

原著

膀胱癌細胞に抗腫瘍効果を発揮する *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) 菌体成分の探索

吉川和暁¹⁾ 盛和行¹⁾ 工藤誠治¹⁾ 劉星星¹⁾
米山高弘¹⁾ 橋本安弘¹⁾ 古家琢也¹⁾ 神村典孝¹⁾
高橋信好¹⁾ 鈴木唯司¹⁾ 大山力^{1,2)}

抄録 表在性膀胱癌に対する *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) 膀胱注入療法の有効性は広く認められているが、生菌であるため副作用の頻度が高く、しばしば重篤な有害事象も認められる。本研究では BCG に含まれる効果的な成分を見いだすことを目的に BCG の菌体を分画し、その抗腫瘍効果を検討した。BCG (Tokyo 172 株) を超音波処理またはオートクレーブ処理後、遠心分離して上清と沈渣に分画し、ヒト膀胱癌細胞株 5637 と混合培養した。BCG 生菌と超音波処理またはオートクレーブ処理上清画分は 5637 細胞の増殖を抑制し、ギムザ染色及びフローサイトメトリー解析によりアポトーシスが検出された。これらの結果は、上清中の成分がアポトーシスを介して 5637 細胞に細胞増殖抑制効果をもたらすことを示唆し、これらの画分を精製することにより、より効果的で副作用の少ない新しい抗腫瘍薬の創薬が期待される。
弘前医学 59: 41—48, 2007

キーワード: 膀胱癌細胞株; BCG; アポトーシス。

ORIGINAL ARTICLE

INVESTIGATION OF ACTIVE *BACILLUS CALMETTE-GUÉRIN* (BCG) COMPONENT ON BLADDER CANCER CELL LINE

Kazuaki Yoshikawa¹⁾, Kazuyuki Mori¹⁾, Seiji Kudoh¹⁾, XingXing Liu¹⁾,
Takahiro Yoneyama¹⁾, Yasuhiro Hashimoto¹⁾, Takuya Koie¹⁾, Noritaka Kamimura¹⁾,
Nobuyoshi Takahashi¹⁾, Tadashi Suzuki¹⁾ and Chikara Ohyama^{1,2)}

Abstract AIM: Intravesical *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) therapy is an effective treatment for superficial bladder cancer. However, its frequent and severe side-effects were major obstacles for clinical setting. In this study, BCG was fractionized with simple methods to find an active component. METHODS: Sonicated or autoclaved Tokyo 172 BCG strain was fractionated to supernatant and precipitate. These fractions were co-cultured with 5637 human bladder cancer cell line (5637 cell). The growth inhibitory effect on 5637 cell was analyzed by dye exclusion test, ³H-thymidine incorporation, cytologic examination with Giemsa staining, and cell cycle analysis using flowcytometry. RESULTS: Live BCG and supernatant fractions obtained by sonication or autoclave suppressed the growth of 5637 cell. The dark-stained spots suggesting early phase apoptosis were found in nuclei of 5637 cells by co-cultured with live BCG or supernatant fractions. In these cells, the ratios of apoptotic cells were increased compared with non-treated cells. CONCLUSION: These results suggest that BCG has a direct anti-tumor effect to induce apoptosis on 5637 cell. Supernatant fractions obtained by sonication or autoclave maintained the direct anti-tumor effects as well as live BCG. Further purification of these fractions may provide a new BCG derivatives which has higher efficacy with reduced toxicity.

Hirosaki Med. J. 59: 41—48, 2007

Key words: Bladder cancer cell line; BCG; apoptosis.

