

# 安定型アスコルビン酸誘導体の 免疫賦活活性とそのメカニズム

岡山大学薬学部

山本 格

A stable form of ascorbate, AA-2P significantly enhanced anti-SRBC antibody productions by cultured splenocytes at a concentration of 0.5mM, as had been previously described with AA-2G, whereas AA-2S was without effect. In this culture system, it was confirmed that AA-2G and AA-2P were cleaved by lymphocyte's  $\alpha$ -glucosidase and phosphatase, respectively, to release intact ascorbic acid. We also demonstrated that AA-2P synergistically enhanced the antibody responses with nerve growth factor (NGF) by T-cell depleted splenocytes, as had been previously reported with AA-2G, whereas AA-2S did not. SRBC-induced expression of NGF receptor on B cell surface was stimulated by AA-2P as well as AA-2G. These results indicate that AA-2G or AA-2P, as an ascorbate source, may be a useful tool for finding new biological actions and for elucidation of their mechanisms.

## 緒 言

ビタミンCはビタミンの中でもその働きや機能について最もよく知られており、それ故に研究し尽くされたかに見えるビタミンである。しかし、近年細胞レベル、分子レベル並びに遺伝子レベルの研究が進むにつれ、今なお新しい機能の発掘と生体内での意義について知見が蓄積されつつある。

最近、我々は新規安定型アスコルビン酸誘導体、2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G)を見出し、その酵素的大量合成にも成功した<sup>1-3)</sup>。

AA-2Gは熱や酸化に対し極めて安定であるが、経口投与された場合には、消化管組織の $\alpha$ -グルコシダーゼによりグルコースとアスコルビン酸が生じ、それが吸収され抗壊血病作用(モルモット)などのビタミンC活性を発揮する<sup>4, 5)</sup>。AA-2Gは培

養細胞に対しても作用を発揮する。例えば、AA-2Gはヒト線維芽細胞におけるコラーゲン合成を促進する<sup>6)</sup>。この場合、培地中に含まれる血清または細胞膜面上の $\alpha$ -グルコシダーゼによりAA-2Gから遊離したアスコルビン酸が本作用を発揮していることも明らかにされている。

我々はAA-2Gをアスコルビン酸供給源として用い、脾細胞培養系において、アスコルビン酸の抗体産生増強作用を初めて実証した<sup>7)</sup>。ビタミンCの免疫増強作用については、古くより多くの研究者により報告されているが、in vitroにおける細胞レベルで作用が認められないことから、例えば抗体産生増強作用のメカニズムに関してはこれまで全く不明であった。この原因がアスコルビン酸の不安定さにあることを証明した。その後、我々はアスコルビン酸の抗体産生促進作用が神経成長因子(NGF)により相乗効果を受けることを見いだした(投稿中)。そのメカニズムを解析したところ、Bリンパ球上のNGF受容体発現がアスコルビン酸により増強されるという興味ある知見を見いだしている(投稿中)。

本研究では、主に安定型アスコルビン酸誘導体であるAA-2PとAA-2Sについて、AA-2Gと同様の作用があるか否かにつき検討した。

Immunostimulatory activity of stable ascorbates  
and its mechanism.



Itaru Yamamoto

Okayama University

## 実験方法と材料

動物: 雌性BALB/cマウスは7週齢で(株)日本クレアより購入し、一定の環境下で馴化後10週齢で使用した。

抗SRBC抗体産生応答: マウスT細胞除去脾細胞 $4 \times 10^6$ をSRBC抗原及びNGFなどの薬物と共に、10% FCS含有RPMI1640培地を24穴カルチャープレート(NUNC)を用いて5日間培養した。培養終了後細胞を回収・洗浄後、補体並びにSRBC存在下、プラーク形成細胞をcunninghamの方法<sup>8)</sup>に準じて計数した。

