

[原 著]

Endogenous Oxygen Radical Scavengerによる  
マウス退縮型癌細胞の悪性化進展の抑制に関する研究

加 藤 元 康

北海道医療大学歯学部口腔外科学第2講座

(主任：村瀬博文教授)

Study on The Inhibition of Tumor progression of Regressive Tumor  
Cells by Endogenous Oxygen Radical Scavengers

Motoyasu KATO

Second Department of Oral Surgery, School of Dentistry,  
HEALTH SCIENCES UNIVERSITY OF HOKKAIDO

(Chief Prof Hirofumi MURASE)

**Abstract**

QR-32 cell is low tumorigenic and low metastatic clone derived from 3-methy cholanthrene induced C57BL/6 mouse fibrosarcoma (BMT-11) When QR-32 cells ( $2 \times 10^5$ ) were subcutaneously implanted or  $10^6$  cells were intravenously injected into normal mice, they all spontaneously regressed However, when they were subcutaneously co-implanted with gelatin sponge (10x5x3mm), they acquired enhancement of tumorigenicity and metastatic ability and grew lethally Previous in vitro assays have shown that this malignant progression of QR-32 cells was caused by oxygen radicals released from host cells reactive to gelatin sponge To elucidate the effects of oxygen radicals in vivo, this study examined whether endogenous oxygen radical scavengers induced by bismuth subnitrate (BSN) or PSK administration inhibited the malignant progression of QR-32 cells The QR-32 ( $2 \times 10^5$ ) cells and gelatin sponge were subcutaneously co-implanted into mice, pre-administered with BSN (5mg/kg/day) or PSK (150mg/kg/day, i p, 1000mg/kg/day p o) The BSN and PSK administration did not affect the tumor growth. The culture lines from these tumors arising in mice were established implanted with QR-32 cells and gelatin sponge, and implanted these culture tumor cells s c or i v into normal mice Compared with the parental QR-32 cells, the tumor cell lines developed in the normal mice and used for the malignant progression estimation, i e s. c tumorigenicity and i v lung metastasis. All 18 cell lines (100%) obtained from the untreated group showed progress in the malignancy when compared with QR-32 cells However, these cell lines

---

受付：平成6年9月30日

本論文の要旨は第38回日本口腔外科学会総会（平成5年10月於新潟）において報告した。

obtained from the BSN administered group indicated malignant progression in only 4 out of 7 cell lines (57.1%), in the same manner cell lines obtained from the PSK (i p) group indicated malignant progression in 3 out of 6 cell lines (50%), for cell lines obtained from PSK (p o) group indicated in 4 out of 8 cell lines (50%) Endogenous radical scavengers in tumor in mice administered with BSN or PSK were analysed with the immunoblotting and immunohistochemistry These results of the assay showed that the quantity of radical scavengers (metallothionein, Mn-SOD, Cu/Zn-SOD GSH-Px, Catalase) increased over the untreated groups These findings suggest that oxygen radicals may play an important role in in vivo QR-32 malignancy progress

**Key word** Tumor progression, oxygen radical scavenger, Metallothionein, Bismuth subnitrate, PSK

## 緒 言

口腔癌治療の進歩に伴い、その治療成績は近年著しく改善されてきているが、再発、転移により制御不能となる場合も多く、治療上克服すべき課題となっている。この再発、転移には、癌細胞の増殖能、浸潤・転移能などの悪性形質が密接に関与していると考えられ、癌細胞の悪性形質獲得機構の解明は治療上重要な課題であると考えられている。また、これら癌細胞の持つ悪性形質は、発癌当初より具備されているものではなく、その発生後の増殖過程において癌細胞を取り巻く周囲環境との関わりによって獲得されて行くものと考えられており<sup>1)</sup>、その要因として、抗癌剤<sup>2)4)</sup>、癌原性化学物質<sup>5)6)</sup>などの外的因子の他に内的因子<sup>7)9)</sup>が挙げられ、特に活性酸素の関与が注目されている。しかし、癌細胞の悪性化進展に活性酸素が関与している証明は、主としてin vitroに於いてなされており、in vivoでの証明はほとんどないのが現状である<sup>4)10)</sup>。

先にHamada<sup>11)</sup>、Ishikawa<sup>12)</sup>、Okada<sup>13)</sup>らはマウスの線維肉腫BMT-11より樹立した正常同系宿主での増殖性、浸潤・転移能の著しく低下した退縮型癌細胞(QR-32細胞)を用いて、その

増殖能および浸潤・転移能の増強を悪性形質獲得の指標として、癌細胞の悪性化進展の促進因子を検索している。その結果、QR-32細胞の悪性化進展は、ゼラチンスポンジ等の異物とともに移植すると促進されること、その機序として癌細胞の増殖する局所に集積する宿主反応細胞の産生する活性酸素が関与していることをin vitroの実験で明らかにしている<sup>13)</sup>。

一方、重金属である次硝酸ビスマス(以下BSN)は、その投与により生体内に分子量約6,000の低分子蛋白であるメタロチオネイン(Metallothionein 以下MT)を誘導し、この誘導された蛋白は、金属の解毒作用以外に活性酸素(O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH)の消去作用を示すことが知られてきている<sup>14)19)</sup>。また、担子菌カワラタケより抽出された蛋白多糖体であるPSK(クレステン<sup>®</sup>)は、種々の腫瘍に対し、宿主介在型の抗腫瘍効果<sup>20)26)</sup>を有するとともに、Manganese-superoxide dismutase (Mn-SOD)などの活性酸素scavengerを誘導することが報告されている<sup>27)28)</sup>。

そこで、in vivoにおける癌細胞の悪性化進展にも活性酸素が関与することを明らかにするために、QR-32細胞とゼラチンスポンジを同時移植し、マウスにあらかじめBSNあるいはPSKを

投与し、内因性活性酸素scavengerを誘導させ、これが癌細胞の悪性化進展に及ぼす影響を検討した。

## 材料と方法

### 1. 動物

日本クレア（株）より購入し、SPF環境で飼育した7～8週齢の雌C57BL/6マウスを実験に使用した。

### 2. 腫瘍細胞

C57BL/6マウスの3-メチルコランスレン誘発線維肉腫BMT-11の培養系クローンc1-9をケルセチン処理(55 $\mu$ M, 48時間)後、再クローニングして樹立した同系マウスで造腫瘍性の極度に低下した退縮型クローンQR-32細胞を用いた。このQR-32細胞は $2 \times 10^5$ 個を正常同系マウスに単独皮下移植した場合、全例自然退縮してしまうが、放射線照射やTヘルパー細胞に対するモノクロナール抗体投与で免疫を抑制したマウスでは致死的増殖を示す<sup>29)</sup>。

### 3. 培養条件

QR-32細胞は、8% fetal calf serum (FCS, 56°C30分不活化)、L-glutamine 292 3mg/lを添加したEagle's minimum essential medium (MEM)培地にて37°C, 5%CO<sub>2</sub>, 95%air下で培養した。

