

Cernitin pollen-extract (Cernilton®) のラット非細菌性 前立腺炎モデルにおける炎症性サイトカインに対する作用

東菱薬品工業(株)青梅研究所

浅川 清司, 南達 信代, 佐藤 茂

本間 雅人, 波方 庄平, 石井 誠

大阪市立十三市民病院泌尿器科 (部長: 安本亮二)

安本 亮二, 西阪 誠泰, 梶田 周佳

大阪市立大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 岸本武利教授)

岸 本 武 利

EFFECTS OF CERNITIN POLLEN-EXTRACT (CERNILTON®) ON INFLAMMATORY CYTOKINES IN SEX-HORMONE- INDUCED NONBACTERIAL PROSTATITIS RATS

Kiyoshi ASAKAWA, Nobuyo NANDACHI, Shigeru SATOH,

Masato HONMA, Shohei NAMIKATA and Makoto ISHII

From the Ome Research Laboratories, Tobishi Pharmaceutical Co., Ltd.

Ryoji YASUMOTO, Nobuyasu NISHISAKA and Chikayoshi MASUDA

From the Department of Urology and Andrology, Osaka Municipal Juso-shimin Hospital

Taketoshi KISHIMOTO

From the Department of Urology, Osaka City University Medical School

Cernitin pollen-extract (Cernilton®, CN) is a preparation made from eight kinds of pollen and has been used for various prostatic diseases in Japan and Europe. We reported previously that CN possessed a recovery action on the sex-hormone-induced nonbacterial prostatitis in rats. To clarify the possible mechanism of action of CN, we investigated the effects of CN on inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF- α) in the same model. Aged Wistar rats were castrated and injected 17 β -estradiol (0.25 mg/kg/day, s.c.) for 30 days. CN (630 and 1,260 mg/kg, p.o.) or testosterone (2.5 mg/kg, s.c.) was administered for the last 14 days of the treatment of 17 β -estradiol. In control rats, prostatic IL-6 and TNF- α contents were increased approximately 2–3 fold, and acinar glandular inflammation and stromal proliferation were found histopathologically, as compared with those of intact rats. On the other hand, CN decreased the increased contents of cytokines in a dose-dependent manner. The histopathological changes mentioned above were restored in rats treated with 1,260 mg/kg. Testosterone also ameliorated them significantly. These results indicate that CN has an anti-inflammatory action, and that the inhibitory effect of CN on the prostatic inflammatory cytokine is an important factor in its action.

(Acta Urol. Jpn. 47: 459–465, 2001)

Key words: Cernitin pollen-extract, Cernilton, Nonbacterial prostatitis rat, Inflammatory cytokine

緒 言

Cernitin pollen-extract (Cernilton®, CN) は、8種類の花粉より抽出された水溶性成分 cernitin T-60 と脂溶性成分 cernitin GBX を20:1の比率で配合された薬物である。1960年 Ask-Upmark¹⁾ は、CNの前立腺炎に対する有効性を報告した。以来、CNは前立腺疾患の諸症状の改善を目的に使用され、優れた効果を発揮している²⁻⁵⁾。特にヒト慢性前立腺炎に対し

では、高い有効性が報告されている⁵⁻⁷⁾。一方、前臨床的にはCNの排尿促進⁸⁾、抗炎症⁹⁾および前立腺肥大抑制¹⁰⁾などの作用が報告されている。しかしながら、実験的前立腺炎に対する報告は少ない。

先にわれわれは、老齢ラットに去勢術を施し、17 β -エストラジオールを投与して誘発する、いわゆる性ホルモン誘発非細菌性前立腺炎モデルを用い、実験的前立腺炎に対するCNの作用を病理組織学的に検討した。その結果、CNに抗前立腺炎作用があるこ

とを明らかにした¹¹⁾

今回われわれは、CN の作用機序究明の一環として、既報と同一のモデルを用い、炎症性サイトカイン、特に interleukin-1 β (IL-1 β)、IL-6 および tumor necrosis factor- α (TNF- α) に対する CN の作用を検討した。

