

図5. マウス脾における Type 1/Type 2 ratio

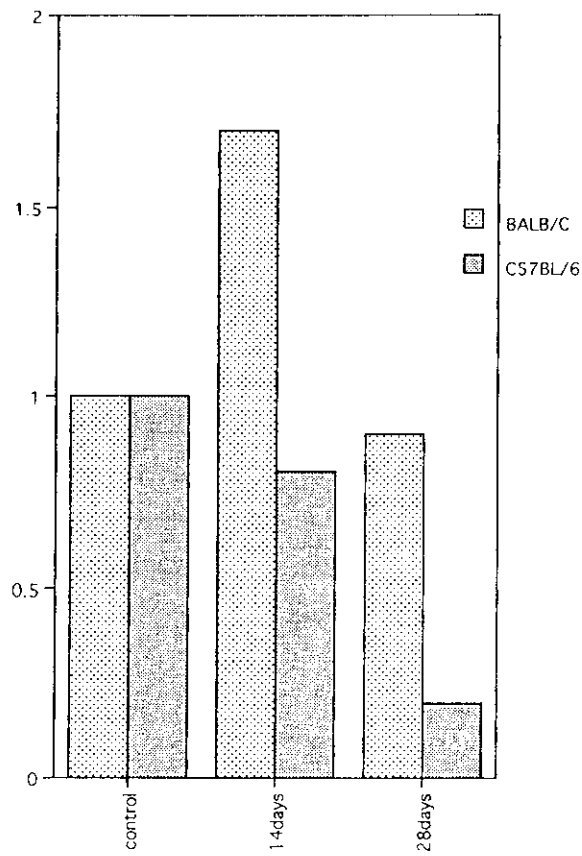
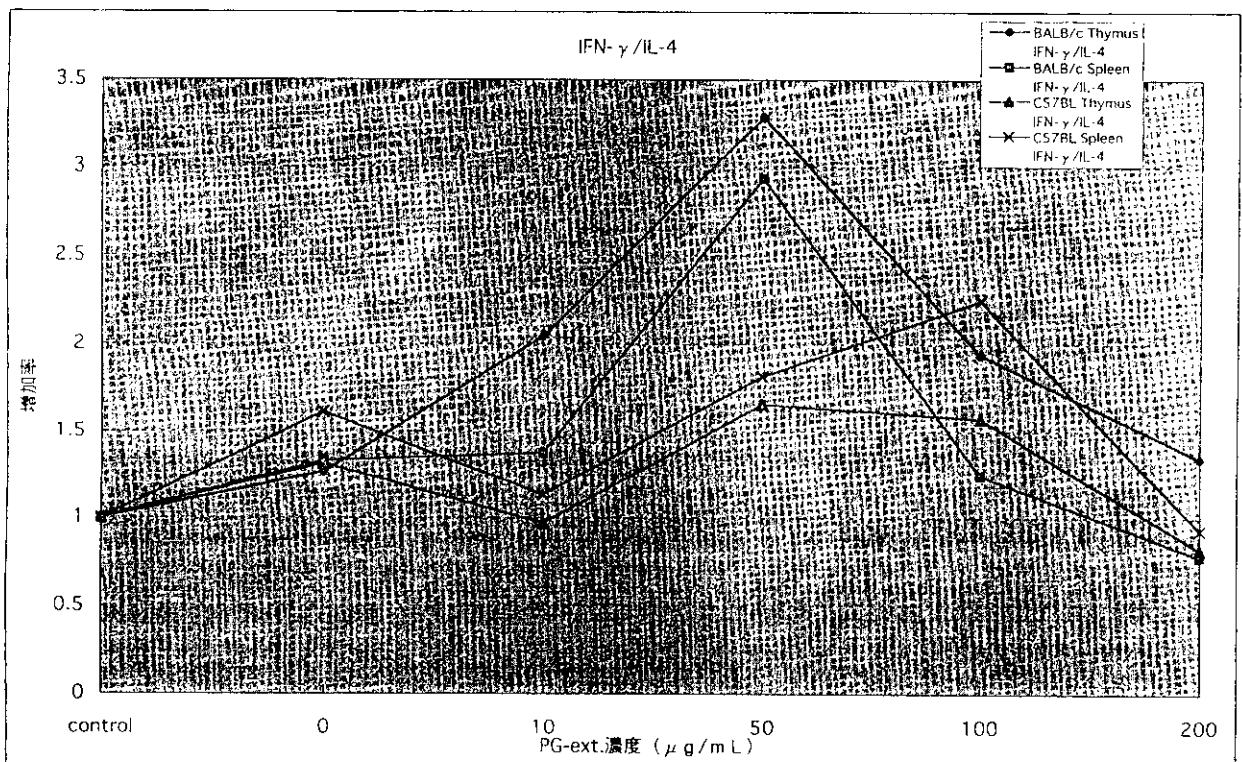


