

図 7. 猫眼草抽出エキス及び単離化合物 1 の RT-PCR による炎症性サイトカインの遺伝子変動

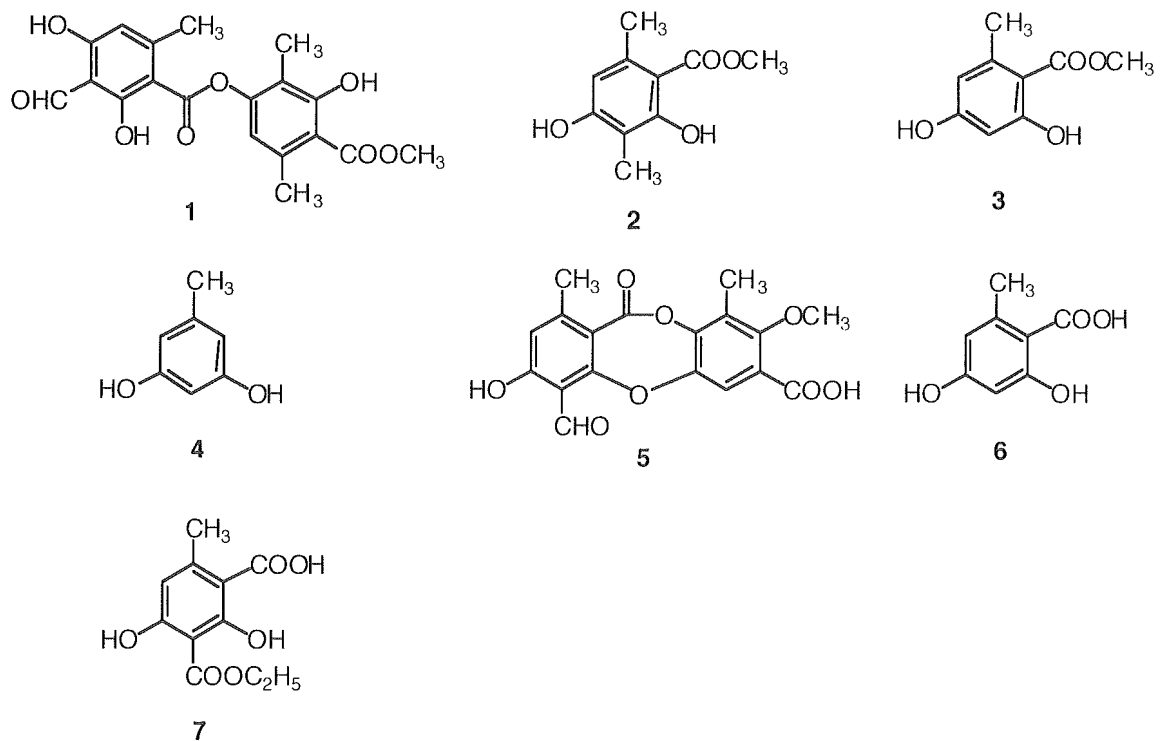


図 8. 紅雪茶より得られた化合物の構造式

厚生労働科学研究補助金（免疫アレルギー疾患予防研究事業）

分担研究報告書

アレルギー疾患を抑制する新規天然薬物に関する研究

分担研究者 羅 智靖

日本大学大学院医学研究科・分子細胞免疫・アレルギー学講座教授

研究協力者

下川敏文 日本大学医学部助手 高橋恭子 日本大学医学部助手
鈴木良弘 日本大学医学部助手 吉丸哲郎 日本大学医学部博士研究員
布村聡 日本大学医学部博士研究員

研究要旨

今まで我々はアレルギー性炎症の局所では、IgE-FcεRI-マスト細胞枢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、IgE の系と非 IgE の系におけるマスト細胞活性化の分子的メカニズムを明らかにした。本年度は、これらの系に対するシジュウムおよび甘遂抽出物の影響を検討した。

研究目的

アレルギー性疾患に対して、その有用性が認められつつあるシジュウムからの抽出成分およびリウマチなどの民間療法として中国で使用されている甘遂から精製した化合物の抗アレルギー作用を検定し、その作用点を明らかにする。

められたジテルペノイドに関しては、マウス骨髄由来培養マスト細胞(BMMC)を用いて作用機構の解析を行った。

2. シジュウムの根、葉、樹皮から熱水およびエタノール抽出したエキスの FcεRI 発現への影響を検討した。BMMC をエキス存在下で 96 時間培養し、培養後の FcεRI 発現を Flow Cytometry および RT-PCR を用いて解析した。

方法

甘遂よりジテルペノイドを精製し、ラットマスト細胞株 RBL-2H3 を用いて、β-Hexosaminidase 放出を指標とした化合物のスクリーニングを行い、脱顆粒抑制効果が認

結果

1. 甘遂 RBL-2H3 を用いたスクリーニングより (図 1)、脱顆粒抑制能が認められた化合物のひとつは、

脱顆粒のみならず、LTC₄、PGD₂、PGE₂ 合成も有意に抑制した (表 1)。また、シグナル伝達分子のレベルでは細胞外カルシウム流入を濃度依存的に抑制し (図 2)、PLC γ 、Syk、Erk1/2 および cPLA₂ の活性化を顕著に阻害した (図 3)。また今回行った濃度において細胞毒性は全く認められなかった。

2. シジュウム

すべてのエキスにおいて Fc ϵ RI の発現低下が認められたが、特に根のエタノール抽出物で顕著であった (図 4)。また、これらのエキスには IgE と Fc ϵ RI の結合を阻害する効果は無く (図 5)、また c-Kit や Fc γ RII/III の発現にも影響を及ぼさなかった (図 6)。さらに RT-PCR を用いた解析により、これらのエキスは α 鎖の発現には影響しないが、 β あるいは γ 鎖の発現を低下させていることが明らかになった (図 7)。

考察

甘遂より得られた化合物のひとつが、マスト細胞活性化に重要であると考えられている各種のシグナル伝達分子の活性化を抑制し、マスト細胞からの炎症性メディエーターの放出を効果的に抑制する物質であることが明らかになった。また、細胞毒性が極めて低いことなどから今後、有望な抗アレルギー薬としての展開が期待される。さらにシジュウムには Fc ϵ RI の発現を低下させる効果があることを明らかにし、今後は、シジュウム中に含まれる Fc ϵ RI の発現を低下させる成分の同定、またヒト Fc ϵ RI 発現への影響を検討すべきである。

