ヘルパー T 細胞のサイトカイン産生とアレルギーに対する フトモモ科植物シジウムからの抽出成分の影響

小菅 崇,^a 宋倉弘記,^a 北中 進,^b 豊島 聡^{*a}
星薬科大学学生化学教室,^a 日本大学薬学部^b

Effects of Psidium Components on Cytokine Productions in Helper T Cells and Type-I Allergy

Takashi KOSUGE,^a Hiroki SHISHIKURA,^a Susumu KITANAKA,^b and Satoshi TOYOSHIMA^{*a}
Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, Hoshi University,^a 4-41, Ebara 2-chome,
Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan and College of Pharmacy, Nihon University,^b
7-71, Narashinodai 7-chome, Funabashi-shi, Chiba 274-8555, Japan

(Received November 17, 1999; Accepted December 29, 1999)

Psidium genus Myrtaceae (*Psidium*) is known to be a chinese medicine with an anti-allergy effect. In the present study, to identify active components in *Psidium* and investigate mechanisms of its anti-allergy effect, effects of several components isolated from *Psidium* on cytokine production in helper T cell subtypes, Th1 and Th2 cells, were studied. All components, except methyl gallate, suppressed cytokine production in both Th1 and Th2 cells. Then, effects of methyl gallate on IgE production in a model mouse with type I allergy were studied. Methyl gallate suppressed IgE production in the mouse. Only methyl gallate selectively suppressed Th2-cytokine production.

Key words—*Psidium* genus Myrtaceae; methyl gallate; type I allergy; helper T cell; IgE

緒 言

近年、アレルギー疾患に悩む患者は増加の一途をたどっており、効果的で安全な予防法及び根本的な治療法が求められている。アレルギー疾患のような慢性疾患の予防あるいは治療に用いる薬物には、特に副作用が弱いことが要求されることから、民間薬や漢方製剤等で用いられている天然薬物はその有力な候補である。現在、諸種生薬に抗アレルギー作用が認められており、^{1,2)} 南米原産のフトモモ科シジウム属植物の一種シジウム (*Psidium* genus Myrtaceae) もその1つである。³⁾ 民間において、シジウムは主にその葉の部分を茶剤や入浴剤として使用され、アトピー性皮膚炎、花粉症、アレルギー性鼻炎等のアレルギー疾患に対し効果があるといわれてきた。

一方、免疫反応において中心的役割を担う細胞である CD4⁺ ヘルパー T 細胞は、産生するサイトカインの違いによって Th1 及び Th2 と呼ばれる2つの細胞群に大別される。⁴⁻⁷⁾ Th1 細胞は interleukin (IL)-2⁸⁾ や interferon-gamma (IFN- γ)^{9,10)} を産生し主に細胞性免疫に関与し、一方 Th2 細胞は IL-4¹¹⁻¹³⁾ や IL-5¹⁴⁾ を産生し主に体液性免疫に関与すると考えられている。¹⁵⁾ 生体内における免疫調節の恒常性はこのヘルパー T 細胞の2つの細胞群のバランスによって保たれていると考えられ、さらにこの Th

1/Th2 バランスはサイトカインを介して制御されているといわれている。アレルギー疾患においては Th1/Th2 バランスが崩れ、特に I 型アレルギーにおいては IgE 抗体の産生を惹起・増強する IL-4 及び IL-5 を産生する Th2 細胞の方が優位になることが分かっている。そこで、免疫学的側面から見ると、Th1 細胞のサイトカイン産生には影響を及ぼさず、Th2 細胞のサイトカイン産生、とりわけ IgE 抗体の産生を増強する IL-4¹⁶⁻¹⁹⁾ に対して選択的な産生抑制作用を有する物質は有効な抗アレルギー薬となり得ると考えられる。

本研究では、天然物シジウムの抗アレルギー作用の本態である物質を同定し、その作用機序を調べるため、まずマウス Th1 及び Th2 細胞株による諸種サイトカイン (IFN- γ , IL-4 及び IL-5) の産生に対するシジウム抽出物及び抽出物から単離された化合物の影響について検討した。

次に、その結果最も有用と考えられた化合物 methyl gallate の *in vivo* 抗体産生系への影響を調べた。すなわち、低用量 KLH で免疫した I 型アレルギーモデルマウスの抗体 (IgE 及び IgG₁) 産生系に対する methyl gallate の継続的投与の影響について検討した。

