

抗腫瘍性溶連菌無細胞抽出物のウサギ体温及び血液像に及ぼす影響について

金沢大学医学部薬理学教室

木	越	茂
河	野	照
西	尾	真
川	尻	博
杉	山	京
正	印	子
		達

(昭和55年3月21日受付)

Streptolysin S 産生能を有する溶連菌に抗腫瘍能があることが実証¹⁾されたことから、溶連菌による一連の実験的制がん研究が岡本らによって行なわれ、多くの知見が発表された。ついで、研究は溶連菌の抗腫瘍能増強化と無毒化の方向に進み、その結果抗腫瘍性の強い、毒性の弱い抗腫瘍性溶連菌製剤 PC-B-45²⁾³⁾⁴⁾ (OK-431 及びその凍結乾燥標品 OK-432) が開発された。

一方、これらの研究と平行して抗腫瘍性溶連菌の有効因子に関する研究も行なわれ、溶連菌体をアルミナまたは金剛砂でホモジネートしてえられる無細胞抽出液に腫瘍細胞傷害作用があることが報告されたが、その活性は強くなかった。本実験では、溶連菌体の破壊に Braun's cell homogenizer を用いて無細胞抽出液を作製し、これについて腫瘍細胞傷害作用を試験するとともに、OK-431 でみられた血液像に対する影響性や発熱性などについても試験を行なった。

材料および方法

1. 使用菌株: 教室保存の溶連菌 Su 株 (Type3, 以下単に Su 菌と略記) を使用した。Su 菌の培養には普通ブイヨン培養液 (pH 7.2~7.4) を用いた。

2. Su 菌無細胞抽出物 (CFE) の調製: Su 菌の 20 時間ブイヨン培養液 600 ml を 3% 酵母エキス培養液 10 l に接種し、37℃ で 24 時間培養後低温下で連続速

心によつて生菌体を集め、冷生理食塩水によって 2 回洗滌したのち冷蒸留水に浮遊した。これに更に適量の蒸留水を加えて菌浮遊液の濁度が OD660nm (日立-堀場 spectronics 20) で 40 になるように調整した。ついで、菌浮遊液 30 ml とガラス粒 (直径 0.1 mm, ブラウン社製) 40g を 70 ml 容量のガラス瓶 (ブラウン社製) に入れ、炭酸ガス通気下で Braun's cell homogenizer で 3,000rpm 2 分間 2 回計 4 分間振とうした。ついでホモジネート液をガラスろ過器 (G1) にてろ過したのちろ液を遠心し、上清液 (無細胞抽出液, cell-free extract) を直ちに凍結乾燥して無晶形茶色粉末の無細胞抽出物 (CFE) 1.4g をえた。CFE は低温下で保存し、実験にはその都度磷酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2) で CFE を所要の濃度に溶解して用いた。

3. エールリッヒがん細胞浮遊液: エールリッヒ腹水がん細胞を移植した 10 日目のマウス (dd 系, 雄, 20g~22g) の腹腔内より腹水を採取し、遠心によりがん細胞を集め、冷生理食塩水で 2 回洗滌したのち洗滌がん細胞を磷酸緩衝生理食塩水に浮遊し、さらに適量の磷酸緩衝生理食塩水を加えて 3.2×10^6 細胞/ml のがん細胞浮遊液を作製した。

4. 腫瘍細胞傷害作用実験: 腫瘍細胞傷害作用をいわゆる *in vitro* - *in vivo* 法によるがん細胞の移植増殖阻害作用によって試験した。すなわち、各濃度の CFE 液 1 容量とがん細胞浮遊液 1 容量を混じて 37℃

Influence of Cell-Free Extract of Anticancer Streptococci on the Blood Picture and the Temperature of Rabbits. Shigeru Kigoshi, Terushige Kohno, Matomo Nishio, Hiroo Kawajiri, Kyoko Sugiyama and Susumu Shoin, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University. 920. Japan.

