

孔あけメカニズムによる、新型ケフィア製品PFTの多剤耐性骨髓性白血病細胞に対するアポトーシス効果

MAMDOOH GHONEUM<sup>1</sup>、JAMES GIMZEWSKI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Drew University of Medicine and Science (米国カリフォルニア州ロサンゼルス) 耳鼻咽喉科;

<sup>2</sup> カリフォルニア大学 ロサンゼルス校 (UCLA) 科学／生化学学部 (米国カリフォルニア州ロサンゼルス) 、UCLA California Nanosystems Institute (米国カリフォルニア州ロサンゼルス)

2013年9月13日受付、2013年9月29日承諾 DOI: 10.3892/ijo.2014.2258

要約) 我々は新型プロバイオティック発酵技術 (Probiotics Fermentation Technology、以下 PFT) ケフィアグレインのアポトーシス効果を研究した。PFTは主に、独特の増殖特性を備えた乳酸菌ケフィアの特定菌株である乳酸菌ケフィアP-IFから成り立つ天然混合物である。本研究の目的はヒト多剤耐性骨髓性白血病 (HL60/AL) 細胞に及ぼす *in vitro* でのPFTのアポトーシス効果を調べ、その効果の根柢となる仕組みを探ることである。HL60/AL細胞は3日間、PFT(0.6-5.0 mg/ml)で培養された。PFTのアポトーシス効果はアポトーシスの存在率、カスパーゼ3活性、Bcl-2発現量、そしてミトコンドリア膜電位 (mitochondrial membrane potential, 以下、MMP) の計測結果で評価した。結果、PFTはHL60/AL細胞内で容量依存的にアポトーシスを誘発し、その率は量5mg/mlの濃度で最大67.5%であった。アポトーシスの誘発は、カスパーゼ3の活性、Bcl-2発現量の減少、そしてMMPの分極の減少と関連していた。さらにPFTは原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope、以下AFM) 研究が示したように、HL60/AR 細胞に孔をあけるという独自の特性を示した。この孔をあけるという作用が、がん細胞に対するアポトーシス効果に関与している可能性がある。本研究結果はPFTが多剤耐性白血病の治療に役立つ可能性を示唆している。

## 序文

乳酸菌は昔から発酵食品や乳製品を作るために用いられてきた。1900年代初期に、生物学者 Eli Metchnikoffが乳酸菌を摂取することで、人間の寿命が延びる可能性があることを提唱した (1)。その後、多数の科学者が乳酸菌による発酵製品を摂取することで健康維持に多くの利益がもたらされることを発見し、Metchnikoffの研究結果を証明してきた (2, 3)。発酵した牛乳の中にある乳酸菌株は腸管微生物叢の通常成分で、病原体バクテリアを減らす一方、プロバイオティクス細菌の健康的なバランスを保つのに役立っている (4, 5)。腸内の維持管理に加え、クローン病、リュウマチ性関節炎やがん等の様々な病気の治療のために近年、乳酸菌を用いた実験が増えてきている (6)。

乳酸菌を用いて癌を治療するという考えは、一般に考えられているほど最近のものではない。1世紀以上も昔、Metchnikoffは乳酸菌には結腸直腸がんを予防する効果がある、と提唱している (7)。しかし、動物モデルにおける乳酸菌の抗がん能力に関するMetchnikoffの発見を確証し、細胞環境に及ぼす乳酸菌の影響に関する理解を深めるよう研究者に拍車をかけたのは、近年の人間の健康に対する微生物の影響に関する研究の再起である (8-12)。さらに別の研究から、乳酸菌が乳がんや子宮がんといったその他の種類のがんにも抗がん作用を及ぼすことが分かってきた (13-17)。

抗がん剤治療といった従来のがんの治療法は、アポトーシスを起こさせることを目的としている。しかし、これらの治療薬には毒性があり、患者の生活の質を低くする可能性もある。よって、より副作用が少なく、患者の健康を改善するための代替治療法の探求が進められてきた。最近の研究では、ロイテリ菌が腫瘍壞死因子 (tumor necrosis factor、以下TNF) 誘導

