甜茶(*Rubus suavissimus*)エキスの抗炎症効果

楊 志博・石倉義之・平井孝一・藤居 亙・諏訪芳秀・田中隆治^{*1)},
河野茂勝・大幡勝也^{*2)}

Effect of Rubus suavissimus extract on croton oil induction murine ear inflammation model

We investigated the effects of *Rubus suavissimus* (chinese name: Ten-Cha) extract on the inflammatory reactions including ear dermatitis induced by croton oil and tumor necrosis factor (TNF) production in ICR mice. When Ten-Cha extract (200 mg/kg/day) was administered po for five consecutive days, the ear edema and capillary permeability induced by croton oil were markedly suppressed by 51.8 and 76.5%, respectively. Furthermore, single p.o. administration of Ten-Cha extract, also showed a tendency to reduced these parameters of edema, ear weight and capillary permeability.

In vitro TNF production of the peritoneal macrophages obtained from ICR mice that had been treated with both Ten-Cha extract (200 mg/kg/day, p.o., 5 days) and proteose-pepton (i.p.) was significantly reduced when compared with that obtained from the animals treated with only proteose-pepton. In contrast, the TNF production of the alveolus macrophages obtained from the mice that had been treated with the Ten-Cha extract at the same conditions was not different from that obtained from untreated animals. These results indicate that Ten-Cha extract exerts anti-inflammatory effects and improvement of capillary permeability, suggesting that the effects may be, at least, partially explained by the reduction of endogenous cytokine production induced by Ten-Cha extract.

Zhi-bo Yang・Yoshiyuki Ishikura・
Kouich Hirai・Wataru Hujii・
Yoshihide Suwa・Takaharu Tanaka^{*1)},
Shigekatsu Kohno・Katsuya Ohata^{*2)}

key words : *Rubus suavissimus*, Ten-Cha,
croton oil, TNF, anti-inflammation,
capillary permeability

甜茶(Ten-Cha, 植物名: *Rubus suavissimus* S. Lee.) は, 中国南部地方の広西壮族自治区境内に生息しているバラ科植物であり^{1,2)}, 中国の植物学名は甘葉懸鈎子とよばれている³⁾. 本植物は, 日本に生息するユキノシタ科植物の甘茶(*Hydrangea serrata* Ser. Var. *thunbergii* Sugimoto, 異名も甜茶)とは同名であるが異種の植物であり⁴⁾, 日本の植物学名はゴショイチゴと命名されている^{5,6)}. 甜茶の葉は現地少数民族の人々に古くより愛飲されている中国茶の一種であり, 特に清熱潤肺, 除痰止咳などの作用があるとされて以来, 健康飲料として中国南部の広域に渡って愛飲されている生薬である. また, 最近では, 甜茶の葉は抗炎症作用があるらしいともいわれている.

そこで, 今回筆者らは, 甜茶葉の熱水抽出エキス(以下, 甜茶エキス)を用いて抗炎症作用を検討するとともに, 炎症に関与する内因性の発熱因子(endogenous pyrogen)⁷⁾とされる TNF(tumor necrosis factor)⁸⁻¹⁰⁾の産生に及ぼす影響についても検討した.

材料と方法

(1) 動物

7 週齢, 雄性 ICR マウス (SPF, 日本クレア) を購入し, specific pathogen free の環境下, 1 週間予備飼育したあと, 実験に供した.

(2) 甜茶エキスの投与

甜茶葉に 10 倍量の水を加え, 沸騰水浴中で 2 時間加熱して抽出液を得た. これを濃縮することにより回収率 25% の甜茶熱水抽出エキス (Ten-Cha extract, サントリー) を作成した. このエキスを純水に溶解後, マウスに単回もしくは 5 日間連続で経口投与した.

なお, 対照群には同容量の純水のみを, positive 対照群には 0.25% CMC に希釈した dexamethasone (Sigma) を経口投与した.

