The Japanese Society of Pharmacognosy

Natural Medicines 51(4), 310-315 (1997)

担子菌培養抽出物であるAHCCのマウス四塩化炭素肝障害モデルに対する肝保護作用

孫　歩祥*, 若命浩二, 向田朋美, 豊島厚司
金沢　勉, 小砂憲一

(株) アミノアップ化学

Protective Effects of AHCC on Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury in Mice

Buxiang Sun,* Koji Wakame, Tomomi Mukoda, Atsushi Toyoshima, Tsutomu Kanazawa and Kenichi Kosuna

Amino Up Chemical Co., Ltd., High Tech Hill Shin-Ei, 363-32, Sin-Ei, Toyohira-ku, Sapporo 004, Japan

(Received September 27, 1996)

Active Hexose Correlated Compounds (AHCC) extracted from cultured broth of *Basidiomycotina* were examined for their protective effects on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver injury in mice. The AHCC treatment obviously suppressed the changes of several physiological and biochemical parameters in the mice injected with CCl_4 for 5 days: the decrease of body weights and the increases of liver weights, the sGPT (serum glutamate pyruvate transaminase) level and the level of LPO (lipid peroxide) induced by CCl_4 were significantly reduced by the AHCC treatment. The AHCC treatment also induced detoxication enzymes—GST (glutathione *S*-transferase) and UDP-GT (uridine diphosphate glucuronyl transferase) activities. AHCC also showed some effects on the CCl_4-induced suppressin of phase I drug-metabolizing enzymes. The anti-oxidant effect and the activity modifying-effect on drug-metabolizing enzymes might be related to the AHCC protection of liver from CCl_4-induced liver injury.

Keywords——liver injury; liver protection effect; carbon tetrachloride; glutathione *S*-transferase; lipid peroxide

自然界には約5,900属，6,400種の菌類が生息するといわれ，中でも担子菌に属する主な菌類生薬には，霊芝，猪苓，雷丸などが知られている．そして，これらの菌類のなかには，β-1,3-glucanのような多糖類をはじめとする様々な生理活性物質が確認されている．その活性として，抗腫瘍活性や免疫系に対する調節活性，血糖降下活性などの報告がある[1]．

近年，培養技術の発展によりこれら担子菌の人工培養が可能となった．Active Hexose Correlated Compounds (AHCC；(株) アミノアップ化学社製) は担子菌類の菌糸体を液体タンク培養し，各種酵素処理，熱水抽出して得られた多糖類等を含有する混合物である[2]．

このAHCCはBiological Response Modifiers (BRM) として，また非特異的免疫活性賦活剤として，いくつかの生理活性が確認，報告されている[3]．特に臨床においては，糖尿病，肝臓病などの成人病の改善，担癌患者の癌細胞の萎縮，転移抑制，生存期間の延長，化学療法による副作用の軽減等の報告がされている[3]．

以上のような臨床報告が多数あるものの，実際の薬理作用に至ってはまだ未解明の部分が多い．今回，この薬理作用解明の第一段階として，ヒト薬剤性肝障害によく似た症状が得られるとされている[4]四塩化炭素による急性肝炎モデルマウスを作成した．そして，このモデルマウスにAHCCを経口投与した際の肝臓に対する肝機能の変化，また肝薬物代謝酵素に及ぼす影響を調べたので報告する．

実　験　の　部

実験動物　生後7週齢，体重34～38 gのICR系雄性マウス(日本クレア株式会社より購入)を使用し，固形飼料(CE-2；日本クレア社製) と飲料水 (水道水) を自由摂取させ，1週間予備飼育を行った．

使用薬物　本研究で使用した薬物はすべて和光純薬工業製，Sigma社製を用いた．

AHCCはアミノアップ化学社製AHCCフリーズドライを使用した．

実験方法

試料の作成及び投与方法——AHCCは精製水に溶解して50%溶液とした後，1 g/kg/dayをマウスに3日間強制経

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Pharmacognosy

口投与した．その翌日からCCl_4をオリーブ油（日本薬局方）で希釈し，20%溶液とした後，2 ml/kg/day (CCl_4 0.4 ml/kg) を5日間腹腔内投与した．これらのマウスは1群5匹とし，無処理の正常群，CCl_4を投与した障害群，AHCCのみを投与した単独投与群，AHCCを投与した後CCl_4を投与した併用群とした．