¹⁾ Department of Urology, Hirosaki University Graduate School of Medicine

²⁾ Correspondence: C. Ohyama

Received for publication, April 25, 2007

Accepted for publication, September 5, 2007

¹⁾ 弘前大学大学院医学研究科泌尿器科学

²⁾ 別刷請求先: 大山 力

平成19年4月25日受付

平成19年9月5日受理

緒 言

Bacillus Calmette-Guérin (BCG) はウシ型結核菌を弱毒化したものであり, Morales らが表在性膀胱癌に対する膀胱内注入療法の有効性を報告して以来¹⁾, 日常診療において広く使用されている. 本療法の抗腫瘍効果と再発予防効果はすでに多くの臨床研究によって明らかにされ²⁾, 標準的治療法としての意義が確立されつつある. しかし, その作用機序については不明な点が多く, 免疫系を介した間接的作用, あるいは BCG 自体の直接的作用が想定されているが, 有効成分の探索に関しては黎明期を迎えたばかりである³⁾. Sasaki et al.⁴⁾ は, ヒト膀胱癌細胞株 T24 と BCG を混合培養し, BCG の直接的抗腫瘍効果を検討したところ, T24 の増殖抑制が認められ, アポトーシス細胞が増加することを明らかにした. このことから, BCG の抗腫瘍効果の作用機序として, 免疫学的機序を介さない直接的作用の存在が示唆され, 細胞傷害にはアポトーシスが関連していると考えられている.

一方, 臨床における BCG 膀胱内注入療法では, 副作用が高頻度に認められ, 治療の継続が阻害されるとともに, 時に重篤な合併症も報告されている⁵⁾. BCG 菌体のどの成分が有効であるのか現在まで明確にされていないが, 菌体を分画することにより有効成分を同定できれば, BCG 生菌感染によりもたらされる副作用がない, 優れた治療法となることが期待される.

そこで, 本研究ではまずヒト膀胱癌細胞株 5637 に対する BCG の直接的抗腫瘍効果を検証した. 次に, 有効成分の探索を目的に, BCG 生菌, 超音波処理画分, オートクレーブ処理画分と 5637 細胞を混合培養して増殖抑制効果を評価した. さらに, その抗腫瘍効果にアポトーシスが関与するか否かに関して検討を加えた.

対象と方法

1) 細胞株

10% FBS 添加 RPMI 1640 培地で継代培養されたヒト膀胱癌細胞株 5637 を用いた.

2) BCG 株

Tokyo 172 株乾燥 BCG ワクチン経皮用 (日本ビーシージー製造株式会社) を用いた.

3) BCG の超音波処理

20 mg の BCG を 5 ml の滅菌水に懸濁し, 超音波破碎装置 (タイテック VP15s) を用いて 40 分間超音波処理を行った. その後, 3,000 回転で 5 分間遠心分離し, 上清を超音波処理上清画分 (sonic sup) とした. 沈渣を 5 ml の滅菌水に懸濁し, 12,000 回転で 5 分間遠心分離し, 得られた沈渣を 5 ml の滅菌水に懸濁し, これを超音波処理沈渣画分 (sonic ppt) とした. また, 両画分を等量混合したものを超音波処理混合画分 (sonic mix) とした. (Fig. 1)

4) BCG のオートクレーブ処理

20 mg の BCG を 5 ml の滅菌水に懸濁し, 121°C で 15 分間オートクレーブ処理を行った. その後, 3,000 回転で 5 分間遠心分離し, 上清をオートクレーブ処理上清画分 (auto sup) とした. 沈渣を 5 ml の滅菌水に懸濁し, 12,000 回転で 5 分間遠心分離し, 得られた沈渣を 5 ml の滅菌水に懸濁し, これをオートクレーブ処理沈渣画分 (auto ppt) とした. また, 両画分を等量混合したものをオートクレーブ処理混合画分 (auto mix) とした. また, 20 mg の BCG に滅菌水を加えずにそのまま同様のオートクレーブ処理を行い, 5 ml の滅菌水に懸濁したものを無水オートクレーブ処理画分 (no water) とした. (Fig. 2)

5) 走査型電子顕微鏡による観察

上記画分は, 2.5% グルタルアルデヒド, 2% オスミウム酸二重固定をした後, 常法に従い, 走査型電子顕微鏡 (日立 s600) にて観察した.

6) 5637 細胞と BCG の混合培養による生細胞数の算出

組織培養用ディッシュ (直径 10 cm, グライナー社) に, 5637 細胞の終濃度が 2×10^4 個/ml になるように調整した細胞浮遊培地を注入し, 3), 4) で調整した各画分及び BCG 生菌 (live BCG) をそれぞれ終濃度 0.1 mg/ml となるように添加し, 37°C, 5% CO₂ 条件下で培養した. 対照は, BCG を添加せずに培養した細胞 (control) とした. 培養開始 120 時間後細胞を剥離し, トリパンブルー染色を行って生細胞数を光学顕微鏡的に算出した. 生細胞数の測定は 5 回行った.

