BCG と PS-K の雌マウスによる雄皮膚移植片拒絶に対する促進効果

瀬尾幸一郎・佐伯清美*

Acceleration by BCG and PS-K of the rejection of male skin grafts by female mice BCG, protein-bound polysaccharide Kureha (PS-K) and levamisole which have been used in tumor immunotherapy were studied for the effect on the rejection of male skin grafts by female mice. The graft rejection was significantly accelerated by one s.c. injection of BCG (5×10^5 microorganisms/mouse) into recipients on the day of transplantation. PS-K injected 250 mg/kg s.c. or i.p. once every other day from the day of transplantation significantly stimulated the graft rejection. Oral administration of 1000 mg/kg PS-K by the same schedule was also effective. Levamisole 20 mg/kg injected s.c. once on the day of transplantation was without any effect.

From these results it is concluded that PS-K has an immunostimulant action similar to that of BCG. This property may be important to the antineoplastic activity of PS-K.

Saiichirou Seo • Kiyomi Saeki

Department of Pharmacology, Okayama University Medical School

腫瘍細胞に腫瘍特異抗原が存在することは、悪性腫瘍に対する免疫療法の基礎となるが¹⁾、腫瘍の増殖特性および腫瘍特異抗原の強さは、移植世代によって変化する。このような変動は実験腫瘍の増殖を免疫系の指標として利用する場合の大きな欠点となる²⁾。一方、純系マウスにおける雌による雄皮膚移植片の拒絶は、性染色体関連組織適合抗原、すなわち H-Y 抗原によるもので^{3~5)}、それが免疫学的性格の反応であることは second-set response によって指摘されている⁶⁾。H-Y 抗原の強さはマウスの系によって一定しているので、雌マウスによる雄皮膚移植片の拒絶は、腫瘍の拒絶にくらべて再現性がより大きいものと期待される。そこで、この伴性皮膚移植片拒絶に及ぼす薬物の効果は、悪性腫瘍の免疫療法における潜在的な臨床的有効性の一つの指標としての価値があるように思われる。

BCG は、悪性腫瘍の治療に広く使用されている^{7,8)}。合成物質である levamisole の臨床的有効性に関しても、すでに多くの報告がある⁹⁾。カワラタケの菌糸体由来の蛋白多糖体 protein-bound polysaccharide Kureha (PS-K) は、ヒトの悪性腫瘍の免疫療法に使用されているが、伴性移植片拒絶に対するその効果は、いまだ検討されていない。また、この実験系における BCG と levamisole の効果を比較した報告もない。そこで筆者らは、今回の研究で BALB/c 系雌マウスによる雄皮膚移植片の拒絶に対する BCG, levamisole および PS-K の効果

を比較検討した。

材料と方法

(1) 動物

5~8 週齢の BALB/c 系マウス (岡山大学医学部マウスコロニー) を使用した。

(2) 皮膚移植

皮膚移植は、Billingham & Medawar¹⁰⁾ の方法に従って、雄の皮膚片を雌に移植した。皮膚移植の 1 または 2 日前に背部の毛をバリカンと除毛クリームを使って、除去した。スタンピング機をつけた内径 11.5 mm、外径 14 mm の試験管の口を消毒した背部皮膚に当て、切開の目印とした。移植片受給マウスでは、切開線の内縁に panniculus carnosus を切断しないように眼科用ハサミで浅い小切開を加えた。皮膚層と panniculus carnosus の間に剝離子を挿入し、移植床範囲の皮膚層を panniculus carnosus から剝離した。その後、目印の内縁に沿って皮膚層を切除し、移植床を作製した。移植片供与マウスでは、目印の外縁に前記と同様の小切開を加えた。panniculus carnosus から剝離した皮膚層を目印の外縁に沿って切除し、移植片を作製した。移植片は受給マウスの毛並みと 90° の角度で移植床にのせた。移植片の辺縁を周囲の皮膚と適合させ、その数カ所を α -シアノアクリレートで接着した。皮膚移植片に硫酸フラジオマイシン含有ワセリンガーゼ (Sofratulle®) および滅菌ガーゼを当てた。ビニールテープでガーゼを皮膚に固定し、その上に伸縮包帯で被った。最後に、伸縮包帯の辺縁を

