

# Studies on Antitumor Activity of propionibacterium acnes Strain KT-28, An Isolate from the Oral Cavity

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8139">http://hdl.handle.net/2297/8139</a>

## 口腔内分離菌 *Propionibacterium acnes* KT-28 株の 抗腫瘍性に関する研究

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 隆 三

(平成1年8月12日受付)

口腔内歯石より分離・同定した *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) KT-28 株の抗腫瘍活性をマウスに移植したエールリッヒ腹水癌細胞, サルコーマ180細胞, およびメス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 (腫瘍重量比), あるいは平均生存日数の比 (T/C) で評価した。*P. acnes* KT-28 株菌体の抗腫瘍活性発現には玉井・福田 (Tamai-Fukuda, TF) 培地48時間培養が良好であった。TF 培地48時間培養菌液から得られた菌体を超音波処理により破壊し, 遠心上清と遠心沈渣 (超音波沈渣) に分けそれぞれの抗腫瘍活性を検討した結果, 超音波沈渣に高い抗腫瘍活性が認められた。特に沈渣濃度が 3g/70ml の時, 腫瘍重量比は17.8-28.3%, また T/C は133.0-147.7%以上であり強い抗腫瘍活性が認められた。次に, 本抗腫瘍物質を精製するため超音波沈渣に対し蛋白分解酵素処理を行った (蛋白分解酵素処理超音波沈渣)。本標品は, 腫瘍重量比で20.7-26.2%, T/C で127.6-146.2%以上の高い抗腫瘍活性を示した。さらに, 蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品をメタノール・クロロホルムで脱脂質した標品 (脱脂質超音波沈渣) について検討した。本標品では, 腫瘍重量比は20.7-29.7%, T/C は125.0-140.2%であり蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品とほぼ同程度の抗腫瘍活性を示した。また免疫学的検索においてはメスA細胞担癌マウスに蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品を投与したとき Lyt 2 陽性T細胞の明らかな増加が認められたが, L3T4 陽性T細胞の有意な増加は認められなかった。また, 標品を投与したマウスでは腫瘍部位に Lyt2 陽性T細胞, L3T4 陽性T細胞の浸潤が病理組織学的に認められた。以上の結果, 口腔内分離菌株である *P. acnes* KT-28 株は, 皮膚および骨髄に存在する嫌気性コリネバクテリウムと同様, 強い抗腫瘍活性を有していることが分かった。また, 本抗腫瘍活性の本態は細胞壁ペプチドグリカンであり, 本活性には免疫系が関与していることが示唆された。

**Key words** anaerobe, antitumor activity, *Propionibacterium acnes*

細菌による抗腫瘍活性, 制癌作用については, 主として好気性菌について多数の研究がなされ, 現在 BCG 製剤, *Streptococcus pyogenes* 製剤が免疫賦活剤として癌免疫療法において実験的にも臨床的にも広く用いられている<sup>1)</sup>。嫌気性菌による抗腫瘍活性の研究は従来 *Clostridium butyricum*, 嫌気性コリネバクテリウムである *Corynebacterium parvum* (*C. parvum*) および *Corynebacterium anaerobium* (これらの菌株の1

部は現在 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) に分類されている) 等数菌種においてのみなされていたにすぎなかったが, 近年種々の嫌気性菌について抗腫瘍活性の研究がなされている<sup>2-5)</sup>。

著者の研究室でも口腔内嫌気性菌の抗腫瘍活性について数年来検討を行い, 1981年玉井<sup>6)</sup>は嫌気性グラム陰性桿菌である *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) の培養上清液に抗腫瘍活性のあることを

Abbreviations: *C. parvum*, *Corynebacterium parvum*; FITC, fluorescein isothiocyanate; *F. nucleatum*, *Fusobacterium nucleatum*; LPS, lipopolysaccharide; PAP 法, peroxidase anti-peroxidase 法; *P. acnes*, *Propionibacterium acnes*; PB, phosphate buffer; *P. magnus*,

見いだし、その後本抗腫瘍物質は本菌のリポ多糖体 (lipopolysaccharide, LPS) であることが明らかにされた<sup>7-16)</sup>。また中川ら<sup>17-20)</sup>は嫌気性グラム陰性球菌である *Veillonella alcalescens* (*V. alcalescens*) の菌体内内容物がエールリッヒ腹水癌細胞に対し抗腫瘍活性を示すことを報告し、坂下<sup>21)</sup>は嫌気性グラム陽性球菌である *Peptococcus magnus* (*P. magnus*) の菌体細胞壁に抗腫瘍活性のあることを報告した。

嫌気性コリネバクテリウムの抗腫瘍活性に関しては、皮膚分離菌株あるいは骨髄分離菌株について数々の研究がなされ、細胞壁ペプチドグリカンに抗腫瘍活性が存在し、その活性は免疫賦活作用によるものと考えられている<sup>22-55)</sup>。

このように種々の細菌が抗腫瘍活性を有することが明らかになってきたが、嫌気性コリネバクテリウムをはじめとしてこれらの細菌については、同一菌種内においても菌株の由来を含め、菌株が異なると抗腫瘍活性もまた異なると報告されている<sup>56-59)</sup>。

口腔内には、上述の *F. nucleatum*, *V. alcalescens*, *P. magnus* をはじめとして多数の嫌気性菌種が存在する<sup>59,60)</sup>。*Propionibacterium* は嫌気性コリネバクテリウムに属し、歯垢、歯石等に主として存在する口腔内優位菌種の1つであるが、皮膚由来嫌気性コリネバクテリウムが抗腫瘍活性を有し、また先に述べたごとく口腔内細菌の中には抗腫瘍活性を示す菌種が存在することから、口腔分離 *Propionibacterium* もまた、抗腫瘍活性を有することが考えられる。

以上の見地から、本研究では口腔 (歯石) 分離菌株である *P. acnes* KT-28 株の抗腫瘍活性について検討した。

## 材料および方法

### I. 使用菌株

口腔内の歯石から分離・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 *P. acnes* KT-28 株を使用した。

### II. 使用培地および菌体の調整

*P. acnes* KT-28 株の培養には、玉井・福田培地<sup>61)</sup> (Tamai-Fukuda medium, TF 培地) (白水, 東京) を使用した。

*P. acnes* KT-28 株を TF 培地 (15ml) で前培養後、TF 血液寒天平板培地に塗抹し、ガスパック (Becton Dickinson, Cockeysville, Canada) を用いて 37°C・48

時間嫌気培養を行った。培養後、発育した集落を TF 培地 (15ml) に釣菌し、37°C・48時間培養した。培養後、その 4ml を 100ml の TF 培地に移植し、37°C・48時間培養し、その 40ml を 1000ml の TF 培地に移植し 37°C で本培養を行った。培養後の集菌は培養菌液を 6500×g, 20分間遠心することにより行った。

### III. ホルマリン処理死菌標品の作製

TF 培地培養菌液 1000ml より得た菌体に 0.5% ホルマリン加 1/15M 磷酸緩衝液 (pH7.0) (phosphate buffer, PB) 50ml を加え菌懸濁液とし、37°C で一夜静置した。その後、滅菌生理食塩水で遠心洗浄 (6500×g, 20分間) を 3 回繰り返し、ホルマリンを除去後、PB に再び懸濁したものをホルマリン処理死菌標品として用いた。

### IV. 超音波処理による菌体の破壊

TF 培地 48 時間培養菌液 1000ml より得た菌体 (湿重量, 4.5g) に PB 50ml を加え、超音波破碎機 Model UR-200P (20KHz) (トミー精工, 東京) を用いて 20 分間超音波処理した。次に未破碎の細胞片を除去する目的で 800×g, 20 分間遠心後、得られた上清液を 20,000×g, 30 分間遠心した。遠心後の上清液を超音波上清液、沈渣を超音波沈渣とした。なお、超音波沈渣は PB に懸濁し実験に供した。

### V. 蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品の調整

超音波沈渣懸濁液にトリプシン (和光純薬, 大阪) およびプロナーゼ (科研製薬, 東京) を各々沈渣の湿重量の 1% の割に加え、室温にて 18 時間処理した。処理後、800×g, 20 分間遠心後、その上清液を 20,000×g, 20 分間遠心して得られた沈渣を蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品とし実験に供した。

### VI. 脱脂質超音波沈渣標品の作製

蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品に、その 20 倍量のメタノール・クロロホルム液 (メタノール 1 容量 + クロロホルム 2 容量) を加え懸濁し室温にて 18 時間静置した後、ガラスフィルター (G-50) (柴田科学器械, 東京) にて濾過した。上述の操作を 3 回繰り返し、得られた残渣を脱脂質超音波沈渣標品とし実験に供した。

### VII. 実験動物

生後 5 週齢雌の ICR 系マウス (体重, 20-22g) および、生後 6 週齢雌の近交系の BALB/c 系マウス (体重, 18-20g) を日本チャールズ・リバー (厚木) より購入し、教室で 1 週間飼育した後実験に供した。マウスは、室温 22°C, 湿度 60.5%, 明暗 12 時間周期のもと

*Peptococcus magnus*; TF 培地, Tamai-Fukuda medium; *V. alcalescens*, *Veillonella alcalescens*

で固型飼料 MF (オリエンタル酵母, 東京) と水を自由に与え飼育した。

Ⅷ. 腫瘍細胞の調整

教室では継代培養している<sup>62)</sup> エールリッヒ (Ehrlich) 腹水癌細胞, サルコーマ (Sarcoma) 180細胞およびメス (Meth) A細胞を用いた。

サルコーマ180細胞およびエールリッヒ腹水癌細胞は, ICR 系マウスの腹腔内, メス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。実験に際してはマウス腹腔内で7日間培養した各種瘍細胞 (腹水) を無菌的に採取した。採取後, Türk 型白血球計算盤 (エルマ光学, 東京) で白血球算定基準<sup>63)</sup>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,  $5.0 \times 10^7$  cells/ml の細胞浮遊液を作製し各実験に供した。

Ⅸ. 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 ( $5.0 \times 10^7$  cells/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, サルコーマ180細胞, エールリッヒ腹水癌細胞には ICR 系マウスを, メスA細胞には BALB/c 系マウスを用いた。

X. 抗腫瘍活性の判定

マウスの背部皮下に各々の細胞浮遊液 0.2ml を皮下注射後, その48時間後より1日1回, 2週間連続してマウスの四肢筋肉内にそれぞれの被験標品の0.2ml を注射し, 担癌マウスの生存日数および腫瘍重量の変化

