Veillonella parvula KN-2株の抗腫瘍活性に関する研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2017-10-04
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 松原, 完也
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8156

金沢大学十全医学会雑誌　第98巻　第6号　1152－1167（1989）

Veillonella parvula KN-2 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）
松　原　完　也

（平成1年11月30日受付）

歯肉膿瘍より分離した *Veillonella parvula* (*V. parvula*) KN-2 株の超音波処理上清液 (supernatant of sonicated cells, SS) の担がん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細胞 (Sarcoma 180 cells, S-180 細胞)，エールリッヒ腹水がん細胞 (Ehrlich ascites carcinoma cells, EAC 細胞) およびメス A 細胞 (Meth A fibrosarcoma cells, Meth A 細胞) を用いて検討した．抗腫瘍活性は，SS 投与群マウスの対照群マウスに対する平均生存日数の比 (T/C)，あるいは腫瘍重量の比 (腫瘍重量比) で評価した．SS は3細胞株全てに対し抗腫瘍活性を示し，T/C は125%以上，腫瘍重量比は45.1%～54.5%であった．病理組織学的所見上，SS を投与したマウスの腫瘍部には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．培養細胞に対する増殖抑制活性は，SS 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測定することにより検討した．S-180, EAC 細胞に関しては，SS 濃度1.9，3.8，7.5，15，30 mg 蛋白/ml について，Meth A 細胞に関しては，更に 60mg 蛋白/ml についても検討した．SS は3細胞株全てに対して増殖抑制活性を示したが，Meth A 細胞に対しては幾分弱かった．その作用は濃度依存性であり，S-180, EAC 細胞では SS 濃度15，30mg 蛋白/ml の時，また Meth A 細胞では 60 mg 蛋白/ml の時，細胞の増殖は完全に抑制された．生細胞数の総細胞数に対する割合は SS 濃度の増加と共に減少し，S-180 および EAC 細胞では 30mg 蛋白/ml の時，Meth A 細胞では 60mg 蛋白/ml の時，培養2日目に5%以下になった．^{3}H-チミジンの細胞への取り込みの減少は，細胞への SS 添加直後から見られ，3日間の培養期間中継続した．また，SS による^{3}H-チミジンの取り込みの減少も SS 濃度依存性であり，SS 濃度 30mg 蛋白/ml の時，取り込み量は対照群の10%以下にすぎなかった．フローサイトメトリーにより細胞周期を解析した結果，SS 濃度 7.5mg 蛋白/ml の時，対照群に較べ S 期の細胞の割合が明らかに高かった．形態学的には，SS 存在下で培養された細胞には顕微鏡的に様々な変性がみられた．SS 中の増殖抑制物質は，100°Cの加熱により不活性化されず，また透析膜透過性を示した．以上の結果，*V. parvula* KN-2 株の SS は，担がんマウスに対し抗腫瘍活性を示し，培養がん細胞に対して殺細胞効果を示すことが判明し，その抗腫瘍性物質は低分子で DNA 合成阻害を起こすのではないかということが示唆された．

Key words anaerobe, anti-tumor activity, flow cytometry, thymidine uptake, *Veillonella parvula*

癌は自然には治らないと考えられているが，子細に検討すると自然治癒の報告は決して少なくない．また，そのほとんどは高熱を伴う感染症の合併によるものであり，特に *Streptococcus pyogenes* 感染症である丹毒の合併が重要であるとされている[1]．この観察から出発して癌患者に丹毒を発症させ癌の治療を計る試みが，多数の研究者によってなされた[2~4]．特に Coley[3] は *Streptococcus pyogenes* と *Serratia marce-*

Abbreviations: ADM, adriamycin; DF 培養液, Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum; EAC 細胞, Ehrlich ascites carcinoma cells; FCM, flow cytometry; *F. nucleatum, Fusobacterium nucleatum*; LPS, lipopolysaccharide;

scens との混合死菌体ワクチンである，いわゆる Coley's toxin を考案し，本ワクチンによる癌の治療を試みた．その後約1世紀にわたり BCG 生菌，*Corynebacterium* 死菌体，*Streptococcus pyogenes* Su 株菌体および大腸菌等を中心に，それらの抗腫瘍活性が検討され，数多くの基礎的臨床的研究が集積されて，現在一部臨床応用されている[5)~16)]．細菌の抗腫瘍活性についての研究は，上述の如く，その報告の多くは好気性菌に関するものであり，嫌気性菌に関する研究は，比較的少なく，嫌気性 *Corynebacterium, Clostridium butyricum* 等について報告されているに過ぎない[17)~25)]．

口腔内嫌気性菌の抗腫瘍活性については，*Fusobacterium nucleatum (F. nucleatum)* に関する玉井[26)]の報告が最初で，その後 *Peptococcus*[27)], *Lactobacillus*[28)]等について報告がある．特に *F. nucleatum* の抗腫瘍活性については詳細に研究され，抗腫瘍物質は細胞壁構成成分の一つであるリポ多糖体 (lipopolysaccharide, LPS) であることが示されている[29)~35)]．また，*Peptococcus, Lactobacillus* の抗腫瘍物質については，その抗腫瘍活性が菌体を超音波により破壊した時の遠心沈渣中に存在するところから，細胞壁であるとされている[27)28)]．

Veillonella は口腔内炎症性疾患，特に，歯肉膿瘍，顎嚢胞，上顎洞炎などから比較的高率に分離され，これら疾患の主因菌とも考えられている[36)~38)]．*Veillonella* の抗腫瘍活性については中川[39)]，八木[40)]により報告されたが，本菌の場合上述の菌とは異なり，その抗腫瘍物質は細胞質成分であることが示唆された．

著者は *Veillonella* の抗腫瘍機構を解明することを目的として，*Veillonella parvula (V. parvula)* KN-2 株を用いて，動物実験により抗腫瘍活性を検討すると共に，培養細胞に対する増殖抑制活性についても検討した．

材料および方法

I．*V. parvula* 菌体からの超音波処理上清液 (supernatant of sonicated cells, SS) の調製

1．使用菌株および培養法

口腔内炎症疾患である歯肉膿瘍からの分離菌株である *V. parvula* KN-2 株を実験に使用した．本菌株は分離後，Bergey's manual[41)] に従い同定した金沢大学医学部歯科口腔外科学教室保存菌株である．凍結保存された本菌株を中試験管に作製した15ml の玉井－福田培地[42)] (Tamai-Fukuda medium, TF 培地) (ニッスイ，東京) で37°C・48時間培養後，1白金耳を TF 血液寒天平板に塗抹し，ガスパック® (Becton Dickinson, Cockeysville, U.S.A.)を用いて48時間嫌気培養を行った．得られたコロニーを再度 TF 培地 (15ml) に釣菌移植し、37°C・48時間培養後，TF 培地 (100ml) に 5ml を移植し，37°C・48時間培養した．その後さらに，その培養菌液 50ml を1,000 ml の TF 培地に移植し，37°C・72時間本培養を行った．

2．SS の調製

先に得られた培養液の1,000 ml (あるいは4,000 ml) を4°Cにて6,500 ×g ・20分間遠心した．得られた沈渣 (菌体) に 1/15 M 燐酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) 50ml (あるいは 20ml) を加え，超音波破砕器 Model UR-200p (20 KHz) (トミー精工，東京) を用いて20分間超音波処理することにより，菌体を破壊した．超音波処理菌液を 4 °Cにて 10,000×g・20分間遠心し，得られた上清液を SS として使用した．

II．マウス固型腫瘍における抗腫瘍活性の測定

1．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，教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24～26g)，5週齢の BALB/c マウス (体重20～22g) を実験に供した．

2．腫瘍細胞の培養

教室でマウス腹腔内で継代培養している[43)]サルコーマ180細胞 (Sarcoma 180 cells, S-180 細胞)，エールリッヒ腹水がん細胞 (Ehrlich ascites carcinoma cells, EAC 細胞)，メス A 細胞 (Meth A fibrosarcoma cells, Meth A 細胞) を用いた．S-180 細胞および EAC 細胞は ICR 系マウス，Meth A 細胞は BALB/c マウスの腹腔内で7日目ごとに継代培養した．培養7日目に腫瘍細胞 (腹水) を無菌的に採取した．採取後，チュルク型の血球計算板を用い，白血球算定基準[44)]にしたがって細胞数を算定し，適量の生理食塩水を加え，5.0×10^7個/ml の細胞浮遊液を調製し実験に供した．

