ヌードマウス実験

ヌードマウス可移植性ヒト悪性黒色腫および
腎癌に対する WPG の抗腫瘍効果

石原 和之^{*1)} 小出 勉^{*2)} 小松 輝夫^{*2)}

Summary

WPG (whole peptidoglycan) はビフィズス菌の 1 種である *Bifidobacterium infantis* 由来の新しい BRM である。その作用として NK 活性の増強作用と IL-1 誘起能、局所免疫反応と腫瘍の退縮、抗腫瘍 T 細胞の誘導などが知られている。我々はヌードマウス可移植性ヒト悪性黒色腫 (SK-14) およびヒト腎癌 (RCC-1) を移植して WPG の増殖抑制効果を検討した。投与は腫瘍内投与と皮下投与で行い、連日 15 回投与後、SK-14 は 13 日目、RCC-1 は 9 日目に切除し、重量を測定し、コントロールと比較して抑制率を検討した。また、同時に病理組織学的にも観察した。抑制率はコントロールと比較してそれほど顕著ではなかったが、皮下投与の方が腫瘍内投与より優れている印象を受けた。また、WPG 投与による組織の変化はいずれも腫瘍細胞の壊死が著明で効果は組織的には PR と考えられた。

緒 言

WPG (Whole peptidoglycan) は腸内常在菌であるビフィズス菌の一種である *Bifidobacterium infantis* から菌体内成分を除去精製した全細胞壁構造物質である。本菌種は母乳栄養児の腸内に存在し、母乳栄養児の高い感染抵抗性に重要な役割を担っているとされている。WPG の抗腫瘍性に関しては Sekine¹⁾ および Kohwira²⁾ により細胞壁画分の抗腫瘍活性が明らかにされた。化学的には約 70% の中性糖と 5～6% のアミノ糖および約 17% のアミノ酸からなり、水に対し、容易にかつ均一に分散する。また、

WPG はその分離過程において物理的および化学的な破壊操作を行っていないので、全菌の形状をそのまま保持しているのが大きな特徴である。WPG の免疫学的性格としては NK 活性の増強、局所免疫反応 (T cell の出現)、ヒト末梢血由来の Monocyte に対しての IL-1 誘起活性などが観察されている³⁾。

また、現在、臨床的には phase I study が終了し⁴⁾、皮膚科領域にては腫瘍内投与の phase II が開始され、途中経過ではあるが、メラノーマや皮膚悪性リンパ腫、その他に有効症例が認められている。一方、WPG の全身投与については従来、検討されていなかったが、その優れた抗腫瘍性から改めて全身投与への応用が検討され、基礎的にその確認の実験を行うことになった。すなわち、ヒト悪性黒色腫および腎癌をヌードマウスに移植し、腫瘍内投与と皮下投与を試み、その感受性を比較検討した。

^{*1)} Kazuyuki ISHIHARA : 国立がんセンター病院皮膚科

^{*2)} Tsutomu KOIDE, Teruo KOMATSU : 同研究所実験動物管理室

材料および方法

使用動物は、日本クレア株式会社において Specific pathogen free (S.P.F) 下で飼育されたヌードマウス BALB/cAJcL-nu の雌で 6 週齢、体重 20~22g のものを用いた。対象腫瘍はヒト悪性黒色腫 SK-14 株とヒト腎癌 RCC-1 株の 2 種である。腫瘍の移植および効果の判定は両腫瘍とも次の様に行った。

あらかじめヌードマウスの皮下で増殖させた腫瘍を摘出し、細切した腫瘍片 (3 mm 角) をトロカール針を用いてヌードマウスの右背部皮下に移植し、20 日後、径が $5 \times 5 \times 3$ mm 以上になった腫瘍を治験の対象とした。

腫瘍は 5 日間隔でキャリパーを用い推定腫瘍重量 ($a \times b^2 / 2$, a : 長径, b : 短径) を測定し、増殖曲線を描いた。

効果判定は腫瘍増殖曲線および投与終了後に摘出した腫瘍重量比 ($T/C = \text{治療群の平均重量} / \text{対象群の平均重量}$) により行った。

最終判定は移植後 SK-14 では 48 日目、RCC-1 では 36 日目に行い、同時に切除し、病理組織学的検討を施した。

被検薬剤については一部記載したが、森永乳業より提供されたもので、*Bifidobacterium infantis* から精製細胞壁を分離し、これを WPG と名付けたものである。

投与法は悪性黒色腫 (SK-14) も腎癌 (RCC-1) も同様であるので一括して記載する。両者とも腫瘍内投与、あるいは皮下投与により、腫瘍移植後 SK-14 では 21 日目、RCC-1 では 13 日目より次の 3 群に分けて投与を開始した。すなわち、WPG $50 \mu\text{g}/\text{head}$ 群、 $100 \mu\text{g}/\text{head}$ 群、また同時に対照 (コントロール) 群として 5% Mannitol をそれぞれ連日 15 回投与した。

結 果

SK-14 と RCC-1 について、それぞれ別に記

載する。

I. ヒト悪性黒色腫 SK-14 について

1) 腫瘍内投与 (i.t.)

