

杜仲葉細胞壁多糖がマクロファージの NO 産生に及ぼす影響

Effects of polysaccharides from the leaves of *Eucommia ulmoides* on NO production in macrophage cell line

伊藤 聖子**・加藤 陽治*
Seiko ITO・Yoji KATO

要 旨

杜仲葉は乾燥重量の22.5%が単糖・オリゴ糖で、18.5%が細胞壁構成多糖類（ペクチン様多糖：ヘミセルロース：セルロース=51：27：22）である。ペクチン様多糖画分はアラビナン、ガラクトン、あるいはアラビノガラクトンを側鎖として有するラムノガラクトロンが主要多糖であり、ヘミセルロース画分は酸性アラビノキシランとキシログルカンが主要で、一部中性糖側鎖の少ないラムノガラクトロンが含まれている¹⁾。先に調製したこのペクチン様多糖およびヘミセルロース性多糖を用い、免疫賦活活性をマクロファージの活性化（NO産生）を指標として検索した。その結果、ガラクトン酸直鎖に結合したラムノース残基に、アラビナン、ガラクトンあるいはアラビノガラクトンの中性糖側鎖を有するいわゆるペクチン様多糖がマクロファージを強く刺激する可能性が示唆された。

キーワード：杜仲葉、ペクチン、免疫賦活、マクロファージ

1. 緒 言

中国の四川省辺りが原産地である杜仲（トチュウ、*Eucommia ulmoides*）は、トチュウ科トチュウ属トチュウという1科1属1種の非常に珍しい樹木である²⁾。樹皮は中国で古くから生薬として用いられ、その効能は利尿、強壮、降圧、強精作用等が知られている³⁾。その成分はリグナン類（pinoresinol diglucoside, syringaresinol diglucoside など）およびイリドイド類（geniposide など）などである⁴⁻⁹⁾。また、杜仲の葉にも同様な薬理作用があることが示唆されている³⁾。また、杜仲の生理活性として抗酸化活性^{10,11)}、抗 HIV 活性^{12,13)}、およびコラーゲンの分解・合成能力の向上^{14,15)}なども報告されている。さらに、杜仲樹皮から熱水で抽出され、アラビノース（Ara）、ガラクトース（Gal）、グルコース（Glc）、ラムノース（Rha）およびガラクトン酸（GalU）が8:6:4:5:8から構成される多糖に免疫系賦活活性があることが報告されている^{16,17)}。

われわれは先に、杜仲葉に含まれる炭水化物全体を明らかにする研究を行った。その中で、杜仲樹皮から得られた免疫賦活活性を示す多糖（Ara:Gal:Glc:

Rha:GalA = 8:6:4:5:8）と類似構造を有する多糖の存在が示唆された¹⁾。

そこで、本研究では杜仲葉のペクチン様多糖およびヘミセルロース性多糖が、同様あるいは他の生理活性を有するか否かを明らかにするため、免疫賦活活性の有無をマクロファージの活性化を指標として明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

2-1. 試 料

先の研究¹⁾で、杜仲葉凍結乾燥粉末の80%エタノール不溶性画分をシュウ酸アンモニウム、4%および24%水酸化カリウムで順次抽出分画を行い、高分子ペクチン（PS-H）画分、低分子ペクチン（PS-L）画分、ヘミセルロース-I（HC-I）画分、ヘミセルロース-II（HC-II）画分、セルロース（CL）画分を得た（表1）。PS-H、HC-I、およびHC-IIをそれぞれDEAE-Sephadex A-25クロマトグラフィーに供し、多糖の分画精製を行った。PS-Hの主要画分（PS-H-III）と、HC-Iの主要画分（HC-I-2、HC-I-3）およびHC-IIの主要画分（HC-II

* 弘前大学教育学部家政学科教室食物学研究室

Laboratory of Food Science, Department of Home Economics, Faculty of Education, Hirosaki University

