

カシサルノコシカケ熱水抽出多糖 画分の諸性質と生物活性

原 千 尋

Some Properties of Polysaccharide Fraction from the Hot-Water Extract of *Phellinus robustus* and Its Biological Activities

Chihiro HARA

Summary

A polysaccharide fraction (K-3) was isolated from the hot-water extract of the fruiting body of *Phellinus robustus*. K-3 was composed of D-xylose, D-mannose, D-glucose and D-glucuronic acid in the molar ratio of 1.0 : 3.7 : 12.8 : 1.5, and contained a small amount of protein. Its total sugar content was estimated to be 99.3% as anhydroglucose. The low value of specific rotation, $[\alpha]^{25}_D -3.8^\circ$ (water) and the presence of a characteristic absorption band at 890cm^{-1} (type 2b) in the infrared spectrum suggest that most of the component sugars of K-3 are bonded by β -D-glycosidic linkage. The molecular weight was presumed to be below 10,000, by gel filtration on SephadexG-200. In some biological screening tests, K-3 exhibited significant antitumor activity against Sarcoma 180 (at a dose of $10\text{mg}/\text{kg} \times 10$) and colony-stimulating factor-inducing activity, although the mitogenic activity was little.

Key words : キノコ mushroom, カシサルノコシカケ *Phellinus robustus*, 多糖 polysaccharide, 抗腫瘍作用 antitumor activity, マイトジェン活性 mitogenic activity, コロニー刺激因子誘導活性 colony-stimulating factor-inducing activity

緒 言

キノコ類に含まれる多糖体には、抗腫瘍作用や免疫賦活作用など種々の生物活性を示すものがあることが数多く報告されている。なかでも猿の腰掛(サルノコシカケ)と呼ばれるキノコには有効な薬効を示すものが多く、古来より民間薬や漢方薬として単独あるいは配合方剤として用いられている。また近年では上記サルノコシカケに属するキノコをはじめシイタケ、スエヒロタケなどに含まれる多糖のうちで β -1,6分枝1,3- β -D-グルカンに強い抗腫瘍作用のあることが証明され、これらのうちの1部の分枝1,3- β -D-グルカンは臨床的にも使用されるようになった。一般的に、このような多糖体の生理特性は生体に比較的温和に作用して、生体の恒常性の維持調節(ホメオスタシス)や免疫機能の賦活(生体防御)などに関与していることが明らかとなりつつある。¹⁾

カシサルノコシカケ *Phellinus robustus* Karst. (別和名：コブサルノコシカケ)は、多孔菌(Polyporaceae)タバコウロコタケ科キコブタケ属に属する多年生、木質のキノコ (Fig. 1) で、通称サルノコシ



Fig.1. カシサルノコシカケ *Phellinus robustus*

カケと呼ばれるキノコ群の1種であり、広葉樹の枯木上で生育して材の白腐れをもたらす木材腐朽菌である。²⁾ これまでサルノコシカケと呼ばれる多くのキノコの熱水抽出画分について、マウスに移植した Sarcoma 180 腫瘍に対する抗腫瘍性のスクリーニング試験が池川ら³⁾および水野ら⁴⁾によって行われているが、カシサルノコシカケについては行われておらず、またその他の生物活性試験にも供されていない。

著者は、天然のカシサルノコシカケ子実体より熱水抽出多糖画分を抽出分離し、得られた多糖画分の諸性質を明らかにするとともに、抗腫瘍作用および免疫機能に及ぼす作用としてマイトジェン活性とコロニー刺激因子(colony-stimulating factor : CSF)誘導活性について検討したのでその結果を報告する。

実 験 方 法

1. 材料

岐阜市金華山麓にて枯木上より採取したカシサルノコシカケ子実体をキノコ試料として用いた。

2. 前処置と熱水による多糖画分の抽出

本菌子実体1個を乾燥し、付着した木部を除去した後、粉碎器によって粉末とした(試料重量32.4g)。粉末試料をソックスレー脂肪抽出装置を用い、メタノールで沸騰水浴中78時間抽出した。脱脂後の抽出残渣(28.8g)を11の70%水性エタノールで加熱攪拌還流下(約80℃)に抽出し、冷却後遠心分離によって抽出残渣を得た。この70%水性エタノールによる抽出を計15回繰り返し行い、単糖、アミノ酸などの低分子量物質を分別除去した。

