

Experimental Studies on the Antitumor Activity of *Veillonella alcalescens*

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/7948

Veillonella alcalescens の抗腫瘍活性に関する実験的研究

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座 (主任: 玉井健三教授)

八 木 茂 夫

(昭和62年3月14日受付)

Veillonella alcalescens T-2 株の菌体超音波処理上清液の抗腫瘍活性について検討した。TF 培地で 48 時間培養した菌体を超音波処理し、その遠心上清液を 60% エタノールで溶媒抽出後、等電点沈澱法によって精製した各分画について抗腫瘍活性を ICR 系マウスを用いて検討した。pH 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 に調整し得られた精製物質をエールリッヒ腹水がん細胞に作用させたところ、pH 8.0 分画に T/C (%) を 200.8% 以上の著しい抗腫瘍活性を認めた。さらに、pH 8.0 分画をサルコーマ 180 細胞の腹水型腫瘍に作用させた結果、同様に高い抗腫瘍活性 (T/C (%), 190.2 以上) が得られた。ついで、pH 8.0 分画をサルコーマ 180 細胞とエールリッヒ腹水がん細胞の固型腫瘍に作用させ、その抗腫瘍活性を検討した。このさい、抗腫瘍活性は increase of lifespan (%) および腫瘍重量の増加によって検討した。Increase of lifespan はエールリッヒ腹水がん細胞の固型腫瘍では 71.2% 以上、サルコーマ 180 細胞固型腫瘍では 128% 以上を示し、pH 8.0 分画は腹水型腫瘍に対してと同様固型腫瘍に対しても高い抗腫瘍活性を示した。また、腫瘍重量ではエールリッヒ腹水がん細胞の固型腫瘍、サルコーマ 180 細胞の固型腫瘍とも移植後 10 日目までは対照群と同様に腫瘍重量が増加するが、pH 8.0 分画投与群ではそれ以後腫瘍重量は減少し、15 日目より緩やかに上昇したのに対し、対照群の腫瘍重量は増加の一途をたどり腫瘍死した。以上の結果より、*V. alcalescens* の菌体から調整した pH 8.0 分画に強い抗腫瘍活性を有することがわかった。

Key words *Veillonella alcalescens*, antitumor activity, Ehrlich ascites carcinoma, Sarcoma 180

微生物による抗腫瘍活性、制がん作用についての研究は、従来から数多くみられるが、その大部分は好気性菌による報告であり^{1)~16)}、嫌気性菌による抗腫瘍活性の研究は、一部の *Clostridium*^{17)~25)} および嫌気性 *Corynebacterium parvum*^{26)~29)} および *Corynebacterium anaerobium*^{30)~32)} のみである。数年前より玉井³³⁾³⁴⁾、渡辺³⁵⁾、西脇³⁶⁾らはグラム陰性嫌気性桿菌 *Fusobacterium nucleatum* に抗腫瘍活性のあることを実験がんで証明し報告した。また、グラム陰性嫌気性球菌の *Veillonella alcalescens* T-2 株の菌体超音波処理上清液に強い抗腫瘍活性のあることを中川が報告し³⁷⁾、グラム陽性嫌気性球菌 *Peptococcus magnus* の菌体内容物にも、抗腫瘍活性のあることを坂下が報告³⁸⁾している。このように、最近では嫌気性菌の抗腫瘍活性についての研究が盛んになりつつある。さらに、

嫌気性菌特にグラム陰性菌の菌体超音波処理上清液にはリポ多糖体 (lipopolysaccharide, LPS) が含まれているから、この LPS による抗腫瘍活性の研究も盛んである^{39)~43)}。

今回、*V. alcalescens* T-2 株のもつ抗腫瘍物質を精製する目的で、等電点沈澱法を用い、各段階で得られた精製物質の抗腫瘍活性をエールリッヒ腹水がん細胞およびサルコーマ 180 細胞の担がんマウスについて検討した。

材料および方法

I. 使用菌株

1980 年に口腔内感染症から分離・同定した金沢大学医学部歯科口腔外科学教室保存株である *V. alcalescens* T-2 株を実験に使用した。本菌株は分離後 API

Abbreviations: TF 培地, 玉井・福田の培地; T/C (%), 処置群の平均生存匹数/対照群の平均生存匹数×100.

20A anaerobic system (La Balme les Grottes, Montalieu, France) を用い Cowan⁴⁴⁾ および Bergey's manual⁴⁵⁾ に従って同定した。

II. 等電点沈澱法による抗腫瘍物質の精製法

抗腫瘍物質の産生および精製は以下の方法によった。まず *V. alcalescens* T-2 株を中試験管 (1.5×16.5 cm) に作製した玉井・福田培地 (TF 培地)⁴⁶⁾ (15 ml) で 37°C・48 時間培養後、玉井・福田血液寒天平板培地 (TF 血液寒天平板培地)⁴⁶⁾ に塗抹した。塗抹後、Gas Pak (BBL, Cockeysville, USA) にて 37°C・48 時間嫌気培養後形成されてくるコロニーを TF 培地 (15 ml) に釣菌し、37°C・48 時間培養した。培養後さらに TF 培地 (100 ml) に 5 ml を移植し、37°C・48 時間前培養した。培養後、TF 培地 (1000 ml) に 50 ml 移植し、37°C・48 時間本培養をおこなった。培養後、4,500×g, 20 分間冷却遠心し、得られた沈澱に 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) (PBS) 50 ml を加え、超音波処理器 (Model UR-200p, 20 KHz) (トミー精工, 東京) を用いて 20 分間超音波処理後、10,000×g にて 20 分間冷却遠心した。得られた上清液に 60% アルコール濃度になるようにエチルアルコールを加え、析出した分画を冷却遠心 (10,000×g・120 分) した。得られた沈澱に PBS を加え、充分攪拌した後、1 規定の NaOH および 10 規定の塩酸で段階的に pH を調整後、10,000×g で冷却遠心し、pH 8.0, 6.0, 4.0, 2.0 の各沈澱に PBS 100 ml を加え実験に供した。

III. 実験動物

4 週齢の ICR 系マウス (日本チャールズ・リバー株式会社, 厚木) を購入後、腹水型腫瘍の実験に用いる場合は 1 週間 (体重; 約 20~22 g), 固型腫瘍の実験に用いる場合は 2 週間 (体重; 23~25 g) 教室で飼育したのち実験に供した。

IV. エールリッヒ腹水がん細胞およびサルコーマ 180 細胞の調整

教室で継代培養しているエールリッヒ腹水がん細胞およびサルコーマ 180 細胞を用いた。7 日目ごとに 4 週齢の ICR 系マウス (体重; 18~20 g) の腹腔内で継代培養したエールリッヒ腹水がん細胞およびサルコーマ 180 細胞を無菌的に採取した。採取後、Thoma の血球計算板を用い、白血球算定基準にしたがって細胞数を算定し、適量の生理食塩水を加え、約 1.0×10^7 cells/ml の細胞浮遊液を作成し各実験に供した。固型腫瘍の実験には、がん細胞数を約 2.0×10^7 cells/ml に調整し実験に供した。

