

Purification and Characterization of an Anti-tumor Substance from *Veillonella parvula* Strain KN-2

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/2297/8369

Veillonella parvula KN-2 株の抗腫瘍活性物質の性状について

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座 (主任: 山本悦秀教授)

馬 場 利 人

(平成4年4月16日受付)

Veillonella parvula (*V. parvula*) KN-2 株の超音波処理上清液 (supernatant of sonicated cells, SS) 中に存在する抗腫瘍活性物質をサルコーマ180 (Sarcoma 180, S-180) 細胞に対する細胞増殖抑制活性および殺細胞活性を指標に精製し, その物理化学的性状について検討した。まず, SSを硫酸アンモニウム塩析した結果, 20%飽和から70%飽和の画分に活性物質が塩析された。この画分に対しフェニールセファロース CL-4B カラムを用いたハイドロフォービッククロマトグラフィーを行った。リン酸緩衝液による溶出画分であるフラクション番号 (fraction number, fr) 28-38 に強い細胞増殖抑制活性が認められた。この画分を分画分子量100のセルロースエステルチューブスペクトラ/ポア CE で10倍に濃縮した後, 分子量1,000から300,000の画分に優れたスーパーローソ12によるゲル濾過を行った。その結果, 分子量約1,300の fr 39, fr 40 に100%の細胞増殖抑制率, fr 39 に70%以上の殺細胞率が認められた。fr 39 画分を部分精製抗腫瘍物質として, その物理化学的性状について検討した。この抗腫瘍活性物質は, セルロースチューブに対しては透過性であったが, セルロースエステルチューブスペクトラ/ポア CE に対しては非透過性であった。また, 100℃の加熱に対して細胞増殖抑制活性および殺細胞活性は共に安定であった。トリプシンおよびプロテイナーゼ K に対しては抵抗性を示した。核酸画分の細胞増殖抑制活性および殺細胞活性は極めて低かった。クロロホルム, 酢酸エチル, ブタノールに対して難溶解性であったが, アセトンに対しては易溶解性であった。フローサイトメトリーにより S-180 細胞の細胞周期に対する影響を検討したところ, S 期および G₂(+M) 期に細胞の集積が認められた。以上の結果は, *V. parvula* KN-2 株の抗腫瘍活性物質は約1,300の分子量を有し, 蛋白質や核酸以外の物質であり, かつ脂質を含んでいないことを示唆している。また, 本物質は DNA 合成阻害活性を有していることを示している。

Key words anti-tumor activity, growth inhibitory activity, cell killing activity, partial purification, *Veillonella parvula*

細菌における抗腫瘍活性, 制がん作用については, 今日まで数多くの報告がみられる。その多くは好気性菌に関する報告であり¹¹⁻¹⁵⁾, 嫌気性菌に関する研究は, 嫌気性 *Corynebacterium*, *Clostridium* など比較的少ない¹⁶⁻²⁵⁾。近年, Tamai ら²⁶⁻²⁸⁾ は口腔内常在のグラム陰性嫌気性桿菌である *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) に抗腫瘍活性があることを報告した。これらの研究を契機として, 口腔内より分離された種々の嫌気性菌について抗腫瘍活性が検討され, グラム陽性嫌気性球菌である *Peptococcus magnus*²⁹⁾, グラム陽性嫌気性桿菌である *Lactobacillus casei*³⁰⁾, グラム陰性嫌気性球菌である *Veillonella*³¹⁻³³⁾ 等が抗腫瘍活性を有することが明らかにされた。

Veillonella については, 松原³³⁾ は口腔内炎症性疾患である歯肉膿瘍から分離同定した *Veillonella parvula* (*V. parvula*) 菌株について検討し, 菌体抽出液が, 抗腫瘍活性を有することを動物実験および培養細胞を用いて明らかにした。

本研究では, *V. parvula* の菌体抽出液中に含まれる抗腫瘍活性物質の本体を明らかにすべく, 本物質を精製すると共にその物理化学的性状について検討した。

材料および方法

I. *V. parvula* 菌体からの SS の調製

1. 使用菌株および培養法

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座保存菌株である *V. parvula* KN-2 株を実験に使用した。本菌株は口腔内炎症疾患である歯肉膿瘍からの分離菌株である。凍結保存された本菌株を松原³³⁾の方法に従い本培養を行った。

2. 菌体の超音波処理上清液 (supernatant of sonicated cells, SS) の調製

SS の調製は松原の方法³³⁾によった。培養菌液を遠心 (6,500rpm, 20分) し, 得られた沈渣 (菌体) に 1/15M リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) を加え, 超音波破砕器 Model UR-200p (20KHz) (トミー精工, 東京) にて菌体を破壊し, 遠心後, 得られた上清液を SS とした。

II. 腫瘍細胞の培養および培養細胞における増殖抑制活性の測定

1. 実験動物

5週齢の ICR 系マウス (体重 24~26g) (日本チャールズ・リ

Abbreviations: A₂₈₀, absorbance at 280 nm; CIAA, chloroform-isoamyl alcohol; DFM, Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum; FCM, flow cytometry; *F. nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum*; FPLC, fast protein liquid chromatography; fr, fraction number; MW, molecular

バー, 厚木) を実験に供した。なお, 動物飼育室で環境馴化のために, あらかじめ1週間飼育した。

2. 腫瘍細胞の培養および培養細胞の調製

実験に使用するサルコーマ180 (Sarcoma 180, S-180) 細胞は, マウス腹腔内で7日目ごとに継代培養しているものを使用した³⁰。腫瘍細胞の培養には10%牛胎児血清 (Gibco, Grand Island, USA) 加ダルベッコ変法イーグル培地 (白水製薬, 東京) (Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, DFM) を用いた。腫瘍細胞 (腹水) は培養7日目に使用直前に無菌的に採取した。採取後, 腫瘍細胞をPBSで洗浄し白血球算定基準³⁰にしたがってビルケルチュルク型の白血球算定板を用い細胞数を算定し, DFMを加え, 4.0×10^5 個/mlの細胞浮遊液を調製し実験に供した。細胞の培養は開放系 (37°C, 湿潤, 5%CO₂) で行った。

3. 細胞増殖抑制効果および殺細胞効果の測定

組織培養用96穴マイクロテストプレート3072 (Becton Dickinson and Company, Lincoln Park, USA) の各穴に細胞浮遊液 (2.5×10^5 個/ml) 160 μ l を注入後, 各濃度に調製した試料あるいはPBSの40 μ lを加えた。ただし, 試料および対照としてのPBSは, DFMで各濃度に調整した。3日間培養後に各穴より0.1ml採取し, 0.2%トリパンブルー0.1mlで染色を行った後, 血球計算板を用い倒立顕微鏡下で総細胞数, 生細胞数, 死細胞数を測定した。細胞増殖抑制率および殺細胞率を下記の計算式により算出した。この際, 3日間培養後の総細胞数から培養開始時の総細胞数を減じた値を増殖細胞数とした。

細胞増殖抑制率 (%) =

$$\frac{\text{対照培養の増殖細胞数} - \text{試料添加培養の増殖細胞数}}{\text{対照培養の増殖細胞数}} \times 100$$

$$\text{殺細胞率 (\%)} = \frac{\text{総細胞数} - \text{生細胞数}}{\text{総細胞数}} \times 100$$

細胞増殖抑制率については20%以上を陽性とした。

III. 抗腫瘍活性物質の精製

1. 硫酸アンモニウム塩析

氷冷下で, SS 100ml に対し20%飽和度になるように粉末状の硫酸アンモニウム (和光純薬, 大阪) を攪拌しながら徐々に加えた。その際, pHの調整を希アンモニア水にて行った。30分間攪拌した後, 遠心 (12,000rpm, 15分) し, その遠心上清液に硫酸アンモニウムを飽和度70%になるように攪拌しながら徐々に加えた。同様に30分攪拌後, 4°Cで24時間静置した。その後, 遠心し, その沈渣をPBSにて溶解した。

