Studies on the Antitumor Activity of Peptococcus magnus

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/2297/7710

Peptococcus magnus の抗腫瘍性に関する研究

金沢大学大学院医学研究科歯科口腔外科学講座（主任：玉井健三教授）
坂　下　英　明

（昭和59年1月31日受付）

TF培地中で12時間から120時間培養したPeptococcus magnus ST-1株の抗腫瘍性を，ICR系マウスに移植したエーリッヒ腹水癌およびサルコーマ180細胞の固型腫瘍について研究した．抗腫瘍性物質を，1）培養上清液より60％エタノールで沈殿させた分画，2）菌体を超音波処理して得た上清液と沈渣，3）菌体抽出物よりpH6.0, pH4.0, pH2.0の等電点にて沈殿した分画の3物質に分離して検討した．3～4×10^7cellsの癌細胞を皮下に移植後48時間目より，適度に懸濁調整した各々の3つの物質の0.25 mlづつを筋肉内注射した．担癌マウスへの治療は1日1回で，1週間続けた．

24時間培養の培養上清液の60％エタノール分画が，エーリッヒ腹水癌細胞の固型癌の担癌マウスに対して延命効果を示した．しかし，48～120時間培養においては，活性は認められなかった．24時間培養の菌体超音波処理上清液では，さらに有効な活性が得られた．10規定塩酸を加え，超音波処理上清液中よりpH4.0にて等電点沈殿した分画が，これらの3検体中で最も高い抗腫瘍性を示した．この分画を投与したエーリッヒ腹水癌またはサルコーマ180細胞の担癌マウスにおいて，延命日数はT/C（％）にして144～174％であった．60日観察にて，10匹中3匹のマウスが腫瘍死せず，この結果は再確認された．さらに，本活性物質の問題点および，細胞免疫能強化と関係していると考えられる作用機序について論じた．

Key words　Anaerobes, Antitumor activity, *Peptococcus magnus*.

近年，細菌およびその生成物の抗腫瘍作用に関する研究は多数認められる[1~7]．しかし，そのほとんどは好気性菌による研究であり，嫌気性による抗腫瘍性の研究は，Clostridia, anaerobic Corynebacterium (Propionibacterium)の一部に限られている[8~12]．

われわれの教室では，数年前よりグラム陰性嫌気性桿菌のFusobacterium nucleatumに抗腫瘍性のあることをin-vivoで証明し報告してきたが[13]，この事実に関連してグラム陽性嫌気性球菌にも抗腫瘍性があるのではないかと考え，Peptococcus magnusについて抗腫瘍性の実験を試みた．

材料および方法

Ⅰ．実験材料：

1．使用菌株：

実験に供したPeptococcus magnus ST-1株は，口腔内炎症性疾患の材料より分離後，Cowan[14]およびBergey's manual[15]にしたがって同定し，API 20 A anaerobic system (La Balme les Grottes, Montalieu, France) にて同定した教室保存株である．

2．使用培地

前培養には，玉井・福田の培地[16]（TF培地・日水，東京）を使用した．

また，本培養には，TF処方より寒天を除いた培地を用いた．以下TF培地（寒天ぬき）と記す．

3．実験に使用した癌細胞

教室で継代している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）の腹部を剃毛し，ヒビテンアルコールで消毒した後に各々の癌細胞1.0×10^7cells/mlの0.5 mlを腹腔内に移植維持した．移植後1週間目に可及的無菌操作にて乳様の腹水を採取し，滅菌生理食塩

Studies on the Antitumor Activity of *Peptococcus magnus*. **Hideaki Sakashita,** Depertment of Dent-Oral Surgery (Director: Prof. Kenzo Tamai), School of Medicine, Kanazawa Univercity.

水で細胞数を調整後，実験に供した．

4．実験動物：

実験に使用した動物はICR系マウスの生後約6週で，体重が約25～27 gのものを供した．

II．**実験方法**

1．担癌マウスの調整：

教室で継代しているEhrlich腹水癌およびSarcoma 180細胞の腹水を滅菌生理食塩水にて希釈し，Türk型血球計算盤にて算定後，3.2～3.6×10^7 cells/mlとなるようにEhrlich腹水癌細胞およびSarcoma 180の細胞浮遊液を調整し，実験に供した．剃毛後ヒビテンアルコールにて消毒したマウスの背部の皮下に，調整した細胞浮遊液0.25 mlを移植し，固型腫瘍として全ての実験に供した．

2．抗腫瘍物質の調整（表1）

(1) エタノール分画の調整：

P. magnus ST-1株をTF培地（中試験管15 ml）で37°C・48時間前培養し，さらにTF培地（中試験管15 ml）で37°C・24時間培養後，TF血液寒天平板培地に塗沫した．Gas Pak（BBL, Cockeysville, USA）にて37°C・48時間嫌気培養後，平板培地上に形成されたコロニーをTF培地（中試験管15 ml）に釣菌し，37°C・48時間培養した．培養後，100 ml容量の投薬ビンに100 mlのTF培地を作製し，この培地中に5％の割合に培養した菌液を移植し，37°C・24時間さらに前培養した．培養後TF培地（寒天ぬき，1,000 ml容量の投薬ビンに1,000 mlのTF培地を作製したもの）に5％の割合で前培養した菌液を移植し，37°Cで各実験に必要な時間培養した．かかる条件でのST-1株の増殖曲線（生菌数測定）は図1に示してある．各時間培養後，各1,000 mlの培養液を無菌的に4°Cにて，4,500×Gで20分間冷却遠心し，培養上清液と沈渣とに分離した．

冷却遠心して得られた培養上清液に純エチルアルコールを加え，培養上清液中のエチルアルコール濃度が60％となるように調整した後に十分攪拌した．4°Cにて一夜静置した後，再度10,000×Gにて20分間冷却遠心した．この際得られた沈渣を滅菌生理食塩水50 mlに懸濁し，エタノール分画として実験に供した．

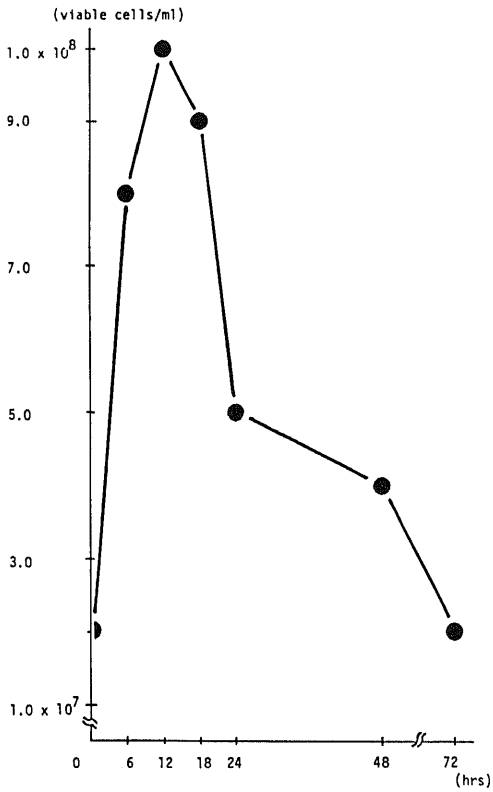

Fig. 1. Growth curve of Peptococcus magnus ST-1 strain.

