

## フクロタケ抽出物の抗腫瘍活性および抗潰瘍活性

沢 田 裕 二  
 鈴 木 浩  
 小 岩 次  
 西 成 宏  
 加 藤 喬 雄

### Antitumor and Antiulcer Activities of Fukurotake Extracts

Yuji SAWADA  
 Hiroshi SUZUKI  
 Seiji KOIWA  
 Akihiro NISHI  
 Takao KATO

Antitumor and antiulcer activities of the extracts of an edible mushroom, *Volvariella volvacea*, have been investigated. Active fractions S and UND of the alkaline extract showed a marked antitumor effect against the transplantable mouse tumors such as Sarcoma 180 and Ehrlich carcinoma, as well as the Fibrosarcoma induced by methylcholanthrene. The fraction S which contained polysaccharide revealed a broad antitumor spectrum similar to those of  $\beta$ -1,3-glucans, while the fraction UND had a somewhat limited antitumor spectrum. Furthermore, the cold water extract of *Volvariella volvacea* was found to exhibit a profound antiulcer activity through the cytoprotective effect in the ethanol-induced stomach ulcer experiments.

#### 1. はじめに

キノコ類は食用として広く用いられているばかりでなく、抗腫瘍作用<sup>1),2)</sup>、抗菌作用<sup>3)</sup>、抗ウイルス作用<sup>4)</sup>などの薬効が報告されている。また古くから漢方薬の原料として用いられており、生理活性物質の抽出源として非常に興味深いものである。

フクロタケ (*Volvariella volvacea*) は台湾などで人工栽培されており、中国料理などに使用される食用キノコで、分類学的には担子菌類ハラタケ目のうち、テングタケ科に属し、Fig. 1 に示すような独特の袋を有するのが特徴である。三崎らはこのアルカリ抽出画分 (AE) にマウス移植腫瘍サルコーマ 180 (S-180) に対して高い抗腫瘍活性が存在することを見出した<sup>5)</sup>。我々はこの AE 画分が既知の抗腫瘍性多糖と比較して、抗腫瘍スペクトル

や活性成分などで違いを有するかを明らかにするために

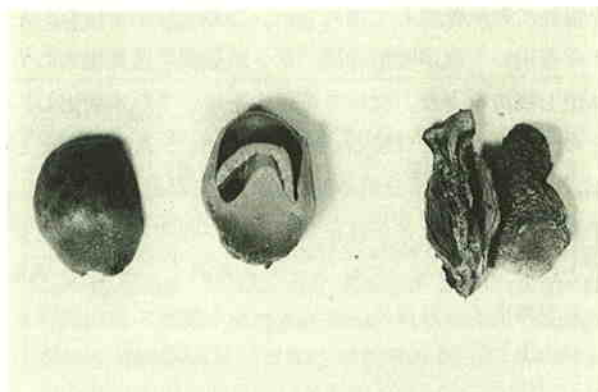


Fig. 1 Fukurotake fruit body.  
 Left: Whole fruit body (wet), Center: Section of fruit body (wet), Right: whole fruit body (dry)

実験を行った。

またフクロタケの冷水抽出画分 (CWE) には今までキノコなどの担子菌類では全く知られていなかった抗潰瘍性が、アルコール誘発性の潰瘍モデルを用いた実験系により確認されたのであわせて報告する。

