

メシマコブの抗腫瘍性成分について

金沢大学薬学部製薬化学科

太田 富久教授

第1章 メシマコブ (*Phelinus linteus*) エキスの抗腫瘍成分の探索

第1節 メシマコブエキスの分画

メシマコブの抗腫瘍性物質の探索を行なうにいたって、第1章と同様に経口投与で、*in vivo*による抗腫瘍性試験を行なった。メシマコブエキスは、メシマジャパンから購入した。分画方法は、Chart 6.のような方法が最善であるとして抽出・分画をすすめた。多糖類はEtOHへの溶解性が低いことから、PL-1、PL-2の主成分は多糖類と推定できる。得た量から、メシマコブエキスの主成分は多糖類ではないか、と推測できる。メシマコブエキス PL-ww の抗腫瘍活性を確認した上で、その各画分を抗腫瘍性試験 (*in vivo*)にかけ、活性のある画分をさらに分離していき、抗腫瘍性試験 (*in vivo*) と同時進行で分離・精製を行なうことでメシマコブエキス中の抗腫瘍性成分の探索を行なった。

1998年韓国新薬の報告によると、Sarcoma-180に対する免疫活性化作用による成長阻害率が担子菌類で最高の96.7%であった、という報告がされている。菌類は株種により性質が異なることがあるため、今回購入したメシマコブエキスに同じような活性があるかどうかという確認を行なった。さらに、韓国新薬の報告は静脈適用であるのに対し、経口投与による方法でその比較を行なった。今回、抗腫瘍性試験 (*in vivo*) に用いた試料は、メシマコブエキス PL-ww と、メシマコブエキスにEtOHを加えて沈殿させることによって得た画分、PL-1、PL-21、PL-22、PL-31、PL-32を用いた。