で60分間インキュベートしたのち、その混合液0.5 mlをそれぞれに対応した1群10匹のマウス腹腔内に接種して60日間のマウスの状態を観察した。対照としては1容量の磷酸緩衝生理食塩水に1容量のがん細胞浮遊液を加えたものを用いた。

5. 溶血力試験: CFEの2 mg/ml液1 mlに生理食塩水1 mlを加えてよく振とうしたのち、この生理食塩水による1 ml宛の倍加稀釈液列を作製し、これら各管に3%ウサギ脱線維血球浮遊液1 ml宛を加えて37℃に2時間静置後、各管について溶血の有無、強弱を判定し、その遠心上清液についてOD540nmでの吸光度を測定して、溶血力を50%溶血単位(HU)で示した。(50%溶血単位とは3%脱線維血球浮遊液の50%を溶血させる力価を1単位としたものである。)

また、CFEの溶血作用がstreptolysin S様のものであるか否かを確認するため、3%血球浮遊液に予めtrypan blueを12.5 µg/mlになるように添加したものをを用いて前述の如く溶血力試験を行なった。

6. ウサギ血液像及び体温に及ぼす影響についての実験: 50 mg/mlのCFE2 mlを所定の時刻にウサギの耳静脈内に1日1回、6日間連日投与し、連日一定の時刻に耳静脈より採血して、赤血球数⁹⁾及び白血球数⁹⁾を算定し、血色素量を小官-sahli法¹⁰⁾により定量した。また体温測定はウサギを固定し、直腸体温計によって測定した。

7. 呈色反応: CFEの0.1%液についての呈色反応をタンパク定性試験としてニンヒドリン反応及びビュウレット反応¹¹⁾を、糖の定性試験としてモーリッシュ反応¹²⁾を、RNA定性試験としてオルシノール反応を、DNA定性試験としてジフェニールアミン反応¹³⁾を行なった。

成 績

1. がん細胞移植増殖阻害実験: 腫瘍細胞傷害作用を*in vitro* - *in vivo*法の移植増殖阻害実験により試験した成績を表1に示した。CFE液とがん細胞浮遊液の混合液中のCFE作用濃度が、3 mg/ml、2 mg/ml及び1 mg/mlでは、がん細胞の移植、増殖は阻害され、これら処理がん細胞を移植した各群のマウスは各群ともに60日目においても100%生存し、60日目における屠殺解剖肉眼的所見でも腫瘍の存在はみられなかった。これに対し、作用濃度0.5 mg/ml及び0.2 mg/mlのCFEで処理されたがん細胞の移植増殖は阻害されず、対照群のマウスと同じくことごとく4週間以内に腫瘍死した。

2. 溶血力試験: 溶血力試験の成績は表2に示し

Table 1. *In vitro-in vivo* anticancer experiments with CFE

Concentration of CFE in a mixture (mg/ml)	No. of survivors*
3	10/10
2	10/10
1	10/10
0.5	0/10
0.2	0/10
Control (Suspension of cancer cells alone)	0/10

*Number of mice alive on 60th day after intraperitoneal injection of the preincubated mixture of cancer cells suspension and CFE Solution.

Table 2. Test for hemolytic activity of CFE

Concentration (mg/ml)	Hemolytic activity	
	R*	R+T*
1	+++	-
0.5	+++	-
0.25	+++	-
0.125	++	-
0.062	+	-
0.031	-	-
Expressed as hemolytic unit/mg**	20.8	0

* Absence (R) or presence (R+T) of trypan blue in erythrocyte suspension.
+++Complete hemolysis; ++, ++, + partial hemolysis; - no hemolysis.

**One hemolytic unit (1 HU) is the amount of hemolytic substance causing 50% hemolysis of 3% rabbit erythrocyte suspension under the stated conditions.

