

メタノールおよびメタン酸化性細菌菌体成分の制癌性

大 岳 望¹⁾・遠藤豊成²⁾・小宮山寛機³⁾・中山 宏⁴⁾
原田隆一郎⁴⁾・梅沢 巖⁵⁾・駒形和男⁵⁾・瀬戸裕男⁵⁾

- 1) 東京大学応用微生物研究所第6研究部
- 2) 共立薬科大学微生物学教室
- 3) 北星研究所研究部
- 4) 三菱瓦斯化学新潟研究所
- 5) 東京大学応用微生物研究所第3研究部

(昭和58年12月9日受付)

メタノールおよびメタン酸化性細菌のうちで、29菌株の菌体成分のアルカリ可溶性画分に、マウス腹水癌に対して制癌活性が認められた。

そのうちで、比較的強い制癌活性が認められた2菌株 (Isolate B-46 および *Pseudomonas* sp. M-27) を用いて、活性物質の精製を試みた。

すなわちアルカリ可溶画分より、活性部分をクロロホルムで抽出し、ゲル透過を行ない、B-46からは第Ⅲ画分および第Ⅳ画分を分離し、一方、M-27からは第Ⅳ画分を分離した。

これら活性画分は、いずれも糖およびアミノ酸を構成成分とする、水溶性両性高分子物質であった。

これら物質は、試験管内では殺細胞作用を示さないが、腹腔に移植した Sarcoma 180 および IMC carcinoma 担癌マウスに対して、軽度ながら治療効果が認められた。さらに皮下移植した IMC carcinoma および MM 46 carcinoma に対しても、増殖抑制作用がみられた。

これら物質をマウス腹腔に投与し、4日後に腹腔細胞を採取して、EL-4 マウス白血病細胞を標的として、付着細胞の cytotoxicity をしらべたところ、EL-4 細胞への ³H-チミジンの取り込み阻害、あるいは ³H-ウリジンの標識細胞からの放射能の遊離が認められた。

さらにこれら物質を正常マウスの静脈に投与すると、血清中にインターフェロンの産生が観察された。

以上示したとおり、メタノールおよびメタン酸化性細菌の菌体より精製した物質は、担癌宿主の生体防御能を非特異的に亢進させて、腫瘍の退縮を導くものと考えられる。

癌化学療法の分野で PS-K^{1,2)}、Lentinan^{3,4)}、BCG⁵⁾、*Corynebacterium parvum*⁶⁾、PICIBANIL^{7,8)}、*Nocardia*-CWS⁹⁾ などの多糖類および菌体成分の抗腫瘍性が多数報告されている。これらの作用機序は、従来の制癌剤のように細胞毒性は示さず、主として担癌宿主の免疫能を増強させると考えられ、癌治療の分野において重要な役割を果たしているといえよう。

一方、メタノールおよびメタン酸化性細菌は、細菌の分類上 C₁ 化合物を酸化し得る点において代謝的に特異な菌群であり、これら菌体成分の制癌活性には大いに興味もたれる。そこで本研究では、mouse の腫瘍を対象として、各種メタノールおよびメタン酸化性細菌菌体の粗抽出物の制癌活性をしらべ、そのなかで比較的優れた活性を示した菌体より有効物質を精製し、その物理化

学的および生物学的性質についてしらべたので報告する。

I. 実験材料および方法

1. 供試菌体

メタノール酸化性細菌は、その脂肪酸の組成と CoQ の特徴により5群に分類することができ¹⁰⁾、この分類は、アイソザイム・パターンによる分類とも相関がある¹¹⁾。本実験においては、脂肪酸組成により分類される5群のメタノール酸化性細菌およびメタン酸化性細菌のうちから、Table 1 に示す29種の細菌(うち5種がメタン酸化性)を選んで使用した。

2. 菌体の調製

メタノール酸化性細菌の培養は、30 L 容ジャー培養槽を用い、回分方式で行なった。通常の場合、斜面培養よ

Table 1 List methanol or methane utilizing bacteria

Group ^{a)}	Fatty acid type ^{a)}	Bacteria				
I	A-1	<i>Pseudomonas</i> sp. C				
	A-2	<i>Pseudomonas methylotropha</i> NCIB 10514				
	A-3	<i>Methylmonas methanolica</i> NRRL B-5458 Isolate K-81, Isolate B-452, Isolate B-185, Isolate B-341				
	A-4	<i>Pseudomonas methylotropha</i> NCIB 10592, Isolate BNK 84, Isolate B-145				
II	B-1	<i>Protaminobacter ruber</i> NCIB 2879, <i>Pseudomonas extorquens</i> NCIB 9399, <i>Pseudomonas</i> sp. AM-1 NCIB 9133, <i>Pseudomonas</i> sp. M-27 NCIB 9186, <i>Pseudomonas rosea</i> NCIB 10610, <i>Pseudomonas rosea</i> NCIB 10611, <i>Pseudomonas</i> sp. 1, <i>Pseudomonas</i> sp. 135, Isolate V-172				
		III	B-2	<i>Microcycylus aquaticus</i> ATCC 27068, <i>Microcycylus aquaticus</i> DSM 334, <i>Microcycylus aquaticus</i> ATCC 25396, Isolate C-42		
				IV	B-3	<i>Hyphomicrobium variabile</i> NCIB 10517, Isolate B-46
						CH ₄

^{a)} : See reference No. 10.

