霊芝 (*Ganoderma lucidum*, 子実体) の研究 (第7報^{1,2)})

抗アレルギー作用について その2

野上真里,^{*,a} 伊藤正明,^a 久保道德,^a 高橋正興,^b

木村浩二,^b 松生好雄^b

近畿大学薬学部,^a 共立薬品工業株式会社^b

Studies on *Ganoderma lucidum*. VII.^{1,2)} Anti-allergic Effect. (2)

MARI NOGAMI,^{*,a} MASAOKI ITO,^a MICHINORI KUBO,^a MASAOKI TAKAHASHI,^b
HIROJI KIMURA^b and YOSHIO MATSUIKE^b

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kinki University,^a 3-4-1, Kowakae,
Higashiosaka, Osaka, 577, Japan and Kyoritsu Yakuhin Kogyo
Co., Ltd.,^b 1085, Shimizudani, Takatori-cho, Takaichi-gun,
Nara, 635-01, Japan

(Received November 19, 1985)

The anti-allergic activity of aqueous extract of "Reishi" ([L]), the fruit body of *Ganoderma lucidum*, was evaluated in the experimental models of allergy.

[L] was found to prevent remarkably the experimental asthma in guinea pigs and contact dermatitis induced by picryl chloride in mice.

It also exhibited markedly a therapeutic effect against the lesion of kidney and decreased the protein excretion into the urine, in serum sickness nephritis caused by immune complex in rats.

Keywords—*Ganoderma lucidum*; asthma; contact dermatitis; serum sickness nephritis; anti-allergic activity

神農本草経³⁾の上品には、六種の霊芝があげられ、それぞれ異なった薬効が記されている。その1つとして「白芝」の項に、「治欬逆上気益肺氣通利口鼻強志意勇悍安魄」と抗アレルギー作用と思われる記載がある。中国においても気管支喘息、慢性気管支炎の咳、痰、喘に対し、有効であるとの報告⁴⁾がみられ、また、わが国においても民間的に気管支喘息などに用いられている。

著者らは、すでに、種々の産地の霊芝について、ラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用を検討し、他の産地の霊芝は、30%—50%の抑制率であったのに対し、奈良県下で自生し、著者らが栽培化に成功した霊芝のうち No. 9 は 80% 近い抑制率を示すことを見出した。⁵⁾ また、この霊芝 No. 9 には、強い PCA (passive cutaneous anaphylaxis) 反応抑制作用も認めている。⁶⁾ 更に、この霊芝が民間療法的に気管支喘息、アトピー性皮膚炎に有効とされることから、この効果が「白芝」のそれに相当するものではないかと考え、今回、更に種々のアレルギー性疾患モデルを作成し、有効性を検討した。

アレルギー性疾患は、現代病の1つに数えられ、難治性であり、しかも小児の罹患率が高いことから難病の1つといえる。現在、アレルギー性疾患は type I—V (ないしは VI) に分類されてとらえられているが、実際の症状や発病の原因はそれらが微妙に重なり合ったものといえる。

今回は、アレルギー性疾患の代表的なものとして気管支喘息、腎炎、接触性皮膚炎をとりあげ、それぞれの *in vivo* 実験モデルを用いて霊芝熱水抽出エキスの効果について検討した。

実 験 の 部

実験材料 奈良県栽培品霊芝 (*Ganoderma lucidum*, 子実体) を細切し、20 倍量の水を加えて 100°C 1 時間、2 回抽出し粗抽出エキス [L] を得た。

実験に際し、PCA 反応に明らかな有効性が認められた用量である 500 mg/kg を中心に検討した。

実験動物 Hartley 系モルモット, Donryu 系ラット, ddY 系マウスを用い, 温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度 60% の恒温恒湿の飼育室にて固形飼料 (日本クレア) 及び水にて飼育した。

