

A群溶連菌の脂質に関する研究-2-溶連菌脂質の腫瘍細胞傷害作用について

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/2297/8895

A群溶連菌の脂質に関する研究

〔II〕溶連菌脂質の腫瘍細胞傷害作用について

金沢大学医学部薬理学教室 (主任: 正印 達教授)

北 島 耕 作

(昭和56年1月26日受付)

Key words Hemolytic streptococci, streptococcal lipids, cytotoxicity, Ehrlich ascites carcinoma.

A群溶連菌の抗腫瘍作用¹⁾²⁾については多くの研究がなされているが、溶連菌の抗腫瘍性因子についてはほとんど明らかにされていない。しかしながら、溶連菌溶血毒素(ストレプトリジンS³⁾⁴⁾およびO⁵⁾には抗腫瘍作用が認められず、溶連菌の培養濾液に抗腫瘍性物質が見いだされないが¹⁾²⁾、無細胞抽出液⁶⁾⁷⁾およびこれより分離されたタンパク画分⁸⁾⁹⁾に抗腫瘍活性がみられることなどが報告されていることから、溶連菌の菌体成分が抗腫瘍作用に関与していることが考えられる。他方、ある種の真菌から抽出された遊離脂肪酸やモノグリセリドが抗腫瘍作用を示すこと¹⁰⁾⁻¹²⁾、大腸菌や赤痢菌から抽出されたlipid Aに抗腫瘍作用が認められること¹³⁾¹⁴⁾などが報告されている。これらのことから、著者は前報において各種連鎖球菌より脂質を分離し、これらについて定性定量実験を行ない比較検討を行なったが²⁾⁶⁾、本論文では、3種類のA群溶連菌(Su菌、Blackmore菌およびC203U菌)からクロロホルム・メタノール液で抽出した総脂質、および薄層クロマトグラフィーで分離した総脂質の画分(リン脂質、糖脂質および中性脂質)のエールリッヒ腹水がん細胞に対する作用について実験を行なった。

材料および方法

1. 溶連菌

教室保存のA群溶連菌Su株(3型、ストレプトリジンSおよびストレプトリジンO産生株、以下Su菌と略記)、Blackmore株(11型、ストレプトリジンS

産生株、以下Blackmore菌と略記)およびC203U株(C203S菌の変異種、ストレプトリジンO産生株、以下C203U菌と略記)を用いた。

2. 溶連菌の培養

溶連菌の培養には前報で用いたWoodらの合成培地を使用した¹⁾⁹⁾⁶⁾。溶連菌の合成培地による培養液200 mlを10 lの合成培地に移植し、37℃で12時間培養したのち、低温下で連続遠心(10000rpm, 100 ml/分)して集菌し、得られた菌体を生理食塩水で2回洗浄した(菌収量: 2.0-2.5g/l)。

3. 溶連菌脂質の抽出

溶連菌の脂質はFolchらの方法によって抽出した¹⁷⁾。すなわち、20-25gの溶連菌を20倍量のクロロホルム・メタノール(2:1, v/v)で室温で2回抽出したのち、抽出液に1/5量の生理食塩水を加えて混和し、4℃に放置して混液が二層に分離してから、水溶性物質を含む上層を除去し、脂質を含む下層をロータリー・エバポレーターを用いて窒素気流下に40℃で減圧濃縮して油状物質(総脂質)を得た(総脂質収量: 9-11 mg/g)。

4. 薄層クロマトグラフィーによる溶連菌脂質の分離・精製

一次元薄層クロマトグラフィーによって溶連菌のリン脂質、糖脂質および中性脂質を分離した。

1) リン脂質と糖脂質

クロマトプレート(20×20 cm, 厚さ1 mm)の一端から2.5 cmのところ溶連菌の総脂質(100 mg前後)

Studies on the Lipids of Group A Hemolytic Streptococci. [II] Cytotoxic Activity of Lipids from Hemolytic Streptococci. **Kousaku Kitajima**, Department of Pharmacology (Director: Prof. S. Shoin), School of Medicine, Kanazawa University.

を線状にスポットし、クロロホルム・メタノール・水 (65 : 25 : 4, v/v)¹⁸⁾ で 16 cm 展開した。展開後、ヨード試薬 (脂質検出用)¹⁹⁾ を噴霧してスポットの位置を確認したのち、ヨードが褪色してから、脂質を含むシリカゲルをプレートより採取し、クロロホルム・メタノール (2 : 1, v/v) で脂質を抽出した。単一の脂質を得るために、分離したリン脂質および糖脂質について上記の操作を 2 - 3 回繰返したが、一部のリン脂質と糖脂質の分離が不十分であったので、クロロホルム・アセトン・メタノール・酢酸・水 (65 : 35 : 11 : 4 : 1.5, v/v)²⁰⁾ を展開溶媒とする一次元薄層クロマトグラフィーによってリン脂質と糖脂質を分離した。