学会発表

1. 羅智靖 第 27 回日本アレルギー学会認定医教育セミナー (教育講演) アレルギー学総論 2003.
2. 羅智靖 第 53 回日本アレルギー学会総会 (教育講演) マスト細胞活性化分子 2003.
3. 羅智靖 第 67 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 (教育講演) 自然免疫からアレルギーまで
4. 羅智靖 第 40 回日本小児アレルギー学会 (招待講演) 抗アレルギーの分子病態に応じた 21 世紀型治療戦略 2003.
5. 高橋恭子, 羅智靖 第 53 回日本アレルギー学会総会 (シンポジウム) Fc ϵ RI 受容体 I を標的とした免疫療法の応用 2003.
6. 下川敏文, 羅智靖: Fc α R (CD89) 遺伝子の発現を調節する核内因子の解析第 53 回日本アレルギー学会総会
7. 岡田壮令, 相良博典, 太田真弓, 川津博子, 中尾篤人, 羅智靖, 福田健: TGF- β /Smad2 シグナル伝達の気道リモデリングへの関与 第 15 回日本アレルギー学会春季臨床大会 2003.
8. 鈴木良弘, 吉丸哲郎, 松井隆, 井上寿男, 新出理, 布村聡, 羅智靖: マスト細胞活性化に伴って生成する H₂O₂ は Fc ϵ RI シグナル伝達における細胞内 Ca 制御に関与する 第 53 回日本アレルギー学会総会 2003.
9. 吉丸哲郎, 鈴木良弘, 松井隆, 井上寿男, 新出理, 布村聡, 羅智靖: マスト細胞活性化に伴って superoxide と H₂O₂ が異なる経路で産生される 第 53 回日本アレルギー学会総会 2003.
10. 松井隆, 鈴木良弘, 吉丸哲郎, 井上寿男, 新出理, 羅智靖: 金は抗原や銀とは異なる ROS 依存性マスト細胞活性化を惹起する 第 53 回日本アレルギー学会総会 2003.

11. 井上寿男, 鈴木良弘, 吉丸哲郎, 松井隆, 新出理, 秋久俊博, 羅智靖: 天然物由来抗酸化性化合物のmast細胞活性化抑制の作用機序第53回日本アレルギー学会総会 2003.
 12. 布村 聡, 古本恭子, 寺田知新, Rivera J., 羅智靖: Fc ϵ RI β 鎖を介した抑制性シグナル伝達の分子機構第53回日本アレルギー学会総会 2003.
 13. 権寧博, 羅智靖: Innate Immunity Toll-like receptor4を介した情報伝達経路のmast細胞活性化における役割、(シンポジウム) 第15回日本アレルギー学会春季臨床大会 2003.
 14. 権寧博, 堀江孝至, 羅智靖: Lipopolysaccharide(LPS)によるmast細胞活性化における dsRNA-activated protein kinase(PKR)の役割 日本呼吸器学会、2003.
 15. 権寧博, 羅智靖: LPSによるmast細胞活性化における dsRNA-activated protein kinase(PKR)の役割 日本免疫学会、2003.
 16. 藤井康行(大正製薬医薬研究所), 中尾徹, 若原俊一, 原寿史, 小紫俊, 羅智靖, 北村大介, 後飯塚僚: Fc ϵ RIシグナル伝達においてMISTとLynの会合に關与するアダプター分子群 日本免疫学会、2003.
 17. 布村聡, 寺田知新, 羅智靖: mast細胞活性化における高親和性IgE受容体(Fc ϵ RI) β 鎖を介した抑制性シグナル伝達機構の解析 日本免疫学会、2003.
 18. 寺田知新, 下川敏文, 布村聡, 羅智靖: 高親和性IgE受容体 β 鎖の細胞質内セリン残基の機能解析 日本免疫学会、2003.
 19. 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: マウスmast細胞におけるFc ϵ RI β 鎖の発現調節機構 日本免疫学会、2003.
 20. 高橋恭子, 西山千春, 長谷川真成, 秋澤有四郎, 羅智靖: ヒト高親和性IgE受容体 β 鎖発現制御機構の解析 日本免疫学会、2003.
 21. 下川敏文, 羅智靖: C/EBP及びEtsファミリーによるFc α R(CD89)遺伝子の細胞特異的発現調節機構の解析 日本免疫学会、2003.
 22. 長谷川真成(山口大学 小児科), 西山千春, 秋澤有四郎, 高橋恭子, 古川漸, 羅智靖, 小川秀興, 奥村康: ヒト高親和性IgE受容体(Fc ϵ RI) α 鎖上流プロモーターの構造と解析 日本小児科学会、2003.
- 論文発表
1. Suzuki Y, Yoshimaru T, Matsui T, Inoue T, Niide O, Nunomura S, Ra C. FcepsilonRI signaling of mast cells activates intracellular production of hydrogen peroxide: role in the regulation of calcium signals. *J Immunol* 171:6119-6127,2003.
 2. Tsuge T, Suzuki Y, Shimokawa T, Horikoshi S, Okumura K, Ra C, Tomino Y. Monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 production via functionally reconstituted Fcalpha receptor (CD89) on glomerular mesangial cells. *Inflamm Res.* 52:428-432,2003.
 3. Ra C. [IgE-Fc(epsilon)RI-mast cell paradigm revisited] *Arerugi.* 52:573-581,2003. Review. Japanese. No abstract available.
 4. Takahashi K, Nishiyama C, Hasegawa M, Akizawa Y, Ra C. Regulation of the human high affinity IgE receptor beta-chain gene expression via an intronic element. *J Immunol.* 171:2478-2484,2003.

5. Hasegawa M, Nishiyama C, Nishiyama M, Akizawa Y, Mitsuishi K, Ito T, Kawada H, Furukawa S, Ra C, Okumura K, Ogawa H. A novel -66T/C polymorphism in Fc epsilon RI alpha-chain promoter affecting the transcription activity: possible relationship to allergic diseases. *J Immunol.* 171:1927-1933,2003.
6. Nishiyama C, Yokota T, Nishiyama M, Ra C, Okumura K, Ogawa H. Molecular cloning of rat transcription factor YY1. *Biosci Biotechnol Biochem.* 67:654-658,2003.
7. Akizawa Y, Nishiyama C, Hasegawa M, Maeda K, Nakahata T, Okumura K, Ra C, Ogawa H. Regulation of human FcepsilonRI beta chain gene expression by Oct-1. *Int Immunol.* 15:549-556,2003.
8. Fujii Y, Wakahara S, Nakao T, Hara T, Ohtake H, Komurasaki T, Kitamura K, Tatsuno A, Fujiwara N, Hozumi N, Ra C, Kitamura D, Goitsuka R. Targeting of MIST to Src-family kinases via SKAP55-SLAP-130 adaptor complex in mast cells(1). *FEBS Lett.* 540:111-116,2003.
9. Hasegawa M, Nishiyama C, Nishiyama M, Akizawa Y, Takahashi K, Ito T, Furukawa S, Ra C, Okumura K, Ogawa H. Regulation of the human Fc(epsilon)RI alpha-chain distal promoter. *J Immunol.* 170:3732-3738,2003.
10. Suzuki Y, Gomez-Guerrero C, Shirato I, Lopez-Franco O, Gallego-Delgado J, Sanjuan G, Lazaro A, Hernandez-Vargas P, Okumura K, Tomino Y, Ra C, Egidio J. Pre-existing glomerular immune complexes induce polymorphonuclear cell recruitment through an Fc receptor-dependent respiratory burst: potential role in the perpetuation of immune nephritis. *J Immunol.* 170:3243-3253,2003.
11. Funaki T, Nakao A, Ebihara N, Setoguchi Y, Fukuchi Y, Okumura K, Ra C, Ogawa H, Kanai A. Smad7 suppresses the inhibitory effect of TGF-beta2 on corneal endothelial cell proliferation and accelerates corneal endothelial wound closure in vitro. *Cornea.* 22:153-159,2003.
12. Yoshimura-Uchiyama C, Yamaguchi M, Nagase H, Fujisawa T, Ra C, Matsushima K, Iwata T, Igarashi T, Yamamoto K, Hirai K. Comparative effects of basophil-directed growth factors. *Biochem Biophys Res Commun.* 302 : 201-206,2003.
13. Shimokawa T, Ra C. C/EBP α and Ets protein Family Members Regulate the Human Myeloid IgA Fc Receptor (Fc α R,CD89) Promoter. *J Immunol.* 170 : 2564-2572,2003.