7) 5637細胞とBCGの混合培養による³H-チミジン取り込みの測定

細胞培養用96穴マイクロプレート(平底, 蓋付, イワキ社)に, 6)と同様に調整した各混合培地を, 200 μ lずつ各種3ウェルに接種し, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂条件下で培養した. 120時間培養後, 各ウェルにメチル-³H-チミジン(37 MBq/ml, Moravec社)を37 kBqずつ加え, 16時間培養を継続した. 上清を除き, セルハーベスタ(フタバメディカル社)により細胞をラボマッシュ用フィルター(フタバメディカル社)に収集した. フィルターを乾燥後, ミニバイアル(WHEATON社)に各ウェル分を移し, 液体シンチレーターとしてクリアゾルII(ナカライ社)を用いて β カウンター(アロカ, LSC-3500)で測定時間4分で測定した. 結果は, 各種BCG画分3ウェルの測定値の平均値とした. ³H-チミジンの取り込みの測定は6回行った.

8) 細胞核の形態学的変化

8ウェルチャンバースライド(Nunc社)を用い, 6)と同様に調整した各混合培地を, 200 μ lずつ各ウェルに接種し, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂条件下で120時間培養した. 上清を除きメタノールで固定し, ギムザ染色を行い, 細胞核の形態を光学顕微鏡にて観察した. 1視野で100個以上の細胞を数え, 10視野分の測定値を基に核内に濃染部分(apoptotic body)が見られた細胞の割合を算出した.

9) フローサイトメトリーを用いたPropidium Iodide法(PI法)によるアポトーシス細胞の検出

組織培養用ディッシュ(直径6 cm, イワキ社)を用い, 5637細胞の終濃度を1 \times 10⁴個/mlとして6)と同様に培養した. 120時間培養後, 細胞を剥離し, 培養上清とともに回収し, 2,500回転で5分間遠心分離した. 沈殿をPBS(-)で1回洗浄した後, 200 μ lの70%氷冷エタノールを加え, -20 $^{\circ}$ Cで30分以上固定した. 次に, 2,500回転で5分間遠心分離し, 上清を除去した. 沈殿をPBS(-)で1回洗浄した後, 100 μ lのPBS(-)に再浮遊させ, 1 μ lのRNase A(10 mg/ml)溶液を加え37 $^{\circ}$ Cで30分間反応した. 2,500回転で5分間遠心分離し, 沈殿を100 μ lのPBS(-)に浮遊させ, 5 μ lのPI

(1 mg/ml)溶液(Wako社)を加え混和し, 暗所で30分間染色した. 50 μ mのナイロンメッシュを通し, フローサイトメーター(FACScan, BECTON DICKINSON社)を用い, 細胞周期の解析を行い, アポトーシス細胞の割合を算出した. 細胞周期解析は5回行った.

10) 統計解析

各群間の統計学的解析はMann-Whitney U-testを用い, p<0.05を有意とした.

結 果

1. 超音波処理及びオートクレーブ処理各画分の走査電子顕微鏡観察

BCGを超音波処理及びオートクレーブ処理した後に走査電子顕微鏡にて観察すると, 沈渣分画では種々の程度に破壊された菌体が観察された. 上清中には粒子状の構造物はほとんど存在せず, no waterでは菌体が凝集して認められた.(Fig. 1, 2)

2. 5637細胞とBCGの混合培養による生細胞数

5637細胞をlive BCGと120時間混合培養す

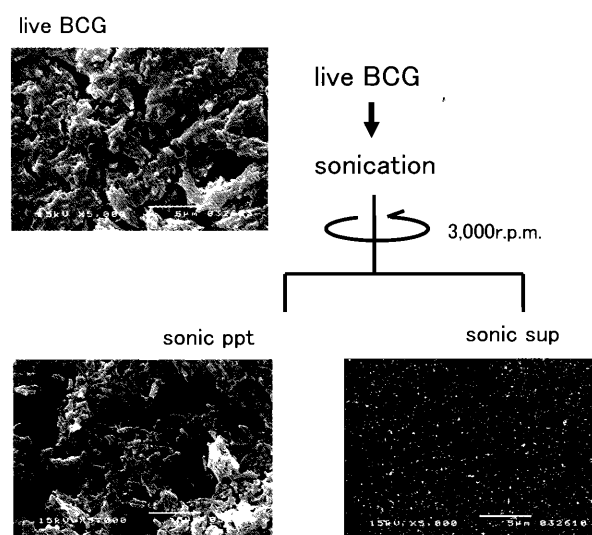


Fig. 1 Scanning electron microscopic (SEM) findings of sonicated BCG.

