

マクロファージの一酸化窒素 (NO) 産生に及ぼす 酵母マンナンの影響

大川 喜男*, 藤原 知, 関 史行, 川俣 友紀, 白男川賢治, 加藤 幸江

Effect of Yeast Mannan on Nitric Oxide Production in Macrophage

Yoshio OKAWA *, Tomo FUJIWARA, Fumiyuki SEKI, Yuki KAWAMATA

Kenji SHIRAOGAWA, and Yukie KATO

(Received November 22, 2005)

In this study we examined *in vitro* effect of yeast mannans on nitric oxide (NO) production in a macrophage cell line, RAW264.7. The acidic mannan fraction (WAM025) from bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, increased the production of NO in RAW264.8 cells. This effect was stronger than that of the neutral mannan fraction (WNM) from the same yeast. On the other hand, the whole mannan from *Candida albicans* NIH A-207 strain did not increase the production of NO in RAW264.7 cells and inhibited lipopolysaccharide-induced NO production in the cells.

Key words — *Saccharomyces cerevisiae*; *Candida albicans*; mannan; macrophage nitric oxide

パン酵母, *Saccharomyces cerevisiae*, 粗マンナン¹⁾ は, DEAE-Sephadex カラムによる分離精製により中性マンナン (WNM) と酸性マンナン (WAM025) に分けられる。²⁾ 我々はすでに, 両マンナンが免疫賦活作用, すなわち, マウスマクロファージの酵素活性や多形核白血球の活性酸素産生の上昇作用等により, 抗腫瘍作用や感染防御作用を示すことを報告した。³⁻¹²⁾ この両マンナンの大きな違いはタンパク質やリン酸含有量の相違であり, WNMはほぼマンノースのみからなるのに対し, WAM025はマンナン部分他にリン酸基やタンパク質を含んでいる。Okawaraらはマクロファージ活性化に, WAM025中のマンナン以外の成分の存在がマクロファージや多形核白血球の活性を直接, 又は間接的に増大し, また, 数をも増加させることからマウス当たりの全活性を顕著に増大し, 腹水型腫瘍に対する抗腫瘍作用や微生物感染防御能を発現していることを報告してきた。⁵⁻⁸⁾

食細胞の放出する一酸化窒素 (NO) は多様な生物活性をもち, 抗菌,^{13,14)} 抗腫瘍作用¹⁵⁾ を示す主要な因子の一つであることが知られてきた。一方, NOは自己の免疫系には抑制的に働き, 自己の正常組織を破壊する事もある。現在まで, 多糖によるマクロファージからのNO産生については, *Phellinus linteus* の酸性多糖¹⁵⁾ と *Aloe vera* からのアセマンナン¹⁶⁾ で検討がなされている。そこで本研究では, *S. cerevisiae* と *Candida albicans* のマンナンのマクロファージのNO産生に及ぼす影響について *in vitro* で検討した。

材料及び方法

1) マンナン

Saccharomyces cerevisiae の中性マンナン (WNM) と酸性マンナン (WAM025)²⁾ 並びに *Candida albicans* NIH A-207株のマンナン (A-

27-M)¹⁷⁾を用いた。

2) マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 の培養

培養液は Dulbecco's Modified Eagle Medium (Dulbecco's MEM, LIFE TECHNOLOGIES) にウシ胎児血清 (GIBCO) 10%, 10000 U/ml ペニシリンと 10000 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンを混合した抗生物質 (GIBCO) を 1% となるように混和し使用した。-80°C で保存の RAW264.7 細胞 (AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION 貯蔵のものを大日本製薬株式会社を介して入手) $1 \times 10^6/\text{ml}$ を 37°C で融解後, 滅菌遠心チューブ (15 ml) に移しかえ, クリーンベンチ内で培養液 5 ml を加え攪拌後, 1000 rpm で 5 分間遠心分離し, 沈殿物 (細胞) を得た。その沈殿物に培養液 2 ml を加え攪拌した後, 生細胞は細胞懸濁液 10 μl にトリパンブルー (LIFE TECHNOLOGIES) を 10 μl 加えよく混和後, 細胞数を血球計算盤で計数し, $1 \times 10^5/\text{ml}$ に調整した。それを 37°C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養した。

