

骨髄抑制に対する OK-432 の効果

鶴 身 孝 文

岡山大学第一外科

(指導：岡山大学第一外科 折田薫三教授)

(昭和 62 年 6 月 8 日受付)

Mitomycin C (MMC) 投与によるマウス骨髄細胞機能の抑制に対する OK-432 単独ならびに OK-432 と骨髄移植 (BMT) の併用効果を, CFU-C, CFU-S, CFU-F を用いて検討した。MMC による CFU-C, CFU-S ならびに CFU-F の抑制効果は MMC 投与後の OK-432 1 回投与により回復したが, MMC 投与前の 1 回投与によっては回復しなかった。また血中白血球数も MMC 投与後に OK-432 を投与することによりほとんど減少しなかった。OK-432 を 5 回に分け 1 回量と同量を MMC 投与後に投与したところ, 1 回投与の場合よりも更に強力な CFU-C の回復効果が認められた。次に BMT によっても MMC による CFU-C の抑制は回復したが, OK-432 と BMT の併用による回復効果は OK-432, BMT 各々単独の場合より優れていた。次に MMC と OK-432 の併用による抗腫瘍効果を調べたところ, MMC, OK-432 単独によるものよりも更に増強された。

以上の成績により OK-432 の投与により MMC の骨髄抑制効果は軽減され, 更に抗腫瘍効果は増強された。このことは MMC 投与においては, その副作用の軽減, 更に抗腫瘍効果の増強を目的として MMC 投与後に OK-432 を投与するのが最良の方法と考えられた。更に, BMT と OK-432 の併用によっては, BMT の効果を OK-432 が増強することから, 移植された bone marrow cell に対しても OK-432 が影響を及ぼすことが示唆された。

薬剤性造血障害の発生機序には, 薬剤の細胞毒性による場合と免疫学的機序を介する場合とが知られている。特に MMC などの化学療法剤投与による白血球系の障害は, 二次的に host の免疫能の低下をきたし, 細菌やウイルスの感染を誘導しやすい。このように, 無顆粒球症を誘導する薬剤の同定は, 治療上重要な課題であり, これまで種々の方法で検討されてきたが, なかでも骨髄コロニー法の適応は起因薬剤の同定だけでなく, 発生機序の推察も可能な点で評価されている。一方, OK-432 は生体防御の主な担い手であるマクロファージ, NK 細胞, 細胞性免疫の機能を活性化させて抗腫瘍効果を発揮するものであり, 基本的には抗腫瘍性化学療法剤とは相反するものである。しかし, 両者の組み合わせを選択し, 投与方法を適切に選ぶと化学療法剤の副作用軽減, 抗腫瘍効果の増強が得られる可能性が大きい。

そこで今回, 我々は MMC と OK-432 を用いて MMC の骨髄抑制効果に及ぼす OK-432 の効果を調べ, 合わせて両者併用による抗腫瘍効果の増強についても検討を加えた。

I. 実験材料ならびに方法

実験動物：実験動物としては静岡実験動物(株)より購

入した 6~9 週齢の C_57H/He 雄性マウスを使用した。

骨髄細胞の調整：マウス大腿骨の両端を切除し, McCoy's 5a medium を用いて骨髄腔内を洗浄することにより, 骨髄細胞を採取した。これを McCoy's 5a medium で更に 2 回洗浄した後 10% fetal calf serum (FCS) を含む McCoy's 5a medium で 5×10^5 cells/ml に調整した。

全身 X 線照射：東芝 KXC-18 を用いて距離 50 cm, 180 kVp, 25 mA, 50 R/min, フィルター 0.5 Cu+0.5 Al の条件で 900 R 照射した。