(2) 超音波処理菌体の上清液と沈渣の調整：

本培養後，冷却遠心して得られた沈渣に50 mlの滅菌生理食塩水を加え，4,500×Gで20分間冷却遠心して洗浄した．

この際得られた沈渣に滅菌生理食塩水50 mlを加え，Tomy ultrasonic disruptor（Model UR-200p, 20KHz, Tomy, Tokyo）を用いて，20分間超音波処理をおこなった．超音波処理後10,000×Gで20分間冷却遠心し，上清液は菌体超音波処理上清液として実験に供した．沈渣は滅菌生理食塩水50mlに懸濁し，菌

Table 1. Antitumor substances extracted from Peptococcus magnus ST-1 strain

1) Ethanol fraction: 60% ethanol precitates of culture supernatant
2) Supernatant and sediment fraction obtained by centrifugation of ultrasonically disrupted cell suspension in physiological saline
3) Fractions obtained by isoelective point precipitation:
   supernatant fraction in 2) was committed to isoelectrical precipitation at different pH 6.0, 4.0 and 2.0

体超音波処理沈渣として実験に供した.

(3) 等電点沈殿法による抗腫瘍性物質の抽出 (pH6.0 分画, pH4.0 分画, pH2.0 分画):

前培養した菌液を 5 %の割合で 4,000 ml の TF 培地 (寒天ぬき, 1,000 ml 容量の投薬ビンに 1,000 ml の TF 培地を作製したものを 4 本) に移植し, 37°C・24 時間培養した. 培養液を 4,500×G で 20 分間冷却遠心し, 得られた沈渣に滅菌生理食塩水 50 ml を加えた後, 再度 4,500×G で 20 分間冷却遠心して洗浄した. この菌体を(2)の操作で超音波処理をおこない, その上清液に(1)のごとくエタノールを 60%に加え折出した分画を遠心し, 得られた沈渣を出発材料とした. さらに pH による分画に用いた. 即ち, 得られた沈渣に PBS (phosphate buffer solution, pH7.0) 50 ml を加え, 充分攪拌した後に 1ON HCl を加えて pH を 6.0 となるように調整した. 調整後 4 °Cに一夜静置し, 10,000×G で 20 分間冷却遠心をおこない, 得られた沈渣に PBS (pH7.0) を 50 ml 加えて懸濁し, pH6.0 分画として実験に供した.

一方, この際得られた遠心上清液に, さらに 1ON HCl を加え, pH4.0 となるように調整した. 攪拌後 4 °Cに一夜静置し, 再度 10,000×G で 20 分間冷却遠心し, 得られた沈渣に PBS (pH7.0) 50 ml を加えて懸濁し, pH4.0 分画として実験に供した.

同様に, pH4.0 分画を得るために操作した後の遠心上清液に, さらに 1ON HCl を加えて pH2.0 に調整し, 攪拌後 4 °C に一夜静置し, 10,000×G にて 20 分間冷却遠心し, 得られた沈渣に PBS (pH7.0) 50 ml を加えて, 懸濁したものを pH2.0 分画として実験に供した.

3. 投与方法:

P. magnus ST-1 株の培養液のエタノール分画, 上記の菌体超音波処理上清液および沈渣ならびに等電点沈殿法によって得られた各分画を次の如く投与した. すなわち, 実験癌細胞移植後 48 時間経過したマウスの左右上腕二頭筋部へ交互に各々の 0.25ml を 1 日 1 回, 1 週間連続して筋肉内注射をした. 全ての実験群は 1 群 10 匹として実験した.

4. 抗腫瘍効果の判定:

実験癌細胞を移植した日より以後のマウスの生存日数にて抗腫瘍効果を判定することとし, 実験群の平均生存日数 (T) と対照群の平均生存日数 (C) の比, 即ち T/C×100 によって抗腫瘍効果を判定した[17].

この際, 各実験群は 60 日間観察し, 60 日目に T/C (%) の判定をおこなった. T/C (%) は 130 以上のものについて抗腫瘍性ありと判定した.

また, 腫瘍重量による抗腫瘍効果の判定もおこなった. すなわち, 実験癌細胞移植後 15 日目より 5 日ごとに, 対照群および処置群のマウスの背部に形成された固型腫瘍の短径と長径を測定し, 下記の式で腫瘍重量を算定した[18].

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

成　　績

I. Ehrlich 腹水癌細胞の固型腫瘍に対する P. magnus ST-1 株のエタノール分画の抗腫瘍性:

P. magnus ST-1 株を 24・48・72・96・120 時間の各時間毎に培養し, 各々の培養上清液より得られたエタノール分画について抗腫瘍性を検討した. 対照群は Ehrlich 腹水癌細胞を移植したマウスに滅菌生理食塩水 0.25 ml を筋肉内注射し実験をおこなった.

経日的にこれらのマウスの生死を観察し, 抗腫瘍性を判定した. この成績を表 2 に示したが, 対照群のマ

Table 2. Antitumor effect of the ethanol fraction from culture supernatant of Peptococcus magnus ST-1 strain on solid type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice

Ethanol fractions obtained from ST-1 strain incubated for (hr)	Mean survival day[a]	Number of[a] survivors	T/C(%)
24	36.0±12.4	1	136.3
48	32.8±10.4	1	124.2
72	33.1±7.5	0	125.3
96	33.3±8.5	0	126.1
120	31.1±5.5	0	117.8
Physiological saline (Control)	26.4±3.0	0	

a) Observed on the 60th day after intramuscular injection of material into tumor-bearing mice.

