

原著

# 肝類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

Effect of Extract of Cultured *Lentinus edodes mycelia* (LEM)  
on Platelet Activating Factor Synthesis from Mouse Hepatic  
Sinusoidal Endothelial Cells

溝口 靖紘 市川 裕三 河田 則文<sup>1)</sup>

Yasuhiro MIZOGUCHI Yuzo ICHIKAWA Norifumi KAWADA<sup>1)</sup>

## 緒言

肝類洞内皮細胞は肝類洞壁細胞の1つとして Disse 腔を介して肝細胞索を肝類洞から隔て肝類洞腔の全周を取り巻く細胞である。この肝類洞内皮細胞の形態と機能に関する話題は肝臓病学における最近のトピックスであり、肝類洞血液と肝細胞間の物質交換や、肝内微小循環系における役割が指摘されている。

ところで、肝類洞内皮細胞から種々のサイトカインや chemical mediator を産生することが報告されている<sup>1) 2)</sup>。とくにこの中には免疫反応に関与するインターロイキン1 (IL1) や炎症反応に関与するアラキドン酸代謝産物も含まれている。また、現在最も強力な血小板凝集因子であるとされる血小板活性化因子 (PAF) が肝類洞内皮細胞から産生されることを著者らは見つけた<sup>3)</sup>。この PAF は最近ではむしろ chemical mediator として注目をあび<sup>4)</sup>、アラキドン酸代謝産物の1つであるロイコトリエン B<sub>4</sub> の産生を誘導して<sup>5)</sup>、アラキドン酸カスケードに関与するとともに、IL1 産生増強を介して免疫反応にも関与している<sup>6)</sup>。すなわち、PAF は肝類洞壁細胞に

おける種々のネットワークの調節に大きな役割を果たしていると考えられる。

さて、シイタケ菌糸体 *Lentinus edodes mycelia* 培養抽出エキス (LEM) に免疫調節作用があることがわかり<sup>7) 8)</sup>、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。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<sup>9)</sup>。また、LEM には免疫性肝障害を抑制し、肝細胞膜保護作用および抗炎症作用もあることが知られている<sup>7)</sup>。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肝の局所における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、LEM の肝における調節作用の機序を解析するため、今回は免疫反応およびアラキドン酸カスケードに関与し、肝類洞内皮細胞から産生される PAF について LEM のおよぼす影響について検討した。

## 材料と方法

### 1. 材料

マウスは BALB/c マウス (6 週齢雄) を用い、

1) 医, 大阪市立大学医学部第3内科, 大阪

1) M. D., The Third Department of Internal Medicine, Osaka City University Medical School, Osaka

日本クレア社から購入した。マウス肝類洞内皮細胞を分離する際に用いた pronase E は Merck 社から、collagenase type IV は和光純薬から、N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-etanesulfonic acid (HEPES) と、metrizamide (2-[3-acetamido-5-N-methyl-acetamido-2, 4, 6-triiodobenzamido]-2-deoxy-D-glucose) は Sigma 社から、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodiumsalt は和光純薬からそれぞれ購入した。Calcium ionophore (CaI) A23187および Tyrode は Sigma 社から購入した。

なお、P A F 標準品としては小野薬品工業より供与された ONO-6002を使用した。

L E Mの調製法は sugar cane bagasse に脱脂米糠を加えた人工固体培地にシイタケ菌を培養し、発芽前に加水、加温して抽出し、次いで抽出液を除菌後、滅菌、濃縮、乾燥粉末化し、さらに細粒したものを使用した。なお、組成は粗蛋白22%、粗脂肪8%、粗灰分22%および可溶性無窒素物48%である。

L E Mは野田食菌工業株式会社より供与された。

## 2. 方法

(1) 肝類洞内皮細胞の分離：6週齢のBALB/cマウスの腹腔内にペントバルビタール1mgを注入して麻酔後、開腹して門脈を露出し、カテーテルを挿入した。このカテーテルからまずCa-free HEPES 加 HBSS (Hanks' balanced salt solution) 溶液10mlを流し、続いて0.05% collagenase を含有した HEPES 加 HBSS 溶液10ml、0.2% pronase E を含有した HEPES 加 HBSS 溶液10ml、をそれぞれ流速3ml/minで流した。灌流後、肝臓を摘出して眼科用バサミで細切し、0.2% pronase E を含有した HEPES 加 HBSS 溶液50ml中に入れて37℃で20分間、振盪、消化した。未消化物をガーゼで濾過したのち、遠心(400×g, 10min, 4℃)により cell debris を取り除いた。得られた cell pellet を5mlの GBS (Gey's balanced salt solution) 溶液に浮遊させ、30%の metrizamide 溶液7mlと混合して、遠心(1400×g, 15min, 4℃)した。最上相の

