

Broncasma Berna による網内系機能の活性化 とくに MFC 療法における併用効果

伊 藤 均・杉 沢 裕 子
三重大学医学部薬理学教室

志 村 圭 志 郎
三重大学医学部動物実験施設

(昭和 55 年 6 月 16 日受付)

上気道アレルギーの免疫療法剤として用いられている細菌多価ワクチンの 1 種である *Broncasma Berna*, は動物移植癌に対して抗腫瘍活性を示すことが知られている。今回は本剤および制癌剤併用時における網内系に対する影響をマウスを用いて検討した。

本剤の i. p., s. c. および i. n. 投与群においては, 網内系の活性が有意に増加した。この活性化の程度は投与回数とほぼ平行関係にあり, phagocytic index [K] 値および corrected phagocytic index [α] 値の増加として認められた。さらに MFC 療法 (Mitomycin C+5-Fluorouracil+Cytosine arabinoside) で発現する網内系機能の抑制は本剤との併用により防止された。

また, *Broncasma Berna* および Zymosan 投与群では, 胸腺および脾臓の摘出臓器重量体重比が著しく増加した。一方, MFC 投与群では, 各臓器重量とも減少したが, *Broncasma Berna* の併用により防止された。以上により, 临床上, 広く行なわれている MFC Therapy において発現する副作用の 1 つである網内系機能の抑制に対して, *Broncasma Berna* は有効であることが明らかとなった。

緒 言

微生物の産生する内毒素, ミコバクテリアおよびある種の病原菌や腐生菌が, 網内系機能を促進することがすでに明らかにされている。

著者らは, 前報¹⁾細菌多価ワクチンの 1 種である *Broncasma Berna* はマウスに移植された Ehrlich 腹水腫瘍に対して抗腫瘍作用を示すことを報告したが, 本剤も網内系機能に影響を及ぼすのではないかと考え, carbon clearance 法により検討した。また, 製癌剤併用時に発現するといわれる網内系機能の低下に対する *Broncasma Berna* の作用態度についても検討を加えた。さらに各臓器重量 (肝臓, 脾臓, 胸腺, 肺臓および腎臓) への影響についても考察を加えたので報告する。

実験材料および方法

I. 実験材料

(i) 実験動物: ICR/JCL マウス (日本クレア) 雄, 5 週令を購入し, オリエンタル固型飼料 NMF と水道水を自由に摂取させ, 温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 50~60% の空調動物質にて飼育管理を行なった。

(ii) 使用薬物

(a) *Broncasma Berna* (B. B: スイス血清ワクチン研究所)

本剤は *Pneumococcus* I, II, III, *Micrococcus catarrhalis*, *Micrococcus tetragenes*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Hemophilus influenzae* の死菌混合液である。

(b) Zymosan (Zymosan A, No. Z-3003, Immunological reagent, ICN Pharmaceuticals, Inc, Sigma 社製)

(c) 他の制癌剤: Mitomycin C (MMC), 5-Fluorouracil (5-FU): 協和醸酵, Cytosine arabinoside (Ara-C): 日本新薬

(iii) 他の試薬

ペリカンインク (C 11/1431 a): Günther Wagner, Hannover Germany, ゲラチン: Merck 社製を用いた。他の試薬は, 市販の特級品を用いた。

II. 実験方法

(i) Carbon clearance test

BIOZZI²⁾らの方法を採用し, ペリカンインク (炭末粒子浮遊液) を用い原液を 5,000 r. p. m. で 15 分間遠心

した後、上澄液をゲラチン1%添加生理食塩水で炭末粒子が16mg/mlになるように、5.6倍に希釈し使用した。

測定は、16mg/mlの希釈ペリカンインクをマウス10g当り0.1mlの割合で尾静脈内に注射し、投与5分後と30分後にメラングールを用いマウス眼窩静脈叢から0.03ml採血し、0.1%炭酸ナトリウム溶液3ml中に溶血させた。この溶血液を日立分光光度計(118形)を用いて600nmにて測定した。常法により以下の算式に従って、食食指数 phagocytic index [K] 値および訂正食食指数 corrected phagocytic index [α] 値を求めた。

