

原 著

教室で樹立したラット自然高肺転移モデル (GKS-HL) を用いた *Lentinus edodes mycelia* の抗腫瘍効果に関する検討

岐阜大学医学部・腫瘍総合外科

伊藤 元博 佐野 純 杉山 保幸
国枝 克行 佐治 重豊

要旨 [目的] シイタケ菌糸体抽出物 (*Lentinus edodes mycelia*: LEM) の抗腫瘍効果を, ラット自然高肺転移モデル (GKS-HL) と癌性腹膜炎モデルを用いて検討した。[方法と結果] ①腫瘍皮下移植で作製した自然高肺転移モデルに, 0.3% LEM を経口投与すると原発巣, 肺転移巣とも有意の抑制がみられた (抑制率: 原発巣に対し 47.4%, 肺転移率に対し 42.9%)。②腫瘍腹腔内移植で作製した癌性腹膜炎モデルでは 0.3% LEM の経口投与で, 生存率が有意に延長し, 血性腹水と腹腔内転移腫瘍結節量が有意に少なかった (抑制率 60.6%)。③上記効果は 0.9% LEM 投与時には軽度であった。[結語] 健康食品としての LEM は BRM (biological response modifier) 的作用により相当程度の抗腫瘍効果を示すので, 臨床応用の可能性が示唆された。

[Biotherapy 16 (6): 605-611, November, 2002]

(Received September 27, 2002/Accepted October 10, 2002)

Anti-Tumor Effect of *Lentinus Edodes Mycelia* Using a Rat Model with High Lung Metastasis (GKS-HL) Established in Our Department

Motohiro Itoh, Jun Sano, Yasuyuki Sugiyama, Katsuyuki Kunieda and Shigetoyo Saji

Department of Tumor and General Surgery, Gifu University School of Medicine

Summary

Aim: Anti-tumor effects of orally administered water-soluble fraction prepared from culture medium of *Lentinus edodes mycelia* (LEM) were examined using a rat model with high lung metastasis and peritoneal carcinomatosa. **Methods and Results:** ① In a high lung metastatic model induced by sc inoculation, the group with 0.3% LEM po administration showed significant inhibition of the primary tumor (inhibition ratio 47.4%) and lung metastasis (% of metastasis 42.9%). ② In a peritoneal carcinomatous model induced by ip inoculation, the group with 0.3% LEM po administration showed significant prolongation of the survival period, and reduction of the ascites and intraperitoneal tumor (inhibition ratio 60.6%). ③ However these effects could not be induced by 0.9% of LEM. **Conclusion:** LEM as a health food may become one of the standard biological response modifiers in cancer immunotherapies.

Key words: *Lentinus edodes mycelia*, Anti-tumor effect, GKS-HL, High lung metastatic model, Peritoneal carcinomatous model

Address request for reprints to: Dr. Motohiro Itoh, Department of Tumor and General Surgery, Gifu University School of Medicine, 40 Tsukasa-machi, Gifu 500-8705, Japan

はじめに

近年健康食品が注目され、特に癌との関連で、東洋世界で汎用されている食用キノコ、シイタケが注目されている。すなわち、シイタケは本邦でも約300年前から人工栽培が開始され、1969年にChiharaら¹⁾によりシイタケ熱水抽出物により精製された高分子中性多糖体である Lentinan の抗腫瘍効果が報告された。その後、シイタケ(子実体)のみならず培養菌糸体についての研究が進んだ。そのなかで、サトウキビの搾りかすであるバガス(sugar cane bagasse)を主成分とした固定培地にシイタケ菌を培養し、それを熱水抽出したエキスであるシイタケ菌糸体抽出物(*Lentinus edodes mycelia*: LEM)は現在健康食品として認可されている。しかし、LEMの抗腫瘍作用に関する報告²⁻⁵⁾は少なく、未だ機序解明には至っていない。