得られた70%水性エタノール抽出残渣に水800mlを加え、沸騰水浴中6時間攪拌下に抽出し、冷後遠心分離によって上清液(熱水抽出液)を得た。この熱水抽出操作を上記と同様に計10回繰り返し行った後、抽出液を合一し、ロータリーエバポレーターを用いて約500mlに濃縮した。次いでこの濃縮液を5日間流水および蒸留水に対して透析した。透析内液中に生じた微量の不溶物を遠心分離によって除去し、得られた上清液を濃縮後凍結乾燥して熱水抽出多糖画分(K-3 ; 収量1.21g)を得た。

3. 物理化学的測定法

(1) ゲル濾過：ゲル濾過は、0.1M NaCl を溶媒として用い、Sephadex G-200を充填したカラム(1.5×96cm)を平衡化した後試料を添加し、3.8mlずつ分取した。各溶出試験管中の糖量をフェノール硫酸法⁵⁾によって、またたん白質を280nmの紫外外部吸収によって測定した。

(2) 構成糖：試料(5mg)を3mlの2Nトリフルオロ酢酸で沸騰水浴中6時間加水分解して得られた単

糖をペーパークロマトグラフィー(PPC)によって定性分析した。展開溶媒としてn-ブタノール-ピリジン-水(6:4:3(容))を用い、2回多重展開した後アルカリ性硝酸銀試薬で糖のスポットを検出した。次いで加水分解物をアルジトールアセテート誘導体とし、ガスクロマトグラフィー(GLC)によって中性単糖を分析した。⁶⁾装置は水素炎検出器付の島津GC-8A型を用い、カラム(0.3×200cm)充填剤として3% Silicone OV-225(Chromosorb W), カラム温度195℃, キャリアーガス窒素(171.6kPa)の分析条件で行った。ガスクロマトグラム上のピーク面積は島津C-R3A型クロマトパックによって求め、中性単糖のモル比を算出した。

(3) 全糖量およびウロン酸の定量：試料の全糖量をフェノール硫酸法⁵⁾によって、またウロン酸含量をカルバゾール硫酸法⁷⁾によって、それぞれグルコース、グルクロン酸を標準物質として検量線を作成し比色定量した。

(4) 赤外線吸収スペクトル(IR)：IRスペクトルは日本分光A-102型赤外線分光光度計を用いKBr錠剤法によって測定した。

(5) 比旋光度：試料水溶液(濃度 $c = 0.59$)を堀場SEPA-300型旋光度計を用い、2 dmの石英セル中25℃で測定した。

4. 生物活性測定法

(1) 抗腫瘍作用：実験動物は6週齢のICR-JCL雌性マウス(20~25 g, 1群10頭; JSLC社)を用いた。2×10⁶個のSarcoma 180腫瘍細胞をマウス鼠蹊部皮下に移植し、その24時間後から1日1回、10日間生理食塩-0.01Mリン酸緩衝液(pH7.2)に溶解した試料(2, 10mg/kg)を腹腔内に投与した。腫瘍移植7日目毎に生じた腫瘍の直径を計測し、30日目に腫瘍を摘出してその重量を測定した。腫瘍増殖抑制率(%)は $((A - B) / A) \times 100$ の式(A: 対照群の平均腫瘍重量, B: 試料投与群の平均腫瘍重量)より算出した。対照標品としてはPSK(カワラタケ由来の抗腫瘍性たん白多糖複合体; 200mg/kg)を用いた。

(2) マイトジェン活性：マイトジェン活性は前報^{8,9)}と同様の方法によって調べた。すなわち、10週齢のC3H/Heマウス(雌)より調整した脾細胞(4×10⁵個)と試料(0.1, 1, 10μg/well)とを37℃, 48時間培養し、培養終了4時間前に1マイクロキュリーの³H-チミジンを加えてパルスラベルし、脾細胞中に取り込まれた³H-チミジンの放射活性(cpm)を液体シンチレーションカウンターによって測定した。対照標品として大腸菌由来のリポポリサッカライド(LPS)を用いた。

