

# SchizophyllanとNK-421の抗腫瘍、 延命効果と細胞性免疫能増強効果

岡山大学医学部第一外科学教室（主任：折田薫三教授）

岡 哲 秀

（昭和60年4月5日受稿）

Key words: シゾフィラン, NK-421,  
SPG, ベスタチン

## 緒 言

近年、臨床面に於ても、これまでの手術、放射線、化学療法に加えて、種々の免疫賦活剤を用いた非特異的免疫療法が行なわれており、新しい免疫賦活剤の開発も行なわれている。

一方、これら免疫賦活剤のうちBCG及びその類似物質Corynebacterium parvum<sup>1)</sup>やOK-432は癌細胞に対する直接効果を有するが、その他の免疫賦活剤は宿主介在性に効果を現わし、その作用機序が複雑であり、未解明な点も多い。

今回、新しい免疫賦活剤であるSchizophyllan (SPG)<sup>2)</sup>とNK-421 (Bestatin)<sup>3),4)</sup>を用い、C<sub>3</sub>H/HeマウスにsyngeneicなMH-134 Hepatoma cellを移植し、これら薬剤を単独ないし、mitomycin C (MMC)と併用投与し、マウスへの延命効果とantibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)活性、natural killer (NK)活性を通しての免疫能の動態を検討した。

SPGは、担子菌の一種であるスエヒロタケ (Schizophyllum commune Fries) の培養液より菌子体を除去して得られるグルコースのみよりなる重合体である。その基本構造は $\beta$ -1.3グルコシド結合をする直鎖のグルコース残基3個に1個の割合で1分子のグルコースが $\beta$ -1.6グルコシド結合を介して分岐している<sup>5)</sup>。

NK-421は、梅沢らによりアミノペプチダーゼB阻害物質としてStreptomyces olivoreticuliの培養炉液中に発見され、2-hydroxy-3-amino-4-phenyl-butylic acidにL-leucineがついた構造の

分子式C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>の低分子(分子量308)ペプチッドである<sup>6)</sup>。

二つの薬剤とも、担癌宿主に対する免疫賦活作用を有することで注目されている。

## 実験材料および方法

### 1) 実験動物

静岡実験動物研究所より購入した10~12週令のC<sub>3</sub>H/He雄性マウスを1群10匹として用いた。

### 2) 腫瘍細胞

C<sub>3</sub>H/Heマウス由来のMH-134 Hepatoma cellを腹水型で同種継代し、12日目の腫瘍細胞を採取後生理食塩水で $5 \times 10^5$  cell/0.1mlに調整し、マウス腹腔内ないし背部皮下に移植した。

### 3) 使用薬剤

a) SPG; 科研製薬K.K.より供与された1バイアル10mg/mlの製剤を使用直前に生理食塩水で、必要な各濃度に希釈して用いた。250mg/kgの高濃度投与には1バイアル200mgの特殊製剤を用いた。

b) NK-421; 微生物化学研究所、日本化薬株式会社より供与された1バイアル10mgの製剤をやはり使用直前に生理食塩水で希釈して用いた。

c) MMC; 協和醸酵工業K.K.製1バイアル2mgのMMCを同様に希釈し各濃度で用いた。なお各薬剤は、マウス1匹に対する1回投与量が0.1mlとなる様に調整した。

### 4) SPGの単独治療実験

a) 腹腔内投与; 腹腔内へ移植したMH-134

5 × 10<sup>5</sup> cellsの腫瘍に対し、1回0.4mg/kg, 10 mg/kg, 250mg/kgのいずれかの量のSPGを連日10回腹腔内へ投与し、延命効果により至適投与量を検討した。

b) 皮下投与; 背部皮下に移植したMH-134 5 × 10<sup>5</sup> cellsの腫瘍に対し腹腔内投与と同様の各薬剤量を、腫瘍より遠位皮下(腹部皮下)に投与し、さらに投与開始を移植翌日の他6日目、または11日目に行い至適投与量及び投与開始時期を検討した。

#### 5) SPGとMMCとの併用治療実験

a) 両薬剤の至適投与タイミング; 1 mg/kgのMMCをMH-134 5 × 10<sup>5</sup> cellsの腫瘍移植3日目、7日目、11日目のいずれかに1回、腹腔内投与した。SPGは、移植翌日、3日目、5日目、7日目、9日目のいずれかより投与を開始し、1回10mg/kgを連日5回腹部皮下に投与し、各intervalの組み合わせから、combination therapyを行う上での至適投与タイミングを検討した。

b) 併用投与時のMMCの投与量の検討; MH-134 5 × 10<sup>5</sup> cells腫瘍移植3日目に0.2, 1, 3, 5mg/kgのいずれかの量のMMCを腹腔内に投与し、5日目よりSPG 10mg/kgを1回量として連日5回皮下投与を行い、SPGと組み合わせるMMCの至適投与量を検討した。

c) 腫瘍切除後のMMC, SPGの併用投与実験; MH-134 5 × 10<sup>5</sup> cellsの腫瘍を背部皮下に移植した17日目に、塊状に隆起した腫瘍根部を結紮、その上より腫瘍切除を行った。術後3日目にMMC 1 mg/kgを投与した群、さらにMMCに加えて、術後5日目より1回10mg/kgのSPGを連日5回投与した群を作り、手術のみを行ったコントロール群と比較して術後治療についての検討を行った。

#### 6) NK-421の治療実験

a) 腹腔内投与; 腹腔内へ移植したMH-134 5 × 10<sup>5</sup> cellsの腫瘍に対し、NK-421 1, 10, 25 mg/kgのいずれかの量を1回量とし、移植翌日より連日10回腹腔内投与して、延命効果について検討した。

b) 皮下投与; 背部皮下にMH-134 5 × 10<sup>5</sup> cells腫瘍移植し、0.1, 1, 10, 25mg/kgのい

ずれかの量のNK-421を腫瘍より遠位皮下(腹部皮下)に投与し、延命効果を検討した。

#### 7) ADCC活性, NK活性の測定

effector細胞には、各実験群のC<sub>3</sub>H/He マウスより無菌的に摘出された脾臓を細切し、No 150 wire mesheでろ過し、混入した赤血球を0.75% NH<sub>4</sub>Cl-trisbuffer (pH7.65)を用いて溶血除去、洗浄後浮遊調整した。

標的細胞にはADCCでは新鮮ニワトリ赤血球(CRBC)を使用した。すなわちCRBC 1 × 10<sup>7</sup> cells/mlに対し、200 μCiのNa<sub>2</sub>[<sup>51</sup>Cr]O<sub>4</sub>を加え5% CO<sub>2</sub>, 37°C 1時間標識し、洗浄の後マイクロプレート(Falcon, No 3042, U.S.A)にwellあたり1 × 10<sup>5</sup> cells/100 μlを分注し、ウサギ抗CRBC抗体、凝集価1 : 5000を加え30分培養した。

NK活性は、標的細胞に麻疹ウイルス感染HeLa細胞(M-HeLa)を5 × 10<sup>3</sup> cells/well用い、5% CO<sub>2</sub>, 37°Cで12時間培養後、wellあたり2 μCiのNa<sub>2</sub>[<sup>51</sup>Cr]O<sub>4</sub>を加え6時間標識を行った。

