

平成10年度厚生科学研究事業報告書

－アレルギー疾患を抑制する天然薬物
シジュウムに関する研究－

平成11年3月

総括研究代表者 北 中 進
(日本大学薬学部生薬学研究室)

目次

I. 総括研究報告	1
日本大学薬学部生薬学研究室	北中 進
II. 分担研究報告	
1) 小児アトピー性皮膚炎に対するシジュウム塗布剤の臨床効果	2
東邦大学小児科	鈴木 五男
2) シジュウム製剤の皮膚疾患に対する効果に関する研究	6
日本大学医学部皮膚科	馬場 俊一
3) Th1/Th2 型ヘルパーT細胞機能へのシジュウムの影響に関する研究	8
星薬科大学生化学教室	豊島 聡
4) Th1/Th2 バランスからみた天然薬物シジュウムの抗アレルギー作用	11
日本大学医学部産婦人科	早川 聡
5) マクロファージの一酸化窒素 (NO) 産生へのシジュウムの調節作用	19
埼玉衛生研究所食品化学科	石井 里枝 斉藤 貢一
6) シジュウムの炎症細胞に与える硬貨と有効成分の分離	22
日本大学薬学部生薬学研究室	北中 進

[I] 総括研究報告

アレルギー疾患を抑制する天然薬物シジュウムに関する研究（総括）

主任研究者 北中 進 日本大学薬学部教授

アレルギー疾患の発症率は日本のみならず欧米においても増加の一途をたどっており、最近の調査では総人口の30%前後におよぶ人々が何らかのアレルギー疾患に罹っているといわれ、これらの治療は重要な課題である。現在使用されている抗アレルギー薬は副作用が強かったり、効果の面で充分でなかったりと根本治療には満足できないのが現状である。漢方薬や民間薬などの天然薬物にはヒトの身体に本来備わった調節機能に働き、一種の生物応答調節をしていると考えられる。南米原産フトモモ科植物シジュウムは民間においてアトピー性皮膚炎、膿疱症等の難治性皮膚炎、花粉症等のアレルギー性鼻炎等のアレルギー疾患に、茶剤、入浴剤、塗布剤として用い効果をあげている。そこで昨年度に引き続きシジュウムの抗アレルギー効果を解明するため、化学成分の研究、臨床的評価及び免疫細胞に与える影響について検討し、現実的な予防法、治療法を開発することを目的として行った。

鈴木はアトピー性皮膚炎の小児を対象にシジュウムの塗布剤3か月投与、観察し、「かゆみ」及び皮膚所見を点数化し評価した。同時にヒスタミン代謝物のN-メチルヒスタミン(NMH)、血中ECP値及びヒスタミン遊離試験(HRT)を実施した。その結果、「かゆみ」の軽減と皮膚症状の改善を認め、また、血中ECP値及び尿中NMH値は有意な低下が認められたことから、シジュウム塗布剤はアトピー性皮膚炎の痒みに有効な手段と考えられ、治療薬の軽減につながる結果を得た。馬場はシジュウムの茶剤、入浴剤、スキンケア外用剤をアトピー性皮膚炎や、炎症を伴う難治性皮膚疾患の尋常性乾癬あるいはその類症等の患者皮膚に対する効果を検討した。これら難治性の皮膚疾患に対して多くの症例において症状の軽減に有用

な方向に働くことが観察され、Q.O.L.の向上に寄与する結果を得た。豊島はシジュウムの抽出物より単離同定したmethyl gallateが選択的にTh2細胞に作用し、サイトカインの産生を抑制することを認めたことから、更にKLH免疫しIgE産生を誘導したマウスにmethyl gallate投与においてIgE産生を抑制することを認めた。また、KLH免疫マウスにmethyl gallateを投与した脾リンパ球のサイトカイン産生は、IL-4が減少し、INF- γ が大幅に増加していることを見出し、抗アレルギー作用を裏付ける結果を得た。一方、早川は健常者Tリンパ球にシジュウム抽出物を添加することによって、低濃度(10-50 μ g)でTh2を抑制し、Th1優位になることを認めた。また、Balb/c及びC57BLマウスにシジュウム茶を自由飲水法で投与し、脾細胞においてTh2を抑制し、Th1優位になったことを認め、シジュウムはTh1/Th2振り分け効果を介した免疫調節作用を有する可能性を示した。石井、斉藤はシジュウムがマクロファージの産生するNOを抑制し、その主要成分が加水分解型のタンニンであることを認め、そのNO産生調節作用のメカニズムの解明を試みた。NO合成酵素と酵素活性に対するシジュウムの作用について検討し、シジュウムエキス及び単離した加水分解型タンニンはNO合成酵素抑制作用と酵素活性阻害作用を持つことを明らかにし、これらのNO産生調節物質は新たな抗炎症剤となる可能性を示唆した。北中はシジュウム中の成分の分離を行い、新規化合物を単離構造決定した。その他にも抗アレルギー性成分の存在が認められ、今後の課題とされた。

以上の結果より、シジュウムは臨床でアレルギー疾患に対し有効性が認められ、エキス及び活性成分の生化学的試験及び免疫学的研究において作用機作の解明がなされつつある。

[II] 分担研究報告

小児アトピー性皮膚炎に対する シジュウム塗布剤の臨床効果

鈴木五男
東邦大学第二小児科学教室

要 旨

アトピー性皮膚炎は粥味を伴った慢性の炎症性疾患として定義づけられている。本症状を軽減することはアトピー性皮膚炎の治療するうえに極めて有用な手段となる。そこで抗アレルギー作用のある南米産フトモモ科植物シジュウムにより生成された塗布製剤を用い、小児を中心にアトピー性皮膚炎に対してシジュウムの塗布剤の臨床的有効性検討した。

研究はアトピー性皮膚炎の小児50名にシジュウムの塗布剤3か月投与、観察し、「かゆみ」および皮膚所見を点数化し、評価した。同時にN-メチルヒスタミン(NMH)、血中ECP (Eosinophil Cationic Protein)値およびヒスタミン遊離試験(HRT)を実施した。

その結果、シジュウムの「かゆみ」効果では使用2週より有意に粥味が軽減し、それとともに皮膚症状の改善も認められた。また炎症の目安となる血中ECP値は塗布前と終了時では有意に低下していた($P < 0.01$)。同様に「かゆみ」に影響する科学伝達物質の一つであるヒスタミンの代謝産物である尿中NMH値は塗布前と終了時では有意($P < 0.05$)に低下していた。

以上のことからシジュウム塗布剤はアトピー性皮膚炎の粥味に有効な手段と考えられ、治療薬の軽減に繋がると思われる。

A. はじめに：

アトピー性皮膚炎は粥味を伴った慢性の炎症性疾患として定義づけられている。本症は種々に因子がかかわって症状が増悪したり、軽減し、その治療はなかなか困難な場合が多い。特に本症に特有な粥味は患者の日常生活に多大な影響をあたえており、本症状を軽減することはアトピー性皮膚炎の治療するうえに極めて有用な手段となる。そこで抗アレルギー作用のある南米産フトモモ科植物シジュウムにより生成された塗布製剤を用い、小児を中心にアトピー性皮膚