(3) CSF誘導活性：血清中のCSF誘導活性は前報^{8,9)}と同様の方法で測定した。すなわち、8週齢のICRマウス(雌)に試料(100μg)を腹腔内に投与し、3時間後に心臓採血して得た血清(12.5, 25μl/dish)の存在下に、C57BL/6マウス(雌)から得た骨髓細胞(5×10⁴個)を5%CO₂-インキュベーター中で37℃, 7日間培養し、骨髓細胞の分裂、増殖によって生じたコロニー数をメチルセルロース法で測定した。対照標品としてネズミ顆粒球-マクロファージ・コロニー刺激因子(GM-CSF, 33units)を使用した。

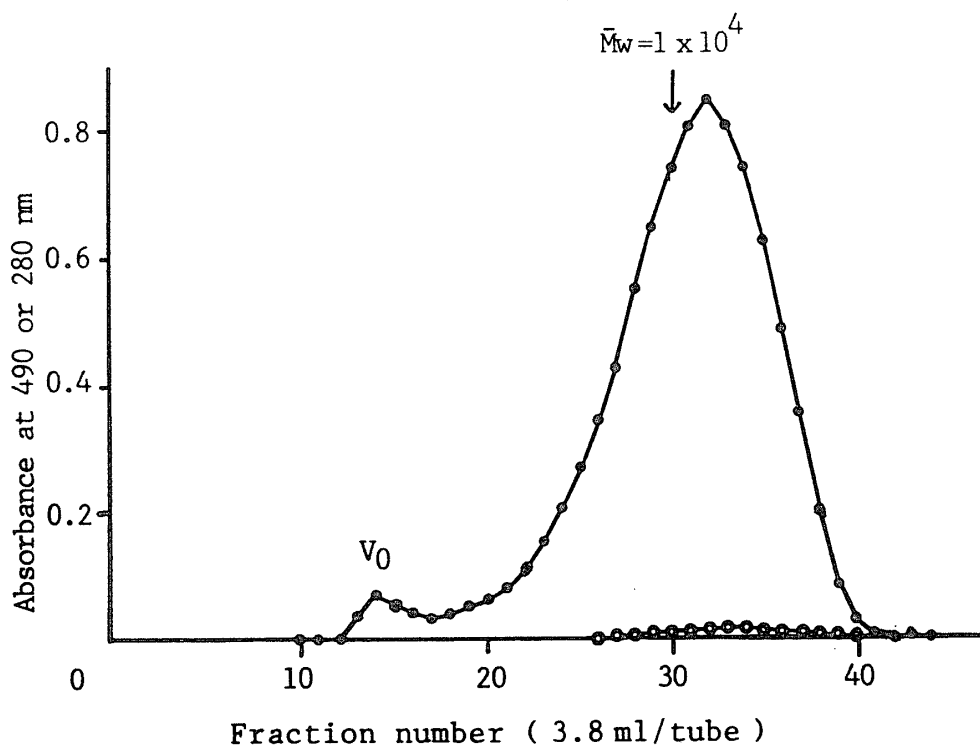


Fig.2. Chromatogram of Polysaccharide Fraction K-3 on Sephadex G-200

The column (1.5×96cm) was eluted with 0.1M NaCl.

●: 490nm(sugar) ○: 280nm(protein)

結果と考察

天然産カシサルノシカケ子実体をメタノール、70%水性エタノールで脂肪などの夾雑物を抽出除去した後、熱水抽出し、次いで抽出液中の低分子物質を透析によって除き、透析内液を凍結乾燥して熱水抽出画分(K-3)を約3.7%の収率で得た。K-3は水に易溶で淡黄色を呈し、粘性を示さなかった。セファデックスG-200を用いてK-3のゲル濾過を行ったところ、Fig. 2に示すようなクロマトグラムが得られた。多糖は試験管番号32を頂点としたピークとして溶出されたが、セファデックスG-200の排除限界(V_0)にも少量の多糖が溶出され、その分子量には多分散性が認められた。Fig. 2中に示した矢印は、分子量既知の標準デキストラン(分子量 \bar{M}_w : 1×10^4 , フェルマシア社製)の溶出位置を示したもので、従ってK-3中の多糖の平均分子量は1万よりやや小さいものと推定された。一方、たん白質による280nmの吸収は極めて低く、分取した試験管の後半部にのみ溶出された。またK-3の全糖量(total sugar content)を、標準物質としてグルコースを用いて定量したところ99.3%と求められた。以上の結果から、K-3はそのほとんどが糖から成る多糖画分であることが明らかとなった。K-3中のたん白質含量は極めて少量であり、またたん白質と多糖のゲル濾過における溶出位置が一致しないこと(上述)から、たん白質は混在物であることが推定された。