そこで今回、本教室で樹立した肝癌からラット自然高肺転移株(GKS-HL)を作製し、肺転移と腹膜播種に及ぼす影響から消化器癌におけるLEMの抗腫瘍効果を推察し、本剤の免疫賦活(biological response modifier: BRM)効果の可能性を評価した。

I. 研究対象と方法

1. 実験動物と実験腫瘍

実験には日本SLCで飼育された4週齢の雄性F344ラットを用い、腫瘍はF344ラットにdiethylnitrosamine腹腔内投与で樹立した肝癌で、これ

を皮下移植して得られた自然肺転移巣を *in vivo* selectionして作製したGKS-HL腫瘍(中分化型肝癌)である。

2. 研究方法

1) 被験物質 LEM の由来

LEM原末⁶⁾はバガス、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)を添加、加湿、濾過したものを粉末化したものである。実験には小林製薬より供与を受けたLEM原末を固形飼料に0.3、0.9%となるように配合したLEM含有飼料を用いた。

2) 実験モデルの作製法

高肺転移モデル: 4週齢ラットF344(♂)を体重別に漸次対照群とLEM群に分け、LEM群には原末を固形飼料で0.3、0.9%となるように配合したLEM含有飼料を、対照群にはクレア製実験用固形飼料(CE-2)を、それぞれ7日間経口投与した。次いで、LEM経口投与7日目に継代培養中のGKS-HL細胞をRPMI-1640培地にて 1×10^6 個/mlに調節して細胞浮遊液を作製し、その1mlを背部皮下に注入移植して高肺転移モデル(high lung metastatic model)を作製した。試験群では腫瘍移植後もLEM投与を続け、移植後10週目に犠牲死させて肺、肝、腹腔内などの転移程度を肉眼的に観察した(Fig. 1)。評価は、腫瘍体積 $[(\text{長径}) \times (\text{短径})^2 / 2]$ と増殖抑制率(%) $[(A-B)/A] \times 100$ および肺転移結節数を算定した上で、LEM非投与(対照)群のそれらとの間で比較検討した。ただし、Aは対照群の腫瘍体積、

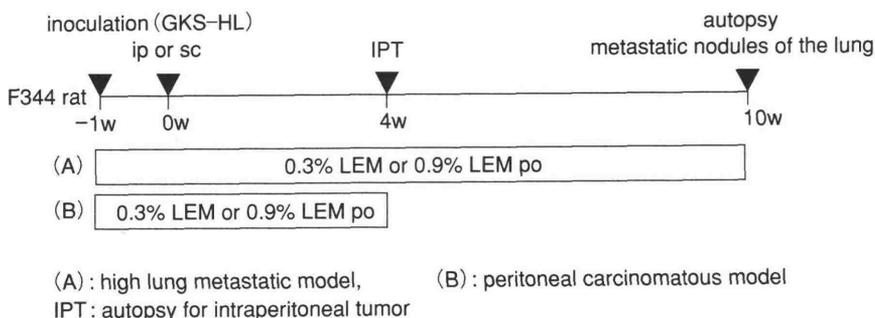


Fig. 1 Experimental design
 1×10^6 of tumor cells (GKS-HL) was inoculated ip or sc on week 0, LEM was orally administered everyday from on week -1 to autopsy (ip: for 4 weeks, sc: for 10 weeks)

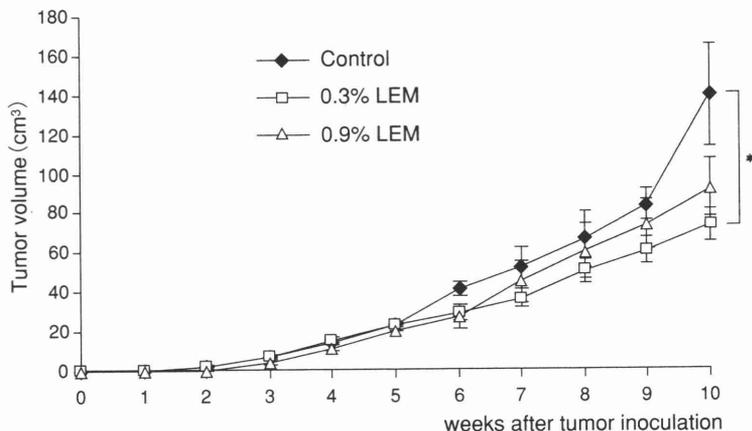


Fig. 2 Comparison on tumor growth curves according to dose of LEM
*: p=0.0073 between Control and 0.3% LEM