ウスは21日目より腫瘍死を認め，31日目で全てのマウスは腫瘍死し，その平均生存日数は26.4±3.0日であった．24時間培養のエタノール分画処置群は22日目より腫瘍死し，38日目で10匹中9匹のマウスが腫瘍死し，その平均生存日数は36.0±12.4日で，T/C（%）は136.3と有意の抗腫瘍性が見出された．しかし，48～120時間各培養のエタノール分画群では平均生存日数31～33日，T/C(%)は117～126と抗腫瘍性は何れにも認められなかった．（表2）

II．Ehrlich腹水癌細胞の固形腫瘍に対するP. magnus ST-1株の菌体超音波処理上清液の抗腫瘍性：

P. magnus ST-1株の培養上清液中のエタノール分画に十分な抗腫瘍性を認めなかったため，続いて本菌株を24・48・72・96・120時間の各時間毎に培養し，遠心後の各々の菌体を超音波処理後遠心して得られた上清液について，抗腫瘍性を検討した．

実験結果を表3，A）に示した．対照群のマウスは21日目から31日目の間に全てが腫瘍死し，その平均生存日数は26.4±3.0日であった．これに対して，24時間培養の菌体超音波処理上清液処置群では，マウスは29日目より腫瘍死し，対照群のマウスが全て腫瘍死した31日目ではわずかに1匹のみの腫瘍死で，その平均生存日数は43,0±12.4日，T/C（%）は162.8という著しい抗腫瘍性を認めた．しかし，48時間培養の菌体超音波処理上清液処置群では平均生存日数が30.6±11.4日でT/C（%）は115.9，72時間培養では30.9±6.8日でT/C（%）は117.0，96時間培養では28.0±5.9日でT/C（%）は106.0，120時間培養では33.4±11.9日でT/C（%）は126.5でいずれにも抗腫瘍効果は認められなかった．（表3，A））

III．Ehrlich腹水癌細胞の固型腫瘍に対するP. magnus ST-1株の菌体超音波処理沈渣の抗腫瘍性：

超音波によってP. magnus ST-1株の24時間培養の菌体を破壊し，その上清液のみに著しい抗腫瘍性が

Table 3. Antitumor effect of the supernatant and sediment of ST-1 strain treated with ultrasonic disruption on solid type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice

A) Supernatant

Supernatant fractions obtained from ST-1 strain incubated for (hr)	Mean survival days[a)]	Number of[a)] survivors	T/C(%)
24	43.0±12.4	3	162.8
48	30.6±11.4	1	115.9
72	30.9±6.8	0	117.0
96	28.0±5.9	0	106.0
120	33.4±11.9	1	126.5
Physiological saline (Control)	26.4±3.0	0	

a) Observed on the 60th day after intramuscular injection of material into tumor-bearing mice.

B) Sediment

Sediment fractions obtained from ST-1 strain incubated for (hr)	Mean survival days[a)]	Number of[a)] survivors	T/C (%)
24	33.1±11.8	1	125.3
48	30.0±4.1	0	113.6
72	34.5±8.1	0	130.6
96	36.0±10.9	1	136.3
120	27.4±5.9	0	103.7
Physiological saline (Control)	26.4±3.0	0	

a) Observed on the 60th day after intramuscular injection of material into tumor-bearing mice.

認められたが，他の培養時間には認められなかった．そこで，本菌株を24・48・72・96・120時間毎に培養し，各々の菌体を超音波処理し，遠心して得られた沈渣について，抗腫瘍性を検討した．

結果を表3，B)に示す．対照群のマウスは21日目より腫瘍死し，31日目で全てのマウスが腫瘍死し，その平均生存日数が26.4±3.0日であるのに対して，24時間培養の菌体超音波処理沈渣処置群の平均生存日数は33.1±11.8日で，T/C(%)は125.3であり，また48時間培養では30.0±4.1日で，T/C(%)は113.6であり，共に抗腫瘍性はなかった．しかし，72時間培養の菌体超音波処理処置マウスは，22日目より腫瘍死し，45日目まで延命しており，その平均生存日数は34.5±8.1日でT/C(%)は130.6であり，96時間培養のそれは，平均生存日数が36.0±10.9日で60日判定で1匹のマウスの生存を認め，T/C(%)は136.3であった．この両実験群には抗腫瘍性が見出されたが，120時間培養のそれでは，平均生存日数が27.4±5.9日であり，T/C(%)が103.7と抗腫瘍性は認められなかった．(表3B))

Ⅳ．菌体超音波処理上清液の等電点沈殿法による抽出物質の抗腫瘍性：

次に，等電点沈殿法により抽出をおこなった．等電点沈殿法は，ある程度精製をおこなったものについて実施する必要があるため，先の実験(表2，3A))で抗腫瘍性の認められた24時間培養の菌体超音波処理上清液のエタノール分画に等電点沈殿法を応用した．等電点沈殿法によって得られたpH2.0，pH4.0，pH6.0の各分画について，抗腫瘍性を検討した．その結果を表4に示す．対照群のマウスは24日目より腫瘍死し，35日目で全てのマウスが腫瘍死し，その平均生存日数が30.8±3.6日であった．一方，pH2.0分画処置群では53日目まで生存したマウスはあったが，その平均生存日数は35.9±10.9日で，T/C(%)が116.5と抗腫瘍性は認められなかった．しかし，pH4.0分画では29日目より腫瘍死を認め，対照群に比して腫瘍増殖が抑制され，60日目で生存マウスが3匹あり，その平均生存日数は48.5±12.1目で，T/C(%)は157.4と著しい抗腫瘍性が見出された．また，pH6.0分画では28日目より腫瘍死し，57日目まで生存したマウスがあり，平均生存日数が41.4±9.6日で，T/C(%)は134.4と抗腫瘍性が認められた．(表4)以上の実験結果から，pH4.0分画に著しい抗腫瘍性がみられたので，菌体超音波処理上清液のエタノール分画から，直ちにpH4.0分画を作製し抗腫瘍性の再現性を検討した．その成績を表5に示す．対照群の平均生存日数が28.6±4.9日であるのに対して，pH4.0分画では平均生存日数が49.8±8.4日で，T/C(%)は174.1と最も著しい抗腫瘍性が見出され，前述の実験結果を再確認し得た．(表5)

次いで，同様にして得られたpH4.0分画の抗腫瘍性をSarcoma 180細胞を用いて検討した．3.6×10^7 cells/mlのSarcoma 180細胞浮遊液の0.25 mlを移植した固型担癌マウスを用い，対照群にはPBS(pH7.0)を注射した．

その成績は表6に示す如く，対照群においては，マウスは23日目より腫瘍死が起り，34日目で全てのマウスが腫瘍死し，その平均生存日数が29.1±3.7日であった．これに対して，pH4.0分画処置群においては，29日目よりマウスの腫瘍死が生じ，腫瘍増殖の抑制が認められ，その平均生存日数が42.0±13.2日で，60日判定で3匹の生存マウスがあり，T/C(%)が144.3と高い抗腫瘍性を見た．(表6)