実験方法 1) モルモットの実験的喘息——a) 抗原の作製: Benzyl penicilloyl bovine γ -globulin (BPO-BGG) 及び benzyl penicilloyl bovine serum albumin (BPO-BSA) は, Levine and Redmond の方法⁷⁾ に従って作製した。すなわち 3 g の benzyl penicillin-K (Sigma) を 250 ml の生理食塩水に溶解し, 4.5 g の BGG (Miles Laboratories. inc, 生化学工業(株)) あるいは BSA (Sigma) を溶解した生理食塩水 300 ml を徐々に加え, 1 N NaOH を用いて pH 11.4—11.5 に合わせ, 室温にて 60 分間反応させた。つぎに 1 N HCl を用いて pH 4.5 とし, 0°C , 10000 rpm, 30 分間遠心分離した。沈殿物を 0.1 N NaOH に溶解し, 上述の操作を更に 1 回繰り返したのち, 生理食塩水に対して 3 日間透析し, 透析内液を凍結乾燥した。

b) 抗血清 (抗 BPO-BGG, Ig (Immunoglobulin) E 血清) の調製: Levine らの方法⁸⁾ に従って作製した。体重約 250 g の Hartley 系雄性モルモットの腹腔内に 1 μg の BPO-BGG と 1 mg の $\text{Al}(\text{OH})_3$ を含む Tris buffered saline (pH 8.2) の 1 ml を毎月 1 回ずつ, 12 回注射した。最終注射の 10 日後に下行大動脈より採血し抗血清を得た。この抗血清中の IgE 力価は 7 d homologous PCA にて 1024 倍であった。

c) モルモットの実験的喘息の誘起: Koda らの方法⁹⁾ に従った。すなわち体重 250—300 g の Hartley 系雄性モルモットを 1 群 10 匹とし, 抗 BPO-BGG-IgE 血清の 0.25 ml/animal を心臓内に注射して受動的に感作した。48 時間後, ウレタン麻酔下に気管を切開し, ガラス性カニューレを介してトランスデューサー (日本光電, TV-241T, MFP-1100) に連結し, 多用途監視記録装置 (日本光電ポリグラフシステム RM₆₀₀₀) を用いて呼吸波及び呼吸流速を記録した。呼吸流速からは呼吸数及び吸気時間に対する呼気時間の比を求めた。誘発抗原は 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の BPO-BSA を股静脈内に注射した。なお, 検体は, 抗原誘発の 30 分前に経口ゾンデにより投与した。

2) Immune Complex 型糸球体腎炎——a) 腎炎の惹起: Type III に属する慢性血清病糸球体腎炎のモデルとして永松らの方法¹⁰⁾ に準じて Immune complex 型の腎炎を作成した。まず, Donryu 系雄性ラット (体重 150 g 前後) に予備免疫として, 生理食塩液に溶解したウサギ血清アルブミン (RSA: Sigma) を等量の Freund's complete adjuvand (Difco) でエマルジョンとし, 3 mg/rat ずつ背部皮下 4 ケ所に計 1 ml 注射した。その 2 週間後から 1 日おきに 8 週間 RSA 1 mg/rat を静脈内注射することにより腎炎を惹起した。静注終了後, 24 時間尿を採取して, 尿中蛋白排泄量が 100 mg/d 以上を示すラットを選出し, 1 群 10 匹として, 各群とも平均蛋白排泄量が約 350 mg/d となるように群構成した。なお, 検体は 30 日間経口ゾンデで投与し, その間, 1 週間毎に蛋白排泄量を測定した。更に 30 日後, 腎組織血流量及び総頸動脈圧を測定したのち採血し, 血清コレステロール, 血清尿素窒素を測定した。また, 腎臓を摘出し, 常法によりホルマリン固定したのち, 薄切してヘマトキシリン・エオジン染色を施して, 光学顕微鏡下に観察した。50 個の糸球体を観察し, 主に白血球の糸球体浸潤, 糸球体細胞の増殖の程度を観察した。

