

原 著

実験的マウス肺転移モデル (B16F10) を用いた *Lentinus edodes mycelia* の抗腫瘍効果に関する検討

小林製薬株式会社 中央研究所

山崎 寛生 川西 貴 松井 保公
為定 誠 浅野 健治

要旨 [目的] シイタケ菌糸体抽出物 (extract of cultured *Lentinus edodes mycelia*, L.E.M.) の抗腫瘍効果を、マウス実験的肺転移モデル (B16F10) を用いて検討した。[方法と結果] B16F10 肺転移モデルに L.E.M. (250 mg/kg および 1,000 mg/kg) を経口投与すると、コントロール群に対して有意に肺転移コロニー数の減少を認めた。また、体内の免疫状態を脾リンパ球サイトカイン産生能にて検討したところ、各投与群にて IFN- γ 、IL-12 産生能の亢進および IL-10 産生能の低下を認めた。また上記効果は、L.E.M. 250 mg/kg 投与群が L.E.M. 1,000 mg/kg 投与群よりも強く現れた。[結語] L.E.M. は腫瘍の転移抑制効果を示し、その効果は biological response modifier (BRM) 的作用によるものであると推察された。

[*Biotherapy* 17 (5) : 467-472, September, 2003]
(Received May 2, 2003/Accepted July 29, 2003)

Experimental Study on the Antitumor Effect of *Lentinus Edodes Mycelia* Using Murine Pulmonary Metastasis Model (B16F10)

Hiroo Yamasaki, Takashi Kawanishi, Yasunori Matsui,
Makoto Tamesada and Kenji Asano

R&D Center, Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd.

Summary

Objective: To evaluate the antitumor effect of an extract of cultured *Lentinus edodes mycelia* (L.E.M.) using a murine experimental pulmonary metastasis model (B16F10). **Methods and Results:** Oral administration of L.E.M. (250 mg/kg and 1,000 mg/kg) in a B16F10 lung metastasis model resulted in a significant decrease in the number of lung metastatic colonies as compared with the control group. The determination of the immunological state of the body based on the ability of splenic lymphocytes to produce cytokines revealed enhanced production of IFN- γ and IL-12 and reduced production of IL-10 in each treatment group. These effects were observed to be more markedly in the group treated with L.E.M. 250 mg/kg than that treated with L.E.M. 1,000 mg/kg. **Conclusion:** L.E.M. showed an inhibitory effect on tumor metastasis, which was attributable to biological response modifier (BRM) activity.

Key words: *Lentinus edodes mycelia*, B16F10, Antitumor effect, Lung metastasis model

Address request for reprints to: Dr. Hiroo Yamasaki, R&D Center, Kobayashi Pharmaceutical Co., Ltd., 1-30-3 Toyokawa, Ibaraki, Osaka 567-0057, Japan

はじめに

癌転移は生体のもつバリア機能をくぐり抜け、様々なステップを経て起こるイベントであるが、それぞれの段階で大きな影響をもっている因子の一つにサイトカインがあると考えられている¹⁾。そしてこのサイトカインには、癌細胞に由来するものと生体組織に由来するものの両者があり、産生されるサイトカインの種類と量によって癌転移の形成に促進もしくは抑制に働くとされている²⁾。

一方、シイタケ菌糸体抽出物 (extract of cultured *Lentinus edodes* mycelia, L.E.M.) は、サトウキビの搾りかすであるバガスを主成分とした固体培地でシイタケ菌を培養したものを熱水抽出したエキスであり、現在までに抗ウイルス作用³⁻⁵⁾、肝障害防御作用⁶⁻⁸⁾、免疫調節作用⁹⁾、抗腫瘍作用^{10,11)}などの生理活性があることが報告されている。特に経口投与においては、大腸や肝臓などの腫瘍形成や増殖を抑制することや、悪性腫瘍の肝転移を抑制する効果などが認められおり、その作用機序としてマクロファージの活性化やNK活性の増強などがあげられている^{12,13)}。しかしL.E.M.の転移抑制作用に関して、その作用機序には未知の部分が多い。

