

## 【原著】

マウス sarcoma 180 スクリーニング系における *Agaricus blazei* Murrill  
(ヒメマツタケ) の臨床至適有効量に関する基礎的研究伊藤浩子<sup>1</sup>、藤島雅基<sup>2</sup>、荒川ゆかり<sup>2</sup>、中田福佳<sup>3</sup>、伊藤均<sup>4</sup><sup>1</sup>三重大学生物資源学部海洋生物化学研究室<sup>2</sup>(株) サン・クロレラ 生産開発本部<sup>3</sup>パワフル健康食品株式会社<sup>4</sup>菌類薬理研究所

(受付：平成 23 年 1 月 31 日)

(受理：平成 23 年 2 月 7 日)

## 要 旨

本研究の目的は、マウス sarcoma 180 スクリーニング系を用いてヒメマツタケ子実体・菌糸体液体培養細胞壁破碎抽出物 (ABM 70%) クロレラ抽出物 (CGF 30%) が配合された ABM-C の経口投与による臨床至適有効量を検討することである。ABM-C の一定量を、1 日 2 回、連日 21 日間経口投与した。ABM-C 1,800 mg/kg 投与群の腫瘍阻止率は 89.4%、腫瘍の消失は 6/10 例に認められた。1,200 mg/kg 投与群の腫瘍阻止率は 88.6%、腫瘍の完全消失は 5/10 例に認められるが、両群の腫瘍阻止率の差はわずか 0.8% であった。結果として ABM-C の至適有効量は約 1,200 mg/kg/日と推定できる。Freireich EJ らの理論では、20 g マウスと 60 kg ヒトにおける薬剤感受性の差は、マウス 1 : ヒト 1/12 とされている。故に ABM-C の臨床至適有効量は 6 g/日と推定される。ABM-C の抗腫瘍効果は宿主介在性機構であり、腫瘍細胞に対する直接的細胞毒性はもたないことが明らかとなった。

キーワード： *Agaricus blazei* Murrill、ヒメマツタケ、至適有効量、sarcoma 180

## 緒 言

学名・*Agaricus blazei* Murrill (和名・ヒメマツタケ<sup>1)</sup>) の種菌は、1965 年の夏、ブラジル・サンパウロ・ピエダーデから日本に送付され、1975 年に岩出博士らによってキノコ子実体の人工栽培<sup>2)</sup>が成功した。著者らは 1978 年、菌糸体の液体培養に成功<sup>3)</sup>した。

ヒメマツタケの子実体<sup>4)</sup>・培養菌糸体<sup>5)</sup>がマウス移植腫瘍に顕著な抗腫瘍活性を示すことを報告しており、癌の民間療法的食品<sup>6)</sup>として広く利用されている。

今回は、ヒメマツタケ *Agaricus blazei* Murrill (ABM) に CGF (chlorella growth factor) が配合された ABM-C をマウス sarcoma 180 スクリーニング系を利用して、経口投与による有効量を決定し、臨床における至適有効量の検討を行った。

## 実験材料と方法

## 1. 被検物質

本実験に使用された材料は 1978 年以降、抗腫瘍活性および免疫学的生物活性が確認されている *Agaricus blazei* Murrill の子実体、菌糸体細胞壁破碎抽出物 (ABM) とクロレラ熱水抽出物である chlorella growth factor (CGF)、および ABM と CGF が配合された (株) サンクロレラ提供の ABM-C (Lot No. 101028) を用いた。

## 2. 実験動物および飼育条件

供試した ICR/Slc 雌マウス (日本エスエルシー (株)) は 4 週齢で購入し、7 日間の予備飼育の後、一般症状観察および尿検査で異常が認められなかったマウスを試験に供した。

マウスは三重大学生命科学研究支援センター動物施設の実験指針による、温度 23 ± 2°C、相

対湿度 55 ± 5% のバリアシステムの環境下の飼育条件下で 1 群 10 匹とし、プラスチックケージに 5 匹ずつ同居させ、固型飼料（クレア CE-7）と水道水を自由に摂取させた。

### 3. 抗腫瘍性試験

sarcoma 180 は、1965 年より、7-10 日毎にマウスに腹水型で継代維持しているものを用いた。腹水腫瘍は  $1 \times 10^6$  cells/mouse の割合で 0.2 ml 中に含まれるようにした腫瘍細胞浮遊液をマウスの皮下に接種した。試料は腫瘍移植、24 時間後より一定量を予試験では腹腔内投与し、本試験では経口投与を一定期間行った。なお、対照群には生理食塩液を投与して実験群と同様の処置を行った<sup>7)</sup>。また、投与群の腫瘍阻止率、完全消失率、生存率などを対照群と比較して腫瘍活性の判定を行った<sup>7)</sup>。