Live BCG was sonicated, centrifuged at 3,000 r.p.m. and fractionated to precipitate (sonic ppt) and supernatant (sonic sup). SEM findings of live BCG, sonic sup and sonic ppt fractions were shown. Various sized particles were observed in sonic ppt, but not in sonic sup. Original magnification is x 5,000.

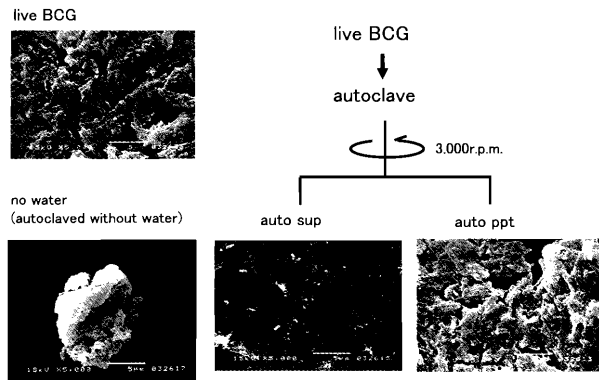


Fig. 2 Scanning electron microscopic (SEM) findings of autoclaved BCG.

Live BCG was autoclaved, centrifuged at 3,000 r.p.m. and fractionated to precipitate (auto ppt) and supernatant (auto sup). BCG was also autoclaved without water (no water). SEM findings of live BCG, auto sup, auto ppt and no water fractions were shown. Various sized particles were observed in auto ppt, but not in auto sup. Aggregated particles were observed in no water. Original magnification is x 5,000.

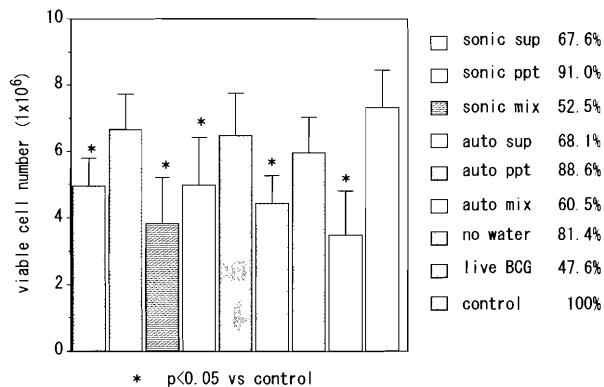


Fig. 3 Viable cell counts of 5637 bladder cancer cell co-cultured with sonicated, autoclaved or live BCG. BCG was sonicated or autoclaved, centrifuged and then fractionated to supernatant and precipitate. These fractions were co-cultured with 5637 human bladder cancer cell line for 5 days. Viable cells were counted by trypan blue staining. Viable cells were significantly decreased in sonic sup, sonic mix, auto sup, auto mix and live BCG compared with control.

ると、生細胞数は control に比して 47.6% であり、有意な増殖抑制効果を認めた ($p < 0.05$)。超音波処理画分では、sonic ppt と混合培養しても生細胞数は 91.0% と抑制が見られないのに対して、sonic sup では 67.6% と増殖抑制が見られた ($p < 0.05$)。また sonic mix でも、52.5% と抑制が

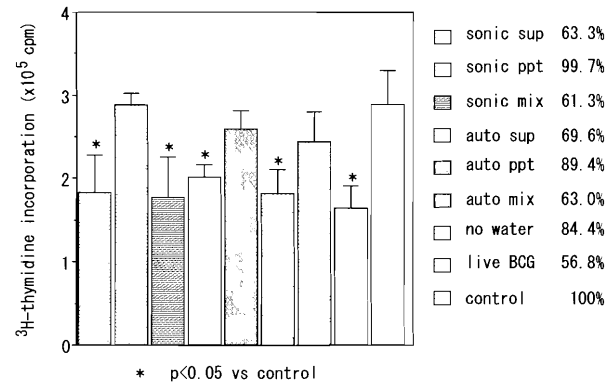


Fig. 4 ³H-thymidine incorporation of 5637 bladder cancer cell co-cultured with sonicated, autoclaved or live BCG.

