

平成11年度厚生科学特別研究
事業及総合研究報告書

－アレルギー疾患を抑制する天然薬物
シジュウムに関する研究－

平成12年3月

総括研究代表者 北 中 進
(日本大学薬学部生薬学研究室)

目次

I. 総括研究報告			1
	日本大学薬学部生薬学研究室	北中 進	
II. 分担研究報告			
1) 小児アトピー性皮膚炎に対するシジュウムの臨床効果			2
	東邦大学小児科	鈴木 五男	
2) シジュウムの炎症細胞に与える効果と有効成分の分離			11
	日本大学薬学部生薬学研究室	北中 進	
3) Th1/Th2 型ヘルパー T細胞機能へのシジュウムの影響に関する研究			14
	星薬科大学学生化学教室	豊島 聡	
4) 天然薬物シジュウムの抗HIV作用 HIV母子感染予防に関連して			17
	日本大学医学部産婦人科	早川 聡	
5) マクロファージのサイトカイン産生に対するシジュウムの効果			19
	埼玉衛生研究所食品化学科	石井 里枝 斉藤 貢一	
III. 総合研究報告			
1) 小児アトピー性皮膚炎に対するシジュウムの臨床効果			35
	東邦大学小児科	鈴木 五男	
2) シジュウムの炎症細胞に与える効果と有効成分の分離			42
	日本大学薬学部生薬学研究室	北中 進	
3) Th1/Th2 型ヘルパー T細胞機能へのシジュウムの影響に関する研究			49
	星薬科大学学生化学教室	豊島 聡	
4) 天然薬物シジュウムのTh1/Th2バランスからみた抗アレルギー作用 と抗HIV作用			52
	日本大学医学部産婦人科	早川 聡	
5) マクロファージのサイトカイン産生に対するシジュウムの効果			62
	埼玉衛生研究所食品化学科	石井 里枝 斉藤 貢一	

[I] 総括研究報告

アレルギー性疾患を抑制する天然薬物シジュウムの研究（総括）

主任研究者 北中 進 日本大学薬学部教授

シジュウムの抗アレルギー効果を解明するため、臨床的評価、免疫学的評価、有効成分解明と創薬への応用について検討した。

鈴木はシジュウムにより生成された塗布剤を用い、アトピー性皮膚炎児を対象にその有効性を二重盲検法より臨床的（睡眠、かゆみ、日常生活、薬剤使用の程度および皮膚所見など）、血液学的に検討した。塗布剤の長期使用により皮膚症状は2週ほどで症状の改善を認め、血清 ECP 値、血清 NO 値、血清 RANTES、血清 Eotaxin 値は臨床像に一致し有意の低下をみた。シジュウムを含有する塗布剤はアトピー性皮膚炎に対し、臨床的に有効であり、特にアトピー性皮膚炎にとって最も問題となるかゆみ対策に効果があることが明らかになった。またステロイド薬剤などの使用の減少にもつながることが確認された。

北中はシジュウムより、ヘンゾフェノン配糖体、フラホノイド類、セスキテルペン類を単離し構造決定した。新規ヘンゾフェノン配糖体や新規フラホノイドはマスト細胞からのヒスタミンの遊離を抑制すると共に、マクロファージの NO 産生を抑制し、更に IL-6 の産生を抑制、IL-12 の産生を増強する事を認めた。これらの成分は、マスト細胞からの化学伝達物質を抑制しているばかりでなく、マクロファージなどの免疫細胞に作用をおよぼし、アレルギー疾患を抑制していることが示唆された。

豊島はシジュウムより得られた methyl gallate およびその類似化合物について Th2 サイトカインである IL-4 の産生に対する影響を検討し、ethyl gallate が methyl gallate より低濃度で IL-4 産生を選択的に抑制することを明らかにし、抗アレルギー薬となりうる可能性が見いだされた。今後、この成果をヒトに活用するためには、まずヒトのリンパ球を用いた実験をする必要がある。

早川は HIV 感染妊婦胎盤における HIV の解析により、胎児に感染する HIV は母体に感染した HIV のごく一部であることを明らかにし、また、胎盤における HIV の感染機構の解析の結果、HIV は CD4 非依存的に絨毛細胞に感染するが、その際ケ

モカインレセプターが関与しており、さらに、脱着膜（母体側）と胎盤（胎児側）の間にはケモカインを介した情報伝達が行われていることを示唆する結果を得た。次に、臍帯血における IL-16 の意義について、健常新生児臍帯血には健常成人の約 10 倍の IL-16 が存在し、これが胎児リンパ球の自然抵抗性に関与している可能性を示した。そこでシジュウム抽出物の抗 HIV 作用を検討し、濃度依存的に CD4 陽性 T リンパ球、絨毛細胞における HIVp24 産生の抑制を認めた。さらに、HIV 感染患者 CD4 リンパ球における HIV 産生抑制、アポトーシスの抑制を示した。これらから、シジュウムが HIV 母児感染予防に対して有効なものとなり得ることが示唆された。

石井らは新たにシジュウムより単離された 12 種の化合物の NO 産生に対する作用を検討するとともに、炎症性サイトカイン（IL-1 β 及び TNF- α ）や Th1/Th2 分化に関与すると報告されている IL-12 の産生に対する影響について検討した。その結果、IFN- γ 及び LPS 刺激マクロファージの NO 産生に対して 10 種の化合物が抑制作用を、2 種の化合物が産生増強作用を認めた。シジュウム抽出エキスは TNF- α 産生に対しては促進的に、IL-1 β 及び IL-12 に対しては顕著な影響が認められなかったが、加水分解型タンニン類は TNF- α 及び IL-1 β 産生に対し促進的に、ヘンゾフェノン配糖体およびフラホノイドのガロイル配糖体は IL-1 β 産生に対し抑制的に、更にヘンゾフェノン配糖体、フラホノイドのカロイル配糖体とセスキテルペン類は IL-12 産生に対し促進的な作用を見いだしている。

以上の結果より、シジュウムはアトピー性皮膚炎児に対し有効性が認められ、免疫学的研究からその作用機序が解明が進みつつある。シジュウム中の有効成分は多くの化合物か化学伝達物質を抑制し、更に生体の免疫バランスを調節している事が示唆された。また、シジュウムには HIV 母児感染予防に対して有効なものとなり得ることが示唆される興味ある知見が得られた。