V. 担がんマウスの調整

腹水型腫瘍の実験には、5 週齢 (体重; 20~22 g) の ICR 系マウスの腹腔内に、至適細胞数に調整したエー

ルリッヒ腹水がん細胞またはサルコーマ 180 細胞の浮遊液 0.5 ml を移植し、48 時間後、調整したそれぞれの精製物質の懸濁液 0.5 ml を腹腔内に 1 日 1 回、2 週間連日投与した。

固型腫瘍の実験には、6 週齢 (体重; 23~25 g) の ICR 系マウスを使用した。実験に際しマウスの背部を電動式バリカン (アニマル クリッパー, モデル 900) (大東電気 K・K, 東京) で剃毛し、ヒビテンアルコールで消毒後、マウスの皮下に適量の細胞数に調整したエールリッヒ腹水がん細胞またはサルコーマ 180 細胞の浮遊液 0.2 ml を移植した。48 時間経過後マウスの前肢上腕二頭筋に、調整したそれぞれの精製物質の懸濁液 0.5 ml を 1 日 1 回、2 週間連日投与した。

VI. 抗腫瘍活性の判定

腹水型腫瘍の実験には、30 日間のマウスの生存匹数を観察し、実験がん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活性を判定することとし、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、下記に示す $T/C \times 100$ の計算式によって T/C (%) を求め、130% 以上の値を示す時抗腫瘍活性を有すると判定した⁴⁷⁾⁴⁸⁾。

$$T/C (\%) =$$

$$\frac{\text{Survival days of treatment group}}{\text{Survival days of control group}} \times 100$$

固型腫瘍の場合は、60 日間のマウスの生存日数を観察し、一群の中間値の生存日数の比を現わす increase of lifespan (%) によって抗腫瘍活性を判定した⁴⁹⁾。また、背部に形成した固型腫瘍の長径 (mm) と短径 (mm) 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、抗腫瘍活性を判定した。すなわち、つぎの計算式によって腫瘍重量を算定した⁴⁹⁾。

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

VII. 蛋白質の定量測定

抽出・精製物質の蛋白質の定量は Lowry 法⁵⁰⁾ に従って測定した。

成 績

I. エールリッヒ腹水がん細胞の腹水型腫瘍に対する *V. alcalescens* T-2 株の抽出・精製物質の抗腫瘍活性

ICR 系マウスに 5.0×10^6 個のエールリッヒ腹水がん細胞を腹腔内に移植し実験に供した。まず *V. alcalescens* T-2 株の菌体を超音波処理し、その上清液と沈澱について抗腫瘍活性を検討した。

本実験には、一群10匹のマウスを使用した。

表1に示すごとく、両者共に抗腫瘍活性を示し、特に超音波処理上清液に、T/C (%)で183.0%の高い活性値が認められた。

つづいて、*V. alcalescens* T-2株の菌体超音波処理上清液を等電点沈澱法にて精製した各沈澱について、その抗腫瘍活性をエールリッヒ腹水がん細胞を移植した担がんマウスを用い検討した。

本実験には一群10匹のマウスを使用した。

滅菌生理食塩水を投与した対照群のマウスは11日目より腫瘍死し、15日目までに全てのマウスは腫瘍死した。平均生存日数は13.0±1.0日であった(表2)。これに対して、pH 8.0分画を投与した処置群のマウスは、20日目より腫瘍死し20日目に2匹、22日目に2匹、27日目に1匹腫瘍死したのみで平均生存日数は、26.1日以上と高い値を示した。しかも、30日間の生存日数の判定では10匹中5匹が生存し、生存したマウスは、完全治癒した。ついで、pH 4.0分画投与群は対照群のマウス同様10日目より腫瘍死したが、20日目ま

で生存し、対照群のそれより延命した。平均生存日数は14.7±4.1日であった。pH 6.0分画およびpH 2.0分画投与群の平均生存日数は各々11.2±1.5、10.6±2.9日であり対照群よりも低値を示した。また、T/C (%)では、pH 8.0分画は200.8%以上と極めて高い抗腫瘍活性を示す値であった。また、pH 6.0、4.0、2.0のT/C (%)は、各々86.2、113.1、81.5%と低値を示し、抗腫瘍活性はいずれの分画でも認められなかった。

II. サルコーマ180細胞の腹水型腫瘍に対する *V. alcalescens* T-2株の抽出・精製物質の抗腫瘍活性

エールリッヒ腹水がん細胞の腹水型腫瘍に対して抗腫瘍活性が高かったpH 8.0分画についてサルコーマ180細胞の腹水型腫瘍に対しても抗腫瘍活性を検討した。

本実験には、1群20匹マウスを使用した。

対照群のマウスは10日目より腫瘍死し、15日目まで全てのマウスが腫瘍死した。平均生存日数は12.2±1.7日であった(表3)。これに対し、処置群では対照

Table 1. Antitumor activity of the supernatant and sediment of *V. alcalescens* strain T-2 cells treated with ultrasonic disruption to ascites type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice

Injection ^{a)}	Number of mice used	Mean survival days ^{b)}	T/C (%)
Supernatant of cells treated with ultrasonic disruption	10	20.5±5.7	183.0
Sediment of cells treated with ultrasonic disruption	10	16.8±5.6	150.0
Saline control	10	11.2±1.3	

a) A half ml of each preparation was injected daily intraperitoneally into tumor-bearing mice for 14 days; the first injection was made at 48 hr after intraperitoneal inoculation of 5.0×10^6 cells/ml.

b) Mice were observed for 30 days after the intraperitoneal inoculation of tumor cells. Mean±SD.

Table 2. Antitumor activity of the sediment fraction^{a)} of *V. alcalescens* strain T-2 cells to ascites type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice

Sediment fraction	Number of mice used	Mean survival days ^{b)}	Number of survivors	T/C (%)
pH 8.0	10	26.1<	5	200.8<
pH 6.0	10	11.2±1.5	0	86.2
pH 4.0	10	14.7±4.1	0	113.1
pH 2.0	10	10.6±2.9	0	81.5
Saline control	10	13.0±1.0	0	

a) The sediment fraction was obtained by isoelectric precipitation of the supernatant of cells treated with ultrasonic disruption.

b) Refer to the footnotes of Table 1.

群のマウスが全て腫瘍死した翌日(16日目)から腫瘍死を認め、20日目までに20匹中8匹が腫瘍死した。さらに、28日目までに11匹が腫瘍死したが、30日目以後では1匹が生存し、この生存マウスは完全治癒を示した。平均生存日数は23.2日以上であった。T/C(%)は、190.2%を示し、pH 8.0分画はエールリッヒ腹水がん細胞の腹水型腫瘍に対してと同様サルコーマ180細胞の腹水型腫瘍に対しても高い抗腫瘍活性のあることが判明した。

III. *V. alcalescens* T-2株から抽出・精製した物質の蛋白量の測定

エールリッヒ腹水がん細胞およびサルコーマ180細胞の腹水型腫瘍に対して、pH 8.0分画が著しい抗腫瘍活性を示したので、等電点沈澱法で精製した各分画の蛋白量をLowry法で測定した。

最も蛋白量の多かった分画はpH 4.0の3.2 mg/mlで、ついでpH 8.0分画の2.5 mg/mlであった。また、pH 2.0分画は1.1 mg/ml、pH 6.0分画は0.8 mg/mlの蛋白量であった。

