Antitumor activity of Fusobacterium nucleatum KO-31 strain

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7722

金沢大学十全医学会雑誌　第93巻　第2号　316－329　(1984)

Fusobacterium nucleatum の抗腫瘍活性に関する研究

金沢大学大学院医学研究科歯科口腔外科学講座（指導：玉井健三教授）

渡　部　好　造

(昭和59年2月17日受付)

今回，Fusobacterium nucleatum の培養上清から得られた抽出物質に対する抗腫瘍活性について研究した．抽出物質は，エタノール沈殿，等電点沈殿，蛋白分解酵素処理により得られた沈殿分画として実験に供した．その結果，培養上清に60%エタノールを添加し，得られたエタノール分画は，ICR系マウスの Ehrlich 癌細胞の腹水癌，固型癌，また Sarcoma 180 細胞の固型癌に対して明らかな抗腫瘍活性を示した．エタノール分画を pH 4.0 に調整し，得られた pH 4.0 沈殿分画は，Ehrlich 腹水癌に対して明らかな抗腫瘍活性が見られた．さらに，pH 4.0 分画をプロナーゼ処理し，遊離核酸除去後，限外沪過をおこなった．そのプロナーゼ処理分画 (TFT-310) を Ehrlich 癌および Sarcoma 180 の腹水癌，固型癌に対して作用させたところ，さらに強い抗腫瘍活性が得られた．また，他の分画についても検討した．癌細胞移植後，4～8週間の観察では，T/C（%）で比較すると，対照群に対して治療群では，131%～188%を示した．このような活性を持つ物質の問題点や抗腫瘍物質の本態についても考察した．

Key words Antitumor activity, Gram-negative anaerobes, *F. nucleatum*.

微生物による抗腫瘍性・制癌作用についての研究は，従来から多数みられるが，その大部分は好気性菌による報告であり[1~10]，嫌気性菌による抗腫瘍性の研究は，*Clostridia*[11]および *anaerobic Corynebacterium*[12]を除いては皆無である．

口腔内常在菌である *Fusobacterium nucleatum* の培養上清液中に抗腫瘍活性を見い出し，*F. nucleatum* KO-31 株の培養上清液中から，抗腫瘍物質の抽出を試みた．抽出時の各段階における抽出物質について，Ehrlich 癌細胞および Sarcoma 180 細胞の担癌マウスを用いて，腹水癌および固型癌について，その抗腫瘍活性を検討した．

材料および方法

I．使用菌株

使用菌株は，白板症を有した患者の口腔内から分離・固定し，金沢大学医学部歯科口腔外科学教室保存菌株とした *F. nucleatum* KO-31 株を実験に供した．

II．培養上清液の調整

F. nucleatum KO-31 株を TF 培地[13]・15 ml の中試験管で 37°C・48 時間培養後，TF 培地・15 ml の中試験管で 37°C・24 時間培養し，TF 血液寒天平板培地に塗沫した．塗沫後，37°C・48 時間培養し，TF 培地・15 ml の中試験管に釣菌後，37°C・48 時間培養した．さらに，その後，100 ml 容量のカルチャーボトルに作製した TF 培地 100 ml で 37°C・24 時間前培養した菌液を 2,000 ml 容量の培養瓶に作成した TF 培地 2,000 ml 中に移植し，37°C・48 時間本培養した．本培養後，無菌的に 4,500×g・20 分間冷却遠心し，培養上清液と菌体に分離し，実験に供した．

III．エタノール分画の調整

冷却遠心後の上清液に，エタノール濃度が 60% となるようにし，攪拌後，4°C下で一夜静置した．静置後，無菌的に 10,000×g・20 分間冷却遠心し，得られた沈殿物にエチルエーテルを加え，乾燥し，エタノール分画として実験に供した．

Antitumor activity of *Fusobacterium nucleatum* KO-31 strain. **Kozo Watanabe,** Department of Dento-Oral Surgery (Director : Prof. Kenzo Tamai), School of medicine, Kanazawa University.

Ⅳ．等電点法による抗腫瘍物質の抽出

エタノール分画に PBS (phosphate buffer solution, pH 7.0) 500 ml を加え，1規定の水酸化ナトリウム溶液で pH を 8.0 とした後，4℃下で一夜静置し，4,500×g・20 分間冷却遠心し，得られた沈殿物に PBS 150 ml を加え，pH 8.0 の沈殿分画とし実験に供した．

一方，分離した上清液に 10 規定の塩酸を加え，pH を 8.0 から 6.0 に調整後，4℃下にて再び一夜静置後，同様に 4,500×g・20 分間冷却遠心した．得られた沈殿物に PBS 150 ml を加え，これを pH 6.0 の沈殿分画として実験に供した．

同様にして，pH 4.0 の沈殿物および pH 2.0 の沈殿物を作成し，各々の沈殿分画を実験に供した．

Ⅴ．プロナーゼ処理による抗腫瘍物質の抽出

pH 処理後の pH 4.0 沈殿分画に PBS (pH 7.0) 200 ml を加え，1規定の水酸化ナトリウム溶液にて pH を 8.0 に調整後，プロナーゼ (プロナーゼ E, 科研化学，東京) を沈殿量の約1％になるように添加した．これを，37℃・24 時間処理後，再び 10,000×g・20 分間冷却遠心し，得られた上清液成分にエタノールを加え，そのエタノール濃度が 60％となるようにした．再び 10,000×g・20 分間遠心し，得られた沈殿物に再留水を加え，cl イオン型イオン交換樹脂カラム Dowex 1×4 を使用し，核酸の除去をおこなった．さらに限外沪過膜 (UK 50, 東洋沪紙，東京) を使用し，加圧沪過をおこなった．その後 0.2 μ のミリポアフィルター (東洋沪紙，東京) を用いて無菌沪過後，凍結乾燥し，実験に供した．得られた物質を TFT-310 と命名した．

Ⅵ．Ehrlich 癌細胞および Sarcoma 180 細胞の調整

7日目ごとに，生後4週の ICR 系マウス (18～20 g) で継代培養した Ehrlich 癌細胞および Sarcoma 180 細胞を無菌的に採取した．白血球算定基準にしたがってその細胞数を算定し，適量の滅菌生理食塩水を加え，約 10^6cells/ml の細胞浮遊液として，各実験に供した．

Ⅶ．担癌マウスの調整

腹水癌実験の場合は，生後5週 (20～22 g) の ICR 系マウスの腹腔内に，至適細胞数に調整した Ehrlich 癌細胞または Sarcoma 180 細胞の浮遊液 0.5 ml を移植した．48 時間経過後，調整したそれぞれの生成物の懸濁液 0.5 ml を腹腔内に投与した．

固型癌の場合は，生後6週 (25～30 g) の ICR 系マウスを使用した．マウスの背部を電動式バリカンにて剃毛し，ヒビテンアルコールにて消毒後，マウスの皮下に適量の細胞数に調整した Ehrlich 癌細胞または Sarcoma 180 細胞の浮遊液 0.2 ml を移植した．48 時間経過後，マウスの前肢上腕二頭筋部に調整したそれぞれの生成物の懸濁液 0.2 ml を投与した．

Ⅷ．抗腫瘍活性の判定

各実験群において，腹水癌の場合は，30～35 日間のマウスの生存匹数を観察し，実験癌細胞を移植した日より以後のマウスの生存日数にて抗腫瘍効果を判定することとし，実験群の平均生存日数 (T) と対照群の平均生存日数 (C) の比，すなわち T/C×100 によって抗腫瘍効果を判定した．

