

青森県産ツバヒラタケ (*Pleurotus dryinus*)

抽出物の superoxide dismutase 活性 の増大および抗腫瘍活性

— I. 腫瘍移植実験動物系における *P. dryinus*
抽出物の抗酸化作用 —

具 然 和¹・久 野 正 俊²
佐々木 有³・藤 宮 芳 章⁴

Key words: *Pleurotus dryinus*, superoxide dismutase, tumor regression

初めに

ミズナラ、ハリギリなどの広葉樹に生育する「ツバヒラタケ *Pleurotus dryinus*」は担子菌の中では人工栽培が難しい種とされている。また青森県では発生環境が限定され、絶滅が危惧されている種に指定されているほど希少な担子菌である。日本一のりんご生産県である青森県では大量のりんごの剪定枝が排出され、その処理に問題を残していた。そこで、青森県ではこの剪定枝の有効利用を考えるアプローチとして、この剪定枝を「ツバヒラタケ」の人工栽培のための菌床に応用する研究開発を行ってきた。この人工栽培が成功すれば、絶滅の危機から種を守るばかりでなく、青森県では食材として利用されていることから、新たな青森県の郷土商品の開発につながる。精力的な研究の結果、青森

県産業技術センター林業研究所で、安定栽培技術が確立されたが、現在まで大量栽培には至っていない。この問題を解決する手段としては新たな栽培技術の開発は必要であるが、いくつかの問題点を克服せねばならず、直近に食材として提供することは困難である。そこで、この食材を健康食品として製品化できないかと考え、その成分の分析および成分の免疫学的・薬理学的作用を解析し、健康に資する食品として評価できるかどうかの検討を行った。十分な薬理学的作用を証明できれば、健康食品として資することができ、少量生産でも十分採算が合う事業が成り立つ。本研究では、先行して担子菌のアガリクスの抽出物に抗酸化作用があることを証明した研究成果から¹、同様に抗酸化作用があると想定し、その検討を行うとともに抗酸化作用有する成分を同定する計画を進めた。併せて、すでに数種の担子菌において証明されている抗癌効果²についても検討を加えることにした。本報告では抗酸化作用の存在を証明した。

¹ 鈴鹿医療科学大学医療衛生学部 教授

² 地方独立行政法人青森県産業技術センター林業研究所 研究管理員

³ 八戸工業高等専門学校物質工学科 教授

⁴ 八戸大学人間健康学部 教授

材料と方法

ツバヒラタケ子実体の半精製

Pleurotus dryinus (*P. dryinus*) 300 g 乾燥子実体をブレンダーで粉碎し、40°Cで2,000 mlの蒸留水で2時間熱水抽出を行った。遠心した後上清を集め、凍結乾燥した後に、乾燥したサンプルに1 MのHClを加えて一晚攪拌した。攪拌後、1 MのNaOHを等量加えてpH7になるよう更に1時間攪拌した。攪拌後遠心して固形物を除去する。除去した後の溶液を透析膜に詰め、水に対して透析した。透析した後の溶液を凍結乾燥して実験に供した(およそ30 g得られた)。

抗酸化作用の検討

抗酸化作用および次項の抗腫瘍活性測定で、抗腫瘍活性が免疫機能増強によるものかどうかを検討するために、実験動物に予め弱めの2 Gyレベルの放射線照射を行う実験計画を策定した。5週齢の雄C3H/HeJマウスを用い、各10匹をIグループの蒸留水経口投与Control群、IIグループ*P. dryinus* 経口投与群、IIIグループ2 Gy放射線照射群、IVグループ*P. dryinus*の経口投与および2 Gy放射線照射群に割付けた。マウス飼育環境は室温22±3°Cおよび湿度60%(午前7時から12時間の明暗サイクル、水と飼料は自由摂取)を維持し、一週間の予備飼育後に上記の設定を行った。ツバヒラタケは250 mg/kg/dayの割合で、ゾンデを用いて経口投与を行った。放射線照射は投与2週間後に行った。投与開始後2週間および4週間で、眼底採血を行い、血中superoxide dismutase (SOD) 様活性を測定した。

SOD 活性の測定

測定キット(日研ザイル, 東京)を用いて測定した。Martinらの方法に準じ³⁾, 血液サンプルをクロロホルム/メタノール抽出でヘモグロビンを除去し、希釈後ヘマトキシリン試薬を添加

し、560 nmにおける吸光度を阻害率を測定して算出した。SODの活性は修正を加えた算出方法で測定した。: ブランクの吸光度上昇率を $R1 = \Delta Abs_{560nm}/min$, サンプルの吸光度上昇率を $R2 = \Delta Abs_{560nm}/min$ として、阻害率 $= [1 - (R1/R2)] \times 100(\%)$ を算出し、それをSOD活性とした。

