

Vol. 151

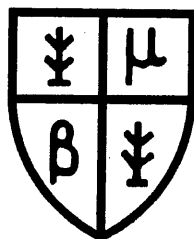
第151巻 第1号 平成19年1月

No. 1

Jan, 2007

医学と生物学

MEDICINE AND BIOLOGY



昭和17年創刊
FOUNDED 1942

原著

“脳死と臓器移植”に関する米国人の意識の特質(続):
レシピエントによる提供意思の変化について

高濃度尿成分による尿酸値低下作用

Phellinus linteus (メシマコブ) 熱水抽出物摂取による
マイトマイシン C 誘導免疫抑制マウスの抗体産生能に及ぼす影響

Stimulation of TNF- α , IL-1 β and IL-6 Levels in Rat Serum
by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LPS Challenge

第150巻 総目次 (150巻1号-150巻12号)

編集・発行：財団法人緒方医学化学研究所 医学生物学速報会

〒101-0031 東京都千代田区東神田一丁目11-4

Edition: Ogata Institute for Medical and Chemical Research

11-4, Higashi-Kanda 1-Chome, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-0031 Japan

【原著】

***Phellinus linteus* (メシマコブ) 熱水抽出物摂取による
マイトマイシン C 誘導免疫抑制マウスの抗体産生能に及ぼす影響**松葉慎太郎¹、松野栄雄、小松靖弘²¹金沢医科大学 代替基礎医学、²サン自然薬研究所

(受付:平成18年12月5日)

(受理:平成18年12月26日)

要 旨

Phellinus linteus (メシマコブ) はタバコウロタケ科キノコブタケ属に属するキノコである。我々は、薬食剤の代替医療的応用を目的とした研究の一環として、メシマコブ熱水抽出エキス (PLW) 経口摂取による実験的免疫不全誘導マウスの抗体産生能に及ぼす影響について検討した。C57BL/6J 系雌性マウスに PLW を 19 日間連続経口投与した。サンプル経口投与開始と同時に、MMC 群にはマイトマイシン C (MMC) を 6 日間連続投与し、実験開始 20 日目に脾細胞における抗体産生細胞 (PFC) の検出を行った。その結果、脾細胞 (10^6 個) における MMC 投与群の PFC 数は、対照群に対して有意に少なかった。しかしながら、PLW 投与群においてはその減少傾向は少なかった。これらの結果から、MMC によって低下した PFC 産生能は、PLW の摂取により回復することが示唆された。

キーワード: メシマコブ、マイトマイシン C、抗体産生細胞

目 的

近年、代替医療としての健康食品の摂取に注目が集まっている。なぜなら、高い抗腫瘍活性を持つ化学療法剤もしくはその混合薬は重篤な副作用を伴うことが多いのに対して、健康食品に関してはほとんど副作用が見られないからである¹⁾。特に担子菌類抽出物摂取による代替医療は免疫賦活作用を目的に広く使われ、しいたけやアガリクスなどのキノコ類含有の多糖体やタンパク質は抗腫瘍活性を有することが報告されている²⁻⁵⁾。キノコ類の一つであるメシマコブもまた細胞障害活性などの様々な活性が報告されている⁶⁻¹³⁾。メシマコブは日本、韓国および中国に分布するもので、伝統的に漢方薬として利尿に用いられてきた。その主成分は多糖類、アミノ酸、 γ -アミノ酪酸、ビタミンおよび糖類である。

上述の薬食剤の標的である免疫系は、主として B 細胞および T 細胞と呼ばれる二つのリ

ンパ球により支配され、癌発症や感染症に対する防御に重要な働きを担っている。しかしながら、その免疫活性は過労、ストレス、化学療法あるいは放射線療法によって容易に低下することが知られている¹⁴⁾。このことは様々な疾病の発症を招き、患者の生命維持に関わる深刻な問題である。また、軽度の場合でも当事者の生活の質 (QOL) を著しく低下させる大きな要因の一つである。

これまでに我々は、漢方薬等その他関連素材の代替医療的応用を目的に、マウスにおける検証を進め、補中益気湯の免疫賦活効果やアガリクスの補体活性化作用などの報告を行ってきた¹⁵⁻²⁰⁾。これらの研究の結果、 β グルカンなどの多糖体を含む担子菌類は、これらの生理活性を有することが示唆され、メシマコブにも同様の活性を持つことが推測される。しかしながら、その熱水抽出物の経口摂取による効果については未だ報告がなされていない。

本研究では、メシマコブの免疫系に及ぼす影響について検証することを目的とし、マイトマイシン C による免疫抑制モデルマウスを作成するとともに、抗体産生系におよぼすメシマコブ熱水抽出物経口摂取の影響について検討した。

