Eubacterium lentum ATCC 25559 株の抗腫瘍活性に関する研究

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: 加藤, 一栄
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8360

Eubacterium lentum ATCC 25559 株の抗腫瘍活性に関する研究

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座（主任：山本悦秀教授）
加　藤　一　栄

（平成3年9月27日受付）

Eubacterium lentum (E. lentum) ATCC 25559 株の菌体超音波処理上清液 (supernatant of sonicated cells, Sup-SC) の担癌マウスに対する抗腫瘍活性を，エールリッヒ腹水癌細胞 (Ehrlich ascites carcinoma cells, EAC 細胞)，サルコーマ180細胞 (Sarcoma 180 cells, S-180 細胞) およびメスA細胞 (Meth A fibrosarcoma cells, Meth A 細胞) の固型癌を用いて検討した．抗腫瘍活性は，各標品投与群マウスの対照群マウスに対する腫瘍重量の比 (腫瘍増殖阻止率)，あるいは平均生存日数の比 (T/C) で評価した．玉井－福田培地48時間培養菌液から得られた培養上清液，および超音波破壊菌体の遠心上清液 (Sup-SC)，遠心沈渣それぞれの抗腫瘍活性を，EAC 細胞および S-180 細胞を使って検討した結果，Sup-SC に腫瘍形成の抑制が認められた．そこで同上清のエタノール画分 (ethanol fraction, EF) について上記の2腫瘍および同系の Meth A 細胞で調べたところ，同じく腫瘍増殖阻止率で39.7－46.1%，T/C で136.7－139.6%以上の抗腫瘍活性が認められた．次に EF を pH2.0, pH4.0, pH6.0の各 pH で等電点沈殿した画分について各腫瘍細胞で抗腫瘍活性を調べたところ，pH6.0画分に腫瘍増殖阻止率で39.0－58.5%，T/C で132.2－139.4%以上の抗腫瘍活性が得られた．更に pH6.0画分を凍結乾燥し，濃度を4段階 (3.5, 7.5, 15.0, 22.5mg/ml) に分けて用量－反応関係をみるため Meth A 細胞で比較したところ，7.5, 15.0mg/ml 濃度投与群において腫瘍形成の抑制がみられた．そして，より高濃度の 22.5mg/ml 投与群ではマウスの斃死，また低濃度の 3.5mg/ml では腫瘍の抑制がみられなかったことから，抗腫瘍活性に対する至適量が存在することが示された．また本標品は100°Cの加熱により不活性化されないことから，その本体は蛋白ではないことが推測された．本標品のマウスへの投与方法を筋肉内，腫瘍内および腹腔内の3経路に分け Meth A 細胞を用い検討したところ，投与経路による明らかな抗腫瘍活性の差異はみられなかった (腫瘍増殖阻止率，30.3－35.8%)．また pH6.0画分標品を投与したマウスでは，腫瘍部位に L3T4 陽性T細胞の著明な浸潤が病理組織学的に認められた．以上の結果より，*E. lentum* ATCC 25559 株の Sup-SC は抗腫瘍活性を有しており，本活性には免疫系が関与していることが示唆された．

Key word　anaerobe, anti-tumor activity, *Eubacterium lentum*

抗腫瘍物質の研究は多岐にわたっている．それらは合成化合物と天然物とに大別でき，種々の物質に及んでいるが，天然物の中で最も古くからその抗腫瘍性に着目されたものが微生物である．細菌が作る毒性物質を悪性腫瘍に対抗する薬として利用することは，人間の健康を目指す研究を続けているものにとってのひとつの課題であった．

この微生物の抗腫瘍作用については，1868年 Busch[1]の丹毒に罹患した肉腫患者が症状の改善をみたとする報告に端を発し，その後1898年に Coley[2]は丹

Abbreviations: ABC, avidin biotin peroxidase complex; AFTF, agar-free Tamai-Fukuda; *Cl. botulinum, Clostridium botulinum*; EAC, Ehrlich ascites carcinoma; EF, ethanol fraction; *E. lentum, Eubacterium lentum*; IM, intramuscular; IP, intraperitoneal; IT,

毒から分離した溶血性レンサ球菌と霊菌との混合培養濾液である有名な Coley's toxin を考案し，多数の有効例を報告した．それ以降，種々の微生物の生菌，死菌あるいは菌体成分の抗腫瘍活性が検討され，国内外を問わず多数の研究報告がなされてきた[3)~7)]．そして細菌の菌体あるいはその構成成分のあるものは，生体にとって抗原となるばかりでなく生物活性を有し，生体の免疫応答を賦活化することが知られてくるようになってきた[4)]．しかし，そのほとんどは好気性菌に関する研究であり，嫌気性菌による抗腫瘍活性の研究は，*Clostridium*，嫌気性 *Corynebacterium* の一部に散見されるにすぎない[8)~10)]．

近年，著者の研究室の玉井らは，口腔癌の感染病巣より高率に分離される嫌気性グラム陰性菌 *Fusobacterium* に着目し，その抗腫瘍活性の検討を行い，培養上清液中に抗腫瘍活性物質を見い出した．更にその本体は細胞壁構成成分であるリポ多糖体 (lipopolysaccharide, LPS) であることを明らかにした[11)~13)]．上述の玉井らの研究に端を発し，著者の研究室では各種の嫌気性菌について抗腫瘍活性の検討がなされ，グラム陰性菌の *Veillonella*[14)]，グラム陽性菌の *Peptococcus*[15)]，*Propionibacterium*[16)] が抗腫瘍活性を有することが明らかにされた．

著者は本研究で，口腔内常在菌の一種で，嫌気性グラム陽性桿菌である *Eubacterium lentum (E. lentum)*[17)] についての抗腫瘍活性の検討を行った．

材料および方法

I．使用菌株

実験には *E. lentum* ATCC 25559 株 (金沢大学医療技術短期大学部山岸高由教授より分与) を使用した．

II．使用培地

前培養には，玉井－福田培地[18)] (Tamai-Fukuda medium, TF 培地) (ニッスイ，東京) および TF 血液寒天平板培地 (10%血液・2%寒天加 TF 培地) を使用した．また本培養には，寒天を除いた TF 培地 (agar-free TF 培地，AFTF 培地) を用いた．

III．*E. lentum* 標品の調整

1．培養法および培養液の処理法

E. lentum ATCC 25559 株培養菌液0.5ml を TF 培地 15ml に植菌し37°Cで培養した．48時間培養後，TF 血液寒天平板培地に1白金耳を塗抹し，BBL ガスパック (Becton Dickinson, Cockeysville, USA) を用いて37°C・48時間嫌気培養後，形成されてくる集落を TF 培地 15ml に釣菌した．37°C・48時間培養後 5ml を TF 培地 100ml に移植した．37°C・24時間培養後，50ml を AFTF 培地 1,000ml に移植し48時間本培養を行った．本培養後，無菌的に冷却遠心器 RS-20 III (トミー精工，東京) を用いて 6,500×g，20分間遠心し，培養上清液 (supernatant of culture, Sup-C) と沈渣 (菌体) に分離した．さらに Sup-C は異物濾過フィルターマイレクス HA (孔径；0.45μm) (Millipore Corporation, Bedford, USA) を用いて濾過滅菌した後，実験に供した．

2．超音波処理菌体上清液 (supernatant of sonicated cells, Sup-SC) と超音波処理菌体沈渣 (sediment of sonicated cells, Sed-SC) の調整

本培養後，遠心して得られた菌体に滅菌生理食塩水を加え遠心洗浄 (6,500×g，20分間) を行った．洗浄菌体3.2g (湿重量) に滅菌生理食塩水 50ml を加え，超音波破砕器 Model UR-20P (20KHz) (トミー精工) を用いて 200W，30分間超音波処理を行った．超音波処理液について，先ず未破砕の細胞片を除去するため 800×g，20分間遠心した．次に上清液を遠心分離機 50-A (佐久間製作所，東京) にて 10,000×g，20分間遠心し，得られた上清液を Sup-SC，沈渣を Sed-SC として滅菌生理食塩水に懸濁し実験に供した．

