

# NEOCARZINOSTATIN の宿主免疫能への 影響に関する基礎的研究

## 第一編

### 体液性免疫能への影響に関する検討

岡山大学医学部第二内科教室（主任：平木潔教授）

### 三河内 弘

（昭和51年3月31日受稿）

#### 目次

- I 緒言
- II 実験材料並びに方法
- III 実験成績
  - 1. 血清蛋白像への影響
    - a. Neocarzinostatin (NCS) 1回投与における検討
    - b. NCS 4日間連日投与における検討
    - c. NCS 7日間連日投与における検討
  - 2. 脾プラーク形成細胞産生に及ぼす影響
    - a. NCS 1回投与における検討
    - b. NCS 4日間連日投与における検討
    - c. NCS 7日間連日投与における検討
    - d. NCS 投与日数と脾プラーク形成細胞産生能との関係についての検討
- IV 考察
- V 結語

#### I 緒言

近年白血病，特に急性白血病の化学療法がめざましい進歩をとげつつある事はその寛解率の向上，生存期間の延長等により示されるところである<sup>1)2)3)4)5)</sup>この事に関しては各種抗菌性抗生物質の開発と白血球輸血等による感染症治療の進歩，血小板輸血による出血傾向の管理等従来その予後を大きく左右していた因子に対する supportive therapy の進歩もさることながら，6-Mercaptopurine, Methotrexate, Cytosine arabinoside そして又 Daunomycin 等極めて有力な白血病寛解導入剤の出現が大きな要因で

ある事は言をまたない。中でも Neocarzinostatin (NCS) は本邦において1957年石田等<sup>6)</sup>により *Streptomyces carzinostatics* の培養液より抽出，精製された抗癌性抗生物質で，化学的には109ケのL型アミノ酸よりなる分子量10,700の酸性ポリペプチドとされている。本剤の抗腫瘍性についてはすでに Ehrlich 腹水癌，Sarcoma 180，SN-36 等で確認され<sup>7)8)9)</sup> 著者も L-1210，DBLA/6 等の腹水系白血病と同時に Rauscher マウス白血病でもその制癌性を認め報告している<sup>10)11)</sup> 一方臨床応用としては平木，喜多島等はすでに refractory な症例に本剤を用い，その血液学的な効果を認めて以来，単独並びに併用療法に本剤を用いる事によって他剤におとらぬ寛解率を報告しており<sup>12)13)</sup> 今後急性白血病の寛解導入剤として極めて有力な薬剤となり得るものと思われる。

現在白血病化学療法の理念の一つとして total cell kill 論<sup>14)</sup> があり臨床白血病細胞をいかにして撲滅し，宿主を cure に導くかということが問題とされている。この点からすれば化学療法の実施に際しては白血病細胞と薬剤の感受性との関連が最も重要な問題となる事は否定できないが，一方では担癌生体という特殊条件，そして又薬剤自体の正常組織への作用を考慮した上での至適投与法が必要となるわけで，“腫瘍—薬剤—宿主”という一連の関連が化学療法の重要な鍵となる事はいうまでもない<sup>15)16)</sup> これまで抗白血病剤を含め各種抗癌剤の宿主に及ぼす影響は正常造血能，宿主免疫能等においてひろく検討されているが<sup>17)18)19)20)</sup> これらいわゆる副作用の分散

と抗腫瘍性の相加ないし相乗効果を目的とした多剤併用間歇投与法等の模索、検討は“腫瘍—薬剤—宿主”の関連を考える際妥当性のあるものと思われる。

さて新抗白血病剤 NCS はすでに述べたごとく急性白血病の寛解導入に際し極めて有力な薬剤となり得るものと思われるが、その臨床応用に際しては抗腫瘍性同様宿主への影響も十分な検討がなされる必要があろう。しかるにこの点に関しては未だ体系的な検討並びに報告は認められないようであり、本研究においては NCS の宿主への影響、特に宿主免疫能への影響に対し基礎的検討を加えることを目的とし、その臨床応用並びに各種抗白血病剤の中での本剤の特殊性を把握するための一助とせんとした。まず本編では NCS のマウス血清蛋白像への影響並びに体液性免疫能を知る一つの手段としてひろく用いられている脾プラーク形成細胞産生能への影響について検討したので報告する。

## II 実験材料並びに実験方法

### 1. 実験動物

岡山大学付属マウスコロニーにて継代飼育された生後1.5~2.0ヶ月、体重20~22gの雄C57BLマウスを用いた。

### 2. Neocarzinostatin

すべて科薬抗生物質研究所(東京)にて2mg/2ml/1Aに製品化されたもので、その投与に際しては生理食塩水に1.0mg/kg, 0.50mg/kg, 0.05mg/kg, 0.005mg/kgの投与量に調整したものをその都度新調し用いた。尚ヒトにおける投与量はおよそ0.05mg/kgであり、マウスにおいて1.0mg/kgはLD<sub>50</sub>の約1/2量に相当するものである。

### 3. 採血方法

マウス眼窩静脈叢にてヘマトクリット毛細管を用いて行った。尚血清採取はヘマトクリット管に採血後遠心沈澱を用い採取し凍結保存を行った。

### 4. 血清蛋白定量並びに血清蛋白電気泳動法

血清蛋白量の測定は HITACHI protein refractometer を用い、血清蛋白分画の測定にはセルローズアセテート膜電気泳動法を行った。泳動には ATAGO 泳動槽, SARTORIUS 膜及びペロナール緩衝液 (pH 8.6, 0.06-0.07M) を用い、血清を電気泳動後ボンソー 3R で染色した。その後デカリンで透明化し、ヒカリデントロール 8 で 500m $\mu$  の干渉フィルター, 0.5 $\times$ 8.0mm のスリットを用いデントメトリーを施行、その後血清蛋白

量より albumin,  $\alpha_1$ -globulin,  $\alpha_2$ -globulin,  $\alpha_3$ -globulin,  $\beta$ -globulin,  $\gamma$ -globulin の絶対量 (g/dl) を算出した。尚  $\beta$ -globulin は  $\beta_1$  及び  $\beta_2$ -globulin を一括したものである。