について検討した。対照群には滅菌生理食塩水を同量注射した。各実験には1群20匹のマウスを使用した。

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,  $T/C \times 100$  (%) によって抗腫瘍効果を判定した。また, 細胞移植部位 (背部) に形成した固型腫瘍の大きさを, 長径 (cm) と短径 (cm) を一定期間ごとに測定することにより, 腫瘍重量を算定し腫瘍重量の増減あるいは処置群マウスの対照群に対する腫瘍重量比 (%) を求め抗腫瘍効果を判定した。なお, 腫瘍重量は以下の計算式により算定した<sup>64,65)</sup>。

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

XI. マウス末梢血リンパ球サブセットの構成率

1. サンプル調整方法

被験マウスを麻酔用エトレンをいれたガラス容器の中で麻酔し, 後大静脈あるいは, 心臓から約1ml採血した。採血した血液をクエン酸・リン酸塩・デキストロース (C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(COOH)<sub>2</sub>ONa, 2.6.3g; C(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(COOH)<sub>2</sub>OH, 3.27g; ブドウ糖, 23.2g; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2.51g; 蒸留水, 1000ml) (テルモ, 東京) 1ml 入りの小試験管に入れ常温で24時間以内に, その100 μl を試験管に分注し, 溶血試薬 (NH<sub>4</sub>Cl, 826mg; KHCO<sub>3</sub>, 100mg; ethylene diamine tetracetic acid·4Na, 3.7mg; 蒸留水, 100ml) 2ml を加え赤血球が溶解したことを確認後 250×g・10分間遠心を行った。上清を除去後, 抗血清 (1% NaN<sub>3</sub>および0.5%牛

Table 1. Antitumor activity of formalin-killed cell preparation of *P. acnes* strain KT-28 harvested from cultures incubated for different periods to tumor weight of the solid type tumor of Sarcoma 180 in mice

Formalin-Killed cell preparation <sup>a)</sup> injected	Number of mice used for the measurement of tumor weight <sup>b)</sup>	Tumor weight (mean±S.D.g)					Tumor weight rate(%) <sup>c)</sup>
		Days after subcutaneous inoculation of Sarcoma 180 cells					
		10	15	20	25	30	
24 hr	20	0.6±0.2	0.7±0.2	0.8±0.4	1.3±0.5	1.6±0.6	21.9*
48 hr	20	0.5±0.2	0.7±0.2	0.8±0.3	1.2±0.5	1.4±0.5	19.2*
72 hr	20	0.5±0.2	0.6±0.2	0.9±0.3	1.3±0.5	1.7±0.5	23.3*
96 hr	20	0.5±0.2	0.7±0.2	0.9±0.3	1.2±0.7	1.6±0.6	21.9*
120 hr	20	0.6±0.2	0.8±0.2	0.9±0.3	1.2±0.4	1.7±0.7	23.3*
Saline (control)	14	0.8±0.5	1.1±0.7	3.4±2.0	4.7±2.6	7.3±2.1	

Two-tenths ml of each preparation was injected daily intramuscularly into tumor-bearing mice for 14 days; the first injection was made at 48 hr after subcutaneous inoculation (0.2 ml) of tumor cell suspension ( $5.0 \times 10^7$  cells/ml). These procedures were used through the experiments.

- a) After each incubation period of culture in Tamai-Fukuda (TF) medium, formalin-killed cell preparation was made.
- b) Living mice 30 days after inoculation of tumor cells were used for the measurement of tumor weight during the test period. Twenty mice were used for each experiment.
- c) Ratio of mean tumor weight of mice injected with each preparation to that of control mice on 30 days after inoculation of tumor cells.

\*  $p < 0.001$ , compared with control by Student's t-test.

血清アルブミン加1/15M磷酸緩衝食塩水 (pH6.8) 4ml にT細胞の機能関連膜抗原である L3T4 陽性T細胞, Lyt2 陽性T細胞に対する各マウスモノクローナル抗体 (Cedarlane Laboratories, Ontario, Canada) 各々 50 $\mu$ l 加えたものを 100 $\mu$ l 加えアイスバス上で 4°C・30分間インキュベートした。さらに、2次抗体 (フルオレッセイン・イソチオシアネイト (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗マウス IgG 抗体) (TAGO, California, U.S.A.) を 100 $\mu$ l 加え 4°C・30分間インキュベート後 250 $\times$ g・10分間 (2回) 遠心洗浄を行った<sup>66)</sup>。

## 2. フローサイトメトリーによる解析

初めに、コントロール検体 (FITC 標識マウスモノクローナル抗体; FITC 標識抗ラット IgG 抗体を反応させたもの) を流し、前方散乱光, 側方散乱光の2パラメータによるサイトグラム上でリンパ球領域にゲートをかけ、その陽性率が1-2%となるように設定し、サンプルを流し、解析を実施した<sup>67)</sup>。解析はレーザー・フローサイトメトリー・システム Ortho SpectrumIII (Ortho Diagnostic System, Massachusetts, U.S.A.) により行い、L3T4 陽性T細胞, Lyt2 陽性T細胞の末梢血全リンパ球に対する比率の変動について検討した。

## XII. 病理組織学的検討

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<sup>68)</sup>に従い、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った後、光学顕微鏡下で観察した。

また、同様に摘出した腫瘍組織標本を OCT コンパウンド (Miles Laboratories, Indiana, U.S.A.) 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 II (マイルス・三共, 東京) で薄切した。第1次抗体として抗マウス Lyt2 モノクローナル抗体 (マウス Lyt2 に対するラット IgG<sub>2b</sub> 抗体,  $\times 100$ ) (Sera-Lab, Crawley Down Sussex, U.K.), 抗マウス L3T4 モノクローナル抗体 (マウス L3T4 に対するラット IgG<sub>2b</sub> 抗体,  $\times 100$ ) (Sera-Lab) で60分, 第2次抗体としてヤギ抗ラット IgG 抗体 (Affinipure Goat Anti Rat-IgG,  $\times 100$ ) (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Baltimore, U.S.A.) で40分, 標識抗体 (Rat Peroxidase Antiperoxidase antibody,  $\times 200$ ) (Jackson Immunoresearch Laboratories) で40分間染色させる酵素抗体法<sup>69)</sup> (peroxidase anti-peroxidase 法, PAP 法) に従い、染色を行った後、光学顕微鏡下で観察した。

## XIII. 統計学的検定法

2群の生存率の差の検定には、generalized Wilcoxon test を、腫瘍の大きさのような連続変数として示されるものには、t 検定 (Student's t-test) を使って検定を行った。

## 成 績

### I. *P. acnes* KT-28 株ホルマリン処理死菌の抗腫瘍活性

まず、*P. acnes* KT-28 株の抗腫瘍活性の発現に最も有効な培養時間を求めるため、24, 48, 72, 96, 120時間培養ホルマリン処理死菌標品を作製し、サルコーマ180細胞の固型腫瘍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。腫瘍重量でみた場合、移植30日目における生存マウスについては、いずれのホルマリン処理死菌標品の投与においても腫瘍重量の抑制が認められ、サルコーマ180細胞移植後30

Table 2. Antitumor activity of formalin-killed cell preparation of *P. acnes* strain KT-28 harvested from cultures incubated for different periods to survival of mice with the solid type tumor of Sarcoma 180

Formalin-killed cell preparation <sup>a)</sup> injected	Number of mice used	Mean survival days <sup>b)</sup>	Number of survivors	T/C (%)
24 hr	20	48.3 <	4	129.5 < *
48 hr	20	49.2 <	4	131.9 < *
72 hr	20	45.8 <	2	122.8 < *
96 hr	20	44.1 <	1	118.2 < * *
120 hr	20	42.9	0	115.0 * *
Saline (control)	20	37.3	0	

a) Refer to the foot notes of Table 1.

b) Mice were observed for 60 days after the subcutaneous inoculation of tumor cells.

\*  $p < 0.001$ , compared with control by generalized Wilcoxon test.

\* \*  $p < 0.05$ , compared with control by generalized Wilcoxon test.

日目における対照群 (生理食塩水投与群) に対するホルマリン処理死菌標品投与群の腫瘍重量比は約20%であり、腫瘍重量の有意な抑制 ( $p < 0.001$ ) がみられた (表1)。各標品間には、腫瘍重量比の有意な差異は認められなかったが、48時間培養標品において腫瘍重量比は19.2%と最も低値であった。さらに、これらホルマリン処理死菌標品の抗腫瘍活性をサルコーマ180細胞移植後60日間のマウスの生存日数により判定した。対照群では49日目までに、120時間培養ホルマリン処理死菌標品投与群では60日目までに20匹全てのマウスは腫瘍死した。他の標品の投与では60日目においても生存マウスが認められ、特に24時間および48時間培養ホルマリン処理死菌標品投与群では各4匹が生存した (表2)。T/Cは、いずれの標品においても対照群に比べ高値を示した (24, 48, 72時間培養標品,  $p < 0.001$ ; 96, 120時間培養標品  $p < 0.05$ )。24, 48, 72時間培養標品間には T/C の有意な差異はなかったが、48時間培養標品において T/C は最も高く、131.9%以上であった。

以上の結果、*P. acnes* KT-28 株の抗腫瘍活性の発現には48時間培養が最も有効と思われたので、48時間培養ホルマリン処理死菌標品について、さらに、その抗腫瘍活性をエールリッヒ腹水癌細胞および同系のメスA細胞固型腫瘍について検討した。

エールリッヒ腹水癌細胞においては、移植30日目における標品投与群、対照群の腫瘍重量は各々  $4.0 \pm 2.4$  g (平均値  $\pm$  標準偏差),  $12.8 \pm 4.7$  g であり、標品投与群の対照群に対する腫瘍重量比は31.3%であり、腫瘍重量の有意な抑制 ( $p < 0.001$ ) が認められた。生存日数でみた場合、48日目まで対照群のマウスはすべて腫瘍死し、生存日数は  $37.2 \pm 5.7$  日 (平均値  $\pm$  標準偏差) であったが、ホルマリン処理死菌標品投与群では60日目

においても3匹が生存し、生存日数は  $51.1 \pm 7.9$  日以上であり、ホルマリン処理死菌標品投与群の T/C は137.4%以上を示し、対照群との間に有意な差異 ( $p < 0.001$ ) がみられた。