Ⅴ．腫瘍重量測定よりみたpH4.0分画の抗腫瘍性：

以上の実験成績より，pH4.0分画はEhrlich腹水癌およびSarcoma 180に対して抗腫瘍性を示すことが証明されたが，さらに固型腫瘍の重量を測定することにより抗腫瘍性を再検討した．3.92×10^7cells/mlのEhrlich腹水癌細胞浮遊液0.25 mlを背部に移植した固型担癌マウスを使用して実験した．

その結果は，図2に示す．Ehrlich腹水癌細胞移植後15日目において，対照群10匹の平均腫瘍重量は2791.6 mgであるのに対して，pH4.0分画処置群の平均腫瘍重量は1736.3 mgであった．20日目では対照群の5106.6 mgに対して，pH 4.0分画群では，747.3 mgとなり，25日目では対照群の8644.2 mgに対して，pH4.0分画群では2713.6 mgであった．さらに，30日目では対照群の15871.9 mgに対して，pH 4.0分画群では4684.6 mgとなり，35日目では対照群の20410.3 mgに対して，pH4.0分画群では6363.2 mgであった．また，腫瘍移植40日目では対照群の25057.7 mgに対して，pH 4.0分画群は4775.6 mgとなり，pH4.0分画に著しい腫瘍増殖の抑制が認められた．この成績は図2に示した通り，対照群にほぼシグモイド曲線様に腫瘍重量が増加しているが，pH4.0分画群においては20日目に一時腫瘍重量の減少が見られた．処置群の20日目以後は35日目まで緩やかな曲線を抽いて増加し，40日目で減少した．これは肉眼的に腫瘍の消失したマウスの相対的割合が増加したためである．(図2)

以上の如く，腫瘍重量の測定においてもpH4.0分画のEhrlich腹水癌に対する著しい抗腫瘍性が証明されたため，同様の検討をSarcoma 180を使用しておこなった．使用したSarcoma 180細胞は3.6×10^7cells/

ml の浮遊液とした．対照群は前述の実験と同様とした．

その結果は，Sarcoma 180 細胞移植後，15 日目の対照群 10 匹の平均腫瘍重量は 4217.4 mg であるのに対して，pH 4.0 分画群の平均腫瘍重量は 2566.8 mg で，この時点で腫瘍増殖の抑制が著明に認められた．20 日目では，対照群の，11115.2 mg に対して pH4.0 分画群では 5225.9 mg となり，30 日目では，対照群の 12472.2 mg に対して，pH 4.0 分画群では 4441.2 mg となり，腫瘍増殖の著しい抑制が見出された．

この成績を図 3 に示したが，対照群はほぼシグモンド曲線様に腫瘍重量が増加しているのに対して，pH4.0 分画群においては増加は緩やかであり，また 40 日目において腫瘍重量は減少し，Ehrlich 腹水癌の処置群と同様の現象を呈した．（図 3）

考　　察

われわれの教室では，従来より嫌気性菌による抗腫瘍性について実験を続けているが，最近 Fusobacterium necleatum の培養上清液中に抗腫瘍活性のあることが証明された[13]ことから，グラム陽性嫌気性球菌にも抗腫瘍性があるのではないかと考え，本実験をおこなった．

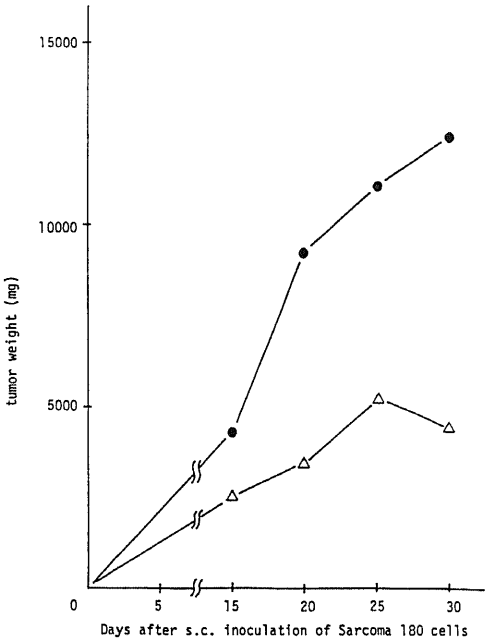

Fig. 2. Effect of the pH 4.0 fraction on tumor weight of solid type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice. (●), the growth of tumor in untreated control group; (△), the growth of tumor in treated group with the pH 4.0 fraction.

Table 4. Antitumor[a] effect of each fraction isoelectrically precipitated in ethanol fraction from ST-1 strain treated with ultrasonic disruption

Fraction[b]	Mean survival days[c]	Number of[c] survivors	T/C (%)
pH 2.0	35.9±10.9	0	116.5
pH 4.0	48.5±12.1	3	157.4
pH 6.0	41.4±9.6	0	134.4
Phosphate buffer solution (Control)	30.8±3.6	0	

a) Solid type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice.
b) Refer to Table 1.
c) Observed on the 60th day after intramuscular injection of material into tumor-bearing mice.

Table 5. Reexamination of the pH 4.0 fraction on solid type tumor of Ehrlich carcinoma cells in mice

Preparation	Mean survival days[a]	Number of[a] survivors	T/C (%)
pH 4.0 fraction	49.8±8.4	3	174.1
Phosphate buffer solution (Control)	28.6±4.9	0	

a) Observed on the 60th day after intramuscular injection of material into tumor-bearing mice.

本実験に使用したP. magnus ST-1株は，われわれの教室で口腔内感染症の臨床材料から分離し，API 20A anaerobic system にて同定された教室保存株である．

P. magnusは種々の臨床材料，特に膿汁よりの分離率が高い菌種である[19~22]．本菌の分類には，研究者によって種々の意見があるため，過去においては種々の分類がおこなわれてきたが[15)23)24)]，1980年のApproved lists of bacterial names[25)]において，国際細菌名分類委員会は本菌をP. magnusと命名したため，われわれも本名称に従って実験を施行した．

