

Azoxymethane 誘発大腸腫瘍発生に対する Bio-three
(*Streptococcus faecalis*, *Bacillus mesentericus*, *Clostridium*
butyricum) 経口投与の抑制効果

富山医科薬科大学第2外科

山 本 克 弥

①

Azoxymethane 誘発大腸腫瘍発生に対する Bio-three (Streptococcus faecalis,
Bacillus mesentericus, Clostridium butyricum) 経口投与の抑制効果

山本克弥、田沢賢次、坂本憲市、藤巻雅夫

富山医科薬科大学医学部第2外科 ・細菌免疫

要 旨

今回、整腸作用を有し乳酸菌等を腸内で増殖させる3種菌株 (Streptococcus faecalis, Bacillus mesentericus, Clostridium butyricum) の Azoxymethane (AOM) 誘発大腸腫瘍に対する効果を検討した結果、AOM (7.4mg/kg S.C. 11週間) を投与した対照群の腫瘍発生率が90%であるのに対して、3種菌株の生菌をAOM投与開始と同時に週2回、15週間経口投与したところ腫瘍発生率が56.5%と有意な減少が認められた。発生腫瘍個数においても2.6個が0.96個と有意に減少した。

この抑制の機序を検討するためにまず、3種菌株のホルマリン死菌を用いて免疫系におよぼす影響を液性免疫、細胞性免疫、NK細胞活性、活性化マクロファージについて検討したところ、著明なNK細胞活性の賦活化が観察された。一方、誘発実験における脾のNK細胞活性の経時的变化を検討した結果、無処置の対照群に対するAOM投与群の活性の低下以上に3種生菌を同時に経口投与した群のNK細胞活性は低値であった。

腸内細菌叢について検討した結果、AOM単独群では投与開始15週目からEnterobacteriaceaeの増加が認められたが、AOM+3種生菌投与群ではその増加がなかった。

以上の結果から、AOM誘発大腸腫瘍の発生においてNK細胞がその主な監視機構とならないこと、および3種生菌による腸内細菌叢の変化が抑制的に働いていることの2点を明らかにした。

はじめに

腸内細菌叢は加齢や生活環境の変化とともに変化し、宿主にさまざまな影響を与えることが知られている。特に母乳で養育された乳幼児では乳酸菌およびビフィズス菌が優位構成菌種である。それらは乳酸産生菌であり、腸管感染に対する防御や宿主の免疫能等の抵抗力の維持に有効と考えられているが、加齢とともに優位構成菌種ではなくなる^{1, 2, 3)}。

これまでに、食生活による腸内細菌叢の変化や、食物の体内代謝産物、および腸内細菌叢による代謝産物などが消化管の発癌誘発物質となる可能性が報告されている^{4, 5)}。さらに、ソテツの実の成分であるサイカシンが通常ラットの肝、腎、肺、および腸管に腫瘍を誘発するのに対して、無菌ラットでは腫瘍を誘発しないことを Laqueur⁶⁾が証明して以来、腸内細菌叢のうちのあるものが、発癌促進に関与していることが考えられてきた。

今回用いた3種菌株 (*S. faecalis*, *B. mesentericus*, *C. butyricum*)の生菌は、独特の共生作用を示し、腐敗菌・病原菌等の有害菌の増殖を抑制し、ビフィズス菌等の乳酸産生菌の増加を促し腸内細菌叢の異常を改善するとされている⁷⁾。そこでこの3種菌株のAzoxymethane (以下AOM)誘発大腸腫瘍の発生に対する効果について検討した。

材 料 と 方 法

1. 使用動物

6-8週齢体重170-180gの雄性ドンリュウラット（静岡県実験動物農業協同組合）を用いた。感染動物室（温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ ）にて固形資料（CE-2日本クレア株式会社）を与え自由給水下に飼育した。また、6週齢の雄性ICRマウス、BALB/cマウス、C3H/Heマウス（静岡県実験動物農協協同組合）は一般飼育室にて飼育した。

2. 使用菌株

今回試験に供した菌株は生菌整腸製剤ビオスリー（Bio-three:B-3）に配合されている *Streptococcus faecalis* T-110, *Bacillus mesentericus* T0-A, *Clostridium butyricum* T0-A, であり、それらの生菌、ホルマリン死菌、細胞壁を用いて検討した。これらの菌株は東亜薬品工業株式会社より提供を受けた。

3. AOM誘発大腸腫瘍に対する抑制効果

大腸腫瘍はドンリュウラットにAOM(Sigma社)7.4mg/kgを背部皮下に週1回、連続11週間注射して誘発した⁸⁾。誘発抑制の検討は、AOM投与開始と同時に3種菌株の合剤（ラット1匹当り生菌 3×10^9 個：死菌 3×10^8 個：細胞壁100 μg ）を週2回ゾンデで15週間経口投与して行った。AOM投与開始後30週で犠死解剖して腫瘍の発生の有無、発生個数および大きさを比較した。なお、腫瘍の大きさは長径×短径の面積で表した。

4. プラーク検定法

プラーク検定法は Cunningham および Szenberg⁹⁾の方法にしたがって行った。すなわち免疫は 5×10^8 個の緬羊赤血球 (sheep red blood cell; 以下 SRBC) を ICR マウスの尾静脈内に投与して行い、免疫後5日後の脾のプラーク数を測定した。マウス脾を無菌的に摘出し、イーグル MEM 培地 (日水製薬株式会社) 中で細切し #200 ステレンス メッシュ を用いて濾過しイーグル MEM 培地で1回洗浄後 5×10^6 個/ml に調整した。この脾細胞 0.1ml と 20%SRBC 0.1ml と 補体 0.1ml を 0.7ml のイーグル MEM 培地に混和し、これをチャンバーに注入、 37°C 5% CO_2 インキュベーターで45分間培養し、1脾当たりのプラーク数を算出した。被検体は免疫の前あるいは後に連続5日間静脈内投与した。担癌マウスにおける検討は Ehrlich 腹水腫瘍細胞 10^6 個を皮下移植後21日目に免疫した。

5. 足底反応

SRBC に対する足底反応 を Nelson および Mildenhall¹⁰⁾の方法で行った。すなわち、ICR マウスの背部皮下に10% SRBC 0.2ml でもって免疫した後1週目、左足底皮内に20%SRBC 0.05ml でチャレンジした。チャレンジ24, 48 時間後にダイヤル型皮厚計 (尾崎製作所) で足の腫脹を計測して、下記の式で腫脹率を算出した。被検体は免疫の前あるいは後に連続7日間静脈内投与した。担癌

マウスにおける検討は Ehrlich 腹水腫瘍細胞 10^6 個を皮下移植後 21 日目に免疫した。

$$\text{腫脹率} = \frac{b-a}{a} \times 100$$

a: 右足底の背腹方向の厚さ (対照部位) b: 左足底の背腹方向の厚さ (反応部位)

6. ナチュラル キラー (NK) 細胞活性の測定

脾 NK 細胞分画は、C3H/He マウス より脾臓を無菌的に摘出し、RPMI1640 培地 (日水製薬株式会社) +10% 胎児ウシ血清 (fetal calf serum; 以下 FCS) 培地中で細切した。その後、#200 ステンレスメッシュを通過させた後、0.83% NH_4Cl トリス緩衝液で 4°C 5 分間処理して赤血球を破壊除去し、ついでリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline; 以下 PBS) (日水製薬株式会社) で 2 回、RPMI1640 培地で 1 回洗浄した。この細胞浮遊液に単球除去用試薬; KAC-2 (日本抗体研究所) と新鮮自家血清をそれぞれ 10% になるように混和し、 37°C 45 分間処理して単球および多核球に貪食させた。それをを Ficoll-paque (Pharmacia) に重層、3000rpm (500G) 30 分間遠心し、中間層を採取し、洗浄後 RPMI1640 培地 + FCS に浮遊させて NK 細胞分画として用いた¹¹⁾。

標的細胞として YAC-1 を用いた。定法¹²⁾に従い RPMI 1640 培地 +10% FCS 中に浮遊させた細胞 10^7 個/ml の YAC-1 1ml 中に ^{51}Cr を 3.7MBq を加え、5% CO_2 ガス下で 37°C 60 分