メスA細胞においては、30日目における標品投与群、対照群の腫瘍重量は各々  $5.4 \pm 1.9$ g,  $15.9 \pm 3.5$ g であり腫瘍重量比は34.0%を示し腫瘍重量の有意な抑制 ( $p < 0.001$ ) が認められた。生存日数に関しては、対照群では35日目まで全てのマウスが腫瘍死し、生存日数は  $30.3 \pm 3.3$  日であった。ホルマリン処理死菌標品投与群では、サルコーマ180細胞、エールリッヒ腹水癌細胞の場合と異なり、60日目まで生存したマウスは認められず、46日目まで全てのマウスは腫瘍死した (生存日数,  $38.8 \pm 3.9$ 日)。しかしながら、T/Cは128.1%であり、対照群との間に有意な差異 ( $p < 0.001$ ) がみられた。

以上の結果に基づき、以後の実験では *P. acnes* KT-28 株の培養時間を48時間とすることにした。

## II. *P. acnes* KT-28 株菌体からの超音波処理抽出物質の抗腫瘍活性

### 1. 超音波処理上清液および超音波沈渣標品の抗腫瘍活性

48時間培養菌液 1000ml の遠心沈渣 (48時間培養菌体, 湿重量4.5g) を 50ml の PB に懸濁した後、超音波処理により菌体を破壊し、その遠心上清液 (超音波上清液) と沈渣 (超音波沈渣, 湿重量 3g) について、その抗腫瘍活性をサルコーマ180細胞の固型腫瘍の担瘤マウスを用いて検討した。

超音波上清液投与群では、対照群とほぼ同様に20日目頃から腫瘍死を認め、55日目までに20匹全てのマウスが腫瘍死した。30日目における腫瘍重量比は、101.9%、また、T/Cは120.6%であり、共に対照群と

Table 3. Antitumor activity of the ultrasonic sediment preparation of *P. acnes* strain KT-28 to tumor weight of the solid type tumor of Sarcoma 180 in mice

Concentration of ultrasonic sediment <sup>a)</sup> in the preparation injected	Number of mice used for the measurement of tumor weight <sup>b)</sup>	Tumor weight (mean $\pm$ S.D., g)					Tumor weight rate (%) <sup>c)</sup>
		Days after subcutaneous inoculation of Sarcoma 180 cells					
		10	15	20	25	30	
3g/50 ml	8	0.2 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.8	12.6 *
3g/70 ml	17	0.5 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 1.1	17.8 *
3g/80 ml	17	0.8 $\pm$ 0.4	1.3 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.6	2.7 $\pm$ 1.2	5.1 $\pm$ 2.6	43.0 **
3g/100 ml	16	0.8 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 1.1	4.0 $\pm$ 1.2	7.2 $\pm$ 2.3	60.3 **
3g/200 ml	17	0.5 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.8	8.4 $\pm$ 2.1	70.9
Saline (control)	10	1.5 $\pm$ 0.9	3.9 $\pm$ 1.4	5.4 $\pm$ 1.8	7.9 $\pm$ 2.8	11.9 $\pm$ 6.3	

a) Cells were harvested from 48 hr culture in TF medium and suspended in 1/15 M phosphate buffer (pH7.0) (PB). Then, the cell suspension was treated with ultrasonic disruption. After centrifugation the sediment was suspended in PB to be each concentration.

b), c) Refer to the foot notes of Table 1.

\*  $p < 0.001$ , compared with control by Student's t-test.

\*\*  $p < 0.05$ , compared with control by Student's t-test.

比較して有意の差は認められず、超音波上清液には抗腫瘍活性はみられなかった。

超音波沈渣標品の抗腫瘍活性の実験では、まず、上述の超音波上清液の実験に対応するよう、超音波沈渣を50mlのPBに懸濁し、その抗腫瘍活性を検討した。標品投与群では13日目からマウスの斃死が認めら

れ、対照群のマウスの最初の腫瘍死が認められる以前(19日目以前)に約1/3(20匹中7匹)のマウスが斃死したが、約1/2(20匹中9匹)のマウスは対照群の全てのマウスが腫瘍死した後(43日目以後)も生存した。また、30日目の生存マウスの対照群マウスに対する腫瘍重量比は、16.7%であり腫瘍重量の明らかな抑制が認

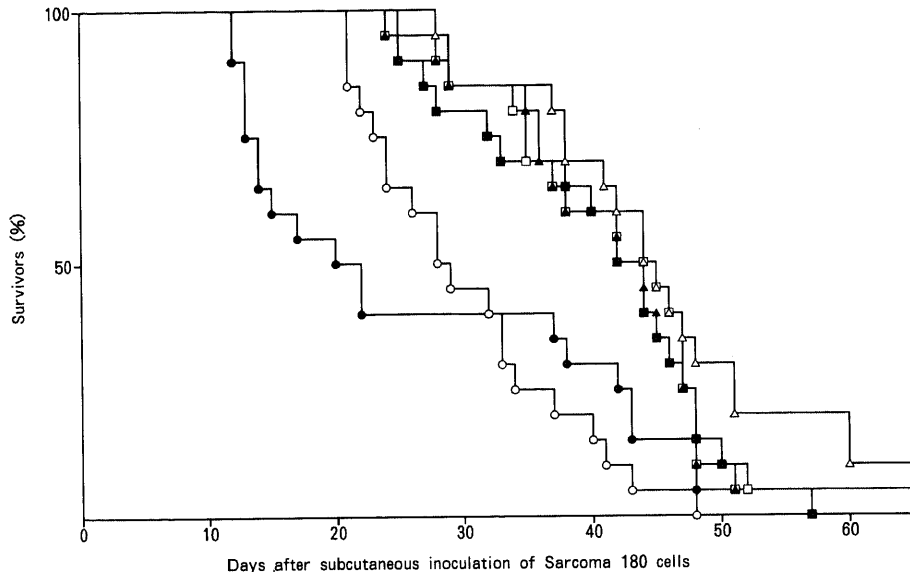


Fig. 1. Survival of mice with solid type tumor of Sarcoma 180 cells by the intramuscular injection of the sediment preparation of *P. acnes* strain KT-28 cells treated with ultrasonic disruption (ultrasonic sediment preparation of *P. acnes* strain KT-28). Two-tenths ml of each preparation was injected daily intramuscularly into tumor-bearing mice for 14 days; the first injection was made at 48 hr after subcutaneous inoculation (0.2ml) of Sarcoma 180 cell suspension ( $5.0 \times 10^7$  cell/ml). Concentration of the sediment preparations: ○, saline (control); ●, 3g/50ml; △, 3g/70ml; ▲, 3g/80ml; □, 3g/100ml; ■, 3g/200ml.

Table 4. Antitumor activity of the ultrasonic sediment preparation of *P. acnes* strain KT-28 to survival of mice with the solid type tumor of Sarcoma 180 in mice

Concentration of ultrasonic sediment <sup>a)</sup> in the preparation injected	Number of mice used	Mean survival days <sup>b)</sup>	Number of survivors	T/C (%)
3 g/50 ml	20	27.3 <	1	89.8 <
3 g/70 ml	20	44.9 <	2	147.7 < *
3 g/80 ml	20	41.7 <	1	137.2 < *
3 g/100 ml	20	41.7 <	1	137.2 < *
3 g/200 ml	20	40.6	0	133.6
Saline (control)	20	30.4	0	

a) Refer to the foot notes of Table 3.

b) Mice were observed for 60 days after the subcutaneous inoculation tumor cells.

\*  $p < 0.001$ , compared with control by generalized Wilcoxon test.

められた。以上のことから超音波沈渣標品には、抗腫瘍活性が存在することが示唆された。しかしながら、標品投与群マウスの約1/3が対照群マウスよりも先に斃死したため、超音波沈渣(湿重量3g)に加えるPBの量を50, 70, 80, 100, 200ml(50-, 70-, 80-, 100-, 200-超音波沈渣標品)と変化させて実験した。

50- および70-超音波沈渣標品投与群では、移植30日目の腫瘍重量は、各々1.5±0.8g, 2.1±1.1gにすぎず、腫瘍重量の著明な増加はみられなかった(表3)。80-超音波沈渣標品投与群では腫瘍重量は25日目では2.7±1.2g, 30日目では5.1±2.6gであり25日目以後に腫瘍重量の明らかな増加がみられた。また、100- および200-超音波沈渣標品投与群の腫瘍重量は、20日目では各々2.6±1.1g, 1.6±0.4gであったが、25日目では4.0±1.2g, 4.1±0.8g, 30日目では7.2±2.3g, 8.4±2.1gであり20日目以降に著しい増加が認められた。

以上の腫瘍重量の抑制を30日目における生存マウスの対照群に対する腫瘍重量比で比較すると50- および70-超音波沈渣標品投与群では、各々12.6%, 17.8%であり、対照群との間に明らかな差異(p<0.001)がみられた。

次にこれらの超音波沈渣標品の抗腫瘍活性を移植後60日間のマウスの生存日数により判定した。50-超音波沈渣標品投与群では、先の実験結果と幾分異なり、対照群におけるマウスの最初の腫瘍死が認められる以前(移植21日目以前)に担癌マウスの約1/2(20匹中10匹)は斃死したが、1匹は対照群のマウスの全てが腫瘍死した48日目でも斃死することなく移植後60日間以上生存した(図1)。他の超音波沈渣標品の投与では、いずれの標品においてもマウスの腫瘍死は対照群における最初の腫瘍死が認められる以後にみられ、生存日数の延長が認められた。また、200-超音波沈渣標品投

与群マウスは57日目に全てが腫瘍死したが、70-, 80-, および100-超音波沈渣標品投与群では各々2, 1, 1匹のマウスが60日間以上生存した。

T/Cは、50-超音波沈渣標品投与群を除いてはいずれの投与群においても、対照群に比べ有意に高値を示した(p<0.001)(表4)。また、70-, 80-, 100-, 200-超音波沈渣標品間にはT/Cの有意な差異はなかったが、70-超音波沈渣標品においてT/Cは最も高く147.7%以上であった。

