Effect of Bacterial Extracts from Oral Bacteria, Particulary Lactobacillus casei 0123, on Cell Growth and Virus Multiplication

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/2297/7841

金沢大学十全医学会雑誌　第94巻　第6号　1155－1168（1985）

口腔内細菌特に *Lactobacillus casei* 0123 株抽出液の細胞増殖およびウイルス増殖への影響

金沢大学がん研究所ウイルス部（主任：波田野基一教授）
天　野　恵　夫

（昭和60年12月25日受付）

癌細胞障害活性によって選らばれた口腔内細菌，*Fusobacterium nucleatum* KO31-3B, *Lactobacillus casei* 0123, *Lactobacillus salivarius* LS 3菌株の菌体抽出液の細胞およびウイルス増殖におよぼす影響について検討した．これら3菌株をTamai-Fukuda培地（TF培地）で増殖させた後，超音波処理をしてから遠心分離し，その上清を粗抽出液とした．ヒト胎児小腸由来細胞（Int-407細胞）をこの粗抽出液（蛋白濃度200 μg/ml）で24時間処理した場合，処理細胞当りのEchovirus type 6 (Echo-6ウイルス）産生量は明らかに減少したが，細胞増殖は僅かな抑制を受けたにすぎなかった．このEcho-6ウイルス増殖抑制は，特に *Lactobacillus casei* 0123株の粗抽出液（粗抽出液LC）処理において著明に認められた．粗抽出液LCについては，さらに硫酸アンモニウム塩析と，Sephadex G-200によるカラムクロマトグラフィーで部分精製を行った．f_a（分子量200 K以上），f_b（分子量100 K），f_c（分子量20～40 K）と名付けたSephadex G-200の主要画分はSDS-PAGE分析によると，それぞれ異なる分子量のいくつかの蛋白の混合物であった．これらの各画分について細胞又はウイルス増殖抑制活性を測定した．Echo-6あるいはCox B-5ウイルス感染Int-407細胞系において，10－50 μg/mlのf_bあるいはf_c画分で2～24時間処理した細胞では，細胞当りのウイルス産生量が10～40%減少した．しかし，インターフェロン（IFN）産生誘発は見られず，このウイルス増殖抑制にはIFNの機構は関与していないと思われた．次にbaboon endogeneous virus (BaEV) 持続感染A204 (BaEV)細胞と，hepatitis B virus持続感染PLC/PRF/5細胞について，細胞およびウイルス増殖抑制効果を検討した．f_c画分処理A204 (BaEV) 細胞では，細胞増殖と細胞当りのBaEVの放出が明らかに抑制された．同様にf_b, f_c画分処理PLC/PRF/5細胞においても細胞増殖と，hepatitis B virus surface antigen (HBsAg), α-fetoprotein (AFP) 両者の産生に抑制効果が認められた．特にf_c画分では，低濃度でも細胞への持続的処理あるいは少数細胞コロニー形成でみると，強い抑制効果がみられた．以上の結果から，これらの口腔細菌構成分は，腫瘍細胞増殖と，ウイルス増殖あるいは放出への抑制効果を示すことが分った．

Key words *Lactobacillus*, bacterial extracts, cultured cells, virus multiplication, virus persistent infection

ウイルスの細胞内増殖を左右する因子として多くのものが知られている．その中で細胞に作用して細胞自身には副作用なく，ウイルス増殖に抑制的に働くものとしてinterferon (IFN)[1)2)]がある．一方，ウイルス自身に作用するものとしては，特異的抗体の他に，非特異的抑制物質，例えば血清中の非特異的抑制複合蛋白[3)]などがミクソウイルス，ピコルナウイルスなどいくつかのウイルスで知られている．その他に，或る種の蛋白又は核酸合成阻害剤[4)]は特定条件下で細胞毒性なく，ウイルスの増殖に抑制効果を示すこともあるが，

Abbreviations: AFP, α-fetoprotein; BaEV, baboon endogeneous virus; BSA, bovine serum albumin; CIR, cell injuring reaction; Cox B-5ウイルス, Coxsackie B virus type 5 Faulkner株; CPM, curie per minute; DBS, Dulbecco's buffered saline; Echo-6ウイルス, Echo-virus type 6 D'Amori株; EC-2 or -5, Eagle's minimum essential medium supplemented

化学療法剤・抗生物質として一般化されるには至っていない.

一方，微生物代謝産物又は抽出物の示す生物活性には医薬生物学的に有用なものが多く，抗生物質はいうまでもなく，諸種酵素及びその阻害物質，免疫捉進強化剤 (immunopotentiator 又は immunoadjuvant) などが実用化されている．これらの中で，ウイルスの細胞内増殖に抑制的に働くものとして，菌内毒素又は抽出物の IFN 誘発能[1)2)5)6)]が知られている．この誘発機作は，通常の inducer(合成二重鎖ヌクレオタイドやウイルスなど) によるものとは異なり，細胞内既存の IFN precursor が遊離されるもので，その誘発 IFN もウイルス誘発のものとやや異なる性状を示すとされている．これら IFN 誘発のからんだウイルス増殖抑制の外に，IFN 産生の関与しない干渉効果による抑制機構も異種ウイルス間の組合せで報告され，内在性干渉 (intrinsic interference)[1)2)] と呼ばれているが，その機構は分っていない．この事は生細胞に働いて IFN 産生がなくても，或る種のウイルスに感染した細胞を，異なるウイルスの増殖抑制に導く場合もあることを示している．

著者は，これまで口腔内分離嫌気性菌の産生する癌細胞傷害活性物質を cell injuring reaction (CIR)法[7)8)]で検索したきた．その中で，癌細胞に対して選択的傷害活性を有する 3 菌株のひとつである *Lactobacillus casei* 0123 株の抽出液は，2・3 のウイルスに対して増殖抑制を示すことを見い出した．乳酸桿菌のある株には，マウス接種癌細胞の増殖を抑制する immunoadjuvant 活性が既に知られている[9)]．そこで癌細胞への *in vitro* 直接作用による増殖抑制能，IFN 誘発能からのウイルス増殖抑制などの生物活性の検討を菌体粗抽出液及びその部分精製標品を用いて行なったので，その結果について述べる．

材料および方法

I．使用菌株

口腔内分離嫌気性菌株合計 148 株中 CIR assay で陽性を示した菌株から，がん細胞選択的傷害活性の比較的高くみられた 3 菌株 *Lactobacillus casei* 0123 株，*Lactobacillus salivarius* LS 株，*Fusobacterium nucleatum* KO31-3B 株を用いた．

II．培養方法

被検菌株は Rogosa 培地を改良した Tamai-Fukuda 培地 (TF 培地)[10)] を用いて semisynchronous culture[7)8)] を行った．既ち 20 ml (中試) にて 37°C で 24 時間培養した菌液 0.5 ml を 20 ml の TF 培地に植菌し 37°C, 12 時間培養した．同様の操作を 3 回行った後，最終培養の定常期の初期 (培養 20 時間) に菌体を集菌し DBS で 3 回遠心洗滌を行い菌体を得た．なお定常期初期における菌の発育量は，光電比色計 (ボシュロムスペクトロニックス，島津，東京) で OD 560 mμ 値が約 1.2 であった．