肝非実質細胞相をとり、洗浄後、HBSS 溶液で  $1 \times 10^8$  cells/100 ml に調整した。この細胞浮遊液から Knook らの方法<sup>10)</sup>に準じて、SRP6Y型エルトリエータロータ(日立工機製)を用いて肝類洞内皮細胞を分離した。なお、この方法を用いると95%以上の肝類洞内皮細胞が採取できた。

(2) マウス肝類洞内皮細胞からのP A F産生誘導とP A F抽出：上述のようにして調製した肝類洞内皮細胞をHBSS溶液で2回洗浄し、Tyrode液に浮遊させ  $1 \times 10^6$  cells/ml に調整した。この細胞浮遊液に  $1 \mu\text{g/ml}$  の CaI A23187を加えて一定時間(0~60min)培養した。培養終了後、ただちに氷冷した2.5倍容のメタノールと1.5倍容の蒸留水を加えて反応を停止させた。超音波処理で細胞を破壊した後、3000rpm(1500×g)で10分間遠心して上清を採取した。この上清より Pinckard らの方法<sup>11)</sup>に準じてP A Fを抽出した。すなわち、上清に0.95倍容のクロロホルムと0.8倍容の蒸留水を加えて激しく振盪し、3000rpm(1500×g)で10分間遠心した後、クロロホルム層を採取した。このクロロホルム層を窒素ガス存在下で蒸溜乾固した後、100 $\mu\text{l}$ のエタノールを加えて溶解しP A F活性測定を試料とした。

(3) P A F産生に及ぼすL E Mの影響：肝類洞内皮細胞( $1 \times 10^6$  cells/ml)に各種濃度(1~100 $\mu\text{g/ml}$ )のL E Mを添加して0~90分間培養した。培養後、CaI A23187(1 $\mu\text{g/ml}$ )を加えて20分間培養した後、上述の方法によりP A Fを抽出し、試料中のP A F活性を測定した。

(4) P A F活性の測定：P A F活性はモルモット洗浄血小板の凝集をもちいたバイオアッセイにより行った。P A F標準品としてはONO-6002を使用した。Benveniste らの方法<sup>12)</sup>に準じてモルモット洗浄血小板を調製し、その500 $\mu\text{l}$ にP A F標準品またはP A F活性測定試料をそれぞれ5 $\mu\text{l}$ 渡加し、凝集計(Lumi Aggregation Module Model 1010: Payton Associate)を用いて最大凝集率を測定した。各種濃度のP A F標準品の最大凝集率より標準曲線を作成し、これをもとに試料中のP A F濃度を決定した。P A F活性測定に当たっては adenosine diphosphate および

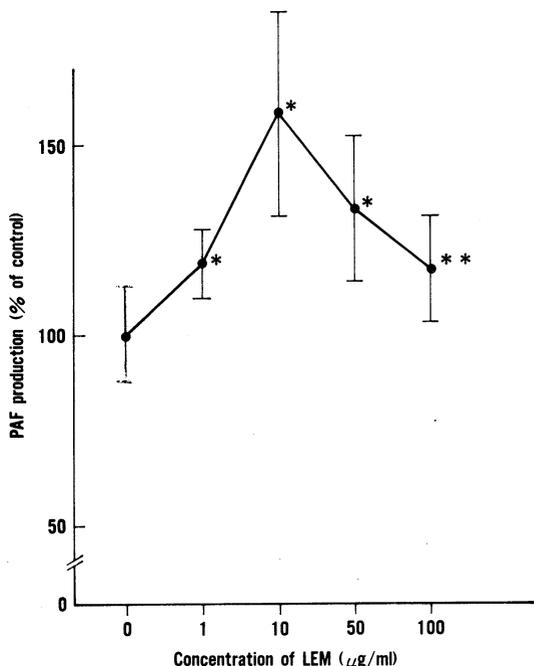


図1 CaI A23187 刺激による肝類洞内皮細胞からのPAF産生に及ぼすLEMの影響 (n=10)