^{*1)} Health Science Laboratory, Consumer Health Products Department, Suntory Ltd., Mishima-gun, Osaka 618 サントリー(株)ヘルスケア事業開発部健康科学研究室

^{*2)} Department of Pharmacology, Kyoto Pharmaceutical University, Yamashina-ku, Kyoto 607 京都薬科大学薬理学教室

(3) クロトンの耳介炎症モデルの作成^{11,12)}

マウスの右耳介中央に 25 μ l/ear の 0.3% クロトン油 (Sigma) を塗布した。3 時間後、1% エバンスブルー (0.1 ml/10g body weight) を静脈内投与して、さらに 1 時間後に耳介を採取し、直径 8 mm の皮革打抜き用パンチを用いて中央部を打ち抜き、耳介重量を測定した。

また、耳介中における血管透過性の亢進の程度を調べるために、反応の指標としたエバンスブルーの浸出色素量を、Katayama らの方法¹³⁾ に準じて定量した。なお、エバンスブルーの色素量は μ g/ear として表示した。

(4) 腹腔マクロファージの採取、調整

10% W/V プロテオースペプトン (Difco) 0.5 ml/animal をマウスの腹腔内に投与して 4 日後、リン酸緩衝化生理食塩水で腹腔を洗浄することにより腹腔細胞を採取した。1500 rpm, 5 分、遠心後、RPMI 1640 培地に浮遊させた。37°C の CO₂ インキュベーター内で 2 時間培養したあと、付着したマクロファージを採取し、RPMI 1640 培地を用いて 5×10^5 macrophage/ml となるように浮遊させた。

(5) 肺泡マクロファージの採取、調整¹⁴⁾

気管支洗浄法により得られた肺泡細胞を上述と同様の処理によりマクロファージを採取、調整した。

(6) マクロファージの TNF 産生誘導

腹腔および肺泡マクロファージ浮遊液を 1 ml ずつ 24 ウェルプラスチックプレート (Falcon) に注入し、さらに、最終濃度 15 μ g/ml の lipopolysaccharide (LPS, Sigma) を添加し、37°C の CO₂ インキュベーター内で 12 時間培養した。培養後、1,500 rpm で 10 分間遠心して得られた上清を TNF 活性測定まで -20°C に凍結保存した。

(7) TNF 活性の測定

5% fetal calf serum (FCS) 含有 RPMI 1640 培地を用いて、マウス線芽肉腫由来の L929 細胞を 5×10^4 cells/ml に調製浮遊したあと、マイクロプレートの well 中に 100 μ l/well ずつ注入した。37°C の CO₂ インキュベーターで 24 時間培養することにより、細胞を well 面上に接着させた。この well 中の細胞に、1 μ g/ml アクチノマイシン D (Sigma) を含む 10% FCS-RPMI 1640 培地で 2

倍数希釈系列の被検液の 100 μ l/well を加えて、さらに 18 時間培養した。

培養終了後、上清を除去したプレート上の細胞を 0.2% クリスタルバイオレット (ナカライテスク) 含有 2% メタノール水溶液で 15 分間固定染色したあと、PBS で洗浄した。乾燥後、100 μ l/well の 0.5% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 水溶液を添加することにより細胞を溶解して、マイクロプレートリーダーにて 595 nm における吸光度を測定することにより、TNF 活性を定量した。

(8) TNF の活性単位

マクロファージの産生した TNF は、標準 TNF (SUN5051[®], サントリー) の検量線により得た値を JRU に換算して表示した。

結 果

(1) 甜茶エキスの耳介浮腫に及ぼす影響

クロトン油無処理マウスの耳介重量は 16.4 ± 0.5 mg であったが、クロトン油を処理したそれは 36.1 ± 1.6 mg と顕著に増加した。この反応に対して、dexamethasone 1 mg/kg を単回投与すると 74.2% の有意な抑制効果を示した。甜茶エキス 200 mg/kg の単回投与は、クロトン油処理 3 日、1 日および 1 時間前のいずれにおいても若干の抑制傾向を示し、薬物投与からクロトン油処理までの時間の延長に伴って抑制の減弱傾向が認められた (図 1)。

また、クロトン油処理 1 時間前に甜茶エキス 25 ~ 1,000 mg/kg の経口投与効果を検討したところ、25 および 50 mg/kg ではほとんど影響を及ぼさなかったが、100 mg/kg 以上の用量ではかなり強い抑制もしくは抑制傾向を示した (表 1)。一方、25 ~ 200 mg/kg/day の 5 日間連続投与 (最終投与はクロトン油処理の 1 時間前) は、ほぼ用量依存的な抑制もしくは抑制傾向を示し、特に 200 mg/kg/day の投与では浮腫による重量の増加を 51.8% と有意に抑制した。

(2) 甜茶エキスの耳介血管透過性亢進に及ぼす影響

クロトン油を処理する 1 時間前に dexamethasone 1 mg/kg を単回投与すると、クロトン油によるマウスの耳介血管透過性亢進作用は顕著な抑制効果を示した。25 ~ 1000 mg/kg の甜茶エキス