炎の症状別（感染部位、肥厚部位など）に対してシジュウムの塗布剤の臨床的有効性検討した。

B. 対象と方法：

小児のアトピー性皮膚炎の症状別（感染部位、肥厚部位など）に対して天然薬物シジュウムにより生成された塗布製剤を用いて臨床的有効性を、粥味の症状をスコア化し、その有効性を検討する。

対象は東邦大学大橋病院に受診のアトピー性

皮膚炎の小児50名（男児29名、女児21名）であった。また対象者の平均年齢は6.9 ± 4.6 歳、平均罹患年数は4.5 ± 5.0 年であった。またアトピー性皮膚炎の重症度は軽症13名、中等症28名、重症9 名であった。

方法は2 - 3週間の観察期間においてシジュウムの塗布製剤を1日3 - 4回（朝、入浴直後、就寝前）に症状のある部位に塗布し、塗布期間は12週間とし、2週間ごとに所見の観察を行い、症状の変化をスコア化した。すなわち観察部位は頭部、頸部、胸部、背部、腰部、上肢、下肢にわけ、皮膚症状を正常:0 点、乾燥のみ:1 点、発赤、湿潤、丘疹:2 点、苔癬化:3 点として評価した。また粥味は図1のような「かゆみ」スコアを観察前、使用2週後、1か月後、2か月後、3か月後の各時点においてスケール評価した。

さらに粥味の指標として同意を得た患者に対して尿中のN-メチルヒスタミン(NMH)、血中ECP (Eosinophil Cationic Protein) 値の測定を塗布前および塗布1か月、2か月、終了時に実施した。また卵白およびダニに対するヒスタミン遊離試験(HRT)を塗布前および終了時に測定した。なお、試験中は抗ヒスタミン剤の服用は禁とした。またステロイド剤など塗布剤の使用に関しては塗布剤の内容および塗布回数は観察期間と基本的には同様とし、また症状の悪化で増量したものは効果なしとし、減量できたものは効果あり判定した。

C. 結果

対象者の試験前検査所見は末梢血白血球数は8400 ± 2650、好酸球数は8.7 ± 3.9%、血清総IgE 値は430 ± 293IU/MLであった。特異的IgE 抗体が2 +以上の陽性をしましたのは、卵白で33例、牛乳12例、大豆18例、ハウスダスト37例、ダニ39例であった。

シジュウムの「かゆみ」効果を点数化した結

果では、観察前が7.7 ± 4.1、使用2週後4.7 ± 3.9、1か月後3.0 ± 3.1、2か月後2.7 ± 2.4、3か月後2.5 ± 1.9と2週より有意(P < 0.05)に粥味が軽減されていた。

また皮膚症状は観察前が6.0 ± 3.8、使用2週後5.4 ± 3.9、1か月後3.7 ± 3.1、2か月後3.7 ± 2.2、3か月後3.1 ± 2.2と使用1か月後から次第に改善が認められた。また皮膚所見では、乾燥、あるいは発赤、湿潤の部位での改善が良かった。苔癬部位では粥味の改善した症例では塗布の継続により軽減していった。

次に血中ECP 値は塗布前で77.9 ± 46.1 μg/l、塗布1か月61.7 ± 42.6 μg/l、2か月42.2 ± 30.2 μg/l、終了時28.9 ± 21.8 μg/lと塗布前と終了時では有意に低下していた(P < 0.01)。特に臨床症状が改善した33例中22例が、いわゆるECP 値の正常値といわれる10-15 μg/lを示していた。

尿中 NMH値は尿の希釈の状況で影響を受けることから、同一検体を尿中クレアチニン値で除して補正し、尿中 NMH値として表現した。塗布前で246.9 ± 146.1 μg/g Cr、塗布1か月211.7 ± 122.6 μg/g Cr、2か月176.2 ± 100.2 μg/g Cr、終了時148.9 ± 84.8 μg/g Crと塗布前と終了時では有意(P < 0.05)に低下していた。特に臨床症状および「かゆみ」のスコアが改善が認めれた35例は104.9 ± 61.2 μg/g CrとP < 0.02と有意に低下していた

卵白およびダニに対するヒスタミン遊離試験(HRT)を塗布前および終了時に測定した。なお抗原無添加のウエルの血液由来の非特異的なヒスタミン遊離量を測定し、抗原添加量時との濃度差をヒスタミン遊離量とした。最高抗原量で非特異的なヒスタミン遊離量を越えた場合以上を陽性とした。これを基準に卵白およびダニに対するヒスタミン遊離試験(HRT)を塗布前および終了時に測定をみると、ともに有意な変化は認めなかった。

D. 考察

アトピー性皮膚炎の病態が次第に解明され、皮膚のバリア機構の低下によるものといわれ、種々の外的・内的因子が皮膚に慢性的に刺激を加え、慢性の接触性皮膚炎として捉えられている。しかし、小児ではアトピー素因をもとに、食生活環境、特に乳幼児期では食物抗原の関与が報告されている。このようにアトピー性皮膚炎は、そのメカニズムの解明により、より具体的な治療や対策が勧められている。

その中で、アトピー性皮膚炎患者を最も問題となる粥味対策は未だ決め手となる治療がない。粥味は小児において睡眠障害、集中力の低下、不機嫌、食欲低下など精神的、心理的負担が大きい。

そこで今回、IL-5の産生を強く抑制し、Th2細胞を選択的に作用する、いわゆる抗アレルギー作用のある南米産フトモモ科植物シジュウムにより生成された塗布製剤を用い、小児を中心にアトピー性皮膚炎の症状別に対してシジュウムの塗布剤の臨床的有効性検討した。その結果、シジュウムの「かゆみ」効果に対する患者および家族の反応は塗布2週より有意に軽減され、50例中33例(66%)に有意な効果を認めた。また粥味の改善とともに、皮膚症状も同様に次第に改善が認められていた。

また炎症の目安といわれる血中ECP値は塗布前と終了時で有意に低下していた。特に臨床症状が改善した33例中22例が、いわゆるECP値の正常値といわれる10-15 $\mu\text{g/l}$ を示していた。

同様にヒスタミンの代謝産物である尿中NMH値は塗布前と終了時では有意に低下していた。特に臨床症状および「かゆみ」のスコアが改善が認めれた33例は10より有意に低下していた。

