

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*

金沢大学結核研究所化学部 (主任: 越村三郎教授)

清	水	隆	作
西	田	信	義
坂	東		勲
越	村	三	郎

金沢大学医学部薬理学教室 (主任: 岡本肇教授)

林	銳	雄
小	林	孝

(受付: 昭和39年6月1日)

緒 言

A群溶連菌に癌細胞を侵害する特性のあることに関しては、1954年以来当研究所化学部ならびに当大学医学部薬理学教室で続行せられてきた制癌に関する実験的研究^{1, 2, 3, 4, 5)}、また溶連菌の接触で Sarcoma 180 の細胞内容が流漏することを組織化学的に観察した倉田らの研究⁶⁾、更には1958年以来 Jordan ら⁷⁾ (1958)、Christensen ら^{8, 9, 10)} (1959~63)、Havas ら¹¹⁾ (1963) および Fertman ら¹²⁾ (1963) によつて行なわれた溶連菌をもつてする制癌実験**の成績に徴して、今や疑うの余地もないところである。しかし、本菌の抗腫瘍効果発現の機序いかんというつきつめた問題となると、いぜんとして不明のままであるといつた現状である。

とはいえ、さきに「癌細胞と溶連菌の接触でメジウム内に顕著な Streptolysin-S (St-S) 産生がある」ことを観察した越村ら^{1, 2, 3, 13, 14)}が、このことと、リボ核酸 (RNA) の溶連菌に対する St-S 増産効果 (核酸効果) に関して行なわれた内・外学者の研究成果^{5, 15, 16)}とを照合考察して、“おそらく、溶連菌による腫瘍細胞の侵害には、その根底に核酸効果が伏在しており、St-S の産生は本菌 (あるいはその酵素) が腫瘍細胞の RNA 系と相関したことの表示であろう”としたことは、たとえそれが単なる推定であろうとも、特に注目に値するところといえよう。

著者らは、最近制癌に関する実験的研究を続

* This work was supported, in part, by a research grant (CA 06133-02, 1963) from the National Institutes of Health, U. S. A. and by a Grant-in-Aid from the Tokyo Biochemistry Research Institute.

本研究の概要は日本薬学会北陸支部第16回例会 (昭和38年6月, 富山) において発表した。

**われわれは St-S 自体は癌細胞には無害であるとしているが^{1, 3)}、Ginsburg^{17, 18)} らは St-S 標品にも癌細胞侵害性があると報告している。

行中, たまたま〔溶連菌+エールリッヒ癌細胞〕混液を 37°C に incubate したものの遠心上清液が核酸体に特異な UV- 吸収スペクトルを示すことを見出した。

そしてこのことには, 癌細胞と溶連菌との間

題における生化学的研究の部面で何か意義があらうとして, 二, 三の検討を行なった。

本論文は現在までにえられた成績の報告である。

実験方法の一般的事項

1) 溶連菌: 教室保存の *Streptococcus hemolyticus* "S-株" を使用。

2) エールリッヒ腹水癌: 武田研究所から分与をうけ, 以後当教室で継代保持したものを使用した。

3) 磷酸緩衝食塩水 (PBS): 0.1 M 磷酸緩衝液 (pH 7.2) に同量の 1.7% NaCl 溶液を加えたもの。

4) エールリッヒ癌細胞懸濁液の調製: dd 系 (白色) マウス (体重 18~20gm) にエールリッヒ癌細胞の腹腔内接種を行なつてから, 8 日目にちよ留腹水を採取した (血性腹水は使用しない)。えられた腹水は 1,500 r.p.m., 5 分間の遠心沈殿を行なう。沈渣 (癌細胞) を PBS による洗浄操作を 2 回施してから当初の腹水と同量の PBS に懸濁せしめた。この癌細胞懸濁液について細胞数の測定を行なつた。

5) 溶連菌懸濁液の調製: 普通ブイヨン (pH 7.4~7.6) に溶連菌を接種し, 37°C, 19 時間培養した後, 遠心 (4,000 r.p.m., 15 分) によつて集菌, 冷 PBS にて 2 回洗浄した後, 原培養液の 1/20 量の PBS に懸濁

