

—総説—

抗アレルギー物質の探索を目的とする新規アッセイ法の開発と応用

岩岡恵実子^{a)}, 奥 尚枝^{b)}, 飯沼宗和^{c)}, 石黒京子^{b),*}

要約: 卵白リゾチーム (HEL) を用いて感作したマウスのアレルギーインダクションフェーズでの血流量低下を指標とするアッセイ法を確立し、これを用いてこの血流量低下のメカニズムの解明を試みた。その結果、アナフィラキシー発症時に血流量あるいは血圧低下に関与するヒスタミン等のケミカルメディエーターは血流量低下に関与しないが、血管内皮細胞や血小板、好中球などが関与し、シクロオキシゲナーゼ (COX) -1 および 2、プロスタグランジン (PG) I₂、トロンボキサン (TX) A₂、エンドセリン (ET) -1、顆粒球エラスターゼ (GE) および誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 由来の NO が複雑に関連して関与していることを明らかにした。さらに天然資源から新規機能物質の探索を行う目的で、顕著な活性が認められたツリフネソウおよびスイフヨウに関して新規アッセイ法を用いてアレルギーインダクションフェーズ抑制物質の探索を行った結果、ツリフネソウ花卉の 35% EtOH エキスより luteolin (3) などに有意な改善効果を確認し、活性発現メカニズムについて検討した。次にスイフヨウ花卉 MeOH エキスでは、活性成分として quercetin-3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranoside (12)、および新規化合物 mutabiloside (11) を明らかにした。さらに本アッセイ法における末梢血流量低下の症状が、漢方における瘀血症状と類似していることに着目し、本アッセイ法が瘀血改善薬の探索に利用可能であることを明らかにし、新たな瘀血のアッセイ法として応用できることを示した。以上、本法はアレルギーのインダクションフェーズでの多数の因子による複雑な生体内反応を総合的にとらえたものであり、天然資源より新しいメカニズムによるアレルギー予防薬のシーズやリード化合物の探索に応用できる可能性を示すと考えられる。

索引用語: 血流量、抗アレルギー、卵白リゾチーム、ツリフネソウ、スイフヨウ、瘀血

Development and Application of the New *in vivo* Assay Method for the Allergy-Preventive Substances

Emiko IWAOKA^{a)}, Hisae OKU^{b)}, Munekazu IINUMA^{c)}, Kyoko ISHIGURO^{b),*}

Abstract: We discovered a phenomenon in which the blood flow in vein microcirculation markedly decreases in response to hen-egg white lysozyme (HEL)-sensitization without any change in blood pressure. Using this blood flow decrease as a guide, we developed an *in vivo* assay method to search for substances, which can prevent allergies. The blood flow decrease appears to be regulated by various factors such as nitric oxide (NO), thromboxane (TX) A₂, prostacyclin (PGI₂) and endothelin (ET)-1 together with cyclooxygenase (COX)-1, COX-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and constitutive nitric oxide synthase (cNOS). Using this *in vivo* assay method, allergy-preventive activity was demonstrated for the 35% EtOH extract of flowers of *Impatiens textori* MIQ. and the MeOH extract of the petals of *Hibiscus mutabilis* L. 'versicolor' MAKINO in a continuing search for allergy-preventive substances from natural source. Among the principal compounds in IT, apigenin (1), apigenin 7-glucoside (2), luteolin (3) and luteolin 7-glucoside (10) showed significant allergy-preventive effects. Among the principal compounds in HM, quercetin-3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranoside (12), and mutabiloside (11) showed significant allergy-preventive effects. "Oketsu", or stagnant blood syndrome, is one of the important pathological concepts in therapy with Kampo formula and drugs. We showed the effectiveness of the method for screening drugs aimed at "oketsu" treatment.

^{a)} 兵庫医療大学薬学部 (〒650-8530 神戸市中央区港島1丁目3-6)

Department of Pharmacy, Hyogo University of Health Sciences; (1-3-6, Minatojima, Chuo-ku, Kobe 650-8530, JAPAN)

^{b)} 武庫川女子大学薬学部生薬学研究室 (〒663-8179 西宮市甲子園九番町1-1-6 8)

School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University; (11-68, Koshien Kyuban-cho, Nishinomiya, Hyogo 663-8179, JAPAN)

^{c)} 岐阜薬科大学生薬学研究室 (〒501-1196 岐阜市大学西1丁目2-5-4)

Laboratory of Pharmacognosy, Gifu Pharmaceutical University (1-25-4, Daigaku-nishi, Gifu 501-1196, JAPAN)

Key phrases: blood flow, allergy preventive medicine, hen-egg white lysozyme, *Impatiens textori*, *Hibiscus mutabilis* 'versicolor', oketsu

1. 結論

気管支喘息、花粉症やアトピー性皮膚炎に代表されるアレルギー性疾患の患者は増加の一途をたどり、現在ではおよそ国民の30%が何らかのアレルギー性疾患に罹患しているといわれている。しかし現状ではアレルギー疾患に対する完全な予防法や根治的治療法がなく、治療の中心は抗原回避、あるいはステロイド薬等の薬物療法による長期的な対処療法のみである。従って、今なお増え続ける多種多様な免疫疾患に対応する予防や治療には新しい取り組みが必要とされている。そこでアレルギーに関する多くの分子レベルでの研究成果を踏まえ、生体内においてシステムで展開するアレルギー反応を総合的に評価できる実験モデルの開発を手がけ、天然からアレルギー抑制物質を探索するための評価法を考案してきた。これまでに卵白リゾチーム (HEL) を用いて抗原特異的に IgE 抗体依存性のアナフィラキシー (I 型アレルギー) を短期間に誘発するモデルマウスを作製し、¹⁾ 数種の *in vivo* アッセイ法やスクリーニング法の確立を行い、天然から多くのアレルギー抑制物質を探索している。^{2), 3)} さらに上記のアナフィラキシーの例を見ない重篤化メカニズムを追求する課程で1回のHEL感作後からアナフィラキシー惹起前の9日間に末梢血管の血流量が顕著に低下する現象を発見している。今回、著者らはこの現象に着目し、この段階での血流量低下を抑制することによりアレルギーの発症を予防あるいは軽減できると考え、この現象を応用した *in vivo* アッセイ法の開発に着手した。さらに血流量の変動に関与すると考えられる諸因子あるいはその阻害剤を用いて感作による血流量低下のメカニズムの解明を行った。また、本アッセイ法を応用し、天然資源からアレルギーインダクションフェーズ抑制活性を有するシーズ探索を行い、活性を確認したツリフネソウ花およびスフヨウ花からアレルギーインダクションフェーズ抑制薬のリード化合物となる活性物質を探索し、その構造を明らかにすると共に活性発現メカニズムに関する考察を述べる。次に、感作マウスの末梢血流量低下の症状が、漢方における瘀血症状と類似していることに着目し、感作マウスを末梢血液循環障害モデルマウスとして用いることにより新たな瘀血改善薬の評価法として開発した経緯について述べる。

