

癌化学療法剤とレンチナンの併用タイミング

第2報 マウス同系固型癌実験系

椎 尾 剛

味の素株式会社中央研究所・生物科学研究所

(昭和 62 年 11 月 12 日受付)

同系腫瘍系においてレンチナンと癌化学療法剤の併用タイミングを検討した。

レンチナンをサイクロホスファミド (CY), 5-フルオロウラシル, またはテガフルと同時併用した場合には各々の単独投与群に比べ Lewis's lung carcinoma の増殖をより強く抑制した。

CY をレンチナン投与開始2週間前に用いた場合には CY をレンチナン投与開始1週間後に投与した群に比べ, より強い抗腫瘍効果が得られた。同様の結果が B₁₆ melanoma および MM 102 乳癌系でもみられた。

これら併用タイミングの理由を明確にするため MM 102 腫瘍抗原に対する MM 102 担癌マウスの足蹠反応を試験したところ, この同系腫瘍系では, 通常, 腫瘍抗原に対する応答は微弱であるが, CY 投与後 7~28 日目に明らかな応答がみられた。これはレンチナンと CY の併用タイミングとよく合致した。

免疫療法は癌を選択的に攻撃する可能性のあるものとして期待されているが, 通常, 単独投与では効果が明確でなく, 他療法 (外科的療法, 化学療法, 放射線療法など) と組み合わせて補完的に用いることが考えられている。

非特異的免疫賦活剤は宿主介在性に作用するもので, 他療法とは異なった抗腫瘍機序を示すものであり, 併用する意義は大きいと考えられている。

一方, 併用によって, より高い抗腫瘍効果を得るには免疫療法を他療法と如何に併用するか条件検討が必要である。癌化学療法剤と併用する場合には, 癌化学療法剤は直接の腫瘍障害作用の他に宿主免疫抑制や腫瘍抗原性増強²⁻⁴⁾ など種々の影響を及ぼすものであり, 免疫賦活剤の特性と合わせて併用条件を考える必要がある。

著者ら⁵⁾は sarcoma-180 腫瘍系における検討に引き続いて, 同系腫瘍系についても癌化学療法剤との併用タイミングを検討する必要を感じて本実験を行なった。

I. 材料と方法

1) 供試動物: C₅₇BL/6 および C 3 H/He の雌マウスを日本チャールス・リバー社から購入し, SPF 飼育した。実験には, 通常, 7 週齢のマウスを用い 1 群 6 ないし 8 匹で実験した。

2) 抗腫瘍実験:

Lewis's lung carcinoma (3LL) 実験系: 3LL 固型癌 5 mm³ を C₅₇BL/6 マウスの腰部皮下に移植し, 担癌

とした。

B₁₆ melanoma 実験系: B₁₆ melanoma/mm³ を C₅₇BL/6 マウスの腰部皮下に移植し, 担癌とした。

MM 102 乳癌実験系: MM 102 腹水癌細胞 3×10⁶ 個を C 3 H/He マウスの腰部皮下に移植し, 担癌とした。

上記の3実験系について各々担癌7日目から癌化学療法剤を1ないし5日間投与し, レンチナン (1 mg/kg/回・2 回/週) と併用した。毎週1回, 腫瘍のサイズをノギスで測定するとともに, 担癌マウスの生存日数を記録して抗腫瘍効果を判定した。

3) 癌化学療法剤: サイクロホスファミド (CY, 塩野義製薬) は腹腔内投与, 5-フルオロウラシル (5-FU, 協和醗酵), テガフル (森下製薬, 商品名ネベルク使用) は経口投与した。

4) レンチナン: 味の素株式会社調製品を用い, 生理食塩水で希釈し腹腔内投与した。

5) 腫瘍抗原に対する応答性: THOMAS らの方法⁶⁾ に従い腫瘍抗原を調製し, この抗原液 0.03 ml (腫瘍細胞 10⁸ 相当量) をマウス足蹠皮下に注射し, 24 時間後の遅延型反応⁷⁾ を dial thickness gauge で測定した。

