

コリネバクテリウム・パルバムの抗腫瘍効果 並びにその細胞性免疫能に及ぼす影響

岡山大学第一外科教室（指導：折田薫三教授）

中 村 憲 治

（昭和56年7月27日受稿）

Key words : *Corynebacterium parvum*, 抗腫瘍効果
遅延型過敏反応, マクロファージ遊走阻
止 (MIF) 活性

はじめに

癌治療において、手術、放射線療法、化学療法に加えて第4の治療法として、免疫療法が行われている。免疫療法を効果たらしめるためには、癌腫を可能な限り減少させることが最少限必要であろうと一般に認識されている¹⁾。現在行われている免疫療法には、免疫賦活剤を用いた非特異的療法が、施行操作が簡単なことと、現在では特異的免疫療法に劣らない効果を有するため、主として用いられている。非特異的な免疫賦活剤も BCG, コリネバクテリウム等の細菌製剤をはじめ、多糖体、低分子化合物などの種々の薬剤があり、数多くの研究が行われている。コリネバクテリウムに関しては、1964年 Halpern²⁾らがマウス網内系に強い賦活作用をもたらすことを示し、1966年 Woodruffら³⁾が *Corynebacterium parvum* にマウス自然発生乳癌と Methylcholanthrene 誘発の fibrosarcoma に強い抗腫瘍効果があることを報告して以来、その網内系賦活作用、体液性・細胞性免疫への影響、感染抵抗、抗腫瘍効果などに関して数多くの報告がなされている⁴⁾。

コリネバクテリウムの抗腫瘍効果の作用機序については今なお不明な点が多いが、Woodruff⁵⁾ および Scott^{6),7)}らの研究より、全身性の投与では、おそらくマクロファージを介する非特異的な抗腫瘍効果が主であり、局所性の投与では T 細胞を介する効果が主となるという、2つの異

なった作用機序が考えられている。

本実験において、近交系マウスと同系腫瘍を用い、コリネバクテリウムの腹腔内投与における、単独での抗腫瘍効果並びに化学療法併用における抗腫瘍効果を検討し、つづいて最も抗腫瘍効果の高かった実験系において、遅延型過敏反応とマクロファージ遊走阻止活性を指標として、コリネバクテリウムの細胞性免疫能に及ぼす影響をあわせて検討した。

実験材料および方法

1. 実験材料

1) 実験動物

静岡実験動物研究所より入手した純系 C3H/He マウス・雄・8~10週令とモルモット・体重 250—400 g を使用した。

2) 実験腫瘍

C3H/He マウス腹腔で継代維持しているマウス腹水肝癌由来 MH 134 腫瘍を用いた。

3) コリネバクテリウム

フランスの Mérieux 社製 4 mg/2 ml アンプルで、キッセイ薬品 KK より提供されたものを使用した。また、6 mg/ml に濃度調整された製剤も同社より提供され、使用量に応じて生理的食塩水で希釈し、1 回投与量を 0.2 ml としてマウス腹腔内に投与した。

本剤に用いられた菌は、1974年に改訂された Bergey's manual⁸⁾の第8版では、*Propionibacterium acnes* と分類されているが、すでに多

くの報告において *Corynebacterium parvum* の名称が使用されていることから、本編においては *Corynebacterium parvum* (*C. parvum* と略す) の名称をそのまま用いることとした。

4) 抗癌剤

a) Mitomycin C (MMC と略す)

2mg/vial のものを生理的食塩水で希釈し 1 mg/kg を 1 回量として用いた。

b) 5-Fluorouracil (5-FU と略す)

250mg/5 ml のアンプルを生理的食塩水で希釈し、25mg/kg を 1 回量として用いた。

5) 腫瘍抗原の作成^{9),10)}

MH 134腫瘍を TC-199 medium (千葉県血清研究所) に浮遊させ、超音波破壊装置 (海上電機株式会社) を用いて、20KC, 150mA で 7~8 分間破壊した後 3000r.p.m. 20分間遠沈し、この上清を可溶性抗原として用いた。その蛋白濃度は Folin-Lowry 法¹¹⁾ により測定し、マクロファージの非特異的遊走阻止の出現しない 100mcg/ml を使用した。

6) エフェクター細胞の採取法

経口的にマウスの両側腋窩リンパ節または脾臓を無菌的に摘出した。P-4 シャーレの中でこれらを細切後、30分放置しガラス壁に付着する細胞を除去し 80メッシュフィルターで濾過後 0.83% NH₄CL trisbuffer で赤血球を破壊し、1000r.p.m. 10分遠沈洗浄した。これを 3 回くり返し、最後に、TC-199 medium に 5×10⁶ cells/ml で浮遊させ、リンパ節リンパ球または脾細胞として使用した。

7) マクロファージの採取法

モルモット腹腔内に流動パラフィン 20ml を注入し、5~7 日後に腹水を採取、1000r.p.m. 5 分遠沈洗浄をくり返してパラフィンを除いた後、TC-199 medium に浮遊させて 10×10⁶ cells/ml に調整した。

2. 実験方法

1) *C. parvum* の単独投与方法

MH 134腫瘍細胞 5×10⁵ cells/0.1ml をマウス背部皮下に移植し、腫瘍の生着が確認できる 5 日目より *C. parvum* を投与すべく以下の 6 群を作った。すなわち a) *C. parvum* 0.6mg 1 回投与群、b) *C. parvum* 0.4mg 1 回投与群、c) *C.*

parvum 0.6mg 連日 5 回投与群、d) *C. parvum* 0.4mg 連日 5 回投与群、e) *C. parvum* 0.2mg 連日 5 回投与群、f) 生理的食塩水のみ投与した対照群とし、各群につき経口的に腫瘍の長径と短径を医療用ノギスを用いて測定し、その平均値を腫瘍径とし、さらに生存日数を観察して抗腫瘍効果とした。

2) *C. parvum* と化学療法剤との併用投与方法

化学療法として、MMC 1 mg/kg、5-FU 25mg/kg を 0.1ml 中に含まれるように生理的食塩水で調整後、腹腔内へ投与し、M.F. 療法 (M.F. と略す) とした。MH 134腫瘍 5×10⁵ cells/0.1ml をマウス背部皮下に移植し、移植後 5 日目に M.F. を投与し以下の 5 群を設けた。すなわち a) 5 日目に M.F. を投与し、7 日目より *C. parvum* 0.6mg 連日 5 回投与した群、b) 5 日目に M.F. を投与し、7 日目より *C. parvum* 0.4mg 連日 5 回投与した群、c) 5 日目に M.F. を投与し、7 日目より *C. parvum* 0.2mg 連日 5 回投与した群、d) M.F. を 5 日目に投与し、7 日目より生理的食塩水を連日 5 回投与した群、e) 生理的食塩水のみ投与した対照群、の各群につき腫瘍径と生存日数を観察した。

3) *C. parvum* の投与時期選択

M.F. と *C. parvum* 0.4mg 5 回投与における投与時期による抗腫瘍効果の差をみるために、MH 134腫瘍 5×10⁵ cells/0.1ml をマウス背部皮下に移植後以下の 6 群を設けた。すなわち a) M.F. を 5 日目に投与、7 日目より *C. parvum* を連日投与した群、b) M.F. を 5 日目に投与、10 日目より *C. parvum* を連日 5 回投与した群、c) M.F. を 5 日目に投与、15 日目より *C. parvum* を連日 5 回投与した群、d) 5 日目・6 日目と *C. parvum* を投与、7 日目に M.F. を投与、8 日目より 10 日目まで *C. parvum* を連日投与した群、e) 5 日目より *C. parvum* を連日 5 回投与、11 日目に M.F. を投与した群、f) 非治療の対照群とし、各群の腫瘍径と生存日数を観察した。

