

昭和 61 年 8 月 18 日

カルボクリン末の薬理試験

大洋薬品工業株式会社 研究開発部

緒言

サルノコシカケ科に属するカワラタケの菌糸体より抽出されたタンパク多糖体は、担癌により低下した免疫応答機構に作用することにより抗腫瘍作用を発揮するものと考えられている。カワラタケの菌糸体より抽出されたタンパク多糖体は in vivo においてサルコーマ 180^{1、2)}、ラット腹水肝癌 AH-13^{1、2)}、メチルコラントレン誘発肉腫^{3、4)}、P388 マウス白血病⁵⁾およびジメチルヒドラジン誘発腸腫瘍⁶⁾等に対し、単独または他の制癌処置あるいは制癌剤との併用により抗腫瘍作用を示すことが認められている。一方、免疫機能は担癌および化学療法により低下することが知られているが、カワラタケの菌糸体より抽出されたタンパク多糖体は担癌状態によって低下した抗体産生能および細胞性免疫を回復させることが報告されている^{6、7、8、9、10)}。

今回、我々はカワラタケの菌糸体より抽出されたタンパク多糖体であるカルボクリン末について、クレスチンを対照として、(1)担癌状態における遅延型皮膚反応低下抑制作用および(2)免疫抑制因子による抗体産生能抑制に対する回復作用を測定し、同等性を比較検討したので報告する。

実験材料および方法

1. 薬物

カルボクリン末 製造記号：4EEC1 大洋薬品工業株式会社製

2. 動物

ICR 系雄性マウス(5 週齢前後、体重約 25g)を(株)富山実験動物より購入し、1 週間前後の予備飼育の後使用した。

3. 癌細胞

サルコーマ 180 腫瘍細胞 (CCRF-S-180、ATCC CCL8) およびエーリッヒ腹水腫瘍細胞 (ATCC CCL77) は、愛知県ガンセンター研究所化学療法部より分与を受けて用いた。

4. 実験方法

(1)遅延型皮膚反応

遅延型皮膚反応は Kondo ら¹⁰⁾の方法に準じて行った。

1)遅延性皮膚反応

マウス腹部を電気バリカンおよび電気カミソリで傷つけないように除毛し、翌日塩化ピクリル(PC)の1%エタノール溶液 100 μ L をガラス棒で腹部に広げて塗布し、初回感作した

(1日目) 8日目にPCの1%オリーブ油溶液を、左右の耳の表裏にそれぞれ15 μ Lずつガラス棒で塗布して遅延型皮膚反応を惹起し、その24時間後(9日目)にアップライトダイアルゲージ(尾崎製作所)で耳の厚さを測定した。測定後、腹部を再度除毛し、翌日PCの1%エタノール溶液100 μ Lを腹部に塗布して再度感作した。初回感作後17日目にPCの1%オリーブ油溶液で前記と同様にして遅延型皮膚反応を惹起し、24時間後(18日目)に耳の厚さを測定した。

2)サルコーマ180腫瘍細胞の移植

マウス腹腔内で3回継代したサルコーマ180細胞を0.2%トリパンブルー溶液で染色し、生細胞数を測定後、滅菌生理食塩水で希釈して 5×10^7 個/mLの細胞浮遊液を調製した。その0.1mLを初回PC感作直後に腋下部に皮下注射して腫瘍細胞を移植した。なお18日目の耳の厚さを測定後、動物を放血致死せしめ、腫瘍を摘出しその重量を測定した。

3)薬物投与

カルボクリン末およびクレスチンは精製水に溶解し、各々100mg/kgの用量で体重10g当たり0.1mLを、PC感作後5日目から17日目まで1日1回連続経口投与した。