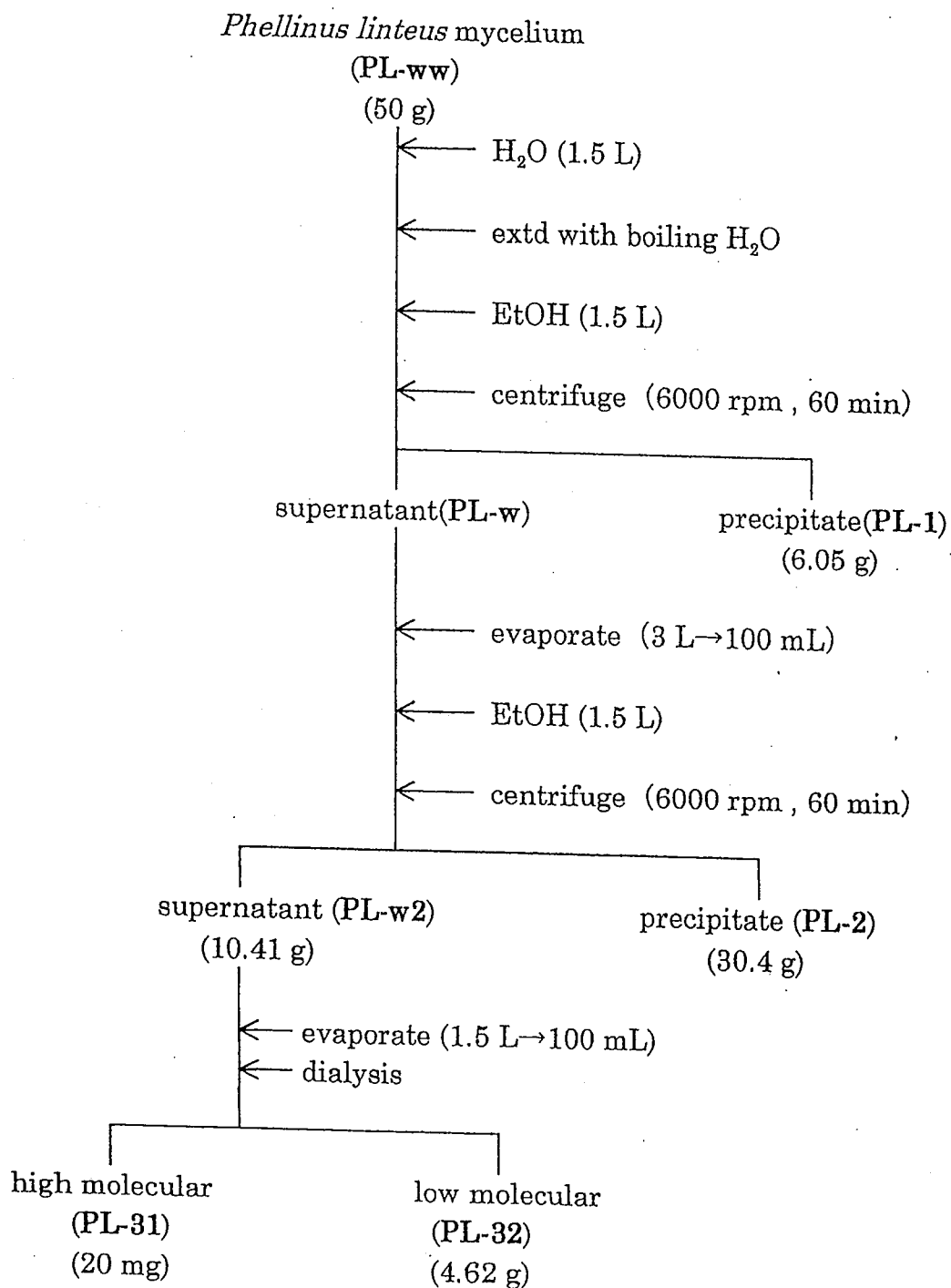


Chart 6. Separation Procedure of Active Substance in H₂O Extract of *Phellinus linteus* Mycelium with Boiling Water

第2節 抗腫瘍性試験 (*in vivo*)

各画分、PL-ww、PL-1、PL-21、PL-22、PL-31、PL-32 について *in vivo* で抗腫瘍性試験を試みた。ICR/JCL 近交系マウスを用い、5週令、雌、6匹 / 群とし、餌は蒸留水とマウス用ダイエツトフードを与えた。ガン細胞は本研究室で継代培養した固形ガン、Sarcoma-180 を使用した。ガン細胞は右股皮下に移植し、薬物は移植後 1 日から 10 日間経口投与した。移植 4~5 週間後まで 1 週間に 2 回、体重と腫瘍容積の観察を行い、最終日にガン細胞摘出しガン細胞重量を測定した。移植の失敗したマウスは、実験対象としなかった。ガン細胞容積は、長径及び短径から換算した。おおよそガン細胞の密度は同じとした。

Fig 11. と Fig 12. と Fig 13. に示すのはその結果である。グラフの上昇がガン細胞の成長を示している。この結果より、メシマコブエキス PL-ww は約 90% の抗腫瘍活性のでているが、最も活性の高かった画分 PL-31 でも 48.3% と、各画分の活性が低いことがわかる。このことは、メシマコブエキス PL-ww 中の活性成分が混合物の状態ではじめて活性を示す物質であるか、その活性物質は非常に不安定な物質で分画途中で壊れた、もしくはアッセイが失敗していた、など考えられる。

Fig 14. と Fig 15. に示すのは摘出後腫瘍で、メシマコブエキス PL-ww と最も活性の高かった PL-31 である。PL-ww に著しい抗腫瘍活性があることがわかる。

Fig 16. と Fig 17. と Fig 18. に示すのは、抗腫瘍性試験中の体重の推移である。結果をみる限り、どのサンプルでも投与中だけ体重が減少する、といった副作用が見られなかったことから、メシマコブエキスには副作用がなかったということが言える。

また、各画分の最終的な摘出ガン細胞重量から求めた抗腫瘍活性を Table 4. に示した。抗腫瘍活性 (%) は、ガン細胞成長阻害率である。最も活性の高かったのは、PL-ww 画分 (89.7%) であった。

