

制癌に関する実験的研究

第11報 溶連菌の抗エールリッヒ癌性に及ぼす 温熱的処理の影響についての考査*

金沢大学結核研究所化学部(主任 越村三郎教授)

金沢大学医学部薬理学教室(主任 岡本 肇教授)

宮地 民子 桐田 俊雄

大月 博昭 角野 光司

(昭和34年8月18日受付)

* 本研究費の一部は文部省科学研究費癌綜合研究の補助金によつた。

さきに越村等¹⁾によつて“エールリッヒ癌細胞は溶連菌生菌体による短時間の接触でマウスに対する移植性を喪失するに至る”という観察がもたらされて以来、この溶連菌生菌体の制癌能に関する考査は

- 1) 溶連菌の制癌効果の特異性についての考証²⁾,
- 2) 溶連菌生菌体の直接注入による腫瘍の破壊実験³⁾,
- 3) 無毒力溶連菌生菌体をもつての制癌実験⁴⁾⁵⁾などと順次拡大深化されてきているのであるが、今回著者等はその一環として、溶連菌に対する温熱的処理がその抗癌細胞能に如何に影響するかについての考査を行なつた。

本論文ではその成績を報告する。

実験方法

1. 実験材料

a) 実験動物： 体重17~21gのddNマウス(♂)を使用。

b) 溶連菌： 当教室保存の“S”-株を使用。本菌は強毒性で、そのブイオン培養の1:100 Mill. 稀釈液0.5ccの腹腔内注射でもマウスは24時間内に敗血症で斃死す。

c) 腫瘍細胞： エールリッヒ腹水癌細胞を使用。

d) ペニシリン溶液： Penicillin G カリウム塩10万単位/cc(生理的食塩水)を用意す。

2. 溶連菌浮遊液の調製とその温熱処理

溶連菌“S”-株の20時間普通ブイオン培養液400ccを遠心して沈渣(生菌体)を得、これに1回50cc宛の冷生理的食塩水をもつてする洗滌操作を2回施した後、生菌体を20ccの磷酸緩衝リンゲル液(pH7.2)に浮遊せしめる。この溶連菌生菌体浮遊液の2cc宛を6本の試験管に分注し、それぞれに対し次のような処置を施す。

- | | |
|-----------------|----------|
| 1) 100°C, 30分間 | } 水浴中に浸漬 |
| 2) 65°C, 30分間 | |
| 3) 56°C, 30分間 | |
| 4) 45°C, 30分間 | |
| 5) 37°C, 30分間 | |
| 6) 氷室(0~4°C)に静置 | |

3. エールリッヒ癌細胞浮遊液の調製

エールリッヒ癌細胞を腹腔内に移植した3匹のマウスから8日目に腹水採取を行ない、得たる腹水(8cc)を遠心沈澱(1,500 r. p. m., 5分間)に附す。沈渣(癌細胞)に対し1回50cc宛の冷磷酸緩衝リンゲル液をもつてする洗滌操作を2回施し、次いでこれを10ccの磷酸緩衝リンゲル液に浮遊せしめて癌細胞数7930万/ccの浮遊液とす。

なお、これらの諸操作は5°C以下で行なつた。

4. 制癌実験

前記2の1)~6)の温熱処理溶連菌浮遊液のそれぞれをもつて次のような方式で癌細胞と溶連菌との接触を行なう。即ち、まず【癌細胞浮遊液1cc+溶連菌浮

Experimental Anticancer Studies. Part 11. Influence of Heating on the Ability of Hemolytic Streptococci to Injure Cancer Cells. Tamiko Miyaji, Toshio Kirita, Hiroaki Ohtsuki and Kōji Kadono Department of Chemistry (Director: Prof. S. Koshimura), Research Institute of Tuberculosis, Kanazawa University; Department of Pharmacology (Director: Prof. H. Okamoto), School of Medicine, Kanazawa University

遊液 2cc + 磷酸緩衝 リンゲル液 1cc] 混液 (4cc) を 37°C に 1.5 時間 incubate し、次いで

a) この混液の 3cc に対しペニシリン溶液 0.75cc を加え混和した後、直ちにその 0.5cc 宛をマウスの腹腔内に注射す。

b) 残りの 1cc は、その 0.5cc 宛 (ペニシリンを加えずに) をマウスに腹腔内注射す。即ち各マウスに移植された癌細胞数は約 793 万個であり、ペニシリンの使用はマウスが菌感染によつて早期に斃死するのを防ぐためである。又ペニシリンが癌細胞に対し全く無害性であることは既に越村等によつて実証されているところである。

