

# Experimental Studies on the Antitumor(Tumor Cell Injuring) Activity of a Fusobacterium nucleatum KO-31 Strain

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7772">http://hdl.handle.net/2297/7772</a>

# Fusobacterium nucleatum KO-31 の腫瘍細胞障害作用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)

西 脇 幸 博

(昭和60年2月1日受付)

*Fusobacterium nucleatum* KO-31を Tamai-Fukuda 培地で培養し、その培養上清より、部分精製物質 (TF-310) を作製し、TF-310の抗腫瘍活性について検討した。Sarcoma 180 および Ehrlich 腹水癌細胞の各々に TF-310 を添加し、37°Cで種々の時間保って、それらをマウスの腹腔内に移植し、マウスの生存日数を30日間観察した。TF-310で処置した Sarcoma 180 細胞 ( $2.0 \times 10^7$  cells/ml) を移植したマウス (処置群) は、未処置の Sarcoma 180 細胞を移植した対照のマウス (未処置群) に比較して1.60倍長く生存した。Ehrlich 腹水癌細胞についても、先と同様の方法で検討したところ、処置群の方が、未処置群に比較して、1.97倍長く生存した。さらに、Sarcoma 180 と Ehrlich 腹水癌の腫瘍細胞に対する TF-310 の直接作用を光学顕微鏡および電子顕微鏡で検索した。光学顕微鏡による観察では、TF-310 を添加し保った時の腫瘍細胞が、保存時間に相応じて著しい変性を受けていた。つまり、細胞膜は変性または消失し、原形質はその内容物を失って、細胞内に空胞を形成していた。TF-310 を添加し120分間保った腫瘍細胞に対し、電子顕微鏡による検討をおこなった。その結果、細胞内小器管の細胞外流出、ミトコンドリアのクリスタの変性と消失、そしてユウクロマチンの減少が観察された。これらの所見は、TF-310 が腫瘍細胞に対して直接細胞障害作用のあることを示唆した。

---

**Key words** anaerobes, *Fusobacterium nucleatum*, antitumor activity.

---

抗腫瘍物質の研究が数多く報告されているなかで、細菌による抗腫瘍効果の研究が盛んである。細菌の抗腫瘍活性についての報告<sup>1)~20)</sup>は多数認められるが、それらのほとんどは好気性菌による研究である。

一方、嫌気性菌の抗腫瘍活性の報告<sup>21)~32)</sup>については、国内・外に見られ、そのほとんどは *anaerobic Corynebacterium*, *Clostridia* の抗腫瘍活性の研究報告<sup>29)~32)</sup>である。玉井らは数年前より嫌気性菌の *Fusobacterium nucleatum* の培養上清液に抗腫瘍活性のあることを報告<sup>33)~35)</sup>している。しかし、細胞レベルについての実験で証明されていないため、著者は *F. nucleatum* KO-31 の培養上清液より抗腫瘍活性を有すると考えられる物質を抽出し、Ehrlich 腹水癌および Sarcoma 180 細胞を用いて、*in vitro* で作用させた後 *in vivo* で抗腫瘍活性を検討した。さらに、その際の腫瘍細胞について、光学顕微鏡および電子顕微鏡に

より形態学的に観察し、腫瘍細胞障害作用について検討した。

## 材料および方法

### I. 抗腫瘍物質の作成

実験に供した菌株は、金沢大学医学部口腔外科学教室保存株の *F. nucleatum* KO-31 を使用した。この保存株を、Tamai-Fukuda 培地<sup>36)</sup> (TF 培地、日水、東京) で、37°C・48時間前培養後、TF 培地 (15 ml) に 0.4 ml を移植し、37°C・24時間培養した。これを、TF 血液寒天平板培地で、37°C・48時間嫌気培養 (Gas Pak, BBL, U. S. A.) 後、形成してくる集落を釣菌し、TF 培地 (15 ml) に移植後、37°C・48時間増菌し、その 4 ml を 100 ml 容量の投薬ビンに作製した TF 培地 (100 ml) に移植した。37°C・24時間培養後、2,000 ml 容量の投薬ビンに 2,000 ml の TF 培地を作製し、培養液の

---

Abbreviations: ICR, Institute for Cancer Research; Crj: CD-1 (ICR), Charles River Japan Inc; TF 培地, Tamai Fukuda 培地.

80 ml を移植した。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% になるように加え十分攪拌後、4°C で一夜静置し、再び 10,000×g・20 分間冷却遠心後、得られた沈澱物質に磷酸緩衝液 (pH 7.0) 200 ml を加え、10-N HCl で pH を 4.0 に調整した。さらに、4°C で一夜静置後 10,000×g・20 分間遠心し、得られた沈澱物質に磷酸緩衝液 200 ml を加え、1-N NaOH で pH 8.0 に調整後、蛋白分解酵素のプロナーゼ (プロナーゼ E, 科研・東京) を加え、24 時間作用させ除蛋白した。除蛋白後、10,000×g・20 分間冷却遠心した後、エチルアルコールを 60% の割に加え、沈澱物質に磷酸緩衝液を加え、イオン交換カラム Dowex 1×4 で吸着させた後、溶出し、限外濾過後ザイツにて無菌的に濾過した。濾過後凍結乾燥し、これらの部分精製した物質を実験に供した。この Tamai-Fukuda 培地から得られた物質を TF-310 と名付け、実験に使用する際、ハンクス液に適量懸濁し使用した。

## II. Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞の調整

4.0~6.0×10<sup>6</sup>cells/ml の Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞を ICR (Institute for Cancer Research, Crj: CD-1 (ICR) Charles River Japan Inc.) 系マウスに 7 日目ごとに継代した腫瘍細胞を実験に供した。本実験に際して 7 日目に、貯留したミルク状の腹水を無菌的に採取し、適量のハンクス液を加え、Türk 型白血球計算盤 (エルマ光学 K. K.・東京) で算定した。各実験ごとに細胞数を調整後、Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞の浮遊液として実験に供した。

## III. 実験動物

すべての実験には、ICR 系マウスの生後 5 週目で約 20 g のものを使用した。

## IV. Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞に対する TF-310 の抗腫瘍活性

まず、TF-310 の量をハンクス液で 0.4, 0.2, 0.04, 0.004, 0.0004, 0.00004 mg/ml に調整し、この懸濁液を、中試験管 5 本に各々 3 ml 分注した。分注後、細胞数を 2.0×10<sup>7</sup>cells/ml に調整した Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞の細胞浮遊液を、それぞれの中試験管内に各々 3 ml 分注し、計 6 ml の均一な懸濁液を作製した。この懸濁液を 37°C で 15, 30, 60, 120, 180 分間保った後、その 0.5 ml をマウス腹腔内に移植し、生存日数を 30 日間観察した。対照群は、2.0×10<sup>7</sup> cells/ml の腫瘍細胞のみの浮遊液を先の各々の時間に保ち、各々 0.5 ml 移植したマウスとし、比較検討した。

ついで、TF-310 の量は 0.2 mg/ml と一定にし、Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞の細胞数は、4.0×10<sup>7</sup>, 2.0×10<sup>7</sup>, 1.2×10<sup>7</sup>, 4.0×10<sup>6</sup>, 2.0×10<sup>6</sup>, 1.2×10<sup>6</sup>, 4.0×10<sup>5</sup>cells/ml に調整して前述の操作と同様に、各試験管の全量を 6 ml とした均一な懸濁液を作製した。懸濁液を 15, 30, 60, 120, 180 分間 37°C に保ち、その 0.5 ml をマウスの腹腔内に移植し、30 日間生存日数を観察した。対照群として、それぞれに合致する細胞数の Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞 0.5 ml を移植した。マウスは 1 群 10 匹で実験した。

## V. 抗腫瘍効果の判定

調整した腫瘍細胞浮遊液の 0.5 ml をマウスの腹腔内に移植後、30 日間生存日数を観察し抗腫瘍効果を判定した。すなわち、TF-310 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、つまり T/C×100 で抗腫瘍効果を判定した<sup>37)</sup>。

## VI. 光学顕微鏡および電子顕微鏡による形態学的観察

Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞を、ハンクス液で 2.0×10<sup>7</sup>cells/ml に調整、懸濁し、各々の細胞につき中試験管に 3 ml ずつ分注した。さらに、TF-310 をハンクス液で、0.2 mg/ml に調整後、それぞれの中試験管内に 3 ml 分注し全量 6 ml の懸濁液を作製した。それらを 37°C で 15, 30, 60, 120, 180 分間保ち、経時的に懸濁液を採取して、メタノール固定後ギムザ染色をおこない、各細胞像を光学顕微鏡 (400 倍) で観察した。

続いて、微細構造の形態学的変化を電子顕微鏡で観察した。電子顕微鏡は、日立 HU-500 型透過電子顕微鏡を使用し、直接倍率 2,100 倍と 6,000 倍で観察した。

Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞を、ハンクス液で 2.0×10<sup>7</sup>cells/ml に調整、懸濁した後、ベックマン超遠心用チューブ (Beckman Instruments, Inc. California, U. S. A.) にそれぞれ、1.5 ml 分注した。つぎにハンクス液で 0.2 mg/ml に調整した TF-310 を、それぞれのチューブに 1.5 ml 加え、各チューブにつき 3 ml の懸濁液とした。それらを 37°C で 120 分間保った。対照は Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞にハンクス液のみを加えたものとし、同様に 37°C で 120 分間保った。その後、TF-310 処置群、対照群ともに、250×g・5 分間遠心した。遠心の回転数および時間の設定は、森<sup>30)</sup>、吉田<sup>38)</sup>、Koshimura ら<sup>39)</sup>、Okamoto ら<sup>40)</sup>の報告に従って人工的に細胞破壊が生じない条件とした。得られた沈澱は、2.5% グルタルアルデヒド (0.1 M カコジル酸ソーダ緩衝液, pH 7.4) で 4°C, 60 分間前固定後、2% オス

ミウム酸 (同緩衝液, pH 7.4) で 90 分間固定した。ついで、エチルアルコールで脱水しエポン包埋した。包埋後、ダイヤモンドナイフにより、LKB ウルトラトーム (8,800 型) にて超薄切片を作製した。染色は、酢酸ウラニウムとクエン酸鉛で二重染色し、電子顕微鏡で観察した。なお、同時に、エポン包埋材料を約 1  $\mu$  の厚さに薄切し、トルイジンブルー染色後、光学顕微鏡で対比観察した。

## 成 績

### I. Ehrlich 腹水癌細胞に対する TF-310 の至適濃度の検討

Ehrlich 腹水癌細胞数を  $2.0 \times 10^7$  cells/ml と一定にし、TF-310 の量を変化させ、その至適濃度を検討した。その結果、表 1 に示すごとく、0.4 mg/ml の TF-

310 を添加した処置群は、15, 30, 60 分間保ったものでは抗腫瘍活性を示さなかった。しかし、120 分間保ったものは T/C(%) が、155.7% と高い抗腫瘍活性を示す数値が得られ、180 分間では 172.4% と著しい抗腫瘍活性を示す数値が得られた。また、0.2 mg/ml を添加した処置群では、15 あるいは 30 分間保っただけでは抗腫瘍活性は低値であったが、60 分間では、130.9% と有効数値を示した。さらに、120 分間では 185.4%、180 分間では、197.8% と著しい抗腫瘍活性を示した。つぎに、0.04 mg/ml を添加した処置群では、15, 30, 60 分間保ったもので有効な抗腫瘍活性を示さなかったが、120 分間で T/C(%) が、137.1% と有効数値を示し、180 分間では、T/C(%) が 158.2% と高い抗腫瘍活性を示す数値が得られた。一方、TF-310 の添加量を少量にした 0.004 mg/ml 以下の処置群の T/C(%) は、いずれ

Table 1. Influence of Ehrlich ascites carcinoma cells on the survival days of inoculated mice, and its modification induced by previous incubation of the carcinoma cells ( $2.0 \times 10^7$  cells/ml) with TF-310 at different concentrations for various periods.

