OK-432による抗腫瘍効果発現の遺伝的支配

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 徐, 尚隣 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8924

金沢大学十全医学会雑誌　第90巻　第4号　568－577　(1981)

OK-432 による抗腫瘍効果発現の遺伝的支配

金沢大学がん研究所外科部（主任：磨伊正義教授）
徐　尚　隣

(昭和56年6月4日受付)

Key words　OK-432, 抗腫瘍効果，遺伝支配，マクロファージ

本論文の要旨は日本癌学会第39回（昭和55年）総会において報告された．

近年，微生物に由来する宿主免疫機能賦活物質が癌治療に用いられてきた．とくに諸種の化学療法剤との併用による化学・免疫療法においてすぐれた治療効果がもたらされることが国内，国外を通じて経験されている．溶連菌製剤OK－432の抗腫瘍性ならびに作用特性に関しては，動物実験及び臨床応用面において多数の報告がみられており，その有用性が評価されている[1)-3)]．本製剤の特色は，直接癌細胞を傷害する活性[1),4)]とともに，宿主機能を賦活し，間接的に抗腫瘍効果をもたらす点にあるとされている[1)-4)]．後者に関しては，OK－432によるマクロファージの活性化[5)]，細胞傷害性T細胞の誘導[6)]，補体の活性化[7)8)]，あるいはインターフェロンの増量[9)]など多数の知見がもたらされており，癌の免疫療法に重要な位置を占めるものとみられている．谷内等[10)]は，OK－432を使用する化学・免疫療法で癌患者に病状の改善をみた場合，細胞性免疫能も改善される傾向にあることを報告している．大山等[11)]はOK－432の有効成分である溶連菌（Su菌）体から多糖体及びM－タンパク質に対する皮内反応陽性及び血中凝集抗体価の高い癌患者ではOK－432による治療効果の改善がより期待されることを示した．

一方，癌に対する免疫反応は，宿主となる動物の種及び系と癌の種類との相互条件によって著しく左右される．ヒト癌において観察される自然退縮例のうち，少くともあるものは免疫学的機序によって起こったものとみなされる．換言すれば，非特異的免疫賦活剤による癌治療において，奏効，無効がきわめて対照的に観察される現象の背景として，この種の制癌剤による抗腫瘍効果の発現には，一部には1）宿主側因子の関与，2）腫瘍細胞のもつ抗原性が想定される．宿主に関する因子のうち，細菌製剤に対する反応性の遺伝的差異の検討は，宿主および腫瘍細胞の主要組織適合抗原（Major Histocompatibility Complex, MHC）制約が実験的解析を困難にしてきた．

動物腫瘍，とくに移植腫瘍においては，MHCを欠くか，その発現がきわめて微弱である例が認められており，この場合，宿主の免疫反応からの逃避が考えられている．また，ヒト癌及びこれに由来する培養系細胞にMHCを欠く例がしばしばみられている．

本研究は，宿主および腫瘍細胞のもつMHCの制約を除外するためにMHC欠損腫瘍を用い，1）宿主のOK－432に対する反応性の遺伝的解析を行い，2）この場合に有効な宿主細胞の同定と，3）有効性を示す宿主細胞群と免疫賦活剤との相互作用を，宿主の遺伝的背景において解析する研究の一環として行なわれたものである．

材料及び方法

1．動物

静岡実験動物（浜松）から購入した6～8週令の雌C3H/HeN (H－2^k), C57BL/6 (H－2^b), DBA/2 (H－2^d) 及び B6D2F_1 (H－2^{bd}) マウスを実験に供した．また，戻し交配による (B6D2F_1 x C57BL/6) 及び (B6D2F_1 x DBA/2) マウスは，自家繁殖によった．

2．腫瘍

C3H/HeNマウスに原発，継代移植のMM2マウス乳癌，およびマウス肝癌MH134, C57BL/6に原発，継代移植の白血病EL4をいずれも腹水型で使用した．各

Genetic Control on the Elicitation of Antitumor Effect of OK-432 in Mice. **Hsu Shang-Lin,** Department of Surgery, Cancer Research Institute, Kanazawa University.

