

制がんに関する実験的研究-39-制がん性溶連菌製剤O K-431の生体分布に関する研究

| | |
|-------|---|
| 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: メールアドレス: 所属: |
| URL | http://hdl.handle.net/2297/8744 |

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 の生体分布に関する研究

金沢大学医学部薬理学教室 (主任 ; 正印 達教授)

林 直 樹

(昭和53年10月26日受付)

核酸効果¹⁾の研究にもとづいて着手された溶連菌の制がんに関する実験的研究は、越村ら²⁾によって Streptolysin S (SLS) 産生能を有する溶連菌に制がん能があることが実証されて以来、数多くの制がんに関する実験が核酸効果の研究と平行しながら行なわれ、悪性腫瘍患者に丹毒が併発すると腫瘍が縮小又は消失するという古い臨床家の観察³⁾を実験的に証明すると共に、多くの知見⁴⁾をもたらした。研究はやがて制がん性溶連菌の無毒化並びに制がん能増強化の方向に進み、溶連菌の Bernheimer's Basal Medium⁵⁾浮遊液にペニシリン G を加えて処置をほどこすことで制がん活性は増強し SLS 産生力と菌増殖力が減弱した溶連菌製剤 PC-B-45 (OK-431)⁶⁾が開発されるに至った。ついで OK-431 に凍結乾燥などの処置を施して SLS 産生力並びに菌増殖力を欠いた PC-B-45 (OK-432⁷⁾)が開発されるに及んで、OK-432 はやがて臨床において使用されるに至り、各方面から作用機序、投与方法、制がん効果並びに副作用などに関する多くの知見⁸⁾⁹⁾が発表されるに至った。しかし薬効に大きな影響を与えると考えられる投与量、投与方法或いは生体内分布と制がん効果との関係などについての基礎的実験は数少なく、生体内分布に関しては僅かに中野ら¹⁰⁾による放射能同位元素で標識化された溶連菌の OK-432 についての報告があるのみであり、OK-431 についての実験に至っては皆無といった現状である。これは OK-432 又は OK-431 についての適当な検出方法がなく、また標識化された溶連菌の OK-432 による実験では、生物学的半減期の問題以外にも、同菌には増殖力がなく、また生体内にあっては同菌に対する生体の諸反応、菌体の崩壊などを含めた生体内運命のために実験観察期間は短時間に限られてい

る。そこで本実験では、OK-432 についての知見をうるためにも、いろいろの面で OK-432 と似ている OK-431 が弱いながらも増殖力及び SLS 産生力を有し、特にリボ核酸存在下では著明に SLS を増産することを利用して、投与量及び投与経路による生体内分布を、OK-431 の原菌である溶連菌 Su 株と比較しながら、長時間にわたって観察し、また生体内分布と制がん効果との関係についても検討が行なわれた。

実験材料及びに実験方法

1. 溶連菌 : 教室保存の溶連菌 Su 株 (Type3, ATCC21060, 以下単に Su 菌と略記) を使用。Su 菌の培養には普通ブイヨン培地 (pH7.2~7.4) が用いられた。

2. 菌浮遊液の調製 : Su 菌浮遊液並びに OK-431 菌浮遊液は作製後水室に保存して1週間以内に使用された。

1) Su 菌浮遊液 : 普通ブイヨン 30 ml に Su 菌のブイヨン培養液 0.3 ml を接種して、37°C で 20 時間培養した後冷却して 3,500rpm で 20 分間遠心し、沈澱した生菌体を冷滅菌生理的食塩水 (以下単に生食水と略記) で 2 回洗浄した後、洗浄生菌体を 1.8 ml の生食水に浮遊させて Su 菌浮遊液を作製する。この Su 菌浮遊液は 1 ml 中に 50KE (1KE は乾燥菌体 0.1mg に相当) の菌体量を含んでおり、これを原液として実験には使用直前に生食水で稀釈したものが用いられた。

2) OK-431 菌浮遊液 : OK-431 は岡本ら⁶⁾の方法によって作製された。すなわち、普通ブイヨン 30 ml に Su 菌の 20 時間ブイヨン培養液 0.3 ml を接種し、37°C で 20 時間培養した後、培養液を冷却して