なお、リンパ球の抗Thy-1処理には、Hybridoma由来のmonoclonal IgM anti Thy-1, 2抗体(Olac社)の1000倍希釈したものをを用い、4°C, 30分間反応させ、その後遠沈、25%モルモット乾燥補体液(極東社)を加え、さらに37°C, 40分反応させ洗浄を行った。別に補体のみで処理したものを対照とした。

測定は、マイクロテストプレート上に分注された各標的細胞に、effector細胞を加え、ADCC活性ではE/T ratioを5 : 1, NK活性では100 : 1として37°C, 5% CO<sub>2</sub>下12時間培養後遠沈、上清を100 μl採取しγ spectrometerで測定を行った。対照には、effector細胞の代わりとして培養液のみを加えたものをを用いた(図1)。

% specific lysis及び抗Thy-1抗体処理による% reductionは次式にて算出した。

$$\% \text{ specific lysis} = \frac{\text{experimental cpm} - \text{spontaneous cpm}}{\text{total cpm} - \text{spontaneous cpm}} \times 100$$

$$\% \text{ reduction} = 100 - \frac{\% \text{ cytotoxicity of cells treated with anti Thy-1 pulus}}{\% \text{ cytotoxicity of cells treated with C only}} \times 100$$

本測定の対照としたマウスは、前述SPG, MMC併用治療実験群のうち最も延命効果の認められ

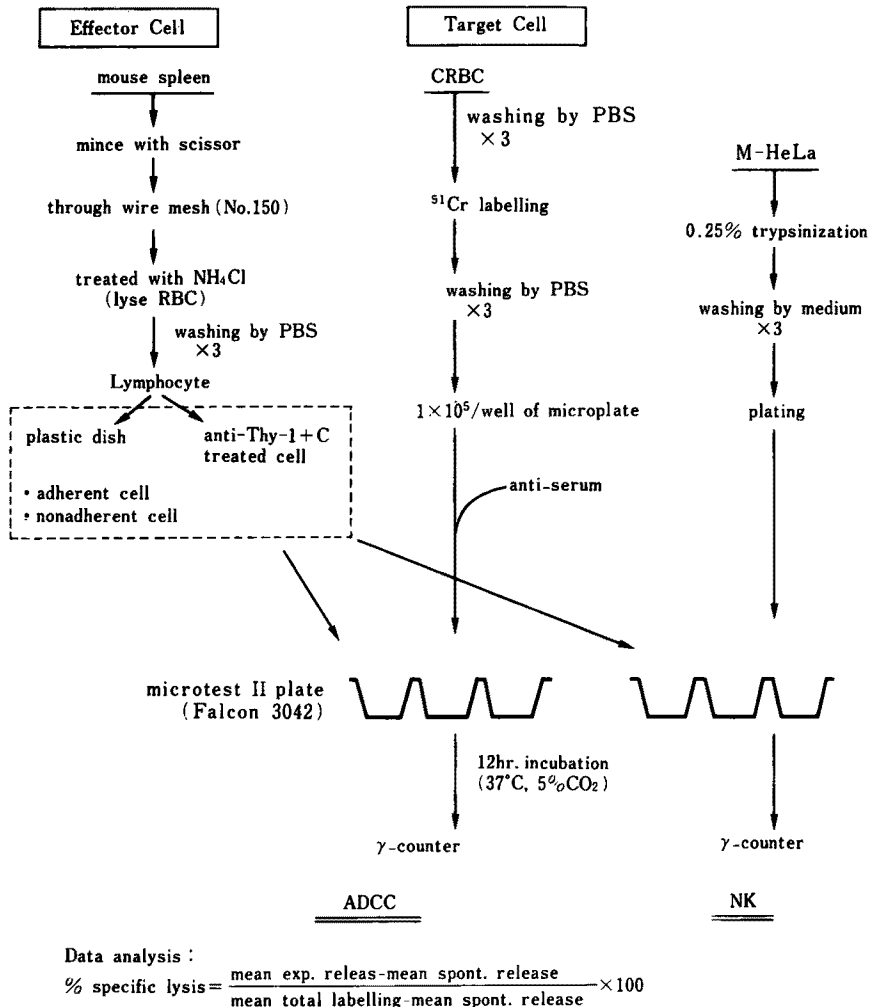


図1 ADCC活性、NK活性の測定

た群, SPG, MMC各単独治療群, 及びNK-421 0.1mg/kg~100mg/kgを1回量として移植翌日より10日間連日経口投与した各群であり, 測定は移植3日目より19日目の間に行った。

### 実験結果

#### 1) SPG単独治療成績

MH-134腫瘍 $1 \times 10^5$  cells/0.1mlを腹腔内移植し, その翌日より連日10日間SPG 0.4mg, 10mg, 250mg/kg/dayの各量を1回量として腹腔内投与した実験では, 対照群の平均生存日数

(MSD)が $11.7 \pm 5.8$ 日であるのに対し, SPG投与群では0.4mg/kg投与群で $14.3 \pm 5.7$ 日, 10mg/kg投与群で $16.2 \pm 5.4$ 日, 250mg/kg投与群で $11.7 \pm 6.0$ 日であり10mg/kg投与群では20日以上生存マウスが2匹認められた。他群は20日以内に全例死亡した。

次にMH-134腫瘍を同量皮下移植した群に, 各薬量を連日10日間腹部皮下投与した実験では, 対照群のMSDが $27.6 \pm 11.2$ 日に対し, SPG 0.4mg/kg投与群で $27.3 \pm 15.7$ 日, 10mg/kg投与群で $33.8 \pm 17.5$ 日と最も延命効果が高く, 250



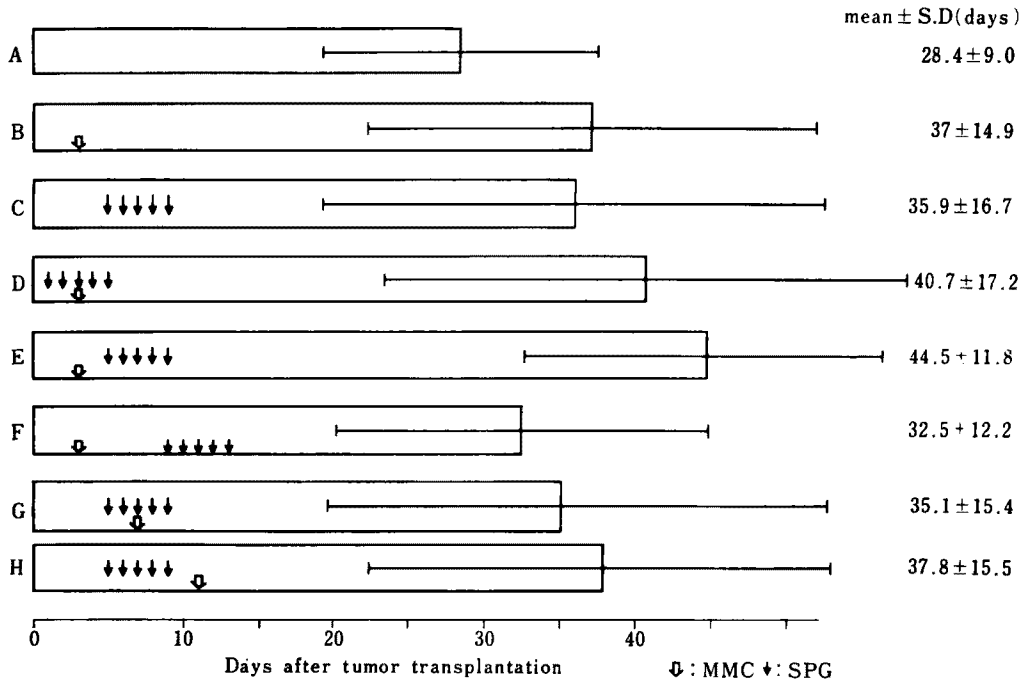


図2 SPGとMMCとの併用による延命効果

↓: MMC/mg/kgをi.p.投与, ↓: SPG 10mg/kgをs.c.投与  
MMCをMH-134腫瘍細胞  $5 \times 10^5$  cells 移植3日後に投与し, 5  
日後よりSPG 10mg/kg/dayで連続5回投与した群が最も有効