* 岡山大学医学部薬理学教室

表 1 雌マウスによる雄皮膚移植片拒絶および死亡率に及ぼす BCG と levamisole の効果

	生着した皮膚移植片数／全例数（％）								移植後 8 週間に おける死亡率
	移 植 後 の 週 数								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
対照群	39/39 (100)	39/39 (100)	36/39 (92)	33/38 (87)	27/38 (71)	26/38 (68)	24/38 (63)	23/38 (61)	1/39
BCG	21/21 (100)	17/21 (81) ^a	14/21 (67) ^b	8/21 (38) ^a	8/21 (38) ^b	6/21 (29) ^a	5/21 (24) ^a	4/21 (19) ^a	0/21
levamisole	25/25 (100)	24/25 (96)	20/24 (83)	19/24 (79)	18/24 (75)	18/24 (75)	17/24 (71)	17/24 (71)	1/25

BCG 5×10^5 個/マウス, levamisole 20 mg/kg を移植当日 1 回皮下注射. 対照群は無処置.
対照群との間に有意差 (χ^2 -検定): ^a $P < 0.005$. ^b $P < 0.025$.

表 2 雌マウスによる雄皮膚移植片拒絶および死亡率に及ぼす PS-K の効果

	生着した皮膚移植片数/全例数　（％）								移植後 8 週間における死亡率
	移　植　後　の　週　数								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
対照群	13/13 (100)	13/13 (100)	11/12 (92)	10/11 (91)	10/11 (91)	10 ^a /11 (91)	10 ^a /11 (91)	10 ^a /11 (91)	2/13
PS-K　s.c	18/18 (100)	15/18 (83)	14/18 (78)	12/18 (67)	9/18 (50) ^f	9 ^b /18 (50) ^f	5 ^b /18 (28) ^g	4 ^b /18 (22) ^g	0/18
PS-K　p.o	24/24 (100)	24/24 (100)	18/22 (82)	15/22 (68)	14/22 (64)	10 ^c /19 (53) ^e	8 ^d /18 (44) ^f	8 ^d /18 (44) ^f	6/24
PS-K　i.p	18/18 (100)	15/16 (94)	13/15 (87)	13/15 (87)	13/15 (87)	12 ^h /14 (86)	10 ^h /14 (71)	10 ^h /14 (71)	4/18

PS-K を移植当日より隔日投与. 皮下および腹腔内投与群 250 mg/kg, 経口投与群 1000 mg/kg. 対照群には生理的食塩水を腹腔内投与.

^a すべての移植片が健康に生着. ^b このうちの 1 例が健康に生着. ^c このうちの 8 例が健康に生着.

^d このうちの 7 例が健康に生着.

^e $P < 0.05$. ^f $P < 0.025$. ^g $P < 0.005$. : 対照群との間の有意差 (χ^2 -検定).

^h このうちの 6 例が健康に生着. 健康に生着した移植片についてみると対照群との間に有意差 ($P < 0.025$).

ピニルテープで皮膚に固定した.

(3) 薬 物

BCG (日本薬局方乾燥 BCG ワクチン, $6 \sim 8 \times 10^7$ 個/mg, 日本ビーシー製造), levamisole (協和醗酵) および PS-K (呉羽化学) を使用した. BCG (5×10^3 個/マウス) および levamisole (20 mg/kg) は, 移植当日 1 回大腿部に皮下注射した. PS-K は移植当日より隔日投与した. 用量は腹腔内および皮下 (両側大腿部) 注射の場合は 250 mg/kg, 経口投与の場合は 1000 mg/kg とした.

BCG および levamisole についての実験では, 無処置動物を対照群とし, PS-K についての実験では, 0.9% 生理的食塩水を腹腔内注射した動物を対照群とした.

(4) 皮膚移植片の観察

皮膚移植片は, 毎週 1 回以上, 発毛, 落屑, 変色, び

らん, 潰瘍, および硬結などの有無およびその程度について観察した.

成 績

(1) 雌マウスによる雄皮膚移植片植拒絶

表 1 に示すように, 無処置対照群においては, 移植後 2 週目まですべての移植片は健康に生着していた. 3 週目にはじめての拒絶が観察され, 生着率は経時的に減少し, 8 週目の生着率は約 60% であった. 個々の移植片についてみると, 拒絶の症状が 1 度あらわれると, 拒絶反応は急速に進行し, 通常 1 週間以内に拒絶は完了した. 移植後 7 および 8 週目に生着していた皮膚移植片は, 外見上は健康であった.

