

【原著】

健康食品のアガリクスエキス及び椎茸菌糸エキスの マクロファージ機能に及ぼす効果

佐藤勝昌¹、佐藤誓子²¹ 神戸女子大学 家政学部² 神戸女子大学 健康福祉学部

(受付：平成 23 年 1 月 22 日)

(受理：平成 23 年 1 月 31 日)

要 旨

アガリクスエキス（アガリクス）及び椎茸菌糸エキス（LEM）のマクロファージ機能に及ぼす効果について、J774A.1 マウスマクロファージ様細胞株を用いて検討した。マクロファージをアガリクスあるいは LEM で 1 日処理した後、*Listeria monocytogenes* を感染させ、その後 3 時間に亘って培養した。リステリア菌の増殖はアガリクス及び LEM で処理されたマクロファージにおいて抑制された。アガリクス及び LEM はリステリア菌感染マクロファージからの活性酸素（ROI）の産生を増強させたが、活性酸化窒素（RNI）の産生は増強させなかった。今回の知見は、アガリクス及び LEM はマクロファージの抗リステリア活性を増強させる作用があることを示している。また、アガリクス及び LEM で誘導されたマクロファージの抗リステリア活性の発現において、ROI は RNI におけるよりも重要な役割を果たしていることが示唆された。

キーワード：アガリクスエキス、椎茸菌糸エキス、マクロファージ、ROI、RNI

目 的

宿主の免疫を増強させ、ガンを抑制・治癒させようとする研究はさまざまな形で行われてきている。これらの中でキノコ類の抽出物についての研究は古くから行われており¹⁾、既に医薬品として認可されているものもある。これらの医薬品は免疫力を増強させて抗腫瘍効果をあらわすものであるが、直接的に腫瘍細胞を攻撃するものではないことから、単独投与での効果は乏しいといわれている。

近年、高齢化の進展と国民の健康志向の高まりにより、食品の機能としての免疫能の亢進作用、疾患の予防・治癒作用、老化防止作用などが注目されるようになってきた²⁾。特に、ガンの治癒は極めて困難なことから、補完代替医療として免疫増強作用を有するとされる食品を自己責任で利用する例が多いことは周知の事実である³⁾。これらの食品は、一般的に「健康食品」という名称で呼ばれ、広く健康の保持増進に資

する食品として販売・利用されるもの全般を指している。これらの中には国が設定した安全性や有効性の規格基準を満たした食品を「保健機能食品」（特定保健用食品と栄養機能食品の 2 つのカテゴリーがある）と表示して販売が認められているものが含まれている。

今回は、抗腫瘍作用、免疫増強作用などを有すると報告されている⁴⁾¹⁾、保健機能食品ではない、いわゆる健康食品のアガリクス（ヒメマツタケ、カワリハラタケ）及び椎茸菌糸体からの各抽出物のマクロファージ機能に及ぼす効果について検討したので報告する。

材料と方法

1. 供試菌

Listeria monocytogenes EGD 株をトリプトソーヤ液体培地（日水製薬）中 37℃ で 18 時間培養し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄したのち、10% グリセリン加 PBS に浮遊させ、-80℃ に保

存した。用時に解凍し所定菌数に調製して用いた。

2. マクロファージ

J774A.1 マウスマクロファージ様細胞株 (American Type Culture Collection, USA) を 10% ウシ胎児血清 (FBS: Biowest, USA) 加 RPMI 1640 培地 (抗菌薬非含有: 和光純薬) 中 37°C で 5 日培養した。その後、PBS で洗浄し、トリプシン処理後に 2% FBS-ハンクス液 (HBSS) で細胞を回収した。遠心洗浄後、10% FBS-RPMI 1640 培地に細胞を浮遊させ、 2.5×10^5 cells/ml に調製した。

3. 健康食品

小林製薬株式会社より分与されたアガリクスエキス (アガリクス) 及び椎茸菌糸エキス (LEM) を供試した。アガリクスは乾燥 *Agaricus blazei* Murill の熱湯抽出物をデキストリンを担体として粉末化されたものである。LEM は *Lentinula edodes* 7911 株を培養して得られた菌糸体 (*L. edodes* mycelia) の熱湯抽出物を粉末化されたものである。いずれの食品も PBS で 20 mg/ml に調製後、濾過 (0.2 μ m) したものを使用した。