分離したリン脂質および糖脂質を同定するために、クロマトプレート (5 × 20 cm, 厚さ 0.25 mm) の一端から 2.5 cm のところに脂質成分を点状にスポットし、上記の展開溶媒で 15 cm 展開したのち、リンモリブデン酸試薬 (脂質検出用)¹⁹⁾、Dittmer - Lester 試薬 (リン脂質検出用)²¹⁾ またはアンスロン試薬 (糖脂質検出用)²²⁾ を噴霧して脂質の種類を調べた (表 1)¹⁶⁾²⁵⁾。

2) 中性脂質

複合脂質の場合と同様に、クロマトプレート (20 × 20 cm, 厚さ 1 mm) に溶連菌の総脂質を線状にスポットし、ヘキサン・エチルエーテル・酢酸 (70 : 30 : 2, v/v)²³⁾ を展開溶媒として 16 cm 展開した。展開後、ヨード試薬によってスポットの位置を確認し、クロマトプレートから脂質成分を回収したが、一部の成分は完全に分離しなかったため、分離が不十分な脂質成分は塩化エチレン・メタノール (98 : 2, v/v)²⁴⁾ を展

開溶媒とする一次元薄層クロマトグラフィーによって分離した。脂質成分を同定するために、クロマトプレート (5 × 20 cm, 厚さ 0.25 mm) に分離した脂質および標準物質 (コレステロール, パルミチン酸, モノパルミチン, ジパルミチンなど) をスポットし、上記の展開溶媒で展開したのち、リンモリブデン酸試薬またはアンチモン試薬 (ステロール類検出用)¹⁹⁾ でスポットを検出して、Rf 値および呈色反応を比較した (表 2)¹⁶⁾²⁵⁾²⁶⁾。

5. ガスクロマトグラフィーによる溶連菌脂質の脂肪酸の分析

薄層クロマトグラフィーで分離した溶連菌のリン脂質、糖脂質および中性脂質の脂肪酸構成をガスクロマトグラフィーで調べた²⁵⁾。

5 - 10 mg の脂質を 5% 硫酸メタノール溶液で 65 - 70 °C ・ 15 時間処理したのち、シクロヘキサン・クロロホルム (1 : 1, v/v)²⁷⁾ を展開溶媒とする一次元薄層クロマトグラフィーによって脂肪酸メチルエステルを分離してガスクロマトグラフィーに用いた。

使用した装置は日立モデル 063 ガスクロマトグラフ (水素炎イオン化検出器付き) で、NPGS を 60 - 80 メッシュの Chromosorb W (AW - DMCS) に 20% コーティングした担体をガラスカラム (長さ 200 cm, 内径 3 mm) に充填して用いた。測定時のカラム温度は 210 °C, 試料注入口の温度は 230 °C, 検出器の温度は 280 °C であり、キャリアーガスとして用いた窒素ガスの流量は 20 ml / 分であった。なお、イオン化検出器の感度はレンジが 10, アッテネーションが 16 であった。

6. 溶連菌脂質の腫瘍細胞傷害作用に関する実験

Table 1. Chromatographic characterization of compound lipids of hemolytic streptococci

Fraction no.	Rf values in solvent*		Color reaction by spray reagent**			Possible identification
	I	II	R1	R2	R3	
I	0.61	0.18	+	-	+	Diglucoyl diglycerides
II	0.75	0.23	+	+	-	Diphosphatidyl glycerols
III	0.75	0.56	+	-	+	Monoglucoyl diglycerides
IV	0.95	0.88	+	-	+	Neutral lipids

*Solvent I, chloroform-methanol-water (65:25:4, by vol.); solvent II, chloroform-acetone-methanol-acetic acid-water (65:35:11:4:1.5, by vol.).

**Spray reagents: R1, phosphomolybdate for lipids; R2, Dittmer-Lester reagent for phospholipids; R3, anthrone reagent for glycolipids or sterols.

Table 2. Chromatographic characterization of neutral lipids of hemolytic streptococci

Fraction no.	Rf values in solvent*		Color reaction by spray reagent**		Possible identification
	III	IV	R1	R4	
N1	0.07	0.07	+	-	Monoglycerides
N2	0.40	0.10	+	-	Free fatty acids
N3	0.27	0.32	+	+	Sterols
N4	0.29	0.52	+	-	Diglycerides
N5	0.70	0.86	+	-	Triglycerides
N6	0.84	0.88	+	+	Sterol esters

*Solvent III, hexane-diethyl ether-acetic acid (70:30:2, by vol.); solvent IV, ethylene chloride-methanol (98:2, by vol).

**Spray reagents: R1, phosphomolybdate for lipids; R4, antimony trichloride for sterols.

Table 3. Comparative cytotoxic test against Ehrlich carcinoma cells with total lipids of hemolytic streptococci

Streptococci	Concentration of total lipids in test mixture* (mg/ml)	No. of survivors at 60th day
<i>St. hemolyticus</i>	5.0	5/5
Su	2.0	2/5
	0	0/5
<i>St. hemolyticus</i>	5.0	5/5
Blackmore	2.0	2/5
	0	0/5
<i>St. hemolyticus</i>	5.0	5/5
C203U	2.0	3/5
	0	0/5

*Total lipids suspended in physiological saline containing Tween 20 (0.02%) were mixed with tumor cells (2×10^7 cells/ml), and incubated at 37°C for 90 min. After incubation, the mixture was injected i.p. into mice (10^7 tumor cells/mouse).

