

# メシマコブの抗腫瘍活性成分について

中嶋加代子 岸本律子\*

Compositions of the Substances in *Phellinus Linteus* Exerting an Antitumor Activity

Kayoko NAKASHIMA

Ritsuko KISHIMOTO\*

## 緒 言

メシマコブ (*Phellinus linteus* (Mesimakobu)) は、桑の木に寄生するタバコウロコタケ科キノブタケ属の黄色い多年生のキノコである。中国では、古くより桑黄(そうおう)と呼ばれ、煎じ薬の漢方薬として利用されている。わが国では、P X U 年に国立がんセンターが各種キノコの腫瘍阻止率を調べた結果、メシマコブ(茸)の煎じ汁は X U D % という高い阻止率を示したと報告されている<sup>P)</sup>。

わが国において近年、メシマコブ(茸)の薬理作用について試験され、抗腫瘍効果が報告されている<sup>Q) R)</sup>。唐崎ら<sup>S)</sup>の研究では、メシマコブ(茸)から抽出されたエキス成分はヒトリンパ球系ガン細胞 U X R V の増殖を抑制し、ニンニクのレクチンと相乗的に U X R V 細胞の増殖を強く抑制したことが確認されている。しかし、唐崎らの研究に使用されたメシマコブ(茸)エキス成分は未精製状態の複数の成分の混合物であり、ガン細胞の増殖抑制作用がどの成分による効果であるのかは確認できていない。

メシマコブ(茸)の生理作用に関しては、石原ら<sup>T)</sup>によりラットにおけるメシマコブ菌糸体(根っこ部分)熱水抽出エキス (*Phellinus lin-*

*teus* extract) の血糖値上昇抑制作用が確認されている。

キノコ類は一般に、従来よりガン予防の食品として伝承的に用いられている<sup>U)</sup>。キノコ類の抗ガン作用に関与している成分としては、多糖類、タンパク質、糖タンパク複合体などが知られており<sup>V) W)</sup>、代表的な多糖類は  $\beta$ -グルカンである。 $\beta$ -グルカンはキノコ類全般に含まれているが、D-フランクションと呼ばれる多糖類のように特定のキノコにだけ含まれているものもある。D-フランクションはマイタケに含まれる成分であり、強いガン抑制作用をもつことが確認されている<sup>V)</sup>。タンパク質としてはマツタケに含まれる MAP (マツタケ抗腫瘍タンパク質) が知られている<sup>V)</sup>。キノコ類の生理作用に関しては、シイタケ<sup>X)</sup>、マイタケ<sup>P O)</sup>、ヒラタケ<sup>P P)</sup>、タモギタケ<sup>1 2)</sup>、マンネンタケ<sup>P R)</sup>などに血糖値降下作用があることが報告されている。

現在、種々のキノコ加工食品が市販されており<sup>P S)</sup>、キノコ加工食品に含まれている生理活性物質としては  $\beta$ -グルカンが一般的に知られている。キノコ加工食品に含まれる  $\beta$ -グルカンは、免疫力を増強する作用を有すると報告されている<sup>U) P S) P T)</sup>。メシマコブ(茸)は現在、子実体や菌糸体を用いて加工された製品が植物性栄養補助食品として、複数のメーカーより市販され人々に利用されている。しかし、メ

\* 神戸学院大学

シマコブ(茸)の生理的効果に関する研究報告は非常に少ないのが現状である。

著者らは前報<sup>P<sup>U</sup></sup>で、ニンニクのレクチン蛋白質の精製法<sup>P<sup>V</sup></sup>に準じメシマコブ(茸)に含まれている抗腫瘍活性物質を分離し精製する方法について報告した。

本報では、メシマコブ(茸)のタンパク質に着目して分離精製したガン細胞増殖抑制成分の経時的な抗腫瘍効果について検討した。

## 実験方法

### 1. 試料

実験材料として用いたメシマコブ(茸)粉末は、菌糸体培養した成分を熱水抽出した後、乾燥し粉末状に加工した市販品である。本試料は吸湿しやすく変色を起こしやすいため、使用直前まで乾燥剤を同封し密封状態で冷蔵( V )保存した。

