

修飾米ぬかはシスプラチンの主要・急性副作用である 体重減少を示したマウスにとって有用である

遠藤雄三、神林宏

マクマスター大学保健科学部病理分子医学部門 (カナダ・オンタリオ州)

(2002年12月2日受付、2003年3月11日受理)

アルキル化剤および代謝拮抗剤は、正常よりも速い悪性細胞の分裂周期に対して選択的な作用を有することから、種々の癌化学療法プロトコルにおいて依然として重要である。新しい白金含有抗癌分子のうち、主要な化合物であるシスプラチン (シス-ジアンミンジクロロ白金 (II)) は、シスプラチンと DNA 鎖が特異的に相互作用することにより有用な抗癌性を示すことが知られている。シスプラチン (Rosenberg *et al.* 1969) は、頭頸部癌、膀胱癌、子宮頸癌 (Loehrer & Einhorn 1984) および乳癌 (Smith & Talbot 1992) の治療に推奨されている。肺癌、胃癌、乳癌、結腸直腸癌、前立腺癌の有病率は、先進国における最も一般的な癌として上位にランクされるが、これらの進行癌の多くが化学療法に反応しない。白金製剤はこのような状況における選択肢となりうるが、悪心、嘔吐、腎症、腎尿細管の障害による低マグネシウム血症など、相当な副作用を引き起こすことが多い (Lajer & Daugaard 1999)。また、難聴や末梢神経障害に加え、骨髄抑制が最も破壊的・抑制的な副作用の 1 つであり (Prestayko *et al.* 1979) 免疫抑制状態を引き起こす。したがって、シスプラチンの副作用を少しでも軽減することは有用となりうる。そこで我々は、最大許容量のシスプラチンを投与したマウスを用い、修飾米ぬかの体重減少防止効果について調べた。他の研究者により発酵米ぬかの抗ストレス・抗疲労効果 (Kim *et al.* 2001) や、抗癌剤投与ラットのある種の副作用に対する修飾米ぬかの有用性 (Jacoby *et al.* 2000) についての短報がある。

本実験のプロトコルは、マクマスター大学 (カナダ・オンタリオ州) 動物研究倫理委員会の承認を受け、以下のように行われた。雌性 BALB/c

マウス (4 週齢) を Charles River Canada から購入し、1 週間馴化させた。体重を測定し、各群間の体重差のばらつきが最小となるよう 5 匹×7 群に分けた。本実験開始時における全試験マウスの平均体重 (17.43 g、標準偏差±0.51 g) を、100% の体重とした。常法通り空調された部屋に設置したそれぞれの標準的代謝ケージにマウス 5 匹を収容した。実験動物用飼料 (LabDiet[®]) と水は自由に摂取させた。明暗周期は 12 時間とした。

シスプラチンおよびジメチルスルホキシド (DMSO) は、Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada) から購入した。シスプラチンは水またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶けにくいいため、シスプラチン溶解用の溶媒として DMSO を用いた (0.1% v/v)。

本実験で用いた修飾米ぬかの性状は以下の通りであった。米ぬか脱脂抽出物をシイタケ (*Lentinus edodes*) 菌糸体に由来するアミラーゼ、ガラクトシダーゼ、グルクロニダーゼなどのグリコシダーゼで消化することにより修飾した。修飾米ぬかの最終産物は高い水溶性を示した。本品は、アラビノキシランヘミセルロースを主成分とする多糖類、およびタンパク質 (13.2%、Lowry *et al.* (1951) の方法により測定) からなっていた。本品は、大和薬品株式会社 (東京) により製造され、北米では MGN-3 (Ghoneum 1998) の名称で市販されている。本製品 (米国特許番号 5,560,914) は、前田浩明博士 (大和薬品株式会社) の好意により供与された。

シスプラチン投与 1 週間前から毎日、マウス 2 群に対して濃度 10 mg/ml (乾燥重量) の修飾米ぬか水溶液 0.1 ml を強制経口投与、または同濃度の修飾米ぬか PBS 溶液 0.1 ml を腹腔内投与した。マウス 1 匹あたり修飾米ぬか 1 mg という投与量は、ヒトに対する推奨使用量 (50 mg/kg) から算出した。0.5% DMSO 含有 PBS を溶媒とした、濃度 15 mg/kg のシスプラチン 0.1 ml を腹腔内に単回投与した。水溶液を経口投与、または PBS 溶液を腹腔内投与された 2 群のマウスに対し、1 週間後にシスプラチンを投与した。水道水

