

Studies on Anti-tumor Activity of Stphylococcus epidermidis

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/2297/8308

表皮ブドウ球菌の抗腫瘍活性に関する研究

金沢大学医学部整形外科講座 (主任: 富田勝郎教授)

土 田 敏 典

(平成4年1月18日受付)

著者は、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*, *S. epidermidis*) 感染症を併発した後、転移病巣が消失した Ewing 肉腫の1症例を経験した。それ故、その患者から分離した *S. epidermidis* 菌株の担癌マウスに対する抗腫瘍活性および培養細胞に対する細胞増殖抑制活性を、サルコーマ-180 (Sarcoma 180, S-180), マウス骨肉腫 (mouse osteogenic sarcoma POS-1, POS-1), ヒト骨肉腫 (human osteogenic sarcoma Takase, OST) 細胞を用いた検討した。*S. epidermidis* 菌株の菌体を Braun の細胞破砕器により破砕し、遠心により粗細胞壁成分 (crude cell wall, CCW) および菌体内内容物 (cell extract, CE) に分画し、前者に対し更に核酸分解酵素処理を行い、部分精製細胞壁成分 (partially purified cell wall, PCW) を作製した。抗腫瘍活性を、菌体成分投与群マウスの対象群マウスに対する腫瘍重量比で評価した時、S-180 細胞に対しては CCW と CE, POS-1 細胞に対しては CE が明らかな抗腫瘍効果を示したが、OST 細胞にはいずれの標品も抗腫瘍効果を示さなかった。病理組織学的所見上、CE を投与したマウスの腫瘍部に明らかなリンパ球の浸潤は認められず、対照群と差異はなかった。S-180 細胞に対する増殖抑制活性は、CE 添加後培養 1, 2, 3 日目に総細胞数と生細胞数をトリパンブルー色素排除能テストを用いて検討した。CE は S-180 細胞に対して、濃度依存性に細胞増殖抑制活性を示し、2.7mg蛋白/ml の時細胞の増殖は完全に抑制された。相対生細胞数は CE 濃度の増加と共に減少し、5.4mg蛋白/ml の時、培養3日目には3.7%を示したにすぎなかった。POS-1, OST 細胞に対しては、コロニー形成アッセイ法にて検討した。CE は POS-1 細胞に対してのみ増殖抑制活性を示した。その作用は濃度依存性かつ時間依存性であり、0.2mg蛋白/ml の濃度で4日間培養した時、コロニーの形成はほとんど完全に抑制された。³H-チミジンの細胞への取り組みの減少は、細胞への CE 添加数時間後から見られ、4日間の培養期間中継続した。CE による³H-チミジンの取り込みの減少も濃度依存性であり、CE 濃度0.2mg蛋白/ml の時、培養6時間後の相対³H-チミジン取り込み量は0.46にすぎなかった。これらのことから DNA 合成阻害が CE の抗腫瘍活性に重要な役割を演じていることが示唆された。CE の核酸抽出成分、加熱処理およびトリプシン処理 CE には細胞増殖抑制活性は認めなかった。スーパーコース-6カラムクロマトグラフィーにて検討したところ、分子量20,000~300,000の分画中に細胞増殖抑制物質の存在を認めた。以上の結果から、*S. epidermidis* の CE 中には直接的抗腫瘍活性を有する蛋白性物質が存在する事を示唆した。

Key words anti-tumor activity, sarcoma cells, *Staphylococcus epidermidis*

丹毒を合併した肉腫患者で特に腫瘍の縮小や消失が認められた¹⁾ことから、*Streptococcus pyogenes* (*Str. pyogenes*) の抗腫瘍活性について種々研究がなされ、本菌製剤が臨床応用されるに至っている²⁾。*Sty. pyogenes* に関する研究が契機となり、他の細菌についても抗腫瘍活性が検討され *Mycobacterium bovis*, *Propionibacterium acnes* 等が抗腫瘍活性を有している事が報告されている^{3,4)}。これら細菌由来の抗腫瘍活性物質の多くは宿主介在性に作用を発揮するものであり、その多くは細胞表層部に局在していることが明らかにされている⁵⁾。グラム陽性菌では細胞壁成分であるリポタイコ酸およびペプチドグリカンが抗腫瘍活性を担っていると考えられている。これらの細胞壁成分は広範な生物学的作用を有する事が明らかになってきており、生体に対する作用としては体液性および細胞性免疫を強化する作用が知られている⁶⁾。

このような微生物による抗腫瘍作用の報告が多くなされてい

るが、表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*, *S. epidermidis*) に関する研究は少ない⁷⁾。Ohshima ら⁸⁾は、*S. epidermidis* 中の細胞表面物質の抗腫瘍活性をサルコーマ L-1 細胞を用いた動物実験により検討し、細胞表面物質が肺の腫瘍コロニー数を減少させることを見出した。その作用機序として、免疫系を介した生物応答修飾作用が考えられている。

著者らは、原発巣手術部に *S. epidermidis* 感染症を併発した後、転移病巣が消失し長期生存している Ewing 肉腫の1例を経験した⁹⁾。このことは、*S. epidermidis* 感染症に由来した抗腫瘍活性の可能性を示唆した。この事実に基づき、著者は本研究において *S. epidermidis* の抗腫瘍活性を検討した。

材料および方法

1. *S. epidermidis* 菌体からの各種成分の調整

1. 使用菌株および培養法

Abbreviations: CCW, crude cell wall; CE, cell extract; CIAA, chloroform-isoamylalcohol mixture; CSS, cell surface substance; OST 細胞, human osteogenic sarcoma Takase cells; PBS, phosphate-buffered saline; PCW, partially purified cell wall; POS-1 細胞, mouse osteogenic sarcoma POS-1 cells; S-180 細胞, Sarcoma

上述の Ewing 肉腫患者⁹⁾から分離した *S. epidermidis* 菌株を実験に使用した。

斜面培地で保存してある本菌株を寒天培地に移植し、37℃で24時間培養後、1白金耳をトリプティック・ソイ・ブローズ (Difco, Detroit, USA) 10ml に移植し、37℃・24時間培養した。それをさらにトリプティック・ソイ・ブローズ5,000ml に移植し、37℃・24時間攪拌培養した。

2. 菌体成分の分量

菌体の破壊・分離方法は、小谷ら¹⁰⁾のグラム陽性細菌の分離方法に準じて行った。先に得られた培養液5,000mlを、4℃にて8,000×gで15分間遠心することにより菌体を集めた。集めた菌体に5倍容量の蒸留水を加え、攪拌して再浮遊させてから10,000×gで30分間遠心した。上清液を捨てて沈渣を蒸留水に再浮遊して遠心する洗浄操作を計10回繰り返したのち、最終の遠心沈渣を-20℃で凍結保存した。凍結菌体を4℃で一晩放置し融解させた後、蒸留水を加えて全量を湿菌重量の4倍容量とし、4℃で一晩攪拌してできる限り均質な浮遊液とした。均質化した菌浮遊液の20mlを75ml容量の振盪用瓶 (B. Braun, Melsungen, FRG) に入れ、直径0.10~0.11mmのガラスビーズを30g加え、ガラス栓をし、付属のゴムバンドをかけ、グリースをつけ密栓した瓶を攪拌し、炭酸ガス噴霧下でブラウン・セル・ホモジナイザー (Braun cell homogeniser) (B. Braun) で、4,000rpm・1.5分間回転を2回、計3分間処理した (この操作で顕微鏡視にて輪郭が明瞭な菌はなくなった)。得られた菌破壊液とガラスビーズを、グラスフィルター3G3 (ハリオ、東京) で濾過しガラスビーズを除去した。10,000×gで30分間遠心し、沈渣と上清に分離した。沈渣に対し、自己融解酵素を不活化するため、90℃で15分間加熱処理した。蒸留水で洗浄した後、10,000×gで30分間遠心し、沈渣を粗細胞壁成分 (crude cell wall, CCW) とし、凍結乾燥した。使用時に凍結乾燥 CCW を1/15M 磷酸緩衝生理食塩水 (pH 7.0) (phosphate-buffered saline, PBS) に懸濁した。