2. カラムクロマトグラフィー

1) ハイドロフォビッククロマトグラフィー

フェニールセファロース CL-4B (Phenyl-Sepharose CL-4B) (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) カラム (2.6 \times 14.5cm) を 1M 硫酸アンモニウム加 0.15M リン酸緩衝液 (pH 7.2) (phosphate buffer, PB) で平衡化後, 20~70%硫酸アンモニウム飽和画分試料 100ml を添加した。カラムを上記緩衝液で洗浄後, 1-0M 硫酸アンモニウム加 PB の直線濃度勾配法による溶出を行い, 引き続き PB で溶出後, 0~50%エチレングリコール加 PB の直線濃度勾配法で溶出を行った。分取量

は 10ml とした。

2) ゲル濾過

1) で得られた試料は後に述べる方法により濃縮した後, 高速液体クロマトグラフィー (fast protein liquid chromatography, FPLC) (Pharmacia Fine Chemicals) 装置に組み込まれたスーパーロース12 (Pharmacia Fine Chemicals) カラム (1.0 \times 30.0cm) を用いてゲル濾過を行った。PBS でカラムを平衡化後, 濃縮試料を添加し, PBS にて溶出を行い, 0.5ml 宛分取した。分子量 (molecular weight, MW) マーカーとしてフェリチン (MW 450,000), カタラーゼ (MW 240,000), キモトリプシン A (MW 25,000), チトクローム C (MW 12,500) (Combithek Boehringer, Mannheim, Germany), ビタミン B₁₂ (MW 1,355) (和光純薬) を使用した。

3) 試料の濃縮

スーパーロース12カラムでゲル濾過を行う前に, ハイドロフォビッククロマトグラフィーによって得られた画分を, 分画分子量100のセルロースエステルチューブスペクトラ/ポア CE (Spectrum, Los Angeles, USA) に注入, 結紮し, これをポリエチレングリコール20,000で覆うことにより10倍に脱水, 濃縮した。

IV. 部分精製抗腫瘍活性物質の物理化学的性状

1. 透析チューブ透過性

セルロースチューブ (Visking, New York, USA) およびセルロースエステルチューブスペクトラ/ポア CE に試料 2ml を注入し, 4°C下で48時間, 5,000ml のPBSに対して透析した。透析後, チューブ内液について, その細胞増殖抑制活性を前述の方法に従い測定した。

2. 熱安定性試験

熱安定性を調べるために, 試料 100 μ l を56°Cにて5, 10, 30, 60, 120分間, および100°Cにて1, 2, 5, 10, 15分間加熱した。非加熱, 加熱の試料あるいは対照としてのPBS 40 μ l をS-180細胞培養液 160 μ l に加え, 培養3日後に生細胞数, 総細胞数を測定し, それらの細胞増殖抑制率および殺細胞率を求めた。

3. トリプシン感受性試験

試料 20 μ l に1, 0.1, 0.01mg/mlの各濃度のトリプシン タイプ III (Sigma, St. Louis, USA) 10 μ l を加え37°C, 60分間インキュベーションを行った。その後, それぞれ1, 0.1, 0.01mg/mlの濃度のトリプシンインヒビタータイプ I-S (Sigma) 10 μ l を加えた。このトリプシン処理による細胞増殖抑制活性の変化をS-180細胞を用い前述の方法に従い測定した。

4. プロティナーゼ K 感受性試験

試料 87.5 μ l に5, 50, 500 μ g/mlの濃度のプロティナーゼ K (Merck, Darmstadt, Germany) 溶液 2.5 μ l と 0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.8) 10 μ l を加え, 37°C, 60分間インキュベーションを行った。その後, 100°C, 10分間加熱することによりプロティナーゼ K を失活させた。このプロティナーゼ K 処理による細胞増殖抑制活性の変化を前述の方法に従い測定した。

5. 核酸分画

weight; PB, phosphate-buffer; PBS, phosphate-buffered saline; S-180, Sarcoma 180; *S. pyogenes*, *Streptococcus pyogenes*; SS, supernatant of sonicated cells; *V. parvula*, *Veillonella parvula*

試料300 μ lにPBS飽和状態のフェノール150 μ lとクロロホルム-イソアミルアルコール(chloroform-isoamyl alcohol, CIAA)(クロロホルム:イソアミルアルコール=50:1)150 μ lを加え、十分攪拌した。12,000rpm, 5分間遠心を行い、分離された水層を取り出して、さらにもう一度同様の操作を繰り返した。次に、水層にCIAA 300 μ lを加え攪拌した。12,000rpm, 5分間遠心し水層を取り出し5M NaClを30 μ l, エタノール600 μ lを加え十分攪拌した。-80 $^{\circ}$ C, 1時間放置することにより核酸を沈澱させた。その後、12,000rpm, 15分間遠心した後、上清を捨て沈澱に70%エタノール1mlを加えて攪拌した。さらに、12,000rpm, 15分間遠心し、上清を捨て減圧乾燥後PBSを300 μ l加えて元の量に戻した。この核酸画分の細胞増殖抑制活性を前述の方法に従い測定した。

6. 有機溶媒溶解性

試料100 μ lに、クロロホルム, 酢酸エチル, ブタノール(和光純薬)をそれぞれ100 μ l加え5分間攪拌した。12,000rpm, 5分間遠心し、有機溶媒層を減圧乾燥しPBSで元の量に戻して、前述の方法に従って細胞増殖抑制活性について測定した。

また、アセトンに対する溶解性の検討では、試料100 μ lにアセトン(和光純薬)900 μ lを加えて4 $^{\circ}$ C一夜静置後、12,000rpm, 15分間遠心した。その上清と沈澱をそれぞれ減圧乾燥しPBS100 μ lを加えて元の量に戻し細胞増殖抑制活性について測定した。

V. フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM)

細胞浮遊液(4.0 \times 10⁵個/ml)3mlに各濃度に調製した試料あるいはPBS3mlを加え、組織培養ペトリ皿3002(直径60mm)(Becton Dickinson and Company)に入れ、37 $^{\circ}$ C・5%CO₂条件下で静置培養した。48時間培養後、培養液を除去し、PBSで遠心洗浄した。洗浄した細胞は0.5mlのPBSを加えて懸濁させ、5mlの70%エタノールに滴下し、60分間水冷下で静置した。遠心により細胞を分離し、PBSで細胞を2回洗浄した。細胞を0.9mlのPBSに懸濁させ、RNAを分解するため20mg/mlのRNA分解酵素(Sigma)溶液を0.1ml加えて、37 $^{\circ}$ Cで30分間処理した。次に、PBSで洗浄後、5mg/mlのプロピディウムイオダイド(propidium iodide)(Sigma)を5 μ l加えて4 $^{\circ}$ C, 30分間DNA染色を行った²⁶⁾。染色後の細胞は水冷下に保存し、2時間以内にFCMに供した。試料は孔径50 μ mのナイロンメッシュに通して可能な限り異物を除去し、フローサイトメーターCS-20(昭和電光, 東京)を用いてDNA解析を行った。

VI. 蛋白質の定量

蛋白質の定量はクロマトグラフィーにおいては波長280nmの吸収(absorbance at 280nm, A₂₈₀)により、また、必要に応じてBio-Rad蛋白アッセイキット(Bio-Rad, Richmond, USA)を用いて行った。

成 績

1. V. *Parvula* KN-2株SS中の抗腫瘍活性物質の精製

1. 硫酸アンモニウム塩析

まず、SS中の抗腫瘍活性物質が塩析される硫酸アンモニウムの飽和度を求めた。各飽和度における遠心沈澱を、元のSS量と等量のPBSに溶解し、さらにPBSにて2倍希釈した後、抗腫瘍活性を測定した(図1)。10%および20%飽和画分には細胞増殖抑制活性、殺細胞活性共に認められなかった。細胞増殖抑制活性は30%飽和画分で出現し(細胞増殖抑制率, 45.1%),