材料と方法

シジウムからの各種分画物の抽出及び同定方法

シジウムの葉を室温にて 80% 含水アセトンで 2 回超音波浴中抽出し、40°C にて減圧下濃縮し、80% アセトンエキスを作成した (PG: Psidium 80% acetone ext.). このエキスを Diaion HP-20 に付し、水、20%, 40%, 70%, 100% メタノール及びアセトンで抽出した。それらの抽出物のうち最もヒスタミンの遊離抑制活性の高かった 20% メタノール画分について ODS, Sephadex LH-20, MCI gel CHP 20, Ptoyopearl HW-40C のカラムクロマトを繰り返し 4 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、PGB 1: tellimagrandin I, PGB-2: casuarinin, PGB-5: methyl gallate, KKPG-1: castalagin とそれぞれ同定した。また PG BW はシジウムの葉を熱水抽出することにより得た。

T 細胞クローンの刺激・培養

Th1 細胞株 (35-9D; C57BL/6 マウス由来 Th1 クローン) 及び Th2 細胞株 (D10.G4.1; AKR マウス由来 Th2 クローン) は細胞濃度を 2×10^5 個/ml とし、あらかじめ抗マウス CD3 ϵ 抗体 (Anti-Mouse-T3 complex (CD3 ϵ) Monoclonal Antibody-Ascites, Hornby 社) をプレートコートした 48 穴平底プレートにて各種シジウム抽出物あるいは methyl gallate の存在下、10% ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum, HyClone 社) を含む RPMI 1640 で 2 日間培養した。2 日後、採取した培養上清を遠心分離し、遠心上清をサイトカイン定量用の試料とした。

KLH 免疫 I 型アレルギーモデルマウスの作成と Methyl Gallate の継続的投与

KLH (Sigma 社) は滅菌生理食塩水により 0.1 mg/ml に調製し水酸化アルミニウムゲルアジュバンド (alum, LSL 社) に吸着させ 0.5 μ g KLH $\cdot$ 10 mg alum/ml 溶液を作成した。Methyl gallate (和光純薬工業) は滅菌生理食塩水に溶解し、それぞれ 0.01, 0.1, 1 及び 10 mg/ml の濃度に調製した。生後 6 週齢の CBA/J マウスに 0.5 μ g KLH $\cdot$ 10 mg alum/ml 溶液を 0.2 ml ずつ 2 週間毎に 5 回腹腔内投与した。一群 6 匹の KLH 免疫マウスに対し、初回免疫より 7 日目から 1 日おきに methyl gallate 生理食塩溶液を 0.1, 1, 10 あるいは 100 mg/kg の用量で腹腔内投与した。初回免疫より 70 日目にジエチルエーテル麻醉下、心臓採血を行い、同時に脾臓を摘出した。採取した血液は 37°C で 2 時間放置した後、血餅を取り除き、遠心分離を行い血清を得た。

サイトカイン及び抗体の定量

培養上清中の各サイトカイン及び血清中の IgE と IgG₁ の定量はサンドウィッチ酵素免疫測定法 (ELISA 法) により行った。サンドウィッチ ELISA 法の固相化抗体には抗 IFN- γ 抗体 (R4-6A2, rat

IgG₁), 抗 IL-4 抗体 (11B11, rat IgG₁), 抗 IL-5 抗体 (TRFK5, rat IgG₁), 抗 IgE 抗体 (R35-72, rat IgG₁) 及び抗 IgG₁ 抗体 (A85-3, rat IgG_{2a}) を用い、検出抗体には抗 IFN- γ 抗体 (XMG1.2, rat IgG₁), 抗 IL-4 抗体 (BVD6-24G2, rat IgG₁), 抗 IL-5 抗体 (TRFK4, rat IgG_{2a}), 抗 IgE 抗体 (R35-118, rat IgG₁) 及び抗 IgG₁ 抗体 (A85-1, rat IgG₁) を用いた。以上の抗体はいずれも PharMingen 社製のものを購入した。