SPGを投与し, かつSPGの投与量もE群に用いたのと同様の至適投与量と考えられる10 mg/kgとし, 移植3日目に投与するMMCの投与量のみを0.2mg/kg, 1mg/kg, 3mg/kg, 5mg/kgと変化させてみて, 両剤併用時に於けるMMCの至適投与量を検討した。

MMC 5mg/kgの単独大量投与により有意な腫瘍の縮小はあるものの ( $p < 0.001$ ), このほか延命効果が少なく, これにSPGを併用した場合, 移植20日目及び29日目に於て, 5 mg/kgのMMC単独投与に比し各々生存マウスは2匹多く認められた。これは1mg/kgのMMCとSPGを併用した場合と差がなく, 両剤の併用投与では, 1mg/kgのMMC投与が至適であると思われた(表2)。

さらに, 腫瘍移植後, MMC, SPGを投与するこれまでの実験に加えて, より実際の外科に於ける治療ケースに近いモデルとして, 腫瘍を背部移植後17日目に切除した後, 前述の二剤の

至適投与法により治療を試みた。

手術日を0日とし, 術後45日まで観察を行った。第一群は, 手術施行のみで投薬を行わず, 平均生存日数(MSD)が $28.1 \pm 11.8$ 日であった。それに対して, 腫瘍移植17日目に腫瘍摘出し, 術後3日目にMMC 1mg/kgを腹腔内投与した群ではMSDが $32.9 \pm 12.2$ 日, 更にその上にSPGを術後5日目より10mg/kg/dayで連日5日間投与した群のMSDは $34.8 \pm 11.4$ 日となった(図3)。この結果は腫瘍摘出後に, MMC, SPGを併用する免疫化学治療を行うと, より延命がみられる事を示した。

### 3) NK-421の治療成績

NK-421 1, 10, 25mg/kg/dayの各投与量をMH-134腫瘍 $5 \times 10^5$  cellsを腹腔内移植したマウスに対して, 翌日から連日10回腹腔内投与を行ったが, 各群とも平均生存日数は無治療コントロールと差はなかった。

また0.1, 1, 10, 25mg/kg/dayの各量を,

表2 MMCとSPGの併用治療に於けるMMCの至適投与量  
 MMCをMH-134腫瘍細胞 $5 \times 10^5$  cells移植3日後に投与し、5日  
 後よりSPG 10mg/kg/dayで連続5回投与。  
 腫瘍の縮小、延命効果を比較した場合、両剤の併用投与では、1  
 mg/kgのMMC投与が至適と思われた。

| therapy \ day |           | 20th day   |                         | 29th day    |                         |
|---------------|-----------|------------|-------------------------|-------------|-------------------------|
| MMC (i.p)     | SPG (s.c) | tumor size | mouse count of survival | tumor size  | mouse count of survival |
| 0 mg/kg       | 0 mg/kg   | 280.9±75.6 | 8/10                    | 320.0±63.8  | 6/10                    |
| 0.2mg/kg      | 0 mg/kg   | 269.1±62.7 | 9/10                    | 271.2±78.3  | 9/10                    |
|               | 10mg/kg   | 269.3±83.5 | 10/10                   | 268.4±95.6  | 10/10                   |
| 1 mg/kg       | 0 mg/kg   | 271.4±85.5 | 10/10                   | 308.1±79.4  | 7/10                    |
|               | 10mg/kg   | 231.2±89.6 | 10/10                   | 248.8±88.5  | 10/10                   |
| 3 mg/kg       | 0 mg/kg   | 256.6±67.7 | 9/10                    | 202.2±74.2  | 7/10                    |
|               | 10mg/kg   | 356.1±61.7 | 10/10                   | 302.7±95.7  | 10/10                   |
| 5 mg/kg       | 0 mg/kg   | 116.0±53.4 | 8/10                    | 136.3±65.3  | 7/10                    |
|               | 10mg/kg   | 166.0±61.2 | 10/10                   | 321.1±131.1 | 9/10                    |

$5 \times 10^5$  cellsの同腫瘍を背部皮下に移植したマウスに移植翌日より連日10日間皮下投与したが、MSDでは、非投与群と投与群の間に有意な差は認められなかった。しかしLD<sub>50</sub>は非投与群に対し投与群で2～3日間の延命傾向が現れており、非投与群が42日間で全例死亡した後も、投与群では全群ともさらに3～4日間少数のマウスが生存した(表3)。

4) SPG投与に於けるADCC, NK活性の変化  
 健常マウス, 担癌生食投与群, MMC 1 mg/kgを腫瘍移植3日目に腹腔内投与した群(MMC単独投与群), SPG 1回10mg/kgを腫瘍移植5日目より連続5回皮下投与した群(SP単独投与群), 前述した最も延命効果の認められたところの腫瘍移植3日目に1 mg/kgのMMCを腹腔内に投与し, 併わせて移植5日目よりSPGを10

mg/kg/day連続5回皮下投与した群(SP, MMC併用群)の計5群について, 経日的にADCC, NK活性を測定した。なお腫瘍は, 同様にMH-134腫瘍 $5 \times 10^5$  cells背部皮下に移植した。SPG単独投与群では, 薬剤投与の終了した移植9日目頃よりADCC活性の急激な上昇がはじまり, 12日目に49%とピークに達した。これは, 担癌対照群に較べ約20%の活性増加であった。その後徐々に活性増強は復元に向かい, 17日目には対照群と同等になった。しかしMMC単独投与群では, 測定の全経過を通して, 対照群に較べ10%強のADCC活性の低下を認めた(図4)。

一方これに対し, MMCにSPGを至適タイミングで併用投与した場合, MMC単独投与の場合の様に活性は低下することなく, 12日目頃まで担癌対照群の活性レベルを維持し, その後さ