飽和度の増加と共にその活性は上昇した。70%および80%飽和画分においては、細胞増殖抑制率はSS原液(100%)とほぼ等しい96.8%を示した。殺細胞活性は、40%以下の飽和画分にはほとんど認められず、50%以上の飽和画分に認められた。殺細胞活性は飽和度の増加と共に上昇し、70%飽和画分においてはSS原液とほぼ等しい99.0%であった。

80%飽和画分については、先に述べた如く、2倍希釈して抗腫瘍活性を測定した場合、活性はSS原液とほぼ等しかった。しかしながら、4倍希釈後に測定した場合、SS原液よりも高い細胞増殖抑制率と殺細胞率が見られたことから、80%飽和画分の細胞増殖抑制活性、殺細胞活性については硫酸アンモニウム自体の細胞毒性が関与していることが考えられた。

以上の結果、活性物質は20%~70%硫酸アンモニウム飽和画分に含まれることが分かった。

2. フェニールセファロース CL-4B カラムを用いたハイドロフォobicクロマトグラフィー

20%~70%飽和画分100mlをフェニールセファロース CL-4B カラムに添加し、1-0M硫酸アンモニウム加PB(直線濃度勾配), PB, 0~50%エチレングリコール加PB(直線濃度勾配)にて溶出させ、各フラクションについて細胞増殖抑制活性を測定した(図2)。

細胞増殖抑制活性のピークはPB溶出部分であるフラクション番号(fraction number, fr)28-38にみられ、特にfr32に高い細胞増殖抑制活性(抑制率; 約80%)がみられた。この細胞増殖抑制活性のピークはA₂₈₀の主ピークの肩の部分に位置していた。

3. スーパーロース12カラムクロマトグラフィー (FPLC)

フェニールセファロース CL-4B カラムを用いたハイドロ

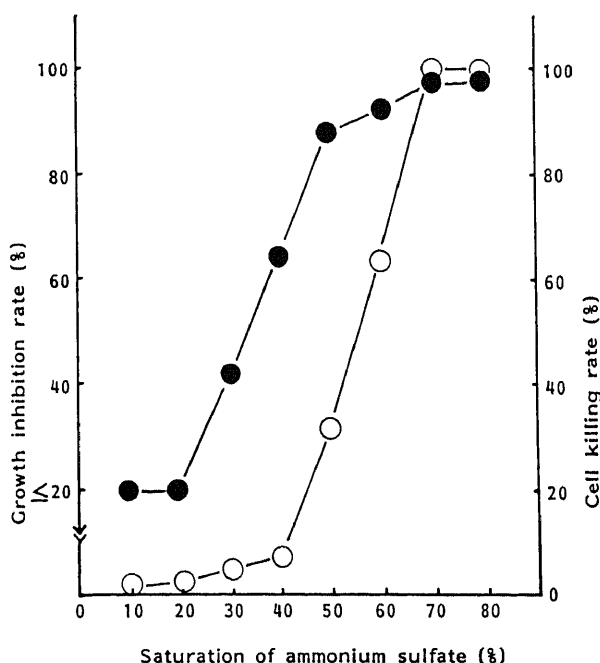


Fig. 1. Saturation of ammonium sulfate and precipitation of anti-tumor substance in SS. Ammonium sulfate precipitate was solubilized with PBS to the original volume of PBS. Samples were diluted twofold with PBS and assayed for growth inhibitory activity (●—●) and cell killing activity (○—○) to S-180 cells.

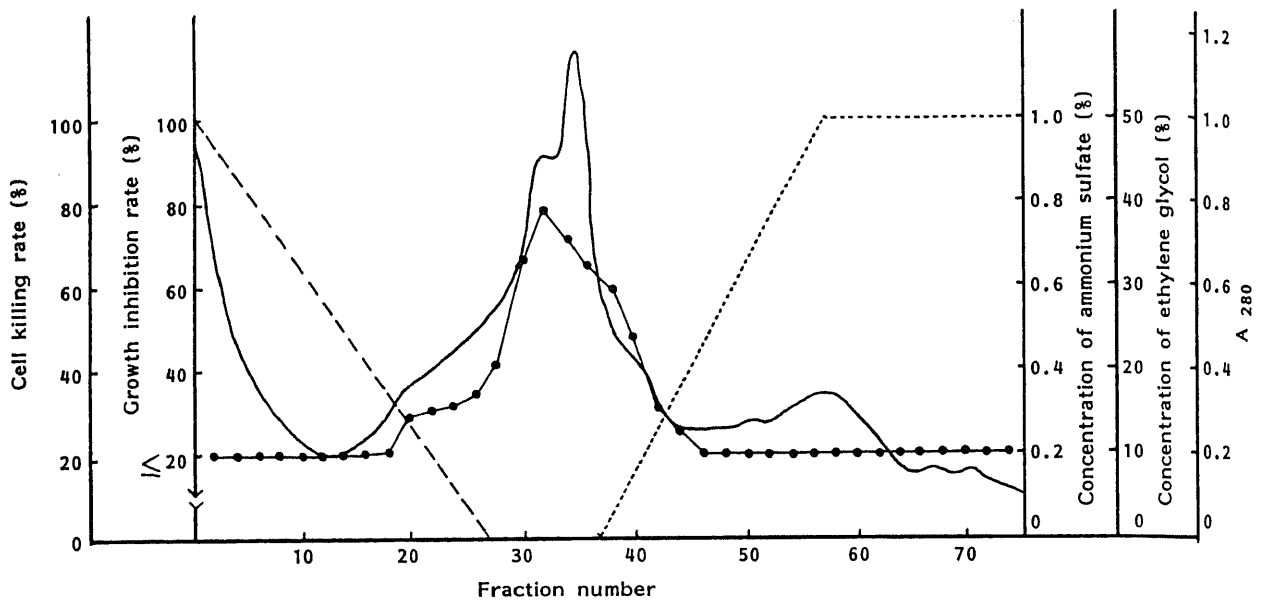


Fig. 2. Profile of growth-inhibitory activity on Phenyl-Sepharose CL-4B column chromatography. SS (5.4mg-protein/ml) concentrated by precipitation with ammonium sulfate between 20% and 70% saturation was applied to the column. —, absorbance at 280nm (A_{280}); ---, concentration of ammonium sulfate; ·····, concentration of ethylene glycol; ●—●, growth inhibition rate.

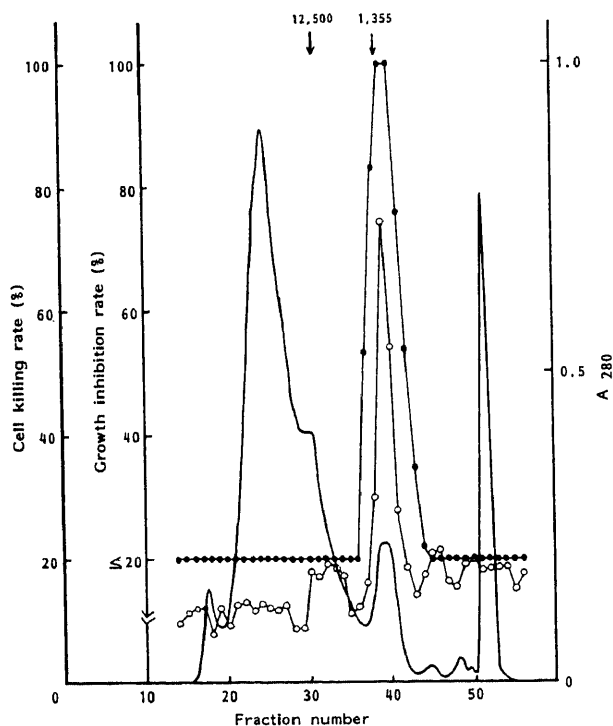


Fig. 3. Profile of anti-tumor activity on Superose 12 gel filtration. Fr 28–38 from Phenyl-Sepharose CL-4B column chromatography were pooled and concentrated 10 times by using cellulose ester tubing Spectra/Por CE. A volume of 0.3ml (6.55mg-protein/ml) of the concentrated sample was applied to Superose 12 gel filtration column. Allows indicate elution position of standard proteins with molecular weights shown in the upper part of the allows. —, A_{280} ; ●—●, growth inhibition rate; ○—○, cell killing rate.

