

厚生労働科学研究事業補助金

免疫・アレルギー研究事業

アレルギー疾患を抑制する新規天然薬物の開発に関する研究

平成14年度総括・分担研究報告書

平成15(2003)年3月

主任責任者 鈴木 五 男

目 次

I. 総括研究報告	
アレルギー疾患を抑制する新規天然薬物の開発に関する研究 鈴木五男	… 7
II. 分担研究報告	
1. 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 鈴木政雄	… 17
2. アレルギー疾患を抑制する新規天然薬物の開発に関する研究 北中 進	… 29
3. マスト細胞の活性化機構並びに活性抑制物質に関する研究 羅 智靖	… 47
4. 天然植物シジュウムの搔痒に対する有用性	… 51
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	… 57
IV. 研究成果の刊行物・別冊	… 61

I. 総括研究報告

アレルギー疾患を抑制する新規天然薬物の開発に関する研究

主任研究者 鈴木五男 東邦大学医学部第二小児科助教授

研究要旨：

本研究の目的は抗アレルギー作用を有する天然薬物の開発にある。そこで本年度は以下4つのテーマを作成し、検討した。

①データファイルの作成により同じ科には構造の類似した有効成分の一群があることが多く、それらの薬効を比較することで新たな天然医薬品の開発に必要な知見が見つかることが期待でき、このデータベースは、民間薬を販売する薬剤師が必要な情報を患者へ提供するための情報源としても有用になると考える。

②天然薬物 シジュウム、アカメガシワ、クスノハガシワ、ホップ、ホソバキシソウ、の5種を研究対象とし、成分の単離と成分及び生薬の活性評価を行った。シジュウム葉は、Tr1細胞誘導抑制効果が認められた。また、強い抗 HIV 活性を有することが明らかになり多用な作用が認められた。アカメガシワ、クスノハガシワ、ホップより単離したフロログルシノール誘導体は、ヒスタミン遊離抑制作用、NO 産生抑制作用、COX-2 遊離抑制作用を示した。また、クスノハガシワ及びホップから単離したカルコン誘導体は NO 産生抑制活性を示し、これらは iNOS mRNA の発現誘導を阻害し炎症性サイトカイン(COX-2、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6)の遺伝子発現誘導を阻害した。ホソバキシソウから 25 種フラボノイド配糖体を単離しヒスタミン遊離抑制活性及び NO 産生抑制活性を認め、以上これらの薬物は抗アレルギー作用などがあることが判明した。

③アレルギー炎症の局所では IgE-Fc RI-マスト細胞軸を巡るアレルギー増悪回路が形成され、炎症のコンダクターとしてのマスト細胞が中心的な、しかも多彩な役割を果すことを明らかにして来た。さらに自然免疫を担う細胞のひとつとして、マスト細胞は細菌成分に反応して活性化されることを見出し、そのアレルギー疾患や慢性炎症への関与を明らかにした。今後この系を用い生薬抽出物質などのアレルギー抑制物質の作用機構を検討し、抑制物質の探索、創出を模索したい。

④臨床的にはシジュウムとヨモギに対する掻痒性疾患に対する有効性を検討した結果、有意にシジュウムの有効性が認められた。今後さらに、抽出液の活性物質の有効性について検討を勧めたい。

分担研究者

北中 進 日本大学薬学部教授
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・アレルギー講座教授
鈴木政雄 東京理科大薬学部製薬学科
講師

研究目的

抗アレルギー、抗炎症作用が報告されている天然薬物の現状として昨年継続し植物中の生物活性成分のデータベース化を進めると共に、薬物活性と構造との相関モデルの作成についての検討やアンケート調査した抗炎症・抗アレルギー作用

があるといわれる植物由来の民間薬等の薬局における販売状況と薬剤師による評価を解析する。

基礎的な検討として、天然薬物のシジュウム、ホップ、アカメガシワ、クスノハガシワおよびホソバキシソウの5種の生薬について活性成分の解明と作用機序について検討した。さらに生薬抽出物質などのアレルギー抑制物質の作用機構を検討する目的で、アレルギー炎症の局所で中心的役割を演ずると考えられるマスト細胞の IgE の系と非 IgE 系の活性化の分子メカニズムを先ず解明する。また臨床的な検討として抗アレルギー作用のあるといわれる天然植物(シジュウム、ヨモギ)の掻痒性疾患についての有効性をみた。

方法

抗炎症・抗アレルギー作用を有する活性成分は SciFinder Scholar 及び Chem. Abstr, Medline を併用し、原著論文から登録した。民間療法、「牧野和漢薬草大図鑑」に加え、本年度は「漢方と民間薬百科」等を含めた書籍や健康雑誌からのデータを一部蓄積し、検索した成分の構造と活性相関のための構造モデルの作成を試みる。さらに民間薬の疫学的調査のアンケート調査(平成14年3月末まで)の解析を行い、解析結果を基に、具体的な植物の利用、疾病への民間療法適用についての意識調査を都内の薬局に対してアンケート調査を行う。

2) (1) ホップ、ホソバキシソウ、アカメガシワ果実、クスノハガシワ、及びシジュウムの抽出成分及び活性成分の単離及び構造決定: アルコール、アセトン、酢酸エチル等で抽出した。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。得られた化合物の構造決定及び同定は、NMR、MS、UV、IR等のスペクトル解析を用いて行った。

(2) NO 産生抑制効果…マクロファージ様株化細胞 RAW 264.7 細胞を用い、IFN- γ /LPS を添加し、培養後、上清の NO₂ 量を Griess 法で定量した。iNOS の蛋白量の変動は SDS-PAGE に供し求めた。

(3) 各種 mRNA に対する影響…RAW 264.7 細胞を用い、IFN- γ /LPS を添加し、培養後、RNA を抽出して RT-PCR により評価した。

(4) ヒスタミン遊離抑制効果…ラット腹腔マスト細胞を用い、Compound 48/80 により刺激し、ポストカラム HPLC 法で定量した。

3) (1) 高親和性 IgE レセプター (Fc ϵ RI) を介したマスト細胞活性化における Fc ϵ RI α 鎖の役割 β 鎖はシグナルを増幅しかつ α 鎖の成熟化と膜への輸送を促進することによってアレルギー反応の強度を決定する大きな要因になっている。ヒトマスト細胞株 KU812 を宿主細胞として用いて、 α 鎖遺伝子断片にルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポーターアッセイにより、Fc ϵ RI α 鎖の全遺伝子領域から α 鎖遺伝子発現を調節するシスエレメントの探索を行なった。

(2) マスト細胞に発現する TLR4 を介したシグナル伝達ラットマスト細胞株、RBL2H3 細胞の TLR4 発現を RT-PCR 法で解析した。LPS による TLR4 を介した NF- κ B の活性化を、NF- κ B のレポーター遺伝子を用いてルシフェラーゼ法で解析した。

4) 東邦大学第二小児科及び関連病院に受診のアトピー性皮膚炎 38 例(軽症 18 例、中等症 20 例)、老人性皮膚搔痒症 12 例を 2 群に分け、シジュウムローション (A 液) とシジュウムを含まないローション (B 液)、またシジュウムローション (A 液) と市販用ヨモギローション (C 液) を 1 週間の観察期間の後、A 液を 2 週間、または B (C) 液を 2 週間使用し、1 週間の観察後逆の内容のローションを使用し、その搔痒、日常生活への効果を比較する。塗布回数は 1 日 3-4 回とした。痒みおよび日常生活の判定は 10 段階のスケールを用いた。

結果

1)

① データベース化に関する研究: 蓄積されたデータベースを解析した結果は、以下の通りであった。植物活性成分は、成分数 255、科名は 40 に増加したが、出現上位の科はキク科、ショウガ科、マメ科、ウリ科、シソ科など、昨年同様であった。作用機序については非常に多岐にわたり、選択可能な登録項目が 30 種以上になり、データベース構造改良の必要性を生じた。主な機序としては、シクロオキシゲナーゼ阻害、リポオキシゲナーゼ阻害、ケミカルメディエーター遊離阻害であった。民間療法に出現する基原植物数は 60 種類に上り、牧野和漢薬草大図鑑の調査はほぼ終了した。なお、市販民間薬、治療実績データに関しては、データベースの構成上、試験データを入力している程度である。市販医薬品の 3 次元構造と植物成分の構造との間に相関が見られ、その模式図を作成した。