NGF受容体発現細胞の測定: 培養細胞 $1 \times 10^6$ をMEM培地 $50 \mu\text{l}$ に懸濁し、ビオチン化NGF溶液 $6 \mu\text{l}$ を加え、氷冷下30分放置し、洗浄後0.5% BSA含有PBSに懸濁しフローサイトメトリーにて解析した。

## 結果

AA-2Gは全脾細胞系においては、0.25mM以上の濃度で抗体産生を著明に増強することをすでに報告している<sup>7)</sup>。この増強作用はAA-2Gによる単なる非特異的な脾細胞の生存維持作用ではなく、特異的抗体産生細胞数の増加によること、すなわち、分化促進作用に基づくことを明らかにしている。一方、T細胞除去脾細胞系では0.25mMのAA-2Gは単独ではほとんど増強作用を示さず、また、NGFも同様に単独では抗体産生に対し無作用である。しかし両者を併用すると相乗効果が出現し、抗体産生は著明に促進される。

ここではAA-2Gと同様、既知の安定型アスコルビン酸誘導体であるAA-2P並びにAA-2Sにも抗SRBC抗体産生におけるNGFとの相乗作用が認められるか否かを検討した。その結果、図1Aに示すように0.5mMのAA-2Pは単独では何等作用は認められないにもかかわらず、30ng/mlのNGFを同時に培地に添加すると、AA-2GとNGFの場合に認められたとほぼ同程度の相乗効果が認められた。

ところで、先に我々が報告したように、AA-2GとNGFの相乗効果の原因の一つはAA-2GによるB

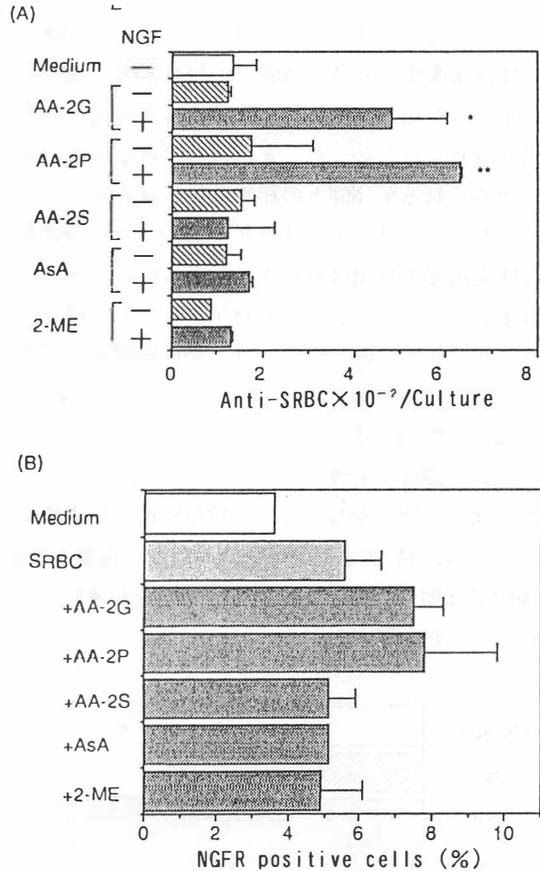


Fig. 1 (A) Combined effect of NGF and several AsA derivatives on anti-SRBC PFC response in T cell depleted splenocytes. (B) Flow cytometric analysis of T cell depleted splenocytes stimulated with SRBC in the presence of several AsA derivatives. Splenocytes were cultured with NGF (30ng/ml) and AA-2G (0.5mM), AA-2P (0.5mM), AA-2S (0.5mM), ASA (0.5mM) or 2-ME (0.5mM) for 5 days (A) or 4 days (B). NGF was added to the cultured medium at day 4. Significant differences from each control was expressed as \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ .

