

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。

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フ 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、Th/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 ても同様に 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、傷害性 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。

E. 結論

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。

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癌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

南米インテ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 細胞の誘導活性化や IFN- γ 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-16 mRNA 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。

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ヒ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) fibinoid 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 の経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、同様の機構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 絨毛細胞と脱落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。

マクロファージの一酸化窒素及びサイトカイン産生に対するシジュウムの影響

石井里枝 齊藤貢一

埼玉県衛生研究所

研究要旨 シジュウムは民間で各種アレルギー疾患に効果をあけている植物であり、共同研究者らの研究により、肥満細胞からのヒスタミン遊離に対する抑制作用等、抗アレルギー作用や抗炎症作用が明らかとなっている。一方、マクロファージは生体防御、炎症反応において初発から最終段階までを担っている細胞である。種々の生理活性物質（一酸化窒素（NO）、TNF- α 、IL-1、6、10、12等）を産生、分泌し、それらは、感染、炎症、免疫応答において重要な作用を示す。そこでシジュウムの抗炎症作用を解明することを目的に、マクロファージのNO、TNF- α 、IL-1 β 及びIL-12産生に対する作用を検討した。また、エキスより単離された16成分についてその活性を検討した。シジュウム抽出エキスはIFN- γ 及びLPS刺激マクロファージのNO産生を濃度依存的に抑制した。その活性成分はフラボノイド及びタンニン等のポリフェノールであった。この抑制作用はiNOS酵素誘導及びiNOS酵素活性阻害の2つのメカニズムにより発現したものであることが明らかとなった。シジュウム抽出エキスはTNF- α 産生に対しては促進的な作用を示し、また、IL-1 β 及びIL-12に対しては顕著な影響を示さなかった。エキス中の成分の検討から、構造の違いにより抑制作用を示す化合物と増強作用を示す化合物の両方の成分が存在することがわかった。

A 研究目的

マクロファージは活性化するとNO、TNF- α 、IL-1 β 等の生理活性物質を産生し、分泌する。それらは生体において微生物の感染を防いだり、また、腫瘍細胞を障害したり、生体を守る上で大きな役割を担っている。しかし、一方でその無秩序な産生は生体を傷害し、慢性炎症や自己免疫疾患の増悪等、生体にとって不利益な状況をもたらす。そこで、本研究では、すでに民間薬としてアトピー性皮膚炎、花粉症やアレルギー性鼻炎等の疾患に応用されているシジュウム（Psidium）葉部80%アセトン抽出エキス及びエキスより単

離された16種の化合物についてマクロファージのNO、TNF- α 、IL-1 β 及びTh1/Th2分化に関与するとされているIL-12の産生能に対する影響を検討した。

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%CO₂下、37℃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 $\mu\text{g/ml}$ または μM となるように調製した (DMSO 濃度 0.4%) 細胞を $1.0 \times 10^5 \text{cells/ml}$ に調製し、96 穴プレートに 200 μl 加え、5% CO_2 , 37°C で 2 時間培養した。各濃度 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 $\mu\text{l/well}$ 添加、混和し、4 時間培養した。上清を除き、DMSO を 150 μl 加え、反応を停止した。マイクロプレートリーダーで 550nm (ref 630nm) の吸光度を測定した。

(2) NO 産生に対する作用

細胞を $8.0 \times 10^5 \text{cells/ml}$ に調製し、96 穴プレートに 200 μl 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- γ (10U/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 μl 採取し、Griess 法により、NO の酸化体である NO_2 量を定量した。また、NO と同時に生成する L-シトルリン量を既報の蛍光検出 HPLC により測定した。

(3) NO 合成酵素 (iNOS) の誘導に対する作用

細胞を $1.2 \times 10^6 \text{cells/ml}$ に調製し、35mm ϕ のペトリティッシュに 1ml 加え、2 時間培養後、sample, IFN- γ (10U/ml) 及び LPS (100ng/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 (Mg^{2+} (-), Ca^{2+} (-)) で 2 回洗浄後した。Lysis Buffer 40 μl を加え、30 分後、

