

OK-432 induced activated killer cell を用いた 養子免疫療法による肝転移抑制効果について

—マウス大腸癌肝転移モデルを用いた検討—

奈良県立医科大学第1外科学教室

山本 雅敏

EFFECTS OF ADOPTIVE IMMUNOTHERAPY USING OK-432-INDUCED ACTIVATED KILLER CELL ON METACHRONOUS LIVER METASTASES IN MURINE COLON ADENOCARCINOMA MODEL

MASATOSHI YAMAMOTO

First Department of Surgery, Nara Medical University

Received September 28, 1994

Abstract: The effects of OK-432-induced activated killer cell on the prevention of metachronous liver metastases were studied in mice. Colon 26 cells (5×10^4) were inoculated into the portal vein of female BALB/c mice. On day 14 after inoculation, the mice showed 114 ± 70 (mean \pm SD) nodules of liver metastasis. The median survival time was 27 days. We used this model for experimental adoptive immunotherapy of OK-432-induced activated killer cell (OK-AK cell). The mice were divided into two groups: one was the control group that was inoculated with colon 26 (5×10^4) with untreated non-adherent splenocyte (2×10^6): the other was the OK-AK group that was inoculated with colon 26 cell (5×10^4) with OK-AK cell (2×10^6). The number of metastatic colonies and wet hepatic weight was significantly reduced in the OK-AK group (32.8 ± 8.1 , 0.98 ± 0.07 g) compared with the control group (171.0 ± 37.3 , 1.23 ± 0.23 g). Also the survival time of mice was significantly improved. These results demonstrate that perioperative adoptive immunotherapy with OK-432-induced activated killer cells reduced the development of liver metastases.

Index Terms

colon cancer, metachronous liver metastasis, adoptive immunotherapy, OK-432-induced activated killer cell, mouse model

緒 言

免疫療法は悪性腫瘍の補助療法として注目をあびてきたが、この療法の中で近年、話題になってきたのは腫瘍に対する生体の非特異的能動免疫の免疫応答に影響を与える様々な物質つまり生物学的応答修飾剤(Biological Response Modifier, BRM)である。

Rosenberg¹⁾がインターロイキン2(interleukin 2, IL-2)で活性化したリンパ球, リンフォカイン活性化キラー細胞(lymphokine-activated killer cell, LAK細胞)を用いて養子免疫療法(adoptive immunotherapy, AIT)を行い, 免疫療法は一躍注目をあびるようになった。一方, 溶連菌製剤であるOK-432はcytotoxicity増強効果が強いBRMの一つであり, in vitro培養によりLAK細胞

に相当する OK-432 activated killer cell (OK-AK 細胞) を誘導することが知られている²⁾。しかし、現在まで行われてきた種々の免疫療法は、effector 誘導法、投与経路、副作用など多くの問題点が残されており、消化器癌やその肝転移巣に対する効果は満足すべきものではない。

異時性肝転移の多くは、手術時すでに肉眼的に判別できない微小転移巣が存在していたか、手術操作により尿管系に散布された癌細胞が門脈を介し肝に着床・発育したと考えられる。さらに、手術侵襲による免疫能の低下が腫瘍細胞の転移能を上昇させたと考えられる。従って、原発巣手術時に門脈を介した免疫的治療を行えば、異時性肝転移を予防することが期待できる。

本研究では治癒切除を行った大腸癌の異時性肝転移モデルとして、マウスを用いた肝転移モデルを作製し、OK-432 を用いて誘導した OK-AK 細胞の門脈内投与による肝転移抑制効果および延命効果について実験的検討を行った。

実験材料および方法

1) 実験動物

実験動物としては日本 Charles River 研究所より購入した雌性 8~10 週齢の BALB/c マウス (平均体重 25 g) を約 150 匹用いた。

2) 実験腫瘍

腫瘍細胞は同型由来の大腸癌細胞株 colon 26 を用いた。これはマウス背部皮下にて継代しているものを当教室において *in vitro* での培養細胞にしたものである。つまりマウス背部で継代中の colon 26 の新鮮腫瘍部分を無菌的に摘出し細切した。DNase, collagenase の double enzyme solution を入れたフラスコ内で、攪拌子を用いて 15 分間攪拌した。5 分間静置したのち、上清のみを取り nylon mesh を通した。洗浄後単細胞化した colon 26 を 1×10^6 個/ml になるように調整し、細胞浮遊完全培地とともに Rimbros フラスコ内で 37°C 、5% CO_2 の条件下にて培養、継代することによりプラスチック附着性細胞としてえた。

3) 細胞浮遊培養用完全培地 (complete medium, CM)

細胞の完全培地には RPMI 1640 溶液に Fetal calf serum (FCS) を最終濃度が 10% になるように添加し、さらに 1 mM 4-[2-hydroxy-ethyl]-1-piperazine-ethanesulfonic acid (HEPES), streptomycin sulfate (SM) 0.01 mg/ml および ampicillin sodium (ABPC) 0.01 mg/ml を加えたものを用いた。