Table 2 Fermentation medium

Components	Flask	Jar fermenter
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.0 g	1.0 g
KH ₂ PO ₄	1.4 g	3.0 g
Na ₂ HPO ₄	2.1 g	—
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g	1.0 g
FeC ₆ H ₅ O ₇ ·XH ₂ O	30 mg	30 mg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	20 mg	20 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg	10 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	3 mg	3 mg
CuSO ₄ ·5H ₂ O	1 mg	1 mg
Methanol	10 ml	^{b)}
Water	1,000 ml	1,000 ml
pH	7.0	6.6-7.0
Vitamin solution ^{a)}	1 ml	1 ml

^{a)} Vitamin solution :

Biotin 20 mg, Ca-pantothenate 4 g, Folic acid 20 mg, Inositol 20 g, Nicotinic acid 4 g, Pyridoxine-HCl 4 g, Thiamine-HCl 4 g, PABA 2 g, Riboflavine 2 g, Water 1,000 ml.

^{b)} See text.

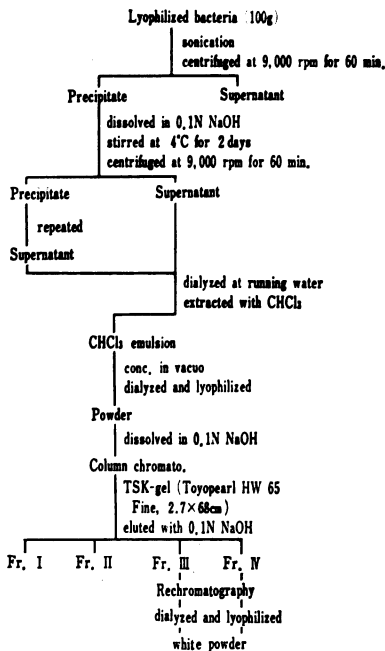
りフラスコ培地 (20 ml 培地/100 ml 容三角フラスコ) に植菌し、1~2日培養した菌をさらに200 ml 培地/1,000 ml 三角フラスコに植菌し、これを1~5本集めたものをジャーへ植菌した。培地は Table 2 に示した組成のものを使用した。ジャーにおいてはメタノールはアンモニア混液 (メタノール: 25% アンモニア水=5:1 vol) として、pH 調節と連動してフィードした。通常の場合、20 L の回分培養で混液は、1,200 ml-1,700 ml が消費される経過をとった。菌株によっては、ビオチンまたはチアミンを要求するものがあり (Isolate B-46)、ビタミン混液を添加して培養を行なった。ジャーの回分培養では通気攪拌条件は、初期には0.25 vvm 通気、300 rpm 程度でスタートし、細菌の生育に応じて漸次、通気量、回転数を増加し最終的には1vvm 通気、600 rpm として培養を行なった。培養温度は30°C を適温とし、この条件下で培養した。培養は O. D. 610 nm の値が、30 ないし35 程度に達するのを一応の目安とし、この前後で培養停止とした。培養停止後培養液をただちに遠心分離 (CEPA 超高速遠心分離機シンマルエンタープライゼス) して、菌体を集め凍結乾燥した。

メタン資化性細菌のうち本論文に用いたのは、メタノールも資化する性質を有するので、同様にして培養した。

3. 菌体成分の精製

菌体成分の精製は、図のような方法で行なった。典型

Fig. 1 Purification procedure



的な方法を Fig. 1 に示すと、凍結乾燥菌体 100 g を水道水 2 L に一晩浸漬後、超音波により破砕し、得られた懸濁液を 9,000 rpm、5°C で1時間遠心して、沈殿物を集めた。この沈殿物に 0.1 N NaOH 液 2 L を加え、4°C にて2日間攪拌を行ない、次いで5°C の条件下で 9,000 rpm 1時間遠心し上清を得た。沈殿物は、さらに 0.1 N NaOH 液 1 L に懸濁させ、同様の操作を行なって上清を得た。これら上清を集めて、水道水で透析後、一部は凍結乾燥させて粗抽出成分として制癌活性をしらべ、残液に等量のクロロホルムを加え、はげしく攪拌した後にエマルジョン状態でクロロホルム層 (エマルジョンを含む) を減圧濃縮して水溶液を得、これを透析した後、凍結乾燥を行ない粉末を得た。この粉末 1 g を、少量の 0.1 N NaOH 液に溶解後 TSK-ゲルトヨパール HW 65, Fine (2.7 cm x 68 cm) のカラムにかけ、0.1 N NaOH で溶出後フェノール硫酸法による糖の発色、紫外吸収 (λ=280 nm) を測定し Fig. 2 に示す分離パターンより4画分を得た。

4. 実験動物

ddY, CDF₁ C₅₇BL/6, および C₅₇H/He マウスを静岡県実験動物農業協同組合より購入し、数日間予備飼育した後実験に供した。

5. 腫瘍

B-16 melanoma および P-388 マウス白血病細胞は癌研究所、IMC carcimoma は微生物化学研究所、MM 46 は帝京大学 (薬) よりそれぞれ分与された株を、また Sarcoma 180 および Ehrlich 腹水癌細胞は当研究室で果代移植した株を使用した。