4°C, 10,000rpm 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 μg 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}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 γ カウンターで測定した。

(4) iNOS 酵素活性阻害作用

RAW264.7 細胞を $6.0 \times 10^5 \text{cells/ml}$ を 90mm ϕ ティッシュに 10ml 添加し、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 が発現した細胞をピペッティングにより採取し、PBS (Mg^{2+} (-), Ca^{2+} (-)) で 3 回洗浄後、modified Hanks 液に $4 \times 10^5 \text{cells/ml}$ となるように懸濁した。24 穴プレートに 500 μl ずつ添加、5 分間インキュベートした後、種々の濃度の sample を添加した。10 分間インキュベートした後、L-アルギニン (1mM) 及び 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazole-3-oxide-1-oxyl (carboxy-PTIO, 100 μM) を添加した。30 分間培養した後、上清中の NO_2 量を Griess 法で測定した。

(5) TNF- α 及び IL-1 β 産生に対する作用

細胞を $8.0 \times 10^5 \text{cells/ml}$ に調製し、48 穴

プレートに 250 μ l ずつ添加し、2 時間培養した。産生増強作用を検討するために、sample 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 μ g/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- α 及び IL-1 β を Enzyme Linmed- Immuno-Sorbent Assay (ELISA) で定量した。なお、IL-1 β についてはさらに培養上清を除去後、滅菌蒸留水を 250 μ l 添加し、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 μ 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 β (p-IL-1 β) を同様に ELISA で定量した。

(6) IL-12 (p40) 産生作用

細胞を 8.0×10^5 cells/ml 調整し、48 穴プレートに 250 μ l ずつ添加し、2 時間培養した。IFN- γ (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 80%アセトン抽出エキス及びエキスから得られた 16 種の化合物の RAW264.7 細胞に対する障害性は、シジュウムエキスでは 100 μ g/ml で、**13-15** の加水分解型タンニンは 100 μ M で、**11** は 100 μ g/ml で、**12** は 10 μ g/ml で細胞毒性が観察された。その他の化合物は 100 μ g/ml 濃度でも毒性は認められなかった。そこで以下の NO 及び TNF- α 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

シジュウム抽出エキスは IFN- γ 及び LPS で刺激したマクロファージの NO 産生を濃度依存的に抑制した。**3-12** のフラボノイド類及び **13-15** の加水分解型タンニンに抑制活性が認められた。また、**1, 2** は NO 産生増強作用を示した (表 1)。抑制作用の認められたシジュウムエキス及び **13-15** について L-シトルリン産生量を検討したところ、NO₂ 量とよく相関した。

(3) iNOS 誘導に対する作用

シジュウム抽出エキス、化合物 **1-5**、及び **13-16** について iNOS 酵素誘導に対する作用を検討した。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% と増加が認められた。また、NO 産生抑制作用の認められた化合物 **3-5**、**13-15** については iNOS タンパク量も減少していた (図 2)。

(4) iNOS 酵素活性に対する作用

シジュウム抽出エキス及び化合物 **13-16** について検討した。NO 産生に対し抑制作用を示さなかった **16** は iNOS の酵素活性に対しても阻害作用を示さなかった。シジュウム抽出エキス及び **13-15** のタンニンは酵素活性に対しても阻害作用を示した (IC₅₀ 値: 71.2 μ g/ml, 48.4, 145.6, 107.0 μ g/ml) (図 3)。