BCG was sonicated or autoclaved, centrifuged and then fractionated to supernatant and precipitate. These fractions were co-cultured with 5637 human bladder cancer cell line for 5 days. Then cells were co-incubated with methyl-³H-thymidine for 16 hr. The growth suppression of 5637 cell was analyzed by ³H-thymidine incorporation. Cellular growth was significantly suppressed in sonic sup, sonic mix, auto sup, auto mix and live BCG compared with control.

見られた ($p < 0.05$)。オートクレーブ処理画分では、auto ppt で 88.6% と抑制が見られないのに対して、auto sup では 68.1% と増殖抑制が見られた ($p < 0.05$)。また auto mix でも、60.5% と抑制が見られた ($p < 0.05$)。no water では 81.4% と有意な抑制は見られなかった。(Fig. 3)

3. 5637 細胞と BCG の混合培養による ³H-チミジン取り込み

live BCG と混合培養した場合が control に比して 56.8% と最も抑制効果が大きかった ($p < 0.05$)。超音波処理画分では、sonic ppt が 99.7% と抑制が見られないのに対して、sonic sup では 63.3% と有意な増殖抑制を示した ($p < 0.05$)。また sonic mix でも 61.3% と有意な抑制が見られた ($p < 0.05$)。オートクレーブ処理画分では auto ppt で 89.4% と抑制が見られないのに対して、auto sup では 69.6% と増殖抑制が見られた ($p < 0.05$)。また auto mix でも、63.0% と有意な抑制が見られた ($p < 0.05$)。no water では 84.4% と顕著な抑制は見られなかった。(Fig. 4)

4. 細胞核の形態学的変化

細胞増殖を抑制した上清画分の添加により、初期のアポトーシスを示唆する核内濃染色像が観察

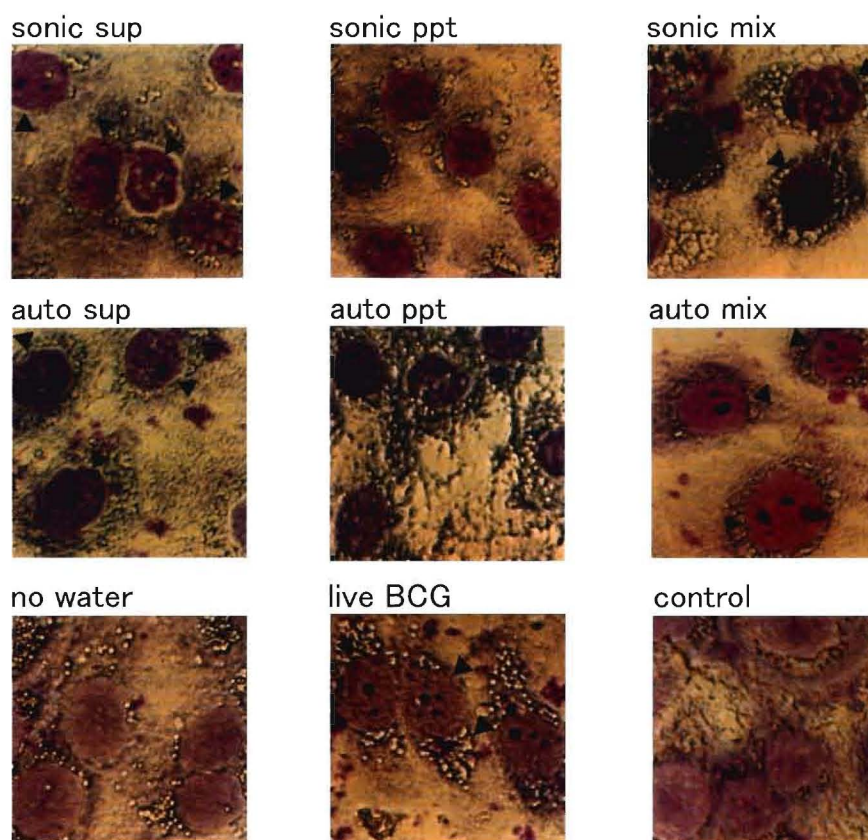


Fig. 5 Apoptotic bodies visualized by Giemsa staining. BCG was sonicated or autoclaved, centrifuged and then fractionated to supernatant and precipitate. These fractions were co-cultured with 5637 human bladder cancer cell line for 5 days. Cells were stained by Giemsa staining. Dark-stained spots indicated by arrowheads are shown in sonic sup, sonic mix, auto sup, auto mix and live BCG fractions.