アポトーシスをヒト慢性骨髓性白血病細胞の中で起こすことが分かった（18）。また、カゼイ菌によって分泌された細菌の溶解要素がヒトの単核白血病細胞系であるTHP-1において、アポトーシスを起こさせることも分かっている（19）。これらのデータは、発酵乳製品や（または）発酵性細菌自体が、従来の治療薬の有害な副作用無しに科学保護的な効果をもたらす可能性を示唆している。

本研究で我々が用いた製品は、プロバイオティック発酵技術（PFT）ケフィアグレイン製品として知られる乳酸菌とイーストの共生微生物である。PFTは東欧、北欧、ロシアで一般的に飲まれているケフィアから分離した。ケフィアは様々な健康上の利益をもたらすことで知られている。例えばケフィアが病気の原因となる細菌から腸内を守ることや（20）、ケフィア成分がネズミの高血圧を低め、血清コレステロール値を低下させたことが報告されている（21）。PFTは主に独自のDNA塩基配列をした独特のラクトバチリス ケフィリ菌株P-IF（以下、*L. kefiri* P-IF）で成り立っている。PFTは一般的なケフィリ菌と99.6%の相同性を示しており、その他の*L. kefiri* 株と類似の16Sリボソーム配列を示している。P-IF株はその他の*L. kefiri* 株と似たような特徴を備えているが、抗がん物質として効果を発揮する原因となる可能性のある顕著な特性も多く備えている（表1）（22）。その他の*L. kefiri* 株と違い、P-IFはガラクトースを炭素源とし、増殖培地に刺激が加わった時、炭酸を作り出す。多くの*L. kefiri* 株は縦方向のパターンで成長するが、P-IFはその表面の独特の炭水化物鎖によって3次元的に増殖するのである（22）。

本研究の結果は、PFTが多剤耐性のヒト骨髓性白血病（以下、HL60/AL）細胞に孔をあける能力を持ち、それがアポトーシスの本質的（ミトコンドリア）経路によって、がん細胞の中でアポトーシスを誘導することを示している。この結果はPFTが多剤耐性がん治療において効果を発揮する可能性を示唆している。

表1 *L. kefiri*P-IF 株の特徴

テスト項目	P-IFの特徴
ラクトバチリス ケフィリ	99.6%の配列相同性 16Sリボソーム配列と同一
細胞の形	棒状
グラム染色法	+
運動性	運動性なし
コロニー増殖	三次元的増殖 <sup>a</sup>
炭素利用	ブドウ糖 果糖 ガラクトース <sup>a</sup> L-アラビノース リボース 麦芽糖 乳糖 メリピオース グルコネート
酸、ガス産出	炭酸ガス <sup>a</sup>
pH許容範囲	>4.3 pH

<sup>a</sup>他のケフィリ菌株とは共通ではない特性。

## 物質と方法

**腫瘍細胞株と培養条件。**本研究では多剤耐性のヒト骨髓性白血病(HL60/AR)細胞が用いられた。細胞は米国カリフォルニア大学（Irvine、カリフォルニア）のS. Gollapudi博士に提供していただいた。腫瘍細胞は我々の実験室で、RPMI-1640、10%のウシ胎児血清、2mMのグル

タミン、そして100 $\mu$ g/mlのストレプトマイシンとペニシリンから成り立つ完全培地において保存した。

薬品と科学製品。3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウム臭化物(MTT)（米国ミズーリ州にあるSigma-Aldrich社製）を用いた。