腹水腫瘍は金沢大学がん研究所化学療法部より分与された．MM2 は，移植性に関し系特異性を喪失しているとされている．本研究ではこの点をさらに確認するために抗 H − $2K^k$ 血清，抗 H − $2D^k$ 血清（国立遺伝学研究所細胞遺伝部森脇和郎博士から恵与された）による中和試験，及び異系マウスへの移植実験を行い，MM2 の MHC(H − 2^k) 発現はきわめて微弱であることを確認した[12]．

3．抗癌剤ならびにアイソトープ標識物質

OK−432(Picibanil®)は中外製薬株式会社より供与をうけた．$Na_2{}^{51}CrO_4$(200 ～ 400m Ci/mg Cr)溶液は New England Nuclear Co. (U.S.A.) より購入した．

4．*In vivo* 抗腫瘍実験

実験群は 16 ～ 20 匹のマウスを用いた．トリパンブルー排除能のある MM2 細胞 5×10^5 個をマウスの腹腔内（iP）に移植し，OK − 432（3KE/ マウス）を移植後 3 日目及び 10 日目の 2 回，腹腔内投与した．対照群マウスには，生理食塩水 0.25 ml を腹腔内投与した．効果判定は，移植後 60 日目における生存マウス数と Median Survival Time (MST) によった．なお，60 日以前に死亡したマウスは剖検によって腫瘍死を確認した．

5．細胞傷害補助因子（CMS）の調製：

In vivo 実験終了 60 日目において MM2 腫瘍腹水及び結節腫瘍形成が認められなかったマウスに，同種腫瘍細胞 2 ～ 3×10^6 個を腹腔に再移植し，約 3 週後腫瘍の生着，増殖が拒絶されたマウスから採血，分離した血清を CMS とした．本血清は，56 ℃，30 分加熱処理後，− 70 ℃で保存した．

6．^{51}Cr − 標識腫瘍細胞浮遊液の調製

移植 6 日目の腹水腫瘍細胞を冷 RPMI − 1640（日水製薬 KK）液で 3 回遠心洗浄し，10% ウシ胎児血清を含む RPMI − 1640 溶液に細胞濃度 1×10^7 個 /ml に浮遊せしめた．この細胞浮遊液 1 ml に 0.1 ml の 100μCi $Na_2{}^{51}CrO_4$ 液を加え，37 ℃，45 分間インキュベート後，5 分間氷水中で放置した．次いで 10% ウシ胎児血清加 RPMI − 1640 溶液で 3 回遠心洗浄し，細胞濃度 2×10^5 個 /ml として実験に供した．

7．腫瘍細胞傷害試験

1）補体依存性傷害試験：段階希釈した CMS 0.1ml をカルチャープレート（Falcon#3042）のウエルに分注した後，0.1 ml の ^{51}Cr − 標識 MM2 細胞浮遊液（2×10^5 個 /ml）を加え，37 ℃，5% 炭酸ガス培養器に 30 分間インキュベートした．次いで，この混合液に 10 倍希釈モルモット新鮮血清 0.1 ml を添加し，上記条件下で 30 分間インキュベートした．培養終了後，500xG，5 分間遠心し，その上清液を測定に供した．各上清液の放射能活性は Auto-gamma Counter(Packard) によって測定し，細胞傷害活性度を求めた．細胞傷害度の定量的表現は，^{51}Cr の特異的放出度の百分率によった．

$$\text{Specific } ^{51}\text{Cr-release (\%)} = \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximum release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

maximum^{51}Cr release は ^{51}Cr − 標識 MM2 細胞に蒸溜水を加え，3 回凍結，融解したものについて，また spontaneous^{51}Cr release は ^{51}Cr − 標識 MM2 細胞浮遊液を単独で培養したものについてそれぞれ測定した．maximum^{51}Cr release は標識アイソトープ量の約 88%，spontaneous^{51}Cr release は 10 時間の培養後でも 20% 以下であった．

2）抗体依存性細胞傷害試験：正常 C3H/HeN 及び C57BL/6 マウスから摘出した脾臓を冷 RPMI − 1640 液を含むガラス皿中で，1 ml ツベルクリン注射筒および駒込ピペットによって破砕し，メッシュ濾過，500xG，10 分遠心後，RPMI − 1640 液に再浮遊せしめ，5×10^7 個 /ml の脾細胞単個浮遊液を作製した．この脾細胞浮遊液 5 ml をプラスチック・ペトリーデイシュ（60 × 15 mm，Lux Scientific Co., U.S.A.）に入れ，37 ℃，5% 炭酸ガス培養器中で 2 時間培養後，ピペット操作により非付着細胞をえた．非付着脾細胞を Tris-NH_4Cl 溶液処理によって混在赤血球を除去後，遠心，洗浄し，最終細胞濃度 2×10^7 個 /ml に調製した．上記非付着脾細胞浮遊液 0.1 ml に，1/10，1/50，または 1/100 に希釈した CMS0.1 ml 及び ^{51}Cr − 標識 MM2 細胞浮遊液（2×10^5 個 /ml）0.1 ml をカルチャープレート（Falcon#3042）中で混合し，37 ℃，5% 炭酸ガス培養器中で 10 時間，培養後，^{51}Cr の特異的放出度を算出した．

