

腹腔滲出マクロファージの細胞内遊離カルシウムイオン濃度に及ぼす 椎茸 (*Lentinus edodes*) 菌糸体培養抽出物 (LEM) の影響

市川 裕三^{a)} 溝口 靖紘^{*a)} 小林 絢三^{a)} 森沢 成司^{b)}

^{a)}大阪市立大学医学部第三内科学教室, ^{b)}大阪市立大学医学部第一生化学教室

Effect of extract from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia on intracellular calcium ion concentration in the peritoneal exudate macrophages

Yuzo ICHIKAWA^{a)}, Yasuhiro MIZOGUCHI^{*a)}, Kenzo KOBAYASHI^{a)} and Seiji MORISAWA^{b)}

^{a)}The Third Department of Internal Medicine, Osaka City University Medical School

^{b)}The First Department of Biochemistry, Osaka City University Medical School

(Received September 2, 1991. Accepted December 25, 1991.)

Abstract

When rat peritoneal exudate macrophages were stimulated with calcium ionophore A23187 or platelet activating factor, the intracellular calcium ion concentration in peritoneal exudate macrophages increased. This increase was enhanced more when the peritoneal exudate macrophages were preincubated with the extract from the culture medium of *Lentinus edodes* mycelia.

Key words calcium ionophore A23187, extract from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia (LEM), intracellular calcium ion, platelet activating factor (PAF), peritoneal exudate macrophage.

Abbreviations CaI, calcium ionophore; DNA-P, DNA-polymerase; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, glycoether diamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid; FCS, fetal calf serum; HBSS, Hank's balanced salt solution; PAF, platelet activating factor; PBS, phosphate buffered saline; RPMI, Rosewell Park Memorial Institute.

緒 言

シイタケ (*Lentinus edodes*) 菌糸体培養抽出エキス (LEM) に免疫調節作用があることがわかり^{1,2)} HBe 抗原陽性慢性肝炎に対する多施設間 open study が施行された³⁾。その結果, B 型慢性肝炎患者において LEM が natural course 以上に seroconversion を惹起しやすいことが示唆された³⁾。また, このエキスには免疫性肝障害を抑制し, 肝細胞保護作用および抗炎症作用があることが知られている¹⁾。すなわち, LEM は免疫反応ばかりでなく, 炎症反応にも関与して種々の反応系を調節している可能性が考えられる。

以上のような観点から, 著者らは, 腹腔滲出マク

ロファージを用いて LEM の調節作用の機序を解析するため, 細胞情報伝達機構に関与する細胞内遊離 Ca^{++} の面から検討した。

材料と方法

(1) ラット腹腔滲出マクロファージ浮遊液の調製: ラット (Wistar 系雄性ラット, 6 週齢, 日本クレア) の腹腔内に 10 ml の滅菌 marcol 52 (Esso 石油) を注入し, 4 日後に腹腔を HBSS で灌流し, この灌流液を静置し, 分離した油層を除き, 低温遠心で得られたペレットを腹腔滲出細胞とした。これらの細胞を 10% のウシ胎児血清 (FCS), ストレプトマイシン (100 μ g/ml) およびペニシリン (100 単位/ml) を含む Rosewell Park Memorial Insti-

*〒545 大阪市阿倍野区旭町1-5-7
1-5-7, Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545, Japan

tute (RPMI) 1640 で洗浄した後、同じ培養液で希釈し、 1×10^7 cells/ml の細胞浮遊液を調製した。これらの細胞浮遊液 10 ml をプラスチックシャーレ (Falcon 3003) に注ぎ、 37°C で 12 時間、 CO_2 細胞培養器で培養した。培養後、上清をすてさらに 37°C で温めた HBSS をシャーレに注ぎ、ゆるやかに攪拌して非粘着細胞を除いた。このプラスチックシャーレに各種濃度となるよう LEM を添加し、 37°C でさらに 12 時間培養した。培養後、上清をすてさらに 37°C で温め HBSS をシャーレに注ぎ、ゆるやかに攪拌して非粘着細胞を除いた。この操作を数回繰り返して LEM を除き、さらに、0.02% EDTA および 5% FCS を含む冷 PBS 10 ml をシャーレに加え、 4°C で 20 分間静置した。次に、粘着細胞をラバーポリスマンではがし、遠心して細胞ペレットを得た。このペレットに 5% FCS を含む、 Ca^{++} を含まない PBS を加え、 2×10^6 cells/ml となるように調製して、腹腔滲出マクロファージ浮遊液とした。