4) 免疫効果細胞

a) OK-AK 細胞

OK-AK 細胞の誘導は、以下のようにして行った。まず、同系由来のマウスの脾臓を無菌的に摘出しホモゲナイズした。nylon mesh を通過させ単細胞化し、 $\text{Tris-NH}_4\text{Cl}$ 溶液にて赤血球を浸透圧的に破壊させた。Hanks' balanced salt solution (HBSS) にて 3 回洗浄した。このようにして得られた単細胞化した脾細胞を 5×10^6 個/ml の濃度に調整し、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 2 時間シャーレ内で培養した。浮遊しているプラスチック非附着性脾細胞を集め、各種濃度の OK-432 (中外製薬 (株) 共与) と共に 96 時間培養することにより OK-AK 細胞を得た。

b) control 細胞

control 細胞として、上記のようにして単細胞したプラスチック非附着性脾細胞を用いた。

5) cytotoxicity assay (*in vitro* 殺腫瘍能試験)

最も効果的な OK-AK 細胞を誘導する OK-432 の至適濃度を決定するために colon 26 を標的細胞とした ^{51}Cr release assay を行った。すなわち、New England Nuclear Corporation 製の $\text{Na}_2 \text{ } ^{51}\text{CrO}_4$ (NEZ-030 S) で標識した 1×10^4 / 0.01 ml の colon 26 と、各種濃度の OK-432 (0.01 KE/ml, 0.05 KE/ml, 0.1 KE/ml, 0.5 KE/ml, 1.0 KE/ml, 2.0 KE/ml) にて誘導した OK-AK 細胞を Effector/Target (E/T) = 10, 20 および 40 となるよう 3 well ずつ (triplicate), 総量が 0.2 ml に調整し、Corning 社製 96 穴丸底培地プレート (#25850) に分注した。 37°C 、5% CO_2 の条件下で 4 時間培養後、プレートを遠沈したのち、上清 0.1 ml を採取し、その ^{51}Cr 放射活性を γ シンチレーションカウンターにて測定した。

OK-AK 細胞の % cytotoxicity は次式により算出された。

$$\% \text{ cytotoxicity} = 100 \times$$

$$\frac{\text{実験群遊離放射活性} - \text{自然遊離放射活性}}{\text{最大遊離放射活性} - \text{自然遊離放射活性}}$$

なお、自然遊離群には腫瘍細胞浮遊液 0.1 ml に 0.1 ml の CM のみを、最大遊離群には腫瘍細胞浮遊液 0.1 ml に 0.1 ml の 5% sodium dodecylsulfate (SDS) を加えたものを用いた。

6) Winn assay (*in vivo* 腫瘍中和能試験)

宿主関連の抗腫瘍効果を Winn assay にて検討した。対照群 ($n=10$) として 2×10^6 個 / 0.05 ml の colon 26 と共に 8×10^6 個 / 0.05 ml の control 細胞を、OK-AK 群は 2×10^6 個 / 0.05 ml の colon 26 と共にそれぞれ OK-432 0.5 KE/ml ($n=10$), 1.0 KE/ml ($n=10$) を用いて誘導した OK-AK 細胞 8×10^6 個 / 0.05 ml を混合し、マウス背部皮内に注入した。経時的に背部の腫瘍径を測定し、瘍

中和能を判定した。平均腫瘍径は相加平均((長径+短径)÷2)にて算出した。

7) マウス肝転移モデル

ネブタール麻酔下にマウスの左季肋部に約5mm大の小切開を加え開腹し、脾臓を腹腔外に授動した。単細胞化した colon 26 を 27 G 針を用い脾臓内に注入し、経門脈的に肝転移を成立させた。肝転移抑制効果の判定に適した至適移入細胞数を決定するために、移入細胞数の異なった3群、つまり 1×10^4 個/0.05 ml, 5×10^4 個/0.05 ml, 1×10^5 個/0.05 ml を作製した。全例、腫瘍細胞の移入5分後に脾臓を摘出した。この3群をさらに14日目で屠殺する群(1×10^4 個/0.05 ml (n=4), 5×10^4 個/0.05 ml (n=5), 1×10^5 個/0.05 ml (n=5))と生存期間を観察する群(1×10^4 個/0.05 ml (n=5), 5×10^4 個/0.05 ml (n=5), 1×10^5 個/0.05 ml (n=5))に分けて検討した。