3）細胞性傷害試験：腫瘍退縮を認めたマウス及び異系腫瘍細胞（EL4）で免疫された C3H/HeN マウスの脾臓からの非付着脾細胞 2×10^6 個 /0.1 ml と ^{51}Cr − 標識腫瘍細胞（2×10^4 個 /0.1 ml）を混合し，標的細胞が MM2 の場合は 10 時間，EL4 及び MH134 の場合は 4 時間，それぞれ 37 ℃で反応せしめ，以後反応液は常法に従って処理し，特異的^{51}Cr 放出度を求めた．

4）OK − 432 誘導腹腔滲出細胞による CMS 存在下での細胞傷害試験：正常 C3H/HeN または DBA/2 マウスに OK − 432（3KE/ マウス）を腹腔内投与し，4 日後にヘパリン添加リン酸緩衝液 5 ml を腹腔に投与し，腹部を良くマッサージした後，腹腔滲出細胞を収

集した．腹腔滲出細胞を10%ウシ胎児血清加RPMI－1640溶液で3回遠心し，洗浄し，1×10^7個/mlの腹腔滲出細胞浮遊液を作製した．腹腔滲出細胞浮遊液0.1mlをカルチャープレート(Falcon#3042)のウエルに分注し，37℃，2時間，培養し，付着腹腔滲出細胞マクロファージをえた．次いで2×10^5個/ml ^{51}Cr－標識MM2細胞浮遊液0.1ml及び50倍希釈CMS 0.1mlを添加し，37℃で10時間反応せしめ，以下常法によって特異的^{51}Cr放出度を求めた．

成　　績

1．OK－432による抗腫瘍効果発現についてのマウス系統差および遺伝的差異の検討

1）C3H/HeN,C57BL/6及びDBA/2マウスについての検討

主要組織適合抗原の制約を超えて，H－2型の異なったマウス系統間に生着，増殖し，ついにはその宿主を腫瘍死させる乳癌MM2を諸マウス系の腹腔に移植し，OK－432の抗癌効果を比較検討した．

表1に示すように対照のMM2 5×10^5個単独では，DBA/2マウスのmedian survival time(MST)は最も短く15日であり，C3H/HeNおよびC57BL/6マウスでは約18日であった．しかし，生存日数の個体差について比較検討してみると，3系統間に有意差が認められなかった．他方，OK－432（3KE/マウス）をMM2移植後3日目及び10日目の2回，腹腔内投与した場合では，DBA/2マウスのMSTは34日で非治療群に比し若干の延命がみられたものの全例腫瘍死し，60日間の生存例はなかった．これに対し，OK－432の投与をうけたC3H/HeNおよびC57BL/6マウスでのMSTは非治療群の3倍以上であり，60日間生存例は50%以上であった．以上の結果から，OK－432による抗腫瘍効果の発現はマウス系によって差異が認められた．また，OK－432の投与により60日間以上生存したマウスにMM2を再移植（$2\sim3\times10^6$個）すると90%以上の個体に腫瘍の生着拒絶が認められたこと，及びOK－432による抗MM2腫瘍効果発現がマウス系統によって著しく異ること[12),13)]からみると，宿主マウスの免疫抵抗能の関与が示唆された．そこでOK－432によって誘導されたMM2に対する宿主抵抗能獲得について検討を加えた．

2）戻し交配実験による検討

上記に認められたOK－432に対する反応性にはマウスの系統差があり，これが遺伝的背景によるものかを明らかにするために，B6D2F$_1$マウスをC57BL/6またはDBA/2マウスに戻し交配して得られた仔について比較検討した．

表2に示すように（B6D2F$_1$×C57BL/6）マウスで

Table 1. Comparison of the antitumor effects of OK-432 in C3H/HeN, C57BL/6 and DBA/2 mice

mouse[a)]		OK-432	survival days		survival rate[c)]
strain	H-2 haplotype		MST[b)]	range	
C3H/HeN	H-2^k	+	54.5	17->60	15/20
		−	18.0	16-30	0/20
C57BL/6	H-2^b	+	60.0	18->60	12/19
		−	18.5	15-32	0/20
DBA/2	H-2^d	+	34.0	16-47	0/16
		−	15.0	14-29	0/20

a) OK-432 (3KE/mouse/day) was administered i.p. (+) on Day 3 and Day 10 to mice which had i.p. injected with 5×10^5 MM2 tumor cells on Day 0; (−) means without OK-432 (controls).
The Day 0 is the day when MM2-tumor cells were injected i.p. into mice, and Day 3 and 10 represent 3 and 10 days after the injected of MM2-tumor cells, respectively.
b) Median survival time.
c) Numbers of survivors among the mice examined on Day 60.

