

〈原著〉

牛由来癌化細胞に対するホーロク茸エキスの効果 —予備試験—

川上 静夫¹⁾、金子 一幸²⁾

In vitro and *in vivo* studies of the anti-immortalized effects of Hohrocutake (*daedalea dickinsii yasuda*) extract on the immortalized cell line established from bovine granulosa cells

Shizuo Kawakami¹⁾ and Kazuyuki Kaneko²⁾

Summary

1. *In vitro* experiment

The growth of immortalized cells was found to perfectly inhibit Eagle's medium containing a small amount of the extract.

2. *In vivo* experiment

The immortalized cells were injected to nude mice, and the extract was injected simultaneously and continuously.

As a result, the extract was not found to inhibit the growth of transplantable cancerous cells.

3. Further studies are needed to establish the effects of a concentrated extract *in vivo*.

Key words: Cancerous cell, *Daedalea dickinsii*, Transplantable tumor

I. はじめに

梅の朽木に生えていたホーロク茸 (*Daedalea dickinsii*) (図1)¹⁾の水道水による浸出液 (茸エキス) を牛由来の癌化細胞JTC-35 (細胞) の培養開始時の培養液に少量添加して細胞の増殖に及ぼす影響を調べた。

ホーロク茸および他の茸類のエキ스가、癌化細胞の増殖を抑制するかどうかについての報告は見当たらない。著者らはホーロク茸エキスを癌化細胞の培地に添加したところ、その可能性を見出した。

そこで本研究は、ホーロク茸エキスの効果を確かめるために、*In vitro*および*In vivo*の試験を

¹⁾ヤマザキ学園大学動物看護学部動物看護学科
〒192-0364 東京都八王子市南大沢4-7-2

²⁾麻布大学獣医学部
〒229-8501 神奈川県相模原市渕野辺1-17-71
受領日 平成24年9月12日
受理日 平成24年9月21日

¹⁾Yamazaki Gakuenn University
4-7-2 Minami-osawa, Hachioji, Tokyo 192-0364, Japan
²⁾Department of Theriogenology, Azabu University,
Sagamihara, Kanagawa 229-8501, Japan

予備的に実施した。

なお、動物使用にあたっては、麻布大学動物実験指針の趣旨に沿って実施した。

II. 材料および方法

1. 材料

ホーロク茸：東京都八王子市片倉地区の倒木置き場の梅の枯木に生育していたものを用いた。分類学上は、サルノコシカケ科、ホーロク茸属となる。

癌化細胞：著者が牛卵胞内顆粒層細胞の継代培養中に偶然癌化したもので、日本組織培養学会株細胞登録委員会にJTC-35として登録されている公認株である。現在、理化学研究所バイオリソースセンターに寄託され、RCB2686として提供可能となりホームページにて公開されている²⁾。

る²⁾。

マウス：ヌードマウスBALB/c系、6週齢、体重約20 g、雌で日本SLC株式会社（浜松市）より入手した。

細胞培養基：イーグルMEM培地ニッスイ①を用いた。

茸エキス：生のホーロク茸を米粒大に細切して試験管に入れ、全体が浸漬する程度に、カラム浄化処理済水道水を加え、ときどき攪拌し、4℃6日間静置した後、細菌濾過操作をして無菌液としたものを用いた。

2. 方法

In vitro（試験1）と*in vivo*（試験2、3）について実施した。

試験1：癌化細胞培養液への茸エキス添加の影響

Table 1 Effects of the Hohrocutake (*Daedalea dickinsii yasuda*) extract on the immortalized cell line established from bovine granulosa cells.

extract (ml/5 ml)	Observation time and a view		
	24-48 hours culture	72 hours culture	96 hours culture
control	90% bottom adhesion	100% bottom adhesion	
0.025	40% bottom adhesion	slightly bottom adhesion	—
0.050	10% bottom adhesion	—	
0.075	—	—	

—: no bottom adhesion



Fig. 1 Hohrocutake (*Daedalea dickinsii yasuda*).

イーグルMEM培養液5.0 mlを容れた培養瓶4個を用意し、それぞれに癌化細胞を約10万個移植した。ついで培養瓶それぞれに茸エキス0.025 ml、0.05 ml、0.075 mlを添加し、残りの1個は無添加対照とした。

培養は37℃で4日間行い、底面における細胞の増殖状態を位相差倒立顕微鏡で観察し、写真撮影を行った。茸エキス添加したものと、無添加対照とを比較した。

試験2：癌化細胞接種マウスの腫瘍形成に対する接種後茸エキス投与の影響

接種細胞の調整方法：癌化細胞を培溶液15.0 mlで37℃、約5日間培養し、底面に付着増殖させた後、培養液を捨て、PBS液で0.25%に溶解したトリプシン液を10 ml加えて攪拌し、細胞を分散させ、さらに、培養液で1回洗浄し、遠沈したものを所定の細胞数を含むように調整した。

マウスへの茸エキスおよび細胞の投与方法：茸エキス投与群は3頭とし、側腹部皮下に約1,000万個の細胞を接種した。その後2日目から隔日に側腹部皮下に0.2 mlずつ茸エキス注射を8回(16日目まで)行った。

対照群の3頭には茸エキス投与を行わず、側腹部皮下に約1,000万個の癌化細胞を接種した。

癌化細胞接種マウスの経過観察法：細胞接種や茸エキスを注射されたマウスの経過は肉眼的、臨床的に約1ヶ月間観察した。

試験3：癌化細胞接種マウスの腫瘍形成に対

する接種前茸エキス投与の影響

マウス3頭を用い、茸エキスを癌化細胞接種(約1,000万個)の1日目より連日0.2 mlずつ26日間、側腹部皮下に注射した。その間、試験2と同様に約1ヶ月間観察した。対照群は試験2の対照群のマウスとした。