### 4. *in vitro* における抗腫瘍試験

sarcoma 180 細胞を採取し、 $1 \times 10^6$  cells/5 ml になるように、20% 牛胎児血清（Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., U.S.A.）を含有したイーグル MEM（Grand Island, N.Y., U.S.A.）混合培地に ABM、CGF、ABM-C の一定用量（Table 3）を添加し、5% CO<sub>2</sub> ガス インキュベーターに入れ、37℃ で 24 時間培養後、トリパンブルーにて染色し、腫瘍細胞の生存率を測定した<sup>8)</sup>。

### 5. 組織学的検査

ABM-C 1,200 (600 × 2) mg/kg/日および対照の生理食塩液 0.4 ml × 2/マウス/日、経口投与 14 日後のマウス各群 3 例の腫瘍部分を切除し、4℃ で 10% ホルマリン液で固定し、以下、常法<sup>9)</sup>によりパラフィン包埋後、ミクロトームにて 5 μm の切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色によって腫瘍細胞に発現した形態学的変化を検討した。

## 結 果

### 1. ABM、CGF 配合比率による抗腫瘍活性

この試験（予試験）の目的は、マウス sarcoma 180 スクリーニング系を利用して、最大の抗瘍活性を示す ABM と CGF の配合比率を検討することである。

Table 1 に示すように、ABM 70%、CGF 30%

配合群において、3 週後における腫瘍増殖阻止率が 92%、4 週後の生存率は 10/10 例であり、他の配合群と比較して、最大の抗腫瘍活性が認められた。

### 2. ABM-C の経口投与による抗腫瘍活性

臨床における適用は経口投与であるので、最大の抗腫瘍活性が得られた予試験の結果より、ABM 70% と CGF 30% が配合された ABM-C を用いて、高用量 1,800 (900 × 2) mg/kg/日、中用量 1,200 (600 × 2) mg/kg/日および低用量 800 (400 × 2) mg/kg/日の 3 群に分別し、抗腫瘍活性を検討した。各群とも、腫瘍移植 24 時間後より、1 日 2 回（朝・午前 8 時と夕方・午後 5 時）、胃ゾンデにより、21 日間連日経口投与を行った。対照群には、生理食塩液を投与群と同様に経口投与した。各群とも腫瘍移植 3 週後に腫瘍増殖阻止率、4 週後に生存率、5 週後に腫瘍の完全消失率と生存率を測定し、対照群と投与群を比較検討した。その結果を Table 2、Fig. 1 に一括して示す。

Table 1 Antitumor effects of prosthetic group (ABM, CGF) on subcutaneously implanted sarcoma 180

Test Samples	ABM (%)	CGF (%)	Tumor inhibition ratio (%) at 21 days <sup>a)</sup>
1	95	5	70 (8/10) <sup>b)</sup>
2	90	10	74 (8/10)
3	85	15	76 (8/10)
4	80	20	75 (9/10)
5	75	25	80 (9/10)
6	70	30	92 (10/10)
7	65	35	75 (9/10)
8	60	40	66 (8/10)
9	55	45	64 (7/10)
10	50	50	52 (7/10)
Control	—	—	— (6/10)

ABM comprised hot water the extract of fruiting bodies and mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Murrill cell wall crushing, and *Chlorella pyrenoidosa*-hot water extract (CGF). In ICR/slc female mice,  $1 \times 10^6$  of cells of 7 day-old sarcoma 180 ascites tumor were implanted subcutaneously and test material (1-10) (100 mg/kg) were given intraperitoneally from the day after implantation, once a day for ten days. <sup>a)</sup>: The tumor size by the saline-treated control group was  $16.3 \pm 5.2$  cm<sup>3</sup> (mean ± S.D.) at the end of 21 days after the tumor implantation. <sup>b)</sup>: No. of 28-day survivors / No. of mice used.