はOK－432の効果はB6D2F$_1$におけるそれよりも強く現れたのに対し，(B6D2F$_1$ × DBA/2) マウスでは，著しい減弱がみられた．これらのことからOK－432による抗MM2効果の発現は劣性遺伝支配とみなされた．そしてC57BL/6マウスは高反応性，DBA/2マウスでは低反応性であり，その遺伝的支配は死亡例と生存例の数の対比関係から比較的単純であろうとみなされた．

2. OK－432の抗MM2効果発現の背景

村山ら[13]はMM2退縮C3H/HeNマウス血清中にはマクロファージの腫瘍傷害に有効な補助因子（CMS）が認められることを報告した．また，宿主の抗腫瘍効果には特異的腫瘍細胞傷害性T細胞，特異的抗腫瘍抗体，マクロファージ等を介する細胞傷害が知られているので本実験における有効因子を検索した．

1）OK－432投与により腫瘍の退縮を認めたマウスの脾細胞によるMM2細胞傷害活性の検討

腫瘍の消失したC3H/HeNマウス脾臓からのプラスチック非付着脾細胞と^{51}Cr－標識したMM2細胞との10時間反応結果を表3に示した．それら脾細胞は

Table 2. Anti-MM2 effect of OK-432 in backcross progenies

mouse strain[a]	survival rate[b]	
	OK-432 treated	control
DBA/2	0/16	0/20
C57BL/6	11/18	0/18
B6D2F$_1$	0/19	0/23
[B6D2F$_1$ × DBA/2]	2/217	0/231
[B6D2F$_1$ × C57BL/6]	44/145	0/149

a) 5×10^5 MM2 cells were i.p. implanted on Day 0, and OK-432 (3 KE/mouse) i.p. injected on Day 3 and 10.
b) See footnote c) of table 1.

Table 3. Cytotoxic activity of nonadherent spleen cells from the tumor rejected mice[a]

Nonadherent spleen cell		CMS[b]	specific ^{51}Cr release (%)[c]
C3H/HeN	−	+	2.2
	+	−	−0.3
	+	+	1.1
C57BL/6[d]	−	+	3.9
	+	−	1.3
	+	+	4.0

a) Nonadherent spleen cells and CMS were prepared from 60-day survivors of the mice which had been injected with 5×10^5 MM2 tumor cells (Day 0) and treated with OK-432 (3KE/mouse, Day 3 and Day 10).
b) Dilution of CMS (C3H/HeN): 1/100.
c) Target cells: MM2 cells; Effector/Target (E/T): 100/1.
d) Rechallenged with 1×10^6 MM2 tumor cells on Day 60 and killed 7 days later.

MM2 細胞をほとんど傷害しなかった．この反応系に補助因子として CMS を添加した場合においても MM2 の傷害が検出できなかった．さらに，60 日間以上生存した C57BL/6 マウスに MM2 細胞 10^6 個腹腔内に再移植した後 7 日目の非付着性脾細胞にも MM2 細胞傷害性を検出できなかった．

対照実験として行った主要組織適合抗原 H − 2^b を保持している C57BL/6 マウス由来の EL4 腫瘍を H − 2^k 型の C3H/HeN に腹腔内移植した後，経時的にその脾細胞の EL4 傷害活性を検討した結果では，表 4 にみられるように EL4 移植後 15 日目にすでに EL4 傷害性がみられ，活性は 20 日目にいたっても保持された．標的細胞の対照として用いた H − 2^k をもつ MH134 細胞に対してはこれら脾細胞の細胞傷害活性は認められなかった．

以上のように，主要組織適合抗原の制約によって異

Table 4. Cytotoxic activity of nonadherent spleen cells from mice injected with allogeneic EL4 tumor[a)]

Spleen cells harvested on Day	specific ^{51}Cr release (%)[b)]	
	EL4	MH134
15	55.7	2.8
20	47.2	2.7
27	3.2	2.4

a) 2×10^6 EL4 tumor cells were given i.p. into C3H/HeN mice on Day 0.
b) E/T: 100/1.

Table 5. Cytotoxic activity of OK-432-induced peritoneal exudate cells (PEC) in the presence of CMS

PEC[a)]	CMS[b)]	specific ^{51}Cr release (%)[c)]
−	+	3.8
+	−	−3.3
+	+	21.9

a) Harvested from C3H/HeN mice 4 days after single ip-injection of OK-432 (3 KE/mouse).
b) See footnote a) of table 3. Dilution of CMS (C3H/HeN): 1/100.
c) Target cells: MM2 cells, E/T: 50/1.

