

## レンチナンと癌化学療法剤の併用によるマウス腫瘍転移抑制

椎尾 剛・弓 狩 康 三

味の素株式会社中央研究所・生物科学研究所

(昭和 62 年 3 月 5 日受付)

Lewis lung carcinoma の肺転移に対するレンチナンと癌化学療法剤の併用を検討した。レンチナンの投与タイミングとしては腫瘍原病巣切除術後に投与することが効果的であることを確認した。

癌化学療法剤ではテガフルおよびサイクロホスファミドの場合には手術前に投与し、これに手術後、レンチナンを併用した試験群で著しい転移抑制効果が得られた。テガフル高投与量とレンチナンを併用した試験群では、腫瘍の肺転移が完全に阻止されたマウスが高率に得られた。

プレオマイシンおよびマイトマイシンCについては、腫瘍切除術後にレンチナンとの同時併用によって効果がみられた。

これらの結果はレンチナンを腫瘍切除術後に投与して、他の癌化学療法剤と併用することの有用性を示唆するものとする。

腫瘍切除術後に残存している転移腫瘍の増殖を抑制し、再発を阻止または遅延させる試みには薬物療法、その中でも免疫療法が最も期待されている。

一方、免疫療法剤は宿主の免疫機能を介して効果をあげるものであるから投与条件、タイミングが適切に行なわれないと効果が発揮されないと推測される。したがって、最適な投与条件、タイミングを明確にすることが重要である。

著者ら<sup>1)</sup>は腫瘍切除術後のレンチナン単独投与がマウス腫瘍の転移増殖を抑制することを明らかにし、転移する腫瘍細胞が極めて少量である場合には単独でも明らかに有効な結果が得られている。一方、腫瘍転移が多量の場合には直接作用を示す癌化学療法剤と併用することが考えられる。

本報ではマウス腫瘍転移系における癌化学療法剤との併用条件、タイミングについて検討した。

## I. 材料と方法

1) 供試動物: C<sub>57</sub>BL/6 雌 6 週齢マウスを日本チャールス・リバー社から購入し、1週間、予備飼育後に使用した。通常、1群 7 匹とした。

2) 移植腫瘍: Lewis lung carcinoma を用いた。この腫瘍は皮下移植し固形癌として継代維持しているが、実験に際しては酵素処理<sup>2)</sup>によって単細胞化して用いた。

3) 抗腫瘍実験: Lewis lung carcinoma 1 × 10<sup>6</sup> 個を C<sub>57</sub>BL/6 マウスの足趾皮下に移植し担癌とした。担癌 14 日目に腫瘍移植部を切除し、更に 8 ~ 9 日後 (担癌 22

~ 23 日目) に剖検した。肺転移コロニー数を測定し、対照群と薬剤投与群を比較して転移抑制率を算出した。

4) 薬剤: レンチナンは当社調製のものを生食塩水で希釈してマウス尾静脈より投与した。テガフルには森下製薬商品 (ネベルク) を用い CMC 0.25% 含有生理食塩水に懸濁し経口投与した。サイクロホスファミド (塩野義製薬製)、プレオマイシン (日本化薬製)、マイトマイシンC (協和発酵製) はマウス腹腔内注射した。

## II. 結 果

## 1) テガフルとの併用タイミング:

Lewis lung carcinoma の肺転移抑制効果でみると、レンチナンは腫瘍切除術後の投与が効果的であるという結果が得られている<sup>1)</sup>。今回の検討結果でもレンチナンは手術後の投与が良いことを再現した。一方、テガフルは 75 mg/kg/日、5 日間投与では手術前の投与が良く、両薬剤を併用した場合にはテガフルを前投与しておいてから、レンチナンを手術後に投与した試験群において明らかな併用効果がみられた (Table 1)。

この成績を確認した結果が Table 2 である。テガフル投与量を 100 mg/kg に増加させた検討においても、テガフル前投与にレンチナンを術後併用した試験群で併用効果があり、著明な転移抑制効果が認められた。