II. 結果

1. 3LL 実験系における併用効果検討

3LL 腫瘍を C₅₇BL/6 マウスの腰部に皮下移植後, 翌日からレンチナン/mg/kg/回を毎週2回, 腹腔投与し, 担癌7日から癌化学療法剤を併用投与した。癌化学療法

Table 1. Combination effect of lentinan with other cancer chemotherapeutic agents on Lewis lung carcinoma in C₅₇BL/6 mice

Treatment	Suppressive effect on tumor growth		Life prolongation effect
	On day 10 Tumor size (IR*, %)	On day 20 Tumor size (IR*, %)	Average number of survival days (T/C, %)
Control	151.8±56.5	509.5±184.6	28.8±3.5
Day 1~ Lentinan 1mg/kg · 2 times/week, i.p.	61.8±55.4 (59.3)	380.5±154.7 (25.3)	36.1±7.5 (125.3)
Day 7~ Cyclophosphamide 100mg/kg×1, i.p.	66.3±62.3 (56.3)	172.0±170.4 (66.2)	59.3±26.0 (205.9)
Day 7~ Cyclophosphamide+ Day 7~ Lentinan	53.0±52.0 (65.1)	158.1±187.4 (69.0)	69.0±26.3 (239.6)
Day 7~ 5-Fv 30mg/kg/day×5, P.O.	84.9±58.7 (44.1)	436.8±176.9 (14.3)	36.1±5.5 (125.3)
Day 7~ 5-Fv+ Day 7~ Lentinan	85.7±45.3 (43.5)	284.8±111.5 (44.1)	39.5±4.3 (137.2)
Day 7~ Tegafur 200mg/kg/day×5, P.O.	91.4±53.6 (39.8)	330.0±130.0 (35.2)	34.0±4.5 (118.1)
Day 7~ Tegafur+ Day 7~ Lentinan	87.9±64.2 (42.1)	254.7±170.4 (50.0)	42.3±19.9 (146.9)

* IR: inhibition ratio

5mm³ of Lewis's lung carcinoma was subcutaneously transplanted in C₅₇BL/6 mice.

剤としては CY, 5-FU, またはテガフルを用いた。結果は Table 1 に示したように、レンチナンと癌化学療法剤の併用群は、いずれも、各々の単独投与群より高い腫瘍増殖抑制効果を示し、担癌マウスの延命においても同様の結果が得られた。

更に、CY とレンチナンの併用タイミングを検討したところ、CY 投与後2週目からレンチナンを併用した群が CY 投与前からレンチナン投与した群よりも若干良い結果となった (Fig. 1)。

2. B₁₆ melanoma 実験系における併用効果

B₁₆ melanoma 腫瘍系における併用タイミングを検討したところ、この腫瘍系においても CY 投与後にレンチナンを併用開始した群が CY 投与前からレンチナン投

与した群よりも良い抗腫瘍効果が得られた (Fig. 2)。

3. MM 102 乳癌実験系における併用効果

MM 102 乳癌実験系では CY 投与と同時にレンチナンを併用開始した場合と、CY 投与後2週目からレンチナンを併用した場合を比較した。その結果では、併用群は、いずれも単独投与群より良い抗腫瘍効果が得られたが、併用群間の比較では前者よりも後者の方が良い結果が得られた (Fig. 3)。

4. 腫瘍抗原に対する宿主免疫応答性検討

併用タイミングの理由を、少しでも明確にするため、MM 102 乳癌実験系を用いて、宿主の腫瘍抗原に対する免疫応答性をマウス足蹠反応を用いて検討した。

Table 2 にその結果を示す。この MM 102 同系腫瘍

Table 2. Effect of cyclophosphamide on foot pad reaction against tumor antigen in MM102-bearing C3H/He mice