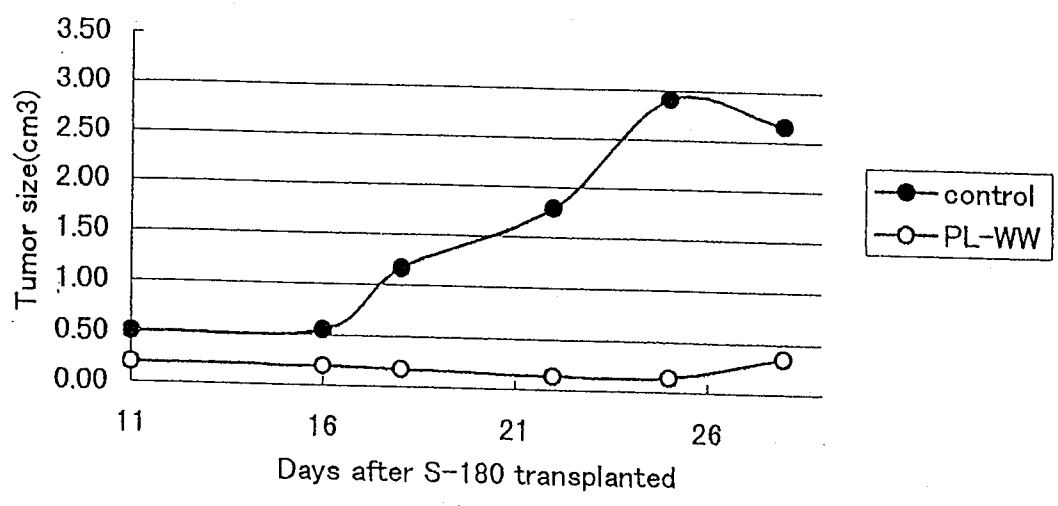


Fig 11. Effect of *Phelinus linteus* on Growth of Sarcoma-180 in Mice by *In-Vivo* Test

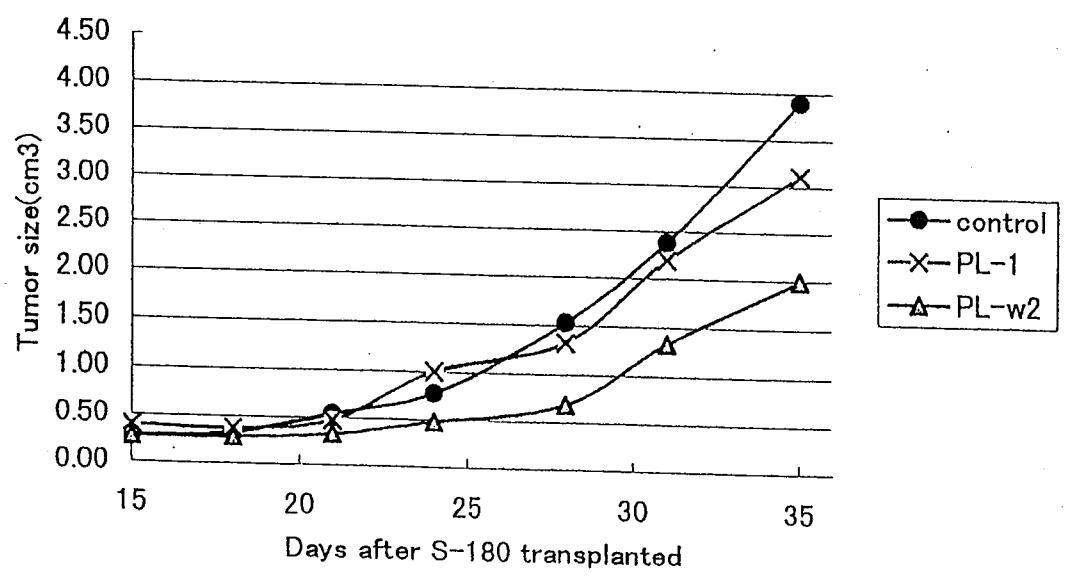


Fig 12. Effect of *Phelinus linteus* on Growth of Sarcoma-180 in Mice by *In-Vivo* Test

