

Fig.16 相談を受けた疾患

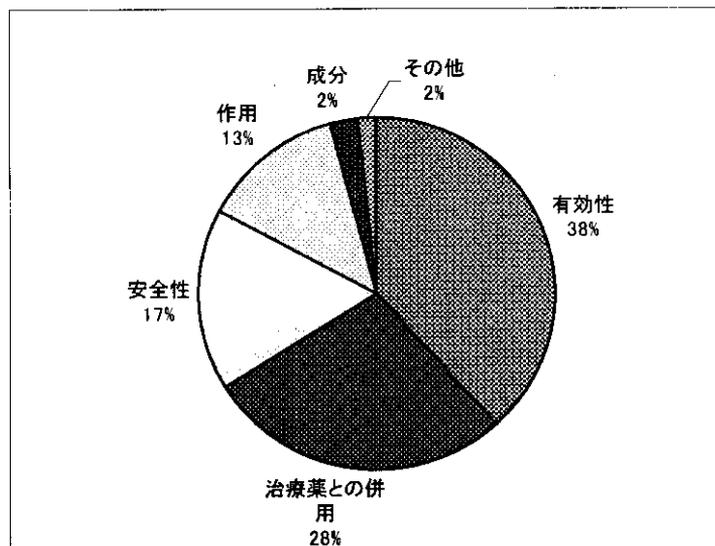


Fig.17 相談を受けた内容

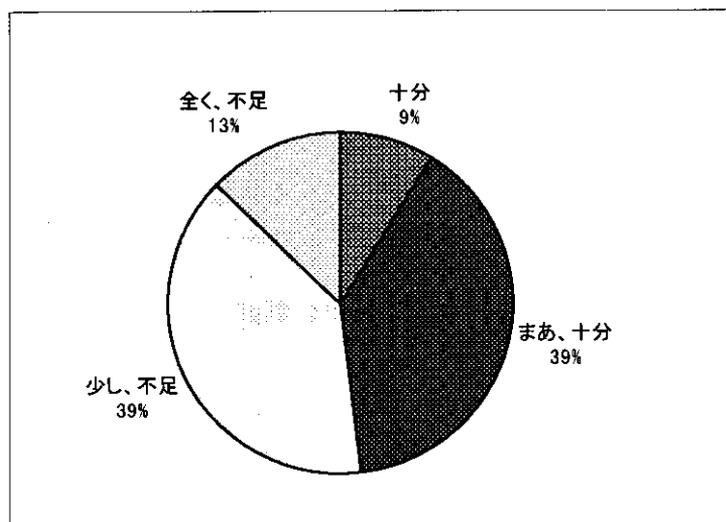


Fig.18 相談に必要な情報の充足度

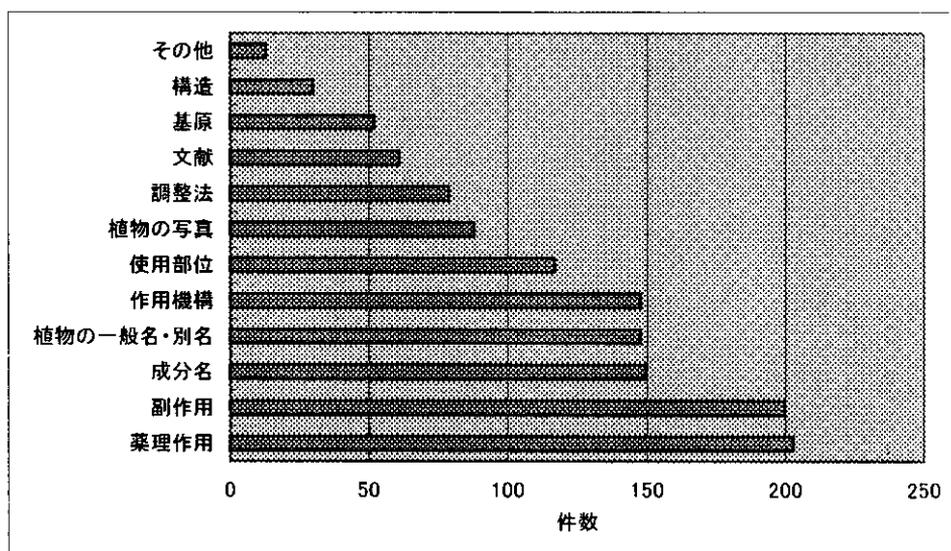


Fig.19 データベースとして希望する項目

Table 7 対象商品の販売、相談、副作用報告件数

対象商品	販売実績	相談対象物	副作用報告
キンカン	41	27	4
カリン	36	36	2
アロエ	117	130	24
ニンニク	64	69	14
ドクダミ	184	112	6
シジュウム	38	34	2
ビワの実	61	71	1
紫蘇	76	75	1
オオバコ	76	47	1
ユキノシタ	13	13	1
羅漢果	74	49	1
甜茶	135	113	0
日本山人参	21	27	1
靈芝	100	105	2
杉の葉エキス	18	24	0
パパイヤ	2	7	2
ヨモギ	85	47	1
モモ	32	27	3
ナンテン	51	33	1

#### D. 考察

昨年の調査の結果、都市部において民間薬の利用者が多く、それも女性に多いことが分かった。更に患者に説明する情報不足も指摘された。これをふまえて、今年度は、東京を調査対象に、民間薬の利用者がどの程度情報を求めているか、また、薬局ではそれにどの程度答えているかを見た。その結果、調剤専門の薬局でも、民間薬の利用者からアレルギー疾患に対する民間薬について、具体的に安全

性、医薬品との併用の問題など、通常の医薬品の相互作用と同様な問題について患者は知りたがっていることが分かった。一方、薬局側のほぼ半数は、それに答える情報が不足しているのではないかと考えられた。

これらのことから、アレルギー等の民間薬として使われる植物成分の成分データベースの構築が有効に機能するものと考えられた。

## E. 結論

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、利用者の意見を聞かなければならないと考え、実際に薬局側の意見を聞いた結果、現在の作成しているものでほぼ十分であることが分かった。また今年作成した、薬物によるシクロオキシゲナーゼ(COX)の阻害模式図は、今後多くの植物成分に適用することでその有用性が確認できれば、簡易的な方法であるので開発研究においても、又現場薬剤師にもそれぞれの立場で有用な手段となると考えられる。

今年のアナケート調査の結果、多数のアレルギー疾患の患者が、薬局に民間薬の利用についての情報を求めており、医療機関と異なる立場で、患者への対応が重要であることが分かった。

## F. 健康危険情報

なし。

## G. 研究発表

・学会発表：

a. 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」

b. 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」

## 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。

厚生科学研究費補助金(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数種の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 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様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- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、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