抗腫瘍性を検討する方法としては，まずP. magnusの培養液を培養上清液と菌体に分離し，それらの分画に抗腫瘍性が存在するか否かを検討することとし，培養上清液に対しては溶媒沈殿法[26,27)]をおこなった．この際メタノールは，蛋白質沈殿時にはエタノールより高濃度を必要とし，アセトンは，脂質を可溶化して蛋白質を沈殿させるため，メタノールおよびアセトンは本実験には不適当と考え，エタノールを用いた．エタノールは40%の濃度でほとんどの蛋白質を沈殿させるとされており[27)]，著者は基礎実験として，40%エタノール濃度とその付近の濃度で比較したところ，60%エタノーリ濃度にて抗腫瘍物質が沈殿する結果が得られたため，60%エタノール濃度にて実験をおこなった．本実験では，本操作にて培地成分中の蛋白質およびP. magnus ST-1株が生産する可能性のある糖蛋白質も沈殿させると考えられる．

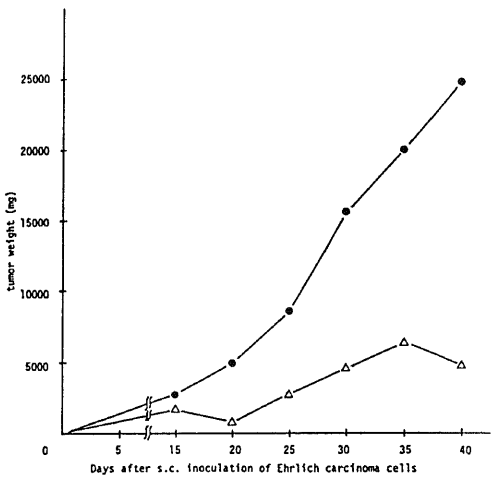

Fig. 3. Effect of the pH 4.0 fraction on tumor weight of solid type of Sarcoma 180 cells in mice. (●), the growth of tumor in untreated group; (△), the growth of tumor in treated group with the pH 4.0 fraction.

菌体は超音波にて破壊し，菌体内容物と細胞壁に分離して検討することとし，菌体を分離する際には，寒天やその他の培地成分の混入を極力防ぐために，本実験では寒天を除いたTF培地を本培養に用いた．また，遠心して得られた菌体自体も滅菌生理食塩水で洗浄しているため，培地成分の混入は比較的少ないと考え実験した．さらに，本実験では比較的少量の濃厚菌体とし，このような状態での菌体破壊に適するとされている超音波法[28)]を用いて菌体を破壊した．この際菌体破壊の程度を知るため，試料を遠心し塗抹標本により破壊率を求める[28)]と63.4%であり，さらに生菌数を測定して破壊率を求める[29)]と90%以上であった．

細菌の細胞壁は，分別遠心にて可溶性の細胞構成物質および膜断片を除くことにより容易に単離される[30)]ので，遠心にて細胞壁が沈渣として得られたと考えた．菌体を超音波処理した後の上清液は，菌体内容物と考え実験に供した．

当初，これらの各成分をEhrlich腹水癌細胞およびSarcoma 180細胞を用いて，腹水癌系による抗腫瘍実験をくり返したが抗腫瘍性は認められなかった．そこで，実験系を固型腫瘍として実験した．その結果，表2；3，A)，B)の如く，24時間培養のエタノール分画に抗腫瘍性を認め，24時間培養の菌体超音波処理上清液にも著しい抗腫瘍性がみられた．また，72・96時間培養の菌体超音波処理沈渣にも抗腫瘍性が見出された．このように本実験では，24時間培養をピークとして異なった培養時間で，エタノール分画，

Table 6. Antitumor effect of the pH 4.0 fraction on solid type tumor of Sarcoma 180 cells in mice

Preparation	Mean survival days[a)]	Number of[a)] survivors	T/C(%)
pH 4.0 fraction	42.0±13.2	3	144.3
Phosphate buffer solution (Control)	29.1±3.7	0	

a) Observed on the 60th day after intramuscular injection of material into tumor-bearing mice.

菌体超音波処理上清液およびその沈渣のいずれにも強弱の差はあれ，抗腫瘍活性がみられた．このことは，これらの各成分に別個の抗腫瘍性物質が存在すると考えるより，むしろ同一の抗腫瘍性物質が存在し，抽出法が完全でないために，各成分に本活性物質が分散し，このような結果を生じたと考えた．特に24時間培養の菌体超音波処理上清液に著しい抗腫瘍性が存在したため，抗腫瘍活性の主体は，菌体の超音波破壊により遊出した物質であると考えられる．本物質は前述したように，当初は菌体内容物と考え実験をおこなったが，エタノール分画でも抽出でき，菌体超音波処理上清液およびその沈渣でも抽出できる成分は，P. magnusの細胞壁断片しかないと考える．

すなわち，24時間培養のエタノール分画では自己融解した菌の細胞壁の一部が抽出され[31]，菌体超音波処理上清液には，細胞壁の細片が多量に含まれ，その沈渣には，細胞壁の比較的大きな分子量の断片が含有されていると考えられる．

そこで，まず最初に菌体超音波処理上清液では著しい抗腫瘍活性が得られるのに，その沈渣では得られない理由について考えると，細胞壁の生物活性発現に与える供給細胞の粒子サイズの問題があると考えられる．細胞壁の生物活性発現の機序とも関係すると考えられている本問題を最初に検討したのはRobersonら[32]である．彼らはA群Streptococciの超音波処理沈渣に酵素処理して細胞壁の断片を得て分画し，細胞壁の断片には粒子サイズによって家兎の皮膚病変の形成能に差があることを認めた．また，Ohanianら[33]はA群Streptococciの超音波処理後の細胞壁の断片の浮遊液を，遠心器にて分画する場合，27,000×Gでは沈渣として得られないが，90,000×Gで沈殿する分画にマウス皮膚に多結節性病変を作る活性の大部分が含まれているとしている．しかし，Abdullaら[34]はA群Streptococciにおいて，長時間超音波処理しすぎて細胞壁を細片化しすぎると，皮膚壊死毒性は減弱すると報告している．このようにA群Streptococciについては，皮膚毒性を効果的に発揮する最適の粒子レベルが，存在することが知られているが，嫌気性グラム陽性球菌であるP. magnusにおいても本実験の結果より，精製の程度は粗ではあるが，A群Streptococci同様に効果発現の粒子レベルが存在するのではないかと考える．すなわち，菌体超音波処理沈渣には，大粒子の細胞壁が含まれ，また菌体超音波処理上清液には細胞壁の断片が含まれ，抗腫瘍活性はこの細胞壁の断片が主体となり発現されると考えられる．

