

オキサル酢酸の溶連菌Streptolysin S産出能並びに制がん能に及ぼす影響について

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/2297/8728

オキサル酢酸の溶連菌 Streptolysin S 産出能 並びに制がん能に及ぼす影響について

金沢大学医学部薬理学教室 (主任：正印 達教授)

木 越 茂
林 直 樹
上 野 順 一
倉 賢 一
正 印 達

(昭和53年5月30日受付)

核酸効果¹⁾の研究に端を発して着手された溶連菌による実験的制がん研究は、越村ら²⁾により溶連菌に制がん能があることが実証されて以来、数多くの実験が行なわれ、やがて抗腫瘍性溶連菌製剤 PC-B-45^{3,4)} の創製にまで発展するに至った。この間にもたらされた多くの知見の中には、溶連菌による制がん効果は Streptolysin S (SLS) 産出能を有する溶連菌にのみみとめられ、Streptolysin O 産出能があっても SLS 産出能を欠く溶連菌では制がん効果はみとめられず⁵⁾、SLS 産出能を有する溶連菌でもブドウ糖加培地で培養すると SLS 産出能も制がん能もなくなること⁶⁾並びに酵母核酸加ブイオン培地で培養された溶連菌では SLS 産出能も制がん効果も強いこと⁶⁾などが報告されており、溶連菌の SLS 産出能と制がん能とが密接な関係にあることが示唆されている。かくて SLS 産出能を増強するような条件が開発されれば溶連菌の制がん能も増強されるとの見地から、培養時におけるオキサル酢酸の溶連菌の SLS 産出能並びに制がん能に対する影響が検討された。

1. オキサル酢酸の溶連菌 SLS 産出能に対する影響に関する実験

SLS 産出実験は従来培養法¹⁾と静菌法^{7,8)}の2方法によって行なわれているが、*in vitro* 法並びに *in vitro-in vivo* 法による制がん実験での溶連菌のがん細胞に対する作用は、静菌状態下での作用であり、また溶連菌の SLS 産出能の有無強弱については静菌状態で判定するのが適当であるので、SLS 産出実験は各種培地で培養された溶連菌について静菌法で行なわれ

た。また普通ブイオン培養溶連菌に比して RNase-core あるいは RNA 加ブイオン培養溶連菌の SLS 産出力が強いこと⁶⁾が報告されているので、まずオキサル酢酸加ブイオン、ついでオキサル酢酸-RNase-core 加ブイオン培養溶連菌について SLS 産出実験が行なわれた。

実験材料並びに実験方法

1. 溶連菌：教室保存の溶連菌 Su 株 (Type 3, ATCC 21060) (以下単に Su 菌とも略記) を使用。

2. RNase core (以下単に core と略記)：core は大体 Bernheimer 法⁹⁾に準じて酵母核酸の RNase I 消化液から 30% アルコール沈澱で分離した画分を用いた。core の 10% 水溶液をミリポアフィルターで濾過滅菌した濾液を原液として氷室に保存し、実験には原液あるいはその希釈液を使用した。

3. オキサル酢酸：オキサル酢酸の 10% 水溶液 (炭酸ソーダ水溶液にて pH7.0 に調整) をミリポアフィルターにて濾過滅菌したものを原液として氷室に保存し、実験にはその希釈液を使用した。

4. 培地の調製：実験には次の4系列の培地を用意し、Su 菌の培養に用いた。

- 1) 普通ブイオン (pH7.4) 27 ml + オキサル酢酸希釈液 3 ml.
- 2) 普通ブイオン 24 ml + オキサル酢酸希釈 3 ml + core 原液または希釈液 3 ml
- 3) 普通ブイオン 27 ml + core 原液または希釈液 3 ml

Experiments on the Effect of Oxalacetic Acid on the Streptolysin S Forming Activity and the Anticancer Activity of Hemolytic Streptococci. Shigeru Kigoshi, Naoki Hayashi, Junichi Ueno, Kenichi Kura and Susum Shoin, Department of Pharmacology (Director : Prof. S. Shoin), School of Medicine, Kanazawa University.