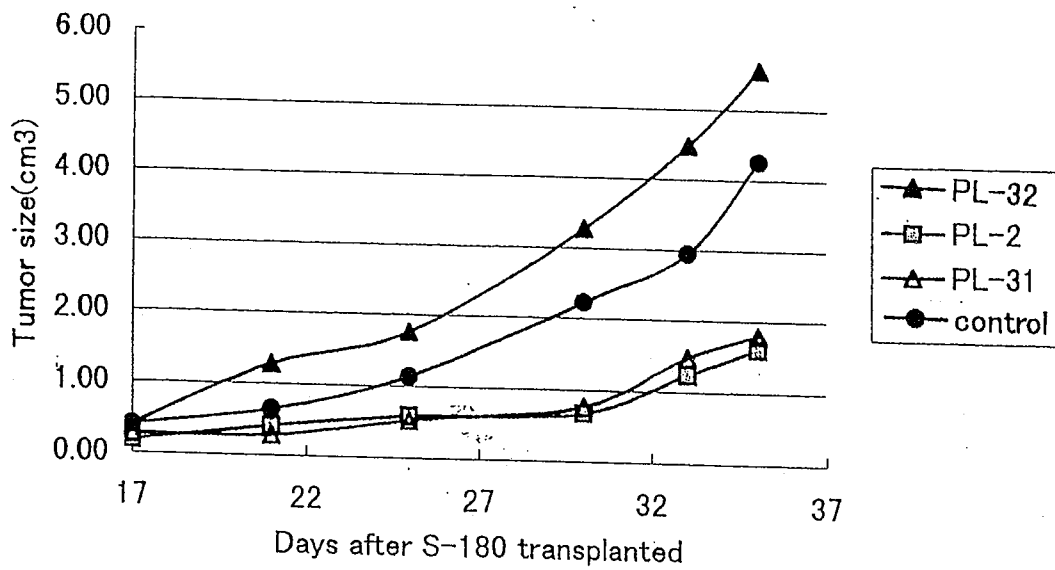


Fig 13. Effect of *Phelinus linteus* on Growth of Sarcoma-180 in Mice by *In-Vivo* Test

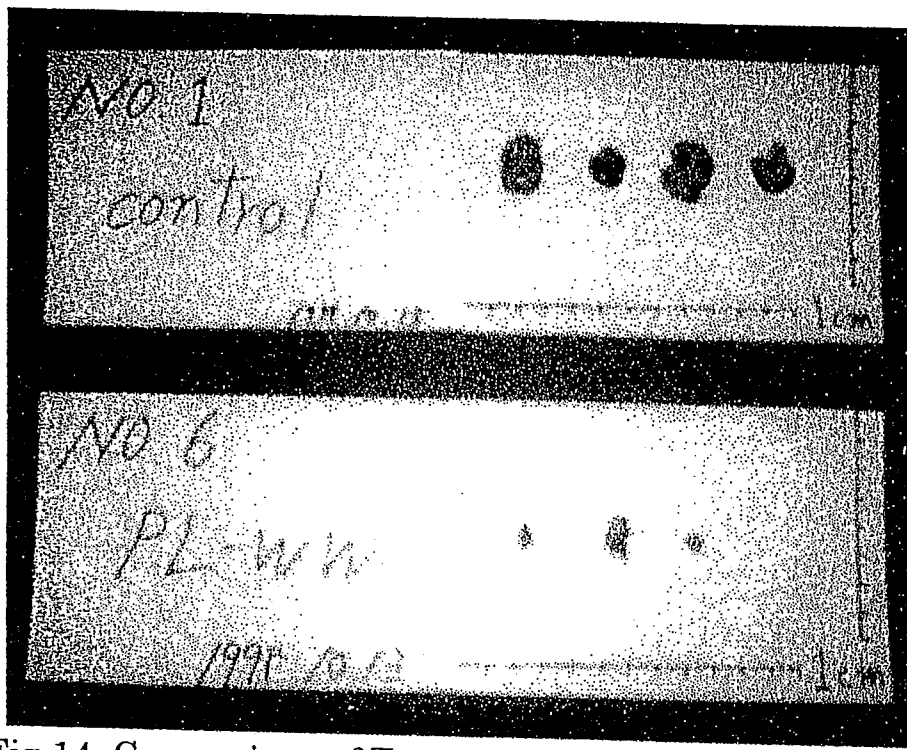


Fig 14. Comparison of Tumor Size between 'Control' and 'PL-ww'