III．菌体抽出液の調整とその部分精製

1．粗抽出液の調整

5,000 xg, 15 分，遠心して集菌した菌体を，OD が 10.0 になるように DBS[7)8)] で再浮遊した．菌体浮遊液 5 ml を Branson's sonifier (U.S.A) を用い 4 °C, 40 w, 5 分の超音波処理を行った．破砕菌液を 6,000 xg, 20 分遠心後，その上清をさらにミリポアフィルター (0.45 μ, Millipore Co.) で濾過したものを粗抽出液とし Lowry らの方法[11)] で蛋白濃度を測定した．*L. casei* 0123, *L. salivarius* LS, *F. nucleatum* KO31-3B の粗抽出液を各々粗抽出液 LC, LS, KO31-3B とした．

2．粗抽出液の部分精製 (f_a, f_b, f_c 画分の調整)

粗抽出液の中，LC はさらに硫酸アンモニウム (硫安) を 50% 飽和になる様に加え，4 °C, 一晩放置後 6,000 xg, 20 分遠心して沈渣を集めた．この沈渣を硫安塩析時と同量の DBS に再浮遊し，DBS に対して 4 °C, 96 時間透析した．この蛋白液 (4.7～20 mg/ml) の 2～5 ml を Sephadex G-200 (ファルマシア社，スウェーデン) でカラムクロマトグラフィーを行った．Sephadex は 17×860mm のカラムで，一画分は 100 drops (約 2.0 ml) とし 4 ml/ 5 分で約 70 画分を集めた．同一カラムを用い，同一条件下で正常ヒト血清分画を行い，各画分の分子量を推定した．

3．SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

各画分の分子量を知るために，bovine serum albumin (BSA), ovoalbumun (Ov) をマーカーとして SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を常法[12)] に従い行った．蛋白染色はクマシブリリアントブルーR-250 (CBB) を用いた．

IV．使用培養細胞とウイルス及び関連活性物質の測定

1．使用継代株化細胞と培養法

Int-407[13)14)] (ヒト胎児小腸由来細胞)，eL 細胞[14)] (ヒ

with 2% or 5% calf serum ; HBV, hepatitis B virus ; HBsAg, hepatitis B virus surface antigen ; IFN, interferon ; KO31-3B, *Fusobacterium nucleatum* KO31-3B ; LC, *Lactobacillus casei* ; LS, *Lactobacillus salivarius* ; OD, optical density ; Ov, ovoalbumin ; PFU, plaque

ト胎児肺由来細胞)，FL細胞[15]（ヒト羊膜由来細胞)，持続感染細胞としてA204 (BaEV) およびPLC/PRF/5細胞を使用した．A204(BaEV)[16][17] 細胞はヒト横紋筋肉腫由来細胞株（A204）にヒヒ内在性ウイルス(baboon endogeneous virus, BaEV）を持続感染させた細胞であり，PLC/PRF/5 (PLC) 細胞はHBs抗原（hepatitis B virus surface antigen, HBsAg）及びα-フェトプロテイン（α-fetoprotein, AFP）産生肝がん由来細胞である．

これら各細胞は5および10%仔牛血清加Eagle's minimum essential mediun (MEM) (EC-5, −10) で培養を行い，継代培養には通常の0.02% ethylenediamine tetraacetate (EDTA) (Difco, U.S.A.) と0.25% trypsin (Difco, U.S.A.) を使用する方法に依った．細胞数計算は，白血球計算盤上での鏡検により計数し，使用稀釈倍数から原細胞総数を算定した．

2．使用ウイルスとその感染力価測定

Echovirus type 6, D'Amori株（Echo-6ウイルス）はInt-407又はeL細胞で増殖させ，FL細胞でのplaque assay, Coxsackie B virus type 5, Faulkner株（Cox B-5 ウイルス）はInt-407細胞で増殖させ，eL細胞でのplaque assay, Vesicular stomatitis virus (VSV) New Jersey株はFL細胞で増殖させ，FL細胞でのplaque assayを各々行った．そしてそれら各々のplaque assayは各ウイルスに常用される方法に従い，その感染力価はplaque forming unit (PFU) で表わした．

3．ウイルス関連活性物質の測定

1）逆転写酵素（reverse transcriptase, RT）assay

既報[17][21][22]に従い，酸不溶性画分へ取り込まれた^{3}H-TMP (thymidine monophoshate) の放射活性（cpm）を細胞当りに換算して表わした．このRT活性測定はBaEV産生の定量と見なされといる[17][23]．

2）HBsAgおよびAFPの測定

HBsAg産生は持続感染HBVゲノムの発現として，radioimmunoassay (RIA), 逆受身赤血球凝集法[20]〔reverse passive hemagglutination (RPHA)〕で測定した．RIAにはAUSRIAキット（ダイナポット社，東京）を，RPHAには市販キット（富士臓器，東京）を使用し，RIA値は相対的カットオフ値で，RPHAは稀釈倍数で表わした．AFP産生は，PLC細胞の肝細胞特異ゲノムの発現としてRIA法で，同じく市販キット（栄研化学社，東京）を用い測定し，ng/mlで表現した．

V．各抽出液又は画分によるる培養細胞処理法

各抽出液又は画分を，蛋白濃度が1.0〜200.0 μg/mlになるようにして，各細胞培養に加え37°C，2〜24時間培養細胞に作用させた．その後，細胞を洗い，それぞれのウイルスの感染を行った後37°Cで培養を行った．経時的に細胞内又は外のウイルス量を測定した．細胞内ウイルス量は，感染細胞をBranson's sonifierで4°C, 30 w, 1分処理したものから定量し，細胞外ウイルス量は，培養液中に放出されたものを定量した．ウイルス持続感染細胞の場合には処理（作用）後培養を行い，培養液中に出現するウイルス又はウイルスゲノム発現産物を経時的に測定した．前項の1），2），の定量又は測定した量は，各測定時の細胞数当りの値として表現した．同時に細胞総数も計測して細胞増殖への影響をみた．特に処理細胞のコロニー形成能を比較した．即ち，200〜400細胞/3.5 cm径シャーレを2〜3枚つくり，37°C，5 %CO_2，24時間培養後洗滌を行い，抽出液・画分含有培養液を添加して培養を続けた．7日以上培養した後，0.1%クリスタル紫で染色，鏡検を行い，少なくとも細胞数8個以上からなる集落を計算した．

VI．推計学的検索

Studentのtテストを行い危険率5%以下を有意とした．

成　　績

I．粗抽出液の生物活性

1．Int-407細胞増殖への影響

粗抽出液KO31-3B, LC, LSをconfluentおよびsubconfluentな状態のInt-407細胞に作用させて，その細胞増殖がどのように変化をうけるかを検討した．表1のExp.1に示したように，contact inhibitionを示しているconfluentな状態の細胞では，処理作用後24時間では粗抽出液LCにより20%，48時間ではいずれの粗抽出液によっても増殖阻害が認められ，その程度は32〜48%であった．またExp.2のsubconfluentで増殖期にある状態の細胞ではその傾向が更に著しく，特に48時間後では55〜68%の増殖阻害が認められた（$P<0.05$で有意)．

2．粗抽出液処理Int-407細胞におけるEcho-6ウイルスの増殖

---

forming unit; PLC, PLC/PRF/5; RIA, radioimmunoassay; RPHA, reverse passive hemagglutination; RT, reverse transcriptase; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; VSV, vesicular stomatitis virus.

