生 薬 学 雑 誌
Shoyakugaku Zasshi
46(1), 25~29 (1992)

ラット好塩基球白血病細胞（RBL-2H3）による生薬の抗アレルギースクリーニング

片岡正博*，高垣　裕
大阪府立公衆衛生研究所

Screening of the Crude Drugs Having the Antiallergic Effect Using Rat Basophilic Leukemia Cells (RBL-2H3)

Masahiro Kataoka* and Yutaka Takagaki

Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1–3–69, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537, Japan

(Received June 11, 1991)

Antiallergic screening of crude drugs is generally performed by the rat passive cutaneous anaphylaxis test (PCA) or by using rat peritoneal mast cells. By using the established cell line, rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3) we established a more advantageous method for the screening of the crude drugs having an antiallergic effect. Using this system, in this paper, we examined the inhibitory effects of the extracts of 109 kinds of crude drugs on the β-hexosaminidase release from RBL-2H3 cells stimulated with biotinyl IgE-avidin complex. The water and 50% methanol extracts of 15 crude drugs inhibited the β-hexosaminidase release and the inhibitions were dose dependent. In the case of Aloe and Angelicae Dahuricae Radix, the water extracts showed the inhibitory effect on the β-hexosaminidase release but the 50% methanol extracts did not.

Keywords——antiallergic crude drug; β-hexosaminidase; rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3)

アレルギー反応は四つの型に分類され，その中のⅠ型アレルギー反応は組織中の肥満細胞や血液細胞中の好塩基球の細胞膜上にある Fcε リセプターに IgE 抗体が結合し，その2分子の抗体を抗原で架橋されることにより，脱顆粒現象が生じて酵素やヒスタミン，セロトニンの化学伝達物質が細胞外へ遊離する．これらの物質により気管支喘息，アレルギー性鼻炎等のアレルギー疾患が発症すると考えられている．

従来，抗アレルギー作用のスクリーニングは PCA 反応や実験動物より分離した肥満細胞を実験材料として実施されている[1]．

われわれはⅠ型アレルギー反応に関与する正常好塩基球や肥満細胞と同様な機能をもったラット好塩基球白血病細胞（RBL-2H3 細胞）[2,3]を用いて，ビオチン化マウス抗 DNP IgE 抗体（biotinyl IgE）とアビジン（avidin）の複合体の刺激により遊離する β-hexosaminidase を指標にして抗アレルギー作用のスクリーニングを実施した．

このスクリーニング方法により，抗アレルギー薬として知られるフマル酸ケトチフェン[4]が β-hexosaminidase の遊離を抑制したので，生薬の水抽出液と50%メタノール抽出液における抗アレルギー作用を検討した．

一般に，麻黄，桂皮，牡丹皮は抗アレルギー作用のある生薬として知られ，われわれも同様な結果を得た．今回，これらの生薬以外に新たな抗アレルギー作用のある生薬が見られたので報告する．

実験材料および方法

1. 生　薬

実験に用いた生薬は以下の109種類であり，三国株式会社より購入した．

アセンヤク，アマチャ，アロエ，アンソッコウ，ウイキョウ，ウコン，ウワウルシ，エイジツ，エンゴサク，オウギ，オウゴン，オウバク，オウセイ，オウレン，ガジュツ，カッコン，カノコソウ，カロコン，カンゾウ，キササゲ，キジツ，キョウニン，クジン，ケイガイ，ケイヒ，ケツメイシ，ケンゴシ，ゲンチアナ，ゲンノショウコ，コウカ，コウジン，コウボク，ゴシツ，ゴバイシ，ゴボウシ，コロンボ，コンズランゴ，サイコ，サイシン，サンキライ，サンシシ，サンシュユ，サンショウ，サンヤク，ジオウ，ジギタリス，シコン，シャクヤク，シャゼンシ，シャゼンソウ，ジュウヤク，シュクシャ，ショウキョウ，ショウズク，ショウマ，センキュウ，センコツ，センナ，センブリ，ソウジュツ，ソウハクヒ，ソヨウ，ダイオウ，タイソウ，タンジン，チクセツニンジン，チモ，チョウジ，チョレイ，チンコウ，チンピ，デンサンシチ，トウガラシ，トウキ，トウニン，トウヒ，トコン，トシシ，ドッカツ，ニガキ，ニクズク，ニクジュヨウ，ニンジン，バクモンドウ，ハマボウフウ，ハンゲ，ハンピ，ビャクシ，ビャクジュツ，ビンロウジ，ブクリョウ，ホミカ，ホウブシ，ボウイ，ボウコン，ボウフウ，ボタンピ，ボレイ，マオウ，マクリ，モクツウ，モッコウ，ヤクチ，ヨクイニン，リュウコツ，リュウタン，リョウキョウ，レンギョウ，ロジン

