

## *Corynebacterium kutscheri* の抗腫瘍性に関する研究

奈良県立医科大学細菌学教室

原 田 七 寛

### STUDIES ON ANTITUMOR ACTIVITY OF *CORYNEBACTERIUM KUTSCHERI*

KAZUHIRO HARADA

Department of Bacteriology, Nara Medical University

Received March 31, 1993

**Summary :** The antitumor effect of *Corynebacterium kutscheri* was evaluated in mice by the administration of formalin-killed whole cell (FK-CK) or subcellular fraction named CK•m (mitogen derived from *C. kutscheri*). In these studies, two systems of mouse vs tumor cell (outbred ddY vs Ehrlich ascites carcinoma cell, inbred CDF<sub>1</sub> vs P 388 leukemia cell) were used. Treatment of mice in the dose range of greater than 10<sup>6</sup> bacterial cells or 20 μg of CK•m per mouse conferred substantial protection on both mice. The enhanced cytotoxicity of peritoneal exudate cells played a leading role in the initial phase of antitumor activity. The Winn assay disclosed that antitumor activity was attributable to nonadherent splenocytes whose activity was impaired by treatment with anti-T cell antibody and complement. The fact that the generation of effector cells paralleled that of the delayed-type hypersensitivity to this bacterium may suggest that the antitumor activity of *C. kutscheri* is mediated in part by T cell.

The isolation and characterization of biological activities of the active component of *C. kutscheri* were attempted. The antitumor activity was confined to the subcellular particle fraction of this organism and associated with a molecule of glycoprotein nature (38,000 Dalton) isolated from this fraction by affinity chromatography with Concanavalin A-Sepharose 4 B. This substance exerted mitogenic effect on C 3 H/HeJ splenocytes and T cells and further exhibited antitumor activity on P 388 leukemia cell in CDF<sub>1</sub> mice. The Winn assay disclosed that the antitumor activity induced by this material was dependent on L 3 T 4 T cells. Furthermore, both the mitogenic and antitumor activity of this moiety were resistant to heating at 100°C for 30 min or RNase digestion, but sensitive to trypsin digestion, low or high pH. These results indicate that the antitumor activity of *C. kutscheri* is attributable to the heat-stable glycoprotein moiety which can directly stimulate T cells and macrophages.

#### Index Terms

antitumor effect, *Corynebacterium kutscheri*, glycoprotein, mitogen, Winn assay

#### 緒 言

近時多くの微生物が、生体の感染防御力を増減せしめ

るいわゆる immunomodulator としての作用を有していることが明らかにされている。特に細菌としては *Propionibacterium acnes* (*Corynebacterium parvum*)が

マウスの網内系を賦活し<sup>1)</sup>, アジュバンド活性を有し<sup>2)</sup>, さらに或種のマウスに抗癌性を賦与することが明らかにされている<sup>3-7)</sup>.

著者は当教室においてマウスの肺肉芽腫症の病巣より分離した *Corynebacterium kutscheri* のホルマリン死菌が<sup>8)</sup>, マウスに抗腫瘍性を賦与することを明らかにし, さらにこの作用が菌体内の糖蛋白成分によるものであり, マウス脾細胞に対し mitogen 作用を有することを明らかにした.

## 材 料 と 方 法

### 1. 菌 株

使用菌株は当教室で飼育中の C57 BL/6 に偶発した肺肉芽腫より分離し, Pierce-Chase ら<sup>9)</sup>の方法に従い *C. kutscheri* NCTT 11938 を基準として同定した *C. kutscheri* SK-1 株である. 本菌株はゲラチンディスク法<sup>9)</sup>で $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した.

用にのぞみこのディスク1枚を brain heart infusion (BHI) broth (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) 1 ml 中に融解後, 1夜 $37^{\circ}\text{C}$ で培養して後 decarboxylase (Sigma chemical Co., St. Louis, Mo.) を 0.01% (w/v) 添加した BHI broth 1 l に接種し,  $37^{\circ}\text{C}$  18 時間回転培養した. この培養液を 6,000 rpm 30 分の遠沈により集菌し, 滅菌 Hanks' balanced salt solution (HBSS) にて同様の遠心により 3 回洗滌した. 洗滌菌体をホルマリン 0.3% を加えたリン酸緩衝液 (0.01 M, pH 7.2) に浮遊し  $4^{\circ}\text{C}$  で 3 日間保存して殺菌した. このホルマリン死菌体はマウスの脾細胞に毒性を示さなくなるまで滅菌 HBSS で数回の洗滌を行った. チオグリコール酸培地による無菌試験により生残菌の存在を否定したものを *C. kutscheri* のホルマリン死菌体 (FK・CK) として使用した.

### 2. マウス

抗腫瘍性を実証するため allogeneic (同種) の ddY および syngeneic (同系) の CDF<sub>1</sub> を使用した. これらは 8-10 週齢の雌で何れも日本クレア株式会社より購入し, 本研究室内で 2 週間飼育した後実験に供した.

さらに標品の mitogen 効果を検索するための C3H/HeJ の 3 週齢雌マウスは同社より購入後, 2 週間研究室内で飼育したものを使用した.

### 3. 腫瘍細胞

腫瘍細胞としては大阪大学微生物病研究所上田重晴教授より分与されたエールリッヒ腹水癌細胞 (EAC) を ddY マウスに継代して使用した. この細胞  $5 \times 10^6$  個を接種した ddY マウスの平均生残日数 (MST) は 15.4 日であ

った. マウスリンパ性白血病細胞 (P 388) は愛知厚生年金病院星野博士により分与されたもので,  $10^6$  個の接種による CDF<sub>1</sub> マウスの MST は 11.1 日であった.

### 4. FK・CK による防御有効量の測定

HBSS 0.1 ml 中に変量した FK・CK を加えたものを ddY マウス腹腔内に注射し, その直後に  $5 \times 10^6$  EAC を同一マウスに注射し 90 日間観察して生残率および MST を測定した. P 388 に関してはその  $10^6$  個を CDF<sub>1</sub> マウスに接種し 60 日後の生残率および MST を測定した.