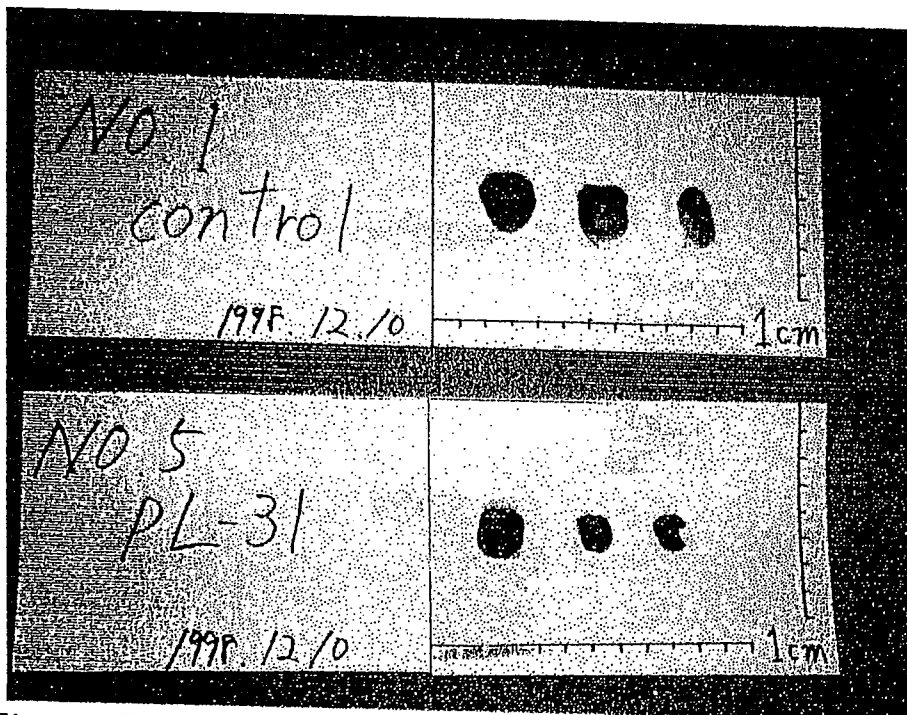


Fig 15. Comparison of Tumor Size between 'Control' and 'PL-31'

