マウス脾臓リンパ球における抗体およびサイトカイン産生に及ぼす 菊抽出液の影響

荒巻文香, 児林聡美, 大石文菜, 立花宏文, 山田耕路[§]

九州大学大学院農学研究院

Effect of Chrysanthemum Flower Extract on Immunoglobulin and Cytokine Production by Mouse Spleen Lymphocytes

Fumika Aramaki, Satomi Kobayashi, Ayana Oishi, Hirofumi Tachibana and Koji Yamada[§]

Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581

To clarify immunoregulatory activity of a *chrysanthemum* flower extract, the effect on immunoglobulin or cytokine production in mouse spleen lymphocytes was examined. When the lymphocytes were cultured with the extract, the IgA, IgG and IgM production was suppressed in the presence of the extract diluted with phosphate buffered saline by 9 fold. At lower concentrations, a weak stimulation of the IgM production was observed. In addition, significant suppression of IFN- γ production was observed in the 729-fold diluted extract. But was hardly detected in the 27-fold or less diluted solution. The significant suppression of IL-4 production was also observed in the 27-fold or more diluted solution during the 24 hr culture, with slight effect after the 48 hr culture. Gel filtration chromatography of the extract provided different fractions suppressing and facilitating the IFN- γ production. These results show that there were both suppression and facilitation factors of the cytokine production in the mouse spleen lymphocytes in the *chrysanthemum* flower extract.

(Received Jan. 7, 2004 ; Accepted Mar. 9, 2004)

これまで、食品成分が種々の生体調節機能を有することが報告されている。例えば、多価不飽和脂肪酸は脂質代謝および免疫調節機能に加え¹⁾、癌細胞選択毒性を発現することが報告されている²⁾。また、多価不飽和脂肪酸の摂取が、脂質代謝調節、免疫調節、制癌などの生理機能を発現することが報告されている^{3)~5)}。同様な機能は、抗酸化ビタミンやポリフェノールのような低分子成分にも、見出されている⁶⁾⁷⁾。これらの食品成分が有する多機能性は、様々な疾病の予防につながることが期待されている。

キク科植物は古くから薬用植物として利用されており、生理活性物質の給源として重要である。しかしながら、その生理活性物質の同定はほとんど進んでおらず、現在も探索が続けられている^{8)~10)}。不知火姫菊は、熊本県不知火町の限られた地域で栽培されているキク科植物であり、形態的に既存のキク科植物と異なるが、その種属の決定がなされていないため学名も付与されていない。この植物の花卉乾燥物を水もしくは日本酒で煎じたものが糖尿病や癌に有効であるとして、伝承的に利用されているが、その生理作用、生理活性物質および作用機構などについては全く明らか

かにされていない。

本研究では、不知火姫菊の生体調節機能の解明を目的として、免疫機能に及ぼす影響について検討した。

実 験 方 法

1. 試 料

不知火姫菊の乾燥花卉は有明通商(株)(熊本)より供給された。実験動物はセアック吉富(福岡)から購入した8週齢のC57BL/6N雄マウスを用いた。

ウシ胎児血清(FBS)は、Biofluid社(Rockville, MD)より、基本合成培地RPMI-1640は日水製薬(東京)より購入した。リンパ球の増殖刺激に用いたリボポリサッカライド(LPS)は、Sigma社(St. Louis, MO)より購入した。

2. 菊抽出液の調製

生理リン酸緩衝液(PBS)抽出液の調製は荒巻らの方法¹¹⁾で行った。紫外可視スペクトルはShimadzu UV160-A(島津製作所, 京都)を用いて測定した。

3. リンパ球の分離および培養

8週齢のC57BL/6N雄マウスから脾臓を採取し、Limらの方法に従い、リンパ球を分離した¹¹⁾。分離したリンパ球を5% FBS-RPMI1640培地で 2×10^6 cells/mLに調整

〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎 6-10-1

[§] 連絡先 (Corresponding author), yamadako@agr.kyushu-u.ac.jp

し、菊抽出液を培地の 10% 量添加した後、37℃ に設定した 5% CO₂ インキュベーター中で 24 もしくは 48 時間培養し、培養上清を回収した。リンパ球の増殖刺激には、終濃度 2.5 μg/mL の LPS を用いた。

4. 抗体量およびサイトカイン量の測定

培養上清の抗体レベルの測定は Lim らの方法¹²⁾ に従い、サイトカインレベルの測定は Yamasaki らの方法¹³⁾ に従い酵素抗体法により行った。

5. 菊抽出液の分画

TSK-GEL G2000SW (東ソー株式会社, 東京) カラムを用いて、菊抽出液の分画を行った。移動相は PBS を用い、菊抽出液 500 μL を注入して、流速 0.5 mL/min で分画した。検出は紫外検出器を用い、280 nm でクロマトグラムを得た。溶出時間は 72 分間で、各フラクションは 3 mL ずつ、フラクションコレクターで回収した。

無添加区と試験区の有意差検定には Student's *t* 検定を用いた。図には危険率 0.5% 以下で有意差が得られた場合にアステリスクを付与した。

実験結果および考察

1. 抗体産生に及ぼす影響

マウス脾臓リンパ球を種々の菊抽出液の存在下で 24 時間培養した後、培養上清中の各抗体の濃度を測定した。表

1 に、LPS 存在下もしくは非存在下におけるマウス脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす菊抽出液の濃度依存的影響を示した。菊抽出物は LPS の有無に関らず 9 倍希釈液から IgA 産生抑制効果を示した。IgG 産生は、LPS の有無に関らず 3 倍希釈液から顕著な抑制効果が認められた。IgM 産生は 243 倍から 9 倍希釈液の存在下で、LPS 刺激していない細胞で有意な増加が観察されたが、3 倍希釈液から LPS の有無に関らず抑制効果が認められた。LPS は B 細胞を抗体産生細胞へと分化させる働きがあり、LPS の有無に関らず高濃度の菊抽出液の存在下でリンパ球の抗体産生抑制効果がみられたことから、菊抽出液は LPS 誘導性の抗体産生機構とは異なる作用機構で抑制することが示唆された。なお菊抽出液の原液を添加した場合、マウス脾臓リンパ球に対して細胞毒性を示したが、3 倍希釈液以上の添加においては菊抽出液による細胞毒性は見られなかった。

IgA, IgG および IgM は生体防御免疫において、抗原の吸収阻害あるいは抗原の排除に重要な役割を果たしている。ペクチン、グルコマンナン、ガラクトマンナン、キトサンなどの水溶性食物繊維を経口投与すると、Sprague-Dawley ラット血清中の IgA レベルが上昇し、脾臓や腸間膜リンパ節のリンパ球の IgA 産生能が上昇することが報告されている¹⁴⁾。これらの食物繊維は、リンパ球の IgA 産生を直接増強することはできないが¹⁵⁾、茶ポリフェノール

表 1 マウス脾臓リンパ球の抗体産生に及ぼす菊抽出液の濃度依存的効果

希釈倍率	IgA (ng/mL)		IgG (ng/mL)		IgM (ng/mL)	
	LPS (−)	LPS (+)	LPS (−)	LPS (+)	LPS (−)	LPS (±)
None	3.50±0.89	6.13±0.30	14.1±0.5	23.7±0.4	0.22±0.00	1.95±0.17
729	4.84±0.48	6.85±0.85	14.1±0.6	21.7±1.0*	0.22±0.02	2.02±0.04
243	3.40±1.28	6.82±0.11*	14.5±0.5	23.6±0.7	0.25±0.02*	1.98±0.06
81	2.96±1.25	5.47±0.20*	15.5±0.4*	22.8±0.6	0.26±0.02*	2.05±0.06
27	2.71±0.80	5.87±1.19	15.0±1.3	21.8±0.5**	0.29±0.01**	2.12±0.16
9	1.74±0.24*	5.00±0.36*	13.2±0.3	21.8±0.6**	0.28±0.01**	1.96±0.03
3	1.14±0.33*	2.74±1.13**	8.7±0.6***	13.3±0.3***	0.10±0.00***	1.38±0.00**
1	0.64±0.43**	1.30±0.50***	5.3±0.2***	7.3±0.2***	0.05±0.01***	0.79±0.00***