Table. Percentage of positive cells shown by dark-stained spots.

	positive cells (%)*	p value
sonic sup	27.1 ± 10.6	0.0002
sonic ppt	7.2 ± 13.2	0.4963
sonic mix	34.4 ± 10.4	0.0002
auto sup	29.5 ± 8.1	0.0002
auto ppt	9.6 ± 4.1	0.0696
auto mix	34.2 ± 9.5	0.0002
no water	7.4 ± 2.7	0.5708
live BCG	43.2 ± 7.9	0.0002
control	6.7 ± 2.5	

*Values are expressed as mean±/standard deviation.

され、その割合は control に比して有意に多かった ($p < 0.05$)。 (Fig. 5, Table)

5. フローサイトメトリーを用いたPI法によるアポトーシス細胞の検出

細胞増殖を抑制した上清画分の添加により、ア

ポトーシス細胞の割合が control に比して有意に増加した ($p < 0.05$)。なお、auto ppt と no water は、オートクレーブ処理によりそれ自体が凝集しているため、フローサイトメトリーによる解析においてアポトーシス細胞として誤認識されたため、細

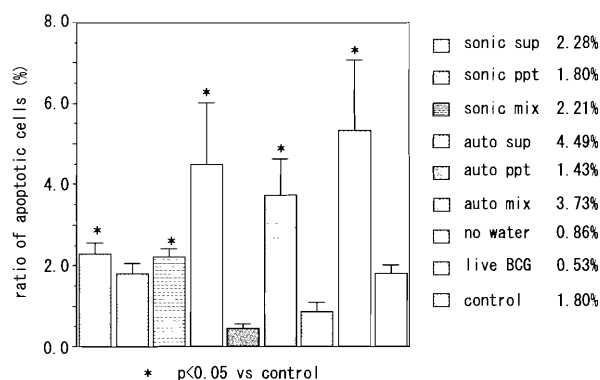


Fig. 6 The ratio of apoptotic cells of 5637 bladder cancer cell co-incubated with sonicated, autoclaved or live BCG. BCG was sonicated or autoclaved, centrifuged and then fractionated to supernatant and precipitate. These fractions were co-cultured with 5637 human bladder cancer cell line for 5 days. Cells and culture supernatant were harvested, stained with PI, then analyzed by FACScan. The ratio of apoptotic cells was significantly increased in sonic sup, sonic mix, auto sup, auto mix and live BCG compared with control. As auto ppt and no water themselves were aggregated and misidentified as apoptotic cell, bars in these fractions were indicated as subtracted these influences.

胞を加えない系で補正した値を用いた。(Fig. 6)

考 察

Sasaki et al.⁴⁾ は BCG 生菌が T24 に対して細胞増殖抑制効果を示し、免疫系を介さずに直接アポトーシスを誘導することを示したが、本研究によって 5637 細胞においても BCG の直接的細胞増殖抑制効果が証明された。BCG 菌体成分中で、何が有効成分であるのかを探索する試みは古くから行われ、細胞壁成分を分離して免疫療法として用いる試みもある⁶⁾。しかし、BCG の直接的抗腫瘍効果として、菌体のどの成分が有効であるのかは未だに明確にされてはいない。我々は BCG の直接的抗腫瘍効果を確認した上で、超音波又はオートクレーブにより破壊した後に、上清と沈渣画分に分けて、その直接的抗腫瘍効果について検討を加えた。

まず、超音波処理及び遠心分離により上清と沈殿に画分した後に、どの画分が抗腫瘍効果を有するのか、さらに両者の混合により相乗効果が現れるのかを検討した。生細胞数の測定と³H-チミジ

ンの取り込みの測定の結果より、上清画分に由来する成分により細胞増殖抑制が見られた。また、上清画分と混合画分とで増殖抑制の効果が大きな差が見られないことから、混合画分での増殖抑制は主に上清画分に由来するものと考えられた。超音波処理による細胞壁破壊と遠心分離による画分によって抗腫瘍効果は大幅に減弱すると予想したが、実際には超音波処理後も抗腫瘍成分が残存することが示された。