本年度は、シジュウム、アカメガシワ、クスノハガシワ、ホップおよびホソバキシソウの 5 種の生薬について、活性成分

の検討を行った。

シジュウムの Th1 細胞誘導の抑制に関わる可能性が高い調節性 T 細胞 (Tr1 細胞) の関与について検討した。また、後天性免疫不全症候群の原因である抗 HIV 活性についても検討した。アカメガシワ果皮 (MJE)、クスノハガシワ果皮、ホップの phloroglucinol 誘導体及びフロログルシノール誘導体の抗炎症作用を検証した。

B. 研究方法

1. ホップ、ホソバキシソウ、クスノハガシワ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、水等で抽出した。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. 葉、皮、根抽出シジュウムを *in vitro* Tr1 細胞誘導時の培養液中に種々の濃度で混合し、誘導に伴う増殖の変化を測定した。

3. 種々の濃度で葉、皮、根抽出シジュウムを経口投与した B6 マウスの皮下に B16 メラノーマ細胞を移植し、その後の腫瘍増殖および脾臓での Tr1 細胞活性を測定した。

4. 同意の下に健常人より採血し比重遠沈法により末梢血単核球を分離し PHA により刺激培養した。

5. 0.1-100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  に調製したシジュウムを添加し7日間培養し、培養上清中の HIVp24 を ELISA 法で定量した。4上記濃度と培養期間における細胞毒性の有無をトリパンブルー染色で検討した。

6. 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- $\gamma$ /LPS を添加し、培養後、上清の NO<sub>2</sub><sup>-</sup>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。

7. 各種 mRNA に対する影響---RAW 264.7 細胞を用い、IFN- $\gamma$ /LPS を添加し、培養後、RNA を抽出して RT-PCR により評価した。

8. RAW264.7 細胞に刺激剤 LPS と MJE または phloroglucinol 誘導体を同時に添加し、産生される PGE<sub>2</sub> 量を ELISA で定量した。その他、アラキドン酸の遊離抑制作用、プロスタグランジンエンドペルオキシド合成酵素 (PGHS)-1 及び-2 の酵素活性抑制作用、PGHS-1 及び-2 蛋白量に対する作用、PGHS-2 mRNA 発現抑制作用を検討した。

9. ヒスタミン遊離抑制効果は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、阻害率を算出した。

### C. 研究結果

1. シジュウムの *in vitro* Tr1 細胞誘導抑制効果は葉(エタノール抽出) > 皮(エタノール抽出) > 根(エタノール抽出)の順で強く、葉(熱水抽出)は何の効果も見られなかった。

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、葉(エタノール抽出) > 皮(エタノール抽出) > 根(エタノール抽出)の順で抑制されていた。

2. B16 細胞増殖は葉(エタノール抽出)、皮(エタノール抽出)、根(エタノール抽出)で抑制されるが、葉(熱水抽出)では抑制されなかった。

3. 全てのシジュウム抽出物(葉、樹皮、根)の熱水ならびにエタノール抽出エキスに 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  より HIV 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$  より増殖抑制作用が認められた。

4. 熱水抽出エキスでは葉、樹皮、根とも 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  で末梢血単核球の viability は 70%以上であるがエタノール抽出エキスでは 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  という低濃度でも viability は 50%程度でありいずれも濃度依存性に低下した。

3. MJE 及び phloroglucinol 誘導体は PGE<sub>2</sub> 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。

5. クスノハガシワは果実エキス及び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 産生抑制物質として単離同定した(IC<sub>50</sub> : I=4.2 $\mu\text{M}$ , II=3.2 $\mu\text{M}$ , III=9.9 $\mu\text{M}$ , VI=7.3 $\mu\text{M}$ , V=38.6 $\mu\text{M}$ )。また、これらは iNOS mRNA の発現誘導を阻害した。さ

らに、2種の新規フロログルシノール誘導体はヒスタミンの遊離を抑制した(IC<sub>50</sub>: I=8.6μM, II=13.8 μM)。

6. クスノハガシワの3種の新規カルコン誘導体は炎症性サイトカイン(COX-2、TNF-α、IL-1β、IL-6)の遺伝子発現誘導を阻害した。

7. ホップ---酢酸エチル抽出エキスより化合物(1-12)を得た。1: humulene, 2: hulupinic acid, 3: xanthohumol, 4: xanthohumol D, 5: dihydro xanthohumol, 6: xanthohumol B, 7: novel chalcone derivative, 9-11:lupulone の異性体。3-7 はルプロンと比較して強い NO 産生抑制率を示した。

8. ホソバキシソウ---活性成分Ⅲから25種フラボノイド配糖体を単離し、Ⅲ-13及びⅢ-30は新規化合物である。化合物9、10、11、16、17、25、26、27及び28にNO産生抑制率はIC<sub>50</sub> 0.22-0.68 mMであった。また、ヒタタミン遊離抑制効果は9-11、14-17、25-28でIC<sub>50</sub>値: 0.12-0.88 mM/mLであった。

#### D. 考察

1. 天然生薬の Tr1 細胞活性抑制による Th1 細胞活性上昇に関する報告は世界で初めての例である。
2. シジュウム中の Tr1 細胞活性抑制成分は熱に感受性の物質である。
3. MJE 及び phloroglucinol 誘導体は特異的に PGHS-2 を抑制することから、非選択的 PGHS 阻害剤と比較し、副作用の軽減が期待できるものと考えられる。
4. クスノハガシワから得られた化合物の作用機序として NF-κB の関与が推定される。
5. ホップ中の新規フロログルシノール誘導体の抗アレルギー効果は食品の機能として興味深い。
6. ホソバキシソウ中のフラボノイド配糖体にヒスタミン遊離抑制活性及び NO 産

生抑制活性が認められた。

#### E. 結論

シジュウムは Th1 細胞を強く誘導できることから Th2 細胞が病因となるアレルギー疾患ばかりでなく、Tr1 細胞が抑制の中心となることが知られているがんの治療にも有用だと考えられる。また、強い抗 HIV 活性が認められた。

アカメガシワ、クスノハガシワ及びホップ中の phloroglucinol 誘導体に PGE<sub>2</sub> が産生抑制活性、NO 産生抑制活性などが確認され、炎症性疾患の治療薬の開発にとって、phloroglucinol 誘導体が新たな一つのリード化合物として有用である可能性を示唆するものである。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 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 E<sub>2</sub> 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<sup>+</sup> Tregulatory cells and sustemic 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 immunopro-phylaxis. *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.

