

Vol. 151

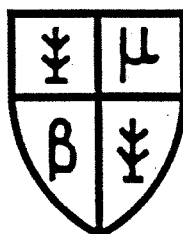
第151巻 第5号 平成19年5月

No. 5

May, 2007

# 医学と生物学

*MEDICINE AND BIOLOGY*



昭和17年創刊  
FOUNDED 1942

## 原著

マイトマイシンC免疫抑制マウスにおけるチャーガ熱水抽出エキス摂取の抗体産生細胞に及ぼす影響

便潜血検査キットを用いた海産魚血液とヒト血液の鑑別およびその現場鑑識への応用

根尖病巣におけるiNOSとキサンチンオキシダーゼとの相互作用

根各濃度の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> から発生する hydroxyl radical の発生量がヒト歯髄培養細胞におよぼす影響

鹿角霊芝から得られた多糖体画分のリンパ球増加作用

Perfusion Cell Culture Using Radial Flow Bioreactor and Highly Porous Hydroxyapatite Beads

慢性閉塞性肺疾患患者の薬物療法についての検討

The Relationship in the P-Value between Fisher Exact  $\Delta$  Test and Original Fisher Exact Test on Odds Ratio

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】

マイトマイシンC免疫抑制マウスにおけるチャーガ熱水抽出エキス摂取の  
抗体産生細胞に及ぼす影響松葉慎太郎<sup>1</sup>、松野栄雄<sup>1</sup>、佐久眞正弘<sup>2</sup>、小松靖弘<sup>3</sup>、山口宣夫<sup>1</sup><sup>1</sup>金沢医科大学 代替基礎医学講座<sup>2</sup>石川天然薬効物質研究センター<sup>3</sup>サン自然薬研究所

(受付:平成19年2月20日)

(受理:平成19年3月27日)

## 要 旨

*Inonotus obliquus* (チャーガ) は、極寒地帯のロシアや北欧の山林中の白樺の木に寄生するキノコである。我々は担子菌類の一つであるこの素材に着目し、チャーガ熱水抽出エキス (IOW) 経口摂取による実験的免疫不全マウスの抗体産生細胞に及ぼす影響について検討した。BALB/c 系雌性マウスに IOW 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) の検出および総白血球数の測定を行った。その結果、いずれの試験においても、IOW 投与群の方が対照群に対して増加していることが確認された。これらの結果から、IOW の摂取は MMC による免疫抑制状態を改善することが示唆された。

キーワード: チャーガ、マイトマイシン C、抗体産生細胞

## 目 的

わが国において広く利用されている代替医療の一つとして、健康食品の摂取が挙げられる。なかでもある一定の効果が確認され、疾病の1次予防に貢献しうる食品は機能性食品 (functional food) と称され、その名称と概念は各国でも認知されることとなった<sup>1)</sup>。しかしながら、このように有用な健康食品もあれば健康に害をなすものもある。今日の健康食品は多種多様で、多くのものは飲用効果・安全性が検証されないまま流通し、健康被害の報告も後を絶たない。こうしたことをなくすためにも、正しい方法で効能・安全性が検証され、evidence based medicine (EBM) の理念に基づいた薬食剤により、代替医療が展開されることが望まれる。こうした状況の下、健康食品として広く用いられているキノコ類、特に *Inonotus obliquus* (以下チャーガと略す) に着目した。

チャーガは、極寒地帯のロシアや北欧の山林中の白樺の木に寄生するキノコである。白樺の樹液を栄養源として十数年かけて生育する。直径 10~20 cm で、表面は黒く凹凸、縦横に亀裂が走り、石炭のように硬い。その主要な成分は多糖類 ( $\beta$ グルカン)、ステロール類、テルペノイドなどである。そして、その多糖類に抗ガン作用や免疫賦活作用を持つということが報告されている<sup>2,3)</sup>。しかしながら、これらの報告は *in vitro* もしくは *ex vivo* の実験系である。生体内において同様の作用を発揮するかについては不明であり、そのような報告は未だなされていない。それゆえに、本研究ではチャーガの生体内における免疫系、特に抗体産生系における影響について検討を行った。

## 材料と方法

## 1. 実験動物

8週齢のBALB/c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. 実験試料の調製

今回使用したチャーガはロシア、イルクーツク地方で白樺の木に10年から15年寄生、自生生育していたもの(直径が15cmから30cm)を春先から初夏にかけて採取し、それらを約1週間かけて自然乾燥させたものを輸入して使用した。保存は低温、乾燥の条件で行った。濃縮エキスの製造は輸入したチャーガ原塊を細粉して蒸留水に浸漬し、24時間後に加熱(90℃)して熱水抽出液(株ピュアワンインターナショナル(東京)製、以下IOWと略す)とし、実験に供した。