14. Komiya A, Hirai K, Iikura M, Nagase H, Yamada H, Miyamasu M, Ohta K, Morita Y, Ra C, Yamamoto K, Yamaguchi M. Induction of Basophil Desensitization in Physiological Medium: Enhancement after IgE-Dependent Upregulation of Surface IgE Binding on Basophils. *Int Arch Allergy Immunol.* 130:40-50, 2003.
15. Togo S, Shimokawa T, Fukuchi Y, Ra C. Alternative splicing of myeloid IgA Fc receptor (FcalphaR, CD89) transcripts in inflammatory responses. *FEBS Lett.* 535:205-209, 2003.
16. Maeda K, Nishiyama C, Tokura T, Akizawa Y, Nishiyama M, Ogawa H, Okumura K, Ra C. Regulation of cell type-specific mouse FcepsilonRI beta-chain gene expression by GATA-1 via four GATA motifs in the promoter. *J Immunol.* 170:334-340, 2003.

**β -hexosaminidase release
(% maximum release of cont.)**

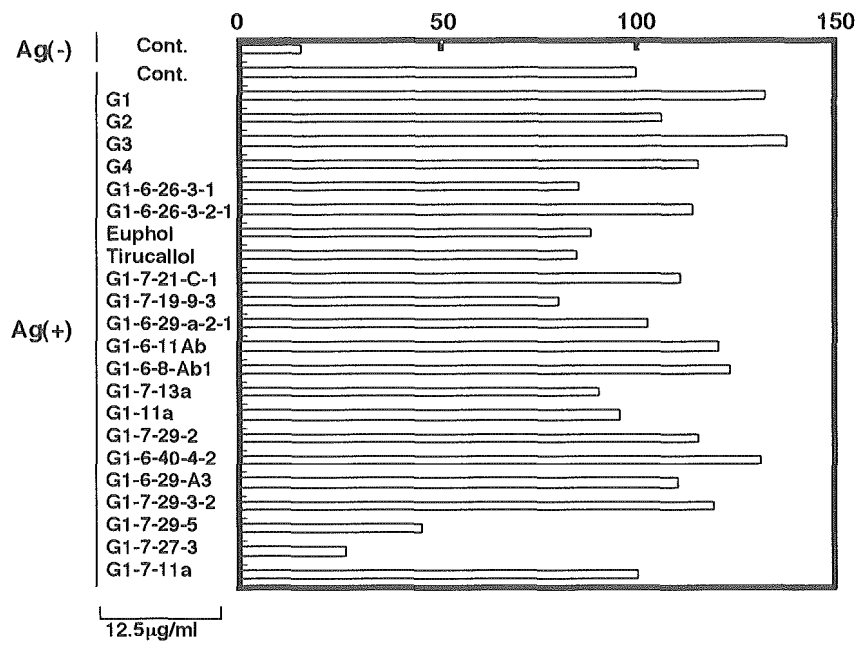


图 1

表 1

G1-7-27-3 ^a	Ag(+) ^b			
	LTC4 (pg/ml)	PGD2(pg/ml)	PGE2 (pg/ml)	
0 μg/ml	9189.14 ± 279.56	2502.13 ± 203.86	238.28 ± 9.0	
12.5μg/ml	0.48 ± 0.44	317.78 ± 35.18	90.03 ± 12.05	
2.5μg/ml	2.43 ± 1.27	328.68 ± 26.97	90.47 ± 6.04	
0.5μg/ml	3.11 ± 1.27	399.82 ± 27.71	88.44 ± 5.32	
0.1μg/ml	725.94 ± 5.80	2692.34 ± 288.57	117.68 ± 12.76	

^aIgE-sensitized BMMC were treated with G1-7-27-3 at indicated concentrations for 30 min.

^b G1-7-27-3-treated cells were stimulated with 10 ng/ml of TNP-BSA for 30 min at 37 °C. The values are means ± SD(n=3).