間培養して標識した。効果細胞と標的細胞は、96穴平底プレート(Corning)にそれぞれ100 μ l(E:T比50:1および25:1)分注し4時間培養した。上清中に遊出した ^{51}Cr をSkatron上清回収装置を用いて回収し、Autowellカウンター(アロカ製作所)にて放射活性を測定した。測定は3回行い、平均値を用いた。なお、%細胞障害性は次式にて計算した。

% 細胞障害性

$$= \frac{\text{実測 cpm} - \text{自然 cpm}}{\text{最大 cpm} - \text{自然 cpm}}$$

最大 cpm は反応終了前30分に1N HClを加えた時の cpm で、自然 cpm は効果細胞を加えずに培養したときの cpm である。

7. 腹腔マクロファージ(M ϕ)の抗腫瘍活性

腹腔M ϕ はマウス腹腔にハンクス液(日水製薬株式会社)を5ml注入し、弱くマッサージ後腹腔滲出細胞(peritoneal exudate cell;以下PEC)を回収し、細胞 10^7 ~ 10^8 個/mlに調整して、プラスチックシャーレ内に浮遊させ37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 ガス下に90~120分放置後、付着細胞をM ϕ 分画として用いた。

抗腫瘍活性の検討は変法腫瘍中和試験¹³⁾に従って行った。すなわちあらかじめMeth-A細胞 2×10^6 個/mlと3種ホルマリン死菌体の合剤 3×10^8 個を3日前および5日前に2回腹腔内投与されたBALB/cマウスのM ϕ 2×10^7 個/mlを

等量混和し1時間作用させた後マウス腹腔内に0.1mlを移植し、さらに同様に3種ホルマリン死菌で処理したMφを2日後および4日後に腹腔内投与してその抗腫瘍性をマウスの生存期間で検討した。対照としては無処置の同系マウスから回収したMφを用いた。

8. 腹腔Mφの細胞障害活性

活性化Mφの測定¹⁴⁾は標的細胞としてP-815およびEL-4を用いて行った。NK細胞活性測定の時と同様に⁵¹Crで標識し、効果細胞と標的細胞(それぞれ5:1および10:1)は、24時間培養し、%細胞障害性を測定した。

9. 腸内細菌叢の検索

検体の採取はラットをエーテル麻酔下に開腹し、肛門側結腸または口側結腸から糞便を採取し、個体別にただちに菌検索に供された。菌検索は1.0gの糞便を9.0mlのFluid thioglycollate培地(DIFCO)に混和後、4.5mlの嫌気性菌用希釈液¹⁵⁾で炭酸ガスを噴射しながら無酸素の状況下で 10^{-8} まで希釈し、必要な数段階の希釈度の0.1mlを分離培地に塗布培養した。総菌数は変法VL-G培地¹⁵⁾を用いロールチューブ法で37°C 3日間培養して算出した。各菌種の分離培地はGAM寒天培地、バクテロイデス(BACT)培地、変法FM培地(以上、日水製薬株式会社)、LBS培地(BBL)、ES培地¹⁶⁾、BS培地¹⁶⁾、RCN寒天培地¹⁶⁾は室温触媒法で37°C 2日間嫌気培養を行い、ハートインフージョン(HI)寒天培地、マッコ

ンキー寒天培地、マンニット食塩培地（以上、日水製薬株式会社）、NAC寒天培地（栄研）は好氣的に37℃24時間、EF寒天培地（日水製薬株式会社）は好氣的に37℃48時間培養して行った。さらに芽胞形成をした Clostridium および Bacillus の培養は被検体を75℃15分間熱処理し、それぞれGAM寒天培地およびHI寒天培地を用いて行った。

菌種の同定はグラム染色性と形態、GAM寒天培地における好気発育の有無、BACT培地および変法FM培地での発育およびグルコースの代謝産物のガスクロマトグラム¹⁷⁾により行った。

大腸内の腸内細菌叢の経時的变化は無処置群、AOM投与群、3種生菌投与群、AOM+3種生菌投与群の4群に分け、AOM投与開始後、7、15、22、30週で検索した。各群8-11匹の腸内細菌叢を検索した。菌数は糞便1g当たりの菌数を常用対数値で示した。

10. 有意差検定

大腸腫瘍発生率の検定には χ^2 テストを用い、その他の検定にはStudentのtテストを用いた。

成 績

1. AOM誘発大腸腫瘍に対する3種菌株の抑制効果

Table 1 に示す成績は3回の実験結果をまとめたものであるが、腫瘍発生率は対照群の45/50(90.0%)に対して、

生菌投与群 26/46 (56.5%), 死菌投与群 14/20 (70.0%), 細胞壁投与群 16/20 (80%) であり、生菌投与群において有意な腫瘍誘発抑制が認められた ($P < 0.01$)。一匹あたりの平均腫瘍数 (Frequency) は対照群の 2.60 個に対し、生菌投与群 0.96 個と、有意な減少が認められた ($P < 0.01$)。対照群と死菌投与群との間には有意差は認められなかったが、細胞壁投与群との間には有意差を認めた ($P < 0.05$)。腫瘍が発生した個体あたりの平均腫瘍数 (Multiplicity) においても対照群の 2.89 個に対し、生菌投与群 1.69 個と減少が認められた ($P < 0.01$)。腫瘍 1 個あたりの大きさについて検討すると対照群といずれの群との間にも有意な差は認められなかった。病理組織学的検討では、すべての群においてそのほとんどが高・中分化腺癌であり低分化腺癌が若干認められ、その構成頻度には差はなかった (Fig. 1)。

2. プラーク検定法

非担癌マウスにおいて、SRBC の免疫前または後に 3 菌種のホルマリン死菌を投与し、対照群 1 脾当たりのプラーク数 1.3×10^5 個に対する百分率で示した場合プラーク数はそれぞれ 135%, 130% と増加を示した。3 週前に Ehrlich 腹水腫瘍細胞 10^6 個を背部皮下に接種した担癌マウスのプラーク数は 78% と減少を示したが、3 菌種ホルマリン死菌を投与するとそれぞれ 95%, 114% と回復した (Fig. 2)。OK-432 の投与では今回用いた 3 菌種より

著明な液性免疫の賦活化を認めた。

3. 足底反応

非担癌マウスにおいて、対照群の腫脹は18.2%であったのに対して、免疫前に3菌種ホルマリン死菌の投与で20.0%と差を認めなかったが、免疫後の投与で32.3%と有意な反応の増強($P < 0.01$)が認められた。OK-432の免疫前投与の腫脹は29.3%、免疫後投与では21.4%と平均値は増加したが、有意差はなかった。また、3菌種ホルマリン死菌は担癌での反応性の低下を回復した(Fig. 3)。

4. 非担癌状態における脾細胞のNK細胞活性

3種ホルマリン死菌(各々 10^8 個)をC3H/Heマウスに静脈内投与後1, 3, 5, 7日の脾細胞のNK細胞活性を測定したところ、対照群の33.0%に対してそれぞれ81.0%, 88.9%, 54.6%, 30.7%を示し、3日目に最大値を示し、対照群の2.6倍の活性が観察された(Fig. 4)。陽性対照として検討したOK-432(1KE)も同様に賦活化が認められた。

5. 腹腔Mφの抗腫瘍活性

Mφの抗腫瘍活性は、無処置のMφ(resident Mφ)投与群では対照群と同様16-22日に全例死亡したが、3菌種死菌で処理されたMφ(primed Mφ)投与群では10例中4例の癌不形成マウスを認め(Fig. 5)、これらの菌種はtumoricidal Mφを誘導活性化させることが示唆された。

6. 腹腔Mφの細胞障害活性

生体内にて tumoricidal Mφを誘導活性化することが示されたので試験管内における細胞障害試験を検討した。3菌種ホルマリン死菌を腹腔内投与後21日後まで検討したがPEC Mφの賦活化は認められなかった (Table 2)。

7. 腸内細菌叢の変化

細菌叢の変化が腫瘍の発生に影響をおよぼすのかどうかを検討するために、経時的に大腸内細菌叢の変化を検索した。AOM投与開始15週目の細菌叢において、Enterobacteriaceaeの菌数は無処置群 6.59 ± 0.26 , AOM投与群 7.94 ± 1.34 と有意に増加し ($P < 0.01$)、AOM + 3種生菌投与群 7.01 ± 0.88 と減少 ($P < 0.05$)していた。また、22、30週目の菌叢においても同様の傾向が認められた (Fig. 6)。Streptococci 15週目の菌数は無処置群 6.52 ± 0.87 , AOM投与群 7.56 ± 1.21 ($P < 0.05$)と増加傾向にあり、AOM + 3種生菌投与群は 6.58 ± 0.57 ($P < 0.05$)とその増加はみられなかった (Fig. 7)。