凍結菌体を PBS で溶解し、上記同様の操作で得られた上清を、異物濾過フィルター (マイクレス GV) (日本ミリポア、山形) で濾過し、菌体内内容物 (cell extract, CE) とした。CE 原液の蛋白濃度は、22mg 蛋白/ml であった。

遠心洗浄で得られた CCW 懸濁液に、デオキシリボスクレアーゼおよびリボスクレアーゼ (Sigma, St. Louis, USA) をいずれも終末濃度が 0.01mg/ml となるように加え、マグネチック・スターラーで攪拌しながら37℃の温浴中で2時間作用させた。酵素処理後の菌液を4℃で450×gで20分間遠心し、細胞壁を含む上清と沈渣に分離した。上清の一部についてグラム染色を行って非破壊菌体の混入がない事を確認した上、4,000×gで60分間遠心して細胞壁を沈渣として集めた。上清液を4,000×gで60分間再遠心し、第1回の遠心の際に上清液に逃した細胞壁を沈澱させた。第1回および第2回の沈渣を130mlの蒸留水に浮遊し、十分攪拌混和した後8,000×gで30分間遠心した。沈渣を130mlの蒸留水に再浮遊して8,000×gで30分間遠心して洗う操作を、洗浄液の波長260nmおよび280nmにおける吸光度が低値となり、かつほぼ一定の値を示すようになるまで繰り返した。最終の沈渣を少量の蒸留水に浮遊

させて凍結乾燥した。これを部分精製細胞壁成分 (partially purified cell wall, PCW) として使用した。これらの菌体成分の希釈には PBS を用いた。

II. マウス固形腫瘍における抗腫瘍活性の測定

1. 実験動物

実験動物は、5週齢の ICR 系マウス (体重 22~25g) (日本チャールズ・リバー、厚木)、および5週齢の BALB/c nu/nu マウス (体重 19~21g) (日本チャールズ・リバー) を使用した。

2. 腫瘍細胞

マウス腹腔内で継代培養している浮遊細胞であるサルコーマ180細胞 (Sarcoma 180 cell, S-180 細胞)¹²⁾¹³⁾ および、培養フラスコ内で継代培養している固形細胞である神奈川県がんセンターより供与されたマウス骨肉腫細胞 (mouse osteogenic sarcoma POS-1, POS-1 細胞)、当教室で樹立し継代してきたヒト骨肉腫由来細胞 (human osteogenic sarcoma Takase, OST 細胞)¹⁴⁾ を用いた。

3. 担癌マウスの作成および菌体成分の投与方法

S-180 細胞の移植には ICR 系マウス、POS-1 細胞、OST 細胞には BALB/c nu/nu マウスを使用した。マウスの背部皮下に腫瘍細胞浮遊液 (S-180 細胞, 5×10^7 /ml; POS-1 細胞, 1×10^6 /ml; OST 細胞, 1×10^6 /ml) 0.1ml を移植した。腫瘍細胞移植後、腫瘍長径が5mm以上になった時点で、マウス腹腔内に、CCW (1.0mg/ml)、PCW (1.0mg/ml)、CE (10.0mg蛋白/ml)、各液0.2mlを1日1回、1週間連日投与した。

4. 抗腫瘍活性の判定

抗腫瘍活性の判定には、S-180 細胞群では各8匹、POS-1 および OST 細胞群では各4匹のマウスを用い、腫瘍細胞移植後69日目まで観察した。但し OST 細胞に関しては136日目まで観察した。

1) 腫瘍重量による判定

腫瘍細胞移植後、投与後3日目から、Battelle Columbus Laboratories Protocol¹⁵⁾ に従い、即ち $1/2 \times (\text{長径 cm}) \times (\text{短径 cm})^2$ で求めた推定腫瘍重量 (g) を対照群と投与群とで比較検討し効果判定を行った。なお腫瘍重量は3日毎に測定した。

3) 生存日数による判定

腫瘍細胞を移植した日からの生存日数により抗腫瘍活性を判定する場合、平均生存日数 (平均値±標準偏差, mean±standard deviation [SD]) の処置群 (T) と対照群 (C) との比、すなわち T/C (%) を $(T/C) \times 100$ の計算式によって求めて判定した¹⁶⁾。

5. 病理組織学的観察

S-180 細胞移植実験においてマウス死亡後に背部皮下に形成された固形腫瘍を十分に周囲組織を含めて摘出した。摘出物は、10%ホルマリンで固定し、標本を作成し、常法¹⁷⁾ に従いヘマトキシリン-エオジン染色を行った後、光学顕微鏡下に観察した。

III. 培養細胞における増殖抑制活性の測定

1. 使用細胞および培養法

S-180, POS-1, OST 細胞を用いた。これらの細胞の培養には、10%牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, New York, USA)・1%ペニシリン・ストレプトマイシン液

180 cells; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus*; SCP, streptococcal cytotoxic protein; *S. epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis*; *Str. pyogenes*, *Streptococcus pyogenes*

(Gibco) 加 RPMI1640 培地 (日本製薬, 東京) を用いた。

2. 細胞数の測定による増殖抑制効果の検定

96穴マイクロプレート (Nunc, Illinois, USA) の各穴に S-180 細胞浮遊液 (4.0×10^5 /ml) 0.1ml を注入後, 各濃度に調整した CE 0.1ml を加えた。1, 2, 3 日間培養後に各穴より 0.1ml 採取し, 0.2% トリパンプル-0.1ml で染色を行った後, チェルク血球計算板 (エルマ, 東京) を用い, 顕微鏡下で総細胞数および生細胞数を測定した。

3. コロニー形成アッセイ法による細胞増殖抑制効果の検討

各細胞の平板効率 (POS-1, 43.7%; OST, 42.7%) を考慮にいれ, 1 デッシュあたり上記培養液 5ml 中に POS-1, OST 細胞とも 400 個の生細胞を播種した。CE を培養液で各濃度に調整したものを加え, 1, 2, 3, 4, 5, 6 日間培養した。各培養時間後, PBS で洗浄を行い, 新しい培養液を加え, 8~12 日間 (1~3mm の直径のコロニーが形成されるまで) 培養した。培養は 37°C, 7.0% CO₂, 水蒸気飽和状態で行った。培養後エタノール固定, ギムザ染色を行い, コロニー数を算定した。各 CE 処理時間群におけるコロニー数と対照群との比を, 相対コロニー数 (relative number of colonies) (%) とし, 効果判定を行った。

