

マクロファージの一酸化窒素産生に対する エミューオイルの効果

伊藤 実*・渡部俊弘**・丹羽光一**†

(平成 28 年 8 月 29 日受付/平成 28 年 10 月 21 日受理)

要約: マクロファージは、細菌感染やがん細胞の発生の際に活性化される細胞であり、一酸化窒素 (NO) などの炎症性物質を産生し、生体を防御する働きをもつ。しかし、炎症性物質の過剰産生は、リウマチなど多くの疾患の原因となるため、これを抑える抗炎症物質が広く機能性食品や化粧品、医薬品として利用されている。本研究では、エミュー (*Dromaius novaehollandiae*) の皮下脂肪から得られるエミューオイルが、マクロファージによって産生される NO に与える影響を調べた。マウス由来培養マクロファージ (RAW264.7) をリポポリサッカリド (LPS) で刺激すると、NO の産生量は 6 倍に増加した。一方、エミューオイルを添加した培養液で培養した RAW264.7 では、この増加はエミューオイルの存在下で抑制された。また、RAW264.7 を LPS で刺激すると NO 合成酵素 (NOS) の発現量が 2 倍に増加した。この NOS の発現量の増加は、エミューオイルで培養した RAW264.7 では抑制された。したがって、エミューオイルは LPS によるマクロファージの NOS 過剰発現を抑制し、NO の産生量を減少させることが明らかとなった。すなわち、エミューオイルには、過剰な炎症性物質の産生を抑制する効果があることが示唆された。

キーワード: エミューオイル, 炎症, マクロファージ, 一酸化窒素

1. 緒 言

炎症は、感染や外傷などの刺激に対する免疫応答によって活性化される生体の防御反応のひとつである。生体において、細菌の感染やがん細胞の発生に対し最初に応答するのが、マクロファージである。グラム陰性菌が産生するリポポリサッカリド (LPS) などの細菌毒素により、マクロファージでは、サイトカインやケモカインなどの炎症性物質の産生が誘導される。また、LPS の刺激が、マクロファージの一酸化窒素合成酵素 (NOS) の発現を誘導し、産生された一酸化窒素 (NO) によって、細菌やがん細胞が除去される。しかし、NO などの炎症性物質が過剰に産生されると、生体に悪影響を与え、リウマチなどの多くの疾患を引き起こす原因となる^{1,2)}。

多くの炎症性疾患の治療には、非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) が使用される。しかし NSAID は消化管粘膜障害を引き起こすなどの副作用があり、その代替療法として、近年、天然資源からの抗炎症薬の探索が進められている³⁾。今までにハーブ類⁴⁾ やウコン⁵⁾ などの植物、カピバラ油⁶⁾ などの動物性油脂など、多くの天然由来成分が抗炎症作用を示すことが明らかにされており、日常的摂取による抗炎症効果を見込んだ機能性食品や化粧品として応用されている。

エミュー (*Dromaius novaehollandiae*) はオーストラリ

ア原産のヒクイドリ目エミュー科に属する走鳥類である。オーストラリアの原住民アボリジニの間では、古くから、エミューから採れる油に抗炎症作用があることが経験的に知られており、これを伝統的に傷や痛みの手当に利用してきた⁷⁾。エミューの皮下脂肪を精製したエミューオイルは不飽和脂肪酸を多く含んでおり、保湿効果と皮膚浸透性が高く、化粧品原料として優れた性質を有している。

近年、実験動物を用いた研究において、エミューオイルが化学療法の副作用である潰瘍性腸炎⁸⁾ や骨粗鬆症⁹⁾、化学物質による外傷¹⁰⁾ などの炎症性疾患に効果があるという報告がなされているが、その作用機序などの詳細は、未だ不明のままである。

本研究では、マクロファージが産生する炎症性物質のひとつである NO にエミューオイルがどのような効果を持つかを、マウス由来マクロファージ株化細胞 RAW264.7 を用いて検討した。

2. 試料および方法

(1) 試料

エミューオイルは、網走産のエミューの皮下脂肪をミンチ状に刻み、フィルター処理および遠心分離などの工程を経て精製したものを、(株)東京農大バイオインダストリーから購入した。