次に処理後48時間では前述のような細胞増殖阻害をうけたが，その程度がより軽い処理後24時間のInt-407細胞におけるEcho-6ウイルスの増殖を検討した（表2）．Echo-6ウイルスが吸着して感染が成立し，ウイルスが増殖可能な細胞数は，処理による細胞増殖の程度で大きく左右されるので，増殖Echo-6ウイルスの力価はPFU/cellで表現，比較することとした．

表2に示したように，粗抽出液処理によるEcho-6ウイルス増殖の抑制は，粗抽出液LCによる処理で特に顕著に認められ，処理後12時間では細胞外ウイルスで82%，細胞内ウイルスでは45%の増殖阻害がみられた（何れも$P<0.05$で有意）．粗抽出液KO31-3B, LS

Table 1. Effect of treatment of Int-407 cells with crude extract KO31-3B, LC or LS on their growth

Experiment	Treatment	Number of cells ($\times 10^4$) per bottle after incubation period of	
		24 hr	48 hr
Exp. 1	None (control)	521 (100*)	596 (100)
	KO31-3B	nt**	390 (65)
	LC	421 (80)	518 (68)
	LS	nt	310 (52)
Exp. 2	None (control)	298 (100)	543 (100)
	KO31-3B	174 (58)	215 (39)
	LC	261 (87)	248 (45)
	LS	272 (91)	176 (32)

Monolayer of Int-407 cells in culture bottle (5 ml) showing confluent growth (Exp. 1) or subconfluent growth (Exp. 2) was treated with 200 μg/ml of crude extracts in Eagle's MEM containing 2% calf serum (EC-2 medium) for 24 hr at 37°C.
*Numbers in parentheses are percentages of numbers of cells growing after treatment to that after non-treatment.
**Not tested.

Table 2. Comparative multiplication of Echo-6 virus in Int-407 cells treated with crude extract KO31-3B, LC or LS

Virus sample	Treatment	Infectious titer of Echo-6 virus (PFU/cell) after incubation period of		
		8 hr	12 hr	24 hr
Extra-cellular virus	None (control)	1.00 (100*)	6.5 (100)	40.0 (100)
	KO31-3B	0.07 (7)	3.0 (44)	60.0 (150)
	LC	0.04 (4)	1.2 (18)	24.0 (60)
	LS	0.04 (4)	1.5 (23)	25.0 (62)
Intra-cellular virus	None (control)	9.0 (100)	11.0 (100)	70.0 (100)
	KO31-3B	3.5 (39)	9.0 (88)	65.0 (92)
	LC	2.5 (27)	6.0 (55)	19.8 (28)
	LS	7.0 (77)	8.0 (77)	67.2 (96)

Confluent Int-407 cells in culture bottle (5 ml) were treated with 200 μg/ml of crude extracts in EC-2 medium for 24 hr at 37°C. The treated cells were washed once with Hanks' balanced salt solution and then infected with Echo-6 virus at multiplicity of infection (m.o.i.) of 1.0. After one hour adsorption of viruses, 5 ml of EC-2 medium was added to the cells. Extra-cellular viruses released into the medium and intra-cellular viruses extracted from the infected cells by a sonication using Branson's sonifier for 2 min at 40 W were examined by plaque assay at 8, 12 and 24 hr after infection. In the similarly treated cells without the virus infection, total cell number in the bottle was counted and infectious titer (PFU/cell) was calculated.
* Numbers in parentheses are percentages of infectious titers in treated cells to that in non-treated cells.

による処理でも，感染後12時間までは細胞外放出ウイルス量において増殖抑制が観察されたが，細胞内蓄積ウイルス量では，その抑制程度は12，23%と軽度であった．さらに感染後24時間（処理後48時間）では，粗抽出液LC処理が特に細胞内ウイルス量に強い影響を与えていた．なおこの実験で各粗抽出液処理後のInt-407細胞へのEcho-6ウイルス吸着の変化は見られず，前述の増殖抑制が抽出液処理後の細胞へのウイルス吸着阻害によるものではないことは確めてある．

II．LCの硫安塩析およびSephadex G-200画分（f_a, f_b, f_c）の生物活性

前述の結果より，使用粗抽出液KO31-3B, LC, LSはInt-407細胞の増殖を抑制し，かつInt-407細胞におけるEcho-6ウイルスの増殖を抑制することが分った．中でも粗抽出液LCは，細胞増殖抑制が比較的軽度であるにも拘らず，Echo-6ウイルス増殖抑制が他の2粗抽出液より高度に認められた．そこでこの粗抽出液LCをさらに部分精製して，その生物活性の測定を他の細胞－ウイルス系も含めて行った．

部分精製の第一歩として得られた硫安沈澱蛋白溶液（50%飽和）は，Int-407細胞－Echo-6ウイルス系で，もとの粗抽出液のもつ細胞増殖抑制，ウイルス増殖抑制活性を同程度もっていた(data略)．そこでこの沈澱蛋白についてSephadex G-200カラムクロマトグラフィーを行った結果，3主要蛋白画分が得られた（図1）．画分21～23，27～29，64～66に溶出した画分を各々f_a, f_b, f_c画分とし以下の実験に供した．f_a, f_b, f_c画分の分子量を，マーカとして用いた正常ヒト血清の溶出画分から，各々＞200K, 約100 K, 約20～40 Kと推定した．なおこれらの3画分は，SDS-PAGEを行った結果，必らずしも単一ではなく，異なる分子量の蛋白の混合であった（図2）．

1．f_a, f_b, f_c 画分処理Int-407細胞におけるEcho-6ウイルスの増殖

粗抽出液LCのf_a, f_b, f_c 各画分処理Int-407細胞でのEcho-6ウイルス増殖度を比較した（表3）．この場合，粗抽出液による実験（表1及び2）の使用濃度の1/4，すなわち50 μg/ml処理でもf_b画分処理で7～48%，f_c画分処理で13～33%のEcho-6ウイルスの増殖抑制が見い出された．表2の粗抽出液処理の実験と同じく，細胞内蓄積ウイルス量への抑制効果の方がやゝ高度に認められた．しかしf_a画分処理では抑制効果よりもむしろ，約10～50%の促進効果が細胞内及び外両ウイルス増殖で見られた．

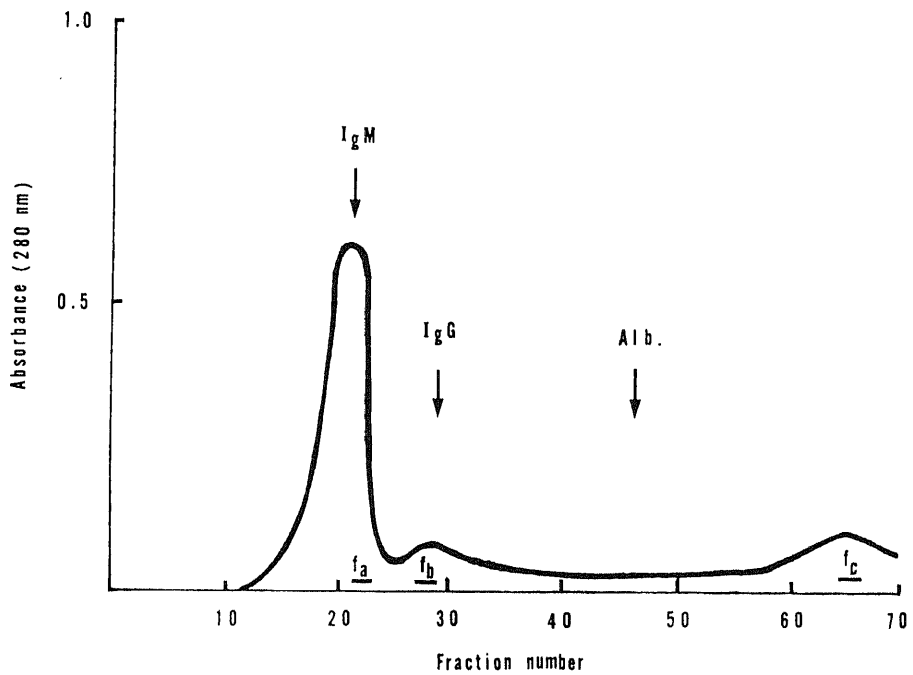

Fig. 1. Gel filtration of $(NH_4)_2SO_4$-precipitated protein from extract LC on a Sephadex G-200 column (17×860 mm)with 0.1M phosphate buffered saline, pH 7.2 as the eluent. The 2.0ml of sample (40mg protein) was applied to the column. One fraction was collected in 2ml. Human-IgM, −IgG and −albumin were used as the marker substances.