(2)脾臓細胞の溶血斑形成細胞(HPFC)産生能

HPFC産生反応はCunninghamら¹¹⁾の方法に準じて行った。

1)免疫抑制因子の調製

マウス腹腔内で2~3回継代したエーリッヒ腹水腫瘍細胞を0.2%トリパンブルー溶液で染色し、生細胞数を測定後、滅菌生理食塩水で希釈して 5×10^6 個/mLの細胞浮遊液を調製し、その0.2mLをマウス腹腔内に注射して腫瘍細胞を移植した。8日後マウスを放血致死せしめ、腹水を採取し、あわせた後、4で $5000 \times g$ 、30分間遠心分離してその上清を分取した。次にMotokiら¹²⁾および松永ら¹³⁾の方法に従い、腹水上清から免疫抑制因子を精製した。すなわち腹水上清をメンブランフィルターXM-300(アミコン社)を用いて限外ろ過し、分子量30万以下の通過画分を得、更にこれをメンブランフィルターPM-30(アミコン社)を用いて限外ろ過し、分子量3万以上の膜内液を得た。得られた膜内液はセファデックスG-150(ファルマシア社)を用い、カラム長 3.6×50 cm、溶出液に0.01M等張リン酸塩緩衝液(pH7.2)を使用して流速0.8mL/分でゲルろ過を行った。溶出液はフラクションコレクターで6mLずつ分取し、280nmでの吸光度を測定した(UV-240、株島津製作所)。各フラクションはピークごとに集め、それぞれメンブランフィルターPM-30で濃縮後凍結乾燥した(フリーズドライヤー5、ラプコンコ社)。

2)HPFC産生能

生理食塩水に懸濁した羊赤血球(SRBC、東洋血清株) 1×10^9 個/mLをマウスに0.2mL尾静脈内注射して感作し(1日目)6日目に動物を放血致死せしめた後脾臓を摘出した。脾臓はハサミで切り込みを入れた後、200メッシュのステンレス網上に置き注射筒のピストンで押さえ付けてステンレス網を通し、0.2%炭酸水素ナトリウムおよび5U/mLのヘパリンを含むイーグルMEM培地(日水製薬株)5mL中に浮遊させ、単細胞浮遊液とした。イーグルMEM培地で8倍希釈した単細胞浮遊液0.1mL、 7.5×10^8 個/mLに調製したSRBC0.45mLおよび6倍希釈したモルモット血清0.45mL(補体価:294)を混和し、混液をカーニングムのチャンバー(高橋技研)に流し込み、チャンバーの両端を加温融解したパラフィンとワセリン等

量混合物に浸して封入した。チャンバーを 37℃、1 時間インキュベートした後 (H-12B 型、平沢製作所) 溶血斑を計数した。

3) 免疫抑制因子および薬物の投与

凍結乾燥した免疫抑制因子は生理食塩水に溶解し、400 μ g/匹の用量で SRBC 感作前日に腹腔内注射した (0.2mL/匹)。またカルボクリン末およびクレスチンは生理食塩水に溶解し、各々 50mg/kg の用量で体重 10g 当たり 0.1mL を、SRBC 感作の 2 日前から 1 日 1 回、3 日間腹腔内投与した。

5. 統計処理

統計処理は、F 検定により分散に有意差がないことを確認した後、スチューデントの t 検定により行った。

実験結果および考察

1. 遅延型皮膚反応

ICR 系マウスの耳に遅延型皮膚反応を惹起した時の耳の厚さの増加を表 2 に示した。PC 感作後 9 日目 (薬物投与 5 日間) では各群間に差は認められなかったが、18 日目 (薬物投与 14 日目) には遅延型皮膚反応のみを行った対照群の耳の厚さの増加に比較して、担癌群で有意な増加の抑制が起こった。これに対し、担癌動物にカルボクリン末またはクレスチンを 100mg/kg 経口投与した群では、担癌により抑制された耳の厚さの増加は、担癌群と比較し有意な回復を示し、対照群との間に有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。またカルボクリン末投与群とクレスチン投与群の間にも有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。なお PC 感作した動物にカルボクリン末を単独経口投与しても、耳の厚さは対照群と比較して有意差 ($p < 0.05$) が認められず、カルボクリン末が正常動物の遅延型皮膚反応に影響を及ぼさないことが確認された。

PC 感作後 18 日目の耳の厚さの測定後、動物を放血致死せしめ腫瘍重量を測定した結果を表 3 に示す。カルボクリン末またはクレスチンを 100mg/kg 投与した群は担癌群と比較して有意な腫瘍増殖の抑制が認められた。またカルボクリン末投与群とクレスチン投与群の間には有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。

これらの結果からカルボクリン末およびクレスチンは、サルコーマ 180 担癌状態における遅延型皮膚反応の低下を同程度の強さで回復させるものと考えられた。

表2 遅延型皮膚反応

(1) 9日目

群	用量 (mg/kg)	耳の厚さの増加 (mm × 10 ⁻²)										平均	標準 誤差
		動物番号											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
対照		17.6	14.0	3.1	11.6	8.9	20.7	10.3	5.0	6.5	7.8	10.5	1.8
担癌		19.0	11.2	8.4	5.4	7.0	3.5	17.6	8.6	6.9	6.6	9.4	1.6
担癌+カルボクリン末	100	10.0	15.8	1.7	9.0	8.7	8.5	16.6	11.5	9.0	9.9	10.0	1.3
担癌+クレスチン	100	5.9	17.5	15.0	8.9	6.9	5.3	12.4	6.6	7.1	19.8	10.5	1.7