### 2. 試薬

セルラーゼ(和光純薬工業株式会社製)は、メシマコブ(茸)の細胞壁を破壊する目的で使用した<sup>P<sup>W</sup></sup>。ゲル濾過のためのセファデックス G- V T<sup>1</sup>は、ファーマシアファインケミカルズの製品を用い、イオン交換クロマトグラフィーのための DEAE-トヨパール U T O M は東ソー株式会社のものを用いた。DEAE-トヨパール U T O M は、親水性ビニルポリマーを基材としたサイズ排除クロマトグラフィー用充てん剤(タンパク質排除限界分子量 T x P O<sup>U</sup>)にイオン交換基を導入した充てん剤である。

### 3. 測定方法

#### P) タンパク質の定量

カラムクロマトグラフィーにおけるタンパク質量は、ウシ血清アルブミンを標準として、ローリー法<sup>P<sup>X</sup></sup>(DC プロテインアッセイ)または Q W nm の吸光度によって測定した。

#### Q) 生物活性の測定

ガン細胞増殖抑制試験<sup>5)</sup>は、ヒトリンパ球系

ガン細胞 U X R V を R V で培養し、メシマコブ(茸)画分で時間依存的に細胞処理し、細胞の数を顕微鏡下で測定した。メシマコブ(茸)画分で処理した群と非処理コントロール群の細胞数の比較により細胞増殖抑制効果を判定した。

### 4. メシマコブ(茸)画分の精製<sup>6)</sup>

メシマコブ(茸)粗抽出液(セルラーゼ処理した画分)をセファデックス G- V T<sup>1</sup>でゲル濾過し、溶出された2番目のピークを減圧下で濃縮した。これをさらに DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィー(カラムサイズ: 1.0 × 9.0 cm)にかけた(図 P)。溶出された4個のピークを各々、減圧下で濃縮し、ガン細胞増殖抑制試験および SDS 電気泳動の試料として用いた。

### 5. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

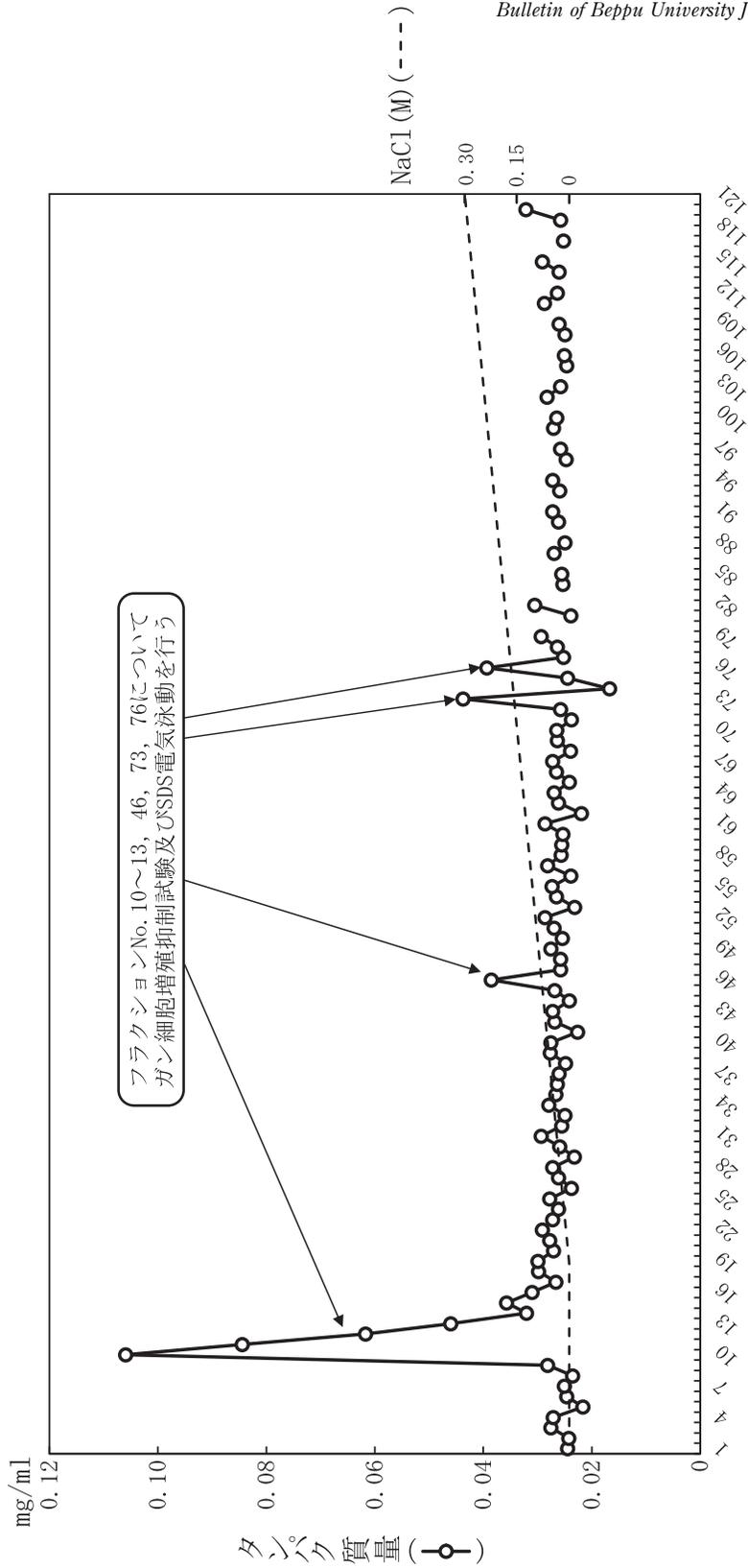
SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動では P T% ポリアクリルアミドゲルを用い、電気泳動後はクマーシーブリアントブルー(CBB)で染色してタンパク質を検出した。分子量マーカーは、10, 15, 25, 37, 50, 75, 100, 150, 250 キロダルトン(kDa)の9種類のタンパク質を含む電気泳動用スタンダード(Bio Rad 社製)を用いた。