3．担がんマウスの作成および SS の投与法

Meth A 細胞，Meth A fibrosarcoma cells；MMC, mitomycin C；PBS, phosphate-buffered saline；S-180 細胞，Sarcoma 180 cells；SS, supernatant of sonicated cells；TF 培地，Tamai-Fukuda medium；*V. parvula, Veillonella parvula*

S-180, EAC 細胞には ICR 系マウス，Meth A 細胞の移植には BALB/c マウスを使用した．実験に際し，マウスの背部を電動バリカン Thrive animal clipper Model 900 (大東電気工業，東京) を用いて剃毛し，エタノールで消毒後，マウスの皮下に細胞浮遊液 (5.0×10^7個/ml) の 0.2ml を移植した．48時間経過後，マウスの前肢に SS を 0.2ml，1日1回，2週間連日投与した．

4．抗腫瘍活性の判定

1）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，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 の計算式によって T/C (%) を求めて判定した[45]．S-180, EAC 細胞では60日観察，Meth A 細胞では50日観察とした．

2）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長径 (cm) と短径 (cm) を測定することにより腫瘍重量を算定し，処置群と対照群の腫瘍重量比をもって判定した[46]．この際，腫瘍重量は下記の計算式により求めた．

$$\text{腫瘍重量(g)}=\frac{\text{腫瘍長径(cm)}\times[\text{腫瘍短径(cm)}]^2}{2}$$

S-180, EAC 細胞では30日目，Meth A 細胞では25日目に測定した．

5．病理組織学的観察

S-180 細胞をマウスの背部皮下に移植後，1，2，10，15および25日目に形成された固型腫瘍を十分に周囲組織を含めて摘出した．摘出物は，10%ホルマリンにて固定し，標本を作成し，常法[47]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．

6．統計学的検討

平均値の差の検定には Student's t-test を用い，$p<0.05$を有意とした．

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

動物実験の場合と同様，S-180, EAC および Meth A の3種類の腫瘍細胞株を用いた．これらの細胞の培養には10%牛胎児血清 (Gibco, Grand Island, U.S.A.) 加ダルベッコー変法イーグル培地 (ニッスイ) (Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum, DF 培養液) を用いた．

マウスの腹腔にて1週間培養した細胞を使用直前に採取し，PBS で洗浄した後 DF 培養液を用い，細胞数が 4.0×10^5個/ml の細胞浮遊液を作製し実験に供した．細胞の培養は開放系 (37°C，湿潤，5% CO_2) で行い，原則として，培養液の交換は行わなかった．SS および対照としての PBS は，DF 培養液で各濃度に調製し用いた．

2．細胞数の測定による増殖抑制効果の検定

96穴マイクロテストプレート (Flow Laboratories, McLean, U.S.A.) の各穴に各細胞浮遊液 (4.0×10^5個/ml) 0.1ml を注入後，各濃度に調製した SS あるいは PBS の 0.1ml を加えた．1，2および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 0.1 ml 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および生細胞数を測定した．

3．培養細胞への^{3}H-チミジンの取り込み実験

細胞浮遊液 (4.0×10^5個/ml) 1ml に各濃度に調製した SS あるいは PBS を1ml 加えた合計2ml を組織培養ペトリ皿3001 (直径35mm) (Falcon, Oxnard, U.S.A.) に注入し，37°C・5% CO_2条件下で静置培養した．培養細胞への^{3}H-チミジンの取り込みは，培養開始直後，培養1，2および3日後の細胞について検討した．各培養時間に200μCi/ml の^{3}H-チミジン溶液 (Amersham, Little Chalfont, U.K.) 10μl を加え，更に6時間培養した．培養後，細胞をグラスファイバーフィルター (Whatmann, Clifton, U.S.A.) 上に集め，5%トリクロル酢酸 (trichlor acetic acid) で2回洗浄後，99%エタノールで乾燥した．次いで，グラスファイバーフィルターをシンチレーションバイアルの中にいれて十分乾燥させた後，トルエンシンチレーター液を各バイアルに5mlずつ分注し，液体シンチレーションカウンター LPS-700 (アロカ，東京) で放射活性を測定した．各培養時間共に1群3試料について実験を行った．

4．フローサイトメトリー (flow cytometry, FCM)

細胞浮遊液 (4.0×10^5個/ml) 3ml に各濃度に調整した SS あるいは PBS を3ml 加え，合計 6ml を組織培養ペトリ皿3002 (直径60ml) (Falcon) に注入し，37°C・5% CO_2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．洗浄後，沈渣 (細胞) に 0.5ml の PBS を加えて懸濁させ，これを5 ml のエタノールに滴下し，60分間氷冷下で静置した．遠心によりエタノールを除去した後，PBS で細胞を2回遠心洗浄した．洗浄後，細胞を 0.9ml の PBS に懸濁させ，二本鎖の RNA を分解するため20mg/ml の RNase (Sigma, St. Louis, U.S.A.) 溶液を 0.1ml

加え，37℃で30分間処理した．その後，PBS で洗浄の後，5 mg/ml のプロピディウムイオダイド (propidium iodide) (Sigma) を 5 μl 加えて 4 ℃・30分間 DNA 染色を行った[48]．DNA 染色後の細胞は氷冷下に保存し，2 時間以内に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．DNA 解析に先立ち細胞を孔径50 μm のナイロンメッシュに通して可能な限り異物を除去した．

5．SS の熱安定性試験

SS 中の増殖抑制活性物質の熱安定性を調べるために，300mg 蛋白/ml 濃度の SS を56℃にて 5，10，30，60，120分間および100℃にて 1，2，5，10，30 分間加熱した．加熱後，それぞれの SS についてその細胞増殖抑制活性を S-180 細胞を用いて前述の方法に従い測定した．非加熱の SS 加熱 SS あるいは PBS を S-180 細胞培養液に加え，培養 2 日後に生細胞数を測定した．なお，SS は30mg 蛋白/ml 濃度になるようにして加えた．

6．SS の透析膜透過性試験

透析膜チューブ (Visking, New York, U.S.A.) に 300mg 蛋白/ml の SS を注入し，48時間，4 ℃下で PBS に対して透析した．透析した後，チューブ内液あるいはチューブ外液について，その細胞増殖抑制活性を S-180 細胞を用い前述の方法に従い測定した．

7．培養細胞の形態学的観察

培養細胞を常法[49]に従い，パパニコロー染色を行った後，光学顕微鏡下にて観察した．

8．蛋白質の定量

蛋白質の定量は Lowry 法[50]に従って行った．

成　　績

I．*V. parvula* KN-2 株 SS のマウス固型腫瘍における抗腫瘍活性

V. parvula KN-2 株の培養菌液 1,000ml の遠心沈渣を50ml の PBS に懸濁し超音波処理した後，遠心によりその上清液 (SS) と沈渣に分け，それぞれについて S-180, EAC あるいは Meth A 細胞の担がんマウスを用いて抗腫瘍活性を検討した．この際，沈渣は50ml の PBS に懸濁した．本実験には一群18匹のマウスを使用した．

1．生存日数による判定

S-180 細胞移植実験では，TF 培地を投与した対照群でマウスの腫瘍死は34日目から出現し，49日目までに全てのマウスは腫瘍死した．超音波処理沈渣を投与

Table 1. Antitumor activity of *V. parvula* KN-2 preparations to survival of tumor-bearing mice in three different tumor cells

Tumor cell[a] inoculated	Preparation injected[b]	Mean survival days[c] (mean ± SD)	T/C (%)[d]
S-180	SS	> 54.4 *	> 125.6
	Sediment	49.0±3.7 *	113.2
	TF medium	43.3±4.5	100.0
EAC	SS	> 53.6 *	> 130.1
	Sediment	45.2±6.0 *	109.7
	TF medium	41.2±3.5	100.0
Meth A	SS	> 45.6 *	> 125.3
	Sediment	43.3±4.8 *	119.0
	TF medium	36.4±4.0	100.0

a) S-180, Sarcoma 180; EAC, Ehrlich ascites carcinoma; Meth A, Meth A fibrosarcoma.
b) A 0.2-ml volume of each tumor cell suspension (1×10^7cells) was inoculated subcutaneously in the back of a mouse. Injection of a 0.2-ml volume of preparation (6mg-protein) was begun 2 days after the inoculation and then performed once a day during 2 weeks in fore leg. Eighteen mice were used for each experiment. SS, supernatant of sonicated cells; sediment, sediment of sonicated cells; TF medium, Tamai-Fukuda medium (control).
c) Evaluation was performed 60, 60 or 50 days after inoculation of S-180, EAC or Meth A tumor cells in mice, respectively.
d) (Mean survival days of treated group/mean survival days of control group) ×100.
* $p<0.05$, by Student's t-test.