結果と考察

シジウムからの単離成分のヘルパー T 細胞サイトカイン産生に対する影響

古来よりシジウムは民間において茶剤や入浴剤として使用され、アトピー性皮膚炎、花粉症、アレルギー性鼻炎等のアレルギー疾患に効果があるとされてきた。本研究において我々は免疫生化学的手法により、シジウム含有成分の抗アレルギー作用について検討した。多くのアレルギー反応においては、ヘルパー T 細胞のサブタイプである Th1 細胞と Th2 細胞とのバランスが崩れ、一方が優位な状態に傾く現象が見られる。健康人において Th1/Th2 バランスは一定に保たれるが、アレルゲンとなる外因性抗原に暴露されるとサイトカイン産生のバランスの崩れを介し Th1/Th2 バランスが一方に傾き、結果的に諸種アレルギー症状を生じる。そこで抗アレルギー薬には、一方に傾いた Th1/Th2 バランスを正常な方向へ戻す作用が望まれる。そこで我々はまず、C57BL/6 マウス由来 Th1 細胞株 35-9D 及び AKR マウス由来 Th2 細胞株 D10.G4.1 によるサイトカインの産生に対するシジウムからの単離成分の影響を調べた。最終濃度 10 μ g/ml で添加した単離成分のうち、PGB-5 が抗 CD3 抗体刺激 D10.G4.1 細胞による IL-4 及び IL-5 産生を最も有意に抑制した (Fig. 1)。また、最終濃度 100 μ g/ml で単離成分を添加した場合、すべての成分によって IL-4 及び IL-5 の産生が大幅に抑制されたが、トリパンブルーを用いた色素排除試験により PGB-5 以外の物質はこの濃度において細胞毒性を示すことが分かった。すなわち PGB-5 は 100 μ g/ml 添加時においても細胞毒性を示さず IL-4 及び IL-5 の産生抑制作用を示す唯一のシジウム抽出物であることが判明した。一方、Th1 細胞株 35-9D による IFN- γ 産生に対して、最終濃度 10 μ g/ml で添加した PGB-5 による抑制作用は見られず、さらに PGB-5 は 100 μ g/ml で添加した場合にも実験に用いた諸種シジウム抽出物中唯一細胞毒性が見られなかった (Fig. 2)。以上の結果から、シジウム抽出物 PGB-5 は Th1 細胞株 (35-9D) による IFN- γ の産生にはあまり影響せず、Th2 細胞株 (D10.G4.1) による IL-4 及び IL-5 産生に対し比較的選択性のある抑制作用を示すことが明らかとなった。また、PGB-5 は最終濃度 100 μ g/ml においても唯一細胞毒性が見られない抽出物であった。

Fig. 1. Effects of Psidium Components on Production of Th2 Cytokines, IL-4 and IL-5, in Th2 Cells, D10.G4.1

Secreted IL-4 (A) and IL-5 (B) in culture supernatants were measured by sandwich ELISA. Each column represents the mean $\pm$ S.D. of 3 experiments. $\square$, Psidium component 10 μ g/ml; $\blacksquare$, Psidium component 100 μ g/ml. N.D. not detected.

Fig. 2. Effects of Psidium Components on Production of Th1 Cytokine, IFN- γ , in Th1 Cells, 35-9D

Secreted IFN- γ in culture supernatants was measured by sandwich ELISA. Each column represents the mean $\pm$ S.D. of 3 experiments. $\square$, Psidium component 10 μ g/ml; $\blacksquare$, Psidium component 100 μ g/ml. N.D. not detected.

したがって、PGB-5はシジウムが有する抗アレルギー作用の本態物質の1つである可能性が示唆された。このPGB-5は各種NMRスペクトル及びMS等を使用した分析により methyl gallate であると同定された。そこで次に市販の化合物 methyl gallate を用いた実験において上記の結果が再現されるか検討した。

Th1細胞株(35-9D)及びTh2細胞株(D10.G4.1)による各種サイトカイン産生に対する化合物 Methyl Gallate の影響

天然物シジウムからの単離成分 PGB-5 (methyl gallate) で見られたT細胞サイトカイン産生への影響が化学的に合成された methyl gallate^{20, 21)} においても見られるかどうか、上記の実験方法と同様に

Th1細胞株(35-9D)及びTh2細胞株(D10.G4.1)を用いて検討した(Fig. 3)。Methyl gallateの最終濃度は1, 10, 100 μ g/mlの3段階としたが、100 μ g/mlを添加した場合はほぼすべての細胞において細胞毒性が見られ、サイトカインの産生量は測定できなかった。Methyl gallateを1 μ g/mlの濃度で添加した場合、Th1細胞株(35-9D)によるIFN- γ 産生はほとんど阻害しなかったがTh2細胞株(D10.G4.1)によるIL-4及びIL-5の産生に対してはそれぞれ36.8%, 44.0%と顕著な抑制率を示した。一方、10 μ g/mlの濃度で添加した場合、Th1細胞株(35-9D)及びTh2細胞株(D10.G4.1)に対する細胞毒性は認められず、これら細胞株によるサイトカイン産生をいずれも抑制した。すなわち、化学的に合成された methyl

Fig. 3. Effect of Methyl Gallate on Production of IL-4 (A) or IL-5 (B) in Th2 Cells, D10.G4.1, or IFN- γ (C) in Th1 Cells, 35-9D

Secreted IL-4 (A), IL-5 (B) and IFN- γ (C) in culture supernatants were measured by sandwich ELISA. Each column represents the mean $\pm$ S.D. of 3 experiments.