固型癌の場合は，5～8週間のマウスの生存を観察し，抗腫瘍活性を判定した．また，背部に形成した固型癌の腫瘍の大きさ：長径 (mm) と短径 (mm) を一定期間ごとに測定することにより，腫瘍重量を算定し，抗腫瘍活性を判定した．腫瘍重量は，次の式にしたがって算定した[14]．

$$\text{腫瘍重量 (mg)} = \frac{\text{腫瘍長径 (mm)} \times \{\text{腫瘍短径 (mm)}\}^2}{2}$$

成　績

Ⅰ．F. nucleatum KO-31 株の培養上清液エタノール分画の抗腫瘍活性

1．Ehrlich 腹水癌への作用

ICR 系のマウスに調整した Ehrlich 癌細胞 5.0×10^6cells/mouse を腹腔内に移植した．エタノール分画をマウス当たり 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 mg/mouse の4段階について，それぞれを 0.5 ml の滅菌生理食塩水に懸濁し，移植 48 時間後より1日1回，7日間連続腹腔内に投与し，抗腫瘍活性を検討した．

実験群は1群 10 匹を使用した．

この結果，表1に示すごとく，滅菌生理食塩水を投与した対照群のマウスは，11 日目より 22 日目までの間に全て腫瘍死し，その平均生存日数は，14.6±3.3 日であった．これに対して，0.5 mg/mouse 投与群では，8日目よりマウスの腫瘍死を認め，25 日目で全てのマウスは腫瘍死し，対照群のそれと類似した成績で平均生存日数も 15.8±5.3 日であった．1.0 mg/mouse 投与群では，マウスの腫瘍死は対照群のそれに類似し，平均生存日数も 17.0±5.7 日であった．2.0 mg/mouse 投与群では，マウスの生存日数が 31 日目まで認め，平均生存日数は 23.6±6.9 日，また 3.0 mg/mouse 投与群のマウスの平均生存日数は，24.7±5.3 日であった．この成績は，マウス当たりの投与量が増加するにしたがって，平均生存日数も延長する成績であった．また T/C (％) は，0.5 mg/mouse 投与群で 108.2％，1.0 mg/mouse 投与群で 116.4％と抗腫瘍活性は認められなかった．しかし，2.0 mg/mouse 投与群で 161.6％，3.0 mg/mouse 投与群で 169.2％という著しい抗腫瘍活性が認められた．

2．Ehrlich 固型癌への作用

以上の実験結果より，Ehrlich 癌の腹水癌に対して著しい抗腫瘍活性が認められたため，次いで Ehrlich 癌の固型癌について抗腫瘍活性を検討した．

本実験には 1 群 10 匹で検討した．

先の実験で，マウス当たりの投与量を増加するにしたがって，T/C（%）が高くなる成績であったため，マウス当たりの投与量を 3.0 mg/mouse と 5.0 mg/mouse の 2 群について検討した．

マウスの背部皮下に Ehrlich 癌細胞 8.0×10^6cells/mouse を移植し，48時間経過後より，滅菌生理食塩水に懸濁したエタノール分画の 0.2 ml を担癌マウスの前肢上腕二頭筋に，1 日 1 回連続 7 日間投与した．その後，8 週目のマウスの生存匹数の観察をもって，抗腫瘍活性の判定をおこなった．

この結果，表 2 に示すごとく，滅菌生理食塩水を投与した対照群は，3 週目より腫瘍死を認め，6 週目ですべてのマウスは腫瘍死した．

一方，3.0 mg/mouse 投与群では，4 週目よりマウスの腫瘍死を認めたが，8 週目では 3 匹のマウスの生存が見られた．

さらに，5.0 mg/mouse 投与群では，5 週目よりマウスの腫瘍死をみたものの，8 週目で 5 匹のマウスの生存を認めた．このうち 1 匹のマウスでは，背部に移植された腫瘍は消失し，完全治癒を示した．

以上の実験成績より，エタノール分画には，Ehrlich 癌の固型癌の実験においても著しい抗腫瘍活性を認めたため，さらに固型癌の腫瘍重量を測定することにより，抗腫瘍活性の効果判定をおこなった．

使用したマウスは，1 群を 10 匹として実験した．

前回の実験成績で，5.0 mg/mouse 投与群が抗腫瘍活性を示したため，今回の実験では，5.0 mg/mouse 投与群についてのみ腫瘍重量を測定した．

Ehrlich 癌細胞 7.0×10^6cells/mouse をマウスの背部皮下に移植後，48 時間後よりエタノール分画の懸濁液 0.2 ml を 1 日 1 回，7 日間連続マウスの前肢上腕二頭筋部に投与した．癌細胞移植後，2，3，4，6 週目の腫瘍重量を測定したところ，滅菌生理食塩水を投与し

Table 1. Antitumor activity of ethanol fraction[a] prepared from the culture supernatant of *F. nucleatum* strain KO-31 on ascites type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice.

Ethanol fraction[a] (mg/mouse)	Number of mice used	Mean survival days	Number of[b] survivors	T/C(%)
0.5	10	15.8±5.3	0	108.2
1.0	10	17.0±5.7	0	116.4
2.0	10	23.6±6.9	0	161.6
3.0	10	24.7±5.3	0	169.2
Physiological saline (control)	10	14.6±3.3	0	

a) Ethanol fraction was obtained by drying the sediment precipitated with 60% ethanol.

b) Reading was performed on the 35th day after intraperitoneal injection of the ethanol fraction into tumor-bearing mice.

Table 2. Antitumor activity of ethanol fraction prepared from the culture supernatant of *F. nucleatum* strain KO-31 on solid type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice.

Ethanol fraction[a] (mg/mouse)	Number of mice used	Number of survivors after							
		1	2	3	4	5	6	7	8 weeks
3.0	10	10	10	10	8	6	5	5	3
5.0	9	9	9	9	9	8	8	6	5
Physiological saline (control)	10	10	10	9	8	3	0		

a) Each preparation was given intramuscularly into *musculus biceps branchii* every day for 7 days after subcutaneous inoculation of 8.0×10^6 cells/mouse.

た対照群では，3週目よりマウスの腫瘍死を認め，4週目では2匹のマウスの生存のみ認められたため，この2匹について腫瘍重量を測定した．

この結果，図1に示すごとく，対照群のマウスの腫瘍重量は，3週目で約 2.5×10^4mg であり，4週目では約 7.5×10^4mg と腫瘍重量の増加が著しい成績であった．これに対して，5.0 mg/mouse 投与群では，マウスの腫瘍形成の抑制がみられ，4週目で約 1.0×10^4mg，6週目では変化がなかった．対照群と処置群との間には，明らかな有意差が認められた．

図2は，本実験経過中の3週目のマウスの状態を示しているが，対照群と 5.0 mg/mouse 投与群とでは，明らかに腫瘍の大きさの差が認められた．対照群のマウスは，背部全体が腫瘍でおおわれ，マウスの毛並みも悪く，悪液質の症状が認められた．5.0 mg/mouse 投与群のマウスでは，腫瘍は縮小し，毛並みの状態も良好であった．

3．Sarcoma 180 固型癌への作用

以上の実験成績よりエタノール分画は，Ehrlich 癌の腹水癌および固型癌について著しい抗腫瘍活性を認めたため，次いで Sarcoma 180 の固型癌について実験をすすめた．

ICR 系マウス（6週）の背部皮下に Sarcoma 180 細胞の 6.0×10^6cells mouse を移植し，48時間後より，3.0 mg/mouse，5.0 mg/mouse をマウスの前肢上腕二頭筋に1日1回，連続7日間投与をおこなった．