PFTケフィアグレイン製品。PFTは熱殺菌し凍結乾燥させた形の*L. kefiri* P-IFを主に（約90%）含む混合物である。*L. kefiri* P-IFは独特のDNA塩基配列を持つ乳酸菌の特定株で、PETスキャンによると一般的なケフィア菌との相同意性は99.6%である。*L. kefiri* P-IFの特徴を表1と図1に示す。またこの製品は、PFT細菌株である*Lactobacillus kefiri* P-IFと*Lactobacillus kefiri* P-B1とイースト菌株である*Kazachstania turicensis*, *Kazachstania unispora*, そして*Khuyveromyces marxianus*をそれぞれ約2~3%含んでいる（22）。PFTは神奈川県にあるバイトス株式会社から提供されたものである。

よう化プロピジウムを用いたがん細胞の生存能力検知。HL60/AR細胞を異なったPFT濃度（0、0.6、1.25、2.5、5 mg/ml）培養液の中で3日間培養し、よう化プロピジウムを使ったFACScanのフローサイトメトリー法を用いて、死んだがん細胞の割合を調べた。最終的なよう化プロピジウム濃度を50  $\mu$ g/mlとするために、短時間、よう化プロピジウム(1x10<sup>6</sup>/ml)を細胞に加えた。細胞を暗闇で室温のまま30分間染色した後、FACScan（米国カリフォルニア州サンホゼにあるBecton-Dickinson社製）を用いて分析した。

*Bcl-2*の発現。*Bcl-2*を検知するために、まず細胞を氷冷の70%エタノールに固定し、透過処理を施した。その後、細胞をFITC標識の抗*Bcl-2*、またはアイソトープコントロール（米国カリフォルニア州カービンテリアにあるDako Corp.社製）によって染色した後、洗浄し、FACScanを用いて分析した。*Bcl-2*が発現した細胞の割合と平均蛍光強度（分子/細胞の密度の指標）を計算した。

カスパー3の細胞内活動。カスパー3の細胞内活動の計測は、カルボキシフルオレセイン標識のフルオロメチルケトン(FMK)-ペプチドのカスパー阻害剤を基に行った。この阻害剤は細胞透過性で無害である。細胞の中に入ると、この阻害剤は活性型カスパーと共有結合する。フローサイトメトリーを用いて、カスパー陽性（+）細胞とカスパー陰性（-）とを区別した。アポトーシスが起こっている細胞を、短時間、カスパー検出のためのフルオレセイン標識のFAM-DEVD-FMK（米国ニューヨーク、Intergen Co.社製）に浸した。一時間培養した後、分離したカスパーを取り除くために細胞を洗浄し、FACScanフローサイトメーターを用いて結合阻害剤を含んだ細胞数を数えた。

ミトコンドリア膜電位(MMP)の検知。アポトーシス中のミトコンドリア膜貫通電位の変動を、テトラメチルローダミンエチルエステル(tetramethylrhodamine ethylester、以下TMRE)（米国オレゴン州ユージーンのあるMolecular Probes社製）を用いて調べた。PFTによって3日間処理した後、がん細胞(5x10<sup>5</sup> cells/ml)を摂氏37度で30分間、50nMのTMREで培養した。その後、細胞をPBSで洗浄し、FACS Forwardを用いて分析した。FACScanを使って細胞の残骸を制限し取り除くために側面分散が用いた。細胞は488nmで励起され、FL2通路で収集された。5000細胞を分析した。データ分析にはCellQuestソフトウェア（Becton-Dickinson社製）を用いた。

原子間力顕微鏡(AFM)画像。PFT(5 mg/ml)と共にHL60/AR細胞(1x10<sup>6</sup> cells/ml)を2分間と24時間、培養し、PFTが投与されなかった細胞との結果を比較した。サイトスピシン（米国ペンシルベニア州SewickleyにあるShandon Southern Inst.製）処理した細胞を空気乾燥した後、100%MeOHに5分間固定してAFM研究に用いた。AFMによる観察は、HL60/AR細胞のPFT治療に関連した、孔の誘導や膜の小胞形成などの形態変化を調べるために行った。HL60/AR細胞の画像を得るために、Veeco社のBruker's Sharp Nitride Lever(SNL)シリコンプローブと共にVeeco社のDimension 5000 AFMがコンタクトモードで用いられた。スキャンレート0.8 Hzにおいて、512x512ピクセルで局所の高さの画像を記録した。画像処理はSPIP™ソフトウェアを用いて行った。一般に特別の幾何学的配置のおかげでMLCT-AFMチップ（先端）