b) 尿中蛋白排泄量の測定: Kingsbury らの方法¹¹⁾ に従って測定した。すなわち, 採取した尿を 2500 rpm, 15 分間遠心分離して得た上清を尿サンプルとし, 精製水で適宜希釈したのち, その 1 ml に 3% sulfosalicylic acid 水溶液 3 ml を加えてよく混和し, 10 分間放置した後, 波長 400 nm で吸光度を測定した。あらかじめ作成した検量線より蛋白量を求め, 24 時間当りの mg として示した。

c) 腎組織血流量の測定: 腎炎ラットをソムノペンチル麻酔下に背位に固定し, 右腎大側部に白金電極 (MT 技研) を刺入して固定し, 一方不関電極を皮膚に固着した。両者とも amplifier (MT 技研) を介して記録計へ接続した。基準線の安定化ののち, 水素ガス ($0.5 \text{ kg}/\text{cm}^2$) を吸入させ, 水素ガス濃度半減期 ($T_{1/2}$) を算出した。 $T_{1/2}$ を Fick の原理を応用した Kety の組織クリアランス式に代入して血流量を求めた。

$$\text{血流量 (ml/min/100 g)} = \frac{0.693}{T_{1/2} (\text{min})} \times 100$$

d) 血圧の測定: 腎炎ラットを 2.5 g/kg のウレタン麻酔下に総頸動脈を露出し, polyethylene 製のカニューレを挿入固定した。カニューレは延長チューブを介して血圧トランスデューサー (P_{231d}, 日本光電), ひずみ圧力アンプ (AP_{601c}, 日本光電) に接続し, ポリグラフシステム (RM₆₀₀₀, 日本光電) を用いてモニターした。更に血圧測定ユニット (AP_{611c}, 日本光電) に入力して, 最高, 最低血圧の計測を行った。なお, 計測中には体温保持の為, 動物を保温マット (夏目製作所) であったため, 直腸センサーで 37°C に保持した。

3) Picryl Chloride (PC) による接触性皮膚炎——Asherson and Dtak¹²⁾ の方法に従って行った。すなわち前日に腹部を剪毛した ddY マウス (雄性, 体重 20 g 前後) を用いて 7% PC のエタノール溶液 0.1 ml を塗布して感作した。7 日後に両耳朶に 1% PC オリーブ油溶液を 0.02 ml ずつ塗布して接触性皮膚炎を誘発した。更にそ

の3日後に再び、腹部に7% PC エタノール溶液を塗布し、再感作した。その後、7日めに再び1% PC オリーブ油溶液を両耳に塗布し、24時間後の耳の厚さを dial thickness gauge (尾崎製作所) を用いて測定し、誘発前の耳の厚さを差し引き、接触性皮膚炎による腫脹度とした。なお、検体は PC 誘発直前及び16時間後の2回、経口ゾンデを用いて投与し、陽性コントロールとしては、ステロイド剤のプレドニゾンを背部皮下に投与した。実験匹数は、各群10匹とした。

実験結果

1) モルモットの実験的喘息に対する効果

Koda らの方法に準じて作成したモルモット実験的喘息においては、抗原誘発直後より、呼吸数が著しく増加し、20分後も20%程増加していた。また吸気と呼気の割合は、一過性に減少した後、上昇しはじめ、20分後も低下しなかった。また、激しい呼吸性呼吸困難の発作が頻繁に起こった。[L] 500 mg/kg 投与群では、呼吸数の安定化作用と呼吸吸気率の増加、発作回数の減少作用が認められた (Fig. 1)。

Fig. 1. Effects of [L] on Respiratory Disorders in Guinea Pigs

a) Significantly different from the control group at $p < 0.05$.
 —○—, control; —●—, [L] 500 mg/kg p.o.