TF-310 (mg/ml)	Incubation times (min)	Mean survival days <sup>a)</sup> of treated group <sup>b)</sup>	Mean survival days <sup>a)</sup> of untreated group <sup>b)</sup>	T/C(%)
0.4	15	12.9 $\pm$ 1.1	13.5 $\pm$ 0.9	95.5
	30	15.8 $\pm$ 2.3	14.4 $\pm$ 1.1	109.7
	60	16.9 $\pm$ 3.3	14.2 $\pm$ 0.9	119.0
	120	23.2 $\pm$	14.9 $\pm$ 1.2	155.7
	180	25.0 $\pm$	14.5 $\pm$ 1.0	172.4
0.2	15	14.2 $\pm$ 1.6	13.6 $\pm$ 1.3	104.4
	30	15.2 $\pm$ 1.4	14.3 $\pm$ 1.4	106.2
	60	18.6 $\pm$ 2.9	14.2 $\pm$ 0.9	130.9
	120	25.4	13.7 $\pm$ 0.6	185.4
	180	27.1	13.7 $\pm$ 0.9	197.8
0.04	15	14.4 $\pm$ 1.7	13.7 $\pm$ 0.8	105.1
	30	14.3 $\pm$ 1.7	13.6 $\pm$ 1.0	105.1
	60	17.2 $\pm$ 1.9	13.5 $\pm$ 1.2	127.4
	120	19.2 $\pm$ 1.9	14.0 $\pm$ 1.1	137.1
	180	22.5 $\pm$ 2.5	13.9 $\pm$ 1.1	158.2
0.004	15	14.2 $\pm$ 1.4	13.5 $\pm$ 1.0	105.1
	30	15.5 $\pm$ 1.9	13.8 $\pm$ 1.2	112.3
	60	16.1 $\pm$ 2.6	14.0 $\pm$ 1.1	115.0
	120	16.3 $\pm$ 1.8	14.2 $\pm$ 1.3	114.7
	180	17.5 $\pm$ 3.2	14.1 $\pm$ 1.3	124.1
0.0004	15	14.7 $\pm$ 1.0	14.0 $\pm$ 1.5	105.0
	30	15.5 $\pm$ 1.0	14.0 $\pm$ 1.1	110.7
	60	16.2 $\pm$ 1.6	14.4 $\pm$ 1.4	112.5
	120	17.0 $\pm$ 1.4	14.5 $\pm$ 0.8	117.2
	180	17.2 $\pm$ 1.8	14.0 $\pm$ 1.1	122.8
0.00004	15	14.6 $\pm$ 1.4	14.4 $\pm$ 1.4	101.3
	30	15.6 $\pm$ 1.5	14.5 $\pm$ 0.8	107.5
	60	16.6 $\pm$ 1.5	14.3 $\pm$ 0.9	116.0
	120	15.9 $\pm$ 1.7	14.5 $\pm$ 1.2	109.6
	180	17.6 $\pm$ 2.1	14.0 $\pm$ 1.2	125.7

a) Reading was performed for 30 days after intraperitoneal injection of a mixed suspension of TF-310 and Ehrlich ascites carcinoma cells ( $2.0 \times 10^7$  cells/ml) into mice.

b) Number of mice used for each group was 10 (Table 1~4).

も130%以下の低値で抗腫瘍活性を示さなかった。以上の実験成績より、Ehrlich 腹水癌細胞の $2.0 \times 10^7$  cells/ml に対し、最も高い抗腫瘍活性を示すTF-310の至適濃度は0.2 mg/ml であるとする成績が得られた。

## II. Ehrlich 腹水癌細胞の細胞数に対するTF-310の作用

先の実験から、TF-310の添加量を0.2 mg/ml と一定にし、Ehrlich 腹水癌細胞の細胞数を変化させてその影響を観察した。

結果は、表2に示すごとく、 $4.0 \times 10^7$  cells/ml のEhrlich 腹水癌細胞にTF-310を添加して15、30分間

保ったものでは、T/C(%)の有効数値は得られなかったが、60、120、180分間では、T/C(%)は各々132.2、146.8、156.8%と有効数値を示した。 $2.0 \times 10^7$  cells/ml にTF-310を添加した群では、15、30分間保ったもので有効数値を示さなかったが、60分間では、T/C(%)が130.9%の有効数値を示し、120、180分間では、T/C(%)は185.4、197.8%と著しく高い抗腫瘍活性を示す数値が得られた。 $1.2 \times 10^7$  cells/ml にTF-310を添加した群は、15、30、60分間保ったものでは有効数値は得られなかったが、120、180分間では、各々T/C(%)が183.9、183.0%と著しく高い抗腫瘍活性を示す数値が得られた。 $4.0 \times 10^6$  cells/ml にTF-310を添加した

Table 2. Influence of Ehrlich ascites carcinoma cells on the survival days of inoculated mice, and its modification induced by previous incubation of the carcinoma cells at different cell numbers with TF-310 at a constant concentration of 0.2 mg/ml for various periods.

Number of cells/ml	Incubation times(min)	Mean survival day <sup>a)</sup> of treated group	Mean survival days <sup>a)</sup> of untreated group	T/C(%)
$4.0 \times 10^7$	15	11.8±0.7	11.7±1.0	100.8
	30	12.5±1.9	12.1±0.7	103.3
	60	16.0±3.5	12.1±1.2	132.2
	120	18.8±3.2	12.8±0.7	146.8
	180	19.6±4.4	12.5±0.9	156.8
$2.0 \times 10^7$	15	14.2±1.6	13.6±1.3	104.4
	30	15.2±1.4	14.3±1.4	106.2
	60	18.6±2.9	14.2±0.9	130.9
	120	25.4	13.7±0.6	185.4
	180	27.1	13.7±0.9	197.8
$1.2 \times 10^7$	15	14.2±1.2	13.2±1.3	107.5
	30	14.8±0.9	13.6±0.9	108.8
	60	16.9±3.0	13.7±1.1	123.3
	120	25.2	13.7±0.9	183.9
	180	26.0	14.2±0.9	183.0
$4.0 \times 10^6$	15	15.6±1.3	14.5±0.8	107.5
	30	16.7±2.3	14.8±1.4	112.8
	60	19.5±5.4	14.3±1.0	136.3
	120	24.7±2.7	14.7±1.2	168.0
	180	24.6±3.0	14.5±0.9	169.6
$2.0 \times 10^6$	15	16.5±1.9	16.8±1.3	98.2
	30	17.6±1.5	17.4±1.4	101.1
	60	21.5±4.2	17.3±1.7	124.2
	120	25.4±3.1	18.6±1.2	136.5
	180	25.6±3.4	17.3±1.8	147.9
$1.2 \times 10^6$	15	18.2±1.4	17.9±1.5	101.6
	30	18.4±1.7	19.5±2.0	94.3
	60	22.5±1.9	19.1±1.3	117.8
	120	26.3±3.0	18.5±1.7	142.1
	180	25.7	18.8±1.4	136.7
$4.0 \times 10^5$	15	19.2±1.9	19.1±1.9	100.5
	30	19.9±2.4	19.6±1.8	101.5
	60	24.9±3.6	19.9±1.8	125.1
	120	26.0	19.8±1.9	131.3
	180	26.3	19.9±1.7	132.1

a) Reading was performed for 30 days after intraperitoneal injection of a mixed suspension of TF-310 (0.2mg/ml) and Ehrlich ascites carcinoma cells into mice.

群では、15, 30 分間保ったもので有効数値を示さなかったが、60 分間で T/C(%) は 136.3% の有効数値を示し、120, 180 分間の T/C(%) は、各々 168.0, 169.6% の高い抗腫瘍活性を示す数値であった。2.0×10<sup>6</sup>cells/ml に TF-310 を添加した群において、15, 30, 60 分の保存時間では有効数値は得られなかったが、120, 180 分間保つと、T/C(%) が各々 136.5, 147.9% の有効数値を示した。1.2×10<sup>6</sup>cells/ml に TF-310 を添加した群は、保存時間が 15, 30, 60 分間で有効数値は得られなかったが、120, 180 分間では、T/C(%) は各々 142.1, 136.7% で有効数値を示した。4.0×10<sup>6</sup>cells/ml に TF-310 を添加した群は、15, 30, 60 分間で有効数値を示さなかったが、120, 180 分間での T/C(%) は各々 131.3, 132.1% で低いながらも有効数値を示した。以上の実験結果より、TF-310 は Ehrlich 腹水癌細胞に対し抗腫瘍活性を示すことが判明した。とくに TF-310

が 0.2 mg/ml, Ehrlich 腹水癌細胞数が 2.0×10<sup>7</sup>cells/ml で最も高い抗腫瘍活性値が得られた。なお、30 日間の経過観察期間をすぎても、120 分間保った群で 2 匹、180 分間保った群でも 3 匹が生存し、ともにその後も健全な発育を示した。

### III. Sarcoma 180 細胞に対する TF-310 至適濃度の検討

表 3 に示すごとく、Sarcoma 180 細胞の細胞数を 2.0×10<sup>7</sup>cells/ml と一定にし、TF-310 の量を変化させ至適濃度の検討をおこなった。

TF-310 0.4 mg/ml の処置群では、15, 30, 60, 120, 180 分間のいずれの保存時間でも T/C(%) は有効数値以下であった。0.2 mg/ml の TF-310 を添加した処置群は、15, 30 分間保ったものでは有効数値以下であったが、60 分間の T/C(%) は 130.4% と有効数値を示し、120 分間では 141.1% と有効数値を認めた。さらに、

Table 3. Influence of Sarcoma 180 cells on the survival days of inoculated mice, and its modification induced by previous incubation of the sarcoma cells (2.0×10<sup>7</sup> cells/ml) with TF-310 at different concentrations for various periods.

TF-310 (mg/ml)	Incubation times (min)	Mean survival days <sup>a)</sup> of treated group	Mean survival days <sup>a)</sup> of untreated group	T/C(%)
0.4	15	13.8±2.2	14.6±1.3	94.5
	30	14.0±3.6	14.3±1.4	97.9
	60	17.0±2.9	13.9±2.1	122.3
	120	15.3±2.3	14.4±1.1	106.3
	180	17.0±4.0	14.6±1.5	116.4
0.2	15	14.1±1.7	13.7±0.7	102.9
	30	15.7±2.6	13.6±1.3	115.4
	60	19.3±3.6	14.8±0.9	130.4
	120	19.9	14.1±1.4	141.1
	180	21.7	13.5±1.1	160.7
0.04	15	15.8±3.0	14.7±1.2	107.5
	30	16.5±2.6	14.4±1.3	114.6
	60	20.8±3.4	15.7±1.6	132.5
	120	21.8±3.2	15.9±1.3	137.2
	180	20.6±4.9	16.3±1.1	126.4
0.004	15	15.5±2.7	13.6±1.0	114.0
	30	17.9±3.2	14.8±0.8	121.0
	60	18.1±3.1	14.2±1.4	127.5
	120	18.1±2.9	15.4±0.7	129.3
	180	20.7±2.3	14.6±1.1	141.8
0.0004	15	16.1±2.0	15.2±1.2	105.9
	30	20.1±2.7	16.2±1.2	124.1
	60	18.3±2.3	15.9±0.7	115.1
	120	21.0±4.8	15.2±1.0	138.2
	180	20.8±1.4	16.0±1.5	130.0
0.00004	15	14.7±0.8	14.1±1.2	104.3
	30	15.4±1.7	15.1±1.7	102.0
	60	16.4±1.7	13.9±1.1	118.0
	120	17.3±2.5	14.6±1.2	118.5
	180	16.4±3.1	14.1±1.4	116.3

a) Reading was performed for 30 days after intraperitoneal injection of a mixed suspension of TF-310 and Sarcoma 180 cells (2.0×10<sup>7</sup> cells/ml) into mice.

180 分間では T/C(%) は 160.7% と著しい抗腫瘍活性を示す成績が得られた。TF-310 0.04 mg/ml を添加した処置群は、15, 30 分間保ったものでは有効数値以下であったが、60 分間の T/C(%) は 132.5% と有効数値を示し、120 分間では 137.2% と T/C(%) の上昇をみた。しかし、180 分間では T/C(%) は 126.4% と有効数値にはいたらなかった。0.004 mg/ml を添加した処置群は、15, 30, 60, 120 分間保ったものでは有効数値以下であったが、180 分間では T/C(%) は 141.8% と上昇し有効数値を示した。また、0.0004 mg/ml を添加した処置群は、15, 30, 60 分間保ったものでは有効数値以下であったが、120, 180 分間では、T/C(%) は各々

138.2, 130.0% と有効数値が得られた。一方、0.00004 mg/ml を添加した処置群は、いずれの保存時間においても T/C(%) は有効数値以下であった。以上の実験成績により、Sarcoma 180 細胞の細胞数が  $2.0 \times 10^7$  cells/ml に対しては、TF-310 0.2 mg/ml が最も高い抗腫瘍活性を示す至適濃度であるとする成績が得られた。

#### IV. Sarcoma 180 細胞の細胞数に対する TF-310 の作用

先の至適濃度の実験より、TF-310 の添加量を 0.2 mg/ml と一定にして、Sarcoma 180 細胞の細胞数を変化させ検討をおこなった。

結果は、表 4 に示すごとく、Sarcoma 180 細胞の細

Table 4. Influence of Sarcoma 180 cells on the survival days of inoculated mice, and its modification induced by previous incubation of the sarcoma cells at different cell numbers with TF-310 at a constant concentration of 0.2mg/ml for various periods.

