

化学療法的活性をもつ生体成分の研究 4

悪性腫瘍をもつたマウスの腹水中の抗腫瘍因子について

豊島 滋・藤田 晴久

慶応大学薬化学研究所生物薬品化学研究室

1972年9月4日受付

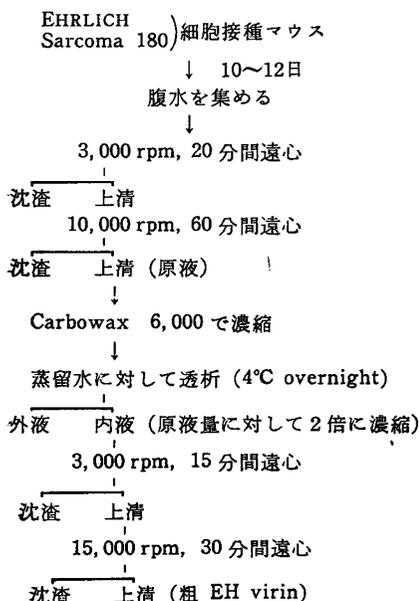
我々は培養細胞において Interferon 生産刺激因子を加えなくとも抗ウィルス活性をもつ物質を生産することを見出し、この抗ウィルス活性高分子物質を Anti-virin (以下、AV と略す) と仮称した。前報において我々はこの Interferon と異なる高分子ウィルス増殖阻止物質の性状と抗ウィルス効果について報告した¹⁻³⁾。我々は今日までの AV の研究から、たんに培養細胞のみでなく、一般に細胞はその置かれた条件下で広く化学療法的活性をもつ物質を生産しているのではないかと考え、この想定を確かめる目的で EHRlich 細胞及び Sarcoma 180 細胞接種マウスの腹水中に抗腫瘍因子が存在するか否かについて検討したので、その結果について報告する。

実験材料および実験方法

1) EH-virin および Sarco-virin の調整

我々は EHRlich 細胞接種マウスの腹水より採取したものを EH-virin (以下、EHV と略す)、Sarcoma-180 接種マウスの腹水より採取したものを Sarco-virin (以

第1図 EH-virin (Sarco virin) の調整法



下、SAV と略す)と呼んでいる。それらの粗材料の一般的な調整法は第1図に示すとおりである。

2) EH-virin (Sarco-virin) の硫酸分画

粗 EHV を硫酸塩析により分画を行なった。すなわち第1図のように調整した粗 EHV を 34% から 68% 飽和の硫酸分画を行ない、硫酸イオンの検出されなくなるまで、各分画を 4°C で蒸留水に対して透析し各分画の蛋白質を LOWRY の方法⁴⁾で測定した。粗 EHV およびその硫酸分画の蛋白質量は表1に示す通りである。

3) 抗腫瘍性試験

抗腫瘍性は①体重増加、②腫瘍細胞数の増加および③延命効果の3点で評価した。すなわち体重 23~25 g の♀のマウスを1群5匹ずつ使用した。EHRlich 細胞または Sarcoma 180 細胞をマウス体重 10g 当り 10⁶ 個腹腔内に接種し、その後 EHV (その硫酸分画) または SAV (その硫酸分画) をマウス体重 10g 当り 5.0 mg 蛋白質量を4日間腹腔内に投与し、10日間マウスの体重増加を測定すると共に、細胞接種10日後の全腫瘍細胞数を測定した。また、これらの内の1群について延命日数を検討した。

4) 抗ウィルス試験

EHV の抗ウィルス効果をポリオウィルスを用いて次の方法で検討した。すなわち培養管内で monolayer になつた Hep #2 細胞にポリオウィルス1型 (MAHONEY 株) を moi=1 になるように接種し、37°C で 60 分間吸着後、未吸着ウィルスを洗い去り、これに 2% 牛血清

第1表 EH-virin 及びその硫酸分画のタンパク量

分 画	*タンパク量 mg/ml
粗 EH virin	10.3
34% 飽 和 F-1	3.5
40% " F-2	3.8
50% " F-3	4.0
62% " F-4	2.3
68% " F-5	1.5
上 清 F-6	1.0

* LOWRY の方法で測定

加 YLE 培地 0.7 ml と EHV 0.3 ml を加え 23 時間 37°C で培養し、游出された細胞外ウィルス量をブラック形成法を用いて測定して PFU/ml により現した。