** 静岡県立大学食品栄養科学部

School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka

表1 杜仲葉細胞壁の多糖画分の収量と構成糖組成¹⁾

凍結乾燥後粉末にした杜仲葉の80%エタノール不溶性画分を0.25%シュウ酸アンモニウム、4%および24%水酸化カリウムで順次抽出分画を行い、ペクチン様物質 (PS) 画分、ヘミセルロース-I (HC-I) 画分、ヘミセルロース-II (HC-II) 画分とした。最終抽出残渣をセルロース (CL) 画分とした。PS 画分は透析操作により透析膜内液の高分子画分 (PS-H) と透析外液の低分子画分 (PS-L) に分けた。

多糖画分	収量 ^{a)}		糖組成(重量%)							
	全糖量(mg)	(%)	U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
PS-L	64.1	8.7	66.9	3.8	tr.	17.9	tr.	0.5	1.8	9.1
PS-H	311.9	42.4	77.9	1.4	-	9.7	tr.	0.4	1.3	9.2
HC-I	83.0	11.3	23.1	3.6	0.8	25.7	8.9	0.6	7.9	29.4
HC-II	117.8	16.0	tr.	1.7	3.6	16.2	18.4	1.9	27.6	30.6
CL	158.6	21.6	tr.	0.7	0.1	4.4	0.8	1.1	91.8	1.1
Total	735.4	100								

(凍結乾燥葉 3.972g より)

-1) はさらに DEAE-Sephadex A-25 陰イオンクロマトグラフィーで分画精製を行った試料を用いた (図1)。

各試料 (PS-H-III-1~5, HC-I-2-a~e, HC-I-3-a~d, HC-II-1-a~b) の収量は微量であったので凍結乾燥物を1.0mlの蒸留水に溶解、0.22 μ m メンブレンフィルターで濾過滅菌し、活性測定試料とした。細胞投与後、各画分の糖濃度を、フェノール硫酸法 (全糖量)¹⁸⁾ とカルバゾール硫酸法 (酸性糖量)¹⁹⁾ にて測定した。

2-2. マクロファージ活性化能の測定

ヒューマンサイエンス研究資源バンクより分譲された、マウスマクロファージ様細胞株 J774.1を用いた。10%FBSを加えた RPMI-1640培地で培養した細胞を、トリプシン消化により回収し、同培養液で 1.0×10^6 cells/ml に調整した。

組織培養用96穴マイクロプレートに 5.0×10^4 または 1.0×10^5 個のJ774.1細胞を播種し、24時間培養した。各画分を10%濃度になるよう添加、さらに24時間培養後、培養上清を採取した。対照とする多糖として、グリコーゲン (Cont.: Final conc. 1mg/ml) を用いた。

各画分の刺激によりJ774.1細胞から産生される培養上清中の NO_2^- を、Griess測定試薬 (Promega) により測定した²⁰⁾。

2-3. 濃度依存性

PS-H-III-1~5画分について、 1.0×10^5 個のJ774.1細胞を播種し24時間培養後、各画分を5%および

20%濃度になるよう添加、さらに24時間培養後の培養上清を採取した。各画分の刺激によりJ774.1細胞から産生される培養上清中の NO_2^- を、Griess測定試薬 (Promega) により測定した。

3. 結果と考察

マクロファージは刺激を受けて活性化すると、貪食・殺菌能の上昇、遊走能の増加、フリーラジカルの産生、サイトカインの産生等が起こり、これらの指標を測定することによりマクロファージの活性評価が可能となる²¹⁾。本実験では、マクロファージの活性評価として、各試料の刺激によって誘導される NO_2^- を、Griess法により測定した。用いた多糖試料は先の実験で調製したものであるが、表1に杜仲葉の細部壁の多糖各画分の収量を示す。また、図1にPS-H、HC-I、およびHC-IIのDEAE-Sephadex A-25クロマトでの分画精製の概略を、そして得られた各画分の構成糖組成と投与糖量を表2に示す。各試料 (PS-H-III-1~5, HC-I-2-a~e, HC-I-3-a~d, HC-II-1-a~b) の NO 産生に対する影響をまとめたのが図2である。

