

マウス実験腫瘍における Cyclosporin A の影響について

岐阜大学医学部第2外科（主任：坂田一記教授）

佐 治 董 豊

〔原稿受付：昭和60年1月21日〕

Effects of Cyclosporin A on Mice Tumors

SHIGETOYO SAJI

Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine
(Director: Prof. KAZUKI SAKATA)

Influence of Cyclosporin A, the fungal endecapeptide which suppresses both humoral and cell-mediated immunity, on tumor growth was examined using murin colon adenocarcinoma (MCA-38) and murine melanoma (B-16) on C57BL/6 female mice. 10 mg/kg of Cyclosporin A was injected intraperitoneally both before and after tumor inoculation every other day for 20 days. Mice in the control group received same amount of the solution without Cy A. Body weight and tumor size were recorded weekly. The mice were sacrificed on day 42 (MCA-38) or day 35 (B-16) after tumor inoculation. They were examined for metastases to the lungs and lymph nodes. Weight of spleen, thymus, liver and kidneys were measured. Results: There were no significant effect on the growth rates of the tumors tested or on metastasis of either the moderately immunogenic MCA-38 or poorly or non immunogenic B-16 tumors. Weight changes in immune-related organs such as the thymus, spleen etc., were statistically analyzed.

結 言

cyclosporin A（以下 cy A と略す）は約20年前に開発された最も重要な薬物的免疫抑制剤¹⁾である。Borelら²⁾が1976年本剤を免疫抑制および抗炎症剤として用いた多くの実験的研究を最初に報告して以来、多くの研究者により cy A の免疫抑制剤としての効果が体液性、細胞性、自己免疫の分野で実験動物を用い立証されて来た^{3)~24)}

cy A の肝毒性、腎毒性およびTリンパ球免疫抑制

による lymphoma や感染死等の報告¹¹⁾にもかかわらず、本剤は近年ヒトおよび動物の各種臓器移植において拒絶反応の防止と着床臓器の延命に極めて有効である¹²⁾として注目を集めている。

一方 cy A の発癌性および腫瘍増殖や転移におよぼす影響も大変興味の持たれるところであるが、担癌動物を用いたこの面の研究は未だ少ない。

Sandoz は¹⁷⁾ 1980年本剤を動物に長期間投与しても発癌性はみられなかったと報告しているが、Pennockら¹⁶⁾はサルを用いた実験で本剤と他の免疫抑制療法を

Key words: Cyclosporin A, Murine tumors, MCA-38, B-16, Anti-tumor effect.

索引語: Cyclosporin A, マウス腫瘍, MCA-38, B-16, 抗腫瘍効果.

Present address: Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine 40 Tsukasa-machi, Gifu 500.

併用すると lymphoma の発生が高頻度でみられることを報告した。

Eccles ら¹⁰⁾ は同系マウスの肉腫、癌、T細胞 lymphoma を用いた研究で cy A は腫瘍増殖には影響がみられなかったが同系マウス肉腫の転移率が有意に高かったことより本剤の抗腫瘍免疫活性抑制の可能性を指摘している。

著者もこの点に注目し、cy A は担癌動物の腫瘍増殖と転移を促進し、生存期間を短縮させるとの仮定のもとにマウス実験腫瘍を用い腫瘍増殖程度と転移におよぼ影響等を検討したので報告する。

実験動物と研究方法

実験動物：C57BL/6 雌性マウス (Jackson Laboratory) 70匹を本研究に用いた。

実験腫瘍：C57BL/6 マウスに 1-2 di-methylhydrazine で誘発したマウス大腸腺癌 MCA-38¹⁹⁾ と C57BL/6 マウスの自然発生メラノーマ B-16⁷⁾ の2種の腫瘍系を用いた。両腫瘍は Roswell Park Memorial Institute の Goldrosen 博士より供与されたもので 10% FCS を含む RPMI 1640 培養液を用い 5% CO₂ 環境下 37°C で培養維持した。

腫瘍移植方法：両培養腫瘍細胞を 0.2% trypsin と

0.02% EDTA 液を用い浮遊細胞とし、上述培養液を用い MCA-38 は 5×10^5 /ml に、B-16 は 5×10^4 /ml に調整し、これらの 0.2 ml を C57BL/6 マウスの大腿部内側皮下に注入移植した。

cyclosporin A：cy A は Sandoz 製薬株式会社 (New Jersey) より散剤の形で寄与をうけた。実験には、この cy A 50 mg を 95% エタノール 5 ml と 10% Intralipid 45 ml (Cutter Vitrum Laboratories) と共に超音波振動法で溶解し腹腔内注入液として用いた。