なお、対照実験として [癌細胞 1cc + 磷酸緩衝リンゲル液 3cc] 混液を 37°C, 1.5 時間置いた後、ペニシリン溶液 1cc を加えてからその 0.5cc 宛を腹腔内に注射したマウス群を置いた。

5. 成績の判定

全動物を普通の飼育下に置き、その生存経過を観察す。途中斃死したものについては剖検によつてその死因 (腫瘍死・菌感染死) を確かめた。而して観察期間を60日とし、なお生存した動物では、これを剖検に附す。

実験成績

Table I は実験成績を総括展示したものであるが、次にその所見を摘記し併せていささか考察を加えることとする：

1) まず溶連菌生菌体浮遊液に対しそれぞれ 100°C, 65°C, 及び 56°C の処置を30分間行なつたものについての制癌実験 [I a, b; II a, b; 及び III a, b] の成績を見ると、そのいずれにあつても

a) [温熱処理溶連菌浮遊液 + 癌細胞浮遊液]

混液を 37°C 下に 1.5 時間置いた後、ペニシリンを加えたものの移植マウスはすべて10~12日以内に腫瘍死しており、又他方

b) [温熱処理溶連菌浮遊液 + 癌細胞浮遊液]

混液を単に 37°C, 1.5 時間 incubate しただけのものを移植したマウスは菌感染で斃死することなく、やはり 10~13 日以内に腫瘍死しておる

といった具合である。

即ちこれらの成績は、これとVIIの対照実験列の成績 (マウスの生存日数は 10~15 日) を対比することによ

つて、56~100°C, 30 分間の処置で溶連菌が既に死滅したこと、従つて癌細胞に対し何ら影響することがなかつたことを明示しているものといえよう。

2) 次に、実験列 VI の成績に転ずると、ここでは [0~4°C 保存の溶連菌浮遊液 + 癌細胞浮遊液] 混液の 37°C 下、1.5 時間置いたものを移植した b 群のマウスは 2 匹共 2 日目に菌感染で死んでいるに対し、[0~4°C 保存の溶連菌浮遊液 + 癌細胞浮遊液] 混液に対し 37°C 下、1.5 時間の処置を施した後、ペニシリンを添加して移植した a 群にあつては 1 匹は43日目に 1 匹は56日目に腫瘍死しているが、残りの 3 匹は更に長生し60日目の剖検で腫瘍所見陰性といつた所見である。

而してこの成績については、癌細胞のマウスに対する移植能が溶連菌生菌体によつて侵害された。しかしこのままではマウスに移植された場合動物は菌感染で死すべき筈のところをペニシリンで防禦されたと解すべきであろう。

ところで、今この成績を基準として 37°C, 1.5 時間の処置を施した溶連菌生菌体浮遊液について行なつた実験列 V の成績を見ると、溶連菌はなおそのマウスに対する毒力を保持しているとはいえ、制癌効果において劣っているものがあり (マウスの生存日数は 24~39 日)、又 45°C 下、1.5 時間処置の実験列 IV では制癌効果において一層劣っている (マウスの生存日数は 13~24 日) といった関係が看取されよう。

要するに、本実験を通じて溶連菌の抗エールリッヒ癌細胞能は温熱的影響に対して極めて敏感であつて、大体 45°C, 30 分間の処置を限界として完全に喪失するに至ることが立証された訳である。

文 献

- 1) Koshimura, S., Murasawa, K., Nakagawa, E., Ueda, M., Ban 'o, Y., & Hirata, R. : Japan. J. Exp. Med., 25, 93 (1955).
- 2) Ohta, T. : Japan. J. Exp. Med., 27, 107 (1957).
- 3) 清水隆作・越村三郎・正印達・平田良三・阪東芳雄 : 第 17 回日本癌学会記事 (千葉), 癌, 49, (附), 9 (1958).
- 4) Shoin, S. : Japan. J. Exp. Med. 29, 529 (1959).
- 5) Okamoto, H., Koshimura, S., Hirata, R., Murasawa, K., Bančo, Y., & Shimizu, R. : Z. Krebsforsch., 62, 408 (1958).

Abstract

Data were presented to show that when hemolytic streptococci, suspended in phosphate-buffered Ringer solution (pH 7.2), were heated for 30 minutes at temperature higher than 45°C, there occurred a complete loss in their ability to injure the invasion power of Ehrlich carcinoma cells to mice.