[II] 分担研究報告

小児アトピー性皮膚炎に対するシジュウムの臨床的効果

分担研究者 鈴木五男 東邦大学第二小児科学教室 助教授

研究要旨 天然染料シジュウムにより生成された塗布剤を用い、2年度の計価の裏付けとして塗布剤の二重盲検法（1か月間）を用い、その臨床効果と皮膚炎症所見の改善を観察し、炎症改善の評価の指標として、血清ECP値、血清NO値、血清RANTES、血清Eotaxin値、さらにIL-8を測定した。対象および方法は東邦大学大橋病院小児科外来および関連病院に受診のアトピー性皮膚炎児に実施した。その結果、臨床効果（睡眠、かゆみ、日常生活の改善具合および、薬剤使用の変動など）および皮膚所見は有意に改善し、またその指標として測定した血清ECP値血清NO値、血清RANTES、血清Eotaxin値は臨床像に一致しシジュウム剤使用群で有意の低下をみた。

以上よりシジュウムによって生成された塗布剤はアトピー性皮膚炎に対し、臨床的に有効であり、特にアトピー性皮膚炎にとって最も問題となるかゆみ対策に効果があることが明らかになった。また一般に臨床に用いられているステロイドを含めた薬剤の使用の減少にもつながることが確認された。さらに種々の炎症を指標としてECP, NO, RANTES, Eotaxinの測定では臨床像に一致して有意な変動を認め、アトピー性皮膚炎が炎症性病態を示唆して可能性を示しており、一方シジュウムが皮膚での炎症性反応をある程度抑制しているであろうことが示唆された。

A. はじめに

アトピー性皮膚炎は痒みを伴った慢性の皮膚疾患と定義されている。本症は主に日常生活の種々の抗原によって起こるアレルギー疾患であり、組織学的に接触性皮膚炎に似た慢性炎症性疾患といわれ、そのメカニズムも解明されつつある。しかしその悪化因子は多岐にわたるため、その治療はなかなか困難な場合が多い。特に本症に特有

な痒みは日常生活に、睡眠障害、精神障害など多大な影響を与え、またその皮膚症状は本人のみならず、周囲の人々に違和感を強く与え、学童などではいじめ、登校拒否などの社会的問題にもなっている。アトピー性皮膚炎の治療は皮膚所見の改善とともにこの痒みの改善がその主な治療となっている。

シジュウムは南米産フトモモ科の植物で、

その抽出液である methy gallate は選択的に Th2 に作用し、サイトカインの産生を抑制することやシシウム主要成分である加水分解型のタンニンが NO 合成酵素抑制作用や酵素活性阻害作用を示すことなど基礎的研究において種々の抗アレルギー作用、抗炎症作用を有する報告がなされている。これまでこのような抗アレルギー作用のあるシシウムにより生成された塗布剤を用い、その有効性を報告（平成9、10年度報告書）してきた。そこでさらに科学的有効性の確証を得るため、シシウムエキスが入っていない塗布剤を作成し、二重盲検法でその有効性を臨床的および血液学的に検討した。

なお本研究で用いたシシウム塗布剤の含有成分はシシウムエキス、ヒオセラミド、セピゲル305、パラオキシ安息香酸エステル、グリチルリチン酸ジカリウム、ホホハ油、精製水である。

B 対象および方法

対象は東邦大学第二小児科およびその関連病院に受診中のアトピー性皮膚炎の小児33名、（男21名、女12名）また年齢は7か月から14歳である。

方法（図1）はそれぞれ2週間の観察期間をおき、シシウムエキスが入っている塗布剤（A剤）と入っていない塗布剤（B剤）1か月毎交互に用い、はじめにA剤を用いた群を1群、またB剤を用いた群を2群とした。2週毎に皮膚症状、痒みの改善度、日常生活および睡眠の障害の改善度合い、さらに併用薬剤の変動について比較検討しました。

観察項目（表1）は皮膚所見としては紅斑、湿润・びらん、乾燥、苔癬化の各項目について同一医師により、高度は3点、中等度は2点、軽度は1点、なしは0点とし

評価し、外来受診時に診察によって行った。またを自覚症状はアトピー性皮膚炎日記を記入させ、痒みには、高度は3点、中等度は2点、軽度は1点、なしは0点とし、睡眠障害、日常生活障害のそれぞれには睡眠、および日常生活はほとんど出来なかった2点、余り出来なかった1点、普通0点として点数の推移を2週ごとに評価した。

アトピー性皮膚炎併用薬剤の治療点数については表2に示す基準で評価した。すなわちステロイド剤、非ステロイド剤、保湿剤にそれぞれ点数をつけ、その使用状況の頻度を日誌より点数化し、推移を評価した。

血液学的検討はシシウム投与前と投与4週目に採血し、血清 ECP 値 (Eosinophil Cationic Protein)、タニに対するヒスタミン遊離試験 (HRT Histamine Releasing Test)、血清 NO 値、血清 RANTES, Eotaxin、および IL-8 (Interleukin-8) のそれぞれについて測定した。

各検査の測定は血清 ECP 値 (Eosinophil Cationic Protein) は Phamacia 社製の測定キットを用い、また血清 NO 産物は NO の血中溶解物として NO₂ と NO₃ 化合物濃度を酵素反応比色法にて測定 (R & D system Inc Minneapolis のキット使用)、血清 RANTES は Human RANTES 測定キットおよび血清 Eotaxin は Human Eotaxin 測定キット、および IL-8 は Human IL-8 測定キットをそれぞれ用いた ELISA 法で測定した。

なお本研究参加について患者および両親に投与方法、投与内容、さらに血液検査について説明し、承諾を得た。

C. 結果

1. 皮膚所見について

図2は湿润・びらん、紅斑、苔癬化、乾燥度について皮膚所見の変動を示した。実線はシシウムが入っているA剤、点線は

入っていないB剤を示し、左が1群、右が2群である。1群ではA剤は湿潤 びらんは前て 142 ± 0.32 から4週で 0.81 ± 0.44 、また乾燥は 1.48 ± 0.51 から4週で 0.83 ± 0.34 に有意に効果を認めたが、皰疹、苔癬化では有意な差はなかった。2群では2、4週でそれぞれ点数の減少を認めたが、統計的有意差はなかった。一方B剤では両群ともやや効果をもとめるもの有効性を認めなかった。

2. 臨床症状について

図3は痒みに対するシシウム剤の効果は1群ではA剤は 1.74 ± 0.51 から4週で 1.03 ± 0.24 と有意に改善していた。また2群においてもA剤は 1.51 ± 0.31 から4週で 1.09 ± 0.27 、B剤は 1.63 ± 0.41 、 1.46 ± 0.46 と1群同様にA剤と同様に効果を見た。またその効果も多くは2週から認められていた。