図6. マウスにおける INF- γ /IL-4 ratio



マクロファージの一酸化窒素 (NO) 産生作用へのシジュウムの調節作用

石井里枝、斉藤貢一

埼玉県衛生研究所

研究要旨

これまでの研究により、シジュウムはマクロファージからの NO 産生を抑制し、その主たる活性成分は加水分解型のタンニンであることが明らかとなった。そこで、この NO 産生調節作用のメカニズムを解明するために、NO 合成酵素 (iNOS) の誘導と酵素活性に対するシジュウムの作用を検討した。その結果、シジュウム 80%アセトン抽出エキス及び単離された加水分解型タンニンは iNOS の誘導抑制作用 (IC_{50} : 0.03~1.54 μ g/ml または μ M) と酵素活性阻害作用 (IC_{50} : 48.4~145.6 μ g/ml または μ M) を示した。

A. 研究目的

マクロファージは細菌やウイルス感染に対する生体防御において重要な役割を果たしている。また、マクロファージは種々の刺激に応じて活性化すると、一酸化窒素 (NO) を産生する。それは、活性酸素とともにマクロファージの抗腫瘍、抗菌作用のエフェクター分子として作用する。しかし、過剰な NO 産生は急性及び慢性の炎症反応において、宿主の正常な細胞や組織を傷害する。さまざまな炎症性疾患においても、活性化したマクロファージからの NO 産生が観察されている。これまでの研究でシジュウムがマクロファージの NO 産生を調節し、その活性成分が加水分解型タンニンであることが明らかとなった。そこで、この調節作用のメカニズムを解明するために、NO 合成酵素 (iNOS) 誘導と酵素活性に対するシジュウム及び単離された活性成分の作用について検討した。

B. 研究方法

(1) NO 産生抑制作用及び iNOS 誘導抑制作用

用

マクロファージはマウスマクロファージ様株化細胞 (RAW264.7 細胞) を使用した。Ham's F12培地 (含10%ウシ胎児血清) に 1.2×10^6 cells/ml となるように懸濁し、35mm ペトリディッシュに播き、2 時間培養後、シジュウム 80%アセトン抽出エキスまたは単離成分を添加、同時に IFN- γ (10U/ml) 及び LPS (100ng/ml) を加え、8 時間培養した。培養上清を採取し、NO₂量をグリース法で定量した。さらに、iNOS タンパクの定量のために、細胞をセルスクレーパーでかきとり、PBS で洗浄後、溶解し、タンパクを抽出した。

(2) SDS-PAGE と Western blotting

(1)で細胞から抽出したタンパク 100 μ g分を SDS-PAGE に供した。ゲル上のタンパクを PVDF メンブランへ転写し、モノクローナル抗マクロファージ iNOS 抗体、ラビット抗マウス IgG 抗体、¹²⁵I ラベルしたプロテイン A と反応させた。メンブラン上の 130kDa の iNOS 酵素タンパクの発現を測定した。

(3) iNOS 活性阻害作用

マクロファージを IFN- γ (10U/ml) 及び LPS (100ng/ml) とともに 16 時間培養し、活性化させた。iNOS を発現した細胞を採取し、PBS で洗浄後、改良 Hanks 液に懸濁し、24 穴プレートに 2×10^5 cells/500 μ l/well に播いた。培養液にシジュウム 80%アセトン抽出エキスまたは単離成分を添加し、10 分間インキュベートした後、L-アルギニン (1mM) 及び carboxy-PTIO (100 μ M) を加える。30 分間インキュベートした後、上清中の NO₂ 量をグリース法で測定した。

