

抗腫瘍性溶連菌の有効因子に関する研究-5-有効因子よりの溶血性物質分離除去実験

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/2297/8811

抗腫瘍性溶連菌の有効因子に関する研究

第5報 有効因子よりの溶血性物質分離除去実験

金沢大学医学部薬理学教室 (主任: 正印 達教授)

河 野 照 茂

(昭和54年12月20日受付)

リボ核酸による溶連菌溶血毒素 streptolysin S 増産効果すなわち核酸効果¹⁾の研究に端を発して行なわれた溶連菌による実験的制がん研究で streptolysin S 産生能を有する溶連菌に制がん能がみられること²⁾が実験的に証明されたことにより腫瘍患者に丹毒が併発すると腫瘍が縮小・消失するという古い臨床家の報告³⁾を実験的に証明するとともに、溶連菌による一連の制がんに関する実験的研究が行なわれるようになった。実験はやがて溶連菌の無毒化と制がん能増強の方向へと進み、その結果新しい制がん剤 PC-B-45 (OK-431⁴⁾)及びその凍結乾燥標品 OK-432⁵⁾)が開発されるに至った。一方、これら一連の研究とともに抗腫瘍性溶連菌の有効因子に関する研究も行なわれ、抗腫瘍性溶連菌 Su 株 (以下 Su 菌と略記)の無細胞抽出液より硫酸アンモニウムの濃度別分画沈澱法によってエールリッヒがん細胞に抗がん活性を有し⁷⁾、その他の可移植性腹水腫瘍細胞に対しても細胞傷害性をもつ²⁰⁾分画 60F が分離されるに至った。同分画については腫瘍細胞傷害性のほか常に溶血活性があること⁷⁾並びに同分画の本態はタンパクであり、他に核酸体、多糖類が若干含まれていること⁷⁾、及びタンパクも一つのものでなく数種類のタンパクが 60F 分画に混在することも報告されている。

溶連菌の抗腫瘍能と streptolysin S 産生能とは密接な関係にある⁴⁾¹¹⁾が、しかしながら同菌の腫瘍細胞傷害作用が溶連菌生菌体または菌体内成分によるのか或いは菌体外溶血毒素 (streptolysin S 及び streptolysin O) または Ginsburg ら¹¹⁾¹⁴⁾ のいわゆる cell bound hemolysin によるのかは未解決のままであっ

た。一方、抗腫瘍性 60F 分画も常に streptolysin S 産生能を有する溶連菌からのみえることができ、しかも同分画には常に溶血活性があること⁶⁾から、60F 分画においてもその抗腫瘍作用が溶血活性物質によるのか或いは溶血活性物質がたまたま同分画中に混入して抗腫瘍性物質と溶血活性物質が別のものであるかについては明らかでなかった。これらのことから本研究では 60F 分画の精製と溶血活性物質の分離除去を目的として実験を行ない、抗腫瘍活性と溶血活性について考察を行なった。

材料および方法

1. 60F 分画: 60F 分画を Shoin の方法⁷⁾によって調製した。すなわち、教室保存の溶連菌 Su 株 (Su 菌, Type 3) の 18 時間肉汁ブイヨン培養液 300 ml を 5 l の 3% 酵母エキス培地⁸⁾ (pH 7.1) に接種し、37℃ で 24 時間培養したのち培養液を冷却して低温下で連続遠心 (12,000rpm, 120 ml/min) して集菌し、菌体を冷生理食塩水で 2 回洗浄したのち冷蒸留水に浮遊させた。これにさらに適量の蒸留水を加えて菌濁度が OD260 nm (日立-堀場 spectronics20) で 40 になるように調整した。次いで 70 ml の細胞破砕用瓶 (ブラウン社製) に Su 菌浮遊液 30 ml とガラス粒 (ブラウン社製、径 0.1 mm) 40 g を入れて細胞破砕機 (ブラウン社製) により二酸化炭素ガスによる冷却下で 4,000rpm 2 分間 2 回 (計 4 分間) ホモジネートしたのち、直ちにホモジネート液をガラスろ過器 (G1) でろ過してろ液 (無細胞抽出液 cell free extract) を採取し、これに硫酸ストレプトマイシンを最終濃度が 2% になるように加え

Studies on the Anticancer Factor(S) from Group A Streptococci. Part 5. Removal Experiment of Hemolytic Substance from Anticancer Factor 60-F. **Terushige Kohno**, Department of Pharmacology (Director: Prof. S. Shoin), School of Medicine, Kanazawa University.

て低温下で30分間放置したのち、遠心によって沈澱物を除去した。えられた上清液をViskingのセルローズチューブに入れて硫酸アンモニウム飽和溶液(アンモニア水にてpH7.2に調整)に対して一昼夜透析を行ない、生じた沈澱物を遠心によって集め、これを冷蒸留水に溶解して再びセルローズチューブに入れて硫酸アンモニウムの40%飽和溶液に対して一夜透析した。生じた沈澱物は遠心によって除去し、えられた上清液をさらに50%飽和溶液、次いで60%飽和溶液の順にそれぞれ一昼夜ずつ低温下で透析を行なった。このうち60%飽和溶液で沈澱する沈澱物(60F分画)を遠心によって集め、蒸留水に溶解して蒸留水に対して透析を行

なって脱塩したのち、凍結乾燥を行なって60F分画の無晶形粉末を用意した。

2.60Fの再分画

1)再分画法1: 60Fの再分画は全操作を低温下で図1に示す如く行なった。前記の如くにして作製した無晶形粉末(60F分画)300mgに硫酸アンモニウム57.5%飽和溶液(pH7.1)30mlを加えて低温下で30分間攪拌したのち遠心(10,000rpm,30分)して上清液と沈澱物に分けた。上清液についてはこれをセルローズチューブに入れて一夜硫酸アンモニウム飽和溶液に対して透析を行ない、生じた沈澱物を遠心によって採取し、蒸留水に溶解して透析によって脱塩したの