6. 制癌活性

制癌活性の評価は宿主の延命率 (ILS) および生存率

Fig. 2 Gel chromatography of bacterial fraction extracted by CHCl₃

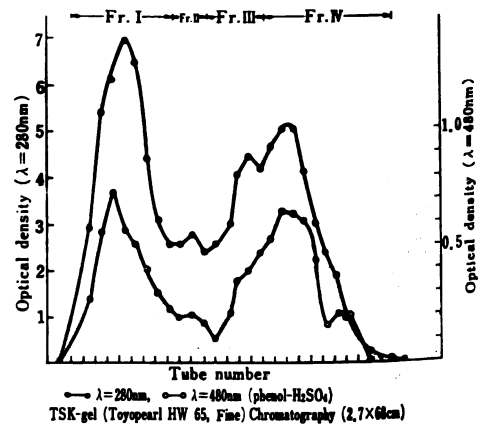


Table 3 Antitumoractivity of alkaline extracts from 5 strains of methanol utilizing bacteria on murine tumors^{a)}

Sample ^{b)}	Dose ^{c)} (mg/kg/day)	P-388		IMC		B-16			Ehrlich			S-180		
		MSD ^{d)}	ILS ^{d)}	MSD	ILS	MSD	ILS	MSD	ILS	MSD	ILS	MSD	ILS	Survivors ^{e)}
Saline	—	10.5	0	16.6	0	23.8	0	22.6	0	0/5	11.8	0	0	0
M-27	100	12.4	20	27.2	64	Toxic		42.3	87	1	41	250	1	1
	25	13.2	26	19.8	19	29.6	24	41	81	3	53	349	3	4
	6.3	12.0	14	20.2	22	25.2	6	56.5	150	3	41.3	250	3	2
	1.6	13.6	30	17.2	4	25.2	6	38	68	2	28.8	144	2	1
B-46	100	13.2	26	14	-16	32.6	37	38.3	70	2	45.7	287	2	2
	25	12.6	20	21.6	30	28.6	20	32.5	44	3	32	171	3	2
	6.3	12.2	16	19.0	14	28.6	20	41	81	3	35.8	203	3	0
	1.6	11.4	9	17.6	6	25.0	5	39	73	1	30	154	1	1
K-81	100	9.2	0	13.4	-19	Toxic		32	42	2	36.8	211	2	1
	25	12.4	18	19.0	14	30.8	29	36.2	60	0	32.4	175	0	0
	6.3	12.8	22	19.4	17	29.4	24	43.4	92	0	34.8	195	0	1
	1.6	11.8	12	19.8	19	31.6	33	41.4	83	0	34.8	195	0	1
V-172	100	7.8	0	19	14	26.8	17	42.3	87	1	31	163	1	3
	25	12.4	18	20.2	22	31.6	33	45	99	3	41	247	3	2
	6.3	15.0	43	20.8	25	24.8	4	36.7	62	2	35.8	203	2	1
	1.6	11.8	12	17.2	4	25.8	8	39.8	76	1	31.2	164	1	0
ATCC 25396	100	11.5	10	12.4	-25	26.6	12	53	135	4	36.3	208	4	2
	25	15.4	47	18.6	12	30.0	26	49.5	119	3	33	180	3	4
	6.3	13.6	30	15.8	-5	26.6	12	30.7	36	2	31.8	169	2	0
	1.6	13.8	31	17.6	6	25.4	7	31	37	2	32.2	173	2	0

a) Murine tumors were inoculated ip into 6 weeks old mice; P-388 leukemia (1×10^5 cells/CDF₁), IMC carcinoma (1×10^5 cells/CDF₁), B-16 melanoma (2×10^5 cells/C₅₇BL), Ehrlich carcinoma (1×10^5 cells/ddY), and sarcoma 180 (1×10^5 cells/ICR) were used.

b) Samples were dissolved in saline.

c) Mice were given ip administrations from days 1 to 9.

d) MSD: mean survival days, ILS(%): increase in life span (T/C-1) × 100.

e) Survival of mice was scored 60 days after tumor inoculation and mice remaining alive at this time were considered as cured.

ウス数で表わした。

$$ILS(\%) = \left(\frac{T}{C} - 1 \right) \times 100$$

C : 無処置群の平均延命日数

T : 治療群の平均延命日数

7. マクロファージの細胞障害試験

Sample を C₃H/BL/6 マウスの腹腔内に投与した後、

4日目にマウスを放血致死させ、氷冷 Hank's 液を腹腔内に 5ml 注入し、腹腔浸出細胞 (PEC) を集めた。RPMI-1640 培養液にて細胞を 3 回洗浄後、1 腹当り 1.2 ml の培養液 (10% 牛胎児血清添加 RPMI-1640) に浮遊させた。これを 0.1 または 0.2 ml 宛 (3 穴/1 細胞濃度) 96 穴マイクロプレート (コーニング社製) に播き 37°C 5% CO₂ ふ卵器に静置し、次いで 1 時間後に上

