

ソヨウ・レイシソウによるスギ花粉症 モデルラットに対する治療効果

近藤 浩代¹⁾, 石田 寅夫^{1),2)}, 郭 義^{1),3)}

¹⁾鈴鹿医療科学大学 東洋医学研究所

²⁾鈴鹿医療科学大学 保健衛生学部 医療栄養学科

³⁾天津中医学院 鍼灸学部

はじめに

スギ花粉症は鼻アレルギーの中で最も多い疾患であり、春先に全国的に発生する。1970年代から増加しつづけ、近年では日本人の約20%が花粉症とも言われているが、未だに根本的な治療方法は見つかっていない。スギ花粉 (Fig. 1) は直径約 30 μm の球形を呈しており、その抗原は安枝ら¹⁾ によって Sugi Basic Protein (SBP) として単離精製され、*CryjI* と命名された。SBP にはさらに抗原性の異なる 2 つの主要アレルゲンを含むことが谷合ら²⁾、阪口ら³⁾ によって発見され、*CryjIII* と呼ばれ、区別されている。花粉症は I 型アレルギー (アナフィラキシー型) に分類され、この反応には IgE とマスト細胞と Fc ϵ R⁺ 細胞が関わる。花粉症の発症は *Cryj* 抗原の進入により抗体産生が開始されるインダクションフェーズと、再度の抗原進入により抗原抗体反応が惹起され、一連の過程を経て標的細胞に症状があらわれるエフェクターフェーズに大別される。インダクションフェーズでは血清中の総 IgG、IgE および *Cryj* 特異的 IgG や IgE は極端に増加する。エフェクターフェーズでは IgE の Fc ϵ 鎖はマスト細胞のような高親和性 IgE レセプター (Fc ϵ RI) (Fig. 2)⁴⁾ を発現

する細胞に結合し、レセプター上の抗原特異的 IgE が外来の花粉抗原によって架橋されると、レセプター凝集が起こり、細胞内顆粒に蓄えられていたヒスタミン等の活性アミンやプロテアーゼ、ヘパリン等の放出、ロイコトリエン、プラスタグランジン等が合成放出される。さらに、マスト細胞は Th2 タイプのサイトカイン (IL-4, 5, 6, 13) 等を合成、放出し、好酸球等を動員して炎症を惹起する。

我々はこれまで花粉症に対して効果的な治療方法を開発するために、SBP のうち最も含量の多い抗原である *Cryj I* の花粉症モデルラットを作製し、血清中の微量な *Cryj I* 特異的 IgG と IgE を測定するために高感度時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) を確立した⁵⁾。本研究では生薬の中から鎮咳去痰薬、かぜ薬、芳香健胃薬として知られるソヨウと、疲労、呼吸困難、不眠症、消化不良を治すとされているレイシソウを治療薬候補とし、スギ花粉免疫ラットにおける血清中の総 IgG と総 IgE と *Cryj I* 特異的 IgG と IgE の産生量を測定し、その治療効果について検討したので報告する。