実験方法

1. 使用動物

体重 400~500 g の Wistar 系雄性ラット (10カ月齢以上、日本エスエルシー) を使用した。ラットは室温 23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C、湿度55 $\pm$ 15%、照明時間 6:00~18:00 の条件下で飼育し、固型飼料 (CE-2、日本クレア) と水を自由に摂取させ、入荷後 1 週間の予備飼育期間を設け、実験に使用した。

2. 使用薬物

CN は、cernitin T-60 および cernitin GBX (AB Cernelle) を 20:1 の割合で混合し、1% HCO-60 (日光ケミカルズ) に懸濁し用いた。その他、17 β -エストラジオール (17 β -Est, 和光純薬) は、sesame oil (Sigma) に溶解し、テストステロン (Test, Sigma) は corn oil (油蟬薬品) に懸濁して用いた。

3. 非細菌性前立腺炎モデルの作製

花本ら¹¹⁾ および Robinette の方法¹²⁾ に準じた。すなわち、ラットをエーテル麻酔下に去勢術を行った後、翌日より起炎物質として 17 β -Est (0.25 mg/kg) をラット背部皮下に30日間連続投与することにより非細菌性前立腺炎を誘発した。

4. 群の構成と被験物質の投与方法

群の構成は、intact 群、対照群 (1% HCO-60 5 ml/kg, p.o.), CN 630 および 1,260 mg/kg (p.o.) 群ならびに Test 2.5 mg/kg (s.c.) 群の合計 5 群を設定し、intact 群を除くすべての群は去勢術の翌日より 17 β -Est の投与を開始し、17日目より14日間連続して被験物質を投与した。各群の動物数は10匹とし、そのうち 6 匹をサイトカイン測定用に、残りを病理組織学的検査のために使用した。

5. 前立腺重量およびサイトカインの測定

最終投与翌日にラットをエーテル麻酔下に採血し、遠心分離により血清を得た。その後、前立腺を摘出し湿重量を測定した。また、剖検時の体重から前立腺の相対重量を算出した。サイトカイン測定用の血清および前立腺組織は使用するまで、約 -80 $^{\circ}$ C で保存した。凍結した組織は、Molina and Abumrad の方法¹³⁾ に準じて処理した。すなわち、組織 100 mg あたり 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, Sigma), 1 μ g/ml pepstatin A (Sigma), 1 μ g/ml aprotinin (Sigma) および 1 μ g/ml leupeptin (Sigma) を含む phosphate buffered salt solution (pH 7.2)

(タカラ酒造) に 0.05% sodium azide (キシダ化学) および 0.5% triton X-100 (Sigma) を混合した緩衝液 1 ml を加え、4 $^{\circ}$ C 下で homogenize した。得られた homogenate は、4 $^{\circ}$ C、120,000 $\times$ g で 1 時間超遠心分離 (SCP85H, 日立工機) した。得られた組織の上清および血清中のサイトカイン含量は、ラット用 IL-1 β 、IL-6 および TNF- α ultra sensitive ELISA キット (Bio Source) を用いて測定した。組織のタンパク定量は、Lowry らの方法¹⁴⁾ にしたがって測定し、1 mg の組織タンパク量あたりのサイトカイン量で表した。

6. 病理組織学的検討

各群 4 例の動物を用いて病理組織学的検査を実施した。すなわち、前立腺を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定、パラフィン包埋後、3~4 μ m の薄切標本を作製し、hematoxyline-eosin (H.E.) 染色後に光顕下で観察を行った。

7. 統計学的解析

結果は、平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。有意差検定は、intact 群と対照群の比較は、Student's *t*-検定を用いて解析を行った。対照群と各薬物投与群間の比較は、Bartlett 法の等分散分析検定後、Dunnett 法の多重比較検定を行った。なお、いずれも有意水準が 5% 未満のときを有意とした。

