

## OK-432 の吉田肉腫および L 1210 白血病の各種薬剤耐性株に対する効果

星野 章・加藤武俊・天羽弘行・太田和雄

愛知県がんセンター研究所化学療法部

(昭和 46 年 12 月 21 日受付)

## I. 緒 言

悪性腫瘍患者が、溶血性連鎖球菌(溶連菌)による感染、とくに丹毒にかかると腫瘍の退縮、治癒が起ることは古くから多数の報告がある。

BUSCH は、1868 年、肉腫患者に丹毒を罹患させて腫瘍の縮少をみており<sup>1)</sup>、1882 年に FEHLEISEN は溶連菌 *Streptococcus erysipelatis* の培養液を肉腫患者に接種し、良好な成績を得ている<sup>2)</sup>。また、COLEY も、1891 年に手術不能の肉腫患者に丹毒を感染させて腫瘍を完全に治癒させた<sup>3)</sup>。しかし丹毒は当時かなり重篤な疾患でありこれにより死を招くこともしばしばであり、このため生菌を含まない COLEY's mixed toxin などが考案されたが、製剤の効力が変動し、効果も不定であり、また作用機序についても明らかにすることができなかった<sup>4)</sup>。

1939 年、岡本は RNA を添加した培地に溶連菌を培養すると溶血毒素 Streptolysin S(SLS) の産生が著しく増大する事実、すなわち“RNA 効果”を見出した<sup>5)</sup>、その事実を基礎にして、1954 年以来、越村、岡本らは溶連菌の制癌作用に関しての精力的な研究をすすめ、越村らはまず溶連菌の生菌体と EHRlich 腹水癌細胞を 37°C にて incubate すると SLS の産生がみられること<sup>6)</sup>、しかもこの incubate した混合液をマウス腹腔内に接種しても腹水癌増殖は起らないことを観察した<sup>7)</sup>。これは溶連菌が癌細胞の RNA を利用したために、癌細胞の RNA が荒廃を起したと考えられている。また、溶連菌は現在まで 10 種以上の実験腫瘍に制癌作用を示し、制癌能は菌の毒力と無関係であることが認められている。

1964 年、越村ら<sup>8,9)</sup>は、BERNHEIMER's basal medium 中で、高濃度の Penicillin 存在下で 37°C、20 分間、ついで 45°C、30 分間処理すると、制癌効果が 10~20 倍強力になり、Penicillin 処理された菌は Streptolysin S 産生能がないことを見出し、この菌製剤が PC-B-45 (OK-431) であり、これを凍結乾燥法によつて安定化したものが OK-432 である。本実験に用いた OK-432 は中外製薬から提供されたものである。

われわれは、吉田肉腫および L 1210 白血病の感性株と各種薬剤の耐性株を用いて OK-432 の抗腫瘍効果、とくに交叉耐性について検討したので報告する。

## II. 方 法

<吉田肉腫の *in vivo* assay>

吉田肉腫は 100 万個を体重 100~120 g、1 群 5 匹(感受性株では 10 匹)の呑竜ラットの腹腔内に移植し、72 時間後から、連日 10 回の薬剤の腹腔内投与を行ない、治療群の平均生存日数の対照群に対する延長率から、50% 以下は無効(-)、50~100% はやや有効(±)、100% 以上は有効(+)、100% 以上で 30 日以上生存するラットのある場合を著効(++)、と判定した<sup>9)</sup>。

<吉田肉腫の *in vitro-in vivo* assay>

吉田肉腫における *in vitro-in vivo* assay 法による薬剤の効果検討を行なつた。すなわち、吉田肉腫細胞の  $5 \times 10^6$  cells/ml のヘパリン加 HANKS 浮遊液を作製し、薬剤を種々の濃度に加えて、37°C、30 分間 incubate し、そのまま 0.2 ml、すなわち吉田肉腫 100 万個を 1 群 5 匹の呑竜ラット腹腔内に移植し、生存日数と移植率から薬剤の効果の判定した。この方法で薬剤の腫瘍細胞への直接効果の有無を検討することが出来る。

<L 1210 白血病の *in vivo* assay>

L 1210 白血病は 100 万個を体重 18~22 g、1 群 5 匹の BDF<sub>1</sub> マウスの腹腔内に移植し、24 時間後から隔日 10 回の薬剤の腹腔内投与を行ない、治療群の平均生存日数の対照群に対する延長率から、25% 以下は無効(-)、25% 以上は有効、と判定した<sup>9)</sup>。