4) 遅延型過敏反応 (DTH) の検索法

Asherson¹²⁾、Ptak¹³⁾らの方法を改善した、夏梅・右田ら¹⁴⁾の hapten 型抗原塩化ピクリルを用いる方法を参考に以下の如く実施した。マウス

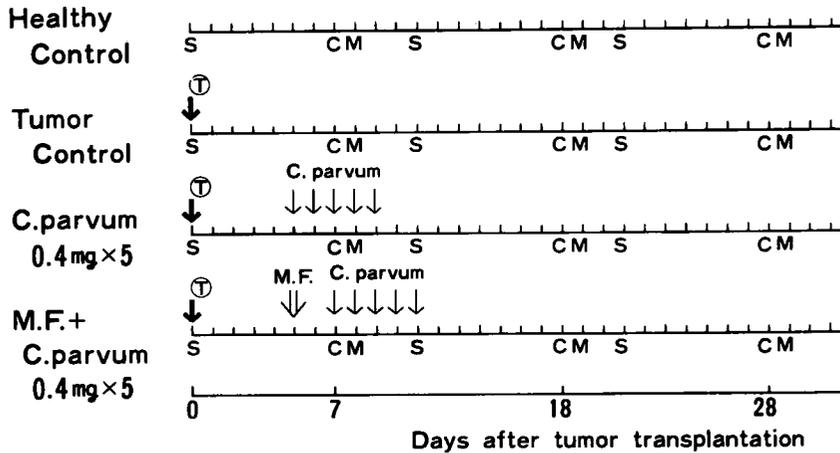


Fig. 1 Effect of Immunotherapy with *C. parvum* and M.F. on Increase in Ear Thickness
 M.F.: Mitomycin C 1mg/kg, 5-Fluorouracil 25mg/kg
 ⊕: MH 134 ascites hepatoma 5×10^5 cells/0.1ml s.c.
 S: Sensitization with 6.0% picryl chloride in alcohol
 C: Challenge with 1.0% picryl chloride in olive oil
 M: Measurement of increase in ear thickness

の腹部を約2.0×1.5cmの範囲にわたって剃毛し、露出した腹部皮膚に市販の綿棒を用いて、感作抗原である塩化ピクリル6%エタノール溶液を均一に塗布した。感作7日後にマウスの耳の厚さを Dial thickness gauge (尾崎製作所, 東京, Picoock type G) を用いて測定した。ついでテスト用抗原である塩化ピクリル1%オリーブ油溶液を両耳の表裏に塗布し、24時間後に再度両耳の厚さを測定した。テスト用抗原塗布前後の耳の厚さの増加を求め、左右の平均値を 10^{-2} mmの単位であらわした。感作を行っていないマウスにも同様にテスト用抗原を塗布し、耳の厚さの増加を求め、感作群の値より差引いて、これをもって DTH の強さとした。これらの検査を健常群, 担癌無処置群, *C. parvum* 投与群, M. F. と *C. parvum* 併用投与群につき, Fig. 1 に示す如く MH 134腫瘍 5×10^5 cells/0.1ml をマウス背部皮下に移植と同時に感作を行ない、7日目, 18日目, 28日目の DTH を検索した。

5) マクロファージ遊走阻止能の検索法

George & Vaughan¹⁵⁾の毛細管直接法に準じて、エフェクター細胞とマクロファージを1:4の割合に混合して毛細管に封入した。これを5%炭酸ガスふ卵器で37℃, 24時間培養後、マクロファージの遊走面積を測定した。マクロファ

ージ遊走阻止因子 (Macrophage migration inhibition factor, MIF) の活性を次式のごとく遊走指数 (Migration index, M.I.) で表わし, M.I. 値が85%以下を陽性とした。

$$M.I.(%) = \frac{\text{感作群の遊走面積}}{\text{無感作群の遊走面積}} \times 100$$

MH 134腫瘍 5×10^5 cells/0.1ml 背部皮下に移植後, a) 担癌無処置群, b) 5日目より *C. parvum* 0.4mg連日5日投与群, c) 5日目に M. F. 投与7日目より *C. parvum* 0.4mg連日5回投与群, につき MIF 活性の変化を経日的に検索した。

実験結果

1) MH 134腫瘍に対する *C. parvum* 単独投与の効果

腫瘍径でみると, 対照群に比較し腫瘍移植後2週目より各群に有意な腫瘍増殖抑制が認められるようになり, 3週目で著明な腫瘍増殖抑制が認められた。しかし4週目では, *C. parvum* 0.4mg連日5回投与群を除き腫瘍増殖抑制は認められなかった(Fig. 2)。平均生存日数では, *C. parvum* 0.6mg連日5回投与群, *C. parvum* 0.4mg連日5回投与群, *C. parvum* 0.6mg1回投与群の3群に有意 ($p < 0.05$) な延命効果が認められ

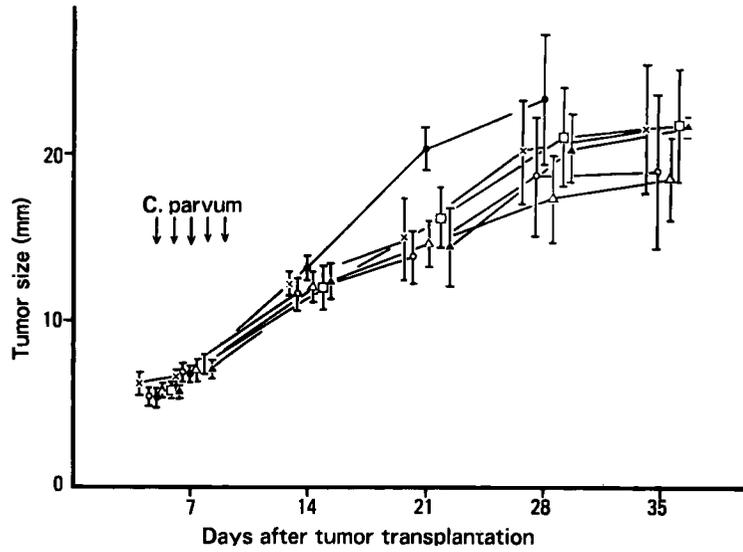


Fig. 2 Antitumor Effect of *C. parvum* on MH 134 tumor
 C.p.: *Corynebacterium parvum*
 ●—● Control, ○—○ C.p. 0.6mg × 5
 △—△ C.p. 0.4mg × 5, □—□ C.p. 0.2mg × 5
 ×—× C.p. 0.6mg, ▲—▲ C.p. 0.4mg