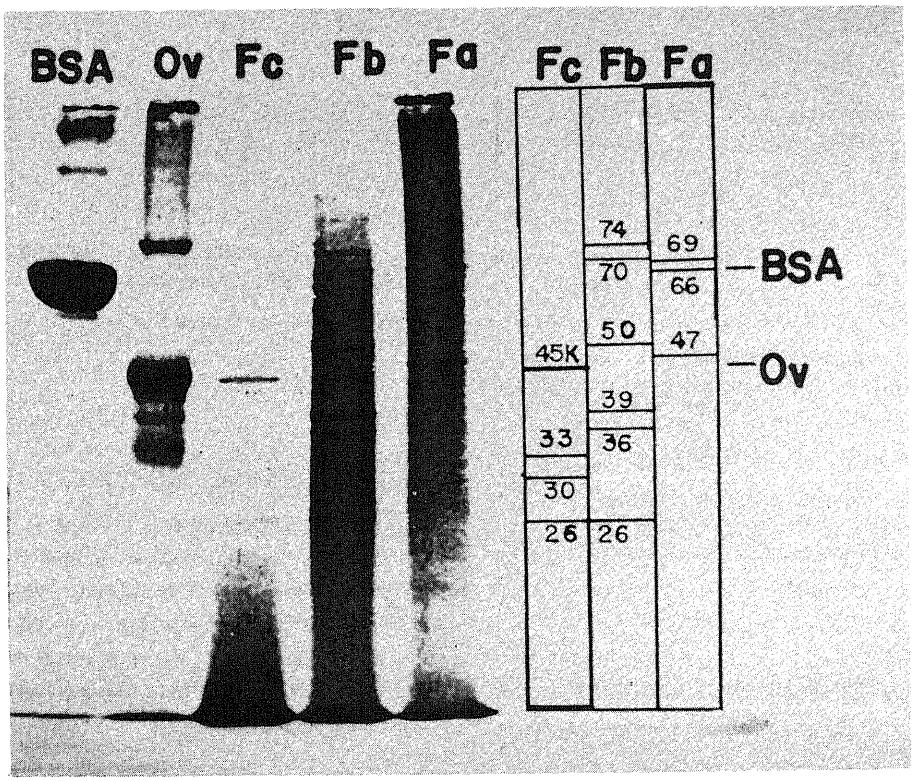

Fig. 2. Analysis of f_a, f_b and f_c fractinos from extract LC on SDS-PAGE. Bovine serum albumin (BSA) and ovoalbumin (Ov) were used as the marker substance. Approximately 20 μg protein of fractions was applied in this analysis. The left 5 lanes of photograph were SDS-PAGE pattern and 3 lanes illustrated in the right half show estimated molecular weight of f_a, f_b and f_c.

Table 3. Comparative multiplication of Echo-6 virus in Int-407 cells treated with f_a, f_b or f_c fration of crude extract LC

Virus sample	Treatment	Infectious titer of Echo-6 virus (PFU/cell) after incubation period of		
		6 hr	8 hr	24 hr
Extra-cellular virus	None (control)	0.08 (100*)	21.3 (100)	23.1 (100)
	f_a fraction	0.09 (113)	26.1 (122)	32.8 (141)
	f_b fraction	0.05 (63)	18.7 (88)	21.5 (93)
	f_c fraction	nt**	nt	20.2 (87)
Intra-cellular virus	None (control)	17.6 (100)	19.3 (100)	21.1 (100)
	f_a fraction	19.9 (113)	29.9 (153)	28.7 (136)
	f_b fraction	10.2 (62)	16.5 (85)	10.9 (52)
	f_c fraction	nt	nt	14.2 (67)

Except the treatment of Int-407 cells with 50 μg/ml of f_a, f_b or f_c fraction the experimental procedures of Echo-6 virus infection were the same same as described in footnote of table 2.
* Numbers in parentheses are percentages of infectious titers in treated cells to that in non-treated cells.
**Not tested.

2．f_a, f_b, f_c 画分処理 Int-407 細胞における Cox B-5 ウイルスの増殖

本実験では，これまでの表2と3におけるようなウイルス産生量の比較ではなく，各画分処理 Int-407 細胞上における少量ウイルスの plaque 形成能を比較した．しかも，処理濃度もより少ない 10 μg/ml, 処理時間も2，12時間という短時間で行った（表4）．

その結果，このような短時間，低濃度処理でも約10%の plaque 形成抑制が各3画分処理で見られたが，plaque の大きさ，形態等に変化はなかった．表3の実験でみられた f_a 画分処理による増殖促進効果は，Int-407 細胞－Cox B-5 ウイルス系では認られなかった．

この表4の実験と同様の方法で FL 細胞を処理後，VSV の plaque assay を行ったが，形成 plaque 数，形態，大きさ等に各3画分処理による影響はなかった（data 略）．

3．f_a, f_b, f_c 画分の持続感染細胞への影響

Table 4. Plaque forming ability of Coxsackie B virus in Int-407 cells treated with f_a, f_b or f_c fraction

Treatment	Time for treatment (hr)	Number of plaques formed				
		Value for each experiment				Mean±S.E.M.*
None (control)	2	182,	169,	163,	162	169±4.6 (100**)
f_a fraction	2	158,	155,	152,	150	153±1.8 (91)
f_b fraction	2	138,	167,	147,	143	148±6.4 (88)
f_c fraction	2	149,	158,	142,	148	149±3.3 (89)
None (control)	12	141,	157,	159,	143	150±4.7 (100)
f_a fraction	12	142,	143,	119,	132	134±5.6 (89)
f_b fraction	12	140,	146,	139,	106	132±5.2 (88)
f_c fraction	12	138,	134,	142,	119	133±5.0 (89)

Confluent Int-407 cells in Petri dish (3.5 cm in diameter) were treated with 10 μg/ml of fractions for 2 and 12 hr at 37°C. The treated cells were washed once with Hanks' balanced solution and then infected with appropriately diluted Coxsackie B-5 virus. After one hour adsorption of viruses, the cells were overlayed by agar according to the method usually employed in plaque assay.
* Standard error of mean.
**Numbers in parentheses are percentages of mean values of plaque formed in treated cells to that in non-treated cells.

