腹腔内に投与されたキトサンや β -サイクロ デキストリンによるマウス腹腔マクロファ ージのスーパーオキサイド産生能増強効果

菱沼宏哉*¹⁾, 細野 朗*²⁾, 稲場文男*^{1,3)}, 木村修一*²⁾

Intraperitoneally administered chitosan and β -cyclodextrin augment superoxide generation from peritoneal exudate macrophages in mice

The effects of intraperitoneally administered chitosan and cyclodextrins (CDs) on the generation of superoxide anion (O_2^-) in mouse peritoneal macrophages (MPs) were investigated.

MPs obtained from mice injected chitosan, α -CD or β -CD generated larger amount of O_2^- during phagocytosis of opsonized zymosan or when stimulated by 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate than those from mice injected proteose peptone, a widely used elicitor for MPs. Especially, generated O_2^- from β -CD-elicited MPs was as strikingly large as that from MPs elicited by lentinan (LN), a strong antitumor polysaccharide. These results suggest the possibility that β -CD may act as a host defense stimulator.

In LN-elicited MPs, striking increase of O_2^- generation was not inhibited by the protein kinase C (PKC) inhibitor 1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-methylpiperazine (H-7), but completely disappeared when the calmodulin (CaM) antagonist *N*-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W-7) was added. In contrast, both H-7 and W-7 reduced the augmentation of O_2^- generation by β -CD, although neither H-7 nor W-7 completely inhibited this augmentation. These results suggest that the augmentation of O_2^- generation by LN might be due only to the increased activity of CaM in the MPs, but that the augmentation by β -CD might be due to the increased activity of both PKC and CaM in the MPs.

Kohya Hishinuma*¹⁾, Akira Hosono*²⁾,
Fumio Inaba*^{1,3)}, Shuichi Kimura*²⁾

key words : chitosan, β -cyclodextrin, macrophages, superoxide, chemiluminescence

近年, “おなかにやさしい第六の栄養素” として, 食物繊維というものが注目されている. 現在のところ, 食物繊維として用いられているものの

図1 多糖類およびオリゴ糖の分類と機能

ほとんどは多糖類やオリゴ糖であり, その種類と効能は, おおよそ図1のように示される. 図1に例示した多糖類やオリゴ糖のなかでも, 特に構造的に特徴があるのは, アミノ多糖であるクチンやキトサン, および環状のオリゴ糖であるサイクロデキストリン(CD)であろう.

クチンは, コウカク類の体表や菌類の細胞壁に存在する多糖類で, その構造単位は, $\beta(1\rightarrow4)$ 結合した *N*-acetylglucosamine 残基である¹⁾. キチンを脱アセチル化すると, 多くの可溶性食物繊維と同様の粘性のある多糖類であるキトサンができる(図2).

経口投与されたキトサンは, 血清コレステロール値を低下させることが知られている²⁾.

一方, CD は, 複数(通常, 6~8個)のグルコース分子が環状に結合したオリゴ糖である(図2). CD はその構造から特有の抱接作用を持ち, 薬品や食品, あるいは農産物などの品質や安定性の向上^{3,4)}, さらには抱接クロマトグラフィーとして, 特定の化合物の分離精製など^{5,6)} に近年利用が高まっている.

ところで, 通常の直鎖状あるいは分枝状多糖類やオリゴ糖については, 栄養学的あるいは免疫学的に数多くの研究がなされ^{7,8)}, 図1にも並記し

*¹⁾ Biophoton Project, Research Development Corporation of Japan 新技術事業団生物フォトンプロジェクト

*²⁾ Laboratory of Nutrition, Faculty of Agriculture, Tohoku University 東北大学農学部栄養化学教室

*³⁾ Laboratory of Quantum Electronics, Research Institute of Electrical Communication, Tohoku University 同電気通信研究所量子電子工学研究室

図2 レンチナン、キチン、キトサン、およびサイクロデキストリンの構造式

たが、腫瘍免疫の分野では、ある種の多糖類 (β (1 $\rightarrow$ 3) グルカンなど) については宿主免疫賦活効果のあることが明らかとなっているが⁹⁻¹¹⁾、キチンやキトサン、あるいはCD自身が、たとえば生体防御機能などにどのような影響を与えるのかについては、検討例が多くはない。