縦軸に tumor size (mg), 横軸に観察期間 (移植後, 治療開始日より) をおいて図 1 に各群の増殖曲線を示した。WPG $100 \mu\text{g}$ 投与群ではコントロール群に比較して 16% の増殖抑制が観察された。これに対し $50 \mu\text{g}$ 投与群では見かけ上 103% の増殖 (約 2 倍) を示した。

しかし、この重量は実際の重量ではなく計算上のものであり、切除後の最終重量比による判定では中等度の抑制を示し、 $50 \mu\text{g}$ で 10.4%, $100 \mu\text{g}$ で 43% の抑制率が認められた (表 1)。写真 1 はコントロール群、写真 2 は $50 \mu\text{g}$ 群、写真 3 は $100 \mu\text{g}$ 群のヌードマウスの腫瘍を示した。

2) 皮下投与 (S.C.)

図 2 に各投与群の増殖曲線を示した。コントロール群が 48 日目に逆に縮小したため、 $50 \mu\text{g}$ 群との差はほとんどなくなった。 $100 \mu\text{g}$ 群では 28.9% の抑制率が観察された。

しかし、44 日目の腫瘍の重量比による判定ではコントロール群に対して $50 \mu\text{g}$ 群では 39.5%, $100 \mu\text{g}$ 群では 50.1% の抑制率を認めている。写真 4 に $50 \mu\text{g}$ 群、写真 5 には $100 \mu\text{g}$ 群のヌードマウスの腫瘍を示した。

腫瘍内投与、皮下投与およびコントロール (mannitol) の各群 (いずれも 5 匹) の腫瘍増殖抑制効果について表 1 に No., Treatment (start on day, dose, route), Tumor size on day 48, % Inhibitionなどをまとめて掲示した。

II. ヒト腎癌 RCC-1 について

SK-14 と同様各群 5 匹である。腫瘍内投与と皮下投与で施行し、WPG の各濃度は既述の通りである。

1) 腫瘍内投与

図 3 は i.t. (□, ■ で表示) の曲線である。

図 1. Effect of WPG on the Growth of Human Malignant Melanoma (SK-14) in Nude Mice

表 1. Antitumor Effect of WPG on the Growth of Human Malignant Melanoma (SK-14) in Nude Mice

No. of animals	Treatment			Tumor size on day 48 (mg, mean±S.D.)	(final tumor weight after excision)	Tumor-free mice
	start on day	dose	route		% Inhibition	Surviving
n = 5	day 21	100µg×15	it	424.4±308.6	43.3 *) ¹	0 / 5
n = 5	day 21	50µ×15	it	1025.6±1233.2	10.4 *) ²	0 / 5
n = 5	day 21	Mannitol (5%)	it	505.0±733.8		0 / 5
n = 5	day 21	100µg×15	sc	490.7±222.1	50.1 *) ³	0 / 5
n = 5	day 21	50µg×15	sc	697.1±625.9	39.5 *) ⁴	0 / 5
n = 5	day 21	Mannitol (5%)	sc	689.8±240.8		0 / 5

*) ¹: p<0.2, *) ²: p<0.8, *) ³: p<1.3, *) ⁴: p<0.02

36日目の100µg群の増殖抑制率は31.4%, 50µg群では1.1%である。

コントロール群が33日目を境にして縮小したために抑制率が低下したと思われるが、参考に33日目の増殖抑制率は100µg群で50%, 50µg群で19.6%とかなり上昇している。写真6にコントロール, 写真7に50µg, 写真8に100µg投与のヌードマウスの腫瘍の状態を示した。

2) 皮下投与

同様に図3に一括掲示した。36日目の増殖抑

制率は100µg群 (図中▲で表示) 34%, 50µg群は53.2%で腫瘍内投与より優れている。また33日目の抑制率は100µg群も50µg群もほぼ同様に50%以上の抑制率を観察している。また、最終腫瘍重量を対照群と比較すると、腫瘍内投与の50µg群で2.8%, 100µg群で28.1%および皮下投与の50µg群で43.2%, 100µg群で41.5%の抑制率が認められた(表2)。写真9に50µg, 写真10に100µg投与のヌードマウスの腫瘍を示した。