4. 培養細胞の DNA 合成に関する CE の効果

POS-1 細胞の DNA 合成に対する CE の効果についての ³H-チミジンの細胞内への取り組み実験を以下の如く行った。

25mm² の組織培養フラスコ中で培養している対数増殖期にある POS-1 細胞に, ¹⁴C-チミジン (東宝バイオケミカル, 東京) 0.01 μCi/ml を加えて 3 日間前標識した。トリプシン (Sigma) 処理後, 直径 25mm のカバースリップ (三光純薬, 東京) を設置した直径 35mm のペトリ皿 (Becton Dickinson, Oxnard, USA) に 1×10^6 個ずつ播種し, 各濃度に調整した CE を添加し, 0, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 98 時間後にそれぞれ ³H-チミジン (東宝バイオケミカル) 5 μCi/ml で 30 分間パルス標識を行った。カバースリップを取り出し, 100% エタノールで固定し, 5% 過塩素酸 (perchloric acid) で洗浄後, 70% エタノールで洗浄し乾燥した後, バイアルに入れた。次いでトル

エンシンチレーター液 (アマシャム・ジャパン, 東京) を各バイアルに 5ml ずつ分注し, 液体シンチレーションカウンター LSC3100 (アロカ, 東京) で放射活性を測定した。各カバースリップにおける ³H-チミジン活性と ¹⁴C-チミジン活性の比 (³H-チミジン/¹⁴C-チミジン) を求め, 相対 ³H-チミジン取り組み量 (relative ³H-thymidine uptake) とした。対照群と CE 接触群とで比較検討し効果判定を行った。

5. CE からの核酸抽出

最終濃度 0.2mg 蛋白/ml の CE に, 1/2 容量のフェノールと 1/2 容量のクロロフォルム・イソアミルアルコール混合液 (chloroform: isoamyl alcohol=24:1: chloroform-isoamylalcohol mixture, CIAA) および 1/100 容量の 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) を加え, 乳濁化するまで振盪し, 12,000 × g で 5 分間遠心し, 上層の水様部分を採取した。同様の操作を 3 回繰り返した後, 同量のフェノールおよび CIAA を加え, 乳濁化するまで振盪し, 12,000 × g で 5 分間遠心し, 上層の水様部分を採取した。1/10 容量の 5 M の NaCl と 2 倍容量のエタノールを加え, 振盪し, -30°C で一夜放置し, 12,000 × g で 5 分間遠心し, 上清と沈渣とに分離した。沈渣に対し, 70% エタノールで洗浄し, 12,000 × g で 5 分間遠心し, 上清を除去した後に乾燥し, 元の量の PBS を加えた。これを CE の核酸抽出成分とした。この細胞増殖抑制活性を, POS-1 細胞を用いてコロニー形成アッセイ法に従い測定した。

6. CE の熱安定性試験

0.2mg 蛋白/ml 濃度の CE を, 56°C にて 1, 2, 5, 10, 30, 60 分間, およそ 100°C にて 1, 2, 10 分間加熱した。加熱後, それぞれの CE について, その細胞増殖抑制活性を, POS-1 細胞を用いてコロニー形成アッセイ法に従い測定した。

7. CE のトリプシン処理

0.2mg 蛋白/ml 濃度の CE を, 1/2 容量のトリプシン液 (10mg/ml) (trypsin type III) (Sigma) を混合し, 37°C にて 60 分間インキュベーションを行った後, 1/2 容量のトリプシンインヒビター液 (10mg/ml) (trypsin inhibitor from Soybean) (Sigma) を加えトリプシン活性を阻止した。このトリプシン処

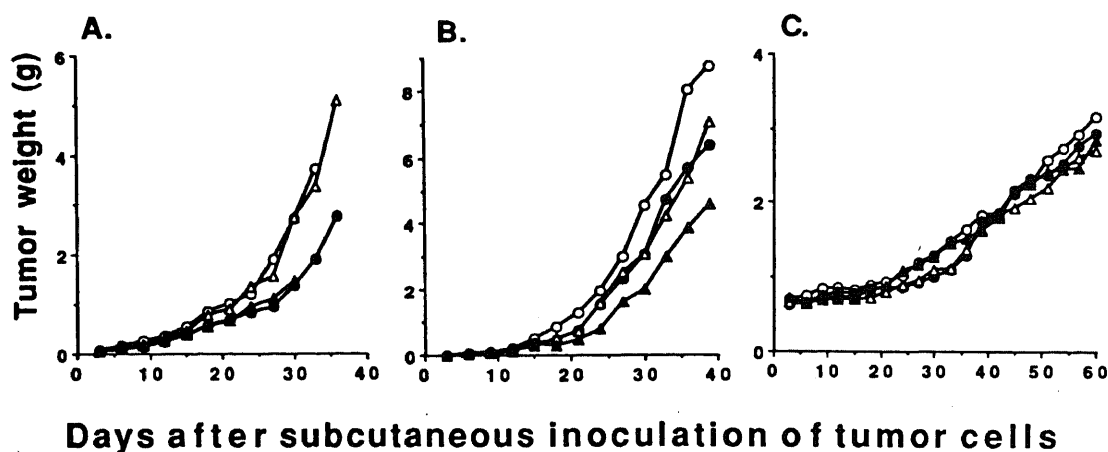


Fig. 1. Effect of *S. epidermidis* preparations on the tumor growth in mice injected with S-180 (A), POS-1(B), or OST (C) cells. ○, control; ●, crude cell wall (CCW); △, partially purified cell wall (PCW); ▲, cell extract (CE). A. 0.1ml volume of tumor cell suspension (S-180, 5×10^6 cells; POS-1, 1×10^5 cells; OST, 1×10^7 cells) was inoculated subcutaneously into the back of the mice. Injection into mouse peritoneum of a 0.2ml volume of *S. epidermidis* preparation (CCW and PCW, 0.2mg; CE, 2mg-protein) was began 2 days after the tumor cell inoculation and repeated daily during 1 week. Four to eight mice were used for each experiment.

理後の CE の細胞増殖抑制活性を, POS-1 細胞を用いてコロニー形成アッセイ法に従い測定した。

8. CE の高速液体クロマトグラフィーによる解析

高速液体クロマトグラフィー FPLC (fast protein liquid chromatography) (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用い, CE を解析した。カラムはスーパーコース-6 (superose-6) (Pharmacia) を使用した。各画分について, その細胞増殖抑制活性を, POS-1 細胞を用いてコロニー形成アッセイ法に従い測定した。

9. 蛋白定量の測定

Lowry 法¹⁸⁾ に従って蛋白濃度を測定した。

10. 統計学的検討

二群の平均値の差の検定には, Student の t 検定を用い, $p < 0.05$ を有意とした。

成 績

1. マウス固形腫瘍における抗腫瘍活性

1. 腫瘍重量による判定

S-180 細胞移植実験では, 対照群と処置群間の腫瘍重量の差

Table 1. Antitumor activity of *S. epidermidis* preparations for the survival of tumore-bearing mice inoculated with three different tumor cells