4) 普通ブイオン 30 ml

5. 静菌法による SLS 産出実験: 前記培地に Su 菌の普通ブイオン培養液 0.3 ml を接種し, 37°C で 18 時間培養したのち冷却遠心し, 沈澱生菌体を冷 0.85 % 食塩水で 2 回遠心洗浄し, 洗浄菌を 1.5 ml の Bernheimer's Basal Medium [BBM: Maltose 675mg, 20 % KH_2PO_4 (NaOH で pH7.0 に調整) 6 ml, 2 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12 ml, 蒸溜水 66 ml] に浮遊した。ついで, Su 菌 BBM 浮遊液 1 ml に 0.5 % core BBM 液 1 ml を加えて 37°C に 2 時間静置したのち, 冷却遠心してえられる上清液について溶血力試験を行なう。

6. 溶血力試験: 被検上清液の 0.85 % 食塩水による 1 ml 宛の倍下稀釈液列を作製し, 各管に 3 % ウサギ脱線維血球浮遊液 1 ml を加えて 37°C に 2 時間静置後, 各管の遠心上清液について OD 540nm での吸光度を測定して被検上清液の溶血力を 50 % 溶血単位 HU で表示した。

実験成績

各種培地で培養された Su 菌による静菌法での SLS 産出実験の結果は表 1 及び表 2 に示されている。すなわち, 普通ブイオンにオキサル酢酸を各種濃度に加えた培地で培養した Su 菌による SLS 産出は, 表 1 に示されている如く, オキサル酢酸の付加濃度が 0.1 % で 5.920HU/ml と普通ブイオン培養菌の 4.736HU/ml より強い溶血力であったが, 付加濃度が 0.2 % 及び 0.4 % では溶血力は 2.442HU/ml 及び 2.200HU/ml と減少した。ついでオキサル酢酸付加濃度を 0.1 % と一定にし, core を各種濃度に加えた 0.1 % オキサル酢酸-core 加ブイオンで培養した Su 菌について行なわれた SLS 産出実験の成績は, 表 2 に示されている如

Table 1 Comparative experiments of Streptolysin S forming activity of resting cells of hemolytic streptococci grown in different culture medium

Exptl. series	Cocci grown in meat-infusion broth containing oxalacetic acid in the concentration of (%)	Streptolysin S formation by resting cells in the presence of 0.1% RNase-core (HU/ml)
1	0	4,736
2	0.1	5,920
3	0.2	2,442
4	0.4	2,220

く, core 付加濃度が 1 %, 0.5 %, 0.2 % 及び 0 % では溶血力はそれぞれ 12.320 HU/ml, 18.944HU/ml 及び 7.424HU/ml で, 付加濃度が 0.5 % で最も強い溶血を示した。これと平行して行なわれた core のみが付加された core 加ブイオン培養菌による SLS 産出実験では, core 付加濃度が 1 %, 0.5 % 及び 0.2 % では溶血力はそれぞれ 23.68HU/ml, 10.752HU/ml 及び 7.120HU/ml で, 付加濃度が 0.5 % で最も強い溶血を示した。

以上の成績から 0.1 % オキサル酢酸 - 0.5 % core 加ブイオンによる培養 Su 菌の SLS 産出力が最も強く, 普通ブイオン培養 Su 菌の約 4 倍, 0.5 % core 加ブイオン培養 Su 菌の 1.8 倍であった。

II. オキサル酢酸の溶連菌制がん能に及ぼす影響に関する実験

普通ブイオン培養 Su 菌に比して 0.1 % オキサル酢酸 - 0.5 % core 加ブイオン培養 Su 菌の SLS 産出力が強いことが実証されたことにもとづき, 0.1 % オキサル酢酸 - 0.5 % core 加ブイオン培養 Su 菌による CIR 試験⁹⁾ (Cell injuring reaction) 及び *in vitro-in vivo* 法制がん実験が行なわれた。