## 2) 腫瘍転移完全阻止の試み:

併用するテガフルの投与量を 200 mg/kg/日として腫瘍転移の完全阻止を検討した。結果は Fig. 1 に示したように肺転移コロニー数で比較するとレンチナンの術後投与群、テガフル投与群、両剤併用群、いずれも効

Table 1 Additive effect of lentinan with tegafur on pulmonary metastasis of Lewis lung carcinoma in C<sub>57</sub>BL/6 mice (1)

Pre-operative administration	Operation (Amputation)	Post-operative administration	Suppressive effect on pulmonary metastasis	
			Average colony number	Inhibition ratio (%)
—	14	—	26.0±33.7	—
Day 7~ Lentinan 2mg/kg×5, iv	14	—	31.0±15.7	-19
—	14	Day 14~ Lentinan 2mg/kg×5, iv	16.2±15.3	38
Day 7~ Tegafur 75mg/kg×5, PO	14	—	10.1±14.0	61
—	14	Day 14~ Tegafur 75mg/kg×5, PO	26.5±19.6	-2
Day 7~ Tegafur 75mg/kg×5, PO+ Lentinan 2mg/kg×5, iv	14	—	11.4± 9.1	56
Day 7~ Lentinan 2mg/kg×5, iv	14	Day 14~ Tegafur 75mg/kg×5, PO	36.3±39.9	-40
Day 7~ Tegafur 75mg/kg×5, PO	14	Day 14~ Lentinan 2mg/kg×5, iv	4.8± 2.8	82
—	14	Day 14~ Lentinan 2mg/kg×5, iv+ Tegafur 75mg/kg×5, PO	18.0±11.1	31

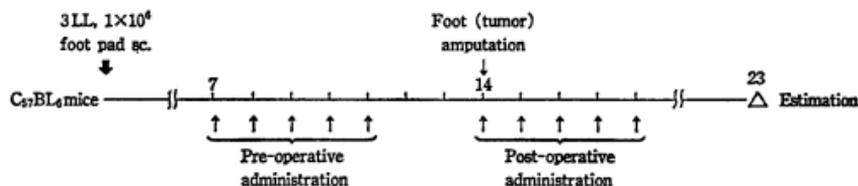
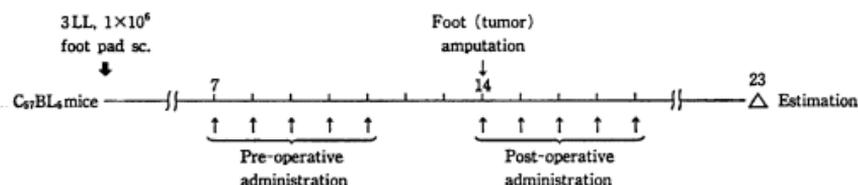


Table 2 Additive effect of lentinan with tegafur on pulmonary metastasis of Lewis lung carcinoma in C<sub>57</sub>BL/6 mice (II)

Pre-operative administration	Operation (Amputation)	Post-operative administration	Suppressive effect on pulmonary metastasis	
			Average colony number	Inhibition ratio
—	14	—	31.7 ± 8.1	— (%)
—	14	Day 14~ Lentinan 2mg/kg×5, iv	11.0 ± 7.2	65.3
Day 7~ Tegafur 75mg/kg×5, PO	14	—	14.4 ± 11.2	54.6
Day 7~ Tegafur 75mg/kg×5, PO	14	Day 14~ Lentinan 2mg/kg×5, iv	4.7 ± 5.3	85.2
Day 7~ Tegafur 100mg/kg×5, PO	14	—	5.8 ± 6.6	81.7
Day 7~ Tegafur 100mg/kg×5, PO	14	Day 14~ Lentinan 2mg/kg×5, iv	3.5 ± 4.3	89.0
—	14	Day 14~ Tegafur 100mg/kg×5, PO	19.9 ± 26.4	37.2
—	14	Day 14~ Tegafur 100mg/kg×5, PO+ Lentinan 2mg/kg×5, iv	10.3 ± 9.1	67.5