2) Immune Complex 型糸球体腎炎に対する効果

a) 尿及び血中の生化学的パラメーターに対する効果 尿中蛋白排泄量の測定結果を Fig. 2 に示した。[L] 500 mg/kg 投与群では、有意な尿中蛋白量の減少作用が認められた。

また、血中コレステロール値及びBUN(尿素窒素)値はともに、対照群では、 201.1 ± 18.4 , 23.4 ± 4.0 mg/dl と増加傾向を示したのに対し、[L] 500 mg/kg 投与群では 113.1 ± 11.0 , 18.2 ± 2.2 mg/dl とコレステロール値は危険率5%で有意に増加を抑制し、BUN 値では、抑制する傾向を示した。

b) 血圧及び血流量に対する効果 糸球体腎炎発症に伴い、血圧は、最高血圧 177.5 ± 15.5 mmHg, 最低血圧 119.5 ± 11.5 mmHg に上昇していたが、[L] 500 mg/kg 投与群においては、最高血圧を有意に低下させ、最低血圧も低下させる傾向を示した (Table I)。

一方、腎組織血流量を水素クリアランス法を用いて(吸入式)測定した結果、対照群では、 334.3 ± 24.4 ml/min/100 g tissue, [L] 500 mg/kg 投与群においても 336.1 ± 27.7 ml/min/100 g tissue であり、血流量に対しては影響は与えていなかった。

c) 腎組織光顕所見に対する効果 糸球体毛細血管内の白血球数の増加に対して、その程度を -, ±, +, ++, +++ の5段階に区分し、それぞれの程度を示す糸球体数を n_0, n_1, n_2, n_3, n_4 とし、次の式によりそれぞれの index として表して比較した。

Fig. 2. Effect of [L] on Protein Excretion into Urine in Rats with Serum Sickness Nephritis

Significantly different from the control group at
 a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$.
 —○—, control; —●— [L] 500 mg/kg.

TABLE I. Effect of [L] on Kidney Blood Flow and Blood Pressure in Rats with Serum Sickness Nephritis

Treatment	Dose (mg/kg)	Blood flow (ml/min/100 g tissue)	Blood pressure (mmHg)	
			High	Low
Control	—	334.3±24.4	177.5±15.5	119.5±11.5
[L]	500	336.1±27.7	158.0±4.4 ^{a)}	97.7±9.0

a) Significantly different from the control group at $p<0.05$. Each value represents mean±s.e. from five rats.

$$\text{Index} = \frac{0 \times n_0 + 0.5 \times n_1 + 1 \times n_2 + 2 \times n_3 + 3 \times n_4}{50}$$

その結果, [L] 500 mg/kg 投与群では, 有意な index の低下が認められ (Table II), また, 組織所見 (Fig. 3) に対しても著明な改善効果が認められた.

3) PC による接触性皮膚炎に対する効果

[L] の PC による接触性皮膚炎に対する効果を検討した結果を Fig. 4 に示した. [L] は, 用量依存的な接触性皮膚炎抑制効果を示した. また, 陽性コントロールとして用いたプレドニゾロンは, 強い抑制効果を示した.

TABLE II. Effect of [L] on Microscopic Findings of Glomeruli from Rats with Serum Sickness Nephritis

Treatment	Dose (mg/kg)	Route	Schedule (d)	Index (mean±s.e.)
Control	—	<i>p.o.</i>	1—30	0.98±0.13
[L]	500	<i>p.o.</i>	1—30	0.39±0.17 ^{a)}

a) Significantly different from the control group at $p<0.05$.

Fig. 3. Effect on Light Micrograph of Glomeruli from Rats with Serum Sickness Nephritis

(A) Control group (untreated nephritic group); (B) [L] 500 mg/kg, *p.o.* group (H.E. ×100).

結 論 及 び 考 察

今回, 奈良県産霊芝 No. 9 の抗アレルギー作用について, *in vivo* のモデルを用いて検討を行った.

