

28amA-004

ノニ (*Morinda citrifolia*) 果肉の細胞性免疫応答に及ぼす影響



○阿部友美^{1, 2}, 大下満紀¹, 二村 (増田) めぐみ¹, 村田和也¹, 松田秀秋¹
(近畿大・薬¹, モリンダワールドワイドインク²)

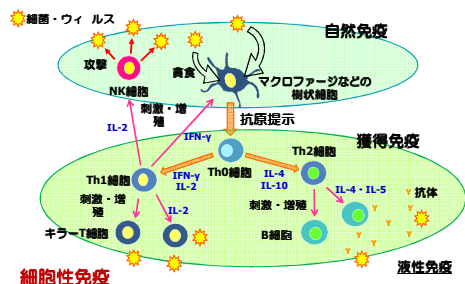
目的

ノニ (*Morinda citrifolia*) は熱帯・亜熱帯地域に広く分布するアカネ科の果樹で、ポリネシア諸島などでは、根から果実・葉までのあらゆる部位が食用および伝薬薬として利用されてきた。我が国でも、発酵させた果肉の飲料が、広く親しまれている。これまで、ノニの抗腫瘍作用に関する報告は多数あり、その作用機序のひとつとして免疫能を賦活化し、がんの進行を抑制するとされているが、その詳細は明らかになっていない。そこで、我々はノニに免疫賦活化作用を期待し、今回、担がん動物由来の免疫抑制物質による免疫能低下マウスにおける細胞性免疫応答をPC-CD試験を用いて検討し、その有効成分の探索を行った。さらに、サイトカイン産生能に及ぼす影響についても検討を行った。

結果と考察

PC-CD試験

ICR系雌性マウスに担がん動物由来の免疫抑制物質であるEC-supを投与すると耳浮腫は顕著に抑制されたが、Noni-extを1週間前投与することで、その耳浮腫の低下が用量依存的に抑制された。そこで、EC-sup処置マウスを用いて細胞性免疫応答を指標に成分探索を行った。Noni-extを以下のスキームに従って分画して検討した結果、BuOHおよびwater画分に作用がみられた。そのため、両画分に多く含まれているdeacetylasperulosidic acid (DAA) について検討を行った結果、耳浮腫の低下抑制作用が認められた。以上から、Noni-extに細胞性免疫応答低下抑制作用が認められ、その有効成分のひとつがDAAであることが明らかになった。



実験方法

被検体の調製

タヒチ産ノニ果肉の乾燥粉末を10倍量の50% EtOHで2時間2回還流抽出し、熱時ろ過して得られたろ液から減圧下で溶媒を留去し、凍結乾燥を施して得られたエキス (Noni-ext, 収率53.0%) を被検体として用いた。

Ehrlich carcinoma 担がんマウス 腹水上清乾燥物 (EC-sup) の作成

ICR系雌性マウスの腹腔内に生理食塩水に懸濁させた Ehrlich carcinoma 細胞をマウスあたり 5×10^6 個移植し、その10-15日後に腹水を採取し、5℃, 1,500×g, 10分間遠心分離して得た上清の凍結乾燥物 (EC-sup) を細胞性免疫抑制物質として実験に用いた。

塩化ピクリル誘発接触性皮炎 (PC-CD) 試験

ICR系雌性マウス (7週齢, 27-29g) 免疫抑制物質の投与 (腹腔内) EC-sup: 担がんマウス由来の免疫抑制物質

耳浮腫測定 臓器重量測定

被検体を7日間経口投与

1 (腹部: 7% PC, 0.1 ml) 6 7 8 9 (日)

7 (両耳介: 1% PC, 0.02 ml)

ICR系雌性マウスの腹部を剪毛し、PCを塗布して感作させた。感作後、7日間被検体を経口投与した。被検体の最終投与日に免疫抑制物質を腹腔内投与した。感作7日後に両耳介にPCを塗布し、PC-CDを誘発させた。PCによる誘発の直前の耳介の厚さと誘発24時間後の耳介の厚さの差を耳介浮腫の増加量として算出し、評価した。

サイトカイン産生試験 (ELISA法)

脾臓 BALB/c雌性マウス (7週齢, 18-20g) 被検体を14日間経口投与

24 well マイクロプレート インキュベーション (37℃, 5% CO₂, 48 h) 上清

脾臓細胞 2×10^6 cells/well RPMI-1640 (10% FBS) Con A (1 μg/ml)

ELISA法

BALB/c系雌性マウスに被検体を2週間連続経口投与し、免疫低下マウスモデルにおいてはEC-supを解剖の前々日より2日間連続腹腔内投与した。投与最終日の翌日にマウスより脾臓を摘出し、得られた脾臓細胞浮遊液を 2×10^6 cells/wellになるように調製し、24 well マイクロプレートに播種した。そこに、concanavalin A (Con A) を添加し、37℃, 5% CO₂下で48時間培養した。その後、培養液上清を回収し、ELISA法によりサイトカイン量 (IL-2, IL-4およびIL-10) を測定した。