Table 4 Antitumor activity on Sarcoma 180 and IMC carcinoma

Sample	Dose ^{c)} (mg/kg/day)	Sarcoma 180 ^{a)}			IMC carcinoma ^{b)}	
		MSD ^{d)} (range)	ILS ^{d)} (%)	Survivors ^{e)}	MSD (range)	ILS
Saline	—	14.2 (12~16)	0	0/5	13.6 (12~14)	0
B-46 Fr. III	25	46.0 (32~60)	224	3	20.4 (12~29)	50
	6.3	33.0 (19~58)	132	1	14.9 (13~16)	9.6
	1.6	41.5 (28~55)	192	1	15.4 (13~22)	13.2
	0.39	32.5 (19~47)	129	1	15.9 (14~22)	16.9
	0.1	24.3 (16~47)	71	1		
B-46 Fr. IV	25	41.0 (22~50)	189	0	18.6 (12~25)	36.8
	6.3	40.5 (26~50)	185	1	16.2 (12~19)	19.1
	1.6	27.5 (27~28)	94	3	14.4 (12~16)	5.9
	0.39	40.8 (14~60)	187	1		
	0.1	41.3 (18~52)	191	1		
M-27 Fr. IV	25				14.4 (14~16)	5.9
	6.3	42.8 (39~56)	201	0	13.3 (12~14)	0
	1.6	44.5 (19~60)	213	1	14.6 (13~17)	7.3
	0.39	23.0 (16~34)	62	2		
	0.1	20.0 (13~27)	41	2		

a)-e) : See footnotes to Table 3.

Table 5 Antitumor activity on B-16 melanoma and Lewis lung carcinoma

Sample	Dose ^{c)} (mg/kg/day)	B-16 melanoma ^{a)}		Lewis lung carcinoma ^{b)}		MM 46 carcinoma ^{a)}	
		MSD ^{d)} (range)	ILS ^{d)}	MSD (range)	ILS	MSD (range)	ILS
Saline	—	21.4 (12~28)	0	18.6 (16~22)	0	13.6 (13~14)	0
B-46 Fr. III	100	22.4 (20~26)	5	19.8 (19~21)	6	15.4 (12~18)	13
	25	21.0 (19~23)	0	19.8 (17~27)	6	14.2 (12~16)	4
	6.3	22.4 (19~28)	5	18.2 (16~21)	-2	13.8 (12~15)	1
B-46 Fr. IV	100	28.6 (19~30)	34	23.0 (19~28)	24	12.4 (6~17)	-9
	25	27.8 (22~26)	30	20.4 (12~26)	10	13.2 (12~14)	-3
	6.3	22.0 (20~23)	3	20.4 (19~20)	10	13.0 (12~15)	-4
M-27 Fr. IV	100	28.8 (26~34)	35	22.6 (19~26)	22	13.0 (12~14)	-4
	50	24.8 (18~28)	16	20.4 (17~26)	10	14.2 (13~16)	4
	6.3	24.4 (22~27)	14	18.8 (14~23)	1	12.6 (11~14)	-7

a)-e) : See footnotes to Table 3.

Table 6 Antitumor activity on IMC carcinoma and MM 46 carcinoma transplanted into subcutaneous

Sample	Dose (mg/kg/day)	Tumor size (mm ²) ^{b)}	
		IMC ^{a)}	MM 46
Saline	—	239 (0) ^{c)}	73 (0)
B-46	100	185 (23)	71 (3)
Fr. III	25	115 (52)	45 (38)
B-46	100	149 (38)	60 (18)
Fr. IV	25	95 (60)	27 (63)
M-27	100	153 (36)	45 (38)
Fr. IV	25	139 (42)	50 (31)

^{a)} IMC carcinoma (1×10^6 cells/CDF₁) or MM 46 mammary carcinoma (1×10^6 cells/C3H) were inoculated sc into 6 week old mice.

^{b)} Tumor size was determined by measuring the maximum and minimum diameters of the tumor with calipers.

清を捨てて、非附着細胞を除去した。

1) 腫瘍細胞増殖抑制能 (cytostasis) の測定

C₅₇BL/6 マウスの腹腔で累代移植した、EL-4 マウス白血病細胞を、RPMI-1640 培養液にて3回洗浄した後、培養液に浮遊させ、先に調整した腹腔附着細胞の入ったマイクロプレートに $1 \times 10^4/0.2$ ml/well 宛播き、37°C で 40 時間 5% CO₂ ふ卵器にて培養した。培養終了 16 時間前に ³H-Thymidine を 0.2 μCi/well 宛添加し、終了時に EL-4 細胞を Cell harvester にてグラスファイバーフィルター上に集め、水で洗浄し乾燥後、Packard 液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した。

2) 腫瘍細胞融解能 (cytolysis) の測定

EL-4 細胞 1×10^6 個/ml を 4 ml プラスチックシャーレに入れ、これに ³H-Uridine (RCC Amersham) 200 μCi を加え、CO₂ ふ卵器にて 5 時間培養した。培養後冷 RPMI-1640 にて 3 回洗浄後 1×10^6 個/ml に調整した。これを先に調整した腹腔附着細胞の入ったマイクロプレートに 0.2 ml 宛播き、CO₂ ふ卵器にて 16 時間培養した。培養終了後、細胞の放射活性を Cytostasis と同様の方法で測定した。

8. 細胞毒性試験

10% 仔牛血清加 MEM 培養液に HeLa 細胞を、 2.5×10^4 個/ml となるように浮遊させ、これを直径 3 cm のシャーレに 2 ml 宛播き、2 日間 37°C の CO₂ ふ卵器にて培養した。次いで種々の濃度の Sample を含む培養

液と交換し、さらに 3 日間培養した後生細胞数を血球計算板で算定した。

9. インターフェロン (IFN) 誘発作用

マウスの尾静脈に Sample を注射した後経時的に採血し、血清中の IFN の titer を MAEHARA らの方法¹²⁾ で測定した。すなわち L 細胞を用い、ウシ水疱性口内炎ウイルスを攻撃用ウイルスとして 50% プラーク減少法で測定した。

