

## クロレラ由来酸性多糖, クロン A

## 2. 制癌活性および免疫賦活化作用

小宮山寛機・広川弓子・諸田 隆・梅沢 巖

北里研究所

(昭和60年11月28日受付)

クロレラピレノイドーサより抽出, 精製した酸性多糖体クロンAの制癌活性および免疫賦活化作用についてマウスを用い検討した。クロンAは Sarcoma 180 担癌マウスに対し広い薬量範囲で延命効果を示した。また, Syngeneic な腫瘍である IMC carcinoma, Meth-A fibrosarcoma, B-16 melanoma, Lewis lung carcinoma に対しても ip 投与で効果が認められ, さらに Meth-A 細胞とクロンAを混合し皮下に移植した場合には著しい増殖抑制がみられた。

次いでクロンAを投与して宿主の反応を調べたところ, マクロファージの腫瘍細胞に対する殺細胞活性を増強しリンパ球の幼若化および網内系機能の亢進作用が観察された。また, クロンAを投与されたマウスの血清中に LA (セルロプラスミン) あるいは LB (ヘモペキシン) 様物質の産生がみられた。

これら結果からクロンAは生体の免疫を賦活化して制癌活性を表わすものと思われる。

先にわれわれはラムノースを主成分とするクロレラ由来酸性多糖クロンAを分離し, その物性を明らかにするとともにインターフェロン誘起能, ウイルス感染防御作用, Ehrlich 腹水癌に対する効果などを報告した<sup>1)</sup>。その後さらにクロンAの生物学的性質について研究したところ, 各種マウス腫瘍に対し制癌活性が認められ, 本作用が宿主介在性作用であることを明らかにしたので報告する。

## I. 実験方法

## 1. 薬剤

クロンAは先に述べた方法<sup>1)</sup>により乾燥クロレラより熱水抽出し, メタノール沈殿, DEAE セルロース, DEAE セフアーセル, セファデックス G 75 カラムなどを用いて精製した。使用に際し, 生理食塩水にて溶解希釈して用いた。

## 2. マウス可移植性腫瘍に対する効果

Table 1 に用いた腫瘍の種類, 動物種, 移植細胞数, 移植場所, 投与経路について示した。使用したマウスはすべて静岡県実験動物農業協同組合より購入した。Sarcoma 180, IMC carcinoma, Meth-A fibrosarcoma および P 388 leukemia は腹水型で継代されたもの, B16 melanoma および Lewis lung carcinoma は皮下固型で継代されたものをそれぞれ用いた。各腫瘍細胞をマウスに移植した日を Day 0 とし, 連日 (Days 1~5, 7~11 の 10 日間) または間歇投与 (Days 1, 3, 5, 7, 9) を行なった。投与量および経路はクロンA 1.56~100 mg/kg/day を腹水型腫瘍には毎日 ip 投与, 固型腫瘍には iv に間歇投与した。

混合移植の場合は Minimum essential medium (MEM) 培地で溶解し試験管内で Meth-A fibrosarcoma 細胞とクロンAを 30 分間 37°C に静置した後, BALB/c マウスに  $1 \times 10^6$  個 sc に移植した。

効果の判定は, 腹水腫瘍の場合は宿主の延命日数を調

Table 1 Tumor used in this experiment

Tumor	Animal	Inoculum size (cells/mouse)	Inoculum site
Sarcoma 180	ICR 6w female	$1 \times 10^6$	ip or sc
IMC carcinoma	CDF <sub>1</sub> 6w female	$1 \times 10^6$	ip
Meth-A fibrosarcoma	BALB/c 6w female	$1 \times 10^6$	ip or sc
B16 melanoma	C <sub>57</sub> BL 6w female	$1 \times 10^6$	ip
Lewis lung carcinoma	C <sub>57</sub> BL 6w female	$1 \times 10^6$	ip
P 388 leukemia	CDF <sub>1</sub> 6w female	$1 \times 10^5$	ip

