

アカジソ葉抽出エキスによる抗原特異的 T Helper Type 2 応答の抑制

1) (株)林原生物化学研究所藤崎研究所, 2) (株)林原生物化学研究所天瀬研究所

石原達也¹⁾ 岡本岩夫¹⁾ 政本直也²⁾ 河野恵三¹⁾谷本忠雄¹⁾ 池上伯郎¹⁾ 栗本雅司¹⁾

アカジソ葉抽出エキス (PFE) は抗アレルギー作用を示す生薬として知られているが, その作用機序は明らかではない. 今回, スギ花粉アレルギー (SBP) とアラムアジュバント (Alum) で免疫したマウスに PFE を投与して, 抗体および脾臓細胞からのサイトカイン産生を測定した. PFE 投与により, 用量依存的に SBP 特異的 IgE, IgG 1 の産生が抑制された. また, 脾臓細胞を抗原刺激したときのインターロイキン (IL)-4, IL-5, IL-10 の産生は PFE の用量依存的に低下した. IgG 2 a やインターフェロン (IFN)- γ の産生は影響を受けなかった. 脾臓細胞を concanavalin A (Con A) で刺激を行った場合は, PFE 投与の有無でサイトカイン産生に差は見られなかった. SBP 免疫マウスのリンパ節細胞から, 抗原刺激時に PFE を添加して樹立した T cell line では, PFE 非添加で樹立したものに比べ, IL-4, IL-5, IL-10 の産生が低下したが, IFN- γ の産生に差は見られなかった. 以上より, PFE は Th 2 タイプのサイトカインの産生を抑制し, Th 1/Th 2 バランスが Th 2 へと傾くのを防ぐ作用があることが示唆された.

Key words : IgE — *Perilla frutescens* extract (PFE) — sugi basic protein (SBP) — Th1/Th2 balance — Th 2 cytokine

緒 言

近年, 花粉症やアトピー性皮膚炎など様々なアレルギー疾患の増加に伴い, その有効な治療法の開発が求められている. 即時型アレルギーは, アレルゲンによって引き起こされる IgE 抗体の産生を特徴とするが, このような即時型アレルギーの発症や病態形成には, T 細胞から産生されるサイトカインが重要な役割を演じることが明らかになってきた.

ヘルパー CD 4⁺T 細胞は, サイトカイン産生パターンによって, Th 1 と Th 2 の 2 つのサブセットに分けられる¹⁾. Th 1 は主として IFN- γ , IL-2 を産生し, 細胞性免疫に関与する. また, IgG 2 a 抗体の産生を誘導す

る. 一方, Th 2 は IL-4, IL-5, IL-10 を産生し, 液性免疫, 特に IgG 1 や IgE 抗体の産生に関与する. Th 1 や Th 2 への分化は, 抗原刺激時に存在するサイトカインによってその方向が決定され, IFN- γ や IL-12 は Th 1 へ, IL-4 は Th 2 への分化をそれぞれ誘導する.

生体内では Th 1/Th 2 のバランスによって免疫応答のタイプが決定されるが, アレルギー疾患はこのバランスが Th 2 に過剰に傾くことによって発症すると考えられている. その結果, Th 2 から産生される IL-4 や IL-5 によって, B 細胞からの IgE 抗体産生や好酸球の分化, 増殖がそれぞれ誘導され²⁾, アレルギーに特徴的な症状が引き起こされる. 実際, アトピー性皮膚炎患者の炎症局所, あるいは喘息患者の気管支肺胞洗浄液中の細胞で, IL-4 や IL-5 などの Th 2 サイトカインの強い発現が認められている³⁾⁴⁾. したがって, 即時型アレルギー疾患の治療のためには, Th 1/Th 2 バランスをコントロールし, 過剰な Th 2 反応を抑制することが症状の改善につながると考えられる.

現在, さまざまなアレルギーの治療薬が開発されているが, その多くは抗ヒスタミン剤などを用いる対症療法にすぎない. また, ステロイド剤のように副作用が問題となる場合が多い. そうした中, アレルギー体質の根本的な改善のために, 天然の生薬による治療が

Received : October 1, 1998

Accepted : December 15, 1998

Abbreviations : Alum Al (OH)₃ adjuvant ;
BSA bovine serum albumin ; Con A concanavalin A ; ELISA enzyme-linked immunosorbent assay ; FCS fetal calf serum ; FITC fluorescein isothiocyanate ; HRPO horseradish peroxidase ; IFN interferon ; IL interleukin ; mAb monoclonal antibody ; PBS phosphate buffered saline ; PFE *Perilla frutescens* extract ; SBP sugi basic protein ; Th 1, 2 T helper type 1, 2