② 薬剤師による評価の解析: 対象となる民間薬の販売は、両地域とも約 30% 薬局で行っていたが、その植物種は極めて少数であった。購入者の多くは、壮年層であり、医療薬の副作用を心配する、妻・母親が購入者になることが多いためか、女性であった。更に、取扱商品数、販売量とも都市部に多く、メディアの影響と考えられた。民間療法の薬剤師の評価では、甜茶については一定の評価を得ており、又、明確に疾病との関連を述べているものは少数であったが、患者が使用している免疫抑制剤の使用量が低減したとの報告もあった。しかし、問題点の多くは民間薬に関する情報の中身に曖昧さであった。

2)

① シジュウムの *in vitro* Tr1 細胞誘導抑制効果は葉 (EtOH 抽出) > 皮 (EtOH

抽出) > 根 (EtOH 抽出) の順で強く、葉 (熱水抽出) は何の効果も見られなかった。

②経口投与後のマウス脾細胞の Tr1 細胞活性は葉 (熱水抽出) で保持されていたが、シジュウムの葉 (EtOH 抽出) > 皮 (EtOH 抽出) > 根 (EtOH 抽出) の順で抑制されていた。

③B16細胞増殖はシジュウムの葉 (EtOH 抽出)、皮 (EtOH 抽出)、根 (EtOH 抽出) で抑制されるが、葉 (熱水抽出) では抑制されなかった。

④全てのシジュウム抽出物 (葉、樹皮、根) の熱水ならびに EtOH 抽出エキスに 1 μ g/ml より増殖抑制作用が見られた。特に葉および根の熱水抽出エキスには 0.1 μ g/ml より増殖抑制作用が認められた。

⑤ホップの酢酸エチル抽出物より3種の新規フロログルシン誘導体を単離した。化合物1-3のNO産生抑制活性は、化合物1 (IC₅₀: 14 μ M)、化合物2 (20 μ M)、化合物3 (237 μ M) であった。

⑥アカメガシワエキス及び phloroglucinol 誘導体は PGE₂産生を顕著に抑制した。これらは PGHS-2 mRNA 発現を阻害し、PGHS-2 蛋白量を特異的に減少させる機序により抑制作用を示した。

⑦クスノハガシワ (1)果実エキス及び2種の新規フロログルシノール誘導体 (I・II) 及び3種の新規カルコン誘導体 (III・IV・V) を NO 産生抑制活性とヒスタミンの遊離を抑制した。

⑧ホソバキシソウより抽出した5成分全てが Tr1 細胞誘導の抑制活性を持つが、bidensynoeside C が最もその効果が強かった。

3)

①イントロンを含む遺伝子断片に転写抑制活性が検出されるので、欠失体の作製、部位特異的な変異の導入により詳細なマッピングを行なった。その結果、転写因子 MZF-1 の結合モチーフの相同配列が抑制活性に寄与していることが判明した。EMSA により、この配列に特異的に結合する因子の存在が明らかになった。大腸菌による組み換えヒト MZF-1 がこの配列に結合し、また KU812 細胞に MZF-1 のアンチセンスオリゴを導入すると \square 鎖 mRNA 量が増加することから、MZF-1 が結合して \square 鎖発現抑制に機能していることが判明した。

②TLR4 の情報伝達に係わることが知られている IRAK 及び TRAF6 の dominant negative (D/N) 体の過剰発現は、LPS 刺激による NF- κ B 活性化を抑制した。しか

し、その上流に位置する MyD88-D/N 体の過剰発現は顕著な抑制効果を示さなかった。一方、MyD88 非依存的な NF- κ B の活性化経路として知られる PKR の D/N 体は NF- κ B を有意に抑制し、また、PKR の阻害剤である 2-aminoprourine は LPS による NF- κ B の活性化を抑制した。4)

①搔痒のスコアでは A 液では 7.4 \pm 2.3 が 2.5 \pm 2.1 に、一方 B 液では 7.2 \pm 2.6 が 5.4 \pm 3.7 と。また C 液では 7.2 \pm 2.6 が 3.9 \pm 3.5 とシジュウムの含有しているローションの効果がヨモギおよびコントロールに比べ有意 (p < 0.05) に痒みを抑制していた。

②日常生活に対する効果は A 液では42例中改善が29例、不変12例、悪化1例に、一方 B 液では21例中改善が6例、不変15例、悪化0例、また C 液では21例中改善が10例、不変9例、悪化2例とシジュウムの含有しているローションの効果が日常生活の改善度が高かった。

考察

1)

①データベース化に関する研究：作用機序の項目は細分化が進み、データベースとしては使用上不便となることが予想され、改良する必要が認められた。これまでの調査で、患者が使用していたとされるメギ科の植物は出現していなかった。今後、患者が使用していた植物に関するデータを蓄積の必要があった。また、構造相関模式図は、既に合成医薬品で解明されている機構と関係つけることができ、新規の天然医薬品開発のヒントを検索するのに有効と考えられた。

②薬剤師による評価の解析：民間療法の利用は地域差があり、メディアの影響多く受けると考えられ、地域を都市部に限定し、又薬剤師が評価し易く、薬剤師の要求する情報がよりデータベース反映できるような内容としたアンケートを取ることが有益と考えられた。

2)

①シジュウムエキスやホソバキシソウから単離されたポリアセチレン配糖体など生薬及びその成分である天然薬物に Tr1 細胞活性抑制による Th1 細胞活性上昇に関する報告は初めての例である。

②シジュウムの抗 HIV 活性を有することが明らかになった。

③ホップの本活性の一部は誘導体フロログルシン誘導体と考えられる。

④アカメガシワの phloroglucinol 誘導体は特異的に PGHS-2 を抑制する。

⑤クスノハガシワは3種の新規カルコン誘導体の作用機序としてはNF- κ Bの不活性化が推定される。

3)

① β 鎖の遺伝子発現制御機構の解析では、既にプロモーター領域にOct-1の結合領域を同定し、Oct-1による発現調節を報告している。今回は β 鎖遺伝子第4イントロンにMZF-1結合モチーフを同定し、MZF-1により β 鎖の転写が抑制されることを証明した。アレルギー炎症現場のマスト細胞の β 鎖発現強度により、マスト細胞のIgE・抗原に対する反応(過敏性)が大きく規定されている可能性が強く、アレルギーの病態解明、治療法の開発に向けて、さらに β 鎖遺伝子全長に亘って発現制御領域の解析が必要である。

② Rsを介するシグナル伝達経路の共通分子として、アダプター分子のひとつであるMyD88が知られているが、TLR4を介するLPSによるシグナル伝達経路では、MyD88非依存性の経路の存在が知られている。今回、我々はPKR(dsRNA-activated protein kinase)を介した経路が、LPSによるMyD88を迂回するシグナル伝達に深く関与していることを明らかにした。Fc γ RIを介するシグナル伝達経路との相違、クロストークを明らかにし、脱顆粒反応との分岐点を検討することによって、アレルギー反応へと向かうマスト細胞の分子的基盤を解明したい。

4)

①シジュウムは北中らの検討で抗ヒスタミン作用、抗ロイコトリエン作用などを有することが確認され、我々は各種のアレルギー疾患に対する有効性を経験してきた。そこで今回は掻痒を有する疾患に対し、シジュウムローションを作成し、有効性を同様の作用を持つヨモギおよびコントロール液を用い比較検討を行った結果、シジュウムローションに有意な効果を得た。

：

結語

①データファイルの作成により同じ科には構造の類似した有効成分の一群があることが多く、それらの薬効を比較することで新たな天然医薬品の開発に必要な知見が見つかることが期待でき、このデータベースは、民間薬を販売する剤師が必要な情報を患者へ提供するための情報源としても有用になることが期待できる。

