

甜茶(*rubus suavissimus*)熱水抽出エキスの 抗アレルギー作用

石倉義之・諏訪芳秀*¹⁾, 岡田 力*²⁾, 河野茂勝*³⁾

Anti-allergic effects of rubus suavissimus extract

Rubus suavissimus is a kind of the plants in Rosaceae, the leaves of which have been brewed and drunk as a usual drink in China. It has been experientially known that the tea is effective for sore throat and laryngitis.

In the present experiments, we investigated the influence of the *Rubus suavissimus* extracts on experimental allergy. As the results, the extracts showed the suppressive effects on cyclooxygenase activity and anaphylactically induced histamine release from rats peritoneal mast cells, *in vitro*. In addition to these, oral administration of the extracts significantly inhibited either skin reaction induced by compound 48/80 or passive cutaneous anaphylaxis in the rat.

These results suggest that the *rubus suavissimus* extracts are therapeutically effective for inflammatory and allergic diseases.

Rec. 11/16/1994, Acc. 12/22/1994, pp 167~173

Yoshiyuki Ishikura • Yoshihide Suwa*¹⁾

Tsutomu Okada*²⁾, Shigekatsu Kohno*³⁾

key words : *rubus suavissimus*, mast cell, histamine,
vascular permeability, PCA

甜茶(*rubus suavissimus*)は、中国ではその甘味とさまざまな効能からお茶の一種として親しまれている。本植物は、中国本草図録には“熱を清め肺を潤し、痰を除き咳を止める”とあり、また、高甘味成分を含有していることから“糖尿病に用いるとよい”などの記述がある¹⁾。さらに経験上から、咽喉喉の炎症に効果があることも知られている。近年、甜茶の甘味成分についての報告はみられる^{2,3)}が、甜茶の薬理作用に関する報告はほとんどない。

前回、筆者らは甜茶の熱水抽出エキスの抗炎症作用について報告した⁴⁾が、さらに今回、この甜茶の熱水抽出エキスをを用いて、シクロオキシナーゼ

に対する作用、ならびに *in vitro* および *in vivo* 抗アレルギー作用について検討し、以下の成績を得た。

材 料

(1) 実験動物

Wistar 系および SD 系雄性ラット(SPF, 日本チャールスリバー)は恒温恒湿飼育室(温度 23.5 ± 2.0°C, 湿度 55 ± 5%)で 1 週間予備飼育したのち、試験に供した。

(2) 試 薬

甜茶熱水抽出エキス(以下, SUAM-24002)は、甜茶 25 kg に熱水 250 l を加えて、90~95°C, 1 時間加熱処理したエキスをスプレイドライして、エキス粉末約 7 kg を得た。本エキス粉末は使用時精製水もしくは生理食塩水に所要濃度となるよう溶解した。また、陽性対照として aspirin(Sigma Chem.), disodium cromoglycate(Biomol Res. Lab.)および ketotifen fumarate(Sigma Chem.)を用いた。その他の試薬は特級もしくはそれに準

*¹⁾ Institute for Fundamental Research, Suntory Ltd. サントリー株式会社基礎研究所

*²⁾ Institute for Biomedical Research, Suntory Ltd. サントリー株式会社生物医学研究所

*³⁾ Department of Pharmacology, Kyoto Pharmaceutical University 京都薬科大学薬理学教室
Offprint requests to : Yoshiyuki Ishikura, Institute for Fundamental Research, Suntory Ltd., 1-1-1, Wakayamada, Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka 618, Japan

ずるものを用いた。

(3) 抗原および抗血清

抗原は, Tada & Okumura⁵⁾ ならびに幅および浜岡⁶⁾の方法に準じてブタ回虫抽出物に dinitrophenyl 基を結合させて作製した dinitrophenylated ascaris suum extract (DNP-As) とし, 抗血清は, Tada & Okumura⁵⁾の方法に準じて DNP-As および百日咳死菌アジュバンドを用いてラットを免疫することにより得た。なお, 本法により得られた抗血清の力価を 48 時間受動的感作皮膚アナフィラキシー (48 hr PCA) により測定すると 1:800 であった。