注目を集めている。すなわち、薬効を示す生薬を、毎日の食事によって摂取することにより、アレルギー体質の改善を目指そうとするものである。

シソ (*Perilla frutescens*) は、防腐や殺菌、発汗、解熱、鎮静、鎮咳作用など多様な薬効作用をもつことが知られており、古くから漢方薬として用いられている。また、さまざまな調理に利用され、日常の食事で摂取しやすい食材である。最近、アカジソ葉の抽出エキス (PFE: *Perilla frutescens* extract) に IgE 抗体産生抑制作用⁵⁾や tumor necrosis factor (TNF)- α 産生抑制作用⁶⁾などの効果が認められることが報告されており、抗アレルギー、抗炎症作用を示す食品として注目を集めている⁷⁾。シソからは、すでにいくつかの有効成分が分離されており、ルテオリンやロスマリン酸などのポリフェノール類は、リポキシゲナーゼの活性を阻害してロイコトリエンの生成を制御する⁸⁾。また、ロスマリン酸やカフェイン酸は TNF- α の産生を抑制する⁶⁾。このように PFE には複数の有効成分が含まれており、それらが相乗的に働いて抗アレルギー、抗炎症作用を示すと考えられている。しかし、PFE の IgE 抗体産生の抑制のメカニズムやその有効成分に関しては、いまだ明らかにされていないのが現状である。

今回、我々はアレルギーのモデルとしてスギ花粉アレルギー (SBP: sugi basic protein) で感作したマウスを用い、IgE 抗体およびサイトカイン産生に及ぼす PFE の影響を検討した。さらに、SBP 感作マウスのリンパ節細胞を用い、PFE によって Th 1/Th 2 のバランスが変化するか検討した。これら *in vivo* および *in vitro* での試験の結果から、PFE には、Th 2 サイトカインの産生を特異的に抑制する作用があり、PFE は Th 1/Th 2 バランスが Th 2 へと傾くのを抑制する可能性が示唆された。

材料および方法

1. マウス

BALB/c 6 週齢メスを日本チャールズリバーから購入し、免疫用および抗原提示細胞の材料として用いた。

2. アカジソ葉抽出エキス (PFE)

ソヨウ (永大薬業) 100 g に脱イオン水を加え 1500 g とし、直火で 40 分煎じた。ろ過後、遠心分離を行い、上清を回収した。125 g まで濃縮後、熱処理 (121°C,

20 分) を行ったものをアカジソ葉抽出エキス (PFE) とした。PFE は、0.9% になるように NaCl を添加して、遠心分離後、0.22 μ m フィルターでろ過して使用した。

3. 抗原

SBP は日本スギ花粉より谷口らの方法⁹⁾により調製した。SBP は Cry j 1 および Cry j 2 の 2 種類の蛋白質から成り、両者の比は約 4:1 であった。Cry j 1, 2 の調製およびビオチン標識は、澤谷らの方法¹⁰⁾に従って行った。

4. 培地

細胞の培養は、10% fetal calf serum (FCS) (GIBCO RBL), 50 μ M 2-メルカプトエタノール, 60 μ g/ml ペニシリン, 50 μ g/ml ストレプトマイシンを含む RPMI 1640 培地を用いた。

5. マウスの免疫および PFE 投与

SBP 1 μ g を Alum 2.5 mg (全量 0.1 ml) とともに BALB/c マウス (10 週齢, メス) の腹腔内に投与し、1 週間ごとに合計 3 回免疫を行った。PFE は phosphate buffered saline (PBS) で希釈し、マウス 1 匹に対し 0, 0.5, 1, 5 mg (全量 0.1 ml) を各免疫の 2 日および 6 時間前に腹腔内投与した。最終免疫の 1 週間後に、麻酔下で採血を行い血清を分離した。同時に脾臓を摘出し、脾臓細胞 (1×10^7 cells/well) を 10 μ g/ml SBP または 10 μ g/ml Con A で刺激した。37°C で 3 日間培養後、培養上清を回収した。マウスは各群 5 匹使用した。

6. SBP 特異的 T cell line の樹立

河野らの方法¹¹⁾に従い、SBP と Alum で免疫した BALB/c マウスより、顎下リンパ節、鼠蹊部および腸間膜のリンパ節を摘出し、T 細胞の材料とした。一次刺激では、リンパ節細胞 (2.4×10^6 cells/well) を 10 μ g/ml SBP および抗原提示細胞として 50 μ g/ml マイトマイシン C で処理 (37°C, 30 分) した BALB/c マウス脾臓細胞 (6×10^6 cells/well) を用いて刺激し、24 穴プレート中で 37°C で培養した。10 日後、細胞を回収し、新鮮な培地で洗浄後、 5×10^5 cells/well の細胞濃度で、10 μ g/ml SBP および抗原提示細胞とともに培養し、二次刺激を行った。10 日後、同様に 2.5×10^5 cells/well の細胞濃度で三次刺激を行い、T cell line を樹立した。実験によっては、一次および二次刺激の際、200 あるいは 500 μ g/ml の PFE を添加し、三次刺激後 3 日目に培養上清を回収した。