以上の結果に基づき、70-超音波沈渣標品について、さらに、その抗腫瘍活性をエールリッヒ腹水癌細胞、メスA細胞について検討した。

エールリッヒ腹水癌細胞の担癌マウスに超音波沈渣標品を投与した場合、20日目までは腫瘍重量の著明な増加が認められず、移植30日目における標品投与群、対照群の腫瘍重量は各々3.0±0.9g, 10.6±2.8gであり、腫瘍重量比は28.3%を示し、腫瘍重量の有意な抑制(p<0.001)が認められた。生存日数でみた場合、47日目で対照群のマウスは全て腫瘍死したが(生存日数, 34.6±7.5日)、超音波沈渣標品投与群では2匹が60日目においても生存した(生存日数, 47.2±9.4日以上)。超音波沈渣標品投与群のT/Cは136.4%以上であり、対照群との間に有意な差異(p<0.001)がみられた。

メスA細胞の担癌マウスにおいてもエールリッヒ腹水癌細胞の場合と同様20日目まで腫瘍重量が抑制され、30日目における超音波沈渣標品投与群、対照群の腫瘍重量は各々3.4±1.1g, 15.0±2.9gであり、腫瘍重量比は22.7%を示し、腫瘍重量の有意な抑制(p<0.001)がみられた。生存日数でみた場合、超音波沈渣標品投与群は、投与47日目で使用全てのマウスは斃死したが、生存日数は40.3±4.7日であり、対照群(生存日数, 30.3±3.9日)より長く、T/Cで133.0%を示

Table 5. Antitumor activity of the protease-treated ultrasonic sediment of *P. acnes* strain KT-28 to tumor weight of the solid type tumors of Sarcoma 180, Ehrlich carcinoma and Meth A cells in mice

Tumor cell inoculated	Injection of the preparation <sup>a)</sup>	Number of mice used for the measurement of tumor weight <sup>d)</sup>	Tumor weight (mean±S.D.,g)					Tumor weight rate (%) <sup>a)</sup>
			Days after subcutaneous inoculation of tumor cells					
			10	15	20	25	30	
Sarcoma 180	+	18	0.1±0.1	0.4±0.2	0.7±0.4	1.2±0.6	3.0±1.6	24.0 *
	-	12	1.0±0.3	2.3±0.6	3.8±1.1	8.2±3.3	12.5±3.4	
Ehrlich carcinoma	+	18	0.1±0.1	0.5±0.3	1.0±0.4	2.8±0.9	26.2 *	
	-	12	0.7±0.2	2.2±0.7	4.1±1.5	8.1±1.7	10.7±2.3	
Meth A	+	19	0.1±0.1	0.2±0.1	0.6±0.3	1.2±0.3	2.8±0.9	20.7 *
	-	16	1.1±0.4	2.8±0.9	6.0±1.8	10.9±2.6	13.5±2.2	

a) Ultrasonic sediment (3g/70 ml), which was digested with trypsin and pronase.

b) +, protease-treated ultrasonic sediment preparation was injected; -, saline was injected (control).

c), d) Refer to the foot notes of Table 1.

\* p<0.001, compared with each control by Student's t-test.



し、対照群との間に有意な差異 ( $p < 0.001$ ) が認められた。

以上の結果、70-超音波沈渣標品は、サルコーマ180細胞、エールリッヒ腹水癌細胞、メスA細胞3種の腫瘍細胞に対し抗腫瘍活性を示すことが分かった。

## 2. 蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品の抗腫瘍活性

先の菌体超音波沈渣標品をトリプシンおよびプロナーゼで処理した後得られた標品(蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品)について、その抗腫瘍活性をサルコーマ180細胞、エールリッヒ腹水癌細胞、メスA細胞の固型腫瘍の担癌マウス(1群20匹)に投与することにより検討した。

蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品のサルコーマ180細胞の固型腫瘍に対する抗腫瘍活性を腫瘍重量でみた場合、25日目においても  $1.2 \pm 0.6$ g にすぎず腫瘍の増大に対して十分に抑制効果のあることが認められた(表5)。30日目における標品投与群の腫瘍重量は  $3.0 \pm 1.6$ g、対照群との腫瘍重量比は24.0%であり腫瘍重量の有意な抑制 ( $p < 0.001$ ) が認められた。生存日数でみた場合、標品投与群では、29日目からマウスの腫瘍死が始まり、60日目までに、合計18匹のマウスが斃死したが2匹は60日間以上生存した(生存日数、 $43.8 \pm 10.7$ 日以上)。対照群では20日目より腫瘍死がみられ、47日目に全てのマウスが腫瘍死し生存日数は  $32.0 \pm 7.1$ 日であった。標品投与群の T/C は136.9%以上であり、対照群に対し有意な差異 ( $p < 0.001$ ) が認められ、本標品は有効な抗腫瘍活性を示した。サルコーマ180細胞接種部位(背部)に形成された腫瘍は、標品投与群では対照群のマウスの腫瘍に比較してやや白色を呈し、中央部に壊死巣が認められた。また、生存した2匹のマウスにおいては、背部に移植された腫瘍は消失し、完全治癒が認められた。

エールリッヒ腹水癌細胞の担癌マウスにおいても、サルコーマ180細胞の場合と同様腫瘍重量でみた場合、蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品投与群では、25日目まで腫瘍の増大傾向はほとんど認められなかった(25日目の腫瘍重量、 $1.0 \pm 0.4$ g)。30日目における標品投与群の腫瘍重量は  $2.8 \pm 0.9$ g、標品投与群の対照群に対する腫瘍重量比は26.2%であり、腫瘍重量の有意な抑制 ( $p < 0.001$ ) が認められた。生存日数でみた場合、標品投与群では29日目からマウスの腫瘍死が始まり60日目までに18匹のマウスが腫瘍死し、2匹は60日以上生存した(生存日数、 $46.5 \pm 9.6$ 日以上)。対照群では20日目より腫瘍死がみられ、48日目に全てが腫瘍死し生存日数  $31.8 \pm 6.9$ 日であった。標品投与群の T/C は146.2%以上と有効な抗腫瘍活性を示した ( $p < 0.001$ )。

メスA細胞においても前2者と同様、腫瘍重量でみた場合、蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品投与群では25日目までは腫瘍重量の増大に対して抑制効果を示した(25日目の腫瘍重量、 $1.2 \pm 0.3$ g)。

30日目における標品投与群の腫瘍重量は  $2.8 \pm 0.9$ g、標品投与群の対照群に対する腫瘍重量比は、20.7%であり、腫瘍重量の有意な抑制 ( $p < 0.001$ ) が認められた。生存日数は標品投与群では  $44.8 \pm 8.6$ 日、対照群では  $35.1 \pm 5.7$ 日であり標品投与群の T/C は127.6%を示し有効な抗腫瘍活性を示した ( $p < 0.001$ )。

以上の結果、蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品はサルコーマ180細胞、エールリッヒ腹水癌細胞、メス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。また本標品投与マウスでは、ホルマリン処理死菌標品、超音波沈渣標品投与マウスに観察された立毛、脱毛、熱感等の全身衰弱の症状、および注射局所の硬結、壊死も軽減していた。

## 3. 脱脂質超音波沈渣標品の抗腫瘍活性

Table 6. Antitumor activity of the lipid-free ultrasonic sediment preparation of *P. acnes* strain KT-28 to tumor weight of the solid type tumors of Sarcoma 180, Ehrlich carcinoma and Meth A cells in mice

Tumor cell inoculated	Injection of the preparation <sup>a)</sup>	Number of mice used for the measurement of tumor weight <sup>c)</sup>	Tumor weight (mean $\pm$ S.D., g)					Tumor weight rate (%) <sup>d)</sup>
			Days after subcutaneous inoculation of tumor cells					
			10	15	20	25	30	
Sarcoma 180	+	17	$0.2 \pm 0.1$	$0.4 \pm 0.2$	$0.8 \pm 0.5$	$1.4 \pm 0.6$	$2.8 \pm 1.8$	20.7*
	-	11	$1.0 \pm 0.3$	$2.2 \pm 0.5$	$3.6 \pm 1.4$	$8.8 \pm 3.5$	$13.5 \pm 2.2$	
Ehrlich carcinoma	+	17	$0.1 \pm 0.1$	$0.3 \pm 0.1$	$0.6 \pm 0.3$	$1.2 \pm 0.5$	$3.3 \pm 0.9$	29.7*
	-	13	$0.8 \pm 0.2$	$2.3 \pm 0.6$	$3.8 \pm 1.2$	$8.0 \pm 1.5$	$11.1 \pm 1.9$	
Meth A	+	18	$0.1 \pm 0.1$	$0.3 \pm 0.2$	$0.8 \pm 0.3$	$1.8 \pm 0.5$	$3.9 \pm 1.7$	28.3*
	-	12	$1.3 \pm 0.5$	$2.9 \pm 0.9$	$6.0 \pm 1.8$	$10.0 \pm 2.6$	$13.8 \pm 2.6$	

a) Ultrasonic sediment (3g/70 ml), which was treated with a mixture of methanol and chloroform following digestion with trypsin and pronase.

b) +, lipid-free ultrasonic sediment preparation was injected; -, saline was injected (control).

c), d) Refer to the foot notes of Table 1.

\*  $p < 0.001$ , compared with each control by Student's t-test.