2. アレルギーインダクションフェーズ抑制物質の探索 目的とする新規アッセイ法の開発

本研究室において、石黒ら²⁾は ddY 系マウスに卵白リゾチーム (hen egg-white lysozyme, HEL) で感作したのち、

9日後、再度 HEL で惹起することにより抗原特異的に IgE 抗体依存性の短期間に重篤な I 型アレルギー (アナフィラキシー) を誘発することを明らかにし、これを指標とした抗アナフィラキシーアッセイ法を開発している。これらの研究の過程において、1回のHEL感作後からアナフィラキシーが惹起されるまでの間、すなわちアレルギーの開始段階 (インダクションフェーズ) で、末梢血管 (静脈微小循環) の血流量が、顕著に低下する現象を発見している。

今回、著者はこの現象に着目し、この段階での血流量低下を抑制することによりアレルギーの発症を予防あるいは軽減できると考え、本血流量低下メカニズムの解明とこの現象を応用した新規のアレルギーインダクションフェーズ抑制物質あるいはアレルギー予防薬の探索のための *in vivo* アッセイ法の開発に着手した。

試薬 HEL (Sigma)、Complete Freund's adjuvant (CFA) (DIFCO) を用いた。

実験動物 5週齢の ddY 系マウス (Specific pathogen free グレード) は日本 SLC より購入し、温度 23±3°C、湿度 50±10%で飼育し、実験期間中、固形飼料 (CE-2、オリエンタル酵母) および水は自由に与えた。

装置 レーザー血流計は ST-N (Fine) プローブをつけた非接触型レーザー血流 (OMEGA FLOW FLO-N1) または EG プローブをつけた接触型レーザー血流 (OMEGA FLOW FLO-C1) を用いた。

HEL 感作方法 前報²⁾と同様に HEL 50 µg を CFA 25 µL と生理食塩水 25 µL に充分懸濁し、感作液を用時調製した。5週齢マウスに、1匹あたり 50 µL の感作液を腹腔内投与 (i.p.) し、感作する。なお、以後の実験は全てこれと同様の方法で感作した。

血流量測定方法 前報⁴⁾と同様に、マウスを 36°C で15分間予備加温後、1匹ずつホルダーに固定し、36°Cの恒温槽中でレーザー血流計を用いて、尾部皮下の静脈微小循環の血流量を0から9日目まで、無麻酔下で10分間測定した。1群5匹で実験を行い、各測定値は実験の前日に同条件で10分間測定した各マウスの平常血流量に対する割合 (%) に換算し、データは平常血流量に対する%の平均値±標準誤差で表した。

統計的評価 2元配置分散分析を行い、有意な差が認められた群について、Dunnett's test を行い、Bonferroni で補正を行った。

Fig. 1 に示すように、無処置マウスの血流量 (—○—) は9日間変化がみられなかった。一方、HEL 感作マウスの血流量 (—●—) は、感作前に測定した平常血流量に対し、徐々に低下し、4日目から有意な低下が認められた。さらに9日目には平常血流量の70%近くまで低下した。

この現象は血流に特徴的で、この間の最高血圧、最低血圧および心拍数に変化は見られなかった。従って、これはHEL感作、すなわちアレルギーのインダクションフェーズで惹起される血流量低下であると考えられた。なお、血流量の動向をモニタリングした結果から、感作マウスの血流量変動の測定日数は、血流量が最も低下した9日目までと決定した。また、1回の測定時間は、加温や固定によるストレスからのバラツキの影響をさけるため10分までとした。試験物質の投与スケジュールは、特に記載しないかぎり感作の1時間前(0日目)および感作の3、6および9日目の血流量測定の前とする。データは個々のバラツキを考慮して、感作前に測定した各々の平常血流量に対する割合(%)で表すこととした。

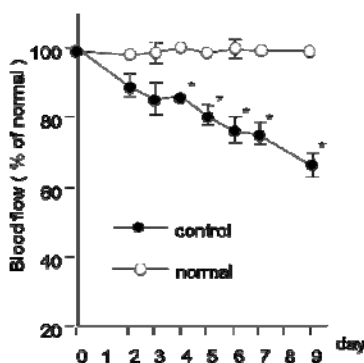


Fig. 1 感作マウスの血流量モニタリング
Each value presents the mean \pm S.E. for 5 mice. * $p < 0.05$ as compared with normal group (Dunnett's test with Bonferroni).

3. HEL感作による血流量低下メカニズムの解明

HEL感作による血流量低下の現象は今回初めて実証した。従って *in vivo* アッセイ法としての応用にはそのメカニズムを解明することが必須と考えられたので、以下の血流量の変動に関与すると考えられる諸因子、あるいはそれらに対する阻害剤である塩酸ジフェンヒドラミン(DPH)(10 mg/kg, *p.o.*)、ケタンセリン(10 mg/kg, *i.v.*)、CV-3988(10 mg/kg, *i.v.*)、クロモグリク酸ナトリウム(DSCG)(10 mg/kg, *i.v.*)、*N*^G-nitro-L-arginine-methyl-ester(L-NAME)(10 mg/kg, *i.p.*)、1400W(5 mg/kg, *s.c.*)、flurbiprofen(10 mg/kg, *p.o.*)、NS-398(3 mg/kg, *i.p.*)、ベラプロストナトリウム(40 μ g/kg, *p.o.*)、塩酸オザグレル(300 mg/kg, *p.o.*)、エラスポール(100 mg/kg, *s.c.*)、BQ-123(1 mg/kg, *i.v.*)、ワーファリン(10 μ g/kg, *p.o.*)、アスピリン(5 mg/kg, *p.o.*)、およびチクロピジン(20 mg/kg, *p.o.*)を、本アッセイ法に適用し、HEL感作による血流量低下メカニズムの検討を行った。これらは文献記載の有効量と投与方法により使用した。なお、L-NAMEは投与直後から一過性に血流が減少するため、血流量測定後に投与した。その他の試薬はそれのみでは平常血流量には影響を及ぼさな

った。血流量の測定は9日間連日行い、コントロール群と比較した。

代表的なケミカルメディエーターのヒスタミンのH₁受容体の阻害薬であるDPHは、コントロール群に対して有意な変化を示さなかった(Fig. 2A)。血小板凝集や血管収縮に関与するセロトニン5HT_{2A}受容体の拮抗薬であるケタンセリンも、同様に有意差を示さなかった(Fig. 2B)。

血小板活性化因子(PAF)は、アナフィラキシー発症後の血流に大きく関与する因子であるが、PAF拮抗薬のCV-3988もほとんど血流量の低下を抑制しなかった(Fig. 2C)。脱顆粒抑制薬のDSCG(Fig. 2D)は、4日目から有意に血流量の低下を抑制した。DSCGは、脱顆粒を抑制するだけでなく、これらの細胞からの様々な伝達物質や因子の分泌および放出を妨げることも知られている。

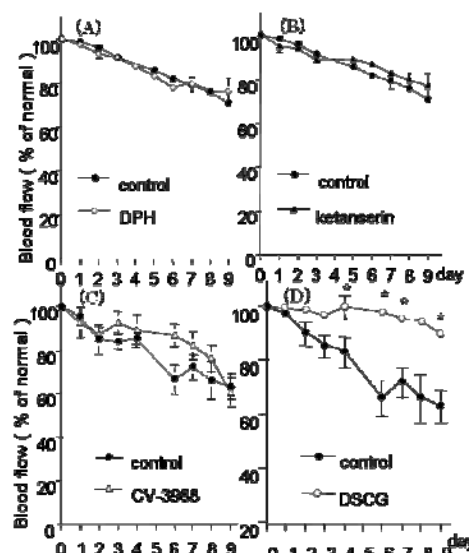


Fig. 2 DPH, ketanserin, CV-3988 および DSCG の影響
Each value presents the mean \pm S.E. for 5 mice. * $p < 0.05$ as compared with normal group (Dunnett's test with Bonferroni).