## 2. 学会発表

1. 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)

2. 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)

3. 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)

4. 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)

5. 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)

6. 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況  
前年度出願書に追加。

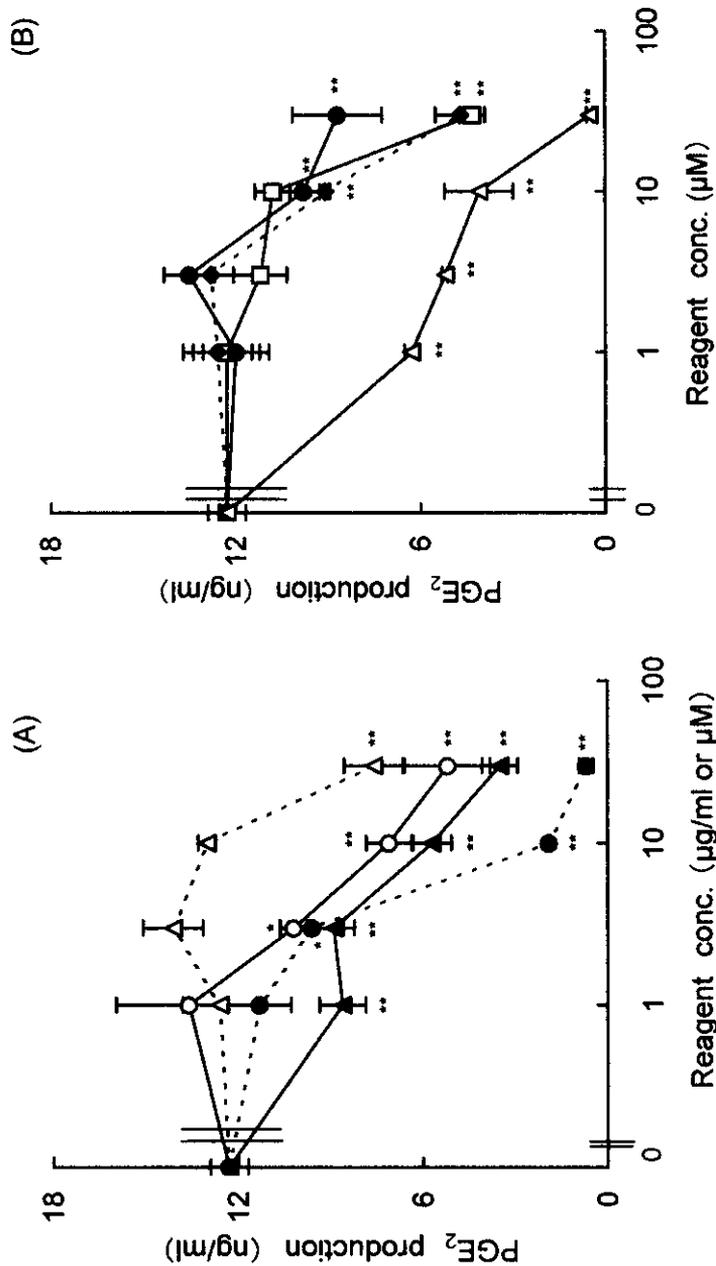


Fig. 2. Inhibitory effects of MJE and its phloroglucinol derivatives on LPS-induced PGE<sub>2</sub> production in RAW 264.7 cells. Cells were treated with various concentrations of MJE or one of its phloroglucinol derivatives in the presence of 100 ng/ml LPS at 37 °C for 16 h. The symbols correspond to: (A) MJE (-O-), 1 (-Δ-), 2 (-▲-), and 7 (-△-), and (B) 3 (-□-), 4 (-◆-), 5 (-●-), and 6 (-▲-). The results are the means ± S.E. for two independent experiments involving triplicate assays. Statistical significance: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs. corresponding controls (cells treated with 100 ng/ml LPS).

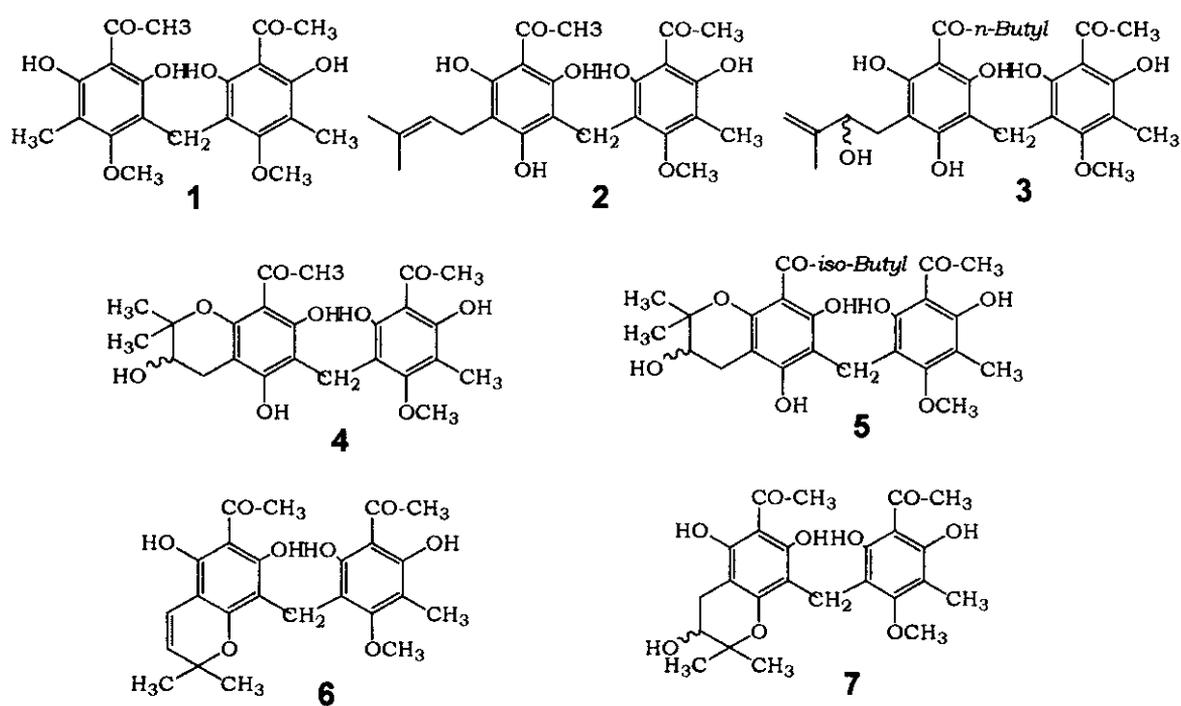


Fig. 1. Chemical structures of the phloroglucinol derivatives examined in the present study.