②シジュウムやホソバキシンソウなどは炎症性のケミカルメディエーターを抑制するばかりではなく生体の免疫調節をおこなっている可能性が示唆され、医薬品或いは現実に即した治療や予防法が開発

される可能性が認められた。今後、作用機序、安全性、品質などに関する研究が必要と考える。

③アレルギー炎症現場のマスト細胞の β 鎖発現強度により、マスト細胞のIgE・抗原に対する反応(過敏性)が大きく規定されている可能性が強く、アレルギーの病態解明、治療法の開発に向け、さらに β 鎖遺伝子全長に亘って発現制御領域の解析が必要である。Fc γ RIを介するシグナル伝達経路との相違、クロストークを明らかにし、脱顆粒反応との分岐点を検討することによって、アレルギー反応へと向かうマスト細胞の分子的基盤を解明し、生薬抽出物質などのアレルギー抑制物質の作用機構を検討し、抑制物質の探索、創出を模索したい。

④今後はシジュウムの抽出液の活性物質の有効性について検討を勧めたい。F.健康危険情報なし。

G. 研究発表

(1)・学会発表：

- 1) 鈴木政雄、鈴木五男：第35回日本薬剤師会学術大会要旨集、p.302(2002)「抗炎症・抗アレルギー作用を有するとされる健康食品等の薬局における販売状況に関する調査」
- 2) 鈴木政雄、1和田浩志、2鈴木五男：日本薬学会123年会(2003)「抗アレルギー食品の利用状況とその薬効評価に関するデータベース化の検討」
- 3) 渡邊由紀、北中 進、趙烽、近藤恵二、ホップ(*Humulus lupulus* L.)の一酸化窒素産生抑制成分の研究、日本生薬学会第49年会、講演要旨集 p111(2002 福岡)
- 4) 趙烽、野澤元、近藤恵二、北中 進、ホップ由来のNO産生抑制活性物質の探索、日本生薬学会第49年会、講演要旨集 p143(2002 福岡)
- 5) 王王玉、北中 進、中国キク科植物*Bidens parviflora* Willd.の成分研究(7)、日本薬学会第121年会、要旨集 2 p124(2002 千葉)
- 6) 王王玉、北中 進、王乃利、姚新生、*Bidens parviflora* Willd.の成分研究(8)、日本生薬学会第49年会、講演要旨集 p99(2002 福岡)
- 7) 大根谷章浩、香月茂樹、北中 進、クスノハガシワ(*Mallotus philippensis*)の抗アレルギー成分の研究(2)、日本薬学会第121年会、要旨集 2 p136(2002 千葉)

8) 大根谷章浩、香月茂樹、北中 進、ク ス ノ ハ ガ シ ワ (*Mallotus philippensis*) の抗アレルギー成分の研究(3)、日本生薬学会第49年会、講演要旨集 p207 (2002 福岡)

9) 下川敏文、羅智靖: 第25回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2002/12/11-14

10) 高橋恭子, 西山千春, 長谷川真成, 秋澤有四郎, 羅智靖: 第25回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2002/12/11-14

11) Yan Xiu, Kazuhiro Nakamura, Masaaki Abe, Na Li, Xiang Shu Wen, Yi Jiang, Danqing Zhang, Hiromichi Tsurui, Shuji Matsuoka, Yamamoto Hamano, Hiroyuki, Fujii, Masao Ono, Toshiyuki Takai, Toshinobu Shimokawa, Chisei Ra, Toshikazu Shirai, and Sachiko Hirose: 第32回日本免疫学会総会, 京王プラザホテル・新宿, 2002/12/4-6

12) 寺田知新, 下川敏文, 布村聡, 羅智靖: 第32回日本免疫学会総会, 京王プラザホテル・新宿, 2002/12/4-6

下川敏文, 羅智靖: 第32回日本免疫学会総会, 京王プラザホテル・新宿, 2002/12/4-6

13) Ushio Hiroko, SUPAJATURA Volaluck, Nakao Atsuhito, Akira Shizuo, Okumura Ko, Ra Chisei, Ogawa Hideaki: 第32回日本免疫学会総会, 京王プラザホテル・新宿, 2002/12/4-6

14) 高橋恭子, 西山千春, 長谷川真成, 秋澤有四郎, 羅智靖: 第32回日本免疫学会総会, 京王プラザホテル・新宿, 2002/12/4-6

15) 前田啓子, 西山千春, 戸倉智子, 秋澤有四郎, 小川秀興, 奥村康, 羅智靖: 第32回日本免疫学会総会, 京王プラザホテル・新宿, 2002/12/4-6

16) 布村聡, 寺田知新, 羅智靖: 第32回日本免疫学会総会, 京王プラザホテル・新宿, 2002/12/4-6

17) 藤井康行, 中尾徹, 若原俊一, 原寿史, 小柴俊, 羅智靖, 北村大介, 後飯塚僚: 第32回日本免疫学会総会, 京王プラザホテル・新宿, 2002/12/4-6

18) Yoshimaru Tetsuro, Suzuki Yoshihiro, Matsui, Takashi, Inoue Teshio, Shimizu Kazufumi, Ra Chisei: 第32回日本免疫学会総会, 京王プラザホテル・新宿, 2002/12/4-6

19) 権寧博, 羅智靖: 第32回日本免疫学会総会, 京王プラザホテル・新宿,

2002/12/4-6

20) 羅智靖: 第52回日本アレルギー学会総会 特別講演, パシフィコ横浜, 2002/11/28-30

21) 羅智靖: 第52回日本アレルギー学会総会 シンポジウム, パシフィコ横浜, 2002/11/28-30

22) 権寧博, 羅智靖: 第52回日本アレルギー学会総会, パシフィコ横浜, 2002/11/28-30

23) 長谷川真成, 西山千春, 秋澤有四郎, 高橋恭子, 羅智靖, 小川秀興, 奥村康: 第52回日本アレルギー学会総会, パシフィコ横浜, 2002/11/28-30

24) 布村聡, 寺田知新, 羅智靖: 第52回日本アレルギー学会総会, パシフィコ横浜, 2002/11/28-30

25) 前田啓子, 西山千春, 戸倉智子, 秋澤有四郎, 奥村康, 羅智靖: 第52回日本アレルギー学会総会, パシフィコ横浜, 2002/11/28-30

26) 寺田知新, 下川敏文, 布村聡, 羅智靖: 第52回日本アレルギー学会総会, パシフィコ横浜, 2002/11/28-30

27) 下川敏文, 羅智靖: 第52回日本アレルギー学会総会, パシフィコ横浜, 2002/11/28-30

28) 渡辺東, 下川敏文, 布村聡, 羅智靖: 第52回日本アレルギー学会総会, パシフィコ横浜, 2002/11/28-30

29) 西山千春, 長谷川真成, 奥村康, 小川秀興, 横田豊一, 高橋恭子, 羅智靖: 第52回日本アレルギー学会総会, パシフィコ横浜, 2002/11/28-30

2) 論文発表

1) Feng Zhao, Hajime Nozawa, Akihiko Daikonya, Keiji Kondo, Susumu Kitanaka, Inhibitors of Nitric Oxide Production from Hops (*Humulus lupulus* L.), *Biol. Pharm. Bull.*, 26 (1) 61-65 (2003).

2) Akihiro Daikonya, Shigeki Katsuki, Jin-Bin Wu, Anti-allergic Agents from Natural Sources 4: Antiallergic Activity of New Phloroglucinol Derivatives from *Mallotus philippensis* (Euphorbiaceae), *Chem. Pharm. Bull.*, 50 (12), 1566-1659 (2002).

3) Rie Ishii, Masakazu Horie, Koichi Saito, Munehisa Arisawa, Susumu Kitanaka, Prostaglandin E₂ production and induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 is inhibited in a murine macrophage-like cell line, RAW264.7, by *Mallotus japonicus* on phloroglucinol derivatives, *Biochim.*

Biophys. Acta, 1571, 115-123 (2002).