1) 動物

体重 20 - 22g の雌の ddN 系マウスを用いた。

2) 腫瘍細胞

エールリッヒ腹水がん細胞を腹腔内に移植して 10 日目のマウスより腹水を採取し、低温下で遠心 (1,000rpm, 5分) して腫瘍細胞を集め、得られた細胞を生理食塩水で 2 回洗浄した。洗浄後、がん細胞を適量の生理食塩水に浮遊させて、 4×10^7 個/ml のがん細胞浮遊液を作製した。

3) In vitro-in vivo 法による腫瘍細胞傷害実験

Tween 20 を 0.02% に含む生理食塩水に脂質を各種濃度に懸濁させ、脂質懸濁液とがん細胞浮遊液を等量に混和した (細胞数: 2×10^7 個/ml)。混液を 37°C で 90 分間インキュベートしたのち、混液の 0.5 ml をマウスの腹腔内に注射し、腫瘍増殖の有無を 60 日間観察した。また、対照群のマウスには、Tween 20 を含む生理食塩水にがん細胞浮遊液を混じり 90 分間インキュベートしたものを投与した。なお、60 日目まで生存したマウスおよび観察期間中死亡したマウスについては剖検し、肉眼的に腫瘍浸潤の有無を確認した。なお、エールリッヒがん細胞と溶連菌脂質の混液およびがん細胞の浮遊液 (対照) を 37°C で 90 分間インキュベートしたのち、がん細胞の生存数をトリパンブルーによる dye exclusion test によって調べた^{2B)}。

成 績

1. 溶連菌脂質の腫瘍細胞傷害作用

3 種類の溶連菌より分離した総脂質のエールリッヒがん細胞に対する作用について行なった移植増殖阻止実験の結果は、表 3 に示した如くである。総脂質が 3 種類の溶連菌の何れから分離されたものであっても、総脂質・がん細胞混合液中の作用濃度が 5 mg/ml では、がん細胞の移植増殖性を阻止し、処理がん細胞を注射されたマウスはいずれも腫瘍死することなく、60 日目まで生存した。総脂質の作用濃度が 2 mg/ml の場合には、注射されたマウスのほぼ半数が 60 日目まで生存していた。しかし、がん細胞のみを投与した対照動物はすべて 20 日以内に腫瘍死した (図 1)。

つづいて、クロロホルム・メタノール・水 (65 : 25 : 4, v/v) またはクロロホルム・アセトン・メタノール・酢酸・水 (65 : 35 : 11 : 4 : 1.5, v/v) を展開溶媒とする一次元薄層クロマトグラフィーで分離された脂質画分 (ジホスファチジルグリセロール、モノグルコシルジグリセライド、ジグルコシルジグリセライドおよび中性脂質) のがん細胞に対する作用を調べた (表 4 および表 5)。表に示した如く、

Blackmore 菌と C203U 菌のジホスファチジルグリセロールは 2 mg/ml の濃度でがん細胞の移植増殖を阻止したが、Su 菌のジホスファチジルグリセロールには移植増殖阻止作用は認められなかった。また、3 種類の溶連菌の中性脂質はいずれも 2 mg/ml の濃度で、がん細胞の移植増殖を完全に阻止した。しかしながら、溶連菌の糖脂質 (モノグルコシルジグリセライドとジグルコシルジグリセライド) の阻止作用は、リン脂質や中性脂質に比較して弱く、脂質の濃度が 2 mg/ml で 60 日目のマウスの生存数は 50% 以下であった。

以上のごとく、溶連菌のジホスファチジルグリセロールおよび中性脂質に腫瘍細胞傷害効果が認められたので、ヘキサノール・エチルエーテル・酢酸 (70 : 30 : 2, v/v) または塩化エチレン・メタノール (98 : 2, v/v) を展開溶媒とする一次元薄層クロマトグラフィー

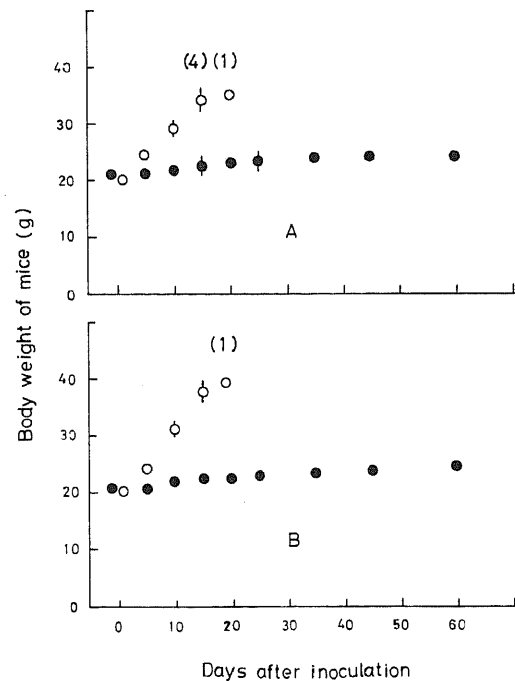


Fig. 1. Change in the body weight of mice inoculated with Ehrlich tumor cells alone (○) or with the mixture of tumor cells and streptococcal total lipids (●). Ehrlich tumor cells suspended in saline were mixed with the total lipids from hemolytic streptococci of Su strain (A) or C203U strain (B) at a concentration of 5 mg per ml. Each value represents mean \pm SE of 5 mice, except three groups of animals. Number of mice in these groups is given in parentheses.

