

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08196

研究課題名(和文) 培養担子菌抽出物の放射線防護効果の解析と放射線治療に伴う障害軽減の検討

研究課題名(英文) The radioprotective and antitumor activities of hot-water extracts from the basidiomycete (*Agaricus Blazei* Murill) on X ray irradiation mice.

研究代表者

宇野 隆 (UNO, Takashi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：30302540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：担子菌抽出物(*Agaricus Blazei* Mural：以下ABM)の放射線防護効果について致死量のX線全身照射マウスに対するABM投与の生存率に及ぼす影響および放射線治療の基礎実験として腫瘍細胞(Meth A)を皮下移植したマウスに対する放射線照射とABM投与の併用による腫瘍増殖抑制効果を検討した。致死線量照射からの生存率上昇や抗腫瘍効果は、照射後のABM投与群により顕著に認められた。これらの結果よりABM投与の放射線防護効果はラジカルスカベンジャー作用ではなく、骨髄細胞や腸管上皮細胞死に対する抑制(防護)作用と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

被ばく事故等の放射線障害や放射線治療に伴う副作用の軽減を目的として放射線防護効果が認められる物質が研究されている。本研究では、アガリクス(菌糸体・子実体)抽出物/ABMの放射線防護効果および照射とABMの併用による抗腫瘍効果について基礎的検討を実施した。マウスに対する致死線量全身照射からの防護効果および移植腫瘍に対するABMと放射線照射の併用では、明らかな効果が認められた。また、これらの効果は照射(被ばく)後のABM投与がより顕著であり、安全で有効な防護剤となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We performed basal examination of ABM (Freezing dryness polysaccharides, *Agaricus Blazei* Murill) about the protection effect of whole body X-ray irradiation in normal mice. In addition, combination effects with X-ray irradiation and ABM administration were investigated in Meth A tumor-bearing mice.

The ABM groups in which performed immediately after irradiation ABM treatment group showed in protection from whole body exposure (8.0Gy). The oral administrated groups of ABM and X-ray irradiation moderately inhibited the growth of Meth A tumor cells implanted (s. c.) in mice. Development of implanted tumor was strongly inhibited by the combination of ABM treatment after irradiation. These results suggest that the radiation exposure protection effect of AMB inhibits bone marrow death, not action as radical scavenger.

研究分野：放射線科学、放射線治療学

キーワード：放射線被ばく 担子菌抽出物 腫瘍増殖抑制 放射線治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

10年前の東北大地震に伴う東京電力福島第一原子力発電所事故によって発生した放射性物質による被ばくは、国民に大きな不安を与えた。幸いにも、これまで公表されている線量測定値からは健康に対して重篤な影響を示唆する高い数値は報告されていない。一方、医療の分野では強度変調放射線治療のように高線量域が腫瘍に集中するため、正常組織の高線量ひばく容積が縮小するが、低線量を被ばくする領域が従来の照射法よりも外側まで拡大する傾向が見られる。

近年、放射線関連事業所における被ばく事故等の放射線障害や放射線治療に伴う副作用の軽減を目的として放射線防護効果が認められた物質(バナデート、ラクトフェリンおよび各種熱処理酵母など)が研究されている。今後とも、安全で強力な放射線防護効果を有する薬剤の開発が期待されている。

2. 研究の目的

前回の科学研究費助成(2016~2018年)の研究課題「若年者の性腺被ばくに由来する妊孕性の異常の解析と予防法の開発」の研究では、X線全身照射された雄マウスの精巣に対する放射線障害(妊娠率や新生仔育成率の低下)がABM(培養担子菌抽出物質)投与により改善が認められた。本研究では、このABMの放射線防護効果について(1)放射線に高感受性のリンパ球(マウス/*in vitro*)に対する放射線傷害からの回復効果(DNA合成促進効果)や(2)生体の致死線量被ばくからの生存率上昇に対するABMの効果(*in vivo*)および(3)担癌マウスに対する照射の効果と担子菌抽出物投与の放射線防護効果の関連について検討した。