リンパ球膜面上の NGF受容体の発現促進であることが明らかにされている。そこで、AA-2Pの場合にも同様の現象が観察されるか否かにつき検討した。その結果、図1Bに示したように、抗原SRBCの刺激下、0.5mMのAA-2PによりNGF受容体の発現増加が認められた。

それに対し、AA-2S (0.5mM) 及びAsA (0.5mM) では抗体産生における NGFとの相乗効果は認められず、また AA-2SやAsAではNGF受容体発現促進効果も認められなかった。また、抗体産生促進効果は認められるが NGFとの相乗効果の認められていない2-メルカプトエタノール (2ME) でも、NGF受容体発現促進作用は観察されなかった。データには示していないが、デヒドロアスコルビン酸やイソアスコルビン酸に関しては、全脾細胞系で抗体産生促進作用やNGFとの相乗作用、さらにはNGF受容体発現作用もすべて認められていない。

図2にはNGF受容体を発現している細胞数を示した。図から明らかのように、抗原SRBCのみの場合にくらべ、AA-2Gまたは AA-2Pの存在下培養したB細胞では顕著に NGF受容体発現細胞数が増加していることが判明した。

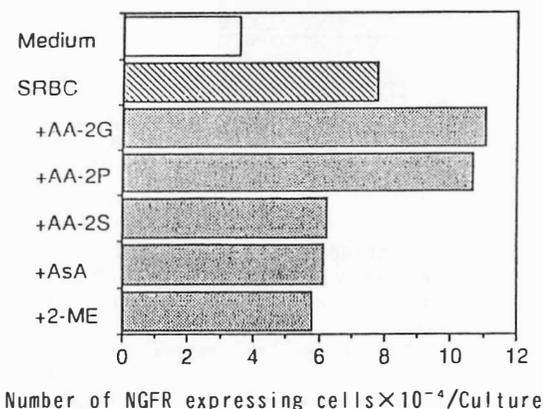


Fig.2 Flow cytometric analysis of T cell-depleted splenocytes stimulated with SRBC in the presence of several AsA derivatives. splenocytes were cultured with or without SRBC in the presence of AA-2G (0.5mM), AA-2P (0.5mM), AA-2S (0.5mM), ASA (0.5mM) or 2-ME (0.5μM) for 4days. Cultured cells (1 × 10<sup>6</sup>) were incubated with biotinylated-NGF and then stored with PE-conjugated streptavidin.

次に、安定型AA-2GとAA-2Pのみでこのような作用が認められ、AsAを遊離しないAA-2Sや不安定なAsAでは認められなかったこと、細胞内アス

コルビン酸含量の間に相関性があるか否かを知るために、培養Bリンパ球内のアスコルビン酸含量を経時的に測定した。その結果、NGFとの相乗効果の認められたAA-2GまたはAA-2Pを添加したときに、培養期間中、細胞内アスコルビン酸含量が培養開始時のレベルに維持されていることが判明した。それに対して、相乗効果の認められなかったAA-2S及びAsAではコントロールと同様に培養後期にはアスコルビン酸含量がほとんど消失していた(図3)。

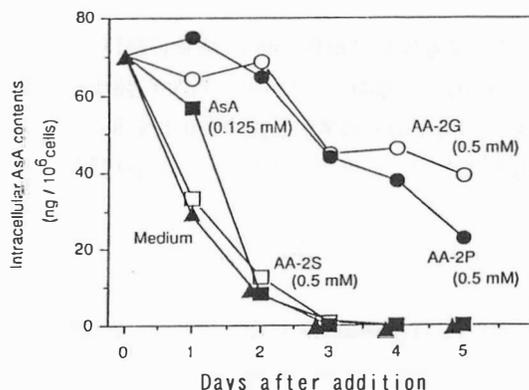


Fig.3 Time course of Intracellular AsA contents in T cell-depleted splenocytes. Splenocytes were cultured with SRBC in the presence of AA-2G (0.5mM:○) AA-2P (0.5mM:●), AA-2S (0.5mM:□), ASA (0.125mM:■) for 5days, Then the cells were washed and lysed with TCA at the indicated days. Those supernatants were analyzed by HPLC equipped with ECD.