3．Sup-SC のエタノール画分 (ethanol fraction, EF) の調整

Sup-SC に純エタノールを濃度が60%となるように加え，充分攪拌後 4°C下で一夜静置した．静置後，無菌的に 10,000×g，20分間遠心し，得られた沈渣を EF として滅菌生理食塩水に懸濁し実験に供した．

4．等電点沈殿法による分画

EF 2.2g (湿重量) に 1/15M 燐酸緩衝液 (pH7.0) (phosphate buffer, PB) 50ml を加え，充分攪拌し溶解した後 10N HCl を加えて溶液の pH を6.0に調整した．4°C下で一夜静置した後 10,000×g，20分間冷却遠心を行い，得られた沈渣 (湿重量1.2g) を pH6.0画分として PB に懸濁して実験に供した．分離した遠心上清液に，更に 10N HCl を加え pH4.0 となるように調整した．攪拌後 4°Cに一夜静置し，再度 10,000×g，20分間遠心し，得られた沈渣 (湿重量 0.7g) を pH 4.0 画分として PB に懸濁して実験に供した．同様に

intratumoral; LPS, lipopolysaccharide; Meth A, Meth A fibrosarcoma; PB, phosphate buffer; S-180, Sarcoma 180; Sed-SC, sediment of sonicated cells; Sup-C, supernatant of culture; Sup-SC, supernatant of sonicated cells; TF, Tamai-Fukuda

pH4.0画分を得た後の分離した遠心上清液に更に10N HClを加えてpH2.0に調整した．攪拌後4℃に一夜静置し，10,000×g，20分間遠心し，得られた沈渣（湿重量0.2g）をpH2.0画分としてPBに懸濁して実験に供した．

また必要に応じpH6.0画分を凍結乾燥し，使用時PBに懸濁し実験に供した．

pH6.0画分の抗腫瘍活性の熱安定性の検討は，pH 6.0画分を100℃，10分間加熱することにより行った．

Ⅳ．実験動物

日本チャールズ・リバー株式会社（厚木）から購入後，著者の研究室の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5週齢のICR系マウス（体重20－26g），5週齢のBALB/c系マウス（体重20－22g）を実験に供した．なお餌と水はマウスが自由に摂取できるようにした．

Ⅴ．腫瘍細胞の調整

著者の研究室で継代培養しているエールリッヒ腹水癌細胞（Ehrlich ascites carcinoma cells, EAC細胞），サルコーマ180細胞（Sarcoma 180 cells, S-180細胞）およびメスA細胞（Meth A fibrosarcoma cells, Meth A細胞）を用いた[19]．

EAC細胞およびS-180細胞はICR系マウスの腹腔内，Meth A細胞はBALB/c系マウスの腹腔内で7日目ごとに継代培養した．実験に際して，マウス腹腔内で7日間培養した各腫瘍細胞（腹水）を無菌的に採取した．採取後，チュルク型白血球計算盤（エルマ光学，東京）で白血球算定基準[20]にしたがって細胞数を算定し，適量の滅菌生理食塩水を加え，5×10^7個/mlの細胞浮遊液を作製し各実験に供した．

Ⅵ．担癌マウスの作製法

マウスの背部を動物用電動バリカン・アニマルクリッパーModel 900（大東電気，東京）で剃毛し，ヒビテンアルコール液で消毒後，皮下に適量の細胞数（5×10^7個/ml）に調整した細胞浮遊液0.2mlを移植し担癌マウスとした．この際EAC細胞，S-180細胞にはICR系マウスを，Meth A細胞にはBALB/c系マウスを用いた．

Ⅶ．抗腫瘍活性の判定

マウスの背部皮下に各腫瘍細胞を移植後，48時間後より1日1回，9日間連続してマウスの前肢筋肉内（intramuscular, IM）にそれぞれの被験標品の0.2mlを注射し，抗腫瘍活性を検討した．またpH6.0画分については，更に腹腔内（intraperitoneal, IP）および腫瘍内（intratumoral, IT）投与を合わせて行った．対照群には滅菌生理食塩水，あるいはPBを同量注射した．

1．腫瘍重量による判定

腫瘍細胞移植後，背部に形成した固型腫瘍の重量を一定期間毎に測定した．腫瘍重量は

腫瘍重量(g)＝腫瘍長径(cm)×〔腫瘍短径(cm)〕^{2}/2

の計算式により求めた[21]．

標品投与群（処置群）の平均腫瘍重量と対照群の平均腫瘍重量を比較して，腫瘍増殖阻止率を算定し，阻止率が30％以上の場合，その標品に対して腫瘍が感受性ありとした．判定の最終日は20あるいは25日とした．腫瘍増殖阻止率の計算式を以下に示した[22]．

腫瘍増殖阻止率(%)＝〔1－(処置群の平均腫瘍重量/対照群の平均腫瘍重量)〕×100

2．生存期間による判定

生存期間の測定は60日間とし，腫瘍細胞を移植した日より以後のマウスの生存日数により抗腫瘍効果を判定することとした．この際処置群の平均生存日数（T）と対照群の平均生存日数（C）の比，すなわち（T/C)×100（%）によって抗腫瘍効果を判定した[21]．

Ⅷ．蛋白質の定量

蛋白質の定量はBio-Rad法[23]にしたがって行った．

Ⅸ．病理組織学的検討

1．ヘマトキシリン－エオジン染色

摘出した腫瘍組織標本を10％ホルマリンにて固定し，パラフィン切片を作製し，常法[24]にしたがいヘマトキシリン－エオジン染色を行った後，光学顕微鏡下で観察した．

2．免疫ペルオキシダーゼ染色

特異性および感受性に優れたavidin biotin peroxidase complex（ABC）法により行った[25]．

摘出した腫瘍組織標本をOTCコンパウンド（Miles Laboratories, Indiana, USA）で包埋後，ドライアイス－アセトンで瞬時に凍結し，クリオスタットTissue-Tek（マイルス・三共，東京）で薄切（6μmの連続切片）した凍結切片を作製した．第1次抗体として100倍希釈した抗マウスLyt2モノクローナル抗体（ラットIgG_{2b}抗体）（Sera-Lab, Crawley down Sussex, UK），抗マウスL3T4モノクローナル抗体（ラットIgG_{2b}抗体）（Sera-Lab）と30分間室温で反応させた．次いで第2次抗体として100倍希釈のヤギ抗ラットIgG抗体（Affinipure Goat anti Rat-IgG）（Jackson Immunoresearch Laboratories, west Baltimore,USA）と30分間室温で反応させた．更にABC試薬ベクタステイン（Vector Laboratories, Burlingame, Canada）と30分反応させた後ペルオキシダーゼ基質溶液で発色させた．

その後，光学顕微鏡下で観察した．

X．統計学的検定法

2群の腫瘍重量の平均値の差の検定には，t検定を，また2群の生存率の差の検定には一般化 Wilcoxon 検定を行った．なお危険率5％以下を有意と判定した．

成　　績

I．*E. lentum* ATCC 25559 株の培養菌液の上清液および菌体の抗腫瘍活性

E. lentum ATCC 25559 株の抗腫瘍活性が菌のどの部分に由来するかを求めるため，培養菌液 (1,000ml) を培養上清液 (Sup-C)，菌体を超音波処理した後の上清液 (Sup-SC) (50ml) と沈渣 (Sed-SC) に分け EAC 細胞および S-180 細胞の担癌マウスに投与することにより，その抗腫瘍活性を比較検討した．この際 Sup-SC は 50ml の滅菌生理食塩水を加え合計 100ml とし，また Sed-SC は Sup-SC の実験に対応するように 100ml の滅菌生理食塩水に懸濁した．各実験には1群10匹のマウスを使用した．

1．腫瘍重量による判定

はじめに腫瘍重量を測定することにより抗腫瘍活性を検討した (表1)．

EAC 細胞移植実験では，対照群と処置群 (Sup-C 投与群，Sup-SC 投与群，Sed-SC 投与群) 間の腫瘍重量の差異は15日目頃より認められはじめた．その後，経日的にその差異は顕著となり，25日目の観察では，Sup-SC 投与群においては平均腫瘍重量が4.5g にすぎず，対照群の平均腫瘍重量と較べると，腫瘍増殖阻止率は43.1％であり腫瘍重量の有意な抑制 ($p<0.01$) がみられた．しかしながら，Sup-C, Sed-SC 投与群では25日目における平均腫瘍重量は各々7.0g，6.0g，腫瘍増殖阻止率は各々11.4％，24.1％にすぎず腫瘍重量の有意な抑制は認められなかった．