なお、交叉耐性および Collateral sensitivity の有無は、薬剤の Optimal dose の耐性株に対する効果を感性株に対する効果と比較して判定した<sup>9)</sup>。

使用した OK-432 は、実験の都度、新しく生理食塩水を加えて懸濁液として注射または *in vitro* における incubation に使用した。

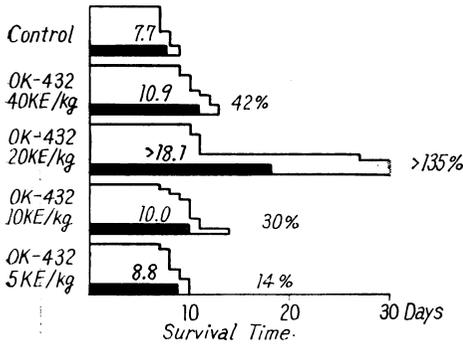
## III. 成 績

<吉田肉腫感受性株>

図 1 は吉田肉腫感受性株に対する OK-432 の効果を生存曲線で示したものであり、黒い棒とその上の数字は各群の平均生存日数を示し、% は治療群の対照群(生食水注射群)に対する平均生存日数の延長率を示している。

OK-432 40 KE/kg 連日投与の群では平均生存日数は 10.9 日、延命率は 42% であつた。20 KE/kg 投与群で

図1. EFFECT OF OK-432 ON ORIGINAL LINES OF YOSHIDA SARCOMA



は延命率 135% 以上で、30 日以上生存ラットが 10 匹中 3 匹認められて、OK-432 の効果は著効(++)と判定された。10 KE/kg 投与群では延命率 30% で無効(-)であつた。

<吉田肉腫耐性株>

吉田肉腫感受性株に対し OK-432 は有効であるが、その Chemotherapy index (MTD/MED) は 2~4 倍と低いことが認められた。

図2-1は、Cyclophosphamide, Busulfan, Thio-TEPA のアルキル化剤耐性株に対する OK-432 の効果を示したもので、Cyclophosphamide 耐性株では、OK-432 40 KE/kg 投与では -14% で無効(-)、20 KE/kg 投与では 32% 以上でやや有効(±)であつた。Busulfan 耐

図2. EFFECT OF OK-432 ON ORIGINAL AND RESISTANT LINES OF YOSHIDA SARCOMA

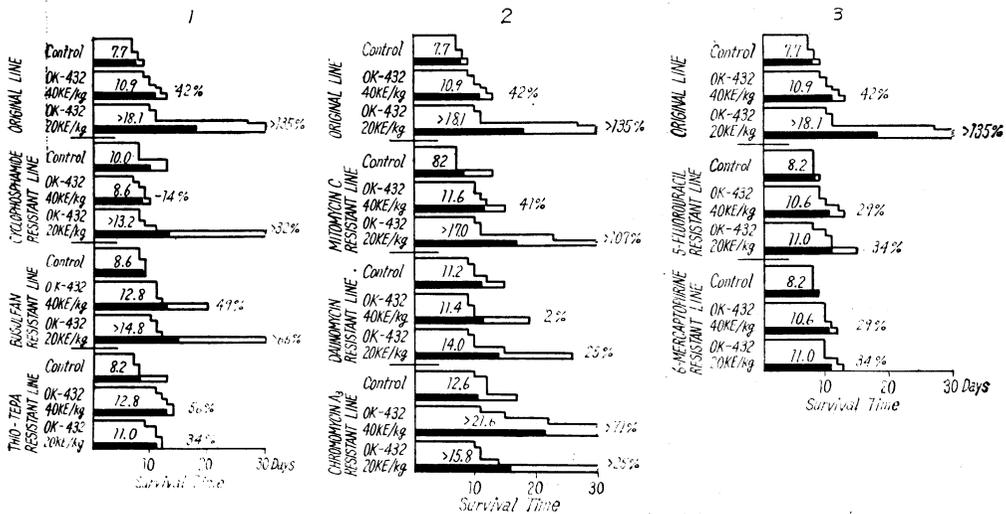
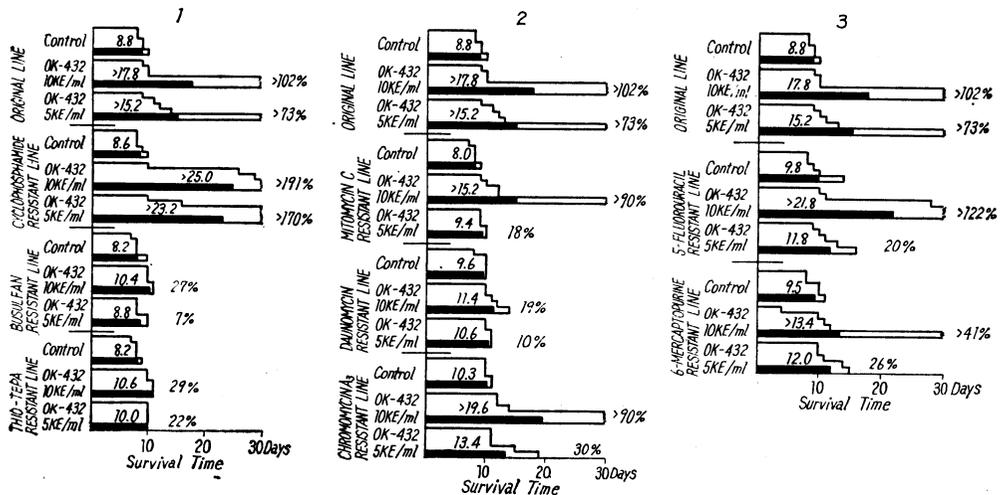