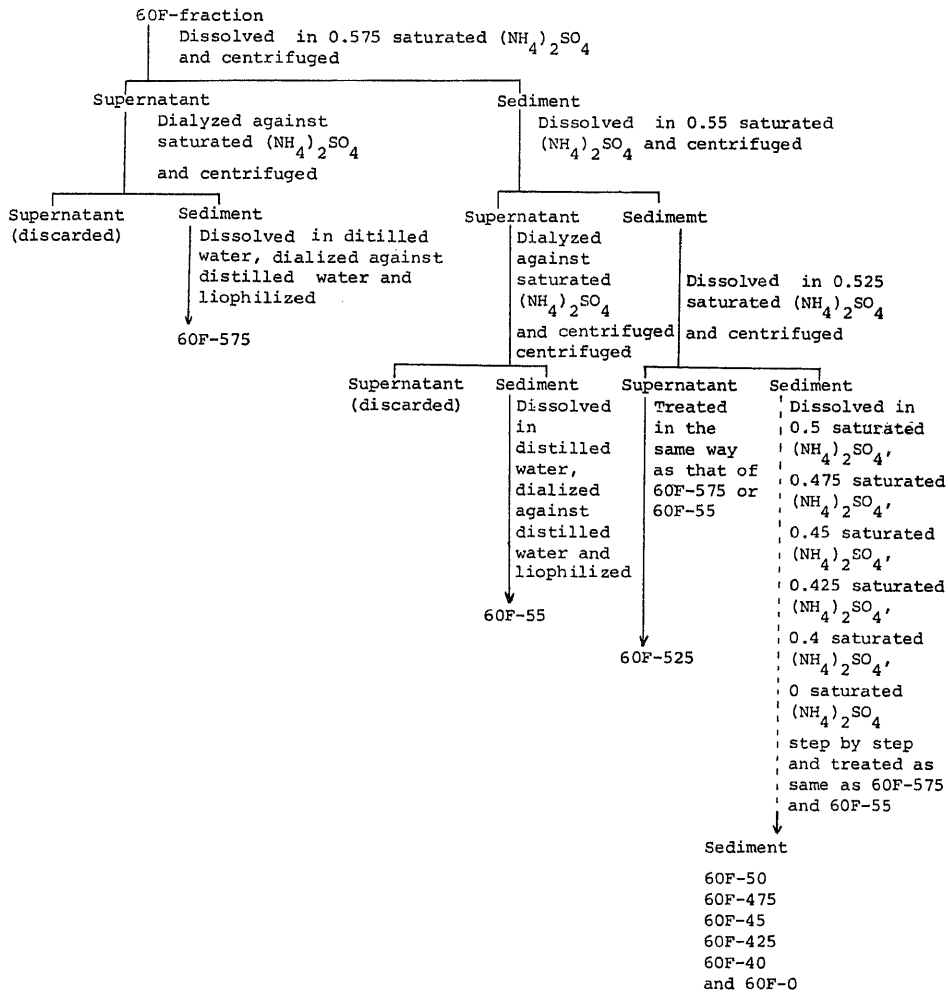


Fig. 1. Procedure 1 for refractionation of anticancer 60F-fraction of hemolytic streptococci Su strain

Note : All the steps were carried out at 2°C-4°C.

ち凍結乾燥を行ない、えられた粉末標品を60F-575分画(収量16mg)とした。硫酸アンモニウム57.5%飽和溶液に溶解しなかった沈澱物については硫酸アンモニウム55%飽和溶液30mlを加えて30分間攪拌したのち遠心に付して上清液と沈澱物に分け、上清液については前記と同様にして無晶形粉末標品60F-55分画(収量18.5mg)をえた。55%飽和溶液に溶解しなかった沈澱物はさらに硫酸アンモニウム飽和濃度52.5%液、50%液、47.5%液、45%液、40%液、及び0%液によって順次前記と同様に処理し、各飽和濃度の

硫酸アンモニウム液に溶解した60Fの各分画を沈澱、脱塩、凍結乾燥に付してえられた粉末標品をそれぞれ60F-525(収量30mg)、60F-50(収量33mg)、60F-475(収量25mg)、60F-45(収量23mg)、60F-425(収量18mg)、60F-40(収量17.5mg)、及び60F-0分画(収量95mg)とした。

2). 再分画法2: 60Fの再分画を図2に示すようにも行った。すなわち、60F分画100mgを硫酸アンモニウム52.5%飽和濃度溶液10mlに溶解させ、30分間攪拌したのち同液を遠心(10,000rpm,30分)に付し上