S-180 細胞移植実験では，25日目の観察での平均腫瘍重量は対照群4.4g，処置群 3.2－4.4g (腫瘍増殖阻止率，4.6－27.3％) であり，いずれも明らかな腫瘍重量の抑制は認められなかった．

2．生存日数による判定

次に生存率を測定することにより，抗腫瘍活性を検討した (表2)．

EAC 細胞移植実験では，対照群は51日目までにすべて腫瘍死した．また Sup-C 投与群では53日目までに，Sed-SC 投与群では52日目までにすべてのマウスは腫瘍死した．これに対し Sup-SC 投与群では，生存日数は長く，被験10匹中2匹は60日間以上生存し，平均生存日数は49.5日以上，T/C は135.9％以上で延命効果 ($p<0.05$) が認められた．

S-180 細胞移植実験では，対照群は51日目までにすべて腫瘍死した．また Sup-C 投与群では59日目まで

Table 1. Antitumor activity of *E.lentum* ATCC 25559 preparations: effect on the tumor weights of tumor-bearing mice in two different tumor cells

Tumor cell[a] inoculated	Preparation injected[b]	Number of mice used	Tumor weight[c] (mean±SD, g)	Inhibition[d] ratio (%)
EAC	Sup-C	10	7.0±3.5	11.4
	Sup-SC	10	4.5±1.5	43.1*
	Sed-SC	10	6.0±3.9	24.1
	Saline (control)	10	7.9±3.8	
S-180	Sup-C	9	4.2±2.7	4.6
	Sup-SC	10	3.2±2.0	27.3
	Sed-SC	10	3.8±2.4	13.6
	Saline (control)	9	4.4±3.4	

a) EAC, Ehrlich ascites carcinoma; S-180, Sarcoma 180.
b) A 0.2-ml volume of tumor cell suspension (1×10^7 cells) was inoculated subcutaneously into the back of a mouse. Intramuscular injection of 0.2-ml volum of each preparation into a foreleg was began 2 days after the inoculation and then performed once a day during 9 days. Sup-C, supernatant of culture; Sup-SC, supernatant of sonicated cells; Sed-SC, sediment of sonicated cells.
c) Evaluation was performed 25 days after the inoculation of tumor cells in mice.
d) (1－Mean tumor weight of treated group/mean tumor weight of control group) ×100.
*$p<0.01$, compared with control by Student's t-test.

に，Sed-SC 投与群でも59日目までにすべてのマウスが腫瘍死した．これに対し Sup-SC 投与群では被験10匹中2匹が60日間以上生存し，平均生存日数は49.7日以上，T/C は128.7%以上を示し，EAC 細胞同様延命効果 ($p<0.05$) が認められた．

以上の結果，*E. lentum* ATCC 25559 株の Sup-SC には抗腫瘍活性物質が存在することが示唆された．また，この Sup-SC の蛋白質を測定した結果 1,659μg/ml であった．

II．*E. lentum* ATCC 25559 株の Sup-SC のエタノール画分の抗腫瘍活性

抗腫瘍活性物質の本態を明らかにするため，Sup-SC にエタノールを最終濃度が60%になる様加え溶媒抽出したエタノール画分 (EF) の抗腫瘍活性を EAC 細胞，S-180 細胞および同系の Meth A 細胞について検討した．この際本画分 2.2g (湿重量) は滅菌生理食塩水 50ml に懸濁した．このときの蛋白濃度は 543μg/ml であった．各実験には1群20匹のマウスを使用した．

1．腫瘍重量による判定

Table 2. Antitumor activity of *E.lentum* ATCC 25559 preparations: effect on the survival of tumor-bearing mice in two different tumor cells

Tumor cell[a] inoculated	Preparation injected[b]	Number of mice used	Mean survival days[c]	Number of survivors	T/C (%)[d]
EAC	Sup-C	10	41.2	0	113.1
	Sup-SC	10	>49.5	2	>135.9*
	Sed-SC	10	43.0	0	118.1
	Saline (control)	10	36.4	0	
S-180	Sup-C	10	44.2	0	114.5
	Sup-SC	10	>49.7	2	>128.7*
	Sed-SC	10	44.5	0	115.2
	Saline (control)	10	38.6	0	

a),b) See footnotes a),b) of Table 1.
c) Evaluation was performed 60 days after inoculation of tumor cells in mice.
d) (Mean survival days of treated group/mean survival days of control group) ×100.
*$p<0.05$, compared with control by generalized Wilcoxon test.

Table 3. Antitumor activity of 60% ethanol fraction (EF) of Sup-SC prepared from *E.lentum* ATCC 25559: effect on the tumor weights of tumor-bearing mice in three different tumor cells

Tumor cell[a] inoculated	Preparation injected[b]	Number of mice used	Tumor weight[c] (mean±SD,g)	Inhibition[d] ratio (%)
EAC	EF	19	3.4±1.0	46.1*
	Saline (control)	18	6.3±2.9	
S-180	EF	18	3.2±1.5	39.7*
	Saline (control)	9	5.3±1.8	
Meth A	EF	20	1.8±0.5	43.8*
	Saline (control)	16	3.2±1.1	

a) EAC, Ehrlich ascites carcinoma; S-180, Sarcoma 180; Meth A, Meth A fibrosarcoma.
b) See footnotes b) of Table 1.
c) Evaluation was performed 25, 25 or 20 days after the inoculation of EAC, S-180 or Meth A cells in mice, respectively.
d) See footnotes d) of Table 1.
*$p<0.01$, compared with control by Student's t-test.

EAC 細胞移植実験では，移植10日目頃より対照群との間の腫瘍重量の差異が現れはじめた．25日目の平均腫瘍重量は対照群の 6.3g に対し，EF 投与群では 3.4g にすぎず腫瘍増殖阻止率は46.1%であり，高い抑制率 ($p<0.01$) が認められた (表3).

S-180 細胞移植実験でも10日目頃より対照群との間の腫瘍重量の差異が現れはじめ，25日目の観察では，対照群の平均腫瘍重量5.3g に対し，EF 投与群は3.2g にすぎず腫瘍増殖阻止率は39.7%であり有意差 ($p<0.01$) がみられた．

Meth A 細胞移植実験では，20日目の平均腫瘍重量は対照群3.2g，EF 投与群1.8g であり，EF 投与群における腫瘍増殖阻止率は43.8%であり先と同様，有意 ($p<0.01$) な腫瘍重量の抑制が認められた．

2．生存日数による判定

EF 標品を投与した場合，EAC, S-180, Meth A 細胞いずれの細胞移植実験においても明らかな延命効果が認められた．即ち，EAC, S-180, Meth A 細胞担癌マウス (各20匹) に EF 標品を投与した時，60日以上生存したマウスは各々4，3，4匹であり，かつ T/C も139.6%以上，136.9%以上，136.7%以上であり，対照群と較べた時有意 ($p<0.01$) な延命が認められた (表4).