遠心し、沈澱した生菌体を生食水で2回洗浄した後、洗浄生菌体を1.5 mlのBernheimer's Basal Medium⁵⁾(以下BBMと略記)に浮遊させ、これにペニシリンGを生食水に200,000U/1.25 mlの濃度に溶解したペニシリンG溶液0.3 mlを加えて37°Cに20分間インキュベートしたのち更に45°C30分間インキュベートしてOK-431を作製する。このOK-431は1 ml中に50KEの菌量を含有しており、これを原液として実験には使用前に生食水で稀釈したものを使用した。

* BBM: 20% KH₂PO₄ (NaOHにてpH7.0に調整) 6 ml, 2% MgSO₄ · 7H₂O 12 ml, マルトース 576mg, 蒸溜水 66 ml

3. 1% RNA 加血液寒天平板培地: 普通ブイオンに酵母リボ核酸(メルク社製)を1%に加えたRNA加ブイオンに、粉末寒天を1.5%に加えて加熱溶解滅菌した後、これにウサギ脱線維血液を5%に加えて滅菌シャーレに分注して、1% RNA 加血液寒天平板培地を作製する。

4. 菌浮遊液の投与方法: Su菌及びOK-431の各種濃度菌浮遊液は、マウスに対し皮下注射及び腹腔内注射では0.5 mlが、尾静脈内注射では0.1 mlが投与された。

5. 実験動物: 体重19~21gのdd系マウス(雄)を使用した。

6. エールリッヒがん細胞浮遊液の調製: エールリッヒがん細胞移植10日目のマウス腹水を採取し、800rpmで5分間遠心して、沈澱したがん細胞を生食水にて2回洗浄した後、滅菌M/15 磷酸緩衝生食水(pH7.2)に浮遊し、 3.4×10^7 cells/mlのがん細胞浮遊液を作製する。

7. 担がん動物: エールリッヒがん細胞浮遊液0.1 mlをマウスソケイ部皮下に移植して固型腫瘍を

つくらせ、移植後10~14日目のマウスを実験に用いた。

8. 菌毒力(Virulence)試験: Su菌並びにOK-431菌の50KE/ml濃度の菌浮遊液2 mlを3,500rpmで20分間遠心し、沈澱した各生菌体を生食水にて2回洗浄した後、生食水2.5 mlに浮遊させて40KE/ml濃度の浮遊液を作製し、これを原液として生食水にて各種濃度の菌稀釈液をつくる。実験動物群としては一群3匹としたものを非担がんマウスで36群、担がんマウスで36群つくり、これを更に背部皮下投与群、腹腔内投与群及び尾静脈投与群にわけ、これにSu菌並びにOK-431菌の各種稀釈菌液をそれぞれ注射して各群のマウスの生死を判定する。

9. 試験動物生体内溶連菌の分離試験

1) 分離方法: OK-431菌並びにSu菌の各種稀釈菌浮遊液を担がんマウス及び非担がんマウスの腹腔内、背部皮下及び尾静脈内にそれぞれ注射した後、一定時間ごとにマウスを頸骨脱臼によって屠殺し、直ちに以下の操作を無菌的に行う。まず開腹を行なって腹腔内に普通ブイオン1.0 mlを注入して腹腔内を洗った後、この洗浄ブイオン液0.3 mlを普通ブイオン3 mlに接種する。ついで脾臓、肝臓、腎臓、及び皮下固型腫瘍を摘出し、それぞれを生食水にて洗浄した後、乳鉢中で普通ブイオン2 mlを加えて臓器をホモジネートし、そのホモジネート液0.3 mlを普通ブイオン3 mlに接種する。ついで胸部を開いて肺臓を摘出して前記と同じように処置した後、露出している心臓を半切開して心臓内血液を白金耳によって普通ブイオン3 mlに接種する。このようにして各臓器及び部位から接種された普通ブイオンを37°Cで24時間培養した後、その培養液を血液寒天平板培地並びにRNA加血液寒天平板培地に接種し、37°C24時間培養する。尚対照実験として滅菌生