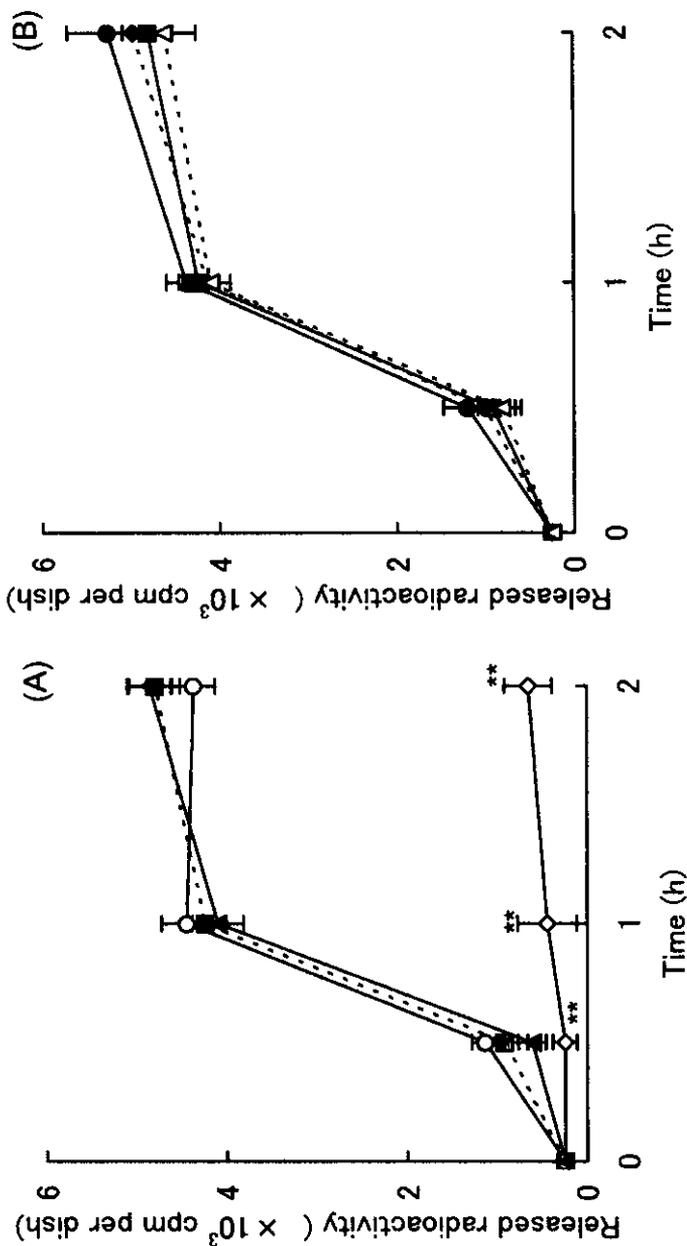
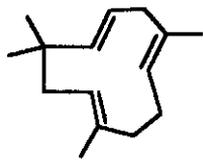
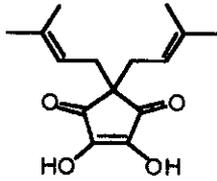


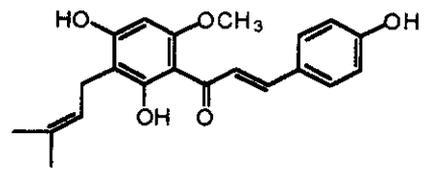
Fig. 3. Effects of MJE and its phloroglucinol derivatives on the release of radioactivity from [14C]arachidonic acid-labeled macrophages. Cells were labeled with [14C]arachidonic acid at 37°C for 18 h, washed three times, suspended in a fresh medium. The cells were reseeded, and treated with MJE or its phloroglucinol derivatives (compounds 2, 4, 6, and 7) in the presence of 100 ng/ml LPS, followed by incubation for 0-2 h. Radioactivity released into the culture supernatant was determined on a liquid scintillation analyzer. The results are the means  $\pm$  S.E. for two independent experiments involving duplicate assays. The symbols correspond to: (A) control cells (treated with LPS) (-■-), + NONE (absence of LPS) (-◇-), 30  $\mu$ M MJE (-○-), and 30  $\mu$ M 2 (-▲-), and (B) control cells (-■-), 30  $\mu$ M 4 (-◇-), 30  $\mu$ M 6 (-●-), and 30  $\mu$ M 7 (-△-). Statistical significance: \*\**P* < 0.01 vs. corresponding controls (cells treated with 100 ng/ml LPS).