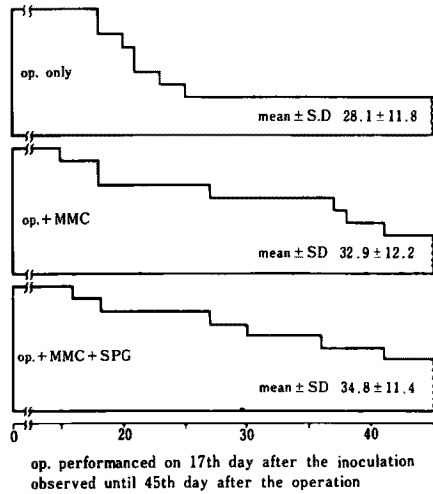


図3 腫瘍切除手術後のMMCとSPGの併用投与による延命効果

腫瘍摘出 腫瘍移植17日目に施行

MMC 術後3日目に1mg/kgを腹腔内投与

SPG 術後5日目より10mg/kg/dayで連日5日間皮下投与

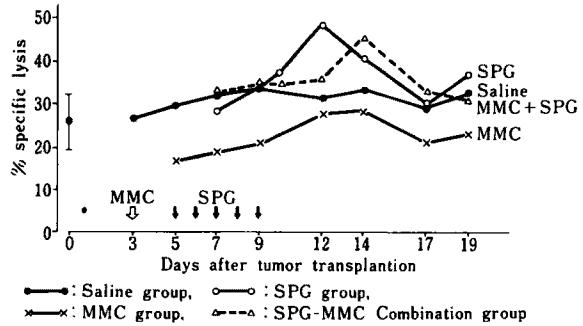


図4 SPGの担癌マウス脾細胞のADCC活性に与える影響

↓: MMC/mg/kg, i.p. 投与, ↓: SPG10mg/kg/day, s.c. 投与. MH-134腫瘍細胞  $5 \times 10^5$  cells, s.c. 移植後SPG単独投与でADCC活性は12日後に最高となる. MMCとSPGの併用投与はADCC活性の増強を復活させた.

らに上昇し14日目にピークを認め、移植19日目も担癌対照群レベルを維持した.

これら各群のADCC活性の増減が、いずれの細胞分画に関わって生じているのかについて、担癌10日目の健常マウス及び前項各処理群のマウスについて検討を行った.

健常群に比べ、担癌対照群では、非付着細胞 (nonadherent) 分画に強い活性増強が認められ、

表3 NK-421単独投与による延命効果

| tumor                  | NK421 therapy | LD <sub>50</sub> (days) | Mean ± S.D (days) | mouse count of living over 43 days |            |
|------------------------|---------------|-------------------------|-------------------|------------------------------------|------------|
| i.p<br>$5 \times 10^5$ | i.p           | control                 | 10                | 11.1 ± 2.7                         |            |
|                        |               | 1 mg/kg × 10            | 10                | 11.3 ± 2.8                         |            |
|                        |               | 10mg/kg × 10            | 12                | 11.3 ± 3.1                         |            |
|                        |               | 25mg/kg × 10            | 10                | 11.0 ± 2.2                         |            |
| s.c<br>$5 \times 10^5$ | s.c           | control                 | 23                | 27.1 ± 8.0                         | 0          |
|                        |               | 0.1mg/kg × 10           | 24                | 28.2 ± 10.1                        | 1 × 3 days |
|                        |               | 1 mg/kg × 10            | 21                | 27.9 ± 10.7                        | 1 × 4 days |
|                        |               | 10mg/kg × 10            | 28                | 28.4 ± 10.5                        | 1 × 3 days |
|                        |               | 25mg/kg × 10            | 27                | 30.2 ± 9.3                         | 1 × 6 days |

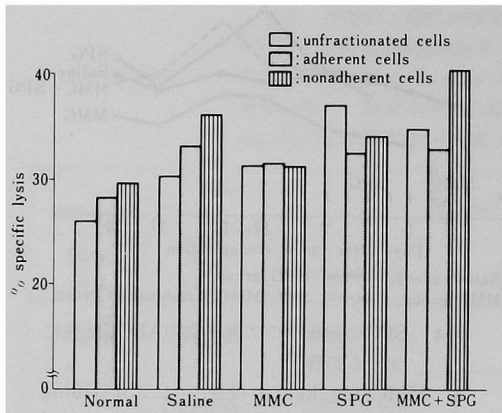


図5 SPGのplastic dish処理脾細胞のADCC活性に与える影響

実験方法は図4に同じで、ADCC活性は腫瘍移植10日目に測定した。MMC+SPG併用群で、脾細胞の nonadherent cellにADCC活性が高かった。

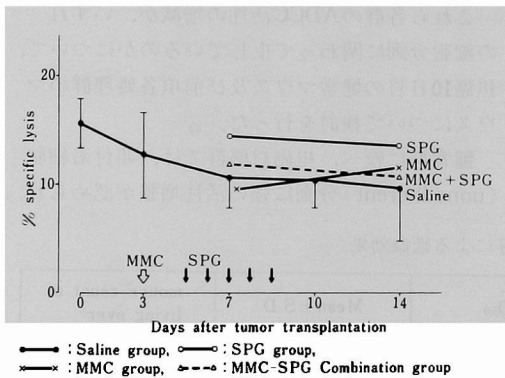


図6 SPGの担癌マウス脾細胞のNK活性に与える影響

実験方法は図4に同じ担癌対照

担癌対照群では腫瘍の増殖とともにNK活性は低下して行く。SPGの投与群では、NK活性を若干上昇せしめるが、健常群以上の強い活性上昇は認められなかった。

MMC投与群では、この分画が抑制を受けているのが認められた。MMC投与に加えて、至適タイミングでSPGを併用した群では、MMC単独投与の場合に抑制を受けていた nonadherent 分画は、強い活性の回復が認められた。SPGの単独投与では、付着細胞(adherent)、非付着細胞(nonadherent)両分画の増強に大きな違いはなく、また unfractionated分画に比して若干の活

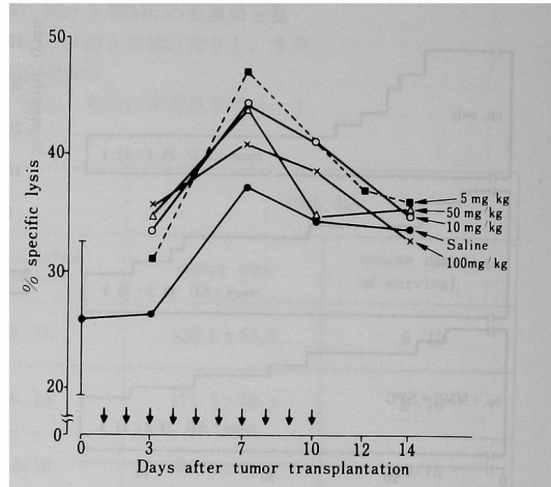


図7 MH-134担癌マウス脾細胞のADCC活性におよぼすNK-421の影響

MH-134 Hepatoma  $5 \times 10^5$  cellsを背部皮下に移植。NK-421を移植翌日より連日10日間経口投与。各投与群では、移植3日目頃より活性が増強し、7日目にピークを認めた。100mg/kgの投与群では活性上昇のピークが弱い。

性低下が認められた(図5)。

同様にして各群について、NK活性の変化を経日的に検討した。その結果、腫瘍細胞移植前の健常マウスでは、 $15.6 \pm 2.2\%$ のNK活性があり、担癌対照群では腫瘍の増殖とともに次第にNK活性の低下して行く状態が認められた。SPGの投与群では、この様に低下していくNK活性を若干上昇せしめる傾向を示したが、健常群以上の強い活性上昇は認められず、MMC投与群、MMC、SPG併用群でも著明な活性変化は認められなかった(図6)。

