

天然薬物シジュウムの抗 HIV 作用  
HIV 母児感染予防に関連して

分担研究者 早川 智 日本大学医学部産婦人科学教室

研究要旨 HIV 感染妊婦において、HIV 垂直感染の予防法を確立することは、産科臨床的にたいへん意義の深いことである。HIV の経胎盤感染は比較的少なく何らかの局所的防御機構の存在が挙げられる。さらに、胎盤絨毛には CD4 が存在せず、HIV 感染機構も興味深い。したがって、CD4 非依存的な HIV 感染機構を解明することは垂直感染予防のみならず中枢神経への HIV 感染機構の解明にもつながると考えられる。今回、HIV 感染患者胎盤の解析並びに培養絨毛細胞を対象に各種検討を行なった。さらに、我々が先に報告した Th1 誘導活性、IFN- $\gamma$  産生増強活性を有する天然物質シジュウムを用いて HIV の CD4 依存性、非依存性に対する効果について検討した。

## A 研究目的

### I HIV 母児感染の解析

近年、我が国において、不法滞在外国人の増加や異性間、同性間の接触による HIV 感染者が著しく増加している。また、血液製剤による感染者とその配偶者が妊娠、出産を希望する事も多い。HIV 感染妊婦において胎児新生児に対する垂直感染の予防は産科臨床的に重要な課題である。AIDS の垂直感染は多くの場合、産道感染によるために陣痛発来前に選択的帝王切開を施行することによって予防が可能であるが、妊娠中に成立する経胎盤感染は確実な予防が困難である。文献的には HIV 感染妊婦より生まれた新生児の約 10% に垂直感染がみられ、多くの場合 10 才以前に発病し死亡するとされる。しかしながら、HIV の経胎盤感染は比較的少なく何らかの局所的防御機構の存在する可能性が示唆される。胎盤絨毛細胞には CD4 が存在せず、CD4 を介さない HIV の感染機構の解明は垂直感染予防の確立のみならず中枢神経への HIV 感染機構の解明にもつながると考えられる。本学ならびに国立感染症研究所エイズ研究センターにおいて 1998 年から 1999 年に収集した HIV 感染患者胎盤と培養絨毛細胞を対象として以下の検討を行った。

### II シジュウムの抗 HIV 作用

南米インディオはシジュウムならびに関連生薬をウイルス感染症に使用しておりその臨床的有効性から、消炎作用と同時に抗ウイルス作用の存在が推定される。我々は先に天然物質シジュウムの細胞性免疫活性化作用として Th1 細胞の誘導活性や IFN- $\gamma$  産生増強を報告した。現在、致命的なウイルス感染症である HIV の CD4 依存性、非依存性感染に及ぼすシジュウムの作用について検討した。

## B 研究方法

### I HIV 母児感染の解析

#### HIV 感染妊婦胎盤の病理組織学的解析

我が国において HIV 陽性が確認できた妊婦 12 例の胎児付属物（臍帯、卵膜、胎盤）における病理所見を検討した。

#### HIV 感染妊婦胎盤における HIV の局在

酵素抗体法により臍帯、卵膜、胎盤における HIVp24 の局在を検討した。

#### 胎盤における HIV の感染機構

一般に胎盤絨毛細胞は CD4 を発現しないとされている。従って HIV 感染患者胎盤に対する HIV の侵入機構の解析が問題になる。そこで、樹立絨毛癌細胞株 JEG-3、JAR に *in vitro* で HIV をチャレンジし、120 時間後に培養上清中の HIV p 24 を定量した。この実験系においてウイルスの添加前に抗 CD4 抗体、抗 CCR5 抗体、抗 CXCR4 を加えて検討した。

#### 胎盤脱落膜局所におけるケモカインによる情報伝達機構

胎盤におけるケモカインレセプターの発現と機能を解析した。妊娠初期、中期、後期各時期 4-8 例の胎盤と絨毛癌細胞株 JEG-3 において RT-PCR、Flow cytometry で各種のケモカインレセプター発現を検討した。また、絨毛細胞に各種濃度の MIP-1、MCP-1、MCP-3、RANTES を加えて絨毛細胞機能に対する影響を検討した。

#### 子宮内感染を来す HIV のウイルス学的解析

胎内感染を起こしやすいウイルス株があるのかを検討した。

#### 臍帯血における IL-16 の意義

近年、クローニングされた T 細胞の遊走、活性化因子である IL-16 は同時に HIV p120 の CD4 への結合を阻害し、HIV 感染者で高値、発病前に低下することから内因性の抗 HIV サイトカインとして注目される。健常妊婦における血中 IL-16 を ELISA によって測定したところ非妊婦に比較して有意に高値であり、さらに臍帯血では非妊婦の約 10 倍の濃度に達していた。同一患者においても臍帯血中の IL-16 は母体末梢血よりも常に高値であり、臍帯血 CD8 リンパ球は構成的に IL-16mRNA を発現していることから IL-16 が胎児リンパ球の HIV に対する自然抵抗性に関与している可能性が示唆された。しかし

ながら、臍帯血リンパ球を用いた *in vitro* の感染実験では、臍帯血中濃度である 1,000-2,000 ng は HIV の感染を完全に防ぐには必ずしも十分では無いため、さらにウイルス量や母児接点局所における IL-16 の作用など今後の検討が必要である。母体側組織である脱落膜に多く存在する CD56 陽性 LGL も構成的に IL-16 を産生しており、局所における HIV 感染防御に作用している可能性がある。

## II シシウム抗 HIV 作用

### CD4 依存性感染に及ぼすシシウムの作用

健常人 4 名の末梢血より採取した CD4 陽性 T リンパ球に国立感染症研究所において維持している日本人由来の HIV 株をチャレンシし 120 時間後に培養上清中の HIVp24 を ELISA により定量した。この実験系においてウイルスの添加前にシシウム粗抽出物を加えて検討した。

### CD4 非依存性感染に及ぼすシシウムの作用

樹立絨毛癌細胞株 JEG-3 に国立感染症研究所において維持している日本人由来の HIV 株をチャレンジし 120 時間後に培養上清中の HIVp24 を ELISA により定量した。