(4) 細胞毒性評価

Viability を MTT 法及びトリパンブルー色素排除法及び鏡検による形態観察により確認した。

C. 研究結果

(1) NO 産生抑制作用

シジュウム 80%アセトン抽出エキス、単離成分である Casuarinin、Castalagin 及び Tellimagrandin I はマクロファージの NO 産生を濃度依存的に抑制した。しかし、これら加水分解型タンニンの構成単位である Methyl gallate は抑制活性を示さなかった。

(表 1)

(2) iNOS 誘導抑制作用

IFN- γ (10U/ml) 及び LPS (100ng/ml) で活性化したマクロファージ中の iNOS タンパク量を 100 とし、相対値として表した(図 1)。シジュウム 80%アセトン抽出エキス、Casuarinin、Casutalagin 及び Tellimagrandin I は濃度依存的に抑制作用を示した(IC₅₀:0.03~1.54 μ g/ml または μ M)。NO 産生に対し、抑制活性を示さなかった Methyl gallate は、iNOS の誘導に対しても効果を示さなかった。

(3) iNOS 活性阻害作用

シジュウム 80%アセトン抽出エキス、Casuarinin、Casutalagin 及び Tellimagrandin I は酵素活性に対しても抑制効果を示した (IC₅₀: 48.4~145.6 μ g/ml または μ M)。Methyl gallate は酵素活性に対しても抑制効果を示さなかった(図 2)。

(4) 細胞毒性評価

今回検討した濃度すべてにおいて、細胞毒性は認められなかった。

D. 考察

シジュウム 80%アセトン抽出エキスはマクロファージの NO 産生を抑制した。その主たる活性成分は Casuarinin や Castalagin などの加水分解型タンニンと考えられる。その抑制作用は iNOS 誘導抑制作用 (IC₅₀ 値: 0.03~1.54 μ M) と iNOS 活性阻害作用 (IC₅₀ 値: 48.4~145.6 μ M) の 2 つの作用によるものであることがわかった。これまで報告されている NO 産生阻害剤はいずれか一つのメカニズムを抑制するものがほとんどである。しかし、シジュウム及び単離成分は両方の作用を調節するものであり、特徴的な性質を持っていると言える。また、単離された加水分解型タンニンの NO 産生抑制作用、iNOS 誘導抑制作用、iNOS 活性阻害作用を IC₅₀ 値により比較すると、すべての抑制効果において、Casuarinin > Castalagin > Tellimagrandin I の順であり、構造の差異により、その NO 産生抑制活性に違いが認められた。

E. 結論

今回の研究により、シジュウムの NO 産生調節作用の作用機序が一部明らかとなった。NO を初めとするマクロファージが産生する

炎症性のサイトカインは大きく炎症疾患に関与している。シジュウムは NO 産生調節作用を通じて、新たな抗炎症剤となる可能性が示唆された。

表 1 シジュウム及び単離成分の NO 産生に対する抑制効果

	I C ₅₀ 値 (μg/mlまたはμM)		
	NO産生抑制効果	iNOS誘導抑制効果	酵素活性阻害効果
シジュウム	31.0	1.28	71.2
Casuarinin	2.7	0.03	48.4
Castalagin	7.5	0.08	107.0
Tellimagrandin I	62.4	1.54	145.6
Methyl gallate	>300	>300	>300