そこで今回、われわれは血行性の実験的肺転移モデルを用い、生体組織に由来するサイトカインに着目してL.E.M.の腫瘍転移抑制効果とその作用機序の検討を行い、本剤の免疫賦活 (biological response modifier, BRM) 効果の可能性を評価した。

I. 材料と方法

1. 実験動物

実験には日本SLC (株) から購入したC57BL/6マウス (雌性, 6週齢) を1週間の予備飼育後に実験に用いた。

2. 腫瘍細胞株

マウスメラノーマ細胞株B16の高転移株であるB16F10 (東北大学加齢研究所, 宮城) を, RPMI-1640培地 (10%牛胎児血清; FBS添加) で継代培養した後, PBSで洗浄してマウスへの移植に用いた。

3. 被験物質

シイタケ菌糸体抽出物 (以下, L.E.M.) は, バカス, 脱脂米糠を加えた固体培地にシイタケ菌を接種, 子実体発生直前まで培養し, 加水, 酵素 (セルラーゼ, プロテアーゼ) 添加, 加温, ろ過したものを粉末化したもの (長岡L・E・M, 東京) である。本試験で用いたL.E.M.は糖質を25% (フェノール硫酸法), 蛋白質を20% (lowly法), ポリフェノールを2.6% (Folin-Denis法) 含んでいた。

また対照物として, 代表的な制癌剤であるfluorouracil (5-FU) を使用した。

4. L.E.M.の転移抑制効果についての検討

マウスをコントロール群, L.E.M.投与群 (250 mg/kg/mouse および 1,000 mg/kg/mouse), 5-FU投与群 (40 mg/kg/mouse) に分けた (各n=5)。L.E.M. 250 mg/kg 投与群, L.E.M. 1,000 mg/kg 投与群はそれぞれL.E.M.を蒸留水で25 mg/ml, 100 mg/mlに懸濁して, また5-FU群は4 mg/mlに懸濁して, 各々0.1 ml/10g (体重) を1日1回, 継続的に経口投与した。なお, コントロール群は蒸留水のみを同様に投与した。腫瘍細胞の移植は投与開始14日後にマウスをネンプター麻酔し, 尾静脈よりB16F10細胞 1×10^5 cellsを接種して行った。その後さらに投与を継続し, 腫瘍接種後14日目にマウスを犠牲死させ, その肺をホルマリン固定し, それぞれの肺に転移した腫瘍コロニー数を顕微鏡下でカウントした。また, 脾臓を無菌的に取りだし, 脾リンパ球のサイトカイン産生能を測定した。またフローサイトメトリーを用い, 脾リンパ球のTh1/Th2 (CD4) を測定した。

5. サイトカイン産生能の測定

マウス脾臓を無菌的に取りだし, 10% FBS加RPMI-1640培地 [Gibco, penicillin (100単位/ml), streptomycin (100 μ g/ml) 含有] で脾細胞懸濁液を作製した。セルストレイナー (Falcon) にて不純物を除いた後, リンホセパール (d=1.09, ILB) に重層し比重遠心分離にかけ, さらに培地で洗浄し脾リンパ球を得た。各個体の脾リンパ球を 1×10^6 cells/mlに調整後, 24ウェルマイクロプレートに分注し, lipopolysaccharide (LPS: Sigma, 20 ng/ml) とともに37°C, 5%

CO₂下にて培養した。24時間後に培養上清を回収し、IFN- γ 、IL-4、IL-10、IL-12産生量を各ELISAキット(BIOSOURCE)を用いて測定した。

6. Th1/Th2 バランス (CD4⁺細胞) の測定

マウス脾リンパ球(1×10⁶ cells/ml)にPhorbol 12-Myristate 13 Acetate (PMA: Sigma, 25 ng/ml)とIonomycin (Sigma, 1 μ g/ml)およびBrefeldin-A (Sigma, 10 μ g/ml)を添加し、37℃, 5%CO₂下で4時間培養した。培養したリンパ球に蛍光標識した抗CD4抗体を添加した後、IntraPrep試薬(Beckman Coulter)を用いて細胞固定、細胞膜透過処理を行い、その後、蛍光標識した抗IFN- γ 抗体、抗IL-4抗体(Beckman Coulter)を添加し細胞内のIFN- γ およびIL-4を染色した。