Table 5. Effect of treatment of A204(BaEV) cells with f_a, f_b or f_c fraction on their growth and the production of reverse transcriptase into culture fluid

Treatment	Number of cells ($\times 10^4$) per Petri dish after incubation period of			Activity of reverse transcriptase ($\times 10^2$ cpm/10^6 cells) after incubation period of		
	24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr
None (control)	230 (100*)	356 (100)	474 (100)	34 (100)	39 (100)	39 (100)
f_a fraction	252 (109)	368 (103)	528 (111)	38 (111)	41 (105)	26 (66)
f_b fraction	169 (73)	225 (63)	294 (62)	37 (108)	23 (58)	26 (66)
f_c fraction	267 (116)	332 (93)	428 (90)	35 (102)	20 (51)	37 (94)

One million A204(BaEV) cells were seeded into Petri dish (3.5 cm in diameter) and 24 hr later the cells were treated with 10 μg/ml of each fraction in Eagle's MEM containing 10% calf serum (EC-10 medium) for 12 hr at 37°C. The treated cells were washed once with Hanks' balanced salt solution and refed with fresh EC-10 medium. Culture media were changed every 24 hr during incubation period. After 24, 48 and 72 hr of incubation period culture media were harvested and assayed for the activity of reverse transcriptase. The treated cells after removal of culture media were submitted to counting of total cells per dish.
* Numbers in parentheses are percentages of values in treated cells to those in non-treated cells.

次に，処理細胞へウイルスを感染させる前述の実験方法とは異なり，既にウイルスの持続感染が成立している細胞へ，各画分を作用（処理）させた．そこでの持続感染細胞自身の増殖への影響が同時に細胞よりの持続感染ウイルスの放出，または関連活性物質産生に変化を与えるかを検討した．

1）．f_a，f_b，f_c 画分の A204(BaEV) 細胞増殖及び BaEV 放出への影響

細胞増殖への影響をみると，f_b 画分処理が 27～38% 抑制，f_c 画分では 7～10%抑制と，その程度は軽微であった(表 5)．しかし f_a 画分処理に僅かながら，むしろ増殖促進傾向が見られた．これら増殖への影響とほ

Table 6. Effect of treatment of PLC/PRF/5 cells with f_a, f_b or f_c fraction on their growth, the production of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and α-fetoprotein

Treatment	Number of cells ($+10^4$) per Petri dish after incubation period of				Amount of AFP (10^2 ng/10^6 cells) after incubation period of				Titer* of HBsAg after incubation pereod of			
	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr	48 hr	72 hr	96 hr	120 hr
None (control	73(100*)	115(100)	181(100)	205(100)	13.2(100)	20.6(100)	12.3(100)	17.4(100)	1:88	1:8	1:8	1:32
f_a fraction	71(97)	113(98)	184(101)	206(100)	14.0(106)	24.3(117)	14.3(116)	32.2(185)	1:8	1:8	1:8	1:32
f_b fraction	75(102)	108(93)	162(86)	196(95)	13.5(102)	20.5(99)	16.1(130)	25.7(147)	1:8	1:8	1:8	1:16
f_c fraction	77(105)	104(90)	162(89)	181(88)	11.0(83)	18.6(90)	10.3(83)	17.0(97)	1:4	1:8	1:4	1:8

Five hundred thousand PLC/PRF/5 cells were seeded into culture bottle (5 ml) and 24 hr later the cells were treated with 10 μg/ml of each fraction in Eagle's MEM containing 5% calf serum (EC-5 medium) for 12 hr. Culture media were changed every 24 hr during incubation period. After 48, 72, 96 and 120 hr culture media were harvested and assayed for HBsAg and AFP production. The treated cells after removal of culture media were submitted to counting of total cells per bottle.

* Numbers in parentheses are percentages of values in treated cells to those in non-treated cells.

Table 7. Colony forming ability of four kinds of cloned PLC/PRF/5 cells, H-4, H-9, L-7 and L-10 in the presence of f_c fraction

Experiment	Cloned cells	Amount of f_c (μg/ml) used for treatment of cells	Number of colonies: Value for each experiment				Plating efficiency**
Exp. 1	H-4*	0	241,	286,	194	240 (100*)	0.601
		10	153,	178,	146	157 (65)	0.393
		50	204,	95,	122	140 (58)	0.351
	L-10	0	238,	248,	200	228 (100)	0.572
		10	149,	167,	129	148 (64)	0.370
		50	122,	115,	132	123 (53)	0.308
Exp. 2	H-9	0		93,	154	124 (100)	0.620
		10		65,	38	52 (41)	0.260
		50		41,	52	47 (37)	0.235
	L-7	0		102,	141	1 2(100)	0.610
		10		72,	57	65 (53)	0.325
		50		54,	43	49 (40)	0.245

Four hundred (Exp. 1) or 200 (Exp. 2) cloned cells were seeded into Petri dish (3.5 cm in diameter). Twenty-four hours later the cells were freshly fed with growth medium (EC-5 medium) containing 0, 10 or 50μg/ml of f_c fraction and maintained for 7 days at 37°C. Formed colonies of the cells were counted microscopically after staining of the colonies by 1% crystalviolet solution.

* H-4, L-10, H-9, L-7 cells, see reference[20].

** Relative ratio of the number of colonies formed to that of cells inoculated initially.

ぼ比例して，時に多少のくい違いはあるものの，BaEV放出を反映するRT活性の低下(34～49%，$P<0.10$で有意）または僅かな上昇が認められた．

2）f_a，f_b，f_c画分のPLC/PRF/5細胞増殖及びHBsAgとAFP産生への影響

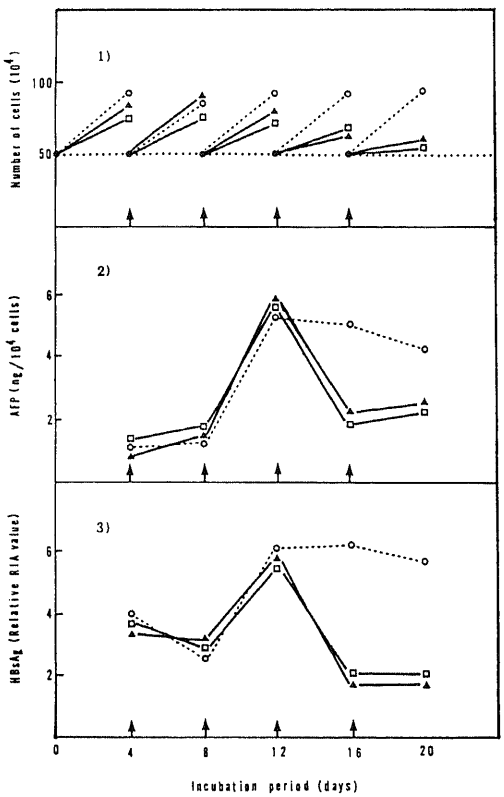

Fig. 3. Effect of persistent treatment of PLC/PRF/5 cells with low concentration of f_c fraction on cell growth and production of HBsAg and AFP. Five hundred thousand PLC cells/bottle were cultured for 4 days at 37 °C in the abscence (○……○), presence of 1 (△——△) or 5 (□——□) μg/ml of f_c fraction. Every 4 days the respectively treated cells adjusted to 5×10^5 cells/bottle were passaged with refreshed growth medium (EC-5 medium) containing the same concentration of f_c fraction. These passages were repeated 4 times (4, 8, 12 and 16 days, respectively). The culture media harvested at every passage were assayed for HBsAg and AFP contents. The cells remained after the removal of media were submitted to counting of cell numbers/bottle.
1) Cell growth. 2) AFP. 3) HBsAg.