図4は夜間睡眠障害を示した。1群のA剤では 0.92 ± 0.21 から4週で 0.38 ± 0.22 と有意に改善され、B剤では 1.09 ± 0.30 、 0.68 ± 0.35 と有意な変動はなかった。また2群においてもA剤では 0.80 ± 0.26 、B剤では 0.83 ± 0.23 が、4週ではA剤では 0.36 ± 0.17 、B剤では 0.43 ± 0.21 と同様にA剤すなわちシシウム剤で有意な効果を認めた。

日常生活に対する障害に対する効果を図5に示した。1群でのA剤では 0.53 ± 0.11 から4週で 0.08 ± 0.02 、B剤では 0.54 ± 0.17 から4週で 0.48 ± 0.20 とA剤で有意に日常生活の改善を認めた。また2群においてもA剤が 0.46 ± 0.16 から4週で 0.07 ± 0.03 同様に効果を認めた。

3. 治療薬の変動

図6に治療薬の使用状況を点数化した。1群のA剤使用群では使用前が 8.0 ± 2.8 が4週後に 4.8 ± 2.5 、B剤使用群ではそれぞれ 7.5 ± 3.1 、 5.8 ± 2.8 に比べ有意に治療薬の使用の減少を認めた。また2群でもA剤で 7.2 ± 2.8 が4週後に 4.5 ± 2.2 、B剤で 7.3 ± 2.4 が4週後に 5.7 ± 2.0 、とA剤での薬物量の減少を認めた。

4. 血液学的検討

本結果は採血の許可を得、評価可能な28例についての結果を示した。表3はA剤投与群とB剤投与群の血清ECP値(Eosinophil Cationic Protein)、タニに対するヒスタミン遊離試験(HRT Histamine Releasing Test)、血清NO値、血清RANTES値、血清Eotaxin値、および血清IL-8(Interleukin-8)の投与前、投与後の平均値および標準偏差である。

タニに対するヒスタミン遊離試験(HRT-Histamine Releasing Test)は投与前後での有意差は認めなかった。

血清ECP値はA剤投与群の投与前の血清ECP値は $83.6 \pm 41.9 \mu\text{g}$ 、投与後 $26.6 \pm 23.9 \mu\text{g}$ 、またB剤投与群の投与前の血清ECP値では $76.6 \pm 39.9 \mu\text{g}$ 、投与後 $42.9 \pm 30.9 \mu\text{g}$ とA剤で有意の低下が認められた。

血清NO値の検討では、A剤投与群の投与前の血清NO値は $45.6 \pm 19.9 \text{ mM/ml}$ 、投与後 $19.6 \pm 8.7 \text{ mM/ml}$ 、またB剤投与群の投与前では $39.9 \pm 16.8 \text{ mM/ml}$ 投与後 $26.8 \pm 9.1 \text{ mM/ml}$ とA剤で有意の低下が認められた。

血清RANTES値はA剤投与群の投与前では $91.6 \pm 89.9 \text{ ng/ml}$ 、投与後 $9.6 \pm 6.7 \text{ ng/ml}$ 、またB剤投与群ではそれぞれ $101.2 \pm 80.1 \text{ ng/ml}$ 、 $78.6 \pm 58.1 \text{ ng/ml}$ とシシウム剤使用群で有意な低下を見た。

血清Eotaxin値は、A剤投与群の投与前

では 603 ± 291 pg/ml、投与後 76 ± 57 pg/ml、またB剤投与群ではそれぞれ 532 ± 348 pg/ml、 176 ± 95 pg/ml とシシウム剤使用群で有意な低下をみた。

CXCケモカインである血中IL-8値はA剤投与群の投与前で 526 ± 419 pg/ml、投与後 166 ± 99 pg/ml、またB剤投与群の投与前では 489 ± 368 pg/ml 投与後 186 ± 83 pg/ml とやや低下傾向を認めたが有意差はなかった。

D. 考察

アトピー性皮膚炎の病態が次第に解明され、皮膚のバリア機能の低下に拠るものといわれ、さらに多岐にわたる外的、内的因子による慢性の刺激による接触性皮膚炎としての炎症所見として捉えられている。

本研究ではこれまでのシシウムの臨床的有効性を科学的評価する目的で二重盲検法による検討を行い、臨床所見および血液学的評価を行った。

その結果、シシウムの皮膚症状は湿潤・びらんおよび乾燥所見では有意の効果を示し、紅斑、苔癬化でも有意な有効性を認めなかったものの改善傾向を示していた。

また痒み、日常生活や睡眠障害に対する検討では有意差を認め、特に痒みの効果は優れ、また使用2週後からその効果を認めていた。外用薬の使用頻度の検討ではシシウム使用例で有意の使用内容の改善がみられ、特に問題とされているステロイド剤の使用頻度が減少していた。

一方血液学的検討において炎症反応の評価に有効といわれるECP値はシシウムの使用で改善とともに有意に低下していた。

さらにアトピー性皮膚炎の局所で、主に単球および上皮細胞の活性化によりNOが産生され、炎症の指標といわれるNO値の測定では、有意に症状の改善群で低下して

いた。

またアレルギー性炎症として局所への好酸球の遊走集積にはRNATESあるいはEotaxinなどに代表されるCCケモカインが関与されるとされる。また感染性炎症場面の好中球の遊走集積にはIL-8などに代表するCXCケモカインによって調整されるといわれる。そこで今回の研究ではECPに加え、これらの検討を行ったが、血清RNATES値、Eotaxin値とも症状の改善により有意に低下していた。このことはアトピー性皮膚炎が炎症性病変を強く示唆するとともに、症状の改善の評価にRNATES値、Eotaxin値が有用と考えられた。一方IL-8は有意な変動は認めなかったが、皮膚症状で湿潤が多い症例で高い傾向を認め、急性増悪に関与するとの報告もあり、今後さらに症例を加え、検討が必要であると考え

E. 結語

- 1 シシウム塗布剤によるアトピー性皮膚炎に対する臨床的検討を行った。
- 2 臨床的には湿潤・びらん、乾燥に対する効果に有為な傾向が見られ、その効果も早いものは2週で見られた。
- 3 痒み、睡眠障害、日常生活障害の改善にも有意であり、特に痒みの効果は優れ、使用2週で効果を認めた。
- 4 外用薬の使用頻度はシシウム使用例で有意の低下が見られた。
- 5 アトピー性皮膚炎の評価として血清ECP値、血清NO値、血清RNATES、Eotaxinの検討では、投与前、投与後で症状の改善とともに有意に減少し、これらの検査がアトピー性皮膚炎の改善の評価に有効といえる。
- 6 以上の結果、シシウムがアトピー性皮膚炎の補助的効果として期待出来るも