## 2. フクロタケアルカリ抽出画分 (AE) の抗腫瘍性について

癌の化学療法剤として臨床で多く用いられている制癌剤のほとんどが細胞毒であり、癌細胞に対しての直接細胞障害作用を有する。しかし宿主に対しても毒性を示すので、その副作用の軽減が大きな課題となっている。一方、腫瘍に対する宿主の生物学的反応を修飾することにより結果として治療効果を得ようとするバイオリジカル・レスポンス・モディファイアー (BRM) という概念が定着して、多くの研究開発が進められている。宿主の免疫力を増強させて癌を治療していこうとする抗腫瘍性多糖もこのような BRM の一部とされている。副作用が少なく、延命効果があることなどを特徴として、従来使用されてきたクレスチン<sup>6)</sup> に続いて、レンチナン<sup>7)</sup> とシゾフィラン<sup>8)</sup> が最近相次いで認可された。しかしこれらの薬品も他の制癌剤との併用などの条件が付けられており、免疫療法剤の使用法は補助的なものという評価が固まってきている。このような状況下で、我々は新たに見出されたフクロタケの AE 画分の抗腫瘍性がレンチナンなどの既存の抗腫瘍性多糖と比較して、次世代の抗腫瘍性多糖としての特徴 (例えば経口投与での有効性、広い抗腫瘍スペクトルなど) を有するかを確認するために、さらに分画を加え同系腫瘍などへの効果を調べた。

### (1) フクロタケ AE 画分の調製法

原料のフクロタケ子実体は台湾で人工栽培されたものを現地で熱風乾燥して輸入した。この乾燥子実体をミキサーを用いて細かく粉碎後、リン酸緩衝生理食塩水にて抽出し残渣を得た。次いで蒸留水を用いて熱水抽出し、その残渣をさらに 1N-NaOH で抽出して AE 画分とした。この画分は元素分析や蛋白質の定量などの結果より、多糖類と蛋白質などが混在しており、既知の抗腫瘍性多糖とは成分が異なっていると考えられた。そこで AE 画分を再度水に懸濁後、フェノールを加えて抽出操作を行い、水相に残る S 画分とフェノール相に移る UND 画分の二つの活性画分を得た。

フクロタケ抽出画分のそれぞれの性質を簡単にまとめる。AE 画分はジメチルスルホキシド (DMSO) を溶媒として用いたゲル滲過 (東ソー株式会社製 TSK-Gel

G6000PW+G4000PW を使用) において分子量約10万と100万以上の主に2つのピークを持ち、元素分析による窒素含量は1.7%、水にはほとんど溶解しなかった。S画分はゲル滲過では分子量100万以上にメインピークを有し、窒素含量は0.3%と低く、水にはほとんど溶解しなかった。ほぼ均一な多糖と考えられ、構造解析の結果、1,6の分枝を持つ  $\beta$ -1,3グルカンであることが判明した。UND 画分は分子量数万の位置にメインピークを有し、窒素含量は8.7%と高く、AE 画分の蛋白質成分が濃縮されていた。水溶性も他の2サンプルに比較して良かった。AE 画分の原料の乾燥子実体からの収率は5%程度で、S画分はAE画分から約50%、UND画分は2%程度の収率であった。

### (2) 抗腫瘍性試験法

試験に使用した腫瘍のうちサルコーマ 180 (S-180), エールリッヒ・カルシノーマ (Ehrlich), メチルコランズレンで誘導したフィブrosalコーマ (MC) の3種類は国立がんセンター研究所佐々木琢磨博士 (現金沢大学がん研究所) より、IMC カルシノーマ (IMC), MM46, Colon-38, Meth-A フィブrosalコーマ (Meth-A), MH134 の5種類は北里研究所小宮山寛機博士よりそれぞれ分与を受けた。使用したマウスのうち ICR は日本クレアより、CDF1, C3H/He, DBA/2, C57BL/6, BALB/C は日本チャールス・リバーよりそれぞれ購入した。

各サンプルはその水溶性に応じて、生理食塩水もしくは0.5% CMC 水溶液を用いてそれぞれの投与量に調製して使用した。S-180 による最適条件の検討結果より、投与量は AE および S 画分では 100 mg/kg (合計投与量)、UND 画分では 200 mg/kg、レンチナンでは 10 mg/kg を中心として必要に応じて 3~5 Dose をとって試験した。腫瘍は腹水癌もしくは固型癌により継代されたものから常法<sup>9)</sup> に従って、細胞懸濁液を調製して  $1\sim5\times 10^6$  個をマウスそけい部皮下に移植した。治療は移植翌日より、サンプルを連続10日間腹腔内投与して行った。