II. 結 果

1. 制癌活性

1) 各種菌体の抗 Ehrlich 活性

培養した 29 種の菌体を遠心により集め、菌体を破壊し水可溶物と残渣に分け、残渣は 1/10 N NaOH にて可溶化し、それぞれの制癌活性をしらべた。すなわち、Ehrlich 細胞 2.5×10^6 個を腹腔に移植し、翌日より 9 日間投与する治療方法で効果をしらべたところ、アルカリ可溶画分に比較的優れた制癌活性が認められた。そこで、これらのうちで細胞壁の脂肪酸組成の特徴から、5 種の菌体を選び、それらのアルカリ可溶画分について抗腫瘍 spectrum を、5 種類のマウス腫瘍を用いてしらべた。

それぞれの腫瘍をマウス腹腔内に移植し、翌日より腹腔内投与で治療した結果、Table 3 に示すように Ehrlich および Sarcoma 180 に対し、いずれの細菌でも優れた制癌活性が認められた。また P-388 白血病、IMC carcinoma および B-16 melanoma に対し、菌株によっては弱いながらも活性がみられた。そこで、これら菌株のうちで B-46 および M-27 の 2 菌株を選んで、制癌活性物質を単離すべく精製を進め、それぞれの菌株より Fig. 2 に示した 4 画分を得た。これら画分の 2-keto-3-deoxy-octulosonate (KDO, Lipid A の構成成分) を、DRÖGE らの方法¹³⁾により定性的に測定したところ、両菌株の Fr. I, II および M-27 の Fr. III に KDO が含まれていることが確認された。そこで、B-46 Fr. III, IV および M-27 Fr. IV について制癌活性を検討した。

2) 精製画分の制癌活性

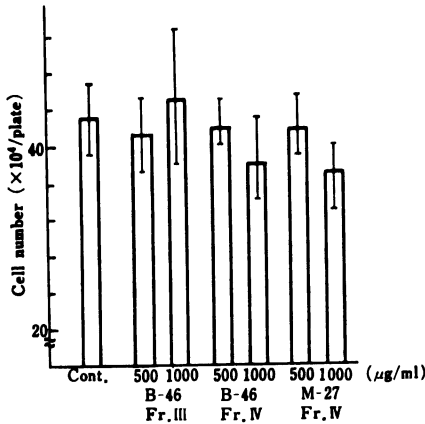
Sarcoma 180, B-16 melanoma および Lewis lung carcinoma を i.p. 移植、MM-46, IMC carcinoma を i.p. または s.c. に移植し、翌日より 9 日間連日 i.p. 投与して宿主の延命、あるいは皮下腫瘍の大きさをノギスで測定して制癌活性をしらべた (Table 4~6)。

その結果腹水型腫瘍では、S-180 腹水癌に対しいずれのサンプルでも優れた延命効果が得られ、投与量によっては 5 匹中 3 匹が治癒した。IMC carcinoma では B-46 Fr. III が効果的であった。B-16 melanoma に対しては、B-46 Fr. IV および M-27 Fr. IV にやや活性が見ら

れたが, Lewis lung carcinoma および MM-46 にはほとんど効果は認められなかった。一方固型腫瘍では IMC carcinoma および MM-46 に対し, いずれのサンプルでも腫瘍の増殖抑制効果が見られたが, 興味あることに 100 mg/kg/day より 25 mg/kg/day がより有効であった。

2. 殺細胞作用

Fig. 3 Cytotoxic activity on HeLa cells *in vitro*



制癌活性が認められたこれらの物質の殺細胞作用をしらべる目的で, *in vitro* で増殖している HeLa 細胞に作用させ, 3 日後に細胞の増殖をしらべた。その結果いずれの濃度でも 1,000 µg/ml の濃度では殺細胞作用は認められなかった (Fig. 3)。

3. 腹腔浸出付着細胞の細胞障害作用

C₅₇BL/6 マウスの i. p. に各物質を投与し, 4 日後に腹腔浸出細胞を採取し付着細胞を分離して, その細胞障害活性 (cytostasis) を EL-4 細胞の ³H-TdR の取り込み障害を指標としてしらべた。その結果いずれの物質でも cytostatic な作用が見られ, 特に 200 mg/kg 投与群が顕著であった (Table 7)。

次いで cytolytic な作用をしらべる目的で, C₅₇BL/6 マウスの i. p. に各物質を 200 mg/kg 投与し, 先と同様の方法で腹腔付着細胞を得て, cytolytic な作用をあらかじめ ³H-UR でラベルした EL-4 細胞を標的としてしらべた。その結果 Table 8 に示すように, いずれの物質でも cytolytic な作用が見られたが, B-46 N 投与群に比較的優れた活性がみられた。

4. IFN 誘発作用

B-46 III および IV の IFN 誘発作用をマウスを用いてしらべたところ, Fr. IV では 3 時間で出現し, 次いで兩

Table 7 Nonspecific cytostasis of peritoneal exudate cells obtained from mice given bacterial component

