

# メシマの抗ガン成分に関する研究抗ガン効果（作用）の仕組み

1992年 10月 30日

ソウル大学 薬学部

金ビョンガク

## I. 序論

最近ガンに対する生体免疫系の反応についてより進展された理解と幅広い分析で宿主の防御方式を多様な仕組みで説明することが可能になった。一方、腫瘍細胞に直接作用して成長抑制または死滅をもたらした。生体の免疫反応を強化させたり、防御体系を活性化する中継者に作用して宿主のガンに対する防御能力を増加させる仕組みおよび腫瘍細胞の宿主の免疫体系に対する感受性を高めて宿主の抗腫瘍効果をあらわした。また、腫瘍細胞に作用して変異細胞の変異度を落して未分化された腫瘍細胞を促進させ分裂しない成熟された細胞でつくる仕組み以外にも腫瘍に対する抗ガン化学療法および放射線療法によって生体の細胞毒性に対する被害を軽減させることによって腫瘍の治療効果を増加させる仕組みなどが発表された。このような仕組みをあらわす物質をひっくるめて生体反応調節物質 (biological response modifier=B RM) と呼ぶ。こういうものは合成された化学療法剤とは別に生体の生物学的反応に影響を及ぼしてガンに対する抑制効果をあらわして治療の時副作用を減らせるのみならずその効果も増加させることが可能である。

メシマ (*Phellinus linteus*) が免疫細胞の大食細胞およびT - リンパ球の機能に及ぼす影響を実験してその結果を取り上げようとする。

## II. 実験方法

### 1. 免疫学的研究

1) マウスの大食細胞 (macrophage) の活性化に及ぼす影響。

(A) Superoxide anion (SOA) 量の測定

a) 実験動物: ICRマウス (♂、20—25 g) を使用した。

b) 試薬および材料

(i) Phosphate buffered saline (PBS, pH7.3)

(ii) Ferricytochrome C IV (Sigma Chem. Co., U. S. A)

(iii) Human serum (Sigma Chem. Co., U. S. A)

(iv) RPMI 1640 medium (Sigma Chem. Co., U. S. A)

RPMI 1640 16.4 g, NaHCO<sub>3</sub> 2g, L-glutamine 0.292 g を三回蒸溜水 900ml に溶かしてから penicillin-streptomycin-amphotericin B を 1ml 加えて滅菌濾過した後、56°C で 30 分間不活性化させた fetal calf serum 100ml を加えた。

(v) Cell culture multiplate well (Falcon Co., U. S. A)

(vi) Opsonized zymosan

Zymosan A (Sigma Chem. Co., U. S. A) を 10mg/ml で P B S に入れて 1 時間沸かしてから 3 回遠心分離で洗浄して 50mg/ml 濃度で P B S に溶かした後、zymosan と human serum を 1 : 4 の比率で混合して 37°C で 30 分間培養した後、遠心分離して zymosan 沈澱物に P B S で最後の濃度が 10mg/ml になるように製造した。

c) 実験方法

(i) ガン移植および試料の投与

I C R マウスを四群に分けて実施した。正常マウス群 (N 群)、正常マウスに試料を投与した群 (NS 群)、sarcoma 180 の細胞を左側の鼠蹊部に皮下移植した群 (T 群)、そして sarcoma 180 の細胞を左側の鼠蹊部に皮下移植した後、試料を投与した群 (TS 群) で分類して実験した。各群は 4 匹マウスを使って NS 群と TS 群には試料 50mg/kg/day の量で 5 日間毎日 1 回ずつ続いて腹腔のなかに投与して、N 群と T 群には生理食塩水を投与した。

(ii) 腹腔細胞の中での大食細胞の製造

最後の試料の投与日から 5 日目の時、マウスを致死させ P B S で腹腔細胞を取り 1200rpm で 10 分間遠心分離して沈澱された細胞を  $1 \times 10^6$  cells/ml で R P M I 1640 の培養基に浮遊させ 37°C で 2 時間培養した後、plate に付いている大食細胞を取った。

(iii) Superoxide anion (S O A) 量の測定

大食細胞に 10mM glucose, 80 $\mu$ m ferricuchrome C と 0.2mg/ml opsonized zymosan を含有する P B S 1.5ml を加えて 37°C で 90 分間培養してから 1200rpm で 10 分間遠心分離する。そしてその上澄液は冷たい試験管に移して 550nm で吸光度を測定して大食細胞  $1 \times 10^6$  cell 当たり S O A 量を算出した

(Scheme I)。

$S O A \text{ nmol}/10^6 \text{ macrophages}/90 \text{ mins.} = O. D \text{ at } 550 \text{ nm} \times 15.87$