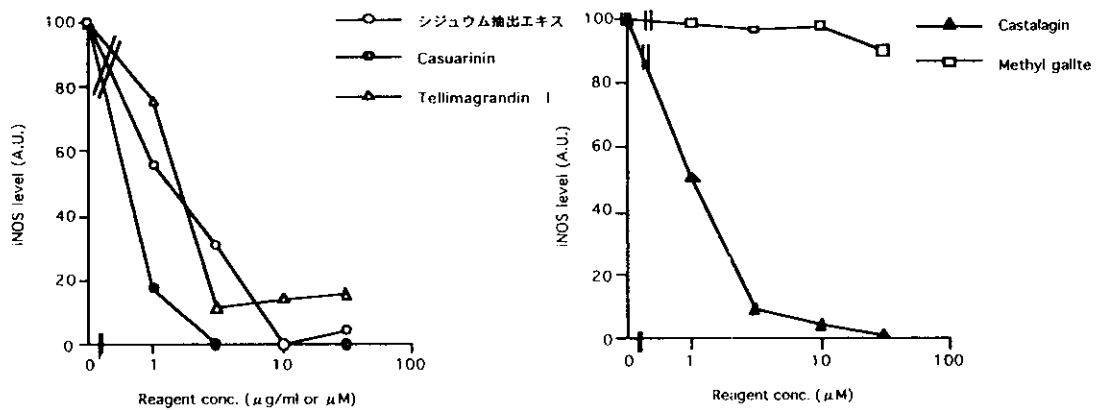


図 1 シジュウム抽出エキス及び単離成分の iNOS 発現阻害作用

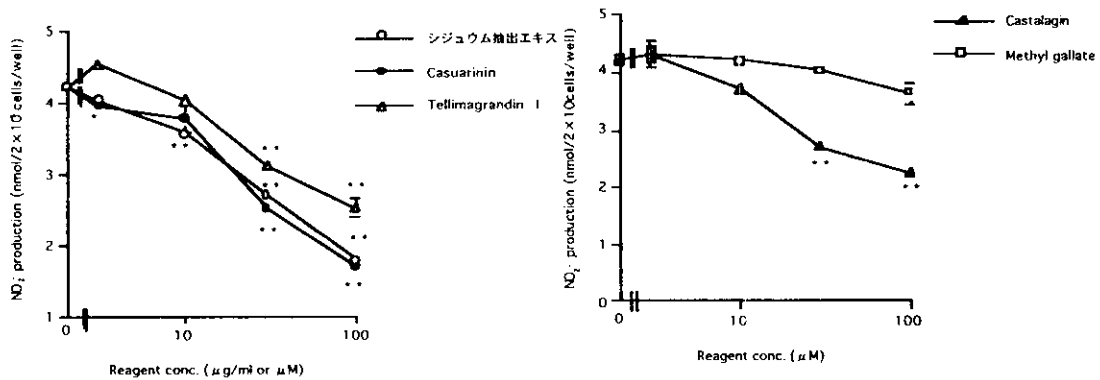


図 2 シジュウム抽出エキス及び単離成分の iNOS 活性阻害作用

*; p<0.05, **; p<0.01

シジュウムの炎症細胞に与える効果と有効成分の分離

研究者 北中 進

日本大学薬学部教授

研究要旨 シジュウムは、各種アレルギー疾患に効果を挙げている植物である。これまで、マスト細胞からのヒスタミン遊離抑制活性を指標に成分検索を行い、タンニン類など水溶性ポリフェノール成分を有効成分として分離してきた。今回、比較的脂溶性画分から、新規ベンゾフェノン配糖体 (1) を単離し、ヒスタミン遊離抑制活性を確認した。また、強力なヒスタミン遊離抑制活性を有する 1 の類似物質の存在を示唆する結果を得た。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎等の疾患は主に I 型アレルギー反応によって引き起こす疾患であり、患者数は、世界的に増加している。しかし、副作用が少なく安全で有効な抗アレルギー薬は現在のところ見いだされていない。I 型アレルギーはアレルゲンに対し、IgE の刺激によりマスト細胞からのヒスタミンをはじめとするケミカルメディエーター遊離が第一の反応である。本過程を抑制することはこれらのメディエーターによるアレルギー反応増悪を幅広く回避できる。

シジュウムは、南米原産のフトモモ科の植物で、葉は民間薬としてアトピー性皮膚炎、花粉症などのアレルギー疾患に応用されている様に、経験的に各種アレルギー疾患に有効性が認められている。本研究ではマスト細胞からのヒスタミンをはじめとするケミカルメディエーター遊離抑制活性を指標に成分の分離を行い、

