

## Veillonellaの抗腫瘍性に関する研究

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: 中川, 清昌 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7742">http://hdl.handle.net/2297/7742</a>

## *Veillonella* の抗腫瘍性に関する研究

金沢大学医学部歯科口腔外科学講座 (主任: 玉井健三教授)

中 川 清 昌

(昭和59年7月14日受付)

T・F培地で48時間培養した *V. alcalescens* T-2株の抗腫瘍活性をICR系マウスを用い、Ehrlich腹水癌細胞、およびSarcoma 180細胞の腹水型、固型について検討した。抗腫瘍活性は、本菌の培養上清液、菌体の超音波処理上清液とその沈渣および同上清のエタノール分画について調べた。これら試料の各々0.5 mlを癌細胞 ( $5.0 \times 10^6$ 個)を移植したマウスの48時間後より2週間連日腹腔内注射した。48時間培養菌の超音波処理上清液を投与したマウスで、上記すべての癌細胞に対して最も強い抗腫瘍活性が認められた。本菌の超音波処理上清液をエタノール処理して得られた物質は、Ehrlich腹水癌、Sarcoma 180細胞を移植したマウスの両者に生存日数の延長を認め、T/C (%)では160.2~166.1%であった。この抗腫瘍活性は、腹水型、固型のいずれにも認められた。さらに、外来患者より分離・同定した *V. alcalescens* 7株、*V. parvula* 9株の計16株について抗腫瘍活性の検討をおこなった。その結果、16株中10株に抗腫瘍活性が認められた。

**Key words** Anaerobes, Antitumor activity, *Veillonella*

細菌由来の抗腫瘍物質については、今日まで多くの研究があり、一部は臨床応用されるに至っている。しかし、そのほとんどは好気性菌由来であり、嫌気性菌の抗腫瘍性に関する実験的研究は、*anaerobic Corynebacterium*<sup>1-4)</sup>、*Clostridia*<sup>5-12)</sup>の一部に限られている。

最近、われわれの教室では、嫌気性グラム陰性桿菌の *Fusobacterium nucleatum* の培養上清液に抗腫瘍活性のあることを報告した<sup>13)14)</sup>。

今回、同様に口腔内常在菌で各種口腔内疾患から *Fusobacterium* と共に分離される嫌気性グラム陰性球菌にも抗腫瘍活性があるのではないかと考え、*Veillonella alcalescens* を用いて検索した。

### 材料および方法

#### 1. 使用菌株

口腔内の炎症性疾患である歯肉膿瘍より分離・同定した *V. alcalescens* T-2株を実験に供した。本菌株は、分離後 Cowan<sup>15)</sup>および Bergey's manual<sup>16)</sup>にしたがって同定し、API 20 A anaerobic system (La Balme les Grottes, Montalieu, France)にて確定診断した教室保存株である。他の実験に供した *V. alcale-*

*scens* 7株および *V. parvula* 9株の計16株は、歯科口腔外科外来患者の歯石、歯性上顎洞炎、感染根管、歯肉膿瘍より検体を採取後、*Veillonella* 培地 (Difco, Detroit, U. S. A.)<sup>17)18)</sup>、玉井・福田の培地 (T・F培地、日水、東京<sup>19)</sup>)を用い培養し、同様に分離・同定したものである。

#### 2. 使用培地、および培養上清液の調製

*V. alcalescens* T-2株をT・F培地<sup>19)</sup>の15 ml (中試験管で前培養後、T・F血液寒天平板培地に塗抹し、37°C、48時間嫌気培養 (GAS Pak, BBL, U. S. A.)した。その後、形成してくる集落をT・F培地 (15 ml)に釣菌した。37°C、48時間増菌後、100 ml容量の投薬ビンに90 mlのT・F培地を作製し、10 mlの前培養した菌を移植後、37°C、48時間培養した。さらに、1000 ml容量の投薬ビンに900 mlのT・F処方より寒天を除去した培地を作製し、100 mlの前培養した菌を移植した後、37°C、48時間本培養した。この培養液を4500×g、20分間冷却遠心し、その上清液を実験に供した。

#### 3. 超音波処理菌体上清液および沈渣の調製

培養上清液の調製の場合と同様に培養した *V. alcalescens* T-2株を4500×g、20分間冷却遠心し、その

Studies on the Antitumor Activity of *Veillonella*. Kiyomasa Nakagawa, Department of Dento-Oral Surgery (Director: Prof. K. Tamai), School of Medicine, Kanazawa University.

菌体を滅菌生理食塩水にて洗滌後、20分間超音波処理 (ultrasonic disruptor, Model UR-200P, TOMY SEIKO K.K, Tokoy) した。処理後、10000×g, 20分間冷却遠心し、その上清液に280 mlのリン酸緩衝液 (PBS, pH 7.0) を加え実験に供した。一方、得られた沈渣に280 mlのPBSを加え、懸濁液にしたものについて実験した。他の16株の *Veillonella* については、超音波処理後の上清液のみを同様の方法で調製し実験に供した。

4. 超音波処理菌体上清液のエタノール分画の調製  
菌体の超音波処理後の上清液50 mlに、60%濃度になるように80 mlのエタノールを加え、4°Cにて24時間静置後、無菌的に10000×g, 20分間冷却遠心し、得られた沈渣にエーテルを加え、減圧乾燥し、粉末を作製後、エタノール分画として実験に供した。実験に際しては、280 mlの滅菌生理食塩水に懸濁し用いた。

#### 5. 実験動物

生後4週のICR系マウスを購入後、腹水型腫瘍の実験に用いる場合は1週間(約20~22 g)、固型腫瘍の実験に用いる場合は2週間(約23~25 g)飼育したのちに実験に供した。

6. Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞の調製

教室で継代培養している Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞を用いた。ICR系マウス(生後4週、体重約18~20 g)の腹腔内に腫瘍細胞を移植し、7日後に貯溜した乳様状の腹水を無菌的に採取した。採取後 Türk 型の白血球算定盤で細胞数を算定後、約  $1.0 \times 10^7$  cells/ml になるように滅菌生理食塩水にて調製し実験に供した。

固型腫瘍の実験には、癌細胞数を約  $2.0 \times 10^7$  cells/ml に調製し実験に供した。

#### 7. 実験方法

#### 1) 腹水型腫瘍

調製した Ehrlich 腹水癌および Sarcoma 180 細胞の0.5 mlをマウス腹腔内に移植し、48時間後より1日・1回・2週間連日調製した培養上清液、超音波処理菌体上清液、沈渣の各々0.5 mlを腹腔内注射し、担癌マウスの生存日数を測定した。