PS-H-III各画分の NO 産生に対する影響をみてみると、いずれも、無刺激群に比べて NO 産生量が増加していることから、PS-H-III画分のマクロファージ活性化能が確認された。主成分となるPS-H-III-3画分は、中性糖側鎖の少ないラムノガラクトロン多糖と考えられるが、 NO 産生量は最も少なく、中性糖比の多いPS-H-III-4やPS-H-III-5画分の方が、最終糖濃度は少ないが NO 産生量は多かった。このことから、ガラクト

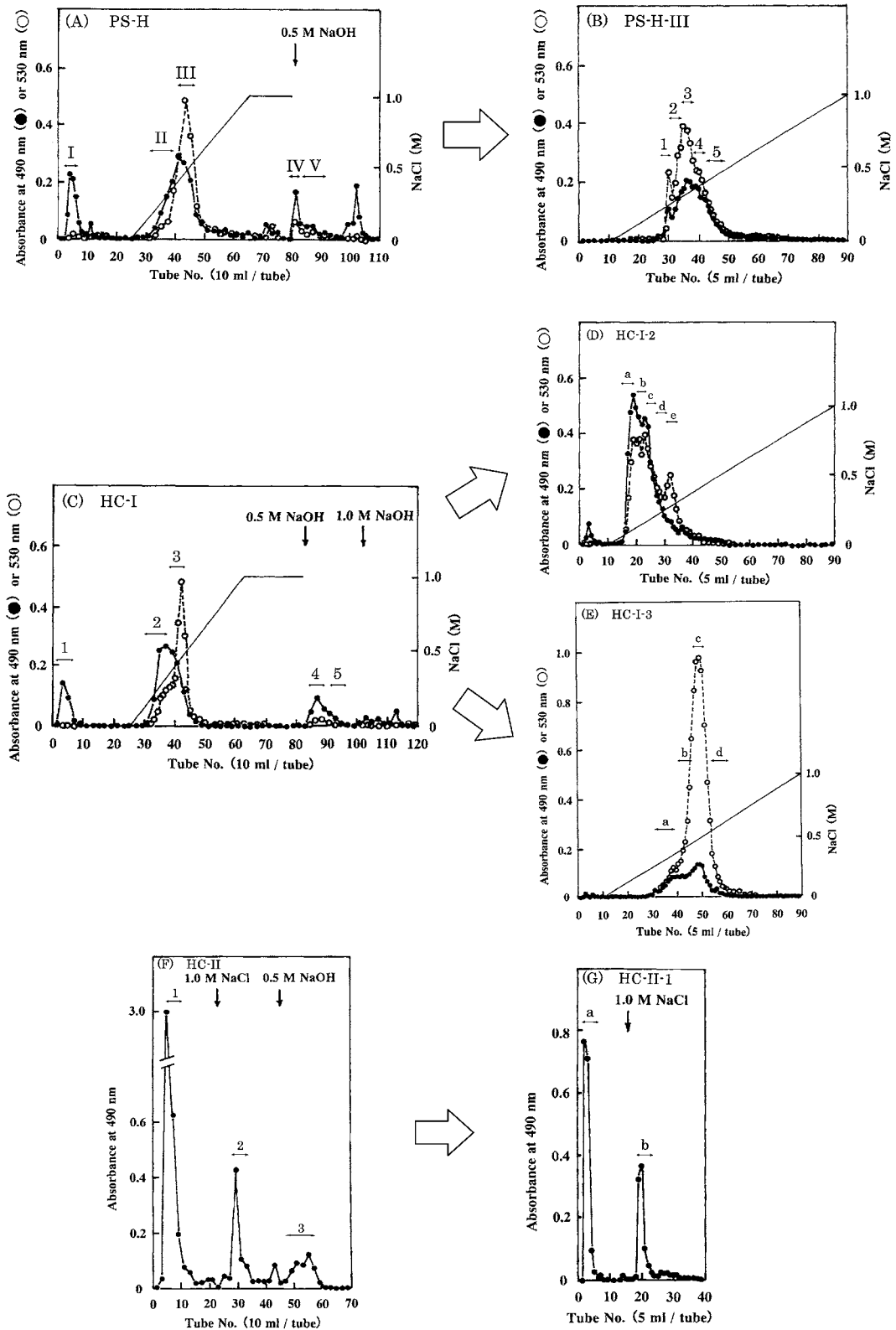


図1 杜仲葉細胞壁多糖、高分子ペクチン画分(PS-H)、ヘミセルロース-I画分(HC-I)およびヘミセルロース-II画分(HC-II)のDEAE-Sephadex A-25クロマトグラフィーによる分画精製の概略

PS-HをまずPS-H-I、-II、-III、-IVおよび-Vに分画した(A)。主要画分PS-H-IIIの再クロマトによりPS-H-III-1~PS-H-III-5を得た(B)。HC-IをまずHC-I-1、-2、-3、-4および-5に分画した(C)。主要画分HC-I-2の再クロマトによりHC-I-2-a~HC-I-2-eを得た(D)。もう一つの主要画分HC-I-3のリクロマトによりHC-I-3-a~HC-I-3-dを得た(E)。HC-IIをまずHC-II-1、-2および-3に分画した。主要画分HC-II-1の再クロマトによりHC-II-1-a~HC-II-1-bを得た(F)。詳細は先の研究¹⁾を参照。

表2 免疫賦活性測定に用いた杜仲葉細胞壁の多糖画分

多糖画分	全糖量 ^{a)} (mg/ml)	酸性糖量 ^{b)} (mg/ml)	糖組成 (重量%)							
			U.A.	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
PS-H-Ⅲ-1	0.53	0.71	54.1	4.5	tr.	19.5	-	0.8	3.7	17.4
PS-H-Ⅲ-2	0.98	2.29	70.7	5.2	0.4	11.4	-	-	0.9	11.4