8) OK-AK 細胞移入による肝転移抑制効果

OK-AK 細胞を移入することによる肝転移抑制効果を判定する目的で、 5×10^4 個/0.05 ml の colon 26 と同時に 2×10^6 個/0.05 ml の OK-AK 細胞を経脾的に門脈内に移入、注入した。生存期間を観察する群(control 群 (n=10), OK-AK 群 (n=10))と、14日目に屠殺し、肝転移結節数の算定および肝湿重量を測定する(control 群 (n=7), OK-AK 群 (n=8))2群を作製した。

control 群には OK-AK 細胞の代わりに 2×10^6 個/

0.05 ml の control 細胞を移入した。

9) 統計学的検定

結果の有意差検定は各々以下の方法で行った。Winn assay および生存率よりみた肝転移抑制効果は generalized Wilcoxon 検定を、肝表面転移結節数および肝湿重量よりみた肝転移抑制効果は t 検定を用い、危険率 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. in vitro 抗腫瘍効果の検討

^{51}Cr release assay により検討した in vitro における OK-AK 細胞の抗腫瘍能は、Fig. 1 のように OK 432 の濃度が 0.5 KE/ml では $25.0 \pm 1.7\%$ (E/T=10), $35.0 \pm 2.7\%$ (E/T=20), $48.8 \pm 3.0\%$ (E/T=40), OK 432 の濃度が 1.0 KE/ml では $29.6 \pm 3.6\%$ (E/T=10), $42.5 \pm 2.3\%$ (E/T=20), $53.3 \pm 9.3\%$ (E/T=40)であり、0.5 KE/ml 以上で満足できる cytotoxicity が得られた。

2. in vivo 抗腫瘍効果の検討

in vivo での Winn assay による腫瘍中和能は、Fig. 2 のように OK-432 1.0 KE/ml で誘導された OK-AK 群と対照群の間ではすべての観察期間で有意差を認めた ($p < 0.01$)。OK-432 濃度が 1.0 KE/ml 群と 0.5 KE/ml 群間で有意差が認められたのは、観察期間が 8 日以内であった ($p < 0.05$) もの、9 日以降も 1.0 KE/ml 群が

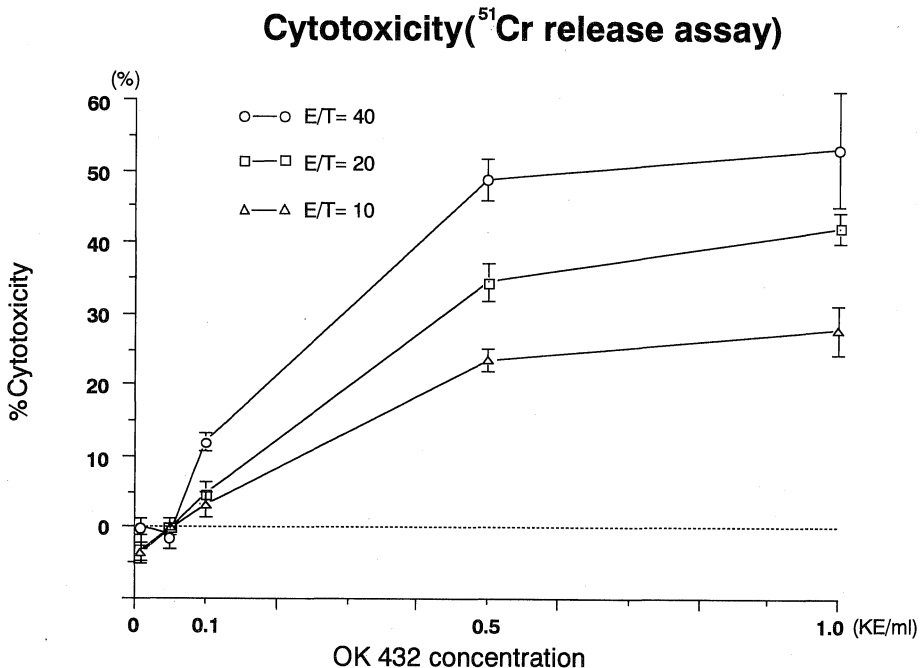


Fig. 1. OK-AK activity of murine non-adherent splenocyte for OK 432 concentration.