#### 2) 固型腫瘍

マウスの背部を剃毛後、調製した Ehrlich 腹水癌および Sarcoma 180 細胞の0.5 mlを皮下注射し、移植後48時間目より、1日・1回・2週間連日上腕二頭筋部に超音波処理上清液のエタノール分画の生理食塩水懸濁液を0.5 ml注射し、担癌マウスの生存日数を測定した。

#### 8. 抗腫瘍活性の判定

腹水型・固型とも対照群には滅菌生理食塩水の0.5 mlを、それぞれ1日・1回・2週間連日腹腔内注射後、処置群と共にマウスの生存日数を比較し、その延命率により抗腫瘍効果を判定した。すなわち、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、つまり下記に示す T/C (%) によって抗腫瘍効果を判定し、130%以上の T/C (%) を示す場合を有効とした<sup>20)21)</sup>。

$$T/C(\%) = \frac{\text{Survival days of treatment group}}{\text{Survival days of control group}} \times 100$$

### 成 績

I. 培養上清液、超音波処理菌体上清液および沈渣の Ehrlich 腹水癌に対する抗腫瘍活性

*V. alcalescens* T-2株を48時間培養し、その培養上清液、超音波処理菌体上清液、およびその沈渣について、Ehrlich 腹水癌に対する抗腫瘍活性を検討した。各実験群は、マウス10匹を1群とし、経日的にこれらの

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

Injection	Mean survival days <sup>a)</sup>	Number of survivors <sup>a)</sup>	T/C (%)
Culture supernatant	15.1 ± 3.1	0/10	114.3
Supernatant of cells treated with ultrasonic disruption	21.0 <	1/10	159.0
Sediment of cells treated with ultrasonic disruption	19.6 ± 4.1	0/10	148.4
Physiological saline (Control)	13.2 ± 1.3	0/10	

a) Reading was performed for 40 days during and after the course of intraperitoneal injections of the materials for 2 weeks into tumor-bearing mice.

マウスの生死を観察し、その成績を表1に示した。対照群のマウスは、11日目より腫瘍死を認め、15日目ですべてのマウスが腫瘍死した。平均生存日数は13.2±1.3日であった。培養上清液を投与した群は、対照群とほぼ同様に12日目より腫瘍死を認め、22日目までにすべてのマウスが腫瘍死した。平均生存日数は15.1±3.1日で、T/C (%)は114.3%と抗腫瘍活性を示す値は得られなかった。

超音波処理菌体上清液投与群では、13日目よりマウスの腫瘍死を認めたが、40日間の観察で1匹が腹水貯溜もなく生存しており、平均生存日数は21.0日以上で、T/C (%)は159.0%以上の抗腫瘍活性が得られた。

菌体超音波処理後の沈渣の懸濁液投与群では、超音波処理菌体上清液投与群と同様、13日目からマウスの腫瘍死を認め、24日目までにすべてのマウスが腫瘍死したが、平均生存日数は19.6±4.1日、T/C (%)は148.4%と有効数値を示した。

以上の実験結果から、超音波処理菌体上清液にマウスの生存日数の延長がみられ、最も高い抗腫瘍活性が認められた。

さらに、抗腫瘍活性のみられた超音波処理菌体上清液を用いて、マウスを1群50匹で再度実験をおこなった。

その成績を表2に示した。調製した Ehrlich 癌細胞の  $5.2 \times 10^6$  cells/mouse を移植し実験した。対照群の

マウスは、9日目より腫瘍死を認め、16日目までにすべてのマウスが腫瘍死した。しかし、超音波処理菌体上清液を投与した群では、12日目よりマウスは腫瘍死したが、30日間の観察で9匹のマウスが生存した。平均生存日数は20.6日以上で、T/C (%)は154.8%以上と高い抗腫瘍活性が認められ、担癌マウスの延命効果が前実験と同様にみられた。

## II. 超音波処理菌体上清液の Sarcoma 180 の腹水癌に対する抗腫瘍活性

超音波処理菌体上清液において Ehrlich 腹水癌に対する抗腫瘍活性が認められたため、つぎに、Sarcoma 180 の腫瘍系を用い、同じく腹水型にて検討した。マウスは1群50匹とした。その成績を表3に示したが、本実験においては Sarcoma 180 細胞を  $4.8 \times 10^6$  cells/mouse に調製し移植した。

対照群のマウスは10日目から腫瘍死し、18日目までにすべてのマウスが腫瘍死した。平均生存日数は13.4±1.8日であった。これに対して、超音波処理菌体上清液を投与した群では、11日目からマウスは腫瘍死を認めたが、腫瘍の増大は抑制され、30日間の観察で11匹のマウスが生存した。平均生存日数は20.3日以上であった。T/C (%)は、151.4%以上と延命効果があり、超音波処理菌体上清液は Sarcoma 180 の腹水型担癌マウスに対しても、Ehrlich 癌細胞の腹水型と同様に抗腫瘍活性がみられた。

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

Injection	Mean survival days <sup>a)</sup>	Number of survivors <sup>a)</sup>	T/C (%)
Supernatant of cells treated with ultrasonic disruption	20.6 <	9/50	154.8 <
Physiological saline (Control)	13.3 ± 1.6	0/50	

a) Reading was performed for 30 days during and after the course of intraperitoneal injection of the material for 2 weeks into tumor-bearing mice.

Table 3. Antitumor activity of the supernatant of *V. alcalescens* strain T-2 treated with ultrasonic disruption on ascites tumor of Sarcoma 180 in mice

Injection	Mean survival days <sup>a)</sup>	Number of survivors <sup>a)</sup>	T/C (%)
Supernatant of cells treated with ultrasonic disruption	20.3 <	11/50	151.4 <
Physiological saline (Control)	13.4 ± 1.8	0/50	

a) Reading was performed for 30 days during and after the course of intraperitoneal injections of the material for 2 weeks into tumor-bearing mice.

