増殖が抑制されるという報告が見られるか¹¹⁾¹²⁾¹³⁾、脾は blocking factor の構成要素である IgG の有力な産生場所であり、また Suppressor-Tcell の存在も示されていることから、摘脾は阻害因子の排除に関し、効果的な処置であると考えられる。

さて Mathé¹⁴⁾ や Morton¹⁵⁾ らの BCG による白血病やメラノームに対する免疫療法以来、BCG が腫瘍の免疫療法の代表として広く用いられる一方、Zbar ら¹⁶⁾¹⁷⁾ の研究により BCG の作用機序も次第に明らかにされて、BCG 生菌を主体とした免疫賦活剤を用いての非特異的免疫療法が現実的なものとなっている¹⁸⁾。

しかしながら BCG は腫瘍の発育を抑制もするが、又時としてその発育を促進する場合があることも報告されている¹⁹⁾²⁰⁾。また腫瘍と BCG の混合接種は必ずしも腫瘍に対する細胞性免疫を強化するとは限らない²¹⁾²²⁾。事実 BCG は T-細胞²³⁾ 大食細胞の活性化²⁴⁾ の他に B-細胞を賦活²⁵⁾ することが知られている。B-細胞の賦活は場合によっては、阻止因子の増強につながると考えられる。

そこで BCG 療法時に摘脾を行うことは、抗腫瘍効果を増強し、かつ腫瘍の enhancement の危険を除くものと期待される。本論文ではこの点に関して検討を加え、両者間に相乗的抗腫瘍効果のあることを見たので報告する。

実験材料と方法

動物：雌の DDS マウスを藤井医化学試験動物繁殖場より購入。

生後2ないし3ヶ月で使用。

腫瘍：岡山大学癌源病理部門で継代維持されている、エールリッヒ腹水癌細胞を、DDS マウスに腹腔継代して用いた。継代5～7日目の腹水を採取し、PBS（Phosphate Buffer Solution）で2回遠心洗浄した後、使用に供した。

BCG: 日本ビーシージー株式会社製の凍結乾燥菌体を生理食塩水に浮遊させて用いた。

BCG-CWS²⁹⁾: 大阪大学第三内科山村教授より提供を受けたBCG-CWS 1mgをテフロンホモゲナイザーに入れ、Drakeol 6-VR(三光純薬株式会社)を1~2滴入れホモジネートした後、ツイン80(石津製薬株式会社)を0.35ml加え、再びホモジネートし、これに生食水0.65mlを加え、60℃に保った状態で使用した。

摘脾: ネンプタル筋注麻酔後に左側腹部に小切開を加え、脾門を結紮して摘脾する。

腫瘍の計測: 背部皮下に発育した腫瘍の長径と短径を測定し、(長径+短径)×1/2を腫瘍の大きさとして示した。

マウス血清の調整: エールリッヒ癌 100×10^4 個をDDSマウス背部皮下に接種。2ヶ月後、担癌状態で生存しているマウスをエーテル麻酔下に開胸、心臓を直接穿刺して採血、血清を分離。

非働化したのち、使用に供した。

実 験 計 画

実験1: BCG および BCG-CWSの腫瘍内接種の影響
DDS マウス背部皮下に、エールリッヒ癌 100×10^4 個/0.1mlを移植。6日後腫瘍径が4~5mmに成長したところで、マウスを3群に分け、それぞれ BCG 4mg/0.1ml, CWS400 γ /0.1ml, 生食0.1mlを腫瘍内に接種。7日後腫瘍径が約1.5cmに発達したところで、これを切除。以後経日的にマウスの生存率を計測した。

実験2: BCG 前感作と BCG 及びBCG-CWSの腫瘍内接種の影響

あらかじめ3週間前に BCG 4mgを背部皮下に接種。その後は3群に分けて実験1と同様の処置を施し、各群の生存率を計測した。

実験3: BCGの腫瘍内接種および摘脾の腫瘍再移植(人為的転移腫瘍)に及ぼす影響(表1)