Fig. 4. Effect of Methyl Gallate on IgE and IgG₁ Production in CBA/J Mice Continuously Immunized with Low Dose KLH

IgE (□) and IgG₁ (■) in immune sera were measured by sandwich ELISA. Each column represents the mean $\pm$ S.D. of 3 experiments/mouse (6 mice for one group). *p* values were calculated by the Bonferroni multiple comparison test; ***p* < 0.01 vs. control group.

gallate を 1 μ g/ml の濃度で添加した場合において、Th2 細胞株 (D10.G4.1) によるサイトカイン産生のみを選択的に抑制することが再現された。また、これより高濃度の methyl gallate (最終濃度 10 μ g/ml) では Th2 細胞に対し選択的なサイトカイン産生抑制効果は薄れ、Th1 細胞株及び Th2 細胞株のサイトカイン産生をともに抑制した。よって化合物 methyl gallate は比較的低用量においてより効果的な抗アレルギー作用が期待できるものと考えられた。

I 型アレルギーモデル CBA/J マウスの抗体産生に対する Methyl Gallate の影響

これまで methyl gallate の抗アレルギー作用として、ヘルパー T 細胞株を用いて調べたヘルパー T 細胞のサイトカイン産生に対する効果について述べてきたが、我々は I 型アレルギーモデル CBA/J マウスの *in vivo* 抗体産生系に対する効果についても調べたのでその結果を次に述べる (Fig. 4)。既に CBA/J マウスにおいて低用量の keyhole limpet hemocyanin (KLH) の繰り返し免疫により血清中の IgE 産生が誘導される I 型アレルギーモデルマウスが作成されることが報告されており、^{22, 23)} 我々はこの方法により作成したアレルギーモデルマウスの血

清 IgE 量に対する methyl gallate の影響について検討した。1 回あたりの methyl gallate の投与量は 0.1, 1, 10, 100 mg/kg の 4 段階とし、1 日おきに腹腔内に投与した。免疫開始から 70 日後の血清 IgE 量を ELISA 法により測定したところ、比較的低用量の methyl gallate 投与により有意に IgE 産生が抑制された。すなわち methyl gallate 0.1 mg/kg を投与した I 型アレルギーモデルマウスにおいて最も強く IgE 産生抑制効果が見られ、その抑制作用は投与量依存的に減弱する傾向が認められた。先に示した *in vitro* における methyl gallate のサイトカイン産生抑制作用の結果を考慮すると、*in vivo* において methyl gallate 投与により有意に IgE 産生が抑制されたのは methyl gallate が Th1/Th2 バランスを Th1 側へシフトさせ、Th1 優位な状態へと誘導したためと考えられる。つまり、低用量の methyl gallate の継続的投与が Th2 細胞によるサイトカインの産生を比較的选择的に抑制し、Th1/Th2 バランスを Th1 優位な状態に誘導した結果、血清中の IgE 量は減少したと考えられる。加えて、この Th1/Th2 バランスの Th1 側へのシフトは低用量の methyl gallate においてより強く見られる可能性が示唆された。

ところでこれまではI型アレルギーを惹起することが知られている免疫グロブリンであるIgEの産生に対する methyl gallate の影響について調べてきたが、血清中に最も多量に存在する免疫グロブリンは病原微生物やウィルスなどに対する生体防御に重要なIgGで、この免疫グロブリンはI型アレルギーを惹起しないことが既に知られている。²⁴⁾むしろ、アレルギー疾患の根本的な治療法として最も一般的な減感作療法を行った場合、アレルゲンに特異的なIgGが増加し、このIgGによりアレルゲンとIgEとの結合が競合的に阻害されることが分かっている。すなわち、methyl gallate の継続的投与によりIgG産生が抑制されては、抗I型アレルギー作用に結びつくと考えられるIgE産生抑制を相殺する可能性もある。そこで次に methyl gallate の継続的投与によるIgG産生への影響について調べた。IgE量の測定と同様にELISA法により血清サンプル中のIgG₁量を測定したところ、いずれの用量の methyl gallate を投与したI型アレルギーモデルマウスの血清中のIgG₁量は影響を受けていないことが確認された。すなわち methyl gallate はI型アレルギーモデルマウスの全体的な抗体産生能には大きな影響を及ぼさず、低用量(0.1 mg/kg)を継続的に投与した場合にIgEの産生を特異的に抑制することが分かった。以上の結果と既に述べてきた *in vitro* の結果とをあわせると、低用量の methyl gallate の継続的投与がTh2細胞によるIL-4産生を比較的選択的に抑制し、Th1/Th2バランスをTh1優位な方向に誘導した結果、IgE産生は抑制され、血清IgE量が減少したと考えられる。さらに、このような methyl gallate の継続的投与によるIgE産生抑制作用は低用量の methyl gallate を投与した場合ほど顕著に見られるが、これは methyl gallate を低用量で投与するほどTh1/Th2バランスをTh1優位な方向に強く誘導するためと考えられた。