生体防御の初発反応においては、マクロファージ ($M\phi$) や好中球が、生体内外の異物を貪食する過程で、異物の処理のみならずT細胞の活性化にも関与しているスーパーオキシド・アニオン (O_2^-) を産生する^{12,13)}。この O_2^- 産生のメカニズムについては、つぎのように解釈されている。

すなわち、異物が $M\phi$ や好中球の表面のレセプターに接触すると、そのシグナルは細胞内伝達の過程で二つの経路——inositol 1, 4, 5-trisphosphate を経て、 Ca^{2+} /calmodulin (CaM) 複合体の形成を介し、arachidonic acid の生成を行う経路 (CaM 経路) と、1, 2-diacylglycerol を経て、protein kinase C の活性化を行う経路 (PKC 経路)——にわかれ、再び一つの経路となって、 O_2^- を産生する酵素群である NADPH oxidase を活性化す

るというものである¹⁴⁻¹⁷⁾。 $M\phi$ が産生する O_2^- を特異的に検出する手段としては、ウミホタル・ルシフェリン誘導体 (Cypridina luciferin analog, CLA)¹⁸⁾ を用いた chemiluminescence (CL) 法が開発されている。

$M\phi$ の O_2^- 産生能は、 β (1 $\rightarrow$ 3) グルカンなどの宿主免疫賦活・抗悪性腫瘍剤や宿主免疫賦活・抗悪性腫瘍効果を有する食餌条件 (カロリー摂取量の制限) によって著明に高まることが知られている¹⁹⁻²⁵⁾。さらに、筆者らは、 β (1 $\rightarrow$ 3) グルカンではないが、弱いながら抗悪性腫瘍効果を有し²⁶⁾、食物繊維としても広く知られているセルロースが $M\phi$ の O_2^- 産生能を高めることを明らかにしている²⁰⁾。

本論文では、 O_2^- に特異的な CLA-CL 法および PKC や CaM の阻害剤を用いて、① キチンやキトサン、あるいは CD を経口ではなく、腹腔内に投与した場合に腹腔渗出 $M\phi$ の O_2^- 産生能は変動するかどうか、② O_2^- 産生能が変動する場合、PKC や CaM はいかなる関与をしているのか、の2点について検討を行った。

材料と方法

(1) 細胞の調製

6週齢の C3H/He 系雄マウス(船橋農場)に、プロテオース・ペプトン(PP, 4 g/kg, Difco, MI), レンチナン(LN, 160 mg/kg, 味の素), キチン(160 mg/kg), キトサン(160 mg/kg), α -CD(160 mg/kg), β -CD(160 mg/kg), あるいは γ -CD(160 mg/kg)を腹腔内投与し, 4日後に腹腔滲出細胞を得た。腹腔滲出 $M\phi$ の誘導に広く用いられている PP は, コントロールとして使用し, 宿主免疫賦活・抗悪性腫瘍効果を有する $\beta(1\rightarrow3)$ グルカンである LN は, ポジティブコントロールとして用いた。キチンおよびキトサンは生化学工業より, また, CD は東京化成工業より購入した。

腹腔滲出細胞は, Eagle's MEM(フェノール・レッドを含有しないもの)に懸濁後, $M\phi$ として $5 \times 10^5/\text{ml}$ となるよう調製し, その 1 ml を CL 計測用のプラスチックシャーレ(Falcon 1008, Becton Dickinson, NJ)に注ぎ, 常法に従って非付着性細胞を除き, さらにフェノール・レッドを含有しない Hanks' balanced salt solution で洗浄して CL の計測に供した。

(2) CL の計測

① 装置

CL は, 新技術事業団生物フォトンプロジェクトによって開発・試作された単一光電子計数装置(single photoelectron counter, SPC)²⁷⁾の温度設定を 37°C にして計測した。なお, SPC に組み込む光電子増倍管として, 浜松フォトニクス の R 375 を用いた。