1群10匹にて実験した．

この結果，表3に示すごとく，滅菌生理食塩水を投与した対照群は，3週目よりマウスは腫瘍死し，6週目ですべて腫瘍死した．これに対し，3.0 mg/mouse 投与群では，3週目より腫瘍死を認め，7週目ですべて腫瘍死した．また 5.0 mg/mouse 投与群では，4週目より腫瘍死を認めたが，7週目では1匹の生存がみられ，しかも背部に移植された腫瘍は消失し，完全治癒を示

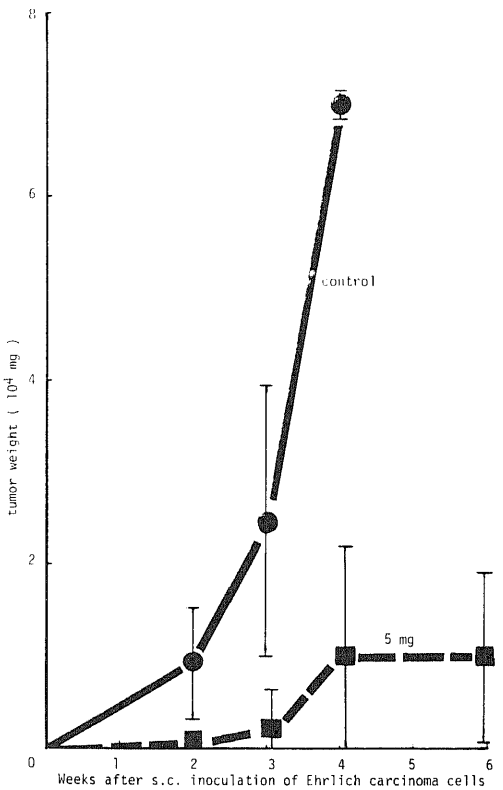


Fig. 1. Periodical changes of solid Ehrlich tumor weight in mice after daily treatments for 7 days with ethanol fraction prepared from culture supernatant of *F. nucleatum* KO-31 strain. Curve (●), the growth of tumor in untreated control; Curve (■), the tumor growth in the treated group (intramuscular administration with 5 mg of the fraction from 48 hrs after tumor cells inoculation).

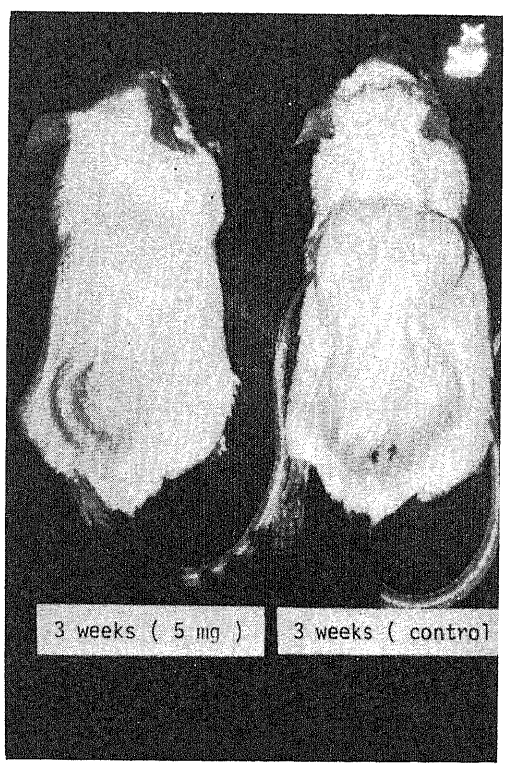


Fig. 2. The mice at 3rd week after administration with ethanol fracion in Fig. 1. Photograph demonstrates an obvious difference in tumor size between the control group and the treated group.

した．投与量が 3.0 mg/mouse, 5.0 mg/mouse と増加するにしたがってマウスの生存日数の延長がみられるものの，Ehrlich 癌の固型癌に比較すると，その活性は低い値であった．

II．等電点法による沈殿分画の抗腫瘍活性

F. nucleatum KO-31 株培養上清液中のエタノール分画は，Ehrlich 癌の腹水癌および固型癌に対し，著しい抗腫瘍活性を示し，さらに Sarcoma 180 の固型癌に対しても抗腫瘍活性が認められたため，等電点法により抗腫瘍物質の抽出による精製をおこない，その抽出物質について検討した．

本実験には，対照群として PBS (pH 7.0) を投与した．また，マウスは 1 群 20 匹として実験した．

1．pH 2.0～8.0 分画の活性

ICR 系，生後 5 週(20～22 g)のマウスの腹腔内に調整した Ehrlich 癌細胞の 5.5×10^6cells/mouse を移植後，48 時間経過後より，等電点法により得られた抽出懸濁液を 0.5 ml ずつマウスの腹腔内に，1 日 1 回 7 日間連続投与した．30 日間のマウスの生存匹数を観察し，抗腫瘍活性を判定した．

この結果，表 4 に示すごとく，PBS を投与した対照群のマウスは 8 日目より腫瘍死を認め，15 日目で全てのマウスは腫瘍死し，その平均生存日数は 9.9±2.3 日であった．pH 2.0 の沈殿分画投与群では，8 日目より腫瘍死を認め，対照群のそれと同一であったが，全てのマウスの腫瘍死は 26 日目であり，平均生存日数は 12.8±5.2 日であった．pH 4.0 の沈殿分画投与群では 12 日目より腫瘍死を認め，対照群のそれより，腫瘍増殖の抑制がみられ，その平均生存日数は 16.0±3.0 日であった．また，pH 6.0 の沈殿分画投与群では 9 日目より腫瘍死を認め，平均生存日数は 13.5±5.0 日であった．pH 8.0 の沈殿分画投与群では，平均生存日数は 6.2±3.3 日であった．

また，T/C (%) を求めると，pH 2.0 の沈殿分画投与群では 129.3%と抗腫瘍活性はみられなかったが，pH 4.0 の沈殿分画投与群では 161.6%と著しい抗腫瘍活性が認められた．また，pH 6.0 の沈殿分画投与群においても 136.4%の抗腫瘍活性が得られた．

以上の実験成績より，等電点法における至適 pH は 4.0 であったため，エタノール分画をただちに 10 規定の塩酸にて pH 4.0 とし，同様の実験をおこなった。使用した Ehrlich 癌細胞は，4.7×10^6cells/mouse を用い

Table 3. Antitumor activity of ethanol fraction prepared from the culture supernatant of *F. nucleatum* strain KO-31 on solid type tumor of Sarcoma 180 cells in mice.

Ethanol fraction[a] (mg/mouse)	Number of mice used	Number of survivivors after						
		1	2	3	4	5	6	7 weeks
3.0	10	10	10	9	7	3	2	0
5.0	10	10	10	10	9	4	3	1
Physiological saline (control)	10	10	10	8	5	2	0	

a) Each preparation was given intramuscularly into *musculus biceps branchii* every day for 7 days after subcutaneous inoculafion of 6.0×10^6 cells/mouse.

Table 4. Antitumor activity of the sediment fraction obtained by isoelectrical precipitation of the culture supernatant on ascites type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice.

Sediment fraction	Number of mice used	Mean survival[a] days	T/C(%)
pH 2.0	20	12.8±5.2	129.3
pH 4.0	20	16.0±3.0	161.6
pH 6.0	20	13.5±5.0	136.4
pH 8.0	20	6.2±3.3	62.2
Phosphate buffer solution (control)	20	9.9±2.3	

a) Reading was performed on the 30th day after intraperitoneal injection of sediment fraction into tumor-bearing mice.

た.

その結果は，表5に示すごとくPBS投与の対照群の平均生存日数は10.5±1.9日であるのに対して，pH 4.0の沈殿分画投与群では17.3±5.0日であり，T/C（%）では164.7%と著しい抗腫瘍活性が再確認された.