3. 研究の方法

(1)照射によるリンパ球の傷害に対するABM添加の傷害回復効果(*in vitro*)

ICR雄マウス(8週齢)の脾臓を無菌的に採取して脾リンパ球を培養液(RPMI1640 with L-Glutamine and FBS15%)に500万個/mlとなるよう調整した。調整されたリンパ球は、プラスチック試験管に入れてエックス線発生装置(MBR-1520R-3:日立メデイコ社)を用いて管電圧150kV、管電流20mAの条件で照射(1~3Gy)した。照射後リンパ球浮遊液0.1ml(50万個)/wellを96wellのプレートに分注し、ABMを1.5mg/mlとなるように調整して添加した。さらに3.7kBq/wellのトリチウム・チミジン(3H-thymidine:以下3H-TdRと略)を添加して37℃で5%の二酸化炭素下にて3日間培養した。培養終了の脾リンパ球に取り込まれた3H-TdRの放射性活性はベータマイクロシステム(1450 Micro Beta WALLAC社)によって測定した。

(2)致死線量全身照射マウスに対するABMの生存率上昇効果(*in vivo*)

ICR雄マウス(7週齢)をSLCより購入して1週間の予備飼育後8週齢で実験に供した。マウスの全身照射は、前述のエックス線発生装置を用い同じ条件にてマウスをプラスチック製の照射用ケージに固定し、無麻酔で8.0Gyの全身照射を実施した。ABM試料は腹腔内投与とし、濾過滅菌ABMを注射用生理食塩水にて溶解して31mg/kg~250mg/kgを投与容量0.2mlとなるように調整した。試料は全身照射直後よりマウス右側腹腔内に1日1回、照射後21日まで連日投与した。また、対照群マウスには生理食塩水を同量(0.2ml)、同期間(21日間)の投与を実施した。さらに全身照射によるマウスの死因を究明する目的で、死亡後直の全て

のマウスを無菌的に開胸して心臓を摘出し、細菌培養液入りの試験管内にて37℃、24時間培養した。培養された細菌の同定は(株)江東微生物研究所に依頼した。

(3)担癌マウスに対するABM単独投与の抗腫瘍効果について

BALB/c 雄マウス (SLC、5週齢で購入して6週齢で使用) に Meth-A 腫瘍細胞(マウス肉腫)を同系のマウス腹腔内にて培養増殖させて RPMI 1640 培養液にて調整した。約 600 万腫瘍細胞/50 μ l に調整した。移植はマウス右大腿部皮下に約 600 万腫瘍細胞/50 μ l に調整した腫瘍をマイクロシリンジにて移植した。本実験では、効果判定標準品としてクレスチン(PSK : クレハ医薬品)を用いた。本品は、カワラタケの CM-101 株菌系体より得られた多糖類で免疫応答機構を改善・回復することにより抗腫瘍作用を示す抗がん剤(生物学的応答調節剤)である。ABM とクレスチンは、共に投与量 : 150 mg、300 mg および 600 mg/kg を 0.2ml/日となるように蒸留水にて調整し、マウスの経口投与用ゾンデにて投与した。投与回数は、Meth-A 細胞の移植 3 日前より各試料の経口投与を開始し、移植後 11 日間の連日投与(計 14 回)を実施した。最終投与 24 時間後にエーテルの過麻酔により安楽死させて腫瘍を摘出して重量を測定した。