(「k」値は0.03N/m) が広がり効果をもたらす(23)。

統計分析。図2の細胞アポトーシスの統計的有意性はスチュードントのt検定で計算した。P値<0.05で有為差ありとみなした。フローサイトメトリーのための統計分析にはCellQuestソフトウェアシステムを用いてコロモゴロフ-スマイルノフ検定を実施した。D値>0.2で有為差ありとみなした。

## 結果

腫瘍細胞の生存に対するPFTの効果。よう化プロピジウムとFACScanフローサイトメトリーを用いて、腫瘍細胞の生存に対するPFTの効果を調べた。図2のデータは、PFTを用いた治療が容量依存的にがん細胞におけるアポトーシスを増加させたことを示している。低濃度でも(0.6 mg/ml)、PFTはおよそ30%のHL60/AR細胞にアポトーシスを誘発した。PFT濃度が高くなるほどアポトーシスの割合は増え続け、5 mg/mlの濃度で平均67.5%に達した。

PFTによるカスパーゼ3の活性化誘発。アポトーシスの経路の活性化を検証するため、様々な濃度のPFTで24時間治療したHL60/AR細胞におけるカスパーゼ3の活性レベルを調べた。分析にはフローサイトメトリーを用いた。図3のデータは、PFT治療を受けた細胞の方が対照群のPFT治療を受けていない細胞よりも、増加した活性型カスパーゼ3の比率が高いことを示している。これはHL60/AR細胞を予めPFTに触れさせることができ、がん細胞の死刑執行人であるカスパーゼ3の活性化の増加につながることを示唆している。

PFTはミトコンドリア膜電位(MMP)を脱分極させる。PFTのMMP破壊能力を調べるための実験を行った。HL60/AR細胞を様々な濃度のPFTで治療し、膜電位に敏感なTMRE染料を用いたフローサイトメトリーを用いて、そのMMPを計算した。図4のデータはPFTで治療された細胞では、治療されていない細胞に比べ、がん細胞のミトコンドリア電位が大きく減少したこと示している。

Bcl-2の発現。PFTによるHL60/AR細胞の治療後の反アポトーシス性活動を解明するためにBcl-2の発現を調べた。図5の結果は、PFT治療されていない対照群のがん細胞に比べると、PFTによる治療を受けた細胞では、統計的に有為にBcl-2の発現が減ったことを示している。

AFM研究。HL60/AR細胞へのPFT治療に関連した形態的变化を調べるためにAFM研究を行った。結果はPFT治療されていない対照群では孔のあいたHL60/AR細胞の割合は低く、細胞あたりの孔の数も少なかった(図6A)。がん細胞が2分間 *L. kefiri* P-IF(5 mg/ml)に触れた時、*L. kefiri* P-IFががん細胞に付着する様子が観察された(図6B)。また、がん細胞を*L. kefiri* P-IFにさらに長い時間(24時間)触れた場合、孔のあいたがん細胞の割合は2.6倍にまで増えた。治療が施されていない対照群では、17.5%に単一の孔があき、2%に複数の孔があくという結果だったが、*L. kefiri* P-IF治療が施された細胞では、42%に単一の孔があき、9.5%に複数の孔があいた。図6Dで示しているように、いくつの孔は非常に大きなものだった。これらの孔は細胞質と細胞核に存在していた。図6Dと図Eも、孔の誘発が膜の小窓形成、及び核/細胞質比の減少と関連していることを示している。このような形態的变化はがん細胞アポトーシスの兆しと考えられる。ピークフォース画像によって孔の大きさや形、深さなどのばらつきを計測することで、さらに孔の特徴が明らかになった(図7、図8)。色の濃さは孔の深さを示している。明るく薄い部分は孔が浅く、暗く濃い部分は孔が深い(図7)。細胞の地形はカンチレバーチップを用いて形状をなぞった。SNLチップの縦方向の動きの変化を記録し、図8で示すように图形で視覚化した。Y軸にそった減少は細胞の表面に孔があることを示唆している。PFTを投与したHL60/AR細胞ではこの分析方法により、多くの孔が見つかった(図8)。