フォービッククロマトグラフィーで溶出された細胞増殖抑制活性の高い11ヶの画分 (fr 28–38) (110ml) を、セルロースエステルチューブスペクトラ/ポア CE を用いて10倍に濃縮した後、スーパーロース12カラムクロマトグラフィーを行った (添加濃縮液量, 0.3ml) (図3)。

細胞増殖抑制活性 (fr37–42) と殺細胞活性 (fr38–41) のピークは一致して出現した。細胞増殖抑制活性は fr39, fr40 で最も強く、細胞増殖抑制率は100%であった。また殺細胞活性も両フラクションで特に強く、殺細胞率は fr39 では70%, fr40 では50%であった。これらの活性ピークと一致して A_{280} の小さなピークがみられた。 A_{280} の主ピークは fr23–24 であり、抗腫瘍活性ピークとは異なった位置に溶出された。抗腫瘍活性が最も高かった fr39 の MW は標準蛋白質の溶出位置から約1,300 であることが分かった。

II. 部分精製抗腫瘍活性物質の物理化学的性状

SS を硫酸アンモニウム塩析、フェニールセファロース CL-4B カラムを用いたハイドロフォービッククロマトグラフィー、スペクトラ/ポア CE による濃縮、さらにスーパーロース12カラムを用いたゲル濾過により精製し、得られた fr39 を部分精製抗腫瘍活性物質試料として、その物理化学的性状について以下の検討を加えた。

1. 透析チューブ透過性

透析による試料の細胞増殖抑制活性および殺細胞活性の変化について検討した。未透析の試料あるいは充分量の PBS で透析した試料を S-180 細胞浮遊培養液に添加後3日目の総細胞数、生細胞数を測定し細胞増殖抑制率および殺細胞率を求めた。未透析試料の細胞増殖抑制率は100%であるのに対して、セルロースチューブ透析試料では活性は23.8%と著しく減少した。殺細胞率についても未透析試料では76.5%の活性があるのに対して、透析した場合は21.0%となり細胞増殖抑制率と同様に著しく減少した。即ち、抗腫瘍物質はセルロースチューブに

対して透過性であると考えられた。また、分画分子量100のセルロースエステルチューブスペクトラ/ポア CE で透析した場合、細胞増殖抑制率92.4%、殺細胞率62.1%と若干の活性の低下はみられるもののほぼ活性物質は透析チューブ内に保持されていた。

2. 熱安定性

56℃で10, 20, 30, 60, 120分間および100℃で1, 2, 5, 10, 15分間加熱処理したもの、あるいは対照として非加熱試料を S-180 細胞浮遊培養液に添加し、培養3日目の総細胞数、生細胞数を測定し、細胞増殖抑制率および殺細胞率を求めた(図4)。56℃および100℃で処理した場合のいずれにおいても細胞増殖抑制率および殺細胞率は対照の非加熱試料とほぼ等しい値であり、増加・減少はほとんどみられなかった。したがって、抗腫瘍物質はきわめて耐熱性の強い物質であることが分かった。

3. タンパク分解酵素感受性

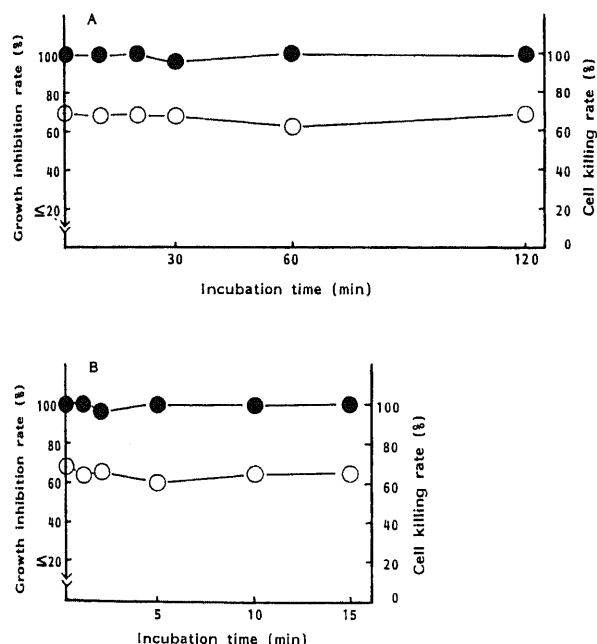


Fig. 4. Heat stability of partially purified anti-tumor substance. The active fraction (fr 39) (2 μ g-protein/ml) from Superose 12 gel filtration was used as partially purified anti-tumor substance. A, 56°C; B, 100°C. ●—●, growth inhibition rate; ○—○, cell killing rate.

Table 1. Sensitivity of partially purified antitumor substance to trypsin

Concentration of trypsin (mg/ml)	Growth inhibition rate (%)	Cell killing rate (%)
0	78.3	29.6
0.01	75.5	25.4
0.1	78.3	36.3
1.0	75.1	30.5

A volume of 20 μ l of sample (2 μ g-protein/ml) was mixed with 10 μ l of each trypsin solution and incubated at 37°C for 60 min. Then trypsin inhibitor solution was added to the mixture and incubated at 37°C for 60 min. After incubation the residual antitumor activity was measured.

1) トリプシン感受性

試料 (2 μ g 蛋白/ml) のトリプシン処理がその細胞増殖抑制および殺細胞活性に対して影響を与えるかどうかを検討した(表1)。試料あるいは対照として PBS を3段階の濃度 (0.01, 0.1, 1.0 μ g/ml) のトリプシンで37°C, 60分間処理した。これら処理試料を S-180 細胞浮遊培養液に添加した後3日目の総細胞数、生細胞数を測定し、細胞増殖抑制率および殺細胞率を求めた。トリプシン処理試料の細胞増殖抑制率は75.1~78.3%、殺細胞率は25.4~36.3%であり、対照と等しい値を示し、活性の低下はみられなかった。

2) プロティナーゼ K 感受性

試料 (2 μ g 蛋白/ml) をプロティナーゼ K で、37°C, 60分間処理し、その後100°C, 10分でプロティナーゼ K を失活させた。このプロティナーゼ K 処理試料あるいは未処理試料を S-180 細胞浮遊培養液に添加後3日目の総細胞数、生細胞数を測定し細胞増殖抑制率および殺細胞率を求めた(表2)。プロティナーゼ K 処理試料の細胞増殖抑制率は70.5~75.4%、殺細胞率は29.7~31.8%であり、未処理試料の場合と等しい値(各々72.5, 26.5%)を示し、活性の低下はみられなかった。

4. 核酸画分

試料の核酸画分あるいは試料原液を S-180 細胞浮遊培養液に添加後3日目の総細胞数、生細胞数を測定し細胞増殖抑制率および殺細胞率を求めた。核酸画分の細胞増殖抑制率、殺細胞率は各々28.9%, 20.4%であり試料原液(細胞増殖抑制率100%, 殺細胞率76.5%)に較べ著しく低かった。