## 結果および考察

### 1. メシマコブ画分の生物活性

P) ガン細胞増殖に及ぼすメシマコブ画分の影響について

セルラーゼ処理したメシマコブ粗抽出液をセファデックス G- V T<sup>1</sup>でゲル濾過し、溶出させた2番目のピークを濃縮して DEAE-トヨパールカラム(1.0 × 9.0 cm)に吸着させた。フラクションナンバー13番まではリン酸緩衝液のみで溶出し、14番以降は NaCl の直線濃度勾配で溶出した際に得られたタンパク質(図 P)についてガン細胞増殖抑制試験を行った結果を表 R に示した。表 P では、図 P の4個のピーク



フラクシオン サンバー

図 P. Sephadex G-75 処理画分ピーク ④の DEAE - トヨパールカラムクロマトグラフィー  
カラムサイズは 1.0 x 9.0 cm。0.02 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いた。

表 P. ガン細胞増殖に及ぼすメシマコブ画分の影響

メシマコブ画分*1	1日後		2日後		3日後		4日後		5日後	
	細胞数*2%									
コントロール*3	QQ IV	POO	SW IV	POO	POO IV	POO	PPU IV	POO	PSS IV	POO
Fr.1 0 ~ 1 3 (4倍希釈)*4	QU IV	PPX	RR IV	UX	SS IQ	SS	TQ IV	ST	PPT IV	WO
Fr.1 0 ~ 1 3 (8倍希釈)*4	QR IR	POS	SQ IQ	WV	TU IQ	TU	UX IV	UO	PPU ID	WO
Fr.4 6 (5倍希釈)*5	QS IQ	POV	RR IR	UX	SQ IR	SQ	TP IR	SS	VR IR	TP
Fr.4 6 (10倍希釈)*5	QT IR	PPR	RU ID	VS	SU IV	SU	SP IQ	RT	UP IV	SR
Fr.7 3 (5倍希釈)*6	QV IQ	PQP	SR IQ	WX	TX IQ	TX	US IV	TT	VX ID	TT
Fr.7 3 (10倍希釈)*6	QW IR	PQU	RS IV	VP	TT IV	TT	TV IV	SX	UQ IR	SR
Fr.7 6 (5倍希釈)*7	RO ID	PRR	ST ID	XR	UW IV	UW	WW IV	VU	VS ID	TP
Fr.7 6 (10倍希釈)*7	QW IV	PQV	SR ID	WX	VR IQ	VR	WQ ID	VO	XP IR	UR