REFERENCES

- 1) Kataoka M., Takagaki Y., *Shoyakugaku-Zasshi*, **46**, 25-29 (1992).
- 2) Haraguchi Y., Yagi A., Koda A., Inagaki N., Noda K., Nishioka I., *J. Med. Chem.*, **25**, 1495-1499 (1982).
- 3) Santos F. A., Rao V. S. N., Silveira E. R., *Phytotherapy Research*, **12**, 24-27 (1998).
- 4) Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A., Coffman R. L., *J. Immunol.*, **136**, 2348-2357 (1986).
- 5) Seder R. A., Paul W. E., *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 635-673 (1994).
- 6) Salgame P., Abrams J. S., Clayberger C., Goldstein H., Convit J., Modlin R. L., Bloom B. R., *Science*, **254**, 279-282 (1991).
- 7) Miner K. T., Croft M., *J. Immunol.*, **160**, 5280-5287 (1998).
- 8) Barve S. S., Cohen D. A., De Benedetti A., Rhoads R. E., Kaplan A. M., *J. Immunol.*, **152**, 1171-1181 (1994).
- 9) Farrar M. A., Schreiber R. D., *Ann. Rev. Immunol.*, **11**, 571-611 (1993).
- 10) Oppenheim J. J., Neta R., *FASEB J.*, **8**, 158-162 (1994).
- 11) Paul W. E., Ohara J., *Annu. Rev. Immunol.*, **5**, 429-459 (1987).
- 12) Paul W. E., Seder R. A., *Cell*, **76**, 241-251 (1994).
- 13) Rapoport M. J., Jaramillo A., Zipris D., Lazarus A. H., Serreze D. V., Leiter E. H., Cyopick P., Danska J. S., Delovitch T. L., *J. Exp. Med.*, **178**, 87-99 (1993).
- 14) Takatsu K., *Curr. Opin. Immunol.*, **4**, 299-306 (1992).
- 15) Su H. C., Cousens L. P., Fast L. D., Slifka M. K., Bungiro R. D., Ahmed R., Biron C. A., *J. Immunol.*, **160**, 5007-5017 (1998).
- 16) Coffman R. L., Ohara J., Bond M. W., Carty J., Zlotnik A., Paul W. E., *J. Immunol.*, **136**, 4538-4541 (1986).
- 17) Finkelman F. D., Katona I. M., Urban J. F. Jr, Holmes J., Ohara J., Tung A. S., Sample J. V., Paul W. E., *J. Immunol.*, **141**, 2335-2341 (1988).
- 18) Holmes B. J., MacAry P. A., Noble A., Kemeny D. M., *Eur. J. Immunol.*, **27**, 2657-2665 (1997).
- 19) McKenzie A. N., Culpepper J. A., de Waal Malefyt R., Briere F., Punnonen J., Aversa G., Sato A., Dang W., Cocks B. G., Menon S., DeVries J. E., Banchereau J., Zurawski G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 3735-3739 (1993).
- 20) Dorsch W., Bittinger M., Kaas A., Muller A., Kreher B., Wagner H., *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **97**, 1-7 (1992).
- 21) Kane C. J., Menna J. H., Sung C. C., Yeh Y. C., *Biosci. Rep.*, **8**, 95-102 (1988).
- 22) Shuler K. R., Dunham R. G., Kanda P., *J. Immunol. Methods*, **156**, 137-149 (1992).
- 23) Marcelletti J. F., Katz D. H., *Cell. Immunol.*, **143**, 405-419 (1992).
- 24) Davies D. R., Metzger H., *Annu. Rev. Immunol.*, **1**, 87-117 (1983).