果を示し、特に、テガフル単独群と併用群では差がみられない。しかし、肺転移完全阻止率（肺転移コロニーのみられないマウスの匹数/供試マウス匹数）で比較すると、併用群は薬剤単独投与群よりも、いずれも良く、テガフル前投与にレンチナン術後投与した試験群が最も良い結果で、7匹中5匹のマウスで肺転移の完全阻止が観察された。

### 3) 他の癌化学療法剤との併用：

テガフル以外の癌化学療法剤として、サイクロホスファミド (CY)、プレオマイシン、マイトマイシンC (MMC) についてレンチナンとの併用による腫瘍転移抑制効果を検討した。結果を Table 3 に示す。サイクロホスファミドとの併用では腫瘍切除術後の同時併用で効果がなく、サイクロホスファミドを前投与して手術後にレンチナンを併用した試験群で明らかな併用効果が認められた。プレオマイシン、マイトマイシンCとの併用では腫瘍切除術後の同時併用で弱いながらも併用効果が見られた。

### III. 考 察

レンチナンは直接の細胞毒性がなく、幼時期に胸線を摘出したマウスでは抗腫瘍効果がみられない<sup>1)</sup>。正常マウスにおける抗腫瘍作用発現が抗胸腺抗体で完全に阻止される事実<sup>1)</sup> などから、レンチナンが宿主介在性の作用を示す抗腫瘍剤であることは明らかである。したがって、手術後の腫瘍転移はレンチナンにとって最も期待される対象の一つであると推測される。

著者ら<sup>1)</sup> は、先に、レンチナンの腫瘍切除術後の投与が転移性腫瘍担癌マウスを著明に延命させる効果があることを報告している。Rose, W. C. ら<sup>2)</sup> も Madison lung carcinoma 担癌マウスに対する延命効果を認めている。引き続き、著者ら<sup>1)</sup> は腫瘍の肺転移に対しても手術後のレンチナン投与が有効である事実を明らかにした。

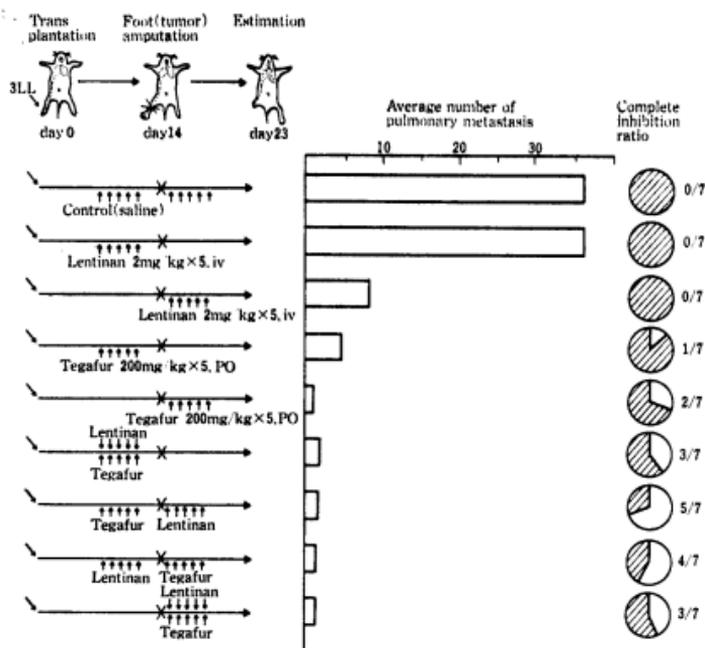
しかし、転移量が多くなると宿主免疫機能を介する免疫療法剤の他に、直接に腫瘍増殖を抑制する薬剤との併用が必要となると考えられる。本報告は、このような術後の腫瘍転移に対し宿主介在性であるレンチナンと癌化

