

(平成15年度)

タイ産および中国産食用ハーブ類における 抗アレルギー成分の探索

園 山 慶

(北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻)

1. はじめに

近年、わが国におけるアレルギー性疾患患者数は増加の一途をたどっている。アレルギーはI～IV型の4つに分類され、その主たるものはI型アレルギーである。I型アレルギーの機序として、肥満細胞膜上の高親和性受容体に結合したIgE抗体にアレルゲンが結合することが刺激となって肥満細胞の脱顆粒が起り、ヒスタミンや新たに生成されるロイコトリエン等の脂質メディエータが放出されて炎症が惹起されることが知られている。また脱顆粒にともなう肥満細胞から放出される様々な炎症性サイトカインが好酸球等を活性化させ、アレルゲン暴露から数時間以上経過した後に発現する炎症を引き起こすことも知られている。したがって、肥満細胞はアレルギー予防・治療の重要な標的のひとつとなりうる。実際、脱顆粒抑制薬はアレルギーに対する医薬品の主要なものであり、この中でクロモグリク酸ナトリウム、トラニラスト、アンレキサノクスなどは天然物から単離された成分をリード化合物として創製された医薬品である。最近ではキク科植物由来フラボノイド類およびショウガ科植物由来フェニルプロパノイド類の脱顆粒抑制効果が確認され、今後さらなる詳細な構造活性相関や作用機序の解明などを経て医薬品へ応用されることが期待されている^{1,2)}。

本研究では、アレルギー疾患治療薬のリード化合物の開拓および機能性食品への応用を志向し

て、抗アレルギー作用に関連した薬効が伝承されているタイ産および中国産食用ハーブ類に着目した。約80種のハーブ類の抽出液について、肥満細胞のモデル細胞としてラット好塩基球白血病細胞株(RBL-2H3細胞)を用い、脱顆粒の際にヒスタミン等と共に放出される β -ヘキソサミンダーゼ遊離量を脱顆粒の指標とした簡便なスクリーニング法によって抗アレルギー作用を評価し、活性の高い植物抽出物より抗アレルギー物質の単離・同定を行った。更にマウスを用いた受身皮膚アナフィラキシー(PCA)試験により、*in vivo*における効果も評価した。

2. 実験材料および方法

2.1 ハーブ類抽出液の調製

風乾したハーブ81種を破碎したのち、乾燥重量の10倍量(v/w)の50%メタノールを加えて室温で一晩放置した。抽出液を減圧濾過して得られた濾液の一部を濃縮乾固し、50%ジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、これを被験溶液とした。ここで植物体0.1g由来の抽出物が溶媒1 mlに溶解している時の濃度を1抽出単位(1n)とし、以下この単位を用いた。被験溶液は0.01, 0.1, 1nとなるように溶解した。

2.2 細胞培養および*in vitro*脱顆粒阻害試験

RBL-2H3細胞は10%ウシ胎児血清添加DMEMを基本培地として37℃、5%CO₂環境下で培養した。コンフルエント前の細胞を24ウェル平底プレートに 8×10^5 cells/wellずつ播種し、24時間培養

した後、以下に述べる脱顆粒阻害試験に用いた。

すなわち、抗ジニトロフェノール (DNP)-IgEモノクローナル抗体を培地に加え (50ng/ml)、2時間インキュベート後、細胞を500 μ lの変法タイロード緩衝液 (MT) で2回洗浄した。次に500 μ lのMTおよび10 μ lの被験液を加え10分間プレインキュベートし、抗原 (DNP-HAS, 50ng/ml) を加えて30分間インキュベートした後、上清を採取した。一方、細胞は0.1% Triton X-100/MTを添加して溶解した。培養上清ならびに細胞溶解液50 μ lを96ウェル平底マイクロプレートに移し、 β -ヘキソサミニダーゼ活性を測定した。すなわち、100 μ lの基質溶液 (3.3 mM p -ニトロフェニル-N-アセチル- β -D-グルコサミニド/0.1Mクエン酸緩衝液pH4.5) を加えて37℃で30分間インキュベートした後、100 μ lの2 Mグリシン緩衝液pH10.4を加えて反応を停止し、マイクロプレートリーダーで405nmの吸光度を測定した。以下の式により遊離率を求めた。