图 2. Effect of WPG on the Growth of Human Malignant Melanoma (SK-14) in Nude Mice

图 3. Effect of WPG on Human Renal Cell Carcinoma (RCC-1) in Nude Mice

表 2. Antitumor Effect of WPG on Human Renal Cell Carcinoma (RCC-1) in Nude Mice

No. of animals	Treatment			Tumor size on day 36 (mg, mean $\pm$ S.D.)	(final tumor weight after excision)	Tumor-free mice
	start on day	dose	route		% Inhibition	Surviving
n = 5	day 13	100 μ g $\times$ 15	it	559.8 $\pm$ 235.6	28.1 *) ¹	0 / 5
n = 5	day 13	50 μ g $\times$ 15	it	806.7 $\pm$ 880.2	2.8 *) ²	0 / 5
n = 5	day 13	100 μ g $\times$ 15	sc	538.7 $\pm$ 181.6	41.5 *) ³	0 / 5
n = 5	day 13	50 μ g $\times$ 15	sc	382.0 $\pm$ 203.6	43.2 *) ⁴	0 / 5
n = 5	day 13	Mannitol (5%)	sc	815.8 $\pm$ 517.8		0 / 5

*) ¹: p<1.0, *) ²: p<0.02, *) ³: p<1.1, *) ⁴: p<1.7

写真 1.

ヒト悪性黒色腫 (SK-14) 移植後48日目。
コントロール
(5%マンニトール連日15回投与後13日
目)

写真 2.

WPG の $50\mu\text{g}$ 連日15回腫瘍内投与後13
日目 (SK-14)

写真 3.

WPG $100\mu\text{g}$ 連日15回腫瘍内投与後13日
目 (SK-14)

写真 4 .

WPG 50 μ g 連日15回皮下投与後13日目
(SK-14)
一部脱色 (白色化) が認められる

写真 5 .

WPG 100 μ g 連日15回皮下投与後13日目
(SK-14)
一部脱色が認められる

写真 6 .

ヒト腎癌 RCC-1移植後36日目 (コントロール)
(5%マンニトール連日15回投与後9日目)

写真 7.

WPG $50\mu\text{g}$ 連日15回腫瘍内投与後 9 日目 (RCC-1)

写真 8.

WPG $100\mu\text{g}$ 連日15回腫瘍内投与後 9 日目 (RCC-1)

写真 9.

WPG $50\mu\text{g}$ 連日15回皮下投与後 9 日目 (RCC-1)

写真10.

WPG 100 μ g 連日15回皮下投与後9日目
(RCC-1)

以上の腫瘍内投与と皮下投与の腫瘍増殖抑制効果についてSK-14の場合と同様まとめて表2に一括掲示した。

III. 病理組織学的所見

移植後、SK-14では48日目、RCC-1では36日目に各群とも切除し、病理組織学的検討を行った。染色はヘマトキシリン・エオシン (HE) である。

1) SK-14について

写真11, 12はコントロールである。腫瘍細胞は充満し、間質には細胞成分が少なく、好中球やリンパ球などもほとんど見られない。写真12は拡大像で丸い核を有する細胞の充満と核分裂が多数認められる。また、細胞の配列は規則正しい。写真13は皮下投与100 μ g投与のものであるが、腫瘍細胞巢の構築が崩れ、離解している。また、腫瘍巢の周辺、あるいは腫瘍細胞をとり囲んで多数の好中球とリンパ球、マクロファージが出現している。写真14は100 μ gの腫瘍内投与であるが、腫瘍細胞は壊死化し、若干の好中球、リンパ球、マクロファージなどが観察される。以上の所見は腫瘍の縮小の割にはかなり広範囲に認められることより、肉眼的よりは組織

的な影響が強く、かつ、壊死化が著明であるところより見掛けよりも強い抗腫瘍効果を有すると考えられる。

2) RCC-1について

写真15, 16はコントロールの組織である。写真15は真皮の深部に腫瘍巢が充満している。写真16はその拡大像で大小不同で細胞の形も様々である。写真17は100 μ gの皮下投与のものであるが、腫瘍巢の崩壊と壊死、変性が強く、SK-14の場合と同様好中球の出現が著明である。写真18はその拡大像の一部であるが、細胞の変性が強く、腫瘍巢の構築も失われている。写真19は100 μ gの腫瘍内投与である。腫瘍細胞の変性が強く、多くは壊死に陥っている。好中球やリンパ球と思われる細胞が出現している。

以上より病理組織学的所見としては、肉眼的所見より強い抗腫瘍効果が観察されていると結論してもよいようである。

考 察

WPGは *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 の菌体を界面活性剤、蛋白質分解酵素、核酸分解酵素、有機溶媒および稀酸で処理して得られた全菌の形状を保持した細胞壁骨格であ

写真11.