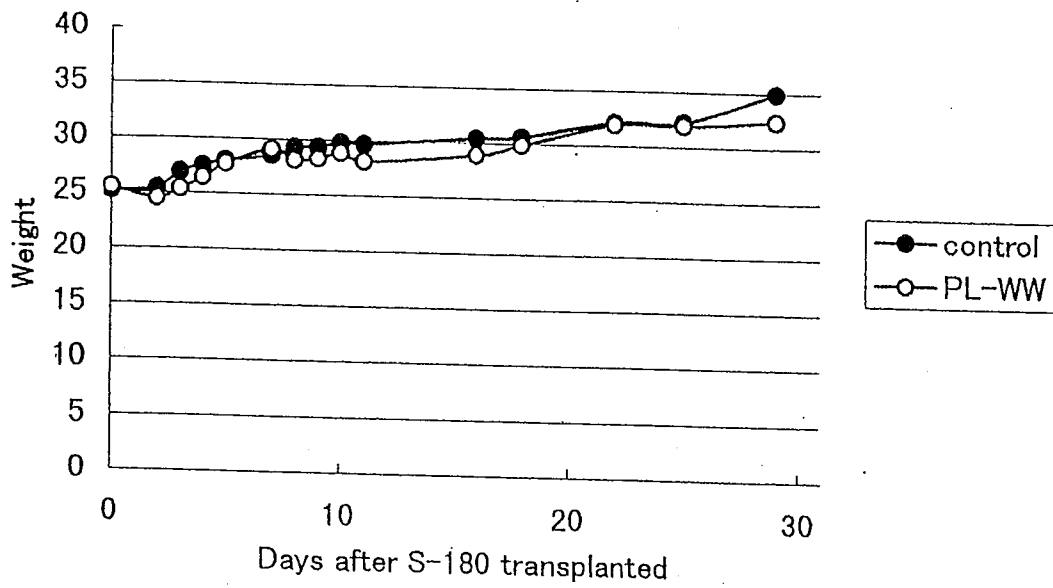


Fig 16. Effect of *Phelinus linteus* on Mice Weight

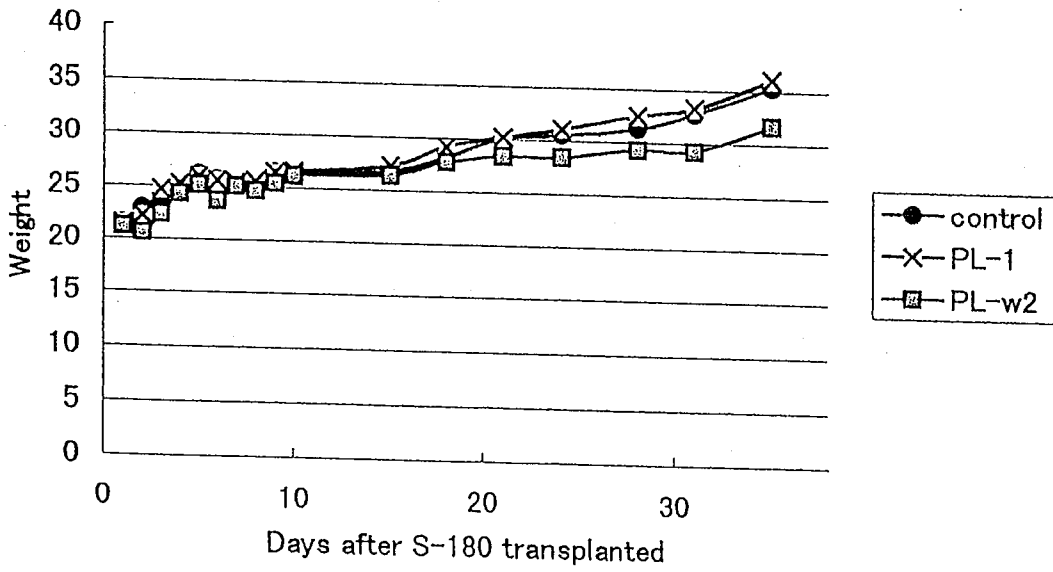


Fig 17. Effect of *Phelinus linteus* on Mice Weight

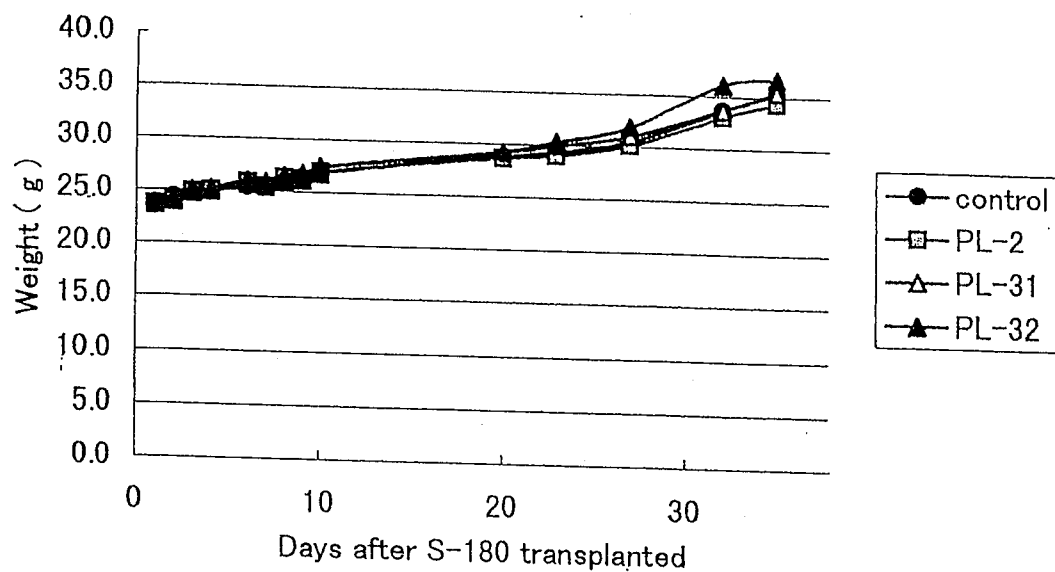


Fig 18. Effect of *Phelinus linteus* on Mice Weight

	Dose (mg/kg/d, p.o.)	Schedule	Average Tumor wt.(g)	Inhibition Ratio (%)
Control PL-ww	100	Days 1-10	2.42 0.25	89.7
Control PL-1 PL-w2	100 100	Days 1-10	3.18 2.93 1.69	8.0 47.0
Control PL-2 PL-31 PL-32	100 100 100	Days 1-10	4.28 2.47 2.19 4.59	41.8 48.3 8.3

Table 4. Effect of *Phelinus linteus* extract Administered per os on Growth of Subcutaneously-Implanted Sarcoma-180

※ mouse : ICR / JCL (5 weeks old, female, 6 mice / group)

第3節 結語と考察

今回のメシマコブの研究により、メシマコブエキス PL-ww は、固形ガン Sarcoma-180 を移植したマウスに対して約 90%の成長阻害活性が認められた。そしてその抗腫瘍活性成分は高分子非多糖画分 PL-31 に存在することがわかった。1997年韓国新薬の報告では、その抗腫瘍性作用はマクロファージや補体システムの活性化による免疫活性化作用である事がわかっている。また、1996年慶熙大学東西医学研究所の報告では、LD₅₀が 1500 mg / kg 以上の安全性があることがわかっている。以上のことより、これからのメシマコブの研究はおおいに期待されうるものであるといえる。今後、これらの活性画分の Sephadex G-25 や HPLC による更なる分画と、*in vivo* や *in vitro* 試験を進めていき活性物質の単離とその構造式の解明を行ないたいと思う。