方 法

(1) シクロオキシゲナーゼ活性

シクロオキシゲナーゼ活性を以下の方法により測定した。すなわち, Sankawa らの方法⁷⁾に従い, 過酸化水素微量測定装置の反応セル中に 10 mM トリプトファンを含む 0.2 M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) 3.84 ml および本緩衝液の 20 mg/ml のヒツジ精囊腺ミクロゾーム (フナコシ薬品) 懸濁液 30 μ l ならびに 40 μ M ヘモグロビン溶液 25 μ l を加えて, 37°C, 5 min プレインキュベーション後, 10 mM アラキドン酸溶液 10 μ l を加えて, さらに 3 min インキュベーションした。シクロオキシゲナーゼ活性はアラキドン酸添加後の酸素吸収速度を測定することにより行い, 次式により算出した。

$$\text{シクロオキシゲナーゼ活性} = \text{酸素吸収速度} \times 1/2$$

なお, 被検薬は, ミクロゾーム懸濁液の添加と同時にし, 酸素吸収速度よりシクロオキシゲナーゼ活性の阻害率として表示した。

(2) ラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離

Sullivan らの方法⁸⁾に準じてラット腹腔より分離精製肥満細胞を得た。すなわち, 8 週齢, Wistar 系雄性ラットを断頭により放血致死させたあと, 腹腔内に Ca^{2+} free mast cell medium (MCM) 20 ml を注入して腹部を軽くマッサージ後, 腹腔細胞を含む腹腔液を採取した。4°C, 50×g, 7 min 遠心後, ペレットに MCM 5 ml を加えて懸濁し, 比重 1.07 の 31.5% ウシ血清アルブミン溶液 2 ml に重層したのち, 4°C, 300×g, 10 min 遠心した。上層および上層と下層の境界面を吸引除去したの

ち, 下層に MCM 4 ml を添加して 4°C, 50×g, 7 min 遠心した。同様の操作をさらに 1 回繰り返して得られたペレット (精製肥満細胞) に MCM を添加して, 1×10^5 肥満細胞/ml となるように浮遊させた。

つづいて, 本細胞からの compound 48/80 による反応誘起を以下のごとく行った。細胞浮遊液 500 μ l/tube に 250 mM CaCl_2 , 4 μ l を加えて 37°C でプレインキュベーション後, 100 μ g/ml compound 48/80 (Sigma Chem.) 5 μ l を加えて, さらに, 10 min インキュベーションすることにより反応を誘起させた。反応の停止は氷冷することにより行い, 4°C, 3,000×g, 3 min 遠心して得られた上清 400 μ l を採取し, 上清中に遊離したヒスタミンを Itoh らの方法⁹⁾に準じて HPLC を用いて定量した。なお, ヒスタミン遊離に及ぼす影響についての検討では, 薬物は compound 48/80 による反応誘起 10 min 前よりの処置とし, 添加量は 5 μ l/tube とした。

(3) 皮膚血管透過性亢進

ヒスタミンおよび compound 48/80 による皮内反応を以下のごとく誘起した。5 週齢, SD 系雄性ラットの背部を剃毛して 1 夜絶食後, ネンプタル麻酔下に 1% エバンスブルー生理食塩水溶液の 0.5 ml/100 g を尾静脈内に投与した。つづいて 1 mg/ml ヒスタミンおよび 100 μ g/ml compound 48/80 を背部皮内のそれぞれ 1 カ所に 0.1 ml/site ずつ投与した。

反応誘起 30 min 後, 断頭により放血致死させて皮膚を剥離し, 直径 20 mm の皮革打ち抜き用パンチを用いて反応の指標とした, エバンスブルーの漏出色素部位の皮膚を打ち抜いた。

この皮膚片を Katayama らの方法¹⁰⁾に従い, 1N KOH 水溶液 1 ml に浸漬して 37°C, 1 昼夜処置後, 抽出溶媒 [0.6N H_3PO_4 : アセトン (5:13)] 9 ml を加えて攪拌後, 室温 2,700×g, 15 min 遠心して得られた上清の 620 nm における吸光度を測定し, 漏出色素を算出した。なお, 被検薬は 0.25% カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁し, 体重 100 g 当たり 1 ml をヒスタミンもしくは compound 48/80 による反応誘起 1 hr まえに経口投与するか, これらの起炎剤 (2 mg/ml ヒスタミンまたは 200 μ g/ml compound 48/