Sample	Dose (mg/kg)	Peritoneal cells ^{a)}	
		0.1 ml	0.2 ml
Saline		12618 ± 410 (0) ^{b)}	11845 ± 1065 (0)
B-46 Fr. III	200	9714 ± 2885 (23)	2669 ± 3173 (77)
	50	13261 ± 1886 (5)	6511 ± 4532 (45)
	12.5	14682 ± 900 (-16)	12758 ± 588 (-8)
B-46 Fr. IV	200	12115 ± 527 (4)	4808 ± 1648 (59)
	50	13138 ± 56 (-4)	7209 ± 1418 (39)
	12.5	13712 ± 544 (-9)	8872 ± 2855 (25)
M-27 Fr. IV	200	9436 ± 3040 (25)	3623 ± 3300 (69)
	50	10026 ± 2527 (21)	4804 ± 4350 (63)
	12.5	8737 ± 1760 (31)	6606 ± 2617 (44)

^{a)} Whole cells in the abdominal cavity of female ddY mice (6 weeks old) given with the sample were collected on Day 4, washed with minimum essential medium (MEM), and resuspended in 1.2 ml of MEM. The cell suspensions (0.1 or 0.2 ml) were seeded into 96-well tissue culture plates (Corning) and incubated for 60 min; macrophage monolayers were washed thoroughly with jets of medium before addition of the target cells (EL-4 leukemic cells). Triplicate cultures were maintained for each mouse.

^{b)} Cytostatic activity was measured by uptake of ³H-TdR into DNA of EL-4 cells (cpm). Numbers in parenthesis indicate the cytostatic ratio (%).

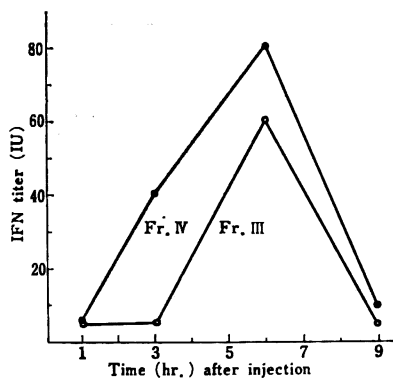
Table 8 Nonspecific cytolysis of peritoneal exudate cells obtained from mice given bacterial extract

Sample	Dose (mg/kg)	Peritoneal cells ^{a)}	
		0.1 ml	0.2 ml
Saline		15653 ± 701 (0) ^{b)}	14905 ± 1497 (0)
B-46 Fr. III	200	9325 ± 1155 (40)	7982 ± 611 (46)
B-46 Fr. IV	200	8527 ± 706 (45)	7112 ± 1784 (52)
M-27 Fr. IV	200	11094 ± 1131 (29)	9884 ± 509 (34)

^{a)} See footnotes to Table 7.

^{b)} Cytolytic activity was measured by release of ³H-uridine from EL-4 cells labeled with ³H-uridine before mixing with macrophages.

Fig. 4 Production of circulating IFN with B-46 Fr. III or Fr. IV in mice



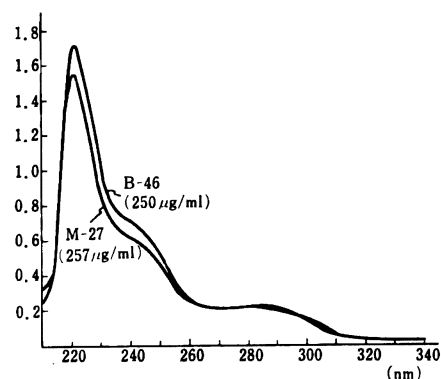
Male ddY mice (5w old) were given with a 100 mg/kg of B-46 Fr. III or Fr. IV intravenously, and IFN titer in serum was measured periodically

サンプルともに6時間で最高値に達し以後急速に減少した (Fig. 4).

5. 物理化学的性質

B-46 III, B-46 IV および M-27 IV 物質の物理化学的性質についてしらべ、Table 9 に示す成績を得た。これら物質は呈色反応から糖およびアミノ酸を構成成分とする水溶性両性高分子物質であると考えられる。Fig. 5 に紫外吸収のパターンを示すが芳香族アミノ酸 (チロシンを除く) を含むことが示唆される。赤外部吸収は3成分ともほぼ同様であり、Fig. 6 に B-46 Fr. III の例を示す。3,500~3,300 cm^{-1} , 1,100 cm^{-1} の吸収は水酸基に、1,650 cm^{-1} , 1,530 cm^{-1} の吸収はペプチド結合によるも

Fig. 5 UV spectra of M-27 Fr. IV and B-46 Fr. IV



のと考えられ、上記の推定を裏付ける。

III. 考 察

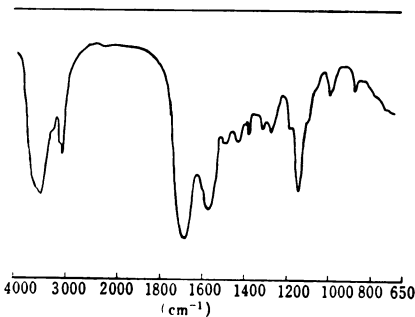
種々のメタノール資化性細菌およびメタン資化性細菌の菌体成分に、制癌活性があるか否か検討する目的で、29種類の細菌の水抽出物およびアルカリ抽出物の制癌活性を検討したところ、アルカリ抽出画分に比較的優れた活性が認められた。そのうちで脂肪酸組成の特徴および活性の面から *Pseudomonas* M-27 株、および Isolate B-46 株を選び、活性物質の精製を進め、*Pseudomonas* M-27 株より1成分 (Fr. IV) を、また Isolate B-46 株より2成分 (Fr. III, IV) を分画した。興味あることは、いずれの物質も物理化学的性質は類似しており、Lipid A^{13,14,15} などとは異なる糖と蛋白質で構成される高分子物質と考えられる。制癌活性は、腫瘍によっては腹水型にも固型にも効果がみられるが、特に固型腫瘍