採血及び各臓器摘出保存方法――CCl_4最終投与日に絶食を行い，飲料水は自由に摂取させた．その12時間後にマウスの頸動脈より採血を行い，遠心分離(3,000 r.p.m., 5 min) により血清成分を得た．また肝臓は摘出後，冷生理食塩水(0.9%)で洗浄し，湿重量の測定を行った．そして速やかに冷凍(−80度) 保存した．

血清成分測定方法――得られた血清中のglutamate pyruvate transaminase (GPT) 活性はRate法 (GPT-UVテストワコー)，Albumin (A) はBCG法（アルブミン-Bテストワコー)，Total protein (TP) はLowryらの方法[5]，Globulin (G) はTP-Aにより算出，Triglyceride (TG) はAcetylacetone法（トリグリセライド-テストワコー）に従い測定した．

酵素材料の調製――摘出凍結保存しておいたマウス肝臓に4倍量の冷0.154 M KCl-0.05 M Tris (pH 7.4)-1 mM EDTAを加え，氷冷下でホモジネートした．この肝ホモジナイズを1,000 r.p.m., 5℃, 5 min, 引き続き10,000 r.p.m., 5℃, 15 minで遠心分離し，上清画分を得た．次に10,000 r.p.m.で得た上清を38,000 r.p.m., 5℃, 60 minで遠心分離して上清（サイトゾール）画分を得てこれをGST測定に用いた．38,000 r.p.m.で得た沈殿物に肝湿重量の2倍量の冷0.154 M KCl-0.05 M Tris (pH 7.4)-1 mM EDTA-20% glycerol液を加えてミクロゾーム画分を得た．このミクロゾーム画分をProtein, P450, LPO, UDP-GT, ERDM, AHHの測定に用いた．

肝ミクロゾーム中の過酸化脂質 (LPO) の測定方法――Yagi[6]の方法に準じた．肝ミクロゾーム画分0.05 mlに1/12 N H_2SO_4 4.0 ml, 10%リンタングステン酸水溶液0.5 mlを加え，3,000 r.p.m., 10 minで遠心分離し，沈殿物にTBA試薬を加え，沸騰水中で60分間加熱した．得られた蛍光物質を*n*-ブタノールで抽出し，分光蛍光光度計により蛍光強度を測定した (EX：515 nm, EM：553 nm)．

P450含量の測定方法――Omura and Satoの方法[7]に準じた．肝湿重量250 mgに相当する酵素液3 ml 2本にハイドロサルファイトナトリウム1×10^{-4} molを加え一方にCOを30秒間通じ，他方を対照とし450～480 nmの吸光度差と91 mM^{-1} cm^{-1}のモル吸光係数から，P450含量をnmol cytochrome P450/mg proteinとして求めた．

各酵素活性の測定――Glutathione *S*-transferase (GST) の測定はHabigらの方法[8]，Uridine phosphate glucuronyl transferase (UDP-GT) の測定はMulderらの方法[9]，Arylhydrocarbon hydroxylase (AHH) の測定はDehnenらの方法[10]，Benzyloxyresorufin *O*-dealkylation (BROD) の測定はLubetらの方法[11]，Erythromycin *N*-demethylase (ERMD) の測定はWrightonらの方法[12]に従い測定した．

病理組織学的検査――脱血後直ちに摘出した肝臓を常法によりホルマリン固定し，パラフィン包埋してからの薄切標品をヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色に付して顕鏡した．

統計処理――結果は平均値±標準偏差 (means±SD) で示した．データはANOVA法で分析し，有意差の検定はKruskall-Wallis testにより行い，危険率5% ($p<0.05$) 以下を有意な変化として表示した．

TABLE I. Effects of Different Treatments on Body Weights, Liver Weights

Samples	Change of body weight (g/5 days)	% of control liver weight/body weight (%)
Control	−1.6±0.9§	100.0±6.5
CCl_4	−2.4±1.1	173.5±37.1*
AHCC	−0.6±0.5	107.1±3.3
CCl_4+AHCC	−1.25±0.9	135.0±9.0*△

§ Values represent means±SD of 4 or 5 mice.
* Statistical significances of differences vs. control are indicated with $p<0.05$.
△ Statistical significance of differences vs. CCl_4 treatment is indicated with $p<0.05$.