卵白およびダニに対するヒスタミン遊離試験(HRT)は塗布前および終了時にともに有意な変化は認めなかった。

これらの結果からシジュウム塗布剤はアトピー

性皮膚炎の治療に有効な手段と考えられ、従来の治療薬の減量に利用可能と考えられた。

今後は塗布剤のプラシボ剤が可能になったことから、2重盲検試験で、その有効性の検討を行う予定である。

E. 結語

1. アトピー性皮膚炎に対するシジュウム塗布製剤の有効性をみた。
2. 対象はアトピー性皮膚炎の小児50名に3か月投与、観察し、「かゆみ」および皮膚所見を点数化し、評価した。同時にN-メチルヒスタミン(NMH)、血中ECP(Eosinophil Cationic Protein)値およびヒスタミン遊離試験(HRT)を実施した。
3. シジュウムの「かゆみ」効果では、使用2週後より有意($P < 0.05$)に粥味が軽減されていた。また皮膚症状もほぼ同様の経過で改善が認められた。
4. 血中ECP値は塗布前と終了時では有意に低下していた($P < 0.01$)。特に臨床症状が改善した33例中22例が、いわゆるECP値の正常値といわれる10-15 $\mu\text{g/l}$ を示していた。
5. 尿中NMH値は塗布前と終了時では有意($P < 0.05$)に低下していた。特に臨床症状および「かゆみ」のスコアが改善が認めれた35例は104.9 \pm 61.2 $\mu\text{g/g Cr}$ と $P < 0.02$ と有意に低下していた。
7. 卵白およびダニに対するヒスタミン遊離試験(HRT)は塗布前および終了時にともに有意な変化は認めなかった。
8. シジュウム塗布剤はアトピー性皮膚炎の治療に有効な手段と考えられ、従来の治療薬の減量に利用可能と考える。

図1 「かゆみ」スコア

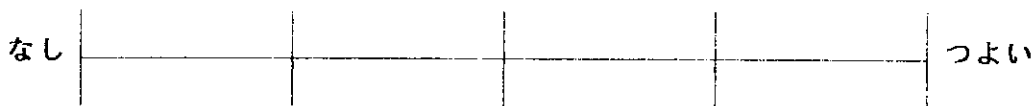
お母さんへ

これはお子様のシジュウムの効果を判断する調査です。使用前の「かゆみ」からどのように変化したかを記載してください。判断としては①かき具合、②ひっかき傷の状態、③睡眠状態、④落ち着き具合、⑤その他などがあげられますが、個々のお子さんの特徴で結構です。

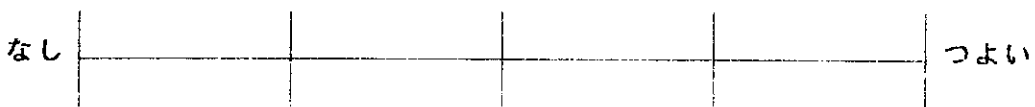
使用前



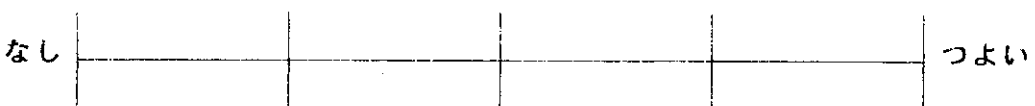
2週間後



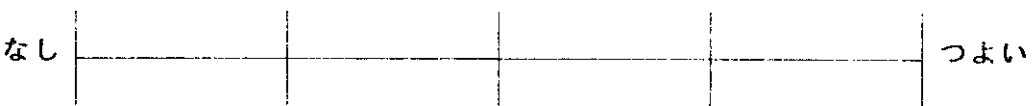
1か月後



2か月後



3か月後



シジュウム製剤の皮膚疾患に対する効果に関する研究

研究者 馬場 俊一 日本大学医学部皮膚科学教室 講師
駿河台日本大学病院皮膚科 科長

研究要旨

抗アレルギー作用を有することが証明されている、天然植物シジュウム葉の製剤、シジュウムAR-18の成分を含有する茶剤、入浴剤、スキンケア用外用剤（以下シジュウム製剤と総称）を使用している、アレルギー性疾患のアトピー性皮膚炎や、炎症を伴う難治性皮膚疾患の尋常性乾癬あるいはその類症等の患者皮膚に対する効果を検討した。

シジュウム製剤のそれぞれにより、皮膚のそう痒が軽快した症例や、皮膚の状態や皮疹が改善した症例が見られた。

これら難治性の皮膚疾患の多くの症例において症状の緩和に有用に働くことが観察された。皮膚表面の掻破の強い場合は刺激感を生ずることがあり、症状軽減の後からの使用が望ましい例も有ると思われた。

シジュウム製剤は補助的な健康食品やスキンケア用品として、患者のQ. O. L. 改善に有用であると考えられる。

A. 研究目的

天然植物シジュウム葉の製剤、シジュウムAR-18の成分を含有する茶剤、入浴剤、スキンケア用外用剤（以下シジュウム製剤と総称）アレルギー性難治性皮膚疾患に対する有用性を検討する。

B. 研究方法

シジュウムAR-18の成分を含有する茶剤、入浴剤、スキンケア用外用剤（以下シジュウム製剤と総称）を使用している、アトピー性皮膚炎患者などのアレルギー性疾患や、炎症を伴う難治性皮膚疾患の尋常性乾癬あるいはその類症等の患者の、臨床症状の改善の有無や、自覚症の改善の有無、

皮膚表面の性状の変化等を検討した。

患者が使用していたシジュウム製剤の種類は次の3種であった。

1. シジュウム葉乾燥粉末入浴剤
2. シジュウム葉水抽出エキス粉末入浴剤
3. シジュウム葉水抽出エキス0.5%
加ホホバ油クリーム

検討の方法

検討は主として次の方法によって行った。

1. 診察による検討
2. ビデオマイクロスコープによる皮膚表面性状の観察

C. 研究結果

1. 診察による検討

診察による検討ではアトピー性皮膚炎皮膚の改善のみならず、皮疹の改善がみられない例でもそう痒の軽減した例が認められた。特に入浴後のそう痒が軽減した例が多く見られた。重症例においては、通常の医学的治療の補助として、症状緩和に有用であった例もあるが、搔破や糜爛が強い例では入浴時の刺激が増強し、使用できない例もわずかに見られた。

軽度のアトピー性皮膚炎の症例においてはシジュウム製剤のそれぞれにより、皮膚のそう痒が軽減した例や、皮膚の表面の状態や皮疹が改善した症例が見られた。

中等度以上の症例では殆どの例で副腎皮質ステロイドホルモン含有外用剤や保湿剤の外用、抗ヒスタミン剤や抗アレルギー剤の内服等を余儀なくされたが、シジュウム製剤が加わることによりそう痒が軽減したという例や、薬剤の使用量が減少した例が観察された。

長期に使用した患者のうちには他の外用剤や内服を要さなくなった例も見られた。

尋常性乾癬患者では入浴後のそう痒が軽減した例が見られた。クリームで皮疹の軽減を見た例もあるが基剤による効果の割合は不明である。クリームを塗布した乾癬の病巣で、副腎皮質ステロイドホルモン外用剤治療による軽快部位より潮紅の少ない例がみられた。また潮紅はステロイド治療部位より強いがそう痒は少ない例も認められた。

掌蹠膿疱症患者では使用初期に改善例もあるが、長期に皮疹の改善がみられる例は少ない。クリーム製剤によって足蹠の鱗屑や自覚症の改善が得られた症例もあった。

2. ビデオマイクロスコープによる皮膚表面の観察

皮膚表面の性状の観察では、粗ざら性の改善や搔破の軽減が見られた。

D. 考察

天然植物シジュウム葉の製剤、シジュウムAR-18は、抗アレルギー作用を有することが既に北中他により証明されている。シジュウムAR-18の成分を含有する茶剤、入浴剤、スキンケア用外用剤（これらをシジュウム製剤と総称）を使用している、アレルギー性疾患のアトピー性皮膚炎や、炎症を伴う難治性皮膚疾患の尋常性乾癬あるいはその類症等の患者を観察し、これら難治性の皮膚疾患に対して如何に働くかを検討した結果、多くの症例において症状の軽減に有用な方向に働くことが観察され、Q. O. L. の向上に寄与できるものと思われた。