② 計測

最終液量 2 ml, 細胞数 5×10^5 個, CLA(東京化成) 500 nM とし, 可溶性刺激剤としては 12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA, 100 ng/ml, Sigma, MO)を, 食食刺激剤としては opsonized zymosan(OZ, 0.5 mg/ml, zymosan, Sigma, を常法に従ってオプソニン化)を用いた。PKC および CaM の阻害剤としては, H-7(50 μM , 生化学工業)および W-7(50 μM , 生化学工業)をそれぞれ用いた²⁸⁾。

実験結果は, *t*-検定を用いて比較検討した。

結果

(1) 各腹腔滲出 $M\phi$ の CL 強度(図3)

図3 キチン, キトサン, あるいはサイクロデキストリンによって誘導された腹腔滲出 $M\phi$ の CLA 依存性ケミルミネッセンス

a: プロテオースペプトン, b: レンチナン, c: キチン, d: キトサン, e: α -サイクロデキストリン, f: β -サイクロデキストリン, g: γ -サイクロデキストリン, h: プロテオースペプトン(無刺激)

β -CD によって誘導された $M\phi(\beta\text{-}M\phi)$ は, TPA 刺激時に LN- $M\phi$ に匹敵するほど強い CL 強度を示した。また, TPA, OZ の両刺激において, α - $M\phi$ およびキトサン- $M\phi$ は, PP- $M\phi$ とくらべて有意に強い CL 強度を示した。なお, キチン- $M\phi$ と PP- $M\phi$ との間に CL 強度の差は認められず, γ - $M\phi$ の CL 強度は, PP- $M\phi$ の CL 強度とくらべて有意に低値を示した。

(2) 各腹腔滲出 $M\phi$ の CL 強度に及ぼす H-7 や W-7 の影響

H-7 あるいは W-7 を添加した場合の, 各腹腔滲出 $M\phi$ の CL 強度(OZ 刺激時の最大値)を図4に示す。

LN による著明な CL 強度の増強効果は H-7 の添加によっても維持されていたが, W-7 を添加した場合には, 完全に消滅した。これとは対照的に, キトサンによる CL 強度の増強効果は, W-7 の影響をまったく受けず, 逆に H-7 の添加

によって消滅した。

α -M ϕ や β -M ϕ における強い CL 強度は、H-7 添加の場合のみならず、W-7 の添加の場合においても、完全には PP-M ϕ のレベルまで低下せず、また、 α -M ϕ と β -M ϕ の CL 強度は、H-7 を添加した場合においてのみ、同じ値となった。 γ -M ϕ の CL 強度は、PP-M ϕ の CL 強度とくらべて有意に低値を示したが、この γ -M ϕ の CL 強度と PP-M ϕ の CL 強度との間の差異は、H-7 を添加した場合には、認められなくなった。

考 察

本研究では、 O_2^- に特異的な CLA-CL 法および PKC や CaM の阻害剤を用いて、① キチンやキトサン、あるいは CD を腹腔内に投与した場合に腹腔滲出 M ϕ の O_2^- 産生能は変動するのかどうか、② O_2^- 産生能が変動する場合、PKC や CaM はいかなる関与をしているのか、の 2 点について検討を行った。

はじめに、図 3 より、キトサンや α -CD、あるいは β -CD の腹腔内投与が腹腔滲出 M ϕ の O_2^- 産生能を増強させることが示され、特に β -CD は LN に匹敵するほど強い O_2^- 産生能増強効果を有することが明らかとなった。

つぎに、キトサンや、 α -CD、あるいは β -CD の O_2^- 産生能増強効果が M ϕ の O_2^- 産生経路をどのように変化させることによって発現されるのかを知る目的で、M ϕ の O_2^- 産生に大きく関与している PKC および CaM をそれぞれ H-7 および W-7 で阻害して、 O_2^- 産生を検討した。

その結果、ポジティブコントロールとして用いた LN-M ϕ の場合には CaM 経路のみがいちじるしく活性化されていたのに対し、直鎖状のアミノ多糖であるキトサンによって誘導された M ϕ の場合には、PKC 経路のみが活性化されていることが示唆された。

