

〔原著〕 松本歯学 42 : 10~15, 2016

key words : ぶどう膜炎, 炎症, マコモタケ, サイトカイン

マコモタケ由来成分による抗炎症作用

堀部 寛治¹, 中道 裕子², 中村 美どり³, 高橋 直之², 宇田川 信之^{2,3},
中村 浩彰¹, 菊池 孝信⁴, 平野 隆雄⁵, 佐藤 敦子⁶, 太田 浩一⁶

¹松本歯科大学 口腔解剖学第2講座

²松本歯科大学 総合歯科医学研究所 硬組織疾患制御再建学部門

³松本歯科大学 口腔生化学講座

⁴信州大学 ヒト環境科学研究支援センター

⁵信州大学 医学部 眼科学講座

⁶松本歯科大学 病院 眼科

Inhibitory effect of Makomotake components on inflammation

KANJI HORIBE¹, YUKO NAKAMICHI², MIDORI NAKAMURA³,
NAOYUKI TAKAHASHI², NOBUYUKI UDAGAWA^{2,3}, HIROAKI NAKAMURA¹,
TAKANOBU KIKUCHI⁴, TAKAO HIRANO⁵, ATSUKO SATO⁶ and KOUICHI OHTA⁶

¹*Department of Oral Histology, School of Dentistry,
Matsumoto Dental University*

²*Division of Hard Tissue Research, Institute for Oral Science, School of Dentistry,
Matsumoto Dental University*

³*Department of Biochemistry, School of Dentistry,
Matsumoto Dental University*

⁴*Department of Instrumental Analysis, Research Center for Human and
Environmental Science, Shinshu University*

⁵*Department of Ophthalmology, Shinshu University School of Medicine*

⁶*Department of Ophthalmology, Matsumoto Dental University Hospital*

Summary

Zizania latifolia (wild rice) is native to Eastern and Southeastern Asia. The fungus *Ustilago esculenta* penetrates this aquatic perennial grass. Makomotake refers to penetration of the *Zizania latifolia* shoot by *Ustilago esculenta*. Recent studies demonstrated that *Zizania latifolia* extracts exhibit diverse biological activities, such as anti-oxidant effects.

The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effect of Makomotake on endotoxin-induced uveitis (EIU) in mice. After the daily oral administration of Makomotake for 5 days, EIU was induced by the injection of a lipopolysaccharide (LPS) into the footpad of mice. At 24 hours after injection, the eyes were enucleated and cells infiltrating the anterior chamber and vitreous cavity were counted histologically. Makomotake administration significantly reduced the total number of infiltrating cells. In addition, Makomotake suppressed the production of interleukin (IL)-1 β and tumor necrosis factor (TNF)- α in murine macrophages induced by LPS. Our findings show that Makomotake can be used as an anti-inflammatory agent against EIU, and that it may be useful for the treatment of acute uveitis.

緒 言

ぶどう膜炎は、眼内組織である虹彩、毛様体、脈絡膜に炎症が起こることで発症する疾患である。正常ならば透明である前房や硝子体が炎症細胞により混濁することにより、霧視や飛蚊症が生ずる。炎症の持続により、白内障（水晶体混濁）のほか緑内障や網膜障害が生じ、不可逆的な視力低下に進行することがある。重症例では失明に至る^{1,2)}。日本国内における主なぶどう膜炎の原因疾患は、サルコイドーシス、フォークトー小柳ー原田病、ベーチェット病である事が報告されている³⁾。ぶどう膜炎に対しては副腎皮質ステロイド薬が主たる治療薬である。しかし、ステロイド緑内障やステロイド白内障のような眼局所の副作用や糖尿病、肥満、胃潰瘍、骨粗鬆症などの全身性副作用が問題となる。そこで、副作用の少ないかつ有効な抗炎症物の開発が必要とされている。