### 5) NK-421投与に於けるADCC, NK活性の変化

NK-421を5, 10, 50, 100mg/kg/dayの各doseを1回投与量とし、MH-134 Hepatoma  $5 \times 10^5$  cellsを背部皮下に移植したマウスに、移植翌日より連日10日間経口投与を行い、経時的にADCC活性を測定した。

各投与群では、移植3日目頃より活性が増強し、7日目にピークを認め14日目には担癌対照群と同等の活性レベルに復した。100mg/kgの投与群では活性上昇のピークが弱く、他の投与



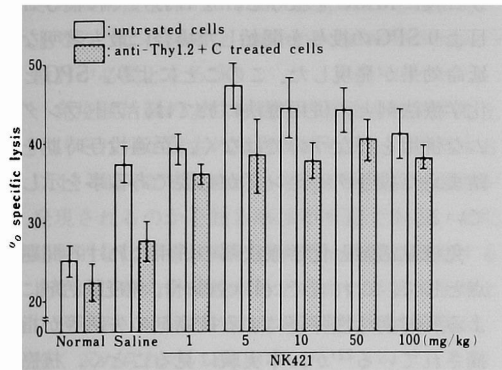


図8 MH-134担癌10日目のマウス脾細胞の抗Thy-1抗体と補体処理によるADCC活性の変化におよぼすNK-421の影響

腫瘍移植10日目の各群の脾細胞を、抗Thy 1, 2 IgM抗体及び補体で処理し、T細胞の活性を除去した場合、担癌対照群の減弱率に対し、NK-421投与群の減弱率は低い値を示した。

表4 MH-134担癌10日目のマウス脾細胞の抗Thy-1抗体と補体処理におけるADCC活性の% ReductionにおよぼすNK-421の影響

| Effector Cells  | % reduction by anti-Thy-1 plus C |
|-----------------|----------------------------------|
| Normal spleen   | 10.4 ± 2.5                       |
| Saline spleen   | 26.2 ± 2.6                       |
| Bestatin 1mg/kg | 8.2 ± 3.5                        |
| 5mg/kg          | 18.3 ± 4.5                       |
| 10mg/kg         | 14.9 ± 4.2                       |
| 50mg/kg         | 8.7 ± 1.0                        |
| 100mg/kg        | 7.1 ± 2.3                        |

(mean ± S.D.)

群の1/2以下であった(図7)。

次に腫瘍移植10日目の各群の脾細胞を、抗Thy 1, 2 IgM抗体及び補体で処理し、T細胞の活性を除去した場合、担癌対照群の減弱率26.2 ± 2.6%に対し、NK-421投与群の減弱率は5mg/kg投与群で18.3 ± 4.5%、10mg/kg投与群で14.9 ± 4.2%と低い値(p < 0.01, p < 0.001)が認められた(図8, 表4)。NK活性に於ては、担癌対照群では腫瘍の増殖とともに徐々に活性が低下していくのが認められた。NK-421の50mg/kg、100mg/kg投与群では、対照とほぼ変わらず、10mg/kg投与群では、健常マウスのレベルまで

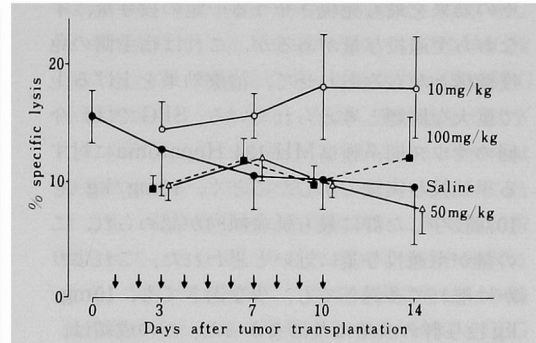


図9 MH-134担癌マウス脾細胞のNK活性におよぼすNK-421の影響

MH-134 Hepatoma  $5 \times 10^5$  cellsを背部皮下に移植、NK-421を移植翌日より連日10日間経口投与、10mg/kg投与群では、健常マウスのレベルまでの有意な(p < 0.01)NK活性の上昇が認められた。

の有意な(p < 0.01)NK活性の上昇が認められた。しかし健常群以上の活性の上昇は認められなかった(図9)。

## 考 察

SPGは、担子菌の一種Schizophyllum commune Fries(スエヒロタケ)の培養液より粘性物質として抽出された無味、無臭の白色粉末で、蛋白質を含有しない多糖体である。水に溶解し、透明な粘調な液体となる<sup>5)</sup>同様に、カワラタケから採取された製剤として、PSK<sup>6)</sup>が知られる。またNK-421はStreptomyces olivoreticuliの培養液中より、細胞膜上に局在するenzymeに対するinhibitorとして発見された物質であり、aminopeptidase Bとleucine aminopeptidaseの活性を阻害するdipeptideであり<sup>7)</sup>、両剤ともlevamisole<sup>8),9)</sup>の如き完全な化学合成品<sup>10)</sup>としての薬剤と、誕生の経緯を異にしている。これまでにbacillus calmette Guérin (BCG)<sup>11)</sup>をはじめとして、各種の免疫賦活作用を有する薬剤についての研究がなされている。これらの中には、癌細胞に直接にcytostaticに作用する薬剤も知られているが、今回使用したSPG、NK-421は、担癌宿主介在性に作用する薬剤であり、その免疫機構を通して抗腫瘍性を発現する<sup>12)</sup>。

現在まで知られている免疫賦活剤の多くは、

その効果を最も発現させようとする一定の投与量、すなわち至適投与量があるが、これは宿主側の免疫機構とからみあわせて、治療効果を上げる上で重大な問題と考えられている。SPGでは、今回のマウス同系腫瘍MH-134 Hepatomaに対する単独投与実験で示したごとく、10mg/kgを10回投与した群に最も延命傾向が認められ、この量が至適投与量に近いと思われた。これよりかけ離れて多過ぎても、少な過ぎても、10mg/kg投与群の成績に及ばなかった。この成績は、投与経路をintraperitoneal (i.p), subcutaneous (s.c) に変えて行ってみても同様であった。また、s.c.投与では、10mg/kg/day投与群について、移植翌日より種々投与開始時を変えて効果の違いを検討したが、移植7日後までに投与を開始した場合に良好な結果が得られており、levamisoleの投与開始時期が、その結果と密接な関連を有していること<sup>13)</sup>と同様の意味と思われる。至適投与時期が、免疫賦活剤の効果に大きく影響することは、至適投与量の問題と考え併せ興味深い。

NK-421の単独投与に於ては、MH-134 Hepatoma cellを用いた本実験系では明確なMSDの延長を認めなかったが、これまでにEhrlich腫瘍系を用いて5~50mg/kgの比較的広い投与領域が報告されている<sup>14)</sup>。