### 5. 羊赤血球 (SRBC) に対する抗体産生細胞 (HPFC) の検出法

感作抗原としての SRBC は日本バイオテスト研究所作製のものを使用し、生食水で 3 回各 2,000 rpm. 10 分間遠沈洗滌、その後生食水にて 20% SRBC 浮遊液としたのち 0.2ml を C57BL に腹腔内 (i. p.) 注入し感作を行った。プラーク形成細胞を含むマウス脾細胞の浮遊液は感作 5 日目にマウスを脱血後、速やかに脾を摘出し、眼科用ハサミで Eagle MEM を加えながら細切し、110 Stainlessmiremesh を通し更に 1,000 rpm. 10 分間水室内で遠沈後総脾細胞数を算出し、Eagle MEM に適当細胞濃度に浮遊させ作成した。HPFC の検出方法としては Cunningham and Szenberg の slide monolayer technique<sup>21)</sup> を用いた。まず Fig. 1 に示すごとくスライドガラス (25 $\times$ 75mm) をスコッチ® 印両面粘着テープ (幅 6mm, 長さ 25mm) によって 3 等分し、その上にカバーガラスを密着させ両ガラス間に極めて薄い chamber を作製する。被検脾細胞浮遊液 0.4ml, 50% SRBC 0.05ml 並びに補体として新鮮モルモット血清 0.05ml の混合液を作製し、この混合液 0.1ml で上記のスライドガラス上にできた 3 つの chamber を満たす。chamber 両端を加熱パラフィンにより封じ、37 $^{\circ}$ C のふ卵器で 30 分静置後溶血斑 (Photo. 1) を観察し、被検脾細胞浮遊液の総量及びその脾細

Fig. 1

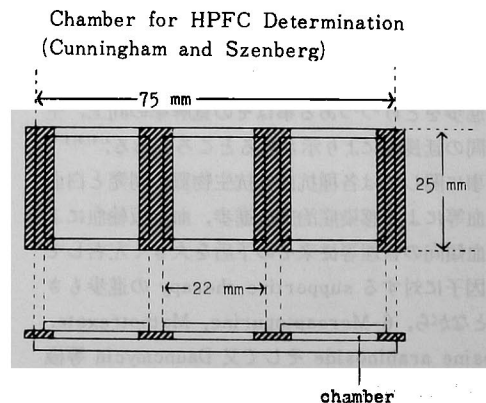
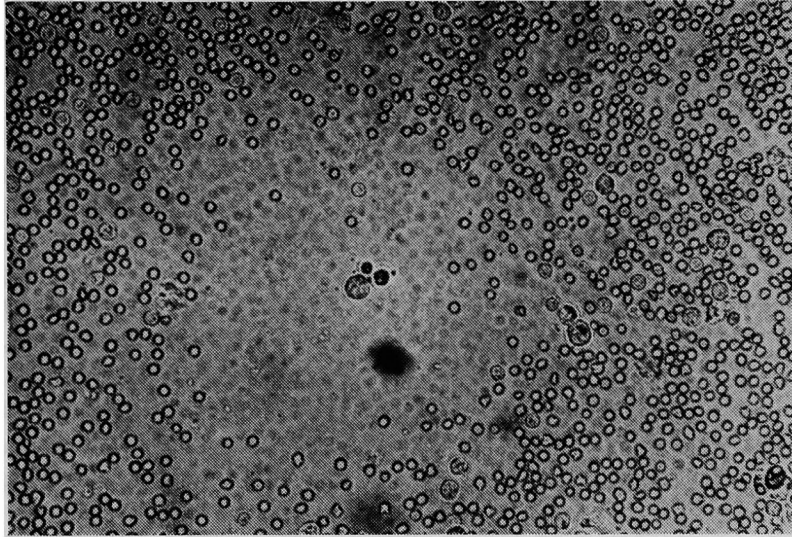


Photo. 1



Tab. 1 Effect of NEOCARZINOSTATIN on Serum Protein of Mice

Days after NCS	Number of mice studied	T. P.	Al	$\alpha_1$ -gl	$\alpha_2$ -gl	$\alpha_3$ -gl	$\beta$ -gl	$\gamma$ -gl
Control	5	6.98±0.47	4.03±0.54	0.44±0.10	0.49±0.13	0.27±0.07	1.12±0.13	0.64±0.08
				1.20 ± 0.07				
4	5	6.60±0.65	3.16±0.54 <sup>+</sup>	0.38±0.17	0.53±0.18	0.29±0.08	1.80±0.45 <sup>+</sup>	0.43±0.06 <sup>#</sup>
				1.20 ± 0.25				
8	4	6.75±0.57	3.84±0.29	0.39±0.12	0.47±0.21	0.32±0.11	1.25±0.19	0.48±0.20
				1.18 ± 0.41				
12	5	6.62±0.25	3.45±0.19	0.41±0.06	0.41±0.07	0.34±0.11	1.38±0.35	0.60±0.19
				1.16 ± 0.15				

NCS of 1.0mg/kg was administrated i.p. as a single dose.

T. P. = Total Protein ; Al = Albumin ;  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ -gl =  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ -globulin ;

$\beta$ -gl = ( $\beta_1 + \beta_2$ ) - globulin ;  $\gamma$ -gl =  $\gamma$ -globulin.

Values are (mean ± standard deviation) g.

+P<0.05    #P<0.005

胞浮遊濃度から、 $10^6$ ヶ脾細胞当たり並びに脾当りのHPFCを算出した。尚1個体のマウスにつき3枚のスライドガラスを使用し、その平均値をもってマウスのHPFCとした。

