

## A. 研究目的

近年、小児においてアトピー性皮膚炎は増加の傾向にある。アトピー性皮膚炎の主要症状は慢性の湿疹に強いかゆみを伴った疾患であり、乳児幼児期では粥味のため睡眠障害や情緒障害などをきたすことがある。また学童期においては集中力の低下による学力の低下、湿疹による『きたない』『うつる』といったことでいじめ、不登校を認めることがある。シジュウム（葉部）は南米原産のフトモモ科の植物であり、種々なアレルギー疾患に茶剤および入浴剤として用いられている。このシジュウムエキスは、動物実験でアレルギー症状を起こす化学伝達物質といわれるヒスタミンやロイコトリエン類を抑制することが認められている。そこで本研究では茶剤および入浴剤、さらに塗布剤を用いて、主に小児のアトピー性皮膚炎を対象に臨床的な有効性および血液学的検討を実施した。

## 茶剤および入浴剤に関する研究

### B. 方法

対象は東邦大学大橋病院および関連病院に受診のアトピー性皮膚炎児40名（男児24名、女児16名）に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を用いて、その有効性を検討した。方法は2週間の観察期間をおいて茶剤を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か月間として実施した。

評価は症状の最も基本となる「かゆみ」に対しては母親に「かゆみ」スコアを観察前、使用2週間、1か月、2か月、3か月の各時点においてスケール評価させた。

つぎに皮膚症状を頭部、顔および頸項部、胸部、背部、腹部、腰部、上肢、下肢の各部位において正常 0点、乾燥のみ 1点、

発赤・丘疹 2点、苔癬化：3点、として、上記の期間で点数化した。さらに検査は血算、好酸球数、IgEは使用前、試験終了時、また血中ECP(eosinophil cationic proteom)値、尿中メチルヒスタミン(NMH)、尿中クレアチニンを使用前、使用後1か月、2か月、3か月に測定した。なお試験期間中の抗ヒスタミン剤、および抗ヒスタミン剤作用をもつ抗アレルギー剤の服用は禁とした。また塗布剤の内容および濃度は観察期間と同様もしくはそれ以下とした。ECPの測定方法は Peterson の方法でファルマシア ECP リアにて測定した。また NMH の測定はファルマシア製キットを用い、競合法による二抗体イムノアッセイ法にて測定した。最後に各受診時に使用状況などについてアンケートにより調査した。

### C. 結果

対象者の平均年齢は  $5.8 \pm 4.1$  歳、家族歴にアレルギーのあるものは40例中27例(67.5%)であった。乳児期栄養法は母乳栄養16例、混合栄養10例、人工栄養14例であった。アトピー性皮膚炎以外のアレルギー疾患の合併状況は気管支喘息が16例、アレルギー性鼻炎14例であった。白血球数は使用前  $7,200 \pm 2,800$ 、試験終了時  $8,100 \pm 2,100$ 、好酸球数は使用前  $7.3 \pm 1.9\%$ 、試験終了時  $6.7 \pm 1.5\%$ 、また IgE は使用前  $540.2 \pm 386.6$  IU/ml、試験終了時  $497.3 \pm 401.5$  IU/ml であった。

「かゆみ」スコアの平均±標準偏差は観察前で  $7.1 \pm 3.6$ 、使用2週間後  $4.2 \pm 3.9$ 、1か月後  $4.2 \pm 3.9$ 、2か月後  $3.7 \pm 3.6$ 、3か月後  $3.9 \pm 2.8$  と使用2週間で痒みが有意 ( $p < 0.05$ ) に認められた。

皮膚症状は使用前の平均点数は観察前で  $5.2 \pm 3.4$ 、使用2週間後  $4.4 \pm 3.7$ 、1か月後  $4.2 \pm 3.7$ 、2か月後  $3.7 \pm 3.1$ 、3か月

後  $35 \pm 3.8$  と月毎に改善傾向にあった。「かゆみ」スコアに比較するとかゆみの改善に遅れて症状が遅れて改善する傾向が認められた。また所見別では乾燥のみおよび発赤・丘疹・湿潤の部位での最も改善が良かった。血清 ECP 値は使用前  $62.7 \pm 23.7 \mu\text{g/l}$  使用後 1 か月  $28.7 \pm 24.7 \mu\text{g/l}$ 、2 か月後  $32.1 \pm 27.2 \mu\text{g/l}$ 、3 か月後  $26.2 \pm 16.7 \mu\text{g/l}$  使用前  $62.7 \pm 23.7 \mu\text{g/l}$  使用後 1 か月  $28.7 \pm 24.7 \mu\text{g/l}$ 、2 か月後  $32.1 \pm 27.2 \mu\text{g/l}$  低下していたが正常基準といわれる  $10\text{--}15 \mu\text{g/l}$  以下を呈したのは 8 例 (20%) であった。

尿メチルヒスタミンは尿の希釈の程度の影響を受けることから同一検体の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。使用前  $284.7 \pm 120.6 \mu\text{g/gCr}$ 、使用後 1 か月  $238.7 \pm 124.7 \mu\text{g/gCr}$ 、2 か月後  $162.1 \pm 147.2 \mu\text{g/gCr}$ 、3 か月後  $166.2 \pm 116.7 \mu\text{g/gCr}$  と有意差は認められなかったが、使用後 NMH 値の減少傾向があった。アンケートの結果では、入浴剤で 1 例入浴後に発赤が認められた。一時的なものであった。また茶剤は幼児期の子供では嫌がるものが一部認められたが、冷やすことによって、飲水が可能であった。今後継続を希望するものは 40 例中 28 例 (70%) に認められた。

塗布剤のオープンチェレンジテストに関する研究

## B. 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剤を用いて臨床的有効性を検討した。

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  $6.9 \pm 4.6$  歳、平均罹患年数は  $4.5 \pm 5.0$  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。観察およびかゆみに関するスコアは研究 - 1 に準じた。また尿中の N-メチルヒスタミン (NMH)、血中 ECP (Eosinophil Cationic Protein) 値の測定も研究 - 1 に準じ、さら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  $8400 \pm 2650$ 、好酸球数は  $8.7 \pm 3.9\%$ 、血清総 IgE 値は  $430 \pm 293 \text{IU/ML}$  であった。特異的 IgE 抗体が 2 + 以上の陽性を示したのは、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  $7.7 \pm 4.1$ 、使用 2 週後  $4.7 \pm 3.9$ 、1 か月後  $3.0 \pm 3.1$ 、2 か月後  $2.7 \pm 2.4$ 、3 か月後  $2.5 \pm 1.9$  と 2 週より有意 ( $P < 0.05$ ) にかゆみが軽減されていた。

また皮膚症状は観察前が  $6.0 \pm 3.8$ 、使用 2 週後  $5.4 \pm 3.9$ 、1 か月後  $3.7 \pm 3.1$ 、2 か月後  $3.7 \pm 2.2$ 、3 か月後  $3.1 \pm 2.2$  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  $77.9 \pm 46.1 \mu\text{g/l}$ 、塗布 1 か月  $61.7 \pm 42.6 \mu\text{g/l}$ 、2 か月  $42.2 \pm 30.2 \mu\text{g/l}$ 、終了時  $28.9 \pm 21.8 \mu\text{g/l}$  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、ECP 値の正常値といわれる  $10\text{--}15 \mu\text{g/l}$  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  $246.9 \pm 146.1 \mu\text{g/g Cr}$ 、塗布 1 か月  $211.7 \pm 122.6 \mu\text{g/g Cr}$ 、2 か月  $176.2 \pm 100.2 \mu\text{g/g Cr}$ 、終了時  $148.9 \pm 84.8 \mu\text{g/g Cr}$  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られた 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。