著者連絡先: 遠藤雄三 (Yuzo Endo) Department of Pathology and Molecular Medicine, Faculty of Health Sciences, FHS-3N11, McMaster University, 1200 Main Street West, Hamilton, Ontario, L8P 3Z5, Canada (fax +1 (905) 308 8372, e-mail yuzoendo@yahoo.ca)

を経口投与したマウス、およびシスプラチン溶解用の DMSO を含む、または含まない PBS を腹腔内投与したマウス計 3 群を、それぞれ対照群とした。個々のマウスの体重は毎日測定した。全マウスの実験開始時の平均体重を 100% として比較し、個々のマウスの体重パーセンテージをプロットした。

シスプラチン腹腔内投与後の体重減少は、修飾米ぬか投与群・非投与群のいずれも、翌日から生じていた。シスプラチン投与 5 日後に、修飾米ぬか経口投与・非投与群、腹腔内投与・非投与群とも、最も体重が減少していた。最大の体重減少は、修飾米ぬかを投与せずにシスプラチンを投与したマウスで生じた。シスプラチン投与群では標準体重に対して 20% 近く体重が減少したが、死亡したマウス、あるいはシスプラチンに多い副作用である下痢や直腸出血を生じたマウスはなかった。図 1 および図 2 に示すように、マウスの体重増加は両群とも同時にシスプラチン投与 14 日後に始まり、体重増加の回復速度は、修飾米ぬかを経口投与または腹腔内投与したマウス群の方が、対照群よりも速かった。

シスプラチンによるマウスの体重減少の重症度は、用量依存的であった（データ未掲載）。経口または腹腔内投与された修飾米ぬかは、シスプラチンによるマウスの重度の体重減少に対して、速やかな予防効果を示した。図 1 は、修飾米ぬか経口摂取群および水摂取群のシスプラチン

による体重減少曲線につき、II、III、IV 期の分散分析 ($P < 0.05$) を行って得られた統計的有意差を示している。図 2 は、修飾米ぬか腹腔内投与群および PBS 投与群のシスプラチンによる体重減少曲線につき、II、III、IV 期の分散分析を行って得られた統計的有意差 ($P < 0.05$) を示している。修飾米ぬか経口投与群と腹腔内投与群とで修飾米ぬかの体重減少予防効果を分散分析により比較したところ、有意差は認められなかった。これらの結果は、シスプラチンによるマウスの体重減少に対して予防効果を示す修飾米ぬか中の有用な物質が、修飾米ぬかを経口投与した場合と腹腔内投与した場合とで同等に有効であることを示している。

修飾米ぬかを投与したマウスの腸粘膜から血清中に吸収された修飾米ぬか化合物を検出するため、BALB/c マウスにおいて抗修飾米ぬかポリクローナル抗体を作製した。修飾米ぬか溶液 (1 mg/ml) 0.1 ml を等量の完全フロイントアジュバントを用いて乳化し、腹腔内注射した。その後、修飾米ぬか溶液 (1 mg/ml) 0.1 ml を等量の不完全フロイントアジュバントを用いて乳化し、追加免疫した。修飾米ぬかはポリペプチドおよび多糖類からなると考えられるため、修飾米ぬか投与マウスの血清中から、修飾米ぬかに含まれる両化合物中の免疫反応性物質を検出すべきである。