### III. 超音波処理菌体上清液のアルコール分画の Ehrlich 腹水癌に対する用量-反応関係

先の実験で超音波処理菌体上清液投与群の担癌マウスに T/C (%) で 150% 以上と高い抗腫瘍活性が認められたため、超音波処理菌体上清液にアルコールを加え、そのアルコール分画について用量-反応関係の検討をおこなった。

乾燥重量で 0.1 mg, 0.2 mg, 0.3 mg/mouse 投与の 3 群について実験した。その成績を表 4 に示した。本実験においては、調製した Ehrlich 癌細胞  $4.8 \times 10^6$  cells/mouse を腹腔内に移植し実験した。

滅菌生理食塩水を投与した対照群の平均生存日数は  $12.7 \pm 2.0$  日で、9 日目から 15 日目までの間にすべてのマウスが腫瘍死した。超音波処理菌体上清液のアルコール分画を投与した群は、0.1 mg/mouse 投与の場合、9 日目に 1 匹が腫瘍死し、その後順次腫瘍死していったが、30 日間の観察で 1 匹が生存しており、平均生存日数は 17.3 日以上であった。T/C (%) は 136.2% 以上と有効数値を示す成績であった。0.2 mg/mouse の量を投与した群では、対照群のマウスがすべて腫瘍死した 15 日目においても 7 匹が生存しており、30 日観察で平均生存日数は 21.0 日以上で、T/C (%) は 166.1% 以上と最も高い抗腫瘍活性を示した。一方、0.3

mg/mouse の量を投与した群では平均生存日数  $18.9 \pm 4.6$  日で、T/C (%) は 148.4% の有効数値が認められたが、27 日目までにすべてが腫瘍死した。

つぎに、抗腫瘍活性の最も高かった投与量、すなわち 0.2 mg/mouse についてマウスを 20 匹、観察日数を 60 日間とし再度実験をおこなった。その成績を表 5 に示した。Ehrlich 腹水癌細胞は  $0.5 \times 10^6$  cells/mouse を移植し実験した。

その結果、処置群のマウスは、対照群と同じく、11 日目より腫瘍死を認めた。しかし、対照群のマウスがすべて腫瘍死した 17 日目においても 13 匹のマウスが生存しており、60 日間の観察でも 2 匹のマウスの腫瘍は経日的に消退した。対照群の平均生存日数は  $13.8 \pm 1.7$  日で、処置群の平均生存日数は 21.9 日以上であった。T/C (%) は 158.6% 以上と抗腫瘍活性が再確認された。

### IV. 菌体超音波処理上清液のアルコール分画の Sarcoma 180 の腹水型に対する抗腫瘍活性

先の実験で超音波処理菌体上清液のアルコール分画を 0.2 mg/mouse の量で投与した場合に最も高い抗腫瘍活性がみられたので、この投与量で Sarcoma 180 細胞の腹水型を用い同様の検討をおこなった。Sarcoma 180 細胞の  $3.7 \times 10^6$  cells/mouse を腹腔内

Table 4. Dose-response of antitumor activity of ethanol fraction <sup>a)</sup> in supernatant of *V. alcalescens* strain T-2 treated with ultrasonic disruption on ascites tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice

Injection	Mean survival days <sup>b)</sup>	Number of survivors <sup>a)</sup>	T/C (%)
Ethanol fraction 0.1 mg/mouse	17.3 <	1/10	136.2 <
0.2	21.1 <	1/10	166.1 <
0.3	$18.9 \pm 4.6$	0/10	148.8
Physiological saline (Control)	$12.7 \pm 2.0$	0/10	

a) Ethanol fraction was obtained from the precipitated by 60% ethanol.

b) Reading was performed for 60 days during and after the course of intraperitoneal injections of ethanol fraction for 2 weeks into tumor-bearing mice.

Table 5. Antitumor activity of the ethanol fraction in supernatant of *V. alcalescens* strain T-2 treated with ultrasonic disruption on ascites tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice

Injection	Mean survival days <sup>a)</sup>	Number of survivors <sup>a)</sup>	T/C (%)
Ethanol fraction 0.2 mg/mouse	21.9 <	2/20	158.6 <
Physiological saline (Control)	$13.8 \pm 1.7$	0/20	

a) Reading was performed for 60 days during and after the course of intraperitoneal injections of ethanol fraction for 2 weeks into tumor-bearing mice.

に移植し実験した。マウスは1群20匹とし、60日間観察した。その成績を表6に示した。

対照群のマウスは、腫瘍細胞移植後12日目から17日目の間にすべてが腫瘍死し、平均生存日数は14.1±1.8日であった。0.2 mg/mouseを投与した群のマウスは、11日目より腫瘍死を認めたが、対照群のマウスがすべて腫瘍死した17日目においても12匹が生存しており、その後60日間の観察では2匹のマウスが生存した。平均生存日数は22.6日以上で、T/C (%)は160.2%以上と Ehrlich 腹水癌と同様、Sarcoma 180細胞の腹水型に対しても抗腫瘍活性があることが判明した。

V. 菌体超音波処理上清液のアルコール分画の Ehrlich 腹水癌の固型腫瘍に対する抗腫瘍活性

菌体超音波処理上清液のアルコール分画が、Ehrlich 癌細胞の腹水型および Sarcoma 180細胞の腹水型に抗腫瘍活性を認めたため、つぎに Ehrlich 腹水癌の固型腫瘍を用いて実験した。超音波処理菌体上清液のアルコール分画の0.2 mg/mouseの投与量でマウスの生存日数を観察した。

マウスは1群10匹とし、Ehrlich 癌細胞は $1.0 \times 10^7$  cells/mouseを移植した。その成績を表7に示した。

対照群のマウスは25日目から36日目に大きな固型腫瘍塊を背部に形成し、6週目にはすべてのマウスが腫瘍死した。これに対して、処置群のマウスは28日目から45日目までに7匹が腫瘍死したが、以降8週間の

観察でも3匹が生存した。

VI. 超音波処理菌体上清液のアルコール分画の Sarcoma 180細胞の固型腫瘍に対する抗腫瘍活性

Ehrlich 腹水癌細胞の固型腫瘍で超音波処理菌体上清液のアルコール分画に抗腫瘍活性がみられたので、同様の方法で Sarcoma 180細胞の固型腫瘍についても検討した。マウスは1群10匹とし、観察期間を8週間とした。その成績を表8に示した。Sarcoma 180細胞は $9.2 \times 10^6$  cells/mouseに調製し移植した。

対照群のマウスは、腫瘍細胞移植後24日目に2匹のマウスの腫瘍死を認め、34日目までにすべてのマウスが腫瘍死した。処置群のマウスは、4週の27日目に1匹が腫瘍死したが、その後11日間マウスの腫瘍死は認めなかった。しかし、38日目に2匹が腫瘍死し、8週目では計7匹のマウスが腫瘍死したが、3匹は生存しており抗腫瘍活性が認められた。

