

OK-431 のウサギ血液像及び体温に対する 影響について

金沢大学医学部薬理学教室

木	越	茂
河	野	照
西	尾	真
川	尻	博
杉	山	京

(昭和55年3月14日受付)

核酸効果¹⁾の研究に端を発して行なわれた溶連菌による実験的制がん研究で, streptolysinS産生能を有する溶連菌には抗腫瘍作用²⁾があることが実証され, やがて virulence と抗腫瘍作用は無関係であること³⁾も報告された. ついで実験は溶連菌の無毒化と抗腫瘍性増強化の方向に進み, その結果, 溶連菌をペニシリン含有 Bernheimer basal medium⁴⁾に浮遊させて処置を行なうことで, 抗腫瘍性の強い, 毒性の弱い溶連菌製剤 PC-B-45 標品⁴⁾⁵⁾⁶⁾ (OK-431) が開発されるに至った.

しかし, OK-431 製剤は溶連菌体を含んでおり, また, 溶連菌には菌体外溶血毒素⁷⁾のほか菌体内溶血毒素⁷⁾⁸⁾も実証されている. これらのことから OK-431 を生体内に投与したとき生体血液に対する影響及び体温に対する影響が問題と考えられたので, OK-431 のウサギ血液像及び体温に対する影響について実験を行なった.

材料及び方法

1. 溶連菌: 教室保存の溶連菌 Su 株 (Type3, 以下単に Su 菌と略記) を使用した. Su 菌の培養には普通ブイオン培地 (pH 7.2~7.4) を用いた.

2. PC-B-45 (OK-431) の調製: Okamoto ら⁴⁾の方法に従って OK-431 を作製した. すなわち, Su 菌の 20 時間普通ブイオン培地 1 ml を 100 ml の普通ブイオンに接種し, 37℃で 20 時間培養したのち, 低温下で遠心して沈澱した生菌体を集め, これを冷生理食塩水で 2 回

洗滌したのち洗滌菌体を 5 ml の Bernheimer basal medium [Maltose 675 mg, 20% KH₂PO₄ (NaOH で pH 7.0 に調整) 6 ml, 2% MgSO₄ · 7H₂O 12 ml, 蒸溜水 66 ml] に浮遊した. ついで, この Su 菌浮遊液に 2 × 10⁶U/1.25 ml のペニシリン G 生理食塩水液 1 ml を加えて 37℃ 20 分間, ついで 45℃ 30 分間インキュベートして OK-431 を作製した. この OK-431 の菌量は 50KE/ml であった. OK-431 は, 3 日ごとに作製し, 低温下で保存した. 実験にはそのつど生理食塩水で 5KE/ml, 10KE/ml 及び 15KE/ml の稀釈液を作製して用いた.

3. 血液像に対する実験

1) OK-431 1 回投与実験: 体重 2 kg のウサギ耳静脈に 15KE/ml の OK-431 1 ml を注射したのち, 経時的に耳静脈より採血して赤血球数⁹⁾及び白血球数¹⁰⁾を測定し, また血色素量を Sahli-小宮法¹¹⁾によって定量した.

2) OK-431 連日投与実験: ウサギ耳静脈に 1 日 1 回定時に各濃度の OK-431 液 1 ml を連日 10 日間耳静脈内に投与し, 1 日 1 回所定の時刻に採血して赤血球数, 白血球数及び血色素量を測定した.

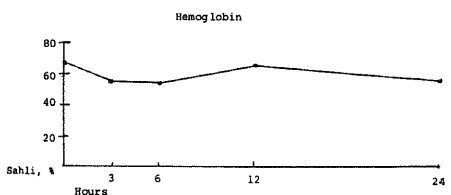
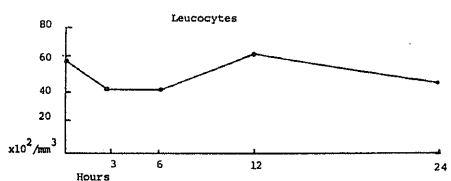
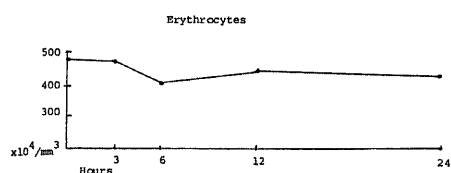
4. 発熱性試験: 体重 2 kg のウサギを実験前 1 週間飼育し, 体重, 体温の変動のないものを選んで耳静脈に 5KE/ml の OK-431 1 ml を 1 日 1 回所定の時刻に連日 6 日間静脈内注射し, 経時的には体温測定を行なった. 体温測定はウサギを固定して直腸体温計を用いて測定した.

