

Experimental Studies on the Effect of Fusobacterium Nucleatum KO-31 preparation(TFT-310) on the Production of Tumor Necrosis Factor

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/2297/7858

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

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座 (主任: 玉井健三教授)

藤 元 栄 輔

(昭和61年2月5日受付)

本実験は、*Propionibacterium acnes* を、priming agent とし、*Fusobacterium nucleatum* KO-31 株から抽出した抗腫瘍物質、TFT-310 を eliciting agent として、SD ラットにおける腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor, TNF) の産生条件について検討した。この際 TNF 活性は ICR 系マウスに作成した Sarcoma 180 固形腫瘍を用いて測定した。Eliciting agent として、TFT-310 と *Escherichia coli* の lipopolysaccharide (LPS) を比較したところ双方に TNF 産生効果を認めた。Eliciting agent として TFT-310 を用い、priming agent として、*Pr. acnes* と Bacille Calmette et Guérin (BCG) を比較したところ双方に TNF 産生効果を認めたが、*Pr. acnes* の効果が強かった。TFT-310 の SD ラットへの投与量とその血清の腫瘍に対する出血壊死反応は投与量依存性を認めた。また、*Pr. acnes* と TFT-310 による SD ラットの処置に際して、カラゲニンを併用すると、TNF の産生は抑制された。故に、*Pr. acnes* と TFT-310 の処置によって、ラット血清中に形成された TNF は、マクロファージに由来すると考えた。TNF 陽性血清は、Meth A および Sarcoma 180 細胞の固型癌に出血壊死を生ずる効果を認めた。しかし、Ehrlich 腹水癌細胞の固型癌に対する効果は不明確であった。以上の如く、TFT-310 を eliciting agent とした結果は、LPS を eliciting agent とした結果と類似した。即ち、TFT-310 は LPS 類似物質あるいは lipid A 分画を有する物質ではないかと考察した。

Key words anaerobes, *Fusobacterium nucleatum*, tumor necrosis factor (TNF)

1975年、Carswellら¹⁾によって腫瘍壊死因子 (Tumor necrosis factor, TNF) が報告されて以来、多くの研究者によって TNF の産生条件、物理化学的性状の検索ならびに作用機序について詳細な研究がなされてきた²⁾⁻²⁷⁾。また、一方、TNF は動物種を越えて腫瘍細胞に細胞傷害ないし増殖阻止作用を示し、線維芽細胞などの正常細胞に対しては、傷害作用を示さないことが最近注目されている¹⁾⁻³⁾。

最近、グラム陰性嫌気性桿菌 *Fusobacterium nucleatum* の菌体内抽出物質 (TFT-310) に抗腫瘍性のあることが *in vitro* あるいは *in vivo* で証明され、lipopolysaccharide (LPS) 類似物質であることが推察されている²⁸⁾⁻³¹⁾。しかし、この物質の作用機序について

は不明であるため、その解明の一つとして TNF の応用を考えた。本研究では *F. nucleatum* の菌体内物質を priming agent として TNF の誘導の可能性について検索した。

材料および方法

1. 実験動物

使用したマウスは、Institute for Cancer Research, Crj:CD-1 (ICR) 系, BALB/cAnNCrj (BALB/c), C57BL/6NCrj (C57BL/6), C3H/HeNCrj (C3H), DBA/2NCrj (DBA/2), CBA/JNCrj (CBA), C57BL/6NCrj × DBA/2NCrj (Crj: BDF₁, BDF₁), BALB/cAnNCrj × DBA/2NCrj (Crj: CDF₁, CDF₁), C57BL/

Abbreviations: BALB/c, ABLB/cAnNCrj; BCG, Bacille de Calmette et Guérin; BDF₁, C57BL/6NCrj × DBA/2NCrj, Crj: BDF₁; B6C3F₁, C57BL/6NCrj × C3H/HeNCrj, Crj: B6C3F₁; CBA, CBA/JNCrj; CDF₁, BALB/cAnNCrj × DBA/2NCrj, Crj: CDF₁; C57BL/6, C57BL/6NCrj; C3H, C3H/HeNCrj; DBA/2, DBA/2NCrj; ICR, Institute for Cancer

6NCrj×C3H/HeNCrj (Crj: B6C3F₁, B6C3F₁) マウスで、生後4週(約16~20g)のものを各々1群10匹として実験に使用した。ラットは、Sprague-Dawley, Crj: CD (SD) 系ラットで、約350~400gのものを実験に供した。これらの実験動物は、全て日本チャールス・リバー株式会社(神奈川)より購入した。

II. 使用菌株

口腔内感染症から分離し、金沢大学医学部歯科口腔外科学教室の保存菌株とした *F. nucleatum* KO-31 株および *Propionibacterium acnes* KT-28 株を実験に供した。

III. 腫瘍細胞の調整

Sarcoma 180 細胞および Ehrlich 腹水癌細胞は、7日目ごとに生後4週(約18~20g)のICR系マウスの腹腔内で継代培養した。実験に際してICR系マウスで各々の細胞を、7日間培養し、腹腔に貯留するミルク状の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K.K., 東京)で白血球算定基準³²⁾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、細胞浮遊液を調整し各実験に使用した。Meth A 細胞は、7日目ごとに生後4週(約18~20g)のBALB/cマウスの腹腔内で継代培養した。実験に際してBALB/cマウスで7日間培養し、腹腔に貯留するMeth A細胞の乳状液を、無菌的に採取した。採取後、前述の如く調整し実験に使用した。

IV. 担癌マウスの作製法

ICR系マウスの背部を動物用電動式バリカン、アニマルクリッパー-Model 900 (Thrive, 東京)で剃毛し、ヒビテンアルコール液で消毒後、マウスの皮下に調整したSarcoma 180細胞浮遊液または、Ehrlich腹水癌細胞浮遊液を0.2ml注射した。

同様に、BALB/cマウスの背部皮下に調整したMeth A細胞浮遊液0.2mlを注射した。

V. *F. nucleatum* KO-31 標品 (TFT-310) の作製

Tamaiら²⁹⁾の方法に従って作製した。すなわち、*F. nucleatum* KO-31株を、玉井・福田培地³³⁾(Tamai Fukuda 培地, TF 培地)(日水, 東京)15mlで、37°C・48時間前培養後、TF 培地(15ml)に0.4mlを移植し、37°C・24時間培養した。培養菌液を、TF血液寒天平板培地に塗布後、Gas Pak (BBL, U.S.A.)を用いて37°C・48時間嫌気培養した。形成してくる集落を鈎菌し、TF 培地(15ml)に移植後、37°C・48時間増菌培養した。その培養液4mlを100ml容量の投薬ビンに