実験の部

特に断らない限り、以下の原料、装置、条件、操作で実験を行なった。

【原料】

メシマコブエキス：メシマジヤパン株式会社から購入。(メシマコブエキス末 100 g 入)

【癌細胞培養】

Sarcoma-180 腹水ガン細胞：マウスの腹腔内 (37°C) で継代培養した。継代は1週間に1回とし、シリンジで 0.05 mL の腹水を新たなマウスの腹腔内に移植した。

【装置】

薄層クロマトグラフィー (TLC) : MERCK Silica gel 60F₂₅₄、MERCK Cellulose F を使用。UV (254 nm)、蛍光 (365 nm) で検出。その後 5% 硫酸、塩化第二鉄試薬、Ninhydrin 試薬、Dragendorff 試薬又は Anisaldehyde 試薬を噴霧後、発光又は加熱発光させた。

カラムクロマトグラフィー：Florisin Florisil を使用。

マウス：CLEA ICR/JCL 近交系マウス (5週令、雌、6匹/群)

透析：SPECTRUM MWCO : 6-8000 で1週間の行なった。水の交換は4回行ない、通過第1液と第2液のみを凍結乾燥させ、その他の通過液は捨てた。

¹H-NMR : CD₃OD 中、JEOL GSX-500 (1H : 500 Mhz) で測定した。なお結合定数(J) は Hz で示し、内部標準物質は TMS [trimethylsilane] を使用した。

質量分析 (MS) : JEOL JMS SX-102

第一節 メシマコブ(*Phellinus linteus*)エキスの分画

メシマジヤパン株式会社より購入したメシマコブエキスを PL-ww とした。PL-ww(50 g)を H₂O 1500 mL に溶かした後、EtOH (1500 mL) を加え多糖類を沈殿させ、遠心分離 (8000 rpm, 60 min) により上澄 PL-w と沈殿 PL-1 (6.05 g) に分離した。上澄 PL-w は、濃縮 (3000 mL→100 mL) し、EtOH を 1500 mL を加えた。これを遠心分離 (8000 rpm, 60 min) し、上澄 PL-w2 と沈殿 PL-2 を (30.4 g) 得た。上澄 PL-w2 は濃縮 (1600 mL→約 50 mL) して透析し、高分子成分 PL-31(20 mg) 及び低分子成分 PL-32(4.62 g) を得た。