Bは試験群の腫瘍体積である。

癌性腹膜炎モデル：LEM 経口投与7日目に 1×10^6 個のGKS-HL細胞を腹腔内へ注入移植して癌性腹膜炎モデルを作製した。試験群では腫瘍腹腔内移植後もLEM投与を続け、移植後4週目に犠牲死させ、血性腹水と腹腔内転移程度を肉眼的に観察した上で、転移結節の総重量（IPT）を測定した（Fig. 1）。増殖抑制率（%）は $[(A-B)/A] \times 100$ により算出し、各群間で平均値を求め、対照群との間で比較検討した。また、移植後80日目まで継続飼育して生存率（各群6匹以上）を求めた。なお、Aは対照群の腫瘍重量、Bは試験群の腫瘍重量である。

3) 統計学的解析法

得られた測定値は、平均値±標準誤差（mean ± standard error : SE）で表示し、2群間の検定にはMann-Whitney's U検定または χ^2 検定にて判定し、また生存率の算出にはKaplan-Meier法を用い、統計学的解析はlogrank法を用い $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

II. 結 果

1. 腫瘍増殖曲線

皮下移植後10週目の腫瘍体積は、0.9% LEM群が 92.0 ± 14.4 (cm³, 以下単位省略)と対照群の 139.4 ± 25.7 に比べ低値で、34.0%の抑制効果が観察された。一方、0.3% LEM群は 73.3 ± 8.1

Table 1 Comparison on rate of lung metastases and number of metastatic nodules on week 10 of tumor sc inoculation

Groups	Metastases (%)	Number of metastatic nodules
Control	100% (8/8)	92.38 ± 20.49
0.3% LEM	42.9% (3/7)	9.57 ± 6.77
0.9% LEM	83.3% (5/6)	53.33 ± 26.61

Control-0.3% LEM : p=0.0125 (*),
p=0.0260 (#)

と0.9% LEM群に比べ低値で、抑制率は47.4%と対照群に比べ有意（p=0.0073）の増殖抑制を示した（Fig. 2）。

2. 肺転移率と転移結節数

GKS-HL移植後10週目の肺転移率は、対照群（100%）に比べ0.9% LEM群が83.3%と軽度低下し、0.3% LEM群は42.9%と有意（p=0.0125）の低値を示した。一方、同時期の肉眼的肺転移結節数は、対照群（ 92.38 ± 20.49 個）に比べ0.9% LEM群が 53.33 ± 26.61 個と減少し、0.3% LEM群は 9.57 ± 6.77 個と有意（p=0.026）の低値であった（Table 1）。

3. 癌性腹膜炎モデルでの生存率

平均生存期間は対照群の 49.7 ± 1.7 日に比べ0.3% LEM群が 53.7 ± 1.7 日と有意（p=0.01）の

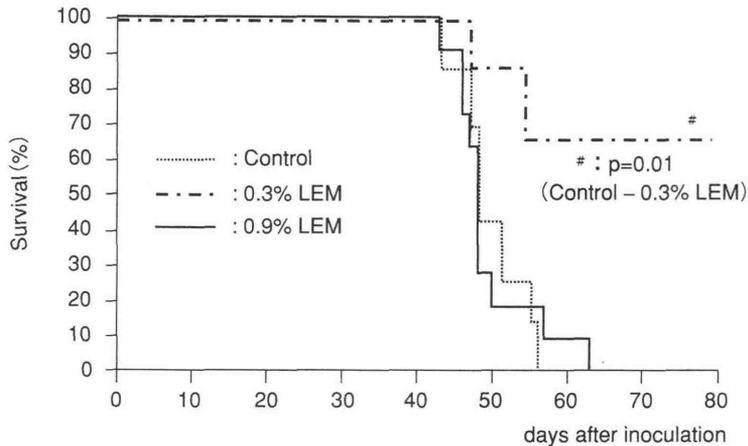


Fig. 3 Comparison of survival curves according to dose of LEM administration after ip inoculation of GKS-HP