成田ら[31]は，細菌細胞壁がその生物活性を効率よく発揮するために，適当なサイズの粒子に分散させることがなぜ必要かという問題について，考察している．供試細胞壁が適当な粒子サイズに分散された場合には，それぞれの作用の発現部位に効果的に運ばれて，あるいは当該部位に，長時間排除されることなく滞留することが考えられる．また細胞壁を超音波処理して細片化すると，標的となる細胞ないしは組織に作用する表面積が拡大し，あるいは作用にあずかる機能群が新しく曝露されて，その数を増し，その結果活性が増加する可能性も考えられる．それ故に，粒子サイズが余りにも小さくなると作用が減弱するという事実は説見しにくいとしている．

これら従来の研究および本実験においては，物理的手段で細胞壁を“可溶化”することによっておこなわれたものであり，酵素的におこなわれたものではないため，実験的に修飾された可能性も存在すると考えられる．しかし，本実験において，菌体超音波処理上清液の方が，その沈渣より抗腫瘍性が高い理由として，細胞壁の断片と考えられる上清液は沈渣に比較して，分子量が小さいため，作用点に到達しやすいのであろう．また，沈渣はより大きな分子量を持つために，局所反応を強く起こすが，抗腫瘍性の発現には不利なのではないかと考えられる．このように考えれば，作用機序としては，グラム陽性球菌の細胞壁が種々の免疫作用を起こす[35~37]ことより，P. magnusの細胞壁の断片にも免疫作用，特に免疫強化作用があり，これが筋肉内注射にて惹起されて，遠隔部の固型腫瘍を縮少させるのではないかと考える．

次に考えられるのは，培養時間と抗腫瘍性の関係である．生菌数測定による本菌株の増殖曲線は，図1に示した如く，12時間をピークとする曲線を描いたため，12時間培養の表1に示す各分画について抗腫瘍性を検討したところ，いずれにも抗腫瘍性は全く見出せなかった．したがって増殖曲線と抗腫瘍性との間に，明らかな相関関係は認められなかった．

しかし，生菌数の多い状態よりも自己融解した死菌の多い状態で，抗腫瘍性が発現する可能性もあると考えられるが，ほとんどの培養時間において，エタノール分画に抗腫瘍性が認められなかったため，自己融解と抗腫瘍性にも明らかな相関関係はないと考える．

次いで，菌体超音波処理上清液中の抗腫瘍性物質を，等電点沈殿法[38,39]にて精製した．等電点沈殿法は，粗活性物質を含む溶液から活性物質の溶解度の差を利用して活性物質を沈殿させる方法で，Snipeら[40]はClostridium botulinumの培養液に塩酸を加えて，pHを3.0～4.0に調整し，A型の毒素を抽出した．Lamannaら[41]は段階的なpHの変化にて，B型の毒素を抽出し，さらにCordellaら[42]は，C型の毒素の抽出にも本法を

応用している．また，本実験では10規定の塩酸を用いて，pHを酸性にして実験をおこなった[43]．本法は，一般に溶解度の比較的小さい蛋白質などの分別に使用されるが，この際には塩類濃度を低くする必要があるとされており，その理由としては，塩類の添加によって蛋白質の等電点が，酸性にずれるためである[44]．そのため本実験に際しては，菌体はよく洗浄しており，一部培地成分の混入や塩類の干渉の可能性はあると考えられるが，著しいものではないと思われる．

表4の如く，当初は段階的にpHを調整したpH4.0分画に，著しい抗腫瘍性を認めたため，表5の如く，菌体超音波処理上清液のエタノール沈殿から，直ちにpHを4.0に調整し抽出したpH4.0分画において抗腫瘍性を検討したが，やはり著しい抗腫瘍性が得られた．この結果から，pHは段階的に調整しなくとも直ちにpH4.0に調整することで，抗腫瘍性物質は沈殿すると考えられる．

pH4.0分画には，脂質・糖質・複合多糖類等が含まれているが，本実験においては，菌体超音波処理上清液を精製しているため主成分は，菌体内容物または細胞壁由来の物質と考えられる．この際，前述したように，その沈渣にも抗腫瘍性が認められ，両者の作用発現物質を同一の物質と考え，細胞壁と推定した．そこで，この分画中の主成分は，P. magnus細胞壁由来の糖蛋白質を中心とした複合多糖類ではないかと考える．

細胞壁は，ペプチドグリカンを主成分とした種々の多糖類より成立している[45]が，その中でも最も割合の高いのは，ペプチドグリカンである．Staphylococcus aureusにおいては，細胞壁の乾燥重量の40～60%を占めるとされ，多くのアミノ酸が細胞中に含有されており[46]，グラム陽性球菌であるP. magnusの細胞壁から本実験に使用した方法において，これらの混合物が得られたのではないかと考える．

グラム陽性菌の生物学的活性については，Heyer[47]が，従来報告されている作用について整理を加え，その中で抗腫瘍活性についても言及している．また小谷[48]は，種々の免疫作用が報告されているにもかかわらず，細胞壁ペプチドグリカンの抗腫瘍免疫への利用が，未開発であることを指摘している．本実験においてはペプチドグリカンとは断定できないが，P. magnusの細胞壁由来の多糖体と考えられる物質に，抗腫瘍性を認めたことは，これらの報告と関連性が深いと考えられる．

細胞壁ペプチドグリカンの種々の生物学的作用は，Holtronら[49]によって明らかにされてきた．さらに，最近Galans[50]によって，グラム陰性菌のLPSの免疫学的作用が，ペプチドグリカンの免疫学的作用に類似していることが明らかにされ，Rotta[51]はペプチドグリカンの内毒素類似の性質について述べている．

LPSまたは内毒素に，抗腫瘍作用があることは古くから知られており[52]，本作用は固型腫瘍組織に，強い出血壊死作用は示すが，腹水腫瘍への作用はそれ程顕著ではない[53]とされ，現在では，作用機序は局所Shwartzman反応によるものと考えられている[53,54]．Kodamaら[55]は，人や実験動物の悪性腫瘍組織よりの抽出物が，LPSと比べて約1/1,000のShwartzman活性を例外なく持っており，正常組織の抽出物にはこの活性はないと報告している．

本実験に先立って，著者はEhrlich腹水癌およびSarcoma 180細胞の腹水癌系によるP. magnus ST-1株の抗腫瘍性の検討をおこなったが，培養上清液・菌体・菌体超音波処理上清液および沈渣のいずれにも，抗腫瘍性は認められなかった．この結果は，山口ら[56,57]のE. coliのLPS（lipopolysaccharide）は，MH 134の腹水型には無効であるが，皮下接種腫瘍には有効であるとする報告と同様の傾向を有し，本実験の抗腫瘍性発現の主体は，細胞壁ペプチドグリカンを主成分とする多糖類ではないかと推定させる理由の1つである．