3) RAW264.7 細胞へのマンナンの添加

十分に増殖した RAW264.7 細胞の培養フラスコの底を Cell scapchar (BECTON DICKINSON) ではがし, さらにピペッティングして付着した細胞を浮遊させた。培地を培養フラスコから滅菌遠心チューブに移し, 1000 rpm で 20°C, 2 分間遠心分離した。その沈殿に培養液を加え, $1 \times 10^7/\text{ml}$ になるように調整したものを測定用細胞として用いた。この細胞液 20 μl を 96 ウェルプレート (住友ベークライト株式会社) に各試料に対し 3 ウェルずつ入れ, 培養液 80 μl を加える。さらに WNM, WAM025, A-27-M 20 mg/ml をそれぞれ 100 $\mu\text{g/ml}$, 1 mg/ml, 10 mg/ml となるように, Dulbecco's MEM で調整し, それぞれ 100 μl を添加して, 全量を 200 μl とした。また, マンナンの代わりに陽性コントロールとして *Escherichia coli* serotype 0111:B4 由来 Lipopolysaccharide: LPS (SIGMA 社) 10 ng/ml, 100 ng/ml を用いた。さらに, マンナンと LPS を A. マンナン 1 mg/ml + LPS 10 ng/ml, B. マンナン 1 mg/ml + LPS 100 ng/ml, C. マンナン 10 mg/ml + LPS 10 ng/ml, D. マンナン 10 mg/ml + LPS 100 ng/ml の濃度で同一ウェルに加えた。この時のコントロ

ールとして, この細胞液を 20 μl とり 96 穴プレートに入れ, 培養液 180 μl を加えたものを用いた。これを 5% CO₂ インキュベーターで 37°C, 24, 48, 72 時間培養した。実験はそれぞれ 2 回ずつ行い, 再現性を確認した。

4) 亜硝酸イオンの測定

Green らの方法¹³⁾ に従って行った。すなわち, 培養した測定用細胞液の上清 100 μl と Griess 試薬 (関東化学) 100 μl を 96 ウェルプレート上で混合した。また, 検量線作成用に亜硝酸ナトリウムを用い, 0, 5, 10, 20, 50 μM をそれぞれ 100 μl 調整し, 測定細胞と同様に Griess 試薬 100 μl を加えた。室温で 10 分間静置し, Micro PLate Reader A4 (Tosoh 社製) で 550 nm における吸光度を測定し, 検量線から亜硝酸イオンの含有量を算出した。

5) 統計処理

有意差検定は Student *t*-test により行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

実験結果

1) RAW264.7 細胞の NO 産生に及ぼす *S. cerevisiae* マンナンの影響

S. cerevisiae マンナン (WNM 及び WAM025) の RAW264.7 細胞の NO 産生に及ぼす影響を比較した結果 (Fig. 1), 24 時間後では, WNM, WAM025 共に 100 $\mu\text{g/ml}$, 1 mg/ml, 10 mg/ml いずれの濃度でもコントロールと比べさしたる変化は認められなかった。一方, 72 時間後では, WNM, WAM025 とも 10 mg/ml で NO 産生の増大がみられ, WNM はコントロールの約 8 倍 ($p < 0.01$), WAM025 では約 30 倍 ($p < 0.001$) と顕著な増大がみられた。

2) RAW264.7 細胞からの NO 産生に及ぼす *C. albicans* マンナンの影響

まず, *C. albicans* マンナン (A-27-M) 単独添加が NO 産生に及ぼす影響を経時的に調べた結果 (Fig. 2), *C. albicans* マンナンは 100 $\mu\text{g/ml}$, 1 mg/ml, 10 mg/ml いずれの濃度でも NO 産生には影響を与えないことがわかった。次に, *C. albicans* マンナンが LPS の NO 産生に与える影

響について検討した(Fig. 2). LPSは10 ng/ml, 100 ng/mlいずれの濃度でも単独でNO産生の上昇がみられた. 特に72時間培養ではコントロールと比べ顕著な上昇がみられた($p < 0.01$, $p < 0.001$). LPSへのマンナン100 $\mu\text{g/ml}$ 及び1 mg/ml添加においては各々の時間値でLPS単独時と比べて変化は認められなかった. 一方, マンナン10 mg/ml添加において, LPS 10 ng/ml混和時ではLPS単独時と比べて48時間値で1/6 ($p < 0.01$)に, 72時間値で1/20 ($p < 0.001$)にNO産生が低下した. また, LPS 100 ng/ml混和時ではLPS単独時と比べて, 48時間値で1/4 ($p < 0.05$)に, 72時間値で1/40 ($p < 0.001$)にNO産生が低下することがわかった.

