

図5 アトピー性皮膚炎(354例)に対する主な天然植物(薬物)の使用状況と有用性
 —入浴用—

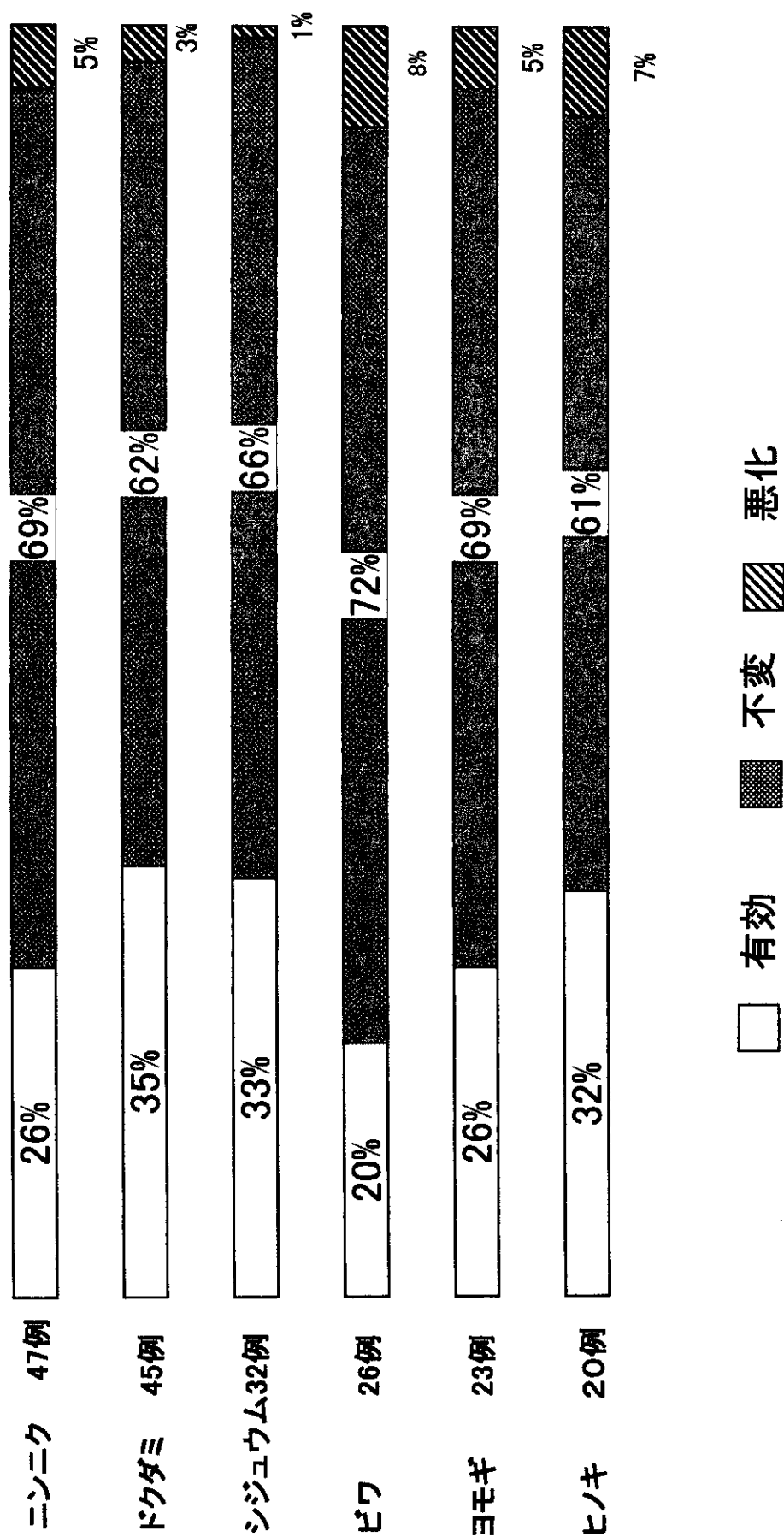
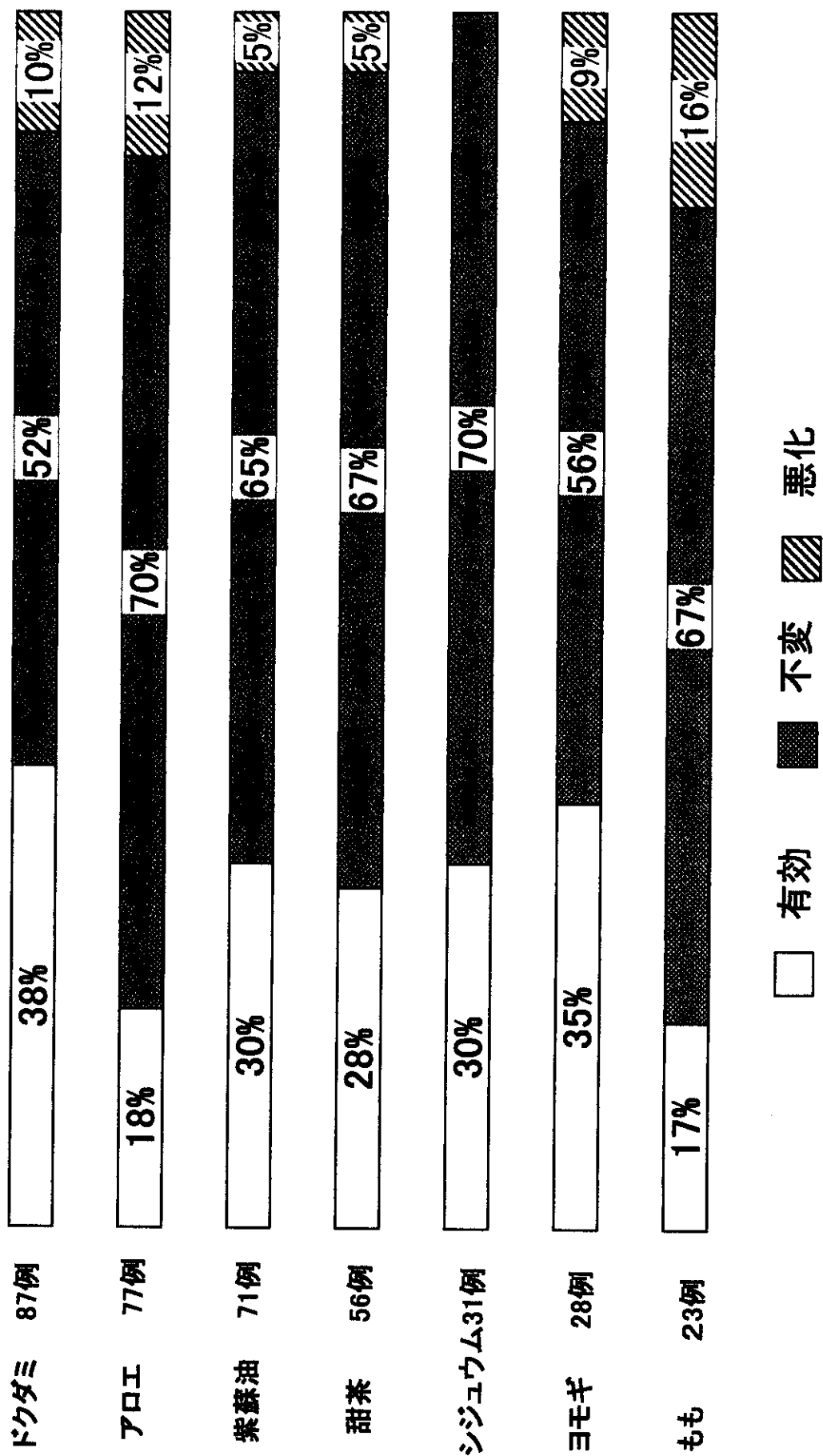


