

Phellinus linteus (メシマ) 培養菌糸体の活性化に関する研究 (I)

公ヨンユン、李カンギ、南サンユン*、洪南斗**

(株) 韓国新薬、*全州大学 理工学部 微生物学科、**キョンヒ大学 東西医学研究所

序論

現在ガンの治療には化学療法、放射線療法および外科的手術法などがある。しかし、治療の範囲と程度の限界および副作用によって、その使用が制限される。

このような観点で直接的な細胞毒性をもつ既存の化学療法治療を代替したり、並行して宿主のガンの細胞について免疫の活性を賦活によって人体に害がない、より効率的に治療しようとする試みが昔からあった。

既にBCGなどの細菌製剤¹⁾と *Saccaromyces cerevisiae* 細胞壁の多糖類の Zymosan²⁻³⁾ が宿主の免疫能力を刺激して抗ガン性の作用をあらわすことは知られている。また漢方で利用されてきた菌類生薬、地衣類生薬および各種植物性生薬で分離した lipopolysaccharide⁴⁾, proteglycan および hemicellulose⁵⁻⁸⁾ が宿主の媒介性抗腫瘍の作用をもつことも報告されている。最近には椎茸で Lentinan⁹⁻¹⁰⁾, 雲茸で PSK¹¹⁻¹²⁾ と Copolang¹³⁻¹⁴⁾, 白絹毛茸で Proteoglycan¹⁵⁾ などが推子菌類から分離した多糖類または蛋白多糖の涵養活性が明らかになり抗腫瘍の免疫治療剤に利用、開発中である。

一方、Ikekawa 等¹⁶⁾ はこのような推子菌類の抗腫瘍性の多糖類についての比較研究でメシマ (*Phellinus linteus* Aoshima) が一番強力な宿主媒介性の抗腫瘍の効果を持つものと報告している。メシマは桑の木の古木に寄生する茸である。しかし、最近桑の木の減少でメシマの子実体の採取が困難になっており、山名等¹⁷⁻¹⁸⁾ はメシマ菌糸体の人工培養成功の結果、大量生産が可能になった。その熱水抽出物が Ehrlich 腹水ガンにおいてA系マウスで ILS=29.8%, Swiss 系マウスで ILS=39.1%と、人工培養菌糸抽出物が天然の子実体抽出物と抗ガン活性にあって差異のないことを確認している。しかし、生化学的及び免疫学的作用機序としてはまだ研究がない実情である。

著者たちは本実験を通じて、抗ガン剤としての利用可能性を追求するべくメシマの人工培養菌糸体の熱水抽出物について抗ガン効能と作用点を実験して、その結果を取り上げようとする。

材料及び方法

1. 菌糸体の培養と抽出

山名培養法¹⁸⁾ によってメシマの子実体を採取して菌糸体を寒天培養基で分離培養した。その菌糸体を次の調査の固形培養基に接種して incubator の 25℃状態で3ヵ月間培養した。

〈培養基造成〉

鋸屑 1000g, 大豆粉 250g, pepton 3.0g, KNO_3 5.0g, CaCO_3 7.5g, d. w1.8~2.01
乾かた菌糸塊の 100g を 1000ml の熱水で 1 時間換流抽出して抽出液を 100°C 以下の
低温で 100ml まで減圧濃縮した。この濃縮液を凍結乾燥して約 11.8 g の粉末を得た。

2. 実験動物および飼育環境

実験動物には雄性の ICR 系マウスと雄性の Sprague-Dauley 系モルモットを 1
週間毎日発育状態、行動、外観を観察して体重を測定してマウスは体重 25g 内外、rat
は体重 200±10g 範囲内に属する動物を選んで 10 匹を各々 1 群として使用した。飼料
は『三洋油脂飼料(株)』の固形飼料で飼育した。水は十分に供給しながら実験室環境
に適応させてから使用した。実験は温度 24±2°C、湿度 55±10% で実施した。

3. ガン細胞

腹水ガンの誘発には ICR 系マウスの腹腔に継代移植させた sarcoma - 180 のガン
細胞を使用した。Natural killer(NK) cell 活性測定に使用した Yac - 1 マウスのリン
パおよび細胞毒性 T 細胞活性の測定に使用した EL - 4 胸腺の細胞株は試験管内で
10% の児形血清 (fetal calf serum ; FCS), 1% の抗生剤を加えた RPMI 1640 の
組織培養液 (完全培養液) を使って継代培養しながら実験に利用した。大食細胞の細
胞毒性を測定するためには 10% の FCS が加えられた DMEM の組織培養液を使って培
養させた P815 マウスの肥満細胞の細胞株を使用した。

