Hypsizigus marmoreus の抗腫瘍活性 (第2報)

Lewis 肺癌転移抑制効果

斎藤英晴,^a 馮 威健,^{a, b} 松沢恒友,^c 池川哲郎*^{a, b}

国立がんセンター研究所,^a 〒104 中央区築地 5-1-1, 金沢大学教育学部,^b

〒920-11 金沢市角間町, (社)長野県農村工業研究所,^c

〒382 須坂市大字須坂 787-1

Antitumor Activity of *Hypsizigus marmoreus*. II. Preventive Effect against Lung Metastasis of Lewis Lung Carcinoma

Hideharu SAITOH,^a Weijian FENG,^{a, b} Tsunetomo MATSUZAWA,^c
and Tetsuro IKEKAWA*^{a, b}

National Cancer Center Research Institute,^a 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104, Japan,

Faculty of Education, Kanazawa University,^b Kakuma-cho, Kanazawa 920-11,

Japan, and Nagano Prefectural Research Institute of Rural Industry,^c

787-1 Oaza-Suzaka, Suzaka-si, Nagano 382, Japan

(Received June 11, 1997)

Antitumor activity of *Hypsizigus marmoreus*, an edible mushroom, was investigated by *in vivo* bioassay. The aqueous extract, hereinafter referred to as YH, was tested against syngeneic tumor, Lewis lung carcinoma. YH was found to give a significant increase in life span when assayed using a solid tumor, Lewis lung carcinoma, by intraperitoneal administration, but not as much by oral administration. It was also found that YH have an inhibitory activity of spontaneous tumor metastasis in mice bearing Lewis lung carcinoma by intraperitoneal administration. YH significantly decreased the number of metastasized nodules. It was suggested by Winn test that antitumor and antimetastatic activities shown by YH was effective in increasing activity on immunological by competent cells.

Key words—*Hypsizigus marmoreus*; antitumor activity; metastasis prevention; immunopotential

緒

言

市販の栽培食用きのこであるブナシメジ (学名: *Hypsizigus marmoreus*) は広く我が国で食用に供されているきのこの1つである。日本で食用に供されているきのこには抗腫瘍活性を示すものが数多く見いだされている。今回、ブナシメジの子実体について抗腫瘍活性を検討した。前報¹⁾では、本きのこの熱水抽出物が *in vitro* の細胞毒性試験では活性を示さないが、*in vivo* において S-180 の固形癌に対しては強い抗腫瘍活性を示し、Meth A に対しても有意ではないが、何らかの効果を示すことを報告した。今回 YH のもつ Lewis 肺癌に対する抗腫瘍活性及びがん転移抑制活性を検討するとともに、細胞毒性活性を示さない本子実体の熱水抽出物が抗腫瘍

活性を示す機構を Winn テストを用いることにより検討した。

実 験 の 部

材料及び方法

1. 動物 5 週齢の BDF₁ 雌マウス及び 5 又は 7 週齢の C57BL/6 雌マウス (いずれも日本チャールス・リバー社より購入) を使用した。

2. 腫瘍 同系腫瘍である Lewis 肺がん (以下 LLC) を用いた。LLC は国立がんセンターで C57BL/6 雌マウスへの皮下接種により継代維持されている腫瘍を用いた。

3. 熱水抽出物 *Hypsizigus marmoreus* 熱水抽出物 (以下 YH) の調製方法は前報¹⁾ に準ずる。すなわち、*Hypsizigus marmoreus* T-2 菌の子実体 (飯山市農協種菌センターより供与) を脱イオン水又は精製水にて加熱抽出した後、その子実体にさらに脱イオン水又は精製水を加え加熱抽出し、先の抽出物と混合し、凍結乾燥して YH を得た。YH は、腹腔内投与時には生理食塩水に溶解し、経口投与時には蒸留水に溶解し、投与に用いた。本研究で用いたような栽培食用きのこは、担子菌類に属し、細菌類とは異なり、エンドトキシンを含有していない。²⁾