IV. エールリッヒ腹水がん細胞の固型腫瘍に対する *V. alcalescens* T-2株の抽出・精製物質の抗腫瘍活性

エールリッヒ腹水がん細胞およびサルコーマ180細胞の腹水型腫瘍に対して抗腫瘍活性が高かったpH 8.0分画を、さらにエールリッヒ腹水がん細胞の固型腫瘍について検討した。

対照群は34日目まで全て腫瘍死し、median survival

dayは33.0日であった(表4)。処置群では60日を経過していてもなお、5匹が生存しており、処置群の中間値の生存日数の比 increase of lifespan (%)は71.2%を示し、pH 8.0分画には高い抗腫瘍活性がみられた。しかも4匹の生存マウスの1匹は背部に形成された腫瘍が25日でほぼ消失し完全治癒がみられた。

V. サルコーマ180細胞の固型腫瘍に対する *V. alcalescens* T-2株の抽出・精製物質の抗腫瘍活性

サルコーマ180細胞の固型腫瘍の担がんマウスに対してpH 8.0分画を投与し、抗腫瘍活性を検討した。

対照群では19日目から腫瘍死し、33日目まで全てのマウスは腫瘍死した。処置群では60日経過してもなお4匹が生存しており、increase of lifespan (%)は128%以上とエールリッヒ腹水がん細胞の固型腫瘍よりもさらに長いマウスの生存日数を示した(表5)。

VI. 腫瘍重量により *V. alcalescens* T-2株の抽出・精製物質の抗腫瘍活性

以上の結果よりpH 8.0分画には、エールリッヒ腹水がん細胞の固型腫瘍およびサルコーマ180細胞の固型腫瘍に対して抗腫瘍活性が認められたため、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。なお、本実験には一群10匹のマウスを使用した。

表6に示すごとく、エールリッヒ腹水がん細胞の固型腫瘍の担がんマウスにpH 8.0分画を投与した処置群は、10日目までは対照群と同様の腫瘍重量の増加を示した。10日目より15日目の5日間に、処置群のマウ

Table 3. Antitumor activity of the pH 8.0 fraction^{a)} to ascites type tumor of Sarcoma 180 cells in mice

Treatment	Number of mice used	Mean survival days ^{b)}	Number of survivors	T/C (%)
pH 8.0	20	23.2<	1	190.2<
Saline control	20	12.2±1.7	0	

a) The pH 8.0 fraction was obtained by isoelectric precipitation at pH 8.0 of the supernatant of *V. alcalescens* T-2 cells treated with ultrasonic disruption.

b) Refer to the footnotes of Table 1.

Table 4. Antitumor activity of the pH 8.0 fraction on solid type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice

Treatment	Number of mice used	Mean survival days ^{a)}	Number of survivors	Increase of lifespan (%)
pH 8.0	10	56.5<	4	71.2<
Saline control	10	33.0	0	

a) Mice were observed for 60 days after the subcutaneous inoculation of Ascites carcinoma cells.

スは全体に腫瘍重量は低下し、15日目の腫瘍重量は 1.8 ± 1.3 gであった。対照群のマウスは上述の5日間で約倍量の腫瘍重量を示し(15日目の腫瘍重量： 4.9 ± 1.1 g)、抗腫瘍活性が認められる成績であった。それ以後は処置群のマウスの腫瘍重量は緩やかな増加を示し、20日目で15日目の約1.4倍、30日目で20日目の約1.3倍を示し正常マウスの生育率とほぼ一致した成績であった。しかし、対照群のマウスでは5日目ごとに約倍量の腫瘍重量の増加が認められ、処置群とは大差のある結果が得られた。なお、腫瘍重量比で処置群では腫瘍重量比が28.9%であり、エールリッヒ腹水がん細胞の固型腫瘍がんに対しても明らかな腫瘍の抑制率が得られた。

一方、表7に示ごとく、サルコーマ180細胞の固型腫瘍では、エールリッヒ腹水がん細胞の固型腫瘍と同様、10日目までは両者共腫瘍重量はほぼ同様の値

(平均重量；約3 g)を示した。しかし、pH 8.0分画投与群のマウスの15日目の腫瘍重量は 0.4 ± 0.4 gにすぎず、10日目より15日目までの5日間に著しい腫瘍の縮小を認めた。また、対照群のマウスの15日目の腫瘍重量(12.3 ± 2.6 g)は10日目の約4倍の値を示し、サルコーマ180細胞の固型腫瘍に対してもpH 8.0分画は著明な抗腫瘍活性を示した。15日目以後においては、処置群のマウスの腫瘍重量は緩やかな増加を示し、20日目では15日目の値よりやや増加し、 1.2 ± 0.4 gであった。しかし、対照群では20日目の腫瘍重量は、15日目の約2.5倍に増加し、 28.5 ± 9.2 gであった。また、処置群の30日目の腫瘍重量は10日目の値と比べて約1.4倍の 4.3 ± 8.5 gに対し、対照群は10日目の約12.3倍であり、 34.3 ± 13.0 gを示した。なお、腫瘍重量比で処置群は12.5%の値が得られ、サルコーマ180細胞の固型腫瘍に対し、著明な腫瘍の抑制率で

Table 5. Antitumor activity of the pH 8.0 fraction to solid type tumor of Sarcoma 180 cells in mice

Treatment	Number of mice used	Mean survival days ^{a)}	Number of survivors	Increase of lifespan (%)
pH 8.0	10	57.0<	4	128.0<
Saline control	10	25.0	0	

a) Mice were observed for 60 days after the subcutaneous inoculation of Sarcoma 180 cells.

Table 6. Antitumor activity of the pH 8.0 fraction to tumor weight of solid type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice

Treatment	Number of mice used	Tumor weight (mean±SD g)				Tumor weight ratio(%)
		Days after subcutaneous inoculation of Ehrlich carcinoma cells				
		10	15	20	30	
pH 8.0 fraction	10	2.3 ± 1.1	1.8 ± 1.3	2.5 ± 1.3	3.3 ± 3.0	28.9
Saline control	10	2.3 ± 0.5	4.9 ± 1.1	6.5 ± 4.3	11.4 ± 13.8	100.0

Table 7. Antitumor activity of the pH 8.0 fraction to tumor weight of solid type tumor of Sarcoma 180 cells in mice

Treatment	Number of mice used	Tumor weight (mean±SD g)				Tumor weight ratio(%)
		Days after subcutaneous inoculation of sarcoma 180 cells				
		10	15	20	30	
pH 8.0 fraction	7	3.1 ± 0.6	0.4 ± 0.4	1.2 ± 0.4	4.3 ± 8.5	12.5
Saline control	7	2.8 ± 0.3	12.3 ± 2.6	28.5 ± 9.2	34.3 ± 13.0	100.0