Table 2 Comparison on clinico-pathological findings about volume of peritoneal metastases and ascites on week 4 of ip inoculation

Groups	IPT (g)	Ascites (%)
Control	10.91±0.89 ^{a)}	100 (10/10) ^{d)}
0.3% LEM	4.30±2.54 ^{b)}	50 (3/6) ^{e)}
0.9% LEM	7.52±1.55 ^{c)}	100 (6/6) ^{f)}

IPT: total volume of intraperitoneal tumor
^{a)-b)}: $p=0.047$, ^{a)-c)}: $p=0.063$, ^{d)-e)}: $p=0.0131$,
^{e)-f)}: $p=0.0455$

延長を認めたが、0.9% LEM群は 49.5 ± 1.7 日と差はみられなかった (Fig. 3)。なお、腫瘍移植後80日目の時点で0.3% LEM群は6例中4例が tumor free の状態で生存しており、その後の腹腔内および皮下への腫瘍再移植試験でも癌性腹水および皮下腫瘍の生着はみられなかった。

4. 腹腔内転移結節総重量 (IPT)

腹腔内移植後4週目の剖検時で、血性腹水は対照群と0.9% LEM群で全例に観察されたが、0.3% LEM群は50%と対照群 ($p=0.0131$) および0.9% LEM群 ($p=0.0455$) に比べ有意の抑制を示した。一方、剖検時に腹腔内全転移結節を合算した総腫瘍重量 IPT (g) は、対照群の 10.91 ± 0.89 に比べ0.3% LEM群が 4.30 ± 2.54 (抑制率60.6%) と有意 ($p=0.047$) に低値で、0.9% LEM群でも 7.52 ± 1.55 (抑制率31.1%) と低値

となる傾向 ($p=0.063$) が観察された (Table 2)。

部位別検討では、対照群は横隔膜下、壁側腹膜、腸間膜に多数の播種が観察され (Fig. 4a)、0.9% LEM群も同部位に播種がみられたが、その程度は対照群に比べ軽度であった (Fig. 4c)。一方、腸管膜播種に限定すると対照群 (10/10) と0.9% LEM群 (6/6) は全例に播種を認めたが、0.3% LEM群は2/6 (33.3%) と低値で対照群との間に有意差 ($p=0.0029$) がみられた。なお、0.3% LEM群での腹膜播種の局在は主に盲腸で、他の腸間膜への転移はほとんど観察されなかった (Fig. 4b)。

III. 考 察

シイタケ菌糸体抽出物 (LEM) の作用機序に関しては、抗ウイルス作用⁷⁻⁹⁾、肝機能防御作用¹⁰⁾、免疫調節作用などの生理活性の存在が報告されている。さらにLEMの免疫調節作用として、interleukin-1 (IL-1) 産生の亢進¹¹⁾、マクロファージの形態促進とグルコース消費の亢進¹²⁾、antibody-dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) による肝細胞障害の抑制¹³⁾、抗腫瘍作用²⁻⁵⁾などが報告されている。一方、Lentinanも同じシイタケ由来のグルコースを主成分とする β -1,3グルカン¹⁴⁾で、1969年にsarcoma-180に対する抗腫瘍効果¹⁾や、担癌生体の腹腔内マクロファージにおけるPGE₂、IL-10、IL-6の産生を