したマウスでは，腫瘍死は44日目から見られ，55日目までに全てのマウスは腫瘍死した．これに対し，SS 投与群では生存日数は長く，マウスの腫瘍死は50日目にようやく見られた．また，1匹は60日間以上生存した．SS 投与群では平均生存日数は最も長く，54.4日以上を示し，また T/C は125.6%以上を示し延命効果が認められた (表1).

EAC 細胞移植実験では，対照群でマウスの腫瘍死は35日目から出現し，47日目までに全て腫瘍死した．超音波処理沈渣投与群ではマウスの腫瘍死は33日目から見られ，57日目までに全て腫瘍死した．これに対し，SS 投与群ではマウスの生存日数は長く，腫瘍死は47日目から始まり，60日間の観察では18匹中4匹が生存した．平均生存日数は SS 投与群において最も長く，53.6日以上であった．また，SS 投与群における T/C は130.1%以上を示し，延命効果が認められた．

Meth A 細胞移植実験においても前2者の場合と同様の傾向が見られた．対照群ではマウスの腫瘍死は31日目から出現し，46日目までに全て腫瘍死した．超音波処理沈渣投与群では対照群と同様マウスの腫瘍死は31日目から見られ，49日目までに全て腫瘍死した．これに対し，SS 投与群では生存日数は長く，腫瘍死は39日目から始まり，50日間の観察で3匹生存した．SS 投与群では平均生存日数は最も長く，45.6日以上を示した．この際，T/C は125.3%以上を示し延命効果が認められた．

2．腫瘍重量による判定

さらに，腫瘍重量を測定することにより，抗腫瘍活性を検討した．

S-180 細胞移植実験では，対照群 (TF 培地投与群) と処置群 (SS 投与群，超音波処理沈渣投与群) 間の腫瘍重量の差異は10日目までは認められなかったが，15日目より認められはじめた．その後，経日的にその差異は大きくなり，30日目の観察では，SS と超音波処理沈渣投与群の対照群に対する腫瘍重量比はそれぞれ47.6%，77.8%であり，SS 投与群に特に強い腫瘍の増殖抑制効果が認められた (表2).

EAC 細胞移植実験では，超音波処理沈渣投与群については，20日目までは対照群との間に腫瘍重量の差異は認められなかったが，30日目の腫瘍重量比は82.8%であり，わずかに差異が認められた．一方，SS 投与群については10日目までは対照群との間に腫瘍重量の差異は認められなかったが，15日目より差異が認められはじめ，次第にその差異は大きくなった．30日目の腫瘍重量比は45.1%であり，高い腫瘍の増殖抑制効果が認められた．

Meth A 細胞移植実験では，S-180細胞の場合と同様，10日目までは対照群と処置群の間には差異は認められなかったが，15日目より差異が認められ経日的に差異は拡大した．30日目の観察では，超音波処理沈渣投与群および SS 投与群の対照群に対する腫瘍重量比では，それぞれ74.2%，54.5%であり，対照群に較べ SS 投与群では明らかな腫瘍重量の抑制がみられた．

S-180 細胞移植マウスの対照群と SS 投与群につい

Table 2. Antitumor activity of *V. parvula* KN-2 preparations o tumor weight of tumor-bearing mice in three different tumor cells

Tumor cell[a] inoculated	Preparation injected[b]	Mean tumor weight[c] (mean ± SD, g)	Ratio (%)[d]
S-180	Supernatant	6.0±1.2 *	47.6
	Sediment	9.8±1.5 *	77.8
	TF medium	12.6±1.6	100.0
EAC	Supernatant	5.5±1.3 *	45.1
	Sediment	10.1±1.4 *	82.8
	TF medium	12.2±1.8	100.0
Meth A	Supernatant	3.6±0.6 *	54.5
	Sediment	4.9±0.7 *	74.2
	TF medium	6.6±1.1	100.0

a), b) Refer to the footnotes of Table 1.
c) Evaluation was performed 30, 30 or 25 days after the inoculation of S-180, EAC or Meth A cells in mice, respectively.
d) (Mean tumor weight of treated group/mean tumor weight of control group) ×100.
* $p<0.05$, by Student's t-test.

て移植後，1，2，10，15および25日目に形成された腫瘍を周囲組織を含めて摘出し，病理組織学的に検討した．SS 投与群では，腫瘍の大きさは対照群に比し小さかったが，腫瘍周囲の組織には，マクロファージやリンパ球等の免疫細胞の明らかな浸潤は対照群と同様認められなかった．

以上の結果より，SS は S-180, EAC および Meth A 細胞の固型腫瘍に対し抗腫瘍活性を有することがわかった．また，その活性は S-180, EAC 細胞に対しては同じ程度であり，Meth A 細胞に対してはやや劣ることが判明した．さらに，その活性は免疫担当細胞を介しての間接作用ではなく腫瘍細胞への直接作用である可能性が示唆された．

II．*V. parvula* KN-2 株 SS の培養細胞に対する増殖抑制活性

V. parvula KN-2 株の培養菌液4,000ml から調製した SS を使用した．実験に先立ち，SS の蛋白量を測定した結果，300mg/ml であったので，SS の濃度はこの蛋白量によって表示することとした．

1．細胞数の測定による増殖抑制効果の検討

1）PBS の細胞増殖への影響

SS 原液 (300mg 蛋白/ml) は菌体を PBS に懸濁し，超音波処理後得られた遠心上清液である．培養細胞に SS を添加する際，細胞培養液である DF 培養液で希釈した SS を加えた．即ち，SS 添加培養細胞液には一定量の PBS が含まれることになるので，まず PBS の細胞増殖への影響を検討した．

PBS を DF 培養液を用いて2.5培希釈した後，順次80倍まで2倍段階希釈を行い，各希釈 PBS について，その 0.1ml を各培養細胞液 0.1ml に加え (細胞数 2×10^5個/ml) 培養を行い，培養1，2，3日目に総細胞数および生細胞数を測定した．

S-180 および EAC 細胞株においては，5，10，20，40，80倍希釈の PBS の添加によっては細胞増殖は影響を受けず，総細胞数は，1日目は 3×10^5個/ml，2日目は 6.5×10^5個/ml，3日目は 7.5×10^5個/ml 程度に増加した．2.5倍の PBS を添加した時，総細胞数は，1日目では先と同様 3×10^5個/ml であったが，2日目，3日目では先に較べ約1/2にすぎず，増殖の低下がみられた．生細胞数の総細胞数に対する割合 (相対生細胞数，%) は，添加 PBS 濃度に関わりなく，培養期間を通じて85～95%であった．