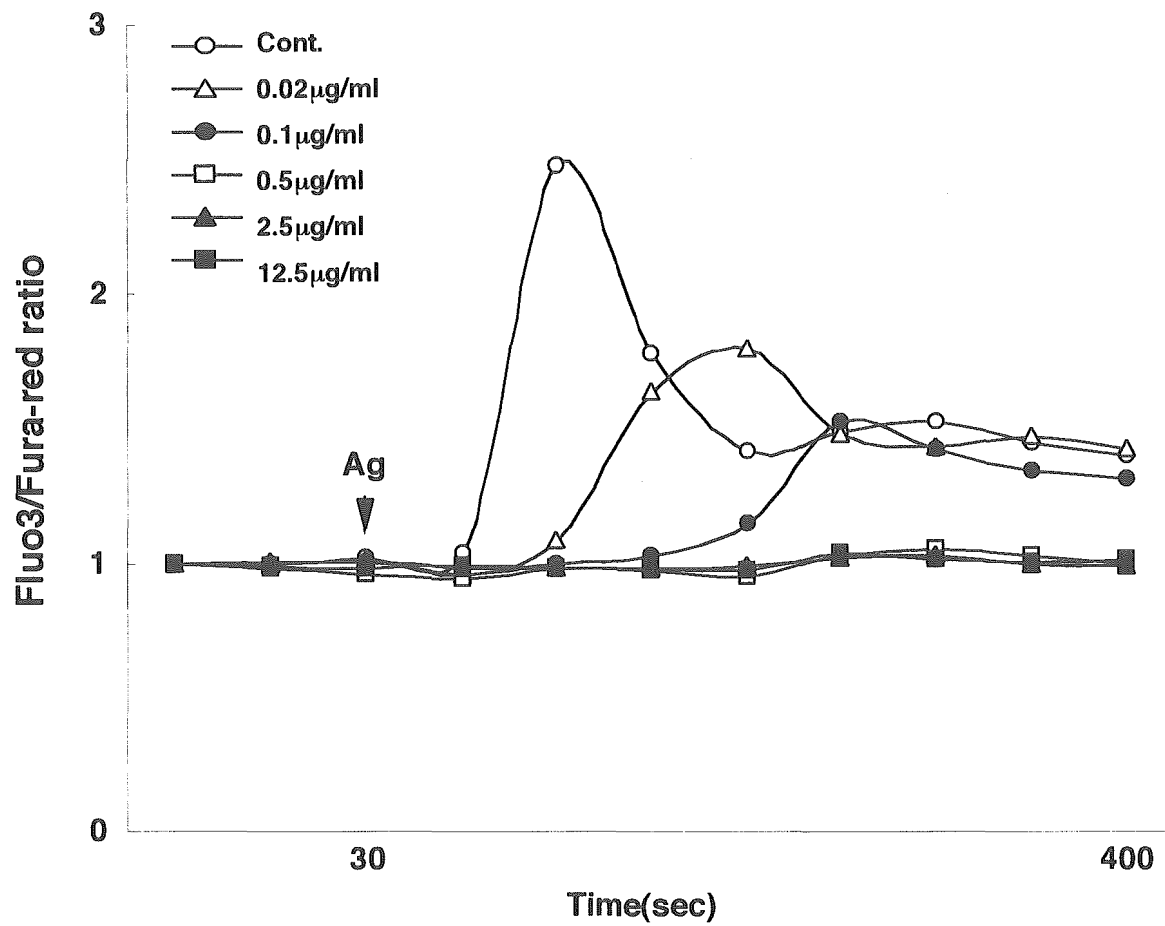


図 2

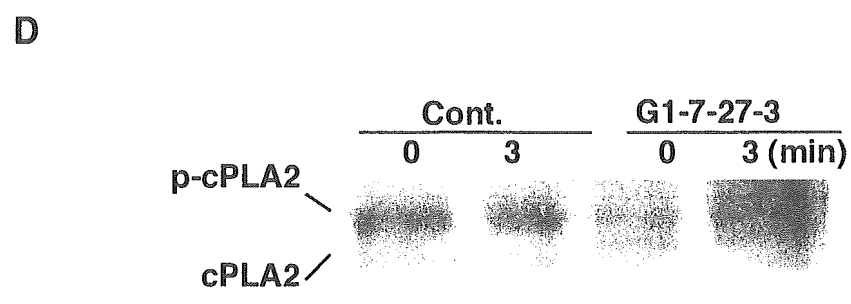
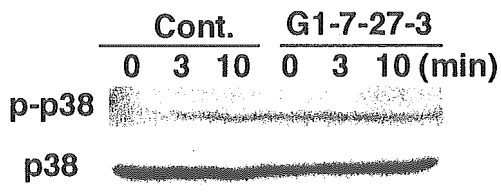
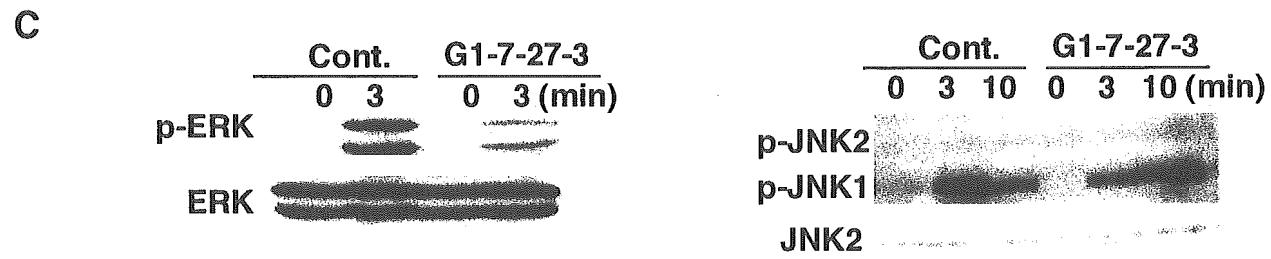
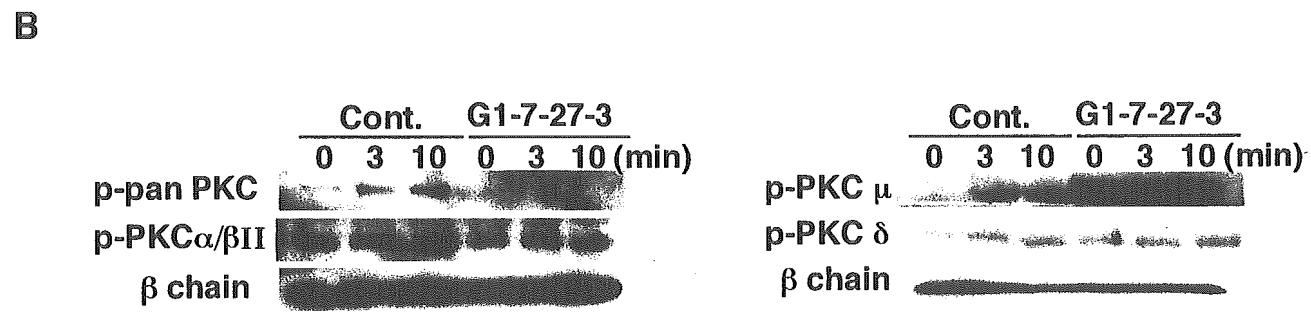
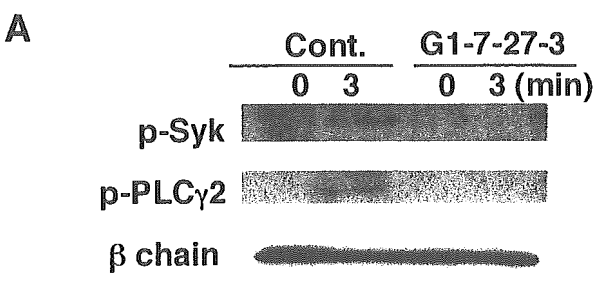