実験結果

1. 体重の変化

Fig. 1 には、各群の体重変化を示した。対照群では intact 群に比べ去勢後 3 日目から有意 ($P < 0.05 \sim 0.001$) に体重の減少が認められた。CN 630, 1,260 mg/kg 群および Test 群では、対照群と比較して体重の推移に差は認められなかった。

2. 前立腺重量の変化

Fig. 2 および 3 には、前立腺の湿重量および相対重量を示した。Intact 群の前立腺の湿 (mg) および相対重量 (mg/100 g b.w.) はそれぞれ 799.0 および 158.4 であったのに対し、去勢後 17 β -Est の連続投与により、対照群の前立腺の湿および相対重量はそれぞれ 256.7 および 66.9 と有意 ($P < 0.001$ および $P < 0.001$) に低下した。CN 投与群ではいずれも対照群と比べて有意な変化は認められなかった。Test 群の前立腺の湿および相対重量は intact 群とほぼ同程度にまで回復し、対照群との間に有意差 ($P < 0.001$) が認められた。

3. 前立腺組織中のサイトカイン含量の変動

対照群の前立腺組織中の IL-1 β 含量は、intact 群とほぼ同程度を示したが、CN 投与によりわずかながら増加傾向が認められた。しかし、有意な変化ではなかった。Test 群は、intact 群とほぼ同程度であっ

IL-6 含量 (pg/mg protein) は, Fig. 4 に示した. Intact 群で51.3であったのに対し, 対照群では165.2と約3倍に増加 ($P<0.001$) した. CN 投与により用量依存的に IL-6 含量は減少し, 630 mg/kg 群では110.8, 1,260 mg/kg 群では49.5と対照群に比べ有意 ($P<0.05$) な減少を示した. また, Test 群も前立腺組織中の IL-6 含量を12.8と有意 ($P<0.001$) に減少させた. TNF- α 含量 (pg/mg protein) は Fig. 5 に

示した. Intact 群で12.9であったのに対し, 対照群では24.2と約2倍に増加 ($P<0.001$) した. CN 投与により TNF- α 含量の減少が認められ, 630および1,260 mg/kg 群ではそれぞれ, 16.4および15.1と対照群に比べ有意 ($P<0.01$ および0.05) な減少を示した. また, Test 群でも10.4と前立腺組織中の TNF- α 含量を有意 ($P<0.001$) に減少させた.