PFE の作用に及ぼす IL-4 の影響を検討するため、SBP で一次刺激したリンパ節細胞を回収し、10 ng/ml マウス recombinant IL-4 (Intergen) 存在下、200 また

は 500 µg/ml の PFE を添加して二次刺激を行った。10 日後、細胞を回収し、SBP 単独で三次刺激を行い、刺激後 3 日目の培養上清を回収した。

なお、各刺激後 4 日目に、細胞をさらに生育させるため、新鮮な培地で細胞を 4 倍に拡張した。

各実験は、異なった SBP 免疫マウスから回収したリンパ節細胞を用いて 2 回行い、そのうちの 1 回のデータを示した。

7. SBP 特異的 T cell line の増殖の測定

種々の濃度の PFE 存在下、SBP 特異的 T cell line (2.5×10^4 cells/well) を 10 µg/ml SBP およびマイトマイシン C 処理した BALB/c マウス脾臓細胞 (6×10^5 cells/well) で刺激して、96 穴プレート中で 37°C で培養した。培養 2 日目に [^{3} H]TdR (Dupont/NEN Research) を 0.5 µCi/well 添加し、さらに 18 時間培養した後、Packard Direct Beta Counter, Matrix 96 TM (Packard Instrument Co.) を用いて、[^{3} H] TdR の取り込みを測定した。測定は、2 種類の T cell line を用いて 2 回行い、そのうちの 1 回のデータを示した。

8. SBP 特異的 T cell line の表面抗原の解析

樹立した SBP 特異的 T cell line の表面抗原 (CD 3, CD 4, CD 8) の発現を、フローサイトメトリー法によって解析した。CD 3 の発現は、SBP 特異的 T cell line を hamster anti-mouse CD 3 ε monoclonal antibody (mAb) (Cedarlane Laboratories Limited) で染色後、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 goat anti-hamster IgG F(ab')₂ fragment (Cedarlane Laboratories Limited) を結合させ、EPICS Profile II flow cytometer (Coulter Electronics) を用いて測定した。CD 4 および CD 8 の発現は、T cell line を rat anti-L3T4 mAb (Becton Dickinson) または rat anti-mouse CD 8 a mAb (PharMingen) で染色後、FITC 標識 goat anti-rat IgG F(ab')₂ fragment (PharMingen) を結合させて測定した。

9. SBP 特異的抗体価の測定

抗 Cry j 1, 2 IgE 抗体価の測定は、IgE-capture enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で行った。96 穴マイクロプレートに PBS で希釈した rat anti-mouse IgE mAb (4 µg/ml, PharMingen) 100 µl を加え、37°C で 3 hr 固相化させた後、1% bovine serum albumin (BSA) を含む PBS (BSA/PBS) で 4°C で一晩ブロッキングした。1% tween 20 を含む PBS (tween/PBS) で洗浄後、10% FCS を含む PBS (FCS/PBS) で希釈した血清を加え、室温で 2 hr 反応させ

た。tween/PBS で洗浄後、ビオチン標識した Cry j 1 または Cry j 2 (2 µg/ml) 100 µl を加え、室温で 1 hr 反応させた。tween/PBS で洗浄後、1000 倍希釈した horseradish peroxidase (HRPO) 標識 streptavidin (Zymed) 100 µl を加え、室温で 1 hr 反応させた。tween/PBS で洗浄後、0.03% H₂O₂, 0.5 mg/ml o-フェニレンジアミンを含む 0.1 M クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 5.0) 100 µl を加えて発色させ、2 N 硫酸 100 µl を加えて反応を停止後、490 nm の吸光度を測定した。IgE の抗体価は、正常マウス血清の示した吸光度の 2 倍の値を示す希釈倍数で表わした。

抗 Cry j 1, 2 IgG 1 および IgG 2 a 抗体価の測定は直接法 ELISA で行った。マイクロプレートに PBS で希釈した Cry j 1 または Cry j 2 (5 µg/ml) 100 µl を加え、37°C で 3 hr 固相化させた後、BSA/PBS で 4°C で一晩ブロッキングした。tween/PBS で洗浄後、FCS/PBS で希釈した血清を加え、室温で 2 hr 反応させた。tween/PBS で洗浄後、1000 倍希釈した HRPO 標識 rat anti-mouse IgG1 mAb (コスモバイオ) あるいは HRPO 標識 rat anti-mouse IgG2a mAb (PharMingen) 100 µl を加え、室温で 1 hr 反応させた。tween/PBS で洗浄後、上記の通り発色を行った。IgG1 の抗体価は、OD 値 0.5 を示す希釈度で示した。IgG2a の抗体価は、各血清検体を 80 倍希釈して測定したときの OD 値で示した。

10. サイトカイン測定

IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-10 の測定は河野らの方法¹¹⁾に従い特異的サンドイッチ ELISA 法で行った。

