

氏名	中 津 継 夫
授与した学位 専攻分野の名称	博 士 歯 学
学位授与番号	博乙第 2863 号
学位授与の日付	平成7年3月25日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者（学位規則第4条第2項該当）
学位論文題名	ビスコクラウリン型アルカロイド製剤 セファランチンのマウス脾臓内ヒスタジン脱炭酸酵素活性誘導増強効果とサイトカイン誘導増強効果に関する研究
論文審査委員	教授 岸 幹二 教授 福井一博 教授 古田裕昭

### 学位論文内容の要旨

#### 研究目的

セファランチン(Cep)はタマサキツツ<sup>®</sup>ラフジ(*stephania cepharantha Hayata*)の根茎から抽出されたビスコクラウリン型アルカロイド製剤で、マクロファージ(Mφ)の活性増強、サイトカイン産生増強など免疫機能増強効果を有することが知られている。しかし、これらの薬理作用の機序に関しては不明な点が多い。

一方、ヒスタミン(His)は肥満細胞、好塩基球から放出される化学伝達物質として古くから知られているが、近年、肥満細胞、好塩基球以外の免疫に関与する細胞にもヒスタミン生成酵素であるヒスタジン脱炭酸酵素(HDC)やヒスタミン受容体が存在することが明らかにされるに至ってHisの免疫系での役割が注目されている。しかし、Hisが免疫系細胞におよぼす影響については、促進的とする報告と抑制的とする報告双方があり、現状ではHisの免疫系での役割については未だ明確でない。

著者はマイトジェンによるマウス脾臓内HDC活性誘導がCepによって増強されることを見出した。これもCepの免疫機能増強作用との関連が考えられるが、HDC活性の変動を指標にHDCを有する脾臓内細胞を特定し、その細胞の活性とCepならびにHisの影響を明らかにすれば、Cepの免疫機能増強効果の機序解明の端緒が得られるのではないかと考えた。

そこで、本研究はCepによるマイトジェン由来脾臓内HDC活性増強でのCep作用細胞の同定とHDC活性を有する細胞のサイトカイン産生におよぼすHisの影響を検討し、Cepによる免疫機能増強効果におけるHisの関与の可能性を明らかにする目的で行った。

#### 研究方法

##### 1. 動物実験

実験動物はすべて6週令の雄性マウスで正常マウスとしてddY系、T細胞機能欠損マウスであるBALB/c nu/nuとその正常コンジュニックのBALB/c +/+を、T細胞B細胞機能欠損マウスであるSCIDマウスC.B-171cr scid/scidを用いた。マウスにCepを1日量10mg/kg連続5日間、腹腔注射し6日目にリポポリサッカライド(LPS)を100μg/kg、コンカナバリンA(Con A)を5mg/kg静注し屠殺後、脾臓を摘出して試料とした。

## 2. Hisの定量

試料を0.02Mリン酸緩衝液(pH6.2, ピリドキサル5リン酸20 $\mu$ M, ジチオスレイトール200 $\mu$ M含有)にてホモゲナイズした。遠心(1500 $\times$ g, 5min)後, pHを調整した上清液をP-セルロースカラムにて分画し, Hisをオルトフタルアルデヒドを用い蛍光法にて定量した。

## 3. HDC活性の定量

上記ホモジネート液の一部を遠心(1500 $\times$ g, 5minおよび20000 $\times$ g, 20min)し, 得られた上清をP-セルロースカラムに通しHisを除去して, これを酵素抽出液とした。この酵素液にL-ヒスチジンを加えてインキュベート(37 $^{\circ}$ C, 4hまたは18h)し, 生成されたHisを上記の定量法で定量して酵素活性とした。

## 4. インターロイキン1(IL-1)ならびに腫瘍壊死因子(TNF)の定量

ddY系マウスの腹腔浸出細胞より分離精製したM $\phi$ を10%牛胎児血清含RPMI1640培地に懸濁して96穴マイクロプレートに分注し各種薬剤を添加後18時間インキュベートした。上清中のIL-1 $\alpha$ ならびにTNF- $\alpha$ をそれぞれMOUSEIL-1 $\alpha$  ELISAキット, MOUSETNF- $\alpha$  ELISAキットを用いて定量した。

## 研究結果

### 1. 脾臓内HDC活性とCepの増強効果

ddY系マウスの脾臓内HDC活性はLPS, Con Aによって誘導され, 脾臓内His量は増加した。LPSによるHDC活性誘導はヌードマウス, SCIDマウスでも認められ, それぞれのコンジュニクよりも高いHDC活性誘導を示した。Cepは各マウスのLPSによるHDC活性誘導を増強し, 増強効果にマウス間の大きな差は認めなかった。

### 2. M $\phi$ のHDC活性とCepの増強効果

腹腔M $\phi$ のHDC活性はLPSによって誘導され, CepによりHDC活性誘導は約1.4倍に増強された。

### 3. M $\phi$ のIL-1, TNF産生におけるHisの影響

M $\phi$ のIL-1, TNF産生はCepによって増大し, Hisは各濃度でIL-1, TNF産生を誘導した。またLPS誘導時のIL-1, TNF産生はHis受容体拮抗剤では阻害されなかったがCep添加時はH<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>受容体拮抗剤ともにIL-1, TNF産生を拮抗剤の濃度に依存して抑制した。更にHDCの阻害剤でIL-1, TNF産生は抑制された。

## 考察

正常マウス, 免疫細胞機能欠損マウスともにLPSによる脾臓内HDC活性誘導, CepのHDC活性誘導増強効果は認められ, HDCの主たる局在はT細胞, B細胞以外の細胞であり, ヌード, SCIDマウスで活性が高いM $\phi$ ではないかと考えられた。腹腔M $\phi$ を用いて, LPSによる脾臓内HDC誘導とCepの増強効果がM $\phi$ のHDC活性誘導とその増強効果に他ならないことが確認された。

HisのM $\phi$ のサイトカイン産生に及ぼす影響は促進的に作用することが明らかになった。この作用は細胞外のHisのみならず細胞内で産生されるHisによって制御されていることが示唆され, Cepのサイトカイン産生増強効果はHisの産生を介して発揮される可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

本論文は免疫機能増強効果を有するアルカロイド製剤セファランチンのサイトカイン産生増強効果における誘導性ヒスタミンの関与を検討した研究である。まず、各種免疫細胞機能欠損マウスを用い、脾臓内のヒスタミン生成酵素であるヒスチジン脱炭酸酵素(HDC)の活性変動より脾臓内HDC活性がT細胞、B細胞を介さずともマイトジェンにより誘導され、セファランチンがその誘導を増強することを示し、更にin vitroの研究でセファランチンの作用している細胞がマクロファージであることを明らかにした。従来、不明確であったヒスタミンの免疫系細胞への影響に関してもヒスタミンがマクロファージのサイトカイン産生を増強すること、この作用が細胞内外のヒスタミンによって制御されていることを示唆する結果を得ている。更にセファランチンがマクロファージのサイトカイン産生を増強する効果においてもヒスタミンの産生増加を介して発揮される効果であることを明らかにした。本論文はセファランチンの作用機構を誘導性ヒスタミンより検討を加えた新規の報告であり、セファランチンのサイトカイン産生増強効果でヒスタミンが関与するとの重要な知見を得たものとして価値ある業績である。

よって、本研究者は博士(歯学)の学位を得る資格があると認める。