### 4. 腫瘍細胞およびゼラチンスポンジの移植と腫瘍計測法

エーテル麻酔下にて正常同系マウスの背部皮下に無菌ゼラチンスポンジ(10x5x3mm) (山之内製薬, 東京)を移植し、同時に、ゼラチンスポンジ内にQR-32細胞を $2 \times 10^5$ 個を移植した。その後、経日的に皮下腫瘍の観察を行い、腫瘍の生着と腫瘍計測を行った。腫瘍計測は腫瘍の長径と短径を計測し、その平均値を腫瘍径とし、腫瘍増殖曲線を作製した。

### 5. 次硝酸ビスマスの投与

滅菌蒸留水に懸濁させたBSN 5 mg/kg/

dayをマウスに強制経口投与した。また、投与は腫瘍移植前5日間連続、腫瘍移植後は1日置きにマウスを屠殺する21日目まで、計26日間継続して行った。

### 6. PSKの投与

1) 腹腔内投与: PSK150mg/kg/dayをマウスに腫瘍移植前5日間、腹腔内連続投与した。

2) 経口投与: PSK 3%含有飼料をマウスに腫瘍移植前5日間、自由摂取により投与した。この投与方法によりマウスは約1000mg/kg/dayのPSKを摂取した。

### 7. 培養株の樹立

BSNまたはPSKを投与したマウスの皮下にゼラチンスポンジとQR-32細胞を移植し、増殖してきた腫瘍を腫瘍移植後21日目に摘出し、各個体ごとに培養株として以下の如く樹立した。無菌的に摘出した腫瘍組織を無血清MEM培地を入れたプラスチックシャーレ内で細切し、4layersのガーゼで濾過後、赤血球を170 mMTrisNH<sub>4</sub>Cl(pH7.2)処理にて溶血し、無血清MEM液を用い、1,200rpm, 5分間の遠心により3回洗浄した。洗浄後、腫瘍細胞数をトリパンプルを用いて算定し、さらに、 $5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$ 個/mlに調整し、QR-32細胞と同様な条件で培養した。

### 8. 悪性化進展の評価

樹立した培養株の培養開始10～14日目の細胞を1系当たりそれぞれ5匹の正常同系マウスに皮下移植( $2 \times 10^5$ 個/マウス)、尾静脈内移植( $1 \times 10^6$ 個/マウス)した。皮下移植では、その後腫瘍の増殖を観察し、尾静脈内移植では、移植後19日目に屠殺し、肺転移巣のコロニー数を測定した。対照として、同数個のQR-32細胞の皮下移植、尾静脈内移植を行い、このQR-32細胞の皮下増殖性、肺転移能に比べ、いずれか一方が有意に増強しているものを悪性化の進展と判定した。

### 9. 腫瘍組織内MTの定量

QR-32細胞とゼラチンスポンジを同時移植後

21日目にBSN投与群, 非投与群のマウス各々10匹より摘出した新鮮な腫瘍組織を検体として使用した。この検体に2倍量の緩衝液(100 mM Tris-HCl pH8.6)を加え, 超音波破碎機(60秒/3回)にてホモジナイズ後, 110,000rpm(60min, 4°C)にて超遠心分離した。その上清2mlにCdCl<sub>2</sub>(1,000ppm)および緩衝液(100 mM Tris-HCl pH8.6)を入れ, 振盪後15min室温放置し, その後加熱処理(80°C, 3min)した。次いで, これを水中冷却後10,000rpmで30min遠沈した。さらに, その上清を0.22μmの遠心濾過チューブで濾過し, 濾過液(200μl)をHPLC用カラム(島津製作所製), Superdex75HR(Pharmacia LKB)に注入し, 移動相を0.1M phosphate-NaCl pH7.4とし, 流速1.0ml/minで行い, 紫外分光光度計(波長250nm)を用いて測定した。尚, 対照としてシグマ社製のMT標準試薬を使用した<sup>30,31)</sup>。

#### 10. 免疫組織染色法による腫瘍組織内MTの分布

皮下腫瘍を10%ホルマリン液で固定後, 通法により作製したパラフィン包埋ブロックを6μmに薄切し, キシレン, アルコールにて脱パラフィンを行い, メタノール, 過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシダーゼの阻害を行い, これを標本として用いた。1次抗体として3,000倍希釈した抗メタロチオネインモノクローナル抗体(MT45)(国立衛生試験所 沢田純一先生より供与)<sup>32)</sup>を用い, 2次抗体にビオチン化マウス抗ウサギIgG(Elite, Vector Lab)を用い, 通法のABC法(Elite, Vector Lab)にて染色, 発色させた。免疫組織染色後ヘマトキシリン後染色し, 鏡検した。

#### 11. 腫瘍組織内のMn-SOD, Cu/Zn-SOD, GSH-Px, Catalaseの検索

移植後21日目のPSK腹腔内投与群, 非投与群のマウス各々3匹ずつから腫瘍を摘出し, 検体とした。次に, 前述した培養株の樹立と同様の

操作を行い, 1x10<sup>5</sup>個/mlになるようにLaemuli's sample bufferを加え, 超音波破碎機(60秒/3回)水中にてホモジナイズ後, 遠心した(15,000 rpm, 15分, 4°C)。この上清をニトロセルロース膜(Bio-Rad Lab)にマイクロ・フィルトレーション装置を用いて転写し, 続いてブロッキングを行い, 3%bovine serum albumin, T-PBS(4°C, overnight)その後, T-PBSで洗浄(5分x3回)し, 各々の1抗体(抗ヒトMn-SODモノクローナル抗体, 抗ヒトCu/Zn-SODモノクローナル抗体, 抗ウシCatalaseポリクローナル抗体, 抗ラットGSH-Pxモノクローナル抗体)を室温で1時間静置した。なお, 1次抗体にはペルオキシダーゼが標識されて, これに反応するECL systemを用い, フィルムに感光(約10秒間)させ, 現像, 定着, 乾燥を行った。また, このイムノプロットの結果をデンストメーター(アトー社, 東京)にて測定し, 定量化した。

12. 統計処理: 樹立培養株の悪性化進展の判定には, QR-32細胞の皮下増殖性, 肺転移能と比較し, X<sup>2</sup>検定を行った。また, 非投与群に対するBSN, PSK投与群の悪性化の進展の抑制効果は, Student t検定を用いた。

Table 1 Tumorigenicity of QR-32 cells co-implanted with gelatin sponge in C57BL/6 mice treated with bismuth subnitrate or PSK