この実験系においてウイルスの添加前にシシウム粗抽出物を加えて検討した。

### HIV 感染患者由来リンパ球における HIV 産生に及ぼすシシウムの作用

HIV 感染患者 2 例より同意を得て採血し、CD4 リンパ球をマグネチノクビースによって分離した。このリンパ球を PHA 5 µg/ml、IL-2 100 IU/ml によって刺激し、120 時間後に培養上清中の HIVp24 を ELISA により定量した。この実験系にシシウム粗抽出物を加えて検討した。

### HIV 感染患者由来リンパ球のアポトーシスに対するシシウムの作用

HIV 感染患者 2 例より採血した CD4 リンパ球を PHA 5 µg/ml、IL-2 100 IU/ml によって刺激し 72 時間後にアポトーシスを DNA ladder の形成より検討した。この実験系にシシウム粗抽出物を加えて検討した。

## C 結果および考察

### I HIV 母児感染の解析

#### HIV 感染妊婦胎盤の病理組織学的解析

胎盤では従来報告される cholangiosis、(絨毛における胎児血管の増生) fibrinoid 変性に加えて絨毛間腔の小円形細胞の出現 (intervillitis)、リンパ球と絨毛の接着、絨毛の未熟性に加えて絨毛細胞の apoptosis の増加がみられた。HTLV の絨胎盤感染では感染絨毛細胞の脱落による局所感染予防機構が報告されているが、同様の機序の存在が示唆された。卵膜、臍帯においては特別な所見を認めなかった。

#### HIV 感染妊婦胎盤における HIV の局在

12 例中 2 例の胎盤において合胞体絨毛、syncytial trophoblast ならびに Hofbauer 細胞に HIVp24 の染色を認めた。卵膜、臍帯においては全例とも染色性は陰性であった。そこで新鮮な 4 検体において抗原性によって分画した胎盤細胞における HIVmRNA の発現の有無を検討した。胎盤を生理食塩水で十分に洗浄して付着した母体血、を除きトリプシン処理後、マグネチックビーズあるいは抗体プレートによって EGF-R 陽性の villous trophoblast erbB2 陽性の extravillous trophoblast、CD11b 陽性の Hofbauer 細胞に分画して RT-PCR を行った。その結果 HIV 感染患者では 5 例中 4 例の villous trophoblast、extravillous trophoblast、Hofbauer 細胞に HIVmRNA の発現を認めた。この所見から胎盤に HIV は感染しているが大部分の胎児には感染しないという事実が明らかになった。

#### 胎盤における HIV の感染機構

JEG-3 ではウイルス量は抗 CCR5 抗体、抗 CXCR-4 抗体で有意に減少したが抗 CD4 抗体では全く影響を受けなかった。この結果、絨毛癌細胞株 JEG-3 は HIV に感受性であり、胎盤絨毛への HIV の感染は CD4 非依存的であるが、ケモカインレセプターは関与するらしいという事実が明らかになった。

#### 胎盤脱落膜局所におけるケモカインによる情報伝達機構

妊娠初期胎盤では CCR1,2,3,4,5 CXCR-1,2,4、中期胎盤では CCR1,2,4、CXCR-2,4、妊娠後期胎盤では CCR-2,4、CXCR-4 の発現を認め、JEG-3 では CCR-3,4,5、CXCR-1,2,4 の発現が見られた。

ケモカインとそのレセプターの脱落膜胎盤局所における機能として、胎盤機能の調節、母児免疫寛容への関与、胎内感染の防御などの可能性がある。その結果、10-100 ng/ml レベルでは絨毛細胞の増殖を促進し、それ以上では hCG 分泌を促進する作用が明らかになった。

ケモカインを産生源となる細胞を RT-PCR で検索した。絨毛細胞自体はケモカインを産生せず、脱落膜リンパ球、特に未熟な NKT 細胞を含む CD56 陽性顆粒リンパ球が IL-2 の存在下に MIP-1、MCP-1、MCP-3、RANTES を産生することが明らかになった。この事実より脱落膜（母体側）と胎盤（胎児側）の間にケモカインを介した情報伝達が行われている事実が明らかになった。

#### 子宮内感染を来す HIV のウイルス学的解析

我々は、先に我が国において HIV 垂直感染の成立した 8 例のうち 6 例は V3 ループの 29 例が D が N に置換していることを報告した。個々の症例内でも母親血中には複数のクローンが存在しても感染した児の HIV はほぼ単独クローンであることから母体に感染した HIV は変異を繰り返しそのごく一部が胎児・新生児に感染すると考えられた。この現象がウイルスの性状に相違によるものかそれとも単に感染機会が少ない事の反映かを検証するため HIV 胎盤から分離した HIV のシーケンシングを行っているが、現時点では確定的な結論を得られていない。

## 臍帯血における IL-16 の意義

近年、クローニングされた T 細胞の遊走、活性化因子である IL-16 は同時に HIV p120 の CD4 への結合を阻害し、HIV 感染者で高値、発病前に低下することから内因性の抗 HIV サイトカインとして注目される。健常妊婦における血中 IL-16 を ELISA によって測定したところ非妊婦に比較して有意に高値であり、さらに臍帯血では非妊婦の約 10 倍の濃度に達していた。同一患者においても臍帯血中の IL-16 は母体末梢血よりも常に高値であり、臍帯血 CD8 リンパ球は構成的に IL-16mRNA を発現していることから IL-16 が胎児リンパ球の HIV に対する自然抵抗性に関与している可能性が示唆された。しかしながら、臍帯血リンパ球を用いた *in vitro* の感染実験では、臍帯血中濃度である 1,000-2,000 ng は HIV の感染を完全に防ぐには必ずしも十分では無いため、さらにウイルス量や母児接点局所における IL-16 の作用など今後の検討が必要である。母体側組織である脱着膜に多く存在する CD56 陽性 LGL も構成的に IL-16 を産生しており、局所における HIV 感染防御に作用している可能性がある。