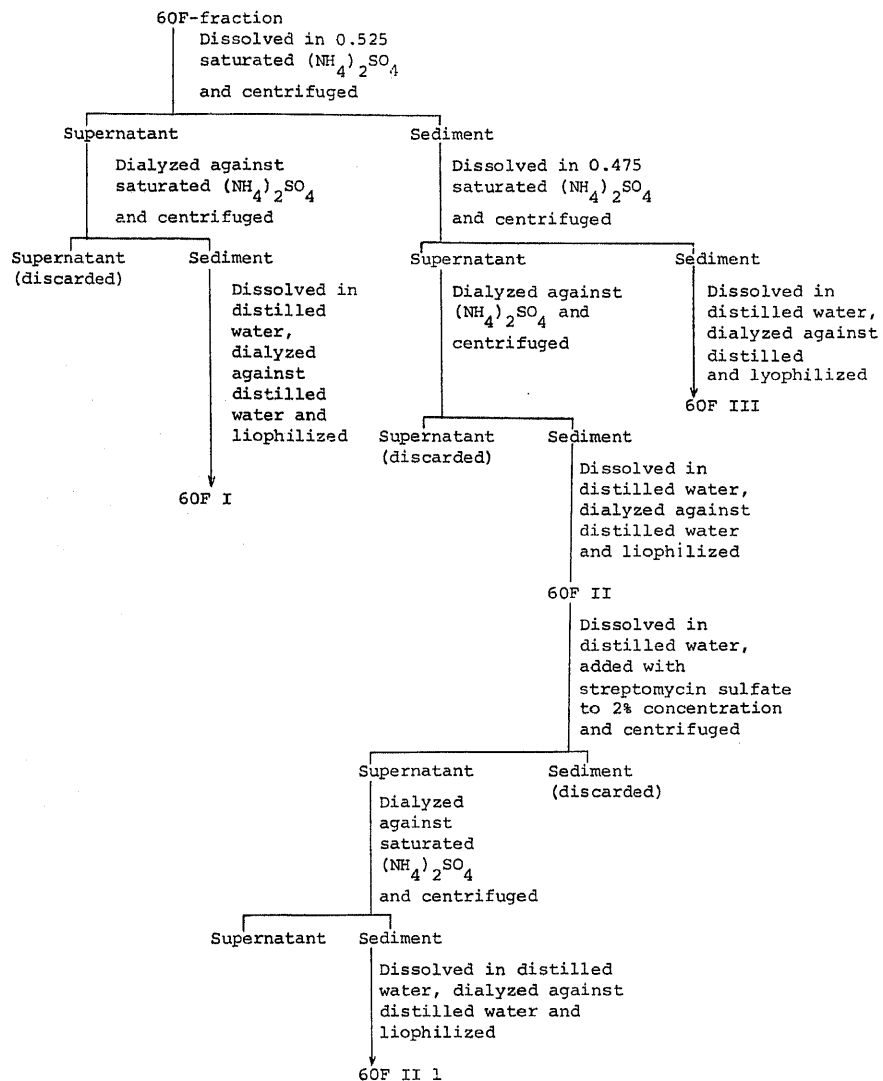


Fig. 2. Procedure 2 for refractionation of anticancer 60F-fraction

Note: All the steps were carried out at 2°C-4°C.

清液と沈澱物に分けた。上清液は Visiking のセルローズチューブに入れて硫酸アンモニウム飽和溶液に対して一夜透析を行ない、生じた沈澱物を遠心によって集めて蒸留水に溶解したのち透析による脱塩を行なってから凍結乾燥を行ない、えられた粉末標品を 60F I 分画 (収量 387 mg) とした。従って 60F I 分画には再分画法 1 での 60F - 575, 60F - 55, 及び 60F - 525 分画が含まれている。52.5% 飽和溶液に溶解しなかった沈澱物についてはこれに硫酸アンモニウム 47.5% 飽和溶液 10 ml を加えて攪拌したのち前記と同様の操作を行なって上清液と沈澱物に分け、上清液については 60F I 分画の如く硫酸アンモニウム飽和溶液に対して透析を行なって沈澱したものについては蒸留水に溶解し、透析を行なって脱塩したのち凍結乾燥し、えられた粉末標品を 60F II 分画 (収量 221 mg) とした。従って同分画には、60F - 50, 60F - 475 分画が含まれている。47.5% 飽和溶液に溶解しなかった沈澱物についてはこれを蒸留水に溶解させてから蒸留水に対して透析を行なって脱塩したのち凍結乾燥を行ないえられた粉末標品を 60F III 分画 (収量 271 mg) とした。同分画には前記の 60F - 45, 60F - 425, 60F - 40, 60F - 0 分画が含まれている。

60F II 分画については同分画を蒸留水に溶解したのち、これに硫酸ストレプトマイシンを最終濃度が 2% になるように加えて 30 分間攪拌後、硫酸アンモニウム飽和溶液に対して透析を一夜行なった。生じた沈澱物を遠心によって集めたのち、蒸留水に溶解して透析を行なって脱塩し、凍結乾燥してえられた粉末標品を 60F II I 分画とした。

3. 60F 及び 60F 再分画溶液の作製: 60F 並びに 60F 再分画の各標品をそれぞれ M/15 磷酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2) に溶解して 0.2% 溶液を作製し、これを原液とした。実験には原液またはその稀釈液を実験直前にその都度作製して用いた。

4. *In vitro-in vivo* 法による制がん実験: 60F 分画並びにその再分画標品の腫瘍細胞傷害活性を、*in vitro-in vivo* 法によるがん細胞移植増殖阻止実験により試験した。

1). 実験動物: 体重 18~21g の dd 系マウス (雄) を 1 群 10 匹として実験に用いた。

2). 腫瘍細胞: エールリッヒ腹水がん細胞を使用した。

3). エールリッヒがん細胞浮遊液の作製: エールリッヒがん細胞を腹腔内に移植したマウスから 10 日目に腹水を採取し、これを遠心してえられた沈澱 (がん細胞) を M/15 磷酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2) にて 2 回洗浄したのち、洗浄がん細胞に M/15 磷酸緩衝生理食

塩水を加えて 3.5×10^7 細胞/ml の細胞浮遊液を調整した。

4). *In vitro-in vivo* 法実験術式: 60F 並びに 60F 再分画の各原液並びにそれぞれの稀釈液 4 ml と エールリッヒがん細胞浮遊液 4 ml とを混じて 37℃ で 60 分間インキュベートしたのちこの混合液をそれぞれに対応する 1 群 10 匹のマウスの腹腔内に 0.5 ml ずつ接種して 60 日間マウスを観察した。混合液接種後観察期間内に死亡したマウスについては直ちに解剖してその死因が腫瘍によるものか否かを判定し、また 60 日目まで生存したマウスは屠殺して腫瘍浸潤の有無を肉眼的に観察した。なお、対照としては M/15 磷酸緩衝生理食塩水 4 ml とがん細胞浮遊液 4 ml を混じて 37℃ で 60 分間インキュベートした混合液を 1 群 10 匹のマウス腹腔内に接種したものをを用いた。

5. 溶血力試験: 60F 並びに 60F 再分画の各原液 (2 mg/ml) 1 ml に生理食塩水 1 ml を加えてよく振とうしたのちこれの生理食塩水による 1 ml 宛の倍加稀釈液列を作製し、これら各管に 3% ウサギ脱線維血球浮遊液 1 ml 宛を加えて 37℃ に 2 時間静置後各管の遠心上清液について OD540 nm での吸光度を測定して被検 60F 及びその各再分画の溶血力を溶血単位 (HU)/mg で表示した。(なお、1 溶血単位とは、3% 脱線維血球浮遊液での 50% 溶血をおこさせる力価である。)

6. 呈色反応: 各分画の 0.1% 溶液についてタンパクの定性試験にはニンヒドリン反応及びビュウレット反応¹⁸⁾を、糖の定性試験にはモーリッシュ反応¹⁹⁾を、RNA 定性試験にはオルシノール反応を、DNA 定性試験にはジフェニールアミン反応²⁰⁾をそれぞれ用いて反応の有無を調べた。

7. Disc 電気泳動法: Disc 電気泳動は Davis²¹⁾の方法に従って行なった。すなわち、7% Acrylamide 分離用ゲル (pH 8.9) を作製し、60F 及びその再分画標品 60F I, 60F II I 及び 60F III の 1% 水溶液 0.02 ml について 2 mA/tube の電流で約 2 時間泳動した。ついでゲルを固定染色液 (メチルアルコール 50 ml, 酢酸 10 ml, 蒸留水 40 ml, Amido Black 10B 1g) にて染色したのち、7% 酢酸にて脱色した。

