

癌化学療法剤とレンチナンの併用タイミング

第3報 マウス自家腫瘍系

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)

3-メチルコランスレンの皮下注射により誘導した自家腫瘍担癌マウスに対するレンチナンと癌化学療法剤の併用タイミングについて検討した。

レンチナンまたはサイクロホスファミドを個別に投与しても延命効果はみられなかった。両剤を同時併用しても、やはり無効であった。

しかしながら、サイクロホスファミド投与後 2~3 週目からレンチナンを投与した場合には有意な延命が認められた。

同様の結果がレンチナンと 5-フルオロウラシルの併用においても得られた。

自家腫瘍担癌マウスでは腫瘍抗原に対する足蹠反応は、どの時期にもみられなかった。サイクロホスファミドを投与した場合には、サイクロホスファミド投与後 5~6 週目に腫瘍抗原に対する反応がみられた。

癌を免疫的機序で治療しようとする試みは BURNET¹⁾ の免疫監視説に理論づけされ、現実的にも spontaneous tumor regression の報告²⁻⁴⁾に裏打ちされて、近年、急速に展開され、選択的に癌を攻撃する方法として大きな期待が持たれて来ている。

しかしながら、spontaneous tumor regression の報告は癌臨床全体から比べれば、極めて小数である。動物実験の中で最も癌臨床に近いと考えられる自家腫瘍の実験系で免疫療法が単独で成果をあげにくいことは、これらの事実とよく一致している。

現在も広く BRM の有効物質が探索されているが、一方において、既存の有効物質の使い方、特に他療法との併用について詳細な検討を重ねることが肝要であろう。

著者は、このような観点のもとに sarcoma-180 実験系⁵⁾、同系腫瘍実験系⁶⁾での検討に引き続いて、自家腫瘍実験系における癌化学療法剤とレンチナンの併用タイミングについて検討した。

I. 材料と方法

1) 自家腫瘍実験系：供試動物には C3H/He マウス・雌・5 週齢を用い、その腰部に 3-メチルコランスレン (MC) 1mg/マウスを皮下投与して、2~3 か月後に発癌して腫瘍が小豆大となった担癌マウスを対象とした。

小豆大 (直径約 5 mm) に腫瘍が発生定着した時点を

0 日とし、群分けして、翌日から薬剤投与を開始し、そのマウスが死亡するまでの日数を記録した。

なお、この自家腫瘍の実験では、通常 200~300 匹のマウスに MC 投与を施行し発癌最盛期には数十匹/週の発癌マウスが得られる。この同時発癌 (週単位) マウスごとに実験を行ない、その都度、対照群を組み入れている。したがって、試験マウス数は一定できなかった。

2) 癌化学療法剤：サイクロホスファミド (CY, 塩野義製薬)、マイトマイシン C (MMC, 協和醸酵) および 5-フルオロウラシル (5-FU, 協和醸酵) を用い、いずれも腹腔内注射した。

3) 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注射した。

4) 腫瘍抗原に対する応答性：自家腫瘍担癌マウスの腫瘍一部を切り取り、THOMAS らの方法⁷⁾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) を当該マウスの左後足蹠皮下に注射し、24 時間後の遅延型反応⁸⁾を dial thickness gauge で測定した。

II. 結果

1. レンチナンと癌化学療法剤併用による延命効果
癌化学療法剤としては CY または MMC を用いレンチナンとの併用による自家腫瘍担癌マウスの延命を検討した。その結果、単独では、いずれの薬剤も延命効果を示さなかった。レンチナンと癌化学療法剤を同時に併用開始した試験群も延命しなかった。一方、CY 投与後

2~3週目からレンチナン投与した群では有意な延命効果が認められた (Fig. 1)。

2. レンチナンと CY の併用タイミングの確認

Fig. 2 に示したように、レンチナン投与開始後7日目に CY 投与した試験群、レンチナン投与開始と同時に CY 投与した群では延命効果が全く認められていないが、CY 投与後1週目からレンチナン併用した試験群では延命傾向がみられ、CY 投与後2週目からレンチナンを併用した群では有意な延命効果が確認された。

3. レンチナンと癌化学療法剤の反復併用

癌化学療法剤投与後2週目からレンチナンを併用するタイミングで反復併用を試みたところ、MMC との併用、CY との併用、ともに延命効果が得られなかった (Fig. 3)。