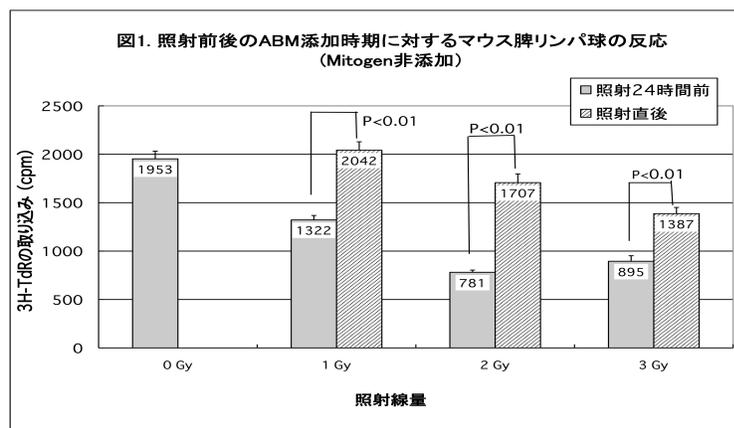
(4)担癌マウスに対するABM投与と放射線照射の併用による抗腫瘍効果について

前項(3)の実験方法と同様にBALB/c 雄マウスの右大腿部皮下に約800万/50 μ lのMeth-A 腫瘍細胞を移植した。移植後10日目に長径7mm以上に発育した腫瘍のみを使用して無処置対照群、ABM単独投与群、照射単独群、ABM前投与+照射群、照射+ABM後投与群の5群(各実験群n=6)を作成した。X線照射は(1)の実験で使用したエックス線発生装置にてマウス右大腿部皮下に移植された腫瘍に対して2週間に4回(2日間隔)、3Gy/回(総線量12Gy)を照射した。マウスは軽度のエーテル麻酔下にて腫瘍局所のみ照射した。ABM投与は、ABMを25mg/マウス(960mg/kg)を連日14日/回の経口投与を実施した。

4. 研究の成果

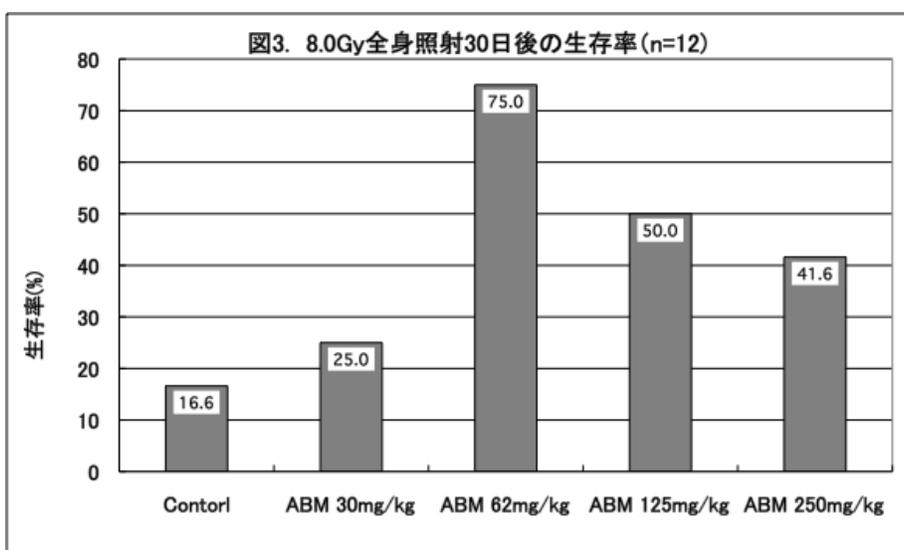
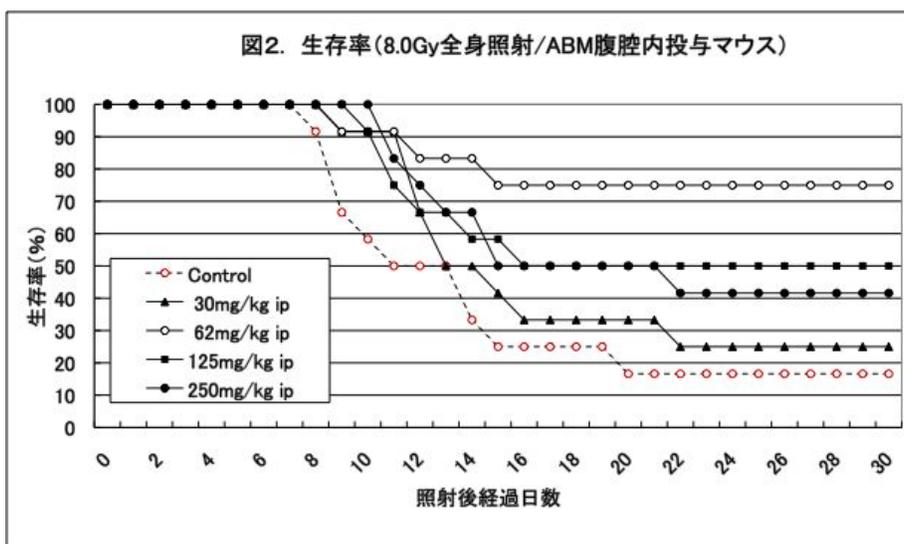
(1) 照射によるマウス脾リンパ球の傷害に対するABMの修復効果(*in vitro*. 図1)