$$\beta\text{-ヘキソサミニダーゼ遊離率 (\%)} = \frac{\text{刺激で遊離した}\beta\text{-ヘキソサミニダーゼ量}-\text{自然遊離量}}{\text{細胞内全}\beta\text{-ヘキソサミニダーゼ量}-\text{自然遊離量}} \times 100$$

2.3 マウスを用いた受身皮膚アナフィラキシー試験

BALB/cマウスに抗DNP-IgEモノクローナル抗体 (2 μ g/頭) を静脈投与することにより受動免疫した。24時間後に、アセトン：オリーブオイル (1 : 1) に溶解した0.15% 2,4-ジニトロフルオロベンゼン25 μ lを耳殻に塗布することにより皮膚アナフィラキシーを惹起した。惹起1時間後に0.5%エバンスブルー/PBS (0.5ml/頭) を尾静脈投与し、その30分後にエーテル麻酔下で頸椎脱臼により屠殺し、耳殻を採取して滲出したエバンスブルー量を定量した。被験物質は惹起1時間前に

腹腔あるいは経口投与した。経口投与する場合には一夜絶食し、また被験物質は0.3%カルボキシメチルセルロース溶液に溶解して投与した。採取した耳殻は0.7mlの1 M水酸化カリウム中で37℃で一晩インキュベートして溶解後、0.6Nリン酸：アセトン (5 : 13) の混合溶媒を9.3ml加えた。激しく攪拌した後に遠心分離を行い、その上清の吸光度 (620nm) を測定した。

3. 結果および考察

RBL-2H3細胞の脱顆粒阻害アッセイの結果、食用ハーブ81種のうち*Areca catechu*種子が強い阻害効果を示した (Table 1)。*A. catechu*種子は生薬名「檳榔子 (ピンロウジ)」といい、シュロ科の檳榔の成熟種子である。駆虫薬として用いられ、抗酸化効果、抗変異原性効果、抗うつ病効果、血圧降下作用など生体での様々な機能が報告されている³⁻⁶⁾。含有成分としてはarecolineなどのアルカロイドや縮合タンニン、一種の紅色素などが知られている³⁾。インド、東南アジア諸国では檳榔子の切片に石灰、阿仙薬時にはショウズクを混ぜこれをキンマの葉で包みガムのように噛む咀嚼性嗜好品として賞用されている。本研究ではこのものに含まれる肥満細胞脱顆粒阻害成分を追求した。

*A. catechu*種子乾燥物 (50g) を50%メタノールで抽出し、抽出物を減圧乾固して50%メタノール抽出物 (15.9g) を得た。これを水と酢酸エチルで振盪分配して水可溶性画分 (15.3g) と酢酸エチル可溶性画分 (0.6g) に分画した。それぞれの画分について阻害活性試験を行った結果、水可溶性画分に強い活性が認められたので、Scheme 1に示したようにこの画分からDiaion HP20および逆相HPLCにより活性成分を単離し、FAB-mass分析およびNMR低温測定によりプロシアニジンB1 (PB1) と同定した (Fig. 1)。さらに同様の分画により2~8量体のプロシアニジンを確認し、こ