Implantation with gelatin sponge <sup>a</sup>	Administered	Growth of tumor on 21 days Taked/tested (%)
No	None	0/24 (0)
Yes	None	36/59 (61)
Yes	BSN <sup>b</sup>	11/18 (61)
Yes	PSK(i.p.) <sup>c</sup>	10/20 (50)
Yes	PSK(p.o.) <sup>d</sup>	8/19 (42)

a QR-32 cells (2x10<sup>5</sup>) were injected s.c. at the site where gelatin sponge was implanted

b Bismuth subnitrate (BSN) (5mg/kg/day) was administered p.o. for 26 days from 5 days before to 20 days after the tumor implantation

c PSK(150mg/kg/day) was administered i.p. for 5 days before the tumor implantation

d PSK-containing diet(3%) was given for 5 days before the tumor implantation

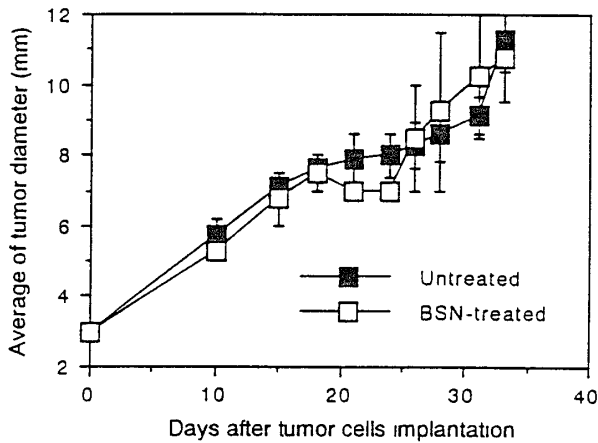


Fig 1 In vivo growth of QR-32 cells co-implanted with gelatin sponge into mice after administration with bismuth subnitrate

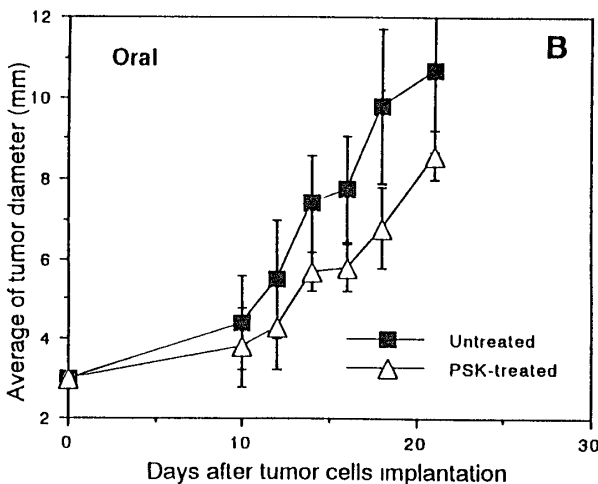
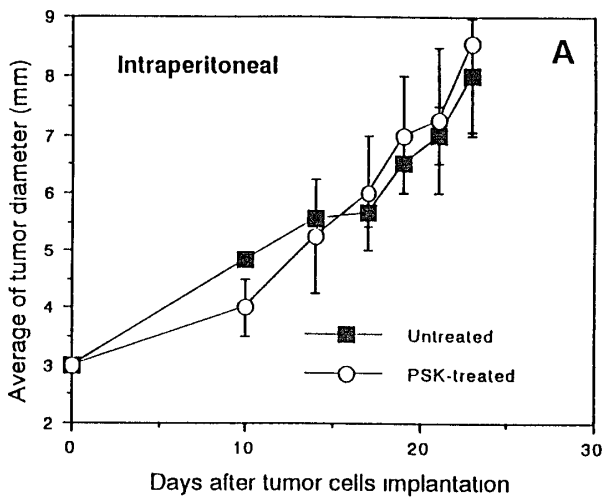


Fig 2 In vivo growth of QR-32 cells co-implanted with gelatin sponge into mice after administration with PSK

## 結 果

### 1. ゼラチンスポンジとともに移植されたQR-32細胞の造腫瘍性の増強に対するBSN, PSK投与の影響

QR-32細胞の単独皮下移植では24匹全てのマウスに腫瘍の増殖を認めなかったが、ゼラチンスポンジとの同時皮下移植したBSN, PSK非投与群は36/59 (61%) のマウスに腫瘍の増殖が認められた。これに対して、BSN投与群でも11/18 (61%) のマウスに腫瘍の増殖が認められた。また、PSK腹腔内投与群のマウスでは10/20 (50%) に、PSK経口投与群のマウスでも8/19 (42%) に腫瘍の増殖が観察された。これらBSNあるいはPSK投与群と非投与群を比較した場合、ゼラチンスポンジ存在下でのQR-32細胞の造腫瘍性は、いずれも有意な差を認めなかった (Table 1)。また、BSN, PSK投

Table 2 Progression of cultured cell lines established from tumors after co-implantation of QR-32 cells with gelatin sponge

Cell lines	Growth of tumor		Progression <sup>c</sup>
	s.c. <sup>a</sup>	i.v. <sup>b</sup>	
QR 32	0/24 (0%)	1/11 (9%)	
No 1	5/5*	3/5*	+
No 2	2/5*	5/5*	+
No 3	0/5	5/5*	+
No 4	4/5*	2/5	+
No 5	1/5	5/5*	+
No 6	5/5*	5/5*	+
No 7	2/5*	4/5*	+
No 8	3/4*	3/4*	+
No 9	1/5	4/5*	+
No 10	1/5	4/5*	+
No 11	2/5*	4/5*	+
No 12	1/5	4/5*	+
No 13	3/5*	3/5*	+
No 14	2/5*	4/5*	+
No 15	2/5*	4/5*	+
No 16	2/5*	4/5*	+
No 17	2/5*	3/5*	+
No 18	2/5*	4/5*	+
Total	40/89 (45%)	68/89 (76%)	18/18 (100%)

a, b Mice were injected s.c. or i.v. with cultured cells ( $2 \times 10^5$  or  $1 \times 10^5$  respectively) of each line established from tumors of mice with QR-32 cells and gelatin sponge co-implanted

c Progression of each cell line was estimated by statistically significant increases in subcutaneous growth or metastasis compared to QR-32 cells

\*  $p < 0.05$  vs QR-32 cells

与群と非投与群の腫瘍増殖曲線にも有意な差は認められなかった (Fig 1, 2A, 2B)。

## 2. ゼラチンスポンジとの移植によって増殖してきた腫瘍細胞の悪性化進展

QR-32細胞単独では24匹全例に皮下腫瘍の増殖が認められなかったが、QR-32細胞とゼラチンスポンジとを同時移植し、増殖してきた腫瘍より樹立した18系の培養株のうち13系 (No 1, No 2, No 4, No 6, No 7, No 8, No 11, No 13, No 14, No 16, No 17, No 18) が元のQR-32細胞に比べ有意な腫瘍増殖の増強を認めた。また、マウスの個体総数でみると培養株の皮下移植による腫瘍の増殖は89匹中40匹 (45%) に認められた (Table 2)。