次にHBVが持続感染しているPLC細胞への影響をみた．

i．12時間処理による影響

表6に示すように，f_bとf_c画分処理で約10%の細胞増殖抑制を認めたが，顕著な効果とは言い難かった．ただ，このように処理後48～120時間の間，24時間毎に培養液を交換して得られた培養上清へ放出されたHBVゲノム発現産物であるHBsAg量は，f_c画分処理で48及び96時間後では1/2へ低下し，殊に120時間後の1/4への低下は有意と思われた．しかしf_c及びf_b画分処理の影響はほとんどないと言えよう．

PLC細胞の肝細胞ゲノム発現産物であるAFP産生はf_c画分処理で3～17%と軽微な低下をみた．しかしながら，f_a，f_c画分処理は全く影響なく，時に産生促進と思われる場合もあった．

ii．f_c画分持続的処理による影響

前述の表6の実験でf_c画分処理が短時間(12時間)処理でもHBsAg及びAFP産生に軽度ながら抑制を示した．そこで，より低濃度のf_c画分で，より長時間持続的に処理した場合の影響を検討した．

図3に示すように，1.0及び5.0 μg/ml，f_c画分含有培養液で4日毎に5×10^5 PLC cells/bottleを植え込む継代培養を4回繰返し，常にf_c画分処理を計20日間持続するという方法を行った．その結果，1.0及び5.0 μg/ml両濃度のf_c存在下で細胞増殖度は次第に低下して，10～45%前後抑制された．これと関連して，HBsAgとAFP産生は処理培養12時間までは余り影響がなかったが，16～20日に及ぶと何れも約1/3～1/4に低下した．

3）HBsAg及びAFP高又は低産生クローンPLC細胞へのf_c画分処理の影響

先にクローン化され，HBsAg及びAFPが共に高又は低産生クローンを選んでf_c画分処理の影響をみた．表7に示すH-4及びH-9は高産生クローンであり，L-7及びL-10は低産生クローンである[17]．これら各クローン化PLC細胞のコロニー形成能がf_c画分10及び50 μg/mlの存在でどう変るかを検討した（表7）．

その結果，高・低産生クローンに関係なく，各濃度f_c存在下で35～63%のコロニー形成抑制又はplating efficiency低下がみられた．従って，比較的少数細胞の増殖には，かなり明らかな抑制効果があると考えられた．

考　　察

微生物の細胞壁骨格や，その他の各構成分の示す生物活性の中，抗腫瘍活性や免疫学的adjuvant活性に

ついてはよく知られており，BCG[24)25)]，*Corynebacterium*[26)27)]，hemolytic *Streptococci*[28)29)]，*Clostridia*[30)31)]等その他数多くある．この中で，いくつかのものは腫瘍の免疫療法剤として，人にも既に応用されているのは周知の通りである[29)32)~35)]．これらの活性を担う細菌性peptidoglycan[36)]の必須構造，N-acetyl muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (MDP)[37)~39)]も現在明らかにされるに至っている．

一方，抗腫瘍活性とも関連して，いくつかの細菌類[5)6)]，特に*Streptococci*[40)41)]の示すIFN誘発能も注目に値する．さらに，この抗腫瘍活性は最近，口腔内嫌気性細菌，*Fusobacterium*[42)~45)]，*Peptococcus*[46)]にも見い出されている．

これら従来の一連の研究を背景として，著者のこゝに検討した口腔細菌抽出液の生物学的活性一細胞増殖抑制及びウイルス感染増殖抑制効果は，あまり強力ではなかったが，常に再現性をもって見られた．先に述べたごとく，CIR活性[7)8)]で選別された3菌株の中，*Fusobacterium nucleatum* KO31-3B株の培養上清には，現在抗腫瘍活性が認められている[42)~45)]．しかしながら，その菌体抽出液で処理したInt-407細胞では，腸内ウイルス，Echo-6の増殖が感染初期(8～12時間まで)で若干抑制されたが，24時間以降は殆どその効果は消失した(表2)．この粗抽出液と培養上清に放出される抗腫瘍活性物質は同一と思われるが，細胞又はウイルス増殖抑制活性と抗腫瘍活性を同一サンプルで何れ検討する必要があると思われる．

他の2菌株は，何れも*Lactobacillus*属で，特に粗抽出液LCは，Int-407細胞増殖に10～20%の抑制を示す濃度でEcho-6ウイルスの細胞内，外での増殖を40～70%抑制した．そこで，この粗抽出液を硫安塩析，Sephadex G-200で画分してみると，分子量，100K前後のf_b画分と20～40K前後のf_c画分に，これらの生物活性物質が見い出された．しかし200K以上のf_a画分には活性が認められなかった．この活性は，Int-407細胞－Cox B-5ウイルス系でも3画分に低いながらも認めることができた．これら部分精製f_b，f_c画分が粗抽出液と異なり，Int-407細胞に殆ど細胞増殖抑制能を示さないが(data略)，腸内ウイルス，Echo-6とCox B-5増殖を低下させ得る事は臨床的に意味があると思われる．その理由として，*Lactobacillus*属菌はヒト腸内常在細菌[47)]で非病原性であるので，その菌体崩壊産物の一部に前述のような腸内ウイルス増殖抑制能があることは，ウイルス感染増殖を免れさせて，腸管機能維持に好都合と言えるからである．

こゝに示したウイルス増殖抑制に働く機構については，ウイルス吸着阻害ではないこと，及びIFN産生誘発でないことは確認した．さらに，Int-407細胞という小腸由来細胞以外のヒト細胞処理でも前述の活性が見い出されるかと，腸内ウイルス以外のもの，例えば呼吸器系ウイルス（ミクソウイルス，アデノウイルスなど）感染増殖にも有効かどうかは今後に残された問題である．一方，上記腸内ウイルスの外来性感染増殖への影響と共に，既に内在的に持続感染しているウイルスの放出への効果も興味ある検討課題である．その目的に選ばれたA204(BaEV)細胞とPLC細胞は，何れもヒトがん由来株化細胞で，腸内ウイルス増殖抑制実験に見られたと同じく，f_b又はf_c画分処理が両細胞増殖へかなりの抑制効果を与えた．同時に，処理細胞当り，持続感染内在ウイルス(BaEV)又はそのウイルスゲノム発現物産（HBsAg）産生も抑制をうけることが見い出された．特にPLC細胞の場合，16～20日前後の比較的長時間持続処理をした場合に，低濃度処理でも有効であることはヒト生体にとって意義深いであろう．なぜならば，前述の腸内ウイルス増殖抑制能と同じく，腸内常在細胞としての*Lactobacillus*属菌の崩壊菌体構成分が長期に亘りHBV性ヒト肝がん細胞増殖抑制と，内在化（持続感染化）HBVゲノム発現へも何らかの抑制的な作用の可能性を示唆しているからである．

このようなヒトがん細胞増殖抑制能と関連して，最近*Lactobacillus*属菌のもつmitogen活性[48)49)]及び免疫adjuvant活性[9)50)51)]が液性ないしは細胞性免疫において報告されている．また本菌は，*Listeria monocytogenes*への非特異的免疫を増強[48)]すると言われている．加えて実験的には*Lactobacillus*産生食品，例えばヨーグルトの経口投与が，動物がん移植による腫瘍形成を抑制するという例[52)]もある．これらはすべて生体宿主機能，例えば免疫を介してのがん抑制などであるが，がん細胞への直接抑制作用も今回の実験で多少認められ，少数細胞または2～3週以上の長期的作用にはかなりの効果が見い出されている．そのがん細胞増殖抑制に働く機構は，現在得られている数種の分子量蛋白の混合物の状態からさらに有効活性物質を精製し，単一物質としてから追求される必要があろう．同時に，こゝに得た画分，f_a，f_b，f_cさらにその精製物が生体宿主機能へも免疫学的に何らかの活性を示すかどうかも今後検討されるべき問題で間あろう．