上述のごとく蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品は、きわめて強い抗腫瘍活性を示したため、さらにこの局在を追求する目的で蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品をメタノール・クロロホルム液に懸濁し、ガラスフィルターにて濾過することにより得られた標品を脱脂質超音波沈渣標品とし、サルコーマ180細胞、エールリッヒ腹水癌細胞、メスA細胞の固型腫瘍に対する抗腫瘍活性を検討した。

脱脂質超音波沈渣標品のサルコーマ180細胞の固型腫瘍に対する抗腫瘍活性を腫瘍重量でみた場合、標品投与群の腫瘍重量は25日目においても  $1.4 \pm 0.6$ g にすぎず、腫瘍の増大に対して十分に抑制効果のあることが認められた(表6)。30日目における標品投与群の腫瘍重量は  $2.8 \pm 1.8$ g、対照群との腫瘍重量比は20.7%であり、腫瘍重量の有意な抑制 ( $p < 0.001$ ) が認められた。生存日数でみた場合、標品投与群では25日目からマウスの腫瘍死が始まり、60日目までに合計18匹のマウスが死亡したが2匹は60日間以上生存した(生存日数、 $40.9 \pm 9.7$ 日以上)。対照群では18日目より腫瘍死がみられ、42日目に全てが腫瘍死し(生存日数、 $29.3 \pm 7.1$ 日)、標品投与群の T/C は139.6%以上であり有効な抗腫瘍活性を示した ( $p < 0.001$ )。

エールリッヒ腹水癌細胞の担癌マウスにおいても、サルコーマ180細胞の場合と同様腫瘍重量でみた場合、脱脂質超音波沈渣標品投与群では、25日目までほとんど増大傾向は認められなかった(25日目の腫瘍重量、 $1.2 \pm 0.5$ g)。30日目における標品投与群の腫瘍重量は  $3.3 \pm 0.9$ g、標品投与群の対照群に対する腫瘍重量比

は29.7%であり、腫瘍重量の有意な抑制 ( $p < 0.001$ ) が認められた。生存日数でみた場合、標品投与群では26日目からマウスの腫瘍死が始まり60日目までに18匹のマウスが腫瘍死し、2匹は60日間以上生存した(生存日数、 $40.4 \pm 9.2$ 日以上)。対照群では20日目より腫瘍死がみられ、43日目に全てが腫瘍死し、生存日数は  $32.4 \pm 6.4$ 日を示し、標品投与群の T/C は124.7%以上と有効な抗腫瘍活性を示した ( $p < 0.001$ )。

メスA細胞においても前2者と同様、腫瘍重量でみた場合、脱脂質超音波沈渣標品では25日目までは重量の増大に対して抑制効果を示した(25日目の腫瘍重量、 $1.8 \pm 0.5$ g)。30日目における標品投与群の腫瘍重量は  $3.9 \pm 1.7$ g、標品投与群の対照群に対する腫瘍重量比は28.3%であり、腫瘍重量の有意な抑制 ( $p < 0.001$ ) が認められた。生存日数は標品投与群では  $39.4 \pm 8.0$ 日、対照群では  $28.1 \pm 7.9$ 日であり標品投与群の T/C は140.2%を示し有効な抗腫瘍活性を示した ( $p < 0.001$ )。

以上の結果脱脂質超音波沈渣標品は蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品と同様、サルコーマ180細胞、エールリッヒ腹水癌細胞、メス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. 免疫学的検討

メスA細胞担癌マウスに対し、腫瘍細胞接種1日目(翌日)から蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品の投与を行い(投与期間、7日間)、投与開始後1, 3, 5, 7日目、および投与終了後7, 10日目のマウスの末梢血Tリンパ球サブセット(L3T4陽性T細胞, Lyt2陽

Table 7. Effect of the protease-treated ultrasonic sediment preparation<sup>d)</sup> of *P. acnes* strain KT-28 on T cell subset ratio in mice with solid type tumor of Meth A cells

Days after injection of the preparation of <i>P. acnes</i> strain KT-28	T cell subset ratio (mean±S.D.,%)			
	Mice injected with the preparation of <i>P. acnes</i> strain KT-28		Control mice <sup>d)</sup>	
	Lyt 2 <sup>+</sup>	L3T4 <sup>+</sup>	Lyt 2 <sup>+</sup>	L3T4 <sup>+</sup>
1	34.3±11.2	38.6±10.8	26.3±4.6	35.4±3.5
3	42.0±11.9	42.4±12.8	26.5±6.2	33.1±8.1
5	34.9±5.0	40.5±6.3	25.3±3.8	30.3±4.2
7	33.6±4.9	38.0±6.6	21.9±5.3	27.8±3.6
14 <sup>b)</sup>	25.1±6.5	27.6±5.3	20.0±3.4	26.5±4.4
17 <sup>c)</sup>	22.9±1.4	26.3±5.6	18.2±2.7	22.7±3.0

Two-tenths ml of the preparation was injected daily intramuscularly into tumor-bearing mice for 7 days; the first injection was made at one day after subcutaneous inoculation (0.2 ml) of Meth A cell suspension ( $5.0 \times 10^7$  cells/ml)

- a) Refer to foot notes of Table 5.
- b) 7 days after finish of injection of the preparation.
- c) 10 days after finish of injection of the preparation.
- d) Saline was injected.

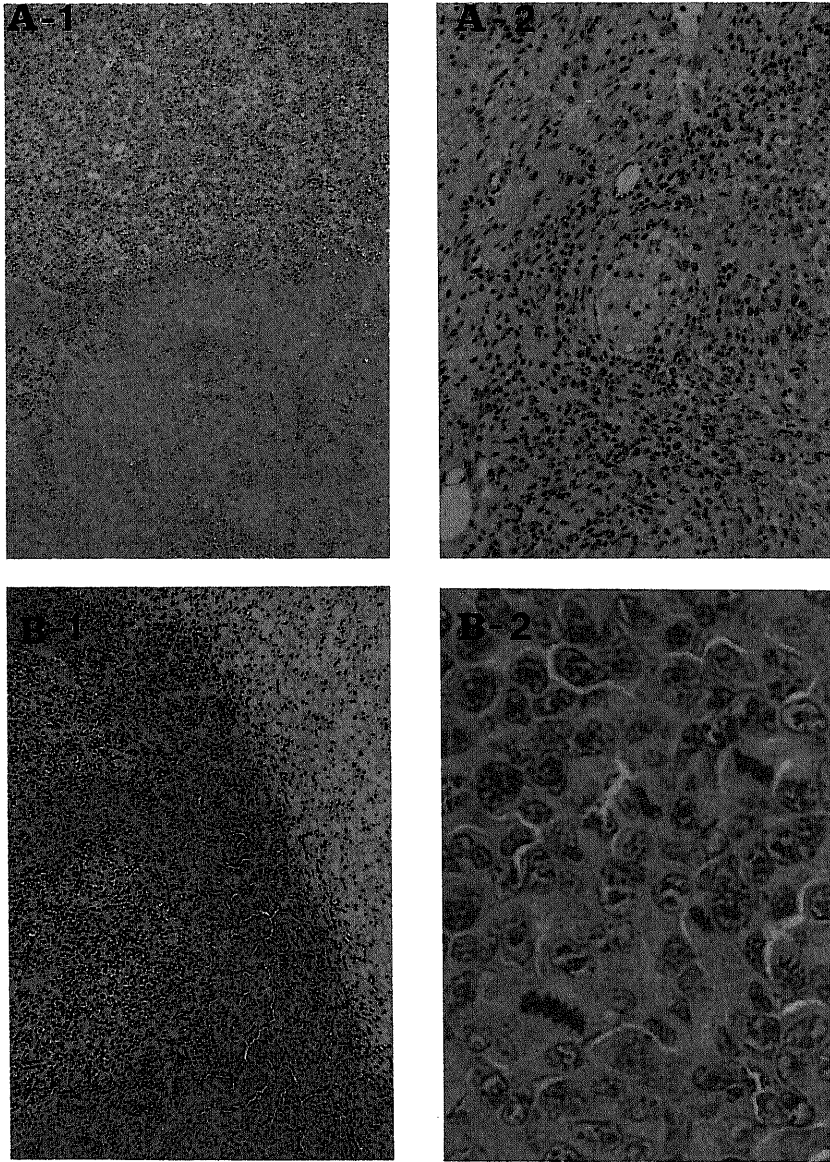


Fig. 2

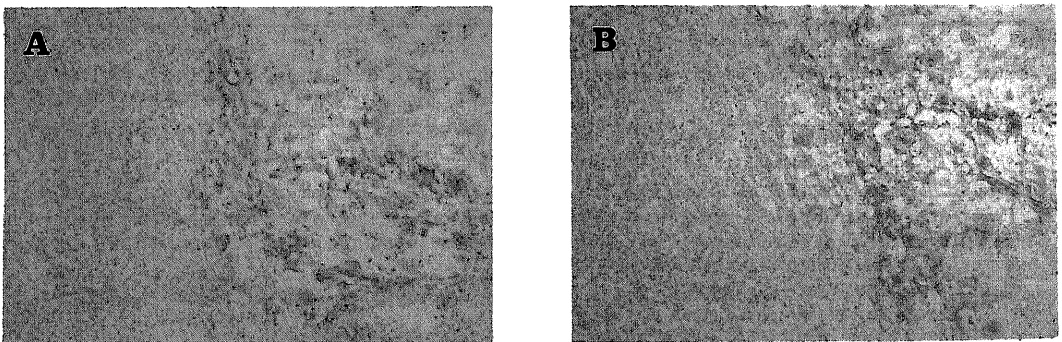


Fig. 3

性T細胞)の全リンパ球に対する比率(%)の変動について検討した。

標品投与群では、投与3日目(腫瘍細胞接種4日目)にL3T4陽性T細胞、Lyt2陽性T細胞共に最高値(L3T4陽性T細胞、 $42.4 \pm 12.8\%$ (平均値±標準偏差);Lyt2陽性T細胞、 $42.0 \pm 11.9\%$ )を示し、以降漸減した(表7)。一方、対照群では、腫瘍細胞接種後2日目に各T細胞共に最高値(L3T4陽性T細胞、 $35.4 \pm 3.5\%$ ;Lyt2陽性T細胞、 $26.3 \pm 4.6\%$ )を示し、以降漸減した。

標品投与群のL3T4陽性T細胞、Lyt2陽性T細胞の比率を対照群と比較すると、投与3日目のLyt2陽性T細胞の比率のみが対照群に比べ有意な差異(高値)を示した。標品投与3日目ではL3T4陽性T細胞の比率も対照群に比べ高値を示したが、有意の差異は認められなかった。

なお、非担癌マウス(健康マウス)では、L3T4陽性T細胞が $42.5 \pm 6.5\%$ 、Lyt2陽性T細胞は $33.5 \pm 3.7\%$ であった。

#### IV. 病理組織学的所見

メスA細胞担癌マウスに対し、腫瘍接種後1日目から蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品の投与を行い、投与3日目に腫瘍組織を摘出し病理組織学的に検討した。

標品投与群では、腫瘍間質に著明なリンパ球の浸潤、癌巣の壊死と巨細胞の出現を認めた。これに対し、対照群では腫瘍細胞の核分裂像を多数認め、腫瘍間質におけるリンパ球の出現は比較的少なかった(図2)。