11. データの解析

サイトカイン産生量および抗体価は、各群ごとにその平均値 ± 標準偏差を求め、データとして表わした。統計学的検討は、対照群に対する有意差を unpaired t-test を用いて求め、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. SBP で免疫したマウスの抗体産生に及ぼす PFE の影響

PFE 投与によって、SBP 特異的 IgE 抗体の産生は、PFE 非投与群に比べ有意に抑制された。同様に SBP 特異的 IgG1 抗体の産生も PFE 投与によって抑制された。抑制は Cry j 1 および Cry j 2 両抗原に対し、投与した PFE の用量依存的にみられ、IgE 抗体は PFE

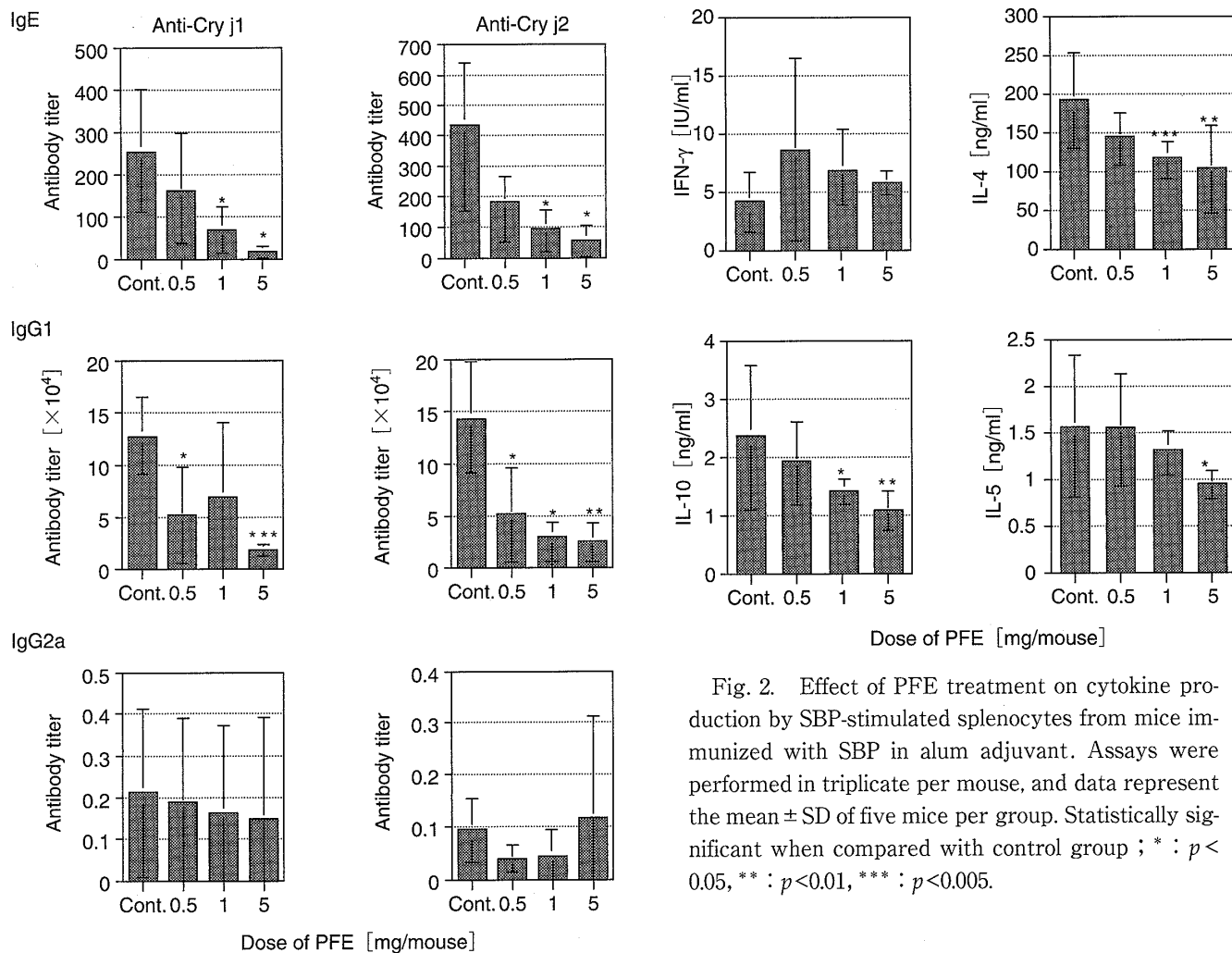


Fig. 1. Effect of PFE treatment on the production of anti-Cry j 1 or anti-Cry j 2 antibodies in the sera of mice immunized with SBP in alum adjuvant. The data represent the mean $\pm$ SD of five mice per group. Statistically significant when compared with control group; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$.