図6 アトピー性皮膚炎(354例)に対する主な天然植物(薬物)の使用状況と有用性
 —飲用—



抗炎症・抗アレルギー作用を有する民間薬の疫学的データの調査と植物成分のデータベース化に関する研究

分担研究者 鈴木政雄（東京理科大学薬学部製薬学科 講師）
研究協力者 和田浩志（東京理科大学薬学部製薬学科 助手）

研究要旨

1. 植物中の抗炎症や抗アレルギー作用を有する生物活性成分のデータベース化のための基本構成を検討した。今回は生物活性を有する植物成分及び民間薬について文献的に調査し、植物活性成分データファイルと民間療法データファイルの一部を作成した。また、薬局での調査データ及び病院での治療データをリレーショナルなデータベースとするための基本システムの構築のための検討を行なった。
2. 薬局・薬店で販売されている医薬品以外の自然食品を含む民間薬についての使用実態や疫学的調査を行うために、アンケート調査を実施した（現在、回収中）。アンケートは対象とした薬剤師会と内容を調整後行った。これまで回収されたアンケートでは、約 30%の薬局・薬店で関連する商品を取り扱っていた。また、その有効性について薬剤師が言及している商品が多数あった。一方、副作用については、数件に留まった。また薬局独自の商品を取扱っている所も数件あった。

A. 研究目的

抗炎症や抗アレルギー作用を有するとされる民間薬も多数あるといわれているがその作用メカニズムや有効性が十分な検討されていないことが多い。しかし、植物成分の生物活性に関する研究は多く行なわれるようになり、抗炎症や抗アレルギー作用を発現するシクロオキシゲナーゼ (Cox) や 5-リポキシゲナーゼ (Lox) を阻害する植物成分についても多数報告されるようになった。また、Cox 阻害や Lox 阻害とは異なる作用機序と考えられるがステロイドと同程度の抗炎症活性を有する成分の探索されている。これらの成分の起源植物はショウガ、カンゾウ、レンコンなど民間薬や生薬としても知られているものもある。そこで、本年度の研究では、民間薬の作用・副作用メカニズムの解析や新規天然医薬品検索の端緒

とするためのデータベースの構築に向けて、次の 2 項目について行うことを目的にした。即ち、第 1 の項目は植物中の抗炎症や抗アレルギー作用を有する生物活性成分のデータベース化のための文献調査と基本構成の構築の検討である。第 2 の項目はデータベースの一つとするために自然食品を含む民間薬の販売実態と薬剤師による有効性等の調査を行うことである。

B. 研究方法

1. データベース作成

基本的なデータファイルとして図 1 に示すような植物活性成分データ、民間療法データ、市販民間薬データ、治療実績データ等の 4 種を構築することを最終目標とした。今年度は植物活性成分データ

ファイル、文献的民間療法データベースの作成を通して、データベースの基本構成の構築を試みた。

データベースソフトは **Fail Maker Pro** を用いた。植物活性成分データファイルは薬学雑誌、**Chem. Pharm. Bull.**、**Phytochemistry**、**Planta Medica** など雑誌の逐次検索や **Chem. Abstr.** 及び **Medline** の検索システムである **SciFinder Scholar** を用い、抗炎症、抗アレルギー等の作用を有する植物成分を検索登録した。

民間療法データファイルは、主に原色牧野和漢薬草大図鑑（三橋監修、北隆館）のデータから本年度は収集した。

データベース化ではデータ間でリレーショナルな形式にするための共通事項を検討した。また、データ間の検索をより有効性・安全性の高い天然成分の検索を支援できるようにすると共に、疫学的データ、副作用、試験方法等の検索に利用できるようにデータベース項目を検討した。

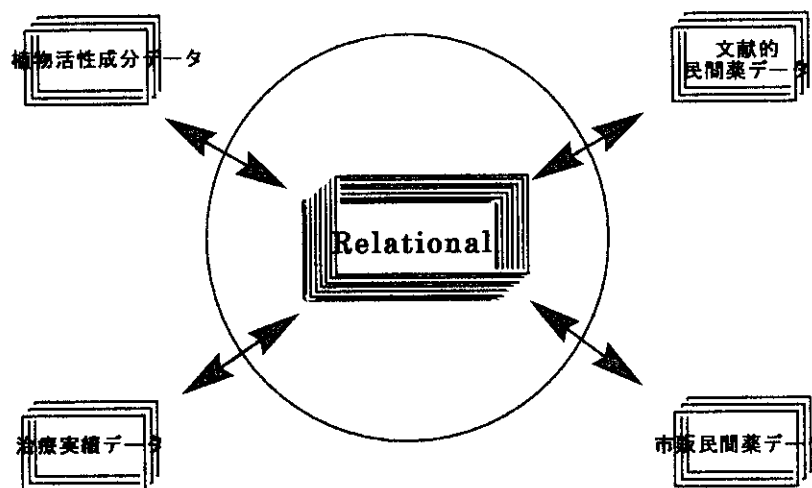


図1 データベースの構成模式図

2. 薬局へのアンケートの実施

医薬品を除く自然食品を含む民間薬の販売状況及び薬剤師による疫学的調査を実施した。調査対象は、薬局（一般販売業を含む）とし、調査地域は都市部の薬局として千葉市（千葉県）、地方の薬局として鹿児島県をモデル地域に選び、千葉市薬剤師会（約 350）、鹿児島県薬剤師会に所属する会員薬局（約 700）に対して郵送によるアンケート調査を実施した（返送：ファクシミリ）。調査期間は平成14年3月末までとした。