このことから、AA-2GやAA-2PのNGFとの抗体産生の相乗効果やNGF受容体発現促進には一定の細胞内アスコルビン酸含量の維持が重要であること、すなわち、アスコルビン酸がその作用の本体であることが示唆された。

## 考 察

これまでのビタミンCに関する研究には三つの方向性がある。第一はビタミンCの新しい生理活性並びにその作用メカニズムに関する研究である。

第二は新規アスコルビン酸誘導体の合成並びに天然からの抽出・構造決定に関する研究であり、第三はビタミンC及びその誘導体の医療的応用である。中でも新規アスコルビン酸誘導体の発見や開発は、それをきっかけにビタミンCの研究を広範囲に活性化する傾向がある。

先に我々は哺乳動物  $\alpha$ -グルコシダーゼや *Bacillus stearothermophilus* 由来CGTaseを用いてアスコルビン酸と二糖または多糖から新規安定型アスコルビン酸誘導体、AA-2Gが合成出来ことを発見した<sup>1-3, 9)</sup>。AA-2Gは酸化的条件下で安定であり、生体に投与された場合または細胞培養系に添加された時には、 $\alpha$ -グルコシダーゼによりアスコルビン酸を遊離しビタミンC活性を発揮する<sup>2)</sup>。

ビタミンCにはIFN誘導能や抗ウイルス作用、さらには免疫増強作用があると言われている。しかしながら、実験的にそれを証明することは極めて困難である。その理由として、アスコルビン酸は他のビタミンと異なり化学的に極めて不安定であること、また実験動物であるマウスやラットではアスコルビン酸を生合成していること、ヒトの場合にも常時食事からアスコルビン酸を得ていることから、ビタミンC投与により誘導される一定の効果を観察出来ないためと考えられている。そこで、例えば細胞培養系でアスコルビン酸の免疫賦活作用などが観察されるならば、そのメカニズムの解析や基礎的・応用的研究が可能となる。しかしながら、これまでそのような報告はない。我々もマウス脾細胞を用いた *in vitro* 一次抗体産生系において、アスコルビン酸の作用を検討したが、既知の免疫賦活物質に見られるような抗体産生増強作用は観察出来なかった<sup>7)</sup>。

ところで、著者らはAA-2Gの生理活性、薬理活性に関する研究過程で、AA-2Gがアスコルビン酸と異なり、培養マウス脾細胞を用いた抗体産生系において、顕著な抗SRBC PFC応答促進作用を示すこと、そして本作用は  $\alpha$ -グルコシダーゼ阻害剤(キャストロスペルミン)の存在下では消失することを観察した<sup>7)</sup>。これらの知見は、

AA-2Gの免疫賦活作用発現が酵素により切断され徐々に生じたアスコルビン酸そのものに基づくことを示唆するものである。そこで、アスコルビン酸を12時間毎に5日間の培養期間中総計10回に渡り分割添加したところ、アスコルビン酸に抗体産生促進作用のあることが認められた。

その後の研究により、抗体産生におけるAA-2GとNGFとの相乗作用とAA-2GによるB細胞上のNGF受容体発現促進作用を見いだしたが、この作用もその本体はアスコルビン酸であることを証明した。

そこで本研究では、AA-2Gと同様、安定型アスコルビン酸として知られるAA-2PやAA-2SにおいてもAA-2Gで認められている抗体産生促進作用など一連の作用が認められるか否かを検討した。

その結果、AsA、AA-2SとAA-2Pとの間で明確な差異が観察された。すなわちAA-2PのみにAA-2Gと同様の免疫活性作用が観察された。これは、AA-2GとAA-2Pの場合には、 $\alpha$ -グルコシダーゼやホスファターゼにより水解を受け、遊離したアスコルビン酸が培養期間を通じてリンパ球に対し作用を発揮出来た結果であり、一方、AsAは不安定であり、AA-2Sはアスコルビン酸を遊離できなかったため、それぞれ作用を示すに至らなかったものと考えられる。