2．プロナーゼ処理により抽出した物質TFT-310の抗腫瘍活性

前実験の等電点法により，pH 4.0で処理した沈殿分画に著しい抗腫瘍活性が認められたので，さらに精製するためにプロナーゼ処理し，抗腫瘍物質TFT-310を作成し，その抗腫瘍活性についてEhrlich癌の腹水癌を用いて実験をおこなった.

(1) Ehrlich腹水癌への活性

本実験には，1群10匹のマウスを使用した.

ICR系5週(20～22 g)のマウスの腹腔内に4.6×10^6 cells/mouseを移植した．48時間経過後，TFT-310を1.0 mg/kgから0.01 mg/kgまで7段階の投与量に分け，5%ブドウ糖溶液に懸濁し，その0.5 mlを1日1回，連続7日間腹腔内に注射し，抗腫瘍活性を検討した.

この結果，表6に示すごとく，対照群の全てのマウスは11日目より16日目までに腫瘍死し，その平均生存日数が13.6±1.8日であった．これに対して0.1 mg/kgから1.0 mg/kgまでの投与量では，いずれも平均生存日数が延長しており，ことに1.0 mg/kgでは30日観察で1匹のマウスの生存がみられ，しかも完全治癒を認めた．T/C（%）では，0.1 mg/kg, 0.3 mg/kgではそれぞれ138.2%，131.6%の抗腫瘍活性を示した．また，0.5 mg/kgで153.6%，1.0 mg/kgでは172.0%と著しい抗腫瘍活性が認められた.

以上の成績のごとく，TFT-310の投与量が増加するにしたがって生存日数が延長する傾向が認められた.

(2) Ehrlich固型癌への活性

以上の実験成績よりTFT-310はEhrlich癌の腹水癌に対して著明な抗腫瘍活性を認めたため，Ehrlich癌の固型癌について検討した.

本実験には，1群20匹のマウスを使用した．また，

Table 5. Antitumor activity of the pH 4.0 sediment fraction of the cuture supernatant on ascites type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice.

Sediment fraction	Number of mice used	Mean survival[a] days	T/C(%)
pH 4.0	20	17.3±5.0	164.7
Phosphate buffer solution (control)	20	10.5±1.9	

a) Reading was performed on the 30th day after intraperitoneal injection of sediment fraction into tumor-bearing mice.

Table 6. Antitumor activity of TFT-310 on ascites type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice.

Sediment fraction (mg/kg)	Number of mice used	Mean survival days	Number of[a] survivors	T/C(%)
1.0	10	23.4	1	172.0
0.5	10	20.9±4.9	0	153.6
0.3	10	17.9±2.9	0	131.6
0.1	10	18.8±2.3	0	138.2
0.05	10	12.6±3.0	0	92.6
0.03	10	10.9±1.5	0	80.1
0.01	10	13.8±3.0	0	101.4
5% glucose (control)	10	13.6±1.8	0	

a) Reading was performed on the 30th day after intraperitoneal injection of sediment fraction into tumor-bearing mice.

先の実験で，kg 当たりの投与量を増加するにしたがって T/C (%) が高くなる成績であったため，kg 当たりの投与量を 1.0 mg/kg と0.5mg/kg について検討した．

ICR 系 6 週 (25 g～30 g) のマウスの背部皮下に 4.9×10^6cells/mouse を移植後，48 時間経過後より，TFT-310 を 1.0 mg/kg と 0.5 mg/kg の投与量になるように 5 %ブドウ糖溶液に懸濁し，その 0.2 ml を 1 日 1 回連続 7 日間前肢上腕二頭筋へ注射し，抗腫瘍活性を検討した．対照群には，5 %ブドウ糖溶液を使用した．また，この実験経過中に，マウスの腫瘍重量も同時に測定した．

この結果，表 7 に示すごとく，対照群は，3 週目よりマウスの腫瘍死を認め，6 週目ですべてのマウスは腫瘍死した．これに対して，処置群の 0.5 mg/kg 投与群のマウスでは，対照群と同じく 3 週目よりマウスが腫瘍死したが，8 週目では 2 匹の生存を認めた．この 2 匹のうち 1 匹は，マウスの背部に移植された腫瘍は消失し，完全治癒を認めた．また 1.0 mg/kg 投与群では 4 週目よりマウスの腫瘍死をみた．8 週目では 8 匹の生存が認められたが，このうち 7 匹のマウスは背部に移植された腫瘍は消失し，完全治癒が認められた．

図 3 は，マウスの腫瘍重量を 5 日間隔で測定したものであるが，対照群の腫瘍重量は，10 日目で約 3.3×10^3mg，20 日目で約 15.9×10^3mg，30 日目では約 21.7×10^3mg であった．

一方，TFT-310 の 0.5 mg/kg 投与群の腫瘍重量は，10 日目で約 1.9×10^3mg，20 日目では約 6.5×10^3mg，30 日目では約 8.8×10^3mg であった．また 1.0 mg/kg 投与群では，10 日目で約 1.2×10^3mg，20 日目で約 4.0×10^3mg，30 日目では約 7.5×10^3mg であった．対照群と処置群との間には，明らかな有意差が認められた．しかも，投与量の増加とともにその抗腫瘍活性が強く認められる成績が得られた．

(3) Sarcoma 180 腹水癌への活性

以上の実験成績により，TFT-310 は Ehrlich 癌の固型癌に対しても著明な抗腫瘍活性を認めたため，次いで Sarcoma 180 の腹水癌について検討した．

1 群 10 匹のマウスを使用した．

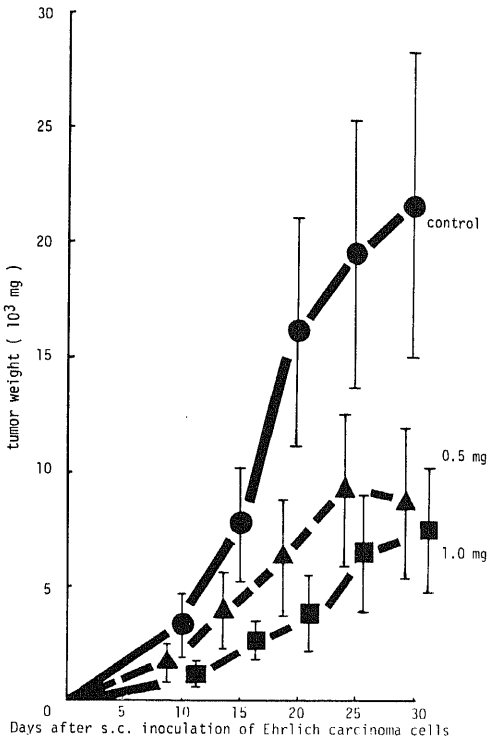


Fig. 3. Antitumor activity of TFT-310 expressed by a periodical change of solid Ehrlich tumor weight in mice. Curve (●), the growth of tumor in untreated control; Curve (▲) and (■), the tumor growth in the mice of two treated groups with an intramuscular administration of TFT-310, 0.5 and 1.0 mg/kg, every day for 7 days from 48 hrs after subcutaneous inoculation of cancer cells.

Table 7. Antitumor activity of TFT-310 on solid type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice

Sediment fraction[a] (mg/kg)	Number of mice used	Number of survivors after							
		1	2	3	4	5	6	7	8weeks
1.0	20	20	20	20	19	14	12	11	8
0.5	20	20	20	18	13	11	9	8	2
5% glucose (control)	20	20	20	19	13	7	0		

a) Each preparation was given intramuscularly into *musculus biceps bsanchii* every day for 7 days after subcutaneous inoculation of 4.9×10^6 cells/mouse.