アンケートの内容の調整は各薬剤師会の担当者で行った。

C. 研究結果

1. データベース作成

使用ソフトの **Fail Maker Pro** は信頼性、作業性、インターネット等での公開の容易性などから用いることにした。植物活性成分データファイルの登録項目

は、図2の一例に示すように次の事項とした：基原植物、科名、属名、成分名（慣用名）、薬効、作用機序、薬効強度、薬効試験法、化学構造、構造パラメーター、など。このうち、作用機序については、比較的多く出現するCox阻害、Lox阻害、PLA2阻害、ヒスタミン遊離阻害、抗酸化作用が全体の約60%であったので、これを主たる登録項目として、残りの多数の作用機構を「その他作用」に分類した。

民間療法データファイルの登録項目は次の事項とした：植物名、科名、属名、同属の植物名、使用部位、使用方法、適応、薬効薬理、成分名、出典、植物画像など。

次年度予定の市販民間薬データと、治療実績データファイルは、本年度開始したデータファイルとの関連づけるために登録項目として、次の事項を予定している：使用している天然物の基源、材料か

ら推定される成分、植物学的分類(科名、属名)、治療目的(疾患)、治療実績、副作用など。

データベース間をリレーションナルにするための項目として、成分名の ID 番号化、作用機構のグループ化、科名・属名の利用を検討した。また検索に便利な形として、成分名、作用機構や植物の科名や属名、病名、病状などからの一括検索が可能な方法を取り入れについても検討し、一部可能にできた。

現在までに、植物活性成分データファイルの登録数は約 120 と民間療法データベースのそれは 30 である。これらの中で、登録された植物の科数は 30 で、表 1 に示すようにキク科、ショウガ科など

に活性成分が多かった。また化学構造的にはテルペノイド、フラボノイド、タンニンなどの構造の化合物であった。

表 1 植物の科と活性成分数

科名	活性成分数
キク	16
ショウガ	14
マメ	10
ウリ	8
シソ	8
ユキノシタ	6
ベンケイソウ	5
セリ	5

論文再確認 済 未

ID: 7207013 科名

基原植物: Cassia torosa C_{AV} ハブソウ
カワラケツメイ(同属) マメ科

化学名: physcion 8-O-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-β-D-glucopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranoside korososide B

慣用名: 同上

グループ分け: COX系 LO系 ヒスタミン遊離抑制系 アラキドン遊離抑制系

薬理作用: ロイコトリエン遊離抑制

構造/パラメータ:

構造活性メモ:

使用部位: 根

スクリーニング方法: in vitro

薬効: 抗アレルギー作用

薬効強度: 抑制率(%)は、hydrocortisone 2.5×10⁻⁶M でLTB₄: 70.1, LTC₄: 75.1, LTD₄: 69.3, LTE₄: 72.1 に対して、10⁻⁶M でLTB₄: 48.9, LTC₄: 39.7, LTD₄: 41.2, LTE₄: 49.3 である。

メモ:

出典: Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 47, 815-818 (1999).

図 2 植物成分データファイルの 1 例

2. 薬局へのアンケートの実施

アンケート調査の対象商品は、アレルギー・炎症・アトピー、花粉症などに効果があるされるもので、シジュウム、ヨモギ、柿の葉、甜茶などを含めて食品・健康飲料・健康食品など商品の形態も飲料、貼付・塗布薬等など形態を問わないことにした。アンケートは回収途中であり、十分な解析は行っていないが、主な点として下記のような点が見られた。

a. 販売等の調査項目について

販売の有無、販売状況（商品の名称と販売会社、連絡先）、販売量などである。

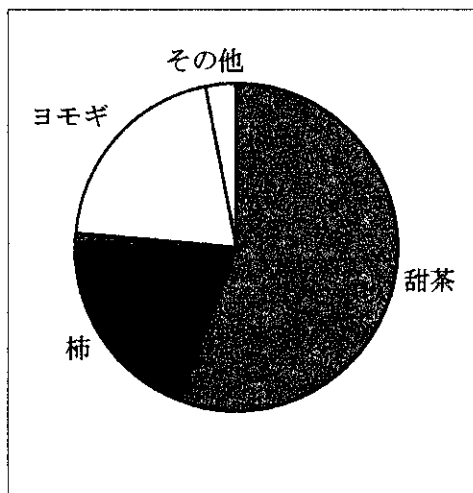


図3 主な商品の割合

b. 評価項目について

各品目について使用者の年齢層、性別、患者の疾病の状況、使用者の意見を聞いた薬剤師の評価、特別な知見（特に明確な症状とそれに対する治療効果）について調査した。使用者は地方よりも都市部で多く又青年以上の女性が多いようであった。しかし、かなり明確に疾病との関連でその有効性を述べているものは数件に留まっていた。また、副作用と思われる症状が、一部の商品について見られるとの報告があったが、重大なものと思われるものは認められなかった。また、商品間のバラツキが多いのではないかとの意見も寄せられた。

現在、各商品に使われている植物を特定していないので、成分データベースと関連付けることはできていないが、今後販売会社からそれらのデータを入手する予定である。

この項目に対して、回収されたアンケートの約30%が販売しており、図3に示すように柿の葉茶、甜茶、ヨモギ茶関連のものが全体の90%に近かった。しかし、その販売会社数と販売の形態は表1に示すように様々であり、薬剤師が消費者に説明するに足る情報は不足しているようであった。又、取扱商品数の総数は20種こえていた。

これまで回収されたアンケートでは、特殊な天然物に関する情報はなかった。

表2 販売会社数と販売の形態

	社	形態
甜茶	13	4
柿	3	2
ヨモギ	6	3

薬局独自に生薬などから作成しているの製品の有無とその状況についての調査では、今回の対象商品を扱っている薬局の約3%であった。

D. 考察

データベース化に関する調査研究では、各データ間の関連性をどのように取るかが重要で、利用する立場（医師、薬剤師、患者、開発研究者）にとって有用にするためには、現在少数のデータで試行錯誤的に進めてきているが、次年度には利用者の意見を聞かなければならないと考える。

薬局からアンケートでは、実に多数の商品があり、健康を求めて多くの利用者がいることが分かった。これはその有効性の裏付けをすることも重要な研究課題となることを示唆している。また、特定の薬局でしか扱っていない商品もあり、

その有効性が述べられているものも有り、それらの商品を追跡調査することで必要と考えられた。

E. 結論

今年作成を開始したデータベースで臨床と関連付けられるものには、物活性成分データから作用機構、民間療法データから適用疾病のみであるが、今後医師の治療的データや薬局からアンケートにより収集したデータが加わえることにより、より幅が広い民間薬についての作用や副作用の科学的解析のための基礎データベースになり得るものと考えられる。更に、これらのデータが相互に関連付けられることにより、患者にとって有効性が高く、

