

Ingestion of *Tabebuia avellanedae* (Taheeb) Inhibits Production of Reactive Oxygen Species from Human Peripheral Blood Neutrophils

Tabebuia avellanedae (タヒボ)摂取はヒト末梢血好中球由来の活性酸素種産生を抑制する

Ohno S, Ohno Y, Suzuki Y, Miura S, Yoshioka H, Mori Y, Suzuki K*

大野智、大野由美子、鈴木洋子、三浦茂樹、吉岡浩、森有一、鈴木克彦（連絡著者）

Int J Food Sci Nutr Diet. S6:001, 1-4.

要旨

好中球は活性酸素種（ROS）産生による酸化ストレスの主な原因であり、過剰な ROS によって引き起こされる組織傷害は老化や種々の疾患につながる。*Tabebuia avellanedae*（タヒボ）の抗炎症効果は試験管内や動物実験で報告されてきたが、ヒトでの効果についてはあまり知られていない。そこで 14 人の成人ボランティアにタヒボ抽出物を 4 カプセル（タヒボジャパン株式会社、大阪、日本）で 500 ミリグラムを 2 週間摂取させた。末梢血好中球由来の ROS 産生は、ルミノール依存性化学発光（LmCL）により 37°C で 30 分間隔のキネティックモードで 1.5 時間発光測定装置を用いて測定された。2 週間のタヒボ摂取後に、LmCL の 1.5 時間でのピーク値と積算値は有意に低下することを我々は見出した。結論として、タヒボ投与はヒト好中球由来の ROS 産生を抑制することが証明された。

キーワード：タヒボアベラネダエ、酸化ストレス、好中球、ルミノール依存性化学発光、炎症、メビオールゲル

緒言

活性酸素種（ROS）は、生物学的システムにおいて両面的な役割を担っており、生体システムにとって有害にも有益にもなりうる[1]。ROS の有益な効果には、感染因子に対する生体防御における細胞性応答や多くの細胞の情報伝達システムにおける重要な役割が含まれる。対照的に、過剰な ROS は脂質やタンパク質、核酸を含む細胞構造への傷害の重要な仲介因子になりうる。さらに、これらの ROS による傷害は、加齢や慢性炎症性疾患、循環器疾患、がんなどのさまざまな病態形成につながっていく可能性がある。

好中球は、特に炎症反応においては ROS の主な産生源のひとつである。好中球は侵入する病原体に対する食作用を通じて生体防御において重要な役割を担い、急性炎症反応の主要なエフェクターである。さまざまな病原体に対して、好中球は呼吸バーストとして知られる現象において大量のスーパーオキシドアニオン(O₂⁻)を放出する[1]。呼吸バーストの不

適切な活性化は組織傷害に関与し、免疫系が侵入微生物を体内から排除する能力を損なう。よって、好中球機能の有益性と有害性の効果のバランスは適切に制御される必要がある。

機能性の天然物は、ROS の産生を抑制したり消去を促進したりすることから、非常に注目されている。そのような機能性天然物のひとつに、ブラジルやアマゾン流域などの南米に野生する広葉樹である *Tabebuia avellanedae* がある。*Tabebuia avellanedae* の樹皮内側部分の水抽出物は「タヒボ」と呼ばれ、伝統的に茶として飲用されてきた。また、*Tabebuia avellanedae* は細菌感染症や血液凝固やがんへのさまざまな民間薬物療法としても用いられてきた[4, 5]。さらに、最近の研究は *Tabebuia avellanedae* が何らかの抗炎症・抗酸化作用を有することを示してきた[6-8]。

Tabebuia avellanedae の抗炎症効果は試験管内や動物で報告されてきたが、この天然物のヒトにおける効果はあまり知られていない。また、*Tabebuia avellanedae* が好中球の活性化を抑制するという報告はない。そこで本研究の目的は、*Tabebuia avellanedae* 抽出物のヒトの好中球機能への修飾作用をルミノール依存性化学発光 (LmCL) で評価して調べることであった。なお、LmCL は主にミエロペルオキシダーゼ (MPO) による次亜塩素酸 (HOCl) のような毒性の高い ROS の生成を検出する[9, 10]。