考 察

疫学的には、ヒトの発癌の70-80%は環境要因によると言われ、食物はその要因の一つであり、食道、胃、腸管、肝、腎、膵、乳腺、卵巣、子宮、前立腺などに発生する癌との関係が考察されている¹⁸⁾。特に、大腸癌は、ある種の食物成分に最も密接に関連することが、疫学的ない

し実験的に明らかにされている¹⁹⁾。例えば、わが国における大腸癌の増加の要因の一つに低蛋白低脂肪高食物繊維の日本食から、高蛋白高脂肪低食物繊維の西洋食への変化があげられている^{20, 21)}。また、Galloway²²⁾らはAOM誘発大腸腫瘍の実験系において食餌性の脂肪および食物繊維の影響を検討しているが、高脂肪低繊維飼料群の発生がきわめて多く、それに対し低脂肪高繊維群での大腸癌の発生はほとんど認められなかったと報告している。

こうした食物と大腸癌発生の関係を探る研究の一つとして食物の種類による腸内細菌叢の変化をみた成績がある²³⁾。また、腸内細菌叢が宿主の免疫能に影響をおよぼしていることも報告されている^{24, 25)}。そこで、われわれは、腸内細菌叢の異常を改善するという3種菌株、*S. faecalis*, *B. mesentericus*, *C. butyricum* のAOM誘発大腸腫瘍の発生におよぼす影響を検討した。3種菌株の生菌を経口投与することにより腫瘍発生率は対照群の90.0%に対して56.5% ($P < 0.01$)、また平均腫瘍数は対照群の2.60個に対して0.96個 ($P < 0.01$)と有意な減少を認めた。この結果は3回の実験結果の平均であるが、いずれの場合も同様な成績であり再現性が示された。

この腫瘍発生率低下のメカニズムを検討するために、まず3種菌株のホルマリン死菌を用いて免疫系に及ぼす影響を検討した。液性免疫に対しては有意差はなかった

が、抗体産生細胞の増加が認められ、担癌状態での低下が回復した。細胞性免疫に対しては、免疫の後に3種菌株のホルマリン死菌を投与することによりその反応を増強し($P < 0.01$)、担癌状態での低下($P < 0.01$)を対照群のレベルまでもどした($P < 0.05$)。また、明らかな脾のNK細胞活性の賦活化が認められ、成績には示さなかったが、腹腔内投与時のPECのNK細胞活性も対照群に比べ3倍に増強されていた。また、生体内でtumoricidal Mφの誘導が認められたが、試験管内ではその活性の賦活化は示されなかった。この相違は現在検討中である。

死菌によってもたらされたこれらの免疫賦活作用が、同じ3種菌株の生菌を経口投与することによって腸管免疫を介した全身免疫の賦活化の可能性が期待された。ところが3種菌株の生菌を4回経口投与したときの脾細胞のNK細胞活性は増強されず、むしろ低下傾向にあった(Table 3)。さらに、AOM投与開始から22週まで2週おきに無処置群、AOM投与群、AOM+3種菌株投与群、3種菌株投与群の4群に分け、脾のNK細胞活性(Fig. 8.)を検討すると、AOM+3種生菌投与群ではAOM投与群のそれよりも強く低下することが判明した。この結果は3種死菌体の静脈内投与の成績およびこれまでにわれわれが報告してきた結果^{26, 27)}とは相反するものであった。しかし、NK細胞活性の増強が常に発癌を抑制するものではないようで、Wei-Zen Weiら²⁸⁾は、N

K細胞活性を増強させると乳腺の前腫瘍性病変から腫瘍への変化の頻度をあげると報告している。従って、NK細胞だけで、発癌機構を論ずることはできないが、今回の結果ではラットAOM誘発大腸腫瘍実験の場合、NK細胞が発癌の監視機構として、大きくは関与していないものと考えられる。

次に、大腸内細菌叢の変化について検討した。AOMや1,2-dimethylhydrazine(DMH)の発癌作用は腸内細菌の影響を受けていることが知られている²⁹⁻³²⁾。AOMの同族体であるDMHを用いた大腸腫瘍誘発実験において、森下ら³³⁾は無処置群に比して発癌の早期からStreptococciの菌数が増加、その後Enterobacteriaceae, C. perfringens, Bifidobacteriumが増加することを観察している。そのうちEnterobacteriaceae, C. perfringensが腫瘍の数と大きさに関係あるものと推定している。われわれの大腸内細菌叢の検索ではAOM投与開始15週目から30週目でEnterobacteriaceaeの増加が、15週目でStreptococciの増加が見られ、3種生菌がこれらを減少させていた。即ち、3種生菌投与群における腫瘍発生直前ないし早期における細菌叢の変化が腫瘍の発生に影響を及ぼしていることを示唆する結果であった。

3種生菌が大腸内細菌叢に変化を生じさせ、これが大腸腫瘍の発生を抑制したとすると、その間の機序が問題

になるが、その一つに胆汁酸代謝系の関与がありうる。腸内細菌は胆汁酸を脱抱合し、さらに一次胆汁酸より二次胆汁酸を作る酵素を産生する³⁴⁾。発癌実験において一次胆汁酸にも二次胆汁酸にも発癌を促進する作用があり、特に二次胆汁酸においてその作用が強力であることが知られている³⁵⁻³⁷⁾。胆汁酸と腸内細菌叢の関係についてはまだ十分解明されていないが^{34, 37)}、大腸癌患者では、一次胆汁酸を二次胆汁酸に変換する腸内常在細菌由来酵素の一つ、 7α -dehydroxylaseが増加し³⁸⁾、また数種の嫌気性菌が増加している³⁹⁾との報告もある。今回の結果も腫瘍を認めたラットの大腸内細菌叢で嫌気性菌の高い検出頻度が認められた。このことは今回の変化が胆汁酸代謝に影響を与えている可能性があることを示唆している。

さらに今回使用した3種菌株の一つの*C. butyricum*は腸内で酪酸を産生する。酪酸には直接結腸上皮細胞の異形成化を阻害するほか、食物繊維発酵を介して腸内pHを低下させ、二次胆汁酸の生成を阻害したり、結腸上皮細胞のアンモニア吸収を阻害することにより、大腸癌を予防している可能性のあることが報告されている⁴⁰⁾。また、T a k a d a⁴¹⁾らは腸内代謝活性酵素の一つの β -glucuronidaseの阻害剤を食餌に添加してラットに与え、A O Mで大腸腫瘍を誘発したところ大腸腫瘍の発生が低下したと報告している。このことは、大腸腫瘍誘発

抑制の機序の一つに腸内菌が産生する酵素
(β -glucosidase, β -glucuronidase, nitroreductase,
azoreductase)の関与がある可能性を考えさせる。従っ
て、今後胆汁酸代謝と細菌由来の酵素活性の両面からの
研究が必要と思われる。

お わ り に

本研究ではAOM誘発大腸腫瘍の発生にNK細胞がそ
の主な監視機構とならないこと、および腸内細菌叢の状
態が関与していることを明らかにした。これらの成績は
Bio-threeが家族性大腸腺腫症の家系における癌化の予防
をはじめ、ヒトの大腸癌の予防にも役立つ可能性のある
ことを示唆しているものと思われる。

参 考 文 献

- 1) Mitsuoka, T. and Hayakawa, K. Die faecalflora bei menschen. I. Mitteilung: Die zusammensetzung der faecalflora der verschiedenen altersgruppen. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A., 223, 333-342 (1972).
- 2) Mitsuoka, T. and Ohno, K. Die faekalflora bei menschen V. Mitteilung: Die schwankungen in der zusammensetzung der faekalflora gesunder erwachsener. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A., 238, 228-236 (1977).
- 3) Mitsuoka, T. and Kaneuchi, C. Ecology of the bifidobacteria. Am. J. Clin. Nutr., 30, 1799-1810 (1977).
- 4) Simon, G. L. and Gorbach, S. L. Intestinal flora in health and disease. Gastroenterology, 86, 174-193 (1984).
- 5) Hill, M. J. Dietary fat and human cancer. Anticancer Res., 7, 281-292 (1987).
- 6) Laqueur, G. L. Carcinogenic effects of cycad meal and cycasin, methylazoxymethanol glycoside, in rats and effects of cycasin in germfree rats. Fed. Proc., 23, 1386-1388 (1964).
- 7) Yoshioka, H., Tasaka, Y., Nishimura, M., Tasaka, S. and Fukui, S. Effects of so-called viable lactic acid bacteria preparations on infantile fecal flora. Pediatric Clin. Med., 14, 281-283 (1966). (in Japanese)
- 8) Ward, J. M., Ymamoto, R. S. and Brown, C. A. Pathology of intestinal neoplasms and other lesions in rats exposed to azoxymethane. J. Natl. Cancer Inst., 51, 1029-1039 (1973).
- 9) Cunningham, A. J. and Szenberg, A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. Immunology, 14, 599-600 (1968).