Meth A 細胞株に関しては，いずれの濃度の PBS 添加においても総細胞数は，1日目で約 3×10^5 個/

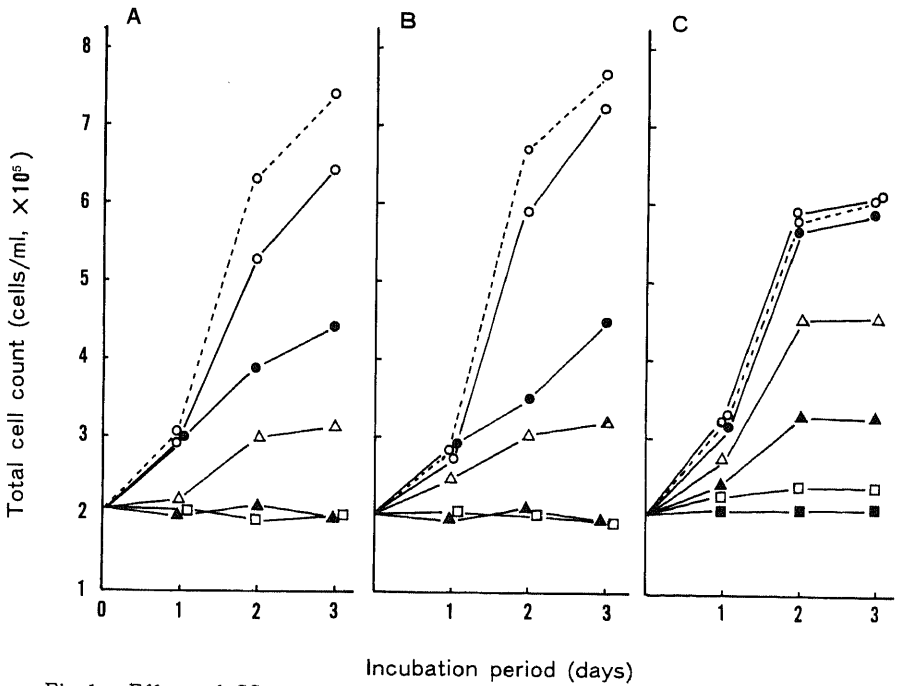

Fig. 1. Effect of SS on cell growth. Concentrations of SS(mg-protein/ml): ○—○, 1.9; ●—●, 3.8; △—△, 7.5; ▲—▲, 15; □—□,30; ■—■,60; ○…○, 0 (control). A, S-180 cells; B, EAC cells; C, Meth A cells.

ml であり，2日目，3日目ともに約5.5×10^5個/ml 程度であり，細胞増殖の低下はみられなかった．相対生細胞数は，いずれの PBS 濃度においても1日目，2日目では約90%，3日目では約70%であった．

以上の結果に基づき，SS の培養細胞の増殖に及ぼす影響の検討には，S-180, EAC 細胞株では5倍 (30 mg 蛋白/ml)，Meth A 細胞株では2.5倍 (60mg 蛋白/ml) に希釈した SS を最高濃度として使用することとした．

2）SS の培養細胞の増殖への影響

i．総細胞数の変動

S-180, EAC 細胞株については，SS 濃度1.9mg 蛋白/ml の添加ですでに細胞増殖の抑制がみられ，SS 濃度の増加と共に，細胞増殖が低下した (図1)．SS 濃度が15mg 蛋白/ml 以上の場合，総細胞数は培養開始時とほぼ同数であった．

Meth A 細胞株は，上記の2細胞株に較べ SS に対し抵抗性を示し，SS 濃度1.9および3.8mg 蛋白/ml では細胞増殖の抑制はみられなかった．7.5mg 蛋白/ml 以上の添加では明らかな細胞増殖の抑制がみられ，60mg 蛋白/ml 濃度に添加した場合，総細胞数は培養開始時とほぼ同数であった．

ii．生細胞数の変動

生細胞数の変動を相対生細胞数で表し，図2に示した．

S-180 細胞株については，SS 濃度1.9および3.8 mg 蛋白/ml では相対生細胞数は培養期間中，対照群 (PBS 添加群) とほぼ等しく約85%であったが，7.5 mg 蛋白/ml 以上の濃度で添加した場合，相対生細胞数は対照群より低値を示した．SS 濃度15および30 mg 蛋白/ml の場合，先に述べた如く総細胞数の増加は認められなかったが，両者の間には生細胞数におい

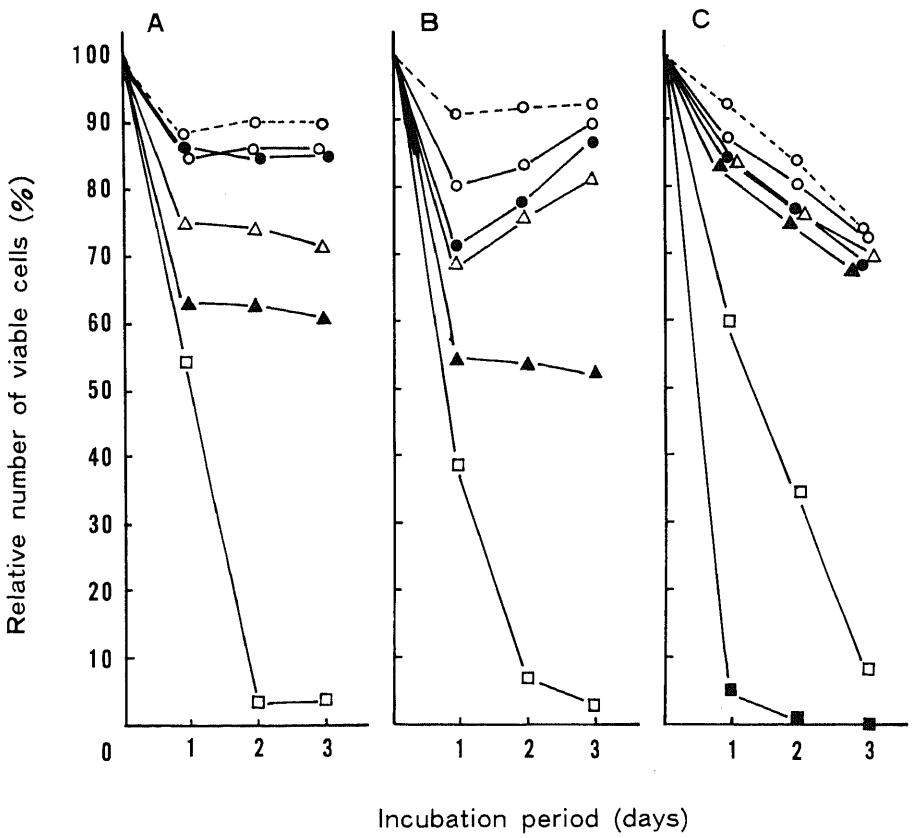

Fig. 2. Analysis of effect of SS on cell growth in relation to viability of cells. Relative number of viable cells (%)=(Number of viable cells / number of total cells) × 100. Concentrations of SS (mg-protein / ml): ○—○, 1.9; ●—●, 3.8; △—△, 7.5; ▲—▲, 15; □—□, 30; ■—■, 60; ○…○, 0 (control). A, S-180 cells; B, EAC cells; C, Meth A cells.

て顕著な差異がみられた．相対生細胞数は15mg 蛋白/ml では培養1日目以後，約60%であったが，30mg 蛋白/ml の場合には培養2日目以後，約3%にまで低下した．

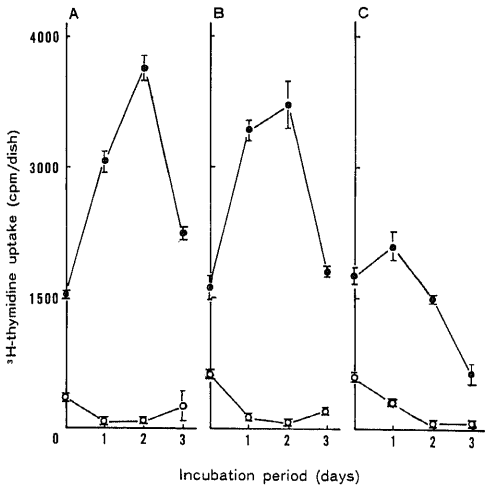

Fig. 3. Effect of SS on ^{3}H-thymidine uptake of cultured cells. Concentrations of SS, 30mg-protein/ml. A, S-180 cells; B, EAC cells; C, Meth A cells. ○—○, cells cultured in the presence of SS; ●—●, control. Each mark indicates "mean±SD cpm (n=3)".