4. 抗腫瘍活性試験 a) 腹腔内投与による実験——BDF₁ 雌マウスの側腹部皮下に LLC 生細胞を 7.0×10^5 個/マウスずつ移植し、移植の翌日より YH の 100, 200 及び 300 mg/kg を 1 日 1 回 10 日間腹腔内投与した。抗腫瘍活性は各グループのマウスの平均生存日数を測定し判定した。

b) 経口投与による実験——5 週齢の C57BL/6 雌マウスの側腹部皮下に LLC 生細胞を 5.0×10^5 個/マウスずつ移植し、YH の 100, 300, 1000 及び 3000 mg/kg を腹腔内投与時と同じスケジュールで経口投与し、同様に抗腫瘍効果の判定を行った。

5. LLC 肺転移抑制試験 7 週齢の C57BL/6 雌マウスの foot-pad 皮下に LLC 生細胞を 4.0×10^5 個/マウスずつ移植し、原発巣とする。腫瘍移植後 11 日目にエーテル麻酔下、原発巣側の足を大腿部より切除した。そして移植 21 日目に各マウスの肺を摘出し、肺における転移結節数を測定した。投与は腹腔内投与で行い、投与スケジュールは A) 100 mg/kg を腫瘍移植後 1 日目より 11 日目まで投与した群及び B) 30 もしくは 100 mg/kg を腫瘍移植後 1 日目より 19 日目まで投与した群で実験を行った。

6. Winn テスト³⁾ 6—8 週齢の C57BL/6 雌マウスを用い次のように行った。すなわち、YH 投与群、対照群及び正常対照群の 3 群を置き、まず YH 投与群では、LLC をマイトマイシン C (以下 MMC, 協和発酵より購入) の 25 µg/ml で 37°C, 30 分処理し、その生細胞を 1.0×10^7 個/マウスずつ皮下移植し、移植翌日より YH の 100 mg/kg を 1 日 1 回 10 日間腹腔内投与した。対照群では MMC 処理 LLC 移植翌日より生理食塩水を 1 日 1 回 10 日間腹腔内投与した。正常対照群では、無処置マウスに生理食塩水を 1 日 1 回 10 日間腹腔内投与した。各群とも投与終了翌日に脾臓を摘出した。脾臓より脾臓細胞を調製し、エフェクター細胞 (以下 E と略す) とし、新に調製した LLC をターゲット細胞 (以下 T と略す) とし、E/T 比が 100/1 となるように混合した。混合した細胞を無処置マウスに皮下移植 (E を 5.0×10^7 個/マウス及び T を 5.0×10^5 個/マウス) した後 19 日目に固形腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定することにより、試料投与による被投与マウスの脾臓細胞の腫瘍中和効果の増強を検討した。

7. 有意差検定 生存日数については Mann-Whitney の U 検定を用い、転移結節数及び腫瘍重量については Student の *t* 検定を用いて有意差検定を行った。

結 果

1. LLCに対するYHの抗腫瘍効果 YHの腹腔内投与におけるLLCに対する抗腫瘍効果は、Table 1に示すように200及び300 mg/kg投与群でそれぞれ28及び22%と有意な延命効果を示した。一方、YHの経口投与においてはTable 2に示すように、対照群に比しYHにおいて延命は示したものの有意ではなかった。

2. LLCに対するYHの肺転移抑制効果 LLC担がんマウスにおいてYHが延命効果を示したことより、同じくLLCを用いてその肺転移における効果を検討した。その結果、Table 3に示すようにAの投与スケジュールでは100 mg/kgで32%の有意な抑制が認められ、またBの投与スケジュールでは30及び100 mg/kgでそれぞれ46及び44%の有意な抑制効果が認められた。

3. Winnテストを用いたYHの腫瘍中和効果の検討 LLCを用いた抗腫瘍活性試験においてYHの投与により延命効果が認められ、また同じくLLCを用いたがん転移抑制試験においても、YHの100 mg/kgを10日間腹腔内投与することにより抑制効果が見られた。そこで次

Table 1. Antitumor Activity of Aqueous Extracts of *Hypsizigus marmoreus* against Lewis Lung Carcinoma by Intraperitoneal Administration

Dose (mg/kg)	Survival days mean $\pm$ S. E.	ILS ^{a)} (%)
Control	22.5 $\pm$ 0.23	
100	26.3 $\pm$ 2.57	17
200	28.8 $\pm$ 1.88 ^{b)}	28
300	27.5 $\pm$ 2.61 ^{c)}	22

a) Increase in life span, b) $p < 0.005$, c) $p < 0.05$.