### 5. 菌体内成分の調製

Sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.25%, DNase (type I: Sigma)  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  および 10 mM  $\text{MgCl}_2$  を含有した 100 ml の 10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) (Tris-B.) に洗滌菌体を浮遊させたものを細胞破壊器 (Vibrogen, Zellmühle, FRG) にてガラス粒子 (0.3-0.5 mm; mixed type) とともに 15 分間菌体破壊を行った. このものを分別遠沈 (330 g 30 分, 4,200 g 60 分, 12,000 g 60 分) した後, その上清をさらに 90,000 g 2 時間の超遠沈を行った. 超遠沈によって得られた沈渣を前述の Tris-B. (10 mM  $\text{MgCl}_2$  含有) に均等に再浮遊して後蒸留水で透析した. その内液を  $-2^{\circ}\text{C}$  36,000 g, 1 時間の冷却遠沈により SDS を除去し凍結乾燥した標品を P-画分として使用した. 前述の 90,000 g 2 時間の超遠沈の上清は充分透析の後凍結乾燥したものを S-画分とし, 330 g 30 分の遠沈上清を 4,200 g 60 分遠沈した沈渣を所定の方法<sup>10)</sup> で処理し凍結乾燥したものを細胞壁 (CW) 画分として使用した.

P-および S-画分は濾過膜 (0.20  $\mu\text{m}$ , Advantec Toyo, 東洋濾紙株式会社) により除菌し CW-画分は 0.5% ホルマリンで  $4^{\circ}\text{C}$  4 日間処理した後, 滅菌生食水で充分に洗滌し, チオグリコール酸培地 (Difco) にて無菌性を確認して使用した.

### 6. P-画分のゲル濾過

P-画分溶液に硫酸アンモニウム (硫酸) を 40% 飽和となるように加え  $4^{\circ}\text{C}$  60 分後に 25,000 g 30 分の遠沈により得た沈渣を Tris-B. に溶解し同液で充分に透析した. この透析内液 1.5 ml を  $\text{MgCl}_2$  10 mM を含む同じ緩衝液で平衡化した Sephacryl S-300 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) のカラム (2 $\times$ 55 cm) に重層し同一緩衝液によって溶出した. 5 ml づつの画分を組織培養液で透析し濾過滅菌した後 C3H/HeJ の脾細胞に対する mitogen 作用を検索した.

### 7. 腹腔細胞の動態

ddy マウスの腹腔内に  $5 \times 10^6$  個の EAC を FK・CK の

有効量を同時に注射して後、適当な時間毎に5 mlのHBSSで腹腔を洗浄し、腹腔細胞数を血球計算盤で計測して後、軽く遠沈しその沈渣をギムザ染色して腹腔細胞の組成を観察した。EACはその形および大きさで正常腹腔細胞と容易に鑑別できた。

10<sup>6</sup>個のP 388を注射したCDF<sub>1</sub>の腹腔細胞の動態についても同様の方法で行った。

CDF<sub>1</sub>の腹腔内に接種したP 388細胞数の推移は、経時的に採取したマウス腹腔細胞を組織培養液(10%牛胎児血清, 5×10<sup>-5</sup>M 2 mercaptoethanol, 2 mM グルタミンおよび所定量の抗生物質を添加したRPMI 1640)で5×10<sup>4</sup>/mlとなるように調製した。この細胞浮遊液200 μlを96穴マイクロタイタープレートに分注し5% CO<sub>2</sub>-チャンパー内で培養した。12時間後に1 μCiの [<sup>3</sup>H] thymidineを加え、さらに6時間培養した後にDNAへの取り込みを液体シンチレーションカウンターにより計測した。

#### 8. 腹腔浸出細胞(PEC)による細胞障害作用

有効量のFK・CKを注射したCDF<sub>1</sub>マウスより経時的に腹腔細胞を採取し、前述の組織培養液で6×10<sup>6</sup>個/mlとなるように調製した。<sup>51</sup>Cr ラベルP 388は以下の方法により作製した。すなわち、50 μCiのNa<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>を加えた培養液に10<sup>7</sup>個のP 388を接種し37℃1時間恒温水槽中で振盪した。その後40 mlの培養液で洗浄後2時間水中で保存し、用いの際み10<sup>4</sup>個のラベルした細胞を種々の濃度のPECと混和しその200 μlづつをマイクロタイタープレートに分注した。5% CO<sub>2</sub>チャンパー内で4時間37℃に保温して後、500 g 10分の遠沈を行い、その上清100 μlのγ線活性をガンマカウンターで計測した。

細胞溶解率は

$$\frac{\text{実験群 cpm} - \text{最小(非溶解)cpm}}{\text{最大(完全溶解)cpm} - \text{最小 cpm}}$$

で表示した。

最大(完全)溶解はTriton X-100を1%に加え、最小溶解は培養液のみで4時間保温したものの遠沈上清を使用した。

脾細胞のNK活性は、ナイロンウール法で得た未吸着細胞をYAC-1細胞を標的に<sup>51</sup>Crの溶出を指標として測定した。PECのNK活性についても同様の方法を用いて検索した。

#### 9. Winn 試験

10<sup>6</sup>個のFK・CKを腹腔内注射後10日目に脾臓を摘出し、脾細胞浮遊液をプラスチックシャーレに注入静置することにより付着細胞(AC)と非付着細胞(NAC)に分

画し、この操作を2度繰り返して後ACはゴム製ヘラでかきとりNACとの抗腫瘍活性の差をWinn試験<sup>11)</sup>により比較した。10<sup>7</sup>個/mlのP 388細胞浮遊液100 μlに、10<sup>6</sup>個/mlに調製したACあるいはNACの細胞浮遊液100 μlづつをそれぞれ加えCDF<sub>1</sub>マウスの腹腔内に注射し、30日後の平均生存率と平均生存日数(MST)を計測した。

CK・mによる実験も同様の操作で行なった。

#### 10. 足蹠反応

FK・CKによる遅延型過敏症(delayed-type hypersensitivity: DTH)の導入能の有無を検索するため10<sup>8</sup>個のFK・CKを注射後、2日目毎に10<sup>6</sup>個/25 μlのFK・CKをマウス後趾の足蹠皮内に注射し24時間後の足蹠の厚さを計測した。

