

担がんマウス脾細胞の腫瘍細胞増殖抑制作用におよぼす 抗腫瘍性溶連菌製剤 OK-431 の影響について

金沢大学医学部薬理学講座

川 尻 博 男
河 野 照 茂
西 一 也
高 村 敬 一
小 久 保 護
正 印 達

(昭和59年9月3日受付)

抗腫瘍性連鎖球菌製剤の OK-431 と OK-432 が宿主介在性の作用をもつことが報告されているため、担がんマウス脾細胞の腫瘍細胞増殖抑制作用への OK-431 の影響について検討した。エールリッヒがん細胞を腹腔内に移植したマウスまたは P388 白血病細胞を皮下に移植したマウスに、移植 24 時間後から OK-431 または生理食塩水 (PS) を連続 7 日間、7 回腹腔内に注射した。腫瘍細胞移植から 10 日後に、脾細胞を OK-431 で処置した担がんマウス (OK-431 脾細胞) または生理食塩水で処置した担がんマウス (PS 脾細胞) より採取し、10% 牛胎児血清加ハックス液に浮遊させた。エールリッヒがん細胞あるいは P388 白血病細胞を OK-431 脾細胞または PS 脾細胞と 1:100 の細胞比で混合し、37°C に 2 時間インキュベートした。インキュベート後がん細胞をマウス側腹部の皮下に移植した。脾細胞と混合せずにインキュベートしたがん細胞も対照として移植した。固型腫瘍の大きさを長径 (L) と短径 (S) で測定し、腫瘍の増殖を $(L+S)/2$ で表示した。移植 4 週後のエールリッヒがんの大きさは次のとおりであった: OK-431 脾細胞処理腫瘍細胞, 10.0 ± 0.7 mm; PS 脾細胞処理腫瘍細胞, 13.3 ± 0.7 mm; 対照腫瘍細胞, 20.0 ± 0.8 mm. 移植 12 日後の P388 白血病細胞では、それぞれ 9.8 ± 0.3 mm, 13.8 ± 0.4 mm, 11.2 ± 0.3 mm であった。この結果から、OK-431 脾細胞で処理した細胞の固型腫瘍の大きさは PS 脾細胞で処理した細胞、または対照腫瘍細胞の固型腫瘍よりも小さかった。したがって、OK-431 は担がんマウス脾細胞の腫瘍細胞増殖抑制作用を増強することが明らかになった。

Key words OK-431, mouse spleen cell, tumor growth inhibitory activity

ストレプトリジン S 産生溶連菌 Su 株が腫瘍細胞を傷害・破壊し、その移植性を阻害することを Koshimura ら¹⁾は実証し、Okamoto ら²⁾は同溶連菌をペニシリン G 加 Bernheimer's basal medium 中で加温処理することで、ストレプトリジン S 産生が消失し、抗腫瘍効果が増強した PC-B-45 (OK-431) を開発した。さらに、OK-431 に凍結乾燥などの処置を行なうことによって OK-432³⁾が製剤化されるに至った。OK-431 および OK-432 製剤の抗腫瘍効果は、腫瘍細胞傷害の直接作用のほか、宿主介在作用にもよることが Sakurai

ら⁴⁾によって示唆され、やがて、OK-432 は抗腫瘍性製剤として臨床的に用いられるに至った。これと共に、宿主介在作用あるいは免疫賦活剤としての研究も盛んに行なわれ、マクロファージ⁵⁾⁶⁾、各種リンパ球⁷⁾や natural killer 細胞の賦活化⁸⁾、およびインターフェロン誘起作用⁹⁻¹²⁾などについて多くの成果が発表されている。しかし、免疫賦活の作用機構などについてはまだ不明の点が多いことから、本論文では、OK-431 の担がんマウス脾細胞に対する影響について検討を行なった。

Abbreviations: FBS, fetal bovine serum, KE, Klinische Einheit, PS, physiological saline.