供試マウスは市販のマウス用固形飼料を給餌し、自由飲水で飼育した。試験期間中は元気や食欲等を注意深く観察したが、特に異常は認められなかった。

Ⅲ. 成績

試験1の結果を表1に示した。

茸エキス無添加(図2)の対照に比べ、添加群の細胞増殖は添加量に応じて著明に抑制された(図3)。

試験2では、腫瘍は類円形、ハート型、ヒョウタン型、クビレ型などのような形状形成された。しかし、茸エキス注射群と対照群のマウスの間に腫瘍形成の差は認められなかった(図4)。

試験3では癌化細胞接種の1日前から連日茸エキスを注射したにもかかわらず腫瘍の形成は抑制できなかった。

Ⅳ. 考察

本研究の結果、茸エキスは培養液に添加した

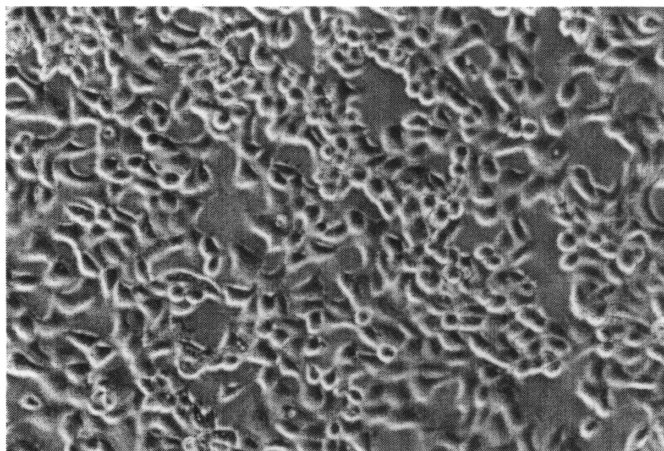


Fig. 2 Control, after 48 hours of culture (×100).

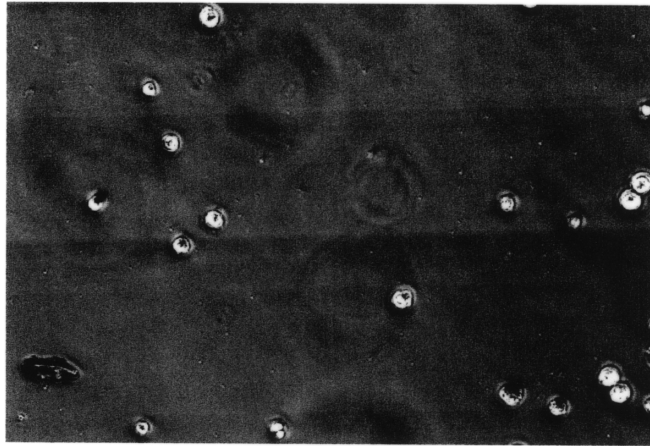


Fig. 3 Growth of immortalized cells was found to perfectly inhibit Eagle's medium containing a small amount (0.02 ml) of the extract, after 48 hours of culture ($\times 100$).



Fig. 4 The extract was not found to inhibit the growth of transplanted cancerous cells 16 days after injections to the left side of the abdomen ($\times 100$).

場合は細胞の増殖を完全に抑制したが、癌化細胞をマウスに接種した場合は腫瘍形成を防ぐことはできなかった。

培養液内で示された茸エキスの細胞発育障害の機序がアポトーシス現象³⁾によるのか、ネクローシス現象によるのかは今回、確かめられなかった。

Hara⁴⁾は、抗アレルギー物質の投与はアレルギー投与の前からはじめた方がより効果的であると報告しているので、試験3では茸エキスを

事前に注射し、かつ、投与回数を増やしたが、腫瘍の形成を抑制することはできなかった。

培養液に添加した茸エキスの容量は、培養液の200分の1であり、そのまま容器内に留まっていたと考えられる。

一方、マウスへの投与量を重量で単純計算すると100分の1（体重20 g、注射量0.2 ml）となり、約2倍多かった。それにもかかわらず腫瘍形成を抑制できなかったことには、生体内における有効成分および代謝排泄機能が関与したと

考えられる。

癌細胞の増殖を抑制したり、死滅させるためには、高濃度の有効成分が必要である。そのため茸エキスの抽出法や凍結乾燥等による濃縮法、成分分析による有効分画の探索とともに、腹腔内、経口など投与経路および投与頻度に関する検討が必要であろう⁵⁾。

本研究でなされたマウスへの茸エキスの連続投与では、有害な副作用はまったくみられなかったので、本エキスを今後癌の治療に応用できる可能性がある。

稿を終わるに当たり、本論文作成に始終ご指導、ご協力を賜りました故大池隆温麻布大学名誉教授に喪心よりご冥福をお祈りいたします。

文献

- 1) 本郷次雄: きのこと菌鑑, 幼菌の会編, 第1版, 242, 家の光協会, 東京, (2001)
- 2) JTC-35, Bovine cell line in RIKEN BRC (RIKEN BRC), <http://www2.brc.riken.jp/cache/cell/RCB2686>
- 3) Kuroda Y, Hara Y: Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols (II). *Environ Mutagen res.* 21: 85-94, 1999.
- 4) Hara Y, Matsuzaki S, Nakamura K: Anti-tumor Activity of Tea Catechins. *Japan Soc Nur Food Sci*, 42: 39-45, 1989.
- 5) Kuroda Y, Hara Y: Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutation Res*, 436: 69-97, 1999.