Table 3. Color reaction of CFE

Test	Color reaction in 0.1% solution
Ninhydrin reaction	+++
Biuret reaction	+++
Molisch reaction	++
Orcinol reaction	+
Diphenylamine reaction	+

た。CFEの50%溶血単位は20.8HU/mgであったが、3%血球浮遊液に予めtrupan blueを加えておくとCFEによる溶血は、streptolysin Sと同様に完全に阻止され、1mg/mlの濃度でも溶血は認められなかった。

3. ウサギ血液像に及ぼす影響について：CFE100mgを1日1回、6日間連日耳静脈内注射による血液像の変化を図1に示した。

白血球数は2日目に25%増加したが4日目より減少し6日目の最終投与では約15%減少した。しかし最終投与より4日目以降では増加し、14日目には投与前の状態に復した。

赤血球数はCFE投与により減少し、最終投与日では約17%減少した。しかし、最終投与より2日目以降では増加し、14日目には投与前の状態に復した。

血色素量は赤血球数と同様にCFE投与により減少し、6日目では約30%減少したが、最終投与より2日目以降では増加して14日目には投与前の状態に復した。

4. ウサギ体温に及ぼす影響：CFE100mgの1日1回6日間連日投与による体温の経時的変化を図2に示した。

CFEの1回目の投与では体温は漸次増加し、9時間で最高の1.2℃上昇したが10時間目から減少し、14時間目での体温上昇はわずかであった。2回目の投与以降では体温上昇は認められないかまたは少なく、最高上昇では0.4℃であった。