効果の判定は、毎週体重と腫瘍サイズを測定し増殖曲線を求めるとともに35日後に動物を屠殺して腫瘍を摘出後、その重量を測定して、増殖抑制率を算出した。

抑制率 Inhibition Ratio (IR) は次式によった。

$$IR(\%) = \left(1 - \frac{\text{処置群腫瘍重量 (g)}}{\text{対照群腫瘍重量 (g)}}\right) \times 100$$

Meth-A および MH134 を用いた実験系では、生存日数で無処置対照群との比較を行った。

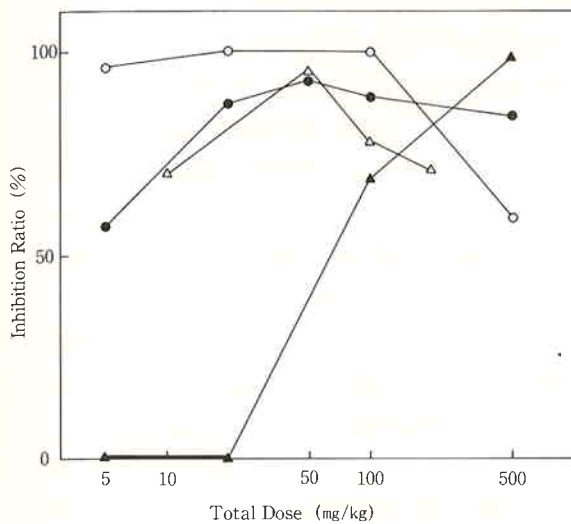


Fig. 2 Dose-response curve for the antitumor activity of Fukurotake extracts. After the initial S.C. transplantation of Sarcoma 180, samples were injected for 10 days successively.  
 ●: Fraction AE, ○: Fraction S  
 ▲: Fraction UND, △: Lentinan

生存日数延長率 Increase in Life-span (ILS) は次式によった。

$$ILS(\%) = \left( \frac{\text{処置群生存日数 (day)}}{\text{対照群生存日数 (day)}} - 1 \right) \times 100$$

(3) 結果と考察

フクロタケ抽出画分の抗腫瘍性試験を各種腫瘍に対して実施するのに先立ち、S-180 を用いて最適投与量および投与時期などの検討を行った。Fig. 2 に各サンプルの投与量と IR 値の関係を示した。AE および S 画分は 10~500 mg/kg の広い範囲で高い抑制率を示した。UND 画分は最適投与量は高く、500 mg/kg で100%近い IR 値を示した。レンチナンは他のサンプルと比較すると 50 mg/kg と低い投与量で最高の抑制率を示した。また S 画分やレンチナンでは投与量が多過ぎて効果も低下してしまうという抗腫瘍性多糖に特有の現象も認められた。

Table 1 には S 画分を用いた投与時期の検討結果を示した。4 mg/kg~100 mg/kg の範囲で投与時期にはほとんど関係なく高い IR 値を示した。この傾向は UND 画分が前投与 (day-14, -7, 1, 7, 14 & 21) でやや活性が低かったことを除けば三つの画分に共通していた。

腫瘍の移植部位を腹腔内として、腹水タイプの増殖の早い腫瘍への効果を調べたが、いずれの画分も有効性は認められなかった。また、ここで採用した投与量の範囲

Table 1 Effect of fraction S treatment schedule against Sarcoma 180.