せしめた。(すなわち原培養液の 20 倍濃厚菌液)。

6) UV-吸収スペクトルの測定: Photoelectric spectrophotometer "Shimazu QR-50 Type" を使用。

7) 溶血試験^{4,5)}: まず被検液 0.5 ml の 0.85% NaCl による倍下希釈液の 1 列を調製し, 各管の内容 0.5 ml に対し 3% 家兎洗浄赤血球浮遊液 0.5 ml あてを混和, 37°C の恒温槽中に 2 時間 incubation した後, 溶血の有無強弱の観察を行ない溶血力価の測定をつぎのごとく行なつた。

8) 溶血力価測定^{4,5)}: 被検液の溶血力価の表示には上記の溶血試験の条件下で 50% 溶血を起す溶血毒素量を 1 溶血単位 (1 H.U.) とする方法によつた。すなわち, 溶血試験において, 不完全溶血を示した二つの希釈倍数液を選び, それぞれに 3 ml あての 0.85% 食塩水を加えて遠心, この両上清液についての比色定量値 (550 m μ) から 50% 溶血に該当する希釈倍数を算出し, これを溶血力価とした。

実験方法ならびに成績

I 〔癌細胞+溶連菌〕混液の上清液についての UV-吸収測定による追究

エールリッヒ癌細胞と溶連菌の混液を 37°C 下に一定時間 incubate したものの, 遠心上清液について紫外線吸収測定を行なうと 260 m μ での吸光度に著しいものがあることが検証されたことから, まずこの混液の incubation time とその遠心上清液における 260 m μ 吸光度の推移関係の考査を行なつた。

エールリッヒ癌細胞懸濁液 (5.7 $\times 10^7$ cells/ml) 10 ml と溶連菌懸濁液 10 ml との混液を 37°C の恒温槽に置き, 0', 60', 90', 120' および 180'

の間隔で 4 ml あてを分取し, そのつどそれぞれの遠心上清液について 260 m μ における O.D. 測定を行なうとともに UV- 吸収曲線図の観察も行なつた。この実験では, 同時に対照として a) エールリッヒ癌細胞懸濁液 (5.7 $\times 10^7$ cells/ml) 10 ml に PBS 10 ml を加えたものと, b) 溶連菌懸濁液 10 ml に PBS 10 ml を加えたものとの二つを用意し, 両者についても上記と同様に遠心上清液について O.D. の経時的測定を行なつた。

Fig. 1 は〔癌細胞+溶連菌〕混液の incubation time に対しそれぞれの上清液で測知された 260

m μ の O. D. 値をプロットしたものである。すなわち、A 曲線の〔癌細胞＋溶連菌〕混液ではすでに incubation 直後より O. D. 値の上昇があり、60分目には O. D.=7.0 に達し、以後は更に急激に上昇して 90', 120' および 180' 後にはそれぞれ 13.4, 20.5 および 52.0 の O. D. 値を示すに至っている。ところが、対照実験における溶連菌懸濁液 (C 曲線) だけを incubate したのでは 180' 後でも全く O. D. 値の上昇がなく、また癌細胞懸濁液 (B 曲線) だけを incubate したのでは 180' 後に至つても僅かに 260 m μ O. D. 値 8.4 の上昇が起こつているに過ぎない。

しかして、Fig. 2 は以上三つの実験における incubation 180' 目の上清液のそれぞれについてえられた UV- 吸収曲線図を示したものであるが、一目して〔癌細胞＋溶連菌〕混液の上清液の UV- 吸収曲線のみが核酸体に定型的であることが注目されよう。

以上のように〔癌細胞＋溶連菌〕混液ではそのメジウム中に核酸体が顕著に遊離してくることが UV- 吸収測定で観察されたわけであるが、いまこの成績と対照実験の癌細胞のみの懸濁液および溶連菌のみの懸濁液における成績とを対比すると〔癌細胞＋溶連菌〕混液でおきる核酸体の遊離はおそらく癌細胞由来のものであらうと推定されようか。

II 〔癌細胞＋溶連菌〕混液の上清液からの RNA の分離実験

前項の実験成績から、ここに当然〔癌細胞＋溶連菌〕混液で遊離する核酸体ははたして polynucleotide であるか、あるいはその分解物 (mononucleotides, nucleosides または bases) が問題となつてきた。

そこで、前項の実験成果にかんがみて〔癌細胞＋溶連菌〕混液の 37°C, 180' incubate したものを選りその上清液を対象として RNA の分離実験を行なつた。