多糖画分K-3を加水分解し、生じた構成単糖をPPC分析によって検索した結果、グルクロン酸ラク

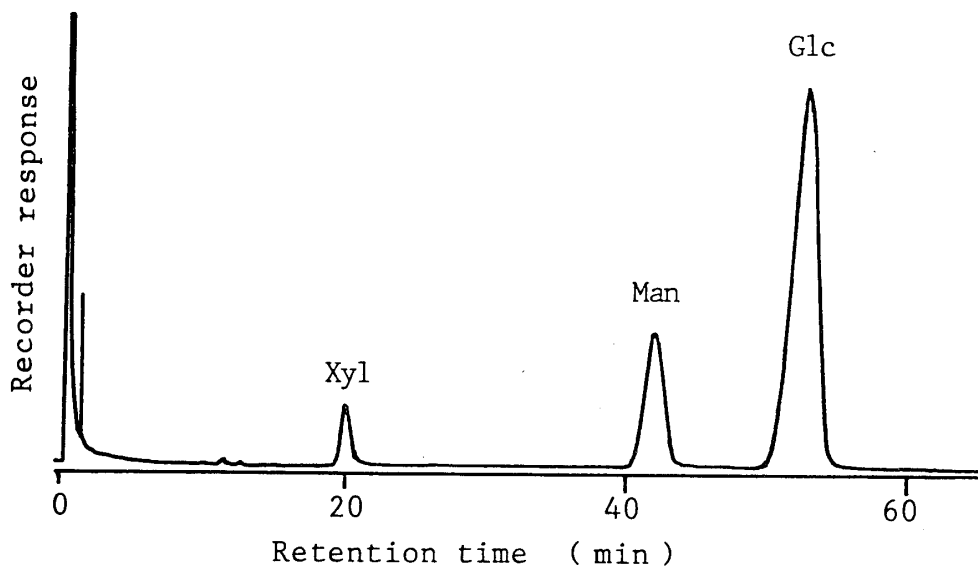


Fig.3. Gas Chromatogram of Neutral Component Sugars of Polysaccharide Fraction K-3 as Alditol Acetate
 conditions : 3% Silicone OV-225 on Chromosorb W at 195°C.