EAC 細胞株については，SS 濃度7.5mg 蛋白/ml 以下の場合，培養1日目の相対生細胞数は80～60%であり対照群よりやや低値を示したが，培養2日目以後その値が増加し，培養3日目には対照群とほぼ等しい値を示した．総細胞数の増加が認められなかった SS 濃度15および30mg 蛋白/ml については，S-180 細胞と同様，両者の間には生細胞数において顕著な差異がみられた．即ち，相対生細胞数は15mg 蛋白/ml では培養1日目以後約55%であったが，30mg 蛋白/ml の場合には，培養2日目以後約3%にまで低下した．

Meth A 細胞株は総細胞数の場合と同様，上記2細胞株に較べ SS に対し抵抗性を示し，SS 濃度15mg 蛋白/ml 以下では相対生細胞数は培養期間中対照群とほぼ等しく，培養1日目では約85%，2日目では約75%，3日目では約70%であった．SS 濃度が30mg 蛋白/ml 以上の時，顕著な相対生細胞数の減少が認められた．特に，総細胞数の増加が全くみられなかった SS 濃度60mg 蛋白/ml の場合，S-180, EAC 細胞株より相対生細胞数の減少は著しく，培養1日目ですでに約5%に低下した．

2．^{3}H-チミジンの取り込みによる増殖抑制効果の検討

1）経日的観察

先の実験で SS 濃度を30mg 蛋白/ml とした場合，顕著な細胞増殖抑制および生細胞数の減少が認められ

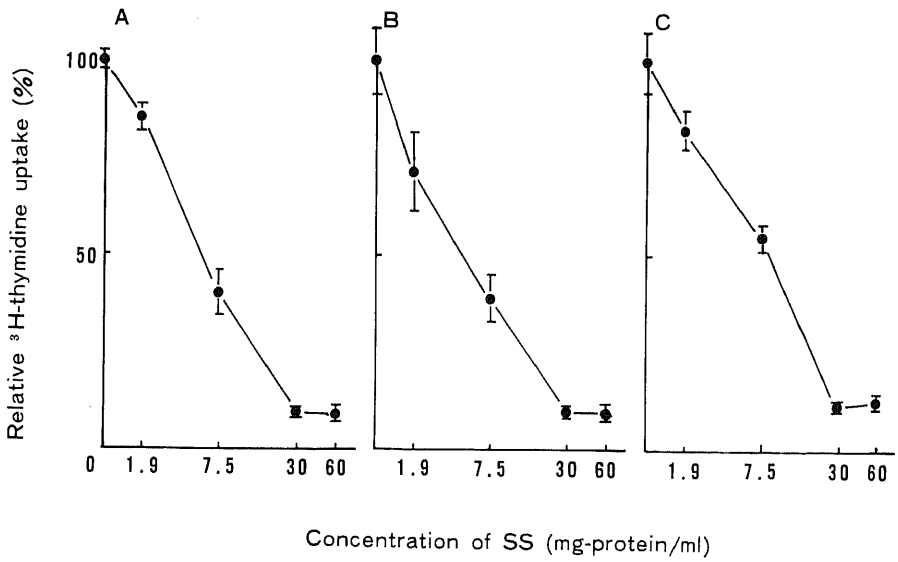

Fig. 4. ^{3}H-thymidine uptake of cells cultured for 2 days in the presence of various concentrations of SS. Relative ^{3}H-thymidine uptake (%)=(^{3}H-thymidine uptake of cells cultured in the presence of SS / that of control) × 100. Each mark indicates "mean±SD cpm (n=3)". A, S-180 cells; B, EAC cells; C, Meth A cells.

たので，30mg 蛋白/ml の SS を添加した場合の培養細胞への ^{3}H-チミジンの取り込みを検討した．測定は1群3試料とし培養直後，培養1，2，3日目に行った（図3）．

S-180 細胞株において，対照群では，培養直後での放射活性は1539.0±41.8cpmであり，活発な ^{3}H-チミジンの取り込みが認められた．^{3}H-チミジンの取り込みは，2日目をピークとして増加し，3日目では減少した．SS 添加群では，培養直後での放射活性は343.2±62.2cpm にすぎず，対照群に較べ ^{3}H-チミジンの明らかな低下が認められた．培養1日目においても対照群と異なり，^{3}H-チミジンの取り込みの増加は認められず，むしろ低下した．^{3}H-チミジンの取り込みは，2日目では1日目と同程度であったが，3日目にはやや増加した．

EAC 細胞株では，S-180 細胞株とほぼ同様の傾向がみられた．培養直後での放射活性は，対照群では1618.7±138.4cpm，SS 添加群では614.8±52.8cpm であり，SS 添加群において ^{3}H-チミジンの明らかな低下がみられた．^{3}H-チミジンの取り込みは，対照群では2日目までは増加し，3日目には減少した．一方，SS 添加群では2日目までは減少したが，3日目ではやや増加した．

Meth A 細胞株における ^{3}H-チミジンの取り込みは，前述の2細胞株の場合と幾分異なっていた．対照群では培養直後での放射活性は1759.2±99.2cpm であり，活発な ^{3}H-チミジンの取り込みが認められた．^{3}H-チミジンの取り込みは，1日目ではさらに増加したが，2日目以後は低下した．SS 添加群では培養直後の放射活性は，590.7±57.3cpm にすぎず，対照群に較べ ^{3}H-チミジンの取り込みの明らかな低下が認められた．さらに，^{3}H-チミジンの取り込みは，その後培養3日目まで低下した．

以上の結果，3細胞株共に SS 添加と同時に DNA 合成が強く抑制されることが分かった．

2）SS 濃度と ^{3}H-チミジンの取り込み

SS 濃度1.9，7.5，30および60mg 蛋白/ml 添加した場合の ^{3}H-チミジンの取り込みを SS 添加後2日目の細胞について測定した（図4）．

いずれの細胞株についても SS 濃度が1.9mg 蛋白/ml から30mg 蛋白/ml 濃度までは，^{3}H-チミジンの取り込みは SS 濃度の増加と共に反比例的に減少し，30mg 蛋白/ml の濃度では対照群の約10%以下の値を示した．

Ⅲ．SS 処理細胞の形態学的変化

パパニコロー染色により細胞の形態学的観察を行った．

S-180 細胞培養液に30，15および7.5mg 蛋白/ml 濃度になるように SS を添加し，培養2日目にパパニコロー染色を行い，光学顕微鏡で観察した．SS 濃度が30mg 蛋白/ml では，細胞全体が縮小し，濃染した所見であった．15mg 蛋白/ml では，細胞の腫大，空胞化，核の対核化ならびに淡明化が認められた．7.5mg 蛋白/ml では，15mg 蛋白/ml とほぼ同様の所見であったが，その変化した細胞の占める割合が少なかった．

Ⅳ．SS の細胞増殖抑制作用の FCM による解析

S-180 細胞培養液に SS を3.8，7.5，15，30mg 蛋白/ml 濃度に添加し培養した場合の細胞内 DNA 分布ヒストグラムを SS 添加後2日目の細胞について検討した．対照群では，2 C に大きく，4 C に小さいピークを有する二峰性の DNA ヒストグラムが得られた（図5—a）．SS 添加群では，30，15mg 蛋白/ml の高濃度では，ほぼ対照群と同じ DNA ヒストグラムが得られた．SS 濃度が10mg 蛋白/ml では，2 C のピークが低くなり，代わりに S 期が高くなり7.5mg 蛋白/ml 濃度では，4 C に2 C より優位なピークをもつ二峰性のパターンが得られた（図5—b）．SS 濃度がさらに低濃度になると，4 C のピークは低くなり，対照群に近いパターンを示すようになった．

対照群と最も異なった DNA ヒストグラムを示した SS 濃度，7.5mg 蛋白/ml の場合のヒストグラムにつ

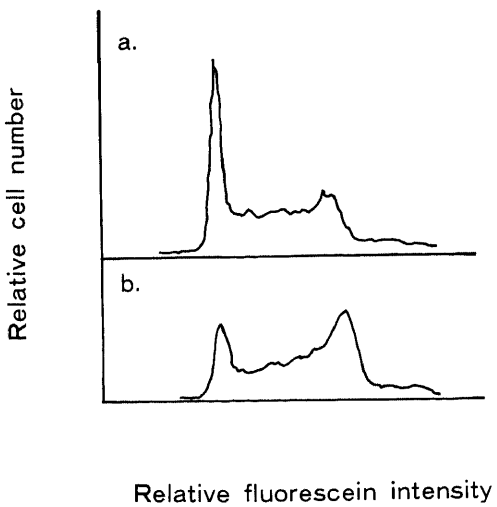

Fig. 5. DNA histogram of S-180 cells cultured for 2 days at a concentration of 7.5 mg-protein/ml of SS. a, cells cultured without SS; b, cells cultured in the presence of SS.