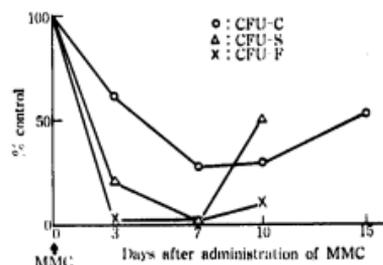
Condition medium の調整：10% FCS を含む McCoy's 5a medium を用いて C_57H/He 由来の L 細胞を 5×10^4 cells/ml に調整し, 10 ml を T 字管で 37°C, 1 週間培養した。次にその上澄を採取し, 2,000 rpm, 10 分遠沈後 0.45 のミリポアフィルターを通し, condition medium として使用した。

[Colony assay]

1. CFU-C

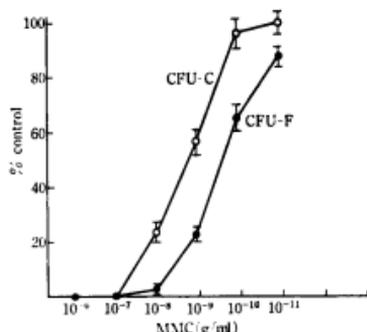
ROBINSON らの軟寒天層法に準じて行なった。すなわち軟寒天層法は, 5×10^5 cells/ml の骨髄細胞 0.1 ml, FCS 0.1 ml, condition medium 0.2 ml, 10%

Fig. 1 The effect of MMC on the CFU-C, CFU-F and CFU-S in mice



MMC was administered at 4 mg/kg ip on day 0 to mice. Saline was administered to control mice.

Fig. 2 The effect of MMC on CFU-C and CFU-F *in vitro*



% CFU-C and % CFU-F were values to the respective controls (100%). Medium alone was added to control tubes.

Agar 0.1 ml to McCoy's 5a medium 0.5 ml を混合し, Falcon 3001 dish で 37°C, 5% CO₂ の条件で 7 日間培養した後, 倒立顕微鏡下で colony を測定した。なお 1 colony は細胞 50 個以上の集団とした。

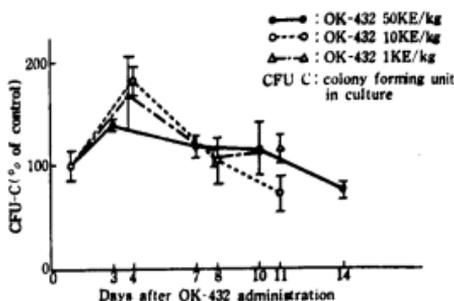
2. CFU-F

1 × 10⁷ cells の骨髓細胞を Falcon plastics tissue culture flask 3013 を用いて 10 ml の Fischer's medium (penicillin 500 V/ml, streptomycin 50 7/ml, horse serum 20%) で 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。培養 7 日目に約半量の medium を flesh な medium と交換し, 更に 7 日間培養した後, culture flask に付着した細胞を methanol で固定, Wright Giemsa 染色を行なって ×15 の倍率で colony 数を測定した。

3. CFU-S

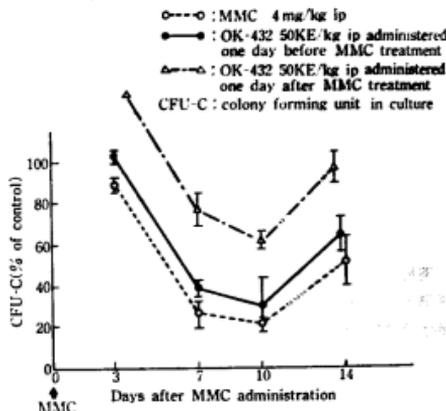
C₂H/He マウスに 900 R の全身 X 線照射を行なった後, 直ちに同系マウス骨髓細胞 10⁶ cells を尾静脈内に注

Fig. 3 The effect of OK-432 on CFU-C in mice



OK-432 was ip injected on day 0 to mice. Saline was administered to control mice.