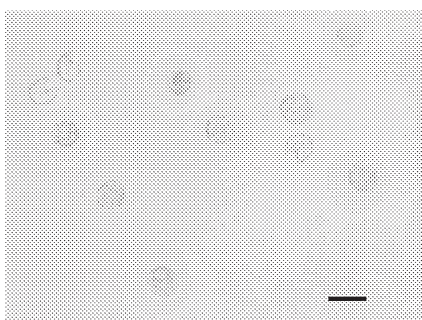


Fig 1. Japanese Cedar Pollen
bar=30 μ m

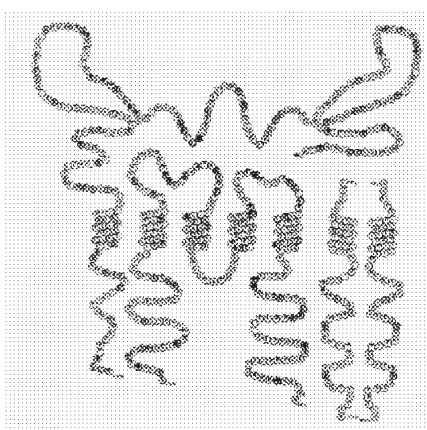


Fig 2. Model of the mouse high affinity
IgE receptor⁴⁾

材料および方法

1) 実験動物

日本チャールズ・リバー社より購入したBN/Crj Rat (雄・5週令) を1週間予備飼育後実験に使用した。

2) アレルゲン

スギ花粉主要アレルゲン *Cryj I* は林原生物化学研究所より購入し使用した。

3) 免疫スケジュール

Cryj I 3 μ g/50 μ l と水酸化アルミニウムゲル (Imject Alum ; Pierce) 50 μ l を30分混合し、ラットの腹

腔内に2週間隔で3回免疫した。3回免疫後5日後に採血を行い、血清を分離し、 -80°C に保存し測定に用いた。

4) 被験物質

生薬：ソヨウとレイシソウは近藤薬草店より購入し、ミキサーで粉碎後混合し、水道水で30分沸騰し、ろ過して凍結乾燥させ、ラット1匹あたりの投与量はヒト1日あたりの服用量を体表面積で換算し、乾燥品を秤量し水道水に溶解して1回目の免疫から5日後の採血後(6日後)以降毎日経口投与した。

5) Total IgG と IgE の測定

96 well マイクロプレート (Nunc) に0.01% bovine serum albumin (BSA) (Sigma) 含有 carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5) で希釈した10 μ g/ml の抗ラット IgG または IgE 抗体 (Zymed) を100 μ l 加え、 37°C で2時間反応させ、1% BSA-PBS で 25°C 1時間ブロッキングした。0.05% Tween-20 含有 PBST で洗浄後、BSA-PBST で希釈した血清を 4°C で一晩反応させた。PBST で洗浄後、ビオチン標識 IgG (CHEMICON) またはビオチン標識 IgE (NORDIC) 1 μ g/ml を加え、 25°C で2時間反応させ、Eu-ストレプトアビジン (1:500, Pharmacia Biotech) を加え、 25°C で45分反応させた。増強試薬を加えて5分後に Eu の時間分解蛍光強度を Wallac 1420 ARVO D (Pharmacia Biotech) にて測定した。

6) スギ花粉 *Cryj I* 特異的 IgG 抗体の測定 (Fig. 3)

96 well マイクロプレートに0.01% BSA 含有 carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5) で希釈した1 μ g/ml の *Cryj I* (林原生物化学研究所) を100 μ l 加え、 37°C で2時間反応させ、1% BSA-PBS で 25°C 1時間ブロッキングした。0.05% Tween-20 含有 PBST で洗浄後、BSA-PBST で希釈した血清を 4°C で一晩反応させた。PBST で洗浄後、ビオチン標識 IgG (CHEMICON) 0.5 μ g/ml を加え、 25°C で2時間反応

させ、以下5)と同様に反応・検出を行った。

7) スギ花粉 *Cryj I* 特異的 IgE 抗体の測定 (Fig. 3)

96 well マイクロプレートに 0.01%BSA 含有 carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.5) で希釈した $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の monoclonal 抗ラット IgE (Zymed) を $100 \mu\text{l}$ 加