\*: P<0.01, \*\*: P<0.05

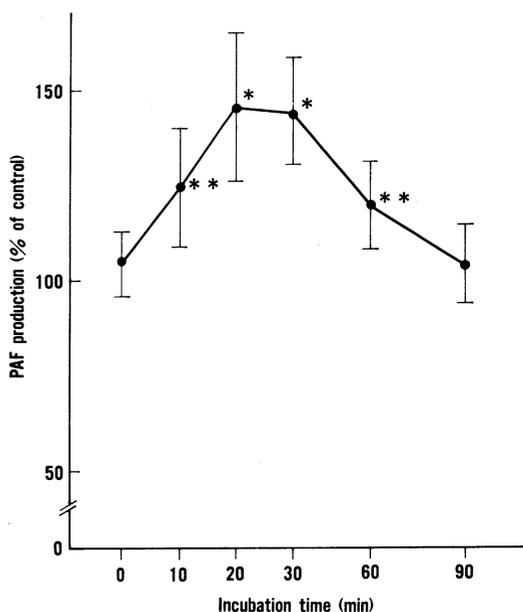


図2 CaI A23187 刺激による肝類洞内皮細胞からのPAF産生の経時的変化に及ぼすLEMの影響 (n=5)

\*: P<0.01, \*\*: P<0.05

thromboxane A<sub>2</sub> による凝集を除外するために creatine phosphate, creatine phosphokinase および indomethacin 存在下で測定を行った。

(5) 統計学的検討: すべてのデータは mean ± S. E. M. で表わし, 有意差検定は Student's t test にて行った。

結果

CaI A23187 刺激による肝類洞内皮細胞の PAF 産生量は図1に示すように, 10 μg/ml 濃度の LEM で最も著明に増加し, LEM 非添加群 (0.73 ± 0.04 pmole / 1 × 10<sup>6</sup> cells, 100.0 ± 14.2%) に比して 1.12 ± 0.16 pmole / 1 × 10<sup>6</sup> cells, 153.4 ± 21.9% と有意に増加した (P < 0.01, n = 10)。しかし, 100 μg/ml 濃度の LEM 添加群ではむしろ低下傾向を示した。

次に, 肝類洞内皮細胞に 10 μg/ml の LEM を添加し, 10~90 分間経時的に培養し, その後に 1 μg/ml の CaI A23187 を添加して PAF 産生量を検討した。その結果, 図2に示すように LEM

(10 μg/ml) を添加して 20 分間培養し, その後に CaI A23187 を添加した時が最も PAF 産生量は増加し, LEM 添加 0 分培養群に比して有意に増加した (P < 0.01, n = 5)。

なお, 肝類洞内皮細胞に LEM のみを添加し, 20 分間培養後 PAF 産生を検討したが, PAF は誘導されなかった。

考察

炎症反応や免疫反応には数多くの mediator が関与することが知られているが, 最近になりリン脂質由来の新しい mediator として PAF が注目されている。PAF は当初, 血小板を活性化することから, この名が付けられた<sup>13)</sup>。しかし, その後の研究により PAF は免疫や炎症の担当細胞に様々な作用を有し, 免疫反応や炎症反応を調節するほか, 種々の臓器組織に対して多彩な作用を及ぼすことが報告されている<sup>14)</sup>。

さて, PAF は血小板を活性化し, その凝集を促すほか, 免疫や炎症反応を担当する細胞に種々の作用を及ぼす。さらに, PAF は好中球やマク

ロファージに作用し、その遊走性や superoxide 産生を促進する。また、リンパ球にも作用し、その IL 2 産生を促進することや natural killer (NK) 活性を増強することが報告されている<sup>15)</sup>。また、Zimmermann ら<sup>16)</sup>は血管内皮細胞から産生される PAF が thrombin や superoxide 刺激による血管内皮細胞への白血球の粘着に重要な役割を果たすことを示唆している。このように PAF は炎症および免疫担当細胞を修飾するほか、平滑筋収縮作用や血圧降下作用などを有し、臨床的にも病態の関与について注目されている<sup>14)</sup>。

一方、肝類洞内皮細胞は肝類洞壁を構成し、肝細胞素を肝類洞から隔て、肝類洞腔から肝細胞への物質輸送のバリアとして機能する。また、肝類洞内皮細胞はプロスタグランジンなどの mediator や<sup>2)</sup> IL 1 を産生し<sup>1)</sup>、隣接する Kupffer 細胞や血液中の白血球の機能を調節し、局所の炎症反応や免疫反応を修飾する可能性が示唆されている。したがって、現在肝疾患の治療として用いられている薬剤が肝類洞内皮細胞にいかなる影響を及ぼすかについては大きな課題である。

さて、慢性肝炎の治療薬の1つに LEM が用いられている。LEM はシイタケ菌糸体培養物抽出エキスであり、本態はアラビノース、キシロースを主体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、抗植物ウイルス作用、抗腫瘍作用等が知られている。