* 株式会社ノエビアグループ総合研究開発部

** 東京農業大学生物産業学部食品香粧学科

† Corresponding author (E-mail: k3niwa@bioindustry.nodai.ac.jp)

(2) 細胞培養

マウスマクロファージ株化細胞である RAW264.7 (理研バイオリソースセンター) を、5% ウシ胎仔血清を添加した Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) を用いて CO₂ インキュベーター内で培養した。

(3) エミュールオイル存在下での細胞培養

96 Well プレートに、RAW264.7 を 2.0×10^4 cells/cm² の密度で播種した。翌日、各濃度のエミュールオイルあるいは 1 μM デキサメタゾン (Dexamethasone, Sigma-Aldrich) を含む培養液に交換して 72 時間培養した。エミュールオイルを培養液に添加するときは、乳化して溶解するために 4% ウシ血清アルブミン (BSA, 脂肪酸不含, 和光純薬工業) を含む培養液を用いた^{11,12)}。デキサメタゾンは NO 産生を抑制するポジティブコントロールとして使用した。デキサメタゾンは、ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide; DMSO, 和光純薬工業) に溶解した 1 mM のストック溶液を、培養液に 1,000 倍希釈して 1 μM とした。エミュールオイルあるいはデキサメタゾンの効果を検討するときは、全ての試験群で 4% 脂肪酸不含 BSA および 0.1% DMSO を含む培養液を用いた。

エミュールオイルあるいはデキサメタゾンを含む培養液に交換して 72 時間培養した後、100 nM のリポポリサッカライド (LPS, Sigma-Aldrich) を含む培養液 (150 μl) に交換し、20 時間後に培養上清を回収した。LPS は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解した 1 mM のストック溶液を、培養液に 10,000 倍希釈して 100 nM とした。

NOS の検出を行うときは、10 cm ディッシュに細胞を播種し、同様の処理を行った。

(4) NO 産生量の測定

回収した培養上清 100 μl と 40 mg/ml に調整したグリース・ロミン亜硝酸試薬 100 μl を混合して室温で 10 分インキュベートした後、マイクロプレートリーダーを用いて 550 nm の波長で吸光度を測定した。亜硝酸ナトリウム (NaNO₂) を用いた検量線から亜硝酸イオン (NO²⁻) の濃度を算出した。細胞は PBS で洗浄した後、0.5% Triton-X で可溶化し、BCA 法を用いてタンパク量を測定した。NO²⁻ 量をタンパク量で除し、NO 産生量とした。

(5) ウエスタンブロットによる NOS の検出

ディッシュを PBS で洗浄し、細胞をエッペンチューブに回収した後 Cell Lysis Buffer (Cell Signaling Technology) 50 μl で懸濁し、4°C で 30 分間静置した。遠心後、上清 50 μl を回収して SDS サンプルバッファー (×3) を 25 μl 加えて懸濁し、5 分間煮沸して試料とした。試料は、7.5% アクリルアミドゲルを用いて電気泳動した後、ニトロセルロース膜に転写した。3% スキムミルクと 0.05% Tween-20 を含むトリス緩衝液 (SM-TBST) で 60 分間室温においてブロッキングした後、SM-TBST で 1000 倍希釈した一次抗体に浸し、4°C で一晩振とうした。一次抗体には、NOS を検出するときは抗 NOS2 抗体 (Rabbit anti-

NOS2 IgG, Santa Cruz Biotechnology) を、アクチンを検出するときは抗アクチン抗体 (Goat anti-actin IgG, Santa Cruz Biotechnology) を用いた。SM-TBST でニトロセルロース膜を洗浄し、SM-TBST で 1000 倍希釈した二次抗体にニトロセルロース膜を浸し、室温で 60 分間振とうした。二次抗体には、NOS を検出するときは抗ウサギ IgG 抗体 (Goat anti-rabbit IgG HRP, Santa Cruz Biotechnology) を、アクチンを検出するときは抗ヤギ IgG 抗体 (Donkey anti-goat IgG HRP, Santa Cruz Biotechnology) を用いた。ニトロセルロース膜を SM-TBST で洗浄し、化学発光基質 (Millipore) を用いてバンドを化学発光させ、バンド強度を画像解析ソフト Image J で数値化した。