2. 生薬抽出液の調整

切断および粉末生薬 5 g を蒸留水 100 ml で一昼夜浸漬後，水浴中 100°C で 1 時間抽出した．これを 4,000 rpm で 5 分間遠心分離後，その上澄に蒸留水を加えて 100 ml とし，millipore filter (pore size: 0.45 μm) で濾過して水抽出液とした．

50%メタノール抽出液は同様に50%メタノールで水浴中 90°C において 1 時間還流抽出した．これを 5A 濾紙（東洋）で濾過後，50%メタノールで 100 ml とし，Ekicrodisc 25CR (pore size: 0.45 μm) で濾過して調整した．

生薬 109 種類中オウセイ，カロコン，キササゲ，キジツ，キョウニン，コウジン，コンズランゴ，ソウハクヒ，タイソウ，ビンロウジ，ホウブシ，リョウキョウの12種類は切断生薬を用い，以外は粉末生薬を試料調整に用いた．

3. 抗アレルギー薬の調整

フマル酸ケトチフェンはアレルギー性疾患治療薬として知られている．この Ketotifen fumarate salt (Sigma 製) は蒸留水で 3 mM 溶液とし，millipore filter (pore size: 0.45 μm) で濾過して調整した．

4. ラット好塩基球白血病細胞（RBL-2H3 細胞）

RBL-2H3 細胞は Wistar 系ラットに β-chloroethylamine を投与して作成された Rat basophilic leukemia 細胞（RBL 細胞）[5] 群中クローニングにより得られた細胞[6] である．RBL-2H3 細胞は RPMI-1640 培地（Sigma 製）に 3% Fetal calf serum(HyClone 製）および 0.2% Bovine serum albumin Fraction V（生化学工業製）を含む培養液中 37°C, 5% CO_2 で培養した．

5. ビオチン化マウス抗 DNP IgE 抗体の調整

ハイブリドーマから得て単離精製したマウス抗 DNP IgE 抗体[7] 4.0 mg に 6 倍モル濃度の NHS-LC-Biotin (Pierce 製) 4.7 mg を 0.1 M $NaHCO_3$ 溶液中にて室温で 1 時間反応させた．この反応生成物を Superose 12 Column を用いた FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) で精製し，ビオチン化マウス抗 DNP IgE 抗体とした．

6. RBL-2H3 細胞の刺激量

RBL-2H3 細胞から β-hexosaminidase を遊離[8]させる刺激はビオチン化マウス抗 DNP IgE 抗体とアビジン (Sigma 製）の複合体を用いた．

Fig. 1 は反応混合液 1 ml 中 3：1 の比率のビオチン化マウス抗 DNP IgE 抗体とアビジン量が最大の β-hexosaminidase 遊離率を示し，Fig. 2 にビオチン化マウス抗 DNP IgE 抗体とアビジンの複合体の用量反応曲線を示した．以上のことから，反応混合液中の刺激量はビオチン化マウス抗 DNP IgE 抗体 (3 μg/ml) とアビジン (1 μg/ml) とした．

7. 抗アレルギー作用のスクリーニング方法

RBL-2H3 細胞（5×10^5 個）を 48 Well (Costar 製) 中培養液とともに 37°C, 5% CO_2 インキュベーターで24時間培養した．培養後各 Well 中の培養液を吸引除去し，Releasing medium で 2 回洗浄した．各 Well に反応混合液 250 μl を加え，37°C で 1 時間反応後，細胞外液 100 μl を分取した．次に，0.2% Triton X-100 を各 Well に 250 μl 加え，10分後に細胞溶解液（細胞内液）100 μl を分取した．細胞外液（A）および内液（B）中の β-hexosaminidase[9] 活性を測定した．

酵素活性の測定は基質溶液 400 μl を加えて 37°C で30分間反応させた．反応後，反応停止液 1 ml を加え生成した *p*-nitrophenol を $O.D._{405nm}$ で測定し，β-hexosaminidase の Net % release を次式により求めた．スクリーニ