また、免疫染色では標品投与群の腫瘍間質におけるリンパ球の浸潤部位に一致して、Lyt2陽性T細胞、L3T4陽性T細胞が認められた(図3)。

#### 考 察

細菌の抗癌作用に関しては、1868年にBusch<sup>70)</sup>が丹毒に罹患した肉腫患者の症状の改善を見た報告に始まり、1891年にColey<sup>71)</sup>が丹毒から分離した*Streptococcus pyogenes*、*Serratia marcescens*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、種々の研究が報告されているが、小児白血病について、Reinhard<sup>72)</sup>は、自然治癒と感染症に注目し、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。嫌気性*Corynebacterium*に関しては、*C. parvum*について1963年Halpern<sup>73)</sup>がマウスを用いてその加熱死菌の投与により強い網内賦活作用を報告したのが最初である。当時BCGは細網内皮系刺激物質であり、抗腫瘍効果を有することが知られていたが、1966年Halpern<sup>74)</sup>はスイスマウスを用いエールリッヒ腹水癌細胞およびベッツ・サルコーマに対し*C. parvum*死菌が抗腫瘍効果を示すことを報告した。同年にWoodruff<sup>75)</sup>がA系マウスと自然発生癌、(CBA×A)F<sub>1</sub>マウスとメチルコラントレン誘発肉腫の2つの同系の腫瘍で同様の抗腫瘍効果を報告している。また、その前年Biozzi<sup>76)</sup>は*C. parvum*の前投与により移植片対宿主疾患(graft-versus-host disease, GVH disease)が抑制されることを報告している。本邦においては、服部<sup>77)</sup>の研究では、胃癌患者に対する術中マイトマイシン大量投与と骨髄移植とを併用した際に延命効果が得られた。このことから、骨髄液中から分離される嫌気性コリネバクテリウム(*Corynebacterium liquefaciens*)の存在が制癌効果と関連しているのではないかという仮定に基づき研究が進められてきた。その後も同菌の網内賦活作用、体液性・細胞性免疫への影響、感染抵抗性、抗腫瘍効果に関

Fig. 2. Histological photomicrographs of tumor of Meth A cells in mice on successive 3 days injection of protease-treated sediment preparation of *P. acnes* strain KT-28 (Hematoxylin & Eosin stain).

The preparation (A) or saline (B) was injected. A-1: Marginal portion of invading cancer (×100). Lymphocyte infiltration is remarkable around the tumor. A-2: Central portion of the tumor (×200). Tumor is replaced by granulation tissue and lymphocyte infiltration. A few cancer nests are degenerated. B-1: Marginal portion of the tumor (×100). No lymphocyte infiltrations are shown. B-2: Central portion of the tumor (×400). Pleomorphism and numerous mitoses are seen.

Fig. 3. Distribution of Lyt2<sup>+</sup> or L3T4<sup>+</sup> T cell in tumor of Meth A cells in mice on successive 3 days injection of protease-treated sediment preparation of *P. acnes* strain KT-28 (Peroxidase stain, ×100). A: Section stained with monoclonal anti-Lyt2<sup>+</sup> antibody which is considered to recognize suppressor, killer/cytotoxic T cells. B: Section stained with monoclonal anti-L3T4<sup>+</sup> antibody which is considered to recognize helper/inducer T cells.

しての報告がなされている<sup>22)~38)</sup>。嫌気性コリネバクテリウムは皮膚、骨髄中に広く生存が認められていることから現在まで以上のような数多くの報告がなされている。しかし、多くのは嫌気性コリネバクテリウムの死菌、フェノール処理加熱死菌、ホルマリン処理死菌や、アジュバント、他の抗癌剤との併用として使用したものであり、投与経路、投与時期、投与量に関して一定の見解は得られていない<sup>39)~55)</sup>。

以上のごとく嫌気性コリネバクテリウムの抗腫瘍活性に関しては種々の研究がされているが、口腔内常在菌である *P. acnes* の抗腫瘍活性に関しては未だ報告されていない。今回、著者は歯石由来菌である *P. acnes* KT-28 株を使用し抗腫瘍活性を検討した。

本研究では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 (allogeneic tumor) であるサルコーマ180細胞、エールリッヒ腹水癌細胞、および2次選別試験に用いられている同系腫瘍 (syngeneic tumor) であるメスA細胞を使用した<sup>79)</sup>。

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、著者は、腫瘍細胞接種後2日目まで腫瘍生着が確認できたもの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。

予備実験で *P. acnes* KT-28 株の抗腫瘍活性は培養上清液には認められなかったため、菌体について検討することとした。抗腫瘍活性を検討する方法として、まず *P. acnes* KT-28 株の培養時間と抗腫瘍活性の関係を検討した。各時間培養の菌体間に、抗腫瘍活性の有意の差は認められなかったが、48時間培養から得た菌体では、腫瘍重量比が最も低く、かつ T/C の値が最も高く、強い抗腫瘍活性が認められたので培養時間を48時間と決定した。有効成分を追求するため超音波破砕機によって菌体を破壊し、遠心上清 (菌体内容物) と遠心沈渣 (主として菌体細胞壁、菌体超音波沈渣) に分け、抗腫瘍活性を検討した結果、菌体超音波沈渣標品、すなわち、*P. acnes* KT-28 株の細胞壁 (主成分) に極めて強い抗腫瘍活性が認められた。しかし、高濃度の投与群では腫瘍死する以前に斃死するマウスがみられたため、沈渣濃度を 3g/50ml から 3g/200ml まで変化させて実験を試みた。なかでも、3g/70ml に浮遊した群、すなわち、43mg/ml の濃度のものを2週間連続投与した群には、本標品投与による斃死も少なく腫瘍重量の増加も充分抑制されたため、こ

の濃度を用いることにした。このように、*P. acnes* の投与量と抗腫瘍活性の量的反応については、Scott<sup>80)</sup>が指摘するように至適量が存在するのではないかと考えられた。過量投与による抗腫瘍活性の減弱理由として、菌そのものの毒性も考えられるがリンパ細網系細胞が一時的に消滅することによると考えられている<sup>79)</sup>。また、3g/200ml に浮遊した群、すなわち、15mg/ml の濃度になると抗腫瘍活性は著しく低下したが、同時に対照群に比べ全身的に衰弱するものが認められたため、蛋白毒などの毒性を考え、これを取り除いたものについて実験を行った。トリプシンとプロナーゼにより蛋白を消化した蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品投与群のものでは抗腫瘍活性は増強し、全身的衰弱に関しても軽減したことにより上述の衰弱は蛋白毒によると思われた。なお、プロナーゼに関しては、小谷ら<sup>75)</sup>、Romeo ら<sup>76)</sup>により高い除蛋白効果が報告されている。上記標品について脱脂質処理を行い、抗腫瘍活性を検討したが、抗腫瘍活性の増強や低下はみられなかった。

以上の結果、*P. acnes* KT-28 株の抗腫瘍活性は細胞壁成分、特にペプチドグリカンによるものと思われた。

*P. acnes* 細胞壁骨格は主として、ジアミノマンノuron酸、ガラクトース、マンノース、グルコースを含む酸性多糖と、アラニン、グルタミン酸、ジアミノピメリン酸、グリシン、ムラミン酸、グルコサミンを含むペプチドグリカンおよび5%のイソ脂肪酸 (主としてイソペンタデカン酸) であるとされている<sup>77)</sup>。細胞壁ペプチドグリカンの種々の生物学的活性は、グラム陰性菌の LPS の活性に類似しており、抗腫瘍活性も見いだされている。

T細胞関連膜抗原を用いた免疫学的検索<sup>78)79)</sup>では、対照群は、健康マウスと比較して L3T4 陽性T細胞、Lyt2 陽性T細胞の低下が認められ、標品投与群では、投与開始と共に L3T4 陽性T細胞、Lyt2 陽性T細胞の上昇を認めた。L3T4 陽性T細胞よりは Lyt2 陽性T細胞の上昇が著しいことにより *P. acnes* KT-28 株の抗腫瘍活性はキラーT細胞の活性に関与していると考えられる。L3T4 陽性T細胞に関しては上昇はしているものの有意の差は認めなかった。しかし、ヘルパーT細胞もなんらかの影響を与えているものと思われるが、これに関しては、今後さらに検討を要する。経時的には L3T4 陽性T細胞、Lyt2 陽性T細胞は同様に推移している。今回の実験結果では、投与3日目に共に最高値を示した。その後投与を継続しているにもかかわらず低下を認めている。これに関してはT細胞

胞の疲労現象, および生体のフィード・バック現象が考えられる。また, 投与終了後7日目のLyt2陽性T細胞, L3T4陽性T細胞値が低下し対照群と差異がないことは, 標品投与終了後(15日目以降)に腫瘍重量が増加していることと一致しており, 腫瘍重量の抑制および抗腫瘍活性の発現にT細胞が密接に関与<sup>80)</sup>しているものと考えられる。Tuttleら<sup>81)</sup>, Bonfordら<sup>82)</sup>は無胸腺マウスでは嫌気性コリネバクテリウムの抗腫瘍活性が消失することからT細胞を介在する経路であるとされている。

病理組織学的所見においても投与群には, 腫瘍組織間質にリンパ球が多数認められた。この部位をPAP法を用いて検索したところ, キラー, サプレッサー, ヘルパー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。以上の成績からP. acnes KT-28株の抗腫瘍活性は宿主介在性であり, 細胞性免疫が密接に関与していることが示唆された。

口腔内にはStreptococcus, Staphylococcus, Lactobacillus, Corynebacterium, Peptostreptococcus, Peptococcus, Neisseria, Bacteroides, Veillonella, Micrococcus, Propionibacterium, Fusobacterium等多種類の細菌が常在菌として存在している<sup>83)</sup>。近年それらの常在菌の抗腫瘍活性が検討されFusobacterium, Veillonella, Peptococcusは抗腫瘍活性を有することが報告されている<sup>84-20)</sup>。P. acnesは常在菌の1つであるが, 本研究で本菌もまた抗腫瘍活性を有することが明らかとなった。口腔は各種刺激の多い所であることを考えると多くの常在菌が抗腫瘍活性を有することは理にかなっていることと思われる。これら口腔内常在菌の抗腫瘍活性の菌体における局在については, Fusobacterium, Peptococcusでは細胞壁<sup>10)16)21)</sup>, Veillonellaは菌体内内容物である<sup>19)20)</sup>と報告されているが, 本研究で示したようにP. acnesは前者に属することが分かった。

## 結 論

口腔内歯石より分離されたP. acnes KT-28株菌体の抗腫瘍活性をICR系マウスに移植したエールリッヒ腹水癌細胞, サルコーマ180細胞, およびBALB/c系マウスに移植したメスA細胞の固型腫瘍について検討した。さらに本菌体の免疫学的作用を検討し次の結果を得た。