これと同様の事は，細胞処理で，細胞のどのような生理的状態が変化し，外来感染ウイルス増殖，又は内在持続感染ウイルスゲノム活性が抑制されるのかも将来の問題である．たゞ，今回用いた処理条件では，少なくてもIFN産生誘発は認められなかったので，それ以外の機構，例えば内在性干渉（intrinsic interf-

erence)[1)2)]に類似したものも考えられるが，これらも将来の問題として残されている．

結　論

1．口腔内分離細菌，*Fusobacterium nucleatum* KO31-3B株，*Lactobacillus casei* 0123株，*Lactobacillus salivarius* LS株の3菌株をTF培地に培養し，その菌体を超音波処理して粗抽出液KO31-3B, LC, LSを得た．この中，粗抽出液LCからさらに硫安塩析－Sephadex G-200カラムクロマトグラフィーで，分子量200K以上(f_a)，約100K(f_b)，20～40K(f_c)の3蛋白画分を得た．これら各画分はSDS-PAGEでは単一ではなく，数種の分子量の蛋白混合物であった．

2．各粗抽出液(蛋白濃度200 μg/ml)でヒト胎児小腸由来細胞(Int-407細胞)を24時間処理すると，細胞増殖は9～42%抑制されたが，Echovirus type 6の処理細胞当りの産生増殖量は低下し，特に粗抽出液LC処理で著明であった．

3．粗抽出液LCのf_b及びf_c画分処理では，細胞増殖には余り影響なく，Int-407細胞－Echovirus type 6系及びInt-407細胞－Coxsackie B virus type 5系の各々に処理細胞当り10～40%程度の産生抑制が認められた．

4．これらf_b又はf_c画分処理で，Int-407細胞にはインターフェロン(IFN)産生誘発は見られず，前述のウイルス増殖抑制にIFNは関与していないと思われた．

5．Baboon endogeneous virus (BaEV)の持続感染ヒト横紋筋肉腫由来細胞A204(BaEV)細胞を処理すると，f_b画分に細胞増殖及び細胞当りのBaEV放出の各抑制能が認められた．

6．Hepatitis B virus (HBV)持続感染ヒトがん由来細胞，PLC/PRF/5細胞処理ではf_b, f_c画分に細胞増殖及びHBVゲノム発現産物，hepatitis B virus surface antigen (HBsAg)とヒト肝細胞ゲノム発現産物，α-fetoprotein (AFP)の両者産生抑制が1/2～1/4及び約10%見い出された．特にf_c画分は低濃度でも持続的処理，又は少数細胞コロニー形成に有意に抑制効果を発揮した．

謝　辞

稿を終えるに臨み，御指導，御校閲を賜わった波田野基一教授に深謝致します．また実験の一部遂行に絶大な御教示，御指導を戴いた金沢大学医学部歯科口腔外科学教室の玉井健三教授に厚く感謝致します．さらに懇切な御教示，御援助を戴いた金沢大学がん研究所ウイルス部の田中淳之助教授，神谷茂博士（現金沢大学医学部微生物学教室），及び吉江忠正博士（現金沢医科大学耳鼻咽喉科）各位に深く謝意を表します．

文　献

1）**Jawetz, E., Melnick, J. L. & Adeledrg, E. A.**: Interferon, p357-358. *In* Jawetz, E., Melnick, J. L. & Adelberg, E. A. (ed.). Review of Medical Microbiology, 16th ed., Maruzen Asian Edition, Singapore, 1984.

2）**東匡　伸**：干渉，117—136頁，ウイルス学(植竹久雄編)，第1版，理工学社，東京．1975.

3）**波田野基一**：ウイルスの定量と血清学(免疫学)的反応，256-261頁，医科微生物学(小笠原一夫，波田野基一，阿多美茂編)，第1版，朝倉書店，東京．1978.

4）**Jawetz, E., Melnick, J. L. & Adelberg, E. A.**: Experimental chemoprophylaxis of virus infection, p355-357, *In* Jawetz, E., Melnick, J. L. & Adelberg, E. A. (ed.), Review of Medical Microbiology, 16th ed., Maruzen Asian, Singapore, 1984.

5）**Youngner, J. S.**: Interferon production by nonviral stimuli of microbial origin. J. Gen. Physiol., **56**, 25-30 (19700).

6）**Cleraqu, E. De & Merigan, T. C.**: Induction of interferon by nonviral agents. Arch. Intern. Med., **126**, 94-108 (1970).

7）**波田野基一**：癌原性細胞に対する溶連菌効果－細胞質RNA流出現象．医学のあゆみ，**63**, 261-268 (1967).

8）**天野恵夫・玉井健三**：口腔内嫌気性菌の研究．第8報　口腔内分離菌体（偏性嫌気性菌）の癌細胞に対するCell Injnring Reaction (C. I. R.)活性について．口科誌，**23**, 322-333 (1974).

9）**Bloskma, N., DeHeer, E., Vadijik. H. & Willers, I. M.**: Adjuvanticity of Lactobacilli. Clin. Exp. Immunol., **37**, 367-375 (1979).

10）**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).

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

12）**Laemmli, U. K.**: Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, 680-685 (1970).

13）**Henle, G. & Deinhardt, F.**: The establishment of strains of human cells in tissue culture. J. Immunol., **79**, 54-59 (1957).

14）**天野恵夫・波田野基一・福田鎮雄・宮本謙一・玉井健三**：人小腸細胞におけるEcho-6ウイルス増殖へ

の口腔内細菌菌体抽出物の影響. 第12回日本細菌学会中部支部総会抄録, **30**, (1975).

15) Fog, J. & Lump, R. O.: Continuous cultivation of epithelial cell strain (FL) fom human amniotic membrane. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **94**, 532-537 (1975).

16) Giard, D. J., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H. & Parks, **W. P.**: In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. J. Natl. Cancer Inst., **51**, 1417-1423 (1973).

17) 神谷 茂: ヒヒ細胞内在性C型ウイルス持続感染ヒト胎児肺由来線維芽細胞の性状. 十全医会誌, **91**, 122-136.(1982).

18) Alexander, J. J., Bey, E., Geddes, E. W. & Lecatsas, G.: Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. South Afr. Med. J., **50**, 2124-2128 (1976).

19) Macnab, G. M., Alexander, J. J., Lecatsas, G., Gey, E. M. & Urbanowicz, J. M.: Hepatitis B surface antigen produced by a human hepatoma cell line. Brit. J. Cancer, **34**, 509-515 (1976).

20) 吉江忠正: ヒト肝癌由来PLC/PRF/5細胞クローンの腫瘍原性と他ウイルス重複感染効果. 十全医会誌, **93**, 620-634 (1984).

21) Liebr, M. M., Sherr, C. J. &Todero, G. J.: S-torpic murine type-C viruses: Frequency of isolation from continuous cell lines, leukemia virus pseparations and normla spleens. Int. J. Cancer, **13**, 587-598 (1974).

22) Sarin, P. S., Friedman, B. & Gallo, R. C.: Purification and characterization of baboon endogeneous virus DNA polymerase. Biochem. Biophys. Acta, **479**, 198-206 (1977).

23) Tamura, T. & Takano, T.: A new, rapid procedure for the concetration of C-type viruses from large quantities of culture media: ultrafiltration by Diaflo membrane and purification by Ficoll gradient centrifugation. J. Gen. Virol., **41**, 135-141 (1978).

24) Tanaka, T. & Tokunaga, T.: Suppression of tumor growth and induction of specific tumor immunity by intradermal inoculation of a mixture of living tumor cells and live *Mycobacterium bovis* in syngenetic mice. Gann, **62**, 433-434 (1971).