表 1 50% inhibitory concentrations(IC₅₀) for SUAM-24002 and related compounds against cyclooxygenase activity

Compounds	IC ₅₀ (μg/ml)
SUAM-24002	170
Rubusoside	>500
Aspirin	15

80)と当量混和して皮内に投与した。

(4) 48 hr 受動的感作皮膚アナフィラキシー (48 hr PCA)

前項(3)と同様にあらかじめ剃毛した5週齢、Wistar 系雄性ラットの背部皮内の左右それぞれ2カ所に400および800倍に希釈した抗血清の0.1 ml/siteを投与することにより、受動的感作を行った。感作48時間後、300 μg DNP-Asおよび1%エバンスブルーを含む生理食塩水溶液 0.5 ml/100 g を尾静脈内に投与して反応を惹起させた。

抗原投与30分後に動物を断頭により放血致死させ、皮膚を剥離して、(3)皮膚血管透過性の項と同様の処理を行い、反応の指標とした漏出色素量を定量した。なお、被検薬は0.25%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁し、体重100 g 当たり1 ml を、抗原による反応誘起1 hr まえに経口投与した。

(5) 有意差検定

得られた実験結果を Student's t 検定により解析し、危険率0.05未満を有意とした。

結 果

(1) シクロオキシゲナーゼ阻害作用

表1は甜茶熱水抽出エキス(SUAM-24002)、甜茶中の甘味成分 rubusoside(サントリー株式会社ヘルスケア事業開発部で甜茶より抽出)および aspirin のシクロオキシゲナーゼ活性に対する50%阻害濃度(IC₅₀)についての成績を示す。

SUAM-24002 は、シクロオキシゲナーゼ活性を抑制したが、そのIC₅₀ 値は、170 μg/ml と陽性対照として用いた aspirin の15 μg/ml には及ばなかった。

一方、rubusoside は500 μg/ml でもシクロオキシゲナーゼ阻害作用はみられなかった。

表 2 50% inhibitory concentrations(IC₅₀) for SUAM-24002 and disodium cromoglycate against compound 48/80-induced histamine release from isolated rat peritoneal mast cells

Compounds	IC ₅₀ (μg/ml)
SUAM-24002	220
Disodium cromoglycate	220

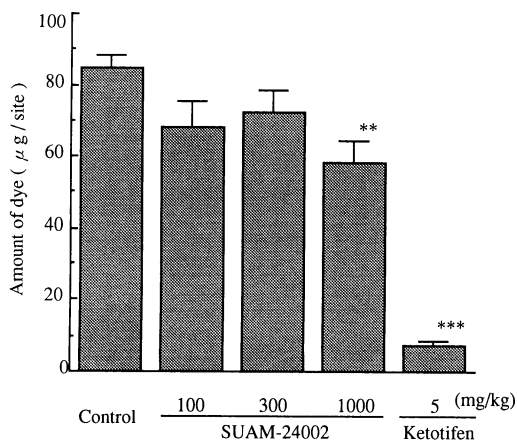


図 1 Effect of SUAM-24002 and ketotifen on the skin reaction induced by 10 μg/site compound 48/80 in rats

Drugs were p.o. administered 60 min before compound 48/80 provocation. Each column represents the mean±SE of 7 animals.

and *: significant difference from the control at P<0.01, and 0.001, respectively.