Winn Assay for colon 26

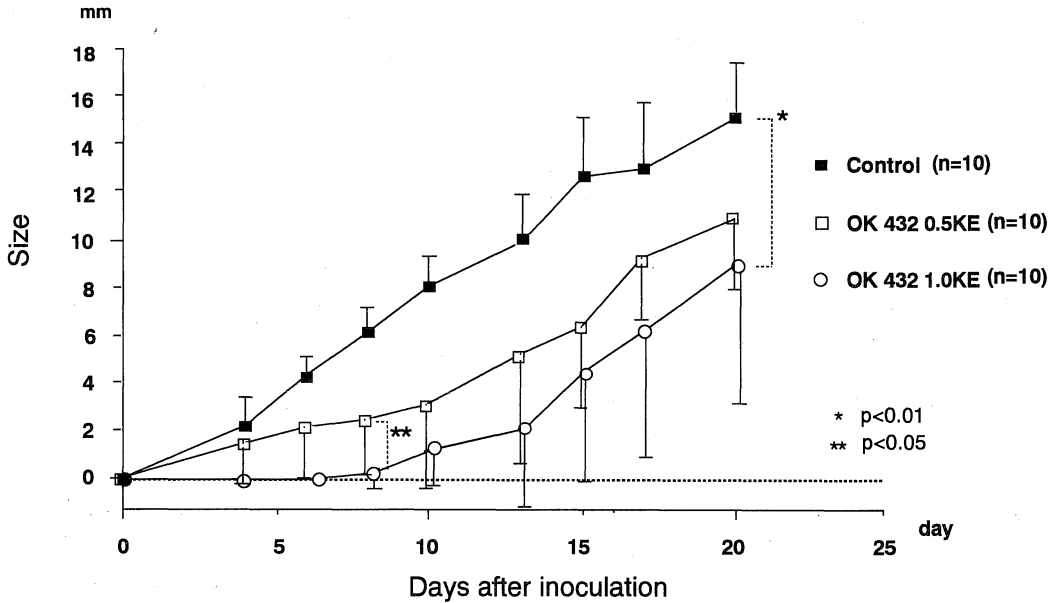


Fig. 2. Antitumor effect on tumor growth after adoptive immunotherapy by OK-AK cell induced concentration of OK-432 0.5 KE/ml and 1.0 KE/ml.

0.5 KE/ml 群より抗腫瘍効果が高い傾向にあった。

以上の in vitro および in vivo の抗腫瘍効果の結果より OK-432 1.0 KE/ml にて誘導された OK-AK 細胞が colon 26 に対し最も有効であることが判明した。従って、以下の実験は OK-432 1.0 KE/ml にて誘導された OK-AK 細胞を用いて行った。

3. 肝転移モデルの作製

前述の方法にて算定された肝表面転移結節数は、Table 1 に示すように移入した colon 26 の細胞数が 1×10^4 個/0.05 ml では 0 個 (n=4), 5×10^4 個/0.05 ml では 114.6 ± 70.0 個 (n=5), 1×10^5 個/0.05 ml では無数 (n=5) であった。また生存期間は 1×10^4 個/0.05 ml (n=5) は 28 日目ですべて生存していたが、 1×10^5 個/0.05 ml (n=5) は 24 日目ですべて癌死した。生存期間の中央値は、 5×10^4 個/0.05 ml (n=5) は 27 日、 1×10^5 個/0.05 ml (n=5) は 22 日であった。

以上の結果より、以下の肝転移モデルを作製するのに必要な colon 26 の移入細胞数は 5×10^4 個/0.05 ml とした。

4. OK-AK 細胞をもちいた AIT による肝転移抑制効果

a) 肝表面転移結節数

14 日後に屠殺したマウスの肝表面の転移結節数は、

Table 1. Metastatic liver tumor in mouse model

Effect of Inoculum Cells Size		
Inoculum cell size (/0.05 ml)	No. of mice	No. of metastatic colonies
1×10^4	4	—
5×10^4	5	114.6 ± 70
1×10^5	5	numerous

On day 14 after, mice were sacrificed and metastatic foci of liver surface were counted.

Median Survival Time of Inoculum Cells Size

Inoculum cell size (/0.05 ml)	No. of mice	Median Survival Time (day)
5×10^4	5	27
1×10^5	5	22

contro 群 (n=7) の 171.0 ± 37.3 個に対し、OK-AK 細胞を同時に移入した OK-AK 群 (n=8) では 32.8 ± 8.1 個と有意に肝転移が抑制された ($p < 0.01$) (Table 2).

b) 肝湿重量

屠殺直後に測定した肝湿重量は、対照群 (n=7) 1.23 ± 0.23 g, OK-AK 群 (n=8) 0.98 ± 0.07 g と OK-AK 群で有意に軽く肝転移が抑制された ($p < 0.05$) (Table 3).

c) 生存率

両群の生存率をKaplan-Meier法で算出し示したものがFig. 3である。control群(n=10)ではOK-AK群(n=10)で全例生存している22日目、すでに生存率が40%となり、36日目には全例死亡した。一方、OK-AK群では24日目までは全例生存し、50日目でも50%の生存率であった。generalized Wilcoxon検定では、19日目以降で両群間に明らかな有意差を認めた(p<0.01)。なお、マウス肝転移モデル作製操作および経脾的な細胞移入にて死亡したマウスはなかった。

Table 2. Effect of Adoptive Immunotherapy on Metastatic Liver Nodules

Group	No. of mice	No. of Nodules (mean±SD)
Control	7	171.0±37.3
OK-AK	8	32.3±8.1

(p<0.01)

Table 3. Effect of Adoptive Immunotherapy on Metastatic Liver Weight

Group	No. of mice	Liver weight (g) (mean±SD)
Control	7	1.23±0.23
OK-AK	8	0.98±0.07