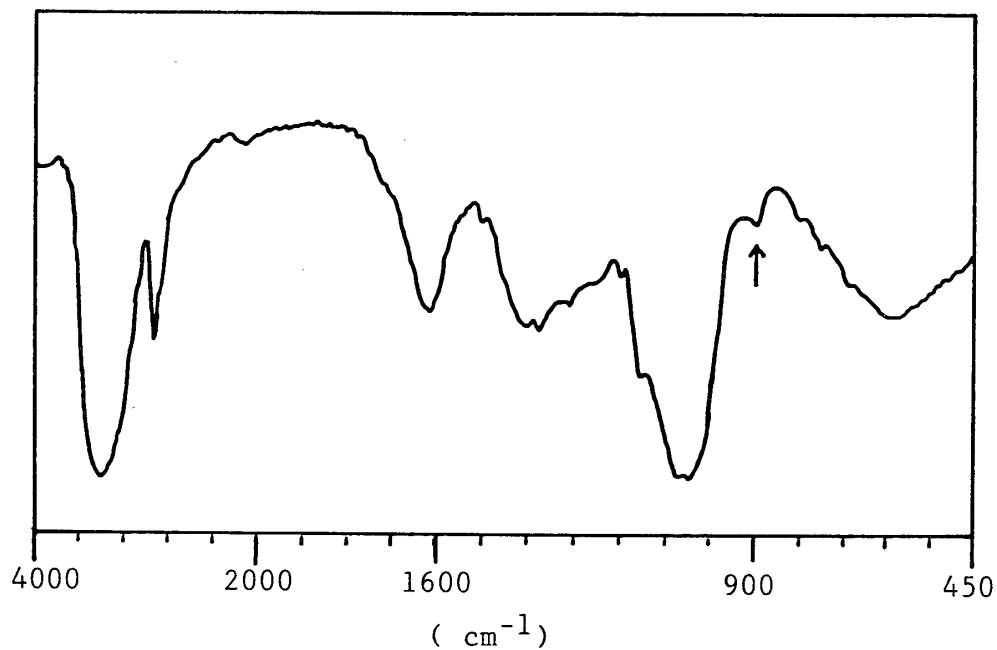


Fig.4. Infrared Spectrum of Polysaccharide Fraction K-3

トン、キシロース、マンノース、グルコース、グルクロン酸が検出された。また加水分解物をアルジトールアセテート誘導体としてGLC分析⁶⁾を行ったところ、Fig. 3に示すように、中性単糖としてキシロース(Xyl)、マンノース(Man)、グルコース(Glc)に由来するアルジトールアセテートを検出した。

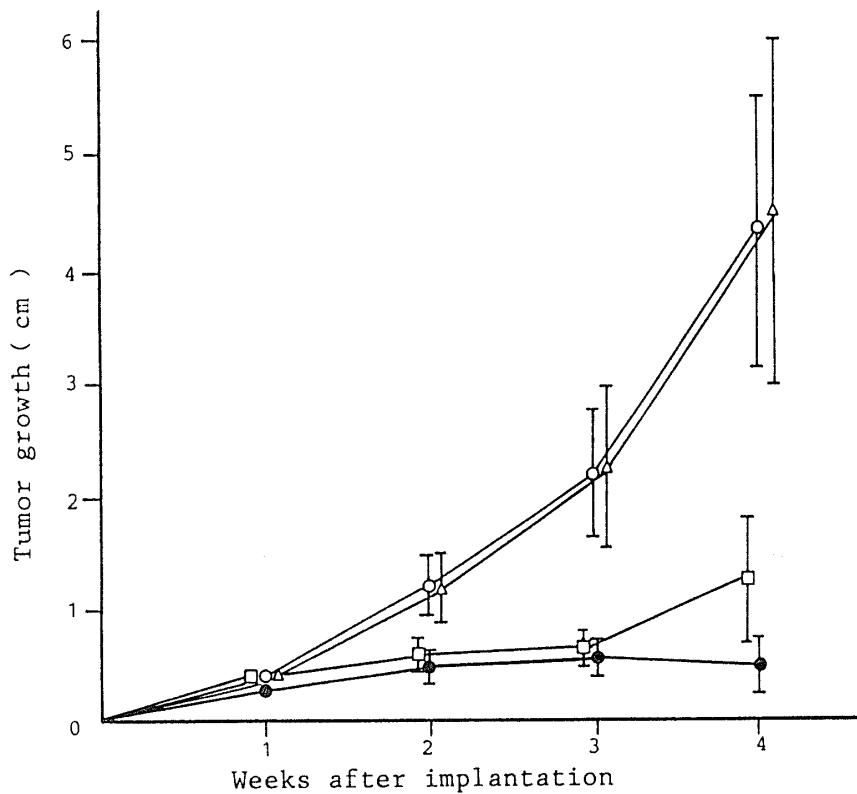


Fig.5. Effect of Polysaccharide Fraction K-3 on the Tumor Growth in Mice

○—○: control. □—□: K-3 (10mg/kg),
 △—△: K-3 (2mg/kg), ●—●: PSK (200mg/kg).

Table I. Antitumor Activity of Polysaccharide Fraction K-3 against Sarcoma 180 Tumor in Mice^{a)}

Sample	Dose (mg/kg/day × 10)	Mean tumor weight ± S.D. ^{b)} (g)	Inhibition ratio (%)	Complete regression
K-3	10	1.86 ± 2.39*	70	3/10
	2	5.53 ± 4.85	10	1/10
PSK	200	0.58 ± 1.11**	91	5/10
Control	-	6.13 ± 5.02	-	0/10

a) Sarcoma 180 tumor cells were implanted subcutaneously into the groins of ten ICR-JCL mice, and after 24 h, test samples were intraperitoneally injected once a day for 10 days.