第二節 抗腫瘍性試験 (*in vivo*)

1) ガン細胞懸濁液 (Sarcorna-180) の調製

継代培養して1週間したマウスの腹水 $20\mu\text{L}$ を生理食塩水で2倍希釈し、10倍希釈し、さらに10倍希釈を2回して200倍希釈とした溶液に0.25%のtrypane blue 染色液を1:1の割合で $20\mu\text{L}$ ずつ加えたものを、血球計算盤で $1/16\mu\text{m} \times 1/16\mu\text{m}$ の枠16マス中の染色された(生存している)ガン細胞を数え、希釈倍数でかけることによりその腹水内のガン細胞濃度 (cells / mL) を求めた。その濃度より、 $0.4\sim 1.0 \times 10^8$ cells / mL になるように調製した。飼料

2) マウスへの移植とランダムマイズ

調製したガン細胞懸濁液を、マウス右足の付け根の皮下にシリンジで 0.05mL 移植 (i.p.) した。移植1日後マウスを1箇所を集め、各ケージのマウスの総重量がだいたい同じになる様にランダムに仕分けした。そして、それぞれのマウスをピクリン酸でマーキングした。(Head、Body、Tail、Head&Tail、Head&Tail、No mark)

3) 試薬の調製と薬物の投与

各サンプルは $10\text{mg} / \text{mL}$ になるように蒸留水で希釈し調製した。その試薬を移植後1日目から10日目の間 $0.01\text{mL} / \text{g}$ (weight)をゾンベで経口投与 (p.o.) した。その間、常に体重を量り体重の10%以上の変動がある場合は、副作用があるものとみなして投薬を見合わせた。Controlは、蒸留水を与えた。

4) 抗腫瘍活性測定

移植して2週間後から5週間後まで、1週間に2回の間隔でノギスで腫瘍の長径、短径を測定した。その長径 \times 短径 $\div 2$ を計算して、それを仮の容積とした。移植後5週間の日に、マウスの腫瘍を眼科用外科バサミで切り取った。この際、移植が皮下でなく筋肉内や腹腔内に入ったと思われるものは省いた。取り除いた腫瘍の重量を量り、各ケージ平均値を計算してcontrolの腫瘍重量を基

準として抗腫瘍活性を計算した。

$$\frac{\text{腫瘍重量(control)} - \text{腫瘍重量(サンプル)}}{\text{腫瘍重量(control)}} = \text{抗腫瘍活性 (\%)}$$

平成10年9月15日

抗腫瘍性試験プロトコル

【目的】

経口投与方法による、マウス移植がんに対する抗腫瘍性試験

【試験材料】

1. 投与サンプル

- 1) 生理食塩水 (control)
- 2) 10 mg/mL の濃度のサンプル水溶液を、100 mg/kg の割合で経口投与する。

【動物】

ICR マウス (5週令、雌、6匹/群)

【腫瘍細胞株】

Sarcoma 180. 37 °C で継代培養した。

【方法】

- 1) マウス片足の皮下に、あらかじめマウス腹腔に投与して増殖させたがん細胞を、 5×10^6 cells/mous の割合で移植する。
- 2) Day 1～Day 10 の間、一日一回、サンプル水溶液を経口投与する。
- 3) 5週間に渡って半週間毎にがん組織の大きさを計測する。
- 4) 5週後、がん組織を取り出し、重量を計測する。

腫瘍重量 9月14日 ~ 10月14日
(g)

10月14日	control	BST-WW	BST-1	BST-31	BST-32	PL-WW
	2.15	1.5	1.72	0.46	0.88	0.14
	1.83	1.07	3.77	1.56	0.6	0.47
	3.27	1.8	3.51	0.31	0.48	0.13
	1.51	2.35		2		
average	2.190	1.680	3.000	1.083	0.653	0.247
抗腫瘍活性		0.233	0.37	0.505	0.702	0.888
%		23.30%	37.00%	50.50%	70.20%	88.80%

抗腫瘍性試驗(容積)