CD4⁺細胞における細胞内IFN- γ 、IL-4⁺細胞(CD4⁺IFN- γ ⁺、CD4⁺IL-4⁺細胞)の割合は、フローサイトメトリー(EPICS/XL flow cytometer, Beckman Coulter)により測定した。

7. 統計解析

得られた測定値は、平均値±標準誤差(means ± standard error, SE)で表示し、2群間の検定にはStudent's t検定を用い、p値が0.05以下を有意差ありと判定した。

II. 結果

1. L.E.M.の肺転移抑制効果

L.E.M.の肺転移抑制効果について検討した結果をFig. 1に示す。肺転移腫瘍コロニー数はコントロール群の169.0±21.2に対して、L.E.M. 250 mg/kg投与群、L.E.M. 1,000 mg/kg投与群および5-FU投与群ではそれぞれ、53.8±28.6、88.2±13.2および58.4±12.2であり、各群ともコントロール群に比べて有意に肺転移コロニー数の減少を認めた(p<0.05)。L.E.M. 250 mg/kg投与群では5-FU投与群と同等の効果を示した。

2. サイトカイン産生能の検討

腫瘍肺転移モデルにおいて、L.E.M.の経口投与による体内の免疫状態を調べるため、各個体の脾リンパ球サイトカイン産生能を検証した結果をFig. 2に示す。IL-12産生量は、コントロール群に比べてL.E.M. 250 mg/kg投与群で有意な増加を認めた(p<0.05)。また、5-FU群では増加傾

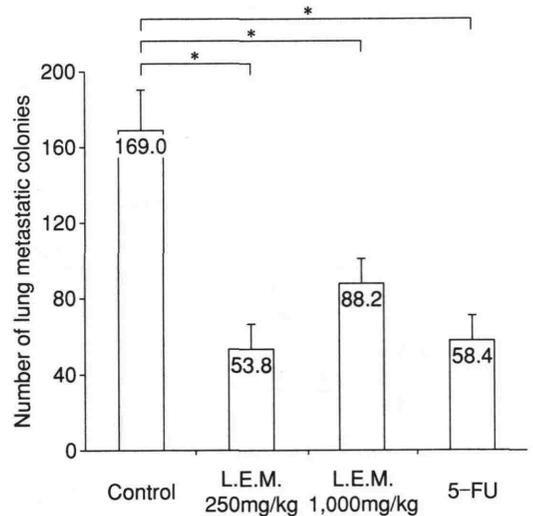


Fig. 1 Effect of oral administration of L.E.M. and 5-FU on lung metastasis produced by i.v. of B16F10 melanoma cells. C57BL/6 mice were orally administered distilled water, L.E.M. (250 or 1,000 mg/day/mouse) or 5-FU (40 mg/day/mouse) for 14 days before i.v. of B16F10 melanoma cells (1×10⁵). 14 days after tumor inoculation, the number of tumor colonies in the lungs were measured manually.

*: p<0.05 as compared with control

向があったものの有意差は認められなかった(p=0.06)。またIFN- γ 産生量では、コントロール群に比べてL.E.M. 250 mg/kg投与群で有意な増加を認めたが(p<0.05)、5-FU投与群ではコントロール群と同様であった。一方、IL-10産生量はコントロール群に比べてL.E.M.投与群で減少傾向であった(p=0.08)が、5-FU投与群ではコントロール群と同等であった。また、IL-4産生量はL.E.M.投与群ではコントロール群と同等であったが、5-FU投与群では有意な増加が認められた(p<0.05)。