選択的シクロオキシゲナーゼ(COX)-1阻害薬のflurbiprofen(Fig. 3A)および選択的COX-2阻害薬NS-398(Fig. 3B)は、いずれも3日目から有意に血流量の低下を抑制した。COX-1は、循環器において急激な生理作用に対する防御機構の役割を果たすだけでなく、血小板においてTXA₂を誘導することにより、血小板凝集を惹起する。COX-2は炎症に深く関与しており、IL-1、TNF- α などのサイトカイン、ペルオキシナイトライト(ONOO⁻)などの活性酸素分子種に代表される炎症性の刺激によりマクロファージや内皮細胞などの細胞より誘導される。また、血管内皮細胞から誘導されたCOX-2が炎症に関与することが知られている⁵⁾。COX-1、2のこれらの作用がこの血流量低下に関与する可能性が示唆された。

一酸化窒素(NO)の合成酵素阻害薬であるL-NAME(Fig. 4A)は、血流量の低下を非常に有意に抑制し、この抑制

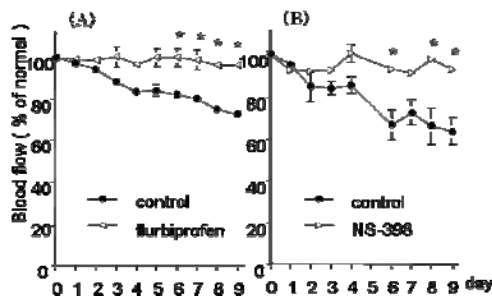


Fig. 3 Flurbiprofen および NS-398 の影響
Each value presents the mean \pm S.E. for 5 mice. * $p < 0.05$ as compared with normal group (Dunnett's test with Bonferroni).

効果は、NO 合成酵素の基質である L-arginine (600mg/kg, *i.p.*) の同時投与により有意に減弱したことから、感作による血流量の低下には NO の関与も示唆された。NO は、循環器において血流改善、血圧低下、血管拡張作用を有する物質として広く知られているが、一方で生体の感染防御反応においては、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) により過剰に生成した NO が、ONOO⁻を生じ、内皮細胞障害や、COX-2 の誘導などを引き起こし、炎症を亢進させる。また、NO は血管内皮細胞の透過性を亢進し、末梢血流量の低下を引き起こすことが知られている⁶⁾。

また、本研究室では HEL 感作マウスにおける血清中の NO_x 量は、血流量の低下と並行して増加することを明らかにしており、血中 NO 量が最大となる感作後 9 日目のマウスの胸部・腹部大動脈において、感作マウスのみ iNOS の発現を確認し、1 日目から 9 日目まで iNOS タンパク発現量の経時的な増加を示すことを確認している。従って、iNOS 由来の NO が血流量低下に関与することが示唆されたことから、血流量低下における iNOS の関与を明らかにするため、iNOS の選択的阻害剤 1400W を用いて検討したところ、感作マウスの血流量低下を改善しなかった (Fig. 4B)。従って、iNOS が血流量低下に必須の要素ではないことが示唆された。また、iNOS の関与をさらに確認するため、感作した iNOS ノックアウト (KO) マウスを用いて、血流量変化を検討したところ、野生種マウス

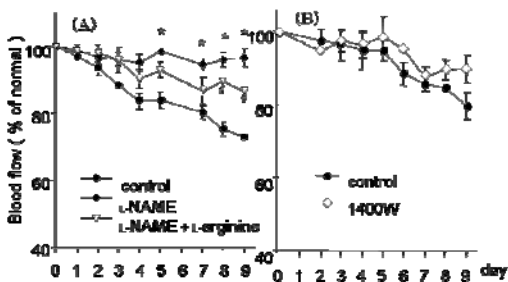


Fig. 4 L-NAME および 1400W の影響
(A); Each value presents the mean \pm S.E. for 5 mice. * $p < 0.05$ as compared with control group (Tukey's test with Bonferroni). § $p < 0.05$ as compared with L-NAME group (Tukey's test with Bonferroni). (B); Each value presents the mean \pm S.E. for 5 mice.

および KO マウス共にそれぞれの無処置 (normal) マウスに対し有意な血流量低下を示した。この結果および先の 1400W の結果から、血流量低下に iNOS が必須の要素でないことが判明した。一方、KO マウスにおける血流量低下が野生種マウスに比べて少ないことから、iNOS 由来の NO は、感作による血流量低下の重篤化に関与していると推測された。

NO と同様に血管内皮細胞由来の血管弛緩因子である PGI₂ の合成誘導体であるベラプロストナトリウムは、6 日目から継続して有意に血流量低下を改善した (Fig. 5A)。よって、感作後の血流量低下は、PGI₂ により改善できることが判明した。トロンボキサン (TX) A₂ 合成阻害薬である塩酸オザグレルは、5 日目から継続して有意に血流量低下を改善した (Fig. 5B)。TXA₂ は血小板やマクロファージより産生する血小板凝集および血管収縮因子であることから、感作後の血流量低下には、TXA₂ 産生誘導による血小板凝集亢進や血管収縮が関与することが示唆された。TXA₂ は PGI₂ と相関しており、⁷⁾ 先の PGI₂ の結果と考え合わせると、血流量低下には、炎症反応における血管内皮細胞障害により、PGI₂ の産生が低下し、TXA₂ 優位となっている可能性が示唆された。

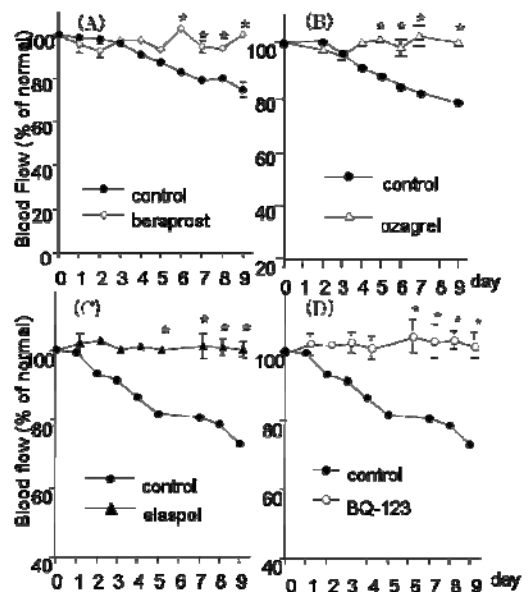


Fig. 5 Beraprost, ozagrel, elaspol および BQ-12 の影響
Each value presents the mean \pm S.E. for 5 mice. * $p < 0.05$ as compared with normal group (Dunnett's test with Bonferroni).