Table 3 Additive effect of lentinan with chemotherapeutic agent on pulmonary metastasis of 3LL in C<sub>57</sub>BL/6 mice

Ex. No.	Drug administration		Suppressive effect on pulmonary metastasis	
	Chemotherapeutic agent	Lentinan	Average colony number	Inhibition ratio
1	—	—	49.3±28.3	— (%)
	Day 7~ CY 25 mg/kg×1, ip	—	14.8±18.8	65.1
	Day 7~ CY 25 mg/kg×1, ip	Day 14~ Lentinan 2 mg/kg×5, iv	3.6± 5.2	91.5
	Day 14~ CY 25 mg/kg×1, ip	—	19.0±30.0	55.2
	Day 14~ CY 25 mg/kg×1, ip	Day 14~ Lentinan 2 mg/kg×5, iv	36.7±37.7	13.4
	—	Day 14~ Lentinan 2 mg/kg×5, iv	40.0±43.5	5.7
2	—	—	32.7±14.3	— (%)
	Day 14~ Bleomycin 5 mg/kg×5, ip	—	42.8±32.9	-31
	Day 14~ Bleomycin 5 mg/kg×5, ip	Day 14~ Lentinan 2 mg/kg×5, iv	17.4±16.0	47
	—	Day 14~ Lentinan 2 mg/kg×5, iv	22.0± 9.7	33
3	—	—	30.3±15.9	— (%)
	Day 14~ MMC 0.5 mg/kg×5, ip	—	23.8±38.0	21.5
	Day 14~ MMC 0.5 mg/kg×5, ip	Day 14~ Lentinan 2 mg/kg×5, iv	12.5±12.4	58.7
	—	Day 14~ Lentinan 2 mg/kg×5, iv	29.0±38.1	4.3

1×10<sup>6</sup> cells of 3LL were transplanted in foot pad of C<sub>57</sub>BL/6 mice subcutaneously at day 0. Foot (tumor) was amputated at day 14.

Fig.1 The approach for complete inhibition of pulmonary metastasis by combination use of lentinan with tegafur



学療法剤の併用を検討したものである。

今回得られた結果から、レンチナンは各種の癌化学療法剤（テガフル、サイクロホスファミド、ブレオマイシン、マイトマイシンC）と併用効果を示すことがわかった。効果的に併用するには投与タイミングが重要であることも明らかになった。テガフル、サイクロホスファミドでは手術前に投与しておき、腫瘍切除後にレンチナンを投与した場合に最も高い併用効果が得られている。作用機序を考察すると、癌化学療法剤と同時に併用する場合には、癌化学療法剤の宿主免疫抑制を防止乃至回復させる面でレンチナンが働いている可能性が高い<sup>7)</sup>、癌化学療法剤を術前に投与しておき、腫瘍切除術後にレンチナンを併用する場合には、他の機序で作用していることが推測される。著者らはテガフルやサイクロホスファミドとレンチナンを併用する場合には同時期に併用するよりは、レンチナン投与を1~2週遅らせて併用した方が効果的であるという結果をマウス自家癌、同系腫瘍の実験系について明らかにしている<sup>8)</sup>。この場合には、癌化学療法剤投与後、宿主の腫瘍抗原に対する応答が高まる時期があり、この時期にレンチナンを投与すると効果的であると考えられた。手術後に用いる

場合には、手術侵襲による免疫機能の低下<sup>9)</sup>をレンチナンが防衛的に働いている可能性も考えられる。一方、VAAGE, J.<sup>10)</sup>は一定期間、腫瘍が増殖した後に腫瘍を切除すると、その腫瘍に対する抵抗力がつくことを報告している。他方、Lewis lung carcinoma を用いた実験で原発巣切除により肺転移が増進するという報告<sup>10,11)</sup>もある。腫瘍、宿主の状態の違いによって変化することが考えられる。これらの知見の中から共通して把握できる事実は、腫瘍切除術は宿主の腫瘍免疫に種々の影響をもたらすものであることである。したがって、この腫瘍切除術後にレンチナンを投与し宿主免疫機能を賦活することは意義深いものと考えられる。