(2) ラット腹腔肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用

ラット腹腔肥満細胞からの compound 48/80 によるヒスタミン遊離に及ぼす SUAM-24002 および disodium cromoglycate の影響についての成績は表2に示すごとくである。SUAM-24002 のヒスタミン遊離に対するIC₅₀ 値は、220 μg/ml であり、陽性対照として用いた disodium cromoglycate と同値を示した。

(3) 血管透過性亢進抑制作用

① 経口投与についての成績

compound 48/80 およびヒスタミンによる血管透過性亢進に及ぼす SUAM-24002 および ketotifen の反応誘起1 hr まえの経口投与による影響についての成績はそれぞれ図1および2に示すごとくである。compound 48/80 による血管透

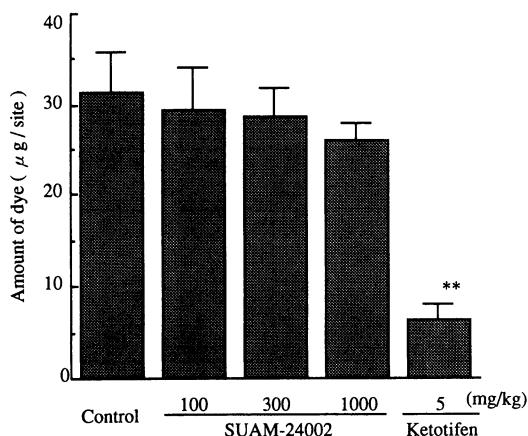


図2 Effect of SUAM-24002 and ketotifen on the skin reaction induced by 100 µg/site histamine in rats

Drugs were p. o. administered 60 min before histamine provocation. Each column represents the mean ± SE of 7 animals. **: significant difference from the control at $P < 0.01$.

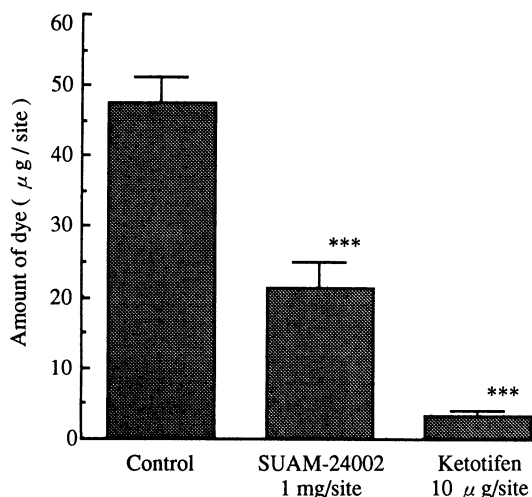


図3 Effect of SUAM-24002 and ketotifen on the skin reaction induced by 10 µg/site compound 48/80 in rats

Drugs were i. d. administered concomitantly with compound 48/80. Each column represents the mean ± SE of 5 animals. ***: significant difference from the control at $P < 0.001$.

過性亢進は SUAM-24002 の 100~1,000 mg/kg の投与により用量依存性はみられなかったが、いずれも抑制し、特に 1,000 mg/kg では有意であった。また、陽性対照として用いた 5 mg/kg ketotifen は有意かつ著明な抑制を示した。

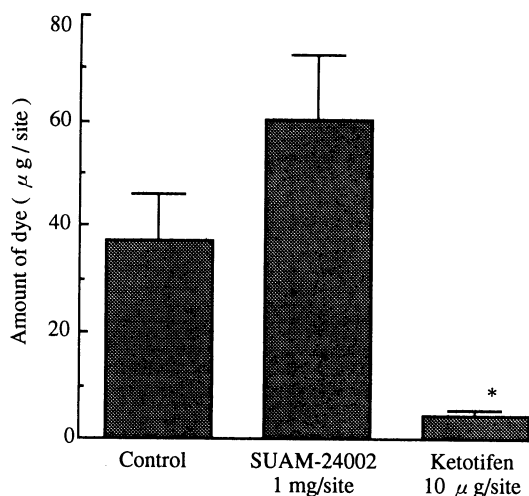


図4 Effect of SUAM-24002 and ketotifen on the skin reaction induced by 100 µg/site histamine in rats

Drugs were i. d. administered concomitantly with histamine. Each column represents the mean ± SE of 5 animals. *: significant difference from the control at $P < 0.05$.