4) Seo N., Hayakawa S., Takigawa M., Tokura Y.: Interleukin-10 expressed at early tumor sites induces subsequent generation of CD4⁺ T-regulatory cells and systemic collapse of anti-tumour immunity. *Immunology*. 103: 449-457, 2001.

5) Takigawa M., Tokura Y., Hashizume H., Seo N.: Percutaneous peptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunoprophylaxis. *Ann. New York Acad. Sci.* 941: 139-146, 2001.

6) Seo N.: Suppressor lymphocytes participating in collapse of antitumor immunity. *Recent Research Developments in Immunology*, 3: 61-74, 2001.

7) Seo N., Hayakawa S., Tokura Y.: Mechanisms of privilege for tumors by regulatory cytokines produced by innate and acquired immune cells. *Seminars in Cancer Biology*, 12: 291-300, 2002.

Xiu Y, Nakamura K, Abe M, Li N, Wen XS, Jiang Y, Zhang D, Tsurui H, Matsuoka S, Hamano Y, Fujii H, Ono M, Takai T, Shimokawa T, Ra C, Shirai T, and Hirose S. Transcriptional regulation of Fc γ r2b gene by polymorphic promoter region and its contribution to humoral immune responses. *J Immunol*. 169:4340-4346, 2002.

8) Suzuki Y, Gomez-Guerrero C, Shirato I, Lopez-Franco O, Hernandez-Vargas P, Sanjuan G, Ruiz-Ortega M, Sugaya T, Okumura K, Tomino Y, Ra C and Egido J. Susceptibility to T cell-mediated injury in immune complex disease is linked to local activation of renin-angiotensin system: the role of NF-AT pathway. *J Immunol*. 169:4136-4146, 2002.

9) Suzuki Y, Yoshimaru T, Matsui T and Ra C. Silver Activates Calcium Signals in Rat Basophilic Leukemia-2H3 Mast Cells by a Mechanism That Differs from the FcepsilonRI-Activated Response. *J Immunol*. 169:3954-3962, 2002.

10) Takahashi K, Nishiyama C and Ra C. Transcriptional regulation of the human high affinity IgE receptor

alpha-chain gene. *Mol Immunol*. 38:1193, 2002.

11) Sagara H, Okada T, Okumura K, Ogawa H, Ra C, Fukuda T and Nakao A. Activation of TGF-beta/Smad2 signaling is associated with airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 110:249-254, 2002.

12) Nishiyama, C., Takahashi, K., Ohtake, Y., Yokota, T., Okumura, K. and Ra, C. Analysis of transactivation region of Elf-1 by using a yeast one-hybrid system. *Biosci Biotechnol Biochem*. 66:1105-1107, 2002.

13) Kanamaru, Y., Nakao, A., Shirato, I., Okumura, K., Ogawa, H., Tomino, Y. and Ra, C. Chronic Graft-versus-Host Autoimmune Disease in Fc Receptor gamma chain-deficient Mice Results in Lipoprotein Glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol*. 13:1527-1533, 2002.

14) Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., Ra, C. and Ogawa, H. Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest*. 109:1351-1359, 2002.

15) Yoshimura, C., Yamaguchi, M., Iikura, M., Izumi, S., Kudo, K., Nagase, H., Ishii, A., Walls, A.F., Ra, C., Iwata, T., Igarashi, T., Yamamoto, K. and Hirai, K. Activation markers of human basophils: CD69 expression is strongly and preferentially induced by IL-3. *J Allergy Clin Immunol*. 109:817-823, 2002.

16) Nishiyama, C., Hasegawa, M., Nishiyama, M., Takahashi, K., Akizawa, Y., Yokota, T., Okumura, K., Ogawa, H. and Ra, C. Regulation of human Fc epsilon RI alpha-chain gene expression by multiple transcription factors. *J Immunol*. 168:4546-4552, 2002.

17) Suzuki, R., Nakao, A., Kanamaru, Y., Okumura, K., Ogawa, H. and Ra, C. Localization of intestinal intraepithelial T lymphocytes involves regulation of alpha(E)beta(7) expression by transforming growth factor-beta. *Int Immunol*. 14:339-345, 2002.

18) Supajatura, V., Ushio, H., Wada, A., Yahiro, K., Okumura, K., Ogawa, H., Hirayama, T. and Ra, C. Cutting edge: VacA, a vacuolating cytotoxin of

Helicobacter pylori, directly activates mast cells for migration and production of proinflammatory cytokines. J Immunol. 168:2603-2607,2002.

19)Konishi,H., Katoh,Y., Takaya,N., Kashiwakura,Y., Itoh,S., Ra,C. and Daida,H. Platelets activated by collagen through immunoreceptor tyrosine-based activation motif play pivotal role in initiation and generation of neointimal hyperplasia after vascular injury. Circulation. 105:912-916,2002.

20)Wakahara,S., Fujii,Y., Nakao,T., Tsuritani,K., Hara,T., Saito,H. and Ra,C. Gene expression profiles for Fc epsilon RI, cytokines and chemokines

upon Fc epsilon RI activation in human cultured mast cells derived from peripheral blood. Cytokine. 16:143-152,2002.

21)Kobayashi,N., Suzuki,Y., Tsuge,T., Okumura,K., Ra,C. and Tomino,Y. FcRn-mediated transcytosis of immunoglobulin G in human renal proximal tubular epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol. 282:F358-365,2002.

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。

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業）
分担 研究報告書

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
データベース化及び模式図の作成

生物活性を有する植物成分についての文献調査を継続し、植物活性成分データベースは、成分数として 300 以上蓄積することができた。また、このデータベースをより有効に利用するための新たな研究として、シクロオキシゲナーゼ(COX)の阻害模式図の作成を試みた。この結果、この模式図は阻害と活性間の相関研究に利用可能な新しい提案ができた。

2. 民間薬等の薬局における販売状況と薬剤師による評価等に関する調査

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の使用実態や有用性、及び薬剤師が患者説明に必要なデータの調査を昨年を引き続き、東京地区で行った。この結果、薬局等では民間薬について患者から多数の問い合わせを受けていることが分かった。しかし、通常得られている情報は、アレルギー患者への説明に必ずしも満足できるものではなかった。

本報告は、A（研究目的）、B（研究方法）、C（研究結果）、D（考察）について、以下のように分けて述べる。

1. 生物活性を有する植物成分のデータベース化と COX-1 及び COX-2 阻害模式図の作成
2. 民間薬等の薬局における販売状況と薬剤師による評価等に関する調査

1. 生物活性を有する植物成分のデータベース化と COX-1 及び COX-2 阻害模式図の作成

A. 研究目的

データベース作成の目的は二点ある。その一つは、抗炎症・抗アレルギー治療を受けている患者の多くが様々な理由により、天然薬物による民間療法を併用していると云われている。この民間薬を提供することの多い薬局・薬店において患者・使用者に説明するための情報源としてのデータベースである。

他の一つは、医薬品開発において、ターゲット化合物として天然物は欠かせな

いものである。その中で植物中の成分の構造やその活性に関する研究は多数行われているが、それらの総合的なデータベースはなく、研究の品質を高める上で有用である。

しかし、研究の個々の報告は、成分についての統一した活性比較がなされていないため、構造と活性に関する有用な情報になりえていないのが実情である。たとえば、アッセイ法ではカラゲニン誘導浮腫、TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-

13-acetate) 誘導浮腫、EPP(ethyl phenylpropiolate)誘導浮腫、アジュバント関節炎、綿球法、シクロオキシゲナーゼ阻害活性など多彩であり、比較医薬品にしてもインドメタシン、アスピリン、オキシフェンブタゾンなど文献によりまちまちであるため、抗炎症作用の強さを総括的に評価することが難しい。一方、近年プロスタグランジン生合成に関与するシクロオキシゲナーゼ(COX)が、COX-1、COX-2に分けられるようになり、それらを阻害する植物成分データが出てくるようになってきた。また、更に合成薬物と酵素の包接複合体のX線結晶解析によりそれらの阻害機構が最近解明された。