#### 11. リンパ球画分の調製

マウス脾細胞浮遊液を形の如く調製し、培養液に浮遊した非付着細胞(NAC)をMage<sup>12)</sup>らの方法に従って分離した。すなわち10倍希釈した抗マウスIgG家兎血清でcoatした直径60 mmのペトリシャーレに注入し、大部分のB細胞を付着させた後、非付着細胞浮遊液をナイロンウールカラムを通過せしめてT細胞画分を得た<sup>13)</sup>。抗体をcoatしたシャーレに付着した細胞は、HBSSを用いてピペッティングを繰り返すことによりシャーレより剝離し、得られた細胞浮遊液をHBSSで2回洗浄の後、抗マウスT細胞抗体(Cedarlane Lab. Ltd., Ont., Canada)と補体(Low-Tox-M, Cedarlane)の処理により僅かに残存しているT細胞を完全に除去した。このようにして得た細胞をB-細胞として使用した。この細胞画分の純度はLipopolysaccharide (LPS, Sigma)やConcanavalin A(Con A, Sigma)に対する応答性の有無によって確認した。

#### 12. マイトジェン効果の測定

C 3 H/HeJの脾細胞より得たTあるいはB細胞画分100 μl (10<sup>6</sup>cells/ml)の培養液(10% FCS, 10 mM HEPES, 5×10<sup>-5</sup>M 2-mercaptoethanol, 100 U/ml ペニシリンおよび50 μg/ml ストレプトマイシンをRPMI 1640に加えたもの)で96穴マイクロタイタープレート中で培養し、54時間後に0.5 μCi/wellの [<sup>3</sup>H] thymidineを加え、さらに18時間培養後のそれぞれの細胞のDNAへの取り込みを液体シンチレーションカウンターで測定した。

## 実験結果

### 1. マウスの抗腫瘍性

マウスに種々の量のFK・CKを投与することによって発現される抗腫瘍作用をTable 1に示した。EAC対同

種の ddY マウスは、 $10^4$ 個の FK・CK により 45% の生残率が得られ、 $10^6$ 個の FK・CK では腫瘍接種 90 日後において 90% のマウスが生残し、その MST は 73.6 日であった。P 388 対 CDF<sub>1</sub> マウスの場合は FK・CK  $10^6$ 個投与により 60 日後における生残率は 60%、MST は 48.2 日であり、 $10^8$ 個の投与によりそれぞれ 80%、55.5 日であった。 $10^4$ 個の投与では対照群の 11.1 日に比し 30.2 日となる程度で 60 日後には全てのマウスは死亡した。これらの結果から以下の実験は EAC-ddY 系では  $10^6$ 個を、P 388-CDF<sub>1</sub> では  $10^8$ 個の FK・CK を使用するのが適当と思われた。

## 2. マウス腹腔内での抗腫瘍効果の発現

### 1) マウス腹腔内細胞の動態

Table 2 に示す如く  $10^6$ 個の FK・CK のみを投与したマウスにおいては約 6 倍の細胞数の増加がみられたがその増加は 72 時間後に最高値を示した。一方  $5 \times 10^6$ 個の EAC を同時に投与した場合は 24 時間後に最高値を示したが以後次第に減少して 3 日後には FK・CK のみのレベ

ルに達した。これに対し  $10^6$ 個 EAC のみを単独投与した群においては、接種 3 日後より細胞数の増加が著明となり 5 日後には約 60 倍に達し、その殆どが EAC であることが腹腔細胞の塗抹標本により確かめられた。

Fig. 1 に示す如く FK・CK のみの投与では、最初の 2 日間の腹腔細胞の主成分は多核白血球 (PMN) であり、6 時間目から次第に増加して 12 時間後に最高値を示し、以後次第に減少して数日間には尚かなりの割合を占めている。マクロファージに関しては 24 時間後より次第に増加し 4 日目で最高値を示し以後 2 週以上その値を持続したが、EAC  $5 \times 10^6$ 個の単独接種では食細胞の反応は殆どみられなかった。なお CDF<sub>1</sub> 対 P 388 系においても同様の傾向であった。

### 2) CDF<sub>1</sub> 対 P 388 系の抗腫瘍性

この点に関しては FK・CK 処置マウスの腹腔細胞 (PEC) を採取して培養し [<sup>3</sup>H] thymidine の DNA への取り込みを指標に P 388 細胞の増殖の有無を検索した。

Table 3 に示す如く P 388 を FK・CK と共に CDF<sub>1</sub> マウ

Table 1. Antitumor effect of FK・CK against EAC and P388 cells

Numbers of FK・CK	Antitumor effect*			
	EAC vs. ddY mice		P388 vs. CDF <sub>1</sub> mice	
	survival rate, %	MST days	survival rate, %	MST days
$10^4$	45	50.6	0	30.2
$10^6$	85	68.4	60	48.2
$10^8$	90	73.6	80	55.5
Control	0	15.4	0	11.1

\*. Each group consisted of 20 mice (ddY) or 10 mice (CDF<sub>1</sub>), and mice were challenged with  $5 \times 10^6$  EAC cells (ddY mice) or with  $10^6$  P388 (CDF<sub>1</sub> mice), immediately after treatment. Mice were kept for 90 days (ddY mice) or 60 days (CDF<sub>1</sub> mice). Data were obtained from two separate experiments and expressed as the mean values of two experiments.

Table 2. Cellular responses in the peritoneal cavity

Time after injection, h	Total cell numbers, $\times 10^6$ /peritoneal cavity		
	$10^6$ FK・CK	$10^6$ FK・CK + $5 \times 10^6$ EAC	HBSS + $5 \times 10^6$ EAC
Before injection	1.8 $\pm$ 0.6	—	—
6	6.3 $\pm$ 0.7	10.2 $\pm$ 1.2	10.6 $\pm$ 2.4
12	10.7 $\pm$ 0.6	16.2 $\pm$ 2.4	12.5 $\pm$ 3.2
24	11.8 $\pm$ 0.4	16.4 $\pm$ 3.6	16.7 $\pm$ 2.3
48	12.2 $\pm$ 2.2	12.9 $\pm$ 1.4	31.5 $\pm$ 4.2
72	13.0 $\pm$ 2.1	13.5 $\pm$ 2.4	37.3 $\pm$ 5.1
96	12.7 $\pm$ 2.3	12.9 $\pm$ 1.1	46.8 $\pm$ 6.3
120	11.5 $\pm$ 0.9	11.6 $\pm$ 1.3	59.6 $\pm$ 8.4

Mice were injected intraperitoneally with  $10^6$  FK・CK,  $10^6$  FK・CK plus  $5 \times 10^6$  EAC or HBSS plus  $5 \times 10^6$  EAC, sacrificed at indicated times, and peritoneal cells were obtained by lavage. Peritoneal cells yields are presented as means  $\pm$  SD for 5 mice per time point.