なお、LEM の調製法はバカス (bagasse) に脱脂米糠を加えた固形培地でシイタケ菌糸体を培養し、発芽前に加水、加温抽出し、この抽出液をメンブランフィルター (0.45μ) で濾過し、濾液を 85°C で 30 分間加熱滅菌した。この加熱処理した濾液を濃縮、乾燥粉末化し、さらに細粒化した標品を本実験に供した。なお、この細粒の化学組成は、蛋白質 22%、脂肪 8%、灰分 22% および可溶性無窒素 48% であった。因みに、LEM は野田食菌工業株式会社より調製・供与された。

(2) 細胞内遊離 Ca^{++} 濃度の測定：腹腔滲出マクロファージ (2×10^6 cells/ml) に Fura-2 AM (同仁化学) を最終濃度が $2 \mu\text{M}$ となるように添加し、 37°C で 30 分間培養した。培養後、細胞を Ca^{++} を含まない PBS で 2 回洗浄し、この洗浄細胞に 5% FCS および 1 mM の Ca^{++} 含有 PBS 溶液を加え、 1×10^6 cells/ml となるように細胞浮遊液を調製した。この浮遊液に各種濃度の calcium ionophore A23187 (CaI, Sigma 社) または血小板活性化因子 (PAF, 小野薬品工業株式会社より供与) を添加し、励起波長 340 nm および 380 nm、蛍光波長 510 nm における蛍光強度を蛍光光度計 (Hitachi, F-2000) を用いて測定した。すなわち、石英セルに細胞浮遊液 (2×10^6 cells/ml) を 1.5 ml 入れ、1 分後に CaI または PAF を添加した。次いで、添加 4 分後に Triton X ($2 \mu\text{l/ml}$, 和光純薬) を加え、さらに、1 分後に EGTA (同仁化学) を最終濃度が $20 \mu\text{M}$ となるように添加して測定した。そして、励起波長 340 nm における蛍光強度と励起波

長 380 nm における蛍光強度の比をもとに細胞内遊離 Ca^{++} 濃度を算出した。

(3) 統計学的検討：すべての実験結果は平均値 $\pm$ 標準誤差であらわし、有意差検定は Student の方法 (t 検定) に従って行った。

結 果

1. CaI 刺激腹腔滲出マクロファージの細胞内遊離 Ca^{++} 濃度の変動

各種濃度の CaI を腹腔滲出マクロファージ細胞浮遊液 (2×10^6 cells/ml) に添加し、細胞内遊離 Ca^{++} 濃度を測定すると、4 分後の Ca^{++} 濃度は Fig. 1 に示すように、濃度依存的に増加した。すなわち、0.1, 0.2, 0.5, $1.0 \mu\text{g/ml}$ の CaI を細胞浮遊液に添加すると、細胞内遊離 Ca^{++} 濃度は、それぞれ、47.2, 138.6, 214.2, 204.6 nM となった (各群 $n=2$ 匹, 2 標本, Fig. 1)。従って、以後の実験には $1.0 \mu\text{g/ml}$ の CaI を用いた。

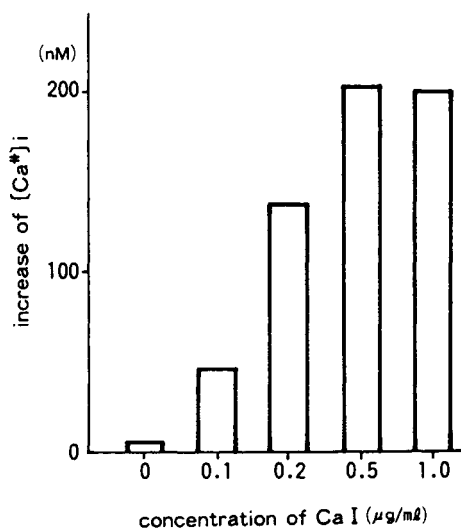


Fig. 1 Increase of intracellular Ca^{++} concentration in rat peritoneal exudate macrophages stimulated with calcium ionophore A23187.

2. LEM の CaI 刺激腹腔滲出マクロファージ細胞内遊離 Ca^{++} 濃度に及ぼす影響

上述の方法によって分離した腹腔滲出マクロファージに、LEM を各種濃度となるように添加し、24 時間培養した。培養後、前述のように細胞を PBS で洗浄し、 2×10^6 cells/ml に調製し、Fura 2-AM

を取り込ませた後、 $1.0 \mu\text{g/ml}$ の CaI を添加し、細胞内遊離 Ca^{++} 濃度の変動について検討した。その結果、Fig. 2 に示すように、 $10 \mu\text{g/ml}$ および $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度になるように LEM を腹腔滲出マクロファージに添加した時の細胞内遊離 Ca^{++} 濃度は、 $176.0 \pm 18.4 \text{ nM}$ および $200.4 \pm 14.6 \text{ nM}$ で、LEM 非添加群 ($138.4 \pm 18.8 \text{ nM}$) と比較して有意に増加した ($p < 0.01$, 各群 $n = 5$ 匹, 5 標本)。