肺転移結節形成能をみると、QR-32細胞では11匹中1匹しか肺転移巣の形成が、認められなかったが、18系の培養株のうち17系 (No 4を除く) で元のQR-32細胞に比べ有意な肺転移陽性マウスの出現率の増加が認められた。さらに、マウスの個体総数でも培養株の尾静脈内移植による肺転移は89匹中68匹 (76%) にみられ、

Table 3 Inhibition of the progression of tumor cells by the administration of bismuth subnitrate

Cell lines	Growth of tumor		Progression <sup>c</sup>
	s.c. <sup>a</sup>	i.v. <sup>b</sup>	
QR-32	0/24 (0%)	1/11 (9%)	-
NO 1	0/4	2/12	-
NO 2	0/3	3/4	+
NO 3	1/4	3/5*	+
NO 4	0/5	4/5*	+
NO 5	1/5	4/5*	+
NO 6	0/5	2/5	-
NO 7	0/3	1/5	-
<b>Total</b>	<b>2/29<sup>a</sup></b> <b>(6.9%)</b>	<b>19/41</b> <b>(46.3%)</b>	<b>4/7<sup>d</sup></b> <b>(57.1%)</b>

a, b Mice were injected s.c. or i.v. with cultured cells ( $2 \times 10^4$  or  $1 \times 10^5$  respectively) of lines established from tumors in mice treated with bismuth subnitrate (BSN) and with QR-32 cells and gelatin sponge co-implanted

c Progression of each cell line was estimated by statistically significant increases in either subcutaneous growth or metastasis compared to QR-32 cells

d  $p < 0.05$  as compared to BSN non-treated group  
e  $p < 0.001$  as compared to BSN non-treated group  
\*  $p < 0.05$  as compared to QR-32 cells

元のQR-32細胞に比べ肺転移能の増強も認められた。また、各培養株ごとに皮下増殖、実験的肺転移能のいずれか一方が増強されているものを悪性化進展と判定すると、18系全例 (100%) が悪性化進展していた (Table 2)。

## 3. BSN投与による悪性化進展の抑制

QR-32細胞単独では、24匹全例に皮下腫瘍の増殖が認められなかったが、BSN投与した群より樹立した腫瘍7系は、いずれも腫瘍出現率が低く、元のQR-32細胞と比べ、増殖能の増強は認められなかった。また、29匹中2匹 (6.9%) と低く、先の非投与群 (Table 2) と比較すると皮下増殖の増強が有意に ( $p < 0.001$ ) 抑制されていた (Table 3)。

肺転移結節形成能では、BSNを投与した群より得られた培養腫瘍株は7系中4系 (No 2, No 3, No 4, No 5) で肺転移出現の増強が認められたが、マウスの個体総数でみると41匹中19

Table 4 Inhibition of the progression of tumor cells by the administration of PSK

Administration of PSK	Cell lines	Growth of tumor		Progression <sup>c</sup>
		s.c. <sup>a</sup>	i.v. <sup>b</sup>	
QR-32		0/24	1/11	
Intraperitoneal	NO 1	0/5	2/5	-
	NO 2	2/5*	3/5*	+
	NO 3	3/5*	3/5*	+
	NO 4	2/5*	2/5	+
	NO 5	0/5	0/5	-
	NO 6	1/5	2/5	-
	<b>Total</b>	<b>8/30**</b> <b>(27.0%)</b>	<b>12/30***</b> <b>(40.0%)</b>	<b>3/6**</b> <b>(50.0%)</b>
Oral	NO 1	1/5	2/5	-
	NO 2	2/5*	2/5	+
	NO 3	2/5*	3/5*	+
	NO 4	1/5	2/5	-
	NO 5	1/5	4/5*	+
	NO 6	3/5*	3/5*	+
	NO 7	1/5	2/5	-
	NO 8	1/5	2/5	-
<b>Total</b>	<b>12/40</b> <b>(30.0%)</b>	<b>20/40</b> <b>(50.0%)</b>	<b>4/8**</b> <b>(50.0%)</b>	

a, b Mice were injected s.c. or i.v. with cultured cells ( $2 \times 10^4$  or  $1 \times 10^5$  respectively) of lines established from tumors in mice treated with PSK and with QR-32 cells and gelatin sponge co-implanted

c Progression of each cell line was estimated by statistically significant increases in either subcutaneous growth or metastasis compared to QR-32 cells

\*  $p < 0.05$  as compared to QR-32 cells

\*\*  $p < 0.05$  or \*\*\*  $p < 0.01$  as compared to PSK non-treated group

匹 (46.3%) のマウスしか認められず、非投与群であるゼラチンスポンジによるQR-32細胞の肺転移能の出現率に比べ、有意 ( $P < 0.05$ ) に抑制されていた。また、悪性化進展した培養株は、BSN投与群では7系中4系 (57.1%) であり、非投与群と比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に減少した (Table 3)。

#### 4. PSK投与による悪性化進展の抑制

PSKを腹腔内投与した群より樹立した培養6系のうち3系 (No 2, No 3, No 4) で腫瘍増殖が観察された。また、PSKを経口投与した群より樹立した培養株8系のうち3系 (No 2, No 3, No 6) で腫瘍増殖が観察され、これらはいずれも元のQR-32細胞に比べ有意な増殖能の増強を認めた。さらに、マウスの個体総数で見るとPSK腹腔内投与群から得られた培養株の皮下移植後の腫瘍増殖は30匹中8匹 (27%) に認められ、また、PSK経口投与群のそれは40匹中12匹 (30%) に認められた。これらPSK投与群から培養株の皮下増殖性は元のQR-32細胞のそれに比べると、増強されてはいたが、ゼラチンスポンジのみの非投与群からのそれらに比べると抑制される傾向がみられた。

肺転移結節形成能では、PSKを腹腔内投与した群より得られた腫瘍系は、6系中2系 (No 2, No 3) で、有意に肺転移の促進が認められた。また、PSKを経口投与した群より得られた腫瘍8系中4系 (No 2, No 3, No 5, No. 6) に肺転移が認められた。さらにマウスの個体総数で見るとPSK腹腔内投与群では30匹中12匹 (40%)、PSK経口投与群では40匹中20匹であった。しかし、非投与群に比べPSK腹腔内または経口投与によって有意 ( $p < 0.05$ ) に肺転移陽性マウスの出現率の低下が認められた。次に個々の培養系において悪性化進展の有無を先に示した方法で評価すると、非投与群では、18系中18系悪性化していたのに対し、PSK腹腔内投与群では6系中3系、また、PSK経口投与群では8系中4系

しか悪性化進展しておらず、各々有意に悪性化進展が抑制されていた (table 4)。

**Table 5** Effects of bismuth subnitrate or PSK the metastatic potential of tumor cells enhanced by co-implantation with gelatin sponge

Treatment	Metastasis in Lung*		
	No of mice Positive/tested (%)	Lung weight (g) (Median)	No of colonies / mouse (Median)
None	68/89 (76.4%)	0.20 ± 0.05 (0.18)	43.1 ± 50.4 (11)
Bismuth subnitrate	19/41** (46.3%)	0.15 ± 0.02* (0.15)	20.5 ± 5.5* (0)
PSK (Intraperitoneal)	12/30** (40.0%)	0.16 ± 0.02* (0.15)	6.3 ± 9.7*** (1)
PSK (Oral)	20/40** (50.0%)	0.17 ± 0.01* (0.16)	3.6 ± 4.4*** (0)

a Mice were i.v. injected with  $1 \times 10^6$  of each of tumor cell lines established as described in Tables 1 and 2. Nineteen days later, the mice were sacrificed and the metastatic nodules on the lung surface were counted macroscopically.