5) 腫瘍細胞数の測定法

EHRlich 細胞および Sarcoma 180 細胞接種後 10 日目のマウスを頸動脈切除で放血死させた。次にマウスの腹壁を上にして小穴をあけ、適当な容器に腹水を採取し、その後腹腔内を phosphate buffer saline(PBS) でよく洗い、もはや腫瘍細胞が認められなくなるまで PBS でくり返し洗滌しその都度の洗液を腹水と混合して全容量を測定した。

次にこの細胞浮游液を PBS で適当に稀釈し血球計算板で腫瘍細胞数を測定し、その細胞数に前記の全容量を乗じたものを全腫瘍細胞数とした。そしてこの全腫瘍細胞数をマウスの体重 10 g 当りの腫瘍細胞数として表現した。

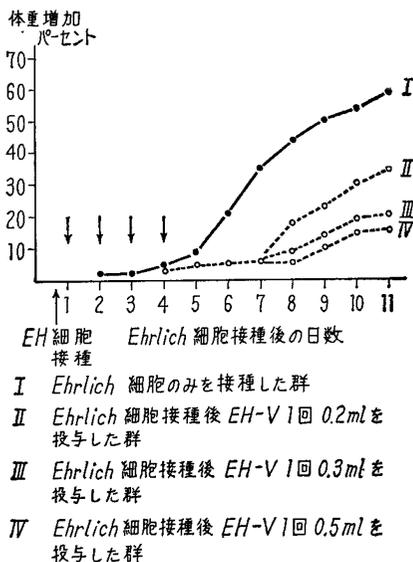
実験結果

(I) EHRlich 細胞接種マウスの腹水に見出される抗腫瘍因子

1) 粗 EH-virin の抗腫瘍性

粗 EHV に抗腫瘍性の活性が存在するか否かをみるためにマウス体重 10 g 当り粗 EHV 0.5 ml (約 5.0 mg 蛋白量), 0.3 ml, 0.2 ml を EHRlich 細胞を腹腔内に接種直後より 1 日 1 回, 4 日間腹腔内投与し、経時的に体重を測定し体重増加率からその抑制程度を調べた。第 2 図に示すように、EHV 0.5 ml 投与群は無処置の対照群と比較して 72.8% の体重増加抑制を示した。

カ2図 Ehrlich 細胞接種マウスの体重増加に及ぼす粗 EH-virin の影響

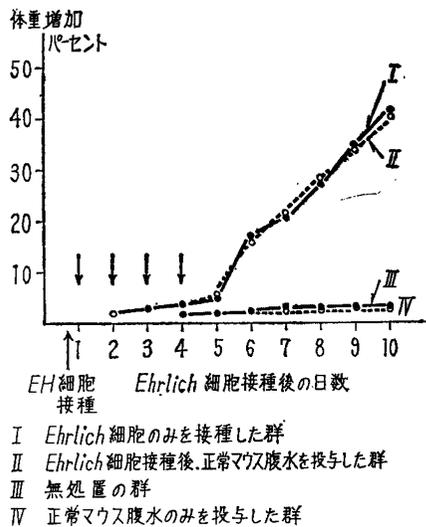


また EHV のみ投与した群で EHV による毒性は認められなかつたので、以後の実験で 0.5 ml を使用することにした。

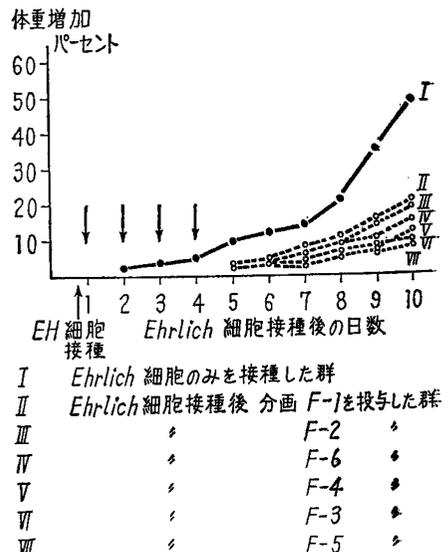
2) 正常マウス腹水中の抗腫瘍性

次に先ず確かめおかねばならないことは粗 EHV のような抗腫瘍性をもつた因子が腫瘍細胞を接種しない正常マウスの腹水中にも存在するか否かである。この点について検討した。