考 察

我々はすでに, パン酵母マンナンがマウス腹腔マクロファージや血中多形核白血球の各種酵素活性を上昇させ, そのことにより抗菌、抗腫

瘍活性を示すことを報告した.^{4,5,7-10,12} また, 抗菌, 抗腫瘍因子としてNOの重要性も指摘されており, ある種の高糖はマクロファージのNO産生を促進することが知られている.^{15,16} そこで次に, パン酵母マンナンと*C. albicans*マンナンを用いてマクロファージNO産生促進効果の有無について検討した. パン酵母マンナンのうち, WAM025のマクロファージのライソゾーム酵素活性や活性酸素産生の上昇はマンナン中のリン酸基やタンパク質などのマンナン以外の成分の影響が大きいので,⁵⁻⁸ まずNO産生においても同様のことがいえるかどうか*S. cerevisiae*粗マンナンから分離・精製したWNMとWAM025を用いて検討した(Fig. 1). WAM025 10 mg/mlにおいてはWNMに比べて, 72時間後でNO合成酵素(iNOS)の誘導がより強く起こりNO量の顕著な増大が見られたものと考えられる. このことから, WAM025中のリン酸基又はタンパク質部分がNO産生をより強く刺激する作用があると推定できる. この実験から, パン酵母マンナ

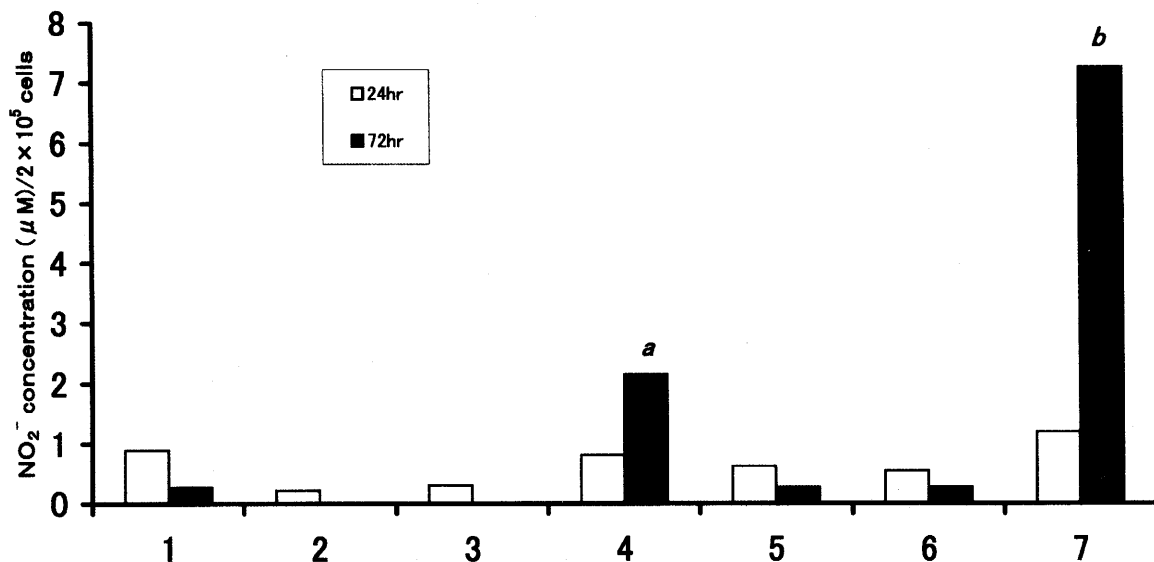


Fig. 1. Effect of *S. cerevisiae* Mannans on NO Production in RAW264.7 Cells

RAW264.7 cells ($1 \times 10^6/\text{ml}$) were incubated for 24 h (□) and 72 h (■) with mannans.

1, Control; 2, WNM 100 $\mu\text{g/ml}$; 3, WNM 1 mg/ml; 4, WNM 10 mg/ml; 5, WAM025 100 $\mu\text{g/ml}$; 6, WAM025 1 mg/ml; 7, WAM025 10 mg/ml

Values are the mean NO concentrations in the supernatants from triplicate cultures. Standard deviations in the cultures were $< 20\%$. Significantly different from control (72 h) group (a, $p < 0.01$; b, $p < 0.001$).

ン, 特にWAM025, はマクロファージのNO産生を増強させる作用があり, このNO産生が抗腫瘍性⁵⁾ や抗感染性^{7,8)} を示す因子の一つになっているものと考えられた.