(p<0.05)

考 察

大腸癌の治療は、診断技術の進歩や集学的治療により良好な成績を収めるようになってきたが、肝転移を有する場合には満足すべき成績がえられていないのが現状である。全大腸癌症例の約20%に肝転移が認められる。諸家の報告²⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾によると、同時性肝転移は11.1~19.4%、異時性肝転移は4.6~9.7%を占めるとされている。

異時性肝転移の発生は、1)手術時すでに肝臓に着床・発育しているが肉眼的には判別できないほど微小なものが、時間とともに発育・増大する、2)手術操作により門脈内に散布された癌細胞が、肝臓着床後、発育・増大する、などに因ると考えられる。さらに、手術侵襲により生体の免疫能の低下が腫瘍細胞の発育・増大に拍車をかけるということは容易に想像できる。

ところで、リンパ球をin vitroで数日間、IL-2と共に培養することによりbroad spectrumな細胞障害活性を有するLAK細胞を誘導し患者に移入するという、LAK細胞によるAITは、1985年Rosenbergら¹⁾により報告された。以来、LAK細胞を用いたAITが悪性黒色腫をはじめ腎癌などの治療に有用であるという報告が多数ある。しかし、LAK細胞単独による治療では十分満足の得られる結果は得られず、IL-2の補充投与⁹⁾やOK-432の併用¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾などさまざまな工夫が行われている。AITをより効果的に行うためには、活性の高い、多くのeffector

Survival Curve (Kaplan-Meire)

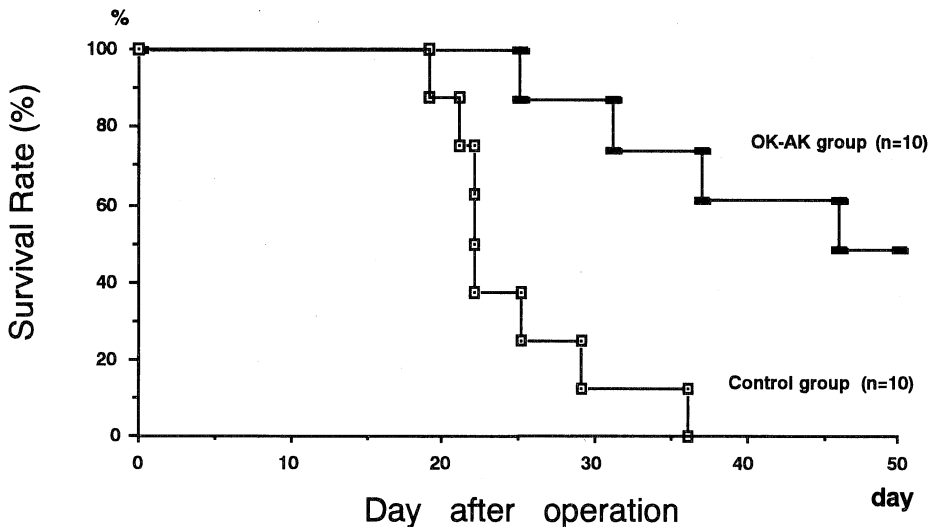


Fig. 3. Survival rates of murine model after adoptive immunotherapy.

を誘導することや、腫瘍局所に効率良く集積させることが必要である。肉眼的に判別できない微小肝転移や、術中に散布された癌細胞は、ある程度限られた両の effector による AIT のよい適応となる。そこで、末梢血リンパ球(peripheral blood lymphocyte, PBL)を用いて OK-432 で抗腫瘍活性を誘導しておき、術中門脈内へ投与するという AIT で、異時性肝転移が抑制できるかどうかをマウスモデルを用いて検討した。

まず、実験動物の肝転移モデルには、マウスを用いた方法として、癌細胞を直接門脈内に注入する白山ら¹³⁾、Tominaga ら¹⁴⁾の方法や脾臓を腹腔外に授動し、脾臓を介して門脈内に注入する君村ら¹⁵⁾の方法がある。また家兎を用いた方法としては、結腸自由紐部漿膜下に腫瘍細胞を注入して肝転移を待つ坂根ら¹⁶⁾の方法がある。著者らの検討では、白山らの方法は操作する静脈が非常に細いため、手技に熟練を要し、安定した肝転移モデルを作製することは容易ではない。また、Neuraminidase 処理をしなければ注入した血管の周囲にも腫瘍の発育を認め、原発巣治癒切除後の異時性肝転移モデルにはならない。坂根らの方法は現実的に即した生理的な肝転移モデルであるが、マウスを実験動物として用いた場合、原発巣切除、吻合を行うことは不可能である。また、転移成立の時期にばらつきがあるなど、これらの方法はいくつかの問題点を有す。今回、著者が用いた授動した脾臓を腫瘍細胞の移入経路とし、細胞移入後に摘出する方法では、先の問題は解決される。つまり、腫瘍細胞移入後に脾臓を摘出することにより、肝臓以外の部位に腫瘍の発育を見ることはなく、消化器癌の治癒切除モデルとしては最適であろう。