副作用の少ない天然由来の薬物の新規探索にも利用できるものと思われる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

初年度のため、この研究では現在までに発表等は行っていない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

作成されるデータベースには、知的財産権が発生する可能性があり、今後製作過程でその権利の行使などについて考えていく予定である。

マスト細胞の活性化機構並びに活性化抑制物質に関する研究

分担研究者 羅 智靖 日本大学医学部先進医学総合研究センター、
分子細胞免疫・アレルギー学講座教授

研究要旨

アレルギー性炎症の局所では IgE-FcεRI-マスト細胞軸を巡るアレルギー増悪回路が形成されている。FcεRI β鎖は、FcεRI を介するサイトカイン産生に対して抑制的に働くモチーフを有している。マスト細胞には TLR が発現しており、自然免疫に関与しているが、TLR2 は黄色ブドウ球菌の PGN と反応してサイトカイン産生、脱顆粒を起こすことが明らかになり、アトピー性皮膚炎の増悪に働くことが示唆される。これらの系に対する生薬抽出物の影響を検討していく。

A.研究目的

今まで我々はアレルギー性炎症の局所では、IgE-FcεRI-マスト細胞軸を巡るアレルギー増悪回路が形成されていることを報告してきた。さらに細菌成分に反応してマスト細胞が活性化される事を見出し、そのアレルギー性疾患への関与が示唆されている。IgE の系と非 IgE の系におけるマスト細胞活性化の分子メカニズムを明らかにし、シジュウムなど生薬抽出物質によるアレルギー抑制機構の詳細を解明し、さらに強力な抑制物質の創出、探索を目的とする。

B.方法

1. 高親和性 IgE レセプター(FcεRI)を介したマスト細胞活性化における FcεRIβ鎖の役割
β鎖は FcεRI を介するシグナルを増強する事が知られており、C 末側の細胞内領域に

ITAM を持つ。β鎖ノックアウトマウスの骨髓細胞からマスト細胞(BMMC)を誘導し、変異型 ITAM を有するβ鎖を導入して、ITAM内の3つのチロシン残基の役割を検討する。さらに変異型ITAMを導入したトランスジェニックマウスを作製し、in vivo におけるアレルギー反応への影響を検討する。

2. マスト細胞上の Toll-like-receptor を介するマスト細胞の活性化

マウスの BMMC 上 TLRs 発現を、mRNA、蛋白レベルで確認し、TLRs を介したマスト細胞の活性化を Ca²⁺動員、サイトカイン産生、脱顆粒などの側面から検討する。TLRs ノックアウトマウスを用いてさらに TLRs のマスト細胞活性化における役割を検討する。

C.結果

1. FcεRIβ鎖の役割

β 鎖 ITAM モチーフ内には3個のチロシン残基(Tyr)が存在するが、この3つの Tyr をすべてフェニルアラニン(Phe)に置換すると、野生型(W型) β 鎖導入 BMMC に比して、FceRI を介したマスト細胞活性化が顕著に低下する。則ち、Ca²⁺流入の減少、ヒスタミン遊離の減少が起こるが、TNF- α ,IL-6 などの炎症性サイトカインの産生、放出は W 型に比して増強する。さらに3つの Tyr のうち中央の Tyr を Phe に置換すると、サイトカイン産生が増強する事を明らかにした。一方で β 鎖 ITAM 変異マウスを作製した。

2. TLRs を介したマスト細胞の活性化

マウスのマスト細胞には TLR-1,2,4 が発現していることを、mRNA、蛋白レベルで証明した。大腸菌などのグラム陰性菌の細胞壁成分である LPS はマスト細胞の TLR4 に結合し、TNF- α ,IL-1 β ,IL-6,IL-13 などのサイトカイン産生、放出を惹起するが、脱顆粒は誘導しないことを明らかにした。一方、TLR2 は、黄色ブドウ球菌などのグラム陽性菌の菌体成分であるペプチドグリカン(PGN)を結合する。PGN でマウスマスト細胞を刺激すると、サイトカイン産生、放出並びに脱顆粒が惹起されることを明らかにした。さらにマスト細胞の TLR4 の役割を *in vivo* で解析するために、マスト細胞を欠損する W/W⁻ マウスにマスト細胞を移入し、大腸菌による腹膜炎を惹起した。野生型マスト細胞を W/W⁻ マウスの腹腔に移入すると、マウスは腹膜炎を生き延びるが、TLR4 を欠損するマスト細胞の移入では敗血症を起こして死亡する。TLR4 陽性マスト細胞が大腸菌に反応して TNF- α を産生し、

好中球を動員して感染防御のフロントラインを構築することが明らかになった。

D.結論ならびに考察

FceRI β 鎖は FceRI を介するシグナルを約10倍増強し、マスト細胞の IgE 刺激に対する感受性を高める重要分子であり、“アトピー遺伝子”の1つとも考えられている。 β 鎖 ITAM に変異を導入する今回の実験で、ITAM 内のチロシン残基の1つが、サイトカイン産生の抑制に関係していることを突き止めた。マスト細胞活性化を抑制する戦略の中で、この発見の意義は大きい。また、最近のトピックスとしてマスト細胞の自然免疫(Innate Immunity)における役割が注目されている。TLR2 を介してマスト細胞が脱顆粒し、サイトカイン産生を起こすことの発見は、例えばアトピー性皮膚炎の病変局所などで、黄色ブドウ球菌によりマスト細胞が活性化されていることを示す重要な知見である。これらの系に対するシジュウムなどの生薬抽出物の影響を次年度以降検討する。FceRI を介するマスト細胞の活性化や FceRI 発現に対する生薬抽出物の影響も検討していく。