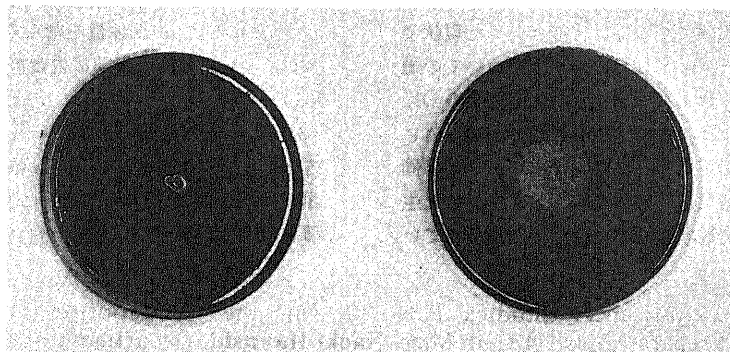


写真1 Blood Agar 1% RNA Blood Agar

食水を非担がんマウス並びに担がんマウスにそれぞれの投与経路で注射したのについて同様の処置を行なった。

2) Su 菌の判定：血液寒天平板培地並びに RNA 加血液寒天平板培地で培養したものについて、コロニーの有無並びに溶血環の有無、大小を判定する。OK - 431 は Su 菌を処置したものであり、Su 菌は写真 1 に示されている如く Streptolysin S (SLS) 産生能を有し、また RNA 存在下では著明に SLS を増産することから、血液寒天平板培地及び RNA 加血液寒天平板培地でコロニーの周囲に溶血環がみとめられ、RNA 加血液寒天平板培地での溶血環が血液寒天平板培地のに比して著しく大きい場合には Su 菌と判定した。

10. 制がん実験：制がん実験はいわゆる、*in vivo* 法によって行なわれ、実験動物の延命効果を指標として、まず OK - 431 の有効量についての実験、ついで投与計画についての実験が行なわれた。

1) OK - 431 の有効量に関する実験：30 匹のマウスの腹腔内にエールリッヒがん細胞浮遊液 (1.5×10^7 cells/ml) を 0.2 ml 宛接種した後、一群 5 匹として、一匹あたり 100KE/kg 投与の群、50KE/kg 投与群、25KE/kg 投与群、10KE/kg 投与群、5KE/kg 投与群及び対照として生食水投与群の 6 群に分け、がん細胞移植後 24 時間目から OK - 431 菌液並びに生食水を 1 日 1 回連続 5 日間腹腔内に注射する。

2) OK - 431 投与計画に関する実験：50 匹のマ

ウスの腹腔内にエールリッヒがん細胞浮遊液を接種した後、マウスを 1 群 10 匹として OK - 431 の 50KE/kg を 24 時間ごとに 1 回投与群、48 時間ごとに 1 回、72 時間ごとに 1 回、96 時間ごとに 1 回並びに生食水 0.5 ml を 24 時間ごとに 1 回投与群の計 5 群に分けて、がん細胞をマウスに移植後 24 時間から OK - 431 並びに生食水をそれぞれの計画に従って腹腔内に総計 5 回注射する。

実験成績

担がんマウス並びに非担がんマウスに対していろいろの投与経路によって行なわれた OK - 431 菌と Su 菌との菌毒力 (Virulence) の比較実験の成績は、表 1 に示されている如く、投与経路によってあるいはマウスが担がん状態であるか非担がん状態であるかによって菌毒力は異っている。一般に Su 菌は OK - 431 よりも菌毒力は強く、また同一菌でも菌毒力は非担がんマウスよりも担がんマウスに対して強くあらわれ、いろいろの投与経路では菌毒力は静脈内投与で最も強かった。すなわち、OK - 431 菌の最少致死量は、担がんマウス及び非担がんマウスに対して皮下投与及び腹腔内投与では 1,000KE/kg 以上であり、静脈内投与では担がんマウスに対しては 250KE/kg、非担がんマウスに対しては 1,000KE/kg であったのに対し、Su 菌では、非担がんマウスに対して最少致死量は皮下投与で 1,000KE/kg 以上、腹腔内投与で 500KE/kg、静脈内投与で 150KE/kg であり、担がんマウスに対しては皮下投与で 1,000KE/kg、腹腔内投与で 150KE/kg、静