スの腹腔内注射を行って後採取した PEC の RI 活性は経時的に減少し 120 時間後には FK・CK のみの投与群のそれとほぼ等しくなり、P 388 細胞は殆ど死滅したものと考えられる。一方 P 388 のみの接種群の PEC の RI 活性は経時的に増加し 120 時間後には  $10^4/ml$  の P 388 のみをウエル中で培養した結果と同程度の値を示し、未処理マウスの腹腔内に接種した P 388 はマウス腹腔内で全く抑制されずに増殖していることを示された。

3) マウス脾細胞の細胞毒性

CDF<sub>1</sub>マウスの脾細胞あるいは PEC の NK 活性は YAC-1 細胞を標的として測定した。Fig. 2 に示す如く、PEC 中の NK 活性は 5 日目までピークに達し、その後次第に減少するが 10 日以降にもかなりの活性上昇が認めら

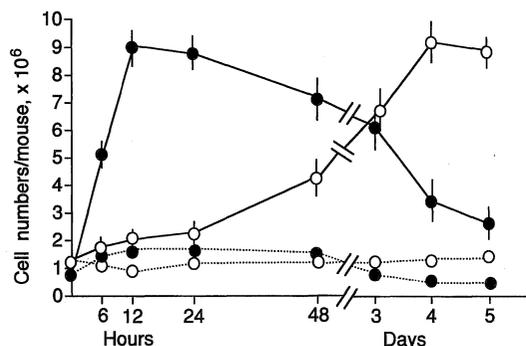


Fig. 1. Differential cell counts of host cells in the peritoneal cavity after injection of  $5 \times 10^6$  EAC cells following  $10^6$  FK·CK treatment. The data are presented as PMN (●—●)/mouse  $\times 10^6$ , mean  $\pm$  SD for 5 mice/time point, and as macrophages (○—○)/mouse  $\times 10^6$ , mean  $\pm$  SD for 5 mice/time point. PMN (●—●) and macrophages (○—○) in control mice receiving HBSS and  $5 \times 10^6$  EAC cells.

れるのに対し、P 388 に対する PEC の溶解能は 18 時間以内で最高値(36.5%)を示し数日間は中等度の上昇が認められた。Table 4 に示す如く抗 asialo GM<sub>1</sub>抗体および補体により NK 活性は完全に阻害された<sup>14)</sup>。

3. *C. kutscheri* 菌体内の活性画分

菌体画分の有効性に関しては Table 5 に示す如く、ddY マウス 10 匹づつの腹腔内に  $5 \times 10^6$ 個の EAC を接種し、接種直後にそれぞれの画分の表示量を静脈内に注射し 60 日間マウスの生死を観察した。その結果 P-画分 100  $\mu g$ /マウスの投与により半数以上のマウスが生残り MST も 2 倍以上に増加した。CW 画分は 250  $\mu g$ /マウスの投与により MST が倍増したにとどまり、S-画分には殆ど抗腫瘍性の賦与は認められなかった。

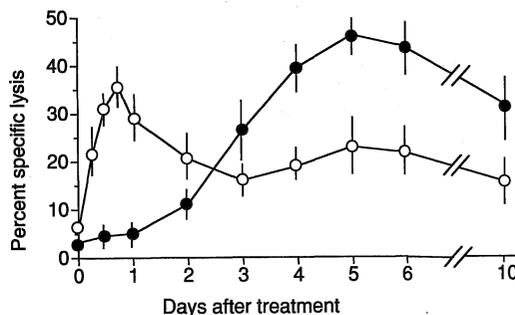


Fig. 2. Cytotoxic activity of PEC obtained from  $10^6$  FK·CK-treated mice to P388 (○) or YAC-1 (●) cells as determined by the 4-hour <sup>51</sup>Cr release assay (E:T ratio=50:1). Data were obtained from three different experiments and expressed as mean  $\pm$  SD for triplicate cultures. Cytotoxicity of HBSS-induced PEC in control mice:  $4.8 \pm 0.2\%$  to YAC-1 cells,  $5.4 \pm 1.1\%$  to P388 cells.

Table 3. Measurement of P388 growth in PEC obtained from mice inoculated with FK·CK and P388 cells

PEC obtained <sup>a</sup> from mice injected with	Incorporation of [ <sup>3</sup> H]TdR, mean cpm $\pm$ SD/culture			
	24 h	48 h	72 h	120 h
FK·CK and P388 ( $10^6$ )	14,500 $\pm$ 3,720 <sup>b</sup>	9,240 $\pm$ 1,780 <sup>b</sup>	6,240 $\pm$ 1,080 <sup>c</sup>	4,200 $\pm$ 1,120 <sup>c</sup>
HBSS and P388 ( $10^6$ )	22,250 $\pm$ 6,730	28,600 $\pm$ 7,400	32,500 $\pm$ 9,480	41,500 $\pm$ 12,400
FK·CK	920 $\pm$ 340	2,040 $\pm$ 870	3,180 $\pm$ 1,260	4,020 $\pm$ 1,850
HBSS	756 $\pm$ 214	840 $\pm$ 180	715 $\pm$ 220	780 $\pm$ 190
P388 ( $10^4$ /well)	46,500 $\pm$ 12,300			

a. Mice were challenged with  $10^6$  P388 tumor cells intraperitoneally and peritoneal cells were obtained by lavage at indicated times. Peritoneal cells ( $10^4$ /well) were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 18 h and pulsed with  $1 \mu Ci$  [<sup>3</sup>H]TdR during the last 6 h. Culture of P388 tumor cells ( $10^4$ /well) served as positive control. Data were obtained from three different experiments and expressed as mean  $\pm$  SD for triplicate cultures.

b. Different from control (HBSS and P388-injected);  $P < 0.05$ .

c. Different from control (HBSS and P388-injected);  $P < 0.01$ .