抗腫瘍活性の検討

抗腫瘍活性が免疫機能の増強に5週齢C3H/HeJマウス各10匹をIグループとして蒸留水を経口投与するControl群およびIIグループとして*P. dryinus*を250 mg/kg/dayの割合で経口投与する実験群に割り当てた。被検体を投与7日後に扁平上皮癌SCC-7 (2×10^5)を皮下接種した。皮下接種開始9日より2日おきに腫瘍を測定し、次式を用いて腫瘍体積を求めた。腫瘍体積 $[mm^3] = 1/2 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$ で求めた。

結 果

図1に示されるように、Control群に比較して*P. dryinus*投与群に有意に高いSOD活性(抗酸化作用)が認められた。この傾向は28日後には一層のSOD活性の上昇が認められ、*P. dryinus*抽出物の摂取量に依存することが示された。また、抗腫瘍活性については、観察日を通して、*P. dryinus*投与群はControl群と比較して有意に腫瘍増殖が抑制され($p < 0.05$)、*P. dryinus*抽出物に抗腫瘍活性が認められた(図2)。また、33日後の腫瘍重量を測定しても、*P. dryinus*経口投与群においては、Control群と比較して有意に縮小しており(データ省略)、ここでも*P. dryinus*抽出物の腫瘍増殖抑制作用が証明された。

結論および考察

*P. dryinus*の経口投与により、同抽出物に抗

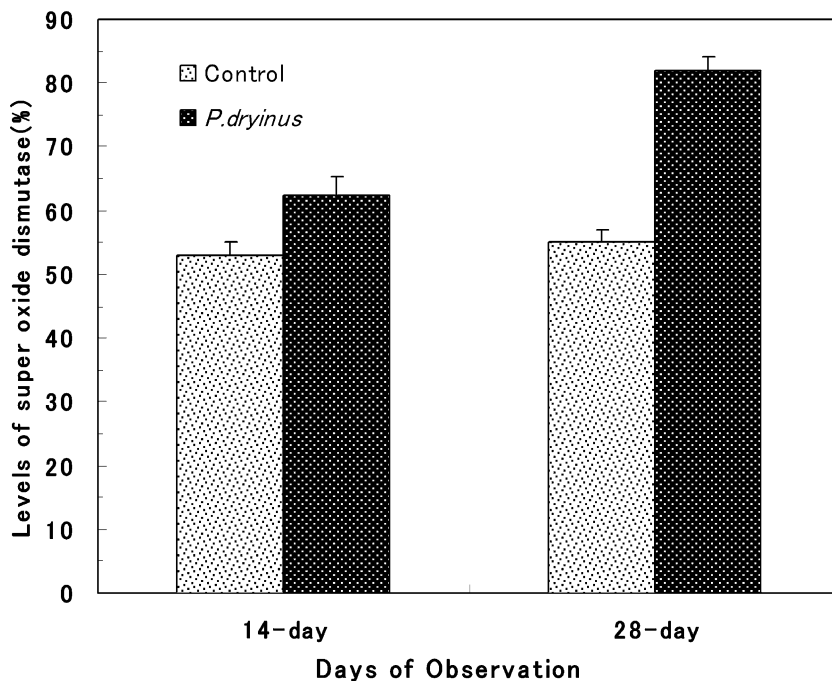


Figure 1 Superoxide dismutase levels in blood samples of tumor-bearing mouse after orally given *P. dryinus* extracts.

The effect of *P. dryinus* extracts on antioxidant activity was examined by measuring superoxide dismutase levels. After blood samples were treated with several testing reagents as instructed by the manufacturer, the absorbance was read at 560 nm using a spectrophotometer. The results are mean \pm SD of representative of 3 experiments. *P. dryinus* vs. water control, $P < 0.05$ by Dunnett test.

酸化作用および抗腫瘍活性を示す成分が含まれていることが示唆された。担子菌類の成分の抗腫瘍活性を示す物質は主として β -グルカンが含まれていることは広く知られている^{2,4}。担子菌成分に抗酸化作用を示すものがあることは、最近ようやく証明されつつあり¹、研究は堵にいたばかりである。抗酸化作用を示す物質が抗腫瘍活性を示す β -グルカンかどうかあるいは未知の物質かどうか解明することが今後の課題となる。また抗酸化作用がどのように抗腫瘍活性として作用しているのか未だ明確に示されていない。本研究では放射線を照射し、若干免疫

機能を抑制した実験系で、抗酸化作用および抗腫瘍活性を検討した。その結果、十分に両活性が認められたことから、免疫機能活性化の他に抗酸化作用による抗腫瘍活性についての検討が必要になる。更に癌患者臨床試験で抗酸化物質による治療が認められた、あるいは全く効果が認められなかったと矛盾した成績が報告された^{5,6}。この理由としてビタミンCなど天然抗酸化物質と合成抗酸化物質の作用の違いとされているが、未だ結論が出ていない。今後の研究成果を注視することになる。