Table 1. Comparative Virulence Test with OK-431 and Hemolytic Streptococci Su strain

| Animal | Mice | | | | | | Ehrlich carcinoma solid tumor bearing mice | | | | | |
|-------------------------|--------|-----|-----|---------|-----|-----|--|-----|-----|---------|-----|-----|
| | OK-431 | | | S-cocci | | | OK-431 | | | S-cocci | | |
| Route of administration | SC* | IP* | IV* | SC | IP | IV | SC | IP | IV | SC | IP | IV |
| Dose (KE/kg) | | | | | | | | | | | | |
| 25 | 3/3** | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| 50 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| 150 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 1/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 2/3 | 0/3 |
| 250 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 1/3 | 3/3 | 0/3 | 0/3 |
| 500 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 0/3 | 3/3 | 0/3 | 0/3 |
| 1,000 | 3/3 | 3/3 | 2/3 | 3/3 | 0/3 | 0/3 | 3/3 | 3/3 | 0/3 | 1/3 | 0/3 | 0/3 |

* SC: Subcutaneous injection, IP: Intraperitoneal injection, IV: Intravenous injection.

** Survivors/test animals.

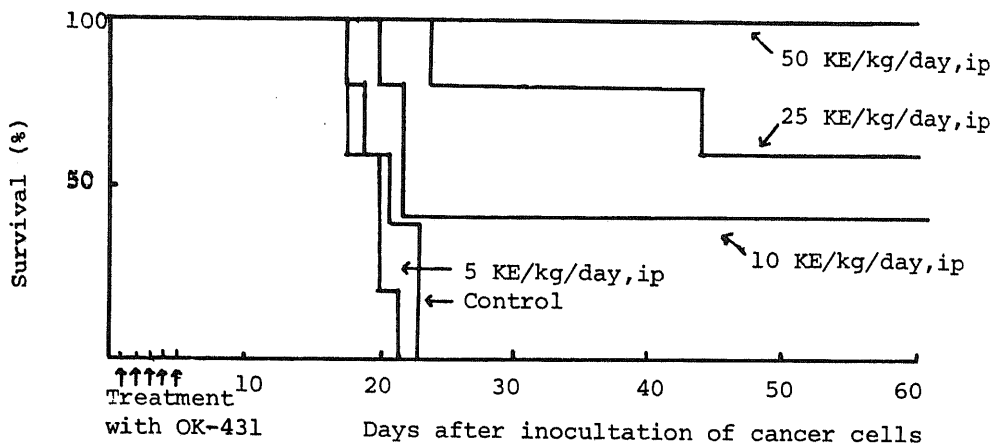
Fig.1 *In vivo* Anticancer Experiment with OK - 431

Table 2. Distribution of OK-431 in Mice

| Route of administration | SC | | | | | | IP | | | | | | IV | | | | | |
|---------------------------|-----|----|-----|-----|----|-----|----|----|-----|-----|----|-----|----|----|-----|-----|----|-----|
| | 250 | | | 500 | | | 50 | | | 150 | | | 50 | | | 150 | | |
| Dose (KE/kg) | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 |
| Time after injection (Hr) | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 |
| Organs Lung | -* | + | + | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - |
| Liver | - | + | + | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - |
| Spleen | - | + | + | - | + | + | - | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - |
| Kidney | - | + | + | - | + | + | - | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | - |
| Blood in heart | - | - | + | - | + | + | - | - | - | + | - | - | + | - | - | + | + | - |
| Abdomen cavity | - | - | + | - | + | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |

* Presence (+) or absence (-) of streptolysin S forming streptococci in organ

脈内投与では50KE/kgであり、OK-431菌の菌毒力はSu菌の菌毒力に比してかなり弱いことが示されていた。

OK-431の制がんのための有効量についての*in vivo*法による制がん実験の成績は、図1に示されている如く、OK-431の50KE/kg腹腔内投与群にあっては一群5匹のマウス全部ががん接種後60日を経ても腫瘍死をまぬがれて健全に生存し、25KE/kg投与群では60%が、10KE/kg投与群では40%が生存したが、5KE/kg投与群では生食水が投与された対照群と同じくがん細胞移植後25日以内に全てのマウスが腫瘍死した。