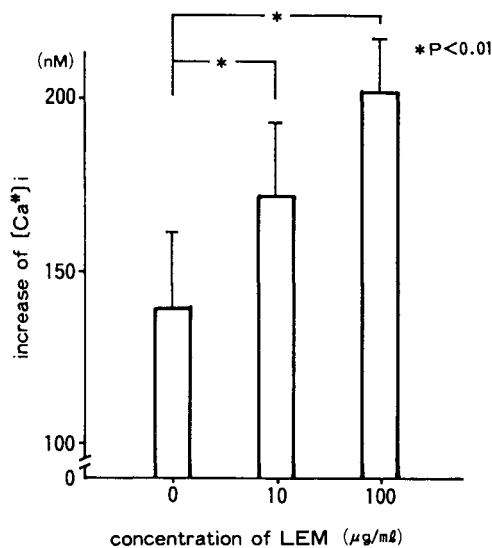


Fig. 2 Effect of extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia on the increase of intracellular Ca^{++} concentration in rat peritoneal exudate macrophages stimulated with calcium ionophore.

3. PAF 刺激腹腔滲出マクロファージの細胞内遊離 Ca^{++} 濃度の変動

腹腔滲出マクロファージ細胞浮遊液 (2×10^6 cells/ml) に、各種濃度になるよう PAF を添加すると、細胞内遊離 Ca^{++} 濃度は、Fig. 3 に示すように、濃度依存的に増加した (各群 $n = 2$ 匹, 2 標本)。そこで、以後の実験では PAF の濃度を $1 \mu\text{g/ml}$ とした。

4. LEM の PAF 刺激腹腔滲出マクロファージ細胞内遊離 Ca^{++} 濃度に及ぼす影響

各種濃度の LEM で腹腔滲出マクロファージを 24 時間培養し、PAF ($1 \mu\text{g/ml}$) を添加して、細胞内遊離 Ca^{++} 濃度の変動を検討した。その結果、Fig. 4 に示すように、PAF 刺激腹腔滲出マクロファージの細胞内遊離 Ca^{++} 濃度は、LEM の濃度に依存して増加した。すなわち、 $10 \mu\text{g/ml}$ の LEM

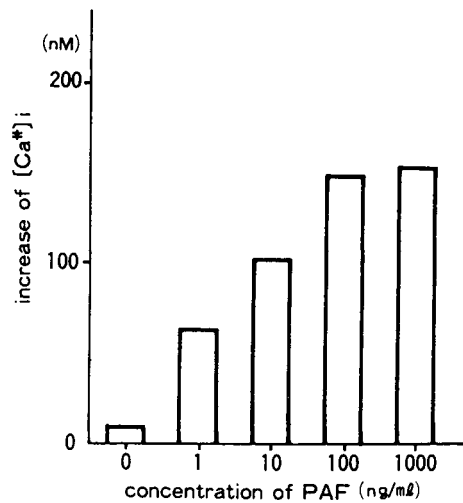


Fig. 3 Increase of intracellular Ca^{++} concentration in rat peritoneal exudate macrophages stimulated with PAF.

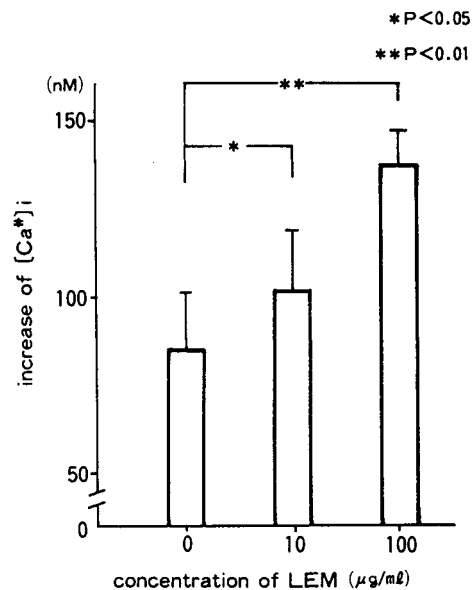


Fig. 4 Effect of extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia on the increase of intracellular Ca^{++} concentration in rat peritoneal exudate macrophages stimulated with PAF.