Number of cells/ml)	Incubation times(min)	Mean survival days <sup>a)</sup> of treated group	Mean survival days <sup>a)</sup> of untreated group	T/C(%)
$4.0 \times 10^7$	15	12.0±1.1	12.2±1.0	98.3
	30	12.6±1.4	12.1±0.7	104.1
	60	12.7±1.6	12.6±1.0	100.7
	120	14.6±2.7	12.3±1.0	118.6
	180	15.4±3.3	12.1±1.1	127.2
$2.0 \times 10^7$	15	14.1±1.7	13.7±0.7	102.9
	30	15.7±2.6	13.6±1.3	115.4
	60	19.3±3.6	14.8±0.9	130.4
	120	19.9	14.1±1.4	141.1
	180	21.7	13.5±1.1	160.7
$1.2 \times 10^7$	15	15.4±1.3	15.5±1.2	99.3
	30	15.7±1.7	13.3±4.4	110.8
	60	14.9±5.5	14.7±1.2	101.3
	120	18.1±4.0	14.6±1.0	123.9
	180	23.4±2.5	14.9±1.4	157.0
$4.0 \times 10^6$	15	16.4±1.0	15.9±0.9	103.1
	30	16.9±1.5	16.1±1.3	104.9
	60	16.8±1.5	16.5±0.8	101.8
	120	21.5±4.0	16.2±1.0	132.7
	180	23.3±2.1	16.5±0.9	141.2
$2.0 \times 10^6$	15	17.0±2.0	16.8±1.7	101.1
	30	17.9±2.6	17.8±1.4	100.5
	60	18.0±3.1	17.6±1.9	102.2
	120	22.4±1.8	17.6±1.3	127.2
	180	23.9	18.5±1.4	129.1
$1.2 \times 10^6$	15	17.8±1.6	17.4±1.2	102.2
	30	18.0±1.3	17.0±1.3	105.8
	60	20.1±2.6	17.7±1.2	113.5
	120	23.1±2.3	17.6±1.4	131.2
	180	24.6±3.4	17.8±1.2	138.2
$4.0 \times 10^5$	15	19.5±1.7	19.4±1.7	100.5
	30	19.6±1.5	19.4±1.5	101.0
	60	21.8±2.5	19.2±1.3	113.5
	120	22.2±2.6	19.6±1.0	115.6
	180	23.1	19.4±1.5	119.0

a) Reading was performed for 30 days after intraperitoneal injection of a mixed suspension of TF-310 (0.2 mg/ml) and Sarcoma 180 cells into mice.

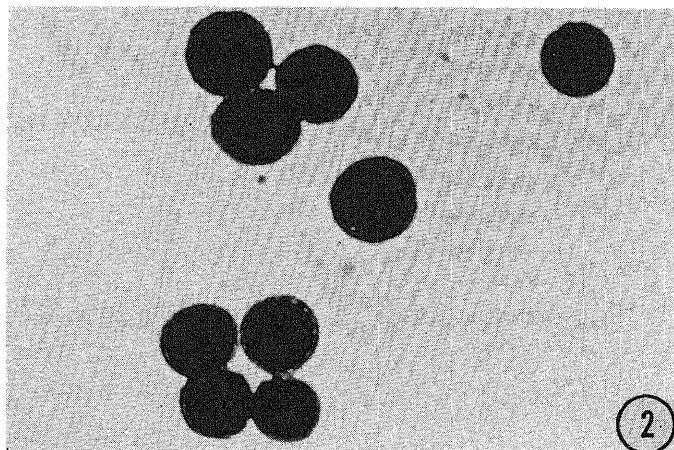
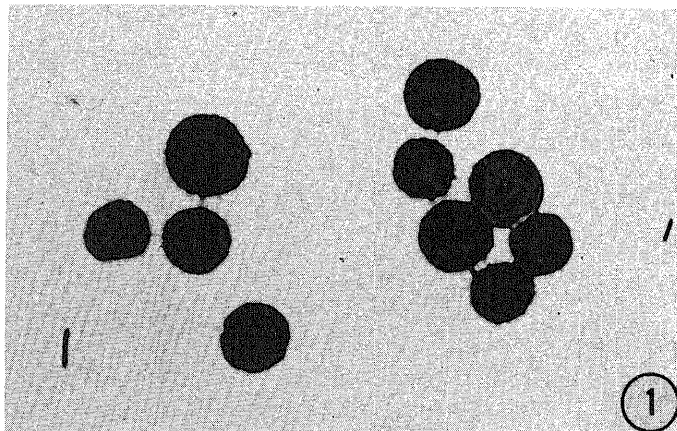
胞数  $4.0 \times 10^7$  cells/ml に対して TF-310 を 0.2 mg/ml 添加した処置群では、いずれの保存時間でも有効数値以下であった。しかし、 $2.0 \times 10^7$  cells/ml に対する TF-310 の処置群は、15, 30 分間保ったものでは有効数値以下であったが、60, 120 分間では T/C(%) が各々 130.4, 141.1% の有効数値を示し、180 分間では T/C(%) は 160.7% と高い抗腫瘍活性を示した。また、 $1.2 \times 10^7$  cells/ml に対して TF-310 を添加した処置群は、15, 30, 60, 120 分間保ったものでは有効数値を示さなかったが、180 分間の T/C(%) が 157.0% と高い抗腫瘍活性を示した。 $4.0 \times 10^6$  cells/ml に対して TF-310 を添加した処置群は、15, 30, 60 分間保ったものでは有効数値以下であったが、120, 180 分間では、T/C(%) は各々 132.7, 141.2% と有効数値を示した。一方、 $2.0 \times 10^6$  cells/ml に対する処置群は、いずれの保存時間でも T/C(%) は有効数値以下であった。 $1.2 \times 10^6$  cells/ml に対する処置群は、15, 30, 60 分間保ったも

のでは有効数値以下であったが、120, 180 分間で、T/C(%) は各々 131.2, 138.2% と有効数値を示した。また、 $4.0 \times 10^6$  cells/ml に対する処置群は、いずれの保存時間においてもそれらの T/C(%) は有効数値以下であった。以上の実験結果より、TF-310 0.2 mg/ml, Sarcoma 180 細胞  $2.0 \times 10^7$  cells/ml の処置群で最も高い抗腫瘍活性を示す成績が得られた。この実験では、30 日間の経過観察期間をすぎても、120 分間保った処置群の中で 1 匹、180 分間保った処置群で 2 匹が生存した。

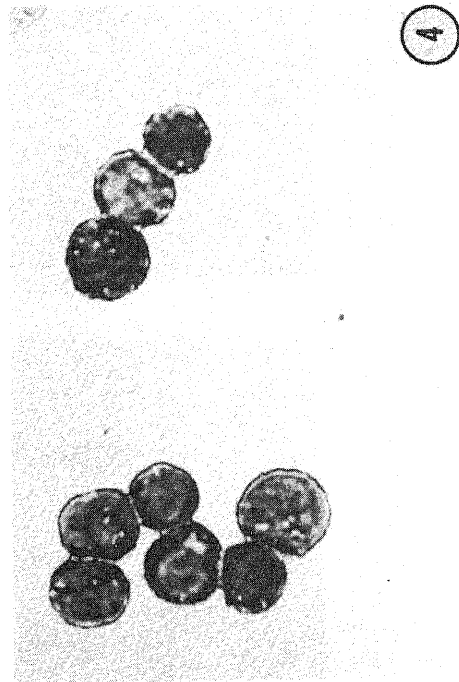
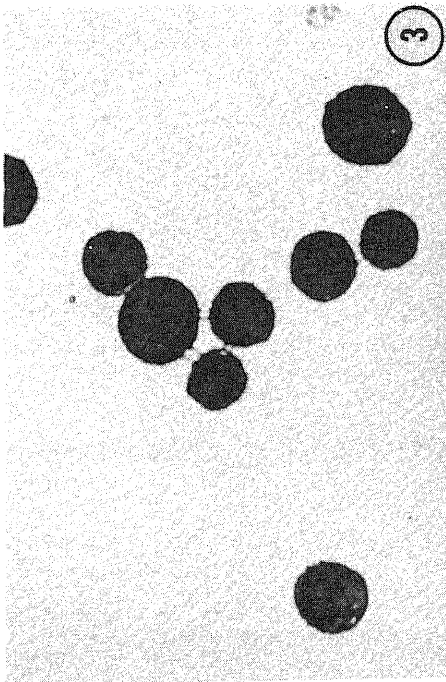
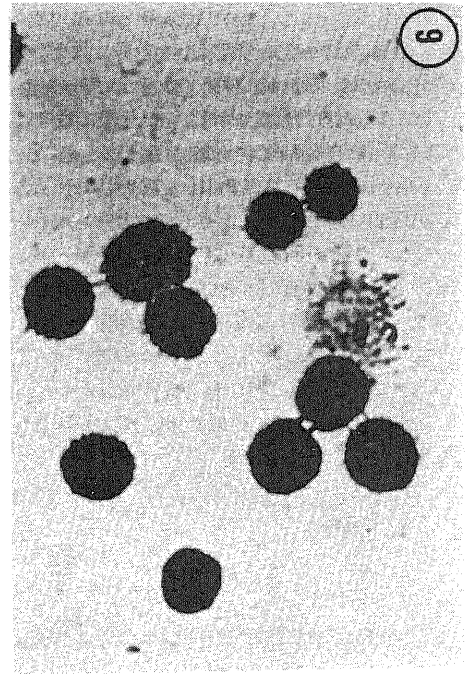
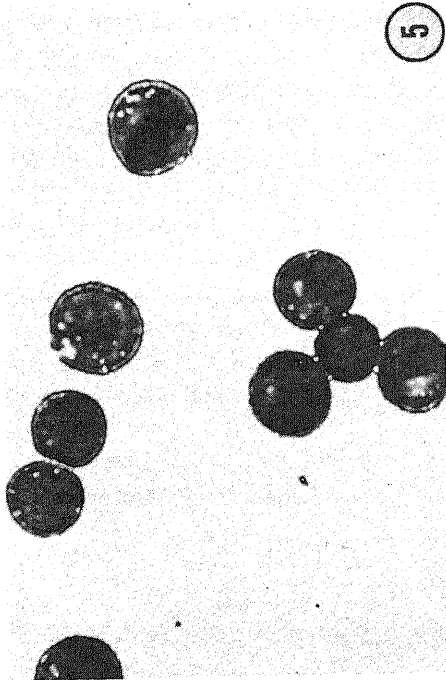
#### V. TF-310 の抗腫瘍効果に対する光学顕微鏡および電子顕微鏡による形態学的検討

##### 1. Ehrlich 腹水癌細胞の形態学的検討

以上の実験から最も著しい抗腫瘍活性を示した TF-310 0.2 mg/ml 添加による  $2.0 \times 10^7$  cells/ml の Ehrlich 腹水癌細胞について、各保存時間における形態学的変化を光学および電子顕微鏡で観察した。







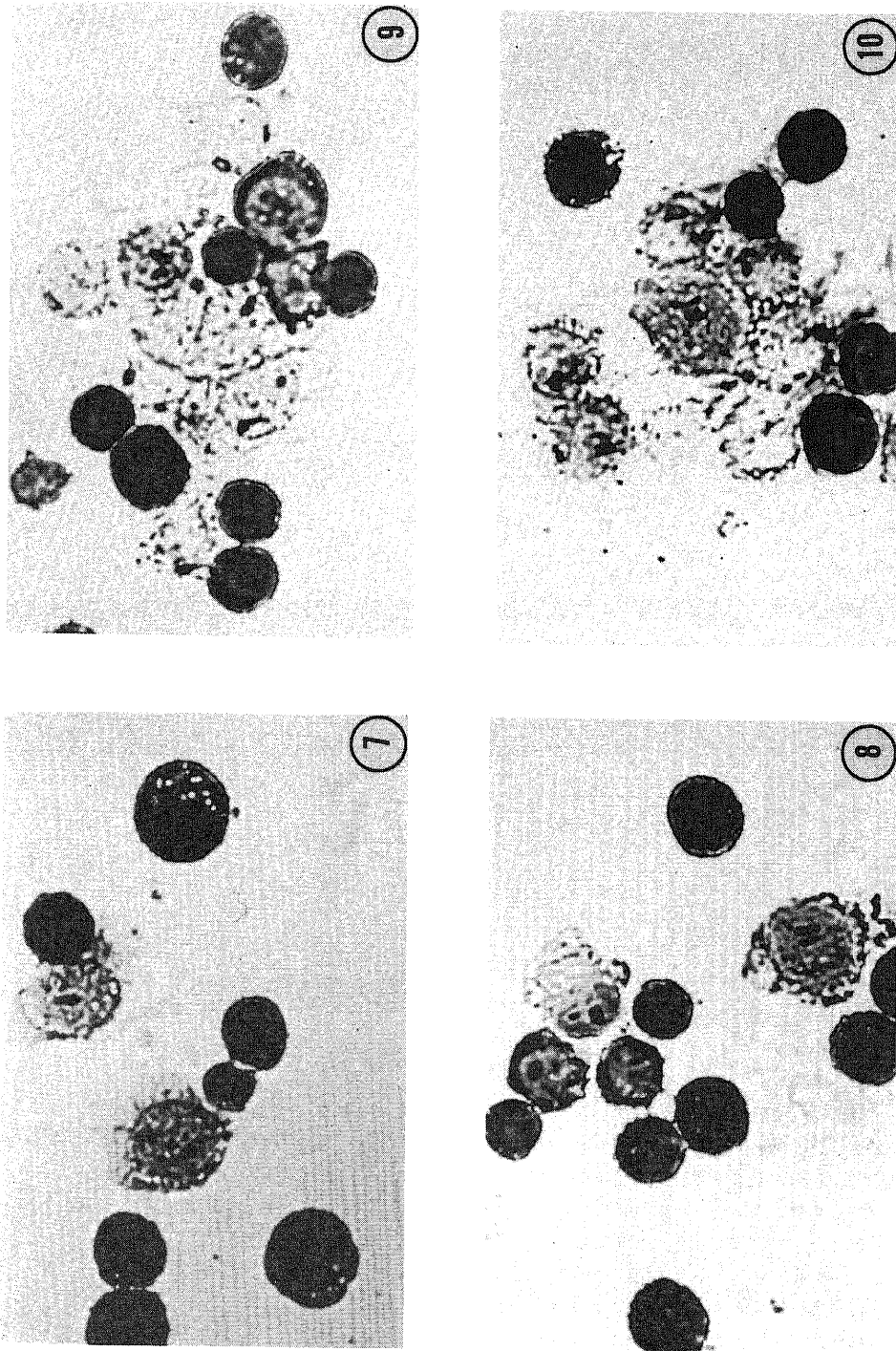


Fig. 1. Morphological changes in Ehrlich ascites carcinoma cells at various intervals in *in vitro* incubation after addition of TF-310. The number of cells incubated was  $2.0 \times 10^7$  cells/ml, to which 0.2 mg of TF-310 was added (treated group). ①-⑤, incubated with no TF-310 (control); ⑥-⑩, incubated with TF-310 (treated). ① and ⑥, incubation time of 15 min; ② and ⑦, 30 min; ③ and ⑧, 60 min; ④ and ⑨, 120 min; ⑤ and ⑩, 180 min. Giemsa-stained smears,  $\times 400$ .