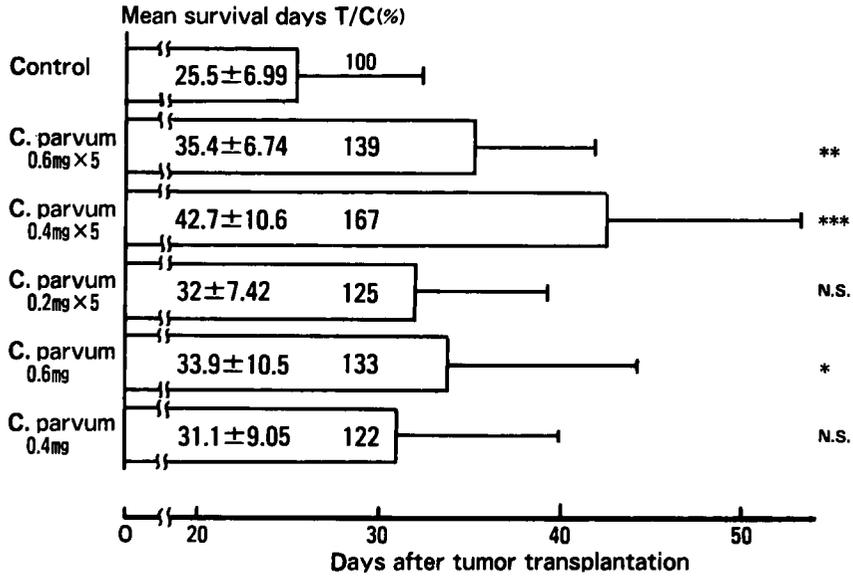


Fig. 3 Antitumor Effect of *C. parvum* on MH 134 tumor
 *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001
 N.S.: Not significant

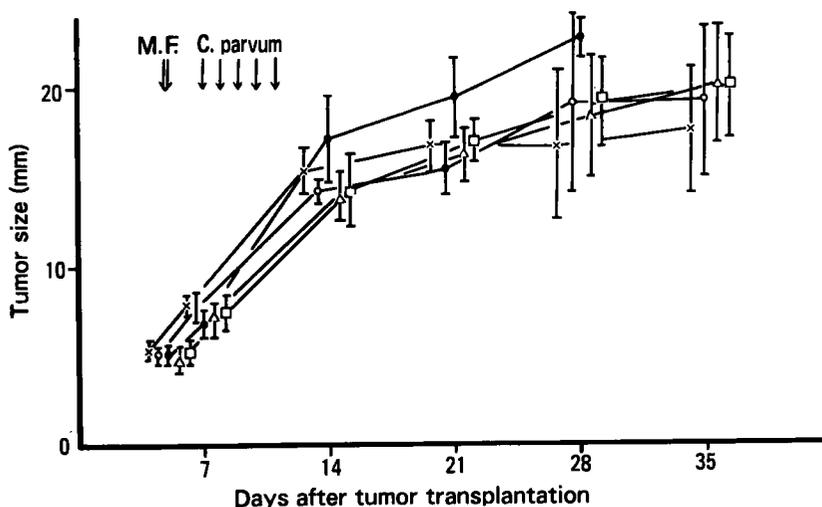


Fig. 4 Antitumor Effect of Immunochemotherapy with *C. parvum* and M.F. on MH 134 tumor

C.p.: *Corynebacterium parvum*, M.F.: MMC 1 mg/kg, 5-FU 25 mg/kg

- Control, ○—○ M.F. + C.p. 0.6mg × 5
- △—△ M.F. + C.p. 0.4 mg × 5
- M.F. + C.p. 0.2 mg × 5, ×—× M.F.

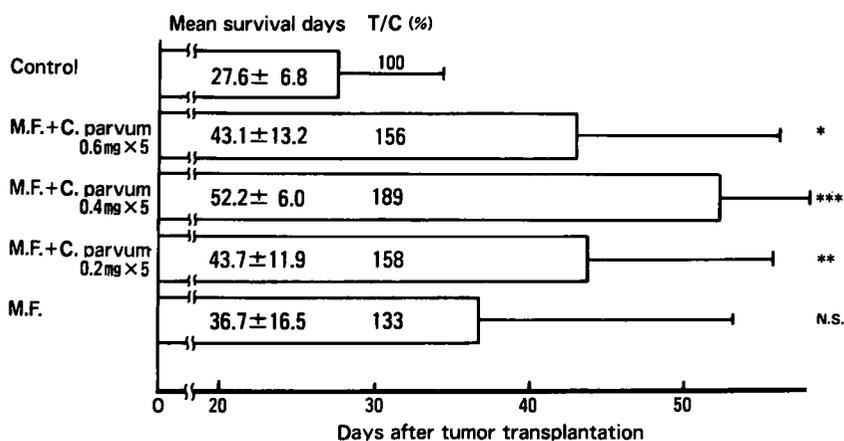


Fig. 5 Antitumor Effect of Immunochemotherapy with *C. parvum* and M.F. on MH 134 tumor

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$
N.S.: Not significant

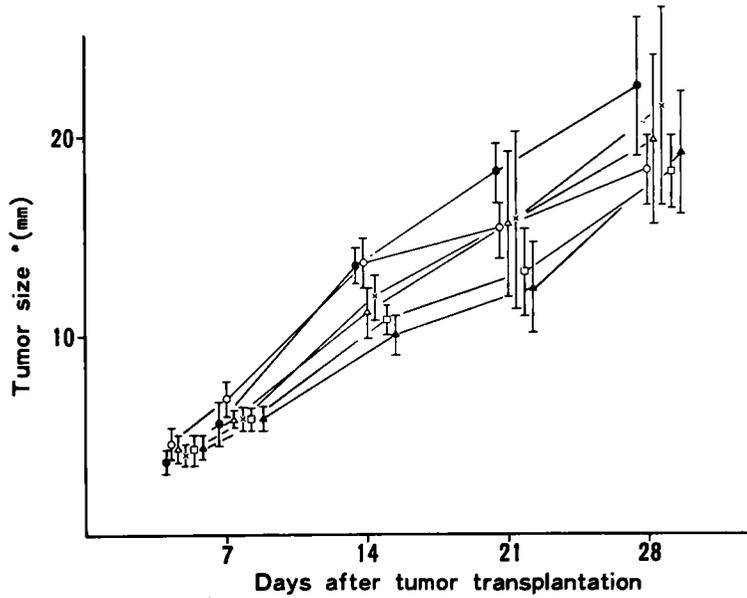


Fig. 6 Antitumor Effect of Immunochemotherapy with *C. parvum* and M.F. on MH 134 tumor

C.p.: *Corynebacterium parvum*, M.F.: MMC 1 mg/kg, 5-FU 25 mg/kg

- Control
- M.F.d.5, C.p.d.7-d.11
- △—△ M.F.d.5, C.p.d.10-d.14
- ×—× M.F.d.5, C.p.d.15-d.19
- M.F.d.7, C.p.d.5, d.6, d.8-d.10
- ▲—▲ M.F.d.11, C.p.d.5-d.9