のと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

鈴木五男：小児アトピー性皮膚炎に対するシシウム塗布剤の臨床的効果。
平成10年度厚生化学研究事業報告書
『アレルギー疾患を抑制する天然薬物シ

シウムに関する研究』（総括研究代表者 北中 進）2-5, 1999

2. 学会発表

Suzuki I, Kiyada M, Okada M, Aoki T Clinical evaluation of the effectiveness of *Psidium guajava* in atopic dermatitis 28th International congress of Allergology and clinical Immunology Sydney 2000, 10

表1 観 察 項 目

皮膚所見	紅斑、湿潤・びらん、乾燥、苔癬化の各項目 なし . 0点、軽度 1点、中等度 2点、高度 3点
自覚症状 そう痒感	なし 0点、軽度：1点、中等度 2点、高度 3点
夜間睡眠の支障度	普通 0点、余りできなかつた 1点、ほとんどできなかつた 2点
日常生活の支障度	普通 . 0点、余りできなかつた 1点、ほとんどできなかつた 2点

表2 治 療 点 数

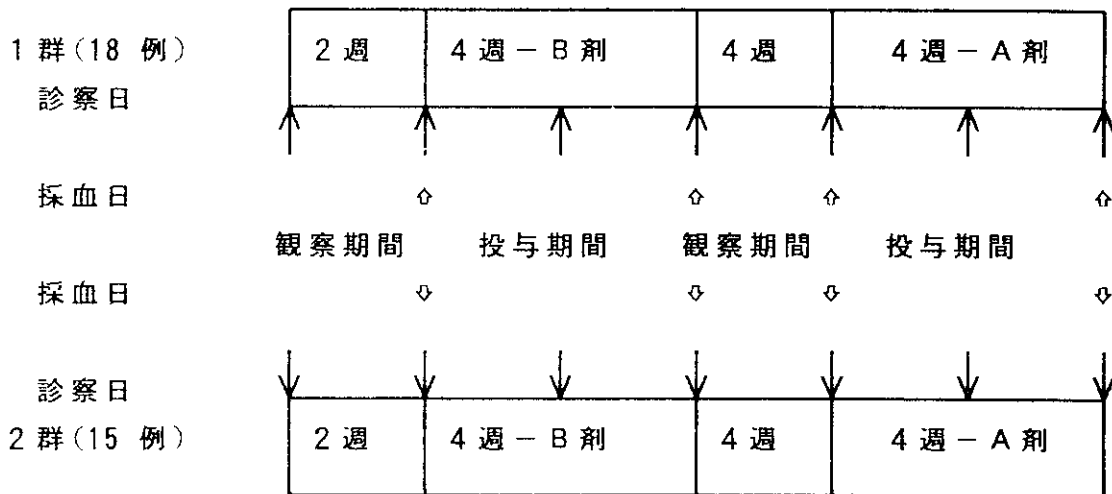
A)ステロイド外用薬	Strong	3点
	Mild	2点
	Weak	1点
B)非ステロイド外用薬	0	5点
C)その他保湿剤	0	5点

$$= (A + B + C) \times \text{使用日数} \times \frac{\text{評価期間中の塗布回数}}{\text{観察期間中の塗布回数}}$$

表 3 血液学的検査

項目	投与前		投与後		有意差
血清ECP値 ($\mu\text{g/ml}$)	A剤	83.6 \pm 41.9	26.6	\pm 23.9	P<0.01
	B剤	76.6 \pm 39.9	42.9	\pm 30.9	NP
血中NO値 (mM/ml)	A剤	45.6 \pm 19.9	19.6	\pm 8.7	P<0.01
	B剤	39.9 \pm 16.8	26.8	\pm 9.1	NP
血中RANTES値 (ng/mlML)	A剤	91.6 \pm 89.9	9.6	\pm 6.7	P<0.01
	B剤	101.2 \pm 80.1	78.6	\pm 58.1	NP
血中Eotaxin値 (pg/ml)	A剤	60.3 \pm 29.1	7.6	\pm 5.7	P<0.05
	B剤	53.2 \pm 34.8	17.6	\pm 9.5	NP
IL-8 (pg/ml)	A剤	52.6 \pm 41.9	16.6	\pm 9.9	NP
	B剤	48.9 \pm 36.8	18.6	\pm 8.3	NP

図 1 プロトコール



A 群 シシュウム (+) B 群 シシュウム (-)

