***Enterococcus faecalis* FK-23 株加熱死菌体のマウス同系腫瘍に対する
抗腫瘍効果**

大橋一智,^{*,a} 里中勝人,^a 山本哲郎,^a 山崎正利,^b
木村貞夫,^c 安部 茂,^c 山口英世^c

ニチニチ製薬(株)中央研究所,^a 帝京大学薬学部,^b 帝京大学医学部^c

**Antitumor Activity of *Enterococcus faecalis* FK-23 Preparation
against Murine Syngeneic Tumors**

Kazutomo OHASI,^{*,a} Katsuhito SATONAKA,^a Tetsuro YAMAMOTO,^a
Masatoshi YAMAZAKI,^b Sadao KIMURA,^c
Shigeru ABE,^c and Hideyo YAMAGUCHI^c

Central Research Laboratories, Nichinichi Pharmaceutical Co.,
Ltd.,^a 239-1 Tominaga Ohyamada-mura, Ayama-gun, Mie
518-14, Japan and Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Teikyo University,^b Sagamiko-cho
Kanagawa 199-01, Japan and School of
Medicine, Teikyo University,^c 2-11-1
Kaga, Itabashi, Tokyo 173, Japan

(Received November 9, 1992)

The antitumor activity of a preparation of heat-killed cells of *Enterococcus faecalis*, FK-23. Intraperitoneal injection of the preparation prolonged the lifespan of C3H/He N mice which were intraperitoneally inoculated with MM46 mammary carcinoma. Not only intraperitoneal but also oral administration of the FK-23 preparation inhibited the growth of these carcinomas inoculated intradermally. The tumor-bearing mice produced tumor necrosis factor (TNF) in their sera 2 h after intravenous injection of OK432. This TNF level increased after the mice were fed with food supplemented with the FK-23 preparation. Additionally, the FK-23 preparation inhibited the growth of Meth A fibrosarcoma in cyclophosphamide-treated BALB/c mice.

Keywords—*Enterococcus faecalis*; FK-23; MM46 tumor; antitumor activity; TNF

最近、我々は正常ヒト糞便から分離された腸球菌 *Enterococcus faecalis* FK-23 株の加熱死菌体標品 (FK-23 標品) の免疫賦活作用を検討し、本標品が好中球及びマクロファージ等の食細胞を活性化し、腫瘍壊死因子 (TNF) の産生を誘導しうることを見いだした。¹⁾ 本研究において、FK-23 標品の上記作用から推測される抗腫瘍活性を、マウス同系腫瘍系を用いて検討した。

実 験 の 部

実験材料 マウス (雄性 6 週齢) を日本エスエルシー (浜松) より購入し、1 週間の予備飼育後、使用した。

FK-23 標品は、前報に従い加熱死菌体の凍結乾燥物として調製した。¹⁾ OK432 は、中外製薬(株)

より供与を受け、シクロホスファミド (CY) 及びマイトマイシン C (MMC) は、それぞれ塩野義製薬 (株)、協和発酵 (株) より購入した。

抗腫瘍活性の測定 MM46 乳癌及び Meth A 肉腫は、常法に従い、それぞれ C3H/He 及び BALB/c マウス腹腔内に移植して継代した。²⁾ 試料は、生理食塩水中に懸濁又は溶解し、マウス当たり 0.2 ml を腹腔内もしくは、胃ゾンデで経口投与した。各対照群には、生理食塩水を同様に与えた。また、一部の実験では、FK-23 標品を固形飼料 CE-2 (日本クレア) に 0.025 又は 0.25% 配合し、自由摂取させた。腫瘍径は、ノギスにて測定し、³⁾ 腫瘍容積は、 $0.5 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$ の式により求めた。TNF の産生能は、前報に従い測定した。¹⁾ なお統計的有意差は Student の *t* 検定及び、カイ二乗検定を用いた。

結 果 及 び 考 察

1. FK-23 標品の腹腔内投与による MM46 乳癌の増殖抑制

MM46 乳癌を用い抗腫瘍活性を検討した。同腫瘍細胞 1×10^5 個を C3H/He マウス腹腔内に移植し、翌日より 4 日間連日 FK-23 標品又は対照薬として、MMC を腹腔内に投与した。対照群では 3 週間以内に 20 匹のマウスがすべて腫瘍死したのに対して、MMC 及び FK-23 標品投与群では、60 日後に、それぞれ 57% 及び 42% の生存率を与え、延命効果が認められた (Table I)。