Table 1 RBL-2H3細胞における食用ハーブ類抽出物の β -ヘキソサミニダーゼ遊離阻害効果

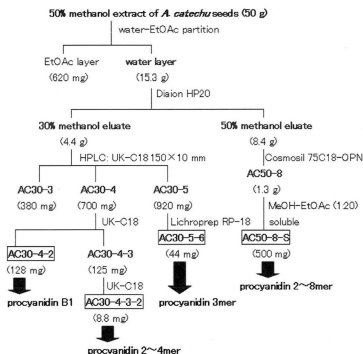
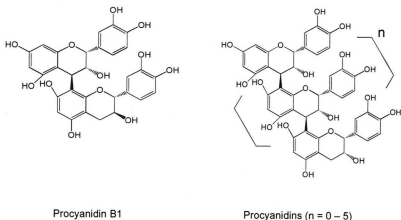
No	scientific name	0.1n	1n	No	scientific name	0.1n	1n
1	<i>Eclipta prostrata</i> (Leaf)	-2	-41	44	<i>Azadirachta indica</i> (Branch)	35	83
2	<i>Eclipta prostrata</i> (Root)	0	-27	45	<i>Azadirachta indica</i> (Leaf)	0	50
3	<i>Eclipta prostrata</i> (Stem)	-7	-13	46	<i>Azadirachta indica</i> (Flower)	81	101
4	<i>Ocimum sanctum</i> (Seed)	-25	-41	47	<i>Azadirachta indica</i> (Stem bark)	0	0
5	<i>Allium sativum</i> (Fruit)	4	-2	48	<i>Areca catechu</i> (root)	-13	-16
6	<i>Languas galanga</i> (Leaf)	-7	-34	49	<i>Areca catechu</i> (seed)	79	100
7	<i>Apium graveolens</i> (Leaf)	-28	22	50	<i>Morus alba</i> (Leaf)	-6	7
8	<i>Apium graveolens</i> (Stem)	-29	-43	51	<i>Momordica charantia</i> (Fruit)	-30	-26
9	<i>Piper sarmentosum</i> (Leaf)	-14	-25	52	<i>Ocimum basilicum</i> (Seed)	-6	0
10	<i>Piper sarmentosum</i> (Stem)	-28	-40	53	<i>Ocimum basilicum</i> (Leaf)	-15	-9
11	<i>Cassia siamea</i> (Young Leaf)	-17	-5	54	<i>Biophytum sensitivum</i> (Stem)	-19	10
12	<i>Mallotus philippensis</i> (Fruit)	-7	-14	55	<i>Solanum torvum</i> (Fruit)	-9	29
13	<i>Mallotus philippensis</i> (Wood)	29	73	56	<i>Schefflera leucantha</i> (Leaf)	2	41
14	<i>Physalis minima</i> (Leaf)	-6	15	57	<i>Saccharum officinarum</i> (Root)	8	9
15	<i>Physalis minima</i> (Root)	-53	-36	58	<i>Saccharum officinarum</i> (Stem)	-53	-78
16	<i>Cymbopogon citrates</i> (Stem)	11	-43	59	<i>Phyllanthus amarus</i> (Root)	-56	64
17	<i>Coccinia grandis</i> (Leaf)	-32	-11	60	<i>Phyllanthus amarus</i> (Stem)	-18	-5
18	<i>Coccinia grandis</i> (Vine)	8	26	61	<i>Parkia speciosa</i> (Seed)	-30	-6
19	<i>Physalis minima</i> (Stem)	8	9	62	<i>Zea mays</i>	-14	-21