图 3

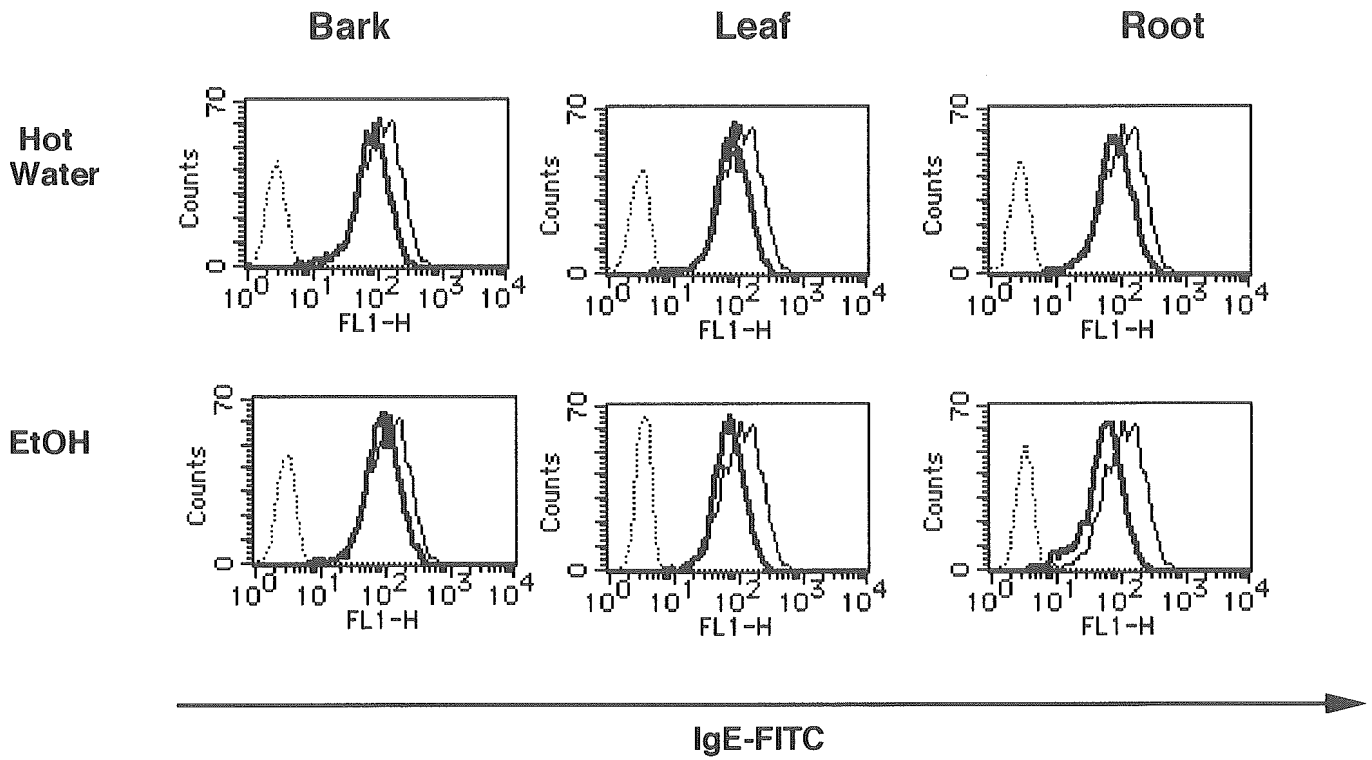
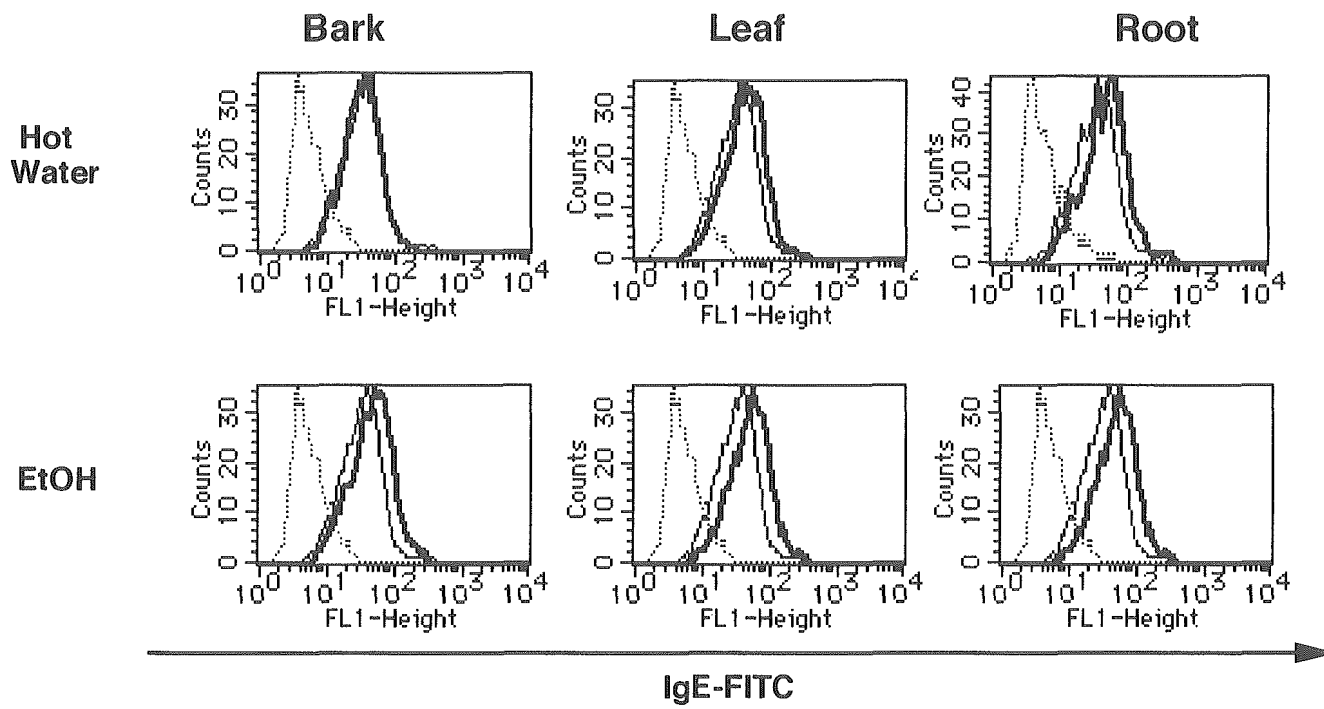