Tumor cell inoculated ^{a)}	Preparation injected ^{b)}	Mean survival days ^{c)} (mean±SD)	T/C (%) ^{d)}
S-180	CCW	47.0±11.5	151.6
	PCW	26.2± 1.4	84.5
	CE	32.1± 9.7	103.5
	Saline (control)	31.0± 4.9	
POS-1	CCW	49.5± 7.1	130.3
	PCW	52.3± 9.7	137.6
	CE	42.5±17.0	111.8
	Saline (control)	38.0±12.9	
OST	CCW	100.6±33.3	114.3
	PCW	80.2± 8.6	91.1
	CE	97.8±20.1	111.1
	Saline (control)	88.0±12.0	

a) S-180, Sarcoma 180; POS-1, mouse osteogenic sarcoma POS-1; OST, human osteogenic sarcoma Takase.

b) CCW, crude cell wall; PCW, partially purified cell wall; CE, cell extract.

c) Evaluation was performed on 60, 60 and 100 days after inoculation of S-180, POS-1 or OST cells into mice, respectively.

d) (Mean survival days of treated group/mean survival days of control group)×100

* $p < 0.05$, by Student's t-test

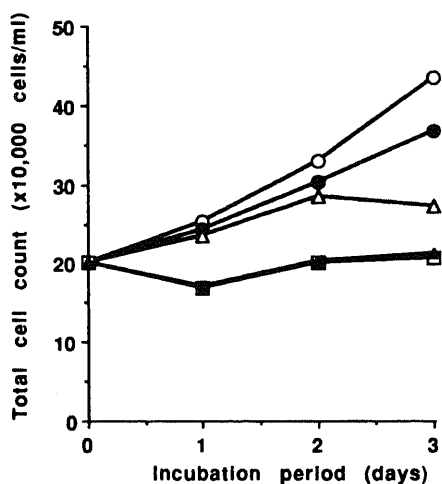


Fig. 2. Effect of CE on the growth of S-180 cells. Concentrations of CE (mg-protein/ml): ○, 0 (control); ●, 0.08; △, 1.4; ▲, 2.7; □, 5.4.

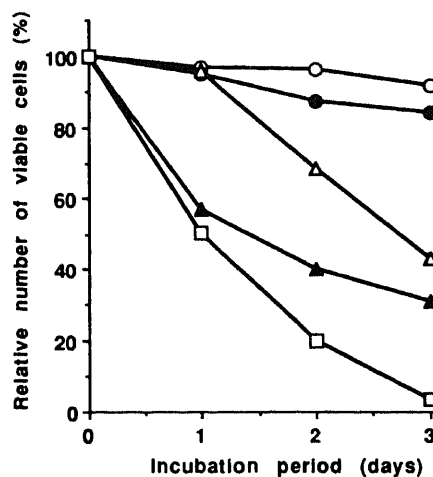


Fig. 3. Effect of CE on the growth of S-180 cells in relation to the viability of cells. Relative number of viable cells (%)=(Number of viable cells/number of total cells)×100. Concentrations of CE (mg-protein/ml): ○, 0 (control); ●, 0.08; △, 1.4; ▲, 2.7; □, 5.4.

異は、12日目までは認められなかったが、その後、経的にその差異は大きくなった(図1-A)。30日目の観察では対照群、CCW, PCW, CE 投与群の腫瘍重量の平均値はそれぞれ2.7, 1.4, 2.7, 1.5gであり、対象群との腫瘍重量比はCCW, PCW, CE 投与群各々51.9, 100.0, 55.6%であり、CCW, CE 投与群に強い増殖抑制効果が認められた。

POS-1 細胞においても S-180 細胞移植実験と同様、対照群と処置群間の腫瘍重量の差異は、12日目までは認められなかったが、その後、経的にその差異は拡大した(図1-B)。36日目の観察では対照群、CCW, PCW, CE 投与群の腫瘍重量の平均値はそれぞれ8.1, 5.7, 5.4, 3.9gであり、対象群との腫瘍重量比はCCW, PCW, CE 投与群各々70.4, 66.7, 48.1%であり、CE 投与群に強い腫瘍の増殖抑制効果が認められた。

OST 細胞においては、60日目の観察においても、対象群、CCW, PCW, CE 投与群の腫瘍重量の平均値はそれぞれ3.2, 2.9, 2.7, 2.8gであり、対象群との腫瘍重量比はCCW, PCW, CE 投与群各々90.6, 84.4, 87.5%であり、いずれの処置群においても明確な増殖抑制効果は認められなかった(図1-C)。

2. 生存日数による判定

S-180 細胞移植実験においては、対照群でマウスの腫瘍死は23日目から出現し、35日目までに被験8匹全てが腫瘍死した。CCW 投与群では8匹中、各々1匹が30, 36, 37, 42, 51日目に、3匹が60日目に死亡した。T/Cは151.6%を示し、延命効果が認められた(表1)。PCW, CE 投与群では、マウスの腫瘍死は各々20, 19日目から出現し、各々33, 44日目までに全てのマウスは腫瘍死した。PCW, CE 投与群のT/Cはそれぞれ84.5, 103.5%であり、延命効果は認められなかった。

POS-1 細胞移植実験においては、対照群でマウスの腫瘍死は18日目から出現し、47日目まで全てのマウスは腫瘍死した。CCW, PCW 投与群ではマウスの腫瘍死は各々42, 40日目から始まり、各々58日目, 67日目までに全てのマウスは腫瘍死した。T/Cはそれぞれ130.3, 137.6%を示し、延命効果が認められた。CE 投与群では腫瘍死は23日目から始まり、53日目に全てが腫瘍死した。T/Cは111.8%であり、延命効果が認められなかった。

OST 細胞移植実験においては、対照群でマウスの腫瘍死は

73日目から出現し、104日目まで全てのマウスは腫瘍死した。CCW, PCW, CE 投与群ではマウスの腫瘍死はそれぞれ69, 64, 80日目から始まり、各々146, 88, 136日目まで全てのマウスは腫瘍死した。CCW, PCW, CE 投与群のT/Cはそれぞれ114.3, 91.1, 111.1%を示し、延命効果は認められなかった。

3. 病理組織学的所見

S-180 細胞を移植後 CE を投与した群と投与しない群との腫瘍組織を病理組織学的に観察したが、組織学的には明らかな差異を認めず、また腫瘍周辺組織にはリンパ球の明らかに浸潤を認めなかった。これらの事から、CE の抗腫瘍効果は宿主の免疫系を介するものではなく、むしろ腫瘍細胞への直接作用によるものであることが強く示唆された。

以上の結果、CE は延命効果は弱かったものの、腫瘍の増殖抑制効果が強く、かつ腫瘍細胞に対し直接作用を有する事が考えられたので、以下 CE について更に検討を進めた。

II. 培養細胞における増殖抑制活性

浮遊細胞系である S-180 細胞については、細胞数の測定、固形腫瘍系である POS-1, OST 細胞についてはコロニー形成アッセイ法により検討した。

1. 細胞数の測定による S-180 細胞に対する CE の増殖抑制効果の検討

1) 総細胞数の変動

0.08mg蛋白/ml の添加で既に細胞増殖の抑制がみられ、CE 濃度の増加と共に細胞増殖の抑制が増強された(図2)。CE 濃度が2.7mg蛋白/ml 以上の時、3日間の観察中細胞数の増加を認めなかった。

2) 生細胞数の変動

添加 CE 濃度の増加と共に生細胞数の総細胞数に対する比(相対生細胞数)は著しく減少した(図3)。総細胞数の増加をほぼ完全に抑制する2.7mg蛋白/ml の時、相対生細胞数は培養1日目で57.1%、3日目で30.8%の値を示した。更にその倍量(5.4mg蛋白/ml)の時、相対生細胞数は培養1日目では2.7mg蛋白/ml の場合とほぼ等しい値(50.2%)を示したが、培養3日目では3.7%となった。