n=3, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001

表 2 マウス脾臓リンパ球のサイトカイン産生に及ぼす菊抽出液の濃度依存的効果

	IFN-γ (ng/mL)		IL-4 (ng/mL)	
	24 h	48 h	24 h	48 h
None	10.11±0.46	14.81±0.55	0.36±0.06	0.22±0.04
729	8.10±0.64*	12.02±0.26**	0.31±0.14	0.18±0.02
243	5.58±0.16***	11.51±0.26***	0.39±0.09	0.19±0.03
81	7.82±0.14**	11.02±0.21***	0.43±0.07	0.55±0.10**
27	2.50±0.09***	4.70±0.32***	0.01±0.00***	0.22±0.12
9	0.00±0.00***	0.00±0.00***	0.01±0.00***	0.19±0.18
3	0.00±0.00***	0.00±0.00***	0.01±0.00***	0.08±0.07*
1	0.00±0.00***	0.00±0.00***	0.13±0.05**	0.24±0.10

n=3, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001

図 1 菊抽出液のゲル濾過クロマトグラムおよびフラクション 3, 7 の紫外可視スペクトル

TSK-GEL G2000SW を用い、流速 0.5 mL/min で 500 μ L の菊抽出液を分画した。検出は紫外検出器を用い、280 nm でクロマトグラムを得た。クロマトグラムに記載している数字は、フラクション 1 から 8 の保持時間である。Fraction 3 および 7 の紫外可視スペクトルは、吸光光度計を用いて測定した。

BSA, Bovine serum albumin (M.W. 66 000) ; OVA, Ovalbumin (M.W. 45 000) ; STI, Soybean trypsin inhibitor (M.W. 20 100) ; Insulin, (M.W. 5 700) ; Tryptophan, (M.W. 204).

などの低分子成分は IgA 産生を直接刺激することが知られている¹⁶⁾。表 1 の結果より、菊抽出液は LPS の有無に関らず各抗体の産生抑制効果を示していることから、菊抽出液中の低分子成分が抗体産生機構に対して抑制作用を発現していることが示唆された。

2. サイトカイン産生に及ぼす影響

リンパ球においては、B 細胞が抗体産生機能を有しており、T 細胞は B 細胞の機能を調節することが示されている。T 細胞やその他の免疫関連細胞が産生するサイトカイ

ンは、T 細胞や B 細胞の活性調節に重要な役割を果たしている。抗体産生を促進するヘルパー T (Th) 細胞はサイトカイン産生パターンにより 2 つの種類に分けられている。すなわち、Th1 細胞は IFN- γ などの細胞性免疫を刺激するサイトカインを産生し、Th2 細胞は IL-4 などの B 細胞の抗体産生を刺激するサイトカインを産生する。したがって、Th1 と Th2 細胞のバランスは、様々な免疫疾患の発症に関与していると考えられている¹⁷⁾。そこで、マウス脾臓リンパ球の IFN- γ および IL-4 産生に及ぼす菊抽出液の効