あった。

考 察

細菌およびその精製物による抗腫瘍活性，制がん作用についての研究は，今日まで数多く報告されてきた。古くは1868年 Bush によって，丹毒に罹患した肉腫患者に腫瘍の増殖の一時停止あるいは，縮小が見られたとする報告⁵¹⁾に始まる。その後，1893年 Coley は，溶連菌と霊菌の混合死菌ワクチンである，いわゆる Coley's toxin を考案し肉腫患者8名に応用後，腫瘍の縮小の経過を克明に記録し報告⁵²⁾した。その後，Coley's toxin による有効例も多数報告されたが，無効例の方も多く報告された。しかし，このことは，免疫療法の基礎になったと今日いわれている^{53)~55)}。また，その後，Reinhard ら⁵⁶⁾は急性感染症にかかった75%の白血病患者に自然軽快をみたすと述べている。さらに，Mathé ら⁵⁷⁾および，Morton ら⁵⁸⁾の BCG の抗腫瘍活性の報告など，細菌の抗腫瘍療法や，その有効性は約1世紀前より散見される。つまり，大腸菌^{59)~62)}，*Proteus*^{63)~65)}，*Neisseria*²⁾，緑膿菌³⁾⁶⁶⁾⁶⁷⁾，*Achromobacter stenohalis*¹²⁾，*Flavobacterium aquatile*¹³⁾，*Streptococcus*^{7)68)~70)}，*Staphylococcus*⁸⁾，*Clorsridium*¹⁷⁾²¹⁾²²⁾，*Corynebacterium*²⁶⁾²⁷⁾，結核菌⁹⁾，*Bacillus*¹⁰⁾⁷¹⁾などの細菌による抗腫瘍性の報告もあるが³⁾いずれも好気性菌が殆んどである。

嫌気性菌の抗腫瘍作用に関する研究は Parker ら¹⁷⁾，Halpern ら²⁷⁾，Bomford ら⁷²⁾，Scott ら²⁹⁾⁷³⁾，Tuttle ら⁷⁴⁾，Woodruff ら²⁶⁾⁷⁵⁾，Möse ら²¹⁾，Gericke ら²²⁾，Thiele ら²³⁾の報告が見られ，最近では Ribi ら⁷⁶⁾の細菌の内毒素を用いた研究がある。我が国では，嫌気性菌の抗腫瘍性に関する報告は服部⁷⁷⁾，森³²⁾，原田⁷⁸⁾などの *Corynebacterium*，Matsunaga ら⁷⁹⁾の Clostridia の制がん研究以外は殆ど皆無である。著者の教室では，1981年玉井らによって口腔内常在菌である *F. nucleatum* に抗腫瘍活性のあることを報告²³⁾³⁴⁾⁸⁰⁾して以来，Tamai ら³³⁾³⁴⁾⁸⁰⁾，渡辺³⁵⁾，西脇³⁶⁾，中新⁸¹⁾は *F. nucleatum* KO-31 株の抗腫瘍活性を，*in vivo*，*in vitro* 実験で証明している。また最近，口腔内常在菌で各種感染症から嫌気性菌が分離・同定されているが，その中でも *Fusobacterium* と共に多数分離される嫌気性グラム陰性球菌の *Veillonella* にも抗腫瘍活性のあることを中川³⁷⁾が報告している。*Veillonella* は人および他の動物の口腔内，消化器，呼吸器などに常在する嫌気性菌である。口腔内より分離される菌種は *V. alcalescens* と *V. parvula* であるが，口腔内の炎症性疾患，特に，歯肉腫瘍，顎嚢胞，上顎洞炎などから比較的高率に分離され，これらの疾患の

主因菌とも考えられている⁴⁷⁾⁸²⁾。また，最近注目されている嫌気性菌感染症の原因菌として検出された報告が見られるが⁸³⁾，他の嫌気性菌よりも病原性については弱いとされている⁸⁴⁾。

中川の報告³⁷⁾によりグラム陰性嫌気性球菌 *Veillonella* sp. に抗腫瘍活性のあることが明らかになった。すなわち，*V. alcalescens* T-2 株に抗腫瘍活性が認められたことより，今回，上清中に存在する抗腫瘍物質の本体を究明するため，本実験では *V. alcalescens* T-2 株の菌体超音波処理上清液から抗腫瘍物質を溶媒抽出し，等電点沈澱法を用いて精製した抗腫瘍物質を *in vivo* 実験で検討した。

従来より，グラム陰性菌に認められる抗腫瘍活性は LPS とされており⁸⁵⁾，その分離・抽出法にはフェノール・水抽出法^{86)~91)}，トリクロロ酢酸法 (Boivin 法^{92)~95)}，EDTA 抽出^{96)~98)}，有機溶媒による抽出法⁹⁹⁾など広く使用されている。*V. alcalescens* T-2 株の抗腫瘍活性は菌体超音波処理後の抽出液に抗腫瘍活性が見られることより，超音波処理によって細片化された菌体細胞膜または，内毒素に有効成分が存在し，それと有機溶媒による抽出法すなわち本実験ではエタノールによる有機溶媒により抽出をおこなった物質に抗腫瘍活性のあることが証明された。さらに，抽出物質を等電点沈澱法によって精製した¹⁰⁰⁾¹⁰¹⁾物質，特に pH 8.0 分画に極めて強い抗腫瘍活性のあることが動物実験腫瘍で確認できた。等電点沈澱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澱させる方法であるが，Snipe ら¹⁰²⁾は *Cl. botulinum* の培養液に塩酸を加え，pH を 3.0~4.0 に調整し A 型の毒素を抽出した。また，Lamanna ら¹⁰³⁾は段階的な pH の変化で B 型の毒素を抽出し，さらに Cardella ら¹⁰⁴⁾¹⁰⁵⁾は C 型，D 型毒素の抽出にも本法を応用している。これらの報告はいずれもグラム陽性菌である *Cl. botulinum* についてであったが，本菌に対しても精製法の1つとして応用できると考え等電点沈澱法を用いて精製した。本実験では1規定の NaOH と10規定の塩酸を用い，段階的に pH 2.0，4.0，6.0，8.0 に調整した。本法は一般には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おり，その理由としては塩類の増加によって蛋白質の等電点が酸性にずれるためである¹⁰⁶⁾。渡辺³⁵⁾の *F. nucleatum* KO-31 の抗腫瘍活性物質の精製時や，坂下³⁸⁾の *P. magnus* の抗腫瘍活性物質の精製時でも，pH 4.0 において最も高い値を得たが，本実験では pH 8.0 分画に高い抗腫瘍活性が認められた。

Lowry 法⁹⁰⁾における蛋白質量の測定では，2.5 mg/ml

と pH 4.0 の蛋白量について多かったが、蛋白量と抗腫瘍活性の関連性では有意とはならず、pH 4.0 分画の蛋白量は細菌の抗腫瘍活性に直接結びつかない蛋白などが多く沈澱したと考えられた。Lowry 法において pH 4.0 に次いで沈澱量の多かった pH 8.0 については 2.5 mg/ml の蛋白含有量であったが、抗腫瘍活性が最も高かった。このことは、60%アルコール分画により沈澱物質には蛋白質、糖蛋白、多糖類など他種類の物質が含有されている。その中には、培地が複合培地であるため、培地中の蛋白質も混じったと考えられ pH 8.0 の沈澱分画において最も抗腫瘍性が高かったことの説明の一部となる。また pH 8.0 に抗腫瘍活性が高かった事実についての説明としてグラム陰性菌の外膜に局在するリポ多糖類はきわめてユニークな化学構造と多様な生物活性を有する高分子として知られている。また、LPS については現在は、グラム陰性菌の LPS について研究が展開されている。これ等の研究は、LPS の一般構造の類似性を示唆している反面微細構造の多様性も示しており、その構造と生物活性はかならずしも一様でないことが浮彫にされつつある。LPS 分子は基本的には陰性荷電を有する両親媒性高分子であるため、pH 8.0 弱アルカリにおいても充分存在することは推察される。以前に中川が *V. alcalescens* T-2 株の菌体超音波処理上清液のアルコール分画について、エールリッヒ腹水がんの固型と腹水型、サルコーマ 180 細胞の腹水型と固型の同様な実験をしているが、今回は、さらに高い抗腫瘍活性を示したことは、精製に、換言すれば純化に一步近かざったことを示唆するものである。