表 1 Effect of Ten-Cha extract on murine ear edema induced by croton oil

Treated with	No. of mice	Ear weight (mg/ear, mean $\pm$ SE)	Evans blue leakage (μ g/ear, mean $\pm$ SE)
Normal	7	18.3 $\pm$ 0.4	—
H ₂ O Control	7	29.7 $\pm$ 1.6	5.49 $\pm$ 0.72
Dexamethasone 1 mg/kg	7	21.2 $\pm$ 1.0*	0.80 $\pm$ 0.15*
Ten-Cha 25 mg/kg	5	29.2 $\pm$ 1.3	7.08 $\pm$ 1.58
Ten-Cha 50 mg/kg	5	27.0 $\pm$ 1.5	4.79 $\pm$ 1.02
Ten-Cha 100 mg/kg	5	26.0 $\pm$ 1.6	4.48 $\pm$ 0.32
Ten-Cha 200 mg/kg	5	24.8 $\pm$ 0.9*	4.06 $\pm$ 0.69
Ten-Cha 500 mg/kg	5	24.8 $\pm$ 1.1*	4.46 $\pm$ 0.68
Ten-Cha 1000 mg/kg	5	22.8 $\pm$ 2.1*	2.68 $\pm$ 1.40

Ten-Cha extract or dexamethasone was administered p.o. 1 hour before croton oil treatment at the indicated doses. * : Statistically significant difference from the control at $p < 0.05$ by Student's t-test.

図 1 Effect of Ten-Cha extract on croton oil-induced edema of the ear in ICR mice

Ten-Cha extract was po administered consecutively 5 days or singly at indicated doses before croton oil treatment. Each column represents the mean $\pm$ SE of five or seven animals.

* : Statistically significant difference from the control at $p < 0.05$ by Student's t-test.

の単回投与では、25 mg/kg で若干の増強傾向を示したが、50 mg/kg 以上ではいずれも抑制傾向を示し、1000 mg/kg では約 50%の抑制率であった(表 1)。

一方、甜茶エキス 25~100 mg/kg/day の 5 日間連続投与は血管透過性の亢進作用を若干抑制したが、有意ではなかった。しかし、200 mg/kg/day の投与では 76.5%と顕著に血管透過性亢進を抑制した。また、甜茶エキス 200 mg/kg をクロトン油塗布 1 時間前に単回投与しても有意な抑制は認められた(図 2)。

図 2 Effect of Ten-Cha extract on croton oil-induced vascular leakage of the ear in ICR mice

Ten-Cha extract was po administered consecutively 5 days or singly at indicated doses before croton oil treatment. Each column represents the mean $\pm$ SE of five or seven animals.

* : Statistically significant difference from the control at $p < 0.05$ by Student's t-test.

(3) 甜茶エキスのマクロファージの TNF 産生能に及ぼす影響

甜茶エキス 25 もしくは 200 mg/kg/day を 5 日間連続投与したマウスの肺胞マクロファージ、および、さらにプロテオースペプトン処理して得られた腹腔マクロファージを用いて、*in vitro* TNF 産生能を検討した。

その結果、表 2 に示すごとく、25 mg/kg/day の投与は、いずれのマクロファージの TNF 産生にも影響を及ぼさなかったが、200 mg/kg/day の投

表 2 Tumor necrosis factor (TNF) production by peritoneal and alveolar macrophages obtained from Ten-Cha extract-treated ICR mice

Dose of Ten-Cha extract	TNF production (JRU/ 5×10^5 macrophages)	
	Peritoneal macrophages	Alveolar macrophages
H ₂ O Control	188 $\pm$ 9.5	295 $\pm$ 33.2
25 mg/kg/day	194 $\pm$ 37.9	310 $\pm$ 17.8
200 mg/kg/day	125 $\pm$ 15.5*	340 $\pm$ 49.7

5×10^5 Macrophages were cultured with LPS (15 μ g/ml) and supernatants harvested after 12 hrs. TNF activity in the samples was assayed using L929 cell. Results was calculated by a standard curve of TNF shown in "Materials and Methods". Ten-Cha extract was consecutively administered p. o. at the indicated doses from Day-5 to Day-1 before macrophages harvest. Values represent the mean $\pm$ SE of twelve animals. *: Statistically significant difference from the control at $p < 0.05$ by Student's t-test.