4. 安定性に関する実験

1) 飼料の調剤および投与

人体投与量の 10 倍量を最小の投与量としてこの 3 倍数ずつ各々 30 倍 (167mg/kg)
および 90 倍の三つの段階で中等用量群 (500mg/kg) および大量群 (1500mg/kg) で
試料を取って蒸留水に溶解して 15 日間一定な時間に雄性 Sprague - Dauley 系 rat に
一回経口投与した。対照群としては生理食塩水を経口投与した。

2) 一般的な観察

毎日 1 回以上動物を観察しながら行動異常、外表異常など中毒症状を観察した。

3) 体重の測定

隔日に検液を投与する前に一回の体重を測定した。

4) 血液の検査

15 日間続いて投与したその次の日、無麻酔状態で rat 心臓から heparin 処理注射器
で血をとった後、白血球数 (WBC), 赤血球数 (RBC), Hematocrit 値 (Ht), 血色素量
(Hemoglobin) を測定した。

i) 白血球数の測定

血液を WBC pipette で 0.5 目盛りまで正確にとって、Turk's WBC の稀釈液 (glacial

acetic acid 3ml, 1v/v% aqueous gentian violet 1 ml, 蒸溜水 100ml) で 20 倍正確に稀釈して counting chamber に満たして microscopy によって WBC を測定した。

ii) 赤血球数の測定

血液を RBC pipette で 0.5 目盛りまで正確にとって、0.85% の食塩水の RBC 稀釈液で 200 倍正確に稀釈して counting chamber に満たして microscopy で RBC を測定計算した。

iii) Hematocrit 値の測定

Hematocrit 用 capillary tube に血液を約 2/3 とって、cristo seal として片側の端を閉じて Hematocrit 用 centrifuge に装置して 13,000rpm で 5 分間遠心分離した後、micro hematocrit tube reader を利用して hematocrit 値を測定した。

iv) Hemoglobin の定量

cyanomethemoglobin 法によって行われた。試験管に Drakin's 液 [NaHCO₃ 1g, KCN 0.05g, K₃Fe(CN)₆ 0.2g, distilled water 100ml] を 5ml とって micropipette で血液 0.02ml を正確に加えてから放置して 540nm で吸光度を測定した後、cyanomethemoglobin の標準液によって目前に作成した検量線を利用して hemoglobin の濃度を割り出した。

5) 血液の生化学的検査

最後の観察後、心臓採血して血液を分離して血清で肝機能代謝と関連がある total cholesterol GPT, GOT, ALP, phospholipid, triacylglycerol などの血液の生化学的検査を Automatic biochemistry Analyzer (ABOTT) を使って実施した。

5. ガン移植マウスの生存期間の観察

sarcoma 180 のガン細胞をリン酸塩の緩衝液 (phosphate - buffer saline ; PBS), pH7.4 に 5×10^6 cells/ml の濃度で複製させた後、マウス腹腔の中に 0.2ml (1×10^6 cells) ずつ移植させ腹水ガンを誘発させた。移植 1 日後から試料 (10mg/kg, 30mg/kg) を 3 週間投与しながら腹水ガンが誘発されたマウスの生存を毎日調査した。対照群は同量の生理食塩水を投与した。全て 35 日間観察して 35 日目まで生存したマウスの生存期間は全て 35 日と見なした。

6. 自然殺害細胞 (NK cells) の活性測定

マウスの脾臓細胞を無菌条件で通常的な方法¹⁹⁾で準備して Hank's 液 (hank's balanced salt solution ; HBSS) で 2 回洗浄してから 10% FCS が加えられた RPMI 1640 完全培養液に $1 - 2 \times 10^6$ cells/ml の濃度で浮遊させた。

細胞毒性は 4 時間 chromium 遊離法 (4hr ⁵¹Cr release assay)²⁰⁻²³⁾を利用して測定した。すなわち、0.5ml (3×10^6) の Yac-1 標的細胞の浮遊液に 100 μ l の Na

