

霊芝の P388 白血球細胞への抑制作用

(日本国 和漢生薬研究所、中国 復旦大学放射医学研究所)

要約 霊芝のマウス P388 細胞への抑制作用及びそのメカニズム。方法 霊芝をマウス骨髄細胞の培地に入れ、顆粒系の CFU-G (コロニー) と赤血球系 CFU-E (コロニー) 生成への影響を観察する。ELISA 法と MTT 法で霊芝のマウス腹腔マクロファージと培養した上澄み中の TNF- α の活性及び P388 白血病細胞増殖への抑制作用を測定し、Tunel 法で上澄みの P388 細胞のアポトシスへの促進作用を分析する。結果 霊芝はコロニー因子依存の骨髄 CFU-G (colony-forming unit granulocyte) と CFU-E (colony forming unit of erythroid) の産生を促進する働きがある。霊芝エキスとマウスのマクロファージ共同培養の上澄みは P388 細胞への抑制作用は霊芝単独より明らかに強い、また、この上澄みは P388 のアポトシスの促進作用を有することも検証された。アポトシス反応は上澄み中の TNF- α の活性化に関連していると思う。結論 霊芝は P388 細胞の増殖を抑制、アポトシスを促進する作用がある、さらに、造血促進作用によって白血病の治療には、良好な補助効果があると思う。

キーワード 霊芝 ; P388 細胞 ; マウス腹腔マクロファージ ; TNF- α ; MTT 法

骨髄抑制副作用は、白血病の治療過程中、治療効果や抗がん剤投与量などを影響する主要な原因である。各国の研究者たちは、白血病細胞の増殖を抑制、骨髄コロニー因子を促進、骨髄の造血機能を高める治療薬あるいは、天然類生薬の開発に頭を悩まされている。以前の研究データによると、霊芝は生体免疫防御と監視機能を促進すると同時に、腫瘍マウス血中免疫因子を調節することによって、腫瘍細胞の成長を抑制する作用がある^[1]。本研究では、霊芝の骨髄造血作用及び P388 細胞への影響を検討し、霊芝を白血病治療の補助薬としての動物実験である。

1. 材料と方法

1.1 実験材料 動物マウス : DBA、♂♀各半分、6 週齢、中国アカデミー実験動物センターより提供 ; 細胞株 : マウス P388 白血病細胞、中国アカデミー細胞センターにより提供。霊芝エキス、和漢生薬研究所 (日本) により提供。霊芝溶液の作成 : 霊芝エキスを生理食塩水に入れ、80 度水浴に 2 時間振動し、1500r/min 遠心分離を 10 分間にかけて、上澄みを取り出し、0.22 μ m フィルタでろ過し、4 度に保存する。LPS、Tunel キット、MTT、アメリカ Sigma 社。TNF- α キット、上海晶美バイオエンジニアリング社。遺伝子組み換え G-CSF (granulocyte colony stimulating factor)、日本 Kirin ビール。遺伝子組み換え EPO、アメリカ AMGEN 社。

1.2 実験方法

1.2.1 霊芝の CFU-G 及び CFU-E への影響の測定

マウス骨髄単細胞混濁液で、CFU-G と CFU-E 系を作成する。CFU-G 系に rhG-CSF 0.25 μ g/ml、CFU-E 系に rhEPO 1IU/ml を含む。実験組に異なる濃度の霊芝溶液を加え、濃度によって 3 組に

分け、対照組に普通の培養液を入れ、各組 3 プレートを作成、37 度、5%CO₂、飽和湿度インキュベーター培養後、倒立顕微鏡でコロニーを計数する。

1.2.2 マウス腹腔マクロファージと霊芝エキス培養の上澄みの作成

マウスの腹腔マクロファージを採取し、24 穴のプレートに入れ、4 時間後に温 Hanks 液で浮遊状態の細胞を 3 回洗い流し、異なる濃度の霊芝溶液と 5 μg/ml の LPS 各 500 μl、対照組に等量の RPMI-1640 を代わりに加え、48 時間培養し、上澄みを取り出し、0.22 μm フィルタでろ過し、-20 度で保存する。