写真1のコントロール (SK-14) の組織像 (HE 染色)。腫瘍細胞が充満し、間質には細胞成分は少ない

写真12.

写真11の拡大像。腫瘍細胞の充満と多数の核分裂を見る

写真13.

WPG 100 μ g 皮下15回投与後、13日目 (SK-14)
腫瘍細胞の構築が崩れ、離解している。多数の好中球が認められる

写真14.

WPG 100 μ g 腫瘍内投与15回後13日目
(SK-14)

腫瘍細胞の壊死が著明 (SK-14)

写真15.

RCC-1。写真6のコントロールの組織像。

腫瘍細胞の充満が認められる

写真16.

写真15の拡大像

写真17.

WPG 100 μ g 連日15回皮下投与後 9 日目。
腫瘍巣の崩壊, 壊死が著明。好中球の多数出現を見る (RCC-1)

写真18.

WPG 100 μ g 連日15回皮下投与後 9 日目
(拡大像)。
細胞の変性が著明 (RCC-1)

写真19.

WPG 100 μ g 連日15回腫瘍内投与後 9 日目。
細胞の壊死が著明 (RCC-1)

る。新しい細菌製剤の BRM である。その作用機序は NK 活性の増強作用と IL-1 誘起能、局所免疫反応と腫瘍の退縮、抗腫瘍 T 細胞の誘導などが知られている⁵⁾。

かかることより WPG の悪性腫瘍に対する phase I study が昭和61年より開始され、皮膚科領域でも早期 phase II study が始まった。しかし、これらは局所投与が中心で全身投与はなされていなかった。従って、我々は全身投与の臨床治験に先立って WPG の全身投与によるヌードマウスの実験を試みた。同時に腫瘍内投与との比較も検討した。対象腫瘍はヒト悪性黒色腫由来の SK-14 とヒト腎癌由来の RCC-1 でいずれもヌードマウス可移植性である。これらをヌードマウスに移植し、WPG の 100 μ g と 50 μ g を皮下投与と腫瘍内投与により、その腫瘍増殖抑制効果を検討した。いずれも 15 回投与で SK-14 は投与終了後 13 日目、RCC-1 は 9 日目に切除を行い、コントロール群と組織重量の比較を行い、さらに病理組織学的に検討した。以上より考察すると SK-14 においては腫瘍内投与よりも皮下投与の方がより増殖抑制効果が観察された。しかも、病理組織学的にも腫瘍細胞の変性、壊死化が強く発現し、好中球の著明な出現とリンパ球やマクロファージのような細胞も認められた。以上より肉眼的所見より病理組織学的所見の方が強い抗腫瘍効果を示したものと思われる。一方、RCC-1 においても明らかに皮下投与の方が腫瘍内投与よりも肉眼的に優れた成績が観察された。

病理組織学的にも SK-14 と同様、大部分が腫瘍細胞の崩壊と壊死化が認められている。従って、WPG の全身投与は局所投与に優る有効性が期待されると考察される。

結 語

ヌードマウス可移植性ヒト悪性黒色腫 SK-14 とヒト腎癌を利用して WPG の増殖抑制効果を検討した。肉眼的には中等度の抑制効果を示し、かつ、腫瘍内投与より皮下投与の方が優れていた。また、病理組織学的には著明な抗腫瘍効果が観察され腫瘍細胞の大部分は壊死に陥っていた。以上より WPG の抗腫瘍効果は肉眼的よりも病理組織学的所見で判定すべきであると考えられた。また、腫瘍内投与に劣らず、あるいはそれ以上に全身投与にも WPG の有効性が期待されると結論する。

文 献

- 1) Sekine, K., Toida, T., Hashimoto, Y. et al: A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *Bifidobacterium infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. *Cancer Res.* 45: 1300-1307, 1985.
- 2) Kohwi, Y., Imai, K., Tamura, Z. et al: Antitumor effect of *Bifidobacterium infantis* in mice. *Gann* 69: 613-618, 1986.
- 3) 石原和之: 免疫療法から BRM へ. *Oncologia*, 20: 55-67, 1987.
- 4) 峠 哲哉, 服部孝雄, 田口鉄男: ビフィズス菌由来精製細胞壁 (WPG) の phase I study. *Biotherapy*, 4: 839-845, 1989.
- 5) 第 2 回 WPG 研究会記録より抜粋.