1 mg 以上, IgG1 抗体は 0.5 mg 以上の投与量で有意差が認められた。一方, SBP 特異的 IgG 2 a 抗体の産生は PFE 投与によって有意な差はみられなかった (Fig. 1)。

2. SBP で免疫したマウスの脾臓細胞からのサイトカイン産生に及ぼす PFE の影響

PFE を投与した SBP 免疫マウスの脾臓細胞を, SBP で刺激して各サイトカインの産生量を測定した。PFE を投与したマウスの脾臓細胞では, PFE 非投与マウスの脾臓細胞に比べ, SBP 刺激による IL-4, IL-5, IL-10 の産生が投与した PFE の用量依存的に低下した (Fig. 2)。IL-4, IL-10 は PFE 1 mg 以上の投与群で, IL-5 は

Fig. 2. Effect of PFE treatment on cytokine production by SBP-stimulated splenocytes from mice immunized with SBP in alum adjuvant. Assays were performed in triplicate per mouse, and data represent the mean $\pm$ SD of five mice per group. Statistically significant when compared with control group; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.005$.

5 mg 投与群で有意差が認められた。一方, IFN- γ の産生は, PFE 投与および非投与マウスの間で有意な差が見られなかった。

これらの結果と対照的に, 脾臓細胞を SBP のかわりに Con A で抗原非特異的に刺激した場合, 0.5 mg 投与群の IL-4 の産生量以外は, いずれのサイトカインの産生量も PFE 投与によって有意な差がみられなかった (Fig. 3)。PFE 0.5 mg 投与群で IL-4 の産生が抑制された原因に関しては不明であるが, PFE をそれ以上投与した群では, IL-4 産生の有意な抑制はみられず, PFE の用量依存性が認められなかったことから, Con A 刺激による IL-4 産生に PFE は影響を及ぼさないと判断した。

3. SBP 特異的 T cell line のサイトカイン産生パターンに及ぼす PFE の影響

SBP で免疫したマウスのリンパ節細胞を, SBP と抗原提示細胞によって抗原刺激を 3 回繰り返し, SBP 特異的 T cell line を樹立した。その過程で, 抗原刺激と

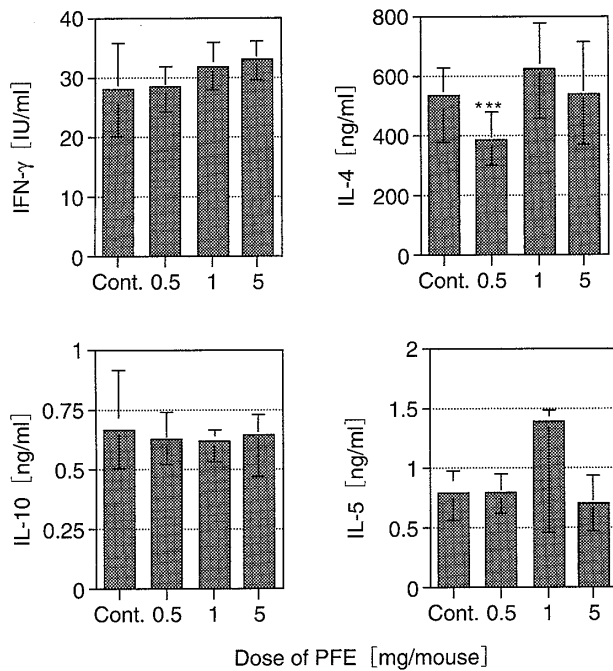


Fig. 3. Effect of PFE treatment on cytokine production by Con A-stimulated splenocytes from mice immunized with SBP in alum adjuvant. Assays were performed in triplicate per mouse, and data represent the mean $\pm$ SD of five mice per group. Statistically significant when compared with control group; * : $p < 0.05$, *** : $p < 0.005$.

ともに PFE を添加して、得られる T cell line のサイトカイン産生パターンが変化するかを調べた。添加する PFE は、あらかじめ樹立した T cell line を用いてその増殖に及ぼす影響を調べた結果 (Fig. 4) より、増殖に影響を及ぼさない 200 μ g/ml および若干の抑制がみられる 500 μ g/ml の 2 種類の濃度を用いた。三次刺激時に SBP 単独で刺激したときの各サイトカインの産生量を Table 1 に示した。PFE 添加の有無に関わらず、この時点でリンパ節細胞の 96% 以上は CD 3⁺CD 4⁺ 細胞、4% 未満が CD 3⁺CD 8⁺ であった。また、いずれの T cell line も三次刺激時の増殖に差はみられなかった。一次あるいは二次刺激まで PFE を添加して樹立した T cell line では、PFE 非添加で樹立した T cell line に比べ、添加した PFE の用量依存的に IL-4, IL-5, IL-10 の産生量が有意に減少していた。PFE 添加の回数は、IL-4, IL-5, IL-10 の産生抑制の程度にはほとんど影響しなかった。一方、IFN- γ の産生量は、PFE 200 μ g/ml を 1 回あるいは PFE 500 μ g/ml を 2 回添加して樹立した T cell line で有意に減少していたが、PFE の用量依存的に IFN- γ の産生が抑制される傾向はみられな