25) Piessens, W. F., Campbell, M. & Churchill, W. H.: Inhibition or enhancement of rat mammary tumors dependent on dose of BCG. J. Natl. Cancer Inst., **59**, 207-211 (1977).

26) Bomford, 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).

27) Milas, L. & Scott, M. T.: Antitumor activity of *Corynebacterium parvum*. Adv. Cancer Res., **26**, 257-306 (1978).

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

29) Okamoto, H. Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R.: β-hemolytic Streptococcus as a cancer controller-A commentary on PC-B-45, lst ed., p20-46, Chugai Pharmaceutical Co., Tokyo, 1972.

30) 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).

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

32) Lieberman, R., Wybran, J. & Epstein, W.: The immunologic and histopathologic changes of BCG-mediated tumor regression in patients with malignant melanome. Cancer, **35**, 765-777 (1975).

33) Yasumoto, K., 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-Guërin*. Cancer Res., **39**, 3262-3267 (1979).

34) Sakurai, Y., Tsukagoshi, S., Satoh, H., Akiba, T., Suzuki, S. & Takagaki, Y.: Tumor-inhibitory effect of a streptococcal preparation (NSC-B116209). Cancer Chemicotherapy Repts., **56**, 9-17 (1972).

35) 木村郁郎: OK-432を用いた人がんの免疫化学療法. 癌と化学療法, **2**, 21-33 (1975).

36) 小谷尚三: 細菌細胞壁ペプチッドグリカンおよび構築単位の生化学的活性. 特に免疫強化作用. 生化学, **48**, 1081-1107 (1979).

37) **Leclerc, C., Juy, D., Bourgeois, E. & Chedid, L.**: In vivo regulation of humoral and cellular immune responses of mice by a synthetic adjuvant, N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, muramyl dipeptide for MDP. Cell. Immunol., **45,** 199-206 (1979).

38) **Okumura, I., Kamisango, K., Saiki, I., Tanio, Y., Azuma, I., Hasegawa, A. and Yamamura, Y.**: Synthesis and immunoadjuvant activity of acylamino analogues of N-acetyl-muramy-L-alanyl-D-isoglutamine. Agric Biol. Chem., **46,** 507-514 (1982).

39) **Saiki, I., Tanio, Y., Yamawaki, M., Uemiya, M., Kobayashi, S., Fukada, T., Yukimasa, H., Yamamura, Y. & Azuma, I.**: Adjuvant activities of quinoyl-N-acetyl-muramyl dipeptide in mice and guinea pigs. Infect. Immunol., **31,** 114-121 (1981).

40) **Matsubara, S., Suzuki, F. & Ishida, N.**: Induction of immune interferon in mice treated with a bacterial immunopotentiator. OK-432. Cancer Immunol. Immunother., **6,** 41-45 (1979).

41) **山口高弘・斉藤之男・黒田洋子・海老名卓三郎・石田名香雄・星野文彦・川出由己**: *Streptococcus faecalis* preparation, TH69 が誘起する IFN の特性とその生物活性. 癌と化学療法, **9,** 1609-1717 (1982).

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

43) **Tamai, K., Nakao, J., Nakagawa, K., Watanabe, K., Sakashita, H.,Nishiwaki, Y. & Nakashin, Y.**: Antitumor activity in the c culture supernatant fluid of *Fusobacterium nucleatum* strain KO-31. Japan J. Exp., **53,** 251-256 (1983).

44) **渡辺好三**: *Fusobacterium nucleatum* の抗腫瘍活性に関する研究. 十全医会誌, **93,** 316-329 (1984).

45) **西脇幸博**: *Fusobacterium nucleatum* KO-31 の腫瘍細胞障害作用に関する実験的研究. 十全医会誌, **94,** 139-172 (1985).

46) **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).

47) **Mitsuoka, T.**: Vergleichende untersuchungen über die Lakobazillen aus den faces von menschen, schweinen und hühneru. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkr. Infektionskr. Hyg., **210,** 32-51 (1969).

48) **Bloskma, N., Ettekoven, H., Hofhuis, F. M., Noorlejansen, L., DeReuver, M. J., Kreeftenberg, J. G.& Willers, J. M.**: Effects of lactobacilli on parameters of non-specific resistance of mice. Med. Microbiol. Immunol., **170,** 45-53 (1981).

49) **Shimizu, T., Mifuchi, I. & Yokokura, T.**: Mitogenic effect of lactobacilli on murine lymphocytes. Chem. Pharm. Bull., **29,** 3731-3734 (1981).

50) **Yasutake, N., Kato, I., Ohwaki, M., Yokokura, T. & Mutai, M.**: Host-mediated antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. Gann, **75,** 72-80 (1984).

51) **Kato, I., Kobayashi, S., Yokokura, T. & Mutai, M.**: Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice Gann, **72,** 517-523 (1981).

52) **Reday,G. V., Shahani, K. M. & Banerjee, M. R.**: Inhibitory effect of yogurt on Ehrlich ascites tumor cell proliferation. J. Natl. Cancer Inst., **50,** 815-817 (1973).

Effect of Bacterial Extracts from Oral Bacteria, Particulary *Lactobacillus casei* 0123, on Cell Growth and Virus Multiplication Shigeo Amano, Department of Virology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920 – J. Juzen Med. Soc., **94**, 1155–1168 (1985)

Key words: *Lactobacillus*, Bacterial extracts, cultured cells, virus multiplication, virus persistent infection.

Abstract

Biological activities of extracts from oral bacteria, *Fusobacterium nucleatum* KO31-3B, *Lactobacillus casei* 0123 and *Lactobacillus salivarius* LS which were selected by their tumor injuring reaction, were examined with respects to their effects on cell growth and virus multiplication. Cells of these three strains grown in the TF-medium were sonicated and then centrifuged. Resultant supernatants were used as crude extracts KO31-3B, LC and LS, respectively. When Int-407 cells were treated with these crude extracts (200 μg/ml as protein concentration) for 24 hours, the yield of Echovirus type 6 (Echo-6 virus) per the treated cell clearly decreased, while cell growth was slightly inhibited. Treatment with crude extract LC was particularly effective on the inhibition of multiplication of Echo-6 virus.

From these results, the extract LC was submitted to further partial purification by $(NH_4)_2SO_4$-precipitation and subsequent column chromatography on Sephadex G-200. The main franctions designated as f_a (more than 200K of molecular weight), f_b (about 100K) and f_c (20-40K) were shown to be mixtures of proteins with some different molecular weights by SDS-PAGE analysis. They were assayed for their activities on cell growth and virus multiplication.

In Int-407 cells infected with Echo-6 virus or Coxsackie B virus type 5, the yield of these two viruses per cell was reduced by 10-40 per cent after the treatment of the cells with 10-50 μg/ml of f_b or f_c fraction for 2-24 hr. However, no induction of interferon production was found, showing no involvement of interferon in the inhibitory activities to the virus multiplication.

These biological activities mentioned above were further examined by using baboon endogeneous virus (BaEV) persistently infected cells [A204(BaEV) cells] and hepatitis B virus (HBV) persistently infected cells (PLC/PRF/5 cells). By the treatment of A204(BaEV) cells with f_b fraction the cell growth and BaEV release per cell were significantly inhibited. Similarly, the f_b and f_c fractions inhibited the cell growth, and the production of HBV surface antigen and α-fetoprotein by their treatment of PLC/PRF/5 cells. Particulary, f_c fraction clearly showed these activities after persistent of a small number of the cells.

The results obtained seem to indicate that components of the oral bacteria examined have inhibitory effects on tumor cell growth, virus multiplication and virus release.