材料および方法

1. 実験動物

8 週齢の C57BL/6J 系雌性マウス（日本 SLC、浜松）を使用した。金沢医科大学動物実験指針に従って適切に飼育した。12 時間おきの明暗サイクル、温度、湿度がコントロールされた環境下で餌および水は自由摂取とし、一週間馴化した後、実験に供した。

2. メシマコブの調製

メシマコブ菌糸体（磐田化学工業株式会社、静岡）1 kg に 10 L の蒸留水を加え約 10 時間攪拌し、その熱水抽出物を凍結乾燥し、実験に供した。

3. マイトマイシン C 免疫抑制モデルマウスの作成

8 週齢の C57BL/6J 系雌性マウスを使用した。マイトマイシン C（以下 MMC と略す）投与群には MMC 1 mg/kg を 6 日間連続腹腔投与した^{21,22}。MMC 製剤（協和発酵、東京）は定法に従って蒸留水に溶解させた。対照群には等量の生理食塩水を投与した。そして我々は、MMC 投与後 1~4 週間の脾臓重量の測定と抗体産生細胞（PFC）の検出を行った。また、フローサイトメトリーにより、MMC 投与終了 1 週間後に脾細胞中の CD 19 陽性細胞比を解析した。

4. MMC 免疫抑制マウスにおける PLW の抗体産生能に及ぼす影響

実験動物を対照群、MMC 対照群、MMC-PLW1 群、MMC-PLW2 群および MMC-PLW3 群の 5 群に分け、対照群と MMC 対照群には蒸留水を、MMC-PLW 投与群にはそれぞれ PLW1、2、4 g/kg を 19 日間

連続経口投与した。サンプル経口投与開始と同時に、MMC 投与群は MMC 1 mg/kg を 6 日間連続腹腔投与し²¹⁻²³、実験開始 20 日目に脾細胞における PFC の検出を行った。

5. PFC の解析

ヒツジ赤血球（SRBC；日本生物材料センター、東京）は抗原として使用した。SRBC は生理食塩水で 3 回洗浄後、マウスに 1×10^8 個尾静脈投与した。4 日後、これらのマウス脾細胞は 2 回遠心（490g、5 分）し、10% Fetal Calf Serum - Roswell Park Memorial Institute（FCS-RPMI）1640 培地 10 mL にて再度懸濁した。脾細胞数はチュルク染色液を用いて測定した。SRBC に対する PFC 測定は Jerne らによる方法により行った²⁴。脾細胞浮遊液 100 μ L にイーグル最小必須（Eagle's MEM）培地 800 μ L、8% SRBC 100 μ L および ジエチルアミノエチル（DEAE）デキストラン 100 μ L を加えて、最終的に 1.1 mL とした。これらの検体はボトムレイヤー上で 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、2 時間インキュベートし、モルモット血清を加え、さらに 1 時間インキュベートした。シャーレ上に生じた SRBC の溶血斑は裸眼で確認した。

6. 統計解析

すべてのデータは平均±標準偏差で表した。PLW 投与群と対照群あるいは MMC-対照群の比較は Student の *t* 検定により行い、危険率 5% 以下のものを統計学的に有意な差とみなした。

結果

1. MMC 投与による PFC 産生能への影響

PLW 摂取の免疫系におよぼす影響について検討するのに、まず我々は、PFC 産生能に及ぼす MMC 連続投与の影響について検討した。その結果、MMC 投与後 1 週間目において PFC は検出されなかったが、その後 2 週間目から徐々に回復する傾向が見られた（表 1）。 10^6 脾細胞中における PFC 数はそれぞれ 88 ± 27 (2

週間目)、 261 ± 145 (3 週間目)、 371 ± 144 (4 週間目) 個であり、1 および 2 週間目において有意な差が確認された ($P < 0.005$)。また、1 週間目における脾臓重量においても有意な減少が見られた ($P < 0.005$)。CD19 陽性細胞比については、ほとんど変化が見られなかった (表 2)。これらのことから、本実験における PFC 産生能の回復は、MMC 投与後 約 2 週間目からであることが示された。

2. 免疫抑制マウスにおける PLW の影響

我々は脾細胞 (10^6 個) における PFC 産生能におよぼす PLW の影響を、MMC 免疫抑制マウスを用いて検証した。PFC の解析は MMC 最終投与から 2 週間目に行った。その結果、対照群における PFC は 502 ± 93 個検出されたに対して、MMC 対照群は 118 ± 80 個、MMC-PLW1 群は 184 ± 49 個、MMC-PLW2 群は 279 ± 69 個 ($P < 0.05$)、MMC-PLW3 群は 183 ± 79 個検出された (表 3)。これらの結果は、MMC によって低下した PFC 産生能が PLW の摂取により回復することを示している。脾臓重量については各群間における差は見られなかった。