以上の実験から生体内分布実験における菌投与量をOK-431では50KE/kg以上、Su菌では25KE/kg以上として生体内分布に関する実験が行なわれた。そ

の結果非担がんマウスにおけるOK-431並びにSu菌による生体内分布の成績は、表2及び表3に示されている如く、投与菌並びに投与経路によって可成り異なること、ならびにOK-431によってSu菌と同じ生体内分布状態をうるにはSu菌より大量の菌量が必要であることが明らかにされた。すなわちSu菌を25KE/kg腹腔内に投与すると、投与後24時間目から120時間にわたって心内血液、肺、肝、脾及び腎にSLS産生菌が検出されるのに対し、OK-431では50KE/kg腹腔内投与されても120時間まではSLS産生菌は全く検出されず、150KE/kg投与で24時間目に各臓器・部位にSLS産生菌がみとめられるが、72時間目では脾及び腎にのみ検出され、120時間目ではどの部位からも検出されなくなっている。また皮下投与によっても、Su菌では150KE/kgで24時間目、

Table 3. Distribution of Hemolytic Streptococci Su strain in Mice

| Route of administration | SC | | | | | | IP | | | | | | IV | | | | | |
|---------------------------|-----|----|-----|-----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|
| | 150 | | | 250 | | | 25 | | | 50 | | | 25 | | | 50 | | |
| Dose (KE/kg) | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 |
| Time after injection (Hr) | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 |
| Organs Lung | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Liver | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Spleen | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Kidney | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Blood in heart | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Abdomen cavity | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - |

Table 4. Distribution of OK-431 in Ehrlich Carcinoma Solid Tumor Bearing Mice

| Route of administration | SC | | | | | | IP | | | | | | IV | | | | | |
|---------------------------|-----|----|-----|-----|----|-----|----|----|-----|-----|----|-----|----|----|-----|-----|----|-----|
| | 250 | | | 500 | | | 50 | | | 150 | | | 50 | | | 150 | | |
| Dose (KE/kg) | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 |
| Time after injection (Hr) | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 |
| Organs Lung | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Liver | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Spleen | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + | - | - | + | + | + |
| Kidney | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + |
| Tumor | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | - | + | - | - | + | + | + |
| Blood in heart | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Abdomen cavity | - | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + |

Table 5. Distribution of Hemolytic Streptococci Su strain in Ehrlich Carcinoma Solid Tumor Bearing Mice

| Route of administration | SC | | | | | | IP | | | | | | IV | | | | | |
|---------------------------|-----|----|-----|-----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|
| | 150 | | | 250 | | | 25 | | | 50 | | | 25 | | | 50 | | |
| Dose (KE/kg) | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 |
| Time after injection (Hr) | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 | 24 | 72 | 120 |
| Organs Lung | - | - | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Liver | - | - | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Spleen | - | - | - | - | + | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Kidney | - | - | - | - | - | + | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Tumor | - | - | - | - | - | - | + | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Blood in heart | - | - | + | - | - | + | + | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Abdomen cavity | - | - | - | - | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

72時間目で腹腔内, 心内血液, 肺, 肝, 脾及び腎で SLS 産生菌が検出され, 120時間目では腹腔内のみを検出されているが, OK - 431では 250KE/kg 皮下投与で Su 菌と異なって 24時間目ではどの臓器部位からも SLS 産生菌は検出されず, 72時間目で肺, 肝, 脾及び腎に検出され, 120時間目で各臓器部位から検出されている. 静脈内投与では他の投与経路とは異なって OK - 431でも Su 菌でも腹腔内からは SLS 産生菌は検出されなかった.