Table 9 Physico-chemical properties of antitumor substances isolated from methanol utilizing bacteria

	B-16 III	B-46 IV	M-27 IV
Analysis (%)	C: 46.34 H: 7.85	C: 48.86 H: 6.53	C: 49.28 H: 7.25
Ash (mg/sample)	0.062/1.599 mg	0.114/2.231 mg	0.093/2.091 mg
$[\alpha]_D^{25}$ (N/10 NaOH)	-69.64 (c=0.1)	76.0 (c=0.25)	-62.5 (c=0.25)
UV Max.(nm) (N/10 NaOH)	203.7 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 11.5) 240 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 10.0) 280 (sh)	221 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 68.9) 242 (sh) 288 (sh)	220.6 ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$ 60.3) 242 (sh) 288 (sh)
Color reaction positive	Anthrone-H ₂ SO ₄ , Molisch, Sakaguchi	Anthrone-H ₂ SO ₄ , Molisch, Sakaguchi	Anthrone-H ₂ SO ₄ , Molisch, Sakaguchi
negative	FeCl ₃	FeCl ₃	FeCl ₃
Melting point (°C)	271~298 (decompose)	245~260 (decompose)	239~262 (decompose)
Solubility soluble in	1 N NaOH, H ₂ O, conc. HCl	1 N NaOH, H ₂ O, conc. HCl	1 N NaOH, H ₂ O, conc. HCl
insoluble in	organic solvent	organic solvent	organic solvent
Component*(w/w%) Sugar (μg) Protein (μg)	3.1 65	2.6 64	3.2 57
Nature	Pale brown powder amphoterie	Pale brown powder amphoterie	Pale brown powder amphoterie

* Sugar: Anthrone-H₂SO₄. Protein: CBB kit.

Fig. 6 IR spectrum of B-46 Fr. III (KBr)



でみられたように薬量相関は認められない。in vitro で増殖している HeLa 細胞にこれらの物質を作用させても、細胞の増殖阻害は見られないことから、直接的な殺細胞作用はないと思われる。多糖体を主成分として、直接的な殺細胞作用を示さない高分子制癌物質として、PS-K^{1,2)}, Lentinan^{3,4)}, TC-13^{16,17)}, KS-2¹⁸⁾ などがあ

これらの制癌活性は直接的な殺細胞作用を示す制癌剤と比較して、いずれの物質でも、明確な薬量相関は示さず、その制癌作用の機序は、宿主の防御機能に作用して、制癌効果を発揮するいわゆる宿主介在性の作用と考えられている。そこで、M-27 および B-46 細菌由来の制癌物質の宿主防御能に対する作用を知る目的で、PEC の付着細胞の cytotoxic activity の賦活化をしらべたところ、いずれの物質を投与しても付着細胞の cytotoxic activity (cytostatic および cytolytic activity) の上昇が認められた。PEC 中の adherent cell は大部分 Mφ であり¹⁹⁾、Mφ の cytotoxic activity を賦活性化すると思われる。その他に IFN 誘発作用が見られた。IFN の多様な生物活性のなかで²⁰⁾、Mφ の腫瘍増殖抑制作用の活性化、あるいは NK 細胞の活性化の増強がよく知られており²¹⁾、誘発された IFN も、制癌活性に関与していると考えられる。