好中球より放出される炎症性メディエーターで、血管内皮細胞傷害を引き起こす顆粒球エラスターゼ阻害薬のエラスポールは、5 日目から継続して有意に血流量低下を改善した (Fig. 5C)。この結果は、好中球の活性化による血管内皮細胞障害及び血管透過性亢進が一連の反応の引き金の一つとなる可能性を示唆した。

エンドセリン (ET) -1 は炎症性サイトカインや血液凝

固因子により血管内皮細胞から誘導される血管収縮物質である。ET_A受容体拮抗薬である BQ-123 は 6 日目から継続して有意に血流量低下を改善した (Fig. 5D)。この結果は、血流量低下への ET-1 による血管収縮の関与を示唆した。抗血液凝固薬のワーファリンおよび抗血小板凝集薬のアスピリンはいずれも継続して有意に血流量低下を改善した。抗血小板凝集薬のチクロピジン は 8 日目に有意な効果を示した (Fig. 6)。なお HEL 感作マウスの 9 日目の自然血液凝固時間および血小板凝集能は、ノーマルマウスに比べて有意に短縮されていた (データは示さず)。これらの結果から、感作後の血流量低下には、血液凝固および血小板凝集の亢進が関与することが示唆された。

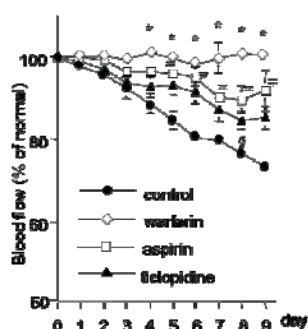


Fig. 6 血液凝固阻止剤の影響
Each value presents the mean ± S.E. for 5 mice. *, # and § p<0.05 as compared with control group (Dunnett's test with Bonferroni).

以上の結果を総合すると、HEL感作による血流量低下は血管内皮細胞、血小板、好中球、マクロファージ、肥満細胞などが関与し、多数の生物活性因子が相互に、複雑に関連して、以下のプロセスで生じたと推察される。すなわち、感作前（平常時）では血管内皮細胞のeNOS由来のNO、PGI₂およびTXA₂のバランス等により血管トーン（収縮と弛緩）が調節されて血流量が規定されているが、① 感作による異物（抗原およびアジュバント）の侵入により自然免疫系が活性化され、マクロファージおよび肥満細胞から炎症性サイトカイン、NOを含む活性酸素分子種が放出され、さまざまな細胞を活性化すると共に、iNOSを誘導する。② 活性化された好中球からは顆粒球エラスターゼや活性酸素分子種が放出される。③ これにより血管内皮細胞が傷害され、エンドセリン-1が産生される。④ 同時にPGI₂の産生が低下し、TXA₂が優位となる。一方、⑤ NOやサイトカインによるCOX-2の誘導が促進することで、単球、マクロファージからもTXA₂が産生され、さらにTXA₂優位が進む。これにより⑥ 血小板凝集が促進し、微小血栓が形成され、微小循環障害が起こり、血流量が低下する。⑦ また、この虚血により産生がさらに亢進したサイトカイン（や活性酸素分子種）によるiNOSやCOX-2誘導が炎症反応を亢進し、その過程で放出される様々な炎症性メディエーターにより、血管内皮細胞の透過性が

亢進し、局所の血液濃縮による循環の泥状化と、血液凝固の活性化による微小血栓形成が起こり、末梢血管の循環障害の重篤化が進行すると考えられる。なお、これらの研究と並行して、奥らは、iNOS ノックアウトマウスを用いた実験により、血流量低下にはTXA₂とET-1の関与するiNOS依存性経路とCOX-1、COX-2、PGI₂の関与するiNOS非依存性経路の2種類が関与することを明らかにしている⁸⁾。

4. アレルギーインダクションフェーズ抑制アッセイ法の応用

先に記載したアッセイ法を応用して、天然資源からアレルギーインダクションフェーズ抑制薬としてのシーズを探索した。その結果、顕著な活性が認められたツリフネソウおよびスイフヨウに関して、活性本体の解明および活性メカニズムについて検討した。

4. 1. ツリフネソウ花に関する研究

ツリフネソウは、日本のほぼ全域の山地の水辺に自生する一年草で、中薬では全草を解毒、悪瘡潰瘍、打撲傷などの治療に用いられている。⁹⁾ 本研究室では先にツリフネソウ花の抗痒み作用、抗アレルギー作用および抗 PAF 作用について報告し、その活性成分を明らかにしている¹⁰⁾。今回は、花含有成分のアレルギーインダクションフェーズ抑制活性について評価し、そのメカニズムの解明を試みた。**ツリフネソウ 35%EtOH エキス (IT) の調製** ツリフネソウ (*I. textori* Miq.) の花は、開花期に岐阜県にて約 2.0 kg を採集した。その花を採取後直ちに 35% EtOH に漬け、1 週間冷浸後ろ過した。その操作を 2 回くり返し得られたろ液を減圧下濃縮後、得られたエキス (IT; 15.5g) を冷凍保存した。IT は精製水を用いて 20 mg/mL に溶かし、マウスの体重 10 g あたり 100 μL を経口投与した時、投与量 200 mg/kg body weight になるように調製し生物試験に用いた。

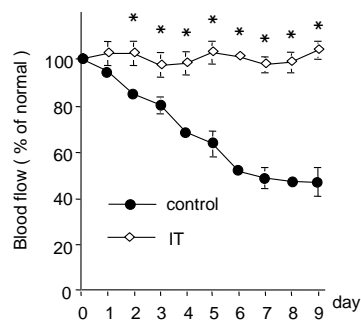
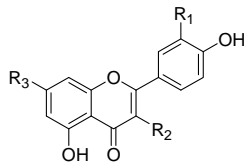


Fig. 7 ツリフネソウ花の効果
Each value presents the mean ± S.E. for 5 mice. * p<0.05 as compared with normal group (Dunnett's test with Bonferroni).