4. マクロファージの形態変化

細胞液の 1 ml を予めプラスチックシート (和光純薬) を入れた 24 well 組織培養用プレート (Becton Dickinson, USA) に入れ、5% CO₂ 下、37°C で 18 時間培養した。その後、2% FBS-HBSS で洗浄したのち、各種濃度のアガリクス、LEM、及び lipopolysaccharide (LPS、大腸菌 O111 由来: 和光純薬) を含む 2% FBS-RPMI 1640 培地の 1 ml を加え、5% CO₂ 下、37°C で 2 日間に亘って培養した。所定日に well 内からプラスチックシートを抜き取り、PBS で洗浄した後にメタノール固定し、ギムザ染色後に顕微鏡下で細胞の形態を観察 (1 シートあたり 300 細胞) した。

5. 抗リステリア活性

細胞液の 0.2 ml を 96 well 組織培養用プレート (Becton Dickinson, USA) に入れ、5% CO₂ 下、37°C、18 時間培養した。その後、2% FBS-HBSS で洗浄したのち、1 mg/ml 濃度の上述の食品を含む 2% FBS-RPMI 1640 培地の 0.2 ml を加

え、5% CO₂ 下、37°C で培養した。1 日後、2% FBS-HBSS で洗浄した後、2% FBS-RPMI 1640 培地に浮遊させたリステリア菌 (1×10^4 CFU/ml) の 0.2 ml を加え、5% CO₂ 下、37°C で培養した。3 時間後、0.23% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) の 80 μ l を well 内に添加して細胞を溶解させた後、全量を 20% ウシ血清由来アルブミン (BSA: 和光純薬) -PBS (120 μ l) 入りの試験管に回収した。その後、トリプトソーヤ寒天培地 (日本製薬) を用いて生菌単位 (CFU) を測定した。

6. 活性酸素 (Reactive Oxygen Intermediates, ROI) 産生能

マクロファージの ROI 産生能はリステリア菌で刺激されたマクロファージからの O₂⁻ 遊離量を指標として測定した。細胞液の 0.2 ml を 96 well 組織培養用プレートに入れ、5% CO₂ 下、37°C、18 時間培養した。その後、2% FBS-HBSS で洗浄したのち、1 mg/ml 濃度の上述の食品を含む 2% FBS-RPMI 1640 培地の 0.2 ml を加え、5% CO₂ 下、37°C で培養した。1 日後、HBSS (フェノールレッド不含) で洗浄した後に、同液で溶解したリステリア菌 (1×10^7 CFU) を含む 80 μ M cytochrome C (和光純薬) の 0.2 ml を加えた。37°C で 60 分培養後、上清の OD を測定して O₂⁻ 活性を求めた^{12,13)}。

7. 活性酸化窒素 (Reactive Nitrogen Intermediates, RNI) 産生能

マクロファージの RNI 産生能はマクロファージの培養上清中に遊離された NO₂⁻ 量として測定した。上述の O₂⁻ 活性の測定と同様にアガリクス及び LEM 含有培地で 1 日培養した。その後、2% FBS-HBSS で洗浄した後に、2% FBS-RPMI 1640 培地に浮遊させたリステリア菌 (1×10^7 CFU) の 0.2 ml を加え、5% CO₂ 下で培養した。37°C で 3 時間培養後、培養上清を回収して Griess 法で NO₂⁻ 量を測定した¹²⁾。

8. 統計処理

有意差検定は多重比較法 (Dunnett 法) で行った。

結 果

1. マクロファージの形態変化に及ぼすアガリク

ス及び LEM の効果

表 1 にはアガリクス及び LEM で 2 日間に亘って処理されたマクロファージの形態変化を起こした細胞の割合を示した。供試細胞株は LPS によって 90% 以上が元の円形の形態から偽足を伸展させた形態へと変化した。同様な変化は、アガリクス及び LEM においても観察されたが、このような細胞の割合は LPS における場合と比較すると少なかった。