表1. BCGの腫瘍内接種および摘脾の腫瘍再移植に及ぼす影響

実 験 操 作						結 果				
月 日	5/20	5/25	5/29	5/29	6/1	6/15	7/8	8/5	9/9	
初回移植	0	5	9	9	12	26	49	77	112	
再移植					0	14	37	65	100	
処 置	エールリッヒ癌移植(後肢) 100×10^4 コ	BCG 4mg	後肢切断 (腫瘍除去)	摘脾	エールリッヒ癌再移植	腫瘍 * 生着率	生 存 率			
A	+	+	+	+	200×10^4	3/6	6/6	4/6	4/6	2/6
A'	+	+	+	+	50×10^4	3/5	5/5	5/5	4/5	4/5
B	+		+	+	200×10^4	4/4	4/6	3/6	0/6	0/6
B'	+		+	+	50×10^4	2/3	3/4	3/4	3/4	1/4
C	+	+	+		200×10^4	2/5	5/6	3/6	1/6	1/6
C'	+	+	+		50×10^4	2/5	5/5	4/5	2/5	2/5
D	+		+		200×10^4	3/7	7/7	3/7	3/7	0/7
D'	+		+		50×10^4	4/6	6/6	4/6	1/6	0/6
E	+				200×10^4	5/6	6/7	1/7	0/7	0/7
E'	+				50×10^4	3/5	5/5	2/5	1/5	0/5

* 腫瘍生着率: 再移植後14日目の 腫瘍生着匹数/生存匹数

A(A')群: 一侧の後肢にエールリッヒ癌 100×10^4 個移植。5日目腫瘍内 BCG 4mg接種, 9日目に後肢切断と摘脾, 引きつづき, 12日目背部皮下にエールリッヒ癌再移植(人為的転移)

B(B')群: 一侧の後肢にエールリッヒ癌移植後肢切断と摘脾, 引きつづき背部皮下にエールリッヒ癌再移植。

C(C')群: 一侧の後肢にエールリッヒ癌移植, 腫瘍内 BCG 接種, 後肢切断, 引きつづき背部皮下にエールリッヒ癌再移植。

D(D')群: 一侧の後肢にエールリッヒ癌移植, 後肢切断, 引きつづき背部皮下にエールリッヒ癌再移植。

E(E')群: 一侧の後肢にエールリッヒ癌移植,

さらに背部皮下に再移植。
A~E 群には再移植を 200×10^4 個, A'~E' 群には再移植を 50×10^4 個行う。D(D'), E(E') 群は対照群である。以上 5 群につきエールリッヒ癌再移植 (人為的

転移) の生着率と担癌マウスの生存日数を計測した。
実験 4: 進行癌マウス血清添加エールリッヒ癌細胞移植に及ぼす BCG 前感作および摘脾の影響 (表 2)

表 2. 進行癌マウス血清添加エールリッヒ癌細胞移植に及ぼす BCG 前感作及び摘脾の影響

実 験 操 作						結 果				
月 日	7/16	7/22	8/26	8/31	9/3	9/17	10/14	11/12	12/10	
初回移植	-41	-35	0	5	8	22	49	78	106	
再移植					0	14	41	70	98	
処 置	BCG 4 mg	摘脾	エールリッヒ癌 移植(後肢) 100×10^4 個	後肢切断 (腫瘍除去)	エールリッヒ癌再移植 50×10^4 個 血清添加腫瘍	腫瘍 * 生着率	生 存 率			
A	+	+	+	+	+	7/8	8/8	6/8	5/8	3/8
A'	+	+	+	+	+	5/7	7/7	6/7	4/7	4/7
B	+		+	+	+	5/9	9/11	8/11	7/11	4/11
B'	+		+	+	+	8/10	10/10	7/10	1/10	0/10
C		+	+	+	+	6/8	8/8	4/8	3/8	2/8
C'		+	+	+	+	5/9	9/9	5/9	3/9	2/9
D			+	+	+	3/7	7/7	5/7	4/7	2/7
D'			+	+	+	5/7	7/7	3/7	3/7	0/7

* 腫瘍生着率: 再移植後 14 日目の腫瘍生着匹数/生存匹数

A 群: 移植前 BCG 接種 (41 日前), 摘脾 (35 日前) を行い, エールリッヒ癌 100×10^4 個を一側後肢に移植。5 日目後肢切断, 8 日目に腫瘍を背部皮下に再移植したもの。担癌マウス血清添加したものを再移植したのが A' 群。

