

ヒトリンパ球を用いたキチンとキトサンのガン細胞障害活性テスト

日本キレート(株) 福田幸蔵

1 はしがき

ヒト免疫とは、ヒト体内に進入した病原菌やウイルスやヒト体内で発生するガンなどを排除する能力である。この免疫機能は、リンパ球など白血球に含まれる細胞によって担われている。この免疫機能は個人差があり、免疫力の低いヒトはガンなどに感染し易い。このヒトリンパ球の免疫機能を利用して、健康食品の免疫賦活能を *in vitro* 測定し、免疫を高める食品検索法を開発することは意義深い。

2 キチンオリゴ糖とキトサンオリゴ糖のマウス静脈注射による *in vivo* ガン細胞増殖阻害
キチン 6 糖とキトサン 6 糖それぞれマウス静脈内への注射で、血液中のリンパ球が賦活され、BALB/c マウス移植 Meth - A 固形ガン細胞の重量増加が、無処理に対して 41 ~ 44% 阻害されている (表 1) 1)。この結果は、動物の *in vivo* 実験にて、ガン細胞増殖が、キチン 6 糖やキトサン 6 糖の静脈内への注射にて阻害されていることを示す。

表 1. キチン 6 糖とキトサン 6 糖のマウス静脈内への注射による BALB/c マウス移植 Meth - A 固形ガンに対するガン細胞増殖阻害

試料	投与量 (mg/kg)	ガン細胞重量 (g)	阻害率 (%)
無処理	9.5±0.4	0
キチン 6 糖	10	5.3±0.8	44
キトサン 6 糖	10	5.6±1.0	41

3 動物リンパ球による *in vitro* ガン細胞傷害活性

表 2 は、いずれも水溶性のキトサンオリゴ糖とキチンオリゴ糖で賦活したマウス脾臓 T リンパ球による Meth - A ガン細胞の *in vitro* ガン細胞障害活性を示す 1)。マウス脾臓 T リンパ球のガン細胞傷害活性が無処理に対して、キトサン 6 糖の賦活で 2.8 倍 (10mg/kg) キチン 6 糖の賦活で 2.4 倍 (10mg/kg) に高くなる。表 1 と表 2 から、キチン 6 糖やキトサン 6 糖により賦活されたリンパ球は、*in vivo* と *in vitro* の二種類の動物実験にて、ガン細胞障害活性を示すことが分かる。

表2. キチン6糖とキトサン6糖で賦活したマウス脾臓Tリンパ球による meth-A ガン細胞の in vitro ガン細胞傷害活性 (%)

試料	投与量 (mg/kg)	ガン細胞傷害活性 (%)
無 処 理	・・・	12.2±1.3
キチン6糖	10	29.9±2.1
キトサン6糖	10	34.2±2.4

4 ヒトリンパ球による in vitro ガン細胞障害活性

上記したキチンやキトサンの動物静脈注射による in vivo データと動物血液リンパ球を用いた in vitro データの一致した結果からして、ヒトリンパ球のガン細胞障害活性の測定に応用できることが分かる。ヒト血液からリンパ球のみを取り出し、このリンパ球をキチンやキトサンと in vitro で接触により賦活させ、ガン細胞を死滅させる攻撃力(ガン細胞傷害活性)を測定する。

表3. リンパ球のガン細胞障害活性 in vitro 測定法 a

血液を 50ml 採取

採取した血液よりリンパ球のみを分離

リンパ球と検査用の 標準ガン細胞を一 定の比率で混合	健康食品を加え、刺激 を加えたリンパ球と検査 用の標準ガン細胞を一定の比率で混合
リンパ球がガン細胞 に対して、どの程度 の攻撃力(ガン細胞 障害活性)をもつか を測定(無処理)	健康食品により刺激を 加えたリンパ球のガン細胞 障害活性を測定

無処理のリンパ球に比して刺激を加えたリンパ球の
ガン細胞障害活性を判定

ガン細胞障害活性(%)

表 3 に示すようにヒトリンパ球を用いたガン細胞傷害活性測定法は、まず、免疫細胞であり免疫の中心を担うリンパ球のみをヒト血液より分離取り出す、1)このリンパ球と検査用の標準ガン細胞を一定の比率で混ぜ合わせ、このリンパ球がガン細胞を死滅させる攻撃力(ガン細胞障害活性)を測定する(無処理区)。2)一方、ヒトリンパ球にキトサンを混ぜて刺激を与え、これと検査用の標準ガン細胞を 1)と同じ様に一定の比率で混ぜ合わせ、キトサンで活性化されたリンパ球のガン細胞障害活性を測定する。1)と 2)を比較して、キトサン添加により上昇したリンパ球のガン細胞傷害活性(免疫力)が判定できる。

