

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	原 田 道 彦
論文審査担当者	主 査 谷口俊一郎 副 査 竹下敏一・伊藤研一
<p>論文題目</p> <p style="text-align: center;">Obligate Anaerobic <i>Lactobacillus Casei</i> KJ686 Selectively Targets Solid Tumors and Exhibits an Antitumor Effect</p> <p style="text-align: center;">(偏性嫌気性菌 <i>Lactobacillus casei</i> KJ686は固形癌を選択的に標的とし、抗腫瘍効果を発揮する)</p>	
<p>(論文の内容の要旨)</p> <p>【目的】今回、細胞壁の多糖類がビフィズス菌より少ないため、細胞壁が薄く、菌体内で産生されたタンパク質などがより分泌されやすいと推測されるカゼイ菌に注目した。カゼイ菌はその細胞質分画やタンパク質、ペプチドグリカンが培養細胞で腫瘍の増殖を抑えるとの報告がある。しかし生体内では宿主の免疫反応を介した間接的な抗腫瘍効果は認めるものの、直接的な抗腫瘍特性は指摘されていない。通性嫌気性から偏性嫌気性へ変異したカゼイ菌が、担癌マウスの腫瘍やその培養細胞に対する影響を検討した。</p> <p>【方法】①C57BL/6(生後8週、オス)に Lewis lung carcinoma (LLC) 1×10^6 /100 μl ハンクス細胞浮遊液を皮下注射し、LLC 担癌マウスを作成した。通性嫌気性菌であるカゼイ菌 ATCC393 の変異菌にエリスロマイシン耐性遺伝子のみを組み込んだ偏性嫌気性菌カゼイ菌 KJ686 がある。これを 37°Cで嫌気性条件下に MRS 液体培地にて培養し、増殖相にあるカゼイ菌 KJ686 5×10^8 c. f. u/100 μl PBS(-)を腫瘍径 5mm となった LLC 担癌マウスに 1日1回、2日間尾静注した。②カゼイ菌 KJ686 を 1×10^{10} c. f. u/ml DMEM に調整した生菌と、それを 95°C90 分間加熱処理した死菌を作成し、$1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ c. f. u/well の濃度で 96well plate の培養細胞 LLC 1×10^4/well に加え 24 時間培養した。③カゼイ菌 KJ686 を DMEM 培地で 24 時間嫌気培養した後、培養液上清を分離した。培養上清は遠心分離フィルターにより 100kDa 以上、100-50kDa、50-10kDa、10kDa 以下の分画に分離した。これらを元の培養上清と同じ濃度に希釈したのち 6well plate の培養細胞 LCC 500/well に加え 8 日間培養細胞増殖への影響を調べた。さらに 1kDa 以下の分画を水層と有機層に分けて同様に培養細胞 LLC に加えて 8 日間培養した。</p> <p>【結果】①カゼイ菌 KJ686 を尾静注後 5 日目以降において有意な腫瘍増殖抑制抗効果を認めた。投与 17 日目においても腫瘍組織にカゼイ菌 KJ686 を認めたが、正常組織には認めなかった。グラム染色にてカゼイ菌 KJ686 は腫瘍組織と壊死部との境界に小集塊状に認めたが、この境界部分でのサイトカイン (IL-2, IL-4, IL-12p, IL-1β, IFN-γ) の RNA の発現は認めなかった。また血清中のサイトカインについて投与 3 日目と 9 日目に評価したところ IL-1β が投与 3 日目に増加していたのみで、腫瘍組織での NK 細胞数の増加など宿主免疫反応は認めなかった。②生菌では $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ c. f. u/well の濃度で抗腫瘍効果を認めたのに対して死菌では 1×10^8 c. f. u/well でも抗腫瘍効果は認めなかった。グラム染色では生菌も死菌も同様の染色性を示した。このことはカゼイ菌 KJ686 の生菌そのものや何らかの産生物が抗腫瘍効果をもたらすことを示唆すると思われた。また乳酸菌培養時の培地の pH は約 4.0 であるため、乳酸により pH4.0 とした培地で LCC を培養したが、抗腫瘍効果は認めなかった。③培養上清の各分画のうち 10kDa 以下の分画のみで元の培養上清と同等の抗腫瘍効果を示した。さらに 1kDa 以下の分画の有機層では抗腫瘍効果は認めなかったものの、水層において 1kDa 以下の分画と同等の抗腫瘍効果を認めた。またこの分画は 100°C 1 分加熱処理した後も同様の抗腫瘍効果を認めた。</p> <p>【結論】LCC 担癌マウス C57BL/6 においてのカゼイ菌 KJ686 の抗腫瘍効果は、宿主免疫を刺激する間接的な効果よりもカゼイ菌 KJ686 が産生した 1kDa 以下の水溶性物質による直接的な効果によるものの寄与が大きいと考えられた。</p>	