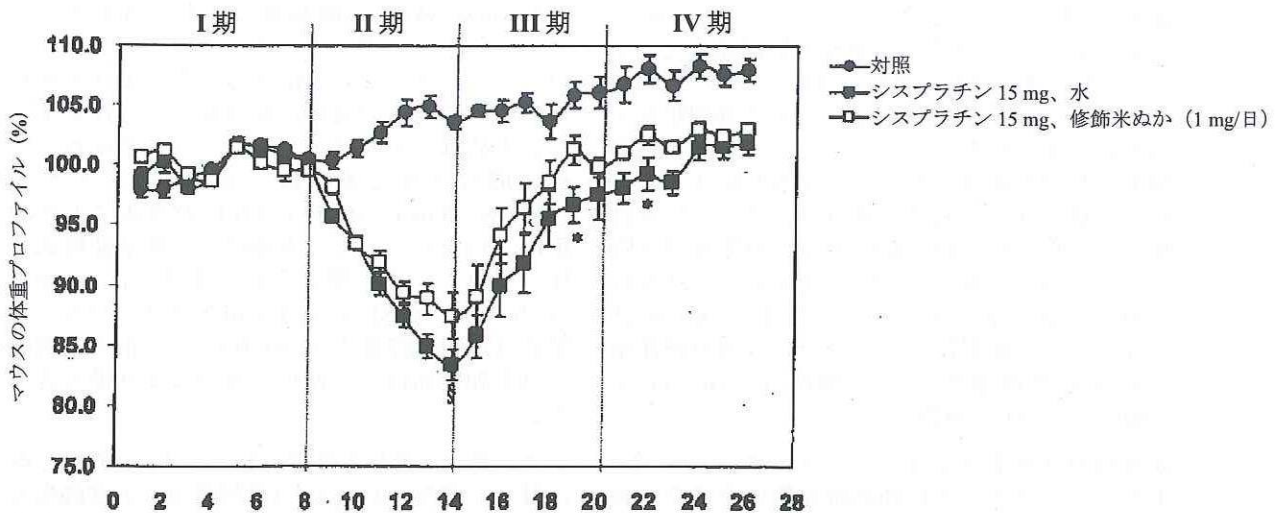


図 1. 第 8 日にシスプラチン (15 mg/kg) を腹腔内投与したマウスにおける体重パーセンテージ減少プロファイルの比較。修飾米ぬか (1 mg/kg) 経口摂取群 (□) および非摂取群 (■) について、第 1 日から示した。縦軸に示す 100% のマウス体重は、実験開始時における全使用マウスの平均体重 (17.43 g ± 0.51 g) を指している。対照群には、シスプラチン、修飾米ぬかのいずれも投与されていない。横軸は、修飾米ぬか投与開始時からの実験日を示している。修飾米ぬか経口摂取群・非摂取群間におけるマウスの体重減少率は、体重減少が最大の点、および回復後期において統計的有意差を示した。バー=各群 5 匹のマウスの平均値および標準誤差。§ $P < 0.001$, * $P < 0.05$ 。

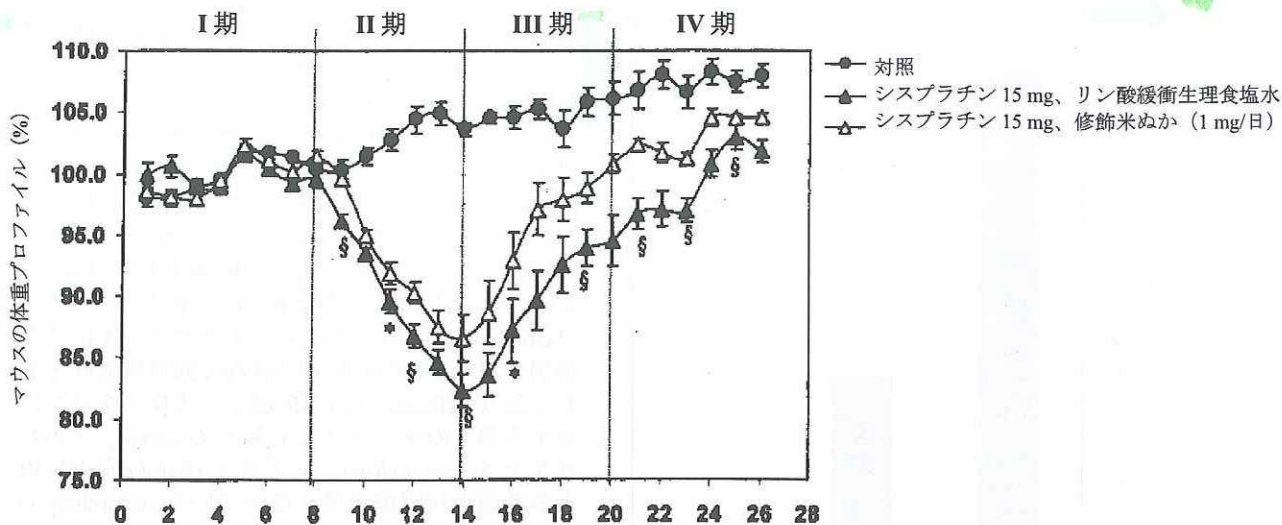


図2. 第8日にシスプラチン(15 mg/kg)を腹腔内投与したマウスにおける体重パーセンテージ減少プロファイルの比較。修飾米ぬか(1 mg/kg)腹腔内投与群(△)および非投与群(▲)について、第1日から示した。縦軸に示す100%のマウス体重は、実験開始時における全使用マウスの平均体重(17.43 g ± 0.51 g)を指している。対照群には、シスプラチン、修飾米ぬかのいずれも投与されていない。修飾米ぬか腹腔内投与群・非投与群間におけるマウスの体重減少率は、シスプラチン投与後の体重減少期および回復期を通じて統計的有意差を示した。バー=各群5匹のマウスの平均値および標準誤差。\$P<0.001、*P<0.05。