Veillonella の内毒素については多くの論文¹⁰⁷⁾⁻¹¹²⁾がみられ、これらを総合すると内毒素が抗腫瘍物質であると推察される。そして、その内毒素の 60%は脂質であるともいわれている¹¹¹⁾¹¹²⁾。しかし、本実験のようにエタノール分画後の抽出物質にも高い抗腫瘍活性を得られたことや、また、中川らの用量-反応関係が見られなかったことより、Coley, Shwartzman, Campbell, Donnelly らが主張している宿主を介しての間接的な免疫学的反応が主体をなしていることも否定できない。

一方、本抽出物質が、エールリッヒ腹水がんおよびサルコーマ 180 細胞の腹水型にも固型がん同様に、高い抗腫瘍効果が見られたことより、エールリッヒ腹水がん、サルコーマ 180 細胞に対しての直接細胞障害作用も推察される。

しかし、*in vitro* の実験では越浦ら¹¹³⁾が、細胞障害反応では *Veillonella sp.* の 6 株は陰性であったと報告しているし、天野ら¹¹⁴⁾は *Veillonella sp.* の 15 株中、

3 株にごく弱い細胞障害活性を認めるにとどまったと報告している。著者も、本実験に入る前の基礎実験として *V. alcalescens* T-2 株の腫瘍細胞への直接作用を西脇³⁶⁾と同様実験を行ったが、直接作用を積極的に示す結果は得られなかった。

以上の事より、*V. alcalescens* T-2 株の超音波処理菌体上清液の pH 8.0 抽出物が抗腫瘍効果を示したことは、勿論、*V. alcalescens* T-2 株の内毒素であることは余論を挟むまでもないが、その作用機序については、TNF や、インターフェロン産生能、マクロファージ活性化など複雑に働いているものと考えられる。pH 8.0 という弱アルカリ性で然も Lowry 法によると pH 4.0 より少ない pH 8.0 の蛋白沈澱抽出物に高い抗腫瘍活性が存在したことは蛋白複合体の LPS の存在が抗腫瘍活性に大きく関係していると思われるが、その作用機序は勿論単独でなく、複雑に働いていると考えられる。

本実験は *V. alcalescens* T-2 株の抗腫瘍物質の精製に一步前進したが、その本体と作用機序の解明は今後の課題である。

結 論

口腔内より分離・同定した嫌気性球菌 *V. alcalescens* T-2 株の菌体超音波処理上清液中に抗腫瘍物質が含まれていることが確認された。さらに、これを等電点沈澱法を用い精製し、マウスを使用した *in vivo* の実験によりその抽出・精製物質の抗腫瘍活性を検討し次の結果を得た。

1. *V. alcalescens* T-2 株の菌体超音波処理上清液を 60%エタノール処理後等電点沈澱法により、pH を 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 に調整し各分画をエールリッヒ腹水がん細胞の腹水型腫瘍に作用させたと、pH 8.0 で T/C (%) 200.8 以上と著しい抗腫瘍活性が得られた。

2. その pH 8.0 の抽出・精製物質をサルコーマ 180 細胞の腹水型腫瘍に作用させたと、T/C (%) 190.2 以上と高い抗腫瘍活性を示した。

3. Lowry 法で蛋白量を測定したところ、著しい抗腫瘍活性を示した pH 8.0 の蛋白量は pH 4.0 の 3.2 mg/ml のそれより低い 2.5 mg/ml であった。

4. さらに pH 8.0 の抽出・精製物質をエールリッヒ腹水がん細胞の固型腫瘍に作用させたと、increase of lifespan が 71.2%以上と高い抗腫瘍活性が見られるとともに、その一匹は完全治癒を示した。

5. また pH 8.0 の抽出・精製物質をサルコーマ 180 細胞の固型腫瘍に作用させたと、increase of lifespan が 128%以上とエールリッヒ腹水がん細胞の

固型腫瘍よりさらに高い抗腫瘍活性がみられた。

6. 一方, pH 8.0 の抽出・精製物質を作用させたエールリッヒ腹水がん細胞の固型腫瘍とサルコーマ 180 細胞の固型腫瘍の腫瘍重量を計測したところ, 対照群に対し両者共大差のある成績を示し, 腫瘍抑制効果のあることが証明された。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導, 御校閲を賜った恩師玉井健三教授に深甚なる謝意を表します。また, 本実験に対し御協力を賜った当教室の諸先生方に心から感謝致します。なお, 本論文の要旨は, 第 27 回日本口腔科学会中部地方会 (1984 年, 名古屋) において発表した。

文 献

- 1) Gratia, A. & Linz, R.: Le phénomène de shwartzman dans le sarcome du codaye. *Comp. Rend. Soc. Biol.*, **108**, 427-428 (1931).
- 2) Gardner, R. E., Bailey, H. & Hyde, R. R.: Hemorrhagic activity of toxic carbohydrate complexes from bacteria on a transplantable rat tumor. *Am. J. Hyg.*, **2913**, 1-14 (1939).
- 3) Jacobs, F. A.: Damage produced by a *Pseudomonas aeruginosa* fraction in Sarcoma 37. *Cancer Res.*, **10**, 227 (1950).
- 4) Ikawa, M., Koepfli, J. B., Mudd, S. G. & Niemann, C.: An agent from *E. coli* causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor: I. Isolation and Properties. *J. Nat. Cancer Inst.*, **13**, 157-166 (1952).
- 5) Mihich, E. & Neter, E.: Necrotizing effects of *Staphylococcus aureus* extract on mouse Sarcoma 180. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, **106**, 97-101 (1961).
- 6) Murata, T., Arakawa, M., Sugiya, Y., Inazu, Y., Hattori, Z., Suzuki, Y., Minakami, H., Nakahara, M. & Okazaki, H.: Oncolytic effect of *Proteus mirabilis* upon tumor bearing animal. *Life Sciences*, **4**, 1055-1067 (1965).
- 7) Okamoto, H., Shoin, S., Minami, M., Koshimura, S. & Shimizu, R.: A development in the study of anticancer activity of hemolytic Streptococci, 9th Int. Cancer Congress-1966, **333** (1966).
- 8) Hata, T., Hoshino, M. & Umezawa, I.: Antitumor effect of bacterial extracts derived from cancer patients. 9th Int. Cancer Congress-1966, **338** (1966).
- 9) Lemonde, P. & Clode-Hyde, M.: Influence of bacille calmette-guerin infection on polyoma in hamsters and mice. *Cancer Res.*, **26**, 585-589 (1966).
- 10) 波田野基一, 清水隆作, 森田修行, 山岸高由: 細菌による細胞障害反応 (CIR) の特異性一癌・細胞非癌細胞の CIR 反応の差 1. *医学と生物学*, **74**, 293-302 (1967).
- 11) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R.: Studies on the anticancer and Streptolysin S-forming abilities of hemolytic Streptococci. *Japan. J. Microbiol.*, **11**, 323-336 (1967).
- 12) 張 国利, 細川治治: *Achromobacter stenohalis* の抗腫瘍性に関する研究 (1). 第 27 回日本癌学会総会記事. **263** (1968).
- 13) 蝶良英郎, 杉岡秀信, 平尾文男, 山村雄一: Flavobacterium 属の産生する細胞溶解性物質の腫瘍細胞に対する影響. 第 28 回日本癌学会総会記事, **228** (1969).
- 14) 泰 藤樹: 微生物領域からみた制癌. 医のあゆみ, **75**, 695-700 (1969).
- 15) Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B.: An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 3666-3670 (1975).
- 16) 東 市郎, 谷尾吉郎, 山村雄一: 癌と BRM (漆崎一朗, 塚越 茂編), 第 1 版, 124-144 頁, サイエンスフォーラム, 東京, 1982.
- 17) Parker, R. C., Plummer, H. C., Siebenmann, C. O. & Chapmon, M. G.: Effect of histolytic infection and toxin on transplantable mouse tumors. *Proc. Soc. Exp. Biol., Med.*, **66**, 461-467 (1947).
- 18) Möse, J. R.: Zur Beeinflussung verschiedener Tiertumoren durch einen apathogenen Clostridien stamm. *Z. Krebsforsch.*, **63**, 447-455 (1959).
- 19) Möse, J. R. & Möse, G.: Onkolyseversuche mit apathogenen, anaeroben Sporenbildern am Ehrlich-Tumor der Maus. *Z. Krebsforschung*, **63**, 63-74 (1959).
- 20) Kayser, D.: Über den Mechanismus der Abtötung von Ascites-Krebszellen durch *Clostridium butyricum*. *Zeitscht. Naturforschung*, **18**, 748-752 (1963).
- 21) Möse, J. R. & Möse, G.: Oncolysis by Clostridia. I. Activity of *Clostridium butyricum* (M-55) and other nonpathogenic Clostridia against the