そこで、今年の研究では、このデータベースを有効に利用するために阻害機構が明らかになったCOX-1及びCOX-2に注目し、合成薬物によるX線結晶解析結果をもとにCOX-1及びCOX-2阻害模式図をまず作成し、パーソナルコンピュータ上で、COX阻害が明らかな植物成分に適用して阻害模式図の妥当性を確認することにした。その上で、抗炎症作用機序が不明な植物成分をこの模式図に当てはめ、COX阻害の可能性を検証するとともに、活性の強さを指標としてCOX阻害機構を成分ごとに明らかにすることをデータベース作成と併せ試みた。

B. 研究方法

a. 生物活性を有する植物成分のデータベース化

植物活性成分、民間療法、市販民間薬、治療実績などに関するデータを統合し、相互に比較できるようなデータベースの作成に向けてデータの収集を行った。データの収集は、前年同様薬学雑誌、*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し、これらのデータを一括管理するべく、活性データ等は File Maker Pro で、三次元を含めた化学構造情報を

Chem Office Pro を用いてデータベース化した。

b. COX-1 及び COX-2 阻害模式図の作成

Loll らの COX-1 に選択的阻害作用を有する iodosuprofen、iodoindomethacin の包接複合体のX線結晶解析結果及び Luong らの COX-2 選択的阻害作用を有する RS104897、RS57067 の包接複合体のX線結晶解析結果をもとに、COX-1 阻害薬 [ibuprofen、flurbiprofen、piroxicam]、COX-2 阻害薬 [NS-398、フロスライド、L-745,337、メニスライド、FK-3318、T-614、Dup-697、SC-58、125、メロキシカム、BF-389] の最適3次元構造を、分子力学(MM)計算ソフトである Chem 3D を用いて求め、Chem 3D における Overlay 機能を駆使して、一般性のある COX-1 及び COX-2 阻害機構に関する模式図をそれぞれ作成した。

C. 研究結果

a. 生物活性を有する植物成分のデータベース化

作成したデータベースの概要は、Table 1 の通りである。

Table 1 データベースの概要

項目	件数
成分総数	337
基原植物数	141
科数	49
作用機序数	48

本データベースに収録された成分についてまとめたものを Table 2~4 に示す。

Table 2 化学構造による分類

項目	成分数
テルペノイド	102
ステロイド	11
フラボノイド	46
タンニン	9
アルカロイド	16
その他の芳香族化合物	94
その他	34

Table 3 作用機序の分布

作用機序	件数
COX 阻害由来	77
LOX 阻害由来	65
ケミカルメディエータ遊離由来	11
PLA-2 阻害、膜安定化由来	45
抗酸化作用	21
その他	186

Table 4 主な科名で分類

科名	成分数
キク	56
ショウガ	22
マメ	20
ウリ	14
シソ	14
ユキノシタ	12
ベンケイソウ	11
セリ	10
ハマウツボ	9
クロウメモドキ	7

データベースの構造は、Fig.1~5の例に示す通り、メイン画面から植物活性データベース表紙→植物データ検索画面→検索結果リスト画面→化学データ画面のように全てスクリプトにより自動化されている。又、各データは必要に応じて、「印刷」、他の「画面」への変換が可能となっている。

抗炎症・抗アレルギー作用を有する天然医薬品のデータベース

ご使用になるデータベースを下記の中から選択して下さい。

-
-
-

Fig. 1 データベースの表紙

植物活性成分データベース

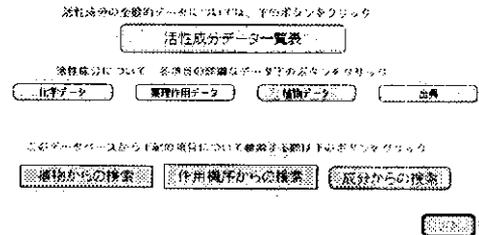


Fig.2 植物活性成分データ表紙

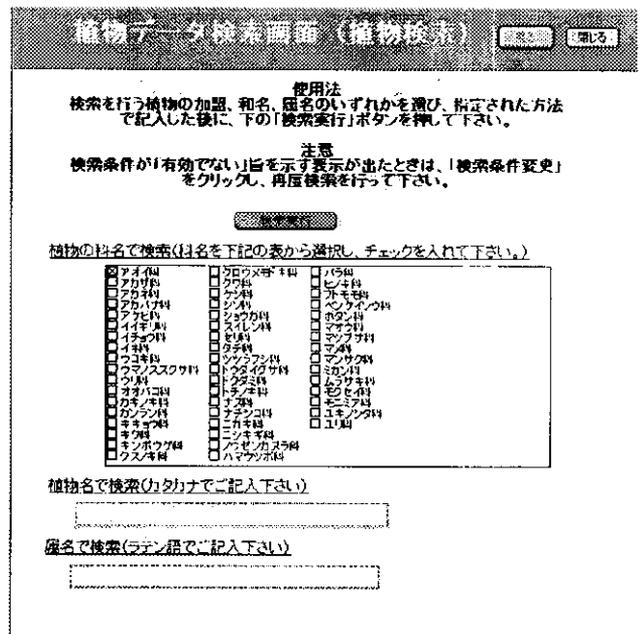


Fig.3 植物データ検索画面

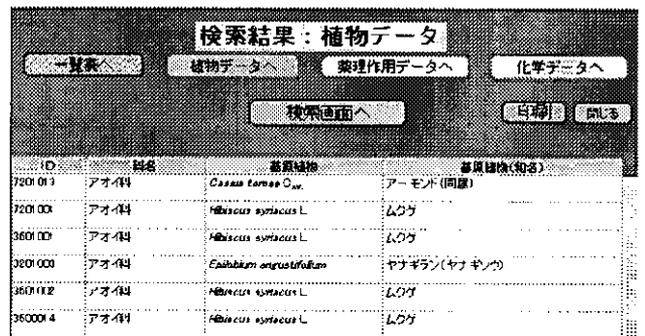


Fig.4 検索結果リスト

化学データ

検索欄: 検索機能データ | 構造データ | 印刷 | 検索

リスト拡張

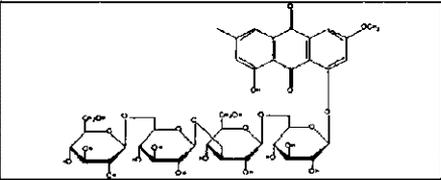
検索結果: 720/13

種別名:

化学名:

構造/ラメーター:

構造活性モジュール:

化学構造: 

作用機序の分類:

出典:

Fig.5 化学データの詳細画面

b. COX-1 及び COX-2 阻害模式図の作成

COX-1 及び COX-2 のアミノ酸末端で示されるタンパク質のキャビティーに挿入された形で作成した阻害模式図をそれぞれ Fig. 6 及び 7 に示す。

次に、COX 阻害が明らかな植物成分に阻害模式図を適用してその妥当性を確認したところ、一部を改良することで構造がより複雑な植物成分にも十分応用できることがわかった。(Fig. 7 および 8)

更に、抗炎症作用機序が不明な植物成分をこの模式図に当てはめ、COX 阻害の可能性を調べたところ。COX-1 及び COX-2 阻害の有無をパーソナルコンピ

ュータ上で推定することが可能であることがわかった。また、植物成分の COX 阻害活性の強さを、成分の模式図への適合性から推定することもできた。現在、データ数を増やしてそれらの信頼性を高めているところである。

D. 考察

データベースに関しては、成分データ数が、300 を超え、一応の体裁は整えられた。今後、他のデータとの統合、Web 上での公開により、使用者の批判を仰ぎ、改良を重ねることが必要である。

一般の医薬品集などでは、構造式が便宜上さまざまな方向で並べられることが多い。そのため薬剤師が構造情報を活用しきれていないのが実情である。医薬品や植物成分の構造式を、今回作成した阻害模式図に適合するように並べることにより、活性部分を中心とした構造上の類似性を視覚的にとらえることができるとともに、構造情報をもとに、阻害の有無や強さをある程度予測することが可能であり、食品や民間薬への評価にも役立つことが期待できる。