- 10) Nelson, D. S. and Mildenhall, P. Studies of cytophilic antibodies: 1. The production by mice of macrophage cytophilic antibodies to sheep erythrocytes: Relationship to the production of other antibodies and the development of delayed-type hypersensitivity. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 45, 113-130 (1967).
- 11) Kumagai, K., Itoh, K., Suzuki, R., Hinuma, S. and Saitoh, F. Studies of murine large granular lymphocytes. I. Identification as effector cells in NK and K cytotoxicities. *J. Immunol.*, 129, 388-394 (1982).
- 12) Kalland, T. Interleukin 3 is a major negative regulator of the generation of natural killer cells from bone marrow precursors. *J. Immunol.*, 137, 2268-2271 (1986).
- 13) Fujiwara, H., Hamaoka, T., Shearer, G. M., Yamamoto, H. and Terr, W. D. The augmentation of in vitro and in vivo tumor-specific T cell-mediated immunity by amplifier T lymphocytes. *J. Immunol.*, 124, 863-869 (1980).
- 14) Yamamoto, S. and Tokunaga, T., In vitro cytotoxicity of peritoneal macrophages activated with Mycobacterium smegmatis. *Microbiol. Immunol.*, 22, 27-40 (1978).
- 15) Hungate, R. E. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 14, 1-49 (1950).
- 16) Mitsuoka, T. "A color atlas of anaerobic bacteria" pp. 319-327 (1980). Soubunsha, Tokyo. (in Japanese)
- 17) Holdeman, L. V., Cato, E. P. and Moore, W. E. C. "Anaerobic Laboratory Manual," 4th Ed., pp. 1-152 (1977). Anaerobe Laboratory Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg.
- 18) Habs, M. and Schmähl, D. Diet and cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 96, 1-10 (1980).
- 19) Wynder, E. L. The epidemiology of large bowel cancer. *Cancer Res.* 35, 3388-3394 (1975).

- 20) Tajima, K. and Tominaga, S. Dietary habits and gastro-intestinal cancers: A comparative case-control study of stomach and large intestinal cancers in Nagoya, JAPAN. *Jpn. J. Cancer Res.*, 76, 705-716 (1985).
- 21) Tajima, K., Hirose, K., Nakagawa, N., Kuroishi, T. and Tominaga, S. Urban-rural difference in the trend of colo-rectal cancer mortality with special reference to the subsites of colon cancer in JAPAN. *Jpn. J. Cancer Res.*, 76, 717-728 (1985).
- 22) Galloway, D.J., Owen, R.W., Jarrett, F., Boyle, P., Hill, M.J. and George, W.D. Experimental colorectal cancer: The relationship of diet and faecal bile acid concentration to tumor induction. *Br. J. Surg.*, 73, 223-237 (1986).
- 23) Hoffmann, K. Untersuchungen über die Zusammensetzung der Stuhlflora während eines langdauernden Ernährungsversuche mit kohlenhydratreicher, mit fettreicher und mit eiweissreicher Kost. *Zbl. Bakteriol. (Orig. A)* 192, 500-508 (1964).
- 24) MacDonald, T.T. and Carter, P.B. Requirement for a bacterial flora before mice generate cells capable of mediating the delayed hypersensitivity reaction to sheep red blood cells. *J. Immunol.* 122, 2624-2629 (1979).
- 25) Yamazaki, S., Kamimura, H., Momose, H., Kawashima, T. and Ueda, K. Protective effect of Bifidobacterium-monoassociation against lethal activity of Escherichia coli. *Bifidobacteria Microflora* 1, 55-59 (1982).
- 26) Yamashita, I., Tazawa, K., Kasagi, T., Masutama, K., Takemori, S., Kastuyama, S., Yamamoto, K., Arai, H., Suzuki, Y., Maeda, M., Honda, T., Fujimaki, M. Inhibitory effects of OK-432-MCT-emulsion administered orally in colon carcinogenesis induced by azoxymethane in rats. *Biotherapy*, 2, 952-958 (1988).

- 27) Yamashita, I., Tazawa, K., Kasagi, T., Ishizawa, S., Masutama, K., Yamamoto, K., Arai, H., Takemori, S., Kastuyama, S., Suzuki, Y., Fujimaki, M., Kawagoshi, T., Maeda, M., Honda, T. Inhibitory effects of intrarectally administered indomethacin on colon carcinogenesis induced by azoxymethane in rats: Augmentation of natural killer activity and comparison with oral administration of indomethacin. *J. Lpn. Soc. Colo-proctol.*, 42, 346-351(1989).
- 28) Wei, W. Z., Folton, A., Winkelhake, J. and Heppner, G. Correlation of natural killer activity with tumorigenesis of a preneoplastic mouse mammary lesion. *Cancer Res.*, 49, 2709-2715(1989).
- 29) Reddy, B. S., Narisawa, T., Wright, P., Vukusich, D., Weisburger, J. H. and Wynder, E. L. *Cancer Res.*, 35, 287-290(1975).
- 30) Mizutani, T., Yamamoto, T., Ozaki, A., Oowada, T. and Mitsuoka, T. Spontaneous polyposis in the small intestine of germ-free and conventionalized BALB/c mice. *Cancer Letters*, 25, 19-23(1984).
- 31) Mizutani, T. and Mitsuoka, T. Effect of intestinal bacteria on incidence of liver tumors in gnotobiotic C3H/He male mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 63, 1365-1370(1979).
- 32) Mizutani, T. and Mitsuoka, T. Inhibitory effect of some intestinal bacteria on liver tumorigenesis in gnotobiotic C3H/He male mice. *Cancer Letters*, 11, 89-95(1980).
- 33) Morishita, Y. and Tsukada, T. Changes in the intestinal microflora in association with colon tumorigenesis in rats treated with 1,2-dimethylhydrazine hydrochloride. *Microbiol. Immunol.* 27, 485-493(1983).
- 34) Lewis, R. and Gorbach, S. Modification of bile acids by intestinal bacteria. *Arch. Intern. Med.*, 130, 545-549(1972).
- 35) Narisawa, T., Magadia, N. E., Weisburger, J. H. and Wynder, E. L. Promoting effect of bile acids on colon carcinogenesis after intrarectal instillation of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 53, 1093-1097(1974).

- 36) Reddy, B. S., Narisawa, T., Weisburger, J. H. and Wynder, E. L.
Promoting effect of sodium deoxycholate on colon adenocarcinomas
in germfree rats. J. Natl. Cancer Inst., 56, 441-442 (1976).
- 37) Reddy, B. S., Watanabe, K., Weisburger, J. H. and Wynder, E. L.
Promoting effect of bile acids in colon carcinogenesis in
germfree and conventional F344 rats. Cancer Res., 37, 3238-3242
(1977).
- 38) Mastromarino, A., Reddy, B. S. and Wynder, E. L. Metabolic
epidemiology of colon cancer: Enzymic activity of fecal flora.
Am. J. Clin. Nutr., 29, 1455-1460 (1976).
- 39) Aries, V., Crowther, J. S., Drasar, B. S., Hill, M. J. and
Williams, R. E. O., Bacteria and the aetiology of cancer of the
large bowel. Gut, 10, 334-335 (1969).
- 40) Cummings, J. H. and Bingham, S. A. Dietary Fiber, fermentation and
Large Bowel Cancer. Cancer Surv., 6, 601-621 (1987).
- 41) Takada, H., T. Hirooka, Y. Hiramatsu and M. Yamamoto. Effect of
 β -glucuronidase inhibitor on azoxymethane-induced colonic
carcinogenesis in rats. Cancer Res., 42, 331-334 (1982).