3. Th1/Th2 バランス (CD4⁺細胞) の検討

CD4⁺細胞の細胞内サイトカイン産生能によるTh1/Th2バランスを測定した結果をFig. 3に示す。その結果、コントロール群の0.48±0.03に比べ、L.E.M. 250 mg/kg投与群で0.81±0.12(p<0.05)、L.E.M. 1,000 mg/kg投与群で0.98±0.11(p<0.01)と、いずれも有意にTh1/Th2バランスが上昇し

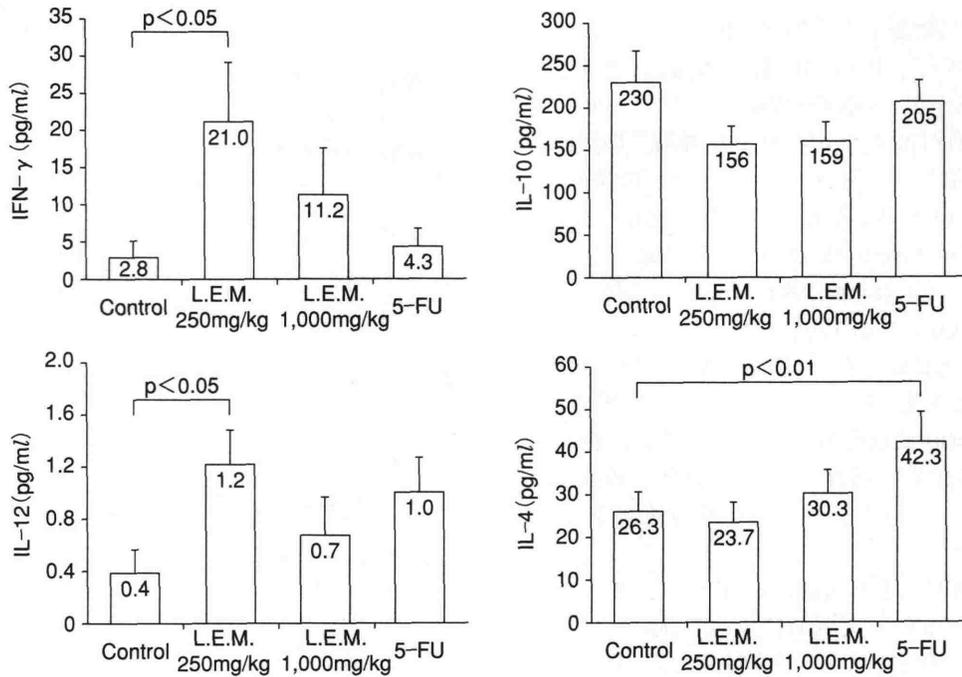


Fig. 2 Effects of oral administration of L.E.M. and 5-FU on the production of IFN- γ , IL-12, IL-4 and IL-10 by splenocytes

C57BL/6 mice were orally administered distilled water, L.E.M. (250 or 1,000 mg/day/mouse) or 5-FU (40 mg/day/mouse) for 14 days before of B16F10 melanoma cells (1×10^5). 14 days after tumor inoculation, single-cell suspensions of spleen cells were prepared. Spleen cells were cultured with 20 ng/ml of LPS for 24 h, and then the supernatant was collected. Cytokines levels were determined by ELISA.

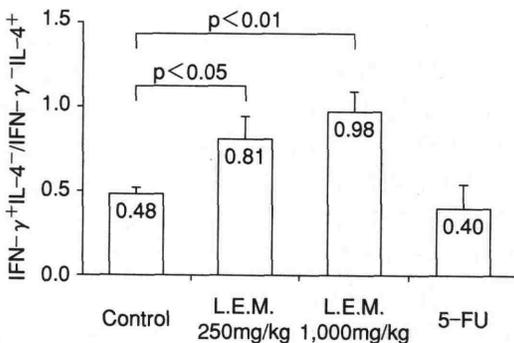


Fig. 3 Effect of oral administration of L.E.M. and 5-FU on cytokine production of CD4⁺ T cell in C57BL/6 mice