Treatment and Total Dose (mg/kg)	Inhibition Ratio (%)	Complete Regression
I. Post-Successive (day 1~10)		
100	98.0**	6/7
20	100 **	7/7
4	98.9**	6/7
0.8	4.9	0/7
II. Post-Intermittent (day 1, 5, 9, 13, 17 & 21)		
100	99.5**	6/7
20	100 **	7/7
4	97.7**	5/7
0.8	45.3	1/7
III. Pre-Intermittent (day -14, -7, 1, 7, 14 & 21)		
100	100 **	7/7
20	100 **	7/7
4	67.3**	2/7
0.8	16.4	0/7

ICR mice were inoculated S.C. with S-180 on day 0. Fraction S was injected at various dose before or after tumor inoculation.

Complete Regression: No. of tumor-free mice/No. of mice tested. Significant difference from the control: \*p<0.05, \*\*p<0.01.

Table 2 Antitumor spectrum of Fukurotake extracts.

Tumor	AE	S	UND	Lentinan
IR (%), Allogeneic				
S-180	100 **	100 **	99.9**	94.6**
Ehrlich	99.1**	96.5**	93.7**	99.0**
IR (%), Syngeneic				
IMC	100 **	100 **	5.7	73.5**
MM46	100 **	100 **	71.0	92.8**
MC	86.6**	89.4**	61.7*	77.6*
Colon-38	53.4**	12.8	19.0	2.2
ILS (%)				
Meth-A	29.6**	31.8**	26.3*	29.6*
MH134	28.4*	27.0	24.6	26.3

All mice were inoculated S.C. with various tumors on day 0. Samples were injected after tumor inoculation for 10 days. S-180 and Ehrlich were allogeneic tumors. Other tumors were syngeneic tumors. Meth-A and MH134 were expressed by ILS (Increase in Life-span) and other tumors were expressed by IR (Inhibition Ratio).

Significant difference from the control; \*p<0.05, \*\*p<0.01.

ではマウスの死亡や著しい体重減少など、サンプルの毒性を疑わせる現象は認められなかった。

Table 2 に、各種腫瘍に対するフクロタケ抽出画分とレンチナンの抗腫瘍性試験の結果をまとめた。S-180 および Ehrlich の二種の同種腫瘍に対しては全てのサンプルともほぼ完全に腫瘍増殖を抑制するほどの高い活性を示した。同系腫瘍に対しては、IMC, MM46 には UND 画分以外はよく効いており、MC には全てのサンプルの有効性が認められた。Colon-38 はやや効きにくく、かろうじて AE 画分のみ有意差が認められた。Meth-A および MH134 に対しては、腫瘍増殖抑制効果は無かったものの、ILS での判定では Meth-A には全てのサンプルで、MH134 では AE 画分のみ有意差が認められた。これらの結果から、UND 画分は他の3サンプルと比較して、その抗腫瘍スペクトルはかなり狭く、AE 画分は残りの2サンプルよりはいくぶん広い抗腫瘍スペクトルを示した。

フクロタケの AE 画分の抗腫瘍性はほぼ多糖のみからなる S 画分と窒素含量が高く、蛋白質を含むと考えられる UND 画分とに分離された。S 画分は元素分析や構成糖およびその結合様式の検討から、既存の抗腫瘍性多糖レンチナンなどと類似したもので、1,6の分岐の割合などがやや異なるものの、 $\beta$ -1,3結合を主鎖とするグルカンであった。UND画分はまだ均一な標品とは言えないので、分析は進んでいないが、窒素含量が高く、分子量が低く、水溶性であることなど、従来の抗腫瘍性多糖とは違った新しいタイプの抗腫瘍性物質の可能性が高かった。しかし最適投与量が高く、抗腫瘍スペクトルに関しては他のサンプルと比較して狭かった。また経口投与の可能性も検討したが有効性は認められなかった。

AE 画分が他の画分よりもいくぶん広い抗腫瘍スペクトルを示したのは、S および UND 画分の相乗効果によるものかも知れない。

以上のようにフクロタケ AE 画分の主要な活性を担っているのは  $\beta$ -1,3グルカンで、構造的にも、活性的にも既知の抗腫瘍性多糖と大きな違いを見出すことはできなかった。