$^{51}\text{CrO}_4$ を加えて 90 分間 37°Cの培養基内に置いて表示して RPMI 1640 培養液で 4 回の遠心洗浄した。

表示された標的細胞を 96well microplate の各 well に 5,000 個ずつ (10 μ l/w) を加えて脾臓細胞の浮遊液を 200l ずつ加えてからその plate を 37°Cの培養基内に置いた。4 時間後、各 well から培養上澄液の 100 μ l ずつをとって放射能を測定した。% 細胞毒性は次のような式によって算出した。

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{cpm of test} - \text{cpm of SR}}{\text{cpm of MR} - \text{cpm of SR}} \times 100$$

自然遊離量 (Spontaneous release ; SR) と全ての遊離量 (maximal release ; MR) は脾臓細胞浮遊液の代わりに各々同量の完全培養液と 1% TritonX - 100 を加えて割り出した。

7. 細胞毒性 T 細胞の活性測定

マウスに試料を 21 日間投与しながら、投与の最後の 10 日前に ICR マウスに 5×10^6 個の EL - 4 細胞を注入して免疫させた。試料の投与が終了した後、マウスの脾臓細胞を取って 4 時間 51-chromium の遊離法で細胞毒性を測定し、免疫させた EL - 4 細胞株を標的細胞で使用した。

実験結果

1. 安定性に関する実験

1) 一般症状および死亡率

少量群、中等用量群および大量群で試験期間の中で死亡または特異な中毒症状を表わすことはなかった。

2) 体重の変動

Figure 1. で示すように 2 週間平均 70g 内外の体重増加を見せたが、対照群と投与群が同じような体重増加現象を見せた。

3) 血液の検査

RBC は $3.44 - 4.03 \times 10^9$ /ml の正常値内に全て均等な数値を見せた。そして hemoglobin および hematocrit 値も正常の範囲内であった。WBC は対照群に比べて増加する傾向を見せたが、統計学的な有意性はなかった。

Ptone 液の 1.5ml ずつを注入して腹腔の大食細胞を刺激した。3 日後 5ml ずつの PBS を腹腔のなかに注入してから PBS と一緒に腹腔のなかの大食細胞を取り去った。

細胞を 2 回遠心洗浄して 5ml の完全培養液に浮遊させてから差し渡し 60mm のプラスチックの培養皿に移して 37°Cの培養基内に置いた。1 時間後、非付着性細胞を取

り去って reber policeman を使って付着性の細胞のみを取った。これらの細胞を完全培養液に $1 - 2 \times 10^6$ cells/ml 濃度で浮遊させ上のような方法で P 815 標的細胞に対する細胞毒性を測定した。

4) 血液の生化学的検査

Table 2. のような total cholesterol および alkaline phosphatase 値において大量では少し減少を見せたが、GPT、GOT、triacylglycerol、phospholipid についても対照群と有意な差はなかった。

5) 臓器の重量および解剖所見

Table 3. で示すように臓器の重量の有意な変化はなかった。また臓器の肉眼で観察が可能な特異所見も発見できなかった。

2. 検液がガン移植マウスの生存期間に及ぼす影響

Sarcoma - 180 のガン細胞を移植して腹水ガンを誘発させた後、検液を投与しながら測定したマウスの生存期間は Table 1. である。10mg/kg ($P < 0.01$), 30mg/kg ($P < 0.05$) の検液投与群の生存期間は各々平均 24.7 日、24.8 日として対照群(平均 19.1 日)より統計学的で有意に延長された。

3. 検液がNK細胞の活性に及ぼす影響

検液を投与して Sarcoma - 180 のガン細胞を移植した後、マウス脾臓細胞のNK細胞の活性を測定して対照群と比較した。対照群の平均値は正常群 (normal) の平均値より若干高く出たが、有意な差異はなかった。検液 30mg/kg 投与群のNK細胞の活性は E/T ratio, 40 : 1 で対照群より有意に ($P < 0.01$) が増加された。E/T ratio, 80 : 1 と検液 10mg/kg 投与した時にも control 群より高いNK活性値を見せたが、統計学的には有意な差異はなかった。

4. 検液が CTL (Cytotoxic T-lymphocyte) 活性に及ぼす影響

検液を投与した後、EL - 4 細胞で免疫させたマウスの CTL の活性を測定して対照群と比較した。検液投与群の CTL の活性は対照群と差異がなく、むしろ多少低下する結果を見せた。