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が、ともに有意な変化は認めなかった。

## 塗布剤による二重盲検法に関する研究

### A. 目的

これまで我々はシシウムにより生成された茶剤、入浴剤、塗布剤を用い、その有効性を報告 (平成 9、10 年度報告書) してきた。そこでさらに科学的有効性の確証を得るため、シシウムエキスが入っていない塗布剤を作成し、二重盲検法でその有効性を臨床的および血液学的に検討した。なお本研究で用いたシシウム塗布剤の含

有成分はシシウムエキス、ヒオセラミト、セピゲル 305、パラオキシ安息香酸エステル、クリチルリチン酸ジカリウム、ホホハ油、精製水である。

### B. 方法

対象は東邦大学大橋病院およびその関連病院に受診中のアトピー性皮膚炎の小児 33 名、(男 21 名、女 12 名) また年齢は 7 か月から 14 歳である。方法はそれぞれ 2 週間の観察期間をおき、シシウムエキスが入っている塗布剤 (A 剤) と入っていない塗布剤 (B 剤) 1 か月毎交互に用い、はじめに A 剤を用いた群を 1 群、また B 剤を用いた群を 2 群とした。2 週毎に皮膚症状、痒みの改善度、日常生活および睡眠の障害の改善度合い、さらに併用薬剤の変動について比較検討しました。

皮膚症状およびかゆみに関する評価はこれまでと同様に評価した。さらにアトピー性皮膚炎日記を記入させ、睡眠障害、日常生活障害のそれぞれには睡眠、および日常生活はほとんど出来なかった 2 点、余り出来なかった 1 点、普通 0 点として点数の推移を 2 週ごとに評価した。

併用薬剤の治療点数をステロイド剤 (Strong 3, Mild 2, Weak 1)、非ステロイド剤 0.5、保湿剤 0.5 とし、その使用状況の頻度を日誌より点数化し、推移を評価した。

血液学的検討はシシウム投与前と投与 4 週目に採血し、血清 ECP 値 (Eosinophil Cationic Protein)、血清 NO 値、血清 RANTES、Eotaxin、および IL-8 (Interleukin-8) のそれぞれについて測定した。各検査の測定は血清 ECP 値 (Eosinophil Cationic Protein) は Phamacia 社製の測定キットを用い、また血清 NO 産物は NO の血中溶解物として  $\text{NO}_2^-$  と  $\text{NO}_3^-$  濃度を酵素反応比色法にて測定 (R&D system Inc Minneapolis のキット使用)、

血清 RANTES は Human RANTES 測定キットおよび血清 Eotaxin は Human Eotaxin 測定キット、および IL-8 は Human IL-8 測定キットをそれぞれ用いた ELISA 法で測定した。

なお本研究参加について患者および両親に投与方法、投与内容、さらに血液検査について説明し、承諾を得た。

## C. 結果

### 1. 皮膚所見について

湿潤・びらん、紅斑、苔癬化、乾燥度について皮膚所見は A 剤では湿潤・びらんは使用前で  $1.42 \pm 0.32$  から 4 週で  $0.81 \pm 0.44$ 、また乾燥は  $1.48 \pm 0.51$  から 4 週で  $0.83 \pm 0.34$  に有意に効果を認めたと、紅斑、苔癬化では有意な差はなかった。2 群では 2、4 週でそれぞれ点数の減少を認めたと、統計的有意差はなかった。一方 B 剤では両群ともやや効果のみとめるもの有効性を認めなかった。

### 2. 臨床症状について

痒みに対するシシウム剤の効果は 1 群では A 剤は  $1.74 \pm 0.51$  から 4 週で  $1.03 \pm 0.24$  と有意と B 剤の  $1.79 \pm 0.67$ 、 $1.42 \pm 0.57$  に比べ有意に改善していた。また 2 群においても A 剤は  $1.51 \pm 0.31$  から 4 週で  $1.09 \pm 0.27$ 、B 剤は  $1.63 \pm 0.41$ 、 $1.46 \pm 0.46$  と 1 群同様に A 剤と同様に効果をみた。またその効果も多くは 2 週から認められていた。

睡眠障害では 1 群の A 剤では  $0.92 \pm 0.21$  から 4 週で  $0.38 \pm 0.22$  と有意に改善され、B 剤では  $1.09 \pm 0.30$ 、 $0.68 \pm 0.35$  と有意な変動はなかった。また 2 群においても A 剤では  $0.80 \pm 0.26$ 、B 剤では  $0.83 \pm 0.23$  が、4 週では A 剤では  $0.36 \pm 0.17$ 、B 剤では  $0.43 \pm 0.21$  と同様に A 剤すなわちシシウム剤で有意な効果を認めた。

日常生活に対する障害は 1 群での A 剤では  $0.53 \pm 0.11$  から 4 週で  $0.08 \pm 0.02$ 、B 剤では  $0.54 \pm 0.17$  から 4 週で  $0.48 \pm 0.20$  と A 剤で有意に日常生活の改善を認めた。また 2 群においても A 剤が  $0.46 \pm 0.16$  から 4 週で  $0.07 \pm 0.03$  同様に効果を認めた。

### 3. 治療薬の変動

治療薬の使用状況を点数化では 1 群の A 剤使用群では使用前が  $8.0 \pm 2.8$  が 4 週後に  $4.8 \pm 2.5$ 、B 剤使用群ではそれぞれ  $7.5 \pm 3.1$ 、 $5.8 \pm 2.8$  に比べ有意に治療薬の使用の減少を認めた。また 2 群でも A 剤で  $7.2 \pm 2.8$  が 4 週後に  $4.5 \pm 2.2$ 、B 剤で  $7.3 \pm 2.4$  が 4 週後に  $5.7 \pm 2.0$ 、と A 剤での薬物量の減少を認めた。