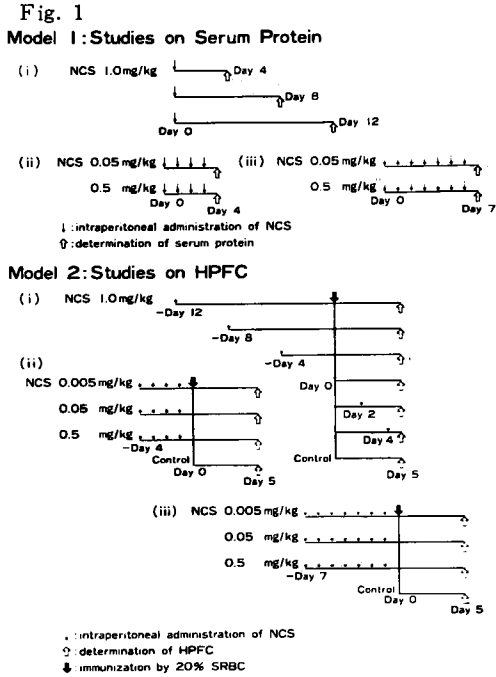
#### 6. NCS投与形式のモデル

本実験における各検討項目の測定時期並びにNCS投与量、投与経路、投与時期はFig. 2のごとくである。

### III 実験成績

#### 1. 血清蛋白像への影響

a. NCS 1.0mg/kg, i.p. 1回投与4日目群、8日目群、12日目群における検討 (Model 1-i) 成績を一括するとTab. 1のごとくで、総蛋白量は無処置群で6.98±0.47 (平均値±標準偏差) g/dlであるのに対し、投与後4日目群では6.60±0.65g/dl、8日目群では6.75±0.57g/dl、12日目群では6.62±0.25g/dlで有意差は認められなかった。次にalbumin,  $\alpha$  ( $\alpha_1 + \alpha_2 + \alpha_3$ ) -globulin,  $\beta$ -globulin,  $\gamma$ -globulin について



検討したが、albuminは無処置群で $4.03 \pm 0.54$  g/dlであるのに対し4日目群では $3.16 \pm 0.54$  g/dlと有意の減少 ( $P < 0.05$ )を示したが、8日目及び12日目群では有意の減少は認められなかった。 $\alpha$ -globulinは4日目群、8日目群、12日目群のいずれにおいても無処置群との間に有意差を認めなかった。 $\beta$ -globulinは無処置群が $1.12 \pm 0.13$  g/dlに対し、投与後4日目群では $1.80 \pm 0.45$  g/dlと有意の増加 ( $P < 0.05$ )を示したが、8日目群及び12日目群では有意の変化を示さなかった。 $\gamma$ -globulin分画をみると無処置群 $0.64 \pm 0.08$  g/dlに対し、4日目群 $0.43 \pm 0.06$  g/dl、8日目群 $0.48 \pm 0.20$  g/dl、12日目群 $0.60 \pm 0.19$  g/dlとなり4日目群では有意の減少 ( $P < 0.05$ )を示し、8日目群では減少傾向はうかがえるものの有意差は認められなかった。

b. NCS 0.05mg/kg, 0.50mg/kg 4日間連日 i. p. 投与群の検討 (Model 1 -ii)  
 成績を一括すると Tab. 2 のごとくで、総蛋白量は無処置群では $6.98 \pm 0.47$  g/dl, 0.05mg/

Tab. 2 Effect of NEOCARZINOSTATIN on Serum Protein of Mice

	Number of mice studied	T. P.	Al	$\alpha_1$ -gl	$\alpha_2$ -gl	$\alpha_3$ -gl	$\beta$ -gl	$\gamma$ -gl
Control	5	$6.98 \pm 0.47$	$4.03 \pm 0.54$	$0.44 \pm 0.10$	$0.49 \pm 0.13$	$0.27 \pm 0.07$	$1.12 \pm 0.13$	$0.64 \pm 0.08$
				$1.20 \pm 0.07$				
0.05mg/kg	4	$7.53 \pm 0.56$	$4.00 \pm 0.56$	$0.51 \pm 0.11$	$0.42 \pm 0.06$	$0.31 \pm 0.14$	$1.59 \pm 0.42$	$0.71 \pm 0.12$
				$1.23 \pm 0.23$				
0.5 mg/kg	5	$7.10 \pm 0.35$	$3.58 \pm 0.32$	$0.62 \pm 0.26$	$0.50 \pm 0.10$	$0.37 \pm 0.12$	$1.54 \pm 0.34$	$0.49 \pm 0.14$
				$1.49 \pm 0.39$				

NCS was daily administrated i. p. for 4 days.  
 T. P. = Total Protein ; Al = Albumin ;  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ -gl =  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ -globulin ;  
 $\beta$ -gl = ( $\beta_1 + \beta_2$ )-globulin ;  $\gamma$ -gl =  $\gamma$ -globulin.  
 Values are (mean  $\pm$  standard deviation) g.  
 All values are not significant with respect to control values ( $P > 0.05$ ).

Tab. 3 Effect of NEOCARZINOSTATIN on Serum Protein of Mice

	Number of mice studied	T. P.	Al	$\alpha_1$ -gl	$\alpha_2$ -gl	$\alpha_3$ -gl	$\beta$ -gl	$\gamma$ -gl
Control	5	$6.98 \pm 0.47$	$4.03 \pm 0.54$	$0.44 \pm 0.10$	$0.49 \pm 0.13$	$0.27 \pm 0.07$	$1.12 \pm 0.13$	$0.64 \pm 0.08$
				$1.20 \pm 0.07$				
0.05mg/kg	5	$6.54 \pm 0.76$	$3.18 \pm 0.29$	$0.48 \pm 0.15$	$0.51 \pm 0.14$	$0.31 \pm 0.09$	$1.47 \pm 0.32$	$0.59 \pm 0.23$
				$1.30 \pm 0.14$				
0.5 mg/kg	5	$6.04 \pm 0.71$	$3.08 \pm 0.42$	$0.41 \pm 0.13$	$0.41 \pm 0.11$	$0.45 \pm 0.11$	$1.39 \pm 0.51$	$0.31 \pm 0.09$
				$1.27 \pm 0.26$				