Fig. 4 The protective effect of OK-432 on the suppression of CFU-C by MMC in mice



入した。10~14 日目に脾を摘出し, プラン液で固定後, 脾の colony 数を肉眼で測定した。

4. 骨髓細胞移植

MMC 4 mg/kg ip 投与翌日に C₂H/He マウス尾静脈より C₂H/He マウスの骨髓細胞 5 × 10⁶ cells/animal を投与した。

5. 抗腫瘍効果の測定

BALB/c マウス 1 群 10 匹に同系腫瘍細胞である Meth A 肉腫を 5 × 10⁶ cells/mouse 移植した後 7 日目より薬物を投与した。移植後 7, 8, 14, 15 日目に MMC 2 mg/kg iv, 9, 16 日目には OK-432 を ip 投与した。なお, control 群には saline を iv 投与したのを用いた。

II. 実験成績

1. MMC 投与による CFU-C, CFU-F ならびに

Fig. 5 The effect of OK-432 on the suppression of total CFU-C per femur by MMC in mice

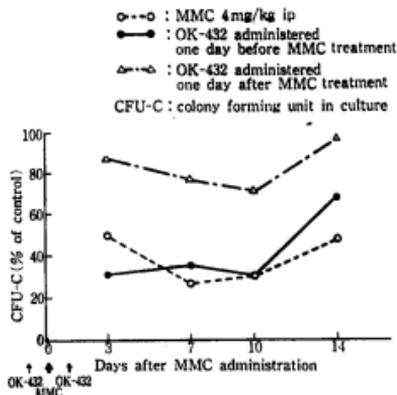
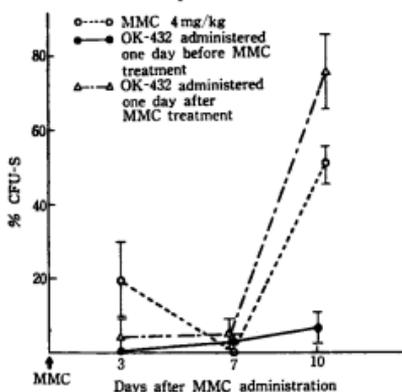


Fig. 6 The effect of OK-432 on the suppression of CFU-S by MMC in irradiated and bone marrow transplanted

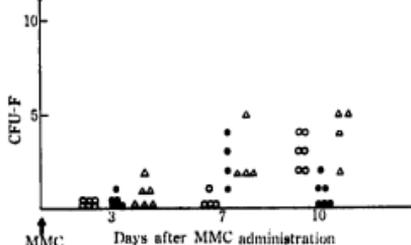


The donor mice was administered with MMC and/or OK-432. The recipient mice, was pretreated with the radiation of X ray, was injected with donor bone marrow cells (1×10^5 cells) at the same time.

CFU-S の抑制効果

MMC 4mg/kg ip を C_57H/He マウスに投与したところ、Fig. 1 に示したように、骨髓細胞を用いた CFU-C は投与後 4 日目にすでに生理食塩水投与の control 群に比べ約 40% 抑制され、8~11 日目にその抑制は約 70% とピークに達した。その後徐々に回復し、15 日目には 47.6% の抑制となった。また、CFU-F は CFU-C よりも更に sensitive で 10 日目まではほぼ完全に抑制され

Fig. 7 The effect of OK-432 on the suppression of CFU-F by MMC in mice



CFU-F was measured at 14 days after the culture.

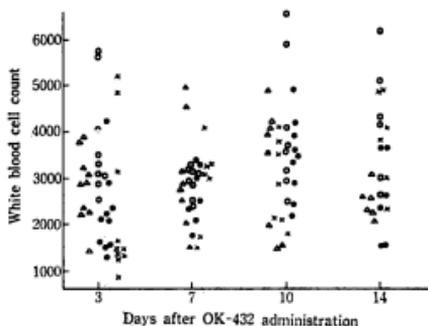
○; administration with MMC,

●; administration with OK-432 at day 1 before MMC,

△; administration with OK-432 at day 1 after MMC.

CFU-F was shown as experimental data (control, was administered with saline, was shown 37.5 ± 6.4 in CFU-F).