(5) TNF- α 産生に対する作用

シジュウム抽出エキス、化合物 **1-5**、**13-16** について TNF- α 産生に対する作用を検討した。無刺激コントロール (TNF- α 産生 9.3 pg/ml) に対しシジュウム抽出エキス (30 μ g/ml)、**13** (30 μ M)、**14** (30 μ M)、**15** (30 μ M)、は 26.7, 135.9, 265.3, 178.9

pg/ml と単独で TNF- α 産生増強作用を示した。また、LPS で刺激した場合の TNF- α 産生に対しては、同様にエキス (30 μ g/ml) 及び **13-15** (30 μ M) の加水分解型タンニンがコントロールに対し 16, 15, 17, 18 倍の増強作用を示した。特に、**14** は 30 μ M よりも 3 μ M の低濃度で最も顕著な増強作用 (39 倍) を示した (図 4)。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。

(6) IL-1 β 産生に対する作用

シジュウム抽出エキス及び化合物 **1-5**, **13-16** について IL-1 β 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 β 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 β について検討した。エキス及び化合物はいずれも単独では p-IL-1 β 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 β 産生に対してもシジュウム抽出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 **3**, **4**, **5**, **16** は抑制作用を、化合物 **13-15** は増強作用を示した (図 5)。

(7) IL-12 (p40) 産生に対する作用

シジュウム抽出エキス及び化合物 **1-5**, **13**, **16** について IL-12 (p40) の産生に対する作用を検討した。シジュウム抽出エキスは有意な作用を示さなかったが、化合物 **1-5** (100 μ g/ml) は産生増強作用 (コントロール細胞のそれぞれ 5.2, 1.7, 1.4, 1.3, 3.5 倍) が認められた。また、**13**, **16** は抑制作用を示した (図 6)。

D 考察

(1) NO 産生に対する作用

シジュウム抽出エキスは NO 産生を抑制した。その活性成分は **3-12** のフラボノイド類や **13-15** のタンニン類と考えられた。これらポリフェノール類は活性酸素等のラジカルを補足する作用が報告されている。そこで、既報の蛍光検出 HPLC により NO と同時に産生される L-シトルリンについて検討した。その結果、L-シトルリン量についても NO₂ 量と同様にその産生は抑制されており、このことから、NO の抑制効果は単に NO ラジカルの補足によるものではないと考えられた。そこで、iNOS 酵素誘導に対する作用を検討した。その結果、これら NO 産生抑制作用を示した化合物は iNOS 酵素誘導に対しても顕著な抑制作用を示した。また、iNOS 酵素活性に対しても高濃度であるが **13-15** のタンニンは抑制作用を示した。NO 産生抑制効果はこの 2 つのメカニズムによるものであることが明らかとなった。一方、**1**, **2** は NO 産生を増強させる作用が認められ、シジュウム中には NO 産生に対し促進的あるいは抑制的に働く両方の成分が混在することがわかった。

(2) TNF- α 及び IL-1 β に対する作用

TNF- α 及び IL-1 β 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、ウイルス等) 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 β 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- α 及び IL-1 β 産生を著しく増強させた。これらの化合物を生体の状

態に合わせて適用させていくことが重要であると考え

(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- γ 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。しかし、エキスは IL-12 産生に対し顕著な作用を示さなかった一方、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った。

E 結論

シジュウム抽出エキスは IFN- γ 及び LPS 刺激マクロファージの NO 産生を濃度依存

的に抑制した。その活性成分はフラボノイド及びタンニン等のポリフェノールであった。この抑制作用は iNOS 酵素誘導及び iNOS 酵素活性阻害の 2 つのメカニズムにより発現したものであることが明らかとなった。シジュウム抽出エキスは TNF- α 産生に対しては促進的な作用を示し、また、IL-1 β 及び IL-12 に対しては顕著な作用を示さなかった。エキス中の成分についての検討から構造の違いにより抑制作用を示す化合物と増強作用を示す化合物の両方の成分が存在することかわかった。

F 研究発表

1 学会発表

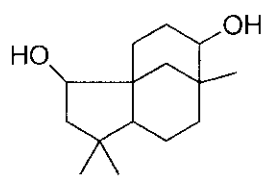
石井里枝, 斉藤貢一, 堀江正一, 柴野剛, 北中進 シジュウム及びチネンのマクロファージ活性化機構への作用, 日本薬学会第 118 年会 (京都), 1998 年 3 月