材料および方法

I. 実験動物

実験には、ddYマウス、DBA/2マウスおよびBDF₁マウスの雌、6～8週令を用いた。

II. がん細胞浮遊液の調製

エールリッヒがん細胞腹腔内移植10日目のddYマウスよりがん細胞を採取し、ハンクス液(pH7.2)にて3回遠心洗滌(1000rpm, 7分間)後、10%牛胎児血清加ハンクス液(FBSハンクス液)に浮遊させて、 1×10^6 細胞/mlの細胞浮遊液を作製した。

DBA/2マウスで継代培養したP388白血病細胞についても同様にして 5×10^6 細胞/mlの細胞浮遊液を作製した。

III. OK-431の作成

OK-431はOkamotoらの方法²⁾によって作製した。すなわち、教室保存の溶連菌Su株(ATCC21060, Su菌)を普通ブイヨン100ml(pH7.2)で37°C, 20時間培養し、菌体を冷生理食塩水で2回洗滌した後、洗滌菌体を5mlのBernheimer's basal medium〔マルトース675mg, 2%硫酸マグネシウム・7水塩12ml, 20%リン酸一カリウム(水酸化ナトリウムでpH7.0に調整)6ml, 蒸溜水66ml〕に浮遊する。この菌浮遊液5mlに 2×10^6 U/1.25mlペニシリンG生理食塩水1mlを加えて、37°C20分間、続いて45°C30分間の加温処置を行なってOK-431を作製した。このOK-431の菌量は50KE/ml(KE:菌量の単位で、1KEは乾燥菌0.1mgに相当する)であった。OK-431は低温下に保存し、1週間以内に実験に用いた。実験使用時には2KE/mlに希釈して用いた。

IV. 脾細胞浮遊液の調製

エールリッヒがん細胞浮遊液(7×10^6 細胞/ml)を40匹のddYマウス腹腔内に0.5mlずつ移植したのち、マウスを20匹ずつ2群に分けた。1群のマウスには、がん細胞移植24時間後からOK-431を1KE/頭/日、連続7日間腹腔内投与し、これをOK-431投与群とした。他の1群には、同じく移植24時間後から生理食塩水を0.5ml/頭/日、連続7日間投与し、これをPS投与群とした。また、P388白血病細胞(1×10^7 細胞/ml)を20匹のBDF₁マウス皮下に0.5mlずつ移植したのち、マウスを10匹ずつ2群に分け、同様の処置を行ない、それぞれ、OK-431投与群およびPS投与群とした。がん細胞移植後10日目に各群のマウスより脾臓を摘出し、これをシャーレ上でハサミを用いて細切し、細砕組織をハンクス液に浮遊させて攪拌後ガーゼでろ過した。ろ液の細胞浮遊液を遠心(1500rpm, 10分間)したのち、沈渣を0.83%塩化アンモニウム液に浮遊さ

せ室温下で7分間静置して赤血球を溶血させて除いた。ついで、この処置細胞をハンクス液で3回洗滌したのち、FBSハンクス液に浮遊させて 1×10^6 細胞/ml, 5×10^7 細胞/mlまたは 3×10^7 細胞/mlの各細胞浮遊液を作製した。

V. 脾細胞によるin vivo中和試験

担がんマウス脾細胞について、エールリッヒがん細胞あるいはP388白血病細胞に対する増殖抑制作用を、Winnの方法¹³⁾により調べた。すなわち、腫瘍細胞と脾細胞の混合比1:100にしたエールリッヒがん細胞浮遊液(1×10^6 細胞/ml)5mlと脾細胞浮遊液(1×10^6 細胞/ml)5mlの混合液、細胞混合比を1:30にしたエールリッヒがん細胞浮遊液(1×10^6 細胞/ml)5mlと脾細胞浮遊液(3×10^7 細胞/ml)5mlの混合液、細胞混合比を1:100にしたP388白血病細胞浮遊液(5×10^6 細胞/ml)10mlと脾細胞浮遊液(5×10^7 細胞/ml)10mlの各混合液を作製し、37°Cに2時間振盪しながらインキュベートした。ついで遠心洗滌後、ハンクス液に再浮遊させ、 5×10^6 腫瘍細胞/mlの浮遊液を作製し、この腫瘍細胞と脾細胞の混液0.2mlをddYまたはBDF₁マウスの側腹部皮下に移植し、腫瘍の増殖を4週間あるいは12日間観察した。腫瘍の大きさは長径(Lmm)と短径(Smm)の平均値((L+S)/2mm)で表示した。