次に、マウスの PBL を十分量得ることは困難なので、脾細胞のうちプラスチック非付着性細胞を effector の前駆細胞として用いた。Thy 1.2, Lyl-2, L3T4 を用いた Flow Cytometry による解析では、このプラスチック非付着性細胞の組成は PBL に類似していることが確かめられている。

effector を誘導する目的で使用した OK-432 は BRM として既に、臨床的に広く使用され、streptococcus pyogenes(A 群 3 型)Su 株を Bernheimer's basal medium 中で培養し、penicillin G と 45℃ で処理したのち、全体を凍結乾燥した白色粉末で、1966 年 Okamoto ら¹⁷⁾により作製された。当初より判明していた直接的な抗腫瘍活性¹⁸⁾¹⁹⁾ばかりでなく、現在では強力な BRM の一つとして広く臨床応用され、その安全性および治療上の有用性はよく示されている。本研究では OK-AK 細胞を誘導する目的で用いたが、その作用は多岐にわたり、

NK 活性の増強²⁰⁾²¹⁾²²⁾、Mφ の活性化²³⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾、CTL の誘導²⁷⁾²⁸⁾、suppressor T 細胞の抑制、好中球の活性化²⁹⁾、好中球活性化因子の増強³⁰⁾、さらには INF³¹⁾³²⁾、tumor necrotic factor(TNF)³³⁾、natural killer activating factor(NKAF)などの液性因子の産生刺激にも関与するという報告もある。しかし、IL-2 により誘導された LAK 細胞とはほぼ同一とされている OK-AK 細胞を用いた AIT の報告は殆どない³⁴⁾。これは従来より、OK-AK 細胞は IL-2 により誘導された LAK 細胞に比較して、その killer 活性が劣るとされているからであろう³⁵⁾。しかし、辻橋ら³⁴⁾の PBL を用いた検討でも、OK-432 でも IL-2 での誘導に匹敵す LAK 活性を誘導することが可能であることが判明している。

しかし、OK-432 をはじめとする多くの BRM には、至適濃度(Optimal BRM Dose, OBRMD)が存在する。実際の臨床の場において最大効果を得るためには、個々の生体別、腫瘍別に OBRMD を決定する必要がある。さらに、OK-432 の NK 増強作用は正常人では普遍的に認められるが、癌患者においてはかなり変動が認められ、一般に、進行癌患者では早期癌患者よりも OK-432 に対する反応が弱いとされている。また、OK-432 による in vitro での NK 活性の上昇(OK-432 と数時間の培養で得られる)は濃度依存적ではなく OBRMD を越えた場合、濃度の上昇につれて落ちてくると言われている²⁾。しかし、colon 26 細胞に対する OK-AK 細胞(OK-432 と数日間の培養で得られる)の細胞障害活性は Fig. 1 のように濃度依存的に上昇しており、in vitro で OK-AK 細胞を誘導するという煩雑な操作は必要となるが、OBRMD を決定する操作は容易となる。

LAK 細胞を全身投与すると網内系に取り込まれることが知られている³⁶⁾が門脈内、あるいは脾臓内に直接移入すればより多くの effector を肝に集積できる。従って、肝転移に対する AIT では、投与経路として門脈内投与は最も効率的な方法と考えられる。

今回の研究で、OK-AK 細胞を移入したマウスは control 細胞を用いたマウスに比べ、明らかに生存率の向上を認めた。これは、肝転移結節数の減少および肝湿重量の減少によるものと考えられる。

以上より、臨床的に術前 PBL を採取し、OK-432 にて抗腫瘍活性を誘導した後、術中門脈内に投与して、異時性肝転移を抑制するという AIT の有用性が動物実験により示唆された。

結 語

大腸癌異時性肝転移予防における養子免疫療法の有用

性を検討するために以下の実験を行った。まず、マウス大腸癌細胞株である colon 26 を用い実験的肝転移モデルを作製した。つぎに、このモデルを用いマウス脾細胞より OK-432 を用いて誘導した OK-AK 細胞を経門脈的に移入し、肝転移抑制効果および延命効果について実験的検討を行い、以下の結果を得た。

1) マウス非付着性脾細胞を各種濃度の OK-432 とともに培養し、誘導した OK-AK 細胞の colon 26 に対する抗腫瘍効果を検討し、OK-432 濃度が 0.5 KE/ml 以上で満足できる cytotoxicity が得られた。

2) in vitro にて継代中の colon 26 細胞を用いた場合、 5×10^4 個/0.05 ml を経脾的に門脈内注入することにより安定した肝転移モデルを作製し得た。