3. MMC免疫抑制マウスにおけるIOWの抗体産生細胞に及ぼす影響

我々はIOW経口投与の免疫系に及ぼす影響を検証するにあたり、マイトマイシンC(以下MMCと略す)を用いた免疫抑制モデルマウスの実験系を行った<sup>4,5)</sup>。実験の流れを図1に示した。8週齢のBALB/c系雌性マウスを

対照群、MMC-対照群、MMC-IOW1群、MMC-IOW2群およびMMC-IOW3群の5群(1群7匹)に分け、対照群およびMMC-対照群には蒸留水を、IOW1~3群にはそれぞれIOW 0.1、0.2、0.3 mLを、一日一回19日間連続経口投与した。また、それぞれのサンプルの投与開始と同時に、MMC投与群にはMMC製剤(株協和発酵、東京)1 mg/kgの6日間連続腹腔投与を行った。対照群には生理食塩水を投与した。そして実験開始20日目に抗体産生細胞(以下PFCと略す)の検出をJemeらの方法に従って行った<sup>6)</sup>。なお、PFCの検出試験実施の4日前に、異種抗原として綿羊赤血球(日本生物材料センター、東京)1×10<sup>8</sup>個をマウス尾静脈に投与した。また、脾臓における総白血球数を、血球計算版を用いて測定した。

4. 統計解析

すべてのデータは平均±標準偏差で表した。IOW投与群と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。(図1)

結果

MMC-対照群のPFC数は333±130個/10<sup>6</sup>脾細胞であり、対照群(1,320±305個/10<sup>6</sup>脾細胞)に対して著しく低かった。しかしながら、

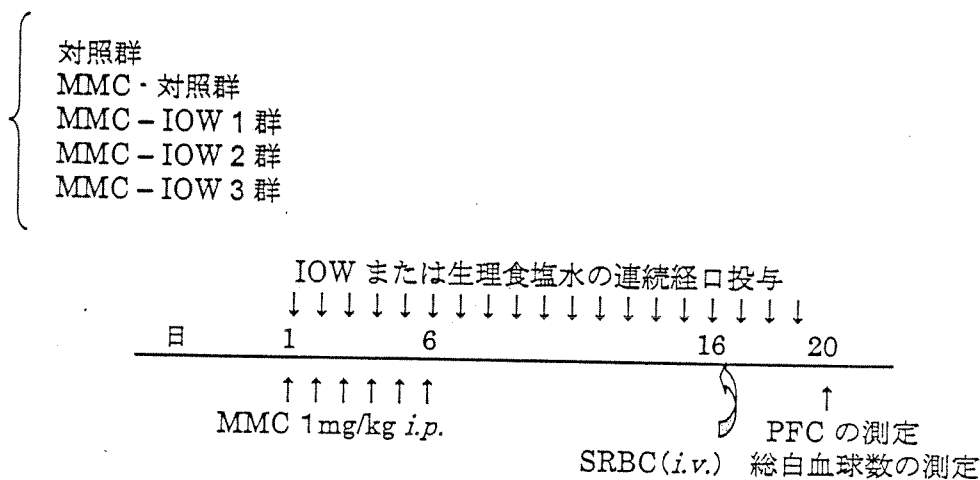


図1 本実験におけるスケジュール

本実験で使用した IOW 0.1、0.2 および 0.3 mL 投与した群の PFC 数は、それぞれ  $497 \pm 80$ 、 $462 \pm 204$ 、 $420 \pm 132$  個/ $10^6$  脾細胞であり、いずれの群においても MMC-対照群の PFC 数より多かった。特に MMC-IOW1 群においては有意な差が確認された ( $P < 0.05$ 、図2)。また、各群の総脾細胞数を測定した結果、チャージ投与群はそれぞれ  $154 \pm 36$  (MMC-IOW1 群)、 $136 \pm 39$  (MMC-IOW2 群)、 $92 \pm 48$  (MMC-IOW3 群)  $\times 10^6$  個/脾臓であり、MMC-対照群 ( $98 \pm 31 \times 10^6$  個/脾臓) よりも多く、MMC-IOW1 群において有意な差が見られた ( $P < 0.01$ 、図3)。

### 考 察

MMC 投与により誘導した免疫抑制マウスにおいて、IOW 投与群の PFC 数は、対照群に対して増加していることが確認された。6 日間の MMC 連続投与により、脾細胞の抗体産生能は完全に欠落していることから<sup>5)</sup>、IOW の投与はその免疫欠落状態からの早期回復を促したものと示唆される。また、MMC により