論文発表

- 1) Wakahara S, Fujii Y, Nakao T, Tsuritani K, Hara T, Saito H, Ra C. GENE EXPRESSION PROFILES FOR FcepsilonRI, CYTOKINES AND CHEMOKINES UPON FcepsilonRI ACTIVATION IN HUMAN CULTURED MAST CELLS DERIVED FROM PERIPHERAL BLOOD Cytokine 16(4): 143-52 2001
- 2) Kobayashi N, Suzuki Y, Tsuge T, Okumura K, Ra C, Tomino Y. FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells Am J Physiol Renal Physiol. 282(2): 358-65 2002
- 3) Miyamasu M, Sekiya T, Ohta K, Ra C, Yoshie O, Yamamoto K, Tsuchiya N, Tokunaga K, Hirai K Variations in the human CC chemokine eotaxin gene Genes Immun 461-3 2(8) 2001
- 4) Goto T, Soma Y, Ra C, Kawa Y, Kubota Y, Mizoguchi M. Enhanced expression of the high-affinity receptor for IgE (Fc(epsilon)RI) associated with decreased numbers of Langerhans cells in the lesional epidermis of atopic dermatitis J Dermatol Sci 156-61 27(3) 2001
- 5) Uchida T, Nakao A, Nakano N, Kuramasu A, Saito H, Okumura K, Ra C, Ogawa H Identification of Nash1, a novel protein containing a nuclear localization signal, a sterile alpha motif, and an SH3 domain preferentially expressed in mast cells Biochem Biophys Res Commun 137-41 288(1) 2001
- 6) Hisada Y, Sugaya T, Tanaka S, Suzuki Y, Ra C, Kimura K, Fukamizu A An essential role of angiotensin II receptor type 1a in recipient kidney, not in transplanted peripheral blood leukocytes, in progressive immune-mediated renal injury Lab Invest 1243-51 81(9) 2001
- 7) Nakajima T, Matsumoto K, Suto H, Tanaka K, Ebisawa M, Tomita H, Yuki K, Katsunuma T, Akasawa A, Hashida R, Sugita Y, Ogawa H, Ra C, Saito H Gene expression screening of human mast cells and eosinophils using high-density oligonucleotide probe arrays: abundant expression of major basic protein in mast cells. Blood 1127-34 98(4) 2001
- 8) Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4 J Immunol 2250-6 167(4) 2001
- 9) Takai T, Takahashi K, Akagawa-Chihara M, Fukada M, Yuuki T, Shibuya I, Okumura K, Ra C, Yokota T, Okumura Y Production of humanized antibody against human high-affinity IgE receptor in a serum-free culture of CHO cells, and purification of the Fab fragments Biosci Biotechnol Biochem 1082-9 65(5) 2001

- 10) Yamaguchi M, Hirai K, Komiya A, Miyamasu M, Furumoto Y, Teshima R, Ohta K, Morita Y, Galli SJ, Ra C, Yamamoto K Regulation of mouse mast cell surface Fc epsilon RI expression by dexamethasone *Int Immunol* 843-51 13(7) 2001
- 11) Nishiyama C, Hasegawa M, Nishiyama M, Takahashi K, Yokota T, Okumura K, Ra C Cloning of full-length genomic DNA encoding human Fc epsilon RI alpha-chain and its transcriptional regulation *Biochem Biophys Res Commun* 1056-64 284(4) 2001
- 12) Iikura M, Yamaguchi M, Hirai K, Miyamasu M, Yamada H, Nakajima T, Fujisawa T, Ra C, Morita Y, Yamamoto K Regulation of surface Fc epsilon RI expression on human eosinophils by IL-4 and IgE *Int Arch Allergy Immunol* 470-7 124(4) 2001
- Gounni AS, Lamkhioued B, Koussih L, Ra C, Renzi PM, Hamid Q Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma *FASEB J* 940-9 5(6) 2001
- 13) Tsuge T, Shimokawa T, Horikoshi S, Tomino Y, Ra C Polymorphism in promoter region of Fc alpha receptor gene in patients with IgA nephropathy *Hum Genet* 128-33 108(2) 2001
- 14) Takai T, Okumura K, Ra C Direct expression of the extracellular portion of human Fc epsilon RI alpha chain as inclusion bodies in *Escherichia coli* *Biosci Biotechnol Biochem* 65(1) 79-85 2001
- 15) Takahashi K, Nishiyama C, Okumura K, Ra C, Ohtake Y, Yokota T. Molecular cloning of rat USF2 cDNA and characterization of splicing variants *Biosci Biotechnol Biochem* 65(1) 56-62 2001
- 16) Takahashi K, Nishiyama C, Nishiyama M, Okumura K, Ra C, Ohtake Y, Yokota T A complex composed of USF1 and USF2 activates the human Fc epsilon RI alpha chain expression via a CAGCTG element in the first intron *Eur J Immunol* 31(2) 590-9 2001
- 17) Aioi A, Tonogaito H, Suto H, Hamada K, Ra CR, Ogawa H, Maibach H, Matsuda H Impairment of skin barrier function in NC/Nga Tnd mice as a possible model for atopic dermatitis *Br J Dermatol* 144(1) 12-8 2001
- 18) Kanamaru Y, Nakao A, Mamura M, Suzuki Y, Shirato I, Okumura K, Tomino Y, Ra C Blockade of TGF-beta signaling in T cells prevents the development of experimental glomerulonephritis *J Immunol* 166(4) 2818-23 2001
- 19) Iida M, Matsumoto K, Tomita H, Nakajima T, Akasawa A, Ohtani NY, Yoshida NL, Matsui K, Nakada A, Sugita Y, Shimizu Y, Wakahara S, Nakao T, Fujii Y, Ra C, Saito H Selective down-regulation of high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI) alpha-chain messenger

RNA among transcriptome in cord blood-derived versus adult peripheral blood-derived cultured human mast cells. Blood 97(4) 1016-22 2001

19) Takai T, Okumura K, Ra C, Yokota T, Okumura Y Expression of humanized Fab fragments that recognize the IgE-binding domain of human Fc(epsilon)RIalpha in COS and CHO cells J Biochem 129(1) 5-12 2001

学会発表

1) Ushio Hiroko, Supajatura Volaluck, Nakao Atsushi, Okumura Ko, Ra Chisei, Ogawa Hideaki The 12th Japan \times Korea Joint Meeting of Dermatology Hotel Nikko Tokyo 2001/11/8-9

2) Yamaguchi Masao, Iikura Motoyasu, Hirai Koichi, Ra Chisei, Galli Stephen J, Yamamoto Hiroko The 12th Japan \times Korea Joint Meeting of Dermatology Hotel Nikko Tokyo 2001/11/8-9

3) Chisei Ra 4th International Workshop on signal transduction in the activation and development of mast cells and basophils Bethesda, Maryland,USA 2001/11/26-30

4) T. Yoshimaru, Y. Suzuki, A. Nakao, M. Yamaki, C. Ra, K. Shimizu 4th International Workshop on signal transduction in the activation and development of mast cells and basophils Bethesda, Maryland,USA

2001/11/26-30

5) Y. Suzuki, T. Yoshimaru, M. Yamaki, C. Ra, K. Shimizu 4th International Workshop on signal transduction in the activation and development of mast cells and basophils Bethesda, Maryland,USA 2001/11/26-30

6) V. Supajatura, H. Ushio, K. Okumura, C. Ra, S. Akira, H. Ogawa 4th International Workshop on signal transduction in the activation and development of mast cells and basophils Bethesda, Maryland,USA 2001/11/26-30