Fig. 8 The effect of OK-432 on the decrement of peripheral white blood cells by MMC in mice



○; control (administration with saline),

●; administration with MMC,

△; administration with OK-432 before MMC,

□; administration with OK-432 after MMC.

た。次に CFU-S も 7 日目において最も抑制されたが 10 日目にはすでに control の 50% まで回復した。MMC のこの効果は *in vitro* においても認められ、Fig. 2 に示したように、正常骨髓細胞の培養系に MMC を添加することによっても認められた。すなわち、CFU-C は、MMC 10^{-9} $\mu\text{g/ml}$ 以上の用量で著明な抑制効果が認められたが、CFU-F は 10^{-10} $\mu\text{g/ml}$ と MMC の抑制に対し更に sensitive であった。

2. MMC 投与による骨髓細胞の colony 形成抑制効果に対する OK-432 の影響

Fig. 9 The effect of OK-432 on the suppression of CFU-C by MMC in mice

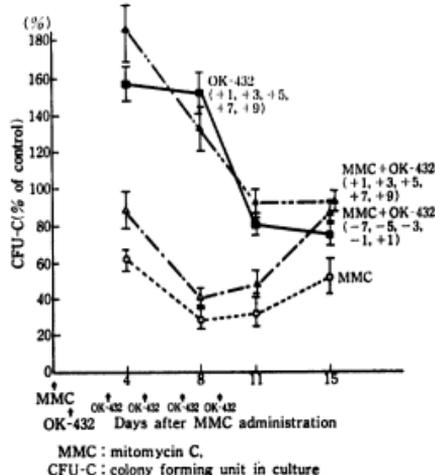


Fig. 10 The effect of OK-432 on the suppression of total CFU-C by MMC per femur in mice

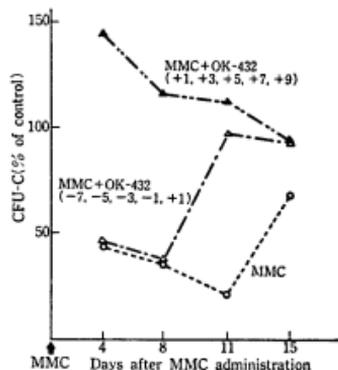


Fig. 11 The synergistic protection of combination of OK-432 and bone marrow transplantation against the suppression of CFU-C by MMC in mice

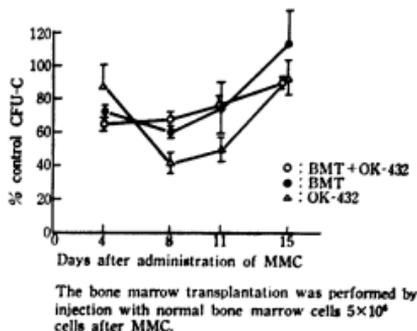


Fig. 12 The synergistic protection of combination of OK-432 and bone marrow transplantation against the suppression of CFU-C by MMC in mice

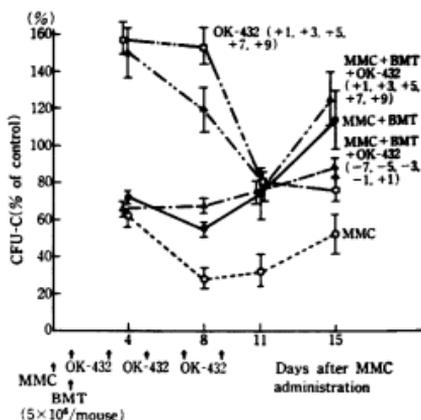
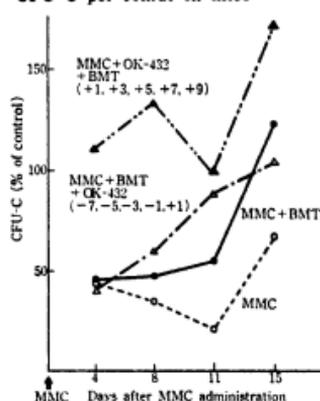