一方、ヒトリンパ球をヒトの体内で自然に産出されるインターロイキン 2(IL2)や、化学合成された抗ガン剤であるピシバニールで、それぞれ活性化し、これらのガン細胞障害活性を測定して比較する。

表 4. 無添加および粉末キトサン、インターロイキン 2 とピシバニールのそれぞれ添加による賦活したヒト血液リンパ球の in vitro ガン細胞傷害活性 (%) a)

試料	リンパ球 ガン細胞 比率	年齢・性別 b)				
		35 才 (F)	30 才 (M)	25 才 (F)	44 才 (M)	49 才 (F)
無処理	40 : 1	9.5	22.2	31.1	32.4	40.4
	20 : 1	6.5	13.3	22.3	21.2	30.0
	10 : 1	3.2	8.3	12.1	12.4	17.2
	5 : 1	1.0	3.2	7.0	6.1	10.2
キトサン (100 μ g / m l)	40 : 1	28.4	44.5	44.2	44.3	61.4
	20 : 1	15.6	30.0	34.7	30.7	45.8
	10 : 1	8.4	14.7	21.8	18.3	27.3
	5 : 1	5.7	7.5	13.8	7.0	12.4
インターロイキン 2	40 : 1	47.2	51.7	62.0	80.2	90.5
	20 : 1	34.3	42.2	50.0	76.0	84.6
	10 : 1	20.1	25.6	34.6	58.4	69.2
	5 : 1	10.1	14.2	23.0	35.8	46.0
ピシバニール	40 : 1	54.7	63.2	61.6	78.8	83.1
	20 : 1	38.1	60.2	60.1	71.7	74.3
	10 : 1	20.0	40.9	48.6	53.4	55.5
	5 : 1	10.4	22.3	32.3	28.7	32.1

a) 本測定は、免疫分析研究センター株式会社、津山で実施された。市販健康食品である“ネオキトサン”、キ

トサン 100%の顆粒の懸濁を使用。

☐ ガン細胞傷害活性が無処理に対して 10%以上増加

☐ ガン細胞傷害活性が無処理に対して 5~10%増加

b) F:女性 M:男性

表5. 無添加および水溶性・高分子キチン+キトサン、インターロイキン2とピシバニールのそれぞれ添加による賦活したヒト血液リンパ球の in vitro ガン細胞傷害活性 (%)

試料	リンパ球 ガン細胞 比率	年齢・性別 b)				
		54才(M)	44才(M)	44才(M)	48才(M)	53才(F)
無処理	40:1	14.5	20.3	38.9	43.4	45.2
	20:1	9.8	11.4	23.4	31.1	30.6
	10:1	4.8	5.3	12.3	20.8	15.6
	5:1	1.7	1.8	4.3	9.6	6.6
水溶性 キチン+キトサン (1mg/ml)	40:1	42.7	47.9	59.5	68.5	66.4
	20:1	42.4	32.2	50.9	58.9	57.1
	10:1	17.5	18.0	30.3	39.2	37.7
	5:1	8.6	8.5	14.8	24.1	17.8
水溶性 キチン+キトサン (500µ/ml)	40:1	50.1	52.5	59.8	67.1	49.9
	20:1	39.7	34.4	53.3	58.6	34.8
	10:1	25.8	18.8	35.5	37.6	19.3
	5:1	10.9	7.6	13.8	19.2	7.6
水溶性 キチン+キトサン (100µg/ml)	40:1	26.9	29.6	53.7	67.9	66.6
	20:1	18.6	17.8	39.3	65.8	54.9
	10:1	7.7	9.4	22.3	42.0	35.6
	5:1	2.9	2.3	8.4	20.5	13.3
水溶性 キチン+キトサン (50µg/ml)	40:1	24.0	22.0	46.8	61.6	60.3
	20:1	17.1	16.3	35.9	49.7	44.9
	10:1	8.1	8.6	19.4	28.4	24.7
	5:1	2.5	1.9	7.0	14.1	11.5