薬剤投与方法：cy A 10 mg/kg をマウス腹腔内へ隔日 20 日間投与した (計 10 回)。又対照群として cy A を含まない溶解液を同量隔日 20 日間投与した。又薬剤投与方法の差により以下の実験群を作成した。

実験 1 (腫瘍移植前投与群)：5~6 週齢 C57BL/6 マウスを無作為に 2 群に分け、それぞれに cy A 又は cy A を含まない対照溶解液を隔日 10 回腹腔内投与し、翌日に MCA-38 又は B-16 を移植した。

実験 2 (腫瘍移植後投与群)：8~9 週齢マウスに腫瘍移植後 MCA-38 の群では 7 日目に、B-16 の群では 4 日目に着床腫瘍径の大きさに従って平等に 2 群に分け cy A 又は cy A を含まない対照溶解液を同様 10 回投与した。

実験 3 (非投与群)：MCA-38 又は B-16 腫瘍を 8

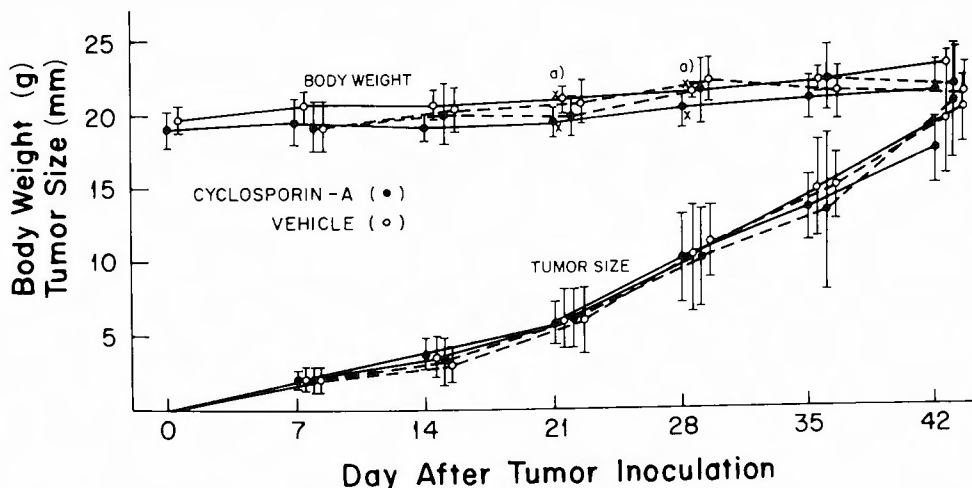


Fig. 1. Daily changes of tumor size and body weight of MCA-38 inoculated mice on Cyclosporin A administration before or after tumor inoculation.
Data is the Mean value $\pm$ Standard Deviation.
Tumor size is expressed as mean diameter of length and width.
Cy A (●) or control solution (○) is intraperitoneally injected every other day for twenty days before tumor inoculation (---) or after tumor inoculation (—).
Difference is significant at $P < 0.025$ between pairs x) - x).

～9週齢マウスに移植後非投与のまま経過を観察した。

評価方法：体重、腫瘍径(長径と短径の平均値)および全身状態を毎週1回チェックし、腫瘍移植後 MCA-38 の群では42日目に、B-16 の群では35日目に屠殺剖検し、肺およびリンパ節転移の有無、脾臓、胸腺、肝、腎の重量を測定し、互いに比較検討した。

尚各測定値は1群7匹の平均値±標準偏差で表わし、統計学的有意差の検定は Student's t test で行った。

実験結果

1. 腫瘍増殖程度：Fig. 1 に MCA-38 腫瘍移植前投与群および移植後投与群における平均腫瘍径と体重を cy A 投与および対照群別に経過的に示した。実験2の移植後投与群で cy A を投与したマウスの体重は対照群に比べ第21および28日目で有意の増加がみられた。しかし全体として cy A を 10 mg/kg, 10回投与しても腫瘍増殖程度および体重には著明な影響はみられなかった。

B-16 腫瘍における平均腫瘍径と体重の変動を同様 Fig. 2 に示した。実験1の前投与群で、cy A を投与したマウスの腫瘍増殖程度は各週とも対照群に比べ高く、特に腫瘍移植後17日目で有意に高い傾向がみられた。