ーによって分離された、中性脂質の各成分（ステロール、ステロールエステル、グリセリド、遊離脂肪酸など）のがん細胞に対する作用を調べた。表6に示した如く、Su菌、Blackmore菌およびC203U菌の中性脂質の各成分のうち、遊離脂肪酸、モノグリセリドおよびステロールエステルは2 mg/mlの濃度でがん細胞の移植増殖を阻止したが、その他の成分はいずれも同じ濃度では移植増殖を阻止しなかった。つぎに、増殖阻止作用を示した中性脂質の各成分について、脂質の濃度と移植増殖阻止作用の関係を調べた(表7)。表に示した如く、阻止作用を示した3種類の中性脂質の中で、遊離脂肪酸の作用が最も強く、0.1 mg/mlで40%のマウスに移植増殖を阻止したが、モノグリセリドでは0.5 mg/ml、ステロールエステルでは2 mg/mlで阻止効果が認められた。C203U菌の中性脂質でもほぼ同様な成績が得られた。したがって、溶連菌の中性脂質のうち、遊離脂肪酸、モノグリセリドおよびステロール

エステルが腫瘍細胞傷害効果を示すと考えられる。以上の成績に関連して、37℃で90分間インキュベートしたエールリッヒがん細胞と溶連菌脂質の混液およびがん細胞の浮遊液について、がん細胞の生存率をトリバンブルー液で調べた。成績は次の如くであった。

がん細胞浮遊液に溶連菌の遊離脂肪酸またはモノグリセリド(濃度: 1-2 mg/ml)を加えてインキュベートした場合には、がん細胞の生存率は2%以下であった。他方、がん細胞浮遊液に溶連菌のジグリセリドまたはトリグリセリド(濃度: 2 mg/ml)を加えてインキュベートした場合には、がん細胞の生存率は80%(73-86%)であった。また、エールリッヒがん細胞のみをインキュベートした場合の細胞の生存率は81%(74-87%)であり、インキュベートしないがん細胞の生存率は84%(78-89%)であった。これらの成績は、溶連菌の遊離脂肪酸やモノグリセリドを加えて90分間インキュベートすると、エールリッヒが

Table 4. Comparative cytotoxic test against Ehrlich carcinoma cells with compound lipids of hemolytic streptococci

Streptococci	Lipid classes*	Concentration of lipids in test mixture** (mg/ml)	No. of survivors at 60th day
<i>St. hemolyticus</i> , Su	DPG	2.0	0/5
	MGD	2.0	0/5
	DGD	2.0	0/5
	NL	2.0	5/5
	0	0	0/5
<i>St. hemolyticus</i> , Blackmore	DPG	2.0	5/5
	MGD	2.0	2/5
	DGD	2.0	1/5
	NL	2.0	5/5
	0	0	0/5
<i>St. hemolyticus</i> , C203U	DPG	2.0	4/5
	MGD	2.0	2/5
	DGD	2.0	0/5
	NL	2.0	5/5
	0	0	0/5

*DPG, diphosphatidyl glycerols; MGD, monoglucosyl diglycerides; DGD, diglucosyl diglycerides; NL, neutral lipids.

**Compound lipids suspended in physiological saline containing Tween 20 (0.02%) were mixed with tumor cells (2×10^7 cells/ml), and incubated at 37°C for 90 min. After incubation, the mixture was injected i.p. into mice (10^7 tumor cells/mouse).

Table 5. Comparative cytotoxic test against Ehrlich carcinoma cells with diphosphatidyl glycerols of hemolytic streptococci

Streptococci	Lipid concentration in test mixture* (mg/ml)	No. of survivors at 60th day
<i>St. hemolyticus</i> , Su	2.0	0/5
	1.0	0/5
	0.5	0/5
	0	0/5
<i>St. hemolyticus</i> , Blackmore	2.0	5/5
	1.0	2/5
	0.5	0/5
	0	0/5
<i>St. hemolyticus</i> , C203U	2.0	4/5
	1.0	2/5
	0.5	0/5
	0	0/5

*Lipids suspended in physiological saline containing Tween 20 (0.02%) were mixed with tumor cells (2×10^7 cells/ml), and incubated at 37°C for 90 min. After incubation, the mixture was injected i.p. into mice (10^7 tumor cells/mouse).