作製したTF培地(100ml)に移植した。37°C・24時間培養後培養液の80mlを2,000ml容量の投薬ビンに製作した2,000mlのTF培地に移植した。37°C・48時間の本培養後、無菌的に4,500×g・20分間遠心した。得られた培養上清液にエチルアルコール濃度が60%になるように加え、充分攪拌後、4°Cで一晩静置し、再び10,000×g・20分間冷却遠心した。得られた沈澱物質に1/15M 燐酸緩衝液(PBS)(pH 7.0)200mlを加え、1N-NaOHでpH 8.0に調整後、プロナーゼE(科研, 東京)を0.1g/mlになるように加えた。室温で24時間作用させた後、10,000×g・20分間冷却遠心した。遠心上清にエチルアルコールを60%の割合に加え、生じた沈澱物質にPBSを加え、イオン交換カラムDawex 1×4で吸着させた後、PBSで溶出させ、限外濾過後ザイツフィルターにて濾過滅菌した。濾過後凍結乾燥した。Tamaiら²⁹⁾がTFT-310と名付けたこの部分精製した物質を、実験に使用する際、5%ブドウ糖水溶液に適量懸濁し使用した。

VI. TNF 活性測定法

TNF活性はSarcoma 180の担癌マウスを用いて測定した。1.0×10⁶個(0.2ml)のSarcoma 180細胞をICR系マウスの背部皮下に移植後、6日目に被験血清0.5mlを尾静脈より投与した。投与24時間後に腫瘍部に形成される潰瘍の程度により投与血清中のTNF活性を測定した(詳細については本文参照)。

VII. TNF 血清の作成

SDラットにpriming agent(0.2ml)を静脈注射後、14日目にeliciting agent(0.2ml)を静脈注射し、その24時間後に心臓血を採取した。採取血液は、1,000×g・5分間冷却遠心後、得られた血清を実験に供した。なお、priming agentとしてはformalin-killed *Pr. acnes* KT-28株(*Pr. acnes*)を、1.0×10⁷個/ラットに、Bacille de Calmette et Guérin (BCG)(日本BCG社製, Lot.No.K.599M, 東京)は7.0×10⁷個/ラットとなる様に注射した。Eliciting agentとしては*Escherichia coli*-LPS(*E. coli*-LPS)(Difw. Lbt., Detroit Michigam, U.S.A.)を250μg/ラット投与した。

VIII. *Pr. acnes* 細胞, BCG, *E. coli*-LPS, カラゲニンの調整法

Pr. acnes KT-28株を、TF培地(15ml)で37°C・48時間前培養後、TF培地(15ml)に0.4mlを移植し、37°C・24時間培養した。培養菌液を、TF血液寒天平

Research, Crj: CD-1; LPS, lipopolysaccharide; *Pr. acnes*, formalin-killed *Propionibacterium acnes* KT-28; SD, Sprague-Dawley, Crj: CD; TF 培地, Tamai Fukuda 培地; TNF, tumor necrosis factor; TNS, tumor necrosis serum.

板培地に塗布後、Gas Pak を用いて 37°C・48 時間嫌気培養した。形成してくる集落を釣菌し、TF 培地 (15 ml) に移植後、37°C・48 時間増菌培養した。その培養液 0.4 ml を TF 培地 (15 ml) に移植し、37°C・24 時間培養後、平板希釈法を用いて菌数測定した。その培養液に濃度が 2% (v/v) となるようにホルマリンを加え、室温で一晩静置し、実験に際して、適量の滅菌生理食塩水を加え 5.0×10⁷ 個/ml に調整し使用した。

BCG は、3.5×10⁸ 個/ml となるように適量の滅菌生理食塩水を加え実験に使用した。

E. coli-LPS は、1,250 μg/ml となるように適量の滅菌生理食塩水に溶解し、実験に使用した。

カラゲニン (k-Carrageenan, Lot.No.WKJ.3700) (和光、大阪) は、5 mg/ml となるように適量の滅菌生理食塩水に溶解し、実験に使用した。カラゲニンは本実験では網内系を抑制する³⁴⁾³⁵⁾ために用いた。

成 績

1. TNF 活性測定法の検討

1. TNF 活性測定用の Sarcoma 180 固形癌の形成

ICR 系マウスの背部皮下に、異なる細胞数の Sarcoma 180 細胞浮遊液を 0.2 ml ずつ注射し、移植細胞数と固形癌の発育について検討した。この際、固形癌が形成されてくる過程で、マウスの背部の注射部位に何ら変化のないものを(-)、腫脹のみを認めるものを(+), 腫脹および発赤を認めるものを(++)、腫

脹および発赤の他に潰瘍の形成をみるものを(+++)として判定した(表1)。

1.6×10⁶ 個の移植では、4 日目より固形癌の発育が(++)のマウスが3匹出現し、7 日目では、(+++)のマウスが10匹中4匹出現した。1.0×10⁶ 個の移植では6 日目に固形癌の発育が(++)のマウスが3匹出現し、8 日目には、(+++)マウスが1匹出現した。4.0×10⁵ 個の移植では、8 日目に(++)のマウスが1匹出現し、9 日目には(+++)マウスが1匹出現した。しかし、12 日目でも10匹中6匹は(+)で、そのなかには極めて小さい腫瘍を形成するのみのマウスも含まれていた。また、1.0×10⁶ 個の移植では、12 日目でも腫瘍の発育を認めないマウスが10匹中5匹出現した。以上の成績から、1.0×10⁶ 個/マウスの Sarcoma 180 細胞を移植した時、腫瘍が確実に生着し、かつ比較的発育が緩やかなことが分かったので、TNF 活性の測定には、Sarcoma 180 細胞 1.0×10⁶ 個を移植後6 日目のマウスを用いることとした。

2. 被験血清注射量の検討

Priming agent として Pr. acnes (1.0×10⁷ 個)を注射し、eliciting agent として TFT-310 (25 mg/Kg 体重)を注射して得た SD ラット血清を用いて、ICR 系マウスの Sarcoma 180 固形癌を標的として、投与血清量と腫瘍の壊死反応の関係を検討した。この際、血清を注射した後 24 時間後に腫瘍の壊死状態を観察し、壊死反応により TNF 活性の程度を現わした。すなわち、腫脹のみを認めるもの、腫脹と発赤を示すもの、潰瘍の

Table 1. Growth of Sarcoma 180 cells in ICR mice*

Number of cells injected per mouse	Tumor growth**	Number of mice showing respective tumor growth after period (day) of									
		4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1.6×10 ⁶	+	7	6	4	3	3	3	2	2	1	
	++	3	4	6	3	2		1	1	1	
	+++				4	5	7	7	7	8	
1.0×10 ⁶	+	10	10	7	6	6	4	4	4	2	
	++			3	4	3	4	4	3	4	
	+++					1	2	2	3	4	
4.0×10 ⁵	+	10	10	10	10	9	7	6	6	6	
	++					1	2	2	2	2	
	+++						1	2	2	2	
1.0×10 ⁵	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
	+	5	5	5	5	5	4	4	4	3	
	++						1	1	1	2	

*Ten ICR mice were used for each experiment.