### 4. 血液学的検討

本結果は採血の許可を得、評価可能な 28 例についての結果を示した。

血清 ECP 値は A 剤投与群の投与前の血清 ECP 値は  $83.6 \pm 41.9 \mu\text{g}$ 、投与後  $26.6 \pm 23.9 \mu\text{g}$ 、また B 剤投与群の投与前の血清 ECP 値では  $76.6 \pm 39.9 \mu\text{g}$ 、投与後  $42.9 \pm 30.9 \mu\text{g}$  と A 剤で有意の低下が認められた。血清 NO 値の検討では、A 剤投与群の投与前の血清 NO 値は  $45.6 \pm 19.9 \text{mM/ml}$ 、投与後  $19.6 \pm 8.7 \text{mM/ml}$ 、また B 剤投与群の投与前では  $39.9 \pm 16.8 \text{mM/ml}$  投与後  $26.8 \pm 9.1 \text{mM/ml}$  と A 剤で有意の低下が認められた。血清 RANTES 値は A 剤投与群の投与前では  $91.6 \pm 89.9 \text{ng/ml}$ 、投与後  $9.6 \pm 6.7 \text{ng/ml}$ 、また B 剤投与群ではそれぞれ  $101.2 \pm 80.1 \text{ng/ml}$ 、 $78.6 \pm 58.1 \text{ng/ml}$  とシシウム剤使用群で有意な低下をみた。血清 Eotaxin 値は、A 剤投与群の投与前では  $60.3 \pm 29.1 \text{pg/ml}$ 、投与後  $7.6 \pm 5.7 \text{pg/ml}$ 、また B 剤投与群ではそれぞれ  $53.2 \pm 34.8 \text{pg/ml}$ 、 $17.6 \pm 9.5 \text{pg/ml}$  とシシウム剤使用群で有意な低下をみた。CXC ケモカインである血中 IL-8 値は A 剤投与群の投与

前て  $52.6 \pm 41.9$  pg/ml、投与後  $16.6 \pm 9.9$  pg/ml、また B 剤投与群の投与前では  $48.9 \pm 36.8$  pg/ml 投与後  $18.6 \pm 8.3$  pg/ml とやや低下傾向を認めたが有意差はなかった。

#### D 総合考察

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かゆみ対策は未だ決め手となる治療がない。かゆみ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シウムにより生成された入浴剤、茶剤（研究 1）、塗布製剤（研究 2、3）を用い、小児を中心にアトピー性皮膚炎の症状に対して臨床的有効性検討した。

初年度のシシウムによって生成された茶剤および入浴剤を用いた研究では、アトピー性皮膚炎の主たる症状である「かゆみ」は 2 週ないし 1 か月で軽減が認められ、茶剤および入浴剤の連用により症状の軽減が持続が認められた。

また皮膚所見は「かゆみ」症状の軽減に比較し、やや遅くても月毎に症状が改善していく傾向が認められた。皮膚所見別では苔癬化している部位に比べ、乾燥のみおよび発赤・丘疹・湿潤の部位での改善が有意

に良かった。

2 年度はシシ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臨床的有効性検討した。その結果、シシウムの「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。またかゆみの改善とともに、皮膚症状も同様に次第に改善が認められていた。

3 年度はこれまでのシシウムの臨床的有効性を科学的評価する目的で二重盲検法による検討を行い、臨床所見および血液学的評価を行った。

その結果、シシウムの皮膚症状は湿潤びらんおよび乾燥所見では有意の効果を示し、紅斑、苔癬化でも有意な有効性を認めなかったものの改善傾向を示していた。

また痒み、日常生活や睡眠障害に対する検討では有意差を認め、特に痒みの効果は優れ、また使用 2 週後からその効果を認めていた。外用薬の使用頻度の検討ではシシウム使用例で有意の使用内容の改善がみられ、特に問題とされているステロイド剤の使用頻度の減少が認められた。

各年度の研究において臨床症状の検討に加え、各種炎症反応に対する血液学的検討を行った。ECP はアレルギー反応の炎症の場の好酸球から放出する好酸球貯蔵特異顆粒蛋白であり、その特徴は分子量 21,000 で強い寄生虫障害作用、組織障害作用を持つといわれ、現在アレルギーの炎症反応の評価に用いられているが、本研究でも各製剤の臨床効果に反映して有意に減少していた。ヒスタミンの代謝産物である尿中 NMH 値は塗布剤の使用前と終了時では有意に低下していた。

また二重盲検法による検討においてはアトピー性皮膚炎の局所で、主に単球および

上皮細胞の活性化により NO が産生され、炎症の指標といわれる NO 値の測定では、有意に症状の改善群で低下していた。またアレルギー性炎症として局所への好酸球の遊走・集積には RNATES あるいは Eotaxin などに代表される CC ケモカインが関与されるとされる。また感染性炎症場面での好中球の遊走・集積には IL-8 などに代表する CXC ケモカインによって調整されるといわれる。シジュウム の二重盲検法の検討では、血清 RNATES 値、Eotaxin 値とも症状の改善により有意に低下していた。このことはアトピー性皮膚炎が炎症性病変を強く示唆するとともに、症状の改善の評価に ECP のみならず RNATES 値、Eotaxin 値が有用と考えられた。

以上 3 年間のシジュウムによる各種製剤はアトピー性皮膚炎に対する効果が十分期待できるものであり、従来の治療の軽減に役に立つものと言えよう。

#### E. 結語

1. シジュウムによって生成された茶剤、入浴剤および塗布剤を用い、アトピー性皮膚炎に対する臨床的効果を検討した。
2. それぞれの製剤はアトピー性皮膚炎の主たる症状である「かゆみ」は早いものは 2 週ないし 1 か月で軽減し、製剤の連用により症状の軽減が持続が認められた。また皮膚所見別では乾燥および発赤・丘疹・湿潤の部位での改善が有意に良かった。
3. 臨床症状の改善とともに血清 ECP 値、血清 NO 値、血清 RANTES、Eotaxin は、投与前、投与後で症状の改善とともに有意に減少し、これらの検査がアトピー性

皮膚炎の改善の評価に有効といえる。一方ヒスタミンの変動は個々による変化が強く、有意差はなかったが、尿中 NMH 値はと塗布前と終了時では有意 ( $P < 0.05$ ) に低下していた。

4. シジュウムによって生成された茶剤および入浴剤、塗布剤はアトピー性皮膚炎に対し、臨床的に有効な効果手段と考えられ、特に塗布剤は痒み、睡眠障害、日常生活障害の改善にも有意であり、使用早期に効果を認めた。その結果ステロイドを含めた外用薬の使用頻度がシジュウム使用例で有意の減少することが判明した。
5. 以上の結果より、シジュウムがアトピー性皮膚炎の補助的効果として十分期待出来るものと思われ、さらに他のアレルギー疾患に対する有用性の検討が必要と言えよう。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

鈴木五男：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的効果。平成 10 年度厚生化学研究事業報告書『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』（総括研究代表者 北中 進) 2-5, 1999.