以上の結果，EF は，EAC 細胞，S-180 細胞，Meth A 細胞の3種の腫瘍群に対し抗腫瘍活性を有することが分かった．

III．等電点沈殿法による抽出物質の抗腫瘍活性

E. lentum ATCC 25559 株 EF より等電点沈殿法で抗腫瘍活性物質の抽出を行い，pH2.0，pH4.0，pH6.0 の各画分について抗腫瘍活性を検討した．本実験も先の実験と同様 EAC 細胞，S-180 細胞および Meth A 細胞について行った．この際各画分は PB 25ml に懸濁した．この時の蛋白濃度は pH2.0 画分が11μg/ml，pH4.0 画分が410μg/ml，pH6.0 画分が264μg/ml であった．

1．腫瘍重量による判定

EAC 細胞移植実験では，20日目の平均腫瘍重量は対照群では3.9g，pH2.0，pH4.0画分投与群では各々3.6g，2.9g であり，腫瘍増殖阻止率は各々7.7%，25.7%にすぎず対照群に対し有意差はなかった (表5)．しかしながら pH6.0 画分投与群では，平均腫瘍重量は 1.8g にすぎず，腫瘍増殖阻止率は53.9%に及び有意 ($p<0.01$) な腫瘍重量の抑制がみられた．

S-180 細胞移植実験においては，EAC 細胞の場合と同様，20日目の観察では，対照群の平均腫瘍重量は5.3g，pH2.0，pH4.0画分投与群の平均腫瘍重量は各々4.4g，4.6g であり，腫瘍増殖阻止率は17.0%，13.3%にすぎず対照群に対し有意差は認められなかった．しかしながら，pH6.0画分投与群では腫瘍重量は2.2g にすぎず，腫瘍増殖阻止率は58.5%であり前者と同じく腫瘍増殖の抑制 ($p<0.01$) がみられた．

Meth A 細胞移植実験でも pH2.0，pH4.0画分投与群は対照群とほぼ同程度の腫瘍増殖を示し，20日目の腫瘍増殖阻止率は各々4.6%，−4.5%であり対照群に対し有意差は認められなかった．pH6.0画分投与群では，腫瘍重量は2.7g，阻止率は39.0%であり有意 ($p<0.01$) な抑制がみられた．

2．生存日数による判定

EAC 細胞移植実験では，pH6.0 画分投与群で明らかな延命効果が認められ，移植後60日目で5匹のマウスが生存しており，T/C は135.3%以上であり対照群に対し有意 ($p<0.01$) な差異が認められた (表6).

Table 4. Antitumor activity of 60% ethanol fraction (EF) of Sup-SC prepared from *E.lentum* ATCC 25559: effect on the survival of tumor-bearing mice in three different tumor cells

Tumor cell[a] inoculated	Preparation injected[b]	Number of mice used	Mean survival days[c]	Number of survivors	T/C (%)[d]
EAC	EF	20	>42.6	4	>139.6*
	Saline (control)	20	30.5	0	
S-180	EF	20	>37.8	3	>136.9*
	Saline (control)	20	27.6	0	
Meth A	EF	20	>39.8	4	>136.7*
	Saline (control)	20	29.1	0	

a), b) See footnotes a), b) of Table 3.
c), d) See footnotes c), d) of Table 2.
*$p<0.01$, compared with control by generalised Wilcoxon test.

Table 5. Antitumor activity of fractions obtained at different pH values of EF prepared from *E.lentum* ATCC 25559: effect on the tumor weights of tumor-bearing mice in three different tumor cells

Tumor cell[a] inoculated	Preparation injected[b] / Fraction obtained at pH of	Number of mice used	Tumor weight[c] (mean±SD,g)	Inhibition[d] ratio (%)
EAC	pH 2.0	15	3.6±1.0	7.7
	pH 4.0	15	2.9±1.2	25.7
	pH 6.0	15	1.8±0.8	53.9*
	Saline (control)	15	3.9±1.5	
S-180	pH 2.0	15	4.4±0.7	17.0
	pH 4.0	15	4.6±1.3	13.3
	pH 6.0	15	2.2±0.2	58.5*
	Saline (control)	15	5.3±1.7	
Meth A	pH 2.0	15	4.2±1.8	4.6
	pH 4.0	15	4.6±1.5	−4.5
	pH 6.0	15	2.7±1.6	39.0**
	Saline (control)	15	4.4±2.1	

a) See footnotes a) of Table 3.
b) See footnotes b) of Table 1. Each fraction was obtained by isoelectric point precipitation of ethanol fraction.
c) Evaluation was performed 20 days after the inoculation of tumor cells in mice.
d) See footnotes d) of Table 1.
*$p<0.01$, compared with control by Student's t-test.
**$p<0.05$, compared with control by Student's t-test.

Table 6. Antitumor activity of fractions obtained at different pH values of EF prepared from *E.lentum* ATCC 25559: effect on the survival of tumor-bearing mice in three different tumor cells

Tumor cell[a] inoculated	Preparation injected[b] / Fraction obtained at pH of	Number of mice used	Mean survival days[c]	Number of survivors	T/C (%)[d]
EAC	pH 2.0	15	37.2	0	109.7
	pH 4.0	15	>39.4	2	>116.2
	pH 6.0	15	>45.9	5	>135.3*
	Saline (control)	15	33.9	0	
S-180	pH 2.0	15	37.8	0	102.1
	pH 4.0	15	39.7	0	107.2
	pH 6.0	15	>51.6	5	>139.4*
	Saline (control)	15	37.0	0	
Meth A	pH 2.0	15	36.0	0	103.7
	pH 4.0	15	36.7	0	105.7
	pH 6.0	15	>45.9	4	>132.2*
	Saline (control)	15	34.7	0	

a), b) See footnotes a), b) of Table 5.
c), d) See footnotes c), d) of Table 2.
*$p<0.01$, compared with control by generalised Wilcoxon test.

S-180 細胞，Meth A 細胞移植実験においてもEAC 細胞の場合と同様，pH6.0 画分投与群においてのみ高い延命効果が認められた．pH6.0画分を投与した S-180 細胞，Meth A 細胞担癌マウスにおいて，各々5，4匹の生存マウスが存在し，T/C は139.4%以上，132.2%以上でありいずれも対照群に較べ有意 ($p<0.01$) な差異が認められた．

以上の結果，pH6.0で抽出された物質が抗腫瘍活性を持つことが分かった．

IV．pH6.0画分の用量－反応関係

pH6.0画分標品を凍結乾燥し，濃度を 3.5mg/ml (115μg 蛋白/ml)，7.5mg/ml (247μg 蛋白/ml)，15.0mg/ml (495μg 蛋白/ml)，22.5mg/ml (742μg 蛋白/ml) の4段階に分け，用量－反応関係の検討を行った．本実験には Meth A 細胞を用い，1群15匹のマウスを使用した．

1．腫瘍重量による判定

標品投与期間中 (投与3日～投与7日) に 22.5mg/ml 濃度投与群は急激な全身の衰弱を示し，すべてのマウスが斃死した．

25日目の平均腫瘍重量は，対照群が 4.8g，3.5mg/ml 濃度投与群では 4.2g であり腫瘍増殖阻止率は 12.5%にすぎず対照群に対し有意差はなかった (表7)．しかしながら，7.5mg/ml および 15.0mg/ml 濃度投与群では平均腫瘍重量が各々 3.2g，2.6g，腫瘍増殖阻止率は各々33.4%，45.9%であり有意 ($p<0.01$) な腫瘍重量の抑制がみられた．

2．生存日数による判定

腫瘍重量の結果と同様 7.5mg/ml および 15.0mg/ml 濃度投与群では明らかな延命効果が認められ，移植後60日目で各々1匹，3匹のマウスが生存しており，T/C は各々131.9%以上，136.7%以上であり，対照群に較べ有意 ($p<0.01$，$p<0.05$) な差異が認められた (図1)．

以上の結果，pH6.0画分標品はマウスあたり 7.5-15.0mg/ml (247-495μg 蛋白/ml) の濃度で高い抗腫瘍活性を示すことが分かった．

V．pH6.0画分標品の投与経路別にみた抗腫瘍活性

pH6.0画分標品の抗腫瘍活性が投与経路の差異によ

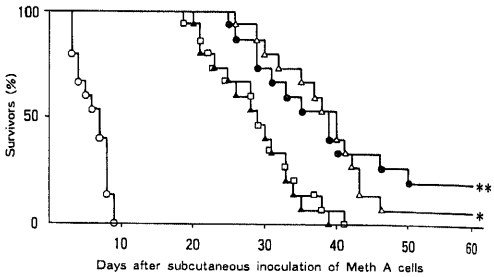

Fig. 1. Survival of mice with solid type tumor of Meth A cells by the intramuscular injection of the pH 6.0 fraction from *E. lentum* ATCC 25559. A 0.2-ml volume of tumor cell suspension (1×10^7 cells) was inoculated subcutaneously into the back of a mouse. Injection of a 0.2-ml volume of each preparation was began 2 days after the inoculation and then performed once a day during 9 days into a foreleg. Concentration of the pH 6.0 fraction: ○, 22.5 mg/ml; ●, 15.0 mg/ml; △, 7.5 mg/ml; ▲, 3.5 mg/ml; □, PB(control). *$p<0.01$, compared with control by generalised Wilcoxon test. **$p<0.05$, compared with control by generalised Wilcoxon test.