VII. Veillonella の新鮮分離菌株に対する抗腫瘍活性

V. *alcalescens* T-2株の超音波処理菌体上清液が Ehrlich 癌細胞、Sarcoma 180細胞の腹水型、固型の両者に抗腫瘍活性を示したため、外来患者の口腔内疾患より分離・同定した Veillonella の新鮮分離菌株の超音波処理菌体上清液について同様の抗腫瘍実験を Ehrlich 癌細胞の腹水型を用いておこなった。その成績を表9に示した。

Table 6. Antitumor activity of the ethanol fraction in supernatant of *V. alcalescens* strain T-2 treated with ultrasonic disruption on ascites tumor of Sarcoma 180 in mice

Injection	Mean survival days <sup>a)</sup>	Number of survivors	T/C (%)
Ethanol fraction 0.2 mg/mouse	22.6 <	2/20	160.2 <
Physiological saline (Control)	14.1 ± 1.8	0/20	

a) Reading was performed for 60 days during and after the course of intraperitoneal injections of ethanol fraction for 2 weeks into tumor-bearing mice.

Table 7. Antitumor activity of the ethanol fraction in supernatant of *V. alcalescens* strain T-2 treated with ultrasonic disruption on solid type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice

Injection	Number of mice used	Number of survivors after							
		1	2	3	4	5	6	7	8 weeks
Ethanol fraction 0.2 mg/mouse	10	10	10	10	9	6	6	3	3
Physiological saline (Control)	10	10	10	10	5	2	0		

a) Mice were given intramuscular infection of the fraction every day for 14 days after subcutaneous inoculation of  $1.0 \times 10^7$  cells/mouse.

検討した 16 株中 10 株が T/C (%) で 130%以上の有効数値を示す結果であった。また、*V. alcalescens* と *V. parvula* の菌種間の差について分析すると、150%以上の抗腫瘍活性を認めた株は 5 株中 4 株までが *V. alcalescens* であった。また、130%以上の有効数値を示す抗腫瘍活性のみられた株は、*V. alcalescens* は 7 株中 5 株、*V. parvula* は 9 株中 5 株であった。

### 考 察

Coley<sup>22)</sup>は、丹毒から分離した *Streptococcus pyogenes* と *Serratia marcescens* の混合死菌ワクチンを用い、肉腫患者 8 名に対し治療したところ、高い治療率が得られたことを腫瘍縮少の経過と共に克明に記録し報告している。また、Reinhard<sup>23)</sup>は小児白血病の 75%が急性感染症の後に自然軽快したと述べている。一方 150 人以上という多くの患者に細菌製剤を使用し、Carcinoma, Melanoma には無効であったが、Lymphoma, Sarcoma に明らかな腫瘍縮少が認められたとする報告<sup>24)</sup>もあり、細菌を悪性腫瘍の治療に用いることや、その有効性を示唆する報告は約 1 世紀前より散見される。また、現在までに細菌由来の抗腫瘍性についての報告は、好気性菌では *E. coli*<sup>25-27)</sup>、*Streptococcus*<sup>28)29)</sup>、*Salmonella*<sup>30-33)</sup> など数多くみられるが<sup>34-38)</sup>、嫌気性菌の抗腫瘍性に関する研究は、嫌気性 *Corynebacterium*<sup>1-4)</sup>、*Clostridium*<sup>5-12)</sup> など一部に限られている。

われわれの教室では、数年前より *Fusobacterium* の抗腫瘍性について *in vitro*, *in vivo* にて実験し、培養上清液に抗腫瘍活性のあることを証明し報告してきた<sup>13)14)</sup>。

口腔内には種々の嫌気性菌が棲息し、口腔内感染症からも嫌気性菌が分離・同定されている<sup>19)</sup>。*Veillonella* は、ヒトおよび他の動物の口腔・消化器・呼吸器などに常在する嫌気性菌であり、口腔より分離される菌種は *V. alcalescens* と *V. parvula* であるが、口腔内炎症性疾患、特に歯肉膿瘍、顎嚢胞、上顎洞炎などから比較的高率に分離され、これら疾患の主因菌とも考えら

れている<sup>19)39)</sup>。

今回、前述の *F. nucleatum* でグラム陰性嫌気性桿菌に抗腫瘍活性を認めたことから、同じ口腔内嫌気性常在菌であり、各種疾患から *Fusobacterium* と共に分離される *Veillonella* についても抗腫瘍活性があるのではないかと考え実験した。

*Fusobacterium* の抗腫瘍活性の実験と同様に菌の培養時間は 48 時間としたが、これは予備実験において培養時間と抗腫瘍活性との関連を検討したところ、24 時間、48 時間と培養時間の比較的短い上清液が T/C (%) で約 160%の抗腫瘍活性を認めたのにくらべ、

Table 9. Antitumor activity of the supernatant of isolated *Veillonella* strains treated with ultrasonic disruption on ascites tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice

Strains	Mean survival days <sup>a)</sup>	T/C (%)
<i>V. alcalescens</i>		
KN-1	15.6 ± 4.7	116.4
KN-3	17.2 ± 4.6	134.3
KN-5	22.6 <	168.6 <
HF-8	16.4 ± 3.5	122.3
H-1	21.2 <	165.6 <
T-1	21.8 <	162.6 <
F-9	19.5 ± 5.0	152.3
<i>V. parvula</i>		
KN-2	17.5 ± 3.5	130.5
KN-4	16.9 ± 6.2	132.0
KN-6	17.0 ± 4.6	126.8
KN-7	14.5 ± 2.2	113.2
KN-8	19.7 ± 5.0	147.0
KN-9	14.7 ± 4.0	114.8
TFV-1	24.7 <	185.7 <
M-7	17.1 ± 3.8	133.5
M-9	14.0 ± 3.0	109.3

a) Reading was performed for 30 days during and after the course of intraperitoneal injections of the materials for 2 weeks into tumor-bearing mice.

Table 8. Antitumor activity of the ethanol fraction in supernatant of *V. alcalescens* strain T-2 treated with ultrasonic disruption on solid type tumor of Sarcoma cells in mice

Injection	Number of mice used	Number of survivors after							
		1	2	3	4	5	6	7	8 weeks
Ethanol fraction 0.2 mg/mouse	10	10	10	10	9	9	6	3	3
Physiological saline (Control)	10	10	10	10	7	0			

a) Mice were given intramuscular injection of the fraction every day for 14 days after subcutaneous inoculation of  $1.0 \times 10^7$  cells/mouse.