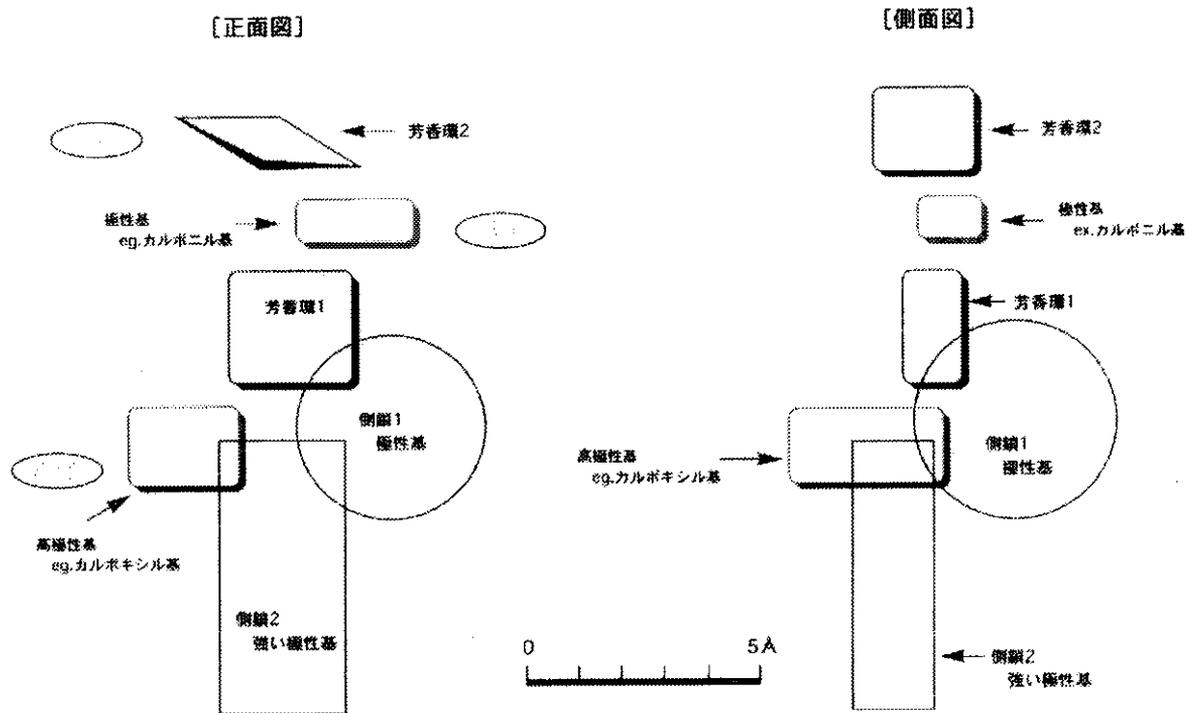


Fig.6 COX-1 阻害模式図

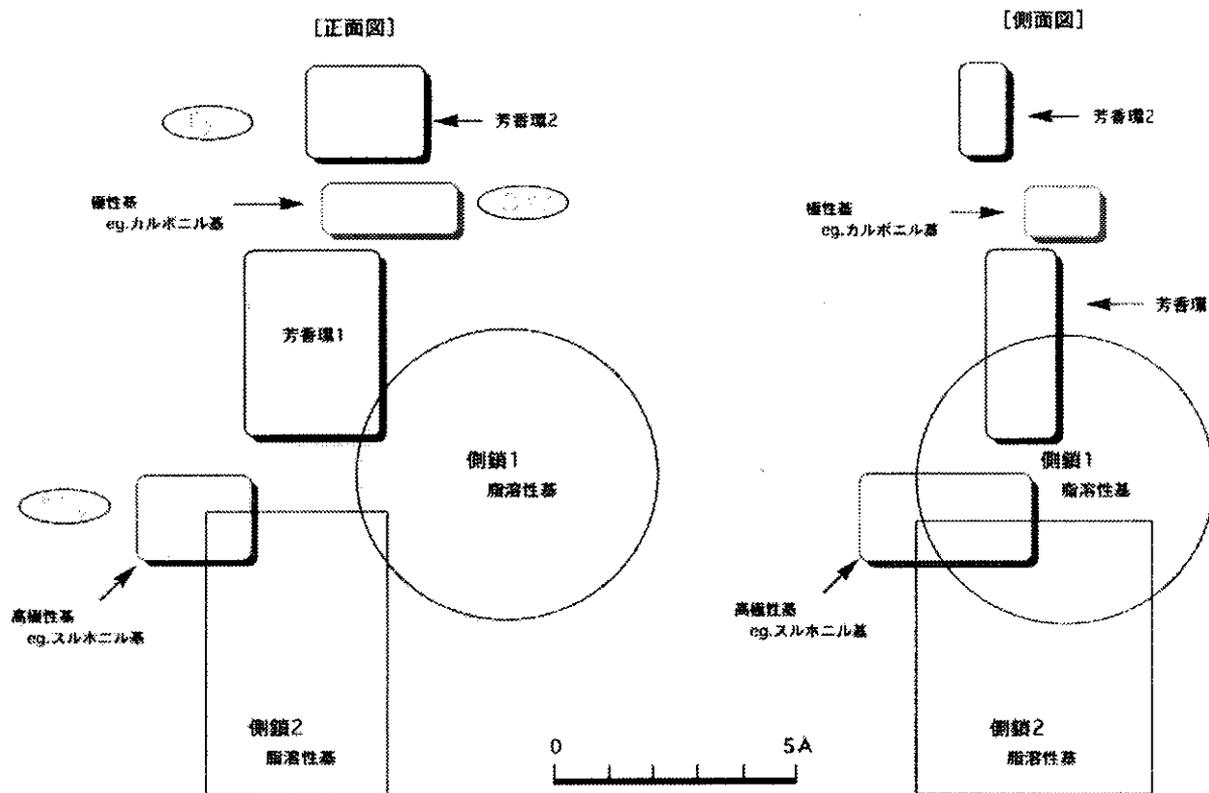


Fig.7 COX-2 阻害模式図

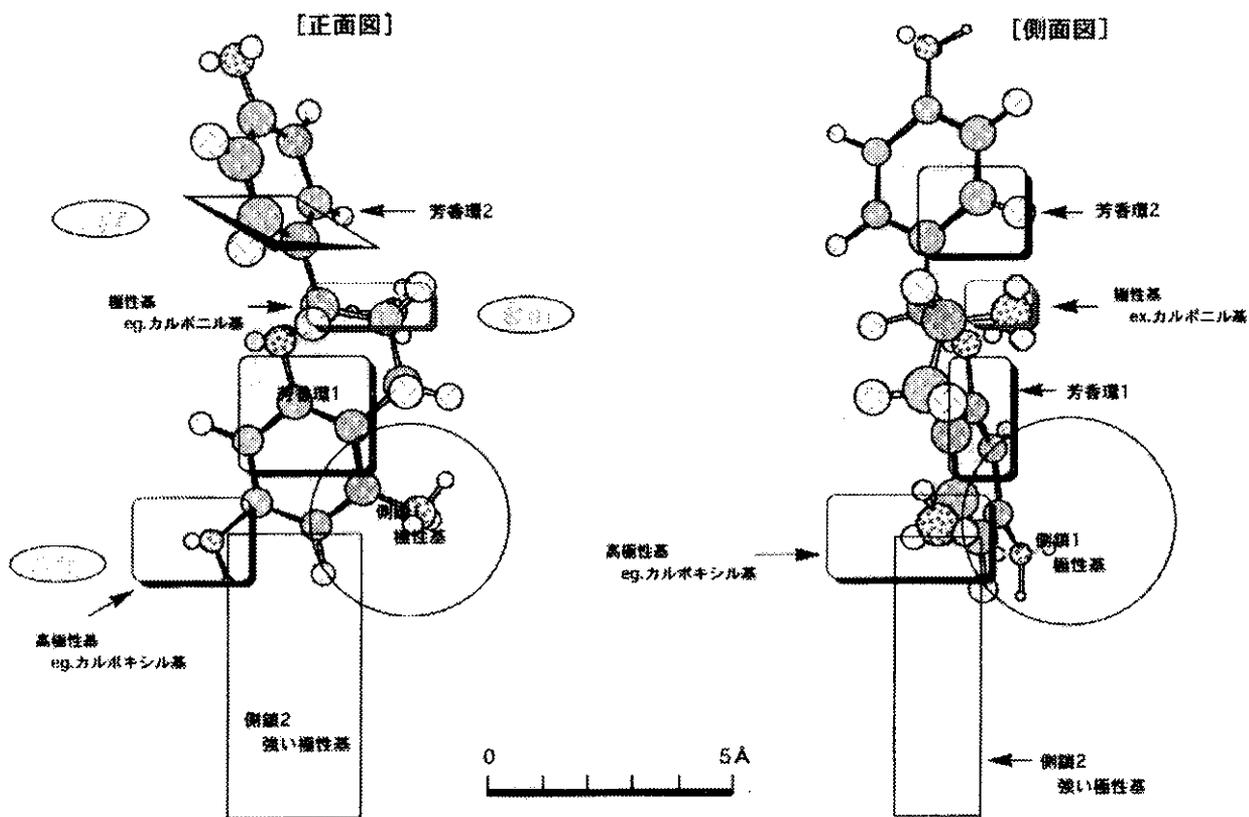


Fig.8 (-)-epiafzelechin の COX-1 阻害推定図

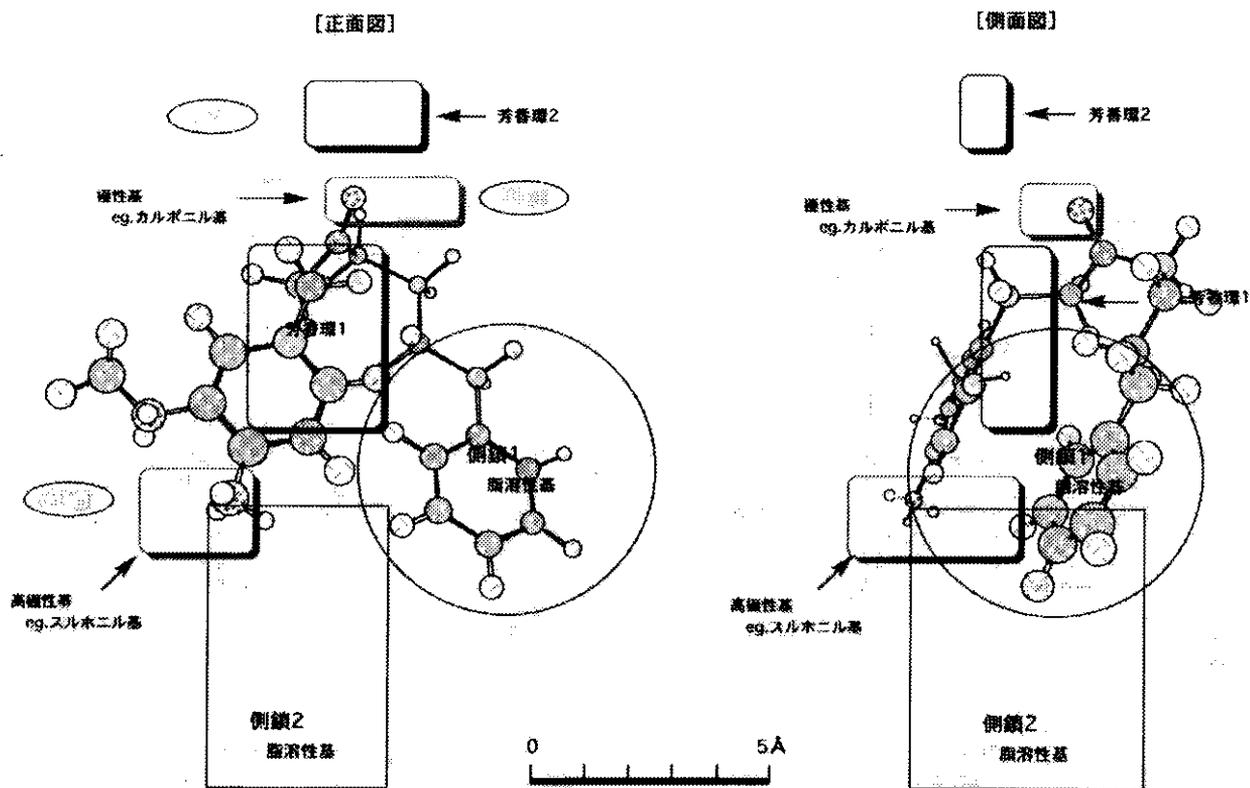


Fig.9 yakuchinone A の COX-2 阻害推定図

2. 民間薬等の薬局における販売状況と薬剤師による評価等に関する調査

A. 研究目的

民間薬の多くは、薬局、薬店等を通して販売されていることが多く、その利用者である患者は、そこから必要な情報を手に入れることが多いと考えられる。

これまで、調剤薬や一般薬に対する情報提供については、各種の調査があるが、民間薬に対する情報の必要性に関するものはなかった。

現実には多くの患者が、様々な理由から民間薬を利用している以上は、それに対する説明は的確なものでなければならない。

これらのことを考え、情報源としてデータベースの作成をしているが、これまで現場のニーズについての定量的なものなかったことから、昨年の調査から民間薬は都市部での利用者が多いことから本年は、東京都における調査を行うことを目的にした。

B. 研究方法

調査方法は対象者に Fax 又は郵便によりアンケートを送付し、回答を得た。調査概要は次の通りである。

a. 千葉市、鹿児島県薬剤師会会員に対する調査

対処者：会員全員

調査項目

1. 調査の対象商品：アレルギー、炎症などに効果があると云われるもので医薬品を除いた商品