5. 検液が大食細胞の細胞毒性に及ぼす影響

検液を投与した群の大食細胞の細胞毒性と対照群の大食細胞の細胞毒性を比較した結果、両者に有意な差異がなかった。

考察および結論

メシマを人工培養した菌糸体について実験動物にみられる毒性と抗ガン効果および

腫瘍免疫仕組を検討した。

培養菌糸体の毒性は検液を投与ができる限り大量 (1500mg/kg) で経口投与しながら体重および LD₅₀ を観察した時、全ての実験期間中、死亡は観察されず、体重も対照群と同じ pattern で増加した。またこの生存した rat の心臓採血をして血液学的 parameters を測定した。その結果は白血球数で若干の増加と total cholesterol 値で微少な増加を見せただけで統計学的には有意性がなかった。赤血球数、hct 値、Hb 値および GDT, GOT, TG, PL などは正常範囲内で維持された。従ってメシマの培養菌糸体の抽出物の LD₅₀ は 1500mg/kg 以上として安定性が認定される。

一方、山名などは Swiss 系マウスでメシマの培養菌糸体の抽出物が対照群に比べて 39.1% の延命率を見せて抗ガン効果を表わすと報告したことがある。本実験にも ICR 系マウスで 30ml/kg 検液の投与群が生理食塩水の投与群に比べて 39.4% の延命率を見せ本研究の試料で使った培養菌糸体の抗ガン活性を認定しなければならない。

現在、腫瘍について免疫起電に関与する抗癌性の作動細胞としては細胞性免疫に関わる感作された T - リンパ球すなわち、細胞毒性の T - リンパ球²⁴⁻²⁶⁾ と非特異的免疫機能に関連された自然殺害細胞 (Natural killer cell ; NK cell)²⁷⁻²⁸⁾ および大食細胞²⁹⁻³⁰⁾ などが報告されていた。NK 細胞は悪性の腫瘍細胞や virus-infected cells において細胞毒性を表わす一つのリンパ球 (large granular lymphocytes ; LGL)³¹⁻³²⁾ として表面免疫のグロブリンであるが、典型的な T - 細胞の抗原をも持ってなくて null 細胞³³⁻³⁴⁾ で分類されていた。また非付着性で細胞毒性 mechanism にあつては事前感作が必要ないので抗体の非依存性で nonspecific host defense に関与すると報告されていた。NK 細胞の生体内の作用は NK 細胞の活性度と腫瘍の発生率の間に有意な相関関係があつたという報告³⁵⁻³⁶⁾ と腫瘍を誘発させた動物に NK 細胞について抗体を投与すれば生体内での腫瘍細胞の生存が延長されたという事実³⁷⁻³⁸⁾ が立証されていた。細胞毒性の T - リンパ球 (Cytotoxic T - lymphocyte) の腫瘍免疫については Yron²⁵⁾ などが感作された T - リンパ球がガン細胞の表面抗原を認識して特異的で腫瘍免疫に関係すると報告したこともあり、Eberlein など²⁶⁾ thymus が除去された宿主の腫瘍が感作された T - cell の静脈注射によって完全な退歩を見ることによって CTL-mediated host defense を確認したこともあり、Walker など³⁰⁾ の大食細胞のガン細胞に対する細胞毒性も知られていた。

本実験を通じて、メシマの菌糸体が NK 細胞の活性を増加させる点で NK 細胞の活性の増強がメシマの抗ガン作用に寄与する要因の一つであると考えられる。しかし、メシマの抗ガン活性の成分が NK 細胞の活性を増強させる mechanism に対しては実験することができなかった。Timonen など³⁹⁻⁴⁰⁾ は interferon の NK 細胞の活性増強作用について結合が可能な LGL としての転換 (converting some nonbinding LGL to target-binding LGL), 結合された LGL の活性化 (activating nonlytic binding LGL), 標的細胞の破壊機能の加速化 (increasing the rate of lysis of lytically

active binding NK cells), 標的細胞に対する再結合機能の促進 (facilitating recycling of NK cells by eliminating refractoriness to rebinding by LGL) の mechanism で作用すると報告したこともある。メシマも interferon の場合と類似な作用が起るといふことも推測されるため、本実験として抗ガン活性増進の作用までは確認することができなかった。

以上の結果をまとめると、メシマの培養菌糸体の抽出物は正常動物では毒性がきわめて微弱するとみられるし、脾臓でのNK活性は増進させたが、細胞毒性のTーリンパ球と腹腔の大食細胞の活性には影響を及ぼさないことがわかる。

以上の結果はメシマがNK細胞機能に作用して宿主の非特異的な免疫機能を増強させ抗ガン活性を発揮すると思われる。