## II シジュウムの抗 HIV 作用

### CD4 依存性感染に及ぼすシジュウムの作用

CD4 陽性 T リンパ球ではウイルス量はシジュウム添加により 100 ng/ml 以上の濃度で濃度依存的に減少した。

### CD4 非依存性感染に及ぼすシジュウムの作用

CD4 陽性 T リンパ球ではウイルス量はシジュウム添加により 100 ng/ml 以上の濃度で濃度依存的に減少した。

### HIV 感染患者由来リンパ球における HIV 産生に及ぼすシジュウムの作用

HIV 感染者 CD4 陽性 T リンパ球ではウイルス量はシジュウム添加により 1000 ng/ml 以上の濃度で減少した。

### HIV 感染患者由来リンパ球のアポトーシスに対するシジュウムの作用

HIV 感染者 CD4 陽性 T リンパ球のアポトーシスはシジュウム添加により 100 ng/ml 以上の濃度で抑制された。

## D 結論

### I HIV 母児感染の解析について

- 1 HIV 感染妊婦胎盤に特異的な所見はないが HIVp24 が染色される症例がある。
- 2 抗原性によって分離した絨毛細胞、Hofbauer 細胞に HIVmRNA が存在する。
- 3 HIV は CD4 非依存的に絨毛癌細胞に感染するがケモカインレセプターは関与する。
- 4 絨毛細胞と脱着膜リンパ球の間にケモカインを介した情報伝達が行われている。
- 5 胎児に感染する HIV は母体に感染した HIV のごく一部である。
- 6 健常新生児臍帯血には健常成人の約 10 倍濃度の IL-16 が存在する。

- 7 新生児臍帯血リンパ球は構成的に IL-16mRNA を発現する。
- 8 IL-16 は臍帯血 CD4 リンパ球に対する HIV 感染を濃度依存性に抑制する。
- 9 脱落膜リンパ球は IL-16 を産生しており局所における HIV 感染防御に作用している可能性がある。

## II シジュウムの抗 HIV 作用について

- 1 シジュウム粗抽出物は 100 ng/ml 以上の濃度で CD4 陽性 T リンパ球における HIV HIVp24 産生を濃度依存性に抑制した。
- 2 シジュウム粗抽出物は 1000 ng/ml 以上の濃度で絨毛癌における HIVp24 産生を濃度依存性に抑制した。
- 3 シジュウム粗抽出物は 1000 ng/ml 以上の濃度で HIV 感染患者 CD4 リンパ球における HIV 産生を抑制した。
- 4 シジュウム粗抽出物は 1000 ng/ml 以上の濃度で HIV 感染患者 CD4 リンパ球におけるアポトーシスを抑制した。

## マクロファージのサイトカイン産生に対するシジュウムの効果

分担研究者 石川里枝 斉藤貢一

埼玉県衛生研究所

研究要旨 これまでの研究で、シジュウム 80%アセトン抽出エキスは IFN- $\gamma$  及び LPS 刺激マクロファージからの NO 産生を抑制し、casuarinin 等の加水分解型タンニンが活性成分の一つであることが明らかとなった。そこで、本年度はエキス及び新たに単離された化合物も含めて一酸化窒素 (NO), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  及び IL-12 産生に対する影響を検討した。NO 産生については新たに 10 種の化合物に抑制作用が認められ、2 種の化合物が産生増強作用を示した。TNF- $\alpha$  産生については、エキスは増強作用を示したが、これは 3 種のタンニンの活性によるものと考えられた。IL-1 $\beta$ , IL-12 の産生に対しては、エキスは有意な作用を示さなかったが、単離された化合物に顕著な増強あるいは抑制作用を示す成分が確認できた。

### A 研究目的

これまでの研究で、シジュウム 80%アセトン抽出エキスは IFN- $\gamma$  及び LPS 刺激マクロファージからの NO 産生を抑制することが明らかとなっている。そして、その作用機序は iNOS 誘導抑制と iNOS 酵素活性阻害作用の 2 つのメカニズムによるものであることや casuarinin 等の加水分解型タンニンが活性成分の一つであることが明らかとなった。本年度は新たに単離された 12 種の化合物の NO 産生に対する作用を検討するとともに、炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$  及び TNF- $\alpha$ ) や Th1/Th2 分化に関与すると報告されている IL-12 の産生に対する影響について検討した。

### B 研究方法

#### (1) 細胞培養法と細胞毒性評価

マクロファージはマウスマクロファージ株化細胞 (RAW264.7 細胞) を用い、Ham's F12

培地 (含 10%ウシ胎児血清) で 5%CO<sub>2</sub> 下、37°C で継代培養した。シジュウム 80%アセトン抽出エキス及びエキスより得られた化合物 16 種 (図 1) は dimethyl sulfoxide (DMSO) で細胞培養液中 1, 3, 10, 30, 100  $\mu$ g/ml または  $\mu$ M となるように調製した (DMSO 濃度 0.4%)。細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/ml に調製し、96 穴プレートに 200  $\mu$ l 加え、5%CO<sub>2</sub>, 37°C で 2 時間培養した。各濃度の sample を加え、さらに 24 時間培養した。培養終了後、鏡検による観察と MTT assay により細胞毒性を確認した。すなわち、MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 水溶液を 10  $\mu$ l/well 添加、混和し、4 時間培養した。上清を除き、DMSO を 150  $\mu$ l 加え、反応を停止した。マイクロプレートリーダーで 550 nm (ref 630 nm) の吸光度を測定した。

#### (2) NO 産生に対する作用

細胞を  $8.0 \times 10^5$  cells/ml に調製し、96 穴プレートに  $200 \mu\text{l}$  ずつ加え、2 時間培養した NO 産生増強作用を検討するために、各濃度の sample を添加し、16 時間培養した また、NO 産生抑制作用を検討するために sample と同時に IFN- $\gamma$  (10 U/ml) 及び lipopolysaccharide (LPS, *Escherichia coli*, O55 B5, 100ng/ml) を加え、16 時間培養した 培養後、上清を  $100 \mu\text{l}$  採取し、Gress 法により、NO の酸化体である  $\text{NO}_2$  量を定量した

(3) NO 合成酵素 (iNOS) の誘導に対する作用

細胞を  $1.2 \times 10^6$  cells/ml に調製し、35mm $\phi$  のペトリティッシュに 1ml 加え、2 時間培養した sample, IFN- $\gamma$  (10U/ml) 及び LPS (100 ng/ml) を加え、8 時間培養した 培養後、細胞をセルスクレイパーで掻き採り、PBS ( $\text{Mg}^{2+}$ (-),  $\text{Ca}^{2+}$ (-)) で 2 回洗浄した Lysis Buffer  $40 \mu\text{l}$  を加え、30 分後、 $4^\circ\text{C}$ , 10,000 rpm で 1min 遠心分離し、上清を採取した このタンパク抽出液のタンパク濃度を Bradford 試薬により測定し、タンパク  $100 \mu\text{g}$  分を SDS-PAGE に供した すなわち、タンパク抽出液を SDS サンプルバッファーで処理し、5-20% グラジエントゲルに負荷し、20mA/ゲルで泳動したゲル上のタンパクを PVDF メンブランに転写し、モノクローナル抗マウスマクロファージ iNOS 抗体、ラビット抗マウス IgG 抗体、 $^{125}\text{I}$  ラベルしたプロテイン A と反応させたメンブランと X 線フィルムを 56 時間密着させ、X 線フィルムの露光により、130 kDa の iNOS 由来のバンドを検出した 定量はそれぞれのバンドに対応する箇所のメンブランを切り取り、放射活性を  $\gamma$  カウンターで測定した