材料と方法

被験者

本研究では、日常的にサプリメントを使用していない、重篤な臓器機能障害がなく慢性疾患のない健康成人を選択基準とした。参加前に、すべての被験者は記入式インフォームドコンセントに署名した。本研究のプロトコールは早稲田大学倫理委員会によって承認された。

研究条件

被験物の「TAHEEBO NAFDIN® ソフトカプセル」(タヒボジャパン株式会社、大阪、日本) は、1 カプセルあたり *Tabebuia avellanedae* 抽出物を 125 mg 含有する。1 カプセルの組成は、炭水化物 (127.5 mg)、タンパク質 (115 mg)、脂質 (195 mg)、ナトリウム (0.41 mg)、水分 (12.5 mg)、カルシウム (0.71 mg)、鉄 (0.04 mg)、カリウム (0.93 mg)、リン (0.20 mg)、マグネシウム (0.28 mg) であった。重金属 (水銀、カドミウム、鉛、ヒ素) の試験結果は厳格な日本食品基準に合致していた。我々は毎日 4 カプセルの TAHEEBO NAFDIN® を 2 週間摂取させるオープンラベル試験を行った。末梢血好中球による ROS 産生の正確な基準値を決めるために、TAHEEBO NAFDIN® の投与前に末梢血が採取された。TAHEEBO NAFDIN® 投与後には、1 日目、7 日目、14 日目に末梢血サンプルが採取された。

ペプチド結合感温性高分子 (G-TRP) の合成

コラーゲンペプチド (SCP-5100, 新田ゼラチン株式会社、大阪、日本) 24 g を 96 g の蒸留水に 37°C で溶解し、N-アクリロイルスクシンイミド (国産化学株式会社、東京、日本) 3.26 g と 37°C で 4 日間反応させ、重合性コラーゲンペプチド水溶液を得た。N-イソプロピルアクリルアミド (108.5 g: 株式会社興人、東京、日本) と n-ブチルメタクリレート (4.26 g: 和光純薬工業株式会社、大阪、日本) を 600 mL のエタノールに溶解し、上記の重合性コラーゲンペプチド水溶液 123 g を加えた。窒素ガス雰囲気下でこの混合溶液に N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン (和光純薬工業株式会社) 1 mL と過硫酸アンモニウム (和光純薬工業株式会社) 10wt% 水溶液 10 mL を加え、窒素ガス雰囲気を維持したまま 4°C で 5 時間反応させた。反応後、冷却 (4°C) した蒸留水 30 L を加え、限外濾過膜 (分画分子量 10 万) を用いて 4°C で 3 L まで濃縮した。未反応物や低分子量分子種を除去するため、この希釈と濃縮の操作を 5 回繰り返した。最終的に濃縮された水溶液を凍結乾燥、滅菌処理し、105 g のペプチド結合感温性ポリマー (G-TRP) を得た。

足場つき熱可逆ゲル形成性高分子 (S-TGP) ゲルの調製

クリーンベンチ内で 0.5 g の G-TRP と 0.5g の熱可逆ゲル形成性高分子 (Mebiol Gel、メビオール株式会社、神奈川、日本) を 16.7 mL のハックス緩衝塩溶液 (HBSS、塩化カルシウム、塩化マグネシウム) に 4°C で終夜溶解させ、実験で使用する泡のない均一な液体状の粘性のある透明足場つき熱可逆ゲル形成性高分子 (S-TGP) 水溶液を得た[11]。メビオールゲルは、温度感応性高分子ブロックと親水性高分子ブロックよりなる純粋な合成生体適合性共重合体であり、温度依存的な粘弾性挙動によって特長づけられ、毒性のない生体適合性の 3 次元培養担体として用いられている。S-TGP ゲルはメビオールゲルと G-TRP を混和することによって作られたペプチド結合熱可逆性ゲルである。