Table 4. NK activity of splenic nonadherent (NA) cells of  $10^6$  FK·CK-treated mice<sup>a</sup>

Days after injection	Treatment	Percent of cytotoxicity to YAC-1
-1 (control)	—	4.8±0.2
1	—	6.2±1.3
3	—	14.5±2.3 <sup>c</sup>
5	—	18.4±3.4
7	—	36.5±2.9
9	—	44.6±2.7
	C alone	43.2±3.1
	anti-asialo-GM <sub>1</sub> +C <sup>b</sup>	2.7±0.8

- a. Splenic nonadherent cells enriched by nylon wool columns (were mixed with <sup>51</sup>Cr-labeled P388 tumor cells (E:T ratio=50:1). Cytotoxicity was measured by the 4 hour Cr release assay. Data was obtained from three different experiments and expressed as mean ± SD for three cultures.
- b. The number of effectors was adjusted to achieve the E:T ratio of 50:1 after cells were treated with anti-asialo-GM<sub>1</sub> and complement.
- c. Statistically significant (P<0.01) by Student's t test, as compared with controls.

Table 5. Antitumor effect of each fraction after inoculation of  $5 \times 10^6$  EAC cells

Doses μg/mouse	Survival rates, % <sup>a</sup>		
	CW	P	S
250	10 (33.8)	85 (52.3)	0 (17.3)
200	0 (28.6)	80 (46.7)	0 (16.8)
100	0 (22.4)	65 (34.8)	0 (16.6)
50	0 (20.3)	30 (28.6)	0 (16.4)
10	0 (17.4)	0 (20.4)	0 (16.6)

Data were obtained from two separate experiments and expressed as the mean value of two experiments. Statistically not significant when survival rate was 15% or less by Fisher's test for 2×2 tables. Numbers in parentheses indicate MST. Survival rate of untreated control groups was 0%, and MST was 16.2 days.

a. Groups of 10 mice (ddY) were challenged intraperitoneally with  $5 \times 10^6$  EAC cells and immediately injected intravenously with graded doses of each fraction. Mice were kept for 60 days.

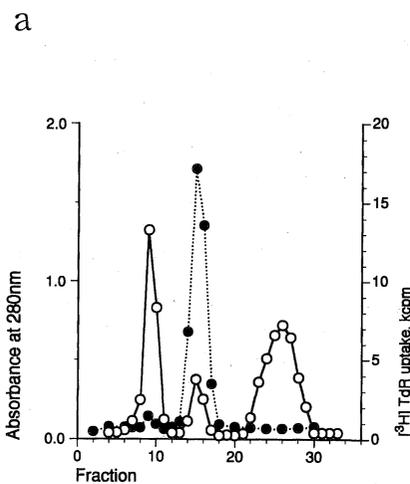


Fig. 3. a. Chromatographic separation of the ammonium-sulfate-precipitated P fraction on a column ( $2 \times 55$  cm) of Sephacryl S-300 preequilibrated with Tris-buffer containing 10 mM MgCl<sub>2</sub>. A 5-ml fraction was collected, and the optical density at 280 nm (○), and mitogenic activity on C3H/HeJ splenocytes (●) were measured.

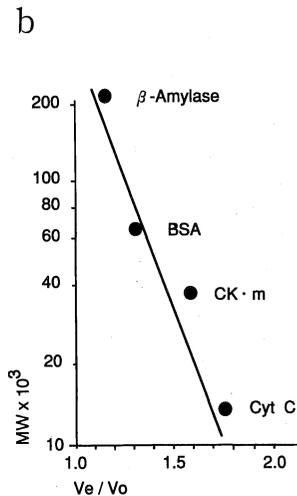


Fig. 3. b. The molecular weight of the second peak was estimated using the kit for molecular-weight marker (Sigma);  $\beta$ -amylase (200,000), bovine serum albumin (BSA; 66,000) cytochrome C (Cyt C; 12,400).  $V_e$ =Elution volume (75 ml);  $V_o$ =void volume (48 ml).

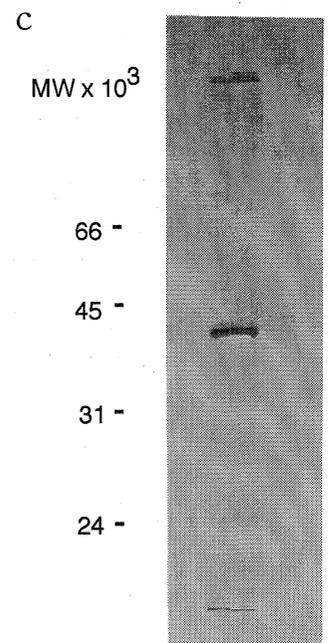


Fig. 3. c. 10% SDS-PAGE of CK·m in the presence of 2ME. The molecular weight was estimated using the standard molecular markers.

4. P-画分の分離と精製

P-画分中の活性物質は硫酸分画と Sephacryl S-300 のゲル濾過によって行った。すなわち硫酸 40%飽和の画分を Tris-B.に溶解し Tris-B.で透析した内液を Sephacryl S-300 のカラム(2×55 cm)を通過させた。

Fig. 3 a に示す如く 280 nm の吸光度により 3 つのピ

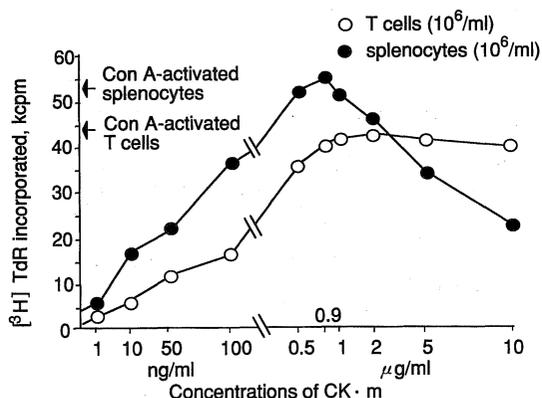


Fig. 4. Blastogenic responses of splenocytes and splenic T cells (C3H/HeJ) to graded doses of CK·m. Cells ( $2 \times 10^5$ ) in  $100 \mu\text{l}$  of complete medium were stimulated with an equal volume of CK·m solution at  $37^\circ\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$  incubator for 72 h. Each point represents the mean value of five cultures.