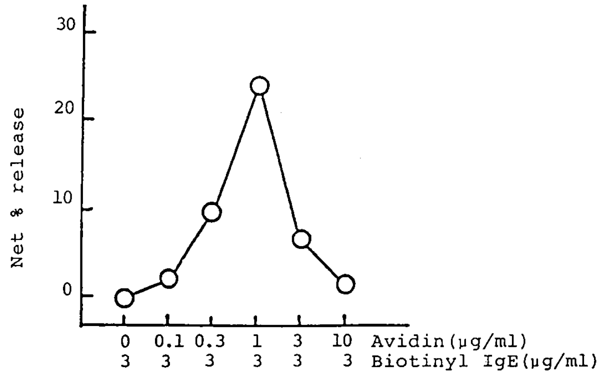

Fig. 1. Effect of the Ratio of Biotinyl IgE and Avidin on the β-HexosaminidaseRelease from RBL-2H3 Cells

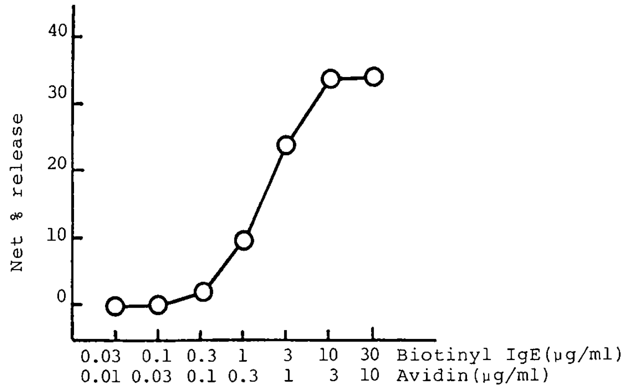

Fig. 2. Dose Dependent Curve of the β-Hexosaminidase Release from RBL-2H3 Cells by Biotinyl IgE-Avidin Complex

ングは試料の duplicate で実施した.

$$\text{Net \% release of } \beta\text{-hexosaminidase} = \frac{A}{A+B} \times 100$$

Relative % release は対照の Net % release (=100) に対する遊離率であり，Relative % release が50%以下を抗アレルギー作用のある生薬とした.

生存率は Trypan blue dye exclusion 法[10]により行った.

8. 基質と反応液組成

基質は *p*-nitrophenyl-2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranoside（半井化学）を 50 mM クエンサン緩衝液（pH 4.5）で 5 mM 溶液とした. Releasing medium の組成は（116.9 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM $MgSO_4$, 5.6 mM D-Glucose, 25 mM HEPES, 2.0 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1 mg/ml BSA, pH 7.7）であり，反応混合液はビオチン化マウス抗 DNP IgE 抗体（3 μg/ml）とアビジン（1 μg/ml）に 3 mM Ketotifen fumarate salt 100 μl, 生薬の水抽出液 100 μl または，50%メタノール抽出液 10 μl をそれぞれ加え，Releasing medium で全量 1 ml とした. 反応停止液は 0.2 M グリシン緩衝液（pH 10.7）を用いた.

実 験 結 果

1. RBL-2H3 細胞からの β-hexosaminidase 遊離に及ぼすメタノールの影響

メタノール抽出液の抗アレルギー作用をスクリーニングするために，RBL-2H3 細胞と β-hexosaminidase 遊離におよぼすメタノールの影響を検討した. Fig. 3 に示したメタノール濃度は反応混合液 1 ml 中の濃度で，検討に用いた液量は 10 μl である. 0.5%メタノールによる β-hexosaminidase 遊離の Relative % release は87.8%であり，RBL-2H3 細胞の生存率に影響をおよぼさなかった.

以上のことから，生薬は50%メタノールで抽出を行い，スクリーニングにはその抽出液 10 μl を用いた.

2. RBL-2H3 細胞からの β-hexosaminidase 遊離に及ぼす pH の影響

反応混合液の pH による β-hexosaminidase 遊離におよぼす影響を検討するために，Releasing medium の pH 調整は 1 N HCl または 1 N NaOH で行った. 各 pH の反応混合液による β-hexosaminidase 遊離率は pH 7.7 で最大値を示したが，酸性やアルカリ性ではその低下が認められた (Fig. 4). これは細胞膜への刺激複合体の結合阻害によると考えられる.