った H − 2 型をもつマウスには移植できない EL4 に対し，C3H/HeN (H − 2^k) マウスは効果的な細胞傷害能をもつ免疫脾細胞を誘導できるのに反し，主要組織適合抗原の障害を超えて，異なった H − 2 型をもつマウス系に生着，増殖できる MM2 に対しては，C3H/HeN および C57BL/6 マウスのいずれもが有意な細胞傷害活性をもつ免疫脾細胞を誘導できなかった．したがって本実験での有効性をもつ細胞因子は T 細胞群ではないと推定される．

2）腹腔マクロファージについての検討

OK − 432 の投与により，宿主マクロファージの生物学的活性が上昇することが報告されている[5)]．そこで，OK − 432 投与をうけた C3H/HeN マウスのマクロファージの MM2 細胞傷害性の有無を検討した．

C3H/HeN マウスに 3KE の OK − 432 を腹腔内投与し，4 日目に腹腔マクロファージと MM2 細胞を 10 時間培養後細胞傷害活性を検討したが，有意な傷害活性をマクロファージに認めることができなかった．しかし，CMS を上記反応系に添加することにより，著明な MM2 細胞の傷害がもたらされた（表 5）．

そこで，マウス系統間でみられた，OK − 432 の抗癌効果相異のメカニズムの一端が，上記 OK − 432 で誘導される腹腔マクロファージの CMS 存在下での MM2 細胞傷害能の相異に基づくかを検討した．表 6 に示されるように，OK − 432 投与により誘導された DBA/2 マウス腹腔マクロファージの CMS 存在下での MM2 細胞傷害活性は，C3H/HeN マウス腹腔マクロファージを用いた実験結果より低値を示した．

3）CMS による MM2 細胞傷害活性の検討

CMS が既知の液性成分－抗体－であるかを予備的にしらべた．CMS の MM2 細胞傷害活性の補体依存性の有無を検討した結果を表 7 示した．3 ～ 15000 倍濃

Table 6. Difference in cytotoxic activity of OK-432-induced PEC between C3H/HeN and DBA/2 mice in the presence of CMS[a)]

PEC from	specific ^{51}Cr release (%)[b)]
DBA/2	13.2 ± 4.7
C3H/HeN	41.2 ± 1.4

a) OK-432 (3KE/mouse) was injected ip into mice 4 days prior to harvesting PEC. Dilution of CMS (C3H/HeN): 1/100.
b) Target cells: MM2 cells, E/T: 50/1. Values are presented as mean ± SE (n=3).

度CMSの補体（新鮮モルモット血清）依存性およびCMS単独でのMM2細胞傷害活性は検出できなかった．次にある種の特異抗体が有するとされている正常マウス脾細胞との共同細胞傷害活性がCMSに認められるかを検討した．表8に示すようにC3H/HeNマウスのCMSには正常C3H/HeNおよびC57BL/6マウス脾細胞との共存下でMM2細胞傷害は認められなかった．

考　　察

著者は本論文において，溶連菌製剤OK－432の抗癌効果が担癌宿主の遺伝的差異によって左右される事

Table 7. Complement-dependent cytotoxic activity of CMS[a)]

Dilution of CMS	complement[b)]	specific ^{51}Cr release (%)[c)]	
		CMS (C57BL/6)	CMS (C3H/HeN)
1/15000	−	−0.5	0.4
	+	0	2.4
1/1500	−	0.4	0.5
	+	0.1	1.9
1/150	−	0.3	−0.7
	+	0.3	1.8
1/30	−	0.8	0.3
	+	0.8	4.0
1/3	−	0.4	0.1
	+	0.5	9.1

a) See footnote a) of Table 3.
b) Dilution of complement (guinea pig): 1/10.
c) Target cells: MM2 cells.

Table 8. Antibody-dependent cellular cytotoxic activity of CMS[a)]

Nonadherent spleen cells from[b)]	dilution of CMS (C3H/HeN)	specific ^{51}Cr release (%)[c)]
C3H/HeN	1/30	−1.7
	1/150	−3.8
	1/300	−0.1
C57BL/6	1/30	−3.5
	1/150	−4.8
	1/300	−5.6

a) See footnote a) of table 3.
b) Nonadherent spleen cells from normal mice.
c) Target cells: MM2; E/T: 100/1.

を，3種の近交系マウスと交配実験によって証明した．OK－432を投与しない非治療群では，C3H/HeN,C57BL/6,DBA/2のマウス間で生存日数に有意な差異がみられなかったが，OK－432投与群ではMM2腫瘍退縮がC3H/HeNおよびC57BL/6マウスではきわめて著明であり，またDBA/2マウスでもOK－432投与群で若干生存日数の延長がみとめられた．