7) V. Supajatura, H. Ushio, K. Okumura, C. Ra, S. Akira, H. Ogawa 4th International Workshop on signal transduction in the activation and development of mast cells and basophils Bethesda, Maryland,USA 2001/11/26-30

8) V. Supajatura, H. Ushio, A. Wada, K. Yahiro, P. Warnnissorn, K. Okumura, H. Ogawa, T. Hirayama, C. Ra 4th International Workshop on signal transduction in the activation and development of mast cells and basophils Bethesda, Maryland,USA 2001/11/26-30

9) 羅 智靖 日本気管食道科学会 都市センターホテル 東京都 2002/02/2-3

羅 智靖 日本学術会議 免疫・感染症連絡委員会シンポジウム 東京都港区六本木 日本学

術会議 2001/11/15

10) 羅 智靖 第 38 回日本小児アレルギー学会
北九州国際会議場 2001/10/6-7

11) 羅 智靖 第 41 回日本呼吸器学会総会 東
京国際フォーラム 2001/4/4-6

羅 智靖 科学技術振興事業団(JST)

戦略的基礎研究推進事業(CREST)「生体防御の
メカニズム」平成 7 年度採択課題終了シンポジウ
ム お茶の水スクエア

A 館 2001/6/7

12) 羅 智靖 第 19 回臨床検査薬教育セミナー
日本薬学会 長井記念ホール
2001/7/5

13) 中尾篤人、金丸裕、鈴木竜洋、奥村康、小
川秀興、羅智靖、松倉聡、出原賢治 第 51 回日
本アレルギー学会総会 福岡シーホークホテル
2001/10/29-31

14) 住吉孝二、中尾篤人、牛尾博子、光石幸市、
奥村康、坪井良治、羅智靖、小川秀興 第 51 回
日本アレルギー学会総会 福岡シーホークホテ
ル 2001/10/29-31

15) 小宮明子、山口正雄、平井浩一、飯倉元保、
長瀬洋之、山田浩和、宮増美里、太田健、森田
寛、羅 智靖、山本一彦 第 51 回日本アレルギー
学会総会 福岡シーホ
ークホテル 2001/10/29-31

16) 齋藤博久、中島敏治、松本健治、海老澤元
宏、須藤一、羅智靖 第 51 回日本アレルギー学
会総会 福岡シーホークホテル 2001/10/29-31

17) .Supajatura, H. Ushio, A. Nakao, K.
Okumura, C. Ra, H. Ogawa 第 51 回日本アレル
ギー学会総会 福岡シーホークホテル
2001/10/29-31

18) 舟木俊成、海老原伸行、松田浩珍、金井淳、
羅智靖、奥村康 第 51 回日本アレルギー学会総
会 福岡シーホークホテル 2001/10/29-31

19) 板東由紀、川本恵子、松本万里、清水章、
羅智靖 第 51 回日本アレルギー学会総会 福岡
シーホークホテル 2001/10/29-31

20) 須藤一、藤田毅、光石幸市、内田隆文、平
喜也子、住吉孝二、羅智靖、小川秀興 第 51 回
日本アレルギー学会総会 福岡シーホークホテ
ル 2001/10/29-31

21) 長谷川俊文、市山高志、松原和代、古川漸、
羅智靖 第 51 回日本アレルギー学会総会 福岡
シーホークホテル 2001/10/29-31

22) 古川漸、奥村康、小川秀興、羅智靖
第 51 回日本アレルギー学会総会 福岡シーホ
ークホテル 2001/10/29-31

秋澤有四郎、西山千春、長谷川真成、奥村康、
小川秀興、羅智靖 第 51 回日本アレルギー学会
総会 福岡シーホークホテル 2001/10/29-31

23) 西山千春、長谷川真成、秋澤有四郎、奥村
康、小川秀興、羅智靖 第 51 回日本アレルギー
学会総会 福岡シーホークホテル
2001/10/29-31

24) 十合晋作、下川敏文、熱田了、奥村康、小
川秀興、福地義之助、羅智靖 第 51 回日本アレル
ギー学会総会 福岡シーホークホテル
2001/10/29-31

25) 関谷剛、宮増美里、美江 修、土屋尚之、徳
永勝士、羅智靖、山本一彦、平井浩一 第 51 回
日本アレルギー学会総会 福岡シーホークホテ
ル 2001/10/29-31

26) 内田隆文、須藤一、倉増敦朗、奥村康、羅
智靖、小川秀興 第 51 回日本アレルギー学会総

会 福岡シーホークホテル 2001/10/29-31

27) 羅 智靖 第 31 回日本免疫学会総会 大阪国際会議場 2001/12/11-13

西山千春、長谷川真成、高橋恭子、横田豊一、奥村康、小川秀興、羅智靖 第 31 回日本免疫学会総会 大阪国際会議場 2001/12/11-13

28) 前田啓子、戸倉智子、西山千春、奥村康、小川秀興、羅智靖 第 31 回日本免疫学会総会 大阪国際会議場 2001/12/11-13

29) 長谷川真成、西山千春、秋澤有四郎、古川漸、奥村康、小川秀興、羅智靖 第 31 回日本免疫学会総会 大阪国際会議場 2001/12/11-13

30) 鈴木良弘、吉丸哲郎、山本光男、羅智靖、清水一史 第 31 回日本免疫学会総会 大阪国際会議場 2001/12/11-13

吉丸哲郎、鈴木良弘、山本光男、羅智靖、清水一史 第 31 回日本免疫学会総会 大阪国際会議場 2001/12/11-13

31) 中尾篤人、松倉聡、出原賢治、奥村康、小川秀興、羅智靖 第 31 回日本免疫学会総会 大阪国際会議場 2001/12/11-13

32) 関谷剛、宮増美里、美江 修、土屋尚之、徳永勝士、羅智靖、松島綱治、山本一彦、平井浩一 第 31 回日本免疫学会総会 大阪国際会議

場 2001/12/11-13

33) 修岩、中村和裕、阿部雅明、大辻希樹、下川敏文、羅智靖、広瀬幸子、白井俊一 第 31 回日本免疫学会総会 大阪国際会議場 2001/12/11-13

34) 十合晋作、下川敏文、奥村康、福地義之助、羅智靖 第 31 回日本免疫学会総会 大阪国際会議場 2001/12/11-13

35) V.Supajatura, H. Ushio, A. Nakao, K. Okumura, C. Ra, H. Ogawa 第 31 回日本免疫学会総会 大阪国際会議場 2001/12/11-13

36) Y.Kanamaru, A. Nakao, K. Okumura, Y. Tomino, H. Ogawa, C. Ra 第 31 回日本免疫学会総会 大阪国際会議場 2001/12/11-13