## 考察

本研究では、我々は主に*L. kefiri* P-IFで成り立つ混合物であるPFTのアポトーシス性活動を調べた。ヨーグルトの摂取や乳酸菌に触ることは様々な種類のがんの成長を抑制する効果が

あることが示されてきた一方（9、11、14-17）、多剤耐性がん細胞に対する乳酸菌のアポトーシス効果や、これらの細胞に対する効果の根底となる可能性のあるメカニズムについては研究が行われていなかった。我々の研究結果はPFTが容量依存的に多剤耐性がん細胞にアポトーシス効果をもたらし、5mg/mgの濃度で最大67.5%の効果をもたらす能力を持っていることを示している。腫瘍細胞が科学療法に対して多剤耐性を持つことは、現在のがん治療の選択肢にとって大きな障害のため、このPFTの能力は大きな可能性を秘めている。膜輸送体P糖タンパク（24、25）、12-デオキシホルボール 13-酢酸フェニル（26）、プロベネシド（27）、そして磁性酸化鉄ナノ粒子（28、29）といった薬が化学療法剤の増感剤として開発されてきたが、これらには毒性がある。

いくつかの研究により、乳酸菌がいくつかのメカニズムを通じて抗腫瘍の作用を及ぼすことが示された。これらの乳酸菌の作用には、突然変異源を結びつけ、腸から発がん物質を取り除く能力（30、31）、NK細胞や樹状細胞、B細胞やT細胞といった免疫システムの様々な武器を調整作用（32-34）、そしてがん細胞におけるアポトーシスの誘発作用（18、35、36）が含まれる。本研究の結果は、*L. kefiri* P-IFがHL60/AR細胞に孔を開けることができるという、興味深い現象を示した。PFTはカスパーズ3の活性化、Bcl-2の減少、そしてMMP電極化の現象に伴い、HL60/AR細胞にアポトーシスを誘発する。このことは、細胞にあいた孔が、がん細胞のアポトーシスを誘発に役立っている可能性を示唆している。さらに、AFMを用いた観察結果は、孔のあいたがん細胞が、膜の小胞形成や核／細胞質比の減少といったアポトーシスの兆しと相関していることを示している。がん細胞に対して*L. kefiri* P-IFがアポトーシス効果を誘発するメカニズムには、[Ca<sup>2+</sup>]Iが関係している可能性がある。以前の我々の研究で、ヒトの乳がん MDA-MB-231細胞が、[Ca<sup>2+</sup>]Iの増加を伴ったメカニズムによって熱殺菌された出芽酵母（*S. cerevisiae*）の食作用の後にアポトーシスを行ったことを示した（37）。このことは酵母を摂取後の[Ca<sup>2+</sup>]Iの増加や、小胞体からCa<sup>2+</sup>を放出するのを薬理的に阻害する2-アミノエトキシジフェニルホウ酸塩(2APB)を加えた後のアポトーシスの阻害において裏付けられた。がん細胞が*L. kefiri* P-IFを摂取することが、この作用剤のアポトーシス効果に役立っている可能性があると思われる。

孔を開ける作用はニッケル（38）や液中ナノダイヤモンドとナノプラチナの混合物であるDPV576といったナノ粒子において観察してきた（39）。DPV576の孔を開ける能力が、がん細胞の中にダウノルビシンといった化学療法薬剤を蓄積させることによってHL60/ARがん細胞の薬剤耐性を反転させることと関連していることは注目に値する（39）。このDPV576のナノ粒子の作用と同じ様に、*L. kefiri* P-IFが誘発した孔がMDRがん細胞による化学療法薬剤を取り込み、蓄積する作用を促進するのではないかと推測される。これは今後の研究課題である。