成 績

1. *In vitro-in vivo* 法による制がん実験成績: *In vitro-in vivo* 法によって行なった 60F 及び 9 種の 60F 再分画標品の移植増殖阻害作用に関する成績を表 1 に示した。すなわち、60F ではがん細胞との混合液中の作用濃度が 1 mg/ml では 1 群 10 匹のマウスはすべてがん細胞腹腔内接種後 60 日目においても生

存し、60日目における剖見の結果、いずれのマウスにも肉眼的所見でがん細胞浸潤像をみとめず健常であったが、作用濃度が0.5 mg/mlでは60日まで健常に生存したマウスは10匹中4匹で、残りの6匹は観察期間中に腫瘍死した。作用濃度が0.2 mg/ml及び0.1 mg/mlではマウスは対照群のマウスと同様にことごとく30日以内に腫瘍死した。この60Fより再分画した9分画標品のうち移植増殖阻害作用がみられたのは60F-50と60F-475の2分画で、それぞれの分画とインキュベートしたがん細胞を腹腔内接種したマウスの60日目における生存数は作用濃度が1 mg/ml及び0.5 mg/mlでは10匹中10匹が、0.2 mg/mlではそれぞれ10匹中2匹及び3匹が生存し、剖検した生存マウスには腫瘍浸潤像はみとめられなかった。すなわち、60F-50及び60F-475分画は60F分画に比してその腫瘍細胞傷害活性は2倍から3倍に増強していた。60F-525分画には腫瘍細胞移植阻害作用がみられたが阻害作用は甚だ弱く作用濃度が1 mg/mlで10匹中5匹のマウスが腫瘍死をまぬがれたが、0.5 mg以下では生存数は0匹であった。他方、その他の60F-575, 60F-55, 60F-45, 60F-425, 60F-40及び60F-0の各分画では作用濃度が1 mg/mlでも腫瘍

細胞移植増殖阻害作用はみられず、これら各再分画標品とインキュベートしたがん細胞の腹腔内接種によってマウスは対照群のマウスと同様に30日以内にことごとく腫瘍死し、60日目における生存数は0匹であった。

再分画法2により60F分画より再分画した60F I, 60F II 1及び60F IIIの各再分画標品の腫瘍細胞傷害作用の成績を表2に示した。腫瘍細胞傷害性は60F-50及び60F-475を含む60F II 1分画では移植増殖阻害作用は強く、作用濃度が0.5 mg/mlでは10匹中10匹のマウスが60日目においても生存しており、60F分画に比して傷害活性は約3倍になっていた。これに対し60F I分画では作用濃度が1 mg/mlでは生存数は0匹であった。また、60F III分画では作用濃度が1 mg/mlでもすべてのマウスが対照群と同様に4週間以内に腫瘍死した。

2. 溶血力試験: 60F並びに60F再分画標品について行なった溶血力試験の成績を表3に示した。再分画標品のうち60F-55, 60F-525, 及び60F-50分画は、赤血球浮遊液との混合液中での作用濃度が1 mg/mlのときに各標品とも若干の溶血を示したが、作用濃度0.5 mg/mlでは溶血はみとめられなかった。また、

Table 1. Comparative *in vitro-in vivo* anticancer experiment with 60F fraction and its fractions prepared by procedure 1

Fraction	No. of survivors*			
	Concentration of fraction in the mixture (mg/ml)			
	1	0.5	0.2	0.1
60F	10/10	4/10	0/10	0/10
60F-575	0/10	0/10	0/10	0/10
60F-55	0/10	0/10	0/10	0/10
60F-525	5/10	0/10	0/10	0/10
60F-50	10/10	10/10	2/10	0/10
60F-475	10/10	10/10	3/10	0/10
60F-45	0/10	0/10	0/10	0/10
60F-425	0/10	0/10	0/10	0/10
60F-40	0/10	0/10	0/10	0/10
60F-0	0/10	0/10	0/10	0/10
Control**	0/10	0/10	0/10	0/10

*Number of mice alive on 60th day in 10 mice used after intraperitoneal injection of the mixture of (2 ml of carcinoma cells suspension and 2 ml of solution of fraction) which was incubated at 37°C for 60 min.

**Suspension of cancer cells alone. All control mice died of tumor invasion within 21 days.

これらの成績から計算した各再分画標品 1 mg の溶血単位は 1HU 以下であった。これに対し、60F - 0 分画では作用濃度が 0.063 mg/ml でも溶血がみとめられ、本分画の溶血単位は 35.2HU/mg で各分画標品の中で最も溶血活性が強かった。他方、60F-475, 60F-45, 60F-425, 及び 60F-40 分画では溶血単位はそれぞれ 1.2, 2.8, 6.2, 及び 9.2HU/mg であり、再分画が

60F - 50 より 60F - 0 へと進むにつれ、すなわち、60F 分画を溶解する際の溶媒液中の硫酸アンモニウム濃度が低下するにつれて溶血活性が増大しているのがみとめられた。また、再分画実験において 300 mg の 60F 分画よりえられた各再分画標品の溶血単位は表 5a に示した如く、(各分画標品 1 mg 当りの溶血単位) × (各分画標品の収量, mg) となり、各再分画標品の

Table 2. Comparative *in vitro-in vivo* anticancer experiment with 60F fraction and its fractions prepared by procedure 2

Fraction	No. of survivors Concentration of fraction in the mixture (mg/ml)			
	1	0.5	0.2	0.1
60F	10/10	4/10	0/10	0/10
60F I	2/10	0/10	0/10	0/10
60F II 1	10/10	10/10	5/10	0/10
60F III	0/10	0/10	0/10	0/10
Control*				

*Suspension of cancer cells alone. All control mice died of tumor invasion within 21 days.