ツリフネソウ花弁の血流量低下の抑制効果 上記のアッセイ法を用いて、ツリフネソウ花弁 35% EtOH エキス (IT) の 200 mg/kg を感作日と、HEL 感作から 3、6 および 9 日目に、測定の前 1 時間前に経口投与し、コントロール群と比較した。その結果、Fig. 7 に示すように、IT は 1 日目から非常に有意に感作マウスの血流量の低下を抑制した。なお、IT のみではマウスの血流量に変化は見られなかった。以上のことから、IT がアレルギー発症を予防する可能性が示唆された。

化合物の抽出と単離 IT 15.5 g を、AcOEt および *n*-BuOH で順次抽出し、各種カラムクロマトグラフィーあるいは再結晶により精製を行った。AcOEt 画分 (340 mg) より apigenin (32.6 mg) (1)、apigenin 7-glucoside (21.6 mg) (2)、luteolin (14 mg) (3)、luteolin 7-glucoside (4)、chrysoeriol (0.21 mg) (5)、quercetin (13 mg) (6)、quercetin 3-glucoside (1.4 mg) (7)、kaempferol (0.8 mg) (8)、kaempferol 3-glucoside (0.42 mg) (9)、また *n*-BuOH 画分 (3.2 g) より kaempferol 3-rhamnosyldiglycoside (7.6 mg) (10) を単離し、それぞれを各種スペクトルデータにより同定した¹¹⁾。



	R ₁	R ₂	R ₃		R ₁	R ₂	R ₃
1	H	H	OH	6	OH	O-glc	OH
2	H	H	O-glc	7	H	OH	OH
3	OH	H	OH	8	H	O-glc	OH
4	OCH ₃	H	OH	9	H	O-glc-rha	OH
5	OH	OH	OH	10	OH	H	O-glc

Fig. 8 IT より単離した化合物の構造式

化合物のアレルギーインダクションフェーズ抑制作用

上記化合物のうち、活性試験に充分な量を単離あるいは入手できた化合物 1、2、3、4、6、8 および 9 の各々 20 mg/kg を、IT と同様に HEL 感作日、感作から 3、6 および 9 日目に経口投与し、1 時間後に血流量を測定し、コントロール群と比較した。なお、これらの化合物のみではマウスの血流量に変化は見られなかった。その結果、Fig. 9 に示すように、apigenin (1) は 8 日目から有意に血流量の低下を抑制したが、配糖体である apigenin 7-glucoside (2) は有意な抑制効果が認められなかった。また luteolin (3) は 2 日目から非常に有意に血流量の低下を抑制した。luteolin 7-glucoside (4) も 5 日目から有意に血流量の低下を抑制した。quercetin (6)、kaempferol (8) にはほとんど効果はなかったが、kaempferol 3-glucoside (9) には、有意な抑制効果が見られた。従って、この結果より、化合物 1、2、3

および 10 が活性に関与すると考えられた。

ツリフネソウの血流量低下抑制メカニズム 新規アッセイ法を用いて、ツリフネソウ花の 35% エタノールエキス (IT) がアレルギーインダクションフェーズ抑制作用を有することを初めて明らかにした。従って、ツリフネソウをアレルギーの予防に用いることが出来ることが示唆

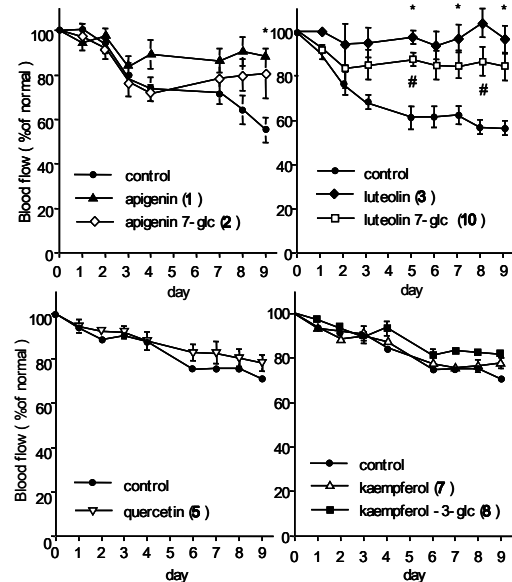


Fig. 9 IT より単離した化合物の効果

Each value presents the mean \pm S.E. for 5 mice. *,# $p < 0.05$ as compared with control group (Dunnett's test with Bonferroni).

された。さらに、luteolin (3)、luteolin 7-glucoside (10)、apigenin (1) および apigenin 7-glucoside (2) が本活性に関与することを示した。Luteolin (3)¹²⁾ は抗炎症、抗アレルギー作用、iNOS および COX-2 発現抑制作用、血小板凝集抑制作用の他、近年では血小板 TXA₂ 受容体への拮抗阻害および TXA₂ 受容体からのシグナル伝達阻害活性、さらに Toll 様受容体 Toll-like receptors (TLRs) の阻害活性が報告されている¹³⁾。TLRs は、肥満細胞、マクロファージ、好中球および血管内皮細胞に発現し、免疫系のうち、非特異的な自然免疫系を制御する受容体であり、肥満細胞での TNF- α の産生など様々な免疫応答、マクロファージでの IL-1、IL-6、IL-5、TNF- α などの炎症性サイトカイン、IFN γ および各種ケモカインの産生、さらに好中球の活性化による NO を含む活性酸素分子種の産生を誘導する。また、TLRs による自然免疫系の活性化は、獲得免疫系の活性化を誘導することも明らかになってきている。一方、apigenin (1)¹⁴⁾ は、iNOS および COX-2 の転写¹⁵⁾ および発現抑制活性の他、luteolin (3) と同様の血小板 TXA₂ 受容体への拮抗作用とその後のシグナル伝達阻害作用¹⁶⁾ を有することが報告されている。以上のことを総合すると、luteolin (3) は TLRs を阻害することで、マクロファージ、好中球、好酸球などの活性化を抑制、さらには炎症性サイトカ

インや、PGs、TXA₂ および NO などの炎症性メディエーターの産生を抑制し、結果として血管内皮細胞の損傷および微小循環系の血管透過性亢進を抑制する。また、luteolin (3) および apigenin (1) は感作後に誘導される iNOS 遺伝子および COX-2 の発現を抑制すると共に、apigenin (1) および apigenin 7-glucoside (2) が、誘導された COX-2 活性も抑制する。加えて、luteolin (3) および apigenin (1) が血小板上の TXA₂ 受容体への拮抗阻害と、さらに TXA₂ 受容体からのシグナル伝達阻害により、血小板凝集を抑制することで、微小血栓の形成を阻害、微小循環障害を改善すると考えられる。

4. 2. スイフヨウに関する研究

スイフヨウ (酔芙蓉: *Hibiscus mutabilis* L. f. *versicolor* Makino) は、アオイ科、フヨウ属に属し、中薬で芙蓉と共に木芙蓉の名で用いられ、清熱解毒、消腫排膿等の効能を有するが⁹⁾、日本では薬用に使用されていない。なお、花の成分については、これまでに quercetin、kaempferol、cyanidin の配糖体とそのアグリコンが報告されている¹⁷⁾。本研究では、薬用資源の新規機能探索の一環として、スイフヨウ花のアレルギーインダクションフェーズ抑制作用の評価と活性本体の解明を行なった。

スイフヨウ花 MeOH エキス (HM) の調製 開花期の花 (1.7 kg) を MeOH に冷浸し、得られた抽出液を減圧下濃縮後、MeOH エキス (HM; 49 g) とした。この一部を冷凍保存し、用時、精製水を用いてマウスの体重 10 g あたり 100 μL になるようにこれを溶かし、200 mg/kg body weight に調製し、生物試験に用いた。

スイフヨウ花のアレルギーインダクションフェーズ抑制作用 Fig. 10 に示すように、HM は、感作による血流量低下を有意に抑制した。なお、HM のみではマウスの血流量に変化は見られなかった。この結果より、スイフヨウ花がアレルギーインダクションフェーズ抑制物質探索のシーズとなる可能性が示唆された。

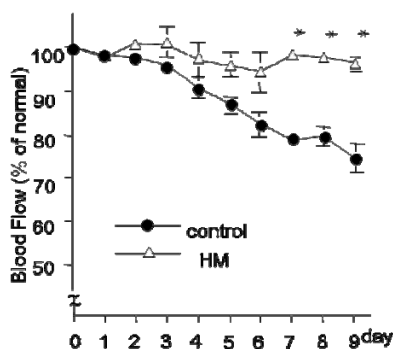


Fig.10 スイフヨウ花エキスの効果
Each value presents the mean ± S.E. for 5 mice. * p<0.05 as compared with normal group (Dunnett's test with Bonferroni).