ヒスタミンによる血管透過性亢進に対して SUAM-24002 の 100~1,000 mg/kg の投与では、用量依存的な若干の抑制を示したが、いずれの用量でも有意ではなかった。5 mg/kg ketotifen は compound 48/80 の場合と同様に著明な抑制を示した。

② 局所投与についての成績

10 µg/site の compound 48/80 および 100 µg/site のヒスタミンによる血管透過性亢進に対する SUAM-24002 の影響についての成績は図3および4に示すごとくである。すなわち、1 mg/site の SUAM-24002 を compound 48/80 とともに局所投与することにより、約 60% の有意な抑制を示した。また、10 µg/site の ketotifen も 90% 以上の有意な強い抑制がみられた。

一方、ヒスタミンによる血管透過性亢進に対して、1 mg/site の SUAM-24002 の同時局所投与では抑制は認められず、むしろ増強傾向を示した。10 µg/site の ketotifen は compound 48/80 の場合と同様に明らかな強い抑制を示した。

なお、SUAM-24002 を単独皮内投与すると明らかな血管透過性の亢進が認められたが、ketotifen ではそのような作用はほとんど認めら

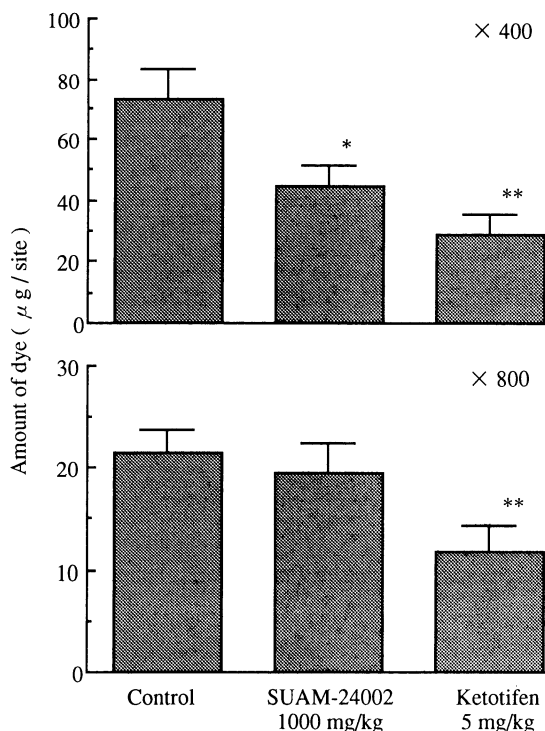


図5 Effect of SUAM-24002 and ketotifen on 48 hr-passive cutaneous anaphylaxis in rats. A 0.1 ml/site of 400-fold (upper panel) or 800-fold dilution (lower panel) of antiserum was used for PCA. Drugs were p. o. administered 60 min before antigen challenge. Each column represents the mean $\pm$ SE of 7 animals. * and **: significant difference from the control at $P < 0.05$ and 0.01, respectively.

れなかった。

(4) PCA 抑制作用

PCA に及ぼす 1,000 mg/kg SUAM-24002 および 5 mg/kg ketotifen の反応惹起 1 hr まえの経口投与による影響についての成績は図5に示すごとくである。SUAM-24002 は 800 倍希釈抗血清による PCA を若干抑制する傾向を示すにすぎなかったが、400 倍希釈抗血清による PCA では約 40% の有意な抑制を示した。

一方、陽性対照として用いた 5 mg/kg ketotifen はいずれの希釈抗血清による反応に対しても有意な抑制を示し、その抑制の程度はいずれも約 50% であった。

考 察

前回、筆者らは甜茶熱水抽出エキス (SUAM-24002) が、200 mg/kg の連続経口投与により、クロトン油によるマウス耳介の炎症に対して抑制作用を示すことを報告した⁴⁾。今回、SUAM-24002 の *in vitro* におけるシクロオキシゲナーゼ阻害作用について検討した結果、SUAM-24002 は、aspirin に比して 10 倍近い高濃度で、ヒツジ精囊腺のシクロオキシゲナーゼ活性を抑制した。このことから SUAM-24002 が高用量でシクロオキシゲナーゼ阻害作用を介する抗炎症作用を示す可能性が示唆された。