石井里枝, 斉藤貢一, 堀江正一, 北中進 マクロファージの NO, IL-1 及び TNF- α 産生に対するシジュウムの調節作用, 日本薬学会第 119 年会 (徳島), 1999 年 3 月

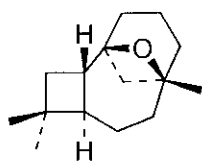
表1 シジュウム及び単離成分のNO産生に対する作用

sample	濃度	NO産生率* (%)	IC ₅₀ 値
シジュウムエキス	30 μ g/ml	59.3	
1	100 μ g/ml	107.9	
2	100 μ g/ml	110.8	
3	100 μ g/ml	94.5	
4	100 μ g/ml	94.5	
5	100 μ g/ml	40.0	143.6 μ M
6	100 μ g/ml	33.0	163.8 μ M
7	100 μ g/ml	32.3	165.8 μ M
8	100 μ g/ml	47.0	176.3 μ M
9	100 μ g/ml	50.2	
10	100 μ g/ml	52.0	
11	30 μ g/ml	67.0	
12	3 μ g/ml	59.5	
13	30 μ M	23.5	2.7 μ M
14	30 μ M	67.6	
15	100 μ M	32.3	7.5 μ M
16	30 μ M	100.1	

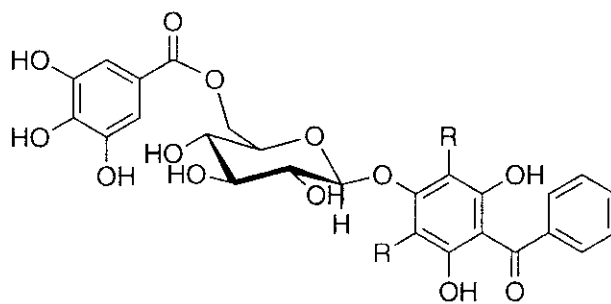
* IFN- γ 及びLPS刺激マクロファージの産生量を100として表した



1

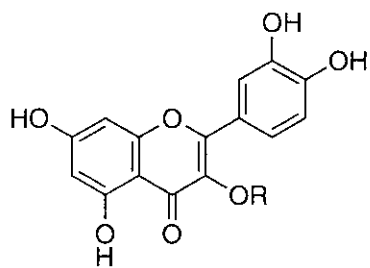


2



3 R=H

4 R=CH₃



5 R=6-galloyl-β-arabinofuranosyl

6 R=β-arabinofuranosyl

7 R=β-arabinopyranosyl

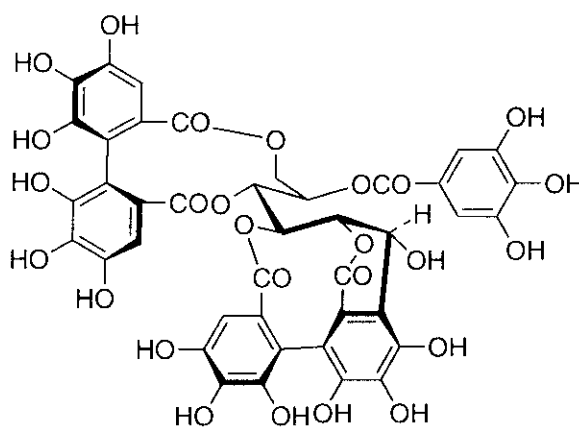