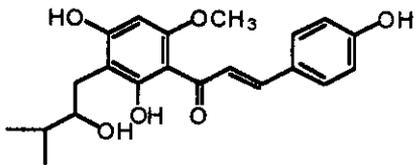
1



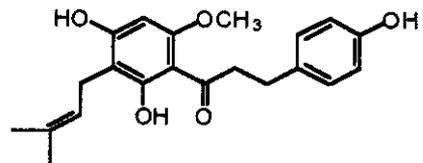
2



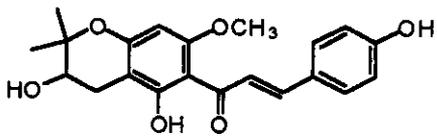
3



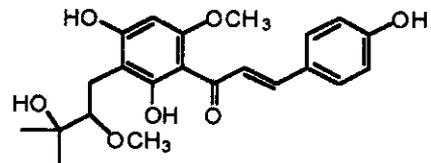
4



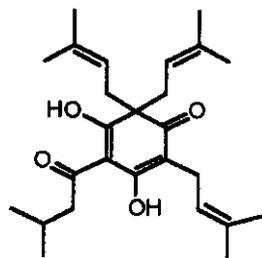
5



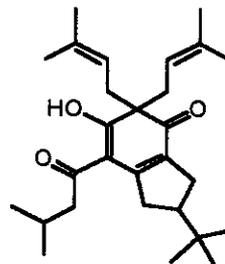
6



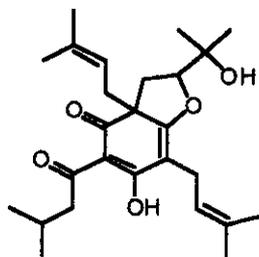
7



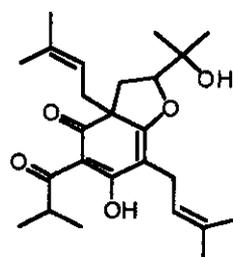
8



9



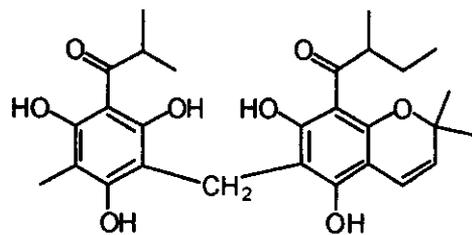
10



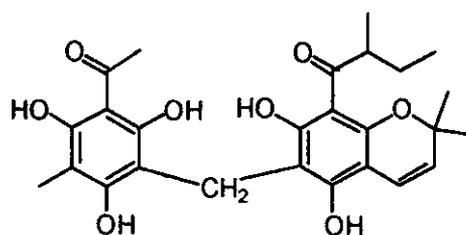
11

ホップから得られた化合物



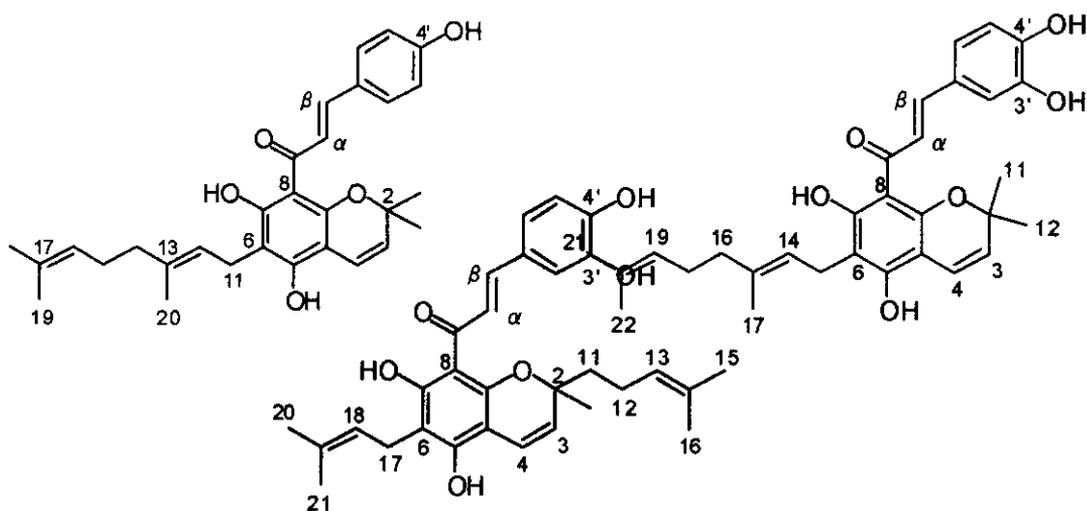


I



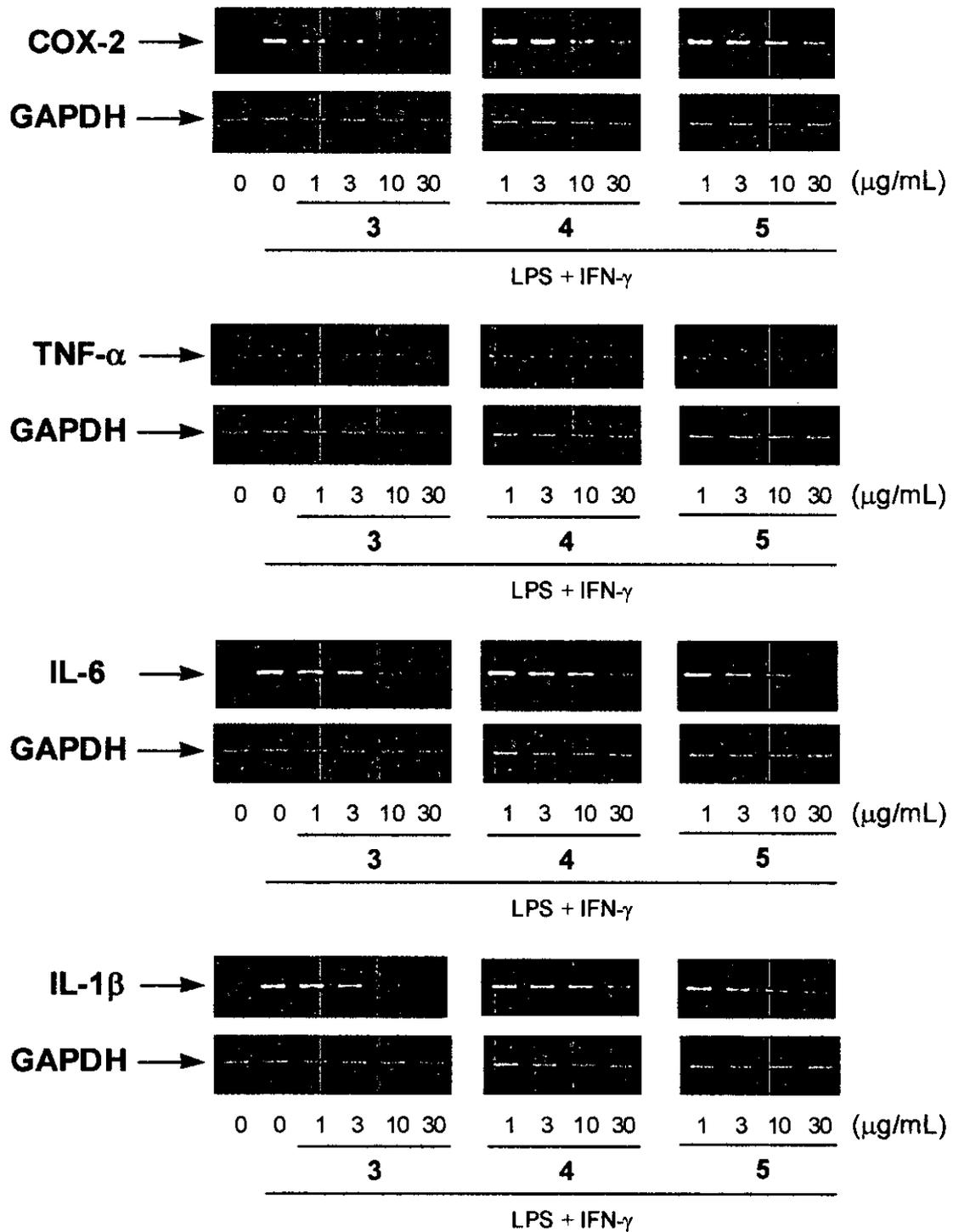
II

III  
IV

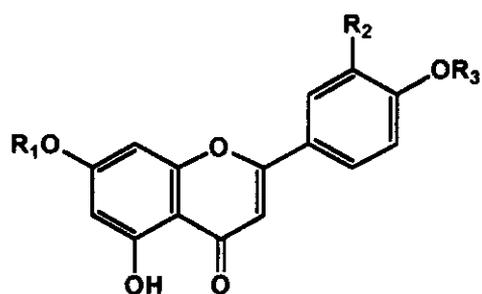


V

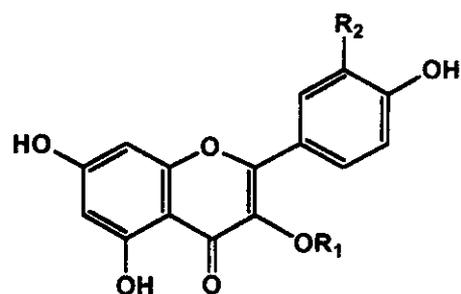
クスノハガシワから得られた化合物



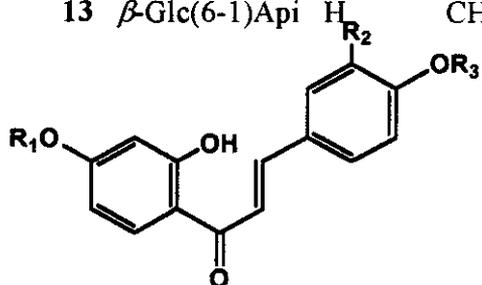
RT-PCR による炎症性サイトカインの遺伝子変動



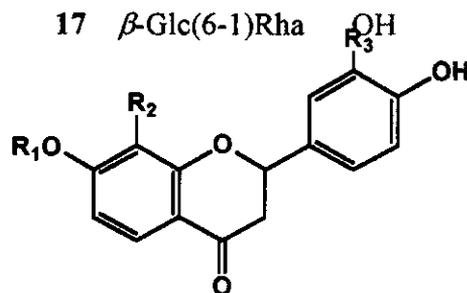
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
6	H	OCH <sub>3</sub>	H
7	H	OH	H
8	H	H	H
9	$\beta$ -Glc	OH	H
10	$\beta$ -Glc	OH	H
11	$\beta$ -Glc	H	CH <sub>3</sub>
12	$\beta$ -Glc	OH	CH <sub>3</sub>
13	$\beta$ -Glc(6-1)Api	H	CH <sub>3</sub>



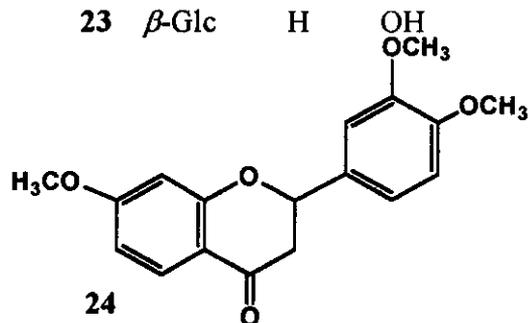
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
14	$\beta$ -Glc	H
15	$\beta$ -Glc	OH
16	$\beta$ -Glc(6-1)Rha	H
17	$\beta$ -Glc(6-1)Rha	H



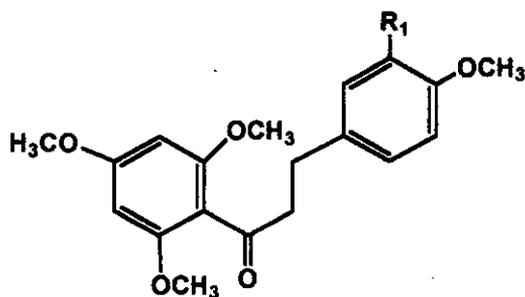
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
18	$\beta$ -Glc	OH	H
19	$\beta$ -Glc	OH	CH <sub>3</sub>
20	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>



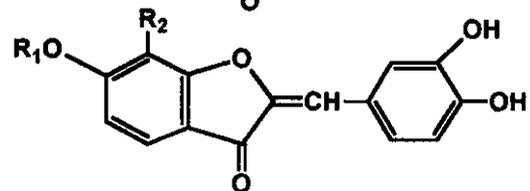
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
21	H	H	OH
22	H	OH	OH
23	$\beta$ -Glc	H	OH



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
24	H	H
25	H	OH
26	$\beta$ -Glc	H
27	$\beta$ -Glc	OH
28	H	$\beta$ -Glc



	R <sub>1</sub>
29	H
30	OCH <sub>3</sub>



ホソバキシソウから得られた化合物

マクロファージ RAW 264.7 細胞による NO 産生に関するホソバキシソウから  
単離したフラボノイドの阻害活性

Compound	I.R.	IC <sub>50</sub> (μM)
Indomethacin	52.5*	--
Chrysoeriol (6)	10.1	--
Luteolin (7)	13.0	--
Acacetin (8)	14.6	--
Luteolin 7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside(9)	76.2	0.63
Luteolin 7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucuronide (10)	63.8	0.29
Chrysoriol 7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (11)	54.4	0.53
Acacatin 7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (12)	14.8	--
Acacatin 7- <i>O</i> -(α- <i>D</i> -apiofuranosyl)6-β- <i>D</i> -glucoside (13)	10.3	--
Kaempferol3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (14)	10.2	--
Kaempferol 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -rutinoside (15)	24.3	--
Quercetin 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (16)	66.1	0.86