Table 1 Effects of Bio-three on tumor induction in the colon of Donryu rats by AOM

Groups	Control	Bio-three (B-3)		
		Living cells	Killed cells	Cell wall
Prevalency	45/50 90.0%	26/46 56.5% ²⁾	14/20 70.0%	16/20 80.0%
Frequency a)	2.60±2.17 ¹⁾	0.96±1.09 ³⁾	1.85±1.87	1.50±1.24 ⁴⁾
Multiplicity b)	2.89±2.09	1.69±0.93 ³⁾	2.46±1.69	1.88±1.01
Tumor size (mm ²)	28.3±36.5	24.0±32.9	28.6±29.54	16.4±14.24

Donryu rats were injected 7.4mg/kg of AOM subcutaneously weekly for 11 weeks. At the same time of AOM injection, the rats started to be orally given the three bacterial mixture twice a week for 15 weeks. The tumor outcome was assessed at the 30th week after the first injection of azoxymethane (AOM).

a) Mean number of tumors per rat, including all the rats in each group.

b) Mean number of tumors per rat, excluding the rats without a tumor.

1) Mean±SD

2) Significant difference from the control group by χ^2 test; P<0.01.

3) Significant difference from the control group by t-test; P<0.01.

4) Significant difference from the control group by t-test; P<0.05.

Table 2
Kinetics of induction of macrophage
activation in PEC of BALB/c mice a)

Groups	Days after treatment	% cytotoxicity b)			
		P-815		EL-4	
		10:1	5:1	10:1	5:1
Control		13.9	14.4	11.1	10.7
B-3 c)	5	13.0	13.6	6.0	8.9
	7	17.9	17.2	2.8	6.7
	14	15.1	16.7	5.4	1.5
	21	19.5	18.4	3.5	1.6
OK-432	5	12.2	15.5	9.8	13.2
	7	16.5	14.1	10.2	13.2
	14	42.9	42.9	NT	NT
	21	4.2	13.3	NT	NT

a) Mice were injected intraperitoneally with 3×10^8 cells of the bacterial mixture or 1KE of OK-432.

b) Cytotoxicity was measured in 24hr assay against 2×10^4 cells of ^{51}Cr -target cells.

c) The three killed bacterial mixture of S. faecalis, B. mesentericus and C. butyricum.

NT: not tested

Table 3
 Effect of the bacterial mixture on NK activity
 in PEC and spleen cells of BALB/c mice

Groups	% cytotoxicity			
	PEC		Spleen cells	
	50:1	25:1	50:1	25:1
Control	7.3	8.3	12.9	9.3
B-3	6.3	9.7	9.9	5.9

- a) Mice were orally given the three living bacterial mixture 4 times at 7th, 5th, 3rd and 1st day prior to the cytotoxic assay.
- b) Cytotoxicity was measured against 2×10^4 cells of ^{51}Cr -YAC-1 in 4hr assay.
- c) The living bacterial mixture of S. faecalis, B. mesentericus and C. butyricum.

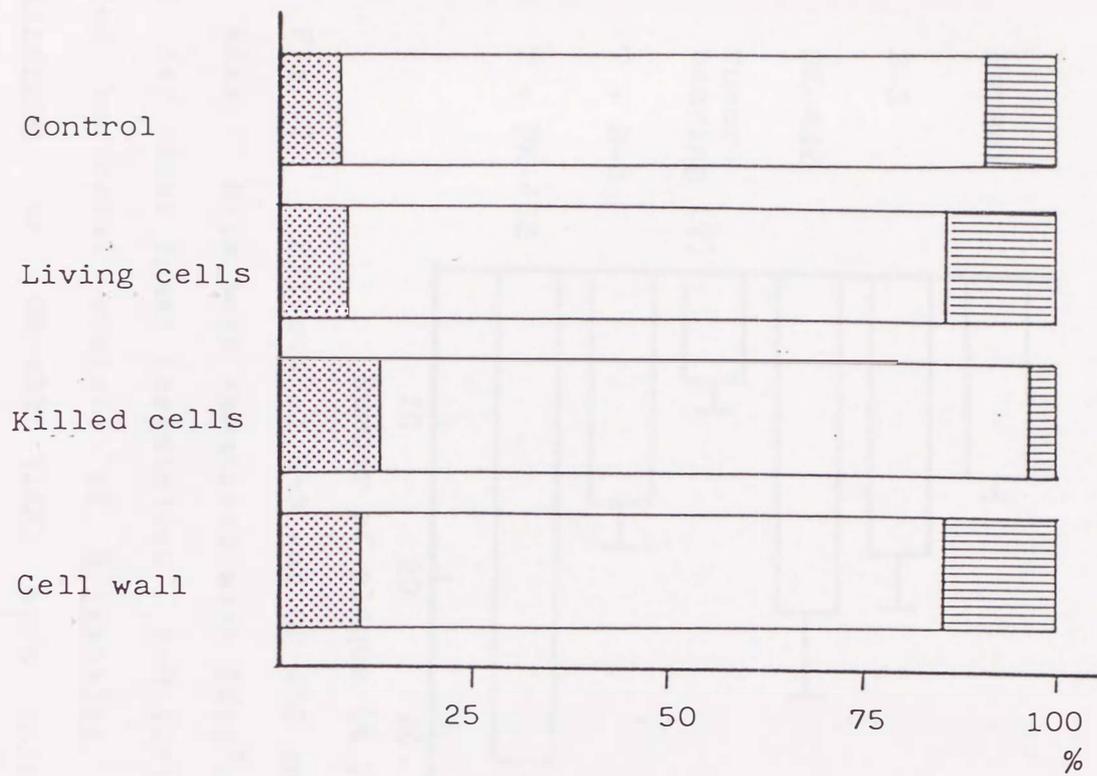


Fig. 1. Classification of tumors of the colon according to histologic appearance

:Adenoma
 :Well or moderately differentiated adenocarcinoma
 :Poorly differentiated adenocarcinoma

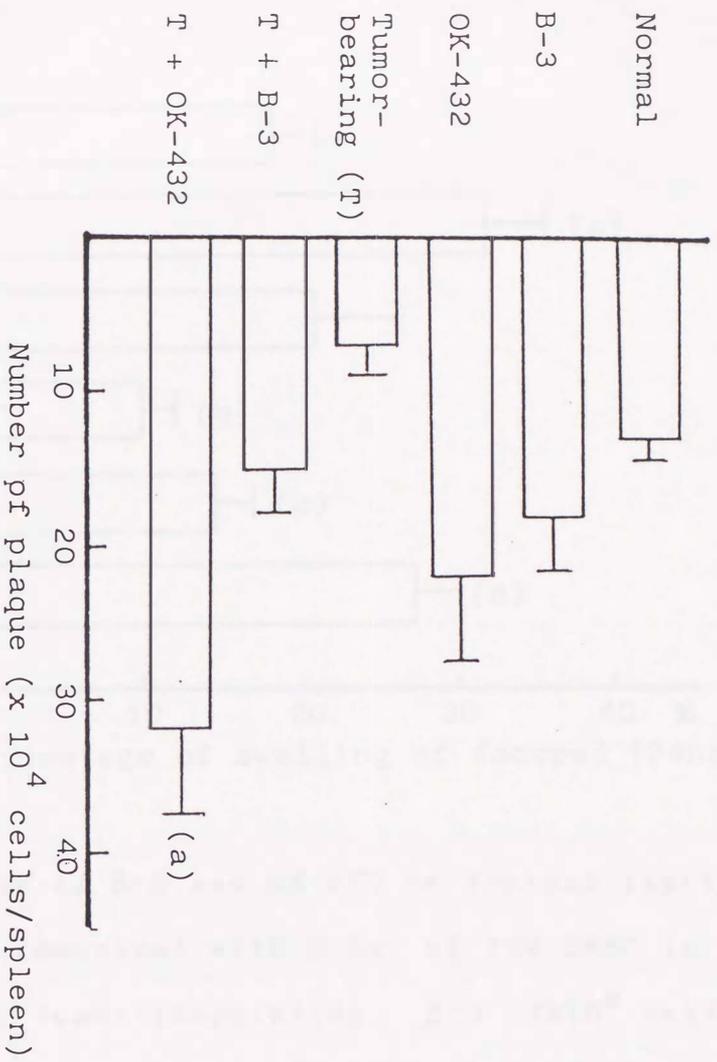


Fig. 2. Effects of B-3 and OK-432 on plaque formation in

ICR mice. Mice were immunized with 5×10^8 cells of SRBC on the 21st day after tumor inoculation. B-3 (3×10^8 cells) composed of killed bacterial mixture of *S. faecalis*, *B. mesentericus* and *C. butyricum* or OK-432 (IKE) were injected for 5 days intravenously after the immunization. Each group contained 5 animals. (a) Significant difference from the tumor-bearing group by t-test; $P < 0.01$; Bars, SE.