高用量、中用量投与群の腫瘍阻止率は 89.4% および 88.6% であり、その差は 0.8% で両群間の抗腫瘍活性において殆ど有意差は認められなかった。また、腫瘍の完全消失率においても前者で 10 例中 6 例、後者で 10 例中 5 例であり、両群ともほぼ同様の効果を示すに過ぎなかった。しかし、低用量投与群では腫瘍増殖阻止率と腫瘍の完全消失率は著明に低下することが認められた。

### 3. *in vitro* における抗腫瘍活性

ABM、CGF、ABM-C を種々の濃度に添加した培地で培養した sarcoma 180 腫瘍細胞の 24 時間後の生存率は、対照群と比較して殆ど差はないことが示され、直接的細胞毒性作用は認められなかった (Table 3)。

Table 3 Viability of sarcoma 180 cells in culture medium containing ABM, CGF or ABM-C

Test Samples	Dose (mg/5ml Medium)	No. of Petri dishes	Average viability of Tumor cells (%)
ABM	0.2	3	96.9
	0.5	3	96.5
	1.0	3	97.4
Control CGF	—	3	95.1
	0.5	3	95.1
Control ABM-C	—	3	96.5
	1.0	3	94.8
ABM-C	2.5	3	94.2
	5.0	3	93.7
	—	3	96.2

The ascites tumor cells ( $1 \times 10^6$  cells) of 7 day-old sarcoma 180 were incubated in a medium containing ABM, CGF or ABM-C in various concentrations, using a CO<sub>2</sub> gas incubator, at 37°C for 24 hours. After incubation, the cells were stained with Trypan Blue to estimate their viability which was compared with that of the saline-treated control cells incubated in the same medium without test samples. Eagle's minimum essential medium (MEM) added with 20% calf serum was used for the suspension cultures.

Table 2 Antitumor effects of ABM-C on subcutaneously implanted sarcoma 180

Experimental groups	ABM-C		Tumor inhibition ratio (%) at 21 days <sup>a)</sup>	Tumor-free mice at 35 days
	Dose (mg/kg × 2/day)	Day of oral administration		
ABM-C	900 × 2	21	89.4* (10/10) <sup>b)</sup>	6/10 (10/10) <sup>c)</sup>
	600 × 2	21	88.6* (10/10)	5/10 (10/10)
	400 × 2	21	59.7* (10/10)	1/10 ( 7/10)
Control (saline)	0.4 ml × 2	21	0 ( 7/10)	0/10 ( 2/10)

ABM-C (The test sample, No.6) comprised 70% of the hot water extract of fruiting bodies and mycelium of liquid- cultured *Agaricus blazei* Murrill cell wall crushing, and 30% of *Chlorella pyrenoidosa*-hot water extract. In ICR/slc female mice were implanted s.c. with  $1 \times 10^6$  sarcoma 180 cells on day 0. ABM-C was given p.o. twice a day at a indicated dose (see Table 2) on days 1 through 21. <sup>a)</sup> The tumor size by the saline-treated control group was  $20.47 \pm 4.1$  cm<sup>3</sup> (mean ± S.D.) at the end of 21 days after the tumor implantation. <sup>b)</sup> No. of 28-day survivors / No. of mice used. <sup>c)</sup> No. of 35-day survivors / No. of mice used. Significant difference: \* P < 0.05, as compared with the saline-treated control mice.



Fig. 1 Tumor growth ratio at 35 days after implantation of sarcoma 180. A : Upper (Control), Under : ABM-C, 1,800 (900 × 2) mg/kg/day × 21). B : Upper (Control), Under : (ABM-C, 1,200 (600 × 2) mg/kg/day × 21), (see Table 2 the details).

#### 4. 組織学的検査

Fig. 2 に示すように対照群の腫瘍組織では、個々の腫瘍細胞には不整形が見られるが、組織全体としてはほぼ均等な腫瘍細胞の増殖像を示した。腫瘍細胞核は大きさ、形ともほぼ一様で明瞭な核膜を持ち、多数のクロマチン顆粒が見られる。奇形な核と弱好酸性細胞体を示す細胞は巨細胞である (写真 A)。ABM-C 処理 14 日後の腫瘍組織では疎性結合組織が増殖し、腫瘍細胞数は減少した (写真 B)。腫瘍組織の中には多数の島状壊死巣が見られ、周辺には多数の好中球の浸潤があり、腫瘍細胞核の有糸分裂像は減少した (写真 C)。線維性結合組織の形成は著しく、縮小した腫瘍組織を囲む島状の構造が観察された (写真 D)。