副作用の少ない新規の抗アレルギー薬を開発することを目的とするものである。

B. 研究方法

シジュウムエキスの調製と化合物 1 の精製

シジュウムの葉(5.8 Kg)を 80%アセトン水で抽出し、得られたエキスを Diaion HP-20 カラムに付し、水、20%-、40%-、70%-、100%-メタノールおよびアセトンで順次溶出した。これらのうち、70%メタノール溶出画分を Sephadex LH20、Diaion CHP-20、ODS カラムクロマトを繰り返し、最終的に順相および逆相の HPLC で精製することにより、化合物 1 を得た。

ヒスタミン遊離抑制試験

ヒスタミン遊離抑制試験は下記の通り行った。すなわち、ラット腹腔マスト細胞を 5×10^5 cells/mL の細胞懸濁液を調

製し、試料を終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で添加した。脱顆粒物質として、comopound 48/80 を用いた。遊離したヒスタミン量は、オルトフタルアルデヒド(OPA)を用いたポストラベル法による HPLC で定量された。

C. 研究結果

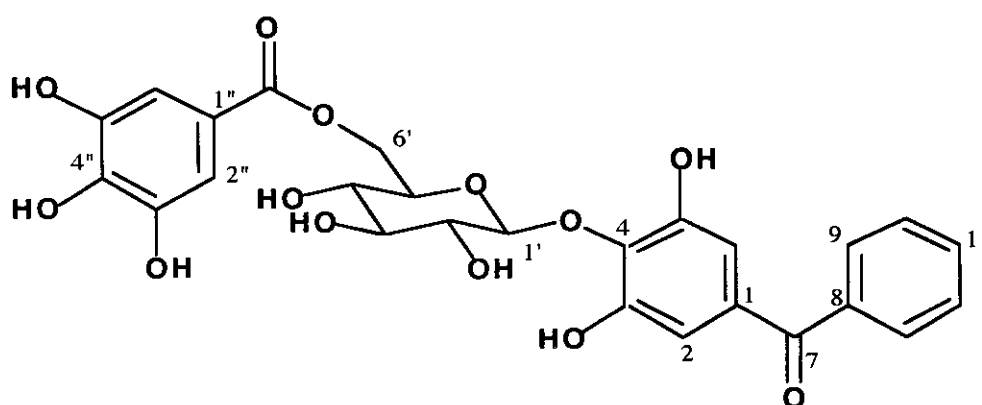
化合物 **1** は、黄褐色の粉末として得られ、融点 165°C、高分解の FAB-MS より、分子式 $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{O}_{13}$ であることが明らかとなった。その構造は UV、IR、NMR の各種スペクトルを解析することにより、新規ベンゾフェノン配糖体 **1** と推定された。また、本物質はラット腹腔由来マスト細胞からのヒスタミン遊離を終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 50% に抑制した。また、Diaion CHP-20、ODS で得られた各画分のうち、薄層クロマト上、**1** と同様に呈色する物質を含む画分には、終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でヒスタミン遊離をほぼ完全に阻害することが明らかになった。

D. 考察

今回は、これまで明らかにしたヒスタミン遊離抑制物質より比較的水溶性の低い 70%メタノール画分の成分を検索し、新規ベンゾフェノン配糖体を単離構造決定するとともに、ヒスタミン遊離抑制活性を有することを明らかにした。なお、化合物 **1** の近傍には類似物質含む画分がいくつか存在し、それら画分には **1** 以上のヒスタミン遊離抑制活性が認められたことから、新たな遊離抑制物質の発見が期待される。

E. 結論

これまでシジュウムにはタンニン類という水溶性ポリフェノールにヒスタミン遊離抑制活性を有することを明にしてきたが、今回、比較的水溶性物質にも同様の活性が存在することを明らかにした。また、今回単離された化合物 **1** を含まない他の画分には、いくつかの関連化合物と強力なヒスタミン遊離抑制活性が認められることから、生物活性を含めた探索が今後の検討課題である。



1