**-, no change; +, swelling; ++, swelling and redness; +++, ulcer formation.

形成を認めるもの、大きな潰瘍(腫瘍部の50%以上の潰瘍)の形成を認めるものを各々TNF活性(-), (+), (++)、(+++)と判定した(図1)。血清投与量が0.5 mlの群では、TNF活性(+++)のマウスが8匹、(++)のマウスが1匹、(+)のマウスは1匹であった(表2)。

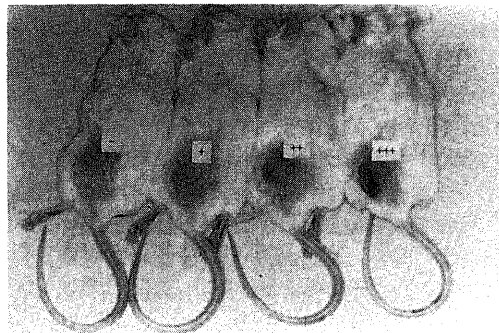


Fig. 1. Grading of TNF activity on Sarcoma 180 tumor in ICR mice.

Sarcoma 180 cells (1.0×10^6) were transplanted subcutaneously into ICR mice and 6 days later 0.5 ml of the serum tested was injected intravenously. Twenty four hr after the injection of the serum necrotic changes of tumor was observed. Serum tested was prepared as follows. Formalin-killed *Pr. acnes* cells (1.0×10^7) were injected intravenously into SD rats and 14 days later TFT-310 (25 mg/Kg rat) was injected. Two hr after the injection the rat was exsanguinated and the serum was obtained. TNF activity: -, swelling; +, swelling and redness; ++, small ulcer formation; +++, large ulcer formation.

0.4, 0.3および0.2 ml投与群でも、TNF活性が(+++)あるいは(++)のマウスがそれぞれ8匹と、大多数を占めた。しかし、0.1 ml投与群では、TNF活性が(+++)のマウスが3匹、(++)のマウスが2匹含まれていたが、(-)のマウスも3匹出現した。これらの結果から、TNF活性測定には被験血清を0.5 ml注射することとした。

以上の成績に基づき、 1.0×10^6 個のSarcoma 180細胞をICR系マウスに移植し、移植6日目に被験血清0.5 mlの静脈注射を行ない、注射24時間後に腫瘍の壊死反応を観察することにより被験血清中のTNF活性を測定することとした。

II. TFT-310投与によるTNF産生

1. *E. coli*-LPSとの比較

TFT-310のTNF産生に及ぼす効果を*E. coli*-LPSと比較検討した。この際TFT-310投与量は25 mg/Kgラットとした。Priming agentとして*Pr. acnes* (1.0×10^7 個)投与後14日目に、eliciting agentとして*E. coli*-LPS (250 μ g)あるいはTFT-310 (25 mg/Kgラット)を投与した群 ("*Pr. acnes* + *E. coli*-LPS"群、"*Pr. acnes* + TFT-310"群)の各血清 ("*Pr. acnes* + *E. coli*-LPS"血清、"*Pr. acnes* + TFT-310"血清)はTNF活性を示す場合が多かった(表3)。すなわち "*Pr. acnes* + *E. coli*-LPS"群の血清を注射した場合、10匹中6匹のマウスはTNF活性が(++)以上を示し、"*Pr. acnes* + TFT-310"群の血清では、10匹中7匹のマウスはTNF活性が(++)以上であった。これに対してpriming agentとして*Pr. acnes*を注射したのみの群、priming agentを注射せずにeliciting agentとして*E. coli*-LPSを投与した群、priming agentを注射せずにeliciting agentとしてTFT-310を投与したのみ

Table 2. Relationship between the amount of serum injected and TNF activity on Sarcoma 180 tumor in ICR mice

Amount(ml) of serum** injected	Number of mice showing TNF activity* of			
	##	++	+	-
0.5	8	1	1	
0.4	7	1	2	
0.3	5	3	2	
0.2	3	5	2	
0.1	3	2	2	3
Saline 0.5 ml			6	4

* Refer to the footnote of Fig. 1.

** Formalin-killed *Pr. acnes* cells injected into SD rat with 1.0×10^7 cells. Fourteen days later, TFT-310 was injected intravenously at the amount of 25 mg/kg into the rat and 2 hr after the injection the rat was exsanguinated and the serum was obtained.

の群の各血清は2匹のマウスを除きTNF活性陰性であった。以上の成績から、TFT-310はTNF産生に関し、*E. coli*-LPSと同程度にeliciting agentとして有効であることが分った。

2. Priming agent の検討

TFT-310によるTNF産生について、priming agentとしてBCGを用いた群と*Pr. acnes*を用いた群とを比較検討した。この際、TFT-310投与量は25mg/Kgラットとした。

Priming agentとしてBCGを投与したラットの血清ではTNF活性が(++)のマウスが1匹、(++)のマウスが3匹、(+)のマウスは6匹であった(表4)。これに対し、priming agentとして*Pr. acnes*を投与

した血清群では、TNF活性が(++)のマウスが2匹、(++)のマウスが4匹、(+)のマウスは4匹であった。以上の結果は、priming agentとしてBCGを投与したラット血清も、TNF活性を有することを示したが、priming agentとして*Pr. acnes*を投与したラット血清の方がTNF活性が強く、priming agentとして*Pr. acnes*の方がより有効なことが分った。

3. TFT-310 投与量とTNF産生

前述の結果に基づき、priming agentとして*Pr. acnes*を用いることにし、eliciting agentとして投与するTFT-310の投与量とTNF産生について検討した。

TFT-310を25mg/Kgラット投与したラットの血

Table 3. TNF activity of various sera on Sarcoma 180 tumor in ICR mice

Serum	Treatment ** of SD rat	Number of mice showing TNF activity* of			
		##	##	+	-
a	<i>E. coli</i> -LPS		1	4	5
b	TFT-310		1	4	5
c	<i>Propionibacterium acnes</i>			6	4
d	<i>Pr. acnes</i> + <i>E. coli</i> -LPS	3	3	4	
e	<i>Pr. acnes</i> +TFT-310	4	3	3	
f	Non-treated			6	4

* Sarcoma 180 cells were inoculated subcutaneously with 1.0×10^6 cells(0.2 ml) and 6 days later the serum was injected intravenously. Twenty four hr after the injection necrotic response of the tumor was observed. For scoring of the TNF activity, see Fig. 1.

** Two hundred and fifty μ g of *E. coli*-LPS(a) or 25 mg/kg of TFT-310(b) was injected intravenously into SD rat and 2 hr later the rat was exsanguinated to obtain serum. Formalin-killed *Pr. acnes* cells were injected intravenously into SD rat with 1.0×10^7 cells. Fourteen days later, 0.2 ml saline(c), 250 μ g of *E. coli*-LPS(d), or 25 mg/kg of TFT-310 (e), was injected intravenously into the rat and 2 hr after the injection the rat was exsanguinated to obtain serum.