担がんマウスにおける OK - 431 及び Su 菌投与による SLS 産生菌の生体内分布の実験成績は, 表 4 及び表 5 に示されている如く, OK - 431 と Su 菌とでのちがいとはみとめられるが非担がんマウスにおけるほどではなく, また担がんマウスでは非担がんマウスと異なった分布像がみられた. すなわち, OK - 431 及び Su 菌による担がんマウスにおける SLS 産生菌の生体内分布は非担がんマウスにおけるほど投与菌量によるちがいはなく, 殊に静脈内投与においては OK - 431 と Su 菌は投与量 50KE/kg で同様な分布状態を示し, また腹腔内投与によっても OK - 431 150KE/kg と Su 菌 50KE/kg は似た分布状態を示している. しかし分布像は, 担がんマウスと非担がんマウスでは, 表 2, 表 3, 表 4 及び表 5 からみられるように, かなり異なっており, 皮下投与群では Su 菌 150KE/kg 投与非担がんマウスでの SLS 産生菌は 24時間目で各臓器部位から検出され 120時間で検出されなくなるのに, 担がんマウスでは 24時間, 72時間目では SLS 産生菌はどの臓器からも検出されておらず, 120時間目で肺, 肝及び心内血液に検出されており, 250KE/kg 投与でも 24時間ではどの部位からも検出されないが, 120時間目には各臓器部位から検出されている. OK - 431 においても Su 菌と同様な傾向がみられ, 非担がんマウスでは 250KE/kg 皮下投与で 72時間, 120時間で各臓器部位に SLS 産生菌が分布さ

れているのに担がんマウスでは 500KE/kg 皮下投与でも 24時間, 72時間及び 120時間いずれにおいてもどの臓器, 部位からも検出されていない. これに対し, 腹腔内投与群では, OK - 431 50KE/kg で非担がんマウスのどの部位からも SLS 産生菌はみとめられず, 150KE/kg で 24時間目に各部位に SLS 産生菌が検出され, 72時間以降では検出されていないのに, 担がんマウスでは 50KE/kg でも殆どどの臓器に SLS 産生菌が検出され, 又 150KE/kg では SLS 産生菌は 120時間まで持続的に検出されている. 一方, Su 菌の腹腔内投与では非担がんマウスでよりも担がんマウスでの菌消失は早く, 25KE/kg 投与では 120時間目では殆どどの臓器から SLS 産生菌は検出されなくなっている. また OK - 431 の静脈内投与群においても担がんマウスでは, SLS 産生菌は持続的に分布され, ことに非担がんマウスでは分布されなかった腹腔内にも SLS 産生菌が検出されている. Su 菌の静脈内投与においても SLS 産生菌が持続的にまた腹腔内にも検出されている.

OK - 431 の有効量に関する制がん実験成績並びに担がんマウスにおける OK - 431 の生体内分布実験から, 担がんマウスに対する OK - 431 投与量を 50KE/kg として行なわれた投与計画に関する制がん実験の成績は, 表 6 に示されている. すなわちエールリッヒがん細胞をマウス腹腔内に移植後 24時間目から OK - 431 50KE/kg を 24時間ごとに腹腔内投与した実験群ではマウスは全て腫瘍死からまぬがれてがん細胞移植後 60日目でも健康に生存し, 48時間或いは 72時間ごとに OK - 431 を 1回投与した実験では 70% が生存し, 96時間ごとに 1回投与された群では, 生食水を投与された対照群と同じく全て腫瘍死した.

考 察

肺, 肝, 脾, 腎などの諸臓器並びに心内血液及び腹

Table 6. Experiment on the Schedule of Treatment with OK-431 in *in vivo* Anticancer Assay Method.

| Animal group | Treatment with OK-431 | Survivors/test animals on 60th day after implantation of Ehrlich carcinoma cells |
|----------------|--|--|
| 1 | 50 KE/day, ip×5 | 10/10 |
| 2 | 50 KE/2 days, ip×5 | 7/10 |
| 3 | 50 KE/3 days, ip×5 | 7/10 |
| 4 | 50 KE/4 days, ip×5 | 0/10 |
| 5 (Control) | Physiological saline 0.5 ml/day, ip×5 | 0/10 |