NOS のバンド強度をアクチンのバンド強度で除して正規化し、相対的なバンド強度を算出した。

(6) 統計

実験で得られた結果は平均値 ± 標準偏差で示し、Non-repeated measures ANOVA および Bonferroni 検定にて有意差検定を行った。

3. 結 果

(1) NO の産生

RAW264.7 を LPS で 20 時間刺激すると、NO の産生量は対照群の約 6 倍に増加した (図 1)。サイトカイン産生の阻害薬であるデキサメタゾン (1 μM) は、この増加を有意に抑制した。エミュールオイルを添加した培養液で培養した細胞では、LPS 刺激による NO 産生量はエミュールオイルの存在下で抑制された。

(2) NOS の発現

NO 産生量の測定と同様の条件で細胞をエミュールオイルで処理し、さらに LPS で刺激して NOS の発現をウエスタンブロットで検出した (図 2)。LPS の刺激により NOS の

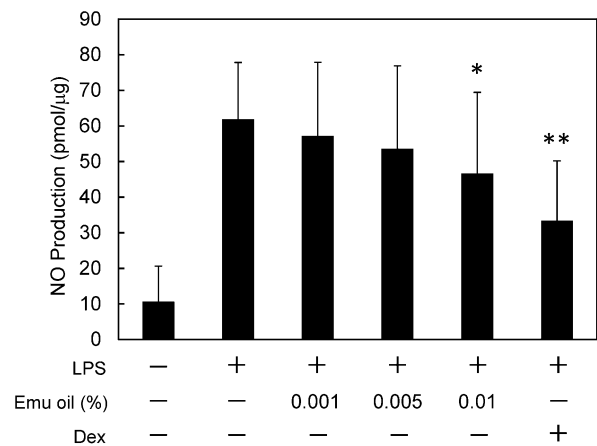


図 1 LPS 刺激による RAW264.7 の NO 産生に対するエミュールオイルの効果
Dex: デキサメタゾン
平均値 ± 標準偏差, n=12. *, P<0.05; **, P<0.01 (LPS 刺激群に対して)

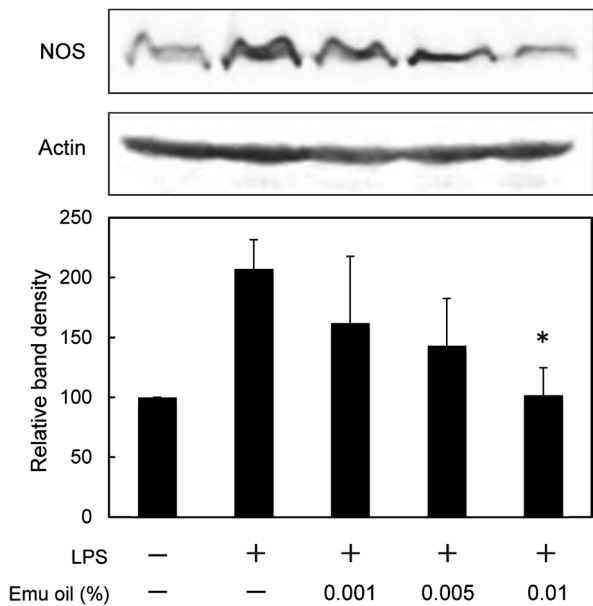


図2 NOSの発現に対するエミューオイルの効果
 上段, 中段 NOS, Actinの代表的バンド
 下段 NOSのバンド強度をActinのバンド強度で除した値 (平均値±標準偏差, n=3)
 *, $P < 0.05$ (LPS刺激群に対して)