\*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.02$ , \*\*\*  $p < 0.001$  as compared to untreated groups

#### 5. ゼラチンスポンジとの移植によって増強された転移能に及ぼすBSN, PSK投与の影響

BSN, PSK投与群で悪性化進展を起こした培養株は計11系あり、このうちPSK腹腔内投与群のNo 4, 経口投与群のNo 3の2系を除く、11系中9系 (82%) が肺転移能の増強によるものであった。そこで、その程度を非投与群のそれと比較するために、先に述べた肺転移出現率以外の肺重量、転移結節数各々の平均をTable 5にまとめ、詳細に検討した。Table 5にみられるように、非投与群の肺重量  $0.20 \pm 0.07$ , 転移結節数  $43.1 \pm 50.4$  に対して、BSN投与群では、肺重量  $0.15 \pm 0.02$ , 転移結節数  $20.5 \pm 5.5$ , PSK腹腔内投与群では、肺重量  $0.16 \pm 0.02$ , 転移結節数  $6.3 \pm 9.7$ , そしてPSK経口投与群でも、肺重量  $0.17 \pm 0.01$ , 転移結節数  $3.6 \pm 4.4$  と各々の群で有意に低かった。これらの成績は、悪性化進展した株と判定された細胞株でも、転移能の程度がBSN, PSK投与群からの培養株では非投与群からのそれらに比べ有意に抑制されていることを示した (Table 5)。

**Table 6** Concentration of metallothionein in tumor tissues of the mice treated with bismuth subnitrate

	Administered bismuth subnitrate <sup>a</sup>	Concentration of metallothionein <sup>b</sup> (nmol/g tumor tissue)	BSN-treated /non-treated (fold)
Exp 1	YES	4.39	x1.51
	NO	2.90	
Exp 2	YES	5.08	x1.53
	NO	3.32	

a Bismuth subnitrate (5mg/kg) was administered for 26 days from 5 days before to 21 days after the tumor implantation

b Metallothionein in tumor tissues was separated and determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) with a Superdex 75 high-performance gel filtration column

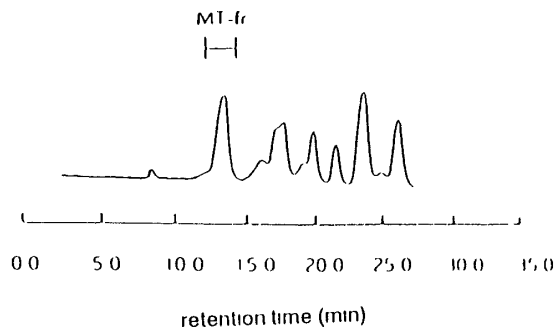
## 6. BSN投与による腫瘍組織の metallothionein 産生量の増強

BSN投与群, 非投与群の腫瘍組織より得られた抽出液をHPLCにて検索した結果, Fig 3のMT分離パターンが得られた。上段はBSN投与群, 中段は非投与群を示し, 下段は標準MTを添加したものを示す。下段に示した標準MTでは14-14.5minのところにはMT分画のピークが見られ, これと同じMT分画の部位をBSN投与群と非投与群と比較すると, そのピーク値は非投与群に比べ, BSN投与群で高値を示していた。そこで, これらの値を検量したところ, 1回目の実験ではBSN投与群, 非投与群各々, 4.39, 2.90nmol/g/tissue, 2回目の実験でも各々, 5.08, 3.32nmol/g/tissueといずれもBSN投与群は非投与群に比べ約1.5倍の増加が認められた(Table 6)。

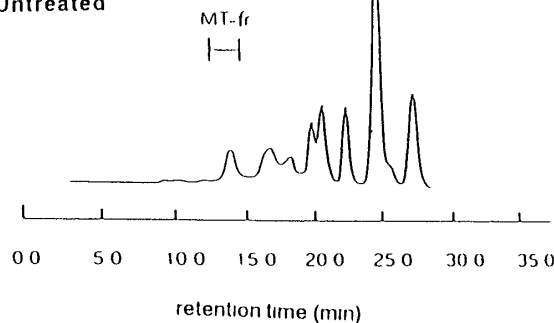
## 7. BSN投与による腫瘍局所におけるMTの分布

BSN投与群, 非投与群での腫瘍組織におけるMTの分布を抗MTモノクローナル抗体を用い, 免疫組織染色した。この結果, BSN投与した腫瘍組織では全体に強く染色され, 特に, 腫瘍細胞の核周辺と細胞質内が広範に染色されていた。これに対し, 非投与群では, 腫瘍細胞の核または細胞質内にわずかに染色されていた

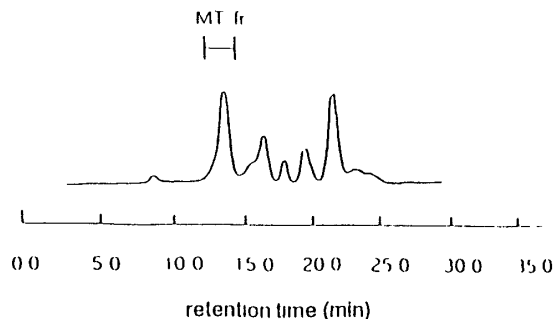
### BSN-treated



### Untreated



### Add MT standard



**Fig 3** Gel filtration of metallothionein by high performance liquid chromatography in tumor tissue and added metallothionein (MT) standard

(Fig 4)。

## 8. PSK投与による腫瘍組織中の各種radical scavengerの増強

PSK腹腔内投与群, 非投与群の腫瘍組織より得られた抽出液中の各種活性酸素scavengerをImmunoblotting法にて検索したところPSK投与群より得られたものは, 非投与群に比べ, 抗Mn-SODモノクローナル抗体, 抗Catalaseポリクローナル抗体, 抗Cu/Zn-SODモノクローナル