を腹腔滲出マクロファージに添加すると、細胞内遊離 Ca^{++} 濃度は、 $104.6 \pm 12.8 \text{ nM}$ (LEM 非添加群; $88.4 \pm 12.6 \text{ nM}$, $p < 0.05$), $100 \mu\text{g/ml}$ の LEM では、 $142.8 \pm 8.6 \text{ nM}$ ($p < 0.01$) となり、LEM による Ca^{++} 濃度の有意な増加が示された (各群 $n = 5$ 匹, 5 標本)。

なお、腹腔滲出マクロファージ浮遊液に、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の LEM を添加し、24 時間後にシャーレに付着した細胞の trypan blue dye exclusion test を行ったところ、viability は 95% 以上であった。

考 察

慢性肝炎の治療薬の 1 つに LEM が用いられている。³⁾ LEM はシイタケ菌糸体を培養した固形培地の水抽出エキスであり、アラビノース、キシロースを主とする多糖蛋白である。現在、LEM の作用としては、植物ホルモン作用、⁴⁾ 抗植物ウイルス作用、⁵⁾ 抗腫瘍作用^{6,7)} などが知られている。植物ホルモン作用としては、発根促進、農作物の成長促進等が知られており、⁴⁾ また、抗植物ウイルス作用としては、タバコモザイクウイルスに著効を示すと報告されている。⁵⁾ 抗腫瘍作用については、AH 414 移植腫瘍の増殖に抑制効果を示すことが菅野ら^{6,7)} により報告された。すなわち、LEM のエタノール沈澱をゲル濾過し、得られた 2 画分のうち、分子量 800,000-900,000、キシロース、アラビノースを主構成糖とする多糖蛋白質画分はアゾ色素による肝癌発症抑制、ラット腹水肝癌増殖抑制等の抗腫瘍効果を有することが知られている。また、LEM はマクロファージを活性化してインターロイキン 1 等のサイトカインの産生を増強し、その結果サイトカインネットワークを活性化して免疫賦活作用を有するばかりでなく、¹⁾ 単核細胞に作用して PAF 等の chemical mediator の産生に作用して炎症反応にも関与する。⁸⁾ また、臨床的には Amagase ら⁹⁾ が LEM の免疫調節作用に注目し、HBe 抗原陽性慢性肝炎患者 40 例に LEM を投与し、DNA-polymerase (DNA-P) 活性の低下、seronegative 症例は 40 例中 17 例 (42.5%)、seroconversion 症例は 40 例中 10 例 (25.0%) であったと報告した。このような状況のもとで、原田ら³⁾ が中心となり、HBe 抗原陽性慢性肝炎患者 66 例について LEM による多施設間 open study による検討がなされた。その結果、HBe 抗原が投与開始時に比べて 16 週後で有意の低下が見られ ($p < 0.01$)、また、HBe 抗体についても投与開始時に比べ 16 週後で有意の上昇がみられた ($p < 0.01$)。

一方、PAF は多形核白血球や、マクロファージ、血管内皮細胞など生体の種々の細胞から産生されることや、¹⁰⁾ PAF が血小板活性化作用のみでなく、血管透過性の亢進、¹¹⁾ 好中球及びマクロファージ活性化¹²⁾ 等の作用を有し、炎症反応の誘導にかかわる

chemical mediator である可能性が示唆されつつある。¹³⁾ 著者らも腹腔滲出マクロファージや肝類洞壁細胞を CaI で刺激し、PAF 産生を誘導し、PAF がサイトカインカスケードばかりでなくアラキドン酸カスケードにも関与することを報告した。¹⁵⁾

そこで、今回、著者らは LEM の作用機序を細胞レベルで解析する一端として、腹腔滲出マクロファージを用いて、細胞内遊離 Ca^{++} 濃度に及ぼす影響について検討した。その結果、LEM は CaI や PAF 刺激による腹腔滲出マクロファージの細胞内遊離 Ca^{++} 濃度を増加させた。細胞内遊離 Ca^{++} 濃度の上昇は、phospholipase A_2 や protein kinase C 等の活性化を誘導し、細胞内反応系のカスケードにおける初期段階において非常に重要な役割を演じる。¹⁶⁾ また、細胞内遊離 Ca^{++} 濃度の上昇は、microfilament の収縮を誘導し、細胞形態にも影響を及ぼすことが示唆されている。¹⁷⁾ すなわち、 CaI や PAF の刺激による腹腔滲出マクロファージの細胞内遊離 Ca^{++} 濃度の増加を、LEM がさらに増強させたことは、マクロファージの機能に細胞内遊離 Ca^{++} が重要な役割を演じていると同時に、LEM が細胞内遊離 Ca^{++} 濃度を介して、マクロファージに作用することを示唆している。

