

チャガ（シベリア靈芝）のガン細胞抑制と ヒスタミン遊離抑制作用について

広島大学医学部総合薬学科 ○陳 志清 仲田 義啓

【目的】

チャガ (Charga) はシベリアや、北海道などに分布する白樺に寄生するカバノアナタケ (*Fuscoporia obliqua*) の菌核である。その菌核はシベリア靈芝とも呼ばれ、強い制ガン作用や免疫調整作用があるといわれ、ロシアではガンの予防と治療に有効な民間薬として知られている。そこで、我々は腫瘍細胞の増殖、マクロファージの機能およびヒスタミン遊離に対するチャガエキスの作用について検討した。

【実験方法】

(1) 試料：シベリアで採取されたチャガの熱水による抽出エキス (イスクラ産業㈱提供) (以下チャガと称す) を実験に供した。

(2) 細胞増殖試験：種々濃度のチャガを添加した培地で細胞を48時間培養した後、細胞の増殖状態をMTTアッセイと顕微鏡下での計数により調べた。

(3) マクロファージの蛍光ラテックスビーズ貪食能試験：蛍光ラテックスビーズ懸濁液を10%FBS添加したRPMI1640培地で0.02%に希釈し、マクロファージを巻いているプレートに400 μ lずつ注入して、37 $^{\circ}$ Cで振動しながら2時間保温した後、あらかじめ4 $^{\circ}$ Cに冷したPBS(-)でプレート内を3回洗浄して、取りこまれなかったビーズを取り除いた。2.5%ホルムデヒド/PBS(-)を用いて20分間氷上で固定して、蛍光顕微鏡の下でマクロファージの貪食状態を観察した。

(4) TNF- α 定量：BioSource International, Inc. 社のマウスTNF- α 測定キットに準じて行った。

(5) ヒスタミン遊離の測定：ラットの腹腔肥満細胞およびRBL-2H3細胞をチャガで30分間前処置して、細胞に脱顆粒を起こす刺激を与え、ヒスタミンと同じ挙動を示すヘキソサミニダーゼを脱顆粒の指標として測定した。

(6) マウスPCA (即時型皮膚反応モデル)：ddy系雄性マウス (Seac Yoshitomi, Ltd) をエーテル麻酔し、抗DNPIgE抗体 (藤沢薬品工業㈱) (3000倍希釈) を両耳耳介の内側に皮内注入し (10 μ l/site) 受動感作した。48時間後、TNP-BSA (BSAとして1mg/ml) および0.5%エバンスブルーを含有する生理的食塩液を尾静脈より投与して反応を誘発した (0.25ml/匹)。反応誘発30

分後、マウスを致死して両耳耳介を採取した。耳介の重さと色素漏出範囲の広さを測り、一对の耳介を併せて1N水酸化カリウム存在下で、37 $^{\circ}$ Cで1晩放置して得た組織の溶解液に、2.5Nリン酸およびアセトンを3:17で混合した溶液を水酸化カリウムの4倍量加え、攪拌および遠心し、組織中に漏出したエバンスブルーを抽出した。その色素の量を吸光度620nmで定量した。

【実験結果】

(1) *in vitro* における腫瘍細胞の増殖に対する作用：

Fig.1とFig.2で示したように、子宮ガン由来のHeLa、白血病由来のRajiなどのガン細胞に対して、チャガは用量依存的に抑制効果を示し、対照群に比較して有意

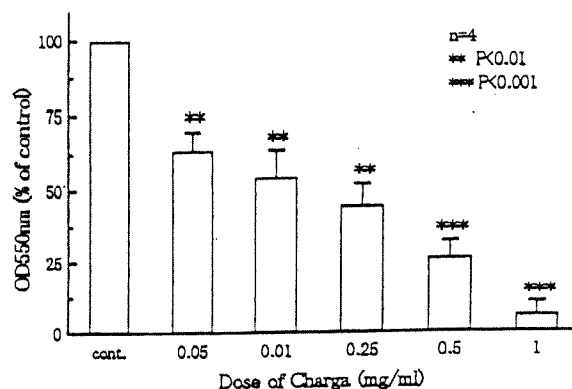


Figure 1. Effects of Charga on HeLa cells proliferation

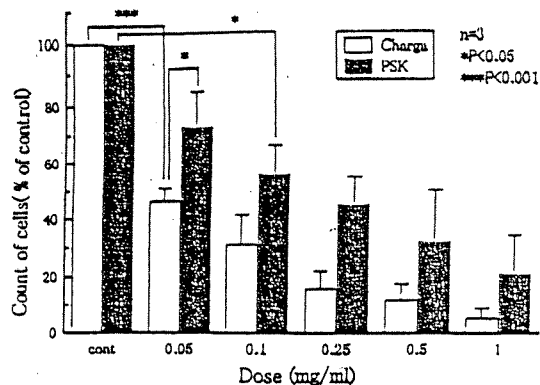


Figure2. Comparison of the effects between Charga and PSK on Raji cells proliferation