図2 皮膚所見

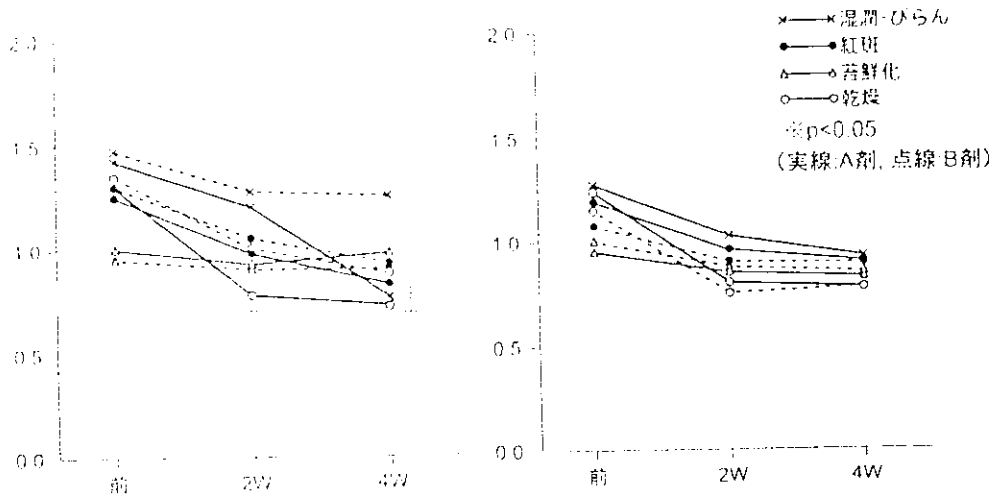


図3 かゆみの推移

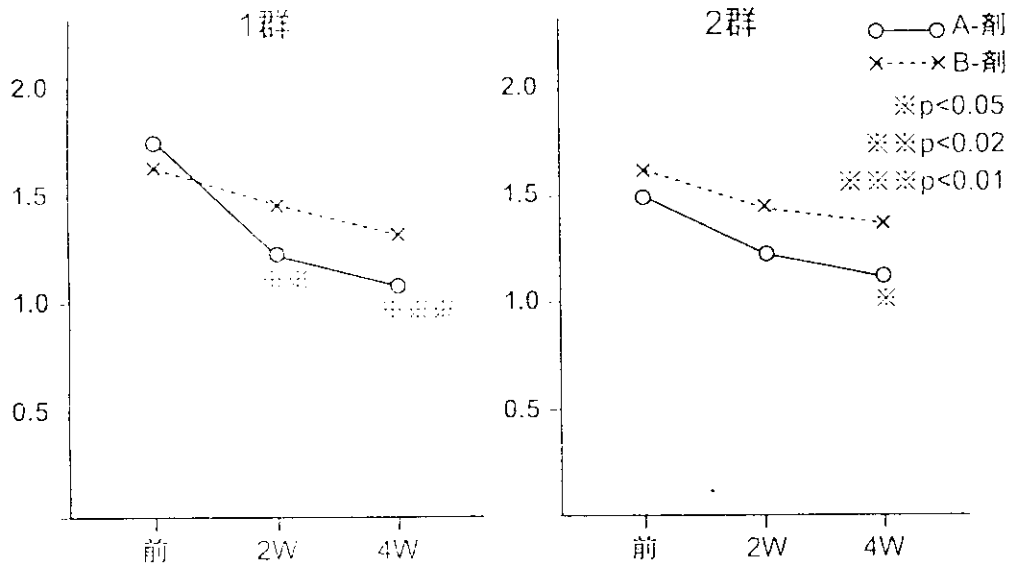


図4 夜間睡眠障害の推移

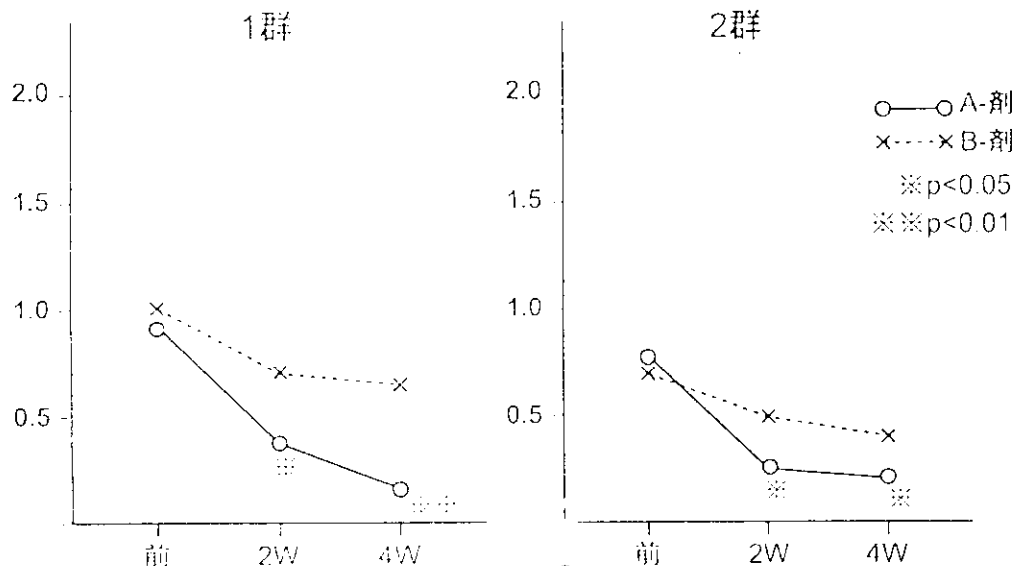


図5 日常生活障害の推移

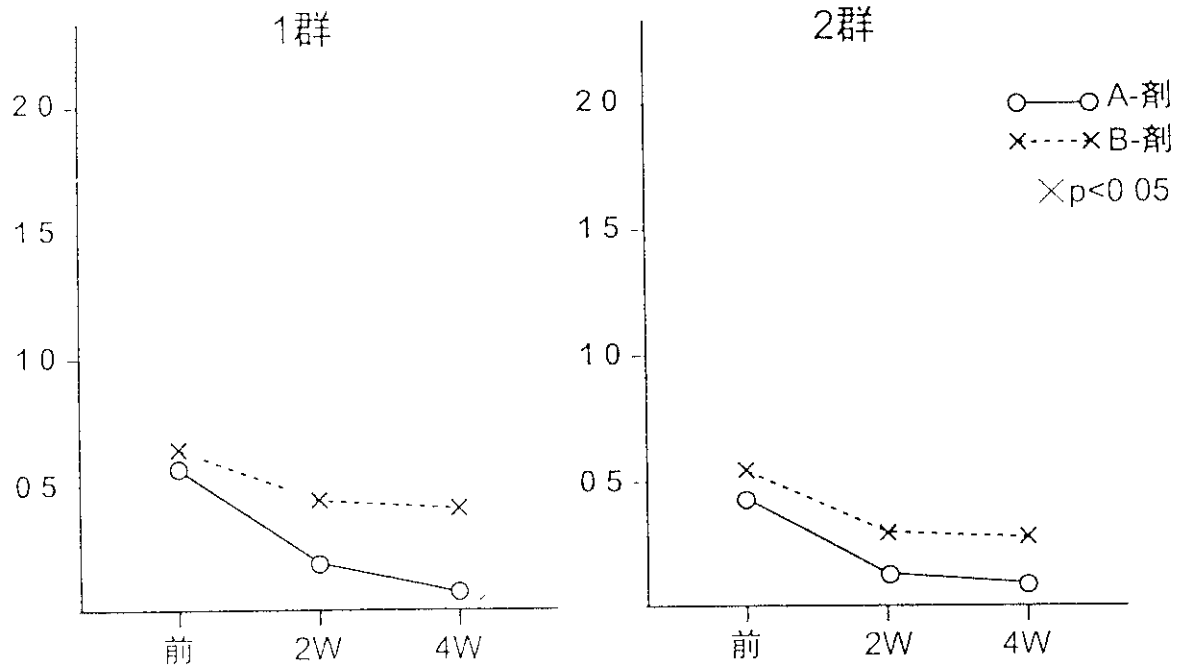
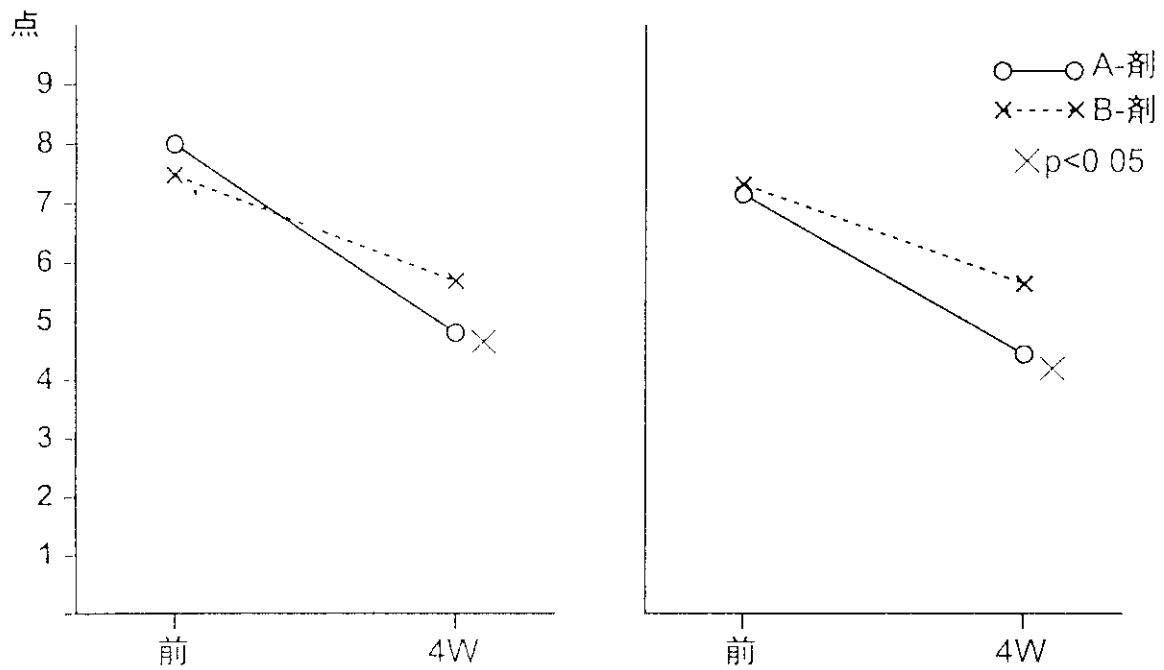