Table 4. TNF activity of the serum from SD rats treated with two different priming agents on Sarcoma 180 tumor in ICR mice

Serum	Treatment** of SD rat		Number of mice showing TNF activity* of			
	Priming agent	Eliciting agent	##	##	+	-
A	BCG	TFT-310	1	3	6	
B	<i>Pr. acnes</i>	TFT-310	2	4	4	
C	Saline control***				5	5

* Refer to the footnote of Table 3.

** Viable organisms (7.0×10^7) of BCG(A) or formalin-killed *Pr. acnes* cells (1.0×10^7) (B) were injected intravenously into SD rat. Fourteen day later, TFT-310 was injected intravenously at the amount of 25mg/kg into the rat and 2 hr after the injection the rat was exsanguinated and the serum was obtained.

*** Half ml of saline was injected into mice.

清には TNF 活性が (++) のマウスが 3 匹, (++) のマウスは 4 匹で, (-) のマウスは, 全くなかった (表 5). TFT-310 の量を, 10 mg/Kg ラットおよび 5 mg/Kg ラットとしたラットの血清でも TNF 活性が (++) 以上を示すマウスがそれぞれ 5 匹出現し, (-) のマウスは全くなかった. 一方, 1 mg/Kg ラットあるいは 0.5 mg/Kg ラット投与した血清をマウスに投与した場合, TNF 活性が (+++) を示したマウスは 1 匹も出現しなかった. すなわち, TFT-310 の投与量を, 25, 10 および 5 mg/Kg としたラット血清は, TNF 活性陽性を示したが, 1 mg/Kg ラット, 0.5 mg/Kg ラット投与したラット血清は, TNF 活性は明瞭ではなかった.

4. カラゲニン投与による TNF 産生の抑制

Priming agent として *Pr. acnes* を投与し, eliciting agent として TFT-310 を投与する TNF 産生系について, 網内系を抑制するカラゲニンを併用した場合の TNF 産生を検討した.

Pr. acnes の投与前と, TFT-310 の投与前の双方にカラゲニンを投与したラットの血清は TNF 活性陰性であった (表 6). また, *Pr. acnes* の投与前のみにカラゲニンを投与したラットの血清, および TFT-310 の投与前のみにカラゲニンを投与したラットの血清では, TNF 活性が (+++) を示したマウスが 1 匹ずつ出現したにすぎなかった. すなわち, カラゲニン投与によ

Table 5. Relationship between the amount of TFT-310 as eliciting agent and the TNF activity of the serum obtained on Sarcoma 180 tumor in ICR mice

Serum**	Amount(mg/kg) of TFT-310 injected	Number of mice showing TNF activity* of			
		##	+	+	-
A	25	3	4	3	
B	10	3	2	5	
C	5	1	4	5	
D	1		3	5	2
E	0.5		1	6	3
F	Saline (0.2ml)			6	4

* Refer to the footnote of Table 3. The amount of serum injected was 0.5 ml.

** Formalin-killed *Pr. acnes* cells (1.0×10^7) were injected intravenously into SD rats. Fourteen days later different amount of TFT-310 were injected intravenously into the rats and 2 hr after the injection the rats were exsanguinated and the serum was obtained.

Table 6. TNF activity of the serum obtained from SD rat treated with *Pr. acnes*, TFT-310 and carrageenan on Sarcoma 180 tumor in mice

	Treatment of SD rat				Number of mice showing TNF activity* of			
	Carrageenan**	<i>Pr. acnes</i> ***	Carrageenan****	TFT-310*****	##	+	+	-
A	+	+	+	+			5	5
B	+	+	-	+	1	4	3	2
C	-	+	+	+	1	3	4	2
D	-	+	-	+	4	3	3	
E	Saline control*****						5	5

* Refer to the footnote of Table 3.

** Carrageenan(10 mg) was given intraperitoneally into SD rat on 7, 5, 3, and 1 days before injection of *Pr. acnes*.

*** Formalin-killed *Pr. acnes* were injected intravenously into SD rat with 1.0×10^7 cells per rat 14 days before exsanguination.

**** Carrageenan(10 mg) was given intraperitoneally into SD rat on 7, 5, 3, and 1 days before injection

***** TFT-310 was injected intravenously into the rats at the amount of 25 mg/kg and 2 hr later the rats were exsanguinate and the sera were obtained.

***** Half ml of saline was injected into mice.

り TNF 産生は抑制されることが分った。

III. “*Pr. acnes*+TFT-310” 血清の Sarcoma 180 担癌各種マウス及び各種担癌マウスにおける腫瘍壊死効果

Priming agent として *Pr. acnes* を 1.0×10^7 個投与し、14 日目に TFT-310 を 25 mg/Kg ラットに投与した後、2 時間後に採血して得た血清 (“*Pr. acnes*+TFT-310” 血清) について、Sarcoma 180 担癌各種マウス及び各種担癌マウスにおける腫瘍壊死効果を検討した。

1. Sarcoma 180 担癌各種マウスにおける腫瘍壊死効果

Sarcoma 180 細胞を 1.0×10^6 個を 9 種類のマウスに移植し、移植 6 日目に “*Pr. acnes*+TFT-310” 血清 0.5 ml の静脈注射を行ない、24 時間後に腫瘍の壊死を判定した (表 7)。

ICR 系マウスの治療群では、小潰瘍の形成を認めるマウスが 1 匹、腫脹と発赤を認めるマウスが 6 匹、腫脹のみ認めるマウスは 3 匹であった。BALB/c マウスの治療群では、小潰瘍を認めるマウスが 2 匹、腫脹と

Table 7. Necrotic effect of “*Pr. acnes*+TFT-310” serum on Sarcoma 180 tumor in different strains of mice

Strain of mouse	Half ml of “ <i>Pr. acnes</i> +TFT-310” serum* was injected intravenously			Half ml of saline was injected intravenously	
	Number of mice showing necrotic response of			Number of mice showing necrotic response** of	
	+	+	-	+	-
BALB/c	2	5	3	4	6
C57BL/6	1	4	5	1	9
C3H	2	3	5	1	9
DBA/2		3	7	2	8
CBA			10	1	9
BDF ₁		1	9		10
CDF ₁		4	6	1	9
B6C3F ₁		7	3	3	7
ICR	1	6	3	1	9

* Formalin-killed *Pr. acnes* cells were injected into SD rat with 1.0×10^7 cells. Fourteen days later, TFT-310 was injected intravenously with the amount of 25 mg/kg into the rat and 2 hr after the injection the rat was exsanguinated and the serum was obtained.