〔エールリッヒ癌細胞懸濁液 (5.25 \times 10⁷ cells/ml) 50 ml + 溶連菌懸濁液 50 ml〕混液を 37°C

に 180' incubate した後、冷却、遠沈、えられた上清液を分取する (沈渣、すなわち癌細胞と溶連菌は放棄)。この上清液に対し冷却下で攪拌しながら 4% HClO₄ の 200 ml を滴下せしめた後、更に 20 分間攪拌を続けて沈殿を完結せしめる。ついで遠心によつて沈殿部 (酸不溶性画分) と上清液 (酸可溶性画分) に分別し、

1) 酸不溶性画分に対しては Kirby 法¹⁹⁾ による RNA 分離を、また

2) 酸可溶性画分に対しては Column chromatography を行なつた。

1) 酸不溶性画分からの RNA 分離

前記の酸不溶画分を蒸留水 100 ml に懸濁せしめたものに、N-NaOH を加えて pH 7.0 とし、これに対し Kirby の原法を適用して、RNA (Na 塩) 82 mg を取得した。

2) 酸可溶性画分の Column chromatography

酸可溶性画分に対しては、まず 5N-KOH で pH を 7.0 とし、析出する KClO₄ を遠心除去する。えられた遠心上清液を凍結乾燥に付し白色粉末 2.6 gm (O. D. 260m μ 0.36/mg/ml) をえた。この粉末標品について次のごとく chromatography を行なつた。

すなわち、該粉末 504 mg を蒸留水 10 ml に溶解せしめたものを Dowex 1 (×2) [Cl], 2.8 × 11 cm のカラムに添加、Volkin & Cohn の方法²⁰⁾ に従つて HCl 溶出を行なつたところ、Fig. 3 に示したように、微量ではあるが 0.005 N HCl までに溶離する bases および mono- あるいは dinucleotides と 2N HCl で溶離する oligonucleotides が存在するというパターンがえられた。このうち oligonucleotides に相当する画分液を集めて凍結乾燥に付したが、秤取しえるほどの物質はえられなかつた。

以上のように〔癌細胞＋溶連菌〕混液を 37°C, 180' incubate した上清液から 82 mg にも及ぶ RNA が取得されるとともに、微量ではあるが oligo- 及び mononucleotides, あるいは bases と考えられるものの存在することが確かめられたわけである。

しからは、酸不溶性画分からえられた RNA 32 mg の由来いかん? いま、前項の UV- 吸収測定の結果に照合してみると溶連菌単独の 37°C, 180' の incubate でその上清液にほとんど 260 m μ 吸収が証明されないことから、これは全く問題とならず、ここに一応考慮すべきことといえば癌細胞単独の incubate でその上清液に軽度ながら UV- 吸収物質の存在が検証されたという所見に対してであろう。もちろん、この UV- 吸収物質は癌細胞由来のものであるが、これが上記の〔癌細胞+溶連菌〕混液の上清液における UV- 吸収物質、なかならず RNA 82 mg にはたしてどの程度の意義を占めるかということになると、これを直接証明する方法がない。

そこで、間接的ではあるが癌細胞だけの懸濁液 (5.25 \times 10⁷ cells/ml) の 50 ml (癌細胞は上記の溶連菌との混液実験におけると同数) を 37°C, 180' incubate したものを遠心によつて上清液と沈渣 (癌細胞) に分別し、それぞれに対し kirby 法による RNA の分離を行なつたところ上清液からは 12.8 mg, 沈渣からは 123 mg の RNA が分離取得された。

すなわち、Table 1 は本項でのそれぞれ対象の違つた三つの実験で取得された RNA の収量とその塩基組成を示したものであつて、ここにもつとも注目すべきは〔癌細胞+溶連菌〕混液の上清液から分離された RNA の収量 (82 mg) が、同数の癌細胞だけを incubate した実験における上清液よりの RNA の収量 (12.8 mg) に 6 倍し、しかもこの場合の癌細胞自体から分離された RNA 量 (123 mg) の 66% にも及んでいる点であつて、このことに関してはさきに倉田ら⁹⁾ が溶連菌の接触で Sarcoma 180 細胞の破壊が起こることを組織化学的に考查したことに考え合せても、〔癌細胞+溶連菌〕混液では溶連菌によつて癌細胞自体の崩壊が起こり、その胞体内容と共にメジウムに流漏した RNA (おそらく核蛋白として) に由来していると考えられるほかに解しようがないところといえよう。