4. CY 併用時のレンチナン投与量の検討

CY 投与後1~2週目からレンチナンを併用するタイミングにおいて、レンチナン投与量を変化させて検討した。その結果、試験した投与量範囲 (0.25~1 mg/kg) では 0.25 mg/kg が最も延命する結果が得られた (Fig.

| n | Administration schedule | Average life-prolongation rate (%) |
|----|-------------------------|------------------------------------|
| | +1 +1w +2w +3w +4w +5w | 0 100 200 |
| 5 | CY L1 | 50.2±17.1* |
| 6 | MMC L1 | 53.8±25.4 |
| 4 | CY L1 | 62.5±11.4 p<0.025 |
| 7 | CY | 45.4±13.7 |
| 7 | MMC | 51.0±24.3 |
| 10 | L1 | 48.2±16.3 |
| 9 | Control | 32.8±11.1 |
| 14 | CY L1 | 101.3±30.8 p<0.025 |
| 16 | Control | 48.0±31.2 |

CY : cyclophosphamide 100 mg/kg×1,i.p.
 MMC : mitomycin C 0.5 mg/kg×5,i.p.
 L1 : lentinan 1 mg/kg×20,i.p.
 *Average no. of survival days.

Fig. 1. Additive effect of lentinan and other chemotherapeutic agents on autochthonous solid tumor in mice

| n | Administration schedule | Average life-prolongation rate (%) |
|----|-------------------------|------------------------------------|
| | +1 +1w +2w +3w +4w +5w | 0 100 200 |
| 8 | CY L1 | 45.5±28.7* |
| 8 | CY L1 | 55.1±21.5 |
| 8 | CY L1 | 65.1±22.5 p<0.05 |
| 6 | L1 CY | 45.7±26.9 |
| 8 | L1 | 41.9±11.7 |
| 6 | CY | 45.5±17.0 |
| 14 | Control | 45.0±13.0 |

Fig. 2. Administration schedule of lentinan in combination with cyclophosphamide

| n | Administration schedule | Average life-prolongation rate (%) |
|----|--------------------------|------------------------------------|
| | +1 +2w +5w +7w +10w +12w | 0 100 |
| 16 | MMC L1 MMC L1 MMC L1 | 53.4±21.0* |
| 16 | MMC MMC MMC | 31.4±17.1 |
| 11 | Control | 45.4±21.8 |
| 18 | CY L1 CY L1 CY L1 | 48.6±10.6 |
| 16 | CY CY CY | 48.3±20.8 |
| 16 | L1 L1 L1 | 38.1±35.1 |
| 16 | Control | 48.1±20.0 |

MMC : mitomycin C 0.5 mg/kg×5,i.p.
 CY : cyclophosphamide 100 mg/kg×1,i.p.
 L1 : lentinan 1 mg/kg×20,i.p.
 *Average no. of survival days.

Fig. 3. Effect of repeated combination of lentinan and other chemotherapeutic agents on autochthonous solid tumor in mice

4)。

5. レンチナン長期投与時の CY 投与タイミング

これまでの実験ではレンチナン投与日数を 20 日間に限定していたが、これを2倍に長期投与して検討した。

| n | Administration schedule | Average life-prolongation rate (%) |
|----|-------------------------|------------------------------------|
| | +1 +1w +2w +3w +4w +5w | 0 100 200 |
| 8 | CY L1 | 55.1±21.5* |
| 14 | Control | 45.0±13.2 |
| 8 | CY L0.5 | 62.0±26.8 |
| 8 | CY L0.25 | 68.0±31.7 |
| 8 | L0.5 | 58.4±28.0 |
| 8 | L0.25 | 48.3±4.4 |
| 8 | Control | 48.1±4.4 |
| 8 | CY L1 | 65.1±22.5 p<0.05 |
| 14 | Control | 45.0±13.2 |
| 16 | CY L0.25 | 87.9±33.5 p<0.005 |
| 16 | Control | 48.0±31.2 |

CY : cyclophosphamide 100 mg/kg×1,i.p.
 L1 : lentinan 1 mg/kg×20,i.p.
 L0.5 : lentinan 0.5 mg/kg×20,i.p.
 L0.25 : lentinan 0.25 mg/kg×20,i.p.
 *Average no. of survival days.