(4) TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  産生に対する作用

細胞を  $8.0 \times 10^5$  cells/ml に調製し、48 穴プレートに  $250 \mu\text{l}$  ずつ添加し、2 時間培養した 産生増強作用の検討に、sample のみを添加した また、LPS 刺激マクロファージからの産生に対する作用を検討するために、sample と同時に LPS (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を培養液に添加した それぞれ 18 時間培養後、培養上清を採取した 上清中の TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  を Enzyme Linmed-Immuno-Sorbent Assay (ELISA) で定量した なお、IL-1 $\beta$  についてはさらに培養上清を除去し、滅菌蒸留水を  $250 \mu\text{l}$  添加、凍結融解を 3 回繰り返すことにより細胞を破碎した この液を遠心分離し、上清  $200 \mu\text{l}$  を採取、同量の培地を加えた この細胞凍結融解液中の precursor-IL-1 $\beta$  (p-IL-1 $\beta$ ) を同様に ELISA で定量した。

(5) IL-12 (p40) 産生に対する作用

細胞を  $8.0 \times 10^5$  cells/ml 調整し、48 穴プレートに  $250 \mu\text{l}$  ずつ添加し、2 時間培養した IFN- $\gamma$  (100 U/ml) を添加し、8 時間培養後、sample を添加し、16 時間培養した 培養後上清を採取し、ELISA で IL-12 (p40) を定量した

## C 研究結果

(1) 細胞毒性について

検討したシジュウムエキス及びエキスから得られた 16 種の化合物の RAW2647 細胞に対する障害性は、エキスでは  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  で、**13-15** の加水分解型タンニンは  $100 \mu\text{M}$  で、**11** は  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  で、**12** は  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  で細胞毒性が観察された その他の化合物は  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  濃度でも毒性は認められなかった そこて以下の NO 産生及び TNF- $\alpha$  等のサイトカイン産生に対する作用の検討にはすべて毒性の発現しない濃度で行った



## (2) NO 産生に対する作用について

これまでに、シジュウム抽出エキスが IFN- $\gamma$  及び LPS で刺激したマクロファージの NO 産生を抑制し、**13-15** の加水分解型タンニンに活性があることを明らかとしている。そこで、新たに単離された 12 種の化合物 (**1-12**) の NO 産生に対する作用を検討した。NO 産生作用はすべての化合物で認められなかった。しかし、IFN- $\gamma$  及び LPS で活性化したマクロファージの NO 産生に対しては **1, 2** が増強作用を示し、化合物 **3-12** が抑制作用を示した (図 2)

## (3) iNOS 誘導に対する作用

IFN- $\gamma$  及び LPS 刺激による NO 産生に対し、増強作用の認められた **1, 2** 及び抑制作用の認められた **3-5** の化合物の iNOS 酵素誘導に対する作用を検討した。図 3 に各化合物 100  $\mu$ g/ml での増強・抑制効果を示した。IFN- $\gamma$  及び LPS 刺激コントロール細胞中の iNOS タンパク量を 100 とした場合の相対量で示した。NO 産生増強作用の認められた **1** (107.9%) 及び **2** (110.8%) はコントロールと比較し、iNOS タンパク量の増加がそれぞれ 100.3%, 106.2% 認められた。また、NO 産生抑制作用の認められた **3, 5** の化合物については同様の傾向で iNOS タンパク量も減少していた。

## (4) TNF- $\alpha$ 産生に対する作用

シジュウムエキス、化合物 **1-5, 13-16** の TNF- $\alpha$  産生に対する作用を検討した。無刺激コントロール (TNF- $\alpha$  産生 9.3 pg/ml) に対しシジュウム抽出エキス (30  $\mu$ g/ml), **13** (30  $\mu$ M), **14** (30  $\mu$ M), **15** (30  $\mu$ M), は 26.7, 135.9, 265.3, 178.9 pg/ml と単独で TNF- $\alpha$  産生増強作用を示した。また、LPS で刺激した場合の TNF- $\alpha$  産生に対しては、同様

にエキス及び **13-15** の加水分解型タンニンが増強作用を示した (図 4)。特に、**14** は顕著な増強作用を示した。その他の化合物 **1-5** については有意な増強あるいは抑制作用は認められなかった。

## (5) IL-1 $\beta$ 産生に対する作用

シジュウムエキス及び化合物 **1-5, 13-16** の IL-1 $\beta$  産生能に対する作用を検討した。LPS で 18 時間刺激したマクロファージの培養上清中には IL-1 $\beta$  は ELISA の検出限界 (7.8 pg/ml) 以下であった。そこで細胞中の p-IL-1 $\beta$  について検討した。エキス及び化合物はいずれも単独で p-IL-1 $\beta$  を誘導する作用を示さなかった。LPS で刺激したマクロファージの p-IL-1 $\beta$  産生に対してもエキスは顕著な抑制あるいは増強作用を示さなかった。一方、化合物については **3, 4, 5, 16** が抑制作用を、**13-15** が増強作用を示した (図 5)。

## (6) IL-12 (p40) 産生作用

シジュウムエキス及び **1-5, 13, 16** の化合物 IL-12 (p40) の産生に対する作用を検討した。まず、IFN- $\gamma$  での前培養の有無、前培養時間と IL-12 (p40) の産生量について検討した。IFN- $\gamma$  (100 U/ml) で 0-16 時間あらかじめ前培養した後、LPS で 16 時間刺激した場合、あるいは、LPS 単独で 16 時間刺激した場合の上清中の IL-12 (p40) を定量した。その結果、図 6 に示すように LPS 単独の刺激では ELISA の検出限界とする濃度 (7.8 pg/ml) 以下であった。また、IFN- $\gamma$  の前培養時間については 8 時間培養した時が最も IL-12 産生能が高かった。そこで、IFN- $\gamma$  (100 U/ml) で 8 時間培養後、sample を添加、16 時間培養することとした。エキスは有意な作用を示さなかったが、化合物 **1-5** に産生増強作用が認められた。特に **1, 5** はコ