#### 文 献

- 1) SHILLO, T.; T. SUGA, G. CHIHARA & Y. YUGARI: Suppressive effect of lentinan on pulmonary metastasis of murine tumors. Abs. of 14<sup>th</sup> Int. Cancer Cong. 2: 659, 1986
- 2) 藤原大実, 伊藤喜一郎, 浜岡利之: Winn Assay. 免疫実験操作法 X, pp.3667~3672, 日本免疫学会編, 1982
- 3) MAEDA, Y. Y.; J. HAMURO, Y. O. YAMADA, K. ISHIMURA, G. CHIHARA: The nature of im-

- munopotentiality by the antitumor polysaccharide lentinan and the significance of biogenic amines in its action, *Immunopotentiality*, Ciba Found. Symp. New Series, 18: 259~286, 1974
- 4) 椎尾 剛, 弓狩康三: レンチナンの抗腫瘍効果発現と宿主の胸腺機能について. 第40回日本癌学会総会記事, p.247, 1981
  - 5) SHILO, T.; Y. YUGARI: The antitumor effect of lentinan and the tumor recognition in mice. Manipulation of Host Defence Mechanisms, *Excerpta Medica, Int. Cong. Series* 576: 29~42, 1981
  - 6) ROSE, W. C.; F. C. REED III, P. SIMINOFF & W. T. BRADNER: Immunotherapy of Madison 109 lung carcinoma and other murine tumors using lentinan. *Cancer Res.* 44: 1368~1373, 1984
  - 7) 椎尾 剛, 吉浜 隆, 弓狩康三: 抗腫瘍性多糖レンチナンの生体免疫機能に対する効果および化学療法剤との併用. 痛と化学療法 2: 45~51, 1975
  - 8) 折田薫三: 外科手術と免疫療法. 痛と化学療法 5: 1153~1159, 1978
  - 9) VAAGE, J.: Influence of tumor antigen on maintenance versus depression of tumor-specific immunity. *Cancer Res.* 33: 493~503, 1973
  - 10) GORELIK, E.; S. SEGAL & M. FELDMAN: Growth of a local tumor exerts a specific inhibitory effect on progression of lung metastases. *Int. J. Cancer* 21: 617~625, 1978
  - 11) 山下 喬, 香川和夫, 山本俊明, 八木正人, 奥中規由, 米田浩二, 蝶良英郎: Lewis lung carcinoma 拒癌マウスにおける転移機相と宿主調整因子による肺転移抑制. 痛と化学療法 8: 120~127, 1981

## SUPPRESSIVE EFFECT OF THE COMBINATION USE OF LENTINAN WITH CHEMOTHERAPEUTIC AGENT ON PULMONARY METASTASIS IN MICE

TSUYOSHI SHIO and YASUMI YUGARI

Life Science Laboratories, Central Research Laboratories, Ajinomoto Co. Inc.

Suppressive effect of the combination use of lentinan with chemotherapeutic agent on the metastasis of Lewis lung carcinoma was examined.

About the administration timing of lentinan, it is more effective to administrate lentinan after the tumor amputation.

In the case of tegafur or cyclophosphamide, chemotherapeutic agent is better to administrate before operation in combination with post-operative administration of lentinan. On the contrary, bleomycin or mitomycin C is better to administrate together with lentinan, post-operatively. In the combination use of lentinan with tegafur at high dose, about 70% of treated mouse were cured completely from pulmonary metastasis of Lewis lung carcinoma in suitable condition.

These data strongly suggest the effectiveness of the combination use of lentinan with chemotherapeutic agent on the suppression of tumor metastasis in cancer therapy.