

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08349

研究課題名(和文)免疫賦活作用を持つ天然物の探索とその薬効解析

研究課題名(英文)A study of searching for immunostimulating natural products

研究代表者

金田 利夫 (Kaneda, Toshio)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：70339521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Sambucus sieboldiana(生薬名：ニワトコ)から免疫賦活作用を有すると考えられる画分を部分精製し、その作用について解析した。SSFは活性物質を80%以上含む画分であり、活性物質はベンゼン環を含む糖脂質であると推定された。このSSFはリンパ球の増殖反応において、B220陽性細胞を選択的に増加させる作用を持つことが示された。詳細については未だ検討の余地があるが、このような活性はこれまでほとんど報告されていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各種の機器データから、部分精製物であるSSFはベンゼン環を有する糖脂質であることが予想されている。さらに、本研究の結果からSSFは、刺激の種類に関わらず、B細胞系の増殖を特異的に増強することが推察された。したがって、本研究で見出したSSFは、これまでに報告の無い免疫賦活作用を持つことが示唆され、今後さらなるSSFの精製と構造の決定、ならびに免疫賦活作用の詳細が明らかとなることが期待される。また、生薬としてのニワトコの利用法としても、従来の外用薬などの用途とは異なる使い方を提案するものである。

研究成果の概要(英文)：A fraction having an immunostimulatory action was partially purified from Sambucus sieboldiana and analyzed for its action. SSF was a fraction containing 80% or more of the active substance, and the active substance was presumed to be a glycolipid containing a benzene ring. This SSF was shown to have the effect of selectively increasing B220-positive cells in the proliferative response of lymphocytes. Although details remain to be examined, such activity has not been reported so far.

研究分野：生薬学

キーワード：免疫賦活 ニワトコ B細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫賦活作用は、生体の免疫機能を活性化させ、疾患に対する防御力を増強させる作用である。漢方薬では十全大補湯や補中益気湯といった処方が、ガンの転移や進行を抑えることが知られている。

一方、最近の製薬業界では分子標的薬の開発が盛んであり、開発される抗体医薬品は非常に高価である。国民医療費の高騰と保健財源確保が危ぶまれる中、生薬/漢方薬を含むセルフメディケーションや免疫賦活作用を含む『予防医学』は今後益々重要視されるべき考え方であるが、その為には十分な科学的根拠と情報発信による啓蒙が必要である。

天然物化学を含む生薬/漢方薬の分野でも、ガン予防や免疫賦活の概念は古くから取り入れられている。しかしながら、その物質的・科学的根拠は乏しいと言わざるを得ない。例えば、フラボノイドの長期的な摂取が、ガン予防効果を示すことが知られているが、これらはフラボノイドの抗酸化作用で説明されている。また、トリテルペノイドについては発ガンプロモーションの抑制作用などで、その機序が説明されている。さらに、漢方薬では、その多糖成分の免疫賦活作用により、その作用が説明されている。このような機序は、生薬成分が持つ生理活性の一端を示していると思われるが、疫学、民間レベルで語られる免疫増強作用を十分に説明できるとは言い難い。

2. 研究の目的

このような背景から、本研究では、免疫賦活作用といった視点から活性天然物を見出し、その作用の詳細を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 免疫賦活作用を持つ天然物を探すため、免疫賦活作用の活性評価系を至適化した後、315種類の生薬エキスを評価した。免疫賦活作用の活性評価系としては、T細胞の反応系として植物レクチンであるコンカナバリン A (ConA) によるマウスリンパ球の増殖反応を用いた。リンパ球の増殖阻害や細胞毒性が認められたサンプルを除外し、増殖を促進したサンプルをピックアップし、候補サンプルを絞り込んだ。

(2) この評価の過程で明瞭な活性を示した *Sambucus sieboldiana* (生薬名：ニワトコ) を選択し、このエキスに含まれる活性成分の単離を試みた。

(3) 部分精製された活性成分 SSF の脾臓細胞に対する増殖増強作用については、フローサイトメーターを用いた表面抗原の解析から、標的となる細胞群について検討した。

4. 研究成果

市販の刻み生薬ニワトコ 10 kg から、メタノール抽出、酢酸エチル抽出を経て、シリカゲルカラム、LH20 カラム、および DIOL カラムを用いて分離精製し、活性画分 SSF 4.4 mg を得た。SSF 中の活性物質の純度は 80%以上と推定され、各種構造解析からベンゼン環を有する糖脂質の関連化合物であると予測された。