また，表5・6および図2・3において示されるように，Ehrlich腹水癌細胞およびSarcoma 180細胞において抗腫瘍性に差の認められる理由は，本成分の可移植腫瘍に対する感受性の差であると考えられる．

本実験で得られた成分は未だ精製が粗であり，本体および作用機序は明らかではないが，これらは今後検討されるべきであろう．

結　　論

P. magnus ST-1株の抗腫瘍性をEhrlich腹水癌細胞およびSarcoma 180細胞を用いて検討したところ，下記のごとき結論を得た．

1）24時間培養の上清液のエタノール分画においてEhrlich腹水癌細胞の固型腫瘍に対して抗腫瘍性がみられた．

2）24時間培養の菌体超音波処理上清液ではEhrlich腹水癌細胞の固型腫瘍に対して著しい抗腫瘍性を認めた．

3）72・96時間培養の菌体超音波処理沈渣も，Ehrlich腹水癌細胞の固型腫瘍に対して抗腫瘍性を示した．

4）24時間培養の菌体超音波処理上清液を等電点沈殿法にて直ちにpH4.0に調整したpH4.0分画は，Ehrlich腹水癌細胞の固型腫瘍に対して著しい抗腫瘍性を示し，またSarcoma 180細胞の固型腫瘍に対して

も，高い抗腫瘍性を認めた．

5)腫瘍重量測定による抗腫瘍性の実験においても，Ehrlich 腹水癌細胞および Sarcoma 180 細胞の固型腫瘍に対して，pH4.0 分画に著しい抗腫瘍性が認められた．

謝　辞

稿を終るに臨み，終始御懇篤なる御指導，御校閲を賜わりました，恩師玉井健三教授に深甚の謝意を表わすとともに，御助言いただいた竹松啓一博士ならびに教室諸兄に，心から感謝いたします．

なお本論文の要旨は，第 20 回日本細菌学会中部支部総会（1983 年）において発表した．

文　献

1) **泰　藤樹**：微生物領域からみた制癌．医学のあゆみ，**75**, 695-700 (1969).

2) **東　市郎・谷尾吉郎・山村雄一**：癌と BRM（漆崎一朗・塚越　茂編），第 1 版，124-144 頁，サイエンスフォーラム，東京．1982.

3) **Ikawa, M., Koepfli, J. B., Mudd, S. G. & Niemann, C.**: An agent from *E. coli* causing hemorrhage and regression of an experimental mouse tumor: I. Isolation and Properties. J. Nat. Cancer Inst., **13**, 157-166 (1952).

4) **Mihich, E. & Neter, E.**: Necrotizing effects of *Staphylococcus aureus* extract on mouse sarcoma 180. Proc. Soc. Expl. Biol. Med., **106**, 97-101 (1961).

5) **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).

6) **国本法雄**：抗腫瘍性を有する微生物に関する研究．第一報　枯草菌による抗腫瘍作用．口科誌，**19**, 1-7 (1970).

7) **Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B.**: An endotoxin-induced serum fractor that causes necrosis of tumors. Prc. Nat. Acad. Sci., **72**, 3666-3670 (1976).

8) **Möse, J. R. and Moše, 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) **Thiele, E. H., Arison, R. N. and Boxer, G. E.**: Oncolysis by Clostridia: IV. Effect of non-pathogenic clostridial spore in normal and pathological tissues. Cancer Res., **24**, 234-238 (1964).

10) **Kayser, D.**: Über den Mechanismus der Abtötung von Ascites-Kregszellen durch *Clostridium butyricum*. Zeitscht. Naturforschung, **18**, 748-752 (1963).

11) **Halpern, M. B.**: Immunologie-Stude de L'action dime immunostimuline associ'ee aus *Corynebacteries anaerobies* dam les neoplasies experimentales et humaines. C. R. Acad. Soc. Paris, **273**, 2186-2190 (1971).

12) **Woodruff, M. F. and Boak, J. L.**: Inhibitory effect of injection of Corynebacterium parvum on the growth of tumor transplants in isogenic hosts. Brit. J. Cancer, **20**, 345-355 (1966).

13) **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).

14) **Cowan, S. T.**: Cowan and Steel's manual of identification of medical bacteria. 2nd ed., p45-76, Cambridge Univercity Press, Cambridge, 1974.

15) **Rogosa, M.**: Peptococcaceae, p517-525. In R. N. Buchanan, and N. E. Gibbon, (ed.), Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.

16) **玉井健三**：口腔内嫌気性菌の研究．口科誌，**27**, 393-415 (1978).

17) **塚越　茂**：癌化学療法・癌免疫療法の効果判定基準と制癌剤開発（斉藤達雄編），第 1 版，19-21 頁，サイエンスフォーラム，東京．1981.

18) **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., p51-52, National Institutes of Health, Maryland, USA, 1972.

19) **酒泉和夫**：歯性化膿性疾患における嫌気性菌の研究．第 11 報　歯性化膿性疾患より分離した嫌気性菌の動態について．口科誌，**23**, 452-468 (1974).

20) **渡辺元裕・小野田和広・大村武平・沼田政志・田中広一・遠藤義隆・田代直也・藤田　靖・林　進武・斉藤利夫・山口　泰・猪狩俊郎・手島貞一**：最近 5 年間の口腔外科患者の細菌検査成績について．口科誌，**29**, 216-225 (1980).

21) **Bourgault, A., Rosenblatt, J. E. & Fitzgerald, R. T.**: *Peptococcus magnus*: A significiant human pathogen, Ann. Int. Med., **93**, 244-248 (1980).

22) **丸井利軌**：臨床材料から分離されたPeptococcus と Peptostreptococcus の特徴づけと分類学上の問題点．岐阜医紀，**29**, 1071-1082 (1982).

23) **鈴木祥一郎**：嫌気性菌と嫌気性菌感染症（小酒井・鈴木編），第1版，92-93頁，医学書院，東京．1968.

24) **Holdeman, L. V. & Moore, W. E. C.**: Anaerobic laboratory manual, 2nd ed., p10-19, Virginia Polytechnic Institute and State Univercity, Blacksburg, 1972.

25) **Skerman, V. B. D., McGowan, V. & Sneath, P. H. A.**: Approved lists of bacterial names. Int. J. Syst. Bacteriol., **30**, 225-420 (1981).

26) **岩永貞昭**：生化学実験講座1．タンパク質の化学Ⅰ（日本生化学学会編），第1版，11-14頁，東京化学同人，東京．1981.

27) **島尾和男**：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，67-72頁，丸善，東京．1974.

28) **医科学研究所学友会編**：細菌学実習提要，第5版，351-352頁，丸善，東京．1980.