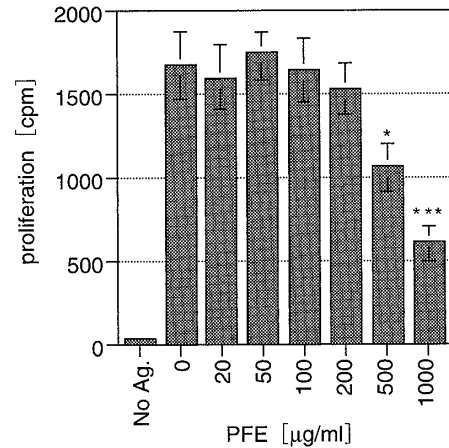


Fig. 4. Proliferation of SBP-specific T cell line in response to SBP in the presence of PFE. The data represent the mean $\pm$ SD of triplicate cultures. Statistically significant when compared with control; * : $p < 0.05$, *** : $p < 0.005$.

かった。したがって、PFE の添加によって、IFN- γ 産生は影響を受けないと判断した。

さらに、SBP で一次刺激を行ったリンパ節細胞を、二次刺激の際、PFE と同時に IL-4 を添加して、IL-4 存在下においても PFE による Th 2 サイトカインの抑制が認められるか調べた。SBP で三次刺激を行ったときのサイトカイン産生量を Table 2 に示した。IL-4, IL-5, IL-10 の産生は、PFE 添加時に IL-4 が存在していても、PFE 非添加の場合に比べ有意に抑制された。一方、IFN- γ の産生は、PFE によって有意な抑制はみられなかった。

考 察

即時型アレルギーは、アレルゲン特異的な IgE 抗体の過剰産生を特徴とし、この IgE 抗体の産生を抑制することはアレルギーの治療のうえで極めて重要である。今回、我々はマウスを SBP で免疫する際、PFE を投与することによって、SBP 特異的な IgE や IgG 1 抗体の産生が抑制されることを示した。同様な結果は、今岡らによっても報告されているが⁵⁾、その作用機序についてはほとんどわかっていない。IgE や IgG 1 抗体の産生は、B 細胞と Th 2 との相互作用によって誘導されるが、その際 Th 2 から産生される IL-4 などのサイトカインが重要な役割を演じることが報告されている¹²⁾。PFE を投与したマウスでは、脾臓細胞を抗原刺

Table 1 Cytokine production by SBP-specific T cell line established in the presence or absence of PFE

Stimulation cycle			IFN- γ [IU/ml]	IL-4 [ng/ml]	IL-5 [ng/ml]	IL-10 [ng/ml]
1°	2°	3°				
SBP	→ SBP	→ SBP	1.2 ± 0.07	18 ± 0.3	58 ± 1.0	79 ± 8.2
SBP + PFE200	→ SBP	→ SBP	0.9 ± 0.01 *	13 ± 0.5 ***	47 ± 1.8 ***	66 ± 5.3
SBP + PFE200	→ SBP + PFE200	→ SBP	1.2 ± 0.05	13 ± 0.4 ***	52 ± 2.3 *	81 ± 3.5
SBP + PFE500	→ SBP	→ SBP	1.1 ± 0.13	9 ± 0.6 ***	35 ± 1.2 ***	55 ± 2.0 *
SBP + PFE500	→ SBP + PFE500	→ SBP	1.0 ± 0.05 *	8 ± 0.9 ***	32 ± 0.8 ***	49 ± 2.6 **

The data represent the mean ± SD of triplicate cultures. PFE200 and 500 indicate the concentration of PFE added to the culture ; 200 μ g/ml and 500 μ g/ml, respectively. Statistically significant when compared with control culture ; * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$.

Table 2 Effect of PFE on cytokine production by SBP-specific T cell line established in the presence of IL-4

Cells cultured with	IFN- γ [IU/ml]	IL-4[ng/ml]	IL-5[ng/ml]	IL-10[ng/ml]
SBP + IL-4	1.8 ± 0.0	17 ± 0.6	74 ± 0.7	70 ± 0.8
SBP + IL-4 + PFE200	1.8 ± 0.1	15 ± 0.4 *	67 ± 2.3 **	66 ± 2.6 *
SBP + IL-4 + PFE500	2.2 ± 0.2 *	12 ± 0.9 ***	60 ± 1.2 ***	48 ± 2.4 ***

The data represent the mean ± SD of triplicate cultures. PFE200 and 500 indicate the concentration of PFE added to the culture ; 200 μ g/ml and 500 μ g/ml, respectively. Statistically significant when compared with control culture ; * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.005$.

激したときの IL-4, IL-5, IL-10 などの Th 2 サイトカインの産生がすべて抑制された. このことから, PFE は IL-4 をはじめ Th 2 サイトカインの産生を抑制することで, IgE 抗体産生を抑制したものと考えられる.