120 時間, 144 時間と培養時間を延長すると T/C (%) は 110% となり抗腫瘍活性が認められなくなったことによる。このような理由により 48 時間培養した *V. alcalescens* T-2 株を冷却遠心し, その上清液と菌体をマウスに注射し, 抗腫瘍活性の検討をおこなった。その際, 幾度か培養上清液を用いた実験に T/C (%) で約 150% のマウスの延命効果が得られ, 菌体を投与した群には延命効果がみられなかった。それゆえ, 遠心沈澱後の上清液に含まれる物質が抗腫瘍活性を発揮するものと考えて実験を続けた。しかし, その後実験をかさねるにつれて, 担癌マウスに有効性のほとんどみられない成績がたびたび得られた。そこでこの現象は, 本菌が 48 時間の本培養中に自己融解をおこし, 遠心した培養上清液に抗腫瘍活性物質が溶出してきたためと考え, 抗腫瘍活性の有効成分は菌体にあるのではないかと推察し, 菌体を処理した検体について本実験を施行した。

その結果, 超音波処理菌体上清液に最も高い T/C (%) が得られたことより, 菌体の超音波処理によって溶出, 可溶化された細胞内成分, あるいは細胞膜構成成分の一部が抗腫瘍活性をもたらしていると考えた。

また, 菌体超音波処理後の沈澱を投与した群にも担癌マウスに延命効果が認められたが, この場合は超音波処理によって細片化された菌体細胞膜 (外膜) に有効成分が残存したまま沈澱したものと考えられる。すなわち, 菌体の処理に用いた超音波は比較的簡便におこなえる可溶化の 1 つの方法であるが, 超音波処理後の遠心回転数を多くしても上清液と沈澱とははっきりとした成分分離をすることが困難であること<sup>40)</sup>から, 後述する有効成分とも関連してこのような実験結果ができたものと考えられる。

本実験において, 培養上清液, 超音波処理菌体上清液, および沈澱をすべて 1 日・1 回・2 週間連日投与した。これは, マウスの生存日数を 1 週間投与の場合と 2 週間投与の場合で比較すると, 2 週間投与の場合が平均で約 5 日目長く, T/C (%) で約 30% の有意差がみられることが予備実験で判明したため 2 週間投与にて実験をすすめた。

つぎに, *V. alcalescens* T-2 株に認められた抗腫瘍活性が, 口腔内から分離される *Veillonella* の新鮮分離菌にもみられるか否かについて検索するために, 外来患者より *Veillonella* を分離・同定し, *V. alcalescens* T-2 株と同様の方法で培養, 超音波処理をおこない実験に供した。その結果 16 株中担癌マウスに延命効果を示す菌株が 10 株 (62.5%) と, 多くの菌株に T/C (%) で 130% 以上の抗腫瘍効果の有効数値が得られた。こ

のことから, *V. alcalescens* と *V. parvula* の両者の菌株には少なくとも *V. alcalescens* が *V. parvula* よりも有意に高い抗腫瘍活性を有することが判明した。

Mergenhagen<sup>41-46)</sup>は, *Veillonella* の内毒素について多くの論文を発表しているが, その中に今明らかにした本菌のもつ抗腫瘍活性物質の本体を示唆するものがいくつかある。すなわち, *Veillonella* をフェノール・水抽出すると, タンパク質と内毒素リポ多糖が除去され, 電子顕微鏡下において細胞壁外膜が消失することを観察するとともに, フェリチン抗体法で内毒素が細胞壁外膜に局在することを示している。また, 電子顕微鏡により細胞の表面構造を *E. coli* と比較したところ類似していることや, この表面に付着している内毒素は *Veillonella* の方が大きな球形であることを報告している<sup>41)42)</sup>。さらに Mergenhagen は, *Veillonella* から抽出した内毒素を Lethality, 発熱試験, Shwartzman 反応等について検索した結果各々に強い活性を示したこと<sup>43)</sup>, *Veillonella* 19 株について調べたところ血清学的にさまざまな特異的内毒素を有すること<sup>44)</sup>, *Veillonella* の内毒素について化学分析をおこないその成分の 60% は脂質であり, また栄養培地内で細胞外に付着物 (内毒素) をつくりあげることなどを報告している<sup>45)46)</sup>。このように *Veillonella* の内毒素についての研究はかなり細部にわたっておこなわれており, *Veillonella* と *E. coli* の細胞組織構造, 内毒素の外膜付着状態が類似していると報告している。

*E. coli* の内毒素を使った抗腫瘍実験では, Watanabe<sup>47)48)</sup>が, Ehrlich 腹水癌, Sarcoma 180, MM<sub>2</sub> 腹水癌を用い, 腫瘍接種前後に超音波処理によって得られた *E. coli* の上清液を投与したところ, 80% の腫瘍抑制が得られ, 著明な延命効果があったとしている。しかし, 山口ら<sup>49)</sup>は, 腹壁皮下の固型腫瘍には無効であったとしている。これは, 実験に使用した腫瘍細胞および実験動物のちがいが大きな原因の 1 つと考えられる。他に Mihichi ら<sup>50)</sup>が, *E. coli* を構成する Lipid A の抗腫瘍効果について, *Staphylococcus aureus* を三塩化酢酸にて抽出した物質と, Sarcoma 180 を使用し比較実験をおこなった報告がある。*E. coli* の lipid A を 40  $\mu\text{g}/\text{mouse}$  で投与した群では 10 匹中 7 匹, 70% に腫瘍の出血, 壊死がおこったが, *Staphylococcus aureus* の場合は, 10 匹中 9 匹, 90% であり効果は *Staphylococcus aureus* の投与群の方がすぐれていたと結論している。

このような研究報告を総合して分析すると *Veillonella* の抗腫瘍活性物質は内毒素であると推察される。しかし, 本実験結果で明らかのように, 処置群の中で対照群とほぼ同様の生存日数をもつマウスが必ず



でてくること、用量-反応関係がみられず、投与量を多くしても高い抗腫瘍活性は得られなかったこと、治療期間が2週間と長い方が1週間投与よりもマウスの生存日数が延長することがわかっていることなどから、Coley, Shwartzman, Campbell, Donnellyらが主張する宿主を介しての間接的な免疫学的反応が内毒素の作用機序の主体をなしているものとする。この免疫学的な実験的研究は現在まで幅広くおこなわれてきていることは衆知のごとくであり、網内系機能<sup>52-55)</sup>、マクロファージ活性化<sup>56-61)</sup>などがあげられる。