与は腹腔マクロファージのそれを有意に抑制し、その抑制率は 33.5%であった。一方、同用量の投与では肺泡マクロファージの TNF 産生に対して抑制はみられず、むしろ若干の増強傾向を示した。

考 察

これまでに、バラ科植物である甜茶 (*Rubus suavissimus*) の葉は抗炎症作用があるらしいとされてきたが、実験的な証明はなされていない。そこで、筆者らは、甜茶葉からの熱水抽出エキスの抗炎症作用を明らかにする一環として、まずクロトン油で誘発されるマウス耳介炎症に対する効果について検討した。その結果、甜茶エキス 200 mg/kg/day の 5 日間連続投与は、浮腫および血管透過性亢進に対して有意かつ顕著な抑制効果を示した。これらの抑制効果は甜茶エキス単回投与によっても認められたが、5 日間の連続投与に比して弱かった。この成績は、甜茶エキスが炎症に対する直接的な抑制作用のみならず、生体内になんらかの変化を誘起し、炎症に対する抵抗性を予め獲得させる作用を有する可能性が示唆される。

一方、炎症反応や免疫応答に関与するエフェクター細胞の増殖活性化、さらに炎症反応そのものにもサイトカインが重要な役割を果たすことが知られ^{15,16)}、なかでも interleukin 1 (IL-1), tumor

necrosis factor (TNF) などのサイトカインは炎症反応に深く関与するとされ¹⁷⁻¹⁹⁾、これらのサイトカインの活性を抑制することは抗炎症作用につながる事が強く示唆されている^{20,21)}。そこで、つぎに予めマウスに連日経口投与した甜茶エキ스가プロテオースペプトンにより遊走(活性化)した腹腔マクロファージの TNF 産生能に対して影響を及ぼすか否かを *in vitro* 実験により検討した。25 mg/kg/day の 5 日間連続投与は TNF 産生にほとんど影響を及ぼさなかったが、200 mg/kg/day では明らかな抑制作用が認められた。興味あることに、これらの投与量では肺泡に常在し、非刺激下に得られた肺泡マクロファージの TNF 産生に対しての抑制は認められず、むしろ増強傾向を示した。

従来、TNF は生体内の抗腫瘍因子であり、癌治療への応用が期待されている²²⁾が、TNF は抗腫瘍作用のみならず、多彩な生物活性を示すことも明らかになりつつある²⁵⁾。特に、TNF が慢性感染症に見られるさまざまな代謝異常の原因といわれたカエクチンと同一物質であることが明らかにされて以来^{23,24)}、感染症の病態においても重要な役割を演じているとされ、また、炎症巣において活性化されたマクロファージから放出される IL-1 および TNF は、局所で血管透過性を亢進するばかりでなく、全身的にも種々の影響を及ぼすことが知られている。さらに、急性期炎症時の発熱、多核白血球増多などの全身反応も IL-1 および TNF によって引き起こされる^{7,26)}。

一般に、炎症は恒常性を維持するために必要な防御反応である²⁷⁾が、過度の反応性は病的な状態をもたらす。今回得られた甜茶葉エキスの抗炎症作用は、正常状態で得られたマクロファージの TNF 産生を抑制することなく、炎症時におけるそれを抑制することが強く示唆された点に大きな意義を有するものと考えられる。

今後、さらに種々の炎症モデルに対する効果、その効果における詳細なメカニズムの解明、有効成分の同定に興味がもたれる。

文献

- 1) Gao, F., Chen, F. H., Tanaka, T., Kasai, R., Seto, T., Tanaka, O.: 19- α hydroxyursane-type