表 1. アガリクス及び LEM 処理によるマクロファージの形態変化

処理	濃度 (mg/ml)	処理日数における細胞の形態変化 (%) ^{a)}		
		0 日	1 日	2 日
-	-	8.1 ± 2.1	4.1 ± 1.3	5.4 ± 1.6
LPS	0.001	-	92.8 ± 4.6 ^{b)}	93.3 ± 5.3 ^{b)}
アガリクス	0.1	-	12.0 ± 3.3	12.3 ± 5.3
	0.5	-	23.9 ± 3.3 ^{b)}	29.3 ± 6.5 ^{b)}
	1	-	30.6 ± 3.2 ^{b)}	33.7 ± 5.0 ^{b)}
LEM	0.1	-	16.7 ± 3.5	22.7 ± 6.6
	0.5	-	22.3 ± 6.0 ^{b)}	23.4 ± 4.6 ^{b)}
	1	-	27.8 ± 4.8 ^{b)}	26.4 ± 3.7 ^{b)}

a) Mean ± SE (n=5)

b) 非処理対照群と有意差あり (p<0.05)。

2. マクロファージの抗リステリア活性におけるアガリクス及び LEM の効果

表 2 にアガリクス及び LEM で処理されたマクロファージのリステリア菌増殖抑制効果を示した。アガリクス及び LEM のいずれで処理されたマクロファージにおいても、リステリア菌感染 3 時間後の生菌単位は増加したが、その増殖の程度は非処理細胞におけるよりも少ない傾向が認められた。

表 2. アガリクス及び LEM 処理マクロファージのリステリア菌増殖抑制効果

処理	濃度 (mg/ml)	CFU (%) ^{a)}	
		0h	3h
-	-	100 ± 5.2	142.4 ± 9.4
アガリクス	1	-	127.1 ± 12.0
LEM	1	-	128.4 ± 10.5

a) Mean ± SE (n=6)

3. マクロファージの ROI 及び RNI 産生におけるアガリクス及び LEM の効果

アガリクス及び LEM 処理マクロファージによる抗リステリア活性の発現における ROI と RNI の役割を知るために、マクロファージの ROI 及び RNI 産生におけるアガリクス及び LEM の効果を、それぞれ O₂⁻ 活性と NO₂⁻ 活性を指標として検討した。

表 3 に示したように、マクロファージのアガリクス及び LEM 処理は、対照群と比較して有意にリステリア菌刺激 O₂⁻ 産生を増強させた。この増強はアガリクスと LEM においては同様な効果を示した。対照実験として、この実験系に 1000 U/ml の superoxide dismutase (SOD: MP Biomedicals, USA) を添加した場合には、基質である cytochrome C に色調変化を生じさせなかった。これは本実験系の cytochrome C の色調変化がマクロファージから遊離された O₂⁻ によるものであることを示している。

表 3. アガリクス及び LEM 処理マクロファージのリステリア菌刺激による ROI 産生能

処理	濃度 (mg/ml)	O ₂ ⁻ 産生 (nmole) ^{a)}
-	-	0.56 ± 0.05
アガリクス	1	0.94 ± 0.04 ^{b)}
LEM	1	0.92 ± 0.01 ^{b)}

a) 組織培養用プレートの well あたりに示した (Mean ± SE, n=6)。

b) 非処理対照群と有意差あり (p<0.05)。

供試細胞をアガリクス及び LEM で処理してリステリア菌を感染させた場合の RNI 産生の増強については、今回の実験系では認めることができなかった。

考 察

今回の検討では、予備実験より供試細胞株は LPS 処理で、その形態を著しく変化させること、即ち元の円形の形態から偽足を伸展させた形態へと変化することが分かった。そこで、免疫増強剤としての効果の有無をスクリーニングするために、この形態変化を利用した。その結果、

表 1 に示したように、アガリクス及び LEM は LPS の効果ほどではないものの、濃度依存性にある程度の割合でマクロファージ機能を増強させる可能性が示唆された。