1. P. acnes KT-28株のTF培地48時間培養ホルマリン処理死菌標品は, サルコーマ180細胞, エールリッヒ腹水癌細胞およびメスA細胞の固型腫瘍に対して対照群と比較して腫瘍重量比で19.2-34.0%, T/Cにおいては128.1-137.4%以上を示し, 著しい抗腫

瘍活性を認めた。

2. 1000mlの48時間培養菌液から得られた菌体超音波処理後の沈渣(湿重量, 3.0g)に50, 70, 80, 100, 200mlのPBを加え, 抗腫瘍活性を検討した結果, 50mlのPBを加えた場合を除き腫瘍重量の増加の抑制(腫瘍重量比; 17.8-70.9%)および生存日数の延長(T/C; 133.6-147.7%以上)が認められ, 本沈渣は著しい抗腫瘍活性を示した。この際沈渣を70mlのPBに懸濁した時に強い抗腫瘍活性が認められ, この物質には至適濃度が存在することが示唆された。

3. 菌体超音波処理沈渣を蛋白分解酵素で処理したところ抗腫瘍活性が向上し(腫瘍重量比, 20.7-26.2%; T/C, 127.6-146.2%以上), サルコーマ180細胞, およびエールリッヒ腹水癌細胞に腫瘍の完全治癒を認めるものもみられた。また, ホルマリン処理死菌, 超音波沈渣に存在していた全身衰弱, 熱感などの副作用が軽減した。

4. さらに蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品に対し脱脂質処理を行ったが, 抗腫瘍活性の増強は認められなかった。

5. 蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品をメスA細胞担癌マウスに投与するとLyt2陽性T細胞の有意な上昇が認められた。

6. 病理組織学的に検討した結果, 蛋白分解酵素処理超音波沈渣標品投与群では実質辺縁の間質で, Lyt2陽性T細胞, 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。

7. 以上の成績から, P. acnes KT-28株の抗腫瘍物質の本態はペプチドグリカンであり, その作用は宿主介在性で免疫系が関与しているものと考えられた。

## 謝 辞

稿を終るに臨み, 本研究の御指導を賜りました恩師故玉井健三教授並びに, 大学院医学研究科課程において終始御懇意なる御指導, 御校閲を賜りました恩師山本悦秀教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また, 御助言, 御指導, 御校閲を頂きました本学微生物学講座, 中村信一教授, 本研究遂行にあたり, 御協力を戴いた本学歯科口腔外科学教室諸兄に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨の一部は, 昭和62年第41回日本口腔科学会総会(東京), 昭和63年第61回日本細菌学会総会(岡山), 平成元年第43回日本口腔科学会総会(長崎)において発表した。

## 文 献

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

- 2) Yasumoto, Y., Manabe, H., Yanagawa, E., Nagano, N., Ueda, H., Hirota, N., Ohta, M., Nomoto, K., Azuma, I. & Yamamura, Y.: Nonspecific adjuvant immunotherapy of lung cancer with cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin. *Cancer Res.*, **39**, 3262-3267 (1979).
- 3) 坂本憲市, 森永信一, 林 君枝, 河合幸一郎, 小西健一: 腸内細菌の抗腫瘍活性に関する研究第7報, *Eubacterium lentum* の抗腫瘍スペクトラム. *日細誌*, **41**, 93 (1986).
- 4) 坂本憲市, 森永信一, 小西健一: 腸内細菌の抗腫瘍性に関する研究第12報, *Eubacterium lentum* (TYH-11) の腫瘍転移に及ぼす影響について. *日細誌*, **43**, 123 (1988).
- 5) 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).
- 6) 玉井健三: *Fusobacterium* KO-31 株の培養上および菌体成分の抗腫瘍作用について. - 1 - . 嫌気性菌感染症研究会11回講記録, **11**, 94-104 (1981).
- 7) 玉井健三, 中尾治郎: エールリッヒ腹水癌および肉腫-180型固型癌に対する *Fusobacterium nucleatum* KO-31 株の抗腫瘍作用. 嫌気性菌感染症研究会12回講記録, **12**, 139-145 (1982).
- 8) Tamai, K., Nakao, J., Takematsu, K. & Nakagawa, K.: Studies on the antitumor activity of *Fusobacterium nucleatum* strain KO-31. *Microbiol. Immunol.*, **2**, 163-165 (1982).
- 9) 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.*, **5**, 251-256 (1983).
- 10) Tamai, K., Watanabe, K. & Maeda, T.: Antitumor activity of sediment fractions from *Fusobacterium nucleatum* culture supernatant. *Jpn. J. Exp. Med.*, **4**, 159-170 (1984).
- 11) 中新敏彦, 渡部好造, 玉井健三: *Fusobacterium nucleatum* の抗腫瘍物質の作用機序に関する検討. 嫌気性菌感染症研, **13**, 55-60 (1983).
- 12) 渡部好造, 西脇幸博, 川辺清光, 中新敏彦, 玉井健三: *Fusobacterium nucleatum* の培養上清液中の抗腫瘍物質の抽出に関する検討-2-. 嫌気性菌感染症研, **13**, 47-55 (1983).
- 13) 渡部好造: *Fusobacterium nucleatum* の抗腫瘍性に関する研究. 十全医会誌, **93**, 316-329 (1984).
- 14) 西脇幸博: *Fusobacterium nucleatum* KO-31 の腫瘍細胞障害作用に関する検討. 十全医会誌, **95**, 190-203 (1986).
- 15) 中新敏彦, 玉井健三: *Fusobacterium nucleatum* KO-31 の培養上清から抽出した抗腫瘍物質の作用機序に関する検討. 嫌気性菌感染症研, **16**, 113-138 (1986).
- 16) 藤元栄輔: *Fusobacterium nucleatum* KO-31 の腫瘍壊死因子に関する研究. 十全医会誌, **95**, 191-203 (1986).
- 17) 中川清昌, 玉井健三: 嫌気性菌の抗腫瘍作用に関する研究. 第六報 *Veillonella parvula* TFV-1 株のエールリッヒ腹水癌に対する抗腫瘍作用. *日細菌誌*, **37**, 379 (1982).
- 18) 中川清昌, 玉井健三: *Veillonella parvula* TFV-1 株のエールリッヒ腹水癌に対する抗腫瘍作用. 嫌気性菌感染症研究会12回講記録, **12**, 122-127 (1982).
- 19) 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).
- 20) 八木茂夫: *Veillonella alcalescens* の抗腫瘍活性に関する実験的研究. 十全医会誌, **96**, 497-509 (1987).
- 21) 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).
- 22) Halpern, B. N., Prevot, A. R., Biozzi, G., Stiffel, C., Mouton, D., Morard, J. C., Bouthillier, Y. & Decreusefond, C.: Stimulation de l'activite phagocytaire du systeme reticuloendothelial provoquee par *Corynebacterium parvum*. *J. Reticuloendothel. Soc.*, **1**, 77-96 (1963).
- 23) Halpern, B. N., Biozzi, G., Stiffel, C. & Mouton, D.: Inhibition of tumor growth by administration of killed *Corynebacterium parvum*. *Nature*, **19**, 853-854 (1966).
- 24) Woodruff, M. F. A. & Boak, J. L.: Inhibitory effect of injection of *Corynebacterium parvum* on the growth of tumor transplants in isogenic hosts. *Br. J. Cancer*, **20**, 345-355 (1966).
- 25) Biozzi, G., Howard, J. G., Mouton, D. & Stiffel, C.: Modification of graft-versus-host reaction induced by pretreatment of the host with *M. tuberculosis* and *C. parvum*. *Transplantation*, **3**, 170-177 (1965).
- 26) 服部孝雄, 八木博司, 村上 浩, 牛島賢一, 森

杉, 合屋忠信, 伊藤一二, 平田克治: 骨髄移植の制癌効果に関する研究. 癌の臨, 15, 39-47 (1969).

27) 服部孝雄, 森 彬, 平田克治, 伊藤一二: 胃癌の術中マイトマイシン大量投与の遠隔成績. 癌の臨, 19, 241-248 (1973).

28) O'Neill, G. J., Henderson, D. C. & White, R. G.: The role of anaerobic *Coryneforms* on specific and non-specific immunological reactions. Immunology, 24, 977-995 (1973).

29) Adlam, C., Broughton, E. S. & Scott, M. T.: Enhanced resistance of mice to infection with bacteria following pretreatment with *Corynebacterium parvum*. Nature, 235, 219-220 (1972).

30) Swartzberg, J. E., Krahenbuhl, J. L. & Remington, J. S.: Dichotomy between macrophage activation and degree of protection against *Listeria monocytogenes* and *Toxoplasma gondii* in mice stimulated with *Corynebacterium parvum*. Infect. Immun., 12, 1037-1043 (1975).

31) Warr, G. W. & Sljivic, V. S.: Enhancement and depression of the antibody response in mice caused by *Corynebacterium parvum*. Clin. Exp. Immunol., 28, 431-442 (1975).

32) Warr, G. W. & James, K.: Effect of *Corynebacterium parvum* on the class and subclass of antibody produced in the response of different strains of mice to sheep erythrocytes. Immunology, 28, 431-443 (1975).

33) Scott, M. T.: Biological effects of the adjuvant *Corynebacterium parvum*. I. Inhibition of PHA, mixed lymphocyte and GVH reactivity. Cell. Immunol., 5, 459-468 (1972).

34) Woodruff, M. F. A. & Dunbar, N.: Effect of local injection of *Corynebacterium parvum* of the growth of a murine fibrosarcoma. Br. J. Cancer, 32, 34-41 (1975).

35) Scott, M. T.: *Corynebacterium parvum* as a therapeutic antitumor agent in mice. I. Systemic effect from intravenous injection. J. Natl. Cancer Inst., 53, 855-860 (1974).

36) Scott, M. T.: *Corynebacterium parvum* as a therapeutic antitumor agent in mice. II. Local injection. J. Natl. Cancer Inst., 53, 861-865 (1974).

37) Fisher, B., Wolmark, N. & Coyle, J.: Effect of *Corynebacterium parvum* on cytotoxicity of regional and nonregional lymph node cells from

animals with tumors present or removed. J. Natl. Cancer Inst., 53, 1793-1801 (1974).

38) Houchens, D. P., Johnson, R. K., Ovejera, A., Gaston, M. R. & Goldin, A.: Effects of *Corynebacterium parvum* alone and in combination with adriamycin in experimental tumor systems. Cancer Treat. Rep., 60, 823-828 (1976).