たが、5-FU 投与群では 0.40 ± 0.14 と、コントロール群と同等であった。

III. 考 察

B16F10 腫瘍細胞を用いた実験的肺転移に対し

て、L.E.M. が転移抑制効果を有することが示された。この転移抑制効果は 5-FU 経口投与の結果と同程度であったが、5-FU 投与群では他群に比べて体重の有意な減少が認められ、生体への副作用が懸念された。一方、L.E.M. 投与群ではこのような体重減少は認められなかった。なお、L.E.M. の安全性に関しては、マウス 26 週反復経口投与試験において、2,000 mg/kg/mouse にて異常が認められないことが確認されている。

転移抑制効果について、生体内の免疫バランスがどのようになっているかを調べるため、脾リンパ球のサイトカイン産生能を調べた。その結果、L.E.M. 投与群ではコントロール群に比べて、LPS 刺激条件において IL-12 および IFN- γ の有意な増加が認められ、また IL-10 の減少傾向が認められた。LPS は B 細胞および単球系を刺激する mitogen であること、またマウスリンパ球系樹状細胞が成熟あるいは活性化されると IL-12 や

IFN- γ を産生すること¹⁴⁾などから、これらのサイトカインはマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞から産生された可能性が高いと考えられる。Th細胞はTh1とTh2に分化し、特にTh1は腫瘍局所に浸潤し、自ら強いcytotoxicityおよびサイトカイン産生能を示し、CTLを局所で誘導することによって腫瘍の退縮を誘導すると考えられている。このようなTh細胞の分化において、Th1への分化はIL-12やIFN- γ によって誘導され、Th2への分化はIL-4によって誘導される¹⁵⁾。L.E.M.投与群にてIL-12やIFN- γ の産生誘導が認められることから、L.E.M.はマクロファージなどの抗原提示細胞に作用し、Th0からの分化をTh1側にシフトさせる働きがあることが示唆された。一方、Th2を誘導するIL-4産生量に変化は認められなかったが、Th1免疫を抑制するIL-10の産生量が低下していたことから、結果的に生体内では担癌によってTh2優位に傾いていた免疫能を、Th1優位にシフトさせるサイトカインバランスを保っていたと推察される。また、特にIL-12については、B16F10を用いた同じ試験においてIL-12の腹腔内投与が転移を投与量依存的に抑制することが確認されており、この効果もTh1の分化を促すことによるとされている¹⁶⁾。実際にTh細胞の細胞内IFN- γ /IL-4産生量からTh1/Th2バランスを調べると、L.E.M.投与群ではコントロール群に比べて有意にTh1/Th2バランスがTh1側にシフトしていることが確認された。

一方で鈴木ら¹²⁾は、AH60背部移植モデルにおいて、腫瘍体積が大きくなった時点からL.E.M.投与を開始したほうが腫瘍の有意な抑制効果を示したとしており、これは腫瘍認識の成立に移植後若干の時間が必要であると考察している。ここではTh1/Th2バランスについては言及されていないが、担癌状態でTh1<Th2となった個体が、L.E.M.投与によりTh1>Th2に転換し腫瘍退縮を誘導したという可能性も考えられる。

このように、マウスで確認された担癌状態におけるTh2優位状態は、ヒトにおいても存在することが示されている。たとえばヒト末梢血単核球のCD4⁺細胞内サイトカインの検討にて、早期癌においてもTh2優位状態が存在し、そしてヒト担癌状態にてTh2優位となるその一因として、IL-12

の産生低下が重要と考えられている¹⁷⁾。われわれの今回の検討では、L.E.M.を経口投与することにより担癌マウスのTh2優位状態を回避することが可能であったが、今後ヒトの担癌状態においても同様の効果を示すことができるのかを検証していきたいと考えている。