2. コロニー形成アッセイ法による CE の細胞増殖抑制活性の検討

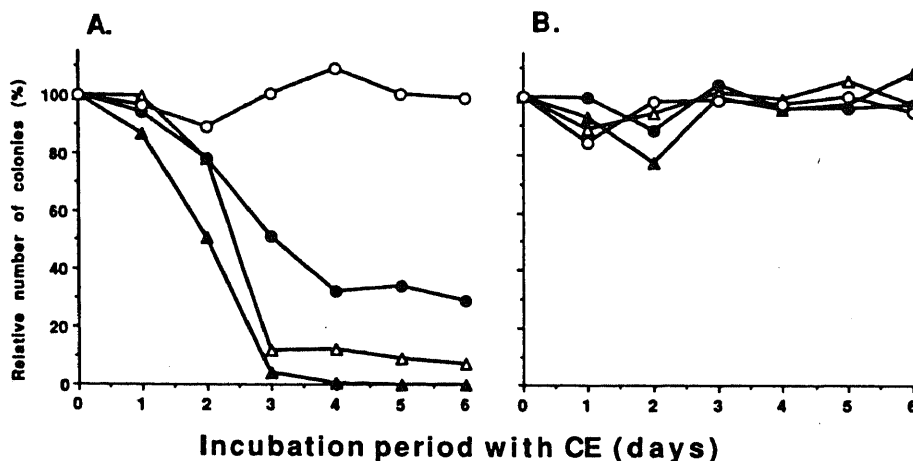


Fig. 4. Effect of CE on the growth of POS-1 (A) and OST (B) cells. Concentrations of CE (mg-protein/ml): ○, 0.03; ●, 0.05; △, 0.1; ▲, 0.2.

POS-1 細胞においては CE 濃度が 0.05, 0.1mg 蛋白/ml では CE を加えた培養時間が 3 日以上の時, 0.2mg 蛋白/ml では 2 日目で, CE 添加培養時のコロニー数の CE 未添加培養時のコロニー数の割合 (相対コロニー数) は有意に減少した (図 4-A). また 0.1, 0.2mg 蛋白/ml 存在下における 3 日間培養時の相対コロニー数は 20% 以下に減少した.

OST 細胞では CE 濃度 0.2mg 蛋白/ml 存在下においても相対コロニー数の減少は認められなかった (図 4-B).

Ⅲ. 培養細胞への DNA 合成に関する CE の効果

コロニー形成アッセイ法において CE に対し最も高い感受性を示した POS-1 細胞を用いて CE の DNA 合成への影響を検討した.

1. 培養時間と ^3H -チミジンの取り込み

CE 濃度はコロニー形成アッセイ法においてはほぼ完全に細胞増殖を抑制する濃度である 0.2mg 蛋白/ml とした (図 5). 対照群では培養直後の相対 ^3H -チミジン取り込み量は 0.57 であった. CE 添加群では添加直後の相対 ^3H -チミジン取り込み量は 0.59 であり, 対照群とはほぼ等しい ^3H -チミジンの取り込みが認められた. 対照群の相対 ^3H -チミジン取り込み量は培養 6 時間後には 1.0 を示し, その後培養時間と共に急速に上昇し, 培養 1 日目には 12.4 \pm 2.0 に達した. 相対 ^3H -チミジン取り込み量はその後緩やかに上昇し培養 3 日目には 17.6 \pm 2.8 に達した. CE 添加群における相対 ^3H -チミジン取り込み量は培養 6 時間後には 0.46 と低下し, 以後 0.7 \sim 1.5 の低値を示した.

2. CE 濃度と ^3H -チミジン取り込み

^3H -チミジン取り込みの測定は, 上述の結果に基づき CE 添加後 1 日目とした. CE 濃度の増加と共に ^3H -チミジン取り込みは急速に減少した (図 6). コロニー形成アッセイ法の実験において CE 濃度が 0.05mg 蛋白/ml 場合, 約 80% のコロニー形成能を有していたが, 同濃度での相対 ^3H -チミジン取り込み量は 3.2 と対照群 (16.8) に比し約 19.0% と ^3H -チミジンの取り込み低下を認めた.

Ⅳ. CE の細胞増殖抑制物質の性状

CE に対し高い感受性を示す POS-1 細胞を用い, 各種処理後の CE の細胞増殖抑制活性をコロニー形成アッセイ法 (処理時間, 6 日間) により測定することにより CE の細胞増殖抑制物

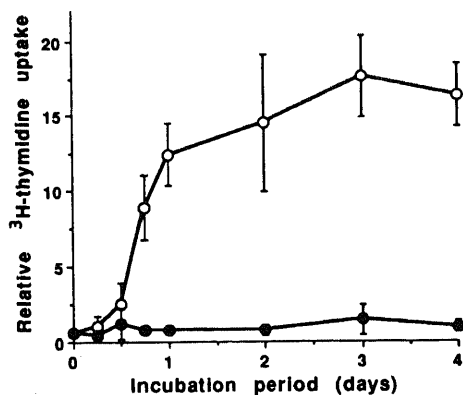


Fig. 5. Effect of CE on the ^3H -thymidine uptake of POS-1 cells. Concentrations of CE, 0.2mg-protein/ml. Relative ^3H -thymidine uptake = (^3H -thymidine uptake/ ^{14}C -thymidine uptake). Each mark indicates mean \pm SD (n=3). \circ , control; \bullet , CE.

質の性状を解析した.

1. CE の核酸抽出成分の検討

CE の核酸抽出成分における相対コロニー数は約 100% であり, 細胞増殖抑制活性は認められなかった.

2. 熱安定性試験

0.2mg 蛋白/ml 濃度の CE を, 56 $^{\circ}\text{C}$ にて 1, 2, 5, 10, 30, 60 分間, および 100 $^{\circ}\text{C}$ にて 1, 2, 10 分間加熱後, 残存細胞増殖抑制活性を測定した. この際, 非処理の場合の相対コロニー数は 0% であった.

56 $^{\circ}\text{C}$ 加熱群では, 1 分間処理した場合の相対コロニー数は非処理の場合とほぼ同値の 0.3% であったが, 2 分間の加熱では急速にコロニー数は増加し, 相対コロニー数は 29.6% を示した. その後相対コロニー数は加熱時間と共に緩やかに増加し, 60 分の加熱では 39.9% を示した.

100 $^{\circ}\text{C}$ 加熱群では, 1 分間加熱では相対コロニー数は 16.0% であったが, 2 分以上の加熱では, コロニー数は増加し相対コロニー数は 90% 以上を示した. 即ち 100 $^{\circ}\text{C}$ の加熱により CE の細胞増殖抑制活性はほぼ完全に失活した.

3. トリプシン処理

トリプシン非処理 CE における相対コロニー数は 0%, トリプシン処理 CE における相対コロニー数は約 80% であり, CE 細胞増殖抑制活性は失われた.

4. 高速液体クロマトグラフィーによる CE の解析

CE の細胞増殖抑制物質の性状をスーパーコース-6 カラムを用いた高速液体クロマトグラフィーで検討したところ, 分子量 20,000 \sim 300,000 の分画中に細胞増殖抑制物質の存在を認めた.