4. 血清中のサイトカイン含量の変動

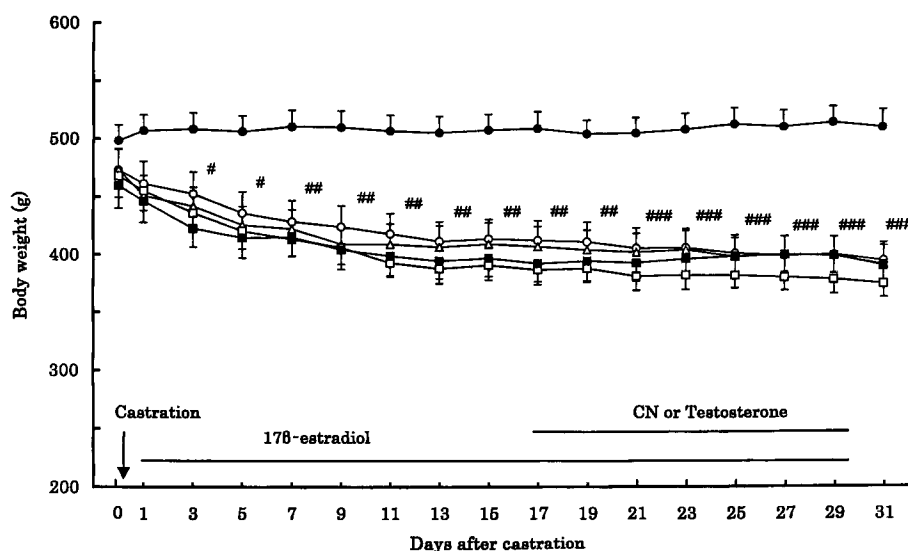


Fig. 1. Changes in body weight of nonbacterial prostatitis rats treated with Cernilton (CN) or testosterone. Each point represents the mean $\pm$ S.E. of 7-10 animals. #, ##, ###: Significantly different from the intact group at $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively (Student's t-test). ●: Intact, ○: Control, △: CN 630 mg/kg, □: CN 1,260 mg/kg, ■: Testosterone 2.5 mg/kg.

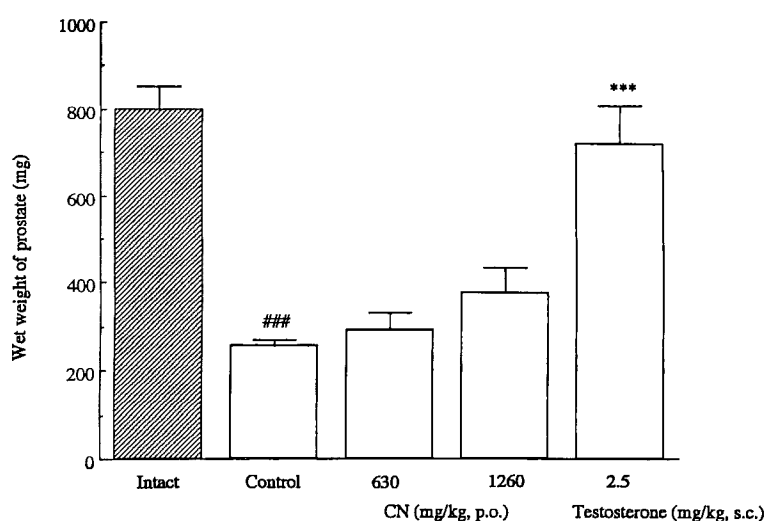


Fig. 2. Effects of Cernilton (CN) or testosterone on wet weight of prostate in nonbacterial prostatitis rats. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 7-10 animals. ###: Significantly different from the intact group at $P<0.001$ (Student's t-test). ***: Significantly different from the control group at $P<0.001$ (Dunnnett's multiple comparison test).

血清中の IL-6 および TNF- α 含量 (pg/ml) は、すべての群において検出限界以下であったので検出できなかった。IL-1 β 含量 (pg/ml) は、intact 群で73.1であったのに対し、対照群では61.4とわずかながら低値を示したが有意差はなかった。対照群に対し、CN 1,260 mg/kg 群では86.2とわずかに増加傾向を示したものの有意な差はなかった。また、Test 群の IL-1 β 含量は、intact 群とほぼ同程度であった。

5. 前立腺の病理組織学的所見

対照群 (Fig. 6A) および CN 630 mg/kg 群の検索例各4例では、intact 群の4例に比べ、平坦な上皮と淡く乏しい内容物および多数の好中球浸潤を伴う不整形の腺組織とリンパ球などの浸潤を伴う間質の増生が認められた。一方、CN 1,260 mg/kg 群4例では、立方状の上皮と内腔への好中球浸潤の減少を伴う腺組織とリンパ球などの浸潤の減少および軽度の増生を伴う