以上示したようにメタノールおよびメタン質化性細菌の菌体より抽出、精製した物質は、担癌宿主の生体防御

機能を非特異的に亢進させて、腫瘍の退縮を導くといえよう。

謝辞：稿を終るに臨み実験に協力いただいた北里研究所藤野敏美氏に感謝致します。

文 献

- 1) 塚越 茂：多糖類の担癌動物に対する宿主効果，特にカワラタケ由来蛋白質，PS-K の作用について。癌と化学療法 1：251～257，1974
- 2) 中野陽典，田口鉄男：抗腫瘍蛋白多糖体 PS-K を使用した癌の免疫化学療法。癌と化学療法 2：13～20，1975
- 3) CHIHARA, G.; Y. MAEDA, J. HAMURO, T. SASAKI & F. FUKUOKA: Inhibition of mouse sarcoma-180 by polysaccharides from *Lentinus edodes*, Berk, Sing, Nature 222: 687～688, 1969
- 4) 椎尾 剛，吉浜 隆，弓狩康三：抗腫瘍多糖レンチナンの生体免疫機能に対する効果および化学療法剤との併用。癌と化学療法 2：45～51，1975
- 5) 東 一郎，山村雄一：BCG 細胞壁骨格(CWS)を用いる癌の免疫療法。蛋白質，核酸，酵素 23：625～640，1978
- 6) 笹尾哲郎，新本 稔，山縣司政，服部孝雄：担癌宿主抵抗性におよぼす嫌気性コリネバクテリウムの影響。癌と化学療法 2：35～43，1975
- 7) OKAMOTO, H.; S. SHOIN, S. KOSHIMURA & R. SHIMIZU: Studies on the anticancer and streptolysin S-forming abilities of hemolytic streptococci. Jap. J. Microbiol. 11: 323～336, 1967
- 8) 木村郁郎：溶連菌剤 OK-432 と癌の免疫化学療法の可能性。癌と化学療法 2：21～33，1975
- 9) AZUMA, I.; T. TANIYAMA, M. YAMAWAKI, K. SUGIURA & Y. YAMAMURA: Adjuvant and antitumor activities of *Nocardia* cell-wall skeletons. Gann 67: 733～736, 1976
- 10) URAKAMI, T. & K. KOMAGATA: Cellular fatty acid composition and coenzyme Q system in gram-negative methanol-utilizing bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 25: 343～360, 1979
- 11) URAKAMI, T. & K. KOMAGATA: Electrophoretic comparison of enzyme in the gram negative methanol-utilizing bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. 27: 381～403, 1981
- 12) MAEHARA, N.; H. KOMATSU, K. SHIMODA, S. MAKINO, Y. NAGANO & M. MATUMOTO: Enhanced production of Virus-inhibiting factor (Interferon) in human diploid cells by ultraviolet irradiation and temperature shift-down after stimulation with new castle disease virus. Microbiol. Immunol. 24: 907～914, 1980
- 13) DRÖGE, W.; V. LEHMAN, O. LUDERITZ & O. WESTPHAL: Structural investigations on the 2-keto-3-deoxyoctonate region of lipopolysaccharides. Eur. J. Biochem. 14: 175～184, 1970
- 14) 河西信彦：リポ多糖の化学構造と生物活性。蛋白質，核酸，酵素（別冊），199～217，1976
- 15) 吉岡守正，金野精文：内毒素脂質分画の化学的性状と生物活性。蛋白質，核酸，酵素（別冊），218～228，1976
- 16) KOHNO, M.; S. ABE, M. YAMAZAKI & D. MIZUNO: Antitumor effect of polysaccharide TC-13 on allogeneic and syngeneic tumors in mice. Gann 73: 488～494, 1982
- 17) KOHNO, M.; S. ABE, H. NAKAJIMA, M. YAMAZAKI & D. MIZUNO: Comparative studies on immunological properties of antitumor polysaccharide TC-13. Gann 73: 618～626, 1982
- 18) KOMATSU, N.; S. OKUBO, S. KIKUMOTO, K. KIMURA, G. SAITO & S. SAKAI: Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *schizophyllum commune*. Gann 60: 137～144, 1969
- 19) 斉藤和久，多田隈卓史：マクロファージの分離，付着法・免疫実験操作法A，日本免疫学会，465～466頁，1971
- 20) 桑田次男：インターフェロンの多面的作用。蛋白質，核酸，酵素（別冊），25：204～208，1981
- 21) MINATO, N.; L. REID, H. CANTOR, P. LENGUEL, & B. R. BLOOM: Mode of regulation of natural killer cell activity by interferon. J. Exp. Med. 152: 124～137, 1980

ANTITUMOR EFFECT OF BACTERIAL COMPONENT OF METHANOL AND/OR METHANE UTILIZING BACTERIA

NOBORU ŌTAKE¹⁾, TOYOSHIGE ENDO²⁾, KANKI KOMIYAMA³⁾,
HIROSHI NAKAYAMA¹⁾, RYUICHIRO HARADA⁴⁾, IWAO UMEZAWA³⁾,
KAZUO KOMAGATA¹⁾, and HARUO SETO¹⁾

- 1) Institute of Applied Microbiology, The University of Tokyo
- 2) Kyoritsu College of Pharmacy
- 3) The Kitasato Institute
- 4) Niigata Research Laboratory, Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.

Antitumor activity of the alkaline soluble fraction of methanol and/or methane utilizing bacteria was observed on murine tumors. For the purification of active substance from the alkaline soluble fraction of two bacterial strains (Isolate B-46 and *Pseudomonas* sp. M-27) which showed relatively marked antitumor activity among the 29 strains examined, extraction with chloroform and gel column chromatography were performed, and Fr. III and IV from strain B-46 and Fr. IV from strain M-27 were obtained.

These substances were water soluble and amphoteric, consisting mainly of sugar and amino acid. The substances did not show direct cytotoxic activity on mammalian cells *in vitro*, but showed marked antitumor activity on the ascites form of sarcoma 180 and IMC carcinoma, and slight activity on B-16 melanoma *in vivo*. Furthermore, growth inhibitory activity was observed on the solid form of IMC carcinoma and MM 46 mammary carcinoma grown subcutaneously.

Cytotoxic activity (cytostasis and cytolysis) of adherent cells in peritoneal exudate cells from mice treated with i. p. injections of B-46 Fr. III, IV or M-27 Fr. IV was determined *in vitro* using EL-4 mouse leukemic cells as target cells. The enhancement of cytotoxic activity of adherent cells was observed by means of the uptake of ³H-thymidine into DNA of target cells or the release of radioactivity from ³H-uridine-labeled EL-4 cells.

When mice were given these substances i. v., the maximum titer of interferon was observed in the serum 6 hours after the injection. These results suggested that B-46 Fr. III, IV and M-27 Fr. IV isolated from methanol utilizing bacteria induce tumor regression by specific and/or non-specific enhancement of the host defence mechanism of tumor bearing mice.