考 察

細菌由来の抗腫瘍作用の研究は, 1868 年に Busch¹⁾ が丹毒を合併した肉腫患者に症状の改善をみた報告に始まり, その後 Coley¹⁷⁾ が溶連菌と霊菌の混合死菌ワクチンを用いて肉腫患者を治療したといわれている. 以来, *Escherichia coli*¹⁸⁾, *Proteus*¹⁹⁾, *Neisseria*²⁰⁾, *Pseudomonas*²¹⁾, *Achromobacter stenohalis*²²⁾, *Flavobacterium acquatile*²³⁾, *Clostridium*²⁴⁾²⁵⁾, *Corynebacterium*²⁶⁾, *Mycobacterium tuberculosis*²⁷⁾, *Bacillus*²⁸⁾ など種々の細菌による抗腫瘍作用の研究が報告されてい

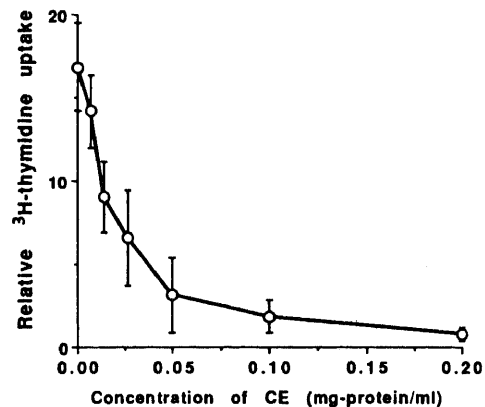


Fig. 6. ^3H -thymidine uptake of POS-1 cells cultured for 1 day in the presence of various concentrations of CE. Relative ^3H -thymidine uptake = (^3H -thymidine uptake/ ^{14}C -thymidine uptake). Each mark indicates mean \pm SD (n=3).

る。

S. epidermidis は、常在菌として皮膚に存在する通性嫌気性菌であり、本来弱毒で殆ど病原性は弱いながらも、各種感染症、近年では院内感染の主要な起原菌の一つとなってきた。整形外科領域においても感染症の起原菌として最も多く遭遇する細菌となりつつある²⁹⁾。

ブドウ球菌の抗腫瘍活性については、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*) の細胞壁蛋白質であるプロテインAを挙げる事ができる³⁰⁾。*S. aureus* の細菌分画には、正常ヒトガンマグロブリンやモルモット正常血清とゲル内沈降反応を呈する蛋白質の存在が知られていたが、Jensen³¹⁾ は、ヒト正常血清による *S. aureus* の凝集はこの蛋白質によるものとした、その後、Löfkvist³²⁾ が、*S. aureus* Cowan I 株から分離した純化標品を用いて、Jensen らの所見をゲル内沈降反応及び感作赤血球 (タンニン酸処理) 凝集反応で確かめ、次いで Grov³³⁾ がこの因子をプロテインAと命名した。プロテインAは、IgG の Fc 部分と非特異的に結合する作用があり、細胞免疫を抑制する循環血漿因子のひとつである循環免疫複合体にも強固に結合する特性がある。この特性を利用し、プロテインAを吸着剤として使用した血漿交換療法を癌患者に第一相試験を行い、癌の縮小を認めている³⁴⁾。

Ohshina ら⁷⁾ は、*S. epidermidis* の細胞表面物質 (cell surface substance, CSS) の免疫刺激作用について、多核白血球は CSS とのインキュベーションで非常に刺激された。ヌードマウスへの腹腔内投与で脾腫・血中 IgG の高値を示した。CSS を投与したマウスではサルコーマ L-1 細胞の肺の腫瘍コロニー数は減少した、と述べている。その作用機序として、免疫系を介した生物応答修飾作用が考えられている。

著者は、*S. epidermidis* 感染症を併発した後、転移病巣が消失し長期生存している Ewing 肉腫の1例を経験した⁸⁾ ことから、*S. epidermidis* の抗腫瘍効果を究明するため、本研究を行った。

まず、マウス固形腫瘍について、腫瘍重量比、T/C を求め、その抗腫瘍活性を検討した。S-180 細胞においては、移植30日目における腫瘍重量比は CCW, PCW, CE 投与群各々51.9%, 100.0%, 55.6%であり、CCW, CE 投与群に明らかな腫瘍抑制効果を認めた。T/C は CCW 投与群において151.6%を示し延命効果が認められた。POS-1 細胞においては、移植36日目における腫瘍重量比は CE 群において48.1%と明らかな抗腫瘍効果が認められた。T/C は CCW, PCW 投与群各々130.3, 137.6%を示し延命効果が認められた。OST 細胞に対する各種菌成分の抗腫瘍活性は、他の2細胞株に比べ弱かったが、この点については腫瘍自体の薬剤感受性の問題、また使用したマウス自体の宿主としての問題が考えられる。

次に S-180 細胞を移植後 CE を投与した群と投与しない群との腫瘍組織を病理組織学的に観察したが、組織学的には明らかな差異を認めず、また腫瘍周辺組織にはリンパ球の明らかな浸潤を認めなかった。以上の事から、CE の抗腫瘍効果は宿主の免疫系を介するものではなく、むしろ腫瘍細胞への直接作用によるものであることが強く示唆された。それ故、CE の培養細胞に対する増殖抑制活性を各種細胞株について検討した。

まず、CE の細胞増殖に及ぼす影響を浮遊細胞系である S-180 細胞についてトリパンブルー色素排除能テストにより、生細胞数を測定することにより検討した。CE の濃度を各種設

定し、それぞれについて、3日間総細胞数および生細胞数を測定した。PBS を添加した対照群は、3日間、総細胞数および生細胞数に差異はなく増殖した。CE 添加群においては CE 濃度の増加と共に、細胞の増殖は低下し、CE 濃度が 2.7mg蛋白/ml 以上では、総細胞数は培養開始時の数とほぼ同じであり、CE は細胞増殖抑制活性を有する事が認められた。さらに、生細胞数は CE 濃度の増加と共に減少し、5.4mg蛋白/ml に添加した時、生細胞数は3.7%にまで減少した。即ち、CE は殺細胞活性を有し、結果として細胞増殖抑制が起こる事が示唆された。

POS-1 および OST 細胞の細胞増殖抑制に及ぼす CE の影響をコロニー形成アッセイ法を用いて検討した。増殖抑制効果は POS-1 細胞では濃度依存性であり、CE 濃度 0.2mg蛋白/ml で2日間以上の培養時間で有意であり、濃度依存性遅効性殺細胞作用を有する事がこの事からも示唆された。OST 細胞では、CE 濃度 0.2mg蛋白/ml でも抑制効果を認めなかったが、この点については腫瘍自体の薬剤感受性の問題が考えられる。