対照群の 15, 30, 60, 120, 180 分間保った各細胞像を図 1 の 1 から 5 に示した。いずれも類円形および楕円形の濃く染色された細胞像であり、時間経過による細胞破壊はみられなかった。一方、TF-310 を添加した処置群の 15 分間および 30 分間保った細胞像は、図 1 の 6 と 7 に示したが、一部の細胞に破壊が観察された。しかし、同一視野にみられる他のほとんどの細胞は染色性も濃く、対照群の細胞とくらべ変化はみられなかった。60 分間保った処置群の細胞像は、図 1 の 8 に示すごとく、細胞の腫大、膨脹を多く認めた。また、各細胞の染色性の低下もみられ、細胞膜の一部断裂した細胞破壊像も観察された。120 分間の処置群の細胞像では、図 1 の 9 に示すごとく、原形質および核の著しい破壊像を認めた。細胞の破壊がみられない像では、染色性の低下が観察された。さらに、180 分間の細胞像では、図 1 の 10 に示すごとく、多数の細胞に著しい破壊像がみられ、ほとんど細胞の原形をとどめていなかった。以上、TF-310 で処理した Ehrlich 腹水癌細胞は、時間が経過するにつれて、細胞の破壊像も多く観察された。これらの現象をさらに詳細に検討するため、120 分間保った腫瘍細胞について電子顕微鏡による比較観察をおこなった。

対照群の Ehrlich 腹水癌細胞は、図 2 の 1 に示すごとく、2,100 倍像では類円形ないし楕円形で、細胞表面に多数の偽足様小突起を有し、原形質にはしばしば脂肪滴が認められ、核は大型、類円形であった。また、6,000 倍像では、図 2 の 2 に示すごとく、原形質に細管状の粗面小胞体および少数のゴルジ装置が明瞭に認められ、遊離リボソームとポリソームも豊富であった。核内のユウクロマチンは豊富で、ヘテロクロマチンは少なく、明瞭な核小体が観察された。一方、TF-310 を添加した処置群の Ehrlich 腹水癌細胞の 2,100 倍像では、図 3 の 1 に示すごとく、核の腫大、膨化がとくに顕著で、核小体の縮小、小円形化、濃縮も認められた。また、原形質も軽度に腫大していた。細胞膜の崩壊に伴い、細胞内小器官が細胞外に露出する細胞も混在していた。また、類円形や楕円形の細胞形態を示さず、その細胞表面の偽足様小突起が減少した細胞もみられた。6,000 倍像では、図 3 の 2 に示すごとく、原形質のポリソームは著しく減少しており、ゴルジ装置もほとんど観察されなかった。ミトコンドリアは腫脹し、クリスタが消失しているものも多かった。核のユウクロマチンは減少し、核膜の辺縁には、ヘテロクロマチンの凝集が観察された。

## 2. Sarcoma 180 細胞の形態学的検討

先述した実験から著しい抗腫瘍活性を示す成績を得た TF-310 0.2 mg/ml 添加による  $2.0 \times 10^7$  cells/ml

の Sarcoma 180 細胞について、細胞レベルでの形態学的変化を観察した。

対照群の 15, 30, 60, 120, 180 分間保った像は、図 4 の 1 から 5 に示すごとく、細胞は濃く染色されており、破壊像もみられなかった。TF-310 を添加し、15, 30 分間保った処置群の Sarcoma 180 細胞像は、図 4 の 6, 7 に示すごとく、原形質に小空胞がみられた。また、原形質の一部流出を認める細胞もみられたが、全体像としては濃く染色され対照群と比較して著しい変化は認められなかった。60 分間保った処置群の像においては、図 4 の 8 にみられるように、細胞膜の一部崩壊による原形質流出や、細胞の破壊が観察された。120 分間の処置群の細胞は、図 4 の 9 に示すごとく、細胞の腫大、膨化が観察された。原形質では融解や破壊がみられ、核が破壊、消失している状態の細胞も存在していた。また、多数の細胞で染色性の低下が認められた。180 分間の処置群の像では、図 4 の 10 のごとく、ほとんどの細胞に高度な破壊像がみられ細胞の原形をとどめていなかった。以上の光学顕微鏡による観察で、Sarcoma 180 細胞は TF-310 により時間の経過とともに細胞の破壊が著しくなることが観察されたため、続いて電子顕微鏡を使用して 120 分間保った Sarcoma 180 細胞を観察した。

対照群の Sarcoma 180 細胞は、図 5 の 1 に示す 2,100 倍像で類円形ないし楕円形の細胞で表面に多数の偽足様小突起を備え原形質にしばしば脂肪滴が認められた。核は大型で類円形を示していた。6,000 倍の対照群の細胞像は、図 5 の 2 に示すごとく、原形質に遊離リボソームとポリソームを豊富に認めた。また、ゴルジ装置および管状の粗面小胞体が同定された。核は明瞭な核小体を有しユウクロマチンが豊富にみられヘテロクロマチンの少ない細胞像であった。一方、TF-310 を添加した処置群の細胞像は、図 6 の 1 に示す 2,100 倍像のごとく、核の腫大、膨化がとくに顕著で、核小体の縮小、小円形化、濃縮も認めた。また、Sarcoma 180 細胞は、全体に原形質水腫を示し、細胞は類円形や楕円形の形態を失い、細胞の表面の偽足様小突起は著しく減少していた。原形質は全体に電子密度の低下が認められた、辺縁部では腫大、膨化がとくに強く観察され、一部原形質の完全崩壊を示す細胞も散見された。

6,000 倍像でも、図 6 の 2 に示すごとく、原形質の細胞内小器官は、辺縁部にきわめて少なくなり、核膜周囲に集合していた。ミトコンドリアは著明に腫大し、クリスタの消失がみられ、ゴルジ装置は不明瞭となり、粗面小胞体の配列は不規則となっていた。また、ポリソームはほとんど消失していた。さらに、核の周囲に

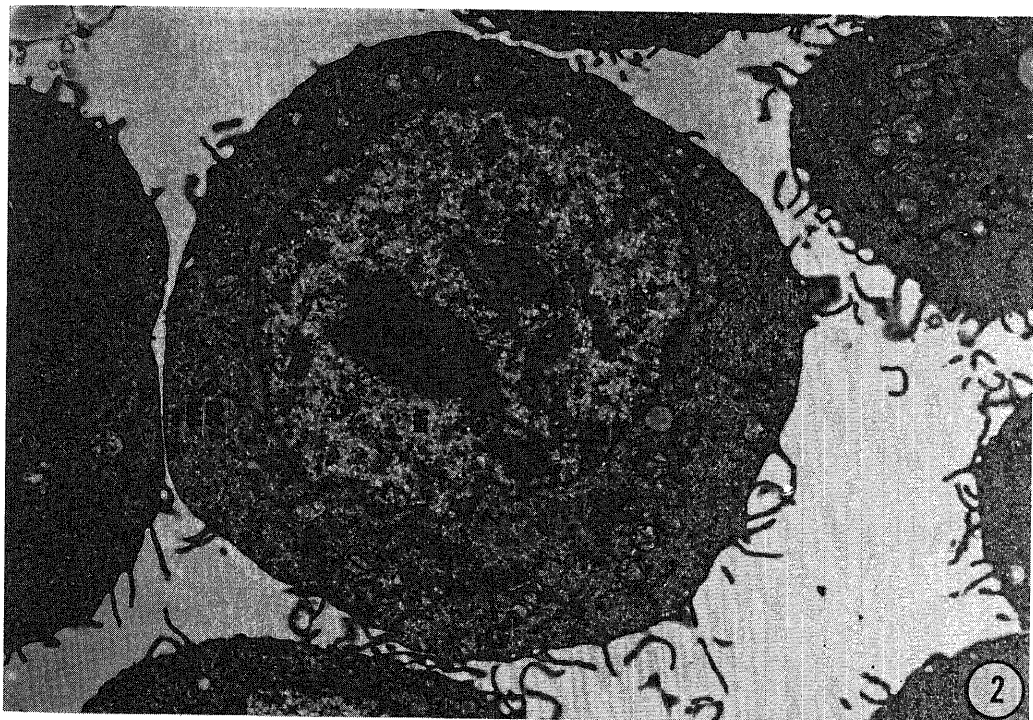
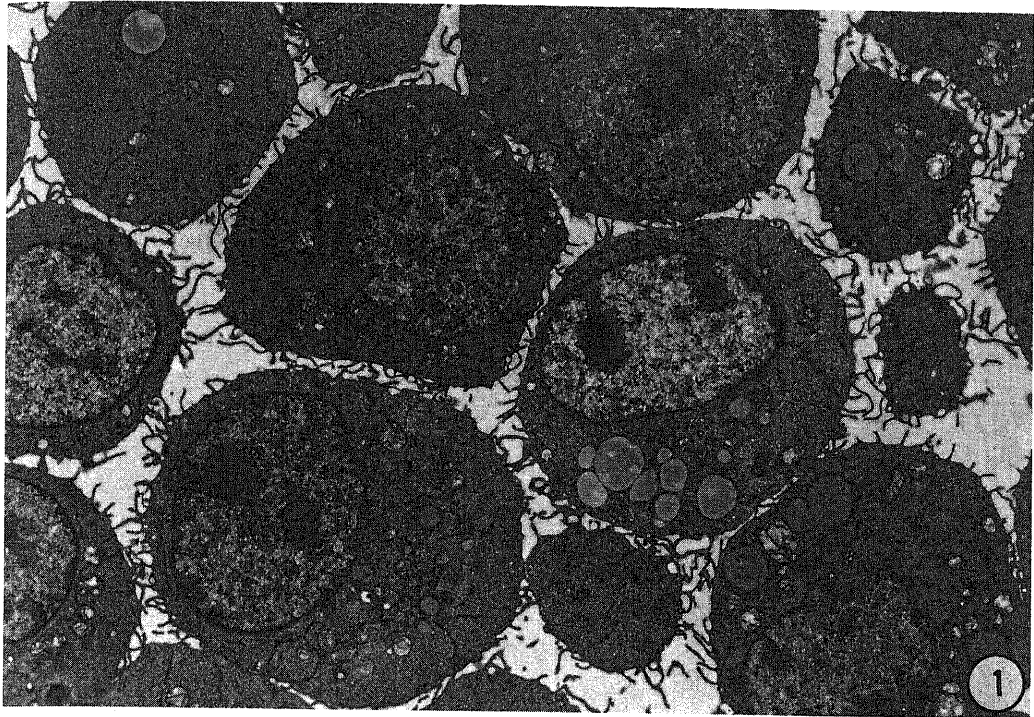


Fig. 2. Electron microscopic pictures showing normal structure of Ehrlich ascites carcinoma cells, incubated at 37°C for 120 min. E, euchromatin; G, golgi complex; H, heterochromatin; No, nucleolus; rER, rough-surfaced endoplasmic reticulum. ①, × 2100; ②, × 6000.