図6 皮膚外用薬点数の推移



シジュウムの炎症細胞に与える効果と有効成分の分離

主任研究者 北中 進

日本大学薬学部教授

研究要旨 シジュウムは、各種アレルギー疾患に効果を挙げている植物である。これまで、マスト細胞からのヒスタミンの検討及び有効成分の分離についての検討を行ってきたなか、新規ベンゾフェノン配糖体を単離した。さらにマクロファージに影響を及ぼす新規化合物を含むセスキテルペノイドを単離した。これらの構造決定と生物活性について検討した。

A. 研究目的

アトピー性皮膚炎、気管支喘息およびアレルギー性鼻炎等の疾患はI型アレルギー反応によって引き起こされる疾患で、世界的に見ても大きな社会問題になっている。しかし副作用が少なく、有効な医薬品は現在のところ、見い出されていない。このI型アレルギー反応はアレルゲンの感作により免疫担当細胞からのケミカルメディエーターおよびサイトカインの遊離が開始され、持続的に炎症反応が起こる疾患である。このケミカルメディエーターおよびサイトカインの遊離を抑制する物質から、抗アレルギー剤開発のためのリード化合物を発見することが期待されている。

シジュウムは南米原産のフトモモ科の植物で、葉は民間薬として経験的にアレルギー疾患に利用されており、これまでにヒ

スタミン遊離抑制物質として数種のタンニンが単離・同定されている。タンニンのような高極性物質ばかりでなく、低極性物質に着目し、炎症細胞に作用する物質を探索した。

B. 研究方法

シジュウムエキスからの低分子化合物の精製

シジュウムの葉(5 kg)の80%アセトンエキスを水に溶解し、Diaion HP-20カラムに付し、そのメタノール溶出画分をSephadex LH20、シリカゲルクロマトグラフィーで分画し、最終的に高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製することにより、化合物**1**および**2**を単離した。また、先に単離されたベンゾフェノン配糖体関連

物質2種(4および5)を単離した。また、ヒスタミン遊離抑制活性のある画分より、既知フラボノール配糖体5種(6~10)を単離した。

ヒスタミン遊離抑制試験

ヒスタミン遊離抑制試験は下記の通り行った。すなわち、ラット腹腔マスト細胞を 5×10^5 cells/mLの細胞懸濁液を調製し、試料を終濃度100 μ g/mLで添加した。脱顆粒物質として、comopound 48/80を用いた。遊離したヒスタミン量は、オルトフタルアルデヒド(OPA)を用いたポストラベル

法によるHPLCで定量された。

C. 研究結果

化合物1は無色の針状晶として得られ、融点104-105°C、高分解のEI-MSより、分子式 $C_{15}H_{24}O$ であることが明かとなった。また、化合物2も無色の針状晶として得られ、融点140-142°C、高分解のEI-MSより、分子式 $C_{15}H_{22}O_2$ であることが明かとなった。これらの構造は、NMR、IR等の各種スペクトルを解析することにより、図1に示すとおりであると決定された。なお、化合物1