CE の培養細胞に対する殺細胞作用・増殖抑制作用を、DNA 合成の観点から検討した³⁵⁾³⁶⁾。POS-1 細胞において、¹⁴C, ³H-チミジンで二重標識し、細胞当たりの³H-チミジン取り込み量を検討したが、培養液に CE を 0.2mg蛋白/ml の濃度で添加し、³H-チミジン取り込み量を測定した結果、添加直後の相対³H-チミジン取り込み量は対照群とほぼ等しかった。しかしながら、対照群では培養数時間後から培養時間と共に相対³H-チミジン取り込み量は上昇したが、CE 添加群では全く上昇しなかった。即ち、CE は細胞の DNA 合成を阻害することが明らかになった。また、CE 濃度と³H-チミジンの取り込み抑制の関係を対数増殖期である培養1日目の細胞について観察したとき、細胞の増殖に対し顕著な影響を与えない CE 濃度 (0.05mg蛋白/ml) においても相対³H-チミジン取り込み量の減少がみられた。以上の事から、CE の培養細胞に対する殺細胞作用・増殖抑制作用には DNA 合成阻害が密接に関与している事が明らかになった。

CE 中の細胞増殖抑制物質の性状について検討した。CE を 56℃, 100℃ で加熱処理を行った結果、細胞増殖抑制効果は減少し、特に100℃加熱で細胞増殖抑制効果は全く失われてしまった。また、CE をトリプシン処理した場合でも細胞増殖抑制効果は全く失われてしまった。更に核酸抽出成分の中には細胞増殖抑制物質は見いだせなかった。以上の事から、CE は蛋白成分である事が示唆された。そこで、CE 中の細胞増殖抑制物質を高速液体クロマトグラフィーで解析した結果、本物質は分子量20,000~300,000である事が推察された。

これまで *S. epidermidis* の抗腫瘍効果は免疫系を介した生物応答修飾作用によるものと考えられていたが、著者の実験から CE は濃度依存性に直接的抗腫瘍効果を有するものと考えられた。

Higuchi ら³⁷⁾ は、*Str. pyogenes* の無細胞抽出免疫から得た蛋白 (連鎖球菌性細胞毒性蛋白) (streptococcal cytotoxic protein, SCP) に殺細胞・抗腫瘍効果を認めた。その効果は牛胎児血清の存在下で作用し、カタラーゼにより抑制される事から、SCP は水素過酸化物を産生し、抗腫瘍効果を作るものと述べている。今後、CE 中の細胞増殖抑制物質の精製を行い、その本態を明らかにする必要があると考える。

Ewing 肉腫患者が *S. epidermidis* 感染症を併発した後に治

癒した⁸⁾事については、従来から知られている細胞壁成分の抗腫瘍活性に加え、著者が本研究で明らかにした如く、菌体内内容物(CE)もまた抗腫瘍活性を有する事が、大きな役割を演じているものと思われる。

結 論

原発巣手術部に *S. epidermidis* 感染症を併発した後、転移病巣が消失し長期生存している Ewing 肉腫患者から採取した *S. epidermidis* の菌体を破砕し、粗細胞壁成分(CCW)および菌体内内容物(CE)に分画し、前者に対しては更に核酸分解酵素処理した部分精製細胞壁成分(PCW)を作製した。これら菌体成分の拒癌動物に対する作用および培養細胞に対する細胞増殖抑制作用を検討し、以下の結果を得た。

1. S-180, POS-1, OST 細胞を皮下接種した拒癌マウスへ、菌体成分を腹腔内投与し、増殖抑制効果を調べた。CCW, PCW, CE 投与群の対照群との腫瘍重量比は、S-180 細胞(移植30日目)では各々51.9, 100.0, 55.6%, POS-1 細胞(移植36日目)ではそれぞれ70.4, 66.7, 48.1%, OST 細胞(移植60日目)ではそれぞれ90.6, 84.4, 87.5%であった。

2. S-180 細胞の拒癌マウスの腫瘍部分を病理組織学的に検討した結果、対照群と CE 投与群に差異は認められず、リンパ球の浸潤は見られなかった。

3. S-180, POS-1, OST 細胞株を CE 存在下で培養したところ、S-180, POS-1 細胞において細胞増殖抑制が認められた。また、その抑制効果は CE の濃度依存性遅効性に作用した。

4. POS-1 細胞株について、³H-チミジンの取り込みを測定した結果、CE 添加6時間後より³H-チミジンの取り込みの抑制が認められ、その効果は CE の濃度に依存した。

5. CE 中の細胞増殖抑制物質は、核酸抽出成分ではなく、100℃の加熱およびトリプシン処理で消失した。また、高速液体クロマトグラフィーでの性状分析により、分子量20,000~300,000の分画中に細胞増殖抑制物質の存在を認めた。

6. 以上の結果は、*S. epidermidis* の CE 中には直接的抗腫瘍活性を有する蛋白性物質が存在する事を示唆している。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師富田勝郎教授および、直接御指導、御教示をいただきました金沢大学医学部微生物学講座、中村信一教授に深甚なる謝意を表します。本研究に際し貴重な御助言を賜りました本学がん研究所化学療法部佐々木琢磨教授に深甚なる謝意を表します。本研究遂行に際し御助言、御協力いただきました本学微生物学講座、小倉寿助教授、また御協力いただいた整形外科腫瘍班ならびに微生物学講座の諸先生方に深く感謝いたします。

なお、本論文の要旨の一部は、第6回日本整形外科学会基礎学術集会、第50回日本癌学会総会において発表した。

文 献

- 1) Busch, W.: Verhandlungen ärztlicher Gesellschaften. Berl. Klin. Wochensh., 5, 137-138 (1868).
- 2) 木村郁郎: 溶連菌剤 OK-432 と癌の免疫化学療法の可能性。癌と化学療法, 2, 19-31 (1975).
- 3) Zbar, B. & Tanaka, T.: Immunotherapy of Cancer: Regression of tumors after intralesional injection of living *Mycobacterium bovis*. Science, 172, 271-273 (1971).
- 4) 加藤隆三: 口腔内分離菌 *Propionibacterium acnes*

KT-28 株の抗腫瘍活性に関する研究。十全医会誌, 98, 879-896 (1989).

5) 小谷尚三: 細菌細胞表層成分ならびにその合成対応物(Synthetic Counterpart)の生物学的活性。細菌学はここまですすんだ(蜂巣賀養悦編), 第1版, 130-149頁, 菜根出版, 東京, 1986.

6) 板谷利幸, 小林 博, 原 哲夫, 関沢泰治: 腸内表皮ブドウ球菌によるラットの抗腫瘍自然抗体力価の増強。医学のあゆみ, 132, 520-521 (1985).

7) Ohshima, Y., Ko, H. L., Beuth, J., Ichiman, Y., Yoshida, K. & Pulverer, G.: Immunostimulating cell surface substance from *Staphylococcus epidermidis* strain ATCC-31432 prevents metastatic lung colonization in Balb/c-mice. Med. Microbiol. Immunol., 176, 281-287 (1987).

8) 土田敏典, 富田勝郎, 土屋弘行, 末吉泰信, 中村信一, 赤崎外志也, 浜岡寛士: 感染症を併発した後、転移巣が消失した無病生存中の Ewing 肉腫の1例。整形外科, 42, 110-111 (1991).

9) Bleiweis, A. S., Karakawa, W. W. & Krause, R. M.: Improved technique for the preparation of streptococcal cell walls. J. Bacteriol., 88, 1198-1201 (1964).

10) Hamada, S., Narita, T., Kotani, S. & Kato, K.: Studies on cell walls of group A *Streptococcus pyogenes*, type 12. Biken J., 14, 217-231 (1971).

11) 小谷尚三, 成田俊彦, 浜田茂幸: グラム陽性細菌の細胞壁。細胞分画法(佐藤了編), 第1版, 366-379頁, 岩波書店, 東京, 1972.