これを行うため、ポリペプチドおよび多糖類の定量用に Covalink マイクロウェルプレートを用いた。またポリペプチドの定量用に通常のポリスチレンプレート(Polysorb)を Nunc (Mississauga, Ontario, Canada) から購入し、Zielen *et al.* (1996) の報告した方法に従って酵素結合免疫吸着法(ELISA)を行った。このELISA系の妥当性を保証するため、修飾米ぬか中のポリペプチドをプロテイナーゼKで消化して(+)または消化せずに(-)作製したマウス抗修飾米ぬかポリクローナル抗体の力価の有意差を図3に示す。2次抗体にはペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスIgG抗体を用い、医学生物学研究所(名古屋)より購入したELISAリーダーにより波長492 nmの吸光度を測定した。これらのデータから、Covalink マイクロタイタープレート上で修飾米ぬかのポリペプチド化合物および多糖類化合物を検出できることが示された。

修飾米ぬか経口投与マウス血清中に吸収された修飾米ぬか由来免疫反応性物質は、この抗修飾米ぬかポリクローナル抗体を用いる免疫学的吸着法により検出できる。そこで、マウス血清中の修飾米ぬか由来免疫反応性物質を抗修飾米ぬかポリクローナル抗体と37°C、60分インキュベートして吸着させ、4°C、30分間遠心(15,000 rpm)した。修飾米ぬか(10 mg/kg)経口投与前、および修飾米ぬか経口摂取1~3時間後の3点において、経時的に連続血清を採取した。2通り(100×、1000×)に希釈した修飾米ぬか投与

マウス血清中の修飾米ぬか由来免疫反応性物質を、抗修飾米ぬかポリクローナル抗体を用いた吸着前後について、Covalink マイクロタイタープレートの吸着法に準じたELISAにより測定した。図4は、修飾米ぬか経口摂取2時間および3時間後の各血清を用いて吸着をかけた後、抗修飾米ぬかポリクローナル抗体の力価が有意に低下したことを示している。この抗修飾米ぬかポリクローナル抗体の力価低下は統計的に有意であり(Wilcoxon検定P<0.01)、修飾米ぬか経口投与マウス血清中に修飾米ぬか由来免疫反応性物質が確実に存在することを示していた。これらの物質がシスプラチンによるマウスの体重減少に対して予防効果を担う活性成分であるかどうかは、検討課題である。とは言え、今回の結果は、修飾米ぬかの経口摂取がシスプラチンによるマウスの体重減少を軽減させるのに有効であることを明白に示している。本研究で作製した抗修飾米ぬかポリクローナル抗体により、抗癌剤の副作用に対する防御機能と密接に関連する修飾米ぬか中の有望な含有物を同定できる可能性がある。