B 群: 移植前 BCG 接種, エールリッヒ癌移植, 後肢切断, 腫瘍を背部皮下に再移植したもの。担癌マウス血清添加したものを再移植したのが B' 群。

C 群: 移植前摘脾, エールリッヒ癌移植, 後肢切断, 腫瘍を背部皮下に再移植したもの。担癌マウス血清添加したものを再移植したのが C' 群。

D 群: BCG も摘脾も行なう事なく, エールリッヒ癌移植, 後肢切断, 腫瘍を背部皮下に再移植したもの。担癌マウス血清添加したものを再移植したのが D' 群。

以上につき, 再移植したエールリッヒ癌の生着率と担癌マウスの生存日数を計測した。

実 験 結 果

実験 1: BCG および BCG-CWS の腫瘍内接種の影響 (図 1)

生食水, BCG, BCG-CWS の腫瘍内接種群の生存率は, 腫瘍切除後 30 日目で 6/15 (40%), 7/15 (46.7%), 9/15 (60%), 60 日目で 3/15 (20%), 4/15 (26.7%), 6/15 (40%) となり, BCG-CWS 群において延命効果が著明であった。

実験 2: BCG 前感作と BCG および BCG-CWS の腫瘍内接種の影響 (図 2)

BCG 前感作は生存率に良好な影響を与え, 実験 1 における腫瘍切除後 30 日目の全体の生存率が 48.9% であるのに対し, 実験 2 のそれは 71.1% となっている。しかし対照群に比し BCG あるいは BCG-CWS を腫瘍内に接種した群の生存率は低く, それぞれの腫瘍切除後 30 日目の生存率は, 14/15 (93.3%), 10/15 (66.7%), 8/15 (53.3%) となっており, 実験 1 と, ちょうど逆の結果を示している。

実験 3: BCG の腫瘍内接種および摘脾の腫瘍再移植に及ぼす影響 (図 3)

再移植された腫瘍の接種後 14 日目の生着増殖の頻度を見ると, 表 1 のごとく, 再接種癌細胞数に関係なく摘脾群の (B: 4/4, B': 2/3) が最も高く, BCG 接種群の (C: 2/5, C': 2/5) が最も低くなっている。摘脾と BCG 接種合併群では (A: 3/6, A': 3/5)