ントロールのそれぞれ 52 倍, 35 倍の産生量を示した。また, 13, 16 は抑制作用を示した (図7)

#### D 考察

##### (1) NO 産生に対する作用

新たに検討した 12 種 (1-12) の化合物のうち 1, 2 が産生増強作用を, 3-12 が抑制作用を示した。特に 5, 6, 7 が強い抑制作用を示した ( $IC_{50}$  値: 143.6, 163.8, 165.8  $\mu$ M)。5, 6, 7 のアグリコンである 12 (quercetin) はすでに NO 産生抑制作用が報告されているが, 本研究においても 10  $\mu$ M 濃度で 40.4% の抑制効果が認められた。3-5 は NO 産生抑制効果と同様の傾向で細胞中の iNOS タンパク量も減少させた。また, 1, 2 は NO 産生増強作用を示したが, 細胞中の iNOS タンパク量も同様に増加しており, iNOS 酵素誘導に対し, 促進的に作用しているものと考えられる。これまでの研究で, シジュウム抽出エキスはマクロファージの NO 産生抑制することが明らかとなっているが, その構成成分を検討すると, 促進的あるいは抑制的に働く両方の成分が存在していることがわかった。

##### (2) TNF- $\alpha$ 及び IL-1 $\beta$ に対する作用

TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  は炎症性サイトカインとして, 炎症性疾患の病巣等で過剰産生され, 症状の増悪に関与していると報告されている。しかし, 一方で, 外来の異物 (病原微生物, ウィルス等) から生体を守る防御反応や腫瘍細胞に対する障害性等, 生体にとって有益な面もあり, そのバランスが重要である。3-5 は NO 産生抑制効果と同様に p-IL-1 $\beta$  産生に対しても抑制作用を示した。一方, 13-15 のタンニンは無刺激あるいは LPS 刺激マクロファージの TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  産生を著し

く増強させた。13-15 は LPS 刺激マクロファージの NO 産生を抑制することから, 同じ活性化のシグナルに対して相反する作用を示す結果であった。このことは, これら化合物は LPS による活性化のシグナル伝達, mRNA への転写に対し, 促進的に作用するものの, iNOS 酵素誘導に対しては post-transcriptional level で抑制的に作用しているものと考えられた。

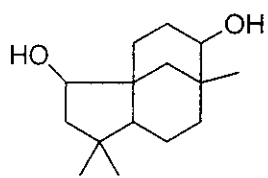
##### (3) IL-12(p40) に対する作用

T細胞クローンのタイプは2つに分類され, Th1 型ヘルパー細胞は IL-2, IFN- $\gamma$  を産生し, Th2 型ヘルパー細胞はアトピーの病態に重要な IL-4, IL-5 を分泌するとされている。IL-12 はマクロファージから分泌され, ナイーブ T 細胞の Th1 細胞への分化を促すサイトカインである。シジュウムはアトピー性皮膚炎をはじめとする各種アレルギー疾患に効果を示すことから, IL-12 (p40) 産生に対する影響を検討した。シジュウムエキスは IL-12 産生に対し, 顕著な作用を示さなかったが, エキスから得られた 1-5 が IL-12 (p40) 産生増強作用を示した。このことは, これら化合物によって Th1/Th2 バランスが Th1 側に誘導される可能性を示すものである。

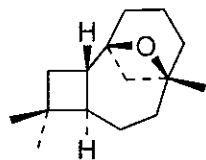
#### D 結論

- ・ IFN- $\gamma$  及び LPS 刺激マクロファージの NO 産生に対して 10 種の化合物が抑制作用を, 2 種の化合物が産生増強作用を示した
- ・ シジュウム抽出エキスは TNF- $\alpha$  産生に対しては促進的に, IL-1 $\beta$  及び IL-12 に対しては顕著な影響を示さなかった
- ・ 単離された化合物について化合物 13-15 は TNF- $\alpha$  及び IL-1 $\beta$  産生に対し促進的に, 化合物 3-5 は IL-1 $\beta$  産生に対し抑制的に, 化合