皮膚表面の搔破の強い場合は刺激感を生ずることがあり、軽減の後の使用が望ましい例も有ると思われた。

入浴剤により入浴後のそう痒が軽減する例が多く見られたが、薬理的止痒作用が主体となっているものか、皮膚表面の改善に基づく軽減かは明らかでなかった。

E. 結論

シジュウム製剤を使用している、アレルギー性疾患のアトピー性皮膚炎や蕁麻疹、炎症を伴う難治性皮膚疾患の尋常性乾癬あるいはその類症等の患者において、皮疹の改善やそう痒の軽減など、症状の改善や自覚症状の緩和が認められる症例があり、シジュウム製剤は患者のQ. O. L. 向上に有用であると考えられる。

Th1/Th2 型ヘルパー T 細胞機能へのシジュウムの影響に関する研究

分担研究者 豊島 聡 星薬科大学教授

研究要旨 昨年度報告したようにシジュウム抽出物より単離・同定された **methyl gallate** は比較的選択的に Th2 細胞に作用して、そのサイトカイン産生を抑制する。*in vivo* でも **methyl gallate** が同様に作用して、I 型アレルギー発症抑制に働くかどうか確認するために、低用量 KLH で免役することにより IgE 産生を誘導したマウスに **methyl gallate** を投与し、IgE 産生への影響を調べたところ、低用量の **methyl gallate** 投与により IgE 産生が有意に抑制されることが判明した。血清グロブリンで最も高い比率を占める IgG1 量には、低用量 **methyl gallate** 投与はほとんど影響しなかった。低用量 KLH 免疫マウスに **methyl gallate** を投与し、脾リンパ球を採取して、*in vitro* 刺激した時のサイトカイン産生について調べたところ、**methyl gallate** 投与マウスからのリンパ球における IL-4 (Th2 サイトカイン) は少量だが有意に減少していたが、IFN- γ 産生は大幅に増加していた。このことは **methyl gallate** 投与は、*in vivo* での Th1/Th2 バランスを、Th1 側に誘導することを示唆する。

A. 研究目的

昨年度シジュウム抽出物より単離・同定した **methyl gallate** が、Th2 サイトカインの産生を比較的選択的に抑制することを見出した。本年度は **methyl gallate** が、I 型アレルギー抑制作用を示すかどうか明らかにするため、低用量 KLH 免疫マウスにおける IgE および Th1/Th2 バランスへの **methyl gallate** 投与の影響を調べた。

B. 研究方法

低用量 KLH による免疫と血清 IgE・IgG1 の測定：CBA/J マウスに水酸化アルミニウムゲルアジュバント (alum) に吸着させた KLH 懸濁液 (0.5 μ g KLH・10mg alum/ml) を 0.2ml、2 週間ごとに 5 回腹腔内投与することにより免疫した。ネガティブコントロールのマウスには、alum 懸濁液 (10mg alum/ml) を 0.2ml、2 週間ごとに 5 回腹腔内投与した。Methyl gallate は初回免疫より 7 日後から 1 日おきに各群 0.1, 1, 10, 100mg/kg を腹腔内投与した。血清は免疫

開始から 70 日後に採取した。血清中の IgE と IgG1 の測定は、サンドイッチ ELISA 法により行った。

低用量 KLH 免疫マウス脾リンパ球によるサイトカイン産生：上述の低用量 KLH 免疫・**methyl gallate** 投与マウスの血清採取時に脾臓を取り出し、リンパ球懸濁液 (5 $\times 10^6$ /ml) を調製する。リンパ球懸濁液に 0.1 μ g/ml の KLH を加えて一晚培養後、培養上清中のサイトカイン (IL-4 および IFN- γ) 量を ELISA 法により測定した。

C. 研究結果

低用量 KLH での免疫のみのコントロールマウス群における血清 IgE の平均値は約 9.5 μ g/ml であった。この低用量 KLH 免疫マウスに **methyl gallate** を投与すると、血清 IgE 量はコントロール群の 0.1mg/kg 投与で 49%、1mg/kg 投与群で 53%、10mg/kg 投与群で 63%、100mg/kg 投与群で 74% に減少し、低用量の **methyl gallate** 投与群において IgE 産生が顕著に抑制されることが

明らかとなった(図1)。また、この抑制作用は投与量依存的に弱くなる傾向を示した。同時に IgG₁ 量の測定を行ったが、methyl gallate 投与は IgG₁ 産生にはほとんど影響しなかった。高用量投与の時にのみ 10~15%減少する傾向が見られた(図2)。

低用量 KLH 免疫脾リンパ球を *in vitro* で KLH 刺激した時の IL-4 産生は、methyl gallate 投与マウス脾リンパ球では少量だが有意に減少していた。0.1mg/kg methyl gallate 投与群で約 37%減少していた。1, 10, 100mg/kg 投与群では約 20%の減少であった。一方、IFN- γ 産生は、methyl gallate 投与マウス脾リンパ球では大幅に増加していた。0.1mg/kg methyl gallate 投与群では IFN- γ 産生は、コントロールの 3.5 倍であり、1, 10, 100mg/kg 投与群では約 2.5 倍であった。これらサイトカイン産生に対する影響は、低用量を投与した時が最大であり、高用量投与では、その影響は低下していた(図3)。

D. 考察

昨年度報告したように、*in vitro* においてシジウム抽出物から単離・同定された methyl gallate は Th1 細胞による IFN- γ 産生に対してほとんど影響せず、Th2 細胞による IL-4 や IL-5 産生を比較的選択的に抑制した。IL-4 は I 型アレルギー発症の原因となる IgE 産生の誘導に必須であることから、methyl gallate の *in vivo* 投与は、I 型アレルギー発症を抑える可能性がある。そこで、methyl gallate の I 型アレルギー抑制効果、すなわち IgE 産生に対する抑制効果の有無について検討した。低用量 KLH 免疫マウスにおける IgE 産生は、0.1mg/kg の methyl gallate 投与により最も強く抑制され、投与量依存的にその抑制効果は低下した。高用量投与で抑制効果が低下した原因は不明であるが、Th1 細胞と Th2 細胞を用いた *in vitro* 実験で高濃度 methyl gallate は Th1 サイトカインと Th2 サイトカインのどちらの産生も阻害したので、*in vivo* でも高用量 methyl gallate 投与は Th1 細胞にも作用してしまうためこのような結果となった可能性が考えられる。また、こ

の結果は methyl gallate をアレルギー抑制薬として用いる場合、投与すべき量を決定することが容易でないことを示唆しており、有効なアレルギー薬の開発には Th2 サイトカイン産生をより選択的に抑制する物質を検索する必要があると考えられた。一方、血清中の IgG₁ 量は、methyl gallate 投与によってあまり影響されず、低用量の methyl gallate は、全体的な抗体産生には大きな影響をおよぼさないと考えられた。