表 2 に示すように, 0.9% 生理的食塩水を腹腔内注射した対照群では, 皮膚移植後 3 週目にはじめて 1 例の拒

図1 皮膚移植後の雌マウスの体重増加に及ぼす BCG と levamisole の効果

BCG, 5×10^5 個/マウス (●), levamisole 20 mg/kg (△) を移植当日 1 回皮下注射. 対照群 (○) は無処置. 各点は, 下に示した数の動物についての平均値で, たて棒は標準誤差.

図2 皮膚移植後の雌マウスの体重増加に及ぼす PS-K の効果

PS-K を移植当日より隔日投与. 皮下 (△) および腹腔内 (●) 投与群は 250 mg/kg, 経口投与群 (□) は 1000 mg/kg, 対照群 (○) には生理的食塩水を腹腔内投与. 各点は, 下に示した数の動物についての平均値で, たて棒は標準誤差.

絶が観察された. 8 週目の生着率は約90%で, 個々の移植片は健康であった.

BCG 注射群では, 移植後 1 から 2 週目の間に移植片拒絶がはじめて認められた. BCG 注射群の生着率は対照群にくらべてより急速に減少し, 2 週目以降, BCG 注射群と対照群の生着率の間には推計学的に有意差が認められた. BCG 注射群の 8 週目の生着率は約20%であった (表1). 個々の移植片拒絶は BCG 注射群では対照群とくらべてより急速に進行した. しかし, 移植後 7 および 8 週目に生着していた移植片は外見上健康であった.

levamisole 注射群では, 移植片拒絶は対照群とほとんど同様の経過をたどった (表1).

表2に示すように, PS-K を皮下注射した場合, 移植後 2 週目より移植片拒絶の促進効果が認められ, この効果は時間の経過とともに明らかになった. 5 週目以降, PS-K 皮下注射群と対照群との間には, 生着率に有意差

が認められた. PS-K を皮下注射したマウスの個々の移植片についてみると, 健康なものは少なく, 異常所見を呈した不健康な移植片が多かった.

PS-K 経口投与群では, 移植後 3 週目より拒絶が観察された. 生着率は経時的に低下し, 6 週目以降対照群との間に有意差が認められた. 8 週目の生着率は44%であった (表2).

PS-K 腹腔内注射群では, 生着率は対照群とほぼ同様の経過で低下し, 8 週目の生着率は約70%であった. しかし, 移植後早期から不健康に生着した移植片が多くみられた. 健康に生着した移植片は, 6 週目以降約40%で, この点については対照群との間に有意差が認められた (表2).

(2) 体重増加および死亡率

図1, 2に示すように, levamisole 処置群および PS-K の皮下ならびに腹腔内注射群においては, 今回の被験用量および投与方法では, 体重増加の抑制は認められな

った。BCG 注射群および PS-K 経口投与群においては、移植後3週目まで対照群とくらべて体重増加にわずかの抑制がみられた。しかし、BCG, levamisole および PS-K 投与群のいずれにおいても、全観察期間中明らかな中毒症状および死亡率の増加は認められなかった(表1, 2)。

考 察

Eichwald ら⁴⁾ および Sachs & Heller⁶⁾ は、BALB/c 系雌マウスによる雄皮膚移植片の拒絶は、移植後41から51日以内に、80から100%の受給マウスで完了したと報告している。しかし、BALB/c 系マウスを使用した今回の実験では、移植後8週目において受給マウスの大多数は、健康な皮膚移植片を保持していた。同様な違いが C3H 系マウスに関しても報告されている。すなわち、Eichwald らは、移植後約50日以内に C3H 雌受給マウス7例中6例が雄皮膚移植片を拒絶したことを観察し⁴⁾、Sachs & Heller は、21例の受給マウスのすべてが71日以内に移植片の拒絶を完了したことを報告している⁶⁾。ところが、これと反対に、Goldberg ら¹¹⁾ および Coons & Goldberg¹²⁾ は、それぞれ C3H/An および C3H/HeJ マウスを使用して、雄皮膚移植片がいつまでも生着していたことを観察した。筆者らの成績と Eichwald ら⁴⁾ および Sachs & Heller⁶⁾ の成績の差異がいかなる理由によるかは不明であるが、使用したマウスの遺伝的差異がその原因であるかもしれない。

Coons と Goldberg は、脾臓摘出した C3H/An 雌マウスと C3H/HeJ 雌マウスが雄皮膚移植片に対して異なった強さの拒絶反応を示すことを発見し、これは C3H 亜系間における免疫学的差異のためであろうと考えている¹²⁾。