また、本菌は固型腫瘍だけでなく、Ehrlich 腹水癌、Sarcoma 180 の腹水型にも有効なことより直接的に働らく細胞毒性の面も考慮すべきである。

直接作用の検討については種々みられるが多くは *in vitro* の実験である<sup>62-64)</sup>。 *Veillonella* についての報告は、越浦ら<sup>65)</sup>が、19種の嫌気性菌について細胞障害作用を Cell Injuring Reaction 法を用いて調べたところ、 *Bacteroides*, *Clostridia*, *Fusobacterium* 等に細胞障害活性があったが、 *Veillonella* の6株は陰性であったと報告している。同じく天野ら<sup>66)</sup>は、口腔内感染症および正常人口腔内より分離した偏性嫌気性菌280株の細胞障害活性を検索した結果、 *Fusobacterium*, *anaerobic Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Peptococcus*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*. などが Ehrlich 腹水癌細胞に対して11~30%の細胞障害活性をみると、 *Veillonella* に関しては15株中3株に11~20%と低いながら細胞障害活性をみると報告している。しかし、本実験のごとく *Veillonella* の菌体抽出物質を *in vivo* にて検討した実験はまったくない。

生体内においては、このような細胞に対する直接的、間接的な作用だけでなく、グラム陰性菌の内毒素が一般にもつといわれるインターフェロン産生能<sup>67-71)</sup>などが加わっているものと推察される。

また、 *Veillonella* の超音波処理菌体上清液をマウス前肢に注射し、背部に形成された腫瘍の抑制効果について実験中に、治癒する場合は腫瘍細胞接種後2週間前後よりマウス背部に形成された腫瘍は比較的大きさに変化がなく、腫瘍の色彩が茶褐色に変化してゆき、この状態で瘢痕化しながら6週目にはほぼ消退することを観察している。このことは最近注目されている Tumor necrosis factor<sup>72)73)</sup>との関連を示唆するものであると考える。

以上、本実験でみられた *Veillonella* のもつ抗腫瘍活性物質は内毒素であると考えられるが、内毒素ゆえに作用機序はさまざまな要因が複雑に働らいているものと考えられ、今後の検討課題である。

## 結 論

口腔内より分離・同定した *V. alcalescens* T-2 株についてマウスを用い、その抗腫瘍活性を調べた。また同じく新鮮分離菌株で *V. alcalescens* 7株、 *V. parvula* 9株の計16株についても同様の検討を加え、つぎのような結論を得た。

1) *V. alcalescens* T-2 株の菌体を超音波処理し、その上清液を Ehrlich 腹水癌を投与したマウスの48時間後より腹腔内に2週間連日注射したところ、T/C (%)で160%以上の生存日数の延長が認められ、抗腫瘍活性がみられた。

2) *V. alcalescens* T-2 株の超音波処理菌体上清液のエタノール分画を、0.1 mg・0.2 mg および 0.3 mg/mouse で Ehrlich 腹水癌を用いて検討したところ、1日・1回 0.2 mg/mouse の投与量にて166.1%の T/C (%)を示し、最も高い抗腫瘍活性を認めた。

3) 上記の抗腫瘍活性は、Ehrlich 腹水癌の固型、および Sarcoma 180 の腹水型、固形にも同様に認められた。

4) 16株の *Veillonella* 属のうち10株に抗腫瘍活性が認められ、菌種をとわず、 *Veillonella* 属に抗腫瘍活性のあることが認められた。

## 謝 辞

稿を終るに臨み、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18回日本細菌学会中部支部総会(1981)、第55回日本細菌学会総会(1982)、第19回日本細菌学会中部支部総会(1982)において発表した。

## 文 献

- 1) Fisher, B., Wolmark, N. & Coley, J.: Effect of *Corynebacterium parvum* on cytotoxicity of regional and nonregional lymph node cells from animals with tumors present on removed. J. Natl. Cancer Inst., 53, 1793-1801 (1974).
- 2) Scott, M. T.: *Corynebacterium parvum* as a therapeutic antitumor agent in mice. II. Local injection. J. Natl. Cancer Inst., 53, 861-865 (1974).
- 3) 加藤英夫・滝沢芳子・花沢重正・加藤 新・小出和子・山浦煌一・山口康夫: ヌードマウスによる *Corynebacterium anaerobium* の抗腫瘍機序に関する研究。日細誌, 32, 813-820 (1977).
- 4) 森 彬: ヒト骨髓中に存する嫌気性コリネバクテリウム<sup>1</sup>の制癌性に関する研究。福岡医誌, 63, 494-511 (1972).