PS-H-Ⅲ-3	1.82	3.68	66.0	8.6	1.2	11.8	-	-	0.6	11.8
PS-H-Ⅲ-4	1.23	1.95	60.2	13.0	1.8	12.1	-	-	0.7	12.3
PS-H-Ⅲ-5	1.30	1.84	47.7	15.5	3.8	13.2	-	-	3.0	16.8
HC-I-2-a	1.84	0.70	3.5	1.9	-	24.0	34.1	0.0	0.8	35.7
HC-I-2-b	1.69	0.69	3.5	4.1	-	30.8	21.2	0.3	1.2	39.0
HC-I-2-c	1.38	0.70	9.2	5.0	-	32.0	14.5	0.3	1.0	38.0
HC-I-2-d	0.90	0.53	15.2	5.4	-	33.6	10.8	0.4	1.1	33.6
HC-I-2-e	0.45	0.59	42.9	2.9	-	24.0	6.4	0.5	0.8	22.4
HC-I-3-a	0.69	0.41	11.5	3.8	-	35.3	8.1	1.3	1.3	38.7
HC-I-3-b	0.87	1.60	54.5	4.5	-	18.6	3.2	0.3	0.6	18.3
HC-I-3-c	0.87	3.16	89.2	1.3	-	3.1	0.7	0.2	0.2	5.3
HC-I-3-d	0.44	1.41	81.7	1.1	-	5.9	1.1	0.6	0.8	8.7
HC-II-1-a	1.37	0.32	0.0	0.5	7.3	5.1	20.1	3.6	43.1	20.4
HC-II-1-b	0.85	0.44	11.0	6.3	0.8	26.4	12.6	0.2	5.7	37.1

a) フェノール・硫酸法での測定値 (グルコース相当量)

b) カルバゾール・硫酸法での測定値 (ガラクトロン酸相当量)

ロン酸直鎖に結合したラムノース残基に、アラビナン、ガラクタンあるいはアラビノガラクタンの中性糖側鎖を有するオリゴ糖あるいは多糖が、マクロファージを強く刺激する可能性が示唆された。