\*1メシマコブ粗抽出液(セルラーゼ処理した画分)をセファデックスG-VTでゲル濾過し、溶出された Q番目のピークをさらに DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーにかけたものであり、時間依存的に細胞処理した後、顕微鏡下で細胞数を測定した。\*2 Uサンプルの平均値である。\*3DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーにより溶出された画分で細胞処理しなかった群である。\*4DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーにより溶出された画分のうちのフラクションナンバー P0~ P番である。\*5DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーにより溶出された画分のうちのフラクションナンバー St番である。\*6DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーにより溶出された画分のうちのフラクションナンバー Vt番である。\*7DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーにより溶出された画分のうちのフラクションナンバー Vt番である。

(メシマコブ画分)についてガン細胞増殖に及ぼす影響を比較した。細胞処理群(ガン細胞にメシマコブ画分を加えたもの)とコントロール群の細胞数を比較した場合、メシマコブ画分による細胞処理後 P日経過した時点では両者の差が明確ではなかった。しかし、 Q日経過した時点の細胞数は、コントロール群を100%としたとき、細胞処理群は約70~90%であった。 R日経過した時点では、細胞処理群は約40~70%、4日または5日経過した時点では約40~80%となり、メシマコブ画分がガン細胞増殖を抑制していることが分かった。

フラクションナンバー10~13番は、リン酸緩衝液のみで溶出されたピーク(図 P)であり、糖質を含有していることを著者らは確認している P10)。したがって、この画分のガン細胞増殖抑制効果については、糖質が関与している可能

性が推測される。多糖類はメシマコブの抗がん成分の P7として報告されている P10)ので、今回確認されたガン細胞増殖抑制作用について糖質が関与しているかどうか、今後さらに検討すべき課題である。

Q) ガン細胞増殖抑制効果の経時的変化について

S種類のメシマコブ画分について、ガン細胞増殖抑制効果を経時的に比較した結果を図 Qに示した。細胞処理後 P日または Q日経過した時点では、 S種のメシマコブ画分のガン細胞増殖抑制効果に大きな差は生じなかった。細胞処理後 R日経過した時点までは、どの画分も細胞増殖抑制率は上昇したが、 S日目以降はフラクションナンバー10~13番では、細胞増殖抑制率が低下した。同様にフラクションナンバー

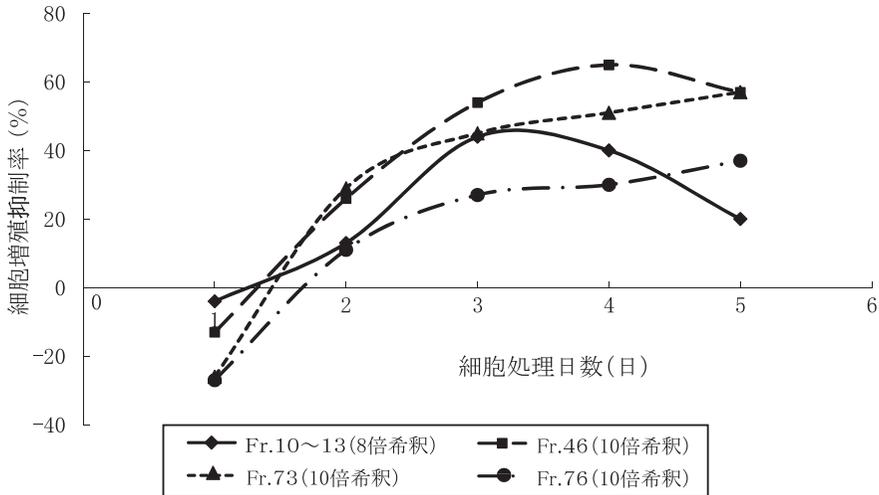


図 Q. メシマコブ画分\*のガン細胞増殖抑制効果  
 \*メシマコブ粗抽出液(セルラーゼ処理した画分)をセファデックスG-VTでゲル濾過し、溶出されたQ番目のピークを濃縮し、さらにDEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーにかけて溶出されたタンパク質溶出曲線のピーク。

46番は、細胞処理後 1日経過した時点で、細胞増殖抑制率が減少に転じた。フラクションナンバー73番および76番については、細胞処理後 5日目以降も増殖抑制率が徐々に増加しており、両者のガン細胞増殖抑制率の経時変化は非常に類似していた。このように、DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーによって分離精製された 5種類の成分は、細胞処理後、数日経過してからガン細胞増殖抑制効果を示すことが確認された。