成 績

エールリッヒがん細胞移植10日目のマウスより脾臓摘出を行った際、OK-431投与群のマウスには腹水の貯留はみとめられなかったが、PS投与群のマウスには著明な腹水の貯留がみとめられた。

エールリッヒがん細胞と脾細胞を1:30の混合比に混じて処理したがん細胞を移植して4週間その増殖を観察した成績は表1に示した如くである。すなわち、脾細胞で処理せずのがん細胞(対照がん細胞)のみを接種したマウスでは、腫瘍径は日時の経過と共に増大し、特に3週から4週にかけて増大は著明で 20.0 ± 0.8 mmを示した。これに対し、OK-431投与群マウス脾細胞およびPS投与群マウス脾細胞で処理したがん細胞の増殖は時間と共に直線的に増大したが、対照がん細胞の増殖に比して小さかった。また、OK-431投与群およびPS投与群マウス脾細胞処理がん細胞間においては、両がん細胞の増殖度はほとんど同じで、4週後の腫瘍の大きさは 13.0 ± 0.7 mmと 13.5 ± 0.7 mmであり、両がん細胞間には差はみとめられなかった。これに対し、がん細胞と脾細胞を1:100の混合比で混して処理したがん細胞の増殖は表2に示した如くである。対照がん細胞、OK-431投与群ならびにPS投与群

マウス脾細胞処理がん細胞は、いずれも日時の経過と共に増殖したが、増殖度は対照がん細胞、PS 投与群、ついで OK-431 投与群マウス脾細胞処理がん細胞の順に大きく、第 4 週ではそれぞれ、 20.0 ± 0.8 mm, 13.3 ± 0.7 mm, および 10.0 ± 0.7 mm と、OK-431 投与群マウス脾細胞処理によりがん細胞の増殖は他の 2 群に比して有意に抑制されていた。

P388 白血病細胞を脾細胞と 1:100 の混合比に混じて処理したのち BDF₁ マウス皮下に移植した。P388 白血病細胞の増殖度に関する成績は表 3 に示した如くである。すなわち、OK-431 投与群マウスの脾細胞処理による P388 白血病細胞の増殖は、PS 投与群マウス脾細胞処理 P388 白血病細胞および脾細胞で処理しなかった P388 白血病細胞の増殖に比して明らかに抑制さ

れ、P388 白血病細胞移植後 12 日目の腫瘍の大きさはそれぞれ 9.8 ± 0.3 mm, 13.8 ± 0.4 mm と 11.2 ± 0.3 mm であった。しかし、各 P388 白血病細胞を移植されたマウスの平均生存日数は、それぞれ 16.5 ± 0.6 日, 15.5 ± 0.6 日ならびに 14.8 ± 0.5 日と差はみとめられなかった。

考 察

抗腫瘍性溶連菌製剤 OK-431 ならびにその凍結乾燥標品 OK-432 の抗腫瘍効果は、腫瘍細胞に対する直接傷害作用と、間接的な宿主介在作用によるとされている¹⁴⁾。後者に関してはマクロファージ⁹⁾¹⁰⁾、T リンパ球⁹⁾ならびに natural killer 細胞の賦活化⁸⁾のほか、インターフェロンを誘起する⁹⁻¹²⁾など数多くの報告があ

Table 1. Growth of Ehrlich carcinoma cells pretreated with spleen cells of tumor bearing mice in a cell ratio of 1:30

Source of spleen cells	Tumor size (mm)			
	Weeks after inoculation of carcinoma cells			
	1	2	3	4
OK-431 treated tumor bearing mice	6.6 ± 0.4^a	8.2 ± 0.4^a	10.0 ± 0.4^a	13.0 ± 0.7^a
PS treated tumor bearing mice	7.3 ± 0.5	7.8 ± 0.3^a	10.1 ± 0.4^a	13.5 ± 0.7^a
None (control)	9.2 ± 0.5	11.3 ± 0.3	14.8 ± 0.2	20.0 ± 0.8