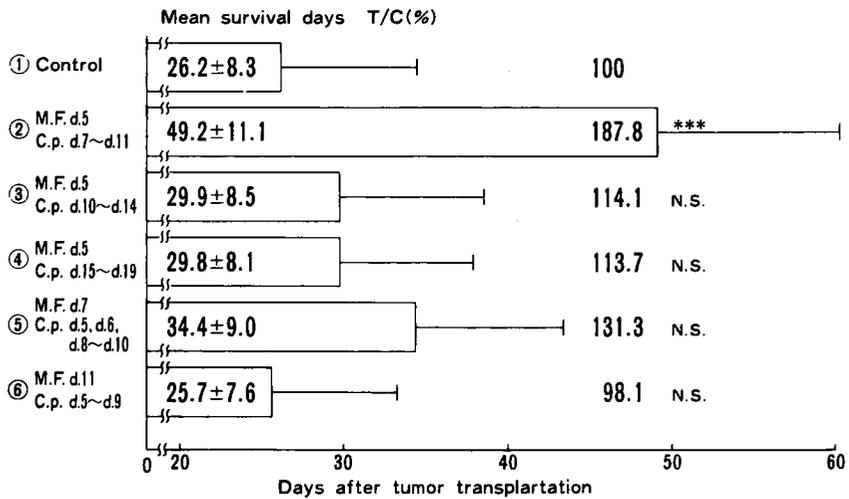


Fig. 7 Antitumor Effect of Immunochemotherapy with *C. parvum* and M.F. on MH 134 tumor

***: $p < 0.001$, N.S.: Not significant

C.p.: *Corynebacterium parvum*

M.F.: MMC 1 mg/kg, 5-FU 25 mg/kg

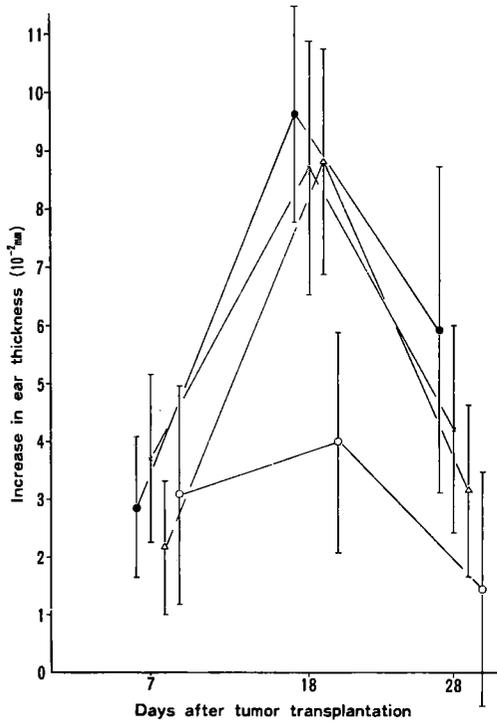


Fig. 8 Effect of Immunochemotherapy with *C. parvum* and M.F. on Increase in Ear Thickness

- Healthy control,
- Tumor control
- ×—× *C. parvum* 0.4mg × 5
- △—△ M.F. + *C. parvum* 0.4 mg × 5

Table 1 Effect of Immunochemotherapy with *C. parvum* and M.F. on Increase in Ear Thickness

Groups	Days after tumor transplantation		
	7	18	28
Healthy Control	2.88 ± 1.22 100% (10)	9.62 ± 1.83 100% (10)	5.90 ± 2.83 100% (10)
Tumor Control	3.07 ± 1.87 106% (10)	3.99 ± 1.89 ^{ooo} 41.5% (8)	1.45 ± 2.01 ^o 24.6% (4)
<i>C. parvum</i> 0.4mg × 5	3.70 ± 1.45 128% (10)	8.69 ± 2.17 ^{N.S.} 90.3% (10)	4.20 ± 1.77 ^{N.S.} 71.2% (7)
M.F. + <i>C. parvum</i> 0.4mg × 5	2.18 ± 1.15 75.7% (10)	8.80 ± 1.93 ^{***} 91.5% (9)	3.14 ± 1.48 ^{N.S.} 53.2% (8)

(×10⁻²mm)

ooo: p < 0.001, o: p < 0.05 as compared with healthy control, *** p < 0.001 as compared with tumor control, N.S.: Not significant, (): number of mice

た。特に *C. parvum* 0.4mg 連日 5 回投与群においては、平均生存日数 42.7 日、T/C 167% と著明な延命効果が認められた (p < 0.001) (Fig. 3)。

2) *C. parvum* と M.F. 療法の併用効果

腫瘍径でみると、2 週目では M.F. 単独投与群には有意な腫瘍増殖抑制は認められなかったが、*C. parvum* と M.F. 併用群においては有意差が認められ (p < 0.05)、3 週目には治療各群とも有意な腫瘍抑制が認められた。しかし治療各群間の有意差は認められなかった。M.F. 単独投与群に腫瘍増殖抑制が良いようにみえる傾向がうかがわれた (Fig. 4) が、これを平均生存日数でみると、M.F. 単独群では有意な延命効果は認められなかった。併用治療群中では、M.F. と *C. parvum* 0.4mg 連日 5 回投与群において、平均生存日数 52.2 日、T/C 189% と著明な延命効果が認められた (p < 0.001) (Fig. 5)。この結果は、*C. parvum* 単独投与で最も抗腫瘍効果の認められた *C. parvum* 0.4mg 連日 5 回投与群の平均生存日数よりも長期に及び、M.F. 併用による抗腫瘍効果が強く表われているものと思われた。

3) *C. parvum* の投与開始時期と抗腫瘍効果

腫瘍径でみると、2 週目・3 週目に各群に有意な腫瘍増殖抑制が認められたが、特に、M.F. を 5 日目に投与し、7 日目より *C. parvum* 0.4mg を連日 5 回投与した群と *C. parvum* 0.4mg を 5 日目・6 日目と投与し、7 日目に M.F. を投与した群に著明であった (Fig. 6)。これを平均生存日数でみると、M.F. を 5 日目に投与し、7 日目より *C. parvum* 0.4mg を連日投与した群に最も強い延命効果が認められた (p < 0.001) が、その他の群は対照群と有意差は認められなかった (Fig. 7)。これらの抗腫瘍効果の in vivo 実験より、*C. parvum* 単独では、腫瘍移植後 5 日目より *C. parvum* 0.4mg 連日 5 回投与した場合、M.F. 併用治療では、M.F. を 5 日目に投与し、7 日目より *C. parvum* 0.4mg 連日 5 回投与した場合に、著明な抗腫瘍効果が認められた。以下の実験には、この両者の投与方法を用いて検索を行った。