1.2.3 霊芝の P388 白血病細胞に対する影響の測定 (MTT 法)

P388 細胞を 2×10⁵/μl にし、50 μl/穴、96 穴のプレートに接種し、異なる濃度の霊芝溶液 50 μl を加え、対照組は RPMI-1640 のみ。同じ条件で、96 穴のプレートに P388 細胞を接種し、異なる霊芝溶液とマクロファージ共同培養の上澄み 50 μl、対照組には、マクロファージ培養液の上澄みを加える。二つプレートを 37 度、5%CO₂、飽和湿度培養ケースで 48 時間培養してから、各穴に 5mg/ml の MTT10 μl を入れ、さらに 4 時間培養し、各穴に酸性化イソプロバノール 100 μl を加え、十分に振動したうえで、各穴の光密度を測る (595nm)。

$$\text{細胞増殖抑制率} = \frac{\text{対照組 OD 値} - \text{投薬組 OD 値}}{\text{対照組 OD 値}} \times 100\%$$

1.2.4 P388 細胞のアポトーシスの測定

P388 細胞 2×10⁶/μl を 24 穴プレートに 500 μl 接種し、異なる濃度の霊芝溶液 500 μl を加え、対照組には霊芝溶液を加えない。これを A プレートとする。もう一枚プレートを B とする。B プレートに上述と同じ条件で細胞を入れ、異なる霊芝溶液とマクロファージ共同培養の上澄み 500 μl を加え、対照組を設ける。A,B 両プレートを 37 度 5%CO₂、飽和湿度インキュベーターで 72 時間培養し、各穴の細胞を Tunel キットでアポトーシス率が測られる。

1.2.5 腫瘍壊死因子 (TNF-α) 活性の測定

標準 TNF-α で、LPS 刺激されたマクロファージと霊芝溶液共同培養の上澄み中の TNF-α 測定曲線を作成したうえで霊芝溶液とマクロファージ共同培養の上澄み中の TNF-α の活性を測定する。

2. 結果

2.1 霊芝とマクロファージ共同培養の上澄みの P388 細胞増殖への影響

20 μg/ml 霊芝とマクロファージ共同培養の上澄みの P388 細胞増殖に対する抑制率は 25% に対して、単独霊芝で培養した場合の抑制率は 3.5%。共同培養の上澄みは P388 白血病細胞の増殖に対して抑制作用を有する (表 1)。

表 1. 霊芝とマクロファージ共同培養の上澄みの P388 細胞増殖への影響

組別	霊芝濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	OD 値		抑制率%	
		A	B	A	B
対照組	0	0.513 \pm 0.014	0.487 \pm 0.017	0	0
実験組	4	0.493 \pm 0.016	0.487 \pm 0.008	3.8	8
	20	0.495 \pm 0.007	0.364 \pm 0.014*	3.5	25
	100	0.436 \pm 0.012*	0.375 \pm 0.009*	15	23
	500	0.336 \pm 0.009*	0.277 \pm 0.014**	34.5	43

対照組と比べ： *P<0.05 **P<0.01

A は霊芝溶液が含まれている培養液を使用、対照組は霊芝溶液が含まれない培養液を使用。

B は霊芝溶液とマクロファージ共同培養の上澄み、対照組はマクロファージ単独培養の上澄みを使用。

2.2 霊芝とマクロファージ共同培養の上澄みの P388 細胞アポトーシスに対する影響

対照組と霊芝単独培養各組は P388 細胞のアポトーシスに対して影響はなかった。霊芝とマクロファージ共同培養の上澄みで P388 細胞と 48 時間培養すると対照組アポトーシス率は 7%に対して 100 $\mu\text{g/ml}$ 、1000 $\mu\text{g/ml}$ 上澄み組のアポトーシス率は、22%と 16%であり、顕著な差がある。実験により、霊芝共同培養の上澄みは P388 白血病細胞のアポトーシスを促進する作用を有する(表 2、図 1、図 2)。