カ3図 Ehrlich 細胞接種マウスの体重増加に及ぼす正常マウス腹水の影響



カ4図 Ehrlich 細胞接種マウスの体重増加に及ぼす粗 EH-virin 硫安分画の影響

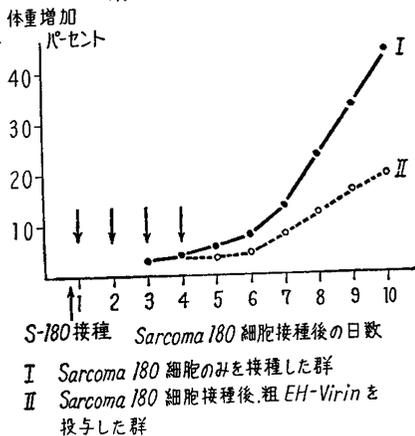


第2表 EHRlich 細胞接種マウスに及ぼす EH-virin 硫安分画の影響

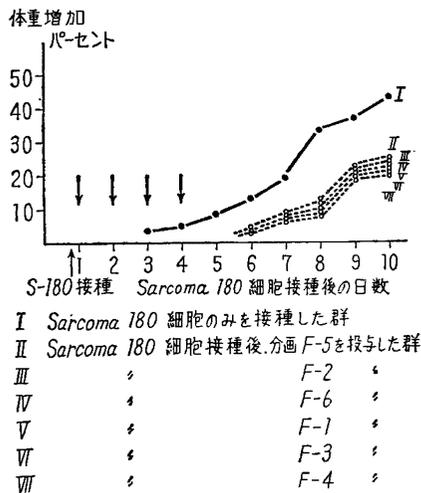
実験群*	細胞増加抑制効果			延命効果
	接種細胞数	全腫瘍細胞数	細胞増加抑制	平均死亡日数
EH 細胞のみ接種	1.0×10 ⁶ /10g 体種	8.5±0.6 (×10 ⁷)/10g		15±2.5日
EH + F-1	"	5.2±0.5 "	39.0%	20±2.5
EH + F-2	"	3.2±0.4 "	61.0	22±2.3
EH + F-3	"	2.3±0.3 "	73.0	30±2.0
EH + F-4	"	3.2±0.2 "	65.0	19±2.5
EH + F-5	"	3.8±0.3 "	45.0	21±2.5
EH + F-6	"	0.8±0.1 "	90.0	20±2.0
EH + Mitomycin C**	"	2.9±0.3 "	65.0	27±2.3
EH + Toyomycin**	"	2.4±0.2 "	72.0	25±2.3

* 1日1回, 細胞接種直後より4日間腹腔内投与
 ** 1/10 LD₅₀ 量を1日1回, 細胞接種直後より4日間腹腔内投与

ホ5図 Sarcoma 180細胞接種マウスの体重増加に及ぼす粗EH-virinの影響



ホ6図 Sarcoma 180細胞接種マウスの体重増加に及ぼすEH-virin 硫安分画の影響



すなわち EHRlich 細胞接種マウスに正常マウスより採取した腹水をマウス体重 10g 当り 5.0mg 蛋白量を1日1回, 4日間腹腔内投与した。第3図に示すように, 腫瘍細胞を接種していないマウスの腹水中には著大な抑制効果をもつものは見出されなかつた。

以上の結果から正常マウスの腹水中には抗腫瘍性の活性因子は存在せず, 粗EHVのような活性因子は接種腫瘍細胞の増殖に伴う生産物質であると考えられる。

3) EH-virin の硫安分画の抗腫瘍性

粗EHVの硫安塩析による各分画をマウス体重10g当り5.0mg蛋白量を1日1回, 4日間腹腔内投与し, 体重増加率は第4図に, 全腫瘍細胞数および延命日数を第2表に示した。

体重増加抑制率では EHRlich 細胞接種対照群と比較

して F-1分画は56%, F-2は58%, F-3は74%, F-4は79%, F-5は89%そしてF-6は68%であり, これら各分画のみの投与群でマウスに対する毒性は認められなかつた。以上の結果から F-3分画が, 体重増加抑制, 全腫瘍細胞数の増加および延命日数のいずれからも対照群と比較して有意の阻止効果が認められる。そしてこの F-3分画の阻止程度は Mitomycin C および Toyomycin の 1/10 LD₅₀ 量を1日1回4日間腹腔内投与した結果とほぼ同程度の効果と評価し得るものであつた。