Table 6. Comparative cytotoxic test against Ehrlich carcinoma cells with neutral lipids of hemolytic streptococci

Streptococci	Concentration of neutral lipids in test mixture* (mg/ml)	No. of survivors at 60th day					
		Lipid classes**					
		FA	MG	DG	TG	S	SE
<i>St. hemolyticus</i> , Su	2.0	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	4/5
<i>St. hemolyticus</i> , Blackmore	2.0	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	4/5
<i>St. hemolyticus</i> , C203U	2.0	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	2/5

*Neutral lipids suspended in physiological saline containing Tween 20 (0.02%) were mixed with tumor cells (2×10^7 cells/ml), and incubated at 37°C for 90 min. After incubation, the mixture was injected i.p. into mice (10^7 tumor cells/mouse).

**FA, free fatty acids; MG, monoglycerides; DG, diglycerides; TG, triglycerides; S, sterols; SE, sterol esters.

ん細胞は著しく傷害されることを示している。なお、
 エールリッヒがん細胞の浮遊液に2種類の溶連菌
 (Blackmore 菌と C203U 菌)のジホスファチジルグリ
 セロール(濃度: 2 mg/ml)を加えて、90分間イン
 キュベートした場合にも、がん細胞の生存率は著しく
 減少していた(ほぼ4%)。

2. 溶連菌のリン脂質および中性脂質の脂肪酸構 成

Blackmore 菌および C203U 菌のジホスファチジル
 グリセロールには移植増殖阻止作用が認められ、Su 菌
 のそれには阻止作用は認められなかったので、Su 菌の
 リン脂質と他の溶連菌のリン脂質との脂肪酸構成を比
 較した(表8)。表に示した如く、Su 菌のジホスファ
 チジルグリセロールの構成脂肪酸は C_{14:0}、C_{16:0}および
 C_{18:0}で、これらの飽和脂肪酸が構成脂肪酸の100%を
 占めており、不飽和脂肪酸は認められなかった。しか

Table 7. Comparative cytotoxic test against Ehrlich carcinoma cells with neutral lipids of streptococci Su and Blackmore

Streptococci	Lipid classes*	No. of survivors at 60th day						
		Lipid concentration in test mixture** (mg/ml)						
		2.0	1.0	0.5	0.2	0.1	0.05	0
<i>St. hemolyticus</i> , Su	FA	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	0/5
	MG	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	.	0/5
	SE	4/5	2/5	0/5	.	.	.	0/5
<i>St. hemolyticus</i> , Blackmore	FA	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	0/5
	MG	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	.	0/5

*FA, free fatty acid; MG, monoglycerides; SE, sterol esters.

**Neutral lipids suspended in physiological saline containing Tween 20 (0.02%) were mixed with tumor cells (2×10^7 cells/ml), and incubated at 37°C for 90 min. After incubation, the mixture was injected i.p. into mice (10^7 cells/mouse).

Table 8. Fatty acid composition of antitumor lipids from hemolytic streptococci

Streptococci	Lipid classes*	Fatty acid composition (%)									
		C10:0	C12:0	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2
<i>St. hemolyticus</i> , Su	DPG	-	tr.	8.2	-	76.7	-	-	15.1	-	-
	FA	tr.	2.6	7.0	-	51.0	4.8	2.6	21.3	10.5	tr.
	MG	tr.	-	1.6	-	44.7	tr.	-	44.7	8.0	-
	SE	-	-	7.3	-	31.7	4.3	-	30.6	21.9	3.0
<i>St. hemolyticus</i> , Blackmore	DPG	-	tr.	8.3	-	69.3	9.6	-	5.6	7.1	-
	FA	tr.	tr.	4.5	-	41.5	12.6	tr.	16.9	18.9	3.2
	MG	tr.	tr.	3.0	-	28.7	6.4	tr.	31.5	20.9	5.5
	SE	tr.	tr.	7.5	1.3	58.5	6.8	tr.	16.6	6.3	-
<i>St. hemolyticus</i> , C203U	DPG	-	tr.	2.3	-	35.2	14.0	-	9.3	39.2	-
	FA	tr.	tr.	3.0	-	40.8	tr.	1.7	51.0	3.0	tr.
	MG	tr.	tr.	3.2	-	39.2	tr.	-	46.3	10.7	-
	SE	tr.	tr.	13.4	-	54.3	tr.	.	31.8	tr.	-

*DPG, diphosphatidyl glycerols; FA, free fatty acids; MG, monoglycerides; SE, sterol esters.

し、Blackmore 菌や C203U 菌のジホスファチジルグリセロールでは、これらの 3 種類の飽和脂肪酸のほかに、 $C_{16:1}$ と $C_{18:1}$ の不飽和脂肪酸が見いだされ、不飽和脂肪酸の構成脂肪酸に占める割合は、Blackmore 菌では 17%、C203U 菌では 53% であった。すなわち、Su 菌のジホスファチジルグリセロールは不飽和脂肪酸が結合していない点で、Blackmore 菌や C203U 菌のリン脂質とは異なっていた。ついで溶連菌の中性脂質についての脂肪酸構成を比較した。実験結果は表 8 の如く、3 種類の溶連菌の遊離脂肪酸、モノグリセリドおよびステロールエステルの脂肪酸構成はそれぞれ菌によって多少異なっていたが、いずれの菌の中性脂質にも $C_{14:0}$ 、 $C_{16:0}$ 、 $C_{18:0}$ の飽和脂肪酸と $C_{16:1}$ 、 $C_{18:1}$ の不飽和脂肪酸が見いだされた。すなわち、移植増殖阻止作用を示した溶連菌の中性脂質には飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸が含まれていた。