発現量が増加した。エミューオイルは、LPS刺激によるNOSの発現を抑制した。

考 察

マクロファージは、細菌などの病原体を貪食してIL-6, TNF- α などの炎症性サイトカインとNO, スーパーオキシドなどの活性酸素を産生する。これらの物質は、病原体の除去に関与しているが、過剰に産生されると、炎症における組織障害を引き起こす^{1,2)}。本研究では、マクロファージからのNO産生に対するエミューオイルの効果を明らかにした。すなわち、エミューオイルを添加した培養液でRAW264.7を培養すると、LPS刺激によるNO産生とNOSの発現量はエミューオイルによって抑制された。この結果は、エミューオイルがNOSの発現を抑制することで、NOの産生を減少させることを示しており、エミューオイルがマクロファージに直接作用して炎症性反応を抑制することが初めて明らかとなった。

近年、エミューオイルを炎症性疾患の治療に使用することが動物実験で検討されており、炎症反応を抑制する効果が認められている。例えば、抗がん剤である5-fluorouracil (5-FU)を投与したラット小腸では好中球の活性化が認められたが、エミューオイルの投与によりこの活性化は抑制された⁹⁾。またクロトンオイルを塗布して炎症を起こしたマウスの耳では、IL-6やTNF- α などの炎症性サイトカイン含量が増加したが、エミューオイルを塗布することでこの増加は抑制された¹⁰⁾。これらの報告から、エミューオイルは炎症性疾患に対する治療効果があることが示唆されている。しかし、その一方で、炎症に関与する細胞へのエミューオイルの効果は不明のままであった。本研究により、

エミューオイルが、炎症発生の初期段階に関わるマクロファージの炎症性物質の産生に直接関与することが初めて示された。

エミューオイルは ω -3不飽和脂肪酸である α -リノレン酸と、 ω -6不飽和脂肪酸である γ -リノレン酸を含んでいる。 ω -3および ω -6不飽和脂肪酸は、プロスタグランジン類を産生するシクロオキシゲナーゼ(COX)やリポキシゲナーゼ(LOX)を阻害し、抗炎症効果を発揮する事が知られている¹³⁻¹⁵⁾。このことから、エミューオイルによる抗炎症効果の機序として、COXやLOXなどの抑制が考えられるが、エミューオイルがこれらの酵素におよぼす影響は検証されていない。また、本研究で明らかとなったエミューオイルによるNOSの抑制も、オイル中のどの成分によるものかは不明である。一方、マウスの耳の炎症に対して様々なオイルを塗布して抗炎症効果を比較した研究では、魚油、亜麻仁油、オリーブオイルよりもエミューオイルの塗布が最も効果が高いことが報告されている¹⁰⁾。抗炎症効果を持つとされる多価不飽和脂肪酸含量は、他のオイルに比べてエミューオイルが際立って高いわけではなく、エミューオイルの高い抗炎症効果は多価不飽和脂肪酸だけでは説明がつかない。今後、炎症に関わる細胞内の酵素にエミューオイルが及ぼす影響を調べ、さらにどの成分が寄与しているかを明らかにする必要がある。

多くの炎症性疾患の治療に用いられるNSAIDは消化管粘膜障害を引き起こすなどの副作用を示す³⁾。一方、エミューオイルは動物実験において副作用を起こさず、粘膜の炎症を緩解することが示されており、炎症性疾患の症状を緩和する新たなツールとなることが考えられる。エミューオイルの抗炎症効果の有用性を明らかにするために、今後、炎症に関与する細胞の機能に対するエミューオイルの直接効果を調べる必要がある。

引用文献

- 1) 小野聡, 望月英隆 (2000) 新しい免疫の啓蒙—外科学との関わり—2 外科侵襲とサイトカイン. 日本外科学会雑誌 101 : 582-587.
- 2) 江口裕伸, 藤原範子, 大河原知水, 鈴木敬一郎, 谷口直之 (2010) 酸化ストレスと健康. 生物試料分析 32 : 247-256.
- 3) 三浦俊明 (2013) 非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drugs) の戦略的用法を目指して: ペルオキシダーゼとの反応性を基にした非ステロイド性抗炎症薬の分類. YAKUGAKU ZASSHI 133 : 681-689.
- 4) JEONG JB, SHIN YK, LEE S -H (2013) Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol in RAW264.7 and HT-29 cells. Food Chem. Toxicol. 55 : 229-233.
- 5) JURENKA JS (2009) Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. Alternat. Med. Rev. 14 : 141-153.
- 6) MARINHO PC, NETO-FERREIRA R, CARVALHO JJ (2013) Evaluation of therapeutic intervention with natural product in cutaneous wound healing : the use of capybara oil. Evid Based Complement. Alternat. Med. 2013 : 1-10.
- 7) JEENGAR MK, KUMAR PS, THUMMURI D, SHRIVASTAVA S, GUNTUKU L, SISTLA R, NAIDU VGM (2015) Review on emu products for use as complementary and alternative medicine.