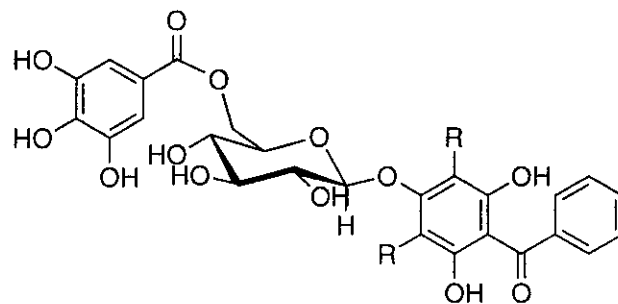
物 1-5 は IL-12 産生に対し促進的に作用した



1

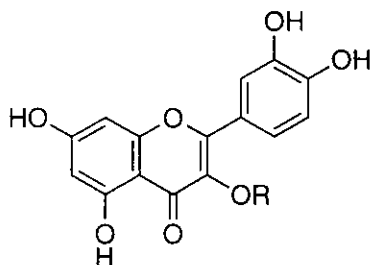


2



3 R=H

4 R=CH<sub>3</sub>



5 R=6-galloyl-β-arabinofuranosyl

6 R=β-arabinofuranosyl

7 R=β-arabinopyranosyl

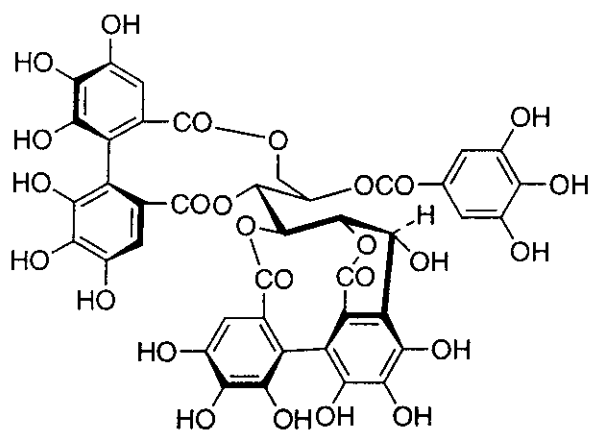
8 R=β-xylopyranosyl

9 R=β-galactopyranosyl

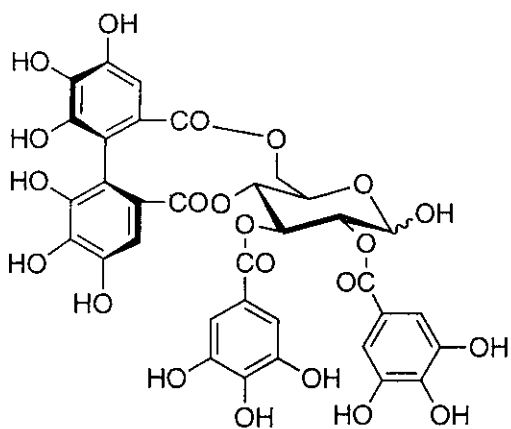
10 R=β-glucopyranosyl

11 R=α-rhamnopyranosyl

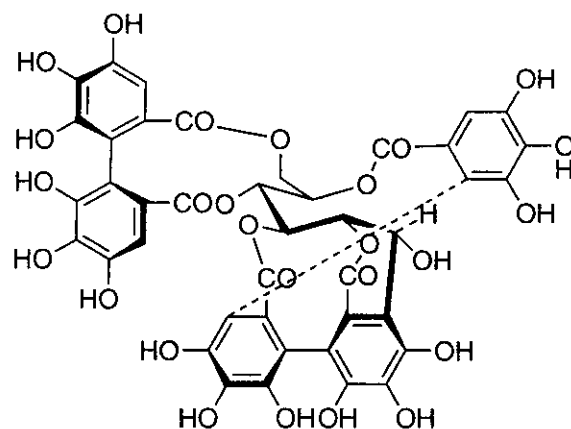