5. 有機溶媒溶解性

抗腫瘍物質の有機溶媒(クロロホルム, 酢酸エチル, ブタノール, アセトン)に対する溶解性を検討した。

クロロホルム, 酢酸エチル, ブタノール処理の水層はそれぞれ78.6%, 83.2%, 75.9%の細胞増殖抑制率を示したが、有機溶媒層はそれぞれ20.6%, 8.7%, 0.5%を示したに過ぎなかった。殺細胞率についてはクロロホルム, 酢酸エチル, ブタノールの水層はそれぞれ75.4%, 71.5%, 79.2%を示した。一方、クロロホルム, 酢酸エチル, ブタノールの有機溶媒層ではそれぞれ24.7%, 27.3%, 27.1%の活性を示したのみであった。この際水層中に溶解している有機溶媒の S-180 細胞への影響を考慮して対照として同様に PBS を処理し測定したが、何らの影響も認められなかった。

アセトンに対する溶解性を検討するため試料に充分量のアセトンを加え4℃一夜静置した後、遠心を行い、遠心上清と遠心沈渣とに分け、それぞれ減圧乾燥した。それぞれに PBS を加

Table 2. Sensitivity of partially purified antitumor substance to proteinase K

Concentration of proteinase K (mg/ml)	Growth inhibition rate (%)	Cell killing rate (%)
0	72.5	26.8
5	72.5	29.7
50	70.5	31.8
500	75.4	28.0

A volume of 87.5 μ l of sample (2 μ g-protein/ml) was mixed with 2.5 μ l of each proteinase K solution and incubated at 37°C for 60 min. Then the mixture was heated at 100°C for 10 min to inactivate proteinase K activity and the residual antitumor activity was measured.

元の量に戻し S-180 細胞浮遊培養液に添加後 3 日目の総細胞数、生細胞数を測定し、細胞増殖抑制率および殺細胞率を求めた。この際アセトン未処理の試料を対照として同様に測定した。細胞増殖抑制率、殺細胞率は遠心上清では各々 94.8%、71.0%、遠心沈渣では各々 35.5%、15.6%であり、遠心沈渣においては未処理試料 (各々 100%、72.0%) に比べ著しく低かった。

6. 試料の細胞増殖抑制作用の FCM による解析

試料 (2 μ g 蛋白/ml) を 10, 20 および 40 倍の希釈濃度になるように S-180 細胞浮遊培養液に添加し培養したときの細胞内 DNA 分布ヒストグラムを培養 3 日目の細胞について検討した (図 5)。この際対照として試料の代わりに PBS を添加し培養したものについて測定した。対照として測定した PBS では、2C に大きなピーク、4C に小さなピークを有する二峰性の DNA ヒストグラムを示した。試料の 40 倍希釈液では、対照とほぼ同じ DNA ヒストグラムのパターンを示した。20 倍希釈液では、2C のピークが低くなり、2C と 4C の間の S 期の増加を示した。10 倍希釈液では、2C より 4C に大きなピークを持つ二峰性の DNA ヒストグラムを示した。さらに 10 倍希釈以上の高濃度になると細胞はほとんど死滅した状態であった。対照および 10 倍希釈液による各細胞周期における DNA 量の割合をみると、対照では、G₁ 期が 49.7%、S 期が 22.0%、G₂ (+M) 期が 30.3%であったのに対して、10 倍希釈液では G₁ 期が 15.5%

S 期が 52.5%、G₂ (+M) 期が 32.0% となり、10 倍希釈液において著しい S 期への細胞集積が認められた。

考 察

微生物菌体ならびにその成分の抗腫瘍性に関しては、1868 年に Busch²⁷⁾ によって、丹毒に罹患した肉腫患者に対する腫瘍増殖の一時停止あるいは腫瘍の縮小を見た報告から始まり、1882 年 Fehleisen²⁸⁾ は丹毒の病原体が *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) であることを発見したことから、その後 *S. pyogenes* を中心に種々の細菌による制癌実験が試みられてきた。Coley²⁹⁾ は *S. pyogenes* と *Serratia marcescens* の混合死菌体ワクチンを用いて肉腫患者に対して腫瘍の縮小を見たことを報告し、Okamoto ら⁷⁾、泰¹³⁾ も *S. pyogenes* の抗腫瘍活性について報告した。さらに *Escherichia coli*, *Salmonella*, *proteus*, *Corynebacterium* など好気性菌による報告が多くみられるが、嫌気性菌による抗腫瘍活性の報告は、嫌気性 *Corynebacterium*¹⁷⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾, *Clostridium*²²⁾⁴²⁾⁴³⁾ の制癌作用など極わずかの菌種に限られている。口腔内細菌、特に口腔内嫌気性菌の研究を行ってきた Tamai ら 1982 年に口腔内常在菌で嫌気性グラム陰性桿菌である *F. nucleatum* の培養上清液に抗腫瘍活性があることを報告した²⁶⁾。以後、この抗腫瘍活性の本体、作用機序などを究明すると共に *Peptococcus*, *Lactobacillus* などの口腔内より分離した嫌気性菌の抗腫瘍活性について積極的に検討してき

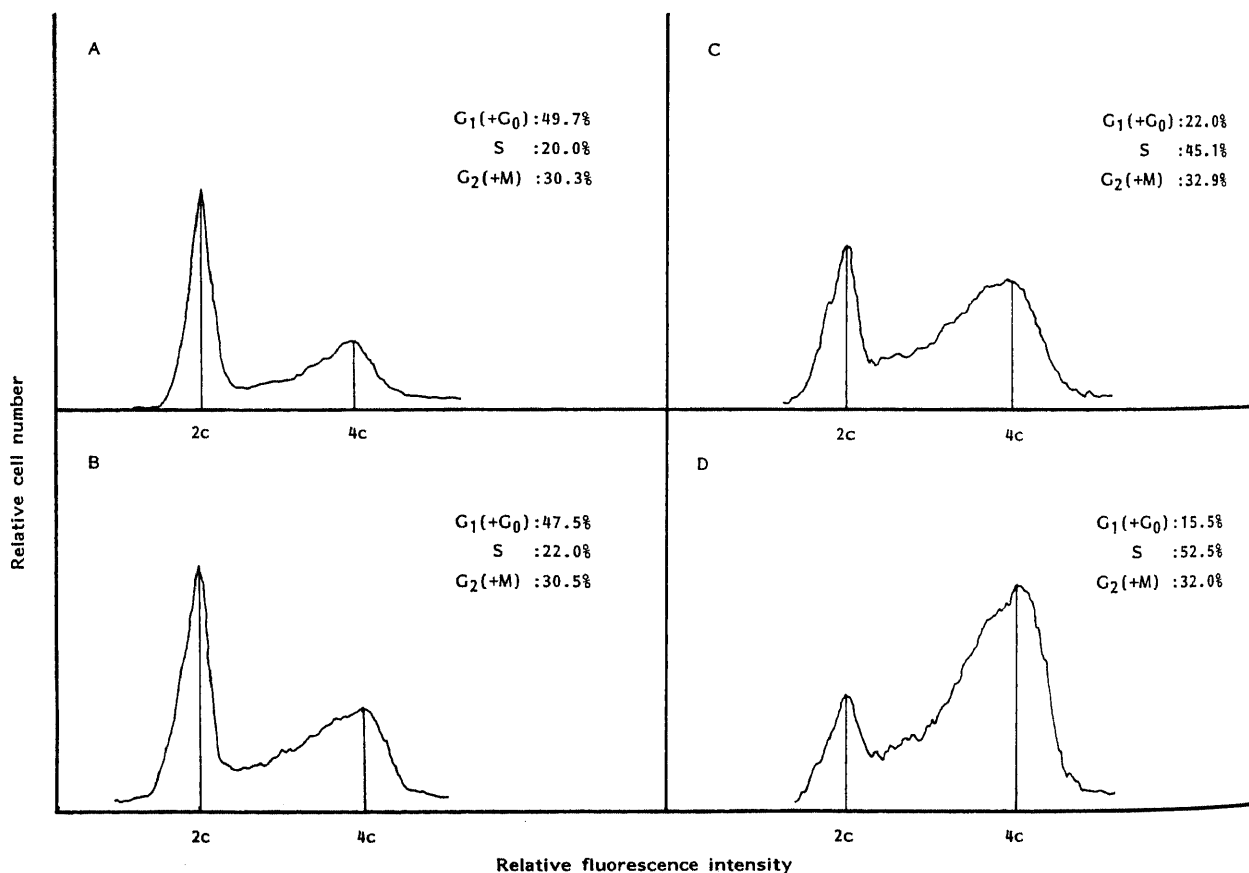


Fig. 5. DNA histogram of S-180 cells treated with various concentrations of partially purified anti-tumor substance (2 μ g-protein/ml). S-180 cells were treated for 3 days with PBS or appropriately diluted anti-tumor substance. A, PBS; B, 1 : 40 dilution; C, 1 : 20 dilution; D, 1 : 10 dilution.