いて，各細胞周期の DNA 量を求めた．対照群では，G_1期が37.9%，S 期が35.1%，G_2(+M) 期が27.0%であったのに対し，処置群では G_1期が14.7%，S 期が53.5%，G_2(+M) 期が31.9%であり，特に S 期の細胞の著しい増加が認められた．

V．SS の細胞増殖抑制物質の性状

1．熱安定性

S-180 細胞を用いて SS の熱安定性を検討した．非加熱の SS あるいは56°Cで5，10，30，60，120分間および100°Cで1，2，5，10，30分間加熱処理を行った SS を S-180 細胞の培養液に 30mg 蛋白/ml 濃度になるように添加し，培養2日目の総細胞数，生細胞数を測定した．なお，加熱には300mg 蛋白/ml の SS を用いた．非加熱の SS を添加した場合，加熱 SS を添加した場合のいずれにおいても総細胞数の増加は認められず，かつ相対生細胞数は約3%であり，加熱処理による細胞増殖抑制作用の増加・減少は認められなかった．

2．透析膜透過性

300mg 蛋白/ml 濃度の SS を透析チューブを用い透析を行い，透析による SS の細胞増殖抑制活性の変化を検討した．細胞増殖抑制試験には S-180 細胞を用い，SS 添加後2日目の総細胞数，生細胞数を測定した．充分量の PBS で透析 (10ml の SS を5,000ml の PBS で透析) した SS を添加した場合の総細胞数，相対生細胞数は SS 非添加の場合とほぼ等しく，それぞれ 7×10^5個/ml，80.5%であり，増殖抑制活性は完全に消失した．一方，SS と等量の PBS で透析 (10ml の SS を 10ml の PBS で透析) した SS を添加した時，総細胞数2.5×10^5個/ml，相対生細胞数は5.0%であった．この場合，透析チューブ外液を S-180 細胞培養液に添加した時の総細胞数は2.5×10^5個/ml，相対生細胞は6.0%であり，外液中には内液 (SS) と同程度の増殖抑制作用があることが分かった．すなわち，SS の増殖抑制物質は，透析膜を通過する比較的分子量の小さいものと考えられた．

考　　察

V. parvula はヒト，ラット，ウサギなどの口腔や腸管に常在菌として生息する嫌気性菌である．嫌気培養法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きているが，*Veillonella* の分離率は比較的高く，歯肉膿瘍，顎嚢胞，上顎洞炎等の口腔内疾患[36)~38)]あるいは歯石[51)]より約17～20%の割合に分離され，一般に病原性は弱いながらも，各種疾患の原因菌となっていると考えられている．

中川[39)]は，口腔内各種炎症性疾患より分離した *Veillonella* 菌株の抗腫瘍活性を EAC 細胞を用いた動物実験 (腹水腫瘍) により検討し，*Veillonella* は抗腫瘍活性を有することを見い出した．またこの場合，抗腫瘍活性は菌体を超音波破壊した時，その遠心上清液に存在することを明らかにした．

著者は *Veillonella* の超音波処理上清液 (SS) 中に存在する抗腫瘍活性物質の本体を究明するため，本研究を行った．本研究では中川の報告の中の新鮮分離菌株のうち担がんマウスに対する延命効果の強かった *V. parvula* KN-2 株を用いた．まず最初に，中川の用いた EAC 細胞の他にさらに2種類の腫瘍細胞を加え，マウス固型腫瘍について T/C，腫瘍重量比を求め，その抗腫瘍活性を検討した．EAC 細胞においては T/C は130.1%以上，腫瘍重量比は45.1%であり，明らかな延命効果，腫瘍発育抑制効果が認められ，中川の腹水腫瘍における結果を確認した．S-180, Meth A 細胞においても EAC 細胞と同様の結果が得られ，SS 中にはこれら3種類の細胞株に対し有効な抗腫瘍物質が存在することが判明した．Meth A 細胞に対する SS の抗腫瘍活性は，他の2細胞株に較べやや弱かったが，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 細胞移植後 SS を投与した場合の腫瘍組織を病理組織学的に観察し，SS 非投与の場合と比較検討した．SS 投与群，SS 非投与群間には腫瘍全体の大きさに差を認めるものの，組織学的に明らかな差異が認められず，また腫瘍周辺組織にはリンパ球の明らかな浸潤は認められなかった．以上の結果から，SS の抗腫瘍作用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，SS の培養細胞に対する増殖抑制活性を各腫瘍細胞株について検討した．

まず，SS の細胞増殖に及ぼす影響を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．その際，試験管内で継代，培養した細胞ではなく，できるだけ生体に近い状態つまり，マウス腹腔より採取直後の細胞を使用した．各細胞株について，SS および PBS の濃度を6段階に設定し，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，3細胞株共にほぼ同程度に対数的に増殖した．SS 添加群においては，S-180, EAC 細胞株では SS 濃度が1.9mg 蛋白/ml の時，Meth A 細胞株では3.8mg 蛋白/ml 以下の時総細胞数の増加は対照群に類似していた．しかしながら，

いずれの細胞株についても SS 濃度の増加と共に，細胞の増殖は低下し，前2者の細胞株では SS 濃度が15 mg 蛋白/ml 以上の時，後者では30mg 蛋白/ml 以上の時，総細胞数は培養開始時とほぼ同数であり，SS は細胞増殖抑制活性を有することが認められた．さらに，生細胞数は SS 濃度の増加と共に減少し，S-180, EAC 細胞株の場合30mg 蛋白/ml，Meth A 細胞株の場合60mg 蛋白/ml に添加した時，生細胞数は0～3％にまで減少した．即ち，SS は殺細胞活性を有し，結果として細胞増殖抑制がおこることが示唆された．

SS 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．DNA 前駆物質であるチミジンは細胞の DNA 合成期のみに選択的に取り込まれ分裂しない限り半減しないことから，細胞への ^{3}H-チミジンの取り込みを測定することにより，DNA 合成の程度を知ることができる[52)53)]．培養液に SS を 30mg 蛋白/ml に添加し，培養直後に ^{3}H-チミジンの取り込みを測定した結果，S-180, EAC, Meth A いずれの細胞株においても，SS 添加群の ^{3}H-チミジンの取り込みは対照群に較べ22～37％にすぎなかった．即ち，SS は細胞の DNA 合成を阻害することが明らかになった．また，この DNA 合成阻害は培養直後の細胞のみならず，対数増殖期の細胞においてもみられた．また，SS 濃度と ^{3}H-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2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 SS 濃度 (1.9および3.8mg 蛋白/ml) においても ^{3}H-チミジンの取り込みの減少がみられた．以上のことから，SS 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ことが判明した．

さらに，FCM を用いて SS の細胞への作用を細胞周期の観点から検討した．FCM は，細胞あるいは染色体などの細胞成分を浮遊液の状態にして，流体系の中を高速で通過させ，各細胞から検出部を通して得られる光学的，電気的信号により各細胞の生物学的特徴を知る方法である[54)～56)]．本研究では，S-180 細胞株を用い，SS の作用について SS 添加後2日目の細胞を FCM で解析することにより検討した．SS 濃度1.9～60mg 蛋白/ml について検討したが，細胞増殖が認められ，かつ約60％が生細胞である SS 濃度7.5mg 蛋白/ml の時，対照群とは明らかに異なる FCM パターンが得られた．対照群では2 C に優位な2 C と4 C にピークを持つ二峰性パターンを示したが，SS 濃度7.5 mg 蛋白/ml では2 C のピークが低くなり4 C のピークが高くなった．即ち，SS 添加時には細胞の S 期への集積が起こることが分かった．SS が細胞の DNA 合成を抑制することは先の ^{3}H-チミジンの取り込み実験により明らかにされたが，この DNA 合成の抑制が S 期，すなわち DNA 合成期を延長せしめ，その結果 S 期への細胞の集積が起こったものと考えられる．

SS 添加培養における細胞の形態的変化をパパニコロー染色を行い検討した結果，核を中心に変化がみられた．SS 濃度が30mg 蛋白/ml では核の濃縮，変性，7.5mg 蛋白/ml の時は核の淡明化，対核化，胞体の腫大および空胞化が認められた．SS が高濃度では細胞が SS の攻撃をうけたその時点ですでに核が破壊し，細胞分裂の進行が停止し，そのまま胞体も縮小するのではないかと考えられる．また，中濃度では，攻撃を受け DNA 合成の抑制を受けながら増殖し，核，胞体および細胞膜の破壊が起きるのではないかと考えられる．核の主な働きは DNA の貯蔵，複製，DNA 依存性 RNA 合成，転写及び合成された RNA の細胞質への輸送である．また，核小体は DNA 依存性の rRNA 合成を行う部位で，これを阻害する薬剤を投与すると，核小体に縮小，小円形化がおこり，後には濃縮をきたし，細胞は死にいたる．本実験と同様の細胞の形態学的変化は d-モルヒナン誘導体を EAC 細胞に投与した場合にも観察されている[57)]．