Quercetin 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -rutinoside (17)	46.8	0.65
3,4,2',4'-tetrahydroxychalcone 4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (18)	12.6	--
3,2',4'-trihydroxychalcone 4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (19)	14.0	--
3,4,4'-trimethoxy, 2'-hydroxychalcone (20)	9.6	--
7,3',4'-trihydroxyflavanone (21)	24.5	--
7,8,3',4'-tetrahydroxyflavanone (22)	16.7	--
7,8,3',4'-tetrahydroxy flavanone 7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (23)	3.6	--
7,3',4' trimethoxy flavanones (24)	17.1	--
Sulfuretin (25)	67.1	0.56
Sulfuretin 6- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (26)	68.3	0.65
Sulfuretin 7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (27)	65.7	0.68
6,7,3',4'-tetrahydroxyaurone (28)	62.9	0.22
4,2',4',6'-tetramethoxydihydrochalcone (29)	2.8	--
3,4,2',4',6'-tetramethoxydihydrochalcone (30)	6.9	--

I.R. : Inhibitory Ratio (%)

\*100μg/m

マスト細胞から抗原抗体反応によるヒスタミン遊離に関するホソバキシソウから単離されたフラボノイドの阻害活性

Compound	I.R.	IC <sub>50</sub> (μM)
Indomethacin	52.5*	—
Chrysoeriol (6)	36.1	—
Luteolin (7)	41.0	—
Acacetine (8)	18	—
Luteolin 7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside(9)	85.4	0.24
Luteolin 7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucuronide (10)	98.6	0.12
Chrysoriol 7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (11)	66.7	0.53
Acaceticin 7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (12)	47.6	—
Acaceticin 7- <i>O</i> -(α- <i>D</i> -apiofuranosyl)6-β- <i>D</i> -glucoside (13)	46.3	—
Kaempferol3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (14)	52.2	0.46
Kaempferol 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -rutinoside (15)	74.3	0.35
Quercetin 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (16)	66.1	0.66
Quercetin 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -rutinoside (17)	56.8	0.72
3,4,2',4'-tetrahydroxychalcone 4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (18)	52.6	—
3,2',4'-trihydroxychalcone 4'- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (19)	23.0	—
3,4,4'-trimethoxy, 2'-hydroxychalcone (20)	22.8	—
7,3',4'-trihydroxyflavanone (21)	54.8	—
7,8,3',4'-tetrahydroxyflavanone (22)	34.8	—
7,8,3',4'-tetrahydroxy flavanone 7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (23)	57.7	—
7,3',4' trimethoxy flavanone (24)	55.6	—
Sulfuretin (25)	87.7	0.62
Sulfuretin 6- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (26)	98.9	0.56
Sulfuretin 7- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucoside (27)	89.3	0.34
6,7,3',4'-tetrahydroxyaurone (28)	68.6	0.88
4,2',4',6'-tetramethoxydihydrochalcone (29)	14.5	—
3,4,2',4',6'-five methoxydihydrochalcone (30)	12.9	—