化合物の構造解析 化合物 5 および 14 は、TLC から、すでに本植物花卉から単離されている quercetin (5)、quercetin-3-O-β-D-galactoside (14) であると推定されたため、標品との混融、TLC、IR および ¹H-NMR により比較、同定した。化合物 12 は、FAB-MS では m/z 597 に [M+H]⁺ の分子イオンピークを示し、¹H および ¹³C-NMR から化合物 14 に β-xylose 1 分子が結合した化合物であると推定された。xylose の結合部位については、HMBC スペクトル (Fig. 11) において xylose の 1 位のプロトンから galactose の 2 位の炭素へ相関が認められたことから、galactose の 2 位の水酸基に結合していることが判明した。従って、quercetin-3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranoside (12) であると推定されたため、文献値¹⁸⁾ と比較したところ一致し、同定した。

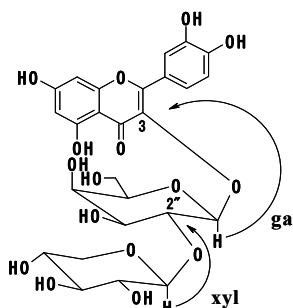


Fig.11 HMBC correlation of 12

化合物 13 は、FAB-MS において化合物 12 より酸素 1 原子少ない分子イオンピークを示した。¹H および ¹³C-NMR においては、化合物 12 と比較したところ、糖部のシグナルは一致していたが、アグリコン部のシグナルパターンが quercetin より水酸基 1 つ少ない kaempferol のシグナルと一致した。従って、kaempferol-3-O-β-D-xylopyranosyl-(1→2)-β-D-galactopyranoside (13) であると推定されたため、文献値¹⁸⁾ と比較したところ一致し、同定した (Fig. 12)。化合物 13 は本植物からは初めて単離した。

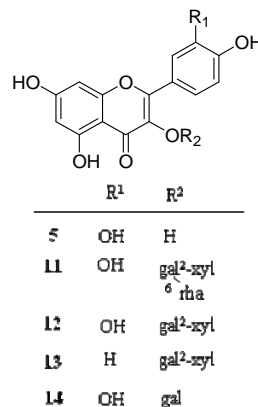


Fig.12 HM より単離した化合物の構造式

化合物 11 は、融点 300 °C 以上の黄色粉末で、FAB-MS において m/z 743 に [M+H]⁺ の分子イオンピークを示し、分子

式は高分解能 MS により $C_{32}H_{38}O_{20}$ と決定した。IR スペクトルで水酸基、カルボニル基の吸収を示し、UV スペクトルではフラボノールに特徴的な吸収を示した。さらに、 1H および ^{13}C -NMR スペクトルデータにおいては、化合物 **12** と比較して、6炭糖1個分に相当するシグナルが多く認められた。この糖は、4.53 ppm にアノメリックプロトン ($J = 1.4$ Hz)、1.18 ppm にメチル基のダブルレット ($J = 6.4$ Hz) のシグナルを示したこと、さらに1位から6位のプロトンの J 値から、rhamnose と決定した。その結合部位については、HMBC スペクトル (Fig. 13) において、1位のプロトンから galactose の6位の炭素へ相関が認められたことから、galactose の6位の水酸基に結合していることが判明した。rhamnose のアノマーの配置は、 ^{13}C -NMR スペクトルのケミカルシフトから α と決定した。以上の結果から、本品は quercetin-3- O -[β -D-xylopyranosyl (1 \rightarrow 2)- α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 6)]- β -D-galactopyranoside であると決定し、文献未記載の化合物であることから mutabiloside (**11**) と命名した。

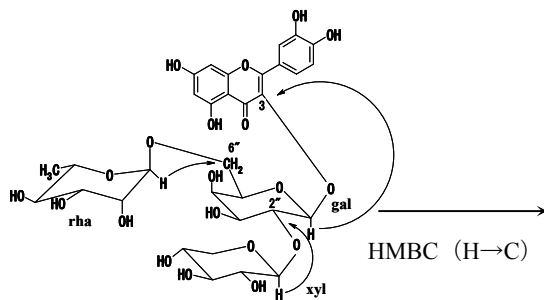


Fig.13 HMBC correlation of **11**

化合物のアレルギーインダクションフェーズ抑制作用

先の化合物のうち、Hmの主成分である化合物**12**と、新規化合物**11**の各々20 mg/kgを、Hmと同様にHEL感作日、感作から3、6、9日目に経口投与し、1時間後に血流量を測定し、コントロール群と比較した。その結果、Fig. 14に示すように、化合物**12**、**11**ともに5日目から血流量

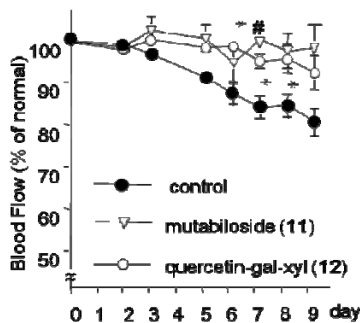


Fig. 14 HM から単離した化合物の効果
Each value presents the mean \pm S.E. ($n = 5$). * and # $p < 0.05$ as compared with control group (Dunnett's test with Bonferroni).

の低下を有意に改善させた。**12**、**11**両化合物のアグリコン

である quercetin (**5**) については活性が無いことを先に証明していることから⁹⁾、この系列の化合物に関しては、配糖体であることが活性の発現に関与していると考えられる。従ってHmの活性本体は、最も含量が高く、有意な活性を示した化合物**12**であると決定した。

スイフヨウのアレルギーインダクションフェーズ抑制作用メカニズム 新規アッセイ法により、スイフヨウ花のMeOHエキス(HM)のアレルギーインダクションフェーズ抑制作用を明らかにし、本植物がアレルギー予防薬のシーズになることを示した。さらに、HMから新規化合物mutabiloside(**11**)を含む5種のフラボノール誘導体を単離、構造決定し、そのうちquercetin-3- O - β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside(**12**)およびkaempferol-3- O - β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside(**13**)に関しては本植物から初めて単離した。さらに、**11**および**12**のアレルギーインダクションフェーズ抑制作用について明らかにした。しかし、**11**および**12**は、感作による血流量低下の一要因である全血血小板凝集亢進に対し、いずれも有意な改善作用を示さなかった(データ示さず)。先に本研究室でXanthorrhoea hastilis¹⁹⁾の樹脂より単離したアレルギーインダクションフェーズ抑制物質のフラバノン誘導体では、感作マウスの血流量低下改善作用に一致した抗血小板凝集作用を確認している。従って、フラボノール配糖体とフラバノンは異なるメカニズムで血流量低下を改善することが示唆された。