図3. EFFECT OF OK-432 ON ORIGINAL AND RESISTANT LINES OF YOSHIDA SARCOMA (IN VITRO-IN VIVO ASSAY)



性株に対し、20 KE/kg 投与では 66% 以上で、30 日生存ラットが 5 匹中 1 匹認められて有効(+)であった。Thio-TEPA 耐性株では 40 KE/kg 投与で 56% とやや有効(±)であった。

図 2-2 は Mitomycin C, Daunomycin, Chromomycin A<sub>3</sub> の抗生物質耐性株に対する OK-432 の効果を示したものである。

Mitomycin C 耐性株では 20 KE/kg 投与で、107% 以上、30 日生存ラットは 5 匹中 1 匹で著効(++)を示した。Daunomycin 耐性株では 40 KE/kg, 20 KE/kg 投与のいずれも無効(-)であった。Chromomycin A<sub>3</sub> 耐性株では、40 KE/kg 投与群で 71% 以上、30 日生存ラットが 5 匹中 2 匹に認められ有効(+)と判定された。

図 2-3 は代謝拮抗剤 5-Fluorouracil, 6-Mercaptopurine の両耐性株に対する効果を示したもので、OK-432 は、この両耐性株に無効(-)であった。

<吉田肉腫 *in vitro-in vivo* assay>

図 3 は、吉田肉腫細胞と OK-432 を試験管内で 37°C, 30 分間 incubate して OK-432 の直接効果をみた *in vitro-in vivo* assay の成績を示したものである。

感受性株細胞と OK-432 を最終濃度 10 KE/ml になるように加えて培養した群では、その細胞をラット腹腔内に戻し移植すると、生存日数の延長率は 102% 以上、5 匹中 2 匹が 30 日以上生存し著効(++)を示した。5 KE/ml では 73% 以上で、5 匹中 1 匹が 30 日生存し有効(+)と判定された。すなわち吉田肉腫に対して OK-432 は直接抗腫瘍作用を有することを示す成績と考えられる。

図 3-1 に示すとおり、Cyclophosphamide 耐性株では、10 KE/ml 処置群で 191% 以上、5 匹中 2 匹が 30 日以上生存し、5 KE/ml では 170% 以上、5 匹中 3 匹が 30 日以上生存し、いずれの群も著効(++)を示した。しかし Busulfan 耐性株、Thio-TEPA 耐性株には無効(-)であった。

図 3-2 は Mitomycin C, Daunomycin, Chromomycin A<sub>3</sub> の各耐性株に対する OK-432 の成績を示したものであり、Mitomycin C 耐性株と OK-432 の 10 KE/ml を incubate した場合は、延命率 90% 以上で有効(+)であった。しかし Daunomycin 耐性株では全く無効であった。いつぼう、Chromomycin A<sub>3</sub> 耐性株では 10 KE/ml の incubation で延命率 90% 以上、5 匹中 2 匹が 30 日以上生存し有効(+)であった。

図 3-3 は 5-Fluorouracil, 6-Mercaptopurine の両耐性株に対する効果を示したもので、5-Fluorouracil 耐性株では 10 KE/ml の incubation で、延命率は 122% 以上、5 匹中 2 匹が 30 日以上生存し著効(++)を示した。6-Mercaptopurine 耐性株では 10 KE/ml 処置群で 41