実験材料並びに実験方法

1. 実験動物: dd 系マウス (雄, 体重 18 ~ 22g) を使用

2. がん細胞浮遊液: エールリッヒ腹水がん細胞をマウス腹腔内に接種して 10 日目の腹水を採取し, 遠

Table 2 Comparative experiments of Streptolysin S forming activity of resting cells of hemolytic streptococci grown in various culture medium

Exptl. series	Cocci grown in meat-infusion broth containing		Streptolysin S formation by resting cells in the presence of 0.1% RNase-core (HU/ml)
	Oxalacetic acid in (%)	RNase-core in (%)	
1	0.1	0	7,424
2	0.1	0.2	10,240
3	0.1	0.5	18,944
4	0.1	1	12,320
5	0	0.2	7,120
6	0	0.5	10,240
7	0	1	2,368
8	0	0	4,736

心によって分離したがん細胞を 0.85 % 食塩水で 2 回洗浄したのち、洗浄がん細胞を用いて次の 2 種類の浮遊液を用意する。

1) がん細胞 Dulbecco A 浮遊液 (DBA 浮遊液) : 洗浄がん細胞を Dulbecco A 液 (NaCl 8g, KCl 2.0g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2.9g, KH_2PO_4 0.2g, 蒸留水 800 ml) に浮遊させて 10^7 cells/ml の DBA 浮遊液を用意し, CIR 試験に用いる。

2) がん細胞-BBM 浮遊液 (BBM 浮遊液) : 洗浄がん細胞を BBM 液に浮遊させて 3.4×10^7 cells/ml のがん細胞-BBM 浮遊液を用意し, *in vitro-in vivo* 法制がん実験に使用。

3. 菌液の調製:

1) Su 菌-DBA 浮遊液: 0.1 % オキサル酢酸-0.5 % core 加ブイオン 50 ml に Su 菌のブイオン培養液 0.5 ml を接種して 37°C で 20 時間培養したのち、培養液を冷却遠心し、沈澱生菌体を冷食塩水で 2 回洗浄したのち 5 ml の DBA 液に浮遊したものを原液とし, CIR 試験には原液及びその希釈液を用いた。対照としては普通ブイオン 50 ml に培養した Su 菌を前記とどのようにして用いた。

2) PC-B-45 (OK-431) : 岡本ら³⁴⁾の方法によってつくられた。すなわち、0.1 % オキサル酢酸-0.5 % core 加ブイオン 100 ml に Su 菌のブイオン培養液 1 ml を接種して 37°C で 20 時間培養したのち、培養液を冷却遠心し、沈澱生菌体を冷食塩水で 2 回洗浄したのち 5 ml の BBM 液に浮遊させる。この Su 菌 BBM 浮遊液 5 ml に 200,000U/1.25 ml のペニシリン G 液 1 ml を加えて 37°C に 20 分間静置したのち更に 45°C に 30 分間静置して PC-B-45 (OK-431) を作製する。これを原液としてその希釈液を *in vitro-in vivo* 法制がん実験に用いた。対照としては普通ブイオン培養 Su 菌より作製された OK-431 が用いられた。

4. 制がん実験

1) CIR 試験: 清水ら⁹⁾の方法によって行なわれた。すなわち

a) Su 菌-DBA 浮遊液 1 ml + がん細胞 DBA 浮遊液 1 ml

b) Su 菌-DBA 浮遊液 1 ml + DBA 液 1 ml

c) がん細胞-DBA 浮遊液 1 ml + DBA 液 1 ml

d) がん細胞-DBA 浮遊液 1 ml + HgCl_2 液 (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DBA) 1 ml

e) HgCl_2 液 (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DBA) 1 ml + DBA 1 ml