照射により傷害を受けたリンパ球に対するABMの修復効果について検討し図1に示した。リンパ球に対するABMの添加時期を照射前と後に実施してリンパ球の分裂能力に対する影響を3H-TdR取り込み量から検討した。照射線量(1~3Gy)によって3H-TdRの取り込みの低下が認められた。ABMの添加(濃度1.5mg/ml : 100mg~125mg/kgマウス腹腔内投与時の血液中濃度)は、いずれの照射線量においても照射24時間前に対して照射直後の添加に有意差を伴う3H-TdR取り込みの増加が認められた。



(2)8.0Gyの全身照射マウスに対するABM投与の生存率におよぼす影響(図2. 図3)

照射対照群の生存率16.6%に対して、ABM投与(31~250mg/kg)群は全ての群において生存率の上昇効果が認められた。特に、62mg/kg腹腔内投与群にて75%の高い生存率を示した。また、マウスの死因究明を目的とした死亡全マウスの心臓血培養検査により腸内細菌種のモルガン菌、プロテウス菌、大腸菌、腸球菌、黄色ブドウ球菌などが確認された。全身照射によるマウスに死因は、照射によりマウス腸管上皮細胞の腸管免疫系が照射後10日前後に破綻して腸内細菌が血液中に混入し、照射により白血球が減少した体内にて急速な敗血症を発症した結果と考えられた。ABM投与の生存率上昇作用の一つとして、腸管上皮細胞に対する放射線傷害からの防護もしくは修復(効果)により、急激な菌の増殖が阻止された可能性が示唆された。



(3)担癌マウスに対するABM単独投与の抗腫瘍効果について(表1)

マウスのMeth-A腫瘍に対するABMとクレスチン(PSK)の抗腫瘍効果は、担癌無処置対照群の平均腫瘍重量(1,540mg)の約30%にまで縮小が認められた。この縮小効果は、ABMおよびPSK共に同程度の効果と見られる。しかし、ABMおよびPSKは投与量に依存した腫瘍縮小効果は認められなかった。

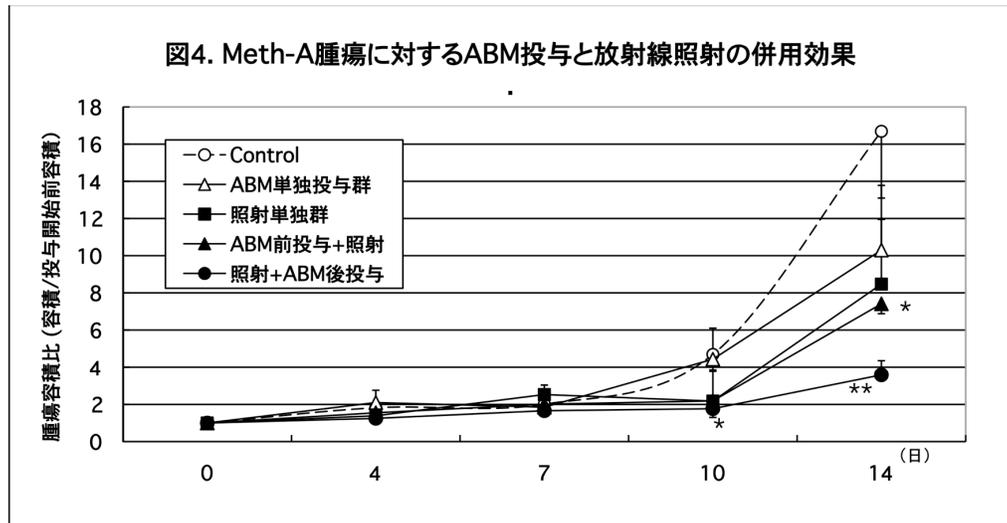
表 1. Meth-A 移植腫瘍に対する ABM および PSK 投与 1) の腫瘍縮小効果