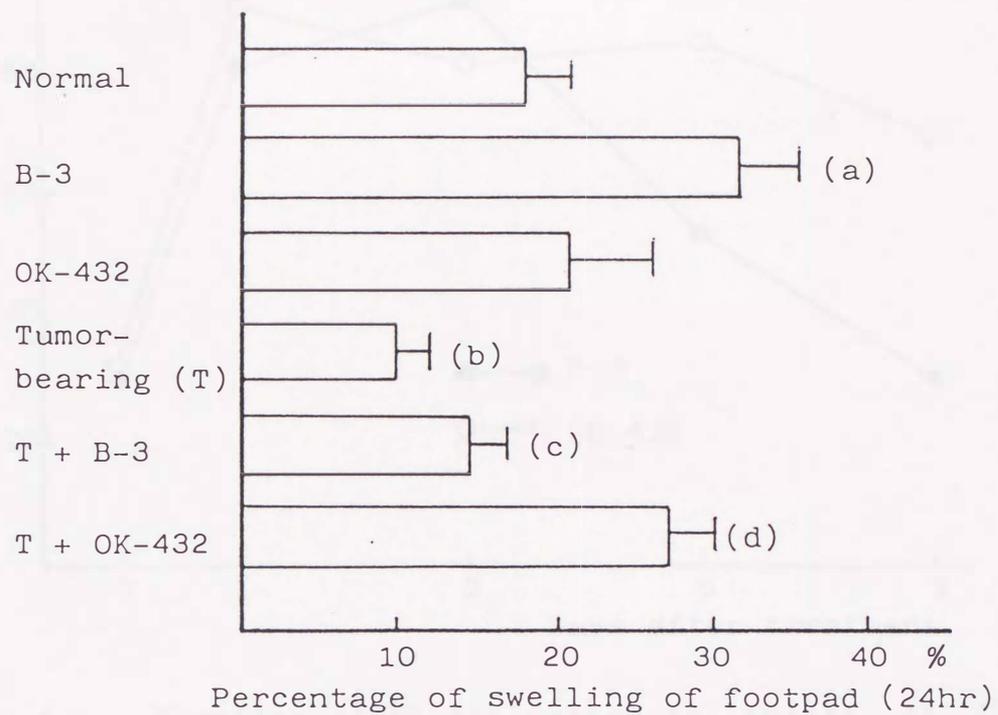


Fig. 3. Effects of B-3 and OK-432 on footpad reaction in ICR mice. Mice were immunized with 0.2ml of 10% SRBC in saline on the 21st day after tumor inoculation. B-3 (3×10^8 cells) and OK-432 (1 KE) were injected for 7 days intravenously after immunization. Each group contained 5 animals.

(a) Significant difference from normal group by t-test; $P < 0.01$.

(b) Significant difference from normal group by t-test; $P < 0.01$.

(c) Significant difference from tumor-bearing group by t-test; $P < 0.05$.

(d) Significant difference from tumor-bearing group by t-test; $P < 0.01$.

Bars, SE.

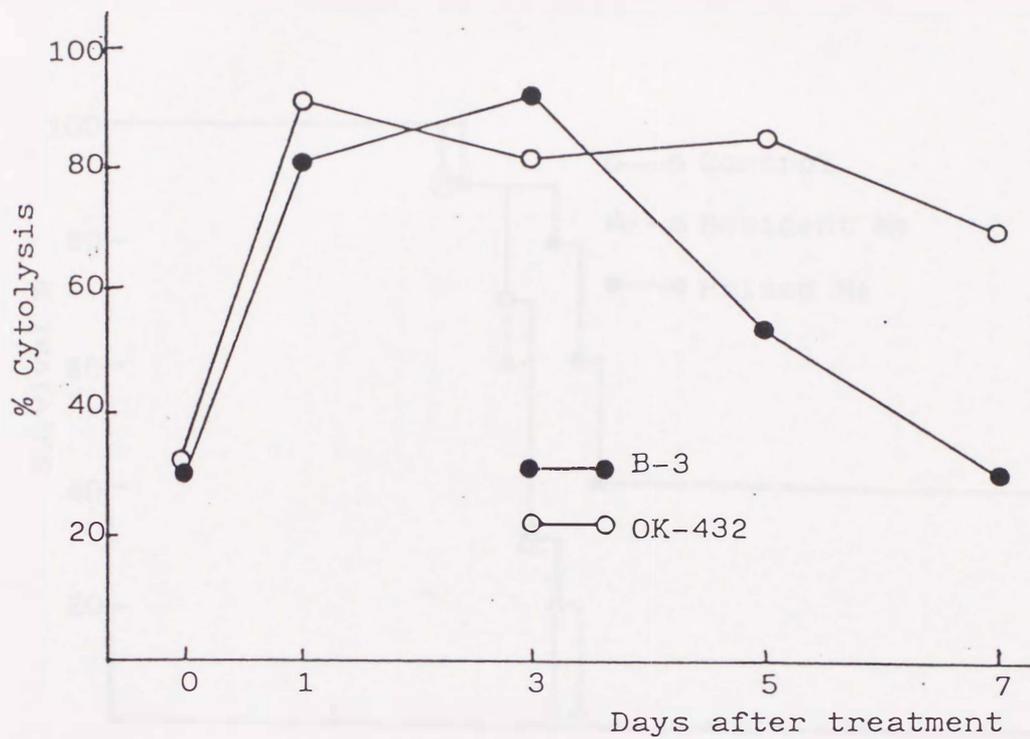


Fig. 4. Kinetics of NK activation in spleen of C3H/He mice. Mice were injected with 3×10^8 cells of B-3 or 1KE of OK-432 intravenously. NK activity in the spleen of the mice was measured against 2×10^4 cells/well of ^{51}Cr -labeled YAC-1 in 4-hr assay. E:T=50:1.