しかし、これらの至適投与量、至適投与開始時期を踏まえた上でも、臨床面に於ては現在免疫賦活剤単独で癌を治そうと考えるのは不可能に近く、主腫瘍の外科的切除、放射線照射、化学療法をまず用いて、腫瘍の縮小を計り、その上で免疫賦活剤を用いることが必要条件とされている<sup>15)</sup>。免疫賦活剤と化学療法剤を併用する場合、その併用時期、タイミングが問題であり<sup>16)</sup>これを無視した不適当な投与は、相加相乗効果をあげる事はできない。これまでも、BCG, corynebacterium parvum, levamisole等について、化学療法剤との併用効果に関する同様な検討がなされているが<sup>17),18),19)</sup>多糖体系の免疫賦活剤であるPSKについても、化学療法剤との併用投与のタイミングの重要性が指摘されている<sup>20),21)</sup>。

SPGとMMCとの併用投与を行なった今回の検討でも、種々の組み合わせの中で、腫瘍移植

3日後にMMCを投与し、1日おいて移植5日目よりSPGの投与を開始した場合に最も著明な延命効果が発現した。このことにより、SPGと化学療法剤との併用療法に於ては、アトランダムな併用を行なうのではなく、至適投与時期を踏まえた投与タイミングが必要である事を示している。

免疫賦活剤と化学療法剤の併用に於ける問題点として、これまでcell cycleや、免疫賦活剤による肝酵素活性障害による抗癌剤の失活等が指摘されている<sup>22)</sup>が、本実験に見るごとく、抗癌剤投与直後よりのSPG投与より、むしろ数日経て後の投与開始が効果的であるという、一種の静置期間ともいうべきものの意味づけには、宿主側の各種の免疫応答機構の複雑な相互作用が、微妙に関与している事には相違ない。

腫瘍切除を行なった後でのマウスへの薬剤投与実験では、手術に加え至適と思われるタイミングで、MMCとSPGと併用した群は、手術のみ行なった群に比べMSDで6.7日の延命を認めしたが、手術に加えMMCのみを投与した群に比べて約2日間の延命しか現れなかった。この原因として、手術施行日を含め、免疫化学療法の開始時期が遅れた事も考えられ、表1で示したごとく、SPG単独治療でも遅れてからの投与は延命効果が劣る傾向にあり、移植17日目に切除手術をし、移植22日目よりSPGの投与を始める条件では、MMCとの併用効果も十分発現しなかったのではと思われた。同条件で腫瘍移植を行なった後、無治療で放置した担癌マウスの平均生存日数は、27.6日であることから、手術施行時期は、すでに相当の進行癌である。また、これよりさらに遅れて、移植31日目になお生存しているマウスに、切除手術を行い、MMCとSPGのcombination therapyを行なったが、手術のみ行ない放置したコントロール群と大差がなかった。

これらのことから、手術施行時期と、それに続く免疫化学療法の開始時期の設定は、成績向上の上で、密接な関連を有していると考えられる。臨床面に於ても、MMC, SPGの術後併用療法で、Stage I, II, IVには無効で、Stage IIIにのみ有効であったとの報告がある<sup>23)</sup>。今後

さらに術後生体の immunoresponce を踏まえた上で、より詳細な immunochemotherapy の検討が必要となろう。

免疫賦活剤のより有効な投与方法を検討する上で、それらが宿主の免疫機構を通して作用する以上、如何なる免疫担当細胞が働き抗腫瘍性が発現されるのかを知る事は不可避である。また、効果的な化学療法剤との併用治療法を確立する上で、二剤の併用投与時と各々の単独投与時とに於ける、生体内の免疫系の変化を知る事が、強く求められている。

これまでSPGの免疫賦活効果として、細胞性免疫能では、マクロファージの活性化、Tリンパ球機能増強としてのリンパ球幼若化能の増強、(Td)細胞増強能としての遅延型皮膚反応の促進等が報告されており、また液性免疫能に関しては、免疫グロブリン産生の促進が報告されている<sup>24),25),26),27)</sup>。

NK-421の細胞性免疫能増加については、担癌マウスのマクロファージの super oxide の産生増加、T-cell数の増加、胃癌患者血清によるIg産生抑制に対する保護作用、骨髄中の好中球系細胞への増殖促進作用<sup>28),29),30),31)</sup>等が報告されている。

従来、宿主側の抗腫瘍性をにやうものとして、主にキラーT細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL), macrophage等が指摘されているが、今回行ったADCC活性は、K-cell, 単球, 多核白血球, T $\gamma$ -cell等が、主にその活性に関わっているものと考えられており<sup>32),33)</sup>, それらの相互的な関連等なお未知の部分も多い。一般にADCC活性は、担癌の進行とともに増強し、担癌末期では低下するとされており、levamisole投与によるこの活性の増強なども報告されている<sup>34)</sup>。今回のSPG及びNK-421の単独投与によっても、ADCC活性は、著しく増強されている。

SPGの単独投与では、投与終了頃から、急性な活性増強を認め、対照群より約20%の上昇を示している。この活性増強の主体となる細胞を検索すべく、effector細胞をプラスチックディッシュへの付着、非付着脾細胞にわけ検索したが、両細胞の能力に於ては、ほぼ同等と思われた。担癌マウスへMMCを単独で投与した場合、

adherent, non-adherent両細胞群で、ほぼ等しくADCC活性の低下を認めたが、このMMC投与に加えて、至適投与量、至適投与間隔でSPGを併用投与した場合は、MMC単独投与で低下したADCC活性は増強され、特にnon-adherent細胞分画にその効果が著明にあらわれた。これまでも、化学療法剤が免疫抑制的に働く事が指摘されているが<sup>35)</sup>、今回のADCC活性の検討により、SPGが、MMCの免疫抑制効果からの離脱を促進させる事が明確となり、MMCとSPGの併用による延命効果増強の一因となっているものと思われた。

NK-421投与によるADCC活性の増強は、投与量により活性増強の程度に差を認め、最も強い増強を示したのは5mg/kg投与群であった。この活性増強の主体をなす細胞を検すべく、抗Thy-1.2抗体と補体処理を行って、T細胞を除いてみると、活性増強は減弱するものの、担癌対照群に比べ著明でなく、NK-421投与によるADCC活性の増強は、non T細胞が主体と思われた。同様にADCC活性を増強させるものにセファランチンが知られるが、この場合の活性増強は、T細胞非活化で著明に低下を示すことからT cell主体の活性増強と考えられている<sup>36)</sup>。

一方NK活性は、担癌の進行とともに低下して行くことが知られている。このNK活性を示す細胞集団は、おそらくは、non-T-cell(K cell)が主体であろうと思われるが、これらは、ADCC活性担当リンパ球に含まれるものであるとの報告<sup>37),38),39)</sup>もあり、担癌生体の免疫機構を解析する上で、ADCC活性と同様、近年注目を集めている。

今回の実験で、担癌マウスに投与したSPG, NK-421では、単独投与によって、担癌により低下したNK活性を回復せしめ、正常レベルまでの増強を示した。またMMCの単独投与では、NK活性の増強が認められず、これにSPGを併用しても同様であった。Ge-132<sup>40)</sup>が正常レベルの2倍もの活性増強作用を有する<sup>41)</sup>のに比べると、SPG, NK-421のNK活性増強効果は、若干弱いとも言える。