5. HEL感作マウスの血流量低下を指標とする瘀血のin vivo評価法への応用

更年期障害、婦人病、冷えや肩凝りなどの原因の一つである『瘀血』は、漢方において炎症や血液循環障害などが関与する重要な症例の一つであり、これを改善することはQOLの向上につながると考えられる。瘀血の診断基準としては、in vitroで血液粘度、ヒト眼底結膜微小循環、赤血球変形能などが用いられており、in vivoではステロイドホルモン剤連投による病態モデルなどが用いられている²⁰⁾。一方、先に述べた感作マウスの血流量低下には血管内皮細胞や血小板、好中球などが関与し、様々な因子が複雑に関連して炎症性の血液凝固、血小板凝集などが関与することを明らかにし、さらにHEL感作後のマウスの血中のNO量が増えていることを確認している。この血流の停滞は瘀血症状と類似した現象と考えられたことから、感作モデルマウスを末梢血液循環障害モデルマウスとして応用し、臨床応用されている漢方処方と代表的な構成生薬を評価し、新たに瘀血のアッセイ法として確立することを試みた。

生薬 生薬はいずれも市販品(栃本天海堂)の第14改正日本薬局方適用生薬を用いた。

漢方処方エキスの調製および投与方法 以下の漢方処方

はいずれも、1日量を文献値²¹⁾に従ってそれぞれ水400 mLを加えて30分間煎じ、得られた抽出液を減圧下濃縮後エキスとした。これらのエキスを蒸留水に懸濁あるいは溶解し、200 mg/kgの用量で経口投与した。

漢方処方における検討 駆瘀血薬として繁用される加味逍遙散(柴胡、芍薬、当帰、白朮、茯苓、山梔子、牡丹皮、甘草、生姜、薄荷)、当帰芍薬散(芍薬、沢瀉、茯苓、川芎、当帰、白朮)、桂枝茯苓丸(桂皮、芍薬、桃仁、茯苓、牡丹皮)、桃核承気湯(桃仁、甘草、桂皮、芒硝、大黄)および一般処方薬として小柴胡湯(柴胡、半夏、黄芩、大棗、人参、甘草、生姜)について検討した。

一般的に駆瘀血剤として処方される漢方処方である加味逍遙散、当帰芍薬散、桂枝茯苓丸、桃核承気湯はHEL感作による血流量低下を非常に有意に改善したが、駆瘀血剤として応用されない小柴胡湯は作用が弱かったことから、本法が駆瘀血剤を評価できることを示した (Fig. 15)。

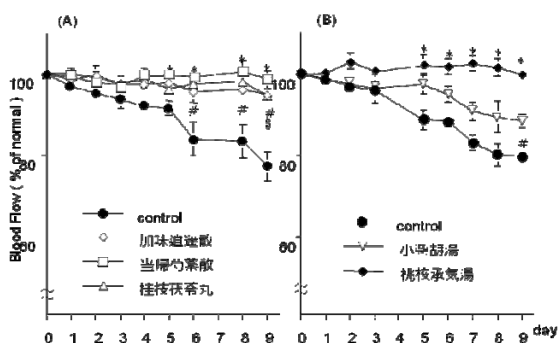


Fig. 15 漢方処方エキスの効果
Each value presents the mean ± S.E. for 5 mice. * p<0.05 as compared with normal group (Dunnnett's test with Bonferroni).

生薬エキスの調製および投与方法 構成生薬である桃仁、牡丹皮、当帰、芍薬、山梔子、茯苓、桂皮および柴胡は、それぞれ20 gを、いずれも30%EtOH 400 mLにより冷浸後、得られた抽出液を減圧下濃縮し、エキスとした。これらのエキスを蒸留水に懸濁あるいは溶解し、200 mg/kgの用量でマウスに経口投与した。

生薬における検討 駆瘀血薬として繁用される生薬として牡丹皮、当帰、桃仁、芍薬を用い、活血作用を目的としない生薬として山梔子、柴胡、茯苓、桂皮を用いて比較検討した。構成生薬のうち、駆瘀血作用をもつ牡丹皮、桃仁、当帰および芍薬は、感作による血流量低下を改善した。それ以外の生薬は駆瘀血生薬と比較すると、全体的に抑制作用が弱かった。しかし、これらの中で、抗炎症作用がよく知られる山梔子、柴胡が比較的強い抑制作用をもつことから、瘀血に炎症が関与することを示持する結果を得た (Fig. 16)。

瘀血評価法に関する考察 HEL感作後のマウスの血流量

低下を指標とするアッセイ法を用いて、臨床応用される代表的な漢方処方5種においては、駆瘀血剤として処方される加味逍遙散、当帰芍薬散、桃核承気湯および桂枝茯苓丸はHEL感作による血流量低下を非常に有意に改善したが、駆瘀血剤として用いられない小柴胡湯ではほとんど有意な効果は見られなかった。また、駆瘀血生薬として知られる牡丹皮、桃仁、当帰および芍薬は、感作による血流量低下を有意に改善したが、活血、通経作用を目的として配合されない山梔子、柴胡、茯苓および桂皮などの生薬では、山梔子、柴胡のようにわずかに改善傾向が見られるものもあるが、いずれも有意な効果は見られなかった。わずかに改善傾向を示した山梔子、柴胡には抗炎症作用がよく知られており、これらに改善傾向が見られたことは、瘀血に炎症が一部関与することを示持する結果と考えられる。

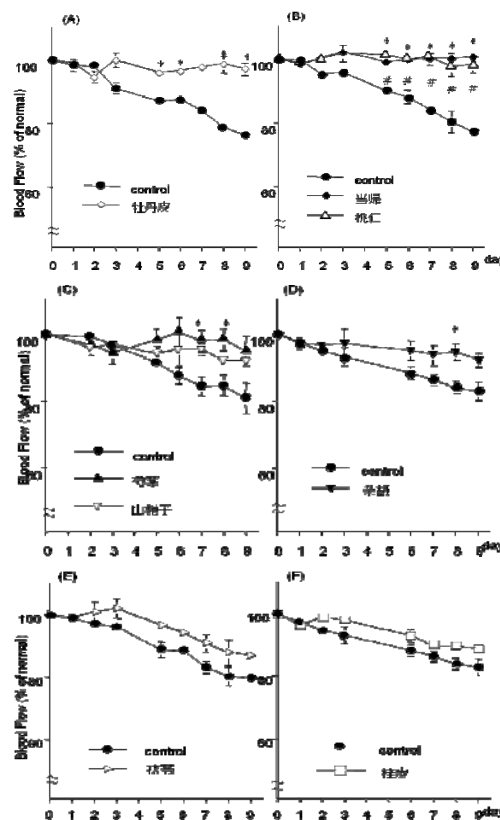


Fig. 16 構成生薬のHEL感作による血流量低下に対する効果

Each value presents the mean ± S.E. for 5 mice. * p<0.05 as compared with normal group (Dunnnett's test with Bonferroni).