** Refer to the footnote of Table 3. The amount of serum injection was 0.5 ml.

Table 8. Necrotic effect of “*Pr. acnes*+TFT-310” serum on different tumors in mice

Kind of tumor**	Strain of mouse	Half ml of “ <i>Pr. acnes</i> +TFT-310” serum* was injected intravenously				Half ml of saline was injected intravenously	
		Number of mice showing necrotic response of				Number of mice showing necrotic response*** of	
		+	+	+	-	+	-
Meth A	BALB/c	6	4			5	5
Ehrlich ascites carcinoma	ICR		2	7	1	5	5
Sarcoma 180	ICR	1	3	6		4	6

* Formalin-killed *Pr. acnes* cells were injected into SD rat with 1.0×10^7 cells. Fourteen days later, TFT-310 was injected intravenously with the amount of 25 mg/kg into the rat and 2 hr after injection the rat was exsanguinated and the serum was obtained.

** Meth A, Ehrlich ascites carcinoma and Sarcoma 180 cells (1.0×10^6) were transplanted subcutaneously into mice and 6 days later 0.5 ml of the serum was injected intravenously.

*** Refer to the footnote of Table 3. Half ml of the serum was injected intravenously into mice on 6 days after transplantation of tumor cells.

発赤を認めるマウスは5匹、腫脹のみを認めるマウスは3匹であった。B6C3F₁ マウスの治療群では、腫脹と発赤を認めるマウスが7匹、腫脹のみを認めるマウスは10匹中3匹であった。すなわち、ICR系マウス、BALB/cマウス、B6C3F₁ マウスでは、治療群の大多数のマウスに腫瘍の腫脹・発赤、あるいは小潰瘍の形成を認めた。また、C57BL/6マウス、CH3マウスでは、治療群の半数のマウスに腫瘍の発赤あるいは小潰瘍の形成を認めた。しかし、DBA/2マウス、CBAマウス、BDF₁マウス、CDF₁マウスでは、いずれの治療群マウスにも、腫瘍の潰瘍形成は認めず、腫脹のみ認めるマウスが10匹中それぞれ、7、10、9、6匹と大多数を占めた。対照群では、いずれのマウスにおいても潰瘍の形成は認めなかった。

2. 各種癌細胞担癌マウスにおける腫瘍壊死効果

Sarcoma 180, Meth A, あるいは Ehrlich 腹水癌細胞の各々 1.0×10^6 個をマウス皮下に移植し、移植6日目に“Pr. acnes + TFT-310”血清 0.5 ml の静脈注射を行ない、24時間後に腫瘍壊死効果を判定した(表8)。

Meth A 細胞の固型癌では、小潰瘍の形成を認めるマウスが6匹、Sarcoma 180 細胞の固型癌では、大きな潰瘍の形成を認めるマウスが1匹、小潰瘍の形成を認めるマウスが3匹であった。これに対し、Ehrlich 腹水癌細胞の固型癌では、小潰瘍の形成を認めるマウスが2匹出現したにすぎなかった。対照群ではいずれの腫瘍系においても腫脹を認めるのみのマウスが半数以上を占め、潰瘍の形成を認めるマウスは出現しなかった。すなわち、TNF 活性は、Meth A 細胞の固型癌に対しても、Sarcoma 180 細胞の固型癌と同程度に強く示されたが、Ehrlich 腹水癌細胞の固型癌に対しては弱かった。

考 察

微生物の抗腫瘍活性に関する研究は、Busch³⁶⁾の癌患者が丹毒に罹患した際、腫瘍増殖の一時停止あるいは減退が見られたとする報告に始まっている。その後、Coley³⁷⁾は、丹毒患者から分離した Streptococci と他の細菌、特に *Bacillus prodigiosus* の培養濾液より“Coley's toxin”を作り上げ、その抗腫瘍活性を報告している。Coley's toxin による有効例も多数報告されているが、失敗例が圧倒的に多かった。しかし、この研究は、今日の癌免疫療法の基礎になったと言われて³⁸⁾⁻⁴⁰⁾。現在、微生物より精製し、臨床応用に至っている抗腫瘍物質の代表的なものとして、Okamoto⁴¹⁾の Picibanil (OK-432) が挙げられるが、これは *Streptococcus pyogenes* から作り出されたものである。

この他、Reinhard⁴²⁾の小儿白血病患者の感染症と自然治癒の関係、Mathé⁴³⁾および Old⁴⁴⁾の BCG の抗腫瘍活性の報告など、細菌の抗腫瘍活性に関連する報告は数多く見られる。これらの研究の大多数は、好気性菌から抽出した抗腫瘍物質について報告されたものである。嫌気性菌の抗腫瘍活性に関連する報告は、嫌気性 *Corynebacterium* や Clostridia の研究以外はほとんど皆無である⁴⁵⁾⁻⁵⁸⁾。Tamai²⁸⁾²⁹⁾、西脇³⁰⁾、中新³¹⁾は数年前より *F. nucleatum* KO-31 株の抗腫瘍活性を検討し、*F. nucleatum* KO-31 標品 TFT-310 を作製し、*in vivo* あるいは *in vitro* 実験で抗腫瘍活性を証明している。さらにその作用機序の解明のため、今回、TNF を応用し実験した。

Old⁴⁾、Carswell¹⁾は、マウスに BCG を接種して2週間後に、細菌性の LPS を静注すると、血清中に特異な蛋白が出現し、この血清は Meth A 同系腫瘍、Sarcoma 180, Leukemia EL 4 などの種々の同種および同系移植癌に対して Schwartzman 反応を引き起こし、腫瘍を壊死に陥らせ、増殖を抑制する作用があると報告した。さらに Helson²⁾は、人の Melanoma に対して、*in vitro* で増殖抑制効果を報告し、TNF の効果に種特異性のないことを示した。この種特異性の欠如という事実は、臨床応用への可能性を示唆し、以後多くの cell line についての検討が加えられている²⁾⁻⁸⁾。一方、TNF 本体に対する検討では、マウスの TNF は 39,000~40,000、家兎の TNF は 40,000~70,000 の分子量を有するとする報告が多い⁹⁾⁻¹²⁾。Haranaka¹²⁾は、約20万倍の精製度を有するマウス TNF を得たと報告し、さらにこの物質は蛋白染色と糖染色の両方で染色され、糖蛋白質であると報告している。本研究では、TFT-310 の作用機序解明が目的であるため、血清中の TNF の精製は行なわず、*in vitro* での percent cytotoxicity の測定も行なわなかった。しかし、Old⁴⁾は TNF の定義を、(1) BCG 又は *Corynebacterium parvum* などで前処置されたマウスに LPS を注射すると血中に誘導される；(2) 分子量 40,000 の糖蛋白である。そしてその L 細胞に対する 50% Killing activity は 10^8 units/mg protein であること；(3) Meth A はじめ移植癌に対し、出血壊死を生じさせる；(4) *in vitro* では、マウスやヒトの癌細胞に対し、toxic 又は static に作用する；(5) マクロファージで作られる；としている。本研究では、この定義を満たしていないが、Carswell¹⁾の方法に従い検討を行なった。すなわち、TNF の性状は必ずしも解明されておらず、Old の定義も修正され得るものと思われる。本研究で用いた *in vivo* の測定法では、腫瘍がある程度の大きさになると、中心部に自然壊死を作りやすい