た^{27-30, 44-49}). *Veillonella* は口腔内常在菌で炎症性疾患, 特に, 歯肉膿瘍, 顎嚢胞, 上顎洞炎等から比較的高率に分離され, 弱病原性菌ながら, これら疾患の原因菌とも考えられている. 本菌の抗腫瘍活性については中川²¹, 八木²², 松原²³が検討し, 本菌もまた抗腫瘍活性を有することを報告している. 松原²³はさらに培養細胞に対しても細胞増殖抑制作用があることを明らかにした.

著者は, 松原²³の使用した *V. parvula* KN-2 株の抗腫瘍活性について, その SS 中に存在する活性物質を精製し, その物理化学的性状を明らかにし, この物質の本体を究明すべく本研究を行った. 実験に際し, 細胞増殖抑制効果を検討するために S-180 細胞, エールリッヒ腹水がん細胞 (Ehrlich ascites carcinoma cells), メス A 細胞 (Meth A fibrosarcoma cells) の培養細胞中, SS に最も感受性の高かった S-180 細胞株を使用した.

まず, 限外濾過により分子量の大きさを活性物質を分離, 濃縮しようと試みた. 分画分子量 1,000, 5,000, 10,000, 30,000, 100,000, 200,000 の平膜型ダイアフロームメンブレンを使用して加圧型攪拌方式で SS の限外濾過を行った (データ未掲載). しかし, いずれの分画にも抗腫瘍活性は明確には認められなかった. これは, 活性物質の濾過膜への吸着, 他の高分子物質への吸着, 共存するリン酸緩衝液の濃度, pH によって透過性が著しく変動することも関係したと思われる.

次にゲル濾過カラムを用いて分子量の大きさを分画しようと試み, セファデックス G-100 カラムに SS を添加し PBS にて溶出を行った. その結果, 低分子量域に抗腫瘍活性を認めるものの, 素通り画分に強い活性が認められ明確に分離することができなかった (データ未掲載).

さらに陰イオンおよび陽イオン交換クロマトグラフィーを用いて活性物質の分離を試みた (データ未掲載). しかし, 両イオン交換クロマトグラフィーとも素通り画分に活性があり分離することができなかった. 即ち, 活性物質は陰イオンにも陽イオンにも吸着しない物質であることが示唆された.

以上の予備実験の結果, 活性物質は疎水性の強い物質ではないかと考え, これを精製する手段としてヒドロフォビッククロマトグラフィーを行った. まず, カラムに添加する試料を濃縮する目的で塩析を行った. 塩析は, 細胞組織の抽出液, 微生物や培養細胞の培養濾液などに含まれる酵素あるいは生理活性蛋白質の濃縮や分画に広く応用されている. 特に硫酸アンモニウムは, 溶解度が高い, 温度による溶解度の変化が少ない, 塩析効果が大い, 塩析による蛋白質などの変性がほとんどない, などの特徴を備えているので硫酸アンモニウム塩析を行った. SS を塩析させるための硫酸アンモニウムの至適飽和度を求めるため, 10%から80%飽和度までの種々の濃度で塩析を行った. その結果, 10%, 20%飽和画分では抗腫瘍活性を認めなかったが, 30%以上の飽和画分には活性が認められ, 70%飽和画分には SS 原液とほぼ等しい活性が認められた. 以上の結果に基づき 20%~70%飽和画分を次の精製段階のヒドロフォビッククロマトグラフィー (フェニールセファロース CL-4B カラムを使用) に供した.

ヒドロフォビッククロマトグラフィーは, 吸着体のもつ疎水性基と蛋白質などがもつ疎水性部位との間の疎水結合がその物質の種類ごとに異なることを利用して, 蛋白質を分離する方法である. 本実験ではカラムへの疎水結合を強くさせる目的

で 1M の硫酸アンモニウムで平衡化し, 溶出条件として硫酸アンモニウム加 PB 直接濃度勾配法およびエチレングリコール加 PB 直線濃度勾配法にて溶出を行った. 硫酸アンモニウム加 PB 直線濃度勾配法により硫酸アンモニウムの濃度を下げるに従い蛋白質が出現し, 濃度勾配終了後の PB による洗浄時に蛋白質溶出のピークが示され, このピークの肩の部分に細胞増殖抑制活性が認められた. この結果, この活性物質は比較的確水性の強い物質であることが示唆された.

次に, この活性画分について MW の大きさを分画しようと考へ, ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行った. しかし, この活性画分をそのままゲル濾過カラムに添加した場合, 溶出液にて活性画分が希釈されると考えられたため, 濃縮を行った. 濃縮の方法としては, 限外濾過法, 凍結乾燥法, 透析膜とポリエチレングリコールによる濃縮などがある. 限外濾過法は, 濃縮にはきわめてよい方法であるが, 今回の活性物質は, 先述の如く活性物質の分離・濃縮ができなかった. また, 凍結乾燥法による濃縮では, 濃縮乾燥物質が緩衝液に一部溶解しなかったり, 活性の低下を認めた. 透析膜とポリエチレングリコールによる濃縮は物質の活性を保持し, かつ変性させることも少なく比較的簡便である. 今回の活性物質は MW が比較的小さいので分画分子量 100 のセルロースエステルチューブスペクトラ/ポア CE を用いて濃縮した. 濃縮後の総活性は濃縮前と比較すると約 20% の低下がみられた. しかし, 濃縮試料自体は非常に活性が高いため, この方法で濃縮しゲル濾過カラムに添加することにした.

スーパーロース 6 ゲル濾過カラムクロマトグラフィーの成績では MW の非常に小さい画分 (MW 12,500 以下) に強い活性が認められたので, MW 1,000 から 300,000 の分画に優れたスーパーロース 12 を使用して分画した. 抗腫瘍活性ピークは fr37-42 に出現し, fr39 の活性が最も高かった. fr39 の溶出位置は約 1,300 であったことから, 本活性物質の MW は約 1,300 であると推察された.

細胞増殖抑制率, 殺細胞率による活性の正確な定量的測定には被験試料を段階的に希釈し, それぞれの活性を測定することが必要である. 本研究では被験試料原液についてのみ細胞増殖抑制率, 殺細胞率を測定したので, 各精製段階における精製度は正確には計算できなかった. しかしながら, 各精製段階における細胞増殖抑制率, 蛋白質質量から, 蛋白質当りの活性は SS 原液を 1 とした場合, 硫酸アンモニウム塩析画分では 1.2, ヒドロフォビッククロマトグラフィー fr28-38 では 5.0, スーパーロース 12 ゲル濾過カラムクロマトグラフィー fr39 では 81.0 と推定された. 即ち, 蛋白質当りの活性でみた場合, fr39 の抗腫瘍物質は SS 原液に較べ約 81 倍に精製されたと考えられた.

fr39 を部分精製抗腫瘍物質としてその物理化学的性状を検討した. セルロースチューブに対しては透過性であったが, 分画分子量 100 のセルロースエステルチューブスペクトラ/ポア CE に対しては非透過性であり, 本物質の MW は約 1,300 であるとの上述の成績を支持するものであった. また, トリプシン処理あるいはプロテイナーゼ K 処理によって蛋白質を分解, 消化し, 活性物質が蛋白質か否かを検討した. プロテイナーゼ K は, セリンプロテアーゼに分類され高い活性を有する安定なエンドペプチダーゼである. SS から分離した抗腫瘍活性物質をこれらの酵素で処理したところ活性にはほとんど変化がなかつ