$$K = \frac{\log C_1 - \log C_2}{T_2 - T_1}$$

但し、C₁はペリカンインク静注後、T₁分における炭末濃度であり、C₂はT₂分における同濃度である。

$$\alpha = \frac{W}{WLS} \sqrt{K}$$

但し W: マウスの体重, WLS: マウスの肝臓および脾臓の総重量

(ii) *Broncasma Berna* および他の薬剤の投与方法

B.B. 原液 0.2ml/mouse を1回および週3回、腹腔内(i.p.)、皮下(s.c.)あるいは鼻腔内(i.n.)投与を行なった。B.B. を1回投与、3回投与、6回投与および9回投与した後、各投与群とも24時間後に carbon clearance test を行なって、食食指数 [K] 値を求めた。一方、Zyosan は 40mg/kg を1回投与および週3回 i.p. 投与を行ない、B.B. の場合と同様に測定を行なった。

MFC (MMC 0.25mg/kg, 5-FU 30mg/kg および Ara-C 20MG/kg の各投与量の1/3量を併用) 0.2ml/mouse 単独投与群および MFC+B.B 併用群あるいは

MFC+B.B 10倍希釈併用群についても、1回投与および週3回 i.p. 投与をして、[K] 値の測定を行なった。対照群には、滅菌生理食塩液 0.2ml/mouse を i.p. 投与した。

なお、採血後直ちにマウスを殺し、肝臓、脾臓、胸腺、肺臓および腎臓を摘出して、その臓器重量を測定し、訂正食食指数 [α] 値を求めた。各投与群は、いずれも同一実験を2回行ない、計10匹のマウスの平均値で比較検討を行なった。

III. 実験結果

(i) *Broncasma Berna* の投与経路および投与量による carbon clearance 値の変動

B.B. 原液および10倍希釈液 0.2ml/mouse を i.p. 投与し、また B.B. 原液 0.2ml/mouse を s.c. および i.n. 投与を行ない、経時的に食食指数 [K] 値を求め、投与経路あるいは投与量により網内系にどのような影響を及ぼすかを調べた。Fig.1 にその結果を総括して示した。i.p. および i.n. 投与群の [K] 値は、s.c. 投与群に比べ、高値を示した。B.B. 1回投与では、対照群に比較して、i.p. 投与群 35.8%, i.n. 投与群では 38.7% の [K] 値の増加を示し、9回投与群では i.p. および i.n. 投与群ともに約 80% [K] 値が増加し、Zyosan 40mg/kg 投与群に相当する [K] 値の上昇が認められた。このように、B.B. の i.p. および i.n. 投与群では顕著な網内系機能の亢進が観察された。また、投与経路のいずれの場合にも、投与回数を増すに従い有意な [K] 値の増加が認められた。

さらに、B.B. 原液および10倍希釈液 i.p. 投与群を比較検討したところ、[K] 値は、原液のほうがやや高値を示した。

(ii) MFC の carbon clearance 値に及ぼす影響と

Fig.1 Effect of *Broncasma Berna* or Zyosan by the administration route on the reticuloendothelial system in mice.

○; Control, ●; *Broncasma Berna*. (0.2 ml/mouse), □; Zyosan (40 mg/kg)

Broncasma Berna or Zyosan was given three times a week. Each point represents the mean ± S.E. of 10 animals. Significantly different from the control group at *P < 0.05 or **P < 0.01, respectively.