- Ehrlich carcinoma. *Cancer Res.*, **24**, 212-216 (1964).
- 22) Gericke, D. & Engelbart, K.: Oncolysis by *Clostridia*. II. Experiments on a tumor spectrum with a variety of *Clostridia* in combination with heavy metal. *Cancer Res.*, **24**, 217-221 (1964).
- 23) Thiele, E. H., Arison, R. N. & Boxer, G. E.: Oncolysis by *Clostridia*. III. Effects of *Clostridia* and chemotherapeutic agents on rodent tumors. *Cancer Res.*, **24**, 222-233 (1964).
- 24) Thiele, E. H., Arison, R.N. & Boxer, G. E.: Oncolysis by clostridia. IV. Effect of nonpathogenic clostridia spores in normal and pathological tissues. *Cancer Res.*, **24**, 234-238 (1964).
- 25) Engelbart, K. & Gericke, D.: Oncolysis by clostridia. V. Transplanted tumors of the hamster. *Cancer Res.*, **24**, 239-243 (1964).
- 26) Woodruff, M. F. & Boak, J. L.: Inhibitory effect of injection of *Corynebacterium parvum* on the growth of tumor transplants in isogenic hosts. *Brit. J. Cancer*, **20**, 345-355 (1966).
- 27) Halpern, B. N., Biozzi, G., Stiffel, C. & Mouton, D.: Inhibition of tumor growth by administration of killed *Corynebacterium parvum*. *Nature*, **212**, 853-854 (1966).
- 28) Fisher, B., Wolmark, N. & Coley, J.: Effect of *Corynebacterium parvum* on cytotoxicity of regional and nonregional lymph node cells from animals with tumors present on removed. *Natl. Cancer Inst.*, **53**, 1793-1801 (1974).
- 29) Scott, M. T.: *Corynebacterium parvum* as a therapeutic antitumor agent in mice, II. Local injection. *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**, 861-865 (1974).
- 30) Halpern, M. B.: Immunologie-Stude de L' action dime immunostimuline associ'ee aus *Corynebacteries anaerobies* dam les neoplasies experimentales et humaines. *C. R. Acad. Soc. Paris*, **273**, 2186-2190 (1971).
- 31) 加藤英夫, 滝沢芳子, 花沢重正, 加藤 新, 小出和子, 山浦煌一, 山口康夫: スードマウスによる *Corynebacterium anaerobium* の抗腫瘍機序に関する研究. *日細誌*, **32**, 813-820 (1977).
- 32) 森 彬: ヒト骨髓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).
- 33) 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).
- 34) Tamai, K., Nakao, J., Nakagawa, K., Watanabe, K., Sakasita, H., Nisiwaki, Y. & Nakasin, T.: Antitumor activity in the culture supernatant fluid of *Fusobacterium nucleatum* strain KO-31. *Japan. J. Exp. Med.*, **53**, 251-256 (1983).
- 35) 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).
- 36) 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**, 139-162 (1985).
- 37) 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).
- 38) 坂下英明: *Peptococcus magnus* の抗腫瘍性に関する研究. *十全医会誌*, **93**, 147-158 (1984).
- 39) 原中勝征: TNF・腫瘍壊死因子, 初版, 1-285, 日本医事新報社出版局, 東京, 1984.
- 40) 藤本栄輔: *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).
- 41) Old, L. J.: Tumor necrosis factor, *Clin. Bull.*, **6**, 118-120 (1976).
- 42) Oettgen, H. E., Carswell, E. A., Kassel, R. L., Fiore, N., Williamson, B., Hoffmann, M. K., Haranaka, K. & Old, L. J.: Endotoxin-induced tumor necrosis factor. *Recent Result in Cancer Research*, **75**, 207-212 (1980).
- 43) Männel, D. N., Meltzer, M. S. & Mergenhagen, S. E.: Generation and characterization of a lipopolysaccharide-induced and serum-derived cytotoxic factor for tumor cells. *Infect. Immun.*, **28**, 204-211 (1980).
- 44) Cowan, S. T.: Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, 1st ed., p.83-88, Cambridge Univ. Press, London, 1966.
- 45) Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E.: Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., p. 446-447, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- 46) 玉井健三: 口腔内嫌気性菌の研究. *口科誌*, **27**, 393-415 (1978).
- 47) 塚越 茂: 制癌剤の開発とその臨床応用, (塚越, 田口, 仁井谷, 斉藤編), 第一版, 25-28頁, サイエンスフォーラム, 東京, 1978.
- 48) 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, 3rd ed., Cancer Chem. Rep., 3, 47-48 (1972).
- 49) 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, 3rd ed., Cancer Chem. Rep., 3, 51-52 (1972).
- 50) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randail, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951).
- 51) Busch, W.: Verhandlungen ärztlicher Gesellschaft. Berlin. Klin. Wochensh., 5, 137-138 (1868).
- 52) Coley, W. B.: Contribution to the knowledge of sarcoma. Ann. Surg., 14, 199-220 (1891).
- 53) Nauts, H. C., Swift, W. E. & Coley, B. L.: The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B. Coley, M. D., Reviewed in the light of modern research. Cancer Res., 6, 205-216 (1946).
- 54) Nauts, H. C., Fowler, G. A. & Bogatko, F. H.: A review of the influence of bacterial infection and of bacterial products (Coley's toxins) on malignant tumors in man. Acta. Med. Scand., 145, 1-103 (1953).
- 55) Nauts, H. C.: Bacterial vaccin therapy of cancer. International symposium on biological preparations in the treatment of cancer London. 1977. Develop. Biol. Standard, 38, 487-494 (1978).
- 56) Reinhard, E. H., Good, J. T. & Martin, E.: Chemotherapy of malignant neoplastic disease. J. Am. Med. Assoc., 142, 383-390 (1950).
- 57) Mathé, G., Schwarzenberg, L., Amiel, J. L., Sohneider, A. M., Cattani, A. & Schlumberger, J. R.: Traitement de la Leucémie aiguë lymphoblastique pendant une rémission par L'irradiation du système nerveux central et L'administration successive de wres de huit composés cimi-thérapiques. Som. Hôp. Paris, 42, 2960-2965 (1966).
- 58) Morton, D. L., Eilber, F. R., Malmgren, R. A. & Wood, W. C.: Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. Surg., 68, 158-164 (1970).
- 59) Shear, M. J.: Chemical treatment of tumors. IV. Properties of hemorrhageproducing fraction of B. coli filtrate. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 34, 325-326 (1936).
- 60) Nakazawa, M., Kasai, N. & Yamamoto, T.: Studies on carcinostatic activity of phosphomucolipid (PML) obtained from lipopolisaccharide. 9th Int. Cancer Congress-1966, 334 (1966).
- 61) Watanabe, T.: Antitumor effect of sonic extract of *E. coli*. 9th Int. Cancer Congress-1966, 388 (1966).
- 62) 渡辺 貞: 大腸菌菌体成分のマウス腹水腫瘍阻止作用について. 第26回日本癌学会総会記事, 72-73 (1967).
- 63) Arakawa, M., Sugiura, K., Rely, H. C. & Stock, C. C.: Oncolytic effect of *Proteus mirabilis* upon tumor-bearing animals. II. Effect on transplantable mouse and rat tumors. GANN, 59, 117-122 (1968).
- 64) Mizuno, D. & Isiguro, M.: Intracutaneous injection-therapy against trasplanted tumor cells. 9th Int. Cancer Congress-1966, 333 (1966).
- 65) 水野伝一, 吉岡 修, 赤松正子, 沢田知子: 細菌糖脂質皮内接種による制癌効果. 医のあゆみ, 63, 89-93 (1967).
- 66) 香山時彦: Ehrlich carcinoma に対する緑膿菌培養濾液の制癌作用. 第28回日本癌学会総会記事, 226 (1969).
- 67) 星 昭夫, 宮沢文彦, 樽谷和男, 阿部千代治, 本間 遜: 緑膿菌の細胞壁蛋白質及び糖脂質の制がん性. 第29回日本癌学会総会記事, 229 (1970).
- 68) 鈴木成生, 梶島碩樹, 小川春樹: 溶連菌製剤 PCB-45 の移植結節癌及び自然発生癌に対する効果. 第27回日本癌学会総会記事, 261 (1968).
- 69) Kosimura, S., Hirata, R. & Shion, S.: On the streptolysin S synthesizing and anticancer activities of cell-free extract from living *hemolytic streptococci*/Cancer Chemo. Rep., 13, 107-111 (1961).
- 70) 波多野基一: 癌原性細胞に対する溶連菌効果—細胞質 RNA の流出現象. 医のあゆみ, 63, 261-268 (1967).
- 71) 国本法雄: 抗腫瘍性を有する微生物に関する研究, 第1報, 枯草菌による抗腫瘍作用. 口科誌, 19, 1-7 (1970).
- 72) Boomford, R. & Olivotto, M.: The mechanism of inhibition by *Corynebacterium parvum* of the growth of lung nodules from intravenously injected tumor cells. Int. J. Cancer, 14, 226-235 (1974).