こと、細菌性 endotoxin の投与により腫瘍の縮小を伴った壊死の生ずる可能性があること⁵⁹⁾、などに配慮することが必要である。そのために、基礎実験として、Sarcoma 180 細胞を用い、細胞数と腫瘍の発育および潰瘍形成の有無について検討した。この成績から、腫瘍が確実に発育し、潰瘍形成の認められない時期に実験を行なった。また、血清中に、endotoxin, LPS およびこの分解物が残存する可能性は、Carswell ら¹¹⁾は無視できるとしている。また、*in vitro* の TNF 活性の測定法としては、trypanblue 染色あるいは位相差顕微鏡を用いて生細胞数を測定する方法¹⁾、アイソトープを用い、その放出により TNF 活性を測定する方法などが報告されている³⁾¹³⁾¹⁵⁾。その *in vitro* の TNF の細胞傷害作用は、直接効果であり明確である。しかし、同一の TNF 物質によって *in vitro* と *in vivo* の抗腫瘍作用がもたらされているか不明である。

Eliciting agent についての検討は少なく、ほとんどの報告は LPS を用いている。他に *Pseudomonas aeruginosa* の死菌、lipid A, OK-432 などの報告が散見されるのみである¹⁶⁾¹⁹⁾。本研究では、SD 系ラットを用いて TNF 活性を検討し、*E. coli*-LPS と同様な、TFT-310 による TNF 産生を示唆する成績を得た。LPS は BCG 等の前処置により非常に強い毒性を示すことが知られている⁶⁰⁾。本研究においても、priming agent として *Pr. acnes* を投与後 14 日目に、eliciting agent として TFT-310 を投与したところ、1~2 時間後に死亡するラットが全ての実験の中で 2~3 匹出現した。担癌固体での TNF 誘導には、この毒性も解決されなければならないと考える。また、LPS の lipid A 分画が TNF 産生誘導能を持つことが知られている¹⁷⁾¹⁹⁾。グラム陰性嫌気性桿菌 *F. nucleatum* から抽出した TFT-310 は、*E. coli*-LPS と類似する物質、あるいは lipid A 分画を有する物質であろうかと考えられる。

Carswell ら¹¹⁾は、腫瘍壊死血清 (Tumor necrosis serum, TNS) を 0.5 ml 投与すると著明な腫瘍壊死を認めるが、0.1 ml ではほとんど反応がないと報告している。本研究においても、血清の投与量が多い程腫瘍の潰瘍形成が著明となる傾向を示した。TNF は、癌特異抗原に対する receptor を有していると考えられている¹³⁾。原中¹⁹⁾は、TNF と細胞を混合培養し、経時的に検討すると、1~6 時間の間に上清中の TNF 活性が減弱してゆき、それ以後の上清には TNF 活性が認められなくなると報告している。この receptor の存在により、TNS の投与量が多い程腫瘍の潰瘍形成が著明となるものと考えられた。そこで、以後の実験は、TNS を 0.5 ml 投与することとした。

Priming agent として、*Pr. acnes* の他に、BCG, *Propionibacterium granulosum*, Zymosan, OK-432 などが報告されている¹¹⁾¹⁹⁾²⁰⁾。原中¹⁹⁾は、priming agent の違いによる TNF 産生の差について、eliciting agent として LPS を用い DDY 系マウスで検討している。本研究では、eliciting agent を TFT-310 とし、*Pr. acnes* と BCG を比較したが、原中らの実験成績と同様に、*Pr. acnes* を priming agent として用いるほうが、腫瘍壊死は著明であった。*Pr. acnes* は、宿主の網内系を刺激することが知られているが⁴⁷⁾、この網内系の刺激と TNF の産生には、強い相関が認められている¹⁹⁾。一方、Green ら²¹⁾、原中¹⁹⁾は、LPS の投与量と TNF の産生について検討し、投与量が増量する程 TNF の産生が増加すると報告している。TFT-310 の投与量と TNF の活性について検討した成績も同様の結果であった。

in vivo の系での TNF の抗腫瘍効果に関しては、Carswell ら¹¹⁾、Helson ら²²⁾、Haranaka ら²³⁾などの報告が見られる。効果判定基準をどこに設定するかの問題はあるが、TNF は種を越えて多数の腫瘍系に対し有効とされている。本研究では、Sarcoma 180 細胞を用いて TNF 活性の検討を行なったが、Meth A 細胞においても、TFT-310 により産生された TNF が活性を示す成績が得られた。Ehrlich 腹水癌細胞においては、TNF 活性は不明瞭とする成績であったが、10 匹中 2 匹に潰瘍形成を認めた。

Green ら²⁴⁾は、TNF 産生時に silica を投与しても影響を受けなかったことから、マクロファージは TNF 産生細胞ではないとしているが、大多数の報告者は、マクロファージが TNF の産生細胞であるとしている¹⁴⁾¹⁹⁾²⁵⁾²⁷⁾。著者は、網内系を抑制する目的でカラゲニン¹⁴⁾を投与したラットで TNF の産生について検討を加えた。その結果、網内系の抑制により TNF の産生も抑制される成績であった。特に priming agent と eliciting agent の双方の投与前にカラゲニンを投与したラットの血清では、TNF の産生が見られなかった。以上の実験結果から、TNF の産生細胞はマクロファージであろうと考えた。また、Satomi ら²⁷⁾は、*C. parvum* の投与前のみにカラゲニンを 3mg 以上投与されたマウスでは、TNF の産生は抑制されると報告している。本研究との差異は、eliciting agent の違いも挙げられるが、実験動物の違いと投与方法の違いが大きく作用しているものと考えられる。また、eliciting agent の投与前のみにカラゲニンを投与した場合の成績の差異も同様の理由で生じたものと考えられる。