固形腫瘍に対する効果を次に検討した。 1×10^6 個の同腫瘍細胞を C3H/He マウス腹部皮内に移植し、翌日より FK-23 標品をマウス当たり 0.1 又は、1 mg で 7 日間連日腹腔内に投与した。対照群、FK-23 標品 0.1 及び 1 mg 投与群の、各群 6 匹の腫瘍径の平均値±標準偏差は、それぞれ 10 日目では、 10.5 ± 1.5 mm, 8.2 ± 2.3 mm 及び 6.7 ± 1.1 mm, 20 日目では、 11.3 ± 3.2 mm, 11.2 ± 1.6 mm, 及び 9.8 ± 2.3 mm であった。1 mg 投与群では 10 日目に、統計的に有意 (危険率 $p < 0.01$) な腫瘍増殖の抑制が観察された。

以上の結果より、FK-23 標品の腹腔内投与は MM46 の腹水型腫瘍、固形腫瘍に明確な抗腫瘍作用を示すと言える。すでに、本標品が *in vitro* において好中球及びマクロファージを活性化させること¹⁾及びマクロファージが MM46 腫瘍細胞を傷害することを報告している。³⁾ したがって、これらの抗腫瘍活性には、食細胞の活性化が関与しているものと考えられる。

2. 経口投与による MM46 乳癌に対する抗腫瘍活性と TNF 産生誘導能

MM46 乳癌を皮内移植後翌日より、FK-23 標品をマウス当たり 1 mg 及び 10 mg を 7 日間連日経口投与しその効果をみた。Fig. 1 に示すように同標品 10 mg 投与群では投与後 13 日目以降より腫瘍の退縮が認められ、18 日目にはその腫瘍増殖抑制効果は有意なレベルに達した。しかし、

TABLE I. Antitumor Activity of FK-23 Preparation against MM 46 Mammary Carcinoma

Treatment ^{a)}	Exp. 1			Exp. 2			Total (%)
	MST ^{b)} (d)	ILS ^{c)} (%)	S/T ^{d)}	MST (d)	ILS (%)	S/T	
Saline	18.4 ± 2.5	—	0/10	16.8 ± 1.2	—	0/10	0/20
Mitomycin C 50 µg/mouse	36.6 ± 17.1	99	4/7 ^{e)}	43.6 ± 10.8	160	4/7 ^{e)}	8/14(57) ^{f)}
FK-23 1 mg/mouse	36.3 ± 16.2	97	3/6 ^{e)}	35.2 ± 14.9	110	2/6	5/12(42) ^{f)}

a) Saline, mitomycin C or FK-23 preparation were administered i.p. for 4 d. b) MST, Mean survival time (days±S.D.) calculated on day 60. c) ILS, increase in lifespan calculated from the MST. d) S/T, number of survival mice/number of mice tested, calculated on day 60. Statistically significant difference from saline. e) $p < 0.05$, f) $p < 0.01$.

20 日以降、実験終了の 30 日までは腫瘍径の平均値では小さい値を示したものの、個体間でのばらつきが大きく有意差は認められなくなった。

次に、FK-23 標品をより長期にわたって経口投与するため、飼料中に FK-23 標品を配合し摂取させた。予備検討の結果、有効性が示唆された FK-23 標品 0.025% 含有飼料を癌移植後より 30 日間 1 群 18 匹のマウスに与えた。その結果 FK-23 含有飼料摂取後 5 日目から 15 日目の間の腫瘍増大は、 4.3 ± 1.6 mm であり、対照群である、同様に作製した通常食摂取群 (19 匹) の 6.1 ± 1.2 mm の腫瘍増大に比して、統計的に有意 ($p < 0.01$) に小さかった。しかしながら、15 日以降では両群間に有意差は認められなくなった (データ省略)。なお実験期間中、マウスは、両群共に 1 日 1 匹当たり約 4 g の飼料を摂取した。したがって、上記実験群のマウスは、1 日当たり約 1 mg の FK-23 標品を摂取したものと考えられ、ゾンデ投与時の有効量 10 mg/d と異なっているが、その差の原因は、現時点で不明である。