#### 考 察

日本では、40 数年前から国立がんセンター研究所・化学療法部の研究者により、担子菌類由来の多糖体は、マウスの皮下に移植した sarcoma 180 固型腫瘍を用いるスクリーニング系において評価され、従来の抗腫瘍剤とは異なる宿主介在性抗腫瘍作用機作をもつことが示唆されている。

著者らも 1965 年以来、カワラタケ、チョレイ、ニンギョウタケ、ヤマブシタケ、ニオウシメジ、レイシ、ヒメマツタケなどに含まれる抗腫瘍性多糖体について報告してきた。

ヒメマツタケは学名がアガリクス・ブラゼイ・ムリルと呼ばれることから、アガリクス茸と同一であると誤解されることがあるが、「アガリ

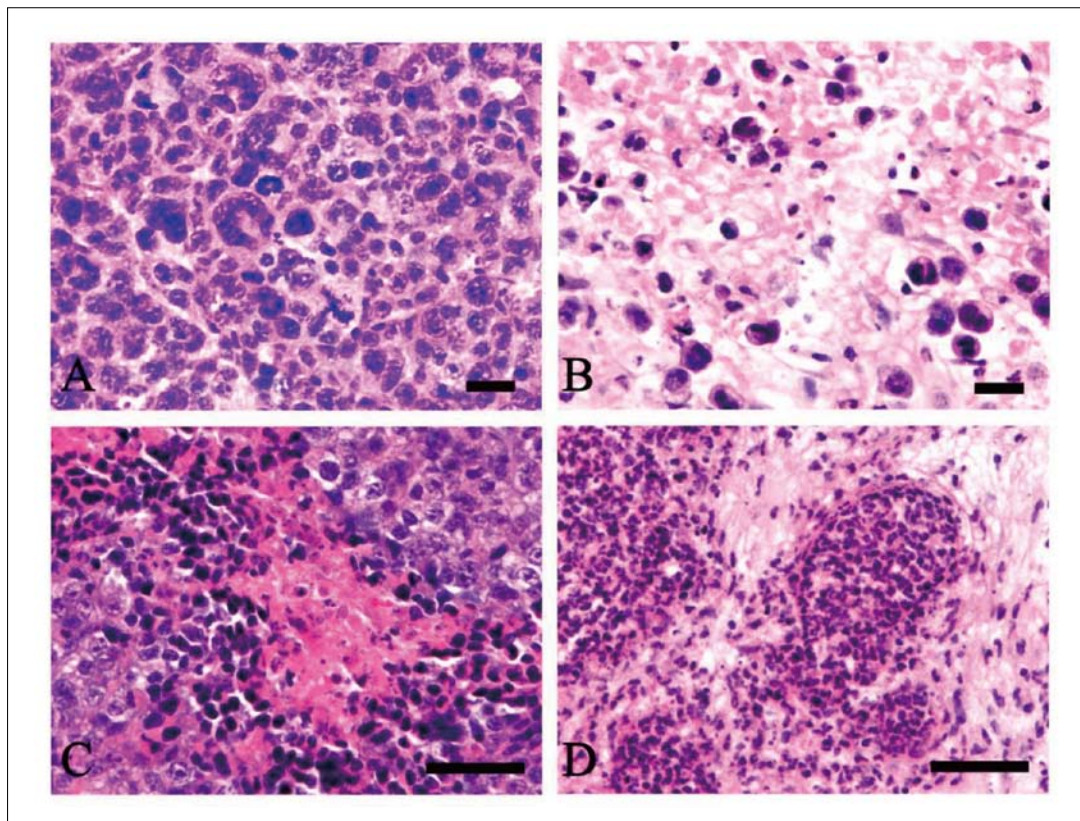


Fig. 2 Micrographs of tumor cells treated with ABM-C 1,200 mg/kg/day (B, C, D) or saline (control: A) at 14 days after implantation of sarcoma 180. Histological sections of sarcoma 180 tumors showed a sarcomatous pattern with anisocytosis, polymorphism and the abundant abnormal mitosis. Some tumor cells had extremely pleomorphic nuclei containing one or more prominent nucleoli and eosinophilic cytoplasm (A). After the treatment for 14 days, the tumor nodules were undergoing necrosis, a few consisting of the viable tumor cells located at the periphery (B). The tumor tissue was mostly necrotic, and the reduced tumor tissues were replaced and enveloped with a large amount of connective tissue with infiltration of abundant inflammatory cells. The tumor cells were expressing the marked reduction of mitosis (C, D). HE staining. A, B: 400 $\times$ , C, D: 200 $\times$ . Scale bar=20  $\mu$ m.