又 cy A 群における体重は腫瘍増殖に伴い対照群より多くなり、31日目に有意の増加を示した。しかし実験2の後投与群では体重・腫瘍径とも両群間で差はみられなかった。

2. 剖検所見

a) 転移率 (Table 1.)：実験1の前投与群で cy A 投与群のうち MCA-38 腫瘍で2例、B-16 腫瘍で1例に転移がみられたが、対照群では1例も観察されなかった。実験2の後投与群では cy A 投与群のうち B-16 の1例、対照群のうち MCA-38 と B-16 の各1例に転移がみられた。しかし実験3の非投与群では転移は1例も観察されなかった。

b) 腫瘍、脾臓および胸腺重量 (Table 2.)：MCA-38 移植後投与した対照群の腫瘍重量は cy A 群より有意に重い傾向を示し、B-16 移植後投与した cy A 群の脾臓重量は対照群に比べ有意に増加する傾向がみられた。しかし全体として cy A 投与、非投与の両群間で腫瘍・脾臓および胸腺重量に関して有意の差はみられなかった。その他肝・腎重量も各群間で差がなく、著明な肝および腎毒性を示唆する所見もみられなかった。

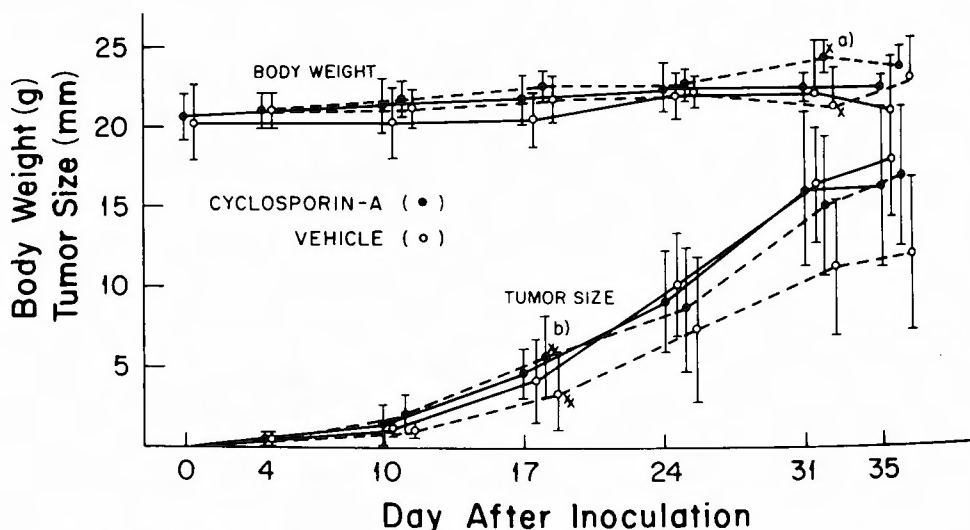


Fig. 2. Daily changes of tumor size and body weight of B-16 inoculated mice on Cyclosporin A administration before or after tumor inoculation.

Data is $M \pm SD$. Tumor size is expressed as mean diameter of length and width. Cy A (●) or control solution (○) is intraperitoneally injected every other day for twenty days before tumor inoculation (---) or after tumor inoculation (—).

- a) Difference is significant at $P < 0.05$ between x) x).
b) Tendency of significant difference at $P > 0.10$ between x) x).

Table 1. Incidence of distant metastasis at autopsy

		MCA-38	B-16
Group (1)	Cy A	2/7 (retro*)	1/7 (lung)
	Control	0/7	0/7
Group (2)	Cy A	0/7	1/7 (retro*)
	Control	1/7 (retro*)	1/7 (retro & liver)
No treatment group (3)		0/7	0/7

Data is cases of positive metastasis/number of experimental mice

(): Location of distant metastasis

retro*: Retroperitoneal lymph node metastasis

Group (1): The drug administration before tumor inoculation

Group (2): The drug administration after tumor inoculation

Table 2. Weight of tumor, spleen and thymus at autopsy in case of drug administration before (group 1) or after (group 2) tumor inoculation

1) Tumor (mg)

		MCA-38	B-16
Group (1)	Cy A	3622.9±1402.3	3130.5±1568.9
	Control	3473.3±1318.5	2357.5±1720.7
Group (2)	Cy A	3101.4±2234.3 ^{a)}	3586.0±545.1
	Control	5125.0±2234.3 ^{b)}	4230.0±825.8

2) Spleen (mg)