表 1 Effect of OK-432 on original and resistant lines of YOSHIDA sarcoma

	<i>in vivo</i> assay		<i>in vitro-in vivo</i> assay	
	40 KE/kg	20 KE/kg	10 KE/ml	5 KE/ml
Original line	—	++	++	+
Cyclophosphamide resistant line	-	±	++	++
Busulfan resistant line	—	+	—	—
Thio-TEPA resistant line	±	—	—	—
Mitomycin C resistant line	—	++	+	—
Daunomycin resistant line	—	—	—	—
Chromomycin A <sub>3</sub> resistant line	+	±	+	—
5-Fluorouracil resistant line	—	—	++	—
6-Mercaptopurine resistant line	—	—	±	—

— ~ 50% of Increase in Average Survival Time  
 ± 50%~100% of Increase in A. S. T.  
 + 100%~ of Increase in A. S. T.  
 ++ 100%~ of Increase in A. S. T. with 30 day Survivors

% 以上であり、やや有効(±)であった。

表 1 は前記の吉田肉腫の各種耐性株に対する OK-432 の *in vivo* における効果、ならびに *in vitro-in vivo* における効果を総括した表である。

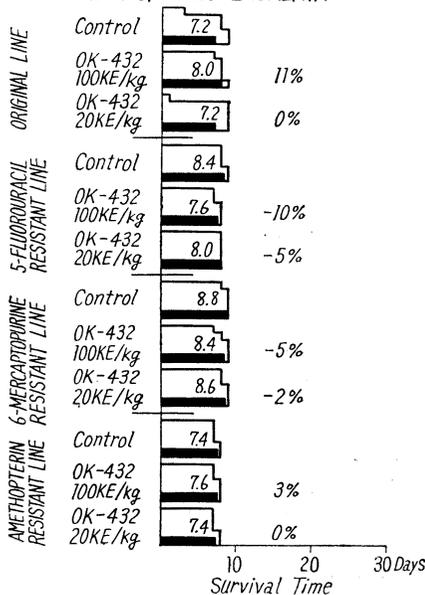
*In vivo* においては Mitomycin C, Chromomycin A<sub>3</sub> の両耐性株に対して、OK-432 は感受性株とほぼ同じ効果を示したが、Cyclophosphamide, Busulfan, Thio-TEPA の各耐性株がいずれも有効(+), またはやや有効(±)という成績を示した他は、すべて無効(-)であり交叉耐性を示す成績であった。

*In vitro-in vivo* assay では、感受性株および Cyclophosphamide, 5-Fluorouracil 耐性株が著効(++)を示し、Mitomycin C, Chromomycin A<sub>3</sub>, 6-Mercaptopurine の各耐性株が有効(+)またはやや有効(±)の効果を示したが、その他の耐性株には無効であった。

<L 1210 白血病の *in vivo* assay>

図 4 は L 1210 マウス白血病の感受性株、5-Fluorouracil, 6-Mercaptopurine, Amethopterin の各耐性株に対し OK-432 を腹腔内に投与した実験の成績を示したものである。L 1210 白血病マウスに OK-432 の 100 KE/kg, 20 KE/kg を隔日 10 回投与したが、いずれの

図4. EFFECT OF OK-432 ON ORIGINAL AND RESISTANT LINES OF L1210 LEUKEMIA



株においても OK-432 は全く無効であった。

#### IV. 考按ならびに結論

吉田肉腫の感受性株に対して OK-432 は, *in vivo* において, また *in vitro-in vivo* 法においてもいずれも有効であった。各種薬剤の耐性株における OK-432 の効果は感受性株に比して劣る。しかしアルキル化剤の耐性株において Cyclophosphamide 耐性株に OK-432 は有効であるが, 他の Busulfan, Thio-TEPA の耐性株にはあまり有効でなく, このようなことから, 各薬剤と OK-432 の有効性には一定の関連がなく, 各薬剤の作用機序と, OK-432 の効果とは関係がないように考えられる。

また, われわれの成績で Cyclophosphamide, Chromomycin A<sub>3</sub> の両耐性株に対する OK-432 の *in vitro-in vivo* assay の効果が比較的良好という結果であるが, これはこの2株が原株および他の耐性株と増殖態度が異なり, 宿主の影響をうけやすい腫瘍であり, incubation 後 *in vivo* にもどした場合には, 変性をうけた細胞が宿主の影響をうけやすく, そのために OK-432 の効果がよく出たとも考えられる。

OK-432 の効果を *in vivo* と *in vitro-in vivo* 法と比較すると, *in vitro-in vivo* assay のほうが効果がよく感度が高い。これは OK-432 が直接細胞障害作用を有することを示す成績と考えられる。