図 2 各フラクションがマウス脾臓リンパ球の IFN- γ 産生に及ぼす影響

各フラクションの原液を培養液の 10 分の 1 量添加して 24 時間培養後、IFN- γ 産生に及ぼす影響を検討した。

($n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

各フラクションの 280 および 330 nm の吸光度を測定した。

果について検討した。

マウス脾臓リンパ球を種々の菊抽出液の存在下で 24 もしくは 48 時間培養した後、培養上清中の IFN- γ と IL-4 レベルを測定した。表 2 に示したように、729 倍希釈液から IFN- γ レベルの有意な減少が観察され、27 倍希釈以上では著しい抑制が認められた。24 時間培養した後の培養上清中の IL-4 レベルは、27 倍希釈液以上で顕著な低下が観察されたが、原液の存在下では阻害活性が減弱した。また 48 時間培養上清中では IL-4 産生量は無処理群と同レベルであった。菊抽出液の原液添加の場合、マウス脾臓リンパ球に対して細胞毒性が認められ、リンパ球の生存率の低下によって細胞内に蓄積された IL-4 が培養上清中に放出されたため、IL-4 濃度の上昇がみられたと思われる。これらの結果は、菊抽出液中には IFN- γ および IL-4 産生を抑制する因子が含まれているがその作用パターンが異なることを示している。81 倍希釈液の存在下で 48 時間培養した場合には、IL-4 レベルの有意な上昇が観察されており、IL-4 産生増強因子が存在する可能性も認められた。これらの結果から、菊抽出液は濃度の違いにより IL-4 産生に及ぼす影響が異なることが示唆された。

3. 菊抽出液の分画

次に、菊抽出液中の免疫調節因子の分画を試みた。図 1 に TSK-Gel G200SW ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて菊抽出液を分画した結果を示した。菊抽出液は、約 20.2, 22.8, 23.4, 24.6, 29.3, 32.4, 41.1, 48.1 分に 8 つのピークを与えた。しかし、図 1 に示してあるように、これらのピークは 330 nm に吸収極大を示し、いずれも同質の着色物質を含むことが示唆された。また、アミノ酸等の低分子物質の流出以降にもピークが観察され菊抽出液の成分はゲル濾過担体と何らかの相互作用があることが示唆された。その結果これらのピークの分子量を推定することができなかった。

表 2 で、マウス脾臓リンパ球における IFN- γ 産生を菊抽出液が濃度依存的に抑制する結果が得られたため、菊抽出液の TSK-Gel G200SW ゲル濾過分離により得られた 12 の画分がマウス脾臓リンパ球の IFN- γ 産生に及ぼす影響を検討し、図 2 に示した。画分 3 および 4 の存在下では IFN- γ 産生が有意に抑制され、10 および 11 の存在下では有意な促進が観察された。以上の結果は、菊抽出液中には IFN- γ 産生抑制因子だけでなく、促進因子も存在することを示唆している。

IL-4 産生の促進は、IgE 産生の誘導を通じて I 型アレルギー応答を促進する。一方、IFN- γ は IgE 産生を抑制するとともに細胞性免疫を増強し、生体防御免疫を活性化することが知られている。菊抽出液中にはこれらのサイトカイン産生を抑制する因子と促進する因子の両方が含まれている可能性があり、その分離、精製および生理的意義の確認が今後の課題である。

要 約

菊抽出液の免疫調節機能を明らかにするため、マウス脾臓リンパ球の抗体およびサイトカイン産生に及ぼす影響について検討した。菊抽出液は、IgA, IgG および IgM 産生を 9 倍希釈液から抑制したが、低濃度領域では IgM 産生を若干促進した。また菊抽出液は IFN- γ 産生に対して 729 倍希釈液から抑制効果を示し、27 倍希釈液から強い抑制効果を示した。IL-4 産生は 24 時間培養では、27 倍希釈液以上で強い抑制効果が誘導されたが、48 時間培養液では抑制効果の減弱が認められた。菊抽出液のゲル濾過分画においては IFN- γ 産生を抑制する画分と促進する画分が得られた。これらの結果は、菊抽出液中にはマウス脾臓リンパ球のサイトカイン産生を抑制する因子と促進する因子が存在することを示唆している。