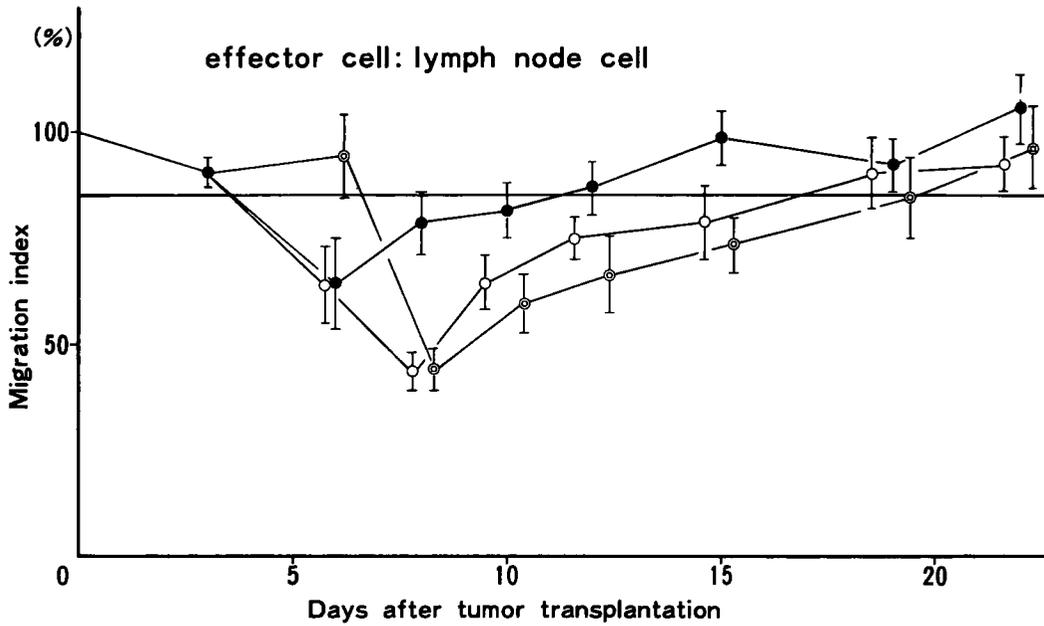


Fig. 9 Effect of Immunochemotherapy with *C. parvum* and M.F. on MIF activity
 ●—● Tumor control, ○—○ *C. parvum* 0.4 mg × 5
 ⊙—⊙ M.F. + *C. parvum* 0.4 mg × 5

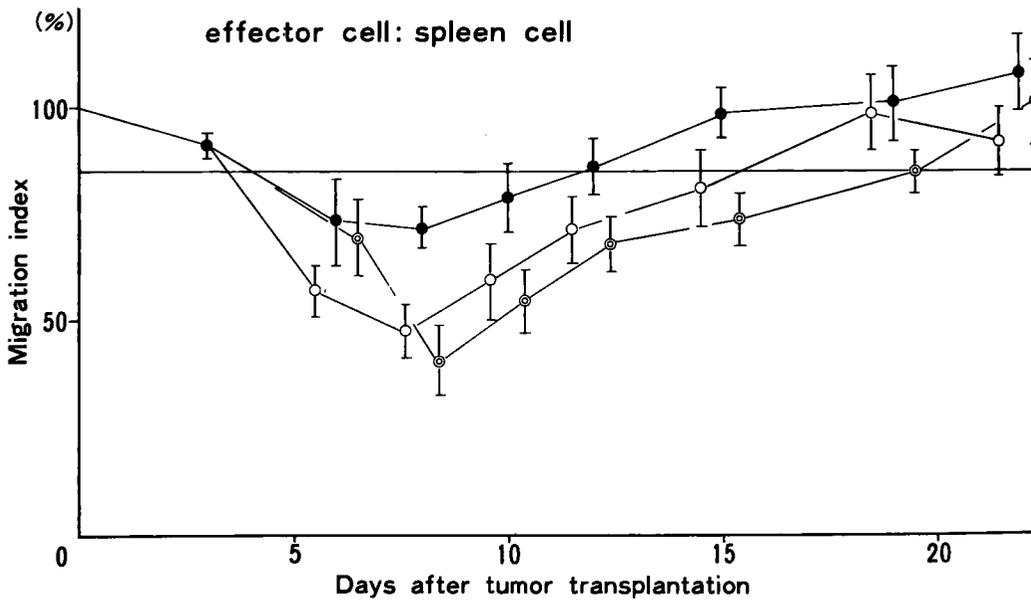


Fig. 10 Effect of Immunochemotherapy with *C. parvum* and M.F. on MIF activity
 ●—● Tumor control, ○—○ *C. parvum* 0.4 mg × 5
 ⊙—⊙ M.F. + *C. parvum* 0.4 mg × 5

4) *C. parvum* の細胞性免疫能に与える効果

a) 遅延型過敏反応 (DTH)

担癌無処置群の DTH は、腫瘍移植後18日目において41.5%と、健常群に比較して有意なDTHの低下が認められたが、それに対し治療群である *C. parvum* 投与群でのDTHは、90.3%、M.F. 併用群でのそれは91.5%と、健常群との有意差は認められなかった。また、担癌無処置群に比べ、*C. parvum* 投与群、M.F.併用群ともに有意な DTH の低下抑制が認められた。腫瘍移植後28日目においては、健常群に比較し、担癌無処置群では24.6%、M.F.併用群では53.2%と有意な DTH の低下が認められたが、*C. parvum* 投与群では、その低下は認められなかった。また担癌無処置群に比較し、*C. parvum* 投与群、M.F. 併用群では、両者共有意差は認められなかったが、DTHの低下抑制がみられる傾向がうかがわれた(Fig. 8, Table 1).

b) MIF 活性

リンパ節リンパ球をエフェクター細胞として用いた場合、担癌群では、6日目前後で活性が $62 \pm 10\%$ と最強となり15日目には消失した。*C. parvum* 投与群では、8日目に $42 \pm 6\%$ と活性が最強となり徐々に消退していったが、15日目までは活性が陽性を保持した。M.F.併用群では、M.F. 投与翌日すなわち腫瘍移植後6日目に一時活性がなくなったが、8日目には $44 \pm 5\%$ と活性が最強となり、19日目まで陽性を示した。*C. parvum* 投与群、M.F.併用群とも、担癌群に比較し MIF 活性が強く長期間陽性に持続し、なかでも M.F. 併用群がより長期間陽性で持続する傾向が認められた(Fig. 9)。脾細胞をエフェクター細胞として用いた場合、担癌群では、6日目から8日目にかけ $70 \pm 10\%$ と活性が最強となったが、15日目には活性が消失した。*C. parvum* 投与群では、8日目に $50 \pm 5\%$ と活性が最強となり15日目まで陽性を持続し、以後徐々に消退した。M.F. 併用群では、M.F.投与後の活性消失はみられず、8日目に $41 \pm 7\%$ と最強となり、19日目まで陽性を持続し以後消失した(Fig. 10)。MIF 活性は、リンパ節リンパ球より脾細胞に活性が長く保たれる傾向であり、M.F.併用群に活性が強く、長期に持続する傾向が認められた。

考 察

癌の免疫療法は、1960年代におけるMathe¹⁶⁾らの急性リンパ芽球性白血病に対するBCGの投与及び同種白血病細胞によるワクチン療法で寛解期と延命期間が延長したという報告、Morton¹⁷⁾らのBCGの腫瘍内注入による腫瘍退縮例の報告、Klein¹⁸⁾らの遅延型過敏反応惹起による、皮膚癌退縮の報告が出されて以来、関心が強くなり現在まで数多くの報告がなされ注目を集めている。一方、癌は、手術的に完全に摘出されたと考えられても、再発・転移を起こし患者を死に致らしめることが少なくなく、また手術的にも完全に摘出することが不可能な例も多くある。このような患者に、いかに放射線・化学療法を行なっても早晚死亡することが多い。また癌そのものが、その進行に伴い、宿主の免疫能を低下させることも周知の通りである。免疫療法は、担癌宿主の免疫能を増強させ抗腫瘍効果をもたらすとともに、手術や放射線療法、化学療法による免疫能低下を抑制するため、癌に対する第4の治療法ということができよう。