- 5) Parker, R. C., Plummer, H. C., Siebenmann, C. O. & Chapman, M. G.: Effect of histolytic infection and toxin on transplantable mouse tumors. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **66**, 461-467 (1947).
- 6) Möse, J. R.: Zur Beeinflussbarkeit verschiedener Tiertumoren durch einen apathogenen Clostridienstamm. Z. Krebsforsch., **63**, 447-455 (1959).
- 7) Möse, J. R. & Möse, G.: Onkolyseversuche mit apathogenen, anaeroben Sporenbildern am Ehrlich-Tumor der Maus. Z. Krebsforschung., **63**, 63-74 (1959).
- 8) 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).
- 9) 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).
- 10) Thiele, E. H., Arison, R. N. & Boxer, G. E.: Oncolysis by *Clostridia*. III. Effects of *Clostridia* and chemotherapeutic agents on rodent tumors. Cancer Res., **24**, 222-233 (1964).
- 11) Thiele, E. H., Arison, R. N. & Boxer, G. E.: Oncolysis by *Clostridia*. IV. Effect of nonpathogenic *Clostridia* spores in normal and pathological tissues. Cancer Res., **24**, 234-238 (1964).
- 12) Engerbart, K. & Gericke, D.: Oncolysis by *Clostridia*. V. Transplanted tumors of the hamster. Cancer Res., **24**, 239-243 (1964).
- 13) 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).
- 14) Tamai, K., Nakao, J., Nakagawa, K., Watanabe, K., Sakashita, H., Nishiwaki, Y. & Nakashin, T.: Antitumor activity in the culture supernatant fluid of *Fusobacterium nucleatum* strain KO-31. Japan. J. Exp. Med., **53**, 251-256 (1983).
- 15) Cowan, S. T.: Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, 1st ed., p 83-88, Cambridge Univ. Press, London, 1966.
- 16) Buchanan, R. E. & Gibbons, N. E.: Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., p 446-447, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- 17) Rogosa, M., Fitzgerald, R. J., Mackintosh, M. & Beaman, A. J.: Improved medium for selective isolation of *Veillonella*. J. Bact., **76**, 455-456 (1958).
- 18) 上野一恵・高添一郎: 嫌気性菌と嫌気性菌症 (小酒井・鈴木編), 第1版, 60-61頁, 医学書院, 東京, 1968.
- 19) 玉井健三: 口腔内嫌気性菌の研究. 口科誌, **27**, 393-415 (1978).
- 20) 塚越 茂: 制癌剤の開発とその臨床応用, (塚越, 田口, 仁井谷・斉藤編), 第1版, 25-28頁, サイエンスフォーラム, 東京, 1978.
- 21) Geran, R. I., Greenberg, N. H., Macdonald, M. M., Schumacher, A. M. and Abbott, B. J.: Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems (Third edition). Cancer Chem. Rep., **3**, 47-48 (1972).
- 22) Coley, W. B.: Contribution to the knowledge of sarcoma. Ann. Surg., **14**, 199-220 (1891).
- 23) Reinhard, E. H., Good, J. T. & Martin, E.: Chemotherapy of malignant neoplastic diseases. J. Am. Med. Assoc., **142**, 383-390 (1950).
- 24) Putman, R. C., Pomeroy, T. C., Donnelly, A. J., Nishimura, E. T., Bowman, H. S. & Reimann, S. P.: The clinical use of bacterial polysaccharides in malignant disease. Proc. Am. Assoc. Cancer Res., **2**, 240 (1957).
- 25) Yoshioka, O., Abe, S., Masuko, Y. & Mizuno, D.: Typing of immunomodulators in terms of their effects on the electrophoretic pattern of serum proteins and antitumor combination therapy based on this typing. Gann., **72**, 471-478 (1981).
- 26) Ikawa, M., Koepfli, J. B., Mudd, S. G. & Niemann, C.: An agent from *E. coli* causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor. I. Isolation and properties. J. Natl. Cancer. Inst., **13**, 157-166 (1952).
- 27) 田村 宏・松村龍雄: 腸内細菌とくに大腸菌属による生体の感作とその意義の研究. 日細誌, **22**, 31-36 (1967).
- 28) 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).
- 29) Okamoto, H., Shoin, S., Minami, M., Koshi-

- mura, 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).
- 30) Berendt, M. J., North, R. J. & Kirstein., D. P. : The immunological basis of endotoxin-induced tumor regression. *J. Exp. Med.*, **148**, 1550-1559 (1978).
- 31) Berendt, M. J., North, R. J. & Kirstein., D. P. : The immunological basis of endotoxin-induced tumor regression. *J. Exp. Med.*, **148**, 1560-1569 (1978).
- 32) Nigam, V. N. : Effect of core lipopolysaccharides from *Salmonella minnesota* R mutants on the survival times of mice bearing Ehrlich tumor. *Cancer Res.*, **35**, 628-633 (1975).
- 33) Michael, J. G. & Landy, M. : Endotoxic properties of gram-negative bacteria and their susceptibility to the lethal effect of normal serum. *J. Infect. Dis.*, **108**, 90-94 (1961).
- 34) Nowotny, A. : Relation of structure to function in bacterial O antigens. II. Fractionation of lipids present in Boivin-type endotoxin of *Serratia marcescens*. *J. Bact.*, **85**, 427-435 (1963).
- 35) Greech, H. J., Koehler, L. H., Havas, H. F., Peck, R. M. & Andre, J. : Preparation and chemical properties of polysaccharide-lipid complexes obtained from *Serratia marcescens* and *Escherichia coli*. *Cancer Res.*, **14**, 817-823 (1954).
- 36) Jacobi, M. : The effect of the shwartzman reaction with bacterial filtrate on transplantable tumors in animals. *Am. J. Cancer.*, **26**, 770-774 (1936).
- 37) Hoshi, A., Kanzawa, F., Kuretani, K., Homma, Y. & Abe, C. : Antitumor activity of constituents of *Pseudomonas aeruginosa*. *Gann*, **64**, 523-525 (1973).
- 38) Mihich, E. & Neter, E. : Necrotizing effects of *Staphylococcus aureus* extract on mouse Sarcoma 180. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.*, **106**, 97-101 (1961).
- 39) Nolte, W. A. : Oral microbiology, 1st ed., p 21-32, C. V. Mosby Co., Saint Louis, 1968.
- 40) 香川靖雄 : 基礎生化学実験法, 2. 抽出・分離・精製 (阿南・紺野・田村・松橋・松本編), 第1版, 9-13頁, 丸善, 東京, 1980.
- 41) Mergenhagen, S. E., Bladen, H. A. & Hsu, K. C. : Electron microscopic localization of endotoxic lipopolysaccharide in gram-negative organisms. *Ann. N. Y. Acad. Soci.*, **133**, 279-291 (1966).
- 42) Bladen, H. A. & Mergenhagen, S. E. : Ultrastructure of *Veillonella* and morphological correlation of an outer membrane with particles associated with endotoxic activity. *J. Bact.*, **88**, 1482-1492 (1964).
- 43) Mergenhagen, S. E., Hampp, E. G. & Scherp, H. W. : Preparation and biological activities of endotoxins from oral bacteria. *J. Infect. Disease*, **108**, 304-310 (1961).
- 44) Mergenhagen, S. E. & Varsh, E. : Serologically specific lipopolysaccharides from oral *Veillonella*. *Arch. Oral. Biol.*, **8**, 31-36 (1963).
- 45) Mergenhagen, S. E., Zipkin, I. & Varah, E. : Immunological and chemical studies on an oral *Veillonella* endotoxin. *J. Immunol.*, **88**, 482-487 (1962).
- 46) Mergenhagen, S. E. : Polysaccharide-lipid complexes from *Veillonella parvula*. *J. Bact.*, **90**, 1730-1734 (1965).
- 47) Watanabe, T. : Regression of mouse ascites tumors by the treatment with bacterial extracts. *Japan. J. Exp. Med.*, **36**, 453-455 (1966).
- 48) 渡辺 貞 : 大腸菌抽出成分の抗腫瘍作用, 最新医学, **25**, 1049-1053 (1970).
- 49) 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).
- 50) Mihichi, E., Westphal, O., Lüderitz, O. & Neter, E. : The tumor necrotizing effect of lipid A component of *Escherichia coli* endotoxin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **107**, 816-819 (1961).
- 51) Donnelly, A. J., Havas, H. F. & Groesbeck, M. E. : Mixed bacterial toxins in the treatment of tumors. II. Gross and microscopic changes produced in sarcoma 37 and in mouse tissues. *Cancer Res.*, **18**, 149-161 (1958).
- 52) Old, L. J., Benacerraf, B., Clarke, D. A., Carswell, E. A. & Stockert, E. : The role of the reticuloendothelial system in the host reaction to neoplasia. *Cancer Res.*, **21**, 1281-1300 (1961).
- 53) Benacerraf, B. & Sebastyen, M. M. : Effect of bacterial endotoxins on the reticuloendothelial system. *Federation Proc.*, **16**, 860-867 (1957).