Table 3. Test for hemolytic activity of 60F and its fractions prepared by procedure 1

Fraction	Concentration of fraction in the mixture (mg/ml)							HU*/mg
	1	0.5	0.25	0.13	0.06	0.03	0.015	
60F	++++	++++	+++	+++	++	+	-	11.2
60F-575	+++	++	+	-	-	-	-	1.3
60F-55	++	-	-	-	-	-	-	< 1
60F-525	+	-	-	-	-	-	-	< 1
60F-50	+	-	-	-	-	-	-	< 1
60F-475	+++	+	-	-	-	-	-	1.2
60F-45	+++	+++	++	+	-	-	-	2.8
60F-425	++++	++++	+++	++	+	-	-	6.24
60F-40	++++	+++	+++	++	+	-	-	9.2
60F-0	++++	++++	++++	+++	+++	++	-	35.2

Original 0.2% solution of tested fraction was serially diluted with physiological saline. To 1 ml of each diluted solution, 1 ml of 3% washed rabbit erythrocyte suspension was added, and incubated at 37°C for 2 hours, and then reading was taken. ++++ indicates complete hemolysis; +++, ++, + indicate partial hemolysis; - indicates no hemolysis.

*One hemolytic unit (1 HU) is the amount of hemolytic substance causing 50% hemolysis of 3% rabbit erythrocyte suspension under the stated condition.

溶血単位の総計は3730溶血単位となり、これは60F分画300mgの総溶血単位3,360 (11.2HU/mg × 300mg)のすべてが回収されたことを示した。なお、60F分画の溶血活性の約90%が60F-0分画(3,342HU)にあることも注目すべき点である。

60F分画より再分画法2によって分画された60F I, 60F II 1及び60F III各再分画標品の溶血力試験の成績を表4に示した。すなわち、60F I分画では作用濃度が1mg/mlでもまったく溶血がみられず、60F II 1分画の1mg/mlではわずかに溶血がみられたが、溶血単位を算出することはできなかった。これに対し、60F III分画では60F分画よりも溶血性が強く、溶血単位は60F分画の7.2HU/mgに比して23.5HU/mgと増加していた。また、60F分画100mgよりえられた60F III分画は27mgであり、従って表5bに示した如く、60F分画の溶血単位(7.2HU/mg × 100mg)の約90%が60F III分画(23.5HU/mg × 27mg)に集まっていると考えられる。

3. 各分画の物理・化学的性状: 60Fから再分画によって9つの分画標品がえられたが、これら分画標品についての細胞傷害性実験及び溶血力試験の成績から、60F分画を再分画法2によって次の3分画に分けた。すなわち、細胞傷害性も溶血活性もみとめられない60F-575, 60F-55, 及び60F-525分画よりなる60F I分画と、溶血活性はないが腫瘍細胞傷害性が強い60F-50と60F-475よりなる60F II分画または60F II 1分画、及び腫瘍傷害性はみとめられないが溶血活性が強い60F-45, 60F-40及び60F-0分画よりなる60F III分画である。これらの3分画について呈色反応、紫外線吸収スペクトル、及びdisc電気泳動実験を行なって以下の成績をえた。

1). 呈色反応: 呈色反応は60F, 60F I, 60F II 1及び60F III各分画の0.1%水溶液(苛性ソーダによってpHを中性に調整)について行なった。表6にみられるように、各分画はともにタンパク反応は強陽性であった

のに対し、60F分画にみられたモーリッシュ反応は60F II 1においては陰性となり、また60F分画においてみられたオルシノール反応も60F I分画、60F II 1分画では陰性、60F III分画では疑陽性となっていた。ジフェニールアミン反応は各分画とも陰性であった。このような成績から細胞傷害性の60F II 1分画においては多糖類、RNA及びDNAがみとめられず、60F II 1分画の本態はタンパクであると考えられる。

2). 紫外線吸収スペクトル: 各分画の0.1%水溶液についての紫外線吸収スペクトルを図3に示した。60F分画は268nm付近に最大吸収値をもつが、60F I, 60F II 1及び60F III分画では右方ヘシフトし、60F I及び60F II 1分画では270nm付近に最小吸収値がみられ、最大吸収値は282nm付近にみられたほか、分画標品によっては292nm付近においても小さな山がみとめられた。

3). Disc電気泳動実験: Disc電気泳動による結果は図4にスキーム的にあらわした。60F分画においては多くのタンパクのバンドがみられ、これから再分画によってえられた60F I, 60F II 1及び60F III分画でも60F分画に比してバンド数は減少していたが、なお数多くのバンドがみとめられた。これらの成績から腫瘍細胞傷害作用をもつ分画に固有なバンドを、また溶血活性分画に固有のバンドを見出すことはできなかった。

考 察

抗腫瘍性溶連菌の細胞傷害性についてKoshimuraら²²⁾はA群溶連菌とエルリッヒがん細胞を*in vitro*で接触させるとメジウム中にSLSが産生されると同時にがん細胞の移植性が喪失していることを報告している。また、清水ら²³⁾は溶連菌とがん細胞をインキュベートするとメジウム中に260nm値とSLS力価が平行して増加しているのを観察している。この腫瘍細胞傷害性はSLS産生能を有する溶連菌にのみみとめら

Table 4. Test for hemolytic activity of 60F and its fractions prepared by procedure 2

Fraction	Concentration of fraction in the mixture (mg/ml)							HU/mg
	1	0.5	0.25	0.13	0.06	0.03	0.015	
60F	++++	++++	+++	++	+	-	-	7.2
60F I	-	-	-	-	-	-	-	< 1
60F II 1	+	-	-	-	-	-	-	< 1
60F III	++++	++++	+++	+++	++	+	-	23.5

Table 5a. Summarized data of 60F and its fractions prepared by procedure 1

Fraction	Yield from 300mg of 60F	Hemolytic activity (HU/mg)	Total HU of fraction (HU/mg×Yield)	Cytotoxic activity
60F	300 mg	11.2	3360	++
60F-575	16	1.3	21.1	-
60F-55	18.5	< 1	*	-
60F-525	30	< 1	.	-
60F-50	33	< 1	.	+++
60F-475	25	1.2	30	+++
60F-45	23	2.8	64.4	-
60F-425	18	6.24	111.6	-
60F-40	17.5	9.2	161	-
60F-0	95	35.2	3344	-

*Total HU of fraction was not calculated because HU/mg was more less than 1 HU.