以上の成績から、TFT-310 は、LPS と同様なマクロファージに対する作用機作を有する物質であり、先に

述べた如く、その本態は LPS に近似する物質、あるいは lipid A 分画を有する物質であろうと思われた。

結 論

F. nucleatum KO-31 株の菌体から抽出した抗腫瘍物質である TFT-310 による TNF 産生について検討した結果、次のような結論を得た。

1. Formalin-killed *Propionibacterium acnes* KT-28 株 (*Pr. acnes*) 投与後 14 日目に TFT-310 を投与したラットより得られた血清は、TNF 活性陽性を示した。

2. TNF 活性陽性血清の投与量を検討したところ、血清の投与量が多い程、腫瘍の潰瘍形成が著明となる傾向を示した。

3. Eliciting agent として、*E. coli*-LPS と TFT-310 を比較した結果、双方とも TNF 産生を示す成績が得られた。

4. Priming agent として、*Pr. acnes* と BCG を比較した結果、双方とも TNF 産生陽性を示す成績が得られた。しかし、BCG に比べ、*Pr. acnes* を投与した群の方が、TNF 活性が著明であった。

5. TFT-310 の投与量を検討した結果、投与量が多い程、TNF 活性が強い傾向を示した。

6. 網内系を抑制する目的で、カラゲニンを併用すると、TNF の産生も抑制された。

7. 9 系統のマウスで、Sarcoma 180 細胞の固型癌を用いて、TFT-310 を投与して得られた血清の腫瘍壊死効果を検討したところ、BALB/c, C57BL/6, C3H, ICR 系マウスにおいて腫瘍壊死が認められた。

8. Sarcoma 180 細胞, Meth A 細胞, Ehrlich 腹水癌細胞の固型癌を用いて、eliciting agent として TFT-310 を投与して得られた血清の腫瘍壊死効果を検討したところ、Sarcoma 180 細胞, Meth A 細胞に対しては、腫瘍壊死効果が著明であったが、Ehrlich 腹水癌細胞に対しては、不明瞭であった。

すなわち、TFT-310 の本態は、LPS に近似する物質、あるいは lipid A 分画を有する物質であろうと考察した。

稿を終わるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師玉井健三教授に深甚なる謝意を捧げます。また種々の御協力をいただいた教室員各位に、謝意を表します。

本論文の要旨は、第 14 回、第 15 回嫌気性菌感染症研究会 (1984 年、1985 年、東京) および第 39 回日本口腔科学会総会 (1985 年、仙台) において発表した。

文 献

1) 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., U.S.A., 72, 3666-3670 (1975).

2) Helson, L., Green, S., Carswell, E. A. & Old, L. J.: Effect of tumour necrosis factor on cultured human melanoma cells. Nature, 258, 731-732 (1975).

3) Ruff, M. R. & Gifford, G. E.: Rabbit tumor necrosis factor: Mechanism of action. Infect. Immun., 31, 380-385 (1981).

4) Old, L. J.: Tumor necrosis factor. Clin. Bull., 6, 118-120 (1976).

5) Matthews, N. & Watkins, J. F.: Tumor necrosis factor from the rabbit. I. Mode of action, specificity and physicochemical properties. Br. J. Cancer, 38, 302-309 (1978).

6) Ostrove, J. M. & Gifford, G. E.: Stimulation of RNA synthesis in L-929 cells by rabbit tumor necrosis factor. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 160, 354-358 (1979).

7) Oettgen, H. E., Carsell, 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).

8) Gifford, G. E., Ostrove, J. & Ruff, M. R.: Effects of rabbit tumor necrosis factor (TNF) on cells. In: de Weck (eds), Biochemical characterization of lymphokines. Academic Press, New York, 307-313 (1980).

9) Ruff, M. R. & Gifford, G. E.: Purification and physicochemical characterization of rabbit tumor necrosis factor. J. Immunol., 125, 1671-1677 (1980).

10) Haranaka, K. & Satomi, N.: Cytotoxic activity of tumor necrosis factor (TNF) on human cancer cells *in vitro*. Japan. J. Exp. Med., 51, 191-194 (1981).

11) Old, L. J.: Cancer immunology: the search for specificity—G. H. A. Clowes memorial lecture. Cancer Res., 41, 361-375 (1981).

12) Haranaka, K., Satomi, N., Sakurai, A., Kunii, O., Old, L. J., Richards, E. & Williamson, B.: Production, purification and biological activity of tumor necrosis factor (TNF). Pro. Jan. Cancer Assoc., 41st Annual Meeting, p.124 (1982).