べ延命率 Increase in life span (ILS) を算出し、固型腫瘍の場合は腫瘍の大きさをノギスにて短径と長径を計測し腫瘍増殖抑制率を算出した。

### 3. 宿主の免疫能に関する作用

#### (1) マクロファージに対する作用

##### 1) Cytostatic activity

ddY6 週齢雌マウスにクロンAを25および100 mg/kg ip 投与し、4日後に腹腔浸出細胞 (PEC) を Hank's 液を用いて採取し、同液で2回洗浄後、10% FCS を含む RPMI-1640 に懸濁し  $2.5 \times 10^6$  個/ml に調製し、これを96穴マイクロプレートに0.2 ml 各群3 well 宛播き  $37^\circ\text{C}$  1時間5%  $\text{CO}_2$  で静置させた。次いで上清を捨て注射器にてRPMI-1640培地を噴射させ、非付着細胞を3回洗い流し、これにマウス癌細胞 (EL-4) 浮遊液 0.2 ml ( $2 \times 10^4$  個) を加え、 $37^\circ\text{C}$  で3日間培養し、培養終了5時間前に  $^3\text{H}$ -TdR (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) を加えた。これを Cell harvester にてガラス濾紙上に集め、冷

5% TCA で洗浄し細胞中に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定し、 $^3\text{H}$ -TdR の細胞内取り込み量を調べた。

##### 2) Cytolytic activity

Cytostatic activity 測定の場合と同様にして得た PEC の Cytolytic activity を主として橋本らの方法<sup>2)</sup>に準じて調べた。あらかじめ  $^3\text{H}$ -uridine を取り込ませた EL-4 細胞と PEC を  $37^\circ\text{C}$  で16時間作用させ残存細胞の放射活性を Cytostatic activity と同様に測定した。

##### (2) 脾細胞に対する作用

ddY マウスを放射致死させ脾臓を摘出後、ステンレスメッシュを用いて単細胞とした後  $2.5 \times 10^5$  個/ml の割合で RPMI-1640 培地 (10% Fetal calf serum 添加) に浮遊させた。次いで96穴マイクロプレートに0.2 ml 宛播いた。

次いでクロンAを添加し  $37^\circ\text{C}$  72時間培養後  $^3\text{H}$ -TdR を加えてさらに  $37^\circ\text{C}$  5時間培養し、これを Cell

Table 2 Antitumor activity of Chlon A on Sarcoma 180 and Meth-A fibrosarcoma (ip-ip)

Sample	Total dose (mg/kg)	Sarcoma 180		Meth-A fibrosarcoma	
		MSD (range)	ILS (%)	MSD (range)	ILS (%)
Saline	—	13.9 (11~18)	— (0)	13.3 (13~14)	— (0)
Zyosan	20×10	20.3 (13~34)	46 (1)	15.4** (15~16)	15.8 (0)
	5×10	17.1* (15~22)	23 (0)	15.6** (14~17)	17.3 (0)
Chlon A	100×10	22.9** (10~43)	64.7 (0)	17.8** (16~19)	33.8 (1)
	25×10	31** (15~41)	123 (2)	20** (17~25)	50.4 (0)
	6.25×10	49.5** (39~54)	256 (1)	20** (15~27)	50.4 (0)
	1.56×10	26.3** (12~57)	89 (1)	15.6 (12~17)	17.3 (0)

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

Mice were given with Chlon A from days 1 to 5 and 7 to 11.

Numbers in parenthesis indicate number of cured mice/7 treated mice. Cured mice were excluded from the calculation of ILS (%).

Zyosan was purchased from SIGMA chemical company (ST. Louis, USA).