Tumor: Lewis lung carcinoma, 7.0×10^5 cells/mouse s.c. transplantation. Animal: female BDF₁ mouse. Administration: i. p. day 1 to day 10. Vehicle: saline.

Table 2. Antitumor Activity of Aqueous Extracts of *Hypsizigus marmoreus* against Lewis Lung Carcinoma by Oral Administration

Dose (mg/kg)	Survival days mean $\pm$ S. E.	ILS ^{a)} (%)
Control	15.3 $\pm$ 1.2	
100	19.5 $\pm$ 2.0	27
300	17.8 $\pm$ 1.8	16
1000	19.2 $\pm$ 1.6	25
3000	18.5 $\pm$ 1.5	21

a) Increase in life span.

Tumor: Lewis lung carcinoma, 5.0×10^5 cells/mouse s. c. transplantation. Animal: female C57-BL/6 mouse. Administration: p. o. day 1 to day 10. Vehicle: distilled water.

Table 3. Inhibitory Effect of Aqueous Extracts of *Hypsizigus marmoreus* against Pulmonary Metastasis of Lewis Lung Carcinoma

Schedule	Dose (mg/kg)	No. of pulmonary metastasis		Inhibition ratio (%)
		mean $\pm$ S. E.	(n)	
	Control	46.3 $\pm$ 4.22	29	
A	100	31.3 $\pm$ 4.72 ^{a)}	14	32
B	30	24.8 $\pm$ 4.06 ^{b)}	13	46
B	100	26.1 $\pm$ 4.17 ^{b)}	14	44

a) $p < 0.05$, b) $p < 0.005$.

Tumor: Lewis lung carcinoma, 4.0×10^5 cells/mouse f. p.-s. c. transplantation. Animal: female C57BL/6 mouse. Administration: i. p. Vehicle: saline.

Schedule: inoculation amputation lung autopsy

↓ ↓ ↓

day 0 day 11 day 21

Administration A: day 1—day 11

B: day 1—day 19

Table 4. Effect of Aqueous Extracts of *Hypsizigus marmoreus* in Winn Test

The origin ¹⁾ of effector cells ²⁾	MMC-treated LLC	Sample (i. p.)	Tumor weight (g) mean $\pm$ S. E.	T/C vs. normal control	T/C vs. control	(n)
Normal control	—	Saline	4.11 $\pm$ 0.86	100		6
Control	+	Saline	3.02 $\pm$ 0.62	73	100	6
YH ³⁾ -treated	+	YH	1.04 $\pm$ 0.70	25 ^{a)}	34	5

a) $p < 0.05$.

1) Tumor: MMC-treated Lewis lung carcinoma, 1.0×10^7 cells/mouse s. c. transplantation. Animal: female C57-BL/6 mouse. Administration: i. p. day 1 to day 10. Dose (YH): 100 mg/kg. Vehicle: saline. MMC: mitomycin C.

2) Effector cells (E): prepared from the origin in the following day of final administration. Target cells (T): Lewis lung carcinoma.

E/T ratio: 100 : 1 (5.0×10^7 cells/mouse + 5.0×10^5 cells/mouse, s. c. transplantation). Animal: female C57BL/6 mouse.

3) YH: aqueous extracts of *Hypsizigus marmoreus*.

に YH の 100 mg/kg の 10 日間の投与が、C57BL/6 雌マウスの免疫担当細胞に及ぼす影響を検討するために、Winn テストを行い Table 4 に示す結果を得た。Table 4 に示すように E/T 比が 100/1 において、対照群に比し T/C が 34 という腫瘍増殖の抑制が見られた。

考 察

前報¹⁾において YH は、S-180 に対して有意な抑制効果をもつこと、及び Meth A に対しても一定の効果をもつことを示した。そして、YH 自身に直接的細胞増殖阻害作用がないことも示した。また、S-180 に対する活性の本体が (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan の一種であることを報告した。