実験各群 2) n=7	担癌 対 照	ABM 150mg	ABM 300mg	ABM 600mg	PSK 150mg	PSK 300mg	PSK 600mg
3) 腫瘍重量 ±SE (mg)	1,540 ±213	507 ±188	472 ±244	418 ±134	369 ±131	697 ±223	505 ±151
4) 対照群の 50% 以下 <770mg	0/7 0 %	6/7 86%	6/7 86%	6/7 86%	6/7 86%	3/7 43%	6/7 86%
5) 腫瘍の生 着が不全	0/7 0 %	2/7 29%	2/7 29%	2/7 29%	2/7 29%	3/7 43%	2/7 29%

- 1) 試料：ABM(担子菌抽出物)、PSK(クレスチン/クレハ医薬)
- 2) 投与量(経口)：150、300 および 600mg/kg/0.2ml/日 x 14 日投与(腫瘍移植 3 日前より投与)
- 3) 経口投与後(15 日目)の腫瘍重量 (mg)
- 4) 腫瘍縮小効果判定：担癌対照腫瘍平均の 50% (770mg) 以下の腫瘍 (個体)
- 5) 移植腫瘍の生着不全判定：移植痕もしくは白色帯状の死滅した腫瘍細胞が筋層に残存し、その部位の重量が 200mg 以下の腫瘍(個体)。

(4)担癌マウスに対する ABM 投与と放射線照射の併用による抗腫瘍効果(図 4)

マウスのMeth-A腫瘍に対するABMとX線照射による抗腫瘍効果は、担癌対照群の腫瘍容積の増殖率が実験開始(304mm³)から14日間で開始時腫瘍体積の16倍(4948mm³)を超える増加が見られた。一方、ABM単独投与群では10.3倍、照射単独群では8.5倍、照射(約30分)前ABM投与群では7.4倍、さらに照射直後ABM投与群では3.6倍の腫瘍容積であった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uno T, Kanazawa A, Nemoto MW, Harada R, Kobayashi H, Saito M, Iwai Y, Usui H, Mitsuhashi A, Shozu M.	4. 巻 39
2. 論文標題 Radiation Therapy for Extrapelvic Lymph Node Recurrence After Curative Treatment for Cervical Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 891-895
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Harada E, Morizono T, Kanno T, Saito M, Kawagishi H.	4. 巻 22
2. 論文標題 Medicinal Mushroom, Grifola gargal (Agaricomycetes), Lowers Triglyceride in Animal Models of Obesity and Diabetes and in Adults with Prediabetes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal Medicine Mushrooms	6. 最初と最後の頁 79-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takada A, Yokota H, Watanabe Nemoto M, Horikoshi T, Matsushima J, Uno T.	4. 巻 38
2. 論文標題 A multi-scanner study of MRI radiomics in uterine cervical cancer: prediction of in-field tumor control after definitive radiotherapy based on a machine learning method including peritumoral regions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 265-273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	根本 未歩 (渡辺未歩) (NEMOTO Miho) (50568665)	千葉大学・大学院医学研究院・講師 (12501)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	齋藤 正好 (SAITO Masayoshi) (80118885)	千葉大学・大学院医学研究院・(特任)協力研究員 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------