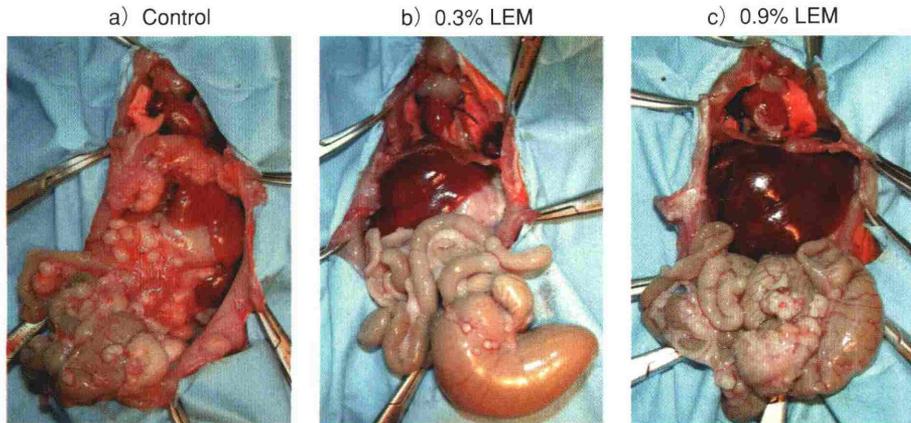


Fig. 4 Effects of LEM po administration comparing the gross findings at autopsy on week 4 of GKS-HP ip inoculation

減少させ、IL-12やNO活性を上昇しTh1優位に導く免疫賦活剤¹⁵⁾として臨床応用されている。

ところでLEMは、製剤としては健康食品の部類に属するが、最近本教室で樹立したラット自然高肺転移モデルが血管新生能を増強しながら高い転移能を獲得することが判明したので、皮下あるいは腹腔内移植で誘導された肺転移あるいは癌性腹水に対するLEMの抗腫瘍効果を検索し、上記諸結果を得たわけである。

1. LEMの腫瘍増殖と転移抑制効果について

GKS-HL細胞は、diethylnitrosamineの腹腔内投与で樹立したラット肝癌を、皮下移植して得られた自然肺転移巣を用い、*in vivo* selectionを数十代繰り返して作製した自然高肺転移モデルである¹⁶⁾。本GKS-HLは皮下移植すると腫瘍局所で高い血管新生能を獲得し、肺転移を高率に形成するが、ヒト癌の転移形式に類似した機序を示すことから、極めて有用な転移モデルと推察している。

今回、LEMを0.9%と0.3%濃度で腫瘍移植1週間前より連日経口投与したが、皮下移植腫瘍の増殖は0.3%群が非投与群に比べ有意の抑制を示した。また、増殖抑制率も0.9%LEM群の34.0%に比べ、0.3%LEM群では47.4%と高い抑制効果を示した。同様に肺転移率および転移結節数ともに0.9%LEM群で軽度の抑制が、0.3%LEM群で有意の抑制が観察された。一般に癌薬物療法では、抗腫瘍効果は血中最高濃度依存性に増強

するが、LEMの場合は0.9%の高濃度より0.3%の低濃度のほうが高い腫瘍増殖抑制効果を示した。一般に免疫賦活剤の抗腫瘍効果は濃度依存性ではなく、至適投与濃度依存性と推察されているので、個々の症例で投与濃度を適時変更する方策が取られている。一般臨床で汎用されているOK-432もSu-PS (polysaccharide extracted from Su-strain of *Streptococcus pyogenes*) 皮膚反応の大きさから、投与量を適時変更する治療法の有用性が報告されている¹⁷⁾。