癌の免疫療法は、大きく非特異的療法と特異的療法に分類されるが、現在は免疫賦活剤を用いる非特異的免疫療法が主として用いられている。すなわち免疫能の低下している担癌宿主に免疫賦活剤を投与することで、非特異的に免疫能を高め、その抗腫瘍効果をもたらそうとするものである。このような免疫賦活剤には、細菌由来のBCG、*C. parvum*、OK 432をはじめ、多糖体のレンチナン、低分子化合物のlevamisoleなど数多くの薬剤が今日研究され、また臨床でも使用されている。野本¹⁹⁾らはimmunopotentiatorを免疫刺激剤と免疫賦活剤に分け、BCG生菌やOK 432等の細菌よりの製剤を免疫刺激剤としているが、*C. parvum*はこの範ちゅうに入るものであろう。各々の作用機序は異なるものと考えられ、Tarnowski²⁰⁾らも各種免疫賦活剤を共通の実験系を用いてその効果を検討し、BCG・*C. parvum*の有効性を示している。

*C. parvum*については、Halpern²⁾らが、この菌の細網内皮系の賦活作用と制癌作用の可能性について報告して以来、数多くの研究がなされ、

臨床効果も報告されている。しかし、どの薬剤においても至適投与量があるように、免疫賦活剤においてもそれが存在するはずであり、*C. parvum* においても同様と考えられる。また、投与経路、投与時期も問題となる。Scott^{6),7)}らは C57BL/6 × DBA/2 F1 マウスと mastocytoma P 815 を用いた実験で、腫瘍移植後 2 日目に *C. parvum* 700mcg を静脈内投与した場合、最も抗腫瘍効果が認められ、過量では減弱するとしている。また 6 日目に 70mcg の腫瘍内投与した場合、44% に腫瘍の完全退縮がみられたとしている。Purnell²¹⁾らは、BALB/c × DBA/2 F1 マウスと自然発生乳癌を用いた実験で、腫瘍移植後 6 日目に、*C. parvum* を投与し、140mcg から 1400mcg の腹腔内投与に効果が認められたとしている。Milas²²⁾らは、C3Hf/Bu マウスとメチルコラントレン誘発 fibrosarcoma を用い、腫瘍移植後 3 日目に 0.25mg の *C. parvum* と *C. granulorum* を静脈内投与し、*C. parvum* の 80%、*C. granulorum* の 67% に完全退縮をみている。

投与経路についての実験をみると、Woodruff²³⁾らは、CBA マウスとメチルコラントレン誘発 fibrosarcoma を用いた実験で、腫瘍移植後 3 日目に *C. parvum* 0.7mg を投与し、その投与経路の検討をしている。これによると、腫瘍内 > 静脈内 > 腹腔内 > 腫瘍周辺 > 皮下投与の順に効果が強く認められたとしている。また Fisher^{24),25)}らは、腹腔内 > 静脈内 > 皮下投与の順に効果が認められたとしている。本邦においては、服部²⁶⁾らが ddN マウスと Ehrlich 腫瘍を用い、*C. liquefaciens* の腹腔内投与が妥当であるとし、原田²⁷⁾は C3H/He マウスとメチルコラントレン誘発 fibrosarcoma を用いた実験で、*C. liquefaciens* 1 mg を腫瘍移植後 7 日目にしない、腫瘍内、静脈内投与に有意な抗腫瘍効果を認めている。

このように、*C. parvum* の投与量・投与時期・投与経路ともに、使用されている実験系の違いにより一定していないが、*C. parvum* 単独で抗腫瘍効果を期待するには、比較的早期で腫瘍細胞数が少ない時期より投与することが必要と思われる。しかし、臨床で癌と認識されるのは、種々の検査で形態的な異常が認められた時点よりであり、本実験においても腫瘍移植後 5 日目

で、腫瘍生着が確認される時点より治療を開始し、投与経路として腹腔内を選択し、その効果を調べた。本実験において、*C. parvum* 0.4 mg 連日 5 回投与群に著明な抗腫瘍効果が認められ、1 回投与や他の連日 5 回投与群より有意な抗腫瘍効果が認められ、*C. parvum* 単独投与においては、0.4mg 連日 5 回が至適投与量と考えられた。

化学療法剤と免疫賦活剤との併用に関して細川²⁸⁾らは、両者の種類と、その投与時期の違いにより、単独では得られない相乗効果が得られる場合と逆に効果が相殺される場合があるとして、投与時期の重要性を示している。また Sansing²⁹⁾らは、併用時の投与間隔に厳密な一定の期間の必要性を示し、免疫療法開始時には一定量のリンパ系細胞の存在が必要であるとしている。このように免疫賦活剤を化学療法剤と併用する場合、併用時期の検討は重要な問題と考えられる。*C. parvum* と化学療法剤との併用に関して、諸家の報告をみると、Purnell³⁰⁾らは、*C. parvum*、BCG、Bordetella-pertussis、levamisole における単独効果と cyclophosphamide の併用効果を、BALB/c × DBA/2F1 マウスと自然発生乳癌を用いた実験より、*C. parvum* の有効性を示しており、BCG などよりも強い抗腫瘍効果をもっているとしている。また Currie³¹⁾らは、CBA マウスと fibrosarcoma を用いた実験で cyclophosphamide 投与後 12 日目に *C. parvum* を投与した場合に著しい効果をみたとしている。その他、種々の化学療法剤を併用した報告があるが、MMC・5-FU を使用した実験に関して、Fisher³²⁾らは、C3HB/FeJ マウスと自然発生乳癌を用いた実験で、5-FU 90mg/kg 投与後 4 日目に、*C. parvum* 1.4mg を毎週 1 回投与した時に、有効な抗腫瘍効果をみたしており、さらにアルキル化剤との併用が、5-FU との併用よりも効果的だと報告している。本邦において、服部²⁶⁾らは ddN マウスと Ehrlich 腫瘍を用い、腫瘍の腹腔内移植後 2 日目に MMC 1mg/kg を腹腔内投与したその後コリネ 0.5mg を 2 回腹腔内投与した場合に著しい効果をあげたとしている。また山縣^{33),34)}は、同様のマウスと腫瘍系を用い、腫瘍を背部皮下に移植し、MMC・Cyclophosphamide、5-FU の併用におけるコリネの

腹腔内・腫瘍内投与につき詳細に検討している。これによると、MMCあるいはCyclophosphamide投与後2日目にコリネを投与すると良い成績が得られ、特に2日目・4日目と2回投与すると最も良い抗腫瘍効果が得られたとし、5-FUの併用ではあまりすぐれた相乗効果は得られなかったが、これは実験計画のまずさによると報告している。加藤³⁵⁾らはBDF1マウスとL1210マウス白血病を用い、各種免疫賦活剤と化学療法剤との併用を検討している中で、MFC療法とコリネの併用に関して、MFC投与後コリネ10mg/kg/dayの1日1回隔日に10日間腹腔内投与した場合、著明な延命効果が認められたとしている。このような報告から、一般的に化学療法剤を先に投与することで腫瘍の減少をはかり、同時にこれより障害された宿主の免疫能を免疫賦活剤で高めるという方法で両者を投与した場合に、より良い効果が得られるようであるが、併用時の投与間隔には確立されたものはないようである。本実験において、腫瘍移植後5日目にM.F.療法を行い、その2日後すなわち腫瘍移植後7日目よりC. parvum 0.4mg連日5回投与した場合に著明な抗腫瘍効果が得られ、それ以外の投与方法では対象群と有意差は認められなかった。

次に、C. parvum投与において抗腫瘍効果がみられる場合に、担癌宿主の細胞性免疫能がどのように変化するかを知る目的で、hapten型抗原である塩化ピクリルによるDTHと腫瘍特異抗原に対するT細胞の反応をMIF活性で測定した。