OK-431 or physiological saline (PS) was injected intraperitoneally on 7 successive days into ddY mice which had been inoculated intraperitoneally with Ehrlich carcinoma cells 24 hours previously. On the 10th day after inoculation, spleen cells were obtained from those mice and mixed with Ehrlich carcinoma cells in a cell ratio of 30:1. After incubation of the mixture at 37°C for 2 hours, the treated carcinoma cells were inoculated subcutaneously into ddY mice. Growth of the solid tumor was observed for 4 weeks and the tumor size was expressed as (long diameter+short diameter)/2. As the control, carcinoma cells were inoculated subcutaneously without mixing with spleen cells. Each value represents the mean \pm S.E.M. of 10 mice. ^aSignificantly different from control group, $p < 0.01$ (with the student's *t*-test).

Table 2. Growth of Ehrlich carcinoma cells pretreated with spleen cells of tumor bearing mice in a cell ratio of 1:100

Source of spleen cells	Tumor size (mm)			
	Weeks after inoculation of carcinoma cells			
	1	2	3	4
OK-431 treated tumor bearing mice	$3.7 \pm 0.4^{a,b}$	$4.9 \pm 0.4^{a,b}$	$6.3 \pm 0.5^{a,b}$	$10.0 \pm 0.7^{a,b}$
PS treated tumor bearing mice	6.0 ± 0.6^a	7.4 ± 0.3^a	8.8 ± 0.5^a	13.3 ± 0.7^a
None (control)	9.2 ± 0.5	11.3 ± 0.3	14.8 ± 0.2	20.0 ± 0.8

Experiment was carried out by the procedure described in Table 1. However carcinoma cells were mixed with spleen cells in a cell ratio of 1:100, and then inoculated subcutaneously into mice. ^aSignificantly different from control group, $p < 0.01$. ^bSignificantly different from PS treated tumor bearing mice group, $p < 0.01$.

る。本論文は担がん状態のマウス脾細胞に対する OK-431 の影響を検討したものであるが、これに関しては、稲葉ら¹⁹⁾は Balb/c マウスに M109 細胞を移植したのち OK-432 を投与した群と非投与の群とから脾細胞を分離し、M109 細胞に対する殺作用を *in vitro* で検討し、OK-432 投与マウスの脾細胞の殺効果が強いことを報告している。また山田ら¹⁹⁾は KKN-1 腫瘍細胞を移植した Balb/c ノードマウスに OK-432 を投与し、同マウスの脾細胞で処理した KKN-1 細胞を正常マウスに移植しても細胞の生着がみられなかったと報告している。本論文ではエールリッヒがん細胞ならびに P388 白血病細胞担がんマウスの脾細胞に対する OK-431 の影響を Winn の方法によって検討したものであり、その結果、OK-431 の投与によって担がんマウスの脾細胞が活性化されたことは、稲葉らおよび山田らの報告とよく一致する。しかし、脾細胞の構成は単一の細胞によるものでなく、Tリンパ球、マクロファージなど複雑であり、OK-431 がこれらの細胞をどのようにして賦活化するかは依然として不明であり、また脾細胞の賦活化が担がん状態によってどのように変化するかも不明である。これらは今後検討するべき課題と考えられる。

結 論

エールリッヒがん細胞ならびに P388 白血病細胞担がんマウスに OK-431 投与を行ない、同マウス脾細胞の腫瘍細胞増殖抑制に対する OK-431 の影響を Winn の方法により検討した。その結果腫瘍細胞と脾細胞を 1:100 の混合比に混じて処理すると、処理腫瘍細胞の