- triterpene glucosyl esters from the roots of *rubus-suavissimus*. Chem. Pharm. Bull. 33 : 37-40, 1985.
- 2) Ohtani, K., Aikawa, Y., Ishikawa, H., Kasai, R., Kitahata, S., Mizutani, K., Doi, S., Nakaura, M., Tanaka, O. : Further study on the 1,4- α -transglucosylation of rubusoside, a sweet steviol-bisglucoside from *rubus suavissimus*. Agric. Biol. Chem. 55 : 449-453, 1991.
 - 3) Hirono, S., Chou, W. H., Kasai, R., Tanaka, O., Tada, T. : Sweet and bitter diterpene-glucosides from leaves of *rubus suavissimus*. Chem. Pharm. Bull. 38 : 1743-1744, 1990.
 - 4) 上海科学技術出版社・編 : 中薬大辞典. 小学館, 1985, p1865-1866.
 - 5) 三橋 博 : 原色牧野和漢薬草大図鑑. 北隆館, 1988 p189.
 - 6) Tanaka, T., Kawamura, K., Kitahara, T., Kohda, H., Tanaka, O. : Ent-labdane-type diterpene glucosides from leaves of *rubus chingii*. Phytochem. 23 : 615-621, 1984.
 - 7) Dinarello, C. A., Cannon, J. G., Wolff, S. M., Bernheim, H. A., Beutler, B., Cerami, A., Figari, I. S., Palladino, M. A. Jr., O'Conoor, J. V. : Tumor-necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. J. Exp. Med. 163 : 1433-1450, 1986.
 - 8) Granger, G. A., Williams, T. W. : Lymphocyte cytotoxicity *in vitro*. Activation and release of a cytotoxic factor. Nature 218 : 1253-1255, 1968.
 - 9) Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B. : An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 : 3666-3670, 1975.
 - 10) Pennica, D., Nedwin, G. E., Hayflick, J. S., Seeburg, P. H., Derynck, R., Palladino, M. A., Kohr, W. J., Aggarwal, B. B., Goeddel, D. V. : Human tumor necrosis factor : precursor structure expression and homology to lymphotoxin. Nature 312 : 724-729, 1984.
 - 11) Swingle, K. F., Reiter, M. J., Schwartzmiller, D. H. : Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammation of the mouse ear and their modification by topically applied drugs. Arch. Int. Pharmacodyn. 254 : 168-176, 1981.
 - 12) Tubaro, A., Dri, P., Delbello, G., Zilli, C., Della Loggia, R. : The croton oil ear test revisited. Agents Actions 17 : 347-349, 1985.
 - 13) Katayama, S., Shinoyama, H., Ohtake, S. : A new method for extraction of extravasated dye in the skin and influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. Microbiol. Immunol. 22 : 89-101, 1978.
 - 14) 高須賀直美, 赤川清子 : 肺胞マクロファージ. マクロファージ実験マニュアル. (徳永 徹, 吉田 彪, 赤川清子・編), 講談社サイエンティフィク, 1992, p 18-21.
 - 15) 高津聖志 : サイトカインと炎症. 炎症 13 : 103-112, 1993.
 - 16) Larrick, J. W., Wright, S. C. : Native cytokine antagonists. Baillieres Clin. Haematol. 5 : 681-702, 1992.
 - 17) Brahn, E., Peacock, D. J., Banquerigo, M. L., Liu, D. Y. : Effects of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) on collagen arthritis. Lymphokine Cytokine Res. 11 : 253-256, 1992.
 - 18) Cunha, F. Q., Poole, S., Lorenzett, B. B., Ferreira, S. H. : The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. Br. J. Pharmacol. 107 : 660-664, 1992.
 - 19) Franks, W. A., Limb, G. A., Stanford, M. R., Ogilvie, J., Wolstencroft, R. A., Chignel, A. H., Dumonde, D. C. : Cytokines in human intraocular inflammation. Curr. Eye Res. 11 : 187-191, 1992.
 - 20) Borish, L., Williams, J., Johnson, S., Mascali, J. J., Miller, R., Rosenwasser, L. J. : Anti-inflammatory effects of nedocromil sodium : inhibition of alveolar macrophage function. Clin. Exp. Allergy 22 : 984-990, 1992.
 - 21) Snyder, P. S., Unanue, E. R. : Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and interleukin 1 production. J. Immunol. 129 : 1803-1807, 1982.
 - 22) Old, L. J. : Tumor necrosis factor (TNF). Science 230 : 630-632, 1985.
 - 23) Beutler, B., Cerami, A. : Cachectin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. Nature 320 : 584-588, 1986.
 - 24) Beutler, B., Cerami, A. : Cachectin : more than a tumor necrosis factor. N. Engl. J. Med. 316 : 379-385, 1987.
 - 25) Chouaib, S., Robinet, E., Zyad, A., Branellec, D. : Tumor necrosis factor : pleiotropic cytokine. Bull. Cancer Paris 79 : 935-949, 1992.
 - 26) Rampart, M., Smet, W. D., Flers, W., Herman, A. G. : Inflammatory properties of recombinant tumor necrosis factor in rabbit skin *in vivo*. J. Exp. Med. 169 : 2227-2232, 1989.
 - 27) Oppenheim, J. J., Potter, M. : Immunity and inflammation. Cellular Functions in Immunity and Inflammation. (ed. Oppenheim, J. J., Rosenstreich, D. L., Potter, M.), Elsevier, 1981, p 1-28.