アガリクスあるいは LEM でマクロファージを前処理することによって、マクロファージはリステリア菌の増殖を抑制させることが分かった。今回の実験系では、この活性発現には ROI の関与が大であることが示唆された。既に我々は、アガリクス及び LEM と同様のキノコからの抽出物であるクレスチン (PSK) のマクロファージ機能に及ぼす効果とリステリア感染抵抗性増強効果について検討しており、PSK で誘導されたマウス腹腔マクロファージは対照マクロファージにおける場合と比較して、ラテックス貪食能、ライソソーム酵素活性、及び ROI 産生能を亢進させること、またマウスに PSK を腹腔内投与することによってリステリア菌感染に対する抵抗性を増強させることを報告している^{14, 15)}。今回の結果から考えて、キノコ類の抽出物には共通的にマクロファージ機能を亢進させる活性があることが示唆される。

今回の検討では、アガリクス及び LEM にマクロファージの RNI 産生を増強させる作用は認められなかった。従って、アガリクス及び LEM で誘導されたマクロファージの抗リステリア活性の発現において、ROI は RNI におけるよりも重要な役割を果たしているかもしれない。

我々は結核菌を感染させたマウス腹腔マクロファージにおいて、ROI は感染早期 (3 時間まで) に産生されるが、RNI は感染 3 時間以降に産生され始めることを報告¹⁶⁾している。リステリア菌は結核菌と同様に細胞内寄生菌ではあるものの、両者は菌種が異なることと増殖速度が遥かに違うことから、一概には言えないが、今回の RNI 産生の測定系を結核菌における場合と同様に更に長時間にすれば、あるいは RNI 産生の増強が認められたかも知れない。この点に関しては今後の検討課題である。

我が国の死亡原因のうち、悪性新生物は第 1 位で肺炎も上位を占めているが、この背景には高齢化が大きく影響している。即ち、加齢に伴っ

て個体の免疫能が低下し、これがガンや感染症の増加を招来させている可能性が強く示唆されている^{17, 18)}。また、高齢者はいろいろな要因によって低栄養に陥ることが多いが、これは免疫能低下の重要な危険因子である¹⁹⁾。このような状況下において、補完代替医療あるいは健康の保持増進のために健康食品を利用する人は多いが、健康食品の効果に関するエビデンスは乏しいのが現状である。

今回の知見は、アガリクス及び LEM には、宿主の免疫能を増強させる効果があることを示唆するものと思われる。

文 献

- 1) 井上良計：アガリクスブルゼイの機能と食品への利用. 月刊フードケミカル **6**: 62-67 1996
- 2) 松井輝明：食の安全と疾病－機能性食品と食の安全. 医学のあゆみ **211**: 801-803 2004
- 3) 鈴木信孝：サプリメントの臨床医学への応用. 日薬理誌 **131**: 252-257 2008
- 4) 伊藤 均：ヒメ (姫) マツタケ (岩出 101 株) [学名：*Agaricus blazei Murrill*] の抗腫瘍効果と生物活性. *Biotherapy* **14**: 1009-1015 2000
- 5) Ito H, Shimura K, et al.: Antitumor effect of a new polysaccharide-protein complex (ATOM) prepared from *Agaricus blazei* (Iwade strain 101) “*Himematsutake*” and its mechanisms in tumor-bearing mice. *Anticancer Res* **17**: 277-284 1997
- 6) 江口文陽：いま注目されるきのこの機能. 森林科学 **30**: 31-37 2000
- 7) Murakawa K, Fukunaga K, et al: Therapy of myeloma in vivo using marine phospholipid in combination with *Agaricus blazei* Murill as an immune respond activator. *J Oleo Sci* **56**: 179-188 2007
- 8) 山崎寛生, 川西 貴, 他：実験的肺転移モデル (B16F10) を用いた *Lentinus edodes* mycelia の抗腫瘍効果に関する検討.