今回我々は、マコモタケという自然食品を入手する機会を得た。イネ科の水生植物マコモ (*Zizania latifolia*) は、東・東南アジアに分布するイネ科の水生植物である⁴⁾。黒穂菌の一種である *Ustilago esculenta* に寄生され変成したマコモの新芽⁵⁾ をマコモタケと呼び、古来より日本や中国で食用に利用されてきた。近年、マコモタケを肌の美白や、歯の漂白作用を期待する民間レベルでの利用、商品開発も行われている。また、マコモタケ成分には抗肥満症⁶⁾、抗酸化⁷⁾、抗炎症作用およびアレルギー抑制作用⁸⁾ があることも報告されている。

そこで、今回我々はこのマコモタケ成分の抗炎症作用に着目し、ぶどう膜炎に対する抗炎症作用について検討した。ベーチェット病のぶどう膜

炎モデルともされるエンドトキシン誘発性ぶどう膜炎 (endotoxin-induced uveitis: EIU) を用いた。

EIU は、1990年に Rosenbaum らによって確立された急性ぶどう膜炎実験モデルである⁹⁾。実験動物後肢に細菌の細胞壁外膜構成成分である lipopolysaccharide (LPS) を投与することで眼内に好中球を主体とした炎症性細胞の浸潤を促し、ぶどう膜炎を誘導する。

本研究では、LPS が惹起する炎症反応に対するマコモタケの作用を EIU モデルによる *in vivo* 実験、マクロファージの LPS 応答性炎症性サイトカイン産生量の変化を計測した *in vitro* 実験により解析した。

実験材料および方法

1. 実験動物

EIU 実験モデルでは 8 週齢の雄 C57BL/6J マウスを、マウス骨髄マクロファージ培養実験では 7 週齢の雄 ddY マウスを実験に用いた。それぞれのマウスは日本 SLC (静岡) より購入した。マウスを用いた全ての実験は松本歯科大学動物実験委員会および信州大学動物実験委員会が定める動物実験取扱規程に基づいて行った。(信州大学動物実験委員会 承認番号 230018)

2. マコモタケ成分抽出

100% エタノール 100ml 中にマコモタケ粉末 (平成農園, 長野県長野市, 中澤 基氏) 20g を添加し、4℃ の環境下で 10 日間の転倒混和を行った。マコモタケ懸濁液を濾過およびフィルター滅菌して得られたマコモタケ抽出液 (65 μ g/ml) を遠心式濃縮器にて 10 倍の濃度 (650 μ g/ml) に濃

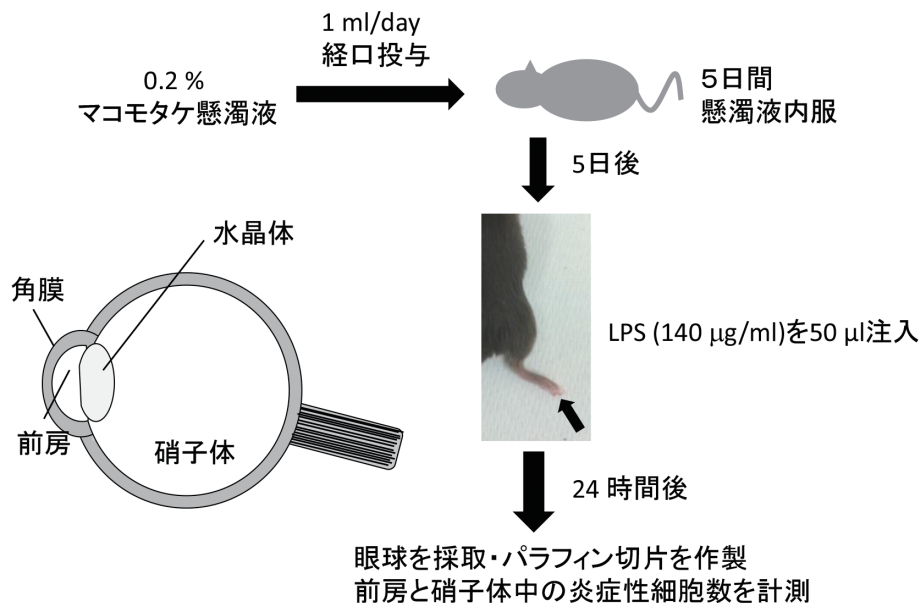


図1: LPS誘導性EIUおよびマコモタケ懸濁液投与方法および, 抗炎症作用の評価方法

縮し, 実験に使用した.