PFE を投与したマウスの脾臓細胞でみられる Th 2 サイトカイン産生の抑制は, 脾臓細胞を抗原で刺激した場合にのみ認められた. 抗原刺激の代わりに, 脾臓細胞を Con A で抗原非特異的に刺激した場合は, PFE 投与の有無でサイトカイン産生に差はみられなかった. このことより, PFE は, すべての T 細胞の応答を非特異的に抑制するのではなく, PFE 存在下に抗原刺激を受けた T 細胞に対して特異的に, Th 2 サイトカイン産生を抑制することが示唆される.

Th 1 と Th 2 は, それぞれのサブセットの T 細胞が産生するサイトカインを通じ, 互いの活性を抑制することが知られている. Th 1 から産生される IFN- γ は, Th 2 の増殖や Th 2 から産生される IL-4 の作用を抑制する. しかし, PFE を投与したマウスにおいて, IgG 2a 抗体の産生や脾臓細胞からの IFN- γ 産生といった Th 1 応答に変化はみられなかった. また, T cell line 樹立時に PFE を添加しても IFN- γ の産生は影響を受けなかった. これらの結果から, PFE は Th 1 を誘導することによって, Th 2 反応を抑制するのではなく, む

しろ, Th 2 反応を直接抑制することが示唆された.

SBP 免疫マウスのリンパ節細胞から, 抗原刺激時に PFE を添加して樹立した T cell line は, PFE 非添加で樹立した T cell line に比べ, IL-4, IL-5, IL-10 の産生が低下していた. SBP 免疫マウスのリンパ節細胞を, 一次刺激する際に PFE を添加し, その後, 二次, 三次と抗原のみで刺激を繰り返しても IL-4, IL-5, IL-10 の産生は抑制されたままであることから, この Th 2 サイトカイン産生の抑制は一時的なものではないことが示唆される. さらに, PFE は, cell line 樹立初期の段階に加えることが必要であり, T cell line 樹立後に PFE を加えて抗原刺激を繰り返しても, サイトカインの産生パターンは変化しなかった(データ略). また,すでに分化が確立した Th 2 clone に対しては, PFE はサイトカインの産生に何も影響を及ぼさなかった(データ略). これらの結果から, PFE は Th 2 サイトカインの産生自体を抑制するのではなく, Th 2 サイトカインを産生する細胞への分化の過程を抑制するのではないかと考えられる. SBP で免疫したマウスから得たリンパ節細胞は, まだ Th 1 や Th 2 へとコミットされていない細胞も含み, その後の刺激によって Th 1/Th 2 のバランスがどちらにも傾きうると思われる¹³⁾¹⁴⁾. したがって, PFE によって, Th 2 サイトカインを産生

する細胞への分化や成熟が抑制され、Th 1/Th 2 バランスが Th 2 へと傾くのが抑制されるのではないかと考えられる。

アレルギーをすでに発症している患者においても、アレルギー特異的な T 細胞がすべて Th 2 へと分化しているのではなく¹⁵⁾、侵入したアレルギーの刺激を受ける度にナイーブ T 細胞から Th 2 への分化も起こり、症状発現の一部に関与するものと思われる。したがって、アレルギーの治療という点から考えると、PFE によって Th 2 への分化のステップを抑制することにより、過剰な Th 2 応答を抑え、最終的にアレルギーの諸症状の緩和につながることが期待される。

IL-4 は Th 2 への分化に必須の因子であると考えられているが、PFE による Th 2 サイトカインの産生抑制作用は、PFE 添加時に IL-4 が同時に存在していても認められた。アレルギー患者の炎症局所や血清中では IL-4 の産生が増加していることが報告されているが¹⁶⁾¹⁷⁾、今回の結果から、そのような IL-4 の過剰な環境においても、PFE は Th 2 応答の抑制作用を発揮しうることが期待される。

今回の結果から、PFE によって、Th 1/Th 2 のバランスを制御し、過剰な Th 2 応答を抑制できる可能性が示唆された。Th 1/Th 2 バランスの制御は、即時型アレルギー疾患の治療において重要な作用点であり、PFE による Th 2 応答の抑制作用は、アレルギー体質の改善につながることが期待される。