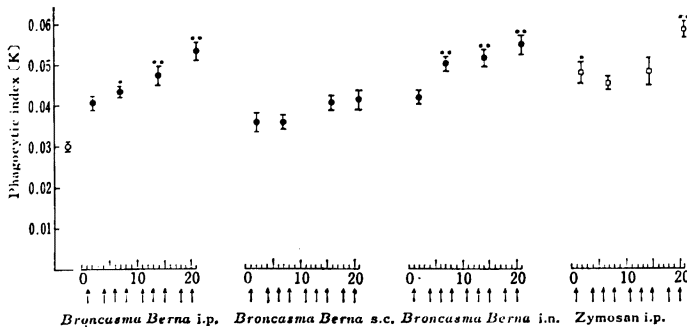


Table 1 Influence of *Broncasma Berna* and MFC on the reticuloendothelial system and the relative organ weight in mice

Experimental group	% Body weight					K Index	α Index
	Liver	Spleen	Lung	Thymus	Kidney		
Control (saline)	6.114 ±0.185	0.488 ±0.022	0.668 ±0.041	0.204 ±0.016	1.635 ±0.053	0.030 ±0.001	4.71 ±0.17
B. B (i. p.) ×1	6.370 ±0.287	0.522 ±0.025	0.719 ±0.026	0.294** ±0.016	1.558 ±0.042	0.041** ±0.001	5.18 ±0.16
×3	6.140 ±0.224	0.564** ±0.008	0.628 ±0.074	0.283** ±0.019	1.666 ±0.077	0.043** ±0.001	5.24* ±0.21
×6	6.701** ±0.091	0.590* ±0.029	0.679 ±0.038	0.270 ±0.037	1.816 ±0.041	0.047** ±0.002	5.84** ±0.23
×9	6.883** ±0.147	0.644** ±0.014	0.712 ±0.058	0.243* ±0.013	1.614 ±0.148	0.053** ±0.002	6.04** ±0.06
MFC(i. p.) ×1	5.778 ±0.140	0.351** ±0.023	0.573** ±0.016	0.282* ±0.016	1.694 ±0.065	0.032 ±0.001	4.96 ±0.11
×3	5.670* ±0.127	0.357** ±0.016	0.576* ±0.029	0.181 ±0.028	1.743 ±0.087	0.028 ±0.002	4.40 ±0.25
×6	5.581** ±0.075	0.303** ±0.036	0.566** ±0.007	0.123* ±0.017	1.585 ±0.255	0.024* ±0.002	4.43 ±0.33
×9	5.531 ±0.128	0.329 ±0.017	0.568 ±0.034	0.124 ±0.008	1.647 ±0.068	0.021** ±0.001	4.29 ±0.28
B. B+MFC (i. p.) ×1	6.453 ±0.354	0.449 ±0.042	0.615* ±0.020	0.318* ±0.025	1.612 ±0.029	0.033 ±0.001	4.80 ±0.28
×3	6.031 ±0.079	0.520 ±0.039	0.630 ±0.117	0.249 ±0.031	1.664 ±0.048	0.036* ±0.003	5.05 ±0.21
×6	5.981 ±0.159	0.527 ±0.036	0.714 ±0.037	0.217 ±0.010	1.641 ±0.083	0.038** ±0.002	5.15** ±0.10
×9	5.977 ±0.153	0.484 ±0.038	0.626 ±0.076	0.188 ±0.010	1.592 ±0.040	0.044** ±0.002	5.67** ±0.17

Broncasma Berna or MFC was given three times a week.

Each value represent the mean ± S. E. of 10 animals.

Significantly different from control group at *P<0.05, or **P<0.01, respectively.

Fig. 2 Effect of intraperitoneal injection of *Broncasma Berna* and MFC, or combined administration of *Broncasma Berna* and MFC on the reticuloendothelial system in mice.

○; Control, ●; B. B, ▲; B. B (×10 dil.), ×; MFC, □; B. B+MFC, △; B. B (×10 dil.)+MFC
Significantly different from the control group at *P<0.05 or **P<0.01, respectively.