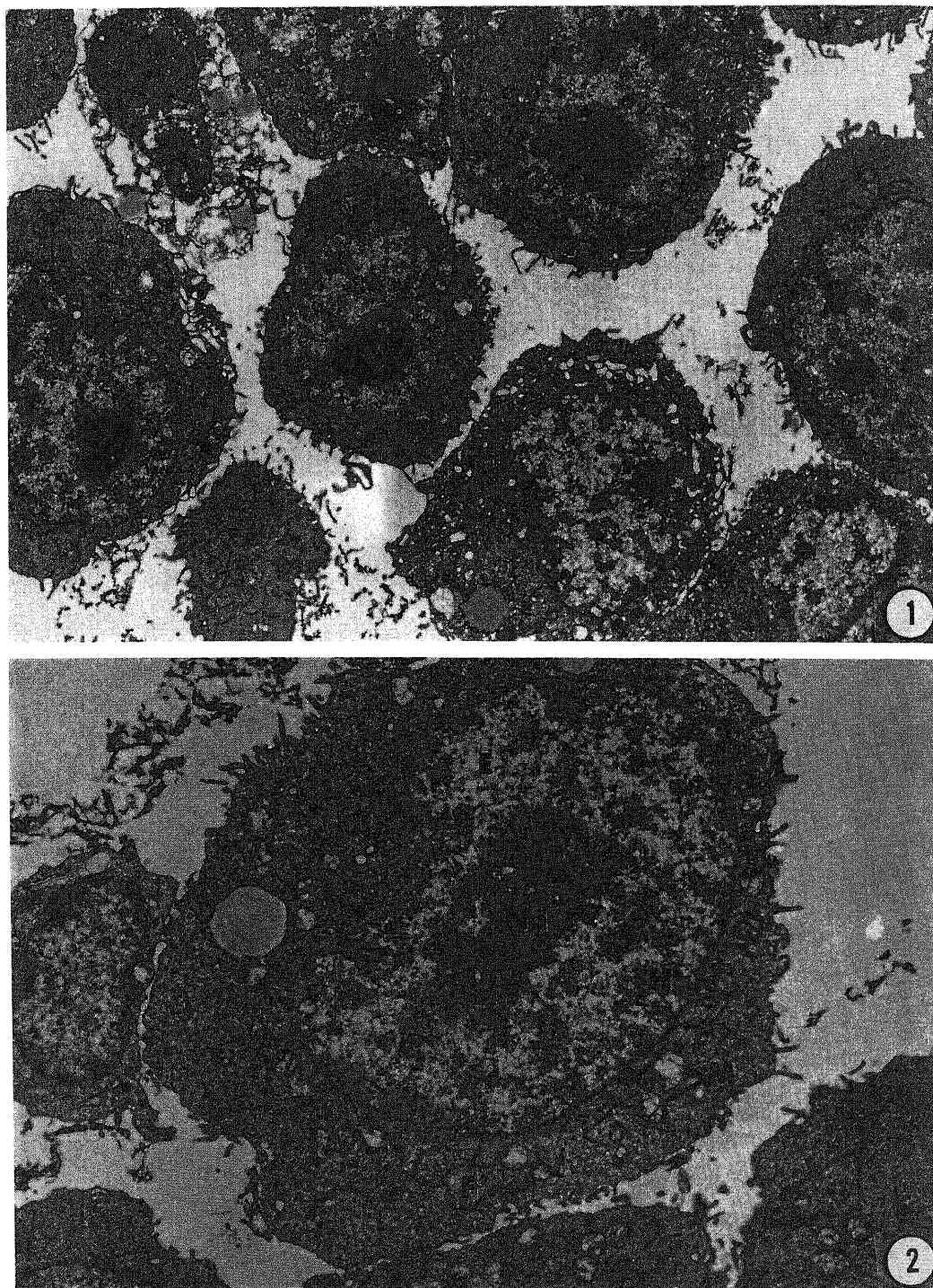
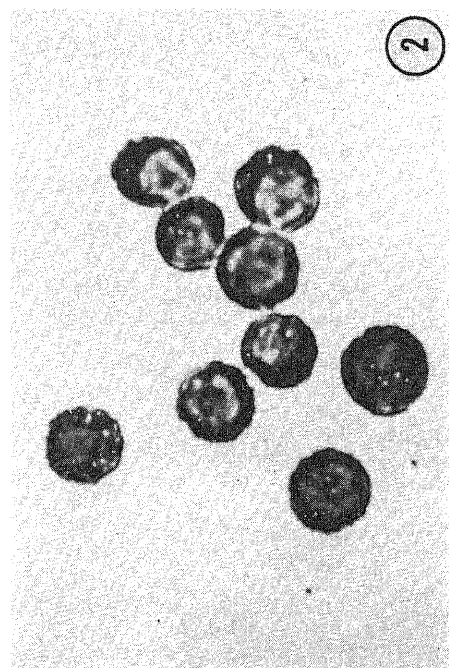
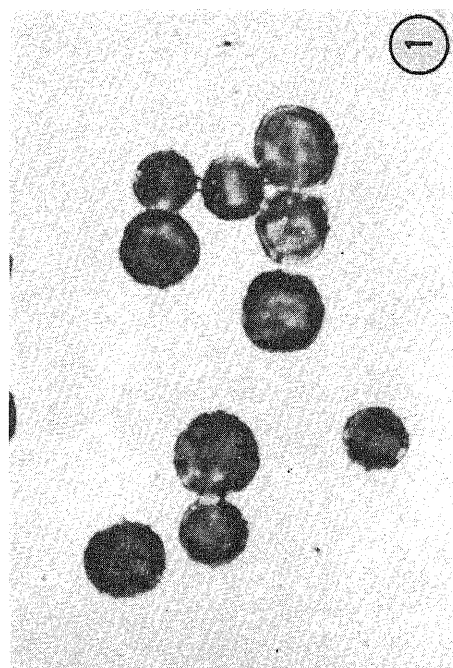
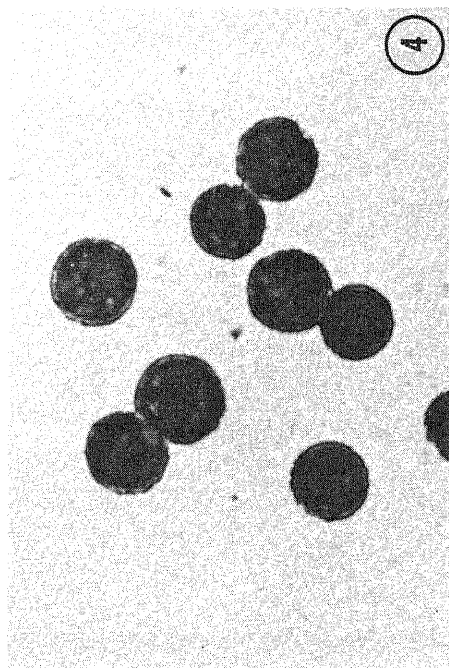
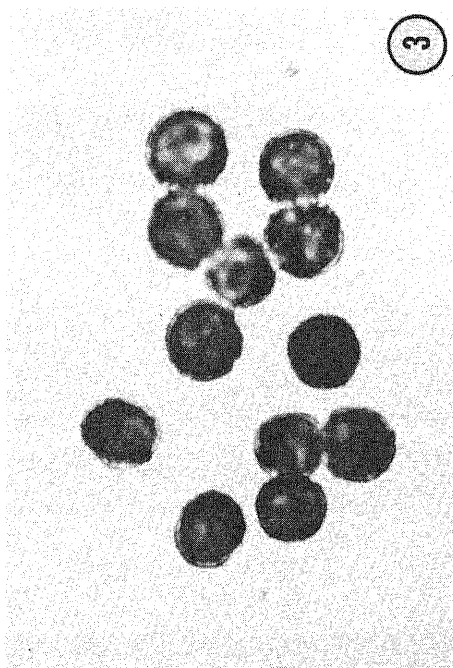
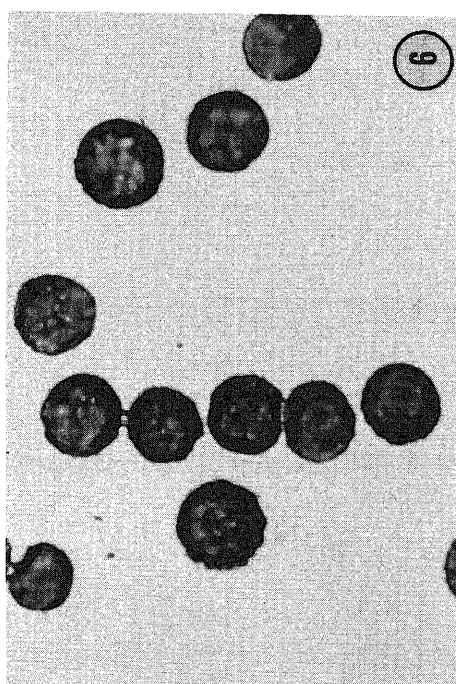
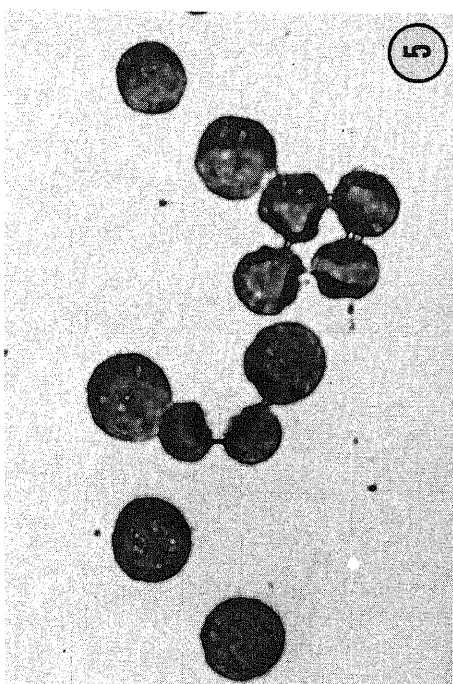
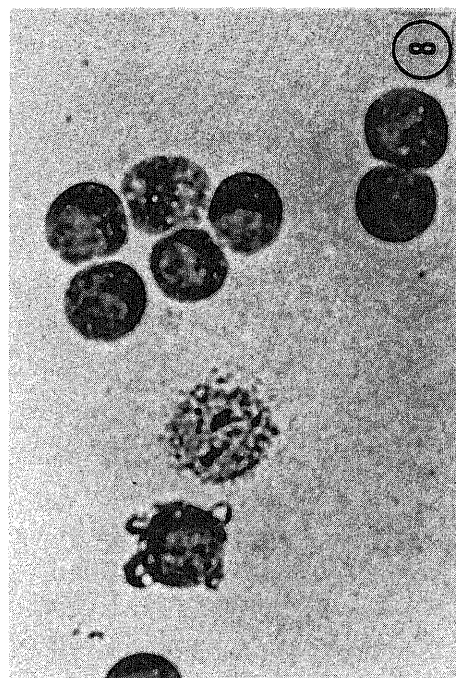
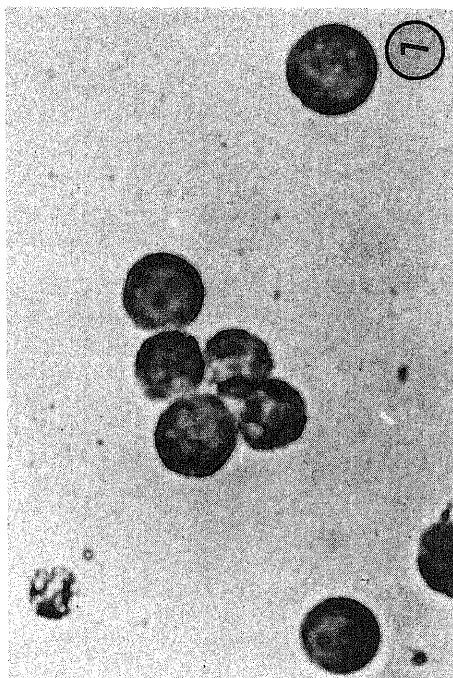


Fig. 3. Electron microscopic pictures showing degeneration of Ehrlich ascites carcinoma cells, incubated with TF-310 at 37°C for 120 min.  
E, euchromatin; F, filament; H, heterochromatin; M, mitochondria; No, nucleolus.  
①,  $\times 2100$ ; ②,  $\times 6000$ .