- 54) Lemperle, G.: Immunization against Sarcoma-180 potentiated by RES stimulation. *J. Reticu. Soc.*, **3**, 385-397 (1966).
- 55) Mizuno, D., Yoshioka, O., Akamatu, M. & Kataoka, T.: Antitumor effect of intracutaneous injection of bacterial lipopolysaccharide. *Cancer Res.*, **28**, 1531-1537 (1968).
- 56) Weinberg, J. B., Chapman, H. A. & Hibbs, J. B.: Characterization of the effects of endotoxin on macrophage tumor cell killing. *J. Immunol.*, **121**, 72-80 (1978).
- 57) Alexander, P. & Evans, R.: Endotoxin and double standard RNA render macrophages cytotoxic. *Nature New Biol.*, **232**, 76-78 (1971).
- 58) McLaughlin, C. A., Hargrave, S. L., Bickel, W. D. & Ribí, E.: Synergistic activity of components of *Mycobacteria* and mutant *Salmonella* in causing regression of line-10 tumors in guinea pigs. *Cancer Res.*, **39**, 1766-1771 (1979).
- 59) Cameron, D. J. & Churchill, W. H.: Cytotoxicity of human macrophages for tumor cells: Enhancement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J. Immunol.*, **124**, 708-712 (1980).
- 60) Currie, G. A. & Basham, C.: Activated macrophages release a factor which lyses malignant cells but not normal cells. *J. Exp. Med.*, **142**, 1600-1604 (1975).
- 61) Ribí, 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).
- 62) Apitz, K.: Über Blutungsreaktionen am Imfcarcinom der Maus. *Z. Krebsforsch.*, **40**, 50-70 (1933).
- 63) Diller, I. C., Mankowski, Z. T. & Harris, L. T.: Lytic action of *Candida* and *Saccharomyces* sp. on Sarcoma 37 and Ehrlich ascites tumors. *Cancer Res.*, **14**, 848-852 (1954).
- 64) Palph, P. & Nakoing, I.: Lipopolysaccharides inhibit lymphosarcoma cells of bone marrow origin. *Nature*, **249**, 49-52 (1974).
- 65) 越浦良三・清水隆作・玉井健三: 口腔内嫌気性菌の研究, 第5報. 口腔内感染症から分離した嫌気性菌の癌細胞に対する Cell injuring reaction (C. I. R.) 活性について. *口科誌*, **21**, 534-539 (1972).
- 66) 天野恵夫・玉井健三: 口腔内嫌気性菌の研究, 第8報. 口腔内分離菌株(偏性嫌気性菌)の癌細胞に対する Cell injuring reaction (C. I. R.) 活性について. *口科誌*, **23**, 323-333 (1974).
- 67) Steinbring, W. R. & Youngner, J. S.: Patterns of interferon appearance in mice injected with bacteria or bacterial endotoxin. *Nature*, **14**, 712 (1964).
- 68) Ho, M.: Interferon-like viral inhibitor in rabbits after intravenous administration of endotoxin. *Science*, **146**, 1472-1474 (1964).
- 69) Feingold, D. S., Youngner, J. S. & Chen, J.: Interferon production in mice by cell wall mutants of *Salmonella typhimurium*. III. Role of lipid moiety of bacterial lipopolysaccharide in interferon production in animals. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **173**, 249-254 (1970).
- 70) Gresser, I., Bourali, C., Lévy, J. P., Fontaine-Brouty-Boyé, D. & Thomas, M. T.: Increased survival in mice inoculated with tumor cells and treated with interferon preparations. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **63**, 51-57 (1969).
- 71) Gresser, I., Maury, C. & Brouty-Boyé, D.: Mechanism of the antitumor effect of interferon in mice. *Nature*, **239**, 167-168 (1972).
- 72) 守屋直人・三輪恕昭・竹束正二郎・折田薫三: 細菌性リボ多糖(LPS)のMH-134腫瘍に対する抗腫瘍効果ならびに抗腫瘍多糖 lentinan との併用効果. 癌と化学療法, **10**, 1646-1651 (1983).
- 73) 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. USA*, **72**, 3666-3670 (1975).

**Studies on the Antitumor Activity of *Veillonella*** Kiyomasa Nakagawa, Department of Dento-Oral Surgery (Director: Prof. K. Tamai), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., 93, 587–598 (1984)

**Key words:** Anaerobes, Antitumor activity, *Veillonella*

**Abstract**

The antitumor activity of *Veillonella alcalescens* T-2 strain cultured in TF medium for 48 hr was investigated on ascites or the solid type tumor of Ehrlich carcinoma and Sarcoma 180 in ICR mice. Antitumor materials examined were culture supernatant, and the supernatant, its ethanol fraction and the sediment of bacterial cells treated by ultrasonic disruption. A half ml of the test materials was administered intraperitoneally once a day for 2 weeks to mice 48 hr after treatment with an intraperitoneal injection of the cancer cells ( $5.0 \times 10^6$  cells). The highest antitumor activity was found in the supernatant of bacterial cells cultured for 48 hr followed by the ultrasonic disruption. After the injection of the ethanol fraction, the survival period of mice inoculated with Ehrlich ascites carcinoma or Sarcoma 180 cells was prolonged by 160.2–166.1% as T/C (%). Similar effects were obtained for ascites and the solid type tumor as well. The antitumor activity was also found in 10 out of 16 *veillonella* strains, i.e., 7 *V. alcalescens* and 9 *V. parvula*, both of which were isolated from outpatients and identified.