3. 抗アレルギー薬と抗アレルギー作用を示した生薬

抗アレルギー薬として知られる Ketotifen fumarate salt と109種類生薬中15種類の多くは水抽出液，50%メタノール抽出液両者に Relative % release が50%以下の β-hexosaminidase 遊離を抑制し，抗アレルギー作用が見られた (TABLE I).

アロエとビャクシは水抽出液にその作用が見られた. これらの抽出溶媒による抑制効果の相違は生薬中の有効成分の極性による相違と考えられる.

スクリーニングを実施した 3 mM Ketotifen fumarate salt や生薬抽出液を含む反応混合液は pH の変化，RBL-2H3 細胞の生存率に影響をおよぼさなかった.

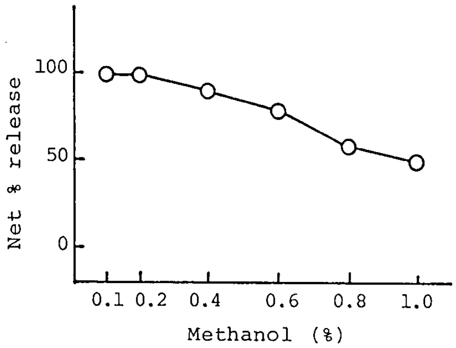

Fig. 3. Effect of Methanol on the β-Hexosaminidase Release from RBL-2H3 Cells

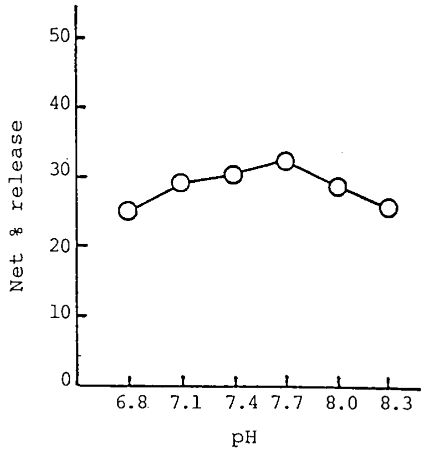

Fig. 4. Effect of pH on the β-Hexosaminidase Release from RBL-2H3 Cells

TABLE I. Inhibitory Effect of the Crude Drug Extracts on the β-Hexosaminidase Release from RBL-2H3 Cells

Chemical and crude drugs	Relative % Release	
	H_2O Extracts	50% MeOH Extracts
Ketotifen fumarate salt	25. 1*	
Gambir (アセンヤク)	20. 0	16. 4
Aloe (アロエ)	3. 4	75. 9
Uvae Ursi Folium (ウワウルシ)	35. 8	8. 9
Cinnamomi Cortex (ケイヒ)	12. 1	6. 5
Geranii Herba (ゲンノショウコ)	27. 5	43. 0
Corni Fructus (サンシュユ)	23. 9	21. 7
Rhei Rhizoma (ダイオウ)	11. 4	9. 2
Caryophylli Flos (チョウジ)	16. 9	7. 3
Arecae Semen (ビンロウジ)	2. 5	4. 8
Angelicae Dahuricae Radix (ビャクシ)	18. 4	102. 9
Moutan Cortex (ボタンピ)	8. 7	5. 6
Ephedrae Herba (マオウ)	8. 6	4. 2
Saussureae Radix (モッコウ)	38. 5	40. 1
Alpiniae Fructus (ヤクチ)	14. 9	25. 5
Alpiniae Officinari Rhizoma (リョウキョウ)	5. 1	19. 4

* Ketotifen fumarate salt was dissolved in H_2O at a concentration of 3 mM and applied to the assay. Each values represents the mean of the duplicate in two separate experiments.

4. 抗アレルギー作用を示した生薬の希釈率による Dose dependent の比較検討

抗アレルギー作用の見られた生薬の水抽出液と50%メタノール抽出液における dose dependent の比較検討を行うために，反応混合液中の各抽出液量を 10 μl とした．各生薬は dose dependent が見られ，50%メタノール抽出液は水抽出液より抗アレルギー作用が大であった．そのなかでビャクシの dose dependent は水抽出液に見られた (Fig. 5).