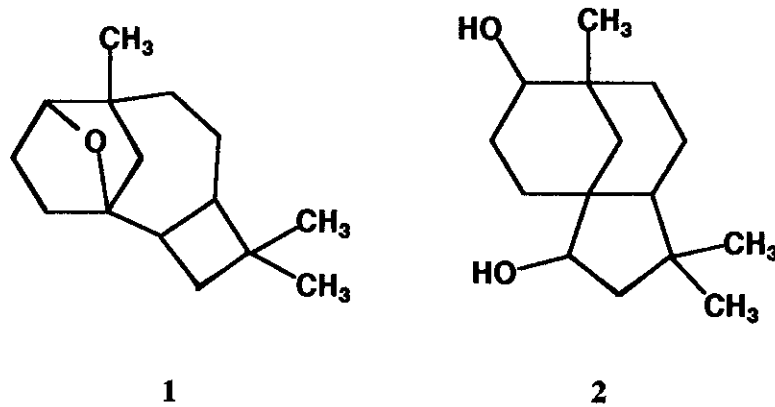


図1 得られたセスキテルペン

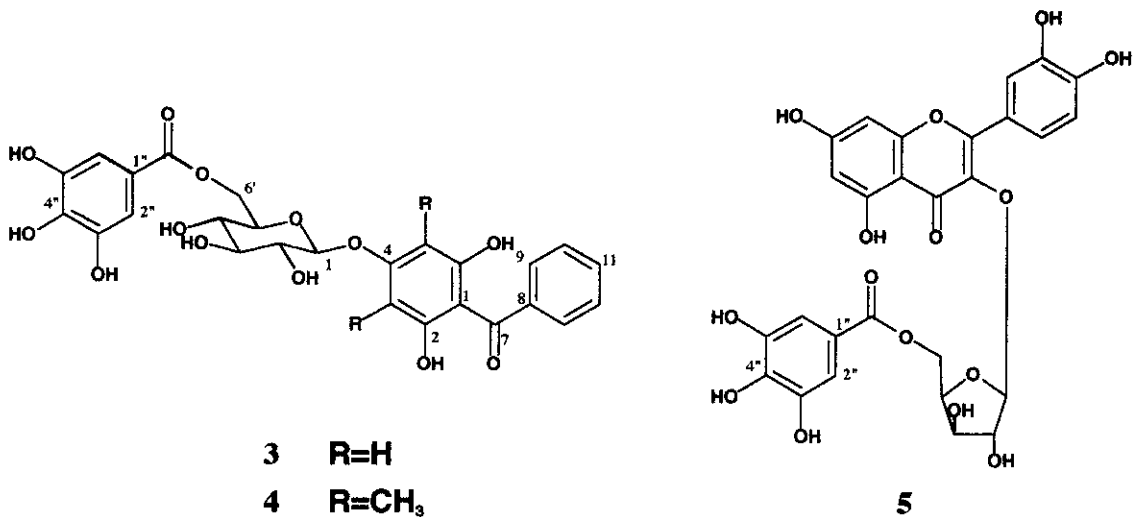


図2 得られた配糖体

は、文献未記載の新規セスキテルペンであった。配糖体1と推定された。また、化合物4および5は、いずれも黄色の粉末として得られ、機器分析の結果から4-(6-O-galloylglucosyl)-2,6-dihydro-3,5-dimethylbenzophenone (4)およびQuercetin-3-O-5-galloylarabinoside (5)と決定された(図2)。いずれも文献未記載の化合物である。このうち、化合物5にラット腹腔由来マスト細胞からのヒスタミン遊離活性が強く、そのIC₅₀は27 μMであった。

D. 考察

今回は、エキス段階では比較的ヒスタミン遊離抑制活性の弱い画分の成分を検索し、新規ベンゾフェノン配糖体を単離構造決定するとともに、弱いながらもヒスタミン遊離抑制活性を有することを明らかにした。なお、クロマトグラムの上、化合物1の近傍には類似物質含む画分がいくつか存在していることから、これらの精査が望まれる。

E. 結論

これまでシジュウムにはタンニン類という水溶性ポリフェノールにヒスタミン遊離抑制活性を有することを明にしてきたが、今回、比較的疎水性物質にも同様の活性が存在することを明らかにした。また、今回単離された化合物1を含まない他の画分には、いくつかの関連化合物と強力なヒスタミン遊離抑制活性が認められることから、生物活性を含めた探索が今後の検討課題である。

およびQuercetin-3-O-5-galloyl-arabinoside

(3)を得た。さらに5種の既知quercetin配糖体を同定した。また、低極性画分からセスキテルペンのchlovandiol (2)と3,5-epoxysenecrassidiol (1)単離構造決定した。なお、1および3、4、5は新規化合物である。このうち、3はラット腹腔マスト細胞からのヒスタミン遊離を抑制すると同時にマクロファージのNO産生をも抑制した。また、4および5はマクロファージからのIL6産生を抑制したばかりでなく、IL12産生を増強した。特に4のIL12産生増強作用は強かった。

これまでシジュウムにはタンニン類という水溶性ポリフェノールにヒスタミン遊離抑制活性を有することを明らかにしてきたが、比較的疎水性物質にも同様の活性が存在することを明らかにした。また、これらにはNO産生IL産生能にも関与することから、シジュウムの抗炎症作用が多岐にわたることを示唆するものである。

F. 学会発表

1. 松崎桂一、北中 進 *Psidium guajava*のフェノール性成分について 日本生薬学会第46回年会(大阪) 講演要旨集 p121 (1999).
2. 松崎桂一、尚 尔金、北中 進 *Psidium guajava*のテルペノイド成分の研究 日本生薬学会第46回年会(大阪) 講演要旨集 p143 (1999).
3. 松崎桂一、北中 進、石井里枝、斉藤貢一 *Psidium guajava*のフェノール性成分について (その2) 日本薬学会第120年会(岐阜) 講演要旨集2 p52 (2000).

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
分担報告書

Th1/Th2 型ヘルパーT細胞機能へのシジウムの影響に関する研究

分担研究者 豊島 聡 星薬科大学教授

研究要旨 methyl gallate より Th2 サイトカン (IL-4) 産生抑制に関し、選択性及び抑制活性の高い化合物を検索するため、methyl gallate 及びその類縁化合物 (gallic acid、ethyl gallate、propyl gallate) について Th2 サイトカンである IL-4 の産生に対する影響を検討した。いずれの化合物も抗 CD3 抗体刺激マウス脾リンパ球における IL-4 の産生を抑制したが、Th1 サイトカンである IFN- γ の産生にはあまり影響しなかった。しかし、gallic acid は IL-4 産生を抑制する濃度で細胞毒性を示したため、毒性を示さない量で抗アレルギー作用を期待できないと考えられた。また、propyl gallate は接触性皮膚炎などIV型アレルギーを誘発することが報告されている。従って、methyl gallate と ethyl gallate が抗アレルギー作用を示す化合物として期待されたが、ethyl gallate は methyl gallate より低濃度で IL-4 産生を抑制したことから、その有用性が示唆された。

A 研究目的

昨年度までに、シジウム抽出物より単離・同定した methyl gallate は、I型アレルギー発症に関わる Th2 サイトカンである IL-4 の産生を選択的に抑制するとともに I型アレルギーモデルマウスにおける IgE 産生を抑制することを報告した。本年度は methyl gallate より、Th2 サイトカン (IL-4) 産生抑制に関し、選択性及び活性の高い化合物を見出すことを目的に、methyl gallate の類縁化合物について検討を加えた。

B 研究方法

抗 CD3 抗体刺激マウス脾 T細胞に methyl gallate あるいは、その類縁化合物 (gallic acid、ethyl gallate あるいは propyl gallate) を加え、2日間培養する。培養後の上清中に含まれる IFN- γ (Th1 サイトカン) と IL-4 (Th2 サイトカン) を、ELISA 法により測定した。