Table 3 Antitumor activity of Chlon A on IMC carcinoma, P388 leukemia, Lewis lung carcinoma and B-16 melanoma (ip-ip)

Sample	Total dose (mg/kg)	IMC carcinoma		P388 leukemia		Lewis lung carcinoma		B-16 melanoma	
		MSD (range)	ILS (%)	MSD (range)	ILS (%)	MSD (range)	ILS (%)	MSD (range)	ILS (%)
Saline	—	14.8 (14~16)	—	12	—	18.2 (10~22)	—	16.2 (14~18)	—
Chlon A	100×10	21.4** (20~23)	44.6	11	-8.3	25.8* (22~30)	41.8	24** (20~31)	48.1
	25×10	21.6** (20~25)	45.9	12.2 (11~13)	1.7	21.8 (15~27)	19.8	21.4** (18~24)	32.1
	6.25×10	22.4** (20~23)	51.4	11	-8.3	23.8 (21~27)	30.5	23** (19~26)	42
	1.56×10	20.6** (20~23)	39.2	11.2 (11~12)	-6.7	20.6 (17~23)	13.2	23.6* (19~31)	45.7

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

Mice were given with Chlon A from days 1 to 5 and 7 to 11.

harvesterにてガラス濾紙上に取り水洗乾燥後液体シンチレーションカウンターにて脾細胞に取り込まれた<sup>3</sup>H-TdRの放射能を測定し、脾細胞の幼若化を判定した。

(3) 網内系機能に対する作用

ddYマウス(6w♂)にクロンAを2日間iv投与し、3日目にカーボン液(Pelikan "Fount India"を生理食塩水で5倍に希釈した液)を0.25 ml iv注射し、経時的に眼窩静脈より0.025 ml採血した。この血液を3.5 mlの0.01 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>溶液に懸濁させ、650 nmの吸光度を測定することにより血中カーボン濃度を調べ網内系細胞のカーボン粒子摂取能をHALPERNらの式<sup>3)</sup>より求めた食食指数により判定した。

$$C = C_0 10^{-kt}$$

k: 食食指数

C: t時の墨汁粒子血中濃度

C<sub>0</sub>: 注射時の墨汁粒子血中濃度

(4) 血清画分

ddY(6w♀)のivにクロンAを投与し3, 5, 7, 9日後に採血し血清をポリアクリルアミドクレディエントゲル電気泳動で画分した。

II. 結 果

(1) 抗癌作用

クロンAの抗癌作用をマウス腫瘍を用いて調べた。Table 2 および Table 3 に示すように、腹水腫瘍群ではSarcoma 180 に対し最も優れた効果を示し、6.3 mg/kg 10日間投与でILS 256%であった。次いでsyngeneicな腫瘍であるIMC carcinoma, Meth-A fibrosarcoma

Table 4 *In vivo* growth of Meth-A cells mixed with Chlon A

Dose (mg/kg)	Tumor size (mm <sup>2</sup> )			
	Days 7	14	21	27
Saline	68.4	234.4	510	686.6
200	±**	24.6** (90)	84.3** (83)	175.6** (74.4)
40	5.7** (91.7)	47.6** (79.7)	159** (69)	331** (51.8)
8	14.57** (78.7)	75.3** (67.9)	208.4** (59)	445.1** (35.2)
1.6	32.7** (62.2)	124.1** (47.1)	382.7* (25)	631.8 (8)

\* P<0.05    \*\* P<0.01  
Numbers in parenthesis indicate percent inhibition of tumor growth.

Meth-A cells suspended in minimum essential medium were admixed with Chlon A *in vitro*, and incubated for 30 minutes at 37°C. After incubation, tumor cells were inoculated subcutaneously into BALB/c mice, and tumor growth was measured periodically by calipers.

などにも約50%前後のILSが認められた。皮下移植したSarcoma 180 固型腫瘍に対する作用を調べるために移植後ivより間歇投与してその後の腫瘍の増殖度を観察した。その結果、移植後14~20日頃まではおおむね増殖は抑制されているが、その後、抑制が持続する例と腫瘍が急速に増殖してくる例とに分けられた(Fig. 1)。

Meth-A とクロンAをあらかじめ*in vitro*で混合して皮下に移植した場合、移植後14日目ではクロンA 200 mg/kgで増殖抑制率90%を示し著しい増殖抑制効

Fig. 1 Antitumor activity of Chlon A on Sarcoma 180 solid tumors. Mice were given Chlon A iv on days 1, 3, 5, 7 and 9. Broken line indicates mean tumor size of control.