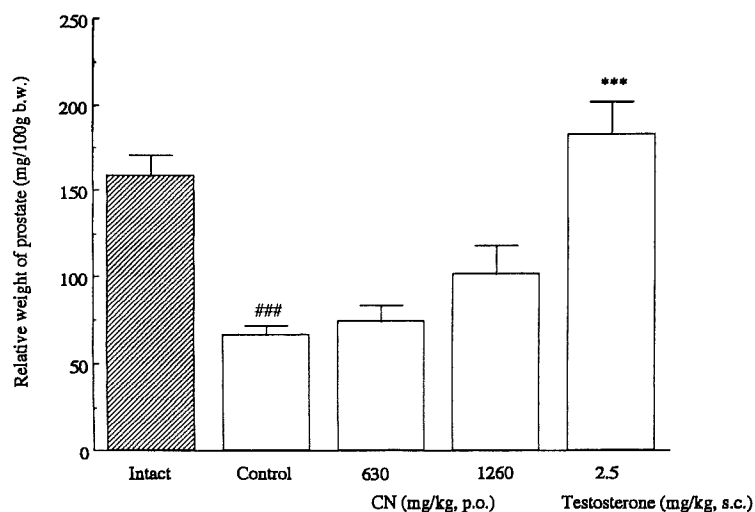


Fig. 3. Effects of Cernilton (CN) or testosterone on relative weight of prostate in nonbacterial prostatitis rats. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 7-10 animals. ###: Significantly different from the intact group at $P < 0.001$ (Student's t-test). ***: Significantly different from the control group at $P < 0.001$ (Dunnett's multiple comparison test).

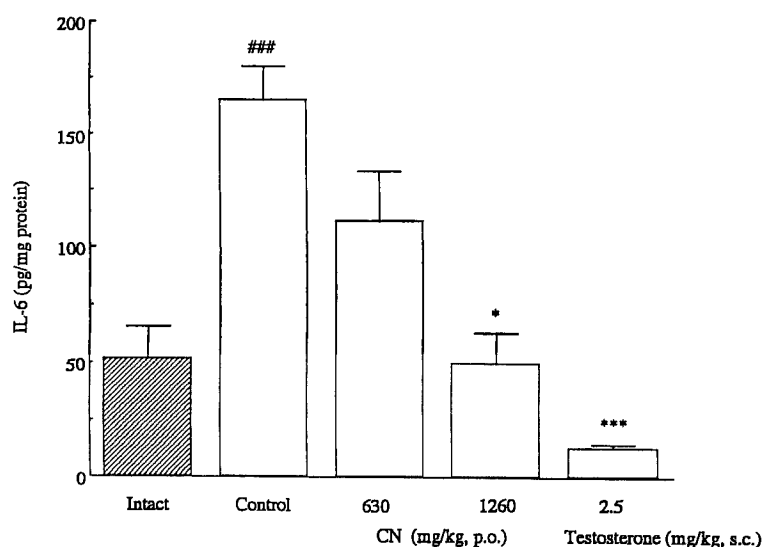


Fig. 4. Effects of Cernilton (CN) or testosterone on interleukin-6 (IL-6) content in prostatic cytosol of nonbacterial prostatitis rats. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 5-6 animals. ###: Significantly different from the intact group at $P < 0.001$ (Student's t-test). *, ***: Significantly different from the control group at $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively (Dunnett's multiple comparison test).