Treatment	Foot pad reaction against tumor antigen* (×10 ⁻² cm)				
	Day 0	Day 7	Day 14	Day 28	Day 35
Normal control	37.7±8.1				
Day 0 MM 102 3×10 ⁶ , s.c.		43.9±12.2		42.2±18.7	44.0±15.1
Day 0 MM 102 3×10 ⁶ , s.c. Day 7 + Cyclophosphamide 100mg/kg×1, i.p.			50.7±17.7		51.0±8.9 (p<0.05)

* Average value of foot pad reaction against MM102 tumor antigen (n=7)

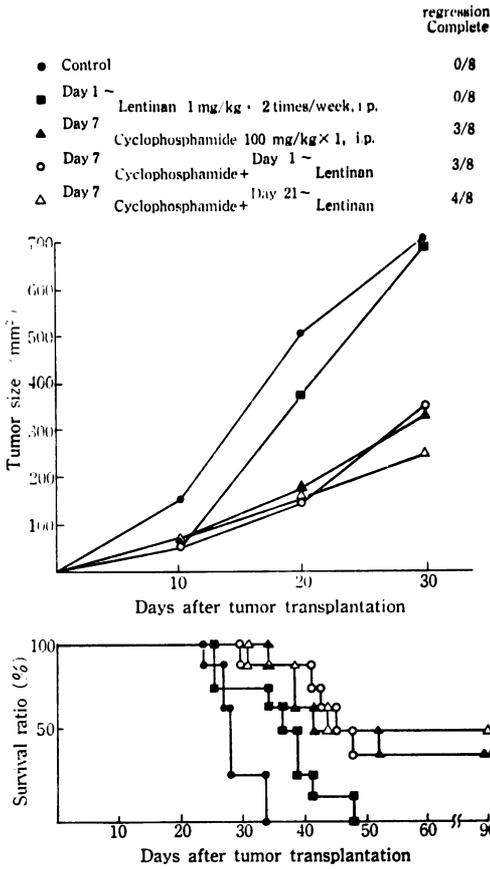


Fig. 1. Combination effect of lentinan with cyclophosphamide on Lewis's lung carcinoma in C₅₇BL/6 mice

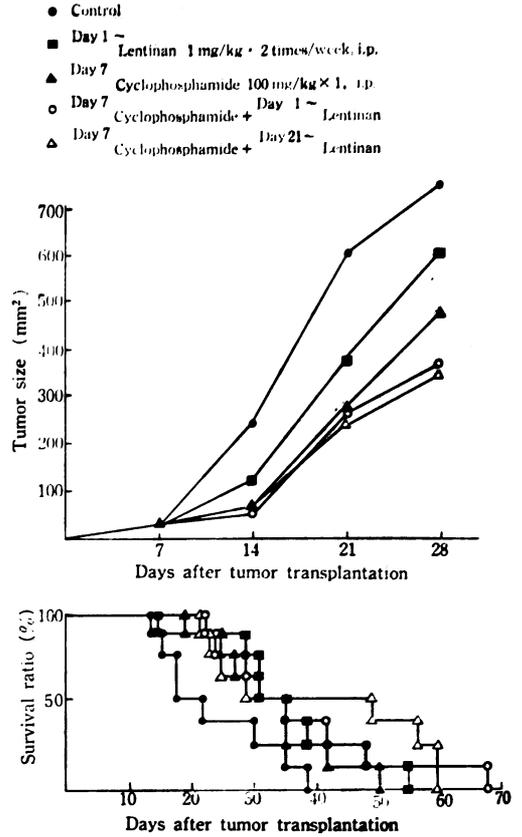


Fig. 2. Combination effect of lentinan with cyclophosphamide on B₁₆ melanoma in BDF₁ mice