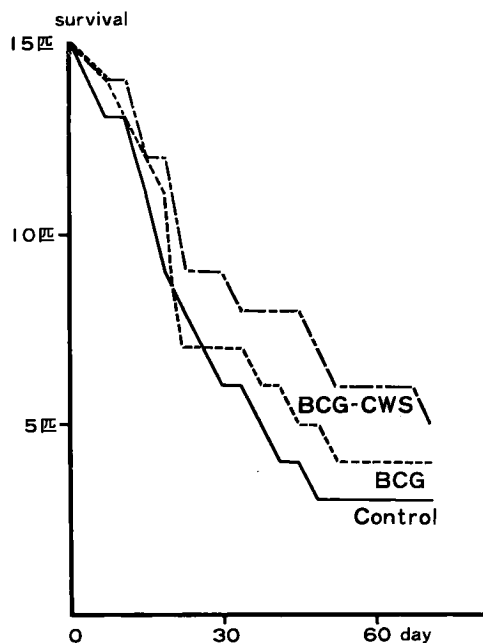


図1. BCG および BCG-CWS の腫瘍内接種の影響

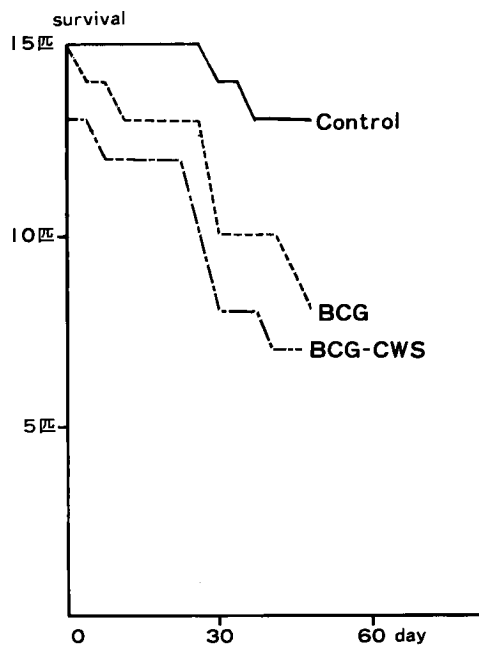


図2. BCG前感作と BCG および BCG-CWS の腫瘍内接種の影響

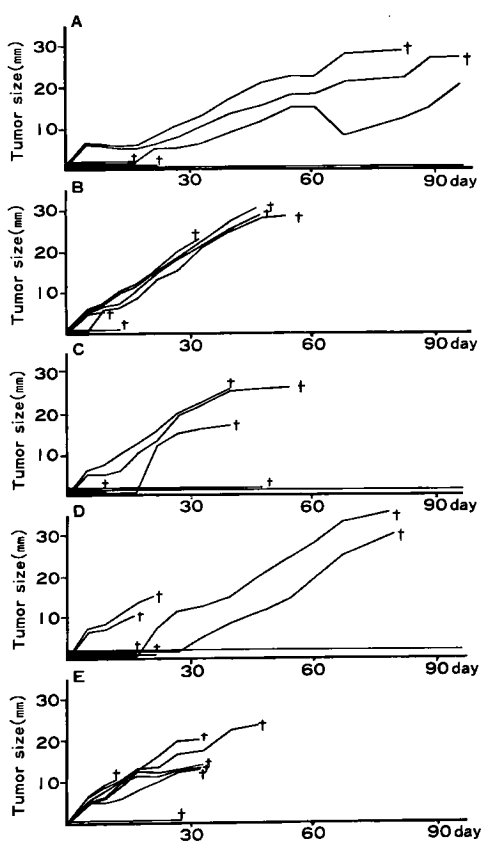
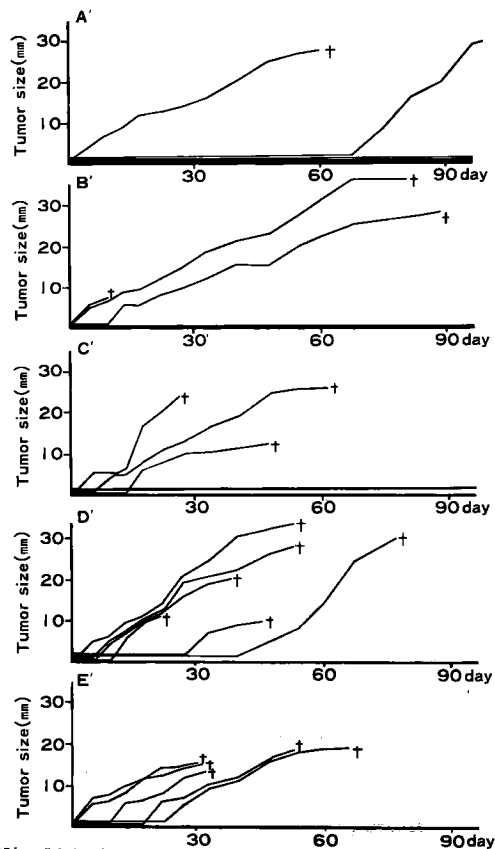
(腫瘍再移植 200×10^4 個)(腫瘍再移植 50×10^4 個)

図3. BCG の腫瘍内接種および摘脾の腫瘍再移植に及ぼす影響

となっており、BCG 接種の関与している群において、腫瘍再移植の生着率が低くなっている事を示している。ついで腫瘍再移植後2~3ヶ月後の生存数を見ると、AA'が一番多く、次いで CC'群、BB'群、DD'群、EE'群の順になっており、摘脾と BCG 接種の併用群生存数が一番多く、BCG の生着を押さえる作用

と、さらに摘脾の合併による延命効果を示している。

以上、AA', BB', CC', DD', EE' 5 群の結果を一覧表にしたものが表1である。

実験4：進行癌マウス血清添加エールリッヒ癌細胞移植に及ぼす BCG 前感作及び摘脾の影響 (図4)