### Normal and Tumor bearing mice

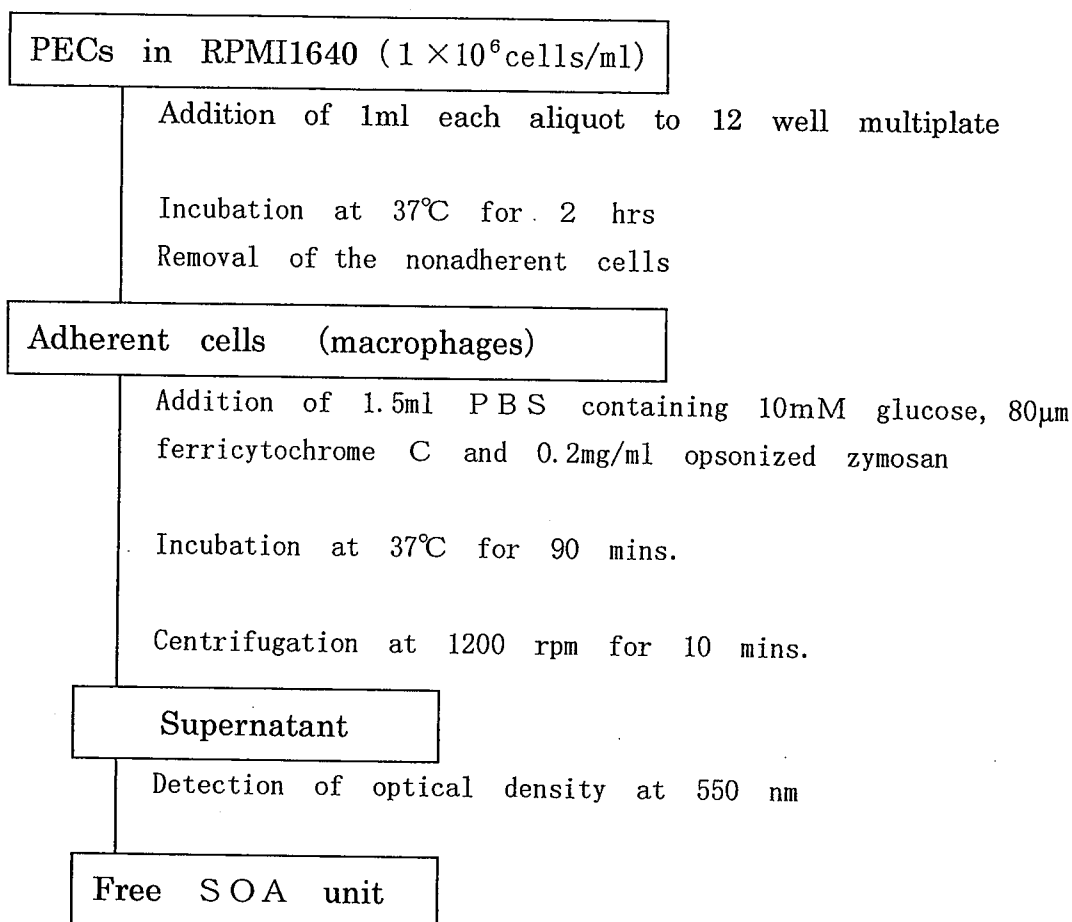
Administration of samples once daily for 5 consecutive days (i. p., 50mg/kg/days)

Sacrificing by cervical dislocation

Collection of PECs with ice cold PBS

Centrifugation at 1200 rpm for 10mins

Counting the PECs.



Scheme I. Procedure for superoxide anion (SOA) assay.