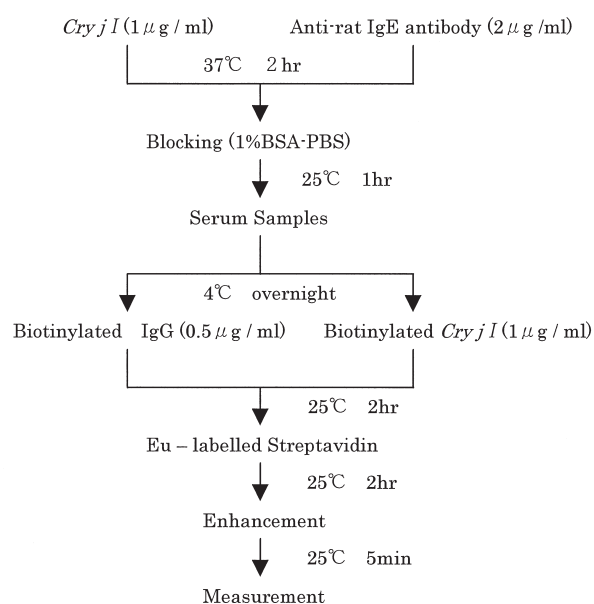


Fig. 3 Procedure of *Cryj I* specific IgG and *Cryj I* specific IgE using Temporal Resolution—Fluoroimmunoassay.

え、 37°C で2時間反応させ、1%BSA-PBSで 25°C 1時間ブロッキングした。0.05%Tween-20含有PBSTで洗浄後、BSA-PBSTで希釈した血清を 4°C で一晩反応させた。PBSTで洗浄後、ビオチン標識 *Cryj I* (林原生物化学研究所) $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ を加え、 25°C で2時間反応させ、以下5)と同様に反応・検出を行った (Fig. 1)。*Cryj I* 特異的抗体価は、正常の蛍光強度が2倍の値を示す希釈倍率で示した。

結 果

Total IgG 抗体量はソヨウ・レイシソウ群において有意な差はなかったが、モデル群より高い傾向がみられた (Fig. 4)。

Total IgE 抗体量はソヨウ・レイシソウ群においてモデル群より有意に低値を示した ($P < 0.05$) (Fig. 4)。

Cryj I 特異的 IgG 抗体価はソヨウ・レイシソウ群においてモデル群より有意に低値を示した ($P < 0.01$) (Fig. 5)。

Cryj I 特異的 IgE 抗体価はソヨウ・レイシソウ群において有意な差は見られなかったが、モデル群よりも抗体価を減少させる傾向が見られた (Fig. 5)。

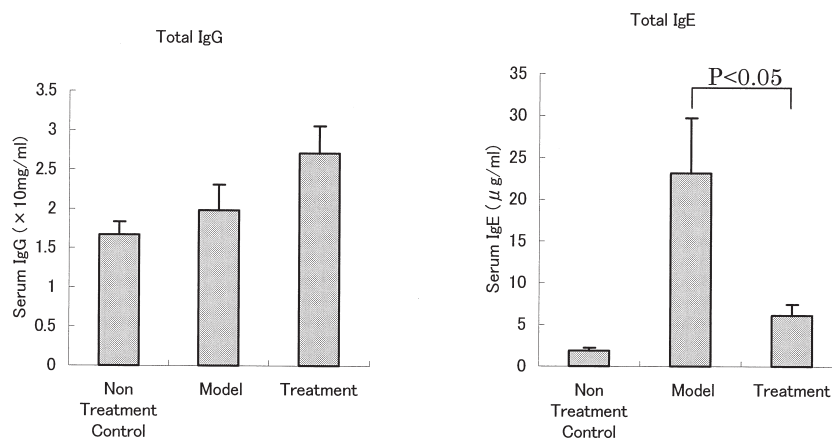


Fig. 4 Immunoresponse of Total IgG and Total IgE in serum.

BN rat ($n=5$) were inoculated i.p. with $3 \mu\text{g}$ of *Cryj I* three times at a two-week interval. Data are presented as means \pm SEM.