クス」は「ハラタケ属」という意味であり、アガリクス茸というのは、これらのキノコの総称であり、固有名ではない。

ヒメマツタケ子実体に含まれる抗腫瘍活性多糖体の中では、(1 → 6)-β-D-グルカン・蛋白複合体 (F III -2-b) が最も高い抗腫瘍効果<sup>10)</sup>を示す。菌糸体の抗腫瘍活性の主体は、β-1,2 結合した D-mannopyranosyl を主鎖とし、β-D-glucopyranosyl-3-O-β-D-glucopyranosyl 残基を側鎖にもつ新規グルコマンナン多糖体であることが確認されている<sup>11)</sup>。

クロレラ抽出液は Th1 (タイプ 1 ヘルパー T 細胞) 活性を誘導し、IFN-γ (インターフェロンガンマ)、IL-12 (インターロイキン 12) の産生を促進することが知られている<sup>12)</sup>。その効能成分の一つとして、*Chlorella pyrenoidosa* の抽出液からラムノースとマンノースを主な構成糖とする二つの多糖体が単離された<sup>13)</sup>。この多糖体は *in vitro* で著しく高い抗腫瘍活性を示し、用量依存性であること、さらに悪性膠芽腫<sup>14)</sup>に対する作用が報告されている。

本報では、多くの抗腫瘍活性が確認されている ABM と CGF の最大抗腫瘍活性を示す配合比率を決定したところ、ABM : CGF = 70 : 30 (ABM-C) であることが認められた。

sarcoma 180 を皮下移植して、ABM-C の強制経口投与により抗腫瘍活性が認められるが、腫瘍細胞培養系に ABM-C を添加したが、直接的な細胞毒性作用は認められず、対照群の腫瘍細胞生存率と同様であった。

また、担腫瘍マウスにおける ABM-C の 14 日間経口投与後の病理組織学的検査では、腫瘍組織自体には特別な所見は見られず、周辺部の結合組織の増殖が顕著で、いわゆる「腫瘍の封じ込め」像が観察され、宿主介在性の効果が認められた。

ABM-C 1,200 mg/kg/日以上の経口投与量であれば、腫瘍の完全消失が発現する顕著な腫瘍増殖阻止率が得られることが明らかとなったが、800 mg/kg/日では抗腫瘍活性は低下したが、59.7%の腫瘍増殖阻止率を示した。この実験による至適有効量は完全に明らかではないが、

1,200 mg/kg/日以上の ABM-C を投与すれば、明確な抗腫瘍活性が認められることから、至適最小有効量は 1,200 mg/kg/日と推察された。

Freireich EJ<sup>15)</sup> によれば、マウス (20 g) とヒト (60 kg) との抗腫瘍剤による薬剤感受性係数は、マウス 1 : ヒト 1/12 とされているので、人体に対する経口投与時における有効量は、1,200 mg/kg × 1/12 = 100 mg/kg、100 mg/kg × 60 kg = 6,000 mg/60 kg (ヒト) と算出された。従って、ABM-C の臨床における至適有効量は、約 6g/日であると推察される。しかし、複雑な宿主 (ヒト) と、癌のタイプ、進行度 (初期・中期・後期) の関係において、ABM-C の投与量の増減を考慮する必要がある。

## 文 献

- 1) 今関六也, 本郷次男: 原色日本新菌類図鑑 (1). 保育社 大阪 pp150-151 1987
- 2) 岩出亥之助: ヒメマツタケについて. 日菌報 **23**: 544-546 1982
- 3) 伊藤均: 抗腫瘍作用を有する蛋白多糖体の製造方法. 特許第 1442648 号 1988
- 4) Itoh H, Ito H, et al.: Inhibitory action of a (1→6)-β-D-glucan-protein complex (F III -2-b) isolated from *Agaricus blazei* Murrill ("Himematsutake") on Meth A fibrosarcoma-bearing mice and its antitumor mechanism. *Japan J Pharmacol* **66**: 265-271 1994
- 5) Ito H, Shimura K, Itoh H, et al.: Antitumor effects of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade Strain 101) "Himematsutake" and its mechanisms in tumor-bearing mice. *Anticancer Res* **17**: 277-284 1997
- 6) 伊藤均: ヒメ (姫) マツタケ (岩出101株) [*Agaricus blazei* Murrill]の抗腫瘍効果と生物活性. *Biotherapy* **14(10)**: 1009-1015 2000
- 7) Ito H, Hidaka H: Antitumor effect of calmodulin antagonist on the growth of solid sarcoma-180. *Cancer Letters* **19**: 215-220 1983