は束状のフィラメントが出現し、核内のユウクロマチンは減少し、核膜の辺縁にヘテロクロマチンの凝集が観察された。

一方、細胞破壊の程度をトルイジンブルー染色法<sup>40)</sup>でみることもでき、この場合、Intactの細胞は濃く染色され、破壊された細胞では染色性が低下するといわれる。このため、電子顕微鏡観察に際し、電顕材料を1 $\mu$ の厚さに薄切し、光学顕微鏡の標本を作り、Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞の TF-310 添加による細胞破壊の程度をトルイジンブルー染色でみた。図7の2, 4に示すごとく、処置群の細胞の染色性は低下し多数の細胞破壊像がみられた。

#### 考 察

現在、抗腫瘍物質の中で、微生物より精製し、臨床応用に至っている代表的なものは、Okamotoら<sup>19)40)~42)</sup>により発見された溶連菌製剤である。微生物の抗腫瘍活性に対する研究は、Busch<sup>43)</sup>が癌患者の丹毒に罹患した際、腫瘍増殖の一時停止あるいは減退という報告に始まっている。その後、Coley<sup>44)</sup>は、溶連菌と霊菌との混合培養濾液である“Coley's toxin”の抗腫瘍活性を報告している。また、Nautsら<sup>45)</sup>は、“Coley's toxin”を用いて270症例の完全治癒例を報告している。その後も、Reinhardら<sup>46)</sup>の小児白血病患者の感染

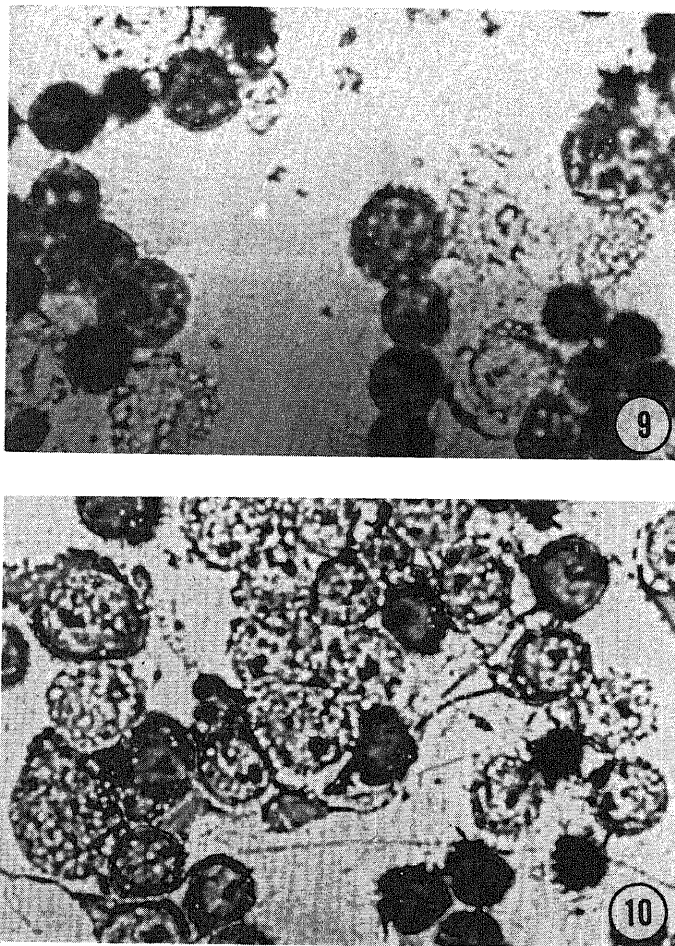


Fig. 4. Morphological changes in Sarcoma 180 cells at various intervals in *in vitro* incubation after addition of TF-310. The number of cells incubated was  $2.0 \times 10^7$  cells/ml, to which 0.2 mg of TF-310 was added (treated group). ①-⑤, incubated with no TF-310 (control); ⑥-⑩, incubated with TF-310 (treated). ① and ⑥, incubation time of 15 min; ② and ⑦, 30 min; ③ and ⑧, 60 min; ④ and ⑨, 120 min; ⑤ and ⑩, 180 min. Giemsa-stained smears,  $\times 400$ .



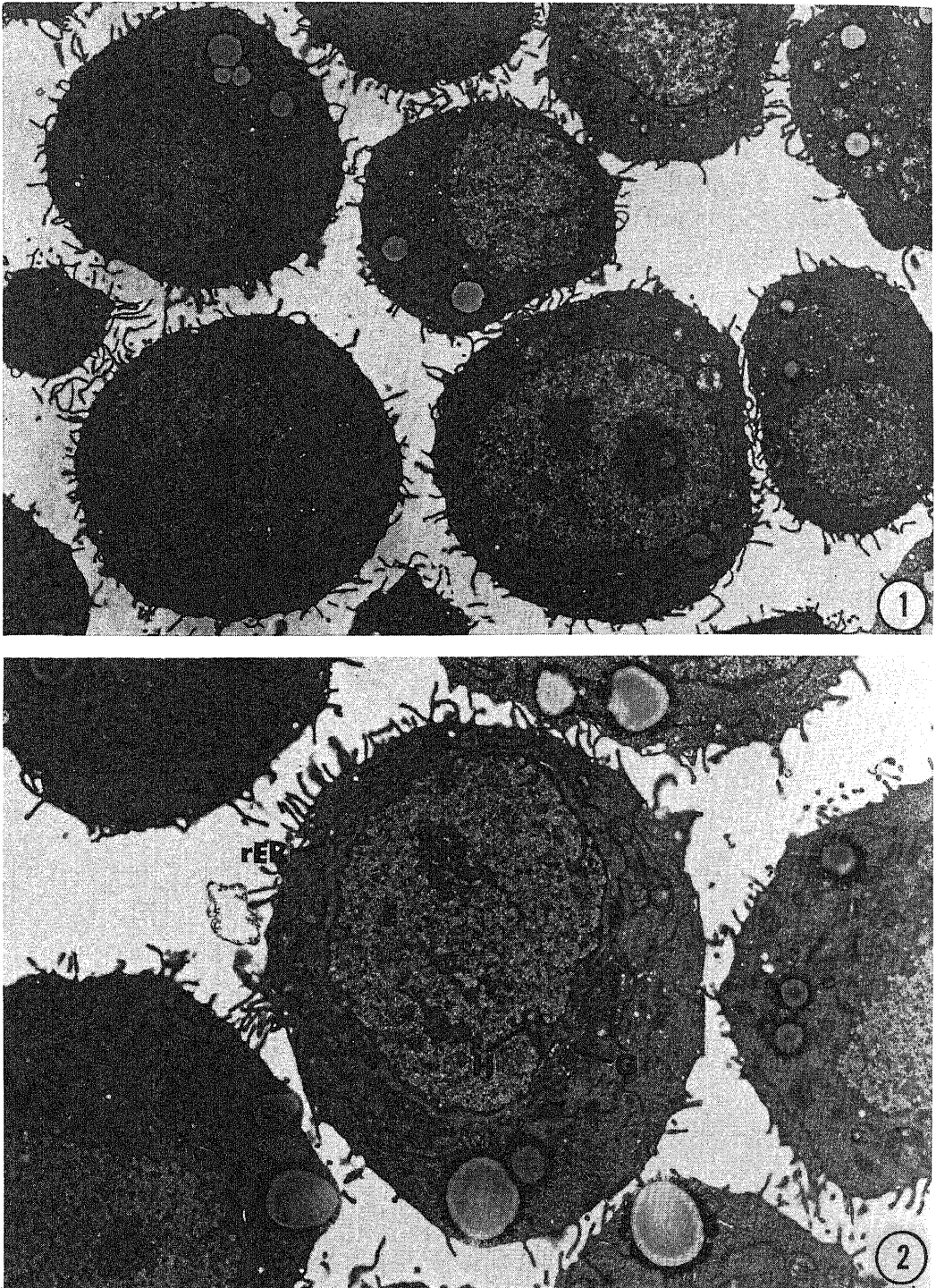


Fig. 5. Electron microscopic pictures showing normal features of Sarcoma 180 cells, incubated at 37°C for 120 min.

E, euchromatin; G, golgi complex; H, heterochromatin; No, nucleolus; rER, rough-surfaced endoplasmic reticulum. ①,  $\times 2100$ ; ②,  $\times 6000$ .

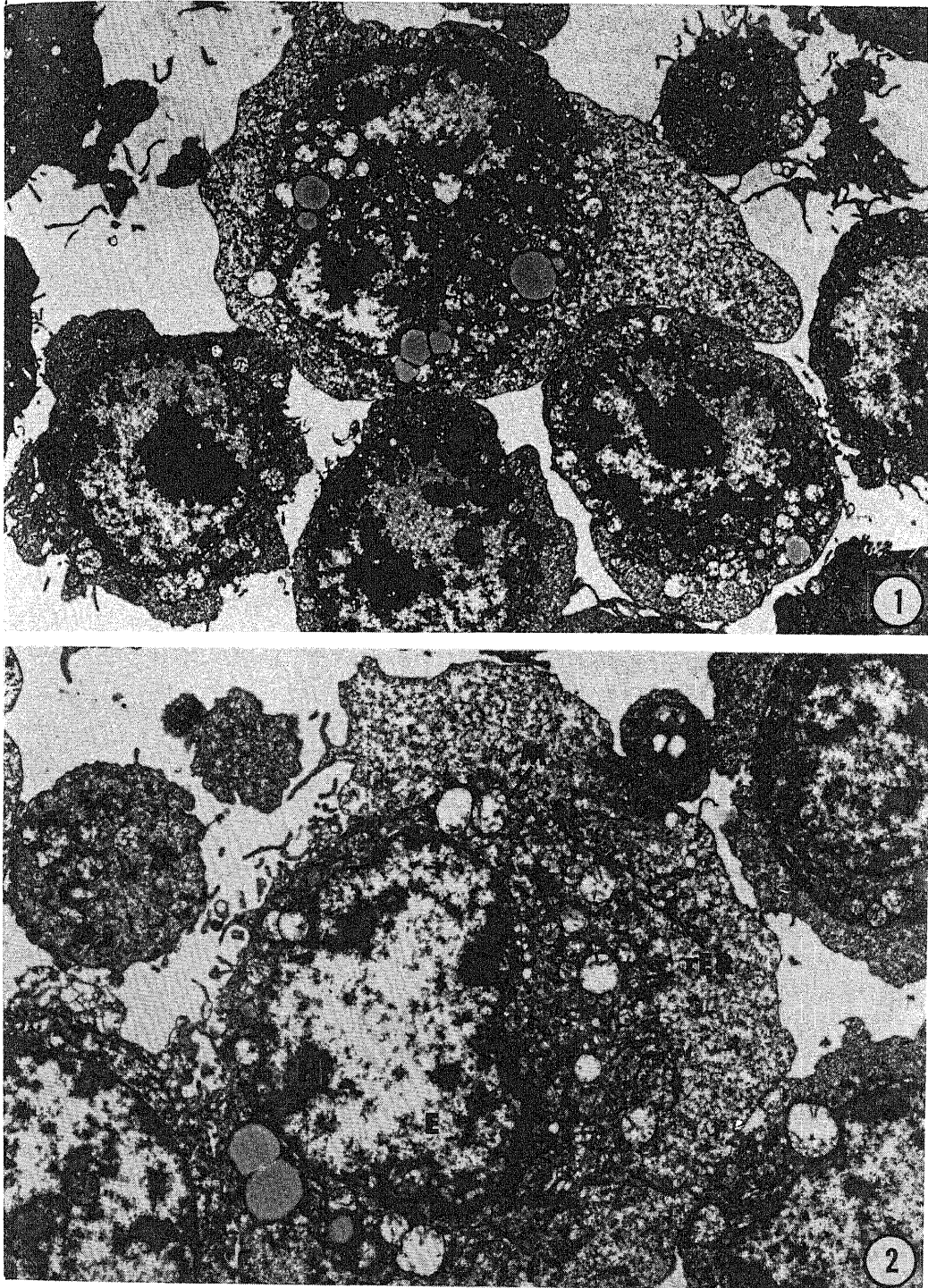


Fig. 6. Electron microscopic pictures showing degenerative changes of Sarcoma 180 cells, incubated with TF-310 at 37°C for 120 min.  
E, euchromatin; F, filament; H, heterochromatin; M, mitochondria; rER, rough-surfaced endoplasmic reticulum. ①,  $\times 2100$ ; ②,  $\times 6000$ .