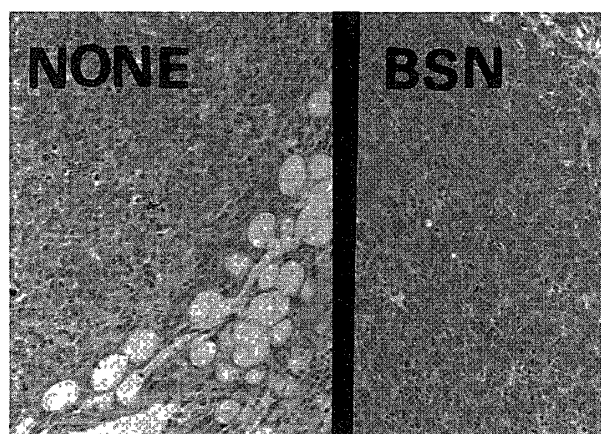


Fig 4 Localization of metallothionein in tumor tissue of mice by immunohistostaining  
BSN Tumor tissue with bismuth subnitrate administration  
NONE Tumor tissue without bismuth subnitrate administration

Antibody reacting to	Tumors from PSK-treated mice	Tumors from non-treated mice
Mn-SOD		
Cu/Zn-SOD		
GSH-Px		
Catalase		

Fig 5 Immunoblotting for oxygen radical scavengers in tumor tissues

ル抗体, 抗GSH-Pxモノクローナル抗体に強く反応し, 太いバンドを示した(Fig 5)。また, このバンドをデンストメーターで測定し, 数値化して比較した結果, PSK投与群では, Mn-SOD, Catalaseで約4倍, Cu/Zn-SOD, GSH-Pxで約2倍の発現の増強が認められた。(Table 7)。

### 考 察

本研究の成績は, 異物であるゼラチンスポンジともに同系マウスに皮下移植されることで促進されるQR-32細胞の悪性化進展が腫瘍増殖局

Table 7 Increase in oxygen radical scavenger protein amounts in tumor tissues of the mice treated with PSK

Oxygen radical scavengers <sup>a</sup>	Scavengers for	Relative amount of scavengers PSK-treated <sup>b</sup> /non-treated (fold)
Mn-SOD	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	x 4.0
Cu/Zn-SOD	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	x 2.7
GSH-Px	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	x 1.8
Catalase	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	x 4.1

a Amounts of oxygen radical scavenger protein were estimated by immunoblotting with antibody to each radical scavenger  
b PSK(150mg/kg) was intraperitoneally injected into mice every day for 5 days before the tumor implantation

所に活性酸素scavengerを誘導するBSNあるいはPSK投与により有意に抑制されることを示している。また, これらのことは, in vivoにおける癌細胞の悪性化進展に活性酸素が深く関与することを証明している。

癌細胞の悪性化進展は, 癌化した細胞がその増殖過程で浸潤・転移能などの悪性形質を獲得していく現象で, 実験癌だけでなく臨床におけるヒト癌細胞でもよくみられ, このような悪性化に伴い, 癌細胞に多くの遺伝子変化が起こることが報告されている<sup>33-36)</sup>。しかしながら, この悪性化進展をin vitroあるいはin vivoで再現性よく観察できる実験モデルはほとんど確立されていないため, その要因についてはあまり検索されていない。

本研究で悪性化進展の実験に用いたマウス線維肉腫の退縮型細胞QR-32細胞は, 1)培養系で樹立したクローン癌細胞であり, 一定条件下で培養している限り, 増殖性がよく, 生物学的性格が極めて安定であるために実験成績の再現性がよい, 2)通常の移植数(1x10<sup>6</sup>個以下)では同系マウスに致死的増殖を示さず退縮するため, 増殖性が増強された場合にその変化を容易に検出することができる, 3)さらに実験的肺転移結節形成もほとんど示さないため, 転移能の増強が検出しやすいなどの特徴を持つ。従っ

て、QR-32細胞は癌細胞の悪性化進展要因の検索にとって極めてよい実験モデルになると考えられた。既に、Okadaらは<sup>13)</sup>、この実験モデルを用い、ゼラチンスポンジとともに正常マウスに皮下移植され増殖してきた癌細胞が元のQR-32細胞と比べ、皮下増殖性、転移能などの亢進した悪性癌細胞に変換していることを示した。本研究においてもOkada<sup>13)</sup>の成績が完全に再現された(Table 2)。さらに最近、プラスチックプレート埋没局所にQR-32細胞を移植した場合にも、同様の悪性化進展が観察されることを報告した<sup>37)</sup>。これら一連の実験においてゼラチンスポンジやプラスチックプレートなどの異物の役割について、QR-32細胞がこれら異物と直接接触することではなく、異物によって惹起される炎症反応の局所に集積する宿主反応細胞とQR-32細胞が接触することが重要であると考えられる。事実、QR-32細胞はゼラチンスポンジ反応腹腔浸潤細胞(PEC)と混合移植することによっても増殖する<sup>37)</sup>。また、QR-32細胞はプラスチックプレート埋没後、0～5日目の早期に移植すると高率に増殖するが、20～30日目の遅期に移植しても増殖し難い。このことは異物による急性期炎症細胞がQR-32細胞の悪性化進展に関与していることを示唆している<sup>29-37)</sup>、また、Natural Killer(NK)細胞、リンフォカイン活性化キラー(LAK)細胞、活性化マクロファージといった癌細胞に障害性を示す抗腫瘍エフェクター細胞もQR-32細胞の悪性化進展に関与する可能性が*in vitro*の実験で示されている<sup>29)</sup>。

異物によって惹起される急性期炎症細胞や抗腫瘍エフェクター細胞が、どのようにQR-32細胞の悪性化進展に関与しているかは完全には解明されていない。Okadaらは<sup>13-29)</sup>、悪性化進展によって皮下増殖性の亢進した癌細胞が元のQR-32細胞に比べ大量のプロスタグランジン(PGE<sub>2</sub>)を産生するようになることから、これら免疫担当細胞とQR-32細胞を48時間混合培養

した培養上清中に産生されるPGE<sub>2</sub>量から悪性化進展要因を*in vitro*で検索する実験系を樹立した。そして、免疫担当細胞が産生する可能性のあるINF- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ およびTGF- $\beta$ などのサイトカインがQR-32細胞のPGE<sub>2</sub>産生量を増加させることが観察されている。また、QR-32細胞とゼラチンスポンジ反応細胞、PECあるいは抗腫瘍エフェクター細胞との混合系に活性酸素 scavenger を添加するとPGE<sub>2</sub>産生量の増加が阻止されることを見出ししている。この実験成績から上記宿主免疫担当細胞の産生する活性酸素がQR-32細胞の悪性化進展に関与していることを強く示唆している。また、この活性酸素の癌細胞に対する作用として、DNAの障害による細胞死以外に細胞死に至らなかった癌細胞に突然変異を惹起することが知られている<sup>38-47)</sup>。これら活性酸素による細胞遺伝子の突然変異は癌細胞の悪性化をもたらすと考えられている。例えば、好中球の産生する活性酸素がマウス線維芽細胞NIH3T3をトランスフォームさせること<sup>48)</sup>やO<sub>2</sub><sup>-</sup>がラットの肝癌細胞の*in vitro*における浸潤能を促進することの報告があり<sup>49-50)</sup>、活性酸素の癌細胞の形質に及ぼす影響は重要である。本研究において、ゼラチンスポンジとともに移植されたQR-32細胞の悪性化進展(Table 2)が、あらかじめBSNあるいはPSKを投与されたマウスでは有意に抑制された(Table 3, 4)。BSNあるいはPSK投与の影響は皮下増殖性の亢進の抑制に強く発現されている一方、転移能の亢進の抑制効果が弱いために、今回の実験で採用した悪性化進展の判定基準では、悪性化進展と判定された株が多く認められた。しかし、実際には、これら悪性化進展株と判定された株の転移能も詳細に検討すると、その程度がBSNあるいはPSKの投与によって有意に抑制されていた(Table 5)。このことはBSNやPSK投与が今回行った悪性化進展株の出現率で判定されるよりも強くQR-32の悪性化を抑制しているこ