## 結 語

C<sub>3</sub>H/HeマウスにMH-134腫瘍を腹腔内および皮下へ移植し、免疫賦活剤であるSPG, NK-421を宿主に投与し実験を行った。SPGは単独で種々投与量を変え、また投与開始時期を変え、さらにMMCと併用した免疫化学療法を行い、抗腫瘍効果とADCC活性, NK活性に及ぼす効果をみた。また抗癌剤と免疫賦活剤の併用投与の至適投与タイミングで、腫瘍切除後実験モデルにも投与を試みた。NK-421では、各種投与量で治療を試み、同様の活性測定を行った。

SPGの単独投与では、腹腔内へ移植した腫瘍への腹腔内投与、背部皮下腫瘍に対しての遠位皮下投与とも、最も優れた延命効果を認めたのは、10mg/kg/day投与を移植翌日より連日10日間投与した場合であり、遅れてよりの投与開始は、同量でも成績が劣った。以上より、至適投与量は、10mg/kg/dayであり、至適投与時期は、担癌早期であると思われた。

SPGとMMCとの併用投与では、1mg/kgのMMCと腫瘍移植3日目に腹腔内投与し、1日において移植5日目より10mg/kg/dayのSPGを5日間皮下投与するのが、他のどの様な組み合わせの投与方法より優れた延命が得られ、最も至適な併用投与タイミングであると思われた。またMMCは、1mg/kgが、SPGとの併用投与における至適量と思われた。

腫瘍切除後の治療実験では、切除後、前述の投与タイミングにのっとったMMCとSPGの併用群に最も延命が認められ、術後併用療法の延命効果が示唆された。

NK-421単独投与では、十分な延命率の増加が認められなかったが、各薬量すべての投与群で、無治療群最長生存日数よりさらに数日延命

する小数例を認めた。

ADCC活性の検討では、SPGの単独投与によって、ADCC活性は増強され、MMCの単独投与では活性が抑制される事が示された。MMCとSPGを前述の至適投与タイミングで併用した場合、MMCの影響で活性が抑制される事はなく、SPG単独投与の場合と同程度に増強された。この点をさらに、各細胞分画別に解析を行ってみると、担癌によって増強されてくる非付着細胞分画を、MMCが抑制する事により、ADCC活性の低下が生じており、SPGの併用で、こうした抑制が解除される事が明確となった。SPGの単独投与では、付着、非付着いずれの分画にも、増強的に作用している事が示された。また、担癌により低下したNK活性を健常レベルまで増強させる様子が認められた。

NK-421の投与は、5mg/kg/day~50mg/kg/dayの広範囲の投与量で、ADCC活性を増強させた。最も強い活性増強を示す投与量は、5mg/kgないし10mg/kgであり、100mg/kgに及ぶ大量投与は、むしろADCC活性増強作用の劣る事が示された。こうした活性を示す分画からT細胞を除去しても、活性の減弱は軽微で、NK-421の作用している分画が、non T細胞である事が推定された。またNK-421は、SPGと同様、担癌時のNK活性を健常レベルまで回復させる作用を有している事が示された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った恩師折田薫三教授に深甚なる謝意を捧げるとともに、直接御指導いただいた三輪恕昭講師及び実験に協力して下さいました小野 稔氏に深く感謝いたします。

本論文の要旨は第28回および第29回日本化学療法学会総会、第41回日本癌学会総会において発表した。

## 参 考 文 献

1. Hashimoto, O., Miwa, H. and Orita, K.: Effect of the removal of the primary tumor and immunotherapy with *Corynebacterium parvum* on metastatic tumor proliferation. *Acta Med. Okayama* 37, 335-340, 1983.
2. 有可 正, 百木克夫, 浅野泰司, 三谷満昭, 高嶺和恵, 松尾哲也: マウス同系腫瘍に対する SPG の抗腫瘍効果. *基礎と臨床*, 15, 2471-2481, 1981.

3. Umezawa, H., Aoyagi, T., Suda, H., Hamada, M. and Takeuchi, T.: Bestatin, an inhibitor of Aminopeptidase B, produced by Actinomycetes. *J. Antibiot.* 29, 97-99, 1975.
4. 三輪恕昭, 岡 哲秀, 鶴身孝文, 柴 康行, 折田薫三: 免疫賦活剤ベスタチンの基礎的, 臨床的検討. 癌と化学療法, 9, 1019-1024, 1982.
5. 菊本昭一, 宮島 徹, 木村恵太郎, 大久保幸枝, 小松信彦: スエヒロタケの生産する多糖に関する研究(第2報). 農化, 4, 162-168, 1971.
6. 伊藤一二, 三富利夫: 多糖体 PSK の臨床的ならびに基礎的研究. 医学のあゆみ, 91, 511-515, 1974.
7. Suda, H., Takita, T., Aoyagi, T. and Umezawa, H.: The structure of Bestatin. *J. Antibiot* 29, 100-101, 1976.
8. 三輪恕昭, 折田薫三: 免疫賦活剤 Levamisol の抗腫瘍効果. 臨床免疫, 12, 491-501, 1980.
9. 三輪恕昭, 折田薫三: 免疫賦活剤 Levamisol の細胞性免疫能賦活効果. 日癌治誌, 16, 1231-1238, 1981.
10. Raeymaekers, A.H.M., Allewijn, F.T.N., Vandenberk, J., Demoen, P.J.A., Van Offenwert, T.T.T. and Janssen, P.A.J.: Nobelbroad spectrum anthelmintics of 6-arylimidazo (2, 1-b) thiazole. *J. Med. Chem.* 9, 545-551, 1966.
11. Mathe', G., Amiel, J.L., Schwarzenberg, L., Schneider, M., Cattan, A., Schlumberger, J.R., Hayat, M. and de Vassal, F.: Active immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1, 697-699, 1969.
12. Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito, G. and Sakai, S.: Host-mediated antitumor action of Schizophyllan, a glucan produced by Schizophillum commune. *Gann* 60, 137-144, 1969.
13. 折田薫三, 三輪恕昭, 河合知則, 中原東亜, 橋本雅明, 大江新野, 小長英二: Levamisole による免疫療法. 癌の臨床, 24, 469-476, 1978.
14. 石塚雅章: ベスタチンの免疫賦活作用および制癌効果. ベスタチン研究会誌, 1, 13-25, 1979.
15. Symoens, J.: Levamisole, an antianergi chemopherapeutic agent, an overview control of neoplasia by modulation of the immune system, ed. M.A. Chirigos, Raven Press New York, vol. 2, pp. 1-24, 1977.
16. 細川真澄男, 水島 豊, 小林 博: 癌の免疫および化学療法における合併時期の問題点. 癌と化学療法, 5, 1111-1117, 1978.
17. Chirigo, M.A., Fuhrman, F., Phyor, J.: Prolongation of chemotherapeutically induced remission of syngeneic murine leukemia by L-2, 3, 5, 6-Tetrahydro-6-phenylimidazo (2, 1-b) thiazole Hydrochloride, *Cancer Res.* 35, 927-931, 1975.
18. Mathe' G.: Active immunotherapy, experimental and ratinal basis, Immunotherapy of human cancer, The University Hospital and Tumor Institute, Raven Press. New York, pp. 5-27, 1978.
19. 中村憲治: Corynebacteriam parvum の抗腫瘍効果ならびにその細胞生免疫能に及ぼす影響. 岡山医学会雑誌, 93, 909-923, 1981.
20. Akiyama, J., Kawamura, T., Gotohda, E., Yamada, Y., Hosokawa, M., Kodama, T. and Kobayashi, H.: Immunochemotherapy of transplanted KMT-17 tumor in WKA rat by combination of cyclophosphamide and immunostimulatory protein-bound polysaccharide isolated from Basidiomycetes. *Cancer Res.* 37, 3042-3045, 1977.
21. Oh-hashi, F., Kataoka, T., Tsukagoshi, S.: Effect of combined use of anticancer drugs with a polysaccharide preparation, Krestin, on mouse leukemia P388. *Gann* 69, 255-257, April, 1978.
22. 前沢 祥, 佐久間正義, 松岡 茂, 涌井 昭: Masked Compound 活性化に対する免疫アジュバンドの影響