Group (1)	Cy A	244.9±34.9 ^{c)}	133.3±12.5 ^{d)}
	Control	269.5±48.0 ^{d)}	130.0±21.6
Group (2)	Cy A	156.3±35.1 ^{e)}	188.3±65.1 ^{b)}
	Control	176.7±48.9 ^{f)}	132.1±25.5 ^{c)}

3) Thymus (mg)

Group (1)	Cy A	56.3±20.0	58.0±15.5 ^{j)}
	Control	40.2±23.4	59.7±13.6 ^{k)}
Group (2)	Cy A	64.2±32.5	30.1±16.9 ^{l)}
	Control	53.5±24.4	37.2±18.2 ^{m)}

Data is the Mean value±StandardDeviation of seven mice

Group (1): The drug administration before tumor inoculation

Group (2): The drug administration after tumor inoculation

Differences are significant at P<0.05 between pairs c)-e), d) f),

g)-h), h)-l) and k)-m) Tendency of significant difference between

a)-b) (P<0.10)

考 按

著者は本研究を始めるに当り cy A は担癌マウスの腫瘍増殖と転移を促進させる可能性が高いと考え、中程度抗原性を有し、腫瘍増殖の遅いマウス大腸腺癌 MCA-38¹⁹⁾ と低抗原性で腫瘍増殖の早いマウス自然

発生メラノーマ B-16²⁾ の2種の腫瘍系を用いて実験を行った。

その結果、MCA-38 腫瘍を用いた場合には cy A の投与の有無にかかわらず腫瘍増殖程度および転移率には差がみられなかった。しかし B-16 腫瘍を用いた場合には cy A を腫瘍移植前に投与すると対照群に比べ

体重の有意の増加と腫瘍径の有意の増加傾向が観察され、かつ実験2で脾臓の有意の増大傾向がみられたことから、cy A は低抗原性の腫瘍である B-16 に対し若干腫瘍増殖促進的に働く可能性が示唆された。他に cy A 投与開始後7～10日頃よりマウスは易刺激性となり、宿主免疫能低下が推察された。

一方剖検所見からは実験1および2において、両腫瘍系とも cy A 投与群と対照群の間に遠隔転移率とか免疫担当臓器重量に有意の差はみられなかった。しかし cy A の腫瘍移植前投与群と移植後投与群とを比較検討すると、MCA-38 では前投与群で脾重量が有意に増加し、B-16 では後投与群で脾重量が有意に増加し、胸腺重量が有意に低下したがこれらの所見の病因的理由は判然としない。

Eccles らは¹⁰⁾ 抗原性を有する腫瘍 (例えば肉腫、lymphoma 等) に cy A を投与すると腫瘍増殖程度には著変がみられないが転移率は明らかに増加するのに対し、低抗原性の腫瘍 (例えば乳癌、扁平上皮癌) に cy A を投与しても転移率には著変がみられなかったと報告している。

著者の研究では cy A は中程度抗原性を有する MCA-38 でも低抗原性の B-16 でも腫瘍増殖率と転移発生率には有意の影響を示さなかった。然し B-16 腫瘍で Cy A を腫瘍移植前に投与した場合、若干の腫瘍増殖促進様所見が観察された。

今後 Cy A の投与量および投与期間を変更した研究が必要であるが Cy A 10 mg/kg は臓器移植時の免疫抑制に使用される投与量であり、隔日10回投与は体液性および細胞性免疫活性を充分低下させ得る量であり、少なくとも MCA-38 と B-16 に対しては Cy A の影響は小さいと考えられる。

結 語

体液性および細胞性免疫抑制剤の1つである Cyclosporin A の腫瘍増殖におよぼす影響を、C57BL/6 マウスの大腸癌 (MCA-38) とメラノーマ (B-16) の2つの移植腫瘍を用い検討した。その結果 Cyclosporin A 10 mg/kg を腫瘍移植前又は後に腹腔内へ隔日10回投与しても腫瘍増殖および転移に対し MCA-38 および B-16 共に有意の影響はみられなかった。

本研究は著者が文部省在外研究員として、Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, New York U.S.A. に10か月間 (昭和57年11月より昭和58年8月) 滞在した時に Samuel Zylstra, M.D. と協同研究で行った実験結果である。

尚、稿を終るに当たり、本研究に対し終始御指導、御助言を賜いました Roswell Park Memorial Institute, Department of Thoracic Surgery, Chief; Hiroshi Takita, M.D. および本学第2外科、坂田一記教授に深謝致します。