とを示した。

本研究に用いたBSNやPSKは生体内に活性酸素scavengerを誘導することが知られている<sup>13,14,22)</sup>。本実験においても腫瘍増殖局所の活性酸素scavenger量がBSNやPSK投与によって増加することが実証された(Table 6, 7)(Fig 3, 4, 5)。特に、免疫組織抗体法でBSN投与群腫瘍組織もMTの局所を観察すると、癌細胞の細胞質内は非投与群ではほとんどMTが染色されないが、BSN投与群では明らかに染色された。このことは癌細胞内の活性酸素の作用がBSN投与によって抑制される可能性を示唆している。一方、Naganumaら<sup>17,18)</sup>は、マウスにP388白血病細胞、エールリッヒ癌細胞を用いた実験系を用いて、BSN投与では、腫瘍細胞中にはMTは誘導されず、特異的に腎臓や肝臓等に誘導されるためCDDP, Adriamycinの副作用のみ軽減し、その抗腫瘍効果は障害しないことを報告している。今回の実験においてBSN投与による腫瘍組織のMT量が増加しており、Naganumaら<sup>17,18)</sup>の結果と異なっている。しかし、本実験で投与したBSNは、Naganumaら<sup>17,18)</sup>の5日間の投与のみに対し、1回の投与量はほぼ同様であるが、長期間の投与を行っていること、使用した腫瘍細胞が異なること、さらに、今回の実験系ではゼラチンスポンジ反応宿主炎症細胞が介在していることより、相違が生じた可能性があるものと考えられた。特にゼラチンスポンジ反応宿主炎症細胞が関与した可能性はBSN非投与でもBSN投与より少ないもののMTが誘導されていたことから強く示唆された。また、PSK腹腔内投与群では、非投与群に比べ、Mn-SOD, Catalaseが約4倍、Cu/Zn-SOD, GSH-Pxが約2倍に増していた(Table 7, Fig 5)。これらの結果、PSK投与により腫瘍組織局所に活性酸素scavenger能を持つMn-SOD, Catalase, Cu/Zn-SOD, GSH-Pxが誘導され、これらがゼラチンスポンジ誘発宿

主炎症細胞からの活性酸素の影響を消去し、QR-32細胞の悪性化の進展を抑制したものと考えられた。従来、PSK投与でヒトの末梢血中のMn-SODがm-RNAレベルで上昇されたという報告はあるが<sup>28)</sup>、本研究の結果のようにPSK腹腔内投与により、腫瘍組織中にMn-SODなどの内因性活性酸素scavengerが誘導されたという報告はない。しかし、活性酸素によるQR-32細胞の悪性化進展がPSK投与でもBSN投与と同様に抑制されたことより、逆説的にPSK投与によって腫瘍局所に活性酸素scavengerが誘導されているものと考えられた。但し、PSK非投与でもPSK投与に比べ、少ないが各活性酸素を抑制したマウスでは致死的増殖を示す<sup>29)</sup>。また、 $5 \times 10^6$ 個以上の大量に移植した場合にも致死的増殖を示すが、この致死的増殖を示した腫瘍組織より培養株を樹立しても、その性格は元のQR-32細胞のままである<sup>37)</sup>。また、QR-32細胞の大量移植により増殖しているマウスにPGE<sub>2</sub>に特異的inhibitorであるIndomethacinを投与すると全例自然退縮してしまうことより、1細胞当たりのPGE<sub>2</sub>産生量が少なくとも、一定以上の集団となり局所でのPGE<sub>2</sub>の総量が多くなると局所的にQR-32細胞に対する免疫反応を抑制し、致死的増殖を示すと考えられている<sup>29)</sup>。一方、QR-32細胞をゼラチンスポンジとともに移植すると、ゼラチンスポンジ反応宿主炎症細胞から産生されるPGE<sub>2</sub>が免疫抑制作用を發揮し、腫瘍局所でのPGE<sub>2</sub>量が総量として多くなり、悪性化進展していないQR-32細胞の増殖が可能になると推察される。この現象により、BSN, PSK投与により悪性形質の獲得が抑制された細胞でも増殖の抑制が生じなかったものと考えられた。