3. エンドトキシン誘発性ぶどう膜炎誘導実験

マウスに1% PBS (対照群) もしくは, マコモタケ懸濁液 (0.2% w/v · PBS) 1 mlを毎日5日間内服させた. それぞれの条件につき3匹のマウスを使用した. 内服開始から5日後, *Escherichia coli*由来LPS (140µg/ml · PBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 50µlを後肢より注入し, EIUを誘導した. LPS注入24時間後に両側の眼球 (各群6サンプル) を採取し, 4%パラホルムアルデヒドで固定した. 厚さ5µmのパラフィン切片を1サンプルから前頭断方向に部位を変えて5枚ずつ作製後, ヘマトキシリン・エオジン染色を行い, 眼球内の前房および硝子体中の浸潤している好中球数を計測した (図1). 計測結果は, 各群計30枚の切片から得られた細胞数の平均値と標準偏差で示した.

4. マウス骨髄マクロファージ培養

7週齢 ddY マウスの脛骨から骨髄細胞を採取し, 60mmdish に播種した. 播種した細胞はヒトM-CSF (10⁴U/ml, 協和発酵, 東京) 存在下で, 10% fetal bovine serum (SAFC Biosciences, Lenexa, KS) を含む α -MEM 培地 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) にて培養した. 16時間後, 浮遊細胞 (血球系細胞) を回収し, 96-well

プレート上に播種 (2 × 10⁵ cells/well) 後, M-CSF (10⁴U/ml) 存在下で3日間培養を行ったものを骨髄マクロファージとして実験に用いた.

5. ELISA法によるTNF- α , IL-1 β 産生量の解析

96-wellプレートでマウス骨髄マクロファージをコンフルエントになるまで培養を行った後, 培地中にLPSを終濃度1µg/mlとなるように添加し, 培養を行った. その際, マコモタケ抽出成分 (終濃度: 65µg/ml, 650µg/ml) をLPSと同時に添加した群を実験群とし, 非添加群を対照群とした. LPS添加から24時間培養後, 培養培地を回収し, Mouse TNF- α ELISA kit, Mouse IL-1 β ELISA kit (R & D systems, Minneapolis, MN) を用いて培地中のTNF- α , IL-1 β 量を測定した. 各実験条件のN数はそれぞれ4で行っており, TNF- α , IL-1 β の測定結果は, その平均値と標準偏差をもって結果に示した. 同様の実験を3回くり返し行った.

6. 統計解析

統計解析は両側 student t 検定により行った. $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとみなした.