图 4

IgE Binding:CHO/ $\alpha\beta\gamma$



☒ 5

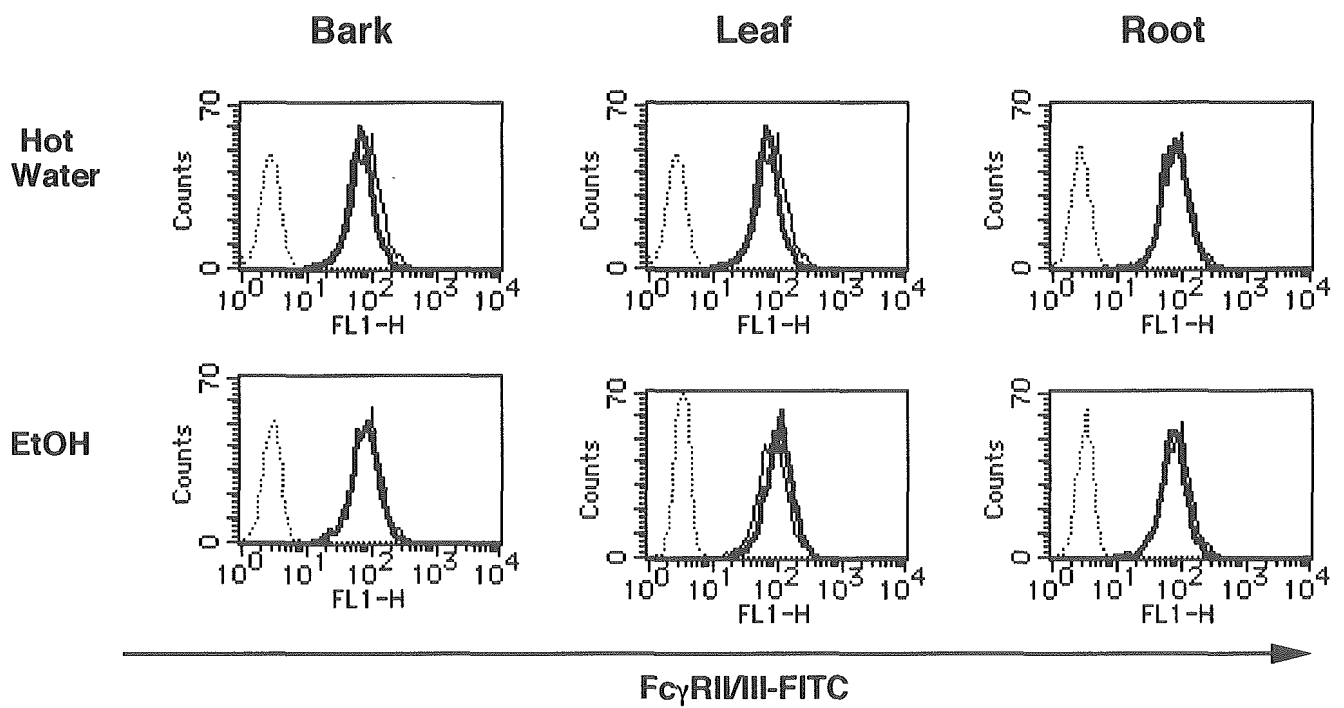
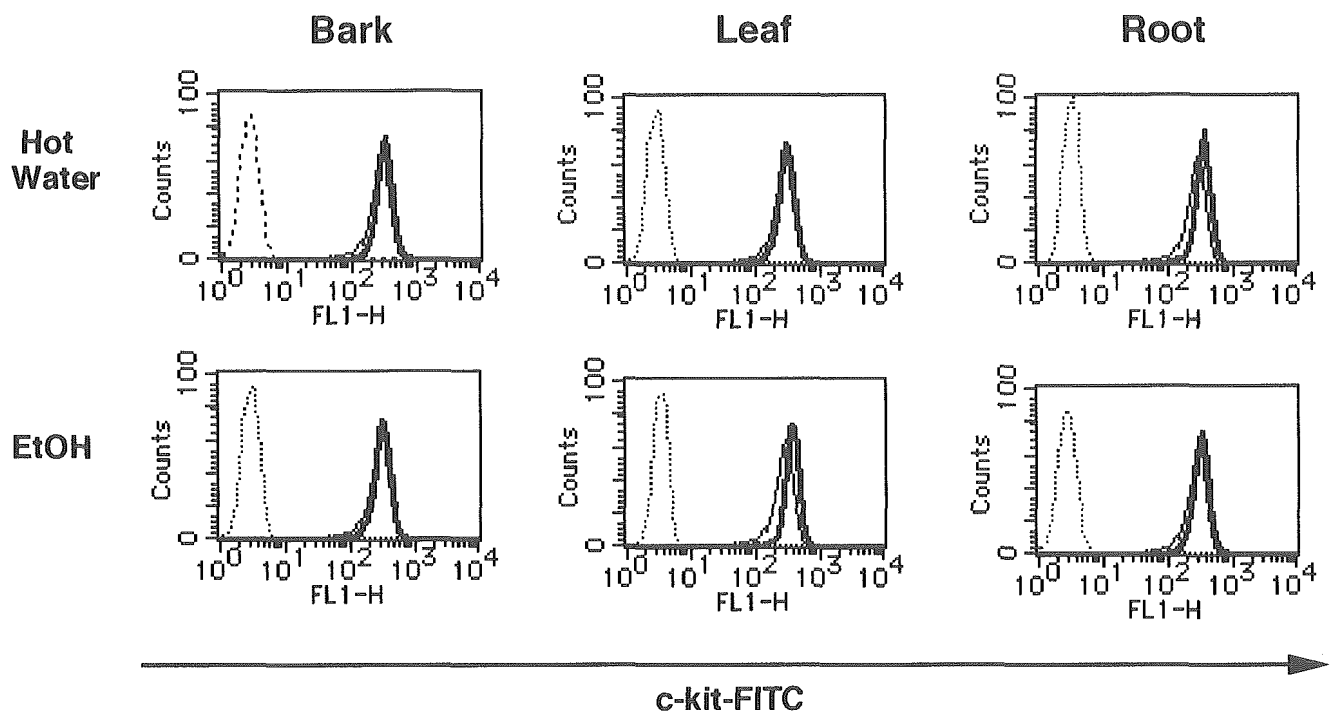


图 6

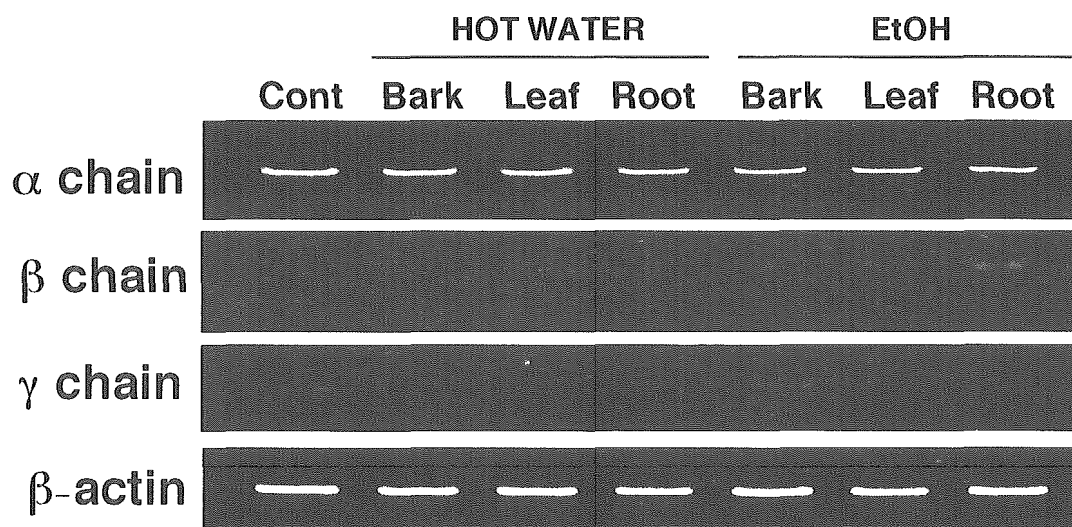


图 7

鼻アレルギーに対するシジュウム点鼻液の臨床効果の検討

分担研究者 鈴木五男 東邦大学第二小児科助教授
研究協力者 岸田 勝 東邦大学第二小児科講師 中園宏紀 東邦大学第二小児科助手
中園純子 東邦大学第二小児科 斉藤誠一 船山病院小児科
下田牧子 東京臨海病院小児科 中野裕史 埼玉医大小児科助手
小渋達郎 小渋医院 山口博明 山口医院
女川裕司 女川医院

研究要旨：シジュウムは南米産フトモモ科の植物である。これまでシジュウムから単離されてきた18種の化合物の中のタンニン類にはヒスタミン遊離抑制活性、およびNO産生抑制活性が認められ、抗アレルギー作用が一部タンニン類と考えられている。またタンニン抽出物にはヒト末梢血T細胞のINF- γ 産生を増強し、Th2細胞の選択的アポトーシスを誘導することが確認されている。INF- γ 産生増強については、シジュウムから単離された5種の成分はIL-12産生を顕著に増加させることとTr1細胞を活性化させTh1/Th2免疫バランスをTH1優位誘導することが分かった。このようにシジュウムがアレルギー抑制系に働くことが伺え、我々はシジュウムを用い、点鼻液を作成し、その有効性を検討した。その結果、シジュウム点鼻液は鼻アレルギーに治療に有効と思われ、鼻アレルギーに対する新規薬物の開発に繋がるものと考える。

A.研究目的：シジュウムは南米産フトモモ科の植物でこれまでの検討で抗ヒスタミン、抗ロイコトリエン作用など抗アレルギー作用を有する植物として言われている。本研究ではシジュウムエキスをを用い、点鼻液を作成し、鼻アレルギーに対する効果を検討した。