腔内の各部位に、OK-431でSu菌と同様にSLS産生菌を広く持続的に分布させるためには、Su菌の少なくとも3倍以上のOK-431投与量が必要であることが実験的に明らかにされたが、これは菌毒力(Virulence)比較実験において示された如く、OK-431とSu菌を同一投与経路によってマウスに投与して菌毒力を比較すると、OK-431の菌毒力は担がんマウスに対してはSu菌の1/5以下、非担がんマウスに対しては約1/7以下であったことから、OK-431とSu菌の菌毒力の差によるものと考えられる。OK-431或いはSu菌によるSLS産生菌の生体内分布像は、投与菌量、投与経路並びに試験動物の状態(がんの有無)によって若干異なっているが、一般にOK-431及びSu菌は肝、脾及び肺によく分布している。本論文ではこれを定量的に測定することはできなかったが、中野ら¹⁰⁾による放射性同位元素で標識されたOK-432を用いての分布実験では、投与後24時間で肝に43%、脾に4.16%、肺に0.60%ついで腎の順となっており、本実験でのOK-431の分布成績とよく一致している。また投与経路及び投与量によっては各臓器並びに各部位に広く分布することがみとめられたが、これは桜井ら⁷⁾の担がん動物に異処的にOK-431或いはOK-432を投与しても制がん効果がみられるということを表づけるものであり、また投与方法を検討することでいろいろの臓器或いは部位の悪性腫瘍にOK-432の制がん効果が期待できることを示唆しているものといえよう。しかし桜井ら⁷⁾の腹水肝がんAH13の腹腔内移植に対しOK-431の皮下投与で延命効果がみられたのに、本論文では担がんマウスでのOK-431皮下投与では腹腔内に菌の分布がみられなかったこと、並びに桜井らの投与量が少なくても制がん効果がみられるということなどは、溶連菌製剤の制がん効果には腫瘍細胞に対する直接傷害作用と宿主介在作用があるとされているが、この宿主介在作用を示唆するものといえよう。また延命効果に関する*in vivo*法実験では、従来実験動物にがん細胞移植後24時間目からOK-431が連日投与されていたが、本論文ではOK-431を連日投与しなくても48時間又は72時間ごとに1回の投与で延命効果がみとめられた。これはOK-431の担がんマウス腹腔内投与でSLS産生菌が長時間にわたって生体に分布していることによるものと考えられる。

生体内分布像及び分布時間はOK-431及びSu菌ともにマウスに皮下固型腫瘍があるかないかによって異なり、OK-431の腹腔内又は静脈内投与では担がんマウスでの分布時間が非担がんマウスより

長く、皮下投与では担がんマウスの方が逆に各臓器、部位に分布されていないのは、皮下腫瘍のためマウスの生体抵抗性は低下しているが皮下では逆に抵抗性が高まっているためと考えられるが、詳細については全く不明であり、更に研究が必要である。また非担がんマウスにおけるOK-431の皮下投与では、24時間で体内分布がみられず、72時間及び120時間でみられるのは実験動物の皮下での抵抗性と、OK-431では菌毒力並びに増殖力が弱いために、OK-431が分布するまでに時間が必要であると考えられるが、これについても詳細は不明であり更に実験が必要である。

OK-432の分布は中野らによって示されている如く、短時間の観察ではOK-431のそれとよく一致しているが、OK-432はOK-431と異なって菌増殖力がないため、長時間での観察ではOK-431と若干異なると考えられる。また溶連菌製剤の抗腫瘍作用機序は直接傷害作用や宿主介在作用など複雑であり、生体内分布と抗腫瘍効果については更に研究が必要である。

結 論

抗腫瘍性溶連菌製剤OK-431の担がんマウス並びに非担がんマウスにおける生体内分布に関する実験が、核酸効果を利用して溶連菌Su株(Su菌)と比較しながら行なわれ、またOK-431の投与量並びに投与間隔の延命効果に及ぼす影響についても*in vivo*制がん実験で検討された。得られた結果は次の如くであった。