SSF は図 1 に示すように、脾臓細胞における ConA によるリンパ球幼若化反応を顕著に増強した。

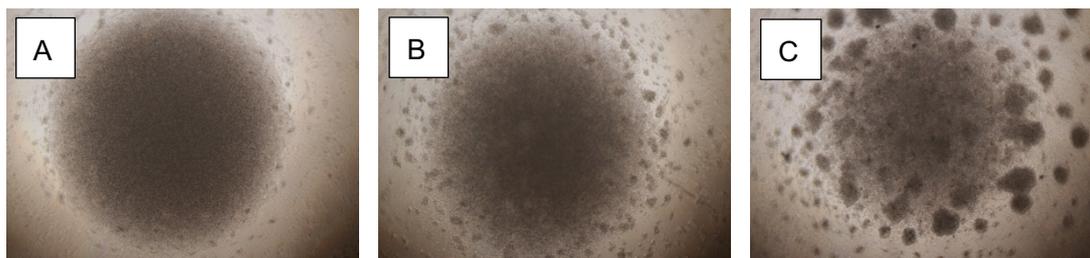


Fig.1 ConA が誘導する脾臓細胞の幼若化に対する SSF の増強作用

脾臓細胞を 96-well plate に 3×10^5 cells/well で播種し、Con A (3 μ g/mL) および SSF (10 μ g/mL) を添加し、CO₂ インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で 24 時間培養した。A: None (control), B: ConA, C: ConA+SSF

SSF の増殖促進作用についてフローサイトメトリーを用いて解析した結果、刺激後 24 時間の CD4 陽性細胞の比率は、対照群、Con A 群、Con A + SSF 群の CD4 陽性細胞の比率はそれぞれ、 $13.7 \pm 0.4\%$ 、 $10.5 \pm 0.2\%$ 、 $11.8 \pm 0.8\%$ であり、Con A 群と Con A + SSF 群間に有意な差は認められなかった。同様に CD8 陽性細胞の比率について検討した結果、CD4 陽性細胞の場合と同様に、Con A 群と Con A + SSF 群との間に有意な差は認められなかった。

一方、B 細胞系マーカーである B220 について陽性細胞の比率を検討した結果、対照群、Con A 群、Con A + SSF 群の B220 陽性細胞の比率はそれぞれ、 $60.4 \pm 1.2\%$ 、 $67.7 \pm 2.2\%$ 、 $73.6 \pm 1.3\%$ であり、Con A 群と Con A + SSF 群間に有意な差を認めた。

これらの結果を踏まえ、B 細胞系を直接的に刺激することが知られる LPS の増殖反応に対する SSF の作用を検討した。その結果、対照群、LPS 群、LPS + SSF 群の B220 陽性細胞の比率はそれぞれ、 $59.6 \pm 2.7\%$ 、 $57.6 \pm 2.1\%$ 、 $68.5 \pm 2.6\%$ であり、LPS 群と LPS + SSF 群間に有意な差を認めた (Fig. 2)。

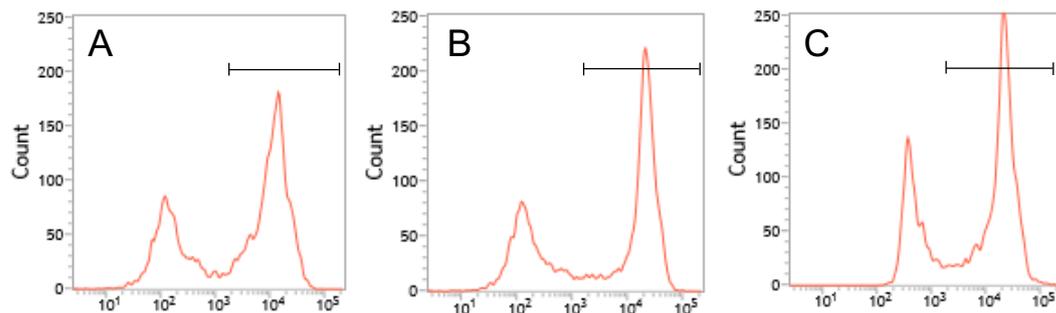


Fig. 2 LPS 誘導する脾臓細胞の増殖に対する SSF の作用

脾臓細胞を 6-cm dish に 3×10^7 cells/dish で播種し、LPS (100 ng/mL) および SSF (10 μ g/mL) を添加し、CO₂ インキュベーター (37°C, 5% CO₂) 内で 24 時間培養した。A: None (control), B: LPS, C: LPS+SSF

Sambucus sieboldiana はレンプクソウ科の植物で、従来の研究では抗骨粗鬆症の作用を持つ vanillic acid やコラーゲン合成促進作用がある kaempferol 3-*O*-sophoroside が単離されている。*Sambucus sieboldiana* について最も研究された物質は、ニホンニワトコレクチンである。ニホンニワトコレクチンは赤血球凝集活性を有することが知られているが、免疫賦活作用については報告されていない。SSF は MeOH から、hexane 層に含まれる画分で、レクチンではないことが推定される。また、各種の機器データから SSF はベンゼン環を有する糖脂質であることが予想されている。さらに、本研究の結果から SSF は刺激の種類に関わらず、B 細胞系の増殖を特異的に増強することが推察された。したがって、本研究で見出した SSF は、これまでに報告の無い免疫賦活作用を持つことが期待され、今後さらなる SSF の精製と構造の決定、ならびに免疫賦活作用の詳細について検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 沈 欣栄
2. 発表標題 レンブクソウ科Sambucus sieboldianaに含まれる免疫賦活物質について
3. 学会等名 第56回植物化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	ヌグロホ アルファリウス・エコ (Nugroho Alfarius Eko) (40770029)	星薬科大学・薬学部・特任助教 (32676)	