b) At 30 days after tumor implantation. Significant difference from the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

一方、別途にK-3中のグルクロン酸含量をカルバズール硫酸法によって定量した結果7.8%であった。上記のGLC分析とグルクロン酸の定量結果から、K-3はキンロース、マンノース、グルコース、グルクロン酸を構成糖とし、それらが1.0:3.7:12.8:1.5のモル比で含まれていることが示された。

多糖画分K-3の旋光度を測定したところ、比旋光度の値は $[\alpha]_D^{25} - 3.8^\circ$ であった。またK-3のIR

Table II. Mitogenic Activity of Polysaccharide Fraction K-3^{a)}

Sample	[³ H]-Thymidine uptake ^{b)} mean cpm ± S.D. (S.I.)		
	Dose (μg/well)		
	0.1	1	10
K-3	6897±415 (1.1)	7244±1894 (1.1)	8049±432* (1.3)
LPS	25199±8825** (3.9)	37621±1753** (5.9)	N. t. ^{c)}

a) C3H/He spleen cells were stimulated for 48h with the indicated dose of polysaccharide fraction.

b) [³H]-Thymidine uptake was measured by a pulse label for the last 4h of incubation in quadruplicate cultures.

A value of the control without test sample was 6426±361. S.I.= stimulation index (cpm in the test sample/cpm in the control). Statistical analyses were carried out by the Student's t-test,* p < 0.01,** p < 0.001

c) N.t.=not tested.

Table III. CSF-Inducing Activity of Polysaccharide Fraction K-3^{a)}

Sample	No. of colonies / 5×10 ⁴ bone marrow cells per dish ^{b)} mean±S.D.	
	12.5μl/dish	25μl/dish
Control	0	0
K-3	26±2	95±12
GM-CSF (33 units)	90±2	124±10

a) Three ICR mice per group were injected intraperitoneally with 100μg polysaccharide fraction in saline. Serum was separated from the blood 3h after administration and pooled in equal volume.

b) The CSF-inducing activity in 12.5 or 25μl of serum per dish was measured in triplicate.

スペクトルにおいて指紋領域の890cm⁻¹にβ-グリコシド結合に特異的なタイプ2 b (Fig. 4中の矢印)の吸収¹⁰⁾が認められた。K-3はキシロース, マンノース, グルコース, グルクロン酸から成るヘテロ多糖であるが, 上記のように比旋光度が低い値を示したこと¹¹⁾, および IR スペクトルにβ-グリコシド結合に特異的なタイプ2 bの吸収が明瞭に認められたことから, K-3の構成糖のほとんどはβ-グリコシド結合しているものと推定された。

これまでの結果を総合すると, カシサルノコシカケ熱水抽出画分K-3は, 微量のたん白質を混在物として含み, そのほとんどがβ-グリコシド結合したキシロース, マンノース, グルコース, グルクロン酸(1.0:3.7:12.8:1.5)を構成糖とする分子量が1万よりやや小さい多糖画分であるものと推定される。

次にK-3についてマウスに移植した Sarcoma 180に対する抗腫瘍作用を検討した。腫瘍移植24時間後から1日1回、10日間K-3を腹腔内に投与し、移植7日目毎に4週間、腫瘍の成長(tumor growth)を腫瘍の直径を測定することにより観察(Fig. 5)し、また30日後に腫瘍を摘出、秤量して抗腫瘍効果を求めた。Fig. 5およびTable Iに示した結果から、K-3は10mg/kg×10を投与した場合に有意な抗腫瘍作用(腫瘍増殖抑制率70%)を示し、腫瘍が完全に退縮したマウスも10頭中3頭に認められた。しかしながらK-3の2mg/kg×10の投与群ではほとんど抗腫瘍作用が認められなかった。K-3が抗腫瘍効果を示すには少なくとも10mg/kg×10以上の投与量が必要と思われる。これまでコフキササルノコシカケやツガサルノコシカケなどのキノコに抗腫瘍作用を示す熱水抽出多糖の存在が知られている^{3,4)}が、これらの多糖はいずれもグルコースのみから成るホモ多糖(β -D-グルカン)であり、分子量も50万以上とK-3と比べて極めて大きい。またこれらの β -D-グルカンの分子量を5万以下に部分加水分解したものでは抗腫瘍作用が消失することが知られている¹²⁾。K-3はグルコース以外の糖を含むヘテロ多糖であり、またその分子量が小さい($< 1 \times 10^4$)にもかかわらず抗腫瘍作用を示すことは非常に興味深い事実である。