III 生物学的方面からの検討

以上の実験は癌細胞に対する溶連菌の影響関係を〔癌細胞+溶連菌〕混液について、そのメジウムに遊離する癌細胞の RNA の検出および分離の方面から検討したことになるのであるが、このような侵害は癌細胞にとってはまさに致命的であろうことはもちろんである。そして、いまこのことに対して、さきに越村ら¹⁰⁾ 「癌細胞に対する溶連菌の接触メジウムでは St-S 産生があり¹¹⁾、しかもこのような癌細胞ではそのマウスに対する移植能を喪失¹²⁾している」ことを実証したことに関して、St-S の産生は溶連菌が癌細胞の RNA と相関したことの表示であり、移植能の喪失は RNA 系機能の荒廃にもとづくとしていることを想起するならばその間に何か重要な関連があるだろうことも想像に難くないところであろう。

すなわち、本項ではその間の消息をうかがうべく〔癌細胞+溶連菌〕混液において、そのメジウムへの UV- 吸光物質の出現、St-S の産生およびマウスへの移植能の三つが時間的どのような推移関係にあるかを考查した。

エールリッヒ癌細胞懸濁液 (5.9 \times 10⁷ Cells/ml) 50 ml と溶連菌懸濁液 40 ml とをそれぞれ別個に無菌的に調製し、二つの滅菌 50 ml- コルベンに次の被検液を用意した。

a) 〔癌細胞懸濁液 20 ml + 溶連菌懸濁液 20 ml〕混液

b) 〔癌細胞懸濁液 20 ml + PBS 20 ml〕 (対照実験)

この両被検液を同時に 37°C の恒温槽につけ、直後 (0') より始まり 60', 90', 120' 及び 180' 目ごとに両者から 6 ml あて分取し、そのつど両者について次のような 3 方面の考查を同時に行なつた。

1) UV- 吸収測定試験——6 ml のうち 1 ml を遠心し、その上清液を 0.85% NaCl 溶液に希釈せしめて 260 m μ での吸光度測定を行なう。

2) 溶血試験——上記 1) の遠心上清液 0.5 ml を溶血試験に供す。

3) マウスへの移植試験——残りの被検液 5 ml に対しペニシリン-Gカリ(50,000U/ml 食塩水 1 ml を加えて、その 0.5 ml あてを一群 8 匹あての dd 系白色マウスの腹腔内に注射する(従つてマウス 1 匹への癌細胞の接種数は 1.23×10^7 であり、ペニシリン量は 4,000 単位に該当)。各群のマウスで観察期間中に斃死したものは剖検によつて腫瘍死のいかんを確かめ、接種 75 日目に全動物を殺して剖検に付した。

Table 2 を一目して明らかなように、37°C 下

結 論

本研究では、最近当面した“洗浄エールリッヒ腹水癌細胞と洗浄溶連菌生菌体との磷酸緩衝液をメジウムとする混液を 37°C 下に incubate すると、そのメジウムに max. 260 m μ の UV-吸収物質が出現する”という事象に対して考査の歩を進めた。その成績を要約すれば：

1) [癌細胞+溶連菌] 混液では 37°C 下の incubate と同時にその遠心上清液に max. 260 m μ の吸収物質の出現が検証され、それは以後時間の経過と共に急激に増加の一途をたどり、しかも 90'~180' 後にはいずれも核酸体に定型的な UV-吸収曲線を示すに至つた。

なお、溶連菌生菌体だけの懸濁液では上清液にほとんど UV-吸収物質の出現が検証されず、また癌細胞だけの懸濁液では上清液が軽微な UV-吸収を示すだけであつた。

2) [癌細胞+溶連菌] 混液の 37°C 下 incubate 180' の上清液から Kirby 法によつてリボ

に incubate した [癌細胞+溶連菌] 混液では時間の経過に伴い上清液での 260 m μ 吸光度と St-S 力価との平行的増強があり、癌細胞の方でも移植能の喪失度(すなわちマウスの生存数)が高まつているという成績がえられた。

この成果は少なくとも溶連菌の対癌細胞機序において癌細胞の RNA 系における侵害があるとする見解に対し生化学的方面から有力なる証左を与えているものといえよう。

核酸を分離しえた。その収量は同数の癌細胞から分離しえたりボ核酸の 66% にも及んだ。

3) [癌細胞+溶連菌] 混液では incubate time の経過と共にその上清液では O.D. 260 m μ 値と Streptolysin-S 力価の増加が検証され、しかもこれに平行して該混液ではそのマウスに対する癌細胞の移植能の喪失度が著しくなつていることも実証された。