Table 7. Antitumor activity of *E.lentum* ATCC 25559 preparations: effect on the tumor weights of tumor-bearing mice with the solid type tumor of Meth A cells

Concentration of pH 6.0 fraction injected (mg/ml)[a]	Number of mice used	Tumor weight[b] (mean±SD, g)	Inhibition[c] ratio (%)
3.5	13	4.2±1.7	12.5
7.5	13	3.2±1.4	33.4*
15.0	15	2.6±1.2	45.9*
22.5	0		
control	13	4.8±1.2	

a) See footnotes b) of Table 1.
b) Evaluation was performed 20 days after the inoculation of tumor cells in mice.
c) See footnotes d) of Table 1.
*$p<0.01$, compared with control by student's t-test.

り変化があるかを検討した．投与経路は従来通りの前肢の筋肉内 (IM)，直接腫瘍内への局所注射 (IT) および腹腔内 (IP) の3経路について検討した．pH6.0画分の投与量は用量－反応関係の結果に基づき蛋白濃度370μg/ml に調整した．腫瘍細胞は Meth A 細胞を使用し，1群10匹のマウスを使用した．

IM, IT, IP 投与群の20日目の平均腫瘍重量は各々7.6g,7.6g，7.0g，腫瘍増殖阻止率は各々30.3%，30.3%，35.8%であり共に対照群に較べ有意差 ($p<0.05$) を認めた (表8)．しかしながら，最も腫瘍増殖阻止率の高い IP 投与群と他の群との間に有意差はみられなかった．また生存日数においても同様な結果であった．

このことより *E. lentum* ATCC 25559 株 EF, pH 6.0画分標品は IM, IT および IP いずれの投与経路においても抗腫瘍活性を発現しうることが分かった．

VI. pH6.0 画分標品の抗腫瘍活性の熱安定性

100°C10分加熱 pH6.0 画分 (蛋白濃度，370μg/ml) の抗腫瘍活性を Meth A 細胞担癌マウス10匹を用いて検討した．20日目の腫瘍重量1.0g，また平均生存日数は52.6日であり，非加熱 pH6.0 画分投与群 (腫瘍重量，1.2g，平均生存日数，55.1日) に較べ有意差が認められなかった．

VII. 病理組織学的所見

Meth A 細胞担癌マウスに対し，腫瘍細胞接種後2日目から EF の pH6.0画分標品の投与を行い，投与7日目に腫瘍組織を摘出し，病理組織学的に検討した．

対照群では，類円形核を有する多形腫瘍細胞が髄様に増殖し，大小不同，多数の核分裂像がみられた．また，小さな壊死巣をみるもリンパ球等の炎症細胞浸潤は認めなかった．これに対し，標品投与群では，腫瘍組織内およびその周囲に著明なリンパ球の浸潤を認め，間質に対する腫瘍細胞の面積は明らかに小さくなっている所見がみられた (図2)．

更に免疫染色の結果，標品投与群の腫瘍組織に浸潤したリンパ球の大多数は L3T4 陽性T細胞であることが分かった (図3)．

考　　察

細菌による抗腫瘍活性についての研究は古く，1868年の Busch[1] に始まり，感染症の中でも丹毒すなわち *Streptococcus pyogenes* の感染の合併が肉腫患者の腫瘍の縮少と関連することが報告された．更にここから発展した Coley's toxin[2] が考案され，腫瘍患者の治療が試みられた．このことは現在の免疫療法の基礎になったと言われており，以来種々の研究が報告されている．特に Reinhard ら[26] は小児白血病患者と感染症に着目し，自然治癒したものの75%が急性感染症の後に起こっていると報告している．更に現在までに BCG, *Streptococcus*，大腸菌等数多くの研究がなされ，その内の何種類かは現在臨床治療につかわれている[7)27)~33)]．これらはいずれも好気性菌に関するものであり，嫌気性菌に関する研究は *Clostridium*[9)19)]，嫌気性 *Corynebacterium*[10)34)35)] 等について報告されているだけで比較的少ない．

口腔には，*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Peptostreptococcus*, *Neisseria*, *Bacteroides*, *Veillonea*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* 等多種類の細菌が常在菌として存在している．また嫌気性培養技術の進歩により，口腔内炎症性疾患からの嫌気性菌の分離率は高まっており，玉井[36] によれば口腔内感染症の44%に嫌気性菌の感染が認められ，また歯性上顎洞炎からの分離菌では40.9%が嫌気性菌で占められ，その内訳は，*Veillonella* (19.5%), *Peptococcus* (8.2%), *Peptostreptococcus* (4.3), *Propionibacte-*

Table 8. Injection route and antitumor activity of pH 6.0 fraction prepared from *E.lentum* ATCC 25559 in tumor-bearing mice with the solid type tumor of Meth A cells

Injection[a] route	Number of mice used	Tumor weight[b] (mean±SD, g)	Inhibition[c] ratio (%)
IM	10	7.6±1.6	30.3*
IT	10	7.6±2.0	30.3*
IP	10	7.0±1.3	35.8*
control	10	10.9±2.2	

a) IM, intramuscular ; IT, intratumoral ; IP, intraperitoneal.
b), c) See footnotes b), c) of Table 7.
*$p<0.05$, compared with control by Student's t-test.

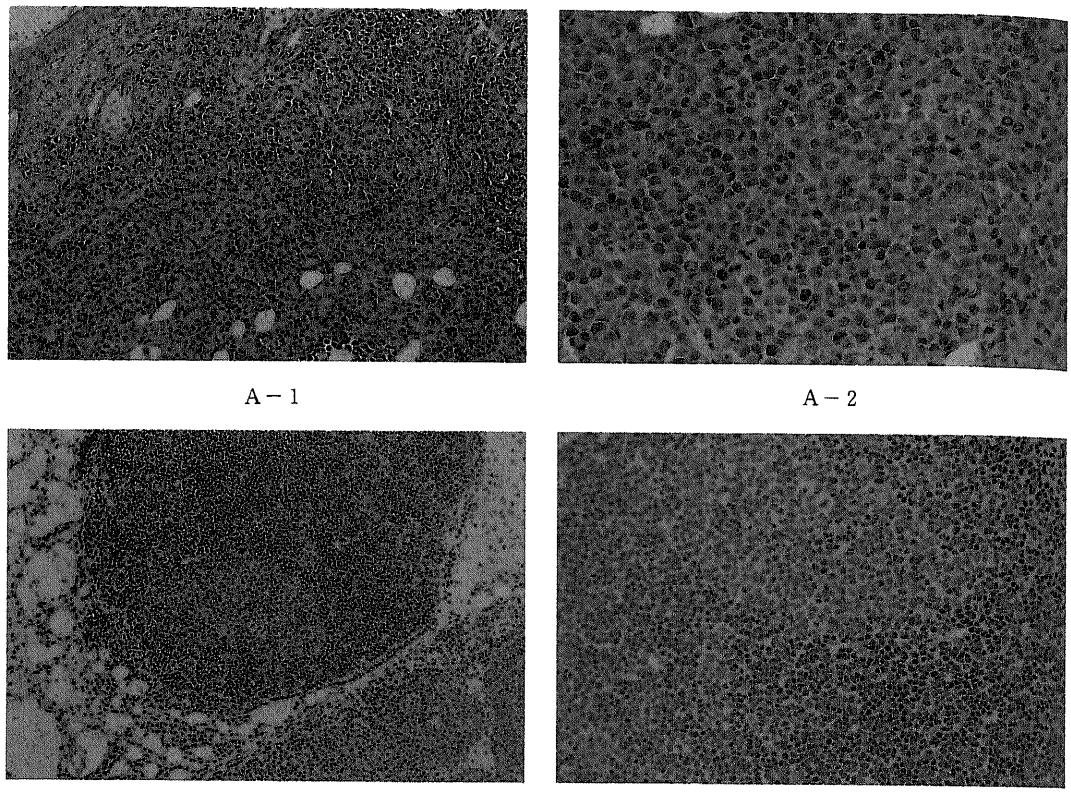

Fig. 2. Hystological photomicrographs of tumor of Meth A cells in mice on successive 7 days injection of pH 6.0 fraction prepared from *E. lentum* ATCC 25559 (Hematoxylin & Eosin stain). A-1: Tumor without therapy. There is solid nest of tumor cells in the dermis to subcutaneous tissue. Lymphocytic infiltration is not found (×186). A-2: Higher magnification of a portion of A-1. Polyhedral tumor cells have oval nuclei, prominent nucleoli and many mitosis are seen (×372). B-1: Tumor after therapy. There is marked lymphocytic infiltration within or around the tumor (×186). B-2: Higher magnification of a portion of B-1 showing of tumor cells (×372).