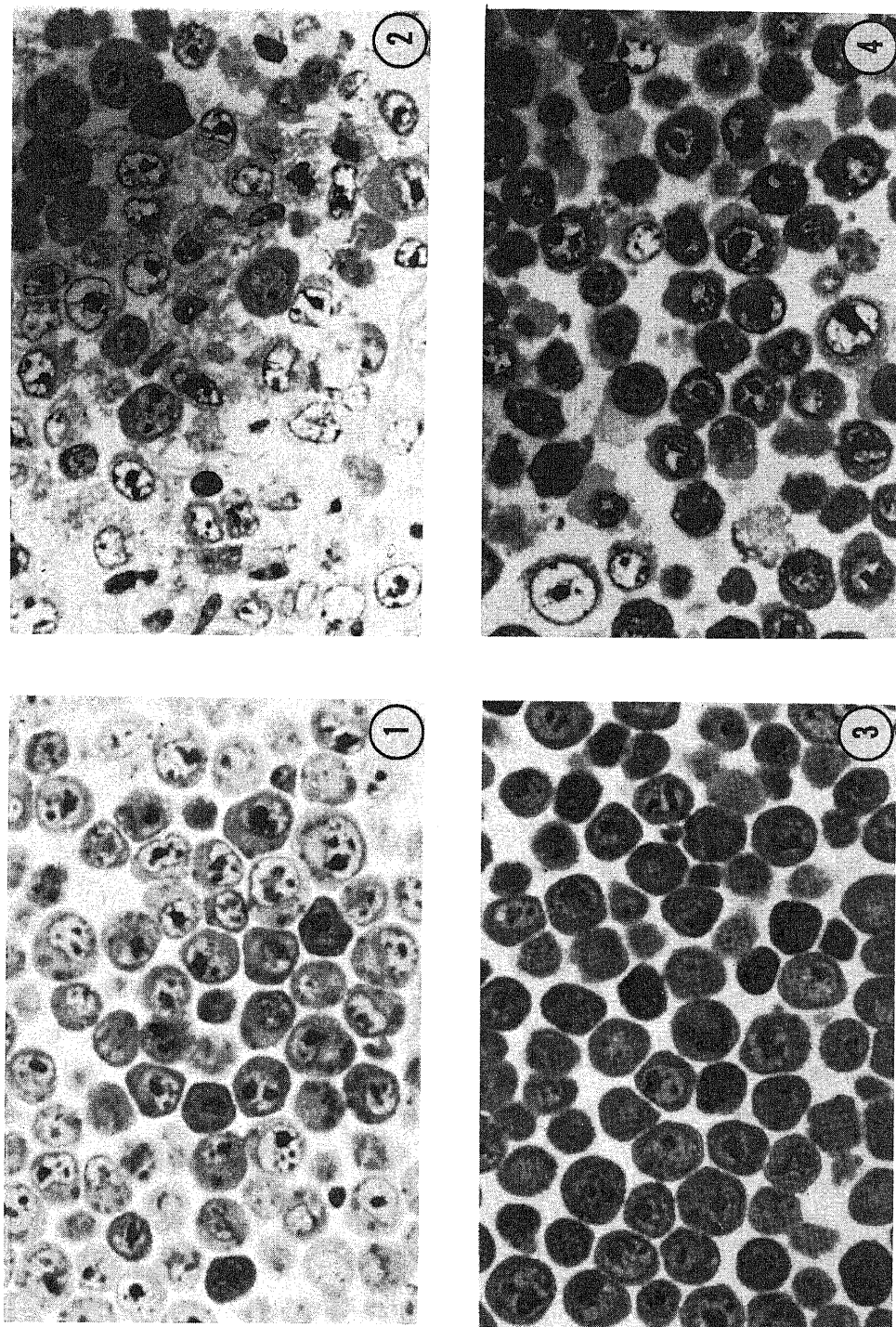


Fig. 7. Morphological changes in Ehrlich ascites carcinoma and Sarcoma 180 cells at 120 min after addition of TF-310. The procedures were the same as in Figs. 1 and 4. ① and ②, Ehrlich ascites carcinoma cells; ③ and ④, Sarcoma 180 cells; ① and ③, incubated with no TF-310 (control); ② and ④, incubated with TF-310 (treated). Toluidine blue-stained smears,  $\times 400$ .

症と自然治癒の関係、Mathéら<sup>47)</sup>およびMortonら<sup>48)</sup>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が数多くみられる。しかし、これらの研究のほとんどは好気性菌である。嫌気性菌の抗腫瘍活性に関する報告は外国文献では、Bomfordら<sup>21)</sup>、Scott<sup>22)23)</sup>、Tuttleら<sup>24)</sup>、Woodruffら<sup>25)</sup>、Möseら<sup>26)</sup>、Gerickeら<sup>27)</sup>、Thieleら<sup>28)</sup>の研究があり、最近では、Ribiら<sup>49)</sup>の細菌の内毒素を用いた研究がある。わが国では、嫌気性菌の抗腫瘍性に関する報告は服部ら<sup>29)</sup>、森<sup>30)</sup>、原田ら<sup>31)</sup>などの *Corynebacterium*、Matsunagaら<sup>32)</sup>の *Clostridia* の制癌研究以外はほとんど皆無である。Tamaiら<sup>33)34)</sup>、中新ら<sup>35)</sup>は数年前より *F. nucleatum* KO-31 の抗腫瘍活性を検討し、*in vivo* 実験で証明してきたが、今回、その作用機序について実験した。

抗腫瘍物質の作用機序の解明として腫瘍細胞に対する直接的な作用も重要な抗腫瘍活性の条件および証明方法と考えられてきている。Apitz<sup>50)</sup>は、Ehrlich 腹水癌細胞に対するシュワルツマン濾液の組織学的影響の報告で、濾液による出血は、一過性に生じたと思われる壊死部位にみられた。そのため、腫瘍組織の退縮は出血の二次的産物だけでなく、この濾液の Ehrlich 腹水癌細胞に対する直接的な作用も考慮すべきだと報告している。また、腫瘍細胞に対する直接作用は、森<sup>30)</sup>、Okamotoら<sup>40)~42)</sup>、Koshimuraら<sup>39)51)</sup>、国本<sup>52)</sup>、Dillerら<sup>53)54)</sup>、梅沢ら<sup>55)</sup>、Komiyaら<sup>56)</sup>により報告されている。一方、波多野<sup>57)</sup>、清水ら<sup>58)</sup>は、溶連菌の抗腫瘍活性の実験で Ehrlich 腹水癌細胞の障害作用をトルイジンブルーの染色性を併用して検討している。Okamotoら<sup>40)</sup>は、溶連菌で細胞増殖作用や RNA 合成の阻害を認めたと報告している。また、Mizunoら<sup>59)</sup>は、*Proteus vulgaris* よりフェノール抽出した内毒素の直接的な細胞障害作用を説明した報告があり、木村<sup>60)</sup>、福島ら<sup>61)</sup>も同様の報告がある。以上の報告のごとく各研究者は、*in vitro* ないし *in vivo* 実験にて腫瘍細胞に対する直接作用を検討し、抗腫瘍物質の効果および作用機序の解明の一証明方法としている。本実験は、*F. nucleatum* KO-31 の培養上清液からエチルアルコールにより沈澱物質を得、等電点法およびプロナーゼ処理にて精製した抗腫瘍物質について、その作用機序の解明の一助として、*in vitro* で作用させた後に *in vivo* で各時間を設定して腫瘍細胞に対する効果をみた。同時に細胞染色を併用して、各保存時間毎の細胞の変化を光学顕微鏡および電子顕微鏡にて観察し、腫瘍細胞に対する影響について検討した。

その結果、TF-310 は、Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞に対し直接細胞障害作用を示すこ

とが証明された。また、TF-310 は光学顕微鏡および電子顕微鏡による形態学的観察でも Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞に対して直接細胞障害作用を示すことが証明された。

TF-310 の直接細胞障害作用の作用機序を、Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞の光学顕微鏡および電子顕微鏡の所見をもとにし、各研究者の報告を参考に以下検討する。TF-310 を添加した処置群の Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞は、時間の経過とともに、光学顕微鏡的観察において、ギムザとトルイジンブルーの両染色性の低下がみられた。この染色性の低下について、Okamotoら<sup>40)</sup>、波多野<sup>57)</sup>、清水ら<sup>58)</sup>は癌細胞を溶連菌生菌体と、37°C、60 分間保ち癌細胞のトルイジンブルー染色性の低下および細胞外に 260 m $\mu$  吸収物質が多量に流出するのを観察したと報告している。そして、この流出物には RNA が多く含まれるとして Okamotoら<sup>62)</sup>の報告の RNA 効果と関連があるのではないかと述べている。

また、TF-310 を添加した両細胞の光学顕微鏡および電子顕微鏡の観察で、細胞膜および原形質には、細胞膜の変性、消失による細胞内小器管の流出がみられた。波多野<sup>57)</sup>および Ginsburgら<sup>63)</sup>は、溶連菌の菌体を添加した Ehrlich 腹水癌細胞の光学顕微鏡的観察で癌細胞障害所見について報告している。Okamotoら<sup>40)</sup>は溶連菌の菌体を添加した Ehrlich 腹水癌細胞の所見について光学顕微鏡および電子顕微鏡を使用し、細胞膜の変性、消失による細胞内小器管の流出を観察したと報告している。そして、細胞内小器管の流出については、とくに遊離リボゾームである顆粒の流出がみられ、これは細胞溶解性を裏付ける所見であるとも報告している。さらに、著者の実験において TF-310 を添加した処置群の両細胞の電子顕微鏡の観察で、核は腫大、膨化し、核小体の縮小、小円形化、濃縮を認め、ユウクロマチンは減少していた。同様の所見を、小川<sup>64)</sup>は、ダウノマイシンやアクチノマイシン D など DNA 合成と DNA 依存性 RNA 合成を抑制する薬剤を白血病細胞に投与した実験で観察したと報告している。小川<sup>64)</sup>は、核の主な働きを DNA の貯蔵、複製、DNA 依存性 RNA 合成、転写および合成された RNA の細胞質への輸送であると述べている。そして、核小体については DNA 依存性の rRNA 合成を行なう部位で、これを阻害する薬剤を投与すると、核小体に縮小、小円形化がおり、後には濃縮をきたし、細胞は死にいたると報告している。核内のクロマチンについて、ユウクロマチンでは、mRNA、tRNA および 5SRNA を合成し、ヘテロクロマチンに比べ代謝上はユウクロマチンの方が RNA 合成能は高いと報告している。このた

め、核内でユウクロマチンの占める部分が多く、かつ核小体が顕著な細胞ほど、タンパク質合成能などの代謝の活性度が高いと述べている。Okamotoら<sup>40)</sup>、波多野<sup>57)</sup>、清水ら<sup>58)</sup>、Ginsburgら<sup>63)</sup>、小川<sup>64)</sup>などの報告を参考に、本実験のTF-310を添加した処置群のEhrlich腹水癌細胞およびSarcoma 180細胞について光学顕微鏡および電子顕微鏡的所見を検討した。その結果、光学顕微鏡的にはトルイジンブルー染色能低下を示し、電子顕微鏡的には核の腫大、膨化、核小体の縮小、小円形化、濃縮が観察された。さらに、ユウクロマチンの減少を考慮すると、TF-310はEhrlich腹水癌細胞およびSarcoma 180細胞に対してDNA合成阻害はもちろんのこと、DNA依存性RNA合成を抑制し、また、ユウクロマチンの減少所見より、RNA合成阻害としても細胞のタンパク質合成能などの代謝の活性度を低くする作用があり、そのため、ついには細胞を死にいたらしめるのではないかと考えられた。しかし、光学顕微鏡および電子顕微鏡的観察にて、Sarcoma 180細胞の形態の破壊像が若干強くあらわれているが、*in vivo*実験では、Ehrlich腹水癌細胞に対して抗腫瘍活性の作用が強くあらわれた。これは、Okamotoら<sup>40)</sup>、Ginsburgら<sup>63)</sup>、Sakuraiら<sup>65)</sup>が報告しているように、宿主の細網内皮系組織を中心とする腫瘍組織の周囲(間葉系組織)の腫瘍細胞に対する拒絶反応の亢進のためと思われる。すなわち、生体防御機構の亢進の程度がEhrlich腹水癌細胞とSarcoma 180細胞とで異なるのではないかと考えられる。また、*in vitro*と*in vivo*実験では、腫瘍細胞の抗腫瘍物質に対する感受性が平行関係にあらわれないとする報告<sup>61)62)</sup>があるが、本実験におけるTF-310も、試験管内と生体内での状態で腫瘍細胞の感受性が異なるため、Ehrlich腹水癌細胞により高い抗腫瘍活性が認められたものと思われる。

## 結 論

- 1) TF-310の量を0.2 mg/ml、Ehrlich腹水癌細胞およびSarcoma 180細胞の細胞数を、それぞれ、 $2.0 \times 10^7$  cells/mlとし、180分間保った処置群のマウスのT/C(%)は、197.8%、160.7%と高い数値を示し、TF-310の抗腫瘍活性が認められた。
- 2) TF-310処置群の腫瘍細胞をギムザ染色とトルイジンブルー染色により光学顕微鏡で経時的に観察した結果、37°Cで保つと、時間の経過とともに、Ehrlich腹水癌細胞、Sarcoma 180細胞像には、多数の細胞破壊像が観察された。
- 3) TF-310の直接細胞障害作用を電子顕微鏡で観察した結果、TF-310を添加し37°Cにて120分間保つ

た処置群のEhrlich腹水癌細胞およびSarcoma 180細胞では、核の腫大、膨化、核小体は縮小、小円形化、濃縮があり、核内のユウクロマチンの減少、原形質でミトコンドリアのクリスタの消失による空胞化や細胞内小器管の流出などがみられた。

以上の所見より、TF-310はEhrlich腹水癌細胞およびSarcoma 180細胞に対して直接細胞障害作用を有することが示された。

## 謝 辞

稿を終るに臨み、大学院医学研究科課程において終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師玉井健三教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、電子顕微鏡の実験にあたり終始多大なる御支援を頂きました第1病理学教室・中西功夫教授および御援助、御助言を頂きました岡田保典博士に心から感謝の意を表します。さらに、本研究に御協力戴いた歯科口腔外科学教室の諸先生方に感謝いたします。

なお、本論文の概要は、第12回嫌気性菌感染症研究会(1982)、第55回日本細菌学会総会(1982)、第28回日本口腔外科学会総会(1983)および第57回日本細菌学会総会(1984)において発表した。