C 研究結果

ethyl gallate と propyl gallate は 1 μ g/ml の濃度で、IL-4 産生を抑制した (図 1 A)。この濃度の ethyl gallate は、IFN- γ 産生に影響しなかったが、propyl gallate は弱い産生抑制作用を示した (図 1 B)。10 μ g/ml の濃度では、gallic acid、methyl gallate、ethyl gallate、propyl gallate のどれもが、IL-4 産生抑制作用を示した (図 2 A)。一方、この濃度では、methyl gallate と propyl gallate が弱い IFN- γ 産生抑制作用を示した (図 2 B)。100 μ g/ml の濃度では、gallic acid、methyl gallate、ethyl gallate、propyl gallate のどれもが、強く IL-4 産生を抑制した (図 3 A)。一方、この濃度では methyl gallate と propyl gallate に弱い有意な IFN- γ 産生抑制作用が見られた (図 3 B)。なお、100 μ g/ml の濃度では、gallic acid に細胞毒性が見られた。以上の結果は、花粉症など I型アレルギーの発症に関わる Th2 サイトカンである IL-4 の産生を ethyl gallate が、methyl gallate 及び他の methyl gallate 類縁化合物よりも選択的に抑制す

ることを示唆するものであった。

D 考察

10 μ g/ml の濃度では、一昨年報告したように、methyl gallate は比較的選択的に IL-4 産生を抑制したが、ethyl gallate および propyl gallate もこの濃度で IL-4 産生を抑制した。しかし、1 μ g/ml の濃度では、ethyl gallate と propyl gallate は有意に（特に ethyl gallate）IL-4 産生を抑制したが、methyl gallate は抑制しなかった。この濃度で、ethyl gallate は、IFN- γ 産生に全く影響せず propyl gallate は、弱い産生抑制を示すのみであった。従って、ethyl gallate と propyl gallate は methyl gallate より選択性及び活性の高い IL-4 産生抑制物質と考えられた。しかし、propyl gallate は、接触性皮膚炎のような IV 型アレルギーを誘発することが知られているので、propyl gallate をアレルギー治療へ応用することは不可能と考えられ、今後、本研究結果のヒトへの応用は ethyl gallate を用いて調べるべきと思われた。

E 結論

花粉症など I 型アレルギーの発症に関わる Th2 サイトカンである IL-4 の産生を ethyl gallate が、methyl gallate よりも低濃度かつ選択的に抑制することが明らかとなった。

F 研究発表

1 論文発表

小菅崇、宍倉弘記、北中進、豊島聰 ヘルパー T 細胞のサイトカイン産生とアレルギー治療に対するフトモモ科シジウムからの抽出物の影響（2000）
YAKUGAKU ZASSHI, 120(4), 408-412

2 学会発表

加藤慶、小菅崇、北中進、豊島聰 methyl gallate および類縁物質による I 型アレルギー抑制作用の検討、日本薬学会 120 年会（岐阜）、2000 年 3 月

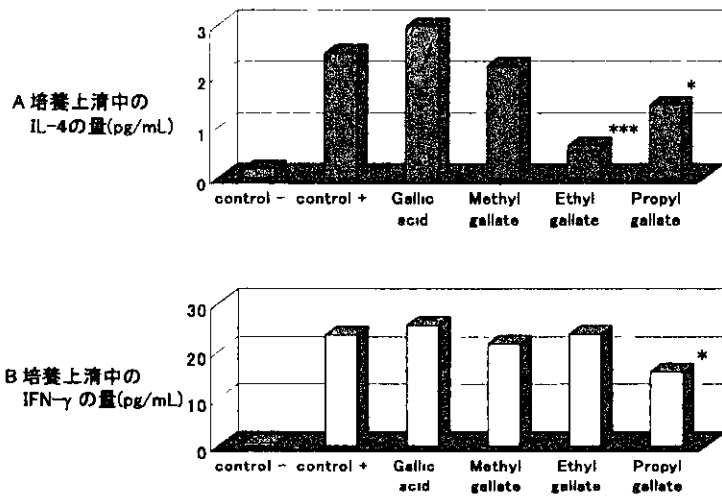


図1 抗CD3 抗体刺激マウス脾細胞より産生されるサイトカインの量に対するMethyl gallate、類縁物質(1μg/mL)の影響

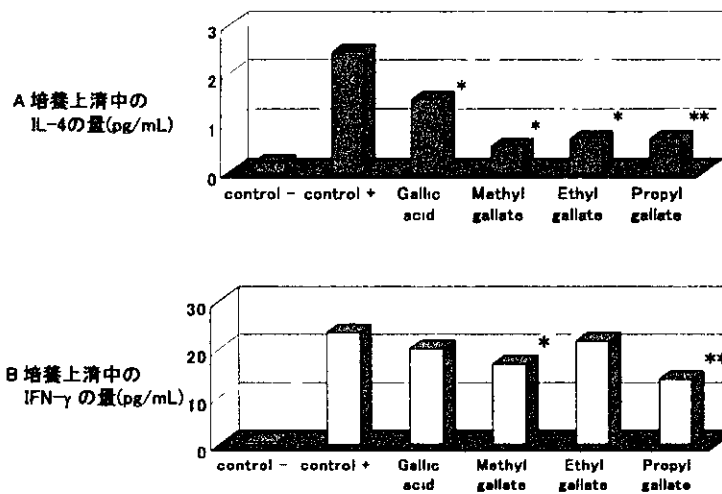


図2 抗CD3 抗体刺激マウス脾細胞より産生されるサイトカインの量に対するMethyl gallate、類縁物質(10μg/mL)の影響

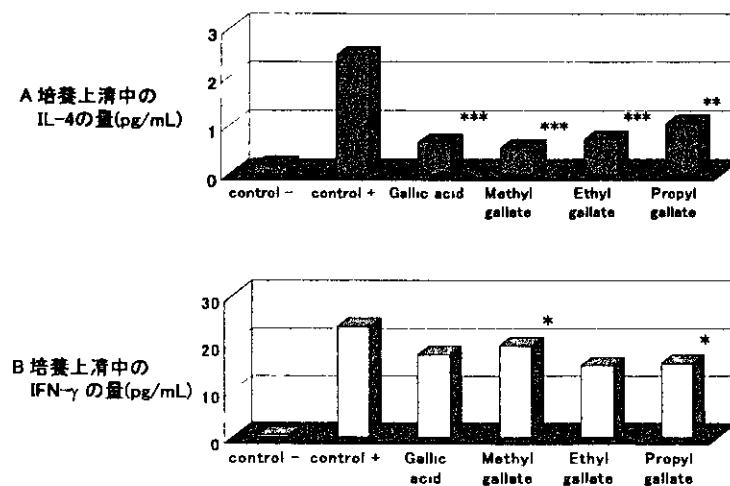


図3 抗CD3 抗体刺激マウス脾細胞より産生されるサイトカインの量に対するMethyl gallate、類縁物質(100μg/mL)の影響