3) colon 26 細胞を OK-AK 細胞と同時に経門脈的に移入することにより、肝転移は抑制され、肝表面転移結節数および肝湿重量は有意に減少した。

4) その結果、生存率も有意に向上した。

従って、手術時すでに存在するであろう微小肝転移や術中経門脈的に散布された癌細胞に対し、術中に OK-AK 細胞を経門脈的に移入する養子免疫療法を行うことにより、大腸癌の異時性肝転移を抑制する可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った奈良県立医科大学第 1 外科中野博重教授に深甚の謝意を表します。さらに、直接御指導、御助言を戴きました中央内視鏡室藤井久男助教授および、第 1 外科山本克彦博士、佐道三郎博士に深謝いたします。また、研究に御協力を戴いた奈良県立医科大学第 1 外科教室の諸兄に感謝いたします。なお、本稿の要旨は第 19 回日本臨床免疫学会総会(1991 年長崎市)において発表した。

本研究の一部は文部省科学研究費(奨励研究 02770791)によって行われた。

文 献

- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., Matory, Y., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., Seipp, C. A., Simpson, C. and Reichert, C. M.: Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *New Eng. J. Med.* 313: 1485-1492, 1985.
- 星野 孝, 八木田正人, 伊保澄子, 荒谷信一, 井上佳子, 荒川久美子, 飴島慎吾, 藤枝重治, 野田一郎, 前原正典, 高橋康嗣, 高橋隆幸: 癌治療における BRM の現況 1「ピンバニール」癌治療. 今日と明日 13 (3): 29-41, 1991.
- 山口佳之, 高山孝弘, 川見弘之: LAK 細胞養子免疫療法 の現況と問題点. 日外会誌. 92 (9): 1234-1236, 1991.
- 北条慶一: 結腸癌・直腸癌の治療成績. 病態生理 8: 381-385, 1989.
- 杉原健一: 転移性肝癌の注療法確立に関する研究. 厚生省がん助成金による研究, 速報集. 国立癌センター, 東京, p457-461, 1991.
- 高橋 孝, 古島 薫, 高橋知之, 村田 聡, 大田博俊, 加藤 洋: 肝転移, 肝再発をきたす因子とその予防対策. 日本臨牀 39: 154-161, 1981.
- 松田泰次, 船井貞往, 安富正幸: 大腸癌肝転移の予防対策. 外科 51: 603-613, 1990.
- 更科廣實, 齊藤典男, 小田奈芳紀, 布村正夫, 奥井勝二: 肝転移再発予防のための治療の選択. 消化器外科 13: 335-340, 1990.
- Mule, J. J., Shu, S., Schwarz, S. L. and Rosenberg, A.: Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastasis with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science* 225: 1487-1489, 1984.
- Kirkwood, J. M., Whiteside, T. L. and Heberman, R. B.: An overview of the Pittsburgh Cancer Institute's phase I trial of OK-432, Presented at 15 th Intern. Congress of Chemotherapy: 19-24 July, Istanbul, 1987.
- 星野 孝, 内田温士: 免疫賦活剤 OK-432 の最近の動向について—特に OK-432 の作用機序と至適投与法に関する研究. *Biotherapy* 2(3): 486-495, 1988.
- 沖野 孝, 菅 典道, 中西正樹, 佐藤剛平, 三瀬圭一, 山崎誠二, 寺村康史, 堀 泰祐, 児玉 宏, 大垣和久, 戸部隆吉: 乳癌肝転移に対する OK-432 併用 adoptive immunotherapy (AIT) の治療効果. 癌と化学療法 16 (4): Part-II, 1913-1919, 1989.
- 白山泰明, 奥野清隆, 山本克彦: 定量的肝転移モデルの作製—Neuraminidase 処理 colon 26 結腸癌培養細胞の門脈内投与による肝転移の作製. 日外会誌. 92(4): 476, 1991.
- Tominaga, T., Yoshida, Y., Kitamura, M. and Kosaki, G.: Liver metastasis of colon 26 cells into the superior mesenteric vein in mice. *Jpn. J.*