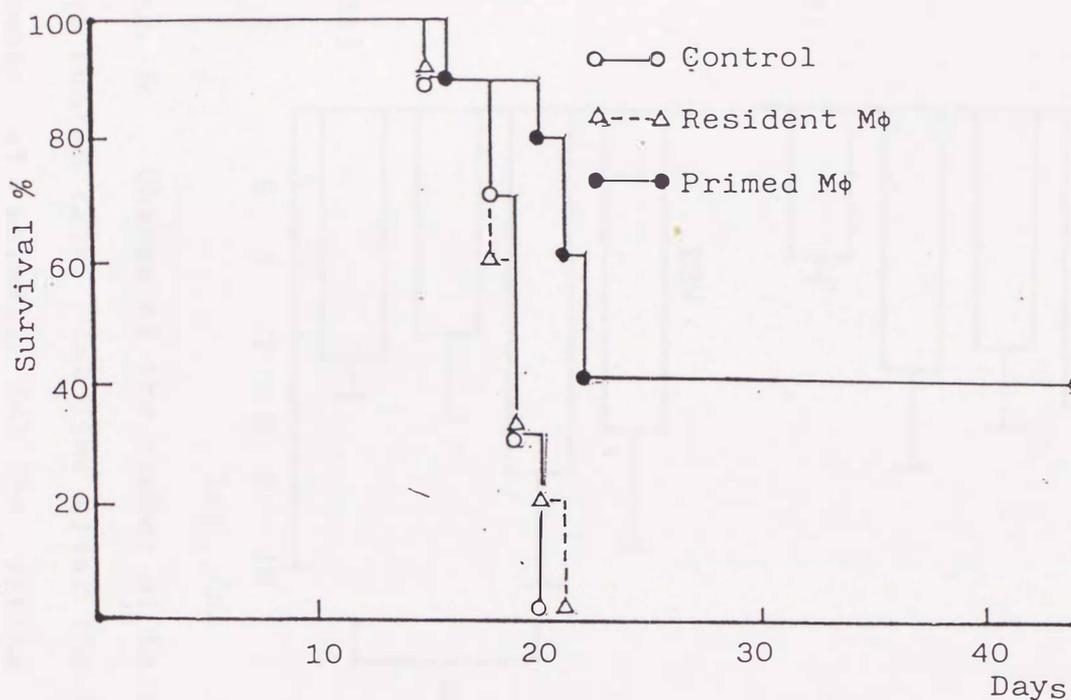


Fig. 5. Effect of peritoneal macrophage on Meth-A. Peritoneal macrophages were collected from the abdominal cavity of the mice injected B-3 (3×10^8 cells) 2 times on 5th and 3rd day before. The macrophages (2×10^7 cells/ml) were mixed with Meth-A cells (2×10^6 cells/ml) and incubated for 1hr at 37 C. Then, mice were injected with 0.1ml of the mixture intraperitoneally, and in addition, the macrophages injected intraperitoneally 2 times on 3rd and 5th day after the inoculation.

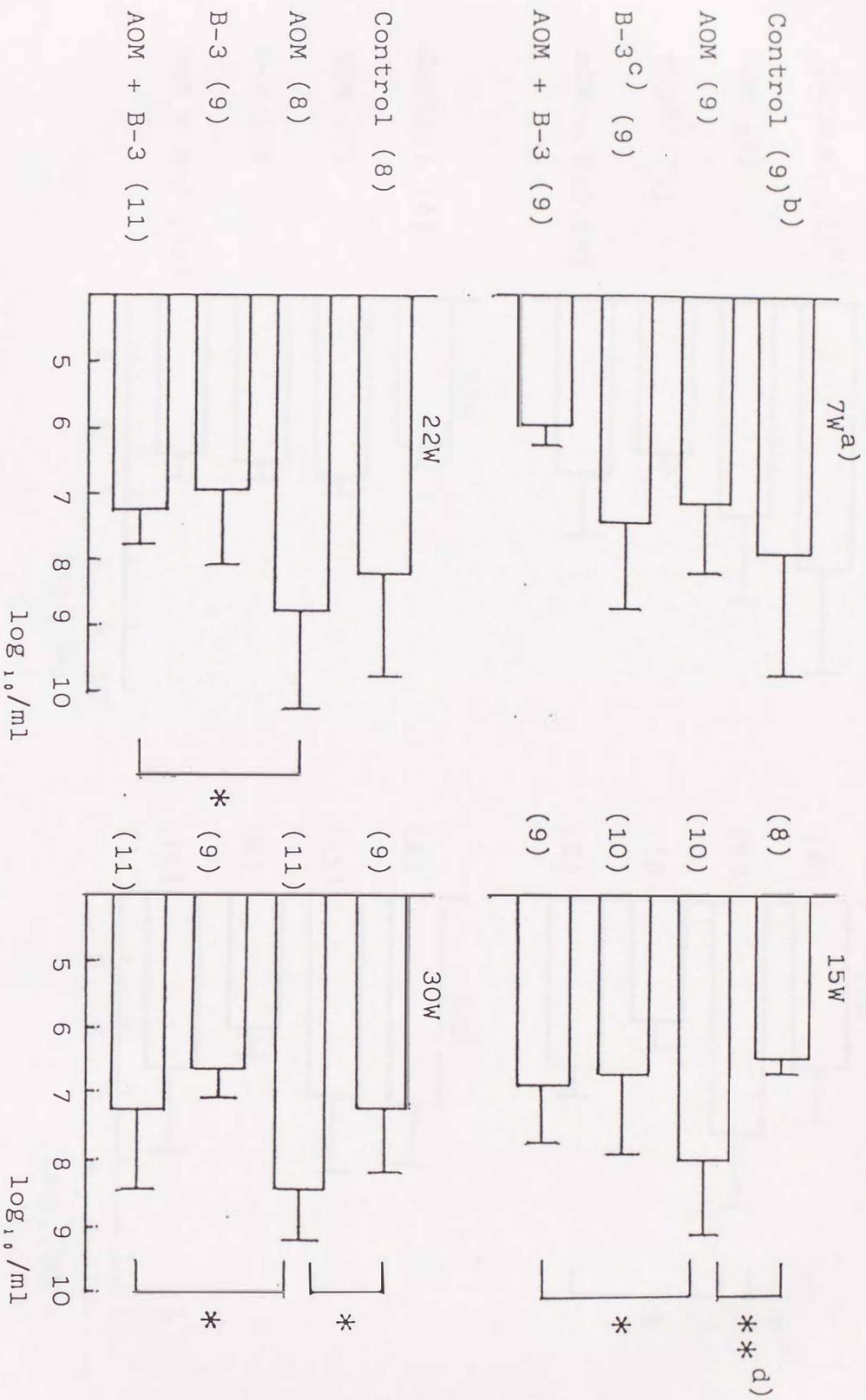


Fig. 6. Change of the number of Enterobacteriaceae in the colon of Donryu rats. (a) Time after the first injection of AOM. (b) Number of animals. (c) The living bacterial mixture of *S. faecalis*, *B. mesentericus* and *C. butyricum*. (d) **P<0.01, *P<0.05.