### 3. フクロタケ CWE の抗潰瘍性について

消化性潰瘍の薬物療法は大きく二つに分けることができる。ひとつは胃酸などの攻撃因子の抑制剤であり、もうひとつは防御因子の強化剤である<sup>10)</sup>。前者の例として代表的なものは  $H_2$  受容体拮抗剤 ( $H_2$  ブロッカー) であり、数年前に登場して以来、著しい効果を上げている。

しかし  $H_2$  ブロッカーには投薬中止後の再発というやっかいな問題が存在し、その使用法などの検討が行われている。後者の例として現在注目を集めているのがプロスタグランジン<sup>11)</sup> であり、細胞保護作用 (サイトプロテクトクシオン) を売り物に、再発防止の切り札として期待が大きい。

我々は前述の抗腫瘍活性を有するフクロタケ中に、他の薬効成分を探索した結果、消化性潰瘍の防御因子強化剤のスクリーニング法のひとつであるアルコール誘発性潰瘍に対して有効性を示す画分を見出した。担子菌類からの抗潰瘍性物質の報告は今までには見られないところから、限外濾過膜を用いての活性成分の濃縮と他の多糖類などとの活性の比較を行ってみた。

#### (1) フクロタケ CWE の調製法

抗腫瘍性試験に用いたのと同じ乾燥フクロタケ子実体をミキサーで細かく粉碎後、蒸留水を加えて  $4^{\circ}C$  で一晩抽出した。遠心分離により不溶物を除去後、凍結乾燥して CWE 画分とした。これを再び蒸留水に溶解後、東ソー株式会社製限外濾過膜 TS-10 (分画分子量1万)

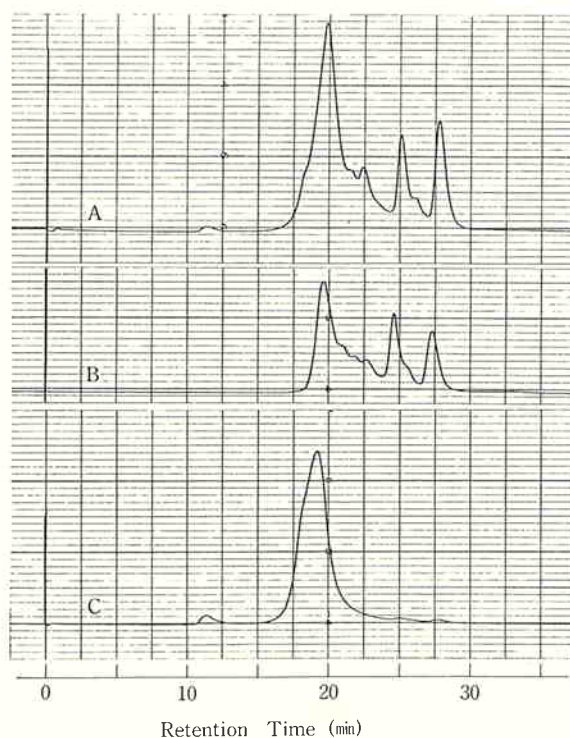


Fig. 3 TSK-gel G4000PW Chromatography of Fukurotake CWE fractions.

Column: TSK-gel G4000PW (7.5 mm I.D.  $\times$  60 cm). Elution solvent: 0.1M Phosphate Buffer (+0.1M NaCl), Flow Rate: 1.0 ml/min, Detector: UV at 280 nm, Sample A: CWE, B: CWE-P, C: CWE-NP



を用いて、高分子画分 CWE-NP と低分子画分 CWE-P とに分画し、それぞれ凍結乾燥してサンプルとした。Fig. 3 に各サンプルのゲル濾過によるクロマトグラフィーのパターンを示した。