上述のように、低用量の methyl gallate 投与が有意に血清中の IgE 量を低下させたことは、*in vivo* で methyl gallate が Th2 細胞に選択的に作用して Th1/Th2 バランスを Th1 側へ誘導したことを示唆する。そこで、低用量 KLH 免疫マウスの脾リンパ球の *in vitro* サイトカイン産生に対する methyl gallate 投与の影響を次に調べ、methyl gallate 投与マウス脾リンパ球は Th2 サイトカインである IL-4 の産生が有意に低下し、Th1 サイトカインである IFN- γ の産生が大幅に増加することを見出した。この結果は、低用量 KLH 免疫マウスにおいて methyl gallate 投与により Th1/Th2 バランスが Th1 側に誘導されることを示唆するものであった。

E. 結論

Methyl gallate 投与は、低用量 KLH 免疫マウスにおける IgE 産生を抑制したことから、I 型アレルギー発症を抑制する医薬品開発のシーズとなる可能性が示された。また、この IgE 産生抑制は methyl gallate がヘルパー T 細胞における Th1/Th2 バランスを Th1 側へ誘導したためである可能性を示唆する結果を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hirohata, S., Isshi, K., Toyoshima, S.: Association of serum IgG antibodies to recombinant ribosomal PO fusion protein with neuropsychiatric systemic lupus erythematosus (1998) *Arthritis Rheum.*, 41(4), 745-747

2. 学会発表

宍倉弘記、小菅 崇、北中 進、豊島 聰：シジュウム抽出物からのヘルパーT細胞によるサイトカイン産生抑制物質の検索、第71回日本生化学会大会(名古屋)、1998年10月

宍倉弘記、小菅 崇、豊島 聰、北中 進：methyl gallateによる1型アレルギー抑制作用の検討、日本薬学会119年会(徳島)、1999年3月

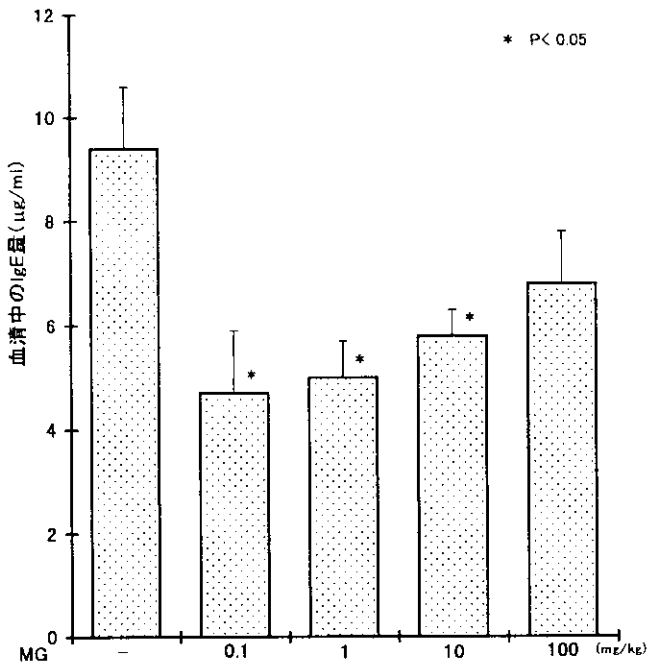


図1 低用量KLH免疫CBA/Jマウス血清中のIgE量に対するmethyl gallate投与の影響(MG:methyl gallate)

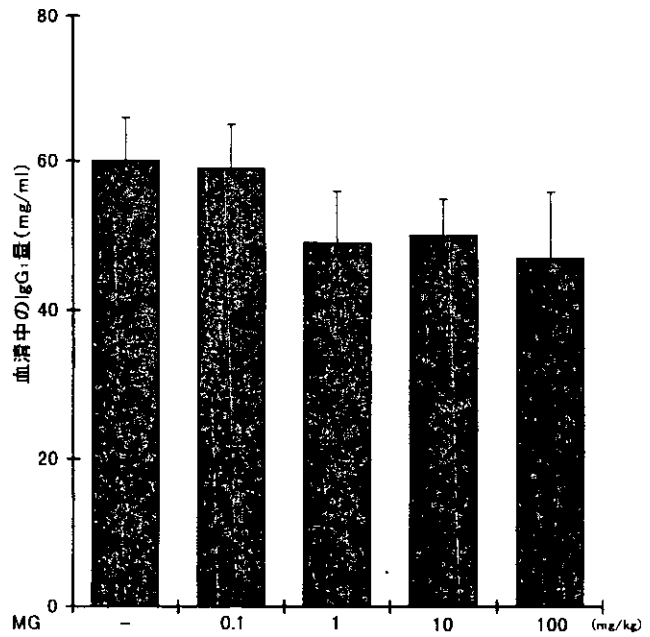


図2 低用量KLH免疫CBA/Jマウス血清中のIgG1量に対するmethyl gallate投与の影響(MG:methyl gallate)

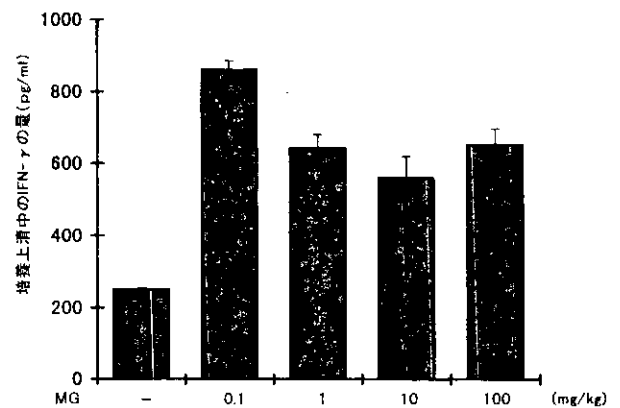
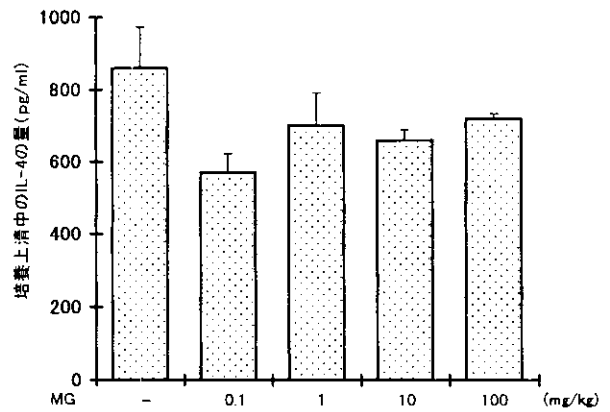


図3 低用量KLH免疫CBA/Jマウスにおける1µg/ml KLH再刺激によるT細胞からのIFN-γおよびIL-4産生(MG:methyl gallate)

概要

南米原産の植物 *Psidium guajava* (PG) の 80% acetone抽出エキスは抗アレルギー作用が報告され、その機序は肥満細胞からの chemical mediator 放出抑制と考えられてきた。我々は PG のリンパ球機能、とくに増殖反応と Th1/Th2 分化に及ぼす作用から PG の抗アレルギー作用を検討した。