##### 2. 学会発表

Suzuki I, Kishida M, Okada M, Aoki T  
Clinical evaluation of the effectiveness of *Psidium guajava* in atopic dermatitis 28th International congress of Allergology and clinical Immunology Sydney 2000, 10

## シジュウムの炎症細胞に与える効果と有効成分の分離

主任研究者 北中 進

日本大学薬学部教授

研究要旨 民間薬シジュウム葉の抗アレルギー効果を解明するため、そのエキスについて抗アレルギー活性や急性および慢性抗炎症試験を中心とした評価を行った。更に有効成分について探索を行い、16種の化合物を単離した。これらの中で1種のセスキテルペン、2種のベンソフェノン配糖体、1種のフラボノイド配糖体は新規化合物であった。単離した化合物の中にPCAやヒスタミン遊離を抑制しマクロファージおよびT細胞の分泌物に影響を与えることが分かり、本植物の抗アレルギー効果や抗炎症効果の作用機序の一部が明らかとなった。

### A. 研究目的

民間薬シジュウム *Psidium guajava* は、フトモモ科の熱帯アメリカ原産の植物でインカ時代より葉や樹皮を胃腸病や切り傷等の治療に、また、中国では約千年前に渡来したといわれ、糖尿病、慢性下痢、皮膚湿疹、掻痒、止血、高血圧などに用いられてきた。

化学成分では、葉の成分としてセスキテルペンやタンニン関連化合物が単離されている。また、葉の抗糖尿病効果のあることが報告されている。その他の活性としては、脂質代謝改善作用が明らかにされている。

最近、葉は民間においてアトピー性皮膚炎、花粉症等のアレルギー疾患に応用されている。そこで、抗アレルギー作用を明らかにし、病気の予防や治療につながる安全な天然薬物の開発を目的とする。

### B. 研究方法

#### (1) シジュウムエキスの調製および成分研究

葉 (5.8 kg) を80%含水アセトン (25 l) で2回、室温にて超音波浴中抽出し、40℃にて減圧下濃縮してエキスを作成し、80%アセトンエキス (306.4 g) を作成した。このエキス (306.0 g) をDiaion HP-20に付し、水、20%-、40%-、70%-、メタノール及びアセトンで溶出しそれぞれの画分についてエキスを調製した。次にこれらの画分をODS, Sephadex LH-20, MCI gel CHP 20P, Toyopearl HW-40Cのカラムクロマトを繰り返して、化合物を単離した。単離した化合物は、NMR、MSなどの機器分析により構造の同定および決定を行った。

#### (2) PCA抑制試験

PCAテストはWistar ラットの背部を剃毛し、マウスモノクローナル抗DNP-IgE抗体5000倍希釈液を背部6箇所100 µlそれぞれ皮下注射した。46時間後に試料溶液を経口投与し、その2時間後、抗原溶液

(250 $\mu$ g DNP-BSA及び1%エハンスブルー混合液)の生理食塩水をラットの尾静脈から静注した。更に1時間後に撲殺し、背部の皮膚を剥離し色素漏出面積をはかり阻害率を算出した。

### (3) ヒスタミン遊離抑制試験

ヒスタミン遊離抑制試験は、H Yamazakiら (Acta Med. Okayama, 24, 113(1970))の方法に従って行った。すなわち、ラット腹腔マスト細胞を用いた $1\sim 2\times 10^6$  cells/mlの細胞懸濁液を調製し、試料溶液および脱顆粒薬物として、compound 48/80、calcium ionophore A23187、concanabalin Aをそれぞれ用いた。また、感作IgEによるマスト細胞の調整は、抗DNP-mouse mono clonal IgEにより感作を行い、DNP-BSAにより脱顆粒させた。ヒスタミンの定量は、イオン交換カラムクロマトグラムによりヒスタミンを分離後、オルトフタルアルデヒド(OPA)と60 $^{\circ}$ Cで反応させ、蛍光誘導体とし、ポストカラムHPLC法でピーク高法により定量し、阻害率を算出した。

### (4) ロイコトリエン遊離抑制効果

ヒスタミン遊離抑制試験と同様の方法で、ラット腹腔内マスト細胞を調整し、マスト細胞を $1\sim 2\times 10^7$  cells/mlとなるように0.2% BSA-Tyrode液を加え調製した。試料と細胞懸濁液を加え、Calcium ionophore A23187を加えインキュベートした。0.001 N HClを加え反応を停止後、遠心分離し、ロイコトリエンを含有する上澄をIsolute C18に付して精製後、HPLCにより分離定量を行った。

### (5) 血管透過性に対する作用

PG-extについて毛細血管の透過性亢進に対する作用をWhittleの方法で検討した。

### (6) マウスカラゲニン足蹠浮腫に対する効果

Tsurufujiらの方法に従った。ddY系雄性マウスに被検液を経口投与し、30分後に、左後肢足蹠に2%カラゲニンを含む生理食塩液を、右後肢足蹠には生理食塩液を皮下投与した。以後1時間ごとに7時間にわたり左右の足蹠の腫れを測定しその差を求めた。

### (7) 急性起炎物質による足蹠浮腫に対する作用

Tsurufujiらの方法に従い、ddY系雄性マウスに被検液を経口投与し、30分後に左後肢足蹠に急性起炎物質(ヒスタミン、セロトニン、ブラジキニン、プロスタグランジン $E_1$ )を皮下投与し、右後肢足蹠には生理食塩液を投与してヒスタミンとセロトニンでは30分間、ブラジキニンでは35分間、プロスタグランジン $E_1$ では75分間両足蹠の腫脹を測定し、その差を求めた。

### (8) 持続性浮腫に対する作用

1%マスタードを含む生理食塩液をマウスの左後肢足蹠に皮下投与し、右後肢足蹠には生理食塩液を投与した。浮腫が最大になる24時間後から7日間左右の足蹠の腫脹を測定し、その差を求めた。被検液はマスタード投与24時間後から1日2回3日間経口投与した。

### (9) アジュバント関節炎に対する作用

Newbouldの方法<sup>12)</sup>に準じ、ラットにエーテル麻酔下で、流動パラフィンに懸濁した*M. butyricum* (12 mg/ml)を、右後肢足蹠に皮下投与した。左右の後肢足蹠はあらかじめその容積を測定し、アジュバント投与前と投与後1、3、5、7、14、21日目に両足蹠の腫脹を容積法で測定し、腫脹率を求めた。被検液はアジュバント投与前日より1日1回21日目まで経口投与した。

### (10) 肉芽形成に対する作用

ラットを用いて綿球法で肉芽形成の検



討をした。

## C. 研究結果

### (1) シシウムエキスの調製および成分研究

シシウムの80% アセトンエキスは、IgE、 compound 48/80、 concanavalin A、 A23187により、マスト細胞からのヒスタミンの遊離を用量依存的に抑制し、それらのIC<sub>50</sub>値は、76、98、207、860 μg/mlを示し、強い遊離抑制活性が認められた。シシウムの80% アセトンエキスとこのエキスのDiaion HP20 カラムクロマトグラフィによる水、20%-、40%-、70%-、メタノール及びアセトンの各画分についてCompound 48/80 刺激によるヒスタミン遊離抑制率は、20%-、40%-、70%-メタノール画分に強い活性が認められた。(表

活性物質を得るため、20%メタノール画分についてODS、Sephadex LH-20、MCI gel CHP 20P、Toyopearl HW-40Cのカラムクロマトマトを繰り返し行い、16種の化合物を単離した。それらの化合物は各種NMRスペクトル及びMS等により同定および構造決定を行った。

セスキテルペン類

clovandiol (1), guavepoxyn (2)

ベンゾフェノン類

guavinoside A (3)、 guavinoside B (4)

フラボノイド類

quercetin 3-O-β-6-galloylarabinofuranoside (5), quercetin 3-O-β-arabinofuranoside (6),

quercetin 3-O-β-arabinopyranoside (7),

quercetin 3-O-β-xylopyranoside (8),

quercetin 3-O-β-galactopyranoside (9),

quercetin 3-O-β-glucopyranoside (10),

quercetin 3-O-α-rhamnopyranoside (11),

quercetin (12)

タンニン類

casuarinin (13), tellimagrandin I (14),

castalagin (15), methyl gallate (16)