本研究でのオートクレーブ処理は滅菌水に懸濁したものと、加えないもの(no water)とで行った。死菌 BCG を得る方法としては、これまでにγ線照射⁷⁾ や 100℃⁸⁾ での煮沸、あるいはオートクレーブ処理を採用しているが、一定のコンセンサスが得られている方法はない。本研究において滅菌水を加えずに菌体のみをオートクレーブ処理した場合(no water)は菌体が焦げた状態になり、これを培養細胞に加えても細胞増殖抑制効果は認めなかった。したがってこの処理方法で得られた菌体は死菌と断定していいものと考えられた。一方、滅菌水に懸濁した BCG の場合、生細胞数の測定と³H-チミジンの取り込みの測定の結果より、超音波処理と同様上清画分に細胞増殖抑制が見られた。BCG を水中に懸濁して処理した場合は、高熱と高圧に安定な成分が生理活性を保って効果を示したのと考えられた。

以上の点より、超音波処理、オートクレーブ処理いずれの処理を施しても上清画分に細胞増殖を抑制する成分が存在することが示唆された。

超音波処理による BCG の菌体画分採取は、従来免疫学的機序を介した間接的抗腫瘍効果を検討するために可溶性タンパク質を抽出する目的で行われてきた。Gulle et al.⁹⁾ は BCG を超音波処理で得られた可溶性タンパク質と BCG で免疫した牛 T 細胞を反応させ、免疫学的作用機序に関与する成分を検出している。著者らも、超音波処理後 BCG を用いてリンパ球の増殖能の検討を行ったが、超音波処理後もリンパ球の活性化作用は維持された¹⁰⁾。

これまでの報告では超音波処理後に、超遠心分離やフィルター濾過することで不溶性成分として細胞壁成分が除去されている^{8,9)}。本研究では超音波処理後、特に細胞壁成分を除去することはし

ておらず、また、3,000回転による遠心分離という方法から、上清画分にも細胞壁成分は含まれるものと考えられる。走査電子顕微鏡による観察結果では、細胞壁の破壊が確認された。細胞壁成分としての脂質、糖鎖、表面抗原タンパク質、または、細胞壁が壊れたことにより漏出した可溶性の各種細胞成分のいずれかに効果があるものと考えられる。

さて、BCGの直接的抗腫瘍効果の機構としてはアポトーシスが考えられる。抗腫瘍効果を有した上清画分との混合培養後に点状の核の濃染部分が検出された。このことはアポトーシスの初期段階を反映していると考えられた。さらにPI法による解析から実際にアポトーシス細胞が検出された。このアポトーシス誘導の機序として Cheng et al.¹¹⁾ は、BCGは細胞表面に多数存在する糖タンパク質であるフィブロネクチンのC末側のヘパリン結合部位に接着することを見いだした。さらに Shemtov et al.¹²⁾ は、lymphokine-activated killer (LAK) 細胞はT24に対してアポトーシスを誘導するが、抗フィブロネクチン抗体によりBCGの接着を阻害すると抗腫瘍効果は減少すると報告した。また、フィブロネクチンは細胞間マトリックスとしての作用を持ち¹³⁾、造血系ではアポトーシスを誘導することが示されている^{13,14)}。今回の検討で抗腫瘍効果が証明された上清画分を用いてアポトーシス誘導におけるフィブロネクチンの関与について解析することが今後の課題である。

BCGの膀胱内注入療法では、Lamm et al.¹⁵⁾ は1,278例中の2%に入院を要する合併症が生じていると報告しており、我々も高度萎縮膀胱の4例、難治性関節炎の2例、間質性肺炎の1例を報告している¹⁶⁾。さらに、Rawls et al.¹⁷⁾ は敗血症の5例(うち3例は死亡)、Fishmann et al.¹⁸⁾ は結核性脊椎炎の1例を報告している。このような重篤な副作用を防ぐためにも、BCGの有効成分を同定し、生菌に比し副作用の少ない治療法の開発が待たれている。