12 R=H



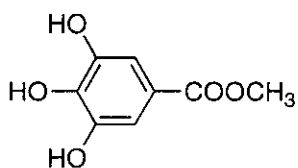
13



14



15



16

図1 検討した化合物の構造式

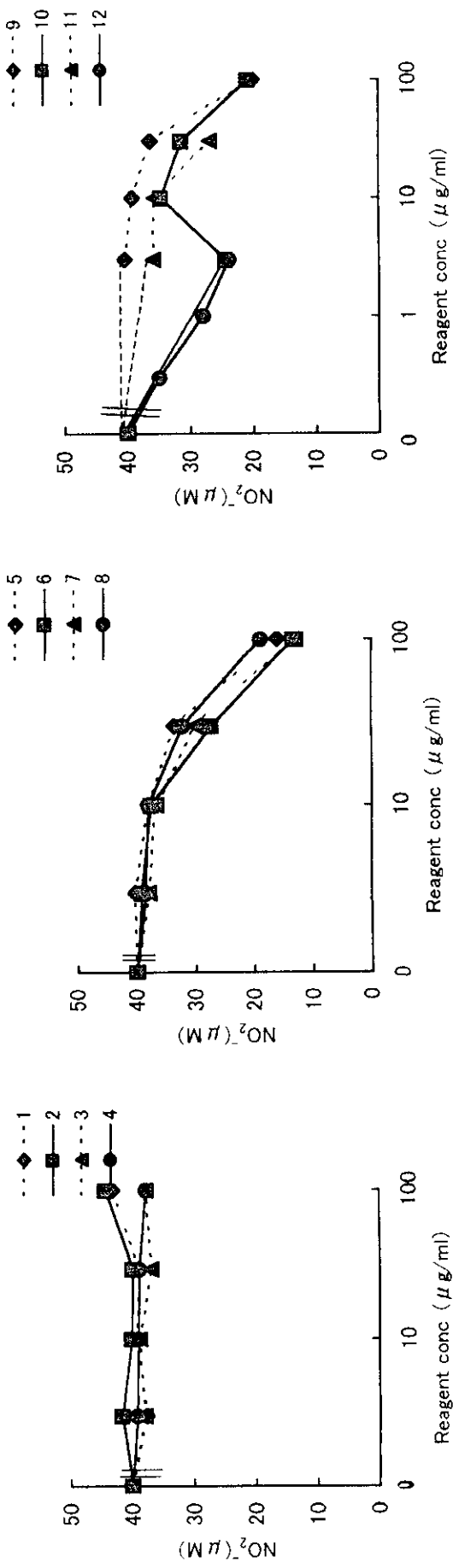


図2 シジュームから単離された化合物のNO産生抑制作用

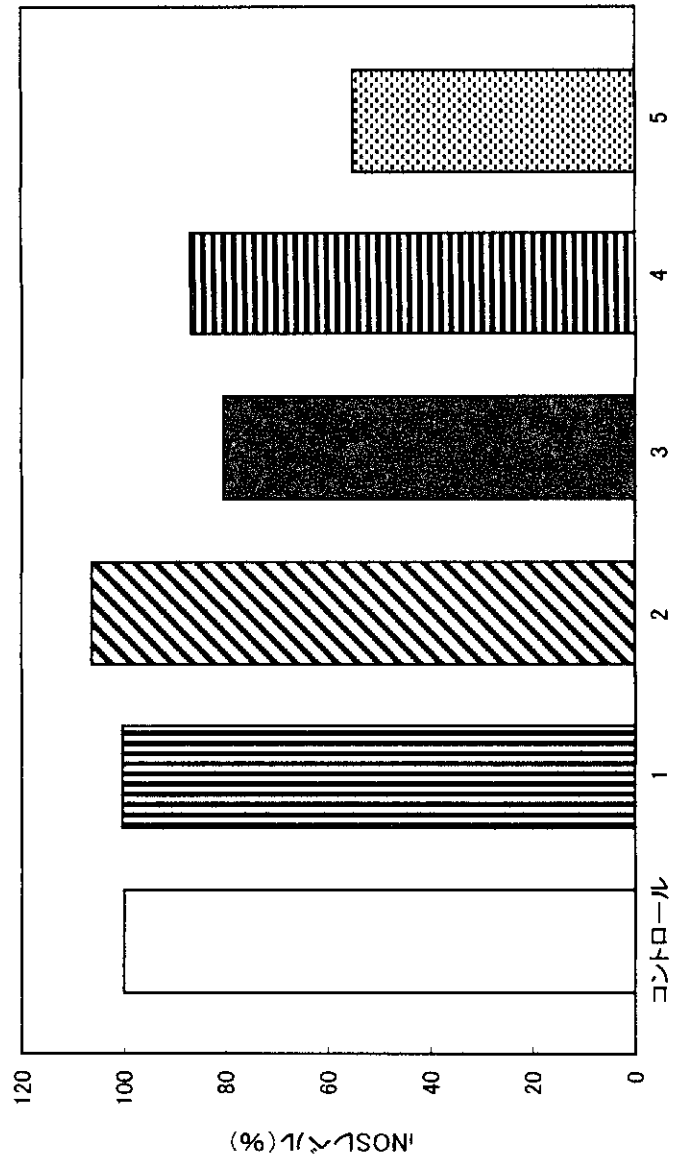


図3 シジューム抽出エキスから単離された成分のiNOS誘導抑制効果

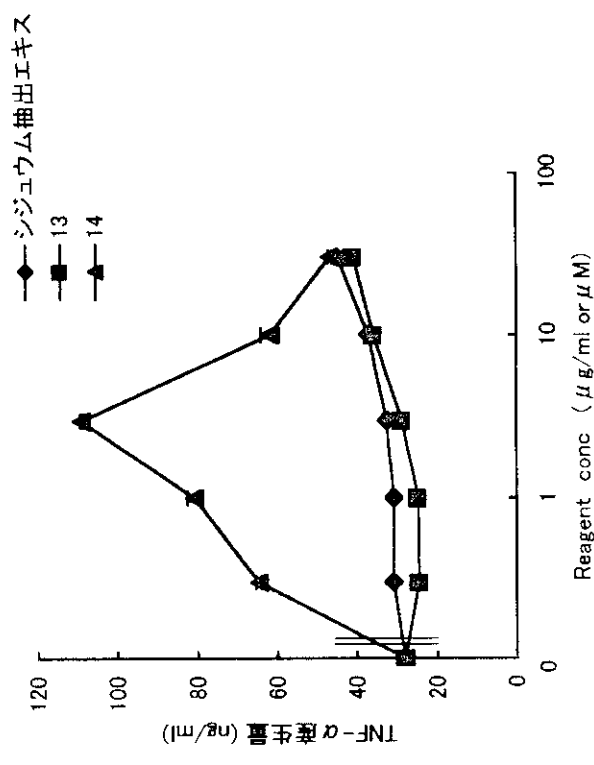
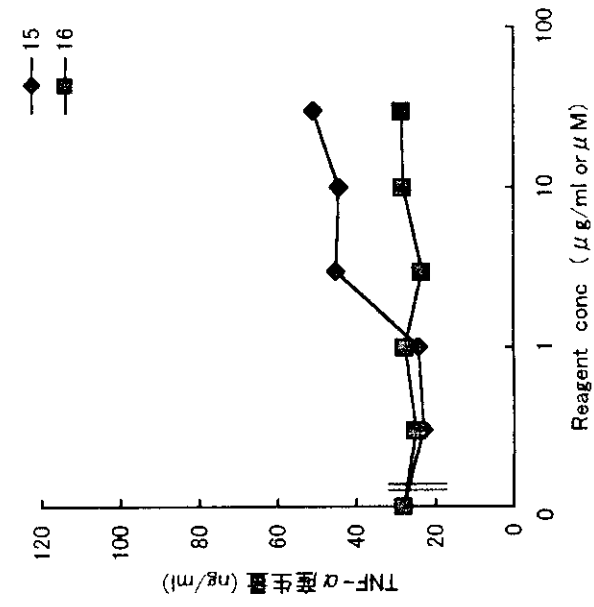


図4 シジウム及び単離成分のTNF-α産生に対する作用

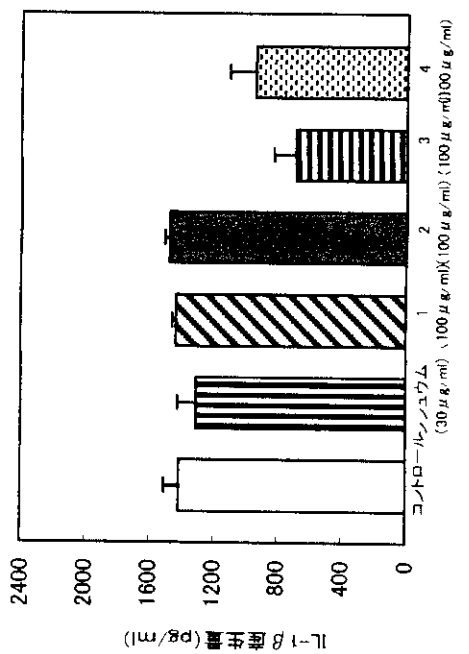
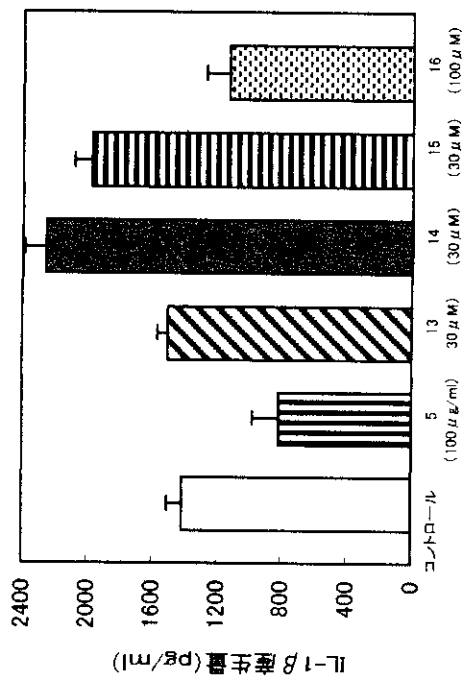