次にK-3が免疫機能の増強に関与しているかどうかをマイトジェン活性およびCSF誘導活性を調べることによって検討した。マイトジェン活性を有する物質によって刺激されたマウスのリンパ球前駆細胞(脾細胞)は、通常細胞分裂が誘発され、脾細胞への³H-チミジンの取り込み量が増大する¹³⁾が、Table IIに示したように、K-3による³H-チミジンの取り込み量の顕著な増大は認められなかった。また骨髄細胞から免疫担当細胞である顆粒球やマクロファージへの分化と増殖を促進する因子としてCSFの存在が知られている¹⁴⁾が、K-3がこのような因子をマウス血清中に誘発できるかどうかを、K-3(100 μ g)投与3時間後の血清と骨髄細胞を培養し、生じたコロニー数を計測することによって調べた。Table IIIに示したようにK-3には明らかに強いCSF誘導効果が認められた。著者らはこれまで食用として用いられるとともに薬用にも供されているキノコ⁸⁾をはじめ数種類のキノコ⁹⁾の熱水抽出多糖画分の中にマイトジェン活性やCSF誘導活性を示すものがあることを見出しているが、本菌子実体の熱水抽出多糖画分(K-3)にも免疫賦活作用を示す物質の含まれていることが示されたことは興味深い。

本研究における結果は、これまで研究の行われていないカシサルノコシカケ熱水抽出多糖画分K-3の基本的な性質と生物活性について検討したものであり、他のサルノコシカケと呼ばれるキノコの熱水抽出多糖画分との関連性において有用な知見を与えるものである。今後はK-3の化学構造を解明し、抗腫瘍作用、免疫賦活作用との関連性について検討することが必要であると思われる。

謝 辞 本菌の鑑定をして頂いた日本菌学会会員吉見昭一氏に謝意を表わします。また抗腫瘍試験をして頂いた台糖株式会社伊藤渡氏並びにマイトジェン活性とCSF誘導活性の試験をして頂いた北里大学薬学部熊沢義雄博士に感謝致します。

引用文献

- 1) 水野卓, 川合正允編著: “キノコの化学・生化学” 学会出版センター, 1992年.
- 2) 今関六也, 本郷次雄編著: “原色日本新菌類図鑑(II)”, 保育社, 1989年, pp132-190.
- 3) T.Ikekawa, M.Nakanishi, N.Uehara, G.Chihara, F.Fukuoka, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 59, 155 (1968); *Cancer Res.*, 29, 734 (1969).
- 4) 水野 卓: 化学と生物, 21, 473 (1983).
- 5) M.Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F. Smith, *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956).
- 6) C. Hara, T. Kiho, S. Ukai, *Carbohydr. Res.*, 117, 201 (1983).
- 7) J.T. Galambos, *Anal. Biochem.*, 19, 119 (1967).
- 8) C. Hara, Y. Kumazawa, K. Inagaki, M. Kaneko, T. Kiho, S. Ukai, *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 1615 (1991).
- 9) 原千尋, 熊沢義雄, 木方正, 鶴飼茂夫: 聖徳学園女子短期大学紀要, 第18集, pp 85 (1992).
- 10) S.A. Barker, E.J. Bourne, D.H. Whiffen, *Methods Biochem. Anal.*, 3, 213 (1956).
- 11) C.S. Hudson, *J. Am. Chem. Soc.*, 52, 1707 (1930).
- 12) T. Kojima, K. Tabata, W. Itoh, T. Yanaki, *Agric. Biol. Chem.*, 50, 231 (1986).
- 13) 豊島聰, 木本雅夫, 今井康之: “統生化学実験講座 5, 免疫生化学研究法”, 日本生化学会編, 東京化学同人, 1986, pp 194-199.
- 14) Y. Kumazawa, K. Mizunoe, Y. Otsuka, *Immunology*, 47, 75 (1982).