Wile & Sparks³⁾ は、比較的小用量 (5×10^5 個/マウス) の Tice 株 BCG が、C57BL/6JCR 雌マウスによる雄皮膚移植片の拒絶を促進したと報告している²⁾。筆者らは、違った系のマウスおよび BCG 株を使った今回の実験で、彼らの報告を確認することができた。ただし、筆者らの使用したマウスとくらべて、彼らの実験ではより多くの割合の受給マウスが移植片を拒絶した。

以上の結果から判断して、H-Y 系による移植片拒絶の強さに系統間でいちじるしい差異があるにもかかわらず、伴性皮膚移植片拒絶に対して BCG はいかなるマウスの系でも有効な促進効果を発揮すると思われる。

また、今回の成績は、つぎのように解釈できよう。それは、無処置の場合にはおそらく移植片を受容したであろうと思われる高率の受給マウスに、BCG が拒絶を惹起したということである。このような受給マウスでは、BCG はおそらく、移植片拒絶を誘発するには不十分な程度の弱い細胞性免疫応答を、十分な水準にまで高めた

ものとみられる。

levamisole は、減弱した細胞性免疫応答を正常に回復させる抗アレルギー性の薬物であり、正常以上には免疫応答を促進しないという証拠がある¹³⁾。マウスの伴性皮膚移植片拒絶に対する levamisole の効果に関する研究は少ない。

Chirigos らは、移植当日1回 levamisole 20 mg/kg を腹腔内注射した雌受給マウスが対照群よりも、早く雄皮膚移植片を拒絶したと報告している¹⁴⁾。

Renoux らは、C57BL/6 マウスについての5セットの実験のうち3セットで、levamisole による伴性皮膚移植片拒絶の促進が起こったと報告している¹⁵⁾。しかし、彼らは levamisole 投与群と対照群との間の推計学的有意差の検定をしていない。筆者らの実験は、C57BL/6 のかわりに BALB/c 系マウスを使い、levamisole を腹腔内ではなく皮下に注射した点で、Chirigos ら¹⁴⁾ および Renoux ら¹⁵⁾ の実験と異なっている。しかし、筆者らは移植片拒絶に対する levamisole の促進効果を認めることができなかった。ただし、他の用量あるいは投与方法では、levamisole がこの免疫応答を促進する可能性は否定できない。今回の実験結果は、levamisole が免疫促進剤というよりはむしろ抗アレルギー剤 (antianergic agent) であるという従来の報告¹³⁾と矛盾しないように思われる。

PS-K は、マウスにおける肉腫-180¹⁶⁾ や、扁平上皮癌¹⁷⁾、およびラットにおける腹水肝癌 AH-13¹⁶⁾ や 3-メチルコラントレン誘発線維肉腫¹⁸⁾ のような腫瘍の *in vivo* での発育を抑制する。PS-K は、担癌動物における減弱したヒツジ赤血球に対する液性抗体の産生¹⁹⁾、および塩化ビクリルに対する遅延型過敏反応²⁰⁾をいちじるしく正常化させる。

現在、PS-K は、悪性腫瘍に対する免疫療法薬として臨床的に使用されている。しかし、伴性皮膚移植片の拒絶に及ぼす PS-K の効果はいまだ研究されていない。今回の研究で、体重増加の抑制および中毒症状を示さない用量で、皮下および経口投与した PS-K が H-Y 抗原による皮膚移植片拒絶を促進した。このことは、PS-K が担癌動物において証明される抗アレルギー作用^{19,20)}に加えて、正常以上に免疫応答を増強する免疫促進剤でもあることを示唆している。

PS-K には、皮下、経口、腹腔内投与の順で弱まる拒絶促進効果が認められた。この効果の差異がいかなる原因によるかは不明である。腹腔内投与した PS-K の大部分は門脈系に吸収され、肝臓で代謝されるものとみられるので、これが腹腔内投与した PS-K の効果が弱い一つの原因であるかもしれない。

Wile & Sparks は、BCG の移植片拒絶促進効果は、腹腔内投与したときのほうが皮下あるいは筋肉内投与し

たときよりも弱いことを発見し、これは腹腔内投与した BCG による suppressor macrophage の活性化の結果だろうと推測した²⁾。腹腔内投与した PS-K の場合にも同様の現象が起こるのかもしれない。

PS-K は、臨床的には経口投与されている。今回の実験でも、経口投与した PS-K が明らかに皮膚移植片拒絶を促進した。従来より、経口投与した血清アルブミンのような巨大分子が免疫系に影響を与えることよく知られている²¹⁾ので、今回のように蛋白結合多糖体が経口投与によって、細胞性免疫応答を増強しても不思議ではない。消化管内で分解されなかった PS-K の一部が、Peyer 氏板、その他で細胞性免疫に関与する細胞を活性化するのかもしれない。