HC-I-2から得られたHC-I-2-a、-b、-c画分は、酸性アラビノキシラン多糖とガラクタン、アラビノガラクタンの存在が示唆されたが、マクロファージ活性化能は認められなかった。HC-I-2-dおよびHC-I-2-e画分は弱い活性が認められ、PS-H-Ⅲ画分と同様、中性糖側鎖を有するラムノガラクトロン多糖と考えられるが、ラムノースの比率が低く、アラビノース、ガラクトースの含有比が高いことから、主鎖が短く側鎖が比較的長い多糖と考えられる。PS-H-Ⅲ画分に比べると最終糖濃度が低いため活性が弱いのか、糖鎖構造の違いによるものかについては今後の検討が必要である。

HC-I-3から得たHC-I-3-a～HC-I-3-dの各画分はPS-H-Ⅲ画分よりは低いものの、いずれの画分もマクロファージの活性化能が認められた。HC-I-3-cと-d

画分は、PS-H-Ⅲ画分に比べると中性糖鎖の少ないラムノガラクトロンが含まれていると示唆されたが活性は低く、ウロン酸含有比が少なく、アラビノースおよびガラクトースを多く含むHC-I-3-aと-b画の方が最終糖濃度はHC-I-3-c、-d画分より低い活性は高かった。

HC-II-1-a画分はキシログルカンであることが示されているが¹⁾、マクロファージの活性化能は認められなかった。ウロン酸を含むHC-II-1-b画分に弱い活性が認められた。

同様に全試料で細胞数を2倍にして行った結果を図3に示した。若干NO産生量が減少したが傾向は等しく、PS-H-Ⅲ画分の活性化能が高いことが示された。

マクロファージの活性化能が認められたPS-H-Ⅲ各画分の濃度依存性について検討した結果が図4に示した。PS-H-Ⅲ-1画分に、濃度に依存して活性が高くなる傾向がみられたが、他の画分は濃度が高くなるにしたがって活性が低くなる傾向が示された。低濃度領域での再検討が必要と考える。