以上の結果より、一度のHEL投与によりみられる感作マウスの血流量低下を用いて駆瘀血作用を評価できることが判明し、HEL感作マウスを簡便な瘀血病態モデルとして利用可能であることが示唆された。一方、丸山ら²²⁾により、瘀血患者の血清中のNOx(一酸化窒素の代謝産物)の値が有意に高値を示す報告がされているが、これは先に述べたように、今回のHEL感作マウスの血流量低下のメカニズム研究において、感作後にマウスの血中NO量が増える結果とも一致している。以上を総合して、先にアレルギーイ

ンダクションフェーズ抑制物質を探索するために開発したアッセイ法が、複雑なメカニズムの瘀血に対応する新しい改善薬の探索の一次スクリーニングとして応用できることが判明した。

6. 総括

HEL を用いて感作したマウスのアレルギーのインダクションフェーズでの血流量低下を指標とする本アッセイ法は、生体反応の一面でなく生体の動的变化を総合的に捕らえたもので、この血流量低下を指標として、天然資源より新しいメカニズムによるアレルギー予防薬のシーズ探索に応用できるものである。今回は、HEL の一度の感作により、引き起こされるアレルギーのインダクションフェーズが血流に特徴的で、それを動的に測定できることを確認し、この現象を指標とした *in vivo* における新規アレルギーインダクションフェーズ抑制アッセイ法を確立した。また、新規アッセイ法を用いて、この血流量低下のメカニズムの解明を試み、アナフィラキシー発症時に血流量あるいは血圧低下に関与するヒスタミン (H_1 レセプター)、PAF およびセロトニン ($5-HT_{2A}$ レセプター) 等のケミカルメディエーターは、血流量低下に関与しないが、血管内皮細胞や血小板、好中球などが関与し、COX-1 および 2、 PGI_2 、 TXA_2 、ET-1 (ET_A レセプター)、顆粒球エラスターゼおよび iNOS 由来の NO が複雑に関連して生じていることを明らかにした。

新規アッセイ法の応用として、天然資源から新規機能物質の探索を行う目的で、中薬および民間薬について調査し、顕著な活性が認められたツリフネソウおよびスイフヨウに関して、新規アッセイ法を用いてアレルギーインダクションフェーズ抑制物質の探索を行った。その結果、ツリフネソウ花の 35% EtOH エキス (IT) より 10 種の化合物を単離し、apigenin (1)、apigenin 7-glucoside (2)、luteolin (3) および luteolin 7-glucoside (10) に有意な改善効果を確認し、活性発現メカニズムを考察した。次にスイフヨウ花 MeOH エキス (HM) では、新規化合物 mutabiloside (11) を含む 5 種の化合物を単離、構造決定し、HM の活性成分として、quercetin-3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-galactopyranoside (12)、および mutabiloside (11) を明らかにした。

本アッセイ法における末梢血流量低下の症状が、漢方における瘀血症状と類似していることに着目し、本アッセイ法が瘀血改善薬の探索に利用可能であることを明らかにし、新たな瘀血のアッセイ法として応用できることを示した。

以上、本法はアレルギーインダクションフェーズでの多数の因子による複雑な生体内反応を総合的にとらえたものであり、今回の知見は本アッセイ法が天然資源より新しいメカニズムによるアレルギー予防薬のシーズやリード化合物の探索に応用できることを証明すると共に、本アッセイ

法により見つけられるアレルギーインダクションフェーズ抑制薬の位置づけを明確にするものと考えられる。

7. 謝辞

本研究を行なうにあたり、iNOS KO マウスのご恵与、ならびに血中 NO 量の測定をしていただきました兵庫医科大学 岡村春樹教授に厚くお礼申し上げます。また、有益なご助言とご指導を頂きました岐阜薬科大学薬学部 森裕志教授、稲垣直樹教授、酒々井真澄教授に感謝いたします。

8. 引用文献

- 1) Semma M., Sakato N., Fujio H., Amano T., *Immunol. Lett.* **3**, 57-61 (1981).
- 2) Ishiguro K., Fukumoto H., Murashima T., Kuriyama M., Semma M., Isoi K., *Phytother. Res.*, **6**, 112-113 (1992).
- 3) Ishiguro K., Fukumoto H., Kuriyama M., Semma M., Isoi K., *Phytother. Res.*, **8**, 301-304 (1994).
- 4) Ishiguro K., Oku H., Ueda Y., Iwaoka E. and Kunitomo M., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 1490-1495 (2005).
- 5) 石黒直樹, “ファーマナビゲーターCOX-2 阻害薬編” 株式会社メディカルレビュー社, 東京, p54-65 (2006).
- 6) 岡嶋研二, “血管内皮細胞障害—臨床へのアプローチ—”, 総合医学社, 東京, 1998, pp 12, 16.
- 7) Cosentino F, Eto M, De Paolis P, van der Loo B, Bachschmid M, Ullrich V, Kouroedov A, Delli Gatti C, Joch H, Volpe M, Lüscher TF., *Circulation.*, **107**, 1017-1023 (2003).
- 8) Oku H., Ogawa Y., Iwaoka E., Kunitomo M., Ueda H., Okamura H., Ishiguro K., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1324-1328 (2007).
- 9) Chang Su New Medical College, “Dictionary of Chinese Crude Drugs,” Shanghai Scientific Technological Publishers, Shanghai, 1977.
- 10) Ueda Y., Oku H., Iinuma M., Ishiguro K., *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 1505-1507 (2003).
- 11) Agrawal P. K., Thakur R. S., Bansal M. C., “Carbon-13 NMR of Flavonoids,” ed. by Agrawal P. K., Elsevier Science Publishing, New York, 1989, pp123-158, 292-354.
- 12) Lee JK., Kim SY., Kim YS., Lee W-H, Hwang DH., Lee JY, *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1391-1400 (2009)
- 13) Rocio L-P., Isabel B., *Biochem. Pharmacol.*, **76**, 495-506 (2008).
- 14) Park KY, Lee SH, Min BK, Lee KS, Choi JS, Chung SR, Min KR, Kim Y., *Planta Med.*, **65**, 457-459 (1999).
- 15) Guerrero JA, Lozano ML, Castillo J, Benavente-García O, Vicente V, Rivera J., *J. Thromb Haemost.*, **3**, 369-176 (2005).

- 17) Ishikura N., *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1705-1706 (1982)
- 18) Larsen L.M., Nielsen J.K., Sorensen H., *Phytochemistry*, **21**, 1029-33 (1982)
- 19) Ogawa Y., Oku H., Iwaoka E., Inuma M., Ishiguro K., *Chem Pharm Bull* **55**, 675-678 (2007).
- 20) Tani T., Iwanaga M., Ohno T., Arichi S., *Kinki Daigaku Igaku Zasshi*, **9**, 229-238 (1984).
- 21) 久保 道德, “医療における 漢方・生薬学”, 廣川書店, 東京 (2003).
- 22) Maruyama I., *Igaku no Ayumi*, **203**, 145-147 (2002).

8. 特記事項

本総説は岐阜薬科大学博士論文(乙第330号)の内容を中心にまとめたものである。