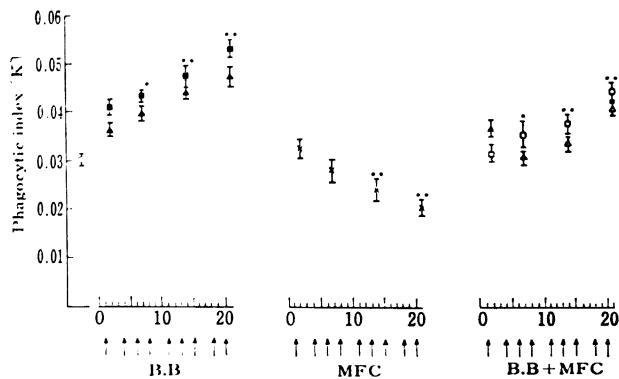
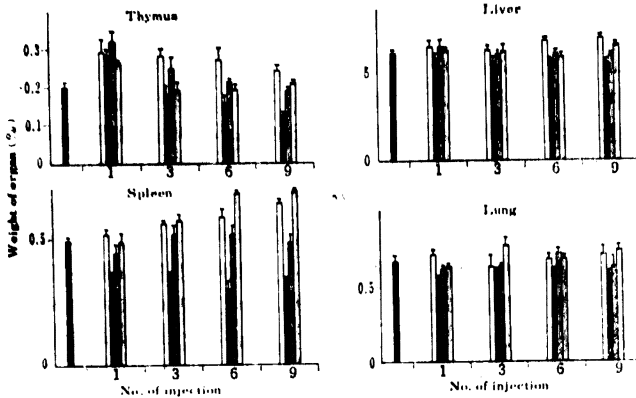


Fig. 3 Relative organ weight in mice treated with i. p. injection of *Broncasma Berna*, MFC, Zymosan, and combined treatment with *Broncasma Berna* and MFC,
 ■; Control, □; B. B(0.2 ml/mouse), ▨; MFC, ▩; B. B+MFC, ▪; Zymosan(40 mg/kg)



Broncasma Berna の併用による回復効果

MMC, 5-FU および Ara-C 3者併用, すなわち MFC の carbon clearance 値に対する影響を調べた。さらに MFC 投与による網内系機能の抑制が, B. B を併用することにより防止できるかどうか検討した。その結果を Table 1 および Fig. 2 に示した。

MFC 1回 i. p. 単独投与群では, 軽度の一時的な網内系機能の亢進が認められたが, 投与回数を3回, 6回, 9回と増加するごとに [K] 値が著しく低下し, 9回投与群では約 31% の [K] 値の低下が認められた。

さらに MFC による網内系機能の抑制を B. B と併用することにより防止できるか検討した。MFC と B. B 原液および 10 倍希釈液 1回 i. p. 併用群ではほとんど効果は認められなかったが, MFC と B. B 10 倍希釈液 3回および 6回併用群では対照群と同程度の [K] 値を示し, 9回併用投与群では MFC 単独投与群の約 2 倍の [K] 値の増加が認められた。また MFC と B. B 原液併用群ではさらに [K] 値は高くなり, 3回併用投与群では単独投与群の約 30% の [K] 値の増加となり, 9回併用投与群では 110% の著明な網内系機能の亢進が認められた。

(iii) *Broncasma Berna* の臓器重量に及ぼす影響と α -index の変動

B. B, MFC および B. B+MFC i. p. 併用群の carbon clearance 値を測定後, 各投与群の胸腺, 脾臓, 肝臓, 肺臓および腎臓を摘出し, 各臓器重量を測定し, その結果を摘出臓器重量体重比 (%) として Fig. 3 および Table 1 に示した。

腎臓の重量は, B. B, MFC, B. B+MFC 併用群およ

び Zymosan 投与群ともに有意な変化は認められなかった。しかし, 他の胸腺, 脾臓, 肝臓および肺臓重量は, 程度の差はあるが, B. B および Zymosan i. p. 投与群では有意に増加し, MFC i. p. 投与群では著しく減少した。さらに MFC による各臓器重量の減少は B. B を併用することにより正常値あるいはそれ以上に増加した。