8 R=β-xylopyranosyl

9 R=β-galactopyranosyl

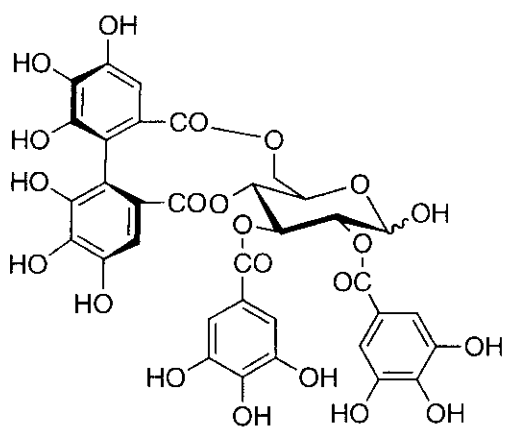
10 R=β-glucopyranosyl

11 R=α-rhamnopyranosyl

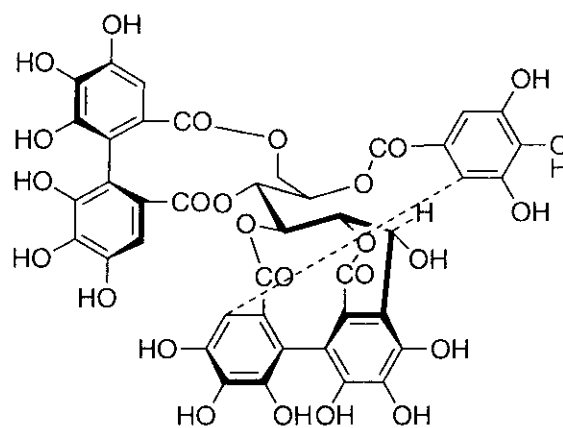
12 R=H



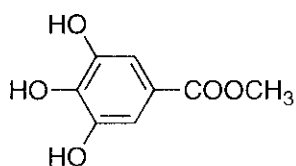
13



14



15



16

図1 検討した化合物の構造式

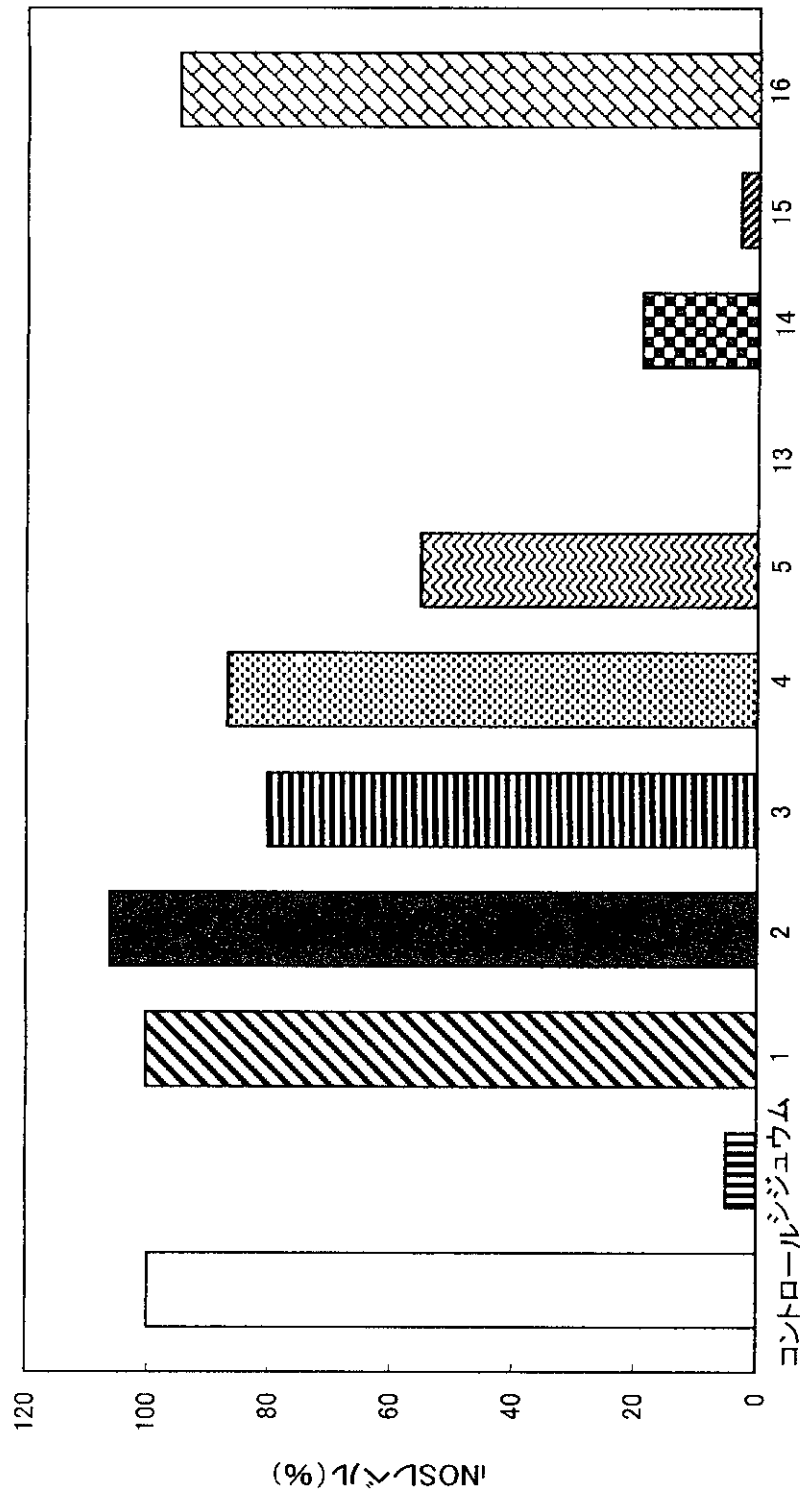


図2 シジウム抽出エキスから単離された成分のNOS誘導に対する効果

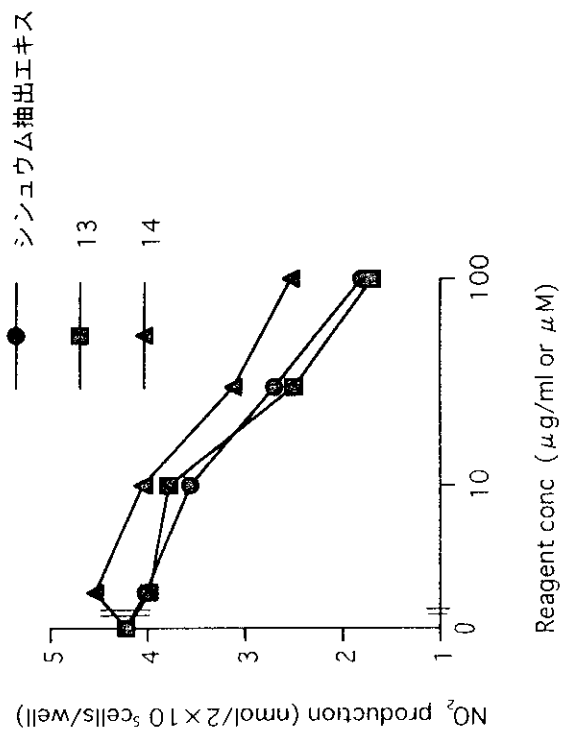
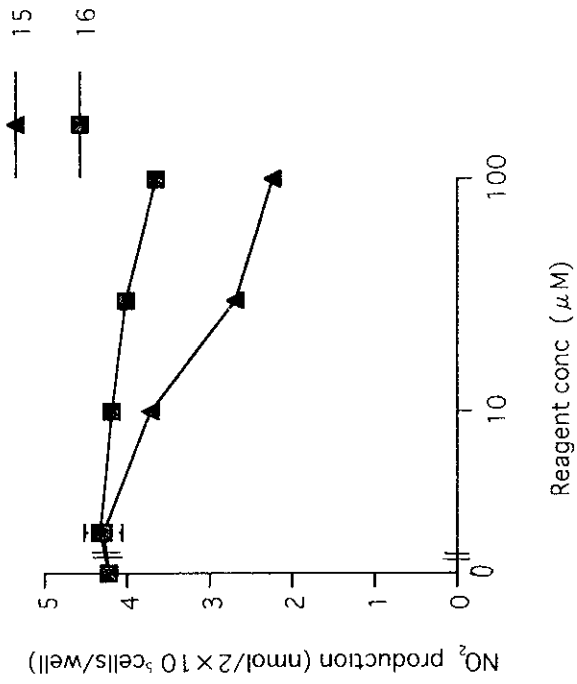