I.R. : Inhibitory Ratio (%)

\*100μg/mL

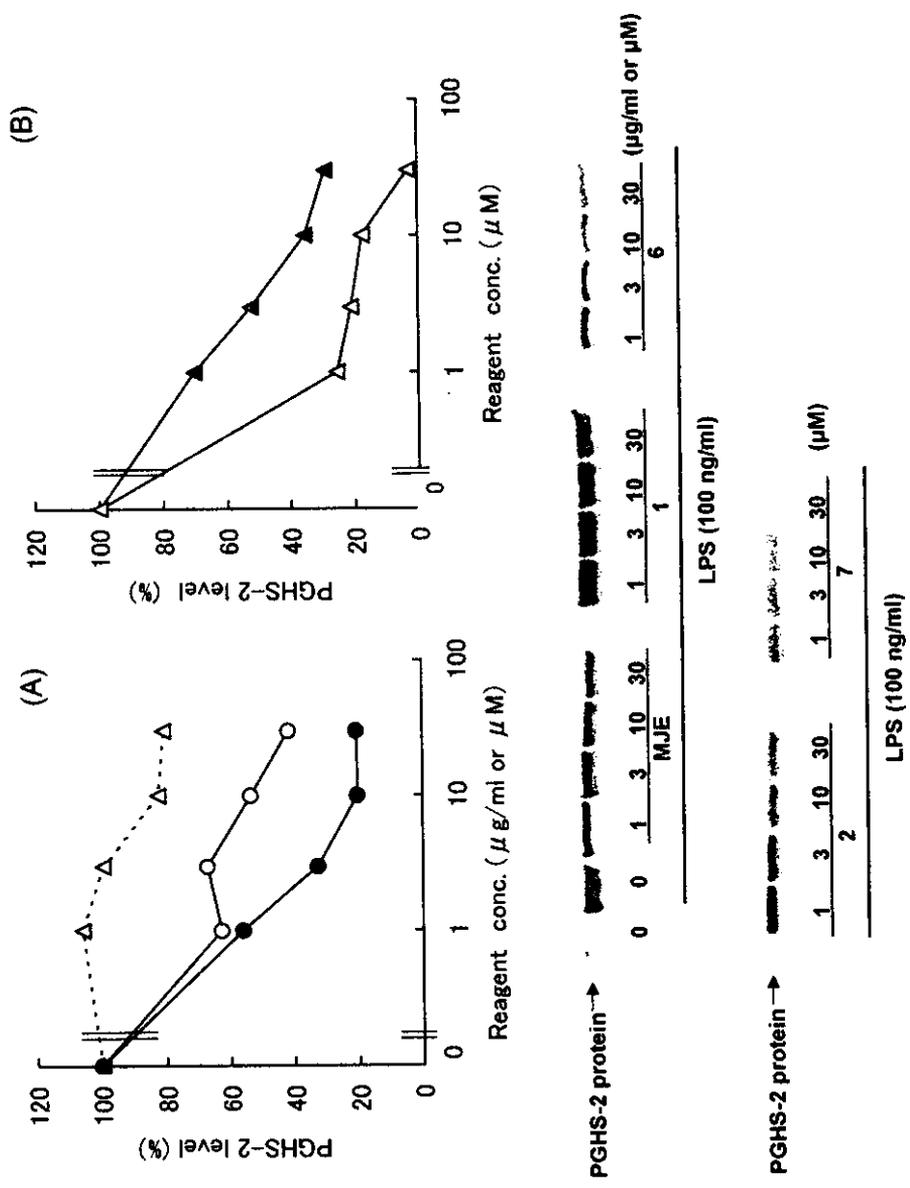


Fig. 6. Inhibitory activities of MJE and its phloroglucinol derivatives towards PGHS-2 protein induction. Cells were treated with various concentrations of MJE, compounds 1, 2, 6, or 7 in the presence of 100 ng/ml LPS for 16 h, and then cell lysates were prepared and assayed as described in the text. The amounts of the PGHS-2 protein were calculated from the radioactivity of the bands corresponding to PGHS-2 protein. The results are expressed relative to the amount of PGHS-2 in 60  $\mu\text{g}$  of the control cell (100%: treated with LPS, but MJE of other compounds not added). The symbols correspond to: (A) MJE (-O-), 1 (-- $\Delta$ --), and 6 (- $\bullet$ -), (B) 2 (- $\blacktriangle$ -), and 7 (- $\Delta$ -). The results are for a typical example of repeated experiments.