の 5 系列を用意し, 37°C で 2 時間静置後、冷却遠心

してえられた各管の上清液を DBA 液で 5 倍希釈したものについて 260 μm での吸光度を測定してそれぞれの実測値 A, B, C, D 及び E を求め, 下記の式によってがん細胞傷害度 (CIR 値) を算出した。

$$\text{CIR 値}(\%) = \frac{A - (B + C)}{D - (D + E)} \times 100$$

2) *in vitro-in vivo* 法制がん実験: 0.1 % オキサル酢酸-0.5 % core 加ブイオン培養 Su 菌及び普通ブイオン培養 Su 菌の各 OK-431 の希釈液 2 ml にがん細胞 BBM 浮遊液 2 ml を混じ, 37°C で 60 分間静置したのち、その混液 0.5 ml を各マウスの腹腔内に注射し, 60 日間観察した。途中死亡したマウスは剖検によってその死因を確かめ, 60 日間生存したマウスについては屠殺後剖検して腫瘍浸潤の有無を調べた。

実験成績

溶連菌のがん細胞に対する傷害作用実験として行なわれた CIR 試験の成績は、表 3 に示されている如く、普通ブイオン培養 Su 菌の原液では CIR 値は 63 % であり、5 倍希釈液で 20 % 及び 20 倍希釈液では 16 % であるのに対し、0.1 % オキサル酢酸-0.5 % core 加ブイオン培養 Su 菌では、原液及び 2 倍希釈液で 100 %、5 倍及び 10 倍希釈液でそれぞれ 74 % 及び 54 %、20 倍希釈液でも 45 % であった。

in vitro-in vivo 法による制がん実験の成績は、表 4 に示されている如く、0.1 % オキサル酢酸-0.5 % core 加ブイオン培養 Su 菌の OK-431 では、5 倍及び 10 倍希釈液で 1 群 5 匹のマウス全部ががん細胞移植後 60 日を経ても健常に生存し、20 倍希釈液でも 5 匹中 2 匹が健常に生存したのに対し、普通ブイオン培養 Su 菌の OK-431 では、5 倍及び 10 倍希釈液で 60 日を経ても健常に生存したのは一群 5 匹のマウスのうち 3 匹であり、20 倍希釈液では一匹のみが生存した

Table 3 Comparative CIR test with hemolytic streptococci grown in different culture medium

Cocci grown in	CIR values (%)				
	Dilution of cocci suspension				
	1:1	1:2	1:5	1:10	1:20
0.1% oxalacetic acid-0.5% RNase core broth (pH 7.4)	125	94	74	54	45
Meat-infusion broth (pH 7.4)	63	34	20	18	16

が、剖検によって腫瘍がみとめられた。

考 察

制がん性溶連菌では SLS 産出能と制がん能とが密接な関係にあることが越村ら⁵⁾及び岡本ら⁶⁾によって示されており、溶連菌の SLS 産出力増強は制がん能の増強化にもなることも示唆されていることから、まずオキサロ酢酸の溶連菌 SLS 産出力に対する影響が検討された。その結果オキサロ酢酸を 0.1% に普通ブイヨンに付加して溶連菌を培養すると、同菌の SLS 産出は普通ブイヨン培養菌の約 1.2 倍となり、オキサロ酢酸と core をそれぞれ 0.1% 及び 0.5% と共に付加すると SLS 産出は約 4 倍になった。これに対し 0.5% core 加ブイヨン培養菌による SLS 産出は普通ブイヨン培養菌の 2 倍であることから、オキサロ酢酸と core を共に付加することによる SLS 産出力増強作用は両物質の相剩的作用によるものと考えられる。しかしその作用機序については不明である。

一方、制がん実験での CIR 試験におけるがん細胞傷害作用は SLS 産出力の増強と平行して増強されているが、*in vitro-in vivo* 法での制がん作用は SLS 産出力あるいは細胞傷害作用ほど増強されていない。これは CIR 試験が試験管内における溶連菌のがん細胞に対する作用であるため溶連菌のがん細胞傷害作用があるていどそのまま実験成績に反映されるのに対し、*in vitro-in vivo* 法での制がん作用は試験管内におけるがん細胞に対する作用と生体内での作用の 2 つより成り、また PC-B-45 (OK-431 及び OK-432¹⁰⁾¹¹⁾ には、桜井ら¹⁰⁾が指摘しているように、がん細胞に対す