下山[58)]は抗癌剤を抗癌性抗生物質［マイトマイシン C (mitomycin C, MMC)，アドリアマイシン (adriamycin, ADM)，ブレオマイシン等］，アルキル化剤 (サイクロホスファマイド等) 等の濃度依存性作用群と代謝拮抗物質（5－フルオロウラシル，メトトレキセート等)，植物アルカロイド（ビンクリスチン等）等の時間依存性作用群とに分類している．SS については，SS 添加直後より ^{3}H-チミジンの取り込みが減少し，かつ濃度依存性であることを考えると，下山の濃度依存性作用群に近いものと考えられた．

高本[59)]は，FCM を用い抗癌性抗生物質の対数増殖期培養細胞の細胞周期の進行に及ぼす影響について検討し，抗癌性抗生物質は G_2 期蓄積および細胞周期の進行停止という2つの共通な作用を有することを明らかにした．G_2 期では RNA および蛋白合成は持続して行われており，特に分裂時に必要な微小管蛋白の合成また分裂蛋白の合成が行われる．Ebina ら[60)]はネオカルチノスタチンによる G_2 期蓄積に関して，微小管蛋白に障害を与えるためであると考えた．Tobey[61)]は，DNA に変化を受けた細胞を分裂期に進ませない機構を G_2 期に想定し，G_2 期蓄積が DNA の異常によることを示唆した．さらに，Rao ら[62)]は，G_2 期蓄積はクロ

モゾームの障害によると報告している．

S 期，G_2(+M) 期に細胞集積を認める抗癌剤としては，ADM, MMC, シスプラチン等が知られているが，これらは DNA 合成障害をきたすためとされている．SS は先に述べた如く，濃度依存性作用群に属すると推測されることを考え合わせると，ADM, MMC に近い性格を持っているのではないかと考えられた．さらに，細胞周期における S および G_2(+M) 期への集積に関して，ADM では不可逆的なもので，その後細胞は死に至ることが明らかにされている[63]．また，S 期への単峰性集積は薬剤の細胞への致死的効果を示すとされている[64][65]．本実験においては，SS 添加時の細胞では S 期に集積が認められ，細胞への致死的作用が示唆されたが，このことは生細胞数の測定，形態学的観察結果と一致した．

SS 中の細胞増殖抑制物質の性状について検討した．SS を56°C，100°Cで加熱処理を行ったが，細胞増殖抑制活性は未処理の SS と差はなく，活性物質は熱耐性であることが分かった．また，SS を透析したところ，透析処理にて細胞増殖抑制活性は全く失われてしまった．一方，SS と等量の PBS で透析し，その SS と PBS の細胞増殖抑制活性を測定すると，共に同程度の活性が認められ，活性物質は透析膜を通過できうる分子量を有することが明らかになった．即ち，細胞増殖抑制物質の分子量は約14,000以下の物質であることが判明した．さらに成績には示さなかったが，担がんマウスに対する SS の抗腫瘍活性は加熱によっては消失しなかったが，透析により消失した．

Veillonella はグラム陰性菌であるので，細胞壁外膜には LPS が存在する[66]~[68]．LPS は生体内において，インターフェロン産生の誘導，インターロイキン1および腫瘍壊死因子産生の促進等多彩な生物活性を示す[69]~[71]．また，直接的な殺細胞作用を示す LPS も知られている[16]．今回検討した *V. parvula* の細胞増殖抑制物質，抗腫瘍物質は，熱耐性である点は LPS と一致するが，LPS は非透析性である点が異なる．*V. parvula* の担がん動物に対する抗腫瘍物質と培養細胞に対する増殖抑制物質が同一物質か否かについては，使用3細胞株に対する両活性が一致したこと，また熱安定性，透析膜透過性の点から両物質は同一のものと考えられる．今後，細胞増殖抑制物質の精製を行い，抗腫瘍物質との関係を明らかにすることが課題である．

結　　論

口腔内より分離した *V. parvula* KN-2 株の超音波処理上清液 (SS) の担がん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 細胞，EAC 細胞および Meth A 細胞を移植した担がんマウスに SS を投与したところ，対照群に較べ T/C で125%以上の生存日数の延長，腫瘍重量比で45%以上の増殖抑制がみられた．

2．S-180 細胞の担がん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 SS 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, EAC, Meth A 細胞株を SS 存在下で培養したところ，細胞増殖抑制が認められた．また，その抑制作用は SS の濃度に依存した．

4．上記3種類の培養細胞株について ^{3}H-チミジンの取り込みを測定した結果，SS 添加直後より ^{3}H-チミジンの取り込みの抑制が認められ，その効果は SS の濃度に依存した．

5．SS 存在下における S-180 細胞の形態学的変化をパパニコロー染色を行い観察したところ，高濃度では細胞全体が縮小，濃染し，中濃度では細胞の腫大，空胞化，核の対核化ならびに淡明化が認められ，細胞の変性が観察された．

6．FCM での細胞周期を解析したところ，SS 存在下で培養した細胞では S 期の細胞の著しい増加が認められた．

7．SS 中の細胞増殖抑制物質は，100°Cの加熱に対して安定であり，また分子量は14,000以下であ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，御校閲を賜りました恩師，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．さらに本実験に際し，直接御指導を賜りました本学微生物学講座，小倉寿助教授ならびにフローサイトメーターの使用にあたり貴重なる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．また，終始御指導を賜りました中川清昌助教授，本研究に御協力いただきました歯科口腔外科学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) **Bush, W.:** Verhandlungen ärztliher Gesellschaften. Berl. Klin. Wochensch., **5,** 137-138 (1868).

2) **Fehleisen:** Ueber die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichem Nährboden und ihre Uebertragbarkeit auf den Menschen. Dtsch. Med.

Wochenschr., 8, 553-554 (1882).

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

4) **Nauts, H. C., Swift, W. E. & Coley, B. L.:** The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late Williams B. Coley, M. D., reviewed in the light of modern research. Cancer Res., **6,** 205-216 (1946).

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

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

7) **東 市郎, 山村雄一:** BCG-CWS による癌の免疫療法. 癌の臨, **24,** 411-420 (1978).

8) **Yamamura, Y., Sakatani, M., Ogura, T. & Azuma, I.:** Adjuvant immunotherapy of lung cancer with BCG cell wall skeleton (BCG-CWS). Cancer, **43,** 1314-1319 (1979).

9) **Okamoto, H.:** Über die hochgradige Steigerung des Hämolysinbildungsvermögens *Streptococcus haemolyticus* durch Nukleinsäure. I. Mitteilung. Jpn. J. Med. Sci. IV Pharmacology, **12,** 167-208 (1940).

10) **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).

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) **Sakurai, Y., Tsukagosi, S., Satho, H., Akiba, T., Suzuki, S. & Takagi, Y.:** Tumor-inhibitory effect of a streptococcal preparation (NSC-B116209). Cancer Chemother. Rep., **56,** 9-17 (1972).

13) **木村郁郎:** 溶連菌剤 OK-432 と癌の免疫療法. 癌と化療, **2,** 21-33 (1975).

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

15) **渡辺 貞:** 大腸菌抽出成分の抗腫瘍作用. 最新医, **25,** 1049-1053 (1970).

16) **Mizuno, D., Yoshioka, O., Akamatu, M. & Kataoka, T.:** Antitumor effect of intracutaneous injection of bacterial lipopolysaccharide. Cancer Res., **28,** 1531-1537 (1968).

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

18) **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,** 494-551 (1972).

19) **Hattori, T., & Mori, A.:** Antitumor activity of anaerobic *Corynebacterium* isolated from the human bone marrow. Gann, **64,** 15-27 (1973).

20) **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ー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).

21) **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).

22) **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).

23) **Gericke, D. & Engelbart, K.:** Oncolysis by Clostridia. II. Experiment on a tumor spectrum with a variety of clostridia in conbination with heavy metal. Cancer Res., **24,** 217-221 (1964).