結 果

1. LPS誘導性EIUに対するマコモタケ懸濁液

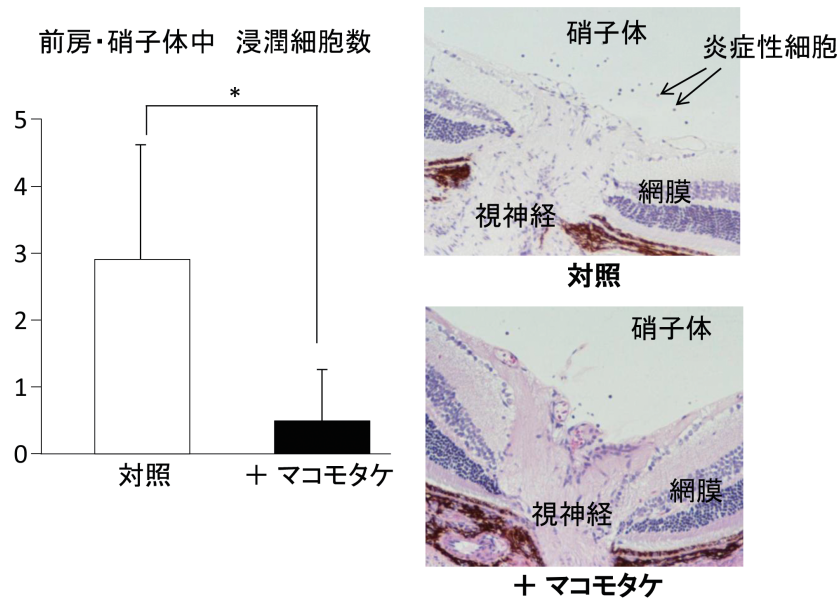


図2：LPS誘導性EIUに対するマコモタケ懸濁液内服の効果

内服の効果

LPS投与から24時間後、対照群、マコモタケ懸濁液内服群ともに、眼球に充血などの臨床所見は確認できなかった。しかし、ヘマトキシリン・エオジン染色による眼球の組織像では対照群の前房、硝子体中に 2.9 ± 1.7 cells (平均±標準偏差)の好中球が浸潤しているのが認められた。

一方、マコモタケ懸濁液内服群では前房、硝子体内部における好中球浸潤はほとんど認められず(0.48 ± 0.77 cells)、眼内の炎症性反応が有意に抑制された(図2)。

2. LPS誘導性炎症性サイトカイン産生に対するマコモタケタノール抽出液の効果

LPSによって誘導される単球・マクロファージ系細胞の炎症性サイトカインTNF- α 、IL-1 β 産生促進に対するマコモタケ抽出液の効果について検討を行った。LPS(1 μ g/ml)存在下での培養は、骨髄マクロファージのTNF- α 産生(730 ± 193.4 pg/ml)を誘導し、マコモタケタノール抽出成分はそれを濃度依存的に抑制した(65mg/ml： 463.7 ± 23.3 pg/ml, 650mg/ml： 313.3 ± 13.3 pg/ml)(図3A)。また、LPSによるIL-1 β 産生誘導(19.9 ± 6.1 pg/ml)に対し、マコモタケタノール抽出成分は低濃度では抑制効果を示さなかった(26.0 ± 5.1 pg/ml)が、高濃度で有意に抑制した(7.2 ± 1.0 pg/ml)(図3B)。

考 察

本研究では、マコモタケの抗炎症作用に注目し、EIUモデルを用いた*in vivo*の実験を行った。PBSを内服させた対照群では、LPS投与により前房・硝子体中への好中球浸潤が認められた。この結果は、過去に報告されたマウスのEIUの所見に一致する¹⁰⁾。一方、マコモタケ懸濁液内服群には好中球の浸潤が抑制された。LPSは宿主細胞に対して活性酸素種(Reactive oxygen species: ROS)の産生を誘導し、炎症反応を亢進させることが知られている¹¹⁾。過去に赤ワインのポリフェノールであるレスベラトロールの内服は抗酸化作用を発揮し、炎症および癌の発生を抑制することが報告されている¹²⁾。EIUの実験モデルにおいてもレスベラトロールの内服は眼内の炎症反応を抑制することが報告されている¹³⁾。マコモタケ懸濁液の内服でも、レスベラトロール同様に抗酸化作用によるEIU発生の抑制が行われた可能性がある。実際に、過去の成分解析によりマコモタケ中には水溶性、脂溶性の両方の溶性を有するポリフェノールが豊富に含まれていることが分かっている(データ省略)。

また、*in vitro*の実験ではマコモタケタノール抽出成分がLPSによって誘導される骨髄マクロファージのTNF- α 、IL-1 β 産生を有意に抑制した。一方で、PBSを用いたマコモタケ水溶性成