Table 5b. Summarized data of 60F and its fractions prepared by procedure 2

Fraction	Yield from 1g of 60F	Hemolytic activity (HU/mg)	Total HU of fraction (HU/mg×Yield)	Cytotoxic activity
60F	1000mg	7.2	7200	++
60F I	387	< 1	.	-
60F II	221	< 1	.	+++
60F III	271	23.5	6368.5	-

Table 6. Color reactions of 60F, 60F I, 60F II 1 and 60F III

	Color reaction in 0.1% solution of			
	60F	60F I	60F II 1	60F III
Ninhydrin reaction	+++	+++	+++	+++
Biuret reaction	+++	+++	+++	+++
Molisch reaction	+	±	-	±
Orcinol reaction	+	-	-	±
Diphenylamine reaction	-	-	-	-

れ⁹¹⁰、溶連菌の制がん能と SLS 産生能との間に密接な関係があると推定されている。その作用機序について、Okamoto ら⁴¹⁵は溶連菌による何らかの作用によってがん細胞が傷害され、その結果細胞内より流出する RNA と溶連菌によって二次的に SLS が産生されるものであるとしている。一方、Ginsburg ら²⁴¹は溶連菌の細胞傷害性は SLS 産生能を有する溶連菌にみとめられるだけでなく、cell bound hemolysin (CBH) や intracellular hemolysin を有する溶連菌にもみとめられ、CBH や intracellular hemolysin を欠く菌には細胞傷害性がみとめられないこと¹⁴¹、並びに SLS 溶血阻害剤である papain や lecithin などが同溶連菌の細胞傷害性を阻害すること¹¹¹を報告し、溶連菌の細胞傷害因子と溶血性因子とは密接な関係があると指摘している。また、RNA - SLS や CBH が腫瘍細胞傷害効果を示し、さらに RNA - SLS に alubumin や tween 40 を加えてえられる albmin-SLS や tween - SLS も腫瘍細胞傷害効果を示すこと²⁵¹から細胞傷

害作用の本態は SLS 或いは溶血毒素であるとしている。また、Taketo ら²⁶¹は溶連菌と精製 RNA 標品 AF によって産生される高溶血力価の SLS をエールリッヒがん細胞とインキュベートするとがん細胞より RNA の流出がおこり、エールリッヒがん細胞浮遊液の濁度が減少することを観察し、SLS には oncolytic activity があるとしているが、同処置がん細胞の増殖性、移植性については明らかにされていない。これに対し、西田¹⁷¹は溶連菌をエールリッヒがん細胞に接触させるときあらかじめがん細胞を SLS 溶血阻害剤である trypan blue または congo red で処理するとがん細胞の移植性を阻止すること並びに精製 SLS 標品には細胞傷害性がみとめられないことを報告している。さらに、Havas ら¹⁵¹は溶血活性の弱い溶連菌でも細胞崩壊が位相差顕微鏡下の観察でみられることから溶血毒素以外の菌体物質が細胞変性をおこすとしており、溶連菌の細胞傷害作用が溶血物質によるものであるか否かは明らかでなかった。一方、抗腫瘍性溶連菌の

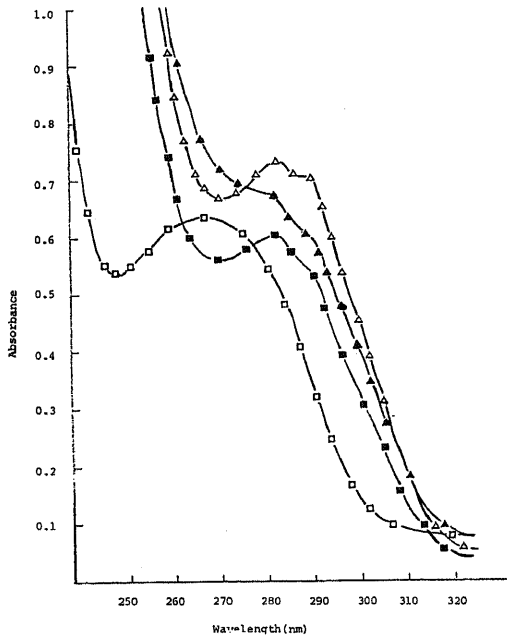


Fig. 3. Ultraviolet absorption spectra of 60F, 60F I, 60F II 1 and 60F III. The concentration of each sample was 0.1%.

—□—□— 60F
 —△—△— 60F I
 —■—■— 60F II 1
 —▲—▲— 60F III

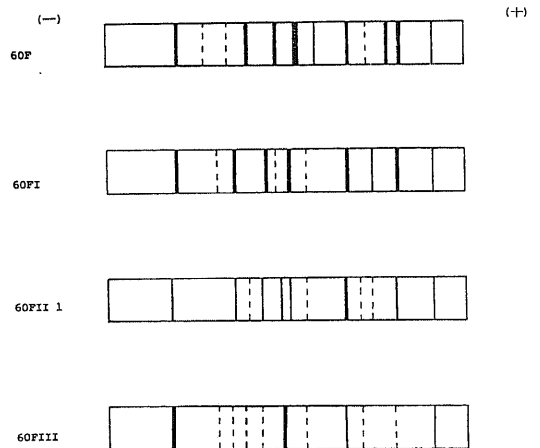


Fig. 4. Shema of polyacrylamide disc electrophoresis of 60F, 60F I, 60F II 1 and 60F III.

Disc electrophoresis was carried out for about 2 hours under 2 mA/tube according to the method of Davis, and 0.02 ml of 1% test preparation solution was used.