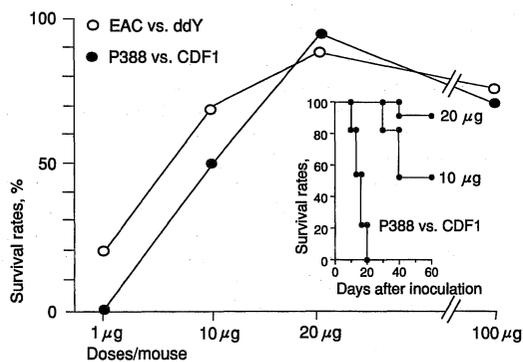


Fig. 5. Antitumor effect of CK·m. Groups of 10 mice were injected intravenously with indicated doses of CK·m immediately after intraperitoneal inoculation of  $5 \times 10^6$  EAC cells to ddY mouse or  $10^6$  P388 cells to CDF<sub>1</sub> mouse. Survival rate was determined at 60 days after inoculation. The survival curves of CDF<sub>1</sub> mice inoculated intravenously with  $10^6$  P388 for  $10 \mu\text{g}$  and  $20 \mu\text{g}$  are shown in the middle. The curve for  $10 \mu\text{g}$  was compared to the control curve ( $P < 0.05$ ). Each group consisted of 10 mice.

ークが認められ、C3H/HeJ マウスの脾細胞に対する mitogen 活性は第 2 のピークに認められた。この物質の分子量は、ゲル濾過の結果を標準タンパク質のそれと比較して 38,000~40,000 と推定された(3b)。さらに数回のゲル濾過によってこのピークを集め濃縮して Con A-Sephacryl(Pharmacia)カラムに吸着させ、0.3 M  $\alpha$ -methyl-D-mannoside および 0.15 M galactose で溶出した。この溶出液を蒸留水に透析し凍結乾燥したものを CK·m (*C. kutscheri* 由来の mitogen)と命名した。この CK·m をさらに SDS-PAGE<sup>15)</sup>により分子量を測定したところ Fig. 3 c に示す如く約 38,000 Da.であることが明らかとなった。

5. CK·m の mitogen 活性

CK·m の mitogen 活性は Fig. 4 に示す如く C3H/HeJ の脾細胞および T 細胞について検討した結果、前者に対しては  $10 \text{ ng/ml}$  から効果が現れ  $900 \text{ ng/ml}$  で最高値を示し、後者に対してはそれぞれ  $50 \text{ ng}$  および  $2 \mu\text{g}$  であった。なお両者の最高値はそれぞれ Con A  $2 \mu\text{g/ml}$  に匹敵することが明らかになった。一方 B 細胞に対しては全く作用を現わさなかった。

6. CK·m の抗腫瘍活性

1) CK·m の同時投与による抗腫瘍活性

CK·m の量を変量してマウスの静脈内注射を行い、同時に ddY マウスには EAC  $5 \times 10^6$ 個を、CDF<sub>1</sub>マウスには P388  $10^6$ 個をそれぞれのマウスの腹腔内に投与し、60 日間観察してその生残率を算定した。Fig.5 に示すように同種マウス(ddY 対 EAC), 同系マウス(CDF<sub>1</sub>対 P388)ともに  $20 \mu\text{g}$ /マウスの CK·m により最大の防御能

Table 6. Generation of the antitumor effect in splenocytes from CDF<sub>1</sub> mice treated with CK·m

Days after treatment	Antitumor effect <sup>a</sup>	
	survival rate, %	MST
- 1 (control)	0	10.7
2	10	14.6
4	55 <sup>b</sup>	20.8
6	80 <sup>c</sup>	25.6
12	85	27.4

a. CDF<sub>1</sub> mice were intravenously injected with  $20 \mu\text{g}$  of CK·m, and splenocytes were obtained at indicated days. Groups of 10 mice received intraperitoneally the admixture of  $10^7$  splenocytes and  $10^6$  P388 cells. Data are presented as the mean survival rate of mice at 60 days after inoculation and also as MST of mice dying of tumor growth. Results are expressed as average value of two separate experiments.

b. Different from control;  $P < 0.05$ .

c. Different from control;  $P < 0.01$ .

が認められた。

2) CK・m 投与による抗腫瘍作用発現に要する日数

CDF<sub>1</sub>マウスの静脈内に 20 μg/マウスの CK・m を投与し、Table 6 に示す日数の後、脾細胞を採取しその 10<sup>7</sup>個と P 388 10<sup>6</sup>個を混合して CDF<sub>1</sub>マウスの腹腔内に接種し 60 日間観察して生残率および MST を算定した。表示する好く、CK・m の投与 6 日後にその脾細胞における有意の抗腫瘍能の発現が、処置マウスにおける生存率の上昇および MST の延長によって確認された。

3) 抗腫瘍性に関与する細胞

CK・m 20 μg を投与後 10 日目の CDF<sub>1</sub>マウスの脾細胞を採取し、Table 7 に示す各種の抗体および補体処理を行って後 Winn 試験により脾細胞中の抗腫瘍能に関与する細胞を同定した。すなわち抗体-補体処理後の脾細胞 10<sup>7</sup>個と P 388 10<sup>6</sup>個を混合し直ちに CDF<sub>1</sub>マウスに腹腔内注射を行い 60 日後のマウスの生残数から抗 L 3 T 4 と補体処理に感受性のある細胞が effector cell であった。

### 7. CK・m の化学組成

Table 8 に示す如く、CK・m の活性はトリプシン処理、酸処理(pH 2)あるいはアルカリ処理(pH 12)により完全に失活し、一方 RNase 処理あるいは熱処理(100°C 30 分)には耐性であった。