Influence of OK-431 upon Blood Picture and Body Temperature of Rabbit. Shigeru Kigoshi, Terushige Kohno, Matomo Nishio, Hiroo Kawajiri and Kyoko Sugiyama, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University, 920, Japan.

Table 1. Influence of OK-431 on the blood picture of rabbits

Tested items	Before injection	Hours after injection			
		3	6	12	24
Erythrocytes ($10^4/mm^3$)	480	470	411	451	436
Leucocytes ($10^2/mm^3$)	62	40	39	63	54
Hemoglobin (Sahli, %)	66	54	53	65	55

A dose of 15 KE of OK-431 was injected into rabbit.



A dose of 15 KE of OK-431 was injected intravenously into rabbit.

Fig. 1. Influence of OK-431 on the blood picture of rabbit

成 績

1. OK-431 の血液像に対する作用

1) OK-431 の 1 回投与による成績: OK-431 15KE の静脈内投与後経時的に測定した赤血球数,白血球数及び血色素量値を表 1 及び図 1 に示した。赤血球数は OK-431 投与後 6 時間で約 15% の減少を示したが,以後増加して投与後 12 時間で投与開始前の状態に復した。

白血球数は投与後 3 時間及び 6 時間で約 30% 減少したが, 12 時間で投与開始前の状態に復した。

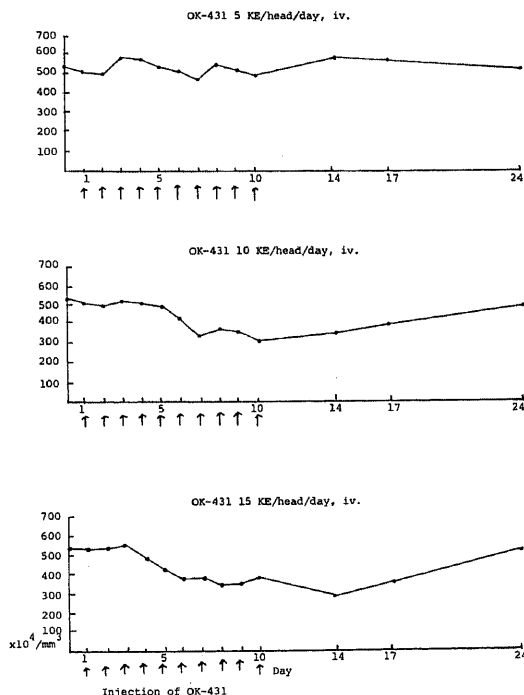


Fig. 2. Influence of OK-431 on the blood picture (erythrocytes) of rabbits

Table 2. Influence of OK-431 on the blood picture (erythrocytes) of rabbits

Dose of OK-431 (KE/head/day, iv)	Body weight of rabbit (Kg)	The number of erythrocytes ($10^4/mm^3$)													
		Before injection	Days after first injection												
			(1)*	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	14	17	24
5	2	545	511	504	582	578	545	520	478	547	521	490	585	568	585
10	2	528	515	503	521	516	492	434	354	373	365	322	354	410	500
15	2.1	531	534	540	552	485	434	389	384	350	359	368	297	347	544

* () indicates that OK-431 was injected on that day.

Table 3. Influence of OK-431 on the blood picture (leucocytes) of rabbits

Dose of OK-431 (KE/head/day, iv)	Body weight of rabbit (Kg)	The number of leucocytes (10 ² /mm ³)													
		Before injection	Days after first injection												
			(1)*	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	14	17	24
5	2	72	73	77	70	76	72	80	63	66	59	90	82	76	80
10	2	70	77	88	88	105	77	63	62	57	66	78	108	86	80
15	2.1	79	75	76	88	61	79	89	66	66	68	100	115	86	76

* () indicates that OK-431 was injected on that day.