NCS was daily administrated i. p. for 7 days.  
 T. P. = Total Protein ; Al = Albumin ;  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ -gl =  $\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ -globulin ;  
 $\beta$ -gl = ( $\beta_1 + \beta_2$ )-globulin ;  $\gamma$ -gl =  $\gamma$ -globulin.  
 Values are (mean  $\pm$  standard deviation) g.  
 + $P < 0.05$     + $P < 0.02$     † $P < 0.001$

kg群で $7.53 \pm 0.56$ g/dl, 0.50mg/kg群で $7.10 \pm 0.35$ g/dlと有意の変化をみなかった. albuminは無処置群 $4.03 \pm 0.54$ g/dl, 0.05mg/kg群 $4.00 \pm 0.56$ g/dlに比し0.50mg/kg群では $3.58 \pm 0.32$ g/dlと減少傾向はうかがえたが有意の変化ではなかった.  $\alpha$ -globulinはいずれの群においても大きな変動を示さなかった.  $\beta$ -globulinは無処置群 $1.12 \pm 0.13$ g/dlに対し0.05mg/kg群 $1.59 \pm 0.42$ g/dl, 0.50mg/kg群 $1.54 \pm 0.34$ g/dlとNCS投与群において増加の傾向がみられたが有意ではなかった. 次に $\gamma$ -globulinをみると, 無処置群 $0.64 \pm 0.08$ g/dl, 0.05mg/kg群 $0.71 \pm 0.12$ g/dlに対し0.50mg/kg群において $0.49 \pm 0.14$ g/dlと減少傾向がうかがわれたが有意の変化ではなかった.

c. NCS 0.05mg/kg, 0.50mg/kg 7日間連日 i. p. 投与群の検討 (Model 1-iii)

成績は Tab. 3 に示すごとくである. 総蛋白量は無処置群の $6.98 \pm 0.47$ g/dlに対し0.05mg/kg群は $6.54 \pm 0.76$ g/dlと変化を認めなかったが0.50mg/kg群では $6.04 \pm 0.71$ g/dlと有意の減少 ( $P < 0.05$ ) を認めた. albumin についてみると無処置群の $4.03 \pm 0.54$ g/dlに対し0.05mg/kg群では $3.18 \pm 0.29$ g/dl, 0.50mg/kg群では $3.08 \pm 0.42$ g/dlといずれの群においても有意の減少 ( $P < 0.05$ ) を認めた.  $\alpha$ -globulin 分画は有意の変動を示さなかった.  $\beta$ -globulin は無

処置群 $1.12 \pm 0.13$ g/dlに比し0.05mg/kg群 $1.47 \pm 0.32$ g/dl, 0.50mg/kg群 $1.39 \pm 0.51$ g/dlとやや増加傾向がうかがわれたが有意の変化ではなかった. 次に $\gamma$ -globulin 分画についてみると無処置群の $0.64 \pm 0.08$ g/dlに対し0.05mg/kg群は $0.59 \pm 0.23$ g/dlと変化を示さなかったが, 0.50mg/kg群では $0.31 \pm 0.09$ g/dlと明らかな減少 ( $P < 0.001$ ) を示した.

## 2. 脾プラーク形成細胞 (HPFC) 産生に及ぼす影響

a. NCS 1.0mg/kg - Day 12, - Day 8, - Day 4, Day 0, Day 2, Day 4 各 1回 i. p. 投与における検討 (Model 2-i)

成績は Tab. 4 に示すごとくである. すなわち $10^6$ ヶ脾細胞当たり並びに脾当りのHPFCは対照群でそれぞれ平均値 $993.5$ ,  $85.6 \times 10^3$ であるのに対し - Day 12 投与群では $348.6$ ,  $49.9 \times 10^3$ ; - Day 8 群では $8.9$ ,  $0.8 \times 10^3$ ; - Day 4 群では $8.8$ ,  $0.6 \times 10^3$ ; Day 0 群では $265.9$ ,  $20.4 \times 10^3$ ; Day 2 群では $358.8$ ,  $28.0 \times 10^3$ ; Day 4 群では $465.6$ ,  $35.0 \times 10^3$ で - Day 8 並びに - Day 4 群において著明な減少が認められ, - Day 12, Day 0, Day 2, Day 4, 群では中等度の減少が認められた.

b. NCS 0.005mg/kg, 0.05mg/kg, 0.50mg/kg 4日間連日 i. p. 投与における検討 (Model 2-ii)

成績は Tab. 5 に示すごとくである. すなわ

Tab. 4 Effect of NEOCARZINOSTATIN on Immune Response of Mice to Sheep Red Blood Cell

NCS given at (day)	Number of mice studied	Total spleen cells ( $\times 10^6$ )	HPFC per $10^6$ spleen cells	HPFC per spleen ( $\times 10^3$ )
Control	3	84.6 (78.8—93.8)	993.5 (630.7—1293.2)	85.6 (49.7—121.3)
-12	3	111.7 (63.8—151.3)	348.6 (59.5—879.7)	49.9 (3.8—133.1)
-8	2	55.5 (21.0—90.0)	8.9 (0—17.8)	0.8 (0—1.6)
-4	3	56.7 (25.0—75.0)	8.8 (0—18.5)	0.6 (0—11.3)
0	3	61.3 (38.8—82.5)	265.9 (64.4—608.6)	20.4 (2.5—51.0)
+2	3	68.8 (23.8—98.8)	358.8 (6.1—965.4)	28.0 (0.6—80.9)
+4	3	66.2 (48.5—80.0)	465.6 (62.9—1140.0)	35.0 (4.4—91.2)

NCS of 1 mg/kg was administrated i. p. as a single dose to 3 mice of each group. All mice were immunized i. p. by 0.2 ml of 20% SRBC on 0 day. Hemolytic plaque forming cells were assayed on +5 th day. One mouse treated with NCS on -8 th day have died before immunization. Numbers indicate average value. Numbers in parenthesis indicate range.

Tab. 5 Effect of NEOCARZINOSTATIN on Immune Response of Mice to Sheep Red Blood Cell

	Number of mice studied	Total spleen cells ( $\times 10^6$ )	HPFC per $10^6$ spleen cells	HPFC per spleen ( $\times 10^3$ )
Control	3	159.9 (125.0—186.2)	536.9 (510.0—574.2)	86.0 (63.8—97.5)
0.005 mg/kg	3	178.0 (151.2—226.2)	441.0 (255.5—537.4)	73.3 (57.8—82.2)
0.05 mg/kg	3	164.0 (126.2—206.2)	465.8 (266.6—653.5)	71.5 (55.0—82.5)
0.5 mg/kg	2	131.9 (93.7—170.0)	159.8 (80.6—238.9)	24.1 (7.5—40.6)

NCS was daily administrated i. p. for 4 days before i. p. immunization with 0.2 ml of 20% SRBC. Hemolytic plaque forming cells were assayed 5 days after immunization. One mouse treated with NCS of 0.50 mg/kg/day have died before immunization. Control group was treated with 0.1 ml of physiological saline solution before immunization. Numbers indicate average value. Numbers in parenthesis indicate range.