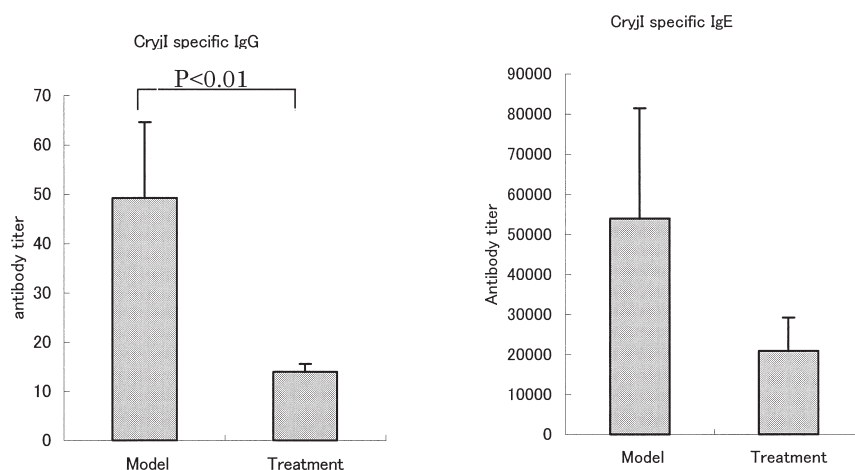


Fig. 5 Immunoresponse of *Cry j I* specific IgG and *Cry j I* specific IgE in serum. BN rat (n=5) were inoculated i.p. with 3 μ g of *Cry j I* three times at a two-week interval. Data are presented as means \pm SEM.

考 察

ソヨウ・レイシソウは Total IgE, *CryjI* 特異的 IgG, *CryjI* 特異的 IgE 抗体を低下させる作用があることが明らかになった。特に花粉症発症に直接作用する *CryjI* 特異的 IgE 抗体を減少させる作用があるため、マスト細胞上の Fc ϵ RI に結合する抗体が少なくなることで根本的に症状が軽減されると考えられた。

アレルギーの治療薬は抗アレルギー薬（ケミカルメディエーター遊離抑制薬、ケミカルメディエーター受容体拮抗薬、Th2 サイトカイン拮抗薬）、ステロイド薬、自律神経作用薬（ α -交感神経刺激薬、抗コリン薬、副交感神経遮断薬）等、エフェクターフェーズに作用して効果を発揮するものが殆どであり、対症療法である。現在アレルギーの治療によく使用される生薬は、小青竜湯、柴朴湯、麻黄附子細辛湯などであり、これらはケミカルメディエーター遊離抑制、気道平滑筋弛緩作用、抗ヒスタミン作用があると言われている。

一方インダクションフェーズに作用して効果を示す療法には抗原特異的免疫療法（減感作療法：Ag-IT）があるが、①効果が出るまでに 2～3 年かかる②有効率は 50%程度である③その 10%は局所的な副作用が発現する④稀にアナフィラキシーショック等の全身性副作用を起こす⑤高齢者や妊産婦・授乳婦や小児への投

与は避けられる⁹⁾、等の原因で利用する人はまだまだ少ない。今回検討した生薬はこのような副作用がない上、インダクションフェーズに作用して効果を示すというユニークな薬物であることが判明した。ソヨウの成分は perillaldehyde, 1-limonene, α -, β -pinene, 3-octanol, 1-octen-3-ol, linalool, caryophyllene, α -farnesene, 8-p-menthen-7-ol, 1-peri-llyl alcohol 等を含み、アントシアン配糖体として shisonin, フラボン類として apigenin luteolin 及びその配糖体、青酸配糖体、caffeic acid, rosmarinic acid 等を含有する⁷⁾。レイシソウの成分はエルゴステロール、リシノレイン酸、フマル酸、グルコサミン、多糖類、樹脂、マンニトール、ペタイン等を含む⁸⁾。

これらの成分または煮沸によりできた物質が、Th2 における Bcell の IgE 産生を何らかの機序で抑制し、今回の IgE 抗体産生抑制作用を示したと考えられた。近年 Th1/Th2 の包括的検索が最近 DNA array⁹⁾¹⁰⁾ や serial analysis of gene expression (SAGE) を用いて行われている¹¹⁾。今後は Th1/Th2 バランスの観点から Th2 の分化・増殖に関わるサイトカインやケモカインの解明ならびに発現遺伝子の解析のような詳細な解析が期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたりご協力くださった本研究所の平澤茂子様，飯田会衣子様，宮崎ひとみ様，張艶軍先生に感謝致します。