この傾向は, 投与回数が増加とともに強化され, とくに胸腺および脾臓重量に著明に認められた。B. B を投与することにより, 胸腺重量は正常値の 1.32~1.44 倍, 脾臓重量は 1.07~1.32 倍に増加したが, MFC を投与すると胸腺は 27~38%, 脾臓は 10~40% 減少した。この減少傾向は B. B と併用することによりほぼ正常値に回復した。

Biozzi *et al.*²⁾ によると脾臓重量体重比と肝臓重量体重比は [K] 値に影響することをラットで報告している。著者らも彼らが実験的に考案した α -index を求めて, 検討を行なった。Table 1 に示したように α -index の傾向はほぼ K-index のそれと同様であり, B. B を i. p. 投与することにより対照群に比べ α -index は有意に増加し, MFC 投与によりやや減少し, さらに B. B と併用することにより α -index は正常値あるいはそれ以上に増加することが明らかとなった。

考 察

制癌剤として使われているアルキル化剤, 抗生物質, 代謝拮抗剤などは逆に免疫機能の抑制を招くといわれており, その対策として癌免疫療法の癌治療における有用性が大きくクローズアップされている。すでに臨床的にも担癌宿主の免疫機能がかなり低下することは明白な事実である。

生体内では、T細胞およびB細胞を主体としてさらに網内系細胞（マクロファージ）、骨髄系細胞（好中球、肥腫細胞）が異物摂取、排除、抗体産生機能その他の諸機能に関与していることが知られている。

OLD³⁾, BALNER⁴⁾, BIOZZI⁵⁻⁷⁾, HALPERN⁸⁾, WOODRUFF⁹⁾, 木村¹⁰⁾らは、BCG, Zymosan, *Corynebacterium parvum* および OK-432 が網内系機能を賦活することを認め、さらにこれらが癌の増殖を抑制することを発見した。一方、SOKOLOFF¹¹⁾ によるとマウス、ラットに MMC のような抗腫瘍剤を投与すると網内系機能の低下が認められるという。

すでに、著者らは8種の死菌混合液である細菌多価ワクチン B.B は、EHRlich 腹水腫瘍に抗腫瘍活性を示し、C3 補体活性化作用および肝薬物代謝酵素活性を抑制することを報告した。本実験では、B.B が網内系機能にどのような影響を及ぼすかを検討した。

B.B の投与経路に関しては、s.c. 投与群に比べて i.p. および i.n. 投与群で著明な網内系機能の亢進が認められた。これらのことから、今後 i.n. 投与による抗腫瘍効果の検討も主要課題と考えられる。また、B.B の投与回数増加に伴ってその機能も強化され、溶連菌製剤の OK-432 は s.c. 投与群に比べ i.p. および i.v. 投与群で著しく網内系活性が上昇すると報告されている¹²⁾。

木村¹⁰⁾や鈴木ら¹³⁾によると、MMC の連続投与により、網内系機能が低下するがこれは、OK-432, SSM との併用である程度防止できると報告している。

著者らは、EHRlich 腹水腫瘍に対して、B.B と各種制癌剤との併用効果を検討し、とくに B.B と MFC との併用群に著明な延命効果が得られることを報告した¹⁾。そこで、MFC の網内系に対する影響を調べたところ、MFC 1回投与後の [K] 値にほとんど認められなかったが、3回、6回、9回と投与回数増加につれ、網内系機能の抑制が顕著に発現した。しかし、MFC による網内系機能の抑制は、B.B 10倍稀釈液および原液と併用することによりかなり回復した。