厚生科学研究費補助金（感覚器障害及び免疫・アレルギー等研究事業）
分担研究報告書

アレルギーを抑制する新規天然薬物の開発に関する研究

分担研究者 北中 進 日本大学薬学部教授

研究要旨 天然薬物 アカメガシワ果実、ホソバキシソウ、エゾムラサキツツジ、シジュウムの4種を研究対象とし、マスト細胞或いはマクロファージを用い、活性成分の検討を行った。アカメガシワ果実からは、フロログルシノール誘導体を単離し、一酸化窒素産生抑制作用とその作用機序について検討した。エゾムラサキツツジからは、10種の新規化合物を含む12種のオルシノール誘導体を単離し、強いヒスタミン遊離抑制活性を明らかにした。ホソバキシソウからは、5種の新規ポリアセチレン配糖体を単離構造決定した。これらの化合物は一酸化窒素産生抑制活性とヒスタミン遊離抑制活性を示した。シジュウムからは、2種のエラグ酸誘導体を単離し、ヒスタミン遊離抑制活性を検討した。

研究協力者 早川 智 日本大学医学部 講師 瀬尾尚弘 浜松医科大学 助手
石井里枝 埼玉衛生研究所 主任

A. 研究目的

民族薬には、各種皮膚疾患や喘息などに用いられている天然薬物が多々ある。これらの薬物は、アトピー性皮膚炎、花粉症、喘息などのアレルギー性疾患の治療、アレルギー症状の緩和や予防など医薬品のシードとして、或いは機能性食品などに応用される資源として重要である。これらの天然資源やその有効成分の解明を行うとともに、これらの作用機序を免疫・アレルギー、炎症等の観点から解析しこれらの病気の予防や治療につながる医薬品の開発や安全な健康食品など現実に即した天然薬物の開発について検討する。

本年度は、アカメガシワ、ホソバキシソウ、エゾムラサキツツジおよびシジュウムの4種の生薬について、マスト細胞やマクロファージを用い、活性成分の検討を行った。

B. 研究方法

- (1) アカメガシワ果実 (I)、ホソバキシソウの全草 (II)、エゾムラサキツツジの地上部 (III) 及びシジュウム (IV) の抽出及び活性成分の単離及び構造決定 ---- アルコール、アセトン抽出物等を用い抽出し、水に懸濁後、ヘキサン、ジエチルエーテル、酢酸エチル、*n*-ブタノールで分配抽出した。活性画分を各種カラムクロマトグラフィーにかけ化合物を単離した。また、構造決定、同定は、NMR、MS、UV、IR等のスペクトル解析によりを行った。
- (2) NO産生抑制作用とiNOS蛋白の抽出及び定量 ---- マクロファージに株化細胞RAW264.7細胞を用い、IFN- γ (10U/ml) 及びLPS (100ng/ml) を添加し培養後、上清の

NO₂をGriess法で定量した。また、iNOS蛋白質の測定はSDS-PAGEに供し求めた。

(3) iNOS酵素活性阻害作用 ---- RAW264.7をIFN- γ 及びLPS共存下培養し、iNOSを発現後、L-arginine及びcarboxy-PTIOを加え培養し、NO₂量を定量した。また、iNOSを抽出しL-[U-¹⁴C] arginineからL-[U-¹⁴C] citrullineへの変換について検討した。

(4) iNOS mRNAの定量 ---- RAW264.7細胞をIFN- γ 及びLPS共存下、サンプルを添加し培養後、RNAを抽出してRT-PCRに供した。

(5) ヒスタミン遊離抑制試験

ヒスタミン遊離抑制試験は、ラット腹腔マスト細胞を用い、Compound 48/80或いはIgEにより刺激し、ポストカラム HPLC法で定量し、阻害率を算出した。

C. 研究結果

(1) アカメガシワ ---- 果皮の80%アセトン抽出エキス及び7種のphloroglucinol誘導体を活性成分として単離同定した。これらの誘導体の中でisomallotochromanolが最も強い抑制作用を示した (IC₅₀: 10.7 μ M)。作用機序はiNOS mRNAの発現を抑制によるNO合成酵素 (iNOS) 誘導阻害と、iNOSの酵素活性に対する阻害作用によりNO抑制作用が発現することが明らかとなった。

(2) エゾムラサキツツジ ---- 12種の化合物 (II-1~II-12) を単離した。なお、化合物II-1~II-10は新規オルシノール誘導体と構造決定した。このうち、化合物II-3、II-6~10にヒスタミン遊離抑制活性が認められたが、特に化合物II-7 (IC₅₀: 1.64 μ M)、II-8 (4.39 μ M)、II-10 (1.32 μ M) に強い活性が認められた。

(3) ホソバキシソウ --- l-ブタノールエキスより活性成分III-1~III-5を単離した。各種スペクトル解析から5種の新規ポリアセチレン配糖体と決定した。これらの化合物のヒスタミン遊離抑制活性はIII-1~III-5の化合物において0.072-0.186 mMで活性が認めら

れた。また、マクロファージのNO産性能におよぼす効果について化合物2を除くIII-1、III-3、III-4及びIII-5で0.077-0.116 mMの活性が認められた。

(4) シジュウム --- 樹皮抽出物のヒスタミン遊離抑制活性画分より、3-O-methyl-ellagic acid (IV-1) と3,3'-O-dimethyl-ellagic acid (IV-2) を単離した。

D. 考察

1) フロログルシノール誘導体に、NO産生抑制活性が認められたことは、初めての例である。

2) オルシノール誘導体にヒスタミン遊離抑制活性認められたことは初めての例である。

3) ポリアセチレン配糖体にヒスタミン遊離抑制活性及びNO産生が認められことは初めての例である。

4) 中国産エゾムラサキツツジは中国では、鎮咳・去痰・気管支炎などに、また、ホソバキシソウは中国において、解熱、抗炎症、リウマチ治療に用いられており、機能性食品などとしてアレルギー疾患の予防や症状の改善への応用に期待がもたれる。

E. 結論

上記の天然薬物は、アレルギー性疾患等に対して利用できる天然薬物として有望であり、今後更に作用機序、安全性、品質などに関する研究が必要と考える。フロログルシノール誘導体、オルシノール誘導体、ポリアセチレン配糖体は抗アレルギー剤開発のリード化合物として注目される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kato, K., Yamashita, S., Kitanaka, S., and Toyoshima, S., Effect of Gallic Acid

Derivatives on Secretion of Th1 Cytokines and Th2 Cytokines from Anti CD3-Stimulated Spleen Cells, *Yakugaku Zasshi*, 121(6), 451-457 (2001) .