しかし前述の Cyclophosphamide, Chromomycin A<sub>3</sub> 耐性株の実験結果は, OK-432 が直接作用の他に宿主を介した作用を有することを示唆する成績である。

以上の結果から, OK-432 は腫瘍増殖を抑制する直接作用の他に宿主を介した非特異的な作用をも有すると考えられる。

また L1210 マウス白血病には OK-432 は無効であったが, これは腫瘍による感受性の差によるものである。

また多くの耐性株と交叉耐性を有する成績は, それぞれの薬剤の作用機序と関連したものではなく, 耐性腫瘍の膜透過性の変化<sup>10)</sup>等に基づく耐性腫瘍一般に認められる非特異的薬剤抵抗性を示すものと考えられる。

#### 文 献

- 1) BUSCH, W. : Niederrheinische Gesellschaft für Natur- und Heilkunde in Bonn. Berlin. Klin. Wochensch. 5 : 137~138, 1868
- 2) FEHLEISEN : VI. Ueber die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Uebertragbarkeit auf den Menschen. Deut. Med. Wochensch. 8 : 553~554, 1882
- 3) COLEY, B. W. : Contribution to the knowledge of sarcoma. Ann. Surg. 14 : 199~220, 1891
- 4) NAUTS, H. C., FOWLER, G. A. & BOGATKO, F. H. : A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (COLEY's toxins) on malignant tumors in man. Acta Med. Scand. Suppl. 276, Accompanies, 145 : 1~103, 1953
- 5) OKAMOTO, H. : Über die hochgradige Steigerung des Hämolyisinbildungsvermögens des *Streptococcus haemolyticus* durch Nukleinsäure, Japan. J. Med. Sci., IV Pharmacology 12 : 167~208, 1940
- 6) KOSHIMURA, S., SHIMIZU, R., MASUSAKI, T., OHTA, T. & KISHI, G. : On the formation of streptolysin-S by hemolytic streptococci acting on tumor cells. Japan. J. Microbiol. 2 : 23~28, 1958
- 7) 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
- 8) KOSHIMURA, S., SHIMIZU, R., FUJIMURA, A. & OKAMOTO, H. : XXI. Effect of penicillin treatment of hemolytic streptococcus on its anticancer activity. Gann 55 : 233~236, 1964
- 9) OKAMOTO, H., MINAMI, M., SHOIN, S., KOSHIMURA, S. & SHIMIZU, R. : Experimental anticancer studies. Part XXXI. On the streptococcal preparation having potent anticancer activity. Japan. J. Exp. Med. 36 : 175~186, 1966
- 10) 星野 章 : 薬剤耐性からみた合併療法。日本癌治療学会誌 4, Suppl. : 28~34, 1969

- 11) HUTCHISON, D. J. : Cross resistance and collateral sensitivity. *in* Advances in Cancer Re-

search, Vol. 7, 235~350, 1963, Academic Press, New York.

## ANTITUMOR EFFECT OF OK-432 CROSS RESISTANCE IN RESISTANT CELL LINES OF YOSHIDA SARCOMA AND OF L1210 LEUKEMIA

AKIRA HOSHINO, TAKETOSHI KATO, HIROYUKI AMO and KAZUO OTA  
Laboratory of Chemotherapy, Aichi Cancer Center Research Institute,  
Chikusa-ku, Nagoya, Japan

Antitumor effect of OK-432, the lyophilized preparation of cell suspension of a low virulent strain of *Streptococcus hemolyticus* treated with penicillin G, was studied in the original and its resistant sublines of YOSHIDA sarcoma and of L 1210 leukemia.

OK-432 showed tumor inhibitory effect to the original YOSHIDA sarcoma and the sublines resistant to cyclophosphamide, busulfan, thio-TEPA, mitomycin C and chromomycin A<sub>3</sub> in *in vivo* experiments.

In *in vitro-in vivo* assay experiments OK-432 was also effective against the original YOSHIDA sarcoma and the sublines resistant to cyclophosphamide, mitomycin C, chromomycin A<sub>3</sub>, 5-fluorouracil and 6-mercaptopurine.

These results indicated that OK-432 possessed both direct and host-mediated antitumor activities in YOSHIDA ascites sarcoma. Cross resistance of OK-432 found in several resistant sublines did not correlate to specific mode of action of the antitumor agents.

Collateral sensitivity to OK-432 observed in the two sublines resistant to cyclophosphamide and chromomycin A<sub>3</sub> might be attributed to elevated immunogenicity of these resistant sublines.

OK-432 was not effective to L 1210 mouse leukemia.