Tab. 6 Effect of NEOCARZINOSTATIN on Immune Response of Mice to Sheep Red Blood Cell

	Number of mice studied	Total spleen cells ( $\times 10^6$ )	HPFC per $10^6$ spleen cells	HPFC per spleen ( $\times 10^3$ )
Control	3	153.4 (148.8—158.8)	462.5 (344.3—505.2)	70.8 (52.5—84.1)
0.005 mg/kg	3	134.2 (118.8—163.8)	270.6 (210.0—328.3)	35.4 (32.5—39.4)
0.05 mg/kg	3	161.0 (121.3—190.0)	43.6 (17.9—90.7)	6.1 (3.4—11.0)

NCS was daily administrated i. p. for 7 days before i. p. immunization with 0.2 ml of 20% SRBC. Hemolytic plaque forming cells were assayed 5 days after immunization. All mice treated with NCS of 0.50 mg/kg/day have died before immunization. Control group was treated with 0.1 ml of physiological saline solution before immunization. Numbers indicate average value. Numbers in parenthesis indicate range.

ち $10^6$ ヶ脾細胞当たり並びに脾当りのHPFCは対照群でそれぞれ平均値536.9,  $86.0 \times 10^3$ であったのに対し, 0.50 mg/kg群では159.8,  $24.1 \times 10^3$ と減少を認めた。一方0.05 mg/kg及び0.005 mg/kg群では対照群との間に有意の差を認めなかった。尚0.50 mg/kg群では3匹中一匹が死亡した。c. NCS 0.005 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.50 mg/kg 7日間連日 i. p. 投与における検討 (Model 2 -iii)

成績は Tab. 6 に示すごとくであった。尚0.50 mg/kg群は3匹全部死亡した。 $10^6$ ヶ脾細胞当たり並びに脾当りのHPFCは対照群で各々平均値462.5,  $70.8 \times 10^3$ であるのに対し0.005 mg/kg群で各々270.6,  $35.4 \times 10^3$ , 0.05 mg/kg群で43.6,  $6.1 \times 10^3$ となり前者で中等度, 後者では高度の抑制が示された。

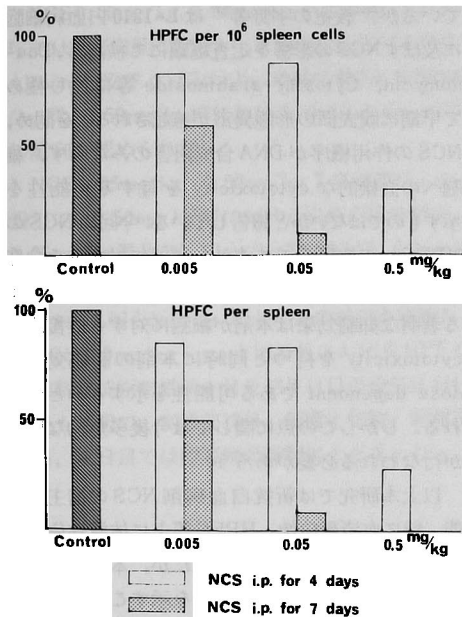
d. NCS 投与日数とHPFC産生能との関連についての検討

NCS 0.005 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.50 mg/kg 4日間及び7日間連日 i. p. 投与の成績を一括し, 投与日数とHPFC産生能との関連を検討すると Fig. 3 に示すごとく, 対照群のHPFCを100%とすると,  $10^6$ ヶ脾細胞当たり並びに脾当りのHPFCは0.005 mg/kg群で4日連日投与群では各々82.1%, 85.2%であるのに比し, 7日連日投与群では58.5%, 50.0%であった。又0.05 mg/kg群で4日間投与群では各々86.8%, 83.1%, 7日間連日投与群では9.4%, 8.6%であり, NCSは同一投与量でもその投与日数の増加に伴いHPFCを抑制することが確認された。

#### IV 考 察

抗白血病剤を含め各種抗癌剤が腫瘍組織のみならず正常組織に対しても何等かの影響を与えることは否定できないものと思われるが, 白血病化学療法は“腫瘍—薬剤—宿主”の関連においてその

Fig. 3  
Relation between Days of Neocarzinostatin Administration and Hemolytic Plaque Forming Cells



効果が期待され、実施されることが原則であり、この点から抗白血病剤の正常組織あるいは正常機能への影響をいかに最少にし、かつ又その抗腫瘍効果を最大とするかということが重要な問題となってくるものと思われる。抗白血病剤の宿主への影響に関してはこれまでその都度報告されているが<sup>(16) (17) (18) (19) (20)</sup> 単に薬剤の投与ということによる非特異的なもの、そして薬物アレルギー、又その薬剤の作用機序—制癌機序—に帰因すると思われる影響等があり、その中でも主に作用機序からの派出とされる正常造血能への影響と免疫能への影響は日常化学療法の実施にあたりいくつかの問題を提起するものと思われる。特に後者については白血病々態における免疫能や、白血病発生と免疫能との関連を示唆する基礎的並びに臨床的報告<sup>(22) (23) (24)</sup> 更に易感染性との問題等々と併考する時、薬剤自体のもつ免疫抑制作用は極めて重要な問題となり、新抗白血病剤の応用に際してはその薬剤が果して免疫能を抑制するのか、するとすればその程度はどうか、更に投与量との関係、投与時期との関連はどうか、又その薬剤が免疫応答過程のいかなるところに作用するのか等詳細な検討と認識が必要

となってくるものと思われる。以上のことからすでに日常寛解導入剤としてひろく用いられ、しかも有力な薬剤とされている Cytosine arabinoside, Vinblastine をはじめ L-Asparaginase, 6-Mercaptopurine, Cyclophosphamide, Prednisolone 等の宿主免疫能に及ぼす影響に関する報告は多い<sup>(17) (25) (26) (27) (28) (29)</sup>