Fig. 3 に OK-432 を 1 回投与した時の骨髓 CFU-C 形成の経時変化を示した。これにみられるように、OK-432 投与により CFU-C の形成は投与後 4 日目まで増強されるが、7 日目以後になると saline 投与の対照群とほとんど変わらなくなった。この結果により、OK-432 の dose は 50 KE/kg ip と定めた。そこで、次に MMC 骨髓機能の抑制効果に及ぼす OK-432 の作用を検討した。Fig. 4 に示したように、MMC 4 mg/kg ip 単独では CFU-C の形成は著明に抑制された。また OK-432 50 KE/kg を MMC 投与の前日に投与した群におい

ても、MMC 単独群と同様の抑制パターンを示した。しかし、OK-432 を MMC 投与の翌日に行なった群では、MMC 単独投与に比べ 7~10 日目の CFU-C 形成抑制も軽度で、更にその回復も早く 14 日目にはすでに生理食塩水投与の対照群と同程度まで回復した。これをマウス大腿骨 1 本当たりの CFU-C 数で測定したところ、この OK-432 の作用は MMC の抑制効果を完全に消失させた (Fig. 5)。次に CFU-S については Fig. 6 に示したように、OK-432 を MMC の前に投与した群では、MMC 単独群よりも更に抑制効果は増強された。しかし、MMC 後に OK-432 を投与した群は、CFU-C の

Fig. 13 The synergistic protection of combination of OK-432 and bone marrow transplantation against the suppression of total CFU-C per femur in mice

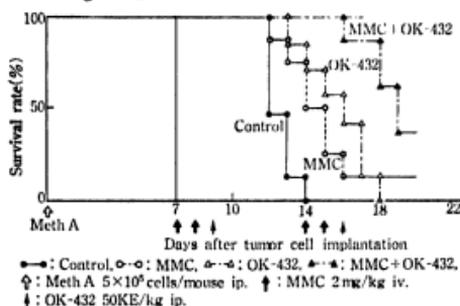


場合に比べるとその効果は劣るが、やはり抑制からの早期の回復が認められた。また CFU-F においても同様であった (Fig. 7)。次に MMC 投与による血中白血球減少においては、Fig. 8 に示したように、MMC 後の投与によりほぼ完全に拮抗された。そこで、この OK-432 の作用を更に増強させるために連日投与を行なった。すなわち、OK-432 50 KE/kg を 1 回投与とせず、1 日おきに 5 回に分け各 10 KE/kg ip 投与を行なった。Fig. 9 に示したように、MMC 前日に投与を行なった群でも MMC 単独投与に比べわずかに抑制効果からの回復は認められたが、MMC 後日に OK-432 を投与した群では、MMC による CFU-C の抑制効果の完全消失がみられた。更に大腿骨 1 本当りの CFU-C についても同様のことが認められた (Fig. 10)。

3. MMC 投与による CFU-C 抑制に対する骨髄細胞移植の効果

Fig. 11 に認められるように、MMC 投与により抑制された CFU-C 産生反応は骨髄細胞移植により約 20~30% 回復したが、OK-432 の 1 回投与と骨髄細胞移植の併用による CFU-C の回復も骨髄細胞移植単独の場合と同程度であった。そこで OK-432 の隔日 5 回投与と骨髄細胞移植の併用効果を調べた。Fig. 12 に示したように、MMC 投与後の OK-432 5 回投与と BMT の併用により CFU-C は著明に回復したが、この回復効果は OK-432 単独投与によるものと変わらなかった。しかし、マウス大腿骨 1 本当りの CFU-C でみると、BMT 単独群に比べ BMT+OK-432 の前投与群においても CFU-C 回復効果は MMC 投与 8~11 日目において優れていた

Fig. 14 The synergistic protection of combination of OK-432 with MMC on Meth A growth in mice