4) 以上の成績から、溶連菌の接触を受けた癌細胞では、胞体の破壊、ひいてはその内容物のメジウムへの流漏が起り、この流漏物質における RNA (おそらく核蛋白体が主) が 260 m μ 吸収測定で鋭敏に検知しうるのであり、従つて本研究の意義は溶連菌の対癌細胞機序の問題に関して、少なくとも癌細胞ではその RNA 系に傷害が起つていふことに対する生化学的方面からの証左をもたらした点にあると論考された。

文 献

- 1) Okamoto, H., Koshimura, S., Hirata, R., Murasawa, K., Bando, Y. & Shimizu, R. : Z. Krebsforsch., 62, 408, 1958.
- 2) 越村三郎 : 医学のあゆみ, 39, 551, 1961.
- 3) Okamoto, H. : 金大結研年報, 19(下), 165, 1962
- 4) Okamoto, H., Fujimura, A., Hayashi, T., Nishida, N., Shimizu, R. & Koshimura, S. : Gann, 55, 225, 1964.
- 5) Koshimura, S., Shimizu, R., Fujimura, A. & Okamoto, H. : Gann, 55, 233, 1964.
- 6) Kurata, Y. & Kitamura, M. : Gann, 52, 121, 1961.
- 7) Jordan, R. T., Rasmussen, A. F. Jr. & Bierman, R. : Cancer Res., 18, 943, 1958.
- 8) Christensen, E. A. :

- Acta Pathol. Microbiol. Scand., 46, 285, 1959.
- 9) Christensen, E. A. & Kjems, E. : Acta Pathol. Microbiol. Scand., 46, 296, 1959.
- 10) Christensen, E. A. : Ibid., 57, 175, 1963; 58, 43, 1963; 59, 1, 1963; 59, 464, 1963. 11) Havas, H. F., Donnelly, A. J. & Porreca, A. V. : Cancer Res., 23, 700, 1963. 12) Fertman, M. H., Fertman, B. & Furst, A. : Proc. West. Pharmacol. Soc., 6, 27, 1963.
- 13) Koshimura, S., Murasawa, K., Nakagawa, E., Ueda, M., Bando, Y. & Hirata, R. : Japan. J. Exp. Med., 25, 93, 1955.
- 14) Koshimura, S., Shimizu, R., Masusaki, T., Ohta, T. & Kishi, G. : Japan. J. Microbiol., 2, 23, 1958. 15) Koyama, J., Sokawa, Y. & Egami, F. : Biochem. Z., 338, 206, 1963. 16) Bernheimer, A.W., McCarty, M. ed. : Streptococcal Infections, 19, Columbia University Press, 1954. 17) Ginsburg, I. : Brit. J. Exptl. Pathol., 40, 417, 1959. 18) Ginsburg, I. & Grossowicz, N. : J. Pathl. Bact., 80, 111, 1960. 19) Kirby, K. S. : Biochem. J. (London), 64, 405, 1956. 20) Volkin, E. & Cohn, W. E. : J. Biol. Chem., 205, 767, 1953.

Fig. 1 Measurement of 260 m μ -absorbing substances in the supernatants of three different suspensions