5. 呈色反応：0.1%CFE液についての呈色反応の

成績は表3に示した。CFEはタンパク反応強陽性、糖反応は陽性及びRNA反応とDNA反応は弱陽性であった。

考 察

抗腫瘍性溶連菌からアルミナまたは金剛砂処理によって作製された無細胞抽出液または同液からアセトンによって沈澱したEAP⁶⁾に比べて、Braun's cell

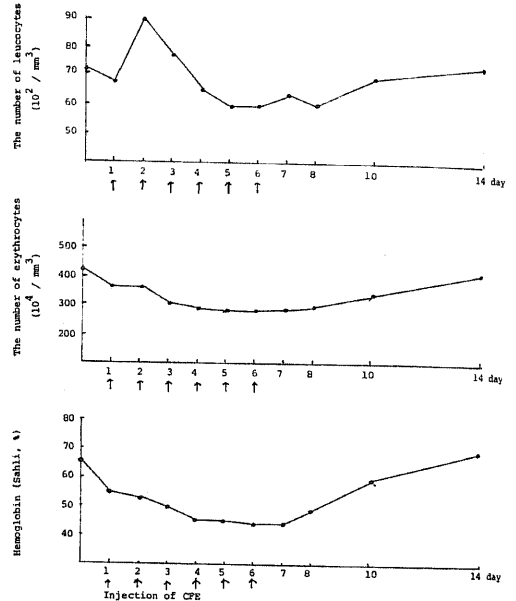


Fig. 1. Influence of CFE on the blood picture of rabbits

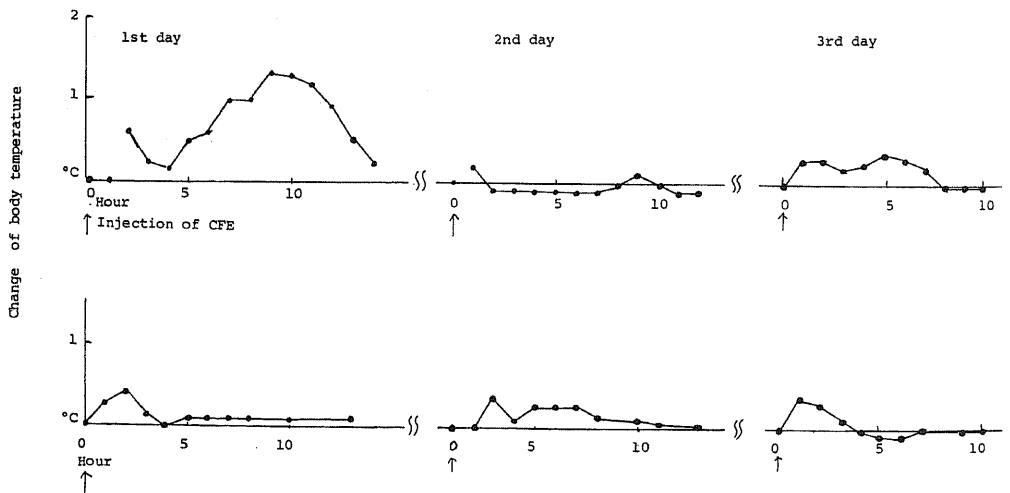


Fig. 2. Influence of CFE on the body temperature of rabbit

homogenizer により作製した無細胞抽出液またはその凍結乾燥標品 CFE の方がはるかに溶血活性並びに抗腫瘍活性は強かった。すなわち、EAP の溶血力価は約 0.8HU/mg と計算されたのに対し、CFE の溶血力価は 20.8HU/mg と EAP の約 25 倍であった。また、*in vitro* - *in vivo* 法による腫瘍細胞移植増殖阻害作用では、EAP の作用濃度が 25 mg/ml で 60 日目のマウス生存率は 15 匹中 10 匹の 67% であり、また 60 日の観察期間中に腫瘍その他の原因で 5 匹が死亡したのに、CFE では作用濃度が 0.5 mg/ml で 60 日目の生存率は 100% であった。これらのことから溶連菌体の破碎には、Braun's cell homogenizer によるのが有利であった。また、本実験によって Su 菌体内には腫瘍細胞傷害因子と溶血性因子が存在し、これら両因子が分離可能なものであることが実証された。しかし、両因子が同一のものであるか否かについては更に研究が必要である。また、CFE の溶血作用は trypan blue の存在によって阻止されたことから、CFE の溶血は streptolysin S 様の溶血と考えられた。CFE には呈色反応から糖類や核酸類が含まれているが、主成分はタンパクとみられた。

CFE の連日投与によってウサギ赤血球数や白血球数が減少したのは CFE の細胞毒性によるものか、その他の原因によるのかは不明であるが、CFE には溶血性があることから赤血球数の減少はこれによるものと考えられた。しかし、赤血球の減少の程度は抗腫瘍性溶連菌製剤 OK-431 による方が CFE によるより大であった。また、OK-431 では白血球数増加の傾向がみられたが、CFE にはこのような傾向はみられなかった。これは CFE が菌体内より分離されたものであるのに対し、OK-431 は菌体を含むものであり、従って両者に対する生体内反応が異なるためによるものと考えられた。体温に対する実験においても、OK-431 では連日投与により若干の耐性は生じるが、投与の都度発熱したのに対し、CFE では 2 回目から発熱はみられなかったのは上記と同様に OK-431 は菌体を含み、CFE は菌体内からの分離物質であるためと考えられた。

結 論

抗腫瘍性溶連菌体を Braun's cell homogenizer によって破碎、作製した無細胞抽出液の凍結乾燥標品 CFE について抗腫瘍活性、溶血活性、ウサギ体温及び血液像に対する影響性について試験し、次の如き結果をえた。