考　　察

一般に，細胞を用いた抗アレルギー作用の検討は Compound 48/80 やカルシウムイオノフォア A23178 等の化学物質による刺激方法により実施されているが，マウス抗 DNP IgE 抗体を用いた方法は生体内で生じる反応様式と類似している．

スクリーニングを実施した生薬中，15種類の多くの生薬は水抽出液と50%メタノール抽出液両者に抗アレルギー作

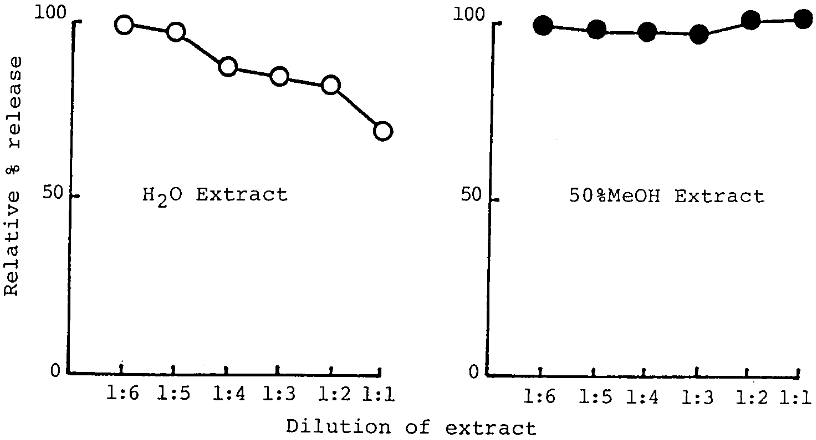

Fig. 5. Dose Dependent Curves of the β-Hexosaminidase Release from RBL-2H3 Cells by the Extract of Angelicae Dahuricae Radix

用が認められた．その作用は50%メタノール抽出液に強く見られた．また，β-hexosaminidase 遊離抑制作用は dose dependent が見られた．

アロエとビャクシは水抽出液に抗アレルギー作用が見られ，これらの生薬の有効成分は極性の大きい成分であると考えられる．

植物界に広く分布するフラボン成分は抗アレルギー作用が報告[11]されている．今回，抗アレルギー作用が報告[12,13]されているフラボノイド baicalin を含むオウゴンと glycyrrhizin を含むカンゾウは抗アレルギー作用が見られなかった．しかし，新たにアロエ，ビャクシ，ウワウルシ等の生薬に抗アレルギー作用が見られた．

抗アレルギー作用のスクリーニング方法として，腫瘍細胞である RBL-2H3 細胞を用いる利点はこの細胞が正常細胞と同様にさまざまな刺激に対して，β-hexosaminidase，ヒスタミン，セロトニンを遊離すること，樹立細胞系の細胞であり，繁雑な細胞調整の必要がなく，迅速に抗アレルギー作用がスクリーニング可能であること，PCA 反応等を抑制する抗アレルギー薬[4]がこの方法における β-hexosaminidase 遊離を抑制することである．そして，抗アレルギー作用が見られた生薬の脱顆粒抑制に関する細胞内酵素に与える薬理学的作用機構の解明が可能である．

引用文献および注

1) Y. Chun, U. Sankawa, *Shoyakugaku Zasshi*, **43**, 314 (1989).
2) AC. Kulczycki, C. Isersky, H. Metzger, *J. Exp. Med.*, **139**, 600 (1974).
3) Y. Morita, R. P. Siraganian, *J. Immunol.*, **127**, 1339 (1981).
4) U. Martin, D. Römer, *Arzneimittel-Forsch.*, **28** 770 (1978).
5) E. Eccleston, B. J. Leonard, J. S. Lowe, H. J. Welford, *Nature New Biol.*, **244**, 73 (1973).
6) E. L. Barsumian, C. Isersky, M. G. Petrino, R. P. Siraganian, *Eur. J. Immunol.*, **11**, 317 (1981).
7) F. Liu, J. B. Bohn, E. L. Ferry, H. Yamamoto, C. A. Molinaro, L. A. Sherman, N. R. Klinman, D. H. Katz, *J. Immunol.*, **124**, 2728 (1980).
8) M. J. Conklyn, S. B. Kadin, H. J. Showell, *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **91**, 369 (1990).
9) L. B. Schwartz, K. F. Austen, S. I. Wasserman, *J. Immunol.*, **123**, 1445 (1979).
10) 日本組織培養学会編，“組織培養の技術”，第二版，朝倉書店，東京，1988，p. 26.
11) E. Middleton, JR. G. Drzewiecki, D. Krishnarao, *J. Immunol.*, **127**, 546 (1981).
12) 江田昭英，永井博弌，和田　浩，日薬理誌，**66**，194 (1970).
13) 畔柳武雄，斉藤昌信，アレルギー，**15**，67 (1966).