さて NCS はすでに述べたごとく 1957 年本邦において石田等により開発された抗癌性抗生物質であり、平木、喜多島等の臨床研究から抗白血病剤、特に寛解導入剤として高く評価されるに至った薬剤である。今回著者は本剤の宿主への影響、特に体液性免疫能への影響を血清蛋白像及び脾プラーク形成細胞産生能への影響を示標として検討したわけであるが、まず血清蛋白像への影響をみると、Tab. 1 に示すごとく NCS 1.0mg/kg i.p. 1 回投与においては総蛋白量には変動は認められないものの、その分画像で投与 4 日目の albumin の減少、 $\beta$ -globulin の増加、そして投与 4 日～8 日目頃における  $\gamma$ -globulin の減少傾向が注目された。一過性ではあるが  $\gamma$ -globulin の減少傾向は NCS の免疫能への影響を考える時興味ある所見と思われる。一方 Fig. 2 の Model 1-ii, iii に示した 0.05 mg/kg, 0.50mg/kg 4 日及び 7 日連日 i.p. 投与における結果は前記した 1.0mg/kg i.p. 1 回投与の成績をより明確にしており、NCS 投与における  $\gamma$ -globulin 減少は NCS 投与量と投与日数に関連することが示唆された。これまで抗白血病剤をはじめ抗癌剤の免疫抑制、特に体液性免疫能への影響の検討に際してはその方法論として羊赤血球に対する脾プラーク形成細胞の測定<sup>(19)</sup> がひろく用いられており、免疫抑制のみならず薬剤の投与時期と抗原感作日との関連から免疫応答過程における各種薬剤の作用時点が推察され、更に又その作用点が白血病細胞に対する作用機序をも反映することが報告されている。本研究においても同法を用いて Fig. 2 の Model 2 に示すごとく NCS の HPFC への影響を多角的に検討したが、まず NCS 1.0mg/kg i.p. 1 回投与を SRBC 感作日を Day 0 とし以下 -Day 12, -Day 8, -Day 4, Day 0, Day 2, Day 4 群及び NCS 無投与群の 7 群にわけて検討するとその結果は Tab. 4 に示すごとく -Day 4  $\approx$  -Day 8 < Day 0 < Day 2 < Day 4  $\approx$  -Day 12 となり抗原感作とは直接関係なく、むしろ感作前 4～8 日目投与においてその抑制が

より強く認められた。Bradley は“Suppression of the Immune Response”の論文<sup>30)</sup>の中で生体内における免疫応答過程を afferent, central 並びに efferent phase の3相に分け模式化している。すなわち Macrophage によりその情報が認識、処理されて免疫担当細胞に transfer されるまでが afferent phase, その免疫担当細胞が分化、増殖する段階が central phase, そして抗体産生や抗原との反応の時期を efferent phase としており、この一連の過程の中で各種抗癌剤がいかなる時期に作用するか—作用点—を述べている。すでに本邦でも螺良等<sup>31)</sup>は抗癌剤の免疫抑制作用に関し積極的に検討し抗原刺激前の投与によって抑制効果を示すものとしては Busulfan, L-Asparaginase, 抗原刺激と同時に又は刺激後に投与して抑制を示すものとしては Thioguanin, Cytosine arabinoside, Vinblastine, 6-Mercaptopurine 等をあげ、免疫反応の作用時点より抗癌剤の分類をしている。これらの報告からもわかるごとく抗白血病剤, 抗癌剤の免疫抑制作用点は各薬剤により若干の異なりを示しているが、NCS についてみると抗原刺激後の投与でも抑制作用を示すものの、その抑制度はむしろ抗原刺激前の投与において強く、本剤の特異性は免疫応答の中で抗原認識の準備段階にあるリンパ球から、抗原刺激により分裂状態にあるものまで比較的広い範囲にわたり作用するものと考えられ、本剤は Cytosine arabinoside 等よりはむしろ Alkylating agent の作用に類した抑制効果を示すものであろう。次に NCS 0.005mg/kg, 0.05mg/kg, 0.50mg/kg 4日及び7日連日 i. p. 投与群において HPFC への影響を検討したが、Tab. 5, 6, に示すごとくであり、本剤の HPFC への影響は1回投与量並びに総投与量と相関する傾向がうかがわれた。又同一投与量でも投与日数により HPFC は減少しておりその影響は投与量、投与日数に依存 (dose and day dependent) するものと考えられる。

HPFC は抗原刺激前には分裂せず、刺激後分裂を開始して2日目に急激に増加するとされており、白血病細胞への作用機序が phase specific とされている Cytosine arabinoside が抗原投与後2日目に極めて強い抑制効果を示すこと<sup>17)</sup> 分裂毒である Vinblastine が抗原刺激前投与ではわずかな影響しか与えず、抗原刺激と同時に投与でその作用が著明であること<sup>25)</sup> 等から各種抗白血病剤の免疫

応答過程での作用点は白血病細胞への作用機序との関連からしても興味ある問題を提起するものと思われる。NCS の作用機序はすでに石田等により検討され DNA 合成阻害と DNA 崩壊にあるとされているが<sup>22)</sup> 教室の宇野等<sup>33)</sup> は L-1210 白血病細胞に及ぼす NCS の影響を走査電顕にて検討し, Daunomycin, Cytosine arabinoside 等に比し極めて早期に膜表面の形態異常が惹起される事を認め、NCS の作用機序が DNA 合成阻害のみならず、細胞への直接的な cytotoxicity を有する可能性を示すものではないかと報告している。今回の NCS の HPFC への影響をみてもリンパ球に対するその作用点は比較的ひろく、特に抗原刺激前の投与による著明な抑制効果は本剤が細胞に対する直接的な cytotoxicity を持つと同時に本剤の抗癌効果が dose dependent である可能性を示すものと思われる。しかしこの点に関しては今後多角的な検討が行なわれる必要がある。