1. CFE には腫瘍細胞傷害作用と溶血作用があり、溶血作用は streptolysin S と同様に trypan blue の

存在によって阻止された。

2. CFE の連日耳静脈内投与で赤血球数、白血球数及び血色素量は若干減少するが、投与中止により投与前の状態に復した。

3. CFE の連日投与で、第 1 回投与時のみ体温は上昇したが、第 2 回投与以降では体温上昇は認められないか少なかった。

文 献

- 1) Koshimura, S., Murasawa, K., Nakagawa, E., Ueda, M., Bando, Y. & Hirata, R. : Experimental anticancer studies. Part III. On the influence of living hemolytic streptococci upon the invasion power of Ehrlich ascites carcinoma in mice. Japan. J. Exp. Med., 25, 93-102 (1955).
- 2) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R. : Studies on the anticancer and streptolysin S-forming activities of hemolytic streptococci. Japan. J. Microbiol., 11, 323-336 (1967).
- 3) Okamoto, H. : Antitumor activity of streptolysin S-forming streptococci, p237-257. In A. W. Bernheimer (ed.), Mechanisms in bacterial toxicology, 1st ed. John Wiley & Sons, Inc., New York & London, 1976.
- 4) Okamoto, H., Shoin, S. & Koshimura, S. : Streptolysin S-forming and antitumour activity of group A streptococci, p259-289. In J. Jeljaszewicz & T. Wadstrom (ed.), Bacterial toxins and cell membranes, 1st ed. Academic Press, London, New York & San Francisco, 1978.
- 5) Koshimura, S. & Shoin, S. : Experimental anticancer studies. Part 13. On the streptolysin S-synthetizing and anticancer activities of cell-free extract from living hemolytic streptococci. Gann, 51, 309-318 (1960).
- 6) 正印 達：制癌性溶連菌製剤「PC-B-45」のウサギ血液像におよぼす影響。日薬理誌, 63, 118-128 (1967).
- 7) 林 義則・木越 茂・正印 達：制癌に関する実験的研究。制癌活性を有する溶連菌抽出物の発熱試験。日薬理誌, 69, 216 (1973).
- 8) 金井 泉・金井 正光：臨床検査法提要, 改訂第 28 版, VI 5-9 頁, 東京, 金原出版, 1978.
- 9) 金井 泉・金井 正光：臨床検査法提要, 改訂第

28 版, VI 10 - 11 頁, 東京, 金原出版, 1978.

10) 金井 泉・金井 正光: 臨床検査法提要, 改訂第

28 版, VI 12 - 13 頁, 東京, 金原出版, 1978.

11) 永井 裕: 生化学研究法 II (山川・西沢・寺山・
安藤編), 第 3 版, 490 頁, 朝倉書店, 1969.

12) 西沢一俊・前田昌徹: 生化学研究法 I (山川・西

沢・寺山・安藤編), 第 3 版, 233 - 234 頁, 東京, 朝
倉書店, 1969.

13) 佐久間 慶子・寺山 宏: 生化学研究法 II (山
川・西沢・寺山・安藤編), 第 3 版, 694 - 695 頁, 東
京, 朝倉書店, 1969.

Influence of Cell-free Extract of Anticancer Streptococci on the Blood Picture and the Temperature of Rabbits. Shigeru Kigoshi, Terushige Kohno, Matomo Nishio, Hiroo Kawajiri, Kyoko Sugiyama and Susumu Shoin. Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920, Japan. *J. Juzen. Med. Soc.*, 89, 284-289 (1980).

Abstract Since it was demonstrated that streptolysin S-forming streptococci possessed an anticancer activity, isolation experiment of anticancer factor of the cocci was carried out. The cocci, harvested from 3% yeast extract broth culture, was homogenized by the aid of Braun's cell homogenizer. The homogenate was centrifuged at 10,000 rpm for 30 minutes. The supernatant (cell-free extract) thus obtained was liophilized and the brownish powder was designated as CFE.

CFE was examined on the subjects of the anticancer activity, the hemolytic activity, and the influence on the blood picture and the body temperature of rabbits.

The results are as follows.

1. Test for anticancer activity was carried out according to the *in vitro- in vivo* assay method, and CFE inhibited the invasiveness of Ehrlich carcinoma cells into mice.
2. Hemolytic power of CFE was 20.8 HU/mg.
3. The number of luocytes and erythrocytes, and the amount of hemoglobin in blood of rabbits decreased by six intravenous injections of CFE for six successive days. After the last injection, the number of both cells and amount of hemoglobin began to increase and returned to their initial value on the 8th day.
4. CFE was injected intravenously into rabbits six times for six successive days to examine the influence on the body temperature. The body temperature rose by the first injection of CFE, but did not rise by injection on and after the 2nd day.