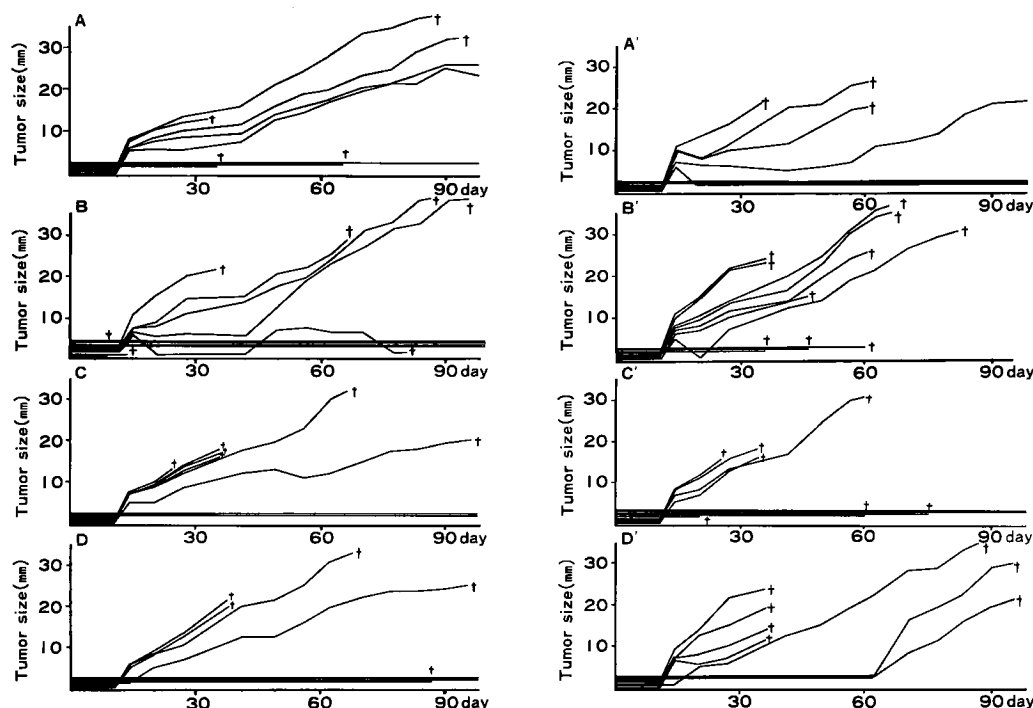


図4. 進行癌マウス血清添加エールリッヒ癌細胞移植に及ぼす BCG 前感作及び摘脾の影響

(腫瘍単独再移植 50×10^4 個)

(担癌マウス血清添加腫瘍再移植 50×10^4 個)

腫瘍単独再接種した各群と担癌マウス血清加腫瘍再接種各群とを比較すれば、摘脾の行なわれていない BCG 前感作群 (B, B') と対照群 (D, D') とにおいて著明な差が認められ、担癌マウス血清加再接種 B', D' 群では、いずれも98日目の生存数は0となり、担癌マウス血清加腫瘍再接種において摘脾の有無に大きな差を示した。単独腫瘍再接種の各群 (A~D) において、再接種後98日目の生存数を検討すると、A 群が 3/8 (37.5%)、B 群が 4/11 (36.3%)、C 群が 2/8 (25%)、D 群が 2/7 (28.6%)、となり、A 群及び B 群に高い生存数を認めており、BCG の前感作による抗腫瘍効果を見ている。担癌マウス血清処理再接種群 (A'~D') において、生存数を検討

すると、再接種後98日目まで生存したのは、摘脾の行なわれている A' 群と C' 群の両群のみであり、さらに A' 群は、はるかに C' 群よりは生存数が高く、BCG 前感作+摘脾の抗腫瘍効果がすぐれている事を示している。

以上、AA', BB', CC', DD', 4 群の結果を一覧表にしたものが表2である。

考 察

BCG の腫瘍免疫に及ぼす影響については、抗腫瘍性に働く場合と、逆に腫瘍の発育促進に働く場合とが知られている。BCG は単に、T-細胞のみを刺激するのではなく、マクロファージや、B-細胞にも影響を与え、腫瘍の抗原性、BCG の性状あるいは投