20	<i>Amorphophallus campanulatus</i> (Tube)	20	37	63	<i>Eleutherine palmifolia</i> (Bulb)	-63	-25
21	<i>Alternanthera sessilis</i> (Whole plant)	-28	1	64	<i>Allium cepa</i> (Bulb)	-14	41
22	<i>Citrus hystrix</i> (Leaf)	25	83	65	<i>Orthosiphon aristatus</i> (Stem)	-45	-47
23	<i>Citrus hystrix</i> (Root)	19	-14	66	<i>Terminalia catappa</i> (Leaf)	32	155
24	<i>Coccinia grandis</i> (Root)	2	-15	67	<i>Lagerstroemia speciosa</i>	-38	85
25	<i>Tinospora crispa</i> (Vine)	-9	0	68	<i>Eclipta prostrata</i> (Stem)	-11	-23
26	<i>Nelumbo nucifera</i> (Root)	-5	35	69	<i>Coix lachryma-jobi</i> (Root)	-4	-15
27	<i>Nelumbo nucifera</i> (Seed)	39	87	70	<i>Coix lachryma-jobi</i> (Fruit)	-19	-46
28	<i>Oryza sativa</i> (Bran)	8	4	71	<i>Nelumbo nucifera</i> (pollen)	27	80
29	<i>Citrus hystrix</i> (Fruit)	11	102	72	<i>Tamarindus indica</i> (Stem bark)	24	82
30	<i>Citrus hystrix</i> (Skin)	2	8	73	<i>Morus alba</i> (Stem bark)	1	10
31	<i>Cocos nucifera</i> (Flower)	-31	6	74	<i>Orthosiphon aristatus</i> (Leaf)	-9	-18
32	<i>Cocos nucifera</i> (Aerating root)	15	101	75	<i>Dendrophthor pentandra</i> (Whole plant)	-2	94
33	<i>Cocos nucifera</i> (Stem bark)	-2	68	76	<i>Mallotus philippensis</i>	16	61
34	<i>Psidium guajava</i> (Leaf)	32	31	77	<i>Tamarindus indica</i> (Seed)	-30	14
35	<i>Capsicum annuum</i> (Fruit)	-30	-54	78	<i>Leucaena leucocephala</i> (Seed)	-29	-52
36	<i>Phyllanthus emblica</i> (Fruit)	-30	-2	79	<i>Streblus asper</i> (Stem bark)	-72	-15
37	<i>Mangifera indica</i> (Leaf)	4	61	80	<i>Streblus asper</i> (Wood)	-37	-53
38	<i>Cocos nucifera</i> (Pulp)	-44	-46	81	<i>Tamarindus indica</i> (Leaf)	-9	32
39	<i>Tamarindus indica</i> (Root)	-9	5				
40	<i>Thunbergia laurifolia</i> (Whole plant)	11	9				
41	<i>Angle marmelos</i> (Leaf)	-10	-5				
42	<i>Spondias pinnata</i> (Leaf)	4	13				
43	<i>Solanum trilobatum</i> (Fruit)	-3	7				