Degrad & Raynaud³⁶⁾によれば、C. parvumはDTHを増強すると報告しており、Asherson³⁷⁾ & Allwood³⁸⁾によればC. parvumの前処置でこれが抑制されると報告している。また、藤原³⁹⁾もC. parvumの前処置でDTHが抑制されることを報告している。C. parvumがDTHを増強したり抑制したりするのは、感作抗原とC. parvumとの投与時期と方法に左右されるように思われる⁴⁰⁾。Scott⁴¹⁾らはSRBCに対するDTHの反応を調べて、感作前にC. parvumを投与すれば抑制され、同日もしくはそれ以後に投与した場合は有意な抑制が認められなかったとしている。

本実験において、担癌宿主のDTHが、健常マウスのそれに比べ低下しているが、これにC. parvumを投与することにより、かなりのDTH低下抑制が認められた。さらにM.F.併用投与の場合においても、同様のDTHの低下抑制が認められた。腫瘍移植後7日目におけるM.F.併用群でのDTHが他の群に比較し、やや低下している傾向がうかがえるが、M.F.投与による影響が表われているのかもしれない。しかし、18日目・28日目のDTHは、担癌群よりも低下抑制が認められ、C. parvum投与による細胞性免疫能の回復が表現されているものと考えられた。MIF活性に及ぼすC. parvumの影響は、Pineiro⁴²⁾らの犬を用いたStreptolysin Oに対する実験と、Gauthier-Rahman⁴³⁾らのモルモットを用いたOvalbuminに対する実験以外に見られず、担癌体における検討は今回の成績が初めてである。今回の成績の如く、リンパ節リンパ球と脾細胞をエフェクター細胞として用いた場合、担癌群では、共に15日目頃までに活性が失われるのに対し、C. parvum投与群ならびにM.F.併用群ともに、担癌群よりも強い活性が示され、より長期に活性が持続する傾向が認められ、腫瘍特異的免疫能が増強されているものと考えられた。DTH、MIF活性ともに、担癌宿主の細胞性免疫能がC. parvum投与により、強く増強されるものと推測できる結果であり、in vivoでの効果をあわせると、C. parvumは有効な免疫賦活剤であると考えられた。

現在、腫瘍免疫に働く免疫応答機構には、マクロファージ、T細胞系、K細胞、NK細胞などが解明されてきており、C. parvumはこれらの細胞群に対しても活性をもたらすことが報告されている^{44),45),46),47)}。しかし、実際に種々の免疫機構が、生体内でどの様に作動しているのかは不明であり、この解析が今後の課題として残されている。

結 論

C3H/Heマウスと同系のマウス腹水肝癌MH-134を用いた実験で、Corynebacterium parvumの抗腫瘍効果とその細胞性免疫能に及ぼす影響を調べ、以下の如き知見を得た。

1) *C. parvum* 単独投与において、背部皮下腫瘍移植後5日目より、*C. parvum* 0.4mg 連日5回腹腔内投与群に著明な抗腫瘍効果が認められた。

2) M.F. (Mitomycin C + 5-FU) 併用において、腫瘍移植後5日目にM.F.を投与し、7日目より*C. parvum* 0.4mg連日5回投与群に、著明な抗腫瘍効果が認められた。

3) 塩化ピクリルにたいする遅延型過敏反応と腫瘍抗原にたいするマクロファージ遊走阻止活性を測定したところ、*C. parvum* 投与により

担癌宿主の細胞性免疫能を強く回復させると考えられた。

4) 本実験より、*C. parvum* は有効な免疫賦活剤であり、化学療法との併用でより効果を高められると考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導・御校閲いただきました恩師折田薫三教授、ならびに終始直接御指導いただきました三輪恕昭講師に深謝します。なお本論文の要旨は、第28回日本化学療法学会西日本地方会、第29回日本化学療法学会総会で発表した。

参 考 文 献

1. 三輪恕昭・折田薫三：免疫化学療法の胃癌例への効果。日癌治会誌，15，858—863，1980。
- 2) Halpern, B.N., Prevot, A.R., Biozzi, G., Stiffel, C., Mouton, D., Morard, J.C., Bouthilier, Y. and Dereusefond, C.: Stimulation de l'activité phagocytaire du système reticuloendothelial provoquée par *Corynebacterium parvum*. *J. Reticuloendothel. Soc.* 1, 77—96, 1964.
3. Woodruff, M.F. and Boak, J.L.: Inhibitory effect of *Corynebacterium parvum* on the growth of tumor transplants in isogenic host. *Br. J. Cancer* 20, 345—355, 1966.
4. Milas, L. and Scott, M.T.: Antitumor activity of *Corynebacterium parvum*. *Adv. Cancer Res.* 26, 257—306, 1978.
5. Woodruff, M.F.A. and Warner, N.L.: Effect of *Corynebacterium parvum* on tumor growth in normal and athymic mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 111—116, 1977.
6. Scott, M.T.: *Corynebacterium parvum* as a therapeutic antitumor agent in mice. I. Systemic effects from intravenous injection. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 855—860, 1974.
7. Scott, M.T.: *Corynebacterium parvum* as a therapeutic antitumor agent in mice. II. Local injection. *J. Natl. Cancer Inst.* 53, 861—865, 1974.
8. Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. p. 639, 1974.
9. 折田薫三：マクロファージ遊走阻止試験。癌と化学療法，2，699—704，1975。
10. Hayashi, S.: Experimental study of tumor immunotherapy. I. Macrophage migration inhibitory activity as an immunological parameter. *Acta Med. Okayama* 30, 95—106, 1976.
11. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265—275, 1951.
12. Asherson, G.L. and Ptak, W.: Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. I. Active sensitization and passive transfer. *Immunology* 15, 405—416, 1968.
13. Ptak, W. and Asherson, G.L.: Contact and delayed hypersensitivity in the mouse. II. The role of different cell population. *Immunology* 17, 769—775, 1969.
14. 夏梅俊之助，右田俊介：塩化ピクリルによるマウスの遅延型皮膚反応。免疫実験操作法 A，日本免疫学会，pp. 614—620，1972。
15. George, M. and Vaughan, J.H.: *In vitro* cell migration as a model for delayed hypersensitivity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 514—521, 1962.