2. 評価項目：

○販売に関する項目：販売状況

○使用者の評価項目

使用者の年齢層、性別、患者の疾病の状況、薬剤師の評価・副作用情報など、

調査期間：平成14年3月まで

b. 東京都薬剤師会会員に対する調査

対処者：東京都薬剤師会会員からランダム抽出した454店舗

調査項目

1. 調査の対象商品：特定保健用食品、

健康補助食品(JHFA)及び単純な栄養補助食品を除く全て

2. 評価項目：

○販売に関する項目：販売状況

○購入相談等

○昨年の病院におけるアンケート調査で患者が使用民間薬に関する調査

○データベースとして、希望する項目

調査期間：平成15年2月まで

C. 研究結果

a. 千葉市、鹿児島県薬剤師会会員に対する調査

調査結果の概略は次の通りである。

対象となる商品は、回収されたアンケートの約30%が販売していたが(Fig. 10)、昨年の病院調査の実態からすると少ないと考えられた。販売商品の約90%は甜茶、カキ、ヨモギ関連の商品が占めていた(Fig. 11)。同じ植物を原料にしている商品でも販売会社数は多く、商品の形態は、多種類あった(Table 5)。

民間薬の使用者の年齢層は、壮年層であり(Fig. 12)、女性の購入が多い結果であった(Fig. 13)。1薬局当たりの販売商品数は都市部が地方に比較し、約1品目多かった。

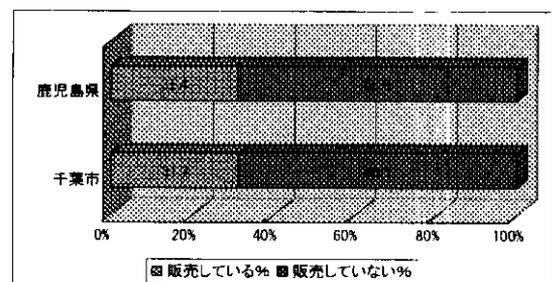


Fig.10 対象商品の販売店比率

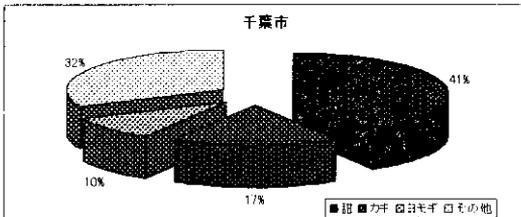
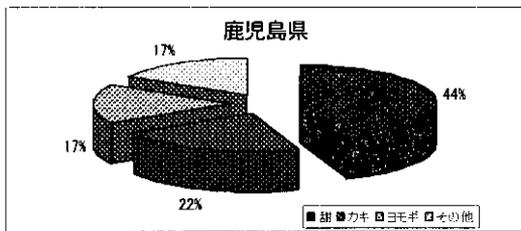