減少した総白血球数も、対照群に対して増加していることから、その経口摂取は抗体産生細胞において、量的かつ機能的に影響を及ぼしていることが示唆された。しかしながら、この作用は健常マウスにおいてはほとんど見られなかった。つまり、IOW の免疫賦活作用は、免疫抑制状態において、より強く発揮されることが示唆された。

一般的に、MMC は抗がん剤として臨床で用いられるが、それは副作用として、しばしば骨髄抑制による免疫抑制を引き起こす<sup>7,8)</sup>。このため、MMC を投与される個体はしばしば重篤な免疫抑制状態に陥る<sup>9)</sup>。それゆえに IOW は、その状態を軽減または改善できる薬食剤としての可能性が示唆され、今後はその抗体産生能の賦活メカニズムの解明およびその薬理活性本体の追及などに興味を持たれる。

### 文 献

- 1) 荒井綜合：機能性食品の研究；文部省科学研究費重点領域研究 320 成果報告集 1995

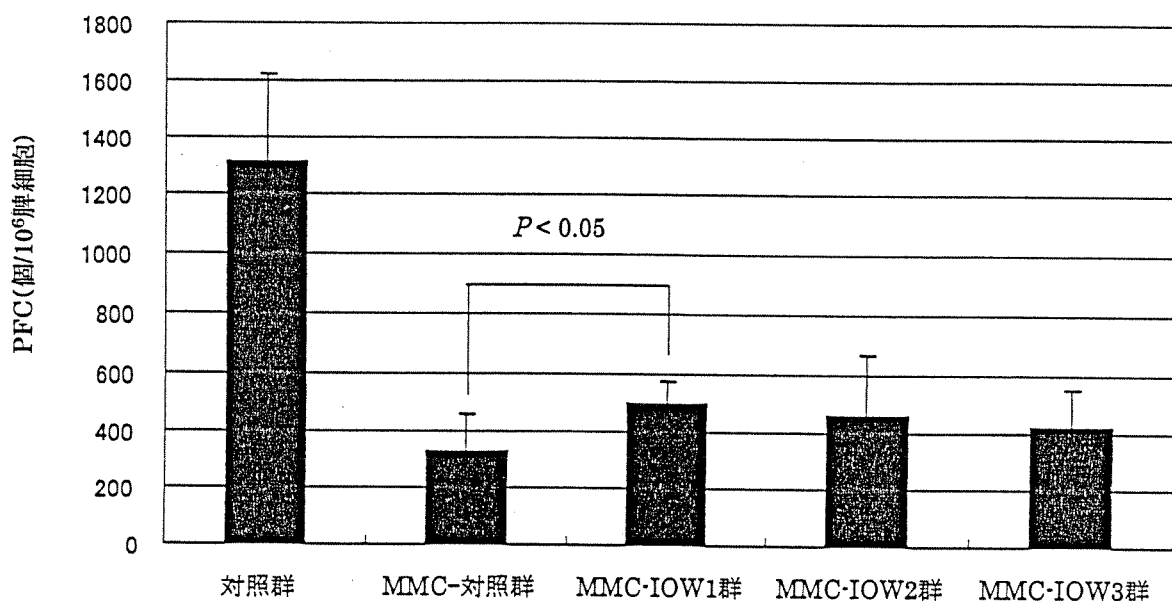


図2 MMC免疫抑制マウスのPFC形成能に及ぼす各IOW投与群における影響

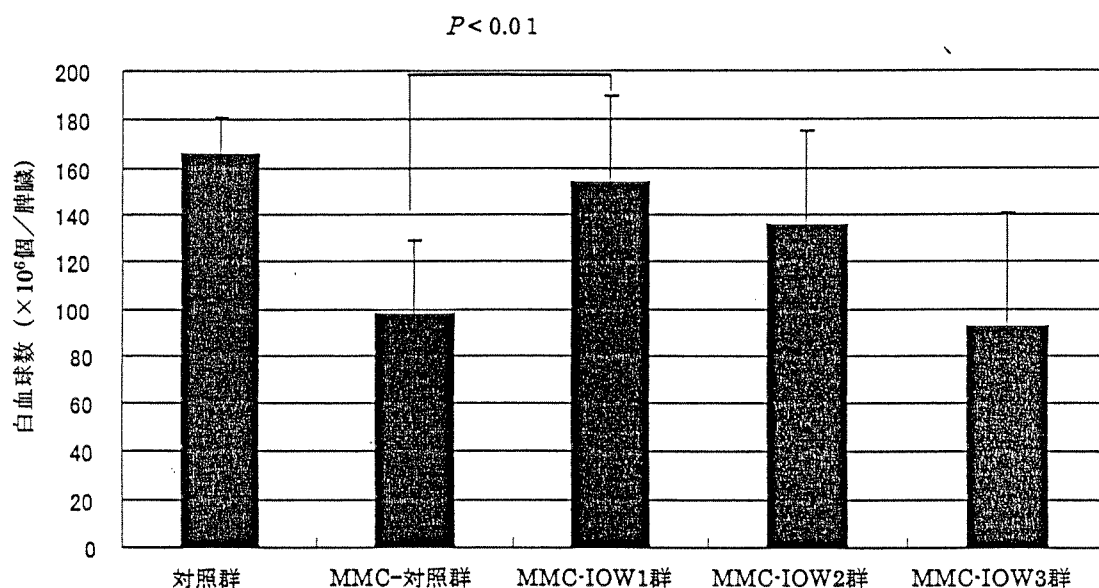


図3 MMC免疫抑制マウスの総白血球数に及ぼすIOWの影響

- 2) Kim YO, Park HW et al.: Anti-cancer effect and structural characterization of endo-polysaccharide from cultivated mycelia of *Inonotus obliquus*. *Life Sci* 79: 72-80 2006
- 3) Kim YO, Han SB et al.: Immuno-stimulating effect of the endo-polysaccharide produced by submerged culture of *Inonotus obliquus*. *Life Sci* 77: 2438-2456 2005
- 4) Takemoto N, Kiyohara H et al.: A novel type of B-cell mitogen isolated from juzen-taiho-to (TJ-48), a Japanese traditional medicine. *Int J Immunopharmacol.* 16 (11): 919-29 1994
- 5) 松葉慎太郎、松野栄雄、他: *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. *医学と生物学* 151(1): 15-20 2007
- 6) Jerne NH, Nordin AA: Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* 140: 405 1963
- 7) Sugiura K: Studies in a tumor spectrum. VIII: The effect of mitomycin C on the growth of a variety of mouse, rat, and hamster tumors. *Cancer Res* 19: 438 1959
- 8) Kanamori H, Shima T: Studies on antitumor activity of mitomycin. *J Antibiotics* 10: 120-7 1957
- 9) Edwards AJ, Bacon TH: Changes in the population of lymphocyte cells in human peripheral blood following physical exercise. *Clin Exp Immunol* 58: 420-7 1984

連絡先: 金沢医科大学代替基礎医学講座  
石川県河北郡内灘町大学1-1 (〒920-0293)、  
TEL: 076-218-8121、FAX: 076-286-2841