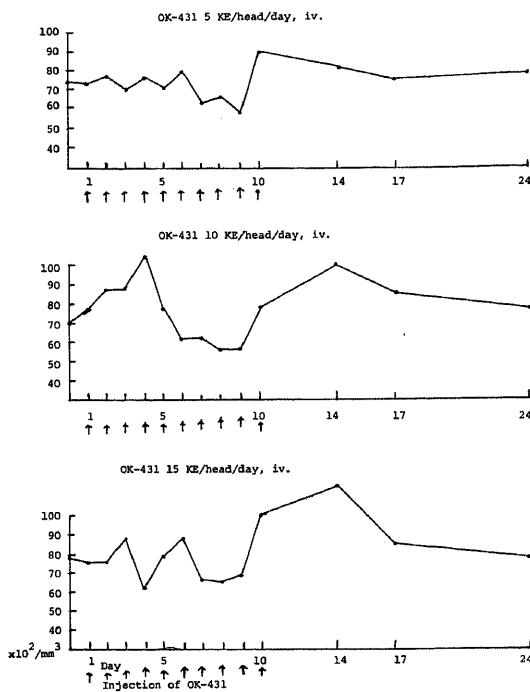


Fig. 3. Influence of OK-431 on the blood picture (leucocytes) of rabbits

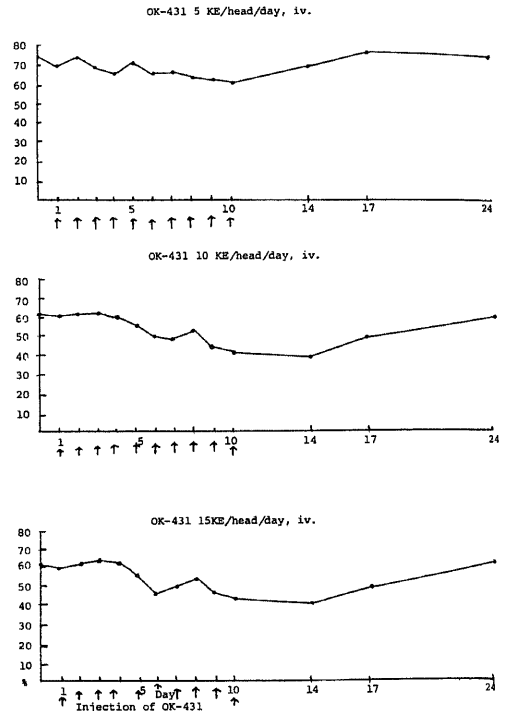


Fig. 4. Influence of OK-431 on the blood picture (hemoglobin) of rabbit

Table 4. Influence of OK-431 on the blood picture (Hemoglobin) of rabbits

Dose of OK-431 (KE/head/day, iv)	Body weight of rabbit (Kg)	Hemoglobin values (Sahli %)													
		Before injection	Days after first injection												
			(1)*	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	14	17	24
5	2	75	70	74	69	66	71	66	66	64	63	61	69	76	75
10	2	62	61	61	62	60	55	50	49	52	45	42	39	49	58
15	2.1	61	60	62	64	62	56	46	50	54	47	44	41	50	62

* () indicates that OK-431 was injected on that day.

血色素量は投与後3時間及び6時間で約20%の減少を示したが12時間で投与開始前の状態に復した。

2) OK-431の連日投与による成績: OK-431の10日間連日投与による赤血球数の変化を表2及び図2に示した。

赤血球数は1日1回5KE, 10日間連日投与で変化はなかったが, 投与濃度が増加すると変化がみられた。すなわち, 7日目から10日目まで30~40%減少したが, 投与計画終了後4日目より増加し, 14日目で投与開始前の状態に復した。1日1回15KE, 10日間連日投与でも6日目から減少がおこり, 以後10日目までは約30%減少したが, 投与計画終了後4日目より増加し, 14日目で投与開始前の状態に復した。

白血球数では特に減少の傾向はみられず, 増加, 減少について増加の傾向が各濃度投与ウサギに共通してみられた。これらの様子を表3及び図3に示した。すなわち, 1日1回5KE, 10日間連日投与では投与開始後6日目で11%増加, 7日目, 8日目及び9日目では約10%減少, 10日目では25%増加しており, 以後増加の状態が続いた。1日1回10KE連日投与では投与開始後増加し, 4日目で50%増加し, 6日目, 7日目, 8日目及び9日目では20%減少し, 10日目では約10%増加し, 投与終了後も増加して投与計画終了後4日目で最高の50%増加となり, 以後漸減しながら投与開始前の状態に復した。1日1回15KEの連日投与では投与開始3日目では11%増加, 4日目では20%減少, 6日目では12%増加, 7日目, 8日目及び9日目では15