文 献

- 1) Southam, C. M.: History and prospects of immunotherapy of cancer: an introduction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 277: 1-6, 1976.
- 2) Wile, A.G., Sparks, F.C.: Effect of dose, route, and schedule of BCG on antibody titer and survival of murine skin grafts across a weak histocompatibility barrier. *Cancer* 39: 570-574, 1977.
- 3) Bernstein, S.E., Silvers, A.A., Silvers, W.K.: An attempt to demonstrate a Y-linked histocompatibility gene in the house mouse. *J. nat. Cancer Inst.* 20: 577-580, 1958.
- 4) Eichwald, E.J., Silmsker, C.R., Weissman, I.: Sex-linked rejection of normal and neoplastic tissue. I. Distribution and specificity. *J. nat. Cancer Inst.* 20: 563-575, 1958.
- 5) Eichwald, E.J., Silmsker, C.R., Wheeler, N.: The genetics of skin grafting. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 64: 737-740, 1957.
- 6) Sachs, L., Heller, E.: The sex-linked histocompatibility antigens. *J. nat. Cancer Inst.* 20: 555-561, 1958.
- 7) Bast, R.C. Jr., Zbar, B., Borsos, T., Rapp, H. J.: BCG and cancer. *New Engl. J. Med.* 290: 1413-1420, 1458-1469, 1974.
- 8) Mastrangelo, M.J., Berd, D., Bellet, R.E.: Critical review of previously reported clinical trials of cancer immunotherapy with non-specific immunostimulants. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 277: 94-123, 1976.
- 9) Amery, W.K.: Double-blind levamisole trial in resectable lung cancer. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 277: 260-268, 1976.
- 10) Billingham, R.E., Medawar, P.B.: The technique of free skin grafting in mammals. *J. exp. Biol.* 28: 385-402, 1951.
- 11) Goldberg, E.H., Boyse, E.A., Scheid, M., Bennett, D.: Production of H-Y antibody by female mice that failed to reject male skin. *Nature New Biol.* 238: 55-57, 1972.
- 12) Coons, T.A., Goldberg, E.H.: Rejection of male skin grafts by splenectomized female mice. *Science, N.Y.* 200: 320-321, 1978.
- 13) Symoens, J.: Levamisole, an antianergic chemotherapeutic agent: an overview. in: *Control of neoplasia by modulation of the immune system: Progress in Cancer Research and Therapy*, vol. 2. ed. M.A. Chirigos; Raven Press, New York, 1977, p. 1-24.
- 14) Chirigos, M.A., Pearson, J.W., Pryor, J.: Augmentation of chemotherapeutically induced remission of a murine leukemia by a chemical immunoadjuvant. *Cancer Res.* 33: 2615-2618, 1973.
- 15) Renoux, G., Renoux, M., Teller, M.N., McMahon, S., Guillaumin, J.M.: Potentiation of T-cell mediated immunity by levamisole. *Clin. exp. Immunol.* 25: 288-296, 1976.
- 16) Tsukagoshi, S., Ohashi, F.: Protein-bound polysaccharide preparation, PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat ascites hepatoma AH-13 by oral use. *Gann* 65: 557-558, 1974.
- 17) Usui, S., Urano, M., Koike, S., Kobayashi, Y.: Effect of PS-K, a protein polysaccharide, on pulmonary metastases of C3H mouse squamous cell carcinoma. *J. nat. Cancer Inst.* 56: 185-187, 1976.
- 18) Akiyama, J., Kawamura T., Gotohda, E., Yamada, Y., Hosokawa, M., Kodama, T., Kobayashi, H.: Immunochemotherapy 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.
- 19) Nomoto, K., Yoshikumi, C., Matsunaga, K., Fujii, T., Takeya, K.: Restoration of antibody-forming capacities by PS-K in tumor-bearing mice. *Gann.* 66: 365-374, 1975.
- 20) Nakano, Y., Taguchi, T., Shiba, S., Arakawa, Y.: Influence of protein polysaccharide (PS-K) isolated from Basidiomycetes on delayed hypersensitivity in sarcoma-180 bearing mice. *Proc. Japan. Cancer Assoc.* 32: 282, 1973.
- 21) Sewell, H.F., Gell, P.G.H., Basu, M.K.: Immune responsiveness and oral immunization. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 58: 414-425, 1979.