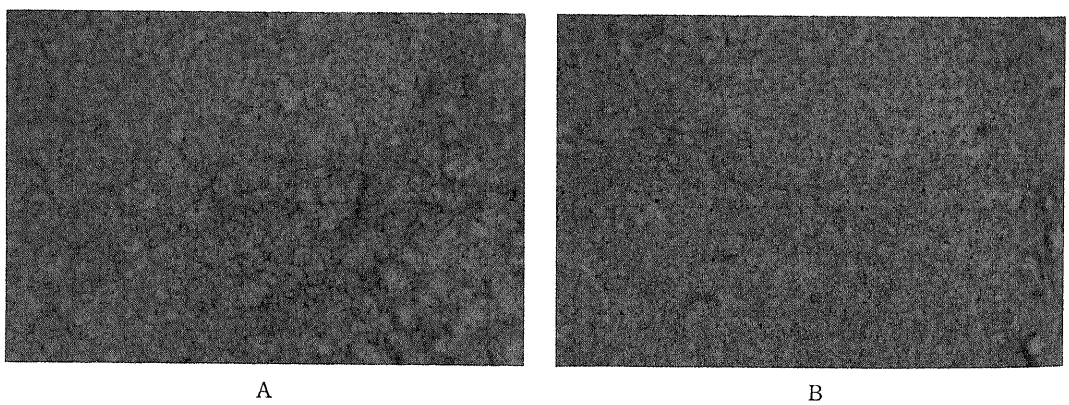

Fig. 3. Distribution of L3T4$^+$ or Lyt2$^+$ T cells in tumor of the same preparation as shown on Fig. 2. (Immunostain by ABC method, ×372). A: Many of the lymphocytes show positive staining for monoclonal anti-L3T4$^+$ antibody which is considered to recognize helper/inducer T cells. B: No lymphocytes show positive staining for monoclonal anti-Lyt2$^+$ antibody.

rium (2.7%), *Eubacterium* (2.7%), *Bacteroides* (1.2%), *Actinomyces* (1.2%), *Bifidobacterium* (1.2%) という成績が報告されている[37].

更に歯石からの分離でもその47%が嫌気性菌で, *Veillonella* (9.7%), *Eubacterium* (8.0%), *Bacteroides* (7.7%), *Peptostreptococcus* (4.3%) 等が分離されている[38].

また, これら口腔内感染症の手術時に偶発する菌血症での菌分離ではグラム陽性菌の分離が高く, 好気性菌群では *Lactobacillus, Staphylococcus, Streptococcus, Corynebacterium*, 嫌気性菌群においては *Eubacterium, Peptococcus, Propionibacterium, Veillonella* の順で分離率が高い. その中でも特に *Eubacterium* は, 全分離菌属中21.4%と最も高率で分離されている[39].

従前, 著者の研究室では口腔内より分離した嫌気性菌の抗腫瘍活性についての検討を行っており, 1981年玉井は *Fusobacterium nucleatum* に抗腫瘍活性があることを見い出し, その後本抗腫瘍物質は本菌の LPS であることを明らかにした[11)~13)]. また中川[14)], 松原[40)]は *Veillonella* の菌体内容物が抗腫瘍活性を示すことを報告し, 次いで坂下[15)]の *Peptococcus magnus*, 加藤[16)]の *Propionibacterium acnes* の菌体細胞壁成分の抗腫瘍活性の報告等, 種々の嫌気性菌が抗腫瘍活性を有することが明らかになってきている.

口腔内では, 前述の菌をはじめとして多数の菌が存在するが, 先に述べたごとく *Eubacterium* はその中でも多数の割合で分離されており, また以上の如く, 多数の口腔内常在細菌が抗腫瘍活性を有していることに鑑み, 本研究では *Eubacterium* の抗腫瘍活性について検討した.

抗腫瘍活性の測定には, 従来抗癌剤のスクリーニングにあたり1次選別試験に用いられている同種腫瘍である EAC 細胞, S-180 細胞, および2次選別試験に用いられている同系腫瘍である Meth A 細胞を使用した[41)].

標品投与時期に関して, 抗腫瘍活性を期待するには比較的早期に, また腫瘍細胞が少ない時期から投与する方が有用に思われるが, 臨床的には, 諸検査で腫瘍が形態的に認められた後に治療が開始されることから, 腫瘍細胞接種後2日目で腫瘍生着が確認できてから治療を開始した. また抗腫瘍活性は腫瘍重量および T/C により判定した.

抗腫瘍活性を検定する方法としては, まず *E. lentum* ATCC 25559 株の培養液を培養上清液 (Sup-C) と菌体に分離し, それらの画分に EAC 細胞および S-180 細胞に対する抗腫瘍活性が存在するか否かを検討することにした. その際の培養時間は, 家兎を使った皮膚毒性の実験で48時間培養液に最も強い皮膚反応が認められたので, 本実験の培養時間も48時間とした[42)]. 菌体はさらに有効成分を追求するため超音波破砕機によって破壊し, 遠心上清 (Sup-SC)(主として菌体内容物) と遠心沈渣 (Sed-SC) (主として菌体細胞壁, 菌体超音波沈渣) に分けて検討した. その結果 Sup-C および Sed-SC には抗腫瘍活性は認められなかった. しかしながら Sup-SC では, 平均腫瘍重量値を比較したいわゆる腫瘍増殖阻止率が有効な値を示し, 生存日数の T/C の値も最も高かった. これにより菌体内容物には抗腫瘍活性を示す可溶性成分が含まれることが判明した. 次にこの Sup-SC から糖蛋白質, 蛋白質を抽出するため有機溶媒法を行った[43)].

沈殿作用を持つ有機溶媒には, アセトン, メタノール, エタノールなどが存在するが, アセトン, メタノールなどは糖蛋白質類, 蛋白質類等を沈殿させるのにエタノールより高濃度が必要なこと, 更にアセトンは脂質を可溶化して蛋白質類を沈殿させるため, 本実験では不向きであると考えエタノールを使用した[44)]. 一般にエタノールは40%の濃度でほとんどの蛋白質類を沈殿させるとされているが, 60%のエタノール濃度が最も高い抽出作用があるという従来の報告[15)]にしたがい本実験もそれに準じて行った.

このようにして得られた60%エタノール画分 (EF) を EAC 細胞, S-180 細胞および Meth A 細胞に作用させたところ, 腫瘍形成に対する抑制作用がみられた. 更に, 等電点沈殿法により EF を精製した[44)]. 等電点法は粗活性物質を含む溶液から活性物質の溶解度の差を利用して活性物質を沈殿させる方法で, 古くは *Clostridium botulinum (Cl. botulinum)* の毒素の抽出法が知られている[45)]. これは *Cl. botulinum* の培養液に塩酸を加え pH を変化させることでA型からD型の毒素を抽出したものである. 本法は一般に溶解度の比較的小さい蛋白質などの分別に使用されるが, この際には塩類濃度を低くする必要があるとされている. その理由として, 塩類の添加により蛋白質の等電点が酸性にずれ, 無塩の状態での等電点とは異なってくるからである[43)]. 本実験では菌体を洗浄し, 培地成分の混入を極力避けているため, 塩類の干渉の可能性はほとんどないと思われる. 実際の pH の調整は, 溶液の局所的な pH の急激な変動を避ける意味で 1/15 MのPB を使用し, 10N HCl を用いて pH の調整を行った. こうして得られた pH6.0 の沈殿画分において, 腫瘍重量および T/C で他の画分に較べて著しい