実験結果

1. マウス一般状態の変化

CCl_4投与群では自発運動の減少，体毛の黄変，体重増加抑制などの中毒症状が確認された．一方，CCl_4とAHCCの併用投与群ではこれらの症状は軽減された．マウスの肝臓湿重量はCCl_4投与群では70%以上増加したのに対しAHCC同時投与群では有意に重量増加を抑制した(TABLE I)．

2. 血清・ミクロゾーム画分中の生化学的パラメーターの変化

CCl_4投与群では血清GPT活性が369.5 (IU) に増加したのに対し，AHCC併用投与群ではその増加を164.7 (IU) に抑制した．トリグリセライド，アルブミン，グロブリンについては有意な変化は確認できなかった (TABLE II)．

また，肝ミクロゾーム画分中の過酸化脂質 (LPO) はCCl_4投与群で287 nmol/mlとコントロールと比較して2倍以上増加した．一方AHCCの併用投与では152 nmol/mlとなり，その脂質過酸化作用を有意に抑制した．また，AHCC単独投与でもコントロールと比較して脂質過酸化を若干抑制した(Fig. 1)．

3. 第I相薬物代謝酵素系の変化

肝ミクロゾーム画分中のチトクロームP450含有量は

NII-Electronic Library Service

CCl_4 投与群で減少を示したが，AHCC を併用投与することによって P450 の減少を抑制した．また，AHCC 単独投与の場合ではコントロールより P450 の含有量の増加がみられた(Fig. 1)．

第 I 相薬物代謝酵素群の活性を測定した結果，BROD 活性は確認されなかった．また，ERDM 活性は CCl_4 単独投与で著しく抑制され，AHCC 単独投与で誘導されたが，CCl_4 と AHCC の併用投与ではコントロールと同じレベルであった．

AHH 活性については CCl_4 または AHCC の単独投与で誘導傾向がみられたが，併用投与群でしか有意差が認められなかった (Fig. 2)．

4. 第 II 相薬物代謝酵素系の変化

第 II 相薬物代謝酵素群の活性を測定した結果，GST 活性および UDP-GT 活性は CCl_4 投与でいずれも抑制されたが，AHCC を同時に投与した時にはこれらの抑制作用はみられなかった．さらに，AHCC 単独投与群では GST 活性を誘導した (Fig. 3)．

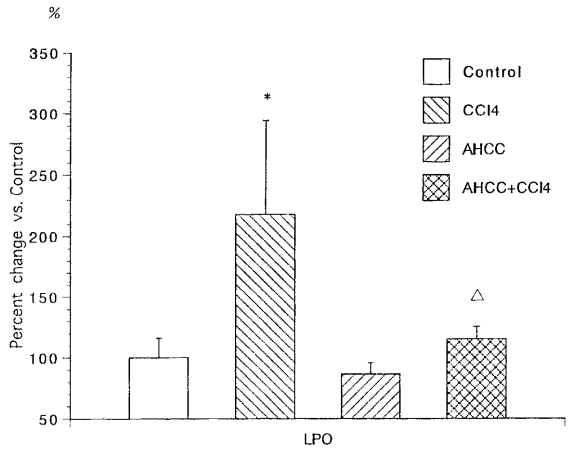

Fig. 1. Changes of Levels of LPO from CCl_4 or AHCC-Treated Hepatic Microsomes in Mice
Values represent mean±SD of 4-5 mice per group and are shown as percent changes compared with control. The value of the control (mean±SD) is 131.94±21.53 nmol/mg-protein.
*Significantly different from untreated group at $p<0.05$. △Significantly different from CCl_4-treated group at $p<0.05$.