## 考 察

*P. acnes* (*C. parvum*) が強力な immunomodulator であることはよく知られていることであり、種々の動物の腫瘍系に対する抗腫瘍効果、さらには臨床応用に関しても研究が行われている<sup>16)</sup>。

*C. kutchneri* は元来ある条件下でのマウスに pseudotuberculosis を惹起する原因菌として知られている菌である。本教室で本菌が分離同定された際にも、この菌の生菌 5×10<sup>8</sup>個を腹腔内注射した際にみられる病理組織像、特に RES 臓器のそれは免疫担当細胞を強く刺激していることを示すものであった。

著者の実験においても、FK・CK の投与により ddY 対 EAC あるいは CDF<sub>1</sub>対 P 388 の組合せにおいて著明な抗腫瘍性が賦与されることを明らかにしている。ddY マウスに FK・CK と EAC を同時に腹腔内注射した場合の PEC の組成は、6 時間後では PMN が大部分であり 4 日後にはその関係が逆転しているが EAC の増加は認められなかったのに対して EAC のみの注射 4 日目に認められる PEC の増加はすべて EAC によるものであり、PNM もマイクロファージもともに全く増加していなかった事から、その強い抗腫瘍性は食細胞によるものと思

Table 7. Effector cells in the antitumor effect induced by CK・m as determined by the Winn test

Treatment of splenocytes	Winn assay <sup>a</sup>	
	exp. 1	exp. 2
Anti-Lyt 2 Ab+C	7/10 <sup>b</sup>	9/10
Anti-L 3 T 4 Ab+C	1/10	0/10
Anti-asialo GM <sub>1</sub> Ab+C	7/10	7/10
Anti-macrophages Ab+C	7/10	7/10
—	9/10	8/10
Control group	0/10	0/10

a. Winn assay expressed as number of survivors/number of mice tested. Spleen cells obtained 10 days after treatment with 20 μg of CK・m were treated with indicated antibodies and complement; 10<sup>6</sup> P388 tumor cells were admixed with 10<sup>7</sup> treated effectors and immediately injected intraperitoneally into naive CDF<sub>1</sub> mice (10 mice/group). The number of survivors was determined at 60 days after inoculation.

b. P<0.01, as determined by Fisher's test for 2×2 tables.

Table 8. Biochemical properties of the mitogenic and antitumor activities of CK・m

Treatment	Biological activities	
	mitogenicity <sup>a</sup>	antitumor effect <sup>b</sup>
None	52,126±3,452	90 (56.4)
RNase	53,017±2,138	85 (50.6)
Trypsin	1,134±214	0 (16.8)
100°C, 30 min	47,378±2,649	80 (48.8)
pH 2	6,536±1,208	0 (16.4)
pH 12	1,118±863	0 (15.5)

a. As determined by incorporated [<sup>3</sup>H]TdR after a 72-hour-culture of C 3 H/HeJ splenocytes (2×10<sup>6</sup>/well) with 500 ng/ml of treated CK・m. Data were obtained from two separate experiments. Result are expressed as mean ± SE for 6 cultures. Cultures of splenocytes with Con A (2 μg/ml: 53,426 ± 4,635; cultures of splenocytes without stimulated: 856 ± 232).

b. As determined by the survival rates of ddY mice injected with 20 μg of treated CK・m after an intraperitoneal inoculation of 5×10<sup>6</sup> EAC. Each group consisted of 10 mice. Data were obtained from two separate experiments. Results are expressed as the mean of two experiments. Numbers in parentheses indicate MST (days).

われる。この *in vivo* の所見と平行して、*in vitro* でも FK・CK 処理をした CDF<sub>1</sub>マウスの PEC は P 388 の増殖を強力に抑制していることが示された。さらに FK・CK 処理マウス(CDF<sub>1</sub>)の PEC の細胞毒性は P 388 に対しては 18 時間以内でピークに達し、以後次第に減少するが数日間はかなりの活性を持続していた。一方 NK 活性は 3 日目より上昇し 5 日目にピークに達し、以後次第に減少しているパターンから考えて、FK・CK 処理によっても

たせられる PEC の P 388 に対する細胞毒性の主役は PMN と考えられる。Christie と Bomford<sup>17)</sup>によれば、*C. parvum* による抗腫瘍活性はマクロファージの活性化によるものであり、また Lichtenstein ら<sup>18)</sup>による *C. parvum* の抗腫瘍作用の主役は PMN であるという説から考えて、食細胞の活性化が抗腫瘍作用の主役であると考えられる。

しかしながら著者の行った FK・CK 処理マウスの脾細胞を使用した Winn 試験の結果から考えて、付着細胞(マクロファージ)よりも、T 細胞依存性の反応も重要な因子と考えられる。さらに足蹠反応の推移(Fig. 6)と比較しても T 細胞の関与の重要性が示唆された。

著者は上記の抗腫瘍活性を有する *C. kutscheri* の菌体よりの活性物質の抽出を試み、生菌体を破砕後分画遠沈を行い、90,000 g 2 時間の超遠沈により得た微小顆粒画分(P-画分)を材料として硫酸分画、Sephacryl S-300 によるゲル濾過、さらに Con A-sepharose による affinity chromatography を行うことにより CK・m を得た。

Con A-Sephacryl 4 B カラムの脱吸着のパターンおよび種々の酵素処理、酸あるいはアルカリ処理および耐熱性などから考えて、CK・m は耐熱性の糖蛋白質と考えられる。

## 結 語

1. *C. kutscheri* のホルマリン死菌体(FK・CK)、あるいは本菌体より分離した CK・m の投与によりマウスに抗腫瘍性を賦与することが出来た。
2. 抗腫瘍性は同種マウス ddY 対エールリッヒ腹水癌細胞あるいは同系マウス CDF<sub>1</sub> 対 P 388 マウス白血病細胞の 2 つの実験系で認められた。
3. FK・CK 10<sup>6</sup>個あるいは CK・m 20 μg の投与により両マウス系統に明確な抗腫瘍性が発現した。
4. 抗腫瘍性発現の初期では腹腔浸出細胞の細胞毒性(食細胞および NK 細胞による)が主体であるが、Winn 試験の結果から考えて T 細胞を主体とする非付着脾細胞も重要であることが判明した。
5. CK・m の抗腫瘍効果はその mitogen 活性と関連するものであり、Con A-Sephacryl 4 B カラムの脱吸着の結果、および酵素処理、熱処理等の結果から耐熱性の糖蛋白質(分子量 38,000 Da.)と考えられる。