今回、さらに甜茶熱水抽出エキス (SUAM-24002) の抗アレルギー作用について検討した。その結果、SUAM-24002 は、*in vitro* compound 48/80 による肥満細胞からのヒスタミン遊離を抑制した。一方、SUAM-24002 は、ヒスタミンとともに直接皮内投与した場合には、ヒスタミンによる皮内反応を増強する傾向を示した。このことは一見、SUAM-24002 がヒスタミンによる血管透過性亢進作用の機構に関与して、この作用を増強している可能性を示唆しているように思われる。しかし、1 mg/site の SUAM-24002 単独の皮内投与でも 17 μ g/site 程度の色素の漏出が認められることから、ヒスタミンによる血管透過性亢進に対する SUAM-24002 の増強作用は、ヒスタミンによるそれに単純に和した相加作用の結果であるものと推察される。

局所投与による作用とは異なり、SUAM-24002 を経口的に投与した場合には、ヒスタミンによる皮膚血管透過性亢進作用は増強されず、むしろ抑制傾向を示したが、その抑制の程度はわずかであった。このことより、SUAM-24002 は、ヒスタミンによる血管透過性亢進に対しては、ほとんど影響しない可能性が示唆される。

compound 48/80 による皮内反応は、SUAM-24002 の局所および経口投与のいずれによっても抑制された。先述のごとく、SUAM-24002 は、遊離したヒスタミンの血管透過性亢進に拮抗する作用はほとんど有しないものと考えられることから、この抑制作用は、compound 48/80 の作用からヒスタミン遊離までの過程のいずれかの部分に作用して発現していることが強く示唆される。こ

のことは *in vitro* compound 48/80 による肥満細胞からのヒスタミン遊離が, SUAM-24002 によって抑制されたことから裏付けられる. さらに, SUAM-24002 はアレルギー反応による血管透過性亢進作用 (passive cutaneous anaphylaxis, PCA) をも抑制した. ラット PCA は, 抗原抗体反応につづいて肥満細胞からの遊離したヒスタミンおよびセロトニンが, 血管透過性亢進作用を引き起こした結果であるとされる¹¹⁾.

SUAM-24002 がセロトニンによる血管透過性亢進を抑制するか否かについては検討しなかったが, ヒスタミンによる血管透過性亢進に対してほとんど抑制作用を有しないことから類推すると, SUAM-24002 の PCA 抑制作用は compound 48/80 によるヒスタミン遊離の場合と同様に, ケミカルメディエーター遊離を抑制した結果に起因する可能性が大きい.

これまでに, ラット腹腔肥満細胞からの compound 48/80 によるヒスタミンの遊離と, アレルギー反応によるその遊離機構は大きくなる可能性のあることが報告されている. すなわち, compound 48/80 はサブスタンス P が islet-activating protein(IAP)感受性の G 蛋白(Gi)に直接作用して本蛋白質を活性化し, ヒスタミン遊離を誘起するのとまったく同一の, 部位および機作によりヒスタミン遊離を誘起する^{12,13)}のに対して, 抗原抗体反応によるヒスタミン遊離は, 基本的には Gi を介している可能性はないと報告されている¹⁴⁾.

disodium cromoglycate およびこれと類似の作用を有する薬物は, アナフィラキシー性ヒスタミン遊離を強力に抑制するが, compound 48/80 によるそれに対しては弱い¹⁵⁾. また, ラット由来の肥満細胞は, ヒトおよびモルモット由来の肥満細胞とは異なり, β -刺激薬に対して低感受性であり¹⁶⁾, 抗原を含めた種々の刺激剤によるヒスタミン遊離において, 外部の Ca^{2+} は必ずしも必要としない¹⁷⁾ことなどの特異な性質を有する. 以上のような肥満細胞からのヒスタミン遊離機構の違いを考えると, 単一の成分が compound 48/80 とアレルギー反応によるいずれのヒスタミン遊離に対しても, 抑制作用を示す可能性はかなり小さいものと考えられる.