TABLE II. Effects of Different Treatments on Serum Parameters

	Glutamate pyruvate transaminase (IU/l)	Triglyceride (mg/dl)	Albumin (g/dl)	Albumin/Globulin
Control	51.4±11.5§	84.5±39.6	4.6±0.2	2.0±0.3
CCl_4	369.5±152.8*	82.7±24.5	5.1±0.5	1.9±0.4
AHCC	66.0±35.9	93.3±36.6	4.6±0.3	1.9±0.2
CCl_4+AHCC	164.7±10.8*△	65.5±24.1	4.8±0.5	1.6±0.2

§ Values represent means±SD of 4 or 5 mice.
*Statistical significances of differences vs. control are indicated with $p<0.05$.
△ Statistical significance of differences vs. CCl_4 treatment is indicated with $p<0.05$.

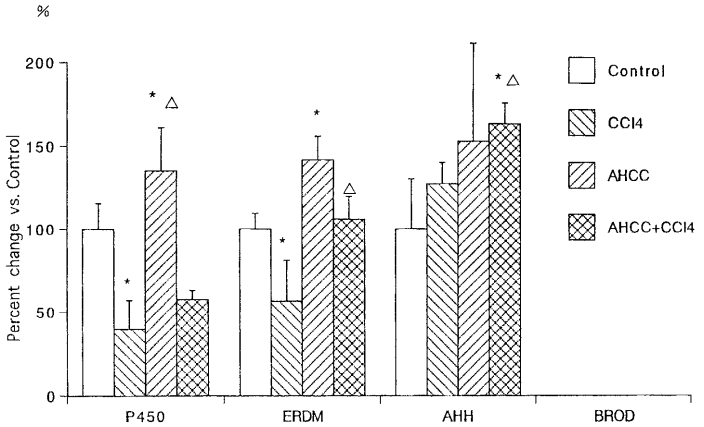

Fig. 2. Changes of Contents of Cytochrome, P450 Activities of ERDM, AHH and BROD from CCl_4 or AHCC-Treated Hepatic Microsomes in Mice
Values represent mean±SD of 4-5 mice per group and are shown as percent changes compared with control. The values of the control (mean±SD) are ERDM : 1.82±0.17, AHH : 6.4±1.93, BROD : 0 nmol/min/mg-protein.
*Significantly different from untreated group at $p<0.05$. △Significantly different from CCl_4-treated group at $p<0.05$.

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Pharmacognosy

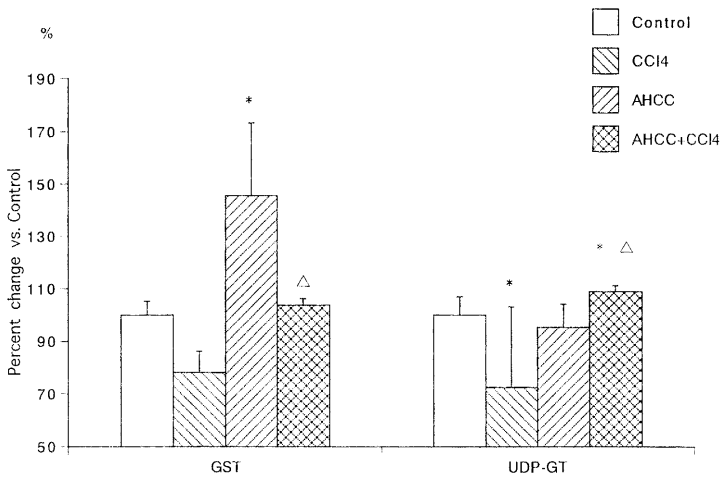

Fig. 3. Changes of Activities of GST and UDP-GT from CCl_4 or AHCC Treated Hepatic Microsomes in Mice
Values represent mean±SD of 4–5 mice per group and are shown as percent changes compared with control. The values of the control (mean±SD) are GST: 102.13±5.18 nmol/min/mg, UDP-GT: 18.14±1.25 nmol/min/mg-protein.
*Significantly different from untreated group at $p<0.05$.
△Significantly different from CCl_4-treated group at $p<0.05$.