また、これらの化合物のうち、化合物2、3、4 および 5 は新規化合物として決定した。

### (2) PCA 抑制試験

シシウムエキスは300 mg/kg の経口投与において62%の抑制を示した。casuarinin (13)、 tellimagrandin I (14)、 castalagin (15)、 methyl gallate (16) は10 mg/kg の経口投与において、それぞれ59.9%、45.5%、47.0%、20.5%の抑制を示した。また、対照薬の prednisolone は30 mg/kg 経口投与において50.2%であった。

### (3) ヒスタミン遊離抑制試験

ヒスタミン遊離抑制試験は、H Yamazaki ら (Acta Med Okayama, 24, 113(1970)) の方法に従って行った。すなわち、ラット腹腔マスト細胞を用いた1~2 × 10<sup>6</sup> cells/mlの細胞懸濁液を調製し、試料溶液および脱顆粒薬物として、compound 48/80、 calcium ionophore A23187、 concanavalin A をそれぞれ用いた。また、感作IgEによるマスト細胞の調整は、抗DNP-mouse mono clonal IgEにより感作を行い、DNP-BSAにより脱顆粒させた。ヒスタミンの定量は、イオン交換カラムクロマトグラムによりヒスタミンを分離後、オルトフタルアルデヒド (OPA) と60℃で反応させ、蛍光誘導体とし、ポストカラム HPLC法でピーク高法により定量し、阻害率を算出した。

### (4) ロイコトリエン遊離抑制効果

シシウムエキスについてLT遊離抑制試験を行い、LTB<sub>4</sub> は10 μg/ml の濃度で抑制し、LTC<sub>4</sub>、LTD<sub>4</sub>、LTE<sub>4</sub> は1-10 μg/ml の濃度で抑制を示した。

### (5) 血管透過性に対する作用

PG-ext は色素の血管透過性を用量依存

的に有意に抑制した。生薬重量換算で10 g/kgの用量ではコントロールに対して24%の抑制率でフェニルブタゾン0.1 g/kgでは44%であった。この結果、シシウムは炎症の初期に作用することが確認された。

#### (6) マウスカラゲニン足蹠浮腫に対する効果

PG-ext を経口投与したものはカラゲニンに惹起される浮腫をほぼ用量依存的に抑制した。生薬重量換算で3 g/kgの用量でも4～6時間目に有意な抑制効果があり生薬重量換算で10 g/kgの用量を投与したものは2時間目にコントロールに対して最大の47%の抑制を示した。フェニルブタゾン100 mg/kgよりは弱い、他の時点でも30～45%抑制した。その結果、用量依存的な抗浮腫作用が認められた。シシウムの生薬重量に換算して10 g/kgを経口投与したときの効果は、抗炎症薬のフェニルブタゾン100 mg/kgよりは弱いものの、初期の1～2時間目は同程度であった。カラゲニン浮腫は急性炎症モデルであり、炎症の初期に関与するといわれているのでシシウムは急性炎症に効果があると考えられた。またカラゲニン浮腫は、ヒスタミンやセロトニンなどのケミカルメディエーターの関与する初期の第一相と、キニンやプロスタグランジンの関与する第二相に分けられるが<sup>1)</sup>生薬重量換算で10 g/kgでは、全般にわたって浮腫を抑制した。特に第二相を強く抑制し、3時間目以降はフェニルブタゾンよりも強い作用が認められた。

#### (7) 急性起炎物質による足蹠浮腫に対する作用

急性炎症のケミカルメディエーターといわれるヒスタミン、セロトニン、フラシキニン、プロスタグランジンE<sub>1</sub>による浮腫についての検討では、PG-extはヒス

タミンやセロトニンによる浮腫を用量依存的に抑制した。抗ヒスタミン薬のシプロヘプタシン10 mg/kg投与群よりは効果が弱いものの有意な作用であった。またカラゲニン浮腫の第二相に関係するメディエーターのフラジキニンとプロスタグランジンE<sub>1</sub>による浮腫も各々抑制することがわかり、PG-ext はカラゲニン浮腫の第一相および第二相を抑制することが確認された。

#### (8) 持続性浮腫に対する作用

PG-ext は生薬重量に換算して10 g/kgの用量で2日目から有意にマスタードによる浮腫を抑制した。2～4日目は、アミノピリン100 mg/kg、フェニルブタゾン100 mg/kgの効果よりも強かった。このことからシシウムキスは持続性の炎症に対して治療効果があると考えられた。

#### (9) アジュバント関節炎に対する作用

PG ext は生薬重量に換算して10 g/kgでは3日目、7日目、14日目、21日目と有意にアジュバント浮腫を抑制した。この効果はアミノピリン100 mg/kg、フェニルブタゾン100 mg/kgより弱かった。アジュバント非投与の足蹠では、アミノピリン、フェニルブタゾンは有意に浮腫を抑制し、PG-ext では14日目から有意な抑制が認められた。遅発型アレルギーに関与するといわれているアジュバント関節炎慢性炎症モデルにも効果が認められた。

#### (10) 肉芽形成に対する作用

アジュバント関節炎慢性炎症とは炎症の第3期に当たる肉芽形成抑制作用はよく適合するといわれているのでラットを用いて綿球法で肉芽形成の検討をしたところPG-ext には肉芽形成抑制作用が認められなかった。

## D 考察

シジュウムエキスおよび単離した加水分解型タンニン類 (13, 14, 15) は、I型アレルギー試験モデルであるPCA試験において強い抑制効果が認められたことから、これらの抗アレルギー効果が明らかになった。研究分担者の豊島はタンニン類 (13, 14, 15, 16) についてTh1 およびTh2細胞への影響を調べ、PCA試験では活性が低いmethyl gallate (16) が選択的にTh2細胞に作用してサイトカイン産生を抑制していることをみいだしており興味深い。また、シジュウムエキスおよび含有成分の中にはマスト細胞からのヒスタミンおよびロイコトリエン類の遊離を強く抑制することから、かゆみ、平滑筋の収縮、血管透過性の亢進、粘液分泌などの亢進を抑制する可能性が示唆された。

アレルギー性疾患においては急性あるいは慢性炎症を伴うことを常とすることから、急性炎症疾患および遅発型アレルギー疾患モデルの試験を行った。

シジュウムエキスについて経口投与で、マウスカラゲニン足蹠浮腫法を用い、炎症に対する作用を検討した。その結果、用量依存的な抗浮腫作用が認められた。シジュウムの生重量に換算して10 g/kgを経口投与したときの効果は、抗炎症薬のフェニルブタゾン 100 mg/kgよりは弱いものの、初期の1~2時間目は同程度であった。カラゲニン浮腫は急性炎症モデルであり、炎症の初期に関与するといわれているのでシジュウムは急性炎症に効果があると考えられた。またカラゲニン浮腫は、ヒスタミンやセロトニンなどのケミカルメディエーターの関与する初期の第一相と、キニンやプロスタグランジンの関与する第二相に分けられるがシジュウム10g/kgでは、全般にわたって浮腫を抑制した。特に第二相を強く抑制し、3時間目