- 響. 癌と化学療法, 7, 1699—1705, 1980.
23. 藤本 茂, 折田薫三, 木村 正, 近藤達平, 田口鐵男, 吉田弘一, 小川暢也, 古江 尚: 胃癌術後療法としてのSPGの臨床評価. 癌と化学療法, 10, 1134—1145, 1983.
  24. 松尾哲也, 有司 正, 小松安彦, 岡崎 満, 岡崎智子, 小松信彦 他: 抗腫瘍多糖 Schizophyllan のマクロファージ活性化に関する研究 (第1報). 医学と薬学, 5, 977—982, 1981.
  25. 松尾哲也, 有司 正, 浅野泰司, 三谷満昭: 抗腫瘍多糖体 Schizophyllan (SPG) の宿主免疫能促進作用. 薬理と治療, 9, 1835—1843, 1981.
  26. 百木克夫, 有司 正, 鈴木宗司, 齋藤伍作: スエヒロタケ由来多糖体 (SPG) の抗腫瘍作用に関する研究 (第3報) 担癌マウスにおけるSPGの遅延型皮膚反応におよぼす影響. 臨床と研究, 56, 2749—2755, 1979.
  27. 鈴木宗司, 小松信彦: 低粘度 Schizophyllan の免疫グロブリン産生系に及ぼす影響. 日本細菌学雑誌, 31, 557—564, 1976.
  28. 井上文夫, 神代龍之介, 井口 潔: ベスタチンのマクロファージ機能への影響について. ベスタチン研究会誌, 3, 40—42, 1980.
  29. 馬島 尚, 鈴木通也: ベスタチンの Phase I study. ベスタチン研究会誌, 3, 17—21, 1980.
  30. 矢田純一, 元木のり子, 山倉 徹: ベスタチンの in vitro におけるリンパ球機能に与える効果. ベスタチン研究会誌, 3, 32—35, 1980.
  31. 木村郁郎, 大槌泰亮, 中田安成, 寺尾誠也: Bestatin の骨髄細胞への影響. 癌と化学療法, 8, 586—589, 1981.
  32. Levy, P.C., Shaw, G.M., Lobuglio, A.F.: Human monocyte, lymphocyte, and granulocyte antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity toward tumor cells. I. General characteristic of cytolysis. *J. Immunol.* 123, 594—599, 1979.
  33. 田中順子, 矢田純一: ヒト Tr 細胞の機能およびそれに関する Fc レセプターの意義について. 臨床免疫, 11, 855—866, 1979.
  34. 小野 稔, 藤原良一, 橋本俊明, 田中紀章, 三輪恕昭, 万波徹也, 小長英二, 折田薫三: 担癌マウスの免疫応答におよぼす Levamisole (LMS) の影響. 癌と化学療法, 7, 1988—1997, 1980.
  35. 久野梧郎, 富永憲治, 曾根三郎, 佐々木春夫, 矢田健太郎, 螺良英郎: 抗癌剤及び免疫抑制因子のリンパ系細胞及び抗体産生に及ぼす影響. 癌と化学療法, 2, 59—66, 1975.
  36. 小野 稔, 藤原良一, 田頭良章, 松井武志, 大橋勝英, 上川康明, 田中紀章, 小長英二, 折田薫三: 担癌マウス腫細胞の ADCC 活性に及ぼすセファランチンの効果. 癌と化学療法, 8, 1565—1569, 1981.
  37. Jensen, P.J. and Koren, H.S.: Heterogeneity within the population of NK and K cell. *J. Immunol.* 124, 395—398, 1980.
  38. Koren, H.S. and Williams, M.S.: Natural Killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity are mediated by different mechanisms and by different cells. *J. Immunol.* 121, 1956—1960, 1978.
  39. Ono, M., Tanaka, N. and Orita, K.: Dissociation of natural killer activity and antibody dependent cellular cytotoxicity in spleen cells of tumor bearing mice. *Acta Med. Okayama* 37, 367—376, 1983.
  40. 佐藤 博, 岩口孝雄: 新規有機ゲルマニウム化合物 Ge-132 の抗腫瘍性. 癌と化学療法, 6, 79—83, 1979.
  41. 小野 稔, 岡 哲秀, 吉原久司, 田中紀章, 三輪恕昭, 万波徹也, 小長英二, 折田薫三: 担癌マウス腫細胞の細胞障害性におよぼす NK-421 (Bestatin) と Ge-132 の効果. 癌と化学療法, 9, 1771—1777, 1982.

**Antitumor effects and augmentation of cellular immunity  
by Schizophyllan and Bestatin**

**Tetsuhide OKA**

**First Department of Surgery, Okayama University Medical School**

**(Director: Prof. K. Orita)**

Antitumor activities and effects on cellular immunity of Schizophyllan (SPG), a highly purified polysaccharide extracted from the culture filtrate of *Schizophyllum commune* Fries, and Bestatin (NK-421), an inhibitor of aminopeptidase B discovered in the culture broth of *Streptomyces olivoreticuli*, were investigated. The optimal dose of SPG monotherapy to manifest an antitumor effect on MH-134 hepatomas transplanted into C3H/He mice was 10 mg/kg, both intraperitoneally (i.p.) and subcutaneously (S.C.). The optimal timing of SPG monotherapy was observed in the group which was treated from 1 day after tumor transplantation, resulting in the most prolonged mean survival (MS) and the highest survival rate. In combined therapy with SPG and mitomycin C (MMC), the most prolonged MS was observed in the group which was treated with MMC on day 3 after tumor transplantation and combined with SPG from day 5. Moreover, the effectiveness continued when the same combined therapy was conducted after the removal of transplanted tumors. The highest ADCC activity by spleen cells harvested from the mice in the SPG monotherapy group was obtained on day 12 after tumor transplantation. The ADCC activity tended to become lower in the MMC monotherapy group, but in the combined therapy group with optimal timing, the highest ADCC activity mediated by non-adherent cells was observed on day 14 after tumor transplantation. Suppressed NK cell activity in tumor-bearing mice was increased to normal levels by SPG monotherapy. On the other hand, NK 421 monotherapy did not manifest a satisfactory antitumor effect regarding survival rate, although it potentiated ADCC activity over a wide range of doses, particularly 5 and 10 mg/kg. The main cellular component exhibiting ADCC activity induced by NK 421 therapy seemed to be non-T-cells. By NK-421 monotherapy, the suppressed NK cell activity in tumor-bearing mice was restored up to the normal level.