水溶性	40 : 1	24.6	25.6	41.5	51.9	51.6
キチン+キトサン	20 : 1	13.0	16.6	27.3	39.4	35.4
(10 μ g / m l)	10 : 1	5.8	8.4	14.2	21.4	20.0
	5 : 1	0.9	1.3	4.7	10.0	6.3
インターロイキン 2	40 : 1	71.6	61.9	82.2	74.1	77.2
	20 : 1	60.9	43.9	76.7	68.5	71.4
	10 : 1	36.5	25.3	54.4	47.4	51.1
	5 : 1	20.9	11.7	30.2	26.9	27.4
ピシバニール	40.1	67.2	62.2	72.6	76.0	80.5
	20 : 1	59.6	57.6	72.7	76.3	74.6
	10 : 1	41.2	36.1	52.1	57.4	64.2
	5 : 1	20.7	18.4	23.0	32.5	35.2

a) 本測定は、免疫分析研究センター株式会社、津山で実施された。市販健康食品である、水溶性・高分子キチン+キトサン“ネオキトサン”の水溶液を使用2)

ガン細胞傷害活性が無処理に対して10%以上増加。

ガン細胞傷害活性が無処理に対して5~10%増加。

b) F : 女性、M : 男性

標準ガン細胞の数1に対してヒトリンパ球の数40、20、10、5の割合で混ぜる。それぞれの混合比にて、無処理区は活性化しない天然ヒトリンパ球、キトサン区は粉末キトサンで活性化したヒトリンパ球、インターロイキン2区はインターロイキン2で活性化したヒトリンパ球、ピシバニール区は活性化したヒトリンパ球の、それぞれのガン細胞障害活性を測定する。表4は水不溶性の高分子キトサン、表5は水溶性の高分子キチン+キトサン(平均分子量300,000~1,000,000)²⁾で賦活したヒト血液のリンパ球を用いたガン細胞障害活性の測定結果の一例をそれぞれ示す。a)自然のヒトリンパ球を用いたのガン細胞傷害活性は、年齢、性別など個人により異なる。b)ガン細胞に対するリンパ球の数を5から40と増加すれば、リンパ球数に比例して、全体としてガン細胞障害活性は高くなる。c)リンパ球の賦活に用いるキチンやキトサン量が多くなれば比例してガン細胞障害活性は高くなる。d)リンパ球:ガン細胞比40:1に於けるガン細胞障害活性は、無処理に対して、水不溶性の高分子キトサンで活性化したリンパ球で1.6倍(100 μ g / m l)、水溶性の高分子キチン+キトサンで1.8倍(1mg/m l)、1.7倍(500 μ g / m l)、1.5倍(100 μ g / m l)、1.3倍(50 μ g / m l)、1.2倍(10 μ g / m l)、インターロイキン2で活性化したリンパ球で2.3~2.4倍・ピシバニールで活性化したリンパ球で2.2~2.5倍それぞれ高くなっていることが分かる。

5 結び

ヒトの血液からリンパ球のみを分離して、健康食品と混合し *in vitro* で賦活し、リンパ球のガン細胞障害活性を測定する方法は、免疫を高める食品検索の手法として有用である。水不溶性の高分子キトサン・水溶性の高分子キチン+キトサン、キトサン 6 糖とキチン 6 糖は、いずれもリンパ球を活性化し、ガン細胞障害活性を示している。経口投与された高分子キチンやキトサンは、腸内細菌の分泌キチナーゼやキトサナーゼにより加水分解され、血管内からオリゴ糖として吸収される。

または、高分子キチンやキトサンが、リンパ球の細胞膜表面のリンパ球賦活レセプターに結合し、誘導されるリゾチームやキトサナーゼにて、それぞれリンパ球の利用できるオリゴ糖が生成し、これがリンパ球を賦活していると推定される。賦活されたリンパ球は、インターロイキン 2 (IL-2) を誘導し、さらにリンパ球やマクロファージのガン細胞傷害活性を高め、宿主の生体防御性を高めている。

引用文献

- 1)a) Tokoro, A . , Tatewaki, A., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S., Suzuki, M., Chem. Pharm. Bull., 36, 784-790 (1988). b) キチン、キトサン研究会編、“キチン、キトサンの応用” 技法堂出版、東京、pp.176-193 , 1990 ; c) キチン・キトサン研究会編、“キチン・キトサンハンドブック” 技法堂出版、東京、pp . 162-166 , 1995.
- 2)a) 特許(申請中)。b) 水木波瑠子、“キチン・キトサン水溶性・高分子の秘密” 現代書林 (2003)。