### 〔2〕 抗潰瘍性試験法

試験に使用した動物はウィスター系ラット、メス12週齢（体重約 200 g）で、日本チャールス・リバーより購入した。

上記ラットを24時間絶食させ、0.5 ml の生理食塩水に溶解したサンプルを胃ゾンデを用いて経口投与した。その30分後に 1 ml の無水エタノールを経口投与することにより潰瘍を誘発した。

効果の判定は無水エタノール投与1時間後にラットを屠殺して胃を摘出し、無処置対照群と潰瘍形成を比較した。すなわち摘出後の胃を大弯に沿って切開し、带状に形成された潰瘍の長さの総和を計測し抑制率を算出した。

抑制率 Inhibition Ratio (IR) は次式によった。

$$IR(\%) = \left(1 - \frac{\text{処置群潰瘍長さ (mm)}}{\text{対照群潰瘍長さ (mm)}}\right) \times 100$$

Fig. 4 に対照群および治療群のアルコール投与後のラットの胃を示す。対照群では带状に数本の潰瘍が認められた。

### 〔3〕 結果と考察

フクロタケ CWE 画分とその膜分画品および各種多糖類の抗潰瘍性試験の結果を Table 3 に示した。なお陽性対照としては16,16ジメチルプロスタグランジン E<sub>2</sub> を用いた。

フクロタケの抗腫瘍活性画分 AE やシズフィランおよびカラギーナンなどの多糖類では効果は認められなかったが、CWE 画分の 250~500 mg/kg の投与量で有効性が認められた。また限外濾過膜により分子量 1 万以上の CWE-NP 画分に活性成分が濃縮され 31.2 mg/kg

の投与量でも有意差が示された。CWE-P 画分も高投与量で有効性を示したが、これは分子量 1 万前後の活性成分の一部が膜を透過したためと考えられた。

今回の試験に用いたフクロタケのサンプルは膜濃縮をした程度で、どのような成分が有効性を示しているのかは全く不明である。投与量が高いのでサンプルの粘度が高く、その物理的な保護効果により潰瘍を防止しているのではないかという疑いがあった。そこで粘度の高い多糖類、カラギーナンなどを用いてみたが効果は示されなかった。また、胃酸を中和してその攻撃因子としての効果を抑えることにより活性を示す可能性を否定するためにサンプル投与後、胃液の酸度と量を調べた。その結果、

Table 3 Antiulcer activity of Fukurotake extracts and Polysaccharides

Sample	Dose (mg/kg)	IR (%)
CWE	500	100**
	250	82**
	125	47
CWE-P	1000	94**
	500	22
	250	21
CWE-NP	125	100**
	62.5	62**
	31.2	56**
AE	50	— 59
Shyzyphyran	75	24
Carrageenan	25	34
PGE <sub>2</sub>	(0.3 μg/kg)	100**

All Rats were administrated p.o. with 0.5 ml Samples. After 30 min, absolute ethanol was administrated. Total ulcer length was measured and compared with control.

Significant difference from the control: \*p<0.05, \*\*p<0.01.

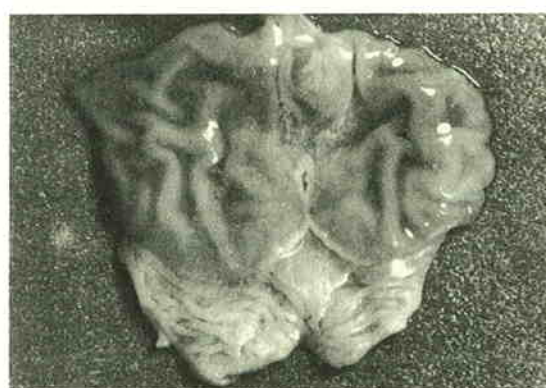


Fig. 4 Ethanol-induced stomach ulcer. Left: Non treated (Control). Right: 16,16-dimethyl-PGE<sub>2</sub> treated.