今回、我々は同系腫瘍である LLC を用いて、YH のもつ抗腫瘍活性を検討した。その結果、YH は LLC に対し、腹腔内投与で有意な抑制効果 (Table 1) を示すことを明らかにした。経口投与では延命は示したが有意ではなかった (Table 2)。

そこで、YH が抗腫瘍活性を示した LLC を用い転移抑制効果を検討したところ、Table 3 に示すように LLC 肺転移実験において、YH を LLC 移植翌日から原発巣切除日まで投与した群で転移抑制効果がみられたことは、この転移抑制効果には原発巣での増殖抑制効果が関与している事を示しているものと考えられる。さらに LLC 移植翌日から肺摘出直前まで投与した群ではより強い抑制効果がみられた。

このことより今後、転移巣での増殖抑制効果を検討するために、原発巣切除後から肺摘出までの期間に YH を投与することによる転移巣増殖抑制効果の検討が必要であると考えられる。一方、Winn テストの結果より YH 投与マウスの脾細胞が LLC に対し抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。このような免疫担当細胞の抗腫瘍活性の増大と *in vitro* で細胞毒性を示さない¹⁾ ことより免疫担当細胞の活性化が YH の作用の本態と考えられる。今後、今回の Winn テストにより示された YH の投与により増強された免疫担当細胞の LLC に対する反応が LLC に対し抗原特異的なものであるのかどうかを検討する必要がある。すなわち YH が非特異的に免疫担当細胞の活性化を行うのか、もしくは接種された MMC 処理 LLC に対する特異的な免疫の活性化を増強するのかを検討すること、さらに免疫担当細胞の population を検討することにより YH の免疫担当細胞の活性化の特長づけを行うことが必要であると考えられる。

以上、今回示した LLC に対する YH の抗腫瘍、転移抑制及び免疫増強活性について報告した。

前報¹⁾において YH の S-180 に対する活性本体は (1→3)- β -D-glucan であると報告した. (1→3)- β -D-glucan は同様の基本骨格をもつものでも, その β -(1-6)-glucoside 側鎖や立体構造などによりその抗腫瘍効果がさまざまである. YH が LLC の転移抑制効果を示したことは (1→3)- β -D-glucan の中でも Sizofilan^{4,5)} との関連性を考えさせられ, また, 免疫担当細胞の活性の上昇は (1→3)- β -D-glucan がその活性本体^{6,7)} である可能性を強く示唆している. しかしながら, 現時点では LLC に対する YH の抗腫瘍, 転移抑制及び免疫増強活性の本体が (1→3)- β -D-glucan である確認はなされていない. 今後の研究に期待される.

一方, 安川ら⁸⁾によりブナシメジのメタノール及び酢エチ抽出物であるエルゴステロールが発がん抑制活性をもつことが報告されている.

今後, ブナシメジに含有される成分が個々にもつ活性が明らかにされるとともに, 混合物だからこそ示される活性があると考えられるので, まるごとのブナシメジの接種による含有成分総和としての生物活性の研究が進展することが期待される.

引用文献

- 1) Ikekawa T., Saitoh H., Feng W., Zhang H., Li L., Matsuzawa T., *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1954—1957 (1992).
- 2) 水野 卓, 河合正允編著, “キノコの化学・生化学,” 学会出版センター, 1992, p. 211; “キノコの科学,” 菅原龍幸編, 朝倉書店, 1997, p. 51.
- 3) 小野 稔, 癌と化学療法, **15**, 249—255 (1988).
- 4) 古江 尚, *Medical Immunology*, **12**, 65—77 (1986).
- 5) 山下 喬, 香川和夫, 山本俊明, 八木正人, 奥中規由, 米田浩二, 螺良英郎, 癌と化学療法, **8**, 120—127 (1981).
- 6) Takeyama T., Suzuki I., Ohno N., Oikawa S., Sato K., Ohsawa M., Yadomae T., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **10**, 644—651 (1987).
- 7) 三谷満昭, 有可 正, 松尾哲也, 浅野泰司, 癌と化学療法, **11**, 1809—1817 (1984).
- 8) Yasukawa K., Aoki T., Takido M., Ikekawa T., Saitoh H., Matsuzawa T., *Phytotherapy Res.*, **8**, 10—13 (1994).