図3 シンジュウムエキス及び単離成分のiNOS酵素活性化阻害作用

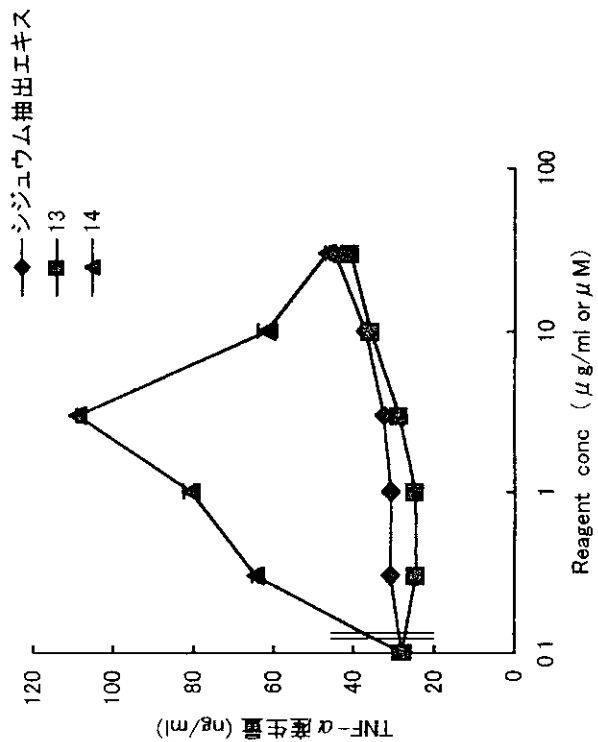
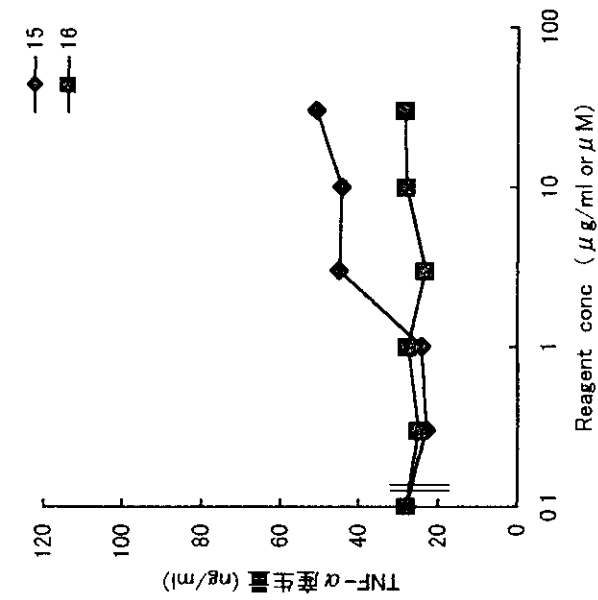