ICR 系 5 週(20～22 g)のマウスの腹腔内に 6.0×10^6 cells/mouse を移植し，48 時間経過後 TFT-310 を 1.0 mg/kg から 0.01 mg/kg までの投与量になるように 7 段階に分け，5％ブドウ糖溶液に懸濁し，その 0.5 ml を 1 日 1 回連続 7 日間腹腔内に注射し，抗腫瘍活性を検討した．

この結果，表 8 に示すごとく，対照群の平均生存日数が 12.3±1.3 日であるのに対して，1.0 mg/kg から 0.01 mg/kg までの投与群ではいずれも平均生存日数が延長していた．ことに 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg で著しく，0.5 mg/kg で 21.0 日，1.0 mg/kg で 23.2 日であった．また T/C (％) では，0.5 mg/kg で 170.7%，1.0 mg/kg で 188.6％と著しい抗腫瘍活性が認められた．

(4) Sarcoma 180 固型癌への活性

以上の実験成績より，TFT-310 は Sarcoma 180 の腹水癌に対しても著明な抗腫瘍活性を認めたため，Sarcoma 180 の固型癌について検討を加えた．使用した Sarcoma 180 細胞は 1.0×10^7cells/mouse を用い，1 群 20 匹のマウスを用いた．この際，先の実験で 0.5 mg/kg と 1.0 mg/kg に著しい抗腫瘍活性が認められたため，本実験では 0.5 mg/kg と 1.0 mg/kg について検討した．また，本実験経過中のマウスの腫瘍重量も同時に測定した．

この結果，表 9 に示すごとく，5％ブドウ糖を投与した対照群のマウスは 3 週目より腫瘍死を認め，6 週目ですべて腫瘍死した．

一方，0.5 mg/kg 投与群では 4 週目よりマウスの腫瘍死を認めたが，8 週目では 4 匹のマウスの生存がみられた．これら 4 匹のうち 1 匹については，背部に移植された腫瘍は消失し，完全治癒を認めた．また 1.0 mg/kg 投与群では 6 週目よりマウスの腫瘍死が認められたが，8 週目では 8 匹が生存しており，しかもこの 8 匹すべてが背部に移植された腫瘍の消失を認め，完全治癒が示された．

図 4 は，マウスの腫瘍重量を 5 日間隔で測定したものであるが，対照群の腫瘍重量は，10 日目で約 1.3×10^3mg であり，20 日目では約 19.2×10^3mg, 30 日目で

Table 8. Antitumor activity of TFT-310 on ascites type tumor of Sarcoma 180 cells in mice.

Sediment fraction (mg/kg)	Number of mice used	Mean survival days	Number of[a] survivors	T/C(%)
1.0	10	23.2	4	188.6
0.5	10	21.0	2	170.7
0.3	10	12.7±2.0	0	103.2
0.1	10	12.8±1.7	0	104.7
0.05	10	12.7±1.4	0	103.2
0.03	10	15.3	1	124.3
0.01	10	15.0±2.9	0	122.0
5% glucose (control)	10	12.3±1.3	0	

a) Reading was performed on the 30th day after intraperitoneal injection of sediment fraction into tumor-bearing mice.

Table 9. Antitumor activity of TFT-310 on solid type tumor of Sarcoma 180 cells in mice.

Sediment fraction[a] (mg/kg)	Number of mice used	Number of survivors after							
		1	2	3	4	5	6	7	8 weeks
1.0	20	20	20	20	20	20	11	11	8
0.5	20	20	20	20	15	11	6	5	4
5% glucose (control)	20	20	20	19	11	4	0		

a) Each preparation was given intramuscularly into *musculus biceps branchii* every day for 7 days after subcutaneous inoculation of 1.0×10^7 cells/mouse.

は約 37.1×10³mg であった.

これに対して, TFT-310 の 0.5 mg/kg 投与群のマウスでは, 10 日目で約 0.4×10³mg であり, 20 日目で約 4.7×10³mg, 30 日目では約 9.2×10³mg であった. また 1.0 mg/kg 投与群のマウスでは, 10 日目で約 0.4×10³mg であり, 20 日目では約 2.2×10³mg, 30 日目では約 3.5×10³mg であった.

以上の成績より, 対照群と処置群との間には明らかな有意差が認められ, しかも投与量の増加とともにその抗腫瘍活性が強く示される成績が得られた.

考 察

細胞の抗癌作用の研究は, 1868 年 Busch によって丹毒に罹患した肉腫患者の症状の改善をみた報告[15]に始まり, その後 1893 年に Coley は溶連菌と霊菌の混合培養液であるいわゆる Coley's toxin を考案し, 実際の患者に応用している[16]. 以来, *E. coli*[1)17~21)], *Proteus*[2)22~24)], *Neisseria*[3)], 緑膿菌[4)25)26)], *Achromobacter stenohalis*[5)], *Flavobacterium acquatile*[6)], *Streptococcus*[7)27~29)], *Staphylococcus*[8)], *Clostridium*[11)30)31)], *Corynebacterium*[12)32)], 結核菌[9)], *Bacillus*[10)33)]など種々の細菌による抗癌作用の報告がみられるが, いずれの場合も好気性菌についての報告が多数を占めている.

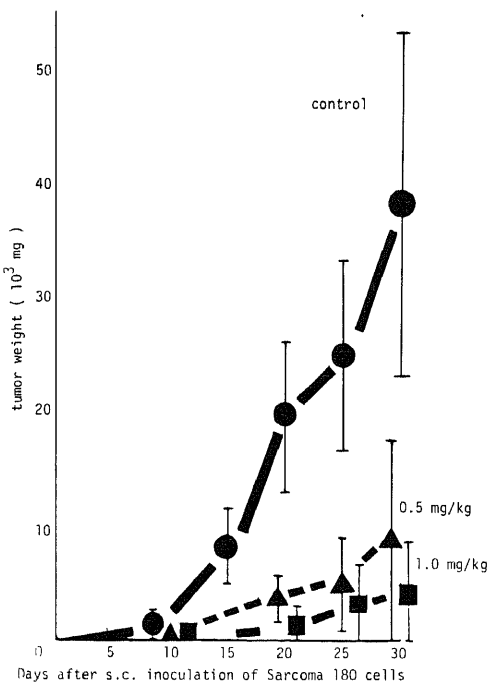


Fig. 4. Antitumor activity of TFT-310 expressed by a periodical change of solid Sarcoma 180 tumor weight in mice. Curve (●), the growth of tumor in untreated control; Curve (▲) and (■), the tumor growth in the mice of two treated groups with an intramuscular administration of TFT-310, 0.5 and 1.0 mg/kg, every day for 7 days from 48 hrs after subcutaneous inoculation of concer cells.

一方, グラム陰性嫌気性桿菌についての抗腫瘍性に関する研究は皆無である.

本実験では, グラム陰性嫌気性桿菌である *F. nucleatum* KO-31 株の抗腫瘍物質の抽出をマウスを使用して in-vivo の実験で検討した.

従来よりグラム陰性菌に認められる抗腫瘍物質は, 一般的に LPS とされており[34)], その LPS の分離・抽出法には, 従来よりフェノール・水抽出法[35~40)], トリクロル酢酸法 (Boivin 法)[41~44)], EDTA 抽出法[45~47)], 有機溶媒による抽出法[48)]などが広く使用されている. これらのうち, フェノール・水抽出法, トリクロル酢酸法, EDTA 抽出法はいずれも主として菌体を処理することにより抗腫瘍物質の分離をおこなっている. しかし, *F. nucleatum* KO-31 の場合, 抗腫瘍活性は菌体成分にはほとんど認められず, 培養上清液中に認められたため, 本実験では溶媒沈殿法, ことに有機溶媒法を利用することにより, 抗腫瘍物質の抽出を施行した.