与条件によっては腫瘍の enhancement を誘発する危険を有しており、この危険をいかにして回避するかが免疫療法の一つの課題と考えられる。

さて、羊赤血球に対する遅延性過敏症 (DTH) に関する Mackaness らの研究によると、cyclophosphamide は抗体産性を選択的に抑制して DTH を強め、BCG との間に相乗効果のあることが認められている²⁷⁾²⁸⁾。そこで今回著者はこの cyclophosphamide のかわりに、抗体産生の主要な臓器である脾を摘出して、BCG 投与による延命効果に相乗的に働くか否か、同種腫瘍免疫系を用いて検討した。

実験 1, 2, ではエールリッヒ癌に及ぼす BCG 及び BCG-CWS 接種の影響を、腫瘍切除後のマウスの生存率で検討した。実験 1 において、BCG 腫瘍内投与は生存率にそれほど影響を与えていず、むしろ BCG-CWS においてすぐれていた。腫瘍内投与の場合は生菌である BCG よりも BCG-CWS の方が効果的であることを、示唆している。又実験 2 において BCG 前感作は明らかに全体の生存率を引き上げており、前感作の抗腫瘍効果が認められる。ところが BCG 前感作に続く BCG 及び BCG-CWS 腫瘍内接種は、対照群に比し、生存率を低下せしめる結果をもたらしている。これは以外な結果であるが、BCG あるいは BCG-CWS 再接種が局所のリンパ球巻き込み効果よりも、blocking factor を含む抗体産生に強く働いたものと想定され、実験 2 の場合でも BCG より BCG-CWS の方に強い効果をみている。これらのことより BCG 前感作自体は抗腫瘍効果が著明であるが、BCG あるいは BCG-CWS 再接種はむしろその効果を低下せしめることがわかった。これらの実験では、腫瘍は背部皮下に接種されており、摘除の完全性、手術の安全性に問題があるため、以後の実験では、足蹠接種、下肢切断を用いた。

実験 3 では、エールリッヒ癌を一側の足蹠に移植、その後発育した腫瘍内に BCG を接種。その後、後肢を切断、この時あわせて摘脾を行った。数日後腫瘍を背部皮下に再接種、これを一つの転移とみなし、この転移の成立とその後の腫瘍の発育と宿主の生存状況を観察した。さてこの場合、転移の成立の頻度は、移植腫瘍細胞数にかかわらず、期待に反して BCG 腫瘍内接種、摘脾によって、それほど影響を受けていない。しかし 2~3 ヶ月後の生存率を見ると、BCG 腫瘍内接種+摘脾は明らかに良い結果をもたらしている。この場合摘脾だけでは効果を認めていないので、BCG の効果を摘脾が補完しているものと考え

えたい。即ち BCG は宿主の抗腫瘍免疫能を強化するだけでなく、negative な影響をも与えていて、これが摘脾により排除されたものと考えられる。この場合、BCG の脾に対する働きが B-細胞の blocking antibody の産生を促しているものか、あるいは T-細胞、マクロファージ²⁹⁾を介して Killer T-cell の抑制をもたらしているのか、今回の実験からは不明である。

脾の腫瘍免疫における抑制的役割は次の事実からも推定できる。即ち実験 4 で示したように、人為的な転移として腫瘍を再接種した際、エールリッヒ担癌マウス血清と腫瘍細胞を混合して接種すると生存率は著しく低下するが、あらかじめの摘脾を行なっておけば、この血清の影響は排除される。ここでも摘脾自体には抗腫瘍効果を認めていないので、血清移入による腫瘍死の促進は、移入担癌マウス血清と脾の共同作用によると考えられる。Bansal らは blocking sera によるボリオーマ肉腫の発育促進の機序を検討し、efferent type の enhancement としている¹⁰⁾。これに対し著者の実験では、血清の効果は脾の存在する場合に限って見られるので、脾を介した一種の central enhancement と考えられよう。