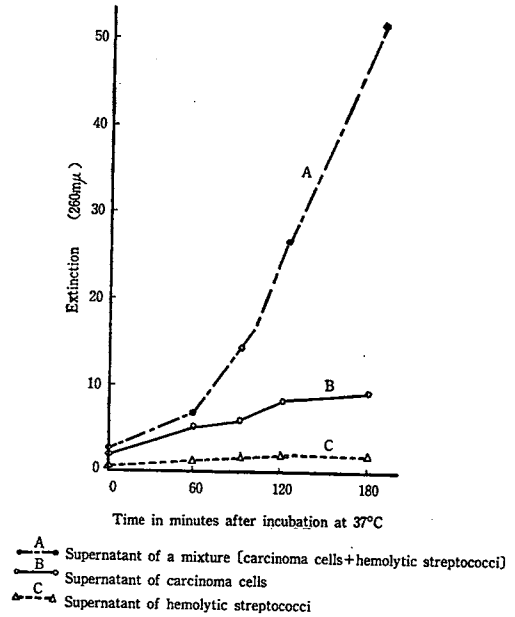


Table 1 Comparative illumination of yield of RNA's and their base ratio

Source of material	Material used for RNA isolation	Yield of RNA	Base ratio*				
			Adenine	Guanine	Uracil	Cytosine	Pu/Py
A mixture (50ml of 5.25×10^7 cancer cells/ml + 50 ml of streptococcal suspension), preincubated at 37°C for 180min.	Supernatant	82mg	10	12.4	7.3	5.0	1.8
A suspension of 50ml of 5.25×10^7 cancer cells/ml, preincubated at 37°C for 180min.	Supernatant	12.8mg	10	11.7	11.2	5.5	1.3
	Sediment (cancer cell)	123mg	10	20.0	9.3	14.5	1.2

* a) Hydrolysis of RNA : 10 mg of a RNA sample was hydrolyzed with 2 ml of 1 N HCl at 100°C for 1 hour.

b) Solvent for chromatography : To 65ml of isopropanol, concentrated hydrochloric acid was added to give a final concentration of 2 N.

The solution was made up to a total volume of 100 ml with distilled water.

Fig. 2 Comparison of UV-absorption spectra of the supernatants obtained after 3-hour incubation of A, B and C suspensions shown in Fig. 1

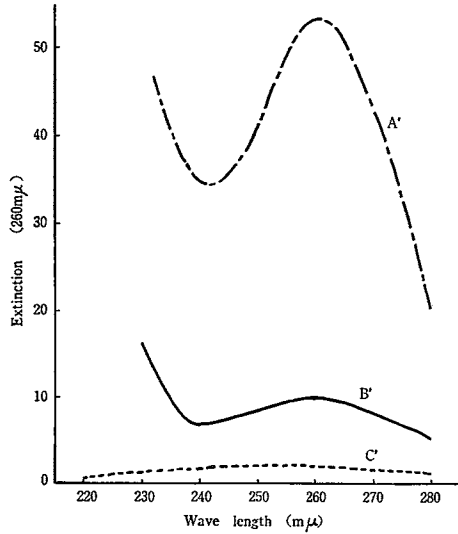
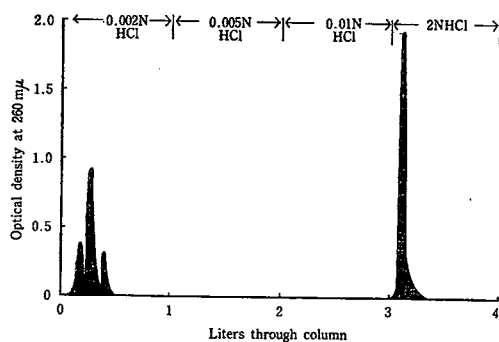


Table 2 Showing the appearance of 260 mμ-absorbing substances and streptolysin S in supernatant of a [carcinoma cells + hemolytic streptococci] suspension, and the loss of invasion power of carcinoma cells to mice in relation to incubation time of the suspension

Suspension	Time of incubation at 37°C after	Test upon supernatant		Mouse inoculation experiment with suspension			
		O.D. at 260mμ	Hemolytic activity (H.U./ml)	Number of survivors/test mice after			
				10days	30days	50days	75days
[Carcinoma cells + hemolytic streptococci]	0 min.	2.1	< 2	8/8	0/8	•	•
	60 min.	5.8	14	7/8	0/8	•	•
	90 min.	12.7	36	8/8	3/8	3/8	3/8
	120 min.	26.5	79	8/8	7/8	5/8	5/8
	180 min.	52.0	38	8/8	8/8	5/8	5/8
[Carcinoma cells alone] (Control)	0 min.	2.2	0	8/8	0/8	•	•
	60 min.	4.5	0	8/8	0/8	•	•
	90 min.	5.1	0	8/8	1/8	0/8	•
	120 min.	7.0	0	7/8	0/8	•	•
	180 min.	8.5	0	8/8	0/8	•	•

Fig 3 Column-chromatography of the acid-soluble portion



Exchanger : Dowex 1 ($\times 2$) (C1), 2.8 cm \times 11 cm.
Solutions : 0.002 N HCl - 2 N HCl solutions, 0.5 ml/min.
Sorbed material : 504 mg of acid-soluble portion dissolved in
10 ml of deionized water.