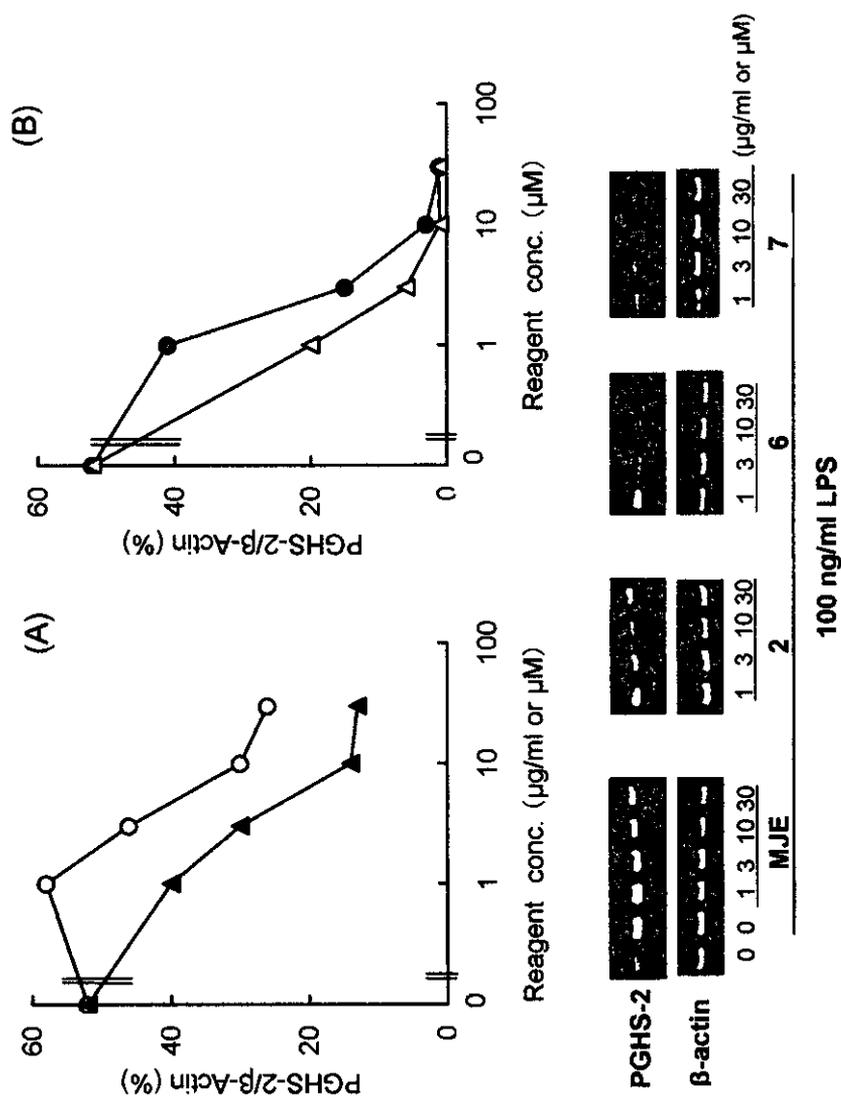
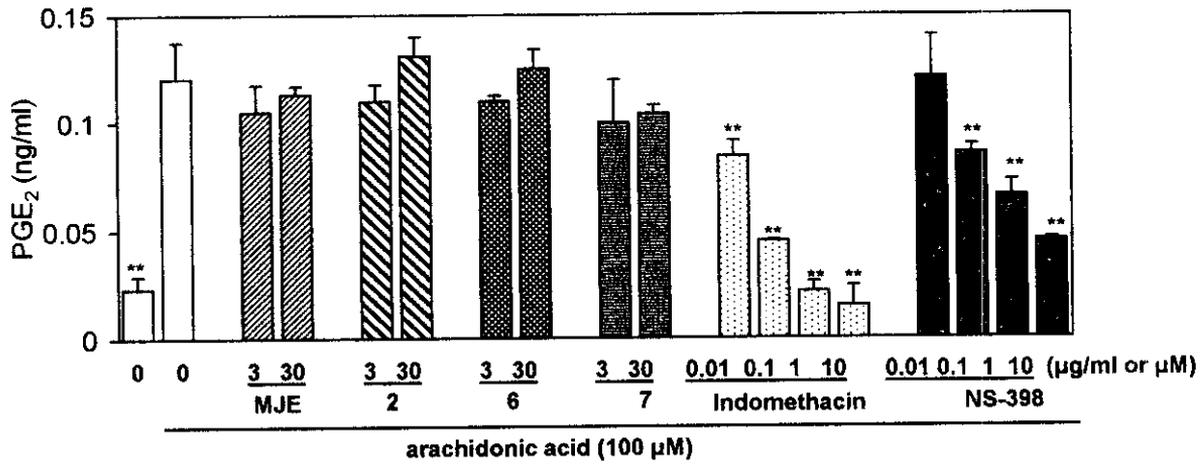


Fig. 7. Effect of MJE and its phloroglucinol derivatives on PGHS-2 mRNA expression. Cells were treated with various concentrations of MJE, compounds 2, 6, or 7 in the presence of 100 ng/ml LPS for 6h, and the cells were subsequently prepared and assayed as described in the text. The symbols correspond to: (A) MJE (○), and 2 (▲), (B) 6 (●), and 7 (Δ). The lower panel shows the PCR products corresponding to the PGHS-2 (296 bp) and β-actin (540 bp) bands. The amounts of PGHS-2 mRNA in (A) and (B) are shown as % values relative to β-actin, individually. The results are for a typical example of repeated experiments.

### (A) PGHS-1



### (B) PGHS-2

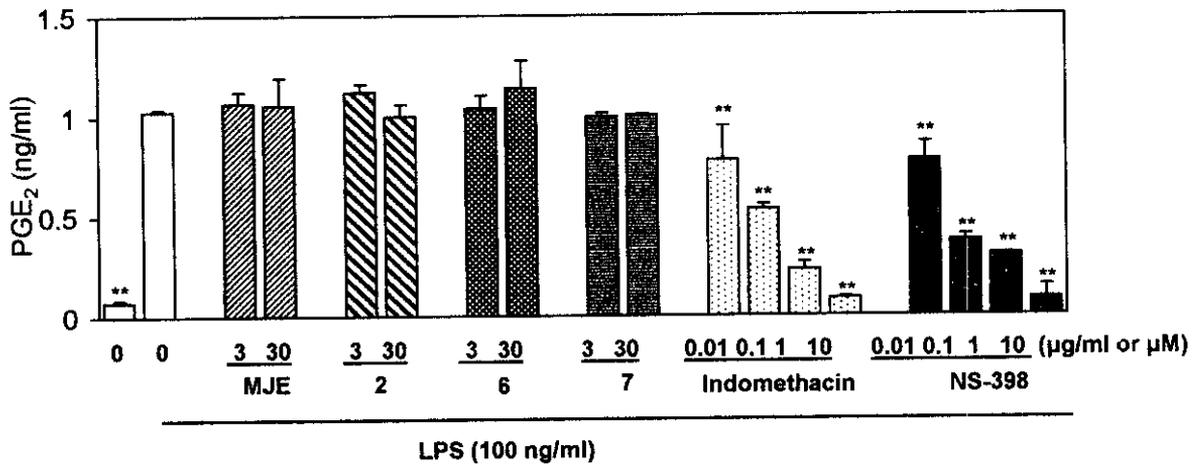


Fig. 4. Direct effects of MJE and its phloroglucinol derivatives on PGHS-1 or PGHS-2 activities in macrophages. (A) Cells were pretreated with 1  $\mu$ M cycloheximide for 4 h. Then cells were washed twice, suspended with fresh medium containing 1  $\mu$ M cycloheximide, and were further incubated for 10 min. MJE, compounds 2, 6, 7, indomethacin, or NS-398 were added to the cell culture in the presence of 100  $\mu$ M arachidonic acid, followed by incubation for 3 h. (B) Cells were pretreated with 100  $\mu$ M aspirin for 4 h. Then cells were washed twice, suspended with fresh medium, and were further incubated with 100 ng/ml LPS for 6 h. MJE, compounds 2, 6, 7, indomethacin, or NS-398 were added to the cell culture, followed by incubation for 30 min. PGE<sub>2</sub> concentrations in the culture supernatant were determined by Enzyme-Immuno-Assay. The results are presented as the means  $\pm$  S.E. for two different experiments involving duplicate assays. Statistical significance: \*\*P < 0.01 VS. corresponding controls (cells treated with 100  $\mu$ M arachidonic acid or 100 ng/ml LPS).