作用機序として *Lentinus edodes* mycelia の水溶性抽出物 (LEM) およびアルコール不溶分画 (LAP) は、*in vivo* 投与でラットの腹水肝癌AH414の増殖を阻止することが知られている³⁾。この場合、アルコール不溶分画であるLAP1の活性の主成分はキシロース、アラビノースを含有するヘテログルカンまたはその蛋白複合体²⁾、interferon (IFN)- γ の産生およびNO₂活性上昇作用の存在が推察されている¹⁸⁾。一方、森永らは肝転移モデルで未投与群の転移率が100%に対し、LEM (300 mg/kg) 経口投与群は転移率が40~75%に低下し、作用機序としてNK細胞やマクロファージが大腸癌肝転移の抑制に大きく関与していると述べている⁵⁾。すなわち、LEMによりIL-1 β が早期に肝臓内で増強され、肝のNK細胞やマクロファージを活性化させた結果、肝や脾内のIL-1 β が増強され、微小肝転移の抑制に有利に作用したとの考えである¹⁹⁾。今回、LEM経口投与

後、脾細胞および血清中のサイトカイン濃度を経時的に測定したので、その詳細は別稿で改めて報告する予定である。

2. 癌性腹水に対する LEM 経口投与の抗腫瘍効果について

GKS-HL 細胞を腹腔内注入移植して作製した癌性腹膜炎モデルで、LEM を経口反復投与すると、平均生存期間は 0.3% LEM 群で有意に延長し、移植後 80 日目の時点で腫瘍を再移植しても生着・増殖は観察されなかった。しかし、0.9% LEM 群では非投与群との間に著差はみられなかった。また、0.3% LEM 群は対照群に比べ血性腹水が有意に少なく、腹腔内の転移結節を合算した総重量も有意に少なく、抑制率は 0.9% LEM 群の 31.1% に比べ 60.6% と高い抗腫瘍効果が観察された。特に剖検時の肉眼所見で非投与対照群では横隔膜下、壁側腹膜、腸間膜に多数の播種がみられたのに対し、0.3% LEM 経口投与群では有意に少なく、わずかに盲腸近辺に腹膜播種が限局して観察された程度であった。

LEM の経口投与に関して、鈴木ら⁴⁾は azoxymethane 誘発大腸癌で抗腫瘍効果は腹腔内投与より経口投与のほうが優れていたと報告している。理由として、消化管に付随するリンパ組織は GALT (gut associated lymphoid tissue) が主体で、これは消化管粘膜固有層に散在するリンパ球や形質細胞、パイエル板を中心とするリンパ濾胞、さらに腸管膜リンパ節などにより構成されている²⁰⁾。それゆえ、LEM の経口投与により消化管独自の免疫機構である GALT への賦活および IL-1 β が早期に肝臓内で増強され、肝の NK 細胞やマクロファージを活性化させ、肝や脾内の IL-1 β が増強された¹⁹⁾結果、腹膜播種が有意に抑制されたものと考えている。同様に今回の検討で、LEM の抗腫瘍効果が肺転移モデルより癌性腹膜炎モデルで顕著であった理由も同じ機序によると推察している。なお、生体防御の立場から、GALT は毒物など経口摂食時に免疫抑制的に作用して生体の恒常性を維持する働きが注目されているが、この局在は回盲部優位と推察されている。それゆえ、LEM 0.3% の経口投与群で播種性転移が回盲部のみ限局して認められた理由も了解可能と思われるが、さらなる検討が必要である。

以上、自然高肺転移株 GKS-HL 細胞を用いた検討で、LEM の抗腫瘍効果は肺転移モデルより癌性腹膜炎モデルで顕著であった。また、癌性腹膜炎モデルで LEM 経口投与により腹水が消失し、腹腔内移植後 80 日目に同系腫瘍を再移植したが、これを拒絶したことから、何らかの機序で特異的抗腫瘍免疫が誘導された可能性が示唆された。それゆえ、LEM は経口投与により BRM 的作用を誘導できる可能性が示唆されたので、今後化学療法との併用効果や、分子生物学的手法による作用機序の解析が必要と推察された。

おわりに

Lentinus edodes mycelia は 0.3% 濃度で投与するとラット自然高肺転移モデルにおいて原発巣、肺転移巣とも有意に腫瘍増殖を抑制し、癌性腹膜炎モデルにおいても生存期間の延長と腹水および腹膜播種の軽減効果を示した。しかし、0.9% 濃度ではこの効果が軽微で、LEM は至適濃度依存性に作用する可能性が示唆された。