現在、臨床上繁用されている MMC, 5-FU, Ara-C のような制癌剤には程度の差こそあれ、網内系機能の抑制作用があることが認められたが、本研究で B.B には制癌剤による網内系機能抑制を回復させる作用のあることが明らかとなった。鈴木ら¹³⁾によると、MMC を ICR/JCL マウス雄と ddY マウス雄に投与して carbon clearance 値を比較すると ddY マウスのほうが著明に低下することを報告している。この点から動物の種差によっても網内系機能には差異のあることが推定される。今後は、動物の選択についても考慮する必要があるよう

に思われる。

食食指数 [K] 値は、主に肝臓および脾臓の網内系細胞の異物摂取能によるものであり、肝臓および脾臓の重量で大きく左右されるため、各々の clearance 値の変動を補正し α -index を HALPERN²⁾ らは考案している。われわれも、 α -index に関して検討したところ、ほぼ K-index と同様の傾向が認められた。このことから、 α -index は異種動物間における網内系機能の比較をしていく上で重要な意味をもつように考えられた。

RIGGI¹⁴⁾ らは Zymosan を静注することより、肝臓、腎臓重量はほとんど変化が認められないが、脾臓および肺臓の相対重量が増加したと報告している。また、OLD³⁾, HALPERN⁸⁾, SCOTT¹⁵⁾ は *Corynebacterium parvum* の網内系の賦活作用は、肝臓と脾臓の相対重量が増加することに関係があると報告している。

著者らも、B.B および MFC の i.p. 投与後の臓器重量について検討を加えたところ、いずれの投与群とも腎臓にはほとんど変化は認められなかったが、胸腺、脾臓、肝臓および肺臓の各重量は B.B 単独投与で有意に増加した。また、MFC 投与群による各臓器重量の減少は B.B と併用することにより防止された。とくに、リンパ球や血漿細胞中に分化されるマクロファージや他の単核球細胞の増生器官である肝臓や脾臓の臓器重量が B.B 投与により増加したこと、免疫系のセンターともいべき生体臓器である胸腺および脾臓の重量も著明に増加したことが注目された。B.B の投与により胸腺および脾臓における網内系機能が賦活され、食食指数 [K] 値と訂正食食指数 [α] 値の有意な増加が認められたことは、これらの作用が本剤の抗腫瘍作用機作に1つの役割を演じていることが示唆される。

文 献

- 1) 伊藤 均, 志村圭志郎, 杉沢 裕子: *Broncasma Berna* の抗腫瘍性に関する研究。癌と化学療法 7: 473~480, 1980
- 2) BIOZZI, G.; B. BENACERRAF & B. N. HALPERN: Quantitative study of the granuloplectic activity of the reticuloendothelial system. II: A study of the kinetics of the granuloplectic activity of the R. E. S. In relation to the dose of carbon injected. Relationship between the weight of the organs and their activity. Brit J. Exp. Path. 34: 441~457, 1953
- 3) OLD, L. J.; B. BENACERRAF, D. A. CLARKE, E. A. CARSWELL & E. STOCKERT: The role of the reticuloendothelial system in the host reaction to neoplasia. Cancer Res. 21: 1281~1300, 1961
- 4) BALNER, H.; L. J. OLD & D. A. CLARKE: Accelerated rejection of male skin isografts by