文 献

- 1) Alberti S, Boraschi D, et al: Effects of in vivo treatments with Cyclosporin A on mouse cell-mediated immune responses. *Int. J. Immunopharmacology*. **33**: 357-364, 1981.
- 2) Bolton C, Allsopp G, et al: The effect of Cyclosporin A on the adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Clin Exp Immunol* **47**: 127-132, 1982.
- 3) Borel JF: Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cell mediated cytotoxicity. *Immunology*. **31**: 631-641, 1976.
- 4) Borel JF and Wiesinger D: Effect of Cyclosporin A on murine lymphoid cells. In: *Regulatory mechanism in lymphocyte activation*, Proceedings of the 11th Leucocyte Culture Conference, Lucas, DO, ed. New York; Academic Press; 1977; 716.
- 5) Borel JF: Cyclosporin A. *Trinagle* **20**: 97-105, 1981.
- 6) Burckhardt J, Guggenheim B: Cyclosporin A: In vivo and in vitro suppression of rat T-lymphocyte function. *Immunology* **36**: 753-757, 1979.
- 7) Celik C, Lewis DA, et al: Demonstration of immunogenicity with the poorly immunogenic B-16 melanoma. *Cancer Res* **43**: 3507-3510, 1983.
- 8) Deeg HJ, Storb R, et al: Cyclosporin A: Effect on marrow engraftment and graft-versus host disease in dogs. *Transplant Proc* **13**: 402-404, 1981.
- 9) Deeg HJ, Mackman RC, et al: Growth of canine tumors transplanted into normal adult dogs immunosuppressed by Cyclosporin A. *Cancer Immunol. Immunotherapy* **12**: 147-152, 1982.
- 10) Eccles SA, Meckford SE, et al: Effect of Cyclosporin A on the growth and spontaneous metastasis of syngeneic animal tumors. *Br J Cancer* **42**: 252-259, 1980.
- 11) Fletchner SM: Cyclosporin: A new and promising immunosuppressive agent. *Urologic Clinic of North America*. **10**: 263-275, 1983.
- 12) Kahan BD, Van Buren CT, et al: Immunopharmacological monitoring of Cyclosporin A-Treated recipients of cadaveric kidney allografts. *Transplantation* **34**: 36-45, 1982.
- 13) Kunkl A, Klans GGB: Selective effects of Cyclosporine A on functional B cell subsets in the mouse. *J Immunology* **125**: 2526-2531,

- 1980.
- 14) Lindsay NJ, Harris KR, et al: The effect of Cyclosporin A on the primary and secondary immune response in the rabbit. *Transplant Proc* **12**: 252-255, 1980.
 - 15) Neussenblatt RB, Rodriguez MM, et al: Cyclosporin A inhibition of experimental autoimmune uveitis in Lewis rats. *J Clin Invest* **67**: 1228-1231, 1981.
 - 16) Pennock JL, Reitz BA, et al: Lethal complications due to Cyclosporin A immune suppression with combination drug and combined heart and lung transplantation. *Surg Forum* **31**: 375-378, 1980.
 - 17) Sandoz: Interval report, 1980.
 - 18) Smith GN: The effect of Cyclosporin A on the primary immune response to allogeneic red cells in rabbits. *Immunology* **45**: 163-167, 1980.
 - 19) Tan MH, Holyoke ED, et al: Brief communication: Murine colon adenocarcinomas: Methods for selective culture in vitro. *J Natl Cancer Inst* **56**: 871-872, 1976.
 - 20) Thomson AW, Whitney PH, et al: A toxicological study in rats receiving immunotherapeutic doses of Cyclosporin A. *Transplantation* **31**: 121-124, 1981.
 - 21) Thomson AW: Immunobiology of Cyclosporin A-A review. *Aust J Exp Biol Med Sci* **61**: 147-172, 1983.
 - 22) Tutschka PJ, Beschoner WE, et al: Use of Cyclosporin A in allogeneic bone marrow transplantation (BMT) in the rat. *Nature* **280**: 148-151, 1979.
 - 23) Van Bekkum DW, Knaqn S, et al: Effects of Cyclosporin A on experimental graft-versus host disease (GVHD) in rodents. *Transplant Proc* **12**: 278-282, 1980.
 - 24) Yanagihara H, Adler WH: Inhibition of mouse natural killer activity by Cyclosporin A. *Immunology* **45**: 325-332, 1982.