このような細菌製剤の生物学的効果発現がマウスの遺伝的背景と密接な関係にあることはLPS,BCG等で明らかにされている[14),15)]．Boraschi等[14)]によれば，BCG投与により誘導される腹腔マクロファージの癌細胞傷害活性はC3H/HeN,C57BL/6，およびDBA/2マウス系統間で有意差をみることができないが，LPSにほとんど反応しないC3H/HeJマウスでは上記傷害活性が低いことから，癌細胞傷害活性をもつマクロファージのBCGでの誘導がLPS遺伝子[16)]そのもの，あるいはそれに密接に関連した遺伝子群に支配されていることを示した．さらに彼等は[16)]細胞傷害活性をもつマクロファージのBCGによる誘導がマウスの性別に関係せず，C3H/HeN（LPS高反応性）マウスとC3H/HeJ（LPS低反応性）マウスからの雑種一代の上記活性は両親の中間となり，それを支配する遺伝子は常染色体上に座位していることが示された．

以上の報告のうちC3H/HeJ以外のマウスの遺伝的解析は，マウスのH－2型に対応した腫瘍細胞を用いて行なわれており，個々の腫瘍がもっている傷害活性に対する感受性の差異ということもあって，抗腫瘍活性獲得に関する遺伝的反応性の差を正しく反映していることにはならない．本研究で使用したMM2マウス乳癌はMHC欠損しているために効果的細胞傷害活性をもつT細胞の誘導を認めることは出来ないが，すべてのマウス系に生着し，宿主を腫瘍死させることから，MM2を使用することによって上記の問題点を克服しえた．

すなわち，OK－432に対するマウスの反応性に雌雄の差はみられなかったし，OK－432の抗癌効果は劣性遺伝することが示唆された．しかもBCG,LPSに対し低反応性であるC3H/HeJマウスでは，OK－432に対しC3H/HeNマウス同様高反応性であり，両マウス系の間に有意差はみられなかった[17)]．これらのことは，OK－432またはBCGを併用する化学免疫療法効果における差異[18)]および特異的免疫能増強効果の相異[19)]が，宿主マウスの両細菌製剤に対する遺伝的に決定づけられた反応性の相異に基因していることを思わせる．このような両細菌製剤の生物活性の相異が，両者によって誘導される腹腔細胞（主にマクロファージ）の癌細胞傷害作用の相異においても明らかであると思われる．BCGで誘導した腹腔細胞は単独で（limulus反応陰性血清下）[20)]癌細胞を傷害するのに対し，本実験系においてはOK－432により誘導された腹腔細胞は，それ自体，MM2細胞の傷害がみられなかったが，CMS存在下で傷害活性が示された．OK－432で誘導した腹腔細胞の癌細胞傷害活性の発現にCMSが必要であることは，Hibbs等[21)]が報告したようにわずかに活性化されたマクロファージの癌細胞傷害活性が仔牛胎児血清中に混在する内毒素により増強される現象と異なると思われる．なぜならば，OK－432単独投与マウスからの血清は本実験の系で有効でなかった．この事はまたCMS中の活性因子はTorikai等[22)]が示したOK－432単独で誘導される因子とは異なることを示している．

またIshii等[5)]はOK－432で誘導したラット腹腔細胞は単独で癌細胞の増殖を *in vivo* および *in vitro* で抑制することを報告しているが，OK－432で誘導されたマクロファージ活性にみられる相異は実験システムの相異に基づくものかどうかは不明である．本研究で使用したMM2マウス乳癌（C3H/HeNマウス由来）は主要組織適合抗原の制約を超えて各系統マウスに生着，増殖し，またその細胞表面に$H-2^k$抗原を検出できない[12)]ことからして，少くともH－2抗原欠損癌細胞とみなされる．殺細胞活性をもつTリンパ球の誘導及び活性発現に抗原細胞が主要組織適合抗原（マウスの場合，H－2抗原）をもつことが非常に重要であるが[23)]，マクロファージの癌細胞傷害活性発現にも主要組織抗原が何らかの形で関与しているものと考えられるが，興味ある問題であろう．

本研究において著者は，マウス系統間にみられるOK－432の抗癌効果の相異は，CMSの存在下で殺細胞効果を示す腹腔細胞の機能活性及び細胞集団がOK－432によって誘導される動態の相異に基づいている可能性を呈示したが，上記機能をになう腹腔細胞の同定，及びCMS中の有効因子の分離等，今後の研究展開が望まれる．

結　　論

本研究では主要組織適合抗原の制約を超えて生着，増殖するMM2マウス乳癌を使用し，諸系統マウスにおけるOK－432の抗癌効果発現にみられる差異とそれをもたらす遺伝的支配の解析が行なわれた．

1）C3H/HeN,C57BL/6及びDBA/2マウスに

MM2 細胞 5 × 10^5 個を腹腔内移植すると，マウスは 2～3 週間で全例腫瘍死した．これに対し，MM2 移植後 3 日目と 10 日目の 2 回，OK－432（3KE/マウス）の腹腔内投与を受けた C3H/HeN マウス及び C57BL/6 マウスでは，median survival time が非処置群の約 3 倍程度延長し，しかも 50% 以上のマウスが 60 日間生存した．しかし，DBA/2 マウスでは全例 60 日以内に腫瘍死した．