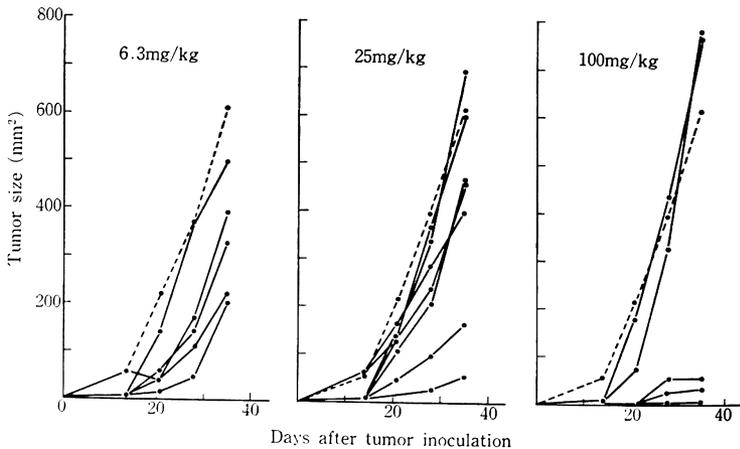


Fig. 2 Effect of Chlon A on the cytolytic activity of peritoneal exudate cells.

Adherent peritoneal exudate cells (PEC) of ddY mice were collected on day 1 or 4 after injection of Chlon A and were mixed with EL-4 cells previously labeled with  $^3\text{H}$ -uridine. After incubation for 16 hours, the radioactivity of EL-4 cells was measured.  $(1-T/C) \times 100$  (%). The mean radioactivity of the control group was 5,931 cpm.

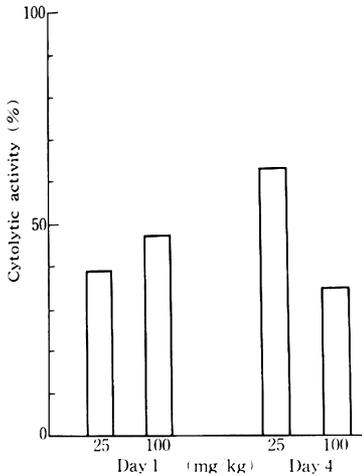


Table 5 Lymphoproliferative effect of Chlon A

Sample	Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$^3\text{H}$ -TdR count (cpm)	Stimulation index
Saline	—	902.3	1
Con A	5	14,988.2	16.6
	1	83,046.5	92.0
LPS	50	18,097.2	20.0
	12.5	22,856.9	25.3
Chlon A	1,000	22,208.5	24.6
	250	17,534.4	19.4
	62.5	7,992.7	8.9
	15.6	5,761.5	6.4
	3.9	3,456.7	3.8

Spleen cells from normal mice were mixed with Chlon A, incubated for 72 hours at  $37^\circ\text{C}$ , and the uptake of  $^3\text{H}$ -TdR into spleen cells was measured.

果がみられた (Table 4)。

#### (2) マクロファージに対する作用

正常マウスにクロンAを ip 投与し、1日または4日後に腹腔より得たマクロファージの腫瘍細胞に対する細胞障害作用を調べた。その結果、Cytolytic activity では

Fig. 3 Effect of Chlon A on the cytostatic activity of peritoneal exudate cells.

Adherent peritoneal exudate cells (PEC) of ddY mice were collected on day 1 or 4 after injection of Chlon A. Then  $^3\text{H}$ -TdR ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was added to the cell mixture, and incubation was further continued for 5 hours. The uptake of  $^3\text{H}$ -TdR into EL-4 cells was measured.  $(1-T/C) \times 100$  (%). The mean radioactivity of the control group was 6,332 cpm.