## Activation of Immunomodulation by Water Extract from *Inonotus obliquus* Observed in Antibody-producing Cells in Mitomycin C-induced Immunodeficient Mice.

Shintaro MATSUBA<sup>1</sup>, Hideo MATSUNO<sup>1</sup>, Masahiro SAKUMA<sup>2</sup>,  
Yasuhiro KOMATSU<sup>3</sup>, Nobuo Yamaguchi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Fundamental Research for CAM, Kanazawa Medical University

<sup>2</sup>Ishikawa Natural Medical Plants Research Center

<sup>3</sup>Sun R&D Institute for Natural Medicines Co; Inc.

### Summary

*Inonotus obliquus* distributed in forest of Russia and Northern Europe is a fungus being parasitic on white birch. We investigated effects of water extract of *I. obliquus* (IOW) on antibody producing cells in mitomycin C (MMC)-induced immunodeficient mice. IOW samples were administered orally for 19 days (0.1, 0.2, or 0.3 mL/day). MMC groups were treated with MMC (1 mg/kg/day) intraperitoneally for the initial 6 days along with the IOW administration. After the treatments, we examined the number of plaque forming cells (PFC) and total leukocytes in the spleen at the following day of the last oral administration. PFC was assayed by the Jerne method. Sheep red blood cell (SRBC) was used as an antigen, mice were received *i.v.* injection of  $1 \times 10^8$  SRBC before 4 days of the assay. The number of PFC per  $10^6$  spleen cells increased in the IOW groups as compared with the MMC-control. Total number of leukocytes in the spleen also increased. These results suggest that IOW augments the immune response on the spleen in MMC-induced immunodeficient mice.

**Key words :** *Inonotus obliquus*, mitomycin C, antibody producing cell

Address: Shintaro MATSUBA, Department of Fundamental Research for CAM, Kanazawa Medical University,  
1-1 Daigaku, Uchinada, Ishikawa, Japan., Tel : +81-76-218-8121; Fax : +81-76-286-2841