今回の成績から, 古くより知られている甜茶の

咽喉に対する効果は, エキス中のなんらかの成分による抗炎症作用もしくは肥満細胞からの, ヒスタミン遊離抑制効果を介した抗アレルギー作用が一因となっている可能性が示唆された. 今後, 甜茶熱水抽出エキスの臨床における応用の拡大も期待されるとともに, 抗炎症および抗アレルギー作用を有する成分が, それぞれ異なるのかあるいは複数の成分がそれぞれの効果に寄与しているのか, さらに, これらの成分の効果がどのような作用機序によるものかなどについても, 今後の進展が期待される.

文 献

- 1) 李 時珍: 中国本草図録.
- 2) Ohtani, K., Aikawa, Y., Kasai, R., Chou, W-H., Yamasaki, K., Tanaka, O.: Minor diterpene glycoside from sweet leaves of *Rubus suavissimus*. *Phytochemistry* 31: 1553-1559, 1992.
- 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) 楊 志博, 石倉義之, 平井孝一, 藤居 互, 諏訪芳秀, 田中隆治, 河野茂勝, 大幡勝也: 甜茶(*rubus suavissimus*)エキスの抗炎症効果. *炎症* 14: 323-327, 1994.
- 5) Tada, T., Okumura, K.: Regulation of homocytotropic antibody formation in the rat. *J. Immunol.* 106: 1002-1011, 1971.
- 6) 幅 誠二, 浜岡利之: 種々の蛋白, 多糖体と DNP 基との結合物の作成法. *免疫実験操作法*. 抗原 7: 865-869, 1970-1977.
- 7) Sankawa, U., Shibuya, M., Ebizuka, Y., Noguchi, H., Kinoshita, T., Iitaka, Y., Endo, A., Kitahara, N.: Depside as potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis. A new active site model for fatty acid cyclooxygenase. *Prostaglandins* 24: 21-34, 1982.
- 8) Sullivan, T. J., Parker, K. L., Stenson, W., Parker, C. W.: Modulation of cyclic AMP in purified rat mast cells. *J. Immunol.* 114: 1473-1479, 1975.
- 9) Itoh, Y., Oishi, R., Nishibori, M., Saeki, K.: Histamine turnover in the rat hypothalamic nuclei estimated from *o*-fluoromethylhistidine induced histamine decrease. *Japan. J. Pharmacol.* 51: 581-584, 1989.
- 10) Katayama, S., Shionoya, H., Ohtake, S.: A new method for extraction of extravasated dye in the skin and the influence of fasting stress on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs and rats. *Microbiol. Immunol.* 22: 89-101, 1978.
- 11) Taira, M., Kohno, S. W., Yamamura, H., Ohata, K.: Lack of involvement of leukotriene and platelet activating factor in passive cutaneous anaphylaxis in rats. *Agents Actions* 24: 189-195, 1988.

- 12) Nakamura, T., Ui, M. : Simultaneous inhibitions of inositol phospholipid breakdown, arachidonic acid release, and histamine secretion in mast cells by islet-activating protein, pertussis toxin. *J. Biol. Chem.* 260 : 3584-3593, 1985.
- 13) Mousli, M., Bronner, C., Landry, Y., Bockeart, J., Rouot, B. : Direct activation of GTP-binding regulatory proteins (G-proteins) by substance P and compound 48/80. *FEBS letters* 259 : 260-262, 1990.
- 14) Saito, H., Okajima, F., Ishizaka, T. : Effect of ADP-ribosylation of GTP-binding protein by pertussis toxin on immunoglobulin E-dependent histamine release from mast cells and basophils. *J. Immunol.* 138 : 3927-3934, 1987.
- 15) Read, G. W., Knoohuizen, M., Goth, A. : Relationship between phosphatidylserine and cromolyn in histamine release. *Eur. J. Pharmacol.* 42 : 171-177, 1977.
- 16) Johnson, A. R., Moran, N. C. : Inhibition of the release of histamine from rat mast cells : The effect of cold and adrenergic drugs on release of histamine by compound 48/80 and antigen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 175 : 632-640, 1970.
- 17) Fewtrell, C. M. S., Foreman, J. C., Jordan, C. C., Oehme, P., Penner, H., Stewart, J. M. : The effect of substance P on histamine and 5-hydroxytryptamine release in the rat. *J. Physiol.* 30 : 393-441, 1982.