- female C57BL mice infected with *Bacillus Calmette-Guérin* (B. C. G.). Proc. Soc. Exper. Med. Biol. 109 : 58~62, 1961
- 5) BIOZZI, G.; C. STIFFEL, B. N. HALPERN & D. MOUTON : Etude de la fonction métabolique des cellules de Kupffer. Rev. Fr. Clin. Biol. 4(4) : 427~441, 1959
 - 6) BIOZZI, G.; J. HOWARD, D. MOUTON & C. STIFFEL : Modification of graft-versus host reaction induced by pretreatment of the host with *M. tuberculosis* and *C. parvum*. Transplantation 3 : 170~177, 1965
 - 7) HOWARD, J.; G. BIOZZI, C. STIFFEL, D. MOUTON & P. LIACOPOULOS : An analysis of the inhibitory effects of *Corynebacterium parvum* of graft-versus-host reaction. Transplantation 5 : 1510~1524, 1967
 - 8) HALPERN, B. N.; A. R. PREVOT, G. BIOZZI, C. STIFFEL, D. MOUTON, J. C. MORARD, Y. BOUTHILLIER & C. DECREUSEFOND : Stimulation de l'activité phagocytaire du système réticuloendothélial provoquée par *Corynebacterium parvum*. J. Reticuloendoth. Sco. 1 : 77~96, 1964
 - 9) WOODRUFF, M. & J. BOAK : Inhibitory effect of injection of *Corynebacterium parvum* on the growth of tumor transplants in isogenic hosts, Brit. J. Cancer 20 : 345~355, 1966
 - 10) 木村郁郎 : 抗癌剤と海連菌製剤の併用。最新医学 28 : 941~951, 1973
 - 11) SOKOLOFF, B.; Y. TODA, M. FUJISAWA, K. ENOMOTO, C. C. SAELHOF, L. BIRD & C. MILLER : Experimental studies on Mitomycin C. 4, Zymosan and the R. E. S. Growth 25 : 249~263, 1961
 - 12) 大石隆夫, 高垣善男 : ピンパニールの細網内皮系活性に及ぼす影響について。ピンパニール文献集 (第1集) 110~112, 1976
 - 13) 鈴木伊豆美, 奥田真弓, 松村教子, 欄田秀雄 : 人型結核菌体抽出物質 (SSM) の網内系機能に及ぼす効果。第1報 ICR/JCL マウスを中心とした Carbon clearance について。応用薬理 14 (3) : 363~367, 1977
 - 14) RIGGI, S. J. & N. R. DI LUZIO : Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan. Am. J. Physiol. 200 : 297~300, 1961
 - 15) SCOTT, M, T. : Biological effects of adjuvant *Corynebacterium parvum*. II. Evidence for macrophage-T-cell interaction. Cell. Immuno. 5 : 469~479, 1972

ACTIVATION OF RETICULOENDOTHELIAL SYSTEM BY *BRONCASMA BERNA*, WITH SPECIAL REFERENCE TO COMBINATION EFFECT WITH MFC THERAPY

HITOSHI ITO and HIROKO SUGISAWA

Department of Pharmacology, Mie University School of Medicine

KEISHIRO SHIMURA

Institute of Laboratory Animals, Mie University School of Medicine

Broncasma Berna (B.B) prepared from multivalent killed bacterial preparation demonstrated previously a growth-inhibiting effect against EHRLICH ascites carcinoma in mice. Its antitumor potency was enhanced, under certain circumstances, in combination with mitomycin C, cytosine arabinoside, cyclophosphamide and 5-fluorouracil.

In this work the effects of B.B, zymosan, MFC (combined administration of mitomycin C, 5-fluorouracil and cytosine arabinoside) and B.B with MFC on the phagocytic function of the reticuloendothelial system (RES) of ICR mice were investigated. The function of the RES was estimated by measuring the rate of clearance of colloidal carbon particles from systemic blood according to the method of BIOZZI G. *et al.*

Either a single or multiple administration of B.B, made intraperitoneally, subcutaneously or intranasally, markedly increased the mean value of phagocytic indexes. The phagocytic index level of the intranasal administration group was nearly equal to that of the zymosan-treated group. Zymosan is a well-known RES stimulant. The corrected phagocytic index was also enhanced markedly in the B.B-treated groups.

The phagocytic index of MFC-treated group varied with the dose; it decreased apparently with the number of injection. The combined administration of B.B and MFC increased the phagocytic index to a higher level than that of the mice receiving only MFC.

Furthermore, the weight of thymus and spleen was by the administration of B.B changed significantly as compared with the control ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

In conclusion, it was clearly shown that the phagocytic function of the RES was stimulated in ICR mice by the administration of B.B alone or in combination with MFC under certain conditions.