る直接作用と宿主介在作用の 2 つがあることなどから、PC-B-45 による *in vitro-in vivo* 法実験では、溶連菌のがん細胞傷害作用が増強されてもそれがそのまま制がん効果に反映されないため *in vitro-in vivo* 法での制がん効果は CIR 試験での制がん効果ほど増強されないものと推察された。

結 論

オキサロ酢酸及び RNase-core のブイヨン培養時における溶連菌の SLS 産出能並びに制がん能に対する影響が検討された。その結果 0.1% オキサロ酢酸-0.5% RNase-core 加ブイヨンで培養されると溶連菌の SLS 産出力は増強し、制がん能も増強することが実証された。また、SLS 産出能と制がん能が密接な関係にあることも確認された。

文 献

- 1) Okamoto, H. : Japan. J. Med. Sci., IV. Pharmacology, 12, 167 (1940).
- 2) Koshimura, S., Murasawa, K., Nakagawa, E., Ueda, M., Bando, Y. & Hirata, R. : Jpn. J. Exp. Med., 25, 93 (1955).
- 3) Okamoto, H., Minami, M., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R. : Jpn. J. Exp. Med., 36, 175 (1966).
- 4) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimitu, R. : Jpn. J. Microbiol., 11, 323 (1967).
- 5) 越村三郎・西田信義・坂東 勲・正印 達・南 幹雄・角野光司 : 金大結研年報, 23, 61 (1965).

Table 4 Comparative *in vitro-in vivo* anticancer experiment with PC-B-45 of hemolytic streptococci grown in different culture medium

Cocci grown in	Dilution of PC-B-45	No. of survivors/test animal after days					
		10	20	30	40	50	60
0.1% Oxalacetic acid- 0.5% RNase-core broth (pH 7.4)	1: 5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	1: 10	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	1: 20	5/5	5/5	4/5	4/5	3/5	2/5
	1: 40	5/5	0/5	.	.	.	.
Meat-infusion broth (pH 7.4)	1: 5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5	4(1*)/5
	1: 10	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5	3/5
	1: 20	5/5	3/5	1/5	1/5	1/5	1*/5
	1: 40	5/5	3/5	1/5	0/5	.	.
Control (without cocci)		5/5	0/5	.	.	.	.

*Tumor invasion was macroscopically observed in the animal.

- 6) Okamoto, H., Fujimura, A., Hayashi, T., Nishida, N., Shimizu, R. & Koshimura, S. : GANN, 55, 225 (1964).
- 7) Ito, R., Okami, T. & Yoshimura, M. : Jpn. Med. J., 1, 253 (1948).
- 8) Bernheimer, A. W. : J. Exp. Med., 90, 373 (1949).
- 9) 清水隆作・越村三郎・波田野基一・森田修行・大野真介・上田久子 : 細胞化学シンポジウム, 18, 35 (1967).
- 10) Sakurai, Y., Tsukagoshi, S., Satoh, H., Akiba, T. & Takagaki, Y. : Cancer Chemother. Rep. Part 1, 56, 9 (1972).
- 11) Okamoto, H. : Mechanisms in bacterial toxinology, p. 237, New York London Sydney Toronto, John Wiley & Sons, Inc., 1976.

A b s t r a c t

As it was demonstrated that there was a close relation between streptolysin S (SLS) forming ability and anticancer ability of hemolytic streptococci, experiments on the effect of oxalacetic acid on SLS forming activity and anticancer activity were carried out.

SLS forming activity in the resting cell system of hemolytic streptococci, which were cultivated in 0.1% oxalacetic acid-0.5% RNase-core meat-infusion broth (pH 7.4), was 4 times as potent as that of the cocci, which were cultivated in meat-infusion broth, and the anticancer activity in cell injuring reaction (CIR test) also increased as well as the SLS forming activity. The anticancer activity in the *in vitro-in vivo* assay system increased, but the enhancement of its activity was not so strong as that of the anticancer activity in CIR test.