- Biotherapy **17**: 467-472 2003
- 9) Kawanishi T, Ikeda-Dantsuji Y, et al.: Effects of two basidiomycete species on interleukin 1 and interleukin 2 production by macrophage and T cell lines. *Immunobiol* **215**: 516-520 2010
- 10) Kojima H, Akaki J, et al.: Structural analysis of glycogen-like polysaccharides having macrophage-activating activity in extracts of *Lentinula edodes* mycelia. *J Nat Med* **64**: 16-23 2010
- 11) 松村治雄, 寺田泰比古, 他: *Lentinus edodes* mycelia (シイタケ菌菌糸) 水溶性抽出物のマウスマクロファージに対する作用と細菌感染防御効果. *日本網内系学誌* **27**: 201-207 1987
- 12) Sato K, Akaki T, et al.: Differential potentiation of anti-mycobacterial activity and reactive nitrogen intermediate-producing ability of murine peritoneal macrophages activated by interferon-gamma (IFN- γ) and tumour necrosis factor-alpha (TNF- α). *Clin Exp Immunol* **112**: 63-68 1998
- 13) Johnston RB Jr, Dodzik CA, et al.: Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J Exp Med* **148**: 115-127 1978
- 14) 齋藤 肇, 佐藤勝昌, 他: PSK のマクロファージ機能に及ぼす効果. *医学と生物学* **108**: 193-196 1984
- 15) Saito H, Tomioka H, et al.: PSK, a polysaccharide from *Coriolus vesicolor*, enhances oxygen metabolism of murine peritoneal macrophages and the host resistance to listerial infection. *J Gen Microbiol* **134**: 1029-1035 1988
- 16) Akaki T, Tomioka T, et al.: Comparative roles of free fatty acids with reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates in expression of the antimicrobial activity of macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol* **121**: 302-310 2000
- 17) 安田尚史, 永田正男: 高齢者と免疫機能. *Surgery Frontier* **15**: 67-75 2008
- 18) 寺本信嗣, 川島正裕, 他: 高齢者の一般的, 免疫学的特徴. *アレルギー・免疫* **17**: 364-368 2010
- 19) 大荷満生: 高齢者の栄養障害 - 自立障害予防のための栄養評価. *医学のあゆみ* **218**: 501-505 2006

連絡先: 佐藤勝昌
 神戸女子大学 家政学部
 神戸市須磨区東須磨青山 2-1 (〒 654-8585)
 Tel: 078-737-2022
 E-mail: satok@suma.kobe-wu.ac.jp

Effects from Extracts of Health Products *Agaricus blazei* Murill and *Lentinula edodes* mycelia on Macrophage Function

Katsumasa SATO¹, Chikako SATO²

¹ Faculty of Home Economics, Kobe Women's University

² Faculty of Health and Welfare, Kobe Women's University

Summary

We studied the effects of *Agaricus blazei* Murill (*Agaricus*) and *Lentinula edodes* mycelia (LEM) extracts on macrophage function using J774A.1 mouse macrophage-like cells. The macrophages were pretreated with either *Agaricus* or LEM for 1 day, followed by an infection with *Listeria monocytogenes*, and subsequently, cultured for 3 hours. The growth of *L. monocytogenes* was suppressed in *Agaricus*- or LEM-treated macrophages. *Agaricus* and LEM enhanced the production of reactive oxygen intermediates (ROI) in macrophages infected with *L. monocytogenes*; however, neither agents increased macrophage release of reactive nitrogen intermediates (RNI) after infection. Therefore, the present findings show that *Agaricus* and LEM potentiated the antilisterial activity of macrophages. Furthermore, it suggests that ROI play a more important role than RNI in the expression of macrophage antilisterial activity induced by *Agaricus* and LEM.

(Med Biol **155**: 182-187 2011)

Key words: *Agaricus blazei* Murill, *Lentinula edodes* mycelia, Macrophages, ROI, RNI

Correspondence address: Katsumasa SATO
Faculty of Home Economics, Kobe Women's University
2-1, Aoyama Higashi-suma, Suma-ku, Kobe 654-8585, Japan
Tel: 078-737-2022
E-mail: satok@suma.kobe-wu.ac.jp