5. 病理組織の変化

CCl_4 単独投与及び CCl_4 と AHCC の併用投与群の肝組織像の所見を Fig. 4 に示した．この CCl_4 単独投与群においては，中心静脈周囲性の広範囲な肝実質細胞壊死巣の散在，炎症性細胞の浸潤などの病理所見が認められた．一方，AHCC との併用投与群は中心壊死巣はほとんどみられず，わずかに炎症性細胞の浸潤がみられたのみであり，病理組織学的にも AHCC の肝臓に対する有効性が認められた．

考　　察

実験的肝障害を誘発させる肝毒物のうち，CCl_4 は一般的に用いられており，短期間の投与により急性肝障害を誘発することが知られている[13]．

今回はこの急性肝障害のモデルを用いて AHCC の肝防護効果を調べた．AHCC の生理活性として免疫賦活作用，抗癌作用などが知られているが，AHCC のような植物性多糖類にはその他にも多くの活性があることが予測される．そして，今回の実験によりその活性の一つが明らかとなったと考えられる．

本研究で作成した CCl_4 によるマウス急性肝炎モデルでは，ヒトの急性肝障害時にもよく認められる食欲の低下，体重の減少，肝臓の肥大，sGPT 値の上昇等が観察された．

まず臓器重量であるが，肝臓湿重量の増加を AHCC は有意に抑制した．CCl_4 を投与したマウスの肝臓は脂質代謝の異常により脂肪肝となることが知られており[13]，また，可溶化剤として用いたオリーブオイルも肝臓の脂肪蓄積に影響を及ぼしていると考えられる[14]．病理組織検査では，CCl_4 単独投与より AHCC との併用投与で肝組織の脂肪変性が有意に抑制されたことで，AHCC は脂肪肝に対してなんらかの効果があると思われる．

血清中の指標については，一般的な肝炎の指標となる sGPT 値の上昇（肝細胞損傷時に上昇する）を抑制したことから，CCl_4 由来のラジカルが肝細胞を攻撃するのを防ぐ[15]といった作用があることが考えられた．

本研究で測定した肝チトクローム P450 は CCl_4 投与群では減少した．P450 が減少した原因について，一般に P450 含量の変化は蛋白量の変化に対応することから，ヘム蛋白質の合成や代謝の変化に障害が生じたか，あるいは CO 結合の抑制など P450 活性部分が変化した[16]可能性があげられる．一方，AHCC の単独投与で P450 含有量を誘導する傾向がみられ，併用投与のとき，この二つの投与物の拮抗作用により P450 含有量が正常レベルに近付くことが考えられた．

さらに P450 系代謝酵素である AHH は CYP1A 分子種に属し，一般化合物，特に芳香族化合物に対する代謝酵素であり，発癌物質の代謝活性化に深く関わっている[17]．また，ERDM は CYP3A 分子種に属し，抗生物質およびホルモンなどの内分泌系物質の代謝に深く関わっている．以上のように肝薬物代謝酵素系はホルモンなどの生体内因性物質や，薬物などの生体外物質が吸収された後に肝臓を通過する際に最も重要な酵素系であり，かつ肝障害時には総量，活性の変動が起りやすい酵素系として知られている[18]．また，肝疾患（肝不全）時にはこれらの酵素活性が抑制され，内分泌障害が起こることが知られており，副腎ホルモンの異常や，性ホルモンの代謝異常によって全身倦怠感や微熱などの様々な一般症状を引き起こす[19]．それに対して