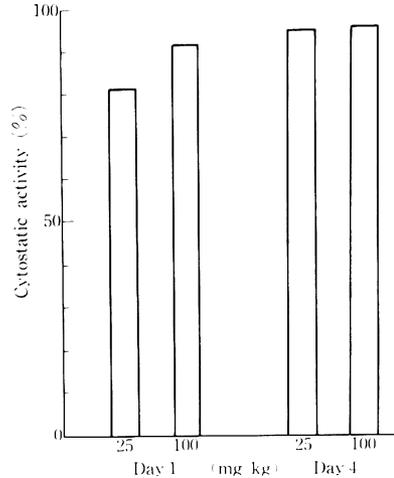


Table 6 Carbon clearance in mice treated with Chlon A

Total dose (mg/kg)	Phagocytic index ( $k$ )	Spleen weight (mg)	Liver weight (g)
—	0.0079	113 $\pm$ 21	1.495 $\pm$ 0.09
100	0.0086 $\pm$ 0.002	197 $\pm$ 27	1.478 $\pm$ 0.07
25	0.0105 $\pm$ 0.001	205 $\pm$ 22	1.420 $\pm$ 0.08
6.25	0.0113* $\pm$ 0.001	185 $\pm$ 24	1.580 $\pm$ 0.1

\*  $P < 0.1$

Normal ddY mice received Chlon A (once a day for 2 days, iv). On day 3, mice were injected iv with India ink (Pelican Fount India) and blood was withdrawn periodically from the retro-orbital plexus. Phagocytic activity was measured by the method of HALPERN<sup>31</sup>.

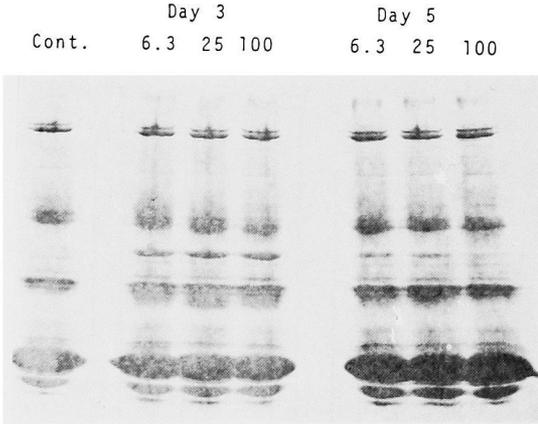
いずれの場合にも活性がみられたが特に 25 mg/kg 投与後 4 日目で 60% 以上の細胞破壊効果が認められた (Fig. 2)。Cytostatic activity ではいずれの場合にも 80~100% の増殖抑制効果が認められた。(Fig. 3)

#### (3) リンパ球の幼若化

リンパ球の幼若化を調べるためにマウス脾細胞を調製し、これにクロンAを加えて3日間培養し  $^3\text{H}$ -TdR の取り込みを調べた。その結果、クロンA 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度では無添加群の 24 倍の  $^3\text{H}$ -TdR の取り込みがみられ、LPS 12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  とほぼ同程度の幼若化率であっ

Fig. 4 Effect of Chlon A on the electrophoretic pattern of mouse serum.

Chlon A was injected iv into normal ddY mice on day 0, and sera were obtained on days 3, 5, 7, and 9. Sera were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis on gradient gel. After electrophoresis, the gel was stained with 15 Amidoblack 10B solution.



Gel: 4- 30% gradient (polyacryl amide)  
Buffer: 0.025 M Tris-0.19 M glycine  
10 mA, 17 hrs.