B：研究方法

1. シジュウムの葉を用いエタノールで抽出し、その抽出エキスをを用いた。
2. シジュウム点鼻液の構成は Sodium chloride 0.5%、1,3-Butylene glycol3.7%、Psidium Extarct7.5%、Benzoic acid,4-hydroxy-methyl ester0.15%、Purified Water88.15%で

作成されている。なおコントロール点鼻液として Psidium Extarct を除いて作成した。

3. 対象は各研究協力者の施設に通院する鼻アレルギー患者 122名(年齢8歳から48歳、平均年齢27.4歳、軽症群61例、中等症群41例)である。シジュウム使用群は96名、コントロール群は26名(年齢15歳から37歳、平均年齢26.9歳)であり、方法は1週間の観察期をおいて、その後2週間シジュウムもしくはコントロール点鼻液を1日2-3回投与し、臨床像(全般改善度および各症状として鼻水、くしゃ

み、鼻閉、睡眠障害など)を鼻アレルギー
 一誌により判定し、また鼻粘膜所見
 は観察期および投与後の変化を検討し
 た。

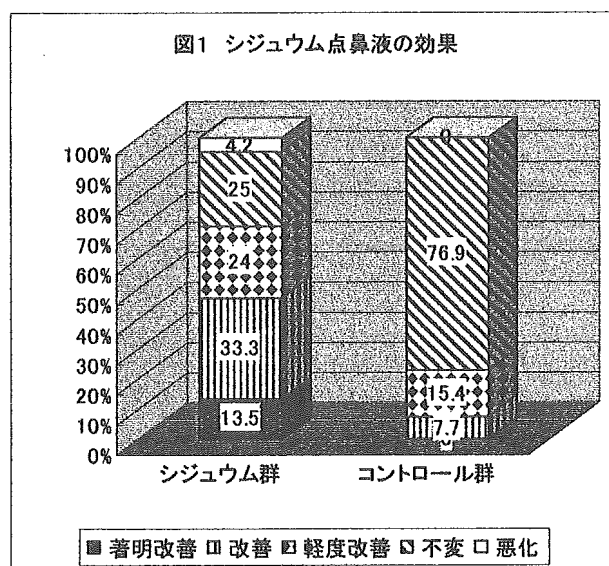
尚、本研究は各施設の倫理的検討によ
 る許可と患者の承諾を得て実施してい
 る。

4. 一部患者の鼻汁を採取し、好酸球数
 及びヒスタミン、ECPをPhrmasia製
 キットを用い、シジュウム点鼻液使用
 前後での測定を実施した。

鼻腔洗浄液の採取

- 37°Cに加熱した生理食塩水を後屈位で息こ
 らえさせた状態で各鼻腔に5mlずつ注入し、
 5-10秒後、頸部を前屈位にし、注入液を採
 取し、回収液にEDTA加PBSおよび
 Dithiothreitolを加え、攪拌後、室温に30分放
 置し、1500Gで遠心分離し、上清を-80度
 凍結保存した。

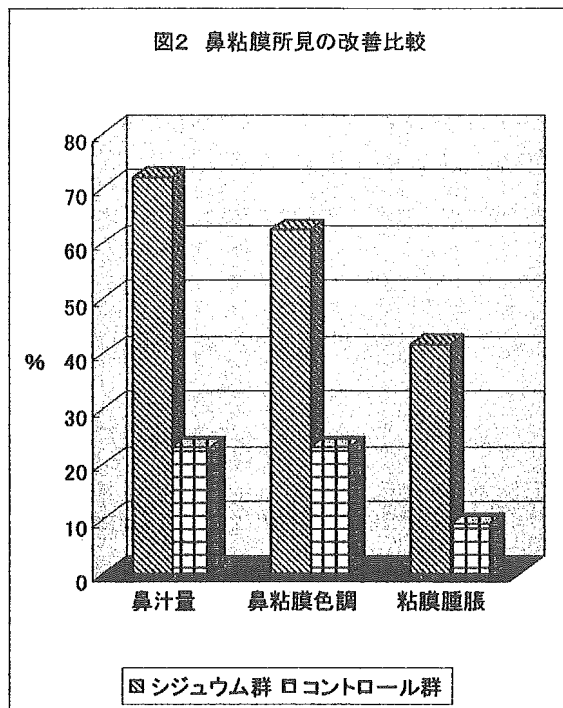
2. シジュウム群の投与終了時の鼻粘膜所
 見では鼻汁減少は71.9%、鼻粘膜色調
 は62.5%、また鼻粘膜の腫脹は48.7%
 に改善を認めた。粘膜の腫脹への効果
 はこれまでの検討を加えるとやや投与
 期間が1ヶ月以上必要と考える。一方
 コントロール群では鼻汁減少は22.7%、
 鼻粘膜色調は22.7%、また鼻粘膜の腫
 脹は9.1%に改善を認めた。(図2)



C. 結果

1. シジュウム群では臨床症状の全般改善
 は著明改善16名(13.5%)、改善40名
 (33.3)、軽度改善30名(24.0)、不変
 31名(25.0)、悪化5名(4.2)であり、軽
 度改善以上が70.6%であった。コント
 ロール群では著明改善はなく、改善2
 名(7.7)、軽度改善4名(15.4)、不変20
 名(76.9)、悪化であった。また鼻症状は
 くしゃみ、鼻水の改善が70%と、鼻閉の
 改善40%に比べ有意に改善していた。
 (図1)

3. 鼻汁好酸球数はシジュウム群で76%減
 少し、コントロール群の21%に比して
 有意に低下していた(図3)。また鼻汁
 ECP値はシジュウム群が前値で31.3±
 13.6μg/lが投与後17.4±10.1μg/lと
 P<0.05で有意に減少していた(図4)。
 またヒスタミン値はシジュウム群が前
 値で31.3±13.6Mが投与後17.4±
 10.1nMとP<0.05で有意に減少していた
 (図5)。