- 73) 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).
- 74) Tuttle, R. L. & North, R. J.: Mechanisms of antitumor action of *Corynebacterium parvum*: Nonspecific tumor cell destruction at site of an immunologically mediated sensitivity reaction to *C. parvum*. J. Natl. Cancer Inst., 55, 1403-1411 (1975).
- 75) Woodruff, V. L.: Effect of *C. parvum* on immunization with irradiated tumor cells. Br. J. Cancer, 33, 491-495 (1976).
- 76) Ribí, E. E., Granger, D. L., Milner, K. C. & Strain, S. M.: Brief Communication: Tumor regression caused by endotoxins and *Mycobacterial* fraction. J. Natl. Cancer Inst., 55, 1253-1257 (1975).
- 77) 服部孝雄, 八木博司, 村上 浩, 牛島賢一, 森彬, 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. とくに嫌気性コリネバクテリウムの意義について. 癌の臨床, 15, 39-47 (1969).
- 78) 原田達司, 峠 哲哉, 妹尾紀具, 服部孝雄: 嫌気性コリネバクテリウムの抗腫瘍性に関する実験的研究. マクロファージの腫瘍細胞増殖抑制におよぼす影響について. 医のあゆみ, 98, 658-660 (1976).
- 79) Matsunaga, T., Miyamoto, K. & Koshiura, R.: Cytotoxic effect of the culture supernatant of *Clostridium tetani*. Chem. Pharm Bull., 30, 702-707 (1982).
- 80) Tamai, K., Watanabe, K. & Maeda, T.: Antitumor activity of sediment fractions from *Fusobacterium nucleatum* culture supernatant. Japan. J. Exp. Med., 54, 159-170 (1984).
- 81) 中新敏彦, 渡辺好造, 玉井健三: *Fusobacterium nucleatum* の抗腫瘍物質の作用機序に関する検討. 嫌気性菌感染症研究, 13, 55-60 (1983).
- 82) Nolte, W. A.: Oral microbiology, 1st ed., p.21-32, C. V. Mosby Co., Saint Louis, 1968.
- 83) 日比野順子, 浜本恒男, 椎名和彦, 泉 昭, 森健, 渡辺一功, 池本秀雄, 小酒井望, 小栗豊子: 嫌気性菌による膿胸の2例. 嫌気性菌感染症研究, 13, 4-8 (1983).
- 84) Smith, L. D. & Holdeman, L. V.: The pathogenic anaerobic bacteria, 1st ed. p.92, Charles C Thomas Pub., Springfield, 1968.
- 85) 渡辺 真: 細菌内毒素 (本間, 斉藤, 河西, 丹羽編), 第1版, 403-407頁, 講談社, 東京, 1973.
- 86) Westphal, O., Lüderitz, O. & Bister, F.: Über Extraction von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z. Naturforsch., 76, 148-155 (1952).
- 87) Westphal, O. & Jann, K.: Bacterial lipopolysaccharides, Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. Methods Carbohydrate Chem., 5, 83-911 (1965).
- 88) Lüderitz, O., Staub, A. M. & Westphal, O.: Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related *Enterobacteriaceae*. Bacteriol. Rev., 30, 192-232 (1966).
- 89) Lüderitz, O., Jann, K. & Wheat, R.: Somatic and capsular antigens of gramnegative bacteria. Comprehensive Biochem., 26A, 105-228 (1968).
- 90) Kotelko, K., Lüderitz, O. & Westphal, O.: Vergleichende Untersuchungen an Antigenen von *Proteus mirabilis* und einer stabilen L-Form. Biochem. Z., 343, 227-242 (1965).
- 91) Weibull, C., Bickel, W. D., Haskins, W. T., Milner, K. C. & Ribí, E.: Chemical, biological, and structural properties of stable *Proteus* L forms and their parent bacteria. J. Bacteriol., 93, 1143-1159 (1967).
- 92) Boivin, A., Mesrobian, I. & Mesrobian, L.: Technique pour la preparation des polysaccharides microbiens specifiques. Compt. Rend. Soc. Biol., 113, 490-492 (1933).
- 93) Webster, M. E., Sagin, J. F., Landy, M. & Johnson, A. G.: Studies on the O antigen of *Salmonellatyphosa* I. Purification of the antigen. J. Immunol., 74, 455-465 (1955).
- 94) Nowotny, A. M., Thomas, S., Duron, O. S. & Nowotny, A.: Relation of structure to function in bacterial O antigens. I. Isolation methods. J. Bacteriol., 85, 418-426 (1963).
- 95) Staub, A. M.: Methods in immunology and immunochemistry. volume 1 Preparation of antigens and antibodies, p.28-30. In C. A. Willams and M. W. Chase (ed.), 2. Preparation of cell wall antigens from gramnegative bacteria. 1st ed. Academic Press, New York and London, 1967.
- 96) Gray, G. W. & Wilkinson, S. G.: The effect of ethylenediaminetetraacetic acid on the cell walls of some gramnegative bacteria. J. Gen. Microbiol. 39, 385-399 (1965).
- 97) Leive, L., Shovlin, V. K. & Mergenhagen, S. E.: Physical, chemical, and immunological properties of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* by