1nは0.1gの乾燥試料を1mlの溶媒で抽出したときの濃度

れらが*A. catechu*種子抽出物の脱顆粒阻害活性に大きく寄与していることが明らかになった。

プロシアニジンは縮合タンニンの一種で、カテキン類を構成単位として4 β -8,あるいは4 β -6で結合したオリゴマーおよびポリマーから構成され、リンゴ、ブドウ、ブルーベリーなど多くの高等植物に広く見出されている。食品中では苦味、収斂性を与え、色素にも寄与することが知られて

いる。*A. catechu*種子の成分としてもすでに5量体までのプロシアニジンが確認されており^{7,8)}, それに加えて本研究で新たに6~8量体も確認されたことになる。近年、プロシアニジンの機能性に関して抗蝕蝕作用⁹⁾, 血圧降下作用⁶⁾, 抗酸化作用^{10,11)}, 育毛作用¹²⁾などの報告がなされている。また、抗アレルギー作用に関しては、プロシアニジン2~15量体を主成分とするリンゴ由来の縮合タ

Scheme 1 *A. catechu*種子抽出物の分画Fig. 1 *A. catechu*種子抽に含まれるプロシアニジン類の構造

ンニンが細胞内への Ca^{2+} 流入を制御することにより肥満細胞の脱顆粒を抑制することが報告されており¹³⁾、本研究の結果と合致する。

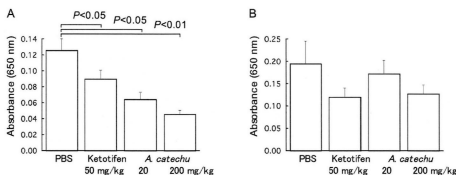
本研究では更にプロシアニジン類の重合度と活性の関係についての知見を得るため、(+)ーカテキン、(-)ーエピカテキン、プロシアニジン2, 3量体およびより重合度の高いプロシアニジン多量体の混合物をRBL-2H3細胞の脱顆粒阻害試験に供した。その結果、重合度が高くなるほど活性が強くなる傾向が認められた (Table 2)。また、共

にプロシアニジン2量体であるPB1, PB2においてはPB1の方が活性が強いことから、重合度の違いだけでなく構成単位の立体構造も活性に影響することが示唆された。

以上のように*A. catechu*種子抽出物が*in vitro*における肥満細胞脱顆粒阻害成分を含むことが明らかとなったので、このものが*in vivo*においても有効であるか否かについてマウスのPCA試験により評価した。Fig. 2Aに示したように、*A. catechu*種子抽出物水可溶性部を腹腔投与した群は、溶媒

Table 2 TRBL2H3細胞におけるプロシアニジンオリゴマーの β -ヘキササミニダーゼ阻害効果

	IC ₅₀	
	μ M	μ g/ml
Procyanidin 2~8mer		28
Procyanidin 2~4mer		64
Procyanidin C1 ((-) -epicatechin trimer)	69	60
Procyanidin B1 ((-) -epicatechin - (+) -catechin dimer)	207	120
Procyanidin B2 ((-) -epicatechin dimer)	367	212

Fig. 2 *A. catechu*種子抽出物がマウスの受身皮膚アナフィラキシー（血管透過性亢進）に及ぼす影響

(PBS)を腹腔投与した陰性対照群に比べて有意に低値を示し、またその抑制効果は濃度依存的であり、更に陽性対照として用いたケトチフェンよりも抑制効果が高かった。したがって、*A. catechu*種子抽出物は生体内でも肥満細胞の脱顆粒を抑制することが示唆された。一方、経口投与した場合にはやはり脱顆粒を抑制する傾向が見られたものの、統計的に有意差は認められなかった (Fig. 2B)。プロシアニジン単量体、すなわちカテキンは小腸で吸収され、それ自体およびそのメチル化体が尿中で確認されている^{14, 15)}。プロシアニジン2量体についても、ココアのPB2およびPB5がラットの腸で少量ではあるが吸収されるという報告や¹⁶⁾、PB2もしくはそれを含むココア飲料を摂取した場合のヒトおよびラットの血中および尿中に低いレベルで確認されたという報告がなされている¹⁷⁻¹⁹⁾。それに対し、プロシアニジン3量体以上では*in vivo*で吸収が確認されている例はほとんどない。摂取した高分子プロシアニジンは小腸ではほとんど吸収されず、大部分が大腸に

到達し大腸フローラによって様々な芳香族有機酸に分解されこれらが生体内で様々な機能性を示すという見方が一般的のようである^{15, 20)}。これらのことを考慮すると、*A. catechu*種子抽出物を経口投与した場合にはプロシアニジン多量体が生体内に吸収されて肥満細胞の脱顆粒に影響を及ぼすとは考えにくく、経口投与した*A. catechu*種子抽出物が有効であるとすれば、腸内細菌による代謝産物がその効果を担っていると考えられるべきであろう。今後、プロシアニジンの生体内への吸収・代謝の動態がより詳細に明らかにされることが期待される。

本研究を遂行するにあたり、研究助成金を賜りました浦上食品・食文化振興財団に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Matsuda, H., Morikawa, T., Ueda, K., Managi, H., and Yoshikawa, M. (2002) *Bioorg. Med. Chem.* 10: 3123-3128.