## 2. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

ガン細胞増殖抑制効果を示したメシマコブ画分(図 Pの4個のピーク)は、ニンニクシクロタンタンパク質の精製法<sup>19)</sup>に準じ、タンパク質に着目した方法により分離精製されたものである。メシマコブ画分に含有されているタンパク質成分について検討するため、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。その結果を図 Rに示した。図中に記載された印は、分子量マーカーであ

る。電気泳動を行った4種類のメシマコブ画分の泳動パターンはシングルバンドではなかったが、すべて類似した位置にバンドが検出された。これらのバンドは、電気泳動用スタンダードの移動度と比較判断すると、分子量約60kDaのタンパク質成分であると推定される。すなわち、今回検討したメシマコブ画分(図 Pの4個のピーク)は、同一のタンパク質成分を共通して含有していることが示唆された。したがって、このタンパク質(分子量約60kDa)は、メシマコブ画分のガン細胞増殖抑制効果の発現に関与している可能性があるかと推察される。

## 要 約

メシマコブ粗抽出液(セルラーゼ処理した画分)をセファデックスG-VTでゲル濾過し、溶出されたQ番目のピークを、さらにDEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーにかけた。得られた4種類の画分についてガン細胞増殖抑制試験およびSDS電気泳動を行い、メシ

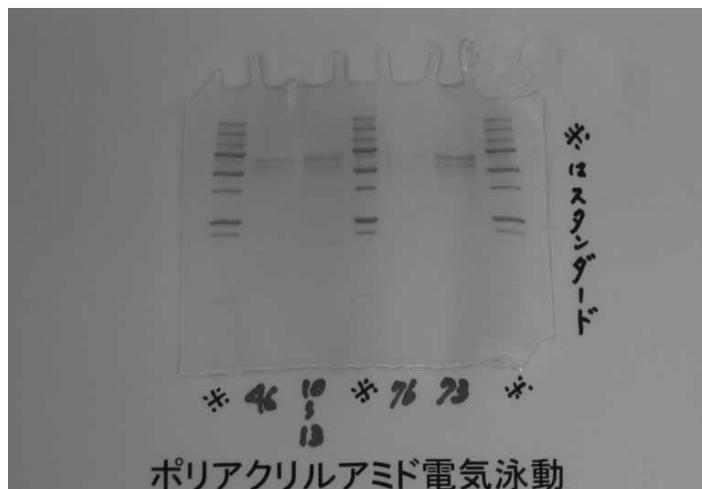


図 R. メシマコブ画分\*の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動像  
 \*メシマコブ粗抽出液(セルラーゼ処理した画分)をセファデックス G-75 でゲル濾過し、溶出された 〇番目のピークを DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーにかけて溶出されたタンパク質溶出曲線のピークである。  
 ; 分子量マーカー。10~13, 46, 73, 76; 各々 DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーにより溶出された画分10~13番, 46番, 73番, 76番である。

マコブ画分の生物活性および純度について検討し、次の結果を得た。

P. 細胞処理群(ガン細胞にメシマコブ画分を加えたもの)と非処理コントロール群の細胞数を比較すると、メシマコブ画分による細胞処理後 1日経過した時点では両者の差が明確ではなかった。しかし、2日経過した時点の細胞数は、コントロール群を100%としたとき、細胞処理群は約70~90%であった。3日経過した時点では、細胞処理群は約40~70%、4日または5日経過した時点では約40~80%となり、メシマコブ画分の添加によってガン細胞の増殖が抑制されていることが示唆された。

Q. 細胞処理後 1日または 2日経過した時点で、ガン細胞増殖抑制効果について 4種類のメシマコブ画分を比較した結果、大きな差はみられなかった。しかし、細胞処理後 3日経過した時点では、どの画分も細胞増殖抑制率が上昇した。4日目以降になると

フラクションナンバー10~13番では、細胞増殖抑制率が低下し、フラクションナンバー46番は細胞処理後 1日経過したとき、増殖抑制率が減少に転じた。フラクションナンバー73番および76番は、細胞処理後 2日目以降も増殖抑制率が徐々に増加しており、両者のガン細胞増殖抑制率の経時的変化は類似していることが分かった。