24) **Asano, M., Karasawa, E. & Takayama, T.:** Antitumor activity of *Lactobacillus casei* (LC 9018) against experimental mouse bladder tumor (MBT-2). J. Urol., **136,** 719-721 (1986).

25) **Shimizu, T., Nomoto, K., Yokokura, T. & Mutai, M.:** Role of colony-stimulating activity in antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. J. Leukocyte Biol., **42,** 204-212 (1987).

26) **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).

27) **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).

28) **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).

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

30) **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).

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

32) **渡部好造**：*Fusobacterium nucleatum* の抗腫瘍活性に関する研究．十全医会誌，**93,** 316-329 (1984).

33) **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).

34) **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).

35) **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).

36) **福田順子，玉井健三**：口腔内嫌気性菌の研究　第3報　口腔内嫌気性菌の分離率．日口腔科会誌，**21,** 21-25 (1972).

37) **玉井健三**：口腔内嫌気性菌の研究．日口腔科会誌，**27,** 393-415 (1978).

38) **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).

39) **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).

40) **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).

41) **Rogosa, M.**: Part II Gram-negative anaerobic cocci. *In* R. E. Buchanan & N. E. Gibbons (eds.), Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., p445-449, Williams & Wilkims, Co., Baltimore, 1974.

42) **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).

43) **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.

44) **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.

45) **塚越　茂**：制癌剤の開発とその臨床応用 (塚越，田口，仁井谷，斎藤編)，第1版，25-28 頁，サイエンスフォーラム，東京，1978.

46) **Geran, R. I., Greenberg, N. H., Macdonald, M. M., Schumacher, A. M. & Abbot,B. J.**: Protocols for Screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (Third edition). Cancer Chemother. Rep., **3,** 47-52 (1972).

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

48) **Krishan, A.**: Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. J. Cell Biol., **66,** 188-193 (1975).

49) **慶応義塾大学医学部病理学教室**：病理組織標本の作り方，第6版，324-328 頁，医学書院，東京，1986.

50) **Lowry, O. N., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randal, R. J.**: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193,** 265-275 (1951).

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

52) **Shoyab, M., Gunnell, M. & Lubiniecki, A. S.**: Reduced uptake and incorporation of ^{3}H-thymidine in Fanconi anemia fibroblasts. Hum. Genet., **57,** 296-299 (1981).

53) **Gewert, D. R., Moore, G. & Clemens, M. J.**: Inhibition of cell division by interferons. Biochem. J., **214,** 983-990 (1983).

54) **太田和雄，高本　滋**：Flow cytometry (FCM) の癌臨床への応用．癌と化療，**9,** 1140-1150 (1982).

55) **Klaus, G. G. B. & Hawrylowicz, C. M.**: Cell-cycle control in lymphocyte stimulation. Immnol. Today, **5,** 15-19 (1984).

56) **渡部郁雄，高橋　学**：データ解析法．フローサイ

トメトリー手技と実際 (太田和雄，野村和弘編), 515-542 頁，第1版，蟹書房，東京，1984.

57) 小久保 護：d-モルヒナン誘導体の抗腫瘍作用に関する実験的研究．十全医会誌，**94,** 983-998 (1985).

58) 下山正徳：制癌剤の cell-kill-kinetics と至適投与法．癌と化療，**3,** 1103-1110 (1976).

59) 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).

60) **Ebina, T., Ohtuki, K., Seto, M. & Ishida, N.:** Specific G2 block in HeLa-S3-cells by neocarzinostatin. Eur. J. Cancer, **11,** 155-158 (1975).

61) **Tobey, R. A.:** Different drugs arrest cells at a number of distinct stages in G_2. Nature, **254,** 245-247 (1975).

62) **Rao, A. P. & Rao, P. N.:** The cause of G_2arrest in Chinese hamster ovary cells treated with anticancer drugs. J. Nat. Cancer Inst., **57,** 1139-1143 (1976).

63) **Barlogie, B., Drewinko, B., Johnston, D. A. & Freireich, E. J.:** The effect of adriamycin on the cell cycle trabverse of a human lymphoid cell line. Cancer Res., **36,** 1975-1979 (1976).

64) **Krishan, A. & Frei, E. III:** Effect of adriamycin on the cell cycle traverse and kinetics of cultured human lymphoblasts. Cancer Res., **36,** 143-150 (1976).

65) **Ohara, H. & Terasima, T.:** Lethal effects of mitomycin C on cultured mammalian cells. Gann, **63,** 317-327 (1972).

66) **Balden, H. A. & Mergenhagen, S. E.:** Ultrastructure of *Veillonella* and morphological correlation of an outer membrane with particles associated with endotoxic activity. J. Bacteriol., **88,** 1482-1492 (1964).

67) **Mergenhagen, S. E., Bladen, H. A. & Hsu, K. C.:** Electron microscopic localization of endotoxic lipopolysaccharide in Gram-negative organisms. Ann. N. Y. Acad. Sci., **133,** 279-291 (1966).

68) **Mergenhagen, S. E.:** Polysaccharide-lipid complexes from *Veillonella parvula.* J. Bacteriol., **90,** 1730-1734 (1965).

69) **Ralph, P. & Nakoinz, I.:** Lipopolysaccharides inhibit lymphosarcoma cells of bone marrow origin. Nature, **249,** 49-51 (1974).

70) 河西信彦：Endotoxin の構造と機能に関する最近の知見．日細菌誌，**34,** 489-504 (1979).

71) 片山 胖，小玉正智，山口 希：細菌内毒素の抗腫瘍作用．臨免疫，**12,** 848-853 (1980).

Studies on Anti-tumor Activity of *Veillonella parvula* Strain KN-2

Kanya Matsubara, Department of Dento-Oral Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
—J. Juzen Med. Soc., 98, 1152—1167 (1989)

Key words anaerobe, anti-tumor activity, flow cytometry, thymidine uptake, *Veillonella parvula*

Abstract

The Supernatant of sonicated cells(SS) of the *Veillonella parvula (V.parvula)* strain KN-2, an isolate from a gingival abscess, was tested for anti-tumor activity on tumor-bearing mice and growth-inhibitory activity on cultured cells, ; Sarcoma 180(S-180), Ehrlich ascites carcinoma(EAC) or Meth A fibrosarcoma(Meth A) cells. Anti-tumor activity was evaluated by the ratio of mean survival days of the SS injected mice, to those of the control mice(T/C), or the ratio of mean tumor weight of the mice injected with SS, to that of the control mice(tumor weight ratio). SS showed anti-tumor activity on all three kinds of cells; the values of T/C were more than 125% and the tumor weight ratios ranged from 45.1 to 54.5%. Histologically, invasion of the lymphocytes was not found in the tumor region of the SS injected mice or in that of the untreated mice. The growth-inhibitory activity of SS on the cultured cells was examined by counting the

numbers of total and viable cellls, by the trypan blue dye exclusion test on the 1st, 2nd and 3rd day of incubation in the medium containing SS. The concentrations of SS used were: 1.9, 3.8, 7.5, 15 and 30 mg-protein/ml for S-180 and EAC cells, and an additional 60 mg-protein/ml for Meth A cells. SS showed dose-dependent growth-inhibitory activity on all three kinds of cells, although less effective on Meth A cells; no cell growth was observed at concentrations of 15 and 30 mg-protein/ml of SS in both S-180 and EAC cells, and 60 mg-protein/ml in Meth A cells. The ratio of the number of viable cells to that of total cells, decreased reciprocally as the concentration of SS increased; the ratios were less than 5% on 2 days of incubation at concentrations of 30 mg-protein/ml in S-180 and EAC, and 60 mg-protein/ml in Meth A cells. The ^{3}H-thymidine uptake of cultured cells was decreased immediately after the addition of SS the culture medium and continued during the incubation period of 3 days. This effect was also dose-dependent; in all cells, the uptake at a concentration of 30 mg-protein/ml of SS was less than 10% of that in the control. Analysis of the cell cycle by flow cytometry revealed that the ratio of phase S cells was higher at a concentration of 7.5 mg-protein/ml of SS in comparison with that in the control. Morphologically, various degenerations were microscopically observed in cells incubated with SS. The growh-inhibitory substance in SS was not inactivated by heating at 100℃ and was permeable through a dialysis membrane. These results seem to indicate that inhibition of DNA synthesis might play an important role in the anti-tumor activity of SS of *V. parvula* strain KN-2.