以上の結果は、LEM の慢性肝炎の作用機序を解析する上で、新しい方向性を示唆するものと考えらる。

結 論

椎茸菌糸体培養抽出物 (LEM) は、calcium ionophore A23187 または platelet activating factor (PAF) で刺激した腹腔滲出マクロファージの細胞内遊離 Ca^{++} 濃度を上昇させた。

文 献

- 1) 溝口靖雄, 児玉千枝, 北村瑞穂, 阪上吉秀, 小林純三, 山崎素直, 戸田昭三, 山本祐夫, 森沢成司: *Lentinus edodes* mycelia 培養抽出物 (LEM) の免疫学的肝細胞障害および抗体産生に及ぼす影響. 肝胆臓 **15**, 127-135, 1987.
- 2) Suzuki, H., Iiyama, K., Yoshida, O., Yamazaki, S. and Yamamoto, N.: Structural characterization of the immunoactive and antiviral water-solubilized ligninin an extract of the culture medium of *Lentinus edodes* Mycelia (LEM). *Agric. Biol. Chem.* **54**, 479-487, 1990.
- 3) 原田 尚, 兼高達武: HBe 抗原陽性慢性肝炎に対する LEM による治療—多施設間 open study による検討. 肝胆臓 **14**, 327-335, 1987.

- 4) Mitsuhashi-Kato, M. and Fujii, T. : Promotion of rooting in azukia cutting by possible glycoproteins extracted from *Lentinus edodes* culture. *Plant Cell Physiol.* **26**, 221-228, 1985.
- 5) 小室康雄：レンテミンの抗植物ウイルス効果について。農林水産省植物ウイルス研究報告。pp. 61-62, 1977.
- 6) Sugano, N., Hibino, Y., Choji, Y. and Maeda, H. : Anticarcinogenic actions of water-soluble and alcohol-insoluble fractions from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Cancer Lett.* **17**, 109-114, 1982.
- 7) Sugano, N., Choji, Y., Hibino, Y., Yasumura, S. and Maeda, H. : Anticarcinogenic action of an alcohol-insoluble fraction (LAP1) from culture medium of *Lentinus edodes* mycelia. *Cancer Lett.* **27**, 1-6, 1985.
- 8) 溝口靖紘, 市川裕三：肝臓洞内皮細胞の血小板活性化因子産生に及ぼす *Lentinus edodes* mycelia 培養抽出物 (LEM) の影響。日本東洋医学雑誌 印刷中。
- 9) Amagase, H. : Treatment of hepatitis B patients with *Lentinus edodes* mycelium. In "New Trends in Peptic Ulcer and Chronic Hepatitis." Excerpta Medica, Amsterdam Princeton, Hong Kong, Tokyo, Sydney, pp. 316-321, 1987.
- 10) Lynch, J.M. and Henson, P.M. : The intracellular retention of newly synthesized platelet-activating factor. *J. Immunol.* **137**, 2653-2661, 1986.
- 11) Humphrey, D.M., Mcmanus, L.M., Satouchi, K., Hanahan, D.J. and Pinckard, R.N. : Vasoactive properties of acetyl glycerylether phosphorylcholine and analogues. *Lab. Invest.* **46**, 422-427, 1982.
- 12) Shaw, J.O., Pinckard, R.N., Ferrigni, K.S., McManus, L.M. and Hanahan, D.J. : Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine (platelet activating factor) *J. Immunol.* **127**, 1250-1255, 1981.
- 13) 井上圭三：炎症と血小板活性化因子。代謝 **23**, 891-899, 1986.
- 14) 市川裕三, 溝口靖紘, 木岡清英, 小林絢三, 留川キヨ子, 森沢成司, 山本祐夫：ラット腹腔渗出細胞からの血小板活性化因子産生に及ぼすグリチルリチンの影響。アレルギー **38**, 365-369, 1989.
- 15) Mizoguchi, Y., Ichikawa, Y., Kioka, K., Kawada, N., Kobayashi, K. and Yamamoto, S. : Effects of arachidonic acid metabolites and interleukin-1 on platelet activating factor production by hepatic sinusoidal endothelial cells. *J. Gastroenterology Hepatology* **6**, 283-288, 1991.
- 16) Pickett, W.C., Jesse, R.L. and Cohen, P. : Initiation of phospholipase A2 activity in human platelet by calcium ionophore A23187. *Biochim. Biophys. Acta* **486**, 209-213, 1977.
- 17) Kakiuchi, S. and Sobue, K. : Control of cytoskeleton by calmodulin and calmodulin-binding protein. *TIBS* **8**, 59-63, 1983.