がん細胞に現れる空胞は明らかに、がん細胞が持つ細菌や酵母菌といった微生物の貪食能力（40-43）と、赤血球、リンパ球、好中球といった他の細胞が持つ微生物貪食能力（44-46）によるものである。さらに、研究により腫瘍細胞が、他のがん細胞を貪食するという共食い能力を持っていることが明らかになっている（47）。本研究により、我々は*L. kefiri* P-IFで治療されたがん細胞において孔があいた細胞の率は、治療されていない対照群のHL60/AR細胞と比べ、2.6倍であることを観測した。この増加は細胞質と核に発生した単一または複数の孔があいたがん細胞で観測された。

*L. kefiri* P-IF株の独特の属性が、多剤耐性HL60/AR白血病細胞株においてアポトーシスを起こすという能力の主要因かもしれない。P-IFコロニーに特徴的な三次元の増殖は、*L. kefiri* P-IF株の表面のプロテオグリカンがその他の*L. kefiri* 株とは異なることを意味している（22）。細菌やその他の微生物の細胞表面は、宿主細胞に対して細胞の成長に貢献、あるいは阻害する特定の刺激作用をもたらすことで知られる様々な多糖ペプチド複合体で構成されている（48-50）。*L. kefiri* P-IF独自の細胞壁成分や属性についてさらに研究を行うことで、細胞表面のプロテオグリカンによるアポトーシス誘発についての理解が深まるかもしれない。本研究の研究範囲ではないが、*L. kefiri* P-IFには低pHレベルで生存できるという特徴がある。これは P-IF 株が胃から腸への移動中も生き抜き、その間も成長し続け保護作用をもたらすことが可能であることを意味している。P-IF 株のいくつかの保護効果は、この菌株が持つガラ

クトースの代謝能力に関連しているかもしれない。高レベルのガラクトースは毒性をもたらす可能性があり、それが変異や健康問題につながる可能性がある（51）。消化管に*L. kefiri* P-IFがあれば、ガラクトースが破壊的なレベルに達するのを防ぐ助けとなるかもしれない（52）。この属性は今後、予防と一般的な健康維持のための研究に値する。

*L. kefiri* P-IFは毒性のない物質として証明されてきた。*L. kefiri* P-IFの投与を受けたネズミを用いた先行研究の結果では、投与後に様々な器官において肉眼的、または組織病理学的な異常は見られず、投与されなかった対照群のネズミと比較して、体重に変化は見られなかった（53）。

本研究は、*L. kefiri* P-IFはがん細胞の細胞膜に孔を開けることと関連している可能性のあるメカニズムによって、HL60/AR細胞にアポトーシス効果をもたらす新型共生微生物培養であると結論づける。*L. kefiri* P-IFは薬剤耐性白血病の治療を向上するための新しい分類の補助薬となる可能性がある。

## 謝辞

著者はカリフォルニア大学基礎・臨床免疫学部（米国カリフォルニア州Irvine）の免疫学の教授であるDr.Sastray Gollapudiに対し、本稿を改訂する際にご助力下さったことに感謝します。著者はパイオス株式会社（神奈川県横浜市）にも感謝します。グラント番号T0099108。著者は本研究に貢献してくださったDr. Peggy Vorwald にも感謝します。また、Dr. James Gimzewski が様々な資料やカリフォルニア州にあるNanoSystems Institute のNano and Pico Characterization Lab を使わせてくださったことに感謝します。