沈殿作用をもつ有機溶媒には, アセトン, エタノール, メタノールなどが存在するが, アセトン, メタノールは蛋白質類, 糖脂質類などを沈殿させるのにエタノールよりも高濃度が必要なこと, さらにアセトンは脂質を可溶化して蛋白質類を沈殿させるため, 本実験では不向きであると考え, エタノールを使用した[49)].

一般に, 有機溶媒としてのエタノール抽出法は, 蛋白質類などを沈殿させる作用が強く, 40%程度でほとんど蛋白質類を沈殿するとされている. しかしながら, pH, イオン強度, 濃度などにより影響をうけるため, 本実験では, 40%, 60%, 80%のエタノール濃度に分けて検討した. この結果, 40%, 80%エタノール濃度で抗腫瘍活性を示さず, 60%エタノール濃度によりその沈殿物に著しい抗腫瘍活性を示したため, 抽出法に使用するエタノールの添加濃度は, 60%が最適であると決定した.

このようにして得られた 60%エタノール分画を Ehrlich 癌の腹水癌に作用させたところ, 著しい抗腫瘍活性が認められた. また, Ehrlich 癌の固型癌に作用させたところ, 腫瘍形成に対する抑制作用がみられ, マウスの生存日数の延長が明らかに認められた. また, 固型癌の実験で, 背部に移植された腫瘍は完全に消失し, 完全治癒のマウスも認めた. このことは, *F. nucleatum* KO-31 株の培養上清液中に存在した抗腫

瘍活性が60%エタノール処理によりほぼ完全にその沈殿物質中に集積されていることを示している．

さらに，このエタノール分画を等電点法により，その抗腫瘍物質の純化をおこなった[49]．

等電点法を応用した蛋白質の抽出方法として，古くからClostridium botulinumの外毒素の抽出法が知られている．Snipeら[50][51]はCl. botulinumの培養液に塩酸を加え，pHを3.0～4.0にすることでA型の毒素を抽出した．また，Lamannaら[52]は段階的にpHを変化させ，B型の毒素を抽出し，Cardellaら[53][54]はC型，D型の毒素を抽出した．これらの報告は，いずれもグラム陽性菌である*Cl. botulinum*についてであったが，本菌に対しても応用できると考え等電点法を用いて実験した．この際，Bronfenbrennerら[55]はボトリヌス毒素は酸に対して安定であるが，アルカリに対しては不安定であると述べているため，本実験では10規定の塩酸を用い，主としてpHを酸性にして実験をおこなった．

一般に，等電点法を応用する場合は，塩類の添加によって蛋白質の等電点は酸性に傾くが，これは陰イオンが陽イオンよりも蛋白質に結合しやすいためである．また本法は，一般に溶解度の比較的小さいタンパク質などの分別に対して用いられ，しかも共存する塩類の濃度を低くしなければ目的を達成されない場合が多い[56]．本実験の場合，*F. nucleatum* KO-31株をTF培地で培養しているため，TF培地中のNaClを始めとして数種類の，しかもわずかの濃度の塩類が添加されている．またTF培地で培養する量から比較すると，エタノール分画で得られる沈殿物質量もわずかであることから，前述の条件を満たす状態であった．実際のpHの調整は，溶液の局所的なpHの急激な変動を避ける意味で1/15 Mのリン酸緩衝液を使用し，10規定の塩酸を用いてpHの調整をおこなった．

このようにして得られたpH 4.0の沈殿分画において，T/C(%)で161.6%と著しい抗腫瘍活性が得られ，またpH 6.0の沈殿分画についても136.4%と抗腫瘍活性が得られた．このため至適pHを4.0としたが，pH 6.0においても抗腫瘍活性を認めたため，pHを一度に4.0まで下げ同様の実験をおこなった．その結果は，T/C(%)で164.7%と前回を上回る著しい抗腫瘍活性が認められた．この成績は，当初培養上清液中に存在した抗腫瘍物質が，エタノール処理および等電点法によって何ら失なわれることなく抽出されたことを意味すると考えた．

F. nucleatum KO-31培養上清液中の抗腫瘍活性は，熱に対して安定であることを証明した[57]．このため，培養上清液中に存在する抗腫瘍物質の本体は蛋白質でなく，他の物質であろうと推測した．このため，等電点法によって得られた物質中の余剰の蛋白質を除去する目的で，蛋白分解酵素を使用した．

プロナーゼによる除蛋白効果は，小谷ら[58]，Romeoら[59]により高い除蛋白効果が報告されているため，本実験ではプロナーゼを使用して除蛋白をおこなった．

等電点法により得られた物質中には，余剰の蛋白質の他に核酸や糖蛋白，リポ多糖類などが含有されると考えられる．このため，まずプロナーゼ処理し，余剰の蛋白質の除去をおこなった．その後核酸の除去をおこなった．

一般的に核酸の除去は，高速遠心を数回くり返すと大部分は除去されるとされている[36]．また，セタブロン法[36]やゲル沪過法[60~62]も核酸の除去・分離に用いられるが，かなり手数がかかる欠点がある．このため，本実験ではイオン交換樹脂(clイオン型)を使用し[63]，核酸の除去をおこなった．

遊離核酸の除去にあたっては，Cohnによる強陰イオン交換樹脂（主としてDowex 1）による核酸の分離法を利用した[64]．cl型を用いる方法では，分離能力は不足するとされるが[65]，核酸を除去する目的には十分であると考え，本法を使用した．

さらに核酸の除去後，Rubioら[66]の報告をもとにして，脱塩と濃縮を目的として，限外沪過をおこなった．

このようにして得られた物質TFT-310をEhrlich癌の腹水癌，固型癌さらにSarcoma 180の腹水癌，固型癌に投与したところ，著しい抗腫瘍活性を示し，しかも完全治癒のマウスも認められた．このように，*F. nucleatum* KO-31株の培養上清液中に存在した抗腫瘍物質は，TFT-310中に完全に抽出され，しかも精製された成績であった．

これらの実験方法により*F. nucleatum* KO-31株の培養上清液中に存在した抗腫瘍物質の抽出・精製は可能になったが，この抗腫瘍物質の作用機序については，まだ知られていない．今後実験をすすめて，その作用機序の検索が必要であろう．

結　　論

口腔内より分離した嫌気性桿菌*F. nucleatum* KO-31株の培養上清液中に存在した抗腫瘍物質を抽出し，マウスを使用したin-vivoの実験によりその抽出物の抗腫瘍活性を証明し，次の結果を得た．

(1) *F. nucleatum* KO-31株の培養上清液を60%エタノール処理することにより得られたエタノール分画は，Ehrlich癌の腹水癌，固型癌およびSarcoma 180の固型癌に対して著しい抗腫瘍活性を示した．

(2) 等電点法を応用した処理にてエタノール分画を

pH 4.0 に調整し，得られた pH 4.0 沈殿分画を Ehrlich 癌の腹水癌に作用させたところ，著しい抗腫瘍活性が得られた．

(3) pH 4.0 沈殿分画を蛋白分解酵素（プロナーゼ）で処理し，核酸の除去をおこなって得られた物質（TFT-310)に対して，Ehrlich の腹水癌，固型癌および Sarcoma 180 の腹水癌，固型癌を作用させたところ，著しい抗腫瘍活性が得られた．

稿を終えるに臨み，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師玉井健三教授に深甚の謝意を表します．また，本研究の遂行にあたり常に御協力を賜った各教室員の皆様に深く感謝致します．

なお，本論文の要旨は，第 11 回，第 13 回嫌気性菌研究会（1981 年，1983 年，東京）および第 18 回，第 19 回日本細菌学会中部地方会（1981 年，金沢，1982 年，名古屋）で発表した．

文　献

1) **Gratia, A. & Linz, R.**: Le phénoméne de shwartzman dans le sarcome du cobaye. Comp. Rend. Soc. Biol., **108**, 427-428 (1931).