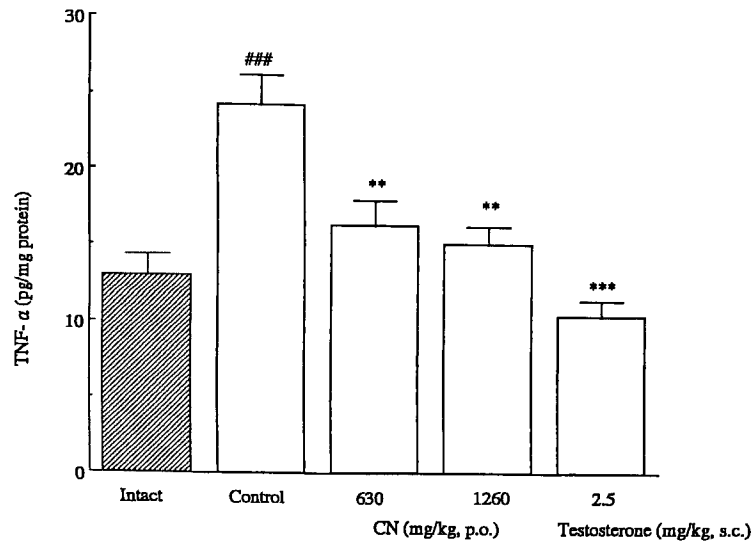


Fig. 5. Effects of Cernilton (CN) or testosterone on tumor necrosis factor- α (TNF- α) content in prostatic cytosol of nonbacterial prostatitis rats. Each column represents the mean $\pm$ S.E. of 5-6 animals. ###: Significantly different from the intact group at $P < 0.001$ (Student's *t*-test). **, ***: Significantly different from the control group at $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively (Dunnett's multiple comparison test).

間質が認められた (Fig. 6B). Test 群 4 例では, 円筒形の上皮と好中球のほとんど見られない豊富な内容物を含む腺組織と軽度の増生を示す間質とが認められた。

考 察

先にわれわれは, 高齢ラットによる性ホルモン誘発非細菌性前立腺炎モデルを用い, CN の抗前立腺炎作用を検討した¹¹⁾。その結果, CN は前立腺の炎症所見を明らかに改善し, 抗前立腺炎作用が認められた。そこで今回は, CN の抗前立腺炎作用の機序究明の一環として, 既報と同じモデルを用いて炎症性サイトカインに対する CN の作用を検討した。

最近, 前立腺疾患の 1 つのパラメーターとして, 炎症性サイトカインが注目されている。Comhaire ら¹⁵⁾は, 副性器の炎症では IL-6 が増加したとし, Hussennet ら¹⁶⁾は, 細菌感染した精液中では IL-2 が増加したことを報告している。また, 濃精液症の精液中では, 白血球数と白血球・エラスターゼ活性が共に高値を示し¹⁷⁾, 白血球・エラスターゼ活性と精液中の IL-8 との間に高い相関性を示している¹⁸⁾。さらに, 慢性前立腺炎患者の精液中において, IL-6 と TNF- α ¹⁹⁾ が, あるいは IL-1 β と TNF- α が高値を示した²⁰⁾との報告がなされていることから, 前立腺炎の病因に炎症性サイトカインが関与していることがうかがえる。安本ら¹⁹⁾は, 慢性非細菌性前立腺炎症例における精液中サイトカイン (IL-1 β , IL-6 および TNF- α) について検討し, 健常男子 (11 例) ではい

ずれのサイトカインもほとんど検出されなかったが, 慢性非細菌性前立腺炎患者 (10 例) では, IL-6 と TNF- α の出現頻度はいずれも 60% と有意に高かったとしている。

以上の実験的事実を考慮し, われわれは炎症性サイトカインとして IL-1 β , IL-6 および TNF- α に焦点をあて, CN の抗前立腺炎作用の機序を検討することにした。その結果, 対照群では intact 群と比較して, 前立腺重量の低下, 間質へのリンパ球および単球の浸潤, 線維芽細胞の増生が認められた。これらの所見は, 既報の結果¹¹⁾や他の成績¹²⁾ともほぼ類似した。これに対し, CN 投与群では対照群で見られた前立腺腔内および間質への炎症性細胞の浸潤が CN 1,260 mg/kg 群で抑制された。また, 前立腺組織中の IL-6 および TNF- α の著しい増加を CN は用量依存的に, かつ有意に減少した。

われわれが得た今回の病理組織学的所見で, CN 投与により前立腺腔内および間質への炎症性細胞の浸潤が抑制されたことや, 前立腺組織中での IL-6 および TNF- α の増大を CN が用量依存的に減少したことは, CN の脂溶性成分である cernitin GBX がアラキドン酸代謝系を阻害し炎症性物質の合成を阻害した²¹⁾ために, サイトカイン産生細胞の前立腺組織への浸潤を抑制した可能性が考えられる。また, これらの作用が, 前立腺肥大抑制作用¹⁰⁾にも何らかの形で関与しているように思われるが, この点については今後の課題である。これに対し, 血清中のサイトカインの変動は, 有意な変化としては認められなかった。こ