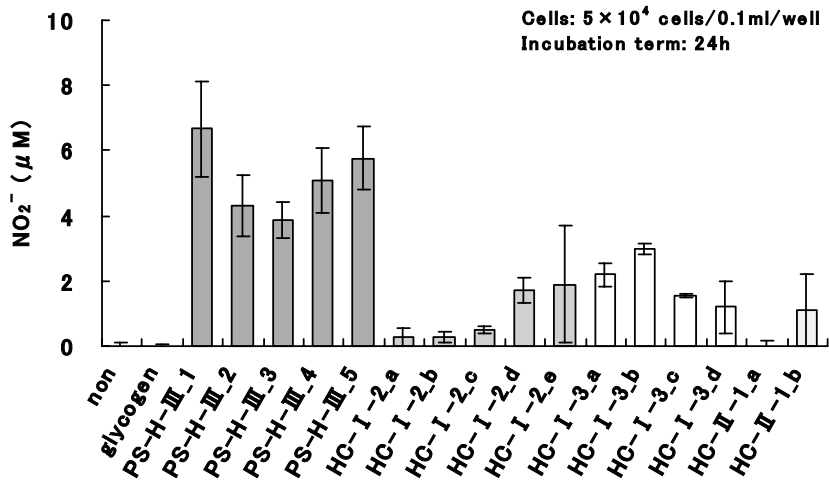


図2 杜仲葉細胞壁に由来する多糖各画分のマウスマクロファージ様細胞 J774.1に対するNO産生誘導活性

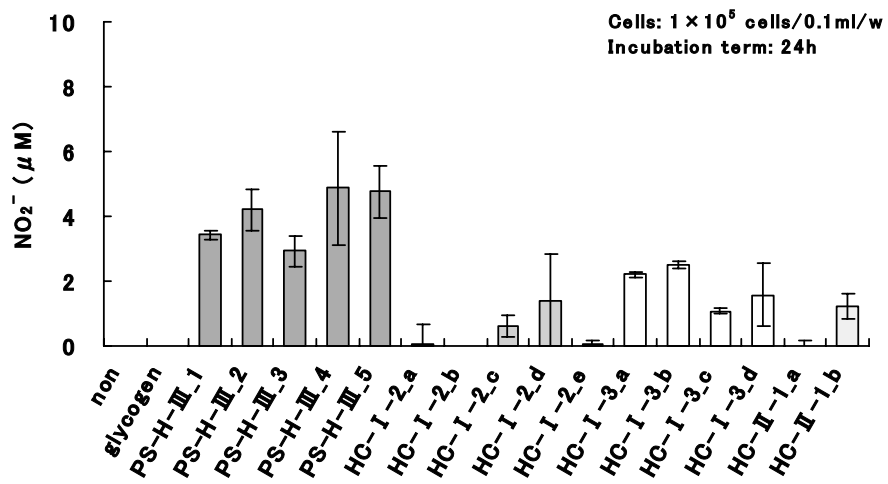


図3 杜仲葉細胞壁に由来する多糖各画分のマウスマクロファージ様細胞 J774.1に対するNO産生誘導活性
試料の濃度は図2の場合の2倍である。

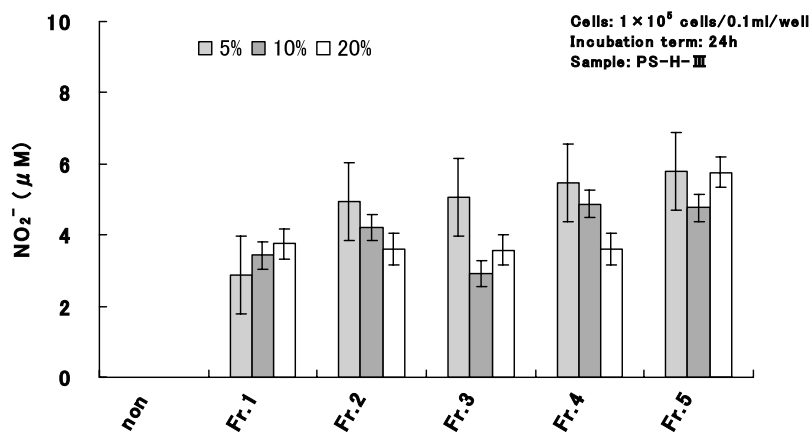


図4 杜仲葉細胞壁に由来する主要高分子ペクチ画分 PS-H-IIIから得られた各多糖画分の濃度変化がNO産生に及ぼす影響

これまで各種植物、動物、微生物由来の多糖類のなかには *in vitro* や *in vivo* で種々の薬理作用を示すことが知られている²¹⁻²⁴。また、その一部の多糖についてはその作用メカニズムの解析も進められている。ある種のアラビナン、ガラクトンもしくはアラビノガラクトタンを側鎖に有するラムノガラクトツロナンなどの免疫機能調節作用も詳しく研究されている²⁵。今後、杜仲葉に由来するペクチン様物質の詳細な構造解析を進め、活性部位の特定あるいは糖鎖構造と活性相関の研究が必要である。