本研究は文部科学省の「ハイテクリサーチセンター整備事業」の補助金の助成を受けて行われた。

参考文献

- 1) Yasuda H, Yui Y, Shimizu T, et al. : Isolation and Partial Characterization of the major allergen from Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen, *J. allergy Clin. Immunol.* 71, 77-86, 1983.
- 2) Taniai M, Ando S, Usui M, et al. : N-terminal amino acid sequence of major allergen of Japanese cedar pollen (*Cry j* I). *FEBS Letters*, 239, 329-332, 1988.
- 3) Sakaguchi M, Inoue S, Taniai M, et al. : Identification of the second major allergen of Japanese cedar pollen, *Allergy* 45, 309-312, 1990.
- 4) Ra C, Jouvin MH, Kinet JP, et al. : Complete Structure of the Mouse Mast Cell Receptor for IgE (Fc ϵ RI) and Surface Expression of Chimeric Receptors (Rat-Mouse-Human) on Transfected Cells, *J. Biol. Chem*, 264, 15323-15327, 1989.
- 5) 近藤浩代, 於志峰, 石田寅夫他 : スギ花粉免疫ラットにおける時間分解蛍光免疫測定法を用いたスギ花粉特異的 IgG・IgE 測定方法とその応答, 鈴鹿医療科学大学紀要, 10, 93-97, 2003.
- 6) 大久保公裕, 後藤穰, 山岸茂夫他 : 標準化スギ花粉エキス (TO-194) の特異的減感作療法における安全性の検討, 耳鼻と臨床, 45, (3), 251-263, 1999.
- 7) 秋山和幸ほか : 日本薬局方解説書, 廣川書店, D 632-635, 1996.
- 8) 白井勝也ほか : 中薬大辞典, 小学館, 4, 2731, 1985.
- 9) Li XD, Essayan DM, Liu MC. : Profiling of differential gene expression in activated, allergen-specific human Th2 cells. *Genes Immun*, 2, 88-98, 2001.
- 10) Rogge L, Bianchi E, Biffi M. : Transcript imaging of the development of human T helper cells using oligonucleotide arrays, *Nat Genet*, 25, 96-101, 2000.
- 11) Nagai S, Hashimoto S, Yamashita T, et al. : Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1-and T(h)2-polarized cells, *Int. Immunol*, 13, (3), 367-376, 2001.

The effect of *Perilla frutescens* and *Ganoderma lucidum* in a rat model of Japanese Cedar Pollinosis

Hiroyo KONDO¹⁾, Torao ISHIDA^{1),2)}, Yi GUO^{1),3)}

¹⁾Institute of Traditional Chinese Medicine, Suzuka University of Medical Science

²⁾Department of Clinical Nutrition, Faculty of Health Science, Suzuka University of Medical Science

³⁾Acupuncture-and-moxibustion faculty, Tianjin University of Traditional Medicine

Key Words: *CryjI*, Japanese Cedar Pollinosis, IgG, IgE, *Perilla frutescens*, *Ganoderma lucidum*

Abstract

Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollinosis is one of the most common immediate-type allergic diseases in Japan. Japanese cedar pollinosis is caused by exposure to Japanese cedar pollen. The major allergens are *CryjI* and *CrjyII*.

We investigated the efficiency of a *Perilla frutescens* and *Ganoderma lucidum* extract focusing on allergen-specific immune responses. Brown Norway rats received a *Perilla frutescens* and *Ganoderma lucidum* extract after they were primed intraperitoneally with *CryjI* and Imject Alam.

Oral administration of *Perilla frutescens* and *Ganoderma lucidum* extract inhibits Total IgE, *CryjI* specific IgE and *CryjI* specific IgG antibodies production in *CryjI* immunized rat serum. These results indicate a potential as an antiallergic drug for Japanese cedar pollinosis.