Fig. 4. Dose of lentinan in combination with cyclophosphamide

| n | Administration schedule | Average life-prolongation rate (%) |
|----|-------------------------|------------------------------------|
| | +1 +1w +2w +3w +4w +5w | 0 100 200 |
| 8 | CY L5 | 66.5±31.7* |
| 8 | L5 | 46.6±26.8 |
| 8 | Control | 48.1±4.4 |
| 16 | L5 CY | 68.5±26.8 |
| 14 | L5 CY | 79.6±21.8 p<0.005 |
| 16 | Control | 48.0±31.2 |

CY : cyclophosphamide 100 mg/kg×1,i.p.
 L5 : lentinan 5 mg/kg×20 or ×40, i.m.
 *Average no. of survival days.

Fig. 5. Administration schedule of lentinan in combination with cyclophosphamide

| n | Administration schedule | Average life-prolongation rate (%) | |
|----|--|------------------------------------|-----|
| | | 0 | 100 |
| 7 | 5-FU +1 +1w +2w +3w +4w +5w --- L 0.25 --- | 70.4 ± 27.1* | |
| 8 | 5-FU | 47.8 ± 40.1 | |
| 16 | Control | 48.0 ± 31.2 | |

5-FU: 5-fluorouracil 25 mg/kg × 5, i.p.
L 0.25: lentinan 0.25 mg/kg × 20, i.p.
*Average no. of survival days

Fig. 6. Additive effect of lentinan and 5-fluorouracil on autochthonous tumor

その結果では、レンチナンよりも遅らせて CY 併用しても延命する結果が得られた (Fig. 5)。

6. レンチナンと 5-FU の併用

5-FU 投与後 2 週目からレンチナンを投与する併用タイミングで延命効果がみられた (Fig. 6)。

7. 腫瘍抗原に対する宿主免疫応答性検討

自家腫瘍担癌マウスでは個々の自家腫瘍抗原に対する宿主応答は極めて弱く作用していないと考えられたが、CY 200 mg/kg 腹腔内注射した場合には 5~6 週後に有意な自家腫瘍抗原に対する免疫応答がみられた (Fig. 7)。

III. 考 察

TOKUZEN ら^{9),10)}はレンチナンの自家腫瘍に対する効果を検討し、レンチナン単独、化学療法剤との併用、いずれも延命効果がないと報告している。MARTIN ら¹¹⁾は zymosan について単独では自家腫瘍に無効であるが化学療法剤との併用によって術後の自家腫瘍再発を抑制する効果が得られたと報告している。

著者らは 3-メチルコランスレンで誘導した自家腫瘍担癌マウスで検討し、レンチナン単独、ないし癌化学療法剤との同時併用では無効であったが、癌化学療法剤投与後 2~4 週目からレンチナンを併用すれば有意に延命効果が得られることを明らかにした。この自家腫瘍系では、通常状態では腫瘍抗原に対する宿主の免疫応答はみられないが、CY 投与した場合には 4~6 週後に自家腫瘍抗原に対する遅延型足蹠反応が陽性化する。この結果は CY とレンチナンの併用至適タイミングとよく一致した。

CY 投与の宿主免疫に対する影響については、一般的免疫抑制の他に suppressor T cell の優先的抑制¹²⁾、θ lymphocyte 増強¹³⁾、腫瘍抗原性増強¹⁴⁾ などの報告がある。

著者らは、先に同種腫瘍系³⁾、同系腫瘍系⁹⁾についてもレンチナンと CY の併用を報告しているが、今回の自家腫瘍系における検討を含めて総括すれば、レンチナンと CY の併用タイミングは宿主-腫瘍相互関係によって変わると考えられる。すなわち、同種腫瘍のように抗原性の

| n | Administration schedule | Foot pad reaction against tumor antigen (× 10 ⁻² cm) | | |
|---|-------------------------|---|----|----|
| | | 0 | 10 | 20 |
| 7 | ☆ | 75 ± 7.0* | | |
| 7 | CY ☆ | 8.0 ± 6.2 | | |
| 7 | CY ☆ | 8.7 ± 6.0 | | |
| 7 | ☆ | 14.2 ± 12.8 | | |
| 7 | CY ☆ | 25.2 ± 8.1 (p < 0.005) | | |
| 7 | CY ...L... ☆ | 35.4 ± 25.9 (p < 0.005) | | |
| 7 | CY ☆ | 28.7 ± 16.2 (p < 0.01) | | |

CY: cyclophosphamide 200 mg/kg × 1, i.p.
L1: lentinan 1 mg/kg/day, i.p.
☆: Estimation day of foot pad reaction.
*Average value of foot pad reaction against tumor antigen.