考 察

これまでに、Cephalosporium diospyri, Penicillium crustosum, Sepedonium ampullosporium などの真菌から抽出された遊離脂肪酸やモノグリセリドが抗腫瘍作用を示すことが報告されており^{10)~12)}、これらの中性脂質の構成脂肪酸中の不飽和脂肪酸の割合と抗腫瘍作用の関係が検討されている²⁹⁾³⁰⁾。また、ある種の動物細胞（リンパ球、肝細胞など）から抽出された遊離脂肪酸が抗腫瘍作用を示すことが報告されている^{31)~35)}。しかしながら、細菌の脂質、とくにリン脂質の抗腫瘍作用についてはほとんど知られていない。

本研究では、3 種類の溶連菌（Su 菌、Blackmore 菌および C203U 菌）から抽出した総脂質および中性脂質について実験を行ない、いずれもマウスでエールリッヒがん細胞の移植増殖を阻止することを見出し、中性脂質成分では遊離脂肪酸、モノグリセリドおよびステロールエステルにがん細胞傷害作用があることを実証した。さらに、Blackmore 菌および C203U 菌のジホスファチジルグリセロールはがん細胞傷害性であるが、Su 菌のジホスファチジルグリセロールにはがん細胞傷害作用が認められなかった。また、リン脂質のがん細胞に対する作用が菌の種類によって異なることから、それぞれのリン脂質について脂肪酸構成を調べ、Blackmore 菌および C203U 菌と Su 菌とではリン脂質の脂肪酸構成が著しく異なることを見いだした。すなわち、傷害作用が認められた Blackmore 菌や C203U 菌のジホスファチジルグリセロールには、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の両方が含まれていたが、傷害作用のみられ

なかった Su 菌のジホスファチジルグリセロールには、飽和脂肪酸のみが含まれており不飽和脂肪酸は見いだされなかった。このことから、溶連菌のリン脂質の移植増殖阻止作用と脂肪酸構成との間に何らかの関係があると考えられる。他方、傷害作用を示した溶連菌の中性脂質（遊離脂肪酸、モノグリセリドおよびステロールエステル）にも飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の両方が見いだされた。

遊離脂肪酸やモノグリセリドなどの中性脂質の抗腫瘍作用については、表面活性剤に類似した作用によって脂質が腫瘍細胞の細胞膜を傷害すること、不飽和脂肪酸が細胞膜の傷害に関与することなどが示唆されている²⁹⁾。また、不飽和脂肪酸が細胞膜の流動性を著しく変化させて、細胞膜の機能に影響を及ぼすことが報告されている³⁰⁾。したがって、Blackmore 菌や C203U 菌のジホスファチジルグリセロールが傷害作用を示したのに対し、Su 菌のリン脂質が作用を示さなかったのは、リン脂質中の不飽和脂肪酸の有無にもとづくのかも知れない。

溶連菌のがん細胞に対する作用は菌の種類によって異なり、Su 菌や Blackmore 菌は抗腫瘍性であるが、C203U 菌は抗腫瘍作用を示さないことが報告されている^{11)~5)}。しかしながら、総脂質のエールリッヒがん細胞に対する作用には、Su 菌または Blackmore 菌と C203U 菌との間にはほとんど差異が認められなかった。したがって、脂質が溶連菌の抗腫瘍作用に関与するか否かについて、さらに実験検討する必要があるが、一つには細菌菌体の構造構成その他の理由から、活性脂質が腫瘍細胞に直接作用できないためとも考えられる。しかしながら、溶連菌の脂質、とくにリン脂質にがん細胞傷害作用が認められたことは注目すべきことである。

結 論

3 種類の A 群溶連菌（Su 菌、Blackmore 菌および C203U 菌）から抽出した総脂質ならびに脂質画分（リン脂質、糖脂質および中性脂質）について、エールリッヒがん細胞に対する作用を調べて以下の成績を得た。