抗腫瘍活性が認められた．このため至適 pH を pH 6.0 とし本標品を凍結乾燥し，用量－反応関係の検討を行うことにより至適量の存在の有無を調べた．

その結果 742μg 蛋白/ml の濃度のものを投与した群では高濃度すぎ，腫瘍死する以前にマウスは斃死した．また逆に最も濃度の薄い 115μg 蛋白/ml の濃度を投与した群にはほとんど活性がみられなかった．しかしながら，その中間の 247，495μg 蛋白/ml の濃度を投与した群では，対照群に較べ有意な腫瘍形成の抑制および生存期間の延長を認めた．このことから，本標品の抗腫瘍効果の発現には一定量を越えて細胞内に侵入することが必要で，投与量と抗腫瘍活性の量的反応には至適量が存在すると考えられた．また本標品を 100°C，10分間加熱し，担癌マウスを使い熱安定性を調べたところ，抗腫瘍活性は非加熱の場合と変化がなかったことから，抗腫瘍物質の本態は蛋白ではないと推擦された．

菌体細胞内部の成分の持つ生物活性については，ほとんどその追求はされていなかった．しかし最近，グラム陽性桿菌 *Mycobacterium bovis* BCG の菌体成分から抽出した核酸画分の抗腫瘍活性が報告され，その主成分は DNA であることが明らかにされた[46]．また口腔内で歯石形成に関与するグラム陽性桿菌 *Bacterionema matruchotii* の菌体成分にも免疫細胞を賦活化させる物質のあることが解明され報告されている[47]．この抽出物質は，その組成中にアミノ糖を含んでいないことや，本菌がグラム陽性菌であり，リムルステスト陰性であることから，ペプチドグリカンや LPS とは異なったものではあるが，LPS に類似した活性を示すことが明らかにされている．本研究で明らかにされた *E. lentum* の菌体内抗腫瘍物質の本態については，上述の物質との関連を含めて，更なる研究が必要とされる．

次に投与経路の差による実験では，IT による投与群と，腫瘍局所と薬液との直接的な接触がない IM, IP による投与群との間には特に有意差がなく，直接的な細胞傷害作用の可能性は考えにくいと思われた．しかしながら，その各投与群の中で IP 投与による腫瘍増殖阻止率が最も高かったことは，本標品と網内系との間のなんらかの関わりを窺わせるものである[34]．

一方，病理組織学的な検討をしたところ，処置群には腫瘍組織内およびその周囲にリンパ球が多数認められた．そこで今回，モノクローナル抗体を用いた ABC 法による免疫組織学的検索を行った．ABC 法はビオチン (ビタミンH) と，その捕捉蛋白であるアビジンとの非常に強固な結合能を利用した酵素標識抗体法で，ビオチンを結合させた抗体を作製し，更にビオチンを標識し，アビジンを介してビオチン化抗体とビオチン化マーカーとを結合し抗原を検出する方法である．本実験に使用したモノクローナル抗体のうち，抗マウス Lyt2 はサプレッサー/キラー/細胞傷害成T細胞を識別し，抗マウス L3T4 はヘルパー/インデューサーT細胞を識別する．

その結果，pH6.0画分標品投与群では腫瘍組織内に浸潤したリンパ球は，大部分がヘルパー/インデューサーT細胞と思われる細胞表面形態を有するT細胞が優位に浸潤していた．これらの所見により，*E. lentum* ATCC 25559 株の Sup-SC の抗腫瘍活性は生体の免疫系を介して働くものと考えられた．

結　　論

E. lentum ATCC 25559 株菌体の超音波処理上清液 (Sup-SC) の抗腫瘍活性をエールリッヒ腹水癌 (EAC) 細胞，サルコーマ180 (S-180) 細胞およびメス A (Meth A) 細胞の固型腫瘍について検討し次の結果を得た．

1．*E. lentum* ATCC 25559 株 Sup-SC は，EAC 細胞および S-180 細胞の固型腫瘍に対して，対照群と比較して腫瘍増殖阻止率で23.1－43.1%，生存率の比においては128.7－135.9%以上を示し，抗腫瘍活性を認めた．

2．Sup-SC を60%エタノール処理することにより得られたエタノール画分 (EF) は，EAC 細胞，S-180 細胞および Meth A 細胞の固型腫瘍に対し腫瘍増殖阻止率で39.7－46.1%，生存率の比で136.7－139.6%以上を示し，抗腫瘍活性を認めた．

3．EF を更に等電点沈殿法で処理したところ，pH6.0 画分において抗腫瘍活性の向上がみられ，EAC 細胞，S-180 細胞および Meth A 細胞に対し腫瘍増殖阻止率で39.0－58.5%，生存率の比で132.2－139.4%以上と高い抗腫瘍活性を認めた．

4．pH6.0画分の用量－反応関係を Meth A 細胞を使って調べたところ，7.5-15.0mg/ml (247-495μg蛋白/ml) の濃度において腫瘍形成の抑制 (腫瘍増殖阻止率，33.4－45.9%；生存率の比，131.9－136.7%以上) が認められ，本物質には至適濃度が存在し，また本標品は熱安定性を有していたことから，その本体は蛋白ではないことが推測された．

5．pH6.0 画分標品の投与経路を，筋肉内，腫瘍内および腹腔内注射と変え，各々の抗腫瘍活性を Meth A 細胞について検討したところ，腫瘍増殖阻止率はそれぞれ30.3%，30.3%，35.8%を示しいずれも抗腫瘍

活性を認めたが，中でも腹腔内投与群で最も高い腫瘍増殖阻止率を示す結果が得られた．

6．病理組織学的に検討した結果，pH6.0画分標品投与群では，腫瘍組織内およびその周囲に L3T4 陽性T細胞を主とする多数のリンパ球の浸潤が認められた．

以上の成績より，*E. lentum* ATCC 25559 株 Sup-SC より抽出した抗腫瘍物質の作用は免疫系が関与していることが示唆された．

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，本研究にあたり多大なる御指導，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．更に本研究に際し，貴重な菌株を分与いただいた金沢大学医療技術短期大学部，山岸高由教授，本実験遂行にあたり御協力を戴いた中川清昌助教授，加藤隆三博士ならびに歯科口腔外科学教室諸兄に厚く御礼申し上げます．

文　　献

1) **Busch, W.:** Verhandlungen ärztlicher Gesellschften. Berl. Klin. Wochenschr., **5,** 137-138 (1868).

2) **Coley, W. B.:** Contribution to the knowledge of sarcoma. Ann. Surg., **14,** 199-220 (1891).

3) **Sher, M. J.:** Chemical treatment of tumors. IV. Properties of hemorrhage-producing fraction of *B. coli* filtrate. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **34,** 325-326 (1936).

4) **Sher, M. J. & Turner, F. G.:** Chemical treatment of tumors. V. Isolation of the hemorrhage-producing fraction from *Serratia marcescens (Bacillus prodigiosus)* culture filtrate. J. Natl. Cancer Inst., **4,** 81-97 (1943).

5) **Jacobs, F. A.:** Damage produced by a *Pseudomonas aeruginosa* fraction in Sarcoma 37. Cancer Res., **10,** 227 (1950).

6) **Mihich, E. & Neter, E.:** Necrotizing effects of *Staphylococcus aureus* extract on mouse Sarcoma 180. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **106,** 97-101 (1961).

7) **Morton, D. L., Eilber, F. R., Malmgren, R. A. & Wood, W. C.:** Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. Surgery, **68,** 158-164 (1970).

8) **Kayser, D.:** Über den Mechanismus der Abtötung von Ascites-Krebszellen durch *Clostridium butyricum*. Z. Naturforsch., **18,** 748-752 (1963).

9) **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).

10) **Halpern, B. N., Biozzi, G., Stiffel, C. & Mouton, D.:** Inhibition of tumor growth by administration of killed *Corynebacterium parvum*. Nature, **212,** 853-854 (1966).

11) **玉井健三：** *Fusobacterium* KO-31 株の培養上清液および菌体成分の抗腫瘍作用について－1－．嫌気性菌感染症研会11回講記録，94-104 (1981).

12) **Tamai, K., Nakao, J., Takematsu, K. & Nakagawa, K.:** Studies on the antitumor activity of *Fusobacterium nucleatum* strain KO-31. Microbiol. Immunol., **26,** 163-165 (1982).