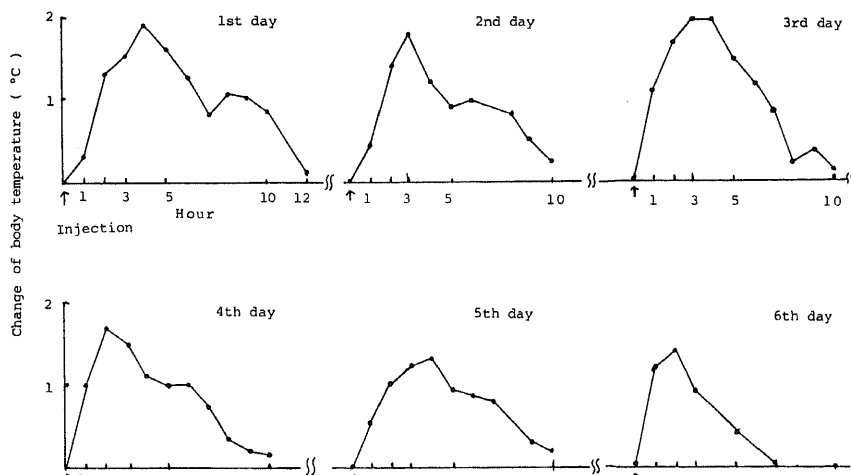
%減少, 10日目では26%増加となり投与計画終了後4日目までは増加して45%増加となり, 以後は減少して7日目で投与開始前の状態に復した。

血色素量は表4及び図4に示した如く各濃度に共通して減少の傾向がみられ, 投与開始後10日目でいずれも血色素量は最低値を示し, 1日1回5KEの連日投与では20%減少, 10KE及び15KE投与では約30%の減少をしめした。しかし投与計画終了後4日目から血色素量は増加し, 7日目で投与開始前の状態に復した。

2. 発熱性実験: OK-431を1日1回5KE, 連日6日間ウサギ耳静脈内投与による体温の変動を図5に示した。第1回の耳静脈投与により30分から1時間で体温上昇がおこり, 投与後3時間で体温は最高となり, 以後体温は次第に下降し, 投与後約10時間で投与前の状態に復した。ついで, 2日目以後の投与でも, 投与のつど発熱がみられ, 発熱度は第1回目投与と同様であった。しかし4日目より体温上昇度はやや減少し, 発熱時間もやや短縮の傾向を示し, 第1日目投与では体温は2℃上昇し発熱時間は約10時間であったのに第6日目では体温は1.5℃上昇し, 発熱時間も7時間であった。

考 察

OK-431はSu菌をペニシリン含有Bernheimer basal mediumに浮遊して処置したもので, 抗腫瘍活性は増強しており, マウスに対するvirulenceも腹腔内注射ではSu菌の1/2以下と低下していた。OK-431



A dose of 5 KE of OK-431 was injected intravenously into rabbit 6 times on 6 successive days.

Fig. 5. Influence of OK-431 on the body temperature of rabbit

標品の菌を普通ブイヨン培地に移植しても増殖はみられず、静止菌法での RNA 付加による streptolysin S 産生もほとんど認められないか、或いは全く認められなかった。しかし、OK-431 150KE/kg を腹腔内投与すると 24 時間後でもマウス体内臓器中から streptolysin S 産生菌が検出された¹²⁾。これらのことから OK-431 の Su 菌は死菌ではないが、死菌に近い状態であると考えられる。一方、溶連菌には菌体外溶血毒素として streptolysin などがあがるが、菌体内にも streptolysin S 様の溶血物質⁷⁰⁾が存在する。本実験において 1 日 1 回 10KE の OK-431 連日投与により、赤血球数が減少したのは OK-431 菌の菌体内溶血毒素によるのか、或いは死菌状態に近いとはいえ生菌状態にある OK-431 菌の産出する菌体外溶血毒素によるものか、または、生体構成成分、特に RNA または血清¹³⁾と反応して溶血毒素を産生し、直接赤血球に作用して赤血球数の減少をおこし、これにともなって血色素量も減少するものと考えられた。

また、白血球数が増加、減少、増加の傾向を示したのは、OK-431 菌の投与によって生体は感染状態となり、これに対する生体反応として白血球数が増加したと考えられる。しかし、OK-431 の連続投与によって白血球数が増加、減少、増加をきたしたのは、投与量による影響も考えられたが、詳細は不明である。