R. DEAE-トヨパールカラムクロマトグラフィーによって分離された 4種類の成分は、細胞処理後、数日経過してからガン細胞増殖抑制効果を示した。

S. SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った4種類のメシマコブ画分の泳動パターンはシングルバンドではなかったが、すべて類似した位置にバンドが検出された。これらのバンドは分子量約60kDaのタンパク質であると推定され、4種類のメシマコブ画分は同一のタンパク質成分を共通して含有している可能性があることが示

唆された。

### 謝 辞

本研究にあたりガン細胞増殖抑制試験を実施していただきました産業医科大学唐崎裕治教授に心より感謝申し上げます。

### 文 献

- 1) 主婦と生活社編(2005), 健康食品バイブル, 主婦と生活社, 東京, 235.
- 2) Ikekawa T, Nakanishi M, Uehara N, Chihara G, Fukuoka F (1968), Anti-tumor action of some basidiomycetes, especially *Phellinus linteus*, *Gann*, 59, 155 - 157.
- 3) Han SB, Lee CW, Jeon YJ, Yoo ID, Kim HM (1999), The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis, *Immunopharmacol*, 41, 157 - 164.
- 4) Yuji Karasaki, Sadaji Tsukamoto, Koichi Mizusaki, Tsutomu Sugiura and Sadao Dotoh (2001), A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells, *Food Research International*, 34, 7 - 13.
- 5) 石原伸治, 渡辺敏郎, Mazumder Tapan Kumar, 永井史郎, 辻啓介(2005), ラットにおけるメシマコブ菌糸体の血糖値上昇抑制作用, 日本栄養・食糧学会誌, 58(4), 225 - 229.
- 6) 田島眞編著(2004), 食品学, 同文書院, 東京, 103.
- 7) 永川祐三(2004), 抗がん食品事典, 主婦と生活社, 東京, 122 - 127.
- 8) 青柳康夫(2008), 改訂食品機能学, 建帛社, 東京, 95.
- 9) Kida K, Inoue T, Kaino Y, Goto Y, Ikeuchi M, Ito T, Matsuda H, Elliott RB (1992) An immunopotentiator of beta-1,6; 1,3 D-glucan prevents diabetes and insulinitis in BB rats, *Diabetes Res Clin Pract*, 17, 75 - 79.
- 10) 堀尾宅之, 大鶴勝(1995) 実験的糖尿病ラットにおいてマイタケ投与が耐糖能および尿糖排泄に及ぼす効果について, 日本栄養・食糧学会誌, 48, 299 - 305.
- 11) Chorvathova V, Bobek P, Ginter E, Klvanova J (1993), Effect of oyster fungus on glycaemia and cholesterolaemia in rats with insulin-dependent diabetes, *Physiol Res*, 42, 175 - 179.
- 12) 藤野正行, 何普明(1998), タモギタケ熱水抽出物による型糖尿病モデルマウスの血糖値抑制, 日本食品科学工学会誌, 45, 618 - 623.
- 13) Hikino H, Konno Y, Mirin C, Hayasi T (1985), Isolation and hypoglycemic activity of Ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit body, *Planta Ned*, 4, 339 - 340.
- 14) 谷村顕雄監修(1999), 植物資源の生理活性物質ハンドブック, サイエンスフォーラム, 東京, 348 - 350.
- 15) 永川祐三(2004), 抗がん食品事典, 主婦と生活社, 東京, 20.
- 16) 中嶋加代子, 岸本律子(2008), メシマコブに含まれる抗腫瘍活性物質の精製, 別府大学短期大学部紀要, 27, 1 - 6.
- 17) 塚本貞次, 水崎幸一, 吉田紀夫, 石本陽子, 坂田良子, 唐崎裕治(1998), ニンニクのレクチンの精製と性質, 九州女子大学紀要, 34, 11 - 21.
- 18) 庄益芬, 艾尼瓦尔艾山, 野英二, 照井英樹, 檜崎昇, 安宅一夫(2002), *Acremonium* 由来のセルラーゼの添加がサイレージの細胞壁成分および *in vitro* 乾物消化率におよぼす影響, *J. Rakuno Gakuen Univ*, 26(2), 295 - 299.
- 19) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J.(1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent,

別府大学短期大学部紀要 第28号(2009)

J. Biol. Chem., 193, 265 - 275.