Fig. 7. Effects of drug administration on foot pad reaction against tumor antigen in autochthonous solid tumor bearing mice

高い実験系では、腫瘍抗原に対する宿主免疫応答の成立していない担癌初期では併用至適条件は広いが、腫瘍抗原に対する宿主免疫応答が確立した担癌中期では CY を先に投与することは、折角、成立している宿主の腫瘍免疫を破壊する危険性があり好ましくないと考えられた。一方、腫瘍抗原性の低い同系腫瘍系では、通常状態では腫瘍抗原に対する宿主免疫応答が成立していないので、まず、CY を先に投与して宿主の免疫応答がみられるようになった時期 (CY 投与後 1~3 週後) からレンチナンを併用することが望ましいと推測された。自家腫瘍系では、更に腫瘍の抗原性が低いと考えられ、CY 投与後 4~6 週目に腫瘍抗原に対する宿主免疫応答が陽性化し、これと相関して CY 投与後にレンチナンを併用するタイミングも遅れるものと考えられた。

5-FU との併用についても、同様の併用タイミングで延命効果が得られており、CY とレンチナンの併用タイミングの知見が他の癌化学療法剤との併用の際の参考になるものと考えられる。

文 献

- 1) BURNET, M.: Immunological Surveillance. Pergamon Press, Oxford/London/New York/Toronto/Sydney, 1969
- 2) MILLER, H. C. and WOODRUFF, W.: Spontaneous regression of pulmonary metastases from hypernephroma. Annals of Surgery 156: 852~856, 1962
- 3) BRUNSCHWIG: Spontaneous regression of cancer. Surgery 53: 423~431, 1963
- 4) 毛受松寿: 癌の自然退行または消失。医学のあゆみ 46: 282~285, 1963
- 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) 椎尾 剛: 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。

- Chemotherapy 36 : 208~212, 1988
- 7) 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
 - 8) 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) IV : 1201~1205頁, 1975
 - 9) TOKUZEN, R. and NAKAHARA, W.: Suppression of autochthonous graft of spontaneous mammary tumor by induced allogeneic graft rejection mechanism. *Cancer Res.* 33 : 645~647, 1973
 - 10) TOKUZEN, R., OKABE, M. and NAKAHARA, W.: Combined effect of cycloctidine and lentinan on spontaneous mammary tumors in mice. *Gann* 67 : 327~329, 1976
 - 11) MARTIN, D. S., HAYWORTH, P., FUGMANN, R. A., ENGLISH, R. and MCNEILL, H. W.: Combination therapy with cyclophosphamide and zymosan on a spontaneous mammary cancer in mice. *Cancer Res.* 24 : 652~654, 1964
 - 12) POLAK, L. and TURK, J. L.: Reversal of immunological tolerance by cyclophosphamide through inhibition of suppressor cell activity. *Nature* 249 : 654~656, 1974
 - 13) POULTER, L. W. and TURK, J. L.: Proportional increase in the θ -carrying lymphocytes in peripheral lymphoid tissue following treatment with cyclophosphamide. *Nature New Biology* 238 : 17~18, 1972
 - 14) 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

COMBINATION AND TIMING OF LENTINAN WITH OTHER CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS

PART 3. STUDIES ON MOUSE AUTOCHTHONOUS TUMOR

TSUYOSHI SHIIO

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

We studied the effect of combinations of lentinan with other cancer-chemotherapeutic agents and their timing on C3H/He mice bearing an autochthonous tumor induced by subcutaneous injection of 3-methylcholanthrene.

Administration of either lentinan or cyclophosphamide alone had no life-prolonging effect, nor was simultaneous use of the drugs effective.

Significant life-prolongation was obtained, however, when administration of lentinan was started two or three weeks after cyclophosphamide treatment.

Similar results were obtained with the combination of lentinan and 5-fluorouracil. In autochthonous tumor bearing mice, the foot pad reaction against tumor antigen was not observed at any time. When cyclophosphamide was administered, reaction against the tumor antigen was found after 5 to 6 weeks.