ルミノール依存性化学発光 (LmCL) 法

末梢血サンプルはヘパリンナトリウム含有採血管 (テルモベネジェクト II、テルモ社、東京、日本) を用いて被験者から得られた。S-TGP ゲルの水溶液は温度を上げることによって固化された。すなわち、マイクロチューブ (2 ml) 内に 50 μ l の S-TGP ゲルを分注し、4°C で慎重に展開され、37°C のブロックインキュベーター上にセットされた。次に、血液サンプルは 2.5 mM ルミノール (5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phthalazinedione、シグマ・アルドリッチ、ミズーリ州、米国) と等量混和した。ルミノールと血液の混和サンプル (150 μ l) は、37°C で S-TGP ゲルの入ったチューブに重層した。好中球由来の ROS 産生は LmCL 値としてルミノメーター (Gene Light 55, マイクロテック社、船橋、千葉) で直後、0.5 時間後、1.0 時間後、1.5 時間後に経時的に測定した。好中球は 37°C で血液から S-TGP ゲル内に浸潤し、LmCL は透明なゲルを通して検出された。それゆえ、ROS 産生を測定するのに好中球を分離する必要はなく、従来法での好中球分離にかかる時間的遅れを減らすことができた[9]。1.5 時間後に LmCL の測定後、チューブ内のルミノールと血

液の混和サンプルを除去し、37°Cで加温された PBS で3回洗浄した。そのゲルが入ったチューブは、氷冷してゲルをゾル化した後、50 μ l の試薬 A と 50 μ l の試薬 B (ChemoMetec A/S, Allerød, Denmark) を添加し十分混和するが、それは DNA 染色のために細胞膜透過性を効率化し、細胞の凝集を分散させるのに効果的である。そのサンプルは NucleoCassett に吸入し、細胞数は NucleoCounter (ChemoMetec A/S, Allerød, Denmark) で計数を行った。

統計処理

Shapiro-Wilk test を用いて等分散の検定を行った。統計学的な分散は、Friedman の繰り返しのある分散分析で順位について検定し多重比較検定を行った。演算は IBM SPSS Statistics version 19 を用いて行われた。

結果

被験者特性

本研究に参加した被験者は 14 人で、30 から 57 歳までの範囲で平均年齢 43 歳であった。被験者は 2 人の男性と 12 人の女性であった。

各時点での化学発光値

2 週間の TAHEEBO NAFDIN® の摂取において、0.5 と 1.0 時間での化学発光値は有意差はなかったが (図 1、2)、1.5 時間での化学発光値は有意に低下した (フリードマン: $P=0.002$) (図 3)。

(この辺に PowerPoint の図 1～7 の挿入)

図 1-7. 2 週間タヒボ摂取した被験者からの検体におけるルミノール依存性化学発光 (Luminol chemiluminescence: LmCL) と細胞数を示した箱ひげ図: (1) 0.5 時間後、(2) 1.0 時間後、(3) 1.5 時間後の化学発光値、(4) 測定中のピーク値、(5) 1.5 時間の積算値、(6) 1.5 時間後のゲルへの浸潤細胞数、(7) 1.5 時間の 1 細胞あたりの合計値の 2 週間の変化。P 値はフリードマンの多重比較検定によって計算された。箱ひげ図は 25 から 75% の間の値を示す (中心線は中央値)。縦線は 10 から 90% を示す。

化学発光のピーク値

化学発光のピーク値は測定中 (0.5–1.5 時間) に評価され、2 週間の TAHEEBO NAFDIN® の摂取によって有意に低下した (フリードマン: $P=0.004$) (図 4)。

化学発光の積算値

化学発光の積算値は、0.5–1.5 時間の各ポイントの化学発光値の合計から算出された。2 週間の TAHEEBO NAFDIN® の摂取によって 1.5 時間までの化学発光の積算値は有意に