AA-2GやAA-2Pのような安定型アスコルビン酸誘導体を用いることにより、細胞培養系でアスコルビン酸の作用解明が可能となった意義は大きいものと思われる。すなわち、培養ヒト線維芽細胞におけるコラーゲン生合成のように、アスコルビン酸によっても促進効果が観察できる作用はむしろ稀であり、それ故にアスコルビン酸の生理作用・薬理作用のメカニズム解明が遅れていたからである。

一般に哺乳動物はアスコルビン酸を生合成し、その1日合成量は体重60kg当たり少なくとも4g、多いものでは12gを越えることが知られている。

一方、生合成能を欠くヒトの場合、ビタミンCの1日の所要量は50mgと定められており、この量で壊血病は予防できる。それではこの開きは一体何を意味するのか。ビタミンCのコラーゲン合成

促進作用を介しての抗壊血病作用以外に、ビタミンCは生体の恒常性と言う基本的機構に対し、様々な形で関与している可能性があるのではないかと筆者らが見出した抗体産生増強におけるビタミンCと神経蛋白質（NGF）の相互作用に関する知見は、ビタミンCの生体防御作用を考える上で重要な意義を持つものと考えられる。それと共に、これらの知見はビタミンCと神経系との直接の関わり合いを示しており、従来から示唆されているビタミンCの精神・神経機能への役割を研究する手がかりを与えたものと思われる<sup>10)</sup>。

### 参考文献

- 1) Yamamoto I., Muto N., Nagata E., Nakamura T., and Suzuki Y., "Formation of a stable L-ascorbic acid  $\alpha$ -glucosidases catalyzed transglucosylation", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1035 44-50 (1990)
- 2) Muto N., Nakamura T., Yamamoto I., "Enzymatic formation of a nonreducing L-ascorbic acid  $\alpha$ -glucosidases catalyzing site-specific transglucosylation from rat small intestine", *J. Biochem.*, 107 222-227 (1990)
- 3) Aga H., Yoneyama M., Sakai S., Yamamoto I., "Synthesis of 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl L-ascorbic acid by cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus stearothermophilus*," *Agric. Biol. Chem.*, 55 1751-1756 (1991)
- 4) Yamamoto I., Muto N., Murakami K., Suga S., Yamauchi H., "L-ascorbic acid  $\alpha$ -glucoside formed by regioselective transglucosylation with rat intestinal and rice seed  $\alpha$ -glucosidases: Its improved stability and structure determination", *Chem. Pharm. Bull.*, 38 3020-3023 (1990)
- 5) Wakamiya H., Suzuki E., Yamamoto I., Akiba M., Otsuka M., Arakawa N., "Vitamin C activity of 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid in guinea pigs" *J. Nutr. Sci. viton.*, 38 ,235-245 (1992)
- 6) Yamamoto I., Muto N., Murakami K., Akiyama J., "Collagen synthesis in human skin fibroblasts is stimulated by a stable form of ascorbate, 2-O- $\alpha$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid", *J. Nutr.*, 122 871-877 (1992)
- 7) Yamamoto I., Tanaka M., Muto N., "Enhancement of in vitro antibody production of murine splenocytes by ascorbic acid 2-O- $\alpha$ -glucoside", *Int. J. Immunopharmacol.*, 15 319-325 (1993)
- 8) Cunningham A. J., Szenberg A., "Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells", *Immunology.*, 14 599-600 (1968)
- 9) Tanaka M., Muto N., Yamamoto I., "Characterization of *Bacillus stearothermophilus*, cyclodextrin glucanotransferase in ascorbic acid 2-O- $\alpha$ -glucoside formation", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1078 127-132 (1991)
- 10) ポーリング L. 「ビタミンCとカゼ、インフルエンザ（村田 晃訳）」 共立出版（1977）