ま と め

エールリッヒ癌に及ぼす BCG 接種の影響を腫瘍切除後のマウスの生存率で検討した。BCG 前感作は明らかに生存率を引き上げたが BCG 腫瘍内投与には、それ程の影響が見られず、BCG 前感作に続く、BCG 腫瘍内接種は、むしろ生存率を低下させる結果となった。BCG 腫瘍内投与の効果を引き上げる目的で、腫瘍切除に続いて摘脾を行ない、その効果をマウスの背部皮下に再接種された腫瘍の増殖とマウスの生存日数により検討した。その結果、一定の条件のもとでは、BCG 前感作と、摘脾の間には相乗的な抗腫瘍効果があることを認めた。さらにエールリッヒ担癌マウスの血清には、腫瘍死を促進させる作用があることを認め、摘脾はこのような血清の効果を遮断することを示した。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導いただいた折田薫三教授並びに田中紀章先生に感謝いたします。

文 献

1. Borberg, H., oettgen H.F., Choudry, K. and Beattie, E.J.: Inhibition of established transplants of chemically induced sarcomas in syngeneic mice by lymphocytes from immunized donors. *Int. J. Cancer*, **10**, 539—547, 1972.
2. Hellström I., Hellström K.E. and Pierce, G.E.: *In vitro* studies of immune reactions against autochthonous and syngeneic mouse tumors induced by methylcholanthrene and plastic disc. *Int. J. Cancer*, **3**, 467—482, 1968.
3. Bubenic, J., Perlman, P., Helmstein, K. and Moberger, G.: Immune response to urinary bladder tumors in man. *Int. J. Cancer* **5**, 39—46, 1970.
4. Leclerc, J.C., Gomard, E. and Levy, J.P.: Cell-mediated reaction against tumors induced by oncornavirus. 1. Kinetics and specificity of the immune response in murine sarcoma virus (MSV)-induced tumors and transplanted lymphomas. *Int. J. Cancer* **10**, 589—601, 1972.
5. Plescia, O.J., Smith, A.H. and Grinwich, K.: Subversion of immune system by tumor cells and role of prostaglandins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **72**, 1848—1851, 1975.
6. Hellstrom, I., Sjögren H.O., Warner G.A. and Hellström, K.E.: Blocking of cell-mediated tumor immunity by sera from patients with growing neoplasm. *Int. J. Cancer* **7**, 226—237, 1971.
7. Fujimoto, S., Greene, M. and Schon, A.H.: Immunosuppressor cells in tumor bearing hosts. *Fed. Proc.* **33**, 769, 1974.
8. Sjögren, H.O., Hellström, I., Bansal, S.C. and Hellström, K.E.: Suggestive evidence that the "blocking antibodies" of tumorbearing individuals may be antigen-antibody complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **68**, 1372—1375, 1971.
9. 藤本重義, 松沢建夫, 中川邦夫, 多田富雄: 腫瘍免疫に於ける Suppressor の遺伝子表現と特異性, 日本免疫学会総会記録, 第6巻, 186—187, 1976.
10. Bansal S.C., Hargreaves R. and Sjögren H.O.: Facilitation of polyoma tumor growth in rats by blocking sera and tumor eluate, *Int. J. Cancer* **9**, 97—108, 1972.
11. Möller, E.: Interaction between tumor and host during progressive neoplastic growth in histocompatible recipients. *J. Natl. Cancer Inst.* **35**, 1053—1059, 1965.
12. Ferrer, J.F.: Enhancement of the growth of Sarcoma 180 in splenectomized and shamoperated AKR mice. *Transplantation* **6**, 160—166, 1968.
13. Ferrer J.F. and Mihich, E.: Effect of splenectomy on the regression transplantable tumors. *Cancer Res.* **28**, 1116—1120, 1968.
14. Mathe, G., Amiel, J.L., Schwarzenberg, L., Schneider, M., Cattani, A., Schlumberger, J.R., Hayat, M. and Vassal, F.: Active immunotherapy for acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **1**, 697—699, 1969.
15. Morton, D.L., Eilber, F.R., Malmgren, R.A. and Wood, W.C.: Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. *Surgery* **68**, 158—164, 1970.
16. Zbar, B., Wepsic, H.T., Borsos, T. and Rapp, H.J.: Tumorgraft rejection in syngeneic guinea pigs: Evidence for a two-seep mechanism. *J. Natl. Cancer Inst.* **44**, 473—481, 1970.
17. Zbar, B., Wepsic, H.T., Rapp, H.J., Stewart, L.C. and Borsos, T.: Two-seep mechanism of tumor graft rejection in syngeneic guinea pigs. 11 Initiation of reaction by a cell fraction containing lymphocytes and neutrophils. *J. Natl. Cancer Inst.* **44**, 701—717, 1970.
18. 折田薫三: 癌免疫治療ワクチン "BCG-CWS" について. 医学のあゆみ, **103**, 211—212, 1977.
19. piessens, W.F., Heimann, R., Legros, N. and Heuson, J.C. Effect of Bacillus Calmette-Guerin on mammary tumor formation and cellular immunity in dimethylbenzanthracene treated rats. *Cancer Res.*