4) EH-virin の Sarcoma 180細胞接種マウスに対する抗腫瘍性: Sarcoma 180細胞接種マウスにEHVを投与し抗腫瘍性を調べた。粗EHV投与による体重増加

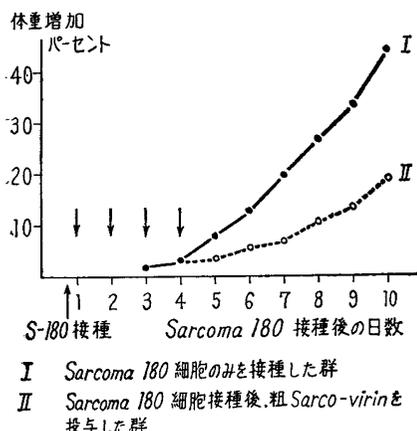
第3表 Sarcoma 180 細胞接種マウスに及ぼす EH-virin 硫安分画の影響

実験群*	細胞増加抑制効果			延命効果
	接種細胞数	全腫瘍細胞数	細胞増加抑制	平均死亡日数
S-180 のみ接種	1.0×10 ⁶ /10g 体重	8.2±0.6 (×10 ⁷)/10g		18±2.6日
S-180 + F-1	"	7.3±0.5 "	11.0%	21±2.2
S-180 + F-2	"	7.0±0.7 "	14.7	23±2.0
S-180 + F-3	"	4.2±0.4 "	48.8	27±2.3
S-180 + F-4	"	5.8±0.3 "	30.0	19±1.8
S-180 + F-5	"	7.3±0.6 "	11.0	19±2.0
S-180 + F-6	"	7.0±0.9 "	14.7	19±1.6
S-180+Mitomycin C**	"	1.5±0.3 "	81.0	28±2.6
S-180+Toyomycin**	"	1.0±0.4 "	88.0	28±1.6

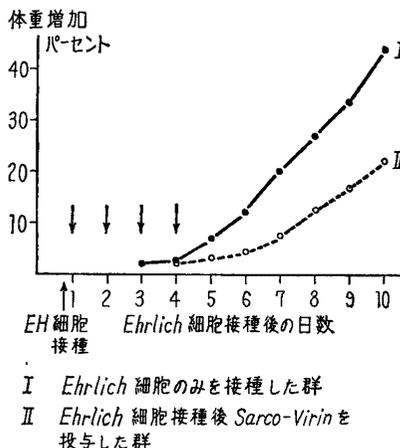
* 1日1回, 細胞接種直後より4日間腹腔内投与

** 1/10 LD₅₀ 量を1日1回, 細胞接種直後より4日間腹腔内投与

カ7図 Sarcoma 180細胞接種マウスの体重増加に及ぼす粗 Sarco-virin の影響



カ8図 Ehrlich 細胞接種マウスの体重増加に及ぼす粗 Sarco-virin の影響



率を第5図に, EHV 硫安分画投与による効果を第6図と第3表に示した。

第6図および第3表の結果から明らかな如く, 粗 EHV およびその硫安分画の F-3 分画に Sarcoma 180 に対する抗腫瘍性が認められた。このことは EHV が腫瘍抗体と異質のものであることを示している。

(II) Sarcoma 180 細胞接種マウス腹水中の抗腫瘍性

1) 粗 Sarco-virin の Sarcoma 180 接種マウスに対する抗腫瘍性: EHV と同じ操作で粗 SAV を Sarcoma 180 細胞接種マウスの体重 10g 当り 5.0mg 蛋白量を腹腔内投与した結果を第7図に示した。第7図に示すように体重増加率では EHV の EH 細胞に対すると同程度の抗腫瘍性が認められた。

2) 粗 Sarco-virin の EHRlich 細胞接種マウスに

対する抗腫瘍性: EHRlich 細胞接種マウスに粗 SA-V を腹腔内に投与した場合の結果を第8図に示す。第8図に示されるように EHRlich 細胞接種後 10 日目の体重増加抑制は 60.8%, 全腫瘍細胞数の増加抑制は 46.6% であり, 平均死亡日数も延長が認められた。