2）この OK－432 に対する反応性のマウス系統差は，遺伝的背景の差異に基づくものであることを，/B6D2F_1 を親系統に戻し交配してえられた仔（B6D2F_1 × DBA/2）マウスまたは（B6D2F_1 × C57BL/6）マウスを用いた結果から確かめられた．

3）OK－432 の投与により腫瘍の消失したマウスからの非付着脾細胞は，CMS 存在の有無にかかわらず，*in vitro* で MM2 傷害活性を示さず，また CMS の補体依存性傷害性活性及び抗体依存性細胞傷害活性もみられなかった．

4）一方，OK－432 の投与を受けた C3H/HeN マウス腹腔マクロファージが CMS 存在下で MM2 傷害活性を示したが，OK－432 投与を受けた DBA/2 からの腹腔マクロファージは，その傷害活性は著しく減弱していた．

以上の実験成績から，諸マウス系統間にみられる OK－432 の抗癌効果発現の相異は，少なくとも OK－432 によって誘導される腹腔細胞の機能活性及び細胞集団の相異に基づいていることが示唆された．

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜った磨伊正義教授ならびに御助言をいただいた研究室の各位に深く感謝いたします．また，御指導御助言を賜った化学療法部越村三郎教授，免疫生物部坂井俊之助助教授ならびに本研究遂行に多大の御協力をいただいた化学療法部猟山一雄博士，村山次哉氏に深く感謝いたします．

文　　献

1) **Okamoto, H., Shoin, S. & Koshimura, S.** : Streptolysin S-forming and antitumor activities of Group A streptococci, p259－289, In J. Jeljaszewicz & T. Wadstrom(eds.), Bacterial toxins and cell membrane. Academic Press, New York, 1978.

2) **大田和雄**：溶連菌製剤ピシバニール，癌と化学療法，**2**, 139 － 142 (1975).

3) **木村郁郎**：溶連菌剤 OK － 432 と癌の免疫化学療法の可能性，癌と化学療法，**2**, 21 － 33 (1975)

4) **Sakurai, Y., Tsukagoshi, S., Satoh, H., Akiba, T., Suzuki, S. & Takagaki, Y.** : Tumor-inhibitory effect of a streptococcus preparation (NSC－B116209). Cancer Chemother. Rep., **56**, 36－43 (1972).

5) **Ishii, Y., Yamaoka, H., Toh, K. & Kikuchi, K.** : Inhibition of tumor growth in vivo and in vitro by macrophages fiom rats treated with a streptococcal preparation, OK－432. Gann, **67**, 115－119 (1976).

6) **Ujiie, T., Natsume-Sakai, s. & Koshimura, s.** : OK－432－mediated augmentation of anti-L1210 immunity and its stimulation of CTL induction. (抄録) 第38回日本癌学会総会記事，p122 (1979).

7) **Natsuume-Sakai,S., Ryoyama, K., Koshimura, S. & Migita, S.** : Studies on the properties of a streptococcal preparation OK － 432 (NSC－B116209) as an immunopotentiator. 1. Activation of serum complement components and peritoneal exudate cells by group A streptococcus. Japan. J. Exp. Med., **46**, 123－133 (1976).

8) **Kondo, M, Ikezaki, M., Imanishi, H., Nishigaki, I., Hosokawa, K. & Masuda, M.** : Streptococcal preparation as an activator of host-mediated immune response: Cellular immunity and alternate pathway of complement. Gann, **66**, 675－678 (1975).

9) **Matsubara, S., Suzuki, F. & Ishida, N.** : Indution of immune interferon in mice treated with a bacterial immunopotentiator, OK－432. Cancer Immunol. Immunother., **6**, 41－45 (1979)

10) **谷内昭，今井浩三，阿部弘，細川幸夫，加藤康夫，和田武雄**：溶連菌製剤による免疫化学療法の癌患者の細胞性免疫能に及ぼす影響．癌と化学療法，**5**, 87 － 97 (1978).

11) **大山馨，金木美智子，日比輝彦，福田完治，高垣善男，二木力夫，佐藤忠夫，秋葉朝一郎**：溶連菌製剤 OK － 432 投与による臨床試験における免疫学的検討．癌の臨床，**21**, (4): 257－263 (1975).

12) **村山次哉，越村三郎，徐尚隣，坂井俊之助** :MHC 欠損実験腫瘍に対する OK － 432 の効果（抄録），第 38 回日本癌学会総会記事，p206 (1979).