図4 シジウム及び単離成分のTNF-α産生に対する作用

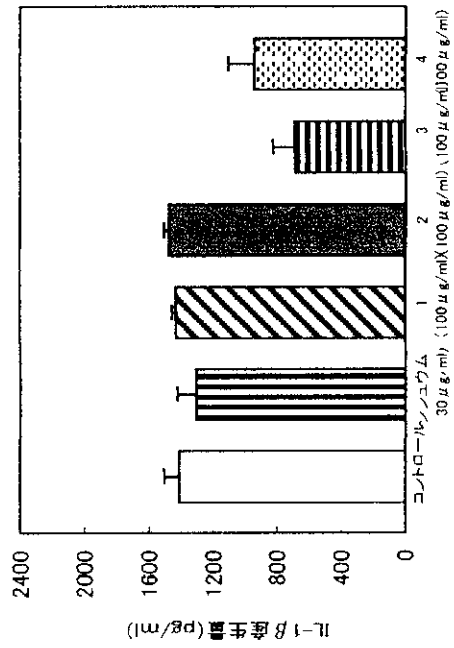
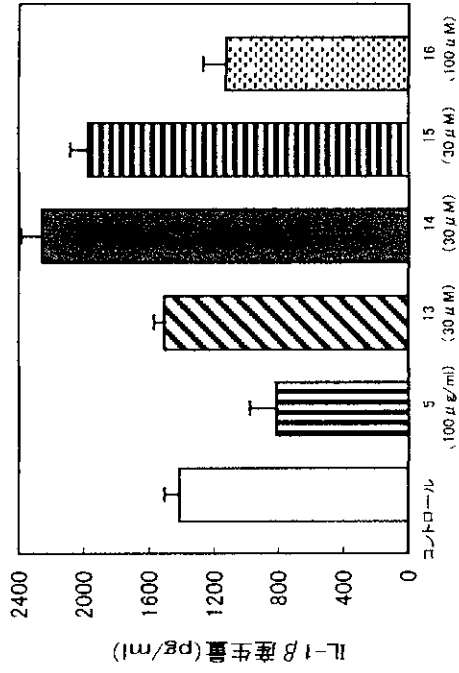


図5 シジウム及び単離された成分のIL-1 β 産生に対する作用

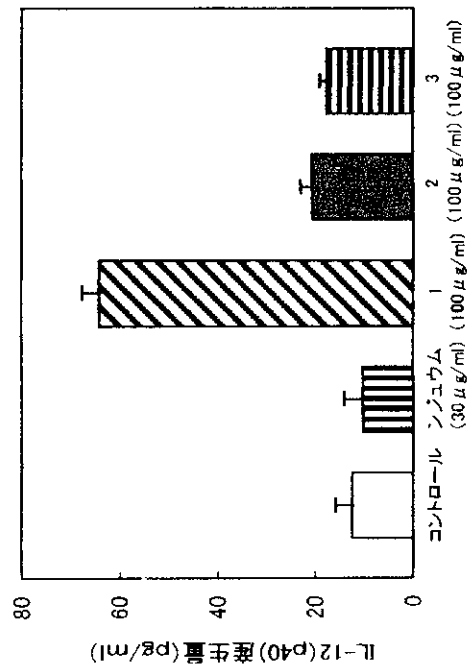
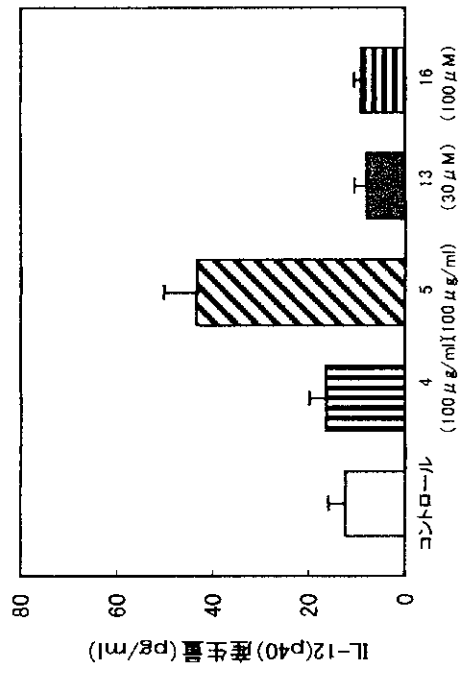


図6 シンジュウム及び単離された成分のIL-12(p40)産生に対する作用