た。またこの幼若化はクロンAの濃度に依存しており3.9  $\mu\text{g}/\text{ml}$  でも3.8倍の増加がみられた (Table 5)。

#### (4) カーボンクリアランス

網内系機能に対するクロンAの作用を調べるために、クロンAで処置されたマウスにカーボン液を注射し経時的に血中よりのカーボンの消失度合を調べた。その結果、Table 6 に示すように食食指数  $k$  値は対照群では0.0079, 6.25 mg/kg 投与群で0.0113, 次いで25および100 mg/kg 投与群であり、クロンAを投与することにより網内系機能の亢進する傾向がみられた。

#### (5) 血清画分

クロンAを投与されたマウスの血清画分をポリアクリルアミド電気泳動で調べたところ、Fig. 4 に示すように投与3日目より分子量約14万の画分、およびトランスフェリンと思われる画分近くに2種類の成分が見られた。これら成分は投与後3日目が顕著であったが9日後でも観察された。

### III. 考 察

クロレラ由来酸性多糖クロンAのマウス腫瘍に対する効果を調べたところ、種々の腫瘍に対し優れた制癌活性が認められた。制癌活性の特徴としては明確な薬量相関が認められず効果を表わす範囲は比較的広い。

クロンAは *in vitro* で各種細胞に作用させても殺細胞作用を示さないことから宿主介入性の制癌作用と考えられる。事実、先の論文<sup>1)</sup>で述べたようにクロンAはIFN誘起能を有し、また本研究で示したようにマクロファージの細胞障害作用および網内系機能を亢進させ、さらには顕著なリンパ球の幼若化を引き起こした。

一方、クロンAを投与されたマウスの血清画分にある種の成分の出現が見られた。これは画分の位置から推察するとレンチナン、TC-13, LPS, OK-432 を投与された動物の血清中で観察されている<sup>4-6)</sup>  $L_B$  あるいは  $L_A$  と名付けられたマクロファージ細胞障害作用を増強させるヘモペキシン<sup>7,8)</sup> または、腫瘍増殖抑制作用のあるセロプラスミン<sup>9)</sup> であることが考えられる。

既知多糖類で制癌活性が報告されている例は多いが、それらの中で Lentinan および TC-13 にリンパ球の幼若化、あるいはカーボンクリアランスの賦活化作用はほとんど認められていない<sup>5,10)</sup> のでクロンAの作用はこれら物質とはやや異なっていると思われる。特にリンパ球の幼若化が顕著であることが注目されるが、この作用が制癌活性にどの程度関与しているかは現在のところ不明である。

クロレラ抽出物の制癌活性については以前より種々報告されてきているが<sup>11-15)</sup>、いずれの場合も糖、蛋白質、核酸などより成る粗抽出物で物性として明らかにされている報告はほとんど見られない。先に報告したようにクロンAはラムノースを主成分とした酸性の多糖体であり、酸性多糖は多彩な生理作用を有していることからクロレラの示す生理作用にはクロンAが大きく関与していると思われる。

稿を終るに臨み血清のポリアクリルアミド電気泳動を行っていただいた北里研究所、東洋医学研究所の山田陽城博士に感謝いたします。

### 文 献

- 1) 梅沢 巖, 小宮山寛機, 渋川信之, 森 緑, 小島保彦: クロレラ由来酸性多糖, クロンA 1. 物理化学的および生物学的性質. *Chemotherapy* 30: 1041~1046, 1982
- 2) 橋本嘉幸, 北川恒代: <sup>3</sup>H-ウリジン法による試験管内細胞性免疫反応の定量化. 免疫実験操作法A (日本免疫学会), 352~359, 1975
- 3) BIOZZI, G.; B. BENACERRAF & B. N. HALPERN: Quantitative study of the granulopoietic activity of the reticuloendothelial system. II: A study of the kinetics of the granulopoietic 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