- 31, 1061-1065, 1971.
20. Ankerse, J. and Jonsson, N.: Inhibitory effects of BCG on adenovirus tumorigenesis, dependence on administration schedule. *Int. J. Cancer* 10, 351-356, 1972.
21. Bartlett, G.L., Zbar, B. and Rapp, H.J.: Suppression of murine tumor growth by immune reaction to the Bacillus-Guerin strain of Mycobacterium bovis. *J. Natl. Cancer Inst.* 48, 245, 1972.
22. 田中紀章: 同種腫瘍移植における Cellular cytotoxicity に及ぼす BCG-腫瘍混合接種の影響. 岡山医学会雑誌 3, 4, 369-377, 1978.
23. Taniyama, T., Azuma, I. and Yamamura, Y.: Adjuvant activity of mycobacterial fractions. III Adjuvant effect of cell wall of mycobacterium bovis BCG on cell-mediated cytotoxicity in mice. *Jpn. J. Microbiol.* 94, 255-264, 1975.
24. Meltzer, M.S., Tucker, R.N., 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, 1177-1184, 1975.
25. Taniyama, T., Watanabe, T., Azuma, I. and Yamamura, Y.: Adjuvant activity of cell walls of mycobacteria, Nocardia and corynebacteria. *Jpn. J. Microbiol.* 18, 415-426, 1974.
26. I., Azuma, Ribi, E.E., Meyer, T.J. and Zbar, B. Biologically Active Components from Mycobacterial cell walls. 1. Isolation and composition of cell wall skeleton and component P3. *J. Natl. Cancer Inst.* 52, 95-101, 1974.
27. Lagrange, P.H., Mackaness, G.B. and Miller, J.E.: Potentiation of T-cell-mediated immunity by selective suppression of antibody formation with cyclophosphamide. *J. Exp. Med.* 139, 1529-1539, 1974.
28. Mackaness, G.B., Lagrange, P.H. and Ishibashi, T.: The modifying effect of BCG on the immunological induction of T cell. *J. Exp. Med.* 139, 1540-1552, 1974.
29. Orita, K., Konaga, E., Okada T., Kunisada, K., Yumura, M. and Tanaka, S.: Effect of splenectomy in tumor-bearing mice and gastric cancer patients. *Gann* 68, 731-736, 1977.

**Effect of B.C.G. and Splenectomy on survival prolongation
of mice with Ehrlich ascites cancer**

Masaaki HASHIMOTO

First Department of Surgery, Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan

(Director : Prof. K. Orita)

In this report, an effective way of B.C.G. in combination with splenectomy is presented for cancer therapy. Ehrlich ascites cancer was inoculated into the footpads of DDS mice. At the appropriate times of tumor growth, a femur was amputated to remove the primary tumor. After several days, the host was rechallenged with Ehrlich ascites cancer. The challenge was considered as metastasis. For the first experiments, mice were injected with B.C.G. into primary inoculated tumor and also splenectomized at the amputation. The combined therapy of B.C.G. injection and splenectomy prolonged survival, whereas neither B.C.G. injection nor splenectomy alone did not. For the next examination, the influence of B.C.G. presensitization with or without splenectomy on survival was examined. It was confirmed that the combined therapy was useful for the prolongation of survival. Furthermore, when Ehrlich ascites cancer was reinoculated with sera obtained from tumor bearing mice, splenectomy effectively prolonged survival. The data suggest that B.C.G. therapy is effective for host survival, especially when splenectomy is also performed.