

オキサロ酢酸の溶連菌 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-45³⁾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⁴⁾、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⁵⁾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ロ酢酸の溶連菌の SLS 産出能並びに制がん能に対する影響が検討された。

1. オキサロ酢酸の溶連菌 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、まずオキサロ酢酸加ブイオン、ついでオキサロ酢酸-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 とも略記) : 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稀釈液を使用した。
3. オキサロ酢酸 : オキサロ酢酸の 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、実験にはその稀釈液を使用した。
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 + オキサロ酢酸稀釈液 3 ml.
 - 2) 普通ブイオン 24 ml + オキサロ酢酸稀釈 3 ml + core 原液または稀釈液 3 ml
 - 3) 普通ブイオン 27 ml + core 原液または稀釈液 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 % KH₂PO₄ (NaOH で pH7.0 に調整) 6 ml, 2 % MgSO₄・7H₂O 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リ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、オキサリ酢酸の付加濃度が 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。ついでオキサリ酢酸付加濃度を 0.1 % と一定にし、core を各種濃度に加えた 0.1 % オキサリ酢酸-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 % で最も強い溶血力を示した。

以上の成績から 0.1 % オキサリ酢酸 - 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. オキサリ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 % オキサリ酢酸 - 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 % オキサリ酢酸 - 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, Na₂HPO₄ · H₂O 2.9g, KH₂PO₄ 0.2g, 蒸留水 800 ml) に浮遊させて 10⁷ 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 × 10⁷ 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%オキサリ酢酸-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菌を前記とどうようにして用いた。

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%オキサリ酢酸-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 + HgCl₂液 (250µg/ml DBA) 1 ml

e) HgCl₂液 (250µg/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260µm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。

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

2) *in vitro-in vivo* 法制がん実験: 0.1%オキサリ酢酸-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%オキサリ酢酸-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%オキサリ酢酸-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日を経ても健全に生存し, 20倍希釈液でも5匹中2匹が健全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日を経ても健全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% に普通ブイオンに付加して溶連菌を培養すると、同菌の SLS 産出は普通ブイオン培養菌の約 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 加ブイオン培養菌による SLS 産出は普通ブイオン培養菌の 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 のブイオ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 加ブイオ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.