低下した（フリードマン：P=0.002）（図5）。

浸潤好中球数

2週間の TAHEEBO NAFDIN® の摂取によって浸潤細胞数は有意な影響を受けなかった（図6）。浸潤細胞数で補正してもなお、細胞あたりの化学発光値は、2週間の TAHEEBO NAFDIN® の摂取によって有意に抑制されていた（フリードマン：P=0.001）（図7）。

考察

本研究は *Tabebuia avellanedae* 抽出物を2週間摂取した被験者において化学発光値の有意な低下を証明した。その影響は、浸潤細胞数で補正しても有意であった。これらの結果は、*Tabebuia avellanedae* は好中球の浸潤を抑制しないが、浸潤した細胞によって産生される活性酸素が有意に抑制されることを示唆する。

好中球の活性化は、抗炎症ないし抗酸化作用を通じて *Tabebuia avellanedae* によって制御されるかもしれない。*Tabebuia avellanedae* の抗炎症作用に関して入手できる報告は限られている。Byeon らは *Tabebuia avellanedae* がマクロファージによる炎症応答を PGE₂ 産生を抑制することによって負に調節をすることを証明した[6]。Awale らは *Tabebuia avellanedae* がマクロファージ様の J774.1 細胞の活性を抑制することを報告した[8]。好中球は炎症においてマクロファージ同様に重要な役割を担う。しかしながら、ほとんどの研究は *Tabebuia avellanedae* によって制御される好中球機能に注目してこなかった。我々は *Tabebuia avellanedae* がヒト好中球の ROS 産生を抑制することを証明した。

Tabebuia avellanedae の主な活性化合物は furanonaphthoquinones, quinones (lapachol and β-lapachone), naphthoquinones, flavonoids, iridoids and phenolic glycosides である。Iridoids and phenylethanoid glycoside は、LPS で刺激されたマクロファージ様の J774.1 細胞の一酸化窒素 (NO) 産生の活性を抑制することが示された[8]。Furano naphtho quinones や β-lapachone may は、試験管内での免疫調節作用を仲介するかもしれない[12]。*Tabebuia avellanedae* のこれらの化合物は好中球の活性化に作用するかもしれないが、どの化合物が好中球の活性化を制御するかを調べるためにさらに研究が必要である。

本研究で、我々は *Tabebuia avellanedae* は化学発光法による好中球活性化の抑制をヒトにおいて証明した。好中球の呼吸バースト活性は、スーパーオキシド (O₂⁻) や過酸化水素 (H₂O₂) などの NADPH 酸化酵素依存性の酸化物質や MPO 依存性の次亜塩素酸 (HOCl) の産生を化学発光物質としてルミノールを用いることによって、発光するレポーター分子の存在下で測定することができる[13]。我々は、熱可逆ゲル形成性高分子としてメビオールゲルを用いたが、この高分子は低温では液体になるが加温するとすぐにゲル化し、また冷やすと液体に戻るため有用である。我々の方法の最大の利点は、細胞分離の手順を必要としない方法を用いることによる迅速性と簡便性である。さらに、我々の好中球の細胞応答

を用いる測定系は、免疫応答のプロフィールのなかで好中球の活性化状態を評価し、炎症ないし抗酸化活性を推定するために抗酸化物質のスクリーニングにも適用できるかもしれない[14]。これらの洞察は、炎症関連の疾患や病態への新規のアプローチを導入する可能性もある[15]。

結論

我々は *Tabebuia avellanedae* 抽出物がヒトの好中球の ROS 産生を抑制することを証明した。将来の研究は、好中球機能調節のメカニズムと *Tabebuia avellanedae* の活性物質の探求に向けられるべきである。