2) **Murata, T., Arakawa, M., Sugiya, Y., Inazu, Y., Hattori, Z., Suzuki, Y., Minakami, H., Nakahara, M. and Okazaki, H.**: Oncolytic effect of *Proteus mirabilis* upon tumor bearing animal. Life Sciences, **4**, 1055-1067 (1965).

3) **Gardner, R. E., Bailey, H. and Hyde, R. R.**: Hemorrhagic activity of toxic carbohydrate complexes from bacteria on a transplantable rat tumor. Am. J. Hyg., **2913**, 1-14 (1939).

4) **Jacobs, F. A.**: Damage produced by a *Pseudomonas aeruginosa* fraction in Sarcoma 37. Cancer Res., **10**, 227 (1950).

5) **張　国利・細川修治**：*Achromobacter stenohalis* の抗腫瘍性に関する研究（1）．第 27 回日本癌学会総会記事，263 (1968).

6) **螺良英郎・杉岡秀信・平尾文男・山村雄一**：*Flavobacterium* 属の産生する細胞溶解性物質の腫瘍細胞に対する影響．第 28 回日本癌学会総会記事，228 (1969).

7) **Okamoto, H., Shoin, S., Minami, M., Koshimura, S. and Shimizu, R.**: A development in the study of anticancer activity of *hemolytic Streptcocci*. 9th Int. Cancer Congress-1966, 333 (1966).

8) **Hata, T., Hoshino, M. and Umezawa, I.**: Antitumor effect of bacterial extracts derived from cancer patients. 9th Int. Cancer Congress-1966, 338 (1966).

9) **Lemonde, P. and Clode-Hyde, M.**: Influence of bacille calmette-guérin infection on polyoma in hamsters and mice. Cancer Res., **26**, 585-589 (1966).

10) **波多野基一・清水隆作・森田修行・山岸高由**：細菌による細胞傷害反応（CIR）の特異性—癌・細胞非癌細胞の CIR 反応の差 1．医学と生物学，**74**，293-302 (1967).

11) **Parker, R. C., Plummer, H. C. Siebenmann, C. O. and Chapman, M. G.**: Effect of Histolyticus infection and toxin on transplantable mouse tumors. Pro. Soc. Exp. Biol. Med., **66**, 461-467 (1947).

12) **Halpern, B. N., Biozzi, G., Stiffel, C. and Mouton, D.**: Inhibition of tumour growth by administration of killed *Corynebacterium parvum*. Nature, **212**, 853-854 (1966).

13) 玉井健三・福田順子：口腔内嫌気性菌の研究，第 1 報，分離培地の検討．口科誌，**19**, 495-504 (1970).

14) **Geran, R. I., Greenberg, N. H., Macdonald, M. M., Schumacher, A. M. and Abbott, B. J.**: Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (Third edition). Cancer chem. rep., **3**, 51-52 (1972).

15) **Busch, W.**: VII. Verhandlungen ärztlicher Gesellschaften. Berl. Klin. wochenschr., **5**, 137-138 (1868).

16) **Coley, W. B.**: The treatment of inoperable sarcoma with the mixed toxins of erysipelas and *Bacillus prodigiosus*. J. Am. Med. Assoc., **31**, 389-465 (1898).

17) **Shear, M. J.**: Chemical treatment of tumors. IV. Properties of hemorrhage-producing fraction of *B. coli* filtrate. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **34**, 325-326 (1936).

18) **Ikawa, M., Koepfli, J. B., Mudd, S. G. and Niemann, C.**: An agent from *E. coli* causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor. I. Isolaton and properties., J. Nat. Cancer Inst., **13**, 157-166 (1952).

19) **Nakazawa, M., Kasai, N., and Yamamoto, T.**: Studies on carcinostatic activity of phosphomucolipid (PML) obatined from lipopolisaccharide. 9th Int. Cancer Congress-1966, 334 (1966).

20) **Watanabe, T.**: Antitumor effect of sonic extract of *E. coli*. 9th Int. Cancer Congress-1966, 388 (1966).

21) **渡辺　貞**：大腸菌菌体成分のマウス腹水腫瘍阻

止作用について．第26回日本癌学会総会記事，72 (1967).

22) **Arakawa, M., Sugiura, K., Reilly, H. C. and Stock, C. C.**: Oncolytic effect of *Proteus mirabilis* upon tumor-bearing animals. II. Effect on transplantable mouse and rat tumors. GANN, **59**, 117-122 (1968).

23) **Mizuno, D. and Ishiguro, M.**: Intracutaneous injection-therapy against transplanted tumor cells. 9th Int. Cancer Congress-1966, 333 (1966).

24) **水野伝一・吉岡　修・赤松正子・沢田知子**：細菌糖脂質皮内接種による制癌効果．医学のあゆみ，**63**, 89-93 (1967).

25) **香山時彦**：Ehrlich carcinoma に対する緑膿菌培養濾液の制癌作用．第28回日本癌学会総会記事，226 (1969).

26) **星　昭夫・宮沢文彦・樽谷和男・阿部千代治・本間　遜**：緑膿菌の細胞壁蛋白質及び糖脂質の制がん性．第29回日本癌学会総会記事，229 (1970).

27) **鈴木成生・椛島碩樹・小川春樹**：溶連菌製剤 PC-B-45 の移植結節癌及び自然発生癌に対する効果．第27回日本癌学会総会記事，261 (1968).

28) **Koshimura, S., Hirata, R. and Shoin, S.**: On the streptolysin S synthetizing and anticancer activities of cell-free extract from living *hemolytic streptococci*. Cancer Chemo. Rep., **13**, 107-111 (1961).

29) **波多野基一**：癌原性細胞に対する溶連菌効果－細胞質 RNA の流出現象．医学のあゆみ，**63**, 261-268 (1967).

30) **Möse, J. R. and Möse, G.**: Oncolysis by Clostridia. I. Activity of *Clostridium butyricum* (M-55) and other nonpathogenic Clostridia against the Ehrlich carcinoma. Cancer Res., **24**, 212-216 (1964).

31) **Gericke, D. and Engelbart, K.**: Oncolysis by Clostridia. II. Experiments on a tumor spectrum with a variety of Clostridia in combination with heavy metal. Cancer Res., **24**, 217-221 (1964).

32) **Woodruff, M. F. A. and Boak, J. L.**: Inhibitory effect of injection of *Corynebacterium parvum* on the growth of tumor transplantations in isogenic hosts. Brit. J. Cancer, **20**, 345-355 (1966).

33) **国本法雄**：抗腫瘍性を有する微生物に関する研究，第1報，枯草菌による抗腫瘍作用．口科誌，**19**, 1-7 (1970).

34) **渡辺　真**：細菌内毒素（本間・斉藤・河西・丹羽編），第1版，403-407頁，講談社，東京，1973.

35) **Westphal, O., Lüderitz, O. und Bister, F.**: Über die Extraction von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z. Naturforsch., 7b, 148-155 (1952).

36) **Westphal, O. and Jann, K.**: Bacterial lipopolysaccharides, Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods Carbohydrate Chem., **5**, 83-91 (1965).

37) **Lüderitz, O., Staub, A. M. and Westphal, O.**: Immunochemistry of O and R antigens of Salmonella and related Enterobacteriaceae. Bacteriol. Rev., **30**, 192-232 (1966).