以降はフェニルブタゾンよりも作用が強かった。

そこで急性炎症のケミカルメディエーターといわれるヒスタミン、セロトニン、フラシキニン、プロスタグランジンE1による浮腫について各々検討したところ、シジュウムエキスはヒスタミンやセロトニンによる浮腫を用量依存的に抑制した。抗ヒスタミン薬のシプロヘプタジン10mg/kg投与群よりは効果が弱いものの有意な作用であった。またカラゲニン浮腫の第二相に関係するメディエーターのフラシキニンとプロスタグランジンE1による浮腫も各々抑制することがわかり、シジュウムエキスはカラゲニン浮腫の第一相、第二相を抑制することが確認された。さらに炎症の初期にみられる毛細血管の透過性亢進に対する作用をWhittleの方法で検討したところ、フェニルブタゾン0.1 g/kgより弱い色素の血管透過性が抑制された。このことからシジュウムは炎症の初期に作用することがわかる。

次に、持続性炎症に対する作用をマスタード足蹠浮腫で検討した。マスタードで浮腫をつくり、その後からシジュウムエキスを投与することにより治療効果を見ることができると考えられた。シジュウムエキス10 g/kgでは抗炎症薬であるフェニルブタゾン100 mg/kgよりも強くマスタード浮腫を抑制し、アミノピリン100 mg/kgと同程度であった。このことからシジュウムエキスは持続性の炎症に対して治療効果があると考えられた。そこで慢性炎症の検討法であるラットアシュハント関節炎法を用いてシジュウムの作用をみた。その結果、アシュハント処置後1~5日に現れる初発の浮腫を第1日目から抑制し、その後も有意な抑制作用が認められたフェニルブタゾン、アミノピリン100 mg/kgより作用が強かつ

た。10日目ころから出現する全身性の病変を伴う浮腫についてはアシュハント非投与の足蹠のデータを用いて判断すると14日目以降に有意な作用が認められた。アシュハント関節炎はヒトの慢性関節リウマチに類似する実験モデルといわれているのでシジュウムキスはリウマチ様の慢性炎症に効果が期待される。またこの作用と炎症の第3期に当たる肉芽形成抑制作用はよく適合するといわれているのでラットを用いて綿球法で肉芽形成の検討をしたところシジュウムキスには肉芽形成抑制作用が認められなかった。以上のことから、シジュウムキスは、炎症のケミカルメディエーターを抑制し、急性炎症モデルに効果があることがわかった。また持続性炎症にも効果があり、遅発型アレルギーが関与するといわれているアシュハント関節炎慢性炎症モデルにも効果が認められた。in vitroの実験においてマスト細胞からのヒスタミン遊離抑制が認められているので、急性炎症の作用機序としてはこのことが考えられるが、慢性炎症に関しては今回の実験の範囲では明らかではない。

今後、更に化合物を単離し、有効成分とその作用機序について研究を行わなければならない。

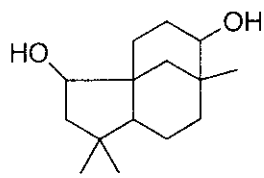
#### E. 結論

今回の研究において、シジュウムエキスおよび含有成分の中には、低濃度でマスト細胞からヒスタミン及びロイコトリエン類のケミカルメディエーターの遊離を抑制し、また、in vivo 試験であるPCAを抑制することから、アレルギー疾患の発症を抑制するものと考えられる。また、シジュウムエキスは急性および慢性炎症モデルの試験において効果が認められ、

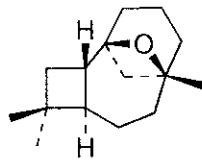
民間で胃腸病や糖尿病に用いられていることから、アレルギー性疾患に対して安全に利用できる天然薬物と考えられる。

#### F. 研究発表 (学会発表)

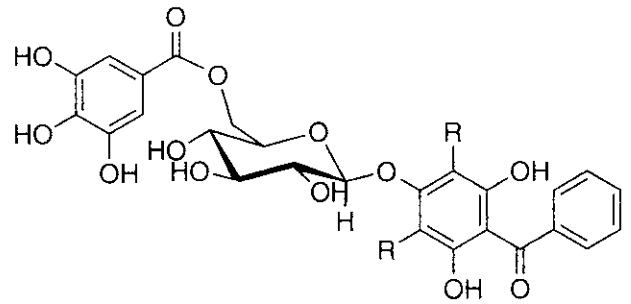
1. 笠原義正、久間木國男、柴野 剛、祖布川真弓、宮地斗美、大越絵実加、滝戸直夫、北中進：シジュウムの抗アレルギー及び抗炎症作用 日本薬学会第117年会（東京）講演要旨集2 p141（1997）
2. 松崎桂一、北中 進：Psidium guajavaのフェノール性成分について 日本生薬学会第46年会（大阪）講演要旨集 p121（1999）
3. 松崎桂一、尚 尔金、北中 進：Psidium guajavaのテルペノイド成分の研究 日本生薬学会第46年会（大阪）講演要旨集 p143（1999）
4. 松崎桂一、北中 進、石井里枝、斉藤貢一：Psidium guajavaのフェノール性成分について（その2）日本薬学会第120年会（岐阜）講演要旨集2 p52（2000）