差が認められた。尚、チャガは抗がん剤のPSK（カワラタケ菌核のエキス）より低濃度で有効であった。また、実験に用いた数種類のガン細胞に殆ど抑制作用を示したが、8305-C、VMGC-RCZには作用が弱かった（Fig.3）。

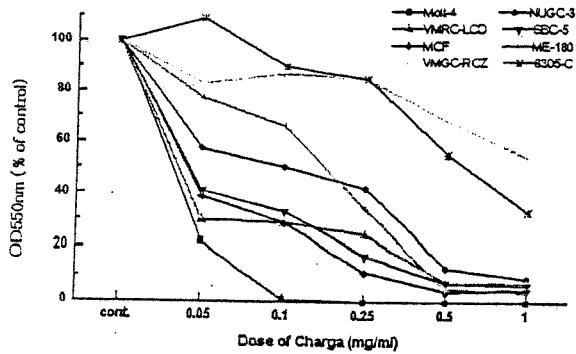


Figure3 Effects of Chaga on the proliferation in several other celllines

(2) マクロファージの貪食能およびTNF- α 産生能に対する影響：未投薬マウスの腹腔マクロファージは蛍光ビーズの取り込みが少なかった（Fig.4A）のに対して、チャガ（250mg/kg）を二週間投与したマウスの腹腔マクロファージは蛍光ビーズをいっぱい取り込んでいた（Fig.4B）。

また、チャガはLPS刺激によるWEHI-3細胞からのTNF- α 遊離を有意に促進した（Fig.5）。

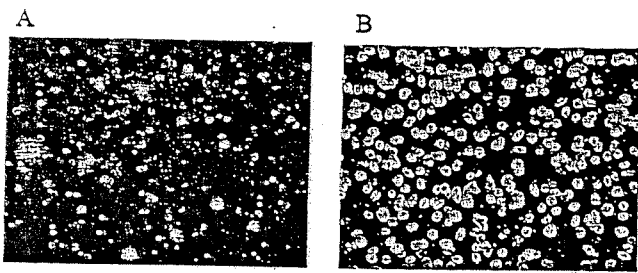


Fig.4 Effects of Chaga on phagocytosis in mice peritoneal macrophage cells.(A: Control, B: Chaga). $\times 200$

(3) 肥満細胞のヒスタミン遊離に対する作用：Compound 48/80の刺激によるラット肥満細胞のヒスタミン遊離に対して、チャガは30ng/mlの濃度で有意の抑制が見られた（Fig.6）。なお、チャガはRBL-2H3において特異的なIgEによるヒスタミン遊離をやや高濃度で抑制した（Fig.7）。一方、チャガ自体はラットの腹腔マスト細胞においても、RBL-2H3においても、ヒスタミン遊離の誘発がなかった。

(4) In vivoのI型アレルギー反応に対する作用：チャガ（250mg/ml）を二週間投与したマウスでは、PCA反応が著しく軽減され、対照群に比べて反応による色素

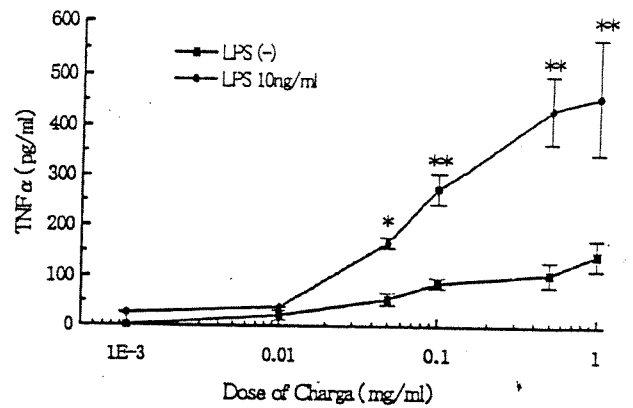


Fig.5 Effects of Chaga on TNF- α release from WEHI-3 cells

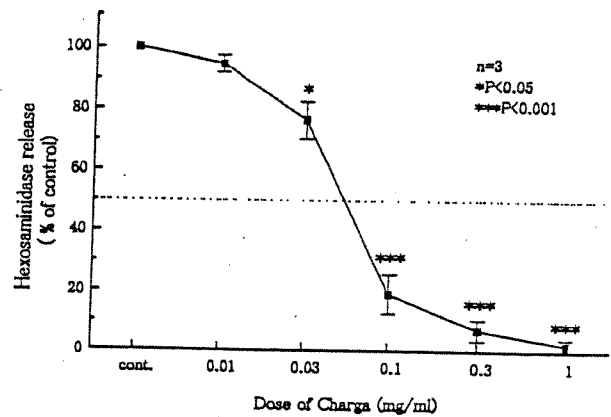


Figure6. Effects of Chaga on Compound48/80-induced hexosaminidase release in rat peritoneal mast cells