その結果 健康ヒト末梢リンパ球を PG 存在下で 48 時間培養すると、10~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で濃度依存的に増殖し、それ以上では増殖は抑制された。一方、混合培養による Allo 反応は 10~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で濃度依存的に促進されそれ以上では抑制された。健康ヒト末梢リンパ球において ELISPOT assay により IFN- γ /IL-4 産生細胞比 (type 1/type 2 バランス) を検討すると in vitro における PG 濃度 10~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲で Th2 を抑制し Th1 優位になった。

BALB/c 及び C57BL マウスに市販のシジュウム茶を自由飲水法で 14 日ないし 28 日間投与し、胸腺、脾細胞を ELISPOT assay により検討すると脾細胞において Th2 を抑制し、Th1 優位になった。以上の結果により PG は Th1/Th2 振り分け効果を介した免疫調節作用を有する可能性が示唆された。

A. はじめに

南米原産の植物 *Psidium guajava* (PG) は、古来からインデオの間で民間薬として使用されてきた。PG の 80% acetone抽出エキスは抗アレルギー作用が報告されその機序は肥満細胞からの chemical mediator 放出抑制と考えられてきた。我々は PG の上位における免疫調節作用をリンパ球の増殖反応と Th1/Th2 分化に及ぼす作用から検討した。

B. 方法

I シジュウムによるヒト末梢リンパ球機能の調節

1 リンパ球増殖反応

健康な 21 歳から 30 歳の男女 5 名 (平均年齢: 23.4 歳) より、本人の同意を得てヘパリン採血し 比重遠心法によってリンパ球を分離した。

リンパ球液を等量の 0.2% トリパンブルー染色し無染色の生細胞をカウントして $1 \times 10^3/\text{mL}$ に調整した。

シジュウム全草から 80% acetone で抽出した結晶 (PG-ext.) を最終濃度 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO) に 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶解したものを sample としてた。

96穴平底 plate 1well に対し、PG-ext. 溶液各濃度 $1\mu\text{L}$ 、リンパ球液 $1\times 10^3/\text{mL}$ を調整して培養液 $100\mu\text{L}$ 加え、 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C で48時間培養した。培養終了後、MTT assay (フナコシ) によりリンパ球の増殖を呈色反応で定量した。すなわち MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrasodium-bromide と pH 7.4 の PBS の呈色混合液を $10\mu\text{L}/\text{well}$ 添加、混和し、 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C で4時間培養した。0.04 M HCl を加えた isopropanol) を $100\mu\text{L}/\text{well}$ にて反応を停止し、ELISA plate reader (TOSA MPR-4Ai) にて 570nm (ref. 630nm) で測定した。

2 シジュウムによる Allo 反応の調節 (リンパ球混合培養)

健常な 21 歳から 40 歳の男女 5 名 (平均年齢: 27.6 歳) より、同様にリンパ球液を生成した。リンパ球液を等量の 0.2% トリパンブルー液に染色し無染色の生細胞をカウントして $1\times 10^3/\text{mL}$ に調整した。

シジュウムエキスも上記同様に調製した。96穴平底 plate 1well に対し、PG-ext. 溶液各濃度 $1\mu\text{L}$ 、非血縁者の混合したリンパ球各 $1\times 10^3/\text{mL}$ 混和、培養液 $100\mu\text{L}$ 入れ、 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C で48時間培養した。

3 シジュウムによる Type 1/Type 2 バランスの調節

健常な 21 歳から 40 歳の男女 5 名 (平均年齢: 27.6 歳) より、同様にリンパ球液を生成した。リンパ球液を等量の 0.2% トリパンブルー液に染色し無染色の生細胞をカウントして $1\times 10^3/\text{mL}$ に調整した。シジュウムエキスも上記同様に調製した。 $1\times 10^5/\text{mL}$ リンパ球液 $1,000\mu\text{L}$ に各濃

度分の sample $10\mu\text{L}$ を混合したものを、1つの検体につき2つずつ用意し、 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C にて48時間培養、各検体の1つに Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA: Sigma) $1\mu\text{L}$ と ionomycin (Sigma) $0.5\mu\text{L}$ を mitogen として添加し、 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C にて4時間培養した。

滅菌 PBS で IFN- γ 、IL-4 の1次抗体 (Purified mouse anti-human IFN- γ monoclonal antibody ELISA capture と Purified mouse anti-human IL-4 monoclonal antibody ELISA capture : 共に Pharmingen) を $1\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整したものを $100\mu\text{L}/\text{well}$ まき、パラフィルムでふたをし、 4°C の moist chamber で1晩おいた後、滅菌 PBS (ニッスイ) に $10\%\text{FBS}$ を加えた溶液 ($10\%\text{FBS-PBS}$) $200\mu\text{L}/\text{well}$ でブロッキングした96穴平底 plate に培養したリンパ球液 $100\mu\text{L}/\text{well}$ をまきパラフィルムでふたをした後、 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C にて1晩培養した。

滅菌 PBS $200\mu\text{L}/\text{well}$ でリンパ球が除去されるまで洗浄した後、滅菌 PBS で2次抗体 (Biotinylated mouse anti-human IFN- γ monoclonal antibody ELISA Detection と Biotinylated RAT anti-human IL-4 monoclonal antibody ELISA Detection : 共に Pharmingen) $1\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整したものを $100\mu\text{L}/\text{well}$ まきパラフィルムでふたをした後、 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C にて1時間静置、抗体液を捨て、滅菌 PBS $200\mu\text{L}/\text{well}$ で洗浄し滅菌 PBS で $1.2\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整した Streptavidin-Alkaline Phosphatase (Life Technologies) を $100\mu\text{L}/\text{well}$ まきパラフィルムでふたをした後、 $5\%\text{CO}_2$ 、 37°C にて30分静置、滅菌 PBS $200\mu\text{L}/\text{well}$ で洗浄した。

Agarose gel (サワディーテクノロジー)

を滅菌 PBS に入れ、オートクレーブで溶解し、1% Agarose gel/PBS 溶液を作成し、精製水に溶解して生成した 1% Nitro Blue Tetrazolium (NBT : Wako) 溶液と 1Tab. を N,N-Dimethyl formamide (DMF : 岩井化学) 0.5 mL に溶かした 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate (BCIP: Sigma) を 10 : 1 の割合 (BCIP-NBT) で 1% Agarose gel/PBS 溶液に混和し 80°C に保温したものを 100 μ L /well ずつ plate にまき、発色させ、spot をカウントした。