38) **Lüderitz, O., Jann, K. and Wheat, R.**: Somatic and capsular antigens of gram-negative bacteria. Comprehensive Biochem., **26A**, 105-228 (1968).

39) **Kotelko, K., Lüderitz, O. und Westphal, O.**: Vergleichende Untersuchungen an Antigenen von *Proteus mirabilis* und einer stabilen L-Form. Biochem. Z., **343**, 227-242 (1965).

40) **Weibull, C., Bickel, W. D., Haskins, W. T., Milner, K. C. and Ribi, E.**: Chemical, biological, and structual propeties of stable *Proteus* L forms and their parent bacteria. J. Bacteriol., **93**, 1143-1159 (1967).

41) **Boivin, A., Mesrobeanu, I. & Mesrobeanu, L.**: Technique pour la preparation des polysaccharides microbiens specifiqus. Compt. Rend. Soc. Biol., **113**, 490-492 (1933).

42) **Webster, M. E., Sagin, J. F., Landy, M. and Johnson, A. G.**: Studies on the O antigen of *Salmonella typhosa* I. Purification of the antigen. J. Immunol., **74**, 455-465 (1955).

43) **Nowotny, A. M., Thomas, S., Duron, O. S. and Nowotny, A.**: Relation of structure to function in bacterial O antigens. I. Isolation methods. J. Bacteriol., **85**, 418-426 (1963).

44) **Staub, A. M.**: Methods in immunology and immunochemistry. volume 1 Preparation of antigens and antibodies, p28-30. *In* C. A. Williams and M. W. Chase (ed.), 2. Preparation of cell wall antigens from gram-negative bacteria, lst ed. Academic Press, New York and London, 1967.

45) **Gray, G. W. and Wilkinson, S. G.**: The effect of etylenediaminetetraacetic acid on the cell walls of some gram-negative bacteria. J. Gen. Microbiol., **39**, 385-399 (1965).

46) **Leive, L., Shovlin, V. K. and Mergenhagen, S. E.**: Physical, chemical, and immunological

properties of lipopolysaccharide released from *Escherichia coli* by ethylenediaminetetraacetate. J. Biol. Chem., **243**, 6384-6931 (1968).

47) Rogers, S. W., Gilleland, H. E. and Eagon, R. G.: Characterization of a protein-lipopolysaccharide complex released from cell walls of *Pseudomonas aeruginosa* by ethylenediaminetetraacetic acid. Can. J. Microbiol., **15**, 743-748 (1969).

48) 医科学研究所学友会編：細菌学実習提要，第5版，358-361頁，丸善，東京．1976.

49) 島尾和男：基礎生化学実験法2．抽出・分離・精製（阿南・紺野・田村・松橋・松本編）第1版，57-74頁，丸善，東京．1974.

50) Snipe, P. T. and Sommer, H.: Studies on botulinus toxin. 3. Acid precipitation of botulinus toxin. J. Infect. Diseases, **43**, 152-166 (1928).

51) Duff, J. T., Wright, G. G., Klerer, J., Moore, D. E. and Bibler, R. H.: Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*. I. A simplified procedure for isolation of type A toxin. J. Bacteriol., **73**, 42-47 (1957).

52) Lamanna, C. and Glassman, H. N.: The isolation of type B botulinum toxin. J. Bacteriol., **54**, 575-584 (1947).

53) Cardella, M. A., Duff, J. T., Gottfried, C. and Begel, J. S.: Studies on immunity to toxin of *Clostridium botulinum* IV. Production and purification of type C toxin for conversion to toxoid. J. Bacteriol., **75**, 360-365 (1958).

54) Cardella, M. A., Duff, J. T., Wingfield, B. H. and Gottfried, C.: Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum* VI. Purification and detoxification of type D toxin and the immunological response to toxoid. J. Bacteriol., **79**, 372-378 (1960).

55) Bronfenbrenner, J. J. and Schlesinger, M. J.: The effect of digestive juices on the potency of botulinus toxin. J. Exper. Med., **39**, 509-516 (1924).

56) 山下仁平：生化学実験学講座1，タンパク質の化学I（宇井・田宮・成田編），第1版，73-74頁，東京化学同人，東京．1976.

57) Tamai, K., Nakao, G., Nakagawa, K., Watanabe, K., Sakashita, H., Nishiwaki, Y. and Nakashin, T.: Antitumor activity in the culture supernatant fluid of *Fusobacterium nucleatum* strain KO-31. Japan J. Exp. Med., **53**, 251-256 (1983).

58) 小谷尚三・下野 勉：生化学実験学講座4．糖質の化学上（山科・山川・鈴木編），第1版，204-206頁，東京化学同人，東京．1976.

59) Romeo, D., Girard, A. and Rothfield, L.: Reconstitution of a functional membrane enzyme system in a monomolecular film I. Formation of a mixed monolayer of lipopolysaccharide and phospholipid. J. Mol. Biol., **53**, 475-490 (1970).

60) Romanowska, E.: Sepharose gel filtration method of purification of lipopolysaccharides. Anal. Biochem., **33**, 383-389 (1970).

61) 金田吉男・小川義文・持田研秀：*Escherichia coli* UKT-Bの lipopolysaccharide その化学構造と発熱活性．衛生試験所報告，第85号，43-48 (1967).

62) Romanowska, E., Pelczarska, A., Wnuk, W., Mulczyk, M., Godzińska, H. and Slopek, S.: Isolation, purification and physico-chemical characteristic of *Shigella sonnei* phase 1 free endotoxin. European J. Biochem., **12**, 435-441 (1970).

63) Hurlbert, R. B., Schmitz, H., Brumm, A. F. and Potter, V. R.: Nucleotide methabolism II. Chromatographic separation of acid-soluble nucleotides. J. Biol. Chem., **209**, 23-39 (1954).

64) Cohn, W. E.: The anion-exchange separation of Ribonucleotides. J. Amer. Chem. Soc., **72**, 1471-1478 (1950).

65) 橘 正道：生化学実験講座2．核酸の化学I（今堀・岡崎・高浪・西村編）第1版，27-35頁，東京化学同人，東京．1976.

66) Rubio, N. and Lopez, R.: Purification of *Pseudomonas aeruginosa* endotoxin by membrane partition chromatography. Appl. Microbiol., **23**, 211-213 (1972).

Studies on Antitumor Active Substances from *Fusobacterium nucleatum* KO-31 Strain

Kozo Watanabe, Department of Dento-Oral Surgery (Director: Prof. K. Tamai), School of medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **93**, 316–329 (1984)

Key words: Antitumor activity, Gram-negative anaerobes, *F. nucleatum*

Abstract

The present study was carried out to examine the extracts of *Fusobacterium nucleatum* culture supernatant for the antitumor activity. The extracts were prepared as the sediment fractions by ethanol precipitation, isoelectric point precipitation and proteolytic emzyme-treatment. An ethanol fraction obtained by addition of 60% ethanol to the culture supernatant showed an effective antitumor activity on ascites and solid type tumors of Ehrlich carcinoma cells, and also on solid type tumors of Sarcoma 180 cells in ICR mice. A pH 4.0 sediment fraction extracted by adjusting the ethanol fraction at pH 4.0 was also found to give a distinct antitumor activity on Ehrlich ascites carcinomas. The pH 4.0 fraction was further subjected to treatment by pronase to eliminate free nucleotide, and then to ultrafiltration. The pronase treated fraction (TFT-310) gave better antitumor activity to both ascites and solid type tumors of Ehrlich carcinoma cells or Sarcoma 180 cells than the other fractions examined. The survival ratios of the treated group to the control ranged from 131% to 188% at 4–8 weeks after the tumor cells inoculation. Problems involved in these active substances and their entities were discussed.