前報²⁰⁾を含めてこれまでに、セルロース、ペクチン、マンナン、キチン、キトサンの合計 5 種類の直鎖状多糖類について同様の検討を行ってきたが、これらの多糖類のすべてが M ϕ の PKC 経路のみを修飾している事実(H-7 の添加によってすべての CL 強度が同じになるという事実)は、非常に興味深い知見であると思われる。

図 4 キチン、キトサン、あるいはサイクロデキストリンの腹腔内投与による腹腔滲出 M ϕ の CLA 依存性ケミルミネッセンスの最大強度に及ぼす H-7 および W-7 の影響

3 検体の“平均値 $\pm$ 標準誤差”であらわした。
a $P < 0.001$, b $P < 0.005$, c $P < 0.025$, d $P < 0.05$
(プロテオース・ペプトンの値と比較して)

環状のオリゴ糖である CD の場合には、直鎖状多糖類の場合とはまったく異なる結果が得られ、CD による O_2^- 産生の修飾には PKC 経路と CaM 経路の両方の変動が関与していることが示された。すなわち、 α -CD あるいは β -CD による M ϕ の O_2^- 産生能増強は PKC 経路と CaM 経路の両方の活性化によるものであり、さらに、 β -CD による著明な M ϕ の O_2^- 産生能増強は特に PKC 経路の著明な活性化に起因するものであることが示唆された。

結 論

① キトサン、 α -サイクロデキストリン、 β -サイクロデキストリンに、腹腔内滲出マクロファージのスーパーオキシド産生能増強効果が認められ、特に β -サイクロデキストリンには、レンチナンに匹敵する効果が認められた。

② レンチナンによるスーパーオキシド産生能増強効果は、calmodulin 経路の増強によるものであったのに対し、キトサンによる増強効果は、protein kinase C 経路の増強によるものであり、サイクロデキストリンによる増強効果は両方の経路の増強によるものであることが示唆された。