表 2. 霊芝とマクロファージの培養液の P388 細胞アポトーシスへの影響

組別	霊芝濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	アポトーシス率%	
		A	B
対照組	0	7 \pm 1.47	7 \pm 1.47
実験組	1	7 \pm 1.63	5 \pm 1.93
	10	6 \pm 2.34	10 \pm 2.39*
	100	9 \pm 1.89	22 \pm 2.56**
	1000	8 \pm 1.76	16 \pm 1.67**

対照組と比べ： *P<0.05 **P<0.01

A は霊芝溶液が含まれている培養液を使用、対照組は霊芝溶液が含まれない培養液を使用。

B は霊芝溶液とマクロファージ共同培養の上澄み、対照組はマクロファージ単独培養の上澄みを使用。

2.3 霊芝とマクロファージ共同培養の上澄み中の TNF- α 活性の測定

マウス TNF- α ELISA キットを用いて、酵素標識機で OD₄₅₀ 値を測定した結果、霊芝はマウスのマクロファージの産生を促進する働きがある。特に 10 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 組の場合は対照組に比べ、顕著な差があった(表 3)。

表3. 霊芝とマクロファージ共同培養の上澄み中の TNF- α 活性の測定

組別	霊芝濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	OD 値	TNF- α の活性 (pg/ml)
対照組	0	8 \pm 0.9	58
実験組	0.1	8 \pm 0.8	58
	1	12 \pm 1.4*	70
	10	50.9 \pm 0.8**	127
	100	51.6 \pm 1.4**	130
	1000	21.8 \pm 4.9*	107

対照組と比べ：*P<0.05 **P<0.01

2.4 霊芝のマウス骨髄細胞 CFU-G と CFU-E 生成への影響

マウスの骨髄細胞を用いて、コロニー法で霊芝の造血系への影響を分析する。対照組の培養液中にコロニー刺激因子を入れ、霊芝組は、対照組と同様にコロニー刺激因子を入れ、さらに異なる濃度の霊芝を加えて培養し、測定する（表4）。上澄み入れ組は対照組よりマウス骨髄細胞 CFU-G と CFU-E 生成を刺激する働きがあり、造血機能に対する促進作用があると考えられている。

表4. 霊芝のマウス骨髄細胞 CFU-G と CFU-E 生成への影響

組別	霊芝濃度 $\mu\text{g/ml}$	コロニー数	
		CFU-G	CFU-E
対照組	0	36.4 \pm 5.7	88.3 \pm 7.5
実験組	25	44.1 \pm 6.2*	94.3 \pm 4.8*
	50	48.6 \pm 6.0**	101.4 \pm 5.2**
	100	50.4 \pm 5.5**	103.3 \pm 7.0**

対照組と比べ：*P<0.05 **P<0.01

3. 検討

白血病の治療は、化学療法を第一の選択肢として行われているが、多くの抗がん剤は骨髄抑制の副作用があるため、治療失敗の原因となる。今のところ抗がん剤による骨髄抑制の治療は、造血コロニー刺激因子がよく使用されている。しかし、造血コロニー刺激因子は、非常に高価なもので、白血病細胞に対して抑制作用を有しない、一部の研究者の間では、造血コロニー刺激因子は白血病細胞を刺激するのではないか、という声もあるため^{2,3)}、短期間の投与が勧められている。

各国の研究者は、腫瘍細胞の増殖を抑制、造血機能を促進という機能をもつ薬物の研究開発に全力を注いでいる。賈永鋒ら⁴⁾の研究によると、霊芝は正常マウスと骨髄抑制されているマウスの造血機能を促進し、末梢血液の白血球数及びヘモグロビン濃度を増やす作用を有する。また、陳雪華、朱正綱の研究⁵⁾では、霊芝が腫瘍細胞の増殖に対して抑制効果が現れた。

本研究で、霊芝はコロニー刺激因子に依存する骨髄細胞コロニーの生成を促進し、CFU-G と CFU-E コロニーを増加させ、骨髄への造血促進作用を有することが確認された。さらに、P388 白血病細胞に対して増殖の抑制とアポトーシスの促進作用も見出した。