次に, RAW246.7細胞に*C. albicans*マンナン(A-27-M)を加えて検討した(Fig. 2). *C. albicans*マンナンは*S. cerevisiae*マンナンと異なり, 単独ではほとんどNO産生に影響を与えなかった. 現在まで, *C. albicans*菌体はインターフェロン-ガンマ(IFN- γ)とLPSで刺激したマウス腹腔マクロファージによるNO産生を抑制することが報告されている.¹⁸⁾ 今回の実験でも, LPSは単独で濃度と時間に依存してNO産生を顕著に増加させることが確認された(Fig. 2). 次に, LPSのNO産生に*C. albicans*マンナンがどのような影響をあたえるか検討した. その結果, *C. albicans*マンナン(A-27-M)10 mg/mlとLPS 10

または100 ng/mlの群で, 48または72時間までにA-27-MはLPSのNO産生を顕著に抑制した(Fig. 2). このことから, NOを防御因子の一つと考えた場合, *Candida*とグラム陰性菌の混合感染で, グラム陰性菌優位ではLPSによるマクロファージからのNOにより*Candida*を殺し真菌感染は抑制状態にあり, *Candida*が優位でマンナンが高濃度に存在するとマクロファージからのグラム陰性菌によるNO産生を抑制し重篤な真菌感染症になる可能性があるという病変部位での複雑な相互作用の一面を想定できる. また本実験から, *C. albicans*菌体によるLPS依存性マクロファージNO産生の抑制活性¹⁸⁾の本体はマンナンであることが証明できた.

今回このように, マクロファージからのNO産生に及ぼす酵母マンナンの影響について検討したが, パン酵母より分離精製した両マンナン

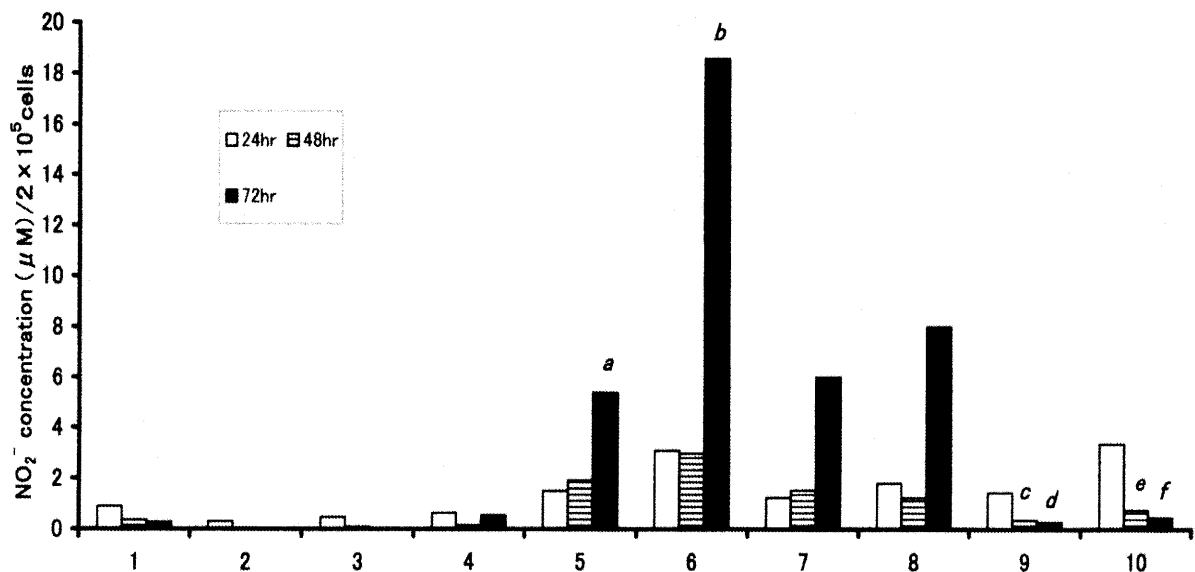


Fig. 2. Effect of *C. albicans* Mannan on NO Production in RAW264.7 Cells

RAW264.7 cells (1×10^6 /ml) were incubated for 24 h (□), 48 h (▨), and 72 h (■) with mannan, LPS, and Mannan + LPS.