(2) 18日目

群	用量 (mg/kg)	耳の厚さの増加 (mm × 10 ⁻²)										平均	標準 誤差
		動物番号											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
対照		32.9	29.5	23.5	29.7	29.1	34.4	21.0	21.9	24.0	24.9	27.1	1.5
担癌		24.2	23.9	14.1	9.7	死亡 ^{d)}	14.6	15.3	16.5	17.1	18.3	17.1 ^{a)}	1.5
担癌+カルボクリン末	100	39.9	22.9	24.5	20.0	30.3	21.9	19.4	21.7	20.6	19.6	24.1 ^{b)}	2.0
担癌+クレスチン	100	25.3	23.4	28.8	死亡 ^{e)}	22.5	20.8	28.6	24.6	30.3	26.7	25.7 ^{c)}	1.1
対照+カルボクリン末	100	31.9	22.6	27.3	35.3	20.2	26.9	28.9	24.5	22.3	28.8	26.9	1.5

a) 対照群に対する有意水準 a) : p<0.05

b, c) 担癌群に対する有意水準 b) : p<0.05 c) : p<0.01

d) 18日目に死亡 e) 17日目に死亡

表3 腫瘍重量

動物番号	腫瘍重量(g)		
	担癌	担癌+ カルボクリン末	担癌+ クレスチン
1	3.25	2.55	1.34
2	2.08	2.25	1.68
3	4.55	4.52	0.72
4	2.96	3.59	5.33 ^{b)}
5	5.49 ^{b)}	1.40	2.50
6	4.48	1.67	2.11
7	3.39	1.31	0.41
8	2.09	1.77	3.84
9	4.18	1.36	0.97
10	2.03	0.90	1.22
平均	3.45	2.13 ^{a)}	2.01 ^{a)}
標準誤差	0.38	0.36	0.48

a) 担癌群に対する有意水準 $p < 0.05$

b) 死亡例については死亡時の腫瘍重量を測定した。

2. HPFC 産生能

エーリッヒ腫瘍動物の腹水から精製した免疫抑制因子のゲルろ過パターンは図 1 に示すように大きく分けてフラクション 1 (Fr.1)、フラクション 2 (Fr.2) およびフラクション 3 (Fr.3) に分画され、各フラクションを SRBC 感作前日にマウスに腹腔内投与し、HPFC 産生能抑制を調べたところ (表 4)、HPFC 反応のみを行った対照群と比較し、HPFC 数は Fr.3 投与群で減少した。

これらの結果は松永らの報告¹³⁾とよく一致した。更に Fr.3 を 25~400 μ g/匹の用量で腹腔内投与した時 (表 5)、用量依存的な免疫抑制作用を示し、400 μ g/匹投与群では対照群と比較して有意差 ($p < 0.01$) が認められた。これらのことから免疫抑制因子は Fr.3 を 400 μ g/匹の用量で投与することとした。