(Fig. 13)。

4. MMC と OK-432 の併用による *in vivo* 抗腫瘍効果

OK-432 は MMC 投与後に投与することにより、MMC の骨髄抑制作用を完全に遮断することができた。そこで OK-432 と MMC の併用による抗腫瘍効果について調べた。BALB/c マウス ip に Meth A sarcoma cells 5×10^5 を移植した後、7, 8, 14, 15 日目に MMC 2 mg/kg を iv 投与し、OK-432 は 50 KE/kg を 9, 16 日目に ip 投与したところ、Fig. 14 に示したように、MMC, OK-432 単独群と比べさらに強力な延命効果がみられた。

III. 考 察

以上の成績に認められるように、OK-432 は MMC の骨髄抑制作用を遮断し、抗腫瘍効果は増強することが明らかになった。この OK-432 による骨髄抑制に対する OK-432 の回復効果は MMC 投与後に投与した方がよく、更に OK-432 の 1 回投与による効果よりも同量の分割投与による効果の方がはるかに強力であることがわかった。また OK-432 と MMC 併用による抗腫瘍効果においては MMC の効果を OK-432 が阻害する可能性も考えられたが、骨髄機能に対する効果とは逆に MMC と OK-432 との間に synergistic な作用が認められた。次に BMT の効果については、MMC の骨髄機能抑制の回復は認められ、その効果は OK-432 投与と同程度のものであった。更に OK-432 との併用による synergistic な効果は、OK-432 前投与群においてもわずかに認められ、この効果は移植した骨髄細胞に対する OK-432 の直接的効果と考えられた。すなわち、移植された骨髄細胞の増殖を OK-432 が増強するためにマウス大腿骨 1 本当りの CFU-C が増強するものと考えられた。

さて、OK-432 については免疫反応の増強、抗腫瘍効

果ならびに骨髓機能の亢進などのさまざまな報告がなされている^{8,9,10}。特に古沢ら¹¹)は、OK-432の好中球増加作用に注目し、C57BLマウスを用いてリンパ球からの colony stimulating factor (CSF) 産生をOK-432が増強させることを報告している。またSTANLEYら¹²)は、*in vitro*におけるCFU-Cのclonalな分化増殖にCSFの存在が不可欠であることを報告しており、OK-432の好中球増加作用はCSF産生増強に起因するものと考えられる。更にこのことは、骨髓移植とOK-432との併用においてOK-432が移植された骨髓細胞のCSF産生をも増強している可能性も考えられる。次に、CFU-CはCSFの影響により、その増殖が促進されるのに対し、CFU-Sは各種血液細胞に分化し得る multipotentiality な細胞であり、CSFの影響を受けにくい¹³。このことは、MMCによるCFU-C、CFU-S産生抑制に対するOK-432投与の回復効果がCFU-Cに比べ、CFU-Sでは劣っていることから推察される。CFU-FについてはMORIら⁹)によってhematopoietic inductive micro-environment (HIM)として重要視されたコロニーである。MMC投与により著明なCFU-Fの抑制が認められたことによりMMC投与によって、CFU-Fなどのstem cell増殖だけでなくHIMも同様に障害を受けたことが考えられる。更にMMCで障害されたCFU-FはOK-432の投与によってもCFU-S同様にCFU-Cと比べその効果は劣っていた。この現象が*in vivo*におけるCFU-Sにも影響しているのであろう。すなわちOK-432の投与は、MMC投与により障害されたHIMの回復をある程度行なうが、完全には回復しないのでCFU-Sも多少抑制を受ける。しかし、CFU-Cの方はCSF産生にdependentであるのでその産生が増強されると増殖は促進され、完全に回復してくるものと考えられる。

今回の実験で、我々はCSF産生などの測定は行っていないが、今後はそれらの測定を含め更に詳しい作用点、また臨床応用におけるスケジュールなども詳しく調べ、化療剤と免疫増強薬の併用、更には骨髓移植との併用についても検討を加え、化療剤の副作用軽減をはかるとともに免疫増強剤との相乗作用についても調べていきたい。