- 2) Wang, N., Yao, Xinheng, Ishii, R. and Kitanaka, S., Antiallergic Agent from Natural Sources.3. Structures and Inhibitory Effects on Nitric Oxide Production and Histamine Release of Five Novel Polyacetylene Glucosides from *Bidens parviflora* Willd., *Chem. Pharm. Bull.*, 49(8), 938-942(2001).
- 3) Rie Ishii, Masakazu Horie, Koichi Saito, Munehisa Arisawa, Susumu Kitanaka, Inhibitory effects of phloroglucinol derivatives from *Malilus japonicus* on nitric oxide production by a murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, activated by lipopolysaccharide and interferon- γ , *Biochimica et Biophysica Acta* 1568, 74-82 (2001).

2. 学会発表

1. 岩田直樹、王乃利、姚新生、北中進、中国遼寧省産*Rhododendron dauricum* L.の抗アレルギー成分の研究、第44回日本薬学会関東支部大会講演要旨集、p 58. (2000)。
2. 岩田直樹、王乃利、姚新生、北中進、中国遼寧省産*Rhododendron dauricum* L.の抗アレルギー成分の研究(2)、日本薬学会第121年会(札幌)講演要旨集2、p146(2001)。
3. 岩田直樹、王乃利、姚新生、北中進、中国遼寧省産*Rhododendron dauricum*

L.の抗アレルギー成分の研究(3)、日本生薬学会48年会(金沢)講演要旨集、p 200 (2001)。

4. 王乃利、姚新生、石井理枝、北中進、*Bidens parviflora* Willd.の抗アレルギー成分について(4) 日本薬学会121回年会(札幌)講演要旨2、p.145 (2001)。
5. 王王玉、王乃利、姚新生、石井理枝、北中進、*Bidens parviflora* Willd.の抗アレルギー成分について(5)、日本薬学会121回年会(札幌)講演要旨2、p145 (2001)。
6. 王王玉、北中進、*Bidens parviflora* Willd.の抗アレルギー成分について(6) 日本生薬学会大48回年会(金沢)講演要旨、p229 (2001)。
7. 王王玉、北中進、*Bidens parviflora* Willd.の抗アレルギー成分について(7) 日本薬学会122回年会(千葉)講演要旨2、(2002) 予定。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 新規ポリアセチレン配糖体及びそれを含有する組成物、特開2001-233888。
- 2) 新規フラボノイド配糖体及びそれを含有する組成物、特開2001-233889。
- 3) 新規なケイヒ酸誘導体並びにこれを用いた組成物、抗アレルギー剤及び抗炎症剤、特願2001-267814。
- 4) 新規なオルシノール誘導体及びこれを用いた組成物、抗アレルギー剤、特願2001-267815。

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	誌名	巻号	ページ	年
Wakahara S, Fujii Y, Nakao T, Tsuritani K, Hara T, Saito H, Ra C.	GENE EXPRESSION PROFILES FOR FcepsilonRI, CYTOKINES AND CHEMOKINES UPON FcepsilonRI ACTIVATION IN HUMAN CULTURED MAST CELLS DERIVED FROM PERIPHERAL BLOOD	Cytokine	16(4):	143-52	2001
Kobayashi N, Suzuki Y, Tsuge T, Okumura K, Ra C, Tomino Y.	FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells	Am J Physiol Renal Physiol.	282(2):	358-65	2002
Miyamasu M, Sekiya T, Ohta K, Ra C, Yoshie O, Yamamoto K, Tsuchiya N, Tokunaga K, Hirai K	Variations in the human CC chemokine eotaxin gene	Genes Immun	461-3	2(8)	2001
Goto T, Soma Y, Ra C, Kawa Y, Kubota Y, Mizoguchi M.	Enhanced expression of the high-affinity receptor for IgE (Fc(epsilon)RI) associated with decreased numbers of Langerhans cells in the lesional epidermis of atopic dermatitis	J Dermatol Sci	156-61	27(3)	2001
Uchida T, Nakao A, Nakano N, Kuramasu A, Saito H, Okumura K, Ra C, Ogawa H	Identification of Nash1, a novel protein containing a nuclear localization signal, a sterile alpha motif, and an SH3 domain preferentially expressed in mast cells	Biochem Biophys Res Commun	137-41	288(1)	2001

Hisada Y, Sugaya T, Tanaka S, Suzuki Y, Ra C, Kimura K, Fukamizu A	An essential role of angiotensin II receptor type 1a in recipient kidney, not in transplanted peripheral blood leukocytes, in progressive immune-mediated renal injury	Lab Invest	1243-51	81(9)	2001
Nakajima T, Matsumoto K, Suto H, Tanaka K, Ebisawa M, Tomita H, Yuki K, Katsunuma T, Akasawa A, Hashida R, Sugita Y, Ogawa H, Ra C, Saito H	Gene expression screening of human mast cells and eosinophils using high-density oligonucleotide probe arrays: abundant expression of major basic protein in mast cells.	Blood	1127-34	98(4)	2001
Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H	Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4	J Immunol	2250-6	167(4)	2001
Takai T, Takahashi K, Akagawa-Chihara M, Fukada M, Yuuki T, Shibuya I, Okumura K, Ra C, Yokota T, Okumura Y	Production of humanized antibody against human high-affinity IgE receptor in a serum-free culture of CHO cells, and purification of the Fab fragments	Biosci Biotechnol Biochem	1082-9	65(5)	2001

Yamaguchi M, Hirai K, Komiya A, Miyamasu M, Furumoto Y, Teshima R, Ohta K, Morita Y, Galli SJ, Ra C, Yamamoto K	Regulation of mouse mast cell surface Fc epsilon RI expression by dexamethasone	Int Immunol	843-51	13(7)	2001
Nishiyama C, Hasegawa M, Nishiyama M, Takahashi K, Yokota T, Okumura K, Ra C	Cloning of full-length genomic DNA encoding human FcepsilonRI alpha-chain and its transcriptional regulation	Biochem Biophys Res Commun	1056-64	284(4)	2001
Iikura M, Yamaguchi M, Hirai K, Miyamasu M, Yamada H, Nakajima T, Fujisawa T, Ra C, Morita Y, Yamamoto K	Regulation of surface FcepsilonRI expression on human eosinophils by IL-4 and IgE	Int Arch Allergy Immunol	470-7	124(4)	2001
Gounni AS, Lamkhioued B, Koussih L, Ra C, Renzi PM, Hamid Q	Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma	FASEB J	940-9	5(6)	2001
Tsuge T, Shimokawa T, Horikoshi S, Tomino Y, Ra C	Polymorphism in promoter region of Fcalpha receptor gene in patients with IgA nephropathy	Hum Genet	128-33	108(2)	2001