以上本研究では新抗白血病剤 NCS の宿主免疫能、特に血清蛋白像、HPFC 等主に体液性免疫能に及ぼす影響について検討したが、本剤はこれまでの抗白血病剤同様抑制効果を示すことが認められた。しかしその作用点は特異的で免疫応答における特に afferent phase における細胞を抑制するが、その作用点は比較的ひろく、しかも投与量、投与時期と関連をもつ事が示唆された。これまで教室では本剤の臨床投与法を積極的に検討し、2mg/day 4日間投与が至適である事から、それを原則とし単独並びに多剤併用療法に用い他剤にとらない寛解率をあげているが、4日以上連日投与を続ける場合にはむしろその臨床効果は低下する事などから考えると、その要因の一端として本剤の免疫能への影響も否定し得ないものと思われる。今後更に本剤の体液性免疫のみならず、細胞性免疫能への影響を含め宿主免疫能への影響を検討してゆきたい。

## V 結 語

今回新抗白血病剤 NCS の宿主体液性免疫能への影響を知る一端として、マウス血清蛋白像、マウス脾 HPFC への影響を検討し、本剤は宿主体液性免疫能を抑制するが、その抑制は免疫応答において、その準備段階の過程に主として作用し、それは投与量、投与日数と関連するものと考えられた。即

1) NCS 1.0mg/kg i. p. 1回投与では総蛋白量に



- 変動は認められなかったが、分画像において投与後4日目におけるAlbuminの減少、 $\beta$ -Globulinの増加及び4日目、8日目における $\gamma$ -Globulinの減少が認められた。
- 2) NCS 0.05mg/kg, 0.50mg/kg 4日間連日i.p.投与では総蛋白量に変動なく、0.50mg/kg群におけるAlbumin及び $\gamma$ -Globulinの減少傾向、0.05mg/kg群、0.50mg/kg群における $\beta$ -Globulinの増加傾向が認められた。
- 3) NCS 0.05mg/kg, 0.50mg/kg 7日間連日i.p.投与では0.50mg/kg群における総蛋白量の減少、0.05mg/kg群及び0.50mg/kg群におけるAlbuminの減少及び $\beta$ -Globulinの軽度上昇、0.50mg/kg群における明らかな $\gamma$ -Globulinの減少を認めた。
- 4) NCS 1.0mg/kg i.p. 1回投与におけるHPFCの抑制は抗原刺激前4日及び8日目の投与において最も著明で、刺激前12日、刺激と同時に、刺激後2日、4日目では中等度の抑制にとどまった。
- 5) NCS 0.005mg/kg, 0.05mg/kg, 0.50mg/kg 4日連日i.p.投与では0.50mg/kg群においてのみHPFCの抑制がみられた。
- 6) NCS 0.005mg/kg, 0.05mg/kg, 0.50mg/kg 7日連日i.p.投与におけるHPFCの検討では、0.50mg/kg群は全部死亡し、0.005mg/kg群では中等度に、0.05mg/kg群では高度にHPFCが抑制された。
- 7) NCSによるHPFCの抑制は投与量並びに投与日数と相関することが示された。

尚本論文の要旨は第33回日本癌学会総会（仙台）において発表した。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜った恩師平木潔教授、並びに御指導をいただいた岡山大学第二内科喜多島康一博士、高橋功博士に謝意を表します。又血清蛋白の検討に際し御指導いただいた岡山大学第二内科瀬崎達雄博士に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 栗田宗次, 小川一誠, 亀井良孝, 村上稔, 太田和雄: 急性白血病のDCMP療法, 癌と化学療法, 2: 183-189, 1975.
- 2) 大野竜三, 山田一正: 成人急性白血病の治療, 癌と化学療法, 2: 191-197, 1975.
- 3) 山口博志, 上平憲, 朝長優, 松永マサ子, 武藤一己, 貞森直樹, 名切彬, 北村勉, 朝長万左男, 古賀庸之, 玉利久二男, 川本幹夫, 富安孝則, 木下研一郎, 野中美紀, 岡部信和, 井上晃, 市丸道人: 寛解導入療法としてのDCVP療法, New DCVP療法について, 癌と化学療法, 2: 215-222, 1975.
- 4) 宇塚善郎, 梁盛強: 成人急性白血病の寛解導入と維持, DCMP protocolについて, 癌と化学療法, 2: 198-208, 1975.
- 5) 平野正美, 森田昭光, 佐光富士男, 植谷忠昭, 鯉江捷夫, 神谷忠, 大野竜三, 西脇洋, 石黒順造, 小寺良尚, 江崎幸治, 高橋武昭, 山田一正, 今村一夫: 急性白血病の寛解導入療法, Daunomycin, Cytosine arabinoside, 6-mercaptopurine riboside 及び副腎皮質ホルモンの四者併用大量間歇療法について, 臨床血液, 13: 951-957, 1972.
- 6) Ishida, N., Kumagai, K., Miyazaki, K. and Ito, M.: CARZINOSTATIN, a new anti-tumor substance. Gann, 51: Suppl., 56, 1960.
- 7) Shōji, J.: Preliminary studies on the isolation of carzinostatin complex and its characteristics. J. Antibiotics. Ser. A., 14: 27-33, 1961.
- 8) Nishikawa, T., Kumagai, K., Kudo, A. and Ishida, N.: Cytological study on the effect of neocarzinostatin on sarcoma 180 in vivo. J. Antibiotics. Ser. A., 18: 223-227, 1965.
- 9) Kumagai, K. and Miyazaki, K.: The effect of carzinostatin on mouse ascitic leukemia SN-36. J. Antibiotics. Ser. A., 16: 55, 1963.
- 10) 喜多島康一: 白血病の治療はいかにあるべきか, 新抗白血病剤の臨床評価, Neocarzinostatin, 日本血液学会誌, 37: 767-772, 1974.