1. 3 種類の溶連菌の総脂質および中性脂質は、いずれもマウスでがん細胞の移植増殖を阻止した。

2. 溶連菌の中性脂質のうち、移植増殖阻止作用を示したのは遊離脂肪酸、モノグリセリドおよびステロールエステルであった。

3. Blackmore 菌および C203U 菌のリン脂質（ジホスファチジルグリセロール）は移植増殖阻止作用を示

したが、Su 菌のリン脂質には阻止作用は認められなかった。

稿を終るにのぞみ、御指導御校閲を賜った正印達教授ならびに本研究に対し直接の御指導を賜りました木越茂助教授に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R. : Studies on the anticancer and streptolysin S-forming abilities of hemolytic streptococci. *Jpn. J. Microbiol.*, **11**, 323 - 336 (1967).
- 2) Okamoto, H. : Antitumor activity of streptolysin S-forming streptococci, p. 238 - 257. In A. W. Bernheimer (ed.), *Mechanisms in bacterial toxinology*, 1st ed., John Wiley & Sons Inc., New York, 1976.
- 3) Shoin, S. : Experimental anticancer studies. Part 10. On the effect of avirulent-mutant strain of *Streptococcus hemolyticus* upon invasion power of Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Jpn. J. Exp. Med.*, **29**, 529 - 533 (1959).
- 4) 西田信義: 制がんに関する実験的研究, 第 38 報, 溶連菌による腫瘍細胞傷害についての検討実験. 金大がん研年報, **2**, 36 - 51 (1968).
- 5) 越村三郎・西田信義・坂東勲・正印達・南幹雄・角野光司: 制がんに関する実験的研究, 第 26 報, Streptolysin-O のみの産生能を有する溶連菌の無効性について. 金大結研年報, **23**, 61 - 66 (1965).
- 6) Christensen, E. A. : Infection and malignant tumours. 5. Inhibition of Brown-Pearce carcinoma by cell-free extract of haemolytic streptococci prepared by grinding the bacteria with alumina. *Acta pathol. Microbiol. Scand.*, **59**, 1 - 12 (1963).
- 7) Koshimura, S. & Shoin, S. : Experimental Anticancer Studies. Part 13. On the Streptolysin-S-Synthetizing and Anticancer Activities of Cell-Free Extract From Living Hemolytic Streptococci. *Gann*, **51**, 309 - 318 (1960).
- 8) Shoin, S. : Isolation and fractionation of cell-free extract from streptolysin-S-forming streptococci. *Gann*, **67**, 661 - 667 (1976).
- 9) Seto, K. : Effect of 60 - F product from cell-free extract of group A streptococci and other microorganisms on the invasion of Ehrlich carcinoma cell in mice. *Gann*, **68**, 275 - 280 (1977).
- 10) Williams, R. H., Lively, D. H., Delong, D. C., Cline, J. C., Sweeney, M. J., Poore, G. A. & Larsen, S. H. : Mycophenolic acid : antiviral and antitumor properties. *J. Antibiotics*, **21**, 463 - 464 (1968).
- 11) Ando, K., Suzuki, S., Suzuki, K., Kodama, K., Kato, A., Tamura, G. & Arima, K. : Isolation of fatty acids with antitumor activity from fungal mycelia. *J. Antibiotics*, **22**, 18 - 22 (1969).
- 12) Kato, A., Ando, K., Kodama, K., Suzuki, S., Suzuki, K., Tamura, G. & Arima, K. : Production, isolation and purification of antitumor active monoglycerides and other antibiotics from *Sepedonium ampullosporum*. *J. Antibiotics*, **22**, 71 - 76 (1969).
- 13) Mihich, E., Westphal, O., Luderitz, O. & Neter, E. : The Tumor necrotizing effect of lipid A component of *Escherichia coli* endotoxin. *Proc. Soc. exptl. Biol. Med.*, **107**, 816 - 819 (1961).
- 14) Kasai, N., Aoki, Y., Watanabe, T., Okada, T. & Yamamoto, T. : Studies on the anti-tumor effect of the bacterial lipid component, lipid A. 1. On some physicochemical properties and anti-tumor activity of lipid A fraction. *Jpn. J. Microbiol.*, **5**, 347 - 366 (1961).
- 15) Wood, A. J. & Gunsalus, I. C. : The production of active resting cells of streptococci. *J. Bacteriol.*, **44**, 333 - 341 (1942).
- 16) 木越茂・北島耕作・林義則・西一也: A 群溶連菌のリン脂質および糖脂質について. 十全医会誌, **87**, 664 - 673 (1978).
- 17) Folch, J., Lees, M. & Sloan Stanley, G. H. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 - 509 (1957).
- 18) Wagner, H., Horhammer, C. & Wolf, R. : Dünnschichtchromatographie von Phosphatiden und Glykolipiden. *Biochem. Z.*, **334**, 175 - 184 (1961).
- 19) 原昭二: 薄層クロマトグラフィー (石川・原・古谷・小沢編), 改訂 3 版, 13 - 74 頁, 東京, 南山堂, 1968.