文 献

- 1) Mosmann, T.R. and Sad, S. : The expanding universe of T-cell subsets : Th 1, Th 2 and more. *Immunol. Today* **17**, 138-146, 1996.
- 2) Mahanty, S., Abrams, J.S., King, C.L., Limaye, A.P. and Nutman, T.B. : Parallel regulation of IL-4 and IL-5 in human helminth infection. *J. Immunol.* **148**, 3567-3571, 1992.
- 3) Kay, A.B., Ying, S., Varney, V., Gaga, M., Durham, S.R., et al. : Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster, interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5, and granulocyte/macrophage colony stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *J. Exp. Med.* **173**, 775-778, 1991.
- 4) Robinson, D.S., Hamid, Q., Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkns, J., et al. : Predominant Th 2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N. Engl. J. Med.* **326**, 298-304, 1992.
- 5) 今岡浩一, 井上 栄, 高橋 徹, 小島保彦 : シソ抽出エキスの抗 DNP-IgE 抗体産生に及ぼす影響. アレルギー **42**, 74-80, 1993.
- 6) Ueda, H. and Yamazaki, M. : Inhibition of tumor necrosis factor- α production by orally administering a perilla leaf extract. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1292-1295, 1997.
- 7) 小砂憲一, 若命浩二 : シソエキスの抗アレルギー作用と食品への応用. 食品と開発 **32**, 16-18, 1997.
- 8) 山本浩代 : シソ種子ポリフェノールの抗アレルギー作用. 食品と開発 **32**, 41-43, 1997.
- 9) Taniguchi, Y., Ikegami, H., Usui, M., Ando, S., Kurimoto, M., et al. : Biological and immunological properties of Sugi basic protein-pullulan conjugate. I. Suppressive effect on IgE antibody production and on IgE-mediated reactions. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* **89**, 136-142, 1989.
- 10) 澤谷真奈美, 小野昭子, 河野恵三, 川島トモ子, 谷口美文, 他 : enzyme-linked immunosorbent assay による Cry j I, Cry j II 定量法の開発. アレルギー **43**, 467-473, 1994.
- 11) Kohno, K., Ohtsuki, T., Inoue, T., Taniguchi, Y., Usui, M., et al. : Regulation of cytokine production by sugi allergen-pullulan conjugate. *Cell. Immunol.* **168**, 211-219, 1996.
- 12) 渡辺直熙 : IgE 抗体の産生調節機構. 医学のあゆみ **180**, 3-6, 1997.
- 13) Murphy, E., Shibuya, K., Hosken, N., Openshaw, P., Maino, V., et al. : Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long term stimulation. *J. Exp. Med.* **183**, 901-913, 1996.
- 14) Bradly, L.M., Yamamoto, K. and Swain, S. : The cytokine IL-4, IFN- γ and IL-12 regulate the development of subsets of memory effector helper T cells in vitro. *J. Immunol.* **155**, 1713-1724, 1995.
- 15) Spiegelberg, H.L., Beck, L., Stevenson, D.D. and Ishioka, G.Y. : Recognition of T cell epitopes and lymphokine secretion by rye grass allergen *Lolium perenne* I-specific human T cell clones. *J. Immunol.* **152**, 4706-4711, 1994.
- 16) Rousset, F., Robert, J., Andary, M., Bonnin, J.P., Souillet, G., et al. : Shifts in interleukine-4 and interferon-gamma production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokine on spontaneous IgE synthesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **87**, 58-69, 1991.
- 17) Hamid, Q., Boguniewicz, M. and Leung, D.Y.M. : Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *J. Clin. Invest.* **94**, 870-876, 1994.

INHIBITION OF ANTIGEN-SPECIFIC T HELPER TYPE 2 RESPONSES
BY *PERILLA FRUTESCENS* EXTRACTTatsuya Ishihara¹⁾, Iwao Okamoto¹⁾, Naoya Masaki²⁾, Keizo Kohno¹⁾,
Tadao Tanimoto¹⁾ Hakuo Ikegami¹⁾ and Masashi Kurimoto¹⁾¹⁾*Fujisaki Institute, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.*²⁾*Amase Institute, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc.*

Perilla frutescens leaf extract (PFE) is known as a natural medicine with anti-allergic activities, although its mechanism of action remains unclear. In this study, we examined the effect of PFE on antigen-specific antibody and on cytokine production. Mice were immunized three times (weekly) with sugi basic protein (SBP), a major allergen of Japanese cedar pollen, in alum adjuvant. PFE was injected intraperitoneally into mice on day 2 before and on the day of each immunization with SBP in alum adjuvant. Serum anti-SBP IgE and IgG 1 antibody levels were significantly suppressed in mice injected with PFE. Furthermore, the production of interleukin (IL)-4, IL-5 and IL-10 by SBP-stimulated splenocytes also decreased in PFE-injected mice in a dose-dependent manner. However, PFE had no effect on either the serum anti-SBP IgG 2 a antibody levels or on interferon (INF)- γ production by splenocytes. When splenocytes were stimulated with concanavalin A, there was no difference in cytokine production between mice injected with PFE and control mice injected with vehicle. SBP-specific T cell line established in the presence of PFE from the lymph node cells of mice immunized with SBP showed reduced IL-4, IL-5 and IL-10 production compared with that established in the absence of PFE. In contrast, comparable levels of IFN- γ production were observed between these two T cell lines. These data suggest that PFE down-regulates Th 2-type cytokine production and prevents the Th 1/Th 2 balance from polarizing toward Th 2-type immune responses.