本論分の要旨の一部は第 17 回日本免疫学会総会(昭和 62 年、金沢)および第 42 回日本細菌学会関西支部総会(平成元年、神戸)において発表した。

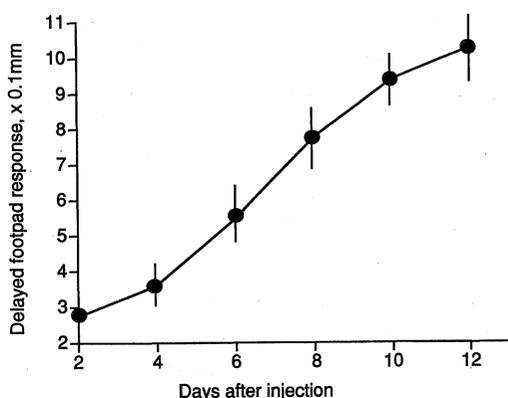


Fig. 6. Generation of DTH in mice treated with 10<sup>6</sup> FK・CK. Group of 5 mice were injected intraperitoneally with 10<sup>6</sup> FK・CK and delayed footpad response to FK・CK antigens was done at 2-days intervals. The data are presented as mean ± SD for 5 mice.

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました樫葉周三教授に深謝いたします。さらに種々のご指導、ご援助を頂きました喜多英二助教授および細菌学教室の各位に謝意を表します。

## 文 献

- 1) Halpern, B. N., Prévot, A. R., Biozzi, G., Stiffel, C., Mouton, D., Morard, J. C., Bouthillier, Y. and Decrevsefond, C.: Stimulation de l'activité phagocytaire du système réticuloendothélial provoquée par *Corynebacterium parvum*. J. Reticuloendothel. Soc. 1: 77-96, 1964.
- 2) Haward, J. G., Christie, G. H. and Scott, M. T.: Biological effects of *Corynebacterium parvum*. IV. Adjuvant and inhibitory activities on B lymphocytes. Cell Immunol. 7: 290-310, 1973.
- 3) Halpern, B. N., Biozzi, G., Stiffel, C. and Mouton, D.: Inhibition of tumor growth by administration of killed *Corynebacterium parvum*. Nature 212: 853-854, 1966.
- 4) Woodruff, M. F. A. and Boak, J. L.: Inhibitory effect of injection of *Corynebacterium parvum* on the growth of tumor transplants in isogenic hosts. Br. J. Cancer 20: 345-355, 1966.
- 5) Smith, S. E. and Scott, M. T.: Biological effects of *Corynebacterium parvum*. III. Amplification of

- resistance and impairment of active immunity to murine tumors, *Br. J. Cancer* **26** : 361-367, 1972.
- 6) **Scott, M. T.** : *Corynebacterium parvum* as a therapeutic antitumor agent in mice. I. Systemic effects from intravenous injection. *J. Natl. Cancer Inst.* **53** : 855-860, 1974.
  - 7) **Scott, M. T.** : *Corynebacterium parvum* as a therapeutic antitumor agent in mice. II. Local injection. *J. Natl. Cancer Inst.* **53** : 861-865, 1974.
  - 8) **Pierce-Chase, C. H., Fauve, R. M. and Dubos, R.** : Corynebacterial pseudotuberculosis in mice. I. Comparative susceptibility of mouse strains to experimental infection with *Corynebacterium kutscheri*. *J. Exp. Med.* **120** : 267-281, 1964.
  - 9) **Yamai, S., Obara, Y., Nikkawa, T., Shimoda, Y. and Miyamoto, Y.** : Preservation of *Neisseria gonorrhoeae* by the gelatin-disc method. *Br. J. Vener. Dis.* **55** : 90-93, 1979.
  - 10) **Kita, E., Emoto, M., Yasui, K., Yasui, K., Katsui, N., Nishi, N. and Kashiba, S.** : Cellular aspects of the longer-lasting immunity against mouse typhoid infection afforded by the live-cell and ribosomal vaccines. *Immunology* **57** : 431-435, 1986.
  - 11) **Winn, H. J.** : Immune mechanisms in homotransplantation. II. Quantitative assay of the immunologic activity of lymphoid cells stimulated by tumor homografts. *J. Immunol.* **86** : 228-239, 1961.
  - 12) **Mage, M. G., McHugh, L. L. and Rothstein, T. L.** : Mouse lymphocytes with and without surface immunoglobulin : Preparative scale separation in polystyrene tissue culture dishes coated with specifically purified anti-immunoglobulin. *J. Immunol. Methods* **15** : 47-56, 1977.
  - 13) **Julius, M. H., Simpson, E. and Herzenberg, L. A.** : A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **3** : 645-649, 1973.
  - 14) **Kasai, M., Yoneda, T., Habu, S., Maruyama, Y., Okumura, K. and Tokunaga, T.** : *In vivo* effect of anti-asialo-GM<sub>1</sub> antibody on natural killer activity. *Nature* **291** : 334-335, 1981.
  - 15) **Laemmli, U. K.** : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature* **227** : 680-685, 1970.
  - 16) **Milas, L. and Scott, M. T.** : Antitumor activity of *Corynebacterium parvum*. *Adv. Cancer Res.* **26** : 257-306, 1978.
  - 17) **Christie, G. H. and Bomford, R.** : Mechanisms of macrophage activation by *Corynebacterium parvum*. **1** : *In vitro* experiments. *Cell Immunol.* **17** : 141-149, 1975.
  - 18) **Lichtenstein, A. K., Kahle, J., Berek, J. and Zigelboim, J.** : Successful immunotherapy with intraperitoneal *Corynebacterium parvum* in a murine ovarian cancer model is associated with the recruitment of tumor-lytic neutrophils into the peritoneal cavity. *J. Immunol.* **133** : 519-526, 1984.