II マウスの type 1/type 2 バランスの調節

1 *in vivo* におけるマウスの type 1/type 2 バランスの調節

コントロールとシジュウム飲水用として C57BL/6 マウス (♀ : 4 週齢) と BALB/c マウス (♀ : 4 週齢) をそれぞれ 2 グループに分けた。精製水約 600 mL をオートクレーブで滅菌し、熱いうちに市販のシジュウム茶 Tea Pack を 3 つ入れ 10 分間抽出したものを 2 日おきにシジュウム飲水用マウスに自由飲水法にて 14 日、28 日間投与飼育した後、頸椎脱臼法で致死させた後解剖し胸腺、脾臓を取出しリンパ球を採取した。適当量の培養液で希釈して 15 mL の遠心管に移し、培養液 10% の FBS (Life Technologies) を添加した RPMI 1640 リキッド (ニッスイ) に浮遊させ、700 rpm で 10 分遠心機にかけ、上清を捨て、再度 RPMI 1640 を添加しリンパ球液を生成し、リンパ球液を等量の 0.2% トリパンブルー液に染色し無染色の生細胞をカウントして 1×10^5 /mL に調整した。

1×10^5 /mL リンパ球液 1,000 μ L を、1 つの検体につき 2 つずつ用意し、PMA

(Sigma) 1 μ L と ionomycin (Sigma) 0.5 μ L を mitogen として添加し、5% CO₂、37°C にて 4 時間培養した。

滅菌 PBS で IFN- γ 、IL-4 の 1 次抗体 (Purified Rat anti-mouse IFN- γ monoclonal antibody ELISA capture と Purified Rat anti-mouse IL-4 monoclonal antibody ELISA capture : 共に Pharmingen) 1 μ g/mL に希釈し、100 μ L/well 分注パラフィルムでふたをし、4°C の moist chamber で 1 晩おいた後、滅菌 PBS (ニッスイ) に 10% FBS を加えた溶液 (10% FBS-PBS) 200 μ L/well でブロッキングした 96 穴平底 plate に培養したリンパ球液 100 μ L/well をまきパラフィルムでふたをした後、5% CO₂、37°C にて 1 晩培養した。

滅菌 PBS 200 μ L/well でリンパ球が除去されるまで洗浄した後、滅菌 PBS で 2 次抗体 (Biotinylated mouse anti-human IFN- γ monoclonal antibody ELISA Detection と Biotinylated RAT anti-human IL-4 monoclonal antibody ELISA Detection : 共に Pharmingen) を 1 μ g/mL に調整したものを 100 μ L/well まきパラフィルムでふたをした後、5% CO₂、37°C にて 1 時間静置、抗体液を捨て、滅菌 PBS 200 μ L/well で洗浄し滅菌 PBS で 1.2 μ g/mL に調整した Streptavidin-Alkaline Phosphatase (Life Technologies) を 100 μ L/well まきパラフィルムでふたをした後、5% CO₂、37°C にて 30 分静置後滅菌 PBS 200 μ L/well で洗浄した。Agarose gel (サワディーテクノロジー) を PBS (-) に入れ、オートクレーブで溶解し、1% Agarose gel/PBS 溶液を作成し、精製水に溶解して生成した 1% NBT (Wako) 溶液と 1Tab. を DMF (岩井化学) 0.5 mL に溶解した

BCIP (Sigma) を 10 : 1 の割合 (BCIP-NBT) で 1 % Agarose gel/PBS 溶液に混和し 80°C に保温したものを 100 μ L/well ずつ plate にまき、発色させ、spot をカウントした。

2 *in vitro* におけるマウスの Th1/Th2 バランスの影響

C57BL/6 マウス (♀ : 4 週齢) と BALB/c マウス (♀ : 4 週齢) を頸椎脱臼法で致死させた後解剖し胸腺、脾臓を取出しリンパ球を採取した。適当量の培養液で希釈して 15 mL の遠心管に移し、培養液 10 % の FBS (Life Technologies) を添加した RPMI 1640 リキッド (ニッスイ) に浮遊させ、700 rpm で 10 分遠心機にかけ、上清を捨て、再度 RPMI 1640 を添加しリンパ球液を生成した。リンパ球液を等量の 0.2 % トリパンブルー液に染色し無染色の生細胞をカウントして 1×10^5 /mL に調整した。

シジュウム全草から 80 % acetone で抽出した結晶 (PG-ext.) を最終濃度 0.1 % の DMSO になるよう各濃度 0 μ g/mL、10 μ g/mL、50 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL に調整したものを sample として用意した。

1×10^5 /mL リンパ球液 1,000 μ L に各濃度分の sample 10 μ L を混合したものを、1 つの検体につき 2 つずつ用意し、5 % CO₂、37°C にて 24 時間培養した後に上記の方法で type 1, type 2 細胞をカウントした。

C. 結果

健常人末梢リンパ球増殖に及ぼす影響

各種濃度の PG-ext. の存在下に末梢リンパ球の培養を行うと、50-100 μ g/mL までは濃度依存的に増殖が促進されそれ

以上では増殖が抑制された。(図 1)

リンパ球混合培養においても、ほぼ 50-100 μ g/mL までは濃度依存的にリンパ球混合培養を促進しそれ以上では抑制した。(図 2)

健常人末梢リンパ球 type 1/ type 2 分化に及ぼす影響

末梢リンパ球の type 1/ type 2 (IFN- γ /IL-4) 比は、ほぼ 100 μ g/mL までは PG-ext. 濃度に依存して増加し、それ以上では減少した。(図 3)

そのメカニズムは IFN- γ は 50 μ g/mL までは増減が見られなかったが、それ以上の濃度になると増加した。IL-4 では PG-ext. 濃度に依存して減少傾向となった。

マウスによる検討

1 *in vivo* 投与による検討

マウスによる *in vivo* 実験では胸腺における IFN- γ は PG 茶飼育開始 14 日後では BALB/c は変化なく、C57BL は増加、28 日後では両方とも増加した。IL-4 は 14 日後では両方とも減少したが、28 日後では両方とも増加した。特に C57BL は 3 倍近く増加した。胸腺細胞における IFN- γ /IL-4 比では 14 日後では両方とも増加し特に BALB/c は約 2 倍増加した。28 日後では両方とも減少した。

脾臓における IFN- γ は PG 茶飼育開始 14 日後で BALB/c は増加し、C57BL は減少した。28 日後では BALB/c は変化なく、C57BL は減少した。IL-4 では 14 日後 BALB/c は減少し C57BL は変化なかった。28 日後では BALB/c は変化なく、C57BL は増加した。IFN- γ /IL-4 では 14 日後では BALB/c は増加し 28 日後では減少し、Control とほぼ同じになった。一方 C57BL は 14 日後、28 日後と減少し、

Controlの0.2倍になった。(図4,5)

2 *in vitro* 処理による検討

マウスによる *in vitro* 実験では IFN- γ 産生細胞は PG-ext. 濃度に依存して増加した。IL-4 産生細胞は 50 μ g/mL までは減少したが、100 μ g/mL までは増加し、200 μ g/mL までは減少した。IFN- γ /IL-4 では 50 μ g/mL までは PG-ext. 濃度に依存して増加しそれ以降は減少した。(図6)