増殖は有意に抑制され、担がんマウスの脾細胞の腫瘍細胞増殖抑制が OK-431 によって賦活化される成績がえられた。

文 献

- 1) Koshimura, S., Murasawa, K., Nakagawa, E., Bando, Y. & Hirata, R.: Experimental anti-cancer studies. Part III. On the influence of living hemolytic streptococci upon the invasion power of Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Jpn. J. Exp. Med.*, **25**, 93-102(1955).
- 2) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R.: Studies on the anticancer and streptolysin S-forming activities of hemolytic streptococci. *Jpn. J. Exp. Med.*, **27**, 107-116(1967).
- 3) Okamoto, H., Shoin, S. & Koshimura, S.: Streptolysin S-forming and antitumor activities of group A streptococci, p259-289. *In* J. Jeljaszewicz & T. Wadström (ed.), *Bacterial toxins and cell membranes*. Academic press inc., London, 1978.
- 4) Sakurai, Y., Tsukagoshi, S., Satoh, H., Akiba, T., Suzuki, S. & Takagaki, Y.: Tumor-inhibiting effect of a streptococcal preparation (NSC-B116209). *Cancer Chemother. Rep.*, Part 1, **56**, -17(1972).
- 5) Toh, K. & Kikuchi, K.: Inhibition of tumor growth *in vivo* and *in vitro* by macrophages from rat treated with a streptococcal preparation, OK-432. *Gann*, **67**, 115-119(1976).

Table 3. Growth of P388 leukemic cells pretreated with spleen cells of tumor bearing mice in a cell ratio of 1:100

Source of spleen cells	Tumor size (mm)		
	Days after inoculation of P388 leukemic cells		
	7	9	12
OK-431 treated tumor bearing mice	5.6 ± 0.2 ^{a,b}	7.5 ± 0.3 ^{a,b}	9.8 ± 0.3 ^{a,b}
PS treated tumor bearing mice	8.6 ± 0.2 ^a	10.4 ± 0.3 ^a	13.8 ± 0.4 ^a
None (control)	7.2 ± 0.4	9.2 ± 0.3	11.2 ± 0.3

OK-431 or physiological saline (PS) was injected intraperitoneally on 7 successive days into BDF₁ mice which had been inoculated subcutaneously with P388 leukemic cells 24 hours previously. On the 10th day after inoculation, spleen cells were obtained from those mice and mixed with P388 leukemic cells in a cell ratio of 100:1. After incubation of the mixture at 37°C for 2 hours, the treated tumor cells were inoculated subcutaneously into BDF₁ mice. Growth of the solid tumor was observed for 12 days and the tumor size was expressed as (long diameter + short diameter)/2. As the control, tumor cells were inoculated subcutaneously without mixing with spleen cells. Each value represents the mean ± S.E.M. of 10 mice. ^aSignificantly different from control group, *p* < 0.01. ^bSignificantly different from PS treated tumor bearing mice group, *p* < 0.01.