1

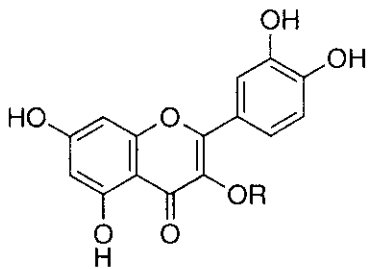


2



3 R=H

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



5 R=6-galloyl-β-arabinofuranosyl

6 R=β-arabinofuranosyl

7 R=β-arabinopyranosyl

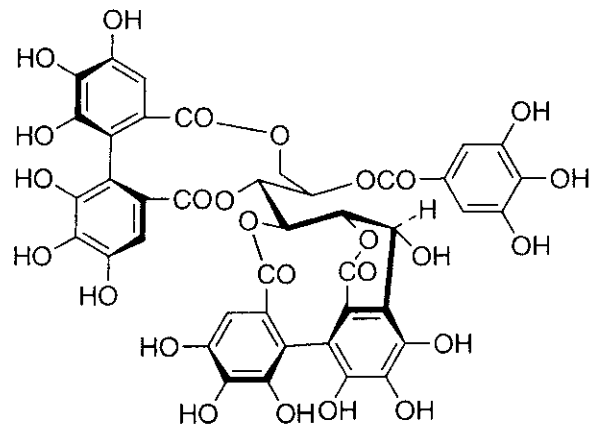
8 R=β-xylopyranosyl

9 R=β-galactopyranosyl

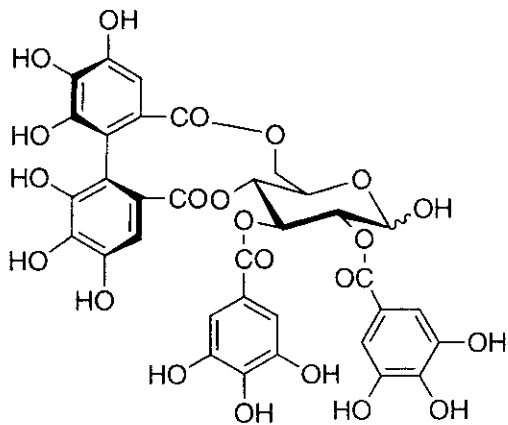
10 R=β-glucopyranosyl

11 R=α-rhamnopyranosyl

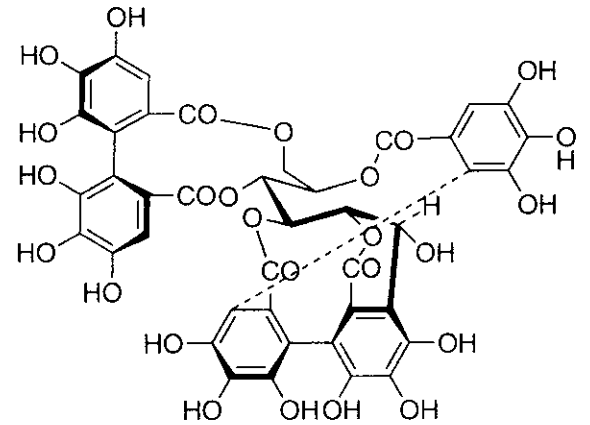
12 R=H



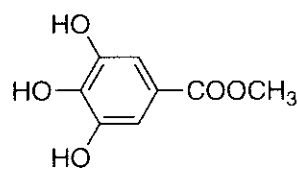
13



14



15



16

Fig. 1. *Psidium guajava* より単離した化合物

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）  
総合研究報告書

Th1/Th2 型ヘルパー T 細胞機能へのシジウムの影響に関する研究

分担研究者 豊島 聰 星薬科大学教授

**研究要旨** シジウム抽出物より単離・同定した **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した。**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 で免疫することにより 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- $\gamma$  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。**methyl gallate** より Th2 サイトカイン (IL-4) 産生抑制に関し、選択的及び抑制活性の高い化合物を検索し、**ethyl gallate** が選択性及び活性の高い化合物であることを発見した。

A 研究目的

ヘルパー T 細胞は産生するサイトカインのパターンにより Th1 (IL-2、IFN- $\gamma$  等を産生) と Th2 (IL-4、IL-5 等を産生) のサブタイプに分類され、両細胞のバランスの乱れは免疫・アレルギー疾患の発症・増悪に関係する。特に IL-4 は井下産生に関係しており、その産生抑制はアレルギー発症の抑制につながると考えられる。本研究はシジウム抽出物よりヘルパー T 細胞によるサイトカイン産生を抑制する物質を同定し、アレルギー治療へ応用することを目的とする。

B 研究方法

各種サイトカイン産生に対するシジウム抽出成分および **methyl gallate** 類縁化合物の影響の検討。抗 CD3 抗体刺激 T 細胞、クローン化 Th1 細胞、クローン化 Th2 細胞にシジウム由来成分あるいは **methyl gallate**

類縁物質を加えて培養する。培養後の上清中に含まれる各種サイトカイン (Th1 サイトカインとしては主に IFN- $\gamma$ 、Th2 サイトカインとしては主に IL-4 の側定を行った) を ELISA 法により測定した。

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  $\mu$ 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。ネカ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 の側定は、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だし、リンパ球懸濁液 ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ) を調製する。リンパ球懸濁液に  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  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- $\gamma$ ) 量を ELISA 法により測定した。

### C 研究結果

シジウム抽出物および単離成分の各種サイトカイン産生に対する影響 シジウムの熱水抽出物、80%-、100%-アセトン抽出物について IFN- $\gamma$  と IL-4 の産生への影響を調べたところ、IFN- $\gamma$  産生も IL-4 産生も  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  濃度の 20%-メタノール抽出物、100%-メタノール抽出物、80%-アセトン抽出物により強く抑制された。次に、80%-アセトン抽出物の分画を進めることにより得られた tellimagradin I、casuarinin、methyl gallate の IFN- $\gamma$  産生と IL-4 産生への影響を調べたところ、いずれも両サイトカインの産生を抑制したが、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の methyl gallate は IL-4 産生を強く抑制するが IFN- $\gamma$  産生はわずかに抑制するのみであった。また、methyl gallate は IL-2 産生よりも IL-5 産生を強く抑制したことから、Th2 細胞により選択的に作用する可能性が示唆された。

I 型アレルギーモデルマウスにおける IgE 産生に対する methyl gallate 投与の影響 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  $9.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  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  $0.1 \text{mg}/\text{kg}$  投与で 49%、 $1 \text{mg}/\text{kg}$  投与で 53%、 $10 \text{mg}/\text{kg}$  投与で 63%、 $100 \text{mg}/\text{kg}$  投与で 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。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。

I 型アレルギーマウス由来脾 T 細胞のサイトカイン産生に対する methyl gallate の影響 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 投与で約 37% 減少していた。1, 10,  $100 \text{mg}/\text{kg}$  投与群では約 20% の減少であった。一方、IFN- $\gamma$  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  $1 \text{mg}/\text{kg}$  methyl gallate 投与群では、コントロールの 3.5 倍であり、1, 10,  $100 \text{mg}/\text{kg}$  投与群では約 2.5 倍であった。これらの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。

methyl gallate 類縁化合物の Th1 サイトカイン (IFN- $\gamma$ ) 及び Th2 サイトカイン (IL-4) 産生に対する影響 gallic acid, methyl gallate, ethyl gallate, propyl gallate の抗 CD3 抗体刺激 T 細胞による IFN- $\gamma$  及び IL-4 産生の影響を比較した結果、ethyl gallate は低濃度で、IL-4 産生を選択的に抑制することが判明した。

### D 考察

シジウムには抗アレルギー作用の存在することが示唆されていたが、本研究で、シジウム抽出物の中にはヘルパー T 細胞によるサイトカイン産生を抑制する物質の存在することが判明し、抗アレルギー作用を裏付ける結果が得られた。さらに、IL-4 産生をある程度選択的に抑制する物質として、methyl gallate が同定された。

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  $0.1 \text{mg}/\text{kg}$  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* 実験でも高濃度 methyl gallate は Th1 サイトカインと Th2 サイトカインのどちら

の産生を阻害したので、*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* での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- $\gamma$**  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。

上述のように、**methyl gallate** よりも選択性及び活性の高い化合物の発見が治療への応用には必須と考えられたことから、**methyl gallate** の類縁化合物について検討を加え、**ethyl gallate** が選択性、活性ともに **methyl gallate** よりすぐれていることを見出した。**propyl gallate** も **methyl gallate** よりも低濃度で **IL-4** 産生を抑制した。しかし、**propyl gallate** は接触性皮膚炎などの **IV** 型アレルギーを誘発することが知られており、治療には応用できないと考えられた。

## E 結論

1) シジウム中には **I** 型アレルギー発症の原因となる **IgE** 産生の制御に関わる **IL-4** や **IL-5** などのサイトカインの産生を抑制