図5 シジウム及び単離された成分のIL-1β産生に対する作用



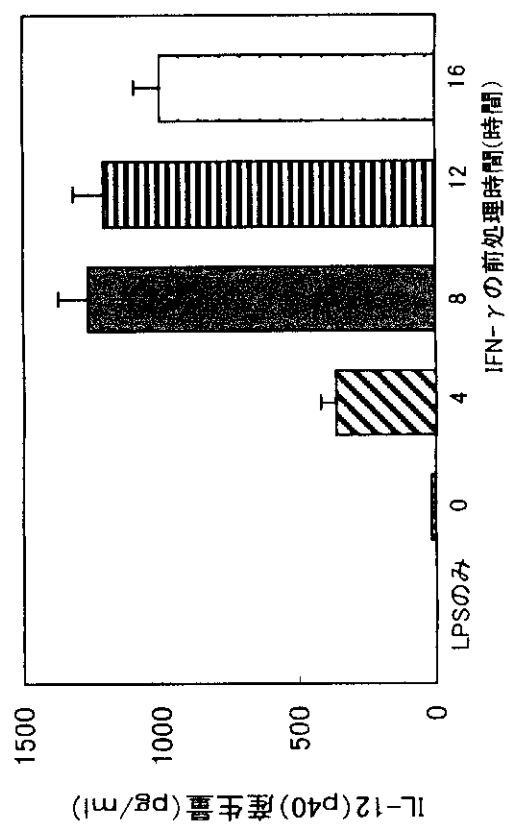


図6 IFN- $\gamma$ の前処理時間とIL-12(p12)産生量の変化

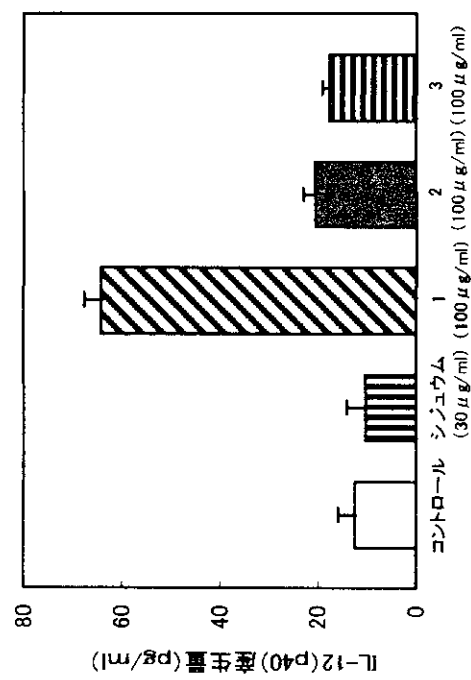
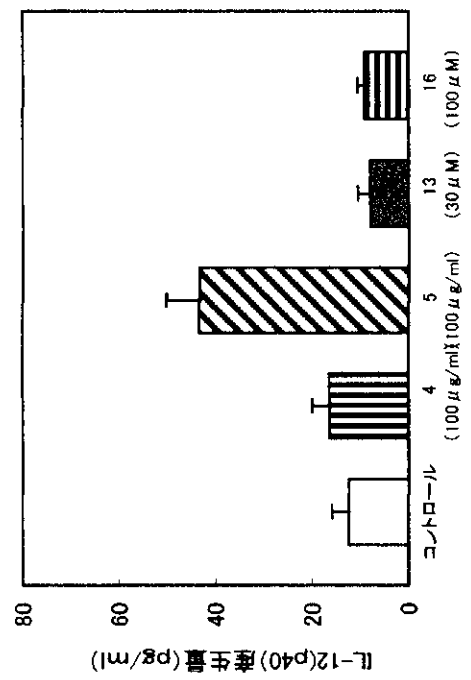


図7 シジューム及び単離された成分のIL-12(p40)産生に対する作用

## [III] 総合研究報告

(平成9年度～平成11年度)

## 小児アトピー性皮膚炎に対するシジュウムの臨床的効果

分担研究者 鈴木五男 東邦大学第二小児科学教室

研究要約 天然薬物シジュウムにより生成された茶剤および入浴剤（1年度）および塗布剤（2、3年度）を用い、アトピー性皮膚炎児を対象にその有効性を臨床的（睡眠、かゆみ、日常生活、薬剤使用の程度および皮膚所見など）、血液学的に検討した。茶剤および入浴剤は対象児40名に2週間の観察期間においてシジュウムの茶剤を1日回2-3回飲用し、同時に入浴剤は1日1回使用し、使用期間を2-3か月間としてその臨床的検討を実施した。また同時に炎症の指標の評価に血清 ECP 値を測定した。

塗布剤の長期使用（3か月間）による臨床的検討において、皮膚症状および炎症の指標として血清 ECP(Eosino cationic protein) 値、さらにかゆみの指標として、科学伝達物質である尿中 N-メチルヒスタミン (NMH) を測定し、評価した。さらにその裏付けとして塗布剤の二重盲検法を用い、その臨床効果と皮膚炎症所見の改善、さらに炎症の指標として、血清 ECP 値、血清 NO 値、血清 RANTES、血清 Eotaxin 値、さらに IL-8 を測定し、評価した。結果では、茶剤および入浴剤の臨床効果は、特にかゆみに対して、治療早期に効果を示し、持続性が確認された。また炎症の指標である血清 ECP 値は臨床像に一致して低下していた。塗布剤の長期使用（3か月間）の臨床効果は、皮膚症状は2週ほどで症状の改善を認め、尿中 NMH は有意に低下し、ほぼ同時に血清 ECP 値も有意の低下をみた。2年度の評価の裏付けとしての塗布剤の二重盲検法では臨床効果はシジュウム製剤において有意に改善し、またその指標として測定した血清 ECP 値、血清 NO 値、血清 RANTES、血清 Eotaxin 値は臨床像に一致し有意の低下をみた。

以上よりシジュウムによって生成された茶剤および入浴剤および塗布剤はアトピー性皮膚炎に対し、臨床的に有効であり、特にアトピー性皮膚炎にとって最も問題となるかゆみ対策に効果があることが明らかになった。また一般に臨床に用いるステロイド薬剤などの使用の減少にもつながることが確認された。さらにかゆみや炎症を指標とした検査値の変動が臨床像に一致を認めたことは、アトピー性皮膚炎が炎症性病態を示唆している可能性を示しており、一方シジュウムの臨床効果が皮膚での炎症性反応をある程度抑制しているであろうことが示唆された。

今後の課題として他のアレルギー疾患への応用、特にスギ花粉症、じんま疹、気管支喘息、さらには老人性皮膚そう痒症などへの臨床的応用への検討が必要であろう。