- Cancer Res. (Gann) 78: 846-850, 1987.
- 15) 君村 博: 大腸癌肝転移モデルを用いた科学療法の基礎的検討—5-Fu 門脈内投与による転移抑制効果. 日大肛誌. 45: 259-265, 1992.
 - 16) 坂根正芳, 田淵芳樹, 中村 毅: VX₂を用いた肝転移再発家兔結腸癌モデルの誘発. 日外会誌. 92 (1): 106, 1991.
 - 17) Okamoto, H., Minami, M. and Shino, S.: Experimental anticancer studies XXXI. On the streptococcal preparation having potent anticancer activity. Jpn. J. Exp. Med. 36: 175-186, 1966.
 - 18) Ono, T., Kurata, S., Wakabayashi, K., Sugawara, Y. and Ogawa, H.: Inhibitory effect of streptococcal preparation (OK 432) on the murine acid synthesis tumor cell in vitro. Gann 64: 59-69, 1973.
 - 19) Sakura, U., Tsugatoshi, S., Satoh, H., Akiba, T., Suzuki, S. and Takagaki, U.: Tumor inhibitory effect of streptococcal preparation. Cancer chemothe. Repts. 56: 9-17, 1972.
 - 20) Utida, A. and Micksche, M.: In vitro augmentation of natural killing activity by OK-432. Int. J. Immunopharmac. 3: 365-375, 1981.
 - 21) Collota, F., Rambalid, A., Colombo, N., Tabacch, L., Introma, M. and Mantoban, A.: Effect of streptococcal preparation (OK-432) on natural killer activity associated lymphoid cell in human ovarium carcinoma and lysis of fresh ovarian tumor cell. Br. J. Cancer 48: 515-525, 1983.
 - 22) Oshimi, K., Kano, S., Takaku, F. and Okumura, K.: Augmentation on mouse natural killer cell activity by a streptococcal preparation (OK-432). J. Nat. Cancer Int. 65: 1256, 1980.
 - 23) Oshii, Y., Yamamoto, H., Toh, K. and Kikuchi, K.: Inhibition of tumor growth in vivo by macrophages from rats treated with a streptococcal preparation, OK-432. Gann 67: 115-119, 1976.
 - 24) Kawaguchi, T., Suematsu, M., Koizumi, H., Mitsui, H., Suzuki, S., Matsuno, T., Ogawa, H. and Namoto, K.: Activation of macrophage function by streptococcal antitumor agent OK-432. Immunopharmacology 6: 177-187, 1983.
 - 25) 齊藤元男, 青沼悦子, 野田哲夫, 中館一朗, 南條正季, 海老名卓三郎, 石田名香雄: OK-432 の抗腫瘍効果(2) OK-432 誘起活性化マクロファージの抗腫瘍性. 癌と化学療法 10: 1363-1372, 1978.
 - 26) 田中憲一, 鈴木利光, 大星章一: 溶連菌製剤 OK-432 処理マクロファージ抗腫瘍性に関する研究. 癌と化学療法 5: 1233-1241, 1978.
 - 27) Hojou, H. and Hashimoto, Y.: Cytotoxic cell induced in tumor-bearing rats by a streptococcal preparation on OK-432. Gann 72: 692-699, 1981.
 - 28) Mashiba, M., Matsunaga, K. and Jin, J.: Effect of immunostimulants of the in vitro generation of cyatotoxic lymphocyte. Japan j. Ext. Medica 53: 235-241, 1984.
 - 29) Watanabe, S., Sendo, F. S., Kimura, S. and Arai, S.: Activation of cytotoxic polymorphonuclear leukocyte by in vivo administration of a streptococcal preparation, OK-432. J. Ncl. 72: 1365-1370, 1984.
 - 30) 安田 新, 阿部吉弘, 新沢陽英, 石川 誠, 木村青史, 井上富夫, 荒井 茂, 仙道 富士郎: ヒト末梢リンパ球(PBL)由来の細胞障害性好中球活性化因子. 消化器と免疫 13: 206-210, 1984.
 - 31) Saito, M., Ebina, T., Koi, M., Yamaguchi, T., Kawabe, Y. and Ishida, N.: Introduction of interferon- γ in mouse spleen cells by OK-432, a streptococcus pyogenes. Cellular Immunol. 68: 187-192, 1982.
 - 32) Saito, M., Ebina, T., Koi, M., Yamaguchi, T., Aonuma, E., Usami, H. and Isida, M.: In vitro production of immune interferon (INF) by murine spleen cells when different sensitizing are used in vivo and in vitro. Cellular Immunol. 78: 379-383, 1983.
 - 33) Watanabe, N., Niitsu, Y., Yamaguchi, N., Nesa, H., Sone, H., Urushibara, I., Yamamoto, A., Nagamuta, M. and Sugawara, Y.: Therapeutic effect of OK-432 induced endogenous TNF on tumor bearing mice and cancer patient. Immunopharmacol. & Immunotoxicol. 10: 53-65, 1988.
 - 34) 辻橋宏典, 石原 浩, 中西 淳, 松田久雄, 上島成也, 秋山隆弘, 栗田 孝: ノードマウス移植人膀胱癌に対する LAK 細胞の抗腫瘍効果. 日泌尿会誌. 80 (2): 204-209, 1988.
 - 35) 山上裕機, 谷村 弘, 岩崎 誠, 角田卓也, 谷 眞至, 玉井美紀子: OK-432 刺激時に誘導される LAK

細胞に対するサプレッサーマクロファージの解析.
J. Jpn. Cancer Ther. 26 (3): 610-161, 1991.

動物および担癌患者における養子移入 LAK 細胞の
臓器分布. Biotherapy 2 (1): 163-167, 1988.

36) 沢村 豊, 細川真澄男, 小林 博, 伊藤和男: 担癌