- 20) Neskovic, N., Sarlieve, L., Nussbaum, J. L., Kostic, D. & Mandel, P. : Quantitative thin-layer chromatography of glycolipids in animal tissues. *Clin. Chim. Acta*, **38**, 147-153 (1972).
- 21) Dittmer, J. C. & Lester, R. L. : A simple specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J. Lipid Res.*, **5**, 126-127 (1964).
- 22) Roe, J. H. : The determinations of sugar in blood and spinal fluid with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, **212**, 335-343 (1955).
- 23) Colp, T. W., Tucker, P. W., Raltiff, C. R. & Hall, F. F. : Chromatographic analysis of ocular lipids. I. Bovine and human iris tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, **218**, 259-268 (1970).
- 24) Jatzkewitz, H. & Hehl, E. : Dünnschicht-chromatographie der Gehirn-Lipoide, ihrer Um- und Abbauprodukte. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **320**, 251-257 (1960).
- 25) Kigoshi, S. : Chromatographic characterization of antitumor lipids from a groupe A *Streptococcus*. *Experientia*, **29**, 375-377 (1973).
- 26) 北島耕作 : A群溶連菌の脂質に関する研究. I. 溶連菌の脂質組成. *十全医会誌*, **90**, 196-213 (1981).
- 27) Christophe, A. & Matthijs, F. : New method for the determination of the fatty acid pattern of serum lipid classes. *Clin. Chim. Acta*, **16**, 39-43 (1967).
- 28) Dannenberg, A. M., Burstone, M. S., Walter, P. C. & Kinsley, J. W. : A histochemical study of phagocytic and enzymatic functions of rabbit mononuclear and polymorphonuclear exudate cells and alveolar macrophages. I. Survey and quantitation of enzymes, and states of cellular activation. *J. Cell. Biol.*, **17**, 465-486 (1963).
- 29) Ando, K., Kato, A., Tamura, G. & Arima, K. : Chemical study of fatty acids with antitumor activity isolated from fungal mycelia. *J. Antibiotics*, **22**, 23-26 (1969).
- 30) Kato, A., Ando, K., Tamura, G. & Arima, K. : Effects of some fatty acid esters on the viability and transplantability of Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res.*, **31**, 501-504 (1971).
- 31) Seno, S. & Yamamoto, M. : Chemical analysis and biological activities of fatty acids from the liver of X-ray irradiated rabbit, the antitumor agent so called OX. *Acta Med. Okayama*, **19**, 59-72 (1965).
- 32) Okudaira, H., Kataoka, T., Okada, H., Furuse-Irie, K., Kawachi, S., Nojima, S. & Nishioka, K. : Cytotoxic factor demonstrated in lymph node extract. *J. Biochem.*, **68**, 379-394 (1970).
- 33) Turnell, R. W., Clarke, L. H. & Burton, A. F. : Studies on the mechanism of corticosteroid-induced lymphocytolysis. *Cancer Res.*, **33**, 203-212 (1973).
- 34) Kigoshi, S. & Ito, R. : High levels of free fatty acids in lymphoid cells, with special reference to their cytotoxicity. *Experientia*, **29**, 1408-1410 (1973).
- 35) Turnell, R. W. & Burton, A. F. : Studies on the mechanism of resistance to lymphocytolysis induced by corticosteroids. *Cancer Res.*, **34**, 39-42 (1974).
- 36) Kosower, E. M., Kosower, N. S., Faltin, Z., Diver, A., Saltown, G. & Frensdorf, A. : Membrane mobility agents. A new class of biological active molecules. *Biochim. Biophys. Acta*, **363**, 261-266 (1974).

Studies on the Lipids of Group A Hemolytic Streptococci. (II) Cytotoxic Activity of Lipids from Hemolytic Streptococci Kousaku Kitajima, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med. Soc., **90**, 214-224 (1981).

Key words: Hemolytic streptococci, streptococcal lipids, cytotoxicity, Ehrlich ascites carcinoma

Abstract

The present study was undertaken to examine the cytotoxic effect of lipids obtained from three strains of group A hemolytic streptococci (strain Su, Blackmore and C203U) against Ehrlich ascites tumor cells in mice.

Streptococcal cells were cultured in Wood and Gunsalus medium at 37°C for 12 hours, and the total lipids were extracted from the cells according to the method of Folch et al. The total lipids were then fractionated into individual lipid components by one-dimensional thin-layer chromatography using various solvent systems. For biological testing, the streptococcal lipids suspended in physiological saline containing 0.02% Tween 20 were mixed with Ehrlich tumor cells (2×10^7 cells/ml), and incubated at 37°C for 90 min. After incubation, the cell mixture was injected i.p. into mice (10^7 cells/mouse), and the tumor growth in mice was observed for 60 days. Control animals received the tumor cells preincubated without the streptococcal lipids in saline containing Tween 20.

Mice receiving the tumor cells preincubated with the total lipids at a concentration of 5 mg/ml showed no signs of tumors at the end of a 60-day period, while control animals invariably died from ascites carcinoma in less than 20 days. Individual lipid components separated from the total lipids were then examined for their cytotoxic activity. Free fatty acids and monoglycerides from three streptococci at concentrations of 0.5-2.0 mg/ml suppressed completely the development of tumor cells in mice.

At a concentration of 2 mg/ml, diphosphatidyl glycerols from two strains of streptococci (Blackmore and C203U) inhibited the tumor growth in mice, and sterol esters from three streptococci were protective. However, all other lipid fractions including diphosphatidyl glycerols of a streptococcus (Su) were shown to have no cytotoxic effect at a concentration of 2 mg/ml.

Comparison of fatty acid pattern among diphosphatidyl glycerols from three streptococci showed that both of the saturated and unsaturated fatty acids were found in the phospholipids with cytotoxic activity, but the phospholipids without the cytotoxic activity contained only the saturated fatty acids. The saturated and unsaturated fatty acids were also found in the active neutral lipids.

These results indicate that free fatty acids, monoglycerides and sterol esters from three streptococci are capable of inhibiting the invasiveness and growth of Ehrlich tumor cells in mice, and diphosphatidyl glycerols from two strains of streptococci (Blackmore and C203U) have the cytotoxic activity against the tumor cells.