———— Very strong
 ———— Strong
 ———— weak
 Very weak

有効因子に関する研究でも, Shoin⁷⁾は Su 菌の無細胞抽出液 (cell free extract) から腫瘍細胞傷害性をもつ 60F 分画を分離し, Seto⁸⁾は 60F 分画が SLS 産生能をもつ溶連菌からのみえられ, 同分画には常に streptolysin S 溶血阻止剤である trypan blue によって阻止される溶血活性がみられることを報告している。また Koshimura²⁹⁾は溶連菌の無細胞抽出液のアセトン沈殿物についても溶血活性, 細胞傷害性並びに核酸効果がみとめられることを報告している。このように溶連菌の無細胞抽出液においても抗腫瘍性因子または腫瘍細胞傷害因子と溶血性因子とは密接な関係にあることを示す結果がえられているが, 両活性が同一因子によるものであるか否かは不明であった。これらのことに関連して行なわれた本研究では表 5a, 表 5b に示した如く, 腫瘍細胞傷害性と溶血活性をともにもつ 60F 分画から硫酸アンモニウムによる再分画によって何れの活性も示さぬ分画, 腫瘍細胞傷害性のみを示す分画, 及び溶血活性のみを示す分画の 3 分画に分離できたことは, 溶血活性と細胞傷害性とは無関係であることを実証するものであり, Havas³⁰⁾らのいう溶血毒素以外の菌体物質ががん細胞に変性をおこすとする報告と一致する。しかしながら, 60F 分画によるがん細胞に対する作用の形態学的観察では位相差顕微鏡²⁸⁾及び走査型電顕²⁹⁾によってみられたブレブスの出現, 微絨毛の膨化²⁸⁾及び透過型電顕によってみられた細胞内の変化は OK-432 による形態学的変化⁹⁾とよく似ているが, 溶連菌によるがん細胞膜の破壊像及びがん細胞からの RNA 流出などの変化が 60F ではみとめられないこと (未発表) などから 60F 分画の作用は原菌である溶連菌の作用とは若干異なっていると考えられる。これは溶連菌のがん細胞に対する傷害作用は単に一つの因子の作用によるものではなく, 多くの因子の総合によるものと考えられ, 60F 分画はその多くの因子の中の一つであると推定される。また, 60F より再分画された 60F II 1 分画の呈色反応では, 精製が無細胞抽出液から 60F, 60F II, 60F II 1 分画と進むにつれて DNA, RNA 及び糖類はみとめられなくなり, タンパク反応は強陽性となり, これにともなって抗腫瘍作用も増加し, これと紫外線吸収スペクトルの成績などと総合してみれば 60F II 1 分画の本態はタンパクであると考えられる。しかし, disc 電気泳動法による実験では 60F II 1 分画にはいまだ数多くのタンパクが含まれており, さらに精製が必要と考えられる。

表 5a, 表 5b に示した如く 60F III 分画または 60F - 45, 60F - 425, 60F - 40 及び 60F - 0 分画特に 60F - 0 分画には腫瘍細胞傷害作用がみられず溶血活性の

みがみられるが, 従来, 溶連菌菌体内溶血毒素については Schwab³⁰⁾は溶連菌菌体を超音波で破壊してえられる上清液に SLS とよく似た溶血毒素があることを報告し, また Taketo³¹⁾は金剛砂で破壊した菌体の無細胞抽出液から溶血活性をもつ分画を分離し, 同分画に精製 RNA 標品 AF を添加してインキュベートすると溶血活性が増加することを報告しているが, その本態については明らかにされていない。本研究では, 強い溶血活性をもつ分画 60F III が分離され, 同分画は紫外線吸収スペクトル, 呈色反応並びに分離方法からタンパクであると考えられる成績がえられたが, このことは菌体内溶血毒素の解明に大きな手がかりを与えるものと考えられる。

結 論

抗腫瘍性溶連菌の無細胞抽出液より硫酸アンモニウム濃度別分画沈澱法によって腫瘍細胞傷害性と溶血活性をもつ 60F 分画を分離したが, 60F 分画をさらに各種濃度の硫酸アンモニウム液に溶解させることで 9 つの分画標品を分離し, これら各分画標品の腫瘍細胞傷害性及び溶血活性についての実験成績から 9 つの分画標品は次の如く, 1. 腫瘍細胞傷害活性も溶血活性もみとめられない分画群 60F I; 2. 腫瘍細胞傷害活性が強く, 溶血活性がほとんどみとめられない分画群 60F II, 3. 溶血活性のみみとめられて細胞傷害性のみとめられない分画群 60F III の 3 つに大別することができ, 腫瘍細胞傷害性と溶血活性は異なるものであることを実証し, また腫瘍細胞傷害性分画及び溶血活性分画の本態はタンパクであるとする成績をえた。

稿を終るにあたり御指導と御校閲を賜りました恩師印達教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

- 1) Okamoto, H. : Über die hochgradige steigerung des Hämolyisinbildungsvermögen des *Streptococcus haemolyticus* durch Nukleinsäure, I. Mitt. Japan. J. Med. Sci., IV. Pharmacology, 12, 167-208(1940).
- 2) Koshimura, S., Murasawa, K., Nakagawa, E., Ueda, M., Bando, Y. & Hirata, R. : Experimental anticancer studies. Part III. On the influence of living hemolytic streptococci upon the invasion power of Ehrlich ascites carcinoma in mice. Japan. J. Exp. Med., 25, 93-102(1955).
- 3) Fehleisen, F. : Über die Züchtung der Erysipelkokken auf künstlichen Nährboden und

ihr Übertragbarkeit auf dem Menschen. Dtsch. Med. Wochenschr., 8, 553-554(1882).

4) **Okamoto, H., Shoin, S., Koshimura, S. & Shimizu, R.** : Studies on the anticancer and streptolysin S-forming activities of hemolytic streptococci. *Japan. J. Microbiol.*, 11, 323 - 336(1967).

5) **Okamoto, H., Shoin, S. & Koshimura, S.** : Streptolysin S-forming and antitumour activities of group A streptococci, p259 - 289. *In J. Jeljaszewicz & T. wadstrom (ed.), Bacterial Toxins and Cell Membranes*, 1st ed. Academic Press, London, New York & San Francisco, 1978.

6) **Sakurai, Y., Tsukagoshi, S., Satoh, H., Akiba, T., Suzuki, S. & Takagaki, Y.** : Tumor - inhibiting effect of a streptococcal preparation (NSC-B116209). *Cancer Chemother. Rep.*, Part 1, 56, 9 - 17(1972).

7) **Shoin, S.** : Studies on the anticancer factor(s) from group A streptococci part 1. Isolation and fractionation of cell - free extract from streptolysin S-forming streptococci. *Gann*, 67, 661 - 667(1976).

8) **Seto, K.** : Studies on the anticancer factor(s) from group A streptococci Part 2. Effect of 60 - F product from cell - free extract of group A streptococci and other microorganisms on the invasion of Ehrlich carcinoma cells in mice. *Gann*, 68, 275 - 280(1977).

9) **Ohta, T.** : Experimental anticancer studies. Part VI. Experimental on the influence of living A streptococci and several other species of microorganisms on the invasion power of Ehrlich carcinoma cells to mice. *Japan. J. Exp. Med.*, 27, 107 - 116(1957).

10) **越村三郎・西田信義・坂東 勲・正印 達・南 幹雄・角野光司** : 制癌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).

11) **Ginsburg, I.** : Streptolysin S, p99 - 171. *In T.C. Montie, S. Kadis & S.J. Aji (ed.), Microbial Toxins Vol. III Bacterial Protein Toxins*, Academic Press, New York & London, 1970.