③ 特に、 β -サイクロデキストリンによる増強効果は、protein kinase C 経路の著明な増強によるものであることが示唆された。

文 献

- 1) Vahouny, G.V., Satchithanandam, S., Cassidy, M.M., Light foot, F.B., Furda, I.: Comparative effects of chitosan and cholestyramine on lymphatic absorption of lipids in the rat. *Am. J. Clin. Nutr.* 38: 278-284, 1983.
- 2) Jennings, C.D., Boleyn, K., Bridges, S.R., Wood, P.J., Anderson, J.W.: A comparison of the lipid-lowering and intestinal morphological effects of cholestyramine, chitosan, and oat gum in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 189: 13-20, 1988.
- 3) Ezure, Y., Maruo, S., Kojima, M., Yamashita, H., Sugiyama, M.: Effect of α -cyclodextrin on thermostability of glucoamylase. *Agric. Biol. Chem.* 52: 1073-1074, 1988.
- 4) Makela, M.J., Korpela, T.K., Puisto, J., Laakso, S.V.: Nonchromatographic cyclodextrin assays: Evaluation of sensitivity, specificity, and conversion mixture applications. *J. Agric. Food Chem.* 36: 83-88, 1988.
- 5) Smolkova, E., Kralova, H., Krysl, S., Feltl, L.: Study of the properties of cyclodextrins as stationary phases in gas chromatography. *J. Chromatogr.* 241: 3-8, 1982.
- 6) Zsardon, B., Szilasi, M., Tudos, F.: Inclusion chromatography of alkaloids on cyclodextrin polymer gel beds. *J. Chromatogr.* 208: 109-112, 1981.
- 7) Anderson, J.W., Chen, W.J.L.: Plant fiber. Carbohydrate and lipid metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 32: 346-363, 1979.
- 8) Komatsu, N., Okubo, S., Kikumoto, S., Kimura, K., Saito, G., Sakai, S.: Host-mediated antitumor action of schizophyllan, a glucan produced by *Schizophyllum commune*. *Gann* 60: 137-144, 1969.
- 9) Chihara, G., Maeda, Y., Hamuro, J., Sasaki, T., Fukuoka, F.: Inhibition of mouse sarcoma 180 by polysaccharides from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. *Nature* 222: 687-688, 1969.
- 10) Nakahara, W., Fukuoka, F., Maeda, Y., Aoki, K.: The host-mediated antitumor effect of some plant polysaccharides. *Gann* 55: 283-288, 1964.
- 11) Tanaka, T., Fukuoka, F., Nakahara, W.: Mechanism of antitumor action of some plant polysaccharides. *Gann* 56: 529-536, 1965.
- 12) Badwey, J.A., Karnovsky, M.L.: Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Annu. Rev. Biochem.* 49: 695-726, 1980.
- 13) Wakeyama, H., Takeshige, K., Takayanagi, R., Minakami, S.: Superoxide-forming NADPH oxidase preparation of pig polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. J.* 205: 593-601, 1982.
- 14) Berridge, M.J., Irvine, R.F.: Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312: 315-321, 1984.
- 15) Curnutte, J.T., Badwey, J.A., Robinson, J.M., Karnovsky, M.J., Karnovsky, M.L.: Studies on the mechanism of superoxide release from human neutrophils stimulated with arachidonate. *J. Biol. Chem.* 259: 11851-11857, 1984.
- 16) Nishizuka, Y.: Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233: 305-312, 1986.
- 17) Takenawa, T., Homma, Y., Nagai, Y.: Role of Ca^{2+} in phosphatidylinositol response and arachidonic acid release in formylated tripeptide- or Ca^{2+} ionophore A23187-stimulated guinea pig neutrophils. *J. Immunol.* 130: 2849-2855, 1983.
- 18) Sugioka, K., Nakano, M., Kurashige, S., Akuzawa, Y., Goto, T.: A chemiluminescent probe with a *Cypridina* luciferin analog, 2-methyl-6-phenyl-3,7-dihydroimidazo[1,2-a]pyrazin-3-one, specific and sensitive for O_2^- production in phagocytizing macrophages. *FEBS Lett.* 197: 27-30, 1986.
- 19) Morikawa, K., Kamegaya, S., Yamazaki, M., Mizuno, D.: Hydrogen peroxide as a tumoricidal mediator of murine polymorphonuclear leukocytes induced by a linear β -1,3-D-glucan and some other immunomodulators. *Cancer Res.* 45: 3482-3486, 1985.
- 20) Hishinuma, K., Hosono, A., Inaba, H., Kimura, S.: Effects of intraperitoneally administered dietary fibers on superoxide generation from peritoneal exudate macrophages in mice. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 60: 288-293, 1990.
- 21) Hishinuma, K., Hosono, A., Mashiko, S., Inaba, H., Kimura, S.: Dietary restriction augments superoxide generation in mouse peritoneal macrophages: An investigation using a chemiluminescence probe specific for superoxide anion. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 59: 314-318, 1989.
- 22) Hishinuma, K., Hosono, A., Mashiko, S., Inaba, H., Kimura, S.: Augmentation of superoxide generation in phagocytosing murine peritoneal macrophages by dietary restriction. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* 60: 95-99, 1990.
- 23) Hishinuma, K., Nishimura, T., Konno, A., Hashimoto, Y., Kimura, S.: The effect of dietary restriction on mouse T cell functions. *Immunol. Lett.* 17: 351-356, 1988.
- 24) Hishinuma, K., Nishimura, T., Konno, A., Hashimoto, Y., Kimura, S.: Augmentation of mouse immune functions by dietary restriction: An investigation up to 1 year of age. *Ann. Nutr. Metab.* 34: 76-84, 1990.
- 25) Hishinuma, K.: Nutrition and the age-related changes of immune responses. *Biomed. Gerontol.* 14: 11-19, 1990.
- 26) Maeda, Y.Y., Chihara, G., Ishimura, K.: Unique increase of serum proteins and action of antitumor polysaccharides. *Nature* 252: 250-252, 1974.
- 26) 菱沼宏哉, 稲場文男: 生体極微弱発光センシング.

季刊化学総説 No. 1. バイオセンシングとそのシステム. (日本化学会編), 学会出版センター, 1988, p 147-158.

- 28) Hishinuma, K., Hosono, A., Mashiko, S., Inaba H., Kimura, S.: Identification of distinct path-

ways for superoxide generation in mouse macrophages: An investigation using a chemiluminescence probe specific for superoxide anion. Agric. Biol. Chem. 53: 1453-1455, 1989.

* * *