引用文献

- 1) 加藤陽治：杜仲葉の炭水化物組成。弘前大学教育学部紀要, **87**, 163-172 (2002).
- 2) 朝日百科 植物の世界 8 種子植物双子葉類 8, 170-171, 朝日新聞社 (1997).
- 3) 難波恒雄：杜仲葉の生理機能とその利用。食品と開発, **29** (3), 9-11 (1994).
- 4) Bianco, A., Bonini, C. C., Iavarone, C. and Trogolo, C.: Structure elucidation of eucommioside (2"-O- β -D-glucopyranosyl eucommiol) from *Eucommia ulmoides*. *Phytochemistry*, **21**, 201-203 (1982).
- 5) Bernini, R., Iavarone, C. and Trogolo, C.: 1-O- β -D-Glucopyranosyleucommiol, an iridoid glucoside from *Aucuba japonica*. *Phytochemistry*, **23**, 1431-1433 (1984).
- 6) Hattori, M., Che, Q.-M., Gewali, M. B., Nomura, Y., Tezuka, Y., Kikuchi, T. and Namba, T.: Studies on Du-Zhong leaves (III) Constituents of the leaves of *Eucommia ulmoides* (1). *Shoyakugaku Zasshi*, **42**, 76-80 (1988).
- 7) Takahashi, T., Matsumoto, N. and Oshio, H.: The stability of bio-active components in the bark of *Eucommia ulmoides*: *Eucommiae cortex*. *Shoyakugaku Zasshi*, **42**, 111-115 (1988).
- 8) Gewali, M. B., Hattori, M. and Namba, T.: Constituents of the stems of *Eucommia ulmoides* Oliv. *Shoyakugaku Zasshi*, **42**, 247-248 (1988).
- 9) 下山明美, 山抱基純, 中沢慶久, 矢原正治, 野原稔弘: 杜仲葉成分の研究。生薬学雑誌, **47**, 56-59 (1993).
- 10) Hsieh, C.-L. and Yen, G.-C.: Antioxidant actions of Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) toward oxidative damage in biomolecules. *Life Sciences*, **66**, 1387-1400 (2000).
- 11) Yen, G.-C. and Hsieh, C.-L.: Reactive oxygen species scavenging activity of Du-Zhong (*Eucommia ulmoides* Oliv.) and its active compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 3431-3436 (2000).
- 12) Nakano, M., Itoh, Y., Mizuno, T. and Nakashima, H.: Polysaccharide from *Aspalathus linearis* with strong anti-HIV activity. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 267-271 (1997).
- 13) Nakano, M., Nakanishi, H. and Itoh, Y.: Anti-human immunodeficiency virus activity of oligosaccharides from rooibos tea (*Aspalathus linearis*) extracts *in vitro*. *Leukemia*, **11**, 128-130 (1997).
- 14) Metori, K., Furutsu, M. and Takahashi, S.: The preventive effect of Giseng with Du-Zhong leaf on protein metabolism in aging. *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 237-242 (1997).
- 15) Li, Y., Sato, T., Metori, K., Koike, K., Che, Q. and Takahashi, S.: The promoting effects of geniposidic acid and aucubin in *Eucommia ulmoides* Oliver leaves on collagen synthesis. *Biol. Pharm. Bull.*, **21**, 1206-1310 (1998).
- 16) Gonda, R., Tomoda, M., Shimizu, N. and Kanari, M.: An acidic polysaccharide having activity on the reticuloendothelial system from the bark of *Eucommia ulmoides*. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 1966-1969 (1990).
- 17) 友田正司：生薬の生物活性多糖をめぐって (6). 現代東洋医学, **11** (2), 82-90 (1990).
- 18) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 19) Bitter, T. and Muir, H. M.: A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, **4**, 330-334 (1962).
- 20) Stuehr, D.J. and Nathan, C.F.: Nitric oxide a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.*, **169**, 1543-1555 (1989).
- 21) Yamada, H. and Kiyohara, H., "Immunomodulatory Agents from Plants," ed. by Wagner H., Birkhauser Publishing Ltd., Basel, 1999, pp.161-202.
- 22) Yamada, H. and Kiyohara, H., "Comprehensive Glycoscience," Vol. 4, Chap. 4.34, eds. By Kamerling J. P., Boons G. -J., Lee Y. C., Suzuki A., Taniguchi N., Voragen A. G. J., Elsevier, Oxford, 2007, pp.663-694.
- 23) 大野尚仁 監修： β グルカンの基礎と応用—感染, 抗がん, ならびに機能性食品への β グルカンの関与—, シーエムシー出版, 東京 (2010).
- 24) 井上國世 監修：機能性糖質素材の開発と食品への応用, シーエムシー出版, 東京 (2005).
- 25) 清原寛章, 松崎敏明, 松本司, 永井隆之, 山田陽城：和漢生薬由来腸管パイエル板免疫機能調節多糖の活性発現糖鎖と作用の解析, **128**, 709-716 (2008).

(2013. 8. 5 受理)