13) Ruff, M. R. & Gifford, G. E.: Tumor necro-

- sis factor, In: Pick, E. (ed), Lymphokines. Academic Press, New York, 2, 235-272 (1981).
- 14) 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).
- 15) Kull, F. C. Jr. & Cuatrecasas, P.: Possible requirement of internalization in the mechanism of *in vitro* cytotoxicity in tumor necrosis serum. *Cancer Res.*, **41**, 4885-4890 (1981).
- 16) Kiger, N., Khalil, A. & Methé, G.: Tumor necrotizing serum production by administration of fibrosarcoma in mice. *Recent Result in Cancer Reserch*, **75**, 220-225 (1980).
- 17) Matsuura, M., Kojima, Y., Homma, Y., Kubota, Y., Yamamoto, A., Kiso, M. & Hasegawa, A.: Biological activities of chemically synthesized analogues of the nonreducing sugar moiety of lipid A. *FEBS letters*, **167**, 226-230 (1984).
- 18) 漆崎一郎: TNF. *Medical Immunology*, **10**, 779-785 (1985).
- 19) 原中勝征: TNF, 腫瘍壊死因子. 1頁, 日本医事新報社, 東京. 1984.
- 20) 漆崎一郎・渡辺直樹・新津洋司朗: 腫瘍壊死因子 (TNF), *日本薬剤師会雑誌*, **36**, 487-495 (1984).
- 21) Green, S., Dobrjansky, A., Chiasson, M. A., Carswell, E., Schwartz, M. K. & Old, L. J.: *Corynebacterium parvum* as the priming agent in the production of tumor necrosis factor in the mouse. *J. Natl. Cancer Inst.*, **59**, 1519-1522 (1977).
- 22) Helson, L., Helson, C. & Green, S.: Effects of murine tumor necrosis factor on heterotransplanted human tumors. *Expl. Cell Biol.*, **47**, 53-60 (1979).
- 23) Haranaka, K., Satomi, N. & Sakurai, A.: Antitumor activity of murine tumor necrosis factor (TNF) against transplanted murine tumors and heterotransplanted human tumors in nude mice. *Int. J. Cancer*, **34**, 263-267 (1984).
- 24) Green, S., Dobrjansky, A. & Chiasson, M. A.: Murine tumor necrosis-inducing factor: Purification and effects on myelomonocytic leukemia cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **68**, 997-1003 (1982).
- 25) Matthews, N.: Tumor necrosis factor from the rabbit. II. Production by monocytes. *Br. J. Cancer*, **33**, 310-315 (1978).
- 26) Männel, D. N., Moore, R. N. & Mergenhagen, S. E.: Macrophages as a source of tumoricidal activity (Tumor-necrotizing factor). *Infect. Immun.*, **30**, 523-530 (1980).
- 27) Satomi, N., Haranaka, K. & Kunii, O.: Research on the production site of tumor necrosis factor (TNF). *Japan. J. Exp. Med.*, **51**, 317-322 (1981).
- 28) Tamai, K., Nakao, J., Takematsu, K. & Nakagawa, K.: Studies on the antitumor activity of *Fusobacterium nucleatum* strain KO-31. *Microbiol. Immunol.*, **26**, 163-165 (1982).
- 29) Tamai, K., Nakao, J., Nakagawa, K., Watanabe, K., Sakashita, H., Nishiwaki, Y. & Nakashin, Y.: Antitumor activity in the culture supernatant fluid of *Fusobacterium nucleatum* strain KO-31. *Japan. J. Exp. Med.*, **53**, 251-256 (1983).
- 30) 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).
- 31) 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).
- 32) 金沢 泉: 臨床検査法提要 (金井正光編), 第29版, 234-235頁, 金原出版株式会社, 東京. 1983.
- 33) 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. *口科誌*, **19**, 495-504 (1970).
- 34) Catanzaro, P. J., Schwartz, H. J. & Graham, R. C.: Spectrum and possible mechanism of carrageenan cytotoxicity. *Am. J. Pathol.*, **64**, 387-400 (1971).
- 35) Sakemi, T., Kuroiwa, A. & Nomoto, K.: Effect of Carrageenan on the induction of cell-mediated cytotoxic responses *in vivo*. *Immunology*, **41**, 297-302 (1980).
- 36) Busch, W.: Verhandlungen arztlicher Gesellschaft. Berlin. *Klin. Wochensch.*, **5**, 137-138 (1868).
- 37) Coley, W. B.: Contribution to the knowledge of Sarcoma. *Ann. Surg.*, **14**, 199-220 (1891).
- 38) 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).
- 39) 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).
- 40) 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).
- 41) Okamoto, H., Shoin, S., Minami, M., Koshimura, S. & Shimizu, R. : Experimental anti-cancer studies part XXX. Factors influencing the streptolysin S-forming ability of Streptococci having anticancer activity. *Japan. J. Exp. Med.*, **36**, 161-174 (1966).
- 42) Reinhard, E. H., Good, J. T. & Martin, E. : Chemotherapy of malignant neoplastic diseases. *J. Am. Med. Assoc.*, **142**, 383-390 (1950).
- 43) Mathé, G., Schwarzenberg, L., Amiel, J. L., Sohneider, 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 cures de huit composés chimiothérapeutiques. *Sem. Hôp. Paris*, **42**, 2960-2965 (1966).
- 44) Old, L. J., Clark, D. A., Benacerraf, B. & Goldsmith, M. : The reticuloendothelial system and the neoplastic process. *An. N. Y. Acad. Sci.*, **88**, 264-280 (1968).
- 45) Woodruff, M. F. A., Ghaffar, A., Dunber, N. & Whitehead, V. L. : Effect of *C. parvum* on immunization with irradiated tumor cells. *Br. J. Cancer*, **33**, 491-495 (1976).
- 46) Tuttle, R. L. & North, R. J. : Mechanisms 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).
- 47) Halpern, B., Crepin, Y. & Rabourdin, A. : An analysis of the increase in host resistance to isogenic tumor invasion in mice by treatment with *Corynebacterium parvum*. In: Halpern, B. (ed.), *Corynebacterium parvum*. Plenum Press, New York, 191-199 (1974).
- 48) Bomford, R. & Olivetto, 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).
- 49) Scott, M. T. : *Corynebacterium parvum* as a therapeutic antitumor agent in mice: I. Systemic effects from intravenous injection. *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**, 855-860 (1974).
- 50) Scott, M. T. : *Corynebacterium parvum* as a therapeutic antitumor agent in mice. II. Local injection. *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**, 861-865 (1974).
- 51) 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).
- 52) 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).
- 53) Thiele, E. H., Arison, R. N. & Boxer, G. E. : Oncolysis by Clostridia. III. Effect of Clostridia and chemotherapeutic agents on rodent tumors. *Cancer Res.*, **24**, 222-233 (1964).
- 54) 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 : 骨髓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).
- 55) 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).
- 56) 原田達司・峠 哲哉・妹尾紀具・服部孝雄 : 嫌気性コリネ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。医学の歩み, **98**, 658-660 (1976).
- 57) Matsunaga, T., Miyamoto, K. & Koshiura, R. : Cytotoxic effect of the culture supernatant of *Clostridium tetani*. *Chem. Pharm. Bull.*, **30**, 702-707 (1982).
- 58) 中村憲治・三輪恕昭・橋本 修・井上 徹・折田薫三 : *Corynebacterium parvum* の MH-134 腫瘍に対する抗腫瘍効果。癌と化学療法, **9**, 1046-1051 (1982).
- 59) Schwartzman, G. & Michailovsky, N. : Phenomenon of local skin reactivity to bacterial filtrates in the treatment of mouse sarcoma 180. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **29**, 737-741 (1932).
- 60) Suter, E., Ullman, G. E. & Hoffman, R. G. : Sensitivity of mice to endotoxin after vaccination with BCG (Bacillus Calmette-Guérin). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **99**, 167-169 (1958).

Experimental Studies on the Effect of *Fusobacterium Nucleatum* KO-31 preparation (TFT-310) on the Production of Tumor Necrosis Factor Eisuke Fujimoto, Department of Dento-Oral Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 – J. Juzen Med. Soc., **95**, 191–203 (1986)

Key words: anaerobes, *Fusobacterium nucleatum*, tumor necrosis factor (TNF)

Abstract

This study was pursued to investigate conditions for the production of tumor necrosis factor (TNF) in SD rats by using *Propionibacterium acnes* as the priming agent and TFT-310, an antitumor substance prepared from *Fusobacterium nucleatum* strain KO-31, as the eliciting agent: for the measurement of TNF activity in the serum, Sarcoma 180 tumor in ICR mice was used. TNF-eliciting activity of TFT-310 was compared with that of lipopolysaccharide (LPS). Both substances were equally effective as eliciting agent for release of TNF. TNF-priming activity of *Pr. acnes* was compared with that of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) by using TFT-310 as eliciting agent. Although both substances were effective as priming agent for release of TNF, *Pr. acnes* was more effective than BCG. The larger amount of TFT-310 was injected into SD rats, the severer was the hemorrhagic necrosis of tumor caused by injection of the serum from the SD rats into mice with tumor. When carrageenan was given prior to each treatment with *Pr. acnes* and TFT-310, the production of TNF was suppressed. These findings suggested that the substance in the serum of rats produced by the treatment with *Pr. acnes* and TFT-310 originated from macrophage. TNF-positive serum was as effective in causing hemorrhagic necrosis in solid type tumor of Meth A as Sarcoma 180. However, in Ehrlich ascites carcinoma, any significant effect was not observed. These results also suggested that eliciting effect of TFT-310 on TNF release was similar to that of LPS. It could be speculated, therefore, that TFT-310 might be a LPS-like substance, or contain a lipid A-like fragment.