- 2) Matsuda, H., Morikawa, T., Managi, H. and Yoshikawa, M. (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 3197-3202.
- 3) Wang, C. K. and Lee, W. H. (1996) *J. Agric. Food Chem.* 44: 2014-2019.
- 4) Dar, A. and Khatoon, S. (2000) *Pharmacol. Biochem. Behav.* 65: 1-6.
- 5) Dar, A. and Khatoon, S. (1997) *Phytother. Res.* 15: 174-176.
- 6) Inokuchi, J., Okabe, H., Yamauchi, T., Nagamatsu, A., Nonaka, G. and Nishioka, I. (1986) *Life Sci.* 38: 1375-1382.
- 7) Ma, Y. T., Hsu, F. L., Lan, S. J. and Chen, C. F. (1996) *J. Chin. Chem. Soc.* 43: 77-81.
- 8) Nonaka, G., Hsu, F. L. and Nishioka, I. (1981) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 781-783.
- 9) Yanagida, A., Kanda, T., Tanabe, M., Matsudaira, F. and Cordeiro, J. G. O. (2000) *J. Agric. Food Chem.* 48: 5666-5671.
- 10) Koga, T., Moro, K., Nakamori, K., Yamakoshi, J., Hosoyama, H., Kataoka, S. and Ariga, T. (1999) *J. Agric. Food Chem.* 47: 1892-1897.
- 11) Gaulejac, N. S. C., Vivas, N., Freitas, V. and Bourgeois, G. (1999) *J. Sci. Food Agric.* 79: 1081-1090.
- 12) Takahashi, T., Kamiya, T. and Yokoo, Y. (1998) *Acta Derm. Venereol.* 78: 428-432.
- 13) Kanda, T., Akiyama, H., Yanagida, A., Tanabe, M., Goda, Y., Toyoda, M., Teshima, R. and Saito, Y. (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 1284-1289.
- 14) Gonthier, M. P., Chetnier, V., Donovan, J. L., Manach, C., Morand, C., Mila, I., Lapiere, C., Remesy, C. and Scalbert, A. (2003) *J. Nutr.* 133: 461-467.
- 15) Gonthier, M. P., Donovan, J. L., Texier, O., Felgines, C., Remesy, C. and Scalbert, A. (2003) *Free Rad. Biol. Med.* 35: 837-844.
- 16) Soencer, J. P. E., Schroeter, H., Shenoy, B., Kaila, S. S., Debnam, E. S. and Rice, E. C. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285: 588-593.
- 17) Steinberg, F. M., Holt, R. R., Schmitz, H. H. and Keen, C. L. (2002) *J. Nutr. Biochem.* 13: 645-652.
- 18) Baba, S., Osakabe, N., Natsume, M. and Terao, J. (2002) *Free Rad. Biol. Med.* 33: 142-148.
- 19) Holt, R. R., Lazarus, S. A., Cameron, S. M., Zhu, Q. Y., Schramm, D. D., Hammerstone, J. F., Fraga, C. G., Schmitz, H. H. and Keen, C. L. (2002) *Am. J. Clin. Nutr.* 76: 798-804.
- 20) Deprez, S., Brezillon, C., Rabot, S., Philippe, C., Mila, I., Lapiere, C. and Scalbert, A. (2000) *J. Nutr.* 130: 2733-2738.

Studies on anti-allergic compounds in Thai and Chinese edible herbes

Kei Sonoyama

(Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)

Water-soluble fraction of 50% aqueous-methanol extract of *Areca catechu* seed, a Thai edible plant, was found to inhibit release of β -hexosaminidase, a marker of antigen-IgE-mediated degranulation, in RBL-2H3. From the active fraction, procyanidin B1 was isolated as an active compound. In addition, procyanidin oligomers were found to contribute to the inhibitory action. Intraperitoneal injection of the water-soluble fraction of *A. catechu* seed extract suppressed the passive cutaneous anaphylaxis in mice, suggesting that the extract inhibits the degranulation of mast cells *in vivo*. However it remains debatable whether oral administration of the extract is also effective.