実験系では、担癌 7, 28, 35 日に足蹠反応を試験したが、MM 102 腫瘍抗原に対する応答は微弱であり、少なくとも、この範囲では細胞性の腫瘍免疫は成立していないと推測された。一方、CY を担癌 7 日目に投与した場合には、その後 7 日目の足蹠反応でかなりの免疫応答がみられ、28 日目の足蹠反応では有意な宿主応答が確認された。

III. 考 察

AKIYAMA⁹⁾、細川⁹⁾は PSK と CY の併用をラット腫瘍 KMT-17 について検討し、CY 投与の 2 日前(担癌 1 日目)に PSK を腹腔注射した場合に併用効果が得られるとしている。FISHER¹⁰⁾は C3H マウス腫瘍について CY と *Corynebacterium parvum* (CP) を併用し、併用順序はあまり影響しないとしている。一方、PEARSON¹¹⁾はマウス白血病についてニトロソウレア系化学療法剤投与後 3 日後に *Corynebacterium* を併用した群が最も良いと報告している。CURRIE¹²⁾はマウス fibrosarcoma に対し、CY 投与 12 日後に CP を

併用するのがよいとしている。これらの論文から、免疫賦活剤、癌化学療法剤の種類、実験に供する腫瘍系によって併用タイミングが異なる可能性が推測される。

著者ら⁵⁾は sarcoma-180 固型癌系では担癌経過によって併用タイミングが異なることを報告している。腫瘍免疫(細胞性)が成立していない担癌初期では併用至適範囲は広いが、腫瘍免疫が成立した状態では CY を先に投与することは腫瘍免疫を障害し望ましくないと考えられた。宿主の腫瘍抗原応答が微弱と考えられる同系腫瘍系ではどうかということでは本検討をしたところ、3LL, B₁₆ melanoma, MM 102 いずれの腫瘍系でも CY 投与後 21 日目からレンチナンを併用した群が最も良い結果となった。

この併用タイミングの理由を明確にするため、MM 102 腫瘍抗原に対する宿主マウスの足蹠反応を試験したところ、この同系腫瘍系では通常状態では腫瘍抗原に対する免疫応答は極めて微弱であるが、CY 投与した場合には 7 日後でかなり免疫応答が高まり、28 日目では有

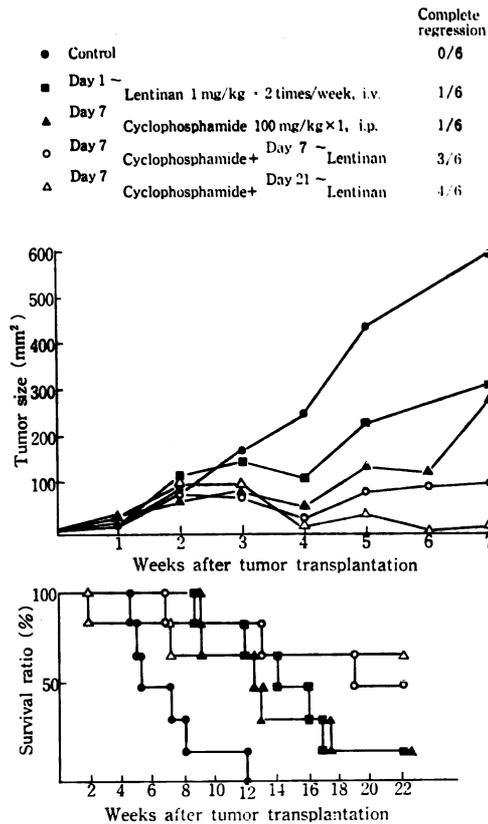


Fig. 3. Combination effect of lentinan with cyclophosphamide on MM 102 solid tumor in C3H/He mice