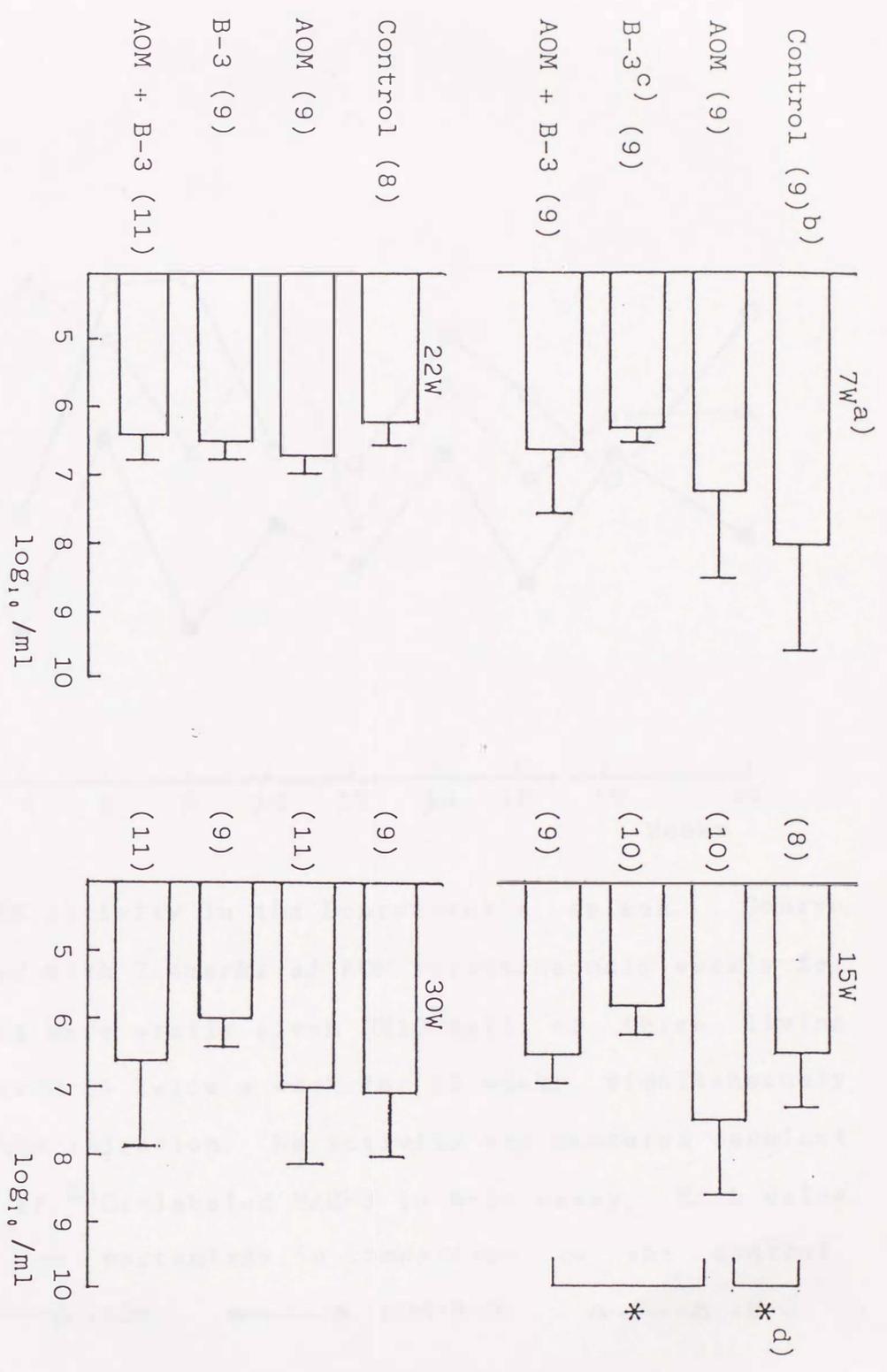


Fig. 7. Change of the number of streptococcus in the colon of Donryu rats. (a)-(d) Refer to the footnotes of Fig. 6.

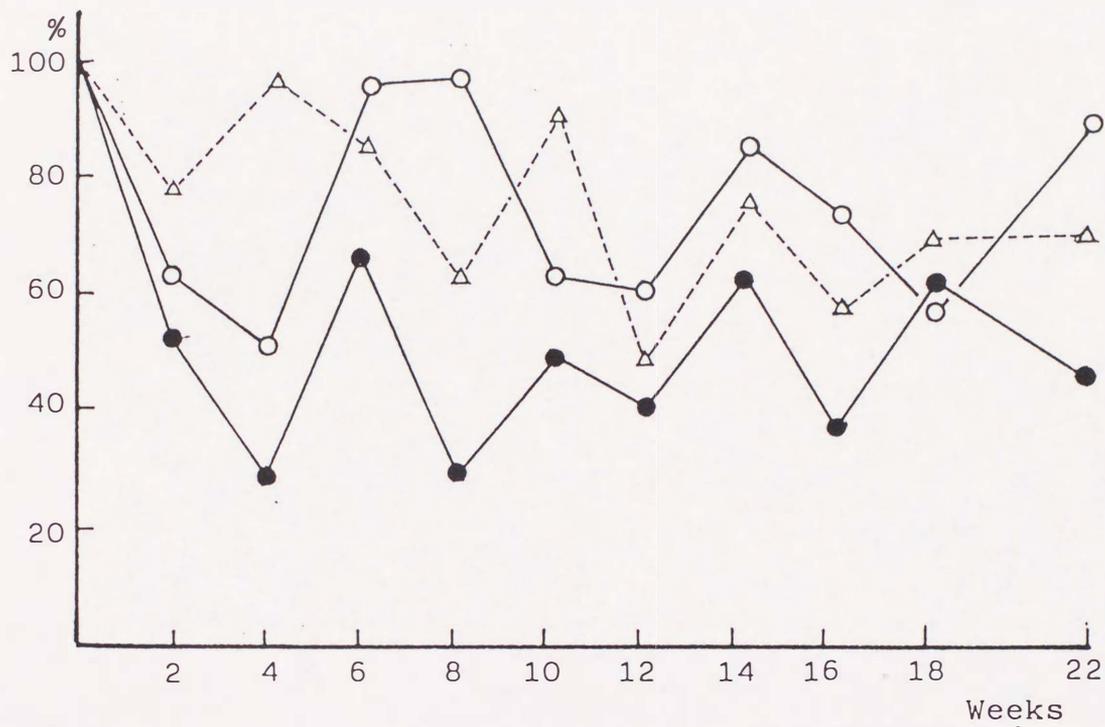
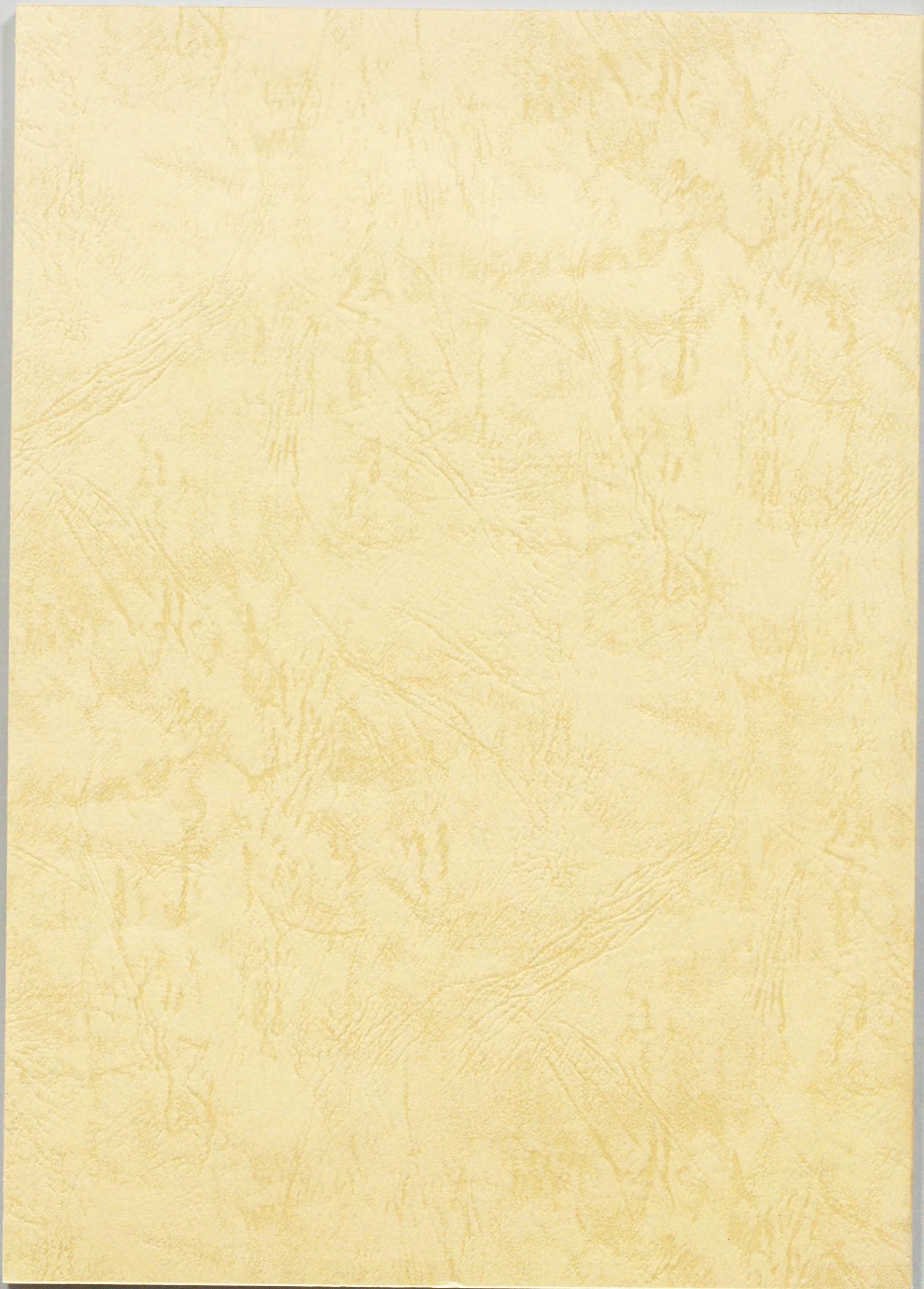


Fig. 8. NK activity in the Donryu-rat's spleen. Donryu rats were injected with 7.4mg/kg of AOM subcutaneously weekly for 11 weeks. Rats were orally given 3×10^9 cells of three living bacterial mixture (B-3) twice a week for 15 weeks simultaneously at the start of AOM injection. NK activity was measured against 2×10^4 cells/well of ^{51}Cr -labeled YAC-1 in 4-hr assay. Each value was represented on percentage in comparison to the control. E:T=50:1. ○—○ : AOM. ●—● : AOM+B-3. △-----△ : B-3.



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