- 4) YUKIKO, Y. MAEDA ; G. CHIHARA & K. ISHIMURA : Unique increase of serum proteins and action of antitumor polysaccharides. *Nature* 252 : 250~251, 1974
- 5) KOHNO, M.; S. ABE, H. NAKAJIMA, M. YAMAZAKI & D. MIZUNO : Comparative studies on immunological properties of antitumor polysaccharide TC-13. *Gann* 73 : 618~629, 1982
- 6) TORIKAI, T.; O. ITOH, S. TOYOSHIMA & T. OSAWA : Purification and biological activities of a mouse serum protein increased by administration of streptococcal preparation, OK-432. *Gann* 69 : 657~666, 1978
- 7) TORIKAI, T.; O. ITOH, M. SATO & T. OSAWA : Enhancement of macrophage tumoricidal activity by a serum glycoprotein that increased in OK-432-treated mice. *Gann* 71 : 52~59, 1980
- 8) TORIKAI, T.; O. ITOH, M. SATO, O. OKUMURA & T. OSAWA : Identification of a serum glycoprotein that increased in OK-432-treated mice as hemopexin. *Gann* 72 : 92~97, 1981
- 9) ITOH, O.; T. TORIKAI, M. SATO & T. OSAWA : Purification and characterization of a mouse serum glycoprotein increased in level by administration of an antitumor polysaccharide, lentinan. *Gann* 71 : 644~650, 1980
- 10) YUKIKO, Y. MAEDA & G. CHIHARA : The effect of neonatal thymectomy on the antitumor activity of Lentinan. Carboxymethyl Pachyman and zymosan, and their effects of various immune responses. *Int. J. Cancer* 11 : 153~161, 1973
- 11) 猪野 茂 : クロレラ多糖体の生物学的意義に関する研究。I. 予報, 福島県衛生研究所年報 16 : 1~4, 1968
- 12) VERMELL, C. & O. MORIN : Role expérimental des algues unicellulaires prototheca et Chlorella (Chlorellaceae) dans l'immunogénèse anticancéreuse (sarcome murin BP 8). *C. R. Soc. Biol.* 170 : 646~649, 1976
- 13) NEVEU, P. J.; O. MORIN, M. MIEGEVILLE, B. P. LEMEVEL & C. VERMEIL : Modulation of antibody synthesis by an antitumor alga. *Experientia* 34 : 1644~1645, 1978
- 14) 野本康二, 横倉輝男, 佐藤 博, 務台方彦 : クロレラ抽出物, PCM-4, の経口投与による抗腫瘍効果。癌と化学療法 10(3) : 781~785, 1983
- 15) TANAKA, K.; F. KONISHI, K. HIMENO, K. TANIGUCHI & K. NOMOTO : Augmentation of antitumor resistance by a strain of unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*. *Cancer Immunol. Immunother.* 17 : 90~94, 1984

## AN ACIDIC POLYSACCHARIDE CHLON A, FROM *CHLORELLA PYRENOIDOSA*

### 2. ANTITUMOR ACTIVITY AND IMMUNOLOGICAL RESPONSE

KANKI KOMIYAMA, YUMIKO HIROKAWA, TAKASHI MOROTA  
and IWAO UMEZAWA  
The Kitasato Institute

Chlon A, an acidic polysaccharide purified from the hot water extract of *Chlorella pyrenoidosa*, possessed antitumor activity against transplantable murine tumors *in vivo*. In allogeneic systems, Chlon A showed remarkable life prolongation effects in mice bearing Sarcoma 180 with a broad optimal dose range. Chlon A was also active in syngeneic systems such as IMC carcinoma, Meth-A fibrosarcoma, B16 melanoma and Lewis lung carcinoma growing in the intraperitoneal cavity. When Meth-A cells were admixed with Chlon A and inoculated *sc*, remarkable growth inhibition of tumor cells was observed. Chlon A enhanced cytotoxicity of mice macrophages for EL-4 tumor cells *in vivo*, lymphoproliferative effects *in vitro*, and carbon clearance activity (reticuloendothelial system) *in vivo*. The electrophoretic pattern showed that L<sub>A</sub> (ceruloplasmin) and/or L<sub>B</sub> (hemopexin)-like components rapidly appeared in serum proteins of mice receiving Chlon A. These findings indicate that Chlon A is a potent modifier of some biological responses.