〔謝辞〕 稿を終るにあたり本研究に御協力下さいました相生半田外科病院長半田祐彦博士に謝意を表します。

また、御指導御教閲を賜った岡山大学第一外科折田薫

三教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) 石井良治, 武石輝夫: 抗腫瘍薬の副作用と対策。総合医学 20: 437~443, 1963
- 2) 斎藤元男, 青沼悦子, 野田哲生, 中嶋一郎, 南條正寿, 海老名卓三郎, 石田名香雄: OK-432の抗腫瘍効果(2), OK-432誘起活性化Mの抗腫瘍性。癌と化学療法 10: 1363~1371, 1983
- 3) OSHIMI, K.; S. KANO, F. TAKAKU & K. OKAMURA: Augmentation of mouse natural killer cell activity by a streptococcal preparation, OK-432. JNCI 65: 1265~1269, 1980
- 4) HOJO, H. & Y. HASHIMOTO: Cytotoxic cells induced in tumor-bearing rats by a streptococcal preparation (OK-432). GANN 72: 692~699, 1981
- 5) ROBINSON, W. A.; D. METCALF & T. R. BRADLEY: Stimulation by normal and leukemic mouse sera of colony formation *in vitro* by mouse bone marrow cells. I. Cell. Physiol. 69: 83~91, 1967
- 6) MORI, K. J.; H. FUJITAKE, H. OKUBO, M. T. DEXTON & Y. ITO: Quantitative development of adherent cell colonies in bone marrow cell culture *in vitro*. Exp. Hematol. 7: 171~176, 1979
- 7) TILL, K. E. & E. A. MCCULLOCH: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiation Research 14: 213, 1961
- 8) 野本 亀久雄: Biological Response Modifier—ビンバニール。日本臨床 42: 587~590, 1984
- 9) 窪田宜夫, 松井謙吾: OK-432の造血幹細胞に対する作用。癌と化学療法 7: 111~115, 1980
- 10) HIRAOKA, A.; M. YAMAGISHI, T. OHKUBO, Y. YOSHIDA & H. UCHIDA: Effect of a streptococcal preparation, OK-432, on murine hematopoietic stem cells. Acta Hematol. JPN 44: 860~863, 1981
- 11) 古沢新平, 間 栄, 榎原英夫, 斎藤憲治, 広瀬康二, 小松秀昭, 穴戸英雄: 溶連菌製剤OK-432の好中球増多作用について。医学のあゆみ 103: 215~217, 1977
- 12) STANLEY, E. R.; W. A. ROBINSON & G. L. ADA: Properties of the colony stimulating factor in leukemic and normal mouse serum. Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci. 46: 715~726, 1968
- 13) 関 正利: セルローズ, アセテート膜法によるCFUの解析—造血の“場”の概念とその実証—。最新医学 28: 1756~1766, 1973

EFFECT OF OK-432 ON BONE MARROW SUPPRESSION BY MITOMYCIN C (MMC) IN MICE

TAKAFUMI TSURUMI

First Department of Surgery, Okayama University Medical School,
Shikata, Okayama City, Japan.

Influences of OK-432 and/or bone marrow transplantation (BMT) on the suppression of bone marrow cells proliferation by mitomycin C (MMC) were observed with CFU-C, CFU-S and CFU-F in mice.

The suppression of CFU-C, CFU-S and CFU-F by MMC was restored by the administration of OK-432 (50 KE/kg) at day 1 after the treatment with MMC, but not before the MMC treatment.

An administration of OK-432 (10 KE/kg) five times at day 1, 3, 5, 7 and 9 after the MMC treatment was more effective than single dosage of 50 KE/kg 1 day after the MMC treatment.

The bone marrow suppression by MMC was restored by BMT alone.

From the results of the present experiments, we suggest that the administration of OK-432 in purpose of restoration of the suppressed bone marrow cells proliferation by MMC should be done after the treatment with MMC. In addition, a stimulatory effect of OK-432 on the proliferation of the transplanted bone marrow cells was also suggested.