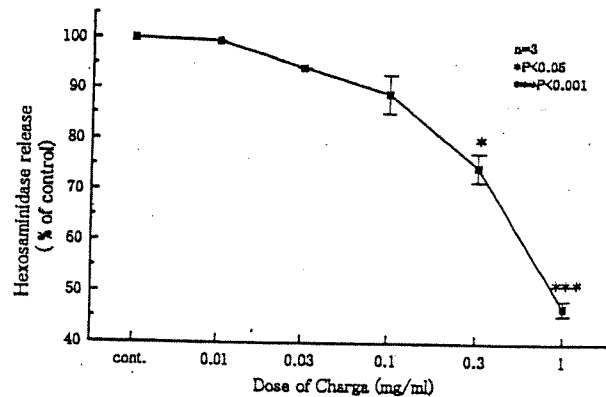


Figure7. Effects of Chaga on antigen-induced hexosaminidase release in RBL-2H3 cells

の漏出量が三分の一に、面積が半分以下に抑制された。一方、チャガ自体はアレルギー反応を起こすことはなかった（Table1）。

【考察】

チャガの抽出成分には β -グルカンなどの多糖類が多く含まれており、その中に制ガン活性の本体があるのではないかとされている。今回の実験に用いられたチャガの粗抽出エキスは、カワラタケより精製された抗ガン剤のPSK（KRESTIN）に比べて、より強い制

Table1. Effects of Charga on passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in mice

Group name	N	Amount of dye (μ g/ears)	Dimension (mm ²)	
Nonsensitized	Nontreated	7	0.89 \pm 0.46	—
	Treated with Charga	7	0.47 \pm 0.38	—
Sensitized	Nontreated	14	18.53 \pm 1.68	69.64 \pm 7.98
	Treated with Charga	14	6.99 \pm 1.27**	34.80 \pm 7.41**

**P<0.01 : Significantly different from the Charga-nontreated group

ガン作用を示した。一方、チャガのガン細胞増殖抑制作用は細胞の種類によって異なり、白血病由来のRaji、Molt-4細胞、および固形ガンのHeLaとME-180(子宮ガン)、SBC-5とVMRC-LCD(肺ガン)、NUGC-3(胃ガン)、MOF-7(乳腺ガン)などのガン細胞に対し強い抑制作用を示したが、甲状腺ガン由来の8305-C細胞と腎臓ガン由来のVMRC-RCZ細胞には著明な効果なかった。

マクロファージは主に貪食作用と、TNF- α やIL-12などの活性物質の分泌作用があり、生体に侵入したウイルスや細菌などの異分子を取り込んで殺すのみならず、種々の生理活性物質を通してNK細胞などの他の免疫細胞と連携して、癌細胞に対する監視、攻撃、除去などに当たり、免疫機構の中で中心的な役割を担う細胞である。マクロファージの活性化は生体の免疫増強につながるものとされている。チャガを投与したマウスの腹腔マクロファージの貪食能が明らかに増強されたことより、チャガのマクロファージの活性化促進作用が示された。

WEHI-3細胞はマウス単球細胞由来のマクロファージの特性を呈する細胞株であり、マクロファージの分泌機能に関する実験によく使われる。In vitroではWEHI-3細胞はLPSなどの刺激を受けると、TNF- α を産生放出する。チャガはLPSによるTNF- α の遊離を大きく促進した。この結果はチャガによるマクロファージの貪食能の増強と一致しており、チャガのマクロファージの活性化促進と機能強化作用を証明したもの

でもある。一方、TNF- α は炎症反応や免疫反応に関与したり、腫瘍細胞の壊死を惹き起こしたりして多彩な生理活性を持っている。チャガはマクロファージのTNF- α の分泌促進作用を通して、免疫機構において様々な薬理作用を示すと考えられる。

マスト細胞はその分泌顆粒中に貯蔵されているヒスタミンなどの即時型メディエーターを介して、アナフィラキシー反応やアレルギー性鼻炎、気管支喘息、アトピー性皮膚炎など、多くのアレルギー反応を引き起こす。ラットの腹腔マスト細胞(組織型マスト細胞)とマスト細胞のモデル細胞とされるRBL-2H3(細胞粘膜炎型マスト細胞)において、脱顆粒を起こすメカニズムは必ずしも同じとは限らないとされているが、チャガは二種類のマスト細胞に対して何れも脱顆粒抑制作用を示した。果たしてこのようなヒスタミン遊離抑制作用はアレルギー反応の抑制に繋がるかどうかを検証するために、マウスのI型アレルギー反応モデルを用いて検討した。その結果、チャガはマウスのI型アレルギー反応を抑制することが認められた。これらの結果より、チャガは臨床でアレルギー反応の予防と治療の補助薬としての可能性が示唆された。

以上の結果より、チャガは免疫増強、健康維持、病氣予防に役立つ科学的な根拠がつけられたのみならず、その多彩な薬理作用を担う成分の究明はガンやアレルギー疾患の治療薬の開発に寄与することも期待される。