た。以上の結果、および本研究で示された如く本物質が耐熱性であることから、活性物質は蛋白質ではないことが強く示唆された。有機溶媒に対する溶解性についても検討したが、クロロホルム、酢酸エチル、ブタノールに対して溶解しにくく、アセトンに対しては溶解性であった。つまり、有機溶媒に難溶性であることで、脂質を中心とした例えばリン脂質などではないことが示唆された。

また、核酸画分に活性物質が認められなかったことから、本物質は核酸ではないことが示唆された。

本抗腫瘍性物質は細胞増殖抑制活性、殺細胞活性を示すが、各精製段階、物理化学的性状試験における挙動から考えると、両活性は同一物質に担われており、小量では細胞増殖抑制活性、多量では殺細胞活性が現れるものと思われる。

FCM は、核 DNA に結合する蛍光材料を用いて細胞 1 個の DNA 相対量を知ることができ、細胞の増殖動態を正確かつ迅速に把握することが可能である。SS より分離した抗腫瘍活性物質について、この抗腫瘍活性物質が細胞周期のどの部分に作用しているかを把握するために FCM について検討した。その結果、高濃度の希釈液に対しては対照と比較して明かに S 期、G₂(+M) 期の細胞集積が認められた。高本⁵⁰⁾らは、FCM を用いて抗癌性抗生物質の培養細胞の細胞周期に及ぼす影響を検討して、抗癌性抗生物質は程度の差はあるが G₂ 期集積作用と細胞周期の進行停止作用を示すことを明かにした。本部分精製物質に関してもこれらと同様の作用機序が考えられる。

この抗腫瘍活性物質の本体および動物実験における効果についてはさらなる研究が必要であると考えられる。

結 論

口腔内から分離した嫌気性グラム陰性球菌の *V. parvula* KN-2 株の SS 中に存在する抗腫瘍活性物質を S-180 細胞に対する腫瘍細胞増殖抑制活性および殺細胞活性を指標に精製し、さらにその物理化学的性状についても検討し、次の結果を得た。

1. SS を精製する目的で硫酸アンモニウム塩析を行ったところ 20% から 70% 飽和の画分に活性物質が塩析された。

2. 1. の活性物質に対しフェニールセファロース CL-4B カラムを用いたハイドロフォエビッククロマトグラフィーを行った結果、リン酸緩衝液溶出画分 (fr28-38) に強い抗腫瘍活性が認められた。

3. 2. の活性画分を濃縮後、スーパーロース12カラムを用いゲル濾過を行った結果、MW 約1,300の画分に高い抗腫瘍活性がみられた。

4. 活性物質は、セルロースチューブに対しては透過性で、分画分子量100のセルロースエステルチューブスペクトラ/ポア CE に対しては非透過性であった。また、100℃の加熱に対しては安定であった。

5. 活性物質は、核酸画分には存在せず、トリプシン処理やプロテイナーゼ K 処理に対しては抵抗性を示した。

6. 有機溶媒に対する溶解性では、活性物質はクロロホルム、酢酸エチル、ブタノールに対して難溶性で、アセトンに対しては易溶性であった。

7. FCM を用いて S-180 細胞の細胞周期に対する影響を検討したところ S 期および G₂(+M) 期に細胞の集積が認められた。

以上の結果は、*V. parvula* KN-2 株の抗腫瘍性物質は約 1,300 の MW を有し、蛋白質や核酸以外の物質であり、かつ脂質を含んでいないことを示唆している。また、本物質は DNA 合成阻害活性を有していることを示している。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導を賜りました恩師、故玉井健三教授ならびに山本悦秀教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究にあたり御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました本学微生物学講座、中村信一教授に衷心より感謝の意を表します。さらに本研究に際し、直接御指導を賜りました本学微生物学講座、小倉壽助教授ならびに山川清孝講師、またフローサイトメーターの使用にあたり貴重な御助言を賜りました薬学部生物薬品化学教室、安田秀世助教授に心より感謝の意を表します。最後に、終始御指導を賜りました中川清昌助教授、松原完也博士をはじめ本研究にご協力いただきました歯科口腔外科講座ならびに微生物学講座の諸先生方に深く感謝致します。

文 献

- 1) Gratia, A. & Linz, R.: Le phénomène de shwartzman dans le sarcome du codaye. Comp. Rend. Soc. Biol., 108, 427-428 (1931).
- 2) Gardner, R. E., Bailey, H. & Hyde, R. R.: Hemorrhagic activity of toxin carbohydrate complexes from bacteria on a transplantable rat tumor. Am. J. Hyg., 2913, 1-14 (1939).
- 3) Jacobs, F. A.: Damage produced by a *Pseudomonas aeruginosa* fraction in Sarcoma 37. Cancer Res., 10, 227 (1950).
- 4) Ikawa, M., Koepfli, J. B., Mudd, S. G. & Niemann, C.: An agent from *E. coli* causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor: I. isolation and properties. J. Natl. Cancer Inst., 13, 157-166 (1952).
- 5) Mihich, E. & Neter, E.: Necrotizing effects of *Staphylococcus aureus* extract on mouse Sarcoma 180. Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 106, 97-101 (1961).
- 6) Murata, T., Arakawa, M., Sugiyama, Y., Inazu, Y., Hattori, Z., Suzuki, Y., Minakami, H., Nakahara, M. & Okazaki, H.: Oncolytic effect of *Proteus mirabilis* upon tumor bearing animal. Life Sci., 4, 1055-1067 (1965).
- 7) Okamoto, H., Shoin, S., Minami, M., Koshimura, S. & Shimizu, R.: A development in the study of anticancer activity of hemolytic streptococci, 9th Int. Cancer Congress-1966, 333 (1966).
- 8) Hata, T., Hoshino, M. & Umezawa, I.: Antitumor effect of bacterial extracts derived from cancer patients. 9th Int. Cancer Congress-1966, 338 (1966).
- 9) Lemonde, P. & Clode-Hyde, M.: Influence of Bacille Calmette-Guerin 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: 細菌による細胞障害反応 (CIR) の特異性—癌・細胞非癌細胞の CIR 反応の差 I. 医学と生物学, 74, 293-302 (1967).
- 11) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R.: Studies on the anticancer and streptolysin S-forming abilities of hemolytic streptococci. Jpn. J. Microbiol., 11, 323-336 (1967).