39) 服部孝雄, 笹尾哲郎, 新本 稔, 大屋正章, 山懸司政, 峠 哲哉, 原田達司: 嫌気性コリネと宿主抵抗性. 医の歩み, 91, 438-445 (1974).

40) 服部孝雄, 新本 稔, 山懸司政, 峠 哲哉, 原田達司, 寺尾 紘: 免疫療法の立場から. 医の歩み, 96, 402-409 (1976).

41) 服部孝雄: 嫌気性コリネの制癌性について. 医の歩み, 98, 693-698 (1976).

42) 原田達司: 嫌気性コリネの抗腫瘍性特に腫瘍内投与に関する実験的研究. 広島大医誌, 27, 849-871 (1979).

43) 山懸司政: 嫌気性コリネと制がん剤の併用に関する実験的研究, 第一編腹水がんにおける併用効果について. 広島大医誌, 24, 1-17 (1976).

44) 山懸司政: 嫌気性コリネと制がん剤の併用に関する実験的研究, 第二編固型がんにおける併用効果について. 広島大医誌, 24, 19-35 (1976).

45) Azuma, I., Sugimura, K., Taniyama, T., Aladin, A. A. & Yamamura, Y.: Chemical and immunological studies on the cell walls of *Propionibacterium acnes* strain C7 and *Corynebacterium parvum* ATCC 11829. Jpn. J. Microbiol., 19, 265-275 (1975).

46) Scott, M. T.: Failure of *Corynebacterium parvum* presensitization to modify the antitumor effects of systemic and local therapeutic injections of *C. parvum* in mice. J. Natl. Cancer Inst., 56, 675-677 (1976).

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

48) Fisher, J. C., Grace, W. R. & Mannick, J. A.: The effect of nonspecific immune stimulation with *Corynebacterium parvum* on patterns of tumor growth. Cancer, 26, 1379-1382 (1970).

49) Christie, G. H. & Bomford, R.: Mechanisms of macrophage activation by *Corynebacterium parvum* I, In vitro experiments. Cell. Immunol., 17, 141-149 (1975).



- 50) Woodruff, M. F. A., McBride, W. H. & Dunbar, N.: Tumor growth, phagocytic activity and antibody response in *Corynebacterium parvum*-treated mice. Clin. Exp. Immunol., **17**, 509-518 (1974).
- 51) 高橋一清, 島山 茂, 田所一郎: 嫌気性コリネバクテリウムの免疫増強作用について. 移植, **8**, 5-8 (1973).
- 52) 谷尾吉郎: *Propionibacterium acnes* C7 細胞壁骨格 (CWS) の抗腫瘍活性. 大阪大医誌, **33**, 33-42 (1978).
- 53) 藤田 浩, 才野祐之: 嫌気性コリネバクテリウムのヒト骨髄よりの分離成績とその制癌作用. 口腔病会誌, **38**, 294-299 (1971).
- 54) 加藤綾子, 中川久義, 秋本英生, 藤田 浩, 田中富子, 木村禧代二: *Corynebacterium liquefaciens* の抗腫瘍性について. 癌と化療, **3**, 677-686 (1976).
- 55) 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).
- 56) H. L. Ko, W. Roszkowski, J. Jeljaszewicz & G. Pulverer: Comparative study on the immunostimulatory potency of different *Propionibacterium* strains. Med. Microbiol. Immunol., **170**, 1-9 (1981).
- 57) 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).
- 58) 越村三郎, 西田信義, 坂東 勲, 正印 達, 南幹雄, 角野光司: 制癌に関する実験的研究, 第26報. *Streptolysin-0* のみの産生能を有する溶連菌の無効性について. 金大結核年報, **23**, 61-66 (1965).
- 59) 玉井健三: 口腔内嫌気性菌感染症. 嫌気性菌感染症研, **15**, 247-254 (1985).
- 60) 玉井健三: 口腔内嫌気性菌感染症. 歯薬療法, **5**, 169-180 (1986).
- 61) 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).
- 62) 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).
- 63) 金井正光, 金沢 泉編: 臨床検査法提要, 第29版, 234-235 頁, 金原出版株式会社, 東京, 1983.
- 64) 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 systems. Cancer Chemother. Rep., **3**, 47-52 (1972).
- 65) 塚越 茂: 制癌剤の有効性と安全性の検討. 制癌剤の開発とその臨床応用 (塚越, 田口, 仁井谷, 芥藤編), 第1版, 25-28 頁, サイエンスフォーラム, 東京, 1978.
- 66) Lefkovits, I. & Pernis, B.: Immunological Methods. Volume II, 2nd., p213-240, Academic Press, New York, 1981.
- 67) 高橋 学: フローサイトメトリーの技術. フローサイトメトリーハンドブック (天神美夫, 高橋 学, 野村和弘編), 第1版, 97-151 頁, サイエンスフォーラム社, 東京, 1984.
- 68) 慶応義塾大学医学部病理学教室編: 病理組織学標本の作り方, 第6版, 1-80 頁, 医学書院, 東京, 1986.
- 69) 慶応義塾大学医学部病理学教室編: 病理組織学標本の作り方, 第6版, 310-320 頁, 医学書院, 東京, 1986.
- 70) Busch, W.: VII Verhandlungen ärztlicher Gesellschaften. Berl. Klin. Wochenschr., **5**, 137-138 (1868).
- 71) Coley, W. B.: Contribution to the knowledge of sarcoma. Ann. Surg., **14**, 199-220 (1891).
- 72) Reinhard, E. H., Good, J. T. & Martin, E.: Chemotherapy of malignant neoplastic diseases. J. Am. Med. Assoc., **142**, 383-390 (1950).
- 73) 塚越 茂: 米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).
- 74) O'Toole, C. M. & Davies, A. J. S.: Pre-emption in immunity. Nature, **230**, 187-189 (1971).
- 75) 小谷尚三, 下野 勉: 生化学実験学講座4. 糖質の化学上 (山科, 山川, 鈴木編), 第1版, 204-206 頁, 東京化学同人, 東京, 1976.
- 76) Romeo, D., Girard, A. & Rothfield, L.: Reconstitution of a functional membrane enzyme system in a monomolecular film I, Formation of a mixed monolayer of lipopolysaccharide and phospholipid. J. Mol. Biol., **53**, 389-475 (1970).
- 77) 東 市郎: 細菌菌体成分の抗腫瘍活性, 癌と化療, **11**, 2691-2699 (1984).
- 78) 垣生園子, 奥村 康: T細胞の分化. 現代免疫学 (山村雄一, 多田富雄編), 第1版, 18-30 頁, 株式会社

医学書院, 東京, 1988.

- 79) 濱丘利之, 小杉 厚: 癌免疫の調整. 現代免疫学 (山村雄一, 多田富雄編), 第1版, 246-263頁, 株式会社医学書院, 東京, 1988.
- 80) 向井晃太, 堀見忠司, 香川茂雄, 二宮基樹, 岡林孝弘, 長江聡一, 金田道広, 武田 功, 下山 均, 丁野真太郎, 徳田直彦, 折田薫三: *Corynebacterium parvum* の菌体成分における抗腫瘍効果の作用機序. 日癌会45回総会記, 119 (1986).
- 81) Tuttle, R. L. & North, R. J.: Mechanisms of antitumor action of *Corynebacterium parvum*.

Replicating short-liver T cells as the mediators of potentiated tumor specific immunity. J. Reticuloendothel. Soc., 20, 209-212 (1976).

- 82) Bomford, R. & Christie, G. H.: Mechanisms of macrophage activation by *Corynebacterium parvum* II in vivo experiments. Cell. Immunol., 17, 150-155 (1975).
- 83) Newman, H. N.: The Microorganisms of Dental Plaque, Dental Plaque the Ecology of the Flora on Human Teeth. 1st ed., p8-21, Charles C Thomas, Illinois, 1980.

**Studies on Antitumor Activity of *Propionibacterium acnes* Strain KT-28, An Isolate from the Oral Cavity** Ryuzo Kato, Department of Oral Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Jusen Med. Soc., 98, 879—896 (1989)

**Key words** anaerobe, antitumor activity, *Propionibacterium acnes*

#### Abstract

Antitumor activity of *Propionibacterium acnes* strain KT-28, an isolate from the oral cavity, was examined by using mice inoculated with Sarcoma 180, Ehrlich carcinoma or Meth A cells. Antitumor activity was evaluated by the ratio of mean tumor weight of the mice injected with each preparation to that of control mice (tumor weight ratio), or ratio of mean survival days of the mice injected with each preparation to that of control mice (T/C). Formalin-killed cells harvested from 48 hr culture in Tamai-Fukuda medium showed stronger antitumor activity compared with those from other cultures. Bacterial cells harvested from 48 hr culture in Tamai-Fukuda medium were disrupted by ultrasonic treatment and then separated into supernatant and sediment (ultrasonic sediment) by centrifugation. Only the sediment showed antitumor activity. When the concentration of the sediment was 3 g/70 ml, the antitumor activity was the strongest; tumor weight ratios were 17.8-28.3% and values of T/C were from 133.0 to more than 147.7%. In order to purify the antitumor substance, the ultrasonic sediment was digested with trypsin and pronase (protease-treated ultrasonic sediment). This preparation showed strong antitumor activity to all tumor cells tested; tumor weight ratios were 20.7-26.2% and values of T/C ranged from 127.6 to more than 146.2%. Furthermore, lipid was removed from the protease-treated ultrasonic sediment by treatment with a mixture of methanol and chloroform (lipid-free ultrasonic sediment). The antitumor activity of lipid-free ultrasonic sediment preparation was nearly the same as that of protease-treated ultrasonic sediment preparation; tumor weight ratios were 20.7-29.7% and values of T/C were 124.7-140.2%. Immunological examination revealed that Lyt2<sup>+</sup>T cells increased significantly but not L3T4<sup>+</sup>T cells, when the protease-treated ultrasonic sediment preparation was injected into mice with the solid type tumor of Meth A cells. Histochemically, it was found that L3T4<sup>+</sup> and Lyt2<sup>+</sup>T cells had invaded the tumor region of the mice injected with the

protease-treated ultrasonic sediment preparation. These findings indicated that *P. acnes* isolated from the oral cavity as well as anaerobic *Corynebacterium* in the skin and bone marrow have antitumor activity, and also that the entity of the antitumor activity may be peptidoglycan of the cell wall. Furthermore, it was suggested that antitumor activity might be related to the immune system.