## 結 語

BSN, PSK投与によりMT, Mn-SOD等の内因性活性酸素scavengerが腫瘍組織局所に誘導

された。また、それによりゼラチンスポンジ移植によって生じた宿主炎症細胞が産生する活性酸素が抑制されたため、QR-32細胞の悪性化進展が阻止されたものと推察された。すなわち、*in vivo*において活性酸素がQR-32細胞の悪性化進展に関与することが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました北海道医療大学歯学部口腔外科学第2講座村瀬博文主任教授、北海道大学医学部癌研究施設病理部門細川真澄男教授、細胞制御部門武市紀年教授に深謝致します。さらに、終始適切な御助言を戴いた北海道医療大学歯学部口腔生化学教室の市田篤郎教授、口腔病理学教室の賀来亨教授ならびに口腔外科学第2講座柴田敏之講師、北海道大学医学部癌研究施設細胞制御部門岡田 太助手に謝意を表します。また、本研究に対しご協力戴いた教室の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Nowell, P C Mechanisms of tumor progression Cancer Res 46, 2203-2207, 1986
- 2) Kerbel, R S, Frost, P, Liteplo, R, Carlow, D A and Elliott, B E Possible epigenetic mechanisms of tumor progression Induction of high frequency heritable but phenotypically unstable changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cell populations by 5-azacytidine treatment J Cell Physiol (Suppl), 3, 87-97, 1984
- 3) Kerbel, R S Facilitation of tumor Progression by cancer therapy Lancet ii 977-978, 1977
- 4) Lso, H, Okada, F, Kato, M, Hosokawa, M Establishment of an experimental model for *in vivo* progression of the tumor cells induced by adriamycin Jpn J Cancer Res, 1933 (in press)
- 5) Poupon, M F, Pauwels, C, Jasmin, C, Antoine, E, Lascaux, V and Rosa, B Amplified pulmonary metastasis of a rat rhabdomyosarcoma in response to nitrosourea treatment Cancer Treat Rep 68, 749-754, 1984
- 6) Frost, P, Kerbel, R S, Bauer, E, Taramella-Biondo, R, and Cefala, W, Mutagen treatment as a means for selecting immunogenic variants from otherwise poorly immunogenic malignant murine tumors Cancer Res 43, 125-132, 1983
- 7) Scotte, L and Heppner, G H Tumor association macrophages of mouse mammary tumors J Immunol 131, 2074-2078, 1983
- 8) Yamashina, K, Miller, B E and Heppner, G B Macrophage-mediated inhibition of drug-resistant variants in a mouse mammary tumor cell line Cancer Res 46 2396-2401, 1986
- 9) Ishikawa, M, Koga, Y, Hosokawa, M, Kobayashi, H Augmentation of B16 melanoma lung colony formation in C57BL/6 mice having marked granulocytosis Int J Cancer 37, 919-924, 1986
- 10) 岡田 太 オキシラジカルによるがんの悪性化の進展 Oncologia, 26, 648-653, 1993
- 11) Hamada, J, Takeichi, N, and Kobayashi, H Inverse correlation between the metastatic capacity of cell clones derived from a rat mammary carcinoma and their intercellular communication with normal fibroblast Jpn J Cancer Res 78, 1175-1178, 1987
- 12) Ishikawa, M Okada, F Hamada, J Hosokawa, M Kobayashi, H Changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cells treated with quecetin or 5-azacytidine Int J Cancer 39, 388-342, 1987
- 13) Okada, F, Hosokawa, M, Hamada, J, Hasegawa, J, Kato, M, Mizutani, M, Ren, J, Takeichi, N and Kobayashi, H Malignant progression of a mouse fibrosarcoma by host cells reactive to a foreign body (gelatin sponge) Br J Cancer, 66, 635-639, 1992
- 14) Karin, M Metallothioneins, proteins in search of function, Cell 41, 9-10, 1985
- 15) Hamer, D H Metallothionein Ann Rev Biochem 55, 913-951, 1986
- 16) Thornallay, P J, Vasak, M Possible role metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals Biochem Biophys Acta 827, 36-44, 1985
- 17) Naganuma, A, Sato, M, and Imura, N, Prevention of lethal and renal toxicity of cis-diamine-dichloroplatinum (II) by induction of metallothionein synthesis without compromising its antitumor activity in mice Cancer Res 47, 983-987, 1987

- 18)永沼 章, 井村伸正:メタロチオネインの医療への応用, サイエンスフォーラム10, 383-390, 1987.
- 19)Dunn, M A, Blalock, T Y, and Cousins R J Metallothionein pro Soc Exp Biol Method 185, 107-119, 1987
- 20)Tsukagoshi, S and Ohashi, F Protein-bound polysaccharide preparation PS-K, effective against mouse sarcoma-180 and rat asites hepatoma AH-13 by oral use Gann, 66, 649-654, 1975
- 21)Ohno, R, Imai, K, Yokomaku, S Antitumor effect of protein bound polysaccharide preparation, PSK, against 3-methylcholanthrene-induced fibrosarcoma in C57BL/6 mice Gann, 66, 679-681, 1975
- 22)Akiyama, J, Kawamura, T, Gotohda, E Immunotherapy 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
- 23)鶴 純明, 谷口真理子, 四ノ宮成祥:PSK局所投与による転移腫瘍抑制効果の増強. 癌と化学療法12, 86-90, 1985.
- 24)海老名卓三郎, 石川慶子:免疫賦活剤PSKの抗腫瘍効果. BIOTHERAPY 3, 557-563, 1989
- 25)Ebina, T and Murata, K Antitumor effect of PSK at a distant site Inductions of interleukin-8-like factor and macrophage chemotactic factor in murine tumor Jpn J Cancer Res 81, 1307-1313, 1990
- 26)Ishihara, Y, Kagawa, J, Fujii, T, Saito, K, Iijima, H, and Matsunaga, K PSK-induced neutrophil migration and its antitumor effect in line 10 lung metastasis BIOTHERAPY 7, 1561-1568, 1993
- 27)広瀬国孝, 松島綱治: Mn-SODの高発現によるサイトカイン, 制剤および放射線に対する抵抗性の獲得, フリーラジカルの臨床, 171-77, 1993.
- 28)Hirose, K, Longo, D L, Oppenheim, J J, Matsushima, K Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs and ionizing radiation FASEB J 7, 361-368, 1993
- 29)Okada, F, Hosokawa, M, Hamada, J, Ishikawa, M, Chiba, I, Nakanura, Y, and Kobayashi, H, Regression mechanisms of mouse fibrosarcoma cells after in vitro exposure to quercetin diminution of tumorigenicity with a corresponding decrease in production of prostaglandin E<sub>2</sub> Cancer Immuno Immunother 31, 358-364, 1990
- 30)Lehman, L D, and Klaassen, C D Separation and quantitation of metallothioneins by high performance liquid chromatography coupled with atomic absorption spectrophotometry Biochem 153, 305-314, 1986
- 31)Kimura, M, Jin, N, Itokawa, Y Determination method of metallothionein in rat liver and kidney by high performance
- 43)Kensler, T W, Egner, P a, Taffe, B G and Trush, M a Role of free radicals in tumor promotion and progression In Slaga, T J, Klem-Szanto, A J P, Bourwell, R K, Stevenson, DE Sprizer, H L, and D'Motto, B, Skin Carcinogenesis Mechanism and Human Relevance Alan R/Liss, New York, pp 223-248, 1989
- 44)Breimer, L H Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis the role of DNA base damage Mol Carcinogenesis, 3, 188-197, 1990
- 45)Frenkel, K Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage Pharmacol Ther, 53, 127-166, 1992
- 46)Sahu, S C Role of oxygen free radicals in the molecular mechanisms of carcinogenesis Environ Carcinog Revs 9, 83-112, 1991
- 47)Adelman, R, Saul, R L, Ames, B N Oxidative damage to DNA Relative to species metabolic rate and life span Proc Natl Acad Sci USA 85, 2706-2708, 1988
- 48)Weitzmann, S, Weitberg, A B, Clark, E and Sossel, T P Phagocytes as carcinogens malignant transformation produced by human neutrophils Science 227, 1231-1233, 1985
- 49)Shinkai, K, Mukai, M and Akedo, H Superoxide radical potentiates invasive capacity of rat ascites hepatoma cells in vitro Cancer Lett 32, 7-13, 1986
- 50)Mukai, M, Shikai, K, Tateishi, R, Mori, Y and Akedo, H Macrophage potentiation of invasive capacity of rat ascites hepatoma cells Cancer Res 47, 2167-2171, 1990