考 察

化学療法剤の副作用による免疫抑制状態は、深刻な問題の一つである。PLW の摂取は健常状態のときよりも免疫抑制状態において効果を発揮し、代替医療として応用できる可能性が高いことから、本研究では MMC による免疫抑制モデルマウスを用いた。実際、データには示さなかったが、健常マウスでは PLW の摂取は免疫系にほとんど影響を与えなかった。MMC による免疫不全状態の誘導作用は、その投与量・投与回数・休薬期間で大きく変動することから、PLW の影響を検証するのに、まず最適な免疫抑制モデルマウスの作成が必要不可欠であった。免疫活性の指標としては、脾細胞における PFC の検出を行った。本法は古典的ではあるが、抗体産生細胞を直接確認することのできる方法である。PFC 産生能は 6 日間の MMC 腹腔投与により完全に欠落した。そしてその状態は 1 週間続き、徐々に回復していった。MMC-1w 群において、脾臓重量は有意に減少した。CD19 陽性細胞比における有意な差は見られなかった。CD19 陽性細胞は B リンパ球

表 1 MMC 免疫抑制マウスにおける PLW 摂取の脾臓重量および抗体産生能に及ぼす影響

	脾臓重量 (mg)	PFC (個/ 10^6 脾細胞)
対照群	92.2 ± 7.9	350 ± 53
MMC-1w 群	$52.3 \pm 4.1^{**}$	0^{**}
MMC-2w 群	86.1 ± 17.5	$88 \pm 27^{**}$
MMC-3w 群	78.5 ± 14.8	261 ± 145
MMC-4w 群	78.3 ± 16.8	371 ± 144

** $P < 0.005$ (対照群に対して)

表 2 対照群およびマイトマイシン C 投与後 1 週間後における脾細胞中の CD19 陽性細胞比 (%)

	CD19 陽性細胞比
対照群	50.5 ± 2.5
MMC-1w 群	47.1 ± 1.5

表3 MMC免疫抑制マウスにおけるPLW摂取の脾臓重量および抗体産生能に及ぼす影響

	脾臓重量 (mg)	PFC (個/10 ⁶ 脾細胞)
対照群	67.8±11.4	502±93
MMC-対照群	85.3±16.1	118±80
MMC-PLW1群	76.6±17.1	184±49
MMC-PLW2群	68.9±18.8	279±69*
MMC-PLW3群	67.1±11.1	183±79

*P<0.05 (MMC-対照群に対して)

の表面抗原である。つまり、本実験におけるMMC処置はBリンパ球比には影響を与えず、リンパ球の分化を阻害することが示唆された。

これらの結果より、我々はPLWの効果を検討するのに、MMCの最終投与後2週間目でPFCの解析を行った。前述のとおり、SRBCに対するPFC数はMMC投与群において減少した。しかしながら、その減少したPFC数は、PLWの摂取によってMMC-対照群の約2倍近くまで増加し、PLWが抗体産生細胞の機能を活性化、抗体産生を助長することが示唆された。PLWの主成分である多糖類には、マウスがん細胞の増殖の抑制作用について報告もされていることから⁹⁾、本結果についてもPLW含有多糖類が関連しているものと考えられる。

今後はその免疫賦活成分の特定と更なる作用機序の解明が必要であると思われる。

文 献

- 1) Lindequist U, Niedermeyer TH, et al.: The pharmacological potential of mushrooms. *Evid Based Complement Alternat Med* **2(3)**: 285-99 2005
- 2) Ooi VE and Liu F: Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr Med Chem* **7(7)**: 715-29 2000
- 3) Hamuro J, Rollinghoff M, et al.: β (1-3) Glucan-mediated augmentation of alloreactive murine cytotoxic T-lymphocytes *in vivo*. *Cancer Res* **38**: 3080-5 1978
- 4) Mizuno T, Wasa T, et al.: Antitumor-active polysaccharides isolated from the fruiting body of *Hericium erinaceum*, an edible and medicinal mushroom called *yamabushitake* or *houtou*. *Biosci Biotechnol Biochem* **56**: 347-8 1992
- 5) Mizuno M, Norimoto M. et al.: Polysaccharide from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem* **62(3)**: 434-37 1998
- 6) Li G, Kim DH, et al.: Protein-bound polysaccharide from *Phellinus linteus* induces G2/M phase arrest and apoptosis in SW480 human colon cancer cells. *Cancer Lett* **28**; **216(2)**: 175-81 2004
- 7) Han SB, Lee CW, et al.: The inhibitory effect of polysaccharides isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. *Immunopharmacol* **41**: 157-164 1999
- 8) Shibata Y, Kurita S, et al.: Dramatic remission of hormone refractory prostate cancer achieved with extract of the mushroom, *Phellinus linteus*. *Urol Int* **73(2)**: 188-90. 2004
- 9) Kim GY, Oh YH, et al.: Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* induces nitric oxide-mediated tumoricidal activity of macrophages through protein tyrosine kinase and protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*