結 語

ヒト膀胱癌細胞株5637に対するBCG生菌及び超音波処理、オートクレーブ処理画分の抗腫瘍

効果を検討した。BCG生菌が最も顕著な細胞増殖抑制効果を呈したが、超音波処理、オートクレーブ処理上清画分でも有意な抗腫瘍効果を示した。その作用機序はアポトーシスによることが示唆された。

文 献

- Morales A, Eidinger D, Bruce AW. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. J Urol 1976;116:180-183.
- Lamm DL. Optimal BCG treatment of superficial bladder cancer as defined by American trials. Eur Urol 1992;21 Suppl 2:12-16.
- Dinney CP, McConkey DJ, Millikan RE, Wu X, Bar-Eli M, Adam L, Kamat AM et al. Focus on bladder cancer. Cancer Cell 2004;6:111-116.
- Sasaki A, Kudoh S, Mori K, Takahashi N, Suzuki T. Are BCG effects against urinary bladder carcinoma cell line T24 correlated with apoptosis *in vitro*? Urol Int 1997;59:142-148.
- Lerner SP. Treatment of high-risk, non-muscle-invasive bladder cancer. Nat Clin Pract Urol 2006;3:398-399.
- Hayashi Y. Interferon-gamma as a marker for the effective cancer immunotherapy with BCG-cell wall skeleton. Proc Japan Acad 1994;70:205-209.
- Turner J, Dockrell HM. Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with live *Mycobacterium bovis* BCG activates cytolytic CD8+ T cells in vitro. Immunology 1996;87:339-342.
- Bohle A, Thanhauser A, Ulmer AJ, Ernst M, Flad HD, Jocham D. Dissecting the immunological effects of Bacillus Calmette-Guerin (BCG) *in vitro*: evidence of a distinct BCG-activated killer (BAK) cell phenomenon. J Urol 1993;150:1932-1937.
- Gulle H, Fray LM, Gormley EP, Murray A, Moriarty KM. Responses of bovine T cells to fractionated lysate and culture filtrate proteins of *Mycobacterium bovis* BCG. Vert Immunol Immunopathol 1995;48:183-190.
- 工藤誠治, 劉 星星, 盛 和行, 斎藤英樹, 工藤大輔, 鈴木唯司. BCG活性化リンパ球についての基礎的研究. BCG・BRM療法研究会会誌 1997;21:37-44.

- 11) Cheng DL, Shu WP, Choi JC, Margolis EJ, Droller MJ, Liu BC. Bacillus Calmette-Guerin interacts with the carboxyl-terminal heparin binding domain of fibronectin: implications for BCG-mediated antitumor activity. *J Urol* 1994;152:1275-1280.
- 12) Shemtov MM, Cheng DL, Kong L, Shu WP, Sassaroli M, Droller MJ, Liu BC. LAK cell mediated apoptosis of human bladder cancer cells involves a pH-dependent endonuclease system in the cancer cell: possible mechanism of BCG therapy. *J Urol* 1995;154:269-274.
- 13) 菅原浩之. フィブロネクチンによる VLA5 を介する白血病細胞のアポトーシス誘導機構. *日本臨床* 1996;54:1809-1814.
- 14) Sugahara H, Kanakura Y, Furitsu T, Ishihara K, Oritani K, Ikeda H, Kitayama H, et al. Induction of programmed cell death in human hematopoietic cell lines by fibronectin via its interaction with very late antigen 5. *J Exp Med* 1994;179:1757-1766.
- 15) Lamm DL, Stogdill VD, Stogdill BJ, Crispen RG. Complications of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy in 1278 patients with bladder cancer. *J Urol* 1986;135:272-274.
- 16) 工藤真哉, 対馬伸晃, 澤田善章, 斎藤文匡, 木村文一, 高島 徹, 古川利有, 他. 膀胱癌に対する BCG 膀胱内注入療法における副作用 - われわれが経験した重篤な合併症. *日泌尿会誌* 1991;82:1594-1602.
- 17) Rawls WH, Lamm DL, Lowe BA, Crawford ED, Sarosdy MF, Montie JE, Grossman HB, et al. Fetal sepsis following intravesical bacillus Calmette-Guerin administration for bladder cancer. *J Urol* 1990;144:1328-1330.
- 18) Fishman JR, Walton DT, Flynn NM, Benson DR, deVere White RW. Tuberculous spondylitis as a complication of intravesical bacillus Calmette-Guerin therapy. *J Urol* 1993;149:584-587.