## 2) マウスのTリンパ球の活性化に及ぼす影響

### (A) 遅延型過敏反応 (Delayed type hypersensitivity ; DTH) 測定

#### a) 実験動物

ICRマウス (♂、20~25 g) を使用した。

#### b) 実験方法

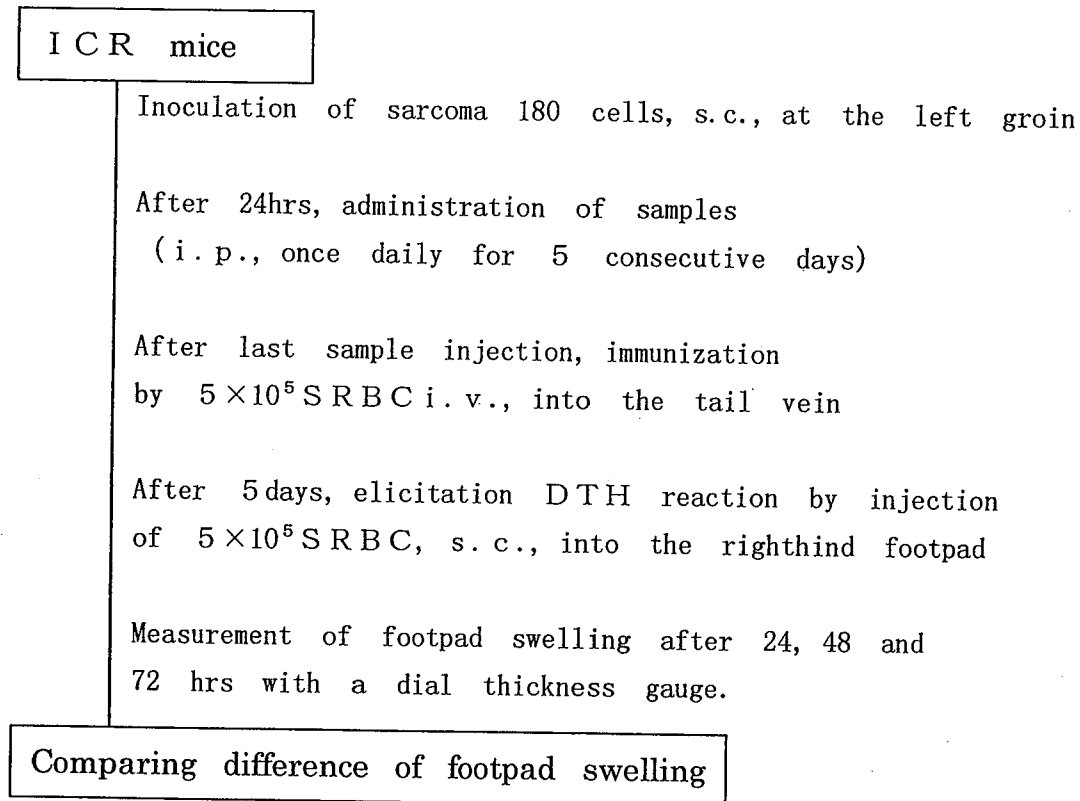
##### (i) ガン移植および試料投与

ICR マウスを四群に分けて実施した。正常マウス群 (N群)、正常マウスに試料を投与した群 (NS群)、sarcoma 180 の細胞を左側の鼠蹊部に皮下移植した群 (T群)、そして sarcoma 180 の細胞を左側の鼠蹊部に皮下移植した後、試料を投与した群 (TS群) に分類して実験した。各群は4匹マウスを使ってNS群とTS群には試料50mg/kg/dayの量で5日間毎日1回ずつ続けて腹腔のなかに投与した。N群とT群には生理食塩水を投与した。

##### (ii) 遅延型過敏反応の測定

試料投与の最後の日  $5 \times 10^6$  SRBC をマウスの尻尾の静脈に投与して感作

させてから5日後 $5 \times 10^6$  SRBCをマウスの右側の足裏に投与した。同時に左側の足裏には生理食塩水を投与して比較値に取った。24、48、72時間後の足の厚さ(足の裏と足の甲との間)をmicrometer (Mizutoyo Co., Japan)を使って測定した。右側の足の厚さで左側の足の厚さを差し引いて足の浮腫の厚さを遅延型過敏反応の尺度で取った(Scheme II)。



Scheme II. Procedure for delayed type hypersensitivity assay.

### III. 実験結果

#### 1. マウスの大食細胞の活性化に対する効果

メシマの抗ガン成分をICRマウスの腹腔のなかに注射した時の効果をTable Iに要約した。すなわち、normal mice (N群) に比べてSuperoxide anion量が約3倍増加し、Tumor miceにも約5倍増加した。従ってメシマの抗ガン成分が大食細胞の活性化を3~5倍増加させることがわかる(Table I)。

Table I. Effects of antitumor components of *Phellinus limteus* on the release of superoxide anion by peritoneal macrophage in normal and tumor-bearing ICR mice.

GROUP	MICE	DOSE	SOA release	Stimulation
		(mg/kg/day)	(mean ± S. E)	index
N	Normal	0	0.36 ± 0.09 <sup>a)</sup>	1.00
NS	Normal	50	1.19 ± 0.37 <sup>b)</sup>	3.31
T	Tumor -	0	0.44 ± 0.15 <sup>c)</sup>	1.22
TS	bearing	50	2.01 ± 0.34 <sup>d)</sup>	5.58

d) vs a), b), c) : <0.05 (Duncan's test)

## 2. マウスのT-リンパ球の活性化に対する効果

メシマの抗ガン成分をICRマウスの腹腔のなかに注射した時、遅延型過敏反応に及ぼす効果をTable IIで示した。すなわち、normal miceに抗ガン成分を投与した後、24時間経ったとき、その反応が約3倍増加した。しかし、48時間後、および74時間後に測定したときにはその反応には有意な差が見られなかった。そしてtumor-bearing miceにもその反応は有意な差がみられなかった (Table II)。

Table II. Effects of antitumor components of *Phellinus linteus* on the Delays type hypersensitivity to SRBC in mice.

GROUP	MICE	DOSE (mg/kg/day)	Footpad thickknness (X 0.1 mm ± S. E)		
			24hrs	48hrs	72hrs
			N	Normal	0
NS	Normal	50	8.0 ± 1.7 <sup>b)</sup>	3.7 ± 0.8	1.9 ± 0.7
T	Tumor	0	5.1 ± 1.6	3.0 ± 1.2	1.4 ± 0.6
TS	Tumor	50	4.0 ± 1.4	2.1 ± 0.6	2.6 ± 0.4

a) vs b) : <0.05 (Duncan's test)

## IV. 結論

メシマの抗ガン成分が免疫体系のなかで重要な細胞の大食細胞の活性を3~5倍増強させた。また大切な免疫細胞のT-リンパ球の遅延型過敏反応が正常マウスで約3倍増強された。従ってメシマの抗ガン成分の作用仕組は免疫力の増強によって確認された。