12) **Okamoto, H.** : Antitumor activity of

streptolysin S-forming streptococci, p237 - 257. *In A.W. Bernheimer(ed.), Mechanisms in Bacterial Toxicology*, 1st ed. John Wiley & Sons, Inc., New York & London, 1976.

13) **Koshimura, S., Shimizu, R., Bando, Y., Hirata, R. & Shoin, S.** : Experimental anticancer studies. Part 12. On the destructive effect of living hemolytic streptococci on solid tumour of Ehrlich carcinoma in mice. *Japan. J. Microbiol.*, 4, 19 - 24(1960).

14) **Ginsburg, I.** : Action of streptococcal haemolysins proteolytic enzymes on Ehrlich ascites tumour cells. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 40, 417 - 423(1959).

15) **Havas, H.F., Donnelly, A.J. & Porreca, A.V.** : The cytotoxic effect of hemolytic streptococci on ascites tumor cells. *Cancer Res.*, 23, 700 - 706(1963).

16) **正印 達・岡本 肇・越村三郎・藤田三樹男** : ペニシリン処理溶連菌の抗腫瘍性に及ぼすトリパン青の影響について. 第26回日本癌学会総会記事, 73頁 (1967)

17) **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).

18) **永井 裕** : 生化学研究法II (山川・西沢・寺山・安藤編), 第3版, 490頁, 東京, 朝倉書店.(1969).

19) **西沢一俊・前田昌徹** : 生化学研究法I (山川・西沢・寺山・安藤編), 第3版, 233 - 234頁, 東京, 朝倉書店.(1969).

20) **佐久間慶子・寺山 宏** : 生化学研究法II (山川・西沢・寺山・安藤編), 第3版, 694 - 695頁, 東京, 朝倉書店.(1969).

21) **Davis, B.T.** : Disc electrophoresis - II Method and application to human serum proteins. *Annals. New York Academy of Sciences*, 121, 404 - 427(1964).

22) **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. Microbiol.*, 2, 23 - 28(1958).

23) **清水隆作・西田信義・坂東 勲・越村三郎** : 制癌に関する実験的研究, 第22報, 癌細胞と溶連菌の接触メジウムにおける癌細胞RNAの出現について. *金大結研年報*, 22, 27 - 34(1967).

- 24) Ginsburg, I. & Grossowicz, N. : Effect of streptococcal haemolysins on Ehrlich ascites tumour cells. *J. Pathol. Bacteriol.*, **80**, 111 - 119(1960).
- 25) Ginsburg, I., Haris, T.N. & Grossowicz, N. : Oxygen - stable hemolysins of group A streptococci I. The role of various agents in the production of the hemolysins. *J. Exp. Med.*, **118**, 905 - 917(1963).
- 26) TaKeto, Y. & Taketo, A. : Cytolytic effect of streptolysin S complex on Ehrlich ascites tumor cells. *J. Biochem.(Tokyo)*, **60**, 357 - 362(1966).
- 27) Higuchi, Y., Nakamura, S., Kigoshi, S. & Shoin, S. : Cytolytic action of 60 - F derived from live hemolytic streptococci against Ehrlich carcinoma cells. *Gann*, **70**, 447 - 451(1979).
- 28) 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).
- 29) 入江 宏: 抗腫瘍性溶連菌の有効因子に関する研究, 第3報, 溶連菌菌体内成分60Fの可移植性腹水腫瘍細胞に対する作用の形態学的観察. 十全医会誌, **87**, 609 - 618 (1978).
- 30) Schwab, J. H. : An intracellular hemolysin of group A streptococci I. Influence of sonic energy and pH on hemolytic potency. *J. Bact.*, **71**, 94 - 99(1956).
- 31) Taketo, A. & Taketo, Y. : Biochemical studies on streptolysin S formation. I. Streptolysin S formation in cell free system. *J. Biochem.(Tokyo)*, **56**, 552 - 561(1964).

Studies on the Anticancer Factor(s) from Group A Streptococci Part 5. Removal Experiment of Hemolytic Substance from Anticancer Factor 60-F—Terushige Kohno, Department of Pharmacology, School of Medicine, Kanazawa University, 920, Japan. *J. Juzen Med. Soc.*, 89, 34–46 (1980).

Abstract Since 60F product obtained from cell free extract of anticancer hemolytic streptococci has been demonstrated to possess both the anticancer activity and the hemolytic activity, the isolation experiment of anticancer preparation from 60F product was carried out in this study.

The 60F product was dissolved successively into 0.575, 0.55, 0.525, 0.50, 0.475, 0.45, 0.425, 0.40 and 0.0 saturated ammonium sulfate solution (pH 7.1) step by step in that order. After the centrifugation of each solution, the supernatant was dialyzed against saturated ammonium sulfate solution overnight under the cold. The precipitate thus obtained was collected by the centrifugation and dissolved in distilled water. After the solution was dialyzed against distilled water, the dialysate was lyophilized. Nine preparations thus prepared were tested for the hemolytic activity and the anticancer activity against Ehrlich carcinoma cells in the *in vitro-in vivo* assay system, i.e. a mixture of Ehrlich carcinoma cells suspension and a solution of tested preparation was incubated at 37°C for 2 hours. After the incubation, the mixture was injected intraperitoneally into a mouse, and it was observed for 60 days,

According to the results of the anticancer experiment and the hemolysis experiment, 9 preparations were divided into the following 3 groups.

Group 1. 60FI which possessed neither the anticancer activity nor the hemolysis activity. To this 60FI belong the preparations which dissolved into 0.575, 0.55, 0.525 saturated ammonium sulfate solution.

Group 2. 60FII which possessed the anticancer activity about 3 times as potent as that of 60F, but possessed little hemolytic activity. To this 60FII belong the preparations which dissolved into 0.50 and 0.475 saturated ammonium solution.

Group 3. 60FIII which possessed the hemolytic activity about 3 times as potent as that of 60F product, but possessed little anticancer activity. To this 60FIII belong the preparations which dissolved into 0.45, 0.425, 0.40 and 0.0 saturated ammonium sulfate solution.

Thus, the preparation which possessed only the anticancer activity was isolated from 60F product with the anticancer and hemolytic activities, and it was also demonstrated that the hemolytic activity was indifferent to the anticancer effect. Also, the data on physical and chemical properties of 60FI, 60FII, 60FIII were presented indicating that each of them was a mixture of several varieties of protein.