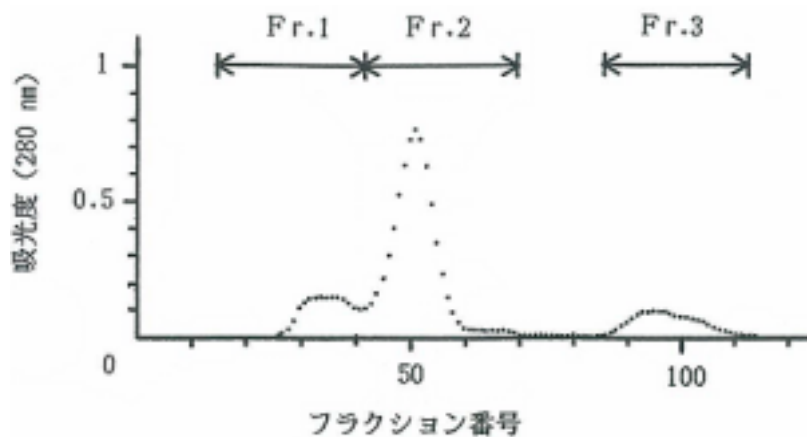


図1 免疫抑制因子のゲルろ過パターン

表4 各フラクションの HPFC 産生能抑制作用

群	投与量 ($\mu\text{g}/\text{匹}$)	脾臓当たり HPFC 数 ($\times 10^3$)						平均	標準誤差
		動物番号							
		1	2	3	4	5	6		
対照		357	735	724	554	550	513	572	58
Fr.1	400	854	681	419	244	567	474	540	87
Fr.2	400	100	659	465	626	700	444	499	90
Fr.3	100	226	409	572	280	309	456	357 ^{a)}	52

a) 対照群に対する有意水準 a) : $p < 0.05$

表5 免疫抑制因子の投与量

群	投与量 ($\mu\text{g}/\text{匹}$)	脾臓当たり HPFC 数 ($\times 10^3$)						平均	標準誤差
		動物番号							
		1	2	3	4	5	6		
対照		357	735	724	554	550	513	572	58
Fr.3	25	406	291	202	598	919	406	470	105
Fr.3	100	589	446	339	528	276	206	397	61
Fr.3	400	346	202	280	317	172	352	278 ^{a)}	31

a) 対照群に対する有意水準 a) : $p < 0.01$

免疫抑制因子による HPFC 産生能低下に対する薬物の作用を表 6 に示した。脾臓辺りの HPFC 数は免疫抑制因子 (Fr.3) 400 $\mu\text{g}/\text{匹}$ の投与により有意に減少した。これに対しカルボクリン末およびクレスチンを 50mg/kg 腹腔内投与した群では、免疫抑制因子により低下した HPFC 数は有意に増加し、対照群との間に有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。またカルボクリン末投与群とクレスチン投与群の間にも有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。なお SRBC 感作のみを行った動物にカルボクリン末を単独腹腔内投与しても、HPFC 数は対照群と比較して有意差 ($p < 0.05$) が認められず、カルボクリン末は正常動物の HPFC 産生能に影響を及ぼさないことが確認された。

これらの結果からカルボクリン末およびクレスチンは、免疫抑制因子による抗体産生能の低下を同程度の強さで回復させるものと考えられた。

表6 HPFC 産生能

群	投与量 (mg/kg)	脾臓当たり HPFC 数 ($\times 10^3$)						平均	標準誤差
		動物番号							
		1	2	3	4	5	6		
対照		350	409	504	391	883	541	513	80
Fr.3		231	106	256	281	293	148	219 ^{a)}	31
Fr.3+カルボクリン末	50	481	413	472	711	409	528	502 ^{b)}	46
Fr.3+クレスチン	50	446	743	619	717	389	380	549 ^{b)}	67
対照+カルボクリン末	50	543	544	480	352	557	326	467 ^{b)}	42

a) 対照群に対する有意水準 a) : $p < 0.01$

b) Fr.3 投与群に対する有意水準 b) : $p < 0.01$

結論

ICR系マウスにおけるサルコーマ180担癌状態でのPCによる遅延型皮膚反応低下およびエーリッヒ腹水腫瘍から精製した免疫抑制因子によるHPFC産生能低下は、カルボクリン末またはクレスチン投与により回復した。またこれらの回復作用の強さにおいてカルボクリン末とクレスチンの間に有意差が認められず、両薬物の薬効に差は無いと判断した。

文献

- 1) 塚越茂, 医学のあゆみ, **91**, 505(1974).
- 2) S.Tsukagoshi et al., Gann, **65**, 557(1974).
- 3) R.Ohno et al., Gann, **66**, 679(1975).
- 4) S.Abe et al., Gann, **69**, 223(1978).
- 5) F.Oh-hashii et al., Gann, **69**, 255(1978).
- 6) M.Sakita et al., Gann, **74**, 351(1983).
- 7) K.Nomoto et al., Gann, **66**, 365(1975).
- 8) C.Yoshikumi et al., Gann, **66**, 649(1975).
- 9) 中野陽典ら, 日本癌学会総会 要旨集, **32**, 282(1973).
- 10) T.Kondo et al., Gann, **72**, 293(1981).
- 11) A.J.Cunningham et al., Immunology, **14**, 599(1968).
- 12) M.Motoki et al., Gann, **66**, 569(1975).
- 13) 松永謙一ら, 癌と化学療法, **7**, 496(1980).