1, Control; 2, Mannan 100 mg/ml; 3, Mannan 1 mg/ml; 4, Mannan 10 mg/ml; 5, LPS 10 ng/ml; 6, LPS 100 ng/ml; 7, Mannan 1 mg/ml + LPS 10 ng/ml; 8, Mannan 1 mg + LPS 100 ng/ml; 9, Mannan 10 mg/ml + LPS 10 ng/ml; 10, Mannan 10 mg/ml + LPS 100 ng/ml

Values are the mean NO concentrations in the supernatants from triplicate cultures. Standard deviations in the cultures were < 20%. Significantly different from control (72 h) group (a, $p < 0.01$; b, $p < 0.001$), LPS 10 ng/ml (48 h) group (c, $p < 0.01$), LPS 10 ng/ml (72 h) group (d, $p < 0.001$), LPS 100 ng/ml (48 h) group (e, $p < 0.05$), and LPS 100 ng/ml (72 h) group (f, $p < 0.001$).

(WNMとWAM025)画分と*C. albicans* マンナンではマクロファージのNO産生において異なった挙動を示すことが明らかになった。これは各マンナンの構造(または構成成分)^{2,19,20)}の微妙な違いがマクロファージに認識されるためと考えられる。今後は各種感染症の病態と生体防御の系におけるNOの役割についてさらに詳細な解析を進めていかなければならない。

REFERENCES

- 1) Kocourek J., Ballou C. E., *J. Bacteriol.*, **100**, 1175–1181 (1969).
- 2) Okubo Y., Suzuki S., *Carbohydr. Res.*, **62**, 135–141 (1978).
- 3) Suzuki S., Suzuki M., Matsumoto T., Okawa Y., *Gann*, **62**, 343–352 (1971).
- 4) Okawa Y., Okura Y., Hashimoto K., Matsumoto T., Suzuki S., Suzuki M., *Carbohydr. Res.*, **108**, 328–334 (1982).
- 5) Hashimoto K., Okawa Y., Suzuki K., Okura Y., Suzuki S., Suzuki M., *J. Pharm. Dyn.*, **6**, 668–676 (1983).
- 6) Hashimoto K., Okawa Y., Mikami T., Suzuki S., Suzuki M., *J. Pharm. Dyn.*, **7**, 472–478 (1984).
- 7) Okawa Y., Okura Y., Hashimoto K., Suzuki K., Suzuki S., Suzuki M., *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 942–947 (1985).
- 8) Okawa Y., Suzuki K., Kobayashi M., Asagi M., Sakai S., Suzuki S., Suzuki M., *Microbiol. Immunol.*, **30**, 957–967 (1986).
- 9) Okawa Y., Ozeki Y., Suzuki K., Sakai K., Suzuki S., Suzuki M., *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 1138–1143 (1987).
- 10) Kobayashi M., Okawa Y., Suzuki S., Suzuki M., *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 807–809 (1990).
- 11) Okawa Y., Howard C. R., Steward M. W., *J. Immunol. Methods*, **149**, 127–131 (1992).
- 12) Okawa Y., *Annual Report Tohoku College of Pharmacy*, **45**, 39–58 (1998).
- 13) Green S. J., Meltzer M. S., Hibbs J. B., Jr., Nacy C. A., *J. Immunol.*, **144**, 278–283 (1990).
- 14) Fierro I. M., Barja-Fidalgo C., Cunha F. Q., Ferreira S. H., *Immunology*, **89**, 295–300 (1996).
- 15) Kim G.-Y., Choi G.-S., Lee S.-H., Park Y.-M., *J. Ethnopharmacol.*, **95**, 69–76 (2004).
- 16) Ramamoorthy L., Kemp M. C., Tizard I. R., *Mol. Pharmacol.*, **50**, 878–884 (1996).
- 17) Okawa Y., Takahata T., Kawamata M., Miyauchi M., Shibata N., Suzuki A., Kobayashi H., Suzuki S., *FEBS Lett.*, **345**, 167–171 (1994).
- 18) Chinen T., Qureshi M. H., Koguchi Y., Kawakami K., *Clin. Exp. Immunol.*, **115**, 491–497 (1999).
- 19) Kobayashi H., Shibata N., Osaka T., Miyagawa Y., Ohkubo Y., Suzuki S., *Phytochemistry*, **31**, 1147–1153 (1992).
- 20) Kobayashi H., Tanaka S., Suzuki J., Kiuchi Y., Shibata N., Suzuki S., Okawa Y., *FEMS Microbiol. Lett.*, **152**, 235–242 (1997).