- 11) Takahashi, I., Sakato, J., Mikochi, H., Moriwaki, H., Kitajima, K., Irimo, S. and Hiraki, K. : Antitumor activity of neocarzinostatin, effect on Rauscher leukemia in mice. *Acta Med. Okayama*, **28** : 271—276, 1974.
- 12) 平木潔, 喜多島康一, 長尾忠美, 高橋功, 木下日出男, 上村致信, 林久智, 森脇洋司, 陳博明 : “Neocarzinostatin” による急性白血病の新しい治療法, *医学のあゆみ*, **87** : 18—19, 1973.
- 13) 喜多島康一, 長尾忠美, 高橋功, 上村致信, 土岐博信, 陳博明, 内藤徳郎, 中西紀男, 林久智, 新谷憲浩 : Neocarzinostatin を中心とする急性白血病の多剤併用療法, *癌と化学療法*, **2** : 223—229, 1975.
- 14) Skipper, H. E., Schabel, F. M. and Wilcox, W. S. : Experimental evaluation of potential anticancer agents. XIII. On the criteria and kinetics associated with “curability” of experimental leukemia. *Cancer Chemother. Rep.*, **35** : 1—111, 1964.
- 15) 西条長宏, 川瀬一郎, 藤村智子, 白石弘子, 仁井谷久暢, 木村禧代二 : 癌の化学療法における宿主免疫能関与の実態, *最新医学*, **30** : 2020—2023, 1975.
- 16) 木村郁郎 : 溶連菌剤 OK-432 と癌の免疫化学療法の可能性, *癌と化学療法*, **2** : 21—32, 1975.
- 17) Gray, G. D., Mickelson, M. M. and Crim, J. A. : The immunosuppressive activity of aracytidine. *Transplantation*, **6** : 805—817, 1968.
- 18) Umezawa, I., Komiyama, K. and Kasamatsu, M. : A study of immunosuppressive effect of antitumor agents. *Kitasato Arch. of Exp. Med.* **45** : 181—191, 1972.
- 19) 国政郁哉 : Bleomycin の造血器に及ぼす影響に関する研究, 第一編, Bleomycin の正常家兎骨髓白血球系造血に対する影響について, *岡山医学会雑誌*, **85** : 59—66, 1973.
- 20) 国政郁哉 : Bleomycin の造血器に及ぼす影響に関する研究, 第二編, Bleomycin の正常海猿骨髓粒球系造血に対する影響について, *岡山医学会雑誌*, **85** : 67—70, 1973.
- 21) Cunningham, A. J. and Szenberg, A. : Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology*, **14** : 599—600, 1968.
- 22) Harris, R. : Leukemia antigens and immunity in man. *Nature*, **241** : 95—100, 1973.
- 23) Green, W. H., Schimpff, S. C. and Wiernik, P. H. : Cell mediated immunity in acute nonlymphocytic leukemia ; Relationship to host factors, Therapy and prognosis. *Blood*, **43** : 1—14, 1974.
- 24) Benjamin, V. S. and Jane, I. M. : Immunologic stimuli in relation to leukemogenesis, The hematopoietic stem cell for Rauscher leukemia virus. *Virus tumor, genesis and immunogenesis*. Academic Press, New York and London, 271—287, 1973.
- 25) Syklocha, D., Siminovitch, L., Till, J. E. and McCulloch, E. A. : The proliferative state of antigen-sensitive precursors of hemolysin-producing cells, determined by the use of the inhibitor, vinblastine. *J. Immunol.*, **96** : 472—477, 1966.
- 26) 三浦守司, 植谷忠明, 平野正美, 柿沢久美, 森田昭光, 大野竜三, 川島康平, 堀越昇, 西脇洋, 山田一正 : L-Asparaginase の免疫抑制作用について, *最新医学*, **25** : 1953—1960, 1970.
- 27) Yamaki, H., Tanaka, N. and Umezawa, H. : Effects of several tumor-inhibitory antibiotics on immunological responses. *J. Antibiotics*, **22** : 315—321, 1969.
- 28) 蝶良英郎, 山下喬, 河野通昭, 矢田健太郎, 久野悟郎, 佐々木春夫, 曾根三郎 : 免疫抑制と副作用, *臨床科学*, **9** : 1409—1419, 1973.
- 29) 熊谷朗 : ステロイド剤による免疫不全, *診断と治療*, **61** : 2174—2178, 1973.
- 30) Bradley, J. and Elson, C. J. : Suppression of the immune response. *J. Med. Genetics*, **8** : 321—340, 1971.
- 31) 矢田健太郎, 久野悟郎, 富永憲治, 香西勝人, 蝶良英郎 : 抗癌剤と免疫不全, *診断と治療*, **61** : 2166—2173, 1973.
- 32) Ono, Y., Watanabe, Y. and Ishida, N. : Mode of action of neocarzinostatin, Inhibition of

DNA synthesis and degradation of DNA in *Sarcina lutea*. *Biochim. Biophys. Acta*, **119**:46–58, 1966.

- 33) 入野昭三, 宇野潤一郎, 豊田勝士, 渡辺克仁, 小野哲也, 高杉敬久, 坂戸純也, 高橋功, 喜多島康一: 白血病細胞に及ぼす抗白血病剤の影響に関する走査電顕的研究, *血液と脈管*, **6**:179–180, 1975.

## Neocarzinostatin effect on immune response of mice

### 1. Effects on humoral immunity

by

**Hiroshi MIKOUCHI**

Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. K. Hiraki)

Since tumor — antitumor agent — host correlation must be considered in the treatment of neoplasms, the qualitative change of serum protein and hemolytic plaque forming cell (HPFC) production against sheep red blood cells (SRBC) in mice were carefully studied in part 1 to investigate the effect of a new antileukemic agent, Neocarzinostatin (NCS), on humoral immunity.

Serum gamma globulin significantly decreased by the 4<sup>th</sup> day and returned to normal by the 12<sup>th</sup> day after a single injection of NCS. After 4 consecutive days of NCS administration gamma globulin value showed no change, but after 7 consecutive days of NCS 0.50mg/kg/day administration marked gamma globulin reduction was observed.

Marked reduction of HPFC was observed in the —8<sup>th</sup> and —4<sup>th</sup> day groups of the single injection of NCS, but the —12<sup>th</sup>, 0, +2<sup>nd</sup> and +4<sup>th</sup> day groups showed only moderate reduction (Immunization by SRBC was done on 0 day.). After 4 consecutive days of NCS injection only 0.50mg/kg/day group showed HPFC reduction. But after 7 consecutive days of NCS administration 0.005mg/kg/day group showed moderate and 0.05mg/kg/day group showed marked reduction of HPFC. All mice in 0.50mg/kg/day group died.

These data suggest that NCS suppresses the humoral immunity of mice to some extent and it affects almost all phases of the immune response but mainly the afferent phase. Furthermore, immunosuppressive effects of NCS are related to the daily dose and the number of consecutive days of NCS administration.