- ethylenediaminetetraacetate. J. Biol. Chem., **243**, 6348-6931 (1968).
- 98) Rogers, S. W., Gilleland, H. E. & Eagon, R. G.: Characterization of a proteinlipopolysaccharide complex released from cell walls of *Pseudomonas aeruginosa* by ethylenediaminetetraacetic acid. Can. J. Microbiol., **15**, 743-748 (1969).
- 99) 医科学研究所学友会編：細菌学実習提要，第5版，358-361頁，丸善，東京，1976。
- 100) 医科学研究所学友会編：細菌学実習提要，第5版，353-354頁，丸善，東京，1980。
- 101) 島尾和尾：基礎生化学実験法2. 抽出・分離・精製（亜南，紺野，田村，松橋，松本編），第1版，57-74頁，丸善，東京，1974。
- 102) Snipe, P. T. & Sommer, H.: Studies on botulinus toxin: 3. Acid precipitation of botulinus toxin. J. Infect. Dis., **42**, 152-160 (1928).
- 103) Lamanna, C. & Glassman, H. N.: The isolation of type B botulinum toxin. J. Bacteriol., **54**, 575-584 (1947).
- 104) Cardella, M. A., Duff, J. T., Gottfried, C. & Begel, J. S.: Studies on immunity to toxin of *Clostridium botulinum* IV. Production and purification of type C toxin for conversion to toxoid. J. Bacteriol., **75**, 360-365 (1958).
- 105) Cardella, M. A., Duff, J. T., Wingfield, B. H. & Gottfried, C.: Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum* VI. Purification and detoxification of type D toxin and the immunological response to toxoid. J. Bacteriol., **79**, 372-378 (1960).
- 106) 岩水貞昭，山下仁平：生化学実験講座1. タンパク質の化学I（日本生化学会編），第1版，72-74頁，東京化学同人，東京，1981。
- 107) Mergenhagen, S. E., Bladen, H. A. & Hsu, K. C.: Electron microscopic localization of endotoxic lipopolysaccharide in gramnegative organisms. Ann. N. Y. Acad. Soci., **133**, 279-291 (1966).
- 108) Bladen, H. A. & Mergenhagen, S. E.: Ultrastructure of *Veillonella* and morphological correlation of an outer membrane with particles associated with endotoxic activity. J. Bact., **88**, 1482-1492 (1964).
- 109) Mergenhagen, S. E., Hampp, E. G. & Scherp, H. W.: Preparation and biological activities of endotoxins from oral bacteria. J. Infect. Disease, **108**, 304-310 (1961).
- 110) Mergenhagen, S. E. & Varsh, E.: Serologically specific lipopolysaccharides from oral *Veillonella*. Arch. Oral Biol., **8**, 31-36 (1963).
- 111) Mergenhagen, S. E., Zipkin, I. & Varac, E.: Immunological and chemical studies on an oral *Veillonella* endotoxin. J. Immunol., **88**, 482-487 (1962).
- 112) Mergenhagen, S. E.: Polysaccharidelipid complexes from *Veillonella parvula*, J. Bact., **90**, 1730-1734 (1965).
- 113) 越浦良三，清水隆作，玉井健三：口腔内嫌気性菌の研究，第5版。口腔内感染症から分離した嫌気性菌の癌細胞に対する Cell injuring reaction (C. I. R.) 活性について。口科誌，**21**, 534-539 (1972)。
- 114) 天野恵夫，玉井健三：口腔内嫌気性菌の研究，第8報。口腔内分離菌株（偏性嫌気性菌）の癌細胞に対する Cell injuring reaction (C. I. R.) 活性について。口科誌，**23**, 323-333 (1974)。

Experimental Studies on the Antitumor Activity of *Veillonella alcalescens* Shigeo Yagi, Department of Dento-Oral Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **96**, 497—509 (1987)

Key words: *Veillonella alcalescens*, antitumor activity, Ehrlich ascites carcinoma, Sarcoma 180

Abstract

The present investigation was performed to study the antitumor activity of the supernatant of *Veillonella alcalescens* T-2 strain cells treated with ultrasonic disruption. Bacterial cells cultured in TF medium for 48 hr were disrupted by ultrasonic treatment and then centrifuged. The

supernatant was extracted with 60% ethanol and further purified by isoelectric precipitation at different values of pH. The purified fractions were examined for antitumor activity by using ICR mice. When the fractions obtained by isoelectric precipitation at pH values of 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0 were examined for antitumor activity to ascites type tumor of Ehrlich ascites carcinoma cells, the fraction at pH 8.0 (pH 8.0 fraction) showed a remarkable antitumor activity of more than 200.8% of T/C. This pH 8.0 fraction also showed as high antitumor activity (more than 190.2% of T/C) to ascites type of Sarcoma 180 cells as to Ehrlich ascites carcinoma cells. When the antitumor activity of the pH 8.0 fraction was tested for the solid type tumors of Sarcoma 180 cells and Ehrlich ascites carcinoma cells, the fraction showed high antitumor activity to both solid type tumors, as well as the ascites type tumors. Antitumor activity of the fraction to solid type tumor was evaluated by the increase of lifespan (%) and the change of tumor weight. The values of increase of lifespan were 71.2% for the solid type tumor of Ehrlich ascites carcinoma cells and more than 128% for the solid type tumor of Sarcoma 180 cells. Tumor weight of mice treated with the pH 8.0 fraction increased, in both tumor cells, until the tenth day after the transplantation of tumor cells in the same manner as those of untreated mice (control). After 10 days tumor weight of treated mice decreased distinctly by the 15th day, followed by slow increment, while those of control mice increased steadily till the death of mice by tumor. The results mentioned above revealed that the pH 8.0 fraction prepared from cells of *V. alcalescens* T-2 strain had the highest antitumor activity among any fractions tested.