29) **医科学研究所学友会編**：細菌学実習提要，第5版，173-174頁，丸善，東京．1980.

30) **Sharon, N.**: Complex carbohydrates, lst ed., p318-344, Addison-Wesley Publishing Co. Inc., Massachusetts, 1975.

31) **成田俊彦・小谷尚三**：グラム陽性球菌細胞壁の生物学的活性について．蛋白質核酸酵素，**17**, 60-80 (1972).

32) **Roberson, B. S., Schwab, J. H. & Cromartie, W. J.**: Relation of particle size of C polysaccharide complexes of *group A Streptococci* to toxic effects on connective tissue. J. Exptl. Med., **112**, 751-763 (1960).

33) **Ohanian, S. H., Schwab, J. H. & Cromartie, W. J.**: Relation of rheumatic-like cardiac lesions of the mouse to localization of group A streptococcal cell wall. J. Exptl. Med., **129**, 37-49 (1969).

34) **Abdulla, E. M. & Schwab, J. H.**: Biological properties of Streptococcal cell wall particles: III. Dermonecrotic reaction to cell-wall mucopeptides. J. Bacteriol., **91**, 374-383 (1966).

35) **小谷尚三・成田俊彦**：細菌細胞壁の生化学と免疫・生物学．感染・炎症・免疫，**2**, 393-414 (1972).

36) **成田俊彦**：微生物細胞壁の生物・免疫学的活性．阪大歯学誌，**19**, 81-99 (1974).

37) **Tauber, J. W., Polley, M. J. & Zabriskie, J. B.**: Nonspecific complement activation by streptococcal structures. J. Exp. Med., **143**, 1352-1366 (1976).

38) **医科学研究所学友会編**：細菌学実習提要，第5版，353-354頁，丸善，東京．1980.

39) **島尾和尾**：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，72-74頁，丸善，東京．1974.

40) **Snipe, P. T. & Sommer, H.**: Studies on botulinus toxin: 3. Acid precipitation of botulinus toxin. J. Infect. Dis., **43**, 152-160 (1928).

41) **Lamanna, C. & Glassman, H. N.**: The isolation of type B botulinum toxin. J. Bacteriol., **54**, 575-584 (1947).

42) **Cardella, M. A., Duff, J. T., Gottferied, C. & Begel, J. S.**: Studies on immunity to toxins of *Clostridium botulinum*: IV Production and purification of type C toxin for conversion to toxoid. J. Bacteriol., **75**, 360-365 (1958).

43) **Bronfenbrenner, J. J. & Schlesinger, M. J.**: The effect of digestive juices on the potency of botulinus toxin. J. Exptl. Med., **39**, 509-516 (1924).

44) **岩永貞昭・山下仁平**：生化学実験講座1・タンパク質の化学Ⅰ（日本生化学会編），第1版，72-74頁，東京化学同人，東京．1981.

45) **小池聖淳・中島幸一**：細菌細胞壁の構造．蛋白質核酸酵素，**17**, 567-572 (1972).

46) **Sharon, N.**: Complex carbonhydrates, lst ed., p393-416, Addison-Wesley Publishing Co. Inc., Massachusetts, 1975.

47) **Heymer, B.**: Biological properties of the peptidoglycan. Z. Immun.-Forsch. Bd., **149**, 245-257 (1975).

48) **小谷尚三**：細菌細胞壁ペプチドグリカンおよびその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).

49) **Holton, J. B. & Schwab, J. H.**: Adjuvant properties of bacterial cell wall mucopeptides. J. Immunl., **96**, 134-138 (1966).

50) **Galanos, C.**: Physical state and biological activity of lipopoly-saccharides: Toxicity and immunogenicity of the lipid A component. Z. Immun.-Forsch. Bd., **149**, 214-228 (1975).

51) **Rotta, J.**: Endotoxin-like properties of the peptidoglycan. Z. Immun.-Forsch. Bd., **149**, 230-244

(1975).
52) **Coley, W. B.**: Contribution to the knowledge of sarcoma. Ann. Surg., **14**, 199-220 (1891).
53) 片山 胖・小玉正智・山口 希: 細菌内毒素の抗腫瘍作用. 臨床免疫, **12**, 848-853 (1980).
54) 片山 胖・小玉正智: 腫瘍特異的物質の存在と悪性腫瘍細胞の本態. 癌と化学療法, **7**, 1873-1877 (1980).
55) **Kodama, M., Yajima, H., Hashimoto, I. & Katayama, Y.**: Biological activities of Shwartzman-active substance from Yoshida sarcoma cells. Jpn. J. Med. Sci. Biol., **30**, 77-81 (1977).
56) 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).
57) 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).

Studies on Antitumor Activity of *Peptococcus magnus*

Hideaki Sakashita, Department of Dento-Oral Surgery (Director: Prof. K. Tamai), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 – J. Juzen Med. Soc., **93**, 147 – 158 (1984)

Key words: Anaerobes, Antitumor activity, *Peptococcus magnus*

Abstract

Antitumor activity of *Peptococcus magnus* strain ST-1 cultured in TF medium for 12–120 hrs was investigeted on solid tumors (Ehrlich ascites carcinoma and Sarcoma 180) in ICR mice. The antitumor active substances examined were as follows :1) 60% ethanol fraction precipitated from culture supernatant; 2) supernatant and sediment obtained by ultrasonic treatment of bacterial cells; 3) fractions by isoelectric point precipitation of cell extracts as pH 6.0, pH4.0 and pH2.0 fraction. A quater of these 3 substances appropriatly resuspended or prepared was administered intramuscularly 48 hrs after a subcutaneous inoculation of cancer cells (3-4x 10^7 cells) into mice. These treatments of tumor-bearing mice were repeated every day for one week. The sixty percent ethanol fraction from 24 hr-old culture supernatant was effective for the prolonged survivals of solid-Ehrlich ascites carcinoma-bearing mice. However, the ones from 48–120 hr-old culture supernatant did not show the activity. More effective activities were found by the administration of supernatant of 24 hr-old bacterial cells treated with ultrasonic disruption. The highest activities among the above 3 substances were shown in the pH 4.0 fraction isoelectrically precipitated from the ultrasonic supernatant by addition of 10 N HCl. Prolonged survival days of Ehrlich ascites carcinoma- or Sarcoma 180 cells-tumor bearing mice groups treated with this fraction reached to 144–174% in comparison with the control group (T/C%). Three out of the 10 treated mice survived even at 60th day of the experiment. Further problems on this active substance(s) and its mechanism of activity probably related to cellular immune augmentation were discucced.