12) 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).

13) Foley, G. & Drolet, B. P.: Sustained propagation of Sarcoma 180 in Tissue Culture. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 92, 347-352 (1956).

14) 山崎安朗: ヒト骨肉腫由来細胞株の樹立とその形態学的観察。十全医会誌, 71, 1-13 (1975).

15) Ovejera, A., Houchens, D. P. & Barker, A. D.: Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice. Ann. Clin. Labor. Sci., 8, 50-56 (1978).

16) 塚越 茂: 製癌剤の有効性と安全性の検討。製癌剤の開発とその臨床応用(塚越, 田口, 仁井谷, 齊藤編), 第1版, 25-28頁, サイエンスフォーラム, 東京, 1978.

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

18) Ikawa, M., Koepfi, 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).

19) Murata, T., Arakawa, M., Sugiya, 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).

20) Gardner, R. E., Bailey, H. & Hyde, R. R.: Hemorrhagic activity of toxic carbohydrate complexes from bacteria

- on a transplantable rat tumor. *Am. J. Hyg.*, **29**13, 1-14 (1939).
- 21) **Jacobs, F. A.**: Damage produced by a *Pseudomonas aeruginosa* fraction in Sarcoma 37. *Cancer Res.*, **10**, 227 (1950).
- 22) **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).
- 23) **蝶良英郎, 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).
- 24) **Möse, J. R. & Möse, G.**: Oncolysis by clostridia. I. Activity of *Clostridium butyricum* (M55) and other nonpathogenic clostridia against the Ehrlich carcinoma. *Cancer Res.*, **24**, 212-216 (1964).
- 25) **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).
- 26) **Halpern, B. N., Biozzi, G., Stiffel, C. & Mouton, D.**: Inhibition of tumor growth by administration of killed *Colynebacterium parvum*. *Nature*, **212**, 853-854 (1966).
- 27) **Lemonde, P. & Clode-Hyde, M.**: Influence of Bacille de Calmette Guêrin infection on polyoma in hamsters and mice. *Cancer Res.*, **26**, 585-589 (1966).
- 28) **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).
- 29) **長野 昭, 鈴木克己, 高橋定雄, 寺尾 誠**: 創と細菌—新鮮創内の細菌, 薬剤感受性, 創治癒を中心として. *整形外科*, **26**, 175-181 (1975).
- 30) **Messerschmidt, G. L., Henry, D. H., Snyder-Jr, H. W., Bertram, J., Mittelman, A., Ainsworth, S., Fiore, J., Viola, M. V., Louie, J., Ambinder, E., MacKintosh, F. R., Higby, D. J., O'Brien, P., Kiprof, D., Hamburger, M., Balint-Jr., J. P., Fisher, L. D., Perkins, W., Pinsky, C. M. & Jones, F. R.**: Protein A immunoadsorption in the treatment of malignant disease. *J. Clin. Oncol.*, **6**, 203-212 (1988).
- 31) **Jensen, K.**: Undersøgelser over staphylococernes antigenstruktur. Thesis, Munksgaard, Copenhagen, 1959.
- 32) **Löfkvist, T.**: Further studies of a preparation of protein A (Jensen's antigen A) from *Staphylococcus aureus*. *Int. Arch. Allergy*, **29**, 240-253 (1966).
- 33) **Grov, A., Myklestad, B. & Oeding, P.**: Immunochemical studies on antigen preparation from *Staphylococcus aureus*, I. Isolation and chemical characterization of antigen A. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **61**, 588-596 (1964).
- 34) **Bensinger, W. I., Buckner, C. D., Clift, R. A. & Thomas, E. D.**: Clinical trials with staphylococcal protein A. *J. Biol. Resp. Modif.*, **3**, 347-351 (1984).
- 35) **Shoyab, M., Gunnel, M. & Lubiniecki, A. S.**: Reduced uptake and incorporation of ³H-thymidine in Fanconi anemia fibroblasts. *Hum. Genet.*, **57**, 296-299 (1981).
- 36) **Gewert, D. R., Moore, G. & Clemens, M. J.**: Inhibition of cell division by interferons. *Biochem. J.*, **214**, 983-990 (1983).
- 37) **Higuchi, Y., Shoin, S. & Matsukawa, S.**: Active oxygen-mediated cytotoxic and antitumor actions of streptococcal cytotoxic protein. *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 169-175 (1990).

Studies on Anti-tumor Activity of *Staphylococcus epidermidis* Toshinori Tsuchida, Department of Orthopedic Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 101, 176—185 (1992)

Key words anti-tumor activity, Sarcoma cells, *Staphylococcus epidermidis*

Abstract

The author experienced a patient with Ewing's sarcoma in whom the tumor disappeared after infection by *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*). Therefore, the *S. epidermidis* strain isolated from the patient was examined for antitumor activity on tumor-bearing mice and for growth-inhibitory activity on cultured tumor cells. Three tumor cell lines were used in the experiments: Sarcoma 180 (S-180), mouse osteogenic sarcoma POS-1 (POS-1) and osteogenic sarcoma Takase (OST) cells. Staphylococcal cells were disrupted by Braun's cell homogenizer, and divided into crude cell wall (CCW) and cell extract (CE) by centrifugation. CCW was treated with DNase and RNase to prepare partially purified cell wall (PCW). When anti-tumor activity was evaluated by the ratio of mean tumor weight of the mice injected with preparations to that of the control mice (tumor weight ratio), CCW and CE showed distinct anti-tumor activity on S-180 cells, while only CE showed a comparable degree of anti-tumor activity on POS-1 cells. No effects were observed on OST cells. Histologically, invasion of lymphocytes was not detected in the tumor regions of the CE-injected mice in the same way as in those of the untreated mice. The growth-inhibitory activity of CE on the S-180 cells was examined by counting the numbers of total and viable cells by the trypan blue dye exclusion test on the 1st, 2nd and 3rd day of incubation in the medium containing CE. CE showed dose-dependent growth-inhibitory activity on the cells; no cell growth was observed at a concentration of 2.7 mg-protein/ml. The number of viable cells decreased reciprocally as the concentration of CE increased; only 3.7% of cells survived after 3 days of incubation with CE at a concentration of 5.4 mg-protein/ml. Colony-forming assay was used as the test for the antitumor activity of the CE on the POS-1 and OST cells. CE showed growth-inhibitory activity only on POS-1 cells. The activity was dose-dependent as well as time-dependent. When the cells were incubated for 3 days in the presence of 0.2 mg-protein/ml of CE, colony formation was almost completely inhibited. The ³H-thymidine uptake of POS-1 cells decreased several hours after the addition of CE to the culture medium and the effect of CE addition continued during the incubation period of 4 days. These effects were also dose-dependent; the relative ³H-thymidine uptake at a concentration of 0.2 mg-protein/ml of CE was only 0.46% 6 hours after incubation. These results seem to indicate that inhibition of DNA synthesis might play an important role in the anti-tumor activity of CE. Neither nucleic acid extract nor CE treated with heating at 100°C or trypsin showed growth-inhibitory activity. The analysis of CE by superose-6 column chromatography revealed the growth-inhibitory substance with molecular weight 20,000 to 300,000. These results indicate that CE of *S. epidermidis* might contain protein moiety with direct anti-tumor activity.