## 文 献

- 1) Ikawa, M., Koepfle, J. B., Mudd, S. G. & Nieman, C.: An agent from *E. coli* causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor. I. Isolation and Properties. J. Natl. Cancer Inst., **13**, 157-166 (1952).
- 2) Chimura, H., Ishizuka, M., Hamada, M., Hori, S., Kimura, K., Iwanaga, J., Takeuchi, T. & Umezawa, H.: A new antibiotic, Macromomycin, exhibiting antitumor and antimicrobial activity. J. Antibiotics, **XXI**, 44-49 (1968).
- 3) 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 syngeneic mice. Gann, **62**, 433-434 (1971).
- 4) Kaibara, N., Ikeda, T., Hattori, T. & Inokuchi, K.: Effectiveness of treatment using a streptococcal preparation (PC-B-45) and Mitomycin-C on transplanted mouse tumor. Gann, **63**, 387-390 (1972).
- 5) Hoshi, A., Kanzawa, F., Kuretani, K., Homma, J. Y. & Abe, C.: Antitumor activity of protein moiety of the *Pseudomonas aeruginosa* endotoxin. Gann, **63**, 503-504 (1972).
- 6) Azuma, I., Taniyama, T., Hirao, F. &

- Yamamura, Y.: Antitumor activity of cell-wall skeletons and peptidoglycolipids of *Mycobacteria* and related Microorganisms in mice and rabbits. *Gann*, **65**, 493-505 (1974).
- 7) Takatsu, K., Tominaga, A. & Kitagawa, L. M.: Induction of antitumor activity in mice sensitized with *Mycobacterium* by immunization with Tuberculin-coated tumor. *Gann*, **69**, 597-598 (1978).
- 8) Namba, M., Ogura, T., Hirao, F., Azuma, I. & Yamamura, Y.: Antitumor activity of peritoneal exudate cells induced by cell-wall skeleton of *Mycobacterium bovis* BCG. *Gann*, **69**, 831-834 (1978).
- 9) Adachi, H., Yabu-Uchi, K., Ozawa, K., Sindo, T. & Tadokoro, I.: Effect of aerobic and anaerobic Corynebacteria on reaginic antibody response in mice. *Microbiol. Immunol.*, **22**, 53-56 (1978).
- 10) Shimizu, T., Nitta, M. & Mifuchi, I.: Antitumor activity of Marine bacteria, *Vibrio anguillarum*, in mice. *Gann*, **70**, 429-433 (1979).
- 11) Azuma, I., Yamawaki, M., Yoshimoto, T., Saiki, I., Uemiya, M., Tanio, Y., Tokuzen, R., Yasumoto, K. & Yamamura, Y.: Antitumor activity of cell-wall skeleton of *propionibacterium acnes* C7 in mice and guinea pigs. *Gann*, **70**, 737-748 (1979).
- 12) Tsuchida, T., Fujiwara, H., Tsuji, Y. & Hamaoka, T.: Inhibitory effect of *Propionibacterium acnes*-activated macrophages on the tumor metastasis enhanced by tumor-specific immunosuppression. *Gann*, **72**, 205-212 (1981).
- 13) 山口 希・渡辺能行・吉田俊一・魚住玄通・川井啓市・片山 胖: LPS (Endotoxin)によるマウス腫瘍の治療実験 (第1報). *交通医学*, **36**, 22-24 (1982).
- 14) 山口 希・渡辺能行・吉田俊一・魚住玄通・川井啓市・片山 胖: LPS (Endotoxin)によるマウス腫瘍の治療実験 (第2報). *交通医学*, **36**, 25-28 (1982).
- 15) Kawazoe, Y. & Kato, M.: Antimutagenic effect of isocyanates and related compounds in *Escherichia coli*. *Gann*, **73**, 255-263 (1982).
- 16) 佐藤 博・館崎良太・大野洋光: *Streptomyces hachijoensis* 産生物質 Soedomycin の抗腫瘍作用. 第1報 Soedomycin の吉田腹水肝癌 AH 66細胞に対する効果. *癌と化学療法*, **7**, 241-248 (1980).
- 17) 山口高弘・斉藤元男・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**, 1609-1616 (1982).
- 18) 斉藤武郎・田中隆子: 辺縁性歯周疾患患者の歯肉組織より分離した菌株による実験的研究. 第5報 *Corynebacterium* の抗腫瘍性に関する試み. *口科誌*, **31**, 243-258 (1982).
- 19) 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).
- 20) Misumi, M., Yamaki, H., Akiyama, T. & Tanaka, N.: Mechanism of action of Aclacinomycin A II. The interaction with DNA and with tubulin. *J. Antibiotics*, **XXXII**, 48-52 (1979).
- 21) Bomford, R. & Olivotto, M.: The mechanism of inhibition by *Corynebacterium parvum* of the growth of lung nodules from intravenously injected tumour cells. *Int. J. Cancer*, **14**, 226-235 (1974).
- 22) 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).
- 23) Scott, M. T.: *Corynebacterium parvum* as a therapeutic antitumor agent in mice. II. Local injection. *J. Natl. Cancer Inst.*, **53**, 861-865 (1974).
- 24) 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).
- 25) Woodruff, M. F. A., Ghaffar, A., Dunbar, N. & Whitehead, V. L.: Effect of *C. parvum* on immunization with irradiated tumour cells. *Br. J. Cancer*, **33**, 491-495 (1976).
- 26) 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).
- 27) 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).
- 28) Thiele, E. H., Arisn, R. N. & Boxer, G. E.: Oncolysis by Clostridia. III. Effect of Clostridia and chemotherapeutic agents on rodent tumors. *Cancer Res.*, **24**, 222-233 (1964).
- 29) 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).
- 30) 森 彬：ヒト骨髄中に存する嫌気性コリネバクテリウムの制癌性に関する研究。福岡医誌, 63, 494-511 (1972).
- 31) 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。医学のあゆみ, 98, 658-660 (1976).
- 32) Matsunaga, T., Miyamoto, K. & Koshiura, R.: Cytotoxic effect of the culture supernatant of *Clostridium tetani*. Chem. Pharm. Bull., 30, 702-707 (1982).
- 33) 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).
- 34) 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).
- 35) 中新敏彦・渡部好造・玉井健三：*Fusobacterium nucleatum* の抗腫瘍物質の作用機序に関する検討。嫌気性菌感染症研究, 13, 55-60 (1983).
- 36) 玉井健三・福田順子：口腔内嫌気性菌の研究（第1報）。分離増地の検討。口科誌, 19, 495-504 (1970).
- 37) 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., p 47, N. I. H., Bethesda, Maryland, 1972.
- 38) 吉田富三：吉田肉腫。癌化学療法の基礎的研究, 第2版, 1-218頁, 寧楽書房, 東京, 1964.
- 39) Koshimura, S., Shimizu, R., Masusaki, T., Ohta, T. & Kishi, G.: On the formation of streptolysin S by hemolytic *Streptococci* acting on tumor cells. Japan. J. Microb., 2, 23-28 (1958).
- 40) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R.:  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus* as a cancer controller-A commentary on PC-B-45, 1st ed., p 20-46, Chugai pharmaceutical Co., Tokyo, 1972.
- 41) Okamoto, H., Fujimura, A., Hayashi, T., Nishida, N., Shimizu, R. & Koshimura, S.: Experimental anticancer studies. XX. Effect of live hemolytic *Streptococci*, grown in ribonucleic acid-containing broth, on tumor cells. Gann, 55, 225-232 (1964).
- 42) Okamoto, H., Shoin, S., Minami, M., Koshimura, S. & Shimizu, R.: Experimental anticancer studies part XXX. Factors influencing the streptolysin S-forming ability of *Streptococci* having anticancer activity. Japan. J. Exp. Med., 36, 161-174 (1966).
- 43) Busch, W.: Verhandlungen Ärztlicher Gesellschaft. Berlin. Klin. Wochensh., 5, 137-138 (1868).
- 44) Coley, W. B.: Contribution to the knowledge of Sarcoma. Ann. Surg., 14, 199-220 (1891).
- 45) 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).
- 46) Reinhard, E. H., Good, J. T. & Martin, E.: Chemotherapy of malignant neoplastic diseases. J. Am. Med. Assoc., 142, 382-390 (1950).
- 47) Mathé, G., Schwarzenberg, L., Amiel, J. L., Schneider, 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 cures de huit composés chimiothérapeutiques. Sem. Hôp. Paris, 42, 2960-2965 (1966).
- 48) 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).
- 49) Ribi, E. E., Granger, D. L., Milner, K. C. & Strain, S. M.: Brief Communication: Tumor regression caused by endotoxins and Mycobacterial fractions. J. Natl. Cancer Inst., 55, 1253-1257 (1975).
- 50) Apitz, K.: Über Blutungsreaktionen am Impfcarcinom der Maus. Ztschr. f. Krebsforsch., 40, 50-70 (1934).
- 51) Koshimura, S., Hirata, R. & Shoin, S.: On the streptolysin S synthesizing and anticancer activities of cell-free extract from living hemolytic *Streptococci*. Cancer Chemotherapy Repts., 13, 107-111 (1961).
- 52) 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).
- 53) Diller, I. C. & Shear, M. J.: Cytological effects of *S. marcescens* polysaccharide on tumors. *Cancer Res.*, 6, 488-489 (1946).
- 54) Diller, I. C.: Degenerative changes induced in tumor cells by *Serratia marcescens* polysaccharide. *Cancer Res.*, 7, 605-626 (1947).
- 55) 梅沢浜夫・田中信男: 抗生物質研究の進歩—あすの化学療法をめざして—, 初版, 248-256頁, 学会出版センター, 東京, 1980.
- 56) Komiyama, K., Takeshima, H. & Umezawa, I.: Antitumor activity of a new antitumor antibiotic, Sporamycin. *Gann*, 68, 213-219 (1977).
- 57) 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. 医学のあゆみ, 63, 261-268 (1967).
- 58) 清水隆作・越村三郎・波多野基一・森田修行・大野真介・上田久子: 溶血性連鎖球菌による細胞質 RNA 流出効果(CSR)について. 細胞化学シンポジウム, 18, 35-43 (1967).
- 59) Mizuno, D., Yoshioka, O., Akamatu, M. & Kataoka, T.: Antitumor effect of intracutaneous injection of bacterial lipopolysaccharide. *Cancer Res.* 28, 1531-1537 (1968).
- 60) 木村郁郎: 抗がん剤と溶連菌製剤の併用. 最新医学, 28, 941-951 (1973).
- 61) 福島雅典・加藤武俊・太田和雄: プロスタグランジン D<sub>2</sub>の抗腫瘍性—PGD<sub>2</sub>の L 1210 白血病培養細胞に対する増殖抑制効果. 癌と化学療法, 9, 159-160 (1982).
- 62) Okamoto, H., Minami, M., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R.: Experimental anticancer studies Part XXXI. On the streptococcal preparation having potent anticancer activity. *Japan. J. Exp. Med.*, 36, 175-186 (1966).
- 63) Ginsburg, I. & Grossowicz, N.: Effect of streptococcal haemolysins on Ehrlich ascites tumour cells. *J. Path. Bact.*, 80, 111-119 (1960).
- 64) 小川和朗: 細胞—しくみとはたらき—, 第3刷, 1-210頁, 朝倉書店, 東京, 1982.
- 65) Sakurai, Y., Tsukagoshi, S., Satoh, H., Akiba, T., Suzuki, S. & Takagaki, Y.: Tumor-inhibitory effect of a streptococcal preparation (NSC-B116209). *Cancer Chemotherapy Repts.*, 56, 9-17 (1972).

**Experimental Studies on the Antitumor (Tumor Cell Injuring) Activity of a *Fusobacterium nucleatum* KO-31 Strain** Yukihiro Nishiwaki, Department of Dento-Oral Surgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 — *J. Juzen Med. Soc.*, 94, 139-162 (1985)

**Key words:** anaerobes, *Fusobacterium nucleatum*, antitumor activity

#### Abstract

A *Fusobacterium nucleatum* KO-31 strain was cultured in the Tamai-Fukuda's (TF) medium, and a partially purified substance (TF-310) obtained from the culture supernatant was examined concerning its antitumor activity. After Sarcoma 180 or Ehrlich ascites carcinoma cells incubated in the presence of TF-310 for different lengths of time were intraperitoneally injected into mice, their survival rate was examined for 30 days. The mouse group inoculated with Sarcoma 180 cells ( $2.0 \times 10^7$ /ml) treated with TF-310 survived 1.60 times longer than the control group inoculated with untreated Sarcoma 180 cells. When the treated or non-treated Ehrlich ascites carcinoma cells were inoculated and then examined by the same program, the former group survived 1.97 times longer than the latter group. Further, direct effects of TF-310 on tumor cells of Sarcoma 180 and Ehrlich ascites carcinoma were studied *in vitro*. It was observed by light microscopy that the tumor cells, when incubated in the presence of TF-310, underwent marked degeneration corresponding with the length of incubation; the cell membranes were degenerated or disappeared and the protoplasm lost the contents, forming vacuoles in the cells. The electron microscopic study was performed on the tumor cells at 120 min after incubation



with TF-310. The EM pictures revealed extracellular drainage of organelles in the cytoplasm, degeneration or disappearance of mitochondrial cristae and decrease of euchromatin substances. These findings imply that TF-310 possesses a direct injuring activity on tumor cells.