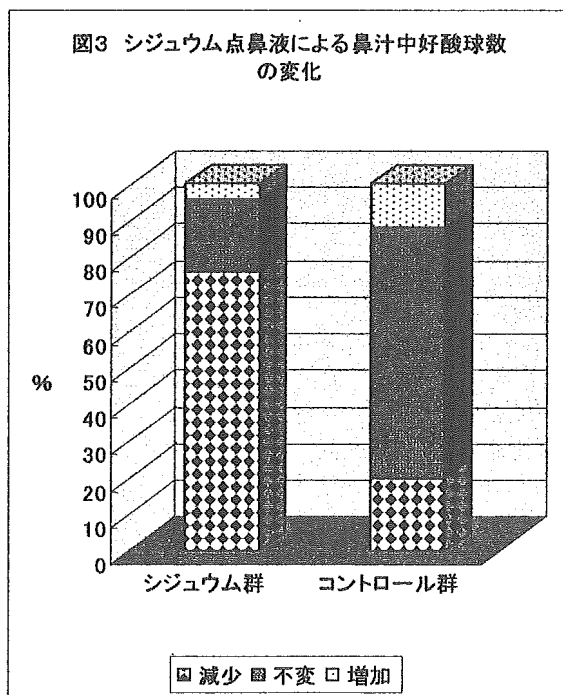
D. 考察および結語

シジュウム点鼻液はシジュウムの抗アレルギー作用を考慮してI型アレルギーである鼻アレルギーの治療に有効と考え、コントロール液を作成し、検討をおこなった。

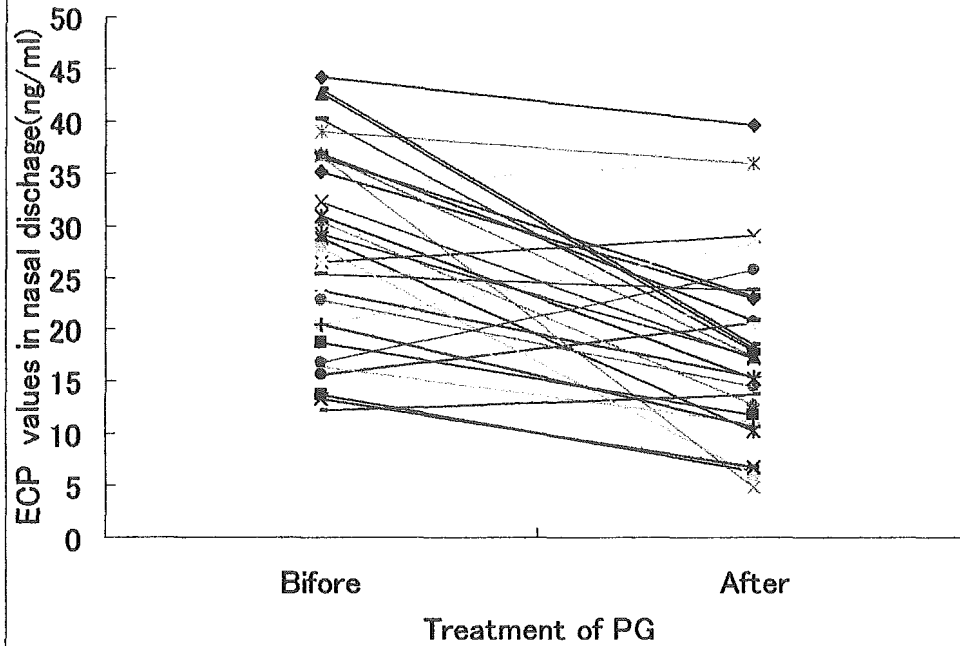
その結果、臨床的には軽度改善以上が70%以上を呈し、コントロールに比し有意な有効性を認めた。また鼻所見ではシジュウムしよう早期から鼻汁、くしゃみに対する改善が鼻閉に比べ有意に認められ、シジュウムの有する抗ヒスタミン作用が強く働いたものと考えられる。鼻閉の効果は効果発現に鼻汁やくしゃみに比べ遅い傾向があり、今後長期使用での検討が必要と考える。

検査結果では鼻中の好酸球数が有意に抑制し、臨床的な効果に一致していた。またアレルギー炎症の場においてその指標の一つであるECPを鼻汁で検討した。シジュウム使用前との比較では有意に低下しており、シジュウムの抗炎症作用を裏付けるものと考えられる。またシジュウムの抗ヒスタミン作用を検討する意味で鼻汁中のヒスタミンを測定した結果、ECP同様、シジュウム使用後有意に低下しており、シジュウムの抗ヒスタミン作用が確認された。

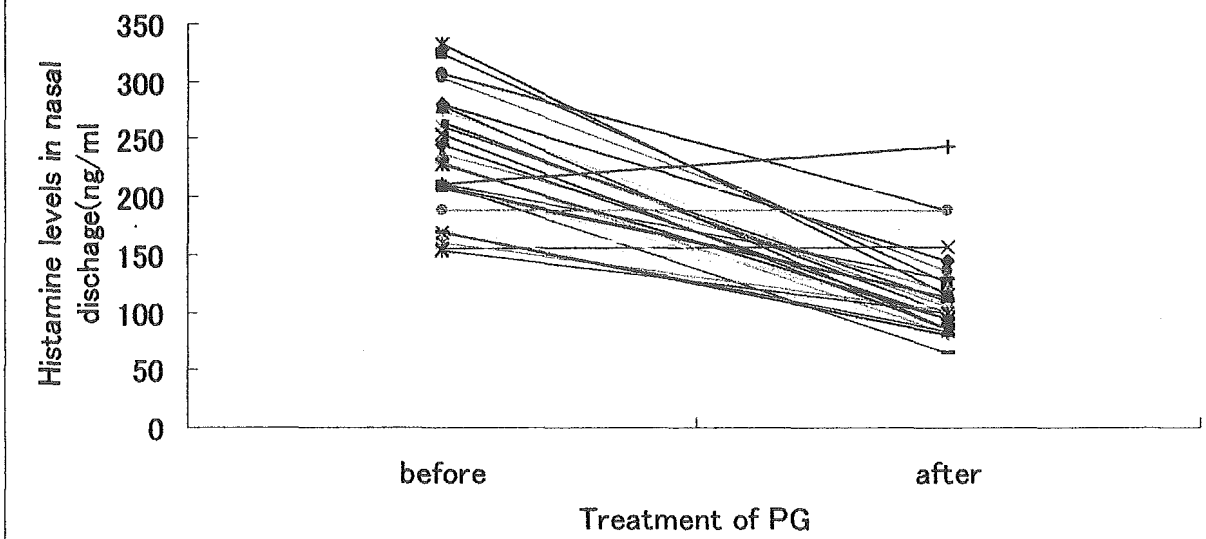
以上よりシジュウム点鼻液は鼻アレルギーに有効な治療手段と考えるが、今後さらにシジュウムがアレルギー疾患を抑制する新規薬物の開発に繋がるものと考えられる。



4 ECP values of nasal discharge before and after PG treatment



5 The histamine levels in nasal discharge before and after PG treatment



E. 論文発表

1)鈴木五男：アトピー性皮膚炎と食物アレルギー. 小児科 44:1629-1635,2003

2)鈴木五男、中里純子、道海秀則：アレルギーを抑える食品とその評価.小児科 45:4号、2004

F. 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、和田浩志、鈴木五男：日本薬学会 123 年会、29【P1】-I-253 (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) 鈴木政雄、和田浩志、鈴木五男：第 36 回日本薬剤師会学術大会要旨集、p -324 (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(2)」

4)鈴木五男、岸田 勝、中園宏紀、山口博明、中野裕史、四宮範明、北中 進、青木継稔、スギ花粉症に対する天然植物シジュウムの点鼻液の有効性、第 53 回日本アレルギー学会 (岐阜) 講演要旨、p898 (2003)。

4)Suzuki IS, Kishida MK, Aoki TA, Kitanaka SK, Hamada MH, The effects of nasal spray of Psidium guajava for cedar pollinosis, World Allergy Organization Congress-XVIII ICACI, Vancouver, Canada

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

1) 点鼻剤およびその製法、特願 2002-235007、特開 2002-073392。

2. 実用新案特許 なし

3. その他 なし

IV. 研究協力者報告