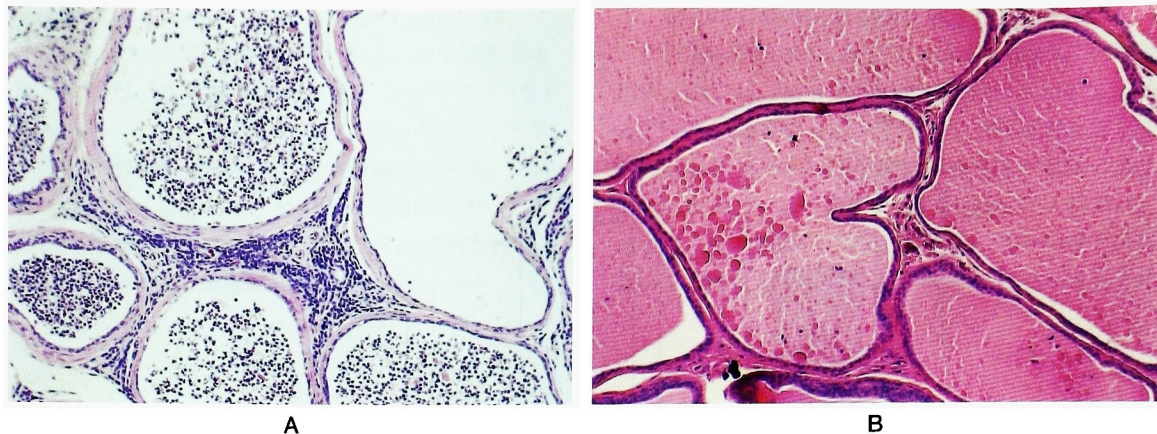


Fig. 6. The prostate lesions. A. Control group: The acinar lumen was poor with pale stained eosinophilic material and filled with induced inflammatory cell infiltration mainly characterized by neutrophil. The stroma showed proliferative condition with many lymphocyte and monocyte infiltration and fibroblast. B. Cernilton (CN) 1,260 mg/kg group: The acinar lumen was diminished cell infiltration. The stroma showed mild proliferation with decreased lymphocyte, monocyte and fibroblast except with mild fibrosis (Hematoxylin and Eosin. $\times 100$).

の原因の詳細については不明であるが、その炎症反応が特定の部位に限られていることから、血中のサイトカインレベルを大きく変動させるほどの影響を及ぼさなかったのかもしれない。

以上のように、今回の実験で CN の抗前立腺炎作用が確認された。同時に、前立腺組織中の炎症性サイトカイン、特に IL-6 および TNF- α の増加も用量に依存して明らかに抑制された。この抑制作用が、CN の抗炎症作用の少なくとも 1 つの作用機序として関与しているものと思われる。

結 語

ラットでの性ホルモン誘発非細菌性前立腺炎モデルを用い、既報の抗炎症作用を病理組織学的に確認すると共に、その作用機序究明の一環として、CN の炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6 および TNF- α) に対する作用を検討した。その結果、対照群で認められた前立腺組織中の IL-6 および TNF- α の増加を用量依存的に抑制した。この抑制作用が CN の抗炎症作用に重要な因子であると推測された。