今回用いた各サンプルでの影響は無かった。これらのことからフロタケ CWE 画分の潰瘍への効果はいわゆるサイトプロテクションと考えてよいであろう。また膜での濃縮結果より判断して薬効成分は分子量約1万前後の物質である可能性が高い。

現在の消化性潰瘍の治療は H<sub>2</sub> ブロッカーにより、活動期・治癒過程期においてはすぐれた効果を上げているが、癒痕期以降の投薬中断でその再発率の高さが問題になっている。そこで再発防止の目的で維持療法の手段が検討されている。この維持療法での主役が防御因子強化剤であるが、潰瘍発症から維持療法終了時期まで含めると治療薬の投与期間はかなり長期にわたる。長期投与という面から治療薬の副作用のチェックは慎重になされなくてはならない。

フロタケの CWE-NP 画分は食用キノコから調製されたものであるから、副作用の面でも有利と考えられる。今後活性成分の単離・同定を行いその性質を確認していきたい。

#### 4. おわりに

食用キノコ、フロタケ中に見出された二種類の薬効について、動物を用いた実験結果を中心に報告した。いずれの活性もまだその本態がつかめていない研究の初歩の段階のものである。しかし、癌や潰瘍の予防薬として、強力な治療効果をねらうのではなく、食品からの抽出物という副作用の面での有意性を武器におもしろい存在になる可能性を秘めていると考えられる。

最後に、腫瘍を分与していただき、実験を御指導していただいた金沢大学がん研究所佐々木琢磨先生と北里研究所小宮山寛機先生に、また、多糖の構造解析をしていただいた大阪市立大学生活科学部三崎 旭先生に深謝致します。

#### 文 献

- 1) 千原呉郎; “発酵と工業”, 34, 942 (1976)
- 2) 三崎 旭; “科学と工業”, 58, 407 (1984)
- 3) 竹内富雄, 飯沼寛信; “発酵と工業”, 34, 843 (1976)
- 4) 鈴木富士夫, 斉藤紀行, 石田名香雄; “蛋白質核酸酵素”, 21, 4, 260 (1976)
- 5) 三崎 旭, 曾根良昭, 松井元子; “生化学”, 55, 740 (1983)
- 6) 平瀬 進ら; “薬学雑誌”, 96, 413 (1976)
- 7) G. Chihara, Y. Maeda and J. Hamuro; *Nature*, 222, 687 (1969)
- 8) K. Tabata, W. Ito, T. Kojima, S. Kawabata, A. Misaki; *Carbohydr. Res.*, 89, 121 (1981)
- 9) A. Misaki, M. Kakuta, T. Sasaki, M. Tanaka and H. Miyaji; *Carbohydr. Res.*, 92, 115 (1981)
- 10) 三宅建夫; “診断と治療”, 75, 119 (1987)
- 11) T. Miyake, M. Murakami; *International Symposium on Prostaglandins and Leukotriens in Gastrointestinal Diseases*, Oct. 22-24, Lisbon. (1986)



著 者

氏名 沢 田 裕 二  
Yuji SAWADA  
入社 昭和49年 3月22日  
所属 研究本部  
          生物学研究所  
          第四研究室  
          主任研究員



著 者

氏名 鈴 木 浩  
Hiroshi SUZUKI  
入社 昭和61年 4月 1日  
所属 研究本部  
          生物学研究所  
          第四研究室



著 者

氏名 小 岩 成 次  
Seiji KOIWA  
入社 昭和44年 4月10日  
所属 研究本部  
          特許情報部  
          情報室  
          主任研究員



著 者

氏名 西 昭 宏  
Akihiro NISHI  
入社 昭和60年 4月 1日  
所属 研究本部  
          生物学研究所  
          第五研究室



著 者

氏名 加 藤 喬 雄

Takao KATOH

入社 昭和44年4月10日

所属 研究本部

研究企画推進部

主席研究員