- 8) Itoh H, Noda H, et al. : Antitumor activity and immunological properties of marine algal polysaccharides, especially fucoidan, prepared from the *Sargassum thunbergii* of phaeophyceae. *Anticancer Res* **13**: 2045-2052 1993
- 9) 榎本真, 林祐造 他 : 実験動物の病理組織. ソフトサイエンス社 東京 pp55-97 1980
- 10) Kawagishi H, Kanao T, et al. : Formolysis of a potent antitumor (1→6)- $\beta$ -D-glucan-protein complex from *Agaricus blazei* fruiting bodies and antitumor activity of the resulting products. *Carbohydr Polym* **12**: 393-403 1990
- 11) Mizuno M, Minato K, et al. : Antitumor polysaccharide from the mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Murrill. *Biochem Mol Biol Int* **47**: 707-714 1999
- 12) Hasegawa T, Ito K, et al. : Oral administration of hot water of extracts of *chlorella vulgaris* reduces IgE production against milk casein in mice. *Int J Immunopathol pharmacol* **21(5)**: 311-323 1999
- 13) Sheng J, Yu F, et al. : Preparation, identification and their antitumor activities *in vitro* of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chem* **105**: 533-539 2007
- 14) Merchant RE, Rice CD, et al. : Dietary *Chlorella pyrenoidosa* for patients with malignant glioma: effects on immunocompetence, quality of life, and survival. *Phytother Res* **4**: 220-231 1990
- 15) Freireich EJ, Gehan EA, et al. : Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey, and man. *Cancer Chemother Rep* **50**: 219-244, 1966

連絡先：伊藤均  
菌類薬理研究所  
三重県津市丸之内 17-5 (〒 514-0033)  
電話番号：059-246-5587  
E-mail: kinruiyk891\_ito@ybb.ne.jp

## Basal Study on Clinical Optimal Effective Dose of *Agaricus blazei* Murrill (Himematsutake) in Mouse Sarcoma 180 Screening System

Hiroko ITOH<sup>1</sup>, Masaki FUJISHIMA<sup>2</sup>, Yukari ARAKAWA<sup>2</sup>,  
Fukuyoshi NAKATA<sup>3</sup> and Hitoshi ITO<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Marine Biochemistry, Faculty of Bioresources, Mie University

<sup>2</sup>Sun Chlorella Corp., Research and Development

<sup>3</sup>Powerful Healthy Food Corporation

<sup>4</sup>Research Institute of Mycology and Pharmacology

### Summary

The purpose of this study was examined the clinical optimal effective dose of ABM-C (comprised 70% of the hot water extract of fruiting bodies and mycelium of liquid-cultured *Agaricus blazei* Murrill, cell wall crushing, and 30% of *Chlorella pyrenoidosa*-hot water extract (CGF) by oral administration (p.o) using sarcoma 180 screening system. ABM-C was given p.o. twice a day at a certain dose on days 1 through 21. In the group receiving 1,800 mg/kg ABM-C, the percentage of the tumor inhibition ratio was 89.4%, and tumor regression was observed in 6 out of 10 mice. In the case of 1,200 mg/kg, the tumor inhibition ratio was 88.6%, and complete tumor regression was seen in 5 out of 10 mice. In both group, the difference of the tumor inhibition ratio was only 0.8%. As a result, the optimal effective dose of ABM-C could be suggested about 1,200 mg/kg/day. According to the theory of Freireich EJ. et al., the difference of sensitivity by antitumor drugs between mouse and man was assumed for the approximate mouse (20 g) : man (60 kg) = 1 : 1/12 ratio. These results suggest that the clinical optimal effective dose of ABM-C for man was 6 g per day. The antitumor activity of ABM-C is host-mediated mechanism and it has no direct cytotoxicity on tumor cells.

(Med Biol **155**: 210-216 2011)

**Key words:** *Agaricus blazei* Murrill, Himematsutake, optimal effective dose, sarcoma 180

Corresponding Address: Hitoshi ITO, M. D., Ph. D.  
Research Institute of Mycology and Pharmacology  
17-5, Marunouchi Tsu, Mie 514-0033, Japan  
Tel: + 81-59-246-5587, FAX: + 81-59-246-5587  
E-mail: kinruiyk891\_ito@ybb.ne.jp