発熱性については、一般に細菌による発熱性はその細菌の生死にかかわらずみられ、細胞壁とくに lipopolysaccharide が原因と考えられている。OK-431 においては、Su 菌をペニシリンで処理してはいるが、同菌には依然として細胞壁が保持されている。従って OK-431 投与による発熱は一般細菌による感染によるのと同様と考えられる。しかし、菌感染による発熱は連日継続して発熱するのに対し、OK-431 による発熱は投与ごとに 10 時間前後位発熱状態にあることは OK-431 が生菌として感染して発熱させることは考え難い。また、OK-431 の連続投与による発熱は、投与ごとの体温上昇度は次第に減少し、発熱時間も短縮傾向にあり、この点で OK-431 による発熱には耐性が生じると考えられた。

結 論

OK-431 をウサギ耳静脈内に投与してウサギ血液像（赤血球数、白血球数及び血色素量）及び体温に対する影響について実験し、次の如き結果をえた。

1. OK-431 15KE を 1 回投与すると 6 時間後に赤血球数、白血球数及び血色素量に若干減少したが、12 時間で投与前の状態に復した。

2. OK-431 を連日 10 日間投与すると、

1) 赤血球数は 1 日 5KE 投与では変化はなかったが、1 日 10KE 以上では投与 4 日目より減少したが、投与終了後 14 日目で投与前の状態に復した。

2) 白血球数には増加、減少ついで増加の傾向がみられ、投与計画終了後でも増加の状態が継続した。

3) 血色素量は投与後より減少したが、投与計画終了後より増加し、7 日目で投与前の状態に復した。

3. 体温に対しては、OK-431 を静脈内投与することに発熱したが、投与回数を重ねるにつれて発熱度は減少し、発熱時間を短縮した。

稿を終るにあたり御指導と御校閲を賜りました恩師正印達教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Okamoto, H. : Über die hochgradigsteigerung des Hämolyisinbildungsvermögen des *Streptococcus haemolyticus* durch Nukleinsäure. I. Mitt. Japan. J. Med. Sci., IV. Pharmacology, 12, 167 - 208 (1940).
- 2) Koshimura, S., Murasawa, K., Nakagawa, E., Ueda, M., Bando, Y. & Hirata, R. : Experimental anticancer studies. Part III. On the influence of living hemolytic streptococci upon the invasion power of Ehrlich ascites carcinoma in mice. Japan. J. Exp. Med., 25, 93 - 102 (1955).
- 3) Shoin, S. : Experimental anticancer studies. Part 10. On the effect of avirulent-mutant strain of streptococcus hemolyticus upon invasion power of Ehrlich ascites carcinoma cells. Japan. J. Exp. Med., 29, 529 - 533 (1959).
- 4) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R. : Studies on the anticancer and streptolysin S-forming activities of hemolytic streptococci. Japan. J. Microbiol., 11, 323 - 336 (1967).
- 5) Okamoto, H. : Antitumor activity of streptolysin S-forming streptococci, p237 - 257. In A. W. Bernheimer (ed.), Mechanisms in Bacterial Toxicology, 1st ed. John Wiley & Sons, Inc., New York & London, 1976.
- 6) Okamoto, H., Shoin, S. & Koshimura, S. : Streptolysin S-forming and antitumour activities of group A streptococci, p259 - 289.

In J. Jeljaszewicz & T. Wadstrom (ed.), *Bacterial Toxins and Cell Membranes*, 1st ed. Academic Press, London, New York & San Francisco, 1978.

7) **Ginsburg, I.** : Streptolysin S, p99-171. In T. C. Montie, S. Kadis. & S. J. Ajl (ed.), *Microbiol Toxins Vol. III Bacterial Protein Toxins*, Academic Press, New York & London, 1970.

8) **Schwab, J. H.** : An intracellular hemolysin of group A streptococci I. Influence of sonic energy and pH on hemolytic potency. *J. Bact.*, 71, 94-99 (1956).

9) **金井 泉・金井 正光** : 臨床検査法提要, 改訂第28版, VI 5-9頁, 東京, 金原出版, 1978.

10) **金井 泉・金井 正光** : 臨床検査法提要, 改訂第28版, VI 10-11頁, 東京, 金原出版, 1978.

11) **金井 泉・金井 正光** : 臨床検査法提要, 改訂第28版, VI 12-13頁, 東京, 金原出版, 1978.

12) **林 直樹** : 制がんに関する実験的研究, 第39報, 制がん性溶連菌製剤 OK-431 の生体内分布に関する研究. 十全医会誌, 87, 655-663 (1978).

13) **Weld, J. T.** : The toxic properties of serum extracts of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, 59, 83 (1934).