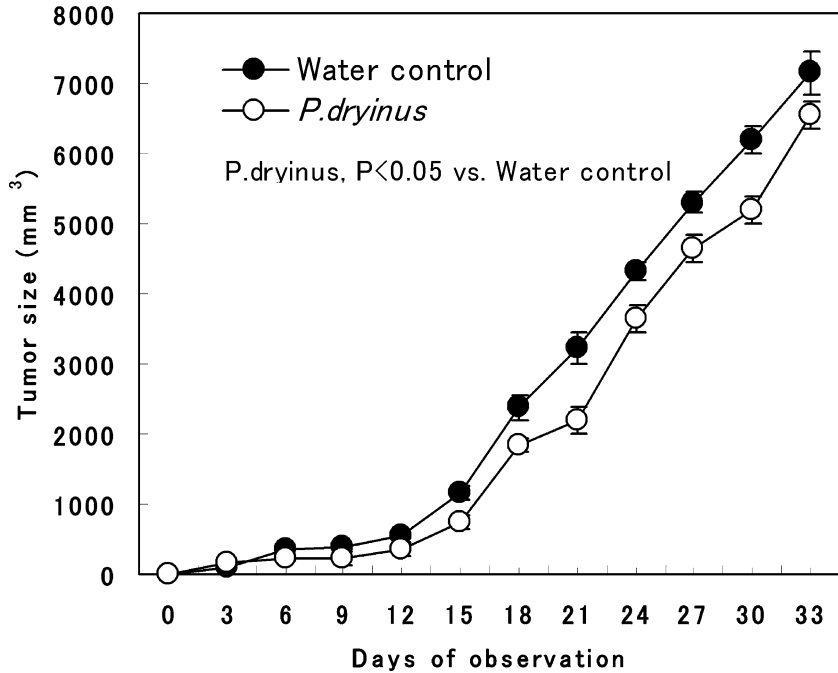


Figure 2 Induction of tumor regression after orally given *P. dryinus* extracts. Groups of C3H/HeJ mice ($n=10$) inoculated subcutaneously with SCC-7 tumor were treated with oral doses of *P. dryinus* extracts or water once daily for 34 consecutive days. Groups of 10 mice each received oral administration of extracts (250 mg/kg/day) or distilled water once daily. The growth of tumor cells was monitored by calculating tumor size as described in the Materials and Methods. Mean values \pm SD are shown (*P. dryinus* extracts vs. water control, $P < 0.05$, Days 15-33 by Student *t* test).

引用文献

1. Gu YH, Fujimiya Y, Itokawa Y, et al. Tumoricidal Effects of β -Glucans: Mechanisms Include Both Antioxidant Activity Plus Enhanced Systemic and Topical Immunity. *Nutri Cancer* 60: 1-7, 2008.
2. Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman K, et al. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother* 46: 147-159, 1998.
3. Martin JP, Dailey M, Sugarman E. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autooxidation. *Arch Biochem Biophys* 255: 329-336, 1987.
4. Mizuno T, Hagiwara T, Nakamura T, et al. Antitumor activity and some properties of water-soluble polysaccharides from "Himematsutake," the fruiting body of *Agaricus blazei* Murill. *Agr Biol Chem* 54: 2889-2896, 1990.
5. Lesperance ML, Olivotto IA, Forde N, et al. Mega-dose vitamins and minerals in the treatment of non-metastatic breast cancer: an historical cohort study. *Breast Cancer Res Treat* 76: 137-143, 2002.
6. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, et al. Effects of a combination of beta

具 然和・久野正俊・佐々木有・藤宮芳章：青森県産ツバヒラタケ (*Pleurotus dryinus*) の抗酸化作用
carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. N Engl J Med 334: 1150-1155, 1996.

**Increased Levels of Superoxide Dismutase and Tumor Regression
by Orally Administered Extracts of *Pleurotus dryinus* Grown
in Aomori Prefecture :**

**I. Increased Antioxidant Activity of Extracts
in Tumor-bearing Mouse Models**

YeunHwa GU¹, Masatoshi KUNO², Yu F. SASAKI³ and Yoshiaki FUJIMIYA^{4*}

¹Professor, Graduate School of Health Science, Suzuka University of Medical Science, Suzuka, Mie

²Research Manager, Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute, Forest Environment Section, Higashitugarugun, Aomori

³Professor, Laboratory of Genotoxicity, Faculty of Chemical and Biological Engineering, Hachinohe National College of Technology, Hachinohe, Aomori

⁴Professor, Department of Microbiology and Immunology, Hachinohe University School of Human Health Sciences, Hachinohe, Aomori, Japan

*Corresponding author

Abstract

The present study was undertaken to evaluate the effects of orally administered *Pleurotus dryinus* extracts on levels of super oxide dismutase produced and tumor regression in a tumor-bearing mouse model. The study demonstrates that the antioxidant properties of extracts when given orally plays a pivotal role in tumor regression in tumor-bearing mouse models. Since the tumor regression was seen in radiation-exposed tumor-bearing mouse models, it was suggested that in addition to enhanced systemic immunity of host the antioxidant pathway also may be involved. The association of antioxidant activity with β -1,6-glucan responsible for tumor regression and detailed analysis of enhanced host immune systems remains to be determined.

Key words : *Pleurotus dryinus*, superoxide dismutase, tumor regression