Fig.11 地域別販売品目の比較

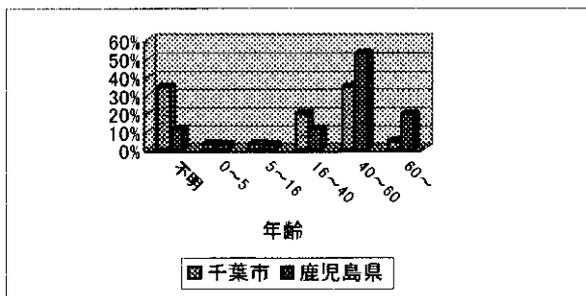


Fig.12 購入者の年齢層の比較

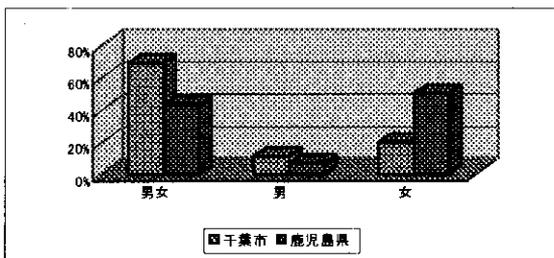


Fig.13

Table 5 販売形態・販社数

	販売会社数	販売形態
甜茶	15	4
カキ	4	2
ヨモギ	6	3

患者から得られた情報を薬剤師がまとめたもので、疾病との関連でその有効性を述べているものは少数であった。その中でもっとも意見が多かった甜茶についての意見を Table 6 にまとめた。

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。商品の情報については、情報の中身に曖昧で、商品間のバラツキが多いのではないかとの意見が見られた

Table 6 甜茶に対する評価のまとめ

症状	風邪、鼻水、花粉症、鼻炎、アレルギー性鼻炎、花粉症、スギ花粉症、花粉症による鼻水、鼻づまり
評価	症状が軽い場合なら有効、薬だけより軽減、鼻がすっきり、季節になっても軽症、免疫系の薬物の低減化、不明

b. 東京都薬剤師会会員に対する調査

アンケートの回収率は、廃業等による返却（19件）を除き、3月17日現在約63.0%である。

業態の分布は、薬局が91.5%（内、調剤取扱量が10%以下：19%、90%以上：18%）、一般販売業が6.3%、卸業が0.7%、薬種商が1.5%であった。

特定保健用食品、JHFA等を除くもので、健康を謳った商品の販売状況調査は、「販売していない」の件数が、20%と比較的高率であった点を除き、全体的に大きな差はなかった（Fig.14）。しかし、民間薬に対する相談は、93%で受けており、その中でも、アレルギー疾患についてのものが、非常に多いことが示された（Fig.15）。これら多数の相談の中で解答に困ったことのある比率は73%にもものぼっていた。

昨年、東邦大学のグループで調査したときに、患者が使用経験のあるものとして挙げた物についての薬局での販売・相談・副作用報告を調べた結果を Table 7 にまとめた。Fig.14で民間薬を販売していない店舗のうち、95%販売経験があると答えていた。相談をしている件数は販売実績件数と相関数と相関しているようであった。また副作用については、「ない」との回答を多数得たが、アロエ、ニンニクでは、~1%程度の報告が見られた。相談された疾患としては、アトピー性皮膚炎、花粉症に対するものが多く、

その相談内容は、有効性、治療薬との併用に関するものが他に比較しかなり多く、薬局等への相談の気安さもあるのではないかと考えられた (Fig. 16、17)。これら相談を受けている薬剤師等が持っている情報量としては、不足と十分が拮抗して

いた (Fig. 18)。この不足している情報を補うものとして考えているデータベースに希望する項目として、薬理作用、副作用成分名、植物の一般名・別名、作用機構について半数以上人が上げていた (Fig.19)。

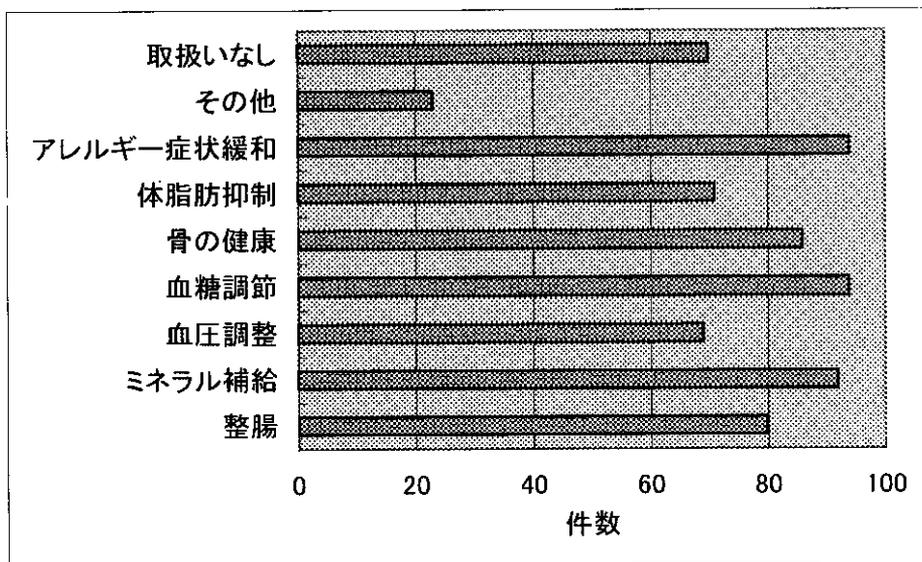


Fig.14 取扱い商品群

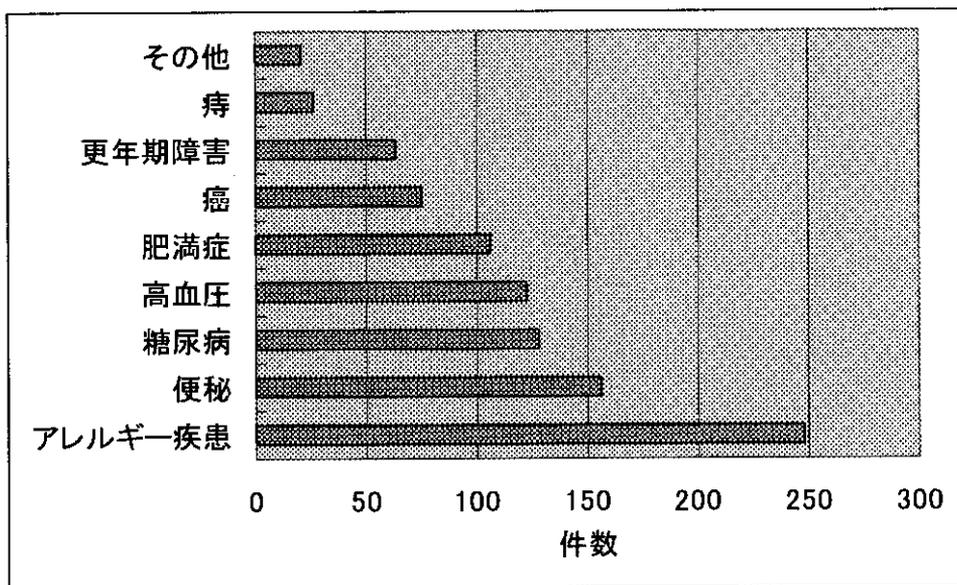


Fig.15 民間薬について相談を受けた疾患