文 献

- 1) Hung, P., Gu, J.Y., Kaku, S., Yunoki, S., Ohkura, K., Ikeda, I., Tachibana, H., Sugano, M., Yazawa, K. and Yamada, K., Dietary effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid esters on lipid metabolism and immune parameters in Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **64**, 2588-93 (2000).
- 2) Begin, M.E., Ells, G., Das, U.N. and Horrobin, D.F., Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *J. Natl. Cancer Inst.*, **77**, 1053-1062 (1986).
- 3) Hara, K., Onizawa, K., Honda, H., Otsuji, K., Ide, T. and Murata, M., Dietary diacylglycerol-dependent reduction in serum triacylglycerol concentration in rats. *Ann Nutr. Metab.*, **37**, 185-91 (1993).
- 4) Gu, J.Y., Wakizono, Y., Dohi, A., Nonaka, M., Sugano, M. and Yamada, K., Effect of dietary fats and sesamin on the lipid metabolism and immune function of Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**, 1917-24 (1998).
- 5) Chen, J., Stavro, P.M. and Thompson, L.U., Dietary flaxseed inhibits human breast cancer growth and metastasis and downregulates expression of insulin-like growth factor and epidermal growth factor receptor. *Nutr. Cancer.*, **43**, 187-92 (2002).
- 6) Kaku, S., Yunoki, S., Mori, M., Ohkura, K., Nonaka, M., Sugano, M. and Yamada, K., Effect of dietary antioxidants on serum lipid contents and immunoglobulin productivity of lymphocytes in Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 575-6 (1999).
- 7) Suzuki, M., Yoshino, K., Maeda-Yamamoto, M., Miyase, T. and Sano, M., Inhibitory effects of tea catechins and O-methylated derivatives of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate on mouse type IV allergy. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5649-53 (2000).
- 8) Radic, A., Akihisa, T., Ukiya, M., Yasukawa, K., Sandeman, R.M., Chandler, D.S. and Polya G.M., Inhibition of trypsin and chymotrypsin by anti-inflammatory triterpenoids from Compositae flowers. *Planta Med.*, **67**, 599-604 (2001).
- 9) Ukiya, M., Akihisa, T., Tokuda, H., Suzuki, H., Mukainaka, T., Ichiishi, E., Yasukawa, K. and Nishino, H., Constituents of Compositae plants III. Anti-tumor promoting effect and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers. *Cancer Lett.*, **177**, 7-12 (2002).
- 10) Wang, S.Y., Chang, H.N., Lin, K.T., Lo, C.P., Yang, N.S. and Shyur, L., Antioxidant properties and phytochemical characteristics of extract from *Lactuca indica*. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 1506-1512 (2003).
- 11) 荒巻文香, 大石文菜, 音成道彦, 内藤聖子, 劉 忠峰, 立花宏文, 山田耕路. 各種癌細胞株の増殖に及ぼす菊花弁抽出液の影響. *食科工*, **50**, 493-497 (2003).
- 12) LIM, B.O., Yamada, K. and Sugano, M., *Cell Develop. Biol.*, **30**, 407-413 (1994).
- 13) Yamasaki, M., Ikeda, A., Hirao, A., Tanaka, Y., Miyazaki, Y., Rikimaru, T., Shimada, M., Sugimachi, K., Tachibana, H. and Yamada, K., Effect of dietary conjugated linoleic acid on the in vivo growth of rat hepatoma dRLh-84. *Nutr. Cancer.*, **40**, 140-8 (2001).
- 14) Yamada, K., Tokunaga, Y., Ikeda, A., Ohkura, K., Mamiya, S., Kaku, S., Sugano, M. and Tachibana, H., Dietary effect of guar gum and its partially hydrolyzed product on lipid metabolism and immune function of Sprague-Dawley rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **63**, 2163-2167 (1999).
- 15) Lim, B.O., Yamada, K., Nonaka, M., Kuramoto, Y., Hung, P. and Sugano, M., Dietary fibers modulate indices of intestinal immune function in rats. *J. Nutr.*, **127**, 663-667 (1997).
- 16) Yamada, K., Watanabe, T., Kaku, S., Hassan, N. and Sugano, M., Effects of tea extracts and phenolic compounds on immunoglobulin production by mesenteric lymph node lymphocytes of Sprague-Dawley rats. *Food Sci. Technol. Int.*, **3**, 179-183 (1997).
- 17) Kidd, P., Th1/Th2 balance : the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.*, **8**, 223-46 (2003).

(平成 16 年 1 月 7 日受付, 平成 16 年 3 月 9 日受理)