おわりに

L.E.M.は体内の免疫状態をTh1>Th2に傾けることにより、肺転移を抑制する効果があることが示唆された。その効果はBRM的作用によるものであると推察された。

文 献

- 1) 樽井武彦, 村田厚夫, 松浦成昭: 癌転移とサイトカイン. *Biotherapy* 12: 347-354, 1998.
- 2) 熊谷勝男, 新田康隆, 竹田和由: サイトカインの転移形成に及ぼす影響. *Biotherapy* 8: 1373-1380, 1994.
- 3) Tochikura, T.S., Nakashima, H., Ohashi, Y. *et al.*: Inhibition (*in vitro*) of replication and of the cytopathic effect of human immunodeficiency virus by an extract of the culture medium of *Lentinus edodes mycelia*. *Med. Microbiol. Immunol.* 177: 235-244, 1998.
- 4) Sorimachi, K., Niwa, A., Yamazaki, S. *et al.*: Anti-viral Activity of water solubilized lignin derivatives *in vitro*. *Agric. Biol. Chem.* 54: 1337-1339, 1998.
- 5) Suzuki, H., Okubo, A., Yamazaki, S. *et al.*: Inhibition of the infectivity and cytopathic of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium *Lentinus edodes mycelia* (LEM). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 60: 367-373, 1989.
- 6) Tsubura, E., Nishimoto, M. and Nishii, K.: Effect of LEM (*Lentinus edodes Mycelia*) for Chemotherapeutic Hepatic Side Effects in the Patients with Pulmonary Tuberculosis. *Prog. Med.* 19: 1959-1964, 1999.
- 7) 梶本修身, 山口康代, 竹内豊実・他: シイタケ菌糸体抽出物における境界域および軽度肝機能障害に対する臨床的検討. *日臨床学誌* 22: 22-31, 2000.
- 8) Suzuki, H., Iiyama, K., Yoshida, O. *et al.*: Structural characterization of the immunoreactive and antiviral water-solubilized lignin in extract of the culture medium of *Lentinus edodes mycelia* (LEM). *Agric. Biol. Chem.* 54: 478-487, 1990.
- 9) Mizoguchi, Y., Katoh, H., Kobayashi, K. *et al.*: Effects of extract of cultured *Lentinus edodes mycelia* (LEM) on polyclonal anti-

- body response induced by pokeweed mitogen. *Gastroenterol. Jpn.* **22**: 627-632, 1987.
- 10) Sugano, N., Hibino, Y., Choji, Y. *et al.*: Anticarcinogenic Actions of water-soluble and alcohol-insoluble fractions from culture medium of *Lentinus edodes mycelia*. *Cancer Lett.* **17**: 109-114, 1982.
 - 11) Sugano, N., Choji, Y., Hibino, Y. *et al.*: Anticarcinogenic action of an alcohol-insoluble fraction (LAP1) from culture medium of *Lentinus edodes mycelia*. *Cancer Lett.* **27**: 1-6, 1985.
 - 12) 鈴木康將, 田澤賢次, 山下 巖・他: 椎茸菌糸体 (*Lentinus Edodes Mycelia*) の温水抽出物による Azoxymethane 誘発ラット大腸癌発生に対する抑制効果. 日本大腸肛門病会誌 **43**: 178-191, 1990.
 - 13) 森永秀夫, 田澤賢次, 坂本憲市・他: *Lentinus Edodes Mycelia* (LEM) の経口投与による肝転移抑制効果. *Biotherapy* **6**: 763-765, 1992.
 - 14) 斉藤 隆, 竹森利忠: 実験医学別冊 新用語ライブラリー 免疫. 第2版, 羊土社, 東京, 2000, pp. 24-25.
 - 15) 西村孝司: 癌免疫療法 21世紀に向かって: 癌免疫療法における Th1/Th2 細胞の役割 将来の治療法発展に向かって. 癌治療と宿主 **12**: 363-373, 2000.
 - 16) Branda, M.J.L., Luistro, R.R., Warriar, R.B. *et al.*: Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumor. *J. Exp. Med.* **178**: 1223-1230, 1993.
 - 17) 柴田昌彦, 根津 健, 竹川本夫・他: 癌患者における末梢血単核球の IL-12 産生能と Th1/Th2 バランスの検討. *Biotherapy* **11**: 281-283, 1997.

0914-2223/03/¥500/論文/JCLS