意に確立されていることがわかった。癌化学療法剤の作用により腫瘍の抗原性が高まるという報告²⁻⁴⁾を裏付けているものと考え。

したがって、腫瘍免疫(細胞性)が成立しにくい同系腫瘍系では癌化学療法剤投与後にレンチナンを併用することが望ましいと考える。

文 献

1) 小林 博: 癌の免疫療法—その可能性—基礎の立場から—。医学のあゆみ 91: 525~529, 1974
 2) BONMASSAR, E., BONMASSAR, A., VADLAMUDI, S. and GOLDIN, A.: Immunological alteration of

leukemic cells *in vivo* after treatment with an antitumor drug. Proc. Natl. Acad. Sci. 66: 1089~1096, 1970

3) MIHICH, E.: Modification of tumor regression by immunologic means. Cancer Res. 29: 2345~2350, 1969
 4) NICOLIN, A., VADLAMUDI, S. and GOLDIN, A.: Antigenicity of L 1210 leukemic sublines induced by drugs. Cancer Res. 32: 653~657, 1972
 5) 椎尾 剛: 癌化学療法剤とレンチナンの併用タイミング。第1報 Sarcoma-180 固型癌実験系。Chemotherapy 投稿中
 6) SMITH, J. T., BARAK, A. J. and THOMAS, L. E.: Cellular lipoproteins I. the insoluble lipoprotein of whole liver cells. Exp. Cell. Res. 13: 96~102, 1957
 7) 桂 義元: 蛋白質抗原によるマウスの遅延型過敏症の足跡試験。免疫実験操作法(日本免疫学会編) V: 1201~1205頁, 1975
 8) AKIYAMA, J., KAWAMURA, J., GOTODA, E., YAMADA, Y., HOSOKAWA, M., KODAMA, T. and KOBAYASHI, H.: Immunotherapy of transplanted KMT-17 tumor in WKA rats by combination of cyclophosphamide and immunostimulatory protein-bound polysaccharide isolated from basidiomycetes. Cancer Res. 37: 3042~3045, 1977
 9) 細川真澄男, 水島 豊, 小林 博: 癌の免疫および化学療法における合併時期の問題点。癌と化学療法 5: 1111~1117, 1978
 10) FISHER, B., WOLMARK, N., SAFFER, E. and FISHER, R. E.: Inhibitory effect of prolonged *Corynebacterium parvum* and cyclophosphamide administration on the growth of established tumors. Cancer 35: 131~143, 1975
 11) PEARSON, J. W., PEARSON, G. R., GIBSON, W. T., CHERMANN, J. C. and CHIRIGOS, M. A.: Combined chemoinmunostimulation therapy against murine leukemia. Cancer Res. 32: 904~907, 1972
 12) CURRIE, G. A. and BAGSHAW, K. D.: Active immunotherapy with *Corynebacterium parvum* and chemotherapy in murine fibrosarcoma. Brit. Med. J. 1: 541~544, 1970

COMBINATION AND TIMING OF LENTINAN WITH OTHER CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS

PART 2. STUDIES ON MOUSE SYNGENEIC SOLID TUMORS

TSUYOSHI SHIO

Life Science Laboratories, Central Research Laboratories,
Ajinomoto Co., Inc., Yokohama 244, Japan

Combinations of lentinan with other cancer-chemotherapeutic agents and their timing were studied in mouse syngeneic solid tumor systems.

When lentinan was administered in combination with cyclophosphamide, 5-fluorouracil or tegafur simultaneously, the growth of Lewis's lung carcinoma was suppressed more strongly than when treated with any of the either agents alone.

When cyclophosphamide preceded lentinan administration by two weeks, greater anti-tumor effect was achieved than when cyclophosphamide was given one week after lentinan administration.

Similar results were observed in B₁₆ melanoma and MM 102 mammary carcinoma systems.

To clarify the difference in effect of these combinations and their timing, we examined the foot pad reaction of MM 102-bearing C3H/He mice against MM 102 antigen.

In this syngeneic tumor-host system, the response against the tumor antigen was usually very weak, whereas an obvious immune response was observed at 7 to 28 days after the administration of cyclophosphamide 100 mg/kg corresponding to the timing of lentinan combination.