担癌マウスへ FK-23 標品を経口投与した場合の TNF 産生能を調べた。上記同様に MM46 腫瘍を腹部皮内に移植後 7 日目より、通常食 (A 群) 及び、FK-23 標品を 0.025% (B 群)、0.25% (C 群) 含有する飼料を与え、15 日まで摂取させた後、TNF 誘発剤として、OK432 をマウス当り 3KE 尾静脈より投与した。2 時間後、誘導された血清中の TNF 活性は、A 群 (15 匹)、B 群 (9 匹) 及び C 群 (10 匹) で 16.2 ± 9.8 , 30.2 ± 16.2 及び 24.0 ± 12.3 U/ml であった。B 群は A 群に比し、有意 ($p < 0.05$) に高かった。この結果は、FK-23 標品を経口投与した際にも、担癌マウスの TNF 産生能が増強されることを示しており、その制癌作用にも、食細胞が関与することを示唆している。

3. CY との併用による Meth A 肉腫増殖抑制効果

Meth A 肉腫細胞を BALB/c マウス腹部皮内に 2×10^5 個移植後、4 日目より 7 日間連日、FK-23 標品を腹腔内に 1 mg/d 又は経口的に 10 mg/d を投与したが、明確な腫瘍増殖抑制作用は認められなかった (データ省略)。そこで、同条件下移植後 10 日目に、CY を 150 mg/kg 腹腔内に投与し上記 FK-23 投与との併用による効果を調べた。CY 単独投与群に比して、FK-23 標品併用群では、腫瘍の増殖が、より著しく抑制され、移植後 26 日目の各群の腫瘍容積は無処置群 ($n=10$) は 11.4 ± 2.2 cm³、CY 単独群 ($n=5$) は 6.3 ± 2.5 cm³、CY+FK-23 1 mg 腹腔内投与群 ($n=6$) は 3.8 ± 1.6 cm³ また CY+FK-23 10 mg 経口投与群 ($n=6$) は 4.4 ± 2.3 cm³ であった。CY 単独投与群に比して、FK-23 標品の経口投与の効果は明確ではないが、1 mg 腹腔内投与では有意 ($p < 0.05$) に併用により、その増殖抑制効果を強めた。この腫瘍系では腫瘍の増殖とともにすみやかに宿主内で抑制性 T 細胞が生じ、生物応答修飾剤 (BRM) 単独では、抗腫瘍活性が発揮されにくくなること、⁴⁾ それに対し、CY は、抑制性 T 細胞の誘導を阻止することは知られている。したがって、FK-23 標品も他の BRM と同様に、抑制性 T 細胞が存在する場合には有効性を示しにくいのかも

Fig. 1. Effect of Orally Administrated FK-23 Preparation on the Growth of MM46 Mammary Carcinoma

C3H/He N mice were inoculated intradermally with MM46 carcinoma at day 0. Saline (○) or FK-23 preparation (□ 1 mg, ■ 10 mg) were administered orally from day 1 to day 7. Each group was consisted of 6—7 mice and bar represents standard deviation. Statistically significant difference from the control group.

a) $p < 0.05$.

しれない。そう仮定すると、MM46 腫瘍系でも、移植後 2 週以後に抑制性 T 細胞が出現することより、⁵⁾ 前述の制癌作用発現の時期が限定されているのも理解しうるだろう。

引 用 文 献

- 1) 大橋一智, 上田浩史, 山崎正利, 木村貞夫, 安部 茂, 山口英世, 薬誌, **112**, 919 (1992).
- 2) S. Abe, J. Tsubouchi, K. Takahashi, M. Yamazaki, D. Mizuno, *Gann*, **73**, 961 (1982).
- 3) M. Yamazaki, H. Shinoda, D. Mizuno, *Gann*, **67**, 651 (1976).
- 4) M. J. Berendt, R. J. North, *J. Exp. Med.*, **151**, 69 (1980).
- 5) H. Nakajima, S. Abe, Y. Masuko, J. Tsubouchi, M. Yamazaki, D. Mizuno, *Gann*, **72**, 723 (1981).