- 6) 溝口靖紘・筒井ひろ子・阪上吉秀・東森俊博・門奈丈之・山本祐夫・森沢成司: OK-432 によって活性化されたマウス腹腔浸出細胞の腹水肝癌細胞 (MH-134) に対する細胞傷害性. 日本臨床免疫学会会誌, 5, 281-286(1982).
- 7) Hojo, H. & Hashimoto, Y.: Cytotoxic cells induced in tumor-bearing rats by a streptococcal preparation(OK-432). Gann, 72, 692-699(1981).
- 8) Oshimi, K., Kano, S., Takaku, F. & Okumura, K.: Augmentation of mouse natural killer cell activity by a streptococcal preparation, OK-432. J. Nat. Cancer Inst. 65, 1265-1269(1980).
- 9) Aoki, T., Kvedar, J. P., Hollis, V. W. & Bushar, G. S.: *Streptococcus pyogenes* preparation OK-432. Immunoprophylactic and immunotherapeutic effect on the incidence of spontaneous leukemia in AKR mice. J. Nat. Cancer Inst., 56, 687-690(1976).
- 10) Matsubara, S., Suzuki, F. & Ishida, N.: Induction of immune interferon in mice treated with a bacterial immunopotentiator, OK-432. Cancer Immunol. Immunother., 6, 41-45(1979).
- 11) Saito, M., Ebina, T., Koi, M., Yamaguchi, T., Kawada, Y. & Ishida, N.: Induction of interferon- γ in mouse spleen cells by OK-432, a preparation of *Streptococcus pyogenes*. Cell. Immunol., 68, 187-192(1982).
- 12) Saito, M., Yamaguchi, T., Koi, M., Aonuma, E., Usami, H. & Ishida, N.: *In vitro* production of immune interferon (IFN- γ) by murine spleen cells when different sensitizing antigens are used *in vivo* and *in vitro*. Cell. Immunol., 78, 379-386(1983).
- 13) Winn, H. J.: Immune mechanisms in homo-transplantation. II. Quantitative assay of the immunologic activity of lymphoid cells stimulated by tumor homografts. J. Immunol., 86, 228-239 (1961).
- 14) Ishida, N., Hoshino, T. & Uchida, A.: A streptococcal preparation as a potent biological response modifier OK-432. p18-32. Excerpta Medica, Amsterdam-Princeton-Geneva-Tokyo, 1983.
- 15) 稲葉征四郎・中根佳宏・高橋俊三・白方秀二・沖野功次・仲井幹雄・野中雅彦・橋本勇: マウス自然発生肺癌に対する OK-432 (ピシバニール) の効果. 癌と化学療法, 8, 974-978(1981).
- 16) 山田好則・久保田哲朗・松本純夫・文鑑花・花谷勇治・熊井浩一郎・石引久弥・阿部令彦: Balb/c ヌードマウスおよびヘテロマウスを用いた実験的免疫療法-OK-432 の検討-. 癌と化学療法, 7, 1089-1095 (1980).

Effect of Anticancer Hemolytic Streptococcus Preparation OK-431 on the Tumor Cell Growth Inhibitory Activity of Spleen Cells of Tumor Bearing Mouse Hiroo Kawaziri, Terushige Kohno, Kazuya Nishi, Kei-ichi Takamura, Mamoru Kokubo and Susumu Shoin, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Juzen Med. Soc., 93, 673-678 (1984)

Key words: OK-431, Mouse spleen cell, Tumor growth inhibitory activity

Abstract

As anticancer streptococcal preparations OK-431 and OK-432 were reported to possess a host mediated action, an effect of OK-431 was examined on the tumor cell growth inhibitory activity of spleen cells obtained from tumor bearing mice. OK-431 or physiological saline (PS) was injected intraperitoneally on 7 successive days into the mice, which had been inoculated with Ehrlich carcinoma cells intraperitoneally or P388 leukemic cells subcutaneously 24 hours previously. On the 10th day after inoculation of the tumor cells, spleen cells were isolated from the tumor bearing mice treated with OK-431 (OK-431 spleen cells) or with PS (PS spleen cells), and suspended in Hanks solution supplemented with 10% fetal bovine serum. Ehrlich carcinoma cells or P388 leukemic cells were mixed with the OK-431 spleen cells or the PS spleen cells in a

cell ratio of 1:100 and then incubated at 37°C for 2 hours. After incubation, the cancer cells were inoculated subcutaneously into mice on the flank. Cancer cells, which had been incubated without spleen cells, were inoculated as the control. The size of a solid tumor was measured by long (L) and short (S) diameters and the growth of the tumor was expressed as $(L+S)/2$. Dimensions of Ehrlich carcinoma 4 weeks after inoculation were as follows: the tumor cells treated with the OK-431 spleen cells, 10.0 ± 0.7 mm; the tumor cells treated with the PS spleen cells, 13.3 ± 0.7 mm; the control tumor cells, 20.0 ± 0.8 mm. Those of P388 leukemic cells 12 days after inoculation were 9.8 ± 0.3 mm, 13.8 ± 0.4 mm and 11.2 ± 0.3 mm, respectively. These results showed that the solid tumor of the cells treated with the OK-431 spleen cells was smaller than that of the cells treated with the PS spleen cells or of the control tumor cells. Thus, it was shown that OK-431 caused the enhancement of the tumor cell growth inhibitory activity of spleen cells of tumor bearing mice.