本研究は、東菱薬品工業(株)青梅研究所と大阪市立十三市民病院泌尿器科、大阪市立大学医学部泌尿器科学教室との共同研究として行った。

文 献

- 1) Ask-Upmark E: On a new treatment of prostatitis. *Grana Palynologica* **2**: 115-118, 1960
- 2) 堀井明範, 岩井省三, 前川正信, ほか: 前立腺肥大症に対するセルニルトンの臨床評価. *泌尿紀要* **31**: 739-746, 1985
- 3) Yasumoto R, Kawanishi H, Tsujino T, et al.: Clinical evaluation of long-term treatment using cernitin pollen extract in patients with benign prostatic hyperplasia. *Clin Ther* **17**: 82-87, 1995
- 4) Dutkiewicz S: Usefulness of cernilton in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Int Urol Nephrol* **28**: 49-53, 1996
- 5) Buck AC, Rees RWM and Ebeling L: Treatment of chronic prostatitis and prostatodynia with pollen extract. *Br J Urol* **64**: 496-499, 1989
- 6) 城代明仁, 丸田直樹, 下前英司, ほか: 慢性前立腺炎に対する Cernilton® の長期使用経験. *泌尿紀要* **34**: 561-568, 1988
- 7) 鈴木孝憲, 黒川公平, 真下 透, ほか: 慢性前立腺炎に対するセルニルトンの臨床効果. *泌尿紀要* **38**: 489-494, 1992
- 8) 小野寺禎良, 吉永雅一, 武永邦三, ほか: Cernitin pollen extract (CN-009) の摘出膀胱平滑筋および生体位膀胱内圧に対する作用. *日薬理誌* **97**: 267-276, 1991
- 9) 伊藤隆太, 野口桂一, 山下彰三, ほか: Cernitin pollen-extract (Cernilton®) の抗炎症作用. *応用薬理* **28**: 55-65, 1984
- 10) 伊藤隆太, 石井 誠, 山下彰三, ほか: Cernitin pollen-extract (Cernilton®) の抗前立腺肥大作用. *応用薬理* **31**: 1-11, 1986
- 11) 花本美津恵, 廖 敏, 鈴木 始, ほか: Cernitin pollen-extract (Cernilton®) のラット非細菌性前立腺炎に対する作用. *薬理と治療* **26**: 57-65, 1998
- 12) Robinette CL: Sex-hormone-induced inflammation and fibromuscular proliferation in the rat lateral prostate. *Prostate* **12**: 271-286, 1988
- 13) Molina PE and Abumrad NN: Differential effects of hemorrhage and LPS on tissue TNF- α , IL-1 and associate neuro-hormonal and opioid alterations. *Life Sci* **66**: 399-409, 2000
- 14) Lowry OH, Rosebrough NJ and Farr AL: Pro

- measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275, 1951
- 15) Comhaire F, Bosmans E, Ombelet W, et al.: Cytokines in semen of normal men and of patients with andrological diseases. *Am J Reprod Immunol* **31**: 99-103, 1994
 - 16) Hussenet F, Dousset B, Cordonnier JL, et al.: Tumor necrosis factor alpha and interleukin 2 in normal and infected human seminal fluid. *Hum Reprod* **8**: 409-411, 1993
 - 17) 荒井哲也, 堀内 晋, 吉田謙一郎: 不顕性濃精液症を呈する男子不妊症患者に対するセルニルトン®投与の効果について. *医と薬学* **37**: 1361-1365, 1997
 - 18) Shimoya K, Matsuzaki N, Tsutsui T, et al.: Detection of interleukin-8 (IL-8) in seminal plasma and elevated IL-8 in seminal plasma of infertile patients with leukospermia. *Fertil Steril* **59**: 885-888, 1993
 - 19) 安本亮二, 河野 学, 辻野 孝, ほか: 慢性非細菌性前立腺炎症例における精液中サイトカイン (IL-1 β , IL-6, TNF- α) とスパフロキサシン治療での変動について. *泌尿紀要* **41**: 771-774, 1995
 - 20) Alexander RB, Ponniah S, Hasday J, et al.: Elevated levels of proinflammatory cytokines in the semen of patients with chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome. *Urology* **52**: 744-749, 1998
 - 21) Loschen G and Ebeling L: Inhibition of the arachidonic acid metabolism by an extract from rye pollen: Benign Prostate Diseases. In Edited by Vahlensieck W and Rutishauser G, pp. 65-72, Thieme Medical Publishers, Inc., Stuttgart; New York, 1992

(Received on October 3, 2000)
(Accepted on January 15, 2001)