1. OK-431及びSu菌のマウスに対する菌毒力(Virulence)は投与経路並びにマウスの状態によって異なり、静脈内投与で菌毒力がもっとも強くみられた。またOK-431の菌毒力はSu菌に比して甚だ弱かった。
2. OK-431及びSu菌のマウス生体内分布像は投与量、投与経路並びにマウスの状態によって異なるが、静脈内投与ではOK-431及びSu菌共に広く体内に分布し、とくに肝、脾及び肺によく分布し、担がんマウスでは皮下固型腫瘍にも分布することがみとめられた。またOK-431でSu菌と同一効果をうるためには、より多くの投与量が必要であった。
3. 投与計画に関する実験では、担がんマウスでのOK-431の生体内分布時間と一致して72時間ごとのOK-431投与でも延命効果がみられた。

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謝の意を表します。

文 献

- 1) **Okamoto, H.** : Japan. J. Med. Sci., IV Pharmacology, **12**, 167 (1940).
- 2) **Koshimura, S., Murasawa, K., Nakagawa, E., Ueda, M., Bando, Y. and Hirata, R.** : Japan. J. Exp. Med., **25**, 93 (1955).
- 3) **Busch, W.** : Berl. Klin. Wochenschr., **5**, 137 (1868).
- 4) **Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. and Shimizu, R.** : Japan. J. Microbiol., **11**, 323 (1967).
- 5) **Bernheimer, A. W.** : J. Exp. Med., **90**, 373 (1949).
- 6) **Okamoto, H., Minami, M., Shoin, S., Kishimura, S. and Shimizu, R.** : Japan. J. Exp. Med., **36**, 175 (1966).
- 7) **Sakurai, Y., Tsukagoshi, S., Satoh, H., Akiba, T., Suzuki, S. and Takagaki, Y.** : Cancer Chemother. Rep., Part 1, **56**, 9 (1972).
- 8) **Okamoto, H.** : In "Mechanisms in Bacterial Toxinology" (A. W. Bernheimer ed.) John Wiley and Sons. New York and London, 237 (1976).
- 9) **Okamoto, H., Shoin, S. and Koshimura, S.** : In "Bacterial Toxins and Cell Membranes" (Jeljaszewicz, J. and Wadstrom, J. eds.) Academic Press, London, New York, San Francisco, 259 (1978).
- 10) 中野英樹・大谷武彦・菅原 豊 : 日本薬学会第3回薬物代謝と薬効毒性シンポジウム, 111頁 (1971) 南山堂

A b s t r a c t

The distribution of anticancer streptococcal preparation OK-431 was examined in a mouse bearing and not bearing an Ehrlich carcinoma solid tumor. OK-431 was prepared by incubating hemolytic streptococci Su strain (Su cocci) suspended in Bernheimer's basal medium containing penicillin G (2.7×10^4 U/ml) at 37°C for 20 minutes followed by the incubation at 45°C for 30 minutes. OK-431 thus prepared still possessed the abilities of growth and streptolysin S formation, especially in the presence of RNA, although both abilities were not so potent as those of Su cocci.

The comparative virulence test with OK-431 and Su cocci was carried out in a mouse bearing and not bearing a solid tumor to which OK-431 and Su cocci were injected subcutaneously, intravenously and intraperitoneally respectively, and then the distribution was examined in a mouse with and without a tumor to which OK-431 and Su cocci were injected by previous routes. In order to find out streptolysin S forming cocci originated from OK-431 and Su cocci injected into a mouse, the homogenate of organs was inoculated in ordinary meat infusion broth and cultivated at 37°C for 24 hours. After the cultivation, this broth culture was inoculated on blood agar and 1% RNA blood agar and incubated at 37°C to see whether hemolysis zone caused by streptolysin S would appear around the colony or not.

The results obtained were as follows ;

1. OK-431 was more avirulent than Su cocci and their lethal dose was different in the injection route and also in the state of a mouse. A mouse not bearing a tumor was more resistant to both Su cocci and OK-431 than a mouse bearing tumor.
2. The distribution of OK-431 and Su cocci was different in the injection route, the dose and the state of a mouse. Although OK-431 was not distributed so widely and for so long a time as Su cocci, both were distributed mainly in the lung, liver, spleen and kidney regardless of the state of a mouse.

3. It seemed that there was a relation between the anticancer effect and distribution of OK-431.