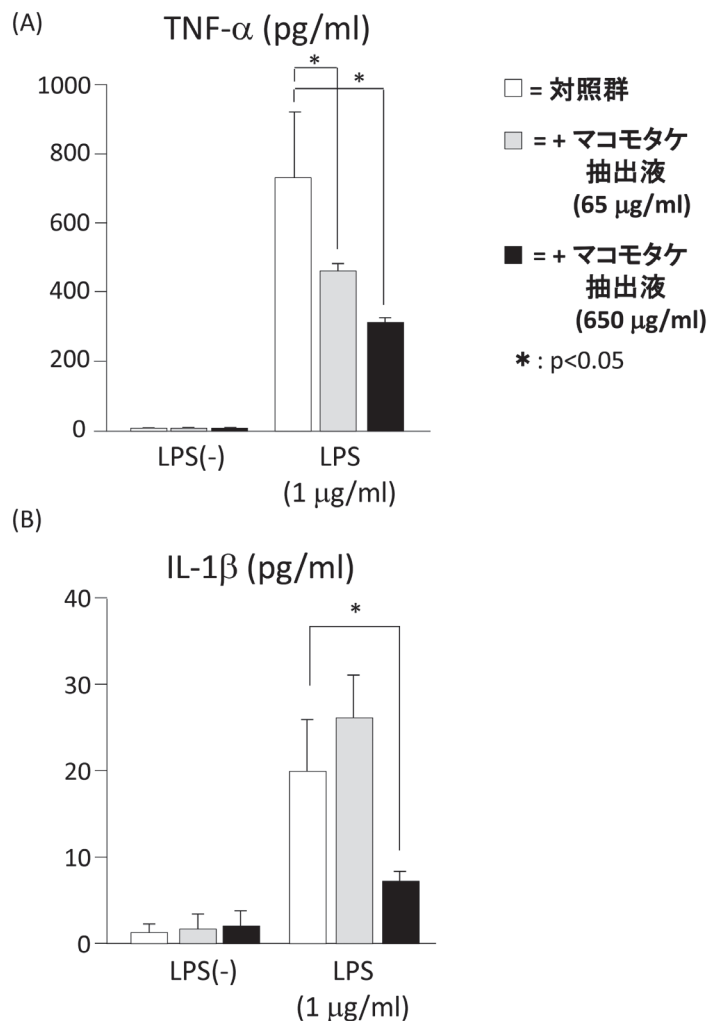


図3: LPS誘導性炎症性サイトカイン産生に対するマコモタケタノール抽出液の効果

分抽出物では, LPS誘導性の炎症性サイトカイン産生を抑制できなかった(データ省略). この結果から, マコモタケの炎症抑制効果は脂溶性成分によるものと考えられる. 過去に *Zizania latifolia* の脂溶性成分として数種類のフラボノリグナン配糖体, フラボン配糖体が報告されている¹⁴⁾. *Ustilago esculenta* には糖質加水分解酵素が存在し¹⁵⁾, マコモタケには神経膠腫細胞の増殖に影響を与えるグリコシド化合物 Makomotindoline が含まれていることが報告されている¹⁶⁾. また, マコモタケ中に含まれている水溶性, 脂溶性の両方に溶性を有するポリフェノールなどの物質が今回の *in vitro* 実験の系に作用した候補として挙げられる. しかしながら, どのような有機成分が炎症性サイトカインの産生抑制に関与しているのかについては詳細な成分解析と

検討を必要とする. また, マコモタケ抽出成分の LPS に対する直接作用や, 細胞内シグナルへの影響の有無などは不明である. 今回の実験結果で見られた TNF- α , IL-1 β 産生に対するマコモタケ抽出物の応答性の違いなども含めて, その作用メカニズムの解明もまた今後の重要な研究課題である.

本実験の結果から, マコモタケを経口摂取することで細菌成分が引き起こす眼内の炎症発症を抑制する可能性が示された. マコモタケおよびその抽出成分は眼内炎をはじめとした炎症性疾患の発生防止, 症状の緩和に有効な栄養補助食品, 薬剤としての利用が期待できる.