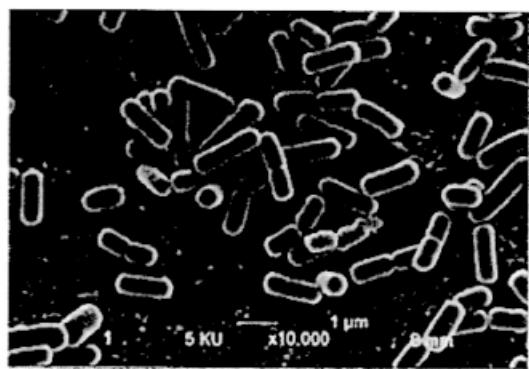


図1. *L. kefiri* P-IFは三次元的に増殖できる。*L. kefiri* P-IF 株の電子顕微鏡の画像。*L. kefiri* P-IF は三次元のどの方向にでもお互いに粘着できるという独自の特徴を持つ棒状の細菌である。

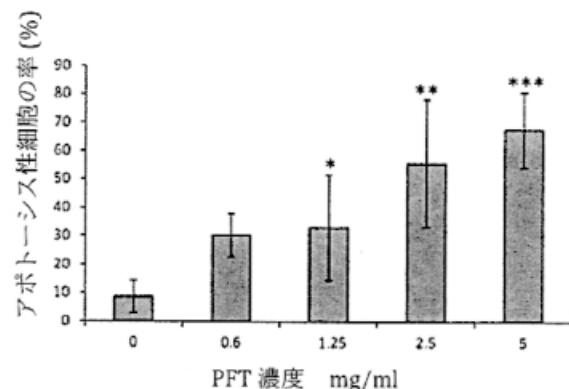


図2. PFTはHL60/AR細胞のアポトーシスを誘発する。腫瘍細胞を異なる濃度のPFT (0、0.6、1.25、2.5、そして 5 mg/ml) と共に培養し、死んだがん細胞の割合 (%) を、FACScanフローサイトメトリーを用いたよう化プロビジュムによって調べた。データは4種の実験の平均±標準偏差を表している。統計分析で対照群 (0 mg/ml) と各濃度の結果を比較した。\* p値<0.05、\*\* p値<0.0005、\*\*\* p値<0.0001。

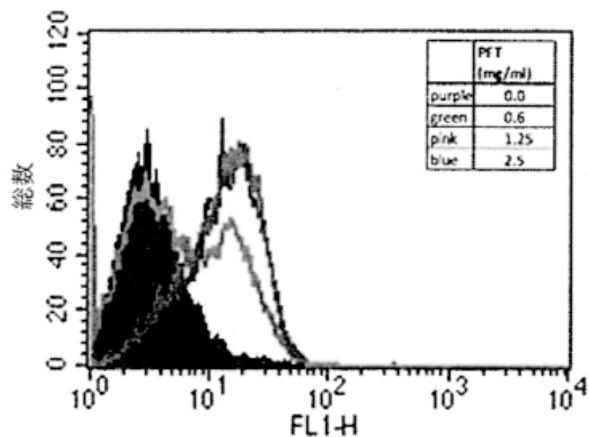


図3. PFTはカスパーゼ3の活性化によってアポトーシスを誘発する。カスパーゼ3の活性化は異なる濃度のPFT (0、0.6、1.25、2.5、そして 5 mg/ml) を用いて培養されたがん細胞によって決まる。それぞれの線はPFTがない場合 (対照群、紫) のがん細胞とPFT濃度が0.6 mg/ml (緑) 、1.25 mg/ml (ピンク) 、または2.5 mg/ml (青) によって治療されたがん細胞を表している。細胞内のカスパーゼ3の活性化は、カルボキシフルオレセイン標識細胞透過性のペプチド阻害剤を用いて検知し、フローサイトメトリーを用いて分析した。