Table I. Influence of Heating on the Ability of Hemolytic Streptococci to Injure Ehrlich Carcinoma Cells

- 1) Pretreatment of thick suspension of living hemolytic streptococci ("S"-strain) : 2cc of the cocci suspension, contained in a test-tube, was placed for 1.5 hours in a water-bath adjusted at a stated temperature (37°C, 45°C, 56°C, 65°C or 100°C), and then chilled.
2cc of the cocci suspension was placed in an ice-box (0-4°C).
- 2) Contact of Ehrlich carcinoma cells with cocci in resting state :
A mixture of 1cc of the carcinoma cells suspension (79,300,000 cells/cc), 2cc of a cocci suspension pretreated as described above, and 1cc of phosphate-buffered Ringer solution (pH 7.2) was allowed to stand, with occasional shaking, in a 37°C incubator for 1.5 hours.
- 3) Inoculation to mice :
 - a) To 3cc of 4cc of the above-mentioned mixture of carcinoma cells and streptococci, 0.75cc of penicillin solution (penicillin G-K 100,000 units per cc saline) was added, and 0.5cc of this mixture was then injected intraperitoneally to each animal in respective group.
 - b) 0.5cc of 1cc of the mixture of carcinoma cells and streptococci remained was injected intraperitoneally to each of two animals. On the other hand, there was set up a control group of mice, to each of which a 0.5cc intraperitoneal dose of a mixture [1cc of the carcinoma cells suspension + 3cc of phosphate-buffered Ringer solution (pH 7.2)] was injected.

Group	Mouse (ddN)		Inoculation mixture	Results		
	No.	Body weight (g)		Survival days of each animal	Cause of death	
I	a	1201	18	(Carcinoma cells + Streptococci (100°C, 30m) ↓ 37°C, 1.5hrs + (Penicillin)	12	●
		1202	18		12	●
		1203	19		10	●
		1204	19		10	●
		1205	20		10	●
	b	1206	18	(Carcinoma cells + Streptococci (100°C, 30m) ↓ 37°C, 1.5hrs + (None)	12	●
		1207	18		13	●
II	a	1208	18	(Carcinoma cells + Streptococci (65°C, 30m) ↓ 37°C, 1.5hrs + (Penicillin)	11	●
		1209	18		11	●
		1210	19		11	●
		1211	19		11	●
		1212	20		10	●

	b	1213	18	(Carcinoma cells + Streptococci (65°C, 30m) ↓ 37°C, 1.5hrs + (None)	12	●
		1214	18		12	●
III	a	1215	18	(Carcinoma cells + Streptococci (56°C, 30m) ↓ 37°C, 1.5hrs + (Penicillin)	11	●
		1216	18		11	●
		1217	19		11	●
		1218	19		11	●
		1219	20		10	●
		b	1220	18	(Carcinoma cells + Streptococci (56°C, 30m) ↓ 37°C, 1.5hrs + (None)	11
		1221	18		12	●
IV	a	1222	18	(Carcinoma cells + Streptococci (45°C, 30m) ↓ 37°C, 1.5hrs + (Penicillin)	13	●
		1223	18		17	●
		1224	19		17	●
		1225	19		13	●
		1226	20		24	●
		b	1227	18	(Carcinoma cells + Streptococci (45°C, 30m) ↓ 37°C, 1.5hrs + (None)	12
		1228	18		13	●
V	a	1229	18	(Carcinoma cells + Streptococci (37°C, 30m) ↓ 37°C, 1.5hrs + (Penicillin)	29	●
		1230	18		39	●
		1231	19		36	●
		1232	19		24	●
		1233	20		24	●
		b	1234	18	(Carcinoma cells + Streptococci (37°C, 30m) ↓ 37°C, 1.5hrs + (None)	2
		1235	18		2	†
VI	a	1236	18	(Carcinoma cells + Streptococci (0~4°C, 30m) ↓ 37°C, 1.5hrs + (Penicillin)	43	●
		1237	18		60	○
		1238	19		60	○
		1239	19		56	●
		1240	20		60	○

b	1241	18	(Carcinoma cells) + Streptococci (0~4°C, 30m)	2	†
	1242	18	↓ 37°C, 1.5hrs + (None)	2	†
VII (Control)	1243	18	Carcinoma cells	15	●
	1244	18	alone	14	●
	1245	19	↓ 37°C, 1.5hrs	13	●
	1246	19	+	10	●
	1247	20	(Penicillin)	13	●

Remarks : ● = Died of tumor invasion.

○ = The animals, alived even after 60 days, was sacrificed and autopsied with no tumor finding.

† = Died of streptococcal septicemia.