参考文献

- 1) Careen Y, Lowder, MD, Devron H and Char

- MD (1984) Uveitis — A Review. *West J Med* **140** : 421–32.
- 2) Rothova A, Buitenhuis HJ, Meenken C, Brinkman CJ, Linssen A, Alberts C, Luyendijk L and Kijlstra A (1992) Uveitis and systemic disease. *Br J Ophthalmol* **76** : 137–41.
 - 3) Goto H, Mochizuki M, Yamaki K, Kotake S, Usui M and Ohno S (2007) Epidemiological survey of intraocular inflammation in Japan. *Jpn J Ophthalmol* **51** : 41–4.
 - 4) Tsuchiya T, Shinozuka A and Ikusima I (1993) Population dynamics, productivity and biomass allocation of *Zizania latifolia* in an aquatic–terrestrial ecotone. *Ecol Res* **8** : 193–8.
 - 5) Yan N, Wang XQ, Xu XF, Guo DP, Wang ZD, Zhang JZ, Hyde KD and Liu HL (2013) Plant growth and photosynthetic performance of *Zizania latifolia* are altered by endophytic *Ustilago esculenta* infection. *Physiol Mol Plant P* **83** : 75–83.
 - 6) Han SF, Zhang H and Zhai CK (2012) Protective potentials of wild rice (*Zizania latifolia* (Griseb) Turcz) against obesity and lipotoxicity induced by a high-fat/cholesterol diet in rats. *Food Chem Toxicol* **50** : 2236–69.
 - 7) Zhang H, Cao P, Agellon LB and Zhai CK (2009) Wild rice (*Zizania latifolia* (Griseb) Turcz) improves the serum lipid profile and antioxidant status of rats fed with a high fat/cholesterol diet. *Br. J. Nutr* **102** : 1723–7.
 - 8) Lee SS, Baek YS, Eun CS, Yu MH, Baek NI, Chung DK, Bang MH and Yang SA (2015) Tricin derivatives as anti-inflammatory and anti-allergic constituents from the aerial part of *Zizania latifolia*. *Biosci. Biotechnol. Biochem* **6** : 1–7.
 - 9) Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB and Egbert PR (1980) Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature* **286** : 611–3.
 - 10) Shen DF, Chang MA, Matteson DM, Buggage R, Kozhich AT and Chan CC (2000) Biphasic ocular inflammatory response to endotoxin-induced uveitis in the mouse. *Arch Ophthalmol* **118** : 521–7.
 - 11) Sanlioglu S, Williams CM, Samavati L, Butler NS, Wang G, McCray PB Jr, Ritchie TC, Hunninghake GW, Zandi E and Engelhardt JF (2001) Lipopolysaccharide induces Rac1-dependent reactive oxygen species formation and coordinates tumor necrosis factor- α secretion through IKK regulation of NF- κ B. *J Biol Chem* **276** : 30188–98.
 - 12) Sengottuvelan M, Viswanathan P and Nalini N (2006) Chemopreventive effect of trans-resveratrol—a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **27** : 1038–46.
 - 13) Kubota S, Kurihara T, Mochimaru H, Satofuka S, Noda K, Ozawa Y, Oike Y, Ishida S and Tsubota K (2009) Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage and nuclear factor- κ B activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50** : 3512–9.
 - 14) Lee SS, Baek NI, Baek YS, Chung DK, Song MC and Bang MH (2015) New flavonolignan glycosides from the aerial parts of *Zizania latifolia*. *Molecules* **20** : 5616–24.
 - 15) Nakajima M, Yamashita T, Takahashi M, Nakano Y and Takeda T (2012) A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoside hydrolase from *Ustilago esculenta* functions in β -1,3-glucan degradation. *Appl Environ Microbiol* **78** : 5682–9.
 - 16) Suzuki T, Choi JH, Kawaguchi T, Yamashita K, Morita A, Hirai H, Nagai K, Hirose T, Omura S, Sunazuka T and Kawagishi H (2012) Makomotindoline from Makomotake, *Zizania latifolia* infected with *Ustilago esculenta*. *Bioorg Med Chem Lett* **22** : 4246–8.