なお、本研究は科学研究費萌芽研究 (14657303) により施行した。

文 献

- 1) Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J. *et al.*: Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* **222**: 687-688, 1969.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 鈴木康将, 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.
- 5) 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.
- 6) 大橋康宏: シイタケ菌糸体培養抽出物の抗がん作用. *Bio. Industry* **15**: 44-51, 1998.
- 7) Suzuki, H., Okubo, A., Yamazaki, S. *et al.*:

- Inhibition of the infectivity and cytopathic effect of human immunodeficiency virus by water-soluble lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **160** : 367-373, 1989.
- 8) Suzuki, H., Iiyama, K., Yoshida, O. *et al.*: Structural characterization of the immunoreactive and antiviral water-solubilized lignin in an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Agric. Biol. Chem.* **54** : 479-487, 1990.
 - 9) Yamamoto, Y., Shirono, H., Kono, K. *et al.*: Immunopotentiating activity of the water-soluble lignin rich fraction prepared from LEM—the extract of the solid culture medium of *Lentinus edodes* mycelia—. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61** : 1909-1912, 1997.
 - 10) Mizoguchi, Y., Katoh, H., Kobayashi, K. *et al.*: Protection of liver cells against experimental damage by extract of cultured *Lentinus edodes* mycelia (LEM). *Gastroenterol. Jpn.* **22** : 459-464, 1987.
 - 11) Mizoguchi, Y., Katoh, H., Kobayashi, K. *et al.*: Effects of extract of cultured *Lentinus edodes* mycelia (LEM) on polyclonal antibody response induced by pokeweed mitogen. *Gastroenterol. Jpn.* **22** : 627-632, 1987.
 - 12) 鈴木春巳, 斉藤 倫, 大久保 明・他: 椎茸菌糸抽出物 LEM 中の高分子画分の免疫活性—マクロファージ活性化およびリンパ球幼若化活性—. *医学のあゆみ* **138** : 441-442, 1986.
 - 13) 溝口靖紘, 児玉千枝, 北村瑞穂・他: *Lentinus edodes* mycelia 培養抽出物 (LEM) の免疫学的肝細胞障害および抗体産生に及ぼす影響. *肝・胆・膵* **15** : 127-135, 1987.
 - 14) Sasaki, T. and Takasuka, N.: Further study of the structure of lentinan, an anti-tumor polysaccharide from *Lentinus edodes*. *Carbohydr. Res.* **47** : 99-104, 1976.
 - 15) Murata, Y., Shimamura, T., Tagami, T. *et al.*: The skewing Th1 induced by lentinan is directed through the distinctive cytokine production by macrophages with elevated intracellular glutathione content. *Int. J. Immunopharmacol.* **2** : 673-689, 2002.
 - 16) 川越 肇, 伊藤元博, 西科琢雄・他: GKS-HL 自然高肺転移モデルの性格について. *Biotherapy* **16** : 587-594, 2002.
 - 17) 山口佳之, 野間浩介, 宮原栄治・他: OK-432 皮内反応と局所投与量. *癌と化学療法* **21** : 2108-2110, 1994.
 - 18) Hibino, Y., Konishi, Y., Koike, J. *et al.*: Productions of interferon- γ and nitrite are induced in mouse splenic cells by a heteroglycan-protein fraction from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Immunopharmacology* **28** : 77-85, 1994.
 - 19) Morinaga, H., Tazawa, K., Tagoh, H. *et al.*: An *in vivo* study of hepatic and splenic interleukin-1 β mRNA expression following oral PSK or LEM administration. *Jpn. J. Cancer Res.* **85** : 1298-1303, 1994.
 - 20) 児玉 宏, 土谷利晴, 戸部隆吉・他: 消化管癌と免疫賦活療法. *最新医学* **37** : 1211-1216, 1982.