する物質（その一つとして **methyl gallate** が同定された）が含まれていることが明らかとなった。

2) **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。

3) **IL-4** 産生を **ethyl gallate** が **methyl gallate** よりも選択的かつ低濃度で抑制することを発見した。

## F 研究発表

### 1. 論文発表

小菅崇、宍倉弘記、北中進、豊島聰・ヘルパー **T** 細胞のサイトカイン産生とアレルギー治療に対するフトモモ科シジウムからの抽出物の影響（2000）**YAKUGAKU ZASSHI**, 120(4), 408-412

### 2. 学会発表

宍倉弘記、小菅崇、北中進、豊島聰 シジ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 20 月

宍倉弘記、小菅崇、豊島聰、北中進 **methyl gallate** による **I** 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

加藤慶、小菅崇、北中進、豊島聰 **methyl gallate** および類縁物質による **I** 型アレルギー抑制作用の検討、日本薬学会 120 年会（岐阜）、2000 年 3 月



天然薬物シジュウムの Th1/Th2 バランスからみた  
抗アレルギー作用と抗 HIV 作用

分担研究者 早川 智

日本大学医学部産婦人科

概要 我々は南米原産の植物 *Psidium guajava* (PG) の 80% acetone 抽出エキスについてリンパ球機能、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と HIV 感染妊婦における、HIV 垂直感染の予防法について検討した。

その結果健常ヒト末梢リンパ球を PG 存在下で培養すると、10~100  $\mu$  g/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  $\mu$  g/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。健常ヒト末梢リンパ球において ELISPOT assay により IFN- $\gamma$ /IL-4 産生細胞比 (type1/type2 バランス) を検討すると *in vitro* における PG 濃度 10~50  $\mu$  g/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。

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り、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

南米原産の植物 *Psidium guajava* (PG) は、古来からインデイ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

健常な 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 で抽出したエキス (PG-ext) を最終濃度 0.1 % dimethyl sulfoxide (DMSO) に  $0 \mu\text{g/mL}$ 、 $10 \mu\text{g/mL}$ 、 $50 \mu\text{g/mL}$ 、 $100 \mu\text{g/mL}$ 、 $200 \mu\text{g/mL}$  溶解したものを sample とした。

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 4 8 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-diphenyl tetrasodiumbromide 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。0.04M 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 570 nm (ref. 630 nm) 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- $\gamma$ 、IL-4 の 1 次抗体 (Purified mouse anti-human IFN- $\gamma$  monoclonal antibody ELISA capture と Purified mouse anti-human IL-4 monoclonal antibody ELISA capture : 共に Pharmingen) を  $1 \mu\text{g/mL}$  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 (ニノスイ) に 10% FBS を加えた溶液 (10% FBS-PBS)  $200 \mu\text{L}/\text{well}$  でフローキングした 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- $\gamma$  monoclonal antibody ELISA Detection と Biotinylated RAT anti-human IL-4 monoclonal antibody ELISA Detection : 共に Pharmingen)  $1 \mu\text{g/mL}$  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

$\mu$  g/mL に調整した Streptavidin-Alkaline Phosphatase (Life Technologies) を  $100 \mu$  L/well まきパラフィルムでふたをした後、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  にて 30 分静置、滅菌 PBS  $200 \mu$  L/well で洗浄した。

Agarose gel (サワティーテクノロジー) を滅菌 PBS に入れ、オートクレーフで溶解し、 $1\%$  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 1 Tab を N,N-Dimethylformamide (DMF: 岩井化学)  $0.5\text{mL}$  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  $80^\circ\text{C}$  に保温したものを  $100 \mu$  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 ハランスの調節

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

コントロールとシシウム飲水用として 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  $600\text{mL}$  をオートクレーフで滅菌し、熱いうちに市販のシシウム茶 Tea Pack を 3 つ入れ 10 分間抽出したものを 2 日おきにシシ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。適量の培養液で希釈して  $15\text{mL}$  の遠心管に移し、培養液  $10\%$  の FBS (Life Technologies) を添加した R P M I 1640 リキソト (ニノスイ) に存遊させ、 $700\text{rpm}$  で 10 分遠心機にかけ、上清を捨て、再度 R P M I 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  $1 \times 10^5/\text{mL}$  に調整した。

$1 \times 10^5/\text{mL}$  リンパ球液  $1,000 \mu$  L を、1 つの検体につき 2 つずつ用意し、P M A (Sigma)  $1 \mu$  L と ionomycin (Sigma)  $0.5 \mu$  L を mitogen として添加し、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  にて 4 時間培養した。滅菌 PBS で IFN- $\gamma$ 、IL-4 の 1 次抗体 (Purified Rat anti-mouse IFN- $\gamma$  monoclonal antibody ELISA capture と Purified Rat anti-mouse IL-4 monoclonal antibody ELISA capture 共に Pharmingen)  $1 \mu$  g/mL に  $k$  希釈し、 $100 \mu$  L/well 分庄パラフィルムでふたをし、 $4^\circ\text{C}$  の moist chamber で 1 晩おいた後、滅菌 PBS (ニノスイ) に  $10\%$  FBS を加えた溶液 ( $10\%$  FBS-PBS)  $200 \mu$  L/well でフロンキングした 96 穴平底 plate に培養したリンパ球液  $100 \mu$  L/well をまきパラフィルムでふたをした後、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  にて 1 晩培養した。滅菌 PBS  $200 \mu$  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- $\gamma$  monoclonal antibody ELISA Detection と Biotinylated RAT anti-human IL-4 monoclonal antibody ELISA Detection 共に Pharmingen) を  $1 \mu$  g/mL に調整したものを  $100 \mu$  L/well まきパラフィルムでふたをした後、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  にて 1 時間静置、抗体液を捨て、滅菌 PBS  $200 \mu$  L/well で洗浄し滅菌 PBS で  $1.2 \mu$  g/mL に調整した Streptavidin-Alkaline Phosphatase (Life Technologies) を  $100 \mu$  L/well まきパラフィルムでふたをした後、 $5\% \text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  にて 30 分静置後滅菌 PBS  $200 \mu$  L/well で洗浄した。Agarose gel (サワティーテクノロジー) を PBS (-) に入れ、オートクレーフで溶解し、 $1\%$  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 1 Tab を DMF (岩井化学)  $0.5\text{mL}$  に溶かした 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  $\mu$  L/well ずつ plate にまき、発色させ、spot をカウントした。

#### in vitro におけるマウスの Th1/Th2 ハランスの影響

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。適量の培養液で希釈して 15mL 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  $1 \times 10^5$ /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  $\mu$  g/mL、10  $\mu$  g/mL、50  $\mu$  g/mL、100  $\mu$  g/mL、200  $\mu$  g/mL に調整したものを sample として用意した。

$1 \times 10^5$ /mL リンパ球液 1,000  $\mu$  L に各濃度分の sample 10  $\mu$  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% CO<sub>2</sub>、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  $\mu$  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。

リンパ球混合培養においても、ほぼ

50-100  $\mu$  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。

#### 健常人末梢リンパ球 type 1/type2 分化に及ぼす影響

末梢リンパ球の type 1/type2 (IFN- $\gamma$ /IL-4) 比は、ほぼ 100  $\mu$  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。

そのメカニズムは IFN- $\gamma$  は 50  $\mu$  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- $\gamma$  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- $\gamma$ /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- $\gamma$  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- $\gamma$ /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。

##### 2 in vitro 処理による検討