16. Mathe, G., Amiel, J.L., Schwarzenberg, L., Schneider, M., Catton, A., Schlumberger, J.R., Hayat, M. and Vassal, F.: Active immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 1, 697—699, 1969.
17. 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.
18. Klein, E. and Holterman, O.A.: Immunotherapeutic approaches to the management of neoplasm. *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 35, 379—391, 1972.
19. 野本亀久雄, 松尾憲一: いわゆる immunopotentiator の位置づけと意義. 癌と化学療法, 5, 37—43, 1978.
20. Tarnowski, G.S., Ralph, P. and Stock, C.C.: Sensitivity to chemotherapeutic and immunomodulating agents of two mouse lymphoma and a macrophage tumor. *Cancer Res.* 39, 3964—3967, 1979.
21. Purnell, D.M., Bartlett, G.L. and Kreider, W.: Effects of dose and schedule of immune stimulant on efficacy of combination *Corynebacterium parvum*-Cyclophosphamide treatment for a murine mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.* 39, 1—5, 1979.
22. Milas, L., Gutterman, J.U., Basic, I., Hunter, G.M., Hersh, E.M. and Withers, R.: Immunoprophylaxis and immunotherapy for a murine fibrosarcoma with *C. granulorum* and *C. parvum*. *Int. J. Cancer* 14, 493—503, 1974.
23. Woodruff, M.F.A. and Dunbar, N.: Effect of local injection of *Corynebacterium parvum* on the growth of a murine fibrosarcoma. *Br. J. Cancer* 32, 34—41, 1975.
24. Fisher, B., Wolmark, N., Saffer, E. and Fisher, E.: Inhibitory effect of prolonged *Corynebacterium parvum* and cyclophosphamide administration on the growth of established tumor. *Cancer* 35, 134—143, 1975.
25. Fisher, B., Wolmark, N., Rubbin, H. and Saffer, E.: Further observation on the inhibition of tumor growth by *Corynebacterium parvum* with cyclophosphamide. I. Variation in administration of both agents. *J. Natl. Cancer Inst.* 55, 1147—1157, 1975.
26. 服部孝雄, 笹尾哲郎, 新本 稔, 大屋正章, 山県司政, 峠 哲哉, 原田達司: 嫌気性コリネと宿主低抗性, 医学のあゆみ, 91, 438—445, 1974.
27. 原田達司: 嫌気性コリネの抗腫瘍性, 特に腫瘍内投与に関する実験的研究. 広大医誌, 27, 849—871, 1979.
28. 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.
29. Sansing, W.A., Killion, J.J. and Kollmorgen, G.M.: Evaluation of time and dose in treating mammary adenocarcinoma with immunostimulants. *Cancer Immunol. Immunother.* 2, 63—68, 1977.
30. Purnell, D.M., Bartlett, G.L., Kreider, J.W., Biro, T.G. and Kontra, J.: Comparative antitumor effect of *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis*, *Bacillus Calmette-Guérin* and Levamisole alone or in combination with cyclophosphamide in the CaD2 murine mammary adenocarcinoma system. *Cancer Res.* 39, 4838—4842, 1979.
31. Currie, G.A. and Bagshawe, K.D.: Active immunotherapy with *Corynebacterium parvum* and chemotherapy in murine fibrosarcoma. *Br. Med. J.* 28, 541—544, 1970.
32. Fisher, B., Rubin, H., Saffer, E. and Wolmark, N.: The effect of *Corynebacterium parvum* in combination with 5-fluorouracil, L-phenylalanine mustard or methotrexate on the inhibition of tumor growth. *Cancer Res.* 36, 2714—2719, 1976.
33. 山縣司政: 嫌気性コリネと制がん剤の併用に関する実験的研究. I. 腹水がんにおける併用効果について. 広大医誌, 24, 1—17, 1976.

34. 山縣司政：嫌気性コリネと制がん剤の併用に関する実験的研究。II。固型がんにおける併用効果について。広大医師, 24, 19—35, 1976.
35. 加藤武俊, 藤川智子, 太田和雄：癌化学療法と免疫療法の併用についての実験的研究。癌と化学療法, 5, 128—136, 1978.
36. Degrand, F.M. and Raynaud, M.: Quantitative effect of Mycobacteria and anaerobic Corynebacteria upon immunogenic activity of azobenzearsonate-N-acetyl-L-tyrosine in guinea pig. *Eur. J. Immunol.* 3, 660—661, 1973.
37. Asherson, G.L. and Allwood, G.G.: Depression of delayed hypersensitivity by pretreatment with Freund-type adjuvants. I. Description of the phenomenon. *Clin. Exp. Immunol.* 9, 249—258, 1971.
38. Allwood, G.G. and Asherson, G.L.: Depression of delayed hypersensitivity by pretreatment with Freund-type adjuvants. II. Mechanism of the phenomenon. *Clin. Exp. Immunol.* 9, 259—266, 1971.
39. 藤原克彦：嫌気性コリネバクテリウムの腫瘍発育抑制作用に関する実験的研究。日整会誌, 51, 1267—1276, 1977.
40. Bred, D.: Effect of *Corynebacterium parvum* on Immunity. *Pharmac. Ther. A.* 2, 373—395, 1978.
41. Scott, M.T.: Depression of delayed-type hypersensitivity by *Corynebacterium parvum*. Mandatory role of the spleen. *Cell. Immunol.* 13, 251—263, 1974.
42. Pineiro, M.S., Bowles, C.A., Cutchins, E.C. and Bull, M.I.: Canine migration inhibitory factor. Effect of *Corynebacterium parvum* administration. *Infect. Immun.* 18, 102—109, 1977.
43. Gauthier-Rahman, S., Halpern, B. and Besluau, D.: Effect of *Corynebacterium parvum* on the immune response of the guinea pig to ovalbumin. *Develop. Biol. Stand.* 38, 205—214, 1978.
44. 加藤 新：嫌気性コリネバクテリウムのメチルコラントレン誘発肉腫に対する抗腫瘍効果。日大医誌, 38, 1189—1196, 1979.
45. Ojo, E., Haller, O., Kimura, A. and Wigzell, H.: An analysis of condition allowing *Corynebacterium parvum* to cause either augmentation or inhibition of natural killer cell activity against tumor cell in mice. *Int. J. Cancer* 21, 444—452, 1978.
46. Ojo, E.: Positive correlation between the levels of natural killer cells and *in vivo* resistance to syngenic tumor transplants as influenced by various routes of administration of *Corynebacterium parvum* bacteria. *Cell. Immunol.* 45, 182—187, 1979.
47. Gabizon, A., Leibovich, S.J. and Goldman, R.: Contrasting effects of activated and non activated macrophages and macrophages from tumor-bearing mice on tumor growth *in vivo*. *J. Natl. Cancer Inst.* 65, 913—919, 1980.

**The antitumor effects and effect on cell-mediated immunity
of *Corynebacterium parvum***

Kenji NAKAMURA

First Department of Surgery, Okayama University Medical School

(Director: Prof. K. Orita)

The antitumor effects and influence on cell-mediated immunity of *Corynebacterium parvum* (*C. parvum*) were studied using C3H/He mice and syngenic mouse ascites hepatoma MH 134 tumor.

With the administration of *C. parvum* alone, a significant antitumor effect was obtained in the group given 0.4mg per day intraperitoneally for 5 consecutive days from the fifth day after transplanting 5×10^5 cells/0.1ml of MH 134 tumor subcutaneously on the back. A significant antitumor effect was also obtained when *C. parvum* was combined with MF chemotherapy (Mitomycin C 1mg/kg, 5-Fluorouracil 25mg/kg), in the group given MF i.p. on the fifth day and 0.4mg/day of *C. parvum* i.p. for 5 consecutive days from the seventh day after tumor transplantation.

The cell-mediated immunity in these two groups was investigated by using the delayed type hypersensitivity (DTH) and macrophage migration inhibition factor (MIF activity). The results were: no decrease in DTH was shown compared with the tumor-bearing untreated group. MIF activity was marked compared with the tumor-bearing untreated group and tended to persist for a long period. From these findings, it was concluded that *C. parvum* was an effective immunopotentiator which yielded an antitumor effect by restoring the cell-mediated immunity of the tumor bearing host. The effect seemed to be enhanced when used in combination with chemotherapy.