植物ホルモン作用<sup>17)</sup>としては発根促進、農作物の成長促進、増収等が期待されており、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<sup>18)</sup>。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により報告された<sup>19)20)</sup>。なお、LEM のエタノール不溶性画分をゲル濾過し、その2画分のうちの分子量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画分画はアゾ色素による肝癌形成抑制、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、Amagase ら<sup>21)</sup>は 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-P 活性の低下、

seronegative 症例は40例中15例(37.5%)、seroconversion 症例は40例中11例(27.5%)であったと報告した。このような状況のもとで原田ら<sup>9)</sup>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みられ ( $P < 0.01$ )、また HBe 抗体についても投与開始時に比べ16週後で有意の上昇をみた ( $P < 0.01$ )。すなわち、LEM が慢性肝炎の治療薬として注目をあびている。

以上のような観点から著者らは肝疾患に対する治療薬が肝類洞内皮細胞にどのような影響を及ぼすかについて検討した。すなわち、LEM の肝類洞内皮細胞の PAF 産生に及ぼす影響について検討した。その結果、LEM は肝類洞内皮細胞の CaI A23187 刺激による PAF 産生を増強した。

LEM はすでにマクロファージを活性化して IL 1 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ことを報告した<sup>7)</sup>。今回著者らの実験結果により、LEM は肝類洞内皮細胞に作用して IL 1 産生を高めるとともに PAF の産生を増強し、間接的に免疫反応を増強することが示唆された。すなわち、肝類洞内皮細胞は細胞自身が産生する chemical mediator により免疫反応や炎症反応のネットワークを調節しているが、LEM は一定の条件下では肝類洞内皮細胞からの chemical mediator の産生を増強することにより、種々のネットワークの調節をしている可能性が示唆された。

しかし、著者らは肝類洞壁細胞や肝浸潤細胞から著明に PAF が産生されると肝細胞障害が誘導されることを認めている<sup>22)23)</sup>。したがって、今後は PAF の肝細胞障害と免疫調節の作用が単に PAF の量的な問題なのか、PAF の質的なちがいなのかについて検討されねばならないであろう。

いずれにしても今回の結果は、LEM の慢性肝炎の作用機序の一端を解析する上に、新しい方向性を示唆するものと考えられる。

## まとめ

L FMは CaI A23187刺激による肝類洞内皮細胞からの PAF産生を増強した。

## 文献

- 1) Mizoguchi, Y., et al: J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU, 6, 172, 1989
- 2) Shaw, R. G., et al: Hepatology, 4, 591, 1984
- 3) 木岡清英, 他: 肝臓, 30巻, p.712, 1989
- 4) 井上圭三: 代謝 23巻, p.891, 1986
- 5) Lin, A. H., et al: J. Clin. Invest., 70, 1058, 1982
- 6) Braquet, P., et al: Immunology Today, 8, 345, 1987
- 7) 溝口靖紘, 他: 肝胆膵, 15巻, p.127, 1987
- 8) Suzuki, H., et al: Agric. Biol Chem., 54, 479, 1990
- 9) 原田 尚, 他: 肝胆膵, 14巻, p.327, 1987
- 10) Knook, D. L., et al: Exp. Cell. Res., 99, 414, 1976
- 11) Pinckard, R. N., et al: J. Immunol., 123, 1847, 1979
- 12) Camussi, G., et al: Immunology., 33, 523, 1977
- 13) Benveniste, J., et al: J. Exp. Med., 136, 1356, 1972
- 14) 和久敬三: 代謝, 24巻, p.625, 1987
- 15) Braquet, P., et al: Immunology Today 8, 345, 1987
- 16) Zimmermann, G. A., et al: J. Clin. Invest., 76, 2235, 1985
- 17) Mitsuhashi-Kato, M., et al: Plant Cell Physiology., 26, 221, 1985
- 18) 小室康雄: 農林水産省植物ウイルス研究報告, p.61-62, 1977
- 19) Sugano, N., et al: Cancer Lett., 17, 109, 1982
- 20) Sugano, N., et al: Cancer Lett., 27, 1, 1985
- 21) Amagase, H., : New Trends in Peptic Ulcer and Chronic Hepatitis. II. Chronic Hepatitis, Excerpta Medica, Amsterdam, Princeton, Hong Kong, Tokyo, Sydney, p.316, 1987
- 22) Mizoguchi, Y., et al: Osaka City Med. J., 36, 99, 1990
- 23) 市川裕三, 他: 肝類洞壁細胞研究の進歩, 国際医書出版, 東京, p.239, 1989

(1991年1月10日受付)