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Pharmacognosy

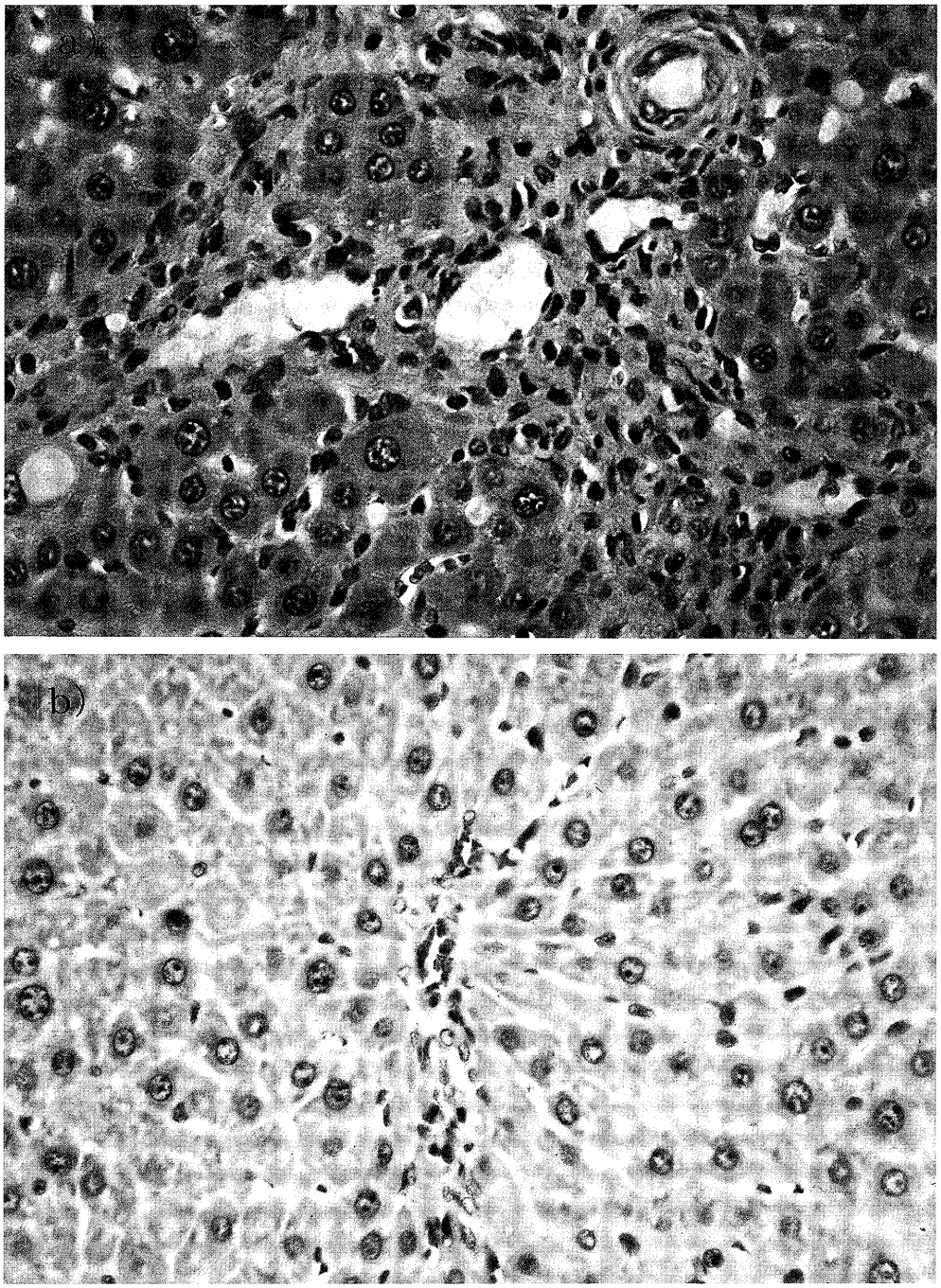

Fig. 4. Liver Morphology after CCl_4 Treatment (H.E. stain, ×200)
a) CCl_4 (0.4 ml/kg, i.p.)-treated; b) CCl_4 + AHCC (5%-diet)-pretreated.

AHCCはこれらの酵素を誘導することにより，生体外からの異物質の解毒，代謝，内因性物質（ホルモンなど）の代謝等の生体機能のバランスを保つ働きをしていることが考えられる．また，AHCCはP450系薬物代謝酵素で代謝される薬物と併用する際に用量の調節などの注意を要することが示唆された．

もう一種の薬物代謝酵素である第II相薬物代謝酵素にGSTとUDP-GTがあげられる．GSTはグルタチオン抱合反応として解毒に深く関わっている．つまり，GSTは疎水性化合物に対して蛋白結合によって解毒を行うもので，生体が吸入したり摂取したりあるいは正常の状態での代謝により生成される有害物に対する生体の防護反応を行う．またUDP-GTについてもグルクロン酸抱合反応として*O*-，*N*-，*S*-，および*C*-グルクロン酸抱合体など様々な種類の生体異物や内因性物質の解毒を行うことが知られている[18]．AHCCにはCCl_4による第II相薬物代謝酵素の活性の低下を抑制する作用，また単独投与でもGST活性を誘導する作用がみられた．つまり，CCl_4による肝障害を防護するメカニズムのひとつが有害物質であるCCl_4の解毒を促進することによるものと考えられる．