D. 考察

外来異物や病原体に対する抗原特異的な免疫応答は哺乳類をはじめとする脊椎動物の生体防御反応の特徴である。異物認識において中心的な役割を果たしているのが T 細胞であり、表面に CD4 分子を有するヘルパー T 細胞は様々なサイトカインを介して B 細胞による抗体産生や細胞傷害 T 細胞の機能を調節している。近年、このヘルパー T 細胞が産生するサイトカインによって Th1、Th2 の二種類に大別されること、そして二つのバランスの変化が自己免疫疾患やアレルギーなどの病態に密接に関係していることが明らかになった。ヘルパー T 細胞には IL-2 や interferon γ (IFN- γ) を産生して細胞性免疫を活性化する Th1 細胞と IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 を産生して液性免疫を活性化する Th2 細胞があり、これらは共通するナイーブ T 細胞から両者に特有のサイトカインを産生する Th0 細胞を経て分化することがマウスのみならずヒトでも証明された。

Th1/Th2 の差は単に T 細胞の産生するサイトカインの相違のみならず、Th1/Th2 バランスが免疫応答の質を決定し、様々な疾患の感受性や予後にも関与する。す

なわち臨床的にはアトピーやアレルギー疾患では Th2 優位によって IgE 産生が亢進しており、また自己免疫疾患でも様々な自己抗体や免疫複合体が組織を傷害する SLE でも同様に Th2 優位である。一方細胞傷害性 T 細胞による組織傷害が病態に関与する関節リウマチや活動性肝炎、接触性皮膚炎、組織特異性自己免疫疾患、若年性糖尿病では Th1 優位が病状に関与している。

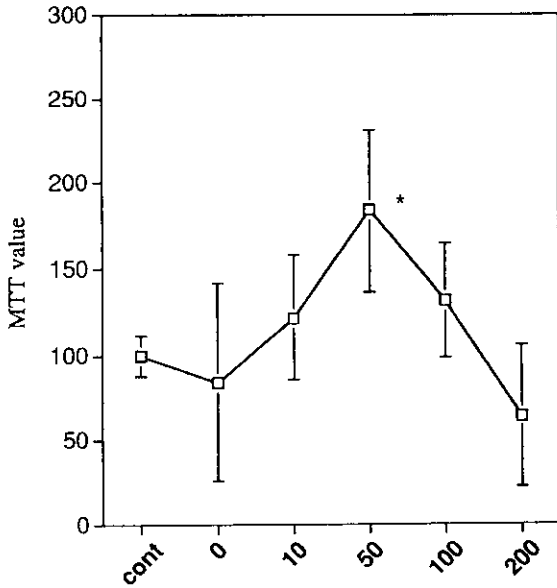
Th1、Th2 は互いの分化増殖を抑制するので治療には逆を活性化することが望ましい。今回我々が検討した PG-ext. には低濃度におけるリンパ球増殖促進作用と高濃度における抑制といった二相性の増殖調節作用に加えて *in vitro* における Th1 誘導作用が認められた。PG-ext. はリンパ球特に T リンパ球を活性化し、傷害生 T 細胞の活性化し Th2 による過剰な体液性免疫反応を抑制するが高濃度では過剰な Th1 による細胞性免疫反応も抑制することができると考えられる。しかし、経口投与ではリンパ組織においてどの程度の濃度になるかが不明であるためにマウスを用いた *in vivo* の検討を行った。その結果、短期間ではいずれの系統も Th1 が優位になるが、服用期間が長くなると、遺伝的に Th1 優位の C57BL は IFN- γ 産生細胞は減少し IL-4 産生細胞は増加、遺伝的に Th2 優位の BALB/c は逆に IFN- γ 産生細胞は増加、IL-4 産生細胞は減少したことより、末梢では PG-ext. の作用は大きく遺伝的な支配を受けると考えられる。

以上の結果よりヒト、マウス共に未分化な Th0 細胞の分化あるいは選択の過程に PG-ext. が作用することを示唆された。すなわち従来報告された chemical mediator の遊離調節に加えて、より免疫の本質的なレベルでリンパ球の分化方向を

左右しTh2 優位によるアレルギーの発症を抑制すると考えられる。

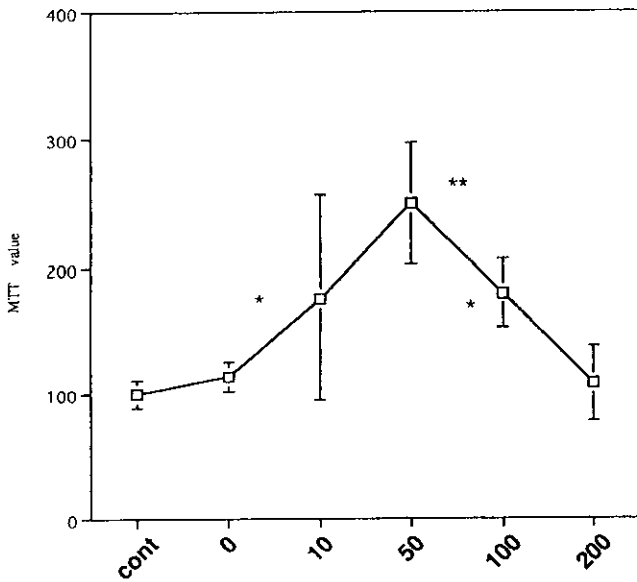
今後活性成分の精製分離によって新たな免疫調節薬の創薬と同時に複雑な免疫機構の解明の手段となる可能性が示唆された。

図 1. Psidium のリンパ球増殖に及ぼす影響



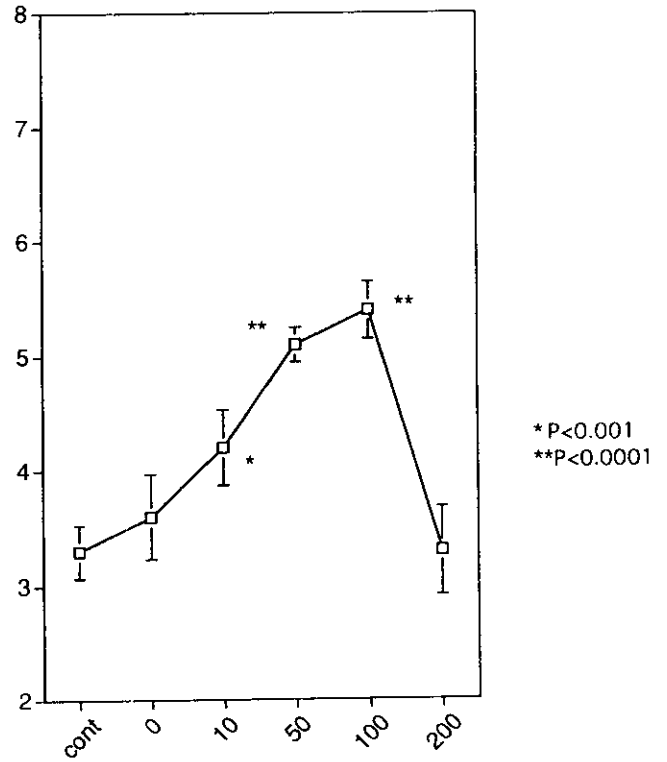
*P<0.01

図 2. Psidium の MLR に及ぼす影響



*P<0.05
**P<0.001

図 3. Psidium の type 1/type 2 比に及ぼす影響



*P<0.001
**P<0.0001

図 4. マウス胸腺における Type 1/Type 2 ratio