ヒト気管支喘息は, アナフィラキシー型である I 型のみならず, アルサス型の III 型や, 細胞性免疫による IV 型アレルギーも関与し, 複雑にからみあった疾患といわれている. 今回は, 江田らによって開発された I 型の応用であるモルモット実験的喘息を用いて, [L] の効果を検討した. その結果, 明らかに, 呼吸型の変化を抑制し, 異常呼吸波の出現を抑制した. その作用点については, 投与時期, 投与期間の検討とともに, 気管支に対す

Fig. 4. Effect of [L] on PC-Induced Contact Dermatitis in Mice

Each group included 10 animals. Significantly different from the control group at a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$, respectively.

Drugs were given per os immediately before and 16 h after the challenge.

る直接作用なのか、あるいは chemical mediator の遊離抑制に基づく二次的な作用なのかについて目下検討中である。

次に III 型アレルギーに分類される糸球体腎炎は、血中で抗原と抗体が結合して生じた免疫複合体が腎糸球体に沈着して惹起される疾患で、ヒト糸球体腎炎の約 90% を占めるといわれている。今回は、ウサギ血清アルブミンによって惹起させるラット active immune complex 腎炎を用いて [L] の効果を検討した。その結果、[L] は尿中への蛋白排泄量を有意に減少させ、血清コレステロールや尿素窒素に対しても明らかな改善作用を示した。また、病理組織学的観察の結果、糸球体部位への白血球の浸潤を強く抑制した。この作用機序については、次報に詳述するが、[L] は、マクロファージの食食能活性化作用を有しており、抗原抗体複合物の網内系によるすばやい処理が考えられる。

また、[L] は、自然発症高血圧ラット (SHR) の血圧に対しては、全く降下作用を示さなかったが、^{b)} この糸球体腎炎発症に伴って起こる高血圧症に対し、有意な降圧作用を示した。この点は、腎性高血圧に対する臨床使用上、興味深く、さらに詳細に検討を加える予定である。

IV 型アレルギーの動物モデルとして、今回 PC による接触性皮膚炎をとりあげ、[L] の効果を検討した結果、用量依存的な著明な抑制効果が認められた。なお、その作用点、ステロイド剤との併用効果についても検討を加え、次報に詳述する。

今回の実験結果と、[L] が強い肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用を有し、^{b)} また I 型アレルギーのモデルである PCA 反応を強く抑制する¹⁾ ことから考えて、更に精査を必要としているものの [L] は、幅広い抗アレルギー作用を有するものと考ええる。

引用文献

- 1) 野上真里, 辻 由貴子, 久保道德, 高橋正興, 日本薬学会第 104 年会講演要旨集, 1984, p. 126.
- 2) 第 6 報: 野上真里, 辻 由貴子, 久保道德, 高橋正興, 木村浩二, 松生好雄, 薬誌, **106**, 594 (1986).
- 3) 唐 慎微, “重修政和經史證類備用本草,” 国立中国医薬研究所, 北京, 1976, p. 168.
- 4) 北京医学院薬理教研組, “関千靈芝研究の進展,” 第 4 卷, 中草葯通訊, 1974, pp. 52—56; *idem, ibid.*, 第 5 卷, pp. 51—58.
- 5) 久保道德, 野上真里, 第 13 回生薬分析討論会, 講演要旨集, 1984, p. 1.
- 6) 高橋正興, 野上真里, 辻 由貴子, 久保道德, 高橋 猛, 日本生薬学会第 30 回年会, 講演要旨集, 1983, p. 25.
- 7) B. B. Levine, A. P. Redmond, *J. Clin. Invest.*, **47**, 556 (1968).
- 8) B. B. Levine, H. J. R. Chang, N. M. Vaz, *J. Immunol.*, **106**, 29 (1971).
- 9) A. Koda, K. Sakamoto, K. Nakamura, T. Kano, *Jpn. J. Pharmacol.*, **30**, 559 (1980).
- 10) 永松 正, 鈴木良雄, 日薬理, **78**, 491 (1981).
- 11) F. B. Kingsbury, C. D. Clark, G. Williams, A. L. Post., *J. Lab. Clin. Med.*, **11**, 981 (1962).
- 12) G. L. Asherson, W. Dtak, *Immunology*, **15**, 405 (1968).