Dried fruit of *Morinda citrifolia*

extracted with 50% EtOH

Noni-ext (yield; 53.0%) Marc

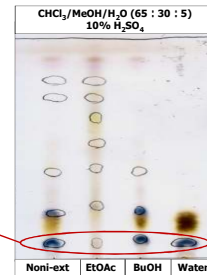
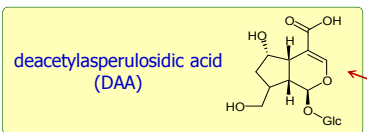
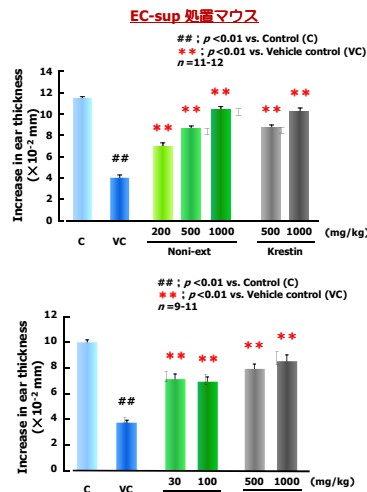
EtOAc/water Aqueous layer BuOH

EtOAc sol. fr. BuOH sol. fr. Water sol. fr.

Yield and activity data for EtOAc and BuOH fractions.

Yield and activity data for Water fraction.

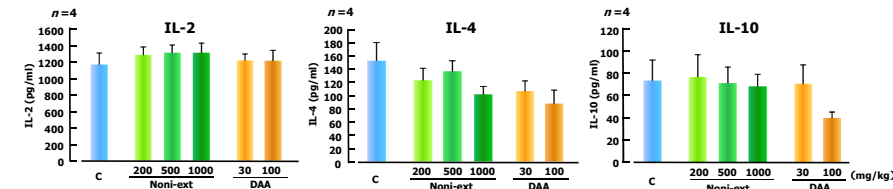
Yield and activity data for DAA contents.



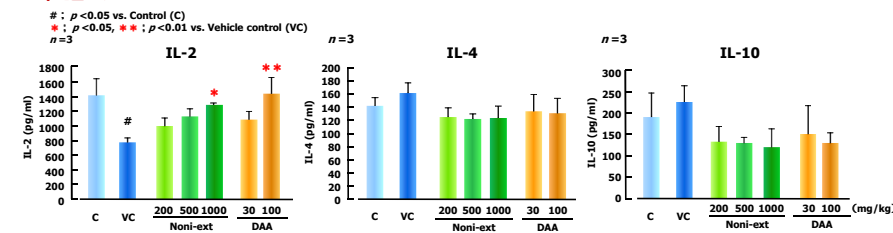
サイトカイン産生試験

次にNoni-extおよびDAAの細胞性免疫応答低下抑制作用がリンパ球の機能に及ぼす影響を、脾臓リンパ球より産生されるサイトカイン量を指標に検討した。その結果、正常マウスにおいてはどのサイトカイン産生量にも影響を及ぼさなかったが、EC-sup処置マウスにおいてはIL-2の産生量を有意に低下させた。さらにNoni-extおよびDAAを2週間前投与することでその産生量の低下が抑制された。このことから、Noni-extおよびDAAはIL-2の低下を抑制することで細胞性免疫応答の低下抑制する可能性が示唆された。また、Noni-extおよびDAAが免疫機能に関するリンパ球中のCD3⁺ (T細胞), CD4⁺CD3⁺ (ヘルパーT細胞), CD8⁺CD3⁺ (キラーT細胞) およびB220 (B細胞) 数の割合に関与しているかをリンパ球サブセット解析により検討を行った。その結果、Noni-extおよびDAAはいずれの細胞数の割合にも影響を及ぼさなかった。EC-sup処置時においても、細胞数に影響を及ぼさなかった。よって、EC-supはリンパ球の機能を低下させることにより細胞性免疫応答を低下させ、Noni-extおよびDAAはその機能を低下を抑制することが示唆された。

正常マウス



EC-sup処置マウス



まとめ

今回、担がん動物由来の免疫抑制物質であるEC-supを用いて、低下した細胞性免疫応答に及ぼすNoni-extの影響をPC-CD試験にて確認した。その結果、Noni-extに細胞性免疫応答の低下抑制作用が認められ、イリドイド配糖体であるDAAが有効成分のひとつであることを明らかにした。さらに、そのメカニズム解明として、Noni-extおよびDAAが免疫担当細胞の数の割合、もしくは機能に影響を与えているかを確認するために、リンパ球サブセット解析およびサイトカイン産生能に及ぼす影響についても確認を行った結果、EC-supはリンパ球中の細胞の割合ではなく、IL-2の産生量を低下させることで細胞性免疫応答を低下させていると考えられる。また、Noni-extおよびDAAは正常状態においては細胞数の割合にもサイトカイン産生にも影響を及ぼさず、EC-sup処置により低下したIL-2の低下を抑制することが分かった。よって、Noni-extおよびDAAは免疫機能を調節する作用があることが示唆された。今後はノニおよびDAAがその他の免疫担当細胞に対しても影響を及ぼすか検討する予定である。