13) **村山次哉，坂井俊之助，越村三郎** :OK － 432（OK）によるマクロファージ（Mφ）の活性化機序．2. Mφ の殺細胞効果について．（抄録），第 39 回日本癌学会総会記事，p137 (1980).

14) **Boraschi, D. & Meltzer, M. S.** : Macrophage

activation for tumor cytotoxicity : Genetic variation in macrophage tumoricidal capacity among mouse strains. Cell. Immunol., **45**, 188 – 194 (1979).

15) **Sultzer, B. M.** : Genetic control of leucocyte responses to endotoxin. Nature, **219**, 1253 – 1254 (1968).

16) **Ruco, L. P., Meltzer, M. S. & Resenstreich, D. L.** : Macrophage activation for tumor cytotoxicity : Control of macrophage tumoricidal capacity by the LPS gene. J. Immunol., **121**, 543 – 548 (1978).

17) 徐尚隣，坂井俊之助，村山次哉，越村三郎：OK – 432による抗腫瘍効果発現の遺伝的支配（抄録）第39回日本癌学会総会記事，p233 (1980).

18) **Koshimura, S. & Ryoyama, K.** : Enhancement of antileukemic effect in the combination of 5 – fluorouracil and OK – 432. Cancer Treat. Rep., **61**, 17 – 27 (1977).

19) **Ryoyama, K., Murayama, T. & Koshimura, S.** : Effect of OK – 432 on immunization with mitomycin-C-treated L1210 cells. Gann, **70**, 75 – 82 (1979).

20) **Ruco, L. P. & Meltzer, M. S.** : Defective tumoricidal capacity of macrophages from C3H/HeJ mice. J. Immunol., **120**, 329 – 334 (1978).

21) **Hibbs, J. B., Taintor, R. R., Chapman, H. a. Jr. & Weinberg, J. B.** : macrophage tumor killing influence of the local environment. Science, **197**, 279 – 282 (1977).

22) **Torikai, T., Itoh, O., Toyoshima, S. & Osawa, T.** : Purification and biological activities of a mouse serum protein increased by administration of streptooccal preparation, OK – 432. Gann, **69**, 657 – 665 (1978)

23) **Weissman, I. L.** : Tumor immunology, T cell maturation, and T cell neoplasia. Prog. Exp. Tumor Res., **25**, 193 – 218 (1980).

Genetic Control on the Elicitation of Antitumor Effect of OK-432 in Mice

Hsu Shang-Lin, Department of Surgery, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa, 920 –

J. Juzen Med. Soc., **90**, 568–577 (1981)

Key words: OK-432–Antitumor effects–Genetic response–Macrophages.

Abstract

The present study examined differences in elicitation of the antitumor effect of OK-432 in various mouse strains and genetic control resulting in the differences. Mouse mammary adenocarcinoma (MM2) was used as an indicator, because this tumor was found to be a deficient, major histocompatibility-antigen (H-2) which could be "taken" up by all strains of mice regardless of H-2 haplotypes. Median survival time (MST) of mice (controls) which received i.p.-implantation of 5×10^5 MM2-cells was 2 to 3 weeks, and no mice survived over 60 days. When C3H/HeN and C57BL/6 mice were treated with OK-432 (3 KE/mouse i.p.) 3 and 10 days after tumor implantation, their MSTs became almost 3 times longer than that of the controls, and 50% of the mice receiving OK-432 survived over 60 days. The antitumor effect of OK-432, however, was not effectively developed in DBA/2 mice, even though MST was moderately prolonged. In another series of experiments with backcross progenies, ($B6D2F_1\times C57BL/6$) mice rejected MM2-tumor more than did ($B6D2F_1\times DBA/2$) mice when OK-432 was administered.

The cytotoxicity against MM2-tumor cells by the nonadherent spleen cells from either C3H/HeN or C57BL/6 mice, which overcame MM2 challenge over 60 days by treatment with OK-432, was not demonstrated by a standard ^{51}Cr-release cytotoxic assay test. The serum (CMS) from such MM2-rejected mice also showed neither the complement-dependent cytotoxic activity nor the antibody-dependent cellular cytotoxic activity against MM2-tumor cells *in vitro*. On the other hand, the adherent peritoneal exudate cells (macrophages) from C3H/HeN mice injected with OK-432 showed the cytotoxic activity against MM2-tumor cells *in vitro* in the presence of CMS, but not in the absence of CMS. The cooperative cytotoxic activity with CMS of OK-432-induced macrophages from DBA/2 mice was lower than that from C3H/HeN mice.

The results obtained suggest that there exists a genetic control on the elicitation of antitumor effect of OK-432, and that the responsiveness to the drug may be due to differences in activities and/or population of the peritoneal exudate cells induced by OK-432.