- 12) 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).
- 13) 泰 藤樹: 微生物領域からみた制癌. 医のあゆみ, 75, 695-700 (1969).
- 14) Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. & Williamson, B.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3666-3670 (1975).
- 15) 東 市郎, 谷尾吉郎, 山村雄一: 癌と BRM. 細菌菌体成分および関連物質 (漆崎一郎, 塚越 茂編), 第1版, 124-144頁, サイエンスフォーラム, 東京, 1982.
- 16) Halpen, B. N., Biozzi, G., Stiffel, C. & Mouton, D.: Inhibition of tumor growth by administration of killed *Corynebacterium parvum*. Nature, 212, 853-854 (1966).
- 17) 森 彬: ヒト骨髄中に存する嫌気性コリネバクテリウムの制癌性に関する研究. 福岡医誌, 63, 494-511 (1972).
- 18) Hattori, T. & Mori, A.: Antitumor activity of anaerobic *Corynebacterium* isolated from the human bone marrow. Gann, 64, 15-27 (1973).
- 19) 原田達司, 峠 哲哉, 妹尾紀具, 服部孝雄: 嫌気性コリネバクテリウムの抗腫瘍性に関する実験的研究—マクロファージの腫瘍細胞増殖におよぼす影響について. 医のあゆみ, 98, 658-660 (1976).
- 20) 服部孝雄, 峠 哲哉, 山県司政, 原田達司, 池田 宏: 嫌気性コリネによる免疫療法. 癌の臨, 24, 421-427 (1978).
- 21) Möse, J. R. & 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).
- 22) Gericke, D. & 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).
- 23) Kayser, D.: Über den Mechanismus der Abtötung von Ascites-Krebszellen durch *Clostridium butyricum*. Z. Naturforsch., 18, 748-752 (1963).
- 24) Asano, M., Karasawa, E. & Takayama, T.: Antitumor activity of *Lactobacillus casei* (LC9018) against experimental mouse bladder tumor (MBT-2). J. Urol., 136, 719-721 (1987).
- 25) Shimizu, T., Nomoto, K., Yokokura, T. & Mutai, M.: Role of colony-stimulating activity of *Lactobacillus casei* in mice. J. Leukocyte Biol., 42, 204-212 (1987).
- 26) Tamai, K., Nakao, J., Takematu, K. & Nakagawa, K.: Studies on the antitumor activity of *Fusobacterium nucleatum* strain KO-31. Microbiol., 26, 163-165 (1982).
- 27) Tamai, K., Nakao, J., Nakagawa, K., Watanabe, K., Sakashita, H., Nishiwaki, Y. & Nakashin, T.: Antitumor activity in the culture supernatant fluid of *Fusobacterium nucleatum* strain KO-31. Jpn. J. Exp. Med., 53, 251-256 (1983).
- 28) Tamai, K., Watanabe, K. & Maeda, T.: Antitumor activity of sediment fractions from *Fusobacterium nucleatum* culture supernatant. Jpn. J. Exp. Med., 54, 159-170 (1984).
- 29) 坂下英明: *Peptococcus magnus* の抗腫瘍活性に関する研究. 十全医会誌, 93, 147-158 (1984).
- 30) 天野恵夫: 口腔内細菌特に *Lactobacillus casei* 0123株抽出液の細胞増殖およびウイルス増殖への影響. 十全医会誌, 94, 1155-1168 (1985).
- 31) 中川清昌: *Veillonella* の抗腫瘍性に関する研究. 十全医会誌, 93, 587-598 (1984).
- 32) 八木茂夫: *Veillonella alcalescens* の抗腫瘍性に関する実験的研究. 十全医会誌, 96, 497-509 (1987).
- 33) 松原完也: *Veillonella parvula* KN-2 株の抗腫瘍活性に関する研究. 十全医会誌, 98, 1152-1167 (1989).
- 34) 文部省「がん特別研究」総括班: 日本で維持されている可移植性腫瘍株一覧表. 第8回 (昭和61年度調査), 9-21頁, 1987.
- 35) 三輪史朗: 細胞学的検査. 臨床検査法提要 (金井正光編), 第29版, 234-235頁, 金原出版, 東京, 1987.
- 36) Krishan, A.: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. J. Cell Biol., 66, 188-193 (1975).
- 37) Busch, W.: Verhandlungen arztlicher Gesellschaft. Berlin. Klin. Wochenschr., 5, 137-138 (1868).
- 38) Fehleisen: Ueber die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Uebertragbarkeit auf den Menschen. Dtsch. Med. Wochenschr., 8, 553-554 (1882).
- 39) Coley, W. B.: Contribution to knowledge of sarcoma. Ann. Surg., 14, 199-220 (1891).
- 40) Fisher, B., Wolmark, N. & Coley, J.: Effect of *Corynebacterium parvum* on cytotoxicity of regional and nonregional lymph node cells from animals with tumors present or removed. J. Natl. Cancer Inst., 53, 1793-1801 (1974).
- 41) Scott, M. T.: *Corynebacterium parvum* as a therapeutic antitumor agent in mice, II. Local injection. J. Natl. Cancer Inst., 53, 861-865 (1974).
- 42) Parker, R. C., Plummer, H. C., Siebenmann, C. O. & Chapmon, M. G.: Effect of histolytic infection and toxin on transplantable mouse tumors. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 66, 461-467 (1947).
- 43) Möse, J. R.: Zur Beeinflussbarkeit verschiedener Tiertumoren durch einen apathohonen clostridien Stamm. Z. Krebsforsch., 63, 447-455 (1959).
- 44) 西脇幸博: *Fusobacterium nucleatum* KO-31 の腫瘍細胞障害作用に関する実験的研究. 十全医会誌, 94, 139-172 (1985).
- 45) 藤元栄輔: *Fusobacterium nucleatum* KO-31 標品 (TFT-310) の腫瘍壊死因子産生に関する実験的研究. 十全医会誌, 95, 191-203 (1986).
- 46) 中新敏彦, 松原完也, 加藤隆三, 織田武吉, 中川清昌: *Fusobacterium nucleatum* KO-31 の培養上清から抽出した抗腫瘍物質 (TFT-310) の作用機序に関する研究. 嫌気性菌感染症研, 18, 136-153 (1988).
- 47) 室木俊美: 歯性上顎洞炎における細菌学および抗生物質の洞粘膜への動態に関する薬理学的研究. 十全医会誌, 97,

134-148 (1988).

48) 加藤隆三: 口腔内分離菌 *Propionibacterium acnes* KT-28 株の抗腫瘍性に関する研究. 十全医会誌, 98, 879-896 (1989).

49) 加藤一栄: *Eubacterium lentum* ATCC 25559 株の抗腫瘍

性に関する研究. 十全医会誌, 100, 989-1003 (1991).

50) 高本 滋, 太田和雄: 抗癌性抗生物質の細胞回転におよぼす影響—Flow microfluorometry 分析による—. 癌と化療, 6, 59-70 (1979).

Purification and Characterization of an Anti-tumor Substance from *Veillonella parvula* Strain KN-2 Toshihito Baba, Department of Dent-Oral Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 101, 547—556 (1992)

Key words anti-tumor activity, growth inhibitory activity, cell killing activity, partial purification, *Veillonella parvula*

Abstract

An anti-tumor substance was purified from the supernatant of sonicated cells (SS) of the *Veillonella parvula* (*V. parvula*) strain KN-2, an isolate from a gingival abscess, by monitoring both growth-inhibitory activity and cell killing activity on Sarcoma 180 (S-180) cells. Physico-chemical properties of the substance were characterized. Ammonium sulfate precipitation of SS was carried out in order to concentrate the anti-tumor substance and remove impurities as much as possible. The substance was precipitated between 20% and 70% saturation of ammonium sulfate. This precipitate was subjected to hydrophobic chromatography using a Phenyl Sepharose CL-4B column. High growth-inhibitory activity was detected between fraction numbers 28 and 38 (fr 28-38) eluted by phosphate buffer. The fraction was concentrated 10 times by cellulose ester tubing Spectra/Por CE (molecular weight 100 cut-off) and applied to a Superose 12 column, which is efficient for the separation of substances with a molecular weight of between 1,000 and 300,000. High activities of both growth inhibition and cell killing were observed in a fraction (fr 39-40); molecular weight of this position was about 1,300. The anti-tumor substance in the fraction, partially purified substance, was characterized physicochemically. This substance was permeable through a cellulose tubing but not through cellulose ester tubing Spectra/Por CE, and was stable when heated to 100 °C. Both growth-inhibitory and cell killing activities of the substance did not show any sensitivity to trypsin or proteinase K treatment. These activities were extremely low in nucleic acid fraction. This substance was soluble in acetone but insoluble in chloroform, ethyl acetate and butanol. Analysis of the cell cycle by flow cytometry revealed that the ratio of phase S or phase G2 (+M) was higher in comparison with each in the control. These results suggest that the anti-tumor substance from *V. parvula* strain KN-2, which may inhibit DNA synthesis, is neither protein nor nucleic acid and does not contain lipid, and that its molecular weight is about 1,300.