謝辞

Nanyang Technological University (Singapore) の Fabian Lim 准教授には原稿校正と英文添削をしていただき、前田病院（狭山市、埼玉県）での臨床研究の実施と補助には病院スタッフと泊美樹氏（早稲田大学）に協力していただき、感謝申し上げます。本研究は、タヒボジャパン株式会社から鈴木克彦教授と大野智客員准教授へ助成された研究費の一部によって実施された。また、本論文の発表は文部科学省私立大学基盤形成事業の支援を受けた。財源提供者は、研究デザイン、データの収集と分析、発表の決定、原稿の準備に関与しなかった。

文献

- [1]. Oliveira BF, Nogueira-Machado JA, Chaves MM (2010) The role of oxidative stress in the aging process. *Scientific World Journal* 10: 1121-1128.
- [2]. Chen AF, Chen DD, Daiber A, Faraci FM, Li H, et al. (2012) Free radical biology of the cardiovascular system. *Clin Sci (Lond)* 123(2): 73-91.
- [3]. Carnero A (2012) MAP17 and the double-edged sword of ROS. *Biochim Biophys Acta* 1826(1): 44-52.
- [4]. Machado TB, Pinto AV, Pinto MC, Leal IC, Silva MG, et al. (2003) In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 21(3): 279-284.
- [5]. Gomez Castellanos JR, Prieto JM, Heinrich M (2009) Red Lapacho (*Tabebuia impetiginosa*)--a global ethnopharmacological commodity? *J Ethnopharmacol* 121(1): 1-13.
- [6]. Byeon SE, Chung JY, Lee YG, Kim BH, Kim KH, et al. (2008) In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of taheebo, a water extract from the inner bark of *Tabebuia avellanedae*. *J Ethnopharmacol* 119(1): 145-152..

- [7]. Bohler T, Nolting J, Gurrachaa P, Lupescu A, Neumayer HH, et al. (2008) *Tabebuia avellanedae* extracts inhibit IL-2-independent T-lymphocyte activation and proliferation. *Transpl Immunol* 18(4): 319-323.
- [8]. Awale S, Kawakami T, Tezuka Y, Ueda JY, Tanaka K, et al. (2005) Nitric oxide (NO) production inhibitory constituents of *Tabebuia avellanedae* from Brazil. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 53(6): 710-713.
- [9]. Hasegawa H, Suzuki K, Nakaji S, Sugawara K (1997) Analysis and assessment of the capacity of neutrophils to produce reactive oxygen species in a 96-well microplate format using lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence. *J Immunol Methods* 210(1): 1-10.
- [10]. Suzuki Y, Ohno S, Okuyama R, Aruga A, Yamamoto M, et al. (2012) Determination of chronic inflammatory states in cancer patients using assay of reactive oxygen species production by neutrophils. *Anticancer Res* 32(2): 565-570.
- [11]. Sudha B, Madhavan HN, Sitalakshmi G, Malathi J, Krishnakumar S, et al. (2006) Cultivation of human corneal limbal stem cells in Mebiol Gel - A thermo-reversible gelation polymer. *Indian J Med Res* 124(6): 655-664.
- [12]. Kreher B, Lotter H, Cordell GA, Wagner H (1988) New furanonaphthoquinones and other constituents of *Tabebuia avellanedae* and their immunomodulating activities in vitro. *Planta Med* 54(6): 562-563.
- [13]. Romaschin AD, Foster DM, Walker PM, Marshall JC (1998) Let the cells speak: Neutrophils as biologic markers of the inflammatory response. *Sepsis* 2: 119-125.
- [14]. Suzuki K, Ohno S, Suzuki Y, Ohno Y, Okuyama R, et al. (2012) Effect of green tea extract on reactive oxygen species produced by neutrophils from cancer patients. *Anticancer Res* 32(6): 2369-2375.
- [15]. Sugama K, Suzuki K, Yoshitani K, Shiraishi K, Miura S, et al. (2015) Changes of thioredoxin, oxidative stress markers, inflammation and muscle/renal damage following intensive endurance exercise. *Exerc Immunol Rev* 21: 130-142