- Nutrition* 31 : 21-27.
- 8) LINDSAY R J, GEIER M S, YAZBECK R, BUTLER R N, HOWARTH G S (2010) Orally administered emu oil decreases acute inflammation and alters selected small intestinal parameters in a rat model of mucositis. *Br. J. Nutr.* 104 : 513-519.
 - 9) NADHANAN R R, ABIMOSLEH S M, SU Y-W, SCHERER M A, HOWARTH G S, XIAN C J (2012) Dietary emu oil supplementation suppresses 5-fluorouracil chemotherapy-induced inflammation, osteoclast formation, and bone loss. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302 : E1440-E1449.
 - 10) YOGANATHAN S, NICOLOSI R, WILSON T, HANDELMAN G, SCOLLIN P, TAO R, BINFORD P, ORTHOEFER F (2003) Antagonism of croton oil inflammation by topical emu oil in CD-1 mice. *Lipids* 38 : 603-607.
 - 11) LEEKUMJORN S, CHO H J, WU Y, WRIGHT N T, SUM A K, CHAN C (2009) The role of fatty acid unsaturation in minimizing biophysical changes on the structure and local effects of bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1788 : 1508-1516.
 - 12) AZZAM M O J, AL-MALAH K I, OMARI R M (2012) Jojoba oil/water emulsions stabilized by BSA and egg proteins : A study using conductivity technique. *J. Dispersion Sci. Technol.* 33 : 1000-1005.
 - 13) 清水俊明 (2003) n-3系多価不飽和脂肪酸の各種病態に対する有用性の検討. *順天堂医学* 49 : 12-23.
 - 14) LEE J Y, PLAKIDAS A, LEE W H, HEIKKINEN A, CHANMUGAM P, BRAY G, HWANG D H (2003) Differential modulation of Toll-like receptors by fatty acids : preferential inhibition by n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* 44 : 479-486.
 - 15) KAPOOR R, HUANG Y-S (2006) Gamma linolenic acid : An anti-inflammatory omega-6 fatty acid. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7 : 531-534.

Effects of Emu Oil on Nitric Oxide Production of Macrophage

By

Minoru ITO*, Toshihiro WATANABE** and Koichi NIWA**†

(Received August 29, 2016/Accepted October 21, 2016)

Summary : Macrophage, which is the cells activated by bacterial infection and growth of cancer cells, produces inflammatory mediators such as nitric oxide (NO) and plays a role in protecting the body. But overproduction of the inflammatory mediators causes various diseases such as rheumatoid arthritis. Therefore, the compounds suppressing the overproduction of inflammatory mediators are widely applied to functional foods, cosmetics and pharmaceuticals. In this study, we examined the effects of emu oil, obtained from emu (*Dromaius novaehollandiae*), on the production of NO by macrophage. When a cultured cell line of mouse macrophage (RAW267.4) was stimulated by lipopolysaccharide (LPS), NO production was increased by 6-times. Addition of emu oil to the culture medium inhibited the LPS-induced NO production. A stimulation of RAW264.7 by LPS increased twice the expression level of NO synthase (NOS). Emu oil decreased the LPS-induced increase in NOS. These results suggest that emu oil reduced the LPS-induced NO production by inhibiting the expression of NOS in RAW264.7. It is likely that emu oil possesses the ability to reduce the production of anti-inflammatory mediators by macrophage.

Key words : emu oil, inflammation, macrophage, nitric oxide

* Groupwide Research and Development, Noevir Co., Ltd.

** Department of Food and Cosmetic Science, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture

† Corresponding author (E-mail : k3niwa@bioindustry.nodai.ac.jp)