13) **Tamai, K., Watanabe, K. & Maeda, T.:** Antitumor activity of sediment fractions from *Fusobacterium nucleatum* culture supernatant. Jpn. J. Exp. Med., **54,** 159-170 (1984).

14) **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).

15) **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).

16) **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).

17) **Holdeman, L. V. & Moore, W. E. C.:** Actinomycetes and related organisms. *In* R. E. Buchanan & N. E. Gibbons(eds.), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., p641-657, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.

18) **玉井健三，福田順子：** 口腔内嫌気性菌の研究，第1報分離培地の検討．日口腔科会誌，**19,** 495-504 (1970).

19) **佐藤　博：** 日本で維持されている可移植性腫瘍株一覧表，文部省61年度研報録，8, 9-21 (1987).

20) **三輪史郎：** 血液検査．臨床検査法提要（金井泉，金井正光編），第29版，234-235 頁，金原出版，東京，1983.

21) **Geran, R. I., Greenberg, N. H., Macdonald, M. M., Schumacher, A. M. & Abbott, B. J.:** Protocols for screening chemical agents and natural

products against animal tumors and other biological system. Cancer Chemother. Rep., **3**, 47-52 (1972).

22) 杉原 信：受精鶏卵漿尿膜法を用いた骨軟部悪性腫瘍に対する抗癌剤感受性試験法の研究．十全医会誌，**97**, 1032-1043 (1988).

23) Bradford, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., **72**, 248-254 (1976).

24) 慶応義塾大学医学部病理学教室：病理組織学標本の作り方．第6版，1-80頁，医学書院，東京，1986.

25) Hus, S. M., Raine, L. & Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques; a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histchem. Cytochem., **29**, 577-580 (1981).

26) Reinhard, E. H., Good, J. J. & Martin, E.: Chemotherapy of malignant neoplastic diseases. J. Am. Med. Assoc., **142**, 383-390 (1950).

27) Zbar, B. & Tanaka, T.: Immunotherapy of cancer: regression of tumors after intralesional injection of living *Mycobacterium bovis*. Science, **172**, 271-273 (1971).

28) Ribi, E. E., Granger, D. L., Milner, K. C. & Strain, S. M.: Brief communication: tumor regression caused by endotoxins and mycobacterial fractions. J. Natl. Cancer Inst., **55**, 1253-1257 (1975).

29) Yamamura, Y., Ogura, T., Yosimoto, T., Nishikawa, H., Sakatani, M., Masuno, T., Namba, M., Yazaki, H., Hirao, F. & Azuma, I.: Successful treatment of the patients with malignanat pleural effusion with BCG cell wall skeleton. Gann, **67**, 669-677 (1976).

30) Koshimura, S., Murasawa, K., Nakagawa, K., 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. Jpn. J. Exp. Med., **25**, 93-102 (1955).

31) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R.: Studies on the anticancer and streptolysin S-forming abilities of hemolytic streptococci. J. Microbiol., **11**, 323-336 (1967).

32) 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).

33) Watanabe, T.: Regression of mouse ascites tumors by the treatment with bacterial extracts. Jpn. J. Exp. Med., **36**, 453-455 (1966).

34) 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).

35) Scott, M. T.: Potentiation of the tumor-specific immune response by *Corynebacterium parvum*. J. Natl. Cancer Inst., **55**, 65-72 (1976).

36) 玉井健三：口腔内嫌気性菌感染症．嫌気性菌感染症研究，**15**, 247-254 (1985).

37) 室木俊美：歯性上顎洞炎における細菌学的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).

38) 仲井雄一：歯石の臨床細菌学的研究．十全医会誌，**98**, 48-61 (1989).

39) 岡部孝一：抜歯後菌血症の臨床細菌学的研究．十全医会誌，**98**, 1032-1045 (1989).

40) 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**, 1152-1169 (1989).

41) 塚越 茂：米国国立癌研究所の新しい抗癌剤スクリーニング法について．癌と化療，**11**, 1134-1139 (1984).

42) 宮田 勝，玉井健三：嫌気性菌 *(Eubacterium lentum)* の家兎皮膚に対する実験感染症．日口腔科会誌，**36**, 423-434 (1987).

43) 岩永貞昭，山下仁平：分離分析法．生化学実験講座1，タンパク質の化学I (宇井信生，田宮信雄，成田耕造編)，第1版，11-80頁，東京化学同人，東京，1982.

44) 島尾和男：沈殿生成．基礎生化学実験法2，抽出・分離・精製 (阿南功一，紺野邦夫，田村善蔵，松橋通生，松本重一郎編)，第1版，57-74頁，丸善，東京，1974.

45) Snipe, P. T. & Sommer, H.: Studies on botulinus toxin: 3. Acid precipitation of botulinus toxin. J. Infect. Dis., **43**, 152-160 (1928).

46) Tokunaga, T., Yamamoto, H., Shimada, S., Abe, H., Fukuda, T., Fujisawa, Y., Furutani, Y., Yano, O., Kataoka, T., Sudo, T., Makiguchi, N. & Suganuma, T.: Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis*

BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. J. Natl. Cancer Inst., **72**, 955-962 (1984).
47) 新田敏正：菌体成分を用いての免疫細胞活性化の機序の解析：*Bacterionema matruchotii* 由来水溶性アジュバント物質 (Bu-WSA) の作用について．日細誌，**41**, 749-756 (1986).

Studies on Anti-tumor activity of *Eubacterium lentum* strain ATCC 25559

Kazuhide Katoh, Department of Dento-Oral Surgery, school of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920－J.
Juzen Med Soc., **100,** 989－1003 (1991)

Key words anaerobe, anti-tumor activity, *Eubacterium lentum*

Abstract

The supernatant of sonicated cells (Sup-SC) of *Eubacterium lentum (E. lentum)* strain ATCC 25559 was tested for anti-tumor activity on tumor-bearing mice with Ehrlich ascites carcinoma (EAC), Sarcoma 180 (S-180) or Meth A fibrosarcoma (Meth A) cells. Anti-tumor activity was evaluated by the ratio of the mean tumor weight of the mice injected with each preparation, to that of the control mice (tumor inhibition ratio), or by the ratio of the mean survival days of the mice injected with each preparation to that of the control mice (T/C). The culture supernatant and supernatant (Sup-SC) and the sediment of sonicated cells separated by centrifugation, all of which were prepared from 48 hr culture in Tamai-Fukuda medium, were tested for anti-tumor activity using EAC and S-180 cells. Only the Sup-SC showed anti-tumor activity. Therefore, an ethanol fraction (EF) obtained from Sup-SC was tested for activity using EAC, S-180 and Meth A cells (syngeneic tumor cells). The EF showed effective anti-tumor activity to each of the tumor tested; tumor inhibition ratios were 39.7-46.1% and values of T/C were from 136.7 to more than 139.6%. In addition the sediment fractions obtained by isoelectric point precipitation of EF at pH 2.0, pH 4.0 and pH 6.0 were examined. The pH 6.0 fraction showed effective anti-tumor activity to each type of tumor cell tested; tumor inhibition ratios were 39.0-58.5% and values of T/C were from 132.2 to more than 139.4%. The pH 6.0 fraction was freeze-dried and the dose response was examined at concentrations of 3.5, 7.5, 15.0 and 22.5 mg/ml using Meth A cells. High anti-tumor activity was demonstrated at concentrations of 7.4 and 15.0 mg/ml. At a higher concentration (22.5 mg/ml) all the mice died and at a lower concentration (3.5 mg/ml) no effective inhibition of tumor growth was observed. These findings indicate that there is an optimum concentration for the expression of anti-tumor activity. This preparation was not inactivated by heating at 100℃, suggesting that proteins are not implicated. Using Meth A cells, three different injection routes, intramuscular, intratumoral and intraperitoneal were used to compare the level of anti-tumor activity of this preparation. No significant difference in the activity among these three routes was found; tumor inhibition ratios were 30.3-35.8%. Histochemically, it was found that $L3T4^+$ T cells had invaded the tumor region of the mice injected with the preparation. These findings indicate that the Sup-SC prepared from *E. lentum* strain ATCC 25559 has anti-tumor activity. Furthermore, it is suggested that the this activity might arise through the stimulation of the immune system of the tumor-bearing animals.