我々以前の研究、分析から、霊芝中の有効成分、各種ヘテロβ-D-グルガン及びこれらのタンパク複合体やガノデリン酸類 (B,D,F,H,K,S,Y)、ガノデラール A、ガノデリオール A,B などは、腫瘍細胞に対して、抑制作用がある。本実験で、培地に霊芝のみ加える組の場合は、P388 細胞のアポトーシス誘導作用が見られなかったが、マクロファージと共同培養の上澄みで培養した場合は、P388 細胞増殖の抑制とアポトーシス誘導作用共に見られた。これは、霊芝とマクロファージ共同培養によって、生理活性物質が多く作られた結果であった。特に、TNF-α は明らかに対照組より多い。TNF-α は一種非常に重要な免疫調節因子であり、腫瘍細胞の生長抑制及び細胞傷害作用、IL-1、IL-6、IL-8、IFN-γ 産生の誘導、IL-2 受容体の expression の促進などの働きがある^[6,7,8]。

上述の研究結果から、霊芝の投与で白血病細胞生長の抑制、白血病細胞アポトシスの促進、免疫の増強、造血機能の向上など総合効果が現われ、霊芝を腫瘍治療の補助薬として利用価値があると考えている。

図1 対照組

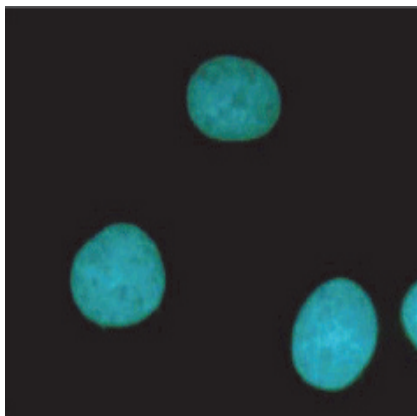
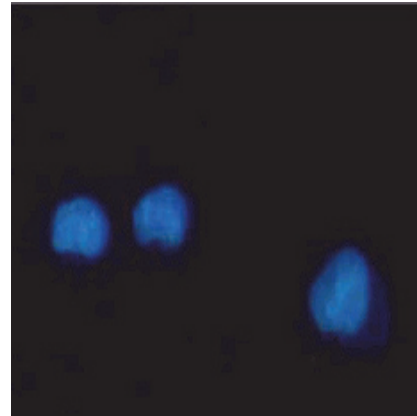


図2 霊芝組



霊芝投与による P388 白血病細胞のアポトーシスの誘発

参考文献

1. 張 群豪、林 志杉等. 靈芝多糖 GL-B の腫瘍抑制作用とメカニズムの研究。中国中西医结合誌, 1999, 544-547
2. Iateaq Ahmed Shameem, Hiroaki Kurisu, Hidiyasu Matuyama E et al. Direct and indirect effects of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor on in vitro colony formation of human bladder cancer cells. *Cancer Immunol Immunother*, 1994,38:353-7
3. Kataro Segawa, Yoshio Ueno and Tateshi kataoka. In vivo tumor growth enhancement by granulocyte colony-stimulation factor. *Jpn J Cancer Res*,1991,82,440-447
4. 賈 永鋒等. 靈芝の Maus 造血系への影響. 上海医科大学出版社, 1994, 52-56
5. 陳 雪華、朱 正綱. 靈芝孢子粉の HAC 肝臓がんマウスの抗腫瘍の実験研究. 上海免疫学誌, 2000, 20(2) : 101-103
6. Malroni w, Rainaldi G, Tritarelli E et al. Tumor necrosis factor is a powerful apoptotic induce in lymphoid leukemic cells expressing the p-170 glycoprotein. *Int J Cancer*, 1996, 67: 238-47
7. Rawadi G, Roman-Roman S, Castego M et al. Effect of mycoplasma fermentans on the myelomonocytic lineage. *J Immunol*, 1996, 156: 670-8
8. Zou W, Bar-Shavit Z. Dual modulation of osteoclast differentiation by lipopolysaccharide. *J Bone Miner Res*, 2002, 17(7): 1211-8