3) Sarco-virin の硫安分画の Sarcoma 180 および EHRlich 細胞接種マウスに対する抗腫瘍性, 次に SAV の硫安分画部の抗腫瘍性について検討したが EHV の硫安分画と同様, SAV の硫安分画部の F-3 画分が, 最も強い非特異的な抗腫瘍性を示した。すなわち Sarcoma 180 細胞接種マウスの体重増加抑制は 75%, 全腫瘍細胞数の増加抑制では 65%, また, EHRlich 細胞接種マウスに対しては, 体重増加抑制が 45%, 全腫瘍細胞数増加抑制では 40% であつた。このように抗腫瘍性は非特異的であるが, どちらかといえば, その抑制効果は抗腫瘍

第4表 粗 EH-virin の polio ウィルス増殖抑制効果

	PFU/ml	阻止率 (%)
VC*	1.5×10^7	
EHV ₁₀ **	1.0×10^6	99.3
EHV ₁₅ ***	7.2×10^6	52.0

* Polio-1型 MAHONEY 株ウィルスのみを接種した群

** Polio ウィルスを接種したのち、EHRlich 細胞接種後 10 日目に採取した EHV を投与した群

*** Polio ウィルスを接種したのち、EHRlich 細胞接種後 15 日目に採取した EHV を投与した群

因子の生産系として用いた細胞系と力価測定に用いた腫瘍細胞系が同一系の場合のほうが一層強い活性が認められるようであった。

考 察

我々は AV の研究から出発して、悪性腫瘍細胞を接種せられたマウスの腹水中に抗腫瘍因子の生産されることを明らかにした。それは蛋白性性格の高分子物質であつて、その活性は生産に用いた腫瘍細胞にのみ作用するのではなくてその他の腫瘍細胞にも作用するので、さうとう広い範囲の抗腫瘍スペクトルをもつものではないかと考えられる。また、この非特異的な活性物質は抗ウィルス効果をもつことがポリオウィルスに対する効果の検討から認められた(第4表)。このように我々が仮称している EHV とか SAV などは 1 種の生体防禦機構に関与するものであり腫瘍細胞のような侵入因子に対して普

遍的に作用する機能をもっているのかも知れない。すなわち腫瘍細胞のような侵入因子に対して、特異的免疫機構と並んで、非特異的に侵入因子に作用するこの防禦機能は、生体防禦反応の中では、おそらく重要な役割をはたしているのではないかと考えている。

要 約

悪性腫瘍細胞を接種せられたマウスの腹水中に蛋白性性格の活性因子が見出された。この因子には抗ウィルスおよび抗腫瘍の 2 つの作用が認められ、腫瘍生体と異なる活性物質である。そして 50% 硫酸分画部に最も強い活性が認められ、その抑制効果は Mitomycin C および Toyomycin の 1/10 LD₅₀ 量投与とほぼ同程度の力価を示した。

参 考 文 献

- 1) 豊島滋, 瀬戸淑子, 高奥昌子, 藤田晴久: 化学療法的活性をもつ生体成分の研究 (1) Antivirin: 培養細胞の生産する新しい抗ウィルス性物質について。Chemotherapy 15(3), 263~266, 1967
- 2) 豊島滋, 瀬戸淑子, 戸根木尚子: 化学療法的活性をもつ生体成分の研究 (2), Antivirin の生産条件と力価測定。Chemotherapy 15(3), 264~267, 1967
- 3) 豊島滋, 瀬戸淑子, 戸根木尚子: 化学療法的活性をもつ生体成分の研究 (3), 部分精製された Antivirin の性状。Chemotherapy 15(3), 271~274, 1967
- 4) LOWRY, O. H., ROSENBOUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265~275, 1951

STUDIES ON THE HIGH MOLECULAR SUBSTANCES POSSESSING CHEMOTHERAPEUTIC ACTIVITY. IV

An Antitumor Substance found in Ascites of Tumor bearing Mice

SHIGESHI TOYOSHIMA & HARUHISA FUJITA

Division of Biochemical Pharmacology, Pharmaceutical Institute, Keio Gijuku University

EH Virin, an antitumor substance found in ascites of EHRlich ascites tumor bearing mice, was investigated. This substance possessed the two inhibitory activity of antitumor effect and antiviral one and was different from tumor antibody.

By using the ammonium sulfate fractionation method, the highest activity of EH Virin was found to be in the 50% saturated fraction. The antitumor effect of this substance equivalents to the therapeutic effect of 1/10 LD₅₀ of mitomycin C or toyomycin.