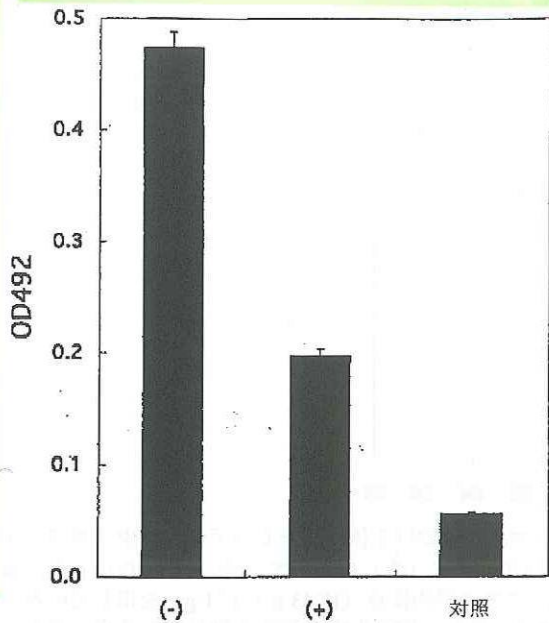


図 3. 我々が作製した抗修飾米ぬかポリクローナル抗体を、Covalink マイクロタイタープレートを用いた ELISA により試験した。修飾米ぬかをプロテイナーゼ K で消化し、タンパク質抗原を除去した。左のヒストグラム (-) は、プロテイナーゼ K 消化を行っていない全修飾米ぬかに対するポリクローナル抗体の力価、すなわち修飾米ぬか中のタンパク質抗原と多糖抗原の両者に対する力価を示している。中央のヒストグラム (+) は、プロテイナーゼ K 消化後の修飾米ぬかに対するポリクローナル抗体の力価、すなわち修飾米ぬか中の多糖抗原のみに対する力価を示している。

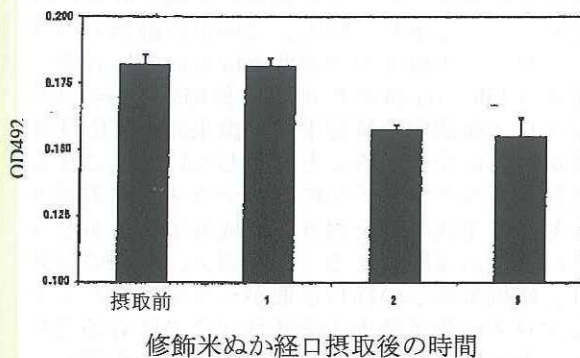


図 4. 修飾米ぬかを経口摂取させたマウスの血清中に存在する修飾米ぬか由来免疫反応性物質の吸収データ概要を示す。経口摂取前および摂取 1 時間後の OD 値は同等であり、血清中に修飾米ぬか由来免疫反応性物質が存在しないことを示しているが、その後 OD 値が低下し、修飾米ぬか経口摂取 2 時間後および 3 時間後のマウス血清には免疫反応性物質が存在することを示している。抗修飾米ぬかポリクローナル抗体の血清力価の低下は、統計的に有意であった (Wilcoxon 検定 $P < 0.01$)。

脱脂米ぬかへミセルロースがラットの末梢血リンパ球数を増加させ、10%へミセルロース含有飼料を与えたラットではヘルパー/インデューサーT細胞とサプレッサー/細胞傷害性T細胞の比が低下することが報告されている (Takenaka & Itoyama 1993)。米ぬかから抽出された修飾アラビノキシランによりナチュラルキラー細胞活性が増強されることが、ヒトに修飾米ぬか (MGN-3) を経口摂取させた研究で示されている (Ghoneum 1998)。米ぬかからエタノールにより抽出された α -グルカンは強力な抗腫瘍活性を有しており (Takeo *et al.* 1988)、一方 β -グルカンに属する種々のキノコ (シイタケ *Lentinus*、スエヒロタケ *Schizophyllum*、マイタケ *Grifola* など) 由来多糖類も抗腫瘍効果を担っている (Borchers *et al.* 1999)。

これらの報告では、米ぬか成分が腸から血清中へ吸収されたことが示されていなかった。本研究は、修飾米ぬか経口摂取後に、修飾米ぬかの免疫反応性成分 (ポリペプチドおよび多糖類) が腸から血液中へ確実に吸収されたことを初めて示した。

修飾米ぬかはストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットの血清脂質低下に有効であり、嗜好性にも優れることが以前に報告されている (Ohara *et al.* 2000)。これは、修飾米ぬかがシスプラチンの副作用である催吐作用に対して潜在的に有用であることを示している。修飾米ぬかがどのようにしてシスプラチン誘導性の体重減少に対する予防効果を発揮するのかは不明であるが、我々の結果は、修飾米ぬかがいわゆる「機能性食品」として進行癌患者の QOL に対する保護効果を示すか確認するための臨床試験実施を促すものである (Harrap 1995)。最良の抗癌作用と、抗癌剤に対する保護効果を得るためには、修飾米ぬかの有効成分についてさらなる解析を行う必要がある。

謝辞

本稿のクリティカル・リーディングを行ってくださった John Bienenstock 教授に感謝いたします。

文献

- Borchers, A. T, J. S. Stern, R. M. Hackman, C. L. Keen & M. E. Gershwin: Minireview. Mushrooms, tumors, and immunity. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 1999, 221, 281-293.
- Ghoneum, M.: Enhancement of human natural killer cell activity by modified arabinosyran from rice bran (MNG-3). *Int. J. Immunotherapy* 1998, 14, 89-99.