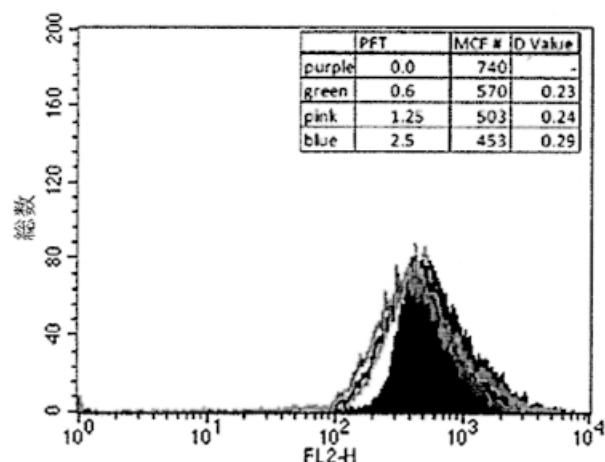


図4. PFTはMMPを減らす。異なる濃度のPFT (0、0.6、1.25、2.5、そして 5 mg/ml) を用いて腫瘍細胞を培養し、TMRE 染色液を用いたフローサイトメトリーによってMMPを測定した。TMRE 蛍光が減少は、膜電位の消極を示唆している。PFTは容量依存的に、膜電位の電位を消極した。CellQuestソフトウェアシステムを使ったコルモゴルフ・スマルノフ検定による統計分析を行った。D値>0.2を統計的有為と見なす。

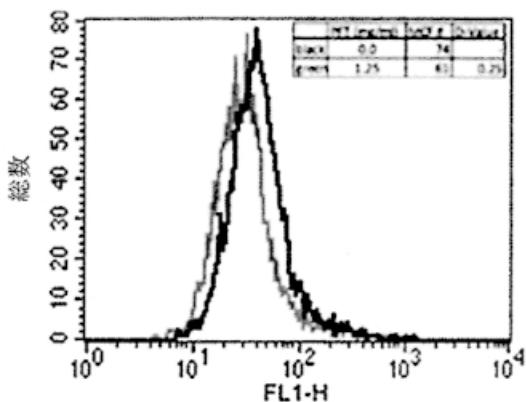


図5. PFTはBcl-2の出現を減少させる。HL60/AR細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/ml) を、濃度1.25 mg/mlのPFTで培養した。Bcl-2の出現は、抗ヒトBcl-2抗体で細胞を染色することによって決定し、フローサイトメトリーによって分析した。平均蛍光強度(MCF)で示している。

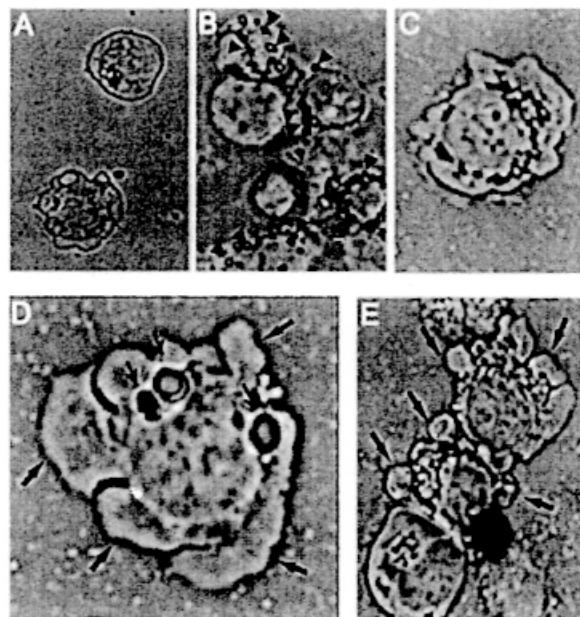


図6. PFTはがん細胞に孔と膜の小疱形成をもたらす。HL60/AR細胞 ( $1 \times 10^6$  cells/ml) をPFTで培養し、AFMを用いて観測した。(A) PFT処置なしの対照群。(B) 5 mg/ml のPFTで2分間治療した細胞 (*L. kefiri* P-IF(矢印の先端)が、がん細胞に付着していることに着目)。(C-E) 5 mg/ml のPFTで24時間処理した細胞(核の周りに多くの孔があいていることに着目)。(D) 3つの大きな孔があいたがん細胞(細い矢印)。(DとE) がん細胞の膜の小疱形成が、太い矢印で示されている。細胞は光学的イメージで検査した。