NII-Electronic Library Service

The Japanese Society of Pharmacognosy

CCl_4は体内でトリクロロメチルラジカルとなり，このラジカルが過酸化脂質を生成して小胞体や細胞膜を損傷する過酸化反応により肝障害を生じる可能性が考えられている[20]．今回の実験でAHCCとの併用投与群のLPO値がCCl_4単独投与より抑制され，またAHCC単独投与でもコントロールより減少されていることから，AHCCの作用のもう一つとしてラジカルを消去することにより，ラジカルが起因する肝臓障害を予防することが考えられる．

以上の実験結果をまとめると，AHCCはマウス実験的急性肝障害に対して，一般状態，血中パラメーター，肝薬物代謝酵素のいずれにも保護作用がみられ，その中で，最も注目されるのは，肝臓肥大の抑制，一般中毒症状の減少および解毒酵素の誘導作用であった．それらの保護作用の薬理機構についてはさらに解明する必要があると考えられる．

謝　辞：本研究遂行にあたりまして，終始ご指導，ご助言を賜りました北海道大学，細川真澄男教授，アミノアップ化学顧問，野中源一郎博士，国立公衆衛生院，福原守雄博士，また実験の細部にわたりご協力いただいた本研究室の皆様に深く感謝いたします．

略　　語

A：albumin, **AHCC**：active hexose correlated compounds, **AHH**：arylhydrocarbon hydroxylase, **BRM**：biological response modifiers, **BROD**：benzyl oxyresorufin *O*-dealkylation, **CCl_4**：carbon tetrachloride, **ERMD**：erythromycin *N*-demethylase, **G**：globulin, **GPT**：glutamate pyruvate transaminase, **GST**：glutathione *S*-transferase, **TG**：triglyceride, **TP**：total protein, **UDP-GT**：uridine phosphate glucuronyl transferase.

引　用　文　献

1）宮崎利夫，“多糖の構造と生理活性”，朝倉書店，東京，1990，p. 3.
2）小砂憲一，*New Food Industry*，**35**，46（1993）.
3）旭丘光志，“食べて治す機能性食品”，光文社，東京，1995，p. 135.
4）R. P. Tamayo, *Hepatology*, **3**, 112 (1983).
5）O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R.G. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
6）K. Yagi, *Biochem. Med.*, **15**, 212 (1976).
7）T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370 (1964).
8）W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby, *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130 (1974).
9）G. J. Mulder, A. B. D. Van Doorn, *Biochem. J.*, **151**, 131 (1975).
10）W. Dehnen, R. Tomingas, J. Roos, *Anal. Biochem.*, **53**, 373 (1973).
11）R. A. Lubet, R. T. Mayer, J. W. Cameron, R. W. Nim, M. D. Burke, R. T. Wolf, F. P. Guengerich, *Arch. Biochem. Biophys.*, **238**, 43 (1985).
12）S. A. Wrighton, P. Maurel, E. G. Schuetz, P. B. Watkins, B. Young, P. S. Guzelian, *Biochemistry*, **24**, 2171 (1985).
13）小澤　光，“新薬開発のための薬効スクリーニング法 Vol. 1”，清至書院，東京，1984，p. 70.
14）清水勝嘉，漢方医学，**10**，13（1986）.
15）伊藤　正，近畿大医誌，**17**，175（1992）.
16）小泉久仁弥，飯島宏治，能美雅才，中山貞夫，小口勝司，日薬理誌，**104**，417（1994）.
17）清水喜八郎他，“疾患と治療薬”，南江堂，東京，1992，p. 255.
18）加藤隆一，高仲　正，佐藤哲男，鎌滝哲也，“薬物の解毒・活性化機構の生化学 Vol. 2”，清至書院，東京，1983，p. 3.
19）F. J. Gonzalez, *Pharmacol. Rev.*, **40**, 243